

뇌신경세포에서 토양미생물 발효추출액인 석정의 카드뮴 독성에 대한 방어효과

홍순해 · 안성희 · 장봉기 · 박종안 · 이종화[#]

순천향대학교 환경보건학과

(Received February 6, 2003; Revised March 20, 2003)

Protective Effects of Seok-Jeong on the Toxicity of Cadmium in Neuronal Cells

Soon-Hai Hong, Sung-Hee Ahn, Bong-Ki Jang, Jong-An Park and Jong-Wha Lee[#]

Department of Environmental Health Science, College of Natural Science, Soonchunhyang University, 646, Shinchang-myun, Asan-Si, Choongchungnam-do 336-745, Korea

Abstract — Seok-jeong (SJ) is a solution of various metal ions and numerous other organic substances produced through extraction and fermentation of herbs and soil using geo-microbes, and it has been shown to improve symptoms of senile dementia. In this study, we investigated the protective effects of SJ against neurotoxicity of cadmium in HT22 hippocampal neuron cell line. SJ significantly protected from the cadmium-induced decreased cell viability measured by MTT assay ($p < 0.01$). The protective effects of SJ against cadmium toxicity were confirmed through observing morphological changes using inverted microscope. Additionally, SJ significantly repressed the formation of lipid peroxidation induced by high concentration of cadmium, and likewise, significantly repressed the reduction of glutathione by cadmium in HT22 cells. Vitamin C at the concentration found in SJ did not show any protective effect against cadmium toxicity in HT22 cells, indicating that vitamin C may not have a major role in the protective mechanism of SJ. Taken together, these results suggest that SJ may be a valuable agent for the protection of cadmium toxicity on the neuronal cells, and that the mechanism of the action of SJ may be due to reduced lipid peroxidation and increased glutathione level.

Keywords □ Cadmium, HT22 cell, MTT assay, lipid peroxidation, glutathione

치매는 알, AIDS와 함께 세계보건기구가 정한 21세기 3대 질환의 하나로, 인간의 독립적인 생활 능력을 현저히 감퇴시켜 결국은 폐인에 이르게 만드는 대표적인 만성 진행성 뇌 정신질환이다. 치매는 그 발생원인에 따라 매우 다양하게 분류되고 있으며, 그 중에서 퇴행성 질환에 의한 치매가 가장 발생빈도가 높은 것으로 알츠하이머병, 픽병, 파킨슨병, 진행성핵상마비, 루이체병 등이 있으나 아직 그 원인이 완전히 규명되지 않고 있다. 노인성 치매의 60~70%를 차지하는 알츠하이머병은 나이가 들수록 이환율이 높은 것으로 알려져 있다.¹⁾

본격적인 고령화 사회의 문턱에서 있는 우리나라의 경우도 이제 치매가 가장 심각한 노인 정신 보건 현안으로 대두되고 있어 조기에 효과적인 치료 관리체계를 마련하지 못한다면 치매가 우리 국가 및 가정 경제에 미치게 될 영향이 심각할 것으로 예상된다. 따라서 한국의 문화적, 사회적, 경제적 현실에 적합한 치

매 치료관리 체계의 확립이 요구되며, 특히 효과적인 치매 치료 체계의 개발이 시급한 상황이다.²⁾

최근에 수종의 금속과 알츠하이머병과의 관련성에 관한 많은 연구논문이 보고되고 있으며, 특히 카드뮴은 자체의 뇌신경세포에 대한 독성뿐만 아니라 다른 필수금속(아연, 마그네슘 등)을 대체함으로써 알츠하이머병을 유발할 수 있는 것으로 조사되고 있다.³⁻⁵⁾

카드뮴은 전기도금, 안료, 플라스틱, Cd-Ni 배터리 등 산업적으로 다양한 용도로 이용되고 있다. 그 사용증가로 인하여 환경 및 식품에 광범위하게 존재하고 있으며, 독성잠재력에 대한 관심이 고조되고 있다. 카드뮴은 인체내 반감기가 20~30년 정도로 나이가 들수록 간, 신장 및 뇌에 축적되어 독성을 유발하는 것으로 알려져 있으며, 신장, 고환, 호흡기계에 대한 부작용⁶⁾을 나타낼 뿐만 아니라 어린이에 있어 학습능력저하 및 과도한 반응과 같은 중추신경계에 대한 독작용^{7,8)}을 초래한다.

카드뮴의 중추신경계에 대한 독성기전으로는 활성 산소종 (ROS, reactive oxygen species)의 생성 유발,⁹⁻¹¹⁾ 항산화 방어시스템 (antioxidant defence systems)의 장애, 세포내 Ca^{++} 농도의 증

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 041-530-1271 (팩스) 041-530-1272
(E-mail) leejong@sch.ac.kr

가,¹²⁾ metallothionein(MT)을 유도하고 MT는 혈중에 존재하는 아연(Zn)의 섭취를 통한 아연결핍 유도작용¹³⁾ 등이 보고되고 있다. 특히, 카드뮴은 다양한 뇌신경세포에서 활성 산소종의 합성을 촉진하여 과산화물 생성 증가, 세포내 산화상태 변화, DNA 손상, 세포막 손상, apoptosis를 유발한다.¹⁴⁾ 최근에 카드뮴에 의해 초래되는 세포내 여러 생리·생화학적 영향들이 알츠하이머병의 유발에 관련이 있다는 사실이 밝혀지고 있다.

토양미생물 발효추출액(석정)은 선별된 토양 미생물을 이용하여 특정토양 내에서 1차 발효시키고, 수종의 생약제제를 가하여 2차 발효시켜 추출한 액상물질이다. 그 동안 석정은 다수의 질환에 민간약으로 사용되어 왔으며, 특히, 최근에 전세계적으로 이환율이 증가추세에 있는 노인성 질환인 치매(Alzheimer's disease)에도 치료효과가 있는 것으로 나타났다. 노인성 치매 환자 65명을 대상으로 13개월간 임상실험을 실시한 결과 90%의 환자에서 치매 증상의 개선효과가 있는 것으로 조사되었다.¹⁵⁾

본 연구에서는 치매에 치료효과가 있는 것으로 조사된 토양미생물 발효추출액(석정)을 대상물질로 하여 뇌신경세포에서 카드뮴의 독성에 미치는 영향을 관찰함으로써 석정의 방어기전을 밝히고, 퇴행성 질환인 치매 및 중금속에 의하여 유발될 수 있는 질환에 대한 석정의 적용 가능성을 검토하고자 한다.

실험방법

실험 대상물질

선별된 토양미생물을 특정토양에 투입하여 호기성 조건에서 1차 발효시키고, 미생물의 먹이로 각종 생약제제의 추출물을 투입하여 2차 발효시킨다. 1개월 정도의 2차 발효과정을 거친 후에 중화시키고, 여과하여 녹색의 토양미생물 발효추출액(석정)을 얻는다.

세포 배양

본 연구에서는 산화적 스트레스 연구^{16,17)}에 많이 이용되고 있는 HT22(hippocampal neuron cell line) 세포를 사용하였다. HT22 세포는 10% FBS가 첨가된 DMEM 배지를 사용하여 5% CO₂, 95% air, 37°C의 CO₂ 배양기에서 배양하였다.

MTT Assay

카드뮴이 세포의 생존 및 성장에 미치는 영향을 관찰하고자 MTT assay를 시행하였다. 96 well plate에 1×10⁶ cells/plate(200 μl/well)를 분주하여 CO₂ 배양기에서 24시간 배양한 후에 카드뮴 및 석정을 농도별로 동시에 처리하였다. 약물을 처리하고 24시간 후에 MTT assay를 시행하였다. MTT assay는 살아있는 세포의 미토콘드리아에 있는 succinate dehydrogenase에 의하여 tetrazolium 염이 보라색의 formazan으로 환원되는 성질

을 이용하여 세포의 생존 및 성장을 측정하는 방법이다. Formazan을 microELISA reader로 595 nm에서 흡광도를 측정한다.

LC₅₀ 산출 및 카드뮴과 석정 처리

MTT assay 결과로부터 HT22 세포에 대한 카드뮴의 LC₅₀와 LC₅₀를 산출하기 위하여 미국 EPA에서 제공하는 Benchmark Dose Software(BMDS)를 이용하였다. 세포에 대한 LC₅₀를 기초하여 카드뮴의 처리농도를 결정하였으며, 석정은 2.5, 5.0, 10.0 μl/ml 배지로 처리하였다.

세포의 형태학적 관찰

6 well plate에 세포를 분주한 후 24시간 배양하여 80~90% 정도 confluent해졌을 때 카드뮴을 농도별(8, 12, 16 μM)로 새로운 배지에 녹여 처리하였다. 24시간 배양한 후에 카드뮴이 세포의 형태에 미치는 영향을 도립현미경으로 관찰하였으며, 석정(2.5, 5.0, 10.0 μl/ml 배지)은 카드뮴과 동시에 배지에 가하여 처리하였다. 카드뮴의 독성에 미치는 비타민 C의 영향을 관찰하기 위한 실험에서 비타민 C의 처리량은 석정에 함유되어 있는 1.7 μg/ml 배지였다.

과산화물 측정

HT22 세포에 농도별로 카드뮴을 처리하고, 동시에 석정 5.0 μl/ml 배지를 가하여 8시간 배양한 후에 지방과산화의 지표로서 thiobarbituric acid-reactive substances(TBARS)를 Galvino 등의 방법¹⁸⁾으로 측정하였다. 20% trichloroacetic acid(TCA) 2.5 ml를 가하여 세포를 사멸 및 파괴시키고, 0.67% thiobarbituric acid(TBA) 4.5 ml를 가한 후에 15분간 끓인다. 원심분리한 후에 형광분광광도계(Ex: 515 nm, Em: 553 nm)로 형광세기를 측정한다. 1,1,3,3-tetramethoxy-propane(TMP)을 표준액으로 작성한 검량선을 이용하여 형광 세기를 nmol MDA량으로 환산하였다.

Glutathione 측정

세포내의 glutathione(GSH)량은 Tietze가 개발한 DTNB-GSSG reductase recycling assay법¹⁹⁾에 따라 측정하였다. 총 GSH 정량에 이용되는 recycling assay법은 특이적 효소과정으로 매우 민감한 방법이다. 측정원리는 GSSG를 glutathione reductase와 NADPH를 이용하여 GSH로 환원시키고, GSH에 DTNB를 가하여 TNB를 생성시킨다. TNB의 생성속도를 분광광도계로 412 nm에서 측정한다. 표준물질로 glutathione을 사용하여 작성한 검량선으로부터 시료중의 glutathione 함량을 산출한다.

자료 처리

실험자료의 분석은 SPSS 통계프로그램(ver. 8.0)과 Microsoft excel을 이용하였다. 대조군과 처치군의 차이는 t-test로 비교하

였으며, 카드뮴 단독 처리군과 카드뮴 및 석정 동시 처리군간의 차이는 분산분석하였다.

실험결과

카드뮴이 HT22 세포의 생존과 성장에 미치는 영향 및 석정의 방어효과

카드뮴이 뇌신경세포의 생존과 성장에 미치는 영향 및 석정의 방어효과를 관찰하고자 실시한 MTT assay 결과는 Fig. 1과 같다. 카드뮴 2 μM까지는 흡광도에 변화가 없는 것으로 보아 HT22 세포의 생존 및 성장에 영향이 없는 것으로 나타났으며, 카드뮴 4 μM부터는 세포의 생존이 억제되었다.

석정(2.5, 5.0, 10.0 μ/ml 배지) 단독 처리군과 대조군(카드뮴을 가하지 않은 군)의 흡광도를 비교하였을 때에 석정 처리군의 흡광도가 높은 것으로 보아 석정은 세포의 증식을 촉진시키는 작용이 있는 것으로 관찰되었다. 석정은 HT22 세포에서 카드뮴의 생존 및 성장 억제작용에 대한 현저한 방어효과가 있는 것으로 관찰되었으며(F-test, P<0.001), Fig. 1에서 석정의 농도를 증가시킬수록 세포의 생존곡선이 우측으로 이동하는 것으로 보아 석정의 방어효과가 용량의존적임을 알 수 있다. 카드뮴 8 μM 처리군에서 흡광도가 30% 정도 감소되었으나 석정을 2.5, 5.0 또는 10 μ/ml 배지로 동시에 처리한 군에서는 각각 9% 정도만 감소되었다. 또한 카드뮴 12 μM 처리군에서 흡광도가 54% 정도 감소되었으나 석정 10 μ/ml 배지 동시 처리군에서는 흡광도의 변화가 거의 없었다.

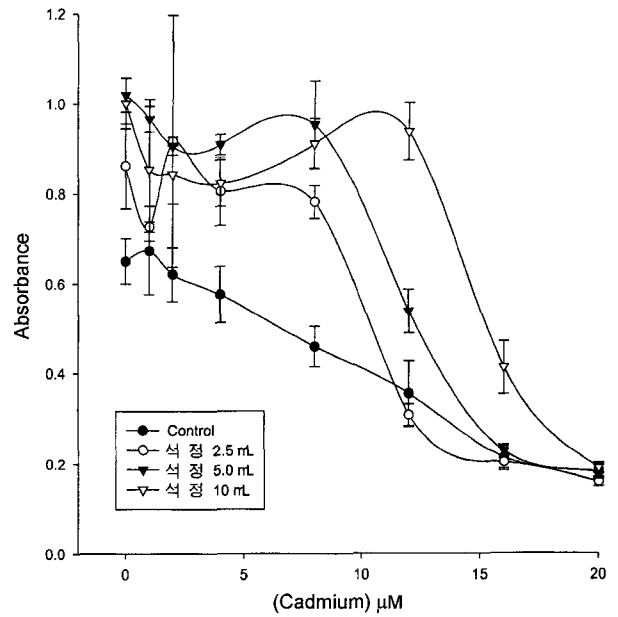


Fig. 1 – Effects of Seok-Jeong on the inhibitory effect of cadmium for HT22 cell survival and proliferation. Each point and vertical bar represents the mean±SEM (n=6).

카드뮴의 영향 및 석정의 방어작용의 현미경적 관찰

카드뮴 각각 0, 8, 12, 16 μM을 처리하여 24시간 배양한 후에 세포의 형태를 관찰한 결과는 Fig. 2와 같다.

대조군(Fig. 2의 A)에서는 세포가 바닥에 잘 부착하여 자라고 있으나 카드뮴 8 μM 처리군(B)에서는 일부의 세포들이 둥근 형

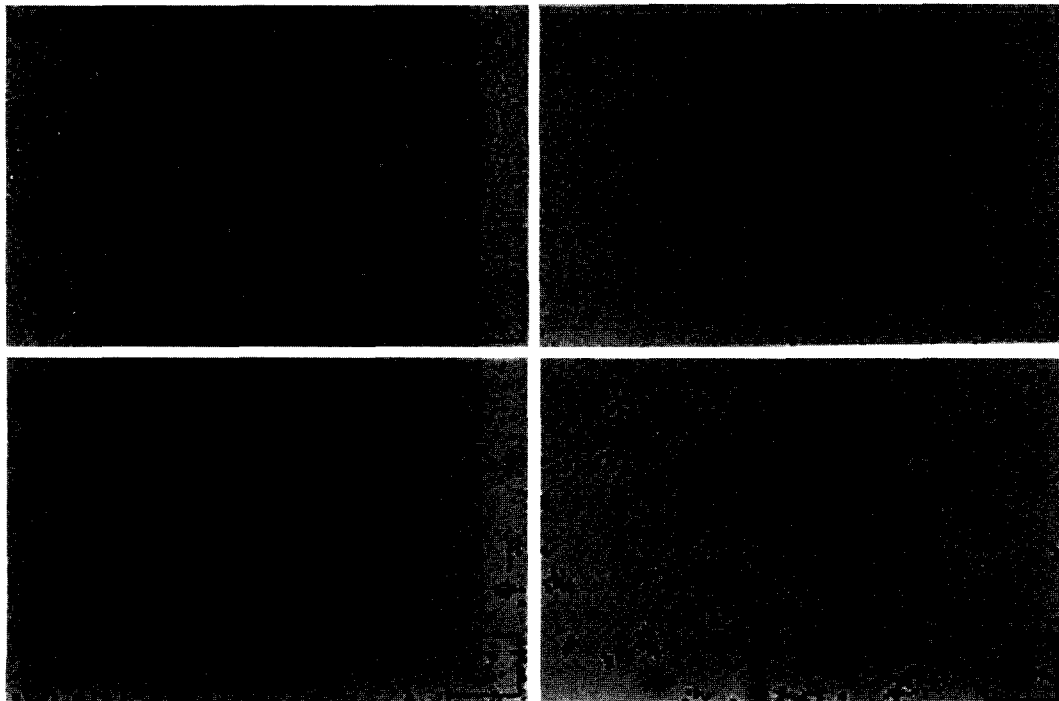


Fig. 2 – The effect of cadmium on morphology of HT22 cell. A; control, B; Cd, 8 μM, C; Cd, 12 μM, D; Cd, 16 μM.

태로 변하고 있는 모습을 관찰할 수 있다. 12 μM 처리군(C)에서는 많은 세포가 둥근 형태로 변하면서 바닥에서 떨어지고 있으며, 16 μM 처리군(D)에서는 생존 세포수가 현저히 감소하였고,

대부분의 세포가 부유되어 있다.

석정이 세포의 생존 및 성장에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 석정(2.5, 5.0, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 배지)을 처리하고, 24시간 배양한 후

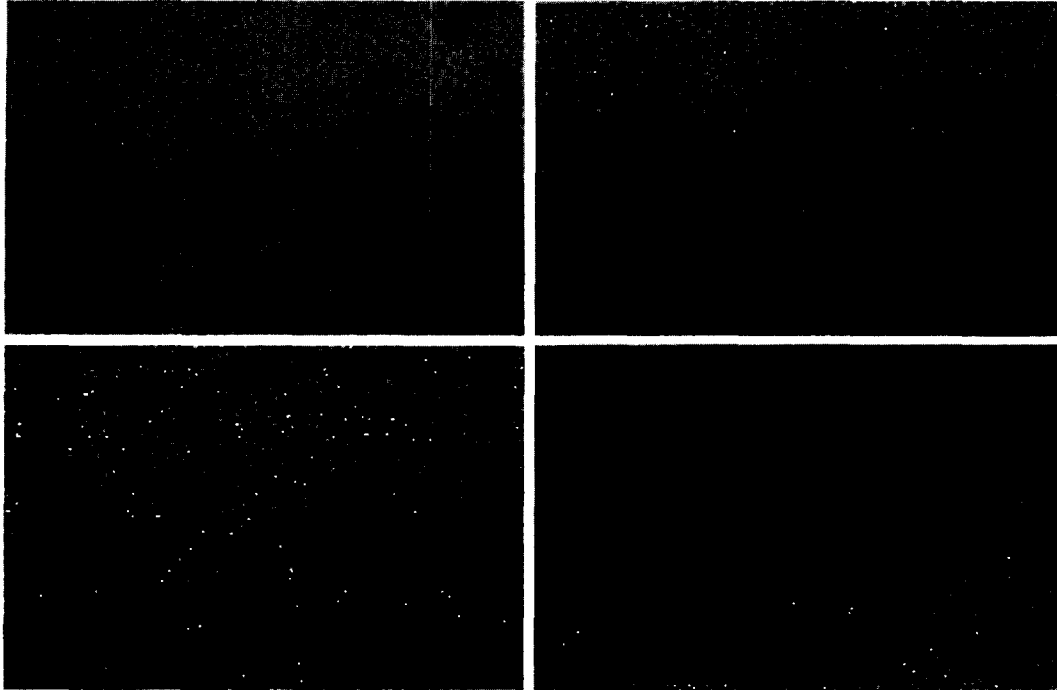


Fig. 3 – Effects of Seok-Jeong on the morphology of HT22 cell. A; control, B; Seok-Jeong 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ medium, C; Seok-Jeong 5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ medium, D; Seok-Jeong 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ medium.

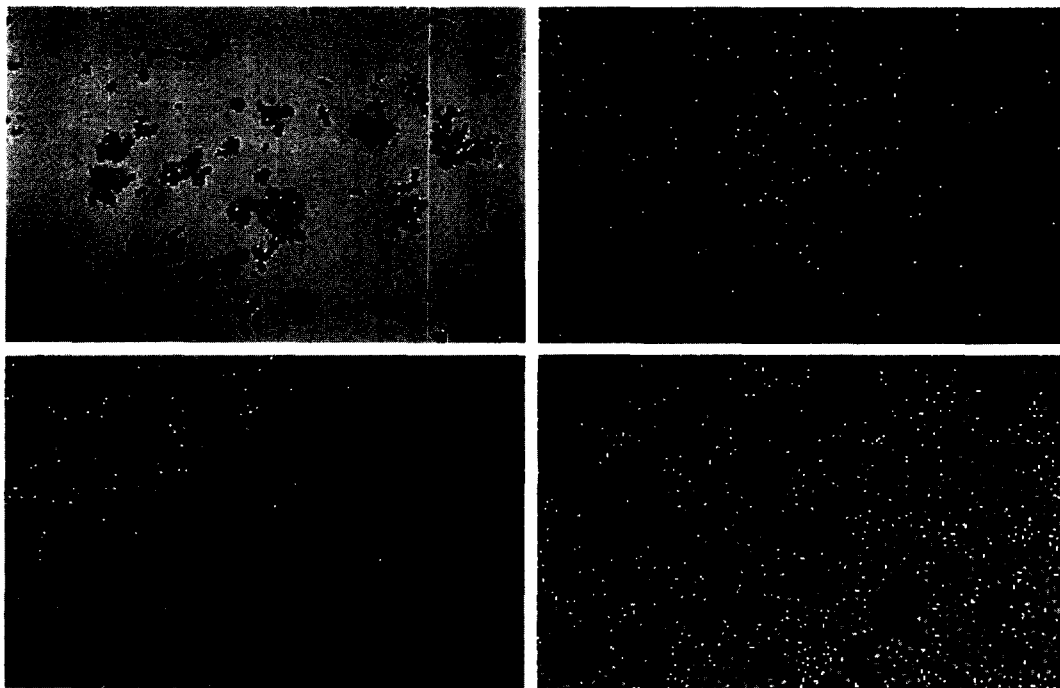


Fig. 4 – The effect of Seok-Jeong on the toxicity of cadmium in HT22 cell viability and morphology. A; Cd 12 μM , B; Seok-Jeong 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ medium+Cd 12 μM , C; Seok-Jeong 5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ medium+Cd 12 μM , D; Seok-Jeong 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ medium+Cd 12 μM .

에 세포의 형태를 도립현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 3과 같다.

대조군(Fig. 3의 A)에서 세포는 바닥에 부착하여 잘 자라고 있으며, 석정을 2.5, 5.0 및 10 µl/ml 단독 처리군(Fig. 3의 B, C 및 D) 경우에 대부분의 세포가 바닥에 부착하여 자라고 있으나 일부 floating 세포를 발견할 수 있다. 석정을 5.0 및 10 µl/ml 배지로 처리한 군에서는 대조군보다 많은 세포가 발견되며, 이는 MTT assay의 결과에서도 확인되었다.

석정이 카드뮴의 독성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 카드뮴 12 µM과 석정(2.5, 5.0, 10 µl/ml 배지)을 동시에 처리하고, 24 시간 배양한 후에 세포의 생존에 미치는 영향을 도립현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 4와 같다.

카드뮴 단독 처리군(Fig. 4의 A)에서 세포는 대부분 사멸되어 바닥에 부착된 것은 거의 없으나, 석정을 2.5, 5.0 및 10 µl/ml 배지로 처리한 경우에는 많은 세포가 바닥에 부착하여 자라고 있다. 석정의 농도를 증가시킬수록 더 많은 세포가 증식하고 있으며, 10 µl/ml 배지 처리군의 경우에는 카드뮴을 처리하지 않은 대조군(Fig. 2의 A)과 비슷한 생존율을 보이고 있어 카드뮴의 독성을 완전히 억제하는 것으로 나타났다.

비타민 C가 카드뮴의 독성에 미치는 영향

산화작용이 있는 비타민 C는 산화적 스트레스를 통하여 초래되는 카드뮴의 독성을 방어하는 효과가 있다고 보고되고 있



Fig. 5 – The effect of vitamin C on the toxicity of cadmium in HT22 cell viability and morphology. A; Cd 12 µM, B; vitamin C 0.95 µM+Cd 12 µM.

Table I – Contents of thiobarbituric acid-reactive substances in HT22 cells treated with cadmium and Seok-Jeong (SJ)

Group	Lipid peroxidation (n mole MDA/mg protein)		T-test
	Cd only	Cd+SJ (5.0 µl/ml)	
Control (Cd 0)	0.73±0.08	1.31±0.10**	p<0.01
Cd 4 µM	1.31±0.13	1.63±0.17**	N.S.
Cd 8 µM	2.02±0.20	1.86±0.25**	N.S.
Cd 16 µM	2.46±0.19	1.89±0.21**	p<0.05

Results are Mean±SD (n=3). **p<0.01 compared with control group (Cd, 0 µM).

다.²⁰⁻²² 석정에 함유되어 있는 비타민 C가 석정의 방어효과를 나타내는 유효성분인지를 조사하기 위하여 석정에 함유되어 있는 양에 해당하는 비타민 C(reduced ascorbic acid)를 카드뮴 12 µM과 동시에 처리하였을 때에 Fig. 5와 같이 비타민 C는 카드뮴이 HT22 세포에서의 생존 및 성장에 미치는 영향을 방어하지 못하였다.

지방 과산화물의 생성에 미치는 영향

카드뮴 단독 처리군과 카드뮴 및 석정(5.0 µl/ml 배지)을 동시에 처리한 군에서 세포 내의 지방 과산화물 함량을 측정된 결과는 Table I과 같다.

HT22 세포에서 카드뮴을 농도별로 처리하였을 때에 지방 과산화물의 함량은 용량의존적으로 증가하였다. 카드뮴 16 µM 처리군에서 지방 과산화물의 함량은 대조군과 비교하여 약 3배 정도 증가하는 것으로 나타났다. 석정 단독 처리군에서 지방 과산화물의 생성이 증가되었으며, 카드뮴(4 및 8 µM)과 석정 동시 처리군에서는 유의한 변화가 없었다. 그러나 카드뮴(16 µM) 단독 처리군에 비교하여 카드뮴과 석정 처리군에서는 지방 과산화물의 함량이 유의하게 감소하였다(p<0.05).

HT22 세포 내의 Glutathione 함량에 미치는 영향

이물질의 독성제거에 중요한 역할을 하며, 카드뮴의 독성기전에 관련된 glutathione의 함량에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 카드뮴 단독 처리군과 카드뮴 및 석정(5.0 µl/ml 배지)을 동시에 처리한 군에서 glutathione의 함량을 측정된 결과는 Table II와

Table II – Contents of glutathione in HT22 cells treated with cadmium and/or Seok-Jeong (SJ)

Group	Glutathione (n mole/mg protein)		T-test
	Cd only	Cd+SJ (5.0 µl/ml)	
Control (Cd 0)	35.8±3.4	32.5±9.6	N.S.
Cd 2 µM	29.8±4.7*	30.5±5.1*	N.S.
Cd 4 µM	21.2±4.9**	28.9±5.1*	p<0.01
Cd 8 µM	17.5±4.1**	31.5±3.5	p<0.01

Results are Mean±SD (n=4). *p<0.05, ** p<0.01 compared with control group (Cd, 0 µM).

같다.

HT22 세포내의 glutathione 함량은 카드뮴에 의해 용량의존적으로 감소되었다. 카드뮴 2 μM 을 처리하였을 때에 glutathione 함량은 17% 정도 감소되었으며, 8 μM 의 경우는 51% 정도 감소하였다. 석정을 카드뮴과 함께 동시에 처리한 군에서는 카드뮴에 의하여 감소된 glutathione의 함량이 상당히 회복되는 것으로 조사되었다($p < 0.01$).

고 찰

카드뮴은 뇌신경세포에서 항산화 방어기전에 중요한 역할을 하는 glutathione, superoxide dismutase 및 glutathione-S-transferase의 함량을 감소시키며, 이는 치매의 발생 및 진행에 관계하는 것으로 조사되었다.²³⁻²⁵ Kanski 등,²⁶ Arlt 등²⁷ 및 Glabe²⁸는 활성 산소종이 지방과산화, 단백질 산화 및 신경독성을 유발하며, 이는 알츠하이머병의 촉발(onset) 및 진행(progress)에 기여한다고 보고하였다. 또한 자유라디칼에 의한 산화적 스트레스는 동맥경화증, 당뇨병 및 퇴행성 신경질환에 관련이 있으며, 비타민 E와 C 같은 항산화성 물질이 치매의 임상적 증상을 지연시키거나 억제할 수 있는 것으로 나타났다.²⁹⁻³¹

뇌신경세포인 HT22 세포에서 카드뮴은 세포의 성장과 생존을 현저히 억제하는 것으로 조사되었다. MTT assay 결과로부터 카드뮴의 LC₅와 LC₅₀를 산출하기 위하여 미국 EPA에서 제공하는 Benchmark Dose Software(BMDS, www.epa.gov/ncea/bnmchrk/dwnldu.htm)를 이용한 결과 LC₅(BMD₅)와 LC₅₀(BMD₅₀)은 각각 5.1 μM 과 13.3 μM 로 나타났다.

토양미생물 발효추출액인 석정은 HT22 세포에서 카드뮴의 생존 및 성장 억제작용에 대한 현저한 방어효과가 있는 것으로 관찰되었다. 석정에 함유되어 있는 비타민 C가 석정의 방어효과를 나타내는 유효성분인지를 조사하기 위하여 석정에 함유되어 있는 량에 해당하는 비타민 C를 처리하였을 때에 비타민 C는 카드뮴이 HT22 세포에서의 생존 및 성장에 미치는 영향을 방어하지 못하였다.

산화적 스트레스가 알츠하이머병과 관련이 있다는 것은 잘 알려진 사실이다.¹⁰⁻¹⁴ 뇌에서 산화의 주요 표적은 지방과 지방단백질이며, 알츠하이머병 환자의 뇌에서 지방 과산화물의 함량이 높은 것으로 조사되었다.^{32,33} 최근에 Schipling 등³⁴과 Kontush 등³⁵은 산화를 알츠하이머병의 발병에 중요한 인자로 제안하였으며, 세포 내의 amyloid가 활성 산소종의 생성과 지방의 과산화를 유발한다고 보고하였다. 본 연구에서 석정은 고농도의 카드뮴 처리군에서 지방 과산화물의 생성을 유의하게 억제하는 것으로 조사되었으며, 이는 석정의 지방 과산화물 생성억제 작용이 카드뮴의 독성 방어기전 중의 하나일 가능성을 제시하고 있다.

Glutathione은 중추신경계에서 뇌의 정상적인 기능유지에 때

우 중요한 것으로 알려져 있다. 중추신경계에서 glutathione은 cysteine의 비독성적 저장형³⁶이며, 조효소로 작용³⁷하고, 활성 산소종(ROS) 및 독성 이물질에 대한 방어작용³⁸을 나타낸다. 뇌는 많은 에너지를 요구하며, 거의 모든 필요한 에너지를 당의 산화적 대사에 의존하기 때문에 상당량의 활성 산소종이 발생된다. 그러나 뇌는 비교적 낮은 항산화 방어시스템(anti-oxidant defenses system)을 지니고 있기 때문에 산화적 스트레스에 취약한 것으로 알려져 있다. Glutathione은 뇌에서 ROS와의 직접적인 작용 또는 효소-촉매산화·환원 순환반응에 관여함으로써 산화적 스트레스에 대한 중요한 보호제로 작용한다.³⁹ 다수의 연구에서 설치류 뇌의 총 glutathione의 함량은 나이가 들수록 감소하며, 늙은 설치류의 뇌는 과산화 스트레스에 보다 더 취약한 것으로 보고하고 있다. 또한 퇴행성 질환인 파킨슨병과 알츠하이머병 환자 뇌의 glutathione 함량이 낮은 것으로 나타났다.⁴⁰ 한편, 카드뮴은 신장 및 중추신경계에서 ROS의 생성촉진, glutathione의 함량 감소, 지방 과산화물의 생성 유발 등을 통하여 독성작용을 나타내는 것으로 간주되고 있다. 석정은 카드뮴에 의해 현저히 감소된 glutathione의 함량을 유의하게 회복시키는 것으로 조사되었으며, 이는 석정이 카드뮴의 산화적 스트레스(oxidative stress)를 경감시킴으로써 신경세포에서 카드뮴의 독성을 방어하는 것으로 판단된다.

결 론

본 연구는 치매치료에 효과가 있는 것으로 알려진 토양미생물 발효추출액인 석정을 대상물질로 하여 뇌신경세포에서 카드뮴의 독성에 미치는 영향을 관찰함으로써 석정의 방어기전을 밝히고, 퇴행성 질환인 치매에 대한 석정의 적용 가능성을 검토하고자 실험을 수행하였다.

뇌신경세포인 HT22 세포에서 MTT assay 결과 카드뮴의 LC₅ 및 LC₅₀는 각각 5.1 μM 과 13.3 μM 로 조사되었다. 석정은 MTT assay에서 카드뮴의 용량-반응곡선을 용량의존적으로 우측으로 이동시켜 카드뮴의 독성에 대한 현저한 방어효과가 있는 것으로 나타났다. 석정 중에 함유된 량에 해당하는 비타민 C를 처리하였을 때에 카드뮴의 독성에 대한 방어효과가 없는 것으로 조사되어 석정의 방어효과는 비타민 C에 기인하지 않는 것으로 나타났다. 석정은 고농도의 카드뮴 처리군에서 나타난 지방 과산화물 생성촉진 작용을 유의하게 억제하였다. 또한 카드뮴은 HT22 세포에서 세포내 glutathione의 함량을 감소시켰으며, 석정은 이러한 카드뮴의 작용을 현저히 억제시켰다.

이상의 결과에서 석정은 뇌 신경세포인 HT22 세포에서 카드뮴의 생존 및 성장 억제작용을 현저히 차단하였다. 카드뮴에 의한 지방 과산화물 생성촉진 작용과 glutathione의 함량 감소작용이 석정에 의하여 억제되는 것으로 조사되었으며, 이는 석정이

카드뮴의 산화적 스트레스(oxidative stress)를 경감시킴으로써 신경세포에서 카드뮴의 독성을 방어하는 것으로 판단된다.

감사의 말씀

본 논문은 2002년도 순천향대학교 기초과학연구소 지원에 의해 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) Panayi, A. E., Spyrou, N. M., Iversen, B. S., White, M. A. and Part, P. : Determination of cadmium and zinc in Alzheimer's brain tissue using inductively coupled plasma mass spectrometry. *Neurol. Sci.* **195**(1), 1 (2002).
- 2) Johnson, S. : Gradual micronutrient accumulation and depletion in Alzheimer's disease. *Med. Hypotheses* **56**(6), 595 (2001).
- 3) Lui, E., Fisman, M., Wong, C. and Diaz, F. : Metals and the liver in Alzheimer's disease. An investigation of hepatic zinc, copper, cadmium, and metallothionein. *Am. Geriatr. Soc.* **38**(6), 633 (1990).
- 4) Kumar, R., Agarwal, A. and Seth, P. K. : Oxidative stress-mediated neurotoxicity of cadmium. *Toxicol. Letters* **89**, 65 (1996).
- 5) Fisso-de Faverney, C. : Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocyte through generation of reactive oxygen species. *Aquat. Toxicol.* **53**(1), 65 (2001).
- 6) Szuster-Ciesielska, A. : The inhibitory effect of zinc on cadmium-induced cell apoptosis and reactive oxygen species production in cell cultures. *Toxicology* **145**(2-3), 159 (2000).
- 7) Wong, K. L. and Klaassen, C. D. : Tissue retention of cadmium in rats during postnatal development. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **53**, 343 (1980).
- 8) Wong, K. L. and Klaassen, C. D. : Neurotoxic effects of cadmium in young rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **63**, 330 (1982).
- 9) Cantilena, L. R. and Klaassen, C. D. : Comparison of the effectiveness of several chelators after single administration on the toxicity, distribution and excretion of cadmium. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **58**, 452 (1981).
- 10) Kanski, J., Varadarajan, S., Aksenova, M. and Butterfield, D. A. : Role of glycine-33 and methionine-35 in Alzheimer's amyloid beta-peptide 1-42-associated oxidative stress and neurotoxicity. *Biochim. Biophys. Acta* **1586**(2), 190 (2002).
- 11) Arlt, S., Kontush, A., Muller-Thomsen, T. and Beisiegel, U. : Lipid peroxidation as a common pathomechanism in coronary heart disease and Alzheimer's disease. *Gerontol. Geriatr.* **34**(6), 461 (2001).
- 12) Glabe, C. : Intracellular mechanisms of amyloid accumulation and pathogenesis in Alzheimer's disease. *Mol. Neurosci.* **17**(2), 137 (2001).
- 13) Grundman, M. : Vitamin E and Alzheimer disease: The basis for additional clinical trials. *Clin. Nutr.* **71**(2), 630 (2000).
- 14) Pitchumoni, S. S. and Doraiswamy, P. M. : Current status of antioxidant therapy for Alzheimer's Disease. *Am. Geriatr. Soc.* **46**(12), 1566 (1998).
- 15) 홍순해 : 건강복지와 치매. 한국복지론 제 1권, 한국복지신문사간, p. 279 (1998).
- 16) Stohs, S. J., Bagchi, D., Hassoun, E. and Bagchi, M. : Oxidative mechanism in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **20**(2), 77 (2001).
- 17) Kowaltowski, A. J. and Vercesi, A. E. : Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radical Biol. Med.* **26**, 463 (1999).
- 18) Miki, I. and Teruo, M. : Do conjugated eicosapentaenoic acid and conjugated docosahexaenoic acid induce apoptosis via lipid peroxidation in cultured human tumor cells?. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **270**, 649 (2000).
- 19) Tietze, F. : Enzymatic method for quantitative determination of glutathione. *Analyt. Biochem.* **27**, 502 (1969).
- 20) Pavlovic, S. Z., Ognjanovic, B. I., Stajn, A. S., Zikic, R. V., Saicic, Z. S. and Petrovic, V. M. : The effect of coenzyme Q10 on blood ascorbic acid, vitamin E, an lipid peroxide in chronic cadmium intoxication. *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* **20**(2), 133 (2001).
- 21) Gupta, P. and Kar, A. : Role of ascorbic acid in cadmium-induced thyroid dysfunction and lipid peroxidation. *J. Appl. Toxicol.* **18**(5), 317 (1998).
- 22) Blasiak, J., Trzeciak, A., Dziki, A., Ulanska, J. and Pander, B. : Synergistic effect of vitamin C on DNA damage induced by cadmium. *Gen. Physiol. Biophys.* **19**(4), 373 (2000).
- 23) <http://home.megapass.co.kr/~porina/english/demential.htm>, 경기도립전문병원의 교육자료집, p. 1 (2002).
- 24) Federica, C., Detmar, B. and Andrea, H. : Effect of cadmium(II) on the extent of oxidative DNA damage in primary brain cell cultures from Pleurodeles larvae. *Toxicology Letters* **94**, 217 (1998).
- 25) Zuster-Ciesielska, A., Stachura, A., Slotwinska, M., Kamlnska, T., Sniezka, R., Paduch, R., Abramczyk, D., Filar, J. and Kandefers-Szerszen, M. : The inhibitory effect of zinc on cadmium-induced cell apoptosis and reactive oxygen species production in cell culture. *Toxicology* **145**, 159 (2000).
- 26) Abuja, P. M. and Albertini, R. : Methods for monitoring oxidative stress, lipid peroxidation and oxidation resistance of lipoproteins. *Clin. Chim. Acta* **306**(1-2), 1 (2001).
- 27) Adams, J. D. Jr., Klaidman, L. K., Chang, M. L. and Yang, J. : Brain oxidative stress-analytical chemistry and thermodynamics

- of glutathione and NADPH. *Curr. Top. Med. Chem.* **1**(6), 473 (2001).
- 28) Karelson, E., Bogdanovic, N., Garlind, A., Winblad, B., Zilmer, K., Kullisaar, T., Vihalemm, T., Kairane, C. and Zilmer, M. : The cerebrocortical areas in normal brain aging and in Alzheimer's disease: noticeable differences in the lipid peroxidation level and in antioxidant defense. *Neurochem. Res.* **26**(4), 353, (2001).
- 29) Figueiredo-Pereira, M. E. and Cohen, G. : The ubiquitin/ proteasome pathway: friend or foe in zinc-, cadmium-, and H₂O₂-induced neuronal oxidative stress. *Mol. Biol. Rep.* **26**(1-2), 65 (1999).
- 30) Kumar, R., Agarwal, A. K. and Seth, P. K. : Oxidative stress-mediated neurotoxicity of cadmium. *Toxicology Letters* **89**, 65 (1996).
- 31) 김동현 : 우리나라에서는 노인성 치매가 얼마나 됩니까. 일반인을 위한 치매 안내서, 대한치매협회 자료집, p. 1 (2002).
- 32) Pitchumoni, S. S. and Doraiswamy, P. M. : Current status of antioxidant therapy for Alzheimer's Disease. *J. Am. Geriatr. Soc.* **46**(12), 1566 (1998).
- 33) Rottkamp, C. A., Nunomura, A., Hirai, K., Sayre, L. M., Perry, G. and Smith, M. A. : Will antioxidants fulfill their expectations for the treatment of Alzheimer disease?. *Mech. Ageing Dev.* **116**, 169 (2000).
- 34) Schippling, S., Kontush, A., Arlt, S., Buhmann, C., Sturenburg, H. J., Mann, U., Muller-Thomsen, T. and Beisiegel, U. : Increased lipoprotein oxidation in Alzheimer's disease. *Free Radic. Biol. Med.* **28**, 351 (2000).
- 35) Kontush, A., Mann, U., Arlt, S., Ujeyl, A., Luhrs, C., Muller-Thomsen, T. and Beisiegel, U. : Influence of vitamin E and C supplementation on lipoprotein oxidation in patients with Alzheimer's disease. *Free Radic. Biol. Med.* **31**, 345 (2001).
- 36) Cooper, A. J. L. : *Glutathione in the brain*. In The molecular and genetic basis of neurological disease. 2nd ed., Rosenberg, R. N., Butterworth-Heinemann, p. 1195 (1997).
- 37) Meister, A. : *On the biochemistry of glutathione*. In glutathione centennial. Molecular perspective and clinical implication. Taniguchi, N., Academic Press, p. 3 (1989).
- 38) Zeevalk, G. D., Bernard, L. P., Albers, D. S., Microchnitchenko, O., Nicklas, W. J. and Sonsalla, P. : Energy stress-induced dopamine loss in glutathione peroxidase-overexpressing transgenic mice and in glutathione-depleted mesencephalic cultures. *J. Neurochem.* **68**, 426 (1997).
- 39) Meister, A. : Mitochondrial changes associated with glutathione deficiency. *Biochem. Biophys. Acta* **1271**, 35 (1995).
- 40) Copper, A. J. L. and Kristal, B. S. : Multiple roles of glutathione in the central nervous system. *Biol. Chem.* **378**, 793 (1997).