한국산업보건학회지, 제27권 제3호(2017) ISSN 2384-132X(Print) ISSN 2289-0564(Online)
Journal of Korean Society of Occupational and Environmental Hygiene, 2017: 27(3): 193-200
https://doi.org/10.15269/JKSOEH.2017.27.3.193

Original Article

환경오염원인 납의 신경독성에 대한 NMDA 수용체 길항제의 보호 효과

손영우[1] · 임요섭[2] · 서영미[3*]

[1]원광대학교 의과대학 산본병원, [2]순천대학교 생명산업과학대학, [3]서남대학교 간호학과

Protective Effect of NMDA Receptor Antagonist on the Neurotoxicity Induced by Lead as an Environmental Pollutant

Young-Wo-Kim[1] · Yo-Sup Rim[2] · Young Mi Seo[3*]

[1]Sanbon Hospital, School of Medicine, Wonkwang University
[2]Department of Bioenvironmenmental Science, Sunchon National University
[3]Department of Nursing Seonam University

ABSTRACT

Objectives: This study was performed to evaluate the neurototoxicity of the environmental pollutant lead acetate(LA) and the protective effect of the D-2-amino-5-phosphonovaleric acid(APV), N-methyl-D-aspartate(NMDA) receptor antagonist on LA-induced cytotoxicity in cultured C6 glioma cells.

Materials and Methods: For this study, cell viability in cultured C6 glioma cells was assessed by XTT assay and antioxidative effect, such as lactate dehydrogenase(LDH) activity, by LDH detection kit.

Results: LA significantly decreased cell viability in a dose-dependent manner, and the XTT50 value was determined to be 33.3 uM of LA. The cytotoxicity of LA was deemed highly toxic according to Borenfreund and Puerner's toxic criteria. The vitamin E antioxidant significantly increased cell viability damaged by LA-induced cytotoxicity in these cultures. For the protective effect of APV on LA-induced cytotoxicity, APV significantly increased not only cell viability, but also inhibition of LDH activity. From these results, it is suggested that oxidative stress is involved in the neurotoxicity of LA, and APV effectively protected against LA-induced cytotoxicity via an antioxidative effect as an inhibotory activity of LDH.

Conclusions: Natural resources like APV may be putative therapeutic agents for the toxic diminution of environmental pollutants such as LA correlated with oxidative stress.

Key words: cytotoxicity, environmental pollutant, oxidative stress, toxic diminution

I. 서 론

납은 오래전부터 카드뮴이나 수은과 같이 수질이나 대기를 오염시키는 중금속류의 환경독성물질로 분류되어 왔으며, 특히 납독성은 동물실험에서 염색체의 형태적 변이를 유발함으로써 돌연변이원으로도 잘 알려져 있다(Tiffany et al., 1988). 그럼에도 불구하고 납은 우리의 일상생활에 필요한 축전지를 비롯하여 장난감제조, 안료제조 및 페인트와 같은 산업공정의 주원료로 사용되고 있으며 그밖에도 자동차부품이나 염료제조에도 유용하게 사용되고 있다(Liu et al., 2000). 납은 생태계의 먹이사슬을 통하여 인체 내에 유입이 되어지기도 하나 특히, 산업공정 중에 발생되는 연기(fume)나 분진에 의한 피부접촉이나 호흡기계를 통하여 인체 내에 과량 축적됨으로써 각종 부작용을 유발한다(Jung et al., 2014). 그러나 독

*Corresponding author: Young Mi Seo, Tel: 063-620-0102, E-mail: dudn0408@naver.com
Department of Nursing Seonam University, 439, Chunhayng-ro, Namwon-si, Jeollabuk-do, 55724
Received: September 1, 2017, Revised: September 13, 2017, Accepted: September 23, 2017

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

성이 강하기 때문에 일단 인체 내 과량이 축적된 경우, 납중독을 유발함으로써 심각한 부작용을 초래하게 된다(Son & Jung, 2012). 특히, 납은 피부접촉이나 호흡기를 통하여 인체 내로 유입된 후 혈류를 통해 조혈기능에 손상을 줄 뿐 아니라, 혈액-뇌장벽(blood-brain barrier, BBB)을 통과하여 뇌중독을 유발한다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다(Bressler et al., 1994). 납중독에 대한 임상적 징후로는 피로나 기억감퇴를 비롯하여 위장장애, 정신적 조증(mania) 및 반사소실 등과 같은 현상을 나타냄으로써 조기진찰과 빠른 진단을 통해 치료하지 않으면 심각한 후유증을 초래한다(Busselberg, 1991). 뇌조직 중 신경교세포(neuroglial cell)는 납중독 시 가장 빠르게 활성화되어 손상된 뇌의 회복을 위하여 가장 먼저 반응하는 일차적인 반응세포이다(Chen et al., 2002). 특히, 신경교세포 중 별아교세포(astrocyte)는 신경원에 영양공급을 비롯하여 BBB 관여 및 뇌손상 시 회복을 위한 활성세포로 알려져 있다(Kim et al., 2013).

납을 비롯한 크롬이나 수은과 같은 몇몇 중금속류는 이들이 붕괴되는 과정에서 자유라디칼(free radicals)을 발생시키지만(Leonard et al., 2000) 항산화제에 의하여 방어되었다고 보고되었다(Jung et al., 2014). 산화적 손상을 유발하는 자유라디칼은 막의 지질과산화사슬(lipid peroxidation channel)을 촉진시킬 뿐만 아니라(Hah et al., 2005), 칼슘채널과 연관되어 막표면에 위치하고 있는 N-methyl-D-aspatate(NMDA) 수용체를 과활성 시켜 세포내로 다량의 칼슘이 유입되어 세포의 퇴화나 사멸을 초래한다(Jung, 2009). 세포내로 유입된 칼슘은 calcium-mediated intercellular free radicals를 생성하여 세포고사를 더욱 촉진시킨다(Pellegrini-Giampietro et al., 1990). 또한, 자유라디칼은 흥분성아미노산(excitatory amino acids, EAAs)의 분비를 촉진시켜 그 결과 NMDA 수용체를 과활성 시켜 결국 세포를 고사시킨다(Zeman et al., 1994). 한편, NMDA 수용체 길항제는 NMAD 수용체를 과활성 시키는 EAAs와 경쟁적으로 작용하여 수용체의 과활성 억제는 물론이고 이로 인한 세포내 다량의 칼슘유입을 저지하여 세포 손상을 방어한다(Hah et al., 2005). 또한, 세포내 칼슘유입을 억제하는 NMDA 수용체 길항제는 칼슘증가에 대응하는 세포내 자유라디칼의 생성을 억제하여 산소자유기 제거제와 같은 역할을 하기도 한다. 그러나 납과 같은 중금속의 독성을 산화적 손상과 관련하여 NMDA 수용체 측면에서 접근한 연구는 흔하지 않으며 더욱이 세포배양을 방법으로 하는 연구는 소수에 불과하다(Ha et al., 2003).

세포배양의 기법은 줄기세포를 비롯한 각종 세포종을 배양하여 병변의 모델제작이나 또는 치료적 목적을 위해 유용한 도구로 활용하고 있다. 배양 세포는 생체세포에서처럼 화학적, 물리적 특성을 그대로 간직하고 있어 생체에서와 동일한 실험효과를 가지고 있다. 또한, 동일세포들로 구성되어 세포 수도 많고 성질이 균일해서 여러 번 반복실험이 가능하다는 장점이 있다(Choi et al., 2001).

따라서 본 연구는 환경오염원인 납에 대한 신경독성을 완화 내지는 경감할 수 있는 물질의 탐색을 위하여 별아교세포종인 배양 C6 glioma 세포를 재료로 초산납(lead acetate, LA)의 독성을 산화적 손상 측면에서 분석하였으며 이와 동시에 납독성에 대한 NMDA 수용체 길항제인 APV(D-2-amino-5-phosphonovaleric acid)의 영향을 조사하였다.

Ⅱ. 연구방법

1. 세포주

본 실험에 사용한 대뇌신경교세포인 C6 glioma 세포주(American Type Culture Collection, Rockville, U.S.A., CCL 107)를 분양 받아 사용하였다.

2. 약제 제조

본 실험에 사용한 시약으로 LA를 비롯한 trypsin, vitamin E(Vit. E), phosphate buffered saline(PBS), D-2-amino-5-phosphonovaleric acid(APV), dimethylsulfoxide (DMSO), methanol, ethanol, hydrogen peroxide(H_2O_2)는 Sigma사(St Luios. MO, U.S.A.)에서 구입하였다. LA의 제조는 fetal bovine serum(FBS, Gibco, BRL, Grand Island, NY, U.S.A.)이 없는 minimum essential medium(MEM, Gibco Rockville, MD, USA)을 사용하여 각각 10 uM, 50 uM, 100 uM 및 150 uM의 저장액을 만들어 실험 전 까지 냉암소에 보관한 다음 실험 당일 필요에 따라 최종 농도로 희석한 후 본 실험에 사용하였다. 2,3-bis-[2-methoxy-4- nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-caboxanilide, disodium salt(XTT, Sigma

Chemical Company, St. Louis, MO, U.S.A.)는 PBS를 이용하여 50 ug/mL의 저장액을 만든 후 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다.

3. 세포 배양

C6 glioma 세포의 배양은 Park et al.(1996)의 방법에 따라 배양용기에 부착된 세포를 세포해리술에 의해 0.025% trypsin을 사용하여 분리하였다. 분리된 세포들은 원심분리 후 10% FBS가 함유된 MEM 배양액에 넣고 1 x 10^5 cells/well이 되도록 조절한 후 배양용기(96-well)에 분주하였다. 분주된 세포들은 36℃, 5% CO_2로 일정하게 조절된 배양기(incubator)내에서 72시간 동안 배양하였다.

4. 초산납(LA) 처리

배양중인 C6 glioma 세포에 LA가 20~40 uM 농도로 각각 함유된 배양액에서 세포를 48시간 동안 배양한 후 세포생존율에 의하여 대조군과 비교 조사하였다.

5. NMDA 수용체 길항제(APV) 처리

배양중인 C6 glioma 세포에 APV가 60 uM과 90 uM 농도로 각각 함유된 배양액에서 세포를 2시간 동안 전배양한 후 세포생존율에 의하여 대조군과 비교 조사하였다.

6. Vit. E의 항산화 활성 측정

Vit. E의 항산화 활성을 조사하기 위하여 활성산소의 일종인 H_2O_2 20 uM를 배양 세포에 처리하기 2시간 전에 Vit. E가 30~50 uM 농도로 각각 포함된 배양액에서 세포를 처리한 다음 세포생존율에 의하여 대조군과 비교 조사하였다.

7. LA에 대한 Vit. E의 영향

XTT_{50} 농도의 LA를 배양세포에 처리하기 2시간 전에 Vit. E가 40 uM과 50 uM로 각각 포함된 배양액에서 세포를 배양한 다음 세포생존율에 의하여 대조군과 비교 조사하였다.

8. 세포생존율 분석

세포생존율의 분석은 Mosmann(1983)의 방법에 따라 행하였다. 즉, 배양 세포에 약제나 시료추출물을 농도별로 처리한 다음 실험 당일 제조한 XTT(50 ug/mL)를 well당 20 ul씩 넣고 36℃로 조절된 항온기에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 DMSO를 넣어 실온에서 정치한 다음 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. XTT_{50} 값은 회귀직선식(regression equation)에 의하여 산출하였다.

9. Lactate dehydrogenase(LDH) 활성 측정

배양세포에 LA나 길항제를 각각 처리한 다음 배양액을 250 x g에서 10분 동안 원심분리시켰다. 원침 완료 후 50 ul의 상등액을 취한 다음 LDH CytoTox detection kit(Asan Co. Seoul, Korea)의 반응액(0.05 U/ml) 50 uL를 넣은 다음 실온에서 30분 동안 방치하였다. 반응 후 ELISA reader로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. LDH 활성은 대조군에 대한 백분율로 표시하였다.

10. 통계 처리

실험결과는 SPSS/WIN 18.0을 사용하였으며 mean±SD로 표시하였다. 실험결과에 대해 one way ANOVA test를 행하였으며, 사후 분석은 Tukey HSD로 하였다. 또한, p-value가 0.05 미만의 경우를 유의한 것으로 하였다.

Ⅲ. 결 과

1. LA의 독성효과

LA의 농도에 따른 독성분석 결과는 Table 1과 같다. 대조군의 세포생존율은 0.47±0.02, 20 uM LA는 0.34±0.03, 30 uM LA는 0.26±0.02, 그리고 40 uM LA는 0.20±0.02로 농도에 의존적으로 세포생존율이 유의하게 감소되어 세포독성이 있는 것으로 나타났다 (p<0.000). 또한, 이 처리과정에서 XTT_{50} 값은 33.3 uM에서 나타났다. 사후검정 결과 40 uM LA, 30 uM LA, 20 uM LA의 순으로 독성이 높은 것으로 나타났다.

2. Vit. E의 항산화 활성 측정

아무런 처치를 하지 않은 대조군에 비하여 20 uM H_2O_2만을 처리한 경우 세포생존율이 43.2%(0.16±0.02)로 나타난 반면, 30 uM, 40 uM, 50 uM의 Vit. E의 처리에서는 각각 70.3%(0.26±0.01), 75.7%(0.28±0.03), 86.5%(0.32±0.03)로 나타났다(p<0.000). 20 uM H_2O_2에 대한

Table 1. The cell viability of LA on cultured C6 glioma cells by XTT assay

(LA*)Group	XTT assay(450nm) Mean±SD	F	*p*	Tukey HSD
Control[a]	0.47±0.02	189.58	.000	a>b>c>d
20LA[b]	0.34±0.03			
30LA[c]	0.26±0.02			
40LA[d]	0.20±0.02			

*LA: Lead acetate, p<.000

Table 2. The antioxidative activity of Vit. E on the H_2O_2 in cultured C6 glioma cells

(Vit. E*)Group	XTT assay(450nm) Mean±SD	F	*p*	Tukey HSD
Control[a]	0.37±0.04	73.57	.000	a>e>cd>b
20H_2O_2[b†]	0.16±0.02			
30 Vit.E[c]	0.26±0.01			
40 Vit.E[d]	0.28±0.03			
50 Vit.E[e]	0.32±0.03			

*Vit. E: vitamin E, † H_2O_2: Hydrogen peroxide. p<.000

Vit. E의 항산화 활성의 사후검정 결과 50 uM Vit. E, 30 uM Vit. E와 40 uM Vit. E, 20 uM H_2O_2순으로 높은 것으로 나타났으며, 30 uM Vit. E와 40 uM Vit. E의 항산화활성은 차이가 없었다(Table 2).

3. LA에 대한 Vit. E의 영향

XTT_{50} 농도의 LA만의 처리에서는 세포생존율이 대조군에 비하여 43.8%(0.07±0.02)로 나타난 것에 비하여 40 uM과 50 uM의 Vit. E의 처리에서는 각각 68.8%(0.11±0.02)와 75.0%(0.12±0.02)로 나타났다 (p<0.000). LA에 대한 Vit. E의 항산화능의 사후검정 결과 40 uM Vit. E, 50 uM Vit. E, 20 uM H_2O_2 순으로 높은 것으로 나타났으며, 40 uM Vit. E와 50 uM Vit. E의 항산화능은 차이가 없었다(Table 3).

4. LA의 세포독성에 대한 APV의 영향

APV가 LA의 세포독성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 배양 세포에 XTT_{50}농도의 LA를 처리하기 전

Table 3. The effect of Vit. E on the cytotoxicity induced by LA in cultured C6 glioma cells

(Vit. E*)Group	XTT assay(450nm) Mean±SD	F	*p*	Tukey HSD
Control[a]	0.16±0.02	33.41	.000	a>cd>b
LA[b†]	0.07±0.02			
40 Vit.E[c]	0.11±0.02			
50 Vit.E[d]	0.12±0.02			

*Vit. E: vitamin E, † LA: Lead acetate. p<.000

Table 4. The protective effect of APV on LA-induced cytotoxicity in cultured C6 glioma cells

(APV*)Group	XTT assay(450nm) Mean±SD	F	*p*	Tukey HSD
Control[a]	0.25±0.02	56.04	.000	a>cd>b
LA[b†]	0.10±0.03			
60 APV[c]	0.17±0.02			
90 APV[d]	0.18±0.03			

*APV: D-2-amino-5-phosphonovaleric acid, † LA: Lead acetate. p<.000

Table 5. The LDH‡ activity of APV measured wavelength of 490 nm

(APV*)Group	XTT release(490nm) Mean±SD	F	*p*	Tukey HSD
Control[a]	0.32±0.02	24.81	.000	b>c>ad
LA[b†]	0.46±0.06			
60APV[c]	0.39±0.05			
90APV[d]	0.30±0.02			

*APV: D-2-amino-5-phosphonovaleric acid, †LA: Lead acetate. ‡LDH: lactate dehydrogenase, $p<.000$

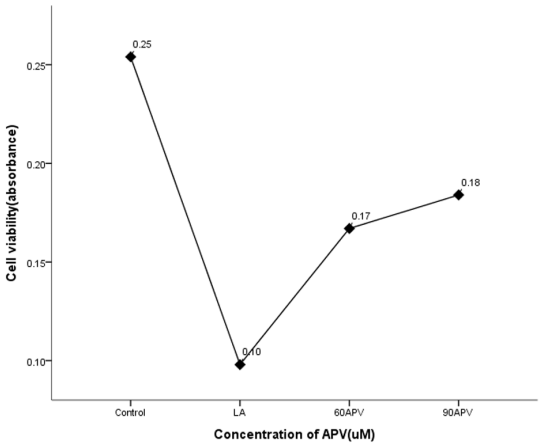

Figure 1. C6 glioma cell were pretreated 60 uM/ml and 90 uM/ml APV for 2 hours. The data indicate the mean±SD for triplicate experiments. Significantly different from the positive control(LA)

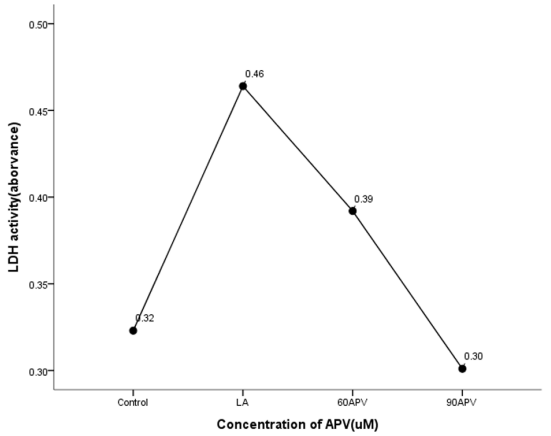

Figure 2. C6 glioma cell were pretreated 60 uM/ml and 90 uM/ml APV for 2 hours. The data indicate the mean±SD for triplicate experiments. Significantly different from the positive control(LA)

에 60 uM과 90 uM의 APV를 각각 처리한 결과는 다음과 같다(Table 4, Figure 1). LA만의 처리에서는 세포생존율이 대조군에 비하여 40.0%(0.10±0.03)로 나타난데 비하여 60 uM APV 처리에서는 68.0%(0.17± 0.02)로 나타났으며, 또한 90 uM APV 처리에서는 72.0%(0.18± 0.03)로 나타났다($p<0.000$). 세포생존율의 사후검정 결과 60 uM APV와 90 uM APV, LA 순으로 높은 것으로 나타났으며, 60 uM APV와 90 uM APV의 항산화능력은 차이가 없었다.

5. LDH 활성 측정

LDH 활성을 조사하기 위하여 XTT_{50}농도의 LA를 배양 세포에 처리하기 전에 60 uM과 90 uM의 APV를 각각 전처리한 결과는 다음과 같다(Table 5, Figure 2). LA만의 처리에서는 LDH 활성이 대조군에 비하여 143.8%(0.46±0.06)로 나타난데 비하여 60 uM APV 처리에서는 121.9%(0.39± 0.05)로 나타났다. 또한 90 uM APV 처리에서는 LDH 활성이 93.8%(0.30±0.02)로 나타났으며, 모두 LA만의 처리에 비하여 유의한 감소를 보였다($p<0.000$). 또한 사후검정 결과 90 uM APV, 60 uM APV, LA 순으로 세포막 손상 방어율이 높은 것으로 나타났다. 대조군과 90 uM APV의 세포막 손상 방어율은 차이가 없었다.

Ⅳ. 고 찰

환경오염원 중 납을 비롯한 수은이나 크롬과 같은 중금속들은 독성이 매우 강하기 때문에 이들에 의해 중독될 경우 치명적인 손상을 초래함은 이미 잘 알려진 사실이다(Leonard et al., 2000). 따라서, 이들 독성에 대한 정량적 분석이나 기전규명이 이들의 중독으로부터 예방이나 치료적 측면에서 매우 중요한 관심의 대상이 되었다. 따라서, 본 연구에서는 환경오염원의 하나인 초산납(LA)의 신경독성을 배양 C6 glioma 세포를

대상으로 정량분석하였다. 본 실험에서 LA의 XTT_{50} 값은 33.3 uM에서 나타남으로써 Borenfreund & Puerner (1984)에 의한 독성판정기준에 따라 고독성(highly-toxic)으로 나타났다. 이들의 약제 독성판정 규정은 XTT_{50} 값이 100 uM 이하인 경우 고독성, 100~1,000 uM인 경우 중간독성(mid-toxic), 1,000~2,000 uM 범위인 경우 저독성(lower-toxic), 2,000 uM 이상인 경우 무독성(non-toxic)으로 각각 판정한다. 본 연구 결과는 Jung et al.(2014)이 NIH3T3 배양세포에 LA를 처리한 결과 세포독성을 나타냈다는 연구 결과와 Son & Jung (2012)이 배양 대뇌 신경교종세포에서 LA가 세포독성을 나타냈다는 보고와도 일치함을 알 수 있었다. 이같이 LA가 배양 C6 glioma 세포에 독성을 보인 것은 LA가 세포내의 단백합성이나 핵산물질의 합성을 방해하면 세포의 성장이나 분화를 저해하여 세포생존율에 영향을 미쳤을 가능성을 생각할 수 있으나(Kern et al., 1993), 그 보다 LA에 의한 산화적 손상으로 EAAs의 분비가 촉진되고 NMDA 수용체가 과활성화 된다는 근거를 고려해 볼 때(Zeman et al., 1994), Lim et al.(1995)의 Ca^{2+}-chelator가 산화적 손상을 방어하였다는 보고와 같이 LA에 의한 산화적 손상에 의해 분비된 EAAs가 세포내 칼슘채널에 영향을 미침으로써 세포손상을 유발하였을 가능성이 클 것으로 사료된다(Busselberg et al., 1991). 이와 동시에 Ca^{2+}로 매개되는 세포내 자유라디칼의 생성억제에도 영향을 주었을 것으로 생각된다(Pellegrini-Giampietro et al., 1990).

한편, 납의 독성이 산화적 손상과 관련이 있다고 제시되면서 항산화 측면에서 독성을 치료하려는 연구가 시도되고 있다(Jung et al., 2014). 따라서, 본 연구에서는 이를 위하여 먼저 vitamin E의 항산화능을 조사하였다. 본 실험의 결과에서 Vit. E의 처리가 H_2O_2만의 처리에 비하여 세포생존율이 유의하게 증가한 것은 Vit. E가 높은 항산화능을 가지고 있음을 증명하고 있다. 본 연구 결과는 Kim & Jekal(2016)이 Vit. E와 같은 항산화제의 일종인 BHT가 H_2O_2에 대하여 높은 항산화능을 보였다고 보고한 연구 결과와도 서로 상통함을 알 수 있었다.

위의 분석과 관련하여 납의 독성과 산화적 손상과의 연관성을 조사하기 위하여 vitamin E를 LA 처리 전에 배양 세포에 전처리한 후 세포생존율을 조사하였다. 본 연구결과 Vit. E 처리가 LA만의 처리에 비하여 세포생존율이 유의하게 증가한 것은 Vit. E에 의하여 LA의 세포독성이 방어된 것을 의미하며, LA의 세포독성에 산화적 손상이 관여하고 있음을 제시하는 것으로 판단된다. 본 결과는 Jung et al.(2014)이 배양 NIH3T3섬유모세포를 대상으로 한 연구보고와도 일치하였다.

한편, 본 연구결과 LA의 신경독성에 대한 NMDA 수용체 길항제인 APV가 LA의 독성을 방어했다. 이는 Ha et al.(2003)이 LA와 같은 중금속인 메틸수은의 세포독성을 APV가 방어하였다는 연구 보고와도 유사하였다. 또한 LA 독성에 의해 감소된 세포생존율이 APV에 의하여 유의한 증가를 나타낸 것은 LA의 독성이 산화적 손상과 관련이 있다는 결과로 판단된다. 따라서, 산화적 손상이 EAAs를 분비한다는 연구 보고(Zeman et al., 1994)와 EAA-dependent Ca^{2+}-channel을 고려해 볼 때(Jung, 2009), LA의 산화적 손상에 의해 분비된 EAAs가 Ca^{2+}-channel과 관련이 깊은 NMDA 수용체를 과활성시키는 것을 APV가 방어함으로써 세포내 다량의 칼슘유입이 저해돼 세포손상이 유의하게 감소된 것으로 판단된다. APV는 EAAs와 경쟁적으로 NMDA 수용체에 부착하여 EAAs에 의해 NMDA 수용체가 과활성되는 것을 효과적으로 방어할 수 있다(Jung, 2009). 세포내 다량의 칼슘유입은 세포를 과도히 팽창시켜 막손상을 초래할 뿐만 아니라 세포 내 Ca^{2+} 매개 자유라디칼의 생성을 촉진함으로써 이로 인한 세포내 환경변화는 물론, 막을 통한 정상적인 물질수송의 저해 및 막의 지질과산화로 인해 세포는 퇴화내지는 사멸하게 된다(Buchan et al., 1994). 이에 LA의 산화적 손상으로 유발된 막 손상에 대한 APV의 영향을 알아보기 위해 LDH 활성을 조사하였다. LDH 활성은 산화적 손상으로 야기되는 막지질의 산화정도를 측정하는 정량적인 항산화 능의 분석방법의 하나로 알려져 있다(Han et al., 2001). 본 연구 결과에서 APV가 LA에 의해 증가된 LDH 활성을 유의하게 감소시킴으로써 LA에 의한 세포막의 손상을 효과적으로 방어하였다. 이는 Jung(2009)이 산화적 손상에 의한 LDH 활성을 NMDA 수용체 길항제인 CKA(7-chlorokynurenic acid)가 방어하였다는 보고와 유사함을 알 수 있었다. 위의 타 연구나 본 연구의 결과는 LA의 산화적 손상이 APV나 CKA에 의해 막손상이 방어된 것을 증명하고 있다. 이는 다시말해, LA의 산화적 손상에 의한 EAAs의 분비로

야기되는 NMDA 수용체 과활성을 APV가 억제함으로써 세포내 칼슘유입을 차단하여 막의 팽창은 물론, Ca^{2+}-dependent free radical 생성을 저해하여 결국 LA의 산화적 손상에 의한 지질과산화를 APV가 방어한 결과임을 제시하고 있다. 이상의 결과는 NMDA 수용체 길항제인 APV가 LA의 독성을 방어한 것으로써 이를 더욱 뒷받침하기 위해서는 LA를 처리한 배양세포에서 APV와 같은 길항제의 처리전과 처리후에 대한 glutamate 생성량을 측정할(Bakker et al., 1991) 필요성이 요구된다. 또 하나는 glutamate나 kainic acid와 같은 agonist로 배양세포를 손상한 후 길항제의 처리전과 처리후의 영향을 측정하는 것이다(Kikuchi & Kim, 1993). 또한, 납은 칼슘채널과 밀접한 관련이 있어 결국 NMDA 수용체와도 연관되어 있는 것은 잘 알려져 있다(Busseiberg et al., 1991). 그러나 납독성과 NMDA 수용체 길항제 간의 상호관계를 자세히 밝히기 위해서 길항제의 처리전과 처리후에 대한 세포내 칼슘통로의 측정을 glutamate 생성량과 상호 비교하여 NMDA 수용체의 활성조사나 자기영동, 면역세포염색법에 의한 수용체의 발현정도를 측정분석할(Busseiberg et al., 1991) 필요성이 요구된다. 따라서 추후 연구에서는 본 연구에서 추가요구되는 실험이 함께 검증될 수 있기를 제언한다.

V. 결 론

환경오염원인 LA의 신경독성과 이에 대한 NMDA 수용체 길항제의 영향을 알아보기 위하여 배양 대뇌 신경교종세포인 C6 glioma 세포를 대상으로 LA의 독성을 산화적 손상 측면에서 조사하였으며, 또한 LA의 세포독성에 대한 APV의 영향을 분석하였다. 본 실험에서 배양 C6 glioma 세포에 20~40 uM의 LA 농도 각각을 처리한 결과, 처리 농도에 의존적으로 세포생존율의 감소양상을 보였으며 이는 대조군에 비하여 유의하게 감소하였다. 이 과정 중 LA의 XTT_{50} 값은 33.3 uM로 고독성(highly-toxic)인 것으로 나타났으며, 또한 항산화제인 vitamin E는 LA의 세포독성을 효과적으로 방어하였다. 한편, LA의 세포독성에 대한 APV의 영향을 조사한 결과 LA에 의하여 감소된 세포생존율을 APV는 유의하게 증가시켰으며, 또한 LDH 활성저해를 보임으로써 LA의 세포독성을 방어하였다. 위의 결과로부터 LA의 세포독성은 산화적 손상과 관련이 있으며, NMDA 수용체 길항제인 APV는 LA의 독성을 효과적으로 방어하는 것을 알 수 있었다. 따라서, APV와 같은 수용체 길항제는 산화적 손상으로 매개되는 독성을 칼슘채널 측면에서 차단하여 세포손상을 보호할 수 있어 차후 산화적 손상과 관련된 독성을 수용체 수준에서 방어할 수 있는 물질의 개발에 대한 기초적 자료를 마련하는데 있어 활용적 가치가 클 것으로 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2016 학년도 원광대학교의 교비지원에 의해 수행됨

References

Bakker MH, Mckernan RM, Wong EM, Foster AC. [^{3}H] MK-801 binding to N-methyl-D-aspartate receptors sloubilized from rat brain: Effects of glycine site ligands, polyamines, ifenprodil, and desipramine. J Neurochem 1991;57:39-45

Borenfreund E, Puerner JA. A simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assay (HTD/NR-90). J Tiss Cult Meth 1984;9(1):7-9

Bressler J, Forman S, Goldstein GW. Phospholipid metabolism in neural microvascular endothelial cells after exposure to lead in vitro. Toxicol Appl Pharmacol 1994;126:352-360

Buchan A, Gertler SZ, Li H, Xue ZG, Chaundy KE. A selective N-type Ca^{2+} channel blocker prevent CA1 injury 24 hr following severe forebrain ischemia and reduces in fraction following focal ischemia. J Cereb Blood Flow Metab 1994;14:903-910

Busselberg D, Evans ML, Rahmann H, Carpenter DO. Lead and zinc block a voltage-activated calcium channel of aplysia neurons. J Neurophysiol 1991;65:786-795

Busselberg D, Evans ML, Haas HL, Carpenter DO. Blockade of mammalian and invertebrate calcium channels by lead. Neurotoxicol 1993;14:249-258

Chen YJ, Yang BC, Hsieh WC, Huang BM, Liu MY. Enhancement of TNF-α expression does not trigger apoptosis upon exposure of glial cells to lead and lipopolysaccharide. Toxicol 2002;178:183-191

Choi YS, Ha DH, Jeong SJ, Lee JH, Kim SS, et al. Effects of acanthopancis cortex on osteo- blasts damaged by

$FeSO_4$. Kor J Med Physiol Pathol 2001;15(4):581-584

Ha DH, Yang HW, Lee JH, Lee KC. Effect of NMDA receptor antagonist on osteoblasts damaged by methymercuric chloride. Kor J Oriental Physiol Pathol 2003;17(2): 412-415

Hah DS, Kim CH, Kim GS, Kim EG, Kim JS. Antioxidative effects of traditional medicinal plants on lipid peroxidation, Kor J Ver Res 2005;45(3):341-350

Han DH, Kwon KB, Kim WK, Oh KS, Kim IG, et al. Effects of Sylso-san water extract on LDH activity in cultured myocardial cells. Kor J Oriental Med Physiol & Pathol 2001;15(5):770-774

Jung IJ. The effect of NMDA/glycin receptor antagonist, 7-chlorokynurenic acid on cultured astrocytes damaged by ischemia-like condition. Kor J Biomed Labor Sci 2009;15(4):355-362

Jung JY, Oh YH, Park SH, Yoon MY, Pyo AJ, et al. Antioxidative and whitening effects Houttuynia cordata extract on lead acetate of hair dye component. J Invest Cosm 2014;10(2):99-105

Kern M, Audesirk T, Audesirk G. Effects of inorganic lead on the differentiation and growth of cortical neurons in culture. Neurotoxical 1993;14:319-327

Kikuchi S, Kim SU. Glutamate neurotoxicity in mesencephalic dopaminergic neurons in culture. J Neurosci Res 1993;36:558-569

Kim SJ, Yu YW, Lee JK. Cytotoxicity and protective effect of *Portulaca oleracea L.* extract on cultured neuroglioma cells damaged by aluminum of dementia-induced agent. J Kor Soc Plants Environ 2013;16(5): 251-256

Kim TY, Jekal SJ. Antioxidative effect of Chelidonium majus extract on cultured NIH3T3 fibroblasts injured by cadmium chloride of toxicant. Kor J Clin Lab Sci 2016;48(1):1-7

Leonard S, Wang S, Zang L, Castranova V, Vallyathan V, et al. Role of molecular oxygen in the generation of hydroxyl and super- oxide anion radicals during enzymatic Cr (VI)- induced carcinogenesis. J Environ Pathol Toxicol Oncol 2000;19(1-2):49-60

Lim KT, Park ST, Cho MK, Chung YT. Neuronal cytotoxicity of oxygen radical in newborn mouse forebrain culture. Kor J Toxicol 1995;11(2):187-192

Liu Y, Hsieh WC, Yang BC. In vitro aberrant gene expression as the indicator of lead-induced neurotoxicity in U-373MG cells. Toxicol 2000;147(1):59-64

Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assays. J Immunol Methods 1983;65(1-2):55-63

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(1):37-46

Pellegrini-Giampietro DE, Cheriei G, Alesiani M, Carla V, Moroni F. Excitatory amino acid release and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. J Neurosci 1990;10:1035-1041

Son YW, Jung IJ. Alleviating effect of Elscholtziae splendense extract on the induced toxicity by lead actate of hair dye compound in cultured glioma cells. J Invest Cosm 2012;8(2):115-120

Tiffany CE, Garcia DE, Wu JN, Zmudzki J, Brattpn GR. Effects of lead on viability and intercellular metal content of C6 glioma cells. J Toxicol Environ Health 1988;23:267-279

Zeman S, Lloyd C, Meldrum B, Leigh PN. Excitatory amino acid, free radicals and the pathogenesis of motor neuron disease. Neuro Appl Neurobiol 1994;20:219-231