

의학 석사학위 논문

대뇌 피질 신경세포 일차 배양에서
리튬의 FeCl₂에 의한 free radical
injury 증강 기전 연구

아주대학교 대학원

의학과

이승혜

대뇌 피질 신경세포 일차 배양에서
리튬의 FeCl₂에 의한 free radical
injury 증강 기전 연구

지도교수 노재성

이 논문을 의학 석사학위 논문으로 제출함.

2006년 6월

아주대학교 대학원

의학과

이승혜

이승혜의 의학 석사학위 논문을
인준함.

심사위원장 노재성인

심사위원 정영기인

심사위원 곽병주인

아주대학교 대학원

2006년 6월 22일

대뇌 피질 신경세포 일차 배양에서 리튬의 $FeCl_2$ 에 의한 free radical injury 증강 기전 연구

리튬은 원자번호 3번의 단순한 경금속으로 정신과 영역에서 가장 먼저 도입된 약물로 조울증 및 반복적 우울증의 급성기 치료 및 유지기의 재발 방지를 위해 가장 많이 쓰이는 약물이다. 이러한 리튬의 기분 안정에 대한 연구들 뿐만 아니라 신경 세포 보호에 대한 연구들이 늘어나고 있다. 하지만 리튬이 신경 세포사의 형태에 따라 특이적으로 작용하여 세포 자멸사(apoptosis)는 억제하지만 괴사(necrosis)를 더 증강 시킨다는 연구가 보고 되고 있다. 본 연구에서는 리튬이 세포 자멸사(apoptosis)는 억제하지만 괴사(necrosis)는 더 증강시킨다는 가설을 세웠고 그 기전에 대해 알아보려고 하였다.

임신 14-15일 된 흰 쥐를 사용하여 14일 간 배양된 대뇌 피질 세포에 Fe^{2+} 30 μ M 를 처리한 후 세포가 죽어가는 양상은 cell body가 swelling되는 괴사가 진행되고 있었고 Li^+ 5mM만 단독 처리한 경우에는 괴사가 진행되고 있지 않았다. 하지만 Fe^{2+} 30 μ M에 Li^+ 5mM를 첨가한 후에는 괴사가 억제 되지 않고 오히려 증가되었음을 알 수 있었다. 이는 LDH분석법으로 신경 세포사를 정량해 보았을 때에도 Li^+ 5mM을 단독처리 했을 때에는 신경 세포사에 영향을 미치지 않았으나 Fe^{2+} 30 μ M에 Li^+ 5mM을 첨가하였을 때 신경세포사가 유의미하게 증가함을 알 수 있었다. 또한 리튬 자체가 free radical를 생성하여 신경세포 손상을 일으키는지를 측정하기 위해 14일간 배양된 대뇌 신경세포에 Li^+ 5mM를 처리하고 4시간 후에 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate(DCDHF-DA)를 가하여 이로 인한 산화된 생산물인 6-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA)의 변화하는 정도를 측정하였을 때 Li^+ 5mM를 단독 처리하였을 경우 리튬 자체만으로는 free radical를 형성하지 않는다는 것을 알 수 있

었다. 하지만 Fe^{2+} 30 μM 를 단독 처리했을 경우 free radical이 형성되고 여기에 Li^+ 5mM를 첨가하였을 때 Fe^{2+} 에 의해 유발된 free radical의 생산을 증강시켜 free radical injury에 의한 피사를 강화시키는 것을 알 수 있었다.

본 연구를 통해 리튬은 신경세포사의 형태에 따라 특이적으로 작용하여 세포 자멸사는 억제하지만 피사를 더욱 증강시킴을 알 수 있었고 리튬 자체에 의한 free radical을 형성하지는 않지만 Fe^{2+} 에 의해 유도된 free radical의 생산을 증가시킴을 알 수 있었다. 이를 통해 리튬이 다양한 다른 free radical injury에 대한 증강효과를 연구하여 임상실제에서 신경세포 보호 효과만을 강조하지 않고 항산화제 투여 등에 대한 다양한 고려들이 되어할 것이다.

핵심어 : 신경 세포사, 리튬, free radical injury, 세포 자멸사(apoptosis), 피사 (necrosis)

차 례

국문요약	i
차 례	iii
그림차례	iv
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	3
A. 실험동물 및 실험 기기	3
B. 배양액 및 용액 조성	3
C. 대뇌피질세포 배양	4
D. 신경 세포사 분석	4
E. Free radicals 측정	5
F. 통계처리	5
III. 결 과	6
A. 리튬이 Fe ²⁺ 에 의한 necrosis를 강화시킴	6
B. 리튬이 free radical injury를 증강시킴.	6
IV. 고찰	10
V. 결론	13
참고 문헌	14
ABSTRACT	18

그림 차례

Fig. I. Li ⁺ potentiates necrotic cell death.	8
Fig. II. Li ⁺ potentiates free radical injury induced by Fe ²⁺	9

I. 서 론

리튬은 급성 조울증 상태뿐만 아니라 반복적인 조증과 우울삽화의 예방에도 효과가 있고 자살예방에도 효과가 있는 것으로 알려져 있다.(Goodwin와 Jamison,1999) 정신과에 도입된 최초의 약물인 리튬은 기분 안정제(mood stabilizer)로서의 탁월한 효과를 설명하기 위한 다양한 연구의 대상이었고 단일 표적(target)이라기보다는 여러 개의 표적과 작용기전을 통해서 기분 안정제로서 작용할 가능성이 많다(Jope, 1999; Manji 등 1999).

최근에는 리튬이 신경 세포사에도 영향을 미쳐 신경세포 보호 효과가 있다고 알려져 있다. 지금까지 연구되어 온 것들을 보면 리튬은 ceramide, staurosporine, potassium결핍에 의한 신경세포의 세포 자멸사(apoptosis)를 억제하고(Bijur 등 2000; Centeno 등 1998; D'Mello 등 1994), 소뇌 과립세포(granular cell)배양에서 리튬을 장시간 처리할 경우 N-methyl-D-aspartate(NMDA) 수용체 활성화에 의한 괴사(necrosis)를 억제한다(Nonaka 등 1998). 리튬의 이런 신경세포 보호 효과는 NMDA 독성에 국한되지 않고 항 경련제인 phenytoin과 carbamazepine에 의한 세포 자멸사(apoptosis)를 억제하고(Nonaka 등 1998), 베타 아밀로이드에 의한 신경세포사도 억제한다고 알려졌다(Wei 등 2000). 그 외에도 리튬의 작용은 pro-apoptotic protein인 p53, Bax의 발현감소, cytoprotective protein인 Bcl-2의 증가, cell survival kinase인 Akt의 활성화, glycogen synthase kinase 3β(GSK-3β)의 억제 등이 있다(Manji 등 1999; Chuang 2002). 이러한 연구결과들을 고려해 볼 때 리튬의 신경세포 보호는 한 가지가 아닌 여러 기전과 표적을 통해 이루어진다고 생각해 볼 수 있다.

하지만 리튬이 신경세포 보호 효과뿐만 아니라 신경독성(neurotoxicity)효과도 있다는 것을 고려해야 한다. 리튬의 신경학적 부작용으로 진전(tremor), 기억력이 감소하거나 반응시간이 느려지는 등의 인지기능의 장애, 드물게는 말초신경병증(peripheral neuropathy)등이 나타날 수 있으며 심하면 발작(seizure)하거나 의식을 잃고 사망할 수도 있다(Benjamin 등 2003). 리튬을 장기간 사용하였을 경

우 지속적인 소뇌의 기능 장애를 나타내거나 추체외로 증후군(extrapyramidal syndrome)이 나타나기도 하며 뇌간(brainstem)에 기능장애를 나타낼 수 있고 치매 증상이 나타날 수 있다. 비특이적으로 안구진탕(nystagmus)이나 시신경염, 유두부종(papilledema)를 나타내거나 실명을 유발할 수도 있다. 이러한 신경독성이 혈중 치료 농도에서도 나타난다는 것은 리튬을 임상에서 사용함에 있어 주의 깊게 생각해보아야 할 부분이다(Adityanjee 등 2005).

이와 같이 리튬은 신경세포 보호와 신경독성이라는 반대되는 효과를 모두 나타낼 수 있고 어떤 작용기전에 따라 다르게 나타나는지 대한 연구가 분명히 밝혀져 있지 않다. 리튬의 신경세포 보호 효과의 긍정적인 측면을 주로 강조하게 되면 실제 임상에서 일어날 수 있는 리튬의 신경독성 효과에 대해 간과하게 되어 여러 부작용등을 초래 할 수 있다. 신경세포 일차배양에서 리튬이 calyculin A, cyclosporin A에 의해 유도된 세포 자멸사는 효과적으로 억제하지만 NMDA에 의한 excitotoxicity 및 FeCl₂에 의한 활성 산소에 의한 괴사는 억제하지 못한다(Kang 등 2003). 따라서 리튬을 신경세포 효과로 이용하기 위해서는 리튬의 신경손상형태에 따라 미치는 영향을 알아보고 그 기전을 규명하는 것이 필요할 것으로 생각된다. 이에 본 연구자는 신경 세포 일차 배양에서 산화적 손상에 의한 세포 사멸에 대한 리튬의 영향과 기전을 알아보고자 한다.

II. 재료 및 방법

A. 실험 동물 및 실험 기기

1. 실험 동물

임신 14-15일 된 흰쥐(ICR mouse)를 사용하였다.

2. 실험 기기

수술용 기구는 ROBOZ(Rockvill MA)를 사용했고 CO₂ incubator는 Forma Scientific(Marietta OH), Clean bench는 삼기를 사용하였다. 위상차 현미경과 해부 현미경은 Olympus(Japan), Conforcal scanning laser microscope(LSM 510)는 Carl Zeiss(Germany)를 사용하였다. Microplate reader는 Molecular device(Menro Park, CA)를, 원심분리기는 VISION Scientific(Korea)를 사용하였다. Minimal essential medium은 Invitrogen(California, U.S.A), FeCl₂는 Fluka(Switzerland), Trolox와 LiCl는 Sigma를 사용하였다.

B. 배양액 및 용액 조성

1. Media stoke(MS)

Minimal essential medium(Earl's salt, L-glutamine free, sodium bicarbonate free)에 21mM glucose와 26.5mM sodium bicarbonate을 첨가한다.

2. Growth medium(GM)

Liquid MEM(L-glutamine free, sodium bicarbonate free)에 20mM glucose, 10% horse serum 및 2mM glutamine을 첨가한다.

3. Plating medium(PM)

Liquid MEM에 20mM glucose, 5% fetal bovine serum, 5% horse serum 과 2mM glutamine을 첨가한다.

4. Hepes controlled salt solution(HCSS)

120mM NaCl, 5mM KCl, 1.7mM MgCl₂ 2.3 mM CaCl₂ 15mM glucose, 18mM HEPES, 10mM NaOH and 0.001% phenol red

C. 대뇌 피질 세포 배양

대뇌 피질 세포의 배양은 이전에 보고되었다(Noh와 Gwag, 1997). 본 연구에서 사용한 방법은 임신 14-15일 된 흰쥐 태아의 대뇌 피질을 분리하여 끝을 1/3 크기로 줄인 파스퇴르 피펫을 사용하여 단세포로 분리하였다. PM에 희석하여 100µg/ml poly-D-lysine과 4 µg/ml laminin으로 coating한 24 well plate에 5 hemispheres/plate(2x10⁵ cell/plate)의 밀도로 세포를 분주하여 5% CO₂, 37도로 유지되는 세포 배양기에서 배양하였다.

신경세포와 아교세포(glia cell)를 포함하는 혼합배양세포는 7일 째 (DIV 7) 별아교세포(astrocyte)가 단일층으로 자란 후 아교세포(glia cell)가 과도하게 증식하는 것을 억제하기 위해 10µM cytosine-arabinofuranoside(Ara-C)를 이틀 간 처리한 후 일주일에 2번씩 GM으로 갈아주었다(Noh 등, 2000).

D. 신경세포사 분석

Lactate dehydrogenase assay

독성 물질에 노출시켰던 세포들은 24시간 동안 위상차 현미경으로 계속 관찰하며 세포가 죽는 정도는 신경독성 약물에 노출 이후 24시간이 지난 다음, 죽은 세포로부터 배지로 분비되는 LDH(lactate dehydrogenase)활성을 측정하여 분석하였다. 세포 배양 상층액 25µl를 96 well plate에 옮기고 100µl의 β-NADH 용액(0.3mg/ml)과 25µl의 22.7mM pyruvate 액을 넣고 1분간 기다린 후 microplate reader로 340nm에서 흡광도 변화를 2분간 측정하였다. 측정값은 거의 모든 신경세포가 죽은 조건인 500µM NMDA를 24시간 동안 계속하여 노출시킨 후 그 배지로부터 얻은 LDH 활성값을 100% 세포사의 기준으로 하고 sham wash를 24시간 동안 노출하여 얻은 LDH 활성값을 0% 세포사의 기준으로 하여 다른 LDH 활성값을 보정하였다(정재훈 등, 1999).

E. Free radicals 측정

세포내 Free radicals은 ROS(reactive oxygen species)에 의해 산화된 dichlorodihydrofluorescein diacetate(DCDHF-DA)의 fluorescent signal를 통해 측정한다(Seo 등, 1999).

배양된 대뇌피질세포에 Fe^{2+} 30 μ M, 단독 혹은 표지된 농도의 리튬과 함께 처리한 후 4시간 후에 HCSS 완충액에 DCDHF-DA의 최종농도가 10 μ M가 되도록 신경세포에 첨가하여, 30분 동안 37 $^{\circ}$ C에서 배양한다. 배양한 후 confocal laser scanning microscope (LSH510, Carl Zeiss)위에 DCDHF-DA를 490nm (Ex = 490nm, Em = 510nm)에서 흥분시켜 그 상을 CCD camera를 통하여 얻은 뒤 LSM 510 expert mode software version 3.2(Carl Zeiss)를 이용하여 세포내에서 생성된 free radical의 양을 정량화하였다(Noh 등, 2000).

F. 통계처리

모든 자료는 computer에 저장되었고 이 저장된 자료들은 Systat사의 Sigmaplot version 9.0을 이용하여 분석하였다. 각 군에서 유도된 LDH 크기의 평균 간의 차이를 알아보기 위해 one-way ANOVA를 시행하였고 post hoc test로는 Student-Neuman-Keuls' test를 시행하였다.

III. 결 과

A. 리튬이 Fe^{2+} 에 의한 necrosis를 강화시킴.

14일간 배양된 대뇌 피질 세포에 Li^+ 5mM를 처리한 후 24시간 후에 LDH 분석법으로 신경 세포사를 검색하면 Li^+ 자체만으로 신경 세포사에 영향을 미치지 않는다(Fig I.D).

역시 14일 간 배양된 대뇌 피질 세포에 Fe^{2+} 30 μ M를 단독 처리한 것(Fig I.B)과 Fe^{2+} 30 μ M과 Li^+ 5mM를 같이 처리한 것(Fig I.C)을 24시간 후에 LDH 분석법으로 신경 세포사를 정량해 보면 Fe^{2+} 에 의한 신경세포사가 Li^+ 첨가로 인해 증가되었음을 알 수 있다. 또한 Fe^{2+} 30 μ M에 항산화제인 Trolox 10 μ M를 처리하였을 때 신경 세포사가 억제됨을 할 수 있다(Fig I.E). Fe^{2+} 에 의한 free radical injury로 cell body의 swelling되는 피사가 진행되고 있고(Fig I.B), Li^+ 5mM를 첨가 한 후에 피사가 더 진행하고 있음을 보여 준다(Fig I.C). 이 결과는 Fe^{2+} 에 의한 피사는 Li^+ 에 의해 억제되지 않고 오히려 강화되고 있음을 보여주고 있다. 이러한 결과는 Li^+ 이 세포 자멸사에 대해서는 신경세포 보호 효과가 있으나 피사는 더 강화시키고 있음을 보여주고 있다.

B. 리튬이 free radical injury를 증강시킴.

리튬 단독처리가 free radical을 생성하여 신경세포의 손상을 일으키는지 측정하기 위해 14일간 배양된 대뇌신경세포에 Li^+ 5mM을 처리하고 4시간 후에 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate(DCDHF-DA)를 가하여 이로 인한 산화된 생산물인 6-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA)의 변화 하는 정도를 측정한다. Li^+ 5mM 단독 처리한 경우에 Li^+ 자체만으로 free radical을 형성하지 않는다는 것을 알 수 있고(Fig II.D), Fe^{2+} 30 μ M 를 처리한 경우에는 free radical이 형성되며(Fig II. B) Fe^{2+} 30 μ M에 Li^+ 5mM를 첨가한 경우에는 free radical 생성이 더 증강됨을 알 수 있다(Fig II. C). 따라서 리튬 자체만으로 free radical을 형성하지 않으나 Fe^{2+} 에 의한 유발된 free radical의 생산을

증강시켜 free radical injury에 의한 피사를 강화시킨다(Fig II.E).

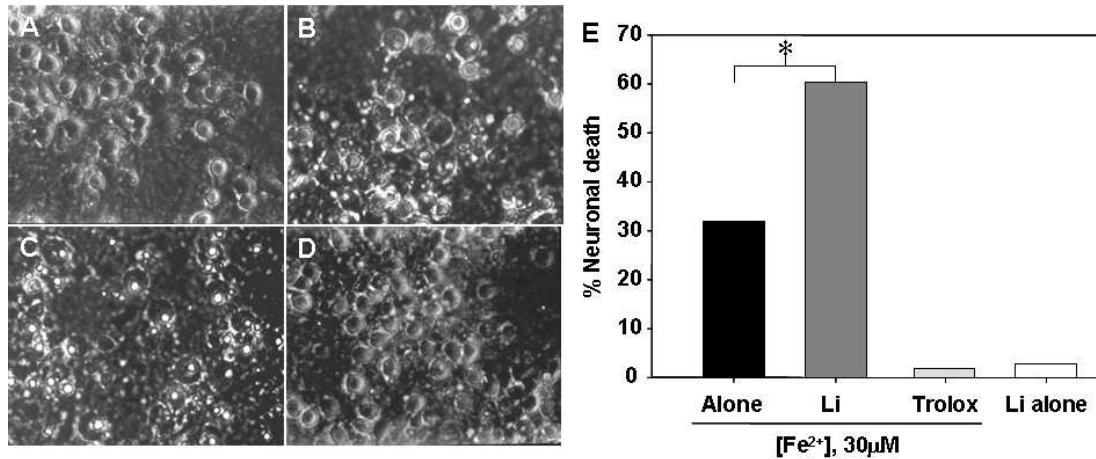


Fig. 1. Li^+ potentiates necrotic cell death. A–C, Phase contrast photomicroscope of cortical cell cultures (DIV 13–14) exposed to following conditions: sham control (A), 30 μM Fe^{2+} (B), 30 μM Fe^{2+} plus 5mM Li^+ (C), 5mM Li^+ alone(D). E, Cortical cell cultures were exposed to 30 μM Fe^{2+} alone or with 5mM Li^+ or with 10 μM Trolox. Neuronal death was analyzed 24h later by measuring LDH efflux into the bathing medium, mean \pm SEM (n = 8 culture wells/condition). *, P < 0.05, significant difference from relevant control (alone) by analysis of variance and Student–Neuman–Keuls’ test.

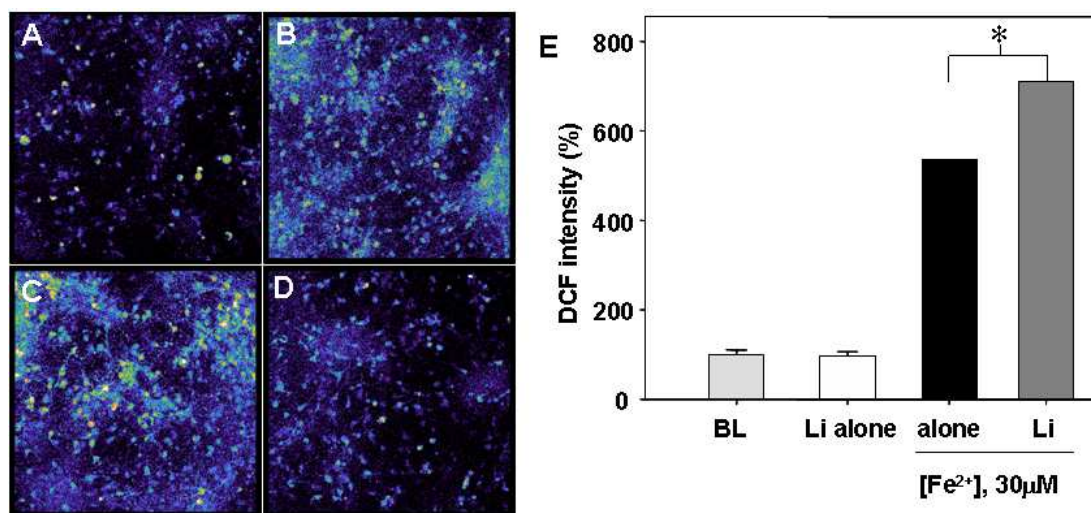


Fig. II. Li⁺ potentiates free radical injury induced by Fe²⁺. A-D, Fluorescence photomicrographs showing 6-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate, the oxidation product of DCDHF-DA with hydroxyl radical, in cortical cell cultures after 4h exposure to sham control (A), 30 μM Fe²⁺ (B), 30 μM Fe²⁺ plus 5mM Li⁺ (C), 5mM Li⁺ alone (D), E, Levels of hydroxyl radical were analyzed by measuring fluorescence intensity of 6-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate, mean±SEM (n = 50 - 60 neurons randomly chosen from two culture dishes for each condition). *, P < 0.05, significant difference from relevant control (alone) by analysis of variance and Student-Neuman-Keuls' test.

IV. 고찰

본 연구를 통해 쥐의 대뇌 신경세포 일차 배양에서 리튬 단독처리로는 신경 세포사를 유발하지 않으나 FeCl_2 를 처리하여 피사를 유발한 후에는 신경 세포사를 더 강화시키는 것을 알 수 있다. 또한 그 기전으로 리튬이 FeCl_2 에 의한 free radical injury의 생산을 증가시킴으로써 피사에 의한 신경 세포사를 더 증강시키는 것으로 생각된다.

본 연구에서는 신경 세포사의 형태에 따른 리튬의 영향에 대해 알아보고자 하는 것으로 신경 세포사는 세포 자멸사와 피사로 나누어 볼 수 있다. 첫 번째로 세포 자멸사는 정상적 발달 과정 중 일어나며 형태학적으로 세포가 죽을 때 세포질이 수축하여 핵 염색질의 응축이 일어나고 결국은 핵막과 세포질이 여러 개로 분리되어 주변의 식균세포에 의해 제거되는 세포사의 한 형태이다(Kerr 등, 1972; Gwag 등, 1995). 신경 성장 단백질(neurotrophic factors)제거, 베타 아밀로이드 처리, protein kinase 활성 억제등을 겪는 신경 세포들에서 세포 자멸사가 일어난다(Johnson 등, 1993; Loo 등, 1993; Deshpande 등, 1992; Ratan 등, 1994). 두 번째로 피사는 형태학적으로 세포질(plasma)과 핵막(nuclear membrane)의 파괴, 미토콘드리아(mitochondria)의 팽창으로 인한 세포 용적이 특징적으로 증가하여 결국 세포가 파괴되는 병적인 현상으로 정상적인 발달과정에서는 발생하지 않으며 주로 Ca^{2+} , Na^{2+} , Cl^- 등 이온들의 급격한 불균형을 유도하는 손상에 의하여 일어난다. 이때 신경세포에서는 ionotropic glutamate receptor가 활성화되어 Ca^{2+} 과 Na^+ 이 세포 안으로 들어가고 이에 따라 Cl^- 와 H_2O 가 신경세포 안으로 따라 들어가서 신경세포는 수 분후에 팽창하여, 수 시간 이내에 세포막이 완전히 유리된다(Choi,1987; Choi 등, 1990; Watt 등, 1994; Dessi 등, 1993; Koh 등, 1995).

리튬의 신경 독성은 이에 대한 작용기전이 명확히 밝혀져 있지 않지만 생검

상(biopsy) 말초신경계에 광범위한 말이집탈락(demyelination)이 발견되었고 특히 소뇌를 포함한 중추신경계의 여러 부위에 광범위한 말이집탈락(demyelination)되어 조롱박세포(Purkinje cell)의 손실, 소뇌피질의 신경아교증(gliosis), 위축 등에 영향을 미친다고 보고된다(Adityanjee 등, 2005). 리튬의 신경세포 보호와 신경독성 효과의 두 가지 다른 형태를 가지게 되는 원인 중의 하나로 장기간 리튬에 노출되면 PKC(Protein kinase C)를 활성화되고 GSK-3(glycogen synthase kinase-3 β)를 억제되는 신호전달 과정이 Lithium-response gene network에 작용하여 Lithium-response transcription factors나 promoter elements에 의해 유전자 발현을 변화시킴으로써 신경세포 보호 효과가 있다고 알려졌다(Lenox와 Wang, 2003). 또한 60세 이상에서 치매가 발병한 군과 대조군을 비교해 보았을 때 리튬을 사용하였을 경우 치매 발병을 예방하지 못하였다(Dunn 등, 2005). Alzheimer's disease에서 리튬이 GSK-3 β 를 억제하여 β -amyloid peptide에 의한 tau hyperphosphorylation과 세포사를 억제함으로써 신경 보호 효과가 있다는 보고도 있지만(Alvarez 등, 2002), 한편에서는 리튬이 GSK-3 β 의 translocation을 억제하지만 tau hyperphosphorylation과 DNA의 산화성 손상(oxidative DNA damage)의 억제와는 연관이 없는 것으로 알려졌다. 따라서 리튬을 단독으로 사용함으로써 β -amyloid peptide에 의한 여러 가지 부작용들을 예방한다고 할 수 없으므로 oxidative DNA damage나 tau hyperphosphorylation을 막을 수 있는 다른 약물의 사용을 고려해 보아야 한다(Ghribi 등, 2003).

리튬이 오랫동안 광범위하게 사용하게 쓰여 온 약물이고 BBB(Blood-brain barrier)를 잘 통과하고, 단백질에 결합하지 않는 등 그 대사과정 등이 간단하고 잘 알려진 약물이다. 따라서 리튬의 신경보호 효과와 신경독성효과가 다르게 나타나는 것에 대한 작용기전을 연구하여 임상 실제에서 적응증을 분명히 하여 사용하는 것이 필요할 것으로 생각된다. 이를 위해서 FeCl₂외에 다른 free radical injury에 대한 리튬의 신경독성 효과와 작용기전에 대해 연구가 되어야 할 것이며 본 연구 결과를 바탕으로 해서 리튬을 임상에서 적용 시에 항산화제를 같이

투여하는 것에 대해서도 고려해 보아야 할 것이다.

V. 결 론

본 연구는 리튬이 세포사멸 형태에 따라 다르게 작용하는 것과 그 작용기전에 알아보고자 하였고, 리튬이 그 자체로는 괴사를 유발하지 않으나 신경세포에서 FeCl₂로 인한 free radical injury를 유발하였을 때 free radical의 생산을 증가시킴으로써 괴사를 더욱 강화시킴을 알 수 있었다. 이 결과는 리튬의 세포 사멸사에 대한 신경세포 보호 효과만을 강조하여 임상 실제에서 사용하기 보다는 신경 세포 괴사를 강화시킴을 알고 free radical injury에 대해 리튬의 영향을 좀 더 연구해 보아야 할 것이다.

참고 문헌

1. 정재훈: 대뇌 피질 신경세포 일차 배양에서 6-hydroxydopamine에 의한 신경 세포의 사멸(석사학위 논문). 아주대학교, 1999
2. Adityanjee, Munshi KR, Thampy A: The syndrome of irreversible lithium-effectuated neurotoxicity. *Clin Neuropharmacol*, 28: 38-49, 2005
3. Alvarez G, Munoz-Montano JR, Satrustegui J, Avila J, Bogonez E, az-Nido J: Regulation of tau phosphorylation and protection against beta-amyloid-induced neurodegeneration by lithium. Possible implications for Alzheimer's disease. *Bipolar Disord* 4: 153-65, 2002
4. Benjamin JS, Virginia AS: Biological therapies. In: James Edmondson, Glen O. Gabbard, Jack A. Grebb, Myrl Manley, Caroly S. Pataki, Norman Sussman. editors. Synopsis of psychiatry. Behavioral Sciences/Clinical Psychiatry. Lippincott Williams & Wilkins, pp. 1069-1072, 2003
5. Bijur GN, De SP, Jope RS: Glycogen synthase kinase-3beta facilitates staurosporine and heat shock-induced apoptosis. Protection by lithium. *J Biol Chem* 275: 7583-7590, 2000
6. Centeno F, Mora A, Fuentes JM, Soler G, Claro E: Partial lithium-associated protection against apoptosis induced by C2-ceramide in cerebellar granule neurons. *Neuroreport* 9: 4199-4203, 1998
7. Choi DW, Rothman SM: The role of glutamate neurotoxicity in hypoxic-ischemic neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 13: 171-182, 1990
8. Choi DW: Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. *J Neurosci* 7: 369-379, 1987

9. Chuang DM, Chen RW, Chalecka-Franaszek E, Ren M, Hashimoto R, Senatorove V *et al.*: Neuroprotective effects of lithium in cultured cells and animal models of diseases. *Bipolar Disord* 4: 129-136, 2002
10. D'Mello SR, Anelli R, Calissano P: Lithium induces apoptosis in immature cerebellar granule cells but promotes survival of mature neurons. *Exp Cell Res* 211: 332-338, 1994
11. Deshpande J, Bergstedt K, Linden T, Kalimo H, Wieloch T: Ultrastructural changes in the hippocampal CA1 region following transient cerebral ischemia: evidence against programmed cell death. *Exp Brain Res* 88: 91-105, 1992
12. Dessi F, Charriaut-Marlangue C, Khrestchatisky M, Ben-Ari Y: Glutamate-induced neuronal death is not a programmed cell death in cerebellar culture. *J Neurochem* 60: 1953-1955, 1993
13. Dunn N, Holmes C, Mullee M: Does lithium therapy protect against the onset of dementia? *Alzheimer Dis Assoc Disord* 19: 20-22, 2005
14. Ghribi O, Herman MM, Savory J: Lithium inhibits Abeta-induced stress in endoplasmic reticulum of rabbit hippocampus but does not prevent oxidative damage and tau phosphorylation. *J Neurosci Res* 71: 853-862, 2003
15. Goodwin FK, Jamison KR: Manic-depressive illness. Oxford university press, New york. 1999
16. Gwag BJ, Lobner D, Koh JY, Wie MB, Choi DW: Blockade of glutamate receptors unmasks neuronal apoptosis after oxygen-glucose deprivation in vitro. *Neuroscience* 68: 615-619, 1995
17. Johnson EM, Jr., Deckwerth TL: Molecular mechanisms of developmental neuronal death. *Annu Rev Neurosci* 16: 31-46, 1993

18. Jope RS: Anti-bipolar therapy: mechanism of action of lithium. *Mol Psychiatry* 4: 117-128, 1999
19. Kang HJ, Noh JS, Bae YS, Gwag BJ: Calcium-dependent prevention of neuronal apoptosis by lithium ion: essential role of phosphoinositide 3-kinase and phospholipase C gamma. *Mol Pharmacol* 64: 228-234, 2003
20. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR: Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257, 1972
21. Koh JY, Gwag BJ, Lobner D, Choi DW: Potentiated necrosis of cultured cortical neurons by neurotrophins. *Science* 268: 573-575, 1995
22. Loo DT, Copani A, Pike CJ, Whittemore ER, Walencewicz AJ, Cotman CW: Apoptosis is induced by beta-amyloid in cultured central nervous system neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 7951-7955, 1993
23. Lenox RH, Le Wang: Molecular basis of lithium action: Integration of lithium-response signaling and gene expression networks. *Mol psychiatry* 8: 135-144, 2003
24. Manji HK, Moore GJ, Chen G. Lithium at 50: have the neuroprotective effects of this unique cation been overlooked? *Biol Psychiatry* 46: 929-940, 1999
25. Noh JS, Gwag BJ: Attenuation of oxidative neuronal necrosis by a dopamine D1 agonist in mouse cortical cell cultures. *Exp Neurol* 146: 604-608, 1997
26. Noh JS, Kang HJ, Kim EY *et al.*: Haloperidol-induced neuronal apoptosis: role of p38 and c-Jun-NH(2)-terminal protein kinase. *J Neurochem* 75: 2327-2334, 2000

27. Nonaka S, Hough CJ, Chuang DM: Chronic lithium treatment robustly protects neurons in the central nervous system against excitotoxicity by inhibiting N-methyl-D-aspartate receptor-mediated calcium influx. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 2642-2647, 1998
28. Nonaka S, Katsube N, Chuang DM: Lithium protects rat cerebellar granule cells against apoptosis induced by anticonvulsants, phenytoin and carbamazepine. *J Pharmacol Exp Ther* 286: 539-547, 1998
29. Ratan RR, Murphy TH, Baraban JM: Oxidative stress induces apoptosis in embryonic cortical neurons. *J Neurochem* 62: 376-379, 1994
30. Seo SY, Kim EY, Kim H, Gwag BJ: Neuroprotective effect of high glucose against NMDA, free radical, and oxygen-glucose deprivation through enhanced mitochondrial potentials. *J Neurosci* 19: 8849-8855, 1999
31. Watt JA, Pike CJ, Walencewicz-Wasserman AJ, Cotman CW: Ultrastructural analysis of beta-amyloid-induced apoptosis in cultured hippocampal neurons. *Brain Res* 661: 147-156, 1994
32. Wei H, Leeds PR, Qian Y, Wei W, Chen R, Chuang D: Beta-amyloid peptide-induced death of PC 12 cells and cerebellar granule cell neurons is inhibited by long-term lithium treatment. *Eur J Pharmacol* 392: 117-123, 2000

Lithium Potentiate the FeCl₂ Induced Free Radical Injury in Primary Mouse Cortical Cell Culture

Seung-hye Lee

Department of Medical Sciences
The Graduate School, Ajou University

(Supervised by Associate Professor Jai Sung Noh)

Objectives: For the past half century, lithium has been used for the acute and prophylactic treatment of bipolar disorder and recurrent depression. Recently, new pharmacological effects of Li⁺ have appeared, showing that Li⁺ can influence neuronal injury. We tested the effects of Li⁺ on free radical induced neuronal injury in primary murine cortical cell cultures.

Methods: Cortical cells were prepared from fetal mice (embryonic day 15) and exposed to 30μM Fe²⁺ alone or with 5mM Li⁺ for 24 hrs at Days in vitro (DIV) 14. Neuronal death was analyzed by measuring lactate dehydrogenase (LDH) release into media. The fluorescence of 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) was measured to estimate the formation of reactive oxygen species (ROS).

Results: Li⁺ alone does not produce neuronal injury itself but it potentiates Fe²⁺-induced neuronal injury through increasing the production of free radical.

Conclusion: This study suggests that the effects of Li^+ on neuronal survivorship may be injury type dependent. Li^+ potentiate the free radical induced neuroanl injury. Therefore clinician should be cautious in using the lithium in the treatment of brain injured patients.

key words: lithium, free radical injury, necrosis, apoptosis