

척수운동신경세포에 있어서 Glucose Oxidase의 독성에 대한 동파의 영향

최유선¹ · 양현웅¹ · 이종화¹ · 이강창^{*}

원광대학교 한의학전문대학원, 1:원광대학교 의과대학

Effect of Benincasae Semen on Glucose Oxidase in Cultured Mouse Spinal Motor Neurons

Yu Sun Choi¹, Hyun Woong Yang¹, Joung Hwa Lee¹, Kang Chang Lee^{*}

Graduate School of Oriental Medicine, 1: School of Medicine, Wonkwang University

It has been suggested that oxidative stress of reactive oxygen species(ROS) may play an important role in the pathogenesis of neurological disorder. The aim of this study was to elucidate the oxidative stress of glucose oxidase(GO) in the cultured mouse spinal motor neurons and the preventing effect of Benincasae Semen(BS) on ROS-induced neurotoxicity. Cytotoxic effect of GO and protective effect of BS were performed by MTT assay. 30mU/ml GO decreased cell viability in dose-and time-dependent mannner, and BS diminished GO-induced neurotoxicity in these cultures. From above the results, ROS such as GO has toxic effect, and herb extract of BS is very effective against GO-induced neurotoxicity in cultured spinal motor neurons of neonatal mouse.

Key words : Cultured mouse spinal motor neuron, Benincasae Semen, Glucose oxidase

서 론

최근 활성산소에 의한 산화적 손상에 관한 연구에서 활성산소의 산화적 손상에 노출된 세포나 조직은 퇴화나 기능부전을 유발함으로써 치매를 비롯한 신경성 질환의 이환율이 높아진다는 보고와 함께^{1,2}, 활성산소의 산화적 손상은 뇌질환을 비롯한 각종 병변의 원인이 될 수 있다고 제시된 바 있다^{3,4}. 활성산소는 치매뿐만 아니라 고혈당에서의 지질과산화물을 비롯하여 당뇨병성 죽상경화증등과 같은 질환의 병인으로 잘 알려져 있으며⁵, 특히 근위축성축삭경화증과 같은 병변에서는 산소라디칼에 의한 뇌조직의 손상과 지질과산화를 통하여 중추신경계내 고분자물질의 손상을 초래할뿐만 아니라⁶, 대뇌의 항산화효소인 glutathione peroxidase나 catalase의 활성을 감소등이 관찰되었으며^{1,6} 산화적 손상에 의한 뇌조직의 손상은 이차적으로 세포의 신호전달체계나 칼슘의 항상성 및 효소의 활성변화와 같은 현상을 유발할 수 있는 가능성을 가지고 있기 때문에 활성산소에 의한 산화적 손

상은 병변의 유발기전과 매우 밀접한 관련이 있는 것으로 제시되었다^{7,8,9}. 위에서 살펴본 바와 같이 산화적 스트레스를 유발하는 활성산소는 뇌졸중을 비롯한 뇌허혈 및 근위축성 축삭경화증과 같은 많은 질환에서 병리적 요인임이 밝혀진 바 있으며^{3,9}, 또한 여러 동물의 병변모델이나 배양 신경세포를 이용한 병변의 모델에서 한약추출물이 활성산소의 산화적 손상을 저해하는 항산화효과를 나타냄으로서 활성산소에 산소라디칼에 의한 신경세포의 손상내지는 고사(apoptosis)를 방어함으로써 활성산소의 매개에 의한 뇌병변에 효과적이라고 보고되어진 바 있다^{10,11,16,17}. 근래에 세포배양기술이 보급되면서 다양한 신경세포를 배양한 후 특정 병변에 대한 모델을 이용하여 병인에 대한 기전이나 작용현상을 생체외에서 밝히려는 연구가 시도되어 왔다^{12,13}. 근래에 배양 신경세포를 응용한 연구는 시험관내 분석기법과 함께^{6,14}, 시험관내 가장 적합한 분석방법의 하나로 자리잡고 있으며, 세포배양은 각종 장기의 손상부위에 이식함으로써 병변의 치료적 예후를 향상시킨다는 보고들이 되어진 바 있다^{6,15}. 그러나 신경세포와 같은 세포배양기법은 고도의 기술이 요구되는 단점도 있지만 분열능이 있는 세포들은 짧은 시간 내에 대량으로 증식시킬 수 잇점뿐만 아니라 실험 단계별에 대하여 세포나 조직의

* 교신저자 : 이강창, 경기도 군포시 산본동 1126-1 원광대학교 군포병원

· E-mail : kcl207@wonkwang.ac.kr Tel : 031-390-2367

· 접수 : 2003/02/08 · 수정 : 2003/03/04 · 채택 : 2003/03/31

형태적 변화를 비롯하여 생리나 생화학적 측면에서 정량적인 분석이 가능하다는 장점도 있다⁸⁾.

본 연구는 산소라디칼을 생성하는 물질의 하나인 glucose oxidase(GO)에 대한 신경세포의 독성을 산화적 손상측면에서 조사하기 위하여 생쥐의 척수운동신경세포를 배양한 후 농도에 따른 GO의 세포독성을 비롯하여, GO의 산화적 손상에 대한 한약 추출물인 동과(Benincasae Semen)의 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양

척수운동신경세포의 분리는 Michikawa 등²⁾의 방법에 따라 시행하였다. 생후 3일된 생쥐에서 적출한 척수조직을 0.25% trypsin이 포함된 phosphate buffered saline(PBS)으로 처리한 후 36°C, 5% CO₂/95%air로 조절된 항온기 내에서 배양하였다. 배양 완료 후 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 전 처리된 96-multiwell에 3×10⁶cells/well의 밀도로 세포를 분주하였다. 분주된 세포는 3일 간격으로 새로운 배양액으로 교환하여 주었으며 7일 동안 배양후 본 실험에 사용하였다.

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. 약제제조

본 실험에서 사용한 약제인 glucose oxidase (GO, Sigma)는 각각 일정농도의 저장액을 만들어 냉암소에 보관 후 실험당일 최종 농도로 희석하여 사용하거나 직접 필요한 양을 배양액에 첨가하여 사용하였다.

4. GO의 노출

GO가 척수운동신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 일정시간 배양중인 신경세포를 0.6% D-glucose가 포함된 minimum essential medium(MEM, Gibco)으로 3회 세척 후 30mU/ml GO가 포함된 배양액내에서 신경세포를 1~4시간 동안 배양한 후 GO가 세포에 미치는 독성효과를 조사하였다.

5. 약제처리

일정 시간 동안 배양이 완료된 척수운동신경세포를 PBS로 3회 내지 4회 세척한 다음 50~150 µg/ml의 농도로 각각 포함된 동과(Benincasae Semen, BS)에서 2시간 동안 전처리한 다음 이를 30mU/ml GO에 노출시켜 이의 효과를 조사하였다.

6. 세포생존율 분석

GO가 척수운동신경세포에 미치는 독성효과를 분석하기 위하여 1~50mU/ml GO가 각각 포함된 배양액에서 세포를 배양한 후 세포의 생존율과 GO에 의해서 유도된 신경독성에 대한 동과(BS)의 효과를 MTT assay 법으로 조사하였다. MTT assay는 Mosmann¹²⁾의 방법에 따라 행하였다. 즉, 신경세포를 일정시간 배양후 PBS로 3회 수세한 다음 well당 최종 농도가 10%가 되도록 MTT를 넣어 3시간 동안 항온기에서 배양하였다. 배양 완료후 fomazan MTT를 용해한 후 microelisa reader를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

결 과

1. GO의 독성효과

1) 농도에 따른 효과

GO가 1~50 mU/ml의 농도로 각각 포함된 배양액에서 생쥐의 척수운동신경세포를 3시간 동안 노출시킨 후 세포의 생존율을 MTT assay법에 의하여 분석한 결과 1mU/ml와 10mU/ml GO를 처리한 경우 대조군 (100%)에 비하여 각각 86%와 67%로 나타났다. 또한 30mU/ml와 50mU/ml GO의 처리군에서는 49%(p<0.05)와 27%(p<0.01)로 대조군에 비하여 유의하게 감소되었다(Fig. 1).

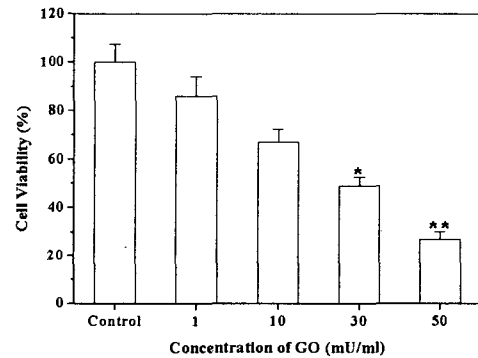


Fig. 1. Dose-dependent response relationship of glucose oxidase (GO) in cultured spinal motor neurons of mouse. Cytotoxicity was measured by MTT assay. The results indicate the mean±SD for 6 experiments. *p<0.05; **p<0.01

2) 시간에 따른 효과

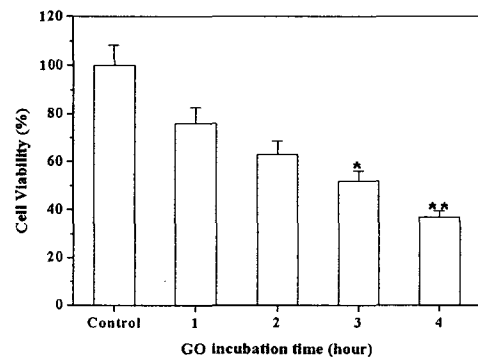


Fig. 2. Time-dependent response relationship of glucose oxidase (GO) in cultured spinal motor neurons of mouse. Cytotoxicity was measured by MTT assay. The results indicate the mean±SD for 6 experiments. *p<0.05; **p<0.01

시간의 변화에 따른 GO의 영향을 조사하기 위하여 30mU/ml GO가 포함된 배양액에서 신경세포를 1~4 시간 동안 배양한 결과 세포의 생존율이 1시간 배양한 경우, 대조군 (100%)에 비하여 76%로 나타났으며 2시간 배양에서는 63%로 나타났다. 그러나 3시간과 4시간 배양에서는 각각 52%($p<0.05$) 및 37%($p<0.01$)로 나타나 유의하게 감소하였다(Fig. 2).

2. 동과(BS)의 방어효과

배양 척수운동신경세포를 30mU/ml GO에 노출시키기 2시간 전에 BS가 50~150 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 포함된 배양액에서 각각 전처리한 다음 이에 대한 영향을 MTT assay법에 의하여 조사한 결과 30mU/ml GO만을 처리한 경우 세포의 생존율은 36%로 나타난 데 비하여 50 $\mu\text{g/ml}$ BS를 전 처리한 경우는 47%로 나타났다. 그러나 100 $\mu\text{g/ml}$ BS를 전 처리한 경우 65%로 나타났으며 특히 150 $\mu\text{g/ml}$ 의 처리에서는 78%로 나타나 이는 GO만의 처리에 비하여 유의하게 높게 나타났다($p<0.01$)(Fig. 3).

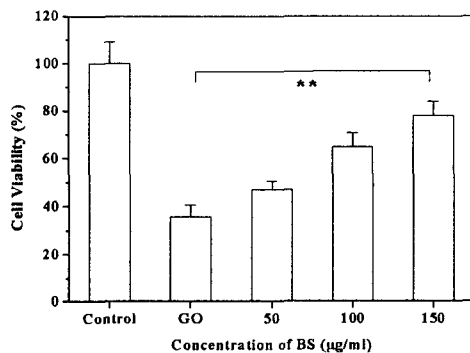


Fig. 3. Dose-response relationship on Benincasae Semen for its neuroprotective effect on glucose oxidase(GO). The results indicate the mean \pm SD for 6 experiments. ** $p<0.01$

고찰

최근 치매나 뇌허혈과 같은 각종 신경병변에 활성산소가 관여한다고 보고되면서^{3,9)}, 뇌질환과 활성산소의 산화적 손상간의 상호작용에 대한 병리적 현상을 밝히려는 연구가 활발히 진행되어 왔다^{2,11)}. 더욱이 활성산소가 근위축성척삭경화증의 병인으로 밝혀지면서 뇌질환이 활성산소의 산화적 손상과 밀접한 관련이 있다는 것이 제시되면서^{3,7)}, 활성산소의 독성을 산화적 손상 측면에서 밝히려는 연구가 시도되었다^{4,14)}. 그러나 이에 대해서는 아직까지 자세히 알려진 바가 없다^{10,15)}. 따라서 본 연구는 활성산소의 독성효과를 규명하기 위하여 생쥐의 배양 척수운동신경세포를 1~50mU/ml GO의 농도가 각각 포함된 배양액에서 3 시간 동안 배양한 결과 세포의 생존율이 신경세포에 처리한 농도에 비례하여 유의하게 감소되었다. 이같은 결과는 GO가 척수운동신경세포에 세포독성을 가지고 있음을 말해주고 있으며, 이는 또한 Kim과 Kim⁸⁾의 보고와도 일치하는 소견이라 하겠다. 한편, 활성산소의 산화적 손상은 superoxide dismutase(SOD)와 같은 항산화제나^{11,15)}, glutamate 수용체의 길항제들에 의해서

방어되었다고 보고 된 바 있다¹⁰⁾. 더욱이 활성산소에 관한 연구에서 운동신경세포질환(motor neuron disease, MND)이 산화적 손상과 관련이 있다고 제시된 바 있으나 여기에 대해 아직까지 확실히 규명되어 있지 않다^{3,9)}. 한편, 육미지황탕과 같은 한약추출물들이 혈압과 같은 각종 난치성 뇌병변에 항산화효과가 매우 뛰어나다는 임상적 보고가 되어지고 있다¹⁶⁾. 이는 한약추출물 중 뇌병변 치료에 효과적인 약리활성물질을 포함하고 있다는 것을 제시해 주고 있다¹⁷⁾. 따라서 본 연구에서는 한약추출물의 일종인 동과가 GO의 산화적 손상에 미치는 영향을 조사하기 위하여 동과가 50 $\mu\text{g/ml}$ 에서 150 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 각각 포함된 배양액에서 척수운동신경세포를 2시간 동안 전처리한 후 이의 효과를 조사한 결과 동과를 처리한 농도에 의존적으로 세포의 생존율이 증가시켰으며, 특히 150 $\mu\text{g/ml}$ 동과의 처리에서는 GO만의 처리의 생존율인 36%에 비하여 78%($p<0.05$)로 유의하게 증가하였다. 이는 GO의 산화적 손상의 방어에 동과와 같은 한약추출물이 매우 효과적임을 말해 주고 있으며 또한 항산화효과를 가지고 있음을 제시하고 있다^{16,17)}. 그러나 GO의 산화적 손상에 대한 세포독성 기전을 비롯하여 GO와 glutamate 수용체간의 작용현상 및^{3,10)}, 중추신경세포의 손상에 대한 동과의 항산화효과에 대한 방어기전에 대한 연구는 향후 더 진행되어야 할 것으로 생각한다.

결론

산화적 손상은 뇌병변에 있어서 매우 중요한 병인의 하나로 알려져 있다. 본 연구는 생쥐의 배양 척수운동신경세포에 대하여 glucose oxidase (GO)의 산화적 손상을 세포생존을 측면에서 조사하였으며 또한 GO의 독성에 대한 한약추출물인 동과(Benincasae Semen)의 효과를 MTT assay에 의하여 조사하였다. 30mU/ml GO를 신경세포에 처리한 결과 처리 농도와 시간에 의존적으로 척수운동신경세포의 세포생존율을 유의하게 감소시켰다. 한편, 한약추출물인 동과는 GO에 의해 유도된 신경독성을 감소시켰다. 이상의 결과에서 GO는 생쥐의 배양 척수운동신경세포에 세포독성을 나타냈으며 동과는 GO에 의하여 유도된 신경독성을 방어하는데 매우 효과적인 것으로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 2002년도 BK21과 원광대학교 교비의 일부지원에 의해서 연구됨

참고문헌

- Jang YJ, Park H, Kim HS, Hong HN, Kim MK: The role of increased oxidative stress in the development of diabetic nephropathy. Korean J Pharmacology 31:95-102, 1995.
- Michikawa M, Lim KT, McLarnon JG, Kim SU: Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron

- cultures. *J Neurosci Res* 37:62-70, 1994.
3. Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carrla 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.
 4. Halliwell B : Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 59:1609-1623, 1992.
 5. McCall AL: The impact of diabetes on the CNS. *Diabetes* 41:557-570, 1992
 6. Park ST : Study on the effect of iron-chelator on oxygen radical-induced neurotoxicity. *Korean J Phys Anthropol* 8: 113-121, 1995.
 7. Jain S. K. : Hyperglycemic can cause membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in human red blood cells. *J Biol Chem* 264:21340-21345, 1989.
 8. Kim Y.S., Kim S.U. : Oligodendroglial cell death induced by oxygen radicals and its protection by catalase. *J Neurosci Res* 29:100-106, 1991.
 9. Camerone NE, Cotter MA, Maxfield EK : Antioxidant treatment prevents the development of peripheral nerve dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 36:299-304, 1993.
 10. 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.
 11. Niki E, Saito T, Kawakami A, Kamiya Y: Inhibition of oxidation of methyl linoleate in solution by vitamin E and vitamin C. *J Biol Chem* 259:4177-4182, 1984.
 12. Mosmann T : Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxic assays. *J Immun Methods* 65:55-63, 1983.
 13. Borenfreund E, Babich H, Martin-Alguacil N: Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays-the neutral red and tetrazolium MTT tests. *Toxic in Vitro* 2:1-6, 1988.
 14. Kontos H, Wei E, Ellis E, Jenkins L, Povlishock J, Rowe G, Hess M : Appearance of superoxide anion radical in cerebral extracellular space during increased prostaglandin synthesis in cat. *Circ Res* 57:142-151, 1985.
 15. Bracco F., Scarpa M., Rigo A., Battistin L. : Determination of superoxide dismutase activity by the polarographic method of catalytic currents in the cerebrospinal fluid of aging brain and neurologic degenerative diseases. *Proc Soc Exp Biol Med* 196:36-41, 1991.
 16. 임종필, 서은실, 김훈, 송영철 : 육미지황탕이 카드뮴 중독된 흰쥐의 혈압에 미치는 영향. *생약학회지* 30(3):250-254, 1999.
 17. 안규석, 최승훈, 김정범, 박종현 : 한의학적 진단 모형에 따른 한방제제의 항암 및 면역 조절작용에 미치는 영향. *동의병리학회지* 9(1):1-20, 1994.