

도파민성 신경독성에서 산화스트레스의 역할

대구 파티마병원 내과학교실,
계명대학교 의과대학 생리학교실¹, 계명대학교 뇌연구소²

강병준 · 김준철 · 여주천 · 정종희¹ · 박원균^{1,2}

Effects of Oxidative Stress on Dopaminergic Neurotoxicity

Byong Jun Kang, M.D., Jun Chul Kim, M.D., Ju Chon Yeo, M.D.,
Jong Hee Chung¹, Won Kyun Park, M.D.^{1,2}

Department of Internal Medicine, Fatima Hospital, Daegu, Korea
Department of Physiology, Keimyung University School of Medicine¹,
Keimyung University Brain Research Institute², Daegu, Korea

Abstract : MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) and its metabolite MPP⁺ (1-methyl-4-phenyl pyridium) are specific dopaminergic neurotoxins and induce parkinsonism-like symptoms and signs in animal models. This study was designed to evaluate the effect of oxidative stress on MPP⁺-induced dopaminergic toxicity and the protective effects of antioxidants. PC12 cells were exposed to the dopaminergic neurotoxicity by adding 0.05–10 mM MPP⁺ for 1–24 hrs. In the cells treated with 2 mM MPP⁺, cell number decreased and the neurites were markedly withdrawal and the cell viability decreased almost 50%. Nerve growth factor (NGF)-differentiated PC12 cells showed higher viabilities than untreated PC12 cells in 0.1–10 mM MPP⁺. N-acetyl cysteine (NAC, 0.1–10 mM) showed significant protective effects against the dopaminergic cytotoxicity with 2 mM MPP⁺, and led to almost complete recovery to normal cells over 3 mM NAC. L-2-oxothiazoline-4-carboxylate (OTC, 0.1–2 mM) showed slightly increased the viability of PC12 cells against the dopaminergic toxicity with 2 mM MPP⁺, however there was not a significant recovery comparing with normal cells. L-lipoic acid (0.1–2 mM) showed some protective effects on PC12 cells against the dopaminergic cytotoxicity with 2 mM MPP⁺, however they did not show a significant recovery comparing with normal PC12 cells. In conclusion, it seems that oxidative stress participates as an important mechanism in MPP⁺-induced dopaminergic neurotoxicity and NAC may be a good neuroprotective agent against MPP⁺-induced dopaminergic neurotoxicity.

Key Words : Antioxidants, Dopaminergic neurotoxicity, MPP⁺, Oxidative stress

서 론

근래 태아 흑질(substantia nigra)의 도파민성 신경세포를 이식함으로써 파킨슨병을 치료하고자 하는 연구가 진행되고 있다[1,2]. 그러나 이 치료법이 성공적으로 개발되기에는 해결되어야 할 많은 문제점이 있으며, 그 중 이식된 신경세포의 생존이 가장 중요한 문제점으로 떠오르고 있다[3-5]. 이식된 도파민성 신경세포의 생존율이 매우 낮은 관계로 한 명의 파킨슨병 환자에게 필요한 도파민성 신경세포를 이식하기 위하여 4~8명의 태아 흑질이 필요하다[6]. 이를 해결하는 방법으로 이식된 도파민성 신경세포의 생존율을 높일 수 있다면 한 명의 태아 흑질 만으로도 파킨슨병의 치료에 이용할 수 있을 것이다[7].

실험실에서 파킨슨병과 유사한 도파민성 신경독성을 유발하는 방법으로 많이 이용되는 약물은 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine(MPTP)과 대사물인 1-methyl-4-phenylpyridinium(MPP⁺)이 있다[8]. 이 약물들이 도파민성 신경독성을 일으키는 기전은 다양할 것이나 대표적인 것으로는 산화스트레스(oxidative stress), 세포내 칼슘농도의 과도한 증가, 미토콘드리아의 기능 손상, cystenyl aspartate-specific proteinase(caspase)의 활성화 등을 들 수 있다[8]. 도파민성 신경세포의 생존을 높이려는 연구들은 이러한 신경독성 기전에 의거하여 보호효과를 나타내는 약물을 개발하려고 시도하여 왔다. 산화스트레스를 억제하는 방법으로 lazaroid계 약물[9]이나 superoxide dismutase 및 nitric oxide synthase 억제제[5] 등이 시도되었다. 세포내 칼슘농도의 증가에 의한 신경독성을 억제하는 방안으로 NMDA수용체 억제제와 막전압의존성 칼슘통로 차단제 등이 시도되었다[10, 11]. 세포자멸사를 억제하기 위하여 caspase 억제제[12], Bcl-2의 과발현[13], cyclosporin A 및 FK-506[8]을 시도한 보고도 있다. 그럼에도 이러한 보호제들이 일괄적으로 도파민성 신경독성에 대하여 탁월한 보호 효과를 보이는 방법으로 규명된 것은 아직까지 없었다.

저자들은 MPP⁺에 의한 도파민성 신경독성의 기전 중 산화스트레스의 역할을 관찰하고, 다른 작용기

전을 통하여 산화스트레스를 억제하는 항산화제들이 도파민성 신경세포독성에 대한 보호 효과를 나타내는지를 알아보려고 하였다.

재료 및 방법

1. PC12세포의 배양

쥐의 교감신경성 세포인 PC12 세포주를 실험재료로 사용하였다. 세포의 배양은 96 well 배양판에 well당 1×10^5 개의 PC12세포를 안치시킨 후 RPMI 1640(Gibco-BRL사, Grand Island, NY, 미국) 배양액에 5% 소태아혈청과 10% 말혈청, 100 μ g/mL penicillin/streptomycin을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 세포배양기(Sanyo사, Osaka, 일본)에서 배양하였다. 배양은 3일 간격으로 동일한 배양액을 1/2씩 교체하여 유지하였다. PC12세포를 신경세포로 변환시키기 위하여 배양초기에 50 ng/mL nerve growth factor(NGF)를 첨가하였고, 배양 동안 신경세포와 유사한 시냅스를 형성하는지 확인하였다. 도파민성 독성 및 보호 실험에서는 NGF에 의한 세포보호 효과를 피하기 위하여 NGF를 첨가하지 않은 세포를 이용하였다.

2. 도파민성 신경독성 유발

신경세포에 대한 도파민성 독성을 확인하기 위하여 NGF를 첨가하여 5-7일간 배양한 PC12세포를 대상으로 배양액에 0.25, 0.5, 1, 2 mM의 MPTP를 첨가하여 24시간 후에 신경독성의 효과를 관찰하였다. 동시에 NGF를 첨가하여 배양한 PC12세포와 NGF를 첨가하지 않고 배양한 한 PC12세포 각각에 대하여 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 5, 10 mM의 MPP⁺를 첨가하였고, 1-24시간 후에 도파민성 독성 효과를 관찰하였다.

3. 도파민성 독성에 대한 항산화제의 효과

도파민성 독성에 대한 항산화제들의 보호효과를

관찰하기 위하여 0.05–10 mM N-acetyl-systeine (NAC), 0.05–2 mM L-2-oxothiazoline-4-carboxylate (OTC), 0.05–1 mM L-lipoic acid (LA) 를 4–24시간 전처리한 후 2 mM의 MPP⁺로 18–24시간 도파민성 독성을 유발한 PC12세포의 생존정도를 비교하였다.

4. PC12세포 생존율의 평가

MPTP로 도파민성 신경독성을 유발한 PC12세포의 생존율을 관찰하기 위하여 도립현미경하에서 세포의 형태, 신경접합의 정도 등을 평가하였다. 또한 MPP⁺로 도파민성 독성을 유발하거나 이와 함께 각 종의 항산화제를 전처리한 각각의 PC12세포에서 신경세포의 생존율은 미토콘드리아의 기능을 평가하는 MTT test kit (Sigma사, St Louis, MD, 미국)를 이용하여 측정하였다.

5. 통계처리

실험결과는 통계 처리하여 평균과 표준오차로 표시하였다. 각 실험에서 PC12세포의 생존율 비교는 Student's t-test로 통계학적 유의성을 검증하였으며 $p < 0.05$ 와 $p < 0.01$ 을 유의하다고 평가하였다.

성 적

1. 도파민성 신경독성의 유발

NGF로 분화한 PC12세포에 0.25–2 mM MPTP를 첨가하여 24시간 후에 도파민성 신경독성의 효과를 관찰한 결과 형태학적으로 다수의 세포가 탈락하였고 신경돌기는 현저하게 위축되었다(Fig. 1).

NGF로 분화하거나 NGF로 분화하지 않은 각각의 PC12세포에 0.25–10 mM MPP⁺를 처리하여 24시간 배양 후 도파민성 독성 효과를 관찰하였다. 세포의 생존율은 정상 세포를 100%로 두었을 때 상대적인 비율로 표시하였다. NGF로 분화한 PC12세포는 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 3, 5, 10 mM의 MPP⁺ 처

리시 생존율이 각각 99.6 ± 0.9 , 94.7 ± 1.0 , 86.8 ± 0.7 , 82.6 ± 0.6 , 70.5 ± 0.8 , 57.8 ± 1.0 , 42.8 ± 0.8 , $8.8 \pm 0.85\%$ 였고, NGF로 분화하지 않은 PC12세포에 동일 농도의 MPP⁺ 처리 시 생존율은 각각 98.7 ± 1.0 , 89.6 ± 0.5 , 80.7 ± 0.6 , 75.0 ± 0.5 , 47.5 ± 0.3 , 35.0 ± 1.2 , 23.2 ± 1.0 , $0.0 \pm 1.7\%$ 였다. 거의 모든 MPP⁺ 농도에서 NGF로 분화한 PC12 세포군이 NGF로 분화하지 않은 세포군에 비하여 통계학적으로 유의하게 높은 ($p < 0.01$) 생존율을 보였다 (Fig. 2). 이러한 결과는 NGF의 보호효과에 기인한 것으로 판단하여 이하의 실험에서는 NGF로 분화하지 않은 PC12세포를 대상으로 약 50%의 생존율을 나타낸 2 mM MPP⁺를 도파민성 독성유발의 적정농

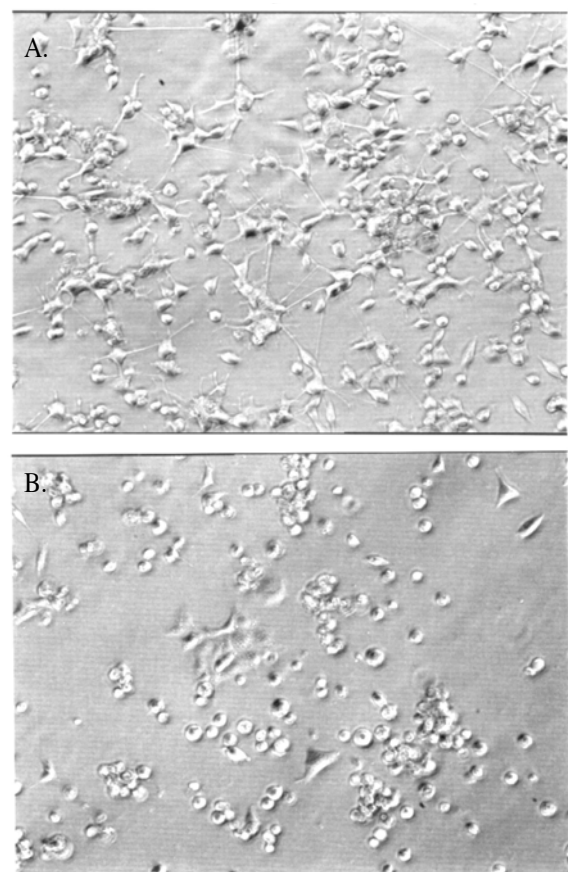


Fig. 1. The morphological features of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)-induced neurotoxicity in nerve growth factor-differentiated PC12 cells (x 100). A, untreated control; B, 24 hrs after the administration of 2 mM MPP⁺.

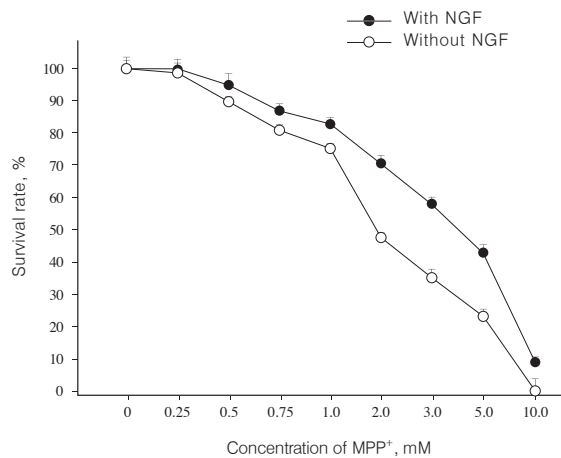


Fig. 2. The effect of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) on the survivability in PC12 cells with or without nerve growth factor (NGF)-differentiation. * $p < 0.01$ NGF -differentiated cells vs. undifferentiated cells.

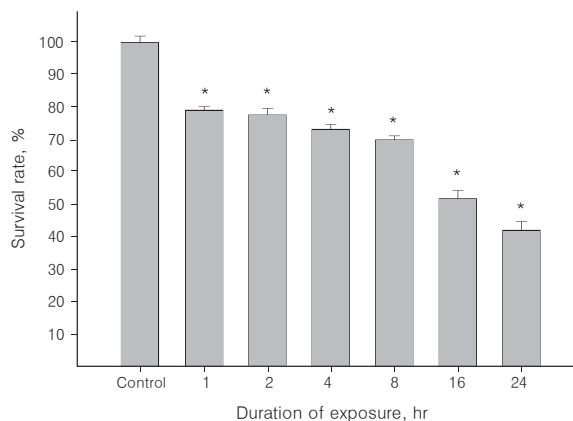


Fig. 3. The effect of exposure duration on 2 mM MPP⁺-induced neurotoxicity in PC12 cells. * $p < 0.01$ vs. control.

도로 삼았다. 한편, NGF로 분화하지 않은 PC12세포에서 2 mM MPP⁺를 처리한 후 1, 6, 4, 8, 16, 24시간의 배양에 따른 PC12 세포의 생존율은 각각 70.9 ± 0.4 , 77.7 ± 0.6 , 73.0 ± 0.7 , 69.8 ± 0.5 , 51.4 ± 1.2 , $41.8 \pm 1.2\%$ 였다(Fig. 3). 이 성적으로 이하의 실험에서는 조건에 따라 16-24시간을 도파민성 독성의 유발시간으로 삼았다.

2. 도파민성 신경독성에 대한 NAC의 보호효과

도파민성 독성에 대하여 항산화제인 NAC의 보호효과를 평가하고자 MPP⁺를 처리하기 4시간 전에 NAC를 전처리하여 세포의 생존율을 정상 세포와 비교하였다. 먼저 도파민성 독성을 유발하지 않고 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 1, 2, 3, 5, 10 mM의 NAC만 처리 시 PC12세포의 생존율은 각각 102.2 ± 1.0 , 104.3 ± 1.3 , 107.6 ± 2.3 , 109.8 ± 0.9 , 105.2 ± 1.2 , 117.3 ± 0.7 , 108.0 ± 1.2 , 107.7 ± 0.9 , $106.7 \pm 0.75\%$ 로 거의 모든 농도에서 생존율이 유의하게 증가($p < 0.05$)하였다(Fig. 4). 2 mM MPP⁺로 도파민성 독성을 유발한 세포의 생존율 $46.3 \pm 0.74\%$ 와 비교하여 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 1, 2, 3, 5, 10 mM의 NAC를 전처리 시 생존율은 각각 45.8 ± 0.5 , 47.4 ± 0.8 , 50.5 ± 1.2 , 50.8 ± 0.6 , 57.9 ± 0.5 , 79.2 ± 0.4 , 92.2 ± 0.6 , 92.5 ± 2.5 , $91.4 \pm 2.0\%$ 를 보여 0.2 mM 이상의 NAC에서 PC12세포의 생존율이 유의하게 증가($p < 0.01$)하였고, 3 mM NAC 이상에서는 거의 정상 세포의 수준으로 회복되었다(Fig. 5).

3. 도파민성 신경독성에 대한 OTC의 보호효과

도파민성 독성에 대하여 항산화제인 OTC의 보호효과를 평가하고자 MPP⁺를 처리하기 4시간 전에 OTC를 전처리하여 PC12세포의 생존율을 정상 세포와 비교하였다. 먼저 도파민성 독성을 유발하지 않

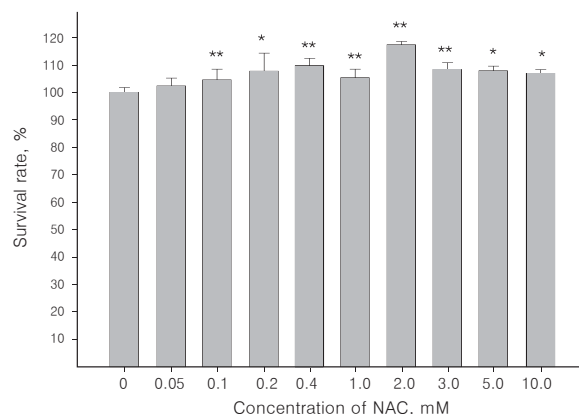


Fig. 4. The effect of N-acetylcysteine (NAC) on normal PC12 cells. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. 0 mM NAC.

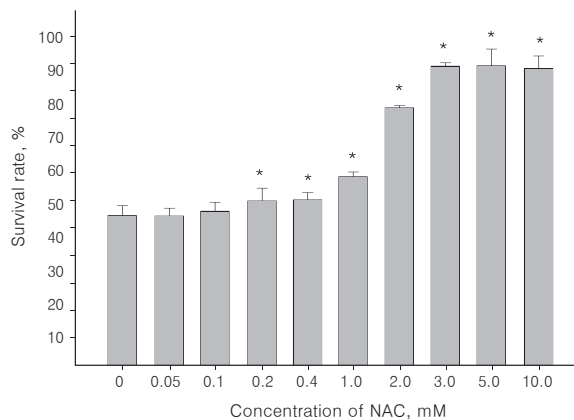


Fig. 5. The protective effect of N-acetylcysteine (NAC) against 2 mM MPP⁺-induced toxicity in PC12 cells. * $p < 0.01$ vs. 0 mM NAC.

고 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 1, 2 mM의 OTC만 처리 시 세포생존율은 각각 105.1 ± 0.8 , 105.7 ± 1.7 , 107.8 ± 0.8 , 109.8 ± 2.2 , 100.4 ± 0.6 , $95.1 \pm 0.8\%$ 로 0.4 mM 이하 농도에서는 PC12세포의 생존율이 유의하게 증가($p < 0.01$) 하였으나 2 mM OTC 농도에서 생존율은 오히려 유의하게 감소($p < 0.01$) 하였다(Fig. 6). 그리고 2 mM MPP⁺로 도파민성 독성을 유발한 세포의 생존율 $47.6 \pm 0.69\%$ 와 비교하여 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 1, 2 mM OTC를 전처리 시 생존율은 각각 48.6 ± 1.3 , 50.4 ± 1.0 , 54.1 ± 1.3 , 55.2 ± 0.8 , 48.6 ± 0.3 , $47.2 \pm 1.2\%$ 를 보여 0.2–0.4 mM 농도에서 생존율이 약간 증가($p < 0.05$) 하였지만 정상 세포의 수준으로는 회복되지 못하였다(Fig. 7).

4. 도파민성 신경독성에 대한 LA의 보호효과

도파민성 독성에 대하여 항산화제인 LA의 보호 효과를 평가하고자 MPP⁺를 처리하기 24시간 전에 LA를 전처리하여 세포생존율을 정상 세포와 비교하였다. 도파민성 독성을 유발하지 않고 0.05, 0.1, 0.3, 0.5, 1 mM LA만 처리 시 PC12세포의 생존율은 각각 101.4 ± 1.1 , 102.3 ± 0.8 , 106.1 ± 1.0 , 103.2 ± 0.9 , $101.3 \pm 1.2\%$ 로 0.1–0.5 mM 농도에서 세포생존율이 유의하게 증가($p < 0.05$) 하였다(Fig. 8). 2 mM MPP⁺로 도파민성 독성을 유발한 세포의 생존율 $65.9 \pm 0.30\%$ 와 비교하여 0.05, 0.1,

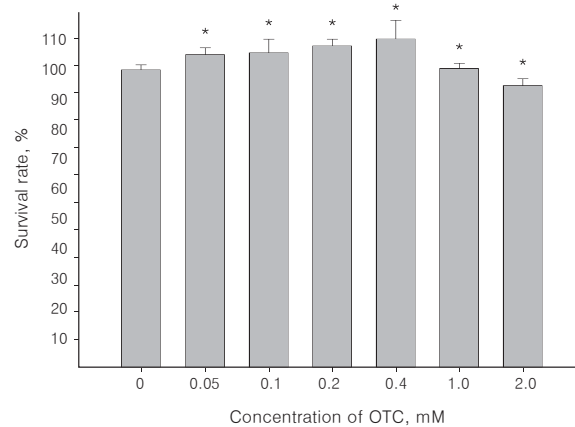


Fig. 6. The effect of L-2-oxothiazoline-4-carboxylate (OTC) on normal PC12 cells. * $p < 0.01$ vs. 0 mM OTC.

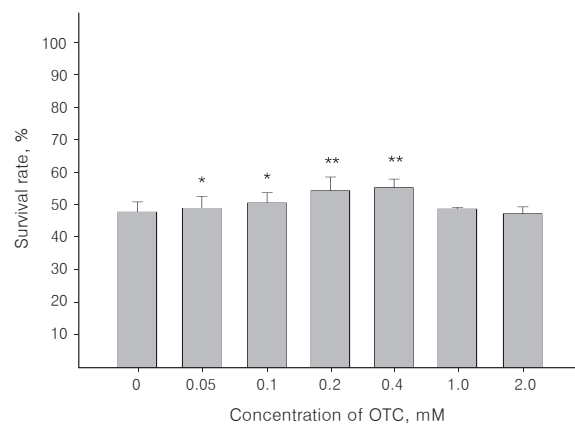


Fig. 7. The protective effect of L-2-oxothiazoline-4-carboxylate (OTC) against 2 mM MPP⁺-induced toxicity in PC12 cells. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. 0 mM OTC.

0.3, 0.5, 1 mM LA를 전처리 시 생존율은 각각 70.7 ± 1.4 , 72.8 ± 1.0 , 76.8 ± 2.3 , 73.4 ± 0.5 , $71.3 \pm 1.1\%$ 를 보여 0.05–1 mM의 농도에서 생존율이 약간 증가($p < 0.01$) 하였지만 정상 세포의 수준까지 회복되지는 못하였다(Fig. 9).

고 찰

MPTP나 그 대사물인 MPP⁺는 실험실에서 파킨

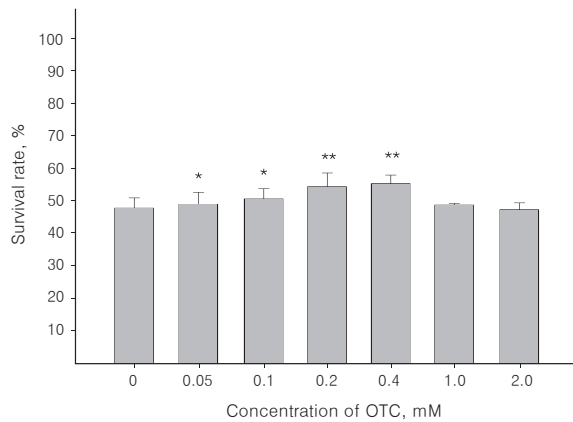


Fig. 8. The effect of L-lipoic acid on normal PC12 cells. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs. 0 mM lipoic acid.

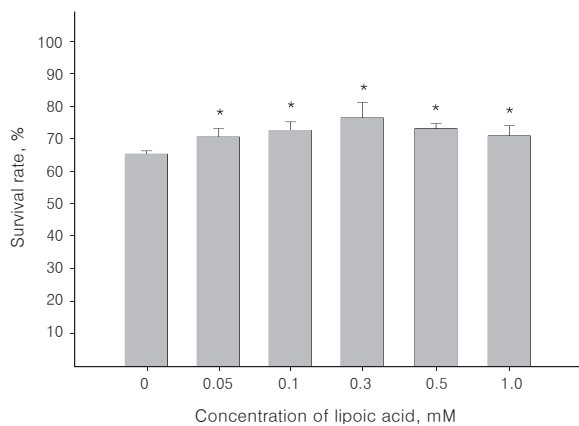


Fig. 9. The protective effect of L-lipoic acid against MPP⁺-induced toxicity in PC12 cells. * $p < 0.01$ vs. 0 mM lipoic acid.

슨병의 동물모델을 만들기 위해 사용되며 도파민성 신경세포에 특이적인 손상을 준다[14,15]. PC12세포에서 MPTP나 MPP⁺를 이용하여 도파민성 신경독성을 유발한 다른 보고자들[16-18]에서 언급된 바와 같이 실험에 사용된 2 mM MPP⁺는 충분히 도파민성 신경독성을 유발하는 농도범위에 속한다. 이 실험의 결과는 NGF로 분화한 PC12세포에서는 2 mM MPP⁺ 투여로는 충분한 도파민성 독성을 유발하기에 미흡하였고, NGF로 분화하지 않은 PC12세포에서 2 mM MPP⁺ 투여 시 약 50%의 생존율을 보이는 도파민성 독성을 유발할 수 있었다. NGF로 분화한 PC12세포에서 MPP⁺에 대한 생존율이 유의하게 높은 결

과는 NGF가 신경독성에 대하여 보호작용을 가지고 있다는 보고[18]와 일치한다. 이외에도 도파민성 신경독성을 유발하는데 고농도의 MPP⁺가 요구되는 조건으로 MPP⁺ 대사에 필요한 monoamine oxidase B가 부족한 경우[19]를 생각할 수 있다.

최근에 도파민성 신경세포의 이식과정에서 여러 가지 보호제를 사용하여 도파민성 신경세포의 생존을 높이려는 크게 4가지의 방향에서의 시도가 이루어지고 있다. 첫째는 산화스트레스를 억제하는 방법으로 lazardide계 약물을 이용하여 산소유리기의 생성을 억제하는 방법이 있다[5,9]. 그 외에 superoxide dismutase 및 nitric oxide synthase 억제제[5], α -phenyl-*N*-*tert*-butyl nitrone 및 pyrrolopyrimidine[8]을 이용한 보고도 있다. 둘째로 세포자멸사로의 진행을 차단하기 위하여 caspase 억제제를 이용[12] 하거나 anti-apoptotic protein인 Bcl-2 과발현을 시킨 보고[13]가 있다. 셋째로 세포 내 칼슘유입에 의한 신경독작용을 억제하는 방안으로 NMDA 수용체를 억제하는 방법과 전압의존성 칼슘통로를 차단하는 방법이 있다[10,11]. 넷째로 성장촉진인에 의한 도파민성 신경세포의 생존 및 분화를 촉진시키기 위하여 basic fibroblast growth factor, glial cell line-derived neurotrophic factor, neuroturin, brain-derived neurotrophic factor 등이 이용된다[7, 20-22]. 이러한 연구들은 도파민성 신경독성의 기전을 밝히는 것과 연관지어 생각할 수 있다.

이 실험에서 3 mM 이상의 NAC는 2 mM MPP⁺에 의한 도파민성 독성을 거의 차단하는 효과가 관찰되어 도파민성 신경독성의 주된 세포 내 기전은 산화스트레스에 의해 일어난다고 생각할 수 있다. 일반적으로 신경독성에서 세포사를 유발하는 산화스트레스의 원인은 superoxide 유리기의 생성에 있으며 이는 미토콘드리아의 내호흡 과정[23]에서 주로 생성되지만 arachidonic acid 대사[24] 혹은 도파민성 신경세포에서 MAO에 의한 도파민의 산화[25]에서도 생성된다. Superoxide는 연속하여 hydrogen peroxide 및 hydroxyl 유리기를 생성하거나 nitric oxide와 반응하여 peroxynitrite를 생성하여 세포의 단백질 및 지질에 손상을 야기한다[26]. 따라서 MPP⁺에 의한 신경독성의 기전은 MPP⁺가 도파민성

신경세포에서 MAO에 의해 대사되는 과정에서 superoxide의 생성이 촉진되고 이어 다른 산소유리 기들이 형성되는 일련의 과정에서 산화스트레스는 미토콘드리아를 손상시키며, 미토콘드리아의 기능적 손상은 다시 산화스트레스를 촉진하는 순환이 반복될 것으로 생각된다. NAC는 thiol을 함유하는 항산화제로 실험실에서 환원 glutathione (GSH), dithiothreitol과 함께 도파민성 신경독성에 대한 보호제로 사용되어 왔다[27]. NAC와 OTC는 GSH의 합성을 위한 cysteine 공여자로 작용하며 [28,29], 동물모델 실험에서 MPTP에 의한 도파민성 신경독성에 유의한 보호효과가 있고, 그 효과는 OTC가 NAC에 비하여 높다고 하였다[30]. 그러나 이 실험에서 NAC는 MPP⁺에 의한 도파민성 독성을 거의 완전하게 차단함에 비해 OTC는 약한 억제효과만을 보여 실험조건에 따른 항산화제의 효과에는 보고자들마다 차이가 있을 수 있음을 보였다. 동시에 *in vivo* 실험과 달리 *in vitro* 실험에서 항산화제의 효과를 검증할 때 그 약제가 혈뇌장벽(blood-brain barrier)을 통과할 수 있는지를 확인하는 것이 중요하다[31,32]. 이 실험에서 NAC에 비하여 OTC의 효과가 낮은 것은 세포내 GSH의 증가 기전 외에도 NAC가 작용하는 산화스트레스의 다른 기전이 도파민성 독성에 관여함을 의미한다.

LA는 pyruvate dehydrogenase와 α -ketoglutarate dehydrogenase의 조효소로, 그리고 glutathione reductase의 기질로써 미토콘드리아의 대사에 관여하며, 세포내 GSH의 농도를 증가시키고 미토콘드리아의 기능을 보호할 목적으로 사용되었다[33,34]. PC12세포 내의 GSH 농도를 감소시키는 실험조건에서 LA는 세포질 및 미토콘드리아의 GSH 농도를 정상 세포의 수준으로 유지시키는 효과를 보였다[35]. 그러나 이 실험에서 LA는 MPP⁺에 의한 도파민성 독성을 부분적으로 억제하지만 완전히 차단하는 효과를 나타내지 못한 것은 MPP⁺에 의한 도파민성 신경독성에 GSH 농도의 감소와 미토콘드리아의 기능저하 외에도 다른 산화스트레스의 기전이 관여함을 의미한다.

산화스트레스 이외에 도파민성 신경독성에 관여할 수 있는 기전으로서 caspase는 세포자멸사의 과

정에서 활성화되어 DNA 분절화, 염색질 농축, 세포 위축 및 apoptotic body의 형성에 관여한다[36,37]. Caspase cascade가 활성화되는 기전 중 하나는 미토콘드리아의 기능 소실이 중요한 역할을 한다[38]. 세포자멸사의 과정에서 미토콘드리아의 손상이 cytochrome c, apoptotic-inducing factor, pro-caspase 9의 복합체를 형성하여 caspase 9를 활성화시키는 경로이다. 다른 하나는 세포막의 death receptor를 통하여 caspase 8을 활성화 시키는 경로이다. 그러나 어떠한 경로를 통하던지 결과적으로 마지막 단계의 caspase 활성화는 caspase 3, 6, 7이 관여하여 특정 단백을 분해 한다[39]. 동시에 cyclosporin A는 immunophilin ligand로 immunophilin과 복합체를 형성하면 calcium calmodulin-dependent phosphatase인 calcineurin의 활성을 억제한다[40]. Calcineurin은 세포자멸사의 여러 과정에 참여하는 것으로 알려져 있다[41,42]. Cyclosporin A는 calcineurin에 대한 작용 외에도 미토콘드리아의 기능 보호 및 neurotrophic 효과도 나타낸다고 한다[43,44]. 이 실험의 결과와 다른 연구자의 보고들을 종합하면 MPP⁺에 의한 신경독성은 산화스트레스, caspase cascade, 미토콘드리아의 기능 손상 등 다양한 기전의 참여와 관련이 있을 것으로 생각된다.

이 실험에서 PC12세포에서 MPP⁺가 유발한 도파민성 신경독성에 대하여 항산화제인 NAC는 충분한 보호효과를 나타내었으나 다른 종류의 항산화제인 OTC 및 LA에서는 MPP⁺에 의한 도파민성 독성에 대한 보호효과가 만족할 만한 결과를 관찰하지 못하였다. 이는 MPP⁺에 의한 도파민성 신경독성에 다양한 기전이 작용할 가능성을 시사하며, 이에 대한 연구가 차후 진행되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

PC12세포를 대상으로 1-methyl-4-phenylpyridium (MPP⁺)을 처리하여 도파민성 신경독성에 여러 가지 항산화제를 사용하여 보호효과를 비교해 보고자 하였다. 0.05-10 mM MPP⁺의 도파민성 독

성에 대하여 nerve growth factor는 유의한 보호효과를 나타내었으며, nerve growth factor로 분화하지 않은 PC12세포에서 도파민성 독성의 적정 유발농도 및 노출시간은 2 mM과 16-24시간이었다. 2 mM MPP⁺에 의한 독성에 대하여 N-acetyl-cysteine은 보호 효과를 나타내었으며, 3 mM 이상의 농도에서는 거의 정상 수준으로 회복되었다. 2 mM MPP⁺에 의한 독성에 대하여 L-2-oxothiazoline-4-carboxylate와 L-lipoic acid는 약간의 보호효과를 보였으나 정상 수준으로 회복되지는 못하였다.

참 고 문 헌

1. Lindvall O. Neural transplantation: a hope for patients with Parkinson's disease. *Neuroreport* 1997;**8**:3-10.
2. Tabbal S, Fahn S, Frucht S. Fetal tissue transplantation in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol* 1998;**11**:341-9.
3. Brundin P, Isacson O, Bjorklund A. Monitoring of cell viability in suspensions of embryonic CNS tissue and its use as a criterion for intracerebral graft survival. *Brain Res* 1985;**331**:251-9.
4. Rioux L, Gaudin DP, Bui LK, Gregorie L, DiPaolo T, Bedard PJ. Correlation of functional recovery after a 6-hydroxydopamine lesion with survival of grafted fetal neurons and release of dopamine in the striatum of the rat. *Neuroscience* 1991;**40**:123-31.
5. Nakao N, Frodl EM, Duan WM, Widner H, Brundin P. Lazaroids improve the survival of grafted rat embryonic dopamine neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;**91**:12408-12.
6. Kordower JH, Freeman TB, Chen EY, Mufson EJ, Sanberg PR, Hauser RA, et al. Fetal nigral grafts survive and mediate clinical benefit in a patient with Parkinson's disease. *Mov Disord* 1998;**13**:383-93.
7. Castilho RF, Hansson O, Brundin P. FK506 and cyclosporin A enhance the survival of cultured and grafted rat embryonic dopamine neurons. *Exp Neurol* 2000;**164**:94-101.
8. Castilho RF, Hansson O, Brundin P. Improving the survival of grafted embryonic dopamine neurons in rodent models of Parkinson's disease. *Prog Brain Res* 2000;**127**:203-31.
9. Bjorklund A, Spenger C, Stromberg I. Tirilazad mesylate increases dopaminergic neuronal survival in the oculo grafting model. *Exp Neurol* 1997;**148**:324-33.
10. McEnery MW, Vance CL, Begg CM, Lee WL, Choi Y, Dubel SJ. Differential expression and association of calcium channel subunits in development and disease. *J Bioenerg Biomembr* 1998;**30**:409-18.
11. Schierle GS, Brundin P. Excitotoxicity plays a role in the death of tyrosine hydroxylase-immunopositive nigral neurons cultured in serum-free medium. *Exp Neurol* 1999;**157**:338-48.
12. Schierle GS, Hansson O, Leist M, Nicotera P, Widner H, Brundin P. Caspase inhibition reduces apoptosis and increases survival of nigral transplants. *Nat Med* 1999;**5**:97-100.
13. Schierle GS, Leist M, Martinou JC, Widner H, Nicotera P, Brundin P. Differential effects of bcl-2 overexpression on fiber outgrowth and survival of embryonic dopaminergic neurons in intracerebral transplants. *Eur J Neurosci* 1999;**11**:3073-81.
14. Sirinathsinghji DJ, Dunnett SB, Northrop AJ, Morris BJ. Experimental hemiparkinsonism in the rat following chronic unilateral infusion of MPP⁺ into the nigrostriatal dopamine pathway, III. Reversal by embryonic nigral dopamine grafts. *Neuroscience* 1990;**37**:757-66.
15. Di Porzio U, Zuddas A. Embryonic dopaminergic neuron transplants in MPTP lesioned mouse striatum. *Neurochem Int* 1992;**20**(Suppl):S309-20.
16. Kohda K, Noda Y, Aoyama S, Umeda M, Sumino T, Kaiya T, et al. Cytotoxicity of 1-amino-4-methyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine and 1-amino-4-phenyl-pyridinium ion, 1-amino analogues of MPTP and

- MPP⁺, to clonal pheochromocytoma PC12 cells. *Chem Res Toxicol* 1998;**11**:1249-53.
17. Seyfried J, Soldner F, Kunz WS, Schulz JB, Klockgether T, Kovar KA, *et al.* Effect of 1-amino-4-phenylpyridinium on glutathione in rat pheochromocytoma PC12 cells. *Neurochem International* 2000;**36**:489-97.
 18. Shimoke K, Chiba H. Nerve growth factor prevents 1-methyl-4-phenyl -1,2,3,6-tetra-hydropyridine-induced cell death via the Akt pathway by suppressing caspase-3-like activity using PC12 cells: relevance to therapeutical application for Parkinson's disease. *J Neurosci Res* 2001;**63**:402-9.
 19. Gelinas S, Martinoli M-G. Neuroprotective effect of estradiol and phytoestrogens on MPP⁺-induced cytotoxicity in neuronal PC12 cells. *J Neurosci Res* 2002;**70**:90-6.
 20. Bouvier MM, Mytilineou C. Basic fibroblast growth factor increases division and delays differentiation of dopamine precursors *in vitro*. *J Neurosci* 1995;**15**:7141-9.
 21. Cacalano G, Farianas I, Wang LC, Hagler K, Forgic A, Moore M, *et al.* GFRalpha1 is an essential receptor component for GDNF in the developing nervous system and kidney. *Neuron* 1998;**21**:53-62.
 22. Studer L, Spenger C, Seiler RW, Altar CA, Lindsay RM, Hyman C. Comparison of the effects of the neurotrophins on the morphological structure of dopaminergic neurons in cultures of rat substantia nigra. *Eur J Neurosci* 1995;**7**:223-33.
 23. Skulachev VP. Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants. *Q Rev Biophys* 1996;**29**:169-202.
 24. Chan PH, Fishman RA. Transient formation of superoxide radicals in polyunsaturated fatty acid-induced brain swelling. *J Neurochem* 1980;**35**:1004-7.
 25. Jenner P, Olanow CW. Oxidative stress and the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neurology* 1996;**47**:S161-70.
 26. Pryor WA, Squadrito GL. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol* 1995;**268**:L699-722.
 27. Offen D, Ziv I, Sternin H, Melamed E, Hochman A. Prevention of dopamine-induced cell death by thio antioxidants: possible implications for treatment of Parkinson's disease. *Exp Neurol* 1996;**141**:32-9.
 28. Mesina JE, Page RH, Hetzel FW, Chopp M. administration of L-2-oxothiazolidine-4-carboxylate increases glutathione levels in rat brain. *Brain Res* 1989;**478**:181-3.
 29. Martinez M, Martinez N, Hernandez AI, Ferrandiz ML. Hypothesis: can N-acetylcysteine be beneficial in Parkinson's disease? *Life Sci* 1999;**64**:1253-7.
 30. Park SW, Kim SH, Park KH, Kim SD, Kim JY, Baek SY, *et al.* Prevention effect of antioxidants in MPTP-induced mouse model of Parkinson's disease. *Neurosci Lett* 2004;**363**:243-6.
 31. Pappert EJ, Tangney CC, Goetz CG, Ling ZD, Lipton JW, Stebbins GT, *et al.* Alpha-tocopherol in the ventricular cerebrospinal fluid of Parkinson's disease patients: dose-dependent study and correlation with plasma levels. *Neurology* 1996;**47**:1037-42.
 32. Reilly DK, Hershey L, Rivera-Calimlim L, Shoulson I. On-off effects in Parkinson's disease: a controlled investigation of ascorbic acid therapy. *Adv Neurol* 1983;**37**:51-60.
 33. Suzuki YT, Tsuchia M, Packer L. Thiocetic acid and dihydrolipoic acid are novel antioxidants which interact with reactive oxygen species. *Free Radic Res Commun* 1991;**15**:255-63.
 34. Scott BC, Aruoma OI, Evans PJ, O'Neill C, Van Der Vliet A, Cross CE, *et al.* Lipoic acid and dihydrolipoic acids as antioxidants: a critical evaluation. *Free Radic Res Commun* 1994;**20**:119-33.
 35. Bharath S, Cochran BC, Hsu M, Liu J, Ames BN,

- Andersen JK. Pre-treatment with R-lipoic acid alleviates the effects of GSH depletion in PC12 cells: implications for Parkinson's disease therapy. *Neurotoxicology* 2002;**23**:479-86.
36. Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;**281**:1309-12.
37. Green DR. Apoptotic pathways: the roads to ruin. *Cell* 1998;**94**:695-8.
38. Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 1998;**60**:619-42.
39. Pettman B, Hendersen CE. Neuronal cell death. *Neuron* 1998;**20**:633-47.
40. Snyder SH, Lai MM, Burnett PE. Immunophilins in the nervous system. *Neuron* 1998;**21**:283-94.
41. Morioka M, Hamada J, Ushio Y, Miyamoto E. Potential role of calcineurin for brain ischemia and traumatic injury. *Prog Neurobiol* 1999;**58**:1-30.
42. Wang HG, Pathan N, Ethell IM, Krajewski S, Yamaguchi Y, Shibasaki F, et al. Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* 1999;**284**:339-43.
43. Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 1999;**341**:232-49.
44. Steiner JP, Connolly MA, Valentine HL, Hamilton GS, Dawson TM, Kester L, et al. Neurotrophic actions of nonimmunosuppressive analogues of immunosuppressive drugs FK506, rapamycin and cyclosporin A. *Nat Med* 1997;**3**:421-8.