

산화적 손상에 의해 유발된 심근세포 독성에 대한 補陽還五湯의 방어효과

이운재, 임은경, 정현애*, 신선호

원광대학교 한의과대학 전주한방병원, 원광대학교 한의과대학 익산한방병원*

Protective Effects of *Boyanghwanoh-tang* on Zinc-mediated Cytotoxicity in H9c2 Cardiomyoblast Cells

Yun-Jae Lee, Eun-Kyung Rhim, Hyun-Ae Jeong*, Sun-Ho Shin

Wonkwang University Oriental Jeonju Medicine Hospital, Jeonju, Korea
Wonkwang University Oriental Jeonju Medicine Hospital, Iksan, Korea*

The water extract of *Boyanghwanoh-tang* has been used for treatment of ischemic vascular disease in oriental medicine. However, little is known about the mechanism by which the water extract of *Boyanghwanoh-tang* rescues cells from these damages. Therefore, this study was designed to evaluate the protective effects of *Boyanghwanoh-tang* on zinc-mediated cytotoxicity in H9c2 cardiomyoblast cells.

This study demonstrates that, after treatment of H9c2 cells with zinc, there was a decrease in cell viability in a dose dependent manner, and there was a chromatin condensation. Zinc induced the change of cell morphology. In addition, zinc induced mitochondrial dysfunction. Zinc-induced H9c2 cell death was remarkably prevented by the pretreatment of *Boyanghwanoh-tang* consistently with increase of the peroxiredoxin 1, 2, 3, 5, and 6 expression.

Taken together, the results suggest that zinc induced severe cell death in H9c2 cardiomyoblast cells, and that protective effects of *Boyanghwanoh-tang* against oxidative injuries are achieved through regulation of peroxiredoxin expression.

Key Words: *Boyanghwanoh-tang*, cardiomyoblast, zinc, cytotoxicity

1. 緒 論

補陽還五湯은 王清任의 『醫林改錯』¹에서 처음 수록되었으며 半身不遂, 口眼喎斜, 言語蹇澀, 口角流涎, 大便頻數, 遺尿不禁 등을 치료하는 처방으로, 근래에는 뇌혈관 질환뿐만 아니라, 소화기 질환, 신경계 질환, 당뇨병 및 심혈관계 질환 등까지 응용범위가 확대되고 있다².

최근 식생활과 생활환경의 변화로 인해 증가하고 있는 고혈압, 고지혈증 및 죽상동맥경화증 등의 심혈관계 질환은 심장에 일시적 혹은 지속적인 허혈 상태를 야기시키며, 심근에 대한 산소공급의 부족을 초래한다. 이러한 손상 부위를 약물이나 수술적인 요법을 통해 재관류시킬 때, 심근세포에서 O_2^- , H_2O_2 , OH^- 등의 활성산소종이 발생하는데, 비록 세포의 생리적 방어체계인 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 등이 작동하지만 과도한 활성산소종의 발생은 이러한 능력을 초과하여 심근세포 손상을 초래하게 된다^{3,4}.

이러한 활성산소종을 제거하는 역할을 하는 단백

· 접수 : 2005. 4. 28. · 채택 : 2005. 5. 20.
· 교신저자 : 이운재, 전북 전주시 덕진구 덕진동
원광대학교 전주한방병원
(Tel. 063-270-1013
E-mail : relax33@hanmail.net)

질인 Peroxiredoxin은 인체를 비롯한 자연계의 모든 생명체에 존재하는데, 외부 스트레스에 의한 세포내 활성산소 등의 농도를 인지하고, 기능적 전환 및 발현을 통해 세포내 단백질 등의 변성, 세포의 기능 상실을 막아줌으로써 생체방어 조절기능을 가지며 여섯 개의 subfamily가 보고되었다⁵.

본 연구에서는 補陽還五湯이 심근 세포의 산화적 손상에 미치는 영향을 알아보기 위하여, 먼저 白鼠의 H9c2 심근세포에 대해 아연을 처리하여 심근세포 독성과 산화적 손상 기전을 관찰하였고, 補陽還五湯을 전처리한 후 아연을 처리하여 H9c2 심근세포 손상을 유발한 후, 세포 생존율에 미치는 변화, 미토콘드리아 막전위 변화, 및 Peroxiredoxin의 발현 변화를 관찰하였다. 또한 活血祛瘀, 安神寧心하는 작용이 있어 관상동맥성 심장병과 고혈압 및 혈전색성 맥관염 등에 활용되는 丹蔘을 군약으로 조성한 丹蔘還五湯을 H9c2 심근세포에 전처리한

후 아연을 처리하여 세포 생존율을 관찰하여 補陽還五湯과 비교연구하였다⁶.

II. 材料 및 方法

1. 재료

1) 세포주

Embryonic rat의 심장에서 유래한 세포주인 H9c2 세포는 ATCC(American Type Culture Collection)로부터 구입하여 계대배양하면서 실험을 실시하였다.

2) 약재

본 실험에 사용된 補陽還五湯의 처방내용은 王淸任의 『醫林改錯』¹에 의거하였으며, 1貼의 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1, 2.).

3) 시약 및 기기

실험에 필요한 DMEM, 항생제, trypsin 및 우태아 혈청(FBS)은 GIBCO BRL社(Grand Island, NY,

Table 1. Prescription of *Boyangwanoh-tang*

韓藥名	生藥名	重量(g)
黃芪	Astragali Radix	37.5
當歸尾	Angelicae gigantis Radix	7.50
赤芍藥	Paeoniae Radix	5.625
川芎	Cnidii Rhizoma	3.75
蚯蚓	Lumbricus	3.75
桃仁	Percicae Semen	3.75
紅花	Carthami Flos	3.75
	Total amount	65.625

Table 2. Prescription of *Dansamhwanoh-tang*

韓藥名	生藥名	重量(g)
丹蔘	Salviae Radix	18.75
當歸尾	Angelicae gigantis Radix	7.50
赤芍藥	Paeoniae Radix	5.625
川芎	Cnidii Rhizoma	3.75
蚯蚓	Lumbricus	3.75
桃仁	Percicae Semen	3.75
紅花	Carthami Flos	3.75
	Total amount	46.875

USA) 제품을, 배양용기(24 well plate와 10 cm dish)는 Falcon社(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphe-nyltetra zolium bromide(MTT), Hoechst 33342, bichinonic acid(BCA), dimethyl sulfoxide(DMSO), Reduced glutathione(GSH), N-acetyl-L-cysteine(NAC)는 Sigma社(St. Louis, Missouri, USA)에서, JC-1은 Molecular probe社(Eugene, OR, USA)에서 구입하였다. Peroxiredoxin에 대한 primer는 (주)제노텍(대전)에서 주문, 구입하였다.

2. 방법

1) 시료의 조제

실험에 사용된 藥材는 물을 용매로 사용한 추출 방법을 사용하여 본 실험에 이용하였다. 물 추출물(H₂O extract)은 음건된 補陽還五湯 및 丹參還五湯 각 100g을 물 1ℓ와 함께 냉각기를 부착한 환저플라스크에서 3시간 끓인 다음 거즈로 여과하고 3200rpm으로 20분간 원심분리 후 농축기(Rotary evaporater)로 농축한 다음 -70℃(Deep Freezer)에서 12시간 이상 동결시키고 Freeze Dryer로 동결건조 시킨 것을 시료로 사용하였다.

2) H9c2 세포주 배양 및 시약처리

H9c2는 CO₂ 세포 배양우태기(37℃, 5% CO₂)에서 10% 아 혈청이 포함된 DMEM으로 배양하였으며, 24시간 간격으로 배양액을 교체하여 log phase에 있는 세포에 補陽還五湯, 丹參還五湯 및 아연을 각각 처리한 후 세포 고사현상과 이에 연관된 생화학 실험을 수행하였다. ZnCl₂는 100mM 농도로 증류수에 녹여서 사용하였다.

3) 세포생존율 측정

세포의 생존율 측정은 MTT 분석법으로 측정하였다. 세포 배양판(24-well plate)에 세포(1×10⁵ 세포수/ml)를 1ml씩 분주하여 12시간 이상 CO₂ 세포배양기 안에서 안정시킨 후 시료를 각각의 조건에 따라 처리하였다. 각각의 배양세포에 배양액의 1/10으로 MTT 용액(5mg/ml in PBS)을 첨가하였다. 4시간 후, 배양액을 제거하고 1ml DMSO를 첨가하여 세포를 용해시킨 다음,

분광광도계(THERMO max, USA)를 이용하여 540nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 정상 대조군과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

4) DAPI 염색

ZnCl₂을 처리한 세포를 4% formaldehyde 용액에 고정시킨 후 PBS로 세척하고, 10μM DAPI로 10분간 염색한 후 다시 PBS로 세척하여 형광현미경(Leica MPS60, Germany)으로 핵의 형태학적 변화를 관찰하였다.

5) Total RNA의 분리

배양 세포로부터 total RNA의 분리는 RNAzolTM B(Tel-Test, USA)를 이용하여 제조회사가 제공하는 방법에 따라 수행하였다. 10cm 배양접시에서 배양된 3~5×10⁶ 세포를 PBS로 세척한 후, 1.5ml 튜브에 이동시킨 후 3,000rpm에서 5분 원심 분리하여 수거하였다. 상층액을 제거한 세포 침전물은 600μl RNAzolTM B로 용해시킨 후, 60μl chloroform을 첨가하여 4℃에서 5분 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 13,000rpm, 4℃에서 20분 원심 분리하여 상층액을 새로운 튜브에 옮긴다. 위 상층액에 동량의 isopropanol을 첨가하여 섞어준 후, 4℃에서 30분 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 13,000rpm, 4℃에서 20분 원심 분리하고, 침전물을 80% 에탄올로 세척하였다. 세척된 RNA는 건조 후, DEPC를 함유한 증류수 20μl로 용해하여 분광광도계에서 흡광도를 측정하여 정량 하였다.

6) 역전사 중합 효소 연쇄 반응

역전사 중합 효소 연쇄 반응(RT-PCR)은 3~5μg total RNA와 reverse transcriptase(MMLV; GIBCO, BRL)를 이용하여 제조회사에서 제공하는 방법에 따라서 수행하였다. Total RNA를 70℃에서 10분 변성시킨 후, 4℃에서 급냉 후 사용하였다. 역전사 반응은 total RNA(3~5μg), oligo d(T) (1μg), 2μl dNTP(10mM), MMLV reverse transcriptase(200U), DTT(10mM), RNasin(1μl; Promega, USA)을 20μl 완충용액(50mM Tris-Cl pH 8.3, 75mM KCl, 3mM MgCl₂)으로 용해하여 42℃에서 60분 반응하여 수행하였다. 2μl 역전사 반응액, 2μl dNTP(2.5mM), 3μl

primer(5μM), Taq DNA polymerase(0.6U; TAKARA)가 함유된 30μl 반응액(20mM Tris-Cl pH8.0, 100mM KCl, 0.1mM EDTA, 1mM DTT)을 94℃에서 5분 predenaturation 시킨 후, 변성(denaturation, 94℃, 45초), 결합(annealing, 55℃, 30초), 연장(elongation, 72℃, 30초)의 조건에서 33 cycles을 수행하였다. PCR 반응 후 Fas DNA 존재는 2% agarose gel에 전개하여 확인하였다.

7) 통계처리

표시된 결과는 3번 이상의 독립적인 실험결과이며, 실험결과의 통계처리는 student's t-test에 준하여 처리하였고, p-value가 최대치 0.05(p<0.05)이하인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

III. 結果

1. 산화적 손상이 H9c2 심근세포에 미치는 독성

H₂O₂, 아연(ZnCl₂) 및 아드리아마이신(ADR)이 H9c2 세포의 생존율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 다양한 농도로 처리한 후 생존율을 MTT 방법으로 측정하였다. 세포의 생존율은 50μM H₂O₂ 처리군에서는 대조군의 73%, 100μM 농도에서는 31%로 현저히 감소하였으며, 200μM의 농도에서는 25% 미만으로 감소하였다. 또한, ZnCl₂ 처리시 125μM 이상의 농도에서 현저한 생존율 저하가 시작되어 250μM 이상에서는 30% 미만의 생존율이 관찰되었다 (Fig. 1.). H₂O₂(150μM)와 ZnCl₂(200μM)을 각각 12

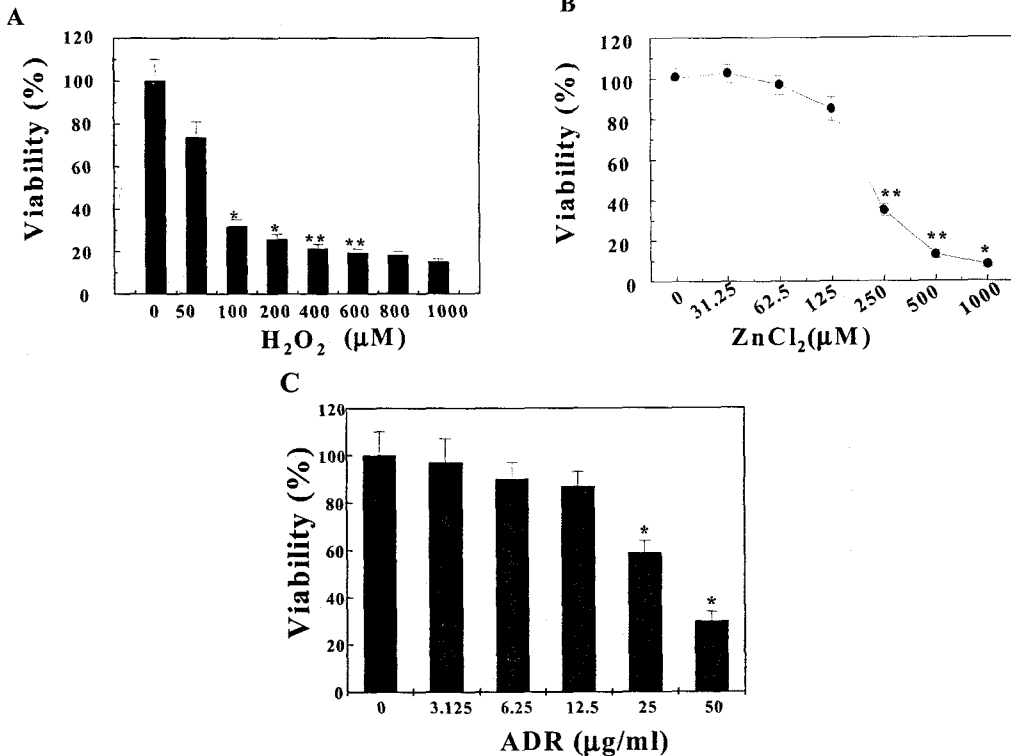


Fig. 1. Oxidative stresses decreased the viability of H9c2 cells in a dose-dependent manner.

A) cells were treated with various concentrations of 62.5~1000μM H₂O₂ for 12hr, B) cells were treated with various concentrations of 62.5~1000μM ZnCl₂ for 12hr, and C) cells were treated with various concentrations of 3.125~50μg/ml adriamycin(ADR) for 24hr. Cell viability was determined by MTT assay. Data represent the mean±S.D. of quadruplicates. *, p<0.05, **, p<0.01 compared with control.

시간 처리한 결과, 처리시간에 의존적으로 생존율이 감소되어 H9c2 세포독성은 시간이 경과함에 따라 축적됨을 알 수 있었다(미발표성적). 심장장애의 부작용이 보고된 ADR의 처리시에도 25µg/ml의 농도에서 59%의 세포생존율을 보였으며, 50 µg/ml 처리시 30%의 세포생존율을 보였다.

2. 補陽還五湯 및 丹蔘還五湯이 산화적 손상에 의한 H9c2 세포의 생존율에 미치는 영향

H9c2 세포주에서 산화적 손상에 의해 유발되는 세포사멸에 대한 補陽還五湯 및 丹蔘還五湯의 방어 효과를 알아보기 위하여 세포에 250µg/ml, 500µg/ml 및 1000µg/ml의 補陽還五湯 및 丹蔘還五湯을 전처리한 후 H₂O₂, ZnCl₂ 및 ADR을 각각 처리하여 세포생존율의 변화를 MTT 방법으로 조사하였다. 여기서 補陽還五湯 및 丹蔘還五湯 단독 처리에 의한 세포독성은 관찰되지 않았다. H₂O₂ 12시간 처리시

30%의 세포 생존율을 보였으며, 補陽還五湯이나 丹蔘還五湯 전처리에 의해서 세포생존율의 회복은 관찰되지 않았다(미발표성적). 그러나 ZnCl₂ 처리군에서는 12시간 처리시 H9c2 세포의 생존율은 30% 미만으로 감소하였으나, 250µg/ml의 補陽還五湯 처리시 72%, 500µg/ml의 補陽還五湯 처리시 82%, 1000µg/ml의 補陽還五湯 처리시 94%의 세포생존율을 보였다(Fig. 2.). 또한 丹蔘還五湯 전처리에 의해서도 동일한 효과를 보였으며, ADR 처리군에서는 24시간 처리시 H9c2 세포의 생존율은 25% 미만으로 감소하였으나, 250µg/ml의 丹蔘還五湯 처리시 38%, 500µg/ml의 丹蔘還五湯 처리시 59 %, 1000 µg/ml의 丹蔘還五湯 처리시 64%의 세포생존율을 보였다(Fig. 3.). 이상의 결과에서 補陽還五湯 및 丹蔘還五湯은 세포내 직접적인 H₂O₂의 제거보다는 ZnCl₂ 및 ADR 등 세포내 기전에 의해 발생된 산화적 손상에 효과적임을 알 수 있었다.

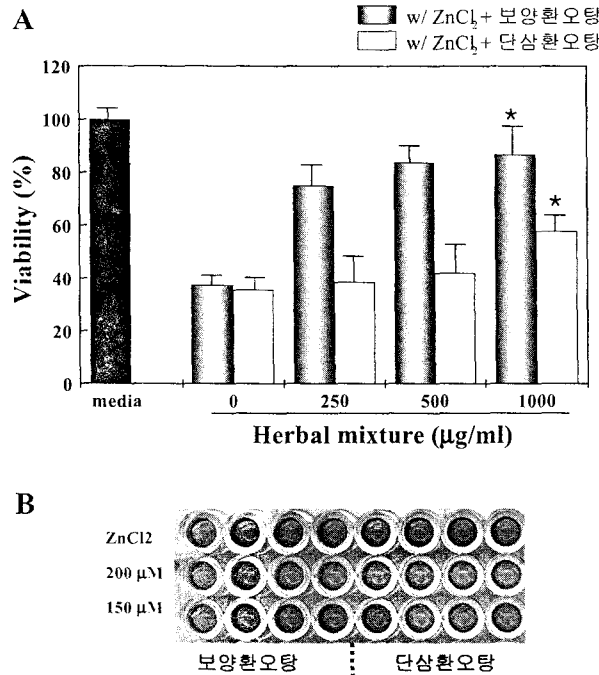


Fig. 2. Protective effect of *Boyanghwanoh-tang* and *Dansamhwanoh-tang* on the death of H9c2 cells by ZnCl₂. *Boyanghwanoh-tang* was preincubated for 30minutes in H9c2 cells and followed by the addition of 200 µM ZnCl₂ for 12hrs. Then, cell viability was determined by MTT assay. Data represent the mean±S.D. of quadruplicate. *, p<0.005 by compared with proportions.

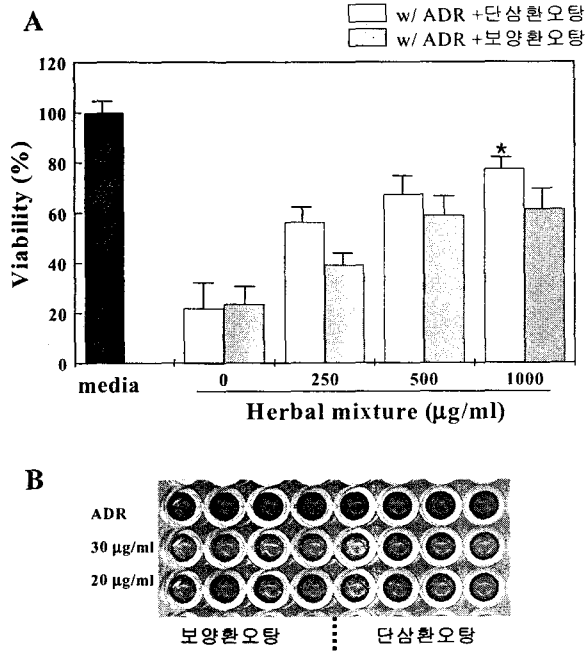


Fig. 3. Protective effect of *Boyanghwanoh-tang* and *Dansamhwanoh-tang* on the death of H9c2 cells by ADR. *Dansamhwanoh-tang* was preincubated for 30minutes in H9c2 cells and followed by the addition of 30 µg/ml ADR for 24hrs. Then, cell viability was determined by MTT assay. Data represent the mean±S.D. of quadruplicate. *, p<0.005 by compared with proportions.

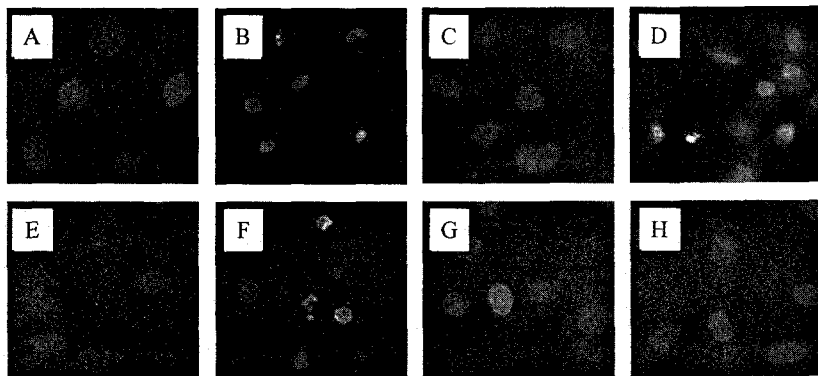


Fig. 4. Protective effects of *Boyanghwanoh-tang* and *Dansamhwanoh-tang* on photomicrograph of nuclei by DAPI staining. H9c2 cells were treated with ZnCl₂ or ADR, stained with DAPI, and observed under florescence microscope. A), E) control cells. B), cells treated with 200µM ZnCl₂, C), cells treated with 1000µg/ml *Boyanghwanoh-tang* only, D) cells treated with 1000µg/ml *Boyanghwanoh-tang* and ZnCl₂, F), cells treated with 30µg/ml ADR only, and G), cells treated with 1000µg/ml *Dansamhwanoh-tang* only, H) cells treated with 1000µg/ml *Dansamhwanoh-tang* and 30µg/ml ADR.

3. 補陽還五湯 및 丹蔘還五湯이 산화적 손상에 의한 핵 분절에 미치는 영향

산화적 손상에 의한 H9c2 세포 죽음의 특성을 알아보기 위하여 핵 분절 현상을 DAPI 염색으로 확인

하였다. 補陽還五湯(1000µg/ml) 혹은 ZnCl₂ 및 ADR 각각 150 µM를 단독 처리한 실험군과 補陽還五湯 및 丹蔘還五湯을 30분 전처리한 후 ZnCl₂ 및 ADR 을 처리한 실험군을 10µM DAPI로 염색하여 형광

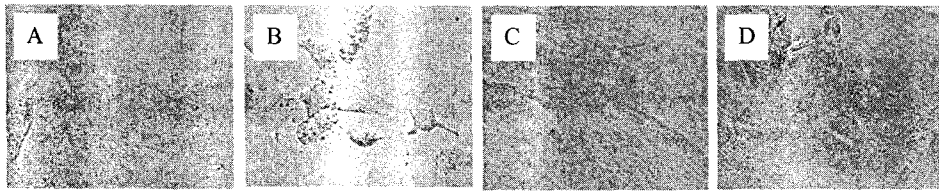


Fig. 5. Pretreatment of H9c2 cells with prevented the cytotoxicity and morphological change by H₂O₂.

Cells were treated with ZnCl₂(200μM) alone, *Boyanghwanoh-tang*(1000μg/ml) alone and pretreated with *Boyanghwanoh-tang* before ZnCl₂ for 6 hr. Then, cells were observed under phase contrast microscopy. (A), control cells. (B), cells treated with ZnCl₂. (C), cells treated with *Boyanghwanoh-tang* and (D), cells pretreated with *Boyanghwanoh-tang* before ZnCl₂.

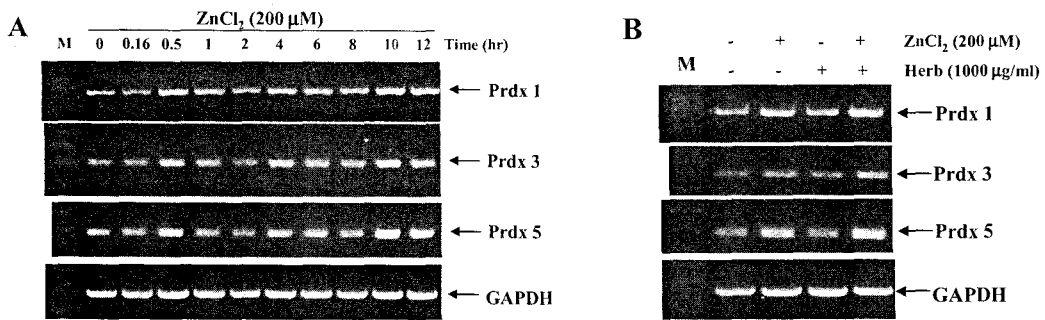


Fig. 6. Effect of *Boyanghwanoh-tang* on zinc induced mRNA expression of peroxiredoxins(1, 3, 5) in H9c2 cells.

Cells were treated with 200 μM ZnCl₂ for various periods. mRNA of Peroxiredoxins were amplified by RT-PCR.

현미경으로 관찰하였다. 그 결과 ZnCl₂ 처리군에서 핵은 세포고사의 형태학적 특징인 염색사 응축(chromatin condensation)이 관찰되었으나 핵 분절(nuclear fragmentation)은 관찰되지 않았다. 그러나 ADR 단독 처리시 전형적인 핵 분절이 관찰되었으며 이는 補陽還五湯 및 丹蔘還五湯 전처리에 의하여 정상 대조군 수준의 타원형의 온전한 핵의 형태로 관찰되었다(Fig. 4.).

4. 補陽還五湯의 아연에 의한 H9c2 세포의 형태적 변화에 대한 효과

아연에 의한 H9c2 세포의 형태적 변화를 알아보기 위하여 위상차 현미경으로 세포의 형태 변화를 관찰하였다. H9c2 세포는 아연(ZnCl₂ 200 μM) 6시간 단독 처리시 세포수의 현저한 감소와 세포의 응축 등의 변화가 관찰되었으나, 補陽還五湯(1000μg/ml)을 30분간 전처리한 군에서는 대조군 수준의 세포수와 형태가 유지되는 것을 확인하였다. 또한,

補陽還五湯 단독처리군의 세포수 및 형태는 대조군과 유사하여 補陽還五湯 자체의 세포 독성은 확인할 수 없었다(Fig. 5.).

5. 補陽還五湯이 아연에 의한 Peroxiredoxin의 발현에 미치는 영향

아연에 의한 세포고사에서 유해 활성산소를 분해하는 역할을 담당하는 단백질인 Peroxiredoxin(Prdx)의 발현 변화와 이때 방어 작용을 하는 補陽還五湯의 효과를 확인하기 위하여 RT-PCR 방법으로 조사하였다. 먼저 H9c2 세포에 아연(200μM)을 다양한 시간동안 처리한 후 RNA를 추출하여 각 Prdx에 대한 RT-PCR을 시행하였다. 그 결과, Prdx 1, 3 그리고 5는 시간의존적인 발현 증가가 관찰되었으며, 처리 12시간에 최대의 발현 증가를 보였다. 이는 외부 자극에 대한 방어작용을 위한 기작으로 보여지며, 補陽還五湯 30분 전처리시 아연 처리군에 비해 현저한 발현증가가 관찰되었다(Fig. 6.). 또한 Prdx 2와

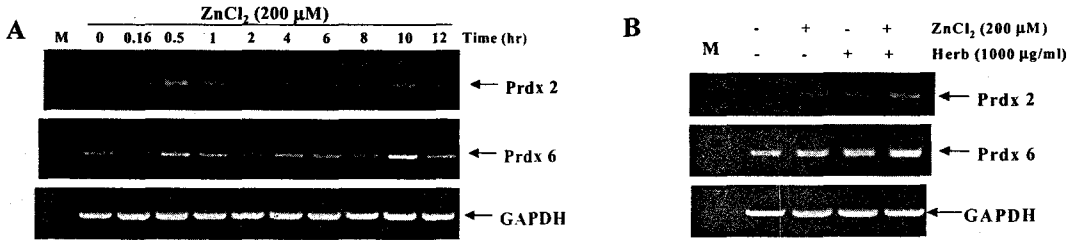


Fig. 7. Effect of *Boyanghwanh-tang* on zinc induced mRNA expression of peroxiredoxins(2, 6) in H9c2 cells. Cells were treated with 200μM ZnCl₂ for various periods. mRNA of Peroxiredoxins were amplified by RT-PCR.

Prdx 6은 아연 처리 30분과 1시간 후에 발현이 일시적으로 증가하였으나 시간에 따른 발현 변화는 관찰되지 않았으며, 補陽還五湯 30분 전처리에 의하여 발현이 증가되었다(Fig. 7.). 이때 RNA량의 정량을 위해 GAPDH를 internal standard로 사용하였다.

IV. 考察 및 結論

補陽還五湯은 王清任의 『醫林改錯』¹에 처음 수록된 처방으로써 半身不遂, 口眼喎斜, 言語蹇澀, 口角流涎, 大便頻數, 遺尿不禁 등의 증상을 치료한다고 하였는데, 中風의 主症인 半身不遂의 根源은 元氣의 虛損에 의해 半身이 無氣한 때문이라고 하였다. 韓醫學에서 氣와 血은 相互依存 및 相生하여 氣行則 血行하고 氣滯則 血滯하는데, 補陽還五湯은 大補元氣하는 黃芪를 君藥으로 하여 血行을 이끌고 當歸尾, 赤芍藥, 川芎, 桃仁, 紅花, 蚯蚓 등 祛瘀活血藥으로 보조함으로써 本虛表實한 氣虛血瘀證을 치료하는 방제이다⁷. 丹蔘還五湯은 補陽還五湯에서 黃芪를 去하고 丹蔘을 加한 것으로 丹蔘은 活血祛瘀, 安神寧心, 排膿, 止痛하여 心絞痛, 癥瘕, 積聚, 瘀血腹痛, 骨節疼痛, 驚悸不眠, 惡瘡腫毒 등을 치료하는 작용이 있다⁶.

補陽還五湯에 대한 實驗的 研究로서, 金⁸은 血栓症 및 高粘度血症에 대한 改善作用을, 張⁹은 血液循環의 改善 및 血栓溶解 作用을, 王¹⁰은 腦血栓症에 대한 改善作用을, 文¹¹은 血壓降下 作用을, 金¹²은 局所腦血流量 개선작용을, 金¹³은 營養血清缺乏에 의한 PC12細胞의 枯死를 방어하는 작용을 밝힌 바가

있다. 또한 心血管係에 대한 연구에서 普¹⁴은 狹心症 및 冠狀動脈疾患에서도 유효하다고 하였는데, 狹心症 및 冠狀動脈疾患은 冠狀動脈에 혈액공급 부족으로 심근허혈에 의한 胸痛을 주로 호소하는 병증으로 辨證上 心氣不足, 心血瘀滯인 경우가 많아 益氣活血하고 通絡止痛하는 本方이 효과가 있다고 하였다. 또한 鄭¹⁵은 冠狀動脈 血流量 增加와 強心作用, 自律神經 調節에 의한 3度 房室傳導 遮斷에 치료 효과가 있음을 보고 하였다. 그러나 심근세포의 산화적 손상에 대한 방어 효과에 대해 실험적으로 밝힌 보고는 아직 없다.

虛血性 심질환은 冠狀動脈의 粥狀硬化 등에 의해 심근에 대한 혈류와 산소의 부족을 초래하는 질환으로서 狹心症, 心筋梗塞症 등이 이에 해당한다¹⁶. 심근에 허혈상태가 지속되면 활성산소종이 발생하는데, 비록 세포내 생리적 방어체계가 작동하지만 과도한 활성 산소종의 발생은 이러한 방어체계의 능력을 초과하게 되어 심근세포의 손상을 야기시킨다¹⁷.

한편, 아연(Zinc)은 세포막의 주요 구성성분이며, 막의 구조와 기능, 그리고 효소의 활성화에 중요한 기능을 수행하고, 중추신경계에서는 세포와 세포간 신호전달의 매개체로서의 역할을 한다¹⁸. 특히 뇌세포 내에서 아연 농도는 zinc transporters(ZnT1, ZnT2, ZnT3) 및 metallothionein(MT) 등에 의해 조절된다¹⁹. 뇌세포에서 다량의 자유상태 아연이 신경세포 연결 이전 소포에 존재하고 있다가 신경자극에 의해 방출된다²⁰. 방출된 아연의 정확한 역할에 대해서는 아직 잘 밝혀져 있지 않지만 N-methyl-D-aspartate (NMDA), GABA(Gamma-Amino-Butyric Acid) 및

voltage-gated calcium channel 등을 통한 이온 혹은 전기적 신호 등을 방해한다²¹⁻²². 또한 대뇌결절의 신경세포에서는 아연의 짧은 기간 노출만으로도 신경세포 독성을 야기시킨다²³. 많은 뇌질환에 있어서 흥분독성이 신경세포 사멸의 주요한 기전으로 알려져 있지만 최근 전일과성 허혈(global transient ischemia)이나 발작(seizures) 등에서 보여지는 뇌세포 내의 아연의 이동 및 축적 과정이 신경세포의 사멸을 초래하는 또 다른 주요 기전의 하나로 대두되고 있다²⁴. 최근 Morishima 등²⁵은 아드리아마이신(Adriamycin)에 의한 심장근육 독성 발생시 심장근육 세포층에 현저한 아연의 축적이 이루어짐을 보고하였으나 심장 근육세포에 미치는 아연의 축적기전과 산화적 손상에서의 역할 등에 대해서는 아직까지 명확히 밝혀진 바가 없다.

본 연구에서는 Adriamycin에 의한 심장근육 독성에서 관찰되는 아연의 축적이 산화적 손상과 심장세포의 사멸에 밀접하게 연관되어 있다는 보고²⁶를 기반으로 심근세포주인 H9c2에 Adriamycin 및 아연의 세포독성을 확인하였고, 이 때 補陽還五湯과 丹蔘還五湯이 Adriamycin 및 아연에 의한 심근세포 손상에 대해 나타내는 방어효과 및 작용기전을 관찰하였다. 그 결과, 아연과 Adriamycin은 H9c2 세포에서 농도, 시간 의존적으로 세포사멸을 유도하였으며, 핵의 분절과 응축현상을 보이는 세포고사임을 확인하였다. 이렇게 유발된 H9c2 세포사멸에 대한 補陽還五湯 및 丹蔘還五湯의 방어효과는 처리 농도에 의존적으로 아연의 세포독성과 Adriamycin에 의한 세포독성을 억제하였으며, 핵의 분절 및 응축을 억제하여 정상 대조군과 유사한 핵의 형태적 소견을 보였다. 그러나 산화적 손상에 대한 전반적인 효과는 丹蔘還五湯에 비하여 補陽還五湯의 효과가 탁월하였으며, 補陽還五湯은 아연에 의한 세포독성에서, 그리고 丹蔘還五湯은 Adriamycin에 의한 세포독성에 더 탁월하였다. 따라서 본 연구에서는 Adriamycin에 의한 아연의 축적 시 나타나는 심근 세포의 손상에 초점을 맞추고 다음 실험을 계속 진행하였다.

현대 사회에서는 남녀노소를 막론하고 누구나 정신적, 육체적, 사회적으로 질병이나 고통에 시달리지 않는 건강한 삶을 추구한다. 특히 인구증가와 평균수명 연장으로 노령인구가 점점 증가하게 됨에 따라 퇴행성 변화로 인한 질환을 비롯한 여러 가지 의학적 문제점들이 사회적 문제로까지 대두되고 있다²⁷.

신체의 각 臟器는 환경에서 오는 다양한 스트레스로부터 항상성을 유지하기 위하여 즉각적으로 반응한다. 카드뮴, 납, 수은과 같은 중금속이나 endotoxin이 체내에 들어오거나, heat shock, 자외선, 활성산소, 저산소 상태에 노출되면, 臟器에서는 스트레스에 대한 반응으로 다양한 단백질과 효소가 유도되면서 생체 방어 작용이 일어난다. 특히 노화와 암, 치매 등의 원인으로 지목되는 유해물질인 활성산소를 분해하는 역할을 하는 단백질인 Peroxiredoxin (Prdx)은 인체가 스트레스에 노출되면 다량으로 생성되어 몸을 보호하는 기능을 수행하게 된다. 또한 Peroxiredoxin은 인체를 비롯한 자연계의 모든 생명체에 존재하며 외부 스트레스에 의한 세포내 활성산소 등의 농도를 인지하여 Peroxidase 기능으로부터 샤페론(chaperon) 기능으로의 기능적 전환을 통해 다양한 스트레스를 제거하는 생체 방어 조절기능을 가지며 여섯 개의 subfamily가 보고되었다²⁸. 본 연구에서도 Prdx 1, 3, 및 5는 아연에 의해 시간 의존적인 발현 증가를 보였으며, 이는 H₂O₂에 의해 시간, 농도 의존적인 발현 증가를 보이는 Chang 등²⁹의 연구 결과와 일치하였다. 그러나 Prdx 단백질은 대표적 노인성 질환인 뇌신경질환, 알츠하이머 질환이나 다운증후군과 같은 비정상적 종양세포에서 발현이 증가되어있는 것으로 보고되고 있으나, Prdx 유전자를 제거시킨 유전자조작 형질전환 쥐는 출혈성 빈혈 등에 의해 사망하거나, Prdx 유전자 과발현시 활성 산소에 대한 저항성이 증가한다는 상반된 연구 결과가 보고되었다²⁸. 본 연구에서도 아연에 의해 발현이 증가하거나 감소된 Peroxiredoxin은 補陽還五湯에 의해 과발현될 경우 방어효과를 보였다. 이는 세포가 외부 스트레스로부터 세포내 단백질 등의 변성을 방지하고 세포의 기능 상실을 막기 위한

사폐론 기능설과 일치된 결과를 시사하였다.

이상의 결과를 종합하면 아연은 H9c2 세포에서 미토콘드리아를 경유하는 신호 전달 기전에 의하여 세포고사를 유도하였다. 補陽還五湯의 전처리 는 아연 및 ADR에 의한 산화적 손상으로부터 핵의 분절 및 세포의 형태학적 변화, 세포내 유해물질인 활성 산소 제거에 중요한 기능을 담당하는 단백질인 Peroxiredoxin의 발현 증가를 초래하였다. 따라서 補陽還五湯은 산화적 손상으로 인한 허혈성 심질환 등 심혈관계 질환에 유효하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

參 考 文 獻

1. 王清任. 國譯 醫林改錯. 益山:圓光大學校 出版局; 1998, p.112,113,126,135.
2. 黃泰康, 施誠主. 中藥 方劑 現代 研究大典. 北京: 科學出版社; 1996, p.723-6.
3. Flitter WD. Free radicals and myocardial reperfusion injury. *Br Med Bull.* 1993;49:545-5.
4. Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol.* 1993;23: 21-48.
5. Wang X, Phelan SA, Forsman-Semb K, Taylor EF, Petros C, Brown A, Lerner CP, Paigen B. Mice with targeted mutation of peroxiredoxin 6 develop normally but are susceptible to oxidative stress. *J Biol Chem.* 2003;278(27):25179-90.
6. 江蘇中醫學院. 中藥大辭典. 香港:商務印書館; 1977, p.220-2,876-9,992-4,1093-5,1787-9,2036-40,2111-3.
7. 陣鐵清. 補陽還五湯今用. *中醫研究.* 1997;10(2): 50-2.
8. 金珖德, 宋孝貞. 血栓症 및 高粘度血症에 관한 補陽還五湯의 實驗的 研究. *대한동의병리학회지.* 1988;3(3):30-46.
9. 張壯戰. 談談補陽還五湯與腦血管意外. *新中醫.* 1984;8:7.
10. 王行浩外. 補陽還五湯治療腦血栓形成的臨床及血液流變學觀察. *中醫雜紙.* 1985;5:73.
11. 文炳淳. 補陽還五湯煎湯液이 家口의 血壓降下에 미치는 영향. 원광대학교 대학원. 1985.
12. 金楠用外. 補陽還五湯이 혈압 및 국소뇌혈류량에 미치는 영향. *동의생리병리학회.* 2001;15(5): 682-6.
13. 金鍾吉. 보양환오탕이 영양혈청결핍에 의한 PC12 세포의 고사에 미치는 영향. 원광대학교 대학원. 2000.
14. 晉錫彬, 劉振國. 補陽還五湯의 冠心病, 心絞痛 治療 44例. *四川醫學.* 1997;15(1):25.
15. 鄧惠民. 補陽還五湯加味の 3度 房室傳導阻滯 治療. *江蘇中醫.* 1996;19(4):26.
16. 전국의과대학 교수 번역. 임상의학 오늘의 진단 및 치료. 서울:한우리; 1999, p.401-32.
17. Halliwell B, Gutteridge, J.M.C.. In free radicals in biology and medicine. 2nd Ed.. Oxford: Clarendon Press; 1989, p86-9.
18. Bettger WJ, O'Dell BL. A critical physiological role of zinc in the structure and function of biomembranes. *Life Sci.* 1981;28(13):1425-38.
19. Cuajungco MP, Lees GJ. Zinc metabolism in the brain: relevance to human neurodegenerative disorders. *Neurobiol Dis.* 1997;4(3-4):137-69.
20. Chung KC, Park JH, Kim CH, Lee HW, Sato N, Uchiyama Y, Ahn YS. Novel biphasic effect of pyrrolidine dithiocarbamate on neuronal cell viability is mediated by the differential regulation of intracellular zinc and copper ion levels. NF-kappa B, and MAP kinases. *J Neurosci Res.* 2000;59(1):117-25.
21. Westbrook GL, Mayer ML. Micromolar concentrations of Zn²⁺ antagonize NMDA and GABA responses of hippocampal neurons. *Nature.* 1987; 328(6131):640-3.
22. Winegar BD, Lansman JB. Voltage-dependent block by zinc of single calcium channels in

- mouse myotubes. *J Physiol.* 1990;425:563-78.
23. Yokoyama M, Koh J, Choi DW. Brief exposure to zinc is toxic to cortical neurons. *Neurosci Lett.* 1986;71(3):351-5.
 24. Sheline CT, Behrens MM, Choi DW. Zinc-induced cortical neuronal death: contribution of energy failure attributable to loss of NAD(+) and inhibition of glycolysis. *J Neurosci.* 2000; 20(9):3139-46.
 25. Morishima I, Okumura K, Matsui H, Kaneko S, Numaguchi Y, Kawakami K, Mokuno S, Hayakawa M, Toki Y, Ito T, Hayakawa T. Zinc accumulation in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats, effects of melatonin, a cardioprotective antioxidant. *J Pineal Res.* 1999;(4):204-10.
 26. Choi DW, Koh JY. Zinc and brain injury. *Annu Rev Neurosci.* 1998;21:347-75.
 27. 이근후. 최신임상정신의학. 서울:하나의학사; 1988, p.138,216-28.
 28. Jang HH, Lee KO, Chi YH, Jung BG, Park SK, Park JH, Lee JR, Lee SS, Moon JC, Yun JW, Choi YO, Kim WY, Kang JS, Cheong GW, Yun DJ, Rhee SG, Cho MJ, Lee SY. Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell.* 2004;117(5):625-35.
 29. Chang TS, Cho CS, Park S, Yu S, Kang SW, Rhee SG. Peroxiredoxin III, a mitochondrion-specific peroxidase, regulates apoptotic signaling by mitochondria. *J Biol Chem.* 2004;279(40): 41975-84.