

흰쥐 뇌에서의 Lipopolysaccharide-유도 산화적 스트레스에 대한 OQ21과 Melatonin의 작용

배미경 · 최신규 · 고문정 · 하헌주 · 김화정*

이화여자대학교 약학대학

(Received August 2, 2005; Revised August 18, 2005)

Effect of OQ21 and Melatonin on Lipopolysaccharide-Induced Oxidative Stress in Rat Brain

Mee Kyung Bae, Shinkyu Choi, Moon-Jeong Ko, Hun-Joo Ha and Hwa-Jung Kim*

Research Institute of Pharmaceutical Sciences, College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

Abstract — Lipopolysaccharide (LPS) induces synthesis of several inflammatory cytokines and nitric oxide (NO). NO in brain is involved not only in the regulation of important metabolic pathways via intracellular cyclic GMP-dependent pathways, but also in neurotoxic damage by reacting with superoxide ion leading to form peroxynitrite radical. Oxidative stress has suggested to be related to the inhibition of NO synthase/cyclic GMP pathway. OQ21 is a new fluorinated quinone compound that is recently known to have inhibitory effects on both NO synthase (NOS) and guanylyl cyclase (GC). In this study, we examined effects of OQ21, other known NOS or GC inhibitors, or an antioxidant, melatonin, on the oxidative stress produced by LPS in rat brain. Oxidative stress was observed by using the 2',7'-dichlorofluorescein diacetate to measure intracellular reactive oxygen species (ROS) production and by measuring the formation of thiobarbituric acid reactive substances to measure lipid peroxidation. LPS induced significant increase in both ROS production and lipid peroxidation in all brain regions tested (striatum, hippocampus and cortex), which were dissected 6 hr after intraperitoneal administration of LPS to rats. Direct striatal injection of two NOS inhibitors, N-nitro-L-arginine methyl ester and diphenyleneiodonium, or a GC inhibitor, 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxaline-1-one, produced no significant ROS increase. However, OQ21 enhanced ROS formation in striatal tissues from LPS-treated rats. Melatonin decreased LPS-induced ROS formation and decreased ROS formation increased by OQ21 in striatum of LPS-treated rats.

Keywords □ lipopolysaccharide, nitric oxide synthase, guanylyl cyclase, oxidative stress, rat brain

동물이 병원성(pathogenic) 박테리아 등의 미생물에 감염되었을 때 생성되는 내독소(endotoxin) 활성 성분인 lipopolysaccharide (LPS)이 직접 정맥이나 뇌 내로 투여되면 대식세포(macrophage) 등의 면역세포 및 뇌의 glia 세포 표면에 있는 수용체와 결합하여 중추신경계의 활성화 및 다양한 행동변화나 생리반응들을 나타내게 된다.¹⁻⁵⁾ LPS가 수용체와 결합 후 일어나는 여러 세포 내 생화학적 반응들이 알려져 있는데 그 중 inducible nitric oxide synthase(iNOS)의 mRNA와 단백질의 합성 유도에 의한 NO 생성 증가가 잘 알려져 있다.¹⁾ NO는 iNOS 이외의 다른 NOS isoform들에 의해서도 생성되는데 NOS isoform은 NOS 1

(neuronal NOS; nNOS), NOS 2(iNOS), NOS 3(endothelial NOS; eNOS)의 세 종류로 분류되며 이들은 모두 대략 300 kDa의 큰 protein homodimer이다. 생성된 NO는 guanylyl cyclase (GC)를 활성화시켜서 cGMP를 증가시킴으로서 뇌 및 신경세포 내 중요한 기능을 매개할 수 있다.⁶⁾

세포 내 Ca^{2+} 증가에 따른 NOS의 활성화에 의해 NO가 생성될 때 세포 내 높은 농도의 Ca^{2+} 에 의해 superoxide anion($O_2^{\cdot-}$)과 hydrogen peroxide(H_2O_2)의 생성이 함께 이루어질 수 있다. H_2O_2 와 $O_2^{\cdot-}$ 는 반응하여 매우 반응성이 강한 hydroxyl free radical($\cdot OH$)을 형성하게 된다. NO는 생성된 $O_2^{\cdot-}$ 와 반응해서 peroxynitrite anion($ONOO^{\cdot-}$) 산소 유리기도 형성하게 되고 이것은 강력한 산화제이므로 protonation되어 $\cdot OH$ 와 $\cdot NO_2$ 로 전환된다. 과량 생성된 $O_2^{\cdot-}$ 는 항산화 효소인 superoxide dismutase (SOD), catalase 및 glutathion peroxidase 등에 의해 H_2O_2 를 거

*본 논문에 관한 문의는 저자에게로

(전화) 02-3277-3021 (팩스) 02-3277-3051

(E-mail) hjkim@ewha.ac.kr

쳐 무해한 H₂O로 변화되어 제거되는데 이 과정에서 유독한 반응성 산소 유리기들(\cdot OH, ROO \cdot , RO \cdot)이 부생하여 생체 내 조직에 독성을 나타내게 되며, 특히 여러 신경계의 질병들의 직접, 간접적인 원인이 되어 궁극적으로 노화 및 신경계 질환들의 기전과 연결되어지기도 한다.^{7,8)} 특히 뇌는 반응성 산소 유리기에 의한 손상이 신체의 다른 어느 기관보다 크게 나타나는데 그 이유는 순환하는 O₂의 20%가 뇌에 집중되어 있고, 세포막에는 불포화 지방산 측쇄(polyunsaturated fatty acid side chain)가 풍부하며, 반응성 산소 유리기 반응의 촉매인 철이 풍부하기 때문이다. 특히 중추신경계에서의 NO가 매개하는 신경독성은 ONOO \cdot 와 관련된 신경세포 사멸이 원인이 된다고 알려져 있으며 그 기전으로서 지질 과산화(lipid peroxidation)가 유도됨으로써 생체막의 기능이 상실되거나, 또는 DNA가 손상되어 DNA 치유 효소인 poly(ADP-ribose)polymerase(PARP)가 활성화되고 이어서 에너지가 고갈됨으로서 세포사멸이 유도되어 일어난다고 제시되어 왔다.⁹⁾ 따라서 LPS 혹은 cytokine이 작용하면 glial cell에서 NO가 생성되므로 뇌 손상시 nNOS와 iNOS의 억제 혹은 불활성화가 신경보호 작용을 일으킬 수 있다고 가정할 수 있으나 이 pathway를 차단시켰을 때 뇌에서 산화적 스트레스에 어떤 영향을 나타내는 지에 대한 연구는 많지 않다.¹⁰⁻¹²⁾ NOS 저해제인 N-methyl-L-arginine methyl ester(NAME)를 쥐에 경구 투여 시 뇌에서 항산화효소인 glutathione peroxidase의 활성이 증가되고 간에서도 전체 glutathione 농도가 증가되었고,¹³⁾ NAME를 *in vitro*에서 간 조직에 처리하였을 때 NO와 superoxide 형성이 감소됨¹⁴⁾이 보고된 바 있다. 앞에서 언급한 대로 NOS에 의해 과도하게 생성된 NO는 ONOO \cdot 를 형성하나 적당한 생성된 NO는 GC를 활성화하여 cGMP를 형성한다. GC 억제 및 그에 따른 cGMP 감소 효과가 뇌의 산화적 스트레스에 미칠 수 있는 영향에 대해서도 많은 보고가 없다.

Melatonin은 serotonin을 전구물질로 하여 합성되어 포유동물의 송과체에서 분비되는 호르몬으로 외부의 빛을 생체 내의 신호로 전환시켜 포유동물의 계절과 밤낮을 주기로 변화하는 행동과 신체의 변화를 나타내도록 역할을 지닌 내분비성 물질로서 알려졌다.¹⁵⁻¹⁷⁾ melatonin의 강력한 항산화작용에 대한 연구결과들이 많이 보고되었다. Melatonin의 강력한 항산화 효과에 의해 반응성 산소 유리기로부터 DNA, 단백질과 세포막 지질 등이 보호되고,^{11,18)} 최근에는 산화적 스트레스를 유발하는 safrol, kainic acid, 방사선(radiation) 및 LPS 등에 의한 독성이 억제된다고 보고되었으며,¹⁹⁻²³⁾ 또한 glutamate 수용체 활성화에 의한 세포 내로의 Ca²⁺의 과도한 유입이 억제되며, NOS가 저해됨으로서 NO의 형성이 억제된다는 것이 알려진 바 있다.²⁴⁾ Poeggeler 등²⁵⁾에 의하면 중추 흥분성 아미노산 수용체의 활성화에 의해 melatonin의 합성이 억제되어 \cdot OH의 해독의 속도가 감소되고, 노화가 진행되면서 신체내의 melatonin의 농도가 점점 감소되는

것과 여러 산화적 스트레스에 의한 질병에 점점 취약해지는 현상과는 무관하지 않을 것이라는 의견을 제시하였다.

본 연구에서는 LPS의 복강 내 투여에 의한 뇌 부위(선조체, 해마, 대뇌 피질)의 ROS 생성 및 지질 과산화 등의 산화적 스트레스의 변화를 조사하고 LPS로 유도되는 산화적 스트레스 변화에 대한 NOS 저해제, GC 저해제 및 새로운 fluorinated-phenylamino-quinone 합성체로서 GC억제 및 NOS 억제 작용을 모두 나타내는 것으로 밝혀진 OQ21²⁶⁾ 화합물과 melatonin의 영향을 알아보기 위하여 흰 쥐의 선조체 내로 이러한 약물들을 직접 투여하여 조사하였다.

실험 방법

시약 및 약물

LPS(*E. coli* serotype O26; B26, phenol extraction)와 NOS 저해제인 NAME과 melatonin은 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고 GC 저해제인 1H-[1,2,4]oxadiazolo[4,3-a]quinoxaline-1-one(ODQ)와 NOS 저해제인 diphenyleneiodonium(DPI는 Tocris cookson(Bristol, UK)에서 구입하였고 fluorinated phenyl amino quinone계 약물인 6-N-[(2,3,4-trifluorophenyl)amino]-5,8-quinolinedione(OQ 21)은 이화여자 대학교 대학원 약학과 정량 분석실에서 합성된 것을 사용하였다. LPS는 생리 식염수(0.9% NaCl)에 녹여 사용하였으며 melatonin, NAME, ODQ, DPI는 각각 dimethylsulfoxide(DMSO)에 녹여 stock solution을 제조하여 사용 시 매일 생리 식염수를 이용하여 용매인 DMSO의 최종농도가 10%가 되지 않도록 희석하였다. 마취제인 pentobarbital은 한림제약(서울, 한국)에서 구입하여 사용하였다.

ROS를 측정하는 실험에서 HEPES, sucrose와 형광의 정량 물질로 사용한 2',7'-dichlorofluorescein(DCF)는 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고 hydrogen peroxide sensitive dye인 DCFH diacetate(DCFH-DA)는 molecular probe(Eugene, Oregon, USA)에서 구입하였다. Lipid peroxidation의 측정을 위해서 사용한 2-thiobarbituric acid(TBA), trichloroacetic acid(TCA)와 기준 정량 물질로 사용된 1,1,3,3-tetraethoxypropane(TEP)액은 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

실험동물

Sprague Dawley(SD)계의 수컷 쥐를 실험 동물(제일동물, 서울)에서 구입하여 온도 20~22°C, 습도 50~60%와 조명시간이 12시간으로 조절된 실험동물실에서 고형사료(삼양양지)와 물을 자유롭게 섭취하게 하면서 실험에 적당한 체중인 200~300 g이 될 때까지 약 일주일 이상 사육 및 적응시킨 후, 실험에 사용하였다.

쥐 뇌의 선조체 및 복강 내로의 약물 투여와 조직 적출

세 부위의 뇌 조직에서 LPS에 의해 유도되는 ROS 생성과 지질 과산화 정도를 조사하기 위해서 먼저 동물실에서 적응시킨 흰 쥐복강 내로 LPS를 투여하였다. 뇌 선조체로 투여된 약물의 작용을 조사하기 위한 실험에서는 pentobarbital sodium(40 mg/kg)으로 마취시킨 뒤 LPS를 투여하고 마취시킨 뒤, 면도하여 수술 부위의 털을 제거한 후 stereotaxic 기구(Various사, USA)에 고정시킨 후, 두피를 제거하고 두개골 접합부 중 bregma점을 기준으로 anterior 1.2 mm, lateral \pm 2.5 mm, ventral 6.5 mm 위치의 양측 선조체 부위에 23 gauge의 disposable needle로 구멍을 뚫은 뒤에 Hamilton사(Nevada, USA)의 hamilton 701N syringe(10 μ l)를 이용하여 시험 약물들을 투여하였다. GC 저해제인 ODQ(2 nmole/2 μ l 10% DMSO/hemisphere), NOS 저해제인 DPI(2 nmole/2 μ l 10% DMSO/hemisphere)와 NAME(2 nmole/2 μ l 10% DMSO/hemisphere), fluorinated quinone 물질인 OQ 21(6 nmole/2 μ l 10% DMSO/hemisphere), melatonin (100 nmole/2 μ l 10% DMSO/hemisphere) 또는 대조액인 10% DMSO(2 μ l)와 saline(2 μ l)를 동일한 선조체 부위에 0.5 μ l/min의 속도로 주입하였다. LPS 또는 saline의 복강 내 투여후 6시간 뒤에 단두하여 두개골을 제거하고 뇌를 적출한 후, 뇌 조직을 부위별(선조체, 해마, 대뇌 피질)로 얼음상에서 신속하게 분리하여 액체 질소 통에 신속히 옮겨 보관하였다.

ROS의 측정

흰 쥐의 대뇌 선조체의 약물의 주입 후의 ROS를 측정하기 위하여 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA)를 사용하였다. 이 분석은 처음에 Keston and Brandt²⁷⁾에 의해 고안된 방법으로서 수용액에서 측정이 가능하며 원리는 DCFH-DA가 형광을 띠지 않는 안정한 물질인데 alkaline hydrolysis에 의해 deesterify 되고 역시 형광을 띠지 않는 DCF가 형성된다. DCFH는 ROS에 반응하여 빠른 속도로 산화되어 매우 형광을 띠는 DCF으로 되며 이 형광을 측정하는 원리이다. 액체 질소에 보관된 선조체를 꺼내 신속히 무게를 재고 그 무게의 15배 용량의 0.32 M sucrose 용액을 가하여 homogenizer(Wheaton사, millville, NJ, USA)로 분쇄한 후 저온 원심 분리기(5417R; Eppendorf사, Hamburg, Germany)를 이용하여 4°C, 20800×g에서 10분간 원심 분리하였다. 그 다음 pellet 만을 취하여 sucrose와 동량의 HEPES buffer(PH 7.4)를 가하여 resuspension 시켜서 대략 0.07 g/ml의 농도가 되도록 하였다. 25 μ l suspension을 에탄올로 제조한 12.5 mM stock solution을 62.5 μ M이 되도록 DCFH-DA와 incubation을 하였는데 이때는 최종 부피가 1 ml이 되도록 HEPES buffer를 넣어 3시간 동안 37°C에서 시행하였다. 이후 96 well plate에 각각 200 μ l씩 넣어 excitation wavelength 485 nm(bandwidth 20 nm), emission

wavelength 530 nm(bandwidth 25 nm)에서 fluorometer인 FL-600(Bio-Tek, VT, USA)을 이용하여 형광을 측정하였다. 각 분석의 autofluorescence는 DCFH-DA를 넣지 않은 blank 실험을 함으로써 보정하였고 ROS 정량은 DCF의 검량선(0.05~1.0 μ M)과 뇌 조직의 단백질 정량으로부터 계산하여 nmol DCF/h/mg protein으로 표시하였다.²⁸⁾

지질 과산화 측정

LPS 등에 의해서 생성되는 ROS에 의해 지질 과산화(lipid peroxidation)가 일어난다. 따라서 산화적 스트레스의 척도로 지질 과산화의 측정을 하였으며 그 측정은 Baegue 등²⁹⁾의 방법에 따라 측정한 TBA test를 따랐다. 이는 실험동물의 조직에서 지질 과산화 반응을 측정할 때 널리 사용되는 민감한 분석 방법으로 조직 homogenate를 공기와의 접촉하에 incubation 할 때 지질 과산화 반응시 생성되는 이차 생성물인 malondialdehyde(MDA) 및 alk-2-enal 등과 같은 물질과 TBA가 서로 반응하여 적색 색소를 형성하게 되어 이를 532 nm에서 흡광도를 측정하는 방법이다.^{30,31)}

액체 질소에 보관된 선조체를 꺼내 신속히 무게를 측정하고 조직 150 mg당 PBS(PH=7.4) 2 ml의 비율로 넣어 분쇄시켰다. 이렇게 마련된 선조체 homogenate 10 μ l, 10% TCA액 500 μ l, 0.6% TBA액 500 μ l에 PBS 완충액 490 μ l를 넣고 잘 혼합시켜 100°C에서 1시간 동안 가열시켰다. 이 경우 공기와의 접촉을 잘 할 수 있도록 반응 용기의 뚜껑은 열어두었다. 반응 후 얼음상(0°C)에서 얼마동안 식힌 후 800 μ l의 n-butyl alcohol을 첨가하여 혼합액을 잘 섞이도록 혼합한 뒤 4000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 96 well plate에 두 층으로 분리된 용액 중 red pigment가 추출된 상층액을 200 μ l씩 취하여 540 nm에서 Bio-Rad사의 Benchmark microplate reader(Richmond, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 정량할 때의 기준물질로는 TEP의 검량곡선(calibration curve)을 얻어 시료를 정량하고 단백질을 분석을 하여 보정해 주었다. 단백질 정량은 표준물질로서 BSA를 이용하여 Lowry법³²⁾으로 시행하였다.

자료 분석

실험 data의 분석은 각 평균값에 대해 ANOVA를 시행하여 p<0.05인 것을 유의성 있는 결과로 하였다.

결과 및 고찰

LPS의 복강 투여에 의해 유도된 산화적 스트레스

LPS를 복강 내로 용량 별로 투여했을 때 뇌 조직 중 선조체(striatum), 해마(hippocampus), 대뇌피질(cerebral cortex)는 각각 용량 의존적으로 ROS와 지질 과산화가 증가됨을 볼 수 있다

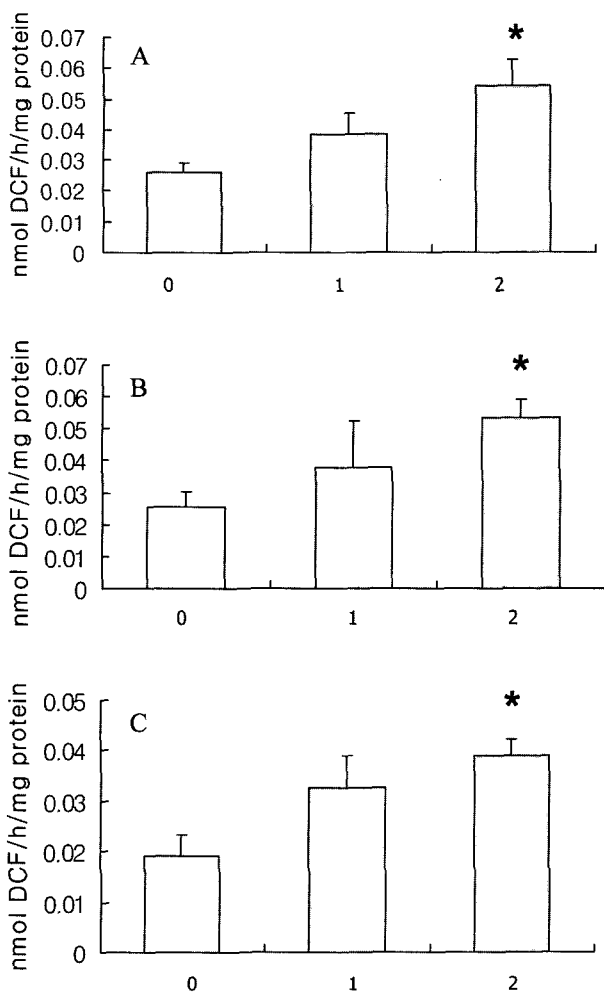


Fig. 1 - The changes of ROS formation administered LPS i.p. in brain. (A) In striatum, (B) in hippocampus, and (C) in cerebral cortex, LPS increased dose dependently ROS formation. Rats were sacrificed by decapitation 6 hrs after LPS administration (i.p) were done. Values represent mean±S.E.M. * $P < 0.05$ relative to saline administration (0 mg/kg).

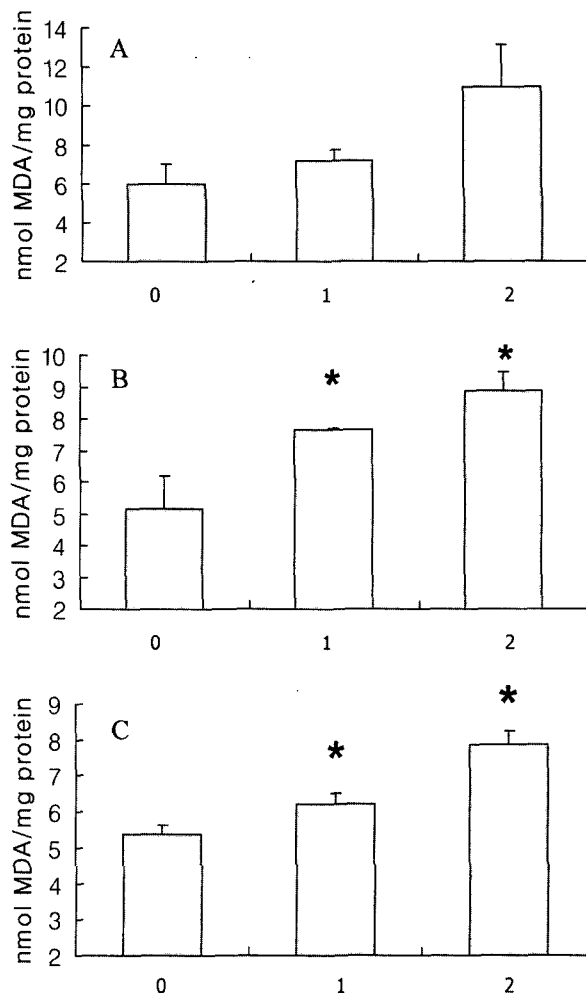


Fig. 2 - The changes of lipid peroxidation administered LPS i.p. in brain. (A) In striatum, (B) in hippocampus, and (C) in cerebral cortex, LPS increased dose dependently lipid peroxidation. Rats were sacrificed by decapitation 6 hrs after LPS administration (i.p) were done. Values represent mean±S.E.M. * $P < 0.05$ relative to saline administration (0 mg/kg).

(Figs. 1 & 2). 복강 내에 LPS를 1 mg/kg의 용량으로 투여했을 때, 선조체에서 ROS의 증가가 대조군(0.9% NaCl)에 비해 1.4 배 증가하였으나 유의할 만한 수준은 아니었고 2 mg/kg의 농도로 투여하였을 때 2배 정도 높게 유의성 있게 증가하였다(Fig. 1A). 해마에서 역시 LPS의 복강 투여에 의해 농도 의존적으로 ROS는 2 mg/kg의 농도로 투여한 경우 대조군에 비해 2배 가량 유의성 있게 증가되었으며 해마에서의 수치는 선조체의 수치와 유사하였다(Fig. 1B). 대뇌피질에서도 LPS의 복강투여에 대해서 농도 의존적으로 증가하여 ROS가 2 mg/kg 투여에 의해서 2배 가량 높게 유의성 있게 증가하였다(Fig. 1C). 따라서 ROS는 LPS의 농도 의존적으로 증가하였음을 확인하였다. 지질 과산화 역시 농도 의존적으로 증가하여 선조체에서 LPS 2 mg/kg를 투여

했을 시 대조군의 1.5배 증가하였으나 유의성을 나타내는 농도는 아니었고(Fig. 2A), 해마에서는 LPS의 1 mg/kg의 농도에서 1.5배, 2 mg/kg의 농도에서 1.7배 더 높게 유의성 있게 증가하였다(Fig. 1B). 대뇌 피질에서는 LPS의 1 mg/kg의 농도에서 1.1배, 2 mg/kg의 농도에서 1.5배 가량 유의성 있게 증가하였다(Fig. 2). 이러한 결과로부터 LPS를 복강 내로 투여시 LPS가 뇌의 blood brain barrier(BBB)를 통과하여 뇌 조직에 ROS와 지질 과산화 증가의 산화적 스트레스를 농도 의존적으로 나타냄을 알 수 있었다. 본 연구의 이러한 결과는 Sewerynek 등^{22,23}의 LPS의 복강 투여로 뇌, 폐, 간에서 지질 과산화가 증가되었다는 보고와 간에서 항산화작용을 가진 총 glutathione 농도가 증가하고 간과 뇌에서 glutathione peroxidase의 활성의 증가되었다는 보고가

있었으므로 본 실험의 결과도 이러한 LPS로 인한 산화적 스트레스의 증가 결과와 일치한다.

LPS에 의해 유도된 ROS 증가에 대한 NOS 저해제와 GC 저해제의 영향

NO/cGMP 경로는 세포내 주요 생리기능에 관여하므로 이 경로가 저해되면 뇌의 기능 손상이 유발되고 반대로 과도한 NO 생성에 의해 유도되는 ROS로 인한 세포내 산화적 스트레스가 NOS 억제에 의해서 감소될 수 있다고 예측할 수 있다. 그러나 이러한 두 경로가 뇌의 산화적 스트레스 반응에 어떠한 역할을 하는 지에 대한 연구는 많이 보고되어 있지 않다. 따라서 LPS에 의해 유도된 ROS 생성 증가효과에 대한 NOS 억제제 및 GC 억제제들의 영향을 알아보기 위하여 약물을 뇌의 선조체 내로 직접 투여하여 조사하였다. 사용한 약물인 ODQ는 처음으로 밝혀진 선택적이고 강력한 soluble GC 저해제이고³³⁾ DPI는 NOS와 NADH oxidoreductase와 같은 flavoenzyme의 저해제이다. NAME는 NOS 기질인 arginine의 구조 유사체로서 작용하여 NOS를 저해하는 약물이다.

먼저 쥐를 pentobarbital로 마취시키고 대조군 혹은 LPS를 복강으로 투여한 뒤 stereotaxic 기구에 고정시켜서 시험 약물들을 뇌 선조체로 투여하고 6시간 뒤에 단두, 뇌의 선조체를 적출하였다. 이 실험에서는 뇌 조직으로의 약물의 주입 없이 LPS의 복

강 투여시의 ROS 생성을 측정된 앞의 실험과 비교할 점이 있었는데 마취제 자체가 ROS의 생성에 미치는 영향과 약물을 녹일 때 사용하였던 용매 효과에 대한 것이었다. Fig. 3에서 볼 수 있듯이 대조군과 LPS를 투여한 군 모두 pentobarbital을 투여하지 않았던 선조체에서 pentobarbital을 투여했을 때 대조군은 35.1%, LPS를 투여하였을 경우는 70.2%의 ROS 생성 증가를 보였다. Sewerynek 등^{13,22,23)}에 의한 보고에서도 쥐에 복강으로 phenobarbital을 투여했을 시 간과 뇌에서 산화적 스트레스가 증가된 것이 관찰된 바 있다. 따라서 pentobarbital 자체가 뇌 내에 작용하여 선조체에서 ROS를 증가시켰을 것으로 사료된다. 약물 중 ODQ와 DPI는 용매로서 10% DMSO를 사용하였고 DMSO에 의한 산화적 스트레스에 대한 영향을 살펴본 결과 복강으로 대조군과 LPS를 투여한 경우 모두에서 10% DMSO의 처리는 뇌 선조체에 ROS 형성에 영향을 미치지 않았다. LPS의 복강투여(Fig. 1A)에서와 마찬가지로 마취시킨 뒤 LPS를 복강 투여했을 때 역시 대조군을 투여한 것에 비하여 ROS가 유의성있게 증가된 것을 관찰하였다. 그러나 마취제를 투여한 경우 LPS에 의한 ROS 생성 효과가 마취제를 투여하지 않은 경우보다 약간 낮게 나타났다. 즉, 마취제를 투여하지 않았을 때(Fig. 1A)에는 LPS 2 mg/kg에 의해서 100%가 증가되었으나 마취제를 투여하였을 경우는 선조체에서 대조군과 비교시 약 30%의 증가 효과가 관찰되었다. 이런 현상은 pentobarbital에 의해 이미 산화적 스트레스가 형성되었으므로 LPS에 의한 산화적 스트레스 증가 반응이 둔화되어 나타난 것으로 추정된다.

복강으로 LPS를 투여한 군과 대조군 동물의 뇌 선조체로 ODQ, DPI 또는 NAME의 약물을 주입했을 때 ROS 생성에 변화가 나타나지 않았다(Fig. 3). 대조군 동물에서 LPS와 같이 ROS 생성을 증가시키는 자극이 존재하지 않았을 때는 ODQ, DPI 및 NAME 모두 약물 자체가 ROS 생성에 아무 영향도 미치지 않은 것으로 생각된다. LPS 처치에 의해 NOS 유도에 의한 NO 생성이 증가되고 따라서 GC도 활성화 되리라 예측되는 상태에서도 NOS의 저해 또는 GC의 저해가 LPS로 유도된 ROS의 증가에 영향을 주지 못한 이유는 LPS에 의해서 NOS 뿐만 아니라 다른 여러 세포내 단백질중 cytokine 생성이 증가되는 연쇄반응이 일어나고 이에 따라 NOS 이외의 염증 반응 관련 단백질들(e.g. cyclooxygenase)의 발현 증가 등의 NOS 경로 이외의 다른 경로로도 ROS를 생성할 수 있으므로 본 실험에 사용된 약물 농도에서의 NOS 저해작용 만으로는 LPS에 의한 최종적인 ROS 생성 변화에 영향을 나타내지 않는 것으로 설명되어 질 수도 있다. 그러나 이 약물들의 작용을 더 명확히 확인하기 위해서는 이들 약물들의 농도를 변화시켜 ROS 생성 변화를 비교해 보는 실험 뿐만 아니라 본 연구에서 조사된 1회 투여에 의한 단시간 내(6시간)의 효과 이외에 24시간 이상으로 실험하는 것이 필요하리라 여겨진다.

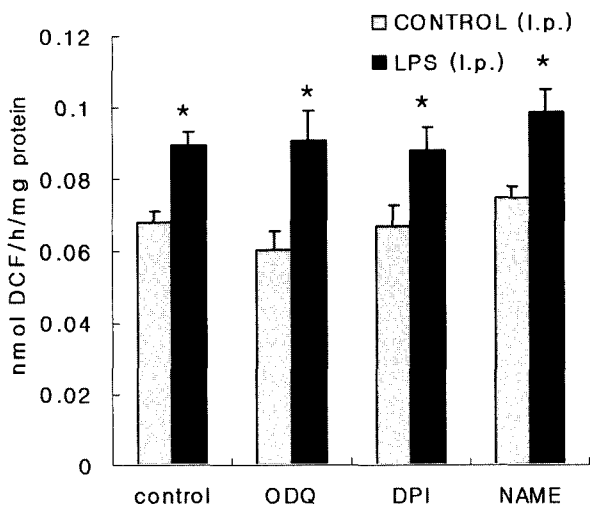


Fig. 3 – Effects of intrastriatal treatment of ODQ, DPI or NAME on LPS-induced ROS generation. Rats were anesthetized and intrastriatally injected with ODQ (2 nmole/2 μ /hemisphere), DPI (2 nmole/2 μ /hemisphere) or NAME (2 nmole/2 μ /hemisphere) right after the treatment (i.p.) of saline (control) or LPS (2 mg/kg). Rats are sacrificed 6 hr after i.p. treatment. Striatal homogenates were prepared for ROS assay. None increased significantly ROS production. * $P < 0.05$ relative to control of control (i.p.). Values represent mean \pm S.E.M.

새로운 합성체 OQ21과 melatonin의 선조체 직접 투여에 의한 ROS 변화 측정

6-(fluorinated-phenyl)amino-5,8-quinolinedione 유도체인 OQ21은 최근 내피 의존적, 내피 비의존적 및 LPS 유도에 의한 혈관 확장에 모두 저해작용이 있음이 밝혀졌으며,²⁶⁾ 따라서 OQ21은 NOS 뿐만 아니라 GC 활성도 억제하리라 추정된다. 또한 OQ21 유사구조인 LY83583이 최근 eNOS 혹은 nNOS와 상호 작용에 의해 superoxide 생성을 증가시키는 반면 NO 형성은 감소시킨다는 보고가 있었다.^{34,35)} 즉, 이러한 종류의 quinone 화합물은 NOS의 reductase domain에 기질로서 결합하여 NOS reductase 활성에 의하여 quinone이 환원됨으로서 NOS를 저해하며 이렇게 quinone이 NOS에 의해 환원되는 과정에서 superoxide를 생성하는 것으로 알려졌다. Melatonin은 잘 알려진 항 산화제로서 본 실험에서 LPS에 의해 유도되는 뇌 선조체에서의 ROS의 생성 증가에 미치는 melatonin 또는 OQ21 단독 처리 효과와 또는 OQ21과 melatonin의 동시 처리 효과를 조사하였다. LPS를 복강으로 투여하지 않은 대조군 동물에서 OQ21과 melatonin을 각각 또는 두 약물을 함께 뇌 선조체로 직접 투여했을 때 OQ21과 melatonin 모두 ROS의 생성이 유의성 있는 변화를 보이지 않았다. 또한 OQ21과 melatonin을 동시 처리 시에도 ROS의 생성에

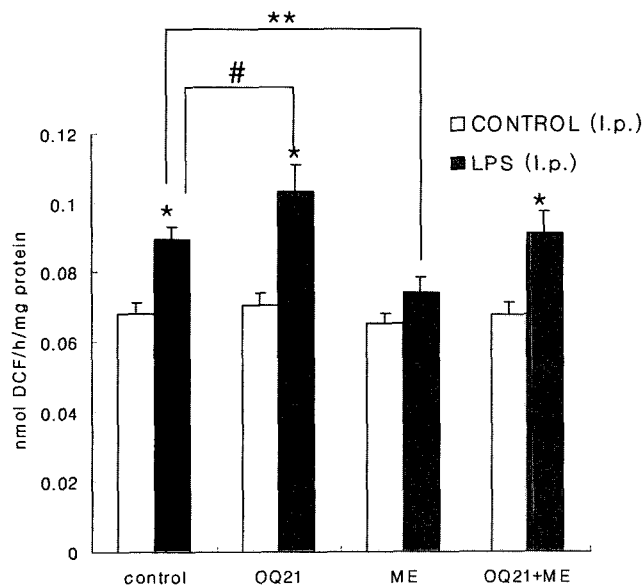


Fig. 4 – Effects of intrastriatal treatment of OQ21, melatonin and OQ21 with melatonin on LPS-induced ROS generation. Rats were anesthetized and intrastriatally injected with OQ21 (6 nmole/2 μ l/hemisphere), melatonin (100 nmole/2 μ l/hemisphere) right after the treatment (i.p.) of saline (control) or LPS (2 mg/kg). Rats are sacrificed 6 hr after i.p. treatment. Striatal homogenates were prepared for ROS assay. None increased significantly ROS production. * $P < 0.05$ relative to control of control (i.p.) # $P = 0.08$ relative to control of LPS (i.p.) ** $P < 0.05$ relative to control of LPS (i.p.) Values represent mean \pm S.E.

있어서 유의적인 변화를 나타내지 않았다. 복강으로 LPS가 투여된 동물군에서는 OQ21 단독 처리시 LPS에 의한 ROS의 생성 증가 효과가 15% 정도 더욱 강화되었으며, melatonin 단독 처리시는 LPS 유도 ROS의 생성 증가를 17% 정도 감소시켰다. OQ21과 melatonin의 병용 투여시 OQ21에 의해 증가된 ROS 생성이 OQ21 처리하지 않은 대조군 수준으로 감소되었다(Fig. 4) 이러한 결과로부터 대조군 동물에서 즉, NOS와 GC 등의 활성에 변화를 주지 않은 경우 OQ21은 NOS를 저해할 때 quinone이 환원되면서 superoxide를 생성하는 작용과 NO의 생성 감소에 의한 peroxynitrite와 hydroxyl radical의 생성 감소 작용 두 가지 작용이 서로 상쇄되어 변화를 나타내지 않은 것으로 예측할 수 있다. 항산화작용이 있다고 알려진 melatonin 역시 대조군 동물에서 산화적 스트레스가 유도되지 않은 조건에서는 아무 영향도 나타내지 않는 것으로 나타났다. LPS를 복강 내로 투여했을 때에는 OQ21에 의해서 어느 정도($P = 0.08$) ROS가 증가하였는데 이는 LPS로 인해 iNOS가 다량 유도되면 OQ21이 NOS와 반응하여 환원될 확률이 더 높아져 superoxide이온 생성도 더욱 증가될 수 있을 뿐만 아니라 앞 실험에서 LPS로 유도된 ROS 증가의 산화적 스트레스가 NOS의 저해제인 DPI와 NAME의 투여시 ROS의 감소를 일으키지 않았으므로 OQ21 또한 NOS의 저해 작용으로 인해 ROS가 감소되지는 않을 것이라 예측될 수 있으므로 LPS로 유도된 ROS의 증가를 오히려 강화시키는 결과로 나타난 것이라고 생각되어 진다. 복강으로 LPS를 투여하지 않은 대조군에서 OQ21에 의해 약간의 ROS 생성 증가를 나타냈으나 유의적이진 못하였다. 이는 LPS로 인해 NOS 활성화가 없는 정상 상태이므로 quinone이 결합하여 환원되어 superoxide를 증가시켜 ROS를 증가시키는 반응이 활발히 일어나지 않을 것이라 예상되기 때문에 이러한 결과가 나온 것이라고 추측하였다. LPS를 복강으로 투여했을 때 항산화 효과가 알려진 melatonin은 iNOS가 유도되어 과도히 생성된 NO에 의한 ROS 증가에 대해서 유의적인 감소를 나타내어 복강으로 LPS를 투여하지 않은 수준으로 회복시켰다. 복강으로 LPS를 투여하고 OQ21과 melatonin을 병용 주입하였을 경우에는 ROS의 생성에 유의적인 변화가 관찰되지 않았으므로 melatonin 동시 투여의 영향으로 OQ21에 의한 ROS 생성 증가가 억제되었다고 여겨진다.

결론

NO는 생체 내 여러 조직에서 neuronal, inducible, endothelial NOS에 의해 생성되어 세포 내 cyclic GMP 의존성 경로를 통해서 신호전달 분자로서 중요한 세포 내 기능에 관여할 뿐 아니라 산화적 스트레스를 유발시켜 세포독성을 나타내기도 한다. 뇌 내에서의 NO는 중요한 생리기능을 조절할 뿐만 아니라 superoxide 이온과 반응하여 peroxynitrite radical의 형성 등의 신경독성을

유발하는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 LPS의 흰 쥐 복강 내 투여에 의한 뇌 부위(선조체, 해마, 대뇌 피질)의 ROS 생성 및 지질 과산화 등의 산화적 스트레스의 변화를 조사하고 NOS 저해제, GC 저해제 및 새로운 fluorinated phenylamino quinone 합성체로서 GC 억제 및 NOS 억제 작용을 모두 나타내는 것으로 최근 밝혀진 OQ 21 화합물과 항산화제로 알려진 melatonin이 LPS로 유도되는 산화적 스트레스 변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 흰쥐의 선조체 내로 이러한 약물들을 직접 투여하여 다음과 같은 연구 결과를 얻었다.

1. LPS를 복강 내로 투여한 처리군에서 LPS가 뇌의 BBB를 통과하여 뇌 조직에서 LPS 농도 의존적으로 ROS 증가와 지질 과산화 증가의 산화적 스트레스를 나타낸 것을 관찰하였다.

2. LPS를 처리하지 않은 대조군에서 뇌 선조체에 ODQ, DPI 또는 NAME의 약물을 주입했을 경우 ROS 생성에 유의성 있는 변화를 나타내지 않았다. 복강으로 LPS를 2 mg/kg로 투여하고 ODQ, DPI, NAME를 주입했을 경우도 대조군의 경우와 마찬가지로 ROS의 생성에 변화를 나타내지 않았다. 이러한 결과로부터 ROS의 증가는 LPS에 의해 활성화된 NOS로 인해 생성된 NO의 작용만으로 일어나는 것이 아니며 다른 경로를 통하여도 역시 ROS를 증가시키므로 NOS와 GC의 각각 단독 저해로는 ROS 생성에 영향을 미치지 못했을 것이라고 추측하였다.

3. 쥐의 복강으로 LPS를 처리하지 않은 대조군에서는 뇌 선조체로 OQ21과 melatonin, 그리고 두 약물을 병용 투여를 했을 때 모두 ROS의 생성에 있어서 유의적인 변화를 나타내지 않았다. 복강으로 LPS를 투여했을 경우는 OQ21은 ROS의 생성을 15% 유의적으로 증가시켰고 melatonin은 유의성 있게 ROS의 생성을 17% 감소 감소시켰다. OQ21과 melatonin의 병용 투여시 melatonin은 OQ21에 의한 ROS 증가를 약간 감소시켰으나 유의적이지는 않았다. OQ21이 LPS에 의해 ROS 증가효과를 강화시키는 이유로는 OQ21이 NOS에 상호작용 하여 자신이 환원되어 superoxide를 형성하는데 LPS로 인해 NOS가 과도하게 유도되어 OQ21과 반응하는 NOS가 많아지므로 이러한 작용이 증가되어 나타났을 것이라 생각된다. 또한 LPS에 의해 증가된 ROS 생성이 melatonin에 의해 감소된 결과로부터 melatonin의 항산화효과를 확인하였다.

감사의 말씀

이 연구는 정부(교육인적자원부) 한국학술진흥재단의 여자대학교 연구기반확충지원사업연구비 지원(R06-2002-011-01004-0)에 의해 수행되었습니다.

문 헌

1) Dantzer, R., Bluthé, R. M., Gheusi, G., Cremona, S., Laye, S.,

- Parnet, P. and Kelley, K. W. : Molecular basis of sickness behavior. *Annals N. Y. Acad. Sci.* **856**, 132 (1998).
- 2) Kent, S., Bluthé, R. M., Dantzer, R., Hardwick, A. J. and Kelley, K. W. : Different receptor mechanisms mediate the pyrogenic and behavioral effects of interleukin-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 9117 (1992).
- 3) Kent, S., Kelly, K. W. and Dantzer, R. : Effects of lipopolysaccharide on food-motivated behavior are not blocked by an interleukin-1 receptor antagonist. *Neurosci. Lett.* **145**, 83 (1992).
- 4) Kent, S. R. M. and Bluthé, K. W. : Sickness behavior as a new target for drug development. *Trends Pharmacol. Sci.* **13**, 24 (1992).
- 5) Saper, C. B. : Neurobiological basis of fever. *Annals N. Y. Acad. Sci.* **856**, 90 (1998).
- 6) Boloanos, J. P., Almeida, A., Stewart, V., Peuchen, S., Land, J. M., Clark, J. B. and Heales, S. J. R. : Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: Mechanisms and implications for neurodegenerative diseases. *J. Neurochem.* **68**, 2227 (1997).
- 7) Halliwell, B. : How to characterize a biological antioxidant. *Free Radic. Res. Commun.* **9**, 1 (1990).
- 8) Knight, J. A. : The process and theories of aging. *Ann. Clin. Lab. Sci.* **25**, 1 (1995).
- 9) Koedel, U. and Pfister, H. W. : Oxidative stress in bacterial meningitis. *Brain Pathology* **9**, 57 (1999).
- 10) Inoue, S. and Kawanishi, S. : Oxidative DNA damage induced by simultaneous generation of nitric oxide and superoxide. *FEBS Lett.* **371**, 86 (1995).
- 11) Izumi, Y., Benz, A. M., Clifford, D. B. and Zorumski, C. F. : Nitric oxide inhibitors attenuate ischemic degeneration in the CA1 region of rat hippocampal slices. *Neurosci. Lett.* **210**, 157 (1996).
- 12) Love, S. : Oxidative stress in brain ischemia. *Brain Pathology* **9**, 119 (1999).
- 13) Sewerynek, E., Poeggeier, B., Melchiorri, D. and Reiter, R. J. : H₂O₂-induced lipid peroxidation in rat brain homogenates is greatly reduced by melatonin. *Neurosci. Lett.* **195**, 203 (1995).
- 14) Arteel, G. E., Kadiiska, M. B., Rusyn, I., Bradford, B. U., Mason, R. P., Raleigh, J. A. and Thurman, R. G. : Oxidative stress occurs in perfused rat liver at low oxygen tension by mechanisms involving peroxynitrite. *Molecular Pharmacology* **55**, 708 (1999).
- 15) Bluthé, R. M., Walter, V., Parnet, P., Laye, S., Lestage, J., Verrier, D., Poole, S., Stenning, B. E., Kelley, K. W. and Dantzer, R. : Lipopolysaccharide induce sickness behavior in rats by a vagal mediated mechanism. *C. R. Acad. Sci. (Paris)* **317**, 499 (1994).
- 16) Laye, S., Parnet, P., Goujon, E. and Dantzer, R. : Peripheral

- administration of lipopolysaccharide induces the expression of cytokine transcripts in the brain and pituitary of mice. *Mol. Brain Res.* **27**, 157 (1994).
- 17) Mccann, S. M., Kimura, M., Karanth, S., Yu, W. H. and Rettori, V. : Role of nitric oxide in the neuroendocrine responses to cytokines. *Annals N. Y. Acad. Sci.* **840**, 174 (1998).
 - 18) Isaac, J. T., Oliet, S. H., Hjelmstad, G. O., Nicoll, R. A. and Malenka, R. C. : Expression mechanisms of long-term potentiation in the hippocampus. *J. Physiol. (Paris)* **90**, 299 (1996).
 - 19) Huang, P. L., Huang, Z., Mashimo, H., Bloch, K. D., Moskowitz, M. A., Bevan, J. A. and Fishman, M. C. : Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* **377**, 239 (1995).
 - 20) Melchiorri, D. and Reiter, R. J. : Paraquat toxicity and oxidative damage Reduction by melatonin. *Biochem. Pharmacol.* **51**, 1095 (1996).
 - 21) Sewerynek, E. and Reiter, R. J. : Oxidative damage in the liver induced by ischemia-reperfusion: protection by melatonin. *Hepato-Gastroenterolog* **43**, 898 (1996).
 - 22) Sewerynek, E., Abe, M., Reiter, R. J., Barlow-Walden, L. R., Chen, L. D. McCabe, T. J., Roman, L. J. and Dias-Lopez, B. : Melatonin administration prevents lipopolysaccharide-induced oxidative damage phenobarbital-treated animals. *J. Cell. Biochem.* **58**, 436 (1995).
 - 23) Sewerynek, E., Melchiorri, D., Chen, L. and Reiter, R. J. : Melatonin reduces both basal and bacterial lipopolysaccharide-induced lipid peroxidation *in vitro*. *Free R. B. M.* **19**, 903 (1995).
 - 24) David, J. C., Currie, R. W. and Robertson, H. A. : Expression and distribution of hsp71 and hsc73 messenger RNAs in rat brain following heat shock: Effect of dizocilpine maleate. *Neuroscience* **62**, 945 (1994).
 - 25) Poeggeler, B., Saarela, S., Reiger, R. J., Tan, D. X., Manchester, L. C. and Barlow-Warden, L. R. : Melatonin-a highly potent endogenous radical scavenger and electron donor; new aspects of the oxidation chemistry of this indole accessed *in vitro*. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **738**, 419 (1994).
 - 26) Lee, J. A., Jung, S. H., Bae, M. K., Ryu, C. K., Lee, J. Y., Chung, J. Y., Chung, J. H. and Kim, H. J. : Pharmacological effects of novel quinone compounds, 6-(fluorinated-phenyl)amino-5,8-quinolinediones, on inhibition of drug-induced relaxation of rat aorta and their putative action mechanism. *General Pharmacology* **34**, 33 (2000).
 - 27) Keston, A. S. and Brandt, R. : The fluorometric analysis of ultramicro quantities of hydrogen peroxide. *Anal. Biochem.* **11**, 1 (1965).
 - 28) Bass, D. A., Parce, J. W., Dechatelet, L. R., Szejda, P., Seeds, M. C. and Thomas, M. : Flow cytometric studies of oxidative product formation by neutrophils: a graded response to membrane stimulation. *J. Immunol.* **130**, 1910 (1983).
 - 29) Bauge, J. A. and Aust, S. D. : Microsomal lipid peroxidation methods. *Methods in Enzymology* **52**, 302 (1978).
 - 30) Kosugi, H., Kato, T. and Kikugawa, K. : Formation of yellow, orange, and red pigments in the reaction of Alk-2-enals with 2-thiobarbituric acid. *Analytical Biochemistry* **165**, 456 (1987).
 - 31) Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. : Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* **95**, 351 (1979).
 - 32) Lowry, E. C., Blumberg, J. M., Rhea, R. L. and Ranson, J. P. : Serum levels of orally administered penicillin. *U. S. Armed Forces Med. J.* **2**, 265 (1951).
 - 33) Ghezzi, P., Saccardo, B. and Bianchi, M. : Role of reactive oxygen intermediates in hepatotoxicity of endotoxin. *Immunopharmacology* **12**, 241 (1986).
 - 34) Kumagai, Y., Midorikawa, K., Nakai, Y., Yoshikawa, T. and Kushida, K. : Homma-Takeda, S. and Shimojo, N., Inhibition of nitric oxide formation and superoxide generation during reduction of LY83583 by neuronal nitric oxide synthase. *Eur. J. Pharmacol.* **360**, 213 (1998).
 - 35) Vasquez-Vivar, J., Martas, D. A. P., Hogg, N., Masters, B. S. S., Pritchard, K. A. and Kalyanaraman, B. : Endothelial nitric oxide synthase-dependent superoxide generation from adriamycin. *Biochemistry* **36**, 11293 (1997).