

The Effect of NMDA/glycine Receptor Antagonist, 7-Chlorokynurenic Acid on Cultured Astrocytes Damaged by Ischemia-like Condition

In-Ju Jung[†]

College of General Education & Teaching, Dongshin University, Naju 520-714, Korea

I evaluated the protective effect of N-methyl-D-aspartate (NMDA)/glycine receptor antagonist, 7-chlorokynurenic acid (CKA) on cultured mouse astrocytes damaged by ischemia-like condition (ILC). The protective effect of CKA was assessed by cell viability, lactate dehydrogenase (LDH) activity, superoxide dismutase (SOD)-like activity and lipid peroxidation. To examine the effect of CKA on the cell apoptosis, the expression and the activity of caspase 3 were assessed by Western blotting. CKA increased the cell viability decreased by ILC. CKA also decreased the LDH activity and antioxidative effects such as SOD-like activity and inhibitory activity of lipid peroxidation. In addition, CKA suppressed the expression of caspase 3 associated with apoptosis, and increased the cell viability by the decrease of caspase 3 activity as like the caspase 3 inhibitor, Av-DVED-MED. From these results, these results suggest that ILS induces cell cytotoxicity in cultured astrocytes and CKA, NMDA/glycine receptor antagonist, is effective on the prevention of the cytotoxicity due to ILS by the antioxidative effect and the inhibition of apoptosis.

Key Words: 7-chlorokynurenic acid, Apoptosis, NMDA/glycine receptor, Caspase 3

서 론

별아교세포 (astrocyte)는 희소돌기아교세포 (oligodendrocyte)나 미세교세포 (microglia)와 같이 뇌조직에 존재하고 있는 신경교세포의 일종이다. 특히, 별아교세포는 뇌 병변시 가장 먼저 민감하게 반응하기 때문에 질환발생시 활동이 가장 왕성한 신경교세포의 하나이다 (Kim and Kim, 1991; Endoh et al., 1994). 이들은 주로 뇌조직의 피질이나 수질에 위치하고 있으며 신경세포에 대한 기능으로서는 신경원에 대한 영양공급 (neurotropic action)을 비롯하여 혈액-뇌관문 (blood-brain barrier, BBB)과 같은 중요한 역할을 담당하고 있다 (Mun et al., 1998; McElhane et al., 1994). 그 밖에도 뇌졸중이나 뇌염 및 뇌수막염과 같은 각종 뇌병변시에는 이의 회복을 위하여 가장 활발하게 활동하기도 한다 (Endoh et al., 1993; Park et al., 1996). 최근 별아교세포에서는 신경영양인자 (neurotropic factor, NTF)를 생성한다는 보고도 있으며 뇌세포의 산화적 손

상 (oxidative stress)에 대하여 보상작용을 해 준다는 보고도 된 바 있다 (McElhane et al., 1994). 한편, 활성산소 (reactive oxygen species, ROS)에 의한 산화적 손상은 hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical (OH^\cdot) 및 superoxide radical (O_2^\cdot) 등과 같은 산소라디칼들이 인체 내에 다량 축적됨으로서 세포의 퇴화나 손상에 의하여 세포고사 (apoptosis)를 초래한다 (Warner and Wispe, 1992; Leonard et al., 2000). 즉, 산소라디칼들은 세포의 지질과산화 (lipid peroxidation)에 의한 막손상을 비롯하여 항산화효소의 일종인 glutathione peroxidase나 superoxide dismutase (SOD)와 같은 효소활성을 저해함으로써 세포의 정상적인 대사나 항상성을 파괴하기 때문이다 (Bracco et al., 1991). 특히, 산화적 손상에 의한 세포독성은 caspase 3나 9와 같은 단백질의 발현을 촉진함으로써 세포고사를 촉진시킨다고 알려져 있다 (Nomura, 1998). 인체내 ROS의 발생기전을 보면, 정상적인 대사과정에 있어서 소량의 ROS가 생성되지만 항산화효소에 의하여 물로 변환되면서 소실되어진다 (Wang et al., 2006). 이에 비하여 병적상태, 즉 저산소 (hypoxia)나 허혈시에는 전자수용력이 부족하게 됨으로서 다량의 ROS가 생성되며 (Rivkin, 1997), 또한 adenosine monophosphate (AMP)가 NAD^+ 대신 산소분자를 이용함으로써 다량의 ROS가 생성되기도

*접수일: 2009년 8월 31일 / 수정일: 2009년 12월 16일
채택일: 2009년 12월 17일

[†]교신저자: 정인주, (우) 520-714 전남 나주시 대호동 252번지,
동신대학교 교양교직학부
Tel: 061-330-3316, e-mail: ijjung@dsu.ac.kr

한다 (Cohen, 1978; Michikawa et al., 1994). 그 밖에 근위축성측삭경화증 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS)에서 볼 수 있는 것과 같이 SOD-1 gene과 같은 항산화효소의 돌연변이에 의하여 다량의 활성산소가 축적되기도 한다 (Rosen et al., 1993). 이같이 비정상적으로 생성된 ROS는 글루탐산염과 같은 흥분성아미노산 (excitotoxic amino acids, EAAs)의 분비유도를 촉진시켜 Ca^{2+} -channel과 밀접한 관련이 있는 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체를 과활성화시킴으로써 세포내 칼슘항상성의 파괴를 유발시키기도 한다 (Michaels and Rothman, 1990; Buchan et al., 1994). 따라서 ROS의 산화적 손상에 의한 세포고사를 방어하기 위하여서는 항산화제를 비롯한 산소라디칼 제거제 또는, nuclear factor kappa B (NF- κ B)나 caspase와 같은 신호전달단백질의 저해제, NMDA 수용체 길항제 및 Ca^{2+} 저해제 등이 유효하다는 보고들이 있다 (Park et al., 1996). 이 중 NMDA 수용체 길항제는 glutamate나 aspartate와 같은 EAAs와는 상호 경쟁적으로 작용을 하게 된다 (Zeman et al., 1994). 즉, NMDA 수용체 길항제는 EAAs에 의한 NMDA 수용체의 결합력보다 더욱 강하기 때문에 그 결과 EAAs에 의한 NMDA 수용체의 과활성을 억제하게 되며 이와 동시에 세포내 칼슘의 항상성을 유지시켜줌으로서 세포퇴화나 세포고사를 방지해준다 (Gelmers, 1985; Pellegrini-Giampietro et al., 1990). 그 밖에도, 각종 식물로부터 정제된 여러 천연추출물속에는 NMDA 수용체의 과활성을 야기하는 EAAs의 분비촉진을 억제하는 항산화효과를 비롯하여 그 밖에 항균 및 항암효과 등이 뛰어난 성분들이 다량 포함되어 있다고 알려지면서 이를 이용하여 병변의 치료를 위한 신약의 개발에 많은 노력을 기울이고 있다 (Kikuzaki and Nakatani, 1993; Kim et al., 2006; Gates et al., 2007). 특히, 지금까지 알려진 천연추출물 중 항산화작용이 뛰어나다고 알려진 물질 중에는 플라보노이드 (flavonoid)를 비롯한 페놀화합물 (phenol compound), 카로티노이드 (carotinoid) 등과 같은 추출물들이 알려져 있다 (Li et al., 2007). 즉, 이들 물질들은 대부분 수산화 (OH^{\cdot})를 한 개 내지는 수개씩 가지고 있어 이들이 다른 물질과 강한 친화력을 나타냄으로서 항산화작용을 나타낸다고 보고된 바 있다 (Krizkova et al., 2000). 본 연구는 NMDA/glycine 수용체 길항제인 CKA가 허혈로 유도된 배양 별아교세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 시험관내 허혈을 유도한 후 허혈에 대한 세포독성을 비롯하여 허혈유도로 인한 세포손상에 대한 CKA의 영향을 세포생존율을 비롯한 LDH 활성, SOD-유

사활성, 지질과산화를 조사하였으며, 또한 CKA의 신호 경로를 전기영동에 의한 caspase 3의 발현과 동시에 caspase 3활성을 신호전달저해제 (signaling inhibitor)와 관련하여 알아보았다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에 사용한 생쥐는 BALB/c 계통의 생쥐를 사용하였다. 온도는 $22\pm 2^{\circ}C$, 습도는 $53\pm 3\%$ 로, 밤과 낮을 12시간씩 조절하여 사육하였으며 물과 사료는 충분히 공급하였다. 교배를 위하여 암수를 1쌍씩 케이지에 넣어 사육하였으며 교배 후 태어난 3일된 신생생쥐의 뇌조직을 사용하였다.

2. 약제 제조

본 실험에 사용한 7-chlorokiuereinic acid (CKA)는 Sigma사 (ST. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, 혈청이 포함되지 않은 minimum essential medium (MEM, Gibco)을 이용하여 농도가 각각 $100\ \mu M$, $500\ \mu M$ 및 $1\ mM$ 의 저장액을 만들어 보관한 다음 실험 당일 최종농도로 희석하여 사용하였다. 또한 세포생존을 분석을 위한 XTT(2,3-bis-[2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide, disodium salt (Sigma)는 $5\ mg/ml$ 의 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 다음 실험 당일 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다. 1차 cleaved-caspase 3 antibody (1:1,000)와 2차 cleaved-caspase 3 antibody (1:3,000) (Cell Signaling, USA), berbamine (Sigma) 및 Ac-DEVD-MCA (Calbiochem, USA)는 냉암소에 보관 후 실험직전에 사용하였다.

3. 세포 배양

본 실험에 사용한 별아교세포 (astrocyte)의 분리 및 배양은 Michikawa 등 (1994)의 방법에 의하여 행하였다. 즉, 적출한 뇌조직을 0.25% trypsin (Sigma)을 최종농도로 희석 처리하여 개개의 세포로 분리한 후 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma)이 함유된 MEM 배양액에 넣어 72시간 동안 배양하였다. 위의 배양방법에 따라 분리 배양된 별아교세포는 96-well 배양용기에 세포수가 well당 1×10^5 이 되도록 계수한 다음 96-well 배양용기에 세포를 넣어 $36^{\circ}C$, $5\%CO_2/95\%O_2$ 로 조절된 항온기내에서 48시간 동안 배양한 다음 분석에 사용하였다.

4. 시험관내 허혈 (ischemia-like condition, ILC) 유도

Kim과 Kim (1991)의 방법에 따라 행하였다. 즉, 배양 중인 별아교세포를 glucose가 포함되지 않은 Hank's balanced salt solution (HBSS, Gibco)으로 3회 세척 후 95:5 로 조절된 N₂와 CO₂의 정온기에서 각각 10~70분 동안 배양한 후 분석하였다.

5. CKA의 처리

ILC 유도에 대한 NMDA receptor 길항제인 CKA의 영향을 측정하기 위하여 CKA가 각각 20~60 μ M의 농도로 포함된 배양액에서 2시간 동안 전처리한 다음 이의 영향을 세포생존율에 의하여 측정하였다.

6. Caspase 3 활성화에 대한 CKA의 영향

CKA가 caspase 3의 활성화에 미치는 영향을 조사하기 위하여 CKA와 caspase 3 저해제인 Av-DVED-MED를 동시에 넣어 2시간 동안 배양세포에 전처리한 후 caspase 3 activation인 berbamine (15 μ g/ml)을 24시간 동안 처리한 실험군과 세포생존율을 비교 조사하였다.

7. 세포생존율 분석

세포생존율은 Mosmann (1983)의 변형된 방법에 따라 행하였다. 즉, 배양 중인 별아교세포에 약제를 농도별로 각각 처리한 다음 실험 당일 제조한 XTT 50 μ g/ml를 well당 100 μ l씩 넣은 후 4시간 동안 배양하였다. 배양이 완료된 후 배양액을 버리고 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma)를 넣은 다음 실온에서 10분 동안 방치하였다. DMSO로 처리한 후 ELISA reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 다음 대조군과 비교 조사하였다.

8. Lactate dehydrogenase (LDH) activity 측정

배양이 완료된 별아교세포에 ILC 유도나 또는 CKA를 각각 일정시간 동안 처리한 다음 배양액을 250 \times g에서 10분간 원심시켰다. 원심 후 상등액 50 μ l를 취한 후 LDH CytoTox detection kit를 사용하여 반응용액 (0.05 U/ml) 50 μ M를 넣은 다음 실온에서 30분간 반응시켰다. 위의 반응이 완료된 후 정지액으로 반응을 정지시킨 후 ELISA reader로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 LDH 활성은 대조군에 대한 백분율로 나타났다.

9. 지질과산화 측정

지질과산화는 Kikuzaki와 Nakatani (1993)의 방법에 따라 행하였다. 즉, 시료 3.9 ml를 에탄올과 혼합하고 에탄올에 녹인 2.52% linoleic acid와 0.05 M phosphate buffered saline (pH 7.0)을 첨가하여 40 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 에탄올과 30% ammonium thiocyanate 처리를 거쳐 0.02 M ferrous chloride를 가한 다음 실온에서 3분간 반응하였다. 반응이 완료된 후 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료대신 증류수를 사용하였다.

10. SOD-유사활성 측정

Marklund와 Marklund (1974)의 방법에 따라 행하였다. 즉, 시료에 Tris-HCl buffer와 10 mM pyrogallol을 가하고 25 $^{\circ}$ C에서 10분간 처리하였다. 처리 후 HCl로 반응시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하여 조사하였다. 이 때 SOD-like activity는 시료첨가군과 무첨가군의 차이에 의한 백분율로 표시하였다.

11. Western blot 분석

1×10^5 cells/well의 밀도로 배양된 세포를 500 μ l의 lysis buffer를 넣어 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 세포를 용해하였다. 용해된 세포는 원심튜브에 넣고 13,000 rpm에서 20분간 원심하여 상등액을 분리하였다. 분리 후 50 μ g의 추출액을 이용하여 15% SDS-PAGE를 행한 다음 PVDF membrane (Millipore)를 사용하여 300 mA, 110분에서 transfer하였다. 완전히 transfer된 membrane을 5% skin milk에 넣어 1시간 동안 blocking한 다음 일차와 이차항체인 cleaved-caspase 3을 반응시킨 후 ECL을 사용하여 X-ray film에 감광한 다음 현상하였다.

12. 통계처리

본 실험의 자료에 대한 유의성의 검정은 one-way ANOVA로 하였으며 P-value가 0.05 미만일 유의성이 있는 것으로 하였다.

결 과

1. 시험관내 ILC 유도에 의한 세포생존율 (CVB) 측정

ILC유도에 의한 XTT₉₀ 값을 세포생존율에 의하여 측정하기 위하여 10~20분 동안 각각 배양 별아교세포에 ILC 유도를 하였다. 그 결과 10분 동안의 처리에서는 세

Table 1. The cell viability of cultured mouse astrocytes exposed by ischemia-like condition (ILC)

Exposure	XTT assay (450 nm)	
	Mean ± S.D.	(% of control)
Incubation time of ILC (min)		
XTT ₉₀	0.88±0.07	100
Control		
10	0.86±0.05	97.7
15	0.80±0.08	90.9
20	0.79±0.06	89.8
XTT ₅₀	1.38±0.12	100
Control		
30	0.77±0.05	55.8*
50	0.76±0.07	55.1*
70	0.71±0.04	51.4*

Cytotoxicity value (% of control)	Exposure	
	Ischemic induction time (min)	
Cytotoxic value	100	0
Lower cytotoxicity (XTT ₉₀)	89.8	20
Higher cytotoxicity (XTT ₅₀)	51.4	70

Cultured mouse astrocytes were treated with 10, 15, 20, 30, 50 and 70 minutes, respectively. The values indicate the mean ± SD for triplicate experiments. Significantly different from the control. * $P < 0.01$

포생존율이 대조군인 100% (0.88±0.07)에 비하여 97.7% (0.86±0.05)로 나타났으며, 15분 동안 ILC 유도에서는 90.9% (0.80±0.08)로 나타났다. 또한, 20분 동안의 ILC 유도에서는 세포생존율이 89.8% (0.79±0.06)로 나타났다. 한편, ILC 유도에 의한 XTT₅₀ 값을 측정하기 위하여 30~70분 동안 각각 배양 별아교세포에 ILC 유도를 하였다. 그 결과 30분 동안의 ILC 유도에서는 세포생존율이 대조군인 100% (1.38±0.12)에 비하여 55.8% (0.77±0.05)로 나타났다. 또한, 50분 동안 ILC 유도에서는 55.1% (0.76±0.07)로 나타났으며, 70분 동안의 ILC 유도에서는 51.4% (0.71±0.04)로 나타나 이는 대조군에 비하여 모두 세포생존율이 모두 유의하게 감소한 것으로 나타났다 ($P < 0.05$) 위의 결과에서 20분과 70분 동안의 ILC 유도에서 각각 저독성 (lower cytotoxicity)값인 XTT₉₀과 고독성 (high cytotoxicity)값인 XTT₅₀이 나타났다 (Table 1).

2. ILC 유도에 대한 CKA의 영향

NMDA/glycine 수용체 길항제인 CKA가 ILC 유도에 미치는 영향을 세포생존율에 의해 조사하기 위하여 배양 별아교세포에 ILC를 유도하기 전에 20 μM에서 60 μM의 CKA가 각각 포함된 배양액에서 2시간 동안 처리하였다.

Table 2. The protective effect of 7-chlorokiurenic acid (CKA) on cultured mouse astrocytes damaged by ischemia-like condition (ILC)

Exposure	XTT assay (450 nm)	
	Mean ± S.D.	(% of control)
Concentration of CKA (μM)		
Control	2.47±0.19	100
ILC	1.71±0.17	69.2
20	2.08±0.13	84.2*
40	2.23±0.15	90.3**
60	2.34±0.15	94.7**

Cultured mouse astrocytes were preincubated with 20, 40 and 60 μM of CKA for 2 hours. The values indicate the mean ± SD for triplicate experiments. Significantly different from the ILC-treated group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Table 3. The lactate dehydrogenase (LDH) activity of 7-chlorokiurenic acid (CKA) on ischemia-like condition (ILC) in cultured mouse astrocytes

Concentration of CKA(μM)	Lactate dehydrogenase activity (570 nm)	
	% of control	
Control	100±9.6	
ILC	150.9±13.4	
20	116.4±9.7**	
30	86.2±7.4***	

Cultured mouse astrocytes were treated with 20 and 30 μM CKA for 2 hours. The values indicate the mean ± SD for triplicate experiments. Significantly different from ILC-treated group. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

그 결과 ILC만을 유도한 실험군의 세포생존율은 대조군인 100% (2.47±0.19)에 비하여 69.2% (1.71±0.17)로 나타남에 비하여, 20 μM의 CKA의 처리에서는 84.2% (2.08±0.13)로 나타났다 ($P < 0.05$). 또한, 40 μM과 60 μM의 CKA의 처리에서는 세포생존율이 각각 90.3% (2.23±0.15)와 94.7% (2.34±0.21)로 나타났다 ($P < 0.01$) (Table 2).

3. LDH activity 측정

CKA에 대한 LDH activity를 알아보기 위하여 배양 별아교세포에 시험관내 ILC를 유도하기 전에 CKA가 20 μM에서 30 μM의 농도로 각각 포함된 배양액에서 2시간 동안 전처리한 후 CKA의 영향을 조사하였다. 그 결과 ILC만을 유도한 실험군에서 LDH 활성은 대조군에 비하여 150.9%로 나타난 반면, 20 μM의 CKA의 처리에서는 116.4% ($P < 0.01$)로 나타났으며, 또한 30 μM의 처리에서는 86.2% ($P < 0.001$)로 나타났다 (Table 3).

Table 4. The lipid peroxidation activity of CKA determined at a wavelength of 500 nm

Concentration of CKA (μM)	Lipid peroxidation activity (500 nm)
	% of control
Control	100 \pm 7.6
40	72.8 \pm 8.4*
60	64.9 \pm 6.5**

The values indicate the mean \pm SD for triplicate experiments. Significantly different from the control. * P <0.05, ** P <0.01

Table 5. The SOD-like activity of CKA determined at a wavelength of 420 nm

Concentration of CKA (μM)	SOD-like activity (420 nm)
	% of control
20	4.6 \pm 0.25
40	8.2 \pm 0.93*
60	13.7 \pm 1.06**

The value indicate the mean \pm SD for triplicate experiments. Significantly different from the control. * P <0.05, ** P <0.01

4. 지질과산화활성 측정

CKA의 지질과산화활성을 조사하기 위하여 CKA가 40 μM 과 60 μM 로 각각 포함된 시료를 대상으로 분석하였다. 그 결과 40 μM 의 CKA 처리에서는 지질과산화가 대조군에 비하여 72.8%로, 60 μM 의 처리에서는 64.9%로 나타남으로서 CKA의 지질과산화활성억제는 각각 27.2% (P <0.05)와 35.1% (P <0.01)로 대조군에 비하여 유의하게 활성증가를 나타냈다 (Table 4).

5. SOD-유사활성 측정

CKA의 SOD-유사활성을 조사하기 위하여 CKA가 각각 20, 40 및 60 μM 로 각각 포함된 시료를 대상으로 조사한 결과 20 μM 의 농도에서는 SOD-유사활성이 대조군에 비하여 4.6%로 나타났으며, 40 μM 농도에서는 8.2% (P <0.05)로 나타났다. 또한, 60 μM 의 농도에서는 13.7%로 이는 대조군에 비하여 유의하게 증가하였다 (P <0.01) (Table 5).

6. Caspase 3의 발현에 대한 CKA의 영향

Caspase 3의 발현에 대한 CKA의 영향을 조사하기 위하여 CKA (40 μM)를 전처리한 경우 ILC의 처리에 비하여 발현이 감소되었다 (Fig. 1).

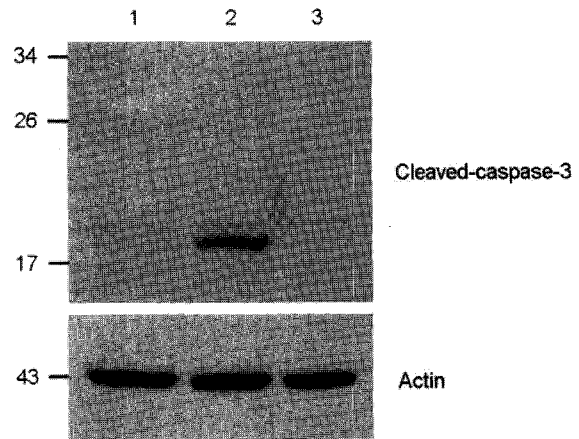


Fig. 1. The result of caspase-3 expression. Cultured cells were pretreated with CKA (40 μM) for 2 hours. Lane 1: control, 2: ILC, 3: CKA

Table 6. The effect of CKA on caspase 3 activity in cultured mouse astrocytes

Incubation	Cell viability (450 nm)
	% of control
Control	100 \pm 8.4
Berberamine	51.0 \pm 6.7
Av-DEVD-MCA	75.8 \pm 6.3*
CKA+AV-DEVD-MCA	90.4 \pm 9.2**

The values indicate the mean \pm SD for triplicate experiments. Significantly different from the control. * P <0.05, ** P <0.01

7. Caspase 3의 활성에 대한 CKA의 영향

Caspase 3의 활성에 대한 CKA의 영향을 알아보기 위하여 배양세포에 CKA (40 μM)와 caspase 3 활성저해제인 Av-DEVD-MCA (10 μM)를 동시에 넣어 배양세포에 2시간 동안 전처리한 결과 caspase 3 activation인 berberamine (15 $\mu\text{g/ml}$)만을 24시간 동안 처리한 경우 세포생존율이 대조군에 비하여 51.0%로 나타났다. 이에 비하여 저해제만의 처리에서는 75.8%로 나타났으며 (P <0.05), CKA와 저해제를 동시에 처리한 경우는 90.4% (P <0.01)로 나타났다 (Table 6).

고 찰

허혈은 조직을 공급하는 혈관이 협착이나 혈전 등에 의하여 내경이 좁아지면서 혈관을 흐르는 혈액량이 감소하여 조직 내로 충분한 산소공급이 이루어지는 것을 말한다 (Rivkin, 1997). 따라서 허혈은 산소가 부족하게 되는 저산소증 (hypoxia)을 유발함으로써 과량의 활성

산소 (ROS)를 생성하여 세포나 조직에 산화적 손상을 초래하게 된다 (Hammerman and Kaplan, 1998). 따라서 본 연구는 허혈의 세포독성을 알아보기 위하여 생쥐의 별아교세포를 배양하여 시험관내 허혈 (ischemia-like condition, ILC)을 유도한 다음 이의 영향을 조사하였다. 이를 위하여 ILC에 배양 별아교세포를 10~70분 동안 노출한 결과 처리 시간이 경과함에 따라 세포생존율이 점차 감소하였으며 ILC 유도 20분과 70분에서 각각 세포생존율의 XTT_{90} 값과 XTT_{50} 값이 나타났다. 본 실험 결과는 ILC 유도가 세포를 손상시킴으로서 세포생존율을 감소시켰음을 말해주고 있다. 이러한 원인으로는 허혈유도가 세포내 단백질계나 핵산물질에 대하여 합성저해를 유발하였을 가능성을 배제할 수 없지만 그 보다는 ILC 유도에 의한 산화적 손상에 의하여 세포생존율을 감소시켰을 가능성이 클 것으로 생각된다 (Prhm et al., 1993). 이 같은 이유의 하나로는 본 실험에 있어서 ILC 유도가 막의 산화적 손상과 관련이 깊은 LDH 활성을 증가시킴으로서 이를 말해주고 있다 (Hah et al., 2005). 한편, ILC 유도에 대한 N-methyl-D-aspartate (NMDA) 수용체 길항제인 CKA의 영향을 알아보기 위하여 배양 별아교세포에 20~60 μ M 농도의 CKA가 각각 포함된 배양액에서 2시간 동안 전처리한 후 세포생존율을 조사하였다. 그 결과 ILC 유도만의 경우에는 세포생존율이 대조군에 비하여 69.2%로 나타났는데 비하여 20 μ M CKA의 처리에서는 84.2% ($P<0.05$)로 나타나 ILC 유도군에 비하여 유의하게 증가하였으며 특히 40 μ M과 60 μ M의 농도 처리에서는 각각 90.3%와 94.7% ($P<0.01$)로 매우 높게 나타났다. 본 결과는 CKA가 ILC 유도에 대하여 방어효과를 나타냈으며 Mun 등 (1998)도 CKA가 방사선조사에 의한 척수운동신경세포의 손상을 방어하였다는 연구 결과와 일치하였다. 본 실험의 CKA의 방어효과는 CKA가 ILC 유도에 의한 산화적 손상으로 초래되는 NMDA 수용체의 과활성을 억제함으로써 이에 따른 세포내 칼슘의 다량유입이나 막손상을 방어하였음을 배제할 수는 없지만 (Park et al., 1996; Mun et al., 1998; Hah et al., 2005), 한편으로는, CKA가 항산화능을 나타냄으로서 ILC 유도에 의한 산화적 손상으로 야기되는 막손상을 비롯한 지질과산화반응이나 또는 항산화효소의 활성저해를 방어함으로써 세포보호효과를 나타내었을 가능성이 클 것으로 생각된다 (Yamamoto et al., 1983). 따라서 본 실험에서는 CKA의 항산화능을 알아보기 위하여 막손상의 지표인 LDH 활성을 비롯한 지질과산화 및 superoxide dismutase (SOD)-유사활성을

조사하였다. 먼저 LDH 활성에 있어서, ILC 유도에서는 LDH 활성이 대조군에 비하여 150.9%로 높게 나타났는데 비하여, 20 μ M과 30 μ M의 CKA를 전처리한 경우 각각 116.4% ($P<0.01$), 86.2%로 나타남으로서 ILC 유도에 비하여 유의하게 감소한 것으로 나타났다 ($P<0.001$). 또한, 지질과산화와 SOD-유사활성에 있어서도 CKA는 대조군에 비하여 높은 지질과산화억제와 SOD-유사활성을 나타냈다. 위의 결과는 CKA가 항산화효과를 가지고 있다는 것을 증명하고 있으며 이는 CKA가 ILC 유도에 의한 산화적 손상으로 부터 세포손상을 방어하였음을 말해주고 있다. 대부분 산화적 손상에 의한 세포독성은 세포고사 (apoptosis)와 밀접한 관련이 있다 (Thornberry and Lazebnik, 1998). 따라서 ILC 유도에 의한 산화적 손상으로 초래되는 세포독성에 대하여 CKA의 방어효과가 세포고사와 관련이 있는가를 알아보기 위하여 세포고사와 관련이 깊은 caspase 3의 발현을 Western blot에 의하여 조사하였다. 그 결과 ILC 유도에서는 caspase 3가 많이 발현된데 비하여 CKA의 전처리에서는 ILC 유도에 비하여 발현이 매우 억제된 것으로 나타났다. 한편, caspase 3의 활성에 있어서도 caspase 3 저해제인 Ac-DEVD-MCA와 CKA를 동시에 전처리한 경우, Bcr/Abl fusion gene 저해제인 동시에 caspase 3 activation인 berbamine (Wang et al., 2007)만의 처리에서 나타난 세포생존율, 51.0%에 비하여 90.4%로 유의하게 증가한 것으로 나타났으며 ($P<0.01$), 이는 또한 저해제만을 전처리한 경우의 75.8%보다도 더 높게 나타났다. 위와 같은 본 실험의 결과는 ILC 유도에 의한 산화적 손상이 세포고사와 관련이 있으며, CKA는 caspase 3의 발현을 억제함으로써 세포손상으로 부터 세포를 보호한 것으로 생각된다 (Thornberry and Lazebnik, 1998; Wu et al., 2005; Xu et al., 2006). 그러나 허혈로 인하여 유발되는 세포독성에 대한 더욱 자세한 기전을 밝히기 위하여서는 caspase 외에도 이와 연관된 세포내 신호전달체계를 비롯하여 흥분성 아미노산 및 COX-2와 같은 세포사멸과 관련된 단백질발현과 같은 다양한 측면에서 더 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

Acknowledgements

이 논문은 동신대학교 학술연구비에 의하여 연구되었음.

REFERENCES

- Bracco F, Scarpa M, Rigo A, Battistin L. Determination of superoxide dismutase activity by the polarographic method of catalytic currents on the cerebrospinal fluid of aging brain neurologic degenerative disease. *Proc So Exp Biol Med*. 1991. 196: 36-41.
- Buchan A, Gertler SZ, Li H, Xue D, Huang ZG, Chaundy KE. A selective N-type Ca²⁺ channel block prevent CA1 injury 24 hr following severe forebrain ischemia and reduces infarction following focal ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1994. 14: 903-910.
- Cohen G. The generation of hydroxyl radicals in biological system. *Photobiol*. 1978. 28: 669-674.
- Endoh M, Maiese K, Pulsinelli WA, Wager JA. Reactive astrocytes express NADPH diaphorase *in vivo* after transient ischemia. *Neurosci Lett*. 1993. 154: 125-128.
- Endoh M, Maiese K, Wanger J. Expression of the inducible form of nitric oxide synthase by reactive astrocytes after transient global ischemia. *Brain Res*. 1994. 651: 92-100.
- Gates MA, Tworoger SS, Hecht JL, De Vivo I, Rosner B, Hankinson SE. A prospective study of dietary flavonoid intake and incidence of epithelial ovarian cancer. *Int J Cancer* 2007. 121: 2225-2232.
- Gelmers HJ. Calcium-channel blockers in the treatment of migraine. *Am J Cardiol*. 1985. 55: 5139-5143.
- Hah DS, Kim CH, Kim GS, Kim EG, Kim JS. Antioxidant effects of traditional medicinal plants on lipid peroxidation. *Korean J Ver Res*. 2005. 45: 341-350.
- Hammerman C, Kaplan M. Ischemia and reperfusion injury. The ultimate pathophysiologic paradox. *Clin Perinatal*. 1998. 25: 757-777.
- Kikuzaki H, Nakatani N. Antioxidant effects of some ginger constituents. *J Food Sci*. 1993. 58: 1407-1410.
- Kim NY, Choi JH, Kim YG, Jang MY, Moon JH, Park GH, Oh DH. Isolation and Identification of an Anti-oxidant Substance from Ethanol Extract of Wild Grape (*Vitis coignetiea*) Seed. *Korea J Food Sci Technol*. 2006. 38: 109-113.
- Kim YS, Kim SU. Oligodendroglial cell death induced by oxygen radicals and its protection by catalase. *J Neurosci Res*. 1991. 29: 100-106.
- Krizkova L, Nagy M, Polonyi J, Dobias J, Belicova A, Grancai D, Krajcovic J. Phenolic acids inhibit chloroplast biogenesis in *Euglena gracilis*. *Mutat Res*. 2000. 469: 107-114.
- Leonard S, Wang S, Zang L, Castranova V, Vallyathan V, Shi X. Role of molecular oxygen in the generation of hydroxyl and superoxide anion radicals during enzymatic Cr(VI) reduction and its implication to Cr(VI)-induced carcinogenesis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*. 2000. 19: 49-60.
- Li YL, Gan GP, Zhang HZ, Wu HZ, Li CL, Huang YP, Liu YW, Liu JW. A flavonoid glycoside isolated from *Smilax china* L. rhizome *in vitro* anticancer cell lines. *J Ethnopharmacol*. 2007. 113: 115-122.
- Marklund S, Marklund G. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem*. 1974. 47: 468-474.
- McElhane MR, Chandler LJ, Streit WJ. Astrocytes but not microglia express NADPH diaphorase activity after motor-neuron injury in the rat. *Neurosci Lett*. 1994. 180: 67-70.
- Michaels RL, Rothman SM. Glutamate neurotoxicity *in vitro*: antagonist pharmacology and intercellular calcium concentrations. *J Neurosci*. 1990. 10: 283-292.
- Michikawa M, Lim KT, McLamon JG, Kim SU. Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. *J Neurosci Res*. 1994. 37: 62-70.
- Mosmann T. Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxic assays. *J Immunol Methods* 1983. 79: 414-420.
- Mun YJ, Park ST, Choi MK, Jeong DH, Moon SR, Chung YT. Irradiation in Central Nervous System and Recovery Effect: Action of Antioxidants and NMDA-receptor Antagonists. *Korean Sci Electron Microscopy* 1998. 28: 591-601.
- Nomura Y. A transient brain ischemia- and bacterial endotoxin-induced glial iNOS expression and NO-induced neuronal apoptosis. *Toxicol Lett*. 1998. 28: 65-69.
- Park ST, Lim KT, Chung YT, Kim SU. Methylmercury-induced neurotoxicity in cerebral neuron culture is blocked by antioxidants and NMDA receptor antagonists. *Neurotoxicology* 1996. 17: 37-46.
- Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carrla V, Moroni F. Excitatory amino acid and free radicals formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J Neurosci*. 1990. 10: 1035-1041.
- Prhn JH, Welsh M, Backhauss C, Nuglisch J, Ausmeier F, Kakoutly C. Effect of serotonergic drugs in experimental brain ischemia: Evidence for a protective role of serotonin in cerebral ischemia. *Brain Res*. 1993. 630: 10-20.
- Rivkin MJ. Hypoxic-ischemic brain injury in the term newborn.

- Neuropathology clinical aspects and neuroimaging. Clin Perinatal. 1997. 24: 607-625.
- Rosen D, Siddique T, Patterson D, Figlewicz D, Sapp P. Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature 1993. 362: 59-62.
- Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. Science 1998. 281: 1312-1316.
- Wang L, Tu YC, Lian TW, Hung JT, Yen JH, Wu MJ. Distinctive antioxidant and antiinflammatory effects of flavonols. J Agric Food Chem. 2006. 54: 9798-9804.
- Wang GY, Zhang JW, Lu QH, Xu RZ, Dong QH. Berbamine induces apoptosis in human hepatoma cell line SMMC7721 by loss in mitochondrial transmembrane potential and caspase activation. J Zhejiang Univ Sci B. 2007. 8: 248-255.
- Warner BB, Wispe JR. Free radical-mediated disease in pediatrics. Perinatal Seminar 1992. 16: 47-57.
- Wu D, Lin MF, Zhao XY. Effects of berbamine on K562 cells and its mechanism *in vitro* and *in vivo*. Zhongguo Shi Yan Xue Za Zhi. 2005. 13: 373-378.
- Xu RZ, Dong QH, Yu Y, Zhao X, Gan X, Wu D, Lu Q, Xu X, Yu XF. Berbamine: a novel inhibitor of Bcr/Abl fusion gene with potent anti-leukemia activity. Leuk Res. 2006. 30: 17-23.
- Yamamoto M, Scima T, Uozumi T, Yamada K, Kawasaki T. A possible role of lipid peroxidation in cellular damages caused by cerebral ischemia and protective effect of alphatocopherol administration. Stroke. 1983. 14: 977-982.
- Zeman S, Lloyd C, Meldrum B, Leigh PN. Excitatory amino acid, free radicals and the pathogenesis of motor neuron disease. Neuropathogenesis Appl Neurobiol. 1994. 20: 219-231.
-