

배양한 흰쥐 대뇌세포에서 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin이 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase)의 표현에 미치는 영향

조선정¹ · 정재섭¹ · 김덕규 · 신승철 · 고 옥 · 정용욱 · 고복현 · 진익렬¹ · 문일수*

동국대학교 의학연구소 신경과학연구부 및 의과대학 해부학교실
¹경북대학교 자연과학대학 미생물학과

Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on the expression of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) in rat cortical neurons in culture

Sun-Jung Cho¹, Jae-Seob Jung¹, Deock Kyu Kim, Seung Chul Shin, Ok Go,
Yong Wook Jung, Bok Hyun Ko, Ingnyol Jin¹ and Il Soo Moon*

Department of Microbiology, College of Natural Sciences, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea
¹Department of Anatomy and Research Institute for Natural Science of Dongguk University, College of Medicine,
Dongguk University, Kyongju 780-714, Korea

Abstract

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), a prototype of the highly toxic halogenated arylhydrocarbons, bioaccumulates in the food chain and induces a complex spectrum of pathological responses. However, its effect on the nerve system is relatively not well studied. In this study we evaluated TCDD's cytotoxicity on the cortical cell and investigated its effect on the expression of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase), a marker for oligodendrocytes. The survival rates of 4 DIV cortical cells, that are dissociated from E18 rat cortex and maintained in the presence of TCDD, were 88.8, 83.6, 78.5, and 78.6% (5, 10, 20, and 50 nM, respectively), where the reduction in 20 and 50 nM TCDD were statistically very significant ($p < 0.01$). Immunocytochemistry of cultured cells revealed that the intensities of immunostaining with an anti-CNP1&2 antibody depended on the concentrations of the toxin. Immunoblot analysis also showed differential expression of the CNP1 and CNP2 in the presence of TCDD; the CNP1 expression was dose-dependently decreased. Interestingly, the expression of CNP2 fluctuated with the TCDD concentration. These results indicate that CNP1 and 2 are differentially regulated by TCDD, implying the functions of oligodendrocytes are modulated by the toxin.

Key words – cortical culture, cytotoxicity, CNPase, immunocytochemistry, immunoblot, 2,3,7,8-TCDD

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : +82-54-770-2414, Fax : +82-54-770-2447
E-mail : moonis@dongguk.ac.kr

서 론

Halogenated arylhydrocarbons (HAHs)은 중요한 환경오염물질로서 먹이사슬을 거치는 동안 생체에 축적되고, 발암(carcinogenesis), 피부독성(dermal toxicity), 면역계독성(immunotoxicity), 간독성(hepatotoxicity), 생식기계 독성(reproductive toxicity) 및 기형발생(teratogenicity) 등을 유발하는 것으로 보고되고 있다[18-20,27]. 또한, 신경발생(neurodevelopment)과 신경행동학적 결핍(neurobehavioral deficits)도 HAH 폭로(exposure)와 관련된 것으로 보인다[14,23]. 그러나, HAHs의 신경독성에 대한 연구는 다른 HAHs 유도성 독성에 비하여 상대적으로 연구가 미흡하다.

흔히 다이옥신으로 알려진 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD)은 매우 독성이 높은 HAHs 가운데 대표적인 것으로 인지기능(cognitive function)과 학습(learning)에 영향을 미친다[15]. 예로서, 자궁기(*in utero* period)와 수유기(lactation period)에 적은 양의 TCDD에 폭로된 흰쥐는 radial arm maze를 이용한 공간학습 기억능력시험에서 활동기억(working memory)의 획득이 촉진(facilitation)되는 것으로 보고되었다[22]. 이 공간학습(spatial learning) 효율의 증가는 독성이 나타나지 않는 매우 낮은 농도(0.1 mg/kg/day)의 TCDD에서 나타나며 조금 높은 0.2 mg/kg/day의 농도에서는 효과가 없었다[24]. 반면에, 0.1 mg TCDD/kg/day에 폭로된 쥐는 spatial discrimination-reversal learning task에서는 결손을 보였다[25]. 이러한 보고들은 임신 및 수유기에 TCDD에 폭로될 경우 과제특이적(task-specific) 학습과 기억의 촉진(facilitation) 또는 억제(inhibition)를 보임을 의미한다.

연접전달(synaptic transmission) 효율의 변화는 학습과 기억의 연접기전이기 때문에[2,3] TCDD는 아마도 연접의 구조와 기능에 영향을 줄 것으로 예상된다. 최근 TCDD에 폭로된 흰쥐 신경세포는 연접전달에 변화가 일어남을 직접적으로 보여주는 연구가 Hong 등[10]에 의하여 보고되었다. 그들의 연구에 의하면 흰쥐의 배측 해마절편을 이용한 연접전달의 효능시험에서 TCDD는 흥분성 연접기능의 지표(index)인 흥분성 연접후 전위(excitatory postsynaptic potentials)를 유의하게 저하시켰다. 흥미롭게도 이러한 저하는 TCDD를 계속 처리함에도 불구하고 30분 내에 없어졌다. 이러한 결과는 TCDD의 장기적 영향은 유전자발현

의 변화에 기인함을 의미한다[10]. 독성환경에서의 유전자 발현의 변화는 만성적 길항제의 폭로(chronic antagonist exposure)[7], 무산소증(anoxia)[11], 만성적 알코올 처리(chronic ethanol treatment)[5,13] 및 활성봉쇄(activity blockage)[9] 등에서도 보고된바 있다.

독성환경에서 신경세포의 유전자 발현의 변화와 세포독성은 신경교세포의 활성과 기능에도 변화를 초래할 것으로 보이나 이에 대한 연구는 거의 없다. 본 연구는 TCDD가 신경세포 독성과 중추신경계에서 수초(myelin sheath) 형성을 하는 oligodendrocyte에 미치는 영향을 세포 및 분자수준에서 알아보고자, 배양한 흰쥐 대뇌세포를 TCDD에 폭로시킨 후 신경세포의 표지단백질인 neurofilament 200(NF200)과 oligodendrocyte의 표지단백질인 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase(CNPase)에 대한 면역반응을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD; 10 mg/ml toluene)은 Supelco (Belefonte, USA)로부터 구입하여 dimethyl sulfoxid(DMSO)에 필요한 농도로 희석하여 사용하였다. NF200(mouse monoclonal) 항체는 Sigma 제품을 이용하였으며, CNPase 항체(rabbit polyclonal)는 본 연구실에서 제조하였으며 CNP1과 2를 모두 인식한다(논문준비 중).

대뇌세포의 배양

흰쥐(Sprague-Dawley) 태아령 18일(Embryonic day 18, E18) 대뇌세포의 배양은 Brewer 등[4]의 방법을 수정하여 사용하였다. E18 대뇌피질을 Ca^{2+} and Mg^{2+} 이 포함되지 않고 1 mM sodium pyruvate과 10 mM HEPES(pH7.4)가 포함된 Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)(Gibco BRL, Grand Island, NY)에서 해부하고 잘게 자른 다음 개별 세포를 fire-polished Pasteur pipette으로 수 차례 통과시켜 분산하였다. 그 후 Ca^{2+} and Mg^{2+} 이 포함된 2 volume의 HBSS를 넣어divalent cation을 회복시키고, 분산되지 않은 조직을 3분 간 방치시켜 가라앉힌 후 상등액을 15 ml Falcon tube에 옮겼다. 세포를 200 g에서 1분간 원심분리하여 침전시키고 재현탁한 후 poly-D-lysine 처리된 24-well plate

에서 1,000 cells/mm²의 밀도로 배양하였다. 사용한 배지는 0.5 mM glutamine과 25 mM glutamate를 첨가한 Neurobasal/B27 (Gibco BRL)이며 TCDD (0~50 nM)는 plating 때부터 첨가하였다. 세포를 humidified CO₂ incubator (95% air/5% CO₂, 37°C)에서 배양하고 2~3일마다 glutamate가 없는 Neurobasal/B27 배지로 1/3씩 교체하였다. 세포생존률은 MTT colorimetric assay 방법(16-Mosmann, 1983)을 이용하였다.

Immunoblot

8% SDS-PAGE 후 단백질을 전이완충용액(50 mM Tris-base, 380 mM glycine, 0.1% SDS, 20% methanol)에서 400 mA(40~50V)로 2시간 NC에 옮겼다. NC를 Ponceau S 용액 [0.1% (w/v) Ponceau S, 0.1% acetic acid]으로 1분간 염색하고, 증류수로 세척하여 분자량 marker를 표시하였다. NC를 TTBS용액(10 mM Tris-HCl, pH7.5, 200 mM NaCl, 0.2% Tween-20, 0.02% NaN₃)으로 10분간씩 네 차례 세척하고, 같은 용액에 2시간 더 처리하였다. 일차항체를 넣고 2시간 반응시킨 후, 과량의 50 mM NaCl로 10분간 세척하고, TTBS용액으로 10분간씩 네 차례 더 세척하였다. alkaline phosphatase-conjugated 2차 항체를 넣고 1-2 시간 반응시킨 후 TTBS용액으로 10분간씩 두 번, TBS용액(10 mM Tris-HCl, pH7.5, 200 mM NaCl, 0.02% NaN₃)으로 두 번 alkaline phosphatase 완충용액(100 mM Tris-HCl, pH9.5, 100 mM NaCl, 50 mM MgCl₂)으로 한번씩 각각 세척하였다. 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate P-toluedine salt (BCIP, 3.3 μl/ml)와 및 p-nitro blue tetrazolium chloride (NBT, 6.6 μl/ml)를 넣고 상온에서 발색시킨 후 증류수로 세척하여 발색을 중지하였다. Blot을 scan하여 얻은 signal의 강도를 NIH Scion Image Beta 3b software를 이용하여 측정하고 Mann-Whitney U test로 통계적 유의성을 조사하였다.

면역세포화학법(Immunocytochemistry)

흰쥐 E18 대뇌피질 신경세포는 Brewer 등[4]의 방법에 따라 poly-D-lysine-coated culture plate에서 배양하였다. 배양조에서 4일간(4 DIV) 유지한 신경세포 plate에 ice-cold D-PBS (0.1 g/L CaCl₂, 0.2 g/L KCl, 0.2 g/L KH₂PO₄, 0.1 g/L MgCl₂·6H₂O, 8.0 g/L NaCl, 2.16 g/L Na₂HPO₄·7H₂O)

를 넣고 4°C methanol로 잠시 세척하였다. 용액을 -20°C methanol로 교체하고 -20°C에 20분간 방치하였다. ice-cold D-PBS로 15분간 세척한 후 preblock solution [0.05% triton, 5% normal goat serum in h-PBS (20 mM NaPO₄, pH7.4, 450 mM NaCl)]으로 at 4°C에서 1시간 처리하고, 1차 항체 (1:5,000)를 넣고 2시간 더 방치하였다. 세포를 상온에서 preblock solution으로 20분씩 3번 세척하고 alkaline-phosphatase-conjugated 이차항체(Boehringer Mannheim)를 넣고 1시간 처리한 후, preblock solution으로 15분, h-PBS로 10분씩 3회 세척하였다. NBT와 BCIP를 이용하여 발색하고 h-PBS로 세척하여 반응을 중지시켰다.

결과 및 고찰

대뇌피질 신경세포에 대한 TCDD의 세포독성

신경세포배양에서 세포의 생존률은 plating한 세포의 밀도에 따라 차이가 난다[29]. 본 연구실의 경험에서도 4 DIV 대뇌피질 신경세포에 대한 TCDD의 세포독성을 조사한 결과 100 ml의 배지/96-well culture plate에서 500, 800, 1000, 1500 cells/mm²의 세포밀도 가운데 1,000 cells/mm²에서 가장 높은 치사율(14.9% cell death)을 나타내었다[6]. 따라서 본 연구에서는 1,000 cells/mm²의 밀도에서 4 DIV 세포를 이용하여 TCDD의 세포독성을 조사하였다. 5, 10, 20, 50 nM의 TCDD가 포함된 배지에서 배양할 경우 TCDD가 포함되지 않은 대조군에 비하여 각각 88.8, 83.6, 78.5, 78.6%의 생존율을 나타내었다(MTT assay, n=8) (Fig. 1). 한편 TCDD stock 용액의 용매인 toluene을 첨가한 대조군 [최종농도 = 배지의 1.6% (v/v)]도 6.2%의 치사율을 나타내었으나, 아무 처리도 하지 않은 대조군과 비교할 경우 통계학적 의미는 없었다(Fig. 1, Veh.). vehicle을 대조군으로 하여 각각의 생존율의 통계학적 유의성을 조사한 결과 10 nM 농도에서는 약간 유의하였으며(p=0.059, n=8, Mann-Whitney U test), 20 및 50 nM에서의 치사율은 매우 유의하였다(p<0.01). 이 결과는 0~50 nM의 농도에서 TCDD가 농도 의존적 세포독성이 있음을 보여준다.

배양한 대뇌세포의 CNP1,2의 면역염색반응

세포독성물질은 신경세포에 뿐만 아니라 신경교세포에도 영향을 미칠 것으로 예상되기 때문에 oligodendrocyte

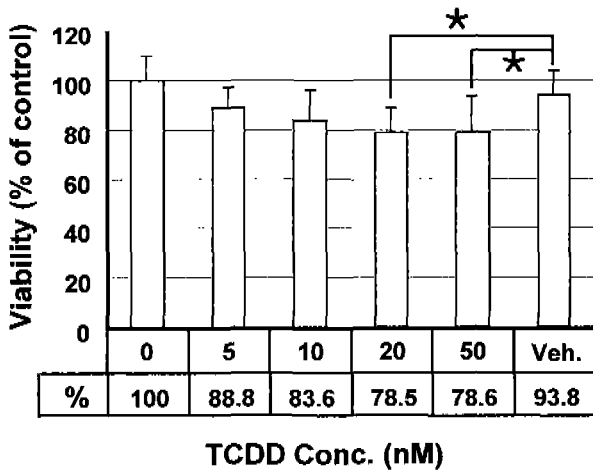


Fig. 1. Cytotoxic effects of 2,3,7,8-TCDD on rat cortical cells.

E18 rat (Sprague-Dawley) cortical cells were dissociated at 1,000 cells/mm² and maintained in the presence of various concentrations (0~50 nM) of TCDD as described in Materials and Methods. Cell viabilities were evaluated on 4 DIV by MTT colorimetric assays (n=8), and expressed as % of control (no TCDD addition). The statistic significance was evaluated by comparing samples with vehicle control using the Mann-Whitney U test. *, p < 0.01

의 표지 단백질로 알려진 2',3'-Cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase; E.C. 3.1.4.37) 발현의 변화를 조사하였다. CNPase는 in vitro에서 2',3'-cyclic nucleotides의 3'-phosphodiester bond를 가수분해하여 2'-nucleotide를 생성한다. 생체 내에서는 oligodendrocyte에서 많이 발현되나 기능에 대하여는 알려진 바가 없다. CNPase의 두가지 isoform인 CNP1과 CNP2는 하나의 유전자에서부터 alternative splicing에 의하여 만들어진다[1]. CNP2는 N-말단에 20개의 아미노산이 더 있으며 in vivo에서 인산화된다[17]. 본 연구에서는 CNP1과 2를 동시에 인식하는 항체를 사용하였다. 흰쥐의 대뇌세포들을 배양하여 CNP1과 2에 대한 면역염색한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. CNP1과 2의 면역염색반응을 강하게 나타내는 세포는 전체 세포 수의 10% 가량 되었으며, axon은 보이지 않았고 가지들이 여러 방향으로 많이 분지되는 양상을 보였다(Fig. 2, arrows). 이러한 형태는 CNPase가 oligodendrocyte의 표지 단백질이라는 사실과 더불어 이 세포들이 oligodendrocyte일 가능성을 보여준다. 그러나 astrocyte도 이와 매우 유사한 형태

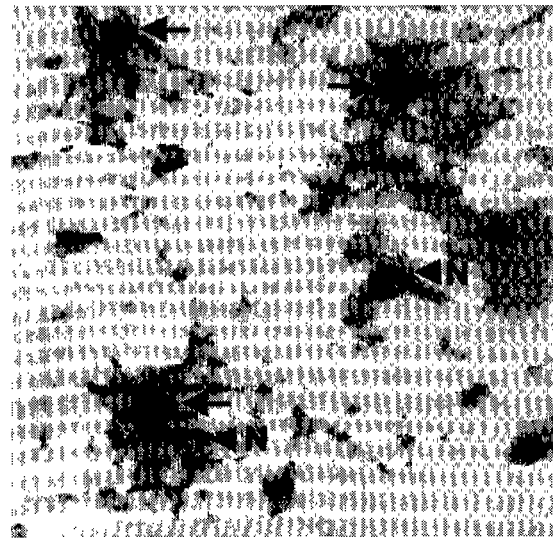


Fig. 2. CNPase-positive cells in 4 DIV cortical cultures.

E18 rat cortical cells were dissociated at 1,000 cells/mm² and maintained for 4 DIV without TCDD. Cells were immunostained with an antibody against CNP1 and 2 (1:5,000) as described in detail in Materials and Methods. Positive cells with stronger signals were indicated as arrows and neurons as arrowhead with N. The strong positive cells may be oligodendrocytes (see text).

를 보이기 때문에 이 결과만으로는 확정적으로 동정하기에는 미흡한 점이 있다. 한편 신경세포도 약하지만 양성반응을 보였다. 신경세포에서는 soma와 dendrite에 상대적으로 강한 면역염색반응을 나타내었다(Fig. 2, arrowhead N). 신경세포에서 CNPase의 발현에 관한 보고는 아직 없으나 본 연구결과는 CNPase가 신경세포에서도 발현됨을 시사한다.

TCDD에 의한 CNPase 발현의 변화

TCDD에 의한 CNPase 발현의 변화를 면역세포화학법 (immunocytochemistry)과 면역염색(immunoblot)법으로 조사하였다. 4 DIV 세포를 CNP1과 2에 대한 항체로 면역염색한 결과, TCDD의 농도에 따라 상당한 차이가 있음을 보았다(Fig. 3, CNP). 5 및 10 nM TCDD에서는 CNP 양성 세포의 면역염색반응이 줄어드는 반면 20 및 50 nM에서는 증가하는 양상을 보였다(Fig. 3, CNP). 그러나 용매인 toluene은 1.6%(v/v) 농도에서 별다른 변화를 보이지 않은 것으로 보아(Fig. 3, Veh.) 이러한 변화는 TCDD에 특이적인 영향으로 보인다. 한편 신경세포에 특이적으로 발현되는

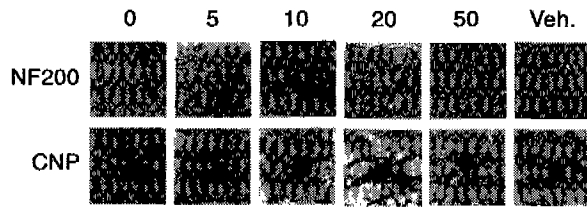


Fig. 3. Immunocytochemistry of TCDD-treated cortical cells. E18 rat cortical cells were dissociated at 1,000 cells/mm² and maintained for 4 DIV in the presence of 0, 5, 10, 20, 50 nM TCDD, or vehicle (toluene 1.6% v/v) only (0, 5, 10, 20, 50, and Veh., respectively). Cells were stained with antibodies against NF200 (1:2,000) or CNP1&2 (1:5,000). Note significant variation in immunostaining with CNP compared to NF200.

neurofilament 200 (NF200) 중간세사(intermediate filament)에 대한 면역염색반응을 조사한 결과, 신경세포에서는 유의한 변화가 나타나지 않았다(Fig. 3, NF200).

CNPase의 변화를 보다 직접적으로 알아보기 위하여 TCDD가 포함된 배지에서 배양한 4 DIV 세포로부터 균질액을 얻고, 8% SDS-PAGE하고 nitrocellulose membrane에 옮긴 후 CNP1과 2에 대한 항체로 면역염색하였다. Fig. 4A에서 보는 바와 같이 CNP1과 2는 발현양상이 서로 달랐다. 이를 densitometer로 정량한 결과를 Fig. 4B에 나타내었다. CNP1은 TCDD에 농도 의존적으로 감소하였는데, TCDD를 5, 10, 20, 50 nM 처리할 경우 대조군에 비하여 각각 75.4, 74.0, 44.5, 39.1%의 발현을 보였다(Fig. 5, CNP1). CNP2는 TCDD의 농도에 따라 그 발현이 증가 혹은 감소되는 양상을 보였다. 즉, 5 nM에서는 대조군에 비하여 68.8%, 10 nM에서는 86.5%, 20 nM에서는 52.7%의 발현을 보였다(Fig. 4B, CNP2). 그러나 특이하게도 50 nM 농도에서는 123.5%로 오히려 대조군보다 증가하는 현상을 나타내었다(Fig. 4B, CNP2). 그러나 NF200의 발현은 큰 변화를 보이지 않았다(Fig. 4B, NF200).

CNP1과 2의 mRNA transcript는 oligodendrocyte의 분화과정에서 서로 다른 발현양상을 보임이 보고되었다. 즉, oligodendrocyte precursor에서는 CNP2 mRNA만 존재하는 반면 분화중인 oligodendrocyte에는 CNP1, CNP2 모두 발현된다(8-Gravel 등, 2000). 또한 CNP2만이 in vivo에서 인산화되는 것으로 알려져 있다[17]. 이와 같은 보고들은 CNP1과 2가 생체 내 혹은 분화과정에서 서로 다른 역할을

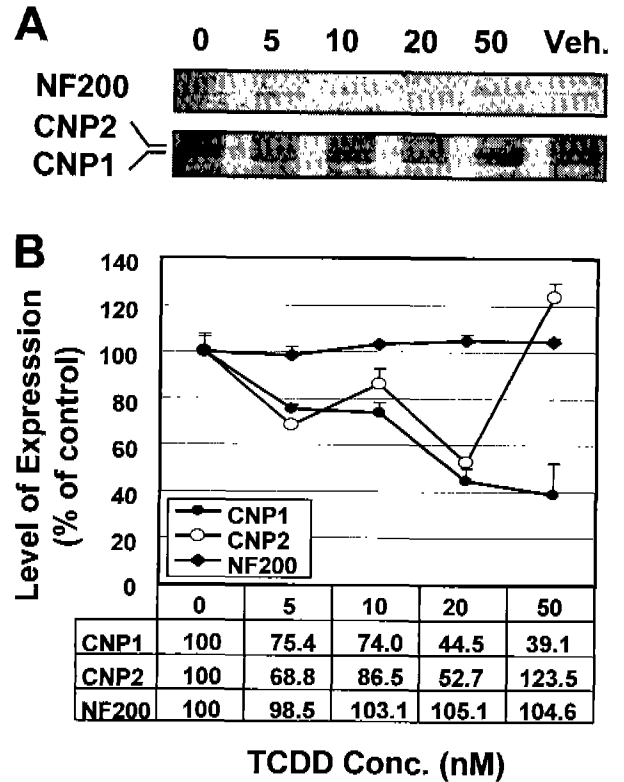


Fig. 4. Effects of TCDD on CNPase expression.

E18 cortical cells grown in the presence of 0, 5, 10, 20, 50 nM TCDD, or vehicle only (0, 5, 10, 20, 50, and Veh., respectively) for 4 DIV. A, Immunoblot analyses. Cells were harvested by scraping, lysed in SDS-gel stop buffer, and electrophoresed in a 8% SDS-polyacrylamide gel. Proteins were transferred to NC and immunoblotted with anti-NF200 (1:2,000) or -CNP1 & 2 (1:5,000). B, Densitometric analyses of the blot. The duplicate immunoblot signals were scanned, signal intensities were measured using the NIH Scion Image Beta 3b software and average values were expressed as % of control (no addition). Closed circle, CNP1; open circle, CNP2; diamond, NF200.

할 것을 의미한다. 따라서 TCDD와 같은 독성환경 하에서도 이들이 서로 다른 발현변화를 보여, 아직 그 기능은 알 수 없지만 각각의 기능을 수행할 것으로 추정된다.

TCDD에 의한 단백질발현의 변화의 의미

다이옥신은 ligand에 의하여 활성화되는 유전자 전사인자(ligand-activated transcription factor)인 aryl hydrocarbon receptor (Ahr)를 통하여 세포 내 여러 가지 변화를 유발하는 것으로 알려져 있다[12]. 따라서 TCDD는 유전자의 발

현에 변화를 줄 것으로 예상되었다. 본 연구실의 이전 연구결과에서도 TCDD에 의한 유전자의 발현의 변화가 나타났는데 아직 동정되지 않은 ~62 kDa의 단백질은 20 nM TCDD에서는 감소되었으며, 50 nM에서는 약 7배 정도 증가되었다[6]. 또한 학습과 기억에 중요한 역할을 하는 N-methyl-D-aspartate 수용체 아단위인 NR2A와 NR2B는 발현이 증가되었으며, 연접의 구조형성에 중요한 역할을 하는 scaffold 단백질인 PSD95, septin6, densin-180 등은 농도 의존적으로 감소하였다[6]. 또한, TCDD는 신경세포의 배양에서 초기의 neurite outgrowth에는 영향을 미치지 않으나 후기 2차 신경가지의 수에는 감소를 초래하였다[6]. 본 연구에서도 신경교세포인 oligodendrocyte의 표지 단백질인 CNPase의 발현이 TCDD에 의하여 조절됨을 보였다. 이러한 현상은 TCDD가 신경세포 및 신경교 세포의 유전자 발현에 변화를 초래함을 보여준다.

TCDD는 인지기능(cognitive function)과 학습(learning)에 영향을 미치는 것으로 알려졌는데[15,21,22,25], 이는 신경세포의 연접기능에 변화를 초래함을 시사한다. 본 연구실의 연구결과에서도 학습과 기억에 중요한 역할을 하는 NR2A와 NR2B[2,3]의 발현의 변화가 있었으며[6], 본 연구결과는 신경교세포에서도 변화가 일어남을 보여주었다. 이러한 TCDD에 의한 유전자 발현의 변화는 유해환경, 예로서, 만성적 길항제의 폭로(chronic antagonist exposure)[7], 무산소증(anoxia)[11], 만성적 알코올 처리(chronic ethanol treatment)[5,13] 및 활성봉쇄(activity blockage)[9] 등에서도 보고된바 있어, 유해환경에 대한 신경세포 및 신경교세포의 대응현상으로 보인다.

요 약

2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD)은 전형적인 halogenated arylhydrocarbon으로서 독성이 매우 강하며 먹이사슬을 통하여 체내에 축적된다. TCDD는 다양한 병리적 현상을 유발하는 것으로 알려져 있으나 신경계에 미치는 영향에 대하여는 상대적으로 연구가 미비하다. 본 연구에서는 흰쥐(Sprague-Dawley) E18의 대뇌피질세포를 배양하여 TCDD의 세포독성과, oligodendrocyte의 표지단백질로 알려진 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase)의 발현에 미치는 영향을 조사하였다.

5, 10, 20 및 50 nM의 TCDD가 포함된 배지에서 배양한 4 DIV 대뇌피질세포의 생존율은 각각 대조군에 비하여 88.8, 83.6, 78.5, 78.6%였는데, 20 및 50 nM에서의 영향은 $p < 0.01$ (Mann-Whitney U test)으로서 매우 유의성이 있었다. 배양한 세포를 CNP1과 2를 모두 인식하는 항체로 염색한 결과 TCDD의 농도에 따라 이들의 발현이 많이 달라졌다. 이러한 현상은 immunoblot에서도 나타났는데, CNP1과 CNP2의 발현의 변화는 서로 달랐다. 즉, CNP1의 발현은 TCDD의 농도에 비례하여 줄어들어 5, 10, 20, 50 nM의 농도에서 대조군에 비하여 각각 75.4, 74.0, 44.5, 39.1%의 발현양상을 보였다. 그러나 CNP2는 TCDD의 농도에 따라 그 발현이 증가 혹은 감소하였다. 즉, 5, 10, 20 nM TCDD 농도에서는 대조군에 비하여 각각 68.8%, 86.5%, and 52.7%로 줄어들었으나 50 nM에서는 대조군에 비하여 오히려 123.5%로 증가하였다. 이러한 결과는 CNP1과 CNP2의 발현이 TCDD에 의하여 조절되는 양상이 서로 다름을 의미하며, TCDD에 의하여 신경교세포인 oligodendrocyte의 기능에 변화가 있음을 시사한다.

참 고 문 헌

1. Bernier, L., F. Alvarez, E.M. Norgard, D.W. Raible, A. Mentaberry, J.G. Schembri, D.D. Sabatini and D.R. Colman. 1987. Molecular cloning of a 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase: mRNAs with different 5' ends encode the same set of proteins in nervous and lymphoid tissues. *J. Neurosci.* 7, 2703-2710.
2. Bliss, T.V. and G.L. Collingridge. 1993. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* 361, 31-39.
3. Braunewell, K.H. and D. Manahan-Vaughan. 2001. Long-term depression: a cellular basis for learning? *Rev. Neurosci.* 12, 21-40.
4. Brewer, G.J., J.R. Torricelli, E.K. Evege and P.J. Price. 1993. Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J. Neurosci. Res.* 35, 567-576.
5. Chandler, L.J., D. Norwood and G. Sutton. 1999. Chronic ethanol upregulates NMDA and AMPA, but not kainate receptor subunit proteins in rat primary cortical cultures. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 23, 363-370.
6. Cho, S.-J., J.-S. Jung, I. Jin, Y.W. Jung, B.H. Ko, K.S.

- Nam, I.K. Park and I.S. Moon. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin on the expression of synaptic proteins in dissociated cortical cells. (submitted).
7. Follesa, P. and M.K. Ticku. 1996. NMDA receptor upregulation: molecular studies in cultured mouse cortical neurons after chronic antagonist exposure. *J. Neurosci.* **16**, 2172-2178.
 8. Gravel, M., E. Gao, C. Hervouet-Zeiber, V. Parsons and P.E. Braun. 2000. Transcriptional regulation of 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase gene expression by cyclic AMP in C6 cells. *J. Neurochem.* **75**, 1940-1950.
 9. Grossman, S.D. and J.R. Wrathall. 2000. The role of activity blockade on glutamate receptor subunit expression in the spinal cord. *Brain Res.* **880**, 183-186.
 10. Hong, S.J., C.A. Grover, S.H. Safe, E. Tiffany-Castiglioni and G.D. Frye. 1998. Halogenated aromatic hydrocarbons suppress CA1 field excitatory postsynaptic potentials in rat hippocampal slices. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **148**, 7-13.
 11. Hsu, K.S. and C.C. Huang. 1997. Characterization of the anoxia-induced long-term synaptic potentiation in area CA1 of the rat hippocampus. *Br. J. Pharmacol.* **122**, 671-681.
 12. Kainu, T., J.A. Gustafsson and M. Pelto-Huikko. 1995. The dioxin receptor and its nuclear translocator (Arnt) in the rat brain. *NeuroReport.* **156**, 2557-2560.
 13. Kalluri, H.S., A.K. Mehta and M.K. Ticku. 1998. Up-regulation of NMDA receptor subunits in rat brain following chronic ethanol treatment. *Mol. Brain Res.* **58**, 221-224.
 14. Kuratsune, M. and Yusho, with reference to Yu-Cheng. 1989. Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalenes, dibenzodioxins, and related products, pp. 381-400, *In* Kimbrough, R. D. and A. A. Jensen (eds.), Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.
 15. MacLusky, N.J., T.J. Brown, S. Schantz, B.W. Seo and R.E. Peterson. 1998. Hormonal interactions in the effects of halogenated aromatic hydrocarbons on the developing brain. *Toxicol. Ind. Health.* **14**, 185-208.
 16. Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* **65**, 55-63.
 17. O'Neill, R.C. and P.E. Braun. 2000. Selective synthesis of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase isoform 2 and identification of specifically phosphorylated serine residues. *J. Neurochem.* **74**, 540-546.
 18. Safe, S.H. 1986. Comparative toxicology and mechanism of action of polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **26**, 371-399.
 19. Safe, S.H. 1998. Development validation and problems with the toxic equivalency factor approach for risk assessment of dioxins and related compounds. *J. Anim. Sci.* **76**, 134-141.
 20. Safe, S.H. 1994. Polychlorinated biphenyls (PCBs): environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* **24**, 87-149.
 21. Schantz, S.L. and R.E. Bowman. 1989. Learning in monkeys exposed perinatally to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *Neurotoxicol. Teratol.* **11**, 13-9.
 22. Schantz, S.L., B.W. Seo, J. Moshtaghian, R.E. Peterson and R.W. Moore. 1996. Effects of gestational and lactational exposure to TCDD or coplanar PCBs on spatial learning. *Neurotoxicol. Teratol.* **18**, 305-313.
 23. Seegal, R.F. and W. Shain. 1992. Neurotoxicity of polychlorinated biphenyls, the role of ortho-substituted congeners in altering neurochemical function. pp. 169-195, *In* Isaacson, R.L. and K.F. Jensen(eds.), *The vulnerable brain and environmental risks, Vol. 2, Toxins in food.*, Plenum., New York.
 24. Seo, B.W., B.E. Powers, J.J. Widholm and S.L. Schantz. 2000. Radial arm maze performance in rats following gestational and lactational exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *Neurotoxicol. Teratol.* **22**, 511-519.
 25. Seo, B.W., A.J. Sparks, K. Medora, S. Amin and S.L. Schantz. 1999. Learning and memory in rats gestationally and lactationally exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD). *Neurotoxicol. Teratol.* **21**, 231-239.
 26. Tomaszewski, K.E., C.A. Montgomery and R.L. Melnick. 1988. Modulation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin toxicity in F344 rats by di(2-ethylhexyl) phthalate. *Chem. Biol. Interact.* **65**, 205-222.
 27. Unkila, M., R. Pohjanvirta and J. Tuomisto. 1995. Biochemical effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) and related compounds on the central nervous system. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **27**, 443-455.

배양한 흰쥐 대뇌세포에서 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin이 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase)의 표현에 미치는 영향

28. Whitlock, J.P. Jr . 1999. Induction of cytochrome P4501A1. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**, 103-125.
29. Young, T.H., J.H. Huang, S.H. Hung and J.P. Hsu.

2000. The role of cell density in the survival of cultured cerebellar granule neurons. *J. Biomed. Mater Res.* **1552**, 748-753.

(Received June 13, 2001; Accepted July 18, 2001)