

자혈양근탕 및 양혈장근건보환이 인체 소장 상피세포주 (Caco-2) 모델에서 칼슘 흡수에 미치는 영향*

임현정 · 황귀서** · 박태선[§]

연세대학교 식품영양학과, 경원대학교 한의과대학**

Effects of the Oriental Medicinal Prescriptions, Jahyulyangeuntang and Yanghyuljangeunkeonbohwan, on Calcium Absorption in the Human Colon Carcinoma Cell Line (Caco-2 Cells)

Lim, Hyun Jung · Hwang, Gwi Seo** · Park, Taesun[§]

Department of Food and Nutrition, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea
College of Oriental Medicine,** Kyungwon University, Kyungki-Do 461-701, Korea

ABSTRACT

Effects of the two oriental medicinal prescriptions, Jahyulyangeuntang (JH) and Yanghyuljangeunkeonbohwan (YH), on intestinal calcium absorption were examined in the human colon carcinoma cell line, Caco-2 cells. Intestinal calcium absorption was evaluated at the level of Ca uptake into the cells across the brush border membranes, as well as at the level of net Ca transport (implying the amount of intestinal Ca transported into the blood stream). When the Caco-2 cells were incubated for 4, 8, 16 and 24 days post seeding, the cells were differentiated continuously, and showed progressively increased activities of Ca uptake (1.13 ± 0.04 , 1.19 ± 0.02 , 1.94 ± 0.03 , and 2.40 ± 0.12 nmole · mg protein⁻¹ · 30 min⁻¹, respectively). Pretreatment of confluent Caco-2 cells with 50 µg/ml of YH for 24 hours resulted in a 30% increase in Ca uptake ($p < 0.05$), while pretreatment of the cells with the same concentration of JH for 6 hours resulted in a 24% increase ($p < 0.05$) in Ca uptake, compared to the value for the control cells (2.34 ± 0.10 nmole · mg protein⁻¹ · 30 min⁻¹). When the cells were pretreated with varied concentrations (5 - 100 µg/ml) of the test samples for 6 hours, maximal increases in Ca uptake were observed in the cells pretreated with 100 µg/ml of YH (a 23% increase), and 50 µg/ml of JH (a 28% increase), respectively; however, no influence was seen on the net Ca transport activity. These results show that pretreatment with JH or YH, the two oriental medicinal prescriptions commonly used for improvement of bone metabolism, could possibly increase Ca accumulation inside the cells. but not the intestinal Ca net transport in vitro. (*Korean J Nutrition* 35(4) : 446~453, 2002)

KEY WORDS: Jahyulyangeuntang, Yanghyuljangeunkeonbohwan, intestinal Ca absorption, Caco-2 cells, Ca uptake, Ca net transport.

서 론

칼슘은 골조직을 비롯하여 신경, 근육 등의 각종 조직에서 중요한 생리적 기능을 담당하는 무기질로서 한국인에게 가장 부족되기 쉬운 영양소이다.¹⁾ 칼슘 섭취의 부족으로 인한 영양문제는 뼈의 성장 및 유지, 골다공증, 골절 등의 골

질환 뿐 아니라 순환기계 질환, 고혈압, 동맥경화 및 고지혈증을 포함하는 각종 성인병과 관련이 있음이 최근 밝혀지고 있다.^{2,3)}

치료제 또는 건강보조 목적으로 사용되고 있는 다양한 한약재의 유효성분에 관해서는 아직까지 규명되어 있지 않은 부분이 많으며, 특히 한약재에 함유된 다량 또는 미량영양 성분 및 각종 생리활성물질의 함량에 관한 자료는 매우 부족한 현실이다. 특정 무기질의 과다 또는 과소 섭취는 같은 이온가를 소유한 타 무기질의 흡수 및 이용에 영향을 미치고, 따라서 무기질의 함량이 높을 것으로 추정되는 한약재의 경우 장기복용시 체내 칼슘대사 및 균형에 영향을 줄 것으로 생각된다. 또한 식이섭유소를 비롯하여 한약재에 포함

접수일: 2002년 1월 29일

채택일: 2002년 3월 29일

*This study was supported by a grant of the Oriental Medicine R&D Project, Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (HMP-00-0-22000-013).

[§]To whom correspondence should be addressed.

된 다양한 영양·비영양 성분들은 칼슘을 비롯한 기타 무기질의 생체이용률에 영향을 미칠 것으로 생각되나, 이에 관한 연구가 현재로서는 전무한 실정이다.

장내 칼슘의 흡수는 주로 소장 상부에서 주로 진행되는 능동적 수송기전 (active transport)과 소장 하부에서 농도차에 의해 일어나는 확산기전 (passive diffusion)의 두가지 과정에 의해 이루어진다.⁴⁵⁾ 칼슘의 능동적 수송기전은 칼슘의 섭취량 및 신체의 칼슘 요구도, 그리고 개체의 비타민 D 영양상태 등에 의해 조절되며, 다음의 세가지 연속적인 단계에 의해 진행된다.⁶⁷⁾ i) 소장세포의 융모막 (brush border membrane)을 통한 세포내로의 uptake 과정, ii) 세포내에서의 translocation (intracellular diffusion), 그리고 iii) 소장상피세포의 basolateral membrane을 통한 칼슘 방출 (efflux) 과정.

칼슘을 비롯한 무기질의 uptake와 net transport를 연구하는데 있어서 최근 세포주 모델의 이용이 급증하는 추세에 있으며, 인체 대장암세포주인 Caco-2 세포는 가장 널리 이용되는 세포주 중의 하나이다. Caco-2 세포는 분화가 되면서 분극현상 (polarization), 미소융모막 (microvilli)의 형성 등과 같은 소장상피세포의 특성을 나타내는 것으로 알려져 있다.^{8,9)} 따라서 다양한 영양소 및 약물이 소장으로부터 흡수되는 기전 및 bioavailability를 연구하는데 있어서 Caco-2 세포주가 유용한 in vitro 모델이 되고 있으며, 실제로 1990년 이후 Caco-2 세포를 이용하여 glutathione¹⁰⁾ 및 taurine¹¹⁾ 등의 아미노산, 비타민 D,¹²⁾ 철분,¹³⁾ 칼슘¹⁴⁾ 및 아연¹⁵⁾ 등의 영양소가 소장으로부터 흡수되는 기전이 연구되어졌다.

자혈양근탕 (滋血養筋湯) 및 양혈장근건보환 (養血壯筋健步丸)은 혈액생성을 촉진시키고 근력을 강화시킬 목적으로 사용되었던 한약처방제이다. 한의학에서는 신장 (腎)이 장정 (藏精), 생수 (生髓), 양골작용 (養骨作用)을 하므로 신장기능이 허약하면 골수 (骨髓)와 골격 (骨格)의 약화가 수반된다고 평가하였다.¹⁶⁾ 또한 골의 약화는 근육과 관련된 부분의 위축 (萎縮)을 가져오므로, 근력을 강화시키는 것과 골을 강화시키는 것은 거의 같은 범주로 취급하여 치료하였다. 따라서 양혈 (養血) 및 양근 (養筋) 작용을 하는 한약은 골대사와 관련이 있을 것으로 판단되었다. 본 연구에서는 이와 같이 골대사와 관련이 있는 자혈양근탕 및 양혈장근건보환 처방제가 장내 칼슘 흡수에 미치는 영향을 살펴보고자 인체 소장상피세포주인 Caco-2 세포를 이용하여 칼슘 uptake와 net transport에 미치는 효과를 각기 평가하였다.

재료 및 방법

1. 한약처방제의 추출 및 시료의 제조

본 연구에서는 자혈양근탕 (滋血養筋湯, JH)과 양혈장근건보환 (養血壯筋健步丸, YH)의 두가지 한약처방제를 사용하였다. 자혈양근탕 (滋血養筋湯)은 숙지황 (熟地黃) 6g, 백작약 (白芍藥), 당귀 (當歸), 맥문동 (麥門冬), 황백 (黃柏), 두충 (杜仲), 창출 (蒼朮) 각 4g, 의이인 (薏苡仁) 3g, 인삼 (人蔘), 천궁 (川芎), 방풍 (防風), 지모 (知母) 각 2g, 강활 (羌活), 감초 (甘草) 각 1.5g, 오미자 (五味子) 9알, 생薑 (生薑) 2편, 그리고 대추 (大棗) 2개로 처방이 구성되었다. 양혈장근건보환 (養血壯筋健步丸)의 경우 숙지황 (熟地黃) 8g, 우석 (牛膝), 두충 (杜仲), 당귀 (當歸), 창출 (蒼朮), 황백 (黃柏) 각 4g, 백작약 (白芍藥) 6g, 황기 (黃芪), 산약 (山藥), 오미자 (五味子), 파고지 (破故紙), 인삼 (人蔘), 토사자 (兔絲子), 구기자 (枸杞子), 백술 (白朮), 귀판 (龜板) 각 4g, 방풍 (防風) 3g, 방기 (防己) 2g, 강활 (羌活) 1g으로 처방이 구성되었다. 각 처방에 증류수 2000ml를 넣고 4시간 이상 환류추출한 후 여과하고, evaporator를 이용하여 농축한 후 동결건조하였다. 자혈양근탕 1첩과 양혈장근건보환 1첩을 추출하여 각각 8.7g과 13.2g의 동결건조물을 얻었다. 실험시에는 배양액을 이용하여 0~100 µg/ml 농도의 한약처방 용액이 되도록 조제하여 세포에 전처리하였다.

2. 세포배양

인체대장암세포주인 Caco-2 세포는 175 cm² culture flask에서 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS), 100 unit/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin, 그리고 1% MEM non-essential amino acid를 함유한 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco) 배지를 사용하여 배양시켰다. 개별 실험을 위해 세포주를 분주할 경우 confluent한 상태의 세포를 0.25% trypsin과 0.3% ethylenediaminetetra acetic acid (EDTA)가 함유된 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)을 사용하여 분산시키고, 6-well plate의 각 well (35 mm dish)에 3.5 × 10⁶개의 세포를 넣고 배양하기 시작하였다. 세포배양은 5% CO₂ 가스가 존재하는 37°C 배양기에서 진행되었다.

Caco-2 세포가 바닥에 단단히 부착하여 자랄 수 있도록 collagen을 이용하여 6-well plate과 transwell mem-

brane filter (Corning Costa사, 0.4 μm pore size, #3450)를 coating하였다. 25 mg의 rat tail collagen (Sigma 사, #C8897)에 멸균된 0.1% acetic acid 10 ml를 가하여 녹인 후 0.22 μm filter (Corning 사, #430513)로 여과한 60% ethanol 용액을 이용하여 1/8로 희석하였다. 희석된 collagen 용액을 140 μm filter를 6-well plate와 transwell membrane filter에 가하여 고루 퍼지도록 한 후 뚜껑을 연 상태로 자외선이 쬐진 laminar flow에서 5시간 동안 건조시켰다.

Transwell membrane filter에서 자라는 Caco-2 세포의 monolayer를 대상으로 tight-junction의 permeability를 평가하고자 epithelial voltometer (World Precision Instruments사, EVOM)를 사용하여 TEER (transepithelial electrical resistance)를 분주 후 18일까지 측정하였다.

3. 세포생존율 분석

MTT 테스트는 살아있는 세포의 미토콘드리아에 함유된 일련의 dehydrogenase에 의해 MTT가 formazan으로 전환되는 양을 분광학적으로 측정하는 방법이다.¹⁷⁾ 본 연구에서는 실험에 적합한 한약처방의 전처리 농도를 결정하기 위해 Caco-2 세포에 대한 한약처방의 안전성을 평가하기 위해 MTT 테스트를 실시하였다. Caco-2 세포를 24-well plate에 3.5×10^5 개씩 분주하여 1일간 배양시킨 후 한약처방 농축액을 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 배지에 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. Phosphate buffered saline (PBS)에 5 mg/ml 농도가 되도록 조제하여 여과한 MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] 용액을 각 well에 100 μl 씩 첨가하고 2시간 동안 더 배양하였다. 처리한 각 well의 배지를 흡입장치를 이용하여 제거시킨 후, 1.1 ml HCl/500 ml isopropanol 혼합액을 첨가하여 세포를 용해시킨 다음 multilabel counter (Perkin Elmer사, Wallac 1420)를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 측정된 흡광도는 살아 생존하는 세포의 미토콘드리아 dehydrogenase에 의해 MTT가 formazan으로 전환된 양을 나타내며, 생존하는 세포수와 비례한다. 한약처방으로 전처리한 세포의 생존율은 생존하는 대조세포의 평균값에 대한 백분율로 표시하였다.

4. Brush border membrane 지표효소의 측정

소장상피세포는 분화가 진행되면서 미소융모막을 형성하게 되므로 융모막에서 다량 발현되는 alkaline phosphatase와 γ -glutamyl transferase, 그리고 sucrase 활성을 측정하여 소장상피세포가 분화되는 정도의 지표로 사용하

였다. 6-well plate에서 confluent한 상태를 지나 일정기간 배양시킨 세포로부터 배양액을 제거한 다음 PBS로 세포를 2회 세척하고, 다시 PBS 1 ml을 넣은 후 cell scraper를 이용하여 세포를 수거하였다. 얼음 위에서 초음파분쇄기를 이용하여 수거된 세포의 막을 파괴시킨 후 피펫으로 균질화시켰다.

세포균질액의 alkaline phosphatase 활성은 Bessy 등¹⁸⁾의 방법을 기초로 한 상업적 kit (Sigma사, #104-LL)를 이용하여 측정하였다. 즉 phosphatase 촉매 하에 p-nitrophenyl phosphate 기질로부터 생성된 p-nitrophenol을 알칼리 환경에서 노란색 화합물로 전환시킨 후 410 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 효소활성은 $\text{mU} \cdot \text{mg protein}^{-1}$ 로 나타냈다.

γ -Glutamyl transferase 활성은 Pillion 등¹⁹⁾의 방법에 준해 시료 200 μl 에 11.1 mM glycylglycine과 2.8 mM L- γ -glutamyl p-nitroanilide를 기질로 첨가하여 37°C에서 20분간 반응시킨 후 4°C의 2N 아세트산용액을 첨가하여 반응을 종결시켰다. 생성된 p-nitroanilide의 양은 spectrophotometer를 이용하여 410 nm에서 흡광도를 측정하여 구하였으며, 효소활성은 $\mu\text{mol} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ 으로 나타내었다.

Sucrase 활성은 Conklin 등²⁰⁾의 방법에 준해 glucose-E kit (영동제약, #BC103-E)를 사용하여 sucrose로부터 생성된 glucose의 양을 410 nm에서 측정하여 정량하였다. 효소활성은 $\mu\text{mol} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ 으로 나타내었다.

세포의 단백질함량을 측정하기 위해 동일한 조건에서 배양시킨 3개의 well에 1ml의 deionized water를 첨가한 후 cell scraper를 이용하여 세포를 수거하였다. 얼음 위에서 초음파분쇄기를 이용하여 수거된 세포의 막을 파괴시켰으며, 파괴된 세포액의 단백질 함량은 bovine serum albumin을 표준용액으로 하여 Bradford²¹⁾ 방법에 의한 Bio-Rad assay kit (#55611A)를 이용하여 측정하였다.

5. 칼슘 uptake 측정

Caco-2 세포에 의한 칼슘 uptake를 측정하기 위해 이용된 uptake 배지의 조성은 다음과 같다: 20 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES) (pH 7.4), 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.5 mM MgSO_4 , 3.5 mM glucose, 4 mM glutamine, 499 μM cold CaCl_2 및 0.001 mM의 $^{45}\text{CaCl}_2$ (NEN Life Science Products, #NEZ-013).

Uptake 실험을 실시하기 전 6-well plate에서 monolayer로 자란 세포의 배양액을 제거시킨 후 PBS로 세포를

2회 세척하였다. 각 well에 1 ml의 uptake medium을 넣은 후 상온에서 일정시간 배양하여 세포내로 $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 이 이동하게 한 다음 흡입장치를 이용해 재빠르게 용액을 제거하고, PBS로 세번 이상 세포를 세척하였다. 0.1% SDS용액 1 ml을 각 well에 넣은 후 10분간 흔들어서 세포막을 파괴시켰다. 세포용해액을 scintillation cocktail (Beckman사, #S812547)이 담긴 scintillation vial에 옮긴 후, liquid scintillation counter (Beckman사, LS6500)를 사용하여 3분간 radioactivity를 측정하였으며, 단위 시간당 세포에 의한 칼슘 uptake 활성은 $\text{nmole Ca}^{2+} \cdot \text{mg protein}^{-1}$ 으로 제시하였다.

6. 칼슘 net transport 측정

용모막을 통해 소장상피세포내로 흡수되었다가 basolateral membrane을 통해 efflux되는 칼슘의 net transport 활성을 측정하기 위해 transwell membrane filter (corning costa사, 0.4 μm pore size)를 사용하였다. Caco-2 세포를 collagen이 처리된 transwell membrane filter에 3.5×10^5 개씩 분주하고, upper chamber에는 1.5 ml의 배지를, 그리고 lower chamber에는 2.5 ml의 배지를 넣어 16일간 배양시켰다.

Upper chamber에 첨가된 칼슘이 세포를 통과해 lower chamber로 빠져 나온 속도를 측정하여 칼슘의 net transport를 측정하였으며, upper chamber에 사용된 배지의 조성은 다음과 같았다: 20 mM HEPES (pH 7.4), 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.5 mM MgSO_4 , 3.5 mM glucose, 4 mM glutamine, 499 μM cold CaCl_2 및 1 μM 의 $^{45}\text{CaCl}_2$. 한편, lower chamber에 사용된 용액의 조성은 다음과 같았다: 20 mM HEPES (pH 7.4), 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.5 mM MgSO_4 , 5 mM glucose, 4 mM glutamine.

7. 통계분석

모든 분석수치는 $\text{mean} \pm \text{SEM}$ 으로 제시하였고, 수집된 자료는 SAS (Statistical Analysis System) PC 프로그램을 이용하여 통계 분석하였다. 한약처방이 칼슘 uptake

또는 net transport에 미치는 영향은 ANOVA test에 의해 평가하였고, 한약처방의 효과가 $p < 0.05$ 수준에서 유의하게 나타난 경우, 각 실험조건에 따른 평균값의 차이는 Duncan's multiple range test에 의해 $p < 0.05$ 또는 $p < 0.001$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

1. Caco-2 세포의 분화정도

인체대장암세포주인 Caco-2 세포는 분화가 되면 소장상피세포의 특성을 나타내는 것으로 알려져 있다. Caco-2 세포를 6-well plate에 3.5×10^5 개씩 분주하고, 24일까지 배양하면서 소장상피용모막의 지표효소인 alkaline phosphatase와 γ -glutamyl transferase, 그리고 sucrase 활성을 측정하였다. Alkaline phosphatase 활성은 4, 8, 16, 그리고 24일 후 각기 17.7 ± 1.24 , 41.6 ± 6.06 , 55.3 ± 1.56 , 그리고 81.4 ± 8.71 munit $\cdot \text{mg protein}^{-1}$ 으로 나타나 시간이 경과함에 따라 증가하였다. γ -Glutamyl transferase 활성은 각기 10.3 ± 0.41 , 16.9 ± 0.50 , 18.8 ± 0.32 , 그리고 19.0 ± 0.42 $\mu\text{mol} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ 로 증가하였고, sucrase 활성 역시 0.7 ± 0.05 , 1.4 ± 0.05 , 1.6 ± 0.05 , 그리고 1.7 ± 0.01 $\mu\text{mol} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot \text{hr}^{-1}$ 로 증가하여 Caco-2 세포는 분주 후 24일까지 분화가 계속됨을 알 수 있었다 (Table 1). Rousset⁹⁾은 인체 소장상피세포주 중 특히 HT-29와 Caco-2 세포주에서 성숙한 소장상피세포로의 분화 특성이 관찰되었다고 보고하였다. 본 실험의 결과에서도 소장상피용모막의 지표효소인 alkaline phosphatase, γ -glutamyl transferase 및 sucrase 활성이 배양시간이 경과함에 따라 계속 증가하여 소장상피세포의 분화 특성을 나타냄을 확인할 수 있었다.

Transwell membrane filter에서 monolayer로 자란 Caco-2 세포의 tight-junction permeability를 측정하기 위해 TEER를 측정한 결과, 분주 후 4일부터 일차함수 관계로 증가하여 16일 이후에서는 $1000 \Omega\text{cm}^2$ 이상의 수치를 나타내었다 (Fig. 1). 이러한 결과는 Caco-2 세포를 분주

Table 1. Activities of brush border membrane marker enzymes in the Caco-2 colon carcinoma cell line

Culture time	Alkaline Phosphatase (mU/mg protein)	γ -Glutamyl Transferase ($\mu\text{mol/mg protein/hr}$)	Sucrase ($\mu\text{mol/mg protein/hr}$)
4 days	17.7 ± 1.24^c	10.3 ± 0.41^c	0.7 ± 0.05^c
8 days	41.6 ± 6.06^b	16.9 ± 0.50^b	1.4 ± 0.06^b
16 days	55.3 ± 1.56^b	18.8 ± 0.32^{ab}	1.6 ± 0.05^b
24 days	81.4 ± 8.71^a	19.0 ± 0.42^a	1.7 ± 0.01^a

Values are mean \pm SEM from two separate experiments done in triplicate
Different superscripts in the same column indicate significant differences among differentiation stage tested by ANOVA at $p < 0.001$

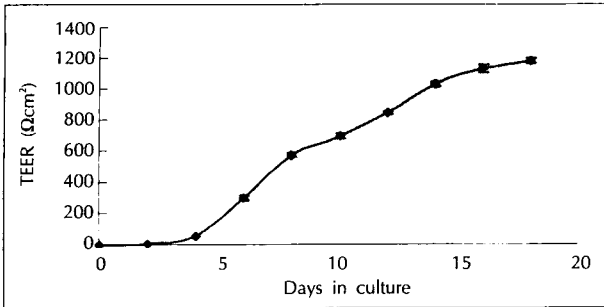


Fig. 1. Changes in transepithelial electrical resistance in Caco-2 cells at varied differentiation stage. Caco-2 cells were grown on transwell membrane filter for up to 18 days. TEER was measured on every other day. Values are means \pm SEM of 6 wells.

후 15일까지 배양하면서 TEER를 측정된 Fleet와 Wood²²⁾의 보고와 일치하며, confluent한 상태에서 세포를 계속 배양하는 경우 세포와 세포사이를 통한 이온의 이동 (paracellular transport)이 감소함을 의미한다. 따라서 본 연구의 칼슘 net transport 실험은 paracellular transport를 최소화하기 위해 monolayer의 TEER 수치가 1000 Ωcm² 이상인 16일 째에 실시하였다.

2. Caco-2 세포의 분화단계에 따른 칼슘 uptake 활성의 변화

칼슘 uptake의 time course를 측정하기 위해 분주 후 4, 8, 16, 그리고 24일간 배양시킨 Caco-2 세포를 uptake medium에서 5, 30, 그리고 60분 동안 배양시킨 결과, 세포의 분화 정도와 무관하게 칼슘 uptake 활성이 시간이 경과함에 따라 지속적으로 증가하여 60분째에 최고치를 나타내었다 (Fig. 2).

Caco-2 세포의 분화단계에 따른 칼슘 uptake의 활성을 비교하기 위해 Caco-2세포를 분주하여 4, 8, 16, 그리고 24일간 배양시킨 후 칼슘 uptake를 측정할 결과, 각각 1.13 \pm 0.04, 1.19 \pm 0.02, 1.94 \pm 0.03, 그리고 2.40 \pm 0.12 nmole \cdot mg protein⁻¹ \cdot 30 min⁻¹으로 나타나 분화가 진행될수록 uptake 활성이 증가하였다 (Fig. 3). 본 실험에 이용된 uptake medium의 칼슘 농도는 0.5 mM이었으며, uptake medium에서 세포를 30분간 배양시킨 후 칼슘 uptake 활성을 측정하였다. 이와 같은 본 연구의 결과는 Caco-2 세포의 칼슘 uptake 활성이 세포분화가 진행됨에 따라 증가함을 보고한 Chirayath 등²³⁾의 결과와 일치하는 것이다.

3. 한약처방제가 세포생존율에 미치는 영향

본 실험에 이용된 한약처방제가 Caco-2 세포의 생존율에 미치는 영향을 평가하기 위해 자혈양근탕 (JH) 또는 양혈장근건보환 (YH) 처방제를 본 실험에서 이용된 농도 중 가장 높은 100 μg/ml로 세포에 24시간 전처리한 후 MTT 테스트를 실시하였다. 그 결과, 전처리한 세포의 생존율이 한약처방

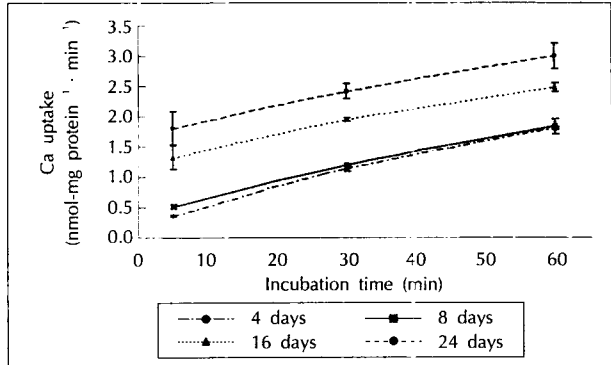


Fig. 2. Time course of calcium uptake by Caco-2 cells at varied differentiation stage. Values are mean \pm SEM from a single experiment done in triplicate.

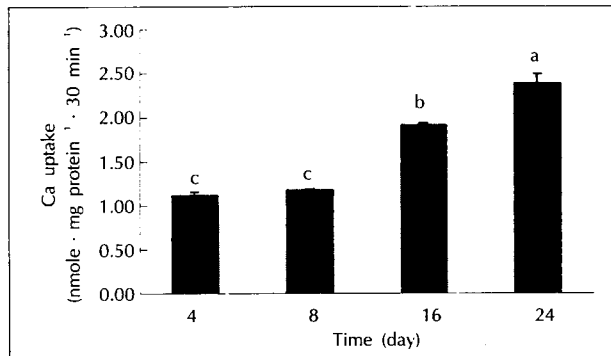


Fig. 3. Changes in calcium uptake by Caco-2 cells at varied differentiation stage. Values are mean \pm SEM from a single experiment done in triplicate. Uptake of calcium (0.5 mM) was measured in Caco-2 cells 4, 8, 16 or 24 days post seeding using a 30 minute incubation. Different letters above the bar indicate significant difference among varied differentiation stage tested by ANOVA at $p < 0.05$.

제로 전처리하지 않은 대조세포의 102 \pm 9.1% 또는 107 \pm 8.4%로 나타나 본 실험에 이용된 한약처방제가 세포생존율에 부정적인 영향을 미치지 않았음을 알 수 있었다.

4. 한약처방제가 칼슘 uptake 활성에 미치는 영향

6-well plate에서 16일간 배양한 Caco-2 세포를 50 μg/ml 농도의 양혈장근건보환 처방제로 0, 1, 3, 6, 그리고 24시간 동안 전처리한 결과, 칼슘 uptake 활성이 각각 2.34 \pm 0.1, 2.24 \pm 0.22, 2.49 \pm 0.41, 2.62 \pm 0.19, 그리고 3.04 \pm 0.05 nmole \cdot mg protein⁻¹ \cdot 30 min⁻¹으로 나타났다. 한편, Caco-2 세포를 같은 농도의 자혈양근탕 처방제로 0, 1, 3, 6 그리고 24시간 동안 전처리한 결과, 칼슘 uptake가 각각 2.34 \pm 0.10, 2.02 \pm 0.22, 2.79 \pm 0.34, 2.90 \pm 0.10, 그리고 2.64 \pm 0.21 nmole \cdot mg protein⁻¹ \cdot 30 min⁻¹으로 나타났다. 따라서 두가지 한약처방제 모두 1시간동안 전처리 시 대조세포에 비해 칼슘 uptake를 감소시켰으나, 그 이상의 기간동안 전처리 시에는 칼슘 up-

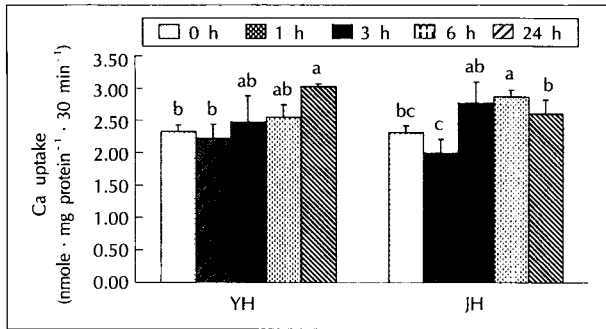


Fig. 4. Effect of Yanghyuljangeuncheonbohwan (YH) or Jahyulyangeuntang (JH) prescription at varied pretreatment time on calcium uptake by Caco-2 cells. Values are mean \pm SEM from two separate experiments done in triplicate. Caco-2 cells (16 days post seeding) were pretreated with YH (50 μ g/ml) or JH (50 μ g/ml) prescription for varying periods, and calcium uptake (0.5 mM) was measured after a 30 minute incubation. Different alphabets above the bar in each group indicate significant difference among varied pretreatment time tested by ANOVA at $p < 0.05$.

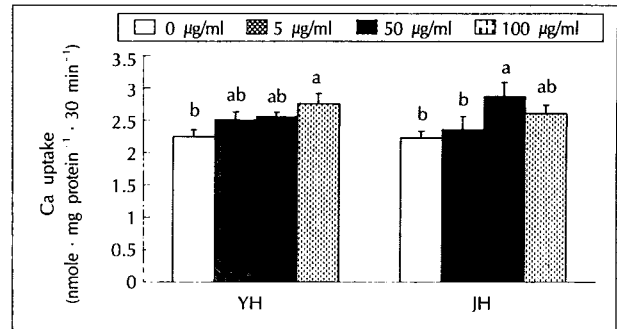


Fig. 5. Effect of Yanghyuljangeuncheonbohwan (YH) or Jahyulyangeuntang (JH) prescription of varied concentrations on calcium uptake by Caco-2 cells. Values are mean \pm SEM from two separate experiments done in triplicate. Uptake of calcium (0.5 mM) was measured using a 30 minute incubation in Caco-2 cells (16 days post seeding) pretreated with varying concentrations (5–100 μ g/ml) of YH or JH prescription for 6 hours. Different letters above the bar in each group indicate significant difference among varied concentration of the prescription tested by ANOVA at $p < 0.05$.

take를 증가시켰고, 양혈장근건보환 처방제의 경우 24시간 전처리 시, 그리고 자혈양근탕의 경우 6시간 전처리 시 가장 높은 칼슘 uptake 활성을 나타냈다 (Fig. 4).

한약처방의 농도에 따른 칼슘 uptake 활성 변화를 평가하고자 6-well plate에서 16일간 배양한 Caco-2 세포를 0, 5, 50, 100 μ g/ml 농도의 양혈장근건보환 처방제로 6시간 동안 전처리하였다. 그 결과, 칼슘 uptake 활성이 각각 2.26 ± 0.10 , 2.52 ± 0.12 , 2.57 ± 0.07 , 그리고 2.78 ± 0.16 nmole \cdot mg protein⁻¹ \cdot 30 min⁻¹으로 나타나, 100 μ g/ml 농도에서 대조세포에 비해 23% 증가된 칼슘 uptake 활성을 나타냈다. Caco-2 세포를 0, 5, 50, 100 μ g/ml 농도의 자혈양근탕 처방제로 6시간 동안 전처리한 결과, 칼슘 uptake가 각각 2.26 ± 0.1 , 2.39 ± 0.21 , 2.9 ± 0.22 , 그리고 2.65 ± 0.13 nmole \cdot mg protein⁻¹ \cdot 30 min⁻¹으로 나타나 50 μ g/ml 농도에서 가장 높았으며, 이는 대조세포에 비해 28.3% 증가된 수치이다 (Fig. 5).

본 연구에 이용된 한약처방의 Ca, Mg, Zn 및 Fe 함량을 분석한 결과 시료 100 g당 JH의 경우 345 ± 19 mg Ca, 34 ± 0.7 mg Mg, 736 ± 175 μ g Zn, 그리고 155 ± 25 μ g Fe를 함유하였으며, YH의 경우 146 ± 11 mg Ca, 24 ± 5.7 mg Mg, 278 ± 93 μ g Zn와 194 ± 30 μ g Fe를 각기 함유하였다. 본 연구에서 전처리에 이용된 한약처방의 최고 농도는 100 μ g/ml이었으며, 이 경우 한약처방의 첨가에 따른 세포 배양액의 칼슘농도 증가분은 0.34~0.15 μ g/ml에 불과하다. 따라서 본 연구의 칼슘 uptake 실험에 0.5 mM의 Ca 농도 (20 μ g/ml)가 사용된 점을 감안한다는 한약처방에 의한 무기질농도 증가분은 무시할 수 있을 것으로 생각된다. 아울러 세포내의 칼슘농도는 식사내의 칼슘 함량과는

무관하게 10⁻⁷M 범위에서 매우 낮게 유지됨을 감안할 때, 한약처방에 함유된 무기질성분에 의해 Caco-2세포의 칼슘 흡수율이 영향을 받을 가능성은 희박한 것으로 사료된다.

이상의 결과는 두가지 한약처방제가 모두 소장상피세포를 통한 칼슘 uptake를 증가시켰음을 제시하는 것이고, 칼슘 uptake 증가 효과가 극대화되는 처방제의 농도 및 전처리 시간은 한약처방제의 종류에 따라 다소 다르게 나타남을 알 수 있다. 소장상피세포를 통한 칼슘 uptake에는 상피세포 용모막에 존재하는 ca binding protein인 calmodulin이 관여하며, 칼슘 uptake와 비타민 D와의 연관성에 관하여는 아직까지 명확히 규명되고 있지 않다.⁶⁾ 본 연구의 결과관으로 YH 또는 JH에 의해 Caco-2 세포의 칼슘 uptake가 증가한 이유를 명확히 추정하기는 어려우나, 이들 한약 처방이 calmodulin의 유전자 발현에 영향을 미쳤을 가능성을 제기할 수 있고, 이에 대한 후속 연구가 필요할 것으로 사료된다.

5. 한약처방제가 칼슘 net transport에 미치는 영향

본 연구에서는 소장내의 칼슘이 상피세포 용모막을 통해 세포내로 이동된 후 basolateral membrane을 통해 혈액으로 빠져나오는 전과정을 대변하는 칼슘 net transport에 미치는 한약처방제의 영향을 평가하였다. Transwell membrane filter에서 16일간 배양한 Caco-2 세포에 양혈장근건보환 및 자혈양근탕 처방제를 5, 50, 그리고 100 μ g/ml 농도로 6시간 동안 전처리한 후 칼슘 net transport를 측정하였다. 양혈장근건보환 처방제로 전처리한 경우 대조세포 (8.39 ± 0.59 nmole \cdot mg protein⁻¹ \cdot h⁻¹)에 비해 칼슘 net transport가 각각 8.66 ± 0.78 , 9.59 ± 1.60 , 그리

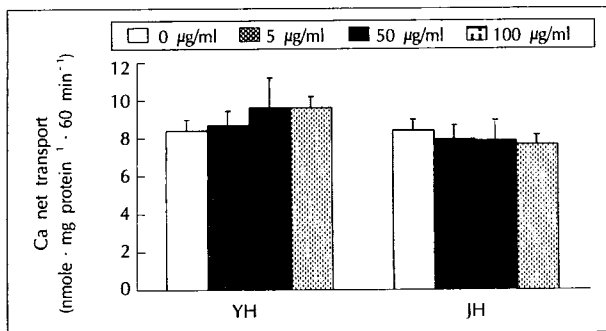


Fig. 6. Effect of Yanghyuljangeuncheonbohwan (YH) or Jahyulyanggeuntang (JH) prescription of varied concentrations on calcium net transport in Caco-2 cells. Values are mean \pm SEM from a single experiment done in triplicate. Cultures of Caco-2 cells were grown on transwell membrane filter for 16 days, and then pretreated for 6 hours with varied concentrations (5–100 μ g/ml) of YH or JH prescription. Net transport of calcium (0.5 mM) was measured using a 60 minute incubation.

고 9.61 ± 0.56 nmole \cdot mg protein⁻¹ \cdot h⁻¹으로 나타나 처방제의 농도가 증가하면서 다소 증가하는 경향을 보였으나, 농도간에 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. 마찬가지로 5, 50, 그리고 100 μ g/ml 농도의 자혈양근탕 처방제로 전처리한 경우 칼슘 net transport가 각각 7.94 ± 0.73 , 7.84 ± 1.09 , 그리고 7.66 ± 0.49 nmole \cdot mg protein⁻¹ \cdot h⁻¹로 나타나 역시 전처리 농도에 따른 변화가 관찰되지 않았다 (Fig. 6).

본 연구의 대조세포에서 측정된 칼슘 net transport 수치를 1분동안 transwell을 통해 운반된 칼슘의 양으로 환산하면 0.15 nmole \cdot well⁻¹ \cdot min⁻¹로 계산되어, 선행연구^{24,25}에서 제시된 수치 ($0.1\sim 0.6$ nmole \cdot well⁻¹ \cdot min⁻¹)와 유사하였다. 다양한 식이성분이 Caco-2 세포주에서 칼슘 net transport에 미치는 영향을 평가한 선행연구 결과들을 살펴보면, 1996년 Fleet 등²⁴은 Caco-2 세포에 1.25 (OH)₂D₃ 유사체를 48시간 동안 전처리한 결과 칼슘 net transport가 대조세포에 비해 37% 증가하였음을 보고하였다. 한편, 최근 Kennefick과 Cashman²⁵의 연구에서는 식이섬유추출물을 Caco-2 세포의 transport buffer에 첨가한 결과, 식이섬유추출물을 첨가하지 않은 경우보다 칼슘 net transport가 17% 감소하였음을 보고하여 식이섬유가 장내 칼슘흡수에 부정적인 영향을 미친 것으로 제시하였다.

본 연구의 결과 두가지 한약처방제 모두 Caco-2 세포에 전처리한 결과 대조세포에 비해 칼슘 uptake는 23~28% 유의적으로 증가시켰으나, 칼슘 net transport에는 유의적인 영향을 미치지 못하였는데, 이는 한약처방제 전처리에 의해 더 많은 양의 칼슘이 소장상피세포내로 이동되어 저장되었을 가능성을 제시해 주는 것이다. 양혈 및 양근작용을

하브로서 골대사에 관여할 것으로 추측되는 자혈양근탕 및 양혈장근건보환 처방제는 결과적으로 소장상피세포를 통한 칼슘 흡수에 유의적인 영향을 미치지 않았음을 본 연구에서 확인할 수 있었고, 앞으로 이들 한약처방제가 골대사에 미치는 효과는 용골세포와 조골세포를 중심으로 규명되어야 할 것으로 생각된다. 아울러 다양한 한약처방제의 장기 또는 단기 복용이 장내 칼슘 흡수 및 체내 이용률에 미치는 효과를 평가하는 연구가 in vivo 실험을 통해 진행되어야 할 것으로 사료된다.

요약 및 결론

본 논문에서는 자혈양근탕 (滋血養筋湯, JH) 및 양혈장근건보환 (養血壯筋健步丸, YH) 처방제가 장내 칼슘흡수에 미치는 영향을 살펴보고자 인체 소장상피세포주 모델인 Caco-2 세포를 이용하여 칼슘 uptake와 net transport를 각기 평가하였으며, 그 결과를 요약하면 다음과 같다.

첫째, Caco-2 세포를 분주 후 4, 8, 16, 그리고 24일간 배양하면서 칼슘 uptake 활성을 측정된 결과 분화가 진행될수록 uptake 활성이 증가하였다.

둘째, Caco-2 세포에 한약처방제를 50 μ g/ml 농도로 일정시간 동안 전처리하여 칼슘 uptake 활성을 측정된 결과, YH 처방제는 24시간 전처리 시 (29.9% 증가), 그리고 JH 처방제는 6시간 전처리 시 (23.9% 증가) 한약처방으로 전처리하지 않은 대조세포에 비해 칼슘 uptake가 유의적으로 증가하였다.

셋째, 한약처방의 농도를 달리하면서 6시간 동안 전처리한 후 칼슘 uptake 활성을 측정된 결과, 대조세포에 비해 YH 또는 JH 처방제는 100 μ g/ml (23% 증가) 및 50 μ g/ml 농도 (28.3% 증가)에서 칼슘 uptake 활성을 각기 최대 로 증가시켰다.

넷째, YH 또는 JH 처방제가 Caco-2 세포에 의한 칼슘 net transport에 미치는 영향을 평가하기 위해 5, 50, 100 μ g/ml 농도의 한약처방제로 6시간 동안 Caco-2 세포에 전처리한 결과, 두가지 한약처방제 모두 칼슘 net transport에 유의적인 변화를 초래하지 않았다.

이상의 in vitro 연구결과는 양혈 및 양근작용에 관여하는 자혈양근탕 및 양혈장근건보환 처방제가 소장상피세포를 통한 칼슘 uptake 활성은 증가시킨 한편 칼슘 net transport 활성에 변화를 초래하지 않았고, 결과적으로 장내 칼슘 흡수에 유의적인 영향을 미치지 않았음을 제시하는 것이다.

Literature cited

- 1) Recommended dietary allowances for Koreans, 7th revision, The Korean Nutrition Society, Seoul, 2000
- 2) Allen L, Wood R. Calcium and phosphorus, In: Shils M, Olson J, Shike M, ed. Modern Nutrition in Health and Disease, 8th ed. pp. 164-168, Lea & Febiger, Philadelphia, 1994
- 3) Rivilin RS. An update on calcium: applications for the 90's. *Am J Clin Nutr* 54(1 Suppl): 177s-290s, 1991
- 4) Pansu D, Bellaton C, Bronner F. The effect of calcium intake on saturable and non-saturable components of duodenal calcium transport. *Am J Physiol* 240: G32-G37, 1981
- 5) Bronner F. Current concepts of calcium absorption: an overview. *J Nutr* 122: 641-643, 1992
- 6) Bronner F. Intestinal calcium absorption: mechanisms and applications. *J Nutr* 117: 1347-1352, 1987
- 7) Guguen L, Pointillar A. The bioavailability of dietary calcium. *J Am Coll Nutr* 19: 119S-136S, 2000
- 8) Pinto M, Robine-Leon S, Appay MD. Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol Cell* 47: 323-330, 1983
- 9) Rousset M. The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2: two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie* 68: 1035-1040, 1986
- 10) Souba WW, Copeland EM. Cytokine modulation of Na⁺-dependent glutamine transport across the brush border membrane of monolayers of human intestinal Caco-2 cells. *Ann Surg* 215: 536-545, 1992
- 11) Brandsch M, Miyamoto Y, Ganapathy V, Leibach FH. Regulation of taurine transport in human colon carcinoma cell lines (HT-29 and Caco-2) by protein kinase C. *Am J Physiol* 264: G939-G946, 1993
- 12) Giuliano AR, Franceschi RT, Wood RJ. Characterization of the vitamin D receptor from the Caco-2 human colon carcinoma cell line: effect of cellular differentiation. *Arch Biochem Biophys* 285: 261-269, 1991
- 13) Han O, Failla ML, Hill AD, Morris ER, Smith JC. Reduction of Fe (III) is required for uptake of nonheme iron by Caco-2 cells. *J Nutr* 125: 1291-1299, 1995
- 14) Giuliano AR, Wood RJ. Vitamin D-regulated calcium transport in Caco-2 cells: unique in vitro model. *Am J Physiol* 260: G207-G212, 1991
- 15) Raffaniello RD, Wapnir PA. Zinc-induced metallothionein synthesis by Caco-2 cells. *Biochem Med Metab Biol* 45: 101-107, 1991
- 16) 今釋, 黃帝內經素問, pp.60, 94, 212, 成輔社, 서울, 1983
- 17) Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol* 65: 55-63, 1983
- 18) Bessey OA, Lowry OH, Brock MJ. A method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic millimeters of serum. *J Biol Chem* 164: 321, 1946
- 19) Pillion DJ, Jeske AH, Leibach FH. γ -Glutamyl transferase in the urine from an isolated rabbit kidney perfused with and without DMSO. *Biochem Pharmacol* 25: 913-918, 1976
- 20) Conklin KA, Yamashiro KM, Gray GM. Human intestinal sucrase-isomaltase. Identification of free sucrase and isomaltase and cleavage of the hybrid into active distinct subunits. *J Biol Chem* 250(15): 5735-5741, 1975
- 21) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-254, 1976
- 22) Fleet JC, Wood RJ. Specific 1,25(OH)₂D₃-mediated regulation of transcellular calcium transport in Caco-2 cells. *Am J Physiol* 276: G958-G964, 1999
- 23) Chirayath MV, Leszek G, Wolfgang H, Jrg G, Heide SC, Meinrad P. Vitamin D increases tight-junction conductance and paracellular Ca²⁺ transport in Caco-2 cell cultures. *Am J Physiol* 274: G389-G396, 1998
- 24) Fleet JC, Bradley J, Reddy S, Ray R, Wood RJ. 1,25-(OH)₂-Vitamin D₃ analogs with mineral in vivo calcemic activity can stimulate significant transepithelial calcium transport and mRNA expression in vitro. *Arch Biochem Biophys* 329: 228-234, 1996
- 25) Kennefick S, Cashman KD. Inhibitory effect of wheat fibre extract on calcium absorption in Caco-2 cells: evidence for a role of associated phytate rather than fibre *per se*. *Eur J Nutr* 39: 12-17, 2000