

자유라디칼이 백서의 뇌별아교세포에 미치는 독성작용

장 혁 · 김명선¹ · 박현영 · 김요식 · 조광호 · 정헌택¹ · 박래길^{1*}

원광대학교 의과대학 신경과학교실, ¹미생물학교실

Cytotoxic Effects of Free Radical on Rat Primary Astrocytes

Hyuk Jang, Myung-Sunny Kim¹, Hyun-Young Park, Yo-Sik Kim, Kwang-Ho Cho,
Hun-Taeg Chung¹ and Rae-Kil Park^{1*}

Department of Neurology and Microbiology¹, School of Medicine, Wonkwang University,

Iksan, Chonbuk 570-749 Korea

(Received October 7, 1999)

(Accepted January 19, 1999)

ABSTRACT : Astrocytes generate free radicals including nitric oxide (NO) and reactive oxygen intermediates (ROI) which in turn play pivotal roles in the pathogenesis of degenerative diseases and sclerotic changes of the brain. This study was designed to evaluate the mechanism that free radicals contribute to the cytotoxicity of rat neonatal primary astrocytes. Treatment with NO donors alone including sodium nitroprusstide (SNP), S-nitrosoglutathione (GSNO), and S-nitroso-n-acetylpentacillamine (SNAP) showed a little effect on the death of rat neonatal primary astrocytes, whereas SNP markedly induced the death of RAW 264.7 cells. ROI including H₂O₂ and O₂⁻ donor also slightly induced the death of rat primary astrocytes. However, 3-morpholinosydnonimine (SIN-1), a donor of peroxynitrite (ONOO⁻), which is a reactive compound of NO with superoxide, significantly decreased the viability of rat primary astrocytes in a dose-dependent manner. Cells were retarded in outgrowth of cellular processes with cell shrinkage and detachment from culture dishes. Hoechst staining demonstrated that SIN-1-induced cell death might be due to an apoptosis which was characterized by nuclear condensation and fragmentation. SIN-1-induced apoptosis was prevented by the pretreatment with superoxide dismutase (SOD) and catalase in rat primary astrocytes. Furthermore, prevention of the generation of reduced glutathione (GSH) by DL-buthionine-[S, R]-sulfoximine (BSO) aggravated the cytotoxic effects of SNP, benzene triol, and SIN-1 in rat primary astrocytes. Taken together, it is suggested that peroxynitrite may be a major effector of apoptosis and cellular antioxidant system is important for cell survival in rat primary astrocytes.

Key Words : Free radical, Peroxynitrite, Primary astrocytes, Apoptosis, GSH

I. 서 론

중추신경계(central nervous system: CNS)에서 중요한 신경전달 기능을 수행하는 자유라디칼(free radical)인 nitric oxide(NO)는 반감기가 매우 짧으며 다양한 생리, 약리 및 병리적 세포내 대사과정에 참여한다(Moncada 등, 1991). 뇌조직에서 저농도의 NO는 신경전도(neurotransmission) 및 혈관이완(vasodilation) 기능을 수행하나, 고농도의 유도성 NO는 허혈, 뇌조직 손상 및 탈수질(demy-

elination)시 퇴행성 뇌질환(degenerative disease)과 뇌졸중(stroke)의 원인이 된다고 보고되어 있다(Dawson 등, 1991; Jaffrey 등, 1995). 또한 NO는 신경세포의 NMDA, kainic acid 수용체 자극과 일시적인 국소적 허혈(focal ischemia) 시에 생성되어 알러지형 뇌척수염(allergic encephalomyelitis)과 뇌경화(brain sclerosis)의 병인에서 탈수질화를 유발시킨다(Mitrovic 등, 1994). 뇌조직의 염증반응시 생성되는 NO는 주로 대교세포(glia cells)가 생성하게 되며, 대교세포의 하나인 별아교세포(astrocyte)는 세포 자신이 NO 전구체인 L-arginine을 고농도로 가지고 있으며(Aoki 등, 1991) 유도성 NO 합성효소(inducible NOS: iNOS, 1, 14, 13, 39)를 가지기 때문에 고농도의 NO를 생성할 수 있다(Murphy 등, 1993; Galea 등, 1992). NO에 의한 뇌조

*To whom correspondence should be addressed

ABBREVIATIONS: GSH, reduced glutathione; NO, nitric oxide; ROI, reactive oxygen intermediates; SIN-1, 3-morpholinosydnonimine; SOD, superoxide dismutase; BSO DL-buthionine-[S, R]-sulfoximine.

직 손상의 병인에 대한 기전은 아직 명확하게 밝혀지지 않았으나, 정상적인 뇌기능 및 뇌병변에 NO가 중요한 역할을 하는 것은 분명하다(Murphy 등, 1993). 별아교세포에 의해 생성된 NO는 세포 자신보다는 신경(neuron)이나 회돌기교세포(oligodendrocytes)에 미치는 영향이 더욱 현저하며 이들 세포의 죽음을 초래하게 된다(Dawson 등, 1993; Merrill 등, 1993). 그러나 비교적 NO에 저항성이 강한 별아교세포에서도 외부에서 NO 공여제를 처리한 경우 세포내 cyclic GMP(cGMP)의 양이 증가하여 NO 작용의 표적세포가 될 수도 있다(Ishizaki 등, 1991). 최근의 보고는 NO가 superoxide anion(O₂⁻)과 같은 산소자유기와 만나서 새로운 화합물을 생성하여 이 화합물의 매개에 의한 뇌조직 기능 변화가 일어남을 추정하고 있다(Brosnan 등, 1994). NO와 O₂⁻의 반응생성물인 peroxynitrite(ONOO⁻) 같은 질소자유기(nitrogen species)는 NO 보다 더욱 짧은 반감기의 라디칼로서 oxidative stress의 강한 유도체이다. 이들은 lipid peroxidation, DNA damage 그리고 mitochondria 이상을 일으켜서 세포의 기능을 상실시키는 것으로 보고된 바 있다(Radi 등, 1991). Peroxynitrite의 생성 기전이 확인되면서 이 화합물의 생체내 기능연구가 활발해지고 있는데 망막손상(Behar-Cohen 등, 1996), 위염(Mannick 등, 1996), 장염(Ford 등, 1997), 태아성장 장애(Miller 등, 1996), 심장이식거부(Szabolcs 등, 1996)와 세포고사(Lin 등, 1998) 등 여러기관에서 독성이 나타남이 밝혀지고 있다. 별아교세포에서의 peroxynitrite는 장시간의 노출시 다른 자유라디칼에 비해 특히 독성을 나타낼 가능성이 보고되었는데(Amin과 Pearce, 1997) 본 연구에서는 백서의 뇌조직으로부터 분리한 별아교세포에 신경계에서 발생할 수 있는 여러 자유라디칼들이 미치는 영향을 조사하고 특히 독성을 보이는 SIN-1에 의한 세포고사(apoptosis) 현상을 연구하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험 동물 및 시약

실험 동물은 임신 중인 Sprague Dawley 백서를 대한실험동물센터로부터 구입하여 사육하다가 태어난 생후 3일 이내의 백서를 암수 구별없이 사용하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), 항생제 및 trypsin 등의 세포배양에 필요한 성분은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였으며 배양용기(24 well plate와 10 cm dish)는 Falcon(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포 및 핵염색 관찰에 이용한 slide chamber는 Nunc사(Germany)로부터 구입하여 사용하였다. MTT, DL-

Buthionine-[S, R]-sulfoximine(BSO), Hoechst33258, S-nitrosoglutathione(GSNO), sodium nitroprusside(SNP), benzene triol, Cu/Zn-SOD, catalase 등은 Sigma사(St. Louis, USA)제품을 사용하였으며, 3-morpholinonydnimine(SIN-1)은 Biomol사(Hamburg, F.R.G.)에서 구입하였다. S-nitroso-n-acetylpenicillamine(SNAP)은 Alexis사(San Diego, CA, USA)로부터 구입하였다.

2. 별아교 세포의 분리 및 배양

백서의 뇌조직으로부터 별아교세포는 Fischer 등(1985)의 방법에 따라 분리하였으며 필요에 따라 약간의 변형을 가하였다. 생후 3일 이내의 백서로부터 분리한 대뇌를 무균적으로 분리하여 Ca⁺⁺, Mg⁺⁺이 없는 Hank's balanced salt solution(HBSS)로 세척한 후 3 ml의 1% trypsin/phosphate buffered saline(PBS)에 옮긴 후 실온에서 10분 방치하였다. Trypsin에 의하여 용해된 백서 대뇌 조직에 10% FBS와 penicillin(50 U/ml) 및 streptomycin(250 ng/ml)이 포함된 DMEM으로 trypsin을 희석시킨 후 파스퇴르 파이펫으로 잘게 분쇄하여 10~20분 계속하여 절개하였다. 얻어진 세포는 멸균된 거즈를 통과시켜서 200 × g로 원심분리하여 침전세포만을 모은 다음 10% FBS/DMEM로 현탁하여 poly-L-lysine으로 coating된 75 cm² flasks에 부착시키기 위하여 37°C, 습기가 충분한 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양 3일 후에 비부착세포는 제거하고, 부착세포만을 HBSS로 세척한 후 10% FBS/DMEM으로 배양액을 교환한 후 매 3일에 배양액을 교환해 주면서 10일 세포배양을 유지하였다. 이때 소교세포(microglia)의 부착을 배제하기 위하여 플라스크를 교반기에 250 rpm으로 12시간 흔들어서 이틀에 한번씩 비부착 세포를 제거하였다. 이렇게 하여 얻어진 세포는 0.25% trypsin으로 처리하여 떼어낸 후 2번의 계대배양을 거친 후 10 cm 배양용기에 배양하면서 필요에 따른 실험을 수행하였다.

3. 세포활성도 측정

세포의 활성도는 MTT assay 방법을 이용하여 측정하였다. 먼저 세포자극에 의해 활성도가 떨어져 바닥으로부터 부착력이 떨어진 세포를 흡입기에 의해 버린 후 완충용액(1× PBS)으로 세척한 후 완충용액으로 용해한 MTT(5 mg/ml)를 배양액의 1/10 부피가 되게 각 well에 넣고 다시 4시간 배양기에서 반응시킨다. 살아있는 세포에 의해 형성된 formazan 결정은 200 μl의 dimethylsulfoxide(DMSO)로 용해시킨 후 분광광도계(spectrophotometer, model ETY-96, Toyo Instruments, Inc., Japan)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 값은 정상적인 세포의 활성도

와 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

4. 세포 염색 및 관찰

별아교세포를 1×10^5 개로 slide chamber에 밤새 부착시킨 후 2.5 mM의 SIN-1을 20시간 동안 처리 후 PBS로 세척하여 죽어 떨어진 세포를 제거 한 후 10% FBS/DMEM을 다시 채워서 도립광학현미경(converted phase-contrast microscopy)하에서 100X의 배율로 사진을 찍었다. 이후 PBS로 세척한 후 4% 포르마린으로 10분 고정시켜서 세척한 후 핵 형광염색제인 Hoechst33258(1 : 10,000 희석)으로 염색하여 형광현미경(fluorescence microscopy, Leica, Germany)하에서 필름에 노출시켜 현상하였다.

5. 결과산출방법

표시된 결과는 3번 이상의 독립적인 실험결과이며 이들의 평균과 표준편차(standard deviation, S.D.)를 산출하여 표시하였다. 세포독성을 보이는 값의 비교에 있어서는 Student's t-test를 사용하였으며 $P < 0.01$, 혹은 $P < 0.05$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

III. 결 과

1. 자유라디칼이 세포생존에 미치는 효과

본 연구에서 사용한 백서 별아교세포는 24 well에 분주하여 12시간 배양용기에 부착시킨 후 실험에 임하였다. 먼저, FBS가 들어있지 않은 DMEM으로 배지를 갈아주고 1시간 안정화시킨 후 NO에 의한 세포독성을 조사하였다. NO 공여제인 SNP을 다양한 농도로 24시간 처리하면서 NO의 별아교세포에 대한 세포독성을 설치류 대식세포주인 RAW 264.7 세포와 비교하면서 생존세포의 활성도(%)를 계산하였다. SNP는 RAW 264.7의 생존율을 농도 의존적으로 감소시키는 1 mM에서 40%의 생존율을 보였으나 별아교세포는 88% 정도의 생존율을 보였다(Fig. 1A). RAW 264.7 세포의 생존율을 30%로 감소시키는 고농도인 2 mM SNP 처리시에도 별아교세포는 79%의 생존율을 보였다. 또 다른 종류의 NO 공여제인 GSNO와 SNAP를 처리하였을 경우에도 고농도의 NO를 내는 0.4 mM에서 82%의 생존율을 보였다(Fig. 1B). 이상의 결과에서 별아교세포는 NO에 의하여 세포독성을 보였으며 고농도의 NO에 비교적 내성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 시험관내에서 O_2 를 방출시키는 화합물질인 benzene triol을 별아교세포에 농도별로 처리한 후 세포독성을 조사하였다(Fig. 2A). Benzene triol 자극 6시간 후에 고농도인

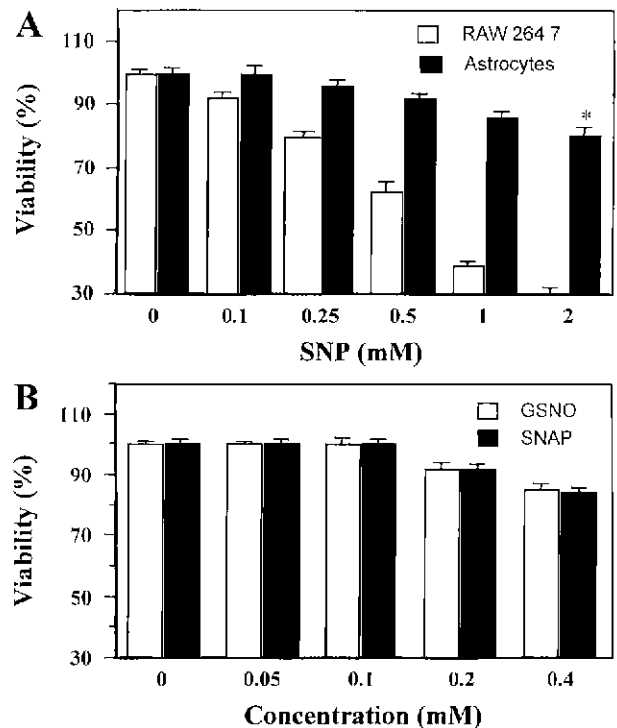


Fig. 1. Effects of nitric oxide donors on the viability of rat primary astrocytes. Cells (3×10^5 cells/well) were washed, refreshed with serum-free DMEM for 1 hr, treated with various concentrations of SNP (A) and GSNO, SNAP (B) for 24 hr. MTT was added to the culture medium and incubated for 3 hr at 37°C, 5% CO_2 incubator. The purple formazan formed in cells was lysed by the addition of DMSO and then the absorbance was measured at 540 nm by a microplate reader. Results were expressed as means \pm SD (%) of three different experiments. *, Statically significant differences from control values at $p < 0.05$.

0.1 mM을 처리한 세포군에서 세포모양이 변하기 시작하였는데 12시간 이후부터 세포막의 형태를 잃는 현상이 현저하게 나타났으나(사진결과 보이지 않음) 이러한 현상은 NO에 의한 세포손상과 다른 세포괴사(necrosis)에 의한 현상으로 확인되었다. 산소자유기 산물의 하나이며 세포독성이 있는 과산화수소(hydrogen peroxide: H_2O_2)는 과산화수소는 별아교세포에서 현저한 세포독성을 유발시키지 못했으며, mitogen-activated protein kinase(MAP kinases)를 활성화시키는 200 μ M 농도에서도(Tournier 등, 1997) 90% 이상의 생존율을 유지하였다(Fig. 2B).

NO 합성효소는 NO와 동시에 superoxide anion을 생성한다고 알려져 있다(Ischiropoulos 등, 1992). 이렇게 방출된 O_2 는 자체적인 독성뿐만 아니라 NO와 결합하여 강한 활성물질인 peroxynitrite를 생성하게 된다. NO와 O_2 를 동시에 방출시키면서 peroxynitrite를 생성시킬을 보고된 바 있는 공여제인 SIN-1을 24시간 처리한 후에 MTT 방법에 의한 세포생존율을 조사한 바 별아교세포는 peroxynitrite에 의하여 현저한 생존율 감소를 보였다(Fig. 3). 이상의

결과에서 별아교세포는 고농도의 NO 단독이나 산소자유기 산물에 의해 80% 이상의 세포 생존도를 유지하였으며

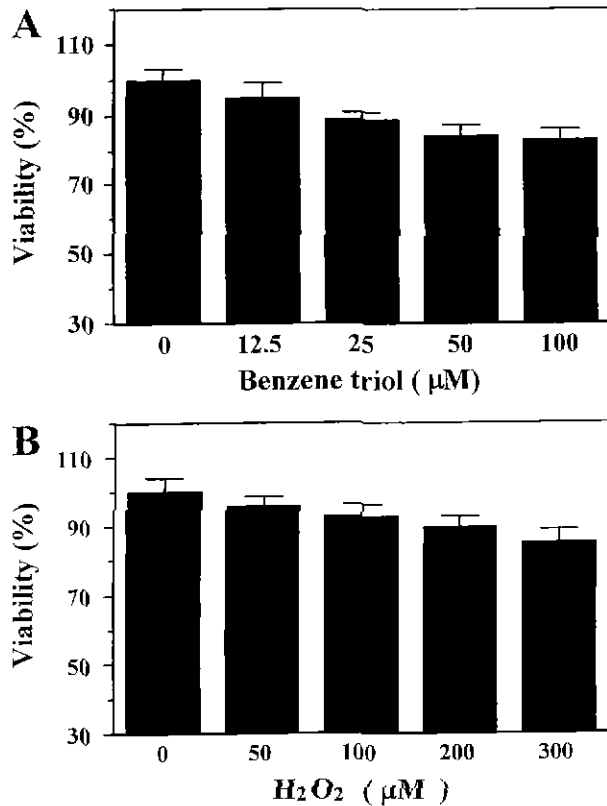


Fig. 2. Effects of benzene triol, a donor of superoxide anion, and hydrogen peroxide on the viability of rat primary astrocytes. Cells (3×10^5 cells/well) were refreshed with serum-free DMEM for 1 hr and were treated with or without various concentrations of benzene triol (A) and hydrogen peroxide (B) for 24 hr. MTT assay was performed as described previously. Results were expressed as means \pm SD (%) of three different experiments

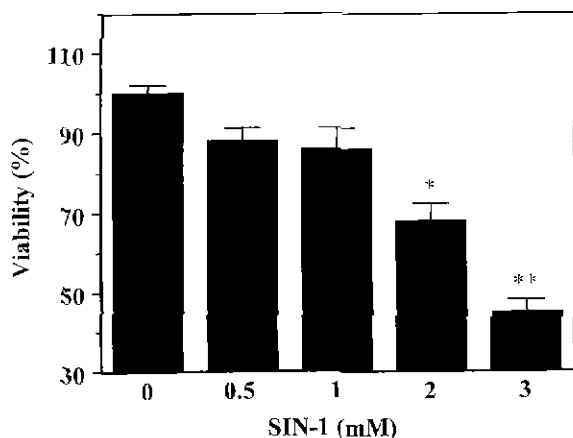


Fig. 3. Effects of SIN-1, a donor of peroxynitrite, on the viability of rat primary astrocytes. Cells were incubated with or without various concentrations of SIN-1 for 24 hr. MTT assay was performed as described previously. Results were expressed as means \pm SD (%) of three different experiments. *, $p < 0.01$, **, $p < 0.05$ compared to control value.

실제 생체내의 조건에서 NO와 O₂가 반응하여 생성하는 활성물질의 하나인 peroxynitrite 매개에 의한 세포손상이 유발되리라 추정되었다.

2. SIN-1에 의한 별아교세포 죽음시 핵 분절과 응축 현상

SIN-1에 의한 별아교세포 죽음의 현상을 확인하기 위하여 SIN-1을 처리한 20시간 후에 세포손상을 광학현미경에서 확인하였다(Fig. 4). FBS가 들어있지 않은 DMEM 상태에서 2.5 mM의 SIN-1을 처리한 12시간 후 별아교세포는 형태가 변하기 시작하여 세포모양의 수축, 세포돌기성장의 감소, 그리고 배양용기로부터 부착력 상실에 의한 세포의 부유상태등이 관찰되었다(Fig. 4B). SIN-1에 의한 별아교세포 죽음의 현상이 세포고사(apoptosis)인지를 확인하기 위하여, SIN-1을 처리한 20시간 후의 별아교세포를 4% 포르말린으로 고정한 후 여기에 Hoechst 33258을 희석하여 핵을 염색하여 형광현미경으로 관찰하였다(Fig. 5). SIN-1처리에 의하여 별아교 세포핵의 크기가 줄어들어 수축하는 현저한 핵응축이 관찰되었으며 일부에서는 분절

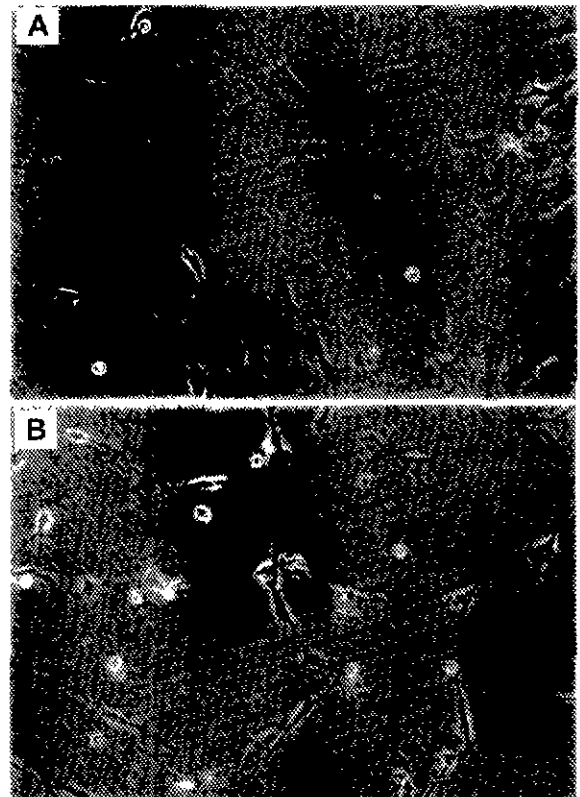


Fig. 4. Morphological changes of rat primary astrocytes by the addition of SIN-1. Cells were cultured on slide chamber and treated with 2.5 mM SIN-1 for 20 hr. Morphological features of astrocytes were observed by converted phase-contrast microscopy ($\times 100$).

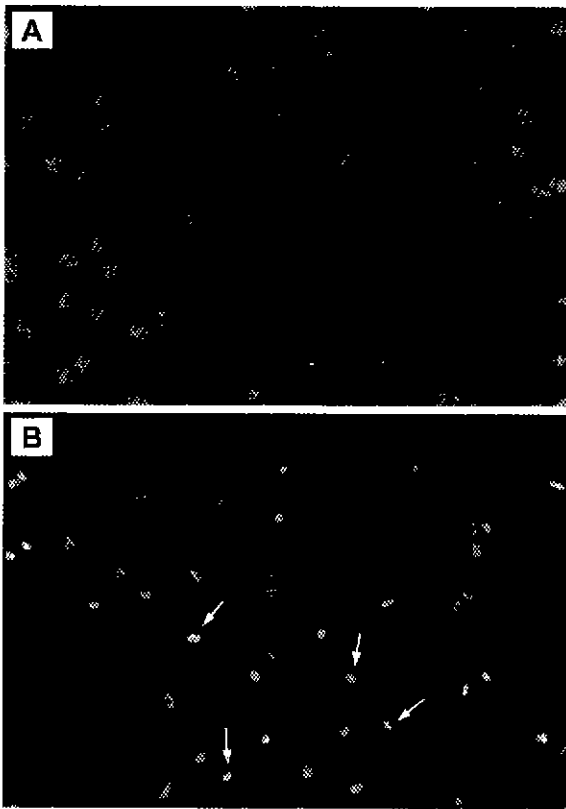


Fig. 5. SIN-1, peroxyntrite donor, induced nuclear condensation and fragmentation of rat primary astrocytes. Control cells (A) were treated with 2.5 mM of SIN-1 for 20 hr (B), washed, fixed with 10% formalin for 10 min and stained with Hoechst 33258 to observe fluorescent microscope (100 X). Morphological features of the nucleus were observed by converted phase-contrast fluorescence microscopy ($\times 100$). Arrows indicate fragmented cells.

현상을 확인할 수 있었다(Fig. 5B, 화살표). 핵응축과 분절 현상은 세포고사의 특징적인 현상의 하나이다. SIN-1에 의한 세포죽음이 다른 자유기들과 다르게 세포고사에 의해 이루어짐을 확인하였다.

3. 항산화제에 의한 SIN-1의 별아교세포 독성저해 효과

SIN-1에 의한 별아교세포 독성이 peroxyntrite 생성에 의하여 유도됨을 확인하기 위하여 O_2 를 제거시키는 효소인 superoxide dismutase(SOD, 200 U/ml)와 H_2O_2 를 분해하는 catalase(400 U/ml)를 전처리하였다. 2.5 mM SIN-1 처리 24시간 후에 별아교세포의 생존율은 대조군의 55% 정도로 감소하였으나 SOD와 catalase를 병용하여 전처리 시 SIN-1에 의한 별아교세포의 생존율은 85%로 증가시켰다(Fig. 6). SOD 및 catalase 단독처리시 별아교세포의 생존율에 미치는 영향은 없었다. SIN-1 처리 이전에 SOD의 전처리는 SIN-1에 의한 별아교세포의 세포독성을 예방하지 못했으며 catalase는 SIN-1에 의한 별아교세포의 세포

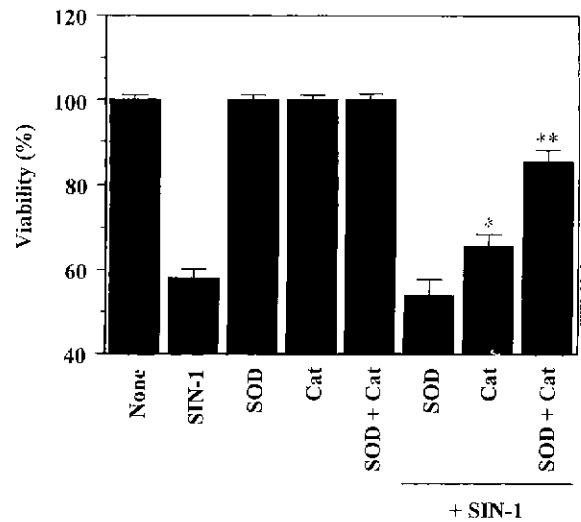


Fig. 6. Superoxide dismutase (SOD) and catalase protected the rat primary astrocytes from SIN-1-induced cytotoxicity. Cells were treated with 2.5 mM SIN-1 in the presence or absence of SOD (200 U/ml) and catalase (400 U/ml) for 24 hr. MTT assay was performed as described previously. Results were expressed as means \pm SD (%) of three different experiments. *, $p < 0.01$; **, $p < 0.05$ compared to SIN-1 alone.

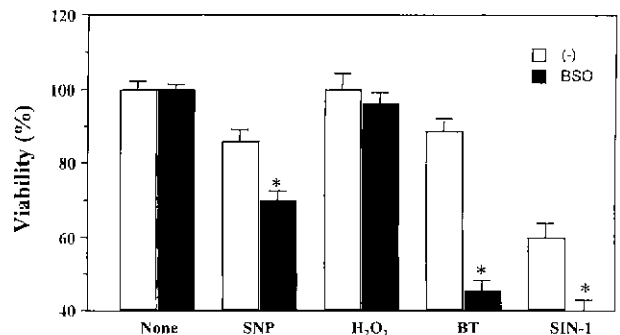


Fig. 7. Antioxidants recovered the rat primary astrocytes from SIN-1-induced cell death. A. Cells were pretreated with 100 μ g of DL-Buthionine-[S, R]-sulfoximine (BSO) for 24 hr and followed by stimulation with indicated donors. The viability assay was performed as described previously. Results were expressed as means \pm SD (%) of three different experiments. *, $p < 0.01$.

독성을 10% 예방하였다. SIN-1에 의한 별아교세포의 세포독성이 세포내 항산화제(antioxidant) 기능과의 연관성을 조사하기 위하여 글루타치온(glutathione)의 생성을 고갈시킬 수 있는 화학물질인 BSO를 24시간 동안 처리하여 세포내의 글루타치온의 생성을 지연시킨 후 SNP(1 mM), benzene triol(0.1 mM), H_2O_2 (0.4 mM), SIN-1(2.5 mM)을 처리 24시간 후에 별아교세포의 생존율을 조사하였다(Fig. 7). 단독처리시 별아교세포의 생존율에 거의 영향을 미치지 않았던 SNP(1 mM)과 benzene triol(0.1 mM) 처리군이 BSO 전처리에 의하여 현저한 별아교세포의 생존율 감소를 보였다. SIN-1처리 24시간 후 별아교세포는 항산화제 생성 억제에 의하여 대부분의 세포가 사멸하였다. 그러나

H_2O_2 (0.4 mM)에 의한 생존율에는 큰 변화가 없었다.

IV. 고 찰

본 연구에서 별아교세포는 NO 혹은 산소자유기 산물 (O_2^- 및 H_2O_2) 단독처리에 의해서는 세포독성이 미약했으나 이들의 화합물인 peroxynitrite를 생성시키는 SIN-1에 의해서는 생존율이 급격하게 감소하였다. 별아교세포는 중추신경계에서 가장 많이 분포하는 세포이며, 이들 세포에서 iNOS 발현증가는 신경세포와 회돌기교세포의 손상에 관련된 중추신경계 염증성 질환의 중요 병인으로 알려져 있어서, 뇌기능에 영향을 미치는 산소자유기에 의한 조직 손상을 조절하기 위해서 신경세포 자극과 염증반응시 수반되는 NO의 생성기전에 관한 연구도 활발히 이루어지고 있다(Dawson 등, 1993; Merrill 등, 1993; Mitrovic 등, 1994). NO는 별아교세포의 글루타민(glutamine) 합성을 저해할 뿐만 아니라(Sorg 등, 1997) 형태학적 분화도 유도한다(Tomita 등, 1997). NO는 cGMP를 경유해서 카이네이즈(protein kinase)의 인산화(phosphorylation)를 일으키나 세포독성은 현저하지 않는다고 보고되었다(El-Husseini 등, 1998). 또한 NO는 별아교세포의 미토콘드리아 호흡계(mitochondrial respiratory chain)를 저하시킨다고 보고되어 있다(Bolanos 등, 1994). 본 결과에서 대식세포주인 RAW 264.7는 40%의 생존율을 보이는 농도인 1 mM SNP 처리군에서 별아교세포는 88%의 생존율을 유지하였다. 즉, NO 단독으로 직접적인 세포죽음을 초래하지 않았으나 고농도에 노출되었을 때 독성을 보였다. Peroxynitrite 처리시 농도 의존적인 별아교세포의 급격한 생존율 감소는 별아교세포가 실제 생체내에서 세포손상을 입을 수 있는 가능성은 NO가 다른 자유라디칼과 결합하여 만드는 NO 유도성 화합물에 의해 매개되어질 가능성을 의미하였다. 실제로 O_2^- 를 제거시키는 효소인 SOD와 H_2O_2 를 분해시키는 catalase를 전처리한 다음 SIN-1을 처리한 경우 세포생존율을 85%까지 유지하였다. 이러한 현미경상으로 관찰되는 peroxynitrite의 공여제인 SIN-1에 의한 별아교세포 독성의 현상적 특성은 세포괴사(necrosis)와는 대별되는 세포고사를 통해 이루어짐을 핵의 응축 및 분절 현상을 통하여 확인할 수 있었다. 세포 고사현상은 1980년대 후반기부터 세포생물학 영역에 주요 관심분야로 도입되면서 많은 분야에 혁명적인 변화를 가져 왔으며 특히 신경계와 면역계 세포의 생성, 분화 및 기능 발현 등에 중요하게 작용함이 밝혀졌다(Raff 등, 1993).

별아교세포는 신경세포와 회돌기교세포에 비하여 활성 산소에 대해 저항성을 가지고 있다. 이는 특이적으로 낮은 농도의 철(iron)과 항산화제 기능을 수행할 수 있는 세포내 글루타치온 농도와 glutathione peroxidase 활성도가 높

게 존재하기 때문인데(Huang과 Philbert, 1995), 실제로 글루타치온의 생성을 고갈시켰을 경우 NO 공여제에 대하여 세포생존율은 거의 영향을 미치지 않았던 SNP, benzene triol, 그리고 H_2O_2 에 의하여 현저히 감소하였다. 60%의 세포생존율을 보였던 SIN-1(2.5 mM)의 경우 40%까지 그 생존율이 감소하였다. 또한 글루타치온을 보충한 경우에는 SIN-1 단독처리군보다 5% 정도 높게 유지되는 것을 알 수 있었으며 항산화제인 NAC도 세포생존율을 증가시켰다(출판되지 않은 결과). 이는 세포내 항산화제가 peroxynitrite에 대한 저항성을 보이는데 중요한 역할을 한다는 것을 보여주는 결과이다. 글루타치온은 성인 뇌조직에서 신경세포보다는 별아교세포에서 현저하게 많이 존재한다(Lowndes 등, 1994). 글루타치온은 대부분의 세포내 효소반응에 의하여 합성, 분해되며, 환원형태(reduced glutathione, GSH)와 산화형태(oxidized dimer, GSSG)의 두 가지 형태로 존재한다. 이 중 글루타치온은 98:2의 비율로 다량 존재하며 글루타치온은 L-glutamate, L-cysteine, 그리고 glycine으로 구성되는 tripeptide이며 포유동물세포에서 가장 중요한 세포내 비단백성(non-protein) thiol/sulfhydryl 화합물이다. 글루타치온은 하이드록실 라디칼(OH radical)의 선택적인 항산화제이나 다른 자유라디칼 보집체(scavenger)이다. 세포내의 글루타치온의 감소는 퇴행성질환뿐만 아니라 정상적인 노화와 관계가 있다(Shaw 등, 1997). 별아교세포는 신경세포에 비교하여 대단히 많은 양의 글루타치온을 가지고 있어서(Makar 등, 1994), 중추신경계에서 발생하는 활성산소 독성을 방어하게 된다(Peuchen 등, 1997). 또한 구리결합단백질(copper binding protein)인 ceruloplasmin이 발현되어 자유로운 Cu와 결합함으로써 자유라디칼의 형성을 적게 한다(Patel과 David, 1997). 이러한 보고들은 별아교세포가 중추신경계에서 글루타치온을 이용하여 외부자극에 대하여 항산화제 역할을 수행하고 있음을 보여주는 결과이다. 이러한 보고와 본 연구의 결과에 비추어 별아교세포 세포독성의 주요 원인은 NO와 superoxide가 만나서 생성되는 화합물인 peroxynitrite에 의한 세포독성임을 암시하며 이는 세포고사현상을 수반하였으며 또한 이러한 세포독성은 세포내 글루타치온을 포함하는 항산화 물질에 의하여 조절될 수 있음을 추정할 수 있었다.

감사의 글

본 연구비는 원광대학교 교내 연구비(1999년도)로 수행되었으며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

Amin, N. and Pearce, B. (1997): Peroxynitrite-induced

- toxicity in cultured astrocytes, *Brain Res.*, **773**, 227-230.
- Aoki, E., Semba, R., Mikoshiba, K. and Kashiwamata, S. (1991): Predominant localization in glial cells of free L-arginine. Immunocytochemical evidence. *Brain Res.*, **547**, 190-192.
- Behar-Cohen, F.F., Heydolph, S., Faure, V., Droy-Lefaix, M.T., Courtois, Y. and Goureau, O. (1996): Peroxynitrite cytotoxicity on bovine retinal pigmented epithelial cells in culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **226**, 842-849.
- Bolanos, J.P., Peuchen, S., Heales, S.J., Land, J.M. and Clark, J.B. (1994): Nitric oxide-mediated inhibition of the mitochondrial respiratory chain in cultured astrocytes. *J. Neurochem.*, **63**, 910-916.
- Brosnan, C.F., Battistini, L., Raine, C.S., Dickson, D.W., Casadevall, A. and Lee, S.C. (1994): Reactive nitrogen intermediates in human neuropathology: an overview, *Dev. Neurosci.*, **16**, 152-161.
- Dawson, V.L., Dawson, T.M., Bartley, D.A., Uhl, G.R. and Snyder, S.H. (1993): Mechanisms of nitric oxide-mediated neurotoxicity in primary brain cultures, *J. Neurosci.*, **13**, 2651-2661.
- Dawson, V.L., Dawson, T.M., London, E.D., Bredt, D.S. and Snyder, S.H. (1991): Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 6368-6371.
- El-Husseini, A.E., Bladen, C., Williams, J.A., Reiner, P.B. and Vincent, S.R. (1998): Nitric oxide regulates cyclic GMP-dependent protein kinase phosphorylation in rat brain, *J. Neurochem.*, **71**, 676-683.
- Fischer, G. and Kettenmann, H. (1985): Cultured astrocytes form a syncytium after maturation, *Exp. Cell Res.*, **159**, 273-279.
- Ford, H., Watkins, S., Reblock, K. and Rowe, M. (1997): The role of inflammatory cytokines and nitric oxide in the pathogenesis of necrotizing enterocolitis. *J. Pediatr. Surg.*, **32**, 275-282.
- Galea, E., Feinstein, D.L. and Reis, D.J. (1992): Induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity in primary rat glial cultures, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 10945-10949.
- Huang, J. and Philbert, M.A. (1995): Distribution of glutathione and glutathione-related enzyme systems in mitochondria and cytosol of cultured cerebellar astrocytes and granule cells, *Brain Res.*, **680**, 16-22.
- Ischiropoulos, H., Zhu, L. and Beckman, J.S. (1992): Peroxynitrite formation from macrophage-derived nitric oxide, *Arch. Biochem. Biophys.*, **298**, 446-451.
- Ishizaki, Y., Ma, L.J., Morita, I. and Murota, S. (1991): Astrocytes are responsive to endothelium-derived relaxing factor (EDRF), *Neurosci. Lett.*, **125**, 29-30.
- Jaffrey, S.R. and Snyder, S.H. (1995): Nitric oxide: a neural messenger, *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, **11**, 417-440.
- Lin, K.T., Xue, J.Y., Lin, M.C., Spokas, E.G., Sun, F.F. and Wong, P.Y. (1998): Peroxynitrite induces apoptosis of HL-60 cells by activation of a caspase-3 family protease [see comments], *Am. J. Physiol.*, **274**, C855-860.
- Lowndes, H.E., Beiswanger, C.M., Philbert, M.A. and Reuhl, K.R. (1994): Substrates for neural metabolism of xenobiotics in adult and developing brain, *Neurotoxicology*, **15**, 61-73.
- Makar, T.K., Nedergaard, M., Preuss, A., Gelbard, A.S., Perumal, A.S. and Cooper, A.J. (1994): Vitamin E, ascorbate, glutathione, glutathione disulfide, and enzymes of glutathione metabolism in cultures of chick astrocytes and neurons: evidence that astrocytes play an important role in antioxidative processes in the brain. *J. Neurochem.*, **62**, 45-53.
- Mannick, E.E., Bravo, L.E., Zarama, G., Realpe, J.L., Zhang, X.J., Ruiz, B., Fontham, E.T., Mera, R., Miller, M.J. and Correa, P. (1996): Inducible nitric oxide synthase, nitrotyrosine, and apoptosis in *Helicobacter pylori* gastritis: effect of antibiotics and antioxidants, *Cancer Res*, **56**, 3238-3243.
- Merrill, J.E., Ignarro, L.J., Sherman, M.P., Melinek, J. and Lane, T.E. (1993): Microglial cell cytotoxicity of oligodendrocytes is mediated through nitric oxide, *J. Immunol.*, **151**, 2132-2141.
- Miller, M.J., Voelker, C.A., Olister, S., Thompson, J.H., Zhang, X.J., Rivera, D., Eloby-Childress, S., Liu, X., Clark, D.A. and Pierce, M.R. (1996): Fetal growth retardation in rats may result from apoptosis: role of peroxynitrite, *Free Radic. Biol. Med.*, **21**, 619-629.
- Mitrovic, B., Ignarro, L.J., Montestrucque, S., Smoll, A. and Merrill, J.E. (1994): Nitric oxide as a potential pathological mechanism in demyelination: its differential effects on primary glial cells *in vitro*. *Neuroscience*, **61**, 575-585.
- Moncada, S., Palmer, R.M. and Higgs, E.A. (1991): Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology, *Pharmacol. Rev.*, **43**, 109-142.
- Murphy, S., Simmons M.L., Agullo, L., Garcia, A., Feinstein, D.L., Galea, E., Reis, D.J., Mine-Golomb, D. and Schwartz, J.P. (1993): Synthesis of nitric oxide in CNS glial cells [see comments]. *Trends Neurosci*, **16**, 323-328.
- Patel, B.N. and David, S. (1997): A novel glycosylphosphatidylinositol-anchored form of ceruloplasmin is expressed by mammalian astrocytes, *J. Biol. Chem.*, **272**, 20185-20190.

- Peuchen, S., Bolanos, J.P., Heales, S.J., Almeida, A., Duchen, M.R. and Clark, J.B. (1997): Interrelationships between astrocyte function, oxidative stress and antioxidant status within the central nervous system, *Prog. Neurobiol.*, **52**, 261-281.
- Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M. and Freeman, B.A. (1991): Peroxynitrite-induced lipid peroxidation: The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide, *Arch. Biochem. Biophys.*, **288(2)**, 481-487.
- Raff, M.C., Bares, B.A., Burne, J.F., Coles, H.S., Ishizaki, Y. and Jacobson, M.D. (1993): Programmed cell death and the control of cell survival, *Science*, **262**, 695-700.
- Shaw, C.A. (1997): Glutathione in the Nervous System. 1st eds, Taylor and Francis. Washington, DC. pp. 3-24.
- Sorg, O., Horn, T.F., Yu, N., Gruol, D.L. and Bloom, F.E. (1997): Inhibition of astrocyte glutamate uptake by reactive oxygen species: role of antioxidant enzymes, *Mol. Med.*, **3**, 431-440.
- Szabolcs, M., Michler, R.E., Yang, X., Aji, W., Roy, D., Athan, E., Sciacca, R.R., Minanov, O.P. and Cannon, P.J. (1996): Apoptosis of cardiac myocytes during cardiac allograft rejection. Relation to induction of nitric oxide synthase, *Circulation*. **94**, 1665-1673.
- Tomita, A., Yoshida, S., Yano, M., Kirino, Y., Kawahara, S. and Shimizu, H. (1997): Removal after addition of NO-generating agents and 8-bromo-cyclic GMP causes morphological change of cultured cerebellar astrocytes: a new mode of NO action, *Brain Res.*, **744**, 344-346.
- Tournier, C., Thomas, G., Pierre, J., Jacquemin, C., Pierre, M. and Saunier, B. (1997): Mediation by arachidonic acid metabolites of the H₂O₂-induced stimulation of mitogen-activated protein kinases (extracellular signal-regulated kinase and c-Jun NH₂-terminal kinase), *Eur. J. Biochem.*, **244**, 587-595.