

생쥐의 배양 대뇌신경세포에 대한 Hydrogen Peroxide의 세포독성 및 천마의 영향

최유선 · 이은미 · 손영우 · 이강창¹ · 신용일 · 송명수² · 최영자² · 최규철² · 강형원³ · 임창용³ · 류지용³ · 박세홍³ · 박승택*

원광대학교 의과대학, 1: 한의화전문대학원, 2: 원광보건대학, 3: 원광대학교 한의과대학

Cytotoxicity of Hydrogen Peroxide and Effects of Rhizoma Gastrodiae Against Hydrogen Peroxide in Mouse Cerebral Neurons

Yu Sun Choi, Eun Mi Lee, Young Woo Son, Kang Chang Lee¹, Yong Il Shin, Myung Su Song², Young Ja Choi², Kyu Chul Choi², Hyung Won Kang³, Chang Yong Lim³, Ti Yong Rhu³, Sea Hong Park³, Seung Taeck Park*

Department of Medicine, 1: Professional Graduate School of Oriental Medicine, 2: Wonkwang health Science College, 3: College of Oriental Medicine, Wonkwang University

To elucidate the toxic effect of oxygen free radicals on cultured mouse cerebral neurons damaged by hydrogen peroxide(H₂O₂)-induced neurotoxicity, we examined the neurotoxicity induced by oxygen radicals by NR assay when cultured cerebral neurons were grown in the media containing various concentrations of H₂O₂ for 6 hours. In addition, neuroprotective effects of herb extracts such Rhizoma Gastrodiae(RG) on H₂O₂-induced neurotoxicity in cultured cerebral neurons were evaluated after cultured cerebral neurons were preincubated with various concentrations of herb extract, RG for 2 hours before 50uM H₂O₂ for 6 hours. H₂O₂ decreased remarkably cell viability in dose-and time-dependent manner in these cultures, and also herb extract, RG decreased LDH activity of cerebral neurons damaged by H₂O₂. From the above results, it is suggested that H₂O₂ was toxic in cultured cerebral neurons from mouse, and RG was effective in blocking the neurotoxicity induced by oxygen radicals in these cultures.

Key words : Oxidative stress, Cerebral neuron, Hydrogen peroxide, Rhizoma Gastrodiae.

서론

산소자유기는 대사과정에서 소량이 생성되나 인체내의 항산화효소인 catalase나 superoxide dismutase(SOD)에 의하여 물로 변환되어 인체에는 아무런 영향을 주지 못한다. 그러나 근위축성 측삭경화증이나 파킨슨씨병과 같은 질환에서는 제거되지 못한 산소자유기가 뇌에 축적되어 그 결과 뇌신경세포를 손상 내지는 사멸시킴으로서 병변을 가속화시킨다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다. 따라서 산소자유기의 산화적 손상으로 매개된 뇌질환의 치료방법의 하나로 glutathione이나 vitamin E와 같은 항산화제들을 투여함으로써 많은 치료적 효과를 얻고 있다. 따라서 항산화제들은 과다한 산소자유기를 제거해줌으로써 병변을 회복시켜주는 데 중요한 역할을 한다는 보고에 근거하여^{1,5)} 산소자유기의

독성효과와 이에 대한 방어 및 회복작용에 대한 기전을 밝히려는 연구가 꾸준히 진행되어 왔다^{2,7)}.

최근 산소자유기와 glutamate 수용체에 대한 연구에서 산소자유기는 흥분성아미노산(excitatory amino acids, EAAs)의 분비를 촉진시킨다는 보고에 따라 신경세포의 손상에 산소자유기와 EAA는 여러 신경성질환의 주된 병리적 요인으로 제시되었다^{4,11)}. 최근 소수의 연구에서 산소자유기는 glutamate 수용체의 하나인 N-methyl-D-aspartate(NMDA) 수용체를 통하여 세포내 Ca²⁺의 농도를 증가시킴으로써 신경세포의 손상이나 퇴화를 초래한다고 보고된 바 있다^{2,12)}. 특히, 인체의 뇌에 존재하고 있는 NMDA 수용체는 α-amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) 및 kainate receptor와 같은 수용체와 함께 이온 전해질의 항상성을 조절하는 중요한 역할을 하고 있다^{5,13)}. 그 중에서 Ca²⁺의 ion-channel과 밀접한 관계가 있는 NMDA receptor는 흥분성아미노산의 과 자극에 의하여 활성화 됨으로써 그 결과 세포내 Ca²⁺ 농도를 증가시키거나¹⁾ 또는 세포내 각종 효소나

* 교신저자 : 박승택, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 의과대학

E-mail : stpark@wonkwang.ac.kr Tel : 063-850-6759

· 접수: 2002/07/10 · 수정: 2002/08/27 · 채택 : 2002/09/19

protein kinase C(PKC)와 같은 신호전달체계에 영향을 줌으로써 결국 세포를 손상케하여⁴⁾ 신경병변을 가속화 시킨다고 알려져 왔다. 최근에 한약추출물이나 동식물의 추출물들이 산소자유기의 산화적 손상이나 독성물질에 의해 야기되는 각종 신경병변의 치료에 매우 효과적이라는 것이 몇몇 임상실험에서 보고되어지고 있다¹⁻³⁾. 특히, 한약추출물은 지금까지 기존 약제에 비하여 독성이 없을뿐만 아니라 이로 인한 부작용이 적기 때문에 이를 이용한 병변의 치료를 위한 약재화에 우리나라를 비롯한 여러 선진국들은 많은 투자를 아끼지 않고 있다^{2,6)}. 한편, 위와 같은 약재개발에 중요한 것은 이를 응용할 수 있는 각종 질환의 병변모델이 필수적임을 말할 것도 없다^{5,7)}. 그러나 현재까지 개발된 동물질환모델은 소수에 불과하며, 동물의 실험모델 값이 고가여서 이를 이용한 약재개발은 사실상 많은 어려움이 있다^{4,8)}. 그러나 근래에 세포배양기술보급으로 인하여 배양세포를 이용한 병변모델이 동물의 실험모델을 대신하여 매우 적합한 시험관내 실험모델로 자리잡고 있다.

본 연구는 산소자유기의 신경독성에 대한 병인에 대한 기전 규명하기 위하여 대뇌조직으로부터 신경세포를 순수 분리하여 배양한 후 H₂O₂에 의한 산화적 손상을 NR 분석법에 의하여 조사하고 또한 산소자유기에 의하여 유발되는 신경독성에 대한 천마(Rhizoma Gastrodiae, RG)의 방어효과를 LDH 활성 측면에서 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에 사용한 동물은 ICR 계통의 생후 3일된 건강상태가 양호한 생쥐를 사용하였다.

2. 실험방법

1) 한약재의 추출

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

2) 약제 제조

본 실험에 사용한 약재로는 Hydrogen peroxide(H₂O₂, Sigma)의 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 후 실험 당일 적당한 양으로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다.

3) 세포배양

대뇌신경세포의 분리는 Kim³⁾의 방법에 따라 시행하였다. 즉 생쥐에서 적출한 뇌조직은 0.25% trypsin이 포함된 phosphate buffered saline(PBS)으로 처리한 후 36°C, 5% CO₂/95%air로 조절된 항온기 내에서 배양하였다. 배양완료 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 전처

리된 96-multiwell에 3×10⁶cells/well의 밀도로 세포를 분주하였다. 분주된 세포는 3일 간격으로 새로운 배양액으로 교환하여 주었으며 7일 동안 배양후 본 실험에 사용하였다.

4) Hydrogen Peroxide(H₂O₂) 처리

H₂O₂가 생쥐의 대뇌신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 일정시간 배양한 대뇌신경세포를 0.6% D-glucose가 함유된 MEM으로 3회 세척한 다음 1~60uM을 여러 농도로 조합하여 혼합한 다음 이들 각각의 배양액에서 1~12시간 동안 처리한 후 분석하였다.

5) 세포독성 및 방어효과 검정 - 세포생존율 분석

(1) NR정량

Neutral red(NR, Sigma)의 정량은 Mosman(1983)⁹⁾의 방법에 따랐다. 즉 여러 농도의 H₂O₂를 처리한 배양 신경세포를 phosphate buffered saline(PBS)으로 3회 세척 후 전날 제조한 5mg/ml의 NR을 well당 최종농도로 희석하여 넣은 다음 3시간 동안 37°C, 5% CO₂로 조절된 정온기에서 배양하였다. 배양 완료 후 PBS로 3회 세척 후 1% formalin으로 고정하고 1% glacial acetic acid로 처리한 다음 spectrophotometer로 540nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

(2) LDH 정량

LDH활성의 측정은 LDH kit를 사용하여 행하였다. 즉, LDH kit(Atron lab, Japan)의 효소기질액 1.0ml를 직경 10cm인 튜브에 넣은 후 여기에 검체인 배양액을 넣어 잘 혼합한 다음 37°C에서 10분간 반응시켰다. 10분 후 희석반응 정지액 3.0ml를 넣어 혼합한 후 570nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

6) 통계 처리

실험 결과에 대한 유의성의 검정은 ANOVA후에 Student's t-test에 의하였으며 p값이 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

실험성적

1. H₂O₂의 독성효과 - 세포 생존율 분석

1) NR 정량

(1) 농도에 의한 영향

대뇌신경세포를 일정시간 동안 배양한 후 Ca²⁺, Mg²⁺-free인 Hank's balanced salt solution(HBSS, Gibco)으로 3회 세척한 다음 1uM에서 100uM까지의 H₂O₂가 각각의 농도로 포함된 배양액에서 6시간 배양한 다음 세포생존율을 조사하였다. 그 결과 1 uM에서 세포생존율은 대조군 (100%)에 비하여 83.6%로 나타났으며 25 uM에서는 75.3%로 나타났다. 또한 50uM H₂O₂의 농도에서는 50.7%(p<0.05)로 나타난 반면 100uM에서는 42.5% (p<0.01)로 나타났으며 이 때 H₂O₂의 MCV값은 50uM에서 나타났다(Fig. 1).

(2) 시간에 따른 영향

H₂O₂의 처리 시간에 따라 대뇌신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 NR 50값인 50 uM의 H₂O₂가 포함된 배양액에서 신경세포를 1~12시간 동안 배양한 후 H₂O₂처리 시간에 의한 세포생존율을 조사하였다. 그 결과 1시간 동안 배양에서는 세포생존율이 대조군(100%)에 비하여 71.9%로 나타났으며 3시간동안 배양에서는

78.7%로 나타났다. 또한 6시간과 12시간의 배양에 있어서는 세포생존율이 각각 50.8%(P,0.05)와 36.5%(p<0.01)로 나타났다(Fig. 2).

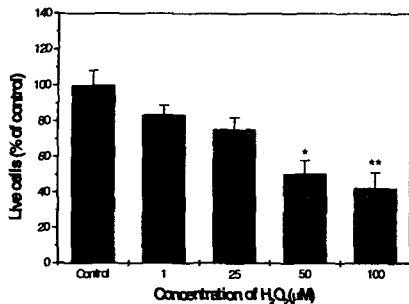


Fig. 1. Dose-relationship of hydrogen peroxide(H₂O₂). H₂O₂-induced neurotoxicity was measured by NR assay in cultured mouse cerebral neurons. Cultured cells were exposed to 1,25,50 and 100μM H₂O₂ for 6hours, respectively. The results indicate the mean±SD for 6 experiments. *p<0.05; **p<0.01

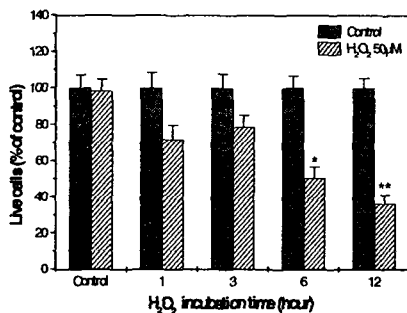


Fig. 2. Time-relationship of hydrogen peroxide(H₂O₂). H₂O₂-induced neurotoxicity was measured by NR assay in cultured mouse cerebral neurons. Cultured cells were exposed to 50μM H₂O₂ for 1,3,6 and 12 hours, respectively. The results indicate the mean±SD for 6 experiments. *p<0.05; **p<0.01

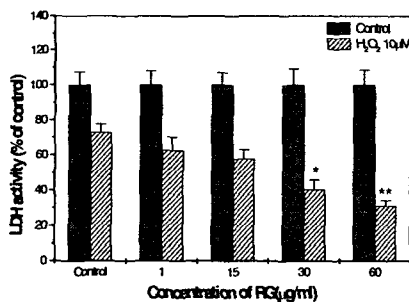


Fig. 3. A dose-response relationship of Rhizoma Gastrodiae(RG) for its neuroprotective effect of hydrogen peroxide(H₂O₂) by NR assay in cultured mouse cerebral neurons. Cultures were preincubated for 2 hours before exposed to H₂O₂. The results indicate the mean±SD for 6 experiments. *p<0.05; **p<0.01

2) 천마(RG)의 영향

일정시간 동안 배양한 대뇌신경세포를 50μM H₂O₂에 노출하기전에 10μg/ml에서 60μg/ml까지의 RG가 각각의 농도로 포함된 배양액에서 2시간 배양한 다음 이를 다시 10μM H₂O₂가 포함된 배양액에서 6시간 동안 배양한 후 세포생존율을 조사하였다. 그 결과 H₂O₂ 10μM만의 처리에서 세포생존율은 대조군(100%)에 비하여 72.7%로 나타난 반면 10μg/mg RG 처리에서는 세포생존율이 62.7%로 나타났다. 또한 15μg/ml와 30μg/ml 농도

의 RG 처리에서는 각각 57.8와 40.5%(p<0.05)로 나타났다. 또한 60μg/ml RG의 처리에서는 31.1%(p<0.01)로 나타났다(Fig. 3).

고찰

산소자유기는 과량이 인체에 축적되면 신경세포를 비롯한 각종 장기를 구성하고 있는 세포에 산화적 손상을 초래함으로써 다양한 병변을 초래함은 잘 알려진 사실이다. 예를 들면 ALS환자에서는 superoxide dismutase-1(SOD-1)유전자의 점돌연변이에 의하여 환자의 뇌속에 산소자유기가 과량 축적됨으로서 심한 신경병변을 야기하기도 한다⁴⁾. 한편, 다량 축적된 산소자유기는 막의 지질과산화반응을 촉진시키고¹⁰⁾ 나아가서 세포내 각종 이차전달자나 신호전달체계에 영향을 미침으로서 결국 세포의 대사이상과 항상성의 균형을 깨뜨림으로서 세포의 퇴화를 초래하게 된다¹¹⁾. 본 연구는 산소자유기의 독성에 대한 기전을 규명하기 위한 일환으로 생쥐의 뇌조직으로부터 순수 분리하여 배양한 대뇌신경세포에 여러 농도의 GO를 노출시킨 후 NR 분석을 시행한 결과 GO의 처리농도와 처리시간에 비례하여 세포생존율을 대조군에 비하여 유의하게 감소시켰다. 이러한 결과는 H₂O₂가 배양 대뇌신경세포에 독성효과를 가지고 있다는 것을 증명하는 것으로, 이는 산소자유기가 척수신경을 손상함으로써 독성효과를 나타냈다는 연구보고와 일치하였다^{3,6)}. 따라서 타 연구 결과나 본 연구 결과들은 모두 H₂O₂의 산화적 손상이 신경독성에 관여하고 있음을 말해 주고 있을 뿐만 아니라, 동시에 세포내 항산화계에 손상을 주어 그 결과 항산화효소의 활성이 감소됨으로서 미처 처리되지 못한 산소자유기들이 축적되어 세포막의 지질과산화반응의 촉진과¹⁵⁾ lipid phosphatase A2와 같은 이차전달자를 비롯하여 각종 효소나 단백질을 불활성 세포의 퇴화 내지는 사멸을 초래하였을 가능성이 크다고 생각된다. 한편, 본 실험에서 H₂O₂는 배양된 대뇌신경세포에 처리한 농도와 시간에 비례하여 세포의 LDH 활성증가를 보였는데 이는 세포막의 lipid peroxidation을 촉진함으로써 인한 세포막의 손상에 기인한 것으로 생각된다. 천마가 H₂O₂에 의하여 손상된 배양 대뇌신경세포에 대한 LDH 활성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 먼저 배양 대뇌신경세포에 H₂O₂를 처리하여 LDH 활성을 조사한 결과 농도에 비례하여 LDH 활성이 증가하였으며, 이 때 MCV값은 10 μM에서 나타났다. 한편, H₂O₂ 의하여 손상된 배양 대뇌신경세포에 대한 천마의 효과를 LDH활성도 측면에서 조사하기 위하여 10 μM H₂O₂농도에서 노출시키기 전에 1~60 μg/ml RG가 각각 포함된 배양액에서 2시간 동안 전처리한 후 LDH 활성을 조사한 결과 RG의 처리농도에 비례하여 LDH의 활성 감소를 보였으며 특히, 30 μg/ml과 60 μg/ml RG의 처리에서는 대조군에 비하여 각각 40.5%(P<0.05), 31.1%(P<0.01)로 유의한 감소를 나타냈다. 이상의 실험 결과를 종합해 보면, H₂O₂에 의한 산화적 손상은 신경독성을 나타냈으며 이에 대한 RG의 투여는 LDH 활성의 감소를 나타내었다. 이와 같은 결과는 RG가 LDH 활성감소에 의하여 지질과산화반응을 저해함으로써 산소자유기로부터 세포손상에 방어작용을 나타내었기 때문이라 생각된다.

결 론

Glucose oxidase(GO)의 산화적 손상에 대한 기전을 규명하기 위하여 생쥐의 대뇌조직으로부터 순수 분리 배양한 대뇌신경세포를 여러 농도의 hydrogen peroxide(H₂O₂)가 포함된 배양액에서 6시간 동안 처리한 다음 H₂O₂가 배양 대뇌신경세포에 미치는 영향을 조사하였으며 또한 H₂O₂의 독성효과에 대한 Rhizoma Gastrodiae(RG)의 영향을 조사하였다. 그 결과 H₂O₂는 NR 분석법에 의하여 생쥐의 배양 대뇌신경세포에 처리한 농도와 시간에 비례하여 유의한 세포생존율의 감소를 보였으며 또한 H₂O₂의 신경독성에 대하여 RG는 H₂O₂만의 처리에 비하여 LDH활성에 있어서 유의한 감소를 보였다.

이상의 결과로부터 H₂O₂는 생쥐에서 분리한 배양 대뇌신경세포에 독성을 나타냈으며, 동시에 RG와 같은 한약 추출물이 H₂O₂의 산화적 손상으로부터 LDH활성을 유의하게 감소시킴으로서 H₂O₂의 독성을 효과적으로 방어한 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2002년도 원광보건대학교 교내연구비지원과 두뇌한국 21 및 원광대학교 교비의 일부지원에 의해서 연구됨.

참고문헌

- 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.
- Elion G.B., Kovensky A., Hitchings G.H., Metz E. , Rundles R.W. : Metabolic studies of allopurinol, an inhibitor of xanthine oxidase. *Biochem Pharmacol* 15: 863-880, 1966.
- Hall E, Braughler JM : Role of lipid peroxidation in post-traumatic spinal cord degeneration. *Cent Nerv System Trauma* 3: 281-249, 1986.
- Halliwell B : Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem* 59: 1609-1623, 1992.
- Kim S.U., Osborne D., Kim M.W., Spigelman I., Puil E., Shin D. : Longterm culture of human fetal spinal cord neurons : Morphological immunocytochemical and electrophysiological characteristics. *Neuroscience* 25:659-670, 1988.
- Kim YS, Kim SU : Oligodendroglial cell death induced by oxygen radicals and its protection by catalase. *J Neurosci Res* 29: 100-106, 1991.
- 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.
- Mosmann T : Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxic assays. *J Immun Methods* 65: 55-63, 1983.
- Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carria V, Moroni F : Excitatory amino acid release from rat hippocampal slices as a consequence of free-radical formation. *J Neurochem* 51: 1960-1963, 1988.
- Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carla V, Morroni F : Excitatory amino acid and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J Neurosci* 10: 1035-1041, 1990.
- 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.
- Rothstein JD, Tsai G, Kunel Rw, Clawson L, Cornblath DR, Drachman DB, Pestronk A, Stauch BL, Coyle JT : Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 28: 18-25,1990
- 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. *Journal of Neurochem* 49: 24-31, 1987.
- 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.
- 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.