

# 대뇌 기저핵 신경세포에서 Nitric Oxide를 매개로 한 망간의 세포독성

신동훈, 정용욱<sup>1)</sup>, 배재훈<sup>2)</sup>, 송대규<sup>2)</sup>, 박원균<sup>2)</sup>, 고복현<sup>1)</sup>, 김두희<sup>3)</sup>

계명대학교 의과대학 예방의학교실, 생리학교실<sup>2)</sup>, 동국대학교 의과대학 해부학교실<sup>1)</sup>, 예방의학교실<sup>3)</sup>

## Nitric Oxide-Mediated Cytotoxicity of Manganese in Basal Ganglia Neuronal Cells

Dong-Hoon Shin, Yong-Wook Jung<sup>1)</sup>, Jae-Hoon Bae<sup>2)</sup>, Dae-Kyu Song<sup>2)</sup>,  
Won-Kyun Park<sup>2)</sup>, Bok-Hyun Ko<sup>1)</sup>, Doo-Hie Kim<sup>3)</sup>

Department of Preventive Medicine, Physiology<sup>2)</sup>, School of Medicine, Keimyung University  
Department of Anatomy<sup>1)</sup>, Preventive Medicine<sup>3)</sup>, School of Medicine, Dongguk University

**Objectives :** We have investigated to manifest whether manganese-induced neurotoxicity is mediated by nitric oxide(NO) in the rat primary neuronal cultures and assess the effect of Mn<sup>2+</sup> on the N-methyl-D aspartate(NMDA) receptors.

**Methods :** We have used 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay to examine the effect of cytotoxicity of MnCl<sub>2</sub> in neuronal cells. NO production was determined by measuring nitrites, a stable oxidation product of NO. The neurons in the rat that contains neuronal nitric oxide synthase(nNOS) were examined by immunofluorescence and confocal microscopy. The effects of Mn<sup>2+</sup> on the NMDA receptors was assessed by the whole cell voltage clamp technique.

**Results :** We showed that the NO release and NOS expression

were increased with 500uM MnCl<sub>2</sub> treatment and an NOS inhibitors, N<sup>6</sup>-nitro-L-arginine , prevented neurotoxicity elicited by manganese. In the electrophysiological study, Mn<sup>2+</sup> does not block or activate the NMDA receptors and not pass through the NMDA receptors in a neurons of basal ganglia.

**Conclusions :** It is concluded that manganese neurotoxicity in basal ganglia was partially mediated by nitric oxide in the cell culture model.

Korean J Prev Med 1999;32(4):459-466

**Key Words:** Manganese(Mn), Nitric oxide(NO), Nitric oxide synthase(NOS), Neurotoxicity, Neurons

## 서 론

망간중독은 망간광산이나 망간제련소의 작업자나, 용접공 등에서 직업적인 만성적 망간폭로에 의해 발생될 수 있는 질병으로 특별한 치료방법이 없는 직업병으로 알려져 있으며, 최근 우리나라에서도 용접공에서 망간 흄에 의한 건강장해(홍영습 등, 1996)가 사회문제로 대두되었다.

망간(manganese: Mn)은 중추신경계의 발달과 활성화에 필수적인 미량금속이지만 또한 중추신경계에 독성을 일으키는 것으로 알려져 있다(Politis 등, 1980). 망

간에 의한 건강장해는 두가지 유형이 있다. 그 중 급성기의 망간정신병은 감정장애, 홍분, 공격적 또는 충동적 행위를 하는 등의 정신적증상이 조기에 나타나고, 다른 하나는 중독이 진행된 후기에 근육의 이상긴장, 무표정한 얼굴표정, 사지나 몸의 진전, 언어장애, 소자증 등의 추체외로계(extrapyramidal system)의 장애증상이 나타나며, 이러한 만성 망간중독의 증상들은 Parkinson씨 병과 비슷한 것으로 알려져 있다(Mena 등, 1967; Barbeau, 1984; Donaldson, 1987). 망간중독환자의 부검소견에서 뇌의 추체외로 구조, 흑질(sustantia nigra), 창백핵(globus pal-

lidus), 시상하핵(subthalamic nucleus), 미상핵(caudate nucleus), 피각(putamen)에서 병변이 발견 되었으며, 동물실험을 통해 대뇌 특히 기저핵(basal ganglia)에 망간이 우선적으로 축적되어 신경세포의 손상을 가져온다는 것이 밝혀 졌으나, 망간중독에 의한 신경세포 손상기전은 확실하게 정립된 것이 없다.

Mn<sup>2+</sup>는 신경활성전압(nerve action potential) 동안 calcium 이온통로를 통해 세포내로 유입되는 것으로 알려져 있다(Anderson, 1979; 1983; Narita 등, 1990) 세포내로 들어온 Mn<sup>2+</sup>은 세포내부의 조면 세포질 내 망(rough endoplasmic reticulum : RER) 등 소기관에 저장된 Ca<sup>2+</sup>의 세포질 내 분비를 유도하며 (Aschner와 Aschner, 1991), 세포내 사립

체의 칼슘 유입통로를 통해 사립체에 우선적으로 축적된다(Chance, 1965; Liccione와 Maines, 1989). 사립체에 축적된 Mn<sup>2+</sup>은 사립체내로 Ca<sup>2+</sup>의 유입을 자극하고, Ca<sup>2+</sup> 배출경로를 방해하여 사립체 내부의 Ca<sup>2+</sup> 농도를 증가시켜 세포에 독작용을 일으킨다(Konji 등, 1985; Gavin 등, 1990).

신경계에 작용하는 brain type의 nitric oxide synthase(NOS)는 특정신경세포에 항상 존재하며 신경세포가 자극을 받아서 세포내에 Ca<sup>2+</sup>이 증가하게 되면 활성화되어서 소량의 nitric oxide(NO)를 합성하게 된다. 이 NO가 주위로 확산되어 신경전달의 역할을 하고, 어떤 병적인 상태로 인해 NMDA수용체를 통해 다량의 Ca<sup>2+</sup>이 신경세포내 유입되면 많은 양의 NO가 생성되어 신경세포에 손상을 미칠 수 있다(Kader와 Fazzini, 1993).

신경세포의 대부분은 과도한 자극을 받게되면 NO를 합성하기 전에 superoxide(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)와 같은 반응성산소 중간대사물을 생성하며 이 superoxide(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)와 NO가 결합하여 peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>)를 형성하여 세포에 손상을 초래한다(Mino-Golomb와 Tsarfaty, 1994). 어떤 병적인 상태에서는 NO와 superoxide는 매우 빠른 속도로 반응하여 peroxynitrite를 생성한다(Beckman 등, 1990; Lafon-Cazal와 Pietry, 1993). Peroxynitrite는 free radical은 아니나 강력한 산화제로 인식되고 있으며 세포의 기능을 강력히 억제하며(Radi와 Beckman, 1991; Crow와 McCord, 1995), 일차배양된 신경세포에서 짧은 시간내에 급속한 세포손상을 유발한다 (Kiedrowski와 Costa, 1992).

Mn<sup>2+</sup>는 superoxide(O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hydrogen peroxide, hydroxyl(OH<sup>-</sup>) free radical과 같은 반응성 산소종(reactive oxygen species)의 생성을 자극하며(Donaldson, 1987), 이들 반응성 산소종들이 dopamin receptor나 dopaminergic cell, dopamine을 공격하여 독성을 일으킨다(Graham, 1984). 그러므로 Mn<sup>2+</sup>에 의해 생성된 superoxide와 세포질내로 유리된 Ca<sup>2+</sup>의 작용으로 합성된 NO가 결합하여 매우

강한 산화제인 peroxynitrite를 생성하여 신경세포에 손상을 일으키는 또 다른 기전을 유추할 수 있다.

Mn<sup>2+</sup>는 N-methyl-D-aspartate(이하 NMDA) 수용체를 차단하는 것으로 알려져 있으므로 세포내의 대량적인 Ca<sup>2+</sup>유입은 실제로 일어나지 않을 것으로 생각되지만, Ca<sup>2+</sup> 통로와 다른 경로를 통해서 세포내로 들어간 Mn<sup>2+</sup>는 세포내의 여러 소기관들에 저장된 Ca<sup>2+</sup>의 세포질내 유리를 촉진하고, Mn<sup>2+</sup>의 주된 표적 소기관인 사립체안으로 Ca<sup>2+</sup>이 과다하게 들어와 축적하게 되면 사립체의 정상적인 기능은 소실하게 되고, 사립체가 파괴되어 결국 세포질내의 유리 Ca<sup>2+</sup>의 농도는 병적인 상태로 증가하게 될 수 있다. Mn<sup>2+</sup>에 의한 신경세포 손상기전에 NO의 매개로 인한 손상을 보고한 연구는 아직까지 그 보고가 없으며, Mn<sup>2+</sup>의 세포에서의 작용기전을 생각해보면 직접적으로 NO의 합성을 자극하지는 않지만 세포내 Ca<sup>2+</sup>의 증가로 인해 NO가 합성 될 수 있을 것으로 생각한다. 이렇게 합성된 NO는 retrograde messenger로서 연접신경세포에 작용하여 glutamate의 분비를 자극하여 NMDA수용체를 활성화시키고 신경세포내로 Ca<sup>2+</sup>을 대량으로 유입 시킬 수도 있을 것으로 추측된다.

수용체-이온통로 복합체(receptor-ionophore complexes)에 대한 Mn<sup>2+</sup>작용은 아직 더 밝혀져야 할 과제로 남아있다. Mn<sup>2+</sup>와 동일한 이가 양이온 중 Mg<sup>2+</sup>이 NMDA의 비경쟁적 길항제로서 NMDA 수용체에 전압의존성 차단작용을 하며 (Evans 등, 1978; Collingridge와 Watkins, 1994), kainate의 강력한 차단제로서 작용한다는 보고가 있으나(Braitman과 Coyle, 1987), 확실한 작용은 아직 밝혀지지 않았다.

그러므로 본 실험에서는 망간의 신경세포에서의 손상기전에 NO가 매개되는지를 알아보기 위하여 기저핵의 신경세포를 배양하여 망간에 의해 NO의 생성정도를 측정하고 NOS의 발현을 관찰하였다. 또한 기존의 NO의 생성과 관련되어 있는 NMDA 수용체에 대한 망간의 영

향을 전기생리학적으로 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 신경세포분리 및 배양

임신후 13-15일의 Sprague-Dawley계의 흰쥐 복강을 70 % alcohol로 소독후 절개하고 자궁을 적출하여 태아의 두경부를 절단후 Hank's Balanced salt solution(HBSS)에 모았다. 뇌조직 주위의 뇌막을 제거후 기저핵 부위를 분리하였다. 분리된 조직에 0.25 % trypsin을 첨가하고 37°C 수조에서 15분간 둔 다음 HBSS로 수차례 씻어내어 trypsin을 완전히 제거하고 HBSS를 첨가 후 세포를 분리하였다. 세포를 부유시킨 다음 일부 세포를 취하여 trypan blue로 염색한 후 hemocytometer를 이용하여 세포의 수를 측정한 다음, 10<sup>5</sup>개의 세포를 Neurobasal™(GIBCOBRL) 배지에 0.5 mM L-glutamine, B27, 25 uM glutamate, 25 uM 2-mercaptoethanol을 첨가하여 배양하였다. 배양 4일후 배지를 glutamate가 없는 배지로 1/2 volume씩 교환하고 2-3주간 배양 후 MnCl<sub>2</sub>를 처리하여 다음 실험을 실시하였다.

### 2. 세포활성도 측정

배양한 신경세포에 1 - 500 μM MnCl<sub>2</sub>를 48시간 동안 처리후 각각 세포활성도를 Cell proliferation kit I (MTT)(Boehringer Mannheim)를 이용하여 측정하였다.

측정방법은 배양 신경세포에 MTT labelling agent 10 μl(최종농도 0.5 mg/ml)를 넣고 4시간 동안 배양한 후 solubilization solution(10 % SDS in 0.01 M HCl)을 100 μl 넣은 후 overnight시키고, 그 다음 ELISA reader(Dynatech MR 700) 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 3. NOS(Nitric oxide synthase) 활성도 측정

#### 1) NO<sub>2</sub><sup>-</sup> 농도 측정

신경세포배양액을 각각 150 μl씩 microplate에 옮기고 4 °C에서 1,500 g의

속도로 15분간 원심분리한 후 세포성분들을 침전시키고 부유액만을 취하여 100  $\mu$ l의 Griess reagents(1:1 mixture of 0.1 % N-1-naphthyleneamine dihydrochloride in 60 % acetic acid)로 혼합하여 실온에서 10분간 반응시키고 분홍색의 발색을 확인한 다음 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준용액 sodium nitrite에 의해 표준곡선을 그린 다음 농도를 계산하였다.

2) 면역형광법을 이용한 NOS의 발현  
배양된 신경세포에 MnCl<sub>2</sub> 처리 48시간 후 phosphate buffered saline(PBS)로 수차례 세척하고 4 % paraformaldehyde(PFA)로 고정시켰다. 0.5 % Tween 20, 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 차례로 처리한 다음 10 % normal goat serum으로 30분 동안 처리하였다. 일차항체 anti-nNOS mAb를 1 % fetal calf serum을 1:1000 농도로 처리하여 4°C에서 overnight 시킨 후 이차항체 Anti-mouse -IgG-Fluorescein 5  $\mu$ l/ml를 사용하여 실온에서 1시간 동안 처리하였다. 0.5 % Tween 20을 처리한 다음 propium iodide로 대조염색을 실시한 후 confocal microscope(Zeiss LSM400)으로 관찰하였다. NOS의 발현은 초록색으로 나타나는 것을 선택하여 상대적인 강도가 25 % 이상되는 것을 인정하였으며, X 400 현미경시야당 관찰된 세포수를 계수하여 NOS의 발현율을 계산하였다.

### 3) NOS저해제의 MnCl<sub>2</sub> 세포독성에 대한 영향

NOS 저해제, N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginine(L-NOARG)를 MnCl<sub>2</sub>와 동시에 처리하여 48시간 동안 배양 후 MnCl<sub>2</sub>의 세포독성에 대한 NOS 저해제의 영향을 MTT방법으로 세포활성도를 측정하여 관찰하였다.

### 4. NMDA 수용체에 대한 MnCl<sub>2</sub>의 영향

배양된 신경세포에서 NMDA 수용체에 대한 MnCl<sub>2</sub>의 영향을 알아보기 위하여 전기생리학적인 실험을 실시하였다.

### 1) 전기생리학적인 실험용액

External bath solution의 조성(mM)은 130 NaCl; 10 HEPES; 5.4 KCl; 5 TEA; 0.5 CaCl<sub>2</sub>; 5 4-AP; 25 D-glucose; 0.5  $\mu$ M Tetrodotoxin이고, MgCl<sub>2</sub> free로 하였으며, 1  $\mu$ M glycine을 첨가하였고, NaOH로 pH 7.4로 하였다. Internal bath solution의 조성(mM)은 110 CsCl; 28 Trizma base; 25 TEA; 10 EGTA; 10 HEPES; 2 MgSO<sub>4</sub>; 0.5 CaCl<sub>2</sub>; 2 Mg ATP; 10 ditris-phosphocreatine이며 pH 7.4로 하였다. 또한 10  $\mu$ M NMDA, 1  $\mu$ M과 100  $\mu$ M MnCl<sub>2</sub>를 실험에 사용하였다.

### 2) 전기생리학적인 실험 및 분석

단일 신경세포의 전류의 변화는 막전압고정법(patch clamp technique)을 이용하여 whole cell mode로 측정하였다. 사용된 pipette은 Narishige puller(pp-83)를 사용하여, 외경이 1 mm인 유리관(Clark electromed)을 두 번 당겨서 얻었다(2-5M  $\Omega$ ). 막전압 고정을 위해 Axopath 200A patch clamp amplifier(Axon Instrument, Inc.)를 사용하였고, 실험중 전기신호는 oscilloscope(Philips, PM-3335)와 chart recorder(Gould)에서 관찰하였다. 기록은 차후 분석을 위해 AD/DA converter (VR 10B)를 통해 기록하여 magnetic tape에 녹화하였다.

### 5. 통계처리

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

## 결 과

### 1. 형태학적 소견

대조군과 25 mM KCl을 첨가한 배양액으로 배양한 신경세포에 100  $\mu$ M, 500  $\mu$ M MnCl<sub>2</sub>를 48시간 처리한 후 형태학적인 소견을 위상차 현미경으로 관찰하였다. 25 mM KCl을 처리한 신경세포는 대조군과 형태학적인 차이를 보이지 않았으며, MnCl<sub>2</sub>를 함께 처리한 신경세포는

대조군에 비해 분절화 되어있고 염주와 같은 모양(fragmented, beaded shape)을 한 신경돌기들과 불규칙하고 거친 형태의 본체를 가진 퇴행성, 비활성화된 신경세포들이 관찰되었으며, MnCl<sub>2</sub> 처리농도가 높을수록 형태학적인 변화가 많이 일어났다(그림 1).

### 2. 세포활성도

대조군과 25 mM KCl을 첨가한 세포배양액에서 배양한 신경세포에 1  $\mu$ M에서 500  $\mu$ M MnCl<sub>2</sub>를 각각 48시간동안 처리한 후 세포활성도를 MTT assay로 측정하였다. MnCl<sub>2</sub>의 농도가 증가할수록 세포활성도는 감소하였으며, 100  $\mu$ M과 500  $\mu$ M MnCl<sub>2</sub>를 투여한 군에서 대조군에 비해 세포활성도가 각각 77.9 %, 72.8 %로 유의하게 감소하였다( $p<0.05$ )(그림 2).

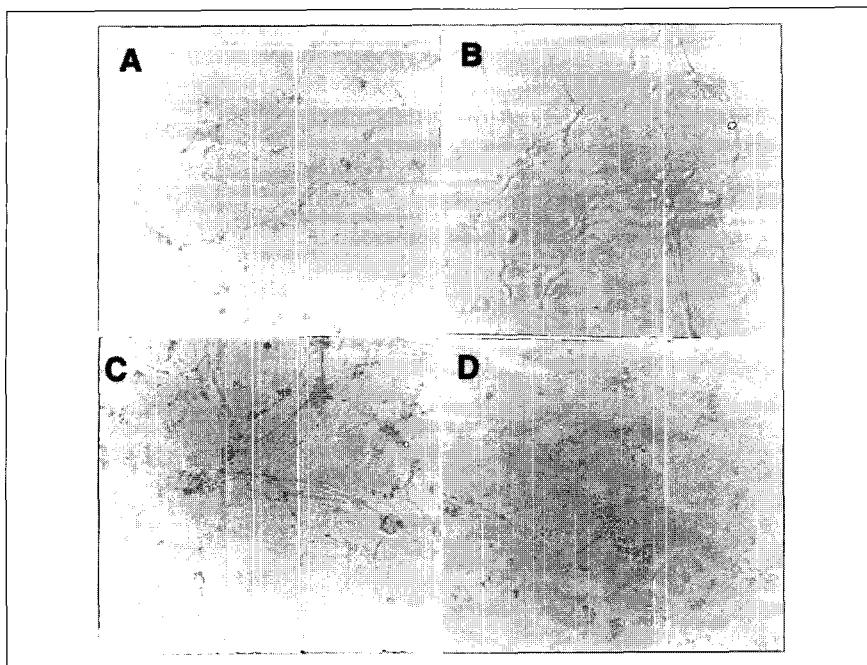
### 3. NOS(nitric oxide synthase) 활성도

#### 1) Nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) 농도

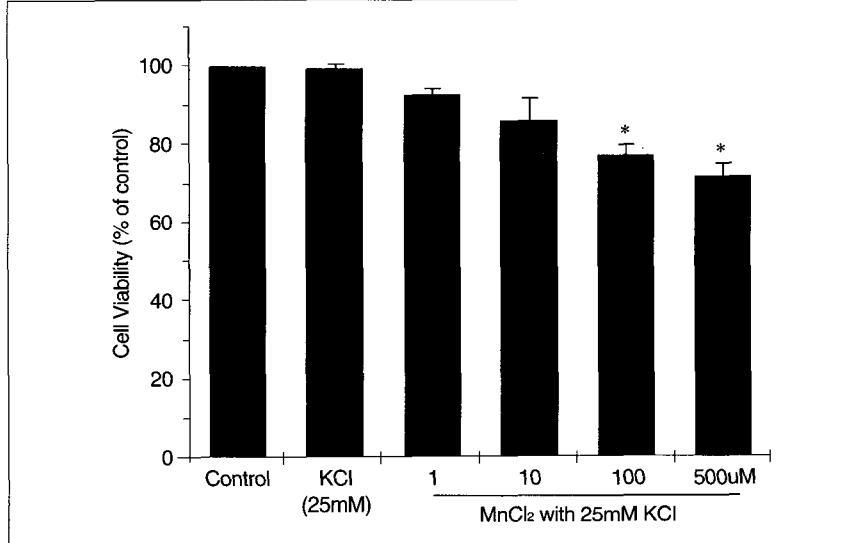
세포배양액에 존재하는 NO의 생성량을 간접적으로 측정하기 위하여 nitrite ( $\text{NO}_2^-$ )의 농도를 측정하였다. 25 mM KCl을 함유한 세포배양액으로 배양한 신경세포에 1  $\mu$ M에서 1 mM MnCl<sub>2</sub>를 각각 48시간 동안 처리한 후 nitrite의 농도를 측정한 결과 용량-반응에 의한 변화는 나타나지 않았으나, 500  $\mu$ M과 1 mM MnCl<sub>2</sub>에서 nitrite의 농도가 대조군 3.56  $\mu$ M에 비해 각각 6.76  $\mu$ M, 4.74  $\mu$ M로 높게 나타났으며, 통계학적으로 유의한 차이를 나타냈다( $p<0.05$ )(그림3).

#### 2) 면역형광법을 이용한 NOS 발현

500  $\mu$ M MnCl<sub>2</sub>를 48시간 동안 처리한 군에서 대조군에 비해 NOS발현 정도가 증가되어 나타났으며, 전체 세포중 NOS 발현율은 20-30 %로 대조군의 9%에 비해 높았으며 상대적인 강도 또한 대조군에 비해 높게 나타남을 관찰 할 수 있었다(그림4).



**Figure 1.** Photomicrographs of basal ganglia neuronal cell culture 48 h after treatment. (A) Control. (B) 25 mM KCl. (C) 100  $\mu$ M MnCl<sub>2</sub> and 25 mM KCl. (D) 500  $\mu$ M MnCl<sub>2</sub> and 25 mM KCl. Photomicrographs were taken randomly from culture wells and are representative of 3-5 determinations.



**Figure 2.** Reduction in cell viability of neurons following treatment with MnCl<sub>2</sub> at various concentrations for 48 h. Cell viability was measured by MTT assay. Columns and bars represent means  $\pm$  SEM ( $n=3$  or 5). \*  $P < 0.05$ : significant differences from control and KCl.

### 3) MnCl<sub>2</sub>의 세포독성에 대한 NOS 저해제의 영향

NOS 저해제에 의한 MnCl<sub>2</sub>의 세포독성에 대한 영향을 조사하기 위하여 NOS 저해제, N<sup>ω</sup>-Nitro-L-Arginine(L-NO-ARG)를 500  $\mu$ M MnCl<sub>2</sub>와 동일한 농도

로 동시에 48시간 동안 처리한 후 MTT 방법으로 세포활성도를 측정한 결과, 대조군에 비해 세포활성도가 MnCl<sub>2</sub> 단독 투여군은 72.8 %, L-NOARG와 MnCl<sub>2</sub> 동시 투여군은 92.2 %로 나타났으며, NOS 저해제가 MnCl<sub>2</sub>의 세포독성에 부

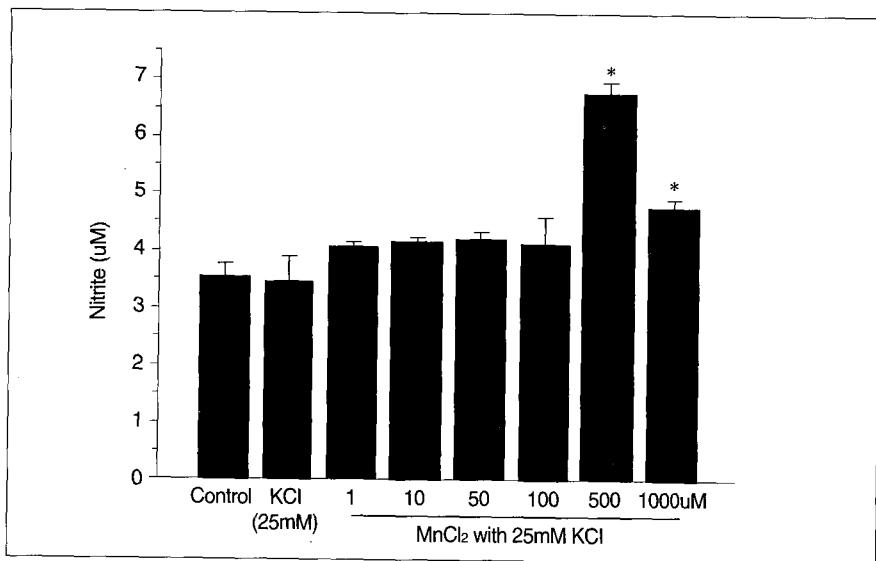
분적으로 방어효과가 있음을 관찰할 수 있었다(그림 5).

### 4. NMDA수용체에 대한 Mn<sup>2+</sup>의 영향

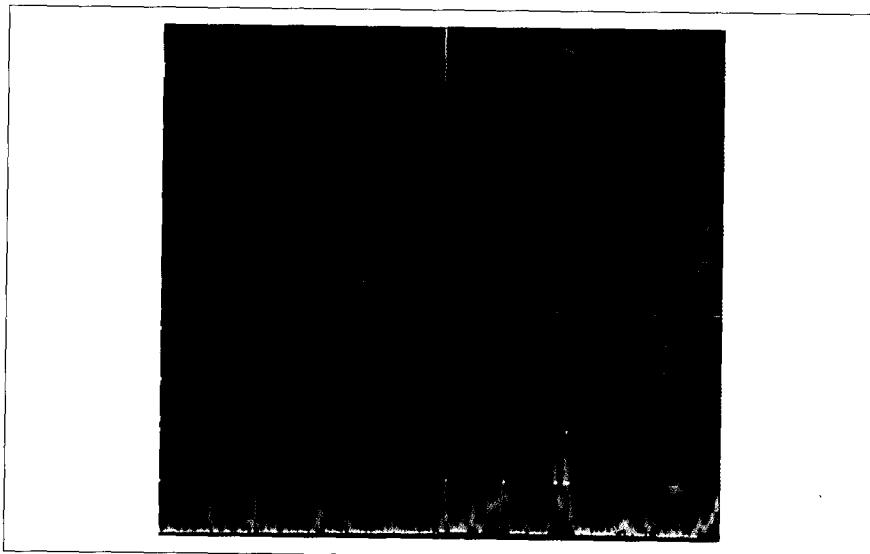
NMDA수용체에 대한 Mn<sup>2+</sup>의 영향을 알아보기 위하여 전기생리학적 분석을 실시하였다. 10  $\mu$ M NMDA를 투여시 내향전류(inward current)를 관찰할 수 있었으며, 10  $\mu$ M NMDA와 100  $\mu$ M MnCl<sub>2</sub>를 동시에 투여하였을 때 NMDA 내향전류가 먼저 나타나고 뒤이어 Mn<sup>2+</sup>의 내향전류가 나타나는 이분성(diphasic) 양상을 관찰할 수 있었다(그림 6). Mn<sup>2+</sup>에 의해 나타나는 내향성 전류가 일부 잔여의 NMDA의 가능성과 Ca<sup>2+</sup>의 내향전류일 가능성을 배제하기 위하여 다음 두 가지의 실험을 실시하였다. 먼저 Bath내에 0.5 mM Ca<sup>2+</sup>을 넣은 다음 MnCl<sub>2</sub>만 투여했을 때 Mn<sup>2+</sup>의 내향전류를 관찰 할 수 있었으며, 두번째 Bath내를 Ca-free로 만들었으며 추가로 EGTA를 사용하여 Ca<sup>2+</sup>의 영향을 완전 제거한 후 MnCl<sub>2</sub>를 투여했을 때 역시 내향전류를 관찰할 수 있었으므로 MnCl<sub>2</sub> 투여시 나타나는 내향전류가 Mn<sup>2+</sup>에 의한 내향전류임을 알 수 있었다. 또한 NMDA 수용체 차단제, APV를 사용하여 NMDA를 차단한 후 MnCl<sub>2</sub>를 투여했을 때 내향전류가 관찰 되었다. 이상의 결과로 Mn<sup>2+</sup>는 NMDA수용체를 활성화 시키는 것은 아니며, 또한 NMDA 수용체를 통하여 세포내로 유입되는 것은 아님을 관찰 할 수 있었다(그림 7).

## 고 찰

망간에 의한 신경세포의 손상은 Parkinson씨 병과 그 유사성이 있어 Cotzias (1961; 1966)는 ‘Parkinsonism은 만성 망간중독의 한 형태이다’라고 주장하였고, 망간의 중독 기전을 신경퇴행성질환의 모델로 삼은 많은 연구가 이루어져 왔으나 국내에서는 망간의 신경독성에 대한 중요성 조차 인식하지 못하고 있으며, 그에 대한 연구는 매우 부진한 실정이다. 따라서 망간중독에 의한 만성신경손상의



**Figure 3.** Nitrites release from neurons following treatment with  $MnCl_2$  for 48 h at various concentrations. Columns and bars are means  $\pm$  SEM(n=3). \* P <0.05 : significant difference from control and KCl.



**Figure 4.** Expression of NOS in cultured neurons. Cells were treated without (A) or with 500  $\mu M$   $MnCl_2$  (B) for 48 h in the growth media (neurobasal media containing 25mM KCl). Arrows indicate NOS expressing neurons. C and D shows relative intensities(spikes) of NOS expression. Bars= 50  $\mu m$ .

초기단계 병리기전을 파악함으로써 합리적인 예방대책과 관리대책 그리고 유효한 치료제 개발의 기반을 구축하고, 퇴행성 신경질환들의 공통적인 신경학적 표적경로를 찾아 퇴행성 신경장애 연구모델의 개발을 위하여 본 연구를 시행하였다.

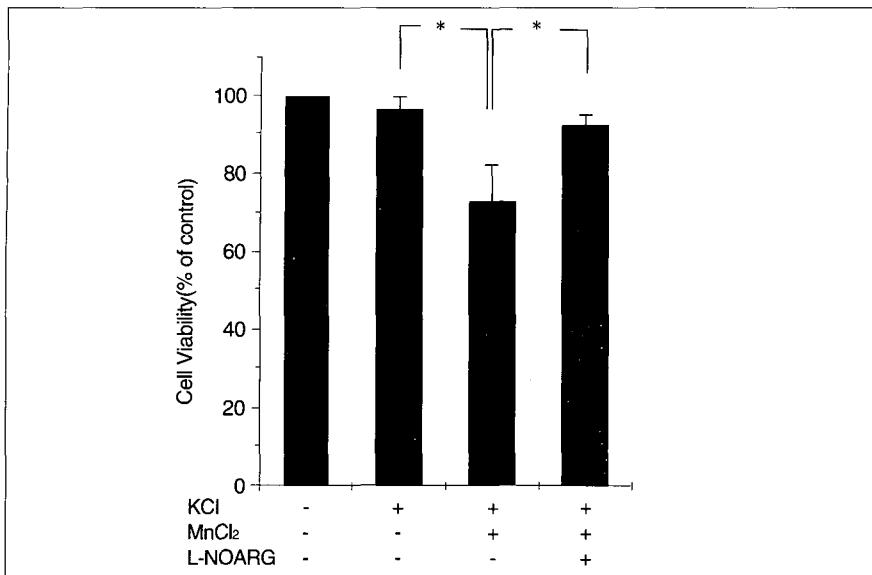
망간의 신경세포 손상기전은 여러 인자들이 복합적으로 작용하는 것으로 알려져 있다. 지금까지 알려진 손상의 기전은  $Mn^{2+}$ 이 세포내 사립체에 축적되어 사

립체내의  $Ca^{2+}$ 의 유입을 증가시켜 세포손상에 관여하며, dopamine의 autooxidation,  $Mn^{2+}$ 이 반응성 산소종(reactive oxygen species)의 생성을 자극하여 이들 반응성 산소종이 dopamin수용체나 dopaminergic cell, 그리고 dopamine에 직접적으로 작용하여(Graham, 1984) 손상을 초래하는 등의 가설이 있지만 아직 까지 망간에 의한 신경세포 손상기전을 확실하게 규명하지 못하고 있다.

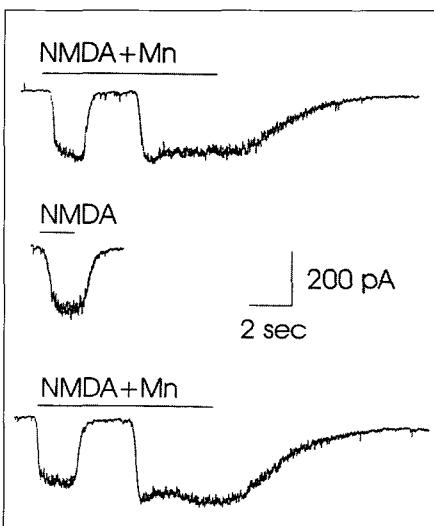
망간중독시  $Mn^{2+}$ 의 작용으로 세포질내  $Ca^{2+}$ 이 비정상적으로 증가되어 NOS를 활성화시키는 signal이 되어 NO의 합성이 촉진 될 것으로 추정된다. 그러므로 망간에 의한 독성에 NO가 신경세포에 손상을 주는 주요한 매개요인으로 작용할 것이라는 가설하에 본 실험을 실시하였다.

본 실험에서는  $MnCl_2$ 를 처리한 신경세포배양액에 존재하는 NO의 생성량을 간접적으로 측정하기 위하여 nitrite의 농도를 측정한 결과  $MnCl_2$ 를 1  $\mu M$ 에서 1 mM농도로 처리한 군에서는 처리 후 1시간 후부터 48시간 후 까지 대조군과 차이가 없었다. 그러나 25 mM KCl을 배양액에 첨가한 후  $MnCl_2$ 를 처리한 결과 500  $\mu M$ , 1000  $\mu M$   $MnCl_2$ 를 48시간 처리군에서 nitrite의 농도가 대조군에 비해 유의하게 증가되어 나타났다. 이러한 결과는  $Mn^{2+}$ 가 직접적으로 NOS를 활성화 시켜 NO의 생성을 자극하는 것은 아니며  $K^+$ 에 의한 세포내  $Ca^{2+}$ 의 증가상태에서  $Mn^{2+}$ 가 작용하여 서로 상호작용의 결과로 NO가 증가된 것으로 생각되며, Tholey 등(1990)의 세포내  $K^+$ 는 뇌 신경세포에서  $Ca^{2+}$ 의 uptake 활성화와 사립체내로의  $Mn^{2+}$ 의 유입을 촉진시키며, 세포내의  $Mn^{2+}$ 의 uptake와 accumulation의 조절역할에  $K^+$ 가 관여한다는 연구보고가 위 실험결과를 뒷받침해줄 수 있는 이론적인 근거가 된다. 승상애 등(1995)은 세포내  $Ca^{2+}$ 을 증가시킴에도 불구하고 NOS가 활성화 되지 않았거나, 활성화된 NOS가 어떤 원인에 의해 그 활성이 억제되었거나, NO가 생성되었더라도 소량이어서 독성에 영향을 미칠 만큼 free radical과의 반응을 일으키지 못했을 가능성으로 인해 NO가 독성에 매개되지 않는다고 하였으므로, 단지 세포내  $Ca^{2+}$ 을 증가 시킨다는 이유만으로 NO 생성이 증가되어 세포독성에 매개된다는 설명은 많은 제한점을 가질 수 있다.

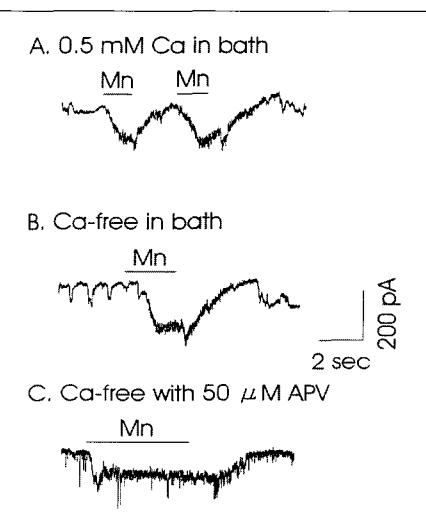
Barbeau(1984), Graham(1984) 그리고 Donaldson(1987)의 연구보고에 의하면  $Mn^{2+}$ 이 superoxide( $O_2^-$ ), hydrogen peroxide, hydroxyl( $OH^-$ ) free radical과 같은 반응성 산소종(reactive oxygen



**Figure 5.** NOS inhibition blocks MnCl<sub>2</sub> neurotoxicity. Control and 25 mM KCl /500 μM MnCl<sub>2</sub> treated neurons were incubated in the absence and presence of 500 μM N<sup>o</sup>-nitroarginine (L-NOARG) for 48 h n=5-7.  
\*P<0.05.



**Figure 6.** Sequential traces of whole-cell inward current showing effect of NMDA(10 μM) and Mn(100 μM) in a neuron of basal ganglia. V<sub>h</sub>=-65 mV, Mg-free, 1 μM glycine was added in bath.



**Figure 7.** Effect of Ca-free and/or APV-containing bath solution on 100 μM Mn-induced whole-cell current in a neuron of basal ganglia. V<sub>h</sub>=-65 mV, Mg-free, 1 μM glycine was added in bath.

species)의 생성을 자극하며, 이들이 세포독성을 일으킨다고 하였으므로, Mn<sup>2+</sup>에 의해 생성된 free radical들과 NO가 결합하여 신경세포에 손상을 일으킬 수 있을 것이다. 그러므로 추후 Mn에 의한 free radical의 생성과 NO의 결합으로 나타나는 peroxynitrite에 대한 연구가 필요할 것으로 생각한다.

본 실험에서 면역형광법을 이용하여 nitrite가 대조군보다 높게 측정된 500 μM MnCl<sub>2</sub> 처리군에서 NOS의 활성을 관찰한 결과 대조군보다 NOS의 발현율과 상대적인 발현강도가 높게 나타나는 것을 관찰할 수 있었다. 또한 NOS 저해제로 알려진 N<sup>o</sup>-nitro-L-arginine를 이용하여 500 μM MnCl<sub>2</sub> 처리군의 신경세포독

성에 대한 NOS저해제의 효과를 관찰한 결과 NOS 저해제 처리군에서 세포활성도가 유의하게 높게 나타났다. 이상의 결과는 Mn<sup>2+</sup>가 어떠한 기전을 통하는지 명확히 설명할 수 없지만 기저핵 신경세포 배양 모델에서 NOS를 활성화 시켜 NO의 생성을 증가시키며, 그 증가된 NO가 Mn<sup>2+</sup> 신경세포독성을 매개한다는 증거를 제시해 주는 것이다.

NO의 생성과 관련성이 있는 NMDA 수용체에 대한 Mn<sup>2+</sup>의 영향을 알아보기 위하여 전기생리학적인 분석을 실시한 결과 Mn<sup>2+</sup>는 NMDA수용체를 차단하거나 활성화 시키는 영향은 관찰할 수 없었으며 Mn<sup>2+</sup>이 NMDA수용체를 통하여 세포내로 유입되지 않는다는 것을 관찰할 수 있었다. Mn<sup>2+</sup>에 의해 나타난 내향성 전류는 facilitated diffusion 기전(Wedler 등, 1989)이나 calcium channels(Anderson, 1983)을 통해 세포내로 유입되는 것으로 생각된다. 그러나 생리학적인 수준인 10 μM, 그리고 100 μM Mn<sup>2+</sup>에서 NMDA수용체에 대해 전기생리학적으로 차단효과를 보고하였으며 이는 전압의존성으로 나타난다는 연구보고가(Ascher와 Nowak, 1988) 있으므로 본 실험에서 나타난 Mn<sup>2+</sup>의 NMDA수용체에 대한 연구는 추후 Mn<sup>2+</sup> 농도별, current-voltage relation, 그리고 Ca<sup>2+</sup>농도에 따른 변화 등에 관한 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

이상의 결과는 Mn<sup>2+</sup>가 NMDA 수용체를 통하여 세포내로 Ca<sup>2+</sup>를 유입 시켜 NOS를 활성화 시켜 NO를 생성하는 경로를 통하지 않는다는 것을 알 수 있으며, 기존의 NO생성의 경로가 아닌 세포내의 저장된 Ca<sup>2+</sup>를 세포질내로 유리시켜 NO의 생성에 관여하는 것으로 유추해 볼 수 있다. 추후 대사지향성(metabotropic)수용체를 자극하여 세포내 칼슘저장고인 세포질세망(ER)으로부터 칼슘을 유리시켜 세포질내 칼슘의 농도를 증가시키는 quisqualate에 특이적으로 반응하는 수용체(Kocher와 Zivin, 1988; Berridge와 Irvine, 1989)에 대한 Mn<sup>2+</sup>의 작용을 밝혀야 할 것으로 생각된다.

본 실험에 사용된 신경세포는 대뇌 기저핵을 분리하여 배양한 세포로서 망간이 대뇌에서 우선적으로 축적되는 부위로 알려져 있어 이용되었다. 그러나 기저핵은 여러부위의 결합체로서 신경세포의 물질 분비기능이나 형태학적인 차이 등으로 인해 신경세포의 기능적인 측면을 고려하지 않았기 때문에 망간에 의한 신경세포독성에 NO의 매개 유무만을 실험하게 되었다. 또한 본 실험에서 NO의 매개에 의한 망간의 신경세포독성에 대한 실험에서 고농도의 망간에 의해 NO의 생성이 차이가 났기 때문에 실제적인 망간중독의 병리기전에 적용하는데 제한이 따를 수 있다. 그러나 세포배양 모델의 장점은 *in vivo*로 실험에 불가능한 농도나 방법을 적용할 수 있다는 점에서 중금속의 중독모델을 개발하는데는 적합한 방법으로 생각된다.

실제로 이가 양이온들은 서로 상호작용을 통해서 그 효과를 나타내며 특히 퇴행성 신경변성 질환에는 인체에 필수 금속이온들  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ 등이 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있으므로, 2가 양이온들의 특성과 이들의 상호관련성에 대한 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

이상의 실험결과는 망간 신경세포독성 기전에 NO가 부분적으로 매개 되며 망간에 의한 NO의 생성이 NMDA수용체와 연관성이 없다는 것을 제시해 준다.

## 결 론

본 실험은 대뇌기저핵의 신경세포를 배양하여  $\text{MnCl}_2$ 를 투여한후 세포독성을 MTT방법으로 측정하였다. L-arginine으로부터 NO를 합성하는 효소인 NOS의 활성도를 형태학적으로 관찰하기 위하여 면역형광법을 이용하였다. 또한 세포배양 액에 존재하는 nitrates ( $\text{NO}_3^-$ )의 양을 측정하여 NO를 간접적으로 유추하였으며, NOS 저해제를 사용하여  $\text{Mn}^{2+}$ 의 세포독성에 대한 영향을 조사함으로써 망간의 신경세포 손상에 NO가 매개되는지를 규명하였다. 또한 NMDA수용체에 대한

$\text{MnCl}_2$ 의 영향을 전기생리학적으로 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

배양한 신경세포에 25 mM KCl과  $\text{MnCl}_2$ 를 처리한 군은 대조군에 비해 분절화되어있고 염주와 같은 모양을 한 신경돌기들과 불규칙하고 거친 형태의 본체를 가진 퇴행성, 비활성화된 신경세포들이 관찰되었으며,  $\text{MnCl}_2$  처리농도가 높을수록 이러한 형태학적인 변화가 많이 관찰되었다.

$\text{MnCl}_2$ 의 농도가 증가할수록 세포활성도는 감소하였으며, 100  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$ 를 이상의 농도군에서 대조군에 비해 세포활성도가 감소하였다( $p<0.05$ ).

25 mM KCl을 함유한 세포배양액으로 배양한 신경세포에 500  $\mu\text{M}$  이상의  $\text{MnCl}_2$  농도를 투여한 군에서 nitrite의 농도가 대조군에 비해 가장 높게 나타났으며 통계학적으로 유의한 차이를 나타냈다( $p<0.05$ ). 또한 NOS 발현이 500  $\mu\text{M}$   $\text{MnCl}_2$ 를 처리한 군에서 대조군에 비해 증가되어 나타났으며, NOS발현율은 20-30%로 대조군의 9%에 비해 높았으며, 상대적인 강도 또한 대조군에 비해 높게 나타남으로서 NO의 증가와 NOS의 발현 정도가 일치하는 소견을 보였다.

$\text{MnCl}_2$ 의 신경세포독성에 대한 NOS 저해제의 영향 조사한 결과, NOS저해제,  $\text{N}^{\text{G}}\text{-Nitro-L-Arginine(L-NOARG)}$ 이  $\text{MnCl}_2$  신경세포독성에 부분적으로 방어효과가 있음이 관찰되었다.

NMDA수용체에 대하여  $\text{Mn}^{2+}$ 는 NMDA수용체를 활성화시키지 않으며, 또한 NMDA수용체를 통하여  $\text{Mn}^{2+}$ 가 세포내로 유입되지 않는다는 것을 관찰 할 수 있었다.

이상의 실험은 망간 신경세포독성기전에 NO가 부분적으로 매개 되며 망간에 의한 NO의 생성이 NMDA수용체와 연관성이 없다는 것을 제시해 준다.

## 참고문헌

- 송상애, 김대병, 윤여표, 정진호. Menadione에 의한 흰쥐 혈소판 세포독성에서 nitric oxide의 역할. 한국독성학회지 1995; 11(2): 303-308

홍영습, 임명아, 이용희, 정해관, 김지용 등. 용접공에서 발생한 망간증독증. 대한산업의학회 초록집, 1996, 53쪽

Anderson M.  $\text{Mn}^{2+}$  ions pass through  $\text{Ca}^{2+}$  channels in myoepithelial cells. *J Exp Biol* 1979; 82: 227-238

Anderson M. Mn ions pass through calcium channels: A possible explanation. *J Gen Physiol* 1983; 81: 805-827

Aschner M, Aschner JL. Manganese neurotoxicity: Cellular Effects and Blood-Brain Barrier Transport. *Neurosci Biobehav Rev* 1991; 15: 333-340

Aschner P, Nowak L. The role of divalent cations in the N-methyl-D-aspartate responses of mouse central neurones in culture. *J physiol* 1988; 399: 247-266

Barbeau A. Manganese and extrapyramidal disorders. *Neurotoxicol* 1984; 5: 13-36

Beckman JS, Beckman TW, Chen J. Apparent hydroxyl radical production by peroxy nitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 1620-1624

Berridge MJ, Irvine RF. Inositol phosphate and cell signaling. *Nature* 1989; 341: 197-255

Braitman DJ, Coyle JT. Inhibition of 3H-kainic acid receptor binding by divalent cations correlates with ion affinity for the calcium channel. *Neuropharmacol* 1987; 26: 1247-1251

Chance B. The energy-linked reaction of calcium with mitochondria. *J Biol Chem* 1965; 240: 2729-2748

Collingridge GL, Watkins JC. The NMDA Receptor: Non-competitive antagonists of N-methyl-D-aspartate, Lodge D, Jones M, Fletcher E 2nd eds Oxford University Press, New York, 1994, p105-131

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

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

Crow JP, McCord JM. Oxidative inactivation of the zinc-thiolate in yeast. *Biochemistry* 1995; 34: 3544-3552

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

Evans RH, Francis AA, Watkins JC.  $\text{Mg}^{2+}$  like antagonism of excitatory amino acid-induced responses by -diaminopimelic acid, D- amino adipate and HA-966 in isolated spinal cord of frog and immature rat. *Brain Res* 1978; 148: 536-542

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
- Gunter TE, Puskin JS, Russell PR. Quantitative magnetic resonance studies of manganese uptake by mitochondria. *Biophys J* 1975; 15: 319-333
- Kader A, Fazzini VI. Nitric oxide Production during focal cerebral ischemia in rats. *Stroke* 1993; 24: 1709-1716
- Kiedrowski L, Costa E. Glutamate receptor agonists stimulate nitric oxide synthase in primary cultures of cerebellar granule cells. *J Neurochem* 1992; 58: 335-341
- Kocher A, Zivin JA. Glutamate antagonist therapy reduces neurologic deficits produced by focal central nervous system ischemia. *Arch Neurol* 1988; 45: 148-153
- Konji V, Montag A, Sandri G, Nordenbrand K, Ernster L. Transport of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mn}^{2+}$  by mitochondria from rat liver, heart, brain. *Biochimie* 1985; 67: 1241-1250
- Lafon-Cazal M, Pietri S. NMDA-dependent superoxide production and neurotoxicity. *Nature* 1993; 364: 535-537
- Liccione JJ, Maines DM. Manganese-mediated increase in the rat brain mitochondrial cytochrome P-450 and drug metabolism activity: susceptibility of striatum. *J Pharmacol Exp Ther* 1989; 248: 222-228
- Mena I, Marin O, Fuenzalida S, Cotzias GC. Chronic manganese poisoning. *Neurology* 1967; 17: 1123-1129.
- Mino-Golomb D, Tsarfaty I. Expression of inducible nitric oxide synthase by neurones following exposure to endotoxin and cytokine. *Br J Pharmacol* 1994; 112: 720-722
- Narita K, Kawasaki F, Kita H. Mn and Mg influxes through Ca channels of motor nerve terminals are prevented by verapamil in frogs. *Brain Res* 1990; 510: 289-295
- Politis MJ, Schaumburg HH, Spencer PS. Neurotoxicity of selected chemicals. In: Spencer PS, Schaumburg HH, ed. Experimental and clinical neurotoxicology Baltimore, MD: Williams & Wilkins, 1980. p. 618-619
- Radi R, Beckman JS. Peroxynitrite-mediated sulphydryl oxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem* 1991; 266: 4244-4250
- Tholey G, Megias-Megias L, Wedler FC, Ledig M. Modulation of  $\text{Mn}^{2+}$  accumulation in cultured rat neuronal and astroglial cells. *Neurochem Res* 1990; 15(7): 751-754
- Wedler FC, Ley BW, Grippo AM. Manganese(II): dynamics and distribution in glial cells cultured from chick cerebral cortex. *Neurochem Res* 1989; 14: 1129-1135