

배양된 흰쥐 대뇌 피질 astrocytes의 세포기능에 대한 화학적 무산소증 유도물의 효과

이선애 · 박우규* · 성연희#

충북대학교 수의과대학, *한국화학연구소

(Received August 31, 1999)

Effects of Chemical Anoxia Inducers on Cellular Functions of Cultured Rat Cortical Astrocytes

Sun Ae Lee, Woo Kyu Park* and Yeon Hee Seong#

College of Veterinary Medicine, Chungbuk National University, Cheongju, Chungbuk

*Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejon, Korea

Abstract — The effects of antimycin A (AA), sodium azide (NaN_3) and 2,4-dinitrophenol (DNP), which inhibit mitochondrial ATP production, on cellular functions of cultured astrocytes were studied. High concentrations of AA (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), NaN_3 (100 mM) and DNP (20 mM) significantly decreased 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) reduction, which was known to be related to mitochondrial function and then cell viability. AA (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) increased lactate dehydrogenase (LDH) release and decreased [^3H]glutamate uptake, suggesting severe damage of cellular function by the concentrations of the compounds. Meanwhile, low concentrations of AA ($\leq 10 \mu\text{g}/\text{ml}$), NaN_3 ($\leq 50 \text{ mM}$) and DNP ($\leq 5 \text{ mM}$) significantly increased MTT reduction, the effect of which was specific to astrocytes. AA (5 and 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) did not affect LDH release and [^3H]glutamate uptake, indicating that these compounds increased MTT reduction at the low concentrations without cellular membrane damage. However, the low concentrations of AA produced significant decrease of MTT reduction in a glucose-free medium. Low concentrations of AA (1 and 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) did not change ATP production of astrocytes in the medium containing 10 mM glucose, but completely inhibited in a glucose-free medium, suggesting marked increase of cytosolic ATP production by the blockade of mitochondrial ATP production with low concentrations of AA. These results suggest that astrocytes have ability to enhance neuronal function or survival under conditions of incomplete ischemia or early stage of ischemia by enhancement of glycolysis, and that cellular reduction of MTT occurs not only mitochondrially but also extramitochondrially.

Keywords □ Cultured astrocytes, cellular function, chemical anoxia inducers, antimycin A, MTT reduction.

포유동물의 중추신경계는 신경세포와 신경교세포로 구성되며, 교세포중에서 가장 그 수가 많은 별아교세포(astrocytes)는 신경세포가 정상적인 기능을 할 수 있도록 세포환경을 제공하는 중요한 역할을 한다. 즉, astrocytes는 혈액뇌관문을 형성하고, 세포외 수분량 및 이온농도를 조절하며,^{1,2)} 각종 신경전달물질의 흡수와

대사기능을 지니며,³⁾ voltage-dependent ion channel 과 신경전달물질 수용체도 함유하여 신경세포가 작용하는 데 필요한 미세 환경구조를 제공하고 있다.^{4,6)} 그러므로 astrocytes의 기능손상은 뇌조직의 팽창, 세포성 또는 혈관성 부종, 이어서 뇌내압의 상승 및 대뇌 이탈로 마침내는 뇌순환부전으로 이어지는 병적 상황을 유발하게 된다.

중추신경계는 신체 중에서 매우 대사율이 높은 곳이나 저장에너지가 낮아, 그들의 기능적 통합성을 유지

본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 0431-261-2968 (팩스) 0431-267-3150

하기 위하여 끊임없는 산소와 포도당의 공급을 필요로 한다. 한편 생성된 에너지의 약 50%는 주로 Na^+ / K^+ -ATPase에 의한 ion transport와 ion gradient의 유지에 이용된다.⁷⁻⁹⁾ 따라서 ischemia나 stroke과 같은 다양한 병적 상황에서 산소와 포도당의 공급이 차단되면 세포내외의 ion gradient의 파괴와 더불어 세포내 구성물질의 누출이 일어나는 등의 생화학적 변화 및 뇌세포의 구조적, 기능적 손상을 초래한다. 그러므로, 심각한 저산소증, 기질부족, 독성대사산물의 제거기전의 손상 등에 의한 허혈증의 결과 일어나는 뇌세포의 손상은 세포의 종류에 따라 매우 다양하며, 특히 astrocytes의 부종은 대뇌허혈증의 초기단계에 나타나는 일차적 결과로 되어 있다.¹⁰⁻¹³⁾ Astrocytes는 hypoglycemia나 ischemia등과 같은 병적 상황에 대하여 신경세포보다 덜 민감하다고 하는데, 이는 astrocytes가 더 많은 glycogen을 저장하고 있기 때문이고, 그 결과 허혈시 neuron으로부터 다량 유리되는 glutamate에 의한 흥분독성에도 잘 견딘다고 한다.^{14,15)} 또한, astrocytes는 대사 장애시 신경세포의 생존력을 증가시키는데^{15,16)} 이는 astrocytes가 lactate를 유리하고,^{17,18)} 세포의 glutamate의 조절과¹⁹⁾ 세포의 이온 조성의 조절능력을 가지기 때문이다.²⁰⁾ 그러나, 또 다른 보고에 따르면, ischemia시 astrocytes의 광범위한 팽윤(swelling)과 glutamate의 유리로 인하여 neuronal damage를 더욱 악화시킨다고도 한다.^{11,21)}

한편, 그러한 ischemia에 의한 세포기능의 손상기전을 연구하기 위하여, 물리적인 저산소성의 환경을 유발하거나, 화학적 무산소증유발방법이 많이 이용되고 있다. 화학적 무산소증유도물로서는 antimycin A (AA), sodium azide(NaN_3), 2,4-dinitrophenol(DNP), sodium fluoride(NaF), sodium cyanide(NaCN) 등이 있다. 이들은 서로 다른 부위에서 서로 다른 양상으로, mitochondria에서 respiratory chain을 차단하거나, 또는 cytosol에서 glycolysis를 차단하여 ATP합성을 억제하므로써 hypoxia, hypoglycemia를 유발한다. 일반적으로 이들 화학적 무산소증 유도물들은 단시간 처리에 의하여 세포내외 이온조절을 방해하는 결과, 세포내 Na^+ 농도의 급격한 상승과 더불어 K^+ , Cl^- , HCO_3^- 등이 세포내로 유입되어 cell swelling이 일어난다. 또한, glutamate uptake능력이 상실되고, 여러 가지 효소의 활성의 변화와 더불어 세포막의 통합기능이 억제됨으로서 세포내 내용물의 유출에 이은 세포사를

유발하게 된다.²²⁾ 이에 대하여 Ca^{2+} channel antagonists, nitric oxide synthase inhibitor 또는 NMDA-receptor antagonist들이 이를 억제함이 보고되어 있다.²³⁾ 일차배양된 astrocytes에 있어서 화학적 무산소증 유도물을 사용하여 허혈성 세포손상의 기전에 관한 연구를 보면, NaN_3 에 의하여 세포내외의 Na^+ gradient의 파괴가 일어나고, acid 및 glutamate가 유리됨이 보고되었고,²⁴⁾ AA, NaN_3 , DNP에 의하여 [^3H]glutamate uptake가 현저히 저하됨이 보고되었다.²⁵⁾ 또한 위의 보고에 있어서, 세포막 통합성의 상실 및 세포사를 측정하기 위하여, lactate dehydrogenase(LDH) release, trypan blue exclusion, [^3H]glutamate uptake를 지표로서 측정하였으며, 또 세포손상을 일으키기 위하여 고농도의 이들 화합물을 사용하였으며, 저농도에 의한 생화학적 변화에 대하여는 보고된 바 없다.

한편, MTT assay란, Mosmann²⁶⁾에 의하여 확립된 방법으로서, tetrazolium염인 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide)가 mitochondria의 dehydrogenase에 의하여 formazan으로 환원되며, formazan의 생성은 세포수와 직접 비례한다고 보고되었다. 그리하여, 이 방법은 mitochondria의 기능을 검토하거나, 세포증식 또는 세포사를 검토하는데 사용되어 왔다. 그러나, 이 방법에 대하여 널리 알려진 것과는 달리, 반드시 mitochondria에 의해서만 MTT의 환원이 일어나는 것이 아니라, mitochondria 외에서도 NADH 및 NADPH 의존적으로 일어나므로 respiratory chain inhibitor에 의하여 억제되지 않는다는 보고가 있으며,²⁷⁾ 또, cell line에 따라, 또는 배양 조건에 따라서 감수성이 변화하는 등,²⁸⁾ 이에 대한 확실한 기전의 규명이 요구되고 있다.

저자들은 신생 흰쥐의 대뇌피질astrocytes를 일차 배양하여 저산소증에 의한 세포손상의 기전을 규명하는 과정에서, mitochondria의 aerobic respiratory chain만을 억제하는 AA, DNP, NaN_3 가 LDH release 및 [^3H]glutamate uptake기능을 손상시키지 않는 저농도에서 MTT reduction을 현저히 증가시키는 것을 확인하였다. 또 저농도의 AA가 glutamate에 의한 astrocytes의 swelling을 억제함을 확인하였다. 이에 본 실험에서는 AA, DNP, NaN_3 등의 저농도에 의한 배양astrocytes의 세포내 에너지 대사의 변화의 특성 및 그 생화학적 기전을 검토하고자 하였다.

실험방법

시약 - AA, NaN₃, NaF, NaCN, ATP assay kit, phloretin, MTT, Eagle's minimum essential medium(EMEM), Dulbecco's minimum essential medium(DMEM), poly-L-lysine은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 3-O-methyl-D-[1-³H]glucose (³H]OMG), [³H]glutamate는 Amersham(Arlington Heights, IL, USA)로부터 구입하였으며, fetal bovine serum(FBS)은 Hyclone (Logan, UT)의 것을, dispase는 Boehringer Mannheim(GmbH, Mannheim, Germany)으로부터 구입하여 사용하였다. Jocklik modified EMEM은 Gibco BRL(Life technologies Inc., USA)의 것을 사용하였고, DNP는 Hanawa(Hayashi Pure Chemical Industries, Ltd. Japan)의 것을 사용하였다. 그리고, 그 이외의 시약은 특급제품을 사용하였다.

흰쥐 대뇌피질 astrocytes의 분리 및 배양 - Astrocytes는 1~2일령의 Sprague-Dawley (SD) 흰쥐의 대뇌 피질로부터 Frangakis 와 Kimelberg²⁹⁾ 방법에 따라 초대 배양하였다. 대뇌 반구를 무균적으로 취해서 수술 현미경하에서 뇌막과 혈관을 제거하고 피질만을 취하여 3 mg/ml dispase를 함유하는 Jocklik modified EMEM중에서 처리하여 세포를 분리하고, 10% FBS함유 EMEM(배양용 배지)중에서 3~4 × 1,000 cells/cm²로 배양용 flask에 심었다. 5% CO₂/95% air를 유지하며 37°C에서 배양하였으며, 10일 정도 지나 세포가 flask 바닥에 confluent하게 퍼지면, 0.25 mg/ml trypsin으로 세포를 단리하여, 12 well 또는 24 well plate에 1 × 10⁴ cells/cm² 로 분주하였다. 이후 같은 조건에서 2 주정도 지난 후에 실험에 이용하였다. 이 단계에서 glial fibrillary acidic protein에 immunoreactivity가 90%이상 나타내는 순도 높은 type I astrocytes를 형성한다.

흰쥐 소뇌 granule cells의 분리 및 배양 - 7~8일령의 흰쥐(SD)로부터 소뇌를 적출하고 McCaslin과 Ho³⁰⁾의 방법을 약간 수정하여, plastic pipette에 의한 기계적 분산과 0.25 mg/ml trypsin 및 0.08 mg/ml DNase을 함유하는 DMEM(NaHCO₃-free) 중에서 배양하여 세포를 단리하고, 10% FBS함유 DMEM으로 suspension시킨 뒤, poly-L-lysine coating된 24well plate에 2 × 10⁶ cells/ml이 되도록 심고, 이를 10%

CO₂/90% air를 유지하며 37°C에서 배양하였다. 배양 후 48시간 뒤에, 배지를 배양용 배지(10% FBS, 20 μM cytosine arabinoside함유 DMEM)로 교환하여 glial cells의 성장을 억제하였다. 배지는 1주일에 2번 교환하고, 배양 후 9~12일된 세포를 실험에 사용하였다.

PC12 cell의 배양 - PC12 cell의 배양은 Greene와 Tischler³¹⁾의 방법에 준하였다. 배양은 10% horse serum과 5% FBS, 100unit/ml penicillin과 100 μg/ml streptomycin을 포함한 RPMI 1640 배양액을 사용하여, 조직배양용 dish상에서 2~3일 배양후, poly-L-lysine coating된 24well plate에서 2일간 배양후 사용하였다. 세포배양은 5% CO₂/95% air를 유지하며 37°C incubator에서 배양하였다.

배양 세포의 화학적 무산소증 유도물에 대한 노출 - HEPES-buffered Krebs-Ringer solution(HBKR(mM): NaCl 156, KCl 5.6, NaHCO₃ 11, MgSO₄ 1, CaCl₂ 1, NaH₂PO₄ 1, D-glucose 10, HEPES-Na 20, pH 7.4)로 3회 세척 후 30분 preincubation하여 세포를 평형시킨 후 여러 화합물을 농도별로 처리하고 일정시간 배양한 뒤 여러 가지 분석을 하였다. [³H]OMG uptake에 의한 세포내의 water space의 측정시에는 AA를 30분 동안 전처리하였다.

MTT assay - Mosmann²⁶⁾의 방법을 약간 수정하여 이용하였다. MTT assay란 오로지 살아있는 세포만을 측정하는 tetrazolium염인 MTT의 formazan으로의 환원을 측정하는 방법으로, 배양세포를 여러 농도의 각 화합물을 함유하는 배지내에서 일정시간 배양한 후 배지를 제거한 다음 5 mg/ml MTT용액(200 μ)을 가하였다. 37°C에서 4시간을 배양하고, 살아있는 세포의 mitochondria에 의하여 tetrazolium환이 환원되어 생성되는 formazan결정을 산성의 isopropanol(0.04N HCl in isopropanol)을 200 μ를 가하여 용해하고, 이중 200 μ씩을 96well plate에 취하여 test과장 570 nm와 참조과장 630 nm에서 ELISA reader에 의하여 흡광도를 측정하여 대조세포의 흡광도에 대한 각 약물처리에 의하여 나타나는 흡광도 변화의 백분율을 구하였다.

LDH활성의 측정 - Bergmeyer와 Bernt³²⁾의 방법에 따라 시행하였다. 대조세포 및 AA에 노출된 세포의 배양 medium을 일정량 취하여 medium중에 유리된 LDH활성을 측정하였으며, 각 plate well에 0.1% triton을 가하여 일정시간 방치함으로써 이를 cell

homogenate로 하고 이로부터 일정량을 취하여 총 LDH 활성(세포 및 medium)을 측정하였다. LDH 활성은 phosphate buffer(pH 7.0)중에서 pyruvate와 NADH 그리고 LDH 표품으로서 일정량의 medium을 가하여 spectrophotometer에 의하여 340 nm에서의 흡광도의 변화를 3분간 측정함으로써 얻었다. 1분간 1 mol의 NAD⁺를 생성시키는 효소의 활성을 1 unit로 하며 medium중으로 유리되는 LDH의 활성은 다음 식에 의하여 계산하였다.

$$\frac{\text{LDH activity of media}}{\text{Total LDH activity (cells and media)}} \times 100 = \% \text{ LDH release}$$

[³H]Glutamate uptake의 측정 - Yu등³³⁾의 방법에 준하였는데, 세포는 여러 농도의 AA를 함유하는 배지 내에서 일정시간 배양된 후, 배양기간의 끝에 [³H]glutamate (0.15 μCi/well, 50 μM)를 가하고 5분간 더 배양하고, 빙냉한 phosphate buffered saline으로 세척함에 의하여 반응을 정지시켰다. 0.1N NaOH로 세포를 가용화하고 scintillation counter에 의하여 방사활성을 측정하였고, 일정량을 취하여 Lowry법³⁴⁾에 의하여 단백량을 측정하였다.

세포용적의 측정 (³H]OMG의 uptake 측정) - 배양 astrocytes의 intracellular water space를 [³H]OMG를 이용하여 Kletzien등³⁵⁾의 방법에 준하여 측정하였다. 이 방법은 대사되지 않는 hexose인 OMG가 세포 내로 들어가 세포내와 세포외의 농도가 평형에 이르게 되는 성질을 이용한 것이다. Phloretin은 세척하는 동안 세포내에 들어간 OMG가 세포외로 방출되는 것을 방지하기 위하여 사용하였다. 배양세포를 HBKR로 3회 세척한 후 30분간 같은 buffer로 평형시켰다. 이어 0.5 mM glutamate를 가하고 1시간 배양하였으며 그 배양의 마지막 20분간에 [³H]OMG (0.5 μCi/well, 1 mM)를 가하여 uptake시켰다. 배지를 제거하고 세포는 0.1 mM phloretin을 함유하는 빙냉 HBKR로 3회 세척하였다. 세포를 0.1N NaOH로 가용화시킨 뒤, 세포내로 uptake된 [³H]OMG의 방사량을 scintillation counter로 측정하였고 일정량에 대하여 Lowry법³⁴⁾에 의하여 단백량을 측정하였다. [³H]OMG의 방사활성은 Kletzien등³⁵⁾의 방법의 산정법에 의하여 intracellular water space로 나타내었다. 따라서 측정치는 mg protein당 H₂O μ로 나타내었다.

ATP 측정 - Lowry³⁶⁾의 방법에 따라 측정하였다. 12 Well plate에 배양된 astrocytes를 glucose를 함유하는 HBKR과 glucose를 함유하지 않는 HBKR로 3회 세척후 각각의 buffer에 AA를 농도별로 처리하고 1시간 배양한 후 빙냉한 5% perchloric acid를 가하고 cell을 scrapping하여 eppendorf tube로 옮겨 homogenise하였다. 이를 시험관에 옮겨, 빙냉한 1M KHCO₃를 넣어 중화한 후, 4°C 220×g에서 14분간 원심분리하고, 상층액을 filtration하였다. 상층액중의 ATP 생성정도는 ATP bioluminescence assay kit를 이용하여 luciferin-luciferase법에 의하여 측정하였으며, 대조세포에 있어서의 ATP에 의한 luminoscent intensity를 100으로 보고 이에 대한 백분율을 구하였다.

통계처리 - 통계자료의 평균값은 mean±SEM으로 표시하였다. 유의성은 student's t-test를 실시하여 확인하였다.

실험결과 및 고찰

화학적 무산소증 유도물로서, mitochondria의 aerobic respiratory chain을 억제하는 AA, NaN₃, DNP와 mitochondria의 에너지 대사뿐 아니라 cytosol의 anaerobic glycolysis를 억제하는 NaCN과 NaF가 MTT reduction에 미치는 영향을 검토하였다. 각 화합물을 가하여 2시간동안 배양한 후 MTT assay를 한 결과, NaCN 및 NaF에 의하여는 농도에 관계없이 MTT reduction이 현저히 억제되는 반면, mitochondria의 에너지대사만을 억제하는 AA, NaN₃ 및 DNP는 농도에 따라 전혀 다른 양상을 나타내었다. 화합물을 처리하지 않고 같은 시간 배양한 well에 함유된 세포에 의하여 일어나는 MTT reduction에 의한 흡광도를 100%로 하였을 때, NaCN와 NaF는 낮은 농도에서도 MTT reduction의 증가는 나타내지 않고 용량의존적으로 억제를 나타내어 50 mM에 의하여는 각각 8.3%와 19.0%로 낮은 MTT reduction율을 나타내었다. 한편, 50 μg/ml AA는 48.1%, 100 mM NaN₃는 76.2%, 그리고 20 mM DNP는 5.1%로, 이 화합물들을 고농도로 처리하면 MTT reduction율이 현저히 감소하였다. 그러나, AA의 5 및 10 μg/ml에 의하여는 각각 149.0%와 147.3%, NaN₃의 10과 50 mM에 의하여는 각각 138.2%와 117.0%, 그리고 DNP의 5 mM에 의하여는 132.3%를 나타내는 등, 각

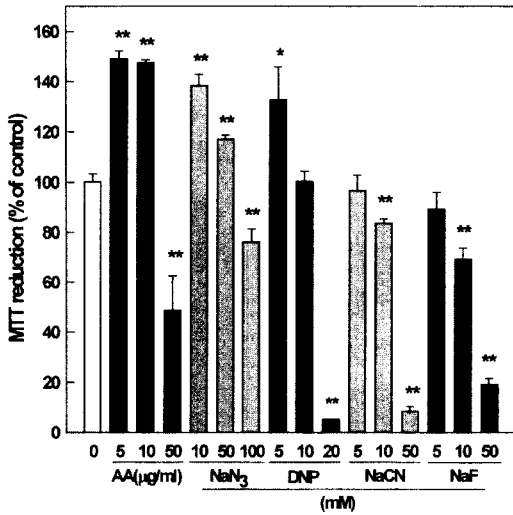


Fig. 1 - Effects of chemical hypoxia inducers on MTT reduction in cultured astrocytes. After washing and equilibration of 30 min with HBKR, cells were incubated with various agents at the indicated concentrations at 37°C for 2 hr. At the end of the incubation, cells were processed for MTT assay. Control cultures (0) were treated with HBKR. Values are means \pm SEM of 4-8 wells. ** p <0.01, * p <0.05 compared to control cells.

화학물의 저농도에 의해서는 MTT reduction이 유의성 있게 증가하였다(Fig. 1). 이는 mitochondria에서 aerobic respiratory chain을 억제하는 물질들이 저농도에서는 세포손상을 유발하지 않고 세포의 에너지대사를 촉진할 수 있다는 것을 시사하는 결과였다.

일반적으로 여러 원인에 의한 세포막 및 세포기능의 손상의 지표로서 medium중으로 유리되는 LDH량을 측정한다. 그러므로 MTT assay결과 MTT reduction을 증가 또는 감소시키는 각 농도의 AA를 배양 astrocytes에 가하고 2시간 배양한 후 medium중으로 유리된 LDH량을 측정하였다. Fig. 2에 나타냈듯이, AA를 처리하지 않은 well(대조세포)의 LDH 유리정도는 10.7%를 보였는데 50 μ g/ml AA에 의하여는 LDH release가 41.8%로 현저히 증가하여 MTT reduction을 감소시키는 고농도에서는 세포막 손상을 일으킨 것을 알 수 있었고, 반면 MTT reduction을 증가시킨 농도인 5와 10 μ g/ml에 의하여는 8.5%로 대조세포와 비교하여 LDH 유리에 영향을 미치지 않았다. 즉, AA는 저농도에서는 세포막손상을 야기하지 않으면서 MTT reduction을 증가시킴을 확인하였다.

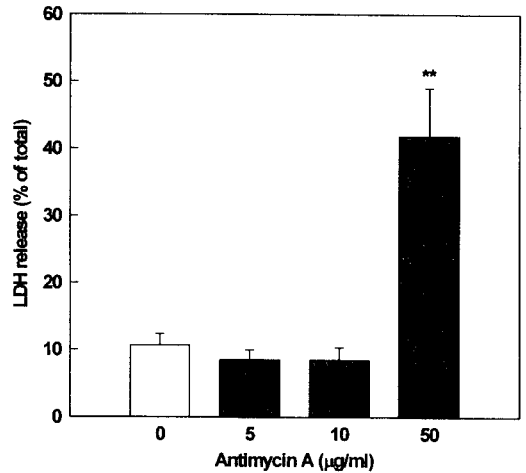


Fig. 2 - Change of LDH efflux to the culture medium after 2 hr treatment with antimycin A. Cells were incubated with antimycin A at 37°C for 2 hr. Values are means \pm SEM of 4-8 wells. ** p <0.01 compared to control cells.

Ischemia에 노출된 신경세포는 다량의 glutamate를 세포외로 유리하며, astrocytes는 이를 흡수하므로서 glutamate에 의한 신경독성을 억제하여 신경세포의 기능을 유지케 한다. 그러므로 astrocytes의 세포막의 통합성 유무를 측정하는 지표로서 glutamate uptake정

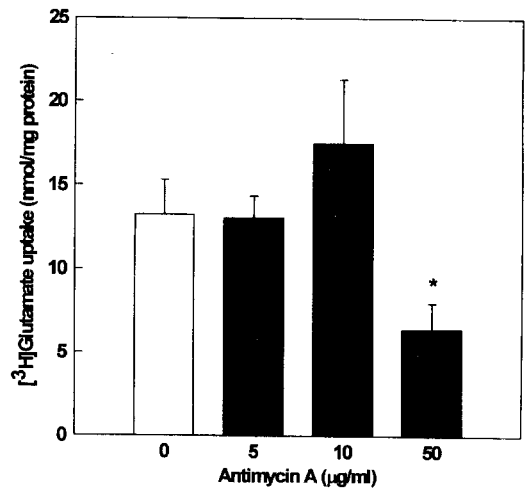


Fig. 3 - Effect of antimycin A on [³H]glutamate uptake in cultured astrocytes. Cells were incubated with various concentrations of antimycin A at 37°C for 2 hr. Uptake of [³H]glutamate was performed for the last 5 min of incubation. Values are means \pm SEM of 4-8 wells. * p <0.05 compared to control cells.

도를 측정한다. 따라서 MTT reduction을 증가 또는 감소시키는 AA의 각 농도에 대하여 세포손상의 정도를 측정하는 또 다른 방법으로서 [^3H]glutamate uptake에 대한 AA의 영향을 측정하였다. Fig. 3에 나타냈듯이, AA를 처리하지 않은 세포에 의하여 [^3H]glutamate uptake는 13.2 nmol/mg protein을 나타낸 데 비하여 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AA에 의하여 6.4 nmol/mg protein으로 현저한 억제 효과를 보인 반면, 5와 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AA에 의해서 각각 13.0, 17.5 nmol/mg protein으로 대조세포에 비하여 변화가 없었다. 즉, AA는 astrocytes의 MTT reduction을 증가시키는 저농도에서는 [^3H]glutamate uptake에 영향을 미치지 않아 세포막에 손상을 일으키지 않는다는 것을 알 수 있었다.

일반적으로 세포의 MTT reduction 정도는 mitochondria의 기능을 나타낸다고 알려져 있다. 그러므로 위의 결과는 mitochondria의 respiratory chain만을 억제하는 AA, NaN_3 , DNP의 낮은 농도에 의하여는 mitochondria의 기능을 증가시켰다고도 추론할 수 있다. 그러나, Berridge와 Tan²⁷⁾에 의하면, 대부분의 세포내 MTT reduction이 mitochondrial inner membrane밖에서의 NADH 및 NADPH 의존성 기전에 의하여 이루어지며, 이는 respiratory chain inhibitor에 의해 억제되지 않는다고 하였다. 그러므로 저농도의 화학적 무산소증 유도물들이 mitochondria의 기능을 자극하였다면 medium중에 glucose를 제거하여 cytosol에서의 glycolysis를 차단한 후 저농도의 이들 화합물들을 가하면 오로지 mitochondria에 의한 MTT reduction정도만을 측정할 수 있을 것으로 가정하였다. 그러나, Fig. 4에 나타냈듯이 glucose-free medium중에 AA를 가하고 1시간 incubation한 후 MTT assay를 한 결과, glucose 함유배지에서는 MTT reduction을 증가시켰던 저농도에서도 MTT reduction은 현저하게 감소하였다. 이러한 결과와, Fig. 1의 NaCN과 NaF에 의하여는 낮은 농도에서도 MTT reduction이 감소하는 결과로부터, 이 화합물들이 저농도에 의하여도 mitochondria의 기능을 증가시키는 것이 아니라 억제하며, mitochondria의 기능이 약하게 억제된 상태에서 cytosol의 anaerobic metabolism이 증가한다는 것을 추정할 수 있었다. 또한 MTT reduction이 cytosol에 의하여도 나타남을 확인시켜주는 결과였다. Data에는 나타나지 않았지만, AA (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)에 의한 MTT reduction의 증가는 8시간까지도 지속되었다.

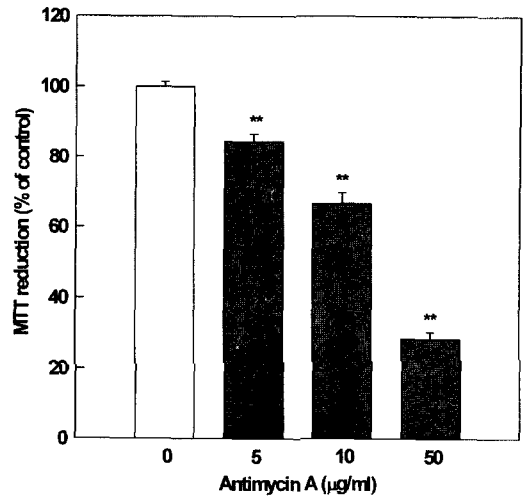


Fig. 4 - Effect of antimycin A on MTT reduction in cultured astrocytes in a glucose-free HBKR. After washing with glucose-free HBKR, astrocytes were incubated with antimycin A in the same buffer at 37°C for 1 hr. At the end of the incubation, cells were processed for MTT assay. Values are means \pm SEM of 4-8 wells. ** $p < 0.01$ compared to control cells.

앞의 결과에서 저농도의 AA에 의하여 mitochondria의 기능이 부분적으로 차단되면 cytosol에서의 anaerobic metabolism의 증가할 가능성을 제시하였다. 그러므로, 저농도의 AA와 MTT reduction을 현저히 억제하는 고농도의 AA가 10 mM glucose를 함유하는 정상 HBKR과 glucose free의 HBKR에서 ATP생성량에 미치는 효과를 검토하였다. 정상 HBKR에서 AA를 처리하지 않은 세포에서 생성되는 ATP량을 100%로 하였을 때 glucose-free의 HBKR에 의한 ATP생성 정도는 변함이 없었으며, 이는 많은 보고와 일치하는 결과이다. 그리고 정상 HBKR중에서 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 AA를 함유시키고 1시간동안 배양한 세포에서 생성된 ATP함량은 대조세포에 비하여 유의성있는 변화를 나타내지 않았으나, MTT reduction을 감소시키는 농도인 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에 의하여는 약 60%의 감소를 나타내었다. 한편 glucose-free HBKR중에 AA를 함유시키고 배양한 세포에서는 모든 농도에서 ATP합성이 완전히 차단되었다(Fig. 5). 이 결과로부터, 저농도의 AA에 의하여 mitochondrial내에서의 aerobic ATP합성은 완전히 차단되며, 그 결과 cytosol에서의 anaerobic ATP합성이 크게 증가하였음을 알 수 있었다.

심한 ischemia시 신경세포로부터 다량 유리되는

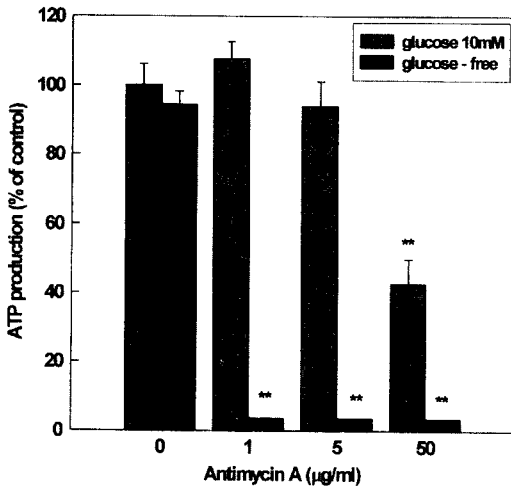


Fig. 5 - Effect of antimycin A on ATP production in cultured astrocytes. After washing, cells were incubated with antimycin A in normal (10 mM glucose) or glucose-free HBKR at 37°C for 1 hr. At the end of the incubation, cells were processed for ATP assay. Control cultures were treated with HBKR without antimycin A. The ATP level produced in the normal HBKR was taken as 100%. Values are means \pm SEM of 4-8 wells. ** $p < 0.01$ compared to control cells.

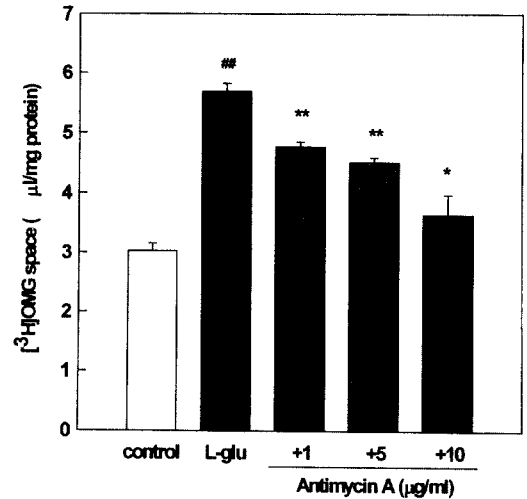


Fig. 6 - Effect of antimycin A on glutamate-induced increase in intracellular water space (measured as [3 H]OMG space). Cultured astrocytes were incubated with 0.5 mM glutamate (L-glu) for 1 hr in the presence or absence of antimycin A. Antimycin A was treated 30 min prior to glutamate treatment. The uptake of [3 H]OMG was carried out for the last 20 min of incubation. Values are means \pm SEM of 4-8 wells. # $p < 0.01$, compared to control. ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ compared to glutamate.

glutamate 등의 흥분성 아미노산은 astrocytes에 의하여 흡수되어 대사됨으로서 신경세포 및 astrocytes의 기능을 유지하는데, 유리된 다량의 흥분성 아미노산에 의하여 astrocytes의 swelling이 뇌부종에 선행하여 일어나며, 일종의 방어기전으로서 곧 회복하는 능력이 있다고 한다. 그러나 장시간의 병태적 인자에 노출되면 대사적 에너지의 감소와 함께 glutamate의 uptake에 이어 다량의 Na^+ , Ca^{2+} 등의 이온과 물의 유입으로 비가역적 swelling을 유발한다.³⁷⁾ 그리하여 MTT reduction을 증가시키는 저농도의 AA가 0.5 mM glutamate에 의하여 일어나는 astrocytes의 swelling에는 어떻게 영향을 미치는지를 검토하였다. Fig. 6에 나타냈듯이 0.5 mM glutamate에 의하여 약 2배의 [3 H]OMG space (5.7 $\mu\text{l}/\text{mg}$ protein)의 증가를 나타내었으며, 이에 대하여 AA를 30분간 전처리한 후 공존시키면 [3 H]OMG space는 용량의존적으로 억제되어, 10 $\mu\text{l}/\text{mg}$ 에 의하여 3.3 $\mu\text{l}/\text{mg}$ protein을 나타내었다. 이와 같은 결과는 저농도의 AA에 의한 cytosol내의 energy metabolism의 증가로 인하여 세포막의 기능을 유지하는 효소, 특히 Na^+/K^+ ATPase의 활성이 증가

하므로서 효과적으로 세포막내외의 이온의 균형이 유지되어, cell swelling이 효과적으로 억제되었음을 시사하는 결과이다. 이에 대하여, glycolysis에 의하여 생성되는 ATP가 Na^+/K^+ ATPase에 보다 선택적이라는 보고도 있다.^{38,39)}

이상의 결과들이 astrocytes에서만 나타나는 특이적 효과인지, 신경세포등에서도 나타나는 결과인지를 검토하기 위하여 흰쥐의 소뇌로부터 granule neuron을 배양하여 여러 농도의 AA, NaN_3 및 DNP를 2시간동안 처리한 후 MTT assay를 하였다. AA, NaN_3 그리고 DNP는 저농도에서 고농도에 이르기까지 모두 MTT reduction의 유의성있는 억제만을 나타내었다 (Fig. 7A). 또한, AA, NaN_3 , DNP의 다양한 농도에 의한 PC 12 cells에서의 MTT reduction 정도를 검토한 결과, 각 화합물들은 astrocytes에서와 같은 MTT reduction의 증가는 나타내지 않았다 (Fig. 7B). 즉 이들에 의한 MTT reduction 증가효과는 astrocytes에서만 나타나는 특이적 작용임이 확인되었다.

이상의 결과로부터, astrocytes는 저농도의 AA, NaN_3 및 DNP에 의하여 mitochondria의 기능이 억제

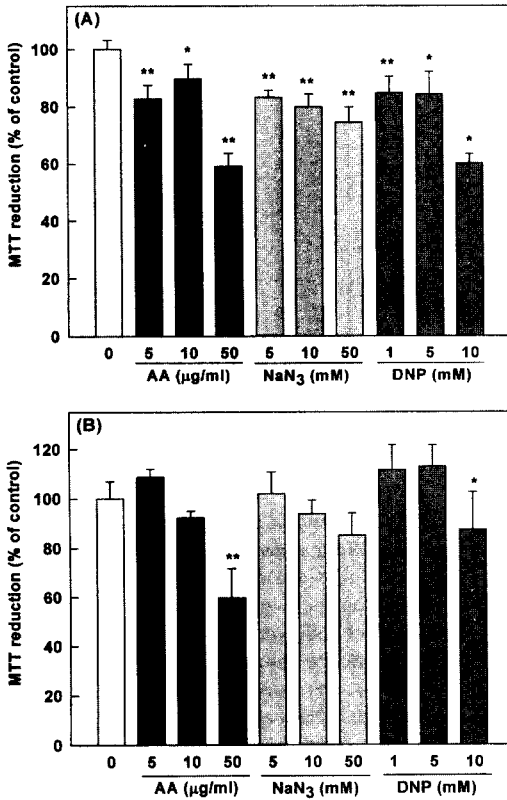


Fig. 7 - Effects of antimycin A (AA), sodium azide (NaN₃), 2,4-dinitrophenol (DNP) on MTT reduction in cultured granule neurons (A) and PC 12 cell lines (B). After washing and equilibration of 30 min with HBKR, cells were incubated with various agents at the indicated concentrations at 37°C for 2 hr. At the end of the incubation, cells were processed for MTT assay. Control cultures were treated with HBKR. Values are means ± SEM of 4-8 wells. **p<0.01, *p<0.05 compared to control cells.

되면, 세포의 기능을 정상적으로 유지하기 위하여 신경 세포들의 다른 cell type에 비하여 매우 특이적으로 cytosol내에서의 glycolysis를 현저히 증가시키며, 그 결과 세포막의 통합성이 그대로 유지된다는 것을 알 수 있었다. 이는 astrocytes가 허혈증의 초기 또는 가벼운 허혈증에 있어서 신경세포의 생존환경의 유지를 위하여 신경세포의 손상에 대한 강한 방어 효과능력을 가짐을 나타내는 결과라고 생각된다. 또한, MTT reduction이 mitochondria뿐만 아니라 mitochondria외에서도 다량 일어난다는 것을 확실히 하였으나 그 자세한 기전에 대하여는 더욱 연구되어야 할 것으로 생각된다.

결론

배양 astrocytes에 있어서 AA를 중심으로 한 화학적 무산소증 유도물질에 의한 농도에 따른 세포활성의 변화를 실험한 결과, 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1) 고농도에 의하여는 MTT reduction의 현저한 감소와 함께 LDH 유리 및 glutamate uptake를 감소시켰다.
 - 2) 그러나 저농도에 의하여는 MTT reduction을 현저히 증가하고, LDH 유리 및 glutamate uptake에는 영향을 미치지 않아 세포손상을 나타내지 않았다.
 - 3) Glucose-free배지중에서는 저농도에서도 MTT reduction을 현저히 감소시키며, ATP 합성도 완벽히 차단되었다.
 - 4) 이러한 결과는 배양neuron 및 PC 12 cell line에서는 관찰할 수 없었던 astrocytes에서만 특이적 효과였다.
- 따라서 astrocytes는 허혈증의 초기 또는 가벼운 허혈증에 있어서 신경세포 및 astrocytes 자체의 기능을 유지하기 위하여 glycolysis를 자극하는 것으로 생각되며, MTT reduction은 mitochondria내에서만 아니라 mitochondria외에서도 일어남을 확인하였다.

문헌

- 1) Hertz, L.: Astrocytes. In: *Handbook of Neurochemistry*. Vol. 1, 2nd ed., Plenum Press, New York, p. 319 (1982).
- 2) Kimelberg, H. K. and Ransom, B. R.: Physiological and pathological aspects of astrocytic swelling. In: *Astrocytes*, Vol. 3, Academic Press, Orlando, p. 129 (1986).
- 3) Barbour, B., Brew, H. and Attwell, D.: Electrogenic glutamate uptake in glial cells is activated by intracellular potassium. *Nature* **335**, 433 (1988).
- 4) Bormann, J. and Kettenmann, H.: Patch-clamp study of gamma-aminobutyric acid receptor Cl⁻ channels in cultured astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* **85**, 9336 (1988).
- 5) Sontheimer, H., Kettenmann, H., Backus, K. H. and Schachner, M.: Glutamate opens Na⁺/K⁺ channel in cultured astrocytes. *Glia*, **1**, 328 (1988).
- 6) Wyllie, D. J., Mathie, A., Symonds, C. J. and Cull-

- Candy, S. G. : Activation of glutamate receptors and glutamate uptake in identified macroglial cells in rats cerebellar cultures. *J. Physiol.* (London), **432**, 235 (1991).
- 7) Hansen, A. J. : Effect of anoxia on ion distribution in the brain. *Physiol. Rev.*, **65**, 101 (1985).
 - 8) Ames, A. 3d., Li, Y. Y., Heher, E. C. and Kimble, C. R. : Energy metabolism of rabbit retina as related to function : high cost of Na⁺ transport. *J. Neurosci.*, **12**, 840 (1992).
 - 9) Erecinska, M. and Silver, I. A. : Ions and energy in mammalian brain. *Prog. Neurobiol.*, **43**, 37 (1994).
 - 10) Baethmann, A. : Pathophysiological and pathochemical aspects of cerebral edema. *Neurosurg. Rev.*, **1**, 85 (1978).
 - 11) Moncada, S. : Biology and therapeutic potential of prostacyclin. *Stroke*, **14**, 157 (1983).
 - 12) Siesjo, B. K. : Membrane events leading to glial swelling and brain edema. In: *Brain Edema*, Springer-Verlag Press, Berlin, p. 200 (1985).
 - 13) Rothman, S. M. and Olney, J. W. : Glutamate and the pathophysiology of hypoxic-ischemic brain damage. *Ann. Neurol.*, **19**, 105 (1986).
 - 14) Hamprecht, B. and Dringen, R. : Energy metabolism. In: *Neuroglia*, Oxford UP, New York, p. 473 (1995).
 - 15) Vibulsreth, S., Hefti, F., Ginsberg, M. D., Dietrich, W. D. and Busto, R. : Astrocytes protect cultured neurons from degeneration induced by anoxia. *Brain Res.*, **422**, 303 (1987).
 - 16) Swanson, R. A. and Choi, D. W. : Glial glycogen stores affect neuronal survival during glucose deprivation in vitro. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **13**, 162 (1993).
 - 17) Walz, W. and Mukerji, S. : Lactate release from cultured astrocytes and neurons : a comparison. *Glia*, **1**, 366 (1988).
 - 18) Tsacopoulos, M. and Magistretti, P. J. : Metabolic coupling between glia and neurons. *J. Neurosci.*, **16**, 877 (1996).
 - 19) Rosenberg, P. A. : Accumulation of extracellular glutamate and neuronal death in astrocytes-poor cultures exposed to glutamine. *Glia*, **4**, 91 (1991).
 - 20) Kraig, R. P. and Chesler, M. : Astrocytic acidosis in hyperglycemic and complete ischemia. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **10**, 104 (1990).
 - 21) Billups, B. and Attwell, D. : Modulation of non-vesicular glutamate release by pH. *Nature*, **379**, 171 (1996).
 - 22) Hansen, A. J. : Effect of anoxia on ion distribution in the brain. *Physiol. Rev.*, **65**, 101 (1985).
 - 23) Varming, T., Drejer, J., Frandsen, A. and Schousboe, A. : Characterization of a chemical anoxia model in cerebellar granule neurons using sodium azide : protection by nifedipine and MK-801. *J. Neurosci. Res.*, **44**, 40 (1996).
 - 24) Rose, C. R., Waxman S. G. and Ransom B. R. : Effects of glucose deprivation, chemical hypoxia, and stimulated ischemia on Na⁺ homeostasis in rat spinal cord astrocytes. *J. Neurosci.*, **18**, 3554 (1998).
 - 25) Swanson, R. A. : Astrocyte glutamate uptake during chemical hypoxia *in vitro*. *Neurosci. letters*, **147**, 143 (1992).
 - 26) Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **65**, 55 (1983).
 - 27) Berridge, M. V. and Tan, A. S. : Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) : subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch. Biochem. Biophys.*, **303**, 474 (1993).
 - 28) Vistica, D. T., Skehan, P., Scudiero, D., Monks, A., Pittman, A. and Boyd, M. R. : Tetrazolium-based assays for cellular viability : a critical examination of selected parameters affecting formazan production. *Cancer Res.*, **51**(10), 2515 (1991).
 - 29) Frangakis, M. V. and Kimelberg, H. K. : Dissociation of neonatal rat brain by dispase for preparation of primary astrocyte cultures. *Neurochem. Res.*, **9**, 1689 (1984).
 - 30) McCaslin, P. P. and Ho, I. K. : Cell cultures in neurotoxicology. In: *Principles and Methods of Toxicology*, 3rd ed., Raven Press, Ltd., New York, p. 1316 (1994).
 - 31) Greene, L. A. and Tischler, A. S. : Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **73**, 2424 (1976).
 - 32) Bergmeyer, H. U. and Bernt, E. : Lactate dehy-

- drogenase and UV-assay with pyruvate and NADH. In: *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie International, Deerfield Beach, FL, p. 574 (1974).
- 33) Yu, A. C. H., Gregory, G. A. and Chan, P. H.: Hypoxia-induced dysfunctions and injury of astrocytes in primary cell cultures. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **9**, 20 (1989).
- 34) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
- 35) Kletzien, R. F., Pariza, M. W., Becker, J. E. and Potter, V. R.: A method using 3-O-methyl-D-glucose and phloretin for the determination of intracellular water space of cells in monolayer culture. *Anal. Biochem.*, **68**, 537 (1975).
- 36) Lowry, O. H. and Passonneau, J. V.: A flexible system of enzymatic analysis. Academic Press. San Francisco, p. 151 (1972).
- 37) Siesjo, B. K.: Cerebral circulation and metabolism. *J. Neurosurg.*, **60**, 883 (1984).
- 38) Weiss, J. N., Lamp, S. T.: Cardiac ATP-sensitive K^+ channels. Evidence for preferential regulation by glycolysis. *J. Gen. Physiol.*, **94**, 911 (1989).
- 39) Glitsch, H. G. and Tappe, A.: The Na^+/K^+ pump of cardiac purkinje cells is preferentially fuelled by glycolytic ATP production. *Eur. J. Physiol.*, **422**, 380 (1993).