

## 신경교세포주 C6 glial에서 Zinc의 Hydrogen Peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 생성을 통한 세포고사

이지현<sup>1,2</sup> · 김명선<sup>1</sup> · 소홍섭<sup>1</sup> · 김남송<sup>3</sup> · 조광호<sup>2</sup> · 이향주<sup>1</sup> · 이기남<sup>2</sup> · 박래길<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>원광대학교 의과대학 미생물학교실, <sup>2</sup>한의학전문대학원, <sup>3</sup>예방의학교실

### Zinc-induced Apoptosis in C6 glial Cells via Generation of Hydrogen Peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Jienny Lee<sup>1,2</sup>, Myung-Sunny Kim<sup>1</sup>, Hong-Seob So<sup>1</sup>, Nam-Song Kim<sup>3</sup>,  
Kwang-Ho Cho<sup>2</sup>, Hyang-Joo Lee<sup>1</sup>, Ki-Nam Lee<sup>2</sup> and Raekil Park<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbiology & <sup>2</sup>Professional Graduate School of Oriental Medicine,

<sup>3</sup>Preventive Medicine, Wonkwang University School of Medicine,

Iksan, Chonbuk 570-749 Korea

(Received April 4, 2000)

(Accepted September 19, 2000)

**ABSTRACT** : Zinc is known to generate reactive oxygen species (ROS) including superoxide anion and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), which eventually contribute to cytotoxicity in a variety of cell types. Here in, we demonstrated that zinc decreased the viability of C6 glial cells in a time and dose-dependent manner, which was revealed as apoptosis characterized by ladder-pattern fragmentation of genomic DNA, chromatin condensation and DNA fragmentation in Hoechst dye staining. Zinc-induced apoptosis of C6 glial cells was prevented by the addition of catalase and antioxidants including reduced glutathione (GSH), N-acetyl-L-cysteine (NAC) and pyrrolidinedithiocarbamate (PDTC). We further confirmed that zinc decreased intracellular levels of GSH and generated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in C6 glial cells. Moreover, antioxidants also decreased the generation of zinc-induced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in C6 glial cells. These data indicated that zinc-induced the apoptotic death of C6 glial cells via generation of reactive oxygen species such as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

**Key Words** : Oxidative stress, Zinc, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, C6 glial cells, Apoptosis

## I. 서 론

지금까지 우리 나라에서는 신경계 질환들이 그 중요성에도 불구하고 효과적인 치료가 불가능한 것으로 여겨져 기초의학 및 임상적 연구의 중심적 영역에서 소외되어 왔다. 그러나 우리 나라 인구의 사망원인 중 암 질환의 총체를 제외하고는 뇌 질환이 단연 선두에 있다. 이러한 신경계 질환만으로도 노년층의 건강이 위협받고 있고 이는 선진화에 따른 인구의 노령화로 점점 더 사회적인 문제로 등장하고 있는데, 다행히 최근에 여러 신경계 질환들의 병리적 기전들이 분자생물학의 발달로 인해 점차 밝혀지고 있다(Dugan 등, 1995). 많은 신경계 질환의 증상 발현에는

중추신경세포의 사멸이 주요한 원인으로 신경세포들이 선택적으로 퇴행, 사멸함으로써 신경세포의 인지 및 기능이 이상이 생겨 신경계 질환이 유발된다고 알려져 있다(Behl 등, 1994). 중추신경세포들은 대사성 손상을 비롯한 여러 종류의 화학적, 물리적 손상에 아주 민감하며 간세포나 근육에는 전혀 손상을 입히지 않는 짧은 시간 동안의 허혈(ischemia)에 의하여 과다방출된 아미노산 글루타메이트(glutamate)에 의해 흥분독성(excitotoxicity)이 이루어지고 신경세포는 비가역적인 손상을 입게 된다(Choi 등, 1987; Coyle 등, 1993; Derrick 등, 1997; Kato 등, 1992; Murphy 등, 1989). 현재 많은 연구들이 이러한 흥분독성이 신경세포 사멸의 주요 기전이라고 시사하고 있지만(Boast 등, 1988; Gill 등, 1988; McDonald 등, 1987; Ozyurt 등, 1988; Simon 등, 1984), 흥분독성 이외에 직접적인 산화성 손상(free radical injury)도 중추신경세포 사멸의 중요한 기전의 하나로 논의되고 있다(Gotz 등, 1990). 중추신경계

\*To whom correspondence should be addressed

Abbreviations used: ROS: reactive oxygen species, GSH: reduced glutathione, NAC: N-acetyl-L-cysteine, PDTC: pyrrolidinedithiocarbamate, MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium blomide.

에 존재하는 아연이 허혈성 신경세포 사멸에 관여한다는 많은 증거들이 보고되고 있다(Koh 등, 1994; Pamela 등, 1997). 즉 중추신경세포 말단에는 상당량의 아연이 시냅스 소포체 안에서 존재하고 신경세포 활동과 함께 세포 밖으로 방출되는데, 방출된 아연의 일부는 칼슘통과이온 통로를 통하여 시냅스 이후 신경세포로 이동하게 되고 이때 과다한 양의 아연이 세포 내로 유입되면 신경세포 사멸의 원인이 된다(Koh 등, 1994; Traves 등, 1994; Weiss 등, 1993). 아연의 유입이 세포 안에서 어떠한 대사적 경로를 통하여 신경세포 사멸을 일으키는지는 아직 명확히 알려져 있지 않지만 아마도 자유라디칼(free radical) 생성에 의한 산화성 손상이 관여한다고 보여지고(Aruoma 등, 1989; Savits 등, 1998; Taotao 등, 2000), 이러한 세포손상 기전들이 단독 또는 복합적인 기전으로 작용함으로써 신경세포 사멸을 초래하여 신경계 질환들이 유발된다고 보고되고 있다.

이러한 산화적 손상은 암, 근이형증, 알츠하이머병, 파킨슨씨병, 허혈성질환, 동맥경화증 그리고 일반적 세포노화에 관련한다. 세포내 아연의 유입으로 인한 세포 독성 및 작용기전에 관심이 모아지기 시작하면서 특히 체내 일차적인 방어작용을 담당하는 면역체계에서 아연의 독성기전 연구가 이루어지고 있고 여기에 세포고사(apoptosis)가 관여한다는 연구결과들이 제시되면서, 아연이 세포고사에 미치는 영향과 동시에 세포고사 기전에 많은 관심이 집중되고 있다(Barbieri 등, 1992; Koh 등, 1996).

본 연구에서는 아연의 세포 내 유입으로 인한 직접적인 독성기전을 연구하고자 하였다. 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)으로 인한 산화성 손상(oxidative stress)이 중추신경세포 사멸에 있어 아연에 의한 뇌세포독성의 중요한 기전으로 작용하였고 아연에 의한 세포 독성은 세포고사 기전의 활성화에 의한 결과이었으며 항산화제(antioxidants)가 산화성 손상을 방어하고 있음을 확인할 수 있었다. 아연에 의한 세포고사 현상 및 세포고사 과정에 관여하는 활성산소종의 역할과 관련하여 세포내의 활성산소종과 항산화제와의 관계를 규명함으로써 중급속의 세포고사 연구를 위한 기초자료를 제공하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시약

ZnCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>, glutathione(GSH), N-acetylcysteine(NAC), catalase, pyrrolidinedithiocarbamate(PDTC) 등은 Sigma(St. Louis, USA)사로부터 구입하여, phosphate buffered saline(PBS)으로 용해하였고 이 용액 모두를 0.2 μm(Millipore, Bedford, MA)필터로 통과시켜서 사용

하였다. 세포 및 핵 염색 관찰에 이용한 세포배양판은 Falcon(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)사로부터 구입하였고 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium blomide(MTT)와 염색시약 Hoechst 33258, horseradish peroxidase(HRP), 7-Hydroxy-6-methoxy-2H-1-benzopyran-2-one(scopoletin) 등은 Sigma(St. Louis, USA)사로부터 구입하여 사용하였다. Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM), fetal bovine serum(FBS), 항생제 및 trypsin 등은 GIBCO BRL(Grand Island, NY, USA)사로부터 구입하였다.

### 2. 세포 배양

백서의 신경교세포주인 C6 glial(rat glial tumor cell line)을 한국 세포주은행에서 분양받아 10% FBS가 포함된 DMEM 세포배양액으로 5% CO<sub>2</sub>, 95% 대기공기 및 37°C 세포배양기에서 배양하였다. 24시간 간격으로 trypsin을 이용하여 세포배양액을 교체하였으며, 배양액을 교체한 후 log phase에 있는 세포에서 ZnCl<sub>2</sub>에 의한 세포고사 현상과 이에 관련한 분자생물학적인 실험을 수행하였다.

### 3. 세포 생존율 측정

세포의 생존율 측정은 24 wells 세포배양판에 C6 glial 세포를 1×10<sup>5</sup> cells/ml씩 분주하고, ZnCl<sub>2</sub>를 농도별로 처리한 후 시간별로 관찰하면서 MTT로 3시간 반응을 시켰다. 살아있는 세포는 MTT로부터 보라색 불용성 formazan을 형성하고 이를 dimethyl sulfoxide(DMSO)로 용해하여 540 nm 파장에서 ELISA reader(Thermo max, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 측정된 formazan 생성 정도는 정상적인 세포의 활성도와 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

### 4. DNA 분절현상 확인

#### 1) DNA 추출 및 전기영동

DNA 분절현상을 알아보기 위한 genomic DNA 추출은 Wizard genomic DNA purification kit(Promega Co., Madison, U.S.A.)를 이용하여 추출하였다. 먼저 ZnCl<sub>2</sub>가 처리된 C6 glial 세포에 nuclei lysis buffer를 첨가하여 세포를 파쇄하고 RNase를 37°C에서 5분 처리하여 RNA를 제거한 후 단백질을 침전용 완충용액으로 단백질을 제거하고 isopropanol 침전에 의하여 응축된 DNA를 70% 에탄올로 세척한 후 진공건조기로 건조하였다. 여기에 TE 완충용액(10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0)을 가하여 DNA를 용해한 후 260 nm와 280 nm의 spectro-

photometer(Beckman Co., Du-7 Model, Palo Alto, CA, U.S.A.)하에서 흡광도를 측정하여 DNA를 정량하였다. DNA 5  $\mu\text{g}$ 을 1.8% agarose gel에서 전기영동(50 voltage, 2시간)을 실시한 후, ethidium bromide로 염색하여 자외선 등 아래에서 DNA 분절을 관찰하였다.

## 2) Hoechst 염색

ZnCl<sub>2</sub>가 처리된 세포를 먼저 4% formaldehyde 용액에서 고정시켰다. 다음으로 PBS로 2번 세척한 후 Hoechst 33258 염색약을 10  $\mu\text{M}$  PBS로 10분 염색하고 다시 PBS로 세척한 다음, 형광 현미경으로 DNA 분절현상을 관찰하였다. 실험에 따른 사진은 역상 광학 현미경(Nikon Eclipse TE300, Japan)을 이용하였고, 10 $\times$ 10의 배율로 사진을 찍었다.

## 5. GSH contents 측정

C6 glial 세포를 6 cm 세포배양판에 2 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/ml씩 분주한 다음 세포배양기에서 24시간 배양시킨 후 ZnCl<sub>2</sub>를 시간별로 처리하였다. 배양액을 조심스럽게 제거하고 차가운 10% trichloroacetic acid(TCA)를 400  $\mu\text{l}$ 씩 분주한 후 세포배양판을 10분 조심스럽게 흔들어 주었다. TCA에 의해서 용출된 분획을 모아 원심분리한 다음 상청액을 3 M NaOH를 사용하여 중성 pH로 조정하였다. 상청액 50  $\mu\text{l}$ 에 250  $\mu\text{l}$ 의 5,5'-dithionitrobenzoic acid(0.96 mg/ml in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4, 5 mM EDTA)와 250  $\mu\text{l}$ 의 NADPH (0.59 mg/ml)와 450  $\mu\text{l}$ 의 glutathione reductase(5 U/ml)를 첨가하고 실온에서 10~15분 반응시킨 다음 ELISA reader로 412 nm에서 GSH contents를 측정하였다.

## 6. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성 측정

C6 glial 세포를 6 cm 세포배양판에 2 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/ml씩 분주한 다음 세포배양기에서 24시간 배양시킨 후 ZnCl<sub>2</sub>를 시간별로 처리하여 상청액만을 모은다. 상청액을 96 wells 세포배양판에 각각 100  $\mu\text{l}$ 씩 분주한 다음 0.2~0.4  $\mu\text{M}$  HRP, 1~2  $\mu\text{M}$  scopoletin을 처리한 다음 10분 동안 반응시켰다. 생성된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 감소된 scopoletin의 형광을 대조군과 비교하여 fluorometer(Molecular Devices Co, Sunnyvale, CA)로 450 nm의 파장에서 측정하여 백분율(%)로 표시하였다.

## 7. 통계처리

표시된 결과는 4번 이상의 독립적인 실험결과이며 이들의 평균(mean)과 표준편차(standard deviation, S.D.)를 산

출하여 결과를 표시하였다. 세포독성을 보이는 값의 비교에 있어서는 Student's t-test를 사용하였으며 P < 0.01, 혹은 P < 0.05 수준으로 유의성을 검증하였다.

## III. 결 과

### 1. ZnCl<sub>2</sub>가 C6 glial 세포주 생존율에 미치는 영향

중금속의 C6 glial 세포에 대한 세포독성을 알아보기 위해 ZnCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> 및 CuCl<sub>2</sub> 등의 중금속을 농도별로 처리해서 C6 glial 세포의 생존율을 MTT 방법으로 측

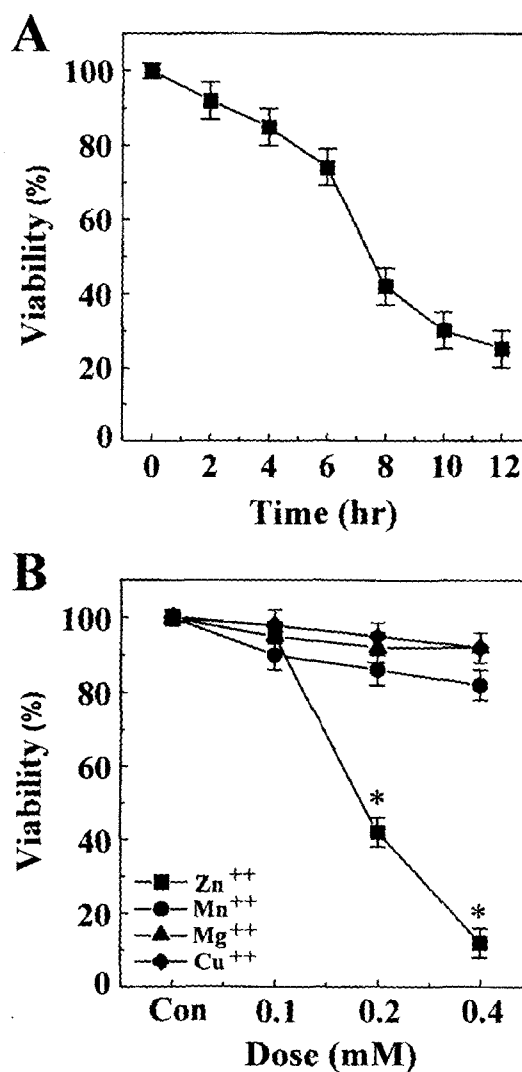


Fig. 1. ZnCl<sub>2</sub> decreased the viability of C6 glial cells in a dose and time dependent manner. A. The time-dependent kinetics of the viability of C6 glial cells by the addition of ZnCl<sub>2</sub> (0.2 mM). B. C6 glial cells were treated with various concentrations of ZnCl<sub>2</sub> and the cells were tested for viability by MTT assay at 8 hr after the treatment of ZnCl<sub>2</sub>. The data are mean values of results obtained from four sets of experiments. \*, p < 0.01 compared to control values.

정하였다. ZnCl<sub>2</sub>만이 처리 양과 시간에 유관하게 C6 glial 세포의 생존율을 감소시켰다(Fig. 1A). 그러나 MnCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> 및 CuCl<sub>2</sub> 등의 중금속은 같은 시간대에 C6 glial 세포에 독성을 나타내지 않았다(Fig. 1B). ZnCl<sub>2</sub> 0.2 mM 처리시 4시간 후 C6 glial 세포의 생존율이 대조군의 80%를 유지하였으며, 8시간 이후에는 40% 수준으로 감소하였다(Fig. 1B). 농도 의존적인 ZnCl<sub>2</sub>의 세포독성을 조사하기 위하여 다양한 농도의 ZnCl<sub>2</sub>를 8시간 처리한 후에 MTT 방법으로 ZnCl<sub>2</sub>의 C6 glial 세포에 대한 독성을 측정하였다(Fig. 1A). C6 glial 세포의 생존율은 0.1 mM의 농도에서는 아무런 변화가 없었으나, 0.2 mM 처리시 8시간 후에 세포 생존율이 40% 수준으로 감소하였다(Fig. 1A).

ZnCl<sub>2</sub>에 의한 세포독성 기전이 세포고사 기전에 의하여 매개될 가능성이 제시되었기에(Weiss 등, 1993), ZnCl<sub>2</sub>에 의한 C6 glial 세포독성의 기전을 확인하기 위하여 DNA 분절현상을 조사하였다. ZnCl<sub>2</sub>를 시간별로 처리하고 세포로부터 genomic DNA를 추출하여 1.5% agarose gel에서 전기영동하였으며 DNA는 ethidium bromide 염색으로 DNA 분절현상을 확인하였다(Fig. 2A). ZnCl<sub>2</sub> 처리 6시간 후에는 DNA의 분절현상은 관찰되지 않았다. 그러나 선명한 사다리 모양(ladder-pattern) DNA 분절현상이 8시간 이상 처리군에서 확인되었다. 또한 세포고사 현상의 형태학적인 특징인 염색질의 응축(chromatin condensation) 및 DNA 분절현상을 조사하였다(Fig. 2B). ZnCl<sub>2</sub>를 8시간 처리한 후 Hoechst 33258 염색에 의하여 핵산의 형태를 형광현미경으로 관찰하였는데 대조군 C6 glial 세포의 타원

형의 핵은 균질한 세기(homogenous intensity)로 염색된 반면, ZnCl<sub>2</sub> 처리군은 타원형 핵 모양이 불규칙한 모양으로 변형되어 있었으며 특히 세포고사의 전형적 특징인 염색질 응축 및 DNA 분절(화살표로 표시)을 확인할 수 있었다.

이상의 결과로 ZnCl<sub>2</sub>가 C6 glial 세포의 생존율을 농도와 시간 의존적으로 감소시키며, ZnCl<sub>2</sub>에 의한 세포독성은 세포고사 기전에 의하여 매개됨을 확인할 수 있었다.

2. 항산화제와 catalase에 의한 세포고사 방지효과

ZnCl<sub>2</sub>는 세포내에서 활성산소종을 생성하여 세포에 산화성 손상을 초래한다고 보고되었기에(Yukiyo 등, 1998), ZnCl<sub>2</sub>에 의한 C6 glial 세포고사에서 산화성 손상과 관련하여 세포내 항산화 기능을 가진 GSH, NAC, PDTC 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 대사효소인 catalase를 1시간 전 처리하고 ZnCl<sub>2</sub>를 8시간 처리한 후 MTT 방법으로 세포생존율을 조사하였다(Fig. 3). GSH 및 NAC의 전 처리군은 ZnCl<sub>2</sub>에 의한 세포독성을 예방하여 대조군 수준으로 세포생존율을 회복시켰다. 또한 catalase, PDTC 전 처리군도 ZnCl<sub>2</sub>에 의한 세포독성을 유의하게 예방하여 C6 glial 세포의 생존율을 대조군 수준으로 회복시켰다. 고농도의 GSH, NAC, PDTC와 catalase 각각의 단독처리는 세포생존율에 영향을 미치지 않았다(미발표성적). 이는 ZnCl<sub>2</sub>에 의한 세포고사에서 자유라디칼이나 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 매개되어질 가능성을 보여 준다.

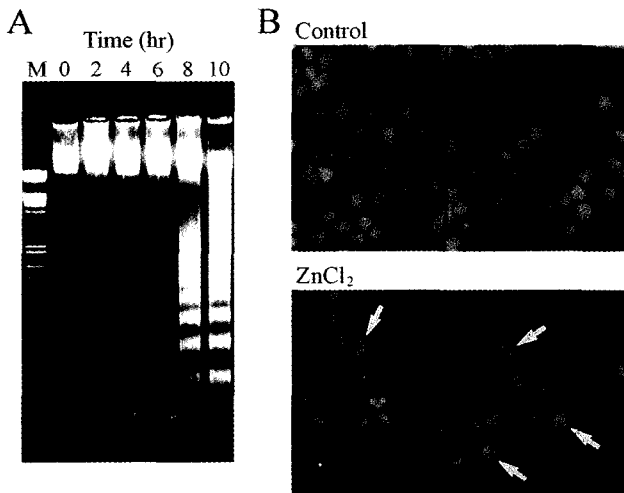


Fig. 2. ZnCl<sub>2</sub> induced the ladder pattern fragmentation of DNA in C6 glial cells. A. C6 glial cells were treated with 0.2 mM of ZnCl<sub>2</sub> for 8 hr and DNA fragmentation was determined by agarose gel electrophoresis in a time-dependent manner. B. DNA fragmentation in C6 glial cells treated with ZnCl<sub>2</sub> revealed by Hoechst 33258 staining. Some examples of cells displaying apoptotic changes in nuclear morphology are shown.

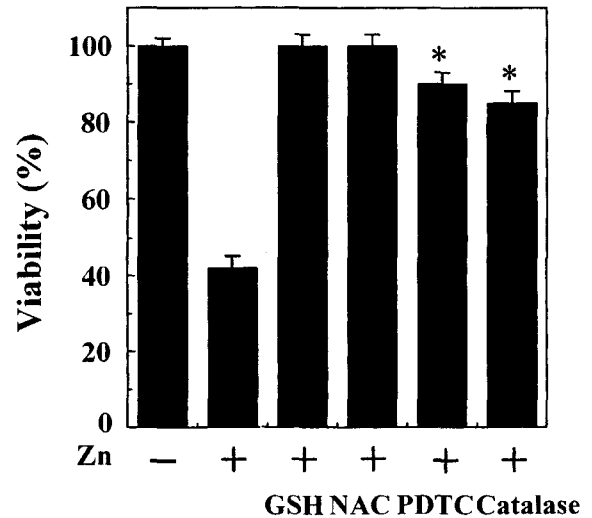


Fig. 3. Effect of GSH, NAC, catalase and PDTC treatment on cellular ZnCl<sub>2</sub> levels. C6 glial cells were incubated with 10 mM GSH, 10 mM NAC, 100 U/ml catalase and 20 nM PDTC for 1 hr. After incubation, cells were treated with 0.2 mM of ZnCl<sub>2</sub>. The cells were tested for viability by MTT assay at 8 hr after the treatment of ZnCl<sub>2</sub>. \*, p < 0.01, compared to control values.

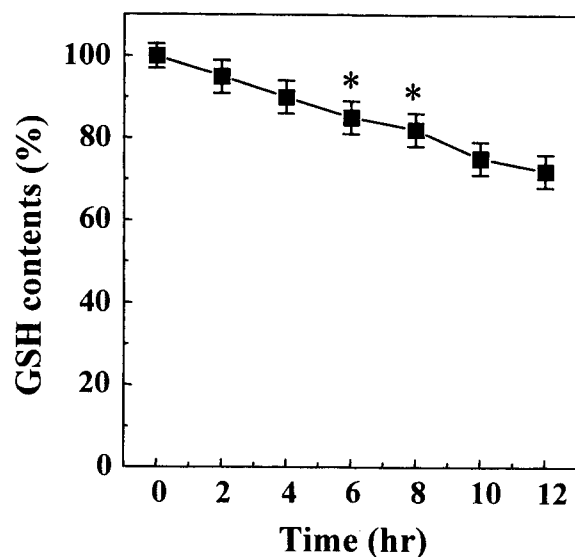


Fig. 4. Time course of cellular GSH depletion by  $ZnCl_2$ .  $ZnCl_2$  (0.2 mM) were added to cells, and GSH were measured as a function of time. Cellular GSH changes are expressed as % of nontreated control. The data are mean values of results obtained from four sets of experiments. \*,  $p < 0.01$ , compared to control values.

### 3. $ZnCl_2$ 가 세포내 GSH 생성에 미치는 영향

$ZnCl_2$ 에 의한 세포고사 기전이  $H_2O_2$  생성과 같은 산화성 손상과 연관됨을 확인하였기에,  $ZnCl_2$ 의 세포내 GSH 생성에 미치는 효과를 측정하였다.  $ZnCl_2$ 을 C6 glial 세포에 시간별로 처리하여 세포내 GSH의 양을 정량하였다 (Fig 4).  $ZnCl_2$  처리는 C6 glial 세포내 GSH의 양을 시간 의존적으로 감소시켜 8시간 후 C6 glial 세포의 GSH의 양이 대조군에 비교하여 20% 정도 감소하였으며, 12시간 후에는 30% 감소하였다.

### 4. $ZnCl_2$ 가 $H_2O_2$ 생성에 미치는 영향

$ZnCl_2$  처리에 의한 C6 glial 세포독성이 catalase 전 처리에 의하여 감소함을 확인하였기에, C6 glial 세포에서  $ZnCl_2$ 로 인해 생성되는  $H_2O_2$ 의 양을 측정하였다(Fig 5).  $ZnCl_2$  0.2 mM 처리 후 12시간 동안의 세포내  $H_2O_2$  생성을 측정할 결과 2시간 이후부터 증가하기 시작하여 6시간 사이에  $H_2O_2$ 의 생성이 2배로 증가하였으며, 이후 점차 감소하여 12시간 후에는 대조군 수준으로 복귀하였다(Fig. 5). 또한 세포내 항산화제인 GSH, NAC 및 PDTC를 전 처리한 후  $ZnCl_2$ 에 의한 세포내  $H_2O_2$  생성을 측정하였다 (Fig. 6).  $ZnCl_2$ 을 처리하기 전에 다양한 농도의 항산화제 및 catalase를 처리하고 C6 glial 세포의  $H_2O_2$ 의 생성을 조사하였다. 대조군 수준에 비교하여  $ZnCl_2$  처리시 1.5배 이상  $H_2O_2$ 의 생성이 증가하였으나 catalase 전 처리군에서

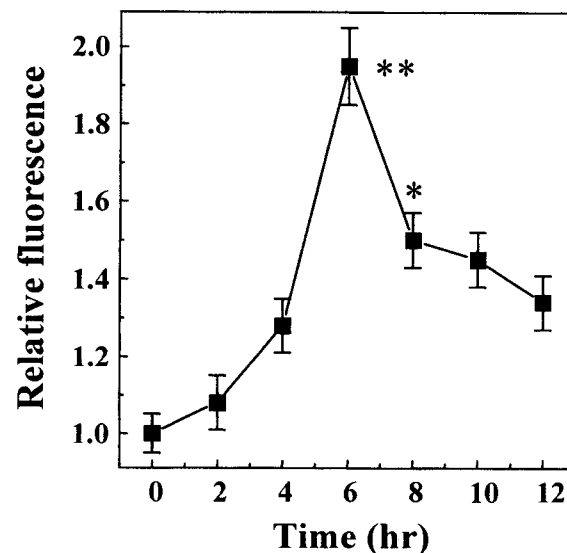


Fig. 5. GSH depletion causes only a partial increase in  $H_2O_2$ . Exposure of C6 glial cells to  $ZnCl_2$  leads to the increased production of  $H_2O_2$ . The increase in  $H_2O_2$  is exclusively due to GSH depletion. In contrast, GSH is necessary for the initial increase in  $H_2O_2$  production, its decrease is not sufficient to generate the late exponential increase in  $H_2O_2$ , which occurs after 8 hr of  $ZnCl_2$  treatment. \*,  $p < 0.01$ , \*\*,  $p < 0.05$  compared to control values.

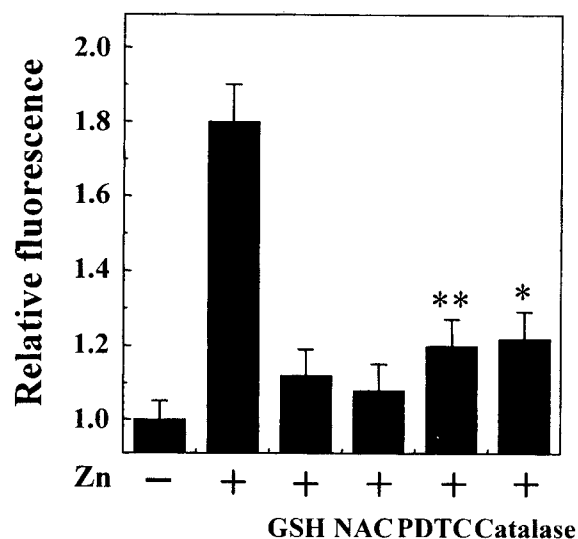


Fig. 6. Protective effects of GSH, NAC, catalase and PDTC treatment against  $ZnCl_2$  toxicity. C6 glial cells were incubated with 10 mM GSH, 10 mM NAC, 100 U/ml catalase and 20 nM PDTC for 1 hr. After incubation, cells were treated with 0.2 mM  $ZnCl_2$ . After 8 hr,  $H_2O_2$  were measured. \*,  $p < 0.01$ , \*\*,  $p < 0.05$  compared to control values.

$ZnCl_2$ 에 의한  $H_2O_2$  생성은 대조군 수준으로 감소하였다. 그리고 항산화제인 GSH, NAC 및 PDTC 전 처리군 모두에서  $ZnCl_2$ 에 의한  $H_2O_2$  생성이 현저히 감소하여 대조군과 유사한 수준을 나타내었다. 이상의 결과는  $ZnCl_2$ 에 의한 C6 glial 세포의 고사는 세포내  $H_2O_2$  생성 증가로 인

한 산화성 손상에 의하여 유도됨을 의미한다.

#### IV. 고 찰

최근 세포내 아연의 유입으로 인한 체내 독성 및 반응에 관심이 모아지기 시작하면서 일차적으로 발생하는 면역계에서의 독성반응과 함께 아연이 뇌신경세포에서 어떤 작용을 하는지와 신경계 질환과의 관련이 관심의 초점이 되고 있다. 많은 신경계 질환은 중추신경세포의 사멸이 그 중심적 원인을 이룬다(Behl 등, 1994). 즉 아연의 유입이 세포 안에서 어떠한 대사적 경로를 통하여 신경세포의 사멸을 일으키는지는 아직 명확히 알려져 있지 않지만 아마도 자유라디칼 생성에 의한 산화성 손상이 관여한다고 보여지고(Savits 등 1998), 이러한 세포손상 기전들이 단독 또는 상호 작용하여 신경세포의 사멸을 초래하여 신경계 질환들이 유발되리라 여겨진다. 이러한 세포 사멸의 원인으로서는 여러 가지가 있지만 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)으로 유도되는 세포의 사멸은 산화성 손상의 정도에 따라서 세포괴사(necrosis)와 세포고사(apoptosis)를 유발하는데(Buttke 등, 1994; Shirlee 등, 1998), 세포고사는 생화학적인 특징과 핵 응축, 세포막 기포화와 같은 형태학적인 특징을 가진다. 활성산소종이란 singlet 산소를 함유하고 있는 물질을 총칭하는 명칭으로 superoxide anion( $O_2^-$ ), hydrogen peroxide( $H_2O_2$ ), hydroxyl radical( $OH \cdot$ ) 외에도 lipid peroxide, nitric oxide(NO), peroxyxynitrite(ONOO $^-$ ), thiol peroxy radical(RSOO $\cdot$ ) 등이 활성산소종에 속한다. 여러 활성산소종 중에서  $H_2O_2$ 가 가장 주목을 받고 있는 이유는 구리나 철과 같은 전이금속과 반응하지 않는 한 상대적으로 안정되어 있고 쉽게 세포막을 통과할 수 있으므로 외부자극에 반응하여 빠른 시간 내에 생성·소멸되어야 하는 신호전달물질로 적합하기 때문이며, 호기성 생물의 대사과정 산물인  $H_2O_2$ 는 fenton 반응을 통하여 hydroxyl radical로 전환되어서 여러 생체 조직에 손상을 일으킬 수 있는 생체독성물질임이 이미 알려져 있다(Bae 등, 1997; Sundaresan 등, 1995). 본 연구에서는 산화성 손상을 일으키는 활성산소종 중의 하나인  $H_2O_2$ 가 C6 glial 세포에서 zinc에 의한 세포의 사멸에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하였다. 같은 농도에서  $MnCl_2$ ,  $MgCl_2$ ,  $CuCl_2$ 와 같은 중금속들은 C6 glial 세포에 어떤 영향도 미치지 않지만 zinc만은 8시간이 경과하자 치명적인 손상을 미치고 있음을 알 수 있었다. 뇌에서 zinc가 축적되고 뉴런과 다른 세포에 독성을 유발한다는 많은 보고들이 있다(Choi 등, 1998; Peter, 1999; Yukiyo 등, 1998). 이러한 뉴런에서의 독성은 DNA 분절현상으로 이미 밝혀진 바 있다(Dipasquale 등, 1991). Zinc는 C6 glial 세포에서도 마찬가지로 선명한 사다리 모양의 genomic DNA 분절현상과

염색질 응축현상을 수반하는 세포고사를 보였다. 또한 zinc는 세포내에서 활성산소종을 생성하여 세포에 산화성 손상을 초래한다(Yukiyo 등, 1998). 실제로 zinc가 C6 glial 세포에서 대조군과 비교하여 2배의  $H_2O_2$ 를 생성하였다. GSH, NAC, PDTC 및  $H_2O_2$  대사효소인 catalase와 같은 항산화제의 전 처리군은 세포생존율을 정상세포 수준으로 회복시켰다. 이는 zinc에 의한 세포의 사멸이 세포내 항산화제의 감소 및 세포독성을 초래하는 활성산소종에 의해 매개되어질 가능성을 제시한다. 실제로 GSH의 양이 zinc 처리시간이 길어질수록 감소하였고 zinc 처리 후  $H_2O_2$ 의 양이 증가하였다. 또한 항산화제인 GSH, NAC, PDTC 및 catalase 전 처리군 모두에서 zinc에 의한  $H_2O_2$  생성의 양이 현저히 감소하여 정상세포와 유사한 수준으로 회복되었다. 이는 항산화제가 활성산소종의 역할을 방어함으로써  $H_2O_2$ 의 양을 감소시켜 세포생존율을 증가시킴을 의미한다(Shirlee 등, 1998). 이 결과로 zinc에 의한 C6 glial 세포의 생존율 감소는 세포내  $H_2O_2$  생성 증가로 인한 산화성 손상에 의하여 유도됨을 알 수 있다. 이러한 세포손상 기전들의 작용들이 신경세포 사멸을 초래하여 신경계 질환들을 유발하며 항산화제가 산화성 손상을 막는 역할을 하고 있음을 알 수 있다.

따라서 본 연구에서는 C6 glial 세포에서 zinc의 농도 및 노출시간을 고려하여 zinc에 의한 세포고사 현상 및 세포고사 과정에 관여하는  $H_2O_2$ 와 이를 방어하는 항산화제와의 역할을 이해하여 중금속으로 유도되는 세포고사를 연구하고자 하였다.

#### 감사의 글

이 논문은 두뇌한국 21사업(2000)과 원광대학교 교내 연구비(2000)의 부분적인 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

#### 참고문헌

- Aruoma, O.L., Halliwell, B., Hoey, B.M. and Butler, J. (1989): The antioxidant action of N-acetylcysteine: its reaction with hydrogen peroxide, hydroxyl radical, superoxide, and hypochlorous acid. *Free Radic. Biol. Med.*, **6**, 593-597.
- Barbieri, D., Troiano, L., Grassilli, E., Agnesini, C., Cristofalo, E., Monit, D., Capri, M., Cossarizza, A. and Franceschi, C. (1992): Inhibition of apoptosis by zinc: A reappraisal. *Biochem Biophys Res Commun.*, **187**, 1256-1261.
- Bae, Y.S., Kang, S.W., Seo, M.S., Bains, I.C., Tekle, E., Chock, P.B. and Rhee, S.G. (1997): Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide.

- J. Biol. Chem.*, **272**, 217-221.
- Behl, C., Davis, J.B., Killer, F.G. and Schubert, D. (1994): Amyloid beta peptide induces necrosis rather than apoptosis. *Brain Res.*, **645**, 253-264.
- Boast, C.A., Gerhardt, S.C., Pastor, G., Lehmann, J., Etienne, P.E. and Leibman, J.M. (1988): The N-methyl-D-aspartate antagonists CGS 19755 and CPP reduce ischemic brain damage in gerbils. *Brain Res.*, **442**, 345-348.
- Buttke, T.M. and Sandstrom, P.A. (1994): Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunol. Today.*, **15**, 7-10.
- Choi, D.W. and Koh, J.Y. (1998): Zinc and Brain Injury. *Annu. Rev. Neurosci.*, **21**, 347-375.
- Choi, D.W., Maulucci-Gedde, M.A. and Kriegstein, A.R. (1987): Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.*, **7**, 357-368.
- Coyle, J.T. and Puttfarcken, P. (1993): Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science.*, **262**, 689-695.
- Derick Han, Chandan K. Sen and Sashwati Roy. (1997): Protection against glutamate-induced cytotoxicity in C6 glial cells by thiols antioxidants. *Am. J. Physiol.*, **273**, 1771-1778.
- Dipasquale, B., Marini, A.M. and Youle, R.J. (1991): Apoptosis and DNA degeneration induced by 1-methyl-4-phenylpyridinium in neurons. *Biochem Biophys Res Commun.*, **181**, 1442-1448.
- Dugan, L.L., Sensi, S.L., Canzoniero, L.M.T. and Choi, D.W. (1995): Mitochondria production of reactive oxygen species in cortical neurons following exposure to N-methyl-D-aspartate. *J. Neurosci.*, **15**, 6377-6388.
- Gill, R., Foster, A.C., Woodruff, G.N. and McCulloch, J. (1988): Systemic administration of MK-801 protects against ischemia-induced hippocampal neurodegeneration in the gerbil. *J. Neurosci.*, **7**, 3343-3349.
- Gotz, M.E., Freyberger, A. and Riederer, P. (1990): Oxidative stress: a role in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J. Neural Transm. Suppl.*, **29**, 241-249.
- Kato, S., Negishi, K., Mawatari, K. and Kuo, C.H. (1992): A mechanism for glutamate toxicity in the C6 glioma cells involving inhibition of cystine uptake leading to glutathione depletion. *J. Neurosci.*, **48**, 903-914.
- Koh, J.Y. and Choi, D.W. (1994): Zinc toxicity on cultured cortical neurons: involvement of N-methyl-D-aspartate receptors. *J. Neurosci.*, **60**, 1049-1057.
- Koh, J., Suh, S., Gwag, B., He, Y., Hsu, C. and Choi, D. (1996): The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia. *Science.*, **272**, 1013-1016.
- McDonald, J.W., Silverstein, F.S. and Johnston, M.V. (1987): MK-801 protects the neonatal brain from hypoxic-ischemic neuronal damage. *Eur. J. Pharmacol.*, **140**, 359-361.
- Murphy, T.H., Miyamoto, M., Sastre, A., Schnaar, R.L. and Coyle, J.T. (1989): Glutamate toxicity in a neuronal cell line involves inhibition of cystine transport leading to oxidative stress. *Neuron.*, **2**, 1547-1548.
- Ozyurt, E., Graham, D.I., Woodruff, G.N. and McCulloch, J. (1988): Protective effect of the glutamate antagonist, MK-801 in focal cerebral ischemia in the cat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, **8**, 138-143.
- Pamela J. Fraker and William G. Telford. (1997): A reappraisal of the role of zinc in life and death decisions of cells. *Proc Soc Exp Biol Med.*, **215**, 229-236.
- Peter Lipton. (1999): Ischemic Cell Death in Brain Neurons. *Physiol. Review.*, **70**, 1499.
- Savitz, S.I. and Rosenbaum, D.M. (1998): Apoptosis in neurological disease. *J. Neurosurgery.*, **42**, 555-574.
- Shirlee Tan, Yutaka Sagara and Yuanbin Liu. (1998): The regulation of reactive oxygen species production during programmed cell death. *J. Cell Biol.*, **141**, 1413-1432.
- Simon, R.P., Swan, J.H., Griffiths, T. and Meldrum, B.S. (1984): Blockade of N-methyl-D-aspartate receptors may protect against ischemic damage in the brain. *Science.*, **226**, 850-852.
- Sundaresan, M., Yu, Z.-Y., Ferrans, V.J., Irani, K. and Finkel, T. (1995): Requirement for Generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for Platelet Derived Growth Factor Signal Transduction. *Science.*, **270**, 296-299.
- Taotao Wei, Yucheng Ni, Jingwu Hou, Chang Chen, Baolu Zhao and Wenjuan Xin. (2000): Hydrogen peroxide-induced oxidative damage and apoptosis in cerebellar granule cells: Protection by ginkgo biloba extract. *Pharmacological Research.*, **41**, 427-433.
- Traves, S., Trentini, P., Ascanelli, M., Bucci, G. and DiVirgilio, F. (1994): Apoptosis is dependent on intracellular zinc and independent of intracellular Ca<sup>++</sup> in lymphocytes. *Exp Cell Res.*, **211**, 339-343.
- Weiss, J.H., Hartley, D.M., Koh, J.Y. and Choi, D.W. (1993): AMPA receptor activation potentiates zinc neurotoxicity. *Neuron.*, **10**, 43-49.
- Yukiyo Fukamachi, Yuji Karasaki and Tsutomu Sugijura. (1998): Zinc suppress apoptosis of U937 cells induced by hydrogen peroxide through an increase of the Bcl-2/Bax ratio. *Biochem Biophys Res Commun.*, **246**, 364-369.