

흰생쥐신경아종세포계열 N18TG2에 미치는 로테논의 신경독성에 대한 연구

류은혜, 한경애

위대한 령도자 김정일동지께서는 다음과 같이 지적하시였다.

《...의학과학의 새로운 분야를 개척하며 최신과학기술의 성과를 치료예방사업에 받아들이기 위한 연구사업을 힘있게 벌려야 합니다.》(《김정일선집》 제11권 증보판 81~82페이지)

최근년간 로화와 함께 동반되는 여러가지 신경퇴화성질환들에서 신경세포의 사립체 기능저하가 가장 중요한 발병원인의 하나로 주목되고있다.

사립체호흡사슬복합체 I의 특이적인 저해제로서 인체내에 흡수되어 파킨슨병을 일으키는 환경독소로 인정되고있는 로테논은 새로운 신경보호물질의 탐색과 개발을 위한 동물 및 세포모형계조성에 리용되고있다.[1]

우리는 흰생쥐신경아종세포계열인 N18TG2를 리용한 로테논신경독성모형계를 조성하기 위하여 사립체에서의 활성산소발생, 그로 인한 산화적스트레스와 아포토시스유발에 미치는 로테논의 영향을 보았다. 로테논의 신경독성작용에 대하여 구체적으로 연구된 자료는 발표된것이 없다.

재료 및 방법

흰생쥐신경아종세포계열인 N18TG2는 2mmol/L 글루타민, 2mmol/L 피루빈산, 2% B27을 포함한 DMEM배지(무색)를 리용하여 5% CO₂, 37°C에서 배양하였다.

세포생존률은 MTT법[2]과 PI염색법[3]으로 평가하였다. PI염색은 48h동안 배양한 세포에 7μg/ml의 PI(propidium iodide)를 37°C에서 5min간 처리하는 방법으로 진행하였다.

세포내활성산소(ROS)발생량은 검은색96공판에서 24h동안 배양하고 로테논처리한 세포를 5μmol/L 5μmol/L의 H₂DCF-DA(dichlorofluorescein diacetate)로 37°C에서 5min간 물들인 후 형광세기측정장치(TECAN)를 리용하여 정량[4]하였다.

기름질과산화정도는 48h동안 배양한 세포를 모아 용균완충액(50mmol/L 트리스, 150mmol/L NaCl, 1% 데옥시콜산나트륨, 1mmol/L EDTA, 1% 트리톤 X-100, 0.1% SDS, pH 7.4)속에서 3s씩 2회 초음파처리(《SonoplusBandelin GM70》)한 후 TBA법[3]으로 측정하였다.

아포토시스유발정도는 36h동안 배양한 세포에 로테논을 처리한 다음 1μg의 DAPI(4', 6-diamidino-2-phenylindole)로 37°C에서 10min간 물들이고 형광현미경(《Nikon Diaphot 300》, ×100)상에서 평가하였다.[2]

웨스턴블로팅은 선행방법[5]에 준하여, 단백질정량은 BCA단백질분석키트(《Thermo Scientific》)를 리용하여 진행하였다.

실험에 리용한 모든 시약들은 《Roche》, 《Sigma-Aldrich》, 《Biorad》, 《Invitrogen》, 《GE Healthcare》에서 구입한 표품들이었으며 모든 실험값들은 네번의 독립적인 배양실험에서 얻은 평균값과 그 표준오차(SEM)로 표시하였다.

결과 및 고찰

1) N18TG2세포의 생존률에 미치는 로테논의 영향

MTT법을 리용하여 N18TG2세포의 생존률에 미치는 로테논의 영향을 검토한 결과는 그림 1과 같다.

그림 1에서 보는바와 같이 N18TG2세포의 생존률은 로테논의 농도를 높임에 따라 250nmol/L까지는 급격히(240nmol/L에서 51.3%), 그이상의 농도에서는 완만하게 감소하였다.(520nmol/L에서 41.2%)

우리는 로테논치리에 의한 세포손상정도를 죽은 세포안에만 침착되는 형광색소인 PI를 리용하여 확인하였다.(그림 2)

그림 2에서 보는바와 같이 200nmol/L의 로테논으로 48h동안 처리하면 PI로 염색되는 세포수가 급격히 증가하며 그로 인한 형광세기 117%로 높아진다.

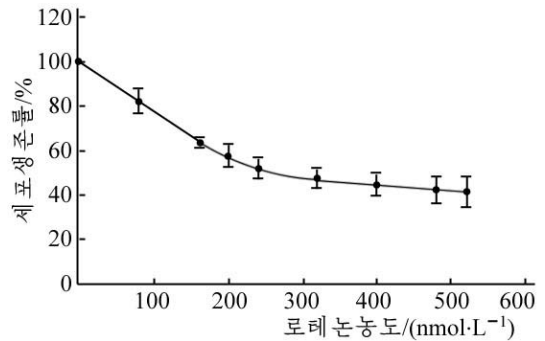


그림 1. N18TG2세포의 생존률에 미치는 로테논의 영향

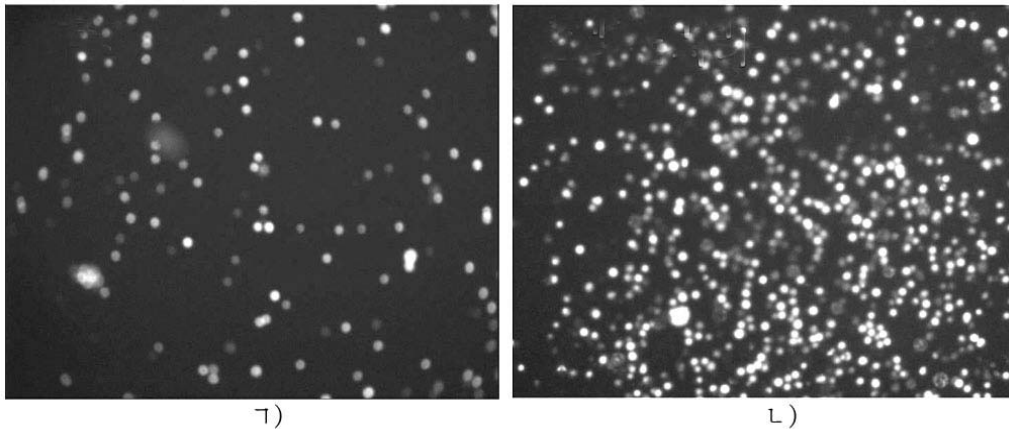


그림 2. PI염색에 미치는 로테논의 영향
1) 대조구, 2) 로테논처리구

이로부터 우리는 로테논치리에 의한 세포생존률감소가 로테논의 세포죽임효과와 증식억제효과를 함께 반영한다는것을 예측할수 있었다.

2) N18TG2세포의 ROS생성에 미치는 로테논의 영향

우리는 N18TG2세포에 로테논을 처리할 때 세포내에서 발생하는 ROS량을 H₂DCF-DA가 산화되어 생기는 DCF의 형광세기증가로 평가한 결과는 그림 3, 처리농도에 따르는 ROS

발생량의 변화는 그림 4와 같다.

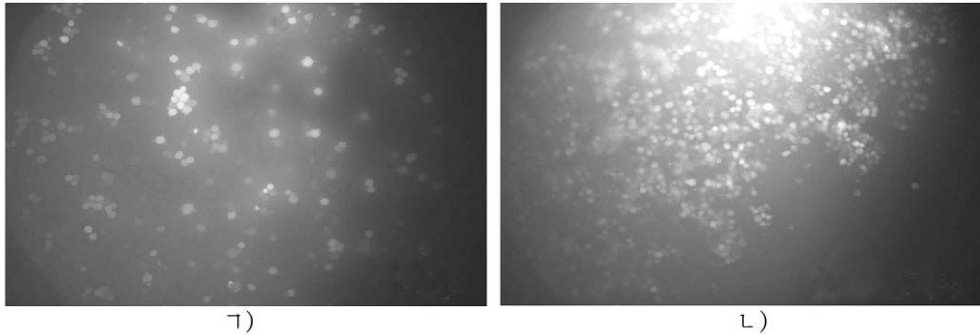


그림 3. N18TG2세포의 ROS생성에 미치는 로테논의 영향
1) 대조구, 2) 로테논처리구

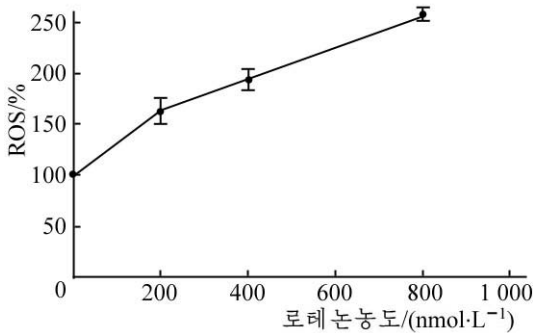


그림 4. 세포내ROS생성에 미치는 로테논의 영향

그림 4에서 보는바와 같이 로테논의 처리 농도를 높일 때 세포내ROS량은 거의 선형적으로 증가하여 800nmol/L의 농도에서는 대조에 비하여 257%로 높아졌다. 이것은 로테논이 호흡사슬복합체 I의 특이적저해제로서 사립체안에서 전자전달을 차단하여 ROS의 생성을 촉진한다는것을 명백히 보여준다.

3) N18TG2세포의 기름질과산화에 미치는 로테논의 영향

비롯한 세포를 이루는 구성성분들에 대한 산화적손상을 일으킨다. ROS에 의한 기름질과산화손상정도를 말론디알데히드(MDA)를 비롯한 티오바르비투르산반응성물질(TBARS)의 함량변화로써 평가한 결과는 그림 5와 같다.

그림 5에서 보는바와 같이 400nmol/L의 로테논으로 48h 동안 처리할 때 N18TG2세포배양물에서 TBARS함량은 대조에 비하여 182%로 높아진다. 이것은 로테논에 의하여 사립체에서 생성된 ROS가 사립체막과 내질망, 원형질막을 비롯한 세포내 막기름질들의 과산화손상을 일으킨다는것을 보여준다.

생성된 ROS는 기름질과 단백질, 핵산을

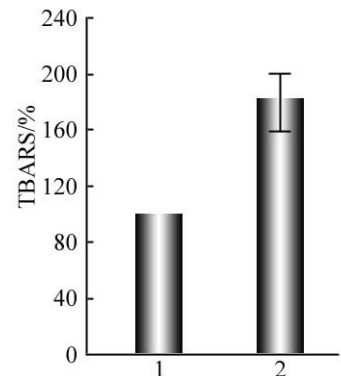


그림 5. N18TG2세포의 기름질과산화에 미치는 로테논의 영향
1-대조구, 2-로테논처리구

4) 로테논처리에 의한 사립체단백질량의 감소

웨스턴블로팅법으로 세포질 및 사립체단백질량에 미치는 로테논의 영향을 검토한 결과는 그림 6과 같다.

그림 6에서 보는바와 같이 200nmol/L의 로테논을 첨가하고 48h동안 세포를 배양할 때 β -악틴이나 글리세르알데히드-3-린산수소효소(GAPDH), 신경세포특이성 β -튜불린(TuJ-1)과 같은 세포질성단백질의 양에서는 변화가 없지만 사립체에 존재하는 탈공액단백질(UCP) 2, 호박산수소효소아단위 A(SDHA), 전압

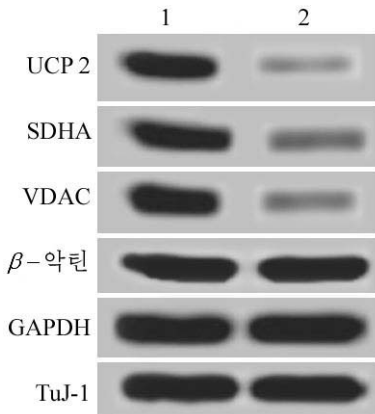


그림 6. 사립체단백질량변화에 미치는 로테논의 영향
1-대조구, 2-로테논처리구

의존성음이온수송체(VDAC)들은 모두 대조에 비하여 뚜렷이 감소되었다. 이것은 로테논의 존재하에 자란 세포들에서 사립체수의 감소 즉 파괴가 일어났다는것을 보여준다.

5) 로테논처리에 의한 N18TG2세포의 아포토시스유발
N18TG2세포에 대한 로테논처리때 아포토시스가 일어나는 정도를 DAPI염색법으로 평가하여보았다.(그림 7)

그림 7에서 보는바와 같이 로테논처리구(400nmol/L, 24h)에서는 두오리DNA사슬과 특이적으로 결합하는 형광물질인 DAPI의 염색정도가 불균일하게 나타났다. 이것은 아포토시스과정의 기본특징인 물들체의 응축과 핵의 크기 감소 및 단편화를 반영한것이다.

우리의 실험결과들은 호흡사슬복합체 I저해제인 로테논이 사립체에서 활성산소산생을 촉진하여 막기름질을 비롯한 세포구성성분들의 산화적손상을 일으키며 사립체자체를 파괴하여 아포토시스를 일으킴으로써 신경세포에 대한 독성을 나타낸다는것을 보여주었다.

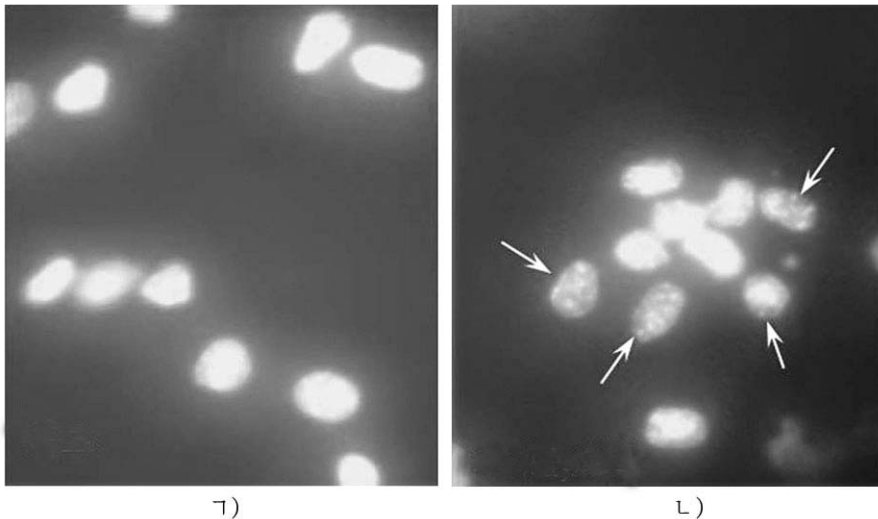


그림 7. 로테논처리에 의한 N18TG2세포의 아포토시스유발
1) 대조구, 2) 로테논처리구

맺는 말

1) 로테논은 농도에 의존하여 흰생쥐신경아종세포계열 N18TG2의 생존률을 감소시키며 48h동안 처리할 때 LD₅₀값은 250nmol/L정도이다.

2) 로테논의 처리농도를 800nmol/L까지 높일 때 세포내ROS량은 거의 선형적으로 증가하며 그 결과 기름질과산화산물인 TBARS함량은 182%로 높아진다.

3) 로테논처리는 전반적사립체단백질량을 감소시키며 종국적으로 아포토시스를 유발시킨다.

참 고 문 헌

- [1] Ricardo Cabezas et al.; *Neuros. Res.*, 74, 80, 2012.
- [2] Zhong-Wei Sun et al.; *Neuros. Bull.*, 26, 1, 8, 2010.
- [3] O. P. Lisiane et al.; *Neuros. Lett.*, 299, 217, 2001.
- [4] V. Antonio et al.; *Free Rad. Biol. Med.*, 36, 9, 1112, 2004.
- [5] A. Rupprecht et al.; *PLoS ONE*, 7, 8, 1, 2012.

주체103(2014)년 3월 5일 원고접수

Rotenone-Induced Neurotoxicity in Mouse Neuroblastoma Cell Line N18TG2

Ryu Un Hye, Han Kyong Ae

Rotenone, a specific inhibitor of mitochondrial respiratory chain complex I, is considered as an environmental toxin which induces the characteristic of Parkinson's disease(PD) in human and it has been used to make animal & cellular model for search and development of neuroprotective compounds.

To make rotenone-induced neurotoxic model using mouse neuroblastoma cell line N18TG2, we investigated the effect of rotenone on the production of reactive oxygen species(ROS), the induction of oxidative stress and further apoptosis.

Rotenone reduced viability of N18TG2 cells in a concentration-dependant manner and its LD₅₀ for 48h was 250nmol/L. The production of intracellular ROS increased in proportion of rotenone concentration to 800nmol/L and it resulted in increased level of lipid peroxidation to 180%. The exposure of the N18TG2 cells to rotenone induced loss of general mitochondrial proteins and finally apoptosis.

Key words: rotenone, neurotoxicity