

신경세포 배양법을 이용한 methamphetamine과 cadmium의 신경독성 평가

조대현* · 김준규 · 정 용 · 이봉훈 · 김은엽 · 김정구 · 조태순¹ · 김진석² · 문화회
식품의약품안전본부 독성연구소 독성부, ¹성균관대학교 약학대학, ²건국대학교 수의과대학

Neurotoxicity Assessment of Methamphetamine and Cadmium Using Cultured Neuronal Cells of Long-Evans Rats

Dae Hyun Cho*, Jun Gyou Kim, Yong Jeong, Bong Hun Lee, Eun Youb Kim, Jeong Goo Kim, Tai Soon Cho¹, Jin Suk Kim² and Hwa Hwey Moon

Department of Toxicology, Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-020, Korea

¹College of Pharmacy, Sung Kyun Kwan University, Seoul 110-745, Korea

²College of Veterinary Medicine, Kon-Kuk University, Seoul 133-701, Korea

(Received May 3, 1996)

(Accepted May 15, 1996)

ABSTRACT : Primary culture of cerebellar neuronal cells derived from 8-day old Long-Evans rats was used. Pure granule cells, astrocytes or mixed cells culture systems were prepared. These cells were differentiated and developed synaptic connections. And the astrocytes were identified by immunostaining with glial fibrillary acidic protein (GFAP). Methamphetamine (MAP), which acts on dopaminergic system and cadmium (Cd), a toxic heavy metal, were applied and biochemical assays and electrophysiological studies were performed. LC_{50} values estimated by MTT assay of MAP and Cd were 3 mM and 2 μ M, respectively. Cells were treated with 1 mM or 2 mM MAP and 1 μ M CdCl₂ for 48 hour, and the incubation media were analyzed for the content of released LDH. MAP (2 mM) and Cd significantly increased the LDH release. Cell viability was decreased in both groups and some cytopathological changes like cell swelling or vacuolization were seen. The cerebellar granule cells were used for measuring membrane currents using whole-cell clamp technique. Sodium and potassium currents were not affected by MAP neither Cd, but calcium current was significantly reduced by Cd but not affected by MAP. Therefore, *in vitro* neurotoxicity test system using neuronal cells and astrocytes cultures were established and can be used in screening of potential neurotoxic chemicals.

Key Words : Neurotoxicity, Methamphetamine, Cadmium, Cerebellar granule cell, Astrocyte, Neuronal cell culture, LDH, Whole cell clamp

I. 서 론

최근 산업의 발달로 산업환경화학물질, 의약품, 식품첨가물, 농약 및 화장품 등 새로운 화학 물질이 생성되고 있으며, 이러한 물질들이 인체에 미치는 독성을 정확히 평가하는 것이 사회적으로 중요한 과제가 되고 있다. 따라서 이러한 물질들의 독성을 조기에 검색하고, 독성 유발기전을 규명하여 독성감소의 효과를 얻을 수 있게 하는 시험법의 개발은 필수적이다.

현재까지는 이러한 독성시험의 대부분이 *in vivo*로 행해지고 있으나 *in vivo* 독성시험법은 대량의 실험동

물 사용, 과다한 인력자원과 경비 및 장기간의 시간이 소요될 뿐만 아니라 독성의 정량화가 어렵고 실험자의 주관에 따라 결과가 판정될 수도 있으며, 항상 일정 조건으로 시험계를 확립하기 어렵다는 단점을 갖고 있다. 이에 비하여 배양세포 등을 이용한 *in vitro* 독성평가는 상기 단점을 보완할 수 있을 뿐만 아니라 일정 조건에서 정확한 시험계를 확립시키는 것이 가능하고 독성을 정량적으로 평가할 수 있으므로 최근 선진외국에서는 독성시험법으로 많이 활용되고 있으나 우리나라에서는 아직 확립되어 있지 않은 실정이다.

또한 신경계는 다른 기관에 비해 다양한 세포들로 구성되어 있으며 특히 신경세포 사이의 synapse는 매우 복잡한 구조로 이루어져 있어 신경독성을 평가하는

*To whom correspondence should be addressed.

데 상당한 어려움이 따르고 있다. 신경독성학적 연구의 발달은 약물 투여에 의한 실험동물의 행동학적 연구와 고전적인 silver stain, Nissl stain 등의 조직염색을 통한 신경조직의 변화 검색방법 등을 통해 이루어졌고, 1970년대에 들어서면서 면역학 분야의 발달로 특이항체 제작과 단클론항체의 제작이 가능해지면서 면역염색법이 발달하게 되었다. 또한 이와 더불어 *in vitro* 신경세포 및 신경교세포의 배양법의 발달은 신경독성분야의 급속한 발달을 가져오게 되었다. 신경조직배양, 그리고 넓은 의미에서의 동물조직 배양은 1906년에 Harrison(1906)이 개구리 입과액중에서 올챙이 척수 소편을 배양하고 신경세포의 신생발육을 관찰함으로써 시작되었다. 이 간편하고 실용적인 조직배양법이 고안된지 90년이 지난 오늘날 각종 동물의 신경계 조직의 조직 배양이 광범위하게 사용되고 있다. 최근에 이르러 *in vitro* 모델이 신경독성물질의 독성을 단기간에 검색하는데 유용할 것으로 여겨짐에 따라 심도 있는 연구가 진행되고 있다. 그러나 *in vitro* 모델을 이용한 신경독성검색법을 개발하기 위해서는 우선적으로 신경세포 및 신경교세포 배양법의 확립이 요구되는데, 신경세포의 순수 배양은 뇌내 세포 유형의 극도의 다양성과 신경세포의 특징인 재생증식불능, 까다로운 배양조건 등으로 인해 아직 미진한 상태이며 현재 많은 연구자들에 의해 실험되고 있다.

본 실험에서는 신경세포(cerebellar granule cell)와 신경교세포(astrocyte)의 배양 기술을 확립하고 이를 바탕으로 주로 dopaminergic 신경세포에 독성을 나타내는 methamphetamine(MAP)과 중금속인 cadmium의 신경독성을 *in vitro* 상태에서 검색하고 그 기전을 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 섬유아세포(fibroblast)의 배양 및 SRB assay를 이용한 LC₅₀의 결정

임신 13.5일된 Long-Evans 랫드를 경추 탈구한 후 자궁을 적출하여 자궁막, 난황막, 태반을 제거하여 태자를 분리하였다. 태자에서 심장, 간장 등의 내장기관들을 제거하여 체조직(somatic tissue)을 이용하여 세포 배양을 하였다. 항생제(50 unit penicillin/ml과 50 µg streptomycin/ml)를 포함한 PBS(phosphate buffered saline)용액으로 2-3회 세척한 후 trypsin-EDTA용액으로 37°C에서 5분간 incubation하고, 10% FBS(fetal bovine serum)를 포함한 D-MEM(Dulbecco's modified Eagle's

media)으로 중화하여 1000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 상층액을 취하였다. 세포수를 count한 후 3×10^5 개/ml로 맞추는 후 37°C, 5% CO₂에서 배양하며 3-4일마다 계대배양하였다.

배양중인 섬유아세포의 각 well에 여러 농도의 methamphetamine과 cadmium에 폭로하여 48시간 동안 노출시킨 후 medium을 well에 부착된 세포가 떨어지지 않게 조심스럽게 버리고 생리식염수로 1회 세척한 후 15% TCA(trichloro-acetic acid) 용액을 가하여 4-5°C에서 1시간 동안 처리하였다. TCA 용액에 의하여 세포가 완전히 고정되면 TCA용액을 버리고 증류수로 5회 세척하고 완전히 말린 후 well당 1% acetic acid에 녹인 0.4% sulforhodamine B(SRB, Sigma Co., U.S.A.) 용액을 0.4 ml 씩 넣고 상온에서 1시간 동안 방치하였다. SRB 용액을 버리고 1% acetic acid로 과량의 SRB를 5회 세척한 후 건조시킨 다음, 10 mM Tris 용액으로 세포단백과 결합된 SRB dye를 녹여 microplate reader(Molecular Device, U.S.A.)를 사용하여 510 nm에서 optical density(O.D.)를 측정하여 각 농도에 따른 세포의 생존율을 측정하여 LC₅₀을 결정하였다.

2. 소뇌과립세포(cerebellar granule cell)의 배양

본 실험에서는 소뇌과립세포의 증식하는 단계의 생후 8일령의 rat를 사용하였으며 Levi의 실험 방법을 변형하여 실험하였다(Levi 등, 1989). 생후 8일령 된 Long-Evans 랫드를 70% ethanol에 담근 후 단두하여 solution A(NaCl 7.07, KCl 0.36, KH₂PO₄ 0.166, NaHCO₃ 2.14, glucose 2.57, phenol red 0.015(Krebs-Ringer bicarbonate medium, KRB + BSA 3 mg/ml MgSO₄ 1.2 mM)에 넣고 두개골을 열어 brain을 채취하였다. 대뇌와 연수, 교를 제거하여 순수하게 소뇌를 분리한 후 조심스럽게 meninges를 제거하였다. 분리된 소뇌를 0.4 mm 두께로 chopping한 후 total volume을 10 ml로 맞추고 150 g, 15초간 원심분리하고 상층액을 버리고 0.2 mg/ml의 trypsin이 들어 있는 solution A를 넣고 전체 부피를 10 ml로 맞추어 37°C에서 15분간 200 rpm으로 shaking하였다. 43 µg/ml DNase type I와 414 µg/ml soybean trypsin inhibitor를 2 ml 첨가하여 150 g 15초간 원심분리하고 상층액은 버린 후, pellet에 80 µg/ml DNase type I와 0.52 mg/ml trypsin inhibitor, 2.7 mM MgSO₄가 포함된 2 ml solution A를 넣고 pipette으로 분쇄하여 15분간 방치하였다. 상층액(약 1.5 ml)을 취한 후 모아진 상층액을 3 mg/ml BSA, 2.4 mM MgSO₄, 0.1 mM CaCl₂를 포함한 3 ml의 KRB에

넣고 resuspension한 후 10분간 방치한 다음 상층액 (95% volume)을 취한 후 10분간 방치하고 침전물이 보이지 않으면 150 g로 10분간 원심분리하고 culture medium으로 resuspension하였다. 그 후 poly-L-lysine이 처리된 6-well plate에 각 well당 2 ml (2×10^6 개)씩 넣고 37°C, 5% CO₂가 유지되는 incubator에서 배양하였다. 48시간 배양한 후 cytosine arabinoside(well당 4 μ l)를 넣어 glial cell을 제거하였다.

3. Astrocyte 배양

본 실험에서는 Cole과 de Vellis(1992)의 방법을 변형하여 실시하였다. 생후 1-2일령의 Long-Evans 랫드를 70% ethanol에 담근 후 단두하고 두개골을 제거하고 뇌를 분리하였다. 다시 대뇌만을 HBSS(Hank's balanced salt solution)에서 분리한 후 DME/F12(serum free) medium으로 옮겨 200 μ m Nitex mesh로 분쇄하고 100 μ m Nitex mesh로 filter한 후 1000 g로 5분간 원심분리하였다. 그 후 15×10^6 cell/75 cm²로 세포수를 조정하고 75 cm² culture flask에서 7-8일간 배양한 다음 200 rpm에서 6시간 shaking후 상층액을 버려 macrophage를 제거하였다. 그 후 다시 200 rpm에서 18시간 동안 원심분리하여 상층액을 버려 oligodendrocyte를 분리해 내고, 24시간 shaking후 남아 있는 astrocyte를 trypsin-EDTA로 처리한 후 80g로 centrifuge하여 4×10^5 cell/35 mm petri-dish로 세포수를 조정하여 다음 배양하였다.

4. 시험물질 및 투여약물 조제

Methamphetamine HCl(MAP, Sigma Co., U.S.A.), cadmium chloride(Cd, Sigma Co., U.S.A.)를 증류수에 용해 조제하여 filtration을 통해 멸균하여 사용하였다. 각 시험 물질의 투여량은 섬유아세포 배양의 경우 MAP는 1, 2, 3, 4, 5 mM을 Cd는 1, 2, 4, 8, 16 μ M을 투여하였고, 신경세포배양의 경우에는 MAP는 0.25, 0.5, 1, 2, 4 mM, Cd는 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2 μ M을 투여하였다.

5. Colorimetric MTT assay

MTT test는 mitochondrial succinate dehydrogenase의 효소 활성을 측정하여 mitochondria의 안전성과 세포 생존율을 검색하는 시험법이다. 사용한 방법은 Mosmann(1983)의 방법을 변형하여 실험을 실시하였

다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetazolium-bromide(MTT, Sigma Co., U.S.A.)를 PBS에 용해시켜 5 mg/ml의 MTT solution을 만든 후 filtration을 통해 멸균시키고, HCl을 isopropanol과 혼합하여 0.04 N acid-isopropanol을 준비하였다.

약물처리 24시간 후 medium을 well당 1 ml 씩만 남겨 놓고 MTT solution을 100 μ l/well씩 넣고 37°C에서 4시간 동안 배양한 후, acid-isopropanol을 100 μ l/well씩 넣고 dark blue crystal이 녹을 때까지 흔들여 주었다. 그 후 96 well plate에 solution을 옮기고 570 nm에서 microplate reader(Molecular Device, U.S.A.)를 사용하여 각 농도에서의 optimal density(O.D.)를 측정하였다.

6. LDH(lactic dehydrogenase) assay

약물처리 후 세포 손상에 의해 medium으로 유리되는 LDH의 활성을 측정하였다. Methamphetamine과 cadmium에 48시간 노출시킨 medium을 100 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 LDH assay kit(Sigma Co., U.S.A.)를 이용하여 LDH에 의해 NADH가 증가하는 양으로 측정하였다. LDH는 lactate, NAD와 반응하여 pyruvate와 NADH가 되며 이때 생성되는 NADH 양의 변화로 LDH leakage 정도를 측정하였다. 각 well의 medium 150 μ l를 취하여 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액 100 μ l를 취하여 미리 37°C로 가온시킨 lactate와 NAD 혼합액 1 ml에 가하여 UV spectrometer를 사용하여 wavelength 340 nm에서 1분 동안의 UV absorbance의 변화를 측정하였다. 결과는 LDH leakage(unit/l)를 산출한 뒤 % control로 표시하였다.

7. 소뇌과립세포 세포막을 통한 이온전류 측정

배양 7일째 소뇌과립세포를 이용하여 whole cell clamp법을 이용하여 신경세포막을 통한 이온전류를 측정하였다. 세포배양은 well내에 coverslip을 넣어 배양한 후 이 coverslip을 기록용 chamber에 옮겨 기록하였다. Glass pipette을 microelectrode puller(PP-83, Narishige, Japan)와 microforge(MF-83, Narishige, Japan)를 이용, 저항이 3-10 M Ω 이 되도록 전극을 제작하였다. 세포의 용액(bath solution)의 이온 조성은 NaCl 120, KCl 5, CaCl₂ 2.5, MgCl₂ 1, D-glucose 10, HEPES 10 mM(pH 7.4 titration with NaOH)이었고, pipette 내부 용액의 이온 조성은 KCl 140, CaCl₂ 1, MgCl₂ 2, EGTA 11, HEPES 10 mM(pH 7.4 titration with KOH)이었다. Sodium 전류의 차단을 위해서는 위 이온 조성

에서 sodium을 choline으로 대체하였으며 potassium 전류의 차단을 위해서는 TEA(tetraethyl ammonium)을 첨가하여 사용하였다. 또한 calcium 전류의 측정시 세포내 증가된 calcium 이온에 의한 calcium channel의 run-down을 막기 위해 calcium을 barium으로 대체하였다.

Whole cell clamp는 일반적으로 알려진 방법을 사용하였다(Hamil 등, 1981). 전극을 세포막에 부착시키고 전극내 음압을 걸어 gigaohm seal을 형성시킨 후 다시 음압을 가해 전극 tip부위의 세포막을 터뜨려 whole cell preparation을 만들었다. 기록되는 신호는 amplifier (Axopatch-200, Axon Instrument, U.S.A.)를 통해 증폭하고 5 kHz로 filter하고 10 kHz로 interface를 통해 PC에 저장하였다. 전류 신호의 발생, 기록된 신호의 저장 및 분석은 pClamp(V 5.5, Axon Instrument)를 사용하였다.

III. 결 과

1. 소뇌과립세포(cerebellar granule cell) 신경교세포(astrocyte) 배양

배양한 소뇌과립세포는 증식 및 분화가 진행되어 배양 3일째부터 neuritic process를 내기 시작하여 배양 5일째에는 인접 세포와 synapse를 형성하였고 이후 synapse의 발달로 배양 10일경에는 synaptic process가 bundle을 형성하고 여러 세포들간의 synapse로 neuronal network를 형성하였다. 배양된 세포의 구성을 확인한 결과 98% 이상 순수한 소뇌과립세포를 배양하였으며 이들 신경세포는 6주 이상 생존 가능하였다(Fig. 1a).

Astrocyte의 경우에도 분화와 증식을 진행하여 process를 내었으며 95% 이상 순수한 astrocyte를 배양하였으며 이들 배양세포는 6주간 생존 가능하였다(Fig. 1b). 또한 astrocyte는 특이 marker인 glial fibrillary acidic protein(GFAP)에 대한 면역염색으로 확인할 수 있었다(Fig. 1c).

2. Methamphetamine과 cadmium이 섬유아세포(fibroblast)의 생존율과 형태에 미치는 영향

MAP의 경우 각 농도별 생존율을 측정한 결과 1 mM에서는 79.4%, 2 mM 77.0%, 3 mM 57.1%, 4 mM 41.1%, 5 mM은 13.0%였다. 이를 토대로 결정한 LC₅₀은 3.2 mM이었다. Cd의 경우 1 μM에서는 29.2%, 2 μM 25.7%, 4 μM 15.9%, 8 μM 11.4%, 16 μM은 4.9%로 LC₅₀은 4 μM이었다. 형태학적 변화 양상은 MAP 투여

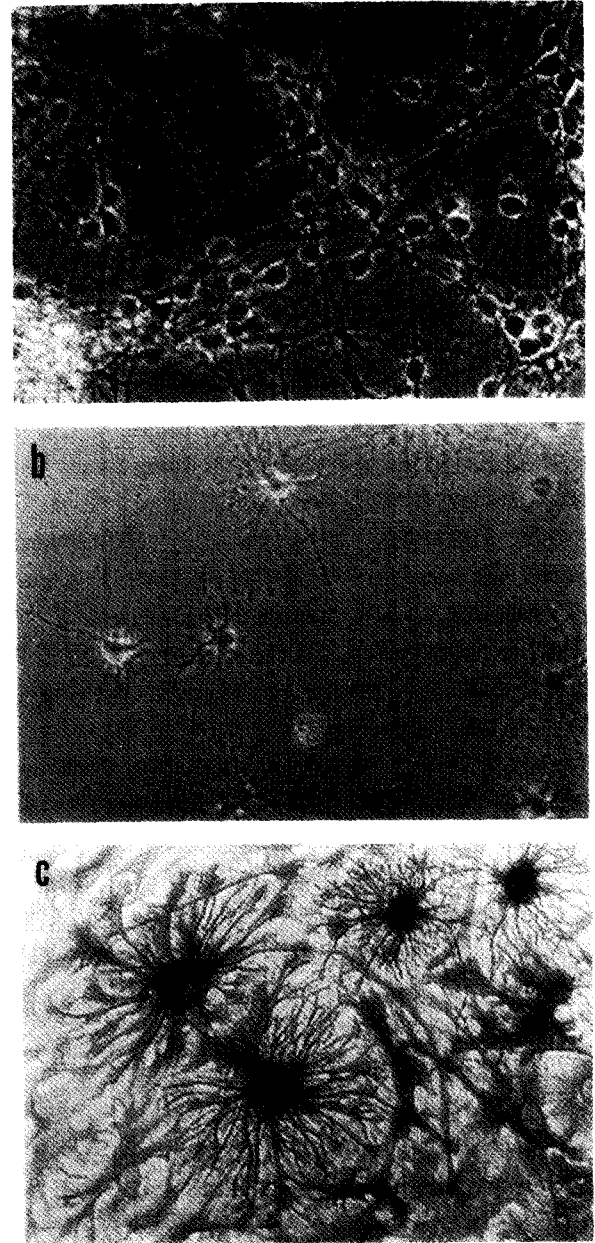


Fig. 1. Photomicrographs of primary cultured cerebellar granule cells and astrocytes a: Cerebellar granule cells after 7 days *in vitro*. b: Astrocytes after 7 days *in vitro*. c: Astrocytes were immunostained on GFAP.

군은 세포내에 과도한 공포(vacuolization)를 형성하였고(Fig 2a), Cd은 세포외형을 소실하여 세포막의 손상 및 세포골격의 파괴 소견을 나타내었다(Fig. 2b).

3. Methamphetamine과 cadmium이 소뇌과립세포(cerebellar granule cell)의 생존율에 미치는 영향

MAP의 경우 0.25 mM에서는 95.2%, 0.5 mM에서는

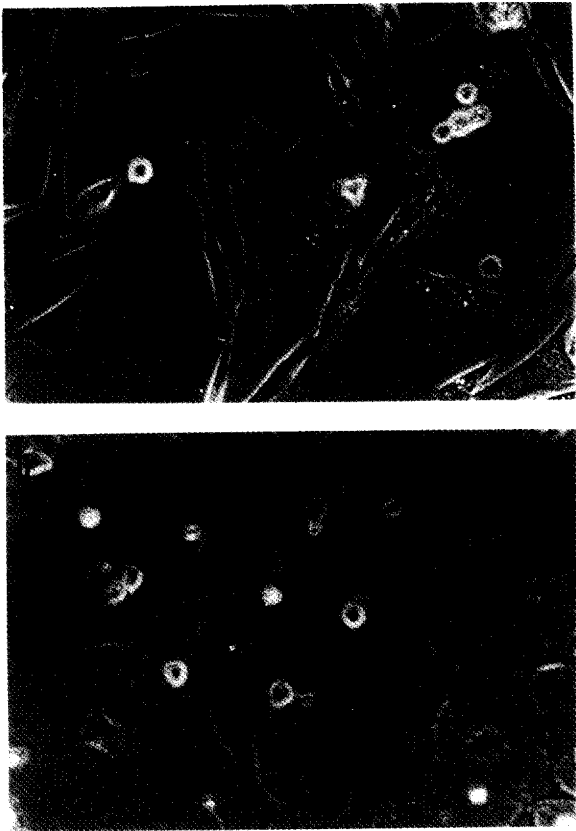


Fig. 2. Photomicrographs of cultured fibroblasts treated with methamphetamine and cadmium. a: Fibroblasts treated with MAP (5 mM) for 48 hours. b: Fibroblasts treated with CdCl₂ (4 μM) for 48 hours.

75.6%, 1 mM에서는 64.4%, 2 mM에서는 56.0%, 4 mM에서는 48.9%가 생존하여 LC₅₀은 3 mM이었고 (Fig. 3), Cd는 0.125 μM에서는 93.7%, 0.25 μM에서는 88.3%, 0.5 μM에서는 75.2%, 1 μM에서는 65.1%, 2 μM에서는 52.1%가 생존하여 LC₅₀은 2 μM이었다 (Fig. 4).

4. Methamphetamine과 cadmium이 LDH(lactic dehydrogenase) leakage에 미치는 영향

Methamphetamine을 0.5, 1, 2, 4 mM의 농도로, cadmium은 0.5, 1, 2, 4 μM의 농도로 처리하여 48시간 노출된 medium의 LDH의 활성을 측정하였다. Methamphetamine의 경우 0.5 mM에서는 대조군의 100.5%, 1 mM에서는 95%로 별 영향을 미치지 않았지만 2 mM에서는 119%, 4 mM에서는 158%로 유의하게 LDH의 활성이 증가하여 methamphetamine에 의한 세포독성으로 LDH의 leakage가 일어남을 알 수 있었다(Fig. 5).

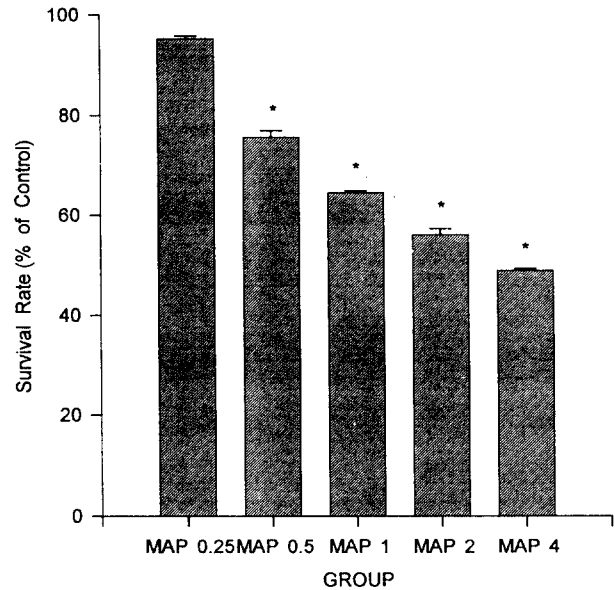


Fig. 3. Effects of MAP treated for 48 hr on cerebellar granule cells estimated by MTT assay. Values are expressed as means ± S.D. *: significantly different from control at $p < 0.05$.

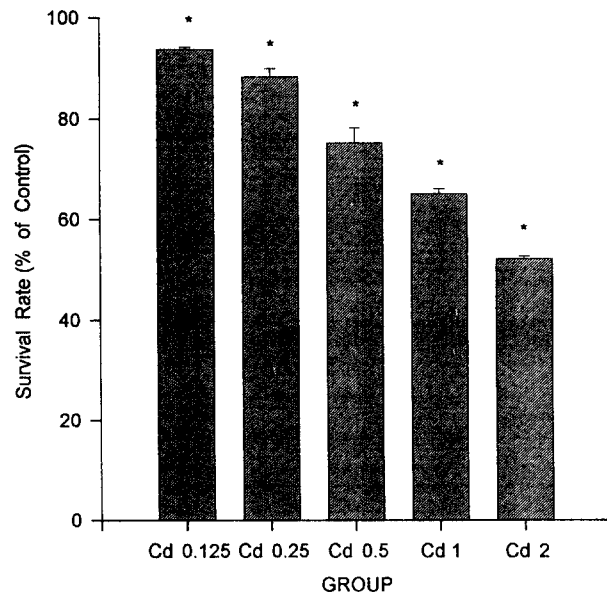


Fig. 4. Effects of Cd treated for 48 hr on cerebellar granule cells estimated by MTT assay. Values are expressed as means ± S.D. *: significantly different from control at $p < 0.05$.

Cadmium의 경우 0.5 μM에서 대조군의 129.7%, 1 μM에서 130.8%, 2 μM에서 135.6%, 4 μM에서는 138.6%로 모든 농도에서 LDH 활성이 대조군에 비해 유의하게 증가되었다(Fig. 6).

5. Methamphetamine과 cadmium이 세포막을 통한 이온 전류에 미치는 영향

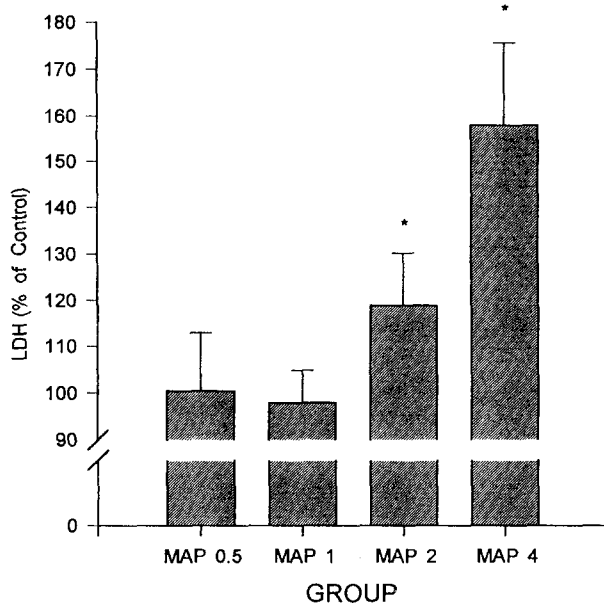


Fig. 5. Effects of MAP on LDH leakage in cerebellar granule cells. MAP was treated for 48 hr and the incubation media were analyzed. Values are expressed as means \pm S.D. *: significantly different from control at $p < 0.05$.

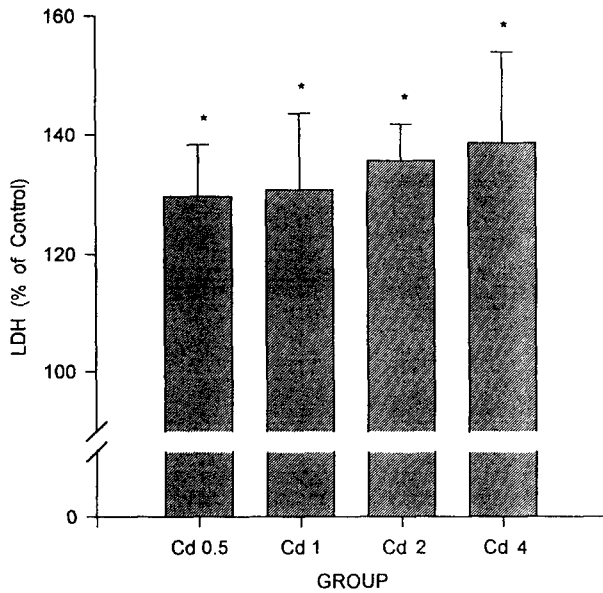


Fig. 6. Effects of Cd on LDH leakage in cerebellar granule cells. Cd was treated for 48 hr and the incubation media were analyzed. Values are expressed as means \pm S.D. *: significantly different from control at $p < 0.05$.

배양된 소뇌과립세포의 세포막을 통한 이온전류를 whole cell clamp 방법으로 측정하였다. 주어진 용액 상태에서 소뇌과립세포의 안정막전압(resting membrane potential)은 -70 mV에서 -60 mV 사이에 위치하였다. Whole cell clamp 방법으로 막전압을 고정하여

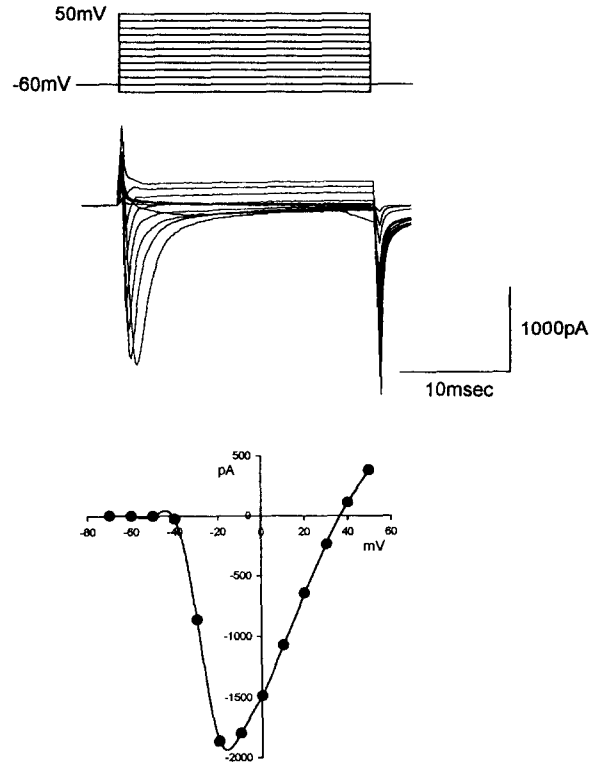


Fig. 7. Kinetics of sodium currents in cerebellar granule cells. a: Current evoked with pulses from holding potential of -60 mV to test potential of -70 mV to 50 mV in 10 mV steps. Outward potassium currents were blocked by tetraethylammonium. b: Peak sodium I-V relationship.

세포막을 통한 이온전류를 측정된 결과 소뇌과립세포에는 크게 내향성 전류와 외향성 전류가 측정되었다. Bath solution과 pipette내 용액의 이온 조성을 변화시켜 측정된 결과 내향 전류는 주로 sodium current와 calcium current이고 외향 전류는 주로 potassium current임을 알 수 있었다. 막전압을 -60 mV로 고정하고 -70 mV에서 +50 mV까지 10 mV의 간격으로 square pulse를 가했을 때 각각의 voltage level에서 기록되는 sodium(Fig. 7), potassium(Fig. 8) 및 calcium current(Fig. 9)의 양을 측정하여 current-voltage relationship을 구하였다.

각 시험 물질이 세포막을 통한 이온 전류에 미치는 영향을 알아보기 위해 직접 시험 물질을 노출시켜 변화하는 것을 측정하였다. Methamphetamine의 경우 0.5, 1, 2, 4 mM의 농도에서 각 current에 거의 영향을 미치지 않았다. Cadmium의 경우 0.5, 1, 2, 4 μ M에서 sodium 및 potassium current에는 별 영향을 미치지 않으나 calcium current의 양이 점차 감소함을 관찰할 수 있었고 10 μ M의 농도에서 약 32%까지 calcium current가 감소함을 관찰할 수 있었다(Fig. 9).

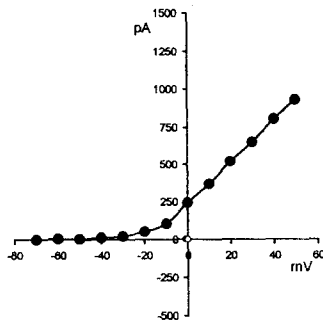
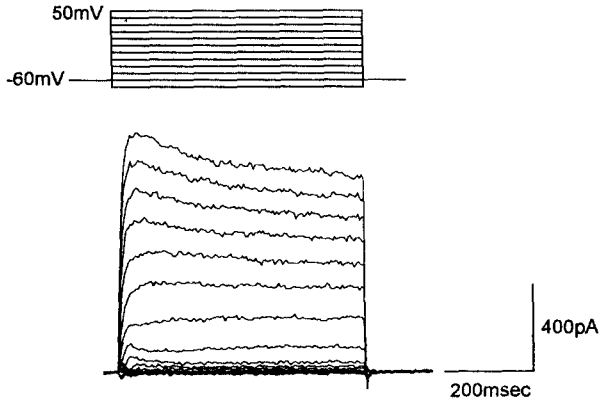


Fig. 8. Kinetics of potassium currents in cerebellar granule cells. a: Current evoked with pulses from holding potential of -60 mV to test potential of -70 mV to 50 mV in 10 mV steps. Inward sodium currents were blocked by substituting of NaCl with choline chloride. b: Peak potassium I-V relationship.

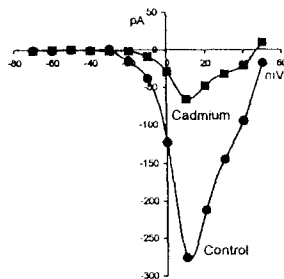
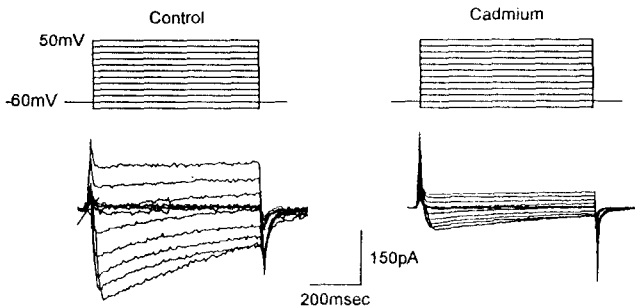


Fig. 9. Kinetics of calcium currents and effects of cadmium on calcium currents in cerebellar granule cells. a: Current evoked with pulses from holding potential of -60 mV to test potential of -70 mV to 50 mV in 10 mV steps. b: Calcium currents were reduced by external cadmium chloride (10 μ M). c: Calcium I-V relationship and effects of cadmium on it.

IV. 고 찰

새로운 화합물의 독성작용기전의 이해를 돕고, 그 물질의 독성을 검색하는데 *in vitro* 모델 시험 방법이 각광을 받기 시작하면서 신경독성분야에서도 이 방법의 활용이 심도 있게 연구되고 있다. *In vitro* 시험법의 가장 큰 장점 중의 하나는 동일한 조건하에서 화합물의 독성을 동물과 인간 모두에서 확인, 비교할 수 있다는 것이다. 또한 실험에 사용되는 동물 수와 실험 기간을 줄임으로써 비용 절감 효과를 볼 수 있다. 신경독성분야에서 *in vitro* 모델의 장점은, 첫째 신경화학적 분석이 가능하고, 둘째 chemical-defined 또는 serum-free 배지에서 장기간 생존이 가능하기 때문에 신경전달물질의 작용을 확인할 수 있고, 셋째는 blood-brain barrier를 거치지 않고 직접 target cell에 작용할 수 있다는 점 등 *in vivo* 모델에서의 제약을 극복하여 여러 실험을 시행할 수 있다. 때문에 *in vitro* 모델을 이용한 신경독성검색법을 개발이 요구되고 있어 이를 위해서는 우선적으로 신경세포 및 신경교세포 배양법의 확립이 요구되는데 신경세포의 순수 배양은 뇌내 세포 유형의 극도의 다양성과 신경세포의 특이인 재생증식불능, 까다로운 배양조건 등으로 인해 신경세포배양을 이용한 신경독성검색법 개발은 아직 미진한 상태이다. 신경세포의 다양성으로 인해 어느 특정 신경세포를 단일하게 순수 배양하는 것은 상당히 어렵다. 하지만 소뇌의 경우 부피는 중추신경계의 10%에 불과하나 전체 중추신경계에 존재하는 신경세포의 반수 이상이 존재하며, 또한 소뇌과립세포(cerebellar granule cell)는 소뇌 과립층에 약 10^{11} 개 정도로 모여 있어 대뇌 피질 전체보다 더 많은 수의 신경세포가 존재한다. 또한 다른 대부분의 신경세포가 출생 전 분화가 진행되는 것과 달리 출생 후 증식, 이동, 분화가 진화가 진행되는 장점이 있다(Seil과 Herndon, 1970; Ghez, 1991; Hatten과 Shelanski, 1988).

본 실험에서는 신경세포와 신경교세포의 배양 기술을 확립하여 *in vitro* 신경독성검색을 위해 활용하고자 신경세포의 배양법을 확립하고자 하여, 98%이상의 순수한 소뇌과립신경세포와 95%이상의 astrocyte를 분리, 배양하였다. 신경독성물질의 독성을 검색하기 위해서는 그 물질의 세포 독성을 배제한 적정 적용 농도를 결정하여야 하는데, 이를 위하여 먼저 섬유아세포를 배양하여 각 물질의 세포독성을 측정하였다. SRB assay를 이용하여 각 물질의 LC_{50} 을 측정하였는데, SRB(sulforhodamin B)는 음하전을 갖는 2개의 $-SO_3$ group이 있어, 생리적 pH하에서 양하전을 갖는 생체 분자에 결합하는 밝은

pink색의 염료로서, TCA(trichloroacetic acid)로 고정시킨 세포에 대한 결합 자리는 amino group이다. 즉, 단백질 착색제로서 세포단백질의 정량분석에 이용될 수 있고 또한 분석의 민감도와 세포수에 따른 직선관계를 신속 정확하게 측정할 수 있으며, 수용성이며 안정되고 가시적이어서 취급이 용이하고 생체 대사에도 무관하다는 장점이 있다. 따라서 본 세포 독성 실험에서의 세포 생존율 측정을 위한 착색제로서 사용하였다. 그 결과 MAP의 LC_{50} 은 3.2 mM이었고, Cd은 4 μ M이었다. 광학현미경상에서 관찰된 형태학적 변화 양상은 MAP는 세포내에 과도한 공포(vacuole)가 형성됨이 관찰되었고, Cd의 경우 세포의 외형을 소실하여 세포막의 손상 및 세포 골격의 파괴 소견을 보였다. 각 약물의 세포 독성 및 작용 기전을 바탕으로 배양된 소뇌과립세포에 대한 이들 약물의 신경독성을 colorimetric MTT assay를 통한 세포 생존율을 측정하였는데, colorimetric MTT assay의 장점은 분석에 소요되는 시간이 짧고 세척 단계를 거치지 않으며, 생체대사과정에 영향을 미치지 않기 때문에 sample 간 변이도를 최소화할 수 있다는 점이다. 그 결과는 세포의 생존율이 MAP의 경우 0.5 mM이상의 농도에서 유의성 있게 감소했으며, Cd는 0.25 μ M이상의 농도에서 유의성 있게 감소하였다. 그리고 소뇌과립세포의 LC_{50} 은 MAP가 3 mM, Cd가 2 μ M이었다. MAP는 섬유아세포의 LC_{50} 값과 비교할 때 MAP의 신경독성 수준은 세포독성의 수준과 비슷하나, Cd의 경우는 2배의 차이를 보여 특이적인 신경세포 독성이 있음을 알 수 있었다. 그러나, 알려진 바와 같이 MAP의 경우 그 target세포가 주로 dopaminergic 세포이고 소뇌과립세포는 주로 inhibitory neurotransmitter인 GABA를 가지고 있으므로, 소뇌과립세포에 대한 독성의 검색만으로는 MAP의 신경독성이 비특이적인 세포독성이라 할 수는 없을 것이다. 실제로 신경세포주(neuronal cell line)를 이용한 실험에서 신경세포 비특이적인 endpoint에는 별 영향 없이 신경세포 특이적인 endpoint에는 영향을 줄 수 있음이 보고되었다(Huang 등, 1993). 이러한 점이 *in vivo* 실험에 비해 *in vitro* 실험의 한계점이라 할 수 있을 것이다. LDH leakage에 의한 세포독성의 검색에서 예상한 바와 같이 투여한 농도에 의존적으로 증가함을 보여 주고 있다. Methamphetamine에 비해 Cd은 LC_{50} 값인 2 μ M보다 훨씬 적은 0.5 μ M부터 유의적인 증가를 나타내어 생존세포에서도 손상이 진행되고 있음을 알 수 있었다.

Whole cell clamp method를 이용하여 소뇌과립세포의 세포막을 통한 이온전류를 측정하였다. 세포막에

존재하는 ion channel은 신경세포의 활성도를 결정하는 역할을 하게 된다. 신경독성물질이 이들 ion channel에 영향을 미치게 되면 신경세포의 기능의 장애를 일으키게 된다. Ion channel의 종류는 투과성에 따라 sodium, potassium, calcium 그리고 chloride channel로 구분하고 각각은 조절 양상이나 kinetics에 따라 다시 여러 종류로 구분된다. MAP의 경우 기본적으로 dopamine 신경말단에서 dopamine의 release를 증가시키며 중추신경계에서 catecholamines, serotonin 및 substance P 등의 신경전달물질에 다양한 영향을 미친다고 알려져 있다. 따라서 신경전달물질, 특히 dopamine의 대사와 turnover rate에 영향을 미쳐 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 실험에서 보듯이 ion channel에는 직접적인 영향을 미치지 않는 것으로 보인다. Cd는 대표적인 중금속으로 신경독성에 관한 최초의 보고로는 De Simon(1893)에 의해 개와 고양이에게 Cd의 투여가 통증에 의한 반사와 감각이 소실됨을 보였으며, 이후에 랫드에서 newborn시 노출된 Cd에 의해 운동수행능력이 변화함이 보고되었다(Rastrogi 등, 1977). 실제로 Cd에 노출되는 공장 근로자들을 대상으로 조사한 바에 의하면 소변내 Cd의 농도가 높은 낮은 근로자보다 작업 집중, 작업수행능, 기억의 수행이 떨어짐을 조사한 바 있다(Hart 등, 1989; Beliles, 1994). Cd이 신경독성을 일으키는 기전에 대해서는 여러 가능성이 제시되고 있다. 우선은 본 실험의 결과에서 보듯이 Cd이 신경세포막에 존재하는 calcium channel에 영향을 주어 나타날 수 있다. Cd은 calcium과 마찬가지로 2가의 금속으로 일반적으로 2가의 양전하를 가진 금속들 즉 magnesium(Mg^{++})이나 lead(Pb^{++}), nickel(Ni^{++}) 등은 모두 calcium channel을 block하는 효과를 가지고 있다고 한다(Seabrook 등, 1989; Hille, 1992; Nicotera와 Rossi, 1993). 본 실험에서도 Cd에 의해 calcium current가 감소함을 볼 수 있었고 kinetics로 보아 이는 voltage dependent calcium channel로 보인다. 또한 Cd는 신경계에 존재하는 여러 enzyme에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. Mitochondrial MAO-A(monoamine oxidase-A)의 활성을 억제하며 높은 농도에서는 MAO-B의 활성도 억제한다(Leung 등, 1992). 그리고 calmodulin-dependent phosphodiesterase의 활성을 억제함이 보고되었고(Vig 등, 1991) brain synaptosomal plasma membrane을 이용한 실험에서 acetylcholinesterase와 adenylate cyclase의 경우 초기에는 그 활성이 감소하나 이후 증가한다고 하며 세포막에도 영향을 미쳐 lipid peroxidation이 증가하고 membrane fluidity가 감소함이 보고되었다(Fasitas 등, 1991). 또한 Cd은 신경세포에 직접 영향을

미칠 뿐 아니라 glial cell의 분화 및 증식에 영향을 미쳐 간접적으로 신경세포에 작용을 한다(Stark 등, 1992).

이상의 결과들을 볼 때 MAP와 Cd는 서로 다른 기전으로 신경독성을 나타냄을 알 수 있다. 소뇌과립세포에서 나타나는 MAP의 신경독성은 일반 세포 독성과 정도가 비슷하여 신경 특이적인 독성이라기 보다는 세포 독성의 기전으로 일어나는 것으로 여겨진다. Cd의 경우는 신경세포 특이적인 독성을 나타내는데 그 기전으로는 calcium channel의 차단이 일부 관여하리라 생각된다. 세포내 calcium은 신경전달물질의 유리, calmodulin과 calcium/calmodulin dependent protein kinase을 통한 여러 enzyme, ion channel, cytoskeleton의 조절, 더 나가 유전자 발현의 조절 등 매우 중요한 역할을 수행한다(Barrit, 1992; Cheek, 1993). Calcium channel의 차단이 일어나게 되면 세포내 calcium ion 농도가 감소되는데 이는 직접적으로 활동전압(action potential) duration의 감소, 신경전달물질 유리의 감소의 작용이 일어난다. 일반적으로 신경세포의 독성이 나타날 때 calcium ion 농도의 증가에 의한 기전을 들고 있다. Seizure, 저산소증, 저혈당이나 외상에 의한 뇌의 손상으로 glutamate와 같은 흥분성 신경전달물질이 과도하게 분비되게 되면 이는 NMDA receptor 등을 통하여 세포내 calcium ion 농도를 증가시킨다. 과도하게 증가된 calcium은 protein kinase C, phospholipase나 xanthine oxidase를 통하여 free radical의 생성, protease의 활성화 등으로 세포손상을 가져오게 된다(Choi, 1988). 따라서 Cd에 의한 calcium channel 차단으로 인한 calcium ion 농도 조절의 이상은 이러한 기전에 의한 직접적인 독성이 아니라 신경세포 기능의 장애를 초래하는 독성을 나타낸다고 하겠다. 그리고 Cd에 의한 신경세포독성은 이외에 언급한 바와 같이 직접 세포내 여러 enzyme이나 cell membrane에 영향을 미쳐 독성을 유발하리라 생각된다.

신경조직은 그 구조의 복잡성, 구성 세포의 다양성으로 인해 신경독성의 추정이 매우 어렵다. 즉 개개의 신경독성물질마다 서로 다른 기전으로 서로 다른 부위에 작용을 나타내기 때문에 이를 검색하는데는 많은 어려움이 따른다. 특히 신경계의 세포들은 외형뿐 아니라 대사 과정, 독성물질에 대한 노출 정도 등이 상이하기 때문에 이러한 모든 점들을 하나의 system으로 반영하기는 어렵다. 신경독성을 나타내는 물질은 크게 metal과 solvent류, 농약 계열, 향정신성 약물들 및 흡입성 기체와 여러 자연 유래의 독물 등으로 구분할 수 있다(Abou-Donia, 1992). 이들이 나타내는 신경독성의 기전으로는 현재 oxygen free radical에 의한 것(LeBel,

1991), glutamate와 같은 excitatory amino acid에 의한 toxicity(Choi, 1988; Bruno 등, 1993; Schouboe 등, 1994)와 이와 관련된 calcium homeostasis의 변화(Bondy, 1991)나 여러 signal transduction에의 영향(Castoldi 등, 1994) nitric oxide에 의한 손상(Lipton 등, 1993; 1994), 손상 초기 *c-fos*와 같은 immediate early oncogene들의 발현(Cole 등, 1989)등이 거론되고 있다. 따라서 이들에 의한 다양한 기전으로 일어나는 신경독성을 검색하는데는 많은 어려움이 따른다. 더욱이 lead의 경우에서 보듯이 연령에 따라 나타나는 신경독성이 상이할 경우에 대한 고려도 포함되어야 한다(Silbergeld, 1992). 이런 점의 보완을 위해서 여러 모델과 다양한 endpoint가 필요할 것이다. 따라서 현재 이용되고 있는 신경독성의 방법에는 복합적인 방법이 제시되고 있다(Veronesi, 1992; Becking, 1992). 또한 생체의 신경계에는 blood-brain barrier가 존재하기 때문에 외부에서 투여된 물질이 실제로 뇌에의 노출 여부가 다르기 때문에 이에 대한 보완도 필요할 것이다. 때문에 *in vitro* 모델을 이용할 경우 시험 물질의 lipid solubility와 같은 물리화학적 특성의 분석을 통해 blood-brain barrier의 투과 정도에 대한 정보와 여러 parameter를 종합하여야 신경독성 예상 물질들의 독성을 검색할 수 있으리라 사료된다. 본 실험의 결과 소뇌과립세포와 astrocyte 배양법을 이용한 *in vitro* 단기 신경독성시험법의 하나로 확립하였고, 추후 세포 및 분자 수준에서의 신경독성작용 규명의 기초 자료로 이용될 수 있으리라 사료된다. 그러나 *in vivo*와 *in vitro* 사이에는 엄연히 실험 환경의 차이가 존재하므로 *in vitro* 실험의 결과를 그대로 *in vivo*로 외삽할 수 없기 때문에 이 차이를 배제하기 위한 연구가 계속 진행되어야 할 것이다.

참고문헌

- Abou-Donia, M.B. (1992): Neurotoxic agents. In *Neurotoxicology*. CRC Press, Florida, 363-505.
- Barritt, G.J. (1992): Calcium, In *Communication within animal cells*. Oxford University Press, Oxford, 193-230.
- Becking, G.C. (1992): Methodology in neurotoxicity-activities within the World Health Organization and International Programme on Chemical Safety. *Toxicol. Lett.*, 64-65, 203-208.
- Beliles, R.P. (1994): Cadmium. In Clayton G. D., and Clayton F. E. Eds. *Patty's industrial hygiene and toxicology*. 4th ed, Vol. 3, Part C. 1954-1967.
- Bondy, S.C. (1991): Intracellular calcium and neu-

- rotoxic events. *Neurotoxicol. Teratol.*, **11**, 527-531.
- Bruno, V., Scapagnini, U., and Canonico, P.L. (1993): Excitatory amino acids and neurotoxicity. *Func. Neurol.*, **8**, 279-292.
- Castoldi, A.F., Coccini, T., Rossi, A., Nicotea, P., Costa, L.G., and Tan, X.X. (1994): Biomarkers in environmental medicine: alterations of cell signalling as early indicators of neurotoxicity. *Func. Neurol.*, **9**, 101-109.
- Cheek, T.R. (1993): Calcium signalling and the triggering of secretion in adrenal chromaffin cells. In Taylor, C. W. Ed. *Intracellular messengers.*, Pergamon Press, Oxford, 427-446.
- Choi, D.W. (1988): Glutamate neurotoxicity and disease of the nervous system. *Neuron*, **1**, 623-634.
- Cole, A.J., Saffen, D.W., Barban, J.M., and Worley, P. F. (1989): Rapid increase of an immediate early gene messenger RNA in hippocampal neurons by synaptic NMDA receptor activation. *Nature*, **340**, 474-476.
- Cole, R., and de Vellis, J. (1992): Astrocytes and oligodendrocyte culture., In Fedoroff, S. and Richardson, A. Eds. *Protocols for neural cell culture.*, Human Press, Totowa, 65-80.
- Costa, L.G. (1994): Signal transduction mechanisms in developmental neurotoxicity: the phosphoinositide pathway. *Neurotoxicol.*, **15**, 19-27.
- De Simone, G. (1893): Sull'azione biologica del cadmio. *Incurabili.*, **8**, 867.
- Fasitas, C.D., Theocharis, S.E., Zoulas, D., Chrisimou, S., and Deliconstantinos, G. (1991): Time-dependent cadmium-neurotoxicity in rat brain synaptosomal plasma membrane. *Comp. Biochem. Physiol. C.*, **100**, 271-275.
- Ghez, C. (1991): The cerebellum in *Principles of Neural Science*, 3rd ed. (Kandel, E.R., Schwartz, J.H. and Jessel, T.M. (Eds), (Elsevier, New York), pp. 627-646.
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., and Sigworth, F.J. (1981): Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Arch.*, **391**, 85-100.
- Harrison, R. (1906): Observation on the living developing nerve fiber. *Anat. Rec.*, **1**, 116-124.
- Hart, R.P., Rose, C.S., and Hamer, R.M. (1989): Neuropsychological effects of occupational exposure to cadmium. *J. Clin. Exp. Neuropsychol.*, **11**, 933-943.
- Hatten, M.E. and Shelanski, M.L. (1988): Mouse cerebellar granule neurons arrest the proliferation of human and rodent astrocyte cells *in vitro*. *J. Neurosci.*, **8**, 1447-1453.
- Hille, B. (1992): Calcium channel in *Ionic Channels of Excitable Membranes 2nd ed.*, (Sinauer, Sunderland), pp. 83-114.
- Huang, J., Tani, H., Kato, K., and Hasimoto, K. (1993): Neurons and glial cell marker proteins as indicators of heavy metal-induced neurotoxicity in neuroblastoma and glioma cell lines. *Arch. Toxicol.*, **67**, 491-496.
- LeBel, C.P. (1991): Oxygen radicals: common mediators of neurotoxicity. *Neurotoxicol. Teratol.*, **13**, 341-346.
- Leung, T.K., Lim, L., and Lai, J.C. (1992): Differential effects of ions on type A and type B monoamine oxidase activities in rat brain and liver mitochondria., *Metab. Brain Dis.*, **7**, 139-146.
- Levi, G., Aloisi, F., Ciotti, M.T., Thangnipon, W., Kinsbury, A., and Balazs, R.: Preparation of 98% pure cerebellar granule cell culture., in *A dissection and Tissue Culture Manual of the Nervous System* (Shahar, A., de Vellis, J., Vernadakis, A., and Haber, B. (Eds), (Alan R. Liss Inc., New York), pp. 211-214.
- Lipton, S.A., Choi, Y.B., Pan, Z.H., Lei, S.Z., Chen, H. S., Sucher, N.J., Loscalzo, J., Singel, D.J., and Stamler, J.S. (1993): A redox-based mechanism for the neuroprotective and neurodegenerative effects of nitric oxide and related nitroso-compounds. *Nature*, **364**, 626-632.
- Lipton, S.A., Singel, D.J., and Stamler, J.S. (1994): Nitric oxide in the central nervous system. *Prog. Brain Res.*, **103**, 359-364.
- Mosmann, T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.*, 55-63.
- Nicotera, P., and Rossi, A. (1993): Molecular mechanisms of metal neurotoxicity. *J. Trace Elem., Electrolytes Health Dis.*, **7**, 254-256.
- Rastroggi, R.B., Merali, Z., Singhal, R.L. (1977): Cadmium alters behaviour and the biosynthetic capacity for catecholamines and serotonin in the neonatal rat brain. *J. Neurochem.*, **28**, 789.
- Rohrer, S.R., Shaw, S.M., and Lamar, C.H. (1978): Cadmium-induced endothelial cell alterations in the fetal brain. *Acta Neuropathologica*, **44**, 147.
- Schousboe, A., Frandsen, A., Whal, P., and Krosgaard-Larsen, P. (1994): Neurotoxicity and excitatory amino acid antagonists. *Neurotoxicol.*, **15**, 477-481.
- Seabrook, G.R., and Adams, D.J. (1989): Inhibition of neurally-evoked transmitter release by calcium channel antagonists in rat parasympathetic ganglia. *Br. J. Pharmacol.*, **97**, 1125-1136.

- Seil, F.J., and Herndon, R.M. (1970): Cerebellar granule cells *in vitro*. A light and electron microscope study. *J. Cell Biol.*, **45**, 212-220.
- Silbergeld, E.K. (1992): Mechanisms of lead neurotoxicity, or looking beyond the lamppost. *FASEB J.*, **6**, 3201-3206.
- Stark, M., Wolff, J.E., and Korbmacher, A. (1992): Modulation of glial cell differentiation by exposure to lead and cadmium. *Neurotoxicol. Teratol.*, **14**, 247-252.
- Veronesi, B. (1992): The use of cell culture for evaluating neurotoxicity. In Tilson, H. A. and Mitchell, C. L. Eds. *Neurotoxicology*, 21-49.
- Vig, P.J., Ravi, K., and Nath, R. (1991): Interaction of metals with brain calmodulin purified from normal and cadmium exposed rats. *Drug Chem. Toxicol.*, **14**, 207-218.