

Glucose Oxidase에 의해서 손상된 혈관내피세포에 대한 단삼의 영향

박상면 · 이종화 · 양현웅 · 이강창^{1*}

원광대학교 의과대학, 1: 원광대학교 한의학 전문대학원

Effect of Salviae Multiorrhizae Radix on the Vasculotoxicity induced by glucose oxidase in cultured Pumonary Endothelial cells

Sang Myeon Bak, Joung Hwa Lee, Hyun Woong Yang, Kang Chang Lee^{1*}

School of Medicine, 1: Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University

Cytotoxicity of glucose oxidase(GO) and cardioprotective effect of Salviae Multiorrhizae Radix(SMR) against GO-induced cardiotoxicity were measured for evaluation of cardiotoxicity on cultured mouse pulmonary endothelial cells(PEC) by MTT assay after PEC were cultured for 8 hours at various concentrations of GO. GO was toxic in a time- and dose-dependent manner on cultured PEC after PEC were grown for 8 hours in media containing 1~60mU/ml GO. While, cultures were pretreated with 60 μg/ml SMR for 2 hours increased remarkably cell viability. From the above results, it is suggested that GO is toxic on cultured PEC by the decrease of cell viability, and herb medicine such as SMR is very effective in the prevention of vascular toxicity induced by GO.

Key words : Glucose oxidase, Cultured pulmonary endothelial cell, Salviae Multiorrhizae Radix

서 론

산소자유기는 인체의 대사과정중 사립체내의 전자전달계에 의하여 소량이 형성되어지나 항산화계의 효소에 의해서 물로 변환됨으로서 인체에는 아무런 손상을 주지 않는다는 것은 이미 잘 알려져 있는 사실이다^{1,2}. 그러나 산소자유기의 과다형성은 세포에 산화적 손상을 초래함으로써 병변을 악화시키며 이로 인해 세포의 손상은 물론 세포고사나 사멸을 초래한다^{3,4}. 최근 죽상경화증의 병리적 요인의 하나로서 산소자유기가 관여함이 제시되면서 산소자유기의 산화적 손상과 죽상경화증간의 상호 작용에 대한 병리적 현상을 규명하기 위하여 생체에서 또는 시험관내에서 많은 연구들이 진행되고 있다⁵. 특히 산소자유기는 혈관내피세포의 벽에 부착인자의 형성을 촉진시키는데 이는 혈관내로 유주하면서 혈전이나 죽상경화증을 유발함으로써 이에 대한 관심이 높아졌다^{5,6}. 따라서 산소자유기의 산화적 손상에 의하여 유발되는 혈관질환의 치료의 한 방법으로 항산화 효소나 산소라디칼 제거제와 같은 약물을 투여함으로써 효과적인 병변의 치료적 결

과를 얻었다는 보고가 되어지고 있다^{2,7}. 한편, 산소자유기는 항산화효소의 활성을 억제하여 산소라디칼의 제거능을 방해하여 그 결과 심혈관질환을 비롯한⁷, 노인성치매나 다발성 경화증과 같은 질환의 초래한다고 제시된 바 있다^{5,8}. 특히, 산소자유기는 glutamate 수용체에 관한 연구에서 흥분성아미노산을 분비케 함으로서 세포내 칼슘의 항상성에 영향을 미칠뿐만 아니라^{1,6,9}, 세포내 신호전달체계에 싸이토카인등에 영향을 주어 정상적인 세포대사를 방해하게 된다고 알려져 있다^{6,10}. 더욱이 산소자유기는 세포내 nitric oxide(NO)와 상호 작용하여 peroxynitrite라는 독성이 강한 물질을 생성함으로써 세포에 대하여 심한 독성효과를 나타낼 뿐만 아니라^{3,11,12}, 병변을 더욱 가속화 시킨다고 한다^{4,10}. 그러나 아직까지 산소자유에 의한 독성효과에 대한 기전은 자세히 알려져 있지 않으며^{7,11}, 특히 산소자유기의 산화적 손상과 혈관독성과의 상호작용에 대해서는 많은 연구가 되어 있지 않다^{2,9}. 한편, 한약추출물이 산소자유기에 의하여 유도되는 각종 심혈관이나 혈관질환등의 치료에 매우 효과적인 약리활성물질을 가지고 있다는 것이 제시되면서¹³, 한약추출물의 성분중 항산화 효과나 산소라디칼제거능을 나타내는 성분추출에 대하여 지속적인 연구가 이루어지고 있다¹⁴. 그러나 항산화능을 갖고 있는 한약추출물의 성분분석을 이용한 질환치료에 대한 연구는 많

* 교신저자 : 이강창, 경기도 군포시 산본동 1126-1, 원광대학교 부속한방병원

E-mail : kcl207@wonkwang.ac.kr Tel : 031-390-2367

· 접수 : 2002/11/15 · 수정 : 2002/12/20 · 채택 : 2003/01/25

이 되어 있지 않으며 불과하며 더욱이 한약추출물의 방어효과에 대한 기전에 대해서는 지금까지 많이 알려져 있지 않다^{13,14}. 근래에 세포배양기술이 널리 보급되면서 각종 세포의 배양과 이를 이용한 병변손상모델에서 질환의 병리적 기전규명이나이나 또는 독성물질의 검정 및 한약추출물의 효능검색 등에 널리 이용되고 있다^{8,12}.

본 연구는 산소자유기의 산화적 손상에 의한 혈관독성을 조사하기 위하여 glucose oxidase(GO)가 여러 농도로 포함된 배양액에서 생쥐의 폐동맥의 내피세포를 배양한 다음 GO의 독성효과를 시험관내 분석방법(in vitro assay)으로 조사하였으며 동시에 GO의 혈관독성에 대한 단삼의 방어효과를 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 연구에 사용한 동물은 원광대학교 의과대학 동물사육실에서 분리 사육중인 건강상태가 양호한 생후 3일된 ICR계통의 생쥐를 사용하였다.

2. 방법

1) 세포배양

혈관내피세포의 분리는 Kasten¹²의 방법에 따라 시행하였다. 생쥐의 폐동맥으로부터 분리된 혈관내피세포(PEC)를 Eagle/s minimum essential medium(MEM, Gibco)에 10% fetal bovine serum(FBS, Sigma)이 포함된 배양액에 넣어 혼합한 뒤 세포를 1×10^5 /well의 밀도로 산정하여 96multiwell에 넣어 심었다. 이때 중금속이 포함되지 않은 배양액을 대조군으로 하여 37°C, 5% CO₂로 혼합된 항온기에서 96시간동안 배양한 후 대조군과 비교 조사하였다.

2) 약재의 추출

한약재와 증류수를 환저 플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 2시간 동안 전열기로 전탕한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 진공 농축기로 감압 농축한 후 동결건조기에서 24시간 동안 동결 건조한 다음 이를 건조시켜 분말 시료를 얻었다.

3) 시약제조

본 실험에 사용한 glucose oxidase(GO, Sigma)는 각각 1M, 100mM, 10mM 및 1mM의 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 뒤 실험 전날 최종농도로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 배양액에 넣어 사용하였다.

4) GO의 처리

실험 전날까지 배양한 혈관내피세포를 0.6% D-glucose가 포함된 MEM으로 3회 세척한 후 1~60mU/ml 농도의 GO가 포함된 배양액에서 생쥐의 혈관내피세포를 1~12시간 동안 배양한 다음 이의 독성효과를 약재가 포함되지 않은 대조군과 비교 조사하였다.

5) 약재의 처리

GO의 독성효과에 대한 천오두의 효과를 조사하기 위하여 30mU/ml GO에 처리하기 2시간 전에 20~80 µg/ml의 농도로

각각 포함된 단삼을 배양 혈관내피세포에 일정 시간 노출시킨 다음 이들의 영향을 대조군과 비교하여 조사하였다.

6) 세포생존율(cell viability)조사

MTT<3-(4,5-demethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, Sigma)> 정량은 배양이 완료된 혈관내피세포에 사용 당일 제조한 50 µg/ml를 배양 용기당 2ml씩 넣어 37°C, 5% CO₂로 조절된 항온기에서 3시간 동안 배양하였다. 배양 완료 후 phosphate buffered saline(PBS)으로 2~3회 세척한 후 흡광광도계로 503nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

7) 통계처리

대조군과 실험군의 차이에 대한 통계적 유의성은 Student-t test로 비교하였으며, 통계적 유의수준은 p값이 0.05 미만인 경우로 하였다.

결 과

1. GO의 세포독성

1) 농도에 따른 영향

1~60 mU/ml의 GO가 포함된 배양액에서 세포를 8시간 동안 배양한 후 GO가 배양 혈관내피세포에 미치는 독성효과를 MTT assay에 의하여 분석한 결과 세포의 생존율이 대조군(100%)에 비하여 1 mU/ml에서는 77.4%로 나타났으며 15 mU/ml에서는 69.3%로 나타났다. 또한 30 mU/ml와 60 mU/ml에서는 각각 48.2%(p<0.05)와 21.4%(p<0.01)로 유의하게 감소하였다(Fig. 1).

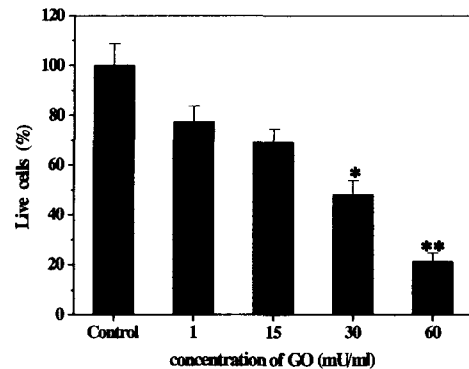


Fig. 1. Dose-dependent response relationship of glucose oxidase (GO) in cultured endothelial cells of pulmonary artery of mouse. Cytotoxicity was measured by MTT assay. The results indicate the mean±SD for 6 experiments. *p<0.05; **p<0.01

2) 시간에 따른 영향

시간의 변화에 따른 GO의 독성효과를 조사하기 위하여 30 mU/ml GO가 포함된 배양액에서 1~12시간 동안 배양한 결과 대조군(100%)에 비하여 세포의 생존율은 1시간 배양에서는 82.6%로 나타났으며, 4시간 배양한 군에서는 71.4%로 나타났다. 또한 8시간과 12시간 배양한 군에서는 53.6%(p<0.05)와 32.8%(p<0.01)로 유의하게 낮게 나타났다(Fig. 2).

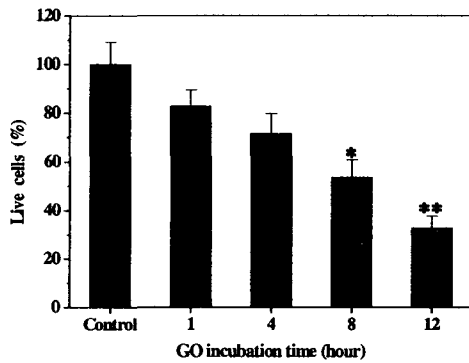


Fig. 2. Time-dependent response relationship of glucose oxidase (GO) in cultured endothelial cells of pulmonary artery of mouse. Cytotoxicity was measured by MTT assay. The results indicate the mean±SD for 6 experiments. *p<0.05; **p<0.01

2. GO의 독성에 대한 단삼(SMR)의 효과

20~80 ug/ml SMR을 처리한 후 GO의 독성에 대한 단삼의 독성방어 효과를 조사한 결과 GO만을 처리한 경우 세포의 생존율은 대조군(100%)에 비하여 37.4%로 나타났으나, 20 ug/ml SMR에서는 53.6%으로 나타났으며, 40 ug/ml에서는 65.2%로 나타났다. 또한 80 ug/ml 처리에서는 82.6%(p<0.01)로 나타나 GO만의 처리군에 비하여 유의하게 증가하였다(Fig. 3).

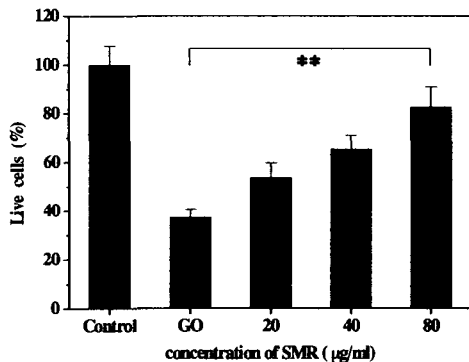


Fig. 3. Dose-response relationship on (SMR) for its vasculoprotective effect on glucose oxidase(GO). The results indicate the mean±SD for 6 experiments. **p<0.01

고찰

활성산소는 혈관내피세포를 비롯한 다양한 세포에 있어서 막지질을 산화시킴으로서 막손상에 의한 세포손상을 유발한다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다^{3,10}. 특히 glucose oxidase(GO)에 의한 산화적 손상은 세포내의 superoxide dismutase(SOD)나 catalase와 같은 항산화효소를 비롯하여 이차전달자들에 영향을 줌으로서 세포의 고사나 사멸을 초래한다^{6,11}. 그러나 활성산소의 산화적 손상에 의한 혈관독성에 대한 기전이나 작용현상들에 대해서는 아직 잘 정립되어 있지 않다^{1,12}. 따라서 본 연구에서는 활성산소의 하나인 GO가 혈관내피세포에 미치는 영향을 조사하

기 위하여 생쥐의 폐동맥으로부터 순수분리 배양한 혈관내피세포(PEC)에 1~60mU/ml의 GO가 각각 포함된 배양액에서 세포를 처리한 후 MTT assay에 의하여 세포생존율을 조사한 결과 GO는 PEC에 처리한 시간과 농도에 비례하여 세포생존율을 유의하게 감소시켰으며 특히 30mU/ml와 60mU/ml GO의 농도에서는 유의한 세포생존율의 감소를 나타냈다. 이같은 본 실험의 결과는 심근허혈시 산소자유기에 의한 심근독성에 대한 보고나⁵, 또는 산소자유기가 신경세포에 독성효과를 나타냈다는 보고와 일치함을 알 수 있었다⁶. 본 실험의 연구 결과나 타연구자들의 실험 결과들은 산소자유기가 생쥐의 배양 혈관내피세포에 독성을 가지고 있음을 말해주며 이같은 GO의 혈관독성은 아마도 GO가 흥분성아미노산의 분비유도에 의하여 혈관내피세포의 칼슘의 항상성을 깨뜨리고 또한 이로 인한 Ca²⁺-dependent PKC와 같은 세포내 신호전달체계에 영향을 준 것으로 생각된다^{6,9}. 그러나 또 다른 가능성은 GO가 superoxide dismutase(SOD)나 catalase와 같은 항산화 효소에 손상을 주어 그 결과 효소활성을 저하시킴으로서 미처 처리되지 못한 활성산소들이 세포에 직접 손상을 주었을 것도 배제할 수는 없다^{2,9}. 한편, GO의 산화적 손상에 대한 한약추출물인 단삼(SMR)의 방어효과를 조사하기 위하여 SMR이 20~80 ug/ml의 농도로 각각 포함된 배양액에서 심근세포를 2시간 동안 처리한 다음 이를 다시 30mU/ml GO에 8시간 동안 처리한 결과 세포생존율은 SMR을 세포에 처리한 농도에 비례하여 세포의 생존율을 증가시켰다. 특히 80 ug/ml SMR의 처리에서는 세포생존율이 82.6%로 나타나 이는 GO만을 처리했을 때의 생존율인 37.4%에 비하면 유의하게 증가하였다 (p<0.01). 본 실험에서 SMR에 의한 세포생존율의 증가는 SMR이 GO에 의한 산화적 손상을 방어해 주는 약리활성을 가지고 있음을 제시하고 있으며¹³, 이는 아마도 SMR의 성분을 이루고 있는 tanshinone을 비롯하여 miltirone과 같은 성분들이 상호작용함으로써 활성산소의 산화적 손상에 대한 방어효과를 나타냈을 가능성이 클 것으로 생각된다^{13,14}. 그러나 SMR의 항산화효과에 대한 더욱 정확한 기전규명을 위해서는 항산화계의 측면을 비롯하여 흥분성아미노산과 활성산소와의 관계 및 glutamate 수용체등의 측면에서 종합적인 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

결론

Glucose oxidase(GO)의 혈관독성기전과 GO의 세포독성에 대한 단삼(SMR)의 효과를 조사하기 위하여 생쥐의 폐동맥의 혈관내피세포(PEC)를 순수 분리배양한 후 1~60mU/ml GO가 각각의 농도로 포함된 배양액에서 8시간 동안 배양한 다음 MTT assay에 의한 세포생존율을 조사하였다. 그 결과 GO는 세포에 처리한 농도와 시간에 비례하여 PEC의 생존율을 유의하게 감소 시킴으로서 세포독성을 나타냈다. 한편, 배양 PEC를 80 ug/ml 단삼이 포함된 배양액에서 2시간 동안 전처리한 결과 세포생존율은 유의하게 증가하였다. 이상의 결과로부터 GO는 생쥐의 배양 PEC에 심근독성을 나타냈으며 SMR이 GO의 독성에 대하여 유효한 방어효과를 보였다.

감사의 말

이 논문은 2002년도 두뇌한국21과 원광대학교의 교비 일부 지원에 의해서 연구됨

참고문헌

1. Row GT, Manson NH, Caplan M, Hess MC : Hydrogen peroxide and hydroxyl radical mediation of activated leukocyte depression og cardiac sarcoplasmic reticulum : Participation of cyclooxygenase pathway. *Cir Res* 53 : 584-591, 1983.
2. Witting LA : Vitamin E and lipid antioxidants in free-radical inhibited reactions. In : *Free Radicals in Biology*, pryor WA, ed, New York Academic Press pp.295-319, 1980.
3. Floyd RA : Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J* 4:2587-2597, 1990.
4. Kaneko M, Elmban V, and Dhalla NS : Mechanism for depression of heart sarcolemmal Ca^{2+} pump by oxygen free radicals. *Am J Physiol* 261 : 4948-4955, 1989.
5. Romaschin A. D., Rebeyka I., Wilson G. J., and Mickle D. A. G. : Conjugated dienes in ischemic and reperfused myocardium free radical mediated injury. *J M Cell Cardiol* 19 : 289-302, 1987.
6. Toraason M, and Breitenstein M : Intracellular calcium transients in cardiac myocytes exposed to carbon tetrachloride(Abstract). *Toxicologist* 11 : 310, 1991.
7. Przyklenk K, Kloner RA : Superoxide dimutase plus catalase improve contractile function in the canine model of "stunned myocardium" . *Cir Res* 58 : 149, 1986.
8. Marivi N., and Michael G: Neuroprotective effects of early vs. late administration of dantrolene in experimental status epilepticus. *Neuropharmacology* 38:1343-1348, 1999.
9. Pellegrini-Giampietro D. E., Cherici G., Alesiani M., Carla V., Moroni F : Excitatory amino acid release from rat hippocampal slices as a consequence of free radical formation. *J Neurochem* 51 : 1960-1963, 1988.
10. Yamamoto M, Shima T, Uozumi T, Sogabe T, Yamada K, Kawasaki T : A possible role of lipid peroxidation in cellular damages caused by cerebral ischemia and protective effect of alpa-tocopherol administration. *Stroke* 14:977-982, 1983.
11. Difazio M, C.. Hollingsworth Z., Young A. B.. Penny J.B.: Glutamate receptors in the substentia nigra of Parkinson's disease brains. *Neurology*. 42:402, 1992.
12. Kasten FH : Cytology and cytochemistry of mammalian myocardial cells in culture. *Acta Histochem* 9:637-647, 1971.
13. 최윤정, 김장현 : 사군자탕 및 사물탕이 methotrexate로 유도된 흰쥐의 면역기능저하에 미치는 영향. *대한한방소아과학회지* 13(1):253-75, 1999.
14. 전진오, 정현우: 육미지황탕이 면역세포에 미치는 실험적 효과. *대한한방내과학회지* 21(2):243-50, 2000.