

글루타메이트에 의하여 유발된 신경독성에 미치는 Betaine의 효과

박 미 정 · 김 영 중
서울대학교 약학대학

Effects of Betaine on the Glutamate-induced Neurotoxicity in Primary Cultured Chicken Brain Cells

Mi Jung Park and Young Choong Kim

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract—The neuroprotective effect of betaine, one of the components of *Lycii Fructus*, on glutamate-induced neurotoxicity in primary cultured chicken brain cells were examined. Betaine was found to attenuate glutamate-induced neurotoxicity at the concentration of 5~10 mM in both morphological and chemical aspects. The pretreatment of chicken brain cells with 5~10 mM betaine for 2hr at the 12th day of culture before the 40min-exposure to 500 μ M glutamate significantly increased the survival rate of nerve cells in chicken brain. Betaine could also raise the decreased LDH-level in chicken brain cells which were induced neurotoxicity with 100 μ M glutamate. LDH value was decreased to 63% of control level in chicken brain cells at the time of 48 hr after the exposure to glutamate. However, the pretreatment of chicken brain cells with 5 mM betaine for 2 hr before the exposure to glutamate prevent the decrease of LDH in cells showing 90% of control level. Nevertheless, the remarkable neuroprotective effect of betaine on the glutamate-induced neurotoxicity in cultured chicken brain cells could not be observed when betaine was simultaneously administrated with glutamate.

Keywords—Betaine · chicken brain cells · glutamate-induced neurotoxicity · survival rate · lactate dehydrogenase

서 론

인구의 고령화 현상과 이에 수반되는 노인성 뇌신경질환의 증가가 우리나라를 비롯한 선진제국에서 심각한 문제로 부상하고 있어 이에 대응하는 치료제 개발에 대한 관심이 고조되어 있다. 노화에 따른 뇌신경계 질환은 뇌신경세포의 구조적 퇴화에 따른 신경세포의 손실에 일차적

으로 기인하는 것으로 알려져 있으나 뇌신경세포의 손실은 여러가지 원인에 의하여 일어날 수 있다. 특히, 뇌신경세포의 손실은 순환기 장애나 다른 성인병에 기인한 2차적 증상, 또는 기계적, 물리적 요인에 의하여 뇌의 혈류량이 감소되어 뇌조직이 저 산소, 저 포도당 상태에 이르게 되면 뇌신경세포의 사멸을 초래하여 결국은 치명적인 결과에까지 이르게 된다. 신경세포 손실이 일어나는 기전에 대해서는 많은 연구가

진행되고 있으며 그 중 내인성 글루타메이트에 의한 신경세포 손실을 중요한 기전으로 여기고 있다. 글루타메이트는 뇌에서 흥분성 신경전달물질로 작용하여 뇌의 원활한 기능이 발휘되도록 하지만 일단 뇌가 손상을 받으면 글루타메이트는 신경세포내에서 밖으로 그 유리가 증가되나 안으로의 유입은 감소되어 결과적으로 세포밖의 글루타메이트 농도를 급속히 증가시키는 요인이 되어 독성을 유발시키는 것으로 알려져 있다¹⁻⁶⁾.

실제로 노인성 치매 환자의 뇌에서는 글루타메이트 대사나 수용체에 이상이 일어나며 뇌에서 기억력과 learning에 관여한다고 알려진 부위인 amygdala, hippocampus 등에 글루타메이트를 신경전달물질로 이용하는 신경세포가 고밀도로 분포되어 있다는 많은 연구 결과가 발표되고 있다⁷⁻⁹⁾.

따라서, 본 논문에서는 뇌신경계질환과 글루타메이트에 의한 신경독성과의 연관을 토대로, 글루타메이트에 의한 신경독성을 회복시키거나 약화시킬 수 있는 생리활성 물질을 천연물에서부터 도출하고자 하였다. 이를 위하여 저자들이 이미 영양 결핍상태인 계배의 뇌신경세포에서 에너지대사에 중요한 역할을 하는 효소인 pyruvate dehydrogenase complex 활성의 감소와 단백질 및 핵산의 생합성 저하를 막아 신경세포의 정상적인 기능을 유지시키는 효과를 가졌다고 밝힌¹⁰⁾ 구기자의 성분 중에서 betaine을 선택하여 글루타메이트에 의한 신경독성에 미치는 효과를 알아보았다.

연구 방법

계배의 뇌신경세포 배양¹¹⁾

일령이 10일된 계배(chicken embryo)에서 뇌를 적출한 후 결체조직을 제거하고 0.15% trypsin으로 조직을 연화시킨 후 세포 상태로 분리하여 이것을 collagen을 도포한 배양용기(Falcon, 15×24 mm)에 뇌세포가 1×10^6 cells/ml이 되도록 이식하였다. 배양액은 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 80%, horse serum 15.0%, chicken embryo extract 5%, penicillin 10,000 IU/100 ml 배양액, streptomycin 10,000 µg/100

ml 배양액과 amphotericin B 500 µg/100 ml 배양액으로 구성된 배양액을 사용하였다.

계배추출물(Chicken embryo extract)의 제조¹²⁾

일령이 10일된 계배를 적출하여 Hank's balanced salt solution(HBSS)으로 세척한 후 주사기를 이용하여 원심분리관 속에 압출하고, 동량의 HBSS로 희석하였다. 실온에서 30분간 방치한 후, 4°C에서 18,000 rpm으로 25분간 원심분리하여서 그 상등액을 취하여 사용하였다.

세포독성 유발¹³⁾

12일간 배양한 일차배양 계배의 뇌신경세포에 흥분성 신경독성 물질인 글루타메이트 10 mM, 500 µM 및 100 µM을 각각 투여하여 급성 및 만성 신경독성을 유발시켰다.

생존율(Survival rate)의 측정

일차배양 계배의 뇌신경세포에 betaine 10, 5, 1 mM을 투여한 후 글루타메이트 등의 신경독성 물질 500 µM을 투여하고 40분이 지난 후에 현미경하에서 전체 세포수에 대한 팽윤(swelling) 세포 수의 비로 나타내었다.

Lactate dehydrogenase(LDH)의 정량¹⁴⁾

일차배양 계배 뇌신경세포를 글루타메이트 100 µM로 처리한 다음 48 시간 후에 세포 속에 남아있는 LDH를 LDH 정량 Kit(Sigma Chemical Company, USA)을 이용하여 정량하였다.

통계처리

통계적 유의성 검토는 대조치로부터의 변동을 "ANOVA" test로 하였다. P값이 5% 미만일 때는 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

계배의 뇌신경세포를 글루타메이트에 대한 수용체가 충분히 발달되도록 12일간 배양한 후에 글루타메이트로 인위적인 신경독성을 유발시켰다. 글루타메이트에 의해 신경독성이 발현되는 시간은 농도 의존적으로 단축되었다. 즉, 100 µM을 투여하였을 때는 독성이 나타나는데 24시간 정도 소요되나 500 µM 이상에서는 30분 이내에 독성이 나타나 신경축색돌기(neurite)가 끊어지고(fragmentation), 세포 자체(cell body)가 팽

윤 (swelling) 되는 것을 현미경하에서 관찰할 수 있었다. 뇌신경세포에 글루타메이트로 독성을 인위적으로 유도시키기 전에 미리 betaine 10 mM을 2시간 동안 작용시키고 글루타메이트로 독성을 유도시키면 신경독성이 일어나지 않는 것을 알 수 있었다. 즉, betaine 10 mM을 2시간 동안 미리 작용시킨 신경세포는 그 후 글루타메이트 10 mM에 18시간 동안이나 노출시켜 지속적으로 독성을 유발시키려해도 신경축색돌기가 끊어지거나 세포 자체의 팽윤이 거의 일어나지 않았으며 (Fig. 1a, 1b, 1c) 계속하여 42시간 동안이나 노출시켜도 독성이 유발되지 않았다 (Fig. 2a, 2b). Betaine을 글루타메이트와 동시에 뇌신경세포에 작용시키면 이러한 betaine의 신경독성 차단효과를 관찰할 수 없었다 (Fig. 2c). 그러나 이 경우에도 글루타메이트만을 작용시켜 신경독성을 유발하였을 때는 48시간 후에는 거의 모든 신경세포가 사멸되었으나 betaine을 동시에 작용시키면 비록 독성이 일어나 신경축색돌기의 끊어짐이 보였으나 그 상태로 생존되어 있는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2d). Betaine의 농도를 10 mM에서 1 mM로 낮추었을 경우에도 저농도의 글루타메이트에 의하여 서서히 유발되는 독성을 완벽하게 저지시키지는 못하였지만 독성에 의한 신경세포의 사멸을 상당 시간 지연시켜 주었다 (Fig. 2e).

이러한 글루타메이트에 의한 신경독성에 대한 betaine의 효과를 현미경으로 관찰하는 것과 병행하여 글루타메이트 500 μ M을 계배의 신경세포

에 40분 동안 처리하여 독성을 유발시킨 후 팽윤이 일어나는 세포의 수를 죽어가는 세포로 간주하고, 팽윤이 일어나는 세포와 일어나지 않는

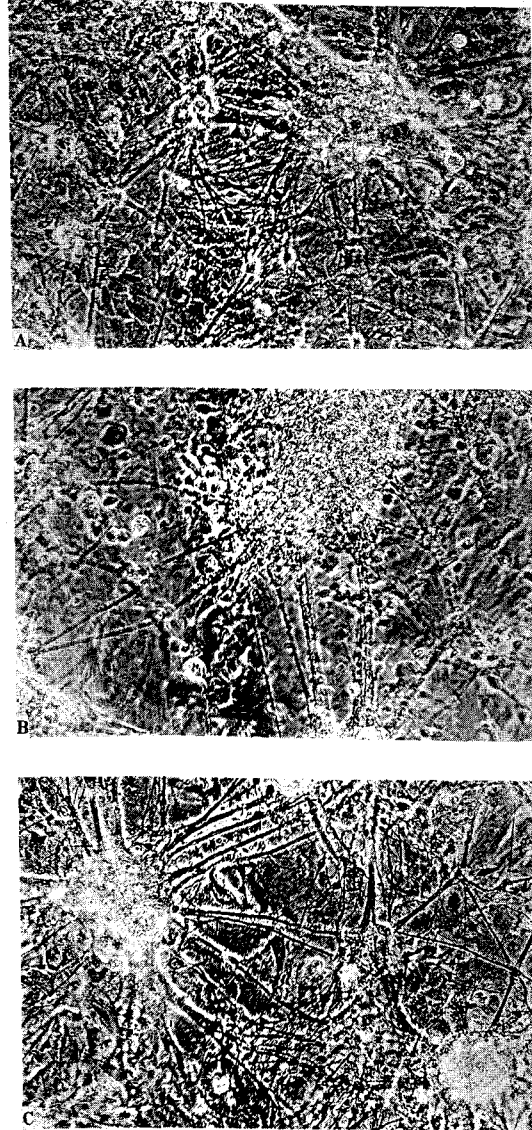


Fig. 1. Primary cultured chicken embryonic brain cells

- a. Chicken embryonic brain cells cultured for 12 days.
- b. Effect of 10 mM glutamate on chicken embryonic brain cells cultured for 18-hr.
- c. Effect of 2-hr preincubation of 10 mM betaine on 18-hr exposure of 12-day-cultured chicken embryonic brain cells to 10 mM glutamate.

Table I. The effect of betaine on the survival rate of chicken embryonic brain nerve cells induced to toxic state with glutamate

	Glutamate conc. (μ M)	Survival rate (%)
Control	500	13.7 \pm 1.3
Betaine 1 mM	500	20.5 \pm 5.8
Betaine 5 mM	500	47.5 \pm 0.6***
Betaine 10 mM	500	53.0 \pm 3.8***

Survival rates are means \pm SE.

Significantly different with respect to control :

p<0.05*, p<0.01**, p<0.001***

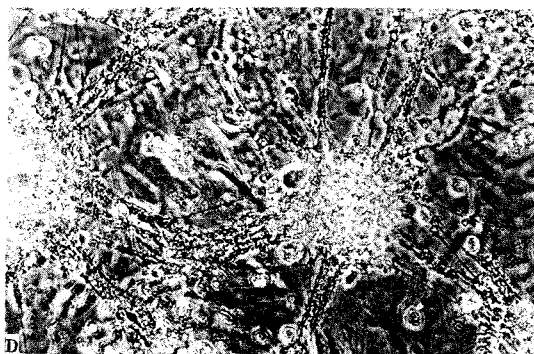
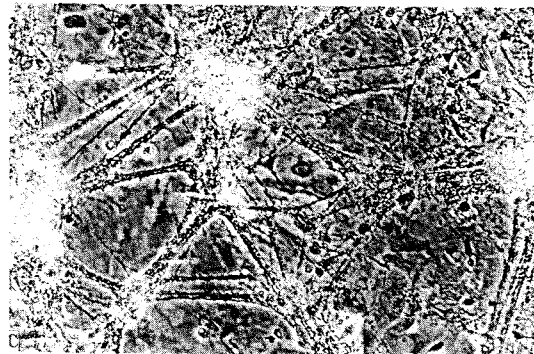
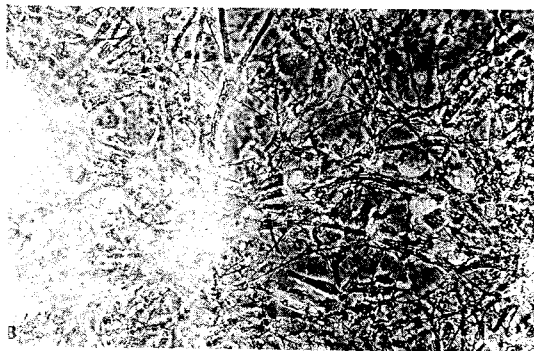
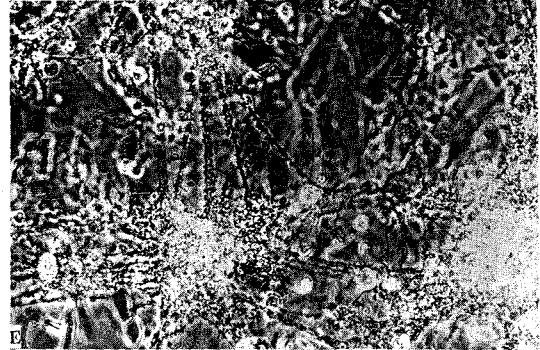
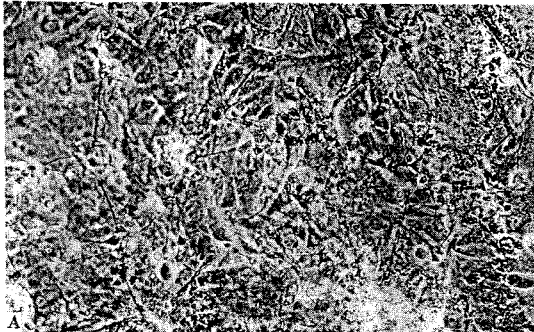


Fig. 2. Primary cultured chicken embryonic brain cells

- a. Effect of 10 mM glutamate on chicken embryonic brain cells cultured for 42 hr.
- b. Effect of 2 hr preincubation of 10 mM betaine on 42 hr exposure of 12 day-cultured chicken embryonic brain cells to 10 mM glutamate.
- c. Effect of simultaneous treatment of 10mM betaine with 10 mM glutamate on 12 day-cultured chicken embryonic brain cells at 18 hr exposure.
- d. Effect of simultaneous treatment of 10 mM betaine with 10 mM glutamate on 12 day-cultured chicken embryonic brain cells at 42 hr exposure.
- e. Effect of 2 hr preincubation of 1 mM betaine on 42 hr exposure of 12 day-cultured chicken embryonic brain cells to 10 mM glutamate.

Table II. The effect of betaine on the LDH values of chicken embryonic brain cells induced to toxic state with glutamate

	Glutamate conc. (μ M)	LDH (Units/ml)
Control A	0	2,076.8 \pm 10.6
Control B	100	1,309.3 \pm 103.8
Betaine 0.1mM	100	1,280.9 \pm 35.6
Betaine 1.0mM	100	1,769.0 \pm 42.1**
Betaine 5.0mM	100	1,857.6 \pm 47.4**

LDH values are means \pm SE.

Significantly different with respect to control :

p < 0.05*, p < 0.01**, p < 0.001***

세포의 비활 생존율 (survival rate)로 간주하여 생존율을 측정하였다 (Table I). Betaine을 작용시키지 않은 신경세포의 경우 글루타메이트 500

μM 에 의하여 독성이 일어나서 생존율이 13.7% 밖에 되지 않았으나 betaine 1 mM을 작용시키면 20.5%, 5 mM을 작용시키면 47.5%, 10 mM을 작용시키면 53%의 생존율을 보였다. 이러한 결과로 미루어볼 때 betaine 5 mM이상은 글루타메이트에 의하여 급속하게 나타나는 신경독성을 차단시키는 효과가 있음을 알 수 있었다.

뇌신경세포의 사멸정도를 측정하기 위한 지표 물질로 세포속에 존재하는 효소인 lactate dehydrogenase(LDH) 양을 측정하였다. LDH는 신경세포가 글루타메이트에 의하여 독성이 유발되었을 때 팽윤이 되고 결국에는 세포가 터져서 세포의 수가 감소되어 그 양이 감소하게 된다. 글루타메이트 100 μM 로 48시간동안 뇌신경세포에 만성적인 독성을 유도하였을 때는 세포속에 남아있는 LDH의 양이 급격하게 줄어들어 정상시의 63%밖에 되지 않았으나, betaine 5 mM 농도에서는 정상시의 90% 수준까지 유의성있게 독성을 막아주고 betaine 1 mM 농도에서는 정상시의 85%수준에 머무는 것으로 미루어 보아 betaine이 글루타메이트에 의한 뇌신경세포의 급격한 사멸을 현저하게 감소시키는 것을 알 수 있었다 (Table II).

이상의 결과에서 betaine은 글루타메이트로 인하여 나타나는 신경세포의 급성독성뿐만 아니라 만성독성에 대해서도 뚜렷한 독성완화효과를 나타냄을 알 수 있다.

결 론

1. Betaine 10 mM을 계배의 뇌신경세포에 글루타메이트 10 mM로 독성을 유발시키기 전에 작용시켰을 경우, 48시간 이상이나 지속적으로 신경축색돌기의 끊어짐과 세포자체의 팽윤을 거

의 대조군 수준으로 막아주었다.

2. Betaine 5 mM 이상을 계배의 뇌신경세포에 글루타메이트로 신경독성을 유발시키기 전에 작용시키면 신경독성이 유발되어 일어나는 생존율의 감소와 LDH값의 감소를 유의성있게 차단시켰다.

감사의 말씀—본 연구에 소요된 경비의 일부는 91년도 보사부의 신약개발지원 연구비로 충당되었으며 이 연구비 지원에 깊이 감사하는 바이다
(1992년 11월 5일 접수 : 11월 26일 수리)

참 고 문 헌

1. Fonnum, F.: *J. Neurochem.* 42, 1 (1984).
2. Choi, D.W., Maulucci-Gedde, M.A. and Kriegstein, A.R.: *J. Neurosci.* 7, 357 (1989).
3. Rothman, S.M.: *J. Neurosci.* 4, 1884 (1984).
4. Wieloch, T.: *Science* 230, 681 (1985).
5. Koh, J.Y. and Choi, D.W.: *J. Neurosci.* 8, 2153 (1988).
6. Fonnum, F.: *J. Neurochem.* 24, 407 (1975).
7. Izquierdo, I. and Medina, J.H.: *Tips* 12, 260 (1991).
8. Izquierdo, I.: *Tips* 12, 128(1991).
9. Thompson, R.F.: *Science* 233, 94(1986).
10. Park, M.J., Chu, E.H., Lee, H.P. and Kim, Y.C.: *Arch. Pharm. Res.* 14, 325(1991).
11. Kim, Y.C. and Kim, E.K.: *Yakhak Hoeji* 24, 143(1980).
12. White, P.R.: *The Cultivation of Animal and Plant Cells*, The Ronald Press Company, New York, pp. 66(1963).
13. Choi, D.W. and Koh, J.Y.: *J. Neurosci. Methods* 20, 83(1987).
14. Choi, D.W.: *Neurosci. Lett.* 58, 293(1985).