

## Glucose Oxidase에 의하여 損傷된 培養 脊髓感覺神經節細胞에 對한 淫羊藿의 效果

朴承澤, 李昊燮\*, 尹用甲\*\*, 朴炳林\*\*\*

圓光大學校 醫藥資源 (연구센터), 圓光大學校 醫科大學 解剖學教室, ~~韓醫科大學 生理學教室~~, \*\*韓醫科大學 方劑學教室, \*\*\*醫科大學 生理學教室

### -Abstract-

Effect of Epimedium Koreanum Nakai on GO-Induced Neurotoxicity in Cultured  
Mouse Spinal Dorsal Root Ganglion Neurons

Seung Taeck Park, Ho Sub Lee\*, Young Gap Yun\*\*, Byung Rim Park\*\*\*

Medicinal Resources Research Center of Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea  
Department of Anatomy, School of Medicine, \*Department of Physiology, \*\*Department of  
Prescription, College of Oriental Medicine, \*\*\*Department of Physiology, Wonkwang  
University

To evaluate the neurotoxic effect of oxygen radicals in cultured mouse spinal dorsal root ganglion(DRG) neurons, cytotoxicity was determined by MTT assay after cultured DRG neurons were grown in the media containing various concentrations of glucose oxidase(GO). In addition, neuroprotective effect of herb extract, Epimedium Koreanum Nakai was examined by MTT assay in cultured DRG neurons. Cell viability of cultured DRG neurons was remarkably decreased by GO in dose- and time-dependent manner, and Epimedium Koreanum Nakai protected remarkably GO-induced neurotoxicity in these cultures.

From the above results, it is suggested that oxygen radicals is toxic in cultured mouse DRG neurons, and herb extracts such as Epimedium Koreanum Nakai are effective in prevention of the neurotoxicity induced by oxygen radicals in cultured mouse DRG neurons.

Key words : Glucose oxidase, Neurotoxicity, Cultured spinal dorsal root ganglion neuron

---

\* 이 논문은 한국과학재단 지정 의약자원 연구센터(MRRC 95-16-02-09-A-1)의 지원에 의하여 이루어 졌음.

## 〈 초 록 〉

척수감각신경절세포에 대한 산소자유기의 신경독성효과에 대한 기전을 규명하기 위하여 여러 농도의 Glucose Oxidase(GO)를 배양 척수감각신경절세포에 처리한 후 GO의 독성효과를 분석하였으며 또한 GO에 의하여 유발된 신경독성에 대한 음양곽(Epimedium Koreanum Nakai)의 방어효과를 MTT assay법에 의하여 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다. GO는 신경세포에 처리한 농도와 시간에 비례하여 세포의 생존율을 유의하게 감소시켰으며, 또한 음양곽이 GO의 독성효과를 효과적으로 방어하였다.

이상의 결과로 부터 산소자유기인 GO는 생쥐의 배양 척수감각신경절세포에 독성을 나타냈으며 음양곽과 같은 한약추출물이 GO의 독성을 방어하는데 효과적인 것으로 나타났다.

찾아보기 낱말 : 음양곽, 신경독성, 배양 척수감각신경절세포

## I. 서 론

산소자유기는 인체내에서는 정상적으로 대사과정중에 형성되어 항산화제에 의하여 인체에는 해가 없는 물질로변환되어 지지만 만약 대사이상에 의한 비정상적인 경우에는 과다히 형성됨으로서 인체를 구성하고 있는 조직이나 장기에 손상을 줌으로서 각종 부작용과 후유증을 초래하게 된다(Halliwell, 1987). 최근 산소자유기는 신경세포에 산화적 손상을 초래함으로써 신경병변의 병인으로 밝혀지고 있다(Jesberger와 Richadson, 1991). 즉, 근위축증측삭화증(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)의 경우 superoxide dismutase(SOD)-1 유전인자의 돌

연변이에 의하여 환자의 뇌속에 산소자유기가 다량 축적됨으로서 병변이 유발된다는 것이 밝혀졌다(Conradi등, 1982; Rosen등, 1993). 이와 같이 산소자유기가 각종 신경질환의 병인의 하나로 알려지면서 뇌졸중을 비롯한 알츠하이머씨병등에 있어서도 산소자유기가 관여하고 있음이 보고되고 있다(Dumuis등, 1988; Elion등, 1990). 따라서 국내외 많은 학자들은 산소자유기의 병인적 현상과 산소자유기의 신경독성에 대하여 연구를 꾸준히 진행하여 왔다(Michikawa등, 1994; Park등, 1996). 그러나 신경독성에 대한 산소자유기의 병리적 기전에 대하여 지금까지 자세히 밝혀진 바 없다(Graf등, 1984; Mattson등, 1993). 최근에 산소자유기와 배양 신경세포와의 상호 병인에 대한 연구에서 산소자유기는 흥분성아미노산(exitotoxic amino acid, EAA)을 분비한다는 것이 밝혀지면서 이에 대한 연구가 활발히 진행중에 있다(Pellegrini-Giampietro등,1990). 그 밖에도 산소자유기는 phospholipase A2를 활성화시켜 새로운 산소자유를 생성케 하며 세포내 칼슘저장고를 자극하여 그 결과 세포내 자유칼슘의 양을 증가시킨 다고 한다(Yamamoto등, 1983; Kim등, 1998). 이와같이 산소자유기는 여러 기전에 의하여 세포를 손상 내지는 사멸시키기 때문에 산소자유기에 의하여 유발된 신경병변의 치료에도 많은 어려움이 있다(Floyd, 1990).그러나 최근에는 한약제의 추출물이나 동.식물천연물을 이용하여 각종 난치성 신경병변의 치료를 시도하고 있다. 특히 한약추출물은 양약에 비하여 병변의 치료에 효과적이면서도 세포독성이 적거나 거의 미미하기 때문에 그 결과 부작용이 적어 우리나라는 물론 많은 선진국에서도 각광을 받고 있다(Mosmann, 1983, Hall과 Braughler, 1986; Kim과 Kim, 1991). 본실험에서 사용한淫羊藿을 자극감각신경 기능을 비롯하여 皮膚不仁 및 半身不遂에 대하여 효과적인 약리적 활성을 가지고 있다고 하였다.(高本釘, 中華民

國1971) 따라서 본 연구는 산소자유기의 신경 독성 효과에 대한 기전을 규명하기 위하여 생쥐의 척수감각신경절세포를 배양한 다음 산소자유기의 일종인 Glucose Oxidase(GO)를 처리하여 이의 독성효과를 측정하였으며 동시에 羊鬍이 GO의 독성에 의해 손상된 척수 감각신경절세포에 대한 다음과 같은 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 세포배양

생쥐의 척수조직으로부터 감각신경절세포의 분리는 Michikawa등(1994)의 방법에 따라 행하였다. 척수감각신경절로부터 분리된 신경세포는 Eagle's medium essential medium(MEM, Gibco)에 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco)이 포함된 배양액에 부유시킨 다음 37°C, 5% CO<sub>2</sub>/95% air로 조절된 정온기에서 일정시간 동안 배양하였다. 배양이 완료된 후 96-multiwell에 1 x 10<sup>4</sup> cells/well의 밀도로 분주하여 배양후 본실험에 사용하였으며 3일 간격으로 새로운 배양액으로 교환하여 주었다.

### 2. 약제 제조

본 실험에 사용한 약제는 Glucose Oxidase (GO, Sigma)와 Glucose(Sigma)로서 GO는 각각 100mU/ml, 10mU/ml, 1mU/ml의 저장액을, glutathione은 각각 100mM, 10mM, 1mM의 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 다음 실험 전날 최종 농도로 희석하여 사용하거나 또는 필요한 양을 직접 배양액에 넣어 사용하였다.

### 3. 한약재 추출

본 실험에 사용한 한약재의 추출은 한약제와

증류수를 넣어 3시간 동안 끓인 다음 이를 다시 여과시켰다. 여과된 액체는 모액을 50ml 정도로 농축한 후 이를 시료로 사용하였다.

### 4. GO 처리

배양중인 세포를 0.6% D-glucose가 포함된 MEM에서 3회 세척한 후 실험 전날 제조한 여러 농도의 GO가 포함된 배양액에서 1~5시간 동안 처리한 다음 약제를 처리하지 않았던 배양액을 대조군으로 하여 이의 영향을 분석하였다.

### 5. 항산화제의 처리

산소자유기의 독성에 대한 항산화제의 영향을 알아보기 위하여 일정시간 배양한 신경세포에 항산화제인 glutathione이 여러 농도로 포함된 배양액에서 2시간 동안 전처리 한 다음 이를 다시 GO에 5시간 동안 처리한 후 이의 영향을 조사하였다.

### 6. 한약추출물의 처리

본 실험에 사용한 한약추출물은 음양곽 (Epimedium Koreanum Nakai)으로서 이가 여러 농도로 포함된 배양액에서 배양 신경세포를 2시간 동안 전처리한 후 이를 다시 4시간 동안 산소자유기에 처리한 다음 음양곽이 배양 신경세포에 미치는 영향을 조사하였다.

### 7. 세포생존율 조사

MTT[3-(4,5-dimethylthiazol)-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide](MTT, Sigma)의 분석은 Mosmann(1983)의 방법에 따랐다. 즉, 실험 전날 제조한 50mg/ml의 저장액을 배양 용기에 well당 1m씩 넣어 잘 혼합하였다. 혼합 완료 후 3시간 동안 반응시킨 후 이를 정지시켜 Dynatch microelisa reader로 490nm에서 흡

광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

### 8. 통계 처리

실험 결과에 대한 유의성의 검정은 Student' s-t test에 의하였으며 p값이 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

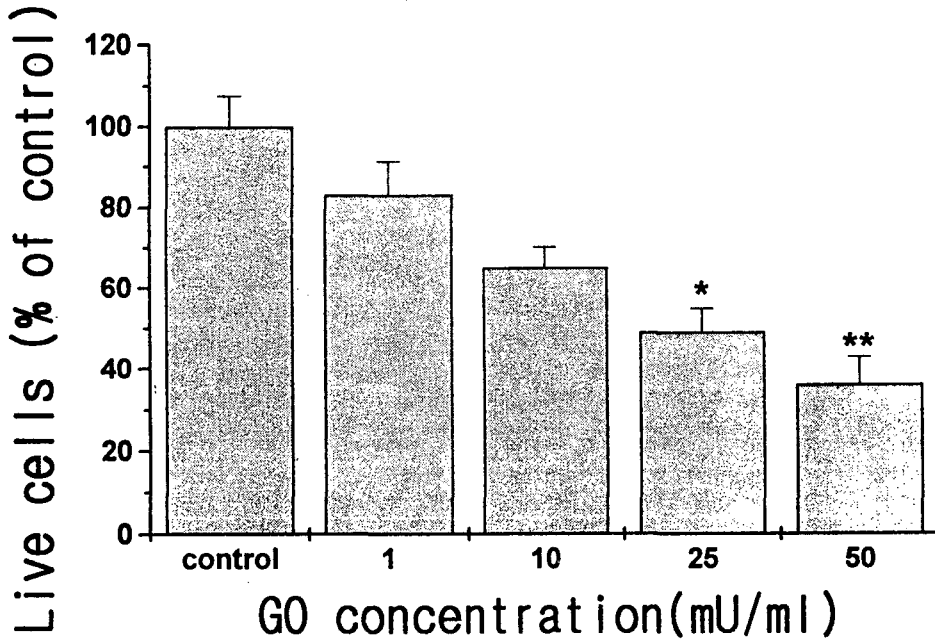


Fig 1 Dose-response relationship of glucose oxidase(GO) concentration on cultured mouse spinal dorsal root ganglion neurons. Cytotoxicity was measured by MTT assay. Cultured cells were exposed to 1, 10, 25 and 50mU/ml GO for 5 hours. The results indicates the mean± SEM(n=6). \*p<0.05 ; \*\*p<0.01

## III. 결 과

### 1. GO의 독성효과

산소자유기가 배양 생쥐의 척수감각신경절세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 Glucose oxidase(GO)가 1mU/ml에서 50mU/ml까지의

각각의 농도로 포함된 배양액에서 5시간 동안 배양한 후 산소자유기의 독성효과를 MTT assay법에 의하여 조사한 결과 1mU/ml GO처리에서는 세포의 생존율이 대조군(100%)에 비하여 83%로 나타났다. 또한 10mU/ml 처리에서는 세포의 생존율이 65%로 나타났으며 25mU/ml와 50mU/ml의 GO 처리에서는 각각 49%와 36%의 생존율을 나타냈다(Fig.1). 시간

에 따른 GO가 배양 척수감각신경절세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 25mU/ml GO가 포함된 배양액에서 배양 척수감각신경절세포를 1시간에서 8시간 동안 배양한 후 세포의 생존율을 MTT assay법에 의하여 대조군과 비교

조사한 결과 1시간 배양에서는 대조군(100%)에 비하여 86%의 생존율을 보였다. 또한 3시간과 5시간 배양에서는 각각 75%와 52%의 생존율을 나타냈으며 8시간 배양에서는 47%로 나타났다(Fig. 2).

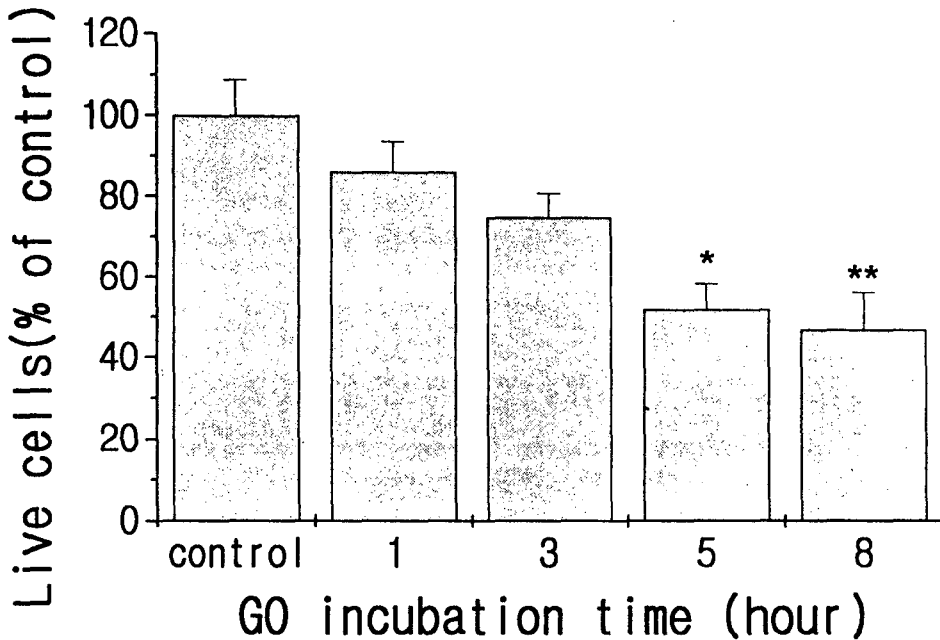


Fig 2 Time-response relationship of glucose oxidase(GO) on cultured mouse spinal dorsal root ganglion neurons. Cytotoxicity was measured by MTT assay. Cultured cells were exposed to 25mU/ml GO for 1, 3, 5 and 8 hours. The results indicates the mean  $\pm$  SEM (n=6). \*p<0.05 ; \*\*p<0.01

## 2. 항산화제의 효과

GO의 독성에 대한 항산화의 영향을 조사하기 위하여 배양 척수감각신경절세포를 25mU/ml GO에 노출시키기 2시간 전에 1mM에서 부터 6mM까지의 glutathione이 각각 포함된 배양액에서 배양한 다음 이의 영향을 MTT assay법에 의하여 세포 생존율을 조사하였다. 25mU/ml GO만을 처리한 경우 세포의 생존율은 대조군(100%)에 비하여 35%로 나타난 반면 1mM glutathione을 처리한 실험군에 있

어서는 세포의 생존율이 68%로 나타났다. 또한 3mM 처리에서는 83%로 나타났으며 6mM glutathione 처리에서는 96%의 높은 생존율을 보였다(Fig. 3).

## 3. 음양곽의 효과

일정시간 동안 배양한 척수감각신경절세포를 30  $\mu$ g/ml 부터 120  $\mu$ g/ml까지의 각각의 음양곽이 포함된 배양액에서 2시간 동안 전처리한 후 이를 다시 25mU/ml GO에 5시간 동안 배양

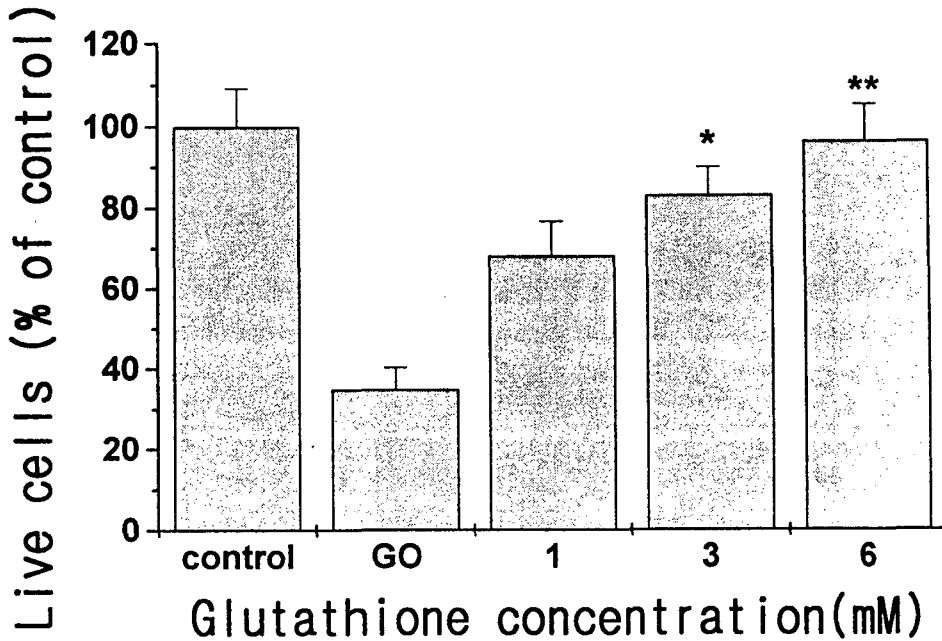


Fig 3 Dose-response relationship of antioxidant for its neuroprotective effect on GO-mediated neurotoxicity by MTT assay. Cultured mouse spinal dorsal root ganglion neurons were preincubated with glutathione for 2 hours before treatment with 25mU/ml GO for 5 hours. The results indicate the mean  $\pm$  SEM (n=6). \*p<0.05 ; \*\*p<0.01

한 다음 이의 영향을 조사한 결과 GO만을 처리한 실험군에서는 세포의 생존율이 대조군(100%)에 비하여 51%인데 비하여 30  $\mu$ g/ml 음양곽을 처리한 실험군에서는 67%의 생존율을 보였다. 또한 60  $\mu$ g/ml 처리에서는 세포의 생존율이 73%로 나타났으며 120  $\mu$ g/ml 음양곽의 처리에서는 91%의 높은 생존율을 나타냈다 (Fig. 4).

#### IV. 고찰

자유라디칼의 일종인 산소자유기는 그 자체 세포독성을 가지고 있음은 물론, 질소자유기와

반응함으로써 peroxynitrite라는 맹독성물질을 생성함으로써 신경세포를 비롯한 여러 세포종에 손상을 초래함은 이미 잘 알려진 사실이다 (Elion 등, 1990). 특히, 산소자유기는 세포막의 지질과산화반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 세포내의 칼슘항상성을 깨뜨려 세포의 퇴행이나 사멸을 유도하기도 한다 (Yamamoto 등, 1983; Kim 등, 1998). 본 실험에서 1~50mU/ml glucos oxidase(GO)를 생쥐의 배양 척수감각신경절세포에 5시간 동안 처리한 결과 GO의 처리 농도에 비례하여 척수감각신경절세포의 생존율을 감소시켰다. 이러한 결과는 GO가 배양 척수감각신경절세포에 세포독성을 가지고 있다는 것을 말해 주고 있다. 본 연구의 이같은 결과는 Michikawa 등(1994)이 척수신경세포가 산소자유기의 산화적 손상에 의하여 세포생존율이 현저

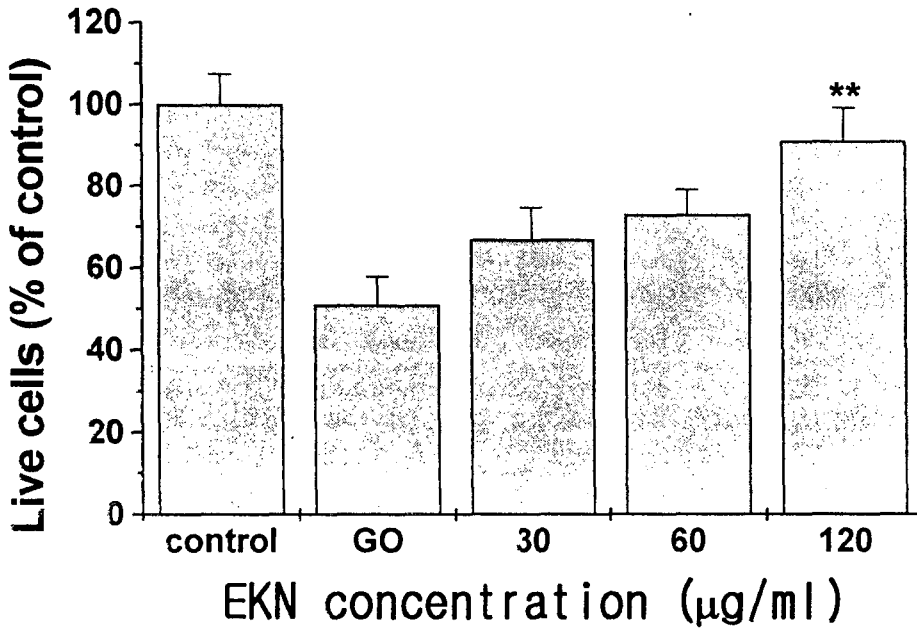


Fig 4 Dose-response relationship of herb extract for its neuroprotective effect on GO-mediated neurotoxicity by MTT assay. Cultured mouse spinal dorsal root ganglion neurons were preincubated with Epimedium Koreanum Nakai(EKN) for 2 hours before treatment with 25µU/ml GO for 5 hours. The results indicate the mean ± SEM(n=6). \*\*p<0.01

히 감소되었다는 보고나 Park등(1996)이 산소 자유기의 일종인 xanthine oxidase(XO)가 배양 척수 감각신경절세포의 손상을 초래하였다는 연구 결과와 일치하였음을 알 수 있었다. 산소 자유기의 이러한 독성효과는 아마도 산소자유기가 항산화제의 항산화효소의 활성을 저해함으로써 세포의 산화적 손상을 방어하지 못하였을 가능성이 클 것으로 생각된다. 따라서 본 실험에서는 이를 알아보고자 항산화제의 일종인 glutathione을 처리하여 이의 방어효과를 조사한 결과 GO만을 처리한 경우 세포의 생존율은 대조군(100%)에 비하여 35%로 낮게 나타났으나 1~6mM glutathione을 처리한 경우 세포의 생존율은 60~90% 이상의 생존율을 보였으며, 특히 6mM glutathione의 처리에서는 96%의 높은 생존율을 보였다. 이같은 연구 결과는 Michikawa등(1994)이 항산화제의 일종인 catalase

가 산소자유기로 손상된 척수신경세포의 생존율을 증가시켰다는 실험 결과와 일치하였다. 본 실험에서 glutathione에 의한 세포생존율의 증가는 아마도 GO에 배양 척수감각신경절세포를 노출시키기 전에 glutathione에 2시간 동안 전처리한 사이 이미 세포로 들어간 glutathione이 GO의 독성을 방어했을 것으로 생각된다. 한편 GO에 대한 한약추출물인 음양곽의 영향에 있어서 GO만을 처리하였을 때 세포의 생존율은 대조군(100%)에 비하여 51%로 낮게 나타났는데 비하여 120 µg/ml의 음양곽을 처리한 경우 세포의 생존율은 90%로 높게 나타났다. 이같은 실험 결과는 음양곽이 항산화제와 같은 약리적 활성을 가지고 있음을 제시하고 있으며 GO의 신경독성의 방어에 매우 효과적임을 증명하고 있다. 그러나 산소자유기의 독성에 대한 한약추출물의 방어효과에 대한 더욱 자세한 약리적

활성에 대해서는 생리를 비롯한 약리 및 생화학 측면에서 종합적인 분석이 필요할 것으로 생각된다.

## V. 결 론

산소자유기의 독성효과에 대한 기전을 규명하기 위하여 생쥐의 배양 척수감각신경절세포에 여러 농도의 GO를 처리한 다음 산소자유기의 독성효과를 조사하였으며 또한 GO의 독성효과에 대한 음양곽(Epimedium Koreanum Nakai)의 영향을 MTT assay법으로 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 25mU/ml glucose oxidase(GO)를 5시간 동안 배양 척수감각신경절세포에 처리한 결과 처리 농도와 시간에 따라 세포의 생존율을 현저히 감소시켰다.
2. 6mM glutathione을 2시간 동안 배양 척수감각신경절세포에 전처리한 후 이를 다시 GO에 노출 시킨 결과 GO에 손상되는 신경세포의 생존율을 크게 증가시켰다.
3. 120 µg/ml 음양곽을 배양 척수감각신경절세포에 2시간 동안 전처리한 결과 GO에 의하여 손상되는 세포의 생존율을 현저히 증가시킴으로서 GO의 독성을 유의하게 방어하였다.

이상의 결과로 부터 산소자유기는 생쥐의 배양 척수감각신경절세포의 생존율을 현저하게 감소시켰으며 음양곽이 산소자유기의 독성을 유의하게 방어하였다.

## 참 고 문 헌

高木 釘 : 新編 中藥大辭典. 新文出版公司,

- 1761~1762, 中華民國 1971
- Conradi S, Ronnevi L, Norris F : Amyotrophic lateral sclerosis. In Rowland LP ed : Human Neuron Disease. New York, Raven Press, pp. 35-56, 1982.
- Dumuis A, Sebben M, Haynes L, Pin J-P, Bockaert J : NMDA receptors activate the arachidonic acid cascade system in striatal neurons. *Nature (London)* 336:68-70, 1988.
- Elion GB, Kovensky A, Hitchings GH, Metz E, Rundles RW : Metabolic studies of allopurinol, an inhibitor of xanthine oxidase. *Biochem Pharmacol* 15:863-880, 1966.
- Floyd RA: Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J* 4:2587-2597, 1990
- Graf E, Mahoney JR, Bryant RG, Eaton JW : Iron-catalyzed hydroxyl radical formation : Stringent requirement for free iron coordination site. *J Biochem* 259:3620-3624, 1984
- Halliwell B : Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 59:1609-1623, 1992.
- Jesberger JA, Richardson JS : Oxygen free radicals and brain dysfunction. *Int J Neurosci* 57:1-17, 1991
- 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* 25:659-670, 1988.
- Michikawa M, Lim KT, McLarnon JG, Kim SU : Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. *J Neurosci Res* 37:62-70, 1994.
- Mattson MP, Cheng B, Smith-Swintosky VL : Mechanisms of neurotrophic factor



- protection against calcium- and free radical mediated excitotoxic injury : Implications for treating neurogenerative disorders. *J Exp Neurol* 124:89-95, 1993.
- Mosmann T : Rapid colorimetric assay for the cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxic assays. *J Immun Methods* 65:55-63, 1983.
- Park ST, Mun YJ, Kim BH, Kim JJ, Choi MK, Chung YT : Study on the Effect of Allopurinol Against Oxidant-Induced Neurotoxicity in Cultured Spinal Sensory Ganglion Cells. *The Korean J Anato* 29 : 65-71, 1996
- Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carrla V, Moroni F : Excitatory amino acid and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J Neurosci* 10:1035-1041, 1990
- 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 *et al.* : Mutation in Cu /Zn superoxide dismutase gene are associated wigh familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature(London)* 362:59-62, 1993.
- Yamamoto M, Shima T, Uozumi T, Yamada K, Kawasaki T:A possible role of lipid peroxidation in cellular damages caused by cerebral ischemia and protective effect of alpa-tocopherol administrrtion. *Stroke* 14:977-982, 1983