

천마가 산소자유기로 손상된 생쥐의 배양 척수 운동신경세포에 미치는 영향

손일홍 · 이정현 · 김상수² · 이강창¹ · 이영미 · 홍기연 · 문형배 · 서은아³ · 한두석³ · 신민교⁴ · 송호준⁴ · 박승택^{4*}

원광대학교 의과대학, 1: 한의학전문대학원, 2: 원광의과학연구소, 3: 치과대학, 4: 한의과대학, 5: 의학자원연구센터

Effect of Rhizoma Gastrodiae on Cultured Spinal Motor Neurons Damaged by Oxygen Radicals

IL Hong Son, Jung Hun Lee, Sang Su kim², Kang Chang Lee¹, Young Mi Lee, Gi Youn Hong,
Hyung Bae Moon², Eun A Seo⁵, Du Seok Han³, Min Kyo Shin⁴, Ho Joon Song⁴, Seung Taeck Park^{2*}

*School of Medicine, 1: Department of Graduate School of Oriental Medicine, 2: Institution of Wonkwang Science, Wonkwang University,
3: College of Dental Medicine, 4: College of Oriental Medicine, 5: Medicinal Resources Research Center, Iksan, Korea*

In order to elucidate the mechanism of cytotoxic effect of oxygen radicals on cultured mouse spinal motor neurons, the neurotoxicity induced by hydrogen peroxide(H₂O₂) was evaluated by MTT assay. The neuroprotective effect of Rhizoma Gastrodiae(RG) against H₂O₂-mediated neurotoxicity was also examined in these cultures by SRB assay. The results were as follows : The value of lethal concentration 50(LC50) of H₂O₂ was estimated at a concentration of 30 μM in these cultures. Cell viability of cultured mouse spinal motor neurons was remarkably decreased by H₂O₂-induced neurotoxicity in a dose- and time-dependent manner. RG was remarkably effective in blocking the neurotoxicity induced by H₂O₂ at a concentration of 120 μM as determined by SRB assay. From above the results, it is suggested that H₂O₂ induce neurotoxicity, and the selective herbal extracted RG was very effective in blocking H₂O₂-mediated neurotoxicity on cultured mouse spinal motor neurons.

Key words : Oxygen radicals, Cultured spinal motor neuron, Rhizoma Gastrodiae.

서 론

산소자유기는 파킨슨씨병을 비롯한¹⁾ 및 뇌졸중²⁾과 같은 여러 신경병변과 밀접한 관련이 있음이 많은 연구에서 보고되고 있다³⁾. 특히, 인체의 대사이상으로 인하여 필요이상으로 과량 생성된 산소자유기는 세포막의 지질과산화반응을 촉진시켜 세포의 노화는 물론 결국 세포의 사멸을 초래하게됨은 잘 알려진 사실이다⁴⁾. 또한 과량으로 생성된 산소자유기는 phospholipase A2의 활성을 촉진시켜 새로운 산소자유기의 생성을 유도할 뿐만아니라 세포내의 칼슘저장소를 자극하여 칼슘의 양을 증가시킴으로서 세포의 손상을 가속화시킨다고 한다⁵⁾. 더욱이 산소자유기는 nitric oxide(NO)와 작용하여 peroxynitrite라는 맹독성물질을 만들며, 특히 aspartate와 같은 흥분성아미노산을 분비케 한다고 보고된 바 있다⁶⁾. 지금까지 알려진 바에 의하면 우리 인체에는

N-methyl-D-aspartate(NMDA) 수용체가 존재하는데 이는 Ca²⁺의 ion-channel과 밀접한 관계가 있다. 특히, NMDA 수용체는 여러가지 흥분성아미노산의 자극에 의해 활성화 됨으로써⁷⁾, 세포내 Ca²⁺ 농도를 증가시키거나, 또는 이차적으로 Ca²⁺ 증가와 같은 병적 상태에 의해 세포내 각종 효소나 이차 신호전달물질에 영향을 줌으로써 결국 세포를 퇴화케하여⁸⁾ 신경병변을 가속화 시킨다고 알려져 왔다. 근래에 산소자유기의 산화적 손상과 관련된 병변의 치료에 항산화제를 비롯한 NMDA 수용체의 길항제⁹⁾나, Ca²⁺의 길항제를 사용한 치료적 접근이 시도되고 있다¹⁰⁾. 특히, 항산화제나 산소자유기의 제거제 등은 직접 과량 생성된 산소자유기를 제거해줌으로써 병변을 회복시켜 주는데 중요한 역할을 한다는 연구결과에 의하여¹¹⁾, 산소자유기의 산화적 손상과 이에 대한 산소자유기제거제의 회복 및 방어효과에 대한 기전을 밝히려는 연구가 진행되어 왔다^{12,13)}. 그러나 아직까지 이들간의 상호작용에 대한 현상에 관해서는 자세하게 밝혀져 있지 않다^{14,15)}. 본 연구는 신경세포에 있어서 산소자유기의 산화적 손상에 대한 병리적 기전을 규명하기 위하여 생쥐의 척수운동신경

* 교신저자 : 박승택, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 의과대학

E-mail : stpark@wonkwang.ac.kr, Tel : 063-850-6759

· 접수: 2002/01/24 · 수정: 2002/03/06 · 채택: 2002/03/23

세포를 순수분리 배양한 후 이를 재료로 산소자유기의 일종인 Hydrogen peroxide(H₂O₂)의 독성효과를 분석하고 또한 H₂O₂에 의하여 유발되는 신경독성에 대한 천마의 영향을 조사하기 위하여 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

본 실험에 사용한 동물은 ICR 계통의 생후 3일된 건강상태가 양호한 생쥐를 사용하였다.

2. 실험방법

1) 약제의 추출

한약재와 증류수를 환저플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 2시간동안 전열기로 전탕한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 진공 농축기로 감압농축한 후 동결건조기에서 24시간 동결건조하여 분말 시료를 얻었다.

2) 약제 제조

본 실험에 사용한 약제로는 Hydrogen peroxide(H₂O₂, Sigma)로서 냉암소에 보관한 후 실험 당일 적당한 양으로 희석하거나 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다.

3) 세포배양

척수운동신경세포의 분리는 Michikawa 등¹⁵⁾의 방법에 따라 시행하였다. 즉 생쥐에서 적출한 척수조직은 0.25% trypsin이 포함된 phosphate buffered saline(PBS)으로 처리한 후 36°C, 5% CO₂/95%air로 조절된 항온기 내에서 배양하였다. 배양완료후 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco)이 포함된 Eagle's minimum essential medium(EMEM, Gibco)으로 3회 세척 후 Pasteur 피펫으로 세포를 분리시켰다. 분리된 세포들은 Poly-L-lysine (Sigma)으로 전처리 된 96-multiwell에 3×10⁶cells/well의 밀도로 세포를 분주하였다. 분주된 세포는 3일 간격으로 새로운 배양액으로 교환하여 주었으며 7일 동안 배양후 본 실험에 사용하였다.

4) 산소자유기 처리

H₂O₂가 생쥐의 척수운동신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 일정시간 배양한 척수운동신경세포를 0.6% D-glucose가 함유된 MEM으로 3회 세척한 다음 1~80 uM을 여러 농도로 조합하여 혼합한 다음 이들 각각의 배양액에서 1-12시간 동안 처리한 후 분석하였다.

5) 세포독성 및 방어효과 검증

(1) MTT정량

MTT<3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Sigma) 정량은 Mosmann¹⁴⁾의 방법에 의하였다. H₂O₂나 약제추출물을 처리한 배양 신경세포를 PBS로 3회 세척한 후 전날 제조한 50mg/ml의 MTT를 well당 최종농도로 희석하여 넣어 37°C, 5% CO₂로 조절된 정온기에서 배양하였다. 배양 완료 후 dimethylsulfoxide (DMSO, Merk)를 처리한 다음 spectrophotometer 로 590nm에서 흡광도를 측정 후 대조군과 비교 조사하였다.

(2) SRB 정량

산소자유기나 한약재 추출물로 일정시간 동안 처리한 척수 운동신경세포에 0.4% sulforhodamine B를 200μl씩 첨가하여 1시간 동안 실온에 방치한 다음 1.0% acetic acid로 3회 세척하였다. 세척 완료후 10mM Tris base를 이용하여 SRB-bound protein을 녹인 후 ELISA reader로 540nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

6) 통계 처리

실험 결과에 대한 유의성의 검정은 ANOVA후에 Tukey-Kramer multiple comparison test에 의하였으며 p값이 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

결 과

1. 산소자유기의 독성효과

1) 세포생존율에 미치는 영향

(1) 농도에 따른 영향

H₂O₂가 배양 척수운동신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 H₂O₂가 1uM에서 60uM까지의 각각의 농도로 포함된 배양액에서 6시간 동안 배양한 후 H₂O₂의 독성효과를 MTT assay 법에 의하여 조사한 결과 1 uM H₂O₂ 처리에서는 세포의 생존율이 대조군(100%)에 비하여 79.5%로 나타났다. 그러나 15 uM의 처리에서는 67.5%로 나타났다. 또한 30, 60 uM H₂O₂를 처리한 경우 세포 생존율은 각각 50.6%(p<0.05)와 38.6 % (p<0.01)로 대조군에 비하여 유의하게 낮게 나타났다(Fig.1).

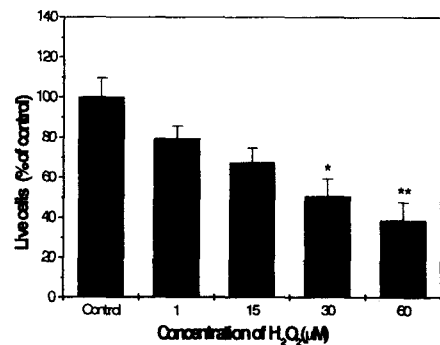


Fig. 1. A dose-dependency of hydrogen peroxide(H₂O₂). H₂O₂-induced neurotoxicity was measured by MTT assay in cultured spinal motor neurons. Cultured cells were exposed to 1, 15, 30, and 60uM for 6 hours, respectively. The results indicate the mean±SE(n=6). *p<0.05; **p<0.01

(2) 처리시간에 따른 영향

H₂O₂가 시간에 따라 배양 척수운동신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 30uM H₂O₂가 포함된 배양액에서 척수운동신경세포를 각각 1에서 12시간 동안 배양한 후 세포의 생존율을 MTT assay법에 의하여 대조군과 비교 조사한 결과 1시간 배양에서는 대조군(100%)에 비하여 81.9%의 세포생존율을 보였다. 또한 3시간 배양에 있어서는 66.0%로 대조군보다 다소 낮게 나타났다. 6시간 배양에서는 대조군에 비하여 48.2%(P<0.05)로, 12시간 배양에서는 23.1%(p<0.01)로 각각 나타났다(Fig.2).

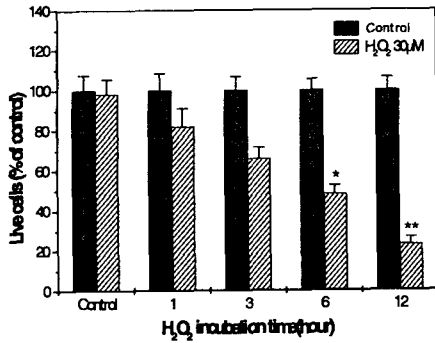


Fig. 2. A time-dependency of hydrogen peroxide(H₂O₂). H₂O₂-induced neurotoxicity was measured by MTT assay in cultured spinal motor neurons. Cultured cells were exposed to 30uM for 1, 3, 6 and 12 hours, respectively. The results indicate the mean±SE(n=6). *p<0.05; **p<0.01

2. 천마의 효과

1) 단백질합성에 미치는 영향

(1) H₂O₂의 영향

H₂O₂가 배양 척수운동신경세포에 미치는 영향을 총단백질 양의 측면에서 조사하기 위하여 1 uM H₂O₂에서 60 uM까지의 H₂O₂가 각각 포함된 배양액에서 6시간 동안 배양한 후 H₂O₂에 의한 단백질 합성의 변화에 대해 조사한 결과 1 uM H₂O₂ 처리에서는 단백질의 합성이 대조군(100%)에 비하여 76.4%로 나타났다. 또한 15uM의 처리에서는 대조군에 비하여 68.2%로 다소 낮게 나타났다. 또한 30, 60uM H₂O₂를 처리한 경우 단백질 합성은 각각 51.7%(p<0.05)와 36.2%(p<0.01)로 나타나 유의성있는 감소를 보였다(Fig. 3).

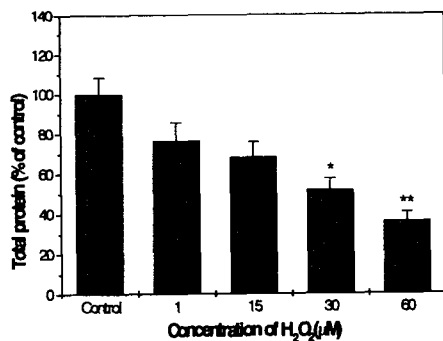


Fig. 3. A dose-dependency of hydrogen peroxide(H₂O₂). H₂O₂-induced neurotoxicity was measured by SRB assay in cultured spinal motor neurons. Cultured cells were exposed to 1, 15, 30, and 60uM for 6 hours, respectively. The results indicate the mean±SE(n=6). *p<0.05; **p<0.01

(2) 천마(RG)의 영향

일정 시간 동안 배양한 척수운동신경세포에 15 ug/ml에서부터 120 ug/ml까지의 각각 농도의 천마를 2시간 동안 전처리한 다음 이를 다시 30 uM H₂O₂가 포함된 배양액에서 6시간 동안 배양한 후 이의 영향을 조사한 결과 30 uM H₂O₂만을 처리한 경우 세포의 생존율은 대조군(100%)에 비하여 48.7%로 나타났다. 그러나 15 ug/ml RG를 처리한 경우 세포의 생존율은 대조군에 비하여 61.4%로 나타났으며 30 ug/ml RG를 처리한 경우

68.7%로 나타났다. 또한 60 ug/ml RG와 120 ug/ml RG의 처리에서는 각각 76.6%와 86.4%(p<0.05)로 나타났다(Fig. 4).

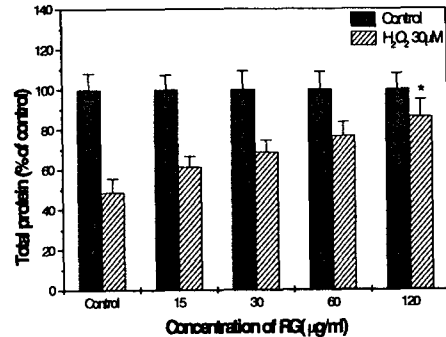


Fig. 4. Dose-response relationship of Rhizoma Gastrodae(RG) for its neuroprotective effect on H₂O₂-induced neurotoxicity by SRB assay. Cultured cells were preincubated with RG for 2 hours before exposure to 30uM H₂O₂ for 6 hours. The results indicate the mean±SE(n=6). *p<0.05; **p<0.01

고찰

Hydrogen peroxide(H₂O₂)는 산소자유기의 일종으로서 이의 산화적 손상에 의하여 세포를 손상시켜 정상적인 세포의 활성을 억제시킴으로서 병변을 촉진시킨다고 한다⁴⁾. 이러한 산소자유기는 인체의 정상적인 대사과정 중에서 소량 만들어지며 이는 superoxide dismutase(SOD)나 catalase와 같은 항산화제에 의하여 물로 변환됨으로서 인체에는 아무런 손상을 주지 않는다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다¹³⁾. 그러나 대사이상인 경우 다량의 산소자유기가 생성되어 인체에 치명적인 손상을 초래하게 된다⁹⁾. 지금까지 밝혀진 바에 의하면 산소자유기의 산화적 손상에 의하여 유발되는 신경성 질환들은, 노인성치매(Alzheimer disease)를 비롯한 파킨슨씨병(Parkinsonism) 및 뇌허혈¹⁵⁾ 등이 있으며 특히, 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)^{6,11)}은 SOD-1 유전자의 돌연변이에 의하여 환자의 뇌속에 과량의 산소자유기가 축적되어 일어난다는 것이 밝혀지면서 산소자유기가 각종 신경병변에 병리적 요인의 하나로 보고되어지고 있다⁷⁾. 산소자유기는 세포막의 지질 과산화반응을 촉진시킴으로서 세포의 손상과 퇴화를 초래하여 정상적인 대사작용을 방해함으로써 그 결과 세포의 노화를 가속화시키며³⁾, 또한 산소자유기는 세포의 활성에 관여하는 각종 효소나 protein kinase C(PKC)와 같은 이차전달자의 활성에 영향을 주어 결국 세포의 퇴화를 초래하게 되고 나아가서는 세포를 사멸케 한다¹⁾. 최근에 산소자유기에 대한 연구에서 산소자유기는 흥분성아미노산(excitatory amino acids, EAAs)의 분비를 유도하고¹²⁾, 분비된 EAAs는 세포의 N-methyl-D aspartate 수용체를 과자극하여 그 결과 세포내 자유 Ca²⁺ 농도를 증가시켜 신경세포에 손상을 초래한다고 보고된 바 있다¹⁶⁾.

본 실험의 MTT assay에 의한 세포생존율의 조사에서 H₂O₂는 생쥐의 배양 척수운동신경세포에 대하여 농도와 시간에 비례하여 현저한 세포의 생존율 감소를 보임으로서 신경독성을 가지고 있음이 제시되었다. 이러한 결과는 Park 등⁹⁾이 생쥐의 뇌에서

분리한 신경세포에, Michikawa 등¹⁵⁾이 생쥐의 배양 척수운동신경세포에서 각각 산소자유기가 세포독성을 나타냈다는 결과와 일치하였다. 본 실험의 결과에서와 같이 산소자유기가 신경독성을 나타내는 현상에는 세포내 세포소기관의 손상을 비롯하여⁴⁾, 세포내 PKC의 활성화⁶⁾와 같은 병인이 있겠지만 아마도 산소자유기가 세포의 항산화계를 손상시켜 그 결과 항산화효소의 작용을 방해 내지는 저하시켰을 가능성이 클 것으로 생각된다. 따라서 본 실험에서는 한약추출물의 일종인 천마(RG)를 신경세포에 처리한 후 단백질 합성분석에 의하여 H₂O₂에 대한 천마의 영향을 분석하였다. 단백질합성의 정량을 위한 SRB assay에 있어서 30 uM H₂O₂만을 처리한 경우 단백질 합성의 양적변화(48.7%)에 비하여 120 µg/ml RG 처리에서는 80%(p<0.05)이상의 높은 양적 증가를 보였다. 본 실험의 이러한 결과는 Park 등⁹⁾이 생쥐의 뇌에서 분리한 대뇌신경세포에서 산소자유기를 생성하는 중금속을 처리한 후 glutathione에 의한 영향이나, Michikawa 등¹⁵⁾에 의한 xanthine oxidase에 대한 SOD의 방어효과에 대한 결과와 일치하였다. RG의 이같은 방어효과는 본 실험에 있어서 아마도 미리 처리한 RG가 H₂O₂에 의해서 형성된 산소자유기의 작용을 억제한 결과라고 생각 되어진다. 따라서 RG는 SOD나 glutathione과 같은 항산화적 약리적 활성을 가지고 있음을 제시하고 있다. 그러므로 RG의 항산화효과는 산소자유기의 산화적 손상과 관련이 있는 신경질환의 병변치료를 항산화 측면에서의 새로운 접근을 시도할 수 있는 가능성을 뒷받침하고 있다고 하겠다. RG의 항산화효과는 이 밖에도 NMDA 수용체와도 밀접한 관계가 있을뿐만 아니라 칼슘채널과도 상호연관성이 있음이 밝혀지고 있다¹⁵⁾. 이같은 연구는 곧 RG와 같은 약제의 항산화효과는 흥분성아미노산, 산소자유기와 세포내 자유칼슘 및 흥분성아미노산과 칼슘간의 밀접한 상호 연관성을 제시하고 있다 하겠다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 본 실험에서 생쥐의 배양 척수운동신경세포에 대하여 산소자유기는 신경독성을 나타냈으며 이러한 신경독성은 천마와 같은 약제의 추출물에 의하여 효과적으로 방어됨이 증명되었다. 이같은 실험 결과는 곧 산소자유기가 항산화계의 손상과 밀접하게 작용하고 있으며 이는 항산화 측면에서 산소자유기에 대한 치료적 접근방법을 제시하고 있다고 생각된다.

결 론

산소자유기가 생쥐 배양 척수 운동신경세포에 미치는 독성 효과에 대한 기전을 규명하기 위하여 Hydrogen peroxide(H₂O₂)를 배양 신경세포에 일정시간 처리한 후 산소자유기의 독성효과를 측정하고 H₂O₂에 의하여 유발된 독성에 대한 천마(Rhizoma Gastrodai, RG)의 방어효과를 MTT assay법과 neurofilament enzymeimmun oassay법 및 SRB assay법으로 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다. H₂O₂는 생쥐의 배양운동신경세포에 대하여 30 uM에서 lethal concentration 50(LC50)을 나타냈다. H₂O₂는 생쥐의 배양 척수 운동신경세포에 농도와 시간에 비례하여 대조군에 비하여 세포의 생존율을 현저히 감소시켰다. RG는 SRB법의 측정 결과 120 µg/ml 농도에서 H₂O₂에 의하여 유발된 신경독성을 방어하는데 매우 효과적인 것으로 나타났다.

이상의 결과로 부터 산소자유기인 H₂O₂는 배양 척수 운동신경세포에 직접적으로 독성효과를 나타냈으며 천마와 같은 선택적인 약재추출물이 H₂O₂에 의하여 감소된 단백질합성량을 증가 시킴으로서 산소자유기에 의한 신경독성을 방어하는데 매우 효과적인 것으로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 2000학년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 이루어 졌음.

참고문헌

1. Serafin M, de waelle C, Khateb A, Vidal P, Muhlethaler M : Medial vestibular nucleus in the guinea pig. II. Ionic basis of the intrinsic membrane properties in brainstem slices. *Exp Brain Res* 84: 426-433, 1991.
2. Takahashi K, Akaike N : Calcium antagonist effects on low-threshold(T-type) calcium current in rat isolated hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Pharmacol Exp Ther* 256-175, 1991.
3. Maioli C, Precht W, Ried S : Short-and long-term modification of vestibulo-ocular response dynamics following unilateral vestibular nerve lesion in the cat. *Exp Brain Res* 50: 259-74, 1983.
4. Mattson MP, Cheng B, Sminth-Swintosky VL : Mechanisms of neurotrophic factor protection against calcium-and free radical mediated excitotoxic injury :Implications for treating neurogenerative disorders. *J Exp Neurol* 124: 89-95, 1993.
5. Smith PF, Curthoys IS : Neuronal activity in the ipsilateral medial vestibular nucleus of the guinea pig following unilateral labyrinthectomy. *Brain Res* 444: 308-19, 1988.
6. Michaels RL, Rothman SM : Glutamate neurotoxicity in vitro : Antagonist pharmacology and intracellular calcium concentrations. *J Neurosci* 10: 283-292, 1990.
7. Freese A, DiFiglia M, Koroshetz WJ, Beal MF, Martin JB : Characterization and mechanism of glutamate neurotoxicity in primary striatal culture. *Brain Res* 521: 245-246, 1990.
8. Drago F, Nardo L, Rampello L, Raffaele R : Vestibular compensation in aged rats with unilateral labyrinthectomy treated with dopaminergic drugs. *Pharmacol Res* 33: 135-140, 1996.
9. 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.
10. Darlington CL, Smith PF : Pre-treatment with a Ca²⁺ channel antagonist facilitates vestibular compensation. *Neuroreport* 3: 143-145, 1992.

11. Kim MS, Jin BK, Chun SW, Lee MY, Lee SH, Kim JH, Park BR : Role of vestibulo-cerebellar N-methyl-D-aspartate receptors for behavioral recovery following unilateral labyrinthectomy in rats. *Neurosci Lett* 222: 171-174, 1997.
12. Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carla V, Morroni F : Excitatory amino acid and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J Neurosci* 10: 1035-1041, 1990.
13. Smith PF, de Waele C, Vidal PP, Darlington CL : Excitatory amino acid receptors in normal and abnormal vestibular function. *Mol Neurobiol* 5: 369-387, 1991.
14. Mosmann T : Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxic assays. *J Immun 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. Zeman S, Liloyd C, Meldrum B, Leigh PN : Excitatory amino acids, free radicals and the pathogenesis of motor neurons disease. *Neuropathol Appl Neurobiol* 20:219-231,1994.