

뇌간 신경세포 배양에서 세로토닌 분비에 대한 N-methyl-D-aspartic Acid(NMDA) 및 Non-NMDA 수용체 효현제들의 작용

한림대학교 의과대학 약리학교실

유순미 · 김율아 · 송동근 · 서홍원 · 김영희*

= Abstract =

Effect of N-methyl-D-aspartic acid(NMDA)-and Non NMDA-Receptor Agonists on Serotonin Release from Cultured Neurons of Fetal Rat Brainstem

Soon-Mi Yoo, Yul-A Kim, Dong-Keun Song,
Hong-Won Suh and Yung-Hi Kim*

Department of Pharmacology, College of Medicine,
Hallym University, Chunchon, Kangwon-Do 200-702, Korea

Serotonergic neurons in brainstem play important roles in the endogenous descending pain inhibitory system. To elucidate the involvement of glutamate receptors in the regulation of brainstem serotonergic neurons, we studied the effects of glutamate receptor agonists on 5-hydroxytryptamine(5-HT) release from cultured neurons of rat fetal(gestational age 14th day) brainstem. Cultured cells maintained for 10 days *in vitro* were stimulated for 30 minutes with agonists of glutamate receptor subtypes at 10-1,000 micromolar concentration. Glutamate(10-1,000 M) increased 5-HT release in a concentration-dependent manner. N-methyl-D-aspartic acid (NMDA)(10-1,000 μ M) increased 5-HT release in a concentration-dependent manner. Non-NMDA receptor agonists, kainate and AMPA(3-1,000 μ M) also concentration-dependently increased 5-HT release. These results suggest that both NMDA and non-NMDA receptors regulate 5-HT release from brainstem serotonergic neurons.

Key Words: Serotonin secretion, Brainstem culture, Glutamate, N-methyl-D-aspartic acid, Kainate, AMPA

초 록

뇌간의 세로토닌 신경계는 내재성 하행성 통통 억제계(endogenous descending pain inhibitory

system)에 있어서 중추적인 역할을 하고 있다. 뇌간의 세로토닌 신경세포에 대한 glutamate 수용체 중 N-methyl-D-aspartic acid-(NMDA-) 및 non-NMDA 수용체 효현제들의 작용을 알아보기 위하여, 쥐의 태자(태생 14일)로부터 뇌간을 분리

하여 10일 동안 배양한 후 5-hydroxytryptamine (5-HT)의 분비에 대한 각 glutamate 수용체 효현제들의 영향을 연구하였다. Glutamate를 10 μM 에서 1000 μM 까지 농도를 변화하여 30분 동안 배지에 가한 후, 배지내에 분비되는 세로토닌을 측정된 결과, 농도 의존적으로 세로토닌의 분비가 증가되었다. Glutamate 수용체 중에서 NMDA 수용체 효현제인 NMDA를 10 μM 에서 1000 μM 까지 농도를 변화하여 30분 동안 배지에 가한 후, 배지내에 분비되는 세로토닌을 측정된 결과, 농도 의존적으로 세로토닌의 분비가 증가되었다. Non-NMDA 수용체 효현제인 kainate 및 AMPA를 3 μM 에서 300 μM 까지 농도를 변화하여 배지에 처리한 결과, 각 효현제에 의해 농도 의존적으로 세로토닌의 분비가 증가됨을 관찰하였다. 이상의 연구결과, 쥐의 태자(태생 14일)로부터 분리하여 10일 동안 배양한 뇌간의 세로토닌 신경세포에 있어서 glutamate, NMDA, kainate 및 AMPA 모두 5-HT의 분비를 자극함으로써, NMDA- 및 non-NMDA 수용체 모두 5-HT의 분비에 관여하고 있음을 나타낸다.

서 론

뇌간의 세로토닌 신경계는 내재성 하행성 동통 억제계(endogenous descending pain inhibitory system)에 있어서 중추적인 역할을 하는 부위이다. 즉 중뇌의 periaqueductal gray로부터 연수의 raphe magnus 및 주위의 reticular nuclei로의 투사가 내재성 통증 조절에 매우 중요하며, 또한 연수의 nucleus raphe magnus에는 척수의 dorsolateral funiculus로 투사되는 5-HT 세포체가 많이 존재하며 이의 자극이 진통 유발에 특히 효과적이다(Fields and Basbaum, 1978; Olivera et al., 1979).

저자들은 뇌간의 세로토닌 신경세포 배양상에서 glutamate에 의한 세로토닌의 세포내 합량이 감소됨을 보고한 바 있다(Park et al., 1993). 본 연구에서는 내재성의 하행성 동통 억제계에 있어서 중

요한 작용을 하는 이들 세로토닌 세포가 밀집해서 존재하는 뇌간부분의 세로토닌 신경세포를 배양하여 세로토닌의 분비에 대한 glutamate 수용체 아형에 대한 각각의 효현제의 효과를 연구하였다.

재료 및 방법

1) 재 료

Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), pargyline HCl, 5-hydroxytryptamine(5-HT), glutamic acid, N-methyl-D-aspartic acid(NMDA), quisqualic acid는 Sigma(St. Louis, MO), AMPA HBr은 RBI(Natick, MA), Hank's balanced salt solution(HBSS)은 Gibco BRL에서 구입하여 사용하였다.

2) 뇌간 5-HT 신경세포의 배양

임신 14일 된 Sprague-Dawley fetal rat의 뇌간의 중간 1/3 부분(폭 2mm)을 절제하여 실험에 사용하였다. Pasteur pipette으로 기계적인 방법에 의하여 세포를 각각 분리시킨 다음, DMEM 액에 부유시켜 500~1,000 rpm으로 3분간 원심 분리하였다(Yamamoto et al., 1981). Defined N2 media(Bottenstein, 1983)를 함유한 DMEM으로 부유시키고 poly-L-lysine(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)이 처리된 24-multiwell plate에 세포농도 0.5×10^6 cells/well로 심고, 포화습도 하에서 5% CO_2 항온기(37°C)에서 배양하였다. 배양 2일 째에 cytosine arabinoside(10 μM)을 첨가하고 배양 4일째 부터 배양액을 3일 마다 교환하였다. 5-HT의 분비에 대한 실험에서 배양 10일 째에 monoamine oxidase 억제제인 pargyline이 30 μM 농도로 첨가된 HBSS로 교환하고 30분 동안 항온기(37°C)에서 노출시켰다.

3) 5-HT의 정량

Saller와 Salama(1984)의 방법에 준하여 high performance liquid chromatography-electrochemical detection(HPLC-EC) 법으로 5-HT를 측정하

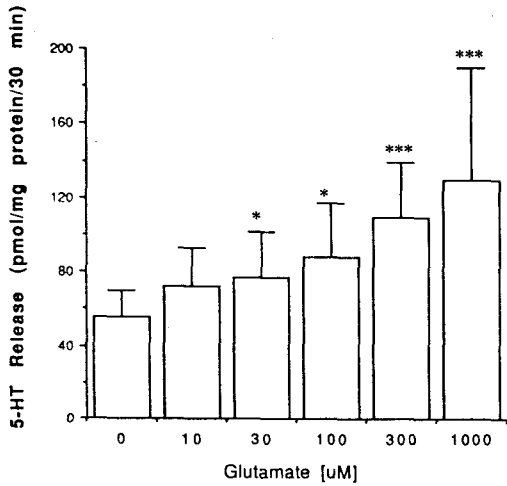


Fig. 1. Effect of glutamate on serotonin(5-HT) release from cultured neuronal cells from rat fetal brainstem. The cells(0.5 million cells/well) were treated with 1 ml of 10-1,000 μ M of glutamate. The 5-HT level was measured by HPLC. The vertical bars indicate the standard error of the mean(*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$ compared to control; $n=3$ independent experiments).

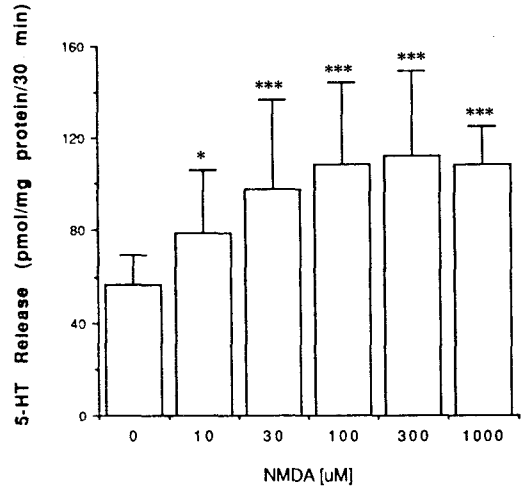


Fig. 2. Effect of N-methyl-D-aspartic acid(NMDA) on serotonin(5-HT) release from cultured neuronal cells from rat fetal brainstem. The cells(0.5 million cells/well) were treated with 1 ml of 10-1,000 μ M of NMDA. The 5-HT level was measured by HPLC. The vertical bars indicate the standard error of the mean (*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$ compared to control; $n=3$ independent experiments).

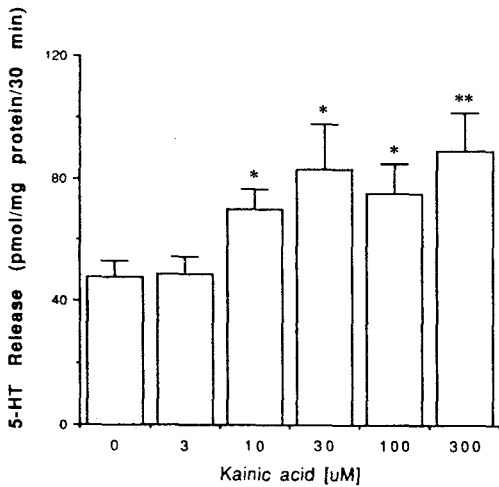


Fig. 3. Effect of kainic acid on serotonin(5-HT) release from cultured neuronal cells from rat fetal brainstem. The cells(0.5 million cells/well) were treated with 1 ml of 3-300 μ M of kainic acid. The 5-HT level was measured by HPLC. The vertical bars indicate the standard error of the mean(*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ compared to control; $n=3$ independent experiments).

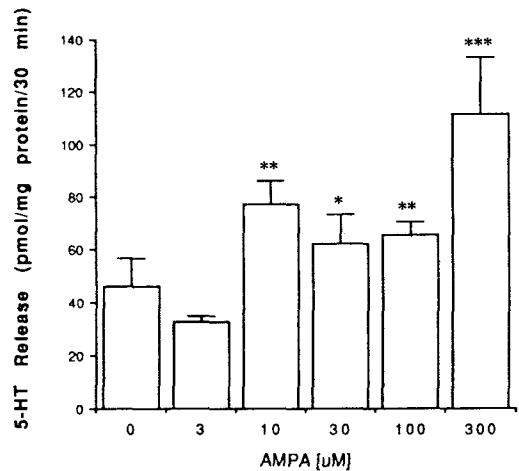


Fig. 4. Effect of AMPA on serotonin(5-HT) release from cultured neuronal cells from rat fetal brainstem. The cells(0.5 million cells/well) were treated with 1 ml of 3-300 μ M of AMPA. The 5-HT level was measured by HPLC. The vertical bars indicate the standard error of the mean(*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$ compared to control; $n=3$ independent experiments).

였다. 검색 약물에 30분간 노출후 배지(HBSS)를 취하여 원심 분리한 후 상등액을 0.45 μm Milipore HV-4 filter로 여과한 후 25 μl 를 $\text{C}_{18}\mu\text{-Bondapak column}$ (Waters)에 주입하였다. 검출기의 전압은 Ag/AgCl 기준 전극에 대해 0.55 V로 유지하고 이동상은 sodium octanesulfonic acid(1 mM), disodium EDTA을 함유한 0.5 M monobasic sodium phosphate(pH 3.7)/10% acetonitrile으로 하였다. 유속은 1 ml/min으로 하였다(Park et al, 1993). 결과는 means \pm S.E.로 표시하였으며 통계적 유의성은 Student's t-test로 검정하였다.

결과 및 고찰

뇌간 신경세포를 10일 동안 배양한 후, 흥분성 신경전달물질인 glutamate를 10 μM 에서 1,000 μM 까지 농도를 변화하여 30분 동안 배지에 가한 후, 배지내에 분비되는 세로토닌을 측정된 결과, 농도 의존적으로 세로토닌의 분비가 증가되었다(Fig. 1). Glutamate 수용체 중에서 NMDA 수용체 효현제인 NMDA를 10 μM 에서 1,000 μM 까지 농도를 변화하여 30분 동안 배지에 가한 후, 배지내에 분비되는 세로토닌을 측정된 결과, 농도 의존적으로 세로토닌의 분비가 증가되었다(Fig. 2). Non-NMDA 수용체 효현제인 kainate 및 AMPA를 3 μM 에서 300 μM 까지 농도를 변화하여 배지에 처리한 결과, 각 효현제에 의해 농도 의존적으로 세로토닌의 분비가 증가되는 결과를 얻었다(Fig. 3, 4). 이상의 연구결과, 쥐의 태자(태생 14일)로부터 분리하여 10일 동안 배양한 뇌간의 세로토닌 신경세포에 있어서 glutamate, NMDA, kainate 및 AMPA 모두 5-HT의 분비를 자극함으로써, NMDA- 및 non-NMDA 수용체 모두 5-HT의 분비에 관여하고 있음을 나타낸다. 본 실험 결과, glutamate 및 glutamate 수용체 아형의 효현제에 대한 serotonin 분비의 증가는 periaqueductal

gray로부터 nucleus raphe magnus로의 투사가 glutamatergic neuron에 의한다는 연구결과(Beitz, 1990)를 뒷받침하는 결과이다.

감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단 특정기초 연구비(92-29-00-11)의 지원으로 이루어졌음.

참 고 문 헌

- Beitz A: *Relationship of glutamate and aspartate to the periaqueductal gray-raphé magnus projection: analysis using immunocytochemistry and microdialysis*. *J Histochem Cytochem* 38: 1755-1765, 1990
- Bottenstein J: *Defined media for dissociated neural cultures*. *Curr Methods Cell Neurobiol* 4: 107-130, 1983
- Fields HL and Basbaum AI: *Brainstem control of spinal pain - transmission neurons*. *Ann Rev Physiol* 40: 193-221, 1978
- Oliveras JL, Guilbord G and Besson JM: *A map of serotonergic structures involved in stimulation producing analgesia in unrestrained freely moving cats*. *Brain Res* 164: 317-322, 1979
- Park SW, Wie MB, Song DK, Kim YS and Kim YH: *Glutamate-induced serotonin depletion in fetal rat brainstem cultures*. *Korean J Pharmacol* 29: 189-193, 1993
- Saller CF and Salama AI: *Rapid automated analysis of biogenic amines and their metabolites using reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrochemical detection*. *J Chromatogr* 309: 287-298, 1984
- Yamamoto M, Steinbusch HWM and Jessel TM: *Differentiated properties of identified serotonin neurons in dissociated cultures of embryonic rat brain stem*. *J Cell Biol* 91: 142-154, 1981