

활성산소로 손상된 척수후근신경절세포에 대한 丹參의 효과

서은아¹ · 최유선^{2,4} · 양현웅² · 이강창^{3*}

1: 원광대학교 생활과학대학, 2: 원광대학교 의과대학, 3: 원광대학교 한의학 전문대학원, 4: 원광의과학연구소

Effect of *Salviae Miltiorrhzae Radix* on Cultured Spinal Dorsal Root Ganglion Neurons Damaged by Reactive Oxygen Species

Eun A Seo¹, Yu Sun Choi^{2,4}, Hyun Woong Yang², Kang Chang Lee^{3*}

1: College of Life Science, 2: School of Medicine, 3: Professional Graduate School of Oriental Medicine, 4: Wonkwang Medical Science, Wonkwang University

To evaluate the neurotoxicity of reactive oxygen species (ROS) in cultured cultured spinal dorsal root(DRG) neurons derived from neonatal mouse, Cytotoxicity was measured by MTS assay after cultured cells were grown for 3 hours in the media containing 1~60 μ M hydrogen peroxide (H₂O₂). In addition the neuroprotective effect of *Salviae Miltiorrhzae Radix* (SMR) was measured in these cultures. Cell viability was positively decreased in a dose- and time-dependent manner after exposure of cultured mouse DRG neurons to 30 μ M H₂O₂ for 3 hours. In the neuroprotective effect of SMR on H₂O₂-mediated toxicity, SMR prevented the H₂O₂-induced neurotoxicity in these cultures. From these results, it suggests that H₂O₂ is toxic in cultured mouse spinal motor neurons and selective herb extract such as *Uncariae Ramulus Cum Uncis* is effective in prevetion of the neurotoxicity induced by H₂O₂.

Key words : ROS, *Salviae Miltiorrhzae Radix*, Spinal dorsal root ganglion neuron

서 론

활성산소는 신경세포를 비롯한 심근세포 및 간세포등 다양한 세포종에 이의 산화적 손상에 의하여 세포손상이나 세포사멸을 초래함으로써 각종 질환의 병리적 요인으로 밝혀지고 있다^{1,2}. 특히, 활성산소는 과도한 운동이나 인체의 비정상적인 대사과정에서 과량 생성됨으로서 superperoxide anion이나 hydroxyl radical과 같은 산소라디칼을 발생하여 이들이 세포를 산화하여 세포손상을 유도하게 된다^{3,4}. 특히, 뇌와 척수는 인체의 중추신경계를 구성하고 있어 이들을 구성하고 있는 뇌신경세포나 척수신경세포가 손상되면 치매를 비롯한 파킨슨씨병 및 근위축성측삭경화증과 같은 신경질환을 초래하게 된다^{5,6}. 지금까지 밝혀진 활성산소의 산화적 손상기전을 보면 활성산소는 세포내 glutamate 수용체의 일종인 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체를 과활성화 시킴으로서 세포내 칼슘유입을 유도하여 세포

의 팽창과 같은 퇴화현상을 일으켜 세포의 사멸이나 고사를 촉진시킨다고 알려져 있다^{7,8}. 더욱이 활성산소는 칼슘의 항상성을 깨뜨림으로서 Ca²⁺-dependent protein kinase C (PKC)를 활성화시키고 이는 세포의 성장이나 분화에 영향을 미쳐 비정상적인 세포분열이나 분화를 일으켜 결국 세포의 퇴화를 초래한다^{9,10}. 이와같이 활성산소는 신호전달체계에 영향을 줄뿐만 아니라 막의 지질과산화반응을 유도하여 막손상을 비롯한 세포내효소의 활성을 방해하기도 한다^{11,12}. 예를 들면 활성산소는 혈관내피에서 vascular adhesion molecule (VCAM)-1 이나 intercellular adhesion molecule (ICAM)을 생성하여 thiobabotric acid-reactive substance (TBARS)의 증가를 초래하여 그 결과 죽상경화증과 같은 혈관질환을 일으킨다¹³. 특히, 산소라디칼은 질소라디칼인 nitric oxide (NO)와 결합하여 peroxynitrate 라는 독성이 강한 물질을 생성함으로써 세포에 이상적인 대사를 유도하여 세포손상을 일으킨다고 알려져 있다^{3,11}. 따라서 활성산소에 의한 산화적 손상을 방어하기 위하여 항산화제를 비롯한 칼슘저해제나 산소라디칼제거제등을 투여하여 병변을 예방 내지는 치료를 위한 접근을 시도하고 있다^{3,12}.

최근에 한약추출물들이 항암효과나 항균 및 항산화활성을

* 교신저자 : 이강창, 경기도 군포시 산본동 1126-1, 원광대학교부속 군포병원
· E-mail : kcl207@wonkwang.ac.kr · Tel : 031-390-2367
· 접수 : 2003/07/30 · 수정 : 2003/08/30 · 채택 : 2003/10/08

가지고 있다고 제시되고 있다^{14,15}). 예를 들면 인삼에 들어 있는 polyacetylene 성분은 간세포에 항암효과가 있다는 것이 타 연구에서 밝혀지고 있다¹⁴). 한약추출물중 단삼 (*Salviae Miltiorrhizae Radix*, SMR)은 꿀풀과에 속하는 다년생초본으로서 맛은 쓰고 성은 약한 한(寒)하다. 홍복자통이나 월경불순 및 창양종독과 같은 처방에 널리 사용되고 있으며 그 밖에도 안정을 비롯한 항균이나 진균작용이 강하다고 보고되어 있으나¹⁵), 항산화작용에 대해서는 자세히 알려져 있지 않다. 한약추출물은 여러 성분이 복합적으로 배합되어 있어 각각의 분획에 대한 약리활성을 정량적으로 분석한다는 것은 많은 어려움이 따르겠지만 반면, 이들의 구성성분이 상호보완작용을 나타냄으로서 각 성분의 고유기능을 능가하는 독특한 효능을 나타낸다는 장점이 있어 한약의 가감처방은 매우 효과적인 병변의 치료적 접근의 한 방법으로서 많은 관심을 끌고 있다¹⁴). 더욱이 한약추출물은 양약에 비하여 독성이 거의 없거나 미약하기 때문에 장기간의 투여에도 많은 부작용이 없어 안심하고 사용할 수 있다는 장점이 있다^{14,15}). 현재는 한약재나 천연추출물에 대하여 정성적으로나 정량적으로 효능을 정확히 분석할 수 있는 시험관내 분석법이 개발됨으로서 이를 이용하여 이들에 대한 효능분석을 비롯하여 그 밖에 각종 화학물질 및 신약재에 대한 안전성 검증등에 대한 분석이 가능하게 되었다¹⁶). 따라서 국내외 많은 학자들은 개발된 다양한 분석법을 적용하여 산소자유기의 산화적 손상에 대한 기전규명을 비롯하여 이의 치료적 접근을 위하여 동물을 대상으로 많은 연구를 수행하여 왔다^{4,8}).

본 연구는 활성산소에 의한 신경세포 손상에 대한 병인적 기전을 규명하기 위하여 생쥐의 척수후근신경절세포를 배양한 후 산소자유기의 독성을 분석하고 또한 산소자유기에 의하여 유발되는 신경독성에 대한 단삼 (SMR)의 방어효과를 조사하기 위하여 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 실험동물

본 실험에 사용한 동물은 원광대학교 의과대학 동물사육실에서 분리 사육중인 건강 상태가 양호한 생후 3 일된 ICR 계통의 생쥐를 사용하였다.

2) 약제 제조

본 실험에 사용한 H₂O₂는 Sigma에서 구입하였다. 위의 약제들을 각각 1 M, 100 mM, 10 mM 의 저장액을 만들어 냉암소에 저장한 다음 실험 당일 최종 농도로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다.

3) 한약재의 추출

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

2. 방법

1) 세포배양

척수후근신경절세포의 분리는 Park 등⁴)의 방법에 따라 척수 조직으로부터 효소단리해리술에 의하여 시행하였다. 분리된 신경세포는 혈청이 포함된 배양액에 1 x 10⁵ cells/well의 밀도로 산정하여 96-multiwell에 넣어 분주하였다. 분주된 세포는 CO₂ 정온기에서 10 시간 동안 배양하였으며 배양 완료후 산소자유기가 포함되어 있지 않은 배양액을 대조군으로 하여 비교 조사하였다.

2) 산소자유기 처리

H₂O₂가 배양 척수후근신경절세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 1 μM에서 60 μM 까지의 농도로 각각 포함된 배양액에서 신경세포를 4 시간 동안 배양한 후 이의 독성효과를 조사하였다.

3) 한약추출물의 처리

일정시간 배양한 척수후근신경절세포에 15 μM H₂O₂를 처리하기 2 시간 전에 각각 여러 농도의 단삼 (*Salviae Miltiorrhizae Radix*, SMR)이 포함된 배양액에서 배양한 다음 이들이 H₂O₂의 독성에 미치는 영향을 조사하였다.

4) 세포생존율 조사

배양 척수후근신경절세포에 여러 농도의 H₂O₂를 처리한 후 H₂O₂가 신경세포에 미치는 독성효과와 이에 대한 SMR의 방어효과를 Borenfreund 등¹⁵)의 MTS분석법에 의하여 분석하였다.

5) 통계처리

대조군과 실험군의 차이에 대한 통계적 유의성은 Student's t-test로 비교하였다. 통계적 유의수준은 p값이 0.05 미만인 경우로 하였다.

결 과

1. H₂O₂의 독성효과

1) 농도에 따른 영향

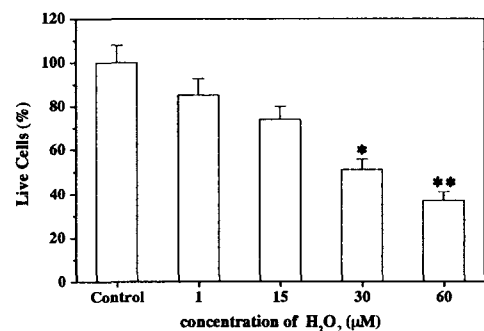


Fig. 1. A dose-dependency of H₂O₂. H₂O₂-induced neurotoxicity was measured by MTS assay in mouse spinal dorsal root ganglion neuron cultures. Cultured cells were exposed to 1, 15, 30 and 60 μM H₂O₂ for 3 hours, respectively. The results indicate the mean ± SEM (n=6). *p<0.05; **p<0.01

H₂O₂가 1~60 μM의 농도로 각각 포함된 배양액에서 생쥐의 척수후근신경절세포를 6 시간 동안 배양한 후 H₂O₂의 독성효과를 MTS assay법에 의하여 조사한 결과 1 μM H₂O₂의 처리에서는 세포생존율이 대조군에 비하여 85%로 나타났으며 15 μM

H₂O₂의 처리에서는 74%로 나타났다. 또한 30 μM과 60 μM H₂O₂의 처리에서는 각각 세포생존율이 51%(p<0.05)와 37%(p<0.01)로 나타났으며 30 μM에서 MTS50 값을 나타냈다(Fig. 1).

2) 시간에 따른 영향

시간의 변화에 따른 H₂O₂의 독성효과를 조사하기 위하여 30 μM H₂O₂가 포함된 배양액에서 생쥐의 척수후근신경절세포를 1~4 시간 동안 배양후 세포생존율을 MTS assay법에 의하여 조사한 결과 1시간 배양에서는 세포생존율이 대조군에 비하여 82%로 나타났으며 2 시간 배양에서는 63%로 나타났다. 또한 3 시간과 4 시간 배양에서는 각각 세포생존율은 54%(p<0.05)와 26%(p<0.01)로 나타났다(Fig. 2).

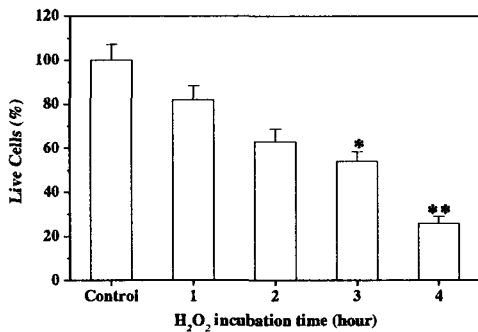


Fig. 2. A time-dependency of H₂O₂. H₂O₂-induced neurotoxicity was measured by MTS assay in mouse spinal dorsal root ganglion neuron cultures. Cultured cells were exposed to 30 μM H₂O₂ for 1, 2, 3 and 4 hours, respectively. The results indicate the mean±SEM(n=6). *p<0.05; **p<0.01

2. 단삼(SMR)의 방어효과

한약추출물인 SMR이 H₂O₂의 독성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 30 μM H₂O₂가 포함된 배양액에서 척수후근신경절세포를 배양하기 2시간 전에 SMR이 80~120 μg/ml의 농도로 각각 포함된 배양액에서 배양한 다음 SMR이 H₂O₂의 독성에 미치는 영향을 MTS assay법에 의하여 조사하였다. 30 μM H₂O₂만을 처리한 경우 세포생존율은 대조군에 비하여 43%로 나타났는데 비하여 80 μg/ml SMR의 처리에서는 56%로 나타났다. 또한 100 μg/ml 과 120 μg/ml URCU 처리에서는 각각 71%와 86%로 나타나 이는 모두 H₂O₂만의 처리에 비하여 유의한 세포생존율을 보였다(p<0.01)(Fig. 3).

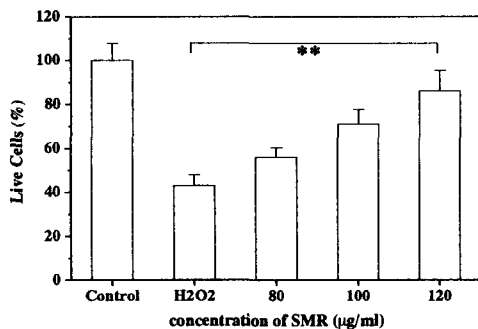


Fig. 3. Dose-response relationship of Salviae Miltiorrhizae Radix (SMR) for its neuroprotective effect on H₂O₂-induced neurotoxicity by MTS assay. Cultured cells were preincubated with SMR for 2 hours before exposure to 30 μM H₂O₂ for 3 hours. The results indicate the mean±SEM(n=6). *p<0.01

고찰

활성산소는 항산화제의 손상과 지질과산화반응에 의한 막손상등을 통하여 세포를 고사시키거나 나아가서는 세포의 사멸을 초래하게 된다¹⁶⁾. 특히 활성산소는 인체내에서 이루어지고 있는 효소전자전달회로에서 전자수용체에 의하여 산화되지 못한 경우 과량의 superoxide anion 이나 hydroxyl radicals와 같은 산소라디칼을 생성하여 인체의 여러장기에 산화적 손상을 줌으로서 세포의 기능부전이나 세포퇴행성 변화를 유도하여 결국 병변을 초래하게 된다^{3,7,12)}. 특히 활성산소는 세포내의 핵산이나 단백질합성계를 손상시키며 나아가서 세포내의 대사적 이상을 유발함으로써 각종 질환의 병리적 원인의 하나로 밝혀지고 있다^{11,13)}. 본 실험에서 활성산소가 척수의 후근신경절 (dorsal root ganglion, DRG) 세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 생쥐의 DRG 세포에 1~60 μM H₂O₂를 3 시간동안 처리한 결과 H₂O₂는 생쥐의 배양 DRG 세포에 처리한 농도에 비례하여 세포생존율을 대조군에 비하여 유의하게 감소시켰다. Borenfreund 등¹⁷⁾은 여러 화학약제들에 대한 독성평가기준에서 MTS50 값이 100 μM 이하이면 고독성이라고 하였다. 본 실험에서 30 μM H₂O₂에서 배양 DRG 세포를 3 시간 동안 처리한 결과 MTS50 값으로 나타남으로서 H₂O₂가 생쥐의 배양 DRG 세포에 고독성인 것으로 나타났다. 본 실험에 있어 H₂O₂가 배양 DRG 세포에 강한 독성효과를 나타낸 것은 아마도 DRG 세포가 산화적 손상으로 세포막의 기능손상으로 인해 항산화효소의 기능저하나 세포소기관에 손상을 초래하였을 가능성이 클 것으로 생각된다^{8,13)}. 최근에 활성산소의 산화적 손상의 방어에 항산화제는 물론 칼슘의 저해제등이 매우 유효하다는 연구 결과가 보고되고 있다^{4,10)}. 항산화제는 과량의 산소자유기를 제거시킴으로써 산화적 손상으로부터 세포를 보호하며, 칼슘차단제는 세포의 NMDA 수용체와 칼슘이온채널의 수준에서 세포내 칼슘의 항상성을 조절해 줌으로써 세포를 보호한다고 밝혀졌다^{7,13)}. 한편 한약추출물에서도 항산화활성을 가지고 있는 성분이 있다는 것이 강력히 제시되면서 이에 관한 연구가 진행되고 있다¹⁵⁾. 따라서 본 실험에서는 한약추출물인 단삼 (SMR) 이 H₂O₂의 산화적 손상에 미치는 영향을 조사하기 위하여 SMR 이 80~120 μg/ml의 각각의 농도로 포함된 배양액에서 신경세포를 2 시간 동안 전처리한 후 이의 영향을 조사한 결과 30 μM H₂O₂만을 처리한 경우 세포의 생존율은 43%인데 비하여 80~120 μg/ml Uncariae Ramulus Cum Uncis의 처리에서는 50~80% 이상의 높은 생존율을 보였다. 이러한 실험 결과는 Park 등¹⁸⁾이 단삼이 GO에 의하여 손상된 혈관내피세포의 생존율을 유의하게 증가시켰다는 연구 결과와 일치함을 알 수 있었다. 본 실험에서 H₂O₂의 독성에 대하여 SMR이 방어효과를 보인 것은 SMR에 함유되어 있는 miltirone이나 tanshinone등과 같은 물질의 약리적 활성일 가능성을 배제할 수는 없다¹⁵⁾. 앞으로 활성산소의 산화적 손상기전의 규명이나 단삼과 같은 한약추출물의 방어기전에 대한 더욱 자세한 연구를 위하여서는 약리나 생리는 물론 생화학이나 분자유전과 같은 복합적인 측면에서의 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결 론

Hydrogen peroxide(H_2O_2)가 배양 척수후근신경절세포에 미치는 산화적 손상에 미치는 영향을 조사하기 위하여 H_2O_2 가 여러 농도로 포함된 배양액에 신경세포를 노출시킨 후 이의 독성 효과를 조사하였으며, 또한 H_2O_2 에 의하여 유발된 신경독성에 대하여 한약추출물인 단삼 (*Salviae Miltiorrhizae Radix* (SMR))의 방어효과를 MTS assay법에 의하여 분석하였다. 생쥐에서 순수 분리 배양한 척수후근신경절세포에 1~60 μM H_2O_2 가 포함된 배양액에서 3 시간 동안 배양한 결과 H_2O_2 는 처리한 농도에 비례하여 세포생존율을 유의하게 감소시켰으며, 또한 H_2O_2 에 의하여 유도된 신경독성에 대하여 한약추출물인 SMR은 산화적 손상에 대하여 유의한 방어효과를 나타냈다. 이상의 결과로부터 활성산소는 생쥐의 배양 척수후근신경절세포에 독성효과를 나타냈으며 SMR과 같은 한약추출물이 H_2O_2 의 독성을 효과적으로 방어한 것으로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 2003년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨

참고문헌

- Halliwell B : Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem* 59:1609-1623, 1992.
- Yamamoto M, Shima T, Uozumi T, Sogabe T, Yamada K, Kawasaki T : A possible role of lipid peroxidation in cellular damages caused by cerebral ischemia and protective effect of alpatocopherol administration. *Stroke* 14:977-982, 1983.
- Nistico G, Ciriolo MR, Fiskin D, Iannone M, DeMartino A, Rotilio G : NGF restores decrease in catalase activity and increases superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity in the brain of aged rat. *Free Rad Biol Med* 12:177-181, 1992.
- 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.
- Rosen D, Siddique T, Patterson D, Figlewicz D, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O Regan J, Deng H, Rahmani Z, Krizus A et al. : Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature(London)* 362:59-62, 1993.
- Hall E, Braugher JM : Role of lipid peroxidation in post-traumatic spinal cord degeneration. *Cent Nerv System Trauma* 3:281-249, 1986.
- Dumuis A, Sebben M, Haynes L, Pin J-P, Bockaert J : NMDA receptors activate the arachidonic acid cascade system in striatal neurons. *Nature(London)*336:68-70, 1988.
- Hayase F, Hirashima S, Okamoto G, Kato H : Scavenging of active oxygens by melanoidin. *Agric Biol Chem* 53:3383-3389, 1989.
- Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carrla V, Moroni F : Excitatory amino acid and free radicals formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J Neurosci* 10:1035-1041, 1990.
- Kim SU, Osborne D, Kim MW, Spigelman I, Puil E, Shin D : Longterm culture of human fetal spinal cord neurons: Morphological immunocytochemical and electrophysiological characteristics. *Neuroscience* 25:659-670, 1988.
- Graf E, Mahoney JR, Bryant RG, Eaton Jw : Iron-catalyzed hydroxyl radical formation : Stringent requirement for free iron coordination site. *J Biochem* 259:3620-3624, 1984.
- Chuyen N.V., Utsunomiya N., Hodaka A. and Kato H. : Antioxidative effect of Maillard reaction products in vivo. in the " The Maillard reaction in food processing, human nutrition and physiology". ed. PA Pinot pp. 285-290 Birkhauser Verlag Basel, 1990.
- Fong KL, McCay PB, Poyer JL, Keele BB, Mista H : Evidence that peroxidation of lysosomal membrane is initiated by hydroxyl free radicals produced during flavin enzyme activity. *J Biol Chem* 248:7792-7797, 1973.
- 김숙영, 문자영, 이동욱, 박기현 : Saponin 함유식물의 거담작용. *한국생약학회지* 19(2):133-140, 1988.
- 김정환, 민선식, 김성훈, 홍희도, 김종수, 김수언 : 갈화(*puerariae flos*)추출물이 rat 혈중 ethanol 농도에 미치는 영향. *한국농화학회지*.38(6):549-53, 1995.
- Mosmann T : Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxic assays. *J Immun Methods* 65: 55-63, 1983.
- Borenfreund E, Babich H, Martin-Alcuacil N : Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays-The neutral red(NR) and tetrazolium MTT test. *Toxic In Vitro* 2:1-6, 1988
- Park SM, Lee JH, Yang HW, Lee KC : Effect of *Multiorrhizae Radix* on the Vasculotoxicity induced by glucose oxidase in cultured Pulmonary Endothelial cells. *Korean J Oriental Physiology & Pathology*. 17(1):136-139, 2003.