

배양된 해마 조직 절편에서 Beta-Amyloid Peptide의 신경 독성 효과

이화여자대학교 의과대학 약리학교실
박정선 · 조미선 · 정연주 · 이경은

= Abstract =

Neurotoxic Effect of Beta-Amyloid Peptide in Hippocampal Slice Culture

Jung Sun Park · Mi Sun Jo · Yeon Joo Jung · Kyung Eun Lee

Department of Pharmacology and Medical Research Mstitute, College of Medicine,
Ewha Women University

Alzheimer's disease (AD) is primarily characterized by neurofibrillary tangles, senile plaques, and neurodegeneration. The major component of senile plaques is the beta-amyloid peptide ($A\beta$), which is considered to have a causal role in AD. However, the biological activities of $A\beta$ in AD has not been clearly defined. In this study, we have investigated the effects of $A\beta$ 25-35 fragment to neurons using organotypic hippocampal slice culture system which maintained intact hippocampal synaptic circuit and anatomy. Hippocampal slice culture is prepared from rat postnatal 10-old days and after 14 days culture, slices were treated with 10uM $A\beta$ 25-35 fragment. Neuronal death was measured with propidium iodide (PI) uptake and NeuN, neuronal marker, staining. After treatment of $A\beta$ 25-35 fragment for 3days or 7days on hippocampal slice culture, we observed the increased PI uptake and the decreased number of NeuN-stained neuron in CA1 region of hippocampal pyramidal layer or dentate gyrus. These results suggested that $A\beta$ 25-35 fragment exerts the neurotoxicity in hippocampal slice culture.

KEY WORDS : Beta-Amyloid peptide · Neurotoxicity · Hippocampal slice culture.

서 론

알츠하이머 병의 원인은 아직 밝혀지지 않았지만 beta-amyloid peptide ($A\beta$)라는 물질이 과도하게 뇌에서 축적되어 신경세포가 죽는 것으로 추측되고 있다. $A\beta$ 는 알츠하이머 환자의 뇌에서 관찰되는 특징 중에 하나인 senile plaque의 주요 성분으로 proteolytic processing을 통해 amyloid precursor protein (APP)로부터 생성

되는 39~43개의 아미노산으로 이루어진 펩타이드이다¹⁾²⁾. $A\beta$ 는 생체 외에서 배양된 신경세포에 직접 독성을 나타내거나 glutamate와 관련된 흥분성 신경독성에 대한 신경세포 손상을 증가시킨다³⁻⁵⁾. 그러나 $A\beta$ 는 배양된 미성숙 신경 세포에서는 신경 친화적 (neurotrophic)으로 작용한다는 보고도 있다⁶⁾. 그러므로 아직까지 $A\beta$ 가 신경세포에 미치는 영향에 대해서는 정확히 이해되지 않고 있다.

알츠하이머 병에서 나타나는 주요 증상 중의 하나는 점진적인 기억력 소실이다. 기억과 학습은 해마에서 관장하는

것으로 알려져 있고' 또한 해마는 뇌 손상에 대해 가장 많은 영향을 받는 부위 중 하나⁸⁾이기 때문에 이러한 기어의 소실은 해마의 신경세포의 손상과 연관될 것으로 생각된다.

흰쥐의 해마 조직 절편 배양은 생체 외 세포 배양과 달리 시냅스 회로, 해부학적, 생리학적 구조, 그리고 신경전달 물질 수용체의 분포 등이 생체 내 해마와 매우 흡사하게 유지되므로⁹⁾ 뇌의 기능을 연구하는데 매우 유용하게 이용될 수 있다.

따라서, 이번 실험에서는 신경세포에 대한 A β 의 효과를 연구하기 위해서 배양된 해마 조직 절편에 10 μ M의 농도로 A β 25-35 단편(fragment)을 처리한 후 propidium iodide (PI) 형광 염색과 neuronal nuclei (NeuN)에 대한 면역형광 염색을 이용하여 신경세포의 죽음을 조사하였다.

실험 재료 및 방법

1. 실험 동물과 실험 군

실험 동물로는 생후 10일째 되는 흰쥐(Sprague-Dowley)를 암수 구별없이 사용하였다. 실험 군은 대조군과 약물투여 군으로 분리하였다.

2. 해마 조직 절편 준비

해마 조직 절편 배양은 Stopirni, et al¹⁰⁾의 방법을 일부 변형하여 시행하였다¹¹⁾¹²⁾. 즉, 실험동물을 희생시킨 후 멸균적인 조건하에서 뇌를 빠르게 적출한 후 차가운 해부용 배양액에 옮기고 해마를 분리한 후 McIlwain tissue chopper (Mickle laboratory engineering Co. Ltd, Surrey, UK)를 사용하여 400 μ m 두께로 절단하여 해부용 배양액이 들어 있는 pertri-dish로 옮겼다. 그 중 해마의 신경구조가 완전히 잘 보존된 절편을 선택하여 영양액을 포함하는 6well 판에 들어있는 0.4 μ m millicell culture plate insert 위에 놓았다. 영양액에는 minimum essential medium, 25% normal horse serum, Earle's balanced salt solution, HEPES, L-glutamine, streptomycin sulfate가 포함되었다. 해마 조직 절편은 37 $^{\circ}$ C, 5% 이산화탄소가 존재하는 배양기(Forma scientific Inc., Ohio, USA)에서 배양하였다.

3. 약물 처리

해마 조직 절편을 14일 동안 배양한 후 beta-amyloid

(A β) 25-35 fragment (Sigma, ST. Louis, MO, USA)을 3일 또는 7일 동안 최종농도 10 μ M이 되도록 처리하였다.

4. Cresyl violet 염색

해마 조직 절편을 4% paraformaldehyde/0.1M phosphate buffered saline (PBS)에서 15분 동안 고정한 후 PBS로 세척하였다. 그리고 insert로부터 해마 조직 절편을 떼어 내어 24well 판으로 옮긴 후 0.1% cresyl violet 용액을 첨가하고 5분간 방치하였다. 증류수로 2회 세척하고 50%, 70%, 80%, 95%, 100% 알코올을 차례로 처리하여 탈수시켰다. 증류수로 2회 세척하고 1% HCl를 2~3초간 처리한 후 다시 증류수로 세척하였다. 염색된 해마 조직 절편을 표본 제작하여 광학 현미경하(Axiovert 200, Hallbergmoos, Germany)에서 관찰하였다

5. Propidium iodide 염색

PI는 손상된 세포막을 가진 세포 안으로 들어가 DNA와 결합하는 형광시료로서 세포 죽음의 지표로 이용된다¹³⁾. PI (Sigma, ST. Louis, MO, USA)는 최종농도 2 μ g/ml 되도록 배양액에 첨가하여 1시간 동안 배양한 후 형광현미경(Axiovert 200, Hallbergmoos, Germany)으로 세포 죽음의 정도를 관찰하였다.

6. 면역 형광 염색법

해마 조직 절편을 4% paraformaldehyde/0.1 M phosphate buffered saline (PBS)에서 4시간 동안 고정한 후 PBS로 세척하였다. 그리고 insert로부터 해마 조직 절편을 떼어 내어 24well 판으로 옮겨 10% bovine serum albumin/0.2% triton x-100/PBS에 1시간 동안 방치함으로써 비특이적 반응을 차단시켰다. 세척없이 일차항체 anti-mouse NeuN를 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 16~18시간 방치한 후 세척하고 fluorescein anti-mouse IgG의 이차항체로 2시간 동안 반응시켰다. PBS로 세척한 후 해마 조직 절편을 표본 제작하여 형광현미경(Axiovert 200, Hallbergmoos, Germany)으로 관찰하였다.

결 과

1. Cresyl violet 염색

14일 동안 배양된 해마 조직 절편은 피라미드 신경 세포층과 dentate gyrus의 과립 세포층이 선명히 구별되는

정상적인 신경세포의 형태를 유지하고 있어 해마 절편 배양이 성공적으로 수행되고 있음을 보여 주었다(Fig. 1A).

2. PI 염색

신경세포 손상을 측정하기 위하여 14일간 배양된 해마 조직 절편에 10 μ M의 A β 25-35 단편을 3일 또는 7일간 처리하고 PI 염색을 실시하였다. 14일간 배양된 대조군의 해마 조직 절편에서는 PI 형광이 거의 나타나지 않았으나(Fig. 1B) A β 25-35 단편에 3일간 노출시켰을 경우 피라미드 신경 세포층의 CA1 부위에서 신경세포의 손상을 의미하는 PI 형광이 관찰되었다. 그러나 CA3와 dentate gyrus 부위에는 PI가 표지 되지 않았다(Fig. 1C). A β 25-35 단편을 7일 동안 처리하였을 경우에는 CA1 부위에 있는 피라미드 신경 세포층의 세포 뿐 아니라 dentate gyrus에 있는 신경세포도 PI 형광을 나타내었다. 그러나 CA3 부위에는 여전히 신경 세포의 손상이 나타나지 않았다(Fig. 1D).

대조군과 실험군에 사용된 해마 조직 절편에서 신경

세포의 세포체(cell body)가 거의 없는 stratum oriens, stratum radiatum, stratum lacunosum-moleculare에는 PI 형광이 관찰되지 않았다.

3. NeuN 염색

NeuN는 신경세포의 핵에 특이하게 존재하는 단백질로서 신경세포의 표지자로 널리 이용되고 있다¹⁴⁾.

대조군의 해마 조직 절편에서 NeuN은 정상적인 뇌조직의 해마에서 관찰되는 것과 매우 유사하게 피라미드 세포층과 dentate gyrus에서 관찰되었다(Fig. 2A). NeuN 염색에 의한 신경세포의 변화는 PI 염색 결과와 매우 유사하여 3일 동안 A β 25-35 단편을 처리한 해마 조직 절편에서 NeuN에 염색된 신경세포는 피라미드 세포층의 CA1 부위에서 현저히 감소하였다(Fig. 2B). 7일 동안 A β 25-35 단편을 처리하였을 경우에는 NeuN에 염색된 신경세포는 CA3 부위에서만 관찰되었고 피라미드 세포층의 CA1 부위와 dentate gyrus에서는 모두 소실되

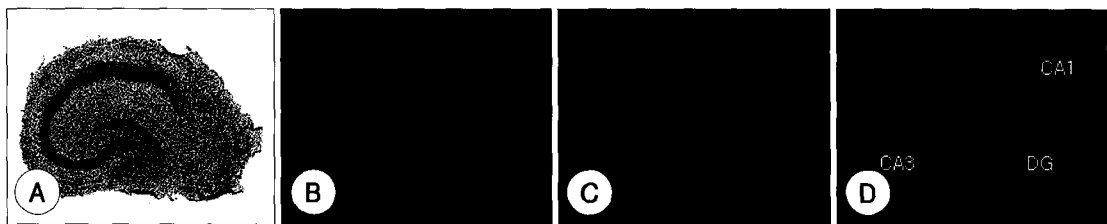


Fig. 1. Typical feature of rat hippocampal slice culture (A) and PI fluorescence image after treatment of A β 25-35 fragment (B-D). (A) Typical cellular organization of cresyl violet staining in hippocampal slice culture. The neurons in the CA1 and CA3 region of the pyramidal cell layer and dentate gyrus (DG) are clearly visible. (B) Propidium iodide (PI) fluorescence image in untreated culture, showing a lack of PI fluorescence. (C) PI fluorescence image after 3day-treatment of A β 25-35 fragment. PI uptake is observed in the CA1, but there is no significant fluorescence in either the CA3 regions of the pyramidal cell layer or dentate gyrus. (D) PI fluorescence image after 7day-treatment of A β 25-35 fragment. PI fluorescence is not observed in CA3, but in the CA1 and the DG.

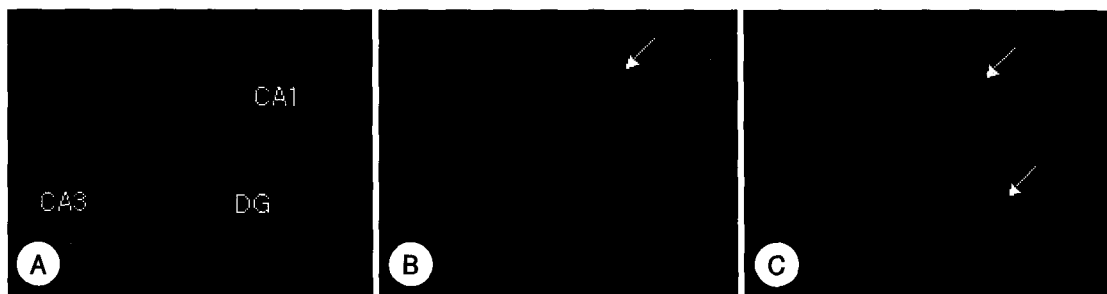


Fig. 2. NeuN immunostaining in rat hippocampal slice culture after treatment of A β 25-35 fragment. (A) In untreated culture, NeuN-stained neurons is visible in pyramidal layer and dentate gyrus (DG), resembling *in vivo* hippocampus. (B) The hippocampal slice treated A β 25-35 fragment for 3days shows neuronal loss in only CA1 region. (C) After 7day-treatment of A β 25-35 fragment, NeuN-stained neurons in CA1 and DG have disappeared, while neurons in CA3 still survive.

었다(Fig. 2C).

고 찰

A β 는 α -secreasase와 γ -secreasase라는 protease에 의해 APP로부터 생성되며 정상적으로 제거된다. A β 는 38~43개 아미노산의 길이에 따라 여러 isoform이 존재하는데, A β 1-40은 정상인의 뇌척수액에서 발견되는 주된 용해성 A β 이고, A β 1-42는 단지 작은 양으로 존재한다. 그러나 A β 1-42는 섬유화되기가 더 쉽고 amyloid deposits에서 풍부하게 발견된다¹⁵⁻¹⁷. A β 25-35는 합성된 가장 짧은 A β 단편으로 full-length peptide의 물리학적 생물학적 성질을 보유한 A β 파생물질이며, 체내의 A β 와 유사하게 작용하여 A β 독성 연구를 위해 사용하기 적합하다¹⁸.

이번 실험에서 배양된 해마 조직 절편에 A β 25-35 단편을 10 μ M 농도로 3일 또는 7일 동안 처리한 후 PI 형광 정도와 신경세포 표지자인 NeuN의 염색을 이용하여 신경세포의 죽음을 측정함으로써 신경세포에 미치는 영향을 조사하였다. A β 에 대한 신경세포 손상은 PI 형광 증가 및 NeuN 염색 시 신경세포 감소에 의해 알 수 있었다. A β 를 3일 동안 처리하였을 경우 CA1부위의 신경세포들이 먼저 손상 받기 시작하며 DG 부위에서도 몇몇 세포들이 죽는 것을 관찰하였고 7일 처리 시에는 CA1과 DG 부위의 상당히 많은 신경세포가 소실된 반면 CA3 부위의 신경세포들은 여전히 생존하고 있어 해마 부위별로 A β 에 대한 민감도가 다름을 알 수 있었으며 CA3 부위는 A β 독성에 대해 저항성이 있는 것으로 생각되었다.

해마 부위에 따른 A β 에 대한 독성 효과의 차이는 부위에 따른 세포 회복과 생존에 관련되는 heat shock protein 같은 단백질 합성과 유전자의 변화, 세포학적, 형태학적 차이, 각 부위로 연결되어 있는 신경회로의 차이, 신경전달 물질에 대한 수용체 분포의 차이 등이 연관될 것으로 생각된다¹⁹. 특히 DG에 나타나는 A β 의 독성 효과는 뇌조직에서는 달리 해마 조직 절편은 entorhinal cortex로부터 DG로 들어오는 perforant 회로는 모두 제거되고 해마만은 분리하여 배양한 상태이므로 perforant 회로를 통해 전달될 수 있는, A β 독성으로 부위의 신경세포 생존에 중요한 영향을 미치는 신경 보호 인자들이 차단되었을 것으로 생각된다.

A β 가 신경세포에 독성을 나타내는 기전은 아직 정확

히 밝혀지지 않았으나, 신경세포와 아교세포에서 활성 산소(reactive oxygen species : ROS)에 의한 산화성 손상(oxidative stress), 미토콘드리아의 손상, 세포 내 칼슘 항상성의 불안정화 등이 연관되어 있는 것으로 알려져 있다¹⁵⁾²⁰⁻²². A β 는 세포막에 이온 통로(ion channel)을 형성하여 세포 내로 직접적인 칼슘의 유입을 일으킨다. 또한 A β 는 L-type voltage-sensitive Ca²⁺ channel과 같은 기존의 이온통로를 통한 칼슘의 유입을 유도한다²³⁾²⁴. 칼슘의 세포 내로 유입은 칼슘 항상성을 파괴하고 결국 신경세포의 손상을 일으키게 된다. 또한 칼슘의 항상성의 파괴는 산화성 손상과 ROS의 축적을 유도한다²⁵⁾²⁶. ROS의 표적 중 하나는 phospholipid membrane으로 ROS에 의해 계속되는 세포막의 손상은 칼슘을 포함한 몇몇 이온들의 투과성을 증가시킨다. 결국 ROS 축적은 칼슘 유입을 다시 촉진하고 그것은 또다시 ROS의 축적을 유발함으로써 두 인자 모두 신경세포 손상을 유발한다. 또 과도한 칼슘 유입은 세포 내에서 비정상적인 kinase 활성화를 유발하고 신호 전달을 변형시켜 세포죽음을 초래하게 된다.

미토콘드리아는 산화성 손상의 표적이 될 뿐 아니라 ROS의 내인적 생성원으로 작용하는데²⁷, A β 는 미토콘드리아에서의 ROS 생성을 증가시켜 결국 미토콘드리아의 기능 손상을 유발시킨다²⁸⁾²⁹. 또한 A β 는 미토콘드리아에 직접적으로 작용하기도 하는데, A β 가 미토콘드리아에 불완전하게 위치하거나 점진적으로 축적되어 효소 활성의 감소, respiratory chain 손상, mitochondrial permeability transition pore(mPTP)를 개방시킨다. mPTP의 개방은 cytochrome C 방출, caspase 활성화 등을 촉진하여 신경세포 죽음을 야기시킨다³⁰⁻³³.

결론적으로, A β 25-35 단편은 배양된 해마 조직 절편의 CA1 부위와 DG 부위의 신경세포의 죽음을 초래한다. A β 가 신경세포 죽음을 유발하는 기전은 계속 연구되어야 할 것이라 생각되며 해마 조직 절편의 배양은 A β 의 약물 효과를 연구하기 위한 매우 유용한 기술이라 판단된다.

References

- 1) Maccioni RB, Munoz JP, Barbeito L : *The molecular base of Alzheimer's disease and other neurodegenerative disorders. Archiv med Res 2001 ; 32 : 377-381*

- 2) Mudrer A, Lovestone S : *Alzheimer's disease do tauists and baptists finally shake hands? Trends Neurosci* 2002 ; 25 : 22-26
- 3) Andrew G, Friederike WB, Elizabeth K, Ruth S, David S : *Involvement of cell cycle elements, cyclin-dependent kinases, pRb, and E2F-DP, in B-amyloid-induced neuronal death. J Bio Chem* 1999 ; 27 : 19011-19016
- 4) Dertk T : *Agata C, Christina J, Endrew R, Apotosis induced by β -amyloid in cultured central nervous system neurons. Neurobiology* 1993 ; 90 : 7951-7955
- 5) Pike CJ, Burdick D, Walencewicz AJ, Glabe CG : *Neurodegeneration induced by β -amyloid peptides in vitro : The role of peptide assembly state. J Neurosci* 1993 ; 13 : 1676-1687
- 6) Yanknen BA, Duffy LK, Kirschen DA : *Neurotrophic and neurotoxic effect of amyloid β protein : Reversal by tachykinin neuropeptides. Science* 1999 ; 250 : 279-282
- 7) Jarrard LE : *On the role of the hippocampus in learning and memory in the rat. Behav Neural Bio* 1993 ; 60 : 9-26
- 8) Harry GJ, d'Hellencourt CL : *Dentate gyrus : Alterations that occur with hippocampal injury. NeuroToxicology* 2003 ; 24 : 343-356
- 9) Gähwiller BH, Capogna M, Debanna D, Mcking RA, Thompson SM : *Organotypic slice culture : A technique has come of age. Trends Neurosci* 1997 ; 20 : 471-477
- 10) Soppini L, Buchs PA, Muller D : *A simple method for organotypic cultures of nervous tissue. J Neurosci Meth* 1991 ; 37 : 173-182
- 11) Park EM, Chu SH, Lee KE : *Glucose/oxygen deprivation induces release of [³H] 5-hydroxytryptamine associated with synapsin I expression in rat hippocampal slice. Kor J. Physiol Pharmacol* 2000 ; 4 : 347-353
- 12) Jung YJ, Park SJ, Park JS, Lee KE : *Glucose/oxygen deprivation induces the alteration of synapsin I and phosphosynapsin. Brain Res* 2004 ; 996 : 47-54
- 13) Guang-ping Xu, Kunjan RD, Richard V, Rainald SK, Thomas JS, Miguel A : *Improvement in neuronal survival after ischemic preconditioning in hippocampal slice cultures. Brain Res* 2002 ; 952 : 153-158
- 14) Mullen RJ, Buck CR, Smith AM : *NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. Development* 1992 ; 116 : 201-211
- 15) Laura C, Andrey YA, Michael RD : *Toxicity of Amyloid β peptide : Tales of calcium, mitochondria, and oxidative stress. Neurochem Res* 2004 ; 29 : 637-650
- 16) Stephen A, Gravina LH, Chrostoper BE, Kristin EL, Laazlo O, Linda HY, Nobuhiro S, Steven GY : *Amyloid β protein ($A\beta$) in Alzheimer's disease brain. J Bio Chem* 1995 ; 270 : 7013-7016
- 17) Mehta PD, Pittlilla T, Patrick BA, Barshatzky M, Mehta SP : *Amyloid β protein 1-40 and 1-42 levels in matched cerebrospinal fluid and plasma from patients with Alzheimer disease. Neurosci lett* 2001 ; 304 : 102-106
- 18) Christian J, Andrea J, Walencewicz W, Joseph K, David HC, Charles GG, Carl WC : *Structure-activity analyses of β -amyloid peptide contributions of the β 25-35 region to aggregation and neurotoxicity. J Neurosci* 1995 ; 64 : 253-265
- 19) Schreber SS, Baudry M : *Selective neuronal vulnerability in the hippocampus-a role for gene expression. Trends Neurosci* 1995 ; 18 : 446-451
- 20) Dyrks T, Dyrks E, Hartmam T, Maste C, Beyrenther K : *Amyloidogenicity of β A4 and β A4-bearing amyloid protein precursor segment by metal catalyzed oxidation. J Bio Chem* 1992 ; 267 : 18210-18217
- 21) Behl C, Davis JB, Lesley R, Schubelt D : *Hydrogen peroxide mediated amyloid β protein toxicity. Cell* 1994 ; 7 : 817-827
- 22) Keisuke H, Gjumakcj A, Akihiko N, Hisashi F, Robert L, Russell, Mark AS : *Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. J Neurosci* 2001 ; 21 : 3017-3023
- 23) Ueda K, Shinohara S, Yagami T, Asakura K, Kawasaki K : *Amyloid β protein protentiate Ca^{2+} influx through L-type voltage-sensitive Ca^{2+} channels : A possible involvement of free radicals. J Neurochem* 1997 ; 68 : 265-271
- 24) Fatma JE, Kafait UM, Thomas BS : *Activation of the L voltage-sensitive calcium, channel by mitogen-activated protein (MAP) kinase following exposure of neuronal cell to β -amyloid. J Bio Chem* 1990 ; 274 : 30322-30327
- 25) Fatma JE, Maria-Dawn L, Thomas BS : *β -Amyloid-induced calcium influx induces apoptosis in culture by oxidative stress rather than tau phosphoprylation. Mol Brain Res* 2000 ; 76 : 389-395
- 26) Tomas BS, Sathya P, Fatra JE : *β -Amyloid and ionophore A23187 evoke tau hyperphosphorylation by distinct intracellular pathways : differential involvement of the calcium/protein kinase C system. J Neuro Res* 1997 ; 49 : 759-768
- 27) Hidupur KA, Gopa B, Marie AR, Narayan GA : *Mito-*

- chondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impair mitochondrial function in neuronal cells. J Cell Bio 2003 ; 161 : 41-54*
- 28) Jason PS, Russel SH, Scott WH, Robert ED, Jan KP, W. Davis P, Jeremy BT : *Calcium homeostasis and reactive oxygen species production in cells transformed by mitochondria from individuals with sporadic Alzheimer's disease. J. Neurosci 1997 ; 17 : 4612-4622*
- 29) Clorinada A, Teresa M, Ricardo QB, Loudes M : *β -Amyloid neurotoxicity is exacerbated during glycolysis inhibition and mitochondrial impairment in the rat hippocampus in vivo and in isolated nerve terminals : implication for Alzheimer's disease. Exp Neurol 2002 ; 176 : 163-174*
- 30) Laura C, John BC, Timothy EB : *β -Amyloid fragment 25-35 selectively decreases complex VI activity in isolated mitochondria. FEBS Lett 1999 ; 457 : 131-134*
- 31) Shevtzova EF, Kireeva EG, Bachurin SO : *Effect of beta-amyloid fragment 25-35 on nonselective permeability of mitochondria. Bull Exp Bio Med 2001 ; 136 : 1173-1176*
- 32) Kim HS, Lee JH, Kim JP, Kim EM, Chang KA, Park CH, Jeong SJ, Seo JH, Choi SH, Suh YH : *Amyloid β peptide induces cytochrome c release from isolated mitochondria. Mol Neurosci 2002 ; 13 : 1989-1993*
- 33) Paula IM, Maria SS, Antonio M, A. Cristina R, Catarina O : *Effect of amyloid-beta peptide on permeability transition pore : A comparative study. J Neurosci Res 2002 ; 69 : 257-267*
-