

인간 신경아세포종 세포 배양을 통한 뇌 신경세포 생육 촉진인자의 생산

홍종수 · 우광희¹ · 박경유¹ · 이현용*

강원대학교 식품생명공학부, ¹한림대학교 의과대학 의학부

The Secretion of Brain-derived Neurotrophic Factor (BDNF) from the Cultures of Human Neuroblastoma Cells. Jong-Soo Hong, Kwang-Hoe Woo¹, Kyung-You Park¹ and Hyeon-Yong Lee*.
Division of Food and Biotechnology, Kangwon National University, Chuncheon, 200-701, Korea, ¹Department of Medicine, Hallym University, Chuncheon, 200-801, Korea—In cultivating human neuroblastoma cells maximum number of neurites per cell and length of the neurite were estimated as 5.5 and 2.2 (nm), respectively. It was found that there was correlation between growth and differentiation of nerve cells. Maximum specific BDNF production rate was also calculated as 2.5×10^5 (ng/cell/day) at 7×10^5 (viable cells/mL) of maximum cell density, corresponding to 100 (ng/mL) of BDNF. The secretion of BDNF was occurred most in the later periods of the cultivation, yielding 75 (ng/mL) of BDNF. The production rate of BDNF was elongated in adding 1 ($\mu\text{g/mL}$) of BDNF as well as 40% increase of the length of the neurites. It proves that BDNF can be used as one of biopharmaceuticals to treat age-related diseases such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease. It can also provide the information of scaling-up mammalian cell culture system to economically produce BDNF.

최근 급증하는 노인성 질환의 대표적인 질병으로 Alzheimer's disease와 Parkinson's disease 등을 들 수 있는데 이는 세포의 노화 및 기타 영향에 따른 뇌 신경세포의 손상에 기인하는 경우가 많다(1). 이들 신경세포는 일단 외부에 의한 손상을 받으면 재 생육이 어려우며 또한 그 회복 속도도 매우 느려 신경 세포의 재생을 요하는 질병의 치료에 많은 어려운 점들이 있다. 이에 최근 신경세포의 생육을 촉진하는 기능을 가진, 엄밀히 표현하면 신경세포내 신경 전달체계에 직접적인 작용을 가해 생육을 촉진하는 물질 들인 Neurotrophic factor들에 관한 연구 결과들이 급증하고 있다(2-4). 이중 Nerve Growth Factor(NGF)와 Brain-derived Neurotrophic Factor(BDNF)가 가장 유용한 생물 의약품으로의 가능성이 높다고 인정되고 있다. 하지만 NGF는 BDNF에 비해 선택성 및 적응성이 떨어져, 뇌 신경세포의 생육을 촉진할 수 있는 생물 의약품으로서 BDNF에 관한 관심이 집중되고 있다(5). BDNF는 분자량이 14.7 kD인 두개의 dimer로 형성된 단백질로서, 신경 전달 receptor인 tyrosine kinase A 혹은 B와 결합해 extracellular relay kinase(Erk)의 자극을 통해 staurosporine의 도움으로 세포 핵에 작용을 해 세포의 분화 및 성장을 유도하는 기작을 갖는 단백질로 알려져 있다(6).

현재 *E. coli*와 같은 세균 등에 유전자 조작을 이용한

BDNF를 생산하는 시도가 있으나, 이같은 공정을 통해 생산된 BDNF는 고등 세포에 존재하는 BDNF들 보다 약리 효과가 떨어지는 것으로 보고되고 있다(7). 이에 곤충세포 혹은 virus 등을 이용해 BDNF를 생산하고자 하는 경우도 있으나 아직은 산업적 단계는 이르지 못한 실정이다(8, 9). 따라서 BDNF의 생산은 동물세포 배양을 통해 생산하는 것이 가장 이상적인 공정으로 평가되고 있다. 하지만 아직까지 BDNF의 세포내 작용 기작 등이 명확히 규명되지 않아 BDNF의 생산이 가능한 세포주들이 거의 알려지지 않은 실정이다. 또한 이 BDNF의 유전자를 포함한 재조합 동물세포의 체외 배양이 가능한 세포주 확립이 어려우며 이들의 배양을 위한 연구가 전무한 실정이다. 이에 본 논문은 BDNF의 경제적 생산이 가능한 배양공정 확립을 위한 기초연구로서 BDNF의 생산이 가능할 것으로 예상되는 인간 신경아 세포종 세포의 체외 배양을 통해 BDNF의 생산 기작 및 작용 등에 관한 자료를 제공하고자 한다.

재료 및 방법

세포주 및 배양 조건

인간 섬유아종 세포(IMR32, CCL127, ATCC)를 EMEM(Gibco, USA)에 10% 혈청(FBS, Gibco)을 함유한 배지에 넣어 75 cm² T-flask에 mL당 1×10^4 생 세포수로 접종했다. 이같이 접종된 세포를 37°C로 CO₂ incubator에서 배양하며 매일 세포수 및 BDNF의 양을 잰다. 세포수는 hemocytometer를 이용해 trypan dye ex-

*Corresponding author

Tel. 82-361-50-6455, Fax. 82-361-56-4819

E-mail: hyeonl@kowngwon.ac.kr

Key words: Human neuroblastoma cells, Brain-derived neurotrophic factor

clusion 및 nuclei count 방법에 따라 살아있는 세포수를 측정했다(10). 세포외 BDNF의 양은 1 mL 배양액을 채취해 anti-BDNF(Promega, USA)와 goat Ig-G를 96 well plate에 coating한 후 standard로 순수 분리한 BDNF(Promega)를 일정 농도로 첨가해 ELISA를 이용해 측정했다. 세포내 BDNF 양은 1000 rpm에서 세포를 모은 후 4°C에서 sonicator(Vibratech, USA)를 이용해 세포를 파쇄했다. 파쇄된 세포를 PBS 용액에서 넣어 교반 후 2500 rpm으로 다시 원심분리를 통해 세포를 제거한 다음 상등액만을 모아 세포외 BDNF 측정 방법과 동일한 방법으로 측정했다.

섬유아종 세포내 신경 돌기 수 및 길이 측정

신경세포의 성장에 따라 신경 돌기(neurite)로 분화되는 정도를 알기위해 도립 현미경을 이용해 T-flask내 일정 부분에서 매일 각 세포당 신경 돌기를 함유하고 있는 돌기수를 3회 이상 세어 평균치를 냈다. 이 수치를 각 세포당 분화된 신경 돌기수로 정했다. 또한 분화된 신경 돌기가 BDNF에 의해 얼마나 빠르게 성장하는 지를 확인하기 위해 특정 세포의 신경 돌기를 매일 눈금자가 매겨진 도립 현미경을 이용해 성장하는 길이를 측정했다(11).

결과 및 고찰

Fig. 1은 IMR-32 세포주를 배양하며 배양 기간에 따라 세포 생육과 이에 따른 신경 돌기의 증가를 비교한 결과다. 최대 세포수가 7×10^5 (viable cells/mL)에 도달했을 때 신경 돌기의 숫자가 세포당 5.6개로 최대 분화된 수치를 나타냈다. 하지만 세포수의 증가와 직선적으로 비

례하게 증가하지 않고, 어느정도의 세포 수에 도달한 후부터 신경 돌기가 형성되는 현상을 나타냈다. 이는 신경 돌기의 분화는 세포의 생육이 어느 정도 이루어진 후에 실행되는 time-lap 반응임을 알 수 있다. 또한 생성된 신경 돌기들은 세포수의 감소에도 불구하고 그 수가 급격히 감소하지 않아 일단 분화된 돌기는 세포 생육과는 직접적인 관계는 없는 것으로 예측됐다. Fig. 2는 신경 세포의 생육을 촉진할 수 있는 단백질인 BDNF의 생산 농도를 확인하기 위해 배양 기간에 따라 세포내, 외에 존재하는 BDNF의 양을 측정하는 것이다. 배양 초기에는 대부분의 BDNF는 세포내에 존재하다 일정 농도에 도달하면 세포외로 분비되는 것을 알 수 있다. Fig. 1에서 나타난 바와 같이 배양 후반부에 신경 돌기의 생성이 있는 점으로 미루어 생성된 BDNF가 세포내에서 신경 세포의 분화에 직접 작용하는 것이 아니라, 생성후 일단 체외로 분비돼 신경 세포표면의 receptor들과 결합해 signal을 보냄으로서 신경 돌기의 분화를 촉진할 것으로 예측된다. 이는 신경세포 전달시 tyrosine kinase(Trk)이 작용해 전달되는 이론(12)과 합치되는 결과다. 또한 세포내 최대 BDNF의 농도는 약 100(ng/mL)이며 이때 세포외 농도는 73(ng/mL)로서 이는 지금까지 보고된 여러 세포주들에 의해 자연적으로 분비되는 BDNF의 양인 0~12(ng/mL) 보다(13, 14) 월등히 높은 생산성으로서 이 세포주를 이용해 BDNF의 체외 생산시 경제성이 있을 것으로 판단된다.

Fig. 3은 신경 돌기의 형성과 형성된 돌기의 성장과의 관계를 알아보기 위해 배양 기간에 따라 세포당 신경 돌기의 수와 성장 중인 신경 돌기의 길이를 비교한 결과다. 신경 돌기의 성장은 신경 돌기의 수와 유사하게 이루어지는 것으로 미루어 신경 돌기의 수가 많을 경우 이에 따른 신경 돌기의 성장도 촉진돼 분화와 함께 돌기의 성장

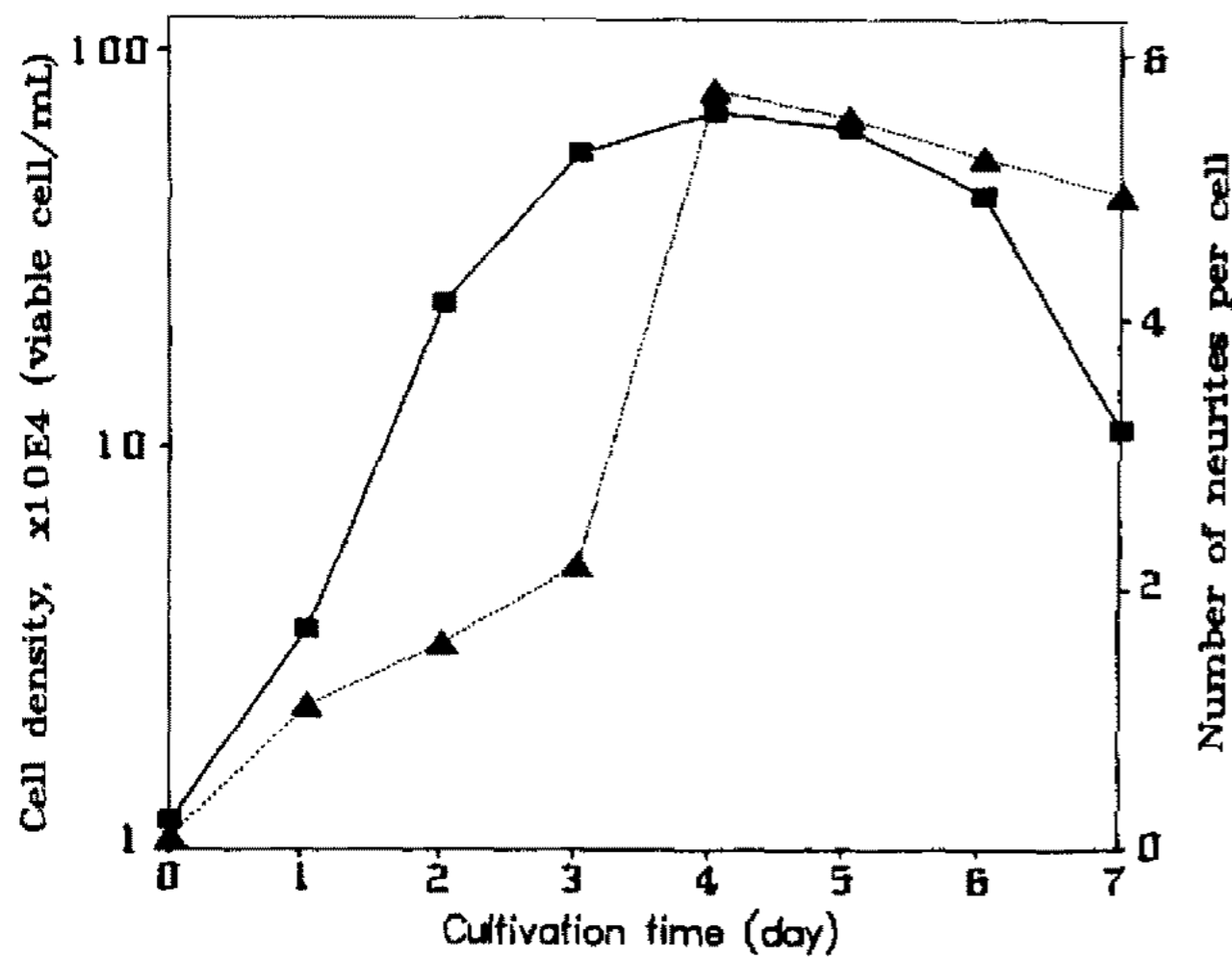


Fig. 1. The growth of the cells and the increase of the number of neurites per cell in cultivating human neuroblastoma cells.

-■- cell density ...▲... neurite number

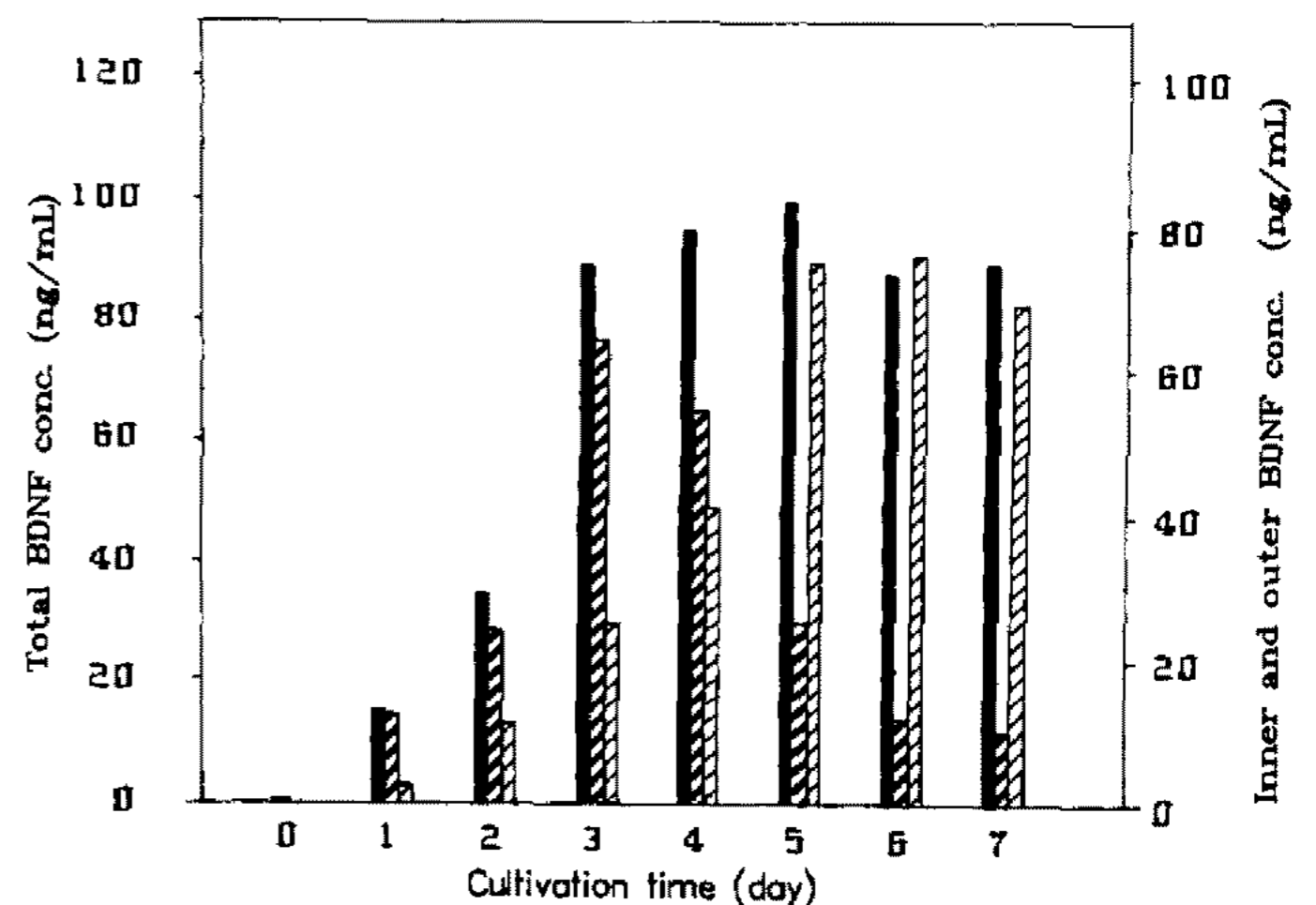


Fig. 2. The production of BDNF inside and outside of the neuroblastoma cells according to cultivation time.

■ total BDNF ▨ inside BDNF ▩ outside BDNF

도 증가함을 알 수 있다. 이와 함께 BDNF의 생산과 신경 돌기의 성장과의 관계를 규명한 것이 Fig. 4로서, BDNF의 체외 비 생산 속도는 최대 세포수에 도달한 때 2.5×10^5 (ng/cell/day)로 계산됐으며 이후 세포수의 감소에 따라 감소되는 현상을 보이고 있다. 즉 세포의 생육이 활발한 경우 BDNF의 생산성이 증가하며 이에 따른 신경 돌기의 성장도 후차적으로 수반되는 cascade 현상을 나타내고 있다. 배양 말기에 세포수의 감소에 따른 BDNF의 생산성 감소가 있으나 일단 형성된 신경 돌기는 잔존하는 BDNF에 영향을 받아 지속적인 성장을 계속했다.

Fig. 5는 실제 세포내 분비되는 BDNF가 신경 돌기의 성장에 영향을 미치는가와 외부에서 투여한 BDNF가 세포내 BDNF의 합성에 영향을 주는가를 확인하기 위해 정상적인 배양시 생산되는 BDNF의 생산 속도와 신경 돌기의 성장을 1($\mu\text{g}/\text{mL}$)의 BDNF를 투여해 배양한 경우와 비교했다. BDNF의 생산성은 배양 초기에는 BDNF를 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우가 그리 큰

차이가 없었으나 배양 말기에 BDNF를 첨가하지 않은 경우는 생산성이 급속히 감소하는 반면 BDNF를 첨가한 경우는 어느정도 지속된후 생산이 감소하는 현상을 보였다. 이와 함께 신경 돌기의 성장은 첨가한 경우가 첨가하

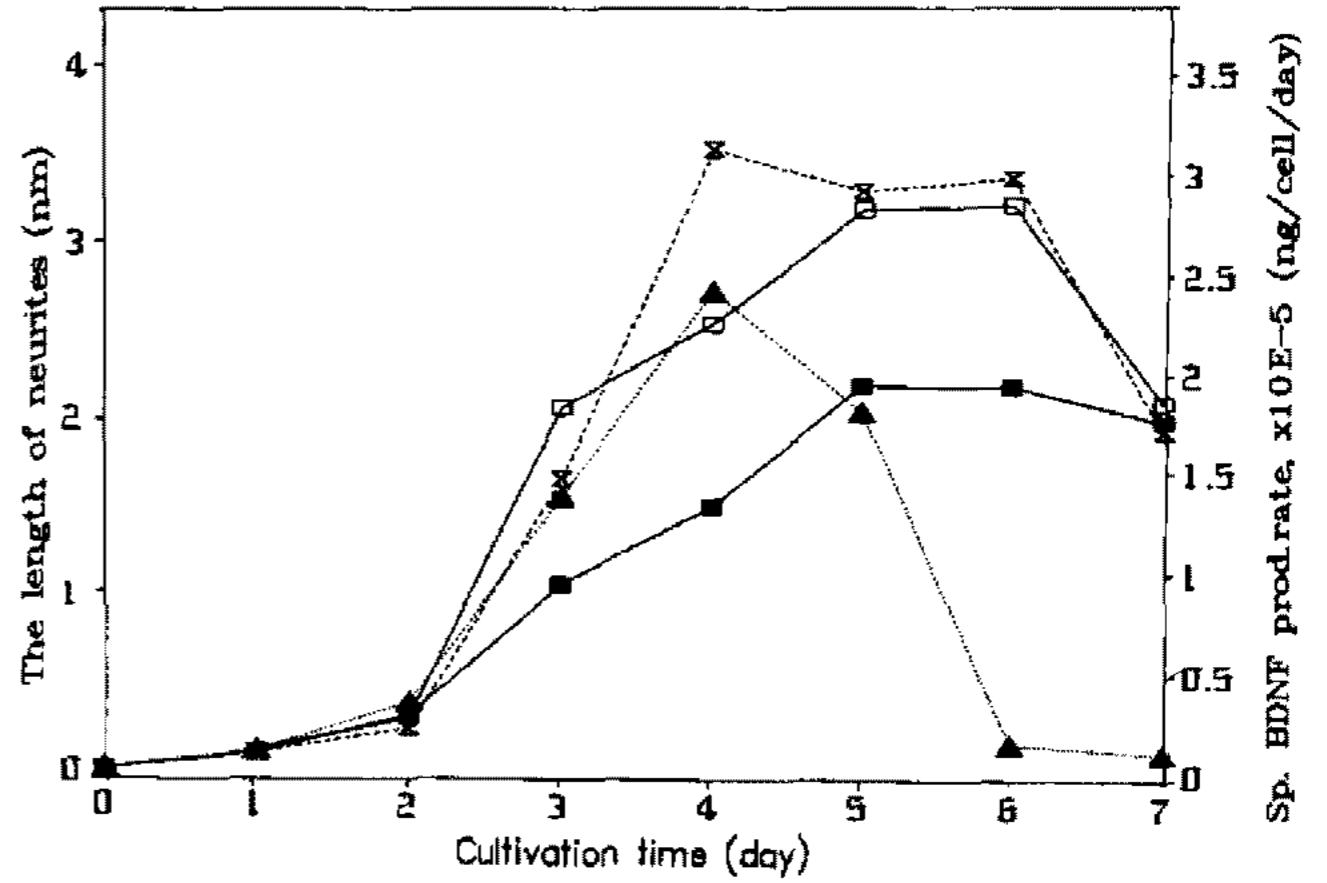


Fig. 5. The effect of BDNF on the growth of neurites and specific production of BDNF in cultivating human neuroblastoma cells.

—■— neurite length-BDNF ...▲... Qbdnf-BDNF Qbdnf-BDF
—□— neurite length+BDNF

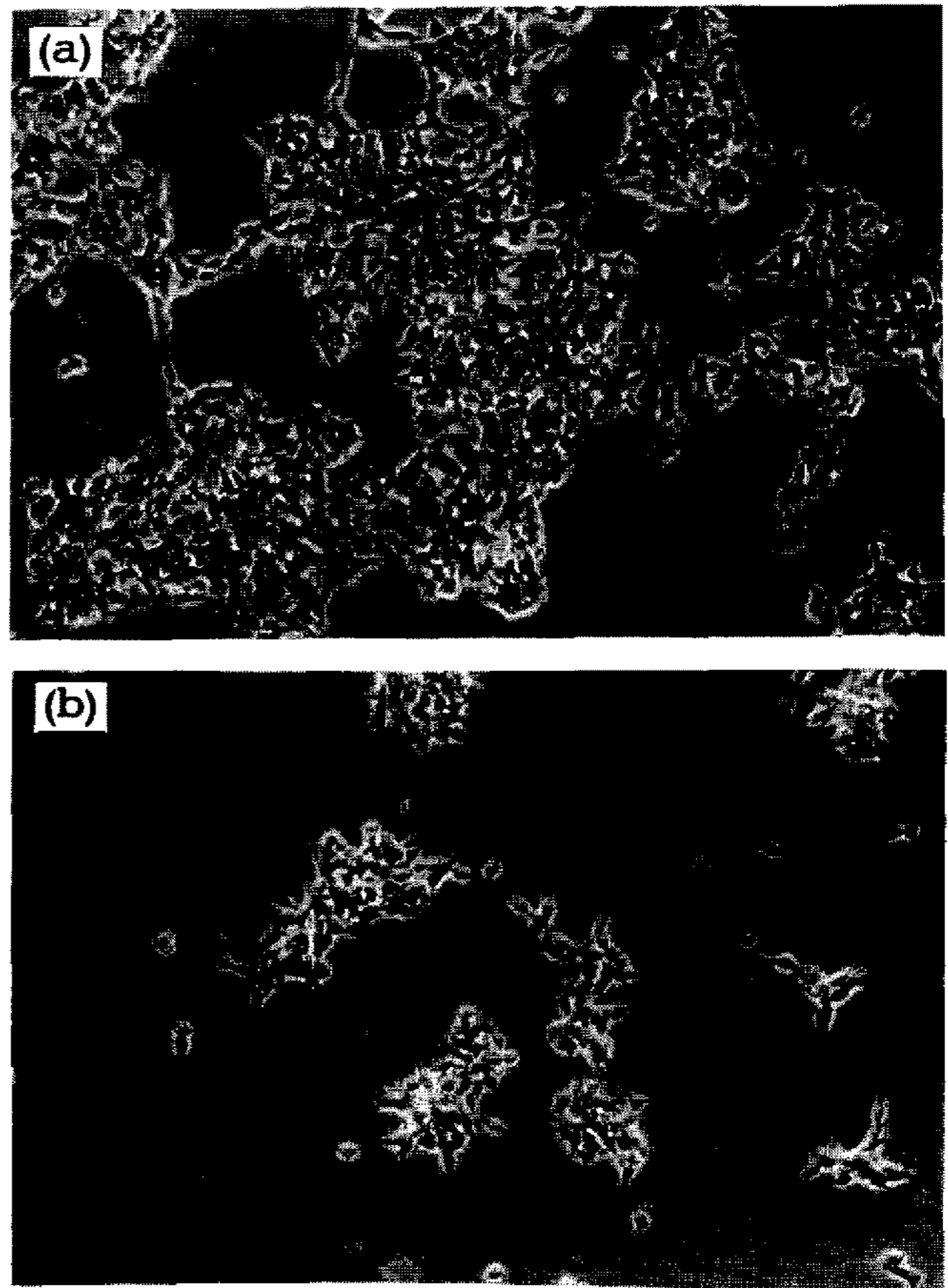


Fig. 6 Pictures of growing the cells the neurites with (a) and without (b) adding 1 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) of BDNF for five day cultivating neuroblastoma cells. Arrows are the neurites.

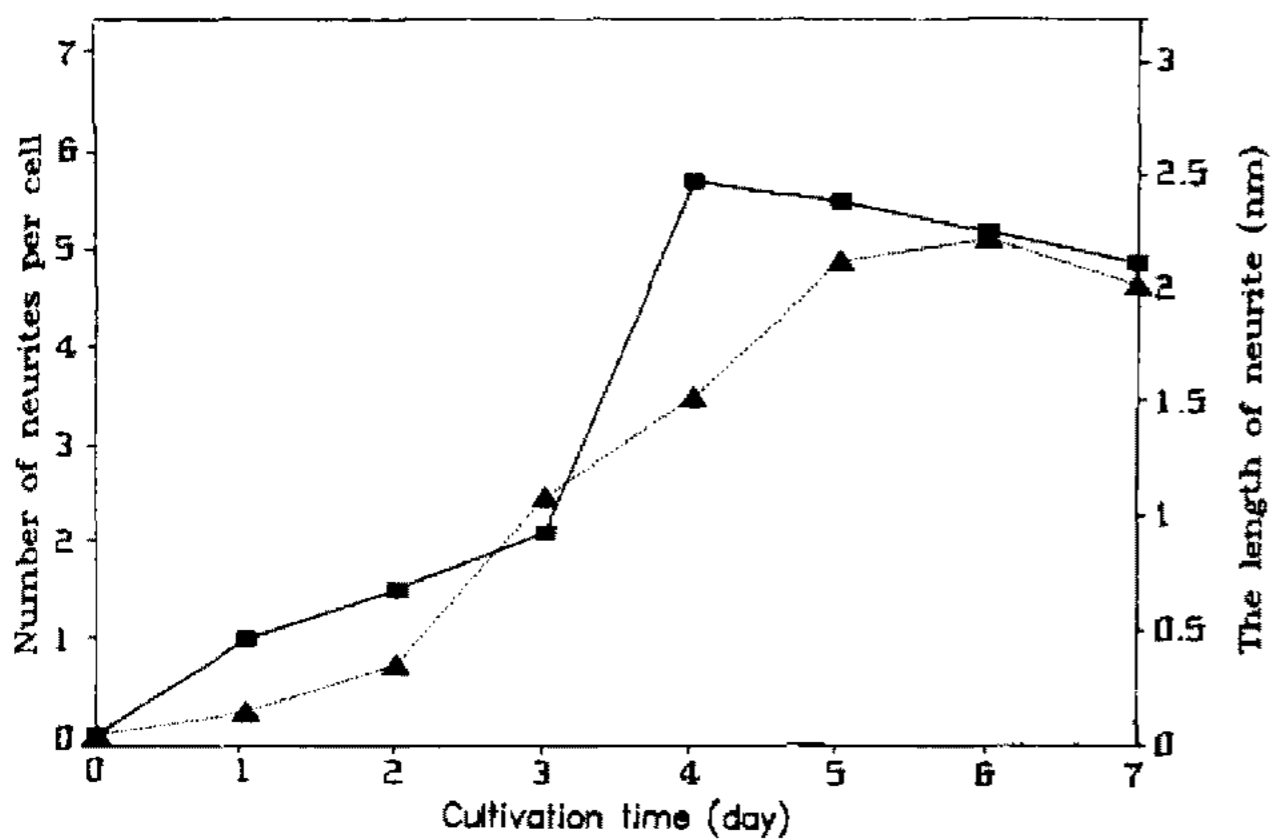


Fig. 3. The comparison of the increase of the number of neurites per cell and the elongation of the neurites.

—■— neurite number ...▲...neurite length

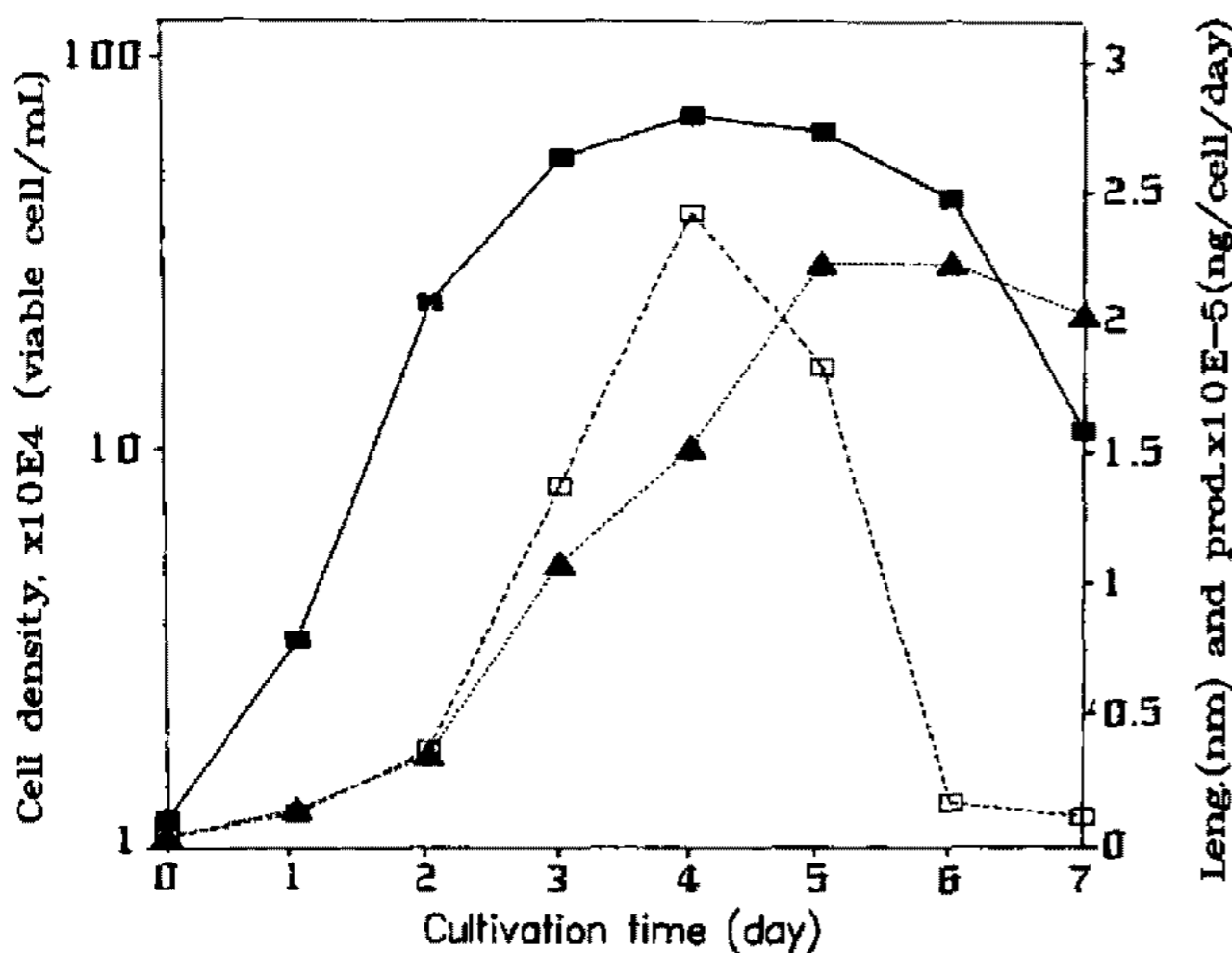


Fig. 4. The correlation between the cell growth and specific BDNF production rate as well as the length of the neurites.

—■— cell density ...▲...neurite length □ sp. BDNF prod. rate

지 않은 경우보다 약 40% 이상 높은 성장 길이를 보여줘 BDNF가 신경세포의 분화와 이에따른 신경 돌기의 성장에 직접적인 영향을 미치는 것이 확인됐다. 또한 BDNF의 첨가는 세포내 BDNF의 생산을 촉진시켜 신경세포의 활성화에 영향을 미쳐 궁극적으로는 신경세포의 생육에 영향을 주는 것으로 확인됐다. 또한 Fig. 6은 상기 결과를 사진으로 보여주는 것으로서 외부에서 BDNF를 첨가한 경우와 그렇지 않은 경우를 비교한 것이다. 그림 a에서 보듯이 BDNF를 첨가해 배양 5일째 경우 사진 b에 비해 신경 돌기의 성장의 현저하게 빠른 것을 알 수 있으며, 전체적인 세포수와 세포 형태도 매우 양호한 것을 알 수 있다. 이로서 신경세포의 생육을 촉진할 수 있는 생물 의약품으로서 BDNF의 가능성이 입증됐으며 이 단백질의 생산을 위한 세포주의 선별이 이루어져 체외 대량 배양 공정 개발을 위한 기초를 제공하고 있다.

요 약

신경세포의 생육과 신경 돌기의 분화 및 성장은 서로 상관관계가 있으나 직선적인 비례 관계는 아닌 것으로 입증됐다. 단위 세포당 신경 돌기의 수는 배양 후 약 3~4일 후에 최대 5.5개로 급속히 증가했으며 이때 신경 돌기의 성장 길이도 2.2 nm로 최고도에 도달했다. 또한 신경아 세포종 세포 배양시 배양 초기에는 세포 내에서 BDNF가 생산된 후 배양 4일째부터 세포 외로 분비돼 7×10^5 (viable cells/mL)의 최대 세포수에 도달했을 때 전체 BDNF 생산량은 100 (ng/mL)이었으며 이때 세포외 BDNF 양은 75 (ng/mL)였다. 또한 이때 최대 BDNF 비생산 속도는 2.5×10^{-5} (ng/cell/day)로 계산됐다. 특히 신경 돌기 수가 증가함에 따라 단위 신경 돌기의 성장 속도도 동시에 증가하는 흥미로운 현상이 밝혀졌다. 또한 1 (μ g/m)의 BDNF를 첨가시 첨가하지 않은 경우보다 배양 말기에 비생산성이 지속적으로 증가했으며, 신경 돌기의 성장은 약 40% 이상 빠르게 증가하는 것으로 입증됐다. 이로서 BDNF가 신경세포의 생육 및 분화에 직접적인 영향을 미치는 것이 확인됐으며 정상 조건에서 100 (ng/mL)의 높은 생산성을 갖고 있는 세포주를 선별함으로써 BDNF를 생물 의약품으로 응용하기 위한 체외 대량배양 공정의 기초를 제공하게 됐다.

감사의 말

본 연구는 교육부 생물화학 공학 연구비의 지원으로 수행된 결과로 이에 심심한 사의를 표합니다.

참고 문헌

- Schorderet, M. 1995. Alzheimer's disease: fundamental and therapeutic aspects. *Experientia*. **51**: 99-105.
- Roush, W. 1996. New neurons use "Lookouts" to navigate nervous system. *Science*. **271**: 1807-1808.
- Konstantinidou, A., I. S. Santiago, N. Flaris and W. D. Sinder. 1995. Development of the primary afferent projection in human spinal cord. *J. Comp. Neuro.* **35**: 1-12.
- deSouza, S., J. Lochner, C. M. Machida, L. M. Matrisian and G. Cimen. 1995. A novel nerve growth factor-responsive element in the stormelysin-1 gene that is necessary and sufficient for gene expression in PC12 cells. *J. Bio. Chem.* **270**: 9106-9114.
- Prakash, N., S. Cory and R. D. Frostig. 1996. Rapid and opposite effects of BDNF and NGF on the functional organization of the adult cortex *in vivo*. *Nature*. **381**: 20-24.
- Vantini, G. and D. Skaper. 1992. Neurotrophic factors: from physiology to pharmacology. *Pharm. Res.* **26**: 1-15.
- Fujimori, S., S. Fukunozono, N. Kotomura, N. Kuno and N. Shimizu. 1992. The expression of NGF in *E. coli*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**: 1985-1990.
- Heymach, J. V. and E. M. Shooter. 1995. The biosynthesis of neurotrophin heterodimers by transfected cells. *J. Biol. Chem.* **270**: 12297-12304.
- Meyer, S. L., D. M. Lang, M. Forbes, E. Hirsh and R. W. Scott. 1994. Production and characterization of recombinant mouse BDNF in insect cells. *J. Neurobiol.* **62**: 825-833.
- Freshney, R. I. (ed.). 1983. Cultivation of animal cells. Alan R. Liss Inc., pp. 199-215.
- Staub, F., B. Mackert, O. Kempfski, J. Peter and A. Baethmann. 1993. Swelling and death of neuronal cells by lactic acid. *J. Neuro. Sci.* **119**: 79-84.
- Heumann, R. 1994. The function of tyrosin kinase B in signalling neurons. *Curr. Opin Neurobiol.* **4**: 668-674.
- Levi-Montalcini, R. 1987. The nerve growth factor: thirty-five years later. *Science*. **237**: 154-1164.
- Nakagawara, A., C. Azar, N. J. Scavarda and G. M. Brodeur. 1994. Expression and function of TRK-B and BDNF in human neuroblastomas. *Mol. Cell Biol.* **14**: 759-767.

(Received 11 November 1996)