

활성산소로 손상된 대뇌신경세포에 대한 천오두의 영향

심재한* · 이은미¹ · 이종화¹ · 김대근² · 이영찬² · 강정호² · 박신기²

전남대학교 농업생명과학대학, 1:원광대학교 의과대학, 2:원광대학교 한의과대학

Effect of Aconiti Radix on Cultured Cerebral Neurons Damaged by Reactive Oxygen Species

Jae Han Shim*, Eun Mi Lee¹, Joung Hwa Lee¹, Dae Geun Kim², Young Chan Lee², Jeong Ho Kang², Sin Kee Park²

Department of Agriculture and Life Science Chonnam National University, 1:School of Mediine, Wonkwang University, 2:Department of Oriental Medicine, Wonkwang University

Neurotoxicity of reactive oxygen species(ROS) and neuroprotective effect of Aconiti Radix(AR) against ROS-induced cytotoxicity were determined on cultured mouse cerebral neurons by MTT assay after cerebral neurons were cultured for 5 hours in various concentrations of GO. GO was toxic in a dose-dependent manner on cultured cerebral neurons after cerebral neurons were incubated for 5 hours in media containing 5~40mU/ml GO. While, cultures were pretreated with 180 μg/ml AR for 2 hours increased remarkably cell viability. From these results, it is suggested that GO has toxic effect on cultured mouse cerebral neurons by the decrease of cell viability. And also, herb extract such as AKR is very effective in the protection of neurotoxicity induced by GO

Key words : Glucose oxidase, Cultured cerebral neuron, Aconiti Radix

서 론

산소자유기는 세포내에 존재하는 항산화효소의 활성을 손상 시킴으로서 산소라디칼 제거능을 떨어뜨려 그 결과 세포의 산화적 손상을 매개로 당뇨나 동맥경화증 및^{1,2)}, 뇌졸중³⁾ 근위축성 측삭경화증⁴⁾과 같은 만성난치성질환의 병리적 요인으로 밝혀지고 있다^{5,6)}. 특히, 산소자유기는 인체의 정상적인 대사과정에서 소량이 만들어지지만 이는 곧 catalase를 비롯한 superoxide dismutase(SOD)나 glutathione peroxides와 같은 항산화효소에 의하여 물로 변환됨으로서 세포에는 아무런 손상을 주지 않음은 이미 잘 알려진 사실이다^{3,6)}. 그러나 근위축성측삭경화증과 같은 병변에 있어서는 SOD-1 유전인자의 돌연변이에 의하여 생성된 산소자유기가 정상적으로 물로 변환되지 못하고 환자의 뇌속에 축적됨으로서 축적된 산소자유기가 뇌세포나 뇌조직을 손상시킴으로서 병변을 더욱 악화시킨다고 한다^{5,7)}. 따라서 산소자유기를 매개로 한 신경질환의 경우 이의 치료적 접근 방법의 하나로서 항산화제나 산소자유기의 제거제, 또는 N-methyl-D-aspartate

(NMDA) 수용체의 길항제등을 투여함으로써 병변의 치료적 효과를 나타냈다는 보고들이 된 바 있다^{8,9)}. 따라서 국내외 많은 학자들은 산소자유기에 의하여 매개되는 독성을 산화적 손상측면에서 규명하려는 연구를 꾸준히 진행하여 왔다^{10,11)}. 특히, 산소자유기는 세포내에 위치하고 있는 glutamate 수용체와 밀접한 관련이 있다는 것이 제시되면서 산소자유기와 흥분성아미노산과의 상호작용에 대한 현상규명에 대하여 많은 관심이 집중되었다^{4,12)}. 즉, 산소자유기와 흥분성아미노산간의 연구에서 산소자유기는 glutamate나 aspartate와 같은 흥분성아미노산을 분비케 유도함으로써 이는 세포내 칼슘의 항상성을 파괴하게 하며 나아가서는 Ca²⁺-dependent protein kinase C(PKC)를 자극하여 세포의 비정상적인 분열의 촉진과 효소나 단백질의 변성 등을 연쇄적으로 유도함으로써 결국 세포의 퇴화나 고사를 촉진시키고 나아가서는 세포의 사멸을 초래하게 한다^{9,13)} 그 밖에도 다량 축적된 산소자유기는 세포내 nitric oxide(NO)와 상호 작용하여 peroxynitrite라는 강한 독성물질을 생성함으로써 세포의 손상을 물론, 병변을 더욱 가속화시킨다고 한다^{3,7)}. 위에서와 같이 산소자유기의 다양한 작용기전에 비하여 아직까지 산소자유에 의한 독성효과에 대한 자세한 기전은 잘 알려져 있지 않으며^{5,10)}, 더욱이, 산소자유기와 NMDA수용체 및 세포내 칼슘의 항상성간의

* 교신저자 : 심재한, 광주시 북구 용봉동 300, 전남대학교 농업생명과학대학 · E-mail : jhshim@chonnam.ac.kr Tel : 062-530-2135 · 접수 : 2003/02/12 · 수정 : 2003/03/15 · 채택 : 2003/04/09

상호작용에 대한 연구는 매우 미흡한 실정이다⁴⁹⁾. 최근에 많은 연구에서 여러 종류의 한약추출물이 산소자유기에 의하여 매개되는 각종 치매나 심혈관질환 및 신경병증의 치료에 매우 효과적인 약리활성 물질을 가지고 있다는 것이 제시되어 지고 있다¹⁴⁾. 그러나 이에 관한 작용현상이나 기전규명에 대한 연구는 소수에 불과하며 더욱이 한약재추출물의 방어효과에 대한 기전에 대해서는 지금까지 많이 알려져 있지 않다¹⁵⁾. 현재, 병변의 병인적 기전연구에 필요한 동물의 병변모델이 매우 부족한 시점에서 세포배양을 이용한 각종 병변의 실험목적에 부합한 병변의 손상 모델의 개발은 다양한 질환의 병리적 요인이나 독성효과의 기전 및 약재추출물의 효능검색 등을 검색하는데 매우 광범위하게 이용되고 있다¹¹⁾. 세포배양기술은 시험관내에서의 정확한 독성분석을 비롯하여 약제의 효능을 정량 및 정성분석에 의하여 정확히 측정할 수가 있기 때문에 질환의 방어나 치료적 접근방법을 더욱 용이하게 하였다¹⁶⁾. 본 연구는 산소자유기의 산화적 손상에 의한 신경독성을 조사하기 위하여 glucose oxidase(GO)가 여러 농도로 포함된 배양액에서 생쥐의 대뇌신경세포를 배양한 다음 GO의 독성효과를 시험관내 분석방법(in vitro assay)으로 조사하였으며 동시에 GO의 신경독성에 대한 천오두의 방어효과를 조사하였다.

재료 및 방법

본 연구에 사용한 동물은 원광대학교 의과대학 동물사육실에서 분리 사육중인 건강상태가 양호한 생후 3일된 ICR계통의 생쥐를 사용하였다.

방 법

1. 세포배양

대뇌신경세포의 분리는 Michikawa등¹¹⁾의 방법에 따라 시행하였다. 생쥐의 뇌조직으로부터 순수, 분리된 신경세포를 Eagle/s minimum essential medium(MEM, Gibco)에 10% fetal bovine serum(FBS, Sigma)이 포함된 배양액에 넣어 혼합한 뒤 세포를 1×10^5 /well의 밀도로 산정하여 96multiwell에 넣어 심었다. 이때 중금속이 포함되지 않은 배양액을 대조군으로 하여 37°C, 5% CO₂로 혼합된 항온기에서 96시간동안 배양한 후 대조군과 비교 조사하였다.

2. 약제의 추출

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. 시약제조

본 실험에 사용한 glucose oxidase(GO, Sigma)는 각각 1M, 100mM, 10mM 및 1mM의 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 뒤

실험 전날 최종농도로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 배양액에 넣어 사용하였다.

4. GO의 처리

실험 전날까지 배양한 대뇌신경세포를 0.6% D-glucose가 포함된 MEM으로 3회 세척한 후 10~40mU/ml 농도의 GO가 포함된 배양액에서 생쥐의 신경세포를 1~7시간 동안 배양한 다음 이의 독성효과를 약제가 포함되지 않은 대조군과 비교 조사하였다.

5. 약제의 처리

GO의 독성효과에 대한 천오두의 효과를 조사하기 위하여 20mU/ml GO에 처리하기 2시간 전에 45~180 μg/ml의 농도로 각각 포함된 천오두를 배양 대뇌신경세포에 일정시간 노출시킨 다음 이들의 영향을 대조군과 비교하여 조사하였다.

6. 세포생존율(cell viability)조사

MTT<3-(4,5-demethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT, Sigma)> 정량은 배양이 완료된 신경세포의 상층액을 버리고 사용 당일 제조한 50 μg/ml를 배양 용기당 2ml씩 넣어 37°C, 5% CO₂로 조절된 항온기에서 3시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 phosphate buffered saline(PBS)으로 2~3회 세척한 후 흡광광도계(spectronic 2000)로 503nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

7. 통계처리

대조군과 실험군의 차이에 대한 통계적 유의성은 Student-t test로 비교하였으며, 통계적 유의수준은 p값이 0.05미만인 경우로 하였다.

결 과

1. GO의 세포독성

1) 농도에 따른 영향

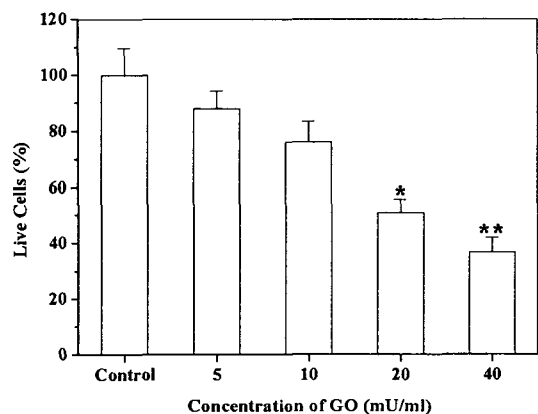


Fig. 1. Dose-dependent response relationship of glucose oxidase (GO) in cultured cerebral neurons of mouse. Cytotoxicity was measured by MTT assay. The results indicate the mean±SD for 6 experiments. *p<0.05; **p<0.01

5~40 mU/ml의 GO가 포함된 배양액에서 세포를 5시간 동

안 배양한 후 GO가 배양 대뇌신경세포에 미치는 독성효과를 MTT assay에 의하여 분석한 결과 세포의 생존율이 대조군(100%)에 비하여 5 mU/ml에서는 88%로 나타났으며 10 mU/ml에서는 76%로 나타났다. 또한 20 mU/ml와 40 mU/ml에서는 각각 51%($p<0.05$)와 37%($p<0.01$)로 유의하게 낮게 나타났다(Fig. 1).

2) 시간에 따른 영향

시간의 변화에 따른 GO의 독성효과를 조사하기 위하여 20 mU/ml GO가 포함된 배양액에서 1~7시간 동안 배양한 결과 대조군(100%)에 비하여 세포의 생존율은 1시간 배양에서는 82%로 나타났으며 3시간 배양에서는 64%로 나타났다. 또한 5시간과 7시간 배양에서는 53%($p<0.05$)와 21%($p<0.01$)로 유의하게 낮게 나타났다(Fig. 2).

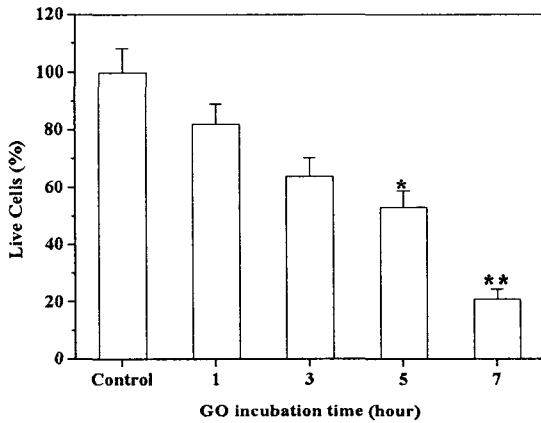


Fig. 2. Time-dependent response relationship of glucose oxidase (GO) in cultured cerebral neurons of mouse. Cytotoxicity was measured by MTT assay. The results indicate the mean±SD for 6 experiments. * $p<0.05$; ** $p<0.01$

2. GO의 독성에 대한 천오두(AR)의 효과

45~180 $\mu\text{g/ml}$ AR을 처리한 후 GO의 독성에 대한 천오두의 독성방어 효과를 조사한 결과 GO만을 처리한 경우 세포의 생존율은 대조군(100%)에 비하여 42%로 나타났다.

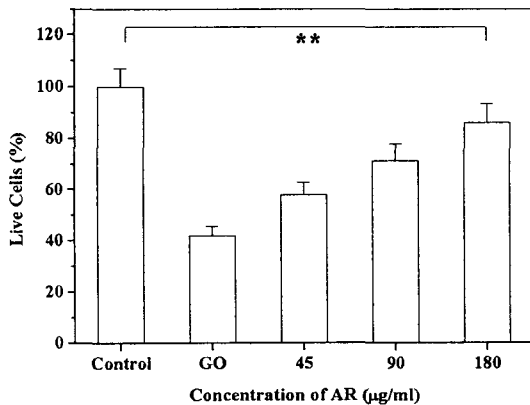


Fig. 3. Dose-response relationship on Aconiti Radix(AR) for its neuroprotective effect on glucose oxidase(GO). The results indicate the mean±SD for 6 experiments. ** $p<0.01$

그러나, 45 $\mu\text{g/ml}$ AR에서는 58%로 나타났으며, 90 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 71%로 나타났다. 또한 180 $\mu\text{g/ml}$ 처리에서는 86%($p<0.01$)로 나타나 GO만의 처리군(42%)에 비하여 매우 유의하게 높게 나타났다(Fig. 3).

고찰

산소라디칼들은 질소라디칼과 같이 신경세포를 비롯한 심근세포등과 같은 많은 세포에 대하여 세포막의 지질과산화반응이나 효소의 활성억제등을 통하여 세포의 손상을 유발한다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다^{11,12}. 특히 glucose oxidase(GO)는 hydroxy radical과 같은 산소라디칼을 생성하여 세포의 항산화계효소나 신호전달체계등에 영향을 줌으로서 세포의 퇴화 내지는 사멸을 초래한다^{4,7,10}. 그러나 산소자유기의 산화적 손상에 의한 신경독성에 대한 기전이나 작용현상들에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않다¹¹. 따라서 본 연구에서는 GO에 의한 산화적 손상이 대뇌신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 생쥐의 뇌조직으로부터 순수분리 배양한 대뇌신경세포에 5~40mU/ml의 GO가 각각 포함된 배양액에서 신경세포를 처리한 후 MTT assay에 의하여 세포생존율을 조사하였다. 그 결과 GO는 대뇌신경세포에 처리한 시간과 농도에 비례하여 세포생존율을 유의하게 감소시켰다. 이 같은 본 실험의 결과는 Michikawa등¹⁶이 척수운동신경세포에 산소자유기를 노출된 후 산소자유기에 의한 세포독성에 대한 보고와 일치함을 알 수 있었다. 본 실험의 연구 결과나 타연구자들의 실험 결과들은 산소자유기가 생쥐의 중추신경세포에 독성을 가지고 있음을 말해주며 이같은 GO의 신경독성은 아마도 GO가 신경세포내의 사립체와 같은 세포소기관의 효소기능을 저하시킴으로서 세포생존율을 저하시켰을 것으로 생각한다¹⁶. 이 같은 근거로는 본 실험의 MTT assay에서 산소자유기의 처리에 의하여 사립체내의 succinic dehydrogenase의 활성감소로 formazan MTT의 양이 감소됨으로서 세포의 생존율이 저하되었기 때문이다^{11,16}. 이 밖에 또 하나의 가능성은 GO의 산화적 손상이 세포내 glutathione peroxidase나 catalase와 같은 세포내 항산화효소의 활성을 저하시킴으로서 그 결과 항산화효소에 의해서 제거되지 못한 산소라디칼들이 세포를 직접 손상시켰을 가능성도 배제할 수는 없다^{3,5}. 한편, GO의 산화적 손상에 대한 한약추출물인 천오두(Aconiti Radix, AR)의 방어효과를 조사하기 위하여 AR이 45~180 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 각각 포함된 배양액에서 신경세포를 2시간 동안 처리한 다음 이를 다시 20mU/ml GO에 5시간 동안 처리한 결과 세포생존율은 AR을 세포에 처리한 농도에 비례하여 세포의 생존율을 증가시켰다. 특히 180 $\mu\text{g/ml}$ AR의 처리에서는 세포생존율이 86%로 나타나 이는 GO만을 처리했을 때의 생존율인 42%에 비하면 유의하게 증가하였다($p<0.01$). 본 실험에서 AR에 의한 세포생존율의 증가는 AR이 GO의 산화적 손상을 방어해 주는 약리적 활성을 가지고 있음을 증명하고 있다¹⁴. 이는 아마도 천오두의 성분중 mesaconitine이나 talatisamine과 같은 성분들이 GO의 산화적 손상방어에 유효한 약리활성을 나타냈

을 가능성이 클 것으로 생각된다^{14,15)}. 그러나 AR과 같은 한약추출물에 대한 항산화효과에 대한 더욱 자세한 기전규명을 위해서는 산소자유기를 비롯하여 항산화효소활성, 흥분성아미노산 및 glutamate 수용체간의 상호작용에 대한 측면에서 종합적인 연구가 이루어져야 될 것으로 생각된다.

결 론

Glucose oxidase(GO)의 신경독성과 GO의 독성에 대한 천오두(Aconiti Radix)의 효과를 조사하기 위하여 생쥐의 대뇌신경세포를 순수 분리배양한 후 5~40mU/ml GO가 각각의 농도로 포함된 배양액에서 5시간 동안 배양한 다음 MTT assay에 의한 세포생존율을 조사하였다. 그 결과 GO는 세포에 처리한 농도와 시간에 비례하여 신경세포의 생존율을 유의하게 감소시킴으로서 세포독성을 나타냈다. 한편, 배양 심근세포를 45~180 µg/ml 천오두가 각각 포함된 배양액에서 2시간 동안 전처리한 결과 세포생존율은 유의하게 증가하였다. 이상의 결과로부터 GO는 생쥐의 배양 신경세포에 심근독성을 나타냈으며 천오두가 GO의 독성방어에 유효한 효과를 나타냈다.

감사의 글

이 논문은 2002년도 BK21과 원광대학교 교비의 일부 지원에 의해서 연구됨

참고문헌

1. Row GT, Manson NH, Caplan M, Hess MC : Hydrogen peroxide and hydroxyl radical mediation of activated leukocyte depression of cardiac sarcoplasmic reticulum : Participation of cyclooxygenase pathway. *Cir Res* 53 : 584-591, 1983.
2. Elion GB, Konvensky A, Hitching GH, Metz E, Rundles RW : Metabolic studies of allopurinol, an inhibitor of xanthine oxidase. *Biochem Pharmacol* 15:863-869, 1966.
3. Suzuki J, Fujimoto S, Oba M : The protective effects of combined administration of anti-oxidants and perfluorochemicals on cerebral ischemia, *Stroke* 15:672-678, 1984.
4. Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carla V, Moroni F : Excitatory amino acid release from rat hippocampal slices as a consequence of free radical

- formation. *J Neurochem* 51 : 1960-1963, 1988.
5. Witting LA : Vitamin E and lipid antioxidants in free-radical inhibited reactions. In : *Free Radicals in Biology*, pryor WA, ed, New York Academic Press pp. 295-319, 1980.
6. Sato Y, Hotta N, Sakamoto N, Matsnoka S, Ohishi N, Yagi KA : Lipid peroxidation level in plasma of diabetic patients. *Biochem Med* 21:104-107, 1979.
7. Halliwell B : Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 59:1609-1623, 1992.
8. Hoekstra WG : Biochemical function of selenium and its relation to vitamin E. *Fed Proc* 34:2083-2089, 1975.
9. Kaneko M, Elmban V, Dhalla NS : Mechanism for depression of heart sarcolemmal Ca²⁺ pump by oxygen free radicals. *Am J Physiol* 261 : 4948-4955, 1989.
10. Rosen D, Siddique T, Patterson D, Figlewicz D, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O Regan J, Deng H, Rahmani Z, Krrizus A et al. : Mutation in Cu /Zn superoxide dismutase gene are associated wigh familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature(London)* 362:59-62, 1993.
11. Michikawa M, Lim KT, McLarnon JG, Kim SU : Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. *J Neurosci Res* 37:62-70, 1994.
12. Myers ML, Bolli R, Lekich RF, Hartley CJ, Poberts R : Enhancement of recovery of myocardial function by oxygen free radical scavengers after reversible regional ischemia. *Circulation* 72 : 915-921, 1985.
13. Mattson MP, Cheng B, Smith-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.
14. 이금수, 정현우, 강성용 : 석창포가 백서의 뇌연막동맥의 직경에 미치는 기전 연구. *대한분초학회지* 15(2):1-7, 2000.
15. 권현, 오태환, 정승기, 이형구 : 청리자감탕 및 청리자감탕 가미방이 폐손상과 면역기능에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. *경희한의대논문집* 15(5):5-28, 1992.
16. Mosmann T : Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxic assays. *J Immun Methods* 65 : 55-63, 1983.