

중추신경의 방사선 조사와 회복효과: 항산화제와 NMDA-receptor 길항제의 작용

문연자 · 박승택 · 최민규 · 정동혁* · 문성록* · 정연태
원광대학교 의과대학 해부학교실, *방사선종양학 교실

Irradiation in Central Nervous System and Recovery Effect: Action of Antioxidants and NMDA-receptor Antagonists

Yeun Ja Mun, Seung Taeck Park, Min Kyu Choi, Dong Hyeok Jeong*
Sun Rock Moon* and Yeun Tai Chung

Department of Anatomy, *Department of Radiation Oncology,
School of Medicine, Wonkwang University

(Received October 30, 1998; revised November 25, 1995)

ABSTRACT

The neurotoxic effects of radiation have been studied in NSC-34 hybrid cells derived from embryonic mouse spinal cord cells. NSC-34 cells irradiated at 25Gy were decreased the cell viability in a time and dose dependent manner. The decrease in cell viability induced by the irradiation was blocked by catalase. Antagonists of the N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor, including D-2-amino-5-phosphonovaleric acid (APV) and chlorokynurenic acid (CKA), similarly blocked radiational induced in cell viability. We performed morphological analysis of light and electron microscope. NSC-34 cells irradiated at 25Gy were decreased the cell density and increased lysosomes and vacuoles in the cytoplasm. Especially chromatin modification was observed. These results indicated that radiation was involved in the oxidant-initiated neurotoxicity and the compounds catalase, APV and CKA were shown to be neuroprotective against radiation.

Key words : Neurotoxic, Catalase, NMDA-receptor antagonist, Radiation, Electron microscope

서 론

1895년 독일의 물리학자 W.C Rontgen이 X선을 발견한 후 방사선은 인간생활 특히 의학에 있어서 많은 도움을 주었고 또 현재에도 많이 이용되고 있

다. 그러나 그 위해작용도 심각하여 이에 대한 많은 연구가 진행되어 왔으며 특히 분열하는 세포나 조직에 더 심한 손상을 일으킨다고 알려져 있다. 항암치료에 이용되는 방사선은 악성세포뿐만 아니라 정상 조직도 손상시키며 (Patt & Quastler, 1963) 신생원주의 머리에 방사선을 조사하였을 때 중추아교세

포의 크기가 작아지고 수초형성이 억제되며 수초의 두께가 얇아졌다(Schjeide *et al.*, 1966). 뇌 방사요법(cranial radiation therapy)을 받는 어린이들 사이에서도 신경정신학적 장애와 중추신경계의 병리적 변화의 빈도가 증가하였다(Dowell & Copeland, 1987). 이러한 방사선에 의한 세포손상의 생물학적 기전은 방사선이 세포내의 물을 이온화시켜 반응성이 강한 수산이온, 수소이온 그리고 수화비전하유리기를 형성하여 여러가지 화학반응 일으키며, DNA에도 직접적인 손상을 주게 된다(Finch, 1991; Malkinson, 1992).

1954년 Gershman 및 Gilbert은 산소가 가지는 특성으로 인하여 생성되는 산소 자유기(oxygen free radical)와 이것으로부터 유래된 산소 화합물들은 반응성이 높아서 산소에 의한 유해 작용이 일어난다는 가설을 제시하였다. 그 이후 산소 자유기에 대한 많은 연구가 이루어져 세포막의 lipid peroxidation과 함께 조직 손상을 비롯한(Agranoff, 1984; Kontos *et al.*, 1985), 약물 독성(Trush *et al.*, 1982) 및 염증 반응(Fentone & Ward, 1982)에서 나타나는 중요한 병리적 현상에도 관여한다는 사실이 밝혀졌고 각종 신경병변에도 관여하여 뇌와 척수 손상 후 신경원의 손상에 주원인이 된다고 하였다(Halliwell & Gutteridge, 1985; Rosen *et al.*, 1933; Saunders *et al.*, 1987). 최근 뇌질환의 하나인 Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)는 운동신경세포의 손상에 의한 것으로 지금까지 그 병리적 현상이 명확하게 규명되지 못하고 있으나 Mitchell (1989)은 산소유리기가 운동신경세포를 손상시키는 병리적으로인이라고 제시하였고, 이는 superoxide dismutase-1 (SOD-1) gene의 돌연변이에 의한 것으로 밝혀졌다(Rosen *et al.*, 1993).

따라서 산소유리기는 뇌질환과 밀접한 관계가 있으며 방사선조사시 생성되는 산소유리기는 중추신경세포에 병리적변화를 일으킬 것이다. 이에 본 연구는 방사선을 조사하였을 때 나타나는 중추신경세포의 변화와 항산화제(antioxidant)와 NMDA-receptor 길항제의 효과를 조사하고자 한다.

재료 및 방법

1. 세포배양

척수운동신경세포는 생쥐에서 유래한 척수운동신경세포종인 NSC-34 잡종세포주를 사용하였다. NSC-34세포를 Eagle's essential minimum medium (MEM)과 10% fetal bovine serum (FBS)이 포함된 배양액 내에 넣어 37°C, 5% CO₂/95% air로 조절된 항온기에서 배양하였다. 배양액은 3일 간격으로 교환하고, 세포는 배양 7일 후 계대배양하여 사용하였고, Pasteur피펫으로 세포를 분리하고 24 wellplate에 5×10⁴ cell/well의 밀도로 분주하여 실험에 사용하였다. 분주된 세포는 24시간 배양하여 안정시킨 후 실험에 사용하였다.

2. 방사선 조사와 억제처리

분주된 NSC-34세포에 방사선을 조사한 후 세포 생존률분석, 세포의 형태적 변화와 미세구조의 변화를 관찰하여 방사선이 운동신경세포에 미치는 영향을 분석하였다. 항산화제로는 Catalase (Sigma), Glutathione (Sigma)를 사용하였고, NMDA-receptor 길항제로는 CKA (7-chlorokynurenine acid, Sigma) 및 APV (D-2-amino-5-phosphonovalic acid, Sigma)를 사용하였다. 배양중인 NSC-34세포에 항산화제(catalase, glutathione)는 2시간동안 전처리한 후 방사선을 조사하였고, NMDA receptor 길항제(CKA, APV)는 처리 후 바로 방사선을 조사하여, 5일동안 배양한 뒤 항산화제와 NMDA-receptor 길항제의 방어효과를 관찰하였다. 방사선은 의료용 선형가속기(ML6M, Mitsubishi co., Japan)에서 방출되는 X-선을 사용하여 배양세포에 1Gy, 10Gy, 25Gy로 조사하였다.

3. 세포생존률 분석

세포의 생존률(cell viability)은 Mosman (1983) 방법에 따라 MTT Microelisa assay에 의해 분석하였다. 일정시간 배양된 NSC-34세포에 supravital dye인 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol)-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma)를 3시

간 처리한 후 PBS로 씻어내고 DMSO (dimethyl sulfoxide, Sigma)에 10분 동안 처리한 뒤에, Dynatech Microelisa reader로 490 nm에서 측정하였다.

4. 형태적 관찰

세포의 형태학적 관찰을 위하여 배양중인 세포를 도립위상차 현미경 (Nikon)으로 관찰하고 촬영하였다. 전자현미경적관찰을 위하여 배양된 세포의 일부는 2% glutaraldehyde/0.1 M phosphate buffer (pH7.4)로 1시간 동안 전고정하고 1% osmium tetroxide로 1시간 동안 후고정하였다. 다시 완충액으로 씻어내고 알콜(10%~100%)로 탈수한 뒤 epon에 포매하고 1 μ m 두께의 절편을 만들어 toluidine blue염색을 하여 관찰하였다. 일부는 얇은 절편을 얻어 uranyl acetate와 lead nitrate로 염색하여 TEM (Hitacchi 600)으로 관찰하였다.

결 과

1. 신경세포에 대한 방사선의 세포독성

배양중인 NSC-34세포에 방사선을 1Gy, 10Gy, 25Gy로 1회 노출시키고 5일동안 배양한 후 방사선이 신경세포에 미치는 영향을 관찰하였다. 방사선이 신경세포에 미치는 세포독성은 MTT assay로 세포 생존률을 관찰하였다. 방사선을 1Gy, 10Gy, 25Gy로 1회 조사하고 5일 후 관찰한 결과 방사선을 조사한 군에서는 방사선 조사량이 증가할수록 세포의 생존률이 감소하여 대조군에 비하여 1Gy 조사군은 74%, 10Gy 조사군은 40%, 25Gy 조사군은 25%로 나타났다 (Fig. 1, A). 또한 시간이 경과함에 따라 세포생존률이 감소하여 방사선 25Gy 조사군의 경우 방사선 조사 1일 후 세포생존률 63%에서 방사선 조사 5일 후 25%로 감소하였다 (Fig. 1, B). 방사선이 NSC-34세포에 미치는 형태학적 변화를 보면 방사선 25Gy 처리군에서는 방사선 조사 5일 후 관찰한 결과 대조군의 세포에 비하여 세포의 크기가 커지고 세포 밀도는 적어졌다. 세포의 모양이 분화된 형태를 보였고 세포질에 많은 과립과 공포가 형성되었다 (Figs. 4, 5). 세포의 미세구조를 관찰한 결과 방사선 25Gy 처리 군은 대조군의 세포에 비하여 세포질에 용해소

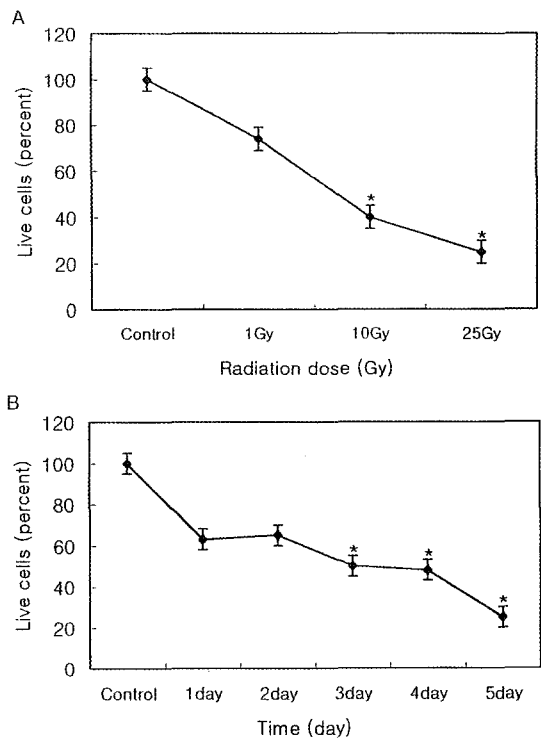


Fig. 1. A: A dose-response relationship of radiation on NSC-34 Cells. Cultures were irradiated at 1Gy, 10Gy and 25Gy. B: The time dependency of radiation on NSC-34 Cells. Cultures were irradiated at 25Gy and incubated with 1day, 2day, 3day, 4day and 5day. The results indicated the mean \pm SEM (n=3). *p>0.05

체 (lysosome)와 공포 (vacuole)가 많이 형성되었고 사립체 (mitochondria)의 수가 감소하였다. 특히 방사선 처리군은 염색질에 많은 변형을 나타내고 있었다 (Figs. 7, 8).

2. 항산화제와 NMDA-receptor 길항제의 효과

방사선을 조사하였을 때 나타나는 신경세포의 독성에 대한 항산화제와 NMDA-receptor 길항제의 방어효과를 관찰하였다. 항산화제로는 catalase와 glutathione을 사용하였고 NMDA-receptor 길항제로는 APV와 CKA를 사용하였다. NSC-34세포에 catalase 1 μ g, 10 μ g, 20 μ g을 처리하고, 2시간 후에 방사선 25Gy를 조사하여 5일 후 세포생존률을 관

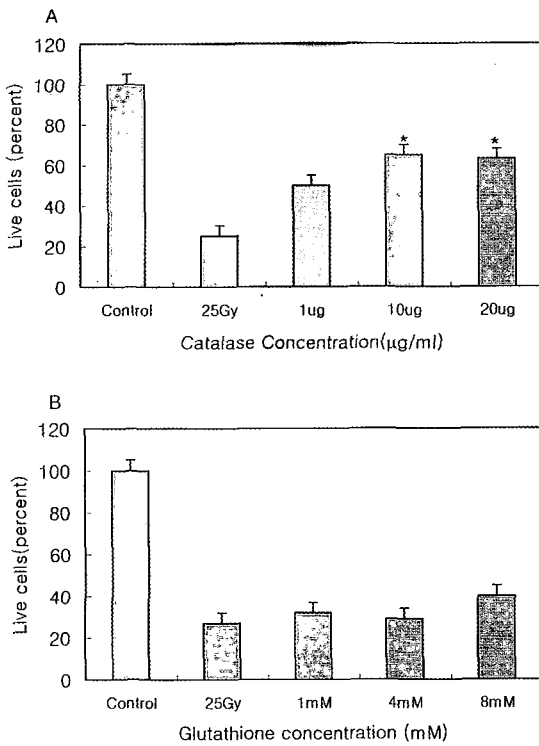


Fig. 2. The effects of catalase and glutathione as antioxidants. Cell viability was measured by MTT assay. A: Cultures were preincubated with 1, 10, 20 mg/ml catalase for 2 hr and irradiated at 25Gy. B: Cultures were preincubated with 1, 4, 8 mM glutathione for 2hr and irradiated at 25Gy. The results indicated the mean±SEM (n=3). *p>0.05

찰하였다. Catalase 처리군에서는 방사선 처리군의 세포생존률 25%에서 63%로 증가하여, catalase는 방사선의 세포독성에 대해 방어작용을 나타내고 있음을 알 수 있었다. glutathione처리군에서는 세포생존률이 1 mM에서 29%, 4 mM에서 32%, 8 mM에서 35%로 나타났다.

산소유리기는 손상된 신경세포로부터 흥분성 신경전달물질의 방출을 일으키고, 과다한 흥분성 신경전달물질에 의해 세포내 칼슘이 증가되어 세포독성을 일으킬 수 있으므로, 이 가능성을 조사하기 위하여 NMDA-receptor 길항제를 사용하였다. NMDA-receptor 길항제 APV와 CKA 처리군의 세포생존률은 25Gy 방사선 조사군의 25%에 비하여 APV 1

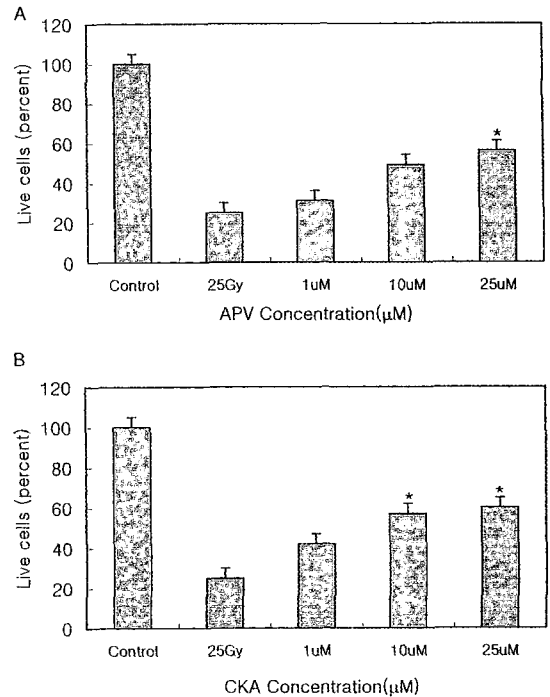


Fig. 3. The Effects of NMDA-receptor antagonist as neuroprotective agents. Cell viability was measured by MTT assay. A: Cultures were incubated with APV at the concentrations of 1, 10, 25 mM and irradiated at 25Gy. B: Cultures were incubated with CKA at the concentrations of 1, 10, 25 mM irradiated at 25Gy. The results indicated the mean±SEM (n=3). *p>0.05

μM, 10 μM, 25 μM에서 각각 31%, 49%, 56%로 나타났다. CKA 처리군에서도 1 μM, 10 μM, 25 μM에서 각각 42%, 57%, 60%로 나타났다.

세포의 변화를 광학현미경적으로 관찰한 결과 방사선 25Gy 처리군에서는 세포의 크기가 커지고 세포의 밀도가 감소하였으며 세포질에 과립이 형성되었고, catalase 처리군에서는 세포의 크기가 대조군과 비슷하여지고 세포질에 과립이 감소하였다 (Figs. 5, 6). 세포의 미세구조를 관찰한 결과 glutathione처리군에서는 방사선 처리군에 비하여 염색질의 변형은 적어졌으나 세포내에 용해소체가 다수 관찰되었고 염색질의 변형도 나타났다 (Fig. 9). APV와 CKA 처리군에서는 방사선처리군보다 염색질의 변형이 현

저히 적었고 세포질내에 용해소체와 공포의 수도 감소하였다(Figs. 10, 11). 따라서 NMDA-receptor 길항제 APV와 CKA는 방사선의 신경세포독성에 대해 방어효과를 나타내고 있음을 알 수 있다.

고 찰

방사선은 세포의 구조에 영향을 미치며 세포의 기능적 변화를 일으켜 의학적으로 진단분야와 함께 치료측면에서 널리 이용되고 있다. 방사선이 생물학적인 효과를 일으키는 기전은 세포내의 물을 이온화시켜 수소이온, 수산이온, 수산화전자유리기를 형성하여 화학적인 반응을 일으키거나, 세포에서 DNA 형성을 억제하고 염색체에 직접 손상을 주어 변성을 일으킨다(Finch, 1991; Malkinson, 1992).

방사선 조사시 중추신경세포에 미치는 방사선의 세포독성을 관찰하기 위하여 배양중인 NSC-34세포에 방사선을 조사한 결과 25Gy처리군에서 대조군에 비하여 세포생존률이 25%로 감소하였다. 또한 시간이 경과함에 따라 방사선 25Gy 조사 1일 후 63%에서 5일 후 25%로 감소하였다(Fig. 1). NSC-34세포에서 방사선 조사후 관찰한 형태학적 변화를 보면 대조군에 비하여 방사선을 조사한 군에서는 세포의 밀도가 감소하고, 세포의 크기가 커지면서 세포내 과립이 많이 형성되었다(Fig. 4). 세포의 미세구조 관찰 결과 방사선은 세포질의 구조에 많은 변형을 일으켰고 특히 염색질에 많은 변형을 초래하였다(Fig. 5). 시간이 지남에 따라 세포생존률이 감소하고 세포손상이 심해지는 것은 방사선이 세포질의 구조를 변화시켰을 뿐만 아니라 염색체 자체의 변화에 의한 영구적 손상으로 손상이 누적되어 세포생존률이 점차 감소된 것으로 보여진다.

산소유리기는 반응성이 높아 세포의 여러 가지 구조물에 변성과 파괴작용을 나타낸다(McCord, 1985). 그러나 생체에는 이러한 산소유리기의 독성 효과를 억제시켜주는 항산화제가 존재하며 SOD, catalase, glutathione, vitamine E, ascorbic acid, selenium 등과 같은 항산화제에 대한 많은 연구가 이루어져 왔다(Michikawa, et al., 1994; Park et al., 1996). 항산화제가 방사선에 의한 신경독성에

미치는 영향을 관찰한 결과 catalase 처리군에서 세포생존률 63%로 방사선에 의한 세포독성으로부터 회복효과를 나타냈다(Fig. 2, A). 이는 배양 척수신경세포(Michikawa et al., 1994)나 희돌기교세포(Kim et al., 1991)에서 산소자유기에 대한 catalase 방어 효과의 결과와 일치하였으며, catalase가 전처리 동안 세포내로 들어가 방사선의 신경독성으로부터 신경세포를 보호한 것으로 사료된다.

한편 뇌의 정상적인 기능을 유지하기 위해서는 흥분성과 억제성 신경전달물질이 필요하고 여러 가지 신경전달물질중 글루타민산염은 내재성 흥분전달물질로 작용한다. NMDA-receptor는 글루타민산염의 세가지 수용체중의 하나이며, 산소유리기는 신경세포로부터 흥분성 아미노산(excitatory amino acid)인 글루타민산염을 방출시키고, 이에 의해 NMDA-receptor가 활성화되면 Ca^{++} 통로가 열리고, 세포내 칼슘농도가 증가되면 여러효소들의 활성화에 의해 생화학적인 반응을 일으켜 세포에 독성을 나타내게 된다(Lipton and Rosenberg, 1994; Rothman et al., 1986; Zeman, 1994).

본 실험에서 방사선의 세포독성이 NMDA-receptor와 연관이 되어 있는지 알아보기 위하여, 방사선을 조사하였을 때 나타나는 신경세포의 독성에 대한 NMDA-receptor 길항제의 방어효과를 관찰하였다. NMDA-receptor 길항제인 APV와 CKA 처리군에서 세포생존률이 방사선 25Gy 조사군의 25%에 비하여 각각 56%와 60%로 증가하였다. 이는 방사선에 의한 신경독성작용에 NMDA-receptor 길항제가 방어효과를 나타내며, 또한 NMDA-receptor-ion channel 활성이 관여하고 있다는 사실을 시사한다.

결 론

본 실험은 방사선이 중추신경에 미치는 신경독성을 조사하고 항산화제와 NMDA-receptor 길항제의 방어효과를 관찰하였다. 항산화제로는 catalase와 glutathione을 사용하였고, NMDA-receptor 길항제로는 APV와 CKA를 사용하였다.

1. NSC-34세포에 방사선 25Gy를 1회 조사하고 5

일 후 관찰한 결과 세포생존률이 대조군에 비하여 25%로 감소하였고, 방사선의 세포독성은 시간이 경과함에 따라 증가하였다.

2. 항산화제 catalase 20 µg 처리군에서 대조군에 비하여 세포생존률 63%로 나타났다.

3. NMDA-receptor 길항제인 APV 25 µM에서 대조군에 비하여 세포생존률 56%, CKA 25 µM에서는 60%로 나타났다.

4. 광학현미경적관찰 결과 방사선 25Gy 처리군에서는 세포의 크기가 커지고 세포밀도가 감소하였으며 세포질에 과립이 형성되었고, catalase 처리군에서는 세포의 크기가 대조군과 비슷하여지고 세포질에 과립이 감소하였다.

5. 미세구조관찰 결과 방사선 25Gy 처리군에서는 세포질 내에 용해소체와 공포가 증가하였고, 염색질의 변형을 초래하였다. APV, CKA 처리군에서는 용해소체와 공포의 수가 감소하였으며 염색질의 변형도 현저히 감소하였다.

이상의 결과 방사선은 산소유리의 형성으로 신경독성을 초래하고, catalase, NMDA-receptor 길항제인 APV와 CKA는 방사선의 신경세포독성에 대해 방어효과를 나타내고 있음을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

- Agranoff BW, 1984. Lipid peroxidation and membrane aging, *Neurobiol. Aging*, 5, 337-338
- Dowell RE, Copeland DR, 1987. Cerebral pathology and neuro-psychological effects of cranial radiation as a function of age, [Review] *Am. J. Pediatr. Hematal. Oncol.* 9(1), 68-72
- Fentone JC, Ward PA, 1982. Role of oxygen-derived free radical and metabolites in leucocytes-dependent inflammatory reactions, *Am. J. Pathol.* 107, 397-418
- Finch SC, 1991. Radiation injury, In principles of internal medicine (12th ed.), eds. Braunwald EB, Isselbach KJ, Petersdorf RG, McGraw-Hill Book, New York, pp. 2204-2208
- Halliwell B, Gutteridge JMC, 1985. Free Radicals in Biology and Medicine, Clarendon Press
- Kontos H, Wei E, Ellis, Jenkis L, Povlishock J, Rowe G, Hess M, 1985. Appearance of superoxide anion radical in cerebral extracellular space during increased prostaglandin synthesis in cat, *Circ. Res.* 57, 142-151
- Kim YS, Kim SU, 1994. Oligodendroglial cell death induced by oxygen radicals and its protection by catalase. *J. Neurosci. Res.* 29, 100-106
- Lipton SA, Rosenberg PA, 1994. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders, *N. Engl. J. Med.* 330, 613-622
- Malkinson FD, 1992. Radiobiology of the skin, eds. Fitzpatrick TB, Eisen AZ, Wolff K, McGraw-Hill Press, New York, pp. 598-1608
- McCord JM, 1985. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury, *N. Engl. J. Med.* 312, 159-163
- Michell PJ and Tjian R, 1989. Transcriptional regulation in mammalian cells by sequence-specific DNA binding proteins, *Science* 245, 371-378
- Michikawa M, Lim KT, McLarnon and Kim SU, 1994. Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures, *J. Neurosci. Res.* 37, 62-70
- Mosman T, 1983 Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxic assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55-63
- Park ST, Lim KT, Chung YT, Kim SU, 1996. Methylmercury-induced neurotoxicity in cerebral neuron culture is blocked by antioxidants and NMDA receptor Antagonists, *Neuro Toxicology* 17(1), 1-9
- Patt HM, Quaster H, 1963. Radiation effects on cell renewal and related system, *Physiol. Rev.* 43, 357-396
- Rosem D, Siddique T, Patterson D, Figlewicz D, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, Regan J, Deng H, Rahmani Z, Krrizus A, 1993. Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis, *Nature (London)* 362, 59-62

- Saunders RD, Dugan LI, Demedink P, Means EC, Harrocks LA, Anderson DK, 1987. Effects of methyl prednisolone and the combination of alpha-tocopherol and selenium on arachidonic acid metabolism and lipid peroxidation in traumatized spinal cord tissue, *J. Neurochem.* 49, 24-31
- Schjeide OA, Yamazaki J, Haack K, Ciminelli E, Clement CD, 1996. Biochemical and morphological aspects of radiation inhibition of myelin formation, *Acta. Radiol.* 5, 185-203
- Trush MA, Mimnaugh EG, Gram TE, 1982. Activation of pharmacologic agents to radical intermediates : Implications for the role of free radicals in drug action and toxicity, *Biochem. Pharmacol.* 31, 3335-3346
- Zeman S, Liyod C, Meldrum B, Leigh PN, 1994. Excitatory amino acids, free radicals and the pathogenesis of motor neuron disease, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 20, 219-231

FIGURE LEGENDS

- Fig. 4.** After fifth day of control NSC-34cells. Cell size is small and cell density is high.
- Fig. 5.** After fifth day of sister culture irradiated with 25Gy. Cultured NSC-34cells are decreased density but increased cell size. The granulization is showed in the cytoplasm.
- Fig. 6.** After fifth day of sister culture preincubated with catalase. Cell size and cell density is recoverd.
- Fig. 7.** An electron micrograph of control NSC-34cell. Numerous mitochondria are found throughout the cytoplasm. Bar indicats 1 μ m.
- Fig. 8.** An electron micrograph of sister culture irradiated with 25Gy. The cells contain numerous vacuole and lysosome. Especially there is cromatin modification. Bar indicats 1 μ m.
- Fig. 9.** An electron micrograph of sister culture preincubated with glutathione. The cell contains numerous lysosome and chromatin modification. Bar indicats 1 μ m.
- Fig. 10.** An electron micrograph of sister culture treated with apv The number of mitochondrias are found, but the number of lysosomes are decreased. Bar indicats 1 μ m.
- Fig. 11.** An electron micrograph of sister culture treated with CKA. Chromatin modification is not found and the number of lysosommes are decreased. Bar indicats 1 μ m.

