

생쥐 피질세포배양에서 Free Radical 유발 신경손상에 대한 손바닥선인장 및 삼백초의 보호효과

위 명 복*

제주대학교 수의학과
(Received October 31, 2000)

Protective Effects of *Opuntia Ficus-Indica* and *Saururus Chinensis* on Free Radical-Induced Neuronal Injury in Mouse Cortical Cell Cultures

Myung-Bok Wie

Department of Veterinary Medicine, Cheju National University, Cheju 690-756, Korea

Abstract — The author examined whether the methanol extracts of *Opuntia ficus-indica* fruit and *Saururus chinensis* have the inhibitory action on xanthine/xanthine oxidase (X/XO)-, FeCl₂/ascorbic acid- and arachidonic acid-induced neurotoxicity in mouse cortical cell cultures. The methanol extracts (10 µg/ml~1 mg/ml) of *Opuntia ficus-indica* and *Saururus chinensis* were exhibited 53-89% and 48~100% inhibitory action on X/XO-induced neurotoxicity, respectively. At the range of same concentration, both extracts also attenuated the FeCl₂/ascorbic acid-induced neurotoxicity by 35~100% and 15~98%, respectively. In arachidonic acid neurotoxicity, the methanol extracts (1 mg/ml) of *Opuntia ficus-indica* and *Saururus chinensis* reduced neuronal injury by 22% and 38%, respectively. These results suggest that *Opuntia ficus-indica* fruit and *Saururus chinensis* may contribute the neuroprotection in certain free radical-mediated neuronal injury.

Keywords □ *Opuntia ficus-indica*, *Saururus chinensis*, neuroprotection superoxide anion radical, hydroxyl radical, arachidonic acid, mouse cortical cultures.

손바닥 선인장(*Opuntia ficus-indica*, 제주도 기념물 35호)은 북제주군 한림읍 월령리에 야생으로 군락을 이루어 자라는 열대성식물로서¹⁾ 항염증,²⁾ 혈당강하,³⁾ 위궤양 억제,⁴⁾ 항산화작용,⁵⁾ 면역기능 증강⁶⁾ 등의 효능이 있는 것으로 알려지면서 관상용 뿐만 아니라 현재 제주도 농가에서 특용작물로 많이 재배되고 있다. 또한 삼백초(*Saururus chinensis*, 산림청지정 희귀 멸종 식물 제177호)는 북제주군 환경면 고습지와 바닷가에 주로 분포하며,⁷⁾ 예로부터 부종완화 및 이뇨등의 목적으로 민간약으로 널리 사용되어 왔으며⁸⁾ 최근 간보호 작용,⁹⁻¹⁰⁾ 항암¹¹⁾ 및 진통작용¹²⁾이 있는 것으로 보고되

어 있다. 한편, 퇴행성 뇌질환(뇌졸중, 치매, 파킨슨씨 병등)으로 인한 뇌신경세포의 손상과정에서 나타나는 주된 병리현상의 특징으로 글루타메이트(glutamate) 수용체의 과도한 흥분으로 인한 신경세포내의 칼슘유입 증가와 더불어 arachidonic acid 대사증가와 관련하여 prostaglandins의 합성증가로 이어지는 염증반응이 관련됨이 잘 알려져 있다.¹³⁻¹⁷⁾ 또한 이 과정에서 산화적 스트레스(oxidative stress) 반응과 관련한 superoxide anion radical(O₂⁻) 및 hydroxyl radical(OH⁻) 등이 신경세포의 손상대지는 죽음과 밀접한 관련이 있다는 사실이 밝혀져 있다.¹⁸⁻²³⁾ 특히 중추신경계에서 고농도로 존재하는 흥분성 아미노산인 glutamate 및 aspartate는 학습 및 기억과 관련하여 신경전달물질로서 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 중추신경계의 대사 및 신

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 064-754-3362 (팩스) 064-756-3354

경성장인자로서도 작용하는 것으로 알려져 있다.²⁴⁾ 그러나 뇌졸중등의 퇴행성뇌손상에 의해 일시적으로 과도한 흥분성 신경전달물질인 glutamate 혹은 aspartate 분비가 일어날 시 흥분성아미노산의 주요 수용체가 과도하게 자극을 받아 뇌손상이 일어나게 된다.¹³⁾ 그러나 이러한 흥분성아미노산과 관련된 수용체를 차단하는 화합물들이 심각한 부작용 때문에 임상시험에서 새로운 의약품으로 아직까지 인정을 받지 못하고 있는 실정이다.²⁵⁾ 따라서 제주도 자원식물들인 손바닥 선인장 열매와 삼백초의 메탄올 추출물이 이러한 glutamate 수용체의 자극으로 인한 신경세포의 손상과정에 관여하는 것으로 알려진 free radical의 생성증가와 arachidonic acid 투여로 인한 뇌신경세포 손상에 방어효과가 있는지 알아보고자 생쥐 피질신경세포를 초대배양(primary culture)하여 조사하였다.

재료 및 방법

식물추출물 제조

제주시내 오일장에서 구입한 제주산 손바닥선인장 열매 및 삼백초를 잘 건조시킨 다음 70% methanol (MeOH)에 300 g/1.5 L 되게 2-3일간 침적시켜 놓은 다음 80°C 수욕조에서 3시간 정도 가열하여 회전식 증발기를 사용하여 농축시킨 다음 -80°C에서 동결시켜 진공동결건조기를 사용하여 powder 형태로 검색시료를 제조하여 -20°C에 밀봉 보관하였다가 실험에 사용하였다.

생쥐 뇌의 글리아 및 신경세포의 배양

Rose등의 방법²⁶⁾에 따라 뇌의 피질신경세포를 배양하기 전, 글리아를 배양하기 위해 먼저 생후 1~3일의 생쥐 새끼를 거즈가 바닥에 깔린 조그만 병안에 halothane을 점적한 다음 넣고 마개를 막아 마취가 될 때까지 기다렸다가 마취가 완료되면 생쥐 새끼를 꺼내 70%의 에탄올이 담겨져 있는 60 mm 배양접시 위에서 목부위를 가위로 절개하여 에탄올에 담근 채로 1~2분 정도 기다린 다음 순서대로 하나씩 머리를 절개용 배양액에 옮겨 두피를 제거하고 두개골을 가위로 자른 다음 뇌실질을 끄집어 내었다. 이렇게 모은 뇌조직들을 다른 배양액에 옮긴 다음 한마리씩 입체현미경 하에서 뇌막을 제거한 다음 순서대로 뇌의 피질 부위를 멸균된 미세 핀셋으로 잘랐다. 이렇게 채취한 대뇌피

질조직들은 0.09% trypsin이 있는 시험관에 넣어 37°C에서 1시간 배양하였다. 그후 이를 꺼내 500×g에서 5분간 원심분리시킨 다음 상등액을 버리고 여기에다 각각 10%씩의 우태가 및 말의 혈청이 있는 Eagle's minimal essential medium(MEM) 배양액을 1 ml 넣어 파스테르 피아펫으로 뇌세포를 여러번 왕복하여 부서지게하여 하나씩의 세포로 모두 분리될 때까지 여러번 반복한 다음 epidermal growth factor를 첨가하여 24 well의 배양판에 0.5~0.75 대뇌반구/plate 농도로 각각 400 μl씩 분주하였다. 첫 2주간은 그냥 방치하고 그 이후는 1주일 마다 1회씩 배양액을 2/3씩 교환하였다. 이렇게 하여 자란 3~6주 정도된 글리아를 기질로 신경세포를 키우기 위해 임신 15~16일된 생쥐를 동일한 마취제를 사용하여 무균적으로 임신된 자궁을 꺼낸다음 역시 뇌를 적출하여 대뇌피질 부위를 입체현미경하에서 미세 핀셋으로 잘라 동일하게 단리 세포로 만든 다음 글리아 위에 배양하였다. 이때 글리아를 키우던 배지는 모두 제거하고 우태가 및 말의 혈청이 각각 5%씩 들어 있는 MEM 배지를 400 μl 되게 하여 세포를 유지하였다. 그리고 5~7일째 비신경세포의 성장을 억제하기 위해 cytosine arabinoside (10 μm)를 첨가하였고 이렇게 하여 2주 이상 신경세포를 키워 성숙하게 되었을 시 실험에 사용하였다. 이때 신경손상유발 독성물질과 이들 두 식물추출물을 배양세포에 농도별로 각각 가하여 방어효능을 조사하였다.

Free radical 관련 신경손상 유발

Superoxide anion radical로 인한 신경손상에 대해 손바닥선인장 및 삼백초 메탄올추출물의 방어효능을 조사하기 위해 xanthine(0.5 mM)/xanthine oxidase (10 mU/ml)를 HEPES-buffered control salt solution (HCSS)에 녹여 배양신경세포에 10분간 노출시킨 뒤 (이때 식물추출물을 농도별로 동시에 처리, 대조군은 무처리) 다시 MEM 배양액으로 교환하고 20~24시간 뒤 Lactate dehydrogenase(LDH)를 정량하여 대조군과 비교평가 하였다. Hydroxyl radical로 인한 신경손상에 대해 이들 두 식물추출물의 방어효능을 조사하기 위해서는 FeCl₂(50 μM)/ascorbic acid(25 μM)를 HEPES- buffered control salt solution(HCSS)에 녹여 배양신경세포에 2시간 노출시킨 뒤(이때 식물추출물을 농도별로 동시에 처리, 대조군은 무처리)

다시 MEM 배양액으로 교환하고 20~24시간 뒤 LDH를 정량하여 대조군과 비교평가 하였다. Arachidonic acid로 인한 신경손상에 대해 이들 두 식물 추출물의 방어효능을 조사하기 위해서 100 μM의 arachidonic acid를 식물추출물과 동시에 MEM 배양액 상에서 처리하고 20~24시간 뒤 LDH를 정량하여 대조군과 비교평가 하였다.

신경세포의 손상측정

신경세포의 손상은 배양세포에서 세포밖의 배양액으로 분비되는 LDH를 측정하였는데 손상 및 파괴된 세포로부터 분비가 거의 완료되는 20~24시간 정도에서 세포 배양액을 채취하여 microplate reader로 측정하였다. 이 방법은 흥분성아미노산 및 유리라디칼로 인한 배양신경세포 독성시 LDH의 분비가 손상 및 파괴된 신경세포수와 비례하였음은 이미 확인되었다.²⁷⁾ 신경세포 역시 200×의 배율에서 위상차 현미경으로 신경세포체의 생존여부를 검사 대조군과 비교확인하여 LDH 분비정도와 비례하는지를 재확인하였다.

통계처리

모든 실험적정은 mean±S.E로 나타내었으며 post-hoc Student-Neuman-Keuls 방법에 의해 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

X/XO 및 FeCl₂/ascorbic acid 유발 신경손상에 대한 손바닥선인장 및 삼백초 메탄올 추출물의 억제효과

성숙된 배양신경세포에 X(0.5 mM)/XO(10 mU/ml)를 손바닥 선인장 및 삼백초 메탄올추출물과 함께 10분 동안 처리하였을 시 superoxide anion radical 유발 신경손상에서는 손바닥선인장 및 삼백초 투여군에서 10 μg/ml~1 mg/ml 처리농도에서 대조군에 비해 각각 53~89% 및 48~100%의 농도의존적인 신경손상 억제 효과를 나타내어 두 추출물간에 비슷한 억제효과가 있음을 알 수있었다(Fig. 1A, 1B). 대조약물로서는 superoxide anion radical을 억제하는 것으로 알려진 catalase(50 U/ml)를 사용하여 비교하였다. 이에 대한 위상차 현미경으로 세포체를 사진찍어 신경세포가 이들 추출물 투여로 보호됨을 형태학적으로 재확인하였다(Fig. 2). Hydroxyl radical로 인한 신경손상에 대한 손바닥선인장 및 삼백초 메탄올추출물 방어효과를 알아보기 위해 FeCl₂(50 μM)/ascorbic acid(25 μM)와 함께 각각의 두 식물추출물을 10 μg/ml~1 mg/ml 농도로 2시간동안 동시처리하고 20~24시간 뒤 그 방어효과를 조사한바 손바닥선인장 및 삼백초 투여군에서 대조군에 비해 각각 35~100% 및 15~98%의 농도의존적인 신경손상 억제효과를 보였으며 손바닥선인장

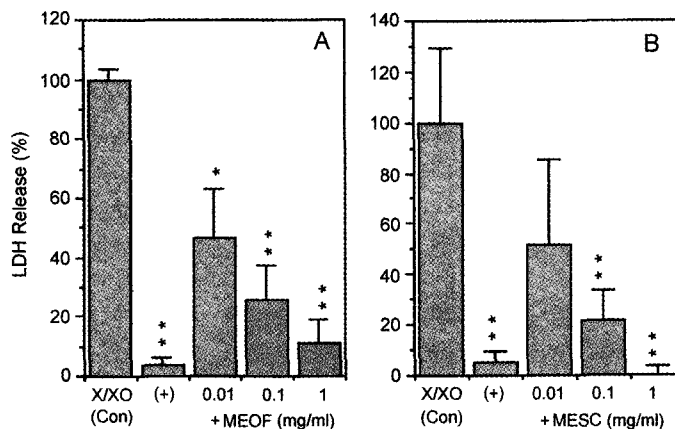


Fig. 1 – Methanol extracts of *Opuntia ficus-indica* (MEOF) (A) and *Saururus chinensis* (MESC) (B) attenuate xanthine (0.5 mM)/xanthine oxidase (10 mU/ml) (X/XO)-induced neurotoxicity dose-dependently. The bars denote LDH release (mean ± SEM, n=4) in sister cultures 20~24 h after a 10 min exposure to X/XO alone, with the addition of 50 U/ml catalase (+), or with the addition of MEOF or MESC at the indicated concentrations. The differences were evaluated with one-way ANOVA and the post-hoc Student-Neuman-Keuls test for multiple comparisons (*p<0.01, **p<0.001 vs. controls).

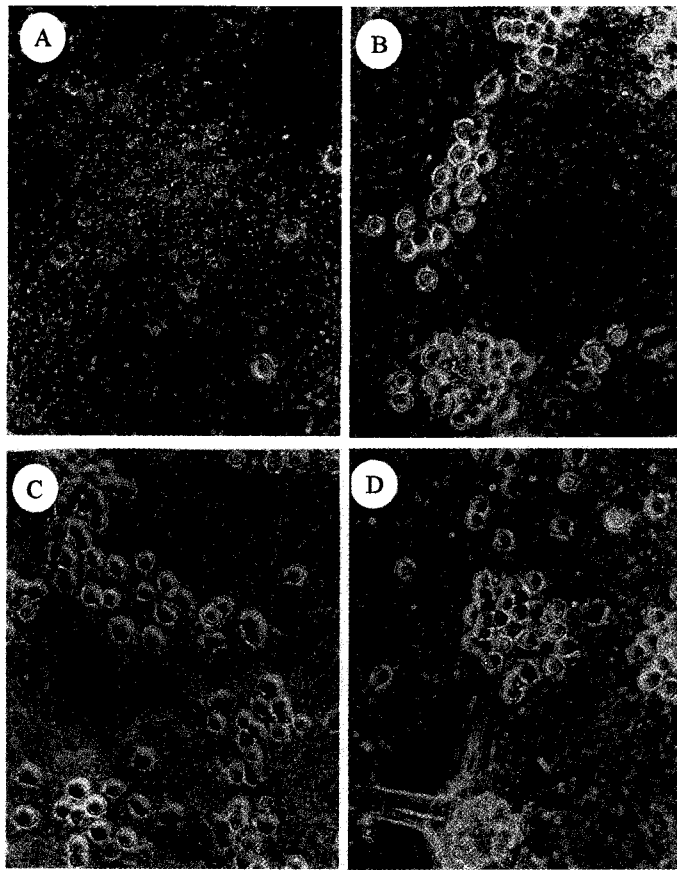


Fig. 2 – Morphological evidence of neuroprotection with MEOF or MESC in X/XO-induced neurotoxicity. Phase-contrast photomicrographs of sister cultures 20~24 h after a 10 min exposure to X/XO alone (A), in the presence of 50 U/ml catalase (B), or 1 mg/ml MEOF (C), 1 mg/ml MESC (D). Scale bar, 50 μ m.

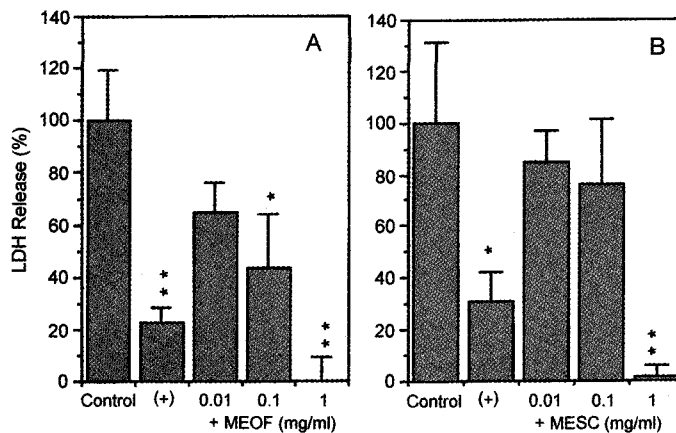


Fig. 3 – Methanol extracts of *Opuntia ficus-indica* (MEOF) (A) and *Saururus chinensis* (MESC) (B) attenuate FeCl_2 (50 μ M)/ascorbic acid (25 μ M)-induced neurotoxicity dose-dependently. The bars denote LDH release (mean \pm SEM, n=4) in sister cultures 20~24 h after a 2 h exposure to FeCl_2 /ascorbic acid alone, with the addition of 200 μ M deferoxamine (+), or with the addition of MEOF or MESC at the indicated concentrations. The differences were evaluated with one-way ANOVA and the post-hoc Student-Neuman-Keuls test for multiple comparisons (* p <0.01, ** p <0.001 vs. controls).

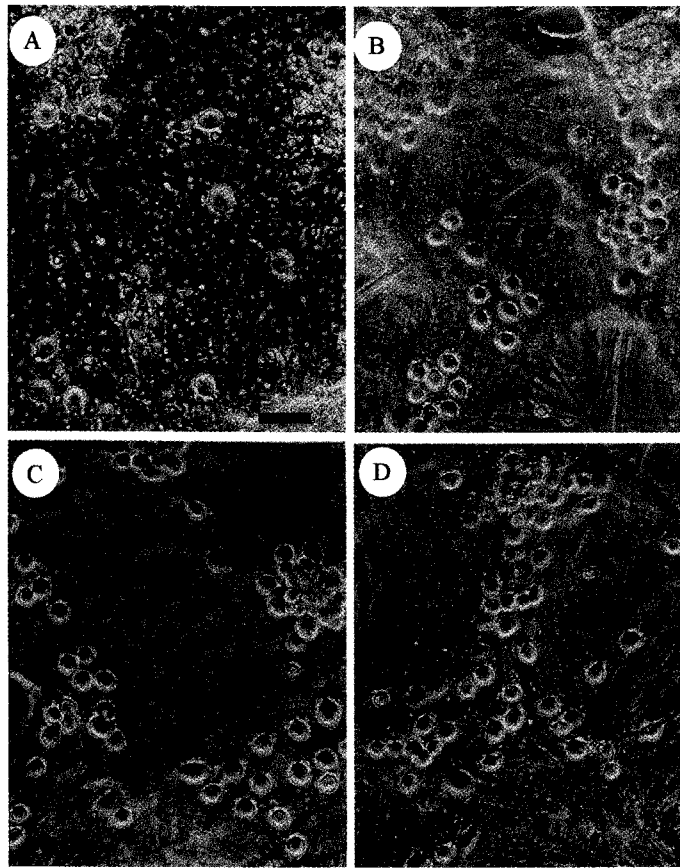


Fig. 4 – Morphological evidence of neuroprotection with MEOF or MESC in FeCl₂/ascorbic acid-induced neurotoxicity. Phase-contrast photomicrographs of sister cultures 20~24 h after a 2 h exposure to FeCl₂/ascorbic acid alone (A), in the presence of 200 μM deferoxamine (B), or 1 mg/ml MEOF (C), 1 mg/ml MESC (D). Scale bar, 50 μm.

투여군이 삼백초 투여군에 비해 각각의 투여농도에서 보다 우수한 억제효과를 나타냄을 알 수 있었다(Fig. 3A, 3B). 이에 대해 위상차 현미경상 세포체를 사진찍어 신경세포가 이들 추출물 투여로 보호됨을 형태학적으로 재확인하였고(Fig. 4), 대조약물로는 deferoxamine (200 μM)을 사용하여 이들 두 식물 추출물과 비교하였다.

Arachidonic acid 유발 신경손상에 대한 손바닥 선인장 및 삼백초 메탄올 추출물의 억제효과

배양신경세포에 100 μM의 arachidonic acid를 손바닥선인장 및 삼백초 메탄올 추출물과 함께 20~24 시간동안 처리하였을 시 손바닥선인장 및 삼백초 추출물 1 mg/ml 처리농도에서 대조군에 비해 각각 22% 및 38%의 신경독성 방어효과를 나타내어 삼백초 추출물이 arachidonic acid 유발 신경손상에 대해

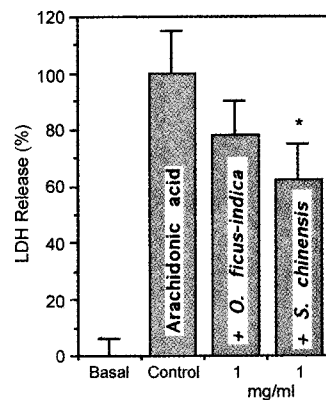


Fig. 5 – Methanol extracts of *Opuntia ficus-indica* (MEOF) and *Saururus chinensis* (MESC) attenuate arachidonic acid-induced neurotoxicity. The bars denote LDH release (mean ± SEM, n=4) in sister cultures after 20~24 h exposure to arachidonic acid alone, or with the addition of MEOF or MESC at the indicated concentrations. *p<0.05 vs. controls.

손바닥선인장 추출물보다 더 우수한 효과를 나타냄을 알 수 있었다(Fig. 5).

결 론

현재 제주도에서 특산식품으로 농가에서 재배 생산, 판매되고 있는 손바닥선인장 열매는 뇌졸중을 비롯한 퇴행성 뇌질환에 유효한 효과가 있는 것으로 알려져 있는 플라보노이드 및 페놀성화합물이 상당수준 함유되어 있는 것이 밝혀져 있으나 아직 그 생리활성에 대한 기본 연구가 미흡한 실정이다. 본 연구에서는 손바닥선인장 열매 뿐만 아니라 삼백초 메탄올추출물도 마우스 신경세포배양을 이용한 free radical 관련 신경손상시 우수한 보호효과가 있음을 알 수 있었다.

감사의 말씀

본 연구는 한국과학재단 지정 제주대학교 아열대원 예산연구센터의 지원에 의한 것입니다 (KOSEF 98-15-01-99-A-1).

문 헌

- 1) 김문홍 : 제주식물도감, 태화인쇄사, 제주도 p.306 (1985).
- 2) Park, E. H., Kahng, J. H. and Paek, E. A. : Studies on the pharmacological action of cactus: identification of its anti-inflammatory effect. *Arch. Pharm. Res.* **21**, 30 (1998).
- 3) Shin, T., Kim, S., Moon, C., Wie, M. and Hyun, B. : *Opuntia ficus-indica* ethanol extract ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia in rats. *Kor. J. Gerontol.* **9**, 78 (1999).
- 4) Lee, H. J., Lee, Y. W. and Kim, J. H. : A study on antiulcer effects of *Opuntia dillenii* Haw. on stomach ulcer induced by water-immersion stress in rats. *J. Food Hyg. Safty*, **13**, 53 (1998).
- 5) Paik, S. : Effects of *Opuntia ficus-indica* fruit on the passive avoidance and anti-oxidation in the senescence-accelerated mouse. Cheju National University, Graduate School, MS thesis. (1998).
- 6) Shin, T., Kim, S. and Lee, S. : Effects of *Opuntia ficus-indica* extract on the activation of immune cells with special reference to autoimmune disease models. *Kor. J. Vet. Pathol.* **2**, 31 (1998).
- 7) 김문홍 : 제주식물도감, 태화인쇄사, 제주도 p.77 (1985).
- 8) 최옥자 : 약초의 성분과 이용, 일월서각, 서울 p.128 (1994).
- 9) Sung, S. H., Lee, E. J., Cho, J. H., Kim, H. S. and Kim, Y. C. : Sauchinone, a lignan from *Saururus chinensis*, attenuates CCl₄-induced toxicity in primary cultures of rat hepatocytes. *Biol. Pharm. Bull.* **23**, 666 (2000).
- 10) Sung, S. H. and Kim, Y. C. : Hepatoprotective diastereomeric lignans from *Saururus chinensis* herbs. *J. Nat. Prod.* **63**, 1019 (2000).
- 11) Park, S. K., Oh, G. J., Bae, C. I., Kim, H. J., Han, W. S., Chung, S. G. and Cho, E. W. : Studies on the cytotoxic constituent of *Saururus chinensis* (L_{OUR}) B_{AILL.} *Yakhak Hoeji*, **41**, 704 (1997).
- 12) Park, S. K., Oh, G. J., Kim, H. T., Kim, H. J., Chung, S. G. and Cho, E. H. : Analgesic constituent from the Herba of *Saururus chinensis* (L_{OUR}) B_{AILL.} *Yakhak Hoeji*, **42**, 238 (1998).
- 13) Choi, D. W. : Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron*, **1**, 623 (1988).
- 14) Wie, M. B., Cho, Y. J., Jhoo, W. K. and Kim, H. C. : Phenidone attenuates oxygen/glucose deprivation-induced neurotoxicity by antioxidant and antiapoptotic action in mouse cortical cultures. *Neurosci. Lett.* **272**, 91 (1999).
- 15) Fiebich, B. L., Hull, M., Lieb, K., Schumann, G., Berger, M. and Bauer, J. : Potential link between interleukin-6 and arachidonic acid metabolism in Alzheimer's disease. *J. Neural. Transm. Suppl.*, **54**, 268 (1998).
- 16) Kubota, M., Nakane, M., Narita, K., Nakagomi, T., Tamura, A., Hisaki, H., Shimasaki, H. and Ueta, N. : Mild hypothermia reduces the rate of metabolism of arachidonic acid following posts ischemic reperfusion. *Brain Res.* **779**, 279 (1998).
- 17) Loopuijt, L. D. and Schmidt, W. J. : The role of NMDA receptors in the slow neuronal degeneration of Parkinson's disease, *Amino Acids*, **14**, 17 (1998).
- 18) Ihara, Y., Hayabara, T., Sasaki, K., Fujisawa, Y., Kawada, R., Yamamoto, T., Nakashima, Y., Yoshimune, S., Kawai, M., Kibata, M. and Kuroda, S. : Free radicals and superoxide dismutase in blood patients

- with Alzheimer's disease and vascular dementia. *J. Neurol. Sci.* **153**, 76 (1997).
- 19) Dajas-Bailador, F. A., Martinez-Borges, A., Costa, G., Abin, J. A., Martignoni, E., Nappi, G. and Dajas, F.: Hydroxyl radical production in the substantia nigra after 6-hydroxydopamine and hypoxia-reoxygenation. *Brain Res.* **813**, 18 (1998).
- 20) Wei, J., Huang, N. C. and Quast, M. J.: Hydroxyl radical formation in hyperglycemic rats during middle cerebral artery occlusion/reperfusion. *Free radical Biol. Med.* **23**, 986 (1997).
- 21) Takamatsu, H., Kondo, K., Ikeda, Y. and Umemura, K.: Hydroxyl radical generation after the third hour following ischemia contributes to brain damage. *Eur. J. Pharmacol.* **352**, 165 (1998).
- 22) Mori, T., Asano, T., Matsui, T., Muramatsu, H., Ueda, M., Kamiya, T., Katayama, Y. and Abe, T.: Intraluminal increase of superoxide anion following transient focal cerebral ischemia in rats. *Brain Res.* **816**, 350 (1999).
- 23) Guo, Q., Sebastian, L., Sopher, B. L., Miller, M. W., Ware, C. B., Martin, G. M. and Mattson, M. P.: Increased vulnerability of hippocampal neurons from presenelin-1 mutant knock-out mice to amyloid beta-peptide toxicity: central roles of superoxide production and caspase activation. *J. Neurochem.* **72**, 1019 (1999).
- 24) Crozier, R. A., Black, I. B. and Plummer, M. R.: Blockade of NR2B-containing NMDA receptors prevents BDNF enhancement of glutamatergic transmission in hippocampal neurons. *Learn. Mem.* **6**, 257 (1999).
- 25) Olney, J. W., Newcomer, J. W. and Farber, N. B.: NMDA receptor hypofunction model of schizophrenia. *J. Psychiatr. Res.* **33**, 523 (1999).
- 26) Rose, K., Goldberg, M. P. and Choi, D. W.: In vitro biological systems. In C. A. Tyson and J. M. Fraizer (Eds.), *Methods in Toxicology*, Academic Press, San Diego, CA, p.46 (1993).
- 27) Koh, J. Y. and Choi, D. W.: Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell cultures by lactate dehydrogenase efflux assay. *J. Neurosci. Methods*, **20**, 83 (1987).