

활성산소에 의한 심근독성 및 동과의 보호효과에 관한 연구

유교상* · 손영우 · 이용석

원광대학교 의과대학

Cardiotoxicity and Effect of Benincasae Semen on the Reactive Oxygen Species

Kyo Sang Yoo*, Young Woo Son, Yong Suk Lee

Department of Medicine, Wonkwang University

To examine the cardiotoxicity of glucose oxidase(GO) in cultured myocardial cells, cardiotoxicity was measured by MTT assay. Myocardial cells were treated with 1~50 mU/ml GO for 5 hours. The cardioprotective effect of Benincasae Semen(BS) was measured by MTT assay in these cultures. Cell viability was significantly decreased in dose- and time-dependently after myocardial cells were exposed to 30mU/ml GO for 5 hours. In the cardioprotective effect of BS on the cardiotoxicity induced by GO, BS prevented the cardiotoxicity induced by GO in these cultures. From these results, it suggests that GO had cytotoxic effect in cultured myocardial cells and herb extract, BS showed protective effect on GO-induced cardiotoxicity.

Key words : Glucose oxidase, Myocardial cell, Benincasae Semen

서 론

활성산소는 인체의 대사과정중 사립체내에서 전자전달계에 의하여 소량이 생성되어 지는데 이렇게 생성된 활성산소는 항산화제에 의하여 물로 변환됨으로서 인체에는 아무런 영향을 미치지 않는다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다¹⁾. 그러나 특정 질환의 경우, 예를 들면 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)과 같은 병변에서는 superoxide dismutase(SOD)-1 유전인자의 돌연변이에 의하여 환자의 뇌속에 과량의 활성산소가 축적됨으로서 초래되는 질환의 하나이다²⁾. 따라서 활성산소는 ALS를 비롯한 당뇨나 뇌일혈과 같은 병변의 병인으로 밝혀지면서 주된 관심의 대상이 되었다. 지금까지 밝혀진 몇가지 활성산소의 발생기전을 살펴보면 phospholipase A2의 활성화와 arachidonic acid의 대사과정을 통한 활성산소의 발생을 비롯하여³⁾ xanthine oxidase에 의한 활성산소의 생성⁴⁾, 활성산소에 의한 glutamate 수용체 과활성에 기인한 산소라디칼의 증가 등 다양한 기전을 통하여 생성된다⁵⁾. 이러한 과정을 통하여 생성된 활성산소는 세포막의 지질과산화반응을 촉진시키며 세포내

항산화계를 손상시킴으로서 세포를 퇴화 내지는 사멸을 유도한다^{3,6)}. 특히 활성산소에 의한 glutamate 수용체의 과활성은 세포막의 양이온의 이동을 활성화 시킴으로서 Na⁺이나 Ca²⁺과 같은 양이온의 세포막 이동을 촉진시킨다⁷⁾. 특히 metabotropic 수용체는 양이온의 이동과는 관련이 없으나 이의 활성화는 G-protein을 통해 phospholipase C를 활성화시키며 이는 PIP2 (phosphatidylinositol-4,5 bisphosphate)를 IP3(inositol triphosphate)와 DAG (diacylglycerole)로 분해시키는데 이들은 결국 세포 내 calcium influx와 protein kinase C를 활성화 시킨다. 이와 같이 활성산소에 의한 glutamate 수용체의 과활성은 결국 세포를 고사시키거나 사멸시킴으로서 세포독성을 나타내게 된다^{2,8)}. 특히 활성산소는 항산화계에 영향을 주어 항산화효소인 superoxide dismutase(SOD)나 catalase, glutathione peroxidase와 같은 항산화효소의 활성을 저해함으로써 세포의 산화적 손상을 초래하게 된다^{5,9)}. 최근 심허혈시 재관류를 통한 활성산소의 증가는 심질환의 새로운 치료적 접근을 시도하게 하였다^{3,10)}. 따라서 이의 임상적인 치료방법의 하나로 활성산소의 제거제나 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체의 길항제등을 투여함으로써 효과적인 치료적 결과를 얻었다고 보고되고 있다^{7,9)}. 근래에 세포배양기술이 널리 보급되면서 시험관에서 배양심근세포를 재료로 심근경색이나 심근마비와 같은 병변의 모델을 제작하여 이들 질환에 대한 병인적 요인과 병리적 기전을 밝히기 위하여 많은 연구들 시도하여

* 교신저자 : 유교상, 경기도 군포시 산본동 원광대학부속 군포한방병원

E-mail : stanyoo@wonkwang.ac.kr, Tel : 031-390-2562

· 접수 : 2002/09/04 · 수정 : 2002/09/30 · 채택 : 2002/11/30

왔다¹¹⁻¹³⁾. 배양세포는 생체에서와 동일한 화학적 특성과 생리적 현상을 그대로 간직하고 있어 시험관내 가장 적합한 분석 도구로 자리잡고 있다¹¹⁾. 특히 배양세포는 세포주기가 짧아 단시간 내에 많은 양의 세포를 얻을 수 있어 동일한 실험을 반복할 수 있기 때문에 재현성이 뛰어나다는 잇점이 있다. 최근에 한약추출물중 뇌졸중이나 치매와 같은 난치성 질환등에 유효한 치료적 효과를 나타냈다고 보고 된 바 있다¹⁴⁾. 한약추출물은 양약에 비하여 독성이 거의 없기 때문에 부작용이 거의 없을 뿐만 아니라 또한 특정 질환에 대한 약리적 활성이 뛰어나므로서 현재 한약추출물을 이용한 치료적 약재의 개발에 선진국들은 많은 노력과 투자를 아끼지 않고 있다¹⁵⁾.

따라서 본 연구는 활성산소에 대한 심독성을 조사하기 위하여 생쥐의 심장조직으로부터 순수분리 배양한 심근세포를 재료로 GO의 독성효과를 조사하였으며 동시에 GO의 독성효과에 대한 한약추출물인 동과(Benincasae Semen, BS)의 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

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

2) 약제 제조

본 실험에 사용한 glucose oxidase(GO, Sigma)를 각각 1U/ml, 100mU/ml, 10mU/ml, 및 1mU/ml 의 저장액을 만들어 냉암소에 저장한 다음 실험 당일 최종 농도로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다.

2. 방법

1) 세포배양

Hoffman등⁴⁾의 방법에 따라 심장조직으로부터 효소해리분리법에 의하여 심근세포를 순수 분리하였다. 분리된 심근세포는 혈청이 포함된 배양액에 1×10^5 cells/well의 밀도로 산정하여 96-multiwell에 넣어 분주하였다. 분주된 세포는 CO₂ 정온기에서 8일 동안 배양하였으며 배양액은 3일마다 교환하여 주었다. 일정 시간 동안 배양이 완료된 세포는 분석에 사용하였으며 약제를 처리하지 않은 배양액에서 배양한 세포를 대조군으로 하여 비교 조사하였다.

2) GO의 처리

GO(glucose oxidase)가 심근세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 1mU/ml에서 50mU/ml까지의 GO가 농도별로 함유된 배양액에서 심근세포를 5시간 동안 배양한 후 이의 독성효과를 분석하였다.

3) 한약추출물의 처리

일정시간 배양한 심근세포에 2시간 동안 BS(Benincasae Semen)에 처리한 다음 30mU/ml GO가 포함된 배양액에서 5시

간 동안 처리한 후 약제가 배양 심근세포에 미치는 영향을 조사하였다.

4) 세포생존율 조사

여러 농도의 GO를 배양 심근세포에 처리한 후 GO가 심근세포에 미치는 독성효과와 이에 대한 BS의 효과를 MTT assay에 의하여 조사하였다.

5) 형태학적 관찰

세포의 형태적 관찰을 위하여 세포를 배양중인 용기를 직접 도립위상차현미경 하에 놓고 검경하였으며 필요시 부착된 사진기로 촬영하였다.

6) 통계처리

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

결 과

1. GO의 영향

1) 농도에 대한 영향

GO가 1~50mU/ml의 농도로 각각 포함된 배양액에서 생쥐의 심근세포를 5시간 동안 배양한 후 GO의 독성효과를 MTT assay법에 의하여 조사한 결과 1mU/ml GO의 처리에서는 세포의 생존율이 대조군에 비하여 72.6%로 나타났으며 10mU/ml GO의 처리에서는 57.3%로 나타났다. 또한 30mU/ml와 50mU/ml GO의 처리에서는 각각 세포의 생존율이 48.2%(p<0.05)와 21.6%(p<0.01)로 나타났으며 30mU/ml에서 MTT₅₀ 값을 나타냈다(Fig. 1).

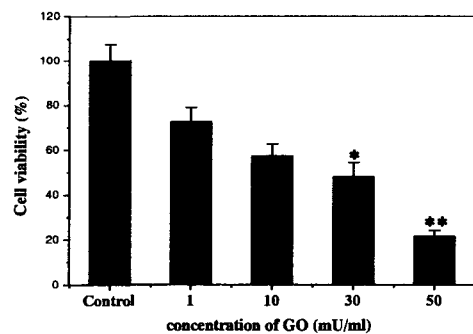


Fig. 1. A dose-dependency of glucose oxidase(GO). GO-induced cardiotoxicity was measured by MTT assay in cultured mouse myocardial cells. Cultured cells were exposed to 1, 10, 30 and 50 mU/ml GO for 5 hours, respectively. The results indicate the mean \pm SD (n=6). *p<0.05 **p<0.01

2) 시간에 대한 영향

GO의 처리시간에 의한 독성효과를 조사하기 위하여 30mU/ml GO가 포함된 배양액에서 심근세포를 1~7시간 동안 배양후 세포생존율을 MTT assay법에 의하여 조사한 결과 1시간 배양에서는 세포의 생존율이 대조군에 비하여 81.3%로 나타났으며 3시간 배양에서는 69.4%로 나타났다. 또한 5시간과 7시간 배양에서는 각각 세포생존율이 52.6%(p<0.05)와 35.8%(p<0.01)로 나타났다(Fig. 2).

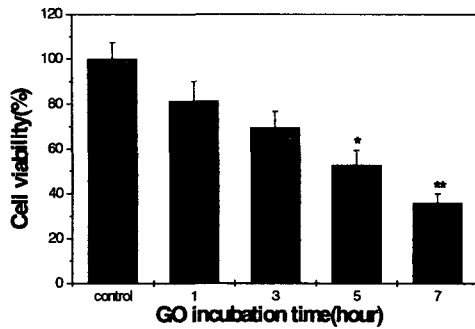


Fig. 2. A time-dependency of glucose oxidase(GO). GO-induced cardiotoxicity was measured by MTT assay in cultured mouse myocardial cells. Cultured cells were exposed to 30 mU/ml GO for 1, 3, 5 and 7 hours, respectively. The results indicate the mean±SD(n=6). *p<0.05; **p<0.01

2. Benincasae Semen(BS)의 효과

GO에 대한 BS의 영향을 조사하기 위하여 30mU/ml GO가 포함된 배양액에서 배양 심근세포를 배양하기 2시간 전에 BS가 25~100 µg/ml의 농도로 각각 포함된 배양액에서 배양한 다음 BS가 GO에 미치는 영향을 MTT assay법에 의하여 조사하였다. 30mU/ml GO만의 처리에 있어서는 세포의 생존율은 대조군에 비하여 36.8%로 나타났는데 비하여 25 µg/ml BS의 처리에서는 47.4%로 나타났다. 또한 50 µg/ml 처리에서는 64.3%로 나타났으며, 또한 100 µg/ml BS 처리에서는 71.5%로 GO만의 처리에 비하여 유의한 증가를 나타냈다(p<0.05)(Fig. 3).

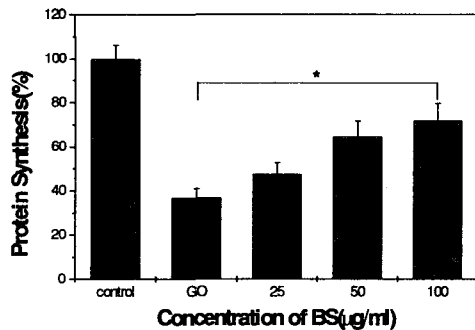


Fig. 3. Dose-response relationship of Benincasae semen, BS for its cardioprotective effect on glucose oxidase(GO)-induced neurotoxicity by MTT assay. Cultured cells were preincubated with BS for 2 hours before exposure to 30 mU/ml GO for 5 hours. The results indicate the mean±SD(n=6). *p<0.05

고찰

활성산소는 산화적 손상으로 인하여 세포의 고사나 사멸을 초래하게 된다^{3,10}. 특히 활성산소는 glutamate 수용체를 과자극 시킴으로서 세포내 칼슘량의 증가를 유도하며 이는 다시 calcium-dependent PKC를 활성화 시키며 나아가서는 c-fos나 c-myc gene을 발현시킴으로서 세포를 퇴화케 만든다^{5,9}. 그 밖에 활성산소는 세포막의 지질과산화반응이나 단백질 산화나 핵산등을 산화시킴으로서 결국 세포를 죽게한다^{5,7}. 따라서 본 연구는 활성산소가 배양심근세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 GO가 1mU/ml에서 50mU/ml까지의 농도로 각각 포함된 배양액에서

심근세포를 5시간 동안 처리한 결과 처리한 농도에 비례하여 세포 생존율을 감소시켰으며 특히 30mU/ml와 50mU/ml의 GO농도에서는 각각 세포의 생존율이 48.2%와 21.6%로 나타나 이는 대조군에 비하여 유의한 세포생존율의 감소를 나타냈다. 위와 같은 본 연구의 결과는 Michikawa 등⁸이 동물의 척수신경세포에 여러 농도의 GO를 처리한 결과 세포독성을 나타냈다는 보고와 일치하였다. 본 실험에서 나타난 GO의 심근독성은 GO가 세포의 항산화효소의 활성저해를 비롯하여 DNA합성이나 세포의 성장을 억제하였을 가능성도 배제할 수 없으며^{1,5,15} 그 외에도 GO가 세포내의 단백질합성계에 영향을 줌으로서 세포를 손상시켜 그 결과 세포의 생존율을 감소시켰을 가능성이 클 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 GO가 단백질합성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 30mU/ml GO를 5시간 동안 심근세포에 처리한 결과 단백질합성이 대조군에 비하여 36.8%로 매우 낮게 나타났다^{6,12}. 그러나 30mU/ml GO를 심근세포에 5시간 동안 처리하기 전 25~100 µg/ml 각각의 BS 농도에서 2시간 동안 배양한 후 단백질 합성은 GO만의 처리에 비하여 모두 증가한 것으로 나타났으며 특히 100 µg/ml BS의 처리에서는 단백질합성이 71.5%로 이는 GO만의 처리에 비하여 유의한 단백질합성의 증가를 나타냈다(p<0.05). 본 연구의 결과는 GO에 의하여 손상된 단백질합성계를 BS가 GO의 산화적 손상을 방어함으로써 단백질합성율이 증가되었음을 증명하고 있으며 이는 GO가 세포내 단백질합성에 관여하고 있는 리보솜체나 조면내형질세망 또는 단백질합성효소등에^{9,12} 손상을 주는 것을 BS가 방어하였을 가능성이 클 것으로 생각한다.

결론

Glucose oxidase(GO)가 배양 심근세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 1~50 mU/ml GO가 각각 포함된 배양액에 심근세포를 5시간 동안 처리한 후 세포생존율을 조사하였으며, 또한 GO의 독성효과에 대한 한약추출물인 동과(Benincasae Semen, BS)의 방어효과를 단백질합성 측면에서 분석하였다. 생쥐로부터 순수분리 배양한 심근세포를 1~50 mU/ml GO가 포함된 배양액에서 5시간 동안 배양한 결과 GO의 농도에 비례하여 세포 생존율을 유의하게 감소시켰다. 또한 GO의 세포독성에 대하여 BS는 단백질합성율을 유의하게 증가시킴으로서 GO의 독성으로부터의 세포손상을 유의하게 방어하였다.

이상의 결과로 부터 GO는 생쥐의 배양 심근세포에 독성효과를 나타냈으며 BS와 같은 한약추출물이 GO의 독성을 방어하는데 매우 효과적인 것으로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 2001년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨

참고문헌

1. Loft S, Astrup A, Buemann B, Poulsen HE : Oxidative

- DNA damage correlates with oxygen consumption in humans. *FASEB J* 8:534-537, 1994.
2. 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 acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 28:18-25, 1993.
 3. Krause SM, Jacobus WE, Becker LC : Alterations in cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport in the post-ischemic "stunned myocardium. *Circ Res* 65 : 526-530, 1989.
 4. Hoffman P, Muller SP, Heinroth K, Buchner E, Richards R, Toraason M : Cardiotoxicity of dichromomethane in rats and in cultured rat cardiac myocyte. *Toxic in Vitro* 9: 489-492, 1995.
 5. 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.
 6. Romaschin AD, Rebeyka I, Wilson GJ, Mickle DAG : Conjugated dienes in ischemic and reperfused myocardium free radical mediated injury. *J M Cell Cardiol* 19 : 289-302, 1987.
 7. Reiter RJ : Oxidative processes and antioxidative defense mechanism in the aging brain. *FASEB J* 9:526-533, 1995.
 8. Michikawa M, Lim KT, McLarnon JG, Kim SU : Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. *J Neurosci Res* 37 : 62-70, 1994
 9. Toraason M., Breitenstein M. : Intracellular calcium transients in cardiac myocytes exposed to carbon tetrachloride (Abstract). *Toxicologist* 11 : 310, 1991
 10. Reiter RJ : Oxidative processes and antioxidative defense mechanism in the aging brain. *FASEB J* 9:526-533, 1995.
 11. Borenfreund E, Babich H, Martin-Alcuacil N : Coparisons of two in vitro cytotoxicity assays-The neutral red(NR) asnd tetrazolium MTT test. *Toxic In Vitro* 2:1-6, 1988.
 12. Przyklenk K., Kloner R. A. : Superoxide dimutase plus catalase improve contractile function in the canine model of "stunned myocardium" . *Cir Res* 58 : 149, 1986
 13. Park ST, Kim JJ, Mun YJ, Lim KT, Choi MK, Chung YT : Effects of methylmercury on the fetal mouse cerebral neurons. *Wonkwang J Environ* 4 : 27-32, 1995.
 14. 박동원 : 단삼보혈탕 및 보화환이 위궤양에 미치는 영향. *경희대학교 논문집*, 14, 261-279, 1985
 15. 차배천, 이승배, 임태진, 이광희 : 오배자 항산화 활성성분과 자유라디칼 소거효과. *생약학회지* 31, pp185-190, 2000