

일차배양 해마 신경세포에서 연에 의해 유도된 세포 독성

계명대학교 의과대학 예방의학교실

정인성

Lead Induced Cytotoxicity in Primary Cultured Hippocampal Neuronal Cell

In Sung Chung, M.D.

*Department of Preventive Medicine,
Keimyung University School of Medicine, Daegu, Korea.*

Abstract : This study carried out to demonstrate of relationships between lipid peroxidation and lead-induced neuronal cell toxicity by measure of the cellular toxicity index on various doses of lead, and to investigate the effect of lead on N-methyl-D-aspartate(NMDA), α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid(AMPA) and kainate-induced neurotoxicity. The cellular toxicity was assessed by morphological examination and by measuring the release of lactate dehydrogenase (LDH) and nitric oxide production. The cell viability of hippocampal neuronal cells showed to decrease following exposure to lead in a dose-dependent manner, resulting in 76.67% of cell viability at 1,000 μ M, 12-hour lead treatment. The LDH leakage was significantly increased at 100 and 1,000 μ M lead treatment for 12 hours. Nitric oxide production significantly increased at 1,000 μ M lead treatment for 4 hours. Lead at 50 μ M reduced significantly NMDA-induced cytotoxicity at 100 μ M NMDA treatment, whereas it failed to reduce AMPA and kainate-induced cytotoxicity at 100 μ M treatment respectively. On the basis of these results the cytotoxicity of hippocampus by lead is related with lipid peroxidation, lead reduced NMDA-induced cytotoxicity.

Key Words : Hippocampus, Lead, NMDA

서론

연(鉛)은 인체의 여러 기관에 영향을 일으키는 유해중금속이다. 연은 일상생활에서 음식물을 통해 폭로되며, 과도한 폭로로 인한 연 중독의 경우는 주로 환경에 의해 유발된다. 그 예로 연이 포함된 오래된 건축물의 실내 페인트나 주위 환경오염에 의한 연 먼지, 연으로 오염된 식수, 연이 오염된 환경에 사는 유아의 손에서 입으로의 활동, 식품의 용기나 교통기관의 배기가스로 인해 생활환경 내에서 문제가 되고 있으며, 도시 주민들은 이러한 연에 쉽게 폭로 될 수 있다[1].

연은 혈액, 연부조직, 무기질조직에 축적되며, 체내 축적의 약 95%가 뼈와 같은 무기질조직에 축적되며, 연 중독시 주요 표적기관은 신경계이다[2]. 그 중 중추신경계에서 연은 회백질과 일부 신경에 축적되는 경향이 있으며, 가장 많이 축적되는 곳으로는 해마, 소뇌, 백질, 수질 순이다[3]. 중추신경계에 대한 연 독성은 고농도에서 급성뇌증을 일으키고[4,5], 저농도에 만성적으로 폭로시 인지 및 학습과 기억에 장애를 일으키는 것으로 알려져 있다[6,7]. 특히 소아는 저농도의 연에 만성적으로 노출되어 나타날 수 있는 신경독성효과에 감수성이 높다. 한 연구에서 2세때 연에 과다폭로 된 결과로 중추신경계의 손상을 입은 소아의 추적조사 결과 5세때 낮은 지능지수와 인지기능 장애가 나타난다는 보고도 있다[8]. 연은 태반을 통과하여 태아에서의 연 농도가 산모 혈액에서 연 농도와 비교하여 임신 기간 동안 혈액회석 결과로 감소[9]하기는 하나, 태아 뇌는 혈-뇌-장벽의 미성숙으로 인해 연의 독성에 특히 민감하여 태어난 이후 보다 임신기간 동안에 태생 뇌에 연 축적이 더 높다는 연구 보고가 있다[10]. 이에 연 폭로시 가장 축적이 많이 되는 해마는 학습과 기억에 중요한 역할을 하는 중추신경계로 주산기에 점차적으로 발달하므로 연 중독 연구에 주 대상이 되고 있으나 발육중인 뇌에 대한 연의 독성효과와 기전은 아직 충분히 설명할 수 없다.

연의 세포독성 기전으로는 여러 가지가 제시되고 있는데, 그 중 반응성 산소종의 생성과 산화성

조직 손상 및 지질 과산화는 연에 의한 세포독성과 연관이 있다는 실험결과가 있다[11]. 그 외 동물실험 결과로 연을 처리한 쥐의 적혈구에서 thiobarbituric acid(TBA)-색소원과 변형이 증가됨을 보고 하였고, 자유기가 연에 의한 세포독성과 연관이 있음을 밝혔으며, Safiq[12]는 노출된 쥐의 뇌에서 TBA-색소원의 생성이 2배 증가하였음을 보고하여 연에 의한 세포독성에 반응성 산소종이 관련 있음을 밝혔다.

또한 연의 전기생리학적인 작용은 흥분성 glutamate 수용체가 관련되어 있으며, 흥분성 아미노산의 아형으로는 NMDA, AMPA, kainate가 있고 그중 NMDA-수용 복합체의 학습과 기억의 과정에서의 중요성은 비경쟁적 NMDA 길항제를 이용한 여러 연구에서 두드러지게 나타난다[13-18]. 지금까지 각각의 glutamate 수용체와 연의 관련성에 대한 연구 결과를 보면, 시험관내에서 쥐해마의 pyramidal 세포에서 NMDA에 의해 야기되는 전체 뉴우런의 glutamate연접의 single-channel 유입은 연농도와 비례하여($IC_{50}=10 \mu M$ lead) 저해되었다[19]. 다른 연구결과에서도 연은 NMDA와 glycine 수용체에 비경쟁적 길항물질로 작용하여 배양 해마 신경세포 실험에서 NMDA-activated current를 저해하는 것으로 보고하였다[20]. 그 외에 소뇌 과립세포에 대한 glutamate에 의해 야기되는 과사에 대해 50과 100 μM 의 연이 방어작용이 있다는 보고가 있다[21]. 또한 연은 kainate에 의해 활성화된 non-NMDA 수용체에 대해 비경쟁적 채널 차단인자로 작용한다는 보고도 있다[22]. 그럼에도 흥분성 아미노산 수용체의 아형중 NMDA, AMPA, kainate 중 어느 수용체에 선택적으로 작용하여 신경보호 작용이 나타나는가에 대한 연구결과는 미미하다.

이에 본 연구에서는 일차배양 해마신경세포에서 연에 의한 독성효과를 알아보기 위하여 독성의 지표로 시간별, 농도별로 연을 처리하여 세포 활성도, nitric oxide(NO)생성, LDH 유출을 측정하였으며, 연에 의한 신경독성효과에 있어 glutamate 수용체의 아형과의 연관성을 보고자 NMDA, AMPA, kainate를 투여하여 세포독성의 변화를

LDH의 발현정도를 측정하여 비교 분석하였다.

재료 및 방법

1. 해마 신경세포의 분리 및 배양

임신 13-15일의 Sprague-Dawley종 흰쥐의 복강을 70% alcohol로 소독후 절개한 뒤 자궁을 적출하여 태아쥐의 두경부를 절단하였다. 피부와 두개골을 제거하고 후뇌에서 연수까지의 뇌를 꺼내어서 HBSS(Hank's Balanced salt solution)에 모은 뒤 현미경 하에서 뇌조직 주위의 뇌막을 제거후 해마부위를 분리하였다. 분리된 조직에 0.25% trypsin과 0.01% DNase를 첨가하여 37℃ 수조에서 20분간 배양한 다음 HBSS로 수차례 씻어내어 trypsin을 완전히 제거하고 조직 덩어리를 작은 입자덩어리로 만든 후 상층액을 취하여 HBSS를 첨가하고 세포를 분리하였다. 동일 과정을 수차례 반복 후 상층액은 버리고 배지에 부유시켰다. 부유시킨 일부 세포를 취하여 trypan blue로 염색한 후 현미경하에서 hemocytometer를 이용하여 세포의 수를 측정한 다음, 10^4 - 10^5 개의 세포를 B-27, 0.5 mM L-glutamine, 25 μ M glutamate, 25 μ M 2-mercaptoethanol이 첨가된 Neurobasal media에 4일간 배양후 glutamate가 없는 배지로 1/2을 교환하고 2-3주간 배양 신경세포가 성숙한 다음 연을 0.1 -1,000 μ M농도로 처리하였다. 또한 IC_{50} 으로 결정된 농도의 연과 AMPA, NMDA, kainate를 동시 처리한 후 다음 실험을 실시하였다.

2. 세포 활성도 측정

배양 신경세포에 0.1-1,000 μ M 연을 4시간, 12시간 동안 처리 후 세포 활성도를 Cell proliferation kit I(MTT;3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide, Boehringer Mannheim, Germany)을 이용하여 측정하였다. 측정 방법은 배양된 신경세포에서 최종 농도가 0.5

mg/mL가 되도록 MTT 표지 시약을 넣고 4시간 배양한 후 solubilization solution(10% SDS in 0.01 M HCl)을 넣고 밤새 배양한 다음 ELISA reader (Dynatech MR 700, U.S.A)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. LDH 활성도 측정

배양 신경세포에 0.1-1,000 μ M 연을 4시간, 12시간 동안 처리후 LDH의 활성도를 측정하였으며, MTT 측정결과로 얻어진 IC_{50} 의 농도인 50 μ M의 연 처리시와 NMDA, AMPA, kainate 단독 처리시, 연과 NMDA, AMPA, kainate 병용 처리시 LDH 활성도를 측정하였다. 측정 방법은 배양된 신경세포를 10분간 원심분리후 세포 성분을 침전시키고 부유액만을 취하여 100 μ L Cytotoxicity detection kit(LDH, Boehringer Mennheirn, Germany)로 혼합하여 실온에서 10-30분 정도 반응시킨 뒤 반응을 멈추게 하기위해 50 μ L의 1 N HCl를 주입후 ELISA reader로 490 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

4. Nitrite 측정

NO synthase의 활성도를 측정하기 위하여 배양액에 존재하는 nitrites (NO_2^-)가 nitrate로 환원하는 원리를 이용하여 nitrites의 양을 측정하였다. 배양 신경세포에 1,000 μ M 연을 4시간, 12시간 동안 처리 후 배양액을 150 μ L씩 얻어 4℃에서 $1,500 \times g$ 의 속도로 15분간 원심분리 후 세포성분들을 침전시키고 부유액만을 취하여 100 μ L의 Griess reagent(1:1 mixture of 0.1% N-1-naphthyleneamine dihydrochloride in 60% acetic acid)로 혼합하여 실온에서 10분간 반응시키고 실온에서 분홍색의 발색을 확인한 다음 ELISA reader로 540 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준농도의 sodium nitrite에 의해 표준곡선을 그린 다음 농도를 계산하였다.

5. 통계처리

자료의 통계학적인 처리는 두 군간 또는 그 이상의 군간의 평균은 평균 $\pm$ 표준오차로 표시하여 비교하였고, 통계학적 유의성은 평균비교(t-test)와 일 원 분 산 분 석 (one-way ANOVA) 후 Scheffe's multiple comparison test를 실시하였으며 유의수준은 0.05미만으로 정하였다

성 적

1. 독립현미경적 소견

14일간의 해마 신경세포 배양 후 대조군과 100 μ M 연을 처리군의 배양세포에 각각 H&E stain을 실시하였다. 연을 처리한 신경세포는 대조군에 비해 분절화된 수상돌기의 형태를 나타내었으며 핵의 크기는 작아진 양상이었다(Fig. 1).

2. 세포 활성도

해마 신경세포에 대조군과 0.1 μ M에서 1,000 μ M까지 연을 4시간, 12시간동안 처리한 후 세포활성도를 MTT assay로 측정한 결과 4시간 처리군에서는 농도별 활성도의 차이가 없었으나 12시간 처리군에서는 1,000 μ M의 농도에서는 대조군에 비해 76.67%로 유의하게 감소하였다($p < 0.05$, Fig. 2)

3. LDH 활성도

대조군과 각 농도의 연 처리군에서 LDH 활성도를 측정한 결과 4시간 처리군에서는 농도별 차이가 없었으나 12시간 처리군에서는 대조군과 비교시 100 μ M, 1,000 μ M에서 LDH 활성도가 각각 163%, 187%로 유의하게 증가하였다($p < 0.05$, Fig. 3).

각 농도별 NMDA, AMPA, kainate 처리군에서는 NMDA는 10 μ M, 100 μ M에서 대조군과 비교시 각각 118, 149%로 유의하게 증가하였고

($p < 0.05$), AMPA와 kainate에서는 100 μ M에서 대조군과 비교시 각각 118%, 125%로 유의하게 증가하였다($p < 0.05$, Fig. 4).

각 농도별 연의 처리에 따른 세포 활성도를 참고로 하여 정한 IC_{50} 에 해당하는 농도인 50 μ M과 각 농도별 NMDA, AMPA, kainate 처리군에서의 LDH 활성도 측정시 유의한 증가를 보인 100 μ M을 선정하여 각각의 단독 투여시와 연과 병용 투여시 LDH 활성도를 측정한 결과에서 보면 NMDA 단독 투여시 보다 연과 병용투여시 오히려 LDH가 171%에서 144%로 유의하게 감소하였다($p < 0.05$, Fig. 5). 이에 반해 AMPA, kainate의 경우 단독 투여군과 연과 병용투여군의 LDH활성도는 차이가 없었다(Fig. 6 & 7).

4. Nitrite 측정

대조군과 연 1,000 μ M을 각각 4시간, 12시간 동안 처리한 후 세포배양액에 존재하는 NO의 생성량을 간접적으로 측정하기 위하여 nitrite의 농도를 측정한 결과는 4시간 처리군에서 대조군에서의 2.18 μ M과 비교하여 6.88 μ M로 nitrite의 생성이 통계학적으로 유의하게 증가하였다($p < 0.05$, Fig. 8).

고 찰

연 중독은 가장 중요한 직업성 질환으로 의학 기술적 예방으로 보고되는 사례들을 줄일수 있고 심각한 임상적 증상도 감소시킬 수 있다[8]. 연은 폭로시 주로 호흡기나 소화기를 통하여 인체로 유입되며 여러 기관에 축적되어 독성 효과를 나타낸다. 그중 신경계에 대한 독성은 숙주의 나이에 따라 다양하게 나타나는데 가장 민감한 연령은 소아 특히 유아기, 주산기 소아, 태아이다[23]. 또한 연의 중추신경계에 영향은 단순한 용량-의존관계로 나타나지는 않는다. 예를 들어 혈-뇌-장벽이 정상인 소뇌에서 연의 효과는 고농도에서만 관찰되며, 해마의 형성과 도파민성 신경전달물질에 대한 영향은

저농도에서 주로 관찰된다. Goldstein[24]은 연의 혈중 농도가 27-270 $\mu\text{g}/100\text{ dL}$ 사이에서 소아의 중추신경계 기능에 영향을 미쳐 지능발달의 지연, 영구적 인지기능 장애를 유발한다고 보고하였다. 본 실험결과에서는 연 처리후 각 농도별로 측정된 세포 활성도를 살펴보면 4시간 처리군에서는 각 농도별 세포 활성도가 대조군과 비교하여 차이가 없었으나 12시간 처리군의 경우에는 저농도에서는 차이가 없었으나 고농도에 해당하는 1,000 μM 농도에서는 대조군과 비교시 세포활성도가 유의하게 감소하였다. Yinn과 Lin[11]은 혈중 연 농도가 35 $\mu\text{g}/\text{dL}$ 이상에서 지질 과산화가 증가한다고 밝혔으며, 이러한 지질 과산화의 발생기전에는 NO가 관여하는 것으로 생각되어진다. 즉, NO는 활성화된 대식세포에 의해 생성된 매우 반응성이 높은 내인성 화학물질이고 세포독성 과정의 중간 매개물로 [25], 대식세포와 중성백혈구, 신경세포에서 superoxide와 NO를 생성하고 이것들이 결합하여 peroxyntirite anion을 형성할 수 있다[26]. 이러한 NO 합성과 superoxide 생성 유도가 어느 정도는 연에 의한 신경독성에 기여할 것으로 생각되어지며 이러한 과정에서 세포막의 손상 결과 배양액 내의 LDH 유출이 증가하는 것으로 생각된다. 본 실험에서는 연을 12 시간동안 100, 1,000 μM 의 고농도로 처리한 군에서 의미 있게 증가하였으며, 또한 LDH의 발현 정도가 높은 고농도의 연 처리군에서 NO의 생성이 증가되었다. 이러한 결과는 LDH 유출이 반응성 산소종의 생성에 의한 세포 파괴의 결과로 나타남을 추측할 수 있다.

NO와 superoxide anion의 생성은 NMDA 수용체를 통한 신경독성에도 부분적으로 관여할 것으로 생각된다. 1980년대 후반에 Bredt와 Snyder[27]는 쥐 소뇌에서 NO synthase (NOS)를 분리·정제하여 실험한 결과 NOS는 Ca^{2+} /calmodulin에 의존적임을 보고하였다. 그리하여 신경전달에 있어서, 자극된 신경세포에서 유리된 glutamate가 주위 신경세포의 NMDA 수용체에 부착하여 활성화시키면 이온채널이 열려 Ca^{2+} 이 세포 내에 들어가 calmodulin과 결합함으로써 NOS가 활성화되고 산소와 nicotinamide-

adenine dinucleotide phosphate(NADPH) 존재 하에서 NOS가 L-arginine을 L-citrulline와 NO로 변화시킴을 밝혔다. 신경계에 작용하는 뇌 형태의 NOS(bNOS)는 특정 신경세포에 항상 존재하면서 신경세포가 자극되어 세포 내에 Ca^{2+} 이 적당하게 증가하는 경우에는 효소가 활성화되어 소량의 NO를 합성하고 이렇게 합성된 NO는 주위조직으로 확산되어 신경전달물질로의 역할을 한다. 그러나 신경조직에 혈액순환의 장애가 초래되었다가 다시 혈액순환이 회복한 경우에는 신경세포 내에 Ca^{2+} 이 과도하게 증가하게 되고 이에 따라서 많은 양의 NO가 생성되어 신경세포에 손상을 미칠 수 있다고 보고하였다[28]. 다시 말하면, NMDA 수용체의 과도한 자극은 자유기의 생산을 촉진하며, 특히 NMDA 수용체의 과도한 흥분과 연관된 신경독성은 과도한 Ca^{2+} 의 유입에 의해 매개되어지고 연이어 여러 가지 신경독성 기전들이 일어나게 된다. 이러한 기전중의 한가지가 NOS활성화와 NO의 생산이다[29]. 그러나, Loikkanen등[30]은 glutamate에 의해 야기된 산화적 손상에서 세포외 Ca^{2+} 의 역할과 함께 glutamate의 신경 자극과 연 신경독성에서 산화적 손상의 역할을 설명하기위한 mouse hypothalamic GT1-7세포에서의 시행 결과에서 glutamate는 세포외 Ca^{2+} 의 존재 유무와는 무관하게 반응성 산소종의 생성을 증가시키고, glutamate에 의해 야기된 반응성 산소종의 생성은 연에 의해 증폭되었다고 보고하였다. 이 실험의 결과로 GT1-7세포에서 세포외 Ca^{2+} 은 glutamate에 의해 야기된 반응성 산소종의 생성에서 필수요건으로 작용하는 것이 아니라 세포외 Ca^{2+} 이 존재하지 않을 경우에만 연에 의하여 세포외 칼슘이 증폭되어짐을 알 수 있고, 이러한 연과 glutamate의 합동 세포독성은 주로 연에 의해 야기되어지며 반응성 산소종보다는 다른 기전을 통해 이루어짐을 알 수 있다고 보고하였다. 또한 Bressler와 Goldstein등[31]은 연에 의한 신경 독성의 많은 부분은 연이 세포 기능의 조절인자로서 Ca^{2+} 의 작용을 방해한다고 하였으며, 신경말단에서 protein kinase의 활성화에 의한 spontaneous release를 증가시키고 막전압-의존성 Ca^{2+} 통로의 차단으로 evoked release를 방해하

여 시냅스 형성의 발달과정을 바꾸어 인지기능에 장애를 초래한다고 하였다. 한편, Anita등[32]은 glutamate에 의해 매개되어지는 신경세포 손상을 조절하는데 NMDA 수용체의 탈감작 작용의 역할을 보기 위해 쥐의 소뇌 과립세포에 NMDA를 subtoxic 농도로 전처치를 한 결과 glutamate에 의해 야기되는 칼슘신호를 아주 많이 감소시켰으며, 더 나아가 glutamate의 과다 자극의 결과로 인한 아포프토시스양 세포사의 감소를 관찰하였다. 이러한 효과는 NMDA 수용체의 길항제를 사용할 때 감소함을 관찰하였고, 이 결과로 수용체의 탈감작은 glutamate에 의한 아포프토시스양 신경세포 손상을 보호함을 알 수 있었다.

본 연구는 우선 그 자체로 흥분성 신경독성을 일으키는 glutamate 수용체의 아형에 대한 연의 영향을 알아보고자 연의 각각의 농도별 LDH의 발현을 조사한 실험 결과에서 얻은 연 농도로 NMDA, AMPA, kainate에 대한 연의 영향을 실험하였다. 결과에서 50 μ M 농도의 연은 AMPA, kainate에 의한 신경독성에는 영향을 나타내지 않았으나 NMDA에 대한 신경독성에는 NMDA를 단독 처리했을 때보다 LDH의 발현률이 낮은 것으로 보아 연이 NMDA에 의한 신경독성에 보호효과가 있음을 보여준다고 할 수 있다. 그러나 MacDonald와 Nowak[33]는 연구 결과에서 연이 NMDA에 의해 야기된 세포막을 통한 흐름에 막전압과는 상관없이 저해 하는데 반해 kainate에 의한 신경독성에 대한 보호효과에서는 막전압과 관련되어 kainate에 의한 세포막 흐름을 감소시키며 이러한 작용은 양전하를 띠는 Pb^{2+} 이 단백질 작용체의 결합자리에서 작용하기 보다는 오히려 수용체와 연관된 이온 통로의 내에서 혹은 그 안에 차단 자리에 존재함을 의미하는 것으로 보고하였다.

이상의 본 실험의 결과에서 연을 고농도로 처리한 군에서 LDH 유출의 증가와 NO의 생성이 증가되었으므로 연의 중추신경계에 대한 독성기전과 관련하여 지질의 과산화가 관여되어 있을 것으로 생각되어 지며, 흥분성 아미노산에 대한 신경독성에는 단독투여시보다 연을 동시에 투여하였을 경우에 LDH 유출이 감소 된 것으로 보아 연이 오히려 신

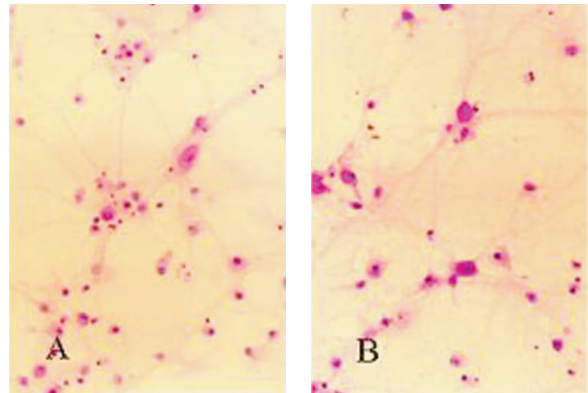


Fig. 1. Light microscopic findings of cultured hippocampal cells(Hematoxylin and eosin stain, $\times 200$)

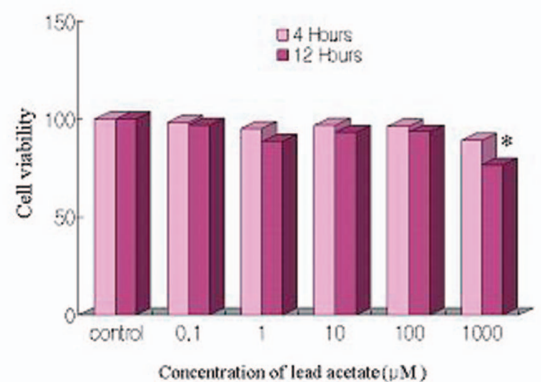


Fig. 2. The cytotoxicity of lead acetate measured by 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay in hippocampal cells treated for 4 and 12 hours. * $p < 0.05$: significantly different from the control.

경의 보호효과가 있음을 제시해 준다. 그러나 실험에 사용한 동물을 태생 14일경에 국한함으로써 발육상태 변화에 따른 연의 세포독성을 관찰할 수 없었으며, 지질의 과산화와 연관된 산화적 손상에 대해서는 충분한 연구가 이루어지지 못하였다. 그러므로 추후 NMDA 수용체의 아단위가 신경세포의 발육과정에서 서로 교체가 일어난다는 이론을 바탕으로 발육상태별로 연이 아단위의 교체시기와 연관하여 어떠한 영향을 나타내는가에 대한 연구가 이루어져야 할 것이다.

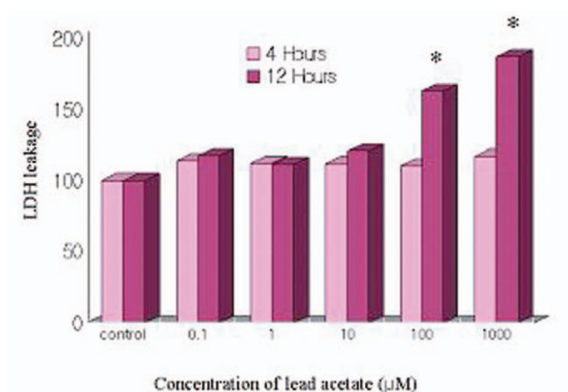


Fig. 3. Effects of lead acetate on the leakage of lactate dehydrogenase (LDH) in cultured hippocampal cells. Assay were performed after 12-hour incubation. * $p < 0.05$: significantly different from the control.

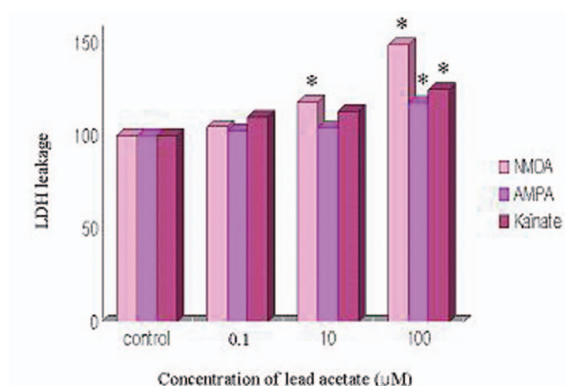


Fig. 4. Effects of NMDA, AMPA, and kainate on the leakage of lactate dehydrogenase (LDH) from cultured hippocampal cells. Assay were performed after 12-hour incubation. * $p < 0.05$: significantly different from the control.

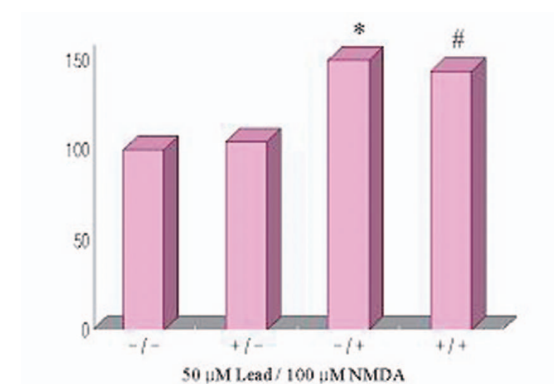


Fig. 5. Effects of NMDA and lead acetate on the leakage of lactate dehydrogenase (LDH) in the cultured hippocampal cells. Assay were performed on culture media after 12-hour incubation. * $p < 0.05$: significantly different from the control, # $p < 0.05$: significantly different from treated with 100 μM NMDA.

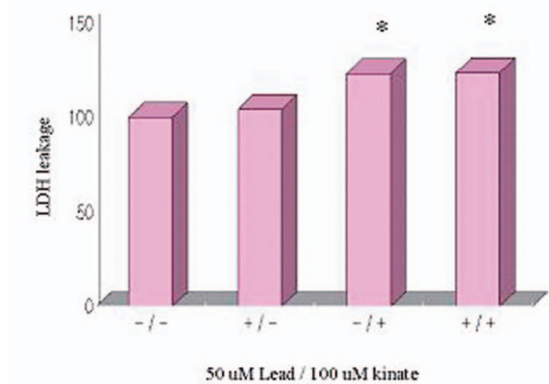


Fig. 6. Effects of Kinate and lead acetate on the leakage of lactate dehydrogenase (LDH) in cultured hippocampal cells. Assay were performed on culture media after 12-hour incubation. * $p < 0.05$: significantly different from the control.

요 약

임신 13-15일의 Spruge-Dawley종 흰쥐의 해마 신경세포를 분리하여 B-27, 0.5 mM L-glutamine, 25 μM glutamate, 25 μM 2-mercaptoethanol이 첨가된 Neurobasal media에 4일간 배양후 glutamate가 없는 배지로 1/2 교환

하고 2-3주간 배양후 신경세포가 성숙한 다음 연을 0.1-1,000 μM 농도로 처리한 후 연의 신경세포 독성기전에서 지질과산화의 관련성과 연과 AMPA, NMDA, kinate를 동시 처리하여 연의 흥분성 아미노산의 신경 독작용에 대한 작용을 조사하였다.

배양세포에 각 농도별 연을 처리하여 세포독성으로 인한 세포 활성도의 변화에서 연의 농도가 증

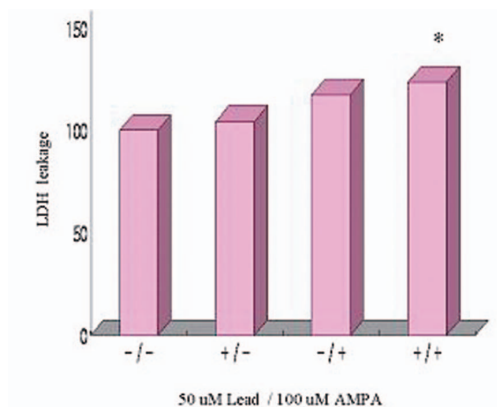


Fig. 7. Effects of AMPA and lead acetate on the leakage of lactate dehydrogenase (LDH) in cultured hippocampal cells. Assay were performed on culture media after 12-hour incubation. * $p < 0.05$: significantly different from the control.

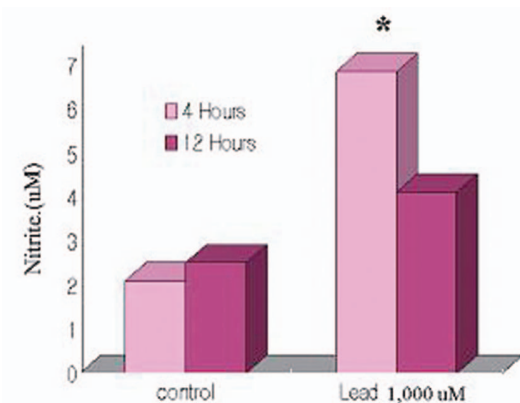


Fig. 8. Nitrite release in cultured hippocampal cells. The cells were treated with lead acetate for 4 and 12 hours. * $p < 0.05$: significantly different from the control.

가함에 따라 감소하는 경향이 있었으며, 특히 12시간동안 1,000 μM 처리시 유의하게 감소하였다. LDH의 경우 12시간동안 100, 1,000 μM 처리군에서 유의한 증가를 볼 수 있었고, glutamate 수용체의 아형에 대한 연의 영향을 실험한 결과에서는 AMPA, kainate에의 영향을 나타내지 않았으나 NMDA에의 영향은 저농도에서는 NMDA 자체의 세포 독성에는 영향을 미치지 않았으나 고농도의 연을 동시에 처리한 경우는 NMDA에 의한 독성을

유의하게 감소시켰다. Nitrite의 생성은 1 mM의 농도로 4시간 처리한 경우 유의한 증가가 있었다.

이상의 결과를 살펴보면 연은 해마 신경세포에서의 독성 기전에는 지질과산화가 관여하며, NMDA 자체에 의한 세포독성기전에는 오히려 보호작용이 있을 것으로 생각되어진다.

참고 문헌

1. LaDou J. Occupational and environmental medicine. 3rd ed. London: Appleton and Lange; 2004, p. 441-5.
2. Goldstein GW, Asbury AK, Diamond I. Pathogenesis of lead encephalopathy. Uptake of lead and reaction of brain capillaries. *Arch Neurol* 1974;**31**:382-9.
3. Klassen CD. *Casarett & Dull's Toxicology: the basic science of poisons*. 5th ed. New York: McGraw Hill; 1996, p. 703-9.
4. Pentschew A. Morphology and morphogenesis of lead encephalopathy. *Acta Neuropathol* 1965;**5**:133-60.
5. Greengard J, Adams B, Berman E. Acute lead encephalopathy in young children. *J Pediatr* 1965;**66**:707-11.
6. Bellinger D, Leviton A, Waternaux C, Needlmann H, Rabinowitz M. Longitudinal analyses of prenatal and postnatal lead exposure and early cognitive development. *N Engl J Med* 1987;**316**:1037-43.
7. Needleman HL, Schell A, Bellinger D, Leviton A, Allred EN. The long-term effects of exposure to low doses of lead in childhood. *N Engl J Med* 1990;**322**:83-8.
8. Stellman JM. *Encyclopedia of Occupational Health and Safety*. 4th ed. Geneva: International Labor Office; 1998, p. 9-18.
9. Goyer RA. Transplacental transport of lead poisoning in children. *Pediatric Annals* 1992;**21**:384-8.
10. Rossouw J, Offermeier J, van Rooyen JM. Apparent central neurotransmitter receptor changes induced by low-level lead exposure during different developmental phases in the rat. *Toxicol Appl*

- Pharmacol* 1987;**91**(1):132-9.
11. Yiin SJ, Lin TH. Lipid peroxidation in workers exposed to lead. *Arch environ health* 1994;**49**:256-9.
12. Safiq UR. Lead-induced regional lipid peroxidation in brain. *Toxicol Lett* 1984;**21**:333-7.
13. Cohn J, Cory-Slechta DA. Defferential effets of MK-801, NMDA and scopolamine on rats learning a four-member repeated acquisition paradigm. *Behav Pharmacol* 1992;**3**:403-13.
14. Cohn J, Cory-Slechta DA. Subsensitivity of lead-exposed rats to the accuracy-impairing and rate-altering effects of MK-801 on a multiple schedule of repeated learing and performance. *Brain Res* 1993;**600**:208-18.
15. Cohn J, Ziriaux JM, Cox C, Cory-Slechta DA. Comparison of error patterns produced by scopolamine and MK-801 on repeated acquisition and transition baselines. *Psychopharmacology* 1992;**107**:243-54.
16. France CP, Moerschbacher JM, Woods JH. MK-801 and relatedmonpounds in monkeys: discriminative stimulus effects and effects on a conditional discrimination. *J Pharmacol Exp Ther* 1991;**257**:727-34.
17. Butelman ER. A novel NMDA antagonist, MK-801, impairs performance in a hippocampal-dependent spatial learning task. *Pharmacol Biochem Behav* 1989;**34**:13-6.
18. Walker DL, Gold PE. Effects of the nover NMDA antagonist, NPC 12626, on long-term potentiation, learning and memory. *Brain Res* 1991;**549**:213-21.
19. Alkondon M, Costa ACS, Radhakrishnan V, Aronstam RS, Albuquerque EX. Selective blockade of NMDA-activated channel currents may be implicated in learning deficits caused by lead. *FEBS Lett* 1990;**261**:124-30.
20. Ujihara H, Albuquerque EX. Developmental changes of the inhibition by lead of NMDA-activated currents in cultured hippocampal neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 1992;**263**:868-75.
21. Oberto A, Marks N, Evans HL, Huidotti A. Lead(Pb²⁺) promotes apoptosis in newborn rat cerebellar neurons: pathological implications. *J Pharmacol Exp Ther* 1996;**279**:435-42.
22. Ulrich M, Michael M, Norbert B, Ute W, Erwin JS. Lead-induced blockade of kainate-sensitive receptor channels. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1995;**353**:42-5.
23. Goyer RA, Rhyne B. Pathological effects of lead. *Int Rev Exp Pathol* 1973;**12**:1-77.
24. Goldstein GW. Neurologic concepts of lead poisoning in children. *Pediatric Annals* 1992;**21**:384-8.
25. Hibbs JB Jr, Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;**23**:205-323.
26. Radi R, Beckman JS, Busch KM, Freeman B. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biopsy* 1991;**288**:481-7.
27. Bredt DS, Snyder SH. Nitric oscide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sce USA* 1989;**86**:9030-3.
28. 정현택. Nitric Oxide의 생체내 역할. *대한 생화학 · 분자생물학회* 1996;**3**:14-6.
29. Lipton SA. Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. *Neurobiology* 1995;**92**:7162-6.
30. Loikkanen JJ, Naarala J, Savolainen KM. Modification of glutamate-induced oxidative stress by lead: the role of extracellular calcium. *Free Radic Biol Med* 1998;**24**:377-84.
31. Bressler JP, Goldstein GW. Mechanisms of lead neurotoxicity. *Biochemical phamacology* 1991;**41**:479-84.
32. Wood AM, Bristow DR. N-methyl-D-aspartate

receptor desensitisation is neuroprotective by inhibiting glutamate-induced apoptotic-like death. *J Neurochem* 1998;**70**:677-87.

33. MacDonald RL, Nowak LM. Mechanisms of blockade of excitatory amino acid receptor channels. *Trends Pharmacol Sci* 1990;**11**:1167-72.