고신대학교 의과대학 학술지 제24권 제1호
Kosin Medical Journal
Vol. 24. No. 1, pp. 23~27, 2009

Cannabinoid Receptor Agonist가 만성 저산소환경에 의한 대뇌 겉질 신경세포의 자멸사에 미치는 영향

김호찬

고신대학교 의과대학 신경정신과학교실

Cannabinoid Protects Primary Cortical Neurons from Apoptosis by Chronic Hypoxia

Ho-Chan Kim

Department of Neuropsychiatry, Kosin University College of Medicine, Busan, Korea

Abstract

Chronic hypoxia has been associated with change in neurovascular behavior. The expression of cannabinoid receptors in brain has been well established and their agonists are thought to modulate neuronal activity and have the neuroprotective function in animal models of hypoxic-ischemia. In this work, we investigated the influence of cannabinoid receptor agonist (win 55.212.2) on cell death progress induced by chronic hypoxia. Rats were incubated in hypoxia conditions consisted of a mixture of 2% O2, 5%CO2, 93% N2. The solution containing WIN55.212.2 was injected into rats twice a day (every 12h) for 7 days.

Synthetic cannabinoid receptor agonist, WIN55.212.2 inhibits the cell death by chronic hypoxia. Also it inhibits neuron apoptosis. These data support that WIN55.212.2 would rescues neurons from apoptosis by chronic hypoxia. Also it suggests that WIN55.212.2 may be therapeutic drug for neuronal death by chronic hypoxia.

Key words: cannabinoids, cortical neuron, hypoxia, apoptosis

Key words : cannabinoids, cortical neuron, hypoxia, apoptosis

서 론

신생아의 신경계 질환을 진단하고 치료하는 다양한 의학 기술과 장비들이 발달하였으나 아직까지 조산(preterm birth)은 신생아에 있어 다양한 정신 신경학적인 발달 장애를 일으키는 것으로 알려져 있다. 조산에 의해 발생되는 대표적인 신경 정신계 질환으로는 정신지체(mental retardation), 인식 기능 (cognitive function) 저하 그리고 간질성 발작 (epileptic seizures) 등의 운동 장애(motor handicap) 등이 있다.[1,2] 조산에 의해 나타날 수 있는 가장 심각한 문제는 뇌실내출혈(intraventricular hemorrhage) 및 만성폐질환 (chronic lung disease)으로 알려져 있으며, 이 두 가지 질환의 근본적인 원인은 조산아에서 흔히 볼 수 있는 만성 저산소증이다. 또한 만성저산소증은 주산기(perinatal period)에서 신생아의 사망률을 증가시키는 중요한 요인으로, 신경계 이상, 간질발작 및 인식능력 이상 등을 유발한다.[3] 만성저산소증에 의한 신경계 이상은 산소 공급이 부족할 때 나타나는 중추신경세포의 세포사(cell death)에 의한 것으로 알려져 있다. 그동안 많은 연구를 통해서 저산소증이 세포사 를 유발하는 기전에 대해 많은 지식이 축적되어 있으나, 저산소증으로부터 세포를 보호할 수 있는 방법은 아직 뚜렷하게 발견되지 않고 있다.[4]

Cannabinoid는 허혈성 뇌질환 혹은 외상성 뇌손상에 있어 신경세포 방어 능력이 있는 것으로 알려져 있다.[5,6] 특히 신생아의 저산소-허혈성 뇌질환 (Neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy)에 있어 합성된 cannabinoid receptor agonist인 WIN이 신경세포의 손상을 줄여준다는 실험 결과에 대한 보고가 있다.[7] 이는 cannabinoid receptor agonist가 만성 저산소 환경에 의해

교신저자 : 김 호 찬
주소 : 602-702 부산시 서구 암남동 34
고신대학교 의과대학 정신과학교실
TEL : 051-990-6628 FAX : 051-241-5832
E-mail : fjdz@naver.com

유발된 신경세포 손상을 억제할 수 있다는 가능성을 보여주고 있다. 이에 **저**자는 **저**산소 환경에서 7일 간 배양한 쥐의 일차 대뇌 겉질 신경세포를 이용하여 세포 자멸사가 증가하는 지 관찰하였고 합성된 cannabinoid receptor agonist를 투여하여 자멸사를 억제할 수 있는 지 확인하였다.

재료 및 방법

1. 대뇌 피질 신경 세포의 일차배양 (primary cortical neuronal cultures)

임신 15일 된 생쥐의 자궁에서 배자를 추출하고, 배자의 종뇌(telencephalon)로 부터Sestan 등(1999)[8]이 서술한 방법에 의해 신경세포를 분리하였다. 분리된 세포들을 poly-L-ornithine과 laminin(이상Sigma Co., USA)으로 코팅된 plastic petri dish에서 배양을 시작하였다. 배양액은 neurobasal media에sodium pyrovate solution, Fetal Bovine Serum, L-glutamine solution, B-27 supplement, Pen/strep solution(이상 GIBCO Co., USA)를 조합하여 제조하였다. 세포들은 7일 간 **저**산소 환경에 노출시켰다. 이때 완전히 밀폐된 **저**산소통(hypoxic chamber)에서 배양하였으며, **저**산소 가스의 조성은 N_2 93%, O_2 5% CO_2 2%로 하였다. **저**산소 환경에서 배양한 세포들은 synthetic cannabinoid receptor agonist인 WIN(Sigma Co., USA)을 50mM의 농도로 투여하여 24시간 동안 배양하였다.

2. Cell viability assay

Cell viability의분석은 MTT assay를 통해 이루어졌다. 약 $5x10^3$ 정도의 세포를 96 well plate에 분주하였다. 그리고 24시간 동안 배양하여 세포들이 잘 부착할 수 있게하였다. 각 세포는 10um의 WIN을 투여하고 **저**산소 환경에서 7일 간 배양하였다. 7일 후 배양액을 제거하고 50ul의MTT stock solution 을 각 well에 투여하였다. 그 후 37°C를 유지하는 CO_2 incubator에서 3~4시간 동안 배양하고 다시배양액을 제거한 후 DMSO를 투여하여 MTT-formazan 결정을 용해시켰다. Bio-Tek microplate reader에서 570nm의 파장에서 각 well을 측정하여 그 감소 정도를 정상 세포들과 비교하여 비율을 계산하였다.

3. Annexin V 면역 형광 염색

세포의 자멸사를 확인하기 위하여 Annexin V로 면역형광 염색을 시행하였다. 우선 각 well에 멸균 처리한 coverglass를 넣은 후 추출한 신경세포를 분주하고 위의 세포 배양 기법에 따라 대조군과 실험군으로 나누어 실험하였다. 배양된 신경세포를 PBS로 세척한 후, 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 각 well에 Annexin binding buffer (10mM HEPES, 140mM NaCl, 2.5mM $CaCl_2$, pH7.4) 100 μl을 첨가하였고, 100ul당 Annexin V 5 μl를 추가하였다. 실온에서 15분간 반응시킨 후 Annexin binding buffer 400 μl를 더 넣어서 잘 섞은 후 반응시켰다.

반응이 끝난coverglass를 slide glass에 붙이고 광학현미경(Ecipse 80i, Nikon, Japan)으로 관찰한 후, 현미경용 디지털 카메라(DS-5MC, Nikon, Japan)를 이용하여 촬영하였다.

4. Western blotting

배양된 신경세포를 ice-cold PBS에 세척하고 단백질을 추출하여 immunoblotting분석을 시행하였다. Lysate를 위한 buffer로는 modified RIPA buffer (50mM Tris-HCl, pH7.4, 1% NP-40, 0.25% Na-deoxycholate, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 1g/ml Aprotinin, leupeptin, 1mM Na_3VO_4, 1mM NaF)를 사용하였다. 일차항체로는 anti-PARP (이상Cell signaling technology, USA, 1:1000), anti-ERK2 (Santa Cruz Biotechnology, USA, 1:10,000)를 사용하였다. 면역 반응을 감지하기 위하여 Supersignal detection reagent (Pierce Co.)를 사용하였으며, Hyperfilm (Kodak, USA)에 노출시킨 후, 평판스캐너를 이용하여, 현상된 film의 디지털 영상을 얻었다. 스캔한 밴드의 농도를 정량적으로 분석하기 위하여, BioMax program을 사용하였다.

결 과

저산소 환경7일간 일차 배양한 대뇌겉질 신경세포의 세포사멸를 관찰하고 WIN이 세포의 죽음에 미치는 영향을 증명하기 위하여 MTT assay를 통해 관찰하였다. 만성**저**산소 환경에서 배양한 신경세포의 사멸(cell death)이 정상 세포에 비해 현**저**하게 증가하였다. 만성 **저**산소 환경에서 합성 카나비노이드 수용체 작용제인

WIN을 50mM의 농도로 배양액에 투여한 경우 세포사멸이 억제되어 신경세포를 방어하고 있음을 확인하였다 (Fig. 1).

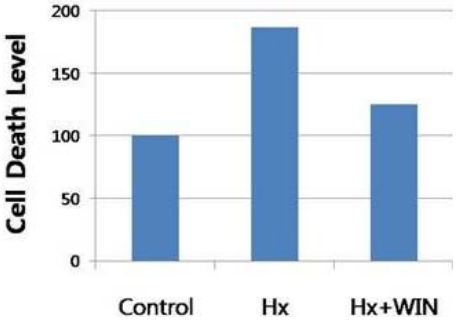

Fig. 1. **MTT assay.** Chronic hypoxia induces death in primary cultured cortical neurons. But administration of WIN protects neurons from cell death.

저산소환경에서 일어나는 세포의 자멸사(apoptosis)의 정도를 형태학적으로 확인하기 위하여 Annexin-V 염색을 시행하였다. Annexin-V는 세포막이 손상되지 않은 경우 염색이 되지 않는다. 그러므로 자멸사가 증가하게 되면 염색이 되는데, 세포자멸사를 형태학적으로 확인하기 위해 널리 사용되고 있다. 만성저산소 환경에서 배양한 신경세포는 정상 신경세포에 비해 Annexin V 양성인 신경세포가 증가하였다. 그러나 만성 저산소환경에서 배양한 신경세포에 WIN을 투여한 경우양성 신경세포가 다시 감소하였다. 이러한 결과는 만성저산소환경에 의해 유발된 세포자멸사를 WIN이 방어하고 있다는 것을보여준다 (Fig. 2).

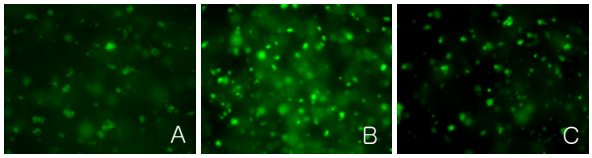

Fig. 2. WIN rescues primary cultured neurons from apoptosis. Representative immunofluorescence micrographs of primary cultured neuron in chronic hypoxia and the presence of 50mM WIN in chronic hypoxia and stained for Annexin V. Note the increased staining in the hypoxic cultures but not with WIN. A: Control, B: Chronic Hypoxia, C: WIN treatment under chronic hypoxia.

신경세포의 자멸사를 확인하기 위하여 배양된 신경세포의 lysate에서 PARP의 발현을 확인하였다. PARP는 미토콘드리아 경로를 통한 자멸사의 결과로 발현되는 단백질이다. 이를 통해자멸사의 정도를 정량적으로 분석하고자 하였다. PARP의 발현은 western blot 분석을 통하여 확인

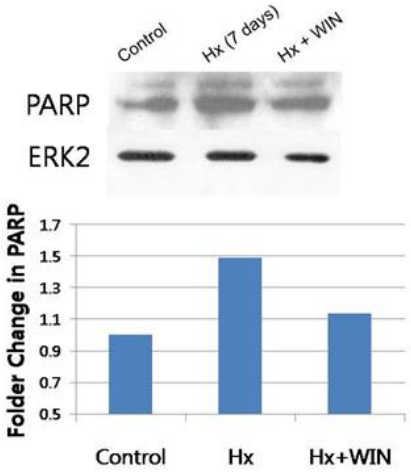

Fig. 3 WIN inhibits expression of PARP. Upper panel: Representative Western blots for PARP in lysates of primary cerebral neuronal cultures in the presence or absence of WIN (normalized for ERK2 expression). Lower panel: Quantitation of PARP expression in primary cerebral neurons as described above. Note that there are changes in PARP expression on in hypoxic cultures with administration of WIN.

하고 그 농도를 측정하여 비교하였다. 7일 동안저산소환경에서 배양된 신경세포의 lysate에서PARP의 발현은 정상 신경세포에 비해 현저하게 증가하였다. 그러나 WIN을 투여한 경우 PARP의 발현이 다시감소하여 정상 신경세포의 수준으로 나타났다. 이러한 결과는 WIN이 만성저산소 환경에 의한 신경세포의 자멸사를 방어할 수 있음을 보여준다 (Fig. 3).

고 찰

비치명적 만성저산소증 (Chronic sublethal hypoxia)는 흡연 등 일반적으로 접할수 있는 환경에서 일어날 수 있다.[9] 신생아기에 저산소증에 의한 신경세포 손상을 받은 경우mental retardation이나 기억장애, 인식장애 등의 후유증이 남을 수 있으며, 새로 태어난 쥐가 저산소 환경에 노출된 후 유사한 학습장애가 나타날 수 있다.[10]

뇌허혈 등과 같은 급성저산소증에 비해 그 증상이 뚜렷하게 나타나지 않으나, 만성적으로 노출되면 다양한 증상이 나타날 수 있다. 만성저산소증은 뇌허혈에 의한 급성 뇌손상과 달리 만성적인 노출에 의한 뇌의 적응을 유도한다. 뇌의적응의 일부로 신경세포의 죽음과 자멸사를 유도하는 것으로 알려져 있다.[11] 그 동안 저산소증 환

경이 세포사멸을 유발하는 기전에 대해 많은 연구가 있었다. **저**산소 환경은 hypoxic-inducible factor를 통하여 다양한 세포 내 신호 전달과정을 활성화하고, 주위의 뇌혈관내피세포의수가 증가하게 되며 혈관재형성이 유도되어 산소의 공급이 증가하여 신경세포가 생존하도록 한다. 또한 만성 **저**산소 환경이 HIF-1의 분비를 유도하고, 이 HIF-1이VEGF나 BDNF의 분비를 증가시켜 뇌혈관내피세포의세포사를 방어하게 된다.[12,13]

카나비노이드는 신경계에서 다양한 작용을 하는 것으로 알려지고 있다. 특히 신경세포를 방어할 수 있다고 보고되고 있다. 흔히 쓰이는 **저**산소실험 모델 중 newborn rat의 hypoxic-ischemic (HI) model을 이용한 실험에서 WIN이 신경세포에서 glutamate과 cytokine의 분비를 줄이고 독성 nitric oxide의 생산을 증가시킨다.[14] WIN의 이러한 작용은 calcium 이온의 influx를 감소시키고, transcription factor의 발현을 억제함으로써 이루어 진다.[15]

HI model을 이용한 실험에서 WIN을 투여한 후 뇌의 MRI 촬영하고 그 변화 보고하였다. 이들 보고에서 신경세포 방어를 위하여 HI 시술 후 WIN을 투여한 경우 42~65% 정도로 손상 부위가 감소하였고 이러한 결과는 **저**체온법을 이용한 경우와 유사하다고 하였다.[16,17] 또한 WIN은 HI 시술 후 관찰될 수 있는 동측 대뇌반구 축소를 감소시킨다.[18] 또한 동측 대뇌반구 축소는 신생아에서 나타나는 **저**산소-허혈성 뇌질환 (Neonatal hypoxic-ischemic encephalopathy)의 결과와도 유사하기 때문에 WIN이 신생아의 만성 **저**산소 질환에 있어 억제작용을 할 수 있다고 생각된다.

저자의 실험에서 만성 **저**산소 환경에서 세포의 사멸이 증가한 것을 MTT assay를 통해 확인하였다. 또한 Annexin V 염색을 통해 면역형광기법으로 형태학적으로 자멸사의 변화를 관찰하였다. 이번 실험에서 만성 **저**산소환경이 대뇌 겉질 신경세포의 자멸사를 유도하는 것을 다시 한번 확인하였다. 특히 자멸사의 증가가 현**저**하였다. 이는 만성 **저**산소 환경은 급성 **저**산소 환경에 비해 신경세포의 적응을 유발하며 이는 세포 사멸에 비해 자멸사를 통해 **저**산소 환경에 적응하려고 하는 것 같다. PARP의 발현을 western blot analysys를 통해 관찰하고 정량적으로 분석한 결과 만성 **저**산소 환경에 의해 현**저**하게 증가한 것으로 관찰되었다. 이는 자멸사가 세포내 신호전달 체계를 통해 미토콘드리아의 파괴로 이어지는 경로를 거친다는 것을 알 수 있다.

흥미로운 것은 WIN이 만성 **저**산소 환경에 의한 신경세포손상을 방어할 수 있다는 것이다. 지금까지 다른 실험들은 주로 급성손상에 대한 보고였다. WIN과 같은 합성 카나비노이드 수용체 작용제가 만성 **저**산소 환경에 의한 세포 자멸사에 미치는 영향에 대한 보고는 드물다. 이번 실험에서 WIN이 자멸사를 감소시키는 신경방어능력이 있는 것을 확인하였다. 앞으로 그 세포내 신호 전달 체계에 대한 연구가 이루어 져야 하며, 이를 통해 WIN과 같은 카나비노이드 물질이 **저**산소증에 의한 신경 손상에 치료제로서의 가능성을 확인할 수 있을 것이다.

참고문헌

1) Hack M, Fanaroff AA: Outcomes of children of extremely low birthweight and gestational age in the 1990's. Early Hum Dev 53: 193-218, 1999
2) Wood NS, Marlow N, Costeloe K, Gibson AT, Wilkinson AR: Neurologic and developmental disability after extremely preterm birth. EPICure Study Group. N Engl J Med 343: 378-384, 2000
3) Vannucci RC: Experimental biology of cerebral hypoxia-ischemia: relation to perinatal brain damage. Pediatr Res 27: 317-326, 1990
4) Bernaudin M, Nedelec AS, Divoux D, MacKenzie ET, Petit E, Schumann-Bard P: Normobaric hypoxia induces tolerance to focal permanent cerebral ischemia in association with an increased expression of hypoxia-inducible factor-1 and its target genes, erythropoietin and VEGF, in the adult mouse brain. J Cereb Blood Flow Metab 22: 393-403, 2002
5) Nagayama T, Sinor AD, Simon RP, Chen J, Graham SH, Jin K, Greenberg DA: Cannabinoids and neuroprotection in global and focal cerebral ischemia and in neuronal cultures. J Neurosci 19: 2987-2995, 1999
6) Mechoulam R, Spatz M, Shohami E: Endocannabinoids and neuroprotection. Sci STKE 2002: RE5, 2002
7) Fernandez-Lopez D, Pazos MR, Tolon RM, Moro MA, Romero J, Lizasoain I, Martinez-Orgado J: The cannabinoid agonist WIN55212 reduces brain damage in an in vivo model of hypoxic-ischemic encephalopathy in newborn rats. Pediatr Res 62: 255-260, 2007
8) Sestan N, Artavanis-Tsakonas S, Rakic P: Contact-dependent inhibition of cortical neurite growth mediated by notch signaling. Science 286: 741-746, 1999
9) Ment LR, Stewart WB, Fronc R, Seashore C, Mahooti S, Scaramuzzino D, Madri JA: Vascular endothelial growth factor mediates reactive angiogenesis in the postnatal developing brain. Brain Res Dev Brain Res 100: 52-61, 1997
10) Kumral A, Baskin H, Gokmen N, Yilmaz O, Genc K, Genc S, Tatli MM, Duman N, Ozer E, Ozkan H: Selective inhibition of nitric oxide in hypoxic-ischemic brain model in newborn rats: is it an explanation for the protective role of

erythropoietin? Biol Neonate 85: 51-54, 2004
11) LaManna JC, Vendel LM, Farrell RM: Brain adaptation to chronic hypobaric hypoxia in rats. J Appl Physiol 72: 2238-2243, 1992
12) Kim H, Li Q, Hempstead BL, Madri JA: Paracrine and autocrine functions of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and nerve growth factor (NGF) in brain-derived endothelial cells. J Biol Chem 279: 33538-33546, 2004
13) Ogunshola OO, Antic A, Donoghue MJ, Fan SY, Kim H, Stewart WB, Madri JA, Ment LR: Paracrine and autocrine functions of neuronal vascular endothelial growth factor (VEGF) in the central nervous system. J Biol Chem 277: 11410-11415, 2002
14) Fernandez-Lopez D, Martinez-Orgado J, Nunez E, Romero J, Lorenzo P, Moro MA, Lizasoain I: Characterization of the neuroprotective effect of the cannabinoid agonist WIN-55212 in an in vitro model of hypoxic-ischemic brain damage in newborn rats. Pediatr Res 60: 169-173, 2006
15) Valenti M, Cottone E, Martinez R, De Pedro N, Rubio M, Viveros MP, Franzoni MF, Delgado MJ, Di Marzo V: The endocannabinoid system in the brain of Carassius auratus and its possible role in the control of food intake. J Neurochem 95: 662-672, 2005
16) Nedelcu J, Klein MA, Aguzzi A, Martin E: Resuscitative hypothermia protects the neonatal rat brain from hypoxic-ischemic injury. Brain Pathol 10: 61-71, 2000
17) Wagner BP, Nedelcu J, Martin E: Delayed postischemic hypothermia improves long-term behavioral outcome after cerebral hypoxia-ischemia in neonatal rats. Pediatr Res 51: 354-360, 2002
18) Vannucci RC, Towfighi J, Vannucci SJ: Hypoxic preconditioning and hypoxic-ischemic brain damage in the immature rat: pathologic and metabolic correlates. J Neurochem 71: 1215-1220, 1998