

빌로바라이드가 글루타메이트에 의한 신경독성에 미치는 영향

김소라 · 장영표 · 성상현 · 이흠숙* · 문애리** · 김영중[#]
서울대학교 약학대학, *서울국립산업대학교 식품공학과, **덕성여자대학교 약학대학
(Received October 9, 1996)

Bilobalide Attenuates Glutamate-Induced Neurotoxicity in Primary Cultures of Rat Cortical Cells

So Ra Kim, Young Pyo Jang, Sang Hyun Sung, Heum Sook Lee*,
Aree Moon** and Young Choong Kim[#]

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

*Department of Food Science & Technology, Seoul National Polytechnic
University, Seoul 139-743, Korea

**College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

Abstract—The neurotoxicity induced by L-glutamate in primary cultures of rat cortical cells could be attenuated by sesquiterpene constituent of Ginkgo biloba leaves, bilobalide. At the concentration of 100 nM, Bilobalide elevated the combined levels of reduced/oxidized glutathione in rat cortical cells exposed to 100 μ M glutamate. Furthermore, bilobalide promoted a reduction in superoxide dismutase activity in glutamate-treated cells. Finally, bilobalide markedly inhibited the production of malondialdehyde, a measure of lipid peroxidation, in glutamate-treated rat cortical cells.

Keywords □ glutamate, primary cultures of rat cortical cells, bilobalide, superoxide dismutase, glutathione, malondialdehyde.

은행잎 추출물은 심혈관계 및 노인성 말초 순환장애, 뇌혈관 장애 등의 치료에 널리 사용되고 있으나 그 성분 및 치료효과가 현대의 약리학적 측면에서 규명된 것은 매우 최근의 일이다.¹⁾ 은행잎의 성분으로는 biflavone계, catechin계 및 flavonol glycoside계로 대별되는 flavonoids, diterpene과 sesquiterpene으로 대별되는 terpenoids, polyprenol, 유기산 및 다당류 등이 있으며²⁻⁴⁾ 은행잎 추출물의 이러한 효과는 주로 flavonoid 성분에 의한 것으로 알려졌다.⁵⁻⁷⁾ 최근에 은행잎의 diterpene계 성분인 ginkgolides가 혈소판활성인자를 억제시키는 것으로 밝혀지면서 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.⁸⁻⁹⁾ 본 연구자들은 ginkgolides

가 일차배양한 흰쥐의 대뇌피질세포에 글루타메이트로 유발시킨 신경독성을 유의성있게 차단시킴을 이미 보고한 바 있다.¹⁰⁾ 글루타메이트는 기억력과 학습력에 관여한다고 알려진 뇌의 부위에 집중적으로 분포되어 있는 quisqualate, N-methyl-D-aspartate 및 kainate와 같은 세 종류의 수용체에 작용한다.¹¹⁾ 글루타메이트는 이들 조직이 비정상적으로 저산소나 저혈당 상태가 되면 세포 외에서 그 농도가 증가되며, 이에 따라 세포내의 Ca^{2+} 의 농도도 증가되어 자유 분자단의 생성을 증대시킴으로써 세포막에 상해를 일으켜 결국에는 세포의 피사를 초래한다.¹²⁻¹³⁾ 그러므로 이러한 글루타메이트의 작용을 차단시킬 수 있는 물질은 신경세포를 보호하는 효과가 있다고 할 수 있다. 한편 sesquiterpene계 성분인 bilobalide는 1971년에 분리 보고되었으나 그 약리작용에 대하여서는 거의 알려진 바 없다.²⁾ 이에 본

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 02-880-7842 (팩스) 02-888-2933

연구는 bilobalide가 일차배양한 흰쥐의 대뇌피질세포에 유발된 글루타메이트성 신경독성에 어떻게 작용하는지를 밝히기 위하여 시도되었다.

실험방법

실험동물 - Sprague-Dawley계 자성 흰쥐 (150~50 g)를 서울대학교 동물사육장에서 공급받아 서울대학교 약학대학 실험동물실에서 사육하였다. 사육장의 환경은 실내온도를 $22 \pm 5^\circ\text{C}$ 로 유지하고 조명시간을 아침 7시에서 저녁 7시로 고정하였으며, 사료는 조단백 23.2%, 조지방 4.0%, 조섬유 6.0%, 조회분 10.0%, 조칼슘 0.6%, 조인 0.4%등이 함유된 고형사료 (서울, 삼양사)를 사용하였다. 자성 흰쥐를 교배시켜 임신을 유도하고 임신된지 17~19일된 태자를 실험에 사용하였다.

시약 및 재료 - 본 연구에 사용한 모든 시약은 Sigma사 (St. Louis, MO, U.S.A.)의 제품을, fetal calf serum은 Hyclone사 (Logan, Utah, U.S.A.) 제품을 사용하였다. Bilobalide는 독일 Heidelberg 대학의 H. Schink 박사로부터 표품을 제공받아 사용하였다.

흰쥐의 대뇌피질세포의 분리 및 배양 - 대뇌피질세포의 분리 및 배양은 Choi의 방법¹⁴⁾을 약간 수정하여 본 연구실에서 확립한 방법¹⁵⁾에 따라 행하였다. 간단히 기술하면 흰쥐 태자의 대뇌를 적출한 후 해부현미경을 이용하여 피질 부분만을 분리한 다음 막을 제거한 후 0.25% trypsin으로 30분간 처리하여 조직을 연화시킨 다음 개개의 세포 상태로 분리하였다. 분리한 신경세포를 LDH와 MTT assay를 위하여 poly-L-lysine으로 도포한 배양용기 (Corning, 15×24 mm)에 1×10^5 cells/dish씩 이식하였다. 항산화 효소의 활성 검색을 위하여서는 collagen으로 도포한 배양용기 (Corning, 60mm dishes)에 3×10^6 cells/dish씩 이식하였다. 배양액은 DMEM 90%, fetal calf serum 10%, penicillin 100 IU/ml과 streptomycin 10 $\mu\text{g/ml}$ 으로 구성된 것을 사용하였다. 세포의 배양은 일정한 습도를 유지하는 37°C 배양기에서 공기 (95%)와 CO_2 (5%)의 혼합기체를 계속 공급시키면서 수행하였으며 세포배양 3일 후에 5×10^{-5} M의 5-fluorodeoxyuridine으로 처리하여 신경세포가 아닌 다른 세포들의 성장을 저지시켰다.

글루타메이트에 의한 신경독성 유발 - 분리한 흰쥐의 대뇌피질세포를 14일 동안 배양한 후 100 μM 의 글

루타메이트를 24시간 동안 배양세포에 작용시켜 신경독성을 유발시켰다.¹⁴⁻¹⁵⁾

Bilobalide의 투여 - Bilobalide는 대뇌피질세포에 글루타메이트로 독성을 유발시키기 1시간 전에 미리 농도별로 투여하였다.

MTT assay - 배양 중인 대뇌피질세포의 배양액에 MTT (5 mg/ml)를 배양액의 10%가 되도록 가하고 계속하여 3시간 더 배양한 후 생성된 formazan을 DMSO로 녹여낸 다음 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.¹⁶⁾

Lactate dehydrogenase (LDH)의 정량 - 흰쥐의 대뇌피질세포의 배양액을 취하여 배양액 중으로 유리된 LDH를 정량 Kit를 이용하여 정량하였다.¹⁷⁾

Superoxide dismutase (SOD) 활성 측정 - 일차배양한 대뇌피질세포 내의 SOD의 활성은 McCord와 Fridovich 등의 방법¹⁸⁾을 약간 수정하여 측정하였다.

Glutathione reductase (GSSG-R) 활성 측정 - 일차배양한 대뇌피질세포 내의 GSSG-R의 활성은 Carlberg와 Mannerviik의 방법¹⁹⁾에 의해 측정하였다.

Glutathione의 정량 - 일차배양한 대뇌피질세포 내의 총 glutathione양과 oxidized glutathione (GSSG)양은 Griffith의 방법²⁰⁾으로 측정하였다.

과산화 지질의 정량 - 지질의 과산화 정도는 1,1,3,3-tetraethoxypropane을 표준물질로 하여 Asakawa와 Matsushita의 방법²¹⁾을 응용하여 측정하였다.

단백질 정량 - 단백질 양은 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 Lowry 방법²²⁾으로 505 nm에서 흡광도를 측정하여 결정하였다.

통계처리 - 통계적 유의성 검토는 대조치로부터의 변동을 "one-way ANOVA" test로 하였으며 p값이 5% 미만일 때는 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

흰쥐의 대뇌피질세포를 글루타메이트성 수용체가 충분히 발달되도록 14일동안 배양한 후 글루타메이트로 인위적인 신경독성을 유발시키면 신경축색돌기의 굵기가 가늘어지며 분절되고 신경세포 자체도 팽윤되어 결국에는 사멸되는 것을 현미경으로 관찰할 수 있었다. Bilobalide가 글루타메이트로 인한 신경독성에 어떻게 영향을 미치는 지 글루타메이트로 독성을 유발시키기 1시간 전에 농도별로 미리 작용시키고 24시간동안 더 배양

한 후 현미경 관찰, MTT assay를 이용한 생존율 측정 및 배양액 중으로 유리되는 LDH양을 측정함으로써 알아보았다. Bilobalide는 글루타메이트로 인한 신경독성을 유의성 있게 완화시켜 100 nM에서 정상상태 때의 56% 수준까지 대뇌피질세포를 생존시켰다(Fig. 1).

글루타메이트 수용체는 직접적으로든 간접적으로든 이온 channel들과 연결이 되어 있어 과량의 NMDA 수용체의 효능제를 배양세포에 투여하면 빠른시간 내에 세포 내 양이온의 농도가 증가되며, 이어서 세포 내의 전압 조절을 위하여 음이온이 역시 세포 내로 유입되고, 높아진 삼투압을 조절하기 위하여 물이 세포 내로 유입되어 결국은 세포가 팽윤되고 터져서 괴사하게 되는데 이러한 세포 괴사는 배양세포의 경우 30분 이내에 급속하게 나타난다.¹³⁾ 한편, 배양세포에 과량의 글루타메이트 효능제를 투여하고 30분 이내에 다시 효능제를 제거하더라도 24시간이 지난 후에는 세포가 심하게 독성을 입게 된다.²⁴⁾ 이는 세포 내로 유입된 Ca²⁺에 의해 여러 calcium-dependent 효소가 활성화되며 cystine uptake가 억제되어 세포 내의 자유 분자단의 생성을 증가시켜 독성이 유발되는 것으로 추정되는데 여러 항산화제들이 글루타메이트로 인한 독성을 유의성 있게 차단시킨다는 연구보고가 이를 뒷받침하고 있다.¹¹⁾ 세포 내의 자유 분

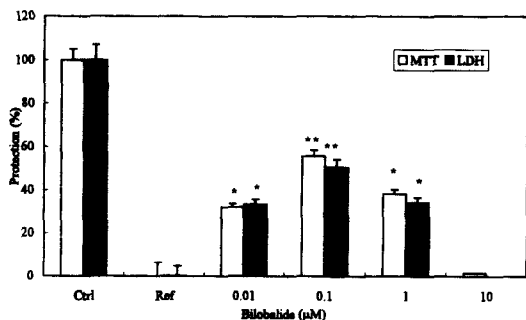


Fig. 1—The effect of bilobalide on the glutamate-induced neurotoxicity in primary cultured rat cortical cells.

Control is the value for primary cultured rat cortical cells. Control values for MTT and LDH were 1.23±0.08 optical density and 197.6±1.06 Unit/ml, respectively.

Reference is the value for primary cultured rat cortical cells exposed to glutamate. Reference values for MTT and LDH were 0.58±0.02 optical density and 110.9±0.31 Unit/ml, respectively.

Differs significantly from the reference : p<0.05*, p<0.01** (n=3).

자단은 정상환경에서도 생성되나 세포 내에 존재하는 항산화제인 glutathione에 의해 직접 포함되거나 SOD, catalase 및 glutathione peroxidase 등의 일련의 효소들과 반응하여 인체에 무해한 물질로 변화되어 배설되게 된다.¹⁸⁻²⁰⁾ 그러나 생체가 비정상 상태가 되어 세포 내의 자유 분자단이 과다하게 생성되면 세포막 지질의 과산화가 유발되어 세포의 괴사가 유도된다.²¹⁾

세포 내의 자유 분자단의 생성이 증가되면 reduced glutathione (GSH)보다는 GSSG양이 증가하게 되며, 증가된 GSSG는 GSSG-R에 의해 다시 GSH로 환원되어 지속적인 항산화 작용이 유지된다. 그러나 신경세포가 글루타메이트에 의해 독성을 입게 되면 GSSG-R의 활성이 감소되어 세포 내에서의 GSSG양이 정상상태 때보다 증가되어 항산화 작용이 원활히 유지되지 못한다. 이에 bilobalide가 글루타메이트로 인해 감소된 대뇌피질세포 내의 GSSG-R의 활성에는 어떠한 영향을 미치는지를 알아보았다(Fig. 2). Bilobalide는 감소된 GSSG-R의 활성을 유의성 있게 증대시켜 정상상태 때의 70% 수준까지 유지시켜 항산화 작용의 향상성

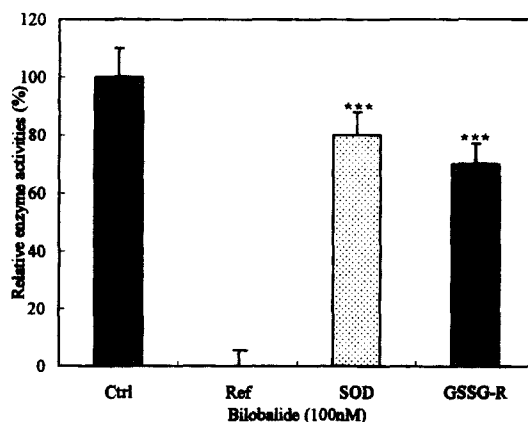


Fig. 2—Effects of bilobalide on the activities of superoxide dismutase and glutathione reductase in primary cultured rat cortical cells exposed to glutamate.

The nomenclature is precisely as described under the legend to Fig. 1 (n=3).

Control values for GSSG-R and SOD were 67.5 ± 3.9 nmol NADPH oxidized/mg protein/min and 53.5 ± 4.4 mU/ml, respectively.

Reference values for GSSG-R and SOD were 34.6 ± 2.2 nmol NADPH oxidized/mg protein/min and 27.5 ± 2.7 mU/mm, respectively.

Differs significantly from the reference : p<0.01** * (n=3).

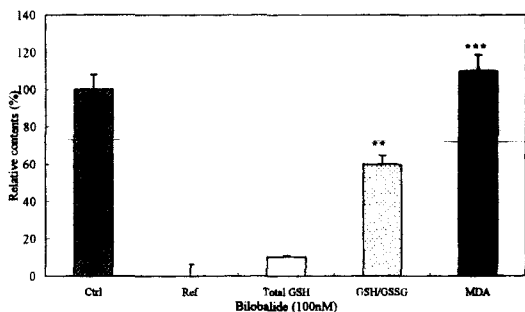


Fig. 3— Effects of bilobalide on total glutathione content, GSH/GSSG level and malondialdehyde content in primary cultured rat cortical cells exposed to glutamate.

The nomenclature is precisely as described under the legend to Fig. 1 (n=3).

Control values for GSH content, GSH/GSSG level and MDA content were 89.3 ± 7.9 nmol/mg protein, 11.4 ± 0.9 and 80.9 ± 5.2 pmol/mg protein, respectively.

Reference values for GSH content, GSH/GSSG level and MDA content were 21.8 ± 3.1 nmol/mg protein, 3.5 ± 0.2 and 216.3 ± 19.2 pmol/mg protein, respectively.

Differs significantly from the reference : $p < 0.01^{**}$, $p < 0.001^{***}$ (n=3).

유지에 관여하는 것으로 생각되었다.

또한, bilobalide가 글루타메이트에 의해 감소된 총 glutathione 양에는 어떠한 영향을 미치는지를 알아보았다. 즉, 배양세포를 수집하여 세포 내에 존재하는 총 glutathione 양과 GSSG 양을 측정하여 알아보았다 (Fig. 3). Bilobalide는 글루타메이트로 인하여 감소된 세포 내의 총 glutathione 양은 유의성 있게 증가시키지 못하였으나 글루타메이트로 인해 감소된 GSH/GSSG의 값은 정상상태 때의 50% 수준까지 유지시켰다. 이러한 결과는 bilobalide에 의해 GSSG-R의 활성이 증대됨으로 GSSG가 GSH로 환원되어 GSH 양이 증가된다는 상기의 실험결과를 뒷받침한다 하겠다.

Bilobalide가 일차배양한 흰쥐의 대뇌피질세포에서 글루타메이트로 인한 신경독성으로 저하된 SOD의 활성에는 어떻게 영향을 미치는 지 알아보았다. 일차배양한 흰쥐의 대뇌피질세포에 bilobalide를 100 nM의 농도로 작용시킨 후 글루타메이트로 독성을 유발시키고, 배양세포를 수집하여 저하된 세포 내의 SOD 활성에 미치는 영향을 알아보았다 (Fig. 2). 실제로 SOD를 흰쥐 대뇌피질의 synaptosomes에 미리 작용시키면 글루타

메이트로 인한 신경독성이 유의성 있게 차단된다는 연구가 보고되었다.²⁵⁾ Bilobalide는 글루타메이트로 인해 저하된 SOD의 활성을 정상상태 때의 80% 수준까지 증대시켜 자유 분자단의 대사를 촉진시키리라 생각되었다.

또한 bilobalide는 100 nM에서 글루타메이트로 인해 증가된 MDA 양을 정상상태 때의 수준까지 감소시켜 세포막 지질의 과산화를 거의 완벽하게 차단시킬 수 있었다 (Fig. 3). 그러나 bilobalide가 세포막 지질의 과산화를 완벽하게 막아줌에도 불구하고, 글루타메이트로 인한 독성을 완전히 차단시키지 못하는 것은 독성 유발초기에 세포 내로의 Ca^{2+} 유입을 차단시키지 못해 이에 따른 급성독성을 막지 못하여 일어나는 결과로 일단은 추측할 수 있으나 이를 뒷받침 할 연구가 뒤따라야 할 것이다. 본 연구결과 지금까지 ginkgolides에 비하여 생리활성이 그다지 알려지지 않는 bilobalide도 글루타메이트에 의한 신경독성을 완화시킬 수 있었다.

결 론

1. Bilobalide는 100 nM에서 글루타메이트로 인한 세포피사를 유의성 있게 차단시켜 대뇌피질세포를 정상상태 때의 56% 수준까지 유지시켰다.
2. Bilobalide는 글루타메이트로 인한 신경독성으로 저하된 superoxide dismutase와 glutathione reductase의 활성을 유의성 있게 증대시켰다.
3. Bilobalide는 글루타메이트로 인한 신경독성으로 증가된 지질과산화 산물인 malondialdehyde의 생성량을 정상상태 때의 수준까지 감소시켰다.

감사의 글

본 연구에 소요된 경비는 교육부 지원 한국학술진흥재단의 94년도 자유공모과제 (과제번호 01 F 0119) 학술연구조성비로 충당된 것으로 이 연구비 지원에 감사드리며 bilobalide를 기증해 주신 독일 Heidelberg 대학의 H. Schink 박사님께도 감사드립니다.

문 헌

- 1) Schwabe, W. and Kloss, P. : Recovery of vasoac-

- tive drugs from leaves of *Ginkgo biloba*, German Patent, 1,767,098, May 31 (1972) (from D.A. 78: 133541).
- 2) Wagner, H., Bladt, S., Hartmann, U. and Daily, A. : *Ginkgo biloba*, *Deutsche Apotheker Zeitung*, **129**, 2421 (1989).
 - 3) Boralle, N., Braquet, P. and Gottlieb, O. R. : *Ginkgo biloba*: A review of its chemical composition. In *Ginkgolides—Chemistry, biology, pharmacology and chemical perspective* (ed Braquet, P.), J. R. Prous Science Publ. Co., Barcellona, p. 9 (1988).
 - 4) Ibata, K., Mizuno, M., Takigawa, T. and Tanaka, Y. : Long chain betulaprenol-type polyprenols from the leaves of *Ginkgo biloba*, *Tetrahedron Lett.*, **29**, 5343 (1983).
 - 5) Allard, M. : Treatment of old-age disorders with Ginkgo extract from pharmacology to clinical medicine, *Press Med.*, **15**, 1540 (1986).
 - 6) Agnoli, A., Rapin, J. R., Scapaginini, V. and Weitbrecht, W. V. : Effects of Ginkgo biloba extract on organic cerebral impairment. In *Proceedings of the International Symposium*, John Libbey and Company, p. 1 (1984).
 - 7) Der Maderosian, A. and Liberti, L. E. : Natural Product Medicine, George F., Philadelphia, p. 309 (1988).
 - 8) Anton, R. : Ginkgo et maladies vasculaires, *Plantes medicinales et phytotherapie*, Tom **XI**, 189 (1977).
 - 9) Braquet, P. : The ginkgolides: Potent platelet-activating factor antagonists isolated from *Ginkgo biloba* L.: Chemistry, pharmacology and clinical applications, *Drug of the Future*, **12**, 643 (1987).
 - 10) Kim, S. R., Jeon, M. H. and Kim, Y. C. : Ginkgolides attenuates glutamate-induced neurotoxicity in primary cultures of rat cortical cells. *Yakhak Hoeji*, **40**, 720 (1996).
 - 11) Monaghan, D. T., Bridges, R. J. and Cotman, C. W. : The excitatory amino acid receptors: Their classes, pharmacology and distinct properties in the function of the central nervous system. *Annu. Rev. Pharmac. Toxic.*, **29**, 365 (1989).
 - 12) Kauppisen, R. A., McMahon, H. T. and Nicholls, D. G. : Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent glutamate release, energy status and cytosolic free Ca^{2+} concentration in isolated nerve terminals following metabolic inhibition: Possible relevance to hypoglycemia and anoxia. *Neurosci.*, **27**, 175 (1988).
 - 13) Weiloch, T. : Hypoglycemia-induced neuronal damage prevented by an N-methyl-D-aspartate antagonists. *Science* **230**, 681 (1985).
 - 14) Choi, D. W. : Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neurosci. Lett.*, **58**, 293 (1985).
 - 15) Park, M. J., Kim, S. R., Moon, A., Kim, S. H. and Kim Y. C. : Primary culture brain cells as screening methods for natural products acting on glutamatergic neurons. *Yakhak Hoeji* **39**, 444 (1995).
 - 16) Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods*, **65**, 55 (1983).
 - 17) Choi, D. W. and Koh J. Y. : Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *J. Neurosci. Methods*, **20**, 83 (1987).
 - 18) McCord, J. M. and Frivich, J. : Superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.*, **244**, 6049 (1969).
 - 19) Carlberg, I. and Mannervik, B. : Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.*, **250**, 5475 (1975).
 - 20) Griffith, O. W. : Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinyl pyridine. *Anal. Biochem.*, **106**, 207 (1980).
 - 21) Asakawa, T. and Matsushita, S. : Thiobarbituric acids test for detecting lipid peroxides. *Lipids*, **14**, 401 (1980).
 - 22) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
 - 23) Choi, D. W., Maulucci-Gedde M. A. and Krieg-

- stein, A. R. : Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J. Neurosci.* **7**, 357 (1989).
- 24) Albers, G. W., Goldberf, M. P. and Choi, D. W. : N-methyl-D-aspartate antagonists: Ready for clinical trial in brain ischemia. *Annal. Neurol.* **25**, 398 (1989).
- 25) Zoccarato, F., Valente, M. and Alexandre, A. : Hydrogen peroxide induced a long-lasting inhibition of the Ca^{2+} -dependent glutamate release in cerebrocortical synaptosomes without interfering with cytosolic Ca^{2+} . *J. Neurochem.* **64**, 2552 (1995).