

五味子湯이 산화적 손상으로 유발된 세포고사에 미치는 영향

최진영, 이운재, 신선호
원광대학교 한의과대학 전주한방병원

Protective Effects of *Omijatang* on Oxidative Stress-Induced Apoptosis of H9c2 Cardiomyoblast Cells

Jin-Young Choi, Yun-Jae Lee, Sun-Ho Shin

Wonkwang University Oriental Jeonju Medicine Hospital, Jeonju, Korea

The water extract of *Omijatang*(*OMJT*) has been traditionally used for treatment of abscess and heart palpitation in oriental medicine. However, little is known about the mechanism by which the water extract of *OMJT* rescues cells from these damages. This study was designed to investigate the protective mechanisms of *OMJT* in H9c2 cardiomyoblasts on oxidative stress-induced cytotoxicity including H₂O₂, ZnCl₂, hypoxia, and reoxygenation. Oxidative stress markedly decreased the viability of H9c2 cells. This was characterized with apparent apoptotic features such as chromatin condensation as well as fragmentation of genomic DNA and nuclei. However, *OMJT* significantly reduced H₂O₂-induced cell death and apoptotic characteristics as well as ZnCl₂, hypoxia/reoxygenation.

Taken together, this study suggests that the water extract of *OMJT* has the protective effects against oxidative injuries.

Key Words: *Omijatang*, cardiomyoblast, oxidative stress, cytotoxicity, H₂O₂, ZnCl₂

1. 緒 論

五味子湯은 張¹의 『景岳全書』에 腎水枯涸 口燥舌乾에 사용한다고 수록되어 있으며, 益氣生津하는 生脈散에 益氣固表하는 黃芪와 補脾益氣하는 甘草를 가미하여 심계질환에 응용되고 있는 처방이다².

고혈압, 고지혈증, 죽상경화증 등과 같은 심혈관계 질환은 원인은 심장의 허혈상태로 초래하여 심근세포 손상을 유발시키는데³, 이 때 관여하는 산화적 손상은 심혈관계 질환의 주된 발병인자로 작용

한다⁴. 동맥경화증, 대동맥협착증, 판막질환 등은 일시적 혹은 지속적인 허혈상태를 야기하고 약물이나 수술에 의한 재관류시 심근세포에서 활성산소종이 생성되어 심근세포를 손상시킨다^{5,6}. 또한, 활성산소종은 활성화된 호중구, xanthine oxidase, 미토콘드리아 호흡 및 아라키돈산 대사과정을 통해서 생성된다⁷. 비록 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 효소 등이 세포내에서 생성된 활성산소종을 제거하기 위한 생리적 방어기전으로 작용하지만, 과도한 활성산소종은 이들 방어체계를 초과하여 세포손상을 초래한다⁶.

黃芪와 甘草를 제외한 처방인 生脈散의 실험적 연구로는 김⁸의 혈압상승, 심박동수 저하 및 심근수축력 증가, 이⁸의 운동지속시간의 연장 및 심박수

· 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)

저하, 신 등¹⁰의 심근세포 손상의 완화에 대한 보고와 허 등¹¹의 대동맥 평활근세포에서 NO 생성에 미치는 영향에 대한 보고가 있다. 또한 五味子湯은 최 등¹²이 Hoechst staining, Fas, PARP, ICAD/DFF45 및 caspase family 단백질의 활성화와 미토콘드리아 막 전위차의 변화를 관찰하여 심근세포의 산화적 손상에 방어효과가 있다고 보고하였으며, 황 등¹³은 Bcl-X_Ls 및 2-D를 통한 단백질의 발현 변화를 관찰하여 방어효과를 보고하였다.

이에 저자는 H₂O₂에 의한 H9c2 세포의 산화적 세포독성에 대한 五味子湯의 방어효과와 이 때 관여하는 생체내 대표적인 항산화 관련 중요 효소인 heme oxygenase-1(HO-1) 등의 관련 여부를 조사하여 五味子湯의 기능을 매개하는 단백질에 대해 연구하였고 人蔘과 人蔘의 야생종인 山蔘으로 구성된 五味子湯의 기능을 비교하였다.

II. 材料 및 方法

1. 재료

1) 세포주

Embryonic rat 심장에서 유래한 세포주인 H9c2 (ATCC, CRL1446)는 CO₂ 세포배양기에서(37℃, 5% CO₂) 10% 우태아 혈청이 포함된 DMEM에서 배양하였다. 48시간 주기로 0.05% Trypsine-EDTA를 사용하여 계대 배양하였으며, 분주 12시간 후에 약제를 처리하여 세포죽음과 연관된 생화학적 실험을 수행하였다.

2) 약제

본 실험에 사용된 五味子湯의 처방내용은 張의 『景岳全書』¹에 의거하였으며, 약재는 원광대학교 전주한방병원에서 구입하여 정선한 것으로 사용하였고, 한 첩의 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1, 2).

3) 시약 및 기기

H₂O₂, methylthizol-2-yl-2, 5-diphenyl, tetrazolium bromide(MTT) 및 crystal violet은 Sigma사(St. Louis, Missouri, USA)로부터 구입하여 사용하였다. Duplecco's modified Eagle's medium(DMEM), 항생제, trypsin 및 FBS(fetal bovine serum)은 GIBCO BRL 사(Grand Island, NY, USA)에서, 배양용기(24-well plate, 10cm dish)는 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. HSP27,

Table 1. Prescription of *OMJT I*

한약명	생약명	중량
黃芪	Astragali Radix	120g
人蔘	Ginseng Radix	80g
五味子	Schizandrae Fructus	40g
麥門冬	Ophiopogonis Radix	40g
甘草	Glycyrrhizae Radix	20g
Total amount		300g

Table 2. Prescription of *OMJT II*

한약명	생약명	중량
黃芪	Astragali Radix	120g
山蔘	Ginseng Radix	80g
五味子	Schizandrae Fructus	40g
麥門冬	Ophiopogonis Radix	40g
甘草	Glycyrrhizae Radix	20g
Total amount		300g

HSP60, HSP70, HSP90 및 Bax 등에 대한 항체는 Santa Cruz사(San Diego, CA, USA)에서, anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase와 Enhanced chemiluminescence kit(ELC kit)는 Amersham사(Buckinghamshire, England)에서 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) 시료의 조제

실험에 사용된 약제는 물을 용매로 추출하였다. 물 추출물은 음건된 五味子湯 100g을 물 1,000ml와 함께 냉각기를 부착한 환저 플라스크에서 3시간 끓인 다음 거즈로 여과하고 3,200rpm으로 20분간 원심분리를 시행한 후 농축기(rotary evaporator)로 농축한 다음 -70℃(deep freezer)에서 12시간 이상 동결시키고 freeze dryer로 동결건조시킨 것을 시료로 사용하였다.

2) H9c2 세포주 배양 및 시약처리

H9c2는 CO₂ 세포배양기(37℃, 5% CO₂)에서 10% 우태아 혈청이 포함된 DMEM으로 배양하였으며,

24시간 간격으로 배양액을 교체하여 log phase에 있는 세포에 五味子湯을 처리한 후 세포고사 현상과 이에 연관된 생화학적 실험을 수행하였다.

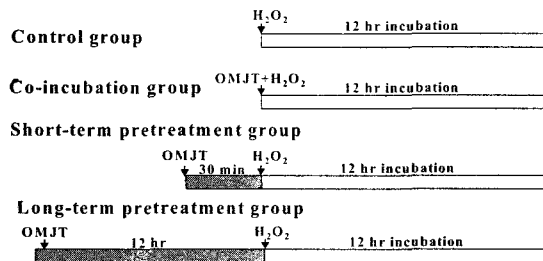
3) 세포생존율 측정

세포생존율은 세포배양판(24-well plate)에 세포 (1×10^5 cells/ml)를 1ml씩 분주하여 12시간 이상 CO₂ 세포배양기 안에서 안정시킨 후, 실험에 필요한 시약을 처리한 다음, 배양액 최종부피의 1/10MTT 용액(5mg/ml in phosphate-buffered saline)을 첨가하여 4시간 반응하였다. 생존세포에 의해 형성된 보라색 formazan은 10% sodium-dodesyl sulfate(SDS)가 포함된 0.01 N HCl 용액 0.1ml/well을 세포에 첨가하여 용해시킨 다음 분광광도계(ELISA reader, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

4) Protocol

산화적 손상에 의한 심장질환 모델을 만들고 이때 五味子湯의 효과를 알아보기 위해 다양한 실험군을 만들었다. 먼저 산화적 손상을 주기 위해 H₂O₂를 세포에 직접 주입하였으며(Fig. 1A), 허혈성 심장

A. Protocol I



B. Protocol II

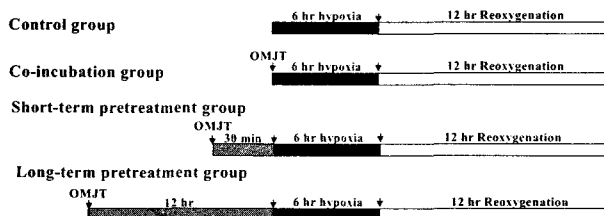


Fig. 1. The experimental protocol

질환 모델을 위하여 5% CO₂, 95%의 N₂ 혼합가스를 주입하여 37°C 세포배양기에서 배양하는 Hypoxia chamber를 이용하였다. 이때 한약재는 동시처리, 30분 전처리 및 12시간 전처리를 시행하여 효과를 비교하였다(Fig. 1.).

5) 세포의 형태적 변화 측정

세포의 형태적 변화를 조사하기 위하여 H9c2 세포에 五味子湯을 처리한 후, phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 2회 세척하였다. 세포는 포름알데히드(3.7%)가 포함된 0.5% crystal violet 용액으로 실온에서 5분간 염색한 후 다시 PBS로 세척하여 위상차 현미경(Phase contrast microscope, Nikon, TE300, Japan)으로 관찰하였다.

6) DAPI 염색

五味子湯을 처리한 세포를 4% formaldehyde 용액에 고정시킨 후 PBS로 세척하고, 0.01mM DAPI로 10분간 염색한 후 다시 PBS로 세척하여 형광현미경(Leica MPS 60, Germany)으로 DNA의 분절현상을 관찰하였다.

7) H₂O₂ 생성의 측정

H9c2 세포의 상층액을 세포배양관에 각각 0.1ml 씩 분주하고, 0.2~0.4μM HRP와 1~2μM scopoletin을 실온에서 10분간 반응시켰다. 생성된 H₂O₂에 의해 감소된 scopoletin의 형광을 대조군과 비교하여 fluorometer(Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA)로 450nm의 파장에서 측정하였다.

8) 통계처리

표시된 결과는 3회 이상의 독립적인 실험결과이며 실험결과에 통계처리는 Student's t-test에 준하여 처리하였으며, p-value가 최대치 0.05(p<0.05)이하인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

III. 結 果

1. 산화적 손상 및 hypoxia/reoxygenation에 의한 H9c2 심근세포의 생존율 변화

Hypoxia chamber를 이용하여 허혈상태에서 H9c2 심근세포의 생존율 변화를 알아보기 위하여 산화적

손상의 조건으로 H₂O₂를 처리하여 비교하였다. H₂O₂의 H9c2 세포에 대한 세포독성은 0.15mM H₂O₂를 다양한 시간 동안 처리하였으며, Hypoxia 조건에서의 세포생존율의 변화는 5% CO₂, 95% N₂의 혼합가스가 주입된 chamber에서 글루코스와 혈청이 빠진 DMEM으로 6시간 동안 배양한 후, 10% FBS가 포함된 일반 DMEM 배지로 다양한 시간 동안 재관류하여 세포생존율의 변화를 MTT 방법으로 측정하였다. 세포의 생존율은 0.15mM H₂O₂ 처리 2시간 후부터 서서히 감소하기 시작하여 처리 6시간에는 약 62%의 세포생존율을 보였으며 처리 10시간에는 38%, 12시간에는 34%로 급격히 감소하였다(Fig. 2A). 또한, Hypoxia에 의한 시간 의존적인 세포생존율의 감소는 chamber에서 6시간 배양한 후 다양한 시간동안 재관류한 결과, 재관류 6시간 후부터 세포생존율이 감소하기 시작하여 재관류 12시간 후에는 약 68%, 24시간에는 49%, 30시간에는 23%, 그리고 36시간에는 8% 미만으로 감소하였으며, 이때 H₂O₂에 의한 H9c2 세포독성 및 hypoxia/reoxygenation 조건에서의 세포독성은 시간이 경과함에 따라 축적되었고 DNA의 분절을 보이는 전형적인 세포고사임을 DAPI 염색을 통하여 확인하였다(Fig. 2.).

2. 五味子湯이 H₂O₂에 의한 H9c2 세포고사에 미치는 영향

H9c2 세포주에서 H₂O₂에 의해 유발되는 세포고사에서 五味子湯의 방어효과를 조사하기 위해 세포에 0.5mg/ml 및 1mg/ml의 五味子湯을 각각 30분과 12시간동안 전처리한 후 H₂O₂(0.15mM)를 처리하여 세포생존율의 변화를 MTT 방법으로 조사하였다. 그 결과 1mg/ml의 농도에서 五味子湯 단독처리에 의한 세포독성은 관찰되지 않았으며 H₂O₂(0.15mM)를 12시간 처리한 H9c2 세포의 생존율은 30% 미만으로 감소하였으나, 人蔘이 들어간 五味子湯(Omijatang I)의 경우, 30분 전처리시 각각 49%, 53%의 세포생존율을 보였으며, 12시간 전처리군에서도 52%, 56%의 세포생존율을 보였다. 또한 山蔘이 들어간 五味子湯(Omijatang II)의 경우, 30분 전

처리시 약 57%, 81%의 세포생존율을 보였으며, 12시간 전처리군에서는 62%와 89%로 현저한 세포생존율의 회복을 보였다(Fig. 3.).

3.五味子湯이 아연에 의한 H9c2 세포고사에 미치는 영향

H9c2 세포의 또 다른 산화적 손상인 아연에 의해 유발되는 세포고사에서五味子湯의 방어효과를 알아보기 위하여, 세포에 0.5mg/ml 및 1mg/ml의五味子湯을 각각 30분 전처리한 후 ZnCl₂(0.2mM)을 처리하여 세포생존율의 변화를 MTT 방법으로 조사하였다. 그 결과 1mg/ml의 농도에서五味子湯 단독처리에 의한 세포독성은 관찰되지 않았으며 ZnCl₂

(0.2mM)을 12시간 처리한 H9c2 세포의 생존율은 29%로 감소하였으나, 人蔘이 들어간五味子湯의 경우, 30분 전처리시 각각 53%, 81%의 세포생존율을 보였으며, 山蔘이 들어간五味子湯의 경우, 약 77%, 91%의 세포생존율을 보여 대조군 수준으로 회복되었다(Fig. 4.).

4.五味子湯이 hypoxia/reoxygenation에 의한 H9c2 세포고사에 미치는 영향

Hypoxia/reoxygenation의 세포독성에 대한五味子湯의 효과를 조사하기 위하여 정해진 protocol II에 따라 세포에 0.5mg/ml 및 1mg/ml의五味子湯을 처리하여 hypoxia 조건에서 6시간 배양한 후, 12시간

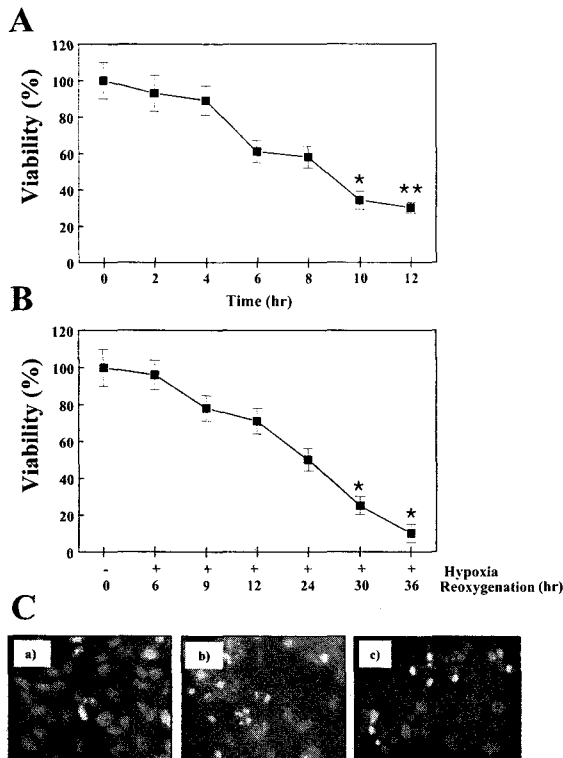


Fig. 2. H₂O₂ and hypoxia/reoxygenation decreased the viability of H9c2 cells in a time-dependent manner.

Cells were treated with 0.15mM H₂O₂ for various time (A) or hypoxia condition for various times (B). Cell viability was measured by MTT assay. Results were expressed as mean±S.D.(Standard deviation) of quadruplicates. * p<0.05, ** p<0.01 by Student's t-test, compared with control group. (C) H₂O₂ and hypoxia/reoxygenation induced the death of H9c2 cells and nuclear fragmentation. Cells were stained with DAPI and observed under fluorescence microscope. (a) control cells; (b) Cells treated with 0.15mM H₂O₂ for 12 hr; (c) Cells treated with hypoxia/reoxygenation for 24 hr.

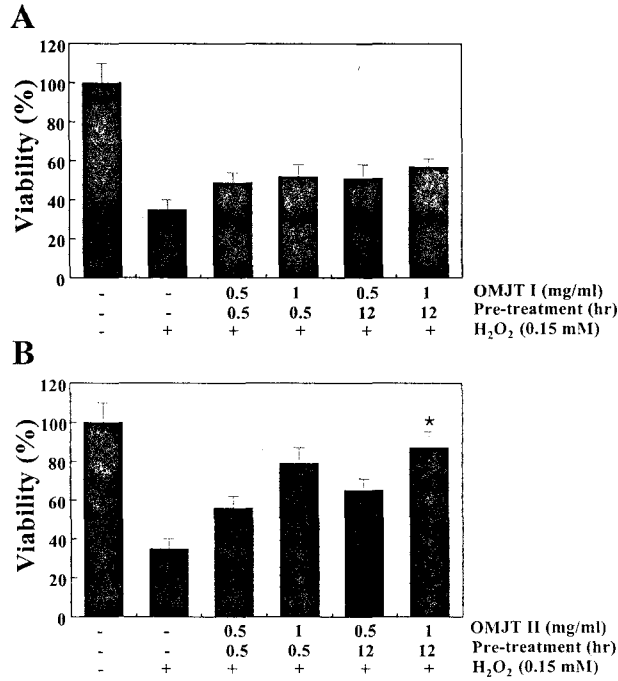


Fig. 3. *OMJT* prevented the cytotoxicity by H₂O₂ in H9c2 cells in a dose-dependent manner.

Cells were pretreated with various concentrations of *OMJT* for indicated time. Cell viability was measured by MTT assay. Results were expressed as mean±S.D. of quadruplicates. * p<0.01 by Student's t-test.

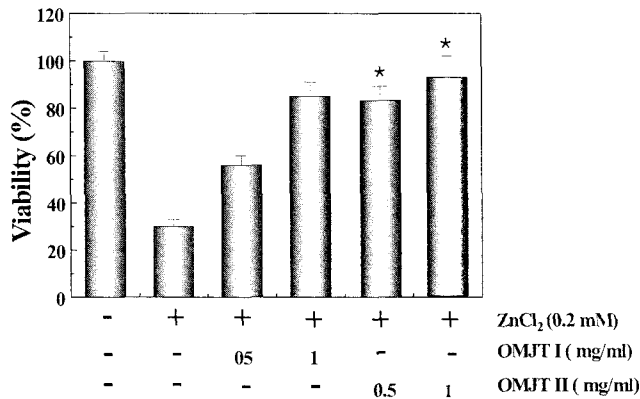


Fig. 4. *OMJT* prevented the cytotoxicity by ZnCl₂ in H9c2 cells in a dose-dependent manner.

Cells were treated with various concentrations of *OMJT* for 12hr. Cell viability was measured by MTT assay. Results were expressed as mean±S.D. of quadruplicates. * p<0.01 by Student's t-test.

reoxygenation하여 세포생존율을 MTT 방법으로 조사하였다. 세포생존율은 hypoxia/reoxygenation 단독 처리시 58%를 보였으나 五味子湯 I을 30분 전처

리한 실험군은 0.5 mg/ml의 농도에서는 59%, 1 mg/ml의 농도에서는 61%을 보였고, 12시간 전처리 군에서는 각각 60%와 73%의 세포생존율을 보였다.

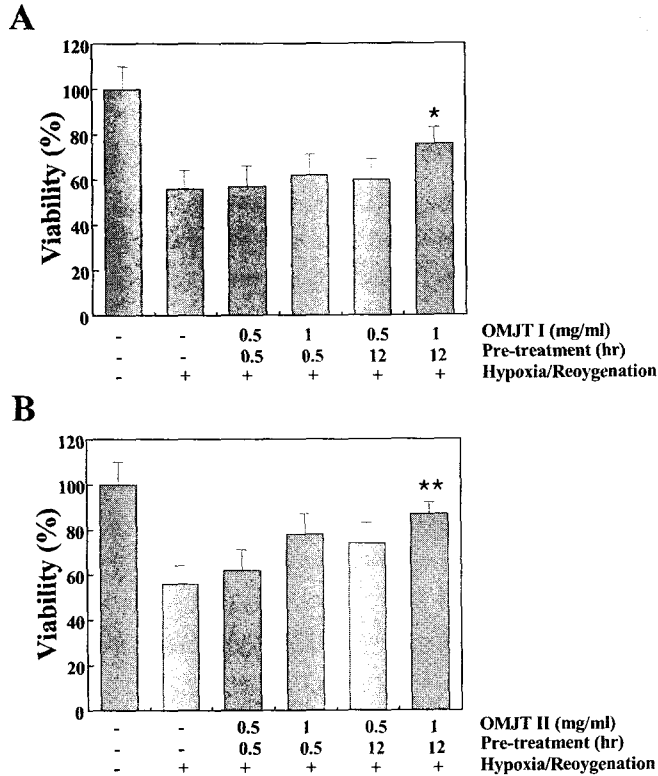


Fig. 5. *OMJT* prevented the cytotoxicity by hypoxia/reoxygenation in H9c2 cells in a dose-dependent manner.

Cells were treated with various concentrations of *OMJT*. Cell viability was measured by MTT assay. Results were expressed as mean±S.D. of quadruplicates. * $p < 0.05$, ** $P < 0.01$ by Student's t-test.

그러나五味子湯 II를 처리한 실험군에서는 30분 전 처리시 0.5 mg/ml의 농도에서는 60%, 1 mg/ml의 농도에서는 78%을 보였고, 12시간 전처리군에서는 각각 75%와 84%의 세포생존율을 보였다(Fig. 5).

5.五味子湯이 산화적 손상에 의한 H9c2의 형태학적 변화에 미치는 영향

H₂O₂, ZnCl₂ 및 hypoxia/reoxygenation에 의한 산화적 손상에 대한五味子湯의 방어효과를 확인한 결과, 山蓼이 처방되어진五味子湯 II의 경우 人蓼이 처방되어진五味子湯 I에 비하여 유의성있는 방어효과가 관찰되어 다음 실험에서는五味子湯 II를 실험에 이용하였다. 산화적 손상에 의한 H9c2의 세포독성의 성격 및五味子湯의 방어효과를 확인하기

위하여 세포수의 감소, 세포의 형태학적 변화 및 세포핵의 분절을 관찰하였다. 먼저 H₂O₂에 의하여 대조군에 비하여 세포수의 현저한 감소와 핵의 응축 및 분절이 관찰되었으나五味子湯 II 전처리에 의하여 농도 의존적으로 세포의 형태학적 변화와 세포수의 감소가 현저히 줄어들었으며 핵의 응축 및 분절이 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 6).

6.五味子湯이 H₂O₂에 의한 H9c2의 세포독성에서 HO-1의 발현에 미치는 영향

H₂O₂, ZnCl₂ 및 hypoxia/reoxygenation에 의한 산화적 손상에 대한五味子湯의 방어효과에서 생체내 항산화 효소인 heme oxygenase-1(HO-1)의 발현에 따른 영향을 알아보고자 하였다. 먼저 HO-1의 유도

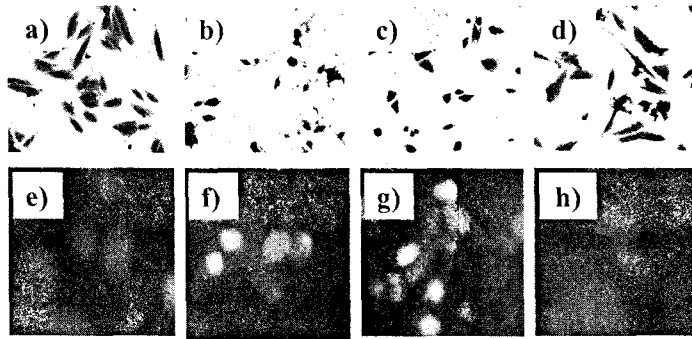


Fig. 6. *OMIT* prevented the morphological change by H_2O_2 in H9c2 cells in a dose-dependent manner.

Cells were treated with H_2O_2 (12 hr) alone (b, f), and *OMIT* with H_2O_2 for 12 hr (c and g; 0.5 mg/ml *OMIT*, d and h; 1 mg/ml *OMIT*). Then, cells stained with crystal violet and observed under phase contrast microscopy (a, b, c, and d), or stained with DAPI and observed under fluorescence microscopy (e, f, g, and h).

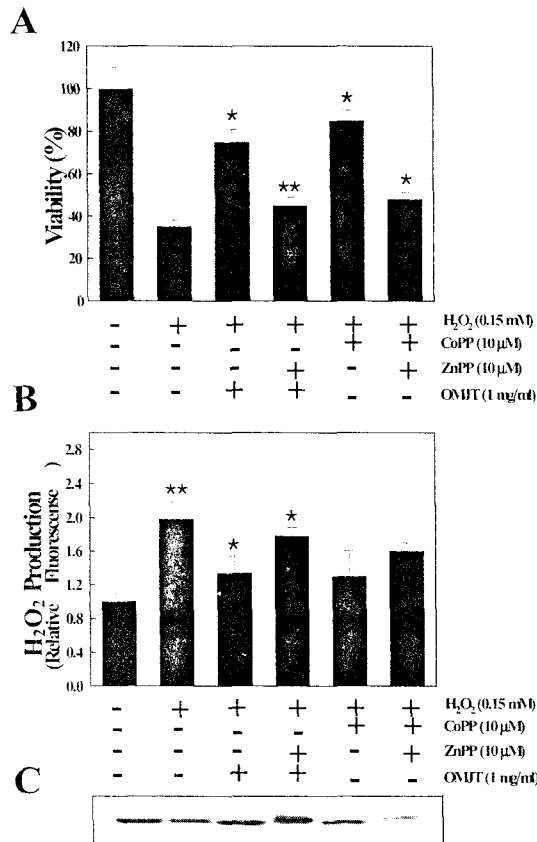


Fig. 7. Effects of HO-1 inducer (CoPP), HO-1 inhibitor (ZnPP) and *OMIT* on H_2O_2 -induced cell death of H9c2.

Cells were treated with 0.15 mM of H_2O_2 . (A) Cell viability was measured by MTT assay. (B) Cells were analyzed intracellular H_2O_2 -level by scopoletin assay. Results were expressed as mean \pm S.D. of quadruplicates. * $p < 0.05$, ** $P < 0.01$ by Student's t-test. (C) Cell lysates were collected, and equal amounts of protein separated by 12.5% SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with anti HO-1 antibody.

물질인 CoPP와 억제물질인 ZnPP를 전처리하여 H₂O₂에 의한 세포고사에서 HO-1의 영향을 알아보았고,五味子湯이 HO-1에 미치는 영향을 확인하였다. CoPP(10 μ M)를 2시간 전처리한 후 HO-1의 발현을 유도시킨 결과 H₂O₂에 의한 세포생존율을 30%에서 82%까지 회복시켰으며, 다시 ZnPP(10 μ M)로 HO-1을 inhibition시키면 42%로 세포생존율을 감소시켰다. 이 때 세포내 H₂O₂의 양을 scopoletin 형광으로 측정된 결과, H₂O₂ 단독처리에 의한 대조군에 비해 2.1배 증가하였으나 CoPP 처리에 의한 것은 1.2배로 감소하였고, ZnPP 처리에 의한 것은 1.6배로 다시 증가하였다. 이는 HO-1의 발현 증가가 세포내 H₂O₂를 조절하여 세포생존율의 감소를 저하시켰으며,五味子湯 전처리에 의해서도 동일한 효과를 확인하였다. 동시에五味子湯 전처리에 의해 HO-1의 단백질 발현이 증가하였다. 그러나 ZnPP에 의해서는 HO-1 단백질 band가 shift되어 나타났다 (Fig. 7.).

IV. 考 察

고혈압, 고지혈증, 죽상동맥경화증과 같은 심혈관계 질환은 심장의 허혈상태로 인해 심근세포 손상을 유발시키는데, 이 때 관여하는 산화적 손상은 심혈관계 질환의 주요 발생원인 인자로 작용하고 있다⁵⁻⁶. 동맥경화, 대동맥협착증, 혹은 혈관질환 등은 일시적 혹은 지속적인 허혈을 야기할 수 있으며, 재판류시에도 다량의 O², H₂O₂, 그리고 OH⁻ 등의 활성산소종이 생성된다¹⁴. 이러한 활성산소종에 의한 심근세포의 손상은 세포고사로 알려져 있으며, 그 기전으로는 c-Jun NH₂-terminal kinase(JNK)에 의한 caspase의 활성화와 그에 따른 DNA의 분절 등이 보고 되었다¹⁵⁻¹⁶.

補益心氣하는 효능을 가진五味子湯은 峻補元氣하는 黃芪, 人蔘, 甘草와 益氣養陰하는五味子, 麥門冬으로 구성된 처방으로, 黃芪는 甘溫하여 益氣補氣하고, 人蔘은 甘溫無毒하고 補脾益氣, 生津하며, 甘草는 補脾益氣, 養心작용이 있으며, 麥門冬은 甘苦

寒하고 滋陰生津의 효능이 있고,五味子是 酸溫하고 益氣生津의 효능이 있다^{2,17}.

여러 종류의 세포에서 세포고사를 방어하는 한약 처방의 효능이 보고되었지만¹⁸, 허혈상태에서 야기되는 H₂O₂에 의한 심근세포의 산화적 손상에 대한 한약처방의 방어효과 및 기전 연구는 미흡한 실정이다. 이에 저자는五味子湯이 H₂O₂, 아연 및 hypoxia/reoxygenation에 의한 H9c2 심근세포의 세포독성을 예방할 수 있는 가능성을 조사하고, 작용 기전 및 작용 표적 단백질을 발굴하고자 본 실험을 시행하였다.

먼저 H9c2 심근세포에 산화적 손상을 일으킬 수 있는 조건으로 0.15mM의 H₂O₂에 직접 처리하거나, 아드리아마이신 등의 항암제에 의한 부작용시 초래되는 심근장애의 원인이 되며 결과적으로 심장 세포에 축적되어 H₂O₂를 발생한다고 알려진 아연을 처리하였다. 또한 허혈성 심장 질환 모델로는 5% CO₂와 95% N₂ 혼합가스로 hypoxia 상태에서 6시간 동안 배양한 후, 12시간 재판류 하였다. 그 결과 세포의 형태학적인 변화와 함께 핵의 응축과 분절이 관찰되었으며, 세포생존율이 30% 정도로 감소되는 실험조건을 수립하였다. 이렇게 유발된 H9c2 세포고사에 대한五味子湯의 방어효과는 동시처리군, 30분 전처리군 및 12시간 전처리군으로 구분하였으며 다양한 농도에서 세포생존율을 확인하였다. 그 결과, 人蔘이 처방되어진五味子湯 I 보다는 山蔘이 가미된五味子湯 II가 농도 의존적으로 산화적 손상에 대한 세포독성을 억제하였으며,五味子湯의 전처리 시간에 의존적으로 방어효과를 보였다. 이 연구에서五味子湯은 H₂O₂(0.15mM) 처리시 나타나는 특징적인 세포고사 현상인 DNA의 사다리 모양 분절을 억제하였다.

신체의 각 장기는 환경에서 오는 다양한 스트레스로부터 항상성을 유지하기 위하여 즉각적으로 반응한다. 카드뮴, 납, 수은과 같은 중금속이나 endotoxin이 체내에 들어오거나 heat shock, 자외선 활성산소, 저산소 상태에 노출되면, 장기는 스트레스에 대한 반응으로 다양한 단백질과 효소가 유도되면서 생체

방어 작용이 일어난다. 대표적인 예로 헤모글로빈을 비롯한 heme 단백질의 보결분자족인 bilirubin, 그리고 일산화탄소와 환원철(Fe^{2+})로 분해하는 heme oxygenase(HO)를 들 수 있다. Bilirubin은 강력한 radical 보조 작용을 통한 항염증작용 및 항산화작용이 있고, 일산화탄소는 혈관확장을 통한 장기의 혈류 유지 작용과 저산소증에 의한 산화적 손상에서 항염증작용을 통한 세포고사 방어작용이 알려져 있다¹⁹. HO는 3가지 isozyme이 알려져 있는데, HO-2와 HO-3는 구성형 효소이고, HO-1은 각종 스트레스원에 반응하여 세포내에서 유도 발현되는 효소로서, 이 효소의 반응을 조사하여 스트레스 검출에 이용할 수 있다. 또한 HO-1의 발현을 유도함으로써 산화적 손상에 의한 세포고사로부터 세포를 방어할 수 있음이 보고되었다²⁰. 이 실험에서는 H_2O_2 (0.15mM) 처리시 HO-1는 시간 의존적으로 발현이 감소하였고, 五味子湯 전처리에 의하여 대조군 수준으로 회복되었다. 또한 HO-1 유도물질인 CoPP(10 μ M) 처리에 의해서 H_2O_2 에 의한 세포독성이 감소되었고, ZnPP같은 HO-1 inhibitor를 전처리에 의하여 HO-1의 활성을 억제시키면 방어효과가 사라지는 것을 확인하였다. 이는 五味子湯 전처리군에서도 동일한 효과를 보였다. 또한 scopoletin 형광을 이용하여 세포내 H_2O_2 의 양을 측정 한 결과, 五味子湯이나 CoPP 전처리에 의해서 세포내 H_2O_2 의 양이 감소하였고, 이는 ZnPP 처리에 의하여 HO-1의 활성을 억제시키는 경우에는 유의한 감소는 관찰되지 않았다. 이상의 결과는 五味子湯이 세포내 HO-1의 발현에 직접적으로 관여 하였으며, 이렇게 증가된 HO-1에 의하여 H_2O_2 와 같은 산화적 손상으로부터 H9c2 세포를 방어하였다고 사료되어진다.

이상의 연구 결과를 종합하면 H_2O_2 에 의해 유도된 H9c2 심근세포 죽음은 세포의 형태적 변화를 동반한 핵의 분절을 보이는 전형적인 세포고사 현상이었다. 또한 세포내 H_2O_2 생성을 유발하는 아연이나 hypoxia/reoxygenation 조건에서도 동일한 현상을 보이는 세포고사 현상이었다. 五味子湯은 이러한 산화적 손상으로부터 H9c2 심근세포를 보호하였다.

V. 結 論

이상의 결과는 五味子湯은 H_2O_2 , 아연 및 hypoxia/reoxygenation에 의한 산화적 손상으로부터 심근세포를 방어하는 효과를 나타냈으므로 허혈성 심장질환 등의 심혈관계 질환에 유효하게 활용될 수 있을 것으로 보이며, 산화적 손상 예방 물질을 개발하는데 응용될 수 있으리라 사료된다.

參 考 文 獻

1. 張介賓. 景岳全書(下). 서울: 대성문화사; 1992, p.476.
2. 신민교. 본초학. 서울: 영림사; 1994, p.166,167, 169-71,175-7,232,233,241,242.
3. Zweier JL. Measurement of superoxide-derived free radicals in the reperfused heart. Evidence for a free radical mechanism of reperfusion injury. J.Biol.Chem. 1988;263:1353-7.
4. Apostolova MD, Ivanova IA, Cherian MG. Metallothionein and apoptosis during differentiation of myoblasts to myotubes: protection against free radical toxicity. Toxicol Appl Pharmacol. 1999;159(3):175-84.
5. Singh N, Dhalla AK, Seneviratne C, Singal PK. Oxidative stress and heart failure. Mol Cell Biochem. 1995;147:77-81.
6. Halliwell B, Gutteridge JMC. In free radicals in biology and medicine. 2nd Ed. Oxford:Clarendon Press; 1989, p.22-31,86-9.
7. Gao Z, Huang K, Xu H. Protective effects of flavonoids in the roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in SH-SY5Y cells. Pharmacol Res. 2001;43(2):173-8.
8. 김세길. 生脈散이 白鼠의 심혈관계에 미치는 영향. 원광대학교 대학원. 1986.
9. 이용세. 生脈散이 스포츠 음료로서 운동수행능

- 력과 혈액학적 변화에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 1997.
10. 신선호. 산소분압에 의한 심근세포변화에 미치는 生脈散의 효과. 대한한방내과학회지. 1998; 18(2):100-11.
 11. 허윤. 生脈散이 대동맥 평활근 세포에서 NO 생성에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2001; 15(5):775-82.
 12. 최진영. 五味子湯이 심근세포에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2002;23(2):181-90.
 13. 황보연. 심근세포의 산화적 손상에 대한 五味子湯의 효과 및 작용기전 연구. 대한한의학회지. 2002;23(4):140-50.
 14. Singh N, Dhalla AK, Seneviratne C, Singal PK. Oxidative stress and heart failure. *Mol Cell Biochem.* 1995;147:77-81.
 15. Turner NA, Xia F, Azhar G, Zhang X, Liu L, Wei JY. Oxidative stress induces DNA fragmentation and caspase activation via the c-Jun NH2-terminal kinase pathway in H9c2 cardiac muscle cells. *J Mol Cell Cardiol.* 1998;30(9): 1789-801.
 16. Wu ML, Tsai KL, Wang SM, Wu JC, Wang BS, Lee YT. Mechanism of hydrogen peroxide and hydroxyl free radical-induced intracellular acidification in cultured rat cardiac myoblasts. *Circ Res.* 1996;78(4):564-72.
 17. 김창민. 중약대사전. 서울:정담출판사, 1998, p.88-103,1648-57,3958-68,4477-98,6460-71.
 18. Ishikawa Y, Kitamura M. Anti-apoptotic effect of quercetin: intervention in the JNK- and ERK-mediated apoptotic pathways. *Kidney Int.* 2000;58(3):1078-87.
 19. Goda N, Suzuki K, Naito M, Takeoka S, Tsuchida E, Ishimura Y, Tamatani T, Suematsu M. Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver. Topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation. *J Clin Invest.* 1998;101(3):604-12.
 20. Hayashi S, Takamiya R, Yamaguchi T, Matsumoto K, Tojo SJ, Tamatani T, Kitajima M, Makino N, Ishimura Y, Suematsu M. Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress role of bilirubin generated by the enzyme. *Circ Res.* 1999;15;85(8):663-71.