

흰쥐 미숙 대뇌피질 신경세포에서 quisqualate로 유발된 흥분성 세포독성에 대한 spermine의 영향

조 정 숙

동국대학교 의과대학 약리학교실
(Received March 20, 1999)

Effects of Spermine on Quisqualate-induced Excitotoxicity in Rat Immature Cortical Neurons

Jungsook Cho

Department of Pharmacology, College of Medicine, Dongguk University, Kyongju, Kyongbuk 780-714

Abstract — Glutamate (Glu) receptor-mediated excitotoxicity has been implicated in many acute and chronic types of neurological disorders. Exposure of mature rat cortical neurons (15-18 days in culture) to the various concentrations of Glu resulted in a marked neuronal death, whereas immature rat cortical neurons (4~5 days in culture) were resistant to the Glu-induced toxicity. Glu receptor subtype-specific agonists showed differential extent of toxicity in the immature neurons. The neurons treated with NMDA or kainate (KA) did not exhibit damage. However, quisqualate (QA) treatment induced a considerable cell death (36.1%) in immature neurons. The non-NMDA antagonist DNQX did not reduce this response. Interestingly, the QA-induced toxicity was potentiated by spermine in a concentration-dependent manner. Again, the spermine-enhanced damage was not altered by the polyamine antagonist ifenprodil. Taken together, unlike NMDA or KA, QA can induce neurotoxicity in immature rat cortical neurons and the QA-induced toxicity was potentiated by spermine. The lack of antagonizing effects of DNQX and ifenprodil on QA-induced toxicity and the potentiated toxicity by spermine, respectively, implies that both QA receptor and the polyamine site of NMDA receptor may not mediate the neurotoxicity observed in this study, and that a distinct mechanism(s) may be involved in the excitotoxicity in immature neurons.

Keywords □ Excitotoxicity, immature, cortical neuron, spermine, quisqualate, excitatory amino acid.

Glutamic acid(Glu)는 포유류의 뇌에서 흥분성 신호를 전달하는 신경전달물질이며, 연접 가소성, 학습 및 기억 등에 관여한다. 최근에 제시된 일련의 증거에 따르면, amyotrophic lateral sclerosis와 같은 퇴행성 신경질환과 저산소증, 질식, 저혈당증, 뇌졸중, 간질과 같은 급성 뇌질환 등의 병적 상태에서는 Glu와 같은 흥분성 신경전달물질이 비정상적으로 과도하게 유리되어 신경세포에 치명적 손상 또는 퇴행을 일으키는 일련의 과정을 유도한다.^{1,3)} 유리된 Glu는 N-methyl-D-

aspartate(NMDA) 수용체, 2(RS)-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionate(AMPA) 수용체나 kainic acid(KA) 수용체와 같은 non-NMDA 수용체, G protein에 연결된 metabotropic 수용체 등의 Glu 수용체 subtype을 통해 작용한다.^{4,5)}

NMDA 수용체는 Glu나 NMDA와 같은 agonist 뿐만 아니라, co-agonist로 불리는 glycine 존재 하에서 활성화되어 Na⁺과 Ca²⁺이 세포 내로 유입된다.⁶⁾ 따라서, 비정상적으로 과다 유리된 Glu에 의해서는 세포 내 Ca²⁺도 과도하게 증가하게 되며, 이에 의해 야기되는 일련의 세포 내 신호전달과정은 Glu에 의해 유발되는 흥분성 세포독성에 있어서 매우 중요한 역할을

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0561-770-2419 (팩스) 0561-770-2447

한다.^{7,8)} Glu와 glycine의 NMDA 수용체에 대한 작용은 spermine과 같은 polyamine에 의해서 더욱 증강되어 세포독성을 가속화시키는 것으로 보고되었다.⁹⁾ Glu, glycine, spermine 등에 의한 NMDA 수용체 활성조절 작용은 각각의 결합부위에 선택적으로 작용하는 길항제에 의해 억제된다. 지금까지 많은 종류의 길항제가 연구, 보고되었으며, 여러 종류의 약물에서 신경세포 손상 억제효과가 확인되었다.^{2,5)} 본 연구에서 사용한 ifenprodil은 polyamine의 NMDA 수용체에 대한 작용을 길항하는 것으로 알려져 있으며, 배양 신경세포를 이용한 실험이나 동물실험에서 신경세포 보호효과가 확인되었다.^{3,10)} 한편, non-NMDA 수용체는 Na⁺과 K⁺을 통과시키는 ion channel 형태의 수용체이며, Glu에 의한 흥분성 세포독성에 관여한다.^{1,3,11)} Non-NMDA 수용체 길항제로 알려진 6,7-dinitroquinoxaline-2,3-dione(DNQX)나 6-nitro-7-sulfamoylbenzo [quinoxaline-2,3-dione (NBQX) 등도 여러 가지 실험 모델에서 신경세포독성 억제작용이 확인되었다.^{1,3,11)}

Glu에 의해 유발되는 흥분성 세포독성은 신경세포의 발생단계에 따라 그 정도가 다르게 나타난다.¹²⁾ 흰쥐 태자의 대뇌피질 또는 해마에서 얻어 2주 이상 배양한 성숙한 신경세포에서는 흥분성 아미노산에 의한 세포독성이 현저하게 관찰되며, 이는 MK-801, 5,7-dichlorokynurenic acid와 같은 NMDA 수용체 길항제와 DNQX와 같은 non-NMDA 수용체 길항제들에 의해 유의성있게 억제된다.¹³⁾ 그러나, 배양 7일 이내인 미숙 대뇌피질 신경세포의 경우 흥분성 독성에 대해 저항성을 나타내는 것으로 보고되었는데,^{12,13)} 이는 발생단계에 따라 발현되는 수용체의 종류와 발현정도의 차이에 기인하는 것으로 이해되고 있다.

본 연구에서는, 미숙 배양신경세포에서 Glu 유도체에 의해 유발될 수 있는 흥분성 세포독성을 측정하여 성숙세포에서 관찰되는 세포손상과의 비교를 통해 미숙이나 주산기에서 발생할 수 있는 신경세포손상의 기전을 연구하고자 하였다. 배양 4-5일 정도의 대뇌피질 신경세포에서 Glu를 비롯한 NMDA, KA, quisqualate(QA)와 같은 흥분성 아미노산 유도체들을 이용하여 유발되는 세포독성 정도를 측정할 결과, 성숙 세포에서와는 달리 미숙 세포에서는 Glu, NMDA, KA에 의해서는 독성이 거의 유발되지 않았거나 미약한 정도의 독성이 유발된 반면, QA에 의해서는 상당한 정도의 세포손상이 유발되었다. QA에 의해 미숙 신경

세포에서 유발되는 세포독성의 특성을 연구하고자 NMDA 길항제인 MK-801 및 non-NMDA 길항제인 DNQX로 처리한 결과, 독성은 억제되지 않음을 관찰하였다. 한편, 성숙 세포에서 보고⁹⁾된 바와 마찬가지로 미숙 세포에서 NMDA에 의해 유발된 세포독성도 spermine에 의해 증강됨을 확인하였다. 흥미롭게도, QA에 의해 야기된 미숙 세포독성도 spermine에 의해 농도 의존적으로 증강되었으며, 이는 spermine의 작용을 길항하는 ifenprodil에 의해 억제되지 않음을 관찰하였다. 이 결과를 바탕으로 미숙 신경세포에서 QA에 의해 야기되는 세포독성 기전에 대해 논의하였다.

실험방법

시약 - Minimum essential media(MEM; with Earle's salts, without L-glutamine and sodium bicarbonate), fetal bovine serum, horse serum은 Gibco BRL(Gaithersburg, USA)에서 구입하였고, poly-L-lysine, laminin, L-glutamine, L-glutamic acid, cytosine arabinoside 및 lactate dehydrogenase(LDH) 정량 kit(Sigma 500C)은 Sigma Chemical Company (St. Louis, USA)에서, NMDA, spermine, ifenprodil은 RBI (Natick, USA)에서 구입하였다. KA와 QA는 Tocris Cookson Ltd.(Bristol, UK)에서, culture용 24-well plate는 Falcon(Lincoln Park, USA)에서 구입하여 사용하였다. 기타 일반 시약은 특급품을 사용하였다.

흰쥐 대뇌피질 신경세포의 분리 및 배양 - 대뇌피질 신경세포의 배양은 Dichter의 방법을 수정하여 수행하였다.¹⁴⁾ 즉, 16~18일 된 Sprague-Dawley 태자에서 대뇌피질 부분을 분리한 후 해부현미경을 이용하여 뇌막을 제거한 다음, 5% fetal bovine serum, 5% horse serum, 2mM glutamine을 함유한 MEM에서 알코올 램프로 pore size를 조절한 Pasteur pipette으로 세포를 분리하여 현탁시킨 후, poly-L-lysine과 laminin으로 미리 coating해 놓은 24-well plate에 well당 4×10^5 의 밀도로 이식하여 37°C 배양기에서 95% 공기/5% CO₂를 유지하면서 배양하였다. 미숙 배양세포의 경우 배양 4~5일 이내에 실험에 사용하였고, 성숙 배양세포의 경우 배양 5~7일에 10 μM cytosine arabinoside로 24~48시간 동안 처리하여 신경세포 이외의 세포 성장을 억제시킨 후 배양 2~3주에 실험에 사용하였다.

흥분성 세포독성 유발 - 배양된 대뇌피질 신경세포에 흥분성 아미노산 및 그 유도체를 이용한 독성유발은 Patel 등¹⁵⁾의 방법을 약간 변형하여 실시하였다. 세포를 MEM으로 2회 세척한 후, 5% horse serum과 2mM glutamine을 함유한 MEM에 적정 농도의 glutamate를 용해하여 37°C 배양기에서 95% 공기/5% CO₂를 유지하면서 일정시간동안 적용하였다. NMDA, KA, QA에 의한 독성유발도 같은 방법으로 실시하되 필요한 경우 적정 농도의 spermine을 첨가하여 적용하였다. 유발된 신경세포 독성에 대한 길항제의 작용을 측정하기 위해서는 필요한 경우마다 적정 농도의 MK-801(10 μM), DNQX(20 μM), ifenprodil(10 μM)을 배양액에 첨가하였다.

유발된 세포손상 정도 측정 - 배양된 세포를 흥분성 아미노산을 함유한 배양액으로 일정시간동안 처리한 후 유발되는 세포독성 정도는 일차적으로 phase-contrast microscope으로 확인하였고, 배양액 상층에 유리되는 LDH의 양을 측정하여 손상 정도를 정량화하였다. Total LDH는 0.9% Triton X-100으로 45분간 처리한 well에서 배양액 상층으로 유리된 LDH를 측정하여 얻었다.

실험결과 및 고찰

Glu와 같은 흥분성 아미노산에 의해 유발되는 농도별, 시간별 신경세포 독성을 측정하고자 흰쥐 태자(E16-18)의 대뇌피질에서 얻은 신경세포를 4~5일간 또는 15~18일간 배양한 후 여러 농도의 Glu로 30분, 2시간, 6시간, 12시간, 24시간동안 처리하고 배양액 중에 유리된 LDH를 측정하였다. 충분히 성숙한 신경세포의 경우 10 μM Glu로 처리했을 때 6시간 이후에서 약 20% 정도의 독성이 관찰된 반면, 50 μM, 100 μM, 500 μM Glu로 처리하면 6시간 이후에서 거의 모든 세포가 손상을 입는 현저한 독성이 나타났다 (Fig. 1A). Glu 대신 NMDA로 처리한 경우에는 Glu로 처리한 경우보다 더 강력하여, 10 μM에서 2시간 경과 후부터 독성이 나타나기 시작하였고 6시간 후에는 65.7%에 이르렀으며 24시간 경과 후에는 82.8%에 달했다. NMDA의 농도를 50 μM, 100 μM, 500 μM로 증가시킨 경우 6시간 이후에서 Glu에서 얻은 결과와 유사한 매우 강력한 독성을 나타내었다(data not shown). 한편, 배양 4~5일 후의 미숙 신경세포에서는

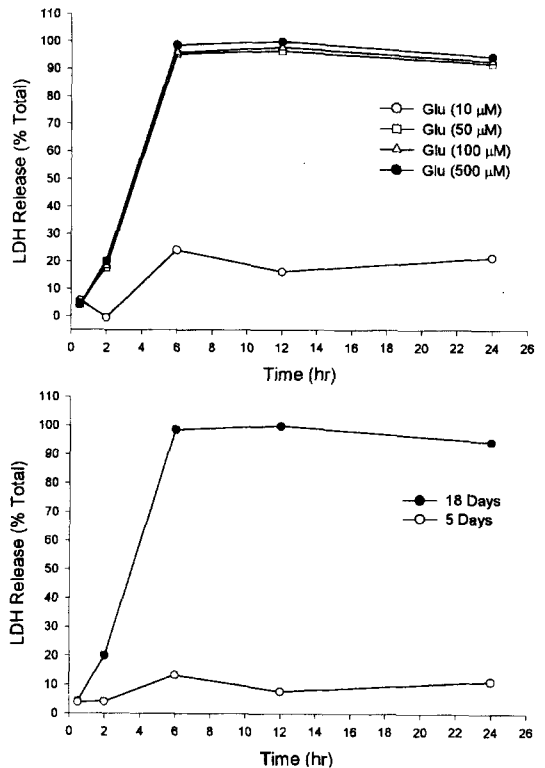


Fig. 1 - Concentration- and time-dependent glutamate (Glu)-induced toxicity in mature or immature rat cortical neurons. A) After 15-18 days in culture, cells were washed two times with MEM and incubated in the medium containing the indicated concentrations of Glu at 37°C in 95% air/5% CO₂. After 30 min, 2 hrs, 6 hrs, 12 hrs, and 24 hrs of incubations, the aliquots of the culture medium were collected for the assessment of toxicity as described in the Materials and Methods. B) After 5 or 18 days in culture, cells were washed and incubated in the medium containing 500 μM Glu. The aliquots of the culture medium were collected at the indicated incubation time periods for the assessment of toxicity as described in the Materials and Methods. Results are expressed as the means of % total LDH from at least two separate experiments of 4 determinations.

성숙 세포에 6시간 정도만 적용해도 치명적 손상을 일으키는 조건인 500 μM Glu로 24시간동안 처리하여도 독성 정도는 11.2%로서 미약했다(Fig. 1B). Glu 대신 NMDA 300 μM로 24시간 처리한 경우 약간 독성이 증가하여 17.5%를 나타내었다. 성숙 세포와 미숙 세포에서 관찰되는 이와 같은 차이는, 2주 이상 배양된 성숙 대뇌피질 또는 해마 신경세포는 Glu 수용체를 완전

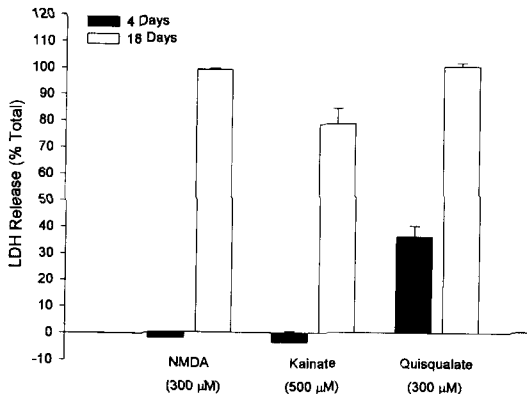


Fig. 2 – Differential susceptibility to NMDA, kainate (KA), and quisqualate (QA) of mature and immature rat cortical neurons. After 4 or 18 days in culture, cells were washed and incubated in the medium containing 300 μM NMDA, 500 μM KA, or 300 μM QA for 18 hrs at 37°C in 95% air/5% CO₂. The aliquots of the culture medium were collected for the assessment of toxicity as described in the Materials and Methods. Percent of total LDH are shown as the means ± SD from two separate experiments of 4 determinations.

히 발현하므로 NMDA 수용체 효현제에 의해 대부분의 세포에 피사가 일어나는 반면, 미숙 대뇌피질 신경세포 (4~5일, 길게는 7일간 배양)에서는 Glu 수용체 channel 이 발현되지 않았거나 또는 발현정도가 낮아서 독성이 일어나지 않는 것으로 해석되고 있다.^{12,13} 즉, Fig. 1B 에 나타난 결과는 성숙 배양세포에 Glu나 NMDA로 처리했을 때 관찰되는 농도 및 시간 의존적인 흥분성 세포독성 (Fig. 1A)과는 대조적으로 흥분성 독성에 대한 미숙 신경세포의 저항성을 보여주는 결과이다.

다음으로, 여러 가지 Glu 수용체 subtype에 선택적으로 작용하는 약물로 알려진 NMDA, KA, QA로 신경세포를 일정시간동안 처리한 후 야기되는 흥분성 세포독성 정도를 측정하여, 미숙 신경세포에서 일어날 수 있는 흥분성 독성을 연구하였다. 성숙 신경세포에서는 300 μM NMDA, 500 μM KA, 300 μM QA로 18시간동안 처리하였을 때 각각 99.2, 78.7, 100.6%의 현저한 세포독성을 관찰할 수 있었던 반면, 미숙 배양세포의 경우 NMDA 및 KA에 의해서는 세포가 거의 손상을 입지 않았고 QA에 의해서는 36.1%의 손상을 보였다(Fig. 2와 Table I). 미숙 세포에서의 QA에 의한 독성은 1일, 3일간 배양한 미숙 세포에서도 유사한 결과를 얻었다. 이와 같은 결과는 미숙 신경세포가

Table 1 – Effects of several antagonists on NMDA-, KA-, and QA-induced excitotoxicity in immature and mature cultured rat cortical neurons. After 4 or 18 days in culture, cells were washed and incubated for 18 hrs at 37°C in 95% air/5% CO₂, in the medium containing 300 μM NMDA, 500 μM KA, or 300 μM QA in the presence or absence of the antagonists as indicated below. The aliquots of the culture medium were collected for the assessment of toxicity as described in the Materials and Methods. Percent of total LDH are shown as the means ± SD from two separate experiments of 4 determinations. Concentrations are shown in parentheses.

| Treatment (μM) | LDH Release (% Total) | |
|------------------------|-----------------------|-------------|
| | 4 Days | 18 Days |
| NMDA (300) | -2.2 ± 1.3 | 99.2 ± 0.35 |
| NMDA (300)+MK-801 (10) | -1.9 ± 0.7 | -1.3 ± 0.8 |
| KA (500) | -3.5 ± 4.0 | 78.7 ± 5.8 |
| KA (500)+DNQX (20) | -1.8 ± 2.0 | 1.4 ± 0.9 |
| QA (300) | 36.1 ± 4.1 | 100.6 ± 1.2 |
| QA (300)+DNQX (20) | 39.6 ± 1.8 | -1.3 ± 0.5 |

Glu나 NMDA, AMPA에 의해 손상을 입지 않는다는 보고^{12,16}와 부분적으로 일치한다. 성숙 세포에서 NMDA, KA에 의해 유발된 독성은 NMDA 길항제인 MK-801(10 μM)과 비선택적 non-NMDA 수용체 길항제인 DNQX(20 μM)에 의해 각각 완전히 억제되었다 (Table I). 한편, 성숙 세포에서 QA에 의해 유발된 독성은 DNQX에 의해 억제되었으나 미숙 세포에서는 전혀 억제되지 않았다(Table I). 이 결과는 미숙 신경세포에서 QA에 의한 독성유발 과정에 non-NMDA 수용체 이외의 기전이 관여할 수 있음을 암시한다. 그러나, 현재로서는 상세한 독성유발 기전에 대해서는 알 수 없고, 이를 규명하기 위한 더 많은 연구가 진행되어야 할 것으로 보인다.

한편, 4일간 배양된 미숙 세포를 500 μM Glu 또는 300 μM NMDA로 장시간(48시간)동안 처리하면 각각 16.2, 30.8%의 독성이 나타났다. Fig. 1B와 Fig. 2에 제시된 바와 같이 미숙 신경세포는 Glu나 NMDA에 의한 세포독성에 민감하지는 않으나, 지속적으로 처리하면 어느 정도 손상을 입는 것으로 보인다. NMDA 수용체는 구성하는 subunit에 따라 여러 isoform으로 존재하며, 이 수용체의 발현은 대뇌피질 신경세포의 발달과정에서 매우 미세하게 조절되고 있다.⁴ 특히 NR1과 더불어 NMDA 수용체를 구성하는 subunit인 NR2의 경우 NR2A는 출생 초기에 대뇌피질에 발현되기 시작하여 3주 내에 성인 수준에 도달하고, NR2B

는 태자기 후반부터 발현되어 성인까지 이어진다.¹⁷⁾ 본 연구에서 관찰된 미숙 세포에 48시간 적용한 NMDA에 의한 독성이 장시간동안 처리하는 과정에서 NMDA에 더 민감한 다른 형태의 isoform이 발현된 때문인지, 또는 처리기간 중에 존재하는 NMDA 수용체의 종류는 일정하나 발현 정도가 낮아 독성을 매개하지 못하다가 지속적인 노출로 인해 그 threshold를 넘어 독성이 나타나기 시작하는지는 알 수 없다. NMDA와는 대조적으로 KA(500 μM)로 48시간동안 처리한 미숙 세포에서는 독성이 전혀 관찰되지 않았으며, 마찬가지로 KA의 작용을 매개하는 수용체의 발현 정도와 연관이 있으리라 유추된다. 그러나, NMDA, KA, AMPA와 높은 친화력을 보이는 결합부위의 존재와 세포독성과의 상관관계는 그리 간단하지만은 않다는 Wahl등¹⁸⁾의 보고를 통해 짐작할 수 있듯이 미숙 세포에서 관찰되는 독성이 단순히 특정 수용체의 발현 정도에 의해 좌우되지는 않을 수도 있을 것이다.

이상에서, 성숙 세포와는 달리 미숙 신경세포는 KA에 의해서는 독성을 나타내지 않는 반면, 장시간동안 NMDA에 노출되거나 QA로 처리한 경우 독성을 나타냄을 보였다. NMDA 수용체는 Glu, glycine 외에도 polyamine에 의해 그 활성이 조절된다는 이미 알려진 사실⁹⁾과 간질이나 뇌졸중과 같은 병적 상태에서 spermine과 spermidine의 합성도 증가한다는 보고¹⁹⁾에 근거하여 본 연구에서는 미숙 신경세포에서 NMDA나 QA로 유발된 독성에 spermine이 어떠한 영향을 미치는가를 연구하였다. Spermine은 성숙 세포에서 알려진 바와 같이⁹⁾ 미숙 세포에서도 NMDA에 의한 세포독성을 증강시키는 것으로 나타났다(Fig. 3). 이는 이 시기의 발생단계에서 spermine에 민감한 NR2B로 구성된 NMDA수용체의 존재에 기인한 결과로 보인다.²⁰⁾ KA로 처리한 경우에는 예상한 바와 같이 spermine에 의해 전혀 영향을 받지 않았으며, 따라서 건강한 세포를 관찰할 수 있었다(Fig. 3). 그런데, 흥미롭게도 미숙 신경세포에서 QA에 의해 야기된 독성은 예상과는 달리 spermine에 의해 농도 의존적으로 증가되었다 (Fig. 3). Spermine의 영향은 QA의 농도를 증가시킴에 따라 더 한층 가속화되었으며, 300 μM QA에 의한 독성은 spermine에 의해 약 2.5배 증가하였다 (Fig. 4).

QA에 의해 미숙 신경세포에서 유발된 독성이 spermine에 의해 증강되는 기전은 현재로서는 명확히 알 수 없다. 앞에서 기술하였듯이 QA에 의한 미숙 세

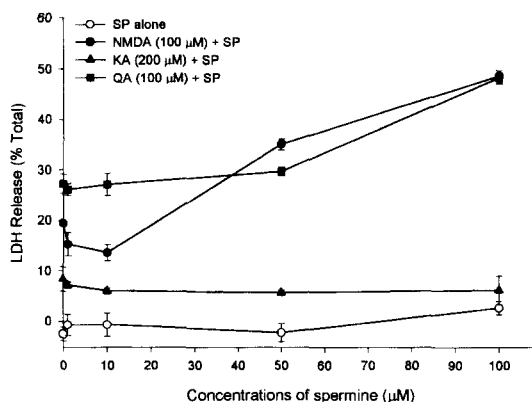


Fig. 3—Effects of spermine (SP) on the NMDA-, KA-, and QA-induced toxicity in immature rat cortical neurons. After 4 days in culture, cells were washed and incubated in the medium containing 100 μM NMDA, 200 μM KA, or 100 μM QA in the presence of the indicated concentrations of SP. After 38 hrs of incubation at 37°C in 95% air/5% CO₂, the aliquots of the culture medium were collected for the assessment of toxicity as described in the Materials and Methods. Percent of total LDH are shown as the means ± SD from two separate experiments of 4 determinations

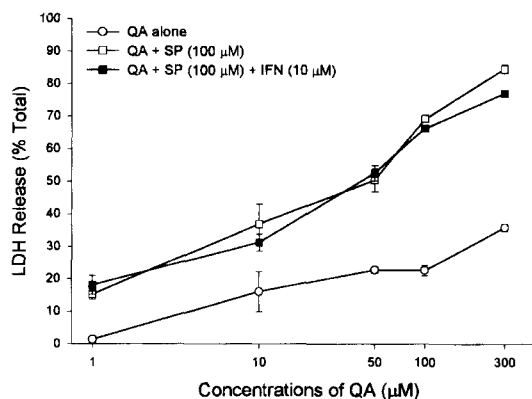


Fig. 4—Lack of effectiveness of ifenprofil (IFN) on spermine's action potentiating the toxicity induced by QA in immature rat cortical neurons. After 5 days in culture, cells were washed and incubated in the medium containing the various concentration of QA, QA+SP(100 μM), or QA+SP(100 μM)+IFN(10 μM) as indicated. After 24 hrs of incubation at 37°C in 95% air/5% CO₂, the aliquots of the culture medium were collected for the assessment of toxicity as described in the Materials and Methods. Percent of total LDH are shown as the means ± SD from two separate experiments of determinations.

포 독성은 non-NMDA 길항제인 DNQX에 의해 전혀 억제되지 않은 사실과 QA 수용체에 spermine이 조절

인자 역할을 한다는 보고는 현재까지 없음을 고려해 볼 때, 본 연구에서 관찰한 QA에 의한 독성은 QA 수용체를 통하지 않고 다른 과정에 작용한 결과일 수도 있다. 이 가능성은 1~3일간 배양된 미숙 대뇌피질 신경세포를 저농도의 cystine을 함유한 배양액에서 QA로 처리했을 때 세포독성이 증가했으며, 이와 같이 야기된 독성은 QA가 특정 수용체에 작용한 결과이기 보다는 신경세포의 cystine uptake 과정을 억제함으로써 glutathione 합성을 감소시켜 독성을 유발한다고 보고한 Murphy 등¹⁶⁾의 주장에 근거하여 유추할 수 있다.

한편, 성숙세포에서 NMDA 수용체에 대한 spermine의 증강작용은 polyamine 길항제로 분류되는 ifenprodil에 의해 억제되는 반면,^{9,10)} 미숙 신경세포에서 QA에 의해 유발된 독성에 대한 spermine의 증강효과는 10 μ M ifenprodil에 의해 전혀 억제되지 않았다(Fig. 4). 이 사실은, spermine이 NMDA 수용체 polyamine 작용부위에 결합하지 않고 다른 경로에 작용하여 세포의 생존에 영향을 미칠 수 있음을 간접적으로 시사한다. 실제로 polyamine의 작용은 매우 다양하여 아직 밝혀지지 않은 부분이 많지만 최근의 발표에 따르면, polyamine은 NMDA 수용체에서 proton에 의한 억제를 반전시켜 수용체 기능을 조절할 뿐만 아니라 K⁺ channel의 기능조절에도 관여한다¹⁹⁾고 한다. 본 연구에서 관찰된 QA로 유발된 세포독성에 대한 spermine의 증강효과가 이러한 polyamine의 기능¹⁹⁾과 어떻게 연관이 되는지는 현재로서는 알 수 없다. 다만, Fig. 3에서 보여준 바와 같이 spermine 자체에 의한 미숙 세포독성은 관찰되지 않았으므로, spermine에 의한 독성 증강효과는 다른 독성유발 인자(이 경우 QA)가 존재하는 상황에서만 나타나게 되는 것으로 보인다.

최근 Chihab 등²¹⁾은 성숙 신경세포의 경우 Glu에 의한 흥분성 세포독성이 hypoxia에 관여하지만, 미숙 신경세포의 경우에는 흥분성 세포독성이 hypoxia를 설명할 수는 없다는 보고를 통해 미숙 세포에서의 독성 유발 과정에는 성숙 세포에서와는 다른 기전이 관여할 수 있음을 제시하였다. 따라서, 미숙 신경세포에서 유발될 수 있는 세포독성의 특성을 연구하는 것은 미숙 아나 주산기 태아의 신경세포에서 발생할 수 있는 hypoxia나 ischemia, asphyxia의 이해를 위해 상당히 중요하다고 할 수 있다. 이에 본 연구를 통하여 미숙 대뇌피질 신경세포가 NMDA나 KA에 의한 세포독성

에 대해서는 비교적 저항성을 보이지만, QA에 의해서는 상당한 정도의 세포독성이 야기되며, QA에 의한 미숙 세포독성은 spermine에 의해 농도 의존적으로 증강됨을 관찰하였다. 이와 같이 QA로 유발한 미숙 세포독성은 non-NMDA 수용체 길항제인 DNQX로 전혀 억제되지 않았으며, QA와 spermine에 의한 독성 또한 polyamine 길항제인 ifenprodil에 의해 전혀 억제되지 않았음을 확인하였다. QA나 spermine이 미숙 세포에서 어떠한 경로를 통해 세포독성을 유발하는지를 규명하기 위한 연구가 진행 중이다.

감사의 말씀

본 연구는 동국대학교 전문학술지 논문게재연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문 헌

- 1) Sauer, D. and Fagg, G. E. : Excitatory amino acids, excitotoxicity and neurodegenerative disorders. In *Excitatory amino acid receptors*. Krogsgaard-Larsen, P. and Hansen, J. J. eds, Ellis Horwood, London. p. 13 (1992).
- 2) Leeson, P. D. and Iversen, L. L. : The glycine site on the NMDA receptor: structure-activity relationships and therapeutic potential. *J. Med. Chem.* **37**, 4053 (1994).
- 3) Muir, K. W. and Lees, K. R. : Clinical experience with excitatory amino acid antagonist drugs. *Stroke* **26**, 503 (1995).
- 4) Monaghan, D. T., Bridges, R. J. and Cotman, C. T. : The excitatory amino acid receptors: their classes, pharmacology, and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **29**, 365 (1989).
- 5) Robinson, M. B. and Coyle, J. T. : Glutamate and related acidic excitatory neurotransmitters: from basic science to clinical application. *FASEB J.* **1**, 446 (1987).
- 6) Johnson, J. W. and Ascher, P. : Glycine potentiates the NMDA response in cultured mouse brain neurons. *Nature* **325**, 529 (1989).
- 7) Choi, D. W. : Excitotoxic cell death. *J. Neurobiol.* **23**, 1261 (1992).

- 8) Choi, D. W. : Calcium: Still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Tren. Neurosci.* **18**, 58 (1995).
- 9) Rock, D. M. and Macdonald, R. L. : Polyamine regulation of N-methyl-D-aspartate receptor channels. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **35**, 463 (1995).
- 10) Tamura, Y., Sato, Y., Yokota, T., Akaike, A., Sasa, M. and Takaori, S. : Ifenprodil prevents glutamate cytotoxicity via polyamine modulatory sites of N-methyl-D-aspartate receptors in cultured cortical neurons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **265**, 1017 (1993).
- 11) Wilding, T. J. and Huettner, J. E. : Antagonist pharmacology of kainate- and α -amino-3-hydroxy-5- α -methyl-4-isoxazolepropionic acid-preferring receptors. *Mol. Pharmacol.* **49**, 540 (1996).
- 12) Koh, J. and Choi, D. W. : Vulnerability of cultured cortical neurons to damage by excitotoxins: differential susceptibility of neurons containing NADPH-diaphorase. *J. Neurosci.* **8**, 2153 (1988).
- 13) Choi, D. W., Maulucci-Gedde, M. A. and Kriegstein, A. R. : Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.* **7**, 357 (1987).
- 14) Ditcher, M. A. : Rat cortical neurons in cell culture: culture methods, cell morphology, electrophysiology and synapse formation. *Brain Res.* **149**, 279 (1978).
- 15) Patel, M., Day, B. J., Crapo, J. D., Fridovich, I. and McNamara, J. O. : Requirement for superoxide in excitotoxic cell death. *Neuron* **16**, 345 (1996).
- 16) Murphy, T. H., Schnaar, R. L. and Coyle, J. T. : Immature cortical neurons are uniquely sensitive to glutamate toxicity by inhibition of cystine uptake. *FASEB J.* **4**, 1624 (1990).
- 17) Wenzel, A., Fritschy, J. M., Mohler, H. and Benke, D. : NMDA receptor heterogeneity during postnatal development of the rat brain: differential expression of the NR2A, 2B, and 2C subunit proteins. *J. Neurochem.* **68**, 469 (1997).
- 18) Wahl, P., Honore, T., Drejer, J. and Schousboe, A. : Development of binding sites for excitatory amino acids in cultured cerebral cortex neurons. *Int. J. Dev. Neurosci.* **9**, 287 (1991).
- 19) Johnson, T. D. : Modulation of channel function by polyamines. *Tren. Pharmacol. Sci.* **17**, 22 (1996).
- 20) Williams, K., Zappia, A. M., Pritchett, D. B., Shen, Y. M. and Molinoff, P. B. : Sensitivity of the N-methyl-D-aspartate receptor to polyamines is controlled by NR2 subunits. *Mol. Pharmacol.* **45**, 803 (1994).
- 21) Chihab, R., Bossenmeyer, C., Oillet, J. and Daval, J. L. : Lack of correlation between the effects of transient exposure to glutamate and those of hypoxia/reoxygenation in immature neurons in vitro. *J. Neurochem.* **71**, 1177 (1998).