



미토콘드리아 기능을 통해 내인성 글루탐산이 신경세포 생존에 미치는 영향

노진우¹, 김혜지¹, 은수용¹, 강문석³, 정성철^{1,2}, 양윤실^{4,*}

¹제주대학교 의학전문대학원 생리학교실, ²제주대학교 의과학연구소, ³보타메디, ⁴한국 뇌연구원

Endogenous glutamate enhances survival rates of neurons via activating mitochondrial signalings in hippocampal neuron by Jin-Woo Noh¹, Hye-Ji Kim¹, Su-Yong Eun¹, Moon-Suk Kang³, Sung-Cherl Jung^{1,2}, Yoon-Sil Yang^{4,*}(¹Department of Physiology, School of Medicine; ²Institute for Medical Science, Jeju National University; ³Botamedi Inc., Jeju; ⁴Korea Brain Research Institute, 61, Cheomdan-ro, Dong-gu, Daegu, Republic of Korea)

Abstract Neuronal excitotoxicity induces mitochondrial dysfunction and the release of proapoptotic proteins. Excitotoxicity, the process by which the overactivation of excitatory neurotransmitter receptors leads to neuronal cell death. Neuronal death by excitotoxicity was related to neuronal degenerative disorders and hypoxia, results from excessive exposure to excitatory neurotransmitters, such as glutamate. Glutamate acts at NMDA receptors in cultured neurons to increase the intracellular free calcium concentration. Therefore endogenous glutamate may be a key factor to regulate neuronal cell death via activating Ca^{2+} signaling. For this issue, we tested some conditions to alter intracellular Ca^{2+} level in dissociated hippocampal neurons of rats. Cultured hippocampal neuron were treated by KCl (20 mM), $CaCl_2$ (3.8 mM) and glutamate (5 μ M) for 24 hrs. Interestingly, The Optical Density of hippocampal neurons was increased by high KCl application in MTT assay data. This enhanced response by high KCl was dependent on synaptic Ca^{2+} influx but not on intracellular Ca^{2+} level. However, the number of neurons seemed to be not changed in Hoechst 33342 staining data. These results suggest that enhancement of synaptic activity plays a key role to increase mitochondrial signaling in hippocampal neurons.

Key words: Glutamate, Excitotoxicity, Neuronal death, NMDA, Ca^{2+} , KCl, Mitochondria

서 론

해마는 척추동물 뇌의 중요한 요소 중의 하나로 대뇌변연계에 속하여 있다. 해마는 대뇌 피질과 밀접하게 연결되어 있으며 학습과 장기·단기 기억, 공간지각 능력 등 중요한 역할을 하며, CA1, CA3, 치아이랑세포 등으로 구성되어 있다. 염증과 저산소증, 내측 측두엽 간질이 발생하는 경우 해마 신경세포에 손상을 유발하게 되는데, 이러한 신경세포손상은 해마 신

경세포에서의 글루탐산(glutamate) 과분비를 유도하며 신경세포의 흥분독성(excitotoxicity)을 유발하여 결국엔 세포사멸에 이르게 한다¹⁾. 신경세포 사멸은 세포 내부로 유입되는 칼슘이온에 의해 유발된다고 알려져 있다. 신경세포 내에 칼슘이온 농도의 증가는 세포에 존재하는 전압 의존적 칼슘이온 통로와 이온투과성 글루탐산 수용체, 미토콘드리아, 칼슘저장고인 소포체에 의해 유발된다고 알려져 있다²⁾.

또한 최근의 연구에서 흥분독성 유발을 위하여 글루탐산을 신경세포에 과하게 처리하였을 때 신경세포 내 칼슘이온의 농도가 급격하게 증가하고 이러한 이온의 증가가 세포사멸을 유발함을 확인하였다. 또한 NMDA 수용체를 선택적으로 차단하였을 때 신경세포사멸이 사라짐을 확인하였고, 세포 외부에 칼슘이온을 제거하거나 세포 내부에 칼슘이온을 차단하는

Received: November 8, 2018; Revised: December 5, 2018; Accepted: December 6, 2018
*Correspondence to : Yoon-Sil Yang
Korea Brain Research Institute, 61, Cheomdan-ro, Dong-gu, Daegu, 41068, Republic of Korea
Tel: 82-53-980-8354, FAX: 82-53-980-8239
E-mail: Yus3462@kbri.re.kr

칼슘이온 제거제를 처리하였을 때도 신경세포사멸이 차단됨을 확인하였다. 이는 흥분독성을 유발하는 상황에서 이온투과성 글루탐산 수용체 중 NMDA 수용체의 활성화가 신경세포 내 칼슘이온의 비정상적인 증가를 유발하고 결국 신경세포사멸이 일어남을 의미한다.

미토콘드리아는 신경세포에 존재하는 중요한 소기관 중 하나로 ATP 생성과 세포내 메신저 역할을 하는 활성산소를 생성하고, 세포내의 칼슘이온 농도의 조절에도 중요한 작용을 한다. 신경세포의 NMDA 수용체로 유입되는 칼슘이온은 미토콘드리아의 칼슘이온 축적을 일으킨다고 알려져 있다^{3,4)}. 미토콘드리아 내의 칼슘이온의 축적은 미토콘드리아 기능이상을 유발하는데, 보통 에너지 합성장애와 더불어 활성산소의 증가와 같은 현상이 관찰된다²⁾. 이러한 기능이상은 미토콘드리아 막전압의 상승에 의해 일어나며 막전압의 상승에는 Permeability Transition Pore (PTP)가 관여한다고 알려져 있다⁵⁾. 이는 미토콘드리아의 기능조절에 글루탐산에 의한 흥분독성이 중요한 역할을 하게 됨을 의미한다.

최근의 연구에서 흥분독성에 의한 신경세포사멸에 미토콘드리아가 밀접한 관련이 있음이 보고되었다^{5,6)}. 이는 과도한 자극이 주어지는 경우 신경세포에 흥분독성이 발생하고 미토콘드리아 내의 칼슘 축적이 막전압을 탈분극시켜 세포사멸을 유발하는 물질을 분비하게 됨을 의미한다.

반면에 여러 연구에서 NMDA 수용체가 신경세포의 연결내외에 모두 분포하고 있음이 알려져 있고, 최근의 연구에서 연결내 NMDA 수용체의 활성화가 신경보호 작용을 하고, 연결외 NMDA 수용체의 활성화는 연결외의 전압 의존적 칼슘 채널과 함께 신경세포의 사멸을 유발함이 보고되었다¹⁾. 이는 신경세포의 NMDA 수용체를 활성화시키는 글루탐산의 작용 위치에 따라 신경세포의 생존율이 조절될 수 있음을 의미한다.

신경세포의 흥분독성 유발을 위해서는 글루탐산의 분비를 유도하거나 외인성 글루탐산의 직접처리, 또는 신경세포내의 칼슘이온 증가를 위하여 신경세포 외부에 고농도의 칼슘 처리가 필요하다. 여러 연구에서 신경세포 외부에 고농도의 포타슘 이온을 처리하였을 때 전압 의존적 포타슘 이온통로의 포타슘이온 전도도가 떨어지고 신경세포내의 포타슘이온 농도 증가가 유발되어 신경세포의 탈분극을 유발하게 되고, 결국 내인성 글루탐산의 분비가 유도됨을 확인하였다^{7,8)}. 따라서 본 연구에서는 신경세포의 흥분독성을 유발한 후 신경세포의 생존율과 신경세포의 형태에 어떠한 영향을 미치는지를 확인하였다.

재료 및 방법

세포배양

본 실험에서는 흰쥐의 해마신경세포를 primary culture하여 실험하였다. 실험에 사용한 흰쥐는 12시간 간격으로 빛이 조절되고 온도 $25 \pm 3^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 10\%$ 가 유지되는 실험 환경에서 사육하였으며, 임신 후 21일 된 배아를 사용하였다. Primary culture는 임신된 흰쥐를 디에틸에테르를 사용하여 마취하고, 배아를 분리한 후 양막과 태반을 제거하여 배아의 머리만 절제한 후 normal tyrode buffer (NaCl 140 mM, KCl 5.4 mM, MgCl_2 2.3 mM, HEPES 10 mM, D(+)-glucose 5 mM)를 사용하여 세척하였다. 세척을 하기 위한 용액은 얼음으로 냉각시킨 상태에서 사용하였고 총 5회 세척 후 해마를 분리하였다. 분리된 해마는 유리피펫을 사용하여 분쇄하였고, 해마가 눈에 보이지 않을 만큼 분쇄되면 hemocytometer를 이용하여 카운트 후 poly-L-lysine으로 코팅이 된 24 well tissue culture testplate에 well 당 4.5×10^4 개의 세포를 시딩하여 인큐베이터에 배양하였다. 인큐베이터는 온도 37°C , CO_2 5%로 유지시켰고, culture cell은 하루 후 neurobasal medium으로 교체를 하고, 3~4일을 주기로 plate 내의 원래의 medium과 새로운 neurobasal medium을 1:1 비율로 혼합하여 medium을 갈아주었다. 실험에 사용된 동물은 제주대학교 동물윤리위원회의 윤리규정을 준수하여 실험에 사용되었다.

약물처리

흥분독성을 유발하기 위해 총 세 가지의 실험군을 설정하였다. 첫 번째는 고농도의 KCl (20 mM, 24 hrs)을 신경세포 외부에 처리하여 탈분극에 의한 내인성 글루탐산 분비를 유도하였고, 두 번째로 고농도의 칼슘이온 (3.8 mM, 24 hrs)을 신경세포 외부에 처리하여 신경세포내로 유입되는 칼슘이온의 양을 증가시켜 신경세포내 칼슘이온의 농도를 증가시켰다. 마지막으로 외인성 글루탐산 (5 μM , 24 hrs) 및 BAPTA-AM (5 μM , 24 hrs)을 처리하여 흥분독성을 유발하였다. 각각의 처리 후 이미지 촬영을 위해 hoechst 33342를 1:250의 농도로 세포 배양액에 3분간 처리하여 형광현미경 (IX-71, Olympus, Japan)을 사용하여 촬영하였다.

세포생존율 측정 (MTT assay)

흥분독성을 유발하는 처리를 한 다음날 tissue culture testplate에 well 당 200 μL 의 neurobasal medium을 빼고 동량의 MTT assay solution을 2시간 동안 인큐베이터에서 처리한 후 모든 medium과 solution을 제거한 후 1 mL의 DMSO

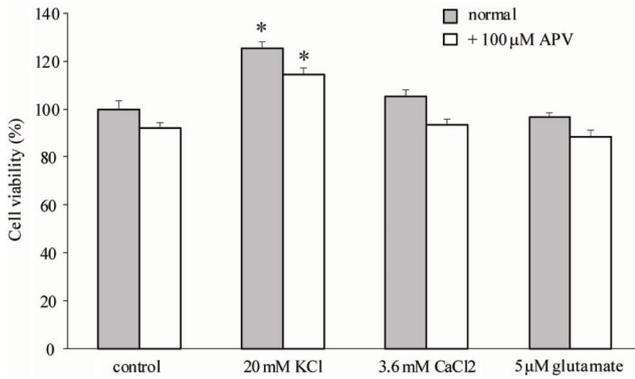


Figure 1. The comparative survival rate after the treatment of drugs (KCl 20 mM, CaCl₂ 3.8 mM or glutamate 5 µM) with and without APV for 24 hrs. The survival rate of hippocampal neurons was increased by high KCl application. Cell viability was measured by MTT assay. **p*<0.05, compared with control (without APV); by using student's t-test (unpaired).

를 20분간 처리였다. Plate 내의 신경세포의 용해가 완료된 후 microplate reader (model 550, Bio-Rad, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

데이터 분석

실험을 통하여 얻어낸 결과는 student's t-test를 이용하여 *p*<0.05 또는 *p*<0.01의 범위에서 유의성을 검정하였다.

결 과

실험에 사용하는 해마 신경세포는 배양 후 6~8일이 지난 후에 실험에 사용되었고, 실험 하루 전에 약물 처리를 하여 24 시간 배양 후 실험하였다. 실험의 진행은 우선 흥분독성 유도 상황을 만들고, 신경세포의 생존율(viability)을 MTT assay를 통하여 확인하였다.

흥분독성유도 상황에서 신경세포의 생존율을 확인한 결과 Figure 1과 같이 대조군에 비해 KCl을 통한 내인성 글루탐산 분비 유도군에서 생존율이 증가(Fig. 1, normal, KCl=121.86±6.44%, *p*<0.05)함을 확인하였다. 반면에 고농도의 칼슘이온(CaCl₂=101.83±6.58%)과 외인성 글루탐산(glutamate=102.55±3.94%)을 직접 처리한 경우에는 신경세포 생존율의 변화가 없었다. 이는 내인성 글루탐산 분비 조건 하에서만 신경세포의 생존율이 증가하고 있음을 의미한다.

여러 연구에서 신경세포의 세포사멸과 생존에 NMDA 수용체가 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다. 따라서 이러한 내인성 글루탐산에 의해 활성화되는 NMDA 수용체를 차단

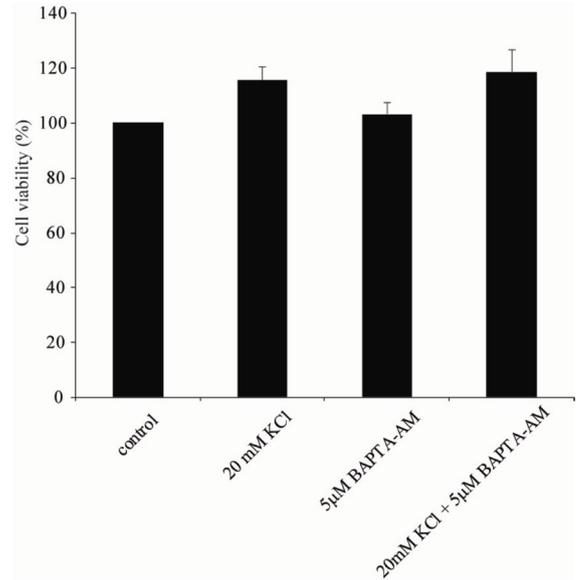


Figure 2. The comparative survival rates after the treatment of calcium chelator, BAPTA-AM, and high KCl for 24 hrs. The increase of survival rate in KCl application was not abolished by BAPTA-AM. Cell viability was measured by MTT assay.

하여 신경세포의 생존율에 어떠한 영향을 주는지 확인하였다. Figure 1에서 NMDA 수용체(APV)를 차단하였을 때 내인성 글루탐산에 의한 생존율 증가 효과를 막지 못했다(Fig. 2, APV, KCl=118.77±2.39%). 또한 Figure 2와 같이 세포내 칼슘이온 제거제인 BAPTA-AM을 처리하였을 때도 KCl 효과를 막지 못했다(Fig. 2, KCl+Bapta-AM=117.11±20.14%). 이러한 결과는 내인성 글루탐산에 의한 NMDA 수용체의 활성화와 이온투과성을 갖는 NMDA 수용체를 통한 칼슘이온의 신경세포내 유입이 신경세포의 생존율에 영향을 주지 못함을 의미한다.

이후 외인성 글루탐산을 고농도로 처리하여 더욱 강력한 흥분독성 상황을 유도하고 신경세포의 생존율의 감소가 고농도로 처리한 KCl에 의해 차단되는지를 확인하였다. Figure 3과 같이 고농도(50 µM, 100 µM)의 글루탐산을 처리한 결과 대조군에 비하여 신경세포의 생존율이 감소하였고(Fig. 3, 50 µM Glutamate=88.60±9.33%, 100 µM Glutamate=83.78±6.73%), KCl과 같이 처리한 결과 생존율감소가 억제되는 것을 확인하였다(Fig. 3, 50 µM glutamate + KCl=98.12±1.58%, 100 µM glutamate + KCl=99.70±6.47%). 이는 고농도의 외인성 글루탐산이 신경세포에 과도한 자극을 주고 이러한 자극이 신경세포 사멸을 유발하며 이러한 효과는 고농도의 KCl에 의해 차단됨을 의미한다.

고농도의 KCl 처리는 신경세포의 탈분극을 유발하여 내인

성 글루탐산 분비를 유도하여 연결내의 NMDA 수용체를 활성화 시켜 신경보호 효과를 일으킬 수 있다. 그러나 Figure 1

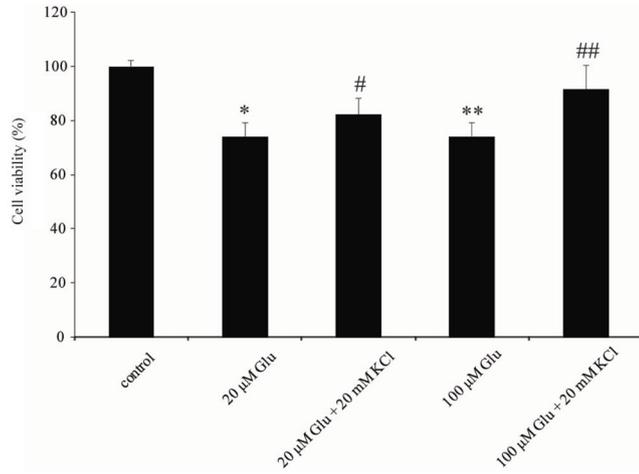


Figure 3. The comparative survival rate after the treatment of different concentration of glutamate (50 or 100 μM) for 24 hrs. The survival rate of hippocampal neurons was decreased by high glutamate concentration, and cell death of neurons was abolished by 20 mM KCl. Cell viability was measured by MTT assay. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, compared with control; # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, compared with 'Glu'; by using student's t-test (unpaired)

의 결과에서 NMDA 수용체 차단제를 사용했음에도 불구하고 신경보호 효과는 차단이 되지 않음을 확인하였다. 이는 내인성 글루탐산의 분비 유도가 NMDA 수용체를 통하지 않고 신경보호 효과를 일으키거나, 혹은 MTT assay를 통하여 얻은 결과가 실제 세포의 생존율과 다르게 나타날 수도 있음을 의미한다. MTT assay 방법은 세포내에 존재하는 미토콘드리아를 염색하여 염색된 정도의 비교를 통해 세포의 수를 간접적으로 파악할 수 있다. 만약 신경세포의 수는 일정하고 미토콘드리아의 수만 늘었을 경우에는 마치 신경세포의 생존율이 늘어난 것으로 보일수도 있다. 또한 최근의 연구에서 수상돌기의 구조와 신경세포의 연결구조의 형성과정에 미토콘드리아의 역할이 중요하다고 보고되었고, 이러한 미토콘드리아의 변화는 연결내 신호전달과정의 증가와 밀접한 관련이 있음이 보고되었다. 따라서 실제 신경세포의 수를 계상하여 약물 처리조건에 대한 생존율을 직접적으로 확인하였다.

Figure 4에서 보여지듯이, 내인성 및 외인성 글루탐산과 고농도의 칼슘이온 모두 신경세포의 생존율에 직접적인 영향을 주지 못하고 있으며, 이는 이전의 실험 결과가 실제 신경세포의 생존율의 변화가 일어났다고 보다는 신경세포내의 미토콘드리아 양의 변화가 일어났음을 의미한다. 또한 고농도의 KCl

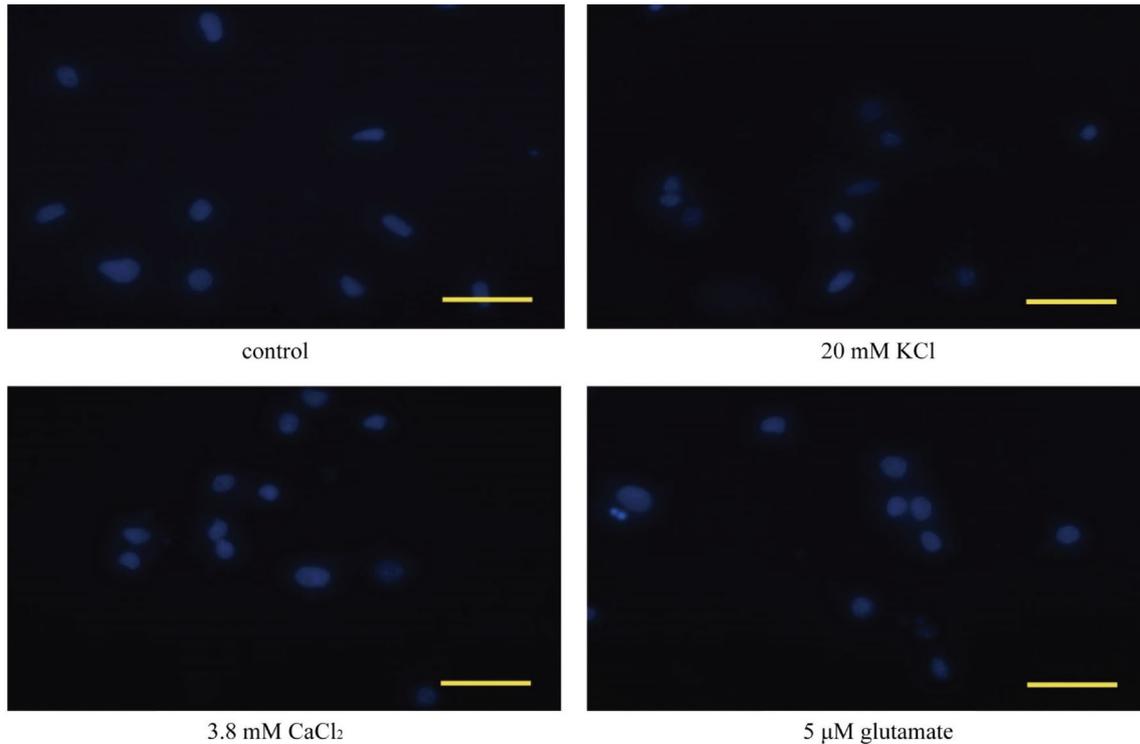


Figure 4. Microscopic view of fluorescence in hippocampal neurons stained by hoechst 33342. In this experiment, neuronal survival rates were not significantly affected by drugs such as glutamate or KCl, indicating that neuronal death is critically dependent on mitochondrial processings. Scale bar 50 μm.

로 인한 전체 신경세포의 내인성 글루탐산 분비 증가가 연결 내 신호전달과정의 증가를 유발하고 결국 미토콘드리아의 증가를 유발하게 됨을 의미한다.

고 찰

이번 연구에서 고농도의 KCl을 처리하여 내인성 글루탐산 분비를 유도한 결과 신경세포의 생존율에는 영향을 주지 못하고, 미토콘드리아의 양적 증가를 일으킨다는 것을 확인하였다. MTT assay 결과에서 예상과는 달리 흥분독성을 유발하는 조건을 만들었을 때 신경세포의 생존율이 크게 변하지 않는 것을 확인하였다. 또한 내인성 글루탐산 분비를 유도하여 흥분독성을 유발한 경우 신경세포의 생존율이 늘어났다. 또한 신경세포의 사멸을 유발한다고 알려진 NMDA 수용체를 차단 하였을 때와 세포내 칼슘이온 농도 증가를 막아주는 칼슘이온 킬레이터를 사용하였을 때 모두 이러한 변화가 사라지지 않음을 확인하였다. 이는 흥분독성을 유발하는 조건을 만들었을 때 나타나는 MTT assay 결과가 실제 신경세포의 생존율을 나타내지 못한다고 볼 수 있다. 따라서 신경세포의 생존율을 직접적으로 확인하기 위해 Hoechst 염색 후 카운팅을 한 결과 세포수의 변화가 없었다. 이는 내인성 글루탐산의 분비가 신경세포의 생존율에는 전혀 영향을 미치지 못한다는 것을 의미한다.

기존의 연구에서 연결내 신호전달의 증가가 수상돌기에 존재하는 미토콘드리아의 이동성과 기능 향상에 영향을 준다는 것이 밝혀졌다⁹⁾. 신경세포의 신호전달과정의 증가는 기억의 형성과 학습 등에 중요한 역할을 하게 되는데, 이는 연결내 신호전달과정의 증가가 수상돌기에 존재하는 미토콘드리아의 기능 향상에 영향을 줘 수상돌기의 구조 형성과 연결 형성에 영향을 주는 것을 의미한다. 또한 미토콘드리아에 의한 수상돌기 형성의 조절작용이 GTPase에 의해 조절됨이 보고되었고, 수상돌기내의 미토콘드리아 증가가 dynamin-related protein 1 (Drp1)의 과발현에 의해 일어남이 보고되었다¹⁰⁾. 또한 미토콘드리아의 기능향상에 creatine이 중요하게 작용한다고 보고되었다¹¹⁾. 따라서 내인성 글루탐산의 분비 유도가 신경세포내의 GTPase의 활성화를 통하여 미토콘드리아의 증가와 기능향상을 유도했다고 볼 수 있으며, 이러한 변화가 수상돌기의 구조 형성과 기능에 중요한 역할을 하게 될 것이다. 결론적으로 신경세포에서의 신경전달과정 증가는 세포 외부에 존재하는 글루탐산 수용체를 통하여 신경세포의 GTPase를

활성화시키고 미토콘드리아를 증가시키며, 이는 신경세포의 기능에 중요한 역할을 하게 된다.

ACKNOWLEDGEMENT

Supported by Grant 2016R1D1A1B01010863

REFERENCES

1. Zeng YS, Xu ZC. Co-existence of necrosis and apoptosis in rat hippocampus following transient forebrain ischemia. *Neurosci Res* 2000;37:113-25.
2. Gogvadze V, Robertson JD, Zhivotovsky B, Orrenius S. Cytochrome C release occurs via Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent mechanisms that are regulated by Bax. *J Biol Chem* 2001;276:19066-71.
3. Alano CC, Beutner G, Dirksen RT, Gross RA, Sheu SS. Mitochondrial permeability transition and calcium dynamics in striatal neurons upon intense NMDA receptor activation. *J Neurochem* 2002;80:531-8.
4. Schinder AF, Olson EC, Spitzer NC, Montal M. Mitochondrial dysfunction is a primary event in glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 1996;16:6125-33.
5. Karbowski M, Youle RJ. Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ* 2003;10:870-80.
6. Kroemer G, Reed JC. Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 2000;6:513-9.
7. Nicholls DG, Budd SL. Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev* 2000;80:315-60.
8. Pivovarova NB, Hongpaisan J, Andrews SB, Friel DD. Depolarization-induced mitochondrial Ca accumulation in sympathetic neurons: spatial and temporal characteristics. *J Neurosci* 1999;19:6372-84.
9. Li Z, Okamoto KI, Hayashi Y, Sheng M. The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell* 2004;119:873-87.
10. Pozzo-Miller LD, Pivovarova NB, Leapman RD, Buchanan RA, Reese TS, Andrews SB. Activity-dependent calcium sequestration in dendrites of hippocampal neurons in brain slices. *J Neurosci* 1997;17:8729-38.
11. Mattson MP, Zhang Y, Bose S. Growth factors prevent mitochondrial dysfunction, loss of calcium homeostasis, and cell injury, but not ATP depletion in hippocampal neurons deprived of glucose. *Exp Neurol* 1993;121:1-13.