心臟內皮細胞의 DNA 합성량에 미치는 甘豆湯의 영향(Ⅰ)

권강범 · 김우경 · 김인수 · 강길성 · 김인규 · 김인섭 · 류도곤*

원광대학교 한의과대학 생리학교실

Effects of Gamdu-tang Extract in Rat Cardiac Endothelial Cells

Kang Beom Kwon, Woo Kyung Kim, In Su Kim, Gil Seong Kang, In Gyu Kim, In Seob Kim, Do Gon Ryu*

Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

To investigate the protective effect of Gamdu-tang(GDT) and its constituents, Radix Glycyrrhizae(RG) and Semen Glycine(SG) on the damage of cardiac endothelial cells by xanthine oxidase (XO)/hypoxanthine (HX)-induced oxygen free radical, Neutral Red (NR) and DNA synthesis assay were used. The results were obtained as follows ; Cardiac endothelial cells treated with XO/HX showed the cytotoxicity such as decreases in viability and DNA synthesis. Cardiac endothelial cells pretreated with GDT extracts were not showed the decrease of DNA synthesis by XO/HX. These results show that XO/HX elicits toxic effects in cultured cardiac endothelial cells derived from neonatal rat, and suggest that GDT extract is very effective in the prevention of XO/HX-induced toxicity.

Key words : Gamdu-tang(甘豆湯), Radix Glycyrrhizae(RG), Semen Glycine(SG), DNA synthesis, xanthine oxidase(XO)/ hypoxanthine(HX)

서 론

甘豆湯은 甘草와 黑豆로 구성되어 있는 처방으로 송대 양[1]의 《仁齊直指方》에 "治諸煩渴, 大小便澁" 이라고 처음으로 수록된 이후 風熱入腎으로 인한 腰痛便秘나 脚腫, 脚氣, 小兒胎熱 등에 사용되어 왔으며, 후대에 이르러 百藥, 百毒을 解하는데 많이 활용되고 있다[2-12]. 활성산소종(Reactive oxygen species : ROS)은 H_2O_2, O_2, O_2^-, OH^- 등으로 산소를 이용한 산화과정 중 발생하여 세포에 상해를 주어 노화를 촉진하거나 세포내 신호전달체계에 영향을 미쳐 세포죽음을 유도하기도 한다. 최근에는 활성산소종에 대한 많은 연구가 이루어지고 있는데 특히 활성산조종에 의한 세포독성을 방어하는 한약재에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[13-18]. 박 등은 甘豆湯과 甘豆湯에 죽엽을 가미한 가미甘豆湯이 xanthine oxidase(XO)/hypoxanthine(HX)에 의해 유도된 배양 심근세포에 대하여 방어효과를 나타낸다고 보고하였다[15,17,18].

이에 저자는 甘豆湯과 구성약물인 甘草와 黑豆 추출물의 배양 심장내피세포 손상에 대한 방어효과를 구명하기 위하여 먼저 한약재 추출물을 전 처리한 후 산소자유기인 xanthine oxidase/hypoxanthine(XO/HX)로 흰쥐의 배양 심장내피세포에 독성을 유발시킨 후 DNA 합성량을 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

* 교신저자 : 류도곤, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의과대학
· E-mail : tkryu@wonkwang.ac.kr Tel : 063-850-6846
· 접수 : 2003/01/20 · 수정 : 2003/02/27 · 채택 : 2003/03/22

재료 및 방법

1. 실험동물

동물은 ICR 계통의 건강상태가 양호한 생후 3일된 백서를 사용하였다.

2. 세포배양

심장조직에서 분리된 심장내피세포를 Ca^{2+}, Mg^{2+}-free인 Hank's balanced salt solution(HBSS, Gibco)으로 3회 세척한 후 1,000rpm에서 20분간 원침시켰다. 심장조직을 0.05% trypsin으로 20분동안 항온기에 넣은 다음 pasteur pipette으로 3, 4회 분쇄한 후 800×g에서 10분간 원침시킨다. 원침된 세포를 Eagle's minimum essential medium(MEM, Gibco)에 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco)과 penicillin G(25 unit/ml)가 첨가된 혼합액에 부유시킨 다음 96-multiwell plate(Gibco)에 1×10^6 cells/well의 세포 밀도로 분주하였다. 분주된 세포는 3일 간격으로 새로운 배양액으로 교환하여 주었으며 XO/HX이 포함되지 않은 배양액을 대조군으로 하여 비교 조사하였다. 실험전 배양액을 버리고 세포를 PBS로 3-4회 세척하였으며 세포는 배양 7일 후 본 실험에 사용하였다.

3. 전탕액의 제조

본 실험에 사용한 약재는 甘草 100g과 黑豆 100g을 합한 甘豆湯(Gamdu-tang, GDT) 200g과 개별 약재인 甘草(Radix Glycyrrhizae, RG), 黑豆(Semen Glycine, SG) 각각 200g을 환저 플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 3시간동안 전열기로 전탕한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 회전 진공 농축기로 감압 농축한 후 동결건조기에서 건조하여 각각 甘豆湯 56.03g, 甘草 49.19g, 黑豆 42.66g의 분말 시료를 얻었다.

4. Xanthine Oxydase(XO)/Hypoxanthine(HX)의 제조 및 처리

본 실험에 사용한 시약으로는 xanthine oxidase(XO, Sigma)와 hypoxanthine (HX, Sigma)으로 XO의 경우 100 mU/ml, 10 mU/ml, 1 mU/ml의 저장액을, HX의 경우 1 M, 100 mM, 10 mM의 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 후 실험 당일 적당한 양으로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다.

5. 세포독성 및 방어효과 검정

1) NR 정량

Neutral red(NR, Sigma)의 정량은 여러 농도의 XO/HX를 처리한 배양 심근세포를 phosphate buffered saline(PBS)으로 3회 세척하였다. 세척완료 후 전날 제조한 5 ㎎/㎖의 NR을 well 당 최종농도로 희석하여 넣은 다음 3시간 동안 37℃, 5% CO_2 로 조절된 정온기에서 배양하였다. 일정시간 동안 배양이 끝난후 세포를 PBS로 세척후 1% formalin과 1% glacial acetic acid로 처리한 다음 ELISA Reader(Molecular Device, USA)로 540nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

2) DNA 합성능 정량

일정 시간동안 약재를 처리한 실험군과 약재처리를 하지 않은 대조군을 [3H] thymidine이 10uCi/ml 포함된 배양액으로 교환하여 1시간동안 표식하였다. 100ug/ml의 sodium azide로 DNA합성을 억제시켜 Ca^{2+}, Mg^{2+}가 없는 PBS로 3회 세척한 후 0.05% trypsin-EDTA로 세포를 부유시켰다. 세포를 Whatman GF/C glass filter paper로 수확한 후 여과지를 건조시켜 scintillation cocktail(PPO 4g, POPOP 0.1g/Toluene 1L)을 넣고 반응시킨 다음 액체섬광계수기로 방사능을 측정하여 이를 대조군과 비교하여 백분율로 표시하였다.

6. 통계처리

실험결과에 대한 유의성의 검정은 ANOVA후에 Tukey-Kramer multiple comparison test에 의하였으며 p값이 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

실험성적

1. XO/HX가 심장내피세포의 생존율에 미치는 영향

XO가 배양 심장내피세포에 미치는 독성을 관찰하기 위하여 1~30 mU/㎖ 농도로 처리한 배양 심장내피세포의 세포생존율을 NR 정량법에 의하여 측정한 결과 처리한 XO의 농도에 비례하여 세포의 생존율이 감소하였다. 특히 20 mU/㎖, 30 mU/㎖ XO의 처리에서는 세포의 생존율이 대조군에 비하여 53.1% ($p<0.05$), 45.7%($p<0.01$)가 감소하여 독성을 나타냈다(Table. 1).

Table. 1. Dose-response relationship of XO treatment on viability rat cardiac endothelial cells.

XO (mU/ml)	NR absorbance (540nm)	Decrease rate of cell viability (%)
0	0.81±0.08	-
1	0.66±0.07	18.5
10	0.60±0.05	25.9
20	0.43±0.03*	46.9
30	0.30±0.02**	54.3

Cultured cells were exposed to various concentrations of XO for 36 hours, respectively. Cell viability was measured by NR assay and determined as % of control. The results indicate mean±SEM(n=5). Significant differences from the control group are marked with asterisk. *p<0.05, **p<0.01

20 mU/㎖의 XO가 포함된 배양액에서 심장내피세포를 12-48시간동안 배양한 후 시간의 경과에 따른 세포의 생존율을 조사한 결과 처리한 시간에 의존적으로 세포 생존율이 감소하였으며 특히 36시간에 대조군에 비하여 50.9%($p<0.05$), 48시간에 33.3%($p<0.01$)로 유의한 감소를 나타냈다(Table. 2).

Table. 2. Time-response relationship of XO/HX treatment on viability in cultured rat cardiac endothelial cells.

XO/HX (mU/ml/mM	NR absorbance (540nm)				
	0 hr	12 hr	24 hr	36 hr	48 hr
0	0.65±0.07	0.61±0.05	0.60±0.09	0.57±0.05	0.51±0.08
20	0.51±0.04	0.45±0.06	0.39±0.02	0.29±0.03*	0.17±0.01**

Cultured cells were treated with 20 mU/㎖ XO in 0.1 mM HX for various time intervals. Cell viability was measured by NR assay and determined as % of control. The values are the mean±SEM(n=5). Asterisk indicate the significant differences between groups. *p<0.05, **p<0.01

2. XO/HX에 의한 심장내피세포 DNA 합성량 감소에 대한 한약재의 효과

XO/HX의 농도에 의하여 감소한 DNA 합성량의 감소에 대한 甘豆湯 과 구성약물인 甘草, 黑豆 추출물의 효과를 관찰하기 위하여 XO/HX에 노출시키기 3시간 전에 甘豆湯 추출물을 10-100ug/ml의 농도로 처리한 후 XO/HX에 36시간 노출시킨 후 DNA 합성량을 조사하였다. 그 결과 XO/HX만을 처리한 군에서는 대조군에 비하여 DNA 합성량이 감소하였다. 그러나 한약재 추출물을 처리한 군에서는 처리한 농도에 비례하여 XO/HX에 의한 DNA 합성의 감소를 방어하였다. 甘豆湯의 경우 100ug/ml의 농도로 전 처리한 군에서 DNA 합성량이 대조군(100%)에 비하여 91.6%($p<0.01$)로 나타나 XO/HX만을 처리한 군(50.8%)에 비하여 유의한 방어효과를 나타냈다. 甘豆湯의 구성약물인 甘草의 黑豆의 경우 100ug/ml의 농도로 전 처리한 군에서 대조군에 비하여 각각 72.4%($p<0.05$), 78.9%($p<001$)로 나타나 XO/HX만을 처리한 군에 비하여 통계적으로 유의한 방어를 나타냈으나 甘豆湯에 비하여 방어효과가 약한 것으로 나타났다(Table 3).

Table 3. Dose-response relationship of Gamdutang(GDT), Radix Glycyrrhizae(RG) and Semen Glycine(SG) for DNA synthesis in cultured rat cardiac endothelial cells.

Herb extract (㎍/ml)	DNA Synthesis (% of control)					
	GDT		RG		SG	
	XO/HX 0	XO/HX 30	XO/HX 0	XO/HX 30	XO/HX 0	XO/HX 30
0	100	50.8±4.2	100	41.3±2.6	100	35.7±2.5
10	100	68.2±7.4	100	56.4±4.2	100	41.6±3.4
40	100	71.8±8.2	100	62.3±5.6	100	53.4±4.3
70	100	83.4±9.6	100	67.5±7.3	100	62.9±7.4
100	100	91.6±8.8**	100	72.4±8.1*	100	78.9±5.7**

Cultured rat cardiac endothelial cells were preincubated with various concentrations of herb extracts for 3 hours, and then exposed to 30 mU/㎖ XO in 0.1 mM HX for 36 hours. DNA synthesis was determined by abxorbance wavelength of scintillation counter. The values are the mean±SEM(n=6). Significant differences from the XO/HX-treated group are marked with asterisk. *p<0.05;**p<0.01

고 찰

甘豆湯은 예로부터 解毒劑로 많이 사용되어 왔으며[4-12], 甘草와 黑豆로 구성되어 있는데 甘草는 豆科에 속한 甘草의 근경으로 《神農本草經》[19]에 "五臟六腑, 寒熱邪氣, 堅筋骨, 長肌肉, 倍氣力, 金創腫, 解毒……." 하는 효능이 있다고 최초로 기재되어 있으며, 성미는 味甘 性平 無毒하고 脾, 胃, 肺經으로 귀경하며 通行十二經하고 補中益氣, 淸熱解毒, 潤肺止咳, 調和諸藥하는 효능이 있다고 알려져 있다[19-24]. 黑豆는 豆科에 속한 큰콩의 검은 종자이며 味甘, 平, 無毒하고 肝, 腎經으로 귀경하며 補陰利水, 祛風, 散熱解毒, 補虛養血하는 효능이 있으며[16]. 諸藥物中毒의 證을 解하는데 生甘草를 배합하여 많이 응용되었으며, 黑豆만을 사용했을 때보다 甘草를 가미했을 때 탁월한 해독효과가 있다고 하였다[5,6,22,24]. 박 등은 배양 심근세포에서 甘豆湯과 구성약물이 XO/HX에 의한 LDH 활성도의 증가[15], 총 단백질 합성량의 감소[17], 심근세포 박동수의 감소에 대하여 방어효과[18]가 있다고 보고하였다. 실험적으로 xanthine 혹은 hypoxanthine은 oxygen에 의해서 산화되는데 이 반응은 xanthine oxidase에 의해서 촉매되어 superoxide radical(O^{-2})과 hydrogen peroxide(H_2O_2)가 생성되며[25,26] 또한 철(iron)과 반응하여 hydroxyl radical($OH^{\cdot}$)과 같은 활성산소종을 생성한다[27,28]고 한다. 저자는 박 등의 보고[15,17,18]에 근거하여 배양 심장 내피세포에 대한 甘豆湯의 방어효과를 관찰하고자 하였다.

실험에서는 먼저 XO/HX의 심장내피세포 독성효과를 NR 정량법을 이용하여 조사하였다. NR assay는 세포의 생존율을 측정하는 방법으로서 이 실험에서 XO/HX를 처리한 후 위의 방법에 의하여 세포의 생존율을 조사한 결과 농도와 시간에 의존적으로 생존율을 감소시켜 (Table. 1~2) 세포에 독성을 유발하였다. 활성산소종의 세포에 대한 많은 독성효과 중의 하나는 DNA 합성능의 감소이다. DNA는 세포주기중 DNA 합성기(synthesis phase)에 복제됨으로써 세포의 증식이나 분열을 조사하는 지표로 잘 알려져 있다. 따라서 DNA 합성의 증감은 세포의 손상이나 회복을 판정하는 방법의 하나이다[29]. XO/HX는 처리한 농도에 비례하여 DNA 합성능을 감소시켰으며 甘豆湯과 구성약물인 甘草, 黑豆 추출물을 10㎍/㎖~100㎍/㎖의 농도로 전 처리한 군에서는 XO/HX에 의한 DNA 합성의 감소를 억제시켰다(Table 3). 이러한 결과는 박 등의 결과[15,17,18]와 더불어 심장 내피세포에서 활성산소종에 대한 방어효과가 DNA 합성능의 감소에 대한 억제를 통하여 이루어짐을 나타내며 앞으로 이에 대한 기전적인 연구가 필요하리라 사료된다.

결 론

甘豆湯과 구성약물인 甘草, 黑豆가 심장내피세포에 미치는 영향을 구명하기 위하여 백서에서 분리하여 배양한 심장내피세포에 甘豆湯, 甘草, 黑豆 추출물을 전 처리한 후 XO/HX를 처리하여 XO/HX에 의한 세포독성효과와 이에 대한 방어효과를 관찰한 결과 XO/HX는 농도와 시간의존적으로 심장내피세포 생존율의 감소를 나타냈으며 甘豆湯, 甘草, 黑豆 추출물을 전처리한 군은 XO/HX에 의하여 유발된 DNA 합성량의 감소에 대하여 유의한 억제효과를 나타냈다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술개발사업의 지원(HMP-CO-03-0003)에 의하여 이루어진 것임.

참고문헌

1. 楊士瀛 : 仁齋直指方(中國醫學大系 · 12卷), 서울, 驪江出版社, pp.296-297.
2. 方 賢 : 奇效良方, 香港, 商務印書館, p.781, 1977.
3. 王肯堂 : 證治準繩, 北京, 人民衛生出版社, p.450, 1991.
4. 許 浚 : 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, p.589, 1989.
5. 汪訒庵 : 醫方集解, 서울, 醫道韓國社, p.128, 1976.
6. 申載鏞 : 方藥合編解說, 서울, 成輔社, pp.505-506, 1991.
7. 陵昌洙 : 現代方藥合編, 서울, 癸丑文化社, p.132, 1997.
8. 東醫學硏究所 : 方劑學, 서울, 여강출판사, p.403, 1994.
9. 조선의학과학원 : 동의처방학(동의학총서), 서울, 여강출판사, p.403, 1992.
10. 中華民國 商務印書館 : 中國醫學大辭典, 서울, 金泳出版社, p.809, 1975.
11. 吳 克 : 古今醫方集成(一), 서울, 翰成社, p.539, 1980.
12. 江克明 · 包明蕙 : 簡明方劑辭典, 上海, 上海科學技術出版社, p.257, 1989.
13. 한동훈, 권강범, 황인진, 김우경, 김희찬, 오광수, 이호승, 류도곤 : 失笑散 전탕액이 XO/HX에 의해 손상된 배양 심근세포 박동수에 미치는 영향, 대한동의생리병리학회지 15(4), 566-570, 2001.
14. 손창식, 권강범, 정종선, 황인진, 김우경, 김희찬, 오광수, 이호승, 류도곤 : 丹參飮 전탕액이 산소자유기에 의해 손상된 심근세포의 LDH 활성도에 미치는 영향, 대한동의생리병리

학회지 15(4):621-625, 2001.
15. 박준배, 권강범, 김우경, 오광수, 김인규, 이호섭, 기영운, 금경수, 류도곤 : 甘豆湯 및 加味甘豆湯 전탕액이 배양 심근세포의 LDH 활성도에 미치는 영향, 대한동의생리병리학회지 15(5):730-734, 2001.
16. 한동훈, 권강범, 김우경, 오광수, 김인규, 류도곤 : 失笑散 전탕액과 구성약물이 배양 심근세포의 LDH 활성도에 미치는 영향, 대한동의생리병리학회지 15(5):770-774, 2001.
17. 박준배, 권강범, 이호승, 김희찬, 김우경, 오광수, 류도곤. 甘豆湯 및 加味甘豆湯 전탕액이 배양 심근세포의 총단백질량에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 2001;15(3):459-463.
18. 박준배, 권강범, 황인진, 김우경, 김희찬, 오광수, 이호섭, 류도곤. 甘豆湯 전탕액과 구성약물이 배양심근세포 박동수에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 2001;15(4):626-630.
19. 吳 普 : 神農本草經, 서울, 醫聖堂, pp.12-13, 1994.
20. 寇宗奭 : 本草衍義, 서울, 醫聖堂, pp.47-48, 1994.
21. 王好古 : 湯液本草, 서울, 醫聖堂, pp.85-87, 168, 1994.
22. 李時珍 : 本草綱目, 北京, 人民衛生出版社, pp.691-695, 1500-1506, 1982.
23. 張介賓 : 景岳全書(上卷), 서울, 大星文化社, p.222, 336, 1992.
24. 汪 昂 : 本草備要, 서울, 高文社, p.2, 160, 1974.
25. Fridovich I. : Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. J. Biol. Chem., 245:4053-4057, 1970.
26. Killogg E. W., Fridovich I. : Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymatically generated superoxide and hydrogen peroxide. J. Biol. Chem., 252:6721-6728, 1977.
27. Harber F., Weiss J. : The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by anion salts. Proc. Roy. Soc. London A. 147:333-351, 1934.
28. Graf E., Mahoney J. R., Bryant R. G., Eaton J. W. : Iron-catalyzed hydroxyl radical formation: Stringent requirement for free iron coordination site. J. Biol. Chem., 259:3620-3624, 1984.
29. Waalkes M. P., Pvirier L. A. : In vitro cadmium-DNA interactions: Cooperativity of binding and competitive antagonism by calcium, magnesium and zinc. Toxicol. Appl. Pharmacol. 75:539-549, 1984.