

## N-메틸-4-페닐피리디니움 및 6-히드록시도파민으로 유도된 도파민계 신경세포 사멸 기작의 규명

오영준\*, 최원석

연세대학교 이과대학 생물학과

(Received December 18, 1996)

### Characterization of Dopaminergic Neuronal Cell Death Induced by either N-Methyl-4-phenylpyridinium or 6-hydroxydopamine

Yong J. Oh\* and Won-Seok Choi

Department of Biology, Yonsei University College of Science, Seoul 120-749

**Abstract**—Even though both N-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP) and 6-hydroxydopamine have been widely used to establish the experimental model for dopaminergic neuronal cell death, mechanisms underlying this phenomenon have not been firmly explored. To investigate how these dopaminergic neurotoxins induce neuronal cell death, murine dopaminergic neuronal cell line, MN9D cells were treated with various concentration of either 6-hydroxydopamine or active form of MPTP, N-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>). Treatment of cells with 5-100 uM 6-hydroxydopamine resulted in apoptotic cell death whereas cell death induced by 5~50 uM MPP<sup>+</sup> was not demonstrated typical apoptotic characteristics such as cell shrinkage, apoptotic body and nuclear condensation. Cell death induced by 6-hydroxydopamine was partially blocked in the presence of antioxidants including soluble form of vitamin E or desferrioxamine suggesting that generation of oxidative stress may be associated with 6-hydroxydopamine-induced cell death in MN9D cells. In contrast, MPP<sup>+</sup>-induced cell death was not blocked by treatment with any of antioxidants tested. As previously demonstrated that MPP<sup>+</sup> caused metabolic alterations such as glucose metabolism, removal of glucose from the medium partially inhibited MPP<sup>+</sup>-induced cell death suggesting excessive cycles of glycolysis may be associated with MPP<sup>+</sup>-induced cell death. Taken together, these studies demonstrate that two types of dopaminergic neurotoxins recruit distinct neuronal cell death pathways.

중추신경계 퇴행성 질환의 대표적인 예인 파킨슨 증후군은 nigrostriatal pathway에 존재하는 도파민계 신경세포가 사멸함으로써 일어나는 병리 현상으로서 이 환자에게서는 운동 기능의 이상으로 인한 증상인 rhythmical tremor, rigidity, akinesia, bradykinesia 등이 나타나게 된다. 이에 대한 연구는 단기적인 치료를 목적으로 L-dopa 등을 투여하여 고갈된 도파민을 대체하는 등의 약물학적인 방법으로부터, 태아 중뇌 세포의 이식등에 이르기 까지 다각적인 방법이 실험적

로 사용되어 왔다. 또한, 도파민 합성의 rate-limiting enzyme인 tyrosine hydroxylase나 신경세포의 생존과 관련된 것으로 알려진 여러종류의 neurotrophic factor 등의 유전자를 세포내로 주입시킨 후, 실험적으로 유도된 동물 모델의 뇌로 투입하여 이들 유전자들의 기능을 분석하는 방법등도 사용되고 있다. 이와 같은 연구가 가능하였던 것은 바로 파킨슨 증후군의 실험동물 모델을 제조할 수 있는 도파민계 특이성 신경독소인 6-hydroxydopamine이나 N-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetra-hydropyridine (MPTP)이 존재하였기 때문이다 (Heikkila and Cohen, 1971; Gerlach *et al.*, 1991). 이들은 dopamine transporter를 통하여 도파

\* 본 문헌에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 02-361-2662 (팩스) 02-312-5657

민 신경세포 내로 들어가 세포 내의 발생기 산소를 증가 시키거나 미토콘드리아의 electron transport chain의 기능을 각각 억제 시킴으로서 이들 신경세포의 사멸을 초래하는 것으로 보고는 되고 있으나 (Nicklas *et al.*, 1985) 아직도 정확한 작용기전이나 이들 약물의 치료로 유도된 신경세포 사멸의 형태가 확립되지 못하다.

위에서 언급된 바와 같은 연구의 주 방향은 파킨슨 증후군으로 인한 증상자체를 일시적으로 개선해 보는데 초점을 두어 진행되어 왔다. 이와는 달리 파킨슨 증후군의 직접적인 원인인 도파민계 신경세포의 사멸 과정과 사멸의 형태 및 기작 자체를 밝히는 등과 같은 연구의 필요성은 최근에 세포사멸의 한 형태인 apoptosis에 대한 연구가 활발해지면서 더욱 부각되기 시작 하였다 (Thompson, 1995). Apoptosis는 necrosis와 대별되어 발생과정 중에 광범위하게 나타나는 세포 사멸의 한 형태로서 대개의 경우에 세포 크기의 축소 (shrinkage of cell size), 세포막의 돌출 (membrane blebbing), 및 세포막으로 쌓여져서 떨어져 나온 apoptotic body의 형성과 같은 세포막의 변화가 수반되는 특징을 가지고 있다. 또한, chromatin condensation이나 DNA fragmentation 등과 같은 핵내의 변화도 동반된다 (Wyllie, 1993).

Apoptosis는 발생과정에서 뿐만 아니라 외부의 자극에 의한 여러 형태의 병리적인 세포의 사멸에도 관련되어 있음이 밝혀지고 있다 (Reed, 1994). 그 대표적인 예로는 gamma- 또는 UV-radiation, heat shock, lipid peroxidation-inducing reagents, tumor necrosis factor, virus infection 및 chemotherapeutic drug 등의 치료로 야기된 세포의 사멸 현상을 들 수가 있다. 실제로 많은 연구가 hemopoietic cells이나 암세포 등을 이용하여 apoptosis의 발생 여부가 암이나 자가 면역 질환 등의 발현과 밀접한 관련이 있다는 것을 밝혀 왔으며, 이와 같은 연구의 방향은 병리적 상황의 치료를 위한 연구의 일환으로 현재까지 진행되어 지고 있다 (Thompson, 1995). 이와는 달리 특정 신경세포의 사멸로 발생하는 중추신경계 퇴행성 질환과 같은 병리 상황에는 어떠한 형태의 세포사멸 현상 (apoptosis 혹은 necrosis)이 발생하는지와 이에 관련된 기작 등에 대한 연구가 아주 미약한 상태이며, 이와 같은 질환이 사회적, 경제적으로 미치는 영향의 심각성에 비추어 연구의 필요성이 그 어느때 보다도 대두되고

있는 실정이다 (Thompson, 1995). 따라서, 본연구는 이와 같은 목표를 추구하기 위하여 최근에 제조되고 성격이 규명된 도파민계 신경세포주인 MN9D라는 세포를 이용하여 (Choi *et al.*, 1991; Tang *et al.*, 1994) 실험적으로 도파민계 특이성 신경독소를 처리하여 세포사멸을 유도한 후, 세포사멸의 과정, 형태 및 기작을 밝히고자 하였다. 본 연구의 결과에 의하면 i) 6-hydroxydopamine의 치료로 유도된 세포사멸은 apoptosis 특이성 변화가 동반됨에 비하여 MPTP의 활성형인 N-methyl-4-phenylpyridinium (MPP<sup>+</sup>)의 치료로 유도된 세포사멸은 이와 같은 현상이 나타나지 않았으며; ii) 6-hydroxydopamine을 처리했을 경우에는 발생기 산소에 의한 apoptosis가 초래되었으며, antioxidants의 치료로 사멸이 둔화되는 것이 관찰되었으나 반면에 MPP<sup>+</sup>를 처리했을 경우에는 발생기 산소에 의한 직접적인 영향없이 glucose uptake의 증가에 따른 과도한 glycolysis에 의해 세포사멸이 발생함을 밝혔다. 따라서, 두 도파민계 특이성 신경독소들이 다른 작용기전에 의해 각기 특징적인 형태의 세포사멸을 유발시키는 것으로 나타나, 향후 이와 같은 독소를 이용한 동물 실험모델의 결과 해석에 새로운 시각을 제공할 것으로 사료된다.

## 실험방법

**Immunocytochemistry** - MN9D cell을 round glass cover slip에서 배양시킨 후, cover slip을 PBS로 3번 세척한 다음, 4% paraformaldehyde의 존재하에서 5분간 고정을 하였다. PBS로 다시 3번 세척한 후, 1% bovine serum albumin과 0.1% Triton X-100를 포함하는 PBS로 primary antibody (1:50 mouse monoclonal anti-tyrosine hydroxylase; Boehringer Mannheim)를 희석하여 상온에서 1시간 동안 반응을 시켰다. 그 후 PBS로 3차례 세척을 한 후 FITC-conjugated goat anti-mouse antibody (1:100; Cappel) 존재하에 상온에서 40 분간 배양하고, PBS로 다시 세척을 하였다. 형광 현미경으로 관찰하기 위하여 1:1의 glycerol:PBS 용액으로 cover slip을 mounting 하였으며, 결과는 Kodak Ektachrome 400을 사용하여 촬영하였다.

**Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)** - MN9D cell을 24-well plate에서 배양하

여 이로부터 total RNA를 acid-phenol을 사용하는 Chomczynski와 Sacchi (1987)의 방법을 이용하여 추출하였다. RT-PCR은 Gandelman등이 기술한 방법 (1991)을 약간 변형하여 실시하였다. 이때 tyrosine hydroxylase 유전자의 primer로 사용된 oligonucleotide의 염기배열은 reverse primer의 경우 5'-AGGCATGGCGGATATACT-3'이며 forward primer의 경우에는 5'-ATATGTCACGCTGAA-GGG-3'이며 이들은 각각 Exon 7과 8에 위치한 염기배열로부터 선정하였다. Reverse transcription 반응을 위하여 0.5 ug total RNA가 사용되었고 10 U의 AMV reverse transcriptase (Promega)를 가해주어 42°C에서 배양함으로써 cDNA를 제조하였다. 이와 같이 생성된 cDNA를 사용하여 tyrosine hydroxylase mRNA의 존재여부를 polymerase chain reaction으로 측정하였다. 이때 사용된 denaturation, annealing 및 extension temperature는 각각 94°C, 50°C, 72°C이며 총 25 cycle을 실시하였다.

**Cell culture** - MN9D cell은 P-100 dish (Corning)에서 대량 배양을 하였으며 본 실험을 위하여서는 0.25% trypsin/0.05% DNase로 처리를 하여 single cell suspension을 만든 후, trypan blue exclusion 방법을 사용하여 hemacytometer로 세포수를 세었다. 이로부터  $4 \times 10^4$  MN9D cell을 0.1 mg/ml의 poly-D-lysine (Sigma)으로 도포된 24-well plate (Corning)에 plating을 한 다음, 3일 간 10% CO<sub>2</sub>와 습기가 일정하게 유지되는 37°C 세포배양기에서 계대 배양을 하였다. 사용된 medium의 조성은 high-glucose가 보급된 DMEM (Gibco)과 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; Gibco)을 포함하였다. 본 실험 직전에 DMEM으로 3번 세척한 다음, 5~100 uM 6-hydroxydopamine이나 MPP<sup>+</sup>를 단독, 또는 antioxidant들을 figure에 명기된 바와 같이 병용처리를 위하여 N<sub>2</sub> serum-free medium (Bottenstein and Sato, 1979)으로 교체한 후 1~2일 간 계속 배양하였다. 이 배양기간이 끝나면 아래항에 명기된 방법으로 실험 결과를 동정하였다.

**MTT reduction assay** - 세포의 생존율을 측정하기 위하여 Fig. 2에 명기된 농도의 약물을 단독 또는 병행 투여한 후 일정시간 후에 Hansen등이 기술한 방법 (1989) 이용하여 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma) as-

say를 행하였다. 간단히 기술하면 상기에 기술된 바와 같이 도파민계 신경독소로 단독, 또는 병용처리된 세포의 배양액에 최종농도가 1 mg/ml가 되게 MTT를 가한 다음 2시간 가량 더 배양을 시켜 생존 세포들의 dehydrogenase activity에 의해 MTT가 환원되도록 했다. 그 후 20% sodium dodecylsulfate가 포함된 50% dimethylformamide수용액을 가하여 세포내에 형성된 formazan grain을 용출해 낸 다음에 ELISA plate reader를 사용하여 540 nm상에서 optical density를 측정하였다. 각 실험군으로부터 얻어진 실험 결과는 약물이 처리 되지 않은 대조군 (100%)에 대한 상대값으로 표현하였다.

**TUNEL staining** - 이 방법의 원리는 DNA가 apoptosis시 잘려지게 되면 3' end에 -OH기가 생기게 되며 이곳에 terminal transferase를 이용하여 면역 반응 검출에 용이한 nucleotide를 붙혀 주는데 있다. 간단히 기술을 하면 약물로 처리된 세포를 phosphate-buffered saline (PBS)로 3차례 세척해 준 뒤 4% paraformaldehyde로 상온에서 5분간 고정을 시킨 후 PBS로 다시 3 차례 세척을 하였다. Proteinase K (20 g/ml; Boehringer Mannheim) 존재하에 상온에서 5분간 배양하여 DNA에 붙어 있는 단백질을 제거시킨 다음 PBS로 3차례에 걸쳐 세척하였다. 이후 Terminal transferase 배양액 존재하에 37°C에서 1시간 동안 반응을 시켰다. 이때 사용한 400 ul 배양액 내의 조성은 2.4 ul biotinylated dUTP (Boehringer Mannheim), 4.8 ul terminal transferase (Boehringer Mannheim)을 포함하였다. 반응 후에 300 mM sodium chloride/30 mM sodium citrate 존재하에 상온에서 15분간 배양하여 terminal transferase의 반응을 종료 시킨다음 alkaline phosphatase-linked avidin을 가한 후 상온에서 30분간 배양시켰다. Substrate를 가하여 반응의 결과를 색깔로 발현시킨 것을 light microscope로 관찰한 후 Kodak Ektachrome 160T로 촬영을 하였다.

## 실험결과 및 고찰

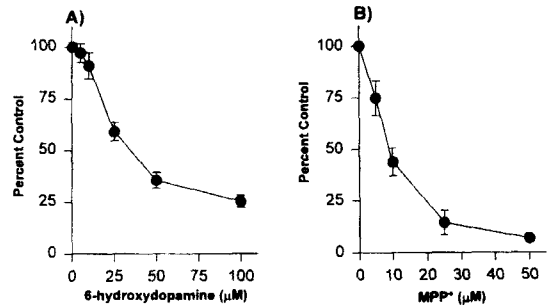
**Characterization of MN9D cells** - 본 실험에 사용된 MN9D cell은 embryonic day 14의 mouse mesencephalic neuron과 N18TG neuroglioma의 융합 반응을 통해 확립된 cell line으로서 도파민계 신경세포 특유

의 여러가지 성질을 가지고 있는 것으로 밝혀져 있다 (Choi *et al.*, 1991; Tang *et al.*, 1994). Fig. 1A에서 보듯이 정상적인 상태의 MN9D cell의 세포모양은 동그라미며, neurite이 존재하되 아주 짧은 것이 특징이다. Immunocytochemistry와 reverse transcription-polymerase chain reaction의 결과에서 보듯이 MN9D cell내에는 도파민 합성의 rate-limiting enzyme인 tyrosine hydroxylase의 mRNA와 단백질이 모두 존재하고 있음을 밝혔다(Fig. 1B, C). 이외에도 도파민계 신경세포가 갖는 다른 특성 중의 하나인 도파민의 재흡수(dopamine uptake)가 MN9D cell에서도 이루어짐으로서 SV40 large T antigen등으로 변형되어 생성된 cell line 과는 달리 cellular phenotype을 유지하는 장점을 가짐과 동시에, 생체내에 존재하는 도파민계 신경세포로서의 거의 모든 기능을 유지함으로써 정량적인 실험을 목적으로 하는 연구에 사용될 수 있는 좋은 model system임이 확인되었다.

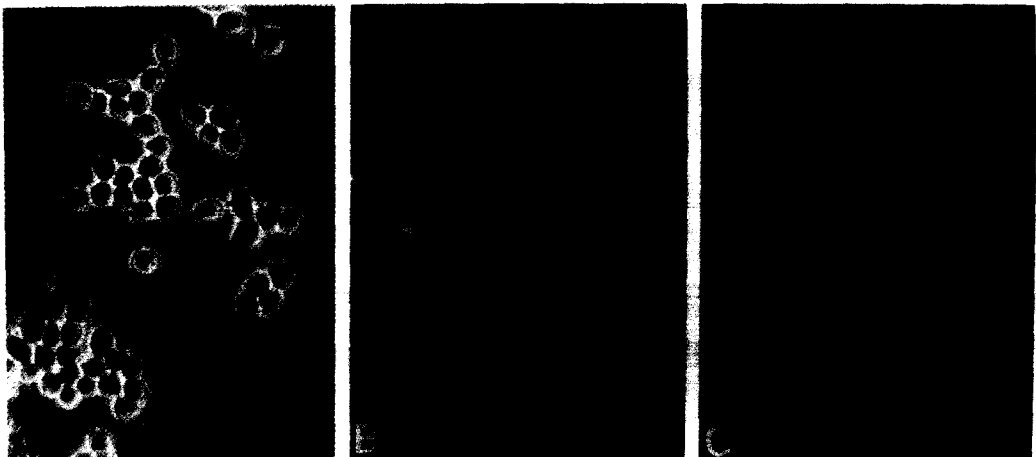
**Cell death induced by dopaminergic neurotoxins**

- 우선적으로 도파민계 특이성 독소로 널리 사용되어 온 6-hydroxydopamine과 MPP<sup>+</sup>의 작용력을 검증하기 위하여 각각을 5~100 uM로 24~48 시간 처리한 후, MTT assay를 통하여 세포생존율을 측정하였다. Fig. 2에서 보듯이 MN9D cell은 가해준 독소의 농도

에 비례하여 사멸함을 관찰하였으며, 이 농도의 범위는 primary dopaminergic neuronal culture를 이용한 여러 실험에서 사용되어 온 점으로 비추어 보아 두 신경독소에 MN9D cell도 endogeneous counterpart와

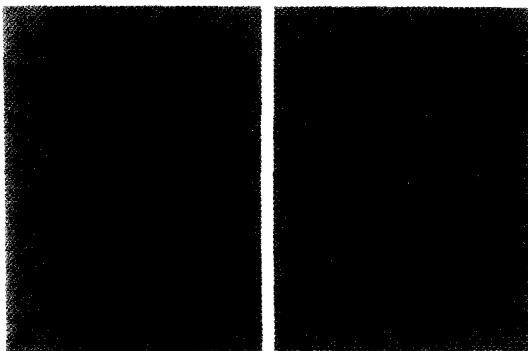


**Fig. 2** — Kinetics of neurotoxin-induced cell death. MN9D cells were plated at  $3 \times 10^4$  cells/24-well plates and maintained in DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum for 3 day. Cells were switched to serum-free N<sub>2</sub> medium containing indicated concentration of (A) 6-hydroxydopamine for 24 hours or (B) MPP<sup>+</sup> for 48 hours. Viability of cells was measured by MTT reduction assay. Results represent the mean of three independent experiments in triplicate  $\pm$  SEM. Value from each treatment were expressed as a percent control over the non-treated matching control(100% survival).



**Fig. 1** — Characterization of MN9D dopaminergic neuronal cell line. Cells were plated onto 25 ug/ml poly-D-lysine coated 24-well plate(Corning). Immunocytochemical localization of tyrosine hydroxylase was carried out as described in Materials and Methods. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) was performed as described in Materials and Methods using total RNA as a template. (A) Phase-contrast micrograph of MN9D cells and (B) immunofluorescent localization of tyrosine hydroxylase. (C) RT-PCR agarose gel stained with ethidium bromide (Lane 1) negative control, without template; (Lane 2) with 50 ng total RNA from MN9D cells; (Lane 3) positive control, with plasmid containing tyrosine hydroxylase cDNA.

비슷한 sensitivity가 있음을 보여 주었다. 다음으로는 이와 같이 유도된 세포사멸의 형태를 비교 및 분석하기 위하여 각각의 신경독소로 처리된 세포를 상기와 같이 배양한 후에 phase-contrast microscope상에서 사멸의 과정을 관찰하였다. 즉, 6-hydroxydopamine으로 처리한 경우에는 apoptosis시에 나타나는 전형적인 변화인 nuclear condensation, membrane shrinkage 및 apoptotic body가 생성되었다 (data not shown). 이와는 대조적으로 MPP<sup>+</sup>로 처리로 유도된 세포사멸의 경우에는 nuclear fragmentation이나 nuclear condensation등의 변화가 아주 미세하였으며 membrane shrinkage나 apoptotic body의 형성등과 같은 cell membrane상의 변화 또한 아주 경미하였다 (data not shown). 이와 같은 결과를 바탕으로 두 신경독소의 처리에 의한 세포사멸이 apoptosis 인지를 더욱 명확히 밝히기 위하여 chromatin condensation과 fragmentation 등과 같은 핵내의 변화를 측정하는데 사용되어 왔던 TUNEL staining을 실시하여 두 신경독소로 유도된 핵내의 변화를 구체적으로 검증하였다. Fig. 3A에서 보듯이 6-hydroxydopamine으로 유도된 MN9D cell의 사멸과정 중에는 위에서 언급한 핵내의 변화가 수반되는 신경세포의 핵들이 특징적으로 염색되는 것을 관찰 하였다. 반면에 MPP<sup>+</sup>로 처리한 경우에는 상기와 같은 핵 내의 변화가 없음을 확인하였다 (Fig. 3B). 그러나 이 경우에도 apoptosis와 대별되는



**Fig. 3** — Immunological localization of DNA fragmentation in MN9D cells after neurotoxin treatment. Cells were plated, maintained and treated with (A) 100 uM 6-hydroxydopamine for 18 hours or (B) 50 uM MPP<sup>+</sup> for 36~40 hours. Cells were then processed for localization of fragmented DNA within the nuclei as described in Materials and Methods. Arrows indicated the positive nuclei indicative of typical apoptotic cell death.

형태의 세포사멸로 알려진 necrosis의 전형적인 특성 중의 하나인 cell swelling이나 cell lysis의 현상이 전혀 관찰되지 않았다. 따라서, MPP<sup>+</sup>로 유도된 세포의 사멸은 DNA의 fragmentation을 아주 제한적으로 동반하는 특이한 형태의 apoptosis로 추측이 된다. 이를 간접적으로 뒷받침하는 증거로서 MPP<sup>+</sup>에 의해 유도된 세포사멸이 단백질 합성억제제인 cycloheximide의 병용처리로 완전히 억제됨을 밝힌 점을 들 수가 있다 (not shown). 이는 유전적으로 이미 정해진 세포사멸이라 하여 programmed cell death라고 칭하는 과정 중에 발현되는 세포사멸 유전자가 거의 모든 경우에 apoptosis를 유발시키며, 따라서 세포사멸 유전자의 발현을 억제시켜 주는 macromolecule 합성 억제제인 cycloheximide나 actinomycin 등을 처리해 주면 apoptosis가 방지 됨이 밝혀져 왔다 (Martin *et al.*, 1988; Oppenheim *et al.*, 1990). 이에 반하여 necrosis를 동반하는 경우에는 이와 같은 처리로 세포사멸이 전혀 방지되지 못한다는 점을 미루어 보아, MPP<sup>+</sup>에 의한 세포사멸은 apoptosis의 특이한 subtype으로 규정하는 것이 가능하다고 본다. 이와 같은 현상은 도파민계 특이성 신경독소에서 뿐 만아니라 일반적으로 널리 사용되는 prooxidants (hydrogen peroxide 또는 menadione)나 mitochondrial electron transfer chain complex inhibitor인 rotenone이나 3-nitropropionic acid를 MN9D cell에 처리하였을 때에도 동일하게 발생한다 (Oh *et al.*, 1995). 즉, MPP<sup>+</sup>, rotenone, 및 3-nitropropionic acid등과 같은 mitochondrial toxin의 처리로 mitochondria의 기능 장애를 초래하여 유도된 신경세포의 사멸은 기존의 apoptosis와 다른 기전을 통해 특이한 형태의 apoptosis를 유발하는 것으로 사료된다 (Oh *et al.*, 1995).

**Role for antioxidants in neurotoxin-induced cell death** — 기존의 연구에 의하면 발생기 산소의 생성과 이에 의한 작용이 apoptosis와 관련된 것으로 밝혀져 있다 (Heikkila and Cohen, 1971; Hockenbery *et al.*, 1993; Kane *et al.*, 1993). 따라서, 본 실험에서는 MN9D cell의 경우에 6-hydroxydopamine이나 MPP<sup>+</sup>에 의한 세포사멸과정이 발생기 산소의 생성에 의한 것인지를 확인하기 위하여 각각의 neurotoxin을 50~100 uM의 농도로 처리함과 동시에 antioxidant를 가하여 주었다. Fig. 4A에서 보듯이 6-hy-

droxydopamine에 의한 세포사멸이 antioxidant로 널리 사용되는 desferrioxamine (100~200 uM, Kane *et al.*, 1993), soluble form인 Vitamine E (250 uM)를 처리하였을 때 상당히 방지됨을 밝혔다 (30%). 반면에 MPP<sup>+</sup>에 의한 세포사멸은 이들 antioxidants나 Vitamin E등을 병행투여하여도 전혀 변화가 없음을 관찰하였다(Fig. 4B). Oxygen species-

sensitive dye인 2',7'-dichlorofluorescein diacetate 을 이용하여 생성된 발생기 산소의 양을 측정한 예비 실험의 결과에 의하면 MN9D cell에 MPP<sup>+</sup>를 처리한 경우에 발생기 산소가 생성은 되는 것으로 나타났으며 상기의 antioxidant를 처리하였을 때에 발생기 산소의 생성이 억제되는 되나 신경세포의 사멸을 전혀 방지하지 못하였다(not shown). 따라서, 위의 결과를 종합해 보면, MPP<sup>+</sup>의 처리에 의해 생성된 발생기 산소는 세포사멸의 직접적인 원인은 아니며, 아마도 세포사멸과정 중에 이차적(secondary effect)으로 생성된 것임을 알 수가 있었다(Gerlach *et al.*, 1991).

**Role for the level of glucose in MPP<sup>+</sup>-mediated cell death**

- 기존의 연구 결과에 의하면 MPP<sup>+</sup>는 mitochondrial electron transfer chain complex I의 기능을 방지함으로써 이에 따른 에너지대사의 기능 이상을 초래하여 도파민계 신경세포의 사멸을 촉진시키는 것으로 밝혀져 있다 (Nicklas *et al.*, 1985). 이 과정에서 필연적으로 예측되는 세포내의 변화로는 mitochondria에 의한 정상적인 ATP의 생성이 억제됨으로서 glycolysis가 증가하게 되고, 그 결과로서 세포내에 lactic acid와 proton이 축적이 되어 세포가 사멸하는 것으로 밝혀져 있다. 따라서, glycolysis에 의한 과도한 glucose의 uptake이 MPP<sup>+</sup>에 의한 MN9D cell의 사멸이 직접적으로 관련이 있는지를 확인하기 위하여 100 uM MPP<sup>+</sup> 존재하에 culture medium중의 glucose를 지속적으로 줄여 주면서 세포 사멸의 정도를 측정하였다. 이 실험의 결과에 의하면 Fig. 5에서 보듯이 biphasic response현상이 나타났다. 즉, 정상 glucose level의 60% 까지 줄여 줄 경우에 dose-dependent하게 세포사멸이 방지됨을 밝힘으로서 MPP<sup>+</sup>의 처리에 의한 신경세포의 사멸 현상은 과다하게 세포내로 유입된 glucose의 대사산물인 lactic acid나 proton의 축적으로 인한 세포내의 pH의 산성화가 주원인일 것으로 추측이 되어진다(Tipton and Singer, 1993). Nigericin과 같이 세포내외의 pH를 산성으로 유도시켜는 약물을 처리하여 발생된 세포사멸이 MPP<sup>+</sup>로 유도된 세포사멸 현상과 상당히 유사하다는 예비 실험의 결과도 이를 간접적으로 증명해 주고 있다(not shown). 그러나 과도한 양의 glucose가 배지로부터 제거되는 경우 (>60%)에는 그 자체가 세포의 사멸을 촉진하기 때문에 다소 세포사멸 방지 능력이 떨어지는 것으로 추측이 되어진다 (Reed, 1994).

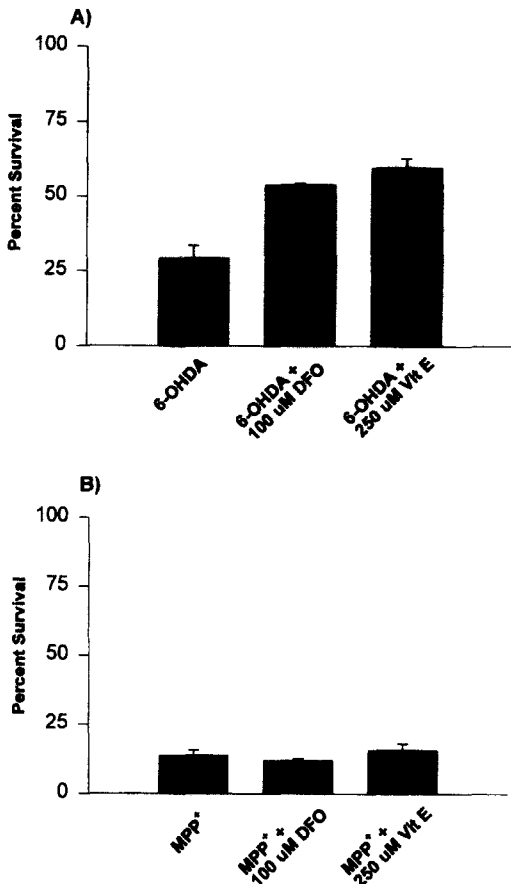
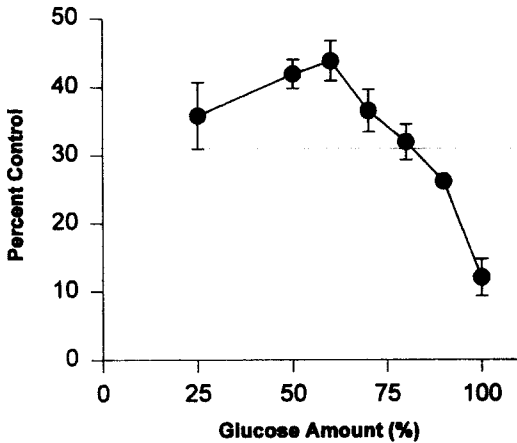


Fig. 4 - Effect of antioxidants in neurotoxin-induced cell death. Cells prepared as described above were co-treated with or without the indicated concentration of each antioxidant. At the end of treatment with (A) 100 uM 6-hydroxydopamine plus 100 uM desferrioxamine (DFO) or 250 uM soluble form of Vitamine E (Vit E) for 24 hours or (B) 50 uM MPP<sup>+</sup> plus each antioxidant for 48 hours, cell viability was measured using MTT reduction assay. Results were expressed as a percent survival over the non-treated control (100% survival). Each bar represents the mean of three independent experiments in triplicate+SEM.



**Fig. 5**—Effect of the level of glucose in MPP<sup>+</sup>-induced cell death. Cells were treated with 50  $\mu$ M MPP<sup>+</sup> for 48 hours in N<sub>2</sub> medium containing a various level of glucose as indicated. Normally, N<sub>2</sub> medium contains 4.5 g/l of glucose (100%). Data represent the mean of three independent experiments in triplicate+SEM.

이상의 결과에 의하면 파킨슨 증후군의 연구모형을 설정하기 위하여 널리 사용되어 왔던 6-hydroxy-dopamine이나 MPP<sup>+</sup>는 도파민계 신경세포의 사멸을 다른 기전을 통해 유도함을 알 수가 있으며, 따라서 각각의 도파민계의 신경독소로부터 얻어진 결과의 해석에 유의할 필요성을 부각시켰다. 또한, MN9D와 같은 dopaminergic neuronal cell line을 이용할 경우에 본 실험과 같은 정량적인 해석이 필요한 다각적인 연구가 가능케 되며, 더욱이 최근에 밝혀지기 시작하는 Bcl-2 등과 같은 anti-apoptotic gene들이 신경세포의 사멸 과정 중에 나타내는 작용력을 검증하기 위한 gene transfection 등의 연구가 가능케 되었다고 본다 (Thompson, 1995).

### 감사의 말씀

본 연구는 교육부 학술연구조성과제 (유전공학 분야) 연구비와 학술진흥재단 (자유공모과제)의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### 문헌

1) Bottenstein, J. E. and Sato, G. H. : Growth of a rat neuroblastoma cell line in serum-free sup-

plemented medium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**, 514 (1979).

- 2) Chomczynski, P. and Sacchi, N. : Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156 (1987).
- 3) Choi, H. K., Won, L. A., Kontur, P. J., Hammond, D. N., Fox, A. P., Wainer, B. H., Hoffmann, P. C. and Heller, A. : Immortalization of embryonic mesencephalic dopaminergic neurons by somatic cell fusion. *Brain Res.* **552**, 67 (1991).
- 4) Gandelman, K. Y., Harmon, S., Todd, R. D., and O'Malley, K. L. : Analysis of the structure and expression of the human dopamine D2A receptor gene. *J. Neurochem.* **56**, 1024 (1991).
- 5) Gerlach, M., Riederer, P., Przuntek, H. and Youdim, M. B. H. : MPTP mechanisms of neurotoxicity and their implications for Parkinson's disease. *Eur. J. Pharmacol.* **208**, 273 (1991).
- 6) Hansen, M. B., Nielson, S. E. and Berg, K. : Reexamination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J. Immunol. Meth.* **119**, 203 (1989).
- 7) Heikkila, R. and Cohen, G. : Inhibition of biogenic amine uptake by hydrogen peroxide: a mechanism for toxic effects of 6-hydroxydopamine. *Science* **172**, 1257 (1971).
- 8) Hockenbery, D. M., Oltvai, Z. N., Yin, X. M., Milliman, C. L. and Korsmeyer, S. J. : Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* **75**, 241 (1993).
- 9) Kane, D. J., Sarafian, T. A., Anton, R., Hahn, H., Gralla, E. B., Valentine, S. J., Ord, T. and Bredesen, D. E. : Bcl-2 inhibition of neural death: Decreased generation of reactive oxygen species. *Science* **262**, 1274 (1993).
- 10) Martin, D. P., Schmidt, R. E., DiSefano, P. S., Lowry, D. H., Carter, J. G. and Johnson, Jr. E. M. : Inhibitors of protein synthesis and RNA synthesis prevent neuronal cell death caused by nerve growth factor deprivation. *J. Cell Biol.* **106**, 829 (1988).
- 11) Nicklas, W. J., Vyas, I. and Heikkila, R. E. : In-

- hibition of NADH-linked oxidation in brain mitochondria by 1-methyl-4-phenylpyridinium, a metabolite of neurotoxin, 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine. *Life Sci.* **36**, 2503 (1985).
- 12) Oh, Y. J., Wong, S. C., Moffat, M. and O'Malley, K. L. : Overexpression of Bcl-2 attenuates MPP<sup>+</sup>, but not 6-OHDA, induced cell death in a dopaminergic neuronal cell line. *Neurobiol. Disease* **2**, 157 (1995).
- 13) Oppenheim, R. W., Prevette, D., Tytell, M. and Homma, S. : Naturally occurring and induced neuronal death in the chick embryo in vivo requires protein and RNA synthesis: evidence for the role of cell death genes. *Dev. Biol.* **138**, 104 (1990).
- 14) Reed, J. C. : Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J. Cell Biol.* **124**, 1 (1994).
- 15) Tang, L., Todd, R. D. and O'Malley, K. L. : Dopamine D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub> receptors inhibit dopamine release. *J. Pharm. Exp. Ther.* **270**, 475 (1994).
- 16) Thompson, C. B. : Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science* **267**, 1456 (1995).
- 17) Tipton, K. F. and Singer, T. P. : Advances in our understanding of the mechanisms of the neurotoxicity of MPTP and related compounds. *J. Neurochem.* **61**, 1191 (1993).
- 18) Wyllie, A. H. : Apoptosis. *Br. J. Cancer* **67**, 205 (1993).