

단삼이 활성산소에 의하여 손상된 배양 해마신경세포에 미치는 영향

이병찬^{1,5} · 한선희² · 송인영³ · 이강창^{4*}

1: 원광대학교 의과대학, 2: 원광보건대학, 3: 목포과학대학, 4: 원광대학교 한의학전문대학원, 5: 원광의과학연구소

Effect of Salviae Multiorrhizae Radix on The Cultured Mouse Hippocampal Neurons Damaged by Reactive Oxygen Species

Byung Chan Lee^{1,5}, Sun Hee Han², In Young Song³, Kang Chang Lee^{4*}

1: School of Medicine, 2: Wonkwang Health Science College, 3: Mokpo Science College, 4: Professional Graduate School of Oriental Medicine, 5: Institute of Wonkwang Science, Wonkwang University

In order to evaluate the cytotoxic effect of reactive oxygen species(ROS), the cell viability was measured by MTT assay after cultured mouse hippocampal neurons were treated with various concentrations of xanthine oxidase(XO) and hypoxanthine (HX) for 5 hours. And also, the protective effect of Salviae Mutiorrhizae Radix(SMR) on XO/HX-induced neurotoxicity was examined in these cultures. XO/HX significantly decreased cell viability in dose- and time dependent manners when cultured mouse hippocampal neurons were treated with 5~40 mU/ml XO for 5 hours. In the protective effect of SMR, SMR increased cell viability dose-dependently after cultured mouse hippocampal neurons were preincubated with 30~120 µg/ml SMR for 2 hours. From these results, it is suggested that XO/HX is toxic on cultured mouse hippocampal neurons, and herbe medicine such as SMR is very effective in blocking the cytotoxicity induced by ROS.

Key words : Xanthine oxidase, Cultured hippocampal neuron, Salviae Mutiorrhizae Radix

서론

활성산소는 산소라디칼을 통하여 산화를 유발함으로써 인체의 장기에 손상을 주기 때문에 이의 산화적 손상은 세포나 조직에서 퇴화현상을 유발한다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다^{1,2}. 따라서 소량의 활성산소는 세포내에 위치하고 있는 superoxide dismutase(SOD)를 비롯하여 catalase 또는 glutathione peroxidase와 같은 항산화효소에 의하여 물로 변환되기 때문에 이들은 인체에 대하여 아무런 영향을 미치지 못한다³. 그러나 병적인 상태, 즉 과량의 활성산소가 인체의 세포나 조직내에 축적될 경우 미처 물로 처리되지 못한 활성산소는 막의 지질과산화반응을 유도할 뿐만 아니라 세포에 위치하고 있는 N-methyl-D-aspartate(NMDA) 수용체의 과활성을 유도하여 세포내 칼슘 유입을 촉진시킴으로서 세포의 팽창을 일으켜 세포를 손상케 함은 물론^{4,5}, 나아가서 Ca²⁺-dependent protei kinase C(PKC)의 발

현유도와 성장과 분화를 조절하는 효소의 활성변화와 같은 일련의 비정상적인 대사를 초래함으로써 결국 세포의 고사나 사멸을 촉진시킨다^{6,7}. 따라서 국내외 학자들은 활성산소의 산화적 손상에 대한 기전을 규명하기 위하여 오래 전부터 동물을 대상으로 생체나 시험관내에서 꾸준히 연구를 계속하여 왔다^{8,9}. 지금까지 밝혀진 활성산소의 병리적 기전으로는 막의 지질과산화반응을 비롯하여 phospholipase A₂의 활성 및 nitrite(NO)와의 반응에 의한 peroxynitrite의 독성물질의 생성등이 알려져 있다¹⁰. 최근에 활성산소는 근위축성측삭경화증을 비롯하여 치매나 뇌졸중과 같은 질환의 병인으로 밝혀지면서 활성산소의 세포독성에 대한 관심이 높아지게 되었다^{11,12}. 이는 세포내 항산화효소의 활성이 활성산소에 의하여 저해됨으로서 결국 활성산소의 산화적 손상이 세포의 정상적인 대사활동을 억제한 결과로 밝혀졌다¹³. 최근 동물이나 식물의 추출물에서 강력한 항산화물질이나 치매 및 뇌졸중과 같은 만성난치성질환의 치료에 효과적인 활성물질이 있다고 제시되면서 이를 이용한 병변의 치료적 접근에 많은 노력을 아끼지 않고 있다¹⁴. 특히, 한약재는 양약에 비하여 독성이 나 부작용이 적거나 거의 없어 장기간 동안 한약재를 투여하더

* 교신저자 : 이강창, 경기도 군포시 산본동 1126-1, 원광대 부속한방병원
· E-mail : kcl207@wonkeang.ac.kr · Tel : 031-390-2367
· 접수 : 2003/04/21 · 수정 : 2003/06/03 · 채택 : 2003/07/23

라도 이로 인한 후유증이나 세포독성이 거의 나타나지 않는다는 장점을 가지고 있다²⁾. 그러나 아직까지 한약추출물의 방어효과에 대한 기전이나 작용현상에 대해서는 자세히 알려져 있지 않으나 실제 임상실험에서 한약추출물의 투여에 의해 병변의 예후가 매우 좋아졌다는 보고들이 되어 오고 있다¹⁴⁾. 단삼은 꿀풀과에 속하는 다년생 초본으로 막은 쓰고 성은 약간 차며 한의학에서는 월경불순이나 창양종독, 신장염등에 널리 처방되고 있으며 그 밖에 항균이나 진균작용이 있다고 한다^{2,14)}. 근래에 세포배양이 기술이 널리 보급되면서 배양세포를 이용한 각종 병변에 대한 모델이나 질환에 부합된 세포의 대량생산과 같은 일들이 가능하게 되면서 이를 적용한 시험관내 독성실험이나 병변의 기전 규명이 활발히 이루어지게 되었다^{8,15,16)}.

본 연구는 활성산소가 배양 생쥐의 해마신경세포에 미치는 세포독성을 조사하고 또한 활성산소가 산화적 손상에 대한 한약추출물인 단삼의 영향을 조사하기 위하여 활성산소의 일종인 xanthine oxidase(XO)와 hypoxanthine(HX)이 여러농도로 포함된 배양액에서 신경세포를 처리한 후 세포의 생존율을 조사하였으며 또한 단삼을 농도별로 XO/HX의 처리전에 신경세포에 전처리한 후 단삼의 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양

생쥐의 해마신경세포는 생쥐의 뇌조직으로부터 0.5% trypsin을 이용한 효소해리술로서 순수분리한 후 Ca²⁺, Mg²⁺-free인 Hank's balanced salt solution (HBSS, Gibco)으로 3회 세척한 다음 세포를 1,000 rpm에서 15 분간 원침시켰다. 원침된 세포들은 Eagle's minimum essential medium(MEM, Gibco)에 부유시킨 다음 미리 Poly-L-lysine (Gibco)으로 천처리된 96-multiwell plate (Gibco)에 1×10⁵cells/well의 밀도로 도입하였다. 도입된 세포는 5% CO₂/95% air로 조절된 항온기내에서 일정시간 배양하였으며 도입된 세포는 3 일 간격으로 새로운 배양액으로 교환하여 주었다.

2. 약재의 추출

한약재와 증류수를 환저 플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 2 시간 동안 전열기로 전탕후 3,000 rpm에서 20 분간 원심분리하고 진공 농축기로 감압 농축한 후 동결건조기에서 24시간 동안 동결 건조한 다음 이를 건조시켜 분말시료를 얻었다.

3. 시약 제조

본 실험에 사용한 약제는 xanthine oxidase (XO, Sigma)와 hypoxanthine (HX, Sigma)으로써 본 실험에 사용하기 위하여 위의 약제들을 용매에 녹인 후 XO는 1 U/ml, 100 mU/ml, 1 mU/ml의 저장액을, HX는 1 M, 100 mM, 10 mM, 1 mM의 저장액을 각각 만들어 냉암소에 보관한 다음 실험 당일 적당한 양으로 희석하거나 필요한 양을 직접 배양액에 첨가시켜 사용하였다.

4. XO/HX의 처리

XO/HX가 배양된 해마신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 일정시간 배양중인 세포를 0.6% D-glucose 가 포함된 MEM으로 3회 세척 후 0.1 mM HX가 포함되어 있는 5~40 mU/ml XO가 각각 혼합된 배양액에서 5 시간 동안 처리한 다음 분석하였다.

5. 약재 처리

XO/HX에 대한 단삼의 영향을 조사하기 위하여 20 mU/ml XO/0.1mM HX에 신경세포를 처리하기 전에 30~120 µg/ml 단삼추출물이 각각 포함된 배양액에 2 시간 동안 노출시킨 후 이들의 영향을 조사하여 대조군과 비교 조사하였다.

6. 세포생존율 (cell viability) 분석

MTT(3-(4,5-dimethylthiazol)-2-yl)-2,5-diphenyltrazolium bromide (MTT, Sigma)분석은 Mosmann⁸⁾의 방법에 따라 행하였다, 즉 배양이 완료된 해마신경세포에 당일 제조한 50 µg/ml 배양 용기 당 2ml 씩 넣어 37°C, 5% CO₂로 조절된 항온기에서 3 시간 동안 배양하였다. 배양 완료후 phosphate buffered saline (PBS, Sigma)으로 3회 세척한 후 흡광광도계로 503 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

7. 통계처리

실험 결과에 대한 유의성은 Student's-t-test에 의하여 비교하였으며 통계적 유의수준은 p 값이 0.05 미만인 경우로 하였다.

결 과

1. 활성산소의 독성효과

1) 농도별 영향

XO가 5~40 mU/ml의 농도로 포함된 각각의 배양액에서 해마신경세포를 5 시간 동안 배양한 후 세포의 생존율을 MTT 분석법에 의하여 조사한 결과 Fig. 1과 같다.

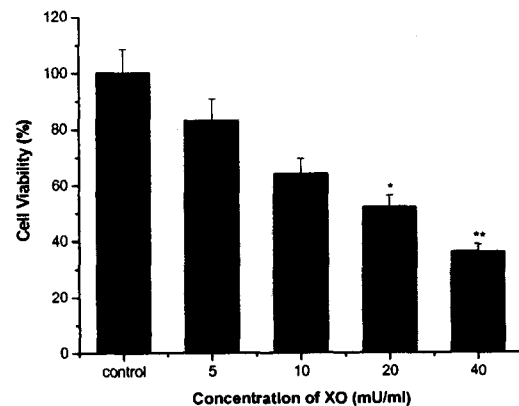


Fig. 1. Dose-dependent response relationship of xanthine oxidase (XO) in cultured mouse hippocampal neurons. Cytotoxicity was measured by MTT assay. The results indicate the mean±SD for 6 experiments. *p<0.05. **p<0.01

5 mU/ml XO를 처리한 경우 대조군에 비하여 세포생존율은 83%로 나타났으며 10mU/ml와 20mU/ml XO처리에서는 각각 64%와 52%($p<0.05$)로 나타났다. 또한 40 mU/ml XO 처리에서는 36%로 나타났다(Fig. 1).

2) 시간별 영향

시간의 변화에 따른 XO/HX의 영향을 분석하기 위하여 20 mU/ml XO와 0.1mM HX가 포함된 배양액에서 신경세포를 1~7 시간 동안 배양한 후 세포생존율을 조사한 결과 1 시간 배양에서는 대조군에 비하여 76%로 나타났으나, 3 시간과 5 시간 배양에서는 각각 63%와 48% ($p<0.05$)로 나타났다. 또한 7 시간 배양에서는 25%($p<0.01$)로 나타났다(Fig. 2).

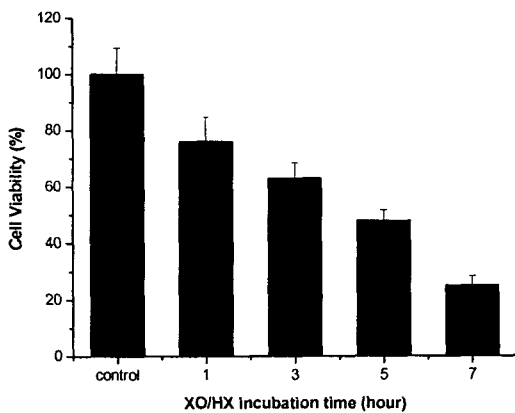


Fig. 2. Time-dependent response relationship of xanthine oxidase (XO) and hypoxanthine(HX) in cultured mouse hippocampal neurons. Cytotoxicity was measured by MTT assay. The results indicate the mean±SD for 6 experiments. * $p<0.05$; ** $p<0.01$

2. XO/HX에 대한 단삼추출물 (SMR)의 효과

XO/HX의 독성에 대한 단삼추출물의 효과를 알아보기 위하여 해마신경세포를 20 mU/mlXO/0.1 mM HX에 처리하기 전에 30~120 µg/ml 농도의 SMR이 각각 포함된 배양액에서 2 시간 동안 배양한 후 세포생존율을 조사하였다.

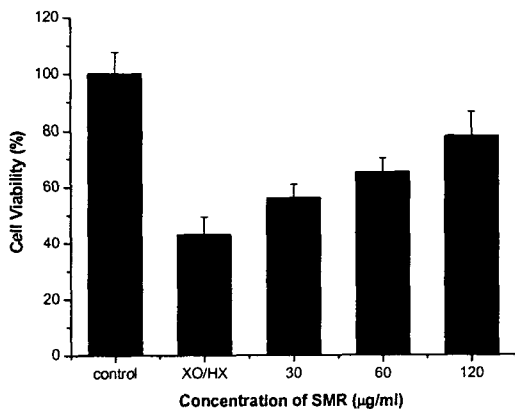


Fig. 3. Dose-reponse relationship of *Salviae Multiorrhizae Radix* (SMR) for its neuroprotective effect on xanthine oxidase (XO) and hypoxanthine (HX). Cytotoxicity was measured by MTT assay. The results indicate the mean±SD for 6 experiments. * $p<0.05$

20 mU/ml XO/HX 만을 해마신경세포에 처리한 경우 세포 생존율은 대조군에 비하여 43%로 나타났으나 60 µg/ml SMR 처리에서는 65%로 나타났다. 특히, 120 µg/ml 처리에서는 세포생존율이 78%로 나타나 이는 XO/HX만의 처리인 43%에 비하여 유의하게 증가한 것으로 나타났다(Fig. 3).

고 찰

활성산소는 산소라디칼에 의하여 세포에 손상을 나타냄으로서 과량의 활성산소의 장기내 노출은 세포독성을 나타내게 된다^{2,5}. 특히, 활성산소는 파킨슨씨병이나 뇌졸중과 같은 뇌질환의 병인으로 제시되면서 활성산소의 산화적 손상에 대한 세포독성의 기전규명을 위한 연구가 활발히 진행되었다^{3,7}. 특히, 근위축성측삭경화증에서는 SOD-1 유전자의 돌연변이에 의하여 미처 제거되지 못한 활성산소가 환자의 뇌속에 축적됨으로서 초래되는 질환이다⁷. 더욱이 활성산소는 신경세포에서 흥분성아미노산의 분비를 유도함으로써 세포의 칼슘농도 균형을 깨뜨리며 이는 PKC와 같은 신호전달체계에 영향을 미침으로서 결국 세포의 퇴화를 초래한다고 한다^{5,10}. 또한, 활성산소는 세포내 칼슘저장소를 자극하여 내인성 칼슘의 분비를 유도함으로써 세포고사나 손상을 더욱 가속화 시킨다고 한다. 본 연구에서는 활성산소가 생쥐의 배양 해마신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 0.1mM HX가 포함된 5~40 mU/ml XO가 각각의 농도로 포함된 배양액에서 5 시간 동안 처리한 결과 XO/HX의 처리 농도와 시간에 비례하여 세포생존율의 감소를 나타냈으며 특히 20 mU/ml 와 40 mU/ml XO의 처리에서는 세포생존율이 각각 52% ($p<0.05$)와 36% ($p<0.01$)로 나타나 매우 유의한 감소를 보였다. 또한 이 때 MTT50값은 20 mU/ml에서 나타났다. 본 실험의 결과에서와 같이 XO/HX의 세포독성은 아마도 활성산소가 막의 지질과산화반응을 유도하여 세포내 사립체와 같은 세포소기관의 효소활성을 억제하였거나 또는 활성산소에 의하여 과활성된 NMDA 수용체의 과활성에 의하여 세포내 칼슘의 증가로 인한 세포의 손상을 초래하였을 것으로 생각된다^{4,8}. 최근에는 활성산소의 산화적 손상으로 매개되는 질환에서 항산화제나 산소라디칼의 제거제들을 투여함으로써 새로운 질환의 치료적 접근을 시도하고 있다¹. 즉, SOD나 vitamin E와 같은 산소라디칼 제거제는 실제 임상적으로 적용시 유효한 효과를 나타냈다고 보고된 바 있다¹². 그러나 최근 한약추출물중에 항산화 효과를 가지고 있는 약리활성물질이 들어 있다고 제시됨으로서 한약추출물에 의한 병변의 치료적 확립에 많은 연구가 시도되고 있다¹⁴. 한약추출물은 양약에 비하여 독성이 없거나 적기 때문에 장기간 투여시에도 각종 부작용이나 후유증이 없다는 장점이 있으며 동시에 약재의 배합에 의하여 새로운 효능을 나타내기 때문에 한약추출물을 이용한 치료적 접근은 관심의 대상이 되었다^{2,14}. 따라서 본 연구에서는 단삼추출물 (SMR)이 활성산소로 손상되는 배양 해마신경세포에 대한 영향을 세포생존율 측면에서 조사하기 위하여 20 mU/ml XO/0.1 mM HX에 신경세포를 5 시간 동안 노출시키

기 전에 30~120 µg/ml SMR이 각각의 농도로 포함된 배양액에서 2 시간 동안 전처리한 다음 세포생존율을 조사하였다. 그 결과 SMR은 처리한 시간에 비례하여 세포의 생존율을 증가시켰으며 특히 120 µg/ml SMR의 처리에서는 XO/HX만의 처리인 43%에 비하여 78%로 나타나 유의한 세포생존율의 증가를 나타냈다. 이러한 결과는 SMR이 XO/HX의 산화적 손상에 대하여 유의한 방어효과를 가지고 있음을 증명하고 있다²⁾. 또한 본 실험의 결과는 박등²⁾이 glucose oxidase 로 손상시킨 생쥐의 혈관내피세포에 대하여 단삼추출물이 세포생존율의 증가를 보임으로서 SMR의 방어효과를 보고한 결과와 일치함을 알 수 있었다. 이는 아마도 SMR을 2 시간 동안 전처리한 과정에서 세포내로 침투한 SMR의 추출물이 XO/HX의 산화적 손상을 저해한 것으로서 SMR이 XO/HX에 의한 항산화효소의 손상억제나 또는 활성산소의 막의 지질과산화반응을 저해함으로써 세포내의 효소활성이나 신호전달체계의 손상을 방어한 결과일 것으로 생각된다^{1,9)}. 그러나 더욱 자세한 기전을 알기 위해서는 단삼추출물의 분획이 항산화효소의 활성이나 세포내 칼슘대사 및 흥분성 아미노산과의 분비현상에 대한 측면에서 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

결 론

활성산소의 산화적 손상을 세포독성의 측면에서 조사하기 위하여 생쥐의 배양 해마신경세포를 재료로 5~40 mU/mg xanthine oxidase(XO)의 각각 농도에 0.1 mM hypoxanthine (HX)이 혼합된 배양액에서 해마신경세포를 5 시간 동안 배양한 다음 MTT assay에 의한 세포생존율을 조사하였다. 또한 XO/HX의 세포독성에 대한 단삼추출물 (Salviae Multiorrhizae Radix, SMR)의 영향을 조사하기 위하여 20 mU/ml XO/0.1 mM HX에 신경세포를 5 시간 노출시키기 전에 30~120 µg/ml SMR이 각각의 농도로 포함된 배양액에서 2 시간 동안 전처리한 후 세포생존율을 조사하였다. 그 결과 XO/HX는 배양 해마신경세포에 처리한 농도와 시간에 비례하여 세포생존율의 감소를 나타냈으며 특히, 20 mU/ml와 40 mU/ml XO의 처리에서 유의한 세포생존율의 감소를 나타냈다. 한편, XO/HX의 세포독성에 대한 SMR의 방어효과에 있어서는 SMR을 전처리한 경우 농도의존적으로 세포생존율의 증가를 보였으며 특히, 120 µg/ml SMR의 처리에서는 20 mU/ml XO/HX만을 처리한 경우의 세포생존율 43%에 비하여 78%로 나타나 유의한 세포생존율의 증가를 나타냈다 (p<0.05). 위의 결과로부터 XO/HX는 생쥐의 배양 해마신경세포에 세포독성을 나타냈으며 또한 SMR과 같은 한약추출물이 활성산소의 산화적 손상을 방어하는데 효과적인 것으로 나타났다.

감사의 글

이 논문은 2003년도 원광대학교의 교비 지원에 의해서 수행됨.

참고문헌

1. Bracco F, Scarpa M, Rigo A, Battisin L: Determination of superoxide dismutase activity by the polarographic method of catalytic currents on the cerebrospinal fluid of aging brain and neurologic degenerative disease, Proc So Exp Biol Med 196:36-41, 1991.
2. 박상면, 이종화, 양현웅, 이강창 : Glucose Oxidase에 의해서 손상된 혈관내피세포에 대한 단삼의 영향. 동의병리생리학 회지 17(1):136-139, 2000
3. Kikuchi S, Kim SU : Glutamate neurotoxicity in mesencephalic dopaminergic neurons in culture, J Neurosci Res 36: 558-569, 1993.
4. Kim MS, Jin BK, Chun SW, Lee MY, Lee SH, Kim JH, Park BR : Role of vestibulo-cerebellar N-methyl-D-aspartate receptors for behavioral recovery following unilateral labyrinthectomy in rats. Neurosci Lett 222: 171-174, 1997
5. Michaels RL, Rothman SM. Glutamate neurotoxicity in vitro : Antagonists pharmacology and intracellular calcium concentrations, J Neurosci 10 : 283-292, 1990.
6. Takahashi K, Akaike N : Calcium antagonist effects on low-threshold(T-type) calcium current in rat isolated hippocampal CA1 pyramidal neurons. J Pharmacol Exp Ther 256-715, 1991.
7. Pellegrini-Gianpietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carla V, Moroni F : Excitatory amino acid and radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage, J Neurosci 10 : 1035-1041, 1990.
8. Mosmann T : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assays, J Immunol Methods 65 :55-63, 1983.
9. Mayer ML, Westbrook GL : Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurons. J Physiol 394: 501-527, 1987.
10. Cochran, SL, Kasik P, Precht W : Pharmacological aspects of excitatory synaptic transmission to second order vestibular neurons in the frog. Synapse 1: 102-123, 1987.
11. Rosen D, Siddique t, Patterson D, Figlewicz D, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'rgan 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.
12. Collingridge GL, Lester AJ : Excitatory amino acid receptors in the vertebrate central nervous system. Pharmacol Rev 40: 143-210, 1989
13. Park ST : Effect of iron-chelator on the neurotoxicity induced by oxygen radicals, Korean J phys Anthropol 8: 113-121, 1995.

14. 전진오, 정현우 : 육미지황탕이 면역세포에 미치는 실험적 효과. 대한한방내과학회지 21(2):243-50, 2000
15. Darlington CL, Smith PF : Pre-treatment with a Ca²channel antagonist facilitates vestibular compensation. Neuroreport 3: 143-145, 1992.
16. Rothstein JD, Tsai G, Kunel RW, Clawson I, 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.