

하수오가 유기수은으로 손상된 생쥐의 배양대뇌신경세포에 미치는 영향에 관한 연구

유교상* · 이용석 · 손영우 · 홍기연

원광대학교 의과대학

Study on the Effect of Radix polygoni Multiflori on Cultured Mouse Cerebral Neurons Damaged by Organic Mercury

Kyo Sang Yoo*, Yong Suk Lee, Young Woo Son, Gi Youn Hong

Department of School of Medicine, Wonkwang University,

To investigate the neurotoxic effect of organic chloride on cultured mouse cerebral neurons, cytotoxic effect was measured by MTT assay after cultured cerebral neurons were incubated with various concentrations of methylmercuric chloride(MMC) for 24 hours. The protective effect of Radix Polygoni Multiflori(RPM) on MMC-induced neurotoxicity was also examined in these cultures. MMC decreased cell viability of cultured mouse cerebral neurons remarkably in a dose- and time-dependent manners. In protective effect of RPM it was remarkably effective in blocking the neuroxicity induced by MMC. From aboved the results, it is suggested that MMC induce neurotoxicity, and the herba extract, RPM is very effective in preventing MMC-induced cytotoxicity on cultured mouse cerebral neurons.

Key words : Cultured cerebral neuron, Methylmercuric chloride, Radix Polygoni Multiflori

서 론

중금속은 독성이 강하기 때문에 수은을 비롯한 카드뮴과 같은 중금속류는 공장의 폐수에 포함되어 개천이나 강으로 흘러나와 수질을 오염시키는 물론 먹이연쇄를 통하여 인체에 노출됨으로서 각종 장기의 손상은 물론 나아가서 생명을 위협하기도 한다^{1,2,17}. 특히 메틸수은과 같은 유기수은은 독성이 강할뿐만 아니라 분해되는 속도가 매우 느리기 때문에 체외로의 배출이 어렵다³. 따라서 수은의 체내 축적은 이의 독성으로 인하여 심각한 부작용과 후유증을 초래함은 이미 잘 알려진 사실이다^{4,5}. 수은은 산업체에서 온도계를 비롯한 공정이나 의약품 및 도금 등의 공정과정에 널리 사용되고 있다^{3,6}. 수은은 1960년대에 일본의 수후만에서 먹이연쇄를 통해 수많은 사람들에게 중독을 유발함으로써 이의 독성이 널리 알려지게 되었다⁷. 수은은 기형유발물질로서 잘 알려져 있으며 주로 동물을 대상으로 한 실험에서 안면기형을 비롯하여 대뇌실질의 석탄화, 구개열과 구순열과 같은 여러 기형을 초래한다고 알려져 있다^{5,6}. 사람에게 있어서도 수은에 노

출된 입산부의 경우 기형을 유발함으로써 이의 독성은 매우 중요한 관심의 대상이 되었다. 따라서 국내외 많은 학자들은 수은의 독성효과에 대하여 꾸준히 연구를 진행하여 왔다^{3,6}. 근래에 수은중 유기수은은 붕괴시 메틸라디칼을 생성함으로써 산화적 손상과 관련이 있음이 제시되면서 수은의 독성을 산화적 손상 측면에서 규명하려는 시도가 활발히 이루어져 왔다⁴. 특히, 수은의 흡입시 중추신경계나 말초신경계에 독성을 나타낸다고 보고된 바 있다^{4,6}. 산소라디칼에 의한 산화적 손상은 세포막의 지질 과산화반응을 유발하며⁸, 세포내 질소라디칼과 반응함으로써 peroxynitrite라는 독성물질을 생성하여 세포에 손상을 주어 결국 세포의 고사를 초래하게 된다^{3,7}. 최근에 활성산소는 신경세포로 하여금 흥분성아미노산(excitotoxic amino acid, EAA)을 분비케 하여 세포손상을 더욱 가속화시킨다고 알려져 있다⁹. 활성산소에 의하여 분비된 흥분성 아미노산은 N-methyl-D-aspartate(NMDA) 수용체를 과활성 시킬뿐만 아니라 또한 세포내 Ca²⁺의 유입을 증가시켜 세포의 퇴행적 변화를 유도하며 또한 calcium-dependent PKC를 활성화 시킴으로서 세포의 사멸을 촉진시킨다고 알려져 있다^{1,10}. 한편, 한약추출물들이 항산화 활성을 가지고 있다는 것이 보고되면서 활성산소의 산화적 손상에 의하여 매개되는 질환의 치료에 적용함으로써 새로운 치료적 방

* 교신저자 : 유교상, 경기도 군포시 산본동, 원광대학부속 군포한방병원

E-mail : stanyoo@wonkwang.ac.kr, Tel : 031-390-2562

· 접수: 2002/07/23 · 수정: 2002/08/28 · 채택 : 2002/11/18

법에 접근하고 있다¹¹⁾. 예를 들면 암의 독성을 완화시키는데 단삼의 약리활성이 매우 효과적이었다는 보고가 된 바 있다¹²⁾. 따라서 한약추출물을 이용한 치료약재의 개발이 매우 활발히 시도되고 있으며 한약추출물은 양약에 비하여 독성이 거의 없거나 적기 때문에 약의 부작용을 최소화 시킬수 있다는 잇점이 있다. 또한 한약추출물은 각 성분을 가감함으로써 새로운 약리활성을 나타내기 때문에 이의 작용기전을 밝히는 데는 매우 어려운 점이 없지는 않다¹³⁾. 근래에 세포배양법이 널리 보급됨에 따라 각종 세포를 이용하여 병변의 모델이나 이의 치료를 위한 신약재의 개발등이 각광을 받고 있다¹⁴⁾. 따라서 본 연구는 메틸수은의 독성효과를 규명하기 위하여 생쥐의 척수 대뇌신경세포를 배양한 후 여러 농도의 메틸수은을 처리한 다음 이의 독성효과를 분석하였으며, 또한 수은의 세포독성에 대한 한약추출물인 하수오(Radix Polygoni Multiflori, RPM)의 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양

생쥐의 대뇌신경세포의 분리는 Michikawa 등¹⁵⁾의 방법에 따라 시행하였다. 즉, 뇌조직으로부터 분리된 신경세포는 phosphate buffered saline(PBS)로 3회 세척한 후 Eagle's minimum essential medium(EMEM, Gibco)에 10%의 fetal bovine serum(FBS, Gibco)이 포함된 배양액에 부유시킨 다음 미리 poly-L-lysine(Sigma)으로 전 처리한 96-multiwell plate에 1×10^5 cells/well의 밀도로 분주하였다. 분주된 세포는 10일 동안 배양한 후 실험에 사용하였으며, 분주 후 3일째에 새로운 배양액으로 교환하여 주었다.

2. 한약재추출

본 실험에 사용한 한약재의 추출은 한약재와 증류수를 환저 플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 2시간 동안 전열기로 전탕한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 진공 농축기로 감압농축한 후 동결건조기에서 24시간 동결건조하여 분말 시료를 얻었다.

3. 시약제조

본 실험에 사용된 methylmercuric chloride(MMC, Sigma) 1mM, 10mM, 100mM, 1M 등의 저장액을 각각 만들어 냉암소에 보관후 실험당일 적당한 양으로 희석 사용하거나 직접 필요한 양을 배양액에 첨가하여 사용하였다.

4. Methylmercuric chloride(MMC)처리

배양중인 대뇌신경세포를 여러 농도의 MMC가 포함된 배양액내에서 24시간 배양한 후 MMC의 독성효과를 약제가 포함되지 않은 배양액을 대조군으로 하여 비교분석하였다.

5. 한약추출물 처리

일정 시간 배양한 대뇌신경세포에 MTT50값의 MMC를 처리하기 2시간 전에 여러 농도의 RPM이 포함된 배양액에서 배양한 후 RPM이 MMC의 독성효과에 미치는 영향을 조사하였다.

6. 세포독성 조사

배양 대뇌신경세포에 여러 농도의 MMC를 처리한 후 MMC가 신경세포에 미치는 독성효과와 또한 배양 신경세포에 대한 RPM의 방어효과를 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(Sigma)분석법에 의하여 분석하였다. spectrophotometer로 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

7. 통계처리

실험 결과에 대한 유의성 검정은 ANOVA후 Student's t-test에 의하였으며 p값이 0.05이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

결 과

1. Methylmercuric Chloride(MMC)의 독성효과

1) 농도에 따른 영향

MMC가 5~40 μ M의 농도로 각각 포함된 배양액에서 생쥐의 배양 대뇌신경세포를 24시간 동안 배양한 후 MMC의 독성효과를 MTT분석법에 의하여 조사한 결과 5 μ M MMC처리에서는 세포의 생존율이 대조군에 비하여 83.6%로 나타났으며 10 μ M과 20 μ M MMC처리에서는 각각 62.8%와 47.2%($p < 0.05$)로 나타났다. 또한 40 μ M MMC처리에서는 31.6%($p < 0.01$)로 나타났다(Fig. 1).

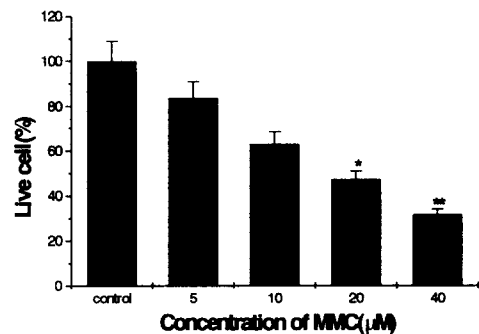


Fig. 1. A dose-response of methylmercuric chloride(MMC). MMC-induced neurotoxicity was measured by MTT assay in cultured mouse cerebral neurons. Cultured cells were exposed to 5, 10, 20 and 40 μ M MMC for 24 hours, respectively. The results indicate the mean \pm SD(n=6). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

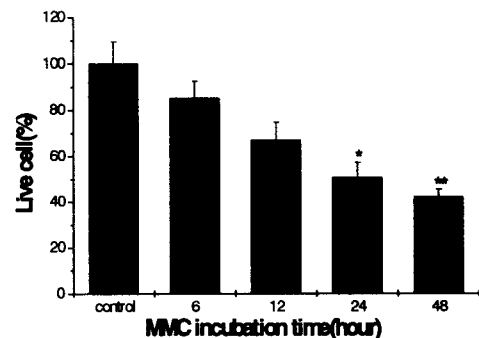


Fig. 2. A time-dependency of methylmercuric chloride(MMC). MMC-induced neurotoxicity. Cytotoxicity was measured by MTT assay in cultured mouse cerebral neurons. Cultured cells were exposed to 20 μ M MMC for 6, 12, 24 and 48 hours, respectively. The results indicate the mean \pm SD(n=6). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

2) 시간에 따른 영향

시간의 변화에 따른 MMC의 독성효과를 조사하기 위하여 20 μM MMC가 포함된 배양액에서 대뇌신경세포를 6~48시간 배양후 세포의 생존율을 조사한 결과 6시간 배양에서는 대조군에 비하여 85.3%로 나타났으며 12시간 배양에서는 67.2%로 나타났다. 또한 24시간과 48시간 배양에서는 세포의 생존율이 각각 50.6%(p<0.05)와 42.3%(p<0.01)로 나타났다(Fig. 2).

2. 한약추출물의 효과

한약추출물인 RPM이 MMC의 독성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 20 μM MMC에 배양 대뇌신경세포를 노출시키기 2시간 전에 RPM이 40~160 μM의 농도로 각각 포함된 배양액에서 배양한 다음 RPM이 MMC의 독성에 미치는 영향을 세포생존율에 의하여 조사하였다. 20 μM MMC만을 처리한 경우 세포의 생존율은 대조군에 비하여 46.3%로 나타났는데 비하여 40 μg/ml의 처리에서는 51.2%로 나타났다. 또한 80 μg/ml의 처리에서는 72.1%로 나타났다. 그러나 160 μg/ml RPM을 처리한 경우 세포의 생존율은 MMC만의 처리에 비하여 세포생존율이 81.4%로 유의하게 나타났다(p<0.05)(Fig. 3).

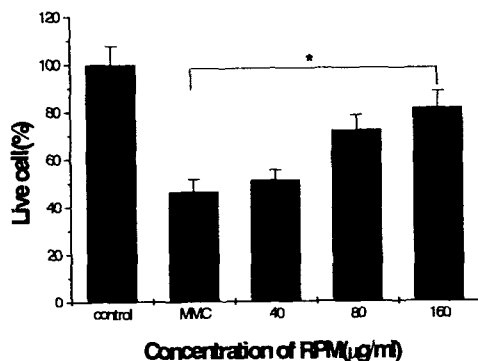


Fig. 3. Dose-response relationship of Radix Polygoni Multiflori(RPM) for its protective effect on MMC-induced neurotoxicity by MTT assay. Cultured mouse cerebral neurons were preincubated with RPM for 2 hours before exposure to 20 μM MMC for 24 hours. The results indicate the mean±SD(n=6). *p<0.05

고 찰

수은은 유동성을 가진 중금속으로서 호흡기나 피부를 통하여 인체에 노출된 경우 심각한 후유증을 초래하게 된 잘 알려진 사실이다³⁶⁾. 특히 메틸수은과 같은 유기수은은 무기수은에 비하여 독성이 더욱 강하기 때문에 일단 체내에 유입될 경우 여러 장기나 기관에 손상을 초래하게 된다⁹⁾. 그러나 아직까지 메틸수은의 독성효과에 대한 기전은 물론 작용현상에 대해서도 자세히 알려져 있지 않은 실정이다³⁷⁾. 본 실험에서 메틸수은이 대뇌신경세포에 미치는 독성효과를 조사하기 위하여 생쥐의 배양 신경세포에 5~40 μM의 농도로 methylmercuric chloride(MMC)가 각각 포함된 배양액에서 처리한 결과 MMC를 처리한 농도와 시간에 비례하여 세포생존율을 유의하게 감소시켰다. 본 실험의 이같은 결과는 Park 등⁶⁾이 생쥐의 배양 생쥐의 대뇌신경세포에

MMC를 처리한 결과 MMC의 처리 농도에 따라 세포생존율을 감소하였다고 보고한 결과와 일치하였다. 이러한 연구 결과들은 MMC가 신경독성효과를 가지고 있음을 증명하고 있다. 이같은 원인의 하나로는 MMC가 세포내 미토콘드리아나 라이소좀과 같은 세포소기관에 손상을 줌으로서 세포의 활성저하에 의한 결과일 가능성을 배제할 수가 없다⁹⁾. 그 이유의 하나는 MTT 분석법이 미토콘드리아에 위치하는 효소의 활성과 밀접한 관련이 있다는 보고에 근거하기 때문이다¹⁶⁾. 또 하나의 가능성은 MMC의 독성이 활성산소의 산화적 스트레스와 관련이 있다는 가설에 의해 MMC가 산화적 손상에 의해 직접 세포막의 지질과산화반응이나 항산화효소의 활성억제 등에 의해 세포를 손상케 하였을 가능성도 배제할 수는 없다고 생각된다⁹⁾. 한편, 한약추출물인 하수오(RPM)가 MMC의 독성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 20 μM MMC를 24시간 동안 배양 대뇌신경세포에 처리하기 전에 40~160 μg/ml RPM을 2시간 동안 처리한 경우 세포의 생존율이 MMC만의 처리(46.3%)에 비하여 모두 증가한 것으로 나타났으며 특히 160 μg/ml 처리에서는 MMC만의 처리에 비하여 81.4%로 유의하게 세포생존율의 증가를 나타냈다(p<0.05).

위의 실험 결과는 RPM이 항산화와 같은 약리활성을 가지고 있음을 말해주고 있다. 그러나 이의 정확한 분석을 위하여 항산화 측면에서 항산화효소의 활성이나 지질과산화반응의 분석 및 산소라디칼의 생성에 대한 정량적 분석과 같은 연구를 병행하여야 할 것으로 생각한다.

결 론

메틸수은(MMC)이 신경세포에 미치는 독성효과를 조사하기 위하여 생쥐의 배양 대뇌신경세포에 여러 농도의 MMC를 24시간 동안 처리한 후 세포생존율에 의하여 독성효과를 조사하였으며, 또한 MMC의 독성효과에 대한 한약추출물인 하수오(RPM)의 보호효과를 조사하였다. 그 결과 MMC는 배양 대뇌신경세포에 농도와 시간 의존적으로 세포생존율을 유의하게 감소시켰으며 또한 한약추출물인 RPM이 MMC에 의해 감소된 세포생존율을 유의하게 증가시킴으로서 MMC에 의한 세포독성을 방어하였다. 위의 결과로부터 MMC는 생쥐의 배양 대뇌신경세포에 독성효과를 나타냈으며 한약추출물인 RPM이 메틸수은의 독성을 방어하는데 효과적인 것으로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 2001년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨.

참고문헌

1. Audesirk T, Audesirk G, Ferguson C, Shugarts D : Effects of inorganic lead on the differentiation and growth of cultured hippocampal and neuroblastoma cells. Neurotoxicol 12:529-638, 1991.

2. Koizumi T, Waalkes MP : Effects of zinc on the binding cadmium to DNA : assessment with testicular interstitial cell and calf thymus DNA. *Toxicol In Vitro* 4:51-55, 1990.
3. Greener, Y. and Kochen J.A. : Methylmercury toxicity in the chick embryo. *Teratology*, 28, 23-28, 1983.
4. Ganther HE: Interactions of vitamin E and selenium with mercury and silver. *Ann NY Acad Sci* 355: 212-225, 1980.
5. Matsumoto T, Suzuki A, Morita C : Preventive effect of penicillamine of the brain defect of fetal rat poisoned transplacentally with methylmercury. *Life Sci* 6:2321-2326, 1967.
6. Park ST, Lim KT, Chung YT, Kim SU : Methylmercury-induced neurotoxicity in cerebral neuron culture is blocked by antioxidants and NMDA receptor antagonists. *Neurotoxicol* 17:37-46, 1996.
7. Tsubaki T, Takahashi H: Recent advances in Minamata disease studies. Kodansha, Tokyo, 1986.
8. Manca D, Ricard AC, Trottier B, et al. Studies on lipid peroxidation in rat tissues following administration of low and moderate dose of cadmium chloride. *Toxicol* 67 :303-323, 1991.
9. Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carla V, Moroni F: Excitatory amino acid and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage, *J Neurosci* 10: 1035-1041, 1990.
10. Inatani R, Nakatani N, Fuwa H : Antioxidative effect of constituents of rosemary(Rosemarinus of ficinalis L.) and their derivatives. *Agric Biol Chem* 47:521-528, 1983.
11. Hatcher EL, Chen Y, Kang YJ. Cadmium resistance in A 549 cells correlates with elevated glutathione content but not antioxidant enzymatic activities. *Free Radic Biol Med.* 19 : 805-812, 1995.
12. 최선미 : 단삼의 항암활성과 apoptosis에 미치는 영향. *동의생리병리학회지* 14(2), *동의병리학회*, 22-47, 2000.
13. 정현우 : 죽력이 T-lymphocytes 및 복강 Macrophage에 미치는 영향. *대한한방내과학회지*, 18(2), 1997.
14. Mosmann T : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63, 1983.
15. Michikawa M, Lim KT, Mclarnon JG, Kim SU: Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. *J Neurosci Res* 37: 62-70, 1994.
16. Borenfreund E, Babichi H, Martin-Alcuacil N : Comparisons of two in vitro cytotoxicity assay-The neutral red(NR) and tetrazolium MTT assay test. *Toxic In Vitro* 2: 1-6, 1988.
17. Coogan TP, Bare RM, waalkes MP : Cadmium -induced DNA strand damage in cultured liver cells : reduction in cadmium genotoxicity following zinc pretreatment. *Toxicol Appl Pharmacol* 113: 227-233, 1992.