DBpia

납에 의해 유발된 신경세포의 APOPTOSIS

Apoptosis of Neuronal Cells Induced by Lead

저자
(Authors)
양선희, 신동훈, 백원기
Seon-Hee Yang, Dong-Hoon Shin, Won-Ki Baek

출처
(Source)
대한직업환경의학회지 11(2), 1999.6, 254-263 (10 pages)
Korean Journal of Occupational And Environmental Medicine 11(2), 1999.6, 254-263 (10 pages)

발행처
(Publisher)
대한직업환경의학회
The Korean Society Of Occupational And Environment

URL
http://www.dbpia.co.kr/Article/NODE01156023

APA Style
양선희, 신동훈, 백원기 (1999). 납에 의해 유발된 신경세포의 APOPTOSIS. 대한직업환경의학회지, 11(2), 254-263.

이용정보
(Accessed)
계명대학교
114.71.5.211
2015/12/30 15:56 (KST)

저작권 안내
DBpia에서 제공되는 모든 저작물의 저작권은 원저작자에게 있으며, 누리미디어는 각 저작물의 내용을 보증하거나 책임을 지지 않습니다.
이 자료를 원저작자와의 협의 없이 무단게재 할 경우, 저작권법 및 관련법령에 따라 민, 형사상의 책임을 질 수 있습니다.

Copyright Information
The copyright of all works provided by DBpia belongs to the original author(s). Nurimedia is not responsible for contents of each work. Nor does it guarantee the contents.
You might take civil and criminal liabilities according to copyright and other relevant laws if you publish the contents without consultation with the original author(s).

대한산업의학회지 제 11 권 제 2 호 (1999년 6월)
Korean J Occup Environ Med, 1999;11(2):254-263

납에 의해 유발된 신경세포의 APOPTOSIS

계명대학교 동산병원 산업의학과, 계명대학교 의과대학 예방의학교실*, 미생물학교실**

양선희 · 신동훈* · 백원기**

— **Abstract** —

Apoptosis of Neuronal Cells Induced by Lead

Seon-Hee Yang, Dong-Hoon Shin*, Won-Ki Baek**

Department of Occupational Medicine, Dongsan Hospital,
Keimyung University Department of Preventive Medicine, Microbiology**,*
College of Medicine, Keimyung University

Lead is a major environmental and occupational neurotoxicant. It has been shown that long-term exposure to a low level of lead impairs the development of brain. For example, it was reported that lead exposure during the childhood causes a learning difficulty and a memory deficit of children.

Neurotoxic agents including the lead are believed to cause neuronal death in developing brain by two mechanisms: apoptosis and necrosis. However, the exact mechanism of neuronal death caused by lead exposure is still not known explicitly.

In this study, we conducted a study to clarify a mechanism of hippocampal neuronal cell death caused by lead acetate. Hippocampal neurons were cultured for 14-16 days and treated with lead acetate of 1, 10, 100 μM concentrations for 12 hours.

With the MTT(methyl tetrazolium test) kit, the viability of neuronal cells was measured. Next, in order to examine apoptosis caused by lead acetate, TUNEL (TdT-mediated d-UTP Nick End Labelling) assay was performed.

It has been shown that lead acetate reduced the viability of neuronal cells in a dose dependent manner, especially at the concentration of 100 μM lead acetate. TUNEL immunostain showed brownish signals in the nucleus of apoptotic cells. The proportions of apoptotic cells in the lead-acetate treated group were more higher than those in the controls and increased as lead acetate concentration increased.

From above results, it may be concluded that lead in the hippocampal neuronal cells reduced cell viability and one of mechanisms in neuronal cell death by lead appears to be apoptosis.

Key Words : Lead, Hippocampus, Apoptosis

계명대학교 | IP: 114.71.5.211 | Accessed 2015/12/30 15:56(KST)

서 론

납은 주위환경에 광범위하게 분포되어있는 중금속으로 모든 생태계에서 검출된다. 환경적으로는 식품의 용기나 교통기관의 배기가스, 오염된 물, 오래된 낡은 집, 산업장에서의 오염된 공기 배출 등에 의해 폭로될 수 있으며 일반 인구집단에서의 가장 주된 폭로 경로는 음식물에 의한 것이다. 드물게는 밀조주, 부적절하게 구워진 도자기, 납이 함유된 한약, 화장품, 가솔린 흡입 등이 원인이 되기도 한다. 직업적으로는 납광석에서의 납생산, 고연재생, 축전지 생산, 납용접 및 납땜, 납 성분의 착색제와 분말제를 포함한 페인트의 생산 및 분사, 크리스탈 유리의 생산시 납화합물의 혼합, 도자기제조, 석유정제업 등에서 주로 폭로되며, 납을 취급하는 근로자의 옷이나 신발에 묻어오는 납도 주위 사람들에게 오염원이 될 수 있다(Klaassen, 1995).

납의 만성적 폭로로 인해 나타나는 주된 건강 장애는 신경독성으로서 특히, 중추 신경계의 발달에 영향을 미친다(Hammond and Dietrich, 1990). 납은 고농도 폭로시에는 급성 뇌증을 일으키고 저농도 폭로에는 인지기능의 장애를 초래하여 폭로수준과 신경독성사이에 용량-반응 관계를 나타내며(Tilson and Mitchell, 1991), 태생기와 5세이전에 저농도의 납에 폭로되는 경우에 가장 손상이 크다고 알려져 있다.

여러 연구결과들을 살펴보면, 급성 납중독에서 회복한 소아의 대부분이 학동기 동안에 행동장애와 학습장애를 나타냈으며(Byers and Lord, 1943), 급성 폭로가 아니더라도 뇌세포장벽 발달이 부진한 소아에서는 1.3~13 μM 정도의 저농도의 혈중 납 수준에서도 중추 신경계의 발달에 영향을 미쳐 정신지체와 인지기능 장애를 초래하였으며(Goldstein, 1992), 소아기에 저농도의 납에 만성적으로 폭로된 경우 청년기에 신경학적 장애가 지속되어 학습 장애 및 기억 장애를 나타낼 수 있다(Needleman, 1990).

해마는 변연계의 일부로 기억과 학습에 주로 관여하며, 수십년간 납의 신경독성연구의 주요 대상이 되어왔다. 중추신경계에서 납이 주로 침착하는 부위는 회백질과 신경핵 들이며, 그 중에서도 해마에 가장 고농도로 축적되는 것으로 알려져있고(Klaassen, 1995), 해마는 콜린성 섬유의 치밀 층을 가지고 있으며, 상대적으로 아연의 농도가 높으며, 아연의존성 기능이 납의 독작용에 더욱 민감하다(Petit et al., 1983). 납은 또한 태반을 통과하여 뇌를 포함한 태아조직에 축적되고 이는 모체의 혈중 납 농도와 비례하여 태생기의 해마 신경세포의 성장을 저해함으로써(Goyer, 1989), 주산기에 주로 발달하여 기억과 학습에 주로 관여하는 해마의 성장과 발달에 영향을 미치는 것으로 알려져 있으나 기전은 확실히 밝혀진 것이 없다.

세포가 사망하는 기전을 두 가지로 설명할 수 있다. 하나는 괴사(necrosis)인데, 이것은 병적인 세포 죽음의 과정으로서 자극이나 손상에 의해 세포의 팽창과 용해가 일어나고, 세포막의 형태가 파괴되면서 염증반응을 일으키는 과정이다. 다른 하나는 세포의 자연사인 아포프토시스(apoptosis)로서, Kerr 등(1972)에 의해 처음으로 제시되었다. 아포프토시스는 능동적으로 조절되는 자가분해과정으로 세포골격파괴, 세포질의 위축, 세포막의 수포, 핵 염색질의 농축, DNA 분절등의 소견을 보이면서 세포막의 형태는 유지되는 특징적인 변화를 보인다(Kerr, 1972; Kerr and Searle, 1973; Searle et al., 1982). 아포프토시스는 생리적으로는 발생과정, 정상세포의 교체, 내분비계, 면역계에서 일어나며, 이는 과다하게 생겨난 세포와 발생학상 문제가 생긴 세포 및 지속적인 유전적 문제를 가진 세포를 제거하는 중요한 생리적 기전이다(Kerr, 1972; Wyllie et al., 1980). 병리적 현상으로는 바이러스의 감염, 암, 항암제에 의한 세포독성, 방사선에 의한 세포 독성, 온열 등과 같은 세포에 대한 스트레스 등 다양한 외부적 요인에 의해 일어난다(Bonfoco et al., 1995; Thompson, 1995; 김원호, 1996; Deshmukh and Johnson, 1997).

중추신경계에서도 신경세포의 사망기전으로 괴사와 아포프토시스 모두 고려해 볼 수 있다. 신경독성물질에 의한 중추신경계의 신경세포의 사망기전으로서의 괴사(Choi, 1988; Manev et al., 1989 and 1990; Koh et al., 1995)는 칼슘 의존성 세포 사망의 한 형태로서, 과도한 glutamate 수용체의 자극에 의해 일어날 수 있다(Oberto et al., 1996). 아포프토시스는 정상적인 중추신경계의 발달과정과

계명대학교 | IP: 114.71.5.211 | Accessed 2015/12/30 15:56(KST)

다양한 병리학적 상태에서 일어나는 것으로 보고되고 있는데, 신경세포의 발달과정에서는 세포자신에 의하여 조절되는 자가손상으로 neurotrophic factor의 작용을 방해하는 약물이나 독소에 의해 아포프토시스가 일어나고(Martin et al., 1988; Oppenheim, 1991; Martin et al., 1992; Franklin and Johnson, 1992; Raff et al., 1993; Yan et al., 1995; 신동훈, 1998), 병적으로는 알쯔하이머병(Alzheimer's disease), 파킨슨씨병(Parkinson's disease), 근위축성 축삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis), 망막색소성변성증(retinitis pigmentosa) 및 소뇌변성(cerebellar degeneration) 등과 같은 신경변성 장애(neurodegenerative disorder) 등의 신경계 질환에서 아포프토시스가 일어나는 것으로 보고되고 있다(Thompson, 1995; Deshmukh and Johnson, 1997). 동물실험에서도, 해마와 대뇌피질이 납에 폭로되었을 때 신경세포 발육에 비정상적인 세포 골격의 변화가 출생전후에 나타나고(Rodier, 1995), 1 μM 이하의 저농도의 납은 소뇌 신경세포에 대하여 glutamate에 의해 유도된 신경세포의 괴사에는 영향을 미치지는 않았지만 아포프토시스는 조장시키는 것으로 나타났다(Obert et al., 1996). 또한 납은 신경 교세포에 대해 독작용을 나타낸 후, 이를 통해 간접적으로 신경세포의 성장에 영향을 미친다는 연구 보고들도 있다(Holtzman et al., 1987; Selvin-Testa et al., 1991 and 1994; Sierra et al., 1989; Buchheim et al., 1994).

주산기의 납의 독작용을 평가하기 위해, Bielarczyk 등(1994)은 임신중의 쥐를 모델로 하여 중추신경계에 대한 납의 독작용에 관한 연구를 하였고, Favaron 등(1988), Yan 등(1995), Oberto 등(1996)은 소뇌의 과립세포를 모델로 하는 연구보고를 하였으나, 태생기에 해마를 중심으로 연구한 납의 신경독작용에 대한 연구는 미미하다.

따라서, 본 연구는 태령 14 - 16일의 태생기 해마 신경세포를 배양하여, 농도별, 시간별로 납을 처리함으로써, 해마에 대한 납의 신경독성으로 나타나는 세포 사망의 기전으로서의 아포프토시스 유무를 관찰하고, 납의 농도와 납 처리 시간이 아포프토시스에 미치는 영향을 알아보고자 한다.

연구대상 및 방법

1. 신경세포 배양 및 납처리

실험동물로는 태령 14~16일 된 Sprague-Dawley종의 흰쥐를 암수 구별없이 사용하였다. 어미쥐의 복부를 70 % 알콜로 소독하여 절개한 후 자궁을 적출하여 태아를 분리하였고, 태아의 두경부를 절단하여 HBSS(Hank's Balanced salt solution)에 담았다. 두피와 두개관을 제거한 후 뇌조직을 적출하여 뇌조직으로 부터 해마를 분리하였다. 분리한 조직에 0.25 %의 trypsin과 0.01 % DNase를 첨가하여 37℃에서 10분간 배양한 다음, HBSS로 수차례 씻어낸 후 조직 덩어리를 작은 덩어리로 만들어 HBSS를 첨가 하여 원심 분리하였다. 수차례 원심분리하여 상층액을 버리고 Neu-robasal medium(Boehringer Mannheim, Germany)에 200 mM L-glutamine, 25 μM glutamate, 14.3 mM mercaptoethanol, cephalosporin 항생제를 첨가한 배양액에 부유시켰다. 부유시킨 일부 세포를 취하여 trypan blue로 염색한 후 현미경하에서 hemacytometer를 이용하여 세포의 수를 측정하여 10^5-10^6개의 세포를 각각 배양접시에 분주하여 배양하였다. 배지의 교환은 3~4일 후 glutamate가 없는 배지로 교환하여 배지양의 1/2정도씩 교체하면서 10-14일간 배양하였다.

배양한 신경세포에 농도별로 납(lead acetate)을 처리하였고, 성장인자가 들어있는 배지를 대조군 배지로 하였고, Neurobasal medium에 200 mM L-glutamine, 25 μM glutamate, 14.3 mM mercaptoethanol 등의 성장인자를 첨가하지 않은 배지를 이용하였으며, 이를 본 실험에서는 아포프토시스 배지로 사용하였다.

2. 세포의 형태학적 관찰

14일간 배양한 해마신경세포를 광학 현미경을 이용하여 관찰하였다.

3. 세포독성 검사

1) 납을 처리한 세포의 형태학적인 관찰

14일간 배양한 해마신경세포에 납 10 μM, 100 μM을 각각 12시간 동안 처리하여 Hematoxylin and

계명대학교 | IP: 114.71.5.211 | Accessed 2015/12/30 15:56(KST)

Eosin 염색을 실시하여 광학현미경으로 납 농도별 세포형태를 관찰하였다.

2) 세포활성도의 측정

배양신경세포에 납을 1 μM, 10 μM, 100 μM 농도별로 처리하여 12시간동안 37℃에서 방치한 후, 세포활성도를 cell proliferation kit I(MTT; Boehringer Mannheim, Germany)를 이용하여 측정하였다. 측정 방법은 배양된 신경세포에 MTT labeling agent를 넣고 4시간 동안 배양한 후 solubilization solution을 넣고 37℃에서 overnight incubation 시키고 ELISA reader(Dynatech MR 700)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. Immunocytochemical detection and quantification of apoptosis

대조군 및 아포프토시스 배지로 각각 교환한 배양신경세포에 납을 1 μM, 10 μM, 100 μM 농도별로 12시간동안 처리하여 관찰하였다. 같은 아포프토시스 배지에서 납을 처리하지 않은 군과 납 100 μM을 처리한 군에서 37℃에서 4, 8, 12 시간 배양 후, 각각 아포프토시스 정도를 비교, 관찰하였다. 아포프토시스 정도는 In situ cell death detection Kit AP를 사용하여 TUNEL(TdT-mediated dUTP Nick End Labeling) assay를 실시하였다. TUNEL assay에 갈색으로 염색되는 세포를 아포프토시스 세포로 관찰하였고, TUNEL stain을 실시한 표본을 광학현미경하에서 10개의 시야를 사진 촬영하여 계수 한 다음, 전체 세포수에 대한 아포프토시스 양성 세포의 비율로 아포프토시스를 정량화하였다. TUNEL assay는 다음과 같다. 먼저, 배양신경세포를 PBS(phosphate buffer solution) 용액으로 씻어낸 후 4 % paraformaldehyde에 30분간 고정한 후 다시 PBS로 씻어내었다. 0.1 % Triton X-100으로 ice에서 2분간 처리하고 TUNEL mixture를 50 μL씩 넣고 37℃ 배양기에서 60분간 방치하였다. TUNEL mixture 용액을 제거한 후 TBE(Tris/Borate/EDTA) buffer(1x)용액에 5분간 담구어 반응을 중지시키고, PBS용액으로 3회 씻은후 converter-AP(anti-fluorescein antibody, conjugated with alkaline phosphatase)를 50 μL씩 넣고 37℃의 배양기에서 20분간 방치하였다. substrate용액과 detection buffer III 200 μL를 넣은 후 상온에서 10분간 둔 다음 methyl green으로 대조염색을 실시하여 광학 현미경으로 관찰하였다.

5. 자료 분석

자료의 통계학적인 처리는 두 군간 또는 그 이상의 군간의 평균을 평균±표준오차로 표시하여 비교하였고, 통계학적인 유의성은 t-test와 일원분산분석(one-way ANOVA)을 이용하였으며, 통계학적인 유의 수준은 0.05로 정하였다.

연구결과

1. 세포의 형태학적 관찰

14일간 배양한 해마의 신경세포를 광학 현미경으로 관찰하였을 때, pyramidal shape의 신경세포가 수상돌기들로 다연접을 형성하고 있는 것을 볼 수 있었다. 또한 10 μM, 100 μM의 농도별로 납을 12시간 처리한 신경세포는 납 농도가 증가할 수록 세포질에 비하여 핵의 크기가 작아지는 소견과 수상돌기들에 의한 연접형성이 소실되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1, 2).

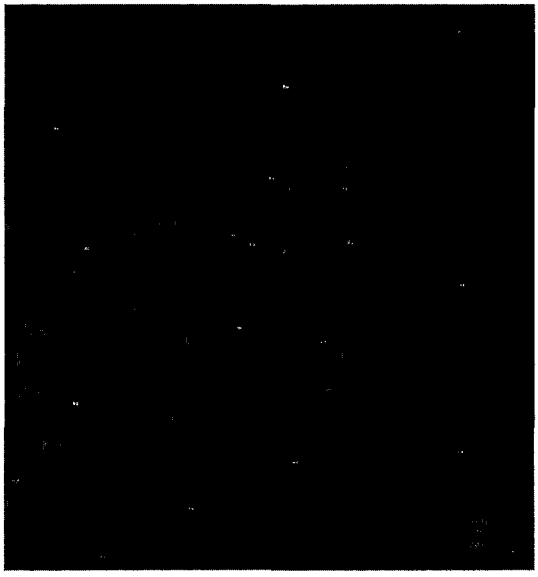

Fig. 1. Inverted microscopic findings of cultured hippocampal neurons for 14 days(×200)

계명대학교 | IP: 114.71.5.211 | Accessed 2015/12/30 15:56(KST)

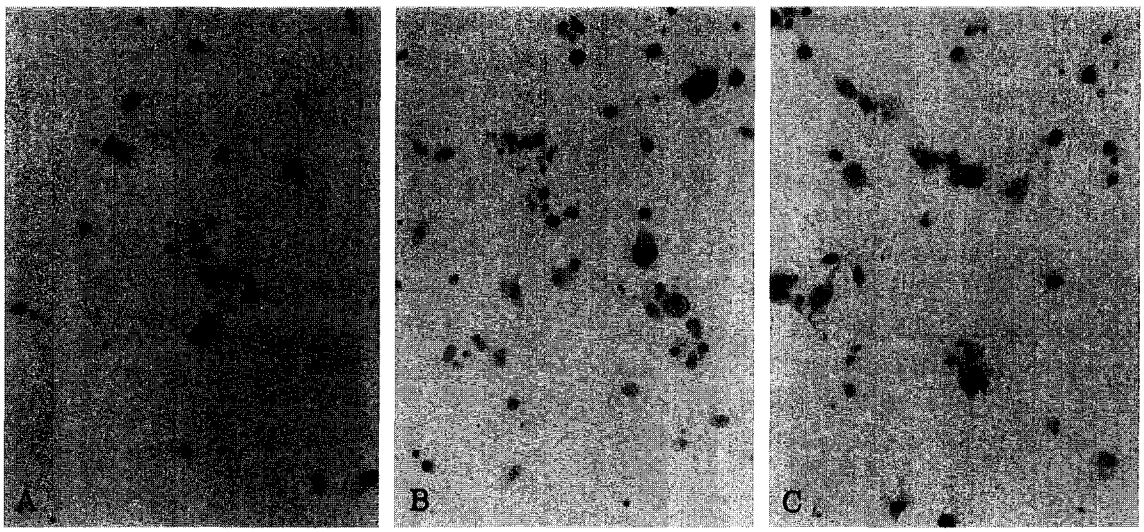

Fig. 2. Findings in hematoxylin and eosin stain of cultured hippocampal neurons treated with lead acetate for 12 hours(×200) (A:control, B:10μM, C:100μM)

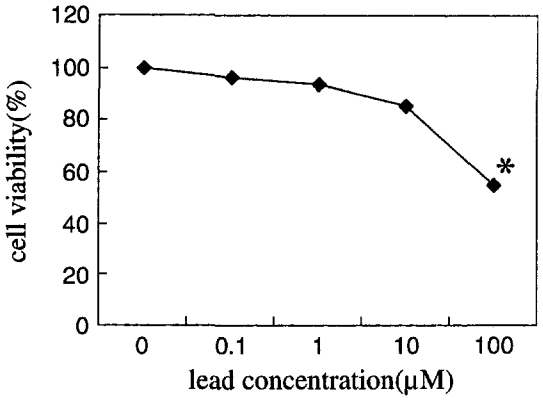

Fig. 3. Effect of lead(Pb) of the cytotoxicity on the cell viability measured by MTT assay in cultured hippocampal neurons treated with lead acetate for 12 hours(* : significantly different from the control group, p<0.05)

2. 세포활성도 측정

납에 의한 세포활성도는 납 농도 1 μM, 10 μM, 100 μM에서 각각 93.7 %, 85.1 %, 54.8 %로, 납 농도가 증가할수록 감소하는 경향을 보였으며, 특히 100 μM의 납 농도에서는 통계학적으로 유의하게 감소하였다($p < 0.05$) (Fig. 3).

3. Immunocytochemical detection and quantification of apoptosis

대조군과 납 10 μM, 100 μM을 처리한 배양신경세포의 immunostain에 의한 형태학적 관찰은 대조군에 비하여 납 처리군에서 아포프토시스가 양적으로 많이 일어남을 보여주었다(Fig. 4).

12시간 처리한 납 농도에 따른 아포프토시스를 정량화 해본 결과, 대조군 배지를 이용한 군에서는 control, 1 μM, 10 μM, 100 μM에서 각각 9.6, 21, 27, 53 %였고, 아포프토시스 배지를 이용한 군에서는 각각 10.2, 12.5, 35.8, 40.7 %로 모두 납의 농도가 증가할수록 신경세포의 아포프토시스가 증가하였다. 1 μM과 100 μM의 납 농도에서는 대조군 배지에서 아포프토시스가 더 많이 일어났고, 10 μM의 납 농도에서는 아포프토시스 배지를 이용한 군에서 현저한 아포프토시스 증가 소견을 보여주었으며, 이들은 두 군간에 통계학적으로 유의한 차이를 보여주었다($p<0.05$) (Fig. 5).

같은 아포프토시스 배지를 이용하여 시간별로 납 100 μM을 처리한 군과 처리하지 않은 군을 관찰하여 보았을 때, 납을 처리하지 않은 군에서는 0, 4, 8, 12시간에서 각각 17.5, 33, 41.2, 41.9 %의 아포프토시스를 보여주었고, 납 100 μM 처리군에서는 각각 23, 26.8, 45.8, 62.2 %의 아포프토시스 소

계명대학교 | IP: 114.71.5.211 | Accessed 2015/12/30 15:56(KST)

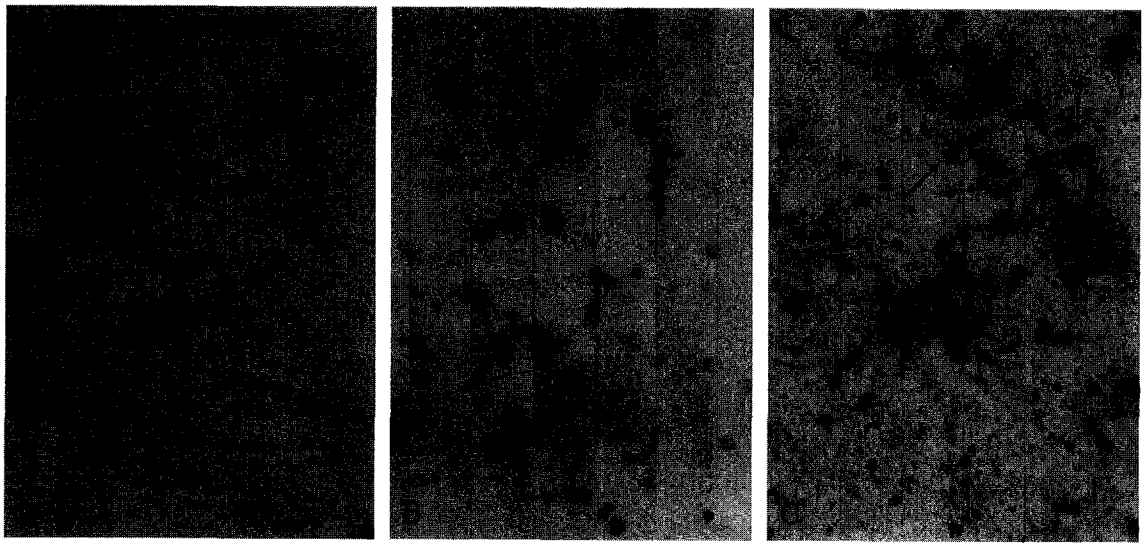

Fig. 4. Effect of Lead(Pb) on cell apoptosis demonstrated by TUNEL immunostain. The nuclei of apoptotic neurons show positive reaction.

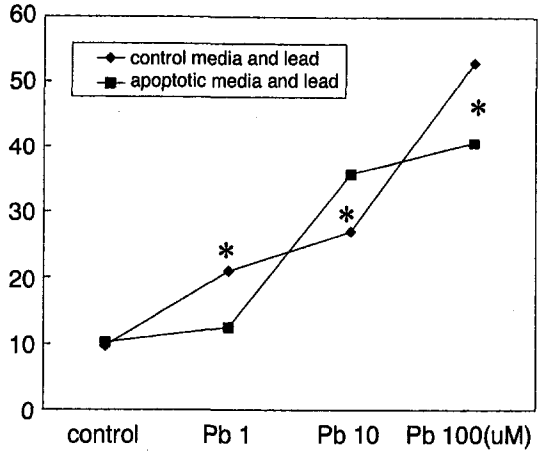

Fig. 5. Effect of lead on cell apoptosis in the control and the apoptosis media(*:$p<0.05$)

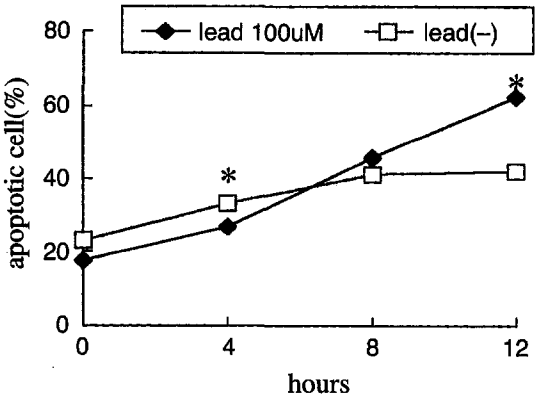

Fig. 6. Time-dependency of cell apoptosis induced by lead in apoptotic medium(*:$p<0.05$).

견을 보여, 납을 처리하지 않은 군에 비하여, 납을 처리한 군에서 아포프토시스가 급격하게 증가하는 양상을 보여, 12시간에서는 통계학적으로 유의한 차이를 보였다($p<0.05$) (Fig. 6).

고 찰

최근에는 납에 대한 폭로가 많이 감소하기는 하였지만, 여전히 납은 어린아이들에게 위험요인으로 남아있다. 특히, 납의 폭로는 저소득층의 아이들에게서 심각하다. Hammond와 Dietrich(1990)는 3백만명의 학동기 전 아동이 높은 혈중 납 농도를 가지는 것으로 보고함으로써, 납이 여전히 미국의 어린아이들에게 가장 심각한 환경적 위험요인임을 증명하였다. 따라서 납의 신경독성 기전이 밝혀져야 할 필요에도 불구하고 아직 그 명확한 기전이 정립되어 있지 않다.

신경세포와 신경교세포는 신경계에서 납에 의한 손상의 가능한 부위이며(Tiffany-Castiglion et al., 1989; Bressler and Goldstein, 1991), 해마

계명대학교 | IP: 114.71.5.211 | Accessed 2015/12/30 15:56(KST)

형성체는 납의 신경독성의 주요 표적이다(Petit et al., 1983). 납은 고농도에서 해마의 성장에 영향을 주고, 저농도에서 해마의 장기강화의 발생을 저해하며, 신경연접가소성 또한, 저농도의 납에 민감하게 반응한다(Petit et al., 1983; Bhattacharya et al., 1988; Altman et al., 1991; Audesirk et al., 1991).

납이 신경기능에 장애를 초래하는 기전은 호기성 에너지 대사를 억제(Holtzman et al., 1987), 납이 칼슘을 치환(Marcovac and Goldstein, 1988), Na+/K+ ATPase 활동을 억제(Chanez et al., 1988), 전압의존성 칼슘통로의 차단, NMDA 수용체의 차단(Ujihara and Albuquerque, 1992) 등 여러가지로 설명하고 있는데, 크게 두가지로 생각해 볼 수 있다. 하나는 신경발생학적인 독소로서 중추신경계의 분화를 방해하는 것이고, 다른 하나는 신경약물학적인 독소로서 신경전달물질의 이온성 기전을 방해하는 것이다(Silbergeld, 1992).

발생과정중에 있는 신경계는 광범위한 아포프토시스를 경험한다. 신경군에 따라서는 태생기 동안에 만들어진 세포의 20-80 %가 성인기에 도달하기 전에 사망한다(Oppenheim, 1991). 신경이 어떤 생체기관을 지배하고 있을 때 그 기관의 세포에서 분비되는 trophic factor에 의해 신경세포의 생존이 결정되고, 지배하는 신경의 수가 결정된다. 노화의 과정이나, 때로는 저산소증, 감염, 독소, 퇴행성 질환 등에서도 세포 사멸이 일어난다(Wyllie et al., 1980).

아포프토시스를 관찰하는 방법은 겔 전기영동을 이용한 DNA laddering을 관찰하는 방법 외에 여러 가지가 있다. 가장 좋은 방법은 겔 전기영동에서 DNA laddering 현상을 관찰하는 것이지만 이것은 조직의 특정세포에만 국한되어 발생하는 아포프토시스를 관찰하기 어렵다(Tian et al., 1991). 최근에 개발된 TUNEL방법은 분절된 DNA의 말단에 3'-OH가 결합하고 있는 것을 착안한 방법으로, 조직내에 특정 세포에 국한되어있는 아포프토시스를 관찰할 수 있고, 비교적 초기의 아포프토시스 세포들도 관찰할 수 있다. TUNEL 방법은 핵의 변성이 일어나는 세포 괴사와 DNA laddering이 있는 아포프토시스 핵을 형태학적으로 구별하는 것이 가능하다.

본 연구는 광학 현미경을 이용하여 세포의 형태학적인 관찰을 하였고, MTT를 이용하여 세포활성도를 측정하였으며, TUNEL assay를 이용하여 아포프토시스를 관찰하였다.

납의 농도에 따른 아포프토시스는 대조군 배지를 이용한 군과 아포프토시스 배지를 이용한 군에서 모두 납의 농도가 증가할 수록 아포프토시스가 증가하여, 납의 농도가 증가할 수록 아포프토시스가 증가한다는 것을 관찰할 수 있었다. 이것은, 납이 신경세포의 아포프토시스를 유도하는 중요한 요인이 될 수 있음을 보여주는 소견이라 생각된다. 성장인자의 유무에 따라 성장인자가 있는 배지에 납을 투여한 경우가 납 농도 1 μM과 100 μM에서 아포프토시스가 더 많이 나타났다. 납 1 μM 농도에서는 성장인자의 상호작용이 어떻게 나타나는지 본 실험에서는 명확히 알 수 없으며, 추후에는 1 μM이하에서의 납에 의한 아포프토시스에 대한 연구와 납 투여 시간의 변화에 따른 아포프토시스에 대한 연구를 병행하여야 할 것으로 생각된다. 납 100 μM농도에서 성장인자가 있는 경우가 아포프토시스가 많이 나타난 것은 성장인자가 없는 배지에서 신경세포의 괴사가 많이 일어남으로서 나타나는 소견으로 추측할 수 있다.

아포프토시스 배지를 이용하여 시간별로 납 100 μM 을 처리한 군과 처리하지 않은 군을 관찰하여 보았을 때, 납을 처리하지 않은 군에서도 시간이 지날수록 점진적으로 아포프토시스가 증가하는 경향을 보였으나, 납을 처리한 군에서는 급격하게 아포프토시스가 증가하여, 12시간에서는 납 처리군에서 아포프토시스 비율이 유의하게 높았고, 이는 통계학적으로 유의하였다($p<0.05$). 따라서, 아포프토시스 배지는 납의 신경세포에 대한 아포프토시스 유발을 촉진시키는 것으로 관찰되었다. 또한, 아포프토시스 배지에 납을 처리한 경우, 4시간에서 8시간 사이에 현저히 아포프토시스가 증가함을 보여주었다. 이는 소뇌의 신경세포를 아포프토시스 배지를 이용하여 100 M의 납을 처리한 Oberto 등(1996)의 실험에서 납을 처리한 시간이 2시간에서 10시간까지 증가할 수록 신경세포의 사망이 현저하게 증가하였다는 것과 아포프토시스 배지만을 이용한 군에서는 점진적으로 아포프토시스가 증가하였다는 점에서는 일치하는 소견을 보여주고 있으나, Oberto 등(1996)의 연구에서 납처리 후 4시간까지 가장 현저한 아포프토시스를

계명대학교 | IP: 114.71.5.211 | Accessed 2015/12/30 15:56(KST)

나타낸 점과는 차이가 있다. 또한, 배양신경세포를 아포프토시스 배지에서 배양한 경우, 24시간후 부터 아포프토시스의 특징적인 소견이 나타났으며, 72시간 후에 완결되었다고 하였으나, 본 연구와는 비교할 수 없었다.

본 연구는 납에 의해 유도되는 아포프토시스를 관찰하였으나, 납의 농도에 따른 세포활성도에 있어 LD_{50} 등의 기준을 설정하지 않았다는 문제점이 있다. 또한, 신경세포의 배양 시간을 일정하게 하고, 납의 처리시간을 12시간으로 균등하게 함으로써, 납이 신경세포의 성장에 가장 영향을 주는 시기를 파악하지 않은 점과 폭로시간에 따른 신경세포에 대한 납의 영향을 조사하지 못한 한계점을 가지고 있다. 향후 연구들에서는 신경세포의 배양시간과 납의 농도 및 처리시간을 다양하게 함으로써 아포프토시스 유도에 대한 납의 영향을 충분히 파악하는 연구가 필요할 것이다.

결 론

본 연구는 태령 14~16일 된 쥐의 해마를 분리하여 해마신경세포를 배양하였으며, 배양한 신경세포에 납(lead acetate)을 1, 10, 100 μM의 농도로 각각 처리하였다. 또한, 신경세포를 배양한 배지와는 달리, 성장인자를 넣지 않은 배지를 아포프토시스배지로 사용하여 납을 처리하였으며, 아포프토시스에 대한 납의 영향을 관찰하고자 하였다. 납을 처리한 세포의 활성도는 MTT를 이용하여 측정하였으며, 납 처리 후 세포의 형태학적인 변화는 hematoxylin and eosin stain으로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. 또한, 납의 신경독성에 의한 세포사망의 양상을 관찰하기 위해 TUNEL법을 사용하였으며, 갈색으로 염색된 세포를 백분율로 정량화하여 비교하였다.

연구 결과를 살펴보면, 1 μM, 10 μM, 100 μM의 농도별로 납을 12시간 처리한 신경세포는 납 농도가 증가할 수록 세포질에 비하여 핵의 크기가 작아지는 것을 관찰할 수 있었다. 납에 의한 세포활성도는 납 농도가 증가할수록 감소하는 경향을 보였으며, 1 μM, 10 μM 납 농도에서는 세포활성도가 약간 감소하는 경향을 보였으나 100 μM의 농도에서는 통계학적으로 유의하게 감소하였다. 납의 농도에 따른 아포프토시스는 대조군 배지를 이용한 군과 아포프토시스 배지를 이용한 군에서 모두 납의 농도가 증가할수록 아포프토시스가 증가하여, 납의 농도가 증가할수록 아포프토시스가 증가한다는 것을 관찰할 수 있었다. 또한, 아포프토시스 배지를 이용한 군에서는 10 μM의 납 농도에서 현저한 아포프토시스 소견을 보여주었고, 대조군 배지에서는 100 μM의 납 농도에서 현저하게 증가된 아포프토시스 소견을 관찰할 수 있었다.

아포프토시스 배지를 이용하여 납 100 μM 처리군과 처리하지 않은 군을 비교하여 보았을 때, 납을 처리하지 않은 군에서도 시간이 지날 수 록 점진적으로 아포프토시스가 증가하는 경향을 보였으나, 납을 처리한 군에서는 급격하게 아포프토시스가 증가하여, 12시간에서는 납 처리군에서 아포프토시스 비율이 유의하게 높았고, 이는 통계학적으로 유의하였다($p<0.05$). 또한, 아포프토시스 배지에 납을 처리한 경우, 4시간에서 8시간 사이에 현저히 아포프토시스가 증가함을 관찰할 수 있었다. 이상의 실험결과로, 납은 해마신경세포의 세포활성도를 감소시키며, 납에 의한 해마신경세포 사망은 아포프토시스와 관계가 있다. 또한, 납은 아포프토시스 배지에 의한 해마신경세포의 사망을 촉진시킨다.

인용문헌

김원호. 세포 사멸과 질병(Apoptosis and Disease). Medical postgraduates 1996;3(24): 275-288.

신동훈. 대뇌 기저핵 신경세포 일차배양에서 망간에 의한 Nitric Oxide 생성과Apoptosis 유도. 박사학위논문, 1998.

Altman L, Svensson K, Wigand H. Long-term potentiation in rat hippocampal slices is impaired following acute lead perfusion. Neurosci Lett 1991;128:109-112.

Audesirk T, Audesirk G, Ferguson C, Shugarts D. Effects of inorganic lead on the differentiation and growth of cultured hippocampal and neuroblastoma cells. Neurotoxicology 1991;12: 529-638.

Bhattacarya A, Shukla R, Dietrich K, Kopke J. Postural disequilibrium quantification in children with chronic lead exposure: a pilot study. Neurotoxicology 1988;9:327-340.

계명대학교 | IP: 114.71.5.211 | Accessed 2015/12/30 15:56(KST)

Bielarczyk H, Tomsig JL, Suszkiw. Perinatal low-level lead exposure and the septo- hippocampal cholinergic system: selective reduction of muscarinic receptors and choliesterase in the rat septum. Brain research 1994;643:211-217.

Bonfoco E, Krainc D, Ankarcrona M, Nicofera P, Lipton SA. Apoptosis and Necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-Daspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures. Neurobiology 1995;92:7162-7166.

Bressler JP, Goldstein GW. Mechanism of lead neurotoxicity. Biochem pharmacol 1991;41(4): 479-484.

Buchhiem K, Noack S, Stoltenburg G, Lilienthal H, Winneke G. Developmental delay of astrocytes in hippocampus of rhesus monkeys reflects the effects of pre- and postnatal chronic low level lead exposure. Neurotoxicology 1994;15: 664-670.

Byers R, Lord E. Late effect of lead poisoning on mental development. Am J Dis Child. 1943;66: 471-481.

Chanez C, Barone P, Flexor MA, Brourke JM. Na+/K+ ATPase activity in synaptosomes and myelin of developing control and intra-uterine growth retarded rats. Neurochem int 1988;12: 39-45.

Choi DW. Glutamate neurotoxicity and disease of the nervous system. Neuron 1988;1:623-634.

Deshmukh M, Johnson EM. Programmed cell death in neurons: Focus on the pathway of nerve growth factor deprivation-induced death of sympathetic neurons. Mol pharmacol 1997; 51:897-906.

Favaron M, Manev H, Alho H, Bertolino M. Gangliosides prevent glutamate and kainate neurotoxicity in primary neuronal cultures of neonatal rat cerebellum and cortex. Proc Natl Acad Sci USA 1988;85:7351-7355.

Franklin JL, Johnson EM. Suppression of programed cell death by sustained elevation of cytoplasmic calcium. Trends Neurosci 1992;15: 501-508.

Goldstein GW. Neurologic concepts of lead poisoning in children. Pediatric Annals 1992;21:384-388.

Goyer RA. Mechanism of lead and cadmium nephrotoxicity. Toxicol lett 1989;46:153-162.

Hammond PB, Dietrich KN. Lead exposure in early life: Health consequence. Rev Environ Contam Toxicol 1990;115:91-124.

Holtzman D, Olson JE, Catherine De Vries, Klaus Bensch. Lead toxicity in primary cultured cerebral astrocytes and cerebellar granular neurons. Toxicol appl pharmacol 1987;89:211-225.

Kerr JF. Some lysosomes functions on liver cells reacting to sublethal injury. 1st ed, Amsterdam, North-Holland, 1972, pp 126-42.

Kerr JF, Searle J. Detection of cells by apoptosis during castratron-induced involution of the rat prostate. Virchow Arch B cell pathol 1973;13: 87-102.

Klaassen CD. Casarett and Dull's Toxicology, the basic science of poisons. 5th edition, McGraw Hill, 1995, pp 703-709.

Koh JY, Gwag BJ, Lobner D, Choi DW. Potentiated necrosis of cultured cortical neurons by neurotrophins. Science 1995;268:573-575.

Lesort M, Blanchard C, Yardin C, Esclaire F, Hugon J. Cultured neurons expressing phosphorylated tau are more resistant to apoptosis induced by NMDA or serum deprivation. Molecular Brain Research 1997;45:127-132.

Manev H, Favaron M, Siman R, Guidotti A, Costa E. Delayed increase of calcium influx elicited by glutamate: Role in neuronal death. Mol Pharmacol 1989;36:106-112.

Manev H, Costa E, Wroblewski JT, Guidotti A. Abusive stimulation of excitatory aminoacid receptors: A strategy to limit neurotoxicity. FASEB J 1990;4:2789-2797.

Markovac J, Goldstein GW. Lead activates protein kinase C in immature rat brain microvessels. Toxicol Appl Pharmacol 1988;96:14-23.

Martin DP, Ito A, Horigome K, Lampe PA, Johnson EM. Biochemical characterization of programed cell death in NGF-deprived sympathetic neurons. J Neurobiol 1992;23:1205-1220.

Martin DP, Schmidt RE, Distefano PS, Lowry OH, Carter JG, Johnson EM. Inhibitors of protein synthesis and RNA synthesis prevent neuronal death caused by nerve growth factor deprivation. J Cell Biol 1988;106:829-844.

Needleman HL, Alan Schell, David Bellinger, Alan Leviton, Allred EN. The long-term exposure to low deses of lead in childhood -An 11-year follow-up report. N Engl J Med 1990;322: 83-88.

계명대학교 | IP: 114.71.5.211 | Accessed 2015/12/30 15:56(KST)

Oberto A, Marks N, Evans HL, Guidotti A. Lead(Pb++) promotes apoptosis in newborn rat cerebellar neurons: pathological implication. J Pharmacol Exp Ther 1996;279(1):435-442.

Oppenheim RW. Cell death during development of the nervous system. Annu Rev Neurosci 1991; 14:453-501.

Petit TL, Alfano DP, LeBoutillier JC. Early exposure and the hippocampus: a review and recent advances. Neurotoxicology 1983;4:79-94.

Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD. Programmed cell death and the control of cell survival: Lessons from the nervous system. Science 1993;262:695-698.

Rodier PM. Developong brain as a target. Envir Health Persp 1995;6:73-76.

Searle J, Kerr JF, Bishop CJ. Necrosis and apoptosis: distinct modex of cell death with fundamentally different significance. Pathol Annu 1982;17:229-59.

Selvin-Testa A, Lopez-Costa JJ, Nessi de Avinon AC, Pecci Saavedra J. Astroglial alterations in rat hippocampus during chronic lead exposure. Glia 1991;4:384-392.

Selvin-Testa A, Loidl CF, Lopez-Costa JJ, Lopez EM, Pecci Saavedra J. Chronic lead exposure induces astrogliosis in hippocampus and cerebellum. Neurotoxicology 1994;15:389-401.

Shafiq-UR-Rehman. Lead-induced regional lipid peroxidation in Brain. Toxicol lett 1984;21:333-337.

Sierra EM, Rowles TK, Martin J, Bratton GR, Womac C, Tiffany-Castiglioni E. Low level lead neurotoxicity in a pregnant guinea pigs model: neuroglial enzyme activities and brain trace metal concentrations. Toxicology 1989;59:81-96.

Silbergeld EK. Mechanism of lead neurotoxicity, or looking beyond the lamppost. FASEB J 1992; 6:3201-3206.

Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatmemt of disease. Science 1995;267:1456-62.

Tian Q, Streuti M, Saito H, Schlossmann SF, Anderson P. A poluadenylate binding protein localized to the granule of cytolytic lymphocytes induces DNA fragmentation in target cells. Cell 1991;67:629-639.

Tiffany-Castiglioni E, Sierra EM, Wu Jn, Rowles TK. Lead toxicity in neuroglia. Neurotoxicology 1989;10:417-444.

Tilson HA, Mitchell CL. Neurotoxicology. Raven Press, 1991, pp 302-305.

Ujihara H, Albuquerque EX. Developmental changes of te inhibition by lead of NMDA-activated currents in cultured ippocampal neurons. J pharmacol Exp Ther 1992;263:868-875.

Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. The significance of apoptosis. Int Rev cytol 1980;68:251-306.

Yan G, Irwin RP, Lin S, Weller M. Diphenylhydantoin induces apoptotic cell death of cultured rat cerebellar granule neurons. J Pharmacol Exp Ther 1995;274:983-990.

계명대학교 | IP: 114.71.5.211 | Accessed 2015/12/30 15:56(KST)