

Brain-derived neurotrophic factor가  
도파민 함유 신경세포의 생존에  
미치는 영향

연세대학교 대학원

의과학사업단

김 시 연

Brain-derived neurotrophic factor가  
도파민 함유 신경세포의 생존에  
미치는 영향

지도 임 중 우 부교수

이 논문을 박사 학위논문으로 제출함

2001년 6월 일

연세대학교 대학원

의과학사업단

김 시 연

# 김시연의 박사 학위논문을 인준함

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

심사위원\_\_\_\_\_인

연세대학교 대학원

2001년 6월 일

## 감사의 글

본 논문을 완성함에 있어 늘 자상한 지도를 베풀어 주신 임중우 교수님께 진심으로 감사드립니다. 연구의 시작부터 완성까지 각별한 관심과 지도편달로 이끌어 주시며 수고를 아끼지 않으신 연동수 교수님께 깊은 감사의 말씀을 올립니다. 또한 연구 진행동안 자상한 배려와 지도를 베풀어 주신 남택상 교수님께 머리숙여 감사드리오며 바쁘신 와중에서도 조언의 말씀으로 이끌어 주신 박국인 교수님, 백자현 교수님께도 진심으로 감사드립니다.

아울러 본 실험을 진행하는 데에 있어 저자의 부족한 점을 언제나 최선을 다해 도와주신 생리학교실 모든 선생님들께 깊이 감사드립니다.

저의 오늘이 있기까지 늘 격려해 주시며 무한한 사랑을 베풀어 주시는 할머니님과 부모님, 그리고 사랑하는 남편께 이 논문을 바칩니다.

저 자 씀

# 차 례

국문요약 .....	1
I. 서 론 .....	2
II. 재료 및 방법 .....	3
1. Ventral mesencephalon으로부터 신경세포의 배양 .....	3
2. Brain-derived neurotrophic factor 처리 .....	4
3. 면역화학 염색방법 .....	4
4. 세포수 측정 .....	4
5. Western blot .....	4
III. 결 과 .....	5
1. 배양된 mesencephalic 신경세포의 특징 .....	5
2. BDNF가 배양된 TH 양성 신경세포의 성숙에 미치는 효과 .....	6
3. BDNF가 배양된 TH 양성 신경세포의 생존에 미치는 효과 .....	7
4. Western blot 결과 .....	9
IV. 고 찰 .....	10
V. 결 론 .....	12
참고문헌 .....	12
영문요약 .....	16

## 그림 차례

- Fig. 1.** Phase-contrast microscopic appearance of ventral mesencephalic cells on 7 day culture ( $\times 100$ ) .....5
- Fig. 2.** Light-microscopic appearance of immunochemically stained TH-positive neurons ( $\times 200$ ) .....6
- Fig. 3.** Effect of BDNF on differentiation of TH-positive neurons .....6
- Fig. 4.** Dual effects of BDNF on the survival of TH-positive neurons .....7
- Fig. 5.** Quantification of TH-positive neurons in ventral mesencephalic cultures of various BDNF concentrations .....8
- Fig. 6.** Western blot analysis of tyrosine hydroxylase in the extract from ventral mesencephalic culture of BDNF-free and BDNF-containing medium .....9

## 국문요약

### Brain-derived neurotrophic factor가 도파민 함유 신경세포의 생존에 미치는 영향

BDNF가 도파민 함유 신경세포에 미치는 영향에 대해서는 세포의 생존율을 증가시키거나 혹은 세포손상을 가속화시킨다는 두 가지 상반된 보고들이 있다. 즉, BDNF는 생체 외에서 태생 mesencephalic 신경세포의 생존과 분화를 촉진시키고, 선택적으로 도파민 함유 신경세포에 독성을 나타내는 MPTP와 6-OHDA의 작용을 억제하는 것으로 알려져 있다. 반면 BDNF를 원추 선조체에 주입하면 오히려 parkinsonism이 유발되는 등 도파민 함유 신경세포에 미치는 toxic effect에 대해서도 많은 보고들이 있다.

이러한 차이가 병변부위의 국소적인 BDNF의 농도차이에 의한 것이라는 가정하에 본 실험에서는 태아 14일째의 원추태아 중뇌 조직으로부터 배양된 TH 양성 신경세포의 생존율이 BDNF의 농도에 따라 영향을 받는지를 보고자 하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)는 tyrosine hydroxylase (TH) 양성 신경세포의 성숙을 촉진하였다.
2. BDNF 100 ng/ml의 농도까지는 배양시 TH 양성 신경세포의 생존율이 증가하였으나, 300 ng/ml BDNF 농도에서 배양할 때는 TH 양성 신경세포의 생존율이 감소하였다.
3. BDNF 50 ng/ml의 농도에서 중뇌 세포를 배양할 때는 TH 양성 신경세포의 세포내 TH 함량이 증가하였다. 그러나 300 ng/ml BDNF 농도에서는 TH 양성 신경세포의 세포내 TH 함량이 감소하였다.

이상의 실험결과로 BDNF는 100 ng/ml의 농도까지는 태아원추 중뇌 조직으로부터 배양한 TH 양성 신경세포의 생존율을 증가시키나, 300 ng/ml의 고농도에서는 TH 양성 신경세포의 생존율을 감소시키는 농도의존적 특성이 있음을 알 수 있었다.

---

핵심되는 말: dopamine 신경세포, brain-derived neurotrophic factor, 신경세포 생존율, 성숙

# Brain-derived neurotrophic factor가 도파민 함유 신경세포의 생존에 미치는 영향

<지도 임 중 우 부교수>

연세대학교 대학원 의과학사업단

김 시 연

## I. 서 론

Parkinson's disease는 만성 퇴행성 질환<sup>1</sup>의 하나로써 중뇌 흑질에 있는 도파민 함유 신경세포의 손상으로 인하여 발생하는 것으로 알려져 있다. 이 질환의 병리학적 특징은 남아있는 흑질의 도파민 함유 신경세포 내에 Lewy bodies가 존재하며<sup>2</sup> glia의 활성화가 동반된다는 것이다.<sup>3</sup> 또 oxidative stress,<sup>4</sup> mitochondria complex I의 기능이상,<sup>5</sup> 과다한 iron 축적<sup>6</sup> 등이 이 병의 진행과정에서 나타나는 변화들이다. 이러한 신경 병리학적, 생화학적 발견에도 불구하고 Parkinson's disease환자에서 중뇌 흑질의 도파민 함유 신경세포가 사멸되는 원인과 기전은 아직 규명되어 있지 않다. 도파민 함유 신경세포의 사멸이 나이가 들어감에 따라 나타나는 신경세포의 손상의 결과인지, 신경세포 손상을 가속화시키며 진행되는 병리학적 과정인지는 논란의 여지가 많다. Parkinson's disease의 병리생태학적 기전을 이해하기 위해서는 우선 도파민 함유 신경세포가 손상 또는 사멸되는 원인을 밝히는 것이 중요하다.

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)는 nerve growth factor (NGF) 등을 포함한 neurotrophic factor군의 하나로, 성숙된 쥐와 인간의 흑질에 있는 도파민 함유 신경세포에서 생성된다.<sup>7-10</sup> 또 도파민 함유 신경세포는 BDNF의 high affinity receptor인 Tyrosine kinase receptor B (TrkB) mRNA<sup>11,12</sup>와 단백질<sup>7</sup>을 발현한다. 그러므로 도파민 함유 신경세포는 BDNF에 대해 autocrine effect를 가지고 있다.

이 BDNF가 도파민 함유 신경세포에 미치는 영향에 대해서는 세포의 생존율을 증가시키거나 혹은 세포손상을 가속화시킨다는 두 가지 상반된 보고들이 있다. BDNF는 생체 외에서 태생 mesencephalic 신경세포의 생존과 분화를 촉진시키고,<sup>13</sup> 선택적으로 도파민 함유 신경세포에 독성을 나타내는 MPTP와 6-OHDA의 작용을 억제하는 것으로 알려져 있다.<sup>14</sup> Hagg<sup>15</sup>은 성숙한 쥐의 흑질 부위에 기계적 손상을 준 후 BDNF를 주입하였을 경우 정상적으로 일어나는 도파민 함유 신경세포의 사멸이 감소하고 생존율이 증가한다고 보고하였



다. 또 Levivier<sup>16</sup>에 의하면 BDNF를 생산하도록 유전자 조작된 fibroblast를 6-OHDA가 투여된 쥐의 선조체에 이식하였을 경우, 흑질의 도파민 함유 신경세포의 손상이 감소되었다고 하였다. 반면 BDNF가 도파민 함유 신경세포에 미치는 toxic effect에 대해서도 많은 보고들이 있다. 쥐에서 인위적으로 axotomy-induced degeneration을 조작한 후 BDNF를 뇌실 내 주입하였을 경우에는 생체 내에서 도파민 함유 신경세포의 생존율을 증가시키지 못하였다.<sup>17</sup> Lapchak 등은<sup>18</sup> 정상 성체 쥐의 흑질에 BDNF를 19일 동안 2일 간격으로 주입한 후 nigrostriatal pathway의 도파민 함유 신경세포의 기능을 관찰하였다. Amphetamine에 의해 유도되는 회전실험에서 BDNF처리된 동물은 BDNF가 주입된 방향으로 회전하는 행동학적 비대칭성을 나타내었을 뿐 아니라, BDNF가 주입된 부위의 선조체에서 [<sup>3</sup>H] 도파민 섭취율(27%), tyrosine hydroxylase (TH)의 활성도(68%), 도파민 함량(36%)과 TH양성세포의 세포수 등이 감소됨을 보고하였다. 또 Koh 등에<sup>19</sup> 따르면 생체 외에서 BDNF는 배양된 cortical neuron의 apoptosis에 대해서는 억제 작용이 있으나 necrosis는 오히려 촉진시킨다고 하였으며 이는 생체 내 실험<sup>20</sup>에서도 확인되었다.

이러한 실험 결과들의 차이가 병변부위의 국소적인 BDNF의 농도차이에 의한 것이라는 가정이 성립되는데 이를 뒷받침하는 소견으로 병변부위의 활성화된 microglia에서 BDNF가 생성된다고 알려져 있으며<sup>21</sup> 또 Parkinson's disease 환자의 흑질에서 도파민 생성 신경세포가 생성하지 않는 세포보다 손상을 더 많이 받는 것으로 보고되고 있기 때문이다.<sup>22</sup>

이러한 연구들을 배경으로 본 실험에서는 도파민 함유 신경세포의 배양시 BDNF의 농도를 다양하게 처리하였을 때 도파민 함유 신경세포의 생존율이 BDNF의 농도에 따라 영향을 받는지를 알아보려고 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. Ventral mesencephalon으로부터 신경세포의 배양

Ventral mesencephalon로부터 분리한 신경세포를 Carolyn H<sup>23</sup>의 방법으로 배양하였다. 즉, 임신 14일째의 태아 흰쥐의 두피와 두개골을 제거하고 mesencephalon을 분리하되, mesencephalon 후반부를 제거하고 전반부만을 분리하였다. 뇌막을 완전히 제거한 후 이를 10 ml의 Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup> free Hanks' balanced salt solution (HBSS, Gibco, Grand Island, NY, USA)가 들어 있는 10 ml 시험관에 옮겼다. 10 ml pipette을 이용하여 조직을 분쇄하였다. 세포를 분리하기 위해 최종농도가 0.125% 되도록 trypsin을 첨가한 후 37°C water bath에서 20분간 흔들어 준 후 100×g에서 5분간 원심분리하였다. Trypsin을 씻어내기 위해 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)이 10%가 되게 첨가하고 원심분리하였다. Trypsin 세척과정을 2회 더 반복하였으며, 마지막에는 세포를 10% FBS가 포함된 배양액(후술)에 부유하였다.

세포수는 hematocytometer를 이용하여 측정하였고, 1×10<sup>5</sup> cell/ml 농도의 세포부유액을 1 ml

Poly-L-lysine (100  $\mu\text{g/ml}$ )이 처리된 chambered slide에 plate하였다. 배양기의 조건은 37°C-5% CO<sub>2</sub>로 맞추었다. Plate한 다음날 10% FBS가 포함된 배양액을 모두 제거한 후, FBS가 포함되지 않은 배양액으로 1주일간 세포를 배양하였다. 배양액은 3~4일에 한번 교환하였다.

배양액은 15 mM HEPES (Sigma, St Louis, MO, USA), 50 nM hydrocortisone (Sigma), 100  $\mu\text{M}$  putrescine (Sigma), 30 nM selenium (Sigma), 20  $\mu\text{g/ml}$  insulin (Sigma), 100  $\mu\text{g/ml}$  transferrin (Sigma), 50 unit/ml penicillin/streptomycin (Sigma)을 DMEM (Gibco)에 첨가하여 사용하였다.

## 2. Brain-derived neurotrophic factor 처리

BDNF (Sigma)는 0.1% BSA/PBS에 녹여 보관하였다. Plate한지 1일 후 FBS가 포함되지 않은 배양액으로 교환할 때 BDNF 농도를 10, 50, 100, 200, 300 ng/ml이 되도록 첨가하였다. 대조군에는 BDNF를 첨가하지 않았다. BDNF를 첨가하고 배양 2일과 7일에 TH에 대한 면역화학 염색법을 시행하여 BDNF의 농도에 따른 도파민 함유 신경세포의 형태와 수를 관찰하였다.

## 3. 면역화학 염색방법

도파민 함유 신경세포를 동정하기 위한 방법으로 세포내 dopamine 생성 과정의 주효소인 TH의 발현 여부를 이용하였다. TH의 발현 여부는 avidin-biotin peroxidase 방법을 이용한 면역화학염색으로 확인하였다. 배양된 세포를 4% paraformaldehyde/20 mM, phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)에 4°C에서 20분간 고정하여 세포표본을 만들었다. 표본을 PBS로 세척한 다음 1% bovine serum albumin (BSA) 포함한 0.1M PBS로 녹인 0.2% triton x-100에 5분간 노출시켰다. 표본을 다시 PBS-0.5%BSA에 세척하고 TH에 대한 일차항체(1 : 500, Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN, USA) 용액에 24시간 동안 실온에 방치하였다. 일차항체를 버리고 PBS-0.5% BSA로 세척한 후 biotinylate 이차항체와 avidin-biotin complex를 가지고 연속적으로 반응시켰다. 발색은 0.05% diaminbenzidine HCl (DAB)와 0.003% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 이용하였다.

TH 양성인 세포가 신경세포인 것은 TH를 발현한 세포가 신경세포 미세관(microtubule)에 특이적으로 존재하는 tau에 대한 항체(1 : 100, Sigma)도 발현하는 것을 이중 염색하여 확인하였다.

## 4. 세포수 측정

TH 양성 신경세포의 수는 현미경 100배 배율 하에 무작위로 선택한 10개 영역에서 측정하였다. 이때 BDNF 농도를 달리하여 배양한 TH 양성 신경세포의 상대적인 세포의 수를 BDNF를 처리하지 않고 배양했을때의 TH 양성 신경세포의 수와 백분율로 비교하였다.

## 5. Western blot

전기영동은 10% separating gel과 5% stacking gel로 구성된 gel을 사용하였고, 전기영동한

gel을 Towbin 등의<sup>24</sup> 방법에 따라 nitrocellulose 막(NC)에 전이시켰다. 단백질이 전이된 NC 막을 3% BSA/TBS 차단 용액에 1시간 흔들면서 처리하여 비특이적 항원을 차단하였다. NC막을 TBS로 3회 세척한 후 0.5% BSA/TBS에 mouse anti-TH를 1 : 500으로 희석하여 2시간 동안 흔들면서 반응시켰다. TBS로 3회 세척한 후 peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG (Boehringer Mannheim)을 0.5% BSA/TBS용액에 1 : 5,000으로 희석하여 1시간 동안 흔들면서 반응시켰다. 이를 다시 TBS로 3회 세척한 후 enhanced chemiluminescence (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA)로 발색시켰다.

### III. 결 과

#### 1. 배양된 mesencephalic 신경세포의 특징

태아 14일된 흰쥐의 ventral mesencephalon으로부터 분리한 세포를 일차 배양하고 배양 7 일째 위상차 현미경으로 관찰한 모습을 Fig. 1에 나타내었다. 이 세포들은 위상차 현미경하에서 대부분 둥글고 밝게 빛나는 세포체를 가지고 있었으며, 1개 이상의 기다란 neurite를 갖고 있었다. 배양된 세포는 거의 대부분이 신경세포였는데(95% 이상), 이 세포들이 신경세포인 것은 신경세포 미세관에 특이적으로 존재하는 tau에 대해 양성반응을 보이는 것으로 확인하였다. 일차 배양된 세포에 glial fibrillary acidic protein가 발현된 세포는 없었다. 따라서 본 실험 조건에서는 일차 배양시 별아교세포는 포함되지 않는 것을 알 수 있었다.

본 실험 배양 조건에서는 배양액에 BDNF를 첨가하지 않아도 TH 양성 신경세포의 발현,

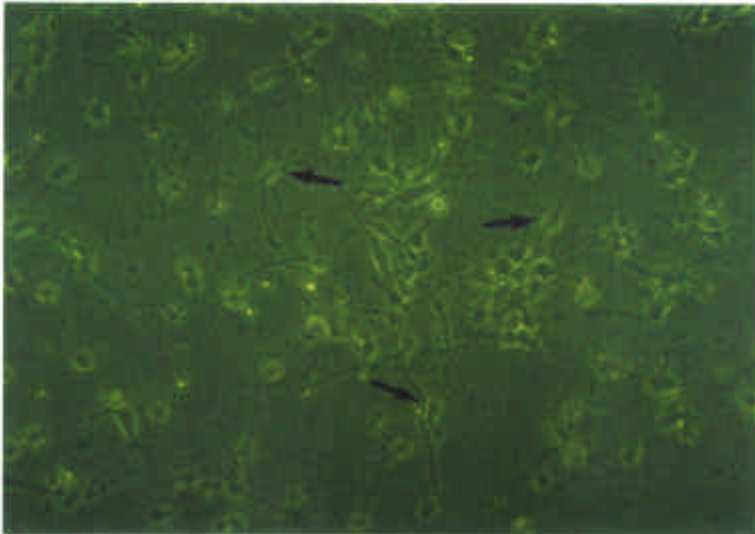
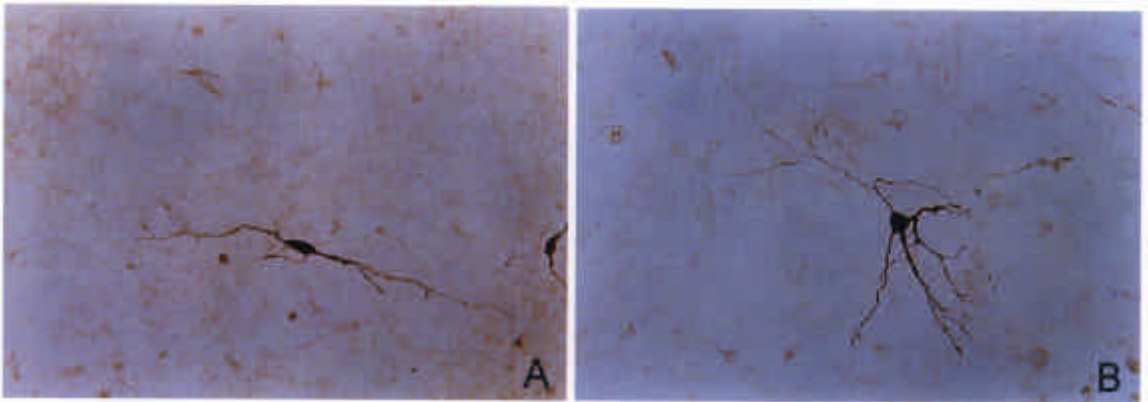


Fig. 1. Phase-contrast microscopic appearance of ventral mesencephalic cells on 7 day culture ( $\times 100$ ). Arrows indicate phase-bright neuronal cells.

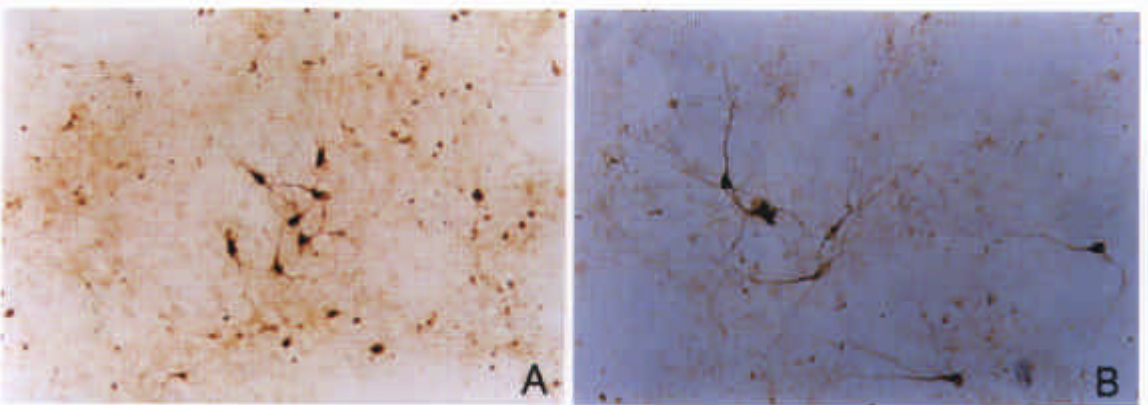
성숙이 일어난다. BDNF를 첨가하지 않고 ventral mesencephalon으로부터 분리한 세포를 배양한 후, TH에 대한 면역염색 결과를 Fig. 2에 나타내었다. TH 양성 신경세포는 배양 2일째 neurite의 발달이 미약하였으나 bipolar 형태의 긴 neurite를 가진 세포도 일부 관찰되었다 (Fig. 2A). 배양 7일에는 neurite가 발달하여 성숙한 신경세포의 모습인 multipolar 형태의 세포가 관찰되었다. TH를 발현한 세포는 전체 세포중 1% 내외였다.

## 2. BDNF가 배양된 TH 양성 신경세포의 성숙에 미치는 효과

BDNF가 TH 도파민 함유 신경세포의 성숙에 미치는 영향을 보기 위해 배양액 내 BDNF를 첨가하지 않은 대조군과 BDNF를 50 ng/ml의 농도로 처리한 군을 2일간 배양한 후, TH



**Fig. 2.** Light-microscopic appearance of immunocytochemically stained TH-positive neurons ( $\times 200$ ). (A) TH-positive neurons with bipolar process. (B) TH-positive cells with multipolar process.

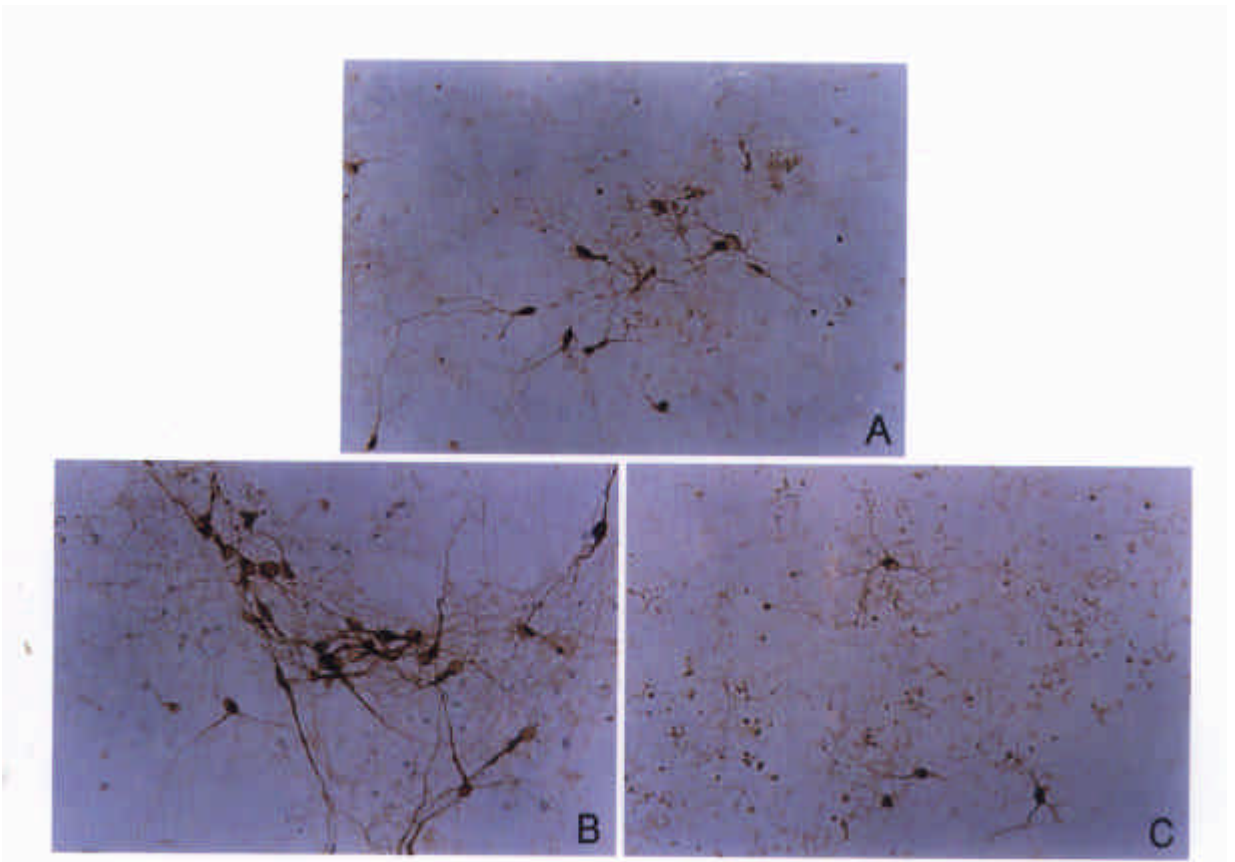


**Fig. 3.** Effect of BDNF on differentiation of TH-positive neurons. Cells were cultured in (A) BDNF-free and in (B) 300 ng/ml BDNF-containing medium, Immunocytochemistry was performed using anti-TH antibodies ( $\times 100$ ).

양성 세포의 형태를 관찰하였다. BDNF가 포함되지 않은 대조군에서도 TH 양성 세포는 발현되나 세포체의 크기가 작고 neurite의 길이가 짧으며, 가늘고 미성숙된 monopolar이거나 bipolar 형태를 나타내었다(Fig. 3A). BDNF 50 ng/ml에서는 TH 양성 세포는 세포체의 크기도 증가하였으며, 잘 발달된 neurite를 가지고 있었고, bipolar 또는 성숙된 신경세포의 형태인 multipolar neurite를 가지고 있었다(Fig. 3B).

### 3. BDNF가 배양된 TH 양성 신경세포의 생존에 미치는 효과

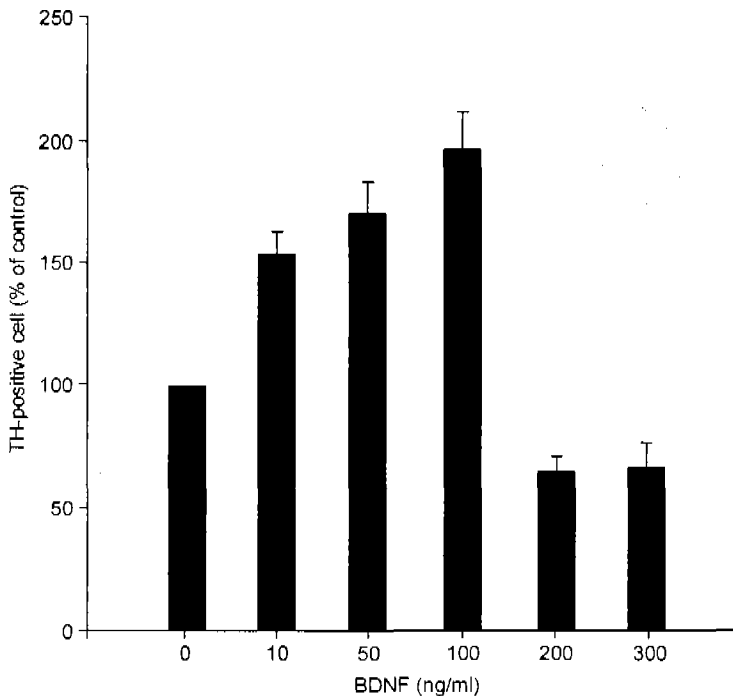
BDNF가 TH 양성 신경세포의 생존율에 미치는 영향을 보기 위해 BDNF를 0, 10, 50, 100, 200, 300 ng/ml 농도별로 처리하고 배양 7일째에 TH 양성인 신경세포 형태와 수를 관찰하였다. Fig. 4에서 보는 것처럼 배양액내 50 ng/ml의 BDNF가 첨가하였을 때는 BDNF가 첨



**Fig. 4.** Dual effects of BDNF on the survival of TH-positive neurons. After 7 days culture, cells were processed for immunocytochemistry using anti-TH antibodies. Mesencephalic cells cultured with N2 medium containing BDNF-free (A), 50 ng/ml BDNF (B), and 300 ng/ml BDNF (C). There are more abundant TH-positive cells in culture of 50 ng/ml BDNF-containing medium than in culture of BDNF-free medium. But the number of TH-positive cells were decreased in 300 ng/ml BDNF-containing medium ( $\times 200$ ).

가 되지 않았을 때보다 TH 양성인 신경세포의 수가 더 많은 것을 알 수 있었다. 그러나 300 ng/ml의 BDNF를 첨가했을 경우에는 BDNF가 처리되지 않았을 때에 비해 오히려 TH 양성 신경세포의 수가 적었다. 또한 이때는 50 ng/ml의 BDNF가 첨가하였을 때보다 multipolar neurite를 가진 세포가 많이 관찰되나, neurite의 길이 자체는 짧아진 즉, 퇴화된 세포의 수도 많아지는 것을 관찰할 수 있었다. 즉 BDNF의 농도가 높을수록 TH 양성 신경세포는 성숙한 모습의 multipolar neurite를 가진 세포로 발달되는 양상을 보이는 반면, 300 ng/ml의 고농도의 BDNF에서는 퇴화된 세포의 수도 증가하는 양상을 보였다.

Fig. 5는 BDNF를 농도별로 처리한 후 TH 양성 신경세포 수를 BDNF를 포함하지 않은 배양액에서 키운 TH 양성인 신경세포 수에 대한 백분율로 나타내었다. TH 양성인 신경세포의 수는 BDNF를 처리한 경우 10, 50, 100 ng/ml까지는 BDNF를 처리하지 않은 대조군에 비해 각기 53%, 69%, 95% 증가하였다. 반면에 200, 300 ng/ml의 고농도의 BDNF를 배양액에 첨가한 경우는 대조군에 비해 36%, 34% 감소하였다. 즉, BDNF 100 ng/ml까지는 TH 양성 신경세포의 생존율을 증가시키지만, BDNF 200 ng/ml 이상의 고농도에서는 BDNF가 오



**Fig. 5.** Quantification of TH-positive neurons in ventral mesencephalic cultures of various BDNF concentrations. In dependence of BDNF concentration, the number of TH-positive neurons were increased up to 100 ng/ml. However, excessive BDNF (>200 ng/ml) decreased the number of TH-positive neurons

히려 TH 양성인 신경세포의 퇴화를 증가시켰다.

#### 4. Western blot 결과

TH 양성인 신경세포라도 BDNF에 의해 세포내 TH 함량에 차이를 나타내는지를 보기 위해 다음과 같은 실험을 시행하였다. 즉 BDNF가 0, 50, 300 ng/ml가 포함된 배양액으로 ventral mesencephalon 세포를 일차 배양한 다음, 배양된 세포로부터 단백질을 추출하고 TH에 대한 항체를 이용하여 western blot을 실시하였다. 이때 전기영동을 위해 가해진 단백질의 양은 TH 양성 세포수에 비례하게 조정하였다. 이는 TH 양성인 세포수는 전체 세포수의 1% 정도이므로 TH 발현세포당 TH 함량을 정량적으로 비교하기 위한 것이었다. Western

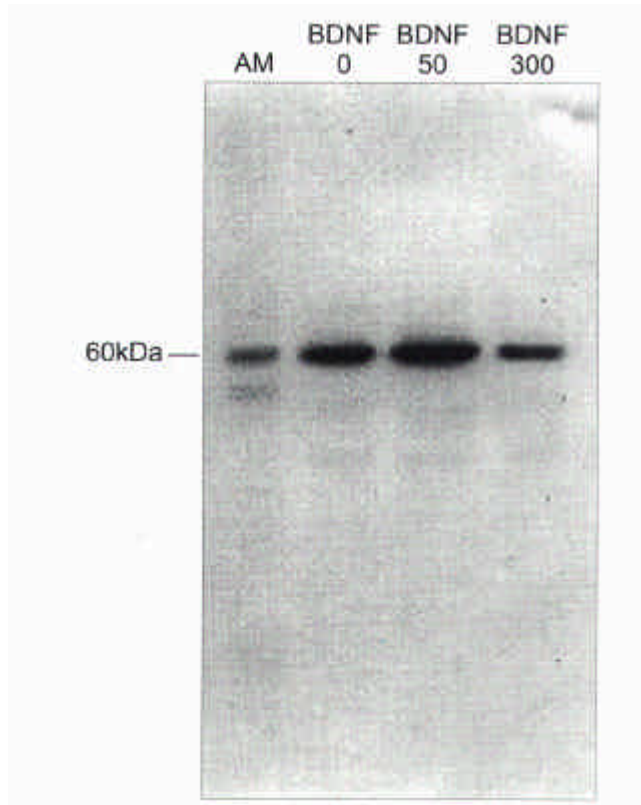


Fig. 6. Western blot analysis of tyrosine hydroxylase in the extract from ventral mesencephalic culture of BDNF-free and BDNF-containing medium. AM: adrenal medulla (positive control). BDNF 0: BDNF-free. BDNF 50: 50 ng/ml BDNF treatment. BDNF 300: 300 ng/ml BDNF treatment. A strongly staining protein band with Mw ~60 kDa, an electrical mobility identical to the TH-subunit observed in a preparation from rat adrenal medulla, was found in BDNF-free and BDNF-treated culture.

blot에서 발색된 것이 TH인 것을 확인하기 위한 비교의 목적으로 흰쥐의 adrenal medulla 조직을 이용하였다(Fig. 6). 50 ng/ml BDNF를 처리한 경우 TH 양성세포의 TH 함량은 BDNF를 첨가하지 않은 때에 비해 증가하였다. 즉 50 ng/ml 농도의 BDNF는 전술한대로 TH 양성세포를 형태학적으로 성숙시키기도 하지만 세포내 TH 함량도 증가시켰다. 반면에 300 ng/ml BDNF는 세포내 TH 함량을 감소시키는데 이는 전술한대로 고농도의 BDNF가 TH 양성세포를 퇴화시켰기 때문일 것으로 생각한다.

#### IV. 고 찰

Neurotrophin은 PNS와 CNS에서 신경세포의 생존과 분화에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 왔다.<sup>25,26</sup> 최근 몇 년에 걸쳐 많은 연구들은 Parkinson's disease 치료에 중요한 단서가 될 수 있는 중뇌 도파민 함유 신경세포를 위한 growth factor를 동정하는데 전력을 다해 왔다. 그러나 중뇌 도파민 함유 신경세포의 정상적인 발달과 유지에 이들 growth factor의 역할에 관해서는 거의 알려진 바가 없다.

본 실험에서는 ventral mesencephalon으로부터 분리된 도파민 함유 신경세포의 생존에 BDNF가 미치는 효과를 조사하였다. 배양액에 10, 50, 100 ng/ml BDNF가 첨가되었을 경우 TH 양성인 신경세포의 생존율이 증가되었으나, 200, 300 ng/ml의 BDNF가 포함된 배양액에서는 오히려 TH 양성인 신경세포의 생존율이 감소하였다. McAllister 등은<sup>26</sup> organotypic cortical slice에 BDNF처리시 cortical neuron의 primary dendrite의 길이와 수가 증가하였으며 이러한 성장촉진제로서의 BDNF의 역할에는 electrical and synaptic activity가 관여한다고 보고하였다. 본 실험에서 BDNF를 첨가한 배양액에서 키운 TH양성 신경세포는 첨가된 BDNF의 농도가 증가할수록 좀더 성숙된 형태를 나타내었는데 이는 BDNF가 도파민 함유 신경세포의 성숙을 가속화시킴으로써 세포의 노화를 촉진시켜 결국 세포사멸을 유도할 수 있을 가능성을 제안한다. 기존의 많은 연구들은 BDNF가 여러 부위의 신경세포의 생존과 분화를 촉진시킨다는 사실을 보고하여 왔다.<sup>27,28</sup> BDNF는 여러 stress나 neurotoxicity에 대해 다양한 intracellular signal pathway를 통해 신경세포를 보호하는 작용을 한다. 그러나 최근 여러 연구들은 BDNF가 신경세포 퇴행을 조장할 수 있다는 증거들을 제시하였다. 배양된 cortical 신경세포에서 BDNF는 NMDA나 oxygen-glucose 부족으로 발생하는 necrosis를 가속화시켰다.<sup>19</sup> 또 BDNF는 spinal motor neuron배양에서는 excitotoxic sensitivity를 증가시켜 세포사멸을 초래한다는 보고가 있다.<sup>29</sup> Parkinson's disease환자의 흑질 부위에서 BDNF를 포함하는 도파민 함유 신경세포 수는 정상인의 9.6%로 감소하는 반면, BDNF를 포함하지 않는 도파민 함유 신경세포 수는 정상인의 23.9%로 감소하였다.<sup>30</sup> 이는 흑질에 BDNF를 발현하지 않는 도파민 함유 신경세포는 BDNF를 포함하는 도파민 함유 신경세포보다 생존할 가능성이 더 크다는 사실을 의미한다. 또한 Lewy bodies를 가지는 모든 도파민 함유 신경세



또는 모두 BDNF에 양성 반응을 보인다. 이 결과는 BDNF가 신경세포를 보호하지 못하거나 Parkinson's disease에서 도파민 함유 신경세포는 손상에 민감할 수 있다는 것을 암시한다. 이러한 연구 결과들은 BDNF가 흑질에 있는 도파민 함유 신경세포의 사멸을 유도할 수 있을 가능성을 제시해 준다.

본 실험에서 배양액에 첨가된 BDNF는 일정농도까지는 ventral mesencephalon의 도파민 함유 신경세포의 생존을 향상시켰으나, 고농도에서는 도파민 함유 신경세포 사멸을 유도하는 2가지 작용을 하는데, 이는 BDNF에 대한 도파민 함유 신경세포의 receptor와 관련이 있을 것으로 추정된다. 생리학적 조건 하에서 BDNF는 high affinity receptor인 TrkB에 결합한 후 intracellular signaling pathway를 통하여 다양한 효소 및 effector들을 활성화시켜 생존과 연관된 단백질의 합성을 증가시키거나 사멸을 유도하는 물질의 발현을 억제함으로써 신경세포 생존을 유지시키는 것으로 알려져 있다. 이외에 모든 neurotrophins에 공통적으로 작용하는 P75는 low affinity receptor로 알려져 있는데, 이것의 정확한 생리학적 역할은 규명되어 있지 않으나 고농도의 BDNF가 투여되었을 경우 P75의 활성화가 유발되고 이것이 또다른 intracellular signal pathway를 활성화시켜 신경세포 손상을 초래할 가능성이 있다.

Microglia는 뇌의 면역체계와 관련된 세포이고, 신경 퇴행성 질환을 포함한 신경학적 질병의 병인과 연관되었을 것으로 알려졌다.<sup>31-33</sup> 정상상태에서 성체 생쥐의 뇌 흑질 부위는 다른 부위에 비해 microglia의 수가 매우 높은 것으로 보고되었으며,<sup>34</sup> Parkinson's disease환자의 도파민 함유 신경세포의 손상이 있는 흑질 부위에 활성화된 microglia가 지속적으로 나타나고 있다는 보고도 있다.<sup>35,36</sup> 또 염증반응의 유도 물질인 lipopolysaccharide (LPS)를 흑질 내로 주사하였을 때 2일 후에 활성화된 microglia가 나타나고 염증과 관련된 cytokine의 분비증가 등의 면역 체계의 다양한 반응들이 관찰된다. 그리고 주사 후 21일까지 흑질과 선조체 부위에 TH 양성인 세포수가 감소하고 또한 dopamine양이 의미있게 감소한다.<sup>36</sup> 이는 LPS가 microglia를 활성화시키고 활성화된 microglia에서 분비하는 neurotoxin이 dopamine 신경세포를 손상시킴을 의미한다.

또 흰쥐 뇌에서 LPS에 의해 유도되는 microglia의 활성화로 인한 신경세포 손상정도가 뇌의 부위별에 따라 다른데, 이는 hippocampus, cortex보다 mesencephalon의 substantia nigra에 더 많은 microglia가 존재함으로써 이들 세포로부터 생성되는 염증 관련 물질의 정도에 따른 차이를 반영한다는 최근 보고가 있다.<sup>37</sup> 이러한 증거들은 microglia활성화 같은 염증과정이 흑질에 도파민 함유 신경세포 사멸의 발달과 진행에 연관되었을 것이라는 사실을 암시한다.

활성화된 microglia는 신경세포에 영향을 주는 NO같은 신경독성 물질<sup>34</sup> 및 cytokine, growth factor<sup>38</sup> 등 다양한 물질을 분비한다. 활성화된 microglia는 신경세포를 보호하는 효과보다는 신경세포 손상에 영향을 준다는 보고들이 많이 있다.<sup>39,40</sup> 그러나 잘 알려진 신경독소 물질로 microglia가 활성화됨에 따라 지속적으로 방출되는 NO는 도파민 함유 신경세

포에는 영향이 없는 것으로 보고된 바 있다.<sup>36</sup> 활성화된 microglia로부터 분비되는 어떤 물질이 도파민 함유 신경세포의 손상에 기여할 것인지는 아직 밝혀지지 않고 있다. Peter 등은 선조체가 손상을 받았을 경우, microglia는 활성화되고, 활성화된 microglia의 BDNF mRNA 발현이 현저히 증가된다고 보고하였다.<sup>39</sup> 그러므로 생체 외, 또는 생체 내의 아직 알려지지 않은 원인에 의해 활성화된 microglia로부터 과도하게 분비될 가능성이 있는 BDNF는 TrkB가 풍부한 흑질의 도파민 함유 신경세포에 특이적으로 작용하여 신경세포의 사멸을 초래할 수 있다고 추측된다. BDNF에 의한 도파민 함유 신경세포 사멸이 어떤 기전에 의해 유도되는지와 생체 내에서 생리학적으로 작용하는 농도 이상의 초과된 BDNF가 어디로부터 생성될 수 있는지 등에 관한 연구는 추후에 더 진행되어야 할 것이다.

## V. 결 론

BDNF가 농도에 따라 TH 양성 신경세포의 생존율에 다르게 영향을 줄 것이라는 가설하에 본 실험에서는 태아 14일째의 흰쥐 태아 중뇌 조직으로부터 배양된 TH 양성 신경세포의 생존율이 BDNF의 농도에 따라 영향을 받는지를 보고자 하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)는 tyrosine hydroxylase (TH) 양성 신경세포의 성숙을 촉진하였다.

2. BDNF 100 ng/ml의 농도까지는 배양시 TH 양성 신경세포의 생존율이 증가하였으나, 300 ng/ml BDNF 농도에서 TH 양성 신경세포의 생존율이 감소하였다.

3. BDNF 50 ng/ml의 농도에서 중뇌 세포를 배양할 때는 TH 양성 신경세포의 세포내 TH 함량을 증가하였다. 그러나 300 ng/ml BDNF 농도에서는 TH 양성 신경세포의 세포내 TH 함량이 감소하였다.

이상의 실험결과로 BDNF는 100 ng/ml의 농도까지는 태아 흰쥐 중뇌 조직으로부터 배양한 TH 양성 신경세포의 생존율을 증가시키나, 300 ng/ml의 고농도에서는 TH 양성 신경세포의 생존율을 감소시키는 농도의존적 특성이 있음을 알 수 있었다.

## 참 고 문 헌

1. Greenfield JG. The brainstem lesions in parkinsonism. JNNP 1953;16:213-6.
2. Forno LS, Alford EC. The pathology of parkinsonism. In: McDosell TH, Markhm CH, eds. Recent Advances in PD. Oxford: Blacell, 1971:120-61.
3. McGeer PL, Itagaki S, Boyes BE, McGeer EG. Reactive microglia are positive for HLA-DA in the substantial nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brain. Neurology 1988;38: 1285-91.

4. Jenner P. Oxidative damage in neurodegenerative disease. *Lancet* 1994;344:796-8.
5. Schapira AHV, Cooper JM, Dexter D, Jenner P, Clark JB, Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in PD. *Lancet* 1989;1:1269.
6. Dexter DT, Wells FR, Agid F. Increased nigral iron content in postmortem parkinsonian brain. *Lancet* 1987;2:1219-20.
7. Wong JYF, Liberatore GA. Expression of brain-derived neurotrophic factor and TrkB neurotrophin receptors after striatal injury in mouse. *Exp Neurology* 1997;148:83-91.
8. Murer MG, Boissier F, Yan Q, Hunot S, Vilares J. An immunohistochemical study of the distribution brain-derived neurotrophic factor in the adult human brain, with particular reference to Alzheimer's disease. *Neuroscience* 1999;88:1015-32.
9. Yan Q, Rosenfeld RD, Matheson CR, Hawkins N, Lopz OT, Bennett L, Welchen AA. Expression of brain-derived neurotrophic factor protein in the adult rat central nervous system. *Neuroscience* 1997;78:431-48.
10. Seroogy KB, Christine MG. Expression of neurotrophin by midbrain dopaminergic neurons. *Exp Neu* 1993;124:119-28.
11. Altar CA, Siuciak JA, Wright P, Lp NY, Lindsay RM, Wiegand S. In situ hybridization of TrkB and TrkC receptor mRNA in rat forebrain and association with high affinity binding of [<sup>125</sup>I]BDNF, [<sup>125</sup>I]NT-4/5 and [<sup>125</sup>I]NT-3. *Eur J Neuroscience* 1994;6:1389-405.
12. Benisty S, Boissiere F, Faucheux B, Agid Y, Hirsch EC. TrkB messenger RNA expression in normal human brain and in the substantia nigra of parkinsonian patient. *Neuroscience* 1998;86:813-26.
13. Carolyn H, Hofer M, Barde YA, Juhasz M, Yncopoulos GD, Squinto SP, Lindsay RM. BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neuron of substantia nigra. *Nature* 1991;350:230-2.
14. Giulian D, Li J, Leara B, Keenen C. Phagocytic microglia release cytokines and cytotoxins that regulate the survival of astrocytes and neurons in culture. *Neuroche Int* 1994;25:227-33.
15. Hagg T. Neurotrophins prevent death and differentially affect tyrosine hydroxylase of adult nigrostriatal neurons in vivo. *Exp Neurol* 1998;149:183-92.
16. Levivier M, Przedborski S, Bensics C, Kang UJ. Intra-striatal implantation of fibroblasts genetically engineered to produce BDNF prevents degeneration of dopaminergic neurons in a rat model of Parkinson's disease. *J Neuroscience* 1995;15:781-2.
17. Knusel B, Beck KD, Winslow JW, Rosenthal A, Burtarl E, Windmer HR, et al. Brain-derived neurotrophic factor administration protects basal forebrain cholinergic but not nigral dopaminergic neurons from degenerative change after axotomy in the adult rat brain. *J Neurosci* 1992;12:4391-402.
18. Lapchak PA, Beck KD, Araujo DM, Langston JW, Hefti F. Chronic intranigral administration of brain-derived neurotrophic factor produces striatal dopaminergic hypofunction in unlesioned adult rats and fails to attenuated the decline of striatal dopaminergic function following medial

- forebrain bundle transection. *Neuroscience* 1993;53:639-50.
19. Koh JY, Gwag BJ, Lobner D, Choi DW. Potentiated necrosis of cultured cortical neurons by neurotrophins. *Science* 1995;268:573-5.
  20. Rudge JS, Mather PE, Pasnikowski EM, Cai N, Corcoran T, Acheson A, et al. Endogenous BDNF protein is increased in adult rat hippocampus after a kainic acid induced excitotoxic insult but exogenous BDNF is not neuroprotective. *Exp Neurol* 1998;149:398-410.
  21. McGeer EG, McGeer PL. The role of immune system in neurodegenerative disorder. *Movement Disorders* 1997;12:6:855-8.
  22. McGeer PL, McGeer EG. The inflammatory response system of the brain: Implication for therapy of Alzheimer's and other neurodegenerative disease. *Brain Res Rev* 1995;21:195-218.
  23. Carolyn H., M. Hofer, YA, Barde, M., Juhasz GD., Yncopoulos, SP. BDNF is a neurotrophic factor for dopaminergic neuron of substantia nigra. *Nature* 1991;350:230-2.
  24. Towbin H, Stachelm T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets; Procedure and some application. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979; 78:4350-56.
  25. Purves D, Snider WD, Voyvodic JT. Trophic regulation of nerve cell morphology and innervation in the autonomic nervous system. *Nature* 1988;336:123-8.
  26. McAllister AK, Lo DC, Katz LC. Neurotrophins regulate dendritic growth in developing visual cortex. *Neuron* 1995;15:791-803.
  27. Hetman M, Kaming K, Cavanaugh JE, Xia Z. Neuroprotection by brain-derived neurotrophic factor is mediated by extracellular signal-regulated kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. 1999;274(32):22569-80.
  28. Mattson MP, Lavell MA, Furukawa K, Markesbery WR. Neurotrophic factors attenuated glutamate-induced accumulation of peroxidases, elevation of intracellular  $Ca^{++}$  concentration, and neurotoxicity and increase antioxidant enzyme activities in hippocampal neurons. *J Neurochem* 1995;65:1740-51.
  29. Freyer HJL, Wolf DH, Knox RJ, Stittmatter SM, Pennica D, O'Leary RM, Russel DS, Kalb RG. Brain derived neurotrophic factor induces excitotoxic sensitivity in cultured embryonic rat spinal motor neurons through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Neurochem* 2000;74:582-95.
  30. Parain K, Murer MG, Yan Q, Faucheux B, Agid Y, Hirsch E, Vozari RR. Reduced expression of brain-derived neurotrophic factor protein in Parkinson s disease substantial nigra. *Neuro-report* 1999;10:557-61.
  31. McGeer EG, McGeer PL. Neurodegeneration and the immune system. In: Calice DB, (ed) *Neurodegenerative disorders*, Philadelphia: W.B. Saunders, 1994:277-300.
  32. Giulian D, Vaca K, Corpuz M. Brain glia release factors with opposing actions upon neuronal survival. *J Neurosci* 1993;13(1):29-37.

33. Lee SC, Liu W, Dickson DW, Brosnan CF, Berman JW. Cytokine production by human fetal microglia and astrocytes. *J Immunol* 1993;150(7):2659-67.
34. Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 1990;39:151-70.
35. Richard B, Banati MD, Daniel SE, Blunt SB. Glial pathology but absence of apoptotic nigral neurons in long-standing parkinson's disease. *Movement Disorder* 1998;13:221-7.
36. McGeer PL, Itagaki S, Akiyama H, McGeer EG. Rate of cell death in parkinsonism indicate active neuropathologic process. *Ann Neurol* 1988;24:574-6.
37. Kim WG, Mohney RP, Wilson B, Jeohn GH, Liu B, Hong JS. Regional difference in susceptibility to lipopolysaccharide-induced neurotoxicity in rat brain: Role of microglia. *J Neurosci* 2000;20(16):6309-16.
38. Banati RB, Gehrmann J, Schubert P, Kruetzberg GW. Cytotoxicity of microglia. *Glia* 1993; 7:111-8.
39. Peter E, Batchelor, Liberatore GT, Wong JYF, Porritt MJ, Frerichs F, Donnan GA, Activate macrophages and microglia induce dopaminergic sprouting in the injured striatum and express brain-derived neurotrophic factor and glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 1999;19(5):1708-16.
40. Howells DW, Giulian D. Reactive glia as rivals in regulating neuronal survival. *Glia* 1993; 7:102-10.

## Abstract

### Dual effects of brain-derived neurotrophic factor on survival of dopaminergic neurons *in vitro*

Si-Yeon Kim

*Brain Korea 21 Project for Medical Sciences  
The Graduate School, Yonsei University*

(Directed by Associate Professor Joong Woo Leem)

Under the conditions of Parkinson's disease (PD), activated microglia produces cytokines that may cause dopaminergic neurodegeneration in the substantia nigra (SN). It has been reported that activated microglia expressed increased amount of brain derived neurotrophic factor (BDNF), and that a high level of TrkB, BDNF receptor, was expressed normally in dopaminergic neurons of SN. From these observations, it is possible to speculate that the excess amount of BDNF may lead to the death of SN dopaminergic neurons.

In this experiment, effects of different concentrations of BDNF on the survival of dopaminergic neurons in SN were investigated. Cells were isolated from SN of fetal rats (E-14) and cultured one day in 10% FBS-containing DMEM (control). Cells were then cultured for 7 days in the presence of different doses of BDNF (10, 50, 100, 200, 300 ng/ml). Dopaminergic neurons were identified using immunocytochemistry for tyrosine hydroxylase (TH), and survived neurons were measured by counting TH-reactive cells.

As compared to the control cultured in BDNF-free medium, the number of TH-cells increased gradually until 7 days in the presence of low doses of BDNF (10, 50, 100 ng/ml) and decreased thereafter. In the presence of high doses of BDNF (200, 300 ng/ml), however, TH-cells decreased in number continuously up to 7 days.

The results suggest that the excess amount of BDNF that is perhaps released from activated microglia in the PD states may participate in the degenerative processes of dopaminergic neurons in SN.

---

Key Words: dopaminergic neuron, brain-derived neurotrophic factor, neuronal survival rate, maturation