

배양전정신경세포에 있어서 5-Fluorouracil의 세포독성에 대한 酸棗仁의 효과

손일홍 · 이정현² · 최유선 · 이재규 · 김형수 · 이용석 · 이환봉 · 최기욱 · 민부기 · 김상수 · 이강창¹ · 류명환³ · 송호준³ · 이영찬³ · 정영목³ · 류도곤³ · 박승택^{2*}

원광대학교 의과대학, 1: 한의학전문대학원, 2: 원광의과학연구소, 3: 한의과대학

Effect of Ziziphi Jujubae Semen on 5-Fluorouracil Induced cytotoxicity in Cultured Vestibular Neurons

Il Hong Son, Jung Hun Lee², Yu Sun Choi, Jae Kyoo Lee, Hyung Su Kim, Yong Suk Lee, Whan Bong Lee, Ki Wook Choi, Bu Ki Min, Sang Su Kim, Kang Chang Lee¹, Myeung Hwan Ryu³, Ho Joon Song³, Young Chan Lee³, Young Mok Jeong³, Do Gon Ryu³, Seung Taeck Park^{2*}

School of Medicine, 1: Department of Graduate School of Oriental Medicine, 2: Institution of Wonkwang Science, 3: College of Oriental Medicine, Wonkwang University

To evaluate the protective effect of Ziziphi Jujubae Semen(ZJS) on 5-Fluorouracil(5-Fu) in cultured vestibular neurons(VN), neurotoxicity was assessed by XTT assay after VN was exposed to 3~24ug/ml 5-Fu for 48 hours. and also, the neuroprotective effect of ZJS was measured by XTT assay in these cultures. Cell viability was remarkably decreased dose-dependently, after the treatment with 12ug/ml 5-Fu to cultured VN for 48 hours. In the neuroprotective effect of ZJS on the toxicity induced by 5-Fu, ZJS prevented the neurotoxicity induced by 5-Fu in these cultures. From above the results, it suggests that 5-Fu is toxic in cultured VN and herb extract, ZJS has protective effect over the neurotoxicity induced by 5-Fu.

Key word : Ziziphi Jujubae Semen(ZJS), vestibular neuron, Neurotoxicity.

서론

최근 급속한 의학의 발달로 인하여 인간의 수명은 많이 연장 되었으며 또한 각종 난치성 질환에 효과적인 화학약제들이 개발 됨으로서 이들의 치료에 많은 발전을 가져왔다^{1,2}. 그럼에도 불구하고 현대인은 과중한 업무부담에 의한 정신적 스트레스와 심한 운동부족으로 인하여 당뇨를 비롯한 고혈압, 뇌졸중 및 암과 같은 각종 질환으로부터 쉽게 노출되어 있다^{3,4}. 이중, 암은 서구식의 생활방식의 도입에 의하여 다른 질환에 비하여 발병빈도가 해마다 높아지고 있는 실정에 있어 사회적 문제로 크게 부각되고 있다⁵. 따라서 이의 정복을 위하여 대부분의 선진국들은 암의 예방이나 이의 치료를 위하여 막대한 투자와 노력을 아끼지 않고 있다⁶. 따라서 이 같은 노력을 힘입어 특정암의 치료에 효과적인 항암제들이 많이 개발됨으로서 암으로부터 인간의 건강위험을 벗어나는데 많은 도움을 주었다^{7,8}. 그러나 지금까지 개

발된 항암제들은 독성이 강하여 이의 투여시 암세포뿐만 아니라 정상적인 세포까지도 손상을 줌으로서 이로 인한 부작용이 매우 심각한 상태에 있다^{9,10}. 이들은 암세포의 DNA나 RNA에 손상을 줌으로서 암세포를 죽이거나^{11,12} 또는 암세포의 단백질합성을 억제함으로써 항암효과를 나타냄은 이미 잘 알려진 사실이다¹³. 예를 들면 Adriamycin은 DNA나 자매염색분체에 손상을 주며¹⁴ actinomycin D는 단백을 저해함으로써 항암효과를 나타낸다고 한다¹⁵. 또한 5-Fluorouracil은 DNA 합성이나 세포주기에 손상을 주며 특히 S-phase에 특이하게 작용하는 anti-neoplastic agent의 하나이다^{11,13}. 그러나 이들을 남용할 경우 후두나 식도염을 비롯하여 간경변, 중추신경계의 손상 및 간이나 신장등에 장애를 일으킴으로서 각종 부작용을 초래하게 된다^{16,17}. 따라서 국내의 많은 학자들은 암의 병인적 현상에 대한 기전규명이나 이의 효과적인 치료약제나 치료방법의 개발을 위하여 꾸준히 연구를 진행하여 왔다^{18,19}. 최근에 한약재의 추출물들의 투여가 당뇨나 고혈압을 비롯하여 각종 난치성 암에 대하여 유효한 효과를 나타냈다는 임상적 보고들이 되어지면서 이를 이용하여 치료약제의 개발이나 병변의 치료를 시도하려는 연구들이 활발히 진행

* 교신저자 : 박승택, 전북 익산시 신용동 344, 원광대학교 의과대학
E-mail : stpark@wonkwang.ac.kr, Tel : 063-850-6759
접수: 2001/12/02 · 수정: 2002/01/16 · 채택 : 2002/02/08

되고 있다¹⁵⁾. 한약추출물은 양약에 대하여 독성이 극소수거나 전혀 없기 때문에 과량을 투여할 경우 기존의 화학약제들에 비하여 아무런 부작용을 나타내지 않기 때문에 이를 이용한 치료는 매우 신뢰를 얻고 있다^{15,16)}. 최근 인삼성분인 polyacetylene이 유효한 항암효과나 환경호르몬의 독성방어에 매우 효과적이라고 보고된 바 있다¹⁵⁾. 산조인은 맛은 달고 성은 평하여 한방에서 허번불면이나 두훈안화 및 번갈이나 허한등의 치료에 널리 사용되어 지고 있다¹⁷⁾. 그 밖에도 진정작용과 항권결 및 혈압감하등의 약리작용을 나타내며 jujuboside Ask spinosin등의 성분을 함유하고 있다^{15,17)}. 한편, 각종 암이나 고혈압, 또는 동맥경화와 같은 질환의 연구에 가장 중요한 동물의 실험적 모델이 매우 미흡하기 때문에 현재에 독성물질의 검정이나 신약제의 효능검정등의 분석에 배양세포를 재료로한 병변모델을 많이 이용하고 있다^{2,11)}. 세포배양의 기술은 시험관내 새로운 분석방법의 개발과 최첨단 시험관내 분석장비의 개발을 함께 적용함으로써 정확한 정량적인 분석이 가능하게 되었다¹¹⁾. 더욱이 면역세포화학염색법이 개발됨으로서 특정 세포의 동정이나 동종 세포의 대량증식은 물론, 짧은 시간내에 다양한 분석을 할 수 있게 되었다^{2,14)}. 따라서 이러한 분석법을 적용하여 한약추출물이나 천연추출물의 효능이나 약리적 활성에 대한 정량분석을 함으로서 시험관내 중요한 분석기구로 자리잡고 있다^{8,11)}.

본 연구는 한약추출물의 일종인 산조인(Ziziphi Jujubae Semen, ZJS)이 배양 전정신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 배양된 전정신경세포에 여러 농도의 5-Fluorouracil을 처리하여 이의 신경독성효과를 조사하였으며 또한 5-Fluorouracil에 의한 세포독성에 대하여 한약추출물인 ZJS의 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에 사용한 동물은 원광대학교 동물사육실에서 순수 분리 사육중인 건강 상태가 양호한 생후 3일된 ICR 계통의 생쥐를 사용하였다. 본 실험에 사용한 5-Fluorouracil(5-Fu, Sigma)를 각각 1g/ml, 100mg/ml, 1M, 10mg/ml, 및 1mg/ml의 저장액을 만들어 냉암소에 저장한 다음 실험 당일 최종 농도로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다.

한약재와 증류수를 환저플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 2시간 동안 전열기로 전탕한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 진공 농축기로 감압농축한 후 동결건조기에서 24시간 동안 동결건조하여 분말 시료를 얻었다.

2. 방법

1) 세포배양

Michikawa등(1994)²⁾의 방법에 따라 전정신경세포를 효소 해리분리법에 의하여 뇌조직으로부터 순수분리하였다. 분리된 전정신경세포는 혈청이 포함된 배양액에 1×10^5 cells/well의 밀도로 산정하여 96-multiwell에 넣어 분주하였다. 분주된 세포는 CO₂ 정온기에서 10일 동안 배양하였으며 배양액은 3일마다 교환하여 주었다. 배양이 완료된 세포는 약제를 처리하거나 처리하지

않은 배양액에서 배양한 다음 약제가 포함되어 있지 않은 배양액을 대조군으로 하여 비교 조사하였다.

2) 5-Fluorouracil 처리

항암제의 일종인 5-Fluorouracil(5-Fu)이 배양 전정신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 3ug/ml에서 24ug/ml까지의 5-Fu가 함유된 배양액에서 전정신경세포를 48시간 동안 배양한 후 이의 독성효과를 분석하였다.

3) 약재추출물의 처리

일정시간 배양한 전정신경세포에 2시간 동안 ZJS에 처리한 다음 12ug/ml 5-FU가 포함된 배양액에서 48시간 동안 처리한 후 약제가 5-Fu에 미치는 영향을 조사하였다.

4) 세포생존율 조사

여러 농도의 5-Fu를 배양 전정신경세포에 처리한 후 5-Fu가 전정신경세포에 미치는 독성효과와 이에 대한 ZJS의 효과를 XTT 분석법에 의하여 조사하였다.

5) 통계처리

대조군과 실험군의 차이에 대한 통계적 유의성은 Student's t-test로 비교하였다. 통계적 유의수준은 p값이 0.05미만인 경우로 하였다.

결 과

1. 5-Fu의 독성효과

1) 농도에 따른 영향

5-Fu가 3~24ug/ml의 농도로 각각 포함된 배양액에서 생쥐의 배양 전정신경세포를 48시간 동안 배양한 후 5-Fu의 독성효과를 XTT assay법에 의하여 조사한 결과 3ug/ml 5-FU의 처리에서는 세포의 생존율이 대조군(100%)에 비하여 87%로 나타났으며 6ug/ml 5-FU의 처리에서는 75%로 나타났다. 또한 12ug/ml와 24ug/ml 5-Fu의 처리에서는 각각 세포의 생존율이 51%(p<0.05)와 38%(p<0.01)로 나타났으며 12uM에서 XTT50 값을 나타냈다(Fig. 1).

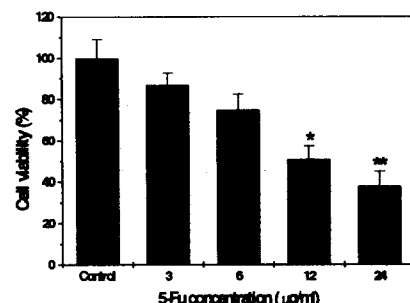


Fig.1. A dose-dependency of 5-Fluorouracil(5-Fu). 5-Fu-induced neurotoxicity was measured by XTT assay in cultured vestibular neurons. Cultured cells were exposed to 3, 6, 12 and 24ug/ml 5-Fu for 48 hours, respectively. The results indicate the mean±SEM(n=6). *p<0.05;**p<0.01

2) 처리시간에 따른 영향

5-Fu의 처리시간의 의한 세포독성효과를 조사하기 위하여 12ug/ml 5-Fu가 포함된 배양액에서 전정신경세포를 12~72시간

동안 배양후 세포생존율을 XTT assay법에 의하여 조사한 결과 12시간 배양에서는 세포의 생존율이 대조군(100%)에 비하여 82%로 나타났으며 24시간 배양에서는 63%로 나타났다. 또한 48시간과 72시간 배양에서는 각각 세포생존율이 49%($p<0.05$)와 26%($p<0.01$)로 나타났다(Fig. 2).

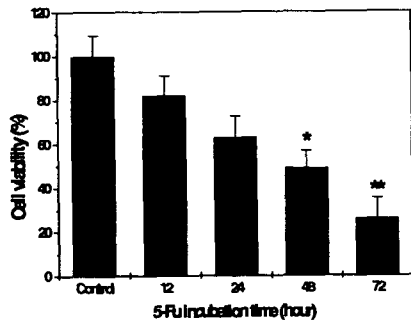


Fig. 2. A time-dependency of 5-Fluorouracil(5-Fu). 5-Fu-induced neurotoxicity was measured by XTT assay in cultured vestibular neurons. Cultured cells were exposed to 12ug/ml 5-Fu for 12, 24, 48 and 72 hours, respectively. The results indicate the mean±SEM(n=6). * $p<0.05$; ** $p<0.01$

2. Ziziphi Jujubae Semen의 효과

5-Fu에 대한 Ziziphi Jujubae Semen(ZJS)의 영향을 조사하기 위하여 12ug/ml 5-FU가 포함된 배양액에서 배양 전정신경세포를 배양하기 2시간 전에 ZJS가 30~140 μ g/ml의 농도로 각각 포함된 배양액에서 배양한 다음 ZJS가 5-Fu에 미치는 영향을 XTT assay법에 의하여 조사하였다. 12ug/ml 5-Fu만의 처리에 있어서는 세포의 생존율은 대조군(100%)에 비하여 37%로 나타났는데 비하여 30 μ g/ml ZJS의 처리에서는 49%로 나타났다. 또한 70 μ g/ml 처리에서는 63%로 나타났으며, 특히 140 μ g/ml ZJS의 처리에서는 88%($p<0.05$)로 높은 증가율을 나타냈다(Fig. 3).

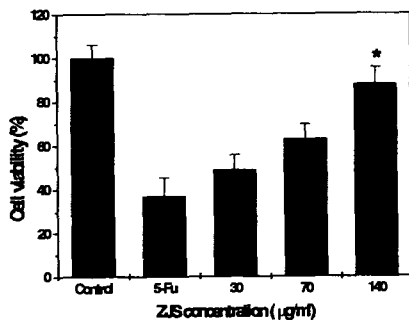


Fig. 3. Dose-response relationship of Ziziphi Jujubae Semen(ZJS) for its neuroprotective effect on 5-Fu-induced cytotoxicity by XTT assay. Cultured cells were preincubated with ZJS for 2 hours before exposure to 12ug/ml 5-Fu for 48 hours. The results indicate the mean±SEM(n=6). * $p<0.05$

고찰

5-Fu는 S-phase에 특이적으로 작용하여 세포주기를 방해함으로써 세포의 증식이나 분열을 억제하는 약리활성을 가지고 있다¹³. 그러나 병변의 치료를 위하여 이의 과도한 사용은 세포의

손상은 물론 이의 독성으로 인한 심한 부작용을 초래하여 결국 병변을 더욱 악화시킨다고 한다^{9,13}. 따라서 본 연구에서는 한약 추출물인 산조인(ZJS)의 영향을 배양 전정신경세포를 대상으로 하여 조사하기 위하여 5-Fu가 3~24ug/ml까지의 각각의 농도로 포함된 배양액에서 신경세포를 48시간 동안 배양한 후 5-Fu의 세포독성효과를 XTT assay에 의하여 세포생존율의 측면에서 조사하였다. 그 결과 생쥐의 배양 전정신경세포에 처리한 5-Fu의 농도에 비례하여 세포생존율을 감소시켰으며, 특히 12ug/ml 5-Fu의 처리에서 XTT50값이 나타났다. 본 실험의 이같은 결과는 5-Fu가 배양 생쥐의 전정신경세포에 독성효과를 나타냈음을 증명하였다. 이는 Moon등(1991)¹³이 생쥐의 배양 섬유모세포에 5-Fu를 처리한 결과 세포독성을 나타냈다는 연구결과와 일치하였다. 본 실험이나 위의 타 연구자의 실험결과에서처럼 5-Fu가 세포독성을 나타낸 것은 아마도 5-Fu가 전정신경세포의 세포주기를 방해함으로써¹³ 세포의 퇴화를 초래하고 이는 곧 세포생존율의 감소를 보임으로서 세포독성을 나타낸 것으로 생각된다¹⁴. 또 하나의 가능성은 5-Fu가 RNA의 활성화에 손상을 초래함으로써 세포의 단백질합성에 장애를 주어 세포의 생존율을 감소시켰을 가능성도 배제할 수는 없다^{13,14}. 한편, 5-Fu의 세포독성에 대한 한약추출물인 ZJS의 영향을 조사하기 위하여 일정시간 동안 배양이 완료된 생쥐의 전정신경세포에 12ug/ml 5-Fu를 48시간 동안 처리하기 전에 30~140ug/ml의 ZJS가 각각의 농도로 포함된 배양액내에서 처리한 결과 5-Fu만의 처리에 비하여 신경세포에 처리한 ZJS의 농도에 비례하여 세포의 생존율이 모두 증가한 것으로 나타났다. 특히, 140ug/ml의 ZJS 처리에서 세포의 생존율은 5-Fu만의 처리시 세포의 생존율인 37%에 비하여 88%($p<0.05$)로 유의하게 증가한 것으로 나타남으로서 ZJS는 5-Fu의 독성을 방어하였다. 본 실험에서 5-Fu에 대한 ZJS의 방어효과는 아마도 5-Fu에 의한 전정신경세포의 세포주기손상을 ZJS가 방어함으로써 그 결과 세포생존율을 증가시켰을 가능성이 클 것으로 생각된다¹³. 또 하나의 가능성은 5-Fu가 세포의 DNA에 미치는 손상을 ZJS를 전처리하는 동안 이미 세포로 들어간 ZJS가 5-Fu에 의한 DNA의 손상을 방해함으로써^{9,13} 그 결과 DNA합성이 회복되어 세포의 생존율이 증가되었을 가능성도 배제할 수는 없다.

결론

5-Fluorouracil(5-Fu)가 배양 전정신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 여러 농도의 5-Fu가 각각 포함된 배양액에서 신경세포를 24시간 동안 처리한 후 5-Fu의 세포독성을 조사하였으며, 또한 5-Fu에 의하여 매개된 세포독성에 대한 한약추출물인 산조인(Ziziphi Jujubae Semen, ZJS)의 방어효과를 XTT assay법에 의하여 분석하였다. 생쥐로부터 순수분리 배양한 전정신경세포를 3~24 μ g/ml 5-Fu가 포함된 배양액에서 48시간 동안 배양한 결과 5-Fu의 농도에 비례하여 세포생존율이 유의하게 감소되었다. 또한 5-Fu에 의한 세포독성에 대하여 ZJS는 세포생존율을 유의하게 증가시킴으로서 5-Fu의 독성으로 부터의 세포손상을 유의하게 방어하였다.

이상의 결과로 부터 5-Fu는 생쥐의 배양 전정신경세포에 독

성효과를 나타냈으며 ZJS와 같은 한약추출물이 5-Fu의 독성을 방어하는데 매우 효과적이었다.

감사의 글

이 논문은 2001년도 두뇌한국21사업과 원광대학교 교비의 일부지원에 의해서 연구됨.

참고문헌

1. Hobson B, Denekamp J : Endothelial proliferation in tumors and normal tissues; continuous lavelling studies. Br J Cancer 49:405-413, 1984.
2. Michikawa M, Lim KT, McLamon JG, Kim SU : Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. J Neurosci Res 37:62~70, 1994.
3. 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.
4. Fernando MR, Nanri H, Yoshitake S, Nagatakuno K, Minakami S: Thioredoxin regenerates proteins inactivated by oxidative stress in endothelial cells. Eur J Biochem 207:917-922, 1992.
5. Mayevsky A : Brain redox state monitored in-vivo by fiberoptic surface fluorometry. Brain Res Rev 7:49-68, 1984
6. 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.
7. Choi DW : Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. J Neurosci 7:369-379, 1987.
8. Rosen D, Siddique T, Patterson D, Figlewicz D, Sapp P, Hentai A, Donaldson D, Goto J, O'Regan J, Deng H, Rahmani Z, Krizus A et al: Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature (London) 362:59-62, 1993.
9. Morad M, Jonasson J, Lindstein J : Distribution of mitomycin C induced breaks on human chromosome. hereditas 74:273-282, 1973.
10. Elion GB, Kovensky A, Hitchings GH, Metz E, Rundles RW : Metabolic studies of allopurinol, an inhibitor of xanthine oxidase. Biochem Pharmacol, 15:863-880, 1986.
11. Borenfreund E, Babich H, Martin-Alcuacil N : Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays-The neutral red(NR) and tetrazolium MTT test. Toxic In Vitro 2:1-6, 1988.
12. Zhang Y, Talaly P, Cho CG, Posner GH : A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: Isolation and elucidation of structure. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 89:2399-2403, 1993.
13. Moon CS, Park HS, Kim JJ, Chung YT : A study on the cytotoxic effects of mitomycin C and 5-Fluorouracil in cultured rat fibroblasts. Korean J Toxicol 7(1):13-20, 1991.
14. Chung YT, Choi MK, Kim JJ, Kim JM, Park ST : A study on the cytotoxicity of adriamycin on cultured rat myocardial and endothelial cells. J Chonnam Med Sci 2:221-229, 1988.
15. 김인환, 황우익 : 인삼의 polyacetylene 성분이 간암(HePG2) 및 L929 세포증식에 미치는 영향연구. 고려의대논문집 30:35-51, 1993.
16. 최영조 : 인삼이 CCl₄에 의한 백서 간손상 및 방사선장애에 미치는 영향에 대하여. 서울 의대지 13:1-14, 1972.
17. 이상인 : 방제학. 서울, 계축문화사. p60-93, 1984.