

# 苦蔘 추출물이 XO/HX에 의해 손상된 血管內皮細胞에 미치는 영향(I)

권강범 · 이호승 · 김인수 · 김인규 · 류도곤\*

원광대학교 한의과대학 생리학교실

## Effects of Sophorae Radix Extract in Pulmonary Vascular Endothelial Cells Damaged by XO/HX

Kang Beom Kwon, Ho Seung Lee, In Su Kim, In Gyu Kim, Do Gon Ryu\*

Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

To investigate the protective effect of Sophorae Radix (SR) on the damage by pulmonary vascular endothelial cells by xanthine oxidase (XO)/hypoxanthine (HX)-induced oxygen free radical, Neutral Red (NR) and c-fos immunopositive cell assay were used. The results were obtained as follows ; The viability of vascular endothelial cells treated with XO/HX was decreased. And c-fos immunopositive cells represented a maximal increase in group treated with XO/HX for 2 hour in pulmonary vascular endothelial cells. But pretreated groups with SR extracts were not inhibited the increase of c-fos immunopositive cells by XO/HX in a dose-dependent manner. These results show that XO/HX elicits toxic effects in cultured pulmonary vascular endothelial cells, and suggest that SR extract is very effective in the prevention of XO/HX-induced increase of c-fos immunopositive cells.

Key words : Sophorae Radix(苦蔘), Neutral Red, c-fos immunopositive cells, xanthine oxidase/hypoxanthine

### 서 론

豆科에 속한 다년생 초본인 苦蔘(Sophorae Radix)은 『神農本草經』<sup>1)</sup>에 최초로 기재되었으며 귀경은 心, 肝, 胃 大腸, 膀胱 등이라고 하였고, 味苦, 性寒, 無毒하다고 하였으며, 淸熱燥濕, 祛風殺蟲, 利水 등의 효능이 있다고 하였다<sup>2-9)</sup>. 최근에 한약재가 산소자유기에 대한 심근세포 독성을 방어한다는 실험적 보고가 있는데<sup>10-13)</sup> 서 등<sup>10)</sup>은 산소자유기에 의한 심근세포 손상에 대한 苦蔘 추출물의 방어효과를 보고하였다. 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>14,15)</sup> 세포증식의 변화 및 성장인자와 호르몬조절 등에 영향을 미친다고 보고되고 있다<sup>16)</sup>. 그리고 PKA나 PKG는 cAMP와 cGMP를 활

성화시키는데, 한편 PKC도 cAMP를 활성화시킨다는 주장이 대두되면서 이에 대한 관심이 높아가고 있다<sup>17)</sup>.

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

### 재료 및 방법

#### 1. 세포배양

혈관내피세포의 분리는 Kasten<sup>18)</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 증금속이 포함되지 않은 배양액을 대조군으로 하여 37℃, 5% CO<sub>2</sub>로 혼합된 항은

\* 교신저자 : 류도곤, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학  
· E-mail : tkryu@wonkwang.ac.kr Tel : 063-850-6846  
· 접수 : 2003/02/08 · 수정 : 2003/03/15 · 채택 : 2003/04/07

기에서 96시간 동안 배양한 후 대조군과 비교 조사하였다.

2. 전당액의 제조

苦蔘 100g에 3차 증류수 0.9 l를 각각 환저플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 2시간동안 전열기로 전탕한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 진공 농축기로 감압농축한 후 동결건조기에서 24시간 동결건조하여 28.5g의 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 적당한 양으로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다.

4. 세포독성 및 방어효과 검정

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) c-fos 단백질 발현 측정

일정 시간동안 약재를 처리한 실험군과 약재처리를 하지 않은 대조군을 c-fos 발현을 측정하기 위하여 sample을 4% paraformaldehyde + 0.1M PBS에서 3시간 동안 실온에서 고정한 후 30% sucrose에서 2일 방치한다. 그 후 pH 7.4의 PBS 용액으로 3회이상 세척하고 0.3% triton-X 100으로 30분간 진탕한 후 PBS로 3회 이상 세척한다. 그 후 Blocking agent(Normal goat serum)를 실온에서 30분간 처리한 다음 일차항체(c-fos, oncogene sci, 1:150)를 영상4도에서 하룻밤 동안 반응시킨 후 2시간동안 실온에서 진탕시키고 PBS로 세척한다. 그 후 이차항체인 biotinylated anti-rabbit & anti-mouse immunoglobulin (Dako, Denmark)을 실온에서 40분간 처리하여 PBS로 세척하고, streptavidin peroxidase(Vector ABC kit)를 20분간 처리하여 PBS로 세척한 뒤 chromogen인 0.05% diaminobenzidine으로 발색하였다. 증류수로 1시간동안 세척한 후 광학현미경하에서 진갈색으로 보이는 c-fos 양성세포를 관찰하였으며, 화상자동분석 시스템(Image Pro Plus 4.0, USA)으로 분석하였다.

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

XO가 배양 혈관내피세포에 미치는 독성을 관찰하기 위하여 5~50 mU/ml 농도로 처리한 배양 혈관내피세포의 세포생존율을 NR 정량법에 의하여 측정된 결과 처리한 XO의 농도에 비례하여 세포의 생존율이 감소하였다. 특히 35 mU/ml, 50 mU/ml XO의 처리에서는 세포의 생존율이 대조군에 비하여 48.1% (p<0.05), 22.2%(p<0.01) 감소하여 독성을 나타냈다(Fig. 1).

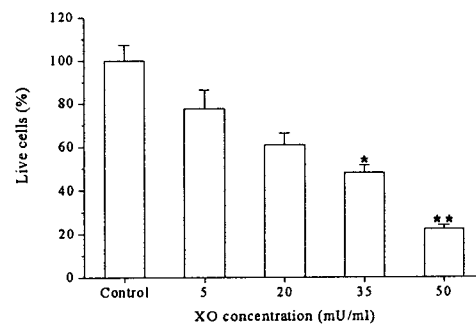


Fig. 1. Dose-response relationship of XO treatment on viability in pulmonary vascular endothelial cells. Cultured cells were exposed to various concentrations of XO for 5 hours, respectively. Cell viability was measured by NR assay and determined as % of control. The results indicate mean±SEM(n=5). Significant differences from the control group are marked with asterisk. \*p<0.05, \*\*p<0.01

35 mU/ml의 XO가 포함된 배양액에서 혈관내피세포를 1-7 시간동안 배양한 후 시간의 경과에 따른 세포의 생존율을 조사한 결과 처리한 시간에 의존적으로 세포 생존율이 감소하였으며 특히 5시간에 대조군에 비하여 53.3%(p<0.05), 7시간에 46.3% (p<0.01)로 유의한 감소를 나타냈다(Fig. 2).

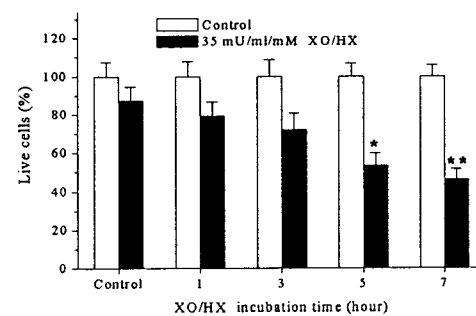


Fig. 2. Time-response relationship of XO/HX treatment on viability in pulmonary vascular endothelial cells. Cultured cells were treated with 35 mU/ml XO in 0.1 mM HX for various time intervals. Cell viability was measured by NR assay and determined as % of control. The values are the mean±SEM(n=5). Asterisk indicate the significant differences between groups. \*p<0.05, \*\*p<0.01

2. XO/HX에 의한 혈관내피세포의 c-fos positive cell 증가에 대한 苦蔘 추출물의 효과

XO/HX에 의한 혈관내피세포의 c-fos positive cell의 측면에서 조사하기 위하여 20mU/ml XO/HX의 농도로 1, 2, 3, 4시간 동안 노출시킨 후 c-fos positive cell의 수를 측정된 결과 2시간 동안 처리한 군에서 대조군에 비하여 48.7% 증가하였으며 그 이후에는 서서히 감소하였다(Table. 1).

Table 1. Time-response relationship of XO/HX treatment on c-fos positive cells in pulmonary vascular endothelial cells.

XO/HX (mU/ml/mM)	c-fos positive cells (% of control)				
	0 hr	1 hr	2 hr	3 hr	4 hr
0	100±7.6	100±8.4	100±9.1	100±7.4	100±6.7
20	108.6±9.4	121.4±11.7	148.7±13.2*	132.6±11.5	112.3±10.9

Cultured cells were treated with 20 mU/ml XO in 0.1 mM HX for various time intervals. A number of c-fos positive cells 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 c-fos positive cell에 대한 苦蔘 추출물의 효과를 조사하기 위하여 XO/HX에 2시간 동안 노출시키기 3시간 전에 10-80ug/ml의 苦蔘 추출물을 3시간 동안 처리한 후 c-fos positive cell의 수를 측정하였다. 그 결과 처리한 농도에 비례하여 c-fos positive cell의 수가 감소하였으며 특히 80ug/ml의 농도로 전 처리한 군에서는 c-fos positive cell의 수가 대조군에 비하여 12.6% 증가하여 XO/HX에 의해 증가한 군에 비하여 유의한 억제효과를 나타냈다(Table. 2).

Fig. 2. Effects of Sophorae Radix (SR) on c-fos positive cells in XO/HX-treated pulmonary vascular endothelial cells.

XO/HX (mU/ml/mM)	c-fos positive cells (% of control)				
	Concentration of SR (µg/ml)				
	0	10	20	40	80
0	100±7.4	100±12.4	100±9.3	100±9.1	100±7.5
20	156.3±16.7	100±8.6	136.7±13.2	121.4±10.9	112.6±13.5**

Cultured cells were preincubated with various concentrations of SR extracts for 3 hours before exposed to XO/HX for 2 hour. A number of c-fos positive cells was measured as described in Material and Methods and represented as % of control. The values are the mean ± SEM (n=5). Significant differences from control group are marked with asterisks. \*\*p<0.01

## 고찰

豆科에 屬한 多年生 草本인 苦蔘(Sophorae Radix)은 『神農本草經』<sup>1)</sup>에 最初로 記載된 이래 다양한 실험적 연구가 이루어졌는데<sup>10,19,20)</sup> 李 등<sup>21)</sup>이 苦蔘이 실험적으로 유발된 부정맥에 대하여 항부정맥작용이 있다고 보고하였고, 강심 항부정맥 등의 작용<sup>21-26)</sup>이 있다고 하였으며, 또한 혈관확장으로 인한 심근의 허탈을 억제하는 작용<sup>26)</sup>이 있다고 하였다.

실험적으로 xanthine 혹은 hypoxanthine은 oxygen에 의해 산화되는데 이 반응은 xanthine oxidase에 의해서 촉매되어 superoxide radical(O<sup>3</sup>)과 hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)가 생성되며<sup>29,30)</sup> 또한 철(iron)과 반응하여 hydroxyl radical(OH)과 같은 산소자유기를 생성한다<sup>31,32)</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 (Fig. 1~2) 세포에 독성을 유발하였다. 산소자유기는 세포내 protein kinase C (PKC)를 활성화시키며

이러한 PKC의 활성도의 증가는 세포내 c-fos gene의 발현을 유도하여 세포의 고사를 촉진시키거나 또는 세포 투과성의 증가를 비롯하여<sup>14,15)</sup> 세포증식의 변화 및 성장인자와 호르몬조절 등에 영향을 미친다고 보고되고 있다<sup>16)</sup>. N본 실험에서 XO/HX는 혈관내피세포에 c-fos 양성세포를 증가시켰으며(Table 1) c-fos 양성 세포의 증가에 대한 苦蔘의 방어효과를 관찰하고자 XO/HX에 노출시키기 3시간 전에 苦蔘 추출물을 처리하였다. 그 결과 처리한 농도에 비례하여 XO/HX에 의한 c-fos 양성세포수의 증가를 억제하였으며 80ug/ml의 농도로 전 처리한 군에서는 통계적인 유의성을 나타냈다(Fig. 2).

앞으로 苦蔘 추출물의 산소자유기의 독성에 대한 방어효과에 대한 기전적인 연구가 필요하리라 사료된다.

## 결론

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

## 감사의 글

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

## 참고문헌

1. 吳 普 : 神農本草經, 서울, 醫聖堂, p. 7, 1994.
2. 黃官綉 : 本草求真, 서울, 醫聖堂, p. 145, 1997.
3. 王好古 : 湯液本草, 서울, 醫聖堂, pp. 111-112, 1994.
4. 唐慎微 : 重修政和經史證類備急本草, 北京, 人民衛生出版社, p. 198, 1982.
5. 上海中醫學院 : 中草藥學, 香港, 常務印書館香港分館, pp. 205-206, 1983.
6. 汪 昂 : 本草備要解析, 新竹, 國興出版社, pp. 186-187, 1985.
7. 李時珍 : 本草綱目, 北京, 人民衛生出版社, pp. 798-802, 1995.
8. 吳儀洛 : 本草從新, 서울, 행림출판, p. 20, 1989.
9. 문관심 : 약초의 성분과 이용, 서울, 일월서각, pp. 342-344, 1991.
10. 서재영, 권강범, 조현익, 이호섭, 서은아, 김인숙, 류도곤. 苦蔘 전탕액 분획물이배양 심근세포에 미치는 영향. 동의생리학회지 15(1):149-155, 2000.
11. 최환석, 권강범, 이호섭, 류도곤. XO/HX에 의해 損傷된 培養 育髓感覺神經細胞에 미치는 加味十全大補湯의 效果. 동의생리학회지 15(1):67-72, 2001.

12. 손창식, 권강범, 김상범, 이호승, 서은아, 이호섭, 류도곤. 丹參飲 煎湯液이 心筋細胞 搏動數에 미치는 영향. 동역생리병리학회지. 15(2):241-245, 2001.
13. 성은경, 권강범, 이호승, 김희찬, 김우경, 오광수, 김영운, 금경수, 류도곤. 解語丸 전당액이 XO/HX에 의해 손상된 배양 척수감각신경세포에 미치는 효과. 동역생리병리학회지 15(3):477-482, 2001.
14. 이소라, 오연균, 박승택 : 허혈 유도에 의해 손상된 신생쥐의 배양 대뇌신경세포에 대한 vitamin E와 Desferrioxamine의 보호효과. 소아과 42(10): 1426-1433, 1999.
15. 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.
16. 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.
17. Nishizuka Y. : Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. Science 258: 607-614, 1992.
18. Kasten FH. Cytology and cytochemistry of mammalian myocardial cells in culture. Acta Histochem 9:637-647, 1971.
19. 권강범, 김구환, 전영석, 조현익, 김영석, 박관하, 백승화, 류도곤. 苦蔘 전당액 분획물이 순환기 Anaphylaxis에 미치는 영향. 대한한의학회지 20(2):37-42, 2000.
20. 김상범, 권강범, 박준수, 박관하, 류도곤. 苦蔘 유기용매 분획층이 적출 심장에 미치는 영향. 동역생리병리학회지 16(1), 160-164, 2002.
21. 侯阿兩 外 : 苦蔘藥用綜論 , 中醫藥學報, 3(48), 1994.
22. 陳馥馨 : 新編中成藥手冊, 北京, 中國醫藥科技出版社, pp. 379-381, 1994.
23. 孟憲紆 : 中成藥分析, 北京, 人民衛生出版社, pp.297-298, 1990.
24. 李廣勛 : 中藥藥理毒理與臨床, 河北, 天津科技翻譯出版公司出版, pp. 63-64, 1992.
25. 董黎明 : 實用中醫內科學, 上海, 上海科學技術出版社, pp. 62-65, 82-83, 330, 451-458, 1986.
26. 邱建榮 外 : 苦蔘在心血管疾病中的應用, 浙江中醫雜誌, p. 473, 1995.
27. 張寶鳳 外 : 苦蔘總鹽抗實驗性心律失常作用的研究, 中藥通報, 10(5) : 37-38, 1985.
28. 李丹 外: 苦蔘鹽類生物鹽的研究進展及臨床應用, 中草藥, 27(5), 308-310, 1996.
29. Fridovich I. : Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. J. Biol. Chem., 245:4053-4057, 1970.
30. Killogg E. W., and Fridovich I. : Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymatically generated superoxide and hydrogen peroxide. J. Biol. Chem., 252:6721-6728, 1977.
31. Harber F., Weiss J. : The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by anion salts. Proc. Roy. Soc. London A. 147:333-351, 1934.
32. 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.