

Hydrogen peroxide로 손상된 대뇌신경세포에 미치는 오미자의 효과에 관한 연구

이중화 · 양현웅 · 박상면 · 이강창^{1*}

원광대학교 의과대학, 1: 원광대학교 한의학 전문대학원

Effect of Schisandrae Fructus on Cultured Mouse Cerebral Neurons Damaged by Hydrogen Peroxide

Joung Hwa Lee, Hyun Woong Yang, Sang Myeon Bak, Kyo Sang Yoo^{1*}

School of Medicine, 1: Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan

It has been suggested that oxidative stress of reactive oxygen species(ROS) may play a key role in the pathogenesis of neuronal complications. The aim of this study was to examine the cytotoxic effect of hydrogen peroxide(H₂O₂) in the cultured mouse cerebral neurons and the protective effect of Schisandrae Fructus(SF) on ROS-induced neurotoxicity. Cytotoxic effect of H₂O₂ and neuroprotective effect of SF were determined by MTT assay. H₂O₂ decreased cell viability in dose-and time-dependent mannner, and SF decreased H₂O₂-induced neurotoxicity in these cultures. From above the results, H₂O₂ has toxic effect, and herb extract, SF is very effective against H₂O₂-induced neurotoxicity in cultured cerebral neurons of mouse.

Key words : Neurotoxicity, Cultured mouse cerebral neuron, Schisandrae Fructus

서 론

활성산소는 뇌졸중을 비롯하여 근위축성측삭경화증 및 치매의 병인으로 작용한다는 보고에 따라¹⁾, 활성산소의 산화적 손상이 관여한다고 제시된 바 있다^{2,3)}. 활성산소의 산화적 손상은 지질과산화반응을 비롯하여 고혈당에서의 적혈구 기능의 소실 등을 유발함은 잘 알려져 있으며⁴⁾, 특히 활성산소의 산화적 스트레스(oxidative stress) 및 지질과산화를 통하여 중추신경계내 단백질의 합성계나 이차전달자등에 손상을 준다고 한다^{1,5)}. 특히, 활성산소의 산화적 손상은 신경세포에 있는 superoxide dismutase(SOD)와 catalase의 활성을 감소시킨 반면 세포내 효소의 변성을 초래함으로써 병변을 촉진시킨다고 밝혀졌다⁶⁾. 활성산소의 산화적 손상은 신경병증에 관여할 뿐만 아니라^{2,7)}, 포도당과 당화단백질의 자동산화시 자유라디칼(free radicals)의 생성으로 세포 손상을 유도한다고 알려져 있다^{4,8)}. 그러나 아직까지 활성산소의 산화적 손상에 대한 자세한 기전은 물론 활성산소의 산화적 손상과 신경독성에 대한 상호관계에 대하여도 정립되어 있지 않다

^{9,10)}. 한편, 활성산소의 산화적 손상과 칼슘채널과의 연구에서 활성산소는 흥분성아미노산의 분비유도로 세포의 N-methyl-D-aspartate(NMDA) 수용체를 과활성화 시켜 그 결과 세포내 칼슘의 유입을 촉진시킴으로서 세포의 퇴화를 유발하며 동시에^{4,11)} Ca²⁺-dependent protein kinase C(PKC)의 발현을 과도하게 증가시켜 세포증식과 세포분화에 커다란 영향을 미치게 된다^{8,12)}. 한편 각종 배양 신경세포를 병변의 모델로 한 많은 연구에서 한약 추출물이 항암작용을 비롯하여 항산화효과를 나타내는 약리활성을 나타냄으로서 각종 암의 치료나 활성산소에 의한 신경병변의 치료에 효과적이라고 보고되어지고 있다¹³⁾. 근래에 세포배양기술이 보급되면서 각종 신경세포를 배양한 후 독성물질의 검정을 비롯하여 신약재의 효능검색, 동식물의 천연물이나 한약추출물의 효능검정 및 특정 병변에 대한 기전을 밝히려는 연구가 시도되고 있다¹⁴⁾. 특히, 신경세포배양을 이용한 연구는 세포 배양에 대한 고도의 기술이 요구되기는 하지만 단 시간 내에 다량의 실험재료를 얻을 수 있어 동일한 실험을 반복함으로써 실험적 재현성이 뛰어나다는 잇점이 있으며 동시에 처리 약재의 영향에 대한 병인적 현상을 형태를 비롯하여 약리 및 생화학적 등과 같은 종합적인 측면에서의 분석이 가능하다는 장점이 있다^{2,15,16)}.

본 연구는 활성산소의 독성을 산화적 손상측면에서 조사하

* 교신저자: 이강창, 경기도 군포시 산본동 1126-1, 원광대학교 부속한방병원
E-mail : kcl207@wonkwang.ac.kr Tel : 031-390-2367

· 접수 : 2002/11/06 · 수정 : 2002/12/10 · 채택 : 2003/01/23

기 위하여 생쥐의 대뇌신경세포를 배양한 후 농도별로 H₂O₂를 처리한 다음 이의 세포독성효과를 비롯하여, H₂O₂에 대한 항산화제인 한약추출물의 일종인 오미자(Schisandrae Fructus, SF)의 효과를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양

대뇌신경세포의 분리는 Michikawa 등⁹⁾의 방법에 따라 시행하였다. 생후 3일된 생쥐에서 적출한 뇌조직을 0.25% trypsin이 포함된 phosphate buffered saline(PBS)으로 처리한 후 36°C, 5% CO₂/95%air로 조절된 항온기 내에서 배양하였다. 배양 완료 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 전 처리된 96-multiwell에 3×10⁶cells/well의 밀도로 세포를 분주하였다. 분주된 세포는 3일 간격으로 새로운 배양액으로 교환하여 주었으며 7일 동안 배양후 본 실험에 사용하였다.

2. 약재추출

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. 약제제조

본 실험에서 사용한 약제인 hydrogen peroxide (H₂O₂, Sigma)는 1M, 100mM, 10mM의 저장액을 각각 만들어 냉암소에 보관 후 실험당일 최종 농도로 희석하여 사용하거나 직접 필요한 양을 배양액에 첨가하여 사용하였다.

4. H₂O₂ 노출

H₂O₂가 대뇌신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 일정시간 배양중인 신경세포를 0.6% D-glucose가 포함된 minimum essential medium(MEM, Gibco)으로 3회 세척 후 20 μM의 H₂O₂가 포함된 배양액에서 신경세포를 2~8시간 동안 배양한 후 H₂O₂가 세포에 미치는 독성효과를 조사하였다.

5. 약재처리

일정 시간 동안 배양이 완료된 대뇌신경세포를 PBS로 3회 세척한 다음 30~120 μg/ml의 농도로 각각 포함된 오미자(Schisandrae Fructus, SF)에서 2시간 동안 전처리한 다음 이를 20 μM H₂O₂에 노출시켜 이의 효과를 조사하였다.

6. 세포생존율 분석

H₂O₂가 대뇌신경세포에 미치는 독성효과를 분석하기 위하여 5~40 μM H₂O₂가 각각 포함된 배양액에서 세포를 배양한 후 세포의 생존율을 MTT assay¹⁴⁾으로 측정하였으며 또한 H₂O₂에

의해서 유도된 신경독성에 대한 오미자(SF)의 효과를 MTT assay¹⁶⁾로 조사하였다. MTT assay는 Mosmann¹⁴⁾의 방법에 따라 행하였다. 즉, 신경세포를 일정시간 배양후 PBS로 서너번 수세한 다음 well당 최종 농도가 5 μg/ml가 되도록 MTT를 넣어 4시간 동안 항온기에서 배양하였다. 배양 완료 후 fomazan MTT를 용해한 후 Microelisa reader를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

결 과

1. H₂O₂의 독성효과

1) 농도에 따른 영향

H₂O₂가 5~40 μM의 농도로 각각 포함된 배양액에서 생쥐의 대뇌신경세포를 6시간 동안 노출시킨 후 세포의 생존율을 MTT assay에 의하여 분석한 결과 5 μM과 10 μM H₂O₂를 처리한 경우 대조군에 비하여 각각 78.7%와 72.4%로 나타났다. 또한 20 μM과 40 μM H₂O₂ 처리군에서는 51.4%(p<0.05)와 42.6%(p<0.01)로 대조군에 비하여 유의하게 감소되었다(Fig. 1).

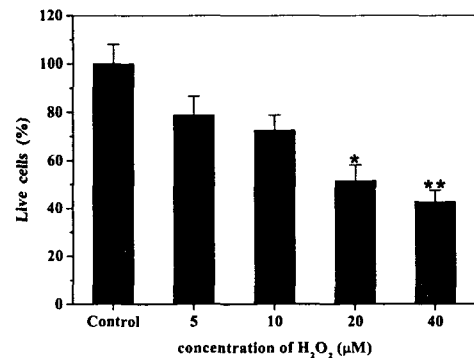


Fig. 1. Dose-relationship of hydrogen peroxide(H₂O₂). H₂O₂-induced neurotoxicity was measured by MTT assay in cultured mouse cerebral neurons. Cultured cells were exposed to 5, 10, 20 and 40 μM H₂O₂ for 6 hours, respectively. The results indicate the mean±SD for 6 experiments. *p<0.05; **p<0.01

2) 시간에 따른 영향

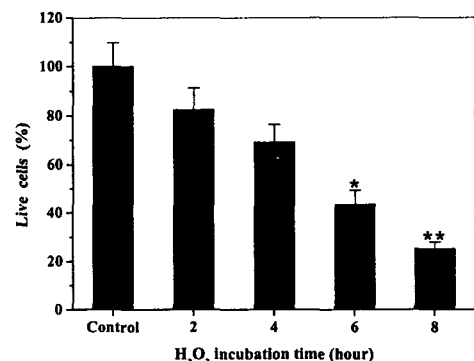


Fig. 2. Time-relationship of hydrogen peroxide(H₂O₂). H₂O₂-induced neurotoxicity was measured by MTT assay in cultured mouse cerebral neurons. Cultured cells were exposed to 20 μM H₂O₂ for 2, 4, 6 and 8 hours, respectively. The results indicate the mean±SD for 6 experiments. *p<0.05; **p<0.01

시간의 변화에 따른 H₂O₂의 영향을 조사하기 위하여 20 μM H₂O₂가 포함된 배양액에서 신경세포를 2~8 시간 동안 배양한 결과 세포의 생존율이 1시간 배양한 경우, 대조군에 비하여 82.6%로 나타났으며 4시간 배양에서는 69.2%로 나타났다. 그러나 6시간과 8시간 배양에서는 각각 43.6%(p<0.05)와 25.4%(p<0.01)로 나타나 유의하게 감소하였다(Fig. 2).

2. 한약추출물의 방어효과

배양 대뇌신경세포를 20 μM H₂O₂에 노출시키기 2시간 전에 오미자추출물(SF)이 30~120 μg/ml 농도로 포함된 배양액에서 각각 전처리한 다음 이에 대한 영향을 MTT assay에 의하여 조사한 결과 H₂O₂를 처리한 경우 세포생존율은 41.5%로 나타난 데 비하여 30 μg/ml SF를 전 처리한 경우는 53.8%로 나타났다. 그러나 60 μg/ml를 전 처리한 경우 62.7%로 나타났으며 특히, 120 μg/ml의 처리에서는 76.4%로 나타나 H₂O₂의 처리에 비하여 유의하게 높게 나타났다(p<0.05)(Fig. 3).

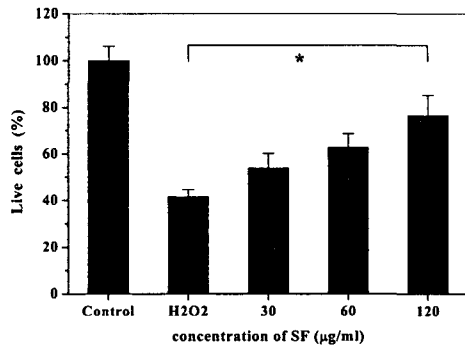


Fig. 3. A dose-response relationship of Schisandrae Fructus(SF) for its neuroprotective effect of hydrogen peroxide(H₂O₂) by MTT assay in cultured mouse cerebral neurons. Cultured cells were preincubated for 2 hours before exposed to 20 μM H₂O₂. The results indicate the mean ±SD for 6 experiments. *p<0.05

고 찰

최근 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)의 발생에 활성산소가 관여한다고 보고되면서¹⁾, 신경병증과 활성산소에 의한 세포의 손상간의 병인적 기전을 밝히려는 연구가 활발히 수행되어져 왔다^{5,16)}. 더욱이 활성산소가 산소라디칼에 의한 산화적 손상과 밀접한 관련이 있다고 제시되면서^{2,7)}, 활성산소의 독성을 산화적 손상 측면에서 밝히려는 연구가 시도되었다^{3,15)}. 그러나 이에 대해서는 아직까지 자세히 정립되어 있지 않다^{4,11)}. 따라서 본 연구는 활성산소의 산화적 손상과 신경독성과의 기전을 규명하기 위하여 생쥐의 배양 대뇌신경세포를 5~40 μM H₂O₂의 농도가 각각 포함된 배양액에서 6시간 동안 배양한 결과 세포의 생존율이 신경세포에 처리한 농도에 비례하여 유의하게 감소되었다. 이같은 결과는 H₂O₂가 대뇌신경세포에 신경독성효과를 가지고 있음을 말해주며, 이는 또한 Park등¹⁶⁾의 보고와도 일치하는 소견이라 하겠다. 한편, 활성산소의 산화적 손상은 glutathione을 비롯하여 vitamin E, catalase와 같은 산소라디칼

제거제나^{6,15)}, 또는 N-methyl-D-aspartate(NMDA) 수용체의 길항제들에 의해서 방어되었다고 보고 된 바 있다^{2,10)}. 최근에 이 밖에도 한약추출물들이 활성산소의 산화적 손상에 대한 방어효과를 가지고 있다는 연구 결과들이 보고되면서 한약추출물의 성분 중 항산화적 약리활성을 갖는 물질의 추출에 많은 관심을 쏟고 있다¹³⁾. 따라서 본 연구에서는 H₂O₂의 신경독성에 대하여 한약추출물인 오미자(SF)의 영향을 세포생존율의 측면에서 조사하기 위하여 20 μM H₂O₂에 처리하기 2시간 전에 30~120 μg/ml의 농도로 SF가 각각 포함된 배양액에서 처리한 결과 H₂O₂만의 처리에 비하여 SF의 처리농도에 비례하여 세포의 생존율이 증가하였으며 특히 120 μg/ml의 처리에서는 H₂O₂만의 처리에 비하여 유의한 증가를 보였다(p<0.05). 본 실험의 이같은 결과는 H₂O₂의 독성이 SF에 의하여 방어되었음을 말하고 있으며 이는 SF의 성분 중 H₂O₂의 산화적 손상에 대한 항산화능을 가지고 있음을 알 수 있다^{2,13)}. 그러나 H₂O₂의 산화적 손상에 대한 신경세포의 손상이나⁸⁾, 오미자와 같은 한약추출물의 항산화 효과에 대한 연구는 항산화효소의 활성이나 항산화와 관계된 유전인자의 활성 측면에서 더 많은 연구가 이루어져야 될 것으로 생각한다.

결 과

산화적 손상은 신경질환에 있어서 중요한 병인의 하나로 알려져 있다. 본 연구는 생쥐의 배양 대뇌신경세포에 대하여 H₂O₂의 산화적 손상을 조사하였으며 또한 H₂O₂의 산화적 손상에 대한 한약추출물인 오미자(Schisandrae Fructus, SF)의 효과를 MTT assay에 의하여 조사하였다. 20 μM H₂O₂를 신경세포에 처리한 결과 처리 농도와 시간에 비례하여 세포생존율을 감소시켰다. 한편, SF는 H₂O₂에 의해 유도된 신경독성을 감소시켰다.

이상의 결과에서 H₂O₂는 생쥐의 배양 대뇌신경세포에 독성을 나타냈으며 SF는 H₂O₂에 의하여 유도된 신경독성을 방어하는데 매우 효과적인 것으로 나타났다.

감사의 말

이 논문은 2001년도 두뇌한국 21과 원광대학교 교비의 일부 지원에 의해서 연구됨.

참고문헌

1. Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carrla V, Moroni F: Excitatory amino acid and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J Neurosci* 10:1035-1041, 1990.
2. 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.
3. Kumar JSS, Menon VP: Effect of diabetes on levels of lipid peroxides and glycolipids in rat brain. *Metabolism*

- 42:1435-1439, 1993.
4. Biessels GJ, Kappelle AC, Bravenboer B, Erkelens DW, Gispen WH: Cerebral function in diabetes. *Diabetologia* 37:643-650, 1994.
 5. Halliwell B : Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 59:1609-1623, 1992.
 6. Bracco F, Scarpa M, Rigo A, Battistin L : Determination of superoxide dismutase activity by the polarographic method of catalytic currents in the cerebrospinal fluid of aging brain and neurologic degenerative diseases. *Proc Soc Exp Biol Med* 196:36-41, 1991.
 7. Zeman S, Liloyd C, Meldrum B, Leigh PN : Excitatory amino acids, free radicals and the pathogenesis of motor neuron disease, *Neuropathol. Appl Neurobiol.*, 20:219-231, 1994.
 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. Niki E, Saito T, Kawakami A, Kamiya Y: Inhibition of oxidation of methyl linoleate in solution by vitamin E and vitamin C. *J Biol Chem* 259:4177-4182, 1984.
 10. Mayer M.L., and Westbrook G.L. : Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurons, *J. Physiol.*, 394:501-527, 1987.
 11. Jang YJ, Park H, Kim HS, Hong HN, Kim MK: The role of increased oxidative stress in the development of diabetic nephropathy. *Korean J Pharmacology* 31:95-102, 1995.
 12. Yamamoto M, Scima T, Uozumi 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.
 13. 이금수, 정현우, 강성용 ; 석창포가 백서의 뇌연막동맥의 직경에 미치는 기전연구. *대한본초학회지* 15(2):1-7, 2000.
 14. Mosmann T: Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxic assays. *J Immun Methods* 65:55-63, 1983.
 15. Ceriello A, Giugliano D, Quatraro A, Donzella C, Dipalo G, Lefebvre PJ: Vitamin E reduction of protein glycosylation in diabetes. *Diabetes Care* 14:68-72, 1991.
 16. Park ST, Lim KT, Chung YT, Kim SU: Methylmercury-induced neurotoxicity in cerebral neuron culture is blocked by antioxidants and NMDA receptor antagonists. *Neurotoxicol* 17:37-46, 1996.