

## Methanol이 배양된 흰쥐 해마의 신경세포 및 신경교 세포의 성장에 미치는 영향

이정임 · 조병채\* · 배영숙\*\* · 이경은\*\*

이 안과 의원

\*이화여자대학교 의과대학 안과학실

\*\*이화여자대학교 의과대학 약리학실

### Effect of Methanol on Cultured Neuronal and Glial Cells on Rat Hippocampus

Jeong-Im Lee, Byung-Chae Cho\*, Young-Sook Pae\*\*, Kyung-Eun Lee\*\*

Dr. Lee's eye clinic, Seoul

\*Department of Ophthalmology, Ewha Womans' University, Seoul

\*\*Department of Pharmacology, Ewha Womans' University, Seoul,

(Received August 30, 1996)

(Accepted September 16, 1996)

**ABSTRACT** : Methanol has been widely used as an industrial solvent and environmental exposure to methanol would be expected to be increasing. In humans, methanol causes metabolic acidosis and damage to ocular system, and can lead to death in severe and untreated case. Clinical symptoms are attributed to accumulation of formic acid which is a metabolic product of methanol. In humans and primates, formic acid is accumulated after methanol intake but not in rodents due to the rapid metabolism of methanol. Nevertheless, the developmental and reproductive toxicity were reported in rodents. Previous reports showed that perinatal exposure to ethanol produces a variety of damage in human central nervous system by direct neurotoxicity. This suggests that the mechanism of toxic symptoms by methanol in rodents might mimic that of ethanol in human. In the present study I hypothesized that methanol can also induce toxicity in neuronal cells. For the study, primary culture of rat hippocampal neurons and glia were employed. Hippocampal cells were prepared from the embryonic day-17 fetuses and maintained up to 7 days. Effect of methanol (10, 100, 500 and 1000 mM) on neurite outgrowth and cell viability was investigated at 0, 18 and 24 hours following methanol treatment. To study the changes in proliferation of glial cells, protein content was measured at 7 days. Neuronal cell viability in culture was not altered during 0-24 hours after methanol treatment. 10 and 100 mM methanol treatment significantly enhanced neurite outgrowth between 18-24 hours. 7-day exposure to 10 or 100 mM methanol significantly increased protein contents but that to 1000 mM methanol decreased in culture. In conclusion, methanol may have a variety of effects on growing and differentiation of neurons and glial cells in hippocampus. Treatment with low concentration of methanol caused that neurite outgrowth was enhanced during 18-24 hours and the numbers of glial cell were increased for 7 days. High concentration of methanol brought about decreased protein contents. At present, the mechanism responsible for the methanol-induced enhancement of neurite outgrowth is not clear. Further studies are required to delineate the mechanism possibly by employing molecular biological techniques.

**Key Words** : Methanol, Hippocampal neurons & glial cells, Neurite outgrowth, Cell viability, Protein content

### I. 서 론

Methanol은 산업체에서 부동액이나 페인트의 용매로 널리 쓰이는 alcohol로서 페인트 제거액이나 고체 연료의 구성 성분으로 흔히 이용되고 있다. 또한 최근에는

자동차의 대체 연료로서 고려되고 있기때문에 향후 사람이 methanol에 노출될 가능성은 점점 높아지고 있다 (Abbott 등 1994). 인체가 methanol에 중독되면 대개 3가지 단계로 증상이 나타난다(Gilger 등 1956). 첫 단계로는 다른 alcohol이나 유기 용매에서와 같이 최면작용

(narcotic action)을 나타내는데 이 단계에서 사망을 일으킬 수 있는 치사량은 10 g/Kg이며 이는 ethanol의 치사량과 유사하다. 이 반응이 지난 후 잠복기(latent period)를 거쳐 두번째 단계 반응인 대사성 산증(metabolic acidosis)이 나타난다. 대사성 산증은 methanol의 대사 산물인 formaldehyde와 formic acid에 의한 조직 손상때문에 발생하므로 체내에서 methanol의 대사가 일어나기까지의 시간이 잠복기로 나타나게 된다. 이 단계에서 적절히 치료되지 않을 경우 사망에 이를 수 있는 최소 치사량은 2-3 g/Kg이다. 대사성 산증에서 회복되었거나 치사량이하(sublethal dose)로 중독되어 30시간 후까지 생존한 경우에는 셋째 단계인 중추 신경계 및 안구 독성이 유발되어 기저 신경절(basal ganglia)과 망막 신경절 세포(retinal ganglion cell)의 괴사가 나타난다(Potts 등 1952). Methanol을 4-17 ml/정도를 복용하여도 시력을 잃게되며 80-150 ml/를 복용하면 대부분 사망한다(홍 1967). 이와 같이 대사성 산증과 중추 신경계 및 시각 기능 장애는 methanol 자체의 독성이라기 보다는 methanol의 대사 산물인 formaldehyde 및 formic acid가 체내에 축적됨으로써 일어난다(Potts 1955, Potts 등 1955, Gilger 및 Potts 1955).

그러나 사람을 포함한 영장류와는 달리 설치류에서는 methanol의 대사 및 배설 과정이 매우 빨리 일어나기 때문에 methanol 및 그 대사 산물들의 축적이 일어나지 않는다(R e 1982). 그럼에도 불구하고 임신중인 흰쥐에게 실험적으로 methanol을 투여하였을 때 태아에서 생식 및 발생학적 장애가 나타난다고 한다.

또 체내에서 methanol과 같은 효소인 alcohol dehydrogenase 및 aldehyde dehydrogenase에 의하여 대사되어 acetaldehyde 및 acetate로 전환되는 alcohol인 ethanol이 임신중에 남용되면 태아에게 지능 저하 및 소뇌증 등이 발생된다(West 등 1986). 또 ethanol은 주산기에 노출되면 신경세포 수 감소, 신경세포 발달 장애 및 신경 접합부 성숙 억제와 소뇌증, 학습 장애 및 운동 장애와 같은 다양한 신경계 장애를 초래한다(Abel 1979 ; Cogan 등 1983 ; Diaz 및 Samson 1980 ; Fernandez 등 1983). 이러한 장애는 중추 신경계에 대한 ethanol의 직접적인 작용에 의한다고 생각된다(Morgane 등 1978 ; Patel 1983).

한편 Zou 등(1993)은 흰 쥐 소뇌 신경세포의 일차 배양 세포에 농도별로 ethanol을 투여하였을 때 고농도에서는 세포 독성이 나타났으나 저농도에서는 오히려 신경세포의 성장 촉진을 일으켰다고 하였다.

이처럼 ethanol에 의한 신경계 독성이나 그 기전에 대한 연구는 많이 보고되고 있으나 methanol의 경우에는 대사 산물인 formaldehyde나 formic acid의 독성에

대하여 주로 연구가 이루어져 왔으며 methanol 자체가 중추 신경계에 미치는 영향에 대하여는 아직 연구가 미미한 실정이다.

이에 본 연구자는 Sprague-Dawley계 흰쥐의 태령 17일된 태아의 해마의 신경세포 및 신경교세포를 일차 배양한 후 농도별로 methanol을 투여하여 나타나는 신경세포 돌기의 성장, 신경세포 생존율 및 신경교세포 변화를 관찰함으로써 신경세포 및 신경교세포에 미치는 methanol의 영향에 대하여 알아보려고 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험 동물 및 실험군

동일 실험실 환경에서 사육한 몸무게 200-250 g의 Sprague-Dawley계 흰쥐를 사용하였다. 암수 흰쥐의 교배는 18-20시에 암컷 3-4마리가 든 쥐장에 수컷 한 마리를 넣고 다음날 9-11시에 수컷을 분리시킨 후 암컷의 질도말(vaginal smear) 표본을 만들어 현미경(X100)으로 정자가 확인되면 임신으로 판정하고 임신 17일째 암컷 흰쥐의 태아를 사용하였다.

실험군은 대조군 및 methanol 투여군으로 나누었으며 methanol 투여군은 다시 농도에 따라 10 mM, 100 mM, 500 mM 및 1000 mM 투여군으로 세분하였다.

### 2. 신경세포 배양

Mattson 및 Kater(1988)의 방법을 변형하여 태령 17일된 흰쥐의 해마 신경세포를 일차 배양하였다. 임신 17일째 암컷 흰쥐의 경추를 탈구시켜 희생시키고, 가슴이하 부위를 70%(v/v) 에탄올로 분무하여 소독한 후 복부를 정중 절개한 다음, 자궁을 적출하였다. 자궁을  $Ca^{++}$  및  $Mg^{++}$ 가 들어 있지 않는 Hank' balanced salt solution(HBSS)에 옮긴 후 무균 상자 안에서 태아를 분리하였다. 해부 현미경하에서 뇌막(meniges)을 벗기고 미세 수술가위로 해마부위를 구하였다. 얻은 해마조직을 HBSS 용액 내에서 잘게 자른 후 0.2% trypsin으로 15분간 처리하고 HBSS로 2회 세척한 다음 열처리된 소 태아 혈청(heat-inactivated fetal bovine serum, FBS)에 15분간 반응시키고 pipet을 이용하여 기계적인 방법으로 세포를 완전히 분리시켰다. 분리된 세포를  $1.5 \times 10^4$  cell/ml의 밀도로 poly-L-lysine(10 g/ml)이 도포된 35 mm 배양접시(Corning Glass Works, NY, USA)에 각 실험군당 배양접시가 최소한 10개 이상이 되도록 심고 5%  $CO_2$ , 37°C 및 포화습도 하의 항온기(Forma

Scientific Inc., Marietta, OH, USA)에서 배양하였다. 배양액으로는 10% FBS와 열처리된 말 혈청(heat-inactivated horse serum, HS)이 10%가 첨가된 Dulbecco' modified Eagle's medium(DMEM)을 사용하였다. 6시간 동안 배양한 후 역상 위상차 현미경(inverted phase-contrast microscope Leica DM IRB)으로 관찰하여 세포가 배양접시에 잘 부착되지 않은 배양접시를 제외하여 각 실험군당 10개의 배양접시를 선택하였다. 선택된 배양접시의 배양액을 transferrin(10 mg/ml), insulin(2.5 mg/ml), selenite(15  $\mu$ M), progesterone(10  $\mu$ M) 및 putrescine(50 mM)이 포함된 혈청 배제 영양액(serum free medium)으로 교체하고 1주일 간 배양하였다. 영양액은 3-4일에 신선한 배양액으로 교환하였다.

### 3. Methanol 투여

배양 6시간 후에 neuron이 배양 접시에 잘 부착되어 신경돌기 생성이 시작된 것을 확인하고, 배양액을 혈청 배제 영양액으로 교환한 후 배양액에 methanol을 0 mM, 10 mM, 100 mM, 500 mM 및 1000 mM 농도로 투여하였다. 증발(evaporation)에 의해 methanol의 농도가 지속적으로 감소하는 것에 대해서는 고려하지 않았다.

### 4. 신경돌기 성장(neurite outgrowth) 및 세포 생존율(cell viability) 측정

배양 6시간 후, 즉 혈청 배제 영양액으로 교환하고 methanol을 투여한 시간을 0시간으로 하고 0시간, 18시간 및 24시간에 배양접시 당 3-4개의 시야를 무작위로 골라 200배 현미경 하에서 동일 부위를 촬영하고 negative film을 slide projector로 비추어 다른 세포와 연결되지 않고 세포 돌기가 잘 발달된 신경세포를 선택하였다.

신경돌기 성장은 선택된 신경세포가 가진 모든 신경돌기의 합을 각 시간별로 위와 같이 측정하여 현미경 및 slide projector에 의해 확대된 비율을 계산하여 환산된 실제의 길이의 합을 m로 표시하였다.

생존율은 신경돌기 성장 측정과 동일한 방법으로 사진 촬영하고 세포체 길이(length) 이상 되는 신경돌기를 가진 세포의 수를 각 시간마다 산출하여 0시간 측정치에 대한 %로 표시하였다.

### 5. 단백질 정량

세포 배양 7일째에 영양액을 제거하고 인산완충용액(phosphate buffered solution PBS)으로 세척한 후 배양

접시 바닥에 붙은 세포들을 긁어 Eppendorf tube에 모았다. 800  $\mu$ l의 PBS를 넣고 분쇄하여 Bradford (1976)의 방법으로 단백질량을 분석하고 bovine serum albumin(BSA)으로 함량을 표준화하였다.

### 6. 자료분석

실험자료는 평균 $\pm$ 표준오차로 표현하였으며 실험군 간의 비교를 위하여 분산분석(analysis of variance)을 이용하였고, 각 군간의 차이는 Dunnett 법으로 비교하였다.

### 7. 시약

Hank's balanced salt solution, Dulbecco's modified Eagle's medium, penicillin/streptomycin, fetal bovine serum, horse serum 등은 Gibco (Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA)의 제품을 이용하였고 poly-L-lysine hydrobromide(Mol Wt 70,000 - 150,000), pyruvate, sodium bicarbonate, glutamine, transferrin, insulin, selenite, progesterone, putrescine, methanol 등은 Sigma(Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA) 제품을 이용하였으며 이들 모든 시약은 세포 배양용 또는 특급 시약을 사용하였다.

## III. 결 과

### 1. 신경세포 배양 (Fig. 1)

태령 17일째 해마 신경세포는 본 실험에 사용된 조건하에서 성장 및 분화하였다. 세포 배양 직후 신경 세



Fig. 1. Phase-contrast photomicrograph of neurons cultured from rat hippocampus. Hippocampal neurons showing oval(a), stellate(b) and pear (c)-shaped cell bodies were cultured for 12 hours in the absence of methanol.

포체(cell body)는 구형(spherical)을 나타내었다. 일부 세포는 배양 1-2시간부터 신경돌기의 길이가 길어지기 시작하였다. 시간이 지날수록 신경세포는 여러 개의 신경돌기를 내며 성장하였고 세포체는 난형(oval), 성상(stellate) 또는 배(pear) 모양을 나타내며 점점 크기가 증가하였다.

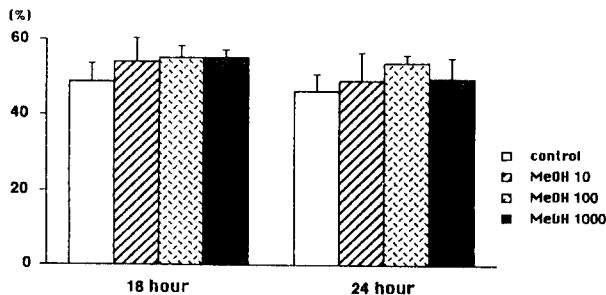
**2. 신경세포 생존율(neuronal viability) (Table 1, Fig. 2)**

신경돌기의 길이가 세포체 길이 이상인 세포를 기준으로 생존율을 측정한 바 대조군에서 18시간에 48.6±4.9%였고 24시간에는 46.2±4.7%로 시간의 경과에 따라 초기 신경세포 생존율은 별다른 변동을 나타내지 않았다. 10 mM methanol 투여시 18시간째 신경세포 생존율은 54.0±6.3%, 24시간째 49.2±7.2% 였고 100 mM 군에서는 18시간과 24시간에 각각 55.1±2.9%, 53.5±2.1% 였으며 1000 mM 투여군은 각각 55.1±1.9% 및 49.4±5.8%를 나타내어 18시간째 신경세포 생존율은 대조군에 비하여 methanol 투여시 약간 증가되는 소견을 보였으며 1000 mM methanol 투여군에서 24시간에 약간 감소하는 경향을 보였으나

**Table 1.** Effect of methanol on the cell viability in cultured rat hippocampal neuron

Group	18 Hour	24 Hour
Control (10)	48.6±4.9	46.2±4.7
M 10 (10)	54.0±6.3	49.2±7.2
M 100 (10)	55.1±2.9	53.5±2.1
M 1000 (10)	55.1±1.9	49.4±5.8

Numbers in parentheses denote the number of dishes.  
 Values are mean ±S.E. expressed as percentage to 0 hour.  
 M 10 : administration of 10 mM methanol  
 M 100 : administration of 100 mM methanol  
 M 1000 : administration of 1000 mM methanol



**Fig. 2.** Cell viability of rat hippocampal neurons after exposure to methanol. The number of neurite-bearing cells was counted and was expressed as percent to the value of 0 hour. MeOH 10 : methanol 10 mM MeOH, 100 : methanol 100 mM, MeOH 1000 : methanol 1000 mM

통계학적인 의의는 없었다.

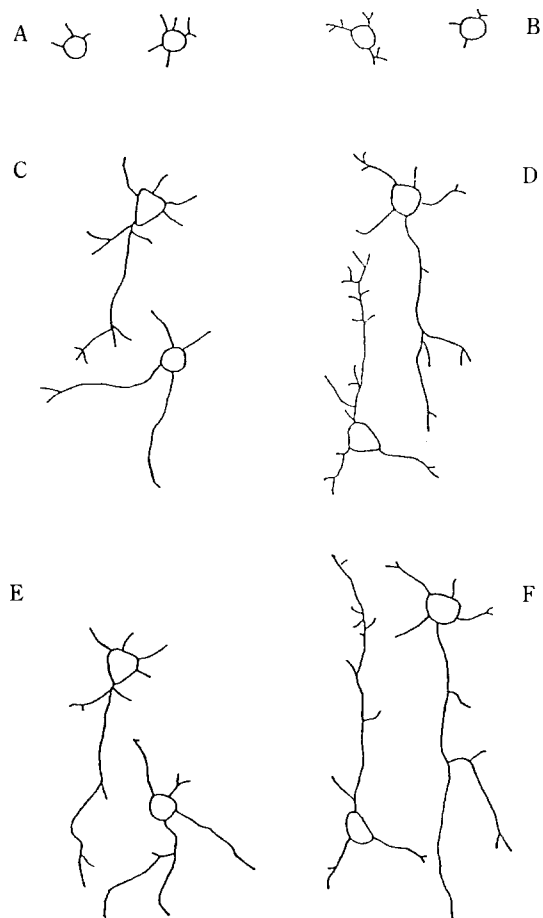
**3.신경돌기 성장(neurite outgrowth) (Table 2, Fig. 3, Fig.4)**

**Table 2.** Effect of methanol on the total neurite length in cultured rat hippocampal neuron

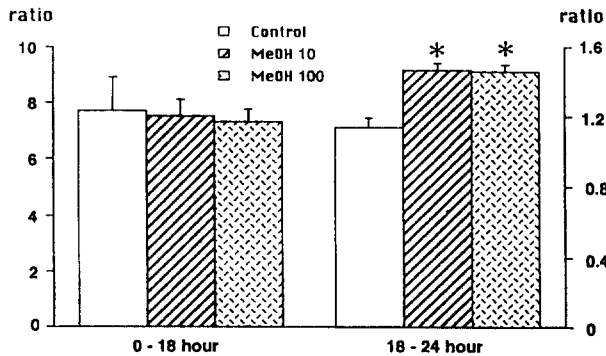
	Control(10)	M 10(10)	M 100(10)
Neurite length (μm)			
0 Hour	32.0± 3.7	32.0± 2.6*	32.0±1.5*
18 Hour	214.9±13.4	220.5± 8.7*	225.9±7.2*
24 Hour	241.8±14.2	320.8±10.9*	324.1±4.8*
Change (ratio)			
0-18 Hour	7.7± 1.2	7.5± 0.6*	7.3±0.4*
18-24 Hour	1.1± 0.0	1.5± 0.0*	1.5±0.0*

\* p < 0.05 compared to control (Dunnet method for multiple contrast was used).

Other legends are the same as table 1.



**Fig. 3.** Representative drawing of hippocampal neurons ; showing neurite outgrowth and morphological development after 0 hour(A, B), 18 hour(C, D) and 24 hour(E, F). Note the increased neurite elongation and neurite branching after 100 mM methanol treatment (B, D, F) compared to the controls(A, C, E).



**Fig. 4.** Changes of neurite outgrowth of rat hippocampal neurons after exposure to methanol. Values are expressed as ratio to 0 hour or 18 hour.

\*  $p < 0.05$  compared to control (Dunnet method for multiple contrast was used.) Other legends are the same as Fig. 2.

대조군의 신경세포 돌기의 총 길이의 합을 구하였을 때, 0시간, 18시간 및 24시간에 각각  $32.0 \pm 3.7$  m,  $214.9 \pm 13.4$  m 및  $241.8 \pm 14.2$  m로 0-18시간 동안 약  $7.7 \pm 1.2$ 배의 길이 성장을, 그리고 18-24시간 동안 1.1배의 성장을 나타내었다. Methanol 10 mM 투여군에서는 0시간, 18시간 및 24시간에 각각  $32.0 \pm 2.6$  m,  $220.5 \pm 8.7$  m 및  $320.8 \pm 10.9$  m로서 0-18시간에  $7.5 \pm 0.6$ , 18-24시간에 1.5배의 성장을 나타내어 특히 18-24시간동안에 대조군에 비하여 유의있는 길이 성장을 나타내었다. Methanol 100 mM 투여는  $32.0 \pm 1.5$  m,  $225.9 \pm 7.2$  m 및  $324.1 \pm 4.8$  m로서 0-18시간에  $7.3 \pm 0.4$ 배, 18-24시간에 1.5배의 성장을 나타내어 10 mM methanol 투여군에서와 마찬가지로 특히 18-24시간동안에 대조군에 비하여 유의있는 길이 성장을 나타내었다. 그러나 10 mM methanol과 100 mM methanol 투여군 간에는 별다른 차이를 나타내지 않았다.

#### 4. 단백질 정량 (Table 3, Fig. 5, Fig. 6)

세포 배양 7일 째 시행한 단백질 정량에서 대조군의 단백질량은 배양접시당  $124.1 \pm 6.4$  g이었다. Methanol 10 mM 투여군은  $150.5 \pm 7.9$  g, 100 mM 투여군은  $149.9 \pm 7.2$  g으로 대조군에 비하여 단백질이 크게 증가되었다. 500 mM methanol 투여군의 단백질량은  $104.7 \pm 11.7$  g으로 10 mM 및 100 mM methanol에 의하여 크게 증가되었던 단백질이 오히려 감소되어 대조군 수준 또는 그 이하의 수준으로 변동되었다. 한편 1000 mM methanol 투여군의 단백질량은  $71.3 \pm 4.7$  g으로 대조군에 비하여 유의한 감소를 나타내었다.

**Table 3.** Effect of methanol on the protein amount of cultured rat hippocampal neuron and glia

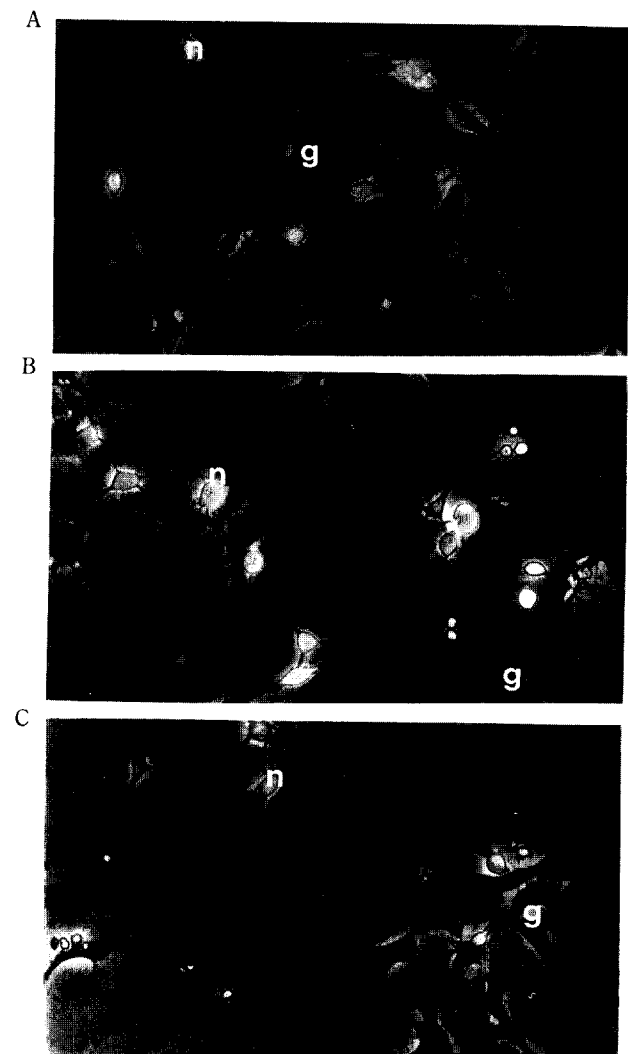
Group	protein content
Control (10)	$124.1 \pm 6.4^*$
M 10 (10)	$150.5 \pm 7.9^*$
M 100 (10)	$149.9 \pm 7.2^*$
M 500 (10)	$104.7 \pm 11.7^*$
M 1000 (10)	$71.3 \pm 4.7^*$

\*  $p < 0.05$  compared to control (Dunnet method for multiple contrast was used.)

Values are mean  $\pm$  S.E. expressed as g/dish.

M 500 : administration of 500 mM methanol.

Other legends are the same as table 1.



**Fig. 5.** Phase-contrast photomicrograph showing the change of numbers of neurons and glial cells in cultures treated with different concentrations of methanol for one week. The numbers of neurons (n) and glial cells (g) in culture are increased after 100 mM (B) and decreased after 1000 mM (C) methanol treatment compared to control (A).

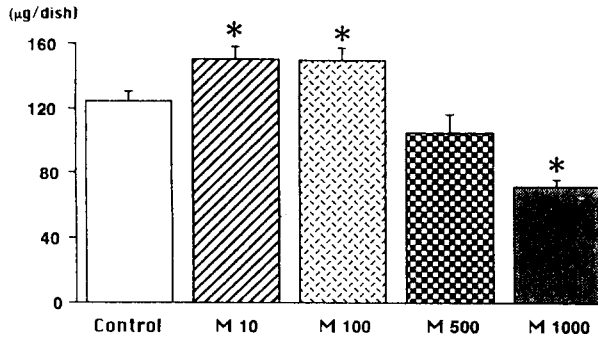


Fig. 6. Effect of methanol on the total protein amount of the culture. Values are expressed as  $\mu\text{g}/\text{dish}$ .

M 10 : methanol 10 mM

M 100 : methanol 100 mM

M 500 : methanol 500 mM

M 1000 : methanol 1000 mM

\*  $p < 0.05$  compared to control (Dunnet method for multiple contrast was used.)

#### IV. 고 찰

본 실험 조건하에서 태령 17일의 흰쥐 해마 신경세포 및 신경교세포는 성장하고 분화하여 정상적인 배양이 이루어졌음을 알 수 있었다. 배양된 세포에 10 mM, 100 mM, 500 mM 및 1000 mM의 methanol을 투여한 결과 배양후 0-24시간동안 신경세포 생존율은 methanol을 투여하지 않은 대조군과 methanol 투여군간에 별다른 차이를 보이지 않았다. 신경돌기 성장은 18-24시간동안 10 mM 및 100 mM methanol 투여군에서 대조군에 비해 유의하게 증가되었다.

배양 초기에 대조군과 10 mM 및 100 mM methanol 투여군 모두에서 신경 세포체는 둥근 형태를 보이다가 18시간 및 24시간에는 세포체의 크기가 커지면서 타원형, 성상 및 배(pear)모양으로 변화하였고 신경돌기의 길이 성장(분화)이 일어났다.

Methanol의 신경세포에 대한 작용을 알아보기 위하여 배양 초기의 신경돌기 성장과 신경세포 생존율을 측정하였다. 신경돌기의 길이 성장은 18시간에는 대조군과 별 차이가 없었으나 24시간에는 10 mM 및 100 mM methanol 투여군에서 대조군에 비하여 유의하게 증가되었다. Ethanol(75 mM)의 경우에도 신경돌기 성장은 배양 후 24시간 및 48시간에 크게 증가되었다고 하였다(Zou 등 1993).

이처럼 저농도의 methanol이 세포 배양 초기 신경세포의 신경돌기의 성장을 촉진시키는 기전에 대하여는 아직 확실치 밝혀지지 않았다. 신경돌기 성장은 세포내에서 cAMP(Nirenberg 등 1983), inositol phospholipid(Hama 등 1986) 및 calcium(Cogan 등 1987 ; Conner

1986 ; Kater 및 Mills 1991) 등의 이차전령물질(second messenger)들에 의해 조절된다고 추측된다. 일정한 세포내 calcium 농도 범위내에서는 저농도의 칼슘 통로 봉쇄제(calcium channel blocker) 투여에 의하여 세포내로의 calcium 유입이 봉쇄되고 이와 함께 신경돌기 길이 성장이 촉진된다(Mattson 및 Katter 1987). 또 글루타민산 수용체중 N-methyl-D- aspartate (NMDA) 수용체는 calcium 이온을 세포내로 유입시키는데 관여하기 때문에 이 수용체에 대한 지나친 자극은 신경독성을 일으킨다고 한다. 최근 분자생물학적 방법에 의해 NMDA 수용체 subunit들(NR1, NR2A, NR2B, NR2C 및 NR2D)이 발견되었는데 이들 subunit의 조합의 변동은 세포내로의 calcium의 유입정도를 다르게 조절함으로써 신경세포의 분화과정에 영향을 준다고 생각하고 있다(Akazawa 등 1994 ; Farrant 등 1994 ; Bockers 등 1994). 한편 ethanol, butanol, isopropyl alcohol 등은 세포배양에서 전압의존성 칼슘 통로(voltage-dependent calcium channel)를 차단함이 밝혀졌기 때문에(Dildy-Mayfield 등 1991 ; Oakes 및 Pozos 1981) 저농도의 ethanol투여에 의한 신경돌기 성장의 촉진 은 세포내 calcium농도의 변화와 관련이 있을 수 있다(Zou 등 1993). 따라서 ethanol과 같은 대사 과정을 거치는 methanol도 같은 기전에 의하여 저농도에서 신경돌기 성장을 촉진하리라고 추측할 수 있으나 이 부분에 대하여는 향후 연구가 필요하리라고 생각된다.

신경세포 생존율은 Trypan blue 또는 fluorescein diacetate-propidium iodide 염색법과 같이 죽은 세포를 염색한 후 생존한 세포를 세는 방법(Jones 및 Senft 1985)과 특히 신경세포에서는 세포체 길이보다 긴 신경돌기를 가진 세포를 생존한 세포로 판단하고 전체 세포수에 대한 생존 세포 수의 비율을 측정하는 방법이 있다. 후자의 방법을 이용한 본 연구에서 10-1000 mM methanol 투여는 18시간 및 24시간에 측정된 신경세포 생존율에 영향을 미치지 않았다. Fluorescein diacetate-propidium iodide 및 Trypan blue 염색법을 이용하여 측정된 실험에서 50-200 mM ethanol 투여는 배양후 24시간까지 대조군에 비하여 별다른 차이를 나타내지 않았다고 하였다(Zou 등 1993).

본 연구에서는 세포 분열을 계속하여 세포 수의 증가가 일어날 수 있는 신경교세포의 양적인 변동을 보기 위하여 배양 후 7일에 실시한 단백질량 결과 저농도(10, 100 mM) methanol 투여군에서는 대조군에 비하여 유의있게 증가하였고, 고농도(500, 1000 mM) methanol 투여군에서는 크게 감소하였는데 이중 1000 mM 투여군에서는 특히 유의한 감소를 보였다.

Ethanol을 투여한 연구에서 배양 4-7일에 고농도(150-200mM)는 현저한 세포 수의 감소를 나타낸다고 하여 (Zou 등 1993) 고농도의 methanol은 고농도의 ethanol에서와 마찬가지로 신경교세포의 성장을 억제시킴을 알 수 있었다. 그러나 저농도(100mM 이하)의 ethanol은 신경세포 및 신경교세포 수의 변화를 일으키지 않는다(Zou 등 1993)고 하였으나 본 연구에서 10-100 mM methanol은 신경교 세포 성장이 오히려 촉진되어 저농도에서는 신경교 세포 성장에 미치는 작용에 차이를 나타내었다. 그러나 같은 ethanol을 이용한 실험 중에서도 그 결과의 차이를 보이는 경우들이 보고되고 있다. 비교적 저농도(100-200 mg/ml, 21.7-43.4 mM)의 ethanol 투여로도 PC12 세포(Wooten 및 Edward 1991) 및 소뇌 과립 세포(cerebellar granule cell) (Pantazis 등 1992)에 대하여 독작용을 나타내었다고 하는 연구 결과가 있다. Ethanol을 투여한 유사 연구에서도 이러한 상반된 결과를 보이는 원인은 아직 확실치 않다. Ethanol에 노출될 당시 신경세포의 성숙 정도가 그 원인 중의 하나일 것으로 추측할 수 있는데(Bonthius 및 West 1990), 신경세포의 분화 정도가 미숙할수록 대사 및 세포 내 calcium 농도 증가에 영향을 덜 받기 때문이다. Methanol을 이용한 본 연구와 ethanol을 이용한 다른 연구 결과와의 차이에는 이러한 신경세포 분화 정도 차이뿐 만 아니라 methanol과 ethanol의 화학적 차이도 관계할 것으로 생각된다.

또 세포 배양 7일째에 단백질 정량을 하기 직전에 촬영한 역상 위상차 현미경사진(Fig. 5)에서 보면 대조군(Fig. 5A) 및 100 mM methanol 투여군(Fig. 5B)에 비해 1000 mM methanol 투여군(Fig. 5C)에서는 신경교세포의 수뿐 아니라 신경세포의 수도 감소되어 있다. 따라서 배양 후기에 신경교세포의 수가 감소된 결과는 신경교세포에 대한 methanol의 직접적인 영향일 수도 있지만 배양 당시 고농도 methanol과 poly-L-lysine간의 상호작용 등에 의해 배양된 세포 밀도 자체가 다른 군에 비해 낮아졌을 가능성도 배제할 수 없다. 그러나 100 mM methanol 투여군에서 보이는 신경교 세포의 분화된 형태가 1000 mM methanol 투여군에서는 거의 나타나지 않는 것으로 보아 methanol 자체가 고농도에서는 직접적으로 신경교세포의 성장을 억제할 가능성이 더 많을 것으로 생각된다.

따라서 methanol은 그 대사 산물 뿐 아니라 methanol 그 자체로도 중추 신경계에 영향을 미칠 수 있으며 그 기전은 본 연구만으로는 명확하지 않으나, 고농도 투여로는 후기 신경교세포 성장이 억제되고 저농도 투여시에는 초기 신경세포 분화 및 신경교세포 성장이 촉진됨

을 알 수 있었다. 그러므로 현재까지의 methanol에 대한 연구는 주로 methanol 자체나 그 대사 산물들의 독성에 대하여 이루어져왔으나 앞으로는 methanol이 저농도에서 가지는 중추 신경계 세포 성장 촉진 등의 기전에 대해서도 연구가 필요하리라 생각된다.

## V. 결 론

Methanol은 인체내로 유입되면 대사 과정을 거쳐 formaldehyde 및 formic acid로 전환되어 축적됨으로서 대사성 산증, 중추 신경계 및 시각기능 장애를 유발시키고 심한 경우 사망에까지 이르게 할 수 있다. 본 연구자는 대사되지 않은 그 자체로서 methanol이 중추 신경계에 미치는 영향에 대하여 알아보고자, 태령 17일된 Sprague-Dawley계 흰쥐 태아의 해마 신경세포 및 신경교세포의 일차 배양 세포에 농도별로 methanol을 투여하여 나타나는 신경돌기의 성장, 신경세포의 생존율 및 단백량을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 본 실험 조건하에서 태령 17일의 해마세포는 성장 및 분화하였다.
2. 배양후 0-24 시간동안 신경세포 생존율은 대조군과 10 mM, 100 mM, 500 mM 및 1000 mM methanol 투여군간에 별다른 차이를 나타내지 않았다.
3. 신경세포 돌기는 10 mM 및 100 mM methanol 투여군 모두에서 18-24 시간동안 대조군에 비하여 유의 있는 길이 성장을 보였다.
4. 배양 7일째 단백질량은 10 mM 및 100 mM methanol 투여로 대조군에 비하여 유의한 증가를 나타내었으며 1000 mM 투여군에서는 오히려 유의하게 감소하였다.

이상의 결과로 볼 때 methanol은 신경세포 및 신경교세포의 성장에 영향을 미칠 수 있는데 특히 저농도(50-100 mM)의 methanol은 초기 신경세포 신경돌기 성장(분화) 및 후기 신경교세포 성장 촉진을 일으키며 고농도(500-1000 mM 이상)의 methanol에 의하여 신경교세포 성장 억제가 나타남을 알 수 있었다.

## 참고문헌

- Abel E.L. (1979): Prenatal effects of alcohol on adult learning in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **10**, 239-243.
- Abbott B.D., Logsdon T.R. and Wilke T.S. (1994): Effects of methanol on embryonic mouse palate in serum-free organ culture. *Teratol.*, **49**, 122-134.

- Akazawa C., Shigemoto R., Bessho Y., Nakanishi S. and Mizuno N. (1994): Differential expression of five N-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in the cerebellum of developing and adult rats. *J. Comp. Neurol.*, **347**, 150-60.
- Bradford M. (1976): A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
- Bockers T.M., Zimmer M., Muller A., Bergmann M., Brose N. and Kreutz M.R. (1994): Expression of the NMDA R1 receptor in selected human brain regions. *Neuroreport*, **5**(8), 965-968.
- Bonthius D.J. and West J.R. (1990): Alcohol-induced neuronal loss in developing rats : increased brain damage with binge exposure. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, **14**, 107-118.
- Cogan D.C., Cohen L.E. and Sparman G. (1983): Effects of gestational alcohol on the development of neonatal reflexes in the rat. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, **5**, 517-522.
- Cogan C.S., Conner J.A. and Kater S.B. (1987): Electrically and chemically mediated increases in intracellular calcium in neuronal growth cones. *J. Neurosci.*, **7**, 3588-3599.
- Connor J.A. (1986): Digital imaging of free calcium changes and of spatial gradients in growing processes in single mammalian central nervous system cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 6179-6183.
- Díaz J. and Samson H.H. (1980): Impaired brain growth in neonatal rats exposed to ethanol. *Science*, **208**, 751-753.
- Dildi-Mayfield J.E., Marchu T. and Leslie S.W. (1991): Ethanol and voltage - or receptor - mediated increases in cytosolic  $Ca^{2+}$  in brain cells. *Alcohol*, **9**, 63-69.
- Farrant M., Feldmeyer D., Takahashi T. and Cull-Candy S.G. (1994): NMDA-receptor channel diversity in the developing cerebellum. *Nature*, **368**, 335-339.
- Fernandez K., Caul W.P., Haenlein M. and Vorhees C.V. (1983): Effects of prenatal alcohol on homing behavior, maternal responding and openfield activity in rats. *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, **5**, 351-356.
- Gilger A.P. and Potts A.M. (1955): Studies on visual toxicity of methanol ; role of acidosis in experimental methanol poisoning. *Am. J. Ophthalmol.*, **39**, 63-82.
- Gilger A.P., Potts A.M. and Farkas I.S. (1956): Studies on visual toxicity of methanol ; effects of ethanol on methanol poisoning in rhesus monkey. *Am. J. Ophthalmol.*, **42**, 244-250.
- Hama T., Huang K.P. and Guroff G. (1986): Protein kinase C as a component of a nerve growth factor-sensitive phosphorylation system in PC12 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 2353-2357.
- Jones K.H. and Senft J.A. (1985): An improved method to determine cell viability by simultaneous staining with fluorescein diacetate propidium iodide. *J. Histochem. Cytochem.*, **33**, 77-79.
- Kater S.B. and Mills L.R. (1991): Regulation of growth cone behavior by calcium. *J. Neurosci.*, **11**, 891-899.
- Mattson M.P. and Kater S.B. (1988): Isolated hippocampal neurons in cryopreserved long-term cultures : Development of neuroarchitecture and sensitivity to NMDA. *Int. J. Develop. Neurosci.*, **6**, 439-452.
- Mattson M.P. and Katter S.B. (1987): Calcium regulation of neurite elongation and growth cone motility. *J. Neurosci.*, **7**, 4034-4043.
- Morgane P.J., Miller M.W., Kemper T., Stern W., Forbes W., Hall R., Bronzino J., Kissane J., Hawrylewicz E. and Resnick O. (1978): The effects of protein malnutrition on the developing central nervous system in rat. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **2**, 137-230.
- Nirenberg M., Wilson S., Higashida H., Rotter A., Krueger K., Busis N., Ray R., Kenimer J.G. and Adler M. (1983): Modulation of synapse formation by cyclic adenosine monophosphate. *Science*, **222**, 794-799.
- Oakes S.G. and Pozos R.S. (1981): Electrophysiological effects of acute ethanol exposure II. Alterations in the calcium component of action potentials from sensory neurons in dissociated culture. *Develop. Brain Res.*, **5**, 251-255.
- Patel A.J. (1983): Undernutrition and brain development. *Trends Neurosci.*, **6**, 151-154.
- Pantazis N.J., Dohrman D.P., Luo J., Goodlett C.R. and West J.R. (1992): Alcohol reduces the number of pheochromocytoma (PC12) cells in culture. *Alcohol*, **9**, 171-180.
- Potts A.M. (1955): Visual toxicity of methanol ; clinical aspects of experimental methanol poisoning treated with base. *Am. J. Ophthalmol.*, **39**, 86-92.
- Potts A.M. and Johnson L.V. (1952): Studies on visual toxicity of methanol ; effects of methanol and its degradation products on retinal metabolism. *Am. J. Ophthalmol.*, **35**, 107-118.
- Potts A.M., Praglin J., Farkas I.S., Orbison L. and Chickering D. (1955): Studies on visual toxicity of methanol ; additional observations on methanol



- poisoning in primate test object. *Am. J. Ophthalmol.*, **40**, 76-85.
- Re O. (1982): Species differences in methanol poisoning. *CRC Crit. Rev. Toxicol.*, **10**, 275-286.
- West J.R., Hamre K.M. and Cassell M.D. (1986): Effects of ethanol exposure during the third trimester equivalent on neuron number in rat hippocampus and dentate gyrus. *Alcohol Clin. Exp. Res.*, **10**, 190-197.
- Wooten M.W. and Edward S.J. (1991): Alcohols synergize with NGF to induce early differentiation of PC12 cells. *Brain Res.*, **550**, 333-339.
- Zou Z.Y., Rabin R.A. and Pentney R.J. (1993): Ethanol enhances neurite outgrowth in primary cultures of rat cerebellar macroneurons. *Develop. Brain Res.*, **72**, 75-84.
- 홍 사 석 (1967): 알콜의 약리. 대한의학협회지, **10**, 549-552.