

## 산소자유기에 의해 저해진 배양 척수감각 신경절 세포에 대한 상피세포성장인자의 영향

박승택\* · 김형룡\* · 채한정\*\*

원광대학교 의과대학 해부학교실\*, 치과대학 치과약리학교실\*, 약학대학\*\*

(Received September 11, 1996)

### Effect of EGF against Oxygen Radical-induced Neurotoxicity in Cultured Spinal Dorsal Root Ganglion Neurons of Mouse

Seung-Taeck Park\*, Hyung-Ryong Kim\* and Han-Jung Chae\*\*

Department of Anatomy, \*School of Medicine, Department of Dental Pharmacology, and  
\*School of Dentistry, \*\*College of Pharmacy, Wonkwang University, Iksan, Chonbuk 507-749, Korea.

**Abstract**—In order to elucidate the cytotoxic effect of oxygen radicals on cultured spinal dorsal root ganglion(DRG) neurons derived from mouse, the neurotoxic effect of oxygen radicals was examined after cultured DRG neurons were exposed to xanthine oxidase(XO) and hypoxanthine(HX)-oxygen radical generating system. In addition, neuroprotective effect of epidermal growth factor(EGF) against oxidant-induced neurotoxicity was also evaluated in these cultures. The results were as follows: 1. Lethal concentration 50(LC<sub>50</sub>) was 35 mU/ml XO and 0.1mM HX in cultured DRG neurons. 2. Oxygen radicals induced the morphological changes such as the decrease of cell number and loss of neurites in these cultures. 3. EGF increased the cell viability and neurofilament in neurons damaged by oxygen radicals. From above the results, it is suggested that oxygen radicals have a cytotoxic effect on cultured DRG neurons of neonatal mouse and selective neurotrophic factors such as EGF are effective in blocking the neurotoxicity induced by oxygen radicals in cultured spinal DRG neurons.

**Keywords** □ Spinal dorsal root ganglion. Epidermal growth factor. Xanthine oxidase. hypoxanthine.

산소자유기는 중추 및 말초 신경계의 여러 신경세포에 손상을 초래함으로써 독성을 나타낸다.<sup>1)</sup> 특히 파킨슨씨병이나 근위축성측삭경화증은 산소자유기나 흥분성아미노산(excitotoxic amino acids, EAAs)에 의한 신경세포의 퇴화에 의해 유발된다.<sup>2,3)</sup> 신경세포내 산소자유기는 철이온에 의하여 형성되기도 하지만 노화나 외상같은 병적인 상태에서는 뇌속의 산소제거제인 superoxide dismutase (SOD)나 catalase와 같은 항산화효소가 감소됨으로써<sup>4)</sup> 제거되지 못한 과량의 산소자유기가 축적되어 그 결과 세포의 생존율을 저하

시킨다.<sup>5)</sup> 더우기 축적된 산소자유기는 EAA의 분비를 촉진시킬뿐만 아니라<sup>6)</sup> 분비된 EAA는 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체를 과자극 시킴으로써 세포내 Ca<sup>2+</sup> 유입을 촉진시켜 결국 세포를 사멸케 한다.<sup>7)</sup> 이에 관한 연구의 하나로는 산소자유기에 노출된 신경세포를 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체의 길항제를 처리한 결과 손상된 세포의 생존력을 크게 증가시켰다는 보고가 이를 증명해 주고 있다 하겠다.<sup>8)</sup> 신경세포의 배양은 다른 세포종에 비하여 외부의 환경변화에 민감하기 때문에 배양하기가 다소 어렵지만 생체 외에서도 생체내에서 처럼 세포의 발생이나 분화의 특징이 그대로 나타나기 때문에 중추나 말초신경계의 각종 질환의 병리적 기전의 규명은 물론 각종 약제나 중

\* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 0653-50-6640 (팩스) 0653-54-0285

금속들이 세포에 미치는 영향을 형태를 비롯하여 생화학이나 생리 및 약리적 측면에서 정량 및 정성분석이 가능함으로써 생체외 분석의 좋은 도구로 되어지고 있다. 최근에 신경성장인자는 세포내의 산소자유기 형성 저해와 세포내 칼슘의 항상성 유지에 중요한 역할을 할뿐만아니라 세포의 기능을 항진시킴으로써 손상된 세포의 생존력 증진에 크게 작용한다.<sup>9,10)</sup>

본 연구는 산소자유기의 신경독성에 대한 기전을 규명하기 위하여 생쥐의 척수감각 신경절 세포를 배양한 후 산소자유기를 처리한 다음 이의 독성효과를 조사하고 또한 산소자유기에 의한 독성의 방어효과를 조사하기 위하여 시행하였다.

## 실험방법

### 세포배양

후근신경절(dorsal root ganglion, DRG) 신경세포의 배양을 위하여 생후 1-3일 된 생쥐에서 분리한 DRG를 Kim 등<sup>11)</sup>(1988)의 방법에 따라 행하였다. 분리된 DRG는 0.25% trypsin(Sigma)이 포함된 phosphate buffered saline(PBS)으로 10분간 37°C로 조절된 정온기내에서 배양한 후 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco)이 포함된 Eagle's minium essential medium(EMEM, Gibco)에 세포를 부유시킨 다음 미리 poly-L-lysine (Sigma)으로 처리된 96-multiwell plate(Gibco)에  $5 \times 10^4$  cells/well의 밀도로 도입하였다. 도입된세포는 5%, CO<sub>2</sub>/95% air로 조절된 습기찬 정온기내에서 배양하였으며 이를 분석에 사용하였다.

### 약제 처리

본 실험에 사용한 xanthine oxidase(XO, Sigma)와 hypoxanthine(HX, Sigma) 및 epidermal growth factor(EGF, Sigma)는 각각 일정농도의 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 후 실험당일에 이를 적당한 양으로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 배양액에 첨가시켜 사용하였다.

### 산소자유기 처리

산소자유기가 생쥐의 DRG 신경세포의 발생에 미치는 영향을 조사하기 위하여 일정시간 동안 배양된 신경세포를 0.6% D-glucose가 포함된 MEM으로 3-4회 세척후 35 mU/ml의 XO와 0.1 mM HX가 혼합된 배

양액에서 3시간 동안 처리한 후 분석하였다.

### 상피세포성장인자 (Epidermal Growth Factor, EGF) 처리

상피세포성장인자가 산소자유기에 의하여 처리된 신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 XO/HX-ox-ygen radical generating system에 세포를 노출시키기 2시간 전에 여러 농도의 EGF를 처리한 다음 일정시간 배양 후 이를 분석하였다.

### 신경세포의 생존율 분석

실험분석을 위하여 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolinm bromide (MTT, Sigma) 분석과 신경세사 면역화학 분석법을 사용하였다. MTT assay는 Mosmann(1983)의 방법에 따라 행하였으며 신경세사 면역화학 분석법 배양중인 신경세포를 phosphate buffered saline (PBS)으로 서너번 세척 후 고정하고 0.2% Tritonx-100이 포함된 PBS로 2회 세척하였다. 세척후 NE14 (Sigma)로 1시간 동안 반응시킨 후 0.04% O-Phenylenediamine(OPD, Sigma)과 0.02% hydrogen peroxide로 처리한 다음 Microelisa로 490 nm에서 측정하였다.

### 세포의 형태적 관찰

세포의 형태적 관찰을 위하여 세포를 배양중인 용기를 직접 도립위상차 현미경(Nikon) 하에 놓고 검경하였으며 필요시 부착된 사진기로 직접 촬영하였다.

## 실험결과

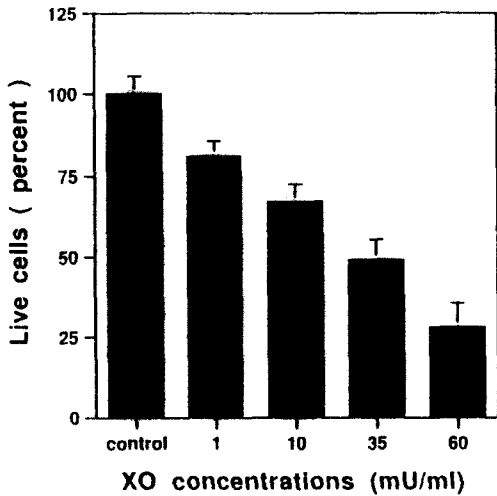
### 척수감각신경절 세포에 대한 산소자유기의 영향

배양중인 후근 신경세포 1-60 mU/ml XO가 포함된 각각의 배양액에서 3시간 동안 노출시킨 후 신경세포의 수적 생존율을 MTT 분석에 의하여 측정된 결과 1 mU/ml XO처리에서는 대조군(100%)에 비하여 81%로 나타났으며 10 mU/ml에서는 67%로 나타났다. 또한 35 mU/ml와 60 mU/ml XO처리에서는 각각 49%와 28%로 나타났다(Fig. 1). XO/HX 처리시간에 따른 세포의 생존율을 조사하기 위하여 35mU/ml XO/0.1 mM HX 가 포함된 배양액에서 세포를 1~4시간 동안 각각 배양한 후 MTT 분석에 의한 조사결과 XO/HX의 1시간 배양에서는 대조군(100%)에 비하여 82%로 나

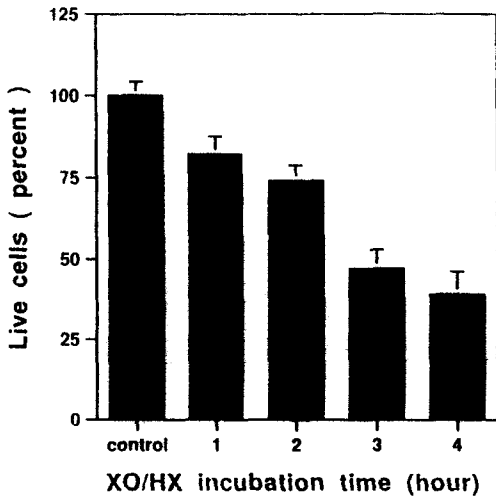
타났으나 2, 3 및 4시간 배양에서는 각각 74%, 47% 및 39%로 나타났다(Fig. 2).

**산소자유기에 대한 상피세포성장인자의 효과**

산소자유기에 의해서 저해된 신경세포의 발생에 대한 EGF의 효과를 조사하기 위하여 MTT 분석과 신경

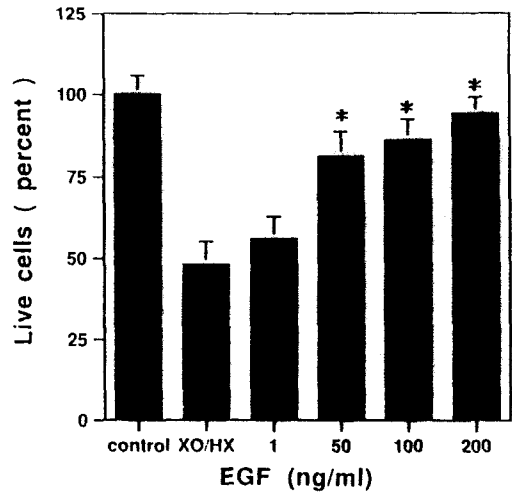


**Fig. 1**—Does-response relationship of xanthine oxidase (XO) in cultured spinal dorsal root ganglion (DRG) neurons of mouse. Cytotoxicity was measured by MTT assay. The results indicate the mean±SEM (n=6).

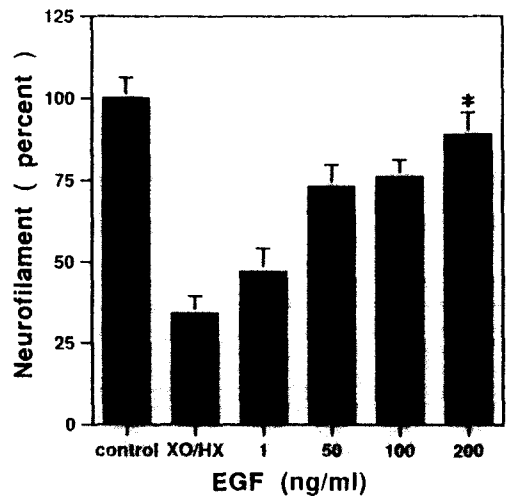


**Fig. 2**—Time-response relationship of xanthine oxidase (XO)/hypoxanthin (HX) in cultured spinal dorsal root ganglion (DRG) neurons. Cytotoxicity was measured by MTT assay. The results indicate the mean±SEM (n=6).

세사 면역화학 분석법 EIA를 행한 결과 MTT 분석의 경우 XO/HX 처리군에서는 대조군(100%)에 비하여



**Fig. 3**—Does-response relationship of epidermal growth factor (EGF) for its neuroprotective effect on oxidant-induced neurotoxicity. Dorsal root ganglion (DRG) neurons of mouse were preincubated with EGF for 2 hours before expose to 35 mU/ml xanthine oxidase (XO)/0.1 mM hypoxanthine (HX). The results indicate the mean±SEM (n=6). p<0.01

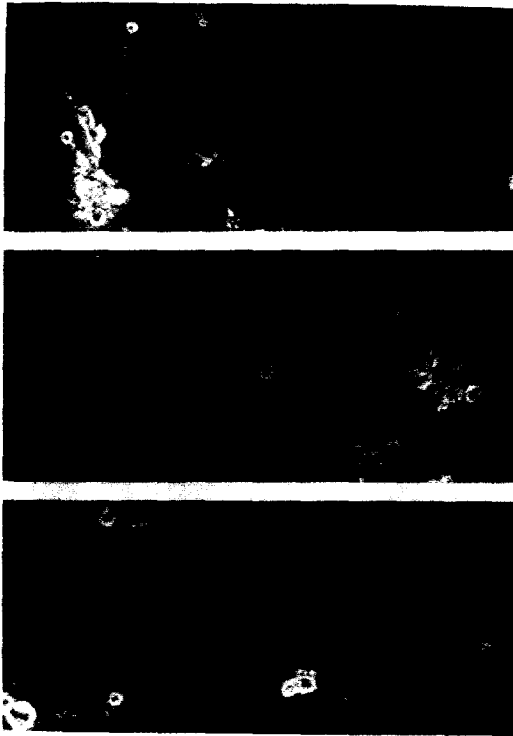


**Fig. 4**—Does-response relationship of epidermal growth factor (EGF) for its neuroprotective effect on oxidant-induced neurotoxicity by neurofilament enzymeimmunoassay (EIA). Dorsal root ganglion (DRG) neurons of mouse were preincubated with EGF for 2 hours before expose to 35 mU/ml xanthine oxidase (XO)/0.1 mM hypoxanthine (HX). The results indicate the mean±SEM (n=6). p<0.01

발생된 세포의 숫적 생존율은 48%로 나타났으나 1 ng/ml EGF 처리에서는 56%의 생존율을 보였으며 50과 100 및 200 ng/ml의 처리에서는 각각 81%, 86% 및 94%의 높은 생존율을 나타냈다(Fig. 3). 또한 EGF가 신경세포의 신경세사에 미치는 영향을 측정하기 위하여 신경세사 면역화학 측정법을 행한 결과 대조군(100%)에 비하여 XO/HX 처리군에서는 34%로 나타난 반면 1, 50, 100 및 200 ng/ml EGF 처리에서는 각각 47%, 73%, 76% 및 89%로 나타났나(Fig. 4).

### 형태적 관찰

세포의 형태적 관찰에 있어서 대조군에서는 많은 신경세포들이 신경돌기로써 서로 연결을 하고 있었으나(Fig. 5A) XO/HX 처리군에서는 신경세포의 숫적감소



**Fig. 5**—Dissociated dorsal root ganglion (DRG) neurons.  
A: Control DRG neuron culture for 5 days in vitro.  $\times 125$   
B: A sister culture exposed to 35 mU/ml xanthine oxidase (XO)/0.1 mM hypoxanthine (HX) for 3 hours.  $\times 125$   
C: A sister culture preincubated with epidermal growth factor (EGF) for 2 hours before 3 treatment with 35 mU/ml XO/0.1 mM HX.  $\times 125$

와 신경돌기의 소실이 나타났나(Fig. 5B). 그러나 산소자유기를 처리한 신경세포에 200 ng/ml EGF를 처리한 경우 세포의 숫적증가와 신경돌기의 연결이 대조군과 비슷하였다(Fig. 5C).

## 고 찰

다발성 경화증에서는 자가면역에 의하여 신경교세포나 대식세포들이 산소자유기를 비정상적으로 발생시켜 수초파괴를 초래함으로써 병변을 가속화시킨다고 한다.<sup>12,13</sup> 본 실험에서 배양중인 생쥐의 DRG 신경세포를 산소자유기에서 3시간 동안 노출시킨 결과 신경세포의 숫적 생존율은 산소자유기의 처리 시간과 농도에 비례하여 점차 감소되었다. 이같은 결과는 Michikawa 등<sup>11</sup> (1994)이 산소자유기가 생쥐의 배양 척수신경원의 생존력을 감소시켰다는 보고나 Kim과 Kim<sup>14</sup> (1991)이 배양된 생쥐의 회돌기교세포에서 산소자유기가 생존력을 저하시켰다는 보고와 일치함을 알수 있었다. 이러한 현상은 산소자유기가 신경세포에 독성효과를 가지고 있음을 말해준다 하겠다. Yamamoto 등<sup>15</sup> (1983)은 산소자유기는 세포막의 lipid peroxidation의 사슬을 활성화시킨다고 하였으며, 또한 Pellegrini-Giampietro 등<sup>6</sup> (1988)은 발생한 산소자유기는 excitotoxic amino acids(EAAs)의 분비를 촉진시킴으로써 그 결과 N-methyl-D-aspartate(NMDA)-coupled  $Ca^{2+}$  ion channel을 통해 세포내 칼슘의 항상성을 파괴시킨다고 하였다. 본 실험에서도 산소자유기는 DRG 신경세포에 대하여 독성효과를 나타냈는데 이러한 독성효과와 원인은 많겠으나 아마도 산소자유기가 세포막의 지질과산화반응이나 EAA의 분비를 촉진시킴으로써 신경세포의 손상을 초래하였을 가능성이 높을 것으로 생각된다. 최근에 신경성장인자는 감소된 항산화효소의 활성을 증가시킴으로써 세포의 생존력을 항진시킬 뿐만아니라<sup>4</sup> 세포내 산소자유기형성 억제나 칼슘농도의 항상성 유지를 조절함으로써 신경세포의 손상을 방어해 준다고 보고된 바 있다.<sup>10</sup> 본 실험에서 산소자유기에 의하여 저해된 배양 DRG 신경세포의 생존율이 EGF의 농도에 비례하여 증가되었다. 이는 EGF가 산소자유기의 독성효과에 대한 세포의 면역기능을 항진시켰다고 생각되며,<sup>16</sup> 이는 EGF가 본 실험의 신경세사 면역화학 측정법의 결과에서 처럼 산소자유기에 의하여 저해된 신경세포에 비하여 현저한 신경세사의 증가

를 촉진시켰다는 소견과 일치된 것 같다. 또한 EGF가 FGF나 IGF 처럼 신경세포의 생존력증가나 신경돌기의 성장을 촉진시켜준다고 하는데 본 실험의 형태적 관찰에서도 이와 복합된 소견을 보여줌으로써 이를 증명한다고 하겠다. 신경세사는 신경세포의 지지에 중요한 역할을 해주지만 또한 세포의 손상이나 세포의 virus 침입 및 병적 상태에서는 정상상태에 비하여 성장 및 분화의 저해를 보임으로써 면역반응에 관계한다고 한다. 그러나 아직까지 신경세사의 면역기능에 대한 자세한 기전은 잘 밝혀져 있지 않지만 신경세포내 신경세사의 분화나 퇴화는 자가면역능과 밀접한 관계가 있음을 시사해 준다고 하겠다.

이상의 결과를 종합하여 볼때 산소자유기는 생쥐의 배양 척수감각신경절세포의 생존율을 저해하였으며 EGF는 산소자유기에 의하여 저해된 신경세포의 숫적 증가와 신경세사의 증가를 촉진시켰다.

## 결 론

척수감각신경절세포에 있어 산소자유기의 독성효과에 대한 기전을 규명하기 위해서 감각신경절 세포를 배양한 후 산소자유기의 신경독성효과를 조사하고 또한 산소자유기의 독성에 대한 신경방어효과를 상피세포성장인자 측면에서 조사하였다.

1. 35m U/ml XO/0.1 mM HX에서 신경세포를 3시간 배양한 결과 lethal concentration 50(LC<sub>50</sub>) 값을 나타냈다.

2. 산소자유기는 배양 생쥐 척수감각신경절 세포에 세포의 숫적감소와 신경돌기의 소실과 같은 세포의 형태적변화를 나타냈다.

3. EGF는 산소자유기에 의해 손상된 oxidative stress-induced cell death 과정을 억제하였다.

이상의 결론으로부터 산소자유기는 생쥐의 배양 척수감각신경절세포에 세포독성을 나타냈으며 EGF와 같은 선택적인 신경성장인자가 산소자유기에 의하여 유발된 독성효과의 방어에 효과적인 것으로 나타났다.

## 감사의 말씀

본 연구는 기초의학연구비및 한국과학재단의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드리며 원광대학교 과학관 장님 및 여러선생님께 감사드립니다.

## 문 헌

- 1) Michikawa M, Lim KT, McLarnon JG, Kim SU : Oxygen radical induced neurotoxicity in spinal cord neuron culture. *J Neurosci Res*, **37**, 62 (1994).
- 2) Difazio MC, Hollingsworth Z, Young AB, Penny JB : Glutamate receptors in the substantia nigra of Parkinson's disease brains. *Neurology*, **42**, 402 (1992).
- 3) Rosen D, Siddique T, Patterson D Figlewicz D, Sapp P Hentati A, Donaldson D, Goto J, O Regan J, Deng H, Rahmani Z, Krizus A : Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature (London)*, **362**, 59 (1993).
- 4) Nistico G, Ciriolo MR, Fiskin D, Iannone M, DeMartino A, Rotilio G : NGF restores decrease in catalase activity and increases superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity in the brain of aged rat. *Free Rad Biol Med*, **12**, 177 (1992).
- 5) Kikuchi S, Kim SU : Glutamate neurotoxicity in mesencephalic dopaminergic neurons in culture. *J Neurosci Res*, **36**, 58 (1993).
- 6) Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carla V, Moroni F : Excitatory amino acid release from rat hippocampal slices as a consequence of free-radical formation. *J Neurochem*, **51**, 1960 (1988).
- 7) 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 (1988).
- 8) Michelon AM, Puget K : Cell penetration by exogenous superoxide dismutase. *Acta Physiol Suppl*, **492**, 67 (1980).
- 9) Baird A, Walicke P : Fibroblast growth factors. *Br Med Bull*, **45**, 438 (1989).
- 10) Mattson MP, Zang Y, Bose S : Growth factors prevent mitochondrial dysfunction, loss of calcium homeostasis and cell injury, but not ATP depletion in hippocampal neurons. *Exp Neurol*, **121**, 1 (1993).
- 11) Kim SU, Osborne D, Kim MW, Spigelman I,

- Puil E, Shin D : Long-term culture of human fetal spinal cord neurons: Morphological immunocytochemical and electrophysiological characteristics. *Neuroscience*. **25**, 659 (1988).
- 12) Elion GB, Kovensky A, Hitchings GH, Metz E, Rundles RW : Metabolic studies of allopurinol, an inhibitor of xanthine oxidase. *Biochem Pharmacol*. **15**, 863 (1966).
- 13) Johnson D, Toms R, Weiner H : Studies of myelin breakdown in vitro. In Kim SU (ed): "Myelination and Demyelination". New York: Plenum Press, 219 (1989).
- 14) Kim YS, Kim SU: Oligodendroglial cell death induced by oxygen radicals and its protection by catalase. *J Neurosci Res*. **29**, 100 (1991).
- 15) 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 alpha-tocopherol administration. *Stroke*. **14**, 977 (1983).
- 16) Muramatsu H, Muramatsu T : Purification of recombinant midkine and examination its biological activities: functional comparison of new heparin binding factors. *Biochem Biophys Res Commun*. **177**, 652 (1991).
- 17) Savage CR Jr, Cohen S : Epidermal growth factor and a new derivative. Rapid isolation procedures and biological and chemical characterization. *J Biol Chem*. **247**, 7609 (1972)