

## 배양된 해마 신경세포의 성장에 대한 납의 영향

김윤아 · 김종곤 · 송동근 · 김용식\* · 김영희

한림대학교 의과대학 약리학교실, \*서울대학교 의과대학 약리학교실

## EFFECTS OF LEAD ON THE GROWTH OF THE CULTURED HIPPOCAMPAL NEURONS

Yul-A Kim, Jong-Gon Kim, Dong-Keun Song, Yong-Sik Kim\*, Yung-Hi Kim  
Department of Pharmacology, Hallym University, Chunchon, 200-702  
\*Department of Pharmacology, Seoul National University, Seoul, 110-799

(Received July 5, 1993)

(Accepted August 12, 1993)

**ABSTRACT:** Lead is an environmental toxicant that causes a marked deficit in cognitive development in infants and children. Damage to the hippocampus has been linked to the lead-induced deficit in the learning process. The present study examined the effects of lead on the development of hippocampal neurons *in vitro*. Hippocampal neurons were incubated with various concentrations in lead acetate (1  $\mu$ M to 30  $\mu$ M) for 72 hrs from 4 h after plating, and the percentage of living neurons bearing neurites, neurite outgrowth and migration of multipolar neurons in culture were determined. The percent of living neurons bearing neurites was decreased at 3  $\mu$ M lead acetate, but it was increased progressively at the higher concentration of lead. The neurite outgrowth was increased slightly at 1  $\mu$ M lead, but it was decreased progressively at the higher concentration of lead. The migration of neuronal cells was increased by lead in a dose-dependent manner. Although the mechanism(s) of the effect of lead acetate on the *in vitro* development of isolated hippocampal neurons was not addressed in this study, it is suggested to be related to its possible effect on intracellular calcium levels, as intracellular calcium levels are critical in neuronal death and neurite outgrowth, and lead has been reported to interfere with calcium current. It is also suggested that the lead-induced change in the development of hippocampal neurons would underlie, at least partly, the morphological perturbation of the hippocampus reported in the animals exposed to low-level of lead during the prenatal or perinatal period.

**Key Words:** Lead, Hippocampal neurons, Neurite outgrowth, Migration, Culture.

## 서 론

산업화의 부산물인 각종 유해성 물질로 인한 환경의 오염은 최근 전세계적인 관심의 대상이 되고 있다. 그 중 자동차의 배기가스, 염료 등으로부터 유래되는 납(lead)에 의한 중독은 특히 영아 및 소아들의 상당수가 이환되는 중요한 보건상의 문제이다. 중추신경계는 납중독시에 가장 민감한 반응을 보이는 장기의 하나로서, 납의 신경 독성에 관하여는 거의 200여년 전부터 알려져 왔으나 납의 신경독성의 정확한 기전에 관하여는 아직도 많은 연구가 필요한 실정이다(Silbergeld, 1992).

최근의 연구 결과, 사람에게 있어서 과거에는 비교적 안전하다고 생각되었던 납의 혈중농도에서도 어린이들의 지능 및 학습능력 저하와 행동이상이 초래된다고 알려짐으로써(Bellinger *et al.*, McMichael *et al.*, 1988), 중추신경 독작용을 일으킬 수 있다고 인정되는 납의 혈중농도가 이전보다 더 낮아지고 있다(Needleman *et al.*, 1990).

실험동물에 납 중독을 유발하였을 때, 신경계의 병리적 소견으로서 신경세포의 퇴행성 변화, 탈수초화, 신경교증(gliosis), 출혈, 부종 등이 초래되며(Verity, 1990; Bellinger *et al.*, 1991), 특히 생리적으로 학습과 기억에 중요한 역할을 수행하는 해마(hippocampus)에 있어서 세포층의 두께, 해마의 최고 넓이 및 치상회(dentate gyrus)의 길이 등이 감소된다(Louis-Ferdinand *et al.*, 1978; Alfano *et al.*, 1982).

납중독의 특징으로서 어린이들의 지능 및 학습능력의 저하가 초래되는 바, 생리적으로 학습과 기억에 중요한 역할을 수행하는 해마에 대한 납의 작용에 관하여 많은 연구가 되어 왔다(Petit *et al.*, 1983). 배양된 해마 신경세포는 신경세포의 발달에 대한 독성물질의 작용을 연구할 수 있는 좋은 모델이나, 배양된 해마세포의 성장에 대한 납의 영향에 관하여는 아직 자세한 연구가 되어 있지 않은 상태이다.

본 실험에서는 해마 신경세포의 일차 배양을 이용하여 초기 신경세포의 발달에 대한 납의 영향을 관찰하고자, 일차 배양한 해마 신경세포에 납(lead acetate)을 처리하여 세포의 생존률, 신경돌기(neurite)의 성장(outgrowth) 및 해마 세포의 이동성(migration)을 측정하였다.

## 재료 및 방법

### 시약

Minimal essential medium(MEM)과 소 태아혈청(fetal bovine serum, FBS)은 Gibco 제품을 사용하였고, HBSS, trypsin, trypsin inhibitor, dimethylsulfoxide(DMSO), poly-L-lysine hydrobromide(mol. wt., 70,000-15,000), pyruvate, KCl, lead acetate 등은 Sigma 제품을, 기타 모든 시약은 특급 시약을 사용하였다.

### 실험동물

동일 조건하에서 사육한 생후 16주 이상된 Sprague-Dawley계 흰쥐를 사용하였다. 교배는 18~20시에 암컷 3~4마리가 든 쥐장에 수컷 1마리를 넣고 다음날 9~10시에 수컷을 분리시킨 후 암컷의 질도말(vaginal smear) 표본을 만들어 현미경(×200)으로 정자가 확인 되면 임신 0.5일로 하였다. 임신 18일 후에 흰쥐를 경추 탈구로 희생시키고, 가슴이하 부위를 70%(v/v) ethanol에 담구어 소독한 후 배위로 고정하여 복부를 절개한 다음 자궁을 적출

하였다. 자궁을 Hank's balanced salt solution(HBSS)에 옮긴 후 무균상자 안에서 태아를 분리하여 입체 해부현미경 하에서 수술용 메스(No. 10)를 사용하여 해마 부위를 잘라내었다.

### 신경세포의 배양

본 실험에서는 Mattson과 Kater(1988)의 방법을 변형하여, 태령 18일 된 흰쥐(Sprague-Dewley)의 해마 신경세포를 일차 배양하였다. 즉 위에서와 같이 쥐 태아의 뇌에서 취한 해마 부위를 잘게 자른 후, 상온에서 15분간 0.2% trypsin처리하고 HBSS로 2회 세척한 다음, 0.2% trypsin inhibitor로 15분간 반응시키고, pipet을 사용하여 세포를 완전히 분리하여, 8% DMSO와 10% FBS를 함유한 MEM 내에서  $-70^{\circ}\text{C}$ 로 보관하였고, 이것을 해동하여 본 실험에 사용하였다. 배양액은 MEM+10% FBS에 1 mM pyruvate와 15 mM KCl을 첨가하여 사용하였다. 35 mm 배양접시를 poly-L-lysine( $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ )으로 도포하고 실온에서 30분간 정치시킨 후, 잔여 poly-L-lysine을 제거하고 무균 증류수로 2회 세척한 다음 세포를  $100\ \text{cell}/\text{mm}^2$ 의 밀도로 4시간 배양한 후에 신선한 10% FBS-MEM 배지로 교체하여 5%  $\text{CO}_2$  및 포화습도 하의 항온기( $37^{\circ}\text{C}$ )에서 배양하였다. 배양된 세포는 Zeiss Axiovert 35형 역상 위상차현미경으로 관찰하였다.

### 초산 납(lead acetate)의 처리

배양 4시간 후 초산 납(lead acetate) 용액을 0, 1, 3, 10 그리고  $30\ \mu\text{M}$  농도로 배지에 첨가한 후 3일간 배양하였다.

### 세포생존률 및 신경돌기 성장(neurite outgrowth)의 측정

배양 4시간 후 배지 교체시간을 0시간으로 하고, 정상군과 납처리군(1, 3, 10,  $30\ \mu\text{M}$  초산납)으로 구분하여 24시간 주기로 동일 부위를 3회 (3일간) 촬영하였다. 배양접시 당 4~5개의 시야를 무작위로 골라 200배로 촬영하였으며, 신경돌기(neurite)의 길이가 세포체 길이 이상의 세포를 세어 0시간을 기준으로 생존율을 산출하였다. 신경돌기의 길이는 영상분석기(IBAS, Kontron)를 통해 측정하였다(Mattson *et al.*, 1988).

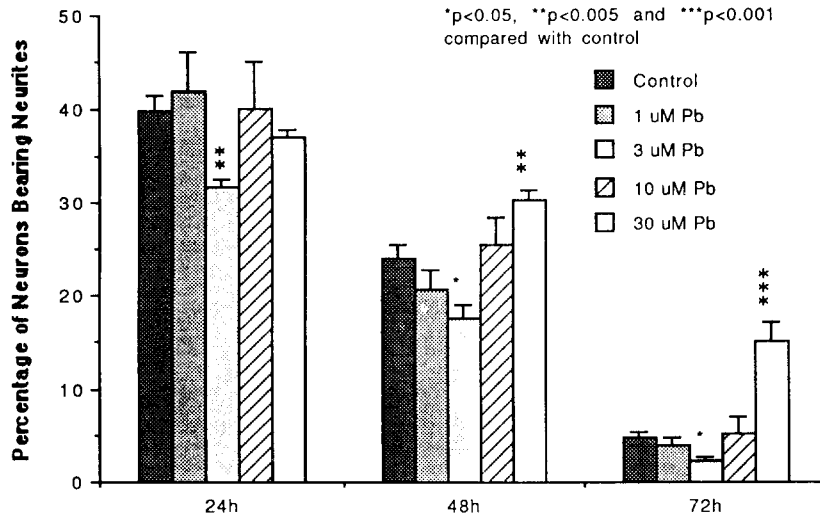
### 신경세포 이동의 측정

역상 위상차 현미경(Axiovert 35, Zeiss)을 이용하여 동일 부위를 24시간 간격으로 배양접시 당 6~8시야를 사진 촬영하였으며, 24시간과 48시간에 촬영한 각각의 현상된 필름을 포개어 이동한 세포의 수와 거리를 측정하였다. 이동한 세포의 수는 세포체 직경의 2배 이상 움직인 세포를 세어 산출하였다.

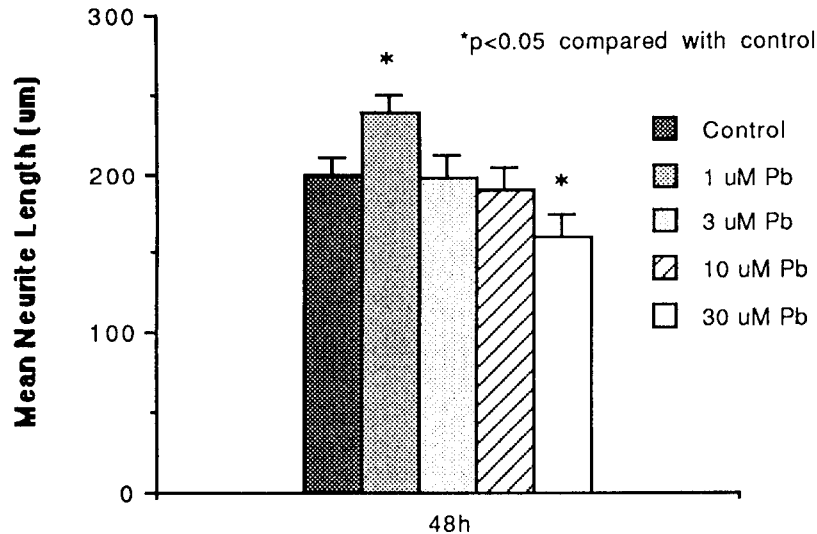
## 결 과

대조군의 배양된 해마 신경세포는 한 개의 긴 축삭(axon)과 3~5개의 수상돌기(dendrite)를 가지는 다극성(multipolar) 세포가 약 70~80%, 이극성(bipolar) 세포가 약 20~30%를 차지하였다.

신경돌기의 길이가 세포체 길이 이상의 것을 기준으로 하여 생존율을 측정한 바, 대조군에서는 24시간에 40%, 48시간에 23%였으며, 72시간에 4%로 감소하였다.  $1\ \mu\text{M}$  농도의 납에서는 24시간에 생존율의 변화가 없었으나, 48시간, 72시간에는 생존율이 감소하는 경향을 나타내었으며  $3\ \mu\text{M}$  농도의 납에서는 24시간부터 72시간까지 계속 유의한 감소를 나타내었다. 한편  $10\ \mu\text{M}$  및  $30\ \mu\text{M}$  농도에서는 24시간에는 별 영향이 없었으나 48시간부터 오히려 농도 의존적으로 증가하여 72시간에서는 대조군보다 약 3배 가량의 생존율을 나타내었다(그림 1).



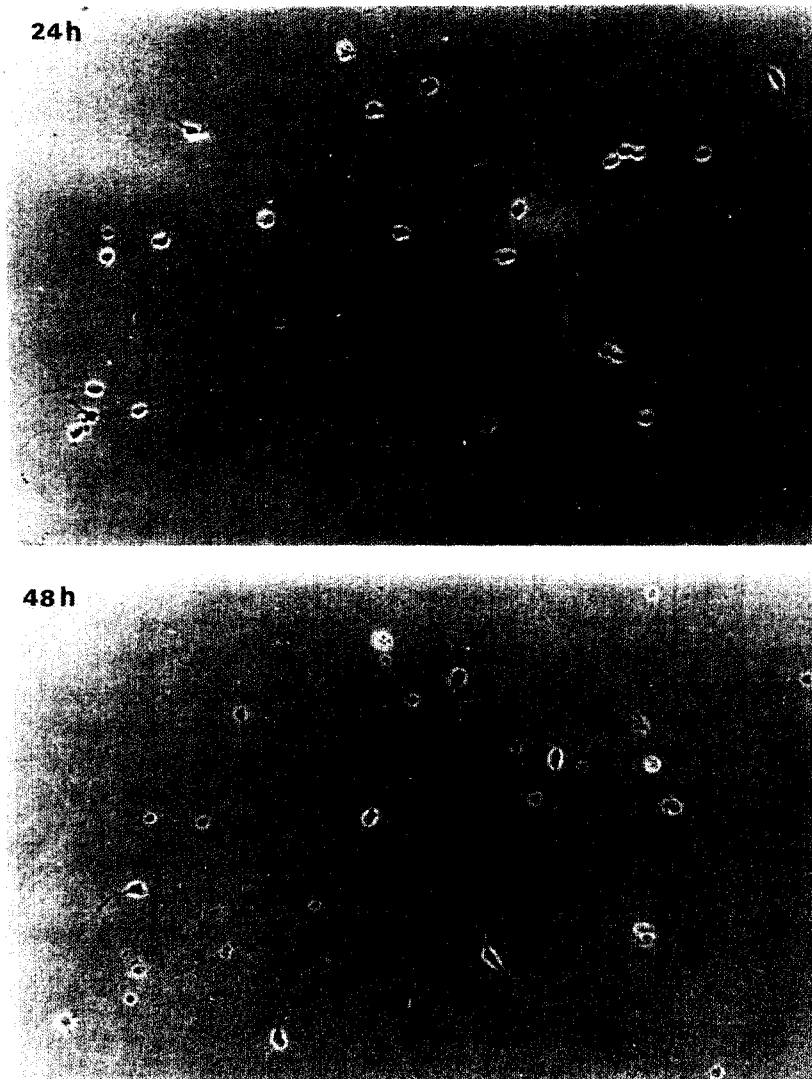
**Figure 1.** Effects of lead acetate on the neuronal survival in the rat hippocampal cultures. Various concentrations of lead acetate were added to culture media 4 h after plating and neuronal survival was measured at 24 h, 48 h, and 72 h. Data are expressed as a percentage of matched control cultures. Results are mean  $\pm$  SE of 4-6 experiments.



**Figure 2.** Effects of lead acetate on the neurite outgrowth in the rat hippocampal cultures. Various concentrations of lead acetate were added to culture media 4 h after plating and mean neurite length was measured at 48 h. Results are mean  $\pm$  SE of 3-4 experiments.

한편, 대조군에서 배양 48시간이 지난 후 측정된 세포당 축삭(axon)과 수상돌기(dendrite)의 길의 합은 평균 200  $\mu\text{m}$ 이었다. 1  $\mu\text{M}$  농도의 납에서는 약간의 유의한 증가가 있었으나 3  $\mu\text{M}$ 과 10  $\mu\text{M}$ 에서는 영향이 없었으며 30  $\mu\text{M}$ 에서는 유의하게 감소하였다(그림 2).

한편, 본 실험을 진행하던 중에 예상하지 못하게 납에 노출된 다극성 신경세포가 대조군과 비교하여 볼 때, 배양 접시위에서 그 이동성이 증가하는 현상을 관찰하였다(그림 3). 즉, 대조

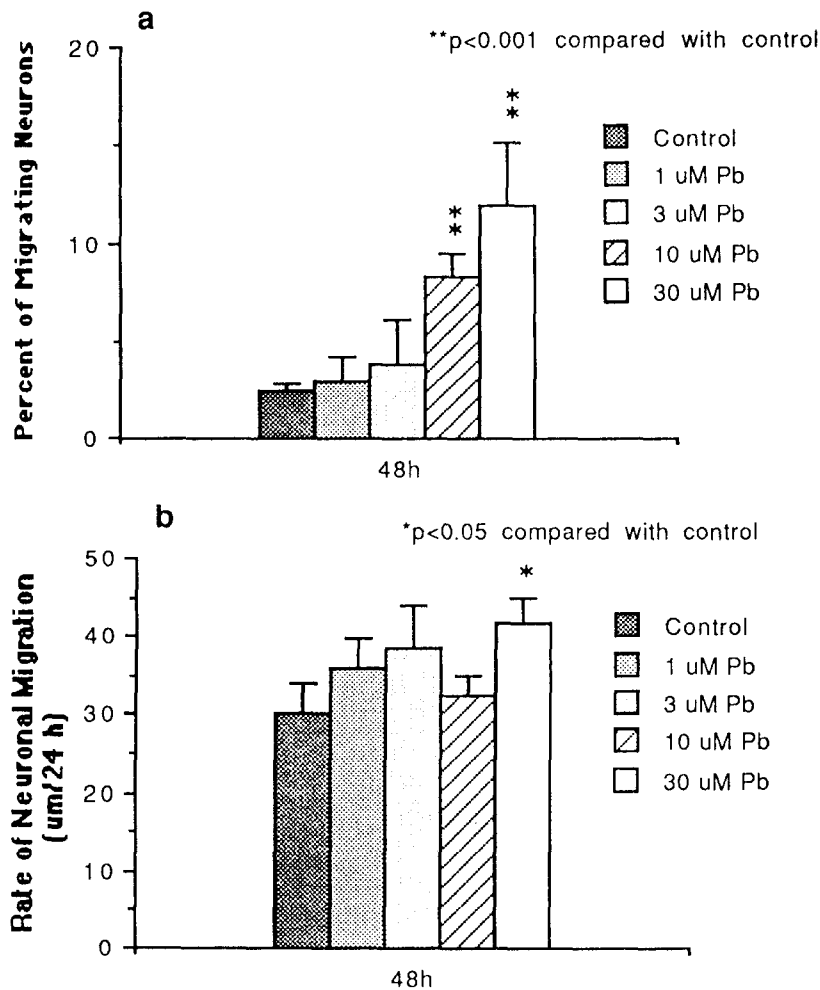


**Figure 3.** Upper and lower photomicrographs show the same field from a culture in which hippocampal neurons were grown on a poly-L-lysine substrate with  $10 \mu\text{M}$  lead acetate. Over the 24 h interval between the two frames, there were extensive movements of the cells.

군에서는 약 3%의 세포가 24시간과 48시간 사이에 그 세포체 만큼의 거리를 이동하였으나, 납에 노출된 군에서는 세포체의 이동(migration)을 나타낸 세포의 수는 납의 농도에 의존적으로 증가하여,  $10 \mu\text{M}$ 에서는 대조군의 약 2배,  $30 \mu\text{M}$ 에서는 대조군의 약 3배로 증가하였다(그림 4a). 각각의 신경세포가 이동한 속도는 노출된 납의 농도에 의존하여 증가하는 양상을 보였으며  $30 \mu\text{M}$  농도에서는 유의한 증가를 나타내었다(그림 4b).

## 고 찰

지금까지 배양상에서 신경세포의 신경섬유의 발달에 대한 납의 작용에 관한 연구 보고로는



**Figure 4.** Effects of lead acetate on migration of rat hippocampal neurons. Various concentrations of lead acetate were added to culture medium 4 h after plating and analysis of migrated neurons was carried out by superimposing two frames at 24 h interval (between 24 h and 48 h). Data are expressed as the percentage of number of migrated cells (number of migrating multipolar neurons/total number of multipolar neurons) (a) and the rate of neuronal migration per 24 h measured between successive frames (b). Result are mean $\pm$ SE of 5-6 experiments.

조류 및 달팽이의 신경세포(Audesirk *et al.*, 1989), 해마 및 neuroblastoma 세포주(Audesirk *et al.*, 1991) 등에서 실험 대상인 세포 종류에 따라 매우 다양한 변화를 보인다는 보고가 있다.

중추신경계에 대한 납의 독작용 기전은 아직 불명확하나, 그중 생체내에서 생리적으로 중요한 역할을 하는 이온들과의 상호작용으로 독작용을 나타낸다는 설이 유력하게 제기되고 있다(Bressler and Goldstein 1991). 이중에서 특히  $Ca^{2+}$ 와의 상호작용으로 생체내에서  $Ca^{2+}$ 과 선택적으로 경쟁하여  $Ca^{2+}$ 의 생리적 작용을 방해한다는 가설에 대한 여러 실험적 증거들이 있다(Silbergeld *et al.*, 1974; Atchison *et al.*, 1984; Cooper *et al.*, 1984). 이는 최근에 밝혀진  $Ca^{2+}$ 의 생리적 세포내 신호전달 경로에 있어서 중요한 second messenger로서의 역할과, 병리적으로

細胞死(cell death)의 최종적 매개체라는 역할에 그 근거를 두고 있다.

한편 신경세포의 발달에 있어서, 각 신경섬유의 성장 및 그 형태를 결정하는 기전에 관하여는 아직도 불명확한 바가 많은 실정이나, 세포내  $Ca^{2+}$ 의 농도가 결정적인 역할을 한다는 설이 유력하게 제기되고 있다(Kater and Mattson, 1989). 즉  $Ca^{2+}$ 의 세포내 유입을 억제하는 여러 약물들이 각각의 신경세포에 있어서 신경섬유의 성장을 조절한다는 증거들로부터 신경섬유의 성장에 최적 범위의 세포내  $Ca^{2+}$ 가 있을 것이라는 가설이 제기되고 있다(Kater *et al.*, 1988). 한편 납의  $Ca^{2+}$ 과의 상호작용에 관하여도 세포막의  $Ca^{2+}$  통로를 통한  $Ca^{2+}$ 의 세포내 유입을 납이 방해함으로써 신경세포에서 독작용을 미칠 것이라는 실험적 증거들이 보고되고 있다(Bus-selberg *et al.*, 1991).

본 실험에서 흰쥐 해마 신경세포의 생존률이  $3 \mu M$ 의 납에서는 감소하였으나, 10 및  $30 \mu M$  농도에서는 오히려 증가하였다(그림 2). 이는 저농도에서는 납의 고유의 독작용이 나타났으나, 고농도에서는 납이  $Ca^{2+}$ 의 세포내 유입을 억제함으로써 생존율이 증가되었다고 사료된다.

또한 배양 48시간이 지난 후 세포당 축삭과 수상돌기의 길이의 합에 있어서  $1 \mu M$  농도의 납에서의 약간의 유의한 증가와,  $30 \mu M$ 에서의 유의한 감소(그림 3)는 납이 농도 의존적으로 칼슘의 세포내 유입을 억제함으로써 세포내  $Ca^{2+}$ 의 농도가 저하된 결과로 사료된다.

한편, 중추신경계의 초기 발달과정에 있어서 신경세포의 이동은 신경교세포와의 밀접한 상호작용으로 이는 소뇌 및 대뇌 피질에서 Rakic(1971, 1972, 1990)이 자세히 밝힌 바 있다. 신경교세포와의 직접적인 접촉이 없이 laminin의 존재하에서도 *in vitro*에서의 배양 신경세포의 이동이 일어남이 최근 보고된 바 있다(Liang and Crutcher, 1992). 그러나 상기의 연구자들은 poly-L-lysine 위에서는 신경세포의 이동을 관찰할 수 없었다고 보고하고 있다. 본 실험에서 관찰한 바와 같은 납에 의한 poly-L-lysine 위에서의 신경세포의 이동은 지금까지 문헌상에 보고된 바 없는 현상으로서 그 기전은 불명하나, 만약 발달과정 중인 뇌에서도 이와 같은 현상이 일어난다면 초기 해마조직의 발달에 현저한 영향을 미칠 수 있을 것으로 사료되며 그 생리적인 중요성에 관하여 앞으로 더 자세한 연구가 필요하리라 사료된다.

이상의 결과를 종합하면 납은  $1 \mu M$ 에서  $30 \mu M$ 의 농도에서 배양 해마 신경세포의 생존과 신경섬유의 성장에 二相性(biphasic) 효과를 보여 저농도에서는 생존의 감소, 신경섬유의 성장 촉진, 고농도에서는 생존의 증가, 신경섬유의 성장감소를 나타내었다. 또한 납은 해마 다극세포의 이동성을 농도 의존적으로 현저히 증가하였다. 배양상에서의 이와 같은 납의 작용에 관하여 그 자세한 기전 및 생리적 의의에 관하여는 앞으로 더 추구해야할 과제라고 사료된다.

## 결 론

영아 및 소아에 있어서 지능 및 학습능력 저하와 행동이상을 초래하는 납의 생리적으로 학습과 기억에 중요한 역할을 수행하는 해마(hippocampus)에 대한 독작용을 규명하기 위하여, 본 실험에서는 해마 신경세포의 일차 배양을 이용하여 초기 신경세포 분화시 신경독성 유발물질인 납이 미치는 영향을 확인하고자 하였다. 일차 배양한 해마 신경세포에 초산 납(lead acetate)을 처리하여 세포의 생존률, 신경돌기의 성장(neurite outgrowth), 또한 해마 다극세포의 이동성(migration)을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 납은  $1 \mu M$ 에서  $30 \mu M$  사이에서 배양 해마 신경세포와 생존과 신경섬유의 성장에 二相性(biphasic) 효과를 보였다. 즉 저농도에서는 생존의 감소, 신경섬유의 성장촉진, 고농도에서는 생존의 증가, 신경섬유의 성장감소를 나타내었다.

2. 납은 해마 다극세포의 이동성을 농도 의존적으로 현저히 증가시켰다.

이와 같은 납의 작용에 관하여 그 자세한 기전과 생리적, 독성학적 의의에 관하여는 앞으로 더 추구해야할 과제라고 사료된다.

## 감사의 말씀

본 연구에 있어서 영상분석기를 사용하도록 허락해 주신 한림의대 병리학교실 박영의 교수님과 해부학교실 최월봉 교수님께 깊은 감사드립니다. 본 연구는 한림대학교 교내 학술연구비에 의해 수행되었습니다.

## 참 고 문 헌

- Alfano, D.P., LeBoutillier, J.C. and Petit, T.L.(1982): Hippocampal mossy fiber pathway development in normal and postnatally lead-exposed rats. *Exp. Neurol.*, **75**, 308-319.
- Atchison, W.D. and Narahashi, T.(1964): Mechanism of action of lead on neuromuscular junctions. *Neurotoxicol.*, **5**, 267-282.
- Audesirk, G., Shugarts, D., Nelson, G. and Przekwas, J. (1989): Organic and inorganic lead inhibit neurite growth in vertebrate and invertebrate neurons in culture. *In vitro Cell. Dev. Biol.*, **25**, 1121-1128.
- Audesirk, T., Audesirk, G., Ferguson, C. and Shugarts, D. (1991): Effects of inorganic lead on the differentiation and growth of cultured hippocampal and neuroblastoma cells. *Neurotoxicol.*, **12**, 529-638.
- Bellinger, D., Leviton, A., Rabinowitz, M., Allred, E., Needleman, H. and Schoenbaum, S. (1991): *Enviromental Research*, **54**, 151-158.
- Bellinger, D., Leviton, A., Waternaux, C., Needleman, H. and Rabinowitz, M. (1987): Longitudinal analyses of prenatal and postnatal lead exposure and early cognitive development. *N. Engl. J. Med.*, **316**, 1037-1043.
- Bressler, J.P. and Goldstein, G.W. (1991): Mechanisms of lead neurotoxicity. *Biochem. Pharmacol.*, **41**, 479-484.
- Busselberg, D., Evans, M.L., Rahmann, H. and Carpenter, D.O. (1991): Lead and zinc block a voltage-activated calcium channel of Aplysia Neurons. *J. Neurophysiol.*, **65**, 786-795.
- Cooper, G.P., Suszikiw, J.B. and Manalis, R.S. (1984): Heavy metals: effects on synaptic transmission. *Neurotoxicol.*, **5**, 247-266.
- Kater, S.B., Mattson, M.P., Cohan, C. and Connor, J. (1988): Calcium control of growth cones, *TINS*, **11**, 315-321.
- Liang, S. and Crutcher, K.A. (1992): Neuronal migration on laminin *in vitro*. *Dev. Brain Res.*, **66**, 127-132.
- Louis-Ferdinand, R.T., D.R. Brown, S.F. Fiddler, *et al.* (1978): Morphometric and enzymatic effects of neonatal lead exposure in the rat brain. *Toxicol. Appl. Phamacol.*, **43**, 351-360.
- Mattson, P.M. and Kater, S.B. (1988): Isolated hippocampal neurons in cryopreserved long-term cultures: Development of neuroarchitecture and sensitivity to NMDA. *Int. J. Dev. Neurosc.*, **6**, 439-452.
- Mattson, P.M., Guthrie, P.B. and Kater, S.B. (1988): Intracellular messengers in the generation and degeneration of hippocampal neuroarchitecture. *J. Neurosci. Res.*, **21**, 447-464.
- McMichael, A.J., Baghurst, P.A., Wigg, N.R., Vimpani, G.V. (1988): Port Pirie Cohort Study: Environmental exposure to lead and children's abilities at the age of four



- years. *N. Engl. J. Med.*, **319**, 468-475.
- Needleman, H.L., Schell, A., Bellinger, D., Laviton, A. and Allred, E.N. (1990): The long-term effects of exposure to low doses of lead in childhood: an eleven year follow-up. *N. Eng. J. Med.*, **322**, 83-88.
- Petit, T.L., Alfano, D.P. and LeBoutillier, J.C. (1983): Early lead exposure and the hippocampus: a review and recent advances. *Neurotoxicol.*, **4**, 79-94.
- Rickic, P. (1971): Neuron-glial relationship during granule cell migration in developing cerebellar cortex. A Golgi and electronmicroscopic study in *Macacus rhesus*. *J. Comp. Neurol.*, **141**, 283-312.
- Rakic, P. (1972): Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J. Comp. Neurol.*, **145**, 61-84.
- Rakic, P. (1990): Principles of neural cell migration. *Experientia* **46**, 882-891.
- Silbergeld, E.K., Fales, F.T. and Goldberg, A.M. (1974): Lead: evidence for a prejunctional effect on neuromuscular function. *Nature Lond.*, **247**, 49-50.
- Silbergeld, E.K. (1992): Mechanisms of lead neurotoxicity, or looking beyond the lamp-post. *FASEB J.*, **6**, 3201-3206.
- Verity, A.M. (1990): Comparative observations on inorganic and organic lead neurotoxicity. *Environmental Health Perspectives*, **89**, 43-48.