

대뇌 기저핵 신경세포 일차배양에서 망간에 의해 유도된 Apoptosis : 형태학적인 소견

계명대학교 의과대학 예방의학교실 및 동산병원 산업의학과, 해부병리학교실¹,
동국대학교 의과대학 해부학교실², 계명대학교 의과대학 생리학교실³, 미생물학교실⁴

신동훈 · 김상표¹ · 정용욱² · 배재훈³ · 송대규³ · 백원기⁴

— Abstract —

Apoptosis Induced by Manganese in Basal Ganglia Primary Neuronal Cell Culture : Morphological Findings.

Dong-Hoon Shin, Sang-Pyo Kim¹, Young-Wook Jung²,
Jae-Hoon Bae³, Dae-Kyu Song³, Won-Ki Baek⁴

*Department of Preventive Medicine, Occupational and Environmental medicine,
Pathology¹, School of Medicine Keimyung University.
Department of Anatomy, School of Medicine, Dongguk University²
Department of Physiology³, Microbiology⁴ School of Medicine, Keimyung University.*

Objectives : Manganese is cytotoxic to the central nervous system including basal ganglia. Its toxic mechanism is related to oxidative stress, mediated by toxic free radicals but is speculatives. In the present study , we have investigated to manifest apoptosis in manganese-induced cytotoxicity in primary neuronal cell culture of rat basal ganglia.

Methods : To detect apoptotic neuronal cells were stained by the terminal deoxynucleotide(TdT)-mediated dUTP nick end-labelling(TUNEL) method and apoptotic changes in nuclei of neurons were observed by electron microscopy.

Results : We showed that TUNEL immunostain showed brownish signal in the nuclei of apoptotic cells and the proportions of apoptotic cells in Manganese treatment groups were more higher than controls. On transmission electron microscopy, there were chromatin condensation with margination toward nuclear membrane and condensation of cytoplasm in the treated with 1uM MnCl₂ for 48 hours in a basal ganglia neurons. Apoptotic bodies were found and consisted of semilunar-like condensed nuclei with relatively intact cytoplasmic organelles.

Conclusions : Apoptosis appears to be one mechanism in the manganese-induced neuronal cell death. Manganese intoxication is a convenient model for apoptosis study.

Key Words : Manganese, Apoptosis, Neurons.

〈접수일 : 1999년 10월 2일, 채택일 : 1999년 12월 22일〉

교신저자 : 신 동 훈(Tel : 053-250-7495) E-mail : dhshin@dsmc.or.kr

* 이 연구는 1997년도 교육부학술연구조성비(기초의학 BM 97-021-F00058)에 의하여 연구되었음

서 론

자연환경이나 산업장에 많은 양의 망간이 산재하고 있으며 많은 근로자들이 직업적 폭로로 만성 망간중독의 위험에 처해 있다. 또한 가솔린의 항노크제로 사용되는 MMT(methylcyclopentadienyl manganese tricarbonyl)와 농약 등에 함유된 망간화합물에 의한 환경오염은 망간의 만성독성에 대한 관심을 증대시키고 있다. 만성 망간중독은 특발성 Parkinson씨 병의 추체외로계 징후나 증상과 비슷한 기능성장애를 일으키고(Cotzias, 1958; Mena 등, 1967; Barbeau, 1984; Donaldson, 1987; Calne 등 1994), 망간의 이가이온(Mn^{2+})이 세포내 superoxide의 주요근원으로 알려진 사립체 전자전달체계인 세포의 안쪽 막에 결합하여(Gunter 등, 1975) 산소자유기에 의해 3가 이온(Mn^{3+})으로 산화되어 세포독성에(Graham, 1984; Halliwell, 1984; Archibald와 Tyree, 1987; Donaldson, 1987) 관여하는 것으로 알려져 있으나 신경세포에 대한 손상기전과 세포사(cell death)의 양상에 대해 확실하게 정립된 것이 없다.

세포사에는 두가지가 알려져 있다. 즉 괴사와 apoptosis이다. 세포는 내부의 단백질 분해효소의 활성을 통하여 세포예정사(programmed cell death)가 시작되며, 이는 세포골격의 붕괴, 세포외출 등을 초래한다. 그리고 apoptosis는 핵내에 특징적인 변화가 초래되는데 핵은 endogenous nuclease의 활성화에 의해 DNA변성이 시작되어 응축이 일어난다. 대부분의 세포에서는 DNA가 변성되어 oligonucleosome 정도의 크기로 분절된 DNA분절이 생겨나기도 한다(Martin과 Green, 1995). Apoptosis는 정상적인 생리학적 조건 또는 병리학적인 상태 모두에서 관찰되는데 신경세포의 apoptosis는 많은 논란의 여지가 있지만 Alzheimer 병, Parkinson씨 병, Amyotrophic lateral sclerosis(ALS) 및 여러형태의 소녀변성질환 등에서는 특정한 신경세포의 소실이 특징적으로 관찰된다(Heintz, 1993; Steller, 1995). 이러한 질환에 있어서 세포사는 특징적인 운동장애 및 중추신경계 기능장애를 초래하며, 세포사의 주된 기전은 괴사에 의한 것이 아니라 염증반응을 수반하지 않는 사멸로 oxidative stress, calcium toxicity, 생존 인자의 결핍 등이 병태생리에 관여하

는 apoptosis에 의해 일어날 것이라는 가능성이 제시되고 있다(Choi, 1992). 또한 사립체의 기능 소실 또한 apoptosis에서 나타나는 특징적인 소견이므로 사립체는 apoptosis를 조절하는 중요한 기능을 가지고 있을 것으로 생각된다. 그러므로 Mn^{2+} 이 축적되는 주요 세포소기관이 사립체이기 때문에 망간중독으로 인한 신경세포의 사망은 괴사보다는 apoptosis의 가능성이 높을 것으로 생각된다.

본 실험에서는 대뇌 기저핵의 신경세포를 배양하여 망간에 의한 apoptosis 유도 여부를 전자현미경학적 및 세포면역화학적 방법으로 관찰하였다.

대상 및 방법

1. 대뇌기저핵 신경세포분리 및 배양

임신후 13~15일의 흰쥐(Sprague-Dawley Rat)의 복강을 70% alcohol로 소독후 절개하여 자궁을 적출하고 태아의 두경부를 절단후 HBSS(Hank's Balanced salt solution)에 모았다. 뇌조직 주위의 뇌막을 제거후 기저핵 부위를 분리하였다. 분리한 조직에 0.25% trypsin을 첨가하고 37°C 수조에서 15분간 배양한 다음 HBSS로 수차례 씻어내어 trypsin을 완전히 제거하고 조직 덩어리를 작은 입자덩어리로 만든후 상층액을 취하여 HBSS를 첨가 후 세포를 분리하였다. 수차례 반복후 상층액은 버리고 배지에 부유시켰다. 부유시킨 일부 세포를 취하여 trypan blue로 염색한 후 현미경하에서 hemocytometer를 이용하여 세포의 수를 측정하고, poly-D-lysine을 처리한 chamber slide와 세포배양 접시에 $10^4 \sim 10^7$ 개의 세포수를 배양하였다. 배양일로 부터 4일 후 배지를 glutamate가 없는 배지로 반씩 교환하고 2~3주간 배양 후 신경세포가 성숙한 다음 0.01~10 μM $MnCl_2$ 를 48시간 처리하여 다음 실험을 실시하였다.

2. Apoptosis의 관찰

1) TUNEL assay(TdT-mediated dUTP Nick End Labelling)

In Situ Cell Death Detection kit, AP(Boehringer Mannheim)를 사용하여 TUNEL 반응에 양성으로 나타나는 apoptotic cell을 관찰하였고, 정량적인 변화를 알아보기 위해 apoptosis율을 계산하였다. Chamber slide에 배양한

신경세포를 PBS용액으로 씻은후 고정액(4% PFA: paraformaldehyde)에 30분간 고정한 후 PBS용액으로 씻어냈다. 0.1% Triton X-100으로 Ice에서 2분간 처리하고 TUNEL mixtures를 50 μ 씩 넣고 37°C 배양기에서 60분간 방치하였다. TUNEL mixtures용액을 제거후 TB buffer (1 \times)용액에 5분간 담구어 반응을 중지시키고, PBS용액으로 수차례 씻은 후 converter-AP를 50 μ 씩 넣고 37°C 배양기에서 20분간 방치하였다. BufferIII (100 mM Tris HCl: 100 mM NaCl: 50 mM MgCl₂) 10 ml에 substrate인 NBT/X-phosphate(BCIP) solution 200 μ 를 넣어 만든 substrate 용액을 100 μ 를 첨가하고 상온에서 10분 간 둔 다음 PBS로 3번 세척한 후 methyl green으로 대조염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. 결과판독은 핵이 갈색으로 염색되는 것을 양성으로 판정하였고, 200배 현미경시야당 양성으로 관찰되는 세포의 수를 세어 apoptosis의 정도를 정량화 하였다.

2) 투과전자현미경학적 관찰

세포배양 접시에 배양된 신경세포를 원심분리하여 시험관에 모은 후 2.5% glutaraldehyde용액(0.1 M phosphate buffer, pH 7.4)으로 1~4°C에서 2시간 전고정을 하고 0.1 M phosphate buffer로 세척한 후 1% OsO₄용액에 2시간 동안 세포를 고정시켰다. 고정시킨 세포를 buffer용액으로 세척 한 다음 계열 ethanol으로 탈수하고 propylene oxide로 치환한 후 Luft(1961)방법에 따라 epoxy혼합물로 포맷하였다. 37°C에 12시간, 45°C에 12시간, 60°C에 48시간 동안 방치하여 열중합 시킨 후 포맷한 세포를 1 μ m 두께로 박절한 후 toluidine blue 염색을 실시하여 관찰 부위를 선택하였다. Sorvall MT-5000형 ultramicrotome에 Dupont diamond knife를 부착하여 회백색(40~60 nm)의 간접색을 나타내는 초박절편을 얻어 grid에 부착시킨 뒤, watson(1958) 및 Reynolds(1963)방법에 의한 uranyl acetate와 lead citrate로 이중 전자염색을 실시하여 Hitachi-600형 투과전자현미경으로 관찰하였다.

3. 통계처리

자료의 통계학적인 처리는 두 군간 또는 그 이상의 군간의 평균은 평균 \pm 표준오차(SEM:standard error of mean)로 표시하여 비교하였고, 통계학적

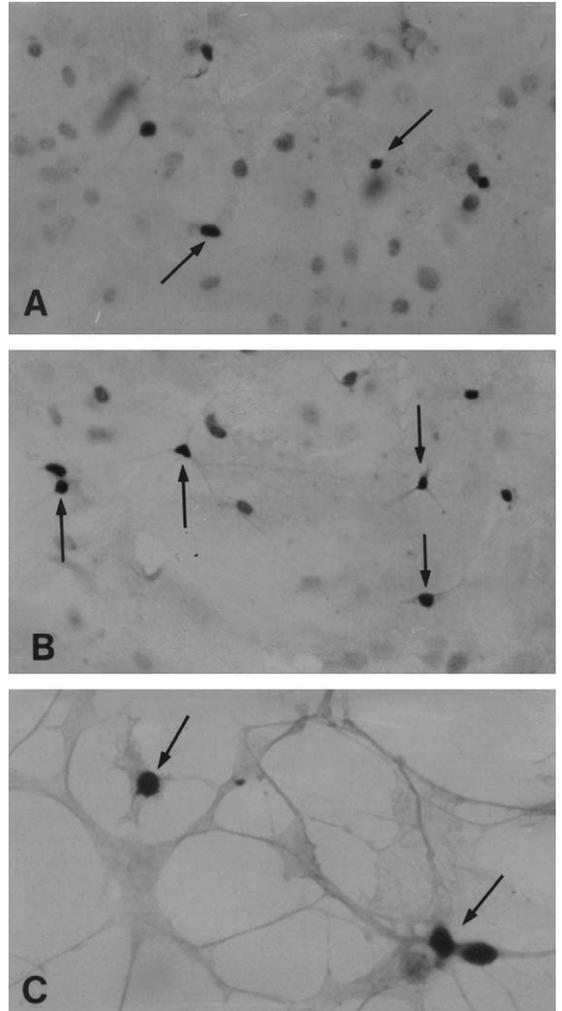


Fig. 1. TUNEL immunostain demonstrates positive reaction in the nucleus of apoptotic neurons(arrows). A:control(x100), B and C:1.0 μ M MnCl₂ treated for 48 hours(X100, 200).

인 유의성은 t-test와 일원분산분석(one-way ANOVA)후 Duncan's multiple comparison test를 실시하였으며 유의수준은 0.05로 정하였다.

결 과

망간의 세포독성에 의한 신경세포 사멸양상을 TUNEL방법을 이용하여 관찰한 결과 TUNEL반응에 갈색으로 양성반응을 나타내는 apoptotic 세포의 수가 대조군에 비해 MnCl₂를 0.01~1 μ M 처리한

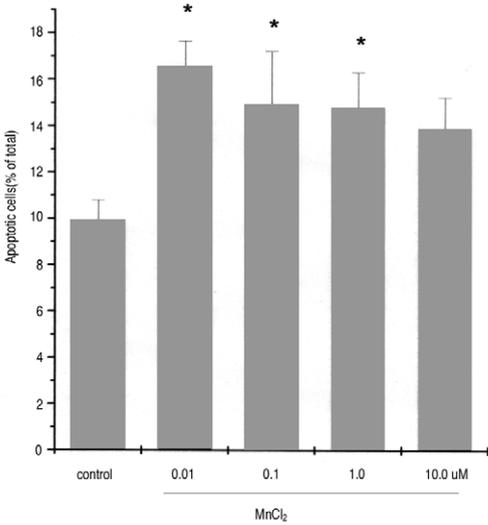


Fig. 2. Quantitative analysis of apoptosis in cultured neuronal cells treated with MnCl₂ for 48 hours. Data are means±SEM(N=3). * P<0.05: compared with the apoptotic cell count in control group.

군에서 유의하게 높게 나타났으며(P<0.05), MnCl₂ 농도에 따른 apoptotic 세포수의 변화에서 용량-반응관계는 관찰할 수 없었다(Fig. 1,2).

대조군의 신경세포들은 핵인(nucleolus)이 두드러지게 특징적으로 보이면서 핵막과 세포질내 소기관들이 잘 보존되어 있으며, 세포질내망(ER)과 사립체(mitochondria)를 특히 많이 가지고 있었다(Fig. 3A). 1.0µM MnCl₂를 48시간 동안 처리한 실험군에서는 이질염색질(heterochromatin)이 핵막으로 이동하면서 응집되어 있었으며, 핵내 불규칙한 형태의 염색질이 나타나 분절이 진행되는 소견을 보였고, 세포질은 농축되어 있으면서 공포(vacule)가 나타났다(Fig. 3B). Apoptosis의 가장 특징적인 초기 소견인 막으로 둘러싸인 반달모양의 핵내염색질의 분절편(fragmented chromatin)과 주위의 상대적으로 정상적인 소기관으로 구성된 apoptotic body를 관찰할 수 있었다(Fig. 3C).

고 찰

망간의 신경독성은 Parkinson씨 병과 유사하여 Parkinsonism을 만성 망간중독의 한 형태로 생각

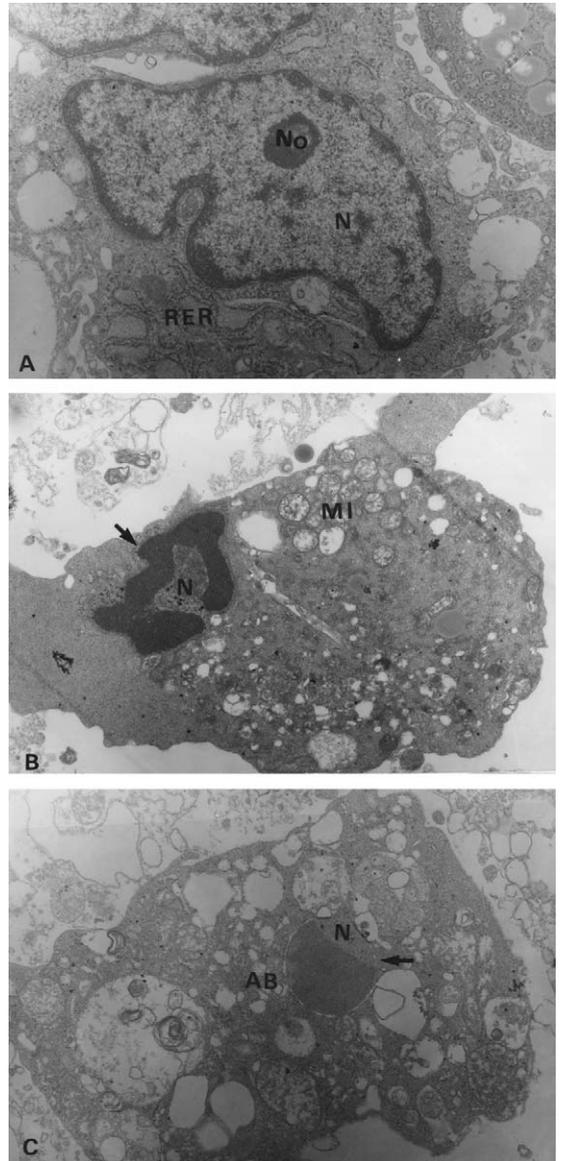


Fig. 3. Electron microscopic findings of cultured neuronal cells. (A) The control neuronal cell. The nucleus and intracytoplasmic organelles are well preserved, TEM, X 17,000. (B and C) The neuronal cell treated with 1 µM MnCl₂ for 48 hours shows margination of heterochromatin and condensed cytoplasm, TEM, X17,000. Membrane-bound apoptotic body shows semilunar like condensed nucleus with relatively intact intracytoplasmic organelle, TEM, X17,000. Abbreviations, No: Nucleolus, N: Nucleus, MI: Mitochondria, RER: Rough endoplasmic reticulum, AB: Apoptotic body

하였으며, 망간의 중독기전을 신경퇴행성질환의 모델로 삼은 연구가 이루어져 왔다(Cotzias, 1961: 1966; Donaldson, 1987) 망간의 신경독성 기전은 복합적으로 작용하며, 사립체내의 Ca^{2+} 의 유입이 증가, Mn^{2+} 이 반응성 산소종의 생성을 자극하고 이들이 dopamin수용체나 dopaminergic cell, 그리고 dopamine에 직접적으로 작용하여 신경세포 손상을 초래한다는 등의 연구보고가 있으나(Graham, 1984; Konji 등, 1985; Gavin 등, 1990) 망간에 의한 신경세포 손상기전은 확실하게 규명하지 못하고 있다. 고농도의 망간은 세포에서 핵산의 대사에 영향을 미친다(Niyogi 등, 1981; Singh, 1983; Rudnykh 와 Saichenko, 1986). 그러나 apoptosis를 유도하는 망간의 용량은 알려져 있지 않다.

Ambramova 등(1988)은 DNase는 망간 의존성 효소라고 보고하였고, Zhavoronkov와 Lugovskoy(1992)는 망간의 과다로 인해 DNase의 활성도가 증가되어 apoptosis가 일어난다고 보고하였으며 또한 망간중독이 apoptosis의 연구에 적합한 모델이라고 하였다. 현재까지 가장 널리 인정되는 apoptosis의 표지자는 전자현미경으로 관찰한 chromatin의 농축과 핵의 fragmentation이지만, 형광 현미경으로 DNA의 양 또는 핵의 fragmentation 정도를 평가하거나 DNA laddering을 관찰하는 방법, 유세포분석(flow cytometry)을 이용하여 세포의 성장변화를 알아보는 법, 최근의 terminal deoxyuridyl transferase(TdT)를 이용하여 조각난 DNA의 3'-OH 말단에 발색제가 부착된 nucleotide를 표지한 후 면역조직화학적 방법으로 찾아내는 TUNEL(TdT-mediated dUTP-biotin nick end labelling)법이 각광받고 있는 apoptosis 측정법의 하나이다.

본 연구에서는 DNase에 의한 DNA 절편화를 확인하는 TUNEL 염색방법을 이용하여 apoptosis를 관찰하였으며 그 소견은 대조군에 비해 0.01에서 1 μ M $MnCl_2$ 를 처리한 군에서 apoptotic cell의 비율이 유의하게 높게 나타남을 관찰 함으로써 망간에 의해 DNA 절편화를 관찰할 수 있었다. 그러나 망간의 농도에 따른 apoptosis의 용량-반응은 나타나지 않았다. 10 μ M $MnCl_2$ 를 처리한 군에서는 대조군과 비교하여 apoptotic cell의 비율이 높았으나 통계학적으로 유의하게 나타나지는 않았다. 본문에 자료를 제시하

지는 않았지만, 상대적으로 고농도인 10 μ M $MnCl_2$ 를 처리한 군에서 저농도의 0.01~1 μ M $MnCl_2$ 를 처리한 군에 비해서 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 방법을 이용하여 측정한 세포활성도가 통계적으로 유의하지는 않았지만 낮게 나타났으므로 피사에 의한 세포사가 저농도의 0.01~1 μ M $MnCl_2$ 처리한 군에 비해 많이 나타나고 있음을 알 수 있었다.

그러나 TUNEL 염색법은 피사가 일어난 세포들 또한 염색이 되며, 단백질 합성억제제나 신경세포 영양인자에 의해 세포사가 줄어드는 경우 또한 DNA 절편화가 나타나기 때문에 DNA 절편화단독으로는 apoptosis의 증거로 충분하지 못하다는 연구보고가 있다(Grazl-Kraupp 등, 1995; Gwag 등, 1997). 그러므로 본 연구에서는 apoptosis의 특징적인 형태학적인 변화를 관찰하기 위하여 투과전자현미경학적인 관찰을 통하여 apoptotic body와 chromatin의 핵막쪽으로의 이동, 응집 그리고 잘 보존된 세포내 소기관등의 소견을 관찰 할 수 있었다. 이상의 소견은 투과전자현미경학적 상의 초기 apoptosis소견으로 Wyllie(1987), Zhavoronkov와 Lugovskoy(1992)의 연구결과와 일치하는 소견이다.

Madiehe 등(1995)은 lithium에 의한 apoptosis의 유도가 용량~반응관계를 나타내며, 시간에 따른 변화를 관찰하여 lithium-induced apoptosis는 단백질 합성을 필요로 한다는 보고를 하였다. 본 실험에서는 망간의 농도에 따른 용량~반응을 보이지 않았으며, apoptosis의 진행소견을 시간적으로 관찰하지 못하였으므로 시간~용량에 따른 apoptosis에 대한 연구가 이루어져야 보다 정확한 해석이 가능할 것으로 생각되며, 실제로 이가 양이온들은 서로 반대의 작용을 나타내기도하고 또는 상호작용을 통해서 그 효과가 나타나기도 하며 특히 퇴행성 신경변성의 질환에는 인체에 필수금속이온들 Fe^{2+} , Zn^{2+} 등이 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있으므로, 추후 2가 양이온들의 특성과 이들의 상호연관성에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다. 본 연구의 결과는 신경세포의 망간에 의한 apoptosis를 전자현미경을 통한 형태학적인 소견과 TUNEL 염색을 이용한 internucleosomal DNA 절편화를 관찰함으로써 망간이 신경세포의 apoptosis를 유도함을 확인 할 수 있었다.

요 약

목적 : 본 실험은 대뇌기저핵의 신경세포를 배양하여 망간(MnCl₂)을 투여한 후 망간독성에 의한 신경세포의 apoptosis를 형태학적인 소견으로 관찰하였다.

방법 : 배양된 신경세포에 0.01에서 10 μM MnCl₂를 48시간동안 처리한 후 TUNEL(TdT-mediated dUTP Nick End Labelling)법 및 투과전자현미경학적으로 관찰하였다.

결과 : TUNEL방법을 이용하여 관찰한 결과 TUNEL반응에 갈색으로 양성반응을 나타내는 apoptotic 세포의 수가 대조군에 비해 MnCl₂를 투여한 군에서 유의하게 높게 나타났으며(P<0.05), 투과전자현미경학적 소견상 대조군의 신경세포들은 핵인(nucleolus)이 두드러지게 특징적으로 보이면서 핵막과 세포질내 소기관들이 잘 보존되어 있으며, 세포질내망(ER)과 사립체(mitochondria)를 특히 많이 가지고 있었다. MnCl₂를 48시간 동안 처리한 군에서 이질염색질(heterochromatin)이 핵막으로 이동하면서 응집되어 있었으며, 핵내 불규칙한 형태의 염색질이 나타나 분절이 진행되는 소견을 보였고, Apoptosis의 가장 특징적인 초기 소견인 막으로 둘러싸인 반달모양의 핵내염색질의 분절편(fragmented chromatin)과 주위의 상대적으로 정상적인 소기관으로 구성된 apoptotic body를 관찰할 수 있었다.

결론 : 신경세포에서 망간에 의해 apoptosis가 유도됨을 형태학적인 방법으로 확인할 수 있었으며 망간에 의한 세포사망양상에 apoptosis가 하나의 기전이 될 수 있을 것이다.

참고문헌

Amramova ZI, Zatkina NL, Belova MM, Hamidullina NG, Vinker VC. Localization of neutral Mn-dependent DNAase in rat hepatocytes. Immunofluorescent study. *cytology* 1988;30:349-354.

Archibald FS, Tyree C. Manganese poisoning and the attack of trivalent manganese upon catecholamines. *Arch Biochem Biophys* 1987; 256:638-650.

Barbeau A. Manganese and extrapyramidal disor-

ders. *Neurotoxicol* 1984;5:13-36.

Calne DB, Chu NS, Huang CC, Lu CS, Olanow W. Manganism and idiopathic parkinsonism: similarities and differences. *Neurology* 1994; 44:1583-1586.

Choi DW. Excitotoxic cell death. *J Neurobiol* 1992; 23:1261-1276.

Cotzias GC. Manganese versus magnesium: why are they so similar in vitro and so different in vivo? *Fed Proc* 1961;20:98-123.

Cotzias GC. Manganese in health and disease. *Physiol Rev* 1958;38:502-532.

Cotzias GC. Manganese, Melanins and the Extrapyrmidal system. *J Neurosurgery (suppl)* 1966;24:170-180.

Donaldson J. The physiopathologic significance of manganese in brain: its relation to schizophrenia and neurodegenerative disorders. *Neurotoxicol* 1987;8:451-462.

Graham DG. Catecholamine toxicity: a proposal for the molecular pathogenesis of manganese neurotoxicity and parkinson's disease. *Neurotoxicol* 1984;5:83-96.

Gavin CE, Gunter KK, Gunter TE. Manganese and calcium efflux kinetics in brain mitochondria: relevance to manganese toxicity. *Biochem J* 1990;266:329-334.

Grazl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, et al. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology* 1995; 21:1465-1468.

Gunter TE, Puskin JS, Russell PR. Quantitative magnetic resonance studies of manganese uptake by mitochondria. *Biophys J* 1975;15:319-333.

Gwag BJ, Koh JY, DeMaro JA, Ying HS, Jacquin M, Choi DW. Slowly triggered excitotoxicity occurs by necrosis in cortical cultures. *Neurosci* 1997;77:393-401.

Halliwell B. Manganese ions, oxidation reactions and the superoxide radical. *Neurotoxicol* 1984; 5:113-118.

Heintz N. Cell death and the cell cycle: a relationship between transformation and neurodegeneration? *Trends Biochem Sci* 1993;18:157-159.

Konji V, Montag A, Sandri G, Nordenbrand K, Ernster L. Transport of Ca²⁺ and Mn²⁺ by mitochondria from rat liver, heart, brain. *Biochimie*

- 1985;67:1241-1250.
- Madiehe AM, Mampuru LJ, Tyobeka EM. Induction of apoptosis in HL-60 cells by lithium. *Biochem Biophysical Res Comm* 1955;209(2):768-774.
- Martin Sj, Green DR. Apoptosis and cancer: the failure of controls on cell death and cell survival. *Crit Rev Oncol* 1995;18:137-153.
- Mena I, Marin O, Fuenzalida S, Cotzias GC. Chronic manganese poisoning. *Neurology* 1967;17:1123-1129.
- Niyogi SK, Feldman RP, Hoffman DJ. Selective effects of metal ions on RNA synthesis rates. *Toxicol* 1981;22:9-21
- Rudnykh AA, Saichenko AP. Reperative synthesis of DNA in rat lymphocytes under the treatment with potassium bichromate and manganese chloride. *Cytol Genet* 1986;2:75-77.
- Singh J. Induction of reverse mutation and mitotic gene conversion by some metal compounds in *saccharomyces cerevicial*. *Mutat Res* 1983;117:149-152.
- Steller H. Mechanism and genes of cellular suicide. *Science* 1995;267:1445-1449.
- Wyllie AH. Apoptosis: cell death in tissue regulation. *J Pathol* 1987;153:313-316.
- Zhavoronkov AA, Lugovskoy SP. Enterocyte apoptosis induced by manganese chloride. *Trace elements in Medicine* 1992;9(3):113-116.