

Hydrogen Peroxide에 의하여 손상된 배양 척수운동신경세포에 대한 천마의 영향에 관한 연구

김형수 · 이용석 · 이환봉 · 손일홍² · 이재규 · 손영우 · 이정현 ·
이강창¹ · 류명환⁴ · 송호준⁴ · 성강경⁴ · 박승택² · 이갑상³ · 류도곤^{4*}

원광대학교 의과대학, 1 : 한의학 전문대학원, 2 : 원광의과학연구소, 3 : 원광대학교 생명과학부, 4 : 원광대학교 한의과대학

Effects of Rhizoma Gastrodiae on Cultured Mouse Spinal Motor Neurons Damaged by Hydrogen Peroxide

Hyung Su Kim, Yong Suk Lee, Whan Bong Lee, Il Hong Son², Jae Kyo Lee,
Young Woo Son, Jung Hun Lee, Kang Chang Lee¹, Myeung Hwan Ryu⁴,
Ho Joon Song⁴, Kang Kyung Seong⁴, Seung Taeck Park², Kap Sang Lee³, Do Gon Ryu^{4*}

School of Medicine, 1 : Department of Graduate School of Oriental Medicine, 2 : Institution of Wonkwang Science,
3 : College of Life Science and Natural Resources, 4 : College of Oriental Medicine, Wonkwang University,

To elucidate the toxic effect of oxygen free radicals on cultured mouse spinal motor neurons damaged by hydrogen peroxide(H₂O₂)-induced neurotoxicity, we examined the neurotoxicity induced by oxygen radicals by NR assay when cultured spinal motor neurons were grown in the medium containing various concentrations of H₂O₂ for 6 hours. In addition, neuroprotective effects of herb extracts such Rhizoma Gastrodiae(RG), on H₂O₂-induced neurotoxicity in cultured spinal motor neurons were evaluated after cultured spinal motor neurons were preincubated with various concentrations of herb extract, RG for 2 hours before 50uM H₂O₂ for 6 hours. H₂O₂ decreased remarkably cell viability in dose-and time-dependent manner in these cultures, and also herb extract, RG increased cell viability of spinal motor neurons damaged by H₂O₂ in these cultures. From the above results, it is suggested that H₂O₂ was toxic in cultured spinal motor neurons derived from mouse, and RG was effective in blocking the neurotoxicity induced by oxidative stress in these cultures.

Key words : Oxidative stress, Spinal motor neuron, Cell viability.

서 론

항산화효소나 산소자유기의 제거제 등은 과도한 산소자유기를 제거해줌으로써 병변을 회복시켜 주는데 중요한 역할을 한다는 보고에 근거하여^{1,2)} 산소자유기의 독성효과와 이에 대한 방어 및 회복작용에 대한 기전을 밝히려는 연구가 진행되어 왔다³⁾. 그러나 아직도 이에 대해 자세하게 밝혀져 있지 않다. 산소자유기는 뇌졸중⁴⁾ 및 Parkinsonism⁵⁾과 같은 여러 신경병변과 밀접한 관련이 있음이 많은 연구에서 보고되고 있다⁶⁾. 또한 산소자유기는 배양 해마신경원에서 excitatory amino acids(EAAs)의 분비를 촉진시킨다는 보고에 따라 산소자유기와 EAA는 여러 신경성질

환의 주요한 병리적 요인이라고 밝혀지고 있다⁷⁾. 최근의 몇몇 연구에서 산소자유기는 곧 EAA의 분비를 촉진시키며⁸⁾, 그 결과 세포내 Ca²⁺의 농도를 증가시킴으로써 신경세포의 손상내지는 사멸을 초래한다고 보고된 바 있다⁹⁾. 우리 인체의 뇌에는 3종류의 glutamate receptor가 존재하고 있는 것은 이미 잘 알려진 사실이다. 다시 말하면 N-methyl-D-aspartate(NMDA) receptor를 비롯하여 α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid (AMPA) 및 kainate activate ion channel-linked receptor이다. 이 중에서도 Ca²⁺의 ion-channel과 밀접한 관계가 있는 NMDA receptor는 여러가지 EAA의 자극에 의해 활성화 됨으로써 세포내 Ca²⁺ 농도를 증가시키거나¹⁰⁾ 또는 이차적으로 Ca²⁺ 증가와 같은 병적 상태에 의해 세포내 각종 효소나 이차 신호전달물질에 영향을 줌으로써 결국 세포를 퇴화케하여¹¹⁾ 신경병변을 가속화시킨다고 알려져 왔다. 최근에 동물이나 식물에서 추출한 천연물

* 교신저자 : 류도곤, 전북 익산시 신용동 344, 원광대학교 한의과대학
E-mail : tkryu@wonkwang.ac.kr, Tel : 063-850-6846
접수: 2001/11/18 · 수정: 2002/01/23 · 채택 : 2002/02/08

들에서 산소자유기의 독성이나 이의 산화적 손상으로 인해 유도되는 각종 신경병변의 치료에 매우 효과적인 약리적 활성을 가지고 있음이 몇몇 임상실험에서 보고되어 지고 있다^{9,11)}. 이같은 천연물은 지금까지 기존의 약제에 비하여 독성이 적거나 없을뿐만 아니라 또한 이로 인한 부작용이 적기 때문에 천연물을 이용한 병변의 치료를 위한 약제의 개발에 우리나라를 비롯한 여러 선진국들은 많은 노력과 투자를 아끼지 않고 있다^{8,13)}. 이같은 천연물을 이용한 신약개발에 있어서 무엇보다도 중요한 것은 각종 질환의 병변모델이 필수적임은 말할 것도 없다¹⁴⁾. 그러나 현재까지 동물질환의 모델은 소수에 불과하며, 이 역시 값이 고가여서 이를 이용한 약제의 개발에 대한 연구는 사실상 많은 어려움이 따른다^{2,15)}. 그러나 다행히 근래에 세포배양기술이 널리 보급되면서 배양세포를 이용한 병변의 모델개발로 위와같은 어려움이 많이 제거되게 되었다. 본 연구는 산소자유기의 신경독성에 대한 병리적 기전을 규명하기 위하여 배양 척수 운동신경세포를 배양한 후 H₂O₂를 처리하여 산소자유기의 독성을 분석하고 또한 산소자유기에 의하여 유발되는 신경독성에 대한 천마(Rhizoma Gastrodiae, RG)의 방어효과를 조사하기 위하여 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

본 실험에 사용한 동물은 ICR 계통의 생후 3일된 건강상태가 양호한 생쥐를 사용하였다.

2. 실험방법

1) 한약재의 추출

본 실험에 사용한 한약재의 추출은 한약재와 증류수를 환저 플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 2시간동안 전열기로 전탕한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 진공 농축기로 감압농축한 후 동결건조기에서 24시간 동결건조하여 분말 시료를 얻었다.

2) 약제 제조

본 실험에 사용한 약제로는 Hydrogen peroxide(H₂O₂, Sigma)는 냉암소에 보관한 후 실험 당일 적당한 양으로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다.

3) 세포배양

척수운동신경세포의 분리는 Kim¹²⁾의 방법에 따라 시행하였다. 즉 생쥐에서 적출한 척수조직은 0.25% trypsin이 포함된 phosphate buffered saline(PBS)으로 처리한 후 36°C, 5% CO₂/95%air로 조절된 항온기 내에서 배양하였다. 배양완료후 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 전처리된 96-multiwell에 3×10⁶cells/well의 밀도로 세포를 분주하였다. 분주된 세포는 3일 간격으로 새로운 배양액으로 교환하여 주었으며 7일 동안 배양후 본 실험에 사용하였다.

4) Hydrogen Peroxide(H₂O₂) 처리

H₂O₂가 생쥐의 척수운동신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 일정시간 배양한 척수운동신경세포를 0.6% D- glucose 가 함유된 MEM으로 3회 세척한 다음 1~100uM을 여러 농도로 조합하여 혼합한 다음 이들 각각의 배양액에서 1-12시간 동안 처리한 후 분석하였다.

5) 세포독성 및 방어효과 검정(세포생존율 분석- NR정량)

Neutral red(NR, Sigma)의 정량은 Mosmann¹⁴⁾의 방법에 따랐다. 즉 여러 농도의 H₂O₂를 처리한 배양 신경세포를 phosphate buffered saline(PBS)으로 3회 세척 후 전날 제조한 5mg/ml의 NR을 well당 최종농도로 희석하여 넣은 다음 3시간 동안 37°C, 5% CO₂ 로 조절된 정온기에서 배양하였다. 배양 완료후 PBS로 3회 세척후 1% formalin으로 고정하고 1% glacial acetic acid로 처리한 다음 spectrophotometer로 540nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

6) 통계 처리

실험 결과에 대한 유의성의 검정은 ANOVA후에 Tukey-Kramer multiple comparison test에 의하였으며 p값이 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

결 과

1. H₂O₂의 독성효과

1) 세포 생존율 분석 - NR 정량

일정시간 동안 배양한 척수운동신경세포를 Ca²⁺, Mg²⁺-free 인 Hank's balanced salt solution(HBSS, Gibco)으로 3회 세척한 후 H₂O₂가 1 uM에서 1~100uM까지의 농도로 각각 포함된 배양액에서 6시간 배양한 다음 세포의 생존율을 조사한 결과 1 uM의 처리에서 세포생존율은 대조군(100%)에 비하여 83.6%로 나타났으며 25 uM과 50 uM에서는 각각 75.3%와 50.7%(p<0.05)로 나타났다. 또한 100 uM H₂O₂에서는 42.5%(p<0.01)의 생존율을 나타냈다(Fig. 1).

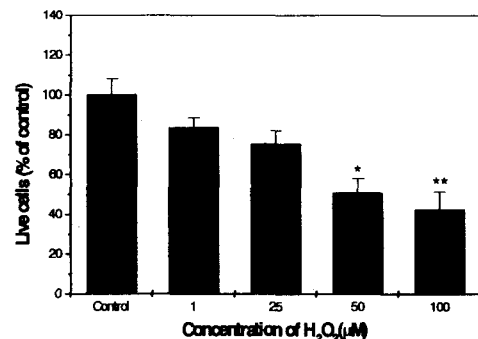


Fig. 1. A dose-dependency of hydrogen peroxide(H₂O₂). H₂O₂-induced neurotoxicity was measured by NR assay in cultured mouse spinal motor neurons. Cultures were exposed to 1, 25, 50 and 100uM H₂O₂ for 6 hours, respectively. The results indicate the mean±SD for 6 experiments. *p<0.05. **p<0.01

H₂O₂가 배양시간에 따라 척수운동신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 NR50값인 50 uM H₂O₂농도에서 1~12시간

동안 배양한 후 각 시간별로 세포의 생존율을 조사한 결과 1시간 배양에서는 대조군(100%)에 비하여 71.9%로 나타났으며 3시간 배양에서는 78.7%로 나타났으며 6, 12시간에서는 각각 50.8 (p<0.05)% 및 36.5%(p<0.01)로 나타났다(Fig. 2).

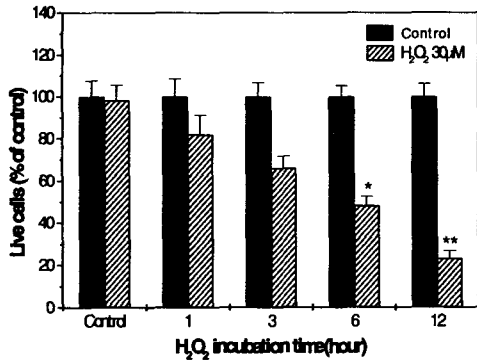


Fig. 2. A Time-dependency of hydrogen peroxide(H₂O₂). H₂O₂-induced neurotoxicity was measured by NR assay in cultured mouse spinal motor neurons. Cultures were exposed to 50μM H₂O₂ for 1, 3, 6 and 12 hours, respectively. The results indicate the mean±SD for 6 experiments. *p<0.05; **p<0.01

2) 천마(RG)의 영향

일정 시간 동안 배양한 척수운동신경세포에 1μg/ml에서부터 100μg/ml 까지의 각각 농도의 천마를 2시간 동안 전처리 한 다음 이를 다시 20μM H₂O₂가 포함된 배양액에서 6시간 동안 배양한 후 이의 영향을 조사한 결과 50μM H₂O₂만을 처리한 경우 세포생존율의 감소율은 대조군(100%)에 비하여 68.8%인데 비하여 1μg/ml RG를 처리한 경우 세포생존율의 감소율은 대조군에 비하여 62.2%로 나타났으며 25μg/ml RG를 처리한 경우 52.5%(p<0.05)로 나타났다. 또한 50μg/ml RG와 100μg/ml RG의 처리에서는 각각 36.8%(p<0.01)와 23.5%(p<0.01)로 나타났다 (Fig. 3)

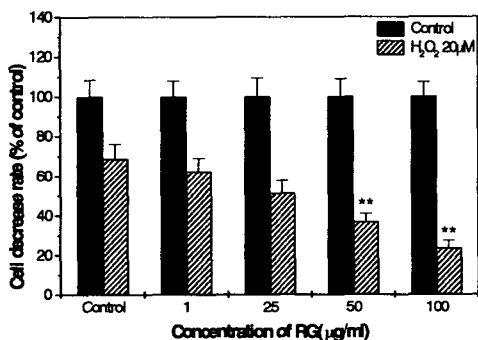


Fig. 3. A dose-response relationship of Rhizoma rattodiae(RG) for its neuroprotective effect on hydrogen peroxide(H₂O₂)-induced neurotoxicity by NR assay, in cultured mouse spinal motor neurons. Cultures were preincubated for 2 hours before exposed to H₂O₂. The results indicate the mean±SD for 6 experiments. **p<0.01

고찰

정상적으로 산소라디칼이나 질소라디칼은 인체의 방어 기전

에 관여하기도 하나 때로는 ALS환자에서와 같이 superoxide dismutase-1(SOD-1)유전자의 이상에 의하여 환자의 뇌속에 과다하게 산소자유기가 축적되어 심한 신경성 병변을 야기하기도 한다⁹⁾. 더우기 과다히 축적된 산소자유기는 세포막의 지질 과산화 반응을 자극하고³⁾ 이는 곧 이어 이 반응과 관계된 효소와 세포 내 각종 이차 전달자의 활성화에 영향을 주어 결국 세포의 퇴화를 초래하게 되고 나아가서는 세포를 사멸케 한다⁸⁾. 또한 과다하게 형성된 산소자유기는 excitatory amino acids(EAAs)의 방출을 촉진시켜⁹⁾, 그 결과 세포내 Ca²⁺ 농도를 증가시킴으로써 여러 신경세포에 손상을 초래한다고 보고된 바 있다¹³⁾. 따라서 산소 자유기에 의한 신경병변의 임상치료적 접근을 위하여 EAA와 세포내 Ca²⁺ 농도를 증계하여 주는 N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor에 대한 길항제를 투여하거나⁵⁾ 또는 세포내 Ca²⁺ 농도의 안정과 산소자유기의 형성을 저해하는 저해제 및 신경성장인자(neurotrophic factor, NTF) 등을 처리함으로써 병변의 치료를 시도하려는 연구가 활발히 진행중이다⁶⁾.

본 연구는 산소자유기의 독성에 대한 병리적 기전을 규명하기 위하여 배양 척수 운동신경세포를 재료로 H₂O₂의 독성을 분석하고 또한 H₂O₂에 의하여 유발되는 신경독성에 대한 천마의 방어효과를 조사하기 위하여 본 연구를 시행하였다. 본 실험에서 산소자유기의 신경독성효과를 조사하기 위하여 생쥐의 척수 조직으로부터 순수 분리하여 배양한 척수운동신경세포를 여러 농도의 H₂O₂에 노출시킨 후 NR 정량분석을 시행한 결과 산소 자유기의 처리농도와 노출시간에 비례하여 세포의 생존율은 대조군에 비하여 유의한 감소를 보였다(Fig. 1). 또한, NR assay법에서는 50 μM H₂O₂ 농도에서 1-12시간 동안 처리한 결과 처리 시간이 경과함에 따라 세포생존율이 대조군에 비하여 유의한 감소를 보였다. 특히, 50 μM H₂O₂ 농도에서 6시간 동안 처리에서 MCV(midcytotoxicity value)값을 나타내었다(Fig. 1). 이러한 결과는 H₂O₂가 척수운동신경세포에 독성효과를 가지고 있다는 것을 증명하는 것으로, 이는 Kim⁶⁾이나 Hall과 Braughler¹⁰⁾가 산소자유기가 척수신경을 손상함으로써 독성효과를 나타냈다는 연구보고와 일치하였다. 따라서 이 같은 연구결과들은 H₂O₂의 산화적 손상이 신경독성에 관여하고 있음을 말해 주고 있을 뿐만 아니라, 동시에 세포내 항산화계에 손상을 주어 그 결과 항산화효소의 활성이 감소됨으로서 미처 처리되지 못한 산소 자유기들이 축적되어 세포막의 지질과산화반응의 촉진과⁴⁾ lipid phosphatase A2와 같은 이차전달자를 비롯하여 각종 효소나 단백질을 불활성 세포의 퇴화 내지는 사멸을 초래하였을 가능성이 크다고 생각된다. 천마가 H₂O₂에 의하여 손상된 배양 척수운동신경세포에 대한 세포생존율의 방어효과를 알아보기 위하여 20 μM H₂O₂농도에서 6시간 동안 노출시키기 2시간 전에 1~100 μg/ml RG가 각각 포함된 배양액에서 전처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 세포생존율의 감소를 유의하게 방어하였다(p<0.01).

이상의 실험 결과를 종합해 보면, H₂O₂와 같은 산소자유기는 산화적 손상에 의해 신경독성을 나타내어 세포생존율을 감소시켰으며, 이에 대한 RG의 처리는 H₂O₂의 산화적 손상을 방어하는데 효과적인 것으로 나타났다.

결 론

산소자유기의 산화적 손상에 대한 기전을 규명하기 위하여 생쥐의 척수로 부터 순수 분리 배양한 운동신경세포를 여러 농도의 hydrogen peroxide(H_2O_2)가 포함된 배양액에서 6시간 동안 처리한 다음 H_2O_2 가 배양 척수운동신경세포에 미치는 영향을 조사하였으며 또한 H_2O_2 의 독성효과에 대한 Rhizoma Gastrodiae (RG)의 영향을 조사한 결과는 다음과 같다. H_2O_2 는 NR 분석법에 의하여 생쥐의 배양 척수운동신경세포에 처리한 농도와 시간에 비례하여 유의한 세포생존율의 감소를 보였으며, 또한 RG는 H_2O_2 에 의한 산화적 손상으로 부터 세포생존율의 감소를 유의하게 방어하였다.

이상의 결과로부터 H_2O_2 는 생쥐에서 분리한 배양 척수운동신경세포에 독성을 나타냈으며, 동시에 RG와 같은 한약추출물이 H_2O_2 의 산화적 손상으로 부터 세포손상을 효과적으로 방어한 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2000년도 두뇌한국 21사업과 원광대학교 교비지원에 의해서 이루어 졌음.

참고문헌

1. Elion GB, Kovensky A, Hitchings GH, Metz E, Rundles RW : Metabolic studies of allopurinol, an inhibitor of xanthine oxidase. *Biochem Pharmacol* 15: 863-880, 1966.
2. Rothstein JD, Tsai G, Kunel Rw, Clawson L, Cornblath DR, Drachman DB, Pestronk A, Stauch BL, Coyle JT : Abnormal excitatory amino acid metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann Neurol* 28: 18-25,1990
3. Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carla V, Morroni F: Excitatory amino acid and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J Neurosci* 10: 1035-1041, 1990.
4. Yamamoto M, Shima T, Uozumi T, Sogabe T, Yamada K, Kawasaki T : A possible role of lipid peroxidation in cellular damages caused by cerebral ischemia and protective effect of alpatocopherol administration. *Stroke* 14: 977-982, 1983.
5. 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.
6. 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.
7. 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.
8. Rosen D, Siddique T, Patterson D, Figlewicz D, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O Regan J, Deng H, Rahmani Z, Krrizus A et al. : Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated wigh familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature(London)* 362:59-62, 1993.
9. Halliwell B : Reactive oxygen species and the central nervous system. *J. Neurochem* 59: 1609-1623, 1992.
10. Hall E, Braugher JM : Role of lipid peroxidation in post-traumatic spinal cord degeneration. *Cent Nerv System Trauma* 3: 281-249, 1986.
11. Saunders RD, Dugan LL, Demediuk P, Means ED, Harrocks LA, Anderson DK : 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, 1987.
12. Kim YS, Kim SU : Oligodendroglial cell death induced by oxygen radicals and its protection by catalase. *J Neurosci Res* 29: 100-106, 1991.
13. Kim SU, Osborne D, Kim MW, Spigelman I, Puil E, Shin D : Longterm culture of human fetal spinal cord neurons: Morphological immunocytochemical and electrophysiological characteristics. *Neuroscience* 25:659-670, 1988.
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. Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carrla V, Moroni F : Excitatory amino acid release from rat hippocampal slices as a consequence of free-radical formation. *J Neurochem* 51: 1960-1963, 1988.