

# 苦蔘 추출물이 배양 심장내피세포에 미치는 영향

권강범 · 박천수 · 김인규 · 김현규 · 최기방 · 김용복 · 류도곤\*

원광대학교 한의과대학 생리학교실

## Effects of Sophorae Radix Extract in Rat Cardiac Endothelial Cells

Kang Beom Kwon, Cheon Su Park, In Gyu Kim, Hyun Gyu Kim, Ki Bang Choi, Yong Bok, Kim, Do Gon Ryu\*

Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

To test the protective effect of Sophorae Radix (SR) on the damage of cardiac endothelial cells by xanthine oxidase (XO)/hypoxanthine (HX)-induced oxygen free radical, Neutral Red (NR), lactate dehydrogenase (LDH), and c-fos immunopositive cells assay were used in the presence of SR extract. The results of these experiments were obtained as follows ; Cardiac endothelial cells treated with XO/HX showed the cytotoxicity such as a decrease in viability, and increases in LDH activity and c-fos immunopositive cells. Cardiac endothelial cells pretreated with SR extract protected the increase of LDH activity. Alos, cardiac endothelial cells pretreated with SR extract inhibited the increase of c-fos immunopositive cells. These results show that XO/HX induces toxic effects in cultured cardiac endothelial cells derived from neonatal rat, and suggest that SR extract is very effective in the prevention of XO/HX-induced toxicity.

Key words : Sophorae Radix (SR), xanthine oxidase/hypoxanthine(XO/HX), cardiac endothelial cells, Neutral Red (NR), lactate dehydrogenase (LDH), c-fos immunopositive cell

### 서 론

苦蔘(Sophorae Radix)은 『神農本草經』<sup>1)</sup>에 최초로 기재되었으며 歸經은 心, 肝, 胃 大腸, 膀胱 등이라고 하였고, 味苦, 性寒, 無毒하다고 하였으며, 淸熱燥濕, 祛風殺蟲, 利水 등의 효능을 가지고 있다<sup>2-5)</sup>. 산소자유기는 흥분성아미노산(excitatory amino acid, EAA)의 분비를 촉진시키고<sup>6,7)</sup>, 세포내 Ca<sup>2+</sup>의 농도를 증가시켜 결국 세포의 사멸을 초래한다<sup>8,9)</sup>고 알려져 있으며 실험적으로 xanthine 혹은 hypoxanthine이 oxygen에 의해서 산화되는데 이 반응은 xanthine oxidase에 의해서 촉매되어 superoxide radical(O<sup>2-</sup>)과 hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)가 생성되며<sup>10,11)</sup> 또한 철(iron)과 반응하여 hydroxyl radical(OH)과 같은 산소자유기를 생성한다<sup>12,13)</sup>고 한다. 근래에 심장질환의 원인의 하나인 심근 세포의 손상이 산소자유기에 의하여 유발된다<sup>14)</sup>고 보고되어 있으며 최근 한약재가 산소자유기에 대한 苦蔘 독성을 방어한다는 실험적 연구가 보고되었다<sup>15-18)</sup>. 이에 저자는 苦蔘이 배양 심장내피세포 손상에 대한 방어효과를 구명하기 위하여 먼저 苦蔘 추

출물을 전처리한 후 산소자유기인 xanthine oxidase/hypoxanthine(XO/HX)로 흰쥐의 배양 심장내피세포에 독성을 유발시킨 후 LDH 활성도와 c-fos immunopositive cells을 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

### 재료 및 방법

#### 1. 실험동물

동물은 ICR 계통의 건강상태가 양호한 생후 3일된 백서를 사용하였다.

#### 2. 세포배양

심장조직에서 분리된 심장내피세포를 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-free인 Hank's balanced salt solution(HBSS, Gibco)으로 3회 세척한 후 1,000rpm에서 20분간 원심시켰다. 심장조직을 0.05% trypsin으로 20분동안 항온기에 넣은 다음 pasteur pipette으로 3, 4회 분쇄한 후 800×g에서 10분간 원심시킨다. 원심된 세포를 Eagle's minimum essential medium(MEM, Gibco)에 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco)과 penicillin G(25 unit/ml)가 첨가된 혼합액에 부유시킨다

\* 교신저자 : 류도곤, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의과대학

E-mail : tkryu@wonkwang.ac.kr, Tel : 063-850-6846

· 접수 : 2002/12/09 · 수정 : 2003/01/04 · 채택 : 2003/02/05

음 96-multiwell plate(Gibco)에  $1 \times 10^6$  cells/well의 세포 밀도로 분주하였다. 분주된 세포는 3일 간격으로 새로운 배양액으로 교환하여 주었으며 XO/HX이 포함되지 않은 배양액을 대조군으로 하여 비교 조사하였다. 실험전 배양액을 버리고 세포를 PBS로 3-4회 세척하였으며 세포는 배양 7일 후 본 실험에 사용하였다.

### 3. 전탕액의 제조

실험에 사용한 약재인 苦參 200g을 환저플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 3시간 동안 전열기로 전탕한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 회전 진공 농축기로 감압농축한 후 동결건조기에서 건조하여 28.5g의 분말 시료를 얻었다.

### 4. Xanthine Oxydase(XO)/Hypoxanthine(HX)의 제조 및 처리

본 실험에 사용한 시약으로는 xanthine oxidase(XO, Sigma)와 hypoxanthine (HX, Sigma)으로 XO의 경우 100 mU/ml, 10 mU/ml, 1 mU/ml의 저장액을, HX의 경우 1 M, 100 mM, 10 mM의 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 후 실험 당일 적당한 양으로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다.

### 5. 전탕액의 처리

실험에 사용한 苦參 추출물을 여러 농도로 하여 백서의 배양 심장내피세포를 XO/HX에 노출시키기 3시간 전에 각각 전처리한 다음 XO/HX에 노출시킨 후 苦參 추출물이 심장내피세포에 미치는 효과를 조사하였다.

### 6. 세포독성 및 방어효과 검증

#### 1) NR 정량

Neutral red(NR, Sigma)의 정량은 여러 농도의 XO/HX를 처리한 배양 심장내피세포를 phosphate buffered saline(PBS)으로 3회 세척하였다. 세척완료 후 전날 제조한 5 mg/ml의 NR을 well당 최종농도로 희석하여 넣은 다음 3시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub>로 조절된 정온기에서 배양하였다. 일정시간 동안 배양이 끝난후 세포를 PBS로 세척후 1% formalin과 1% glacial acetic acid로 처리한 다음 ELISA Reader(Molecular Device, USA)로 540nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

#### 2) Lactate dehydrogenase (LDH) 활성도 측정

LDH 활성도의 측정은 최적화 된 LDH/LD procedure (Sigma)를 이용하여 하였으며 배양액의 일부를 사용하였다. 즉 phosphate buffer (pH 7.5)에 등몰농도의 NADH를 pyruvate로 환원시키는 반응을 이용한 것이다. 340nm의 흡광도의 감소율은 배양액의 LDH 활성도에 비례하게 뽀름을 이용하여 LDH 활성도를 측정하는 방법이다.

#### 3) c-fos 단백질 발현 측정

일정 시간동안 약재를 처리한 실험군과 약재처리를 하지 않은 대조군을 c-fos 단백질 발현을 측정하기 위하여 sample을 4% paraformaldehyde + 0.1M PBS에서 3시간 동안 실온에서 고정한 후 30% sucrose에서 2일 방치한다. 그 후 pH 7.4의 PBS 용액으

로 3회이상 세척하고 0.3% triton-X 100으로 30분간 진탕한 후 PBS로 3회 이상 세척한다. 그 후 Blocking agent(Normal goat serum)를 실온에서 30분간 처리한 다음 일차항체(c-fos, oncogene sci, 1:150)를 영상4도에서 하룻밤 동안 반응시킨 후 2 시간동안 실온에서 진탕시키고 PBS로 세척한다. 그 후 이차항체인 biotinylated anti-rabbit immunoglobulin(Dako, Denmark)을 실온에서 40분간 처리하여 PBS로 세척하고, streptavidin peroxidase(Vector ABC kit)를 20분간 처리하여 PBS로 세척한 뒤 chromogen인 0.05% diaminobenzidine으로 발색하였다. 증류수로 1시간동안 세척한 후 광학현미경하에서 진갈색으로 보이는 c-fos 양성세포를 관찰하였으며, 화상자동분석 시스템(Image Pro Plus 4.0, USA)으로 분석하였다.

### 7. 통계처리

실험결과에 대한 유의성의 검정은 ANOVA후에 Tukey-Kramer multiple comparison test에 의하였으며 p값이 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

## 실험성적

### 1. XO/HX가 심장내피세포의 생존율에 미치는 영향

XO가 배양 심장내피세포에 미치는 독성을 관찰하기 위하여 5~30 mU/ml 농도로 처리한 배양 심장내피세포에 세포생존율을 NR 정량법에 의하여 측정된 결과 처리한 XO의 농도에 비례하여 세포의 생존율이 감소하였다. 특히 15 mU/ml, 30 mU/ml XO의 처리에서는 세포의 생존율이 대조군에 비하여 45.2%(p<0.05), 24.2%(p<0.01)로 유의한 감소를 나타냈다 (Fig. 1).

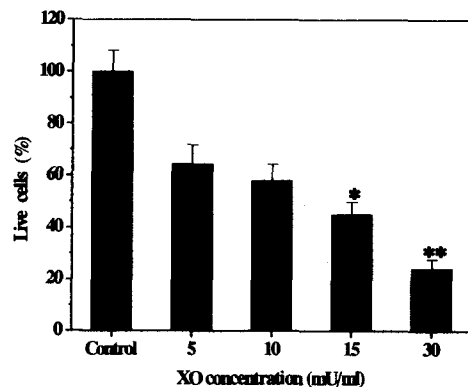


Fig. 1. Dose-response relationship of XO treatment in cultured rat cardiac endothelial cells. Cultured cells were exposed to various concentrations of XO for 36 hours, respectively. Cell viability was measured by NR assay and determined as % of control. The results indicate mean±SE(n=5). Significant differences from the control group are marked with asterisks. \*p<0.05, \*\*p<0.01

또한 15 mU/ml의 XO가 포함된 배양액에서 심장내피세포를 12-64시간동안 배양한 후 시간의 경과에 따른 세포의 생존율을 조사한 결과 처리한 시간에 의존적으로 세포 생존율이 감소하였으며 특히 36시간, 48시간에서 유의한 감소를 나타냈다 (Fig. 2).

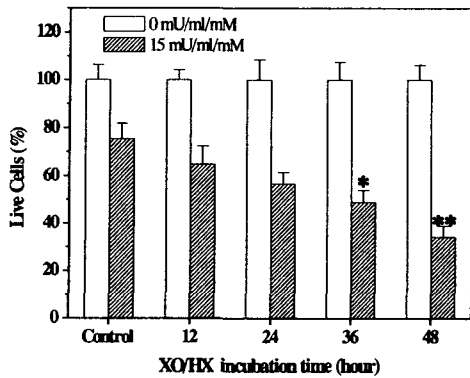


Fig. 2. Time-response relationship of XO/HX treatment in cultured rat cardiac endothelial cells. Cultured cells were treated with 15 μU/ml XO in 0.1 mM HX for various time intervals. Cell viability was measured by NR assay and determined as % of control. The values are the mean±SE for 6 experiments. Asterisk indicate the significant differences between groups. \*p<0.05, \*\*p<0.01

2. XO/HX의 심장내피세포 손상에 대한 한약재의 영향

1) LDH 활성도 정량

(1) XO/HX가 lipid peroxidation에 미치는 영향

XO/HX의 농도에 따른 LDH 활성도를 측정하기 위하여 0.1 mM HX에 1~30 mU/ml의 농도로 XO가 각각 포함된 배양액에서 심장내피세포를 36시간 동안 처리한 후 LDH 활성도를 대조군과 비교 조사하였다. 그 결과 처리한 농도에 비례하여 LDH 활성도 증가를 보였다. 특히 30 mU/ml XO 처리에서는 대조군에 비하여 159.6%(p<0.05)로 LDH 활성도 유의한 증가를 나타냈다. MCV값은 20 mU/ml XO 처리에서 나타났다 (Fig. 3).

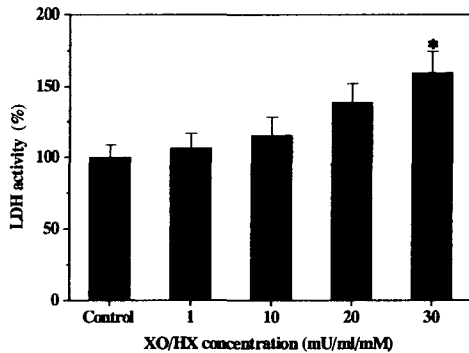


Fig. 3. Dose-response relationship of XO/HX on LDH activity in cultured rat cardiac endothelial cells. Cultured cells were exposed to various concentrations of XO in 0.1 mM HX for 36 hours. LDH activity assay was measured as material and methods and was represented as % of control. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisk. \*p<0.05

(2) XO/HX 처리에 의해 증가한 lipid peroxidation에 미치는 苦蓼 추출물의 효과

배양 심장내피세포에 대한 XO/HX의 세포독성에 대한 苦蓼 추출물의 효과를 LDH 활성도를 통하여 조사하기 위하여 MCV 값인 20 mU/ml XO/0.1 mM HX의 농도에서 36시간 동안 노출 시키기 3시간 전에 각각 20~80 μg/ml의 苦蓼 추출물이 포함된 배양액에서 처리한 후 이의 방어효과를 조사하였다. 그 결과

XO/HX를 처리하지 않고 苦蓼 추출물을 농도별로 처리한 경우 LDH 활성도에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 20 mU/ml XO/HX를 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 61.1%가 증가하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 苦蓼 추출물을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 LDH 활성도가 감소하여 XO/HX에 의한 독성을 방어하였으며 특히 60 μg/ml, 80 μg/ml 苦蓼 추출물을 전처리한 경우에 苦蓼 추출물을 전 처리하지 않고 XO/HX만을 처리한 군에 비하여 통계적으로 유의하게 감소하였다 (Fig. 4).

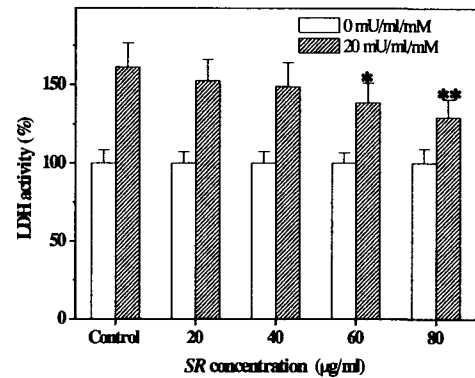


Fig. 4. Dose-response relationship of Sophorae Radix (SR) for LDH activity cultured rat cardiac endothelial cells. Cultured cells were pretreated with various concentrations of SR extracts for 3 hours, and then exposed to 20 μU/ml XO in 0.1 mM HX for 36 hours. Amount of LDH in medium was measured as material and methods. The values represent the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the XO/HX-treated group are marked with asterisk. \*p<0.05, \*\*p<0.01

3) c-fos 양성세포의 정량

심장내피세포에 대한 XO/HX의 세포독성에 대한 苦蓼 추출물의 효과를 심장내피세포 c-fos 양성세포의 측면에서 조사하기 위하여 XO/HX 25 mU/ml 농도에서 1-6시간 동안 처리한 후 c-fos 양성세포의 수를 조사하였다. 그 결과 처리한 후 2시간에서 대조군에 비하여 157.9%(p<0.05)로 증가하였다 (Fig. 5).

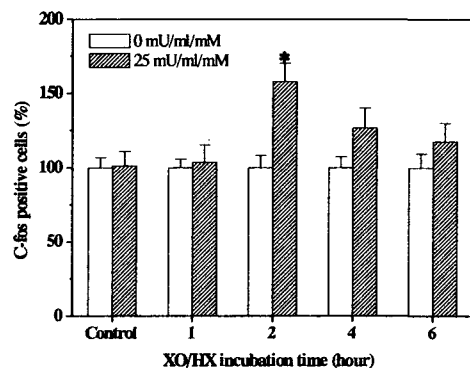


Fig. 5. Time-response relationship of XO/HX on c-fos immunopositive cells in cultured rat cardiac endothelial cells. Cultured cells were treated with time intervals in 25 μU/ml XO/0.1 mM HX. c-fos immunopositive cells were measured by material and methods and were represented as % of control. The values are the mean±SE for 5 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisk. \*p<0.05

XO/HX에 의하여 증가한 c-fos 양성세포수의 증가에 대한 苦蔘 추출물의 효과를 조사하기 위하여 XO/HX에 노출시키기 3 시간 전에 苦蔘 추출물 10-80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 후 c-fos 양성세포수를 조사하였다. 그 결과 처리한 농도에 비례하여 c-fos 양성세포수가 감소하였으며 특히 40  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 유의한 감소효과를 나타냈다 (Fig. 6).

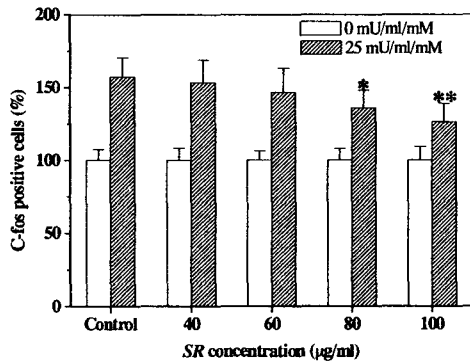


Fig. 6. Effects of Sophorae Radix (SR) for c-fos immunopositive cells in cultured rat cardiac endothelial cells. Cultured cells were pre-incubated with various concentrations of SR extract for 3 hours, and then exposed to 25 mU/ml XO in 0.1 mM HX for 2 hours. c-fos immunopositive cells were measured by material and methods and were represented as % of control. The values are the mean $\pm$ SE for 5 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisk. \*p<0.05; \*\*p<0.01

## 고찰

苦蔘(Sophorae Radix)은 豆科에 속한 도둑놈의 지팡이(Sophora flavescens Ait.)의 根으로서 최초로 《神農本草經》<sup>1)</sup>에 “主心腹結氣, 癥瘕, 積聚...”라고 기재되어있으며, 味苦, 性寒하고 歸經은 心, 肝, 胃, 大腸, 膀胱 등이라고 하였다<sup>2-5)</sup>. 효능은 淸熱燥濕, 利尿, 健脾胃, 祛風殺蟲 등이며, 濕熱下利, 黃疸, 赤白帶下, 陰部癢痒, 疥瘡頑癬 등에 사용한다<sup>2-5)</sup>. 성분은 matrine, oxymatrine이 주요 alkaloid이며 그 외에 sophocarpine, sophoranol, allomatrine, cytosine, methylcystine 등이 포함되어 있다<sup>19-21)</sup>고 알려져 있다.

실험에서는 먼저 XO/HX의 심장내피세포 독성효과를 NR 정량을 이용하여 조사하였다. NR assay는 세포의 생존율을 측정하는 방법으로서 이 실험에서 XO/HX를 처리한 후 위의 방법에 의하여 세포의 생존율을 조사한 결과 농도와 시간에 의존적으로 생존율을 감소시켜 (Fig. 1~2) 세포에 독성을 유발하여 Zhang 등<sup>22)</sup>이 보고한 결과와 일치하였다. LDH는 살아있는 세포의 형질막의 손상으로 인하여 누출되는 효소이므로 세포막손상의 지표가 되는 효소이다. XO/HX의 세포독성을 Zhang 등의 보고<sup>22)</sup>에 근거하여 조사한 결과 농도의존적으로 LDH 활성도를 증가시킴으로서 세포독성을 나타냈다(Fig. 3). 이러한 XO/HX의 심장내피세포독성에 대하여 苦蔘 추출물을 3시간 동안 전처리한 후 세포 배양액내로 누출된 LDH의 양을 조사하였다. 苦蔘 추출물은 구성약물에 비하여 LDH 누출의 억제 효과가 뛰어났으며 60, 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 유의한 억제효과가 나타났다(Fig. 4). 한

XO/HX에 의하여 증가한 c-fos에 대한 양성세포의 수에 대하여 苦蔘 추출물의 억제효과를 조사한 결과 60, 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 유의한 억제효과가 나타났다(Fig. 6). 이러한 결과는 苦蔘 추출물의 XO/HX의 심장내피세포 독성에 대한 방어효과는 c-fos gene과는 관계가 있는 것으로 보인다. 앞으로 이에 대한 심도있는 연구가 필요하다고 생각된다.

## 결론

苦蔘이 심장내피세포에 미치는 영향을 구명하기 위하여 백서에서 분리하여 배양한 심장내피세포에 울금 추출물을 전 처리한 후 XO/HX의 세포독성효과와 이에 대한 방어효과를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

XO/HX는 농도와 시간의존적으로 심장내피세포 생존율의 감소를 나타으나 苦蔘 추출물을 전처리한 군은 XO/HX에 의하여 유발된 LDH 누출의 증가에 대하여 유의한 방어효과를 나타냈다. 또한 苦蔘 추출물은 XO/HX에 의하여 유발된 c-fos 양성세포수의 증가에 대하여 유의한 억제효과를 나타냈다. 이상의 결과에서 XO/HX는 심장내피세포에 독성을 나타냈으며 苦蔘 추출물을 전처리하여 독성을 유의하게 차단하였으며 앞으로 지속적인 기전구명이 필요하리라 생각된다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술개발사업의 지원(HMP-CO-03-0003)에 의하여 이루어진 것임.

## 참고문헌

1. 吳 普 : 神農本草經, 서울, 醫聖堂, p. 7, 1994.
2. 黃官綉 : 本草求真, 서울, 醫聖堂, p. 145, 1997.
3. 王好古 : 湯液本草, 서울, 醫聖堂, pp. 111-112, 1994.
4. 唐慎微 : 重修政和經史證類備急本草, 北京, 人民衛生出版社, p.198, 1982.
5. 上海中醫學院 : 中草藥學, 香港, 常務印書館香港分館, pp. 205-206, 1983.
6. Pellegrini-Giampietro D. E., Cherici G., Alesiani M., Carla V., Morroni F. : Excitatory amino acid release from rat hippocampal slices as a consequence of free-radical formation. J. Neurochem., 51:1960-1963, 1988.
7. Pellegrini-Giampietro D. E., Cherici G., Alesiani M., Carla V., Morroni F. : Excitatory amino acid and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. J. Neurosci. 10:1035-1041, 1990.
8. Mayer M. L., Westbrook G. L. : Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurons. J. Physiol., 394:501-527, 1987.

9. Zeman S., Lloyd C., Meldrum B., Leigh P. N. : Excitatory amino acid, free radicals and the pathogenesis of motor neuron disease, *Neuropathol, Appl. Neurobiol.*, 20:219-231, 1994.
10. Fridovich I. : Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, 245:4053-4057, 1970.
11. Killogg E. W., Fridovich I. : Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymatically generated superoxide and hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.*, 252:6721-6728, 1977.
12. Harber F., Weiss J. : The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by anion salts. *Proc. Roy. Soc. London A.* 147:333-351, 1934.
13. Graf E., Mahoney J. R., Bryant R. G. and Eaton J. W. : Iron-catalyzed hydroxyl radical formation: Stringent requirement for free iron coordination site. *J. Biol. Chem.*, 259:3620-3624, 1984.
14. Cao W., Carney J. M., Duchon A., Floyd R. A., Chevion M. : Oxygen free radical involvement in ischemia and reperfusion injury to brain. 88, pp. 233-238, 1988.
15. 한동훈, 권강범, 황인진, 김우경, 김희찬, 오광수, 이호승, 류도곤 : 失笑散 전탕액이 XO/HX에 의해 손상된 배양 苦蔘 박동수에 미치는 영향, *대한동의생리병리학회지* 15(4): 566-570, 2001.
16. 손창식, 권강범, 정종선, 황인진, 김우경, 김희찬, 오광수, 이호승, 류도곤 : 丹參飲 전탕액이 산소자유기에 의해 손상된 苦蔘의 LDH 활성도에 미치는 영향, *대한동의생리병리학회지* 15(4):621-625, 2001.
17. 박준배, 권강범, 김우경, 오광수, 김인규, 이호섭, 기영운, 금경수, 류도곤 : 甘豆湯 및 加味甘豆湯 전탕액이 배양 苦蔘의 LDH 활성도에 미치는 영향, *대한동의생리병리학회지* 15(5):730-734, 2001.
18. 한동훈, 권강범, 김우경, 오광수, 김인규, 류도곤 : 失笑散 전탕액과 구성약물이 배양 苦蔘의 LDH 활성도에 미치는 영향, *대한동의생리병리학회지* 15(5):770-774, 2001.
19. 江蘇新醫學院 : 新編 中藥大辭典, 臺北, 新文豐出版公司, pp. 1368-1370, 1982.
20. 申佶求 : 申氏本草學, 서울, 壽文社, pp. 658-661, 1979.
21. 李尙仁 外 : 漢藥臨床應用, 서울, 成輔社, pp. 137-138, 1990.
22. Zhang R., Pinson A., Samuni A. : Both hydroxylamine and nitroxide protect cardiomyocytes from oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine* 24(1):66-75, 1998.