

배양심근세포에 있어서 Glucose oxidase의 독성에 대한 천오두의 영향

이정헌 · 이강창¹ · 김상수 · 홍기연 · 오연균 · 석승환 · 이갑상² · 진복희³ · 신흥철³ · 류도곤⁴ · 박승택*

원광대학교 의과대학, 1: 한의학 전문대학원, 2: 생명자원부, 3: 원광보건대학, 4: 한의과대학

Effect of Aconiti Radix on the Toxicity Induced by Glucose Oxidase in Cultured Myocardial Cells

Jung Hun Lee, Kang Chang Lee¹, Sang Su Kim, Gi Youn Hong, Yeon Kyun Oh, Seung Whan Suk, Gap Sang Lee², Bok Hee Jin³, Hong Chul Shin³, Do Gon Ryu⁴, Seung Taeck Park*

School of Medicine, 1: Graduate School of Oriental Medicine, 2: College of Life Science, 3: Wonkwang Health Science College, 4: College of Oriental Medicine, Wonkwang University

Cytotoxicity of glucose oxidase(GO) and neuroprotective effect of Aconiti Radix(AKR) against GO-induced neurotoxicity were measured for elucidating the mechanism of cardiotoxicity on cultured mouse myocardial cells by MTT assay after myocardial cells were cultured for 24 hours at various concentrations of GO. GO was toxic in a time- and dose-dependent manner on cultured myocardial cells after myocardial cells were grown for 24 hours in media containing 5~40μU/ml GO. While, cultures were pretreated with 50 μg/ml AKR for 2 hours increased remarkably cell viability. From the above results, it is suggested that GO is toxic on cultured mouse myocardial cells by the decrease of cell viability, and herb medicine such as AKR is very effective in the prevention of myocardial toxicity induced by GO.

Key words : Glucose oxidase, cultured myocardial cell, aconiti radix

서 론

산소자유기는 항산화계를 손상시켜 항산화효소의 산소라디칼 제거능을 손상시킴으로서 심혈관질환을 비롯한^{1,2)}, 뇌졸중 및³⁾ 근위축성측삭경화증⁴⁾과 같은 만성난치성질환의 병인으로 밝혀지고 있다⁵⁾. 특히, 산소자유기는 심허혈이나 심경색과 같은 심장질환에서 심근세포에 대하여 산화적 손상을 초래한다고 제시되고 있다⁶⁾. 산소자유기와 glutamate 수용체에 관한 연구에서 산소자유기는 흥분성아미노산을 분비케 함으로서 이차적으로 세포의 손상을 초래한다고 보고됨으로서^{5,7)}, 산소자유기와 흥분성아미노산간의 작용기전을 규명하려는 많은 연구가 진행되고 있다^{8,9)}. 산소자유기에 의하여 분비된 흥분성아미노산은 N-methyl- D-aspartate(NMDA) 수용체를 과활성화시킴으로서 세포내로의 칼슘유입을 촉진시켜 그 결과 세포의 퇴화나 사멸을 초래한다고 알려져 있다^{10,11)}. 더욱이 과량 축적된 산소자유기는 세포내 nitric oxide(NO)와 상호 작용하여 peroxynitrite라는 독성이 강한 물질을 생성함으로써 병변

을 더욱 가속화시킨다고 한다^{7,12)}. 이와같이 다양한 산소자유기의 작용기전에 비추어 아직까지 산소자유에 의한 독성효과에 대한 기전은 잘 알려져 있지 않으며¹³⁾, 특히 산소자유기와 NMDA수용체간의 상호작용에 대해서는 많은 연구가 되어 있지 않다⁴⁾. 많은 연구에서 한약추출물중에서 산소자유기에 의하여 매개되는 각종 심장질환이나 신경병변의 치료에 매우 효과적인 약리활성물질을 가지고 있다는 것이 제시되어 지고 있다^{10,14)}. 그러나 이에 관한 연구는 소수에 불과하며 더욱이 약재추출물의 방어효과에 대한 기전에 대해서는 지금까지 많이 알려져 있지 않다⁸⁾. 다행히도 근래에 세포배양기술이 널리 보급되면서 각종 실험 목적에 부합한 세포의 배양과 이를 이용한 병변의 손상모델의 개발에 힘입어 다양한 질환의 병리적 요인이나 독성효과의 기전 및 약재추출물의 효능검색 등에 널리 이용되고 있다¹³⁾. 이와 더불어 시험관내에서의 정확한 독성분석방법의 개발과 함께 이를 적용시킨 정량 및 정성 분석은 질환의 방어나 치료적 접근방법을 더욱 용이하게 하였다¹⁵⁾. 본 연구는 산소자유기의 산화적 손상에 의한 심근독성을 조사하기 위하여 glucose oxidase(GO)가 여러 농도로 포함된 배양액에서 생쥐의 심근세포를 배양한 다음 GO의 독성효과를 시험관내 분석방법(in vitro assay)으로 조사하였으며 동시에 GO의 심근독성에 대한 천오두의 방어효과를 조사하였다.

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

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

· 접수: 2002/03/26 · 수정: 2002/04/30 · 채택 : 2002/05/27

재료 및 방법

1. 재료

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

2. 방법

1) 세포배양

심근세포의 분리는 Kasten³⁾의 방법에 따라 시행하였다. 생쥐의 심장조직으로 부터 분리된 심근세포를 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 증균속이 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 심근세포를 0.6% D-glucose가 포함된 MEM으로 3회 세척한 후 5~40mU/ml 농도의 GO가 포함된 배양액에서 백서의 심근세포를 6~48시간 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 50-250 μg/ml의 농도로 각각 포함된 천오두를 배양 심근세포에 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 심근세포의 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

5~40 mU/ml의 GO가 포함된 배양액에서 세포를 24시간 동안 배양한 후 GO가 배양 심근세포에 미치는 독성효과를 MTT assay에 의하여 분석한 결과 세포의 생존율이 대조군(100%)에 비하여 5 mU/ml에서는 78.4%로 나타났으며 10 mU/ml에서는 65.2%로 나타났다. 또한 20 mU/ml와 40 mU/ml에서는 각각 50.6% (p<0.05)와 32.7%(p<0.01)로 유의하게 낮게 나타났다(Fig. 1).

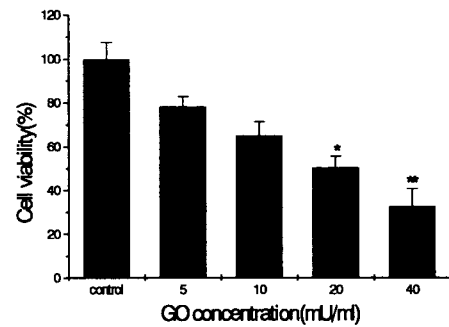


Fig. 1. Dose-dependent response relationship of glucose oxidase (GO) in cultured myocardial cells of mouse. Cytotoxicity was measured by MTT assay. The results indicate the mean±SD for 6 experiments. *p<0.05; **p<0.01

2) 시간에 따른 영향

시간의 변화에 따른 GO의 독성효과를 조사하기 위하여 20 mU/ml GO가 포함된 배양액에서 6~48시간 동안 배양한 결과 대조군(100%)에 비하여 세포의 생존율은 6시간 배양에서는 75.4%로 나타났으며, 12시간 배양한 군에서는 58.9%로 나타났다. 또한 24시간과 48시간 배양한 군에서는 49.2%(p<0.05)와 35.6% (p<0.01)로 유의하게 낮게 나타났다(Fig. 2).

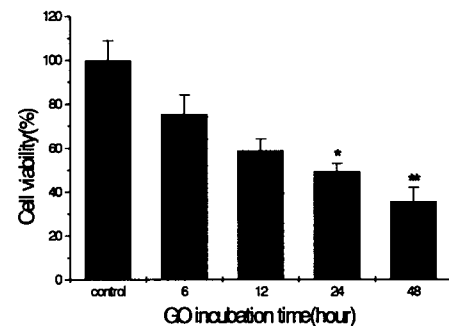


Fig. 2. Time-dependent response relationship of glucose oxidase (GO) in cultured myocardial cells of mouse. Cytotoxicity was measured by MTT assay. The results indicate the mean±SD for 6 experiments. *p<0.05; **p<0.01

2. GO의 독성에 대한 천오두(AKR)의 효과

50~250 μg/ml AKR을 처리한 후 GO의 독성에 대한 천오두의 독성방어 효과를 조사한 결과 GO만을 처리한 경우 세포의 생존율은 대조군(100%)에 비하여 41.3%로 나타났으나, 50 μg/ml

g/ml AKR에서는 56.8%로 나타났으며, 150 μ g/ml에서는 75.2%로 나타났다. 또한 250 μ g/ml 처리에서는 89.7%($p<0.01$)로 나타나 GO만의 처리군(41.3%)에 비하여 매우 유의하게 높게 나타났다(Fig. 3).

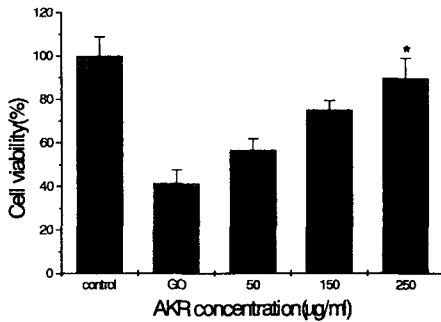


Fig. 3. Dose-response relationship on Aconiti Kusnezofii Radix (AKR) for its neuroprotective effect on glucose oxidase(GO). The results indicate the mean \pm SD for 6 experiments. * $p<0.05$; ** $p<0.01$

고찰

산소라디칼들은 심근세포를 비롯한 많은 세포에 있어서 막의 단백질이나 지질등을 산화시킴으로서 세포손상을 유발한다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다⁹. 특히 glucose oxidase(GO)에 의한 산소라디칼의 생성은 세포의 항산화효소나 세포산화전달체계에 영향을 줌으로서 세포의 퇴화 내지는 사멸을 초래한다^{5,9}. 그러나 산소자유기의 산화적 손상에 의한 심근독성에 대한 기전이나 작용현상들에 대해서는 아직 잘 알려져 있지 않다³. 따라서 본 연구에서는 GO에 의한 산화적 손상이 심근세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 생쥐의 심장조직으로부터 순수분리 배양한 심근세포에 5~40mU/ml의 GO가 각각 포함된 배양액에서 심근세포를 처리한후 MTT assay에 의하여 세포의 생존율을 조사한 결과 GO는 심근세포에 처리한 시간과 농도에 비례하여 세포생존율을 유의하게 감소시켰다. 본 실험의 이같은 결과는 심장 질환에 노출된 후 산소자유기에 의한 심근독성에 대한 보고나¹⁴, 또는 산소자유기가 심근의 세포소관에 독성효과를 나타냈다는 보고와 일치함을 알 수 있었다¹⁰. 본 실험의 연구 결과나 타 연구자들의 실험 결과들은 산소자유기가 생쥐의 배양 심근세포에 독성을 가지고 있음을 말해주며 이같은 산소자유기의 심근독성은 아마도 GO가 심근내의 사립체의 효소의 기능을 저하시킴으로서 세포손상을 손상했을 것으로 생각된다¹⁵. 이같은 이유로는 MTT assay에 의한 사립체내의 succinic dehydrogenase에 의한 formazan MTT의 양이 감소됨으로서 세포의 생존율이 저하되었기 때문이다¹⁴. 그러나 또 하나의 GO의 산화적 손상이 세포내 superoxide dismutase(SOD)나 catalased와 같은 세포내 항산화효소의 활성을 저하시킴으로서 그 결과 항산화효소에 의해서 제거되지 못한 산소라디칼들이 세포를 직접 손상시켰을 가능성도 배제할 수는 없다⁹. 흥분성아미노산의 분비유도로 인해 이차적으로 NMDA 수용체의 자극과 세포내 칼슘농도의 증가로 세포손상을 유발했을 가능성이 클 것으로 생각된다^{5,6}. 한편, GO

의 산화적 손상에 대한 한약추출물인 천오두(Aconiti Radix, AKR)의 방어효과를 조사하기 위하여 AKR이 50~250 μ g/ml의 농도로 각각 포함된 배양액에서 심근세포를 2시간 동안 처리한 다음 이를 다시 20mU/ml GO에 24시간 동안 처리한 결과 세포생존율은 AKR을 세포에 처리한 농도에 비례하여 세포의 생존율을 증가시켰다. 특히 250 μ g/ml AKR의 처리에서는 세포생존율이 89.7%로 나타나 이는 GO만을 처리했을 때의 생존율인 41.3%에 비하면 유의하게 증가하였다($p<0.05$). 본 실험에서 AKR에 의한 세포생존율의 증가는 AKR이 GO의 산화적 손상을 방어해주는 약리활성을 가지고 있음을 제시하고 있다⁹. 이는 아마도 천오두의 성분을 이루고 있는 aconitine을 비롯하여 mesaconitine이나 talatisamine과 같은 성분들이 단독 또는 복합적으로 작용하여 산화적 손상에 효과적인 약리적 활성을 나타냈을 가능성을 클 것으로 생각된다¹³. 그러나 AKR의 항산화효과에 대한 더욱 정확한 기전규명을 위해서는 항산화계의 측면을 비롯하여 흥분성아미노산과 활성산소와의 관계 및 glutamate 수용체등의 측면에서 종합적인 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

결론

Glucose oxidase(GO)의 독성기전과 GO의 독성에 대한 천오두(Aconiti Radix)의 효과를 조사하기 위하여 생쥐의 심근세포를 순수 분리배양한 후 5~40mU/ml GO가 각각의 농도로 포함된 배양액에서 24시간 동안 배양한 다음 MTT assay에 의한 세포생존율을 조사하였다. 그 결과 GO는 세포에 처리한 농도와 시간에 비례하여 심근세포의 생존율을 유의하게 감소시킴으로서 세포독성을 나타냈다. 한편, 배양 심근세포를 50 μ g/ml 천오두 포함된 배양액에서 2시간 동안 전처리한 결과 세포생존율은 유의하게 증가하였다.

이상의 결과로부터 GO는 생쥐의 배양 심근세포에 심근독성을 나타냈으며 천오두가 GO의 독성에 대하여 유효한 방어효과를 보였다.

감사의 말

이 논문은 2001년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 연구됨

참고문헌

1. Row GT, Manson NH, Caplan M, Hess MC : Hydrogen peroxide and hydroxyl radical mediation of activated leukocyte depression og cardiac sarcoplasmic reticulum : Participation of cyclooxygenase pathway. Cir Res 53 : 584-591, 1983.
2. 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.
3. Kasten FH : Cytology and cytochemistry of mammalian myocardial cells in culture. Acta Histochem 9:637-647, 1971

4. 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.
5. 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.
6. Toraason M, Breitenstein M : Intracellular calcium transients in cardiac myocytes exposed to carbon tetrachloride(Abstract). *Toxicologist* 11 : 310, 1991.
7. 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.
8. 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 alpa-tocopherol administration. *Stroke* 14:977-982, 1983.
9. 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.
10. Witting L. A. : 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.
11. 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
12. Przyklenk K, Kloner RA : Superoxide dimutase plus catalase improve contractile function in the canine model of "stunned myocardium" . *Cir Res* 58 : 149, 1986.
13. Michikawa M, Lim KT, McLarnon JG, Kim SU : Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. *J Neurosci Res* 37:62-70, 1994.
14. Myers ML, Bolli R, Lekich RF, Hartley CJ, Poberts R : Enhancenent of recovery of myocardial function by oxygen free radical scavengers after reversible regional ischemia. *Circulation* 72 : 915-921, 1985.
15. Mosmann T : Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxic assays. *J Immun Methods* 65 : 55-63, 1983.