하수오가 Xanthine Oxidase와 Hypoxanthine에 의해 손상된 혈관내피세포에 미치는 영향에 관한 연구

이용석 · 김형수 · 손영우 · 유교상 · 이정헌 · 이강창[1] · 최규철[2] · 신홍철 · 박승택*

원광대학교 의과대학, 1 : 한의학 전문대학원, 2 : 원광보건대학

Effect of Radix Polygoni Multiflori on Cultured Vascular Endotherial Cells Damaged by Xanthine Oxidase and Hypoxanthine

Yong Suk Lee, Hyeong Su Kim, Young Woo Son, Kyo Sang Yoo, Jung Hun Lee, Kang Chang Lee[1], Kyu Chul Choi[2], Hong Chul Shin, Seung Taeck Park*

Department of Medicine, 1 : Graduate School of Oriental Medicine, 2 : Wonkwang Heath Science college, Iksan, Korea,

To clarify the vasculotoxicity of reactive oxygen intermediate(ROI) in cultured vascular endotherial cells(VEC), of mouse, cytototoxicity was measured by MTS assay after VEC was incubated to 10~80mU/ml xanthine oxidase(XO) and hypoxanthine(HX) for 2 hours. and also, the protective effect of Radix Polygoni Multiflori(RPM) was determined by MTT assay in these cultrures. Cell viability was positively decreased dose-, and time-dependently, after the treatment with 40mU/ml XO/0.1mM HX to cultured VEC for 2 hours. In the vasculoprotective effect of RPM on the toxicity induced by XO/HX, RPM prevented the XO/HX-induced cytotoxicity in these cultures. From above the results, it suggests that XO/HX is toxic in cultured VEC and herb extract, RPM has protective effect against the vasculotoxicity induced by XO/HX.

Key words : xanthine oxidase, vascular endotherial cells, Radix Polygoni Multiflori

서 론

뇌조직에 있어 혈관내피세포는 혈관-뇌장벽(blood-brain barrier)을 형성함으로서 독성물질로부터 뇌조직을 보호할 뿐만 아니라 동시에, 고혈압이나 동맥경화증의 유발에도 매우 중요한 역할을 한다[1,7]. 혈관내막의 손상은 내피세포의 기능이상을 초래하게 되며 그 결과 혈관이완인자와 수축인자간의 불균형의 초래를 비롯하여 성장촉진인자와 성장억제인자간의 불균형등을 보이게 된다[2,6]. 병적상태에서는 혈관내피세가 활성화되어 항혈전성의 소실과 백혈구와의 친화력이 강해지면서 백혈구의 부착을 유도하는 물질인 E-selectin이나 vascular adhesion molecule (VCAM)이 tumor necrosis factor-α(TNF-α)나 interleukin-1 (IL-1)의 자극에 의하여 형성됨으로서 내피세포의 기능이상을 초래하게 됨은 이미 잘 알려진 사실이다[3,10]. 혈관내피세포는 정상 내피세포에서는 nitric oxide(NO)나 postacyclin과 같은강력한혈관 확장물질을 생성하며 또한 Tumor necrosis factor(TNF)-α나 Interleukin(IL)-1같은 물질의 자극에 의하여 혈관벽에 백혈구의 부착을 유도하는 물질인 vascular adhesion molecule(VCAM)이나 E-selectin등을 분비함으로써 내피세포의 기능이상을 초래하게 됨은 이미 잘 알려진 사실이다[4,15]. 동맥경화증의 발생에 내피세포의 손상이 중요한 역할을 한다는 것이 강력히 제시되어 왔다. 즉, 내피세포의 손상은 혈관내막의 비후를 유발하는데 이는 곧 동맥경화증에서 내피세포의 기능이상을 나타냄을 알 수 있다[5,11]. 이러한 내피세포의 기능이상의 병리적 요인으로는 NO의 합성과 방출의 저하를 비롯하여 높은 활성산소량, 기저막의 비후 및 NO의 비활성화 과정의 항진등이 밝혀져 있다[8,16]. 이중 활성산소에 의한 산화적 손상은 reactive oxygen 중간대사물의 생산과 이에 대응된 NF-kB와 같은 전사인자의 발현이나 PKC와 같은 이차신호전달물질의 과활성으로 인하여 내피세포의 손상을 초래한다고 한다[9]. 따라서 활성산소에 의한 산화적 손상의 방어적 측면에서 항산화제나 활성산소의 제거제등의 사용은 활성산소의 산화적 손상으로 인한 내피세포의 기능저하를 회복 내지는 방어할 수 있어 이들의 측면에서 많은 연구가 시도되고 있다. 활성산소

* 교신저자 : 박승택, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 의과대학
E-mail : stpark@wonkwang.ac.kr Tel : 063-850-6759

· 접수: 2002/06/03 · 수정: 2001/07/11 · 채택 : 2002/08/02

는 당뇨를 비롯한 뇌졸중이나 치매와같은 질환의 병인적 요소로 이미 밝혀진 바 있는데 이는 NO와 반응함으로서 peroxynitrate라는 독성이 강한 물질을 생성하여 세포의 퇴화와 사멸을 가속화시킴으로서 병변의 진행을 촉진시킨다. 산소라디칼과 glutamate와 같은 흥분성아미노산과의 연구에서 활성산소는 흥분성 아미노산의 분비를 유도하여 세포내 칼슘유입의 증가와 Na^+Ca^{2+} 간의 평행을 깨뜨림으로서 세포손상을 유발케 한다고 한다. 따라서 산소라디칼에 의한 산화적 손상은 항산화제나 산소라디칼제거제, 또는 칼슘 차단제 및 glutamic acid 수용체의 길항제와 같은 약재를 사용함으로서 병변의 치료적 접근을 시도하고 있다. 근래에 세포배양기법이 널리 보급됨에 따라 이를 이용한 시험관내에서의 병변모델의 제작에 의한 병인의 기전규명에 널리 적용하고 있으며 ,더욱 시험관내 새로운 분석방법과 최첨단 분석장비의 개발로 정확한 정량이나 정성분석이 가능하게 되었다[12]. 따라서 이같은 배양기술과 분석방법에 의하여 한약추출물이나 천연추출물의 효능이나 약리적 활성에 대한 정량분석이 가능케 되어 이들은 시험관내 중요한 분석기구로 자리잡고 있다[14,15].

본 연구는 활성산소의 산화적 손상이 혈관세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 배양 혈관내피세포에 xanthine oxidase (XO)와 hypoxanthine(HX)을 처리한 후 혈관독성효과를 조사하였으며 또한 XO/HX에 의한 산화적 손상에 대하여 한약추출물인 하수오(Radix Polygoni Multiflori, RPM)의 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재료

원광대학교 의과대학 동물사육실에서 분리 사육중인 건강상태가 양호한 생후 3일된 ICR 계통의 생쥐를 사용하였으며, 실험에 사용할 Xanthine oxydase나 hypoxanthine(HX)(Sigma)은 각각 100mU/ml, 10mU/ml, 및 1M, 100mM, 10mM등의 저장액을 만들어 냉암소에 저장한 다음 실험 당일 최종 농도로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다.

2. 방법

1) 세포배양

Michikawa등[10]의 방법에 따라 혈관내피세포를 효소해리 분리법에 의하여 폐동맥으로부터 순수 분리하였다. 분리된 혈관내피세포는 혈청이 포함된 배양액에 1 x 10^4cells/well의 밀도로 산정하여 96-multiwell에 넣어 분주하였다. 분주 된 세포는 CO_2 정온기에서 7일 동안 배양하였으며 배양액은 3일마다 교환하여 주었다. 배양이 완료된 세포는 약재를 처리하거나 처리하지 않은 배양액에서 배양한 다음 약재가 포함되어 있지 않은 배양액을 대조군으로 하여 비교 조사하였다.

2) XO/HX처리

XO/HX가 배양 혈관내피세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 0.1mM HX에 XO가 각각 10mU/ml에서 80mU/ml까지 포함된 배양액에서 혈관내피세포를 2시간 동안 배양한 후 이의 독성효과를 분석하였다.

3) 한약추출물의 처리

일정시간 배양한 혈관내피세포에 2시간 동안 RPM에 처리한 다음 40mU/ml XO/0.1mM HX가 포함된 배양액에서 2시간 동안 처리한 후 약재가 XO/HX에 미치는 영향을 조사하였다.

4) 세포생존율 조사

여러 농도의 XO/HX를 배양 혈관내피세포에 처리한 후 XO/HX가 혈관내피세포에 미치는 독성효과와 이에 대한 RPM의 효과를 MTS분석법에 의하여 조사하였다.

5) 통계처리

대조군과 실험군의 차이에 대한 통계적 유의성은 Student's t-test로 비교하였다. 통계적 유의수준은 p값이 0.05미만인 경우로 하였다.

결 과

1. XO의 독성효과

1) 농도에 따른 영향

XO가 10~20mU/ml의 농도로 각각 포함된 배양액에서 생쥐의 배양 혈관내피세포를 2시간 동안 배양한 후 XO의 독성효과를 MTS assay법에 의하여 조사한 결과 10mU/ml XO의 처리에서는 세포의 생존율이 대조군(100%)에 비하여 86.4%로 나타났으며 20mU/ml XO의 처리에서는 72.9%로 나타났다. 또한 40mU/ml와 80mU/ml XO의 처리에서는 각각 세포의 생존율이 52.6%($p<0.05$)와 37.2%($p<0.05$)로 나타났으며 40mU/ml에서 MTS50 값을 나타냈다(Fig. 1).

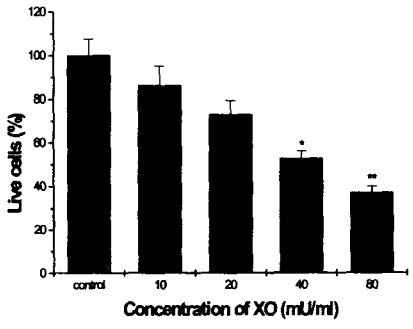

Fig. 1. A dose-dependency of xanthine oxidase(XO) and hypoxanthine(HX). XO/HX-induced vasculotoxicity was measured by MTS assay in cultured vascular endothelial cells. Cultured cells were exposed to 10, 20, 40 and 80 mU/ml XO/0.1mM HX for 2 hours, respectively. The results indicate the mean±SEM (n=6).*$p<0.05$;**$p<0.01$

2) 처리시간에 따른 영향

XO/HX의 처리시간의 의한 세포독성효과를 조사하기 위하여 40mU/ml XO/0.1mM HX가 포함된 배양액에서 혈관내피세포를 0.5~4시간 동안 배양후 세포생존율을 MTS assay법에 의하여 조사한 결과 0.5시간 배양에서는 세포의 생존율이 대조군(100%)에 비하여 81.7%로 나타났으며 1시간 배양에서는 63.2%로 나타났다. 또한 2시간과 4시간 배양에서는 각각 세포생존율이 42.7%($p<0.05$)와 21.4%($p<0.05$)로 나타났다(Fig. 2).

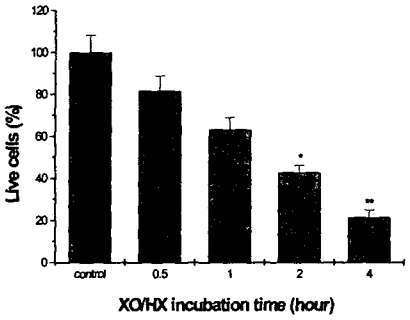

Fig. 2. A time-dependency of xanthine oxidase(XO) and hypoxanthine(HX). XO/HX-induced vasculotoxicity was measured by MTS assay in cultured vascular endothelial cells. Cultured cells were exposed to 40mU/ml XO/0.1 mM HX for 0.5, 1, 2 and 4 hours, respectively. The results indicate the mean±SEM(n=6).*p<0.05;**p<0.01

2. RPM의 효과

XO/HX에 대한 RPM의 영향을 조사하기 위하여 40mU/ml XO/0.1mM HX가 포함된 배양액에서 배양 혈관내피세포를 배양하기 2시간 전에 RPM이 25~100 μg/ml의 농도로 각각 포함된 배양액에서 배양한 다음 RPM이 XO/HX에 미치는 영향을 MTS assay법에 의하여 조사하였다. 40mU/ml XO/0.1mM HX만의 처리에 있어서는 세포의 생존율은 대조군(100%)에 비하여 38.6%로 나타난데 비하여 25 μg/ml RPM의 처리에서는 51.4%로 나타났다. 또한 50 μg/ml 처리에서는 75.6%로 나타났으며, 특히 100 μg/ml RPM의 처리에서는 88.4%로서 이는 XO/HX만의 처리에 비하여 유의한 세포생존율의 증가를 나타냈다 ($p<0.01$)(Fig. 3).

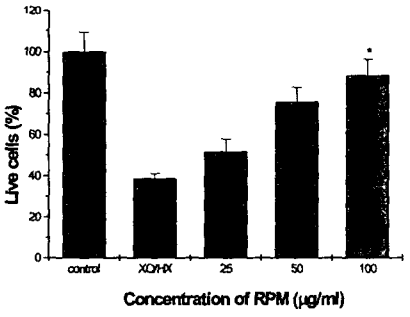

Fig. 3. Dose-response relationship of Radix Polygoni Multiflori, RPM) for its vasculoprotective effect on xanthineoxidase(XO) and hypoxanthine(HX)-induced cytotoxicity by MTS assay. Cultured cells were preincubated with RPM for 2 hours before exposure to 4omU/ml XO/0.1mM HX for 2 hours. The results indicate the mean±SEM(n=6).**p<0.01

고 찰

혈관내피세포에서 혈관의 긴장력을 조절하는 인자인 NO는 superoxide와 반응하여 peroxynitrite를 생성하며 이는 저밀도 지단백의 산화를 유발한다고 한다[3,6]. 또한 peroxynitrite는 단백질의 tyrosine과 반응하여 nitrotyrosine을 형성하는데 이는 동맥경화증에서 관찰되어 지기도 한다[5,8]. 한편 활성산소는 세포막의 지질과산화반응을 유발함으로서 세포의 퇴화나 손상을 유도하게 된다[7,10]. 특히, 내피세포는 활성산소의 산화적 손상에 의하여 기능이상이 유도되며 이 결과로 내피세포에서는 VCAM이나 ICAM과 같은 물질이 발현되어 결국 혈전이나 동맥경화의 병리적 요인이 된다[4,16]. 본 연구에서는 혈관내피세포에 대한 활성산소의 산화적 손상을 MTS assay법에 의한 세포생존율의 분석을 위하여 XO가 10~80mU/ml의 농도로 각각 포함된 배양액에 2시간 동안 노출시킨 후 XO가 세포생존율에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 XO를 혈관내피세포에 처리한 농도에 비례하여 대조군에 비하여 세포생존율을 유의하게 감소시킴으로서 혈관독성을 나타냈다. 특히 40mU/ml XO에서 MTS50값이 나타남으로서 XO는 Borenfreund등[13]의 독성판정기준에 근거하여 고독성인 것으로 나타났다. Borenfreund 등은 독성판정기준을 화학물질의 MTT50, MTS50 또는 NR50, INT50값이 100 μM 이하이면 고독성으로 판정하였고 100 μM이상에서 2000uM 이하인 경우를 중간독성으로 판정하였다. 본 실험에 있어서 XO/HX가 배양 혈관내피세포에 독성을 보인 것은 Michikawa[10]등이 척수신경세포에 활성산소를 처리한 결과 세포의 생존율이 감소됨으로서 세포독성을 나타냈다는 연구결과와 일치하였다. XO/HX의 산화적 손상에 대한 한약추출물인 RPM의 영향을 조사하기 위하여 40mU/ml XO/0.1mM HX의 농도에서 2시간 동안 노출시키기 전 25~100 μg/ml RPM이 여러 농도로 포함된 배양액에서 2시간 동안 전처리한 다음 세포의 생존율을 대조군과 비교 조사한 결과 40mU/ml XO/0.1mM HX만을 처리한 경우 세포의 생존율이 대조군에 비하여 38.6%로 나타난데 반하여 25ug/ml RPM을 처리한 경우 세포생존율이 51.4%로 나타나 XO/HX만의 처리에 비하여 다소 증가하였다. 그러나 50 μg/ml RPM의 처리에서는 세포생존율이 75.6%로 나타났다. 한편, 100 μg/ml RPM의 처리에서는 세포생존율이 88.4%로 이는 XO/HX만의 처리에 비하여 유의하게 높은 생존율을 보임으로서 RPM이 XO/HX의 산화적 손상에 대하여 유의한 방어효과를 가지고 있음을 알 수 있다. 본 실험에서 XO/HX에 대한 RPM의 방어효과는 RPM을 구성하고 있는 chrysophanol이나 rhein등과 같은 구성성분이 항산화활성을 나타냈을 가능성이 클 것으로 생각된다[12]. 그러나 구성성분의 약리활성 대한 정확한 분석을 위하여 분획추출물의 개개의 약리활성에 대한 종합적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

결 론

XO/HX가 배양 혈관내피세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 여러 농도의 XO/HX가 각각 포함된 배양액에 혈관내피세포를 2시간 동안 처리한 후 XO/HX의 세포독성을 조사하였으며, 또한 XO/HX에 의하여 유발된 독성효과에 대한 한약추출물인 RPM의 방어효과를 MTS assay법에 의하여 분석하였다. 생쥐로부터 순수분리 배양한 혈관내피세포를 0.1mM HX에 10~80mU/ml XO가 각각 포함된 배양액에서 2시간 동안 배양한 결과 처리한 XO의 농도에 비례하여 대조군에 비하여 세포생존율을 유의하게 감소시켰다. 또한 XO/HX에 의한 세포독성에 대하여 RPM은 세포생존율를 유의하게 증가시킴으로서 XO/HX의 독성으로부터의 세포손상을 효과적으로 방어하였다. 위의 결과

로부터 XO/HX는 생쥐의 배양 혈관내피세포에 독성효과를 나타냈으며 RPM과 같은 한약추출물이 XO/HX의 독성을 방어하는데 매우 효과적이었다.

감사의 글

이 논문은 2001년도 원광보건대학 교비와 두뇌한국 21사업 및 원광대학교 교비의 일부지원에 의해서 연구됨.

참고문헌

1. Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG: Hypercholesterolemia increases endotherial superoxide anion production. J Clin Invester 91:2546-2551, 1993.
2. Wautier JL, Wautier MP, Schmidt AM et al: Advanced glycation end productus(AGEs)on the surface of diabetic erythrocytes bind to the vessel wall via a specific receptor inducing oxidant stress in the vasculature: a link between suface-associated AGEs and diabetic complications. Proc Natl Acad Sci USA 91:7742-7746, 1994.
3. Suzuki J, Fujimoto S, Oba M:The protective effects of combined administration of anti-oxidants and perfluoro-chemicals on cerebral ischemia, Stroke, 15:672-678, 1984.
4. Halliwell B : Reactive oxygen species and the central nervous system. J Neurochem 59:1609-1623, 1992.
5. Mattson MP, Cheng B, Smith-Swintosky VL : Mechanisms of neurotrophic factor protection against calcium- and free radical mediated excitotoxic injury : Implications for treating neurogenerative disorders. J Exp Neurol 124:89-95, 1993.
6. Choi DW : Ionic dependence of glutamate neurotoxicity. J Neurosci 7:369-379,1987.
7. Rosen D, Siddique T, Patterson D, Figlewicz D, Sapp P, Hentai A, Donaldson D, Goto J, O'Regan J, Deng H, Rahmani Z, Krizus A et al: Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature (London) 362:59-62, 1993.
8. Floyd RA : Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. FASEB J 4:2587-2597, 1997.
9. Elion GB, Kovensky A, Hitchings GH, Metz E, Rundles RW : Metabolic studies of allopurinol, an inhibitor of xanthine oxidase. Biochem Pharmacol, 15:863-880, 1986.
10. Michikawa M, Lim KT, McLarnon JG, Kim SU : Oxygen radical-induced neurotoxicity in spinal cord neuron cultures. J Neurosci Res 37:62-70, 1994.
11. Borenfreund E, Babich H, Martin-Alcuacil N : Coparisons of two in vitro cytotoxzicity assays-The neutral red(NR) asnd tetrazolium MTT test. Toxic In Vitro 2:1-6, 1988.
12. Hayase F, Hirashima S, Okamoto G, Kato H:Scavenger of active oxygens by melanoidin. Agric Biol Chem 53:3383-3389,1989.
13. Borenfreund E, Babich H, Martin-Alcuacil N : Coparisons of two in vitro cytotoxzicity assays-The neutral red(NR) asnd tetrazolium MTT test. Toxic In Vitro 2:1-6, 1988.
14. Zhang Y, Talaly P, Cho CG, Posner GH : A major inducer of anticarcinogenic protective enzymes from broccoli: Isolation and elucidation of structure. Proc Natl Acad Sci U.S.A. 89:2399-2403, 1993.
15. Borenfreund E, Puerner J. A. : A simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assay (HTD/ NR-90). J Tiss Cult Meth 9:7-9, 1984.
16. Chung YT, Park ST, Choi MK, Kim JJ, Mun YJ, Woo WH, Han DS, Choi BK, So JT : A study on the cytotoxicity of cadmium in vitro. Korean J Toxicol 9: 45-60, 1993.