

조구등이 Glucose Oxidase로 손상된 대뇌신경세포에 미치는 효과

김형수 · 이용석 · 오석규 · 이강창¹ · 이건목¹ · 이 정² · 이상복²
· 김종호² · 유준기³ · 강영성³ · 김성수³ · 송호준³ · 박승택*

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

Effect of Ramulus et uncus uncariae on Glucose Oxidase-Induced Toxicity in Cultured Cerebral Neurons

Hyeong Soo Kim, Yong Suk Lee, Suk Kyu Oh, Kang Chang Lee¹, Geon Mok Lee¹, Jeong Lee², Sang Bork Lee², Jong Ho Kim², Jun Ki Yu³, Young Seong Kang³, Sung Soo Kim³, Ho Jun Song³, Seung Taeck Park*

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

To examine the cytotoxic effect of glucose oxidase(GO) in cultured mouse cerebral neurons, cytotoxicity was measured by MTT assay after cultured nerve cells were incubated for 3 hours in the media containing 1~60mU/ml concentrations of GO. In addition, the neuroprotective effect of Ramulus et uncus uncariae(REUU) was determined by MTT assay in these cultures. Cell viability was remarkably decreased in a dose- and time-dependent manner after cultured mouse cerebral neurons were exposed to 30mU/ml GO for 3 hours. In the neuroprotective effect of REUU on GO-induced toxicity, REUU blocked the GO-mediated neurotoxicity in these cultures. From above the results, it suggests that GO is toxic in cultured mouse cerebral neurons and selective herb extract such as REUU is effective in prevention of the neurotoxicity induced by GO.

Key words : Cultured cerebral neuron, Ramulus et uncus uncariae, Neuroprotective effect

서 론

활성산소는 인체의 정상적인 대사과정에서 소량 생성되나 superoxide dismutase(SOD)를 비롯한 catalase와 같은 항산화효소에 의하여 물로 변환됨으로서^{1,2)} 인체에는 아무런 영향을 미치지 않는다. 그러나 병적상태에서는 과량의 활성산소가 생성되어 인체 내에 축적됨으로서 인체를 구성하고 있는 뇌세포를 비롯하여 간 세포 및 심근세포등에 손상을 주어 각종 질환을 유발한다는 것은 이미 잘 알려져 있다^{3,9)}. 특히 치매를 비롯하여 뇌졸중이나 파킨슨씨병 및 근위축성측삭경화증의 병인으로서 활성산소의 산화적 손상이 깊이 관여한다고 밝혀짐으로서 이들 질환의 치료적 접근 방법의 하나로 항산화제와 같은 약제투여가 임상적으로 많은 관심을 끌고 있다^{4,5)}. 최근에 활성산소는 세포막의 지질과산화반응을 촉진시켜 막손상을 유도하며 또한 세포내 반응질소종인 nitric oxide(NO)와 결합함으로써 peroxynitrite라는 독성물질을 생성하

여 그 결과 세포의 사멸이나 퇴화를 유발한다고 보고된 바 있다^{6,13)}. 더욱이 활성산소는 흥분성 아미노산의 분비를 촉진시켜 glutamate 독성을 초래하기도 하며 동시에 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체를 과활성 시킴으로서 세포내 칼슘농도를 증가시켜 세포의 손상 내지는 사멸을 촉진시킨다고 한다^{1,3,7)}. 그러나 아직까지 활성산소에 대한 세포손상에 대한 기전이나 작용현상이 자세히 밝혀져 있지 않을 뿐만 아니라 또한 이에 대한 효과적인 치료적 방법의 접근도 매우 미흡한 실정이다^{8,9)}. 최근에 한약추출물의 일종인 조구등이 활성산소의 산화적 손상에 대하여 방어효과적인 약리활성을 가지고 있다는 것이 보고되고 있다^{2,8,10)}. 조구등은 상록성 덩굴관목으로 산지의 계곡 주변에서 서식하고 있으며 맛은 달고 성은 약간 차다. 특히, 고혈압두훈을 비롯하여 신경성 두통에 효능이 있으며 그 밖에도 강압작용을 비롯하여 항균 및 항진균작용이 있어 각종 신경성 질환에 널리 처방되고 있다^{8,10)}. 본 연구는 glucose oxidase(GO)의 신경독성에 대한 기전을 규명하기 위하여 생쥐의 대뇌신경세포를 배양한 후 GO의 세포독성을 분석하였으며 또한 GO에 의하여 유발되는 신경독성에 대한 조구등의 영향을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하고자 한다.

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

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

· 접수: 2002/07/29 · 수정: 2002/09/05 · 채택 : 2002/09/30

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

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

2) 약제 제조

본 실험에 사용한 Glucose oxidase(GO, Sigma)는 각각 100mU/ml, 50mU/ml, 10mU/ml, 1mU/ml의 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 다음 실험 당일 최종 농도로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다.

2. 방법

1) 세포배양

생쥐의 뇌조직으로부터 대뇌신경세포의 분리는 Michikawa 등¹¹⁾의 방법에 따라 시행하였다. 분리된 대뇌신경세포는 혈구계산기를 사용하여 배양액에 1×10^5 cells/well의 밀도로 계산하여 96-multiwell에 넣어 분주하였다. 분주가 완료된 세포는 CO₂ 정온기에서 5일 동안 배양한 후 실험에 사용하였으며, GO가 포함되지 않은 배양액을 대조군으로 하여 실험군과 비교 조사하였다.

2) GO 처리

GO가 배양 대뇌신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 1mU/ml에서 60mU/ml까지의 농도로 GO가 각각 포함된 배양액에서 대뇌신경세포를 3시간 동안 배양한 후 이의 독성효과를 조사하였다.

3) 한약추출물의 처리

일정시간 배양한 대뇌신경세포에 30mU/ml GO를 처리하기 2시간 전에 각각 25~100µg/ml 농도의 Ramulus et uncaria(REUU)가 포함된 배양액에서 배양한 다음 이들이 GO의 독성에 미치는 영향을 조사하였다.

4) 세포생존율 조사

배양 대뇌신경세포에 여러 농도의 GO나 REUU를 처리한 후 GO가 대뇌신경세포에 미치는 독성효과와 또한 GO의 세포독성에 대한 REUU의 방어효과를 Mosmann(1983)의 colorimetric MTT분석법에 의하여 분석하였다.

5) 통계처리

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

실험성적

1. GO의 세포독성

1) 농도에 의한 영향

생쥐의 배양 대뇌신경세포에 GO가 1~60mU/ml의 농도로 각각 포함된 배양액에서 3시간 동안 배양한 후 GO의 독성효과를 MTT 분석법에 의하여 조사한 결과 1mU/ml GO의 처리에서

는 세포의 생존율이 대조군(100%)에 비하여 79%로 나타났으며 15mU/ml GO의 처리에서는 62%로 나타났다. 또한 30mU/ml와 60mU/ml GO의 처리에서는 세포의 생존율이 각각 47%($p < 0.05$)와 31%($p < 0.01$)로 나타났으며 30mU/ml에서 MTT50 값을 나타냈다(Fig. 1).

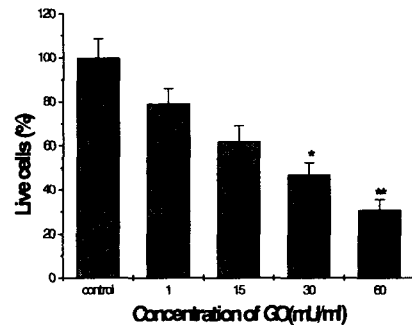


Fig. 1. A dose-dependency of glucose oxidase(GO). GO-induced neurotoxicity was measured by MTT assay in mouse cerebral neuron cultures. Cultured cells were exposed to 1, 15, 30 and 60mU/ml GO for 4 hours, respectively. The results indicate the mean±SD(n=6). *p<0.05,**p<0.01

2) 시간에 의한 영향

생쥐의 배양 대뇌신경세포에 대하여 시간의 변화에 따른 GO의 세포독성을 조사하기 위하여 30mU/ml GO가 포함된 배양액에서 대뇌신경세포를 1~4시간 동안 배양후 세포생존율을 MTT 분석법에 의하여 조사한 결과 1시간 배양에서는 세포의 생존율이 대조군(100%)에 비하여 79%로 나타났으며 2시간 배양에서는 72%로 나타났다. 또한 3시간과 4시간 배양에서는 각각 세포생존율은 51%($p < 0.05$)와 23%($p < 0.05$)로 나타났다(Fig. 2).

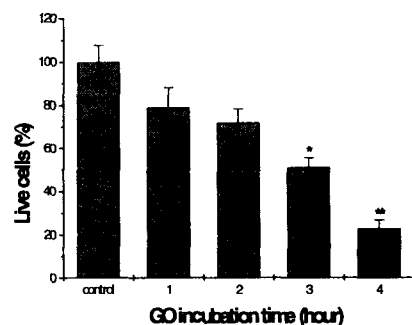


Fig. 2. A time-dependency of glucose oxidase(GO). GO-induced neurotoxicity was measured by MTT assay in mouse cerebral neuron cultures. Cultured cells were exposed to 30mU/ml GO for 1, 2, 3 and 4 hours, respectively. The results indicate the mean±SD(n=6). *p<0.05,**p<0.01

2. Ramulus et uncaria(REUU)의 효과

GO의 세포독성에 대한 한약추출물인 REUU의 영향을 조사하기 위하여 30mU/ml GO가 포함된 배양액에서 대뇌신경세포를 배양하기 2시간 전에 REUU가 25~100µg/ml의 농도로 각각 포함된 배양액에서 배양한 다음 REUU가 GO의 독성에 미치는 영향을 MTT 분석법에 의하여 조사하였다. 30mU/ml GO만을 처리한 경우 세포생존율은 대조군(100%)에 비하여 38%로 나타

난데 비하여 25 μ g/ml REUU의 처리에서는 47%로 나타났다. 또한 50 μ g/ml REUU 처리에서는 63%로 나타났으며, 특히 100 μ g/ml REUU 처리에서는 85%로서 이는 GO만의 처리인 38%에 비하여 약 2배 이상의 높은 생존율($p < 0.05$)을 보였다(Fig. 3).

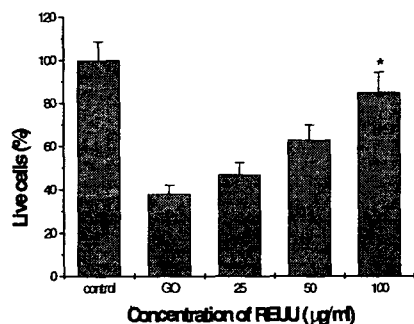


Fig. 3. Dose-response relationship of *Ramulus et uncus uncariae* (REUU) for its neuroprotective effect on GO-induced neurotoxicity by MTT assay. Cultured cells were preincubated with REUU for 2 hours before exposure to 30mU/ml GO for 3 hours. The results indicate the mean \pm SD(n=6). Asterisk indicate the significant difference($p < 0.05$) between groups.

고찰

조구등은 rhynchophylline나 hirsutine 및 corynantheine등을 함유하고 있는 꼭두서니과의 식물로서 소아고열이나 경풍, 자간등에 효능이 있으며 특히 동물실험에서 혈압에 대한 강하효과나 항균작용이 있다고 알려져 있다^{8,12,14}. 활성산소는 항산화효소의 활성저하는 물론 이차적으로 protein kinase C(PKC)와 같은 신호전달체계에 영향을 줌으로서 세포의 기능을 비정상적으로 만든다^{3,5,10}. 따라서 활성산소에 의한 산화적 손상은 세포손상이나 세포의 퇴행성변화를 유발한다고 한다¹⁴. 따라서 본 연구에서는 GO의 신경독성을 조사하기 위하여 생쥐로 부터 분리배양한 대뇌신경세포에 1~60mU/ml GO를 3시간동안 처리한 결과 GO는 대뇌신경세포에 처리한 농도에 비례하여 세포의 생존율을 대조군에 비하여 유의하게 감소시켰다. 본 실험에 있어서 GO가 배양 대뇌신경세포에 세포독성효과를 나타낸 것은 아마도 GO의 산화적 손상이 사립체내의 succinic dehydrogenase(SDH)와 같은 효소활성의 억제에 의한 세포생존율의 감소와 밀접한 관련이 있을 가능성이 클 것으로 생각된다^{9,15}. 그 이유는 본 실험의 MTT 분석법에 의한 세포생존율이 GO의 처리농도에 비례하여 유의하게 감소됨으로서 이를 증명하고 있다¹². 한편, 본 실험에서는 GO의 산화적 손상에 대한 한약추출물인 *Ramulus et uncus uncariae* (REUU)의 영향을 조사하기 위하여 30mU/ml GO를 배양 대뇌신경세포에 처리하기 2시간 전에 REUU를 처리하여 이의 효과를 조사한 결과 30mU/ml GO만을 처리한 경우 세포의 생존율은 38%인데 비하여 25~100 μ g/ml REUU의 처리에서는 40~80% 이상의 높은 생존율을 보였다. 특히, 100 μ g/ml REUU 처리에서는 GO만의 처리시 세포생존율인 38%에 비하여 85%($p < 0.05$)로서 매우 유의하게 증가하였다. 이러한 실험 결과는 Kim과 Kim⁹이 산소자유기에 의하여 손상된 생쥐의 희소돌기아교세포의 생존율을

조구등이 유의하게 증가시켰다는 연구 결과와 일치함을 알 수 있었다. 본 실험에서 한약추출물인 REUU가 GO의 세포독성에 대하여 방어효과를 보인 것은 GO를 대뇌신경세포에 노출전에 REUU를 전처리 하는 동안 세포막내로 확산된 REUU가 GO의 독성을 방어한 것으로 생각된다^{8,12}. 이상의 실험 결과로 부터 REUU는 활성산소에 의한 대뇌신경세포의 산화적 손상방어에 효과적인 것으로 나타났으며 앞으로 GO의 신경독성기전 및 REUU의 방어효과에 따른 약리활성에 대한 기전규명이 수행되어야 할 것으로 생각한다.

결론

생쥐의 배양 대뇌신경세포에 대한 Glucose oxidase(GO)의 세포독성효과를 조사하기 위하여 GO가 여러 농도로 포함된 배양액에 대뇌신경세포를 처리한 후 GO의 세포독성을 조사하였으며, 또한 GO의 세포독성에 대한 한약추출물인 *Ramulus et uncus uncariae*(REUU)의 방어효과를 MTT 분석법에 의하여 조사하였다. 생쥐의 대뇌신경세포를 1~60mU/ml GO가 포함된 배양액에서 3시간 동안 배양한 결과 GO는 신경세포에 농도의존적으로 세포생존율을 유의하게 감소시켰다. 또한 GO의 신경독성에 대하여 한약추출물인 REUU는 GO에 의한 세포생존율의 감소를 유의하게 방어하였다.

이상의 결과로부터 GO는 생쥐의 배양 대뇌신경세포에 독성효과를 나타냈으며 REUU와 같은 한약추출물이 GO의 신경독성을 방어하는데 효과적인 것으로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 2002년도 원광보건대학 교내연구비와 두뇌한국21 및 원광대학교 교비의 일부지원에 의해서 연구됨

참고문헌

- Darlington C.L., Smith P.F. : Pre-treatment with a Ca^{2+} channel antagonist facilitates vestibular compensation. *Neuroreport* 3: 143-145, 1992.
- Decker E.A. : The role of phenolics, conjugated linoleic acid, carnosine, and pyrroloquinoline quinone as nonessential dietary antioxidants. *Nutr Rev* 53:49-58, 1995.
- 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.
- Graf E, Mahoney JR, Bryant RG, Eaton JW : Iron-catalyzed hydroxyl radical formation : Stringent requirement for free iron coordination site. *J Biochem* 259:3620-3624, 1984.

6. Hall E, Braugher JM : Role of lipid peroxidation in post-traumatic spinal cord degeneration. *Cent Nerv System Trauma* 3: 281-249, 1986.
7. Halliwell B. : Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem* 59: 1609-1623, 1992.
8. natani R, Nakatani N, Fuwa H : Antioxidative effect of constituents of rosemary(Rosemarinus of ficinalis L.) and their derivatives. *Agric Biol Chem* 47:521-528, 1983.
9. kim YS, Kim SU : Oligodendroglial cell death induced by oxygen radicals and its protection by catalase. *J Neurosci Res* 29: 100-106, 1991.
10. Madesen HL, Bertelsen G : Spices as antioxidants. *Trends in Food Sci Tech* 6:271-277, 1995.
11. Michikawa M., Lim K. T., McLarnon J. G., Kim S. U. : Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. *J Neurosci Res* 37:62-70, 1994.
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. Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carla V, Morrioni F. :Excitatory amino acid and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J Neurosci* 10: 1035-1041, 1990.
14. 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.
15. Zhang Y, Talaly P, Cho CG, Posner GH : A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: Isolation and elucidation of structure. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 89:2399-2403, 1993.