

# 동과가 streptozotocin에 의해 손상된 대뇌신경세포에 미치는 영향

이환봉 · 이강창<sup>1</sup> · 이기남<sup>1</sup> · 홍기연 · 석승환 · 조정구 · 정선관 · 허정무<sup>2</sup> · 이상복<sup>3</sup> · 서은아<sup>3</sup> · 송호준<sup>4</sup> · 이영찬<sup>4</sup> · 박승택\*

원광대학교 의과대학, 1: 한의학 전문대학원, 2: 전북대학교 의과대학, 3: 원광전문대학, 4: 한의과대학, 5: 의학자원연구소

## Effect of Benincasae Semen on Cultured Mouse Cerebral Neurons Damaged by Streptozotocin

Whan Bong Lee, Kang Chang Lee<sup>1</sup>, Ki Nam Lee<sup>1</sup>, Gi Youn Hong, Seung Whan Suk, Chung Cu Cho, Seon Kwan Jung, Jung Mu Hur<sup>2</sup>, Sang Bork Lee<sup>3</sup>, Eun A Seo<sup>5</sup>, Ho Jun Song<sup>4</sup>, Young Chan Lee<sup>4</sup>, Seung Taek Park\*

School of Medicine, 1: Graduate School of Oriental Medicine, 2: Medical School of Chunbuk National University, 3: Wonkwang Health Science College, 4: College of Oriental Medicine, 5: medicinal resources research center, Wonkwang University,

It has been suggested that oxidative stress may play an important role in the pathogenesis of diabetic complications. The purpose of this study was to examine the oxidative stress of streptozotocin(STZ) in the cultured mouse cerebral neurons and the preventing effect of vitamin E and and Benincasae Semen(BS) on STZ-induced neurotoxicity. Cytotoxic effect of STZ and neuroprotective effect of antioxidant and BS were performed by MTT assay. 30 μM STZ decreased cell viability in dose-and time-dependent mannner, and vitamin E and BS diminished STZ-induced neurotoxicity in these cultures. From above the results, STZ has toxic effect, and antioxidants, vitamin E or herb extract of BS is very effective against STZ-induced neurotoxicity in cultured cerebral neurons of neonatal mouse.

Key words : Cultured mouse cerebral neuron, Benincasae Semen, Antioxidant

### 서 론

최근 당뇨병과 중추신경계에 관한 연구에서 당뇨병에 이완된 환자는 뇌졸중의 위험이 높아진다는 보고와 함께<sup>1,2</sup>, 뇌허혈에 의한 뇌손상의 상태가 당뇨병에 의해 악화될 수 있다고 제시된 바 있다<sup>3,4</sup>. 고혈당에서의 지질과산화물을 비롯하여 적혈구 기능의 소실 등이 나타남은 잘 알려져 있으며<sup>5,6</sup>, 특히 streptozotocin (STZ)을 이용한 당뇨병유발백에서 고혈당은 산화적 스트레스 (oxidative stress) 및 지질과산화를 통하여 중추신경계내 단백질과 고분자들에 손상을 가할뿐만 아니라<sup>7</sup>, 대뇌의 superoxide dismutase(SOD)와 catalase의 활성을 감소시킨 반면 산화적 스트레스나 지질과산화 반응을 증가시키는 관찰되었으며<sup>8</sup> 뇌 내부의 이러한 변화가 당뇨병환자에서의 뇌졸중 발생빈도의 증가와 매우 밀접한 관련이 있는 것으로 주장되었다<sup>6,9</sup>. 이같이 당뇨병성 신경병증에 산화적 스트레스가 관여하며<sup>10,11</sup> 또한 포도당과 당화 단백질의 자동산화등이 자유라디칼(free radicals)의 생성을 촉진시킨다고 알려져 있으나<sup>7,12</sup>, 당뇨병유발물질인 STZ와 산화적 손상과에 대한 기전을 비롯하여 STZ의 독성효과에 대한 중추신경

세포간의 상호작용에 대한 현상에 대해서는 아직까지 자세히 알려진 바 없다<sup>8,13</sup>. 한편 산화적 스트레스를 유발하는 활성산소는 뇌졸중을 비롯한 뇌허혈 및 근위축성 축삭경화증과 같은 많은 질환에서 병리적 요인이 밝혀진 바 있으며<sup>14,15</sup>, 또한 각종 배양 신경세포를 병변의 모델로 한 많은 연구에서 한약추출물이 항산화효과를 나타내어 활성산소에 의한 신경세포의 손상을 방어함으로써 산화적 매개에 의한 뇌병변에 효과적이라고 보고되어진 바 있다<sup>16,17</sup>. 근래에 세포배양기술이 보급되면서 각종 신경세포를 배양한 후 특정 병변에 대한 기전을 생체외에서 밝히려는 연구가 시도되어 있다<sup>18,19</sup>. 배양 신경세포를 이용한 연구는 시험관내 분석과 더불어<sup>20</sup>, 세포 배양에 고도의 기술이 요구되는 단점도 있지만 짧은 시간 내에 병인적 현상에 대하여 형태를 비롯하여 생리 및 생화학적 측면의 종합적인 분석이 가능하다는 장점이 있으며 또한 짧은 시간 내에 수회의 반복실험이 가능하기 때문에 재현성이 뛰어나다는 장점도 있다<sup>21,22</sup>.

본 연구는 당뇨병 유발물질의 하나인 STZ에 대한 신경세포의 독성을 산화적 손상측면에서 조사하기 위하여 생쥐의 대뇌 신경세포를 배양한 후 농도별로 STZ를 처리한 다음 이의 세포 독성효과를 비롯하여, STZ에 대한 항산화제인 vitamin E의 효과 및 STZ의 독성에 대한 한약추출물인 동과(Benincasae Semen)의 효과를 조사하였다.

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

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

· 접수: 2002/04/16 · 수정: 2002/05/29 · 채택 : 2002/06/08

## 재료 및 방법

### 1. 세포배양

대뇌신경세포의 분리는 Kim<sup>12)</sup>의 방법에 따라 시행하였다. 생후 1~3일된 생쥐에서 적출한 뇌조직을 0.25% trypsin이 포함된 phosphate buffered saline(PBS)으로 처리한 후 36°C, 5% CO<sub>2</sub>/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 3×10<sup>6</sup>cells/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 streptozotocin (STZ, Sigma) 및 vitamin E(Sigma)는 각각 일정농도의 저장액을 만들어 냉암소에 보관 후 실험당일 최종 농도로 희석하여 사용하거나 직접 필요한 양을 배양액에 첨가하여 사용하였다.

### 3. STZ의 노출

STZ가 대뇌신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 일정시간 배양중인 신경세포를 0.6% D-glucose가 포함된 minimum essential medium(MEM, Gibco)으로 3회 세척 후 30μM STZ가 포함된 배양액내에서 신경세포를 12~96시간 동안 배양한 후 STZ가 세포에 미치는 독성효과를 조사하였다.

### 4. 항산화제 처리

STZ에 의하여 유발된 신경독성에 대한 항산화제인 vitamin E의 방어효과를 조사하기 위하여 STZ 처리 2시간 전에 50~150 μM 농도의 vitamin E가 각각 포함된 배양액에서 처리한 후 이의 영향을 조사하였다.

### 5. 약재처리

일정 시간 동안 배양이 완료된 대뇌신경세포를 PBS로 3회 내지 4회 세척한 다음 50~200 μg/ml의 농도로 각각 포함된 동과(Benincasae Semen, BS)에서 2시간 동안 전처리한 다음 이를 30 μM STZ에 노출시켜 이의 효과를 조사하였다.

### 6. 세포생존율 분석

STZ가 대뇌신경세포에 미치는 독성효과를 분석하기 위하여 1~50 μM STZ가 각각 포함된 배양액에서 세포를 배양한 후 세포의 생존율을 MTT assay 법<sup>18)</sup>으로 측정하였으며 또한 STZ에

의해서 유도된 신경독성에 대한 vitamin E의 효과를 MTT assay<sup>19)</sup>로 조사하였다. MTT assay는 Mosmann<sup>20)</sup>의 방법에 따라 행하였다. 즉, 신경세포를 일정시간 배양후 PBS로 서너번 수세한 다음 well당 최종 농도가 10%가 되도록 MTT를 넣어 3시간 동안 항온기에서 배양하였다. 배양 완료후 fomazan MTT를 용해한 후 microelisa reader를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 결 과

### 1. STZ의 독성효과

STZ가 1~50 μM의 농도로 각각 포함된 배양액에서 CD-1 계통 생쥐의 대뇌신경세포를 48시간 동안 노출시킨 후 세포의 생존율을 MTT assay법에 의하여 분석한 결과 1 μM과 10 μM STZ를 처리한 경우 대조군 (100%)에 비하여 각각 85.3%와 61.8%로 나타났다. 또한 20 μM과 30 μM STZ 처리군에서는 47.2%(p<0.05)와 26.4%(p<0.01)로 대조군에 비하여 유의하게 감소되었다(p<0.05) (Fig. 1).

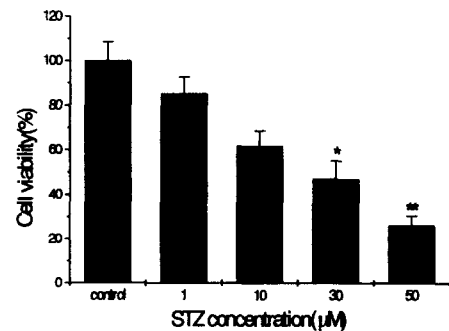


Fig. 1. Dose-dependent response relationship of streptozotocin (STZ) in cultured myocardial cells of mouse. Cytotoxicity was measured by MTT assay. The results indicate the mean±SD for 6 experiments. \*p<0.05; \*\*p<0.01.

시간의 변화에 따른 STZ의 영향을 조사하기 위하여 30 μM STZ가 포함된 배양액에서 신경세포를 12-96 시간 동안 배양한 결과 세포의 생존율이 1시간 배양한 경우, 대조군 (100%)에 비하여 78.2%로 나타났으며 24시간 배양에서는 71.6%로 나타났다. 그러나 48시간과 96간 배양에서는 각각 52.9%(p<0.05) 및 43.7%(p<0.01)로 나타나 유의하게 감소하였다(Fig. 2).

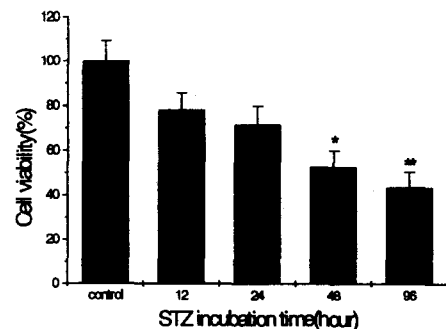


Fig. 2. Time-dependent response relationship of streptozotocin (STZ) in cultured myocardial cells of mouse. Cytotoxicity was measured by MTT assay. The results indicate the mean±SD for 6 experiments. \*p<0.05; \*\*p<0.01.

### 2. 항산화제의 방어효과

배양 대뇌신경세포를 30 μM STZ에 노출시키기 2시간 전에 항산화제인 vitamin E가 50-150 μM 농도로 포함된 배양액에서 각각 전처리한 다음 이에 대한 영향을 MTT assay법에 의하여 조사한 결과 STZ만을 처리한 경우 세포의 생존율은 39.2%로 나타난 데 비하여 50 μM vitamin E를 전 처리한 경우는 68.5%로 나타났다. 그러나 100 μM vitamin E를 전 처리한 경우 86.8%(p<0.05)로 나타났으며 특히 150 μM의 처리에서는 92.3%(p<0.01)로 나타나 STZ의 처리에 비하여 유의하게 높게 나타났다(Fig. 3).

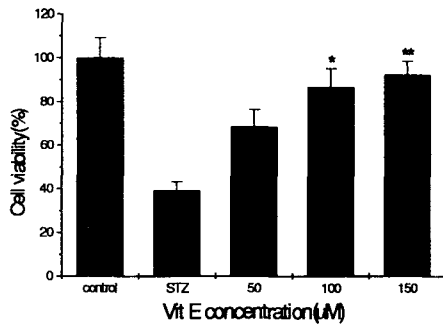


Fig. 3. Dose-response relationship on vitamin E for its neuroprotective effect on streptozotocin(STZ). The results indicate the mean ±SD for 6 experiments. \*p<0.05; \*\*p<0.01

### 3. 동과(BS)의 방어효과

배양 대뇌신경세포를 30 μM STZ에 노출시키기 2시간 전에 BS가 50~200 μg/ml 농도로 포함된 배양액에서 각각 전처리한 다음 이에 대한 영향을 MTT assay법에 의하여 조사한 결과 30 μM STZ만을 처리한 경우 세포의 생존율은 45.2%로 나타난 데 비하여 50 μg/ml BS를 전 처리한 경우는 63.9%로 나타났다. 그러나 100 μg/ml BS를 전 처리한 경우 각각 71.6%로 나타났으며 특히 200 μg/ml의 처리에서는 86.4%(p<0.05)로 나타나 STZ만의 처리에 비하여 유의하게 높게 나타났다(Fig. 4).

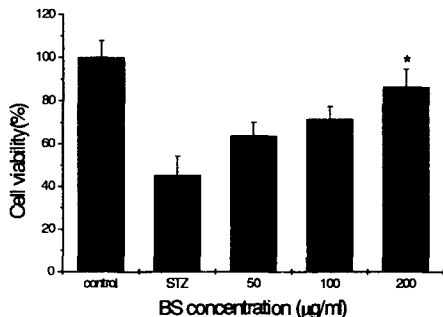


Fig. 4. Dose-response relationship on Benincasae Semen(BS) for its neuroprotective effect on streptozotocin(STZ). The results indicate the mean ±SD for 6 experiments. \*p<0.05; \*\*p<0.01.

## 고찰

최근 당뇨병성 신경병증의 발생에 활성산소가 관여한다고 보고되면서<sup>1,11)</sup>, 당뇨병과 활성산소의 산화적 손상간의 병리적 기

전을 밝히려는 연구가 활발히 진행되어 왔다<sup>2,20)</sup>. 더욱이 당뇨병 발약제인 STZ가 활성산소와 밀접한 관련이 있다고 제시되면서<sup>9)</sup>, STZ의 독성을 산화적 손상 측면에서 밝히려는 연구가 시도되었다. 그러나 이에 대해서는 아직까지 자세히 알려진 바가 없다(5,15). 따라서 본 연구는 STZ의 독성과 산화적 손상과의 기전을 규명하기 위하여 생쥐의 배양 대뇌신경세포를 1~50 μM STZ의 농도가 각각 포함된 배양액에서 48시간 동안 배양한 결과 세포의 생존율이 신경세포에 처리한 농도에 비례하여 유의하게 감소되었다. 이같은 결과는 STZ가 대뇌신경세포에 신경독성효과를 가지고 있음을 말해주며, 이는 또한 Pulsinelli등<sup>1)</sup>의 보고와도 일치하는 소견이라 하겠다.

한편, 활성산소의 산화적 손상은 butylated hydroxytoluene 이나 글루타치온과 같은 항산화제나<sup>12)</sup>, N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체의 길항제들에 의해서 방어되었다고 보고 된 바 있다<sup>12,22)</sup>. 더욱이 활성산소에 관한 연구에서 STZ의 세포독성이 산화적 손상과 관련이 있다고 제시된 바 있으나 여기에 대해 아직까지 확실히 규명되어 있지 않다<sup>7)</sup>. 따라서 본 연구에서는 STZ의 신경독성이 활성산소의 산화적 손상과 관련이 있는가를 밝히기 위하여 항산화제의 일종인 vitamin E를 대뇌신경에 처리한 후 30 μM STZ의 배양액에서 배양한 결과 vitamin E의 처리농도에 비례하여 세포의 생존율이 STZ만을 처리한 경우에 비하여 유의하게 증가하였다. 본 실험의 이같은 결과는 STZ의 독성이 산화적 손상의 매개에 의한다는 것을 말해주고 있으며, 이 또한 당뇨병성 신경병증의 발생이 산화적 스트레스와 밀접한 관계가 있다는 Niki등<sup>12)</sup>의 가설의 증명이나 Cameron 등<sup>23)</sup>이 streptozotocin으로 유도한 당뇨병성 환쥐에서 말초신경의 기능 장애가 항산화제에 의해 방어 되었다는 결과와 일치하였다. 한편, 인삼과 같은 한약추출물들이 뇌졸중과 같은 각종 난치성 뇌병변이나 고혈압등의 치료에 매우 효과적이라는 임상적 보고가 되어지고 있다<sup>2)</sup>. 이는 약재추출물중 질환치료에 효과적인 약리 활성물질이 있음을 말해주고 있다. 본 연구에서는 한약추출물인 동과가 STZ의 산화적 손상에 미치는 영향을 조사하기 위하여 동과가 50 μg/ml에서 200 μg/ml의 농도로 각각 포함된 배양액에서 대뇌신경세포를 2시간 동안 전처리한 후 이의 효과를 조사한 결과 농도 의존적으로 동과의 처리가 세포의 생존율을 증가시켰으며, 특히 200 μg/ml 동과의 처리에서는 STZ만의 처리의 생존율인 45.2%에 비하여 86.4%(p<0.05)로 유의하게 증가하였다. 이는 STZ의 독성방어에 동과와 같은 한약추출물이 매우 효과적임을 시사해 주고 있으며 또한 vitamin E와 같이 동과가 항산화효과를 가지고 있음을 증명하고 있다<sup>12)</sup>. 그러나 STZ의 산화적 손상에 대한 작용현상이나, 중추신경계의 신경세포의 손상에 대한 기전 및 동과의 항산화효과에 대한 연구는 향후 더 진행되어야 할 것으로 생각한다.

## 결과

산화적 손상은 당뇨병에 있어서 중요한 병인의 하나로 알려져 있다. 본 연구는 생쥐의 배양 대뇌신경세포에 대하여 streptozotocin (STZ)의 산화적 손상을 조사하였으며 또한 STZ의

독성에 대한 vitamin E와 한약추출물인 동과(Benincasae Semen)의 효과를 MTT assay에 의하여 조사하였다. 30  $\mu$ M STZ를 신경세포에 처리한 결과 처리 농도와 시간에 의존적으로 세포생존율을 감소시켰다. 한편, vitamin E와 동과는 STZ에 의해 유도된 신경독성을 감소시켰다. 이상의 결과에서 STZ는 생쥐의 배양 대뇌 신경세포에 독성을 나타냈으며 vitamin E나 동과는 STZ에 의하여 유도된 신경독성을 방어하는데 매우 효과적인 것으로 나타났다.

## 감사의 말

이 논문은 2001년도 원광대학교의 교비지원에 의해서 연구됨

## 참고문헌

- Pulsinelli WP, Waldman S, Sigsbee B, Rawlinson D, Scherer P, Plum F: Experimental hyperglycemia and diabetes mellitus worsen stroke outcome. *Trans Am Neurol Assoc* 105:21-24, 1980.
- Helgason CM, Blood glucose and stroke. *Stroke* 19:1049-1053, 1988.
- 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.
- 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.
- Jain SK: Hyperglycemic can cause membrane lipid peroxidation and osmotic fragility in human red blood cells. *J Biolo Chem* 264:21340-21345, 1989.
- Kumar JSS, Menon VP: Effect of diabetes on levels of lipid peroxides and glycolipids in rat brain. *Metabolism* 42:1435-1439, 1993.
- 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.
- Biessels GJ, Kappelle AC, Bravenboer B, Erkelens DW, Gispen WH: Cerebral function in diabetes. *Diabetologia* 37:643-650, 1994.
- Teniconi B, Gorio A: Denervation and hyperinnervation in the nervous system of diabetic animals: III. Functional alterations of G protein in diabetic encephalopathy. *J Neurosci. Res* 24:517-523, 1989.
- Shapiro R, McManus M, Garrick L, McDonald MJ, Bunn HF: Nonenzymatic glycosylation of human hemoglobin at multiple sites. *Metabolism* 28:427-431, 1979.
- McCall AL: The impact of diabetes on the CNS. *Diabetes* 41:557-570, 1992.
- 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.
- 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.
- Kim YS, Kim SU : Oligodendroglial cell death induced by oxygen radicals and its protection by catalase. *J Neurosci Res* 29:100-106, 1991.
- Park ST : Study on the effect of iron-chelator on oxygen radical-induced neurotoxicity. *Korean J Phys Anthrop* 8: 113-121, 1995.
- Halliwell B : Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 59:1609-1623, 1992.
- Michikawa M, Lim KT, McLarnon JG, Kim SU: Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. *J Neurosci Res* 37:62-70, 1994.
- Borenfreund E, Babich H, Martin-Alguacil N: Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays-the neutral red and tetrazolium mtt tests. *Toxic in Vitro* 2:1-6, 1988.
- 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.
- Mosmann T: Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxic assays. *J Immun Methods* 65:55-63, 1983.
- Kontos H, Wei E, Ellis E Jenkins L, Povlishock J, Rowe G, Hess M : Appearance of superoxide anion radical in cerebral extracellular space during increased prostaglandin synthesis in cat. *Circ Res* 57:142-151, 1985.
- 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.
- Cameron NE, Cotter MA, Maxfield EK : Antioxidant treatment prevents the development of peripheral nerve dysfunction in streptozotocin-diabetic rats. *Diabetologia* 36:299-304, 1993.