

원 저

배양 혈관 내피세포에서 Hydrogen Peroxide에 의한 투과성 증가에 미치는 星香正氣散의 효과

이동언, 김영균, 권정남
동의대학교 한의학대학 내과학교실

Protection by *Sunghyangchungisan* against Hydrogen Peroxide-induced Increase in Endothelial Permeability

Dong-Uhn Lee, Young-Kyun Kim, Jeong-Nam Kwon

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongeui University

Objectives : Hindered barrier function of vascular endothelium has been implicated in the initiation and progression of degenerative vascular diseases such as atherosclerosis. In this study, the effect of *Sunghyangchungisan*(SHCS) as a protectant against oxidant-induced destruction of endothelial barrier function was assessed.

Methods : Toward this end, endothelial cells derived from the human umbilical vein were cultured as monolayers on permeable membrane filters. Endothelial permeability was monitored by measuring transendothelial electrical resistance and movement of low density lipoprotein (LDL) across the endothelial monolayer.

Results : Along with increased movement of LDL, H₂O₂-induced increase in endothelial permeability was paralleled by a decrease in transendothelial electrical resistance. The effect of H₂O₂ was mimicked by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), a potent activator of protein kinase C. Calphostin-C, a protein kinase C inhibitor, effectively blocked the increase in endothelial permeability induced by H₂O₂ or PMA, indicating that activation of protein kinase C is associated with the H₂O₂-induced permeability change. SHCS effectively protected the endothelial monolayer against H₂O₂-induced increase in permeability, whereas, it did not affect PMA-induced change. Forskolin, a potent activator of adenylyl cyclase, antagonized H₂O₂ to increase endothelial permeability. In addition, in H₂O₂-treated cells, intracellular cAMP concentration was significantly decreased, indicating that impaired cAMP production as well as activation of protein kinase C is a mechanism underlying H₂O₂-induced increase in endothelial permeability. SHCS was effective to interfere with H₂O₂ with regard to its effect on intracellular cAMP content. However, SHCS itself did not affect resting cAMP concentration in endothelial cells.

Conclusions : These results suggest that SHCS might operate as an effective protectant against oxidant-induced destruction of endothelial barrier function. The mechanism does not appear to involve direct interaction with protein kinase C- or cAMP-associated signaling mechanism. (*J Korean Oriental Med* 2000;21(4):193-203)

Key Words: Hydrogen Peroxide(H₂O₂), Endothelium, *Sunghyangchungisan*(SHCS), Low density lipoprotein (LDL)

서론

· 접수 : 2000년 11월 11일 · 채택 : 12월 11일
· 교신저자 : 이동언, 부산광역시 부산진구 전포4동 189-45번지
· 옥당한의원
(Tel. 051-804-0027, E-mail : Djey00@mail.hitel.net)

최근 성인 사망 원인에 대한 통계에 의하면 뇌혈관 질환, 고혈압, 허혈성 심질환 등 순환기계 질환이

우리 나라에서의 사망 원인 중 1/3 이상을 차지하고 있으며, 中風을 포함한 암, 동맥경화, 본태성고혈압, 당뇨병, Parkinson씨병, 치매 등 노화와 연관된 많은 질환 들에서 활성 산소 (reactive oxygen species)가 주요 병인으로 주목받고 있다¹⁻³⁾.

산소는 강한 산화력을 지니고 있으며 그 중 일부는 반응성이 강한 활성 산소로 대사되어 생체 여러 구성 성분들을 산화시켜 세포 및 조직의 기능 저하를 초래한다. 최근에 노화 과정 및 여러 질환의 발생 기전에 관여하는 것으로 확인된 활성 산소기로서 O²⁻ (superoxide), H₂O₂ (hydrogen peroxide), OH (hydroxyl radical) 등이 있으며³⁾, 이러한 활성 산소는 대식세포 (macrophage)의 식균작용, 오래된 단백질의 제거 등에 이용되는 필수적인 물질이기도 하지만 반응성이 커서 생체 세포에 유해한 작용을 나타낼 수 있다.

혈관 내피세포는 혈관의 탄성을 조절하여 조직 혈류량을 조절하는데 핵심적인 기능을 할 뿐만 아니라 동맥 조직과 혈액 사이의 물질 이동의 장벽 역할을 한다. 만약 혈관 내피의 이러한 장벽 기능이 장애를 받게 되면 저밀도 지단백 (low-density lipoprotein, LDL) 등의 고분자 물질이나 단핵구등의 염증세포가 내피하 조직으로 이동하게 되고, 이는 염증성 병변이나 동맥경화증 등 혈관 변성 질환의 시발이 된다^{4,5)}. 한편 활성 산소 등에 의한 산화성 손상시에도 혈관 내피 투과도의 증가가 관찰되는데⁶⁾, 이것은 동맥경화 등 혈관 변성 질환의 중요한 기전으로 생각되고 있다⁵⁾.

星香正氣散은 戴⁷⁾의《證治要訣》에 처음 收載된 처방으로 藿香正氣散과 星香散을 합방한 처방으로 理氣祛痰의 효능이 있어⁸⁾ 中風, 中氣, 痰厥, 食厥 등의 證에 先用되는 대표적인 방제이며⁹⁻¹¹⁾, 임상에서 中風昏倒, 人事不省, 痰涎壅盛 등의 證에 調氣의 목적으로 활용되고 있는 구급처방이다^{12,13)}. 대표적인 순환기계 질환의 하나인 中風의 주요 증상은 意識障礙, 運動麻痺, 言語障礙 등이며^{12,14,15)} 그 원인은 風, 火, 濕痰 및 虛 등이 爲主가 되고^{14,16-18)}, 이에 대한 治法은 疎風, 淸熱瀉火, 理氣祛痰 및 補虛를 기본으로 하며^{18,20)}, 中風 초기의 구급처방으로 星香正氣散을 활용하고 있다⁸

10,21-23)

星香正氣散에 관한 실험적 연구로는 安²⁴⁾, 文²⁵⁾, 柳²⁶⁾ 등이 실험 동물을 이용하여 혈압, 심박동, 뇌손상 등에 미치는 영향을 보고한 바 있으나, 혈관 내피세포에서 산화성 세포손상에 대한 투과도의 변화와 이에 미치는 星香正氣散의 효과에 관한 연구는 보고된 바가 없었다.

이에 저자는 中風등 뇌혈관장애의 치료에 상용되는 星香正氣散이 배양된 혈관 내피세포의 산화성 손상 방지 효과와 연관하여 혈관 내피의 투과성 변화에 미치는 효과를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실 험

1. 실험재료

1) 약재

星香正氣散은 《方藥合編》⁹⁾에 의거하였고, 약재는 동의대학교 한방병원에서 양질의 것을 정선하여 사용하였다. 처방의 내용과 10첩의 분량은 다음과 같다.

Prescription of Sunghyangjunggisian

韓藥名	生藥名	重量(g)
藿香	<i>Herba Pogostemi</i>	56.25
蘇葉	<i>Folium Perillae</i>	37.50
白芷	<i>Radix Angelicae Dahuricae</i>	18.75
大腹皮	<i>Pericarpium Arecae</i>	18.75
白茯苓	<i>Poria</i>	18.75
厚朴	<i>Cortex Magnoliae</i>	18.75
白朮	<i>Rhizoma Atractylodis Macrocephalae</i>	18.75
陳皮	<i>Pericarpium Citri Nobilis</i>	18.75
半夏(製)	<i>Tuber Pinelliae</i>	18.75
桔梗	<i>Radix Platycodi</i>	18.75
甘草(炙)	<i>Radix Glycyrrhizae</i>	18.75
生薑	<i>Rhizoma Zingiberis</i>	30.00
大棗	<i>Fructus Zizyphi Jujubae</i>	30.00
南星	<i>Rhizoma Arisaematis</i>	37.50
木香	<i>Radix Saussurea</i>	37.50
總量		397.5

2) 실험 세포

본 연구에 사용한 세포는 사람의 제대정맥 (umbilical vein) 기원의 내피세포를 미국의 American Type Culture Collection (ATCC)에서 분주 받아서 배양하

여 사용하였다.

3) 시약 및 용액

세포 배양에 필요한 배양액 및 fetal bovine serum, 항생제 등은 Gibco-BRL사(미국, Grand Island, NY), forskolin 및 hydrogen peroxide (H₂O₂)는 Sigma사(미국, St. Louis, MO), 1,1'-dioctadecyl-1-1-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate (DiI-labeled LDL)은 Molecular Probes사(미국, Eugene, OR), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), H-89 및 calphostin-C는 Calbiochem사 (미국, La Jolla, CA) 제품을 구입하여 사용하였다.

2. 실험방법

1) 星香正氣散 extract의 조제

星香正氣散 10첩 분량인 397.5 g을 둥근 플라스크에 넣고 증류수 3 l를 가한 후 3시간 동안 전탕하고 여과액을 동결건조하여 89.5 g의 extract를 얻었다.

2) 세포의 배양

혈관 내피세포는 10% fetal bovine serum, 50IU/ml penicillin G 및 50 g/ml streptomycin이 포함된 세포 배양액 Medium-119를 이용하여 플라스틱 세포 배양 플라스크에서 유지 배양하였다. 세포 배양 조건은 37°C, 5% CO₂, 포화습도 상태였으며 이틀에 한번씩 세포 배양액을 갈아주었다. 세포가 배양 플라스크에 완전히 차게 자라면 0.05% trypsin-0.53mM EDTA 용액으로 처리하여 세포를 분리한 후 약 1/4의 세포 밀도로 재분주하여 繼代培養 (subculture)하였다. 실험에 사용하기 위한 세포는 繼代培養시에 투과성 필터 (Snapwell; Costar, Cambridge, MA)에 2x10⁶의 세포 밀도로 분주하여 배양하였다.

필터는 繼代培養 하루 전에 미리 1% Vitrogen 100 (Collagen, Palo Alto, CA) 및 1mg/ml human fibronectin (Collaborative Research, Bedford, MA) 으로 처리하고 무균 실험대에서 상온에서 건조시킨 후 사용하였다.

3) 내피 투과도의 측정

필터에 배양한 내피 투과도의 측정은 특수 고안한 Ussing chamber에서 내피 양단간에 일어나는 고분자

물질의 이동 정도 및 내피 양단간의 전기 저항의 변화로서 측정하였다. 이 Ussing chamber는 본 실험에서 세포를 배양한 Snapwell filter를 설치할 수 있도록 특별히 고안된 것으로 그 구조는 Fig. 1에 간단히 도시하였다. Snapwell에서 떼어낸 필터는 대칭형의 두 부분으로 구성된 chamber 사이에 설치하며 이로써 필터에 붙어 있는 내피세포층을 사이에 두고 원래 혈관 내피 조직과 유사하게 동맥벽측과 혈액측이 완전히 구분되게 된다. 각 chamber를 싸고 순환 수조로 chamber의 온도를 37°C로 유지하며 chamber내의 가스 공급 장치는 산소 등 필요한 가스의 공급과 함께 chamber 내의 용액을 일정한 방향으로 계속 순환하게 한다. 본 연구에서 內皮 투과도의 지표로 형광 표식자가 붙은 저밀도 지단백인 1,1'-dioctadecyl-1-3,3,3',3'-tetramethyl-indocarbocyanine perchlorate (DiI-labeled LDL)이 내피층을 가로질러 일어나는 이동을 측정하였다. Filter에 배양한 내피세포를 Ussing chamber에 장착하고 Hanks balanced salt solution (HBSS)에서 30분 동안 평형 시킨 후 여러 실험 조건에서 DiI-labeled LDL 200 g/ml을 luminal chamber에 첨가하였다. 내피층을 가로질러 이동하는 LDL의 양은 반대측 즉 abluminal chamber에 나타나는 DiI-labeled LDL의 농도를 형광분석기로 여기 파장 553nm, 방출 파장 578nm에서 측정하였다²⁷⁾. LDL의 이동은 제거율 (clearance)로 환산하여 나타내었으며, 다음의 식을 이용하여 계산하였다.

$$CL_{LDL} = CAC \times V_{AC} / CLC$$

여기서

CL_{LDL} = clearance of LDL (uL)

CAC = concentration of LDL in abluminal chamber

V_{AC} = volume of fluid in abluminal chamber

CLC = concentration of LDL in luminal chamber at t=0

CLC는 실험 기간 동안 거의 변화가 없었으며 LDL의 이동이 4시간 이상의 특정 기간 동안 직선적인 변화를 보였다. 따라서 본 연구에서는 각 시점에서 측정된 LDL 제거율을 L/hr로 계산하여 나타내었다.

내피 양단간의 저항의 측정은 agar/KCl 전극을 이용하여 luminal side 용액과 반대측 (abluminal

chamber) 용액 사이에 short circuit을 만들어 측정하였다. 이 회로에 DVC-1000 상피세포 전압 고정장치(World Precision Instrument)를 연결하고 상피 조직 양단에 10mV 전압을 가하였을 때 나타나는 단락전류(short circuit current)의 변화를 측정하여 Ohm의 법칙에 따라 저항을 계산하였다.

4) 세포 생존율 (viability)의 측정

세포 생존율은 trypan blue exclusion assay²⁸⁾으로 측정하였다. 세포를 실험 조건에 노출시킨 후 0.05% trypsin-0.53mM EDTA 용액으로 세포를 분리, 수거한 후, 4% trypan blue가 포함된 HBSS 용액에서 15분간 배양하였다. 생존 세포는 색소를 세포 외로 배출하여 염색되지 않지만 사망 세포는 이 색소에 염색이 된다. 따라서 색소에 염색이 된 세포를 광학현미경 하에서 혈구 계산판을 이용하여 색소에 염색된 세포와 염색되지 않은 세포를 세어 세포 생존율을 측정하였다.

5) 세포내 cAMP 함량의 측정

내피 투과도의 변화를 관찰하는 실험에서와 같은 조건으로 5분간 처리한 후 내피세포가 붙어 있는 필터를 찬 ethanol/HCl (20mM HCl in ethanol) 용액으로 옮겼다. 미세침을 이용하여 Snapwell로부터 filter를 분리시키고 초음파 세포막 분쇄기를 이용하여 세포막을 파괴하여 세포 내용물을 추출한 세포 균질액을 만들었다. 이 균질액을 12,000 중력에서 10분간 원심분리하여 단백질을 침전시켜 제거한 후 상층액을 동결건조시켜 50mM Tris/ 1mM EDTA (pH 7.5)에 용해시켜 냉장고에 보관하였다가 cyclic AMP (cAMP) 함량을 측정하였다. cAMP 함량은 c-AMP^[3H] kit를 사용하여 방사면역법 (radioimmunoassay)으로 측정하였으며 pmole/mg protein으로 나타내었다.

단백질 농도는 γ -globulin을 표준으로 하여 Biorad kit를 사용하여 측정하였다.

6) 자료 분석

실험 결과들은 평균과 표준오차로 표시하였으며 실험군 간의 차이를 검정할 필요가 있을 때는 Student's t-test, 혹은 ANOVA test를 시행하였으며 P 값이 0.05 이하일 때 유의한 차이가 있는 것으로 간

주하였다.

실험성적

1) 배양 기간에 따른 내피 양단간 저항 및 LDL 이동의 변화

배양일에 따라 저항이 점차 증가하여 배양 4일째에는 $42.2 \pm 3.7 \text{ohm cm}^2$ 에 달하였다. 배양 4일째 이후부터 10일째까지는 저항치가 약간씩 증가하는 경향은 있었지만 이는 통계학적으로 유의한 차이는 아니었다. 이는 본 실험 조건에서 배양 기간 4일이 되면 내피세포들이 완전한 기능성 투과 장벽을 형성함을 나타내는 결과로 해석할 수 있다. 따라서 이후의 본 실험 들에서는 배양 6일째부터 8일째 사이의 내피를 실험에 사용하였다(Fig. 2).

저항의 측정과 병행하여 내피 투과도의 지표로서 저밀도 지단백 (LDL)의 이동량의 변화를 측정하였다. LDL의 이동은 저항치의 변화와 반대로 배양 일

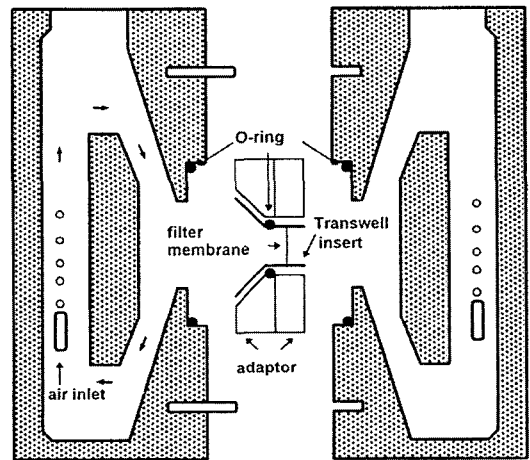


Fig. 1. Sectional diagram of modified Ussing-type diffusion chamber. Transwell inserts containing cell monolayers cultured on permeable polycarbonate membrane filters are mounted between two acrylic half-chambers with the aid of O-ring. Transport medium is circulated by O₂/CO₂ gas lift and flows in the direction indicated by arrows parallel to the surface of the monolayer. Temperature is maintained by water jacket connected to circulating water bath.

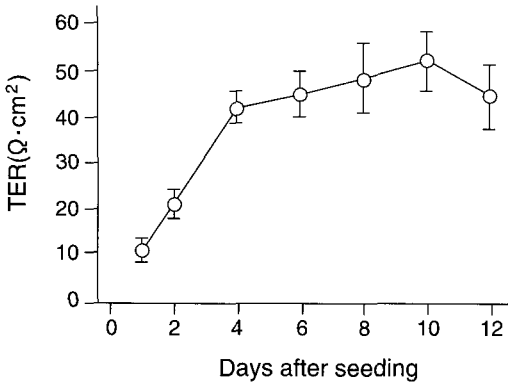


Fig. 2. Age-dependent changes of transendothelial resistance in endothelial cell monolayers grown on permeable polycarbonate membrane filters. Transendothelial resistance (TER) was calculated as the total resistance (filter, medium, and endothelial sheet) minus the background resistance (filter and medium). Each point represents mean S.E. of 9 monolayers.

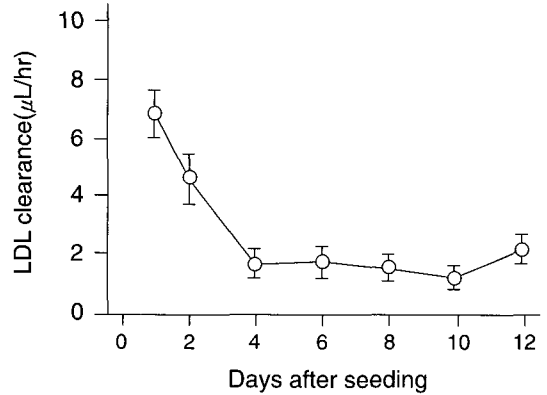


Fig. 3. Age-dependent changes in flux of low density lipoprotein across endothelial monolayers grown on permeable polycarbonate membrane filters. Transendothelial movement of low density lipoprotein (LDL) for 3 hr was measured and presented as LDL clearance as described in "Materials and Method". Each point represents mean S.E. of 4 monolayers.

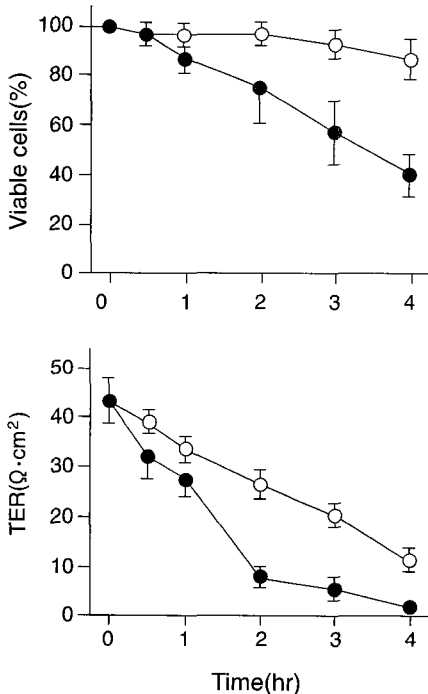


Fig. 4. Effects H₂O₂ on cell viability and transendothelial resistance in cultured endothelial monolayers. Cells were treated with 0.1 (○) and 0.5 (●) mM of H₂O₂ for indicated time periods, and cell viability and transendothelial resistance (TER) was determined. Each point represents mean ± S.E. of 6 experiments.

수에 따라 점차 감소하였으며 배양 4일째에 최저치에 도달한후 약 10일째까지 유사한 값을 유지하였으며 10일 이후부터는 다시 급격하게 증가하는 양상도 저항치의 변화와 유사하였다. 이와 같은 결과들은 본 연구에서 측정한 내피 양단간 전기 저항 및 LDL 이동이 내피 투과도를 충실히 반영하는 좋은 지표임을 시사한다(Fig. 3).

2) H₂O₂에 의한 내피 양단간 저항의 변화

본 연구에서의 목적에 부합하는 H₂O₂의 농도와 처리 시간을 결정하기 위하여 0.1 및 0.5mM의 농도에서 처리 시간에 따라 나타나는 내피세포의 사망과 내피 양단간 저항의 변화를 함께 측정하였다. 0.5mM의 농도에서는 H₂O₂의 처리 시간에 따라 내피세포의 사망율이 현저히 증가하였다. 그러나 0.1mM의 농도에서는 처리 시간 4시간까지도 뚜렷한 세포 사망율의 증가가 나타나지 않았다. 그러나 이와 동시에 측정된 내피 양단간 저항의 변화에서는 이와 다른 양상을 보였다. Fig. 4의 하단에 나타난 것처럼 0.1mM의 농도에서도 0.5mM에서보다는 그 정도가 약하였지만 시간에 따라 저항치가 감소하는 양상을

보였다. 이는 H₂O₂에 노출시 세포 사망에 의한 내피 장벽 파괴가 진행되기 이전에도 내피 투과장벽의 기능에 현저한 장애가 초래될 수 있음을 나타낸다. 이러한 결과를 토대로 본 연구에서는 뚜렷한 세포 사망을 초래하지 않으면서 투과장벽의 기능적 손상을 초래하는 것으로 보이는 점 즉, 0.1mM의 농도와 3시간의 처리 시간을 산화성 손상의 기준으로 삼아 실험을 진행하였다(Fig. 4).

3) H₂O₂에 의한 내피 투과도 변화에 미치는 星香正氣散의 효과

현재까지 내피 투과도를 증가시키는 가장 잘 알려진 인자 중의 하나가 protein kinase C인데^{29,30}, 특히 H₂O₂에 의한 내피 투과도의 변화에도 관여하는 것으로 알려져 있기 때문에³¹, H₂O₂에 의한 내피 투과도 변화에 protein kinase C의 특이적 억제 약물인 calphostin-C³²가 미치는 효과를 함께 관찰하여 그 효과를 비교하였다. 그 결과 星香正氣散은 1mg/ml의 농도에서 LDL 이동 및 내피 양단간 저항으로 측정된 내피 투과도의 변화를 현저히 억제하였으며 그 효과는 calphostin-C의 효과보다 더 크게 나타났다(Fig. 5).

4) PMA에 의한 내피 투과도 변화와 星香正氣散의 효과

Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)는 발암성을 나타내는 phorbol ester의 일종으로 protein kinase C를 직접 활성화시켜³³ protein kinase C에 의한 세포 기능의 변화를 직접 확인할 수 있는 도구로서 종종 사용된다. Fig. 6에 나타난 결과에서 보듯이 PMA (0.1 M)를 3시간 처리한 세포에서는 LDL 이동이 증가하고 내피 양단간의 저항치가 감소하였으며 이는 PMA가 내피 투과도를 증가시킴을 의미한다. 또한 calphostin-C 존재 하에서는 이러한 내피 투과도의 증가가 완전히 차단되어 PMA에 의한 내피 투과도의 증가가 protein kinase C의 활성화와 긴밀히 연관되어 있음을 보여준다. 그러나 星香正氣散은 PMA에 의한 내피 투과도의 증가를 차단하지 못하였다.

5) 내피 투과도 변화에 미치는 forskolin의 효과

혈관의 내피 투과도에는 위에서 언급한 protein

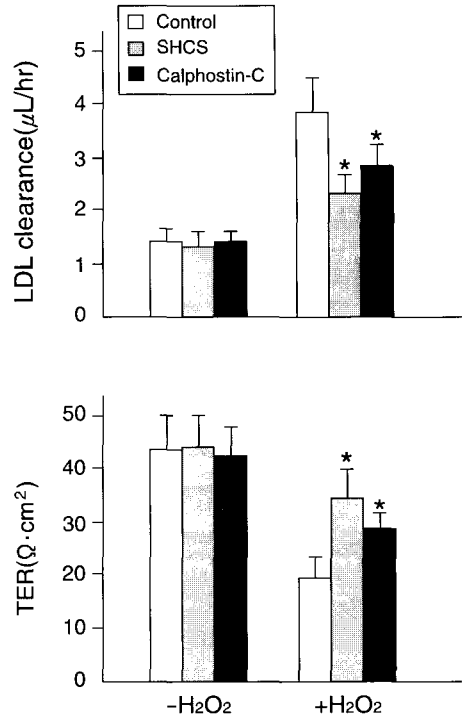


Fig. 5. Effects of Sunghyangchungisan and calphostin-C on H₂O₂-induced change in endothelial permeability. Endothelial monolayers were exposed to H₂O₂ (0.1mM) for 3 hr in the presence and absence of Sunghyangchungisan (SHCS, 1mg/ml) and calphostin-C (10µM), and movement of low density lipoprotein (LDL) across endothelial monolayer and transendothelial electrical resistance (TER) were measured. Each bar represents mean S.E. of 5 monolayers. *P<0.01 vs. control.

kinase C와 함께 세포내 nucleotide들에 의해서 조절을 받는데, 특히 cyclic AMP (cAMP)는 내피 투과도를 감소시키는 중요한 인자로 잘 알려져 있다³⁴. 세포내 cAMP 농도를 증가시키는 방법으로 adenylyl cyclase의 효소 아단위 (catalytic subunit)에 직접 작용하여 이를 활성화시킴으로써 세포내 cAMP의 생성을 촉진시키는 forskolin³⁴을 사용하였다. 그 결과 forskolin (1 M)을 처리한 세포에서 LDL의 이동이 감소하고, 내피 양단간의 저항이 유의하게 증가하여 내피 투과도의 감소 효과가 있음을 확인할 수 있다. 이러한 효과는 H₂O₂로 처리하여 내피 투과도를 증가

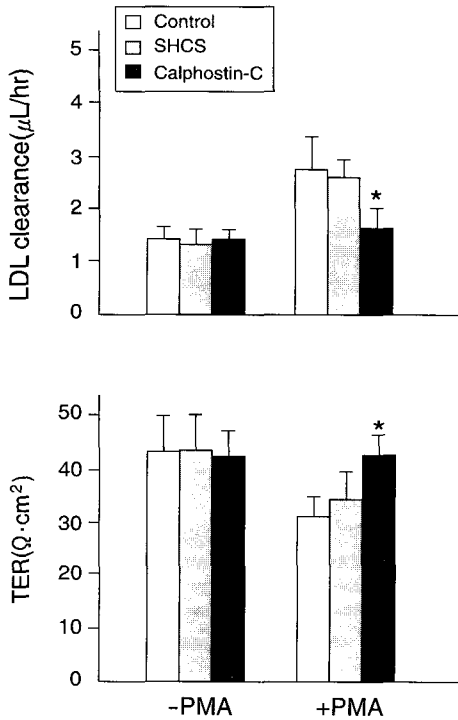


Fig. 6. Effects of *Sunghyangchungisan* and calphostin-C on phorbol 12-myristate 13-acetate-induced change in endothelial permeability. Endothelial monolayers were exposed to phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 0.1 μM) for 3 hr in the presence and absence of *Sunghyangchungisan* (SHCS, 1 mg/ml) and calphostin-C (10 μM), and movement of low density lipoprotein (LDL) across endothelial monolayer and transendothelial electrical resistance (TER) were measured. Each bar represents mean S.E. of 5 monolayers. *P<0.01 vs. control.

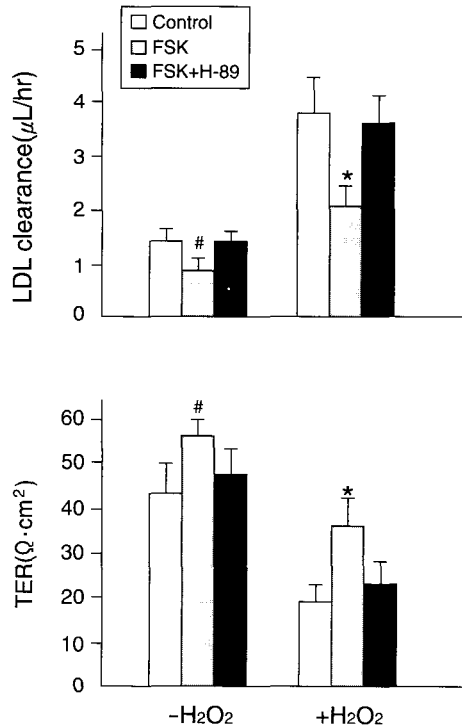


Fig. 7. Effects of forskolin and H-89 on H₂O₂-induced change in endothelial permeability. Endothelial monolayers were exposed to H₂O₂ (0.1 mM) for 3 hr in the presence and absence of forskolin (FSK, 1 μM) and H-89 (10 μM), and movement of low density lipoprotein (LDL) across endothelial monolayer and transendothelial electrical resistance (TER) were measured. Each bar represents mean S.E. of 5 monolayers. #P<0.05, *P<0.01, vs. control.

시킨 세포에서 더욱 뚜렷이 나타남을 보여, 세포내 cAMP 농도를 증가시키면 H₂O₂에 의한 내피 투과도의 증가를 상쇄시키는 효과가 있음을 보여준다 (Fig. 7).

6) 세포내 cAMP 함량에 미치는 H₂O₂ 및 星香正氣散의 효과

H₂O₂로 처리한 세포에서는 세포내 cAMP 함량이 현저히 감소하였으며 星香正氣散은 이러한 H₂O₂의 효과를 강하게 차단하였다. 그러나 星香正氣散 단독으로는 세포내 cAMP 함량에 아무런 효과를 나타내

지 못함을 확인할 수 있다(Fig. 8).

고 찰

내피세포는 혈관 구조 중에서 혈액과 직접 접하고 있어 혈관의 항상성 유지에 중요한 기능을 하고 있으며 혈액 성분이 혈관 조직으로 쉽게 침투하지 못하게 하는 투과 장벽으로서의 역할을 한다. 그러나 내피세포는 산화적 스트레스에 매우 약하여, 배양 내피세포를 이용한 실험에서 H₂O₂나 O²⁻ 등의 활성 산소기들이나 과산화지질 등에 의해 쉽게 손상 당한다

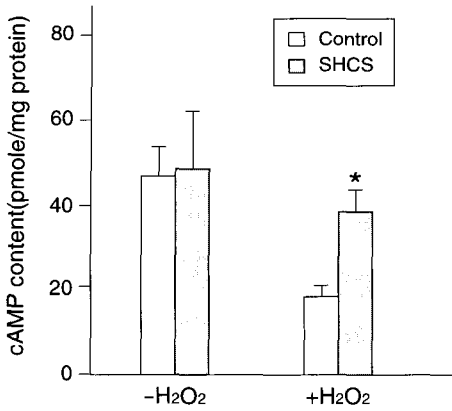


Fig. 8. Effects of *Sunghyangchungisan* and H₂O₂ on intracellular cAMP concentration in endothelial monolayer. Endothelial monolayers were exposed to H₂O₂ (0.1mM) for 3 hr in the presence and absence of *Sunghyangchungisan* (SHCS, 1mg/ml), and cAMP content was determined in cellular extracts. Each bar represents mean S.E. of 6 monolayers. *P<0.01 vs. control.

³⁵. 이러한 산화성 손상이 동맥경화를 일으키는 기전에 대해서는 많은 연구가 있었으며 일반적으로 Ross 등³⁵이 제시한 상해 반응설 (response to injury hypothesis)이 인정을 받고 있는데 이를 단계별로 요약해보면 다음과 같다. 1) 흡연, 고혈압, 활성 산소 및 고산화 지질에 의해 혈관 내피세포의 기능에 장애가 일어난다. 2) 내피세포 장애로 PGI₂의 생성 장애를 가져오고, 내막하의 collagen이 혈액에 노출되어 혈소판 침착, 응집 또는 macrophage의 침착을 가져온다. 3) 물질의 투과성이 항진되어 내피하 조직으로 지단백 (VLDL, LDL)이 침투한다. 혈소판, 거대탐식세포 (macrophage)에서 성장인자인 PDGF, MDGF가 분비되어 평활근 세포가 증식에서 내막측으로 침투하며 증식함에 따라 초기 내막 비후가 나타난다. 4) 내량의 지질이 침투하고 지질을 탐식한 포말세포 (foam cell)의 출현이 보이며 내막에서 증식하는 평활근 세포에서 collagen, elastin이 생성되어 내막이 점차 비후해진다. 5) 포말세포가 파괴되면 cholesterol이 방출되어 결정으로 침착한다. 6) 조직의 괴사, 출혈, 석회화를 가져온다.

본 연구에서 실험에 사용한 투과성 필터에 배양한 내피세포는 내피 투과도의 변화 혹은 내피를 통한 물질 이동의 변화를 측정할 수 있다는 점 외에도 일반적인 플라스틱 배양 장치에 배양하는 것보다 훨씬 생체 상태에 가까운 특성을 지닌 내피 모형을 만들 수 있는 장점이 있다. 본 연구에서도 확인하였듯이 내피 양단간의 전기 저항의 변화와 LDL의 이동 변화가 서로 밀접하게 연관되어 있음은 이들이 내피 투과도의 변화를 측정하는 훌륭한 지표로 사용될 수 있다. 특히 내피 투과도 증가와 연관되어 나타나는 내피하 조직에서의 LDL의 축적이 혈관 조직의 염증성 변화와 동맥경화를 일으키는 시초가 됨은 앞에서 이미 밝힌 바 있다.

본 연구에서 中風 등 뇌혈관장애를 나타내는 순환기계 질환에서 구급처방으로 상용되는 星香正氣散이 H₂O₂에 의한 내피 투과도의 증가를 효과적으로 방지하는 효과를 보였다. 星香正氣散의 이러한 효과가 어떠한 기전 혹은 과정에 작용하여 나타나는 지는 본 연구에서 명확히 밝히지는 못하였다. 내피 세포의 사망율이 증가하면 내피 조직의 구조가 파괴되고 따라서 내피 투과도는 급격히 증가할 것이다. 따라서 星香正氣散이 내피 세포의 사망을 억제하는 효과가 있다면 내피 세포 사망과 연관된 투과도 증가를 억제할 수 있을 것이다. 그러나 본 실험에서 사용한 H₂O₂의 농도와 처리 시간이 내피 세포의 사망이 뚜렷이 관찰되지 않는 조건이기 때문에 내피 세포의 사망에 의한 투과도 변화와는 별개의 기전에 작용하여 나타난 결과로 생각된다.

현재까지 내피 투과도를 조절하는 중요한 인자로 잘 알려져 있는^{29,30} protein kinase C 및 cAMP 의존성 기전과 星香正氣散이 서로 상호 작용에 의해 본 연구에서 관찰한 효과들이 나타날 수 있으므로 그 가능성을 조사하였다. H₂O₂ 등 활성 산소에 의한 산화성 손상 기전에 protein kinase C의 활성화가 직접 혹은 간접으로 간여하는 것으로 알려져 있다³¹. 본 연구에서 protein kinase C를 직접 활성화시키는³² PMA에 의해 내피 투과도가 증가되며 이는 protein kinase C 억제제인 calphostin-C³²에 의해 억제됨은 이러한 주

장과 합치하는 결과이다. 만약 星香正氣散이 protein kinase C의 활성화를 억제하는 직접적인 작용이 있다면 PMA에 의한 내피 투과도 증가도 차단하는 효과를 나타내어야 하지만 Fig. 6의 결과에 나타난 것처럼 星香正氣散은 PMA에 의한 내피 투과도 증가에는 아무 효과를 보이지 못하여 protein kinase C 활성화에 대한 직접적인 작용은 없는 것으로 보인다. 세포내 cAMP 농도를 직접 측정된 실험에서 H₂O₂에 의한 cAMP 함량 감소를 강력하게 차단시키는 효과를 보였지만 星香正氣散 단독으로는 cAMP 함량에 아무런 영향을 보이지 못하여 이러한 星香正氣散의 효과가 adenylyl cyclase 등 cAMP-의존성 신호 전달계의 효과기들과의 직접 작용에 의해서 나타나지 않는 것으로 보인다. 따라서 본 연구에서 관찰한 星香正氣散의 효과들은 내피 투과도를 조절하는 세포내 인자들과의 직접 작용이라기보다는 반응성 산소기들을 제거하는 scavenger로서의 작용과 밀접한 연관이 있는 것으로 보이며 앞으로의 연구에서 중점적으로 확인해야 할 점으로 사료된다.

본 연구자의 연구 결과에서 관찰한 星香正氣散의 혈관 내피 손상에 대한 보호 효과는 星香正氣散의 알려진 임상 효과와 연관지어 많은 흥미로운 점들을 제시해 주었다. 심장이나 뇌 등에서 혈행 장애 혹은 허혈 후 혈액 재관류에 의한 손상 시에도 활성 산소가 결정적인 역할을 하기 때문에 본 연구에서 관찰된 혈관 내피세포에 대한 산화성 세포 손상을 방지하고 내피 투과도의 증가를 차단하는 星香正氣散의 효과는 여러 가지 면에서 의미가 확대될 수 있을 것으로 사료된다. 먼저 혈관 내피세포의 손상 보호 효과는 노화나 여러 가지 다른 요인들에 의해 활성 산소를 매개로한 내피 세포의 손상을 방지함으로써 이와 연관된 동맥경화 등 혈관 질환의 발생 혹은 진행을 방지하거나 지연시키는 효과가 기대된다. 또 다른 관점에서 관상동맥 혈행 장애에 의한 허혈성 심질환 혹은 뇌혈관 장애에 의한 中風 등에서 활성 산소에 의한 이들 조직 손상의 진행을 방지 혹은 완화시키는 효과를 기대할 수 있을 것이다. 이는 星香正氣散이 中風 초기의 구급처방으로 효과적으로 활용

되고 있다는 점에서 아주 흥미로우며, 뇌 혹은 심근 조직을 이용하거나 생체 실험 등을 통해서 구명해야 할 필요가 있을 것으로 사료된다.

이상의 결과를 요약하면 星香正氣散은 투과성 필터에 배양한 혈관 내피 세포에서 H₂O₂에 의한 내피 투과도의 증가를 유의성 있게 차단하였으며 그 이전에 protein kinase C 혹은 cAMP 등 세포내에서 작동하는 투과도 조절 인자들과의 직접 작용은 관여하지 않는 것으로 사료된다.

결론

사람의 제대정맥 기원의 혈관 내피세포를 투과성 필터에 배양하여 내피 투과성의 지표로서 내피 양단간의 전기 저항 및 저밀도 지단백 (low density lipoprotein)의 이동 변화를 측정하고 이에 미치는 hydrogen peroxide (H₂O₂) 및 星香正氣散의 효과를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Hydrogen peroxide (H₂O₂)는 내피 세포의 사멸을 초래하지 않는 농도와 처리시간에서 내피 투과도를 증가시켰으며 이는 星香正氣散 (SHCS)에 의해 유의성 있게 차단되었다.
2. Protein kinase C 활성화 물질인 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)도 내피 투과도를 증가시켰으며, 이는 calphostin-C에 의해 완전히 차단되었다. 그러나 星香正氣散 (SHCS)은 PMA에 의한 내피 투과도의 증가에 영향을 미치지 않았다.
3. Forskolin (FSK)을 처리하여 세포내 cAMP 농도를 증가시키면 내피 투과도가 유의하게 감소하였으며, 또한 Hydrogen peroxide (H₂O₂)에 의한 내피 투과도의 증가를 상쇄시키는 효과를 보였다.
4. 星香正氣散 (SHCS)은 Hydrogen peroxide (H₂O₂)에 의한 세포내 cAMP 농도의 감소를 유의성 있게 차단하였으나, 단독으로 처리 시에는 cAMP 농도를 증가시키지는 못하였다.

참고문헌

1. 김종평, 유익동. 新物質探索:자유아카데미. 1996:325-329.
2. Ashok, B.T. and Ali, R. The aging paradox: free radical theory of aging. *Exp Gerontol.* 1999;34:293-303.
3. Hogg, N. Free radicals in disease. *Semin Reprod Endocrinol.* 1998;16:241-8.
4. Lusinskas, F.W. and Gimbrone, M.A., Jr. Endothelial-dependent mechanisms in chronic inflammatory leukocyte recruitment. *Annu Rev Med.* 1996;47:413-421.
5. Gimbrone, M.A., Jr. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherosclerosis. *Thromb Haemost.* 1999;82:722-726.
6. Boissonneault, G.A., Hennig, B., Wang, Y. and Wood, C.L. Aging and endothelial barrier function in culture: effects of chronic exposure to fatty acid hydroperoxides and vitamin E. *Mech Ageing Dev.* 1990;56:1-9.
7. 戴思恭. 證治要訣(卷四). 北京:人民衛生出版社. 1983:35-36.
8. 龔延賢. 新刊醫林狀元濟世全書. 臺北:新文豐出版社. 1982:21,23,27.
9. 黃度淵. 證脈方藥合編. 서울:南山堂. 1978:138-140.
10. 尹吉榮. 東醫方劑學. 서울:高文社. 1980:40,41, 108,144,155,173.
11. 李麟星. 藿香正氣散과 夏節節. 醫林. 1987;180:4-7,12.
12. 具本泓. 東醫心系內科學. 서울:書苑堂. 1985:305-311.
13. 金定濟. 診療要鑑. 서울:東洋醫學研究院. 1974: (上)pp.448-449,453,(下)p.431.
14. 金定濟. 中風證의 病理的 考察. 東洋醫學. 1978;4:33-38.
15. 김상현. 腦卒中的 症狀과 豫後. 大韓醫學協會誌. 1977;20:1037-1042.
16. 金永錫. 中風の 病因病理에 關한 文獻의 考察. 東洋醫學. 1981;7:42-54.
17. 宋孝貞, 文濬典. 清上瀉火湯이 血壓 및 脂質代謝에 미치는 影響. 慶熙韓醫大論文集. 1982;5:131-146.
18. 李京燮, 具本泓. 竹瀝湯, 加味竹瀝湯이 高血壓 및 血糖에 미치는 影響. 慶熙韓醫大論文集. 1980;3:91-108.
19. 朴鍾榮, 李京燮. 祛風續命湯이 脂質代謝에 미치는 影響에 關한 研究. 慶熙韓醫大論文集. 1982;5:335-343.
20. 權寧哲, 李京燮. 疎風湯 및 加味疎風湯이 高脂血症에 미치는 影響. 慶熙韓醫大論文集. 1982;5:269-279.
21. 王肯堂. 證治準繩(1). 臺北:新文豐出版公司. 1974:37,40,41.
22. 孫東宿. 赤水玄珠(1)(影印本). 海著易堂藏版. 1914:7,11.
23. 方賢. 奇效良方(1). 香港:商務印書館. 1977:2,5.
24. 安恭立. 星香正氣散이 家猫의 血壓 및 心搏動에 미치는 影響. 圓光大韓醫大論文集. 1982;2:199-217.
25. 文炳淳. 星香正氣散이 家兔의 頭蓋內壓 및 血壓에 미치는 影響. 圓光大學校. 1988.
26. 柳鍾三. 星香正氣散이 흰쥐의 腦損傷에 미치는 影響. 大田大學校. 1992.
27. Hashida, R., Anamizu, C., Kimura, J., Ohkuma, S., Yoshida, Y. and Takano, T. Transcellular transport of lipoprotein through arterial endothelial cells in monolayer culture. *Cell Struct Funct.* 1986;11:31-42.
28. Bjorkerud, S. and Bondjers, G. Endothelial integrity and viability in the aorta of the normal rabbit and rat as evaluated with dye exclusion tests and interference contrast microscopy. *Atherosclerosis.* 1972;15:285-300.
29. Yamada, Y., Furumichi, T., Furui, H., Yokoi, T., Ito, T., Yamauchi, K., Yokota, M., Hayashi, H. and Saito, H. Roles of calcium, cyclic nucleotides, and protein kinase C in regulation of endothelial permeability. *Arteriosclerosis.* 1990;10:410-420.
30. Hoek, J.B. Intracellular signal transduction and the control of endothelial permeability [editorial; comment]. *Lab Invest.* 1992;67:1-4.
31. Siffinger-Birnboim, A., Goligorsky, M.S., Del Vecchio, P.J. and Malik, A.B. Activation of protein kinase C pathway contributes to hydrogen peroxide-induced increase in endothelial permeability [see comments]. *Lab Invest.* 1992;67:24-30.
32. Kobayashi, E., Nakano, H., Morimoto, M. and Tamaoki, T. Calphostin C (UCN-1028C), a novel microbial compound, is a highly potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989;159:548-553.
33. Castagna, M., Takai, Y., Kaibuchi, K., Sano, K., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. Direct activation of

- calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem.* 1982;257:7847-7851.
34. Seamon, K.B., Padgett, W. and Daly, J.W. Forskolin: unique diterpene activator of adenylate cyclase in membranes and in intact cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1981;78:3363-3367.
35. Ross, R. Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol.* 1995;57:791-804.