

노르아드레날린성 신경세포에서의 BDNF 생산 증진 물질 탐색

† 전 흥 성

조선대학교 자연과학대학 생물과학부
(접수 : 2003. 5. 11., 게재승인 : 2003. 6. 25.)

Screening of Potential Compounds Promoting BDNF Production in Noradrenergic Locus Coeruleus Neurons

Hong-Sung Chun†

Division of Biological Science, College of Natural Science, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea
(Received : 2003. 5. 11., Accepted : 2003. 6. 25.)

The locus coeruleus (LC) contains about half of the total number of noradrenergic neurons in the brain and those noradrenergic neurons from the LC innervate entire brain regions. The LC is a major common target region in several neurodegenerative disorders such as Alzheimer's, Parkinson's and Huntington's diseases. The brain-derived neurotrophic factor (BDNF) regulate neuronal cell survival and differentiation of central nervous system neurons, including LC noradrenergic neurons. In this study, various small molecules and growth factors were tested as candidates to promote the production of BDNF in LC noradrenergic neuronal cells. The molecules tested include neuropeptides, cytokines, growth factors, neurotransmitters, and intracellular signaling agents. Four small molecules or growth factors, FGF8b, BMP-4, forskolin, and dibutyryl cGMP, were found to increase the release of BDNF in LC noradrenergic neurons. Especially, BMP-4 significantly enhanced BDNF production over 2.5-fold in LC noradrenergic neurons.

Key Words : Locus coeruleus, BDNF, BMP-4, FGF8b, forskolin

서 론

Locus coeruleus (LC)는 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병을 포함하는 여러 가지 신경퇴행성 질환에서 심하게 손상을 받는 부위인데, 전체 중추신경계의 노르아드레날린성 뉴런의 절반이 이 부위에 모여있다. LC는 뇌 전체 부위로 신경전달 물질을 보내서 뇌 대사, 통증, 기분, 학습과 기억, 수면, 집중, 각성 등의 다양한 기능을 조절한다(1).

LC 노르아드레날린성 뉴런의 생존을 도와주는 물질로 밝혀진 것들은 신경교 세포주 유래 신경영양인자 (glial cell line-derived neurotrophic factor; GDNF), neurotrophin-3 (NT-3), 뇌 유래 신경영양인자 (brain-derived neurotrophic factor; BDNF) 등의 신경영양인자들이다(2-5). 이들 신경영양인자들은 신경세포가 성장하고 분화하고 생존하도록 도와주는 단백질인데 중추신경계 뿐만 아니라 말초신경계의 분화와 생존을 조절해준다(6).

특히, BDNF는 LC 노르아드레날린성 뉴런이 손상을 받았을 때 뚜렷하게 감소하는 신경영양인자이다(7). LC에서는 BDNF를 만들어내고 뇌의 여러 부위로 전달해서 신경세포를 생존시키고 분화시키며 시냅스 형성에도 관여하고, 신경보호 효과를 준다(8-10). 여러 가지 신경퇴행성 질환 동물모델에서 BDNF가 올바르게 전달되거나 발현된 경우 신경세포의 사멸을 효과적으로 막아주었고, 회복을 유도하거나 빠른 치유력을 보여 주었다(5, 8). 이러한 전 임상 실험 결과를 바탕으로 현재까지 BDNF가 여러 가지 신경퇴행성 질환에 대해 임상 실험 단계에 있다. 하지만, BDNF는 그 크기 때문에 혈액-뇌 차단벽(blood brain barrier; BBB)을 통과하지 못하므로 구강 투입 혹은 주사에 의해서는 뇌에 도달하지 못한다(11). BDNF를 직접적으로 뇌에 투여하는 방법은 수술을 통해 머리에 구멍을 뚫어 전달할 수 있지만 실용적인 방법은 아니다. 가장 실용적인 접근 방법은 BBB를 통과할 수 있는 구강적으로 활동적인 합성물을 투여하고 뇌 속에서 신경영양인자 효과를 생성하거나, 유전자를 이용하여 뇌 속에서 신경영양인자를 생산하는 것이다. 본 연구에서는 BBB를 쉽게 통과할 수 있는 다양한 작은 분자들을 사용해서 LC 노르아드레날린 뉴런에서 BDNF 합성 및 분비를 활성화시킬 수 있는지를 탐색하였다.

† Corresponding Author : Division of Biological Science, College of Natural Science, Chosun University, 375 Seosuk-dong, Gwangju 501-759, Korea
Tel. : +82-62-230-6609, Fax : +82-62-230-6619
E-mail : hchun18@hotmail.com

재료 및 방법

재료 및 시약

모든 화학물질은 Sigma Co.의 것을 사용하였다. Neuropeptides로는 neurotensin (NEUT), somatostatin (SOM), adrenocorticotrophic hormone (ACTH), dynorphin (DYPN)을 사용하였고, 신경전달 물질로는 noradrenaline (NA), dopamine (DA), serotonin (5-HT), glutamate (GLU) 등을 사용하였다. 신호전달 물질로는 forskolin (Fors), dibutyl cGMP (cGMP), genistein (Geni), Ca⁺⁺ ionophore A23187, dexamethasone (Dex), hydrogen peroxide (H₂O₂) 등을 사용하였다. Cytokine인 interleukin 1β (IL-1β), tumor necrosis factor-α (TNFα) 성장인자인 fibroblast growth factor 8b (FGF8b), glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF), neurotrophin-3 (NT-3)는 R & D Systems (Minneapolis, MN, USA) 에서 구입하였다. Bone morphogenic protein 4 (BMP-4)는 Genetics Institute (Cambridge, MA, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

세포배양

Locus coeruleus 유래의 노르아드레날린성 세포주(12)는 33°C, 5% CO₂ 조건으로 RF 배지 (10% FBS, 1% glucose, 2 mM L-glutamine, 100 units/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin 첨가 D-MEM 배지)에서 배양하였으며, 실험에는 계대수가 5 이내인 세포를 사용하였다.

BDNF 생산의 측정

노르아드레날린성 세포를 6-well plate에서 2×10⁵ cells/well의 subconfluent 상태로 하룻동안 배양한 후, 1.5 ml의 최소배지 (MEM/F12 + N-2 supplement) 로 바꾸고 나서 BDNF 유도 후보 물질들을 각 well에 첨가하였다. 24시간 후, 배지를 회수하여 ELISA (enzyme-linked immuno sorbent assay)로 BDNF를 측정하기 전까지 -80°C에 보관하였다. BDNF의 양은 BDNF E_{max} ImmunoAssay System (Promega, Madison, WI, USA)을 사용해서 자동화된 ELISA plate reader를 통해 측정하였다.

통계처리

모든 실험은 4회 이상 수행하였으며, 평균값과 오차범위로 나타내었다. 결과는 GraphPad Prism data analysis program (GraphPad Software, San Diego, CA) 으로 분석하였고, 유의성은 Student's *t*-test에 의한 2-way ANOVA를 사용하여 검사하였다. 통계적 유의성은 *p*<0.05를 기준으로 하였다.

결과 및 고찰

Fig. 1에서 보듯이 중뇌의 locus coeruleus (LC) 부위와 노르아드레날린성 세포주에서 기본적으로 분비되는 BDNF의 양을 측정한 결과, 1mg 단백질 당 81~85pg BDNF로 거의 동일하였고, 특히 노르아드레날린성 세포주는 여러 차례 계대배양한 후 분비되는 BDNF의 양도 일정하게 유지됨을 확인하였다.

본 논문에서는 여러 가지 다양한 작은 분자들과 성장인자

들이 LC 노르아드레날린성 신경세포에서 BDNF의 분비를 촉진하는지 광범위하게 조사하였다. 살아있는 실험동물의 뇌에서는 이러한 작은분자들의 작용을 탐색하기가 거의 불가능하므로 LC 노르아드레날린성 신경세포주(12)를 사용하여 여러 그룹의 작은 분자들의 BDNF 분비 조절 효과를 조사하였다.

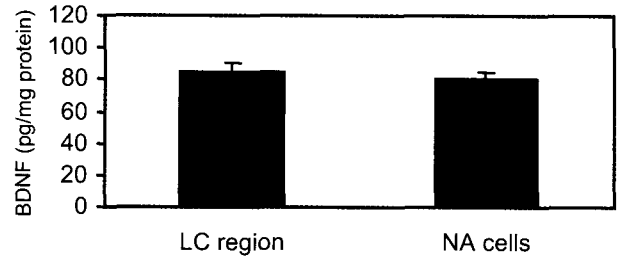


Figure 1. Quantitative measurement of BDNF release in the LC brain region as well as the NA cell line. The quantitative amount of BDNF produced in the NA neurons of LC region (B6CBA/J6 female mice, 12 weeks old) were measured by ELISA and compared with the BDNF release in 24hr by NA cell line (2×10⁵ cells). The columns and bars represent mean ±SD from four experiments.

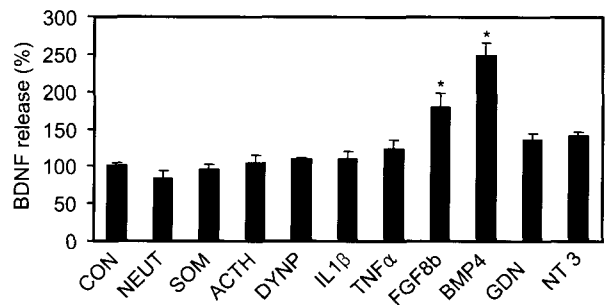


Figure 2. Modulation of BDNF release in the NA cells by neuropeptides, cytokines, and growth factors. The response of noradrenergic cells to various chemicals for 24hr was quantified by BDNF ELISA assay. Untreated sample was used as control (CON). All neuropeptides tested had no effect on BDNF release. Cytokines tested had minimum effect on BDNF release. The growth factors, FGF8b and BMP4 caused a statistically significant increase. FGF8b increased BDNF release by 80% and BMP4 treatment increased BDNF release a significant amount, over 2.5-fold. GDNF and NT-3 increased BDNF levels by 35-40%. Neurotensin (NEUT, 1 µM), somatostatin (SOM, 1 µM), adenocorticotrophic hormone (ACTH, 1 µM), dynorphin (DYPN, 1 µM), interleukin 1 β (IL1β, 50 ng/ml), tumor necrosis factor α (TNFα, 50 ng/ml), fibroblast growth factor 8b (FGF-8b, 10 ng/ml), bone morphogenic protein 4 (BMP-4, 200 ng/ml), glial cell-line derived neurotrophic factor (GDNF, 20 ng/ml) and neurotrophin-3 (NT-3, 20 ng/ml). All values are the means ±SD from four experiments; **p*<0.05.

Neuropeptides와 성장인자들은 신경작용을 조절하는 것으로 잘 알려져 있어서, 대표적인 neuropeptide들과 cytokine들 그리고 성장인자들이 LC 노르아드레날린성 뉴런에서 BDNF 분비를 조절하는지의 여부를 조사하였다. Fig. 2에서 보듯이 24 시간동안 LC 노르아드레날린성 뉴런을 neuropeptides로 자극한 결과 neurotensin은 약간 BDNF 분비를 감소시켰다 (17% 감소). Somatostatin과 ACTH, dynorphin 등은 별다른 영향을 주지 못했다. Cytokine들 중에서는 TNFα가 20% 정도 BDNF

분비를 촉진하였다. 성장인자로는 FGF8b, BMP4, GDNF 그리고 NT-3를 사용하였다. 이들은 LC 노르아드레날린성 뉴런의 성장과 분화에 필요한 것으로 알려져 있다(13). FGF8b는 BDNF 분비를 80% 정도 증대시켰다. FGF8b는 LC 부위에 존재하고 특히 노르아드레날린성 뉴런에 존재하는 것으로 알려져 있으며, 중뇌의 발달에 관여한다(14). LC의 노르아드레날린성 뉴런에서 FGF8b가 작용하는 기능에 대해서 아직까지 명확하게 밝혀진 바가 없지만, 이 실험결과로 FGF8b가 LC 노르아드레날린성 뉴런에서 BDNF 분비를 조절하는 것으로 새롭게 밝혀졌다. Bone morphogenic protein (BMP)들은 많은 종류의 세포에서 분화를 시작하도록 유도한다고 알려져 있다. 특히 BMP-4는 신경세포 선구체가 신경세포로 분화하도록 유도한다(15). 본 실험결과 놀랍게도 BMP-4는 2.5배 이상의 BDNF 분비 증대 효과를 보여주었다. BDNF는 LC 노르아드레날린성 뉴런의 분화에 깊이 관여한다고 알려져 있으므로, BMP-4가 신경세포 분화를 유도하는 것이 BDNF를 많이 분비하게 하는 기작을 사용하는 것으로 볼 수 있다. 노르아드레날린성 뉴런의 생존에 관여한다고 알려진 GDNF와 NT-3는 30-40%의 BDNF 분비 증가를 유도하였다.

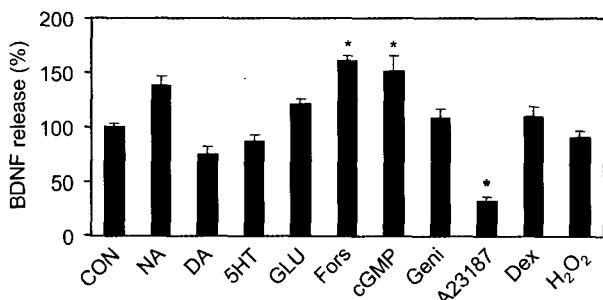


Figure 3. BDNF secretion from the LC NA cell line by neurotransmitters and intracellular signaling agents. The amount of BDNF in the cell-conditioned medium was quantified by ELISA. Untreated sample was used as control (CON). The four representative neurotransmitters, such as noradrenaline(NA, 25 μ M), dopamine(DA, 1 μ M), serotonin(5HT, 25 μ M) and glutamate(GLU, 25 μ M) were tested. Glutamate and noradrenaline increased the release of BDNF by 20-40%. Various intracellular signaling agents were tested to determine possible intracellular signaling pathways involved in regulating BDNF release in the NA neurons. Forskolol(Fors, 25 μ M) and cGMP (1mM) elevated BDNF release by 50-60%. Ca⁺⁺ ionophore, A23187(1 μ M) significantly suppressed the amount of BDNF release by 70%. Genistein (Geni, 100nM), dexamethasone(Dex, 1 μ M) and hydrogen peroxide(H₂O₂, 50 μ M) had no significant effect. All values are the means \pm SD; **p*<0.05.

LC 노르아드레날린성 뉴런에서 BDNF의 발현과 분비를 조절하는 세포내 신호전달 과정을 조사하기 위해서, 특정 신호전달 경로를 자극하거나 저해하는 여러 가지 신경전달물질과 신호전달 관련 물질들을 사용하였다(Fig. 3). 다양한 신호전달 경로가 LC 노르아드레날린성 뉴런에서의 BDNF 발현과 분비에 관여하는 것으로 판정되었다. 노르아드레날린과 glutamate는 BDNF 수준을 20-40% 정도 증가 시킨 반면, 도파민과 serotonin은 13-25% 감소 시켰다. 흥분성 신경전달물질인 glutamate는 독성을 나타내지 않는 농도로 주어진 경우 BDNF를 분비하고 신경세포 보호효과를 나타내는 것으로 알

려져있다(16). 따라서 노르아드레날린이나 glutamate가 보이는 흥분성 작용이 LC 노르아드레날린성 뉴런에서 BDNF의 분비를 증대시킴을 의미한다. Forskolol과 cGMP가 뚜렷하게 BDNF 분비를 증가시켰고 (50-60%), 비특이적 tyrosine kinase 저해제인 genistein과 dexamethasone, hydrogen peroxide 등은 별다른 효과를 보이지 않았다. Forskolol은 노르아드레날린성 신경세포를 포함한 여러 가지 종류의 신경세포에서 cAMP를 증가시키고, protein kinase A (PKA)를 활성화시키는 기작을 통해 신경세포의 생존을 증가시킨다고 보고되었다(13, 17, 18). cGMP 유사체인 dibutyryl cGMP는 세포내에서 cGMP를 증가시키고 protein kinase G만 특이적으로 활성화시킨다(19). 따라서 이 결과는 cAMP, protein kinase A 그리고 protein kinase G가 LC 노르아드레날린성 뉴런에서 BDNF 분비에 중요한 역할을 담당한다고 볼 수 있다. 세포내로 Ca⁺⁺을 유입시키는 Ca⁺⁺ ionophore인 A23187은 가장 뚜렷하게 BDNF 분비를 억제시켰다(70% 감소).

결론적으로, 본 실험에서는 여러 가지 작은 분자들과 성장인자들이 LC 노르아드레날린성 뉴런의 분화와 생존에 필요한 BDNF를 분비하도록 촉진한다는 사실을 확인하였다. FGF8b, BMP-4, Forskolol과 cGMP가 뚜렷하게 LC 노르아드레날린성 뉴런에서 BDNF 분비를 촉진하였고, 이러한 인자들이 여러 가지 신경퇴행성 질환에서 손상을 받는 LC 노르아드레날린성 뉴런의 생존에 도움을 줄 수 있는 치료제나 증상완화제로서의 가능성을 가짐을 제시하고 있다.

요약

Locus coeruleus (LC)에는 전체 노르아드레날린성 뉴런의 절반 가량이 모여 있는데, 여기서 노르아드레날린성 뉴런이 뇌의 거의 모든 부위로 신경자극을 보내게 된다. LC는 알츠하이머병, 파킨슨병, 헌팅턴병 같은 여러 가지 신경퇴행성 질환에서 공통적으로 타격을 받는 주요 부위이다. 뇌 유래 신경영양인자, BDNF가 LC 노르아드레날린성 뉴런을 포함한 중추신경계 뉴런들의 분화와 신경세포 생존에 중요한 조절자로 작용한다. 본 연구에서는 LC 노르아드레날린성 신경세포에서 여러 가지 작은 분자들과 성장인자들이 BDNF 생산을 촉진할 수 있는지를 조사하였다. 실험에 사용한 분자들로는 neuropeptides, cytokines, 성장인자, 신경전달물질들과 세포내 신호전달물질들이 포함되었다. 여러 가지 작은 분자들과 성장인자들 중에서 FGF8b, BMP-4, forskolin 그리고 dibutyryl cGMP가 LC 노르아드레날린성 뉴런에서 BDNF 분비를 뚜렷하게 증대시킨 것으로 판명되었다. 특히, BMP-4는 BDNF 생산을 2.5배 이상 증가시켰다. LC 노르아드레날린성 뉴런에서 BDNF를 증가시킨 물질들은 여러 가지 신경퇴행성 질환에서 신경세포가 손실되는 것을 막거나 지연시킬 수 있을 것이므로, 치료제나 증상완화제로서의 가능성이 높다.

감사

본 연구는 조선대학교 신경분자생물학 실험실에서 수행하였으며, 조선대학교의 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Marshall, K. C., M. J. Christie, P. G. Finlayson, and J. T. Williams (1991), Developmental aspects of the locus coeruleus-noradrenaline system, *Prog. Brain Res.* **88**, 173-185.
2. Lindsay, R. M., S. J. Wiegand, C. A. Altar, and P. S. DiStefano (1994), Neurotrophic factors: from molecule to man, *Trends Neurosci.* **17**, 182-190.
3. Friedman, W. J., C. Ibanez, F. Hallbook, H. Persson, L. D. Cain, C. F. Dreyfus, and I. B. Black (1993), Differential actions of neurotrophins in the locus coeruleus and basal forebrain, *Exp. Neurol.* **119**, 72-78.
4. Arenas, E. and H. Persson (1994), Neurotrophin-3 prevents the death of adult central noradrenergic neurons in vivo, *Nature* **367**, 368-371.
5. Sklair-Tavron, L. and E. J. Nestler (1995), Opposing effects of morphin and the neurotrophins, NT-3, NT-4, and BDNF, on locus coeruleus neurons in vitro, *Brain Res.* **702**, 117-125.
6. Lewin, G. R. and Y. A. Barde (1996), Physiology of the neurotrophins, *Annu. Rev. Neurosci.* **19**, 289-317.
7. Cirelli, C. and G. Tononi (2000), Differential expression of plasticity-related genes in waking and sleep and their regulation by the noradrenergic system, *J. Neurosci.* **20**, 9187-9194.
8. Fawcett, J.P., S.X. Bamji, C.G. Causing, R. Aloyz, A.R. Ase, T.A. Reader, J.H. McLean, and F.D. Miller (1998), Functional evidence that BDNF is an anterograde neuronal tropic factor in the CNS, *J. Neurosci.* **18**, 2808-2821.
9. Conner, J. M., J. C. Lauterborn, Q. Yan, C. M. Gall, and S. Varon (1997), Distribution of brain-derived neurotrophic factor(BDNF) protein and mRNA in the normal adult rat CNS: evidence for anterograde axonal transport, *J. Neurosci.* **17**, 2295-2313.
10. Aloyz, R. A., J. P. Fawcett, D. R. Kaplan, R. A. Murphy, and F. D. Miller (1999), Activity-dependent activation of TrkB neurotrophin receptors in the adult CNS, *Learn. Mem.* **6**, 216-231.
11. Betz, A. L., G. W. Goldstein, and R. Katzman (1989), Blood-brain-cerebrospinal fluid barriers, In *Basic Neurochemistry*, G. Siegel, B. Agranoff, R.W. Albers, and P. Molinoff, Eds., pp591-606, Raven Press, New York.
12. Son, J. H., H. S. Chun, T. H. Joh, S. Cho, B. Conti, and J. W. Lee (1999), Neuroprotection and neuronal differentiation studies using substantia nigra dopaminergic cells derived from transgenic mouse embryos, *J. Neurosci.* **19**, 10-20.
13. Reiriz, J., P. C. Holm, J. Alberch, and E. Arenas (2002), BMP-2 and cAMP elevation confer locus coeruleus neurons responsiveness to multiple neurotrophic factors, *J. Neurobiol.* **50**, 291-304.
14. Ye, W., K. Shimamura, J. L. Rubenstein, M. A. Hynes, and A. Rosenthal (1998), FGF and Shh signals control dopaminergic and serotonergic cell fate in the anterior neural plate, *Cell* **93**, 755-766.
15. Li, W., C. A. Cogswell, and J. J. LoTurco (1998), Neuronal differentiation of precursors in the neocortical ventricular zone is triggered by BMP, *J. Neurosci.* **18**, 8853-8862.
16. Marini, A. M., S. J. Rabin, R. H. Lipsky, and I. Mochetti (1998), Activity-dependent release of brain-derived neurotrophic factor underlies the neuroprotective effect of N-methyl-D-aspartate, *J. Biol. Chem.* **273**, 29394-29399.
17. Lo, L., X. Morin, J. F. Brunet, and D. J. Anderson (1999), Specification of neurotransmitter identity by Phox2 proteins in neural crest stem cells, *Neuron* **22**, 693-705.
18. Meyer-Franke, A., G. A. Wilkinson, A. Kruttgen, M. Hu, E. Munro, M. G. Hanson, L. F. Reichardt, and B. A. Barres (1998), Depolarization and cAMP elevation rapidly recruit TrkB to the plasma membrane of CNS neurons, *Neuron* **21**, 681-693.
19. Schwede, F., E. Maronde, H. Genieser, and B. Jastorff (2000), Cyclic nucleotide analogs as biochemical tools and prospective drugs, *Pharmacol. Ther.* **87**, 199-226.