

신경모세포종 세포배양에서 글루탐산염에 의해 유발된 흥분성세포독성에 대한 Indirubin-3'-monoxime의 보호 효과

¹건양대학교 의과대학 해부학교실 및 명곡의과학연구소

²강릉원주대학교 치과대학 구강해부학교실 및 구강과학연구소

한승연¹, 정보현², 이희수², 유기연^{2*}

서 론

신경연접점으로 분비되어 글루탐산염 수용체에 결합하는 글루탐산염(glutamate)은 포유동물의 주요 흥분성 신경전달물질로 알려져 있다¹⁾. 하지만, 글루탐산염에 의해 전달되는 신경전달의 과도한 흥분은 신경독성(neurotoxic)을 나타내거나 세포사멸(cell death)을 유발할 수 있다²⁾. 흥분성 아미노산들(excitatory amino acids)은 허혈(ischemia), 머리 외상(head trauma), 뇌졸중(stroke), 알츠하이머병(Alzheimer's disease) 및 파킨슨씨병(Parkinson's disease)과 같은 급성 뇌손상이나 만성 신경퇴행성 질환들의 병태생리에 관련이

있는 것으로 알려져 있다¹⁾. 이전의 글루탐산염에 관한 연구들은 calcium-dependent enzyme들의 활성화, nitric oxide synthase 및 미토콘드리아 활성산소종 생성과 같이 신경세포사멸을 일으키는 글루탐산염의 신경독성 유발 기전을 제시하였다³⁻⁵⁾.

여러 종류의 배양 신경세포들이 글루탐산염에 의해 발생하는 분자 수준의 현상을 규명하기 위해 사용되고 있는데, 그 중 신경모세포종(SH-SY5Y) 세포는 그들의 형태학적, 생화학적 그리고 기능적 특징들이 신경모세포(neuroblast)와 유사하여 neuron-like cell로써 세포사멸사 및 신경세포보호 연구를 위한 유용한 도구로써 이용되고 있다⁶⁾. 또한, 신경모세포종 세포주는 ionotropic 및 metabotropic glutamate receptor를 모두 발현하기 때문에 *N*-methyl-*D*-aspartate glutamate receptor (NMDA

* 교신저자 : 유기연

강릉원주대학교 치과대학 구강해부학교실 및 구강과학연구소
E-mail: kyyoo@gwnu.ac.kr

receptor)의 활성화를 통해 세포사멸을 유발하는 연구에 자주 사용된다⁷⁾. 본 연구에서도 IMX의 신경세포 보호효과를 확인하기 위하여 신경모세포종 세포주를 이용하였다.

사멸 세포에서 글루탐산염은 NMDA receptor의 흥분과 caspase-3의 활성화를 통해 농도에 의존적으로 세포자멸사(apoptosis) 및 세포괴사(necrosis)를 유발하는 경향이 있다^{8,9)}. 이때 글루탐산염 수용체의 과흥분은 주로 NMDA receptor를 통해 지속적으로 세포 내로 Ca^{2+} 를 유입시켜, Ca^{2+} 과 관련된 하위 기전에 과부하를 유발해 신경세포를 사멸에 이르게 한다¹⁰⁾.

Polygonum tinctorium, *Isatis indigotica* 및 *Isatis tinctoria*와 와 같은 식물들로부터 추출되는 남색 염료의 자주색 성분인 인디루빈(Indirubin)은 항염증 및 항백혈병 활성을 가지는 중국 한의약 처방의 활성 성분으로 알려져 있다¹¹⁾. 다양한 연구에서 인디루빈은 cyclin-dependent protein kinase (CDKs)¹¹⁾, glycogen synthetase kinase 3 (GSK3)^{11,12)}, c-Src kinase 및 c-Jun NH2-terminal kinase^{13,14)}와 같은 중요한 protein kinase들의 억제 능력을 보고한 바 있다. 인디루빈에 대한 연구는 인디루빈의 유도체들에 대한 연구까지 확장되어 있는데 여러 연구들에서 5-iodoindirubin-3'-monoxime, 5-5'-dibromoindirubin, iodoindirubin-3'-monoxime-5-sulfonate 및 indirubin-3'-monoxime (IMX) 등의

인디루빈 유도체들을 합성하였으며, 이들 유도체 또한 Cdk5, GSK3 β , 및 tau 인산화 등을 억제하는 것으로 알려져 있다¹¹⁾.

여러 인디루빈 유도체 중에서 IMX는 폐암 및 후두암에서 항암효과가 보고된 바 있으며, 대식세포에서 LPS에 의해 유도된 염증반응을 억제하는 것으로 알려져 있다. 뿐만 아니라 마우스를 이용한 알츠하이머병 모델에서 IMX의 처리는 A β 침착, tau 과인산화, A β plaque주변 미세아교세포와 별아교세포의 활성화 누적 등의 현저한 감소를 보인다는 연구결과도 제시된 바 있다¹⁵⁾. 하지만 아직까지 인디루빈 유도체들에 대한 연구 중 중추신경계 질환과 관련된 연구가 많지 않으며, 더군다나 대표적인 인디루빈 유도체인 IMX의 경우 가장 설득력있는 신경세포 사멸 기전 중 글루탐산염에 의한 흥분성신경독성에 의한 신경세포 사멸에 대한 연구는 진행이 된 바 없다.

따라서 본 연구에서는 신경세포와 유사한 특징을 가지며 불멸화되어 있어 계대배양이 용이한 신경모세포종 세포주에서 글루탐산염에 의해 유발된 흥분성신경독성에 대한 IMX의 세포사멸 억제 효과를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 SH-SY5Y 사람 신경

모세포종은 ATCC (Manassas, VA, USA)에서 구매하여 사용하였다. 글루탐산염, dimethyl sulfoxide (DMSO) 및 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT)는 Sigma chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였으며, indirubin-3'-monoxime은 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Dallas, TX, USA) 제품을 구입하여 사용하였다.

세포 배양

신경모세포종 세포는 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 배지에서 배양되었으며, 15% fetal bovine serum, penicillin (100 IU/ml), streptomycin (100 μ g/ml) 및 l-glutamine (2 mM)을 첨가하였다. 배양용 배지는 2일마다 교환하였으며, 세포 배지는 가슴배양기에서 온도 37 °C, 가스비 (공기: CO₂) 95%:5% 조건을 유지하며 배양하였다.

MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazoliumbromide) assay 본 연구 조건에서 IMX의 최대허용용량 (maximal tolerated dose) 및 글루탐산염의 반수최대억제농도 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀value)를 결정하기 위해 96-well plate에 신경모세포종 세포주를 5×10³cells/ml의 농도로 100 μ l씩 분주하여 37°C에서 24시간 동안 배양한 후 DMSO에 용해시킨 IMX (0, 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2,

4 및 8 μ M) 및 글루탐산염 (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 mM)을 각각 처리하여 동일한 조건에서 배양하였다. 정상군 (control)의 경우 용매로 사용된 DMSO만을 처리하였다. 배양 24시간 후 PBS에 녹인 MTT 용액 (5 mg/ml)을 각각의 well에 첨가하여 37°C에서 4시간동안 다시 배양하였다. 배양 종료 후 배지를 완전히 제거한 다음 DMSO를 첨가하여 실온에서 30분간 흔들어주었다. 세포생존력 (cell viability)는 ELISA reader를 이용하여 492 nm에서 흡광도를 측정하였다.

IMX의 글루탐산염에 의한 흥분성세포독성에서의 효과를 확인하기 위하여, 앞서 확인된 IMX의 최대허용량에 따라 0 - 2 μ M IMX 및 글루탐산염의 IC₅₀값에 따라 6 mM 글루탐산염 농도를 이용하였다. IMX의 효능 확인을 위해 동일한 방법으로 배양된 신경모세포종 세포주에 IMX (0-2 μ M) 및 6 mM 글루탐산염을 동시에 처리한 후 24시간 동안 배양하였으며 세포생존력은 앞서 사용된 방법과 동일하게 측정하였다.

각 실험군의 세포생존력 값은 정상군 세포를 100%로 하였을 때 상대적인 비율로 나타내었다.

세포의 형태학적 변화 관찰

IMX에 대한 신경모세포종 세포주의 형태학적 변화를 관찰하기 위해 6-well plate에 5×10³ cells/ml로 2 ml씩 첨

가하여 24시간 동안 배양하고 정해진 IMX의 농도 및 6 mM 글루탐산염을 동시에 처리한 후 24시간 뒤 위상차현미경을 이용하여 세포주의 형태학적 특징을 촬영하였다.

Statistical analysis

본 연구의 모든 결과는 처리군의 평균값간의 비교를 위하여 SPSS 프로그램 (SPSS Inc., Chicao, IL, USA)에서 일원분산분석(one-way ANOVA)법을 통해 F값을 구하고 LSD test를 통하여 대조군과 각 군간의 유의성 차이를 검증하였다. 통계적 유의성은 0.1% 수준에서 평가하였다.

결 과

IMX의 세포 독성

신경모세포종 세포주에 용매 또는 0.25-8uM IMX를 처리한 결과 세포생존력은 MTT assay에 의해 판단하였다 (Fig. 1). IMX 처리 후 2 μM 이하에서는 신경모세포종의 세포생존력이 정상군과 비교하여 유의성 있는 차이가 없었다. 4 μM 이상의 농도로 IMX를 처리한군에서는 정상군과 비교하여 세포생존력이 현저히 감소하였다 ($p < 0.01$ vs 정상군) (Fig. 1). 따라서, 본 연구에서 IMX의 처리 범위를 2 μM 이내로 하였다.

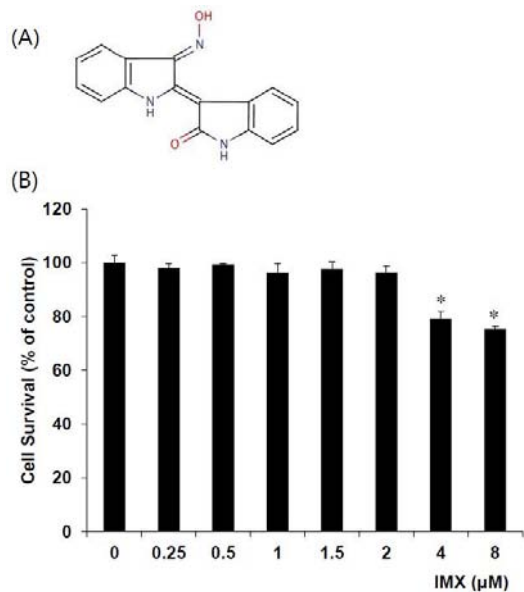


Fig 1. (A) Structure of indirubin-3'-monoxime (IMX). (B) Effects of IMX on SH-SY5Y cells. Cells were treated with the vehicle (control) or indicated concentration (0.25-8 μM) of IMX for 24 h. Cell viability was assessed as the percentage of the control group (* $P < 0.01$, significantly different from the control group). The bars indicate the means±S.D.

글루탐산염에 의한 세포 독성

글루탐산염에 의한 세포독성 또한 신경모세포종 세포주에 용매 또는 2-14 mM의 글루탐산염을 처리한 후 24시간 뒤에 MTT assay로 세포생존력을 측정하였다. 용매를 처리한 정상군에 비교하여 2 mM의 글루탐산염을 처리한 후 19.8%의 세포 생존력이 감소하여 글루탐산염의 농도가 증가함에 따라 세포생

존력은 더 감소하였다. 특히, 6mM 글루탐산염을 처리한 군에서는 61.1%의 세포생존력 감소를 확인할 수 있었다. 6 mM 이상의 농도에서도 지속적으로 농도의존적으로 세포생존력이 감소하였다. 따라서 본 연구에서는 6 mM 을 IC₅₀으로 사용하였으며 세포보호 효과에서 글루탐산염에 의한 세포독성 농도로 설정하였다 (Fig. 2).

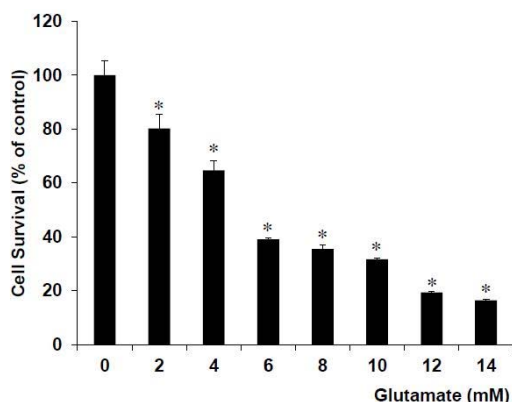


Fig 2. The cytotoxicity of glutamate on SH-SY5Y cells. Cells were treated with the vehicle (control) or indicated concentration (2–14 mM) of glutamate for 24 h. Cell viability was assessed as the percentage of the control group (**P* < 0.01, significantly different from the control group). The bars indicate the means ± S.D.

IMX의 세포 보호효과

IMX의 최대허용 용량 결정에 따라 결정된 IMX 및 6 mM의 글루탐산염을 처리하고 24시간뒤에 동일하게 MTT assay를 통해 세포생존력을 측정하여

세포사멸 억제효과를 확인하였다. 글루탐산염 및 용매 투여군에서는 세포생존력이 41.1%로 확인되었다. 0.25 μM IMX를 처리한 군에서는 세포생존력이 글루탐산염과 용매를 투여한 군보다 증가하였으며, 이때의 세포 생존력 증가율은 용매투여군 보다 49% 증가하였다. 이러한 증가는 0.15 mM IMX를 투여한 군 까지 큰 차이를 보이지 않았다. 하지만 2 mM IMX를 투여한 군에서는 세포생존력이 더 증가하여 용매투여군 보다 85.6% 증가를 나타내었다 (Fig. 3A).

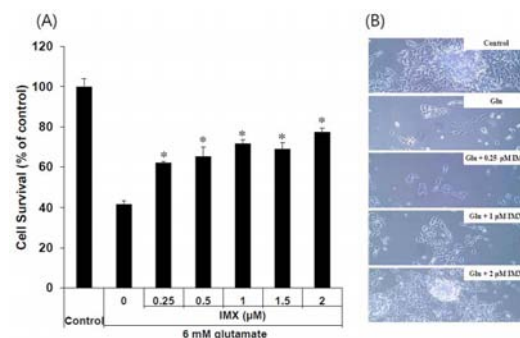


Fig 3. (A) Effect of IMX on SH-SY5Y cells viability decrease induced by glutamate. Cells were incubated with the vehicle (control) or the indicated concentration (0–2 μ M) of IMX and 6 mM glutamate for 24 h. Cell viability was assessed as the percentage of the control group (**P* < 0.01, significantly different from the vehicle and glutamate co-treated group). The bars indicate the means ± S.D. (B) Effect of IMX treatments on morphology of SH-SY5Y cells.

IMX의 흥분성 세포독성을 억제하는 효과는 광학현미경을 이용한 세포 관찰에서도 확인할 수 있었다. 정상군의 경우 위상차현미경 상에서 투명하게 관찰되는 많은 수의 둥근형태의 세포체와 신경돌기를 관찰할 수 있었다. 하지만 용매와 글루탐산염을 처리한 군에서는 관찰되는 세포의 수가 감소하였으며 세포체의 수축과 응집이 발견되었다. IMX를 처리한 군에서는 농도에 따라 발견되는 세포의 수가 증가하였으며 2 μ M IMX를 투여한 군에서는 정상군의 세포의 형태와 유사한 형태로 관찰되어 IMX의 세포보호 효과를 확인할 수 있었다 (Fig. 3B).

총괄 및 고안

뇌졸중을 포함한 신경퇴행질환들은 해마다 증가하는 추세에 있으며, 흥분성세포독성, 산화적스트레스, 세포자멸사 및 단백질 침착(α -synuclein과 A β) 등을 포함한 신경세포사멸에 관련된 주요 기전들이 이들 질환의 주요 기전이다¹⁶⁻¹⁸). 본 연구에서는 신경세포사멸의 가장 대표적 기전을 모델로 하여 신경모세포종 세포주에서 글루탐산염에 의해 유도된 흥분성세포독성에 대한 IMX의 효과를 확인하였다.

본 연구에서 흥분성신경독성에서 IMX의 효과를 확인하기 전 허용용량을 확인한 결과에서 2 μ M IMX의 용량까지는 세

포생존력의 유의성 있는 차이가 없었으며 4 μ M 이상의 농도에서 유의성 있는 세포 생존력의 저하가 확인되었다. 이와 같은 결과는 IMX에 대한 독성이 3 μ M 이상의 농도에서 나타난다는 이전의 보고와 일치하는 결과이며¹⁹⁾ 본 연구에서 최대 허용용량을 2 μ M 이내로 사용하는데 이용하였다.

또한 흥분성세포독성을 유발시키기 위한 방법으로써 글루탐산염을 사용하였다. 글루탐산염은 중추신경계에서 흥분성 신경전달물질로써 작용하지만, 신경세포에 흥분성세포독성을 유발할 수 있다. 글루탐산염 수용체의 활성화에 의해 유발된 칼슘 침착 증가, 단백질 분해효소의 활성화, 활성산소종의 발생 및 일산화질소(NO)의 발생에 의해 신경세포를 사멸에 이르게 한다. 이러한 글루탐산염에 의해 유발되는 세포독성은 다양한 신경세포주에서 연구된 바 있다²⁰⁻²²⁾. 본 연구에서는 신경모세포종 세포주에 다양한 농도의 글루탐산염을 처리하여 현저하게 독성을 유발하는 농도 (IC₅₀)을 6 μ M로 정하였다.

중추신경계에서 신경세포 사멸의 대표적인 기전인 흥분성세포독성은 여러 단계의 복잡한 신호체계를 거쳐 세포자멸사에 이르게 된다. 본 연구에서는 IMX가 글루탐산염 수용체의 활성화에 의한 흥분성세포독성의 기전이 작동된 신경세포를 보호하여 세포사멸을 억제하는지 확인하기 위하여 신경세포종 세포주에서

세포독성이 확인된 글루탐산염의 농도에 최대 허용 용량이 확인된 IMX를 동시에 처리하여 세포생존력을 확인한 결과 0.25 μ M IMX를 처리한 군에서부터 글루탐산염 단독으로 처리한 군보다 세포생존력이 증가하는 것을 확인하였으며 이러한 결과는 최대 허용용량인 2 μ M IMX 처리군까지 이어졌으며 처리 농도에 따라 세포생존력이 증가하고 세포 형태 관찰에서도 세포수가 글루탐산염 단독 처리군 보다 많은 것을 확인하여 신경세포종 세포주에서 IMX의 처리가 글루탐산염에 의해 유발된 흥분성세포독성을 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 이전의 알츠하이머병 연구에서 0.5 μ M 이상의 IMX 농도가 A β 유발 세포사멸을 효과적으로 억제한다고 보고하였으며, 이때 신경세포 보호효과는 IMX에 의한 tau 단백질의 과인산화억제에 의한 가능성이 있음을 제시한 바 있다¹⁹⁾. 알츠하이머병의 병인 기전에서도 tau 단백질의 인산화는 GSK-3 β 및 CDK5와 밀접한 연관성이 있는 것으로 알려져 있다^{23,24)}.

본 연구에서 흥분성세포독성에 의한 세포사멸을 효과적으로 억제한 IMX는 glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β)의 효과적인 저해제로 잘 알려져 있다. GSK3 β 는 중추신경계에 많이 분포한 serine/threonine kinase의 일종으로 세포의 생존에 중요한 기능을 하는데²⁵⁾, 일부 세포사멸 신호 중 GSK3

β 의 활성화가 나타나며, GSK3 β 의 과도한 활성화가 신경세포 사멸을 유발하는 것으로 알려져 있다. GSK3 β 의 활성화에 의한 신경세포 사멸은 A β 에 의한 신경세포 사멸에서 주로 발견되었었는데, 최근 글루탐산염에 의해 유발되는 흥분성세포독성에서도 GSK3 β 의 과도한 활성화가 일어난다는 보고가 있었다²⁶⁾. 이 연구에서는 글루탐산염은 세포독성유발 동안 GSK3 β 의 Ser9 인산화를 감소시켜 GSK3 β 의 과활성화를 유발하는 것으로 보고하였으며, 때문에 GSK-3 β 의 과활성화 억제는 신경세포사멸 보호의 전력적인 표적으로 이용할 수 있다고 제시하였다. 때문에 많은 연구자들이 GSK-3 β 의 조절이 신경세포 사멸로부터 신경세포를 보호할 수 있는 표적신호로 고려하고 있다.

결론

이상의 결과를 종합해 보면 글루탐산염의 처리는 신경모세포종 세포주에 세포독성을 유발하며, 강력한 GSK3 β 억제제인 IMX는 A β 에 의한 신경독성 뿐만 아니라 글루탐산염에 의해 유발되는 흥분성세포독성에 의한 신경세포 사멸을 보호할 수 있을 것으로 사료된다. 따라서, 흥분성세포독성 기전에 의하여 신경세포사멸이 일어나는 다양한 신경퇴행성 질환에서의 효과에 대한 가능성이 있기 때문에, 앞으로 이 질환들에 대한 동물

실험을 통해 효과를 검증해 볼 필요성이 있을 것으로 사료된다.

Acknowledgements

이 논문은 2012년도 강릉원주대학교 학술연구조성비지원에 의하여 수행되었음.

참고문헌

- Ozawa S, Kamiya H and Tsuzuki K: Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Prog Neurobiol* 54(5):581-618, 1998.
- Choi DW: Glutamate receptors and the induction of excitotoxic neuronal death. *Prog Brain Res* 100:47-51, 1994.
- Ankarcrona M, Dypbukt JM, Orrenius S and Nicotera P: Calcineurin and mitochondrial function in glutamate-induced neuronal cell death. *FEBS Lett* 394(3):321-324, 1996.
- Dawson VL, Kizushi VM, Huang PL, Snyder SH and Dawson TM: Resistance to neurotoxicity in cortical cultures from neuronal nitric oxide synthase-deficient mice. *J Neurosci* 16(8):2479-2487, 1996.
- Urushitani M, Nakamizo T, Inoue R, Sawada H, Kihara T, Honda K, Akaike A and Shimohama S: N-methyl-D-aspartate receptor-mediated mitochondrial Ca^{2+} overload in acute excitotoxic motor neuron death: a mechanism distinct from chronic neurotoxicity after Ca^{2+} influx. *J Neurosci Res* 63(5):377-387, 2001.
- Biedler JL, Helson L and Spengler BA: Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res* 33(11):2643-2652, 1973.
- Choi DW: Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* 1(8):623-634, 1988.
- Ankarcrona M, Dypbukt JM, Bonfoco E, Zhivotovsky B, Orrenius S, Lipton SA and Nicotera P: Glutamate-induced neuronal death: a succession of necrosis or apoptosis depending on mitochondrial function. *Neuron* 15(4):961-973, 1995.
- Verdaguer E, Garcia-Jorda E, Canudas AM, Dominguez E, Jimenez A, Pubill D, Escubedo E, Pallas JC and Camins A: Kainic acid-induced apoptosis in cerebellar granule neurons: an attempt at cell cycle re-entry. *Neuroreport* 13(4):413-416, 2002.
- Choi DW: Calcium: still center-stage in hypoxic-ischemic neuronal death. *Trends Neurosci* 18(2):58-60, 1995.

11. Leclerc S, Garnier M, Hoessel R, Marko D, Bibb JA, Snyder GL, Greengard P, Biernat J, Wu YZ, Mandelkow EM, Eisenbrand G and Meijer L: Indirubins inhibit glycogen synthase kinase-3 beta and CDK5/p25, two protein kinases involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer's disease. A property common to most cyclin-dependent kinase inhibitors? *J Biol Chem* 276(1):251-260, 2001.
12. Marko D, Schatzle S, Friedel A, Genzlinger A, Zankl H, Meijer L and Eisenbrand G: Inhibition of cyclin-dependent kinase 1 (CDK1) by indirubin derivatives in human tumour cells. *Br J Cancer* 84(2):283-289, 2001.
13. Nam S, Buettner R, Turkson J, Kim D, Cheng JQ, Muehlbeyer S, Hippe F, Vatter S, Merz KH, Eisenbrand G and Jove R: Indirubin derivatives inhibit Stat3 signaling and induce apoptosis in human cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 102(17):5998-6003, 2005.
14. Sethi G, Ahn KS, Sandur SK, Lin X, Chaturvedi MM and Aggarwal BB: Indirubin enhances tumor necrosis factor-induced apoptosis through modulation of nuclear factor-kappa B signaling pathway. *J Biol Chem* 281(33):23425-23435, 2006.
15. Ding Y, Qiao A and Fan GH: Indirubin-3'-monoxime rescues spatial memory deficits and attenuates beta-amyloid-associated neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 39(2):156-168, 2010.
16. Khan KA, Kumar N, Nayak PG, Nampoothiri M, Shenoy RR, Krishnadas N, Rao CM and Mudgal J: Impact of caffeic acid on aluminium chloride-induced dementia in rats. *J Pharm Pharmacol* 65(12):1745-1752, 2013.
17. Liu Y, Wong TP, Aarts M, Rooyackers A, Liu L, Lai TW, Wu DC, Lu J, Tymianski M, Craig AM and Wang YT: NMDA receptor subunits have differential roles in mediating excitotoxic neuronal death both in vitro and in vivo. *J Neurosci* 27(11):2846-2857, 2007.
18. Rabinovici GD and Jagust WJ: Amyloid imaging in aging and dementia: testing the amyloid hypothesis in vivo. *Behav Neurol* 21(1):117-128, 2009.
19. Zhang S, Zhang Y, Xu L, Lin X, Lu J, Di Q, Shi J and Xu J: Indirubin-3'-monoxime inhibits beta-amyloid-induced neurotoxicity in neuroblastoma SH-SY5Y cells.

- Neurosci Lett 450(2):142-146, 2009.
20. Behl C, Widmann M, Trapp T and Holsboer F: 17-beta estradiol protects neurons from oxidative stress-induced cell death in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 216(2): 473-482, 1995.
 21. Froissard P and Duval D: Cytotoxic effects of glutamic acid on PC12 cells. *Neurochem Int* 24(5): 485-493, 1994.
 22. Sun ZW, Zhang L, Zhu SJ, Chen WC and Mei B: Excitotoxicity effects of glutamate on human neuroblastoma SH-SY5Y cells via oxidative damage. *Neurosci Bull* 26(1):8-16, 2010.
 23. Alvarez A, Munoz JP and Maccioni RB: A Cdk5-p35 stable complex is involved in the beta-amyloid-induced deregulation of Cdk5 activity in hippocampal neurons. *Exp Cell Res* 264(2): 266-274, 2001.
 24. Hoshi M, Sato M, Matsumoto S, Noguchi A, Yasutake K, Yoshida N and Sato K: Spherical aggregates of beta-amyloid (amylo-spheroid) show high neurotoxicity and activate tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (11):6370-6375, 2003.
 25. Rubinfeld B, Albert I, Porfiri E, Fiol C, Munemitsu S and Polakis P: Binding of GSK3beta to the APC-beta-catenin complex and regulation of complex assembly. *Science* 272(5264):1023-1026, 1996.
 26. Ma K, Yang LM, Chen HZ and Lu Y: Activation of muscarinic receptors inhibits glutamate-induced GSK-3beta overactivation in PC12 cells. *Acta Pharmacol Sin* 34(7):886-892, 2013.

ABSTRACT

Indirubin-3'-monoxime inhibits excitotoxicity provoked by glutamate on neuroblastoma cell culture

Seung Yun Han¹, Bo Hyun Jung², Hee Su Lee², Ki-Yeon Yoo^{2*}

¹*Department of Anatomy, College of Medicine and Myunggok Research Institute, Konyang University*

²*Department of Oral Anatomy, College of Dentistry and Research Institute of Oral Science, Gangneung-Wonju National University*

Indirubin is the active component of Danggui Luhui Wan, a Chinese traditionally medicine. Recently, pharmaceutical researches have focused on its inhibitory effect of cyclin-dependent kinases (Cdks) and glycogen synthase kinase-3beta (GSK3 β). Indirubin-3'-monoxime (IMX), a synthetic derivative by indirubin, is commonly used to *in vitro* studies for indirubin. In the present study, we investigated the inhibitory effect of IMX on glutamate-induced excitotoxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. Glutamate-induced cytotoxicity was verified characterized by decreased cell viability. However, treatment of IMX attenuated the glutamate-induced cell death in a dose-dependent manner. This result suggests that IMX may inhibit the neuronal death in various neurodegenerative diseases including stroke.

Key Words: *indirubin-3'-monoxime, excitotoxicity, glutamate, SH-SY5Y cells*