

과산화수소로 손상된 배양 심근세포에 대한 골쇄보의 영향

이병찬^{1,2} · 이종화¹ · 이환봉¹ · 이강창*

원광대학교 한의학전문대학원, 1: 원광대학교 의과대학, 2: 원광의과학연구소

Effect ofon Cultured Myocardial Cells Damaged by Hydrogen Peroxide

Byung Chan Lee^{1,2}, Joung Hwa Lee¹, Whan Bong Lee¹, Kang Chang Lee*

Department of Graduate School of Oriental Medicine,
1: School of Medicine Wonkwang University, 2: Institute of Wonkwang Science

To examine the cytotoxicity of reactive oxygen species in cultured rat myocardial cells, cytotoxic effect was determined by MTT assay after cultured cells were incubated for 4 hours in the media containing 1~30 μM of H₂O₂. And also, the protective effect of *Drynariae Rhizoma*(DR) was determined in these cultures. Cell viability was significantly decreased in a dose-dependent manner after exposure of 15 μM H₂O₂ to cultured rat myocardials for 4 hours. In the protective effect of DR, DR prevented the H₂O₂-induced cytotoxicity in these cultures. From these results, it suggests that H₂O₂ has toxic effect in cultured mouse myocardial cells and DR has protective effect on the cytotoxicity induced by H₂O₂.

Key words : *Drynariae Rhizoma*, Reactive oxygen species, Cultured myocardial cells

서 론

활성산소에 의한 산화적 손상은 노인성 치매를 비롯하여 근위축성측삭경화증이나 뇌졸중과 같은 신경질환의 병인으로 밝혀져 있으며 그 밖에도 고혈압이나 당뇨병과 같은 각종 난치성질환에 관여하고 있다는 것이 알려지고 있다^{1,2}. 활성산소는 세포에 손상을 줌으로서 세포의 퇴화나 사멸을 초래하게 되는데³, 이 현상의 하나는 활성산소가 세포의 항산화계에 손상을 주어 그 결과 항산화효소의 활성저해 내지는 방해함으로서 그 결과 불필요한 산소라디칼이 누적되어 세포손상을 유도한 다는 것은 이미 잘 알려져 있다^{4,5}. 특히, 중추신경계는 불필요한 활성산소가 생성될 경우 이를 충분히 제거할수 있는 방어기구가 충분하지 않아 오히려 축적된 활성산소에 의하여 세포손상을 입게 된다². 이러한 예의 하나로 잘 알려진 질환은 근위축성측삭경화증으로서 이는 세포내 항산화효소의 하나인 superoxide dismutase(SOD)-1 유전자가 돌연변이 됨으로서 SOD에 의하여 물로 변환되지 않은 활성산소가 이의 산화적 손상으로 세포의 퇴화나 고사를 초래하기 때문이다^{2,6}. 뇌조직중 학습과 기억에 관장하는 부분인 해마(hippocampus)는 치매와 밀접한 관련이 있으며 이의 파괴시 기

역의 감퇴는 물론이고 반복적인 학습효과가 나타나지 않아 정상적인 활동에 많은 지장을 받게 된다⁷. 따라서 치매에 대한 기전을 연구하기 위하여 많은 학자들이 해마를 대상으로 꾸준히 연구를 진행하여 왔다^{7,8}. 그럼에도 불구하고 치매에 대한 병리적 요인이 아직까지 자세히 밝혀져 있지 않으며 또한 이에 대한 연구도 매우 미흡한 실정이다^{7,9}. 최근에 치매에 대한 병인적 요인의 하나로 활성산소가 관여한 다는 것이 제시되면서 산화적 손상측면에서 질환의 현상을 규명하려는 노력이 이루어지고 있다^{1,3}. 활성산소는 세포내 항산화효소의 활성저해는 물론이고 또한 세포로 하여금 흥분성아미노산을 분비케 함으로서 세포내의 칼슘유입의 증가와 이로 인한 세포내 신호전달체계에 영향을 주어 정상적인 세포분열이나 분화를 방해한다는 것이다^{9,10}. 특히, 세포내 칼슘의 증가는 Ca²⁺-dependent protein kinase C(PKC)를 활성화시킴으로서 이와 관련된 세포대사에 영향을 주고 나아가서는 세포의 사멸을 가져오게 된다고 한다^{11,12}. 더욱이 활성산소는 질소라디칼과 작용하여 peroxynitrate라는 맹독성의 물질을 생성함으로서 세포를 더욱 손상시켜 퇴화를 촉진한다^{13,14}. 이와 같이 활성산소의 산소라디칼은 각종 병인으로 작용하고 있기 때문에 산소라디칼의 제거는 병변의 효과적인 치료적 접근의 한 방법으로 관심의 대상이 되고있다. 실제로 이를 위하여 활성산소 제거제를 비롯하여 항산화제 및 칼슘저해제등의 투여등 다양한 치료적 방법이 시도되고 있다^{10,15}. 근래에 세포배양기술이 보급

* 교신저자 : 이강창, 경기도 군포시 산본동 1126-1, 원광대학교 군포병원
· E-mail : kcl207@wonkwang.ac.kr · Tel : 031-390-2367
· 접수 : 2003/03/11 · 수정 : 2003/04/30 · 채택 : 2003/05/26

되면서 동종세포를 대량보급이 가능하게 되었으며 이와 동시에 면역세포화학염색법이 개발되면서 연구 목적에 적합한 특정세포를 분리하여 병변모델을 제작함으로써 다양한 병변에 대한 병리적 현상을 규명하는데 많은 연구를 시도하고 있다¹⁶⁾.

본 연구는 활성산소에 의한 세포손상에 대한 기전규명의 일환으로 생쥐의 해마신경세포를 배양한 후 활성산소의 독성을 분석하고 또한 산소자유기에 의하여 유발되는 신경독성에 대한 방어효과를 활성산소제거제의 측면에서 조사하기 위하여 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 실험동물

본 실험에 사용한 동물은 건강 상태가 양호한 생후 3일된 Sprague-Dawley 계통의 백서를 사용하였다.

2) 약제 제조

본 실험에 사용한 H₂O₂(Sigma)는 각각 1M, 100mM, 10mM, 1mM의 저장액을 만들어 냉암소에 저장한 다음 실험 당일 최종 농도로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다.

2. 방법

1) 세포배양

심근세포의 분리는 Kim 등⁷⁾의 방법에 따라 시행하였다. 분리된 심근세포는 혈청이 포함된 배양액에 1 x 10⁵cells/well의 밀도로 산정하여 96-multiwell에 넣어 분주하였다. 분주된 세포는 CO₂ 정온기에서 5시간 동안 배양하였으며 배양 완료후 산소자유기가 포함되어 있지 않은 배양액을 대조군으로 하여 비교 조사하였다.

2) 약재추출

한약재와 증류수를 환저 플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 2시간 동안 전열기로 전탕한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 진공 농축기로 감압 농축한 후 동결건조기에서 24시간 동안 동결 건조한 다음 이를 건조시켜 분말 시료를 얻었다.

3) H₂O₂ 처리

배양 심근세포에 H₂O₂가 미치는 영향을 조사하기 위하여 1 μM에서 30 μM 까지의 농도로 각각 포함된 배양액에서 심근세포를 4시간 동안 배양한 후 이의 독성효과를 조사하였다.

4) 골쇄보(DR)의 처리

배양된 심근세포에 15 μM H₂O₂를 처리하기 2시간 전에 각각 여러 농도의 DR이 포함된 배양액에서 배양한 다음 이들이 H₂O₂의 독성에 미치는 영향을 조사하였다.

5) 세포생존율 조사

여러 농도의 H₂O₂를 배양 심근세포에 처리한 후 H₂O₂가 심근세포에 미치는 세포독성과 이에 대한 DR의 방어효과를 Mosmann¹⁶⁾의 MTT분석법에 의하여 분석하였다.

6) 통계처리

대조군과 실험군의 차이에 대한 통계적 유의성은 Student's

t-test로 비교하였다. 통계적 유의수준은 p값이 0.05미만인 경우로 하였다.

결 과

1. H₂O₂의 독성효과

1) 농도에 따른 영향

H₂O₂가 1~30 μM의 농도로 각각 포함된 배양액에서 생쥐의 배양 심근세포를 4시간 동안 배양한 후 H₂O₂의 독성효과를 MTT assay법에 의하여 조사한 결과 1 μM H₂O₂의 처리에서는 세포의 생존율이 대조군에 비하여 79%로 나타났으며 5 μM H₂O₂의 처리에서는 64%로 나타났다. 또한 15 μM과 30 μM H₂O₂의 처리에서는 각각 세포의 생존율이 46%(p<0.05)와 28%(p<0.01)로 나타났으며 20 μM에서 MTT50 값을 나타냈다(Fig. 1).

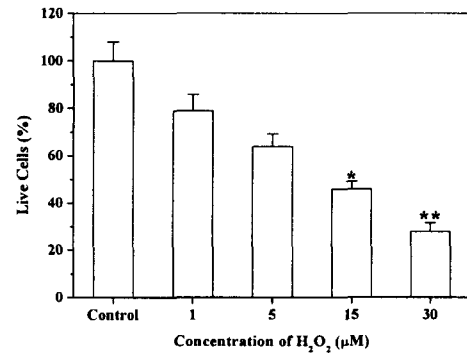


Fig. 1. A dose-dependency of H₂O₂. H₂O₂-induced cytotoxicity was measured by MTT assay in rat myocardial cell cultures. Cultured cells were exposed to 1, 5, 15 and 30 μM H₂O₂ for 4 hours, respectively. The results indicate the mean ± SE(n=6). *p<0.05; **p<0.01

2) 시간에 따른 영향

시간의 변화에 따른 H₂O₂의 독성효과를 조사하기 위하여 15 μM H₂O₂가 포함된 배양액에서 생쥐의 심근세포를 1~6시간 동안 배양후 세포생존율을 MTT assay법에 의하여 조사한 결과 1 시간 배양에서는 세포생존율이 대조군에 비하여 82%로 나타났으며 2시간 배양에서는 74%로 나타났다. 또한 4시간과 6시간 배양에서는 각각 세포의 생존율은 53%(p<0.05)와 41%(p<0.01)로 나타났다(Fig. 2).

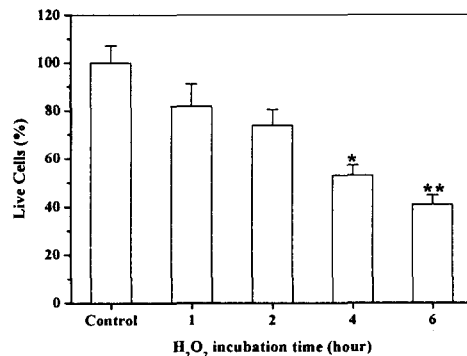


Fig. 2. A time-dependency of H₂O₂. H₂O₂-induced cytotoxicity was measured by MTT assay in rat myocardial cell cultures. Cultured cells were exposed to 15 μM H₂O₂ for 1, 2, 4 and 6 hours, respectively. The results indicate the mean ± SE(n=6). *p<0.05; **p<0.01

2. 골쇄보(DR)의 효과

DR이 H_2O_2 의 독성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 $15 \mu M H_2O_2$ 가 포함된 배양액에서 심근세포를 배양하기 2시간 전에 DR이 $40 \sim 140 \mu M$ 의 농도로 각각 포함된 배양액에서 배양한 다음 DR이 H_2O_2 의 독성에 미치는 영향을 MTT assay법에 의하여 조사하였다. $15 \mu M H_2O_2$ 만을 처리한 경우 세포생존율은 대조군에 비하여 42%로 나타났는데 비하여 $40 \mu g/ml$ DR의 처리에서는 54%로 나타났다. 또한 $80 \mu g/ml$ 처리에서는 68%로 나타났으며, 특히 $140 \mu g/ml$ DR의 처리에서는 74% ($p < 0.05$)의 높은 생존율을 보였다(Fig. 3).

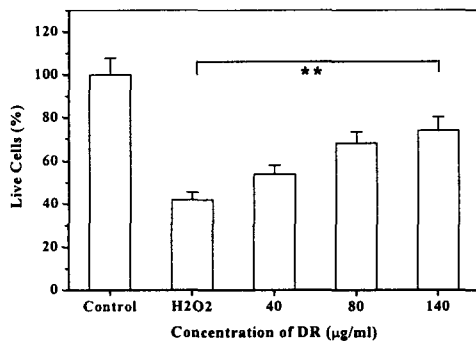


Fig. 3. Dose-response relationship of *Drynariae Rhizoma*(DR) for its protective effect on H_2O_2 -induced cytotoxicity by MTT assay. Cultured cells were preincubated with DR for 2 hours before exposure to $15 \mu M H_2O_2$ for 4 hours. The results indicate the mean \pm SE ($n=6$). * $p < 0.05$

고찰

활성산소는 세포를 손상시키는 유해인자의 하나로 이의 산화적 손상은 세포막의 지질과산화반응을 활성화 시키며 항산화 효소계에 영향을 줌으로서 세포의 고사나 사멸을 초래함은 이미 잘 알려진 사실이다¹³. 특히, 활성산소는 lipofuscin이나 malondialdehyde 및 carbonyl group 등을 세포나 조직에서 증가 시킴으로서 세포손상을 가속화 시키며 또한 superoxide anion 이나 hydroxyl radical로서 인체의 조직이나 기관을 구성하고 있는 세포에 산화적 손상을 줌으로서 세포의 고사나 세포사멸을 유도하여 결국 병변을 초래하게 된다^{4,10,13}. 활성산소는 다른 물질과 반응력이 강하여 세포내 핵산물질을 비롯하여 단백질을 손상시키며 동시에 세포의 정상적인 대사를 방해함으로써 질환의 병리적 원인의 하나로 밝혀지고 있다^{5,11}. 본 실험은 활성산소가 해마신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 생쥐의 뇌조직으로 부터 순수분리 배양한 배양 해마신경세포에 $1 \sim 40 \mu M H_2O_2$ 를 3시간 동안 처리한 결과 H_2O_2 는 신경세포에 처리한 농도에 비례하여 세포생존율을 대조군에 비하여 유의하게 감소시켰다. Mosmann¹⁶은 화학약제들에 대한 독성평가기준에서 MTT50 값이 $100 \mu M$ 이하면 고독성이라고 하였다. 본 실험에서는 $20 \mu M H_2O_2$ 를 배양 해마신경세포에 3시간 동안 처리한 결과 MTT50 값으로 나타나 H_2O_2 가 고독성인 것으로 나타났다. 본 실험에 있어서와 같이 해마신경세포에 대한 H_2O_2 의 독성은 H_2O_2 에 의한 산화적 손상이 세포의 사립체와 같은 세포소기관의

효소활성의 손상이나 또는 항산화효소의 활성억제등에 영향을 미침으로서 나타난 결과일 것으로 생각된다^{4,11,12}. 최근에 활성산소에 의한 세포손상의 방어를 항산화제등이 매우 효과가 있다고 보고되어 지고 있다^{5,6,14}. Calalase나 superoxide dismutase(SOD)와 같은 항산화제들은 불필요한 산소라디칼을 제거시킴으로서 산화적 손상으로부터 세포를 보호함은 이미 잘 알려져 있다^{2,13}. 따라서 본 실험에서는 vitamin E가 H_2O_2 의 산화적 손상에 미치는 영향을 조사하기 위하여 vitamin E가 $40 \sim 160 \mu M$ 의 각각의 농도로 포함된 배양액에서 신경세포를 2시간 동안 처리한 후 이의 영향을 조사한 결과 $20 \mu M H_2O_2$ 만을 처리한 경우 세포의 생존율은 32%인데 비하여 $40 \sim 160 \mu M$ vitamin E의 처리에서는 50~70% 이상의 높은 생존율을 보였다. 이러한 실험결과는 Cho 등¹⁰이 xanthine oxidase로 손상된 생쥐의 대뇌신경세포에 대하여 vitamin E의 처리가 세포생존율을 유의하게 증가시켰다는 연구 결과와 일치함을 알 수 있었다. 본 실험의 H_2O_2 의 독성에 대한 vitamin E의 방어효과는 vitamin E가 H_2O_2 로 부터 산소라디칼을 제거함으로서 이로 인해 나타나는 산화적 손상에 의한 세포손상을 방어한 결과라고 생각된다^{8,10}. 그러나 활성산소에 의한 세포손상에 대한 더욱 자세한 기전을 밝히기 위해서는 세포분자적 측면을 비롯하여 세포내 신호전달체계에 관한 작용현상에 대한 연구가 동시에 이루어져야 할 것으로 생각된다.

결론

흰쥐의 심장조직으로 부터 순수분리 배양한 심근세포에 대한 Hydrogen peroxide(H_2O_2)의 영향을 조사하기 위하여 H_2O_2 가 여러 농도로 포함된 배양액에 심근세포를 노출시킨 후 이의 세포독성효과를 조사하였으며, 또한 H_2O_2 에 세포독성에 대한 골쇄보(DR)의 방어효과를 MTT assay법에 의하여 분석하였다. 배양 심근세포에 $1 \sim 30 \mu M H_2O_2$ 가 포함된 배양액에서 4시간 동안 배양한 결과 H_2O_2 는 처리한 농도에 비례하여 세포생존율을 유의하게 감소시켰다. 또한 H_2O_2 에 의한 세포독성에 대하여 DR은 독성효과를 유의하게 감소하였다.

이상의 결과로부터 활성산소는 흰쥐의 배양 심근세포에 독성을 나타냈으며 DR은 H_2O_2 의 독성을 효과적으로 방어하였다.

감사의 글

이 논문은 2002년도 두뇌한국21과 원광대학교 교비의 일부 지원에 의하여 연구됨

참고문헌

1. Baynes JW : Role of oxidative stress in development of complication in diabetes. *Diabetes* 40:405-412, 1991.
2. 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.
3. Loft S., Astrup A., Buemann B., Poulsen H. E. : Oxidative DNA damage correlates with oxygen consumption in humans. *FASEB J* 8:534-537, 1994.
 4. Kim YS, Kim SU : Oligodendroglial cell death induced by oxygen radicals and its protection by catalase. *J Neurosci Res* 29:100-106, 1991.
 5. Jacobson J. M., Michael J. R., Jafri M. H., Gurtner G. H. : Antioxidants and antioxidant enzymes protect against pulmonary oxygen toxicity in the rabbit. *J Appl Physiol* 68:1252-1259, 1990.
 6. Jain SK : Hyperglycemic can cause membrane lipidperoxidation and osmic fragility in human red blood cells. *J Biolo Chem.* 264:21340-21345, 1989.
 7. O'Dell TJ, Kandle ER, Grant SGN : Long-term potentiation in the hippocampus is blocked by tyrosine kinase inhibitors. *Nature* 353:558-560, 1991.
 8. Saunders R. D., Dugan L. L., Demediuk P., Means E. D., Harrocks L. A., Anderson D. K.: Effects of methyl prednisolone and the combination of alpha-tocopherol and selenium on arachidonic acid metabolism and lipid peroxidation in traumatized spinal cord tissue. *J Neurochem* 49:24-31, 1987.
 9. Park S.T., Lim K.T., Chung Y.T., Kim S.U.: Methylmercury-induced neurotoxicity in cerebral neuron culture is blocked by antioxidants and NMDA receptor antagonists. *Neurotoxicol* 17:37-46, 1996.
 10. Cho C.G., Kim H.M., Park S.T. : Effect of Vitamin E on Cultured Mouse Cerebral Neurons Damaged by Oxidative stress. *Kor J Gerontol* 8(3):17-22, 1988.
 11. 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.
 12. Reiter RJ : Oxidative processes and antioxidative defense mechanism in the aging brain. *FASEB J* 9:526-533, 1995.
 13. Hayase F, Hirashima S, Okamoto G, Kato H : Scavenging of active oxygens by melanoidin. *Agric Biol Chem* 53:3383-3389, 1989.
 14. Ceriello A, Giugliano D, Quatraro A, Donzella C, Dipalo G, Lefebvre PJ : Vitamin E reduction of protein glycosylation in diabetes. *Diabetes Care* 14:68-72, 1991.
 15. Kikuchi S., and Kim S. U. : Glutamate neurotoxicity in mesencephalic dopaminergic neurons in culture. *J Neurosci Res* 36:558-569, 1993.
 16. Mosmann T : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65:55-63, 1983.