

배양 척수감각신경세포에 대한 살리실산 나트륨의 신경독성에 관한 연구

원광대학교 의과대학 마취과학교실, *해부학교실

이 감 창 · 최 유 선 · 박 승택*

= Abstract =

Neurotoxicity of Sodium Salicylate on Spinal Sensory Neurons in Culture

Kang Chang Lee, M.D., Yu Sun Choi, M.D., and Seung Taeck Park, Ph.D.*

Departments of Anesthesiology & Pain Clinic and *Anatomy, School of Medicine, Wonkwang University, Iksan, Korea

Background: Sodium salicylate (SS) is a nonsteroidal anti-inflammatory drug (NSAID) for the treatment of neuralgia or pain from rheumatoid arthritis. When abused or used in excess, SS can induce cytotoxicity. The present study examined whether SS has a neurotoxic effect.

Methods: Cell viability was examined by MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)] assay and Sulforhodamine (SRB) assay after cultivating dorsal root ganglion (DRG) neurons derived from neonatal mouse. These cells were treated with various concentrations of SS for 24 hours. In addition, the amount of protein synthesis against SS was measured in these cultures.

Results: Cell viability (20, 40 $\mu\text{g/ml}$ SS) significantly decreased in a dose-dependent manner. Additionally, SS inhibited protein synthesis after the exposure of cultured mouse DRG neurons to 30 $\mu\text{g/ml}$ of SS for 24 hours.

Conclusions: The present study suggests that SS is toxic in cultured DRG neurons derived from neonatal mouse by decreasing cell viability and the amount of protein synthesis.

Key Words: Neurotoxicity, Sodium salicylate, Spinal dorsal root ganglion neurons

서 론

임상에서 각종 통증의 치료에 사용되는 약제로는 비스테로이드성 소염진통제(nonsteroidal anti-inflammatory

drugs, NSAIDs)가 가장 널리 사용되어지고 있다.^{1,3)} 지금까지 알려진 NSAIDs의 작용기전을 살펴보면 진통작용은 물론이고 그 밖에 항염이나 해열작용이 있음은 이미 잘 알려진 사실이며^{1,4)} 이 같은 효과는 NSAIDs가 주로 cyclooxygenase 기능을 억제함으로써 결국 prostaglandin의 생성을 차단하기 때문인 것으로 알려져 있다.⁴⁾ 한편 인체에서 prostaglandin의 항상성이 파괴되면 위장관장애를 비롯하여 혈류순환이나 조절에 대한 장애를 유발케하며 또한 혈액응고에 대한 저항성을 나타내게 됨으로서 이에 대한 부작용 또한 심각하지 않을 수 없다.^{1,2)} 그러나 NSAIDs 계

책임저자 : 이감창, 경기도 군포시 산본동 1126-1
원광대 군포병원 통증치료실
우편번호: 435-040
Tel: 031-390-2575, Fax: 031-390-2368

이 논문은 2001년도 두뇌한국21과 원광대학교 교비의 일부 지원에 의하여 연구됨.

통의 일종인 아스피린의 경우 prostaglandin의 생성을 억제하여 통증을 완화하는 통증억제 및 해열작용을 나타내지만 염증을 억제시키는 항염작용은 미약하다.^{1,5)} 이에 비하여 salicyl salicylate와 같은 종류의 NSAIDs의 계통은 prostaglandin에 대한 생성억제작용은 없으나 소염진통효과를 나타냄으로서 NSAIDs의 진통작용기전이 다양함을 제시하고 있다.⁵⁾ 이 밖에도 NSAIDs는 백혈구에서 leukotriene의 생성 억제와 단핵구에서 phospholipase C의 억제 등의 다양한 약리적 활성을 나타낸다고 한다.⁶⁾ 한편, NSAIDs는 진통이나 해열 및 항염작용과 같은 효과를 나타내지만 동시에 이의 과도한 사용은 각종 부작용을 초래할 수 있어 약제 사용에 신중을 요하고 있다. 특히 NSAIDs를 복용하는 환자들에서 나타나는 가장 흔한 부작용으로는 위장관 증상으로 위나 십이지장에 빈번하나 소장이나 결장에서도 발견되는 확률도 증가하고 있다.^{5,7)} 그러나 최근에 cyclooxygenase-II 저해제 등이 개발되면서 위장관의 부작용에 대한 위험은 감소 추세에 있다. 다음으로 NSAIDs는 거의 모두가 간손상을 유발하기 때문에 장기간 투여시 전신성 홍반성 루푸스등나 류마티스 관절염 등이 나타난다고 알려져 있다.¹⁾ 그 밖에도 수포성 발진과 같은 피부질환이나 혈소판감소와 같은 혈액부작용 및 creatinine의 상승에 따른 신질환 등도 알려져 있다.³⁾ Sodium salicylate (SS)는 NSAIDs의 일종으로 진통효과나 해열작용을 나타냄으로서 임상적으로 널리 사용되고 있다.^{2,6)} 그러나 이의 장기간 투여시 다른 NSAIDs처럼 각종 부작용을 초래한다고 알려져 보고된 바 있다.⁷⁾ 즉, 예를 들면 SS는 코르티솔관에서 나선인대의 noradrenalin에 의해 지배받는 혈관에 작용하여 와우(cochlea)의 혈류량을 감소시키거나, 또는 내이 외림프의 카테콜아민 농도에 영향을 줌으로서 이독성(ototoxicity)을 유발한다고 보고된 바 있다.^{2,5)} 그러나 SS를 비롯한 많은 NSAIDs가 신경계에 미치는 영향에 대해서는 연구가 미흡한 실정이며 특히 배양세포를 재료로한 연구는 그리 많지 않다.^{1,8)}

본 연구는 NSAIDs의 일종인 SS가 생쥐의 배양 척수 감각신경세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 생쥐의 신경조직으로부터 분리한 척수 후근신경절세포를 배양한 후 SS의 독성효과를 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (sigma)] 분석법에 의하여 조사하였으며 동시에 SS가 단백질

합성계에 미치는 영향을 조사하였다.

대상 및 방법

본 실험에 사용한 동물은 순수 분리 사육종인 ICR 계통의 체중 20 g 내외인 건강이 양호한 생쥐를 1 : 1로 교배시켜 나온 신생쥐를 사용하였다. 신생쥐는 한모체에서 나온 1세대를 1회 실험당 대조군과 실험군을 각각 5마리씩 나누어 6회 반복하였다. 신경세포의 분리는 대조군과 실험군으로부터 뇌조직을 적출한 후 Park 등의⁹⁾ 방법에 의하였다. 뇌조직으로부터 순수 분리된 신경세포는 well당 1×10^4 cells/well로 산정하여 96-multiwell에 도입 후 37°C로 유지되는 CO₂ 정온기 내에서 5일 동안 배양하였다. 배양이 완료된 세포는 sodium salicylate (SS)가 5 µg/ml에서 60 µg/ml까지의 농도로 각각 포함된 배양액에서 척수후근신경절을 24시간 동안 배양한 후 실험전날 제조한 MMT 50 mg/ml를 최종 농도가 100 µM medium에 10%가 되도록 첨가한 후 3시간 동안 반응시켰다. 반응 완료 후 microelizer reader에서 570 nm에서 흡광도를 측정하여 MMT50 값에서 24시간 동안 처리한 후 100 mg/ml sulforhodamine B (SRB)를 최종농도가 100 ml medium당 10%가 되도록 처리한 후 2시간 동안 반응시킨다. 반응완료 후 microelizer reader에서 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 형태학적 관찰을 위하여 배양종인 용기를 직접 도립위상차현미경에 놓고 검경하였으며 필요시 부착된 사진기로 촬영하였다. 본 실험 결과에 대한 유의성 검정은 Student's t-test로 하였으며 통계적 유의수준은 0.05 미만의 경우로 하였다.

결 과

SS의 독성효과

농도에 따른 영향: SS가 5-40 µg/ml의 농도로 각각 포함된 배양액에서 생쥐의 배양 척수 후근신경절세포를 24시간 동안 배양한 후 SS의 독성효과를 MTT assay법에 의하여 조사한 결과 5 µg/ml SS의 처리에서는 세포의 생존율이 대조군(100%)에 비하여 82%로 나타났으며 10 µg/ml SS의 처리에서는 73%로 나타났다. 또한 20 µg/ml ($P < 0.05$)와 40 µg/ml ($P < 0.01$) SS의 처리에서는 각각 세포의 생존율이

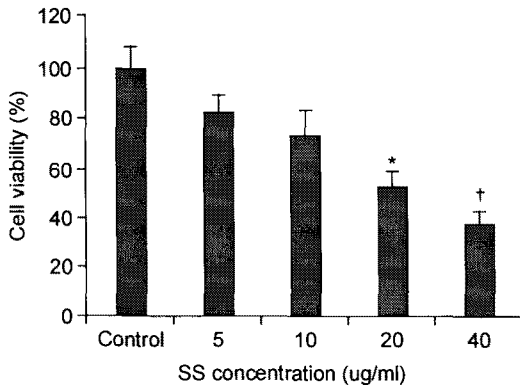


Fig. 1. A dose-dependency of sodium salicylate (SS). SS-induced neurotoxicity was measured by MTT assay in mouse spinal dorsal root ganglion (DRG) neuron cultures. Cultured cells were exposed to 5, 10, 20 and 40 $\mu\text{g/ml}$ SS for 24 hours, respectively. Data are expressed as mean \pm SEM for each group. *: $P < 0.05$; †: $P < 0.01$

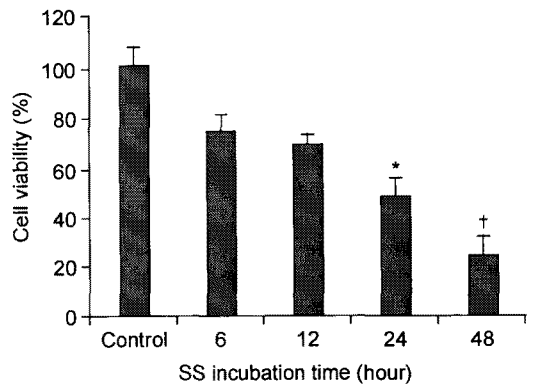


Fig. 2. A time-dependency of sodium salicylate (SS). SS-induced neurotoxicity was measured by MTT assay in mouse spinal dorsal root ganglion (DRG) neuron cultures. Cultured cells were exposed to 20 $\mu\text{g/ml}$ SS for 6, 12, 24 and 48 hours, respectively. Data are expressed as mean \pm SEM for each group. *: $P < 0.05$; †: $P < 0.01$

52% ($P < 0.05$)와 36% ($P < 0.01$)로 나타났으며 20 $\mu\text{g/ml}$ 에서 MTT50 값을 나타냈다(Fig. 1).

시간에 따른 영향: 시간의 변화에 따른 SS의 독성 효과를 조사하기 위하여 20 $\mu\text{g/ml}$ SS가 포함된 배양액에서 생쥐의 척수 후근신경절세포를 6-48시간 동안 배양후 세포의 생존율을 MTT assay법에 의하여 조사한 결과 6시간 배양에서는 세포의 생존율이 대조군(100%)에 비하여 74%로 나타났으며 12시간 배양에서는 67%로 나타났다. 또한 24시간과 48시간 배양에서는 각각 세포의 생존율은 48% ($P < 0.05$)와 23% ($P < 0.01$)로 나타났다(Fig. 2).

단백질 정량: SS가 1-60 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 각각 포함된 배양액에서 척수 후근신경절세포를 24시간 동안 양한 후 SS가 단백질합성에 미치는 영향을 조사하였다. 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 SS를 처리한 경우 단백질합성량은 대조군(100%)에 비하여 84%로 나타났는데 비하여 15 $\mu\text{g/ml}$ 의 SS 처리에서는 65%로 나타났다. 또한 30 $\mu\text{g/ml}$ 의 SS 처리에서는 54% ($P < 0.05$)로 나타났으며, 특히 60 $\mu\text{g/ml}$ SS 처리에서는 43% ($P < 0.05$)로 유의한 감소를 보였다(Fig. 3).

형태학적 관찰

대조군: 세포의 형태학적 관찰을 위하여 SS가 포함되지 않은 배양액에서 세포를 배양한 대조군의

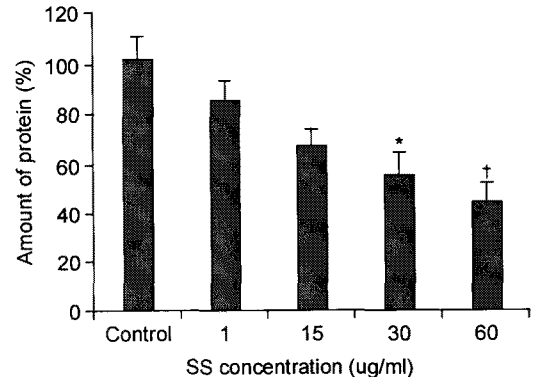


Fig. 3. A time-dependency of sodium salicylate (SS) in protein synthesis. Amount of protein synthesis by SS was measured by sulforhodamine B (SRB) assay in mouse spinal dorsal root ganglion (DRG) neuron cultures. Cultured cells were exposed to 1, 15, 30 and 60 $\mu\text{g/ml}$ SS for 24 hours, respectively. Data are expressed as mean \pm SEM for each group. *: $P < 0.05$; †: $P < 0.01$

경우 신경세포는 신경돌기를 내어 서로 연락하고 있었으며 수개가 모여 세포피를 형성하고 있었다(Fig. 4A).

SS 처리군: 20 $\mu\text{g/ml}$ SS에서 24시간 동안 신경세포를 배양한 결과 대조군에 비하여 신경세포가 숫적

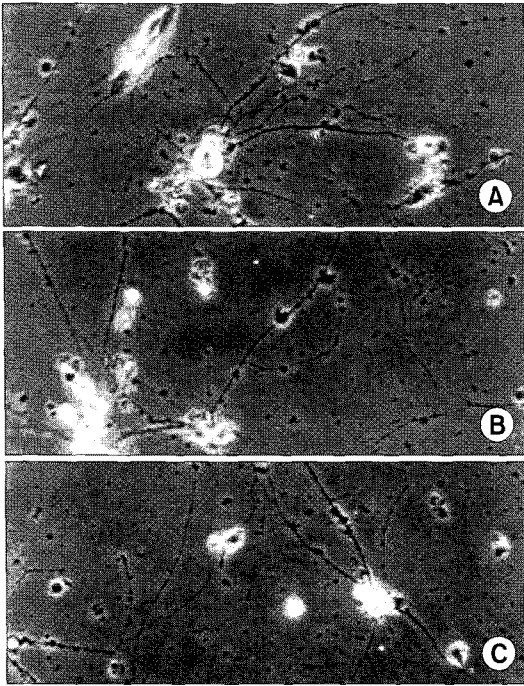


Fig. 4. Dissociated spinal dorsal root ganglion (DRG) neurons of neonatal mouse in vitro. A: Control DRG neuron culture for 5 days in vitro ($\times 25$). B: DRG neurons exposed to $20 \mu\text{g/ml}$ sodium salicylate (SS) for 24 hours ($\times 125$). C: DRG neurons exposed to $30 \mu\text{g/ml}$ sodium salicylate (SS) for 24 hours ($\times 125$).

으로 감소하였으며 일부 손상을 입은 세포들은 배양액 위로 떠올라 부유하고 있었다(Fig. 4B). 또한 $30 \mu\text{g/ml}$ SS 농도에서 24시간 배양에서는 신경돌기의 소실로 인하여 세포간의 연결도 감소되었다(Fig. 4C).

고 찰

통증환자들에 널리 사용되고 있는 소염진통제로는 부신피질호르몬제를 비롯하여 비스테로이드성 약제들이 있다.^{1,10,11)} 이 중 비스테로이드성 소염진통제는 전 세계적으로 가장 많이 사용되고 있으며, 크게 enolic acid 계열을 비롯하여 nonacidic compound 계열 및 carboxylic acid 계열로 나뉘어진다.^{5,12,13)} 이들은 각각 약제의 생화학적 특성에 의하여 효과나 부작용이 서로 다르게 나타난다고 알려져 있다.^{5,14,15)} 대개 이들은 prostaglandin의 생성을 억제함으로써 진통효과를

나타내게 되는데 과량이 인체에 노출되면 위장관 질환을 비롯하여 간질환, 피부질환 등의 각종 부작용을 유발할 뿐만 아니라 고혈압이나 신장 등에도 병변을 초래한다는 것은 이미 밝혀져 있다.^{3,16)} 그러나 신경계에 대한 부작용에 대해서는 환청이나 경련 등과 같은 증상이 보고된 바는 있으나^{1,2)} 신경독성이나 그 작용기전에 대하여 아직까지 자세히 밝혀져 있지 않다.¹⁷⁾ 따라서 본 연구에서는 비스테로이드성 소염진통제의 일종인 sodium salicylate (SS)가 신경계에 미치는 영향을 조사하기 위하여 척수의 후근신경절 세포를 배양한 후 $5-40 \mu\text{g/ml}$ 의 SS가 각각 포함된 배양액에서 24시간 동안 배양한 다음 SS가 신경세포에 미치는 독성효과를 MTT 분석법에 의하여 조사하였다. 그 결과 SS는 배양 척수후근신경절세포에 처리한 농도에 비례하여 세포의 생존율을 유의하게 감소시켰다. 본 연구의 이러한 결과는 SS가 배양 척수 후근신경절세포에 독성효과를 가지고 있음을 말해주고 있다. Didier 등은¹⁾ SS를 guinea pig에 처리한 결과 SS에 의하여 혈류의 변화와 청각장애를 나타냄으로서 SS가 이독성효과가 있다고 보고한 바 있다. 본 연구와 위의 연구의 결과는 모두 SS가 세포독성을 가지고 있음을 증명하고 있다. SS의 이 같은 독성효과에 있어서 이독성의 경우 prostaglandin의 생성을 SS가 억제함으로써 독성을 나타낸다는 주장이 있는가 하면¹⁾ Puel 등은⁵⁾ salicylate가 독성을 나타낼 때 보이는 전기생리학적 변화가 다른 prostaglandin의 합성억제제와 다르다는 점을 들어 SS에 의한 독성효과가 prostaglandin의 생성억제가 아니라고 주장하기도 하였다. 본 실험에 있어서 SS는 처리된 농도에 비례하여 MTT 분석법에 의한 세포생존율을 유의하게 감소시켰으므로 독성효과를 나타냈는데 이는 아마도 신경세포내 MTT와 관련된 세포소기관의 효소활성에 손상을 주어 세포대사나 단백질합성계에 영향을 미침으로써 세포생존을 저하를 초래한 독성효과를 보였을 가능성이 클 것으로 생각된다. 따라서 본 실험에서는 SS가 신경세포의 단백질합성계에 미치는 영향을 조사하기 위하여 $1-60 \mu\text{g/ml}$ 의 SS 농도가 각각 포함된 배양액에서 24시간 동안 처리한 후 단백질합성에 대한 양적변화를 조사하였다. 그 결과 $1 \mu\text{g/ml}$ 의 SS농도의 처리에서는 단백질합성량이 대조군에 비하여 84%로 다소 감소한 것으로 나타났다으며 $15 \mu\text{g/ml}$ 의 경우 65%로 감소하였다. 특히

30 $\mu\text{g/ml}$ 의 SS의 처리에서는 54% ($P < 0.05$)로 감소하였으며 60 $\mu\text{g/ml}$ 의 처리에서는 43% ($P < 0.01$)로 매우 유의하게 단백질합성량이 감소한 것으로 나타났다. 본 실험의 이같은 결과는 SS가 세포에 존재하는 효소의 활성을 저해했거나 또는 이차적으로 단백질합성계에 손상을 유도함으로써 세포대사에 영향을 미쳐 그 결과 세포독성을 나타냈을 것으로 생각된다. 본 실험의 형태학적 관찰소견에 있어서 SS는 대조군에 비하여 척수 후근신경절세포의 수적인 감소를 비롯하여 신경돌기의 소실 등이 관찰되었다. 이같은 결과는 SS가 세포생존율을 감소시킴으로써 세포의 퇴행이나 사멸을 초래하여 수적 감소를 보였을 것으로 생각되며 또한 단백질합성에 저해효과를 줌으로써 신경돌기의 생성억제 내지는 소실을 초래하였을 가능성이 크다고 생각된다. 그러나 SS의 신경독성에 대한 더욱 자세한 기전규명을 위해서는 신호전달체계를 비롯하여 세포분자학적인 분석이 수행되어야 할 것으로 생각된다. Sodium salicylate (SS)가 배양 척수 후근신경절세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 SS가 여러 농도로 포함된 배양액에 신경세포를 노출시킨 후 이의 독성효과를 조사하였으며, 또한 SS에 의하여 유발된 신경독성이 세포의 단백질합성에 미치는 영향을 SRB 분석법에 의하여 조사하였다. 생쥐에서 순수분리 배양한 척수 후근신경절세포에 5-40 $\mu\text{g/ml}$ SS가 포함된 배양액에서 6-48시간 동안 배양한 결과 SS를 처리한 농도와 시간에 비례하여 세포의 생존율을 유의하게 감소시켰다. 또한 1-60 $\mu\text{g/ml}$ 의 SS가 각각의 농도로 포함된 배양액에서 신경세포를 24시간 동안 처리 후 SS가 단백질합성에 미치는 영향을 조사한 결과 SS는 농도 의존적으로 대조군에 비하여 단백질합성을 유의하게 감소시켰다. 이상의 결과로부터 SS는 배양 척수감각신경세포에 대하여 세포생존율의 감소와 단백질합성을 저해함으로써 신경독성을 나타냈다.

참 고 문 헌

1. Didier A, Nutta1 AL, Miller JM: Sodium salicylate induced blood flow changes and hearing losses in the guinea pig cochlea. *Assoc Res Otolaryngol* 1990; 13: 310-5.

2. 김상윤, 노관택: 살리실산 나트륨이 내이 외림프의 카테콜아민 농도에 미치는 영향. *대한이비인후과학회지* 1992; 35: 847-61.
3. McCade PA, Dey FL: The effect of aspirin upon auditory sensitivity. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1965; 74: 312-25.
4. Jung TTK, Juhn SK: Prostaglandin in perilymph. *Assoc Res Otolaryngol Abstr* 1984; 7: 107-11.
5. Puel JL, Bobbin RP, Fallon M: Salicylate, meclofenomate, and guinine on cochlear potentials. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1990; 102: 66-73.
6. Jastreboff PJ, Hansen R, Sasaki PG, Sasaki CT: Differential uptake of salicylate in serum, cerebrospinal fluid, and perilymph. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1986; 112: 1050-3.
7. Hawkins JE: Drug ototoxicity. *Hand book of sensory physiology. Springer Verlag* 1976; 3: 708-12.
8. Skehan P, Friedman SJ: A rapid Naphthol Yellow S method for measuring the cellular protein content of anchorage cultures. *In Vitro Cell Dev Biol* 1985; 21: 288-90.
9. Park ST, Lim KT, Chung YT, Kim SU: Methylmercury-induced neurotoxicity in cerebral neuron culture is blocked by antioxidants and NMDA receptor antagonists. *Neurotoxicol* 1996; 17: 37-46.
10. Loft S, Astrup A, Buemann B, Poulsen HE: Oxidative DNA damage correlates with oxygen consumption in humans. *FASEB J* 1994; 8: 534-7.
11. Reiter RJ: Oxidative processes and antioxidative defense mechanism in the aging brain. *FASEB J* 1995; 9: 526-33.
12. Jacobson JM, Michael JR, Jafri MH, Gurtner GH: Antioxidants and antioxidant enzymes protect against pulmonary oxygen toxicity in the rabbit. *J Appl Physiol* 1990; 68: 1252-9.
13. Rosen D, Siddique T, Patterson D, Figlewicz D, Sapp P, Hentati A, et al: Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature (London)* 1993; 362: 59-62.
14. Kim YS, Kim SU: Oligodendroglial cell death induced by oxygen radicals and its protection by catalase. *J Neurosci Res* 1991; 29: 100-6.
15. Saunders RD, Dugan LL, Demediuk P, Means ED, Harrocks LA, Anderson DK: Effects of methyl prednisolone and the combination of alpha-tocopherol and selenium on arachidonic acid metabolism and lipid peroxidation in traumatized spinal cord tissue. *J Neurochem* 1987; 49: 24-31.

16. Borenfreund E, Babich H, Martin-Alcuacil N: Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays-the neutral red (NR) and tetrazolium MTT test. *Toxic In Vitro* 1988; 2: 1-6.
17. Loft S, Astrup A, Buemann B, Poulsen HE: Oxidative DNA damage correlates with oxygen consumption in humans. *FASEB J* 1994; 8: 534-7.