

五味子湯이 심근세포에 미치는 영향

최진영, 한명아, 최우정, 김동웅, 정대영, 신선호

원광대학교 전주한방병원 내과

Protective Effects of *Omija-tang* on H₂O₂-induced apoptotic death of H9c2 cardiomyoblast cells

Jin-Young Choi, Myoung-Ah Han, Woo-Jung Choi, Dong-Woung Kim, Dea-Young Jung, Sun-Ho Shin

Dept. of Internal Medicine
Wonkwang University Oriental Medicine Hospital, Chonju, Korea

The water extract of *Omija-tang*(OMJT) has been traditionally used for treatment of ischemic heart and brain damage in oriental medicine. However, little is known about the mechanism by which the water extract of OMJT protects cells from such damage. Therefore, this study was conducted to investigate the protective mechanisms of OMJT on H₂O₂-induced toxicity in H9c2 cardiomyoblast cells. Treatment of H₂O₂ markedly induced death of H9c2 cardiomyoblast cells in a dose-dependent manner. The characteristics of H₂O₂-induced death of H9c2 showed apparent apoptotic features, such as DNA fragmentation. However, OMJT significantly reduced both H₂O₂-induced cell death and chromatin fragmentation. The decrease of Bcl-XL expression by H₂O₂ was inhibited by OMJT. In addition, the increase of Bcl-XS and Bax expression were also inhibited by OMJT. In particular, Fas expression, which is generally recognized as cell death inducing signal by Fas/FasL interaction, was markedly increased by H₂O₂ in a time-dependent manner, whereas this increase was completely prevented by OMJT. The combined treatment of OMJT and H₂O₂ in H9c2 cells also reduced activation of caspase-9 and caspase-3 like protease.

Taken together, this study indicates that the protective effects of the water extract of OMJT against oxidative damage may be mediated by the modulation of Bcl-XL/S and Bax expression by way of the regulation of mitochondrial membrane potential and caspase cascades.

Key Words: cardiomyopathy, *Omija-tang*

I. 서론

五味子湯은 張의 景岳全書에 腎水枯涸 口燥舌乾에 사용한다고 수록되어 있으며, 人蔘, 五味子, 麥門冬으로 구성된 生脈散에 黃芪, 甘草를 가미한 처방이다.¹

益氣生津하는 효능으로 元氣와 津液이 손상되어 발생하는 저혈압, 심부전, 부정맥, 관상동맥질환 등의 심장질환에 응용되고 있는 生脈散에, 益氣固表하는 黃芪와 益氣補脾하는 甘草를 가미하여 심장 수축력을 강화시킨다.^{2,5}

최근 생활환경의 변화로 인해 증가추세에 있는 심혈관계 질환은 고혈압, 고지혈증, 동맥경화 등을 원인으로 심장에 허혈상태를 초래하며 심근세포에 손상을 일으키는 것으로 알려져 있다.⁶ 이때 관여하는 산화성 손상은 이러한 수많은 심혈관계 질환의 주 발

· 접수 : 2002년 4월 9일 · 채택 : 2002년 7월 31일
· 교신저자 : 최진영, 전북 전주시 덕진구 덕진동 2가 원광대학교 전주한방병원 심계내과
(Tel. 063-270-1013, Fax : 063-270-1199, E-mail : trueglory@hanamil.net)
· 본 논문은 원광대학교 교비 연구비지원에 의해 이루어짐

생 원인인자로 작용하고 있다.⁷ 특히 동맥경화, 대동맥협착증, 혈관질환 등은 일시적 혹은 지속적인 허혈을 야기시킬 수 있으며, 다시 약물이나 수술적인 요법 등에 의하여 재관류시에 심근세포에서 O₂⁻, H₂O₂, 그리고 OH⁻ 등의 활성산소종이 발생하여 심근세포의 손상을 초래한다.⁸⁻¹⁰

五味子湯에 대한 기존의 실험 및 임상논문은 없지만,五味子湯에서 黃耆와 甘草를 제외한 처방인 生脈散은 몇가지 실험논문이 보고되어 있는데, 生脈散의 실험적 연구로는 김의 혈압상승, 심박동수 저하 및 심근 수축력 증강, 이의 운동지속시간의 연장 및 심박수 저하, 신 등의 심근세포 손상의 완화에 대한 보고와 허 등의 대동맥 평활근세포에서 NO 생성에 미치는 영향에 대한 보고가 있다.¹¹⁻¹⁴

따라서 본 실험에서는 人蔘,五味子, 麥門冬으로 구성된 生脈散에 黃耆, 甘草를 가미한 처방인五味子湯의 물 추출액이 H9c2 심근세포에서 H₂O₂에 의해서 유도되는 세포독성을 줄일 수 있는지를 알아보고, 이때 세포고사에 관여하는 신호전달 분자인 caspase family 단백질 등을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용된 약재는 張의 景岳全書에 기재된 구성내용을 바탕으로 하여 원광대학교 익산한방병원에서 정선한 것으로서 한 첩 분량은 다음과 같다.

한약명	생약명	증량
한약명	생약명	증량
黃耆	Astragali Radix	3兩
人蔘	Ginseng Radix	2兩
五味子	Schizandrae Fructus	1兩
麥門冬	Ophiopogonis Radix	1兩
甘草	Glycyrrhizae Radix	5錢
	총량	75錢

2) 검액조제

五味子湯 1/3첩 분량인 100g을 물 1 l 와 함께 냉각기를 부착한 환저 플라스크에서 3시간 끓인 다음 거즈로 여과하고 3200rpm으로 20분간 원심분리 후 농축기(Rotary evaporater)로 농축한 다음 -70℃(Deep Freezer)에서 12시간 이상 동결시키고 Freeze Dryer로 동결건조시킨 후 20.0g의 시료를 얻어 세포에 투여하기 전 농도를 조정하여 사용하였다.

3) 시약 및 기기

실험에 필요한 Duplecco's modified Eagle's medium(DMEM), 항생제, trypsin 및 fetal bovine serum(FBS)은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며 배양용기(96-well plate, 10cm dish)는 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. MTT(methylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl, tetrazolium bromide), Hoechst 33342는 Sigma사(St. Louis, Missouri, USA)로부터 구입하여 사용하였다. Bcl2, Bax 등의 항체들은 모두 Santa Cruz사(San Diego, CA, USA)에서, anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase와 Enhanced chemiluminescence kit(ELC kit)는 Amersham사(Buckinghamshire, England)에서 구입하여 사용하였다. Genomic DNA 추출에 사용한 Wizard Genomic DNA purification kit는 Promega사(Medison, WI)에서 구입하였다.

2. 실험방법

1) H9c2 심근세포주 배양

Embryonic rat 심장에서 유래한 세포주인 H9c2(ATCC, CRL1446)는 CO₂ 세포배양기에서(37℃, 5% CO₂) 10% fetal bovine serum(FBS: PAA Laboratories, Austria)이 포함된 Duplecco's modified Eagle's medium(DMEM)에서 배양하였다. 48시간 주기로 0.05% Trypsine-EDTA를 사용하여 이차 배양하였으며, 분주 12시간 후에 약재를 처리하여 세포 죽음과 연관된 생화학적 실험을 수행하였다.

2) 세포생존율 측정

세포 활성도는 MTT assay를 이용하였다. 세포 배

양판(24-well plate)에 세포(1×10^2 세포수/ml)를 1ml/well씩 분주하여 12시간 이상 CO₂ 세포배양기 안에서 안정화시킨 후 실험에 필요한 각 조건의 시약 등을 처리한 다음, MTT 용액(5mg/ml in PBS)을 배양액 부피에 최종적으로 1/10 되도록 첨가하였다. 4시간 후 10% sodium-dodesyl sulfate(SDS)가 포함된 0.01N HCl 용액 100 μ l/well을 첨가하여 살아있는 세포에 의해 생성된 보라색 formazan을 용해시킨 다음 분광광도계(ELISA reader, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

3) DNA 추출 및 전기영동

DNA 분질현상을 조사하기 위한 genomic DNA 추출은 Wizard Genomic DNA purification kit를 이용하여 추출하였다. 먼저 五味子湯 등이 처리된 세포를 수확하여 nuclear lysis buffer(100mM NaCl₂, 40mM Tris-Cl, pH7.4, 20mM EDTA, 0.5% SDS)를 첨가하여 세포를 파쇄한 다음 RNase(Ribonuclease)를 37℃에서 5분 처리하여 RNA를 제거한 후 단백질 침전용 완충용액으로 단백질을 제거하고 isopropanol 침전에 의하여 응축된 DNA를 70% 에탄올에 세척한 후 진공 건조기로 건조하였다. 여기에 TE 완충용액(10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA, pH 8.0)을 가하여 DNA pellet을 용해한 후 260nm와 280nm의 파장에서 spectrophotometer(Beckman, Du-7 Model, Palo Alto, CA)하에서 흡광도를 측정하여 DNA를 정량하였다. DNA 5 μ g을 1.5% agarose gel에서 전기영동(50V, 2시간)을 실시한 후 ethidium bromide로 염색하여 UV등 아래에서 DNA 분질을 관찰하였다.

4) Hoechst staining

세포핵의 형태학적 변화를 알아보기 위하여 Hoechst 염색을 시행하였다. 먼저 五味子湯 등이 처리된 세포들을 4% 포르말데히드(formaldehyde) 용액에서 10분 고정시킨 후 생리식염수(PBS, pH 7.4)로 2회 세척하였다. Hoechst 33342 염색은 생리식염수에 10 μ M이 되도록 희석하여 1시간 염색한 후 다시 생리식염수로 세척하여 형광현미경(Leica MPS 60, Germany)으로 관찰하였다.

5) Caspase계 cystein protease 활성도 측정

五味子湯을 30분 전처리한 후 H₂O₂ 0.15mM을 처리하여 포집된 H9c2 세포(1×10^6)를 4℃에서 15분 lysis buffer(1% TritonX-100, 0.32M sucrose, 10mM Tris/HCl, pH 8.0, 5mM EDTA, 2mM dithiothreitol[DTT], 1mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin)로 용해하고 13,000rpm으로 15분 원심 분리하였다. 원심 분리하여 얻은 세포 파쇄액은 bicinchoninic acid(BCA, Sigma Co. MO, USA)법으로 단백질을 정량하고, 세포파쇄액을 분석 완충용액(100mM HEPES, pH 7.5, 10% sucrose, 0.1% Chaps, 2mM DTT, 1mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin, 1 μ g/ml leupeptin)에 희석된 형광기질과 37℃에서 30분 반응시킨 후 Fluorometer(Molecular Devices Co. USA)로 측정하였다.

먼저 caspase-3 protease의 효소활성 측정은 형광기질인 Ac-DEVD-7-amino-4-methylcoumarin(AMC) (Calbiochem Co. CA, USA) 50 μ M을 이용하였고, 이들 형광기질의 proteolytic cleavage를 측정하여 caspase 활성을 결정하였다. 이때의 파장은 excitation wavelength (380nm)와 emission wavelength(460nm)를 사용하였다. Caspase-9 protease 효소적 활성은 Ac-LEHD-AFC(Calbiochem) 50 μ M을 기질로 사용하여 이들의 proteolytic cleavage를 400nm(excitation wavelength)와 505nm(emission wavelength)의 파장에서 측정하였다.

6) Western blot analysis

배양된 H9c2 세포에 五味子湯 등을 처리 후 세포를 포집하여 차가운 Hank's balanced salt 용액(HBSS)으로 2회 세척하였다. 얻어진 세포는 세포 파쇄용액(50mM HEPES pH 7.4, 150mM NaCl, 1% deoxycholate, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 1 μ g/ml aprotinin)과 4℃에서 30분 처리하였다. 13,000rpm에서 20분 원심 분리하여 얻은 세포 파쇄액은 BCA 용액을 이용하여 단백질을 정량하였다. 동량의 세포파쇄액(단백질: 200 μ g)은 2 \times sample buffer와 섞어 100℃에서 5분 끓인 후에 12.5% SDS-PAGE를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질은 semi-dry 방법으로 실온에서 단위 면적당 0.8mA 전하를 2시간 걸어주어

nitrocellulose membrane상에 이동시켰다. nitrocellulose membrane은 blocking buffer(5% skim milk)와 상온에서 1시간 반응시켜 비특이적 항체결합을 억제시켰다. Bcl-XL/S, Bax, PARP, Fas 그리고 ICAD/DFF45에 대한 항체는 0.01%(v/v)의 Tween-20이 포함된 3% skim milk/TBS에 1:1000으로 희석하여 상온에서 3시간 반응 후 이차항체 anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase와 1시간 반응시켰다. nitrocellulose membrane은 TBS로 3회 세척 후 ECL kit를 사용하여 ECL 필름에 노출시켰다.

7) 통계처리

실험결과와 통계처리는 student's t-test에 준하여 처리하였으며, p-value가 최대치 0.05(p<0.05) 이하인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

III. 실험결과

1. H₂O₂에 의한 H9c2 심근세포주의 세포생존율의 변화
H₂O₂의 심근세포에 대한 독성을 알아보기 위하여 다양한 농도의 H₂O₂를 처리하여 세포생존율의 변화를 MTT 방법으로 측정하였다. 0.05mM 저농도에서 약 73%이상의 세포생존율을 나타내었고, 0.1mM 농도에서는 31%로 유의성 있는 세포생존율 감소를 나타내었으며, 0.2mM의 농도에서는 25%로 급격한 세포생존율 감소를 나타내었다(Fig. 1A). 또한 H₂O₂의 시간 의존적인 세포독성을 확인하기 위하여 약 70%의 세포생존율 감소를 나타낸 0.15mM 농도의 H₂O₂를 다양한 시간별로 처리하여 측정하였다. 4시간 후 부터 약 88.24±7.1%로 세포생존율이 감소하기 시작하였고, 6시간 이후에는 59.39±4.5%로 급격한 세포생존율 감소가 관찰되었으며, 12시간 이후에는 세포생존율이 29.23±3.0%를 나타내어 유의성 있는 세포생존율 감소를 나타내었다(Fig. 1B).

2. H₂O₂에 의한 H9c2 세포죽음에서五味子湯이 세포생존율에 미치는 영향

H₂O₂에 의해 유발된 심근세포의 세포죽음에서五味子湯이 미치는 세포생존율의 변화를 알아보기 위

하여 다양한 농도의 한약재를 30분 전처리한 후 H₂O₂(0.15mM)를 처리하여 세포죽음이 방지되는지를 MTT 방법으로 측정하였다.

五味子湯 0.075mg/ml의 농도에서는 H9c2 심근세포가 35%의 생존율을 보였으며, 0.15mg/ml의 농도에서는 46% 그리고 0.3mg/ml에서는 54%의 생존율을 각각 보였다. 그리고 0.6mg/ml의五味子湯을 처리하였을 경우에는 58%의 생존율을 나타내어 약 20% 이상의 생존율 증가를 보이기 시작하였고, 1.2mg/ml에서는 63%의 생존율을 나타내어 유의성 있는 생존율 증가를 나타내었다(Fig. 2).

3.五味子湯의 H₂O₂에 의한 DNA 분절에 대한 효과
H₂O₂에 의해 일어나는 H9c2 심근세포의 세포고사 과정에서 전형적으로 나타나는 DNA 분절현상을 관

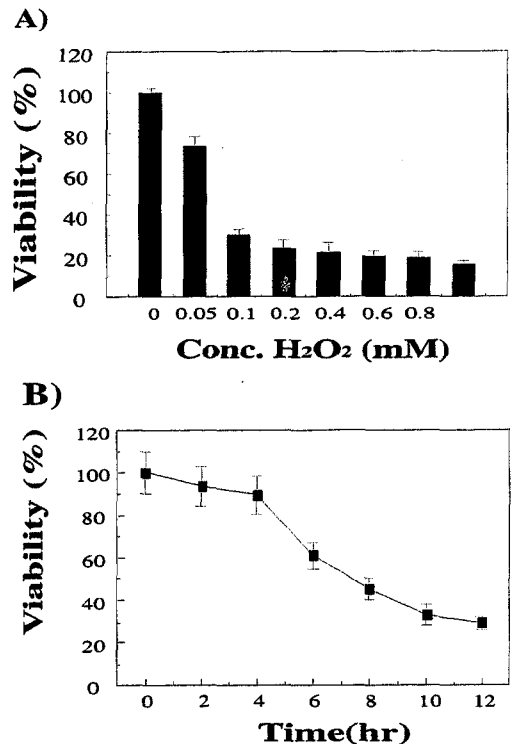


Fig. 1 Effects of hydrogen peroxide(H₂O₂) on the viability of H9c2 cells in a dose dependent manner. Cell viability was measured by MTT assay as described in Materials and Methods. Results were expressed as mean ±S.D. of quadruplicates.

찰하고 이러한 세포고사 현상에 五味子湯이 미치는 영향을 알아보기 위하여 agarose gel electrophoresis법을 이용한 사다리형 DNA 분절 및 Hoechst staining에 의한 nucleus의 염색을 시행하였다(Fig. 3, Fig. 4). 먼저 DNA 분절현상을 관찰하기 위하여 五味子湯을 0.6mg/ml, 1.2mg/ml의 농도로 30분 전처리한 후 H₂O₂(0.15mM)를 처리하여 DNA를 추출한 다음, 1.8% agarose gel에 전기영동하여 ethidium bromide 염색을 통하여 조사한 결과, H₂O₂ 단독처리에 의해 초래되었던 DNA 분절현상이 五味子湯 전처리에 의해 농도 의존적으로 사라지는 것을 확인하였다(Fig.

3). 또한 Hoechst staining에 의한 세포의 형광 현미경 하에서의 관찰에서도 H₂O₂에 의해 나타났던 DNA 분절(Fig. 4B)이 점차 사라져 대조군 수준으로 회복되는 것을 확인하였다(Fig. 4C).

4. 五味子湯의 Fas 단백질 발현에 대한 효과

H₂O₂(0.15mM)에 대한 세포죽음에서 五味子湯 처리시 세포고사에 관여하는 수용체 막단백질인 Fas의 발현변화를 알아보기 위하여 western blot을 시행하였다. H9c2에 0.6mg/ml과 1.2mg/ml의 五味子湯을 30분 전처리한 후 0.15mM의 H₂O₂를 6시간 처리하였다. H₂O₂ 단독 처리시 발현이 증가하였던 Fas 단백질이 五味子湯 처리에 의해 세포생존을 회복과 함께 대조군 수준으로 발현 감소를 나타내었다(Fig. 5).

5. H₂O₂에 의한 H9c2 심근세포죽음에서 caspase-9과 caspase-3 like protease의 활성에 미치는 영향

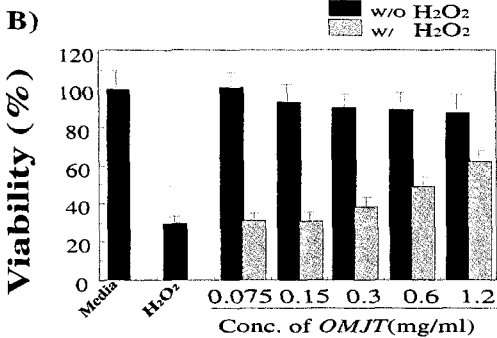


Fig. 2 Effects of Omija-Tang extract on the viability of hydrogen peroxide induced-cell death in H9c2 cells in a dose dependent manner. Cell viability was measured by MTT assay as described in Materials and Methods. Results were expressed as mean ± S.D. of quadruplicates.

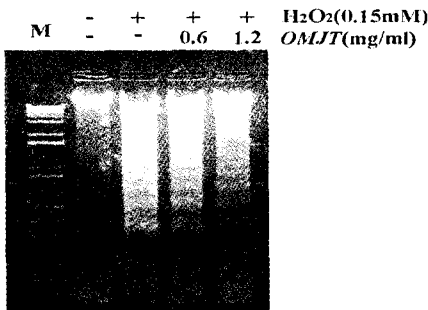


Fig. 3 Agarose gel electrophoresis showed ladder pattern of DNA fragmentation. Genomic DNA was extracted and separated on 1.8% agarose gel with size maker (M). The DNA was stained with ethidium bromide and visualized under UV light.

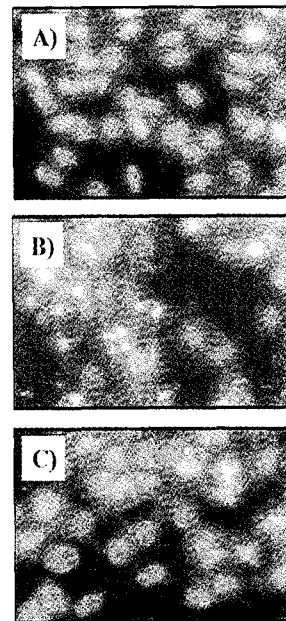


Fig. 4 Hoechst staining showed DNA fragmentation by H₂O₂ in H9c2 cardiac myoblasts. Nuclear morphology was analyzed by Hoechst 33342 dye staining under fluorescence microscopy. A) control B) H₂O₂ only and C) with OMJT 0.6mg/ml

H₂O₂에 의한 H9c2 심근세포죽음에서 Fas 단백질의 발현을 증가시켰기 때문에 Fas 수용체의 하부에 있는 caspase-9 protease의 활성 변화와 하부 단백질인 caspase-3 protease의 활성변화를 조사하였다. H9c2 세포주에 0.15mM의 H₂O₂를 다양한 시간 처리한 후 세포질 내 효소 활성을 형광기질을 이용하여 측정하였다. Fas DISC 복합체의 하나인 FADD와 결합하는 caspase-8 protease의 활성에는 변화가 없었으나(data not shown), H₂O₂ 처리 2시간 후에 caspase-9 protease는 최고활성을 보였으며(Fig. 6A), 활성화된 caspase-9의 하부단체인 caspase-3 protease는 H₂O₂ 처리 4시간 후부터 활성이 증가하여 6시간 이후에 최고의 활성을 나타내었다(Fig. 6B).

6. 五味子湯의 caspase-9 protease 활성에 대한 영향

Fig. 6A에서 활성화된 caspase-9 protease에 활성에 대한 五味子湯의 영향을 알아보기 위하여 형광기질을 사용하여 활성변화를 측정하였다. 0.6, 1.2mg/ml의 五味子湯을 30분 전처리한 후 0.15mM의 H₂O₂ 처리 2시간 후에 세포를 포집, 분쇄한 세포 파쇄액에서 단백질 농도를 정량한 후 세포질내의 caspase-9 protease의 활성을 형광기질을 이용하여 기질의 분해정도를 Fluorospectrometer로 측정하였다. Fig. 7에서와 같이 대조군에 비하여 최고 11.2배 증가하였던 caspase-9의 활성이 0.6mg/ml의 五味子湯 처리시 4.5배, 1.2mg/ml 처리시 2.3배로 현저히 감소하였다(Fig. 7).

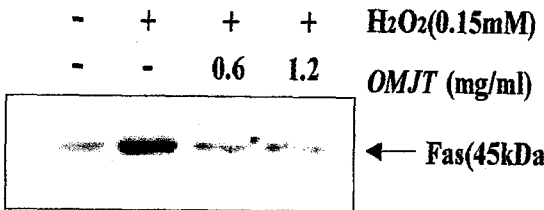


Fig. 5 Protective effect of OMJT on induced the expression Fas protein in H₂O₂-treated H9c2 cells. Cells were treated with 0.15mM H₂O₂. Cell lysates were prepared and analyzed by western blotting with anti-Fas antibodies.

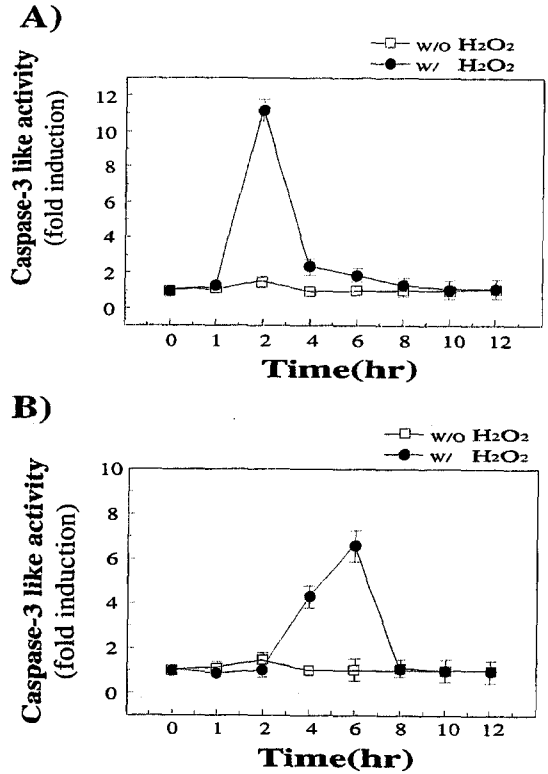


Fig. 6 H₂O₂-induced the catalytic activation of caspase-9 protease and caspase-3 like protease in H9c2 cells. Cells were treated with 0.15mM H₂O₂. The data represents the means ± S.D. of three independent experiments.

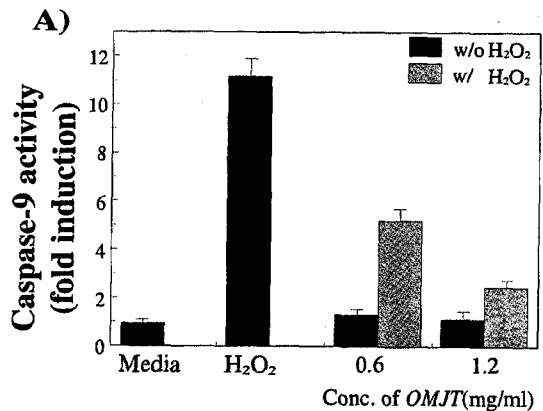


Fig. 7 Protective effect of OMJT on caspase-9 protease activation in H₂O₂-treated H9c2 cells. Cells were treated with 0.15mM H₂O₂. The data represents the means ± S.D. of three independent experiments.

7. 五味子湯의 caspase-3 like protease의 활성과 PARP 및 ICAD/DFF45 단백질에 대한 영향

Fig. 6B에서 활성화된 caspase-3 like protease의 활성에 대한 五味子湯의 영향을 알아보기 위하여 형광기질을 사용하여 활성변화를 측정하였다. 0.6, 1.2mg/ml의 五味子湯을 30분 전처리한 후 0.15mM의 H₂O₂ 처리 6시간 후에 세포를 포집, 분쇄한 세포 파쇄액에서 단백질 농도를 정량한 후 세포질내의 caspase-3 like protease의 활성을 형광기질을 이용하여 기질의 분해정도를 Fluorospectrometer로 측정하였다. Fig. 8A에서와 같이 대조군에 비하여 최고 6.3

배 증가하였던 caspase-3의 활성이 0.6mg/ml의 五味子湯 처리시 4.2배, 1.2mg/ml 처리시 1.5배로 현저히 감소하였다(Fig. 8A). 또한 caspase-3 protease의 세포내 기질 단백질인 PARP의 분절이 관찰되었고(Fig. 8B), H₂O₂ 처리에 의하여 분해되었던 DNA 분절을 억제하는 ICAD/DFF45 단백질이 五味子湯 전처리에 의해 농도 의존적으로 회복되었다(Fig. 8C).

IV. 고찰

심혈관계 질환은 전세계적으로 자연사망의 주요 원인이며, 이때 산화성 손상은 이러한 수많은 심혈관계 질환의 주요 발생 원인인자로 작용하고 있다.^{6,7} 동맥경화, 대동맥협착증, 혈관질환 등은 일시적 또는 지속적인 허혈을 야기시킬 수 있으며, 다시 약물이나 수술적인 요법 등에 의하여 재관류시에 심근세포에서 O₂, H₂O₂, 그리고 OH⁻ 등의 활성산소종이 발생한다.^{10,12,15-17} neutrophils, xanthine oxidase, mitochondrial respiration 등의 다양한 대사과정을 통하여 생성된 활성산소종은 비록 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 등의 세포내 생리적 방어체계가 작동하지만, 이러한 방어체계의 능력을 초과하여 세포손상을 초래하게 된다.¹⁸⁻²³

최근 이러한 심근세포의 산화적 손상에 대한 한약재의 방어효과에 관한 연구로는 한²⁴의 失笑散 煎湯液이 배양 심근세포에 미치는 영향, 이²⁵의 炙甘草湯이 배양 심근세포에 미치는 영향 등이 있다. 그러나 아직까지 五味子湯이 심근세포의 허혈상태에서 야기되는 H₂O₂에 의한 산화적 손상에 미치는 五味子湯의 영향은 보고되지 않았다.

五味子湯은 景岳全書에서 腎水枯涸 口燥舌乾에 사용한다고 하였으나, 심장질환에 많이 응용되고 있는 生脈散 제제에, 심장수축력의 강화와 관련이 있다고 보고된 黃耆와 養心작용이 있는 甘草가 가미되어진 처방이다.^{1,2,3,5,26}

본방을 구성하는 人蔘은 甘溫, 無毒하고 補脾益氣, 生津의 효능이 있고, 麥門冬은 甘苦寒하고 滋陰生津의 효능이 있으며, 五味子は 酸溫하고 生津斂汗의 효

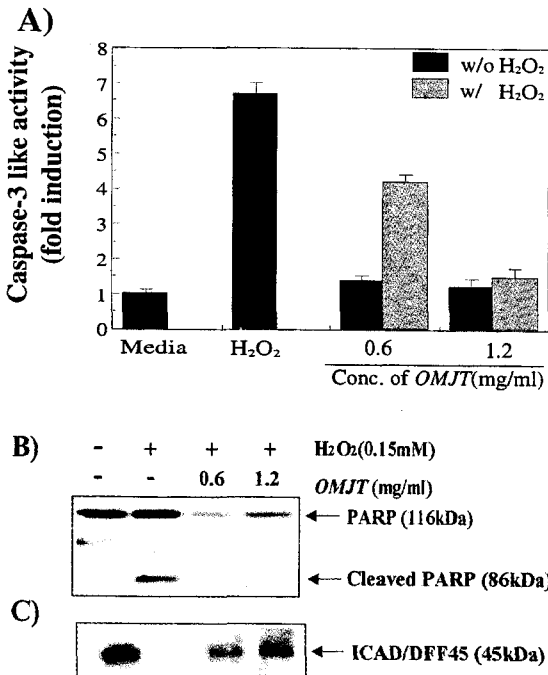


Fig. 8 Protective effects of OMJT on the activation of caspase-3 like protease, PARP Behl C, Davis JB, Killer FG, Schubert D : Amyloid beta peptide induces necrosis rather than apoptosis. Brain Res, 645:253-264, 1994. cleavage and ICAD/DFF45 degradation in H₂O₂-treated H9c2 cells. Cells were treated with 0.15mM H₂O₂. The data represents the means ± S.D. of three independent experiments. A) caspase-3 like protease activity B) The expression of PARP was measured by Western blotting with anti- PARP antibody C) The expression of ICAD/DFF45 was measured by Western blotting with anti- ICAD/DFF45 antibody

능이 있고, 黃耆는 甘溫하고 益氣固表하므로 氣虛衰弱症에 人蔘과 배합하여 補氣作用을 강하게 하여 心氣不足에 사용하고, 甘草는 甘溫하여 補脾益氣 또는 通心陽 작용이 있는 약물과 배합하여 心動悸에 사용한다.^{4,26,28}

人蔘의 약리작용으로 chloroform-adrenaline에 의해 생긴 부정맥을 경감시키고 강심작용이 있다고 했으며, 麥門冬은 관상동맥 혈류와 심근의 수축력을 증가시킨다고 하였다.^{29,31} 五味子는 혈압하강작용과 심근 수축 증가작용이 있다고 하였다.^{30,31} 黃耆는 利尿, 降壓, 심장수축력의 강화작용이 보고되었고, 甘草는 부신피질호르몬양작용과 항염증작용, 혈압하강작용 등이 보고되었다.^{5,29,31}

본 실험에서는 五味子湯이 심근배양세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 생쥐의 심장에서 분리하여 배양한 H9c2 심근세포주에 H₂O₂를 처리하여 세포죽음을 유도하였고 이때 세포생존율의 변화, DNA 분절, 세포고사 신호전달 단백질인 Caspase 등의 활성화에 미치는 五味子湯의 효과와 그 작용 기전을 알아보았다.

H9c2 심근세포에 직접적으로 산화적 손상을 일으킬 수 있는 H₂O₂를 다양한 농도별로 처리하여 세포 생존율을 측정 한 결과, H₂O₂ 0.05mM의 저농도에서는 약 23%의 세포생존율의 감소를 나타내었으며, 0.1mM 이상의 고농도에서는 약 70% 이상의 세포생존율 감소를 나타내었다. 또한 H₂O₂에 의해 유발된 심근세포죽음에서 五味子湯의 방어효과를 알아보기 위하여 약 30%의 세포생존율을 나타내는 농도 0.15mM의 H₂O₂를 실험조건으로 결정하여 다양한 농도의 五味子湯을 전처리하여 심근세포 죽음이 방지되는 지를 측정 한 결과 0.3mg/ml 농도의 五味子湯 처리시 약 15%정도의 세포생존율 회복이 관찰되어 0.6mg/ml, 1.2mg/ml에서 각각 58%, 63%로 현저한 세포생존율의 회복을 보여 H₂O₂에 의한 산화적 손상에 대해서 五味子湯의 방어효과를 확인할 수 있었다.

Neil 등³²은 산화적 손상이 Menadione 이나 H₂O₂에 의한 H9c2 심근세포의 DNA 분절과 Caspase의 활성을 통한 세포고사임을 보고하였는데, 본 실험에서도

세포고사의 전형적인 DNA의 분절을 전기영동과 Hoechst 염색을 통하여 관찰한 결과, H₂O₂에 의한 H9c2 심근세포의 손상이 세포고사에 의함을 확인하였다(Fig.3-4).³²

종양 괴사 인자 수용체(Tumor necrosis factor receptor)군의 하나로서 세포막에 위치하면서 세포의 자극을 받아 세포고사 신호를 전달한다고 알려진 Fas 단백질의 발현이 H₂O₂처리에 의해 증가하였으나 五味子湯의 전처리에 의해 농도 의존적으로 발현이 감소되는 것을 확인하였다(Fig. 5).^{33,34} 특히 세포막에 존재하는 Fas 수용체는 Fas ligand나 길항작용을 하는 Fas 항체(agonistic antibody)에 의해 삼중화되면서 활성화되고, 세포질내 특정 부위에 FADD라는 단백질이 결합되어 복합체를 형성하고 caspase-8 등의 활성을 통하여 세포고사에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.^{35,36} 본 연구결과에서 H₂O₂ 0.15mM을 시간별로 처리하였을 경우 caspase-8 protease의 활성변화는 관찰할 수 없었으나 그 하위 단계인 caspase-9 protease의 활성이 처리 2시간 후에 최대를 나타내었으며, caspase-3 like protease는 그보다 늦은 시간인 처리 6시간 후에 활성화됨을 알 수 있었다(Fig. 6). 이러한 caspase-9, -3 protease의 활성은 五味子湯 전처리에 의해 각각의 활성이 대조군 수준으로 감소되었으며(Fig.7, 8), 특히 caspase-3 protease의 세포내 기질 단백질인 PARP 단백질과 ICAD/DF45 단백질의 절단을 감소시켜 caspase-3 protease의 활성 억제에 기여하였다(Fig. 8B, C).

이상의 연구결과를 종합하면 0.15mM의 H₂O₂에 의해 유도된 H9c2 심근세포의 세포죽음은 사다리형 DNA 분절과 Bcl-XL의 발현 감소, Fas, Bcl-XS 및 Bax의 발현 증가, caspase-9과 caspase-3 like protease의 활성화를 보이는 전형적인 세포고사성 죽음이었으며, 이에 대한 보호효과를 보이는 五味子湯은 DNA 분절 및 세포고사성 단백질의 발현조절, caspase-9과 caspase-3 like protease의 활성 억제를 통하여 H₂O₂에 의한 H9c2 심근세포의 산화적 손상에 방어효과를 나타낸 것으로 사료된다.

V. 결론

허혈상태에서 야기되는 H₂O₂에 의한 산화적 손상에 대한五味子湯의 보호 효과를 규명하기 위하여 심근세포주인 H9c2의 세포죽음을 통하여 세포생존을 변화, DNA 분절, Hoechst staining, Fas, PARP, ICAD/DFF45, caspase family 단백질의 활성화를 조사, 분석한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1.五味子湯은 0.3mg/ml 이상의 농도에서 농도의존적으로 유의성 있게 세포생존율을 회복시켰다.

2.五味子湯은 H₂O₂에 의한 DNA의 분절과 chromatin의 응축현상을 유의성 있게 억제시켰다.

3.五味子湯은 H₂O₂에 의해 활성이 증가된 caspase-9 protease의 활성을 농도의존적으로 유의성 있게 억제시켰다.

4.五味子湯은 H₂O₂에 의해 활성이 증가된 caspase-3 like protease의 활성을 농도 의존적으로 억제시켰으며, caspase-3 protease의 세포내 기질 단백질인 PARP의 분절과 ICAD/DFF45 단백질의 분해를 유의성 있게 억제시켰다.

이상의 결과로 보아五味子湯은 허혈상태에서 야기되는 심근세포의 산화적 손상에서 DNA 분절과 caspase family 단백질의 활성조절을 통하여 방어효과를 나타내므로 허혈성 심장질환 등의 심혈관계 질환에 유효하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 張介賓. 景岳全書(下). 서울: 大星文化社;1992, 476.
2. 李鐘朴. 現代中醫生理學基礎. 서울: 醫聖堂;1993, 97.
3. 彭懷仁. 中醫方劑大辭典(第三冊). 北京: 人民衛生出版社;1994, 578-581.
4. 辛民教. 本草學. 서울: 永林社;1994, 166-167, 169-171, 175-177, 232-233, 241-242.
5. 張伯叟. 中醫內科學. 北京: 人民衛生出版社;1993, 115, 207, 207-216.

6. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:7915-22.
7. Apostolova MD, Ivanova IA, Cherian MG. Metallothionein and apoptosis during differentiation of myoblasts to myotubes protection against free radical toxicity. Toxicol Appl Pharmacol 1999;159(3):175-84.
8. Bromme HJ, Holtz J. Apoptosis in the heart:when and why?. Mol Cell Biochem 1996; 163-164:261-275.
9. Chen QM, Tu VC, Wu Y, Bahl JJ. Hydrogen peroxide dose dependent induction of cell death or hypertrophy in cardiomyocytes. Arch Biochem Biophys 2000;373(1):242-8.
10. Halliwell B and Gutteridge JMC. Oxygen is poisonous-an introduction oxygen toxicity and free radicals. In free radicals in biology and medicine. 2nd Edition. Clarendon Press: Oxford; 1989, 1-7, 22-31.
11. 金世吉. 生脈散이 白鼠의 심혈관계에 미치는 영향. 圓光大學校大學院 博士學位論文, 1986.
12. 이용세. 生脈散이 스포츠 음료로서 운동수행 능력과 혈액학적 변화에 미치는 영향. 慶熙大學校大學院 碩士學位論文, 1997.
13. 申善濤. 산소분압에 의한 심근세포변화에 미치는 生脈散의 효과. 대한한의학회지 1998; 19(2):100-111.
14. 許胤. 生脈散이 대동맥 평활근 세포에서 NO 생성에 미치는 영향. 동의생리학회지 2001;15(5):775-82.
15. Flitter WD. Free radicals and myocardial reperfusion injury. Br Med Bull 1993; 9:545-55.
16. Kloner RA, Przyklen K, Whittaker P. Deleterious effects of oxygen radicals in ischemia/reperfusion. Resolved and unresolved issues. Circulation 1989;80:1115-27.
17. MacLellan WR, Schneider MD. Death by design. Programmed cell death in cardiovascular biology and disease. Cir Res 1997;81:137-44.
18. Chen WC, Chen CC. Signal transduction of arginine vasopressin-induced arachidonic acid release in H9c2 cardiac myoblasts: role of Ca²⁺ and the protein kinase

- C-dependent activation of p42 mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology* 1999;140(4):1639-48.
19. Choi DW, Maulucci-Gedde MA, Kriegstein AR. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci* 1987;7:357-68.
 20. Choi DW, Koh JY. Zinc and brain injury. *Annu Rev Neurosci* 1998;21:347-375.
 21. Derick Han, Chandan K Sen, Sashiwati Roy. Protection against glutamate-induced cytotoxicity in the C6 glial cells by thiols antioxidants. *Am J physiol* 1997;273:1771-8.
 22. Kato S, K Negishi, K Mawatari, CH Kuo. A mechanism for glutamate toxicity in the C6 glioma cells involving inhibition of cystine uptake leading to glutathion depletion. *J Neurosci* 1992;48:903-14.
 23. Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol* 1993;23:21-48.
 24. 韓東勳. 失笑散 煎湯液이 배양 심근세포에 미치는 영향 원광대학교대학원 1999.
 25. 李來春. 炙甘草湯이 배양 심근세포에 미치는 영향. 동의생리학회지 1999;14(2):179-87.
 26. 康舜洙. 本草學 서울: 永林社; 1991, 331-3, 531-6, 540-1, 588-9, 622-3.
 27. 鄒澍. 本草疏證. 上海: 上海科學技術出版社; 1991, 15-21, 41-3, 73-8.
 28. 李時珍. 本草綱目. 北京: 人民衛生出版社; 1995, 699-710, 1033-5, 1238-40.
 29. 金炯均 編譯. 韓藥의 藥理. 서울: 고려의학; 2000, 29-32, 62-3, 100.
 30. 김창민 외. 완역. 中약대사전. 서울: 도서출판 정담; 1998, 88-103, 1648-57, 3958-68, 4477-98, 6460-71.
 31. 康秉秀. 配合本草學. 서울: 永林社; 1996, 94-7, 108-12, 112-6, 173-5, 676-9.
 32. Neil A. Turner, Fen Xia, Gohar Azhar, Xiaomin Zhang, Lixin Liu and Jeanne Y. Wei. Oxidative Stress Induces DNA Fragmentation and Caspase Activation Via the c-Jun NH2-terminal Kinase Pathway in H9c2 Cardiac Muscle Cells. *J Mol Cell Cardiol* 1998;30:1789-801.
 33. Kasibhatla S, Genestier L, Green R. Regulation of FasLigand expression during activation-induced cell death in T-lymphocytes via nuclear factor. *B J Biol, Vhem* 1999; 274:987-92.
 34. Klaus SO, Davide F. Apoptosis signal by death receptors. *Eur J Biochem* 1998;254:439-59.
 35. Robaye B, Mosselmans R, Fiers W, Dumont JE, Galand P. Tumor necrosis factor induces apoptosis in normal endothelial cells in vitro. *Am J Pathol* 1991;138:447-53.
 36. Trauth, B C, Klas C, Peters A M J, Matzuku S, Moller P, Falk W, Debatin K M, and Krammer P H. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science* 1989;245:301-5.
 37. Baeuerle PA, Henkel T. Function and Activation of NF- κ B in the immune system. *Ann, Rev immunol* 1994;12:141-79.
 38. Behl C, Davis JB, Killer FG, Schubert D. Amyloid beta peptide induces necrosis rather than apoptosis. *Brain Res* 1994;645:253-64.
 39. Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol (Today)*. 1993;14:126-30.