

# 산소자유기에 의해 손상된 血管內皮細胞의 PKC 활성도에 미치는 薤白 추출물의 효과(I)

권강범 · 이호승 · 강길성 · 김인섭 · 류도곤\*

원광대학교 한의과대학 생리학교실

## Effects of Bulbus Allii Macrostemi Extract on PKC activity in Pulmonary Vascular Endothelial Cells Damaged by XO/HX

Kang Beom Kwon, Ho Seung Lee, Gil Seong Kang, In Seob Kim, Do Gon Ryu\*

Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

To investigate the protective effect of Bulbus Allii Macrostemi (BAM) on the damage by pulmonary vascular endothelial cells by xanthine oxidase (XO)/hypoxanthine (HX)-induced oxygen free radical, Neutral Red (NR) and protein kinase c (PKC) activity assay were used. The results were obtained as follows ; The viability of vascular endothelial cells treated with XO/HX was decreased. And activation of PKC represented a maximal increase in group treated with XO/HX for 15 mins in vasvular pulmonary endothelial cells. But pretreated groups with BAM extracts were not inhibited the increase of PKC activation by XO/HX in a dose-dependent fashion. These results show that XO/HX elicits toxic effects in cultured pulmonary vascular endothelial cells, and suggest that BAM extract is very effective in the prevention of XO/HX-induced PKC activation.

Key words : Bulbus Allii Macrostemi(薤白), Neutral Red (NR), protein kinase c (PKC), xanthine oxidase (XO)/hypoxanthine (HX)

### 서 론

薤白은 百合科에 속한 다년생 초본인 산달래 및 산부추의 鱗莖으로, 성미는 辛 苦 溫 無毒하고 肝 心 肺 大腸의 4經으로 귀경하며<sup>1-8)</sup> 효능은 溫中通腸, 行氣導滯의 효능으로 胸痺證을 치료하는데 이용하고 있다<sup>1-14)</sup>. 산소자유기는 최외각 전자궤도에 쌍을 이루고 있지 않는 홀수개의 전자가 존재하는 원자나 분자를 지칭하는 것으로서 이러한 특수구조 때문에 대단히 큰 반응성을 보여 생체내의 여러 가지 병태생리적인 반응에 관여하고 있어, 생체막의 불포화지방산을 과산화시키거나 단백질, DNA를 변화시킨다<sup>15,16,17)</sup>. 최근에 한약재가 산소자유기에 대한 심근세포 독성을 방어한다는 실험적 보고가 있는데<sup>18-22)</sup> 특히 안 등<sup>22)</sup>은 瓜蒌薤白半夏湯 추출물이 XO/HX에 의해 손상된 배양 심근세포에 방어효과를 나타낸다고 보고하였다.

이에 저자는 薤白 추출물이 생쥐의 폐동맥으로부터 분리된 혈관내피세포(pulmonary vascular endothelial cell, PVEC)의 손상에 대한 방어효과를 구명하기 위하여 薤白 추출물을 전 처리한 후 산소자유기인 xanthine oxidase/ hypoxanthine(XO/HX)로 혈관내피세포에 독성을 유발시킨 후 PKC의 활성도를 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

### 재료 및 방법

#### 1. 세포배양

혈관내피세포의 분리는 Kasten<sup>23)</sup>의 방법에 따라 시행하였다. 생쥐의 폐동맥으로부터 분리된 혈관내피세포(pulmonary vascular endothelial cell, PVEC)를 Eagle/s minimum essential medium(EMEM, Gibco)에 10% fetal bovine serum(FBS, Sigma)이 포함된 배양액에 넣어 혼합한 뒤 세포를 1×10<sup>5</sup>/well의 밀도로 산정하여 96 multiwell에 넣어 심었다. 이때 중금속이 포함되지 않은 배양액을 대고균으로 하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub>로 혼합된 항온기에서 96시간 동안 배양한 후 대조군과 비교 조사하였다.

\* 교신저자 : 류도곤, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학  
· E-mail : tkryu@wonkwang.ac.kr Tel : 063-850-6846  
· 접수 : 2003/02/05 · 수정 : 2003/02/28 · 채택 : 2003/03/31

2. 전당액의 제조

薤白 200g을 환저플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 3시간 동안 전열기로 전탕한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 회전 진공 농축기로 감압농축한 후 동결건조기에서 건조하여 21.71g의 분말 시료를 얻었다.

3. 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 적당량으로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다.

4. 세포독성 및 방어효과 검증

1) NR 정량

Neutral red(NR, Sigma)의 정량은 여러 농도의 XO/HX를 처리한 혈관내피세포를 phosphate buffered saline(PBS)으로 3회 세척하였다. 세척완료 후 전날 제조한 5 mg/ml의 NR을 well당 최종농도로 희석하여 넣은 다음 3시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 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) PKC 활성 측정

PKC의 정량 측정은 XO/HX나 薤白 추출물을 일정시간 동안 처리한 혈관내피세포를 Hu<sup>24</sup> 등의 방법에 따라 시행하였다. 즉 Tris-HCl 완충액(50mM)과 합성 peptide를 포함한 반응액에 효소를 가하여 25°C에서 15분간 반응시킨 다음 50 ul를 취하여 P81 종이에 옮겨 건조시켰다. 건조가 완료된 후 75mM 인산용액으로 세척한 다음 섬광계수기에 의하여 측정하였다.

5. 통계처리

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

실험성적

1. XO/HX가 혈관내피세포의 생존율에 미치는 영향

Table. 1. Dose-response relationship of XO treatment on viability in pulmonary vascular endothelial cells.

XO (mU/ml)	NR absorbance (540nm)	Decrease rate of cell viability (%)
0	0.75±0.08	-
10	0.57±0.06	24.0
30	0.52±0.03	30.7
50	0.39±0.02*	48.0
70	0.19±0.01**	74.7

Cultured cells were exposed to various concentrations of XO for 4 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

XO가 배양 혈관내피세포에 미치는 독성을 관찰하기 위하여 10~70 mU/ml 농도로 처리한 배양 혈관내피세포의 세포생존율을 NR 정량법에 의하여 측정된 결과 처리한 XO의 농도에 비례하여 세포의 생존율이 감소하였다. 특히 50 mU/ml, 70 mU/ml XO의 처리에서는 세포의 생존율이 대조군에 비하여 52.0% (p<0.05), 25.3%(p<0.01) 감소하여 독성을 나타냈다(Table. 1).

50 mU/ml의 XO가 포함된 배양액에서 혈관내피세포를 1-6 시간동안 배양한 후 시간의 경과에 따른 세포의 생존율을 조사한 결과 처리한 시간에 의존적으로 세포 생존율이 감소하였으며 특히 4시간에 대조군에 비하여 48.9%(p<0.05), 6시간에 36.2% (p<0.01)로 유의한 감소를 나타냈다(Table. 2).

Table. 2. Time-response relationship of XO/HX treatment on viability in pulmonary vascular endothelial cells.

XO/HX (mU/ml/mM)	NR absorbance (540nm)				
	0 hr	1 hr	2 hr	4 hr	6 hr
0	0.54±0.07	0.52±0.05	0.50±0.06	0.45±0.03	0.47±0.04
50	0.44±0.08	0.40±0.03	0.32±0.04	0.22±0.02*	0.17±0.01**

Cultured cells were treated with 50 mU/ml 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 혈관내피세포의 PKC 활성화 증가에 대한 薤白 추출물의 효과

XO/HX에 의한 혈관내피세포의 PKC 활성화도의 측면에서 조사하기 위하여 35mU/ml XO/HX의 농도로 1, 15, 30, 60분 동안 노출시킨 후 PKC 활성도를 측정된 결과 15분 동안 처리한 군에서 대조군에 비하여 73.7% 증가하였으며 그 이후에는 감소하였다(Fig. 1).

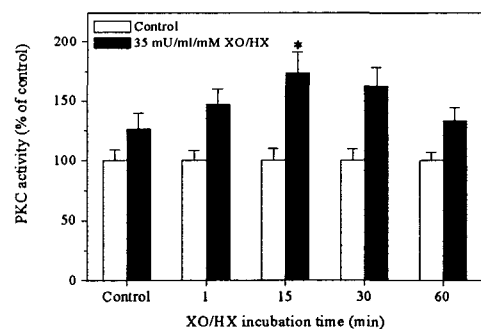


Fig. 1. Time-response relationship of XO/HX treatment on PKC activity in pulmonary vascular endothelial cells. Cultured cells were treated with 35 mU/ml XO in 0.1 mM HX for various time intervals. PKC activity was measured as described in Material and Methods and represented as % of control. The values are the mean±SEM(n=5). Asterisk indicate the significant differences between groups. \*p<0.05

XO/HX에 의해 증가한 PKC 활성화도에 대한 薤白 추출물의 효과를 조사하기 위하여 XO/HX에 15분 동안 노출시키기 3시간 전에 20-160ug/ml의 薤白 추출물을 3시간 동안 처리한 후 PKC 활성도를 측정하였다. 그 결과 처리한 농도에 비례하여 PKC 활성도가 감소하였으며 특히 160ug/ml의 농도로 전 처리한 군에서는 PKC 활성도가 대조군에 비하여 20.0% 증가하여 XO/HX에 의해 증가한 군에 비하여 유의한 억제효과를 나타냈다(Fig. 2).

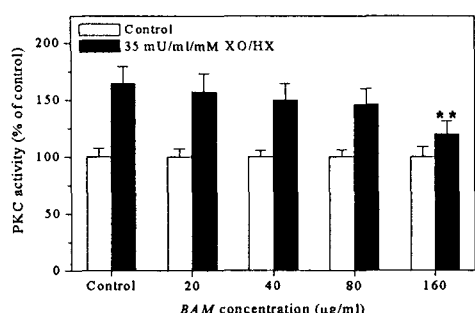


Fig. 2. Effects of Bulbus Allii Macrostemis(BAM) on PKC activity in XO/HX-treated pulmonary vascular endothelial cells. Cultured cells were preincubated with various concentrations of BAM extracts for 3 hours before exposed to XO/HX for 15 min. PKC activity was measured as described in Material and Methods and represented as % of control. The values are the mean  $\pm$  SEM (n=5). Significant differences from the XO/HX-treated group are marked with asterisks. \*\*p<0.01

## 고찰

薤白은 溫中通陽 行氣導滯 下氣散結의 藥理作用을 가지고 있으며<sup>1-14</sup>, 그 作用機轉은 연구되어 있지 않지만 과거 유럽 민간에서는 肺의 炎症性刺激症狀(胸痛 등)을 緩解한다 하여 잘 사용되어 왔다<sup>25</sup>. 또한 胸痺에 대한 상용약으로도 쓰이는데 胸痺란 주로 心장의 血流가 정체하여 胸膈이 不運됐기 때문에 생긴 것으로, 氣道の 閉塞感, 胸背部的 刺痛, 胸背의 잡어당기는 듯한 통증, 胸이나 脇下 등의 放散痛 등 症狀에 呼吸促迫, 呼吸困難을 수반하는 일이 많다<sup>1-2,25</sup>. 이런 증상들이 현대 의학적으로는 血液循環機能의 停滯와 관련되며 胸痺는 狹心症發作에서 잘 볼 수 있고, 冠狀動脈의 血流不足이나 閉塞과 관계가 있다<sup>25</sup>. 현대 중국에서 연구된 薤白의 약리 작용을 보면, 心血管계통으로 縮血管작용과 冠狀動脈血流量 감소 및 血小板合成을 억제하여 血拴量을 감소시키는 효능이 있음이 밝혀졌고, 이 밖에 過酸化脂質을 降下시켜 血小板의 생성 및 聚集을 억제하고, 平滑筋細胞의 增生을 抑制, 降血脂 작용 등의 약리작용을 밝혀냈다<sup>26</sup>. 또한 안 등<sup>22</sup>은 薤白을 포함하고 있는 처방인 瓜薤薤白半夏湯이 심근세포에서 XO/HX에 의해 증가한 LDH 활성도와 심근세포 박동수의 감소에 대하여 방어효과가 있다고 보고하였다.

실험적으로 xanthine 혹은 hypoxanthine은 oxygen에 의해서 산화되는데 이 반응은 xanthine oxidase에 의해서 촉매되어 superoxide radical(O<sup>2-</sup>)과 hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)가 생성되며<sup>27,28</sup> 또한 철(iron)과 반응하여 hydroxyl radical(OH)과 같은 산소자유기를 생성한다<sup>29,30</sup>고 한다. 실험에서는 먼저 XO/HX의 혈관내피세포 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. 산소자유기는 phosphoinositide-specific phospholipase C(PI-PLC)를 활성화시키고 이러한 결과로 생성된 diacylglycerol (DAG)이 calcium-phospholipid dependent PKC를 활성화시키는데, 더욱이 PKC의 활성화는 세포내 c-fos gene의 발현을 유도케하여 세포의 고사를 촉진시키며, 그 외에도 투과성의 증가를 비롯하여<sup>31,32</sup> 세포증식의 변화 및 성

장인자와 호르몬조절 등에 영향을 미친다고 보고되고 있다<sup>33</sup>. 본 실험에서 XO/HX는 혈관내피세포에 PKC 활성도를 증가시켰으며 (Fig. 1) PKC 활성도의 증가에 대한 薤白의 방어효과를 관찰하고자 XO/HX에 노출시키기 3시간 전에 薤白 추출물을 처리하였다. 그 결과 처리한 농도에 비례하여 XO/HX에 의한 PKC 활성도의 증가를 억제하였으며 160ug/ml의 농도로 전 처리한 군에서는 통계적인 유의성을 나타냈다(Fig. 2).

이러한 배양 심근세포에 대한 방어효과를 발표한 안 등<sup>22</sup>의 결과와 더불어 심장질환에 薤白의 응용 가능성을 시사하며 앞으로 이에 대한 생화학적인 연구가 필요하리라 사료된다.

## 결론

薤白이 혈관내피세포에 미치는 영향을 구명하기 위하여 백서에서 분리하여 배양한 혈관내피세포에 薤白 추출물을 전 처리한 후 XO/HX를 처리하여 XO/HX에 의한 세포 독성효과와 이에 대한 薤白 추출물의 방어효과를 관찰한 결과 XO/HX는 농도와 시간 의존적으로 혈관내피세포 생존율의 감소를 나타냈으며 薤白 추출물을 전 처리한 군은 XO/HX에 의한 PKC활성도의 증가에 대하여 유의한 억제효과를 나타냈다.

## 감사의 글

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

## 참고문헌

1. 辛民教 : 臨床本草學, 南山堂, 서울, pp.398-399, 1986.
2. 金先熙 外 : 本草學, 圖書出版永林社, 서울, pp.361-362, 1998.
3. 東醫學研究所 : 本草學, 여강출판사, 서울, pp.296-300, 1993.
4. 安德均 : 韓國 本初圖鑑, (株)敎學社, 서울, p.452, 1998.
5. 責編組 外 : 中藥辭海, 中國醫藥科技出版社, 北京, pp.1546-1549, 1993.
6. 胡世林 : 中國道地藥材原色圖說, 山東科學技術出版社, 山東, p.57, 1998.
7. 金昌緒 : 本草從新, 杏林出版社, 서울, p.167, 1989.
8. 柳庚華 外 : 實用植物本草, 天津科學技術出版社, 天津, pp.209-210, 1998.
9. 高學敏 : 中藥學, 中國醫藥科技出版社, 北京, p.190, 1990.
10. 上海中醫學院 : 中草藥學, 商務印書館香港分館, 上海, pp.357-358, 1983.
11. 尹古榮 : 東醫方劑學, 慶熙大學校醫科大學, 서울, p.254, 1971.
12. 崔同寅 : 全國重名易混中藥鑒手冊, 中國醫藥科技出版社, 북경, pp.348-349, 1992.
13. 丁林生 外 : 中國藥材學(上冊), 中國醫藥科技出版社, 北京, pp.611-612.
14. 圓光韓醫大 圖書部 : 本草備要解釋, pp.483-484.

15. Graf E., Mahoney J. R., Bryant R. G., and Eaton J. W. : Iron-catalyzed hydroxyl radical formation: Stringent requirement for free iron coordination site. *J. Biol. Chem.*, 259:3620-3624, 1984.
16. Pellegrini-Giampietro D. E., Cherici G., Alesiani M., Carla V., Morroni F. : Excitatory amino acid release from rat hippocampal slices as a consequence of free-radical formation. *J. Neurochem.*, 51:1960-1963, 1988.
17. Pellegrini-Giampietro D. E., Cherici G., Alesiani M., Carla V., Morroni F. : Excitatory amino acid and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J. Neurosci.*, 10:1035-1041, 1990.
18. 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.
19. 손창식, 권강범, 정종선, 황인진, 김우경, 김희찬, 오광수, 이호승, 류도곤 : 丹參飲 전탕액이 산소자유기에 의해 손상된 심근세포의 LDH 활성도에 미치는 영향, *대한동의생리병리학회지* 15(4):621-625, 2001.
20. 박준배, 권강범, 김우경, 오광수, 김인규, 이호섭, 김영운, 금경수, 류도곤 : 甘豆湯 및 加味甘豆湯 전탕액이 배양 심근세포의 LDH 활성도에 미치는 영향, *대한동의생리병리학회지* 15(5):730-734, 2001.
21. 한동훈, 권강범, 김우경, 오광수, 김인규, 류도곤 : 失笑散 전탕액과 구성약물이 배양 심근세포의 LDH 활성도에 미치는 영향, *대한동의생리병리학회지*
22. 안효창, 권강범, 박은영, 장승호, 류도곤. 枳實白朮散 추출물이 배양 심근세포의 박동수와 LDH 활성도에 미치는 영향. *동의생리병리학회지* 2002;16(2):289-295.
23. Kasten FH. Cytology and cytochemistry of mammalian myocardial cells in culture. *Acta Histochem* 9:637-647, 1971.
24. Hu K. Q., Backer J. M., Sahagian G., Feener E. P., King G. L. : Modulation of the insulin factor II/mannose 6-phosphate receptor in microvascular endothelial cells by phobol ester via protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 265:13864-13872, 1990.
25. 金成萬 外; 漢藥의 藥理.成分.臨床應用. 癸丑文化史. pp.577-578. 1982.
26. 王筠默 外; 中藥現大研究與應用. 學苑出版社. pp.4638-4644. 1998.
27. Fridovich I. : Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, 245:4053-4057, 1970.
28. Killogg E. W., Fridovich I. : Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymatically generated superoxide and hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.*, 252:6721-6728, 1977.
29. Harber F., and Weiss J. : The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by anion salts. *Proc. Roy. Soc. London A.* 147:333-351, 1934.
30. Graf E., Mahoney J. R., Bryant R. G., and Eaton J. W. : Iron-catalyzed hydroxyl radical formation: Stringent requirement for free iron coordination site. *J. Biol. Chem.*, 259:3620-3624, 1984.
31. 이소라, 오연균, 박승택 : 허혈 유도에 의해 손상된 신생쥐의 배양 대뇌신경세포에 대한 vitamin E와 Desferrioxamine의 보호효과. *소아과* 42(10): 1426-1433, 1999.
32. Lynch J.J., Ferro T.J., Blumenstock F. A., Brockenauer A. M., Malik A. M.: Increased endothelial albumin permeability mediated by protein kinase C activation. *J. Clin. Invest.* 85:1991-1998, 1990.
33. Nowak T. S., Ikeda J., Nakajima T. : 70-kDa heat shock protein and c-fos gene expression after transient ischemia. *Stroke Suppl III* 21: 107-111, 1990.