

원 저

八物湯이 저산소증에 의한 배양심근세포고사에 미치는 영향

임은경, 신선호

원광대학교 전주한방병원 심계내과교실

Protective Effects of *Palmul-tang* on Hypoxia-induced Apoptosis in H9c2 Cardiomyoblast Cells

Eun-Kyung Rhim, Sun-Ho Shin

2th Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine Wonkwang University

Objectives : This study was designed to investigate the protective mechanisms of *Palmul-tang* on hypoxia-induced cytotoxicity in H9c2 cardiomyoblast cells.

Methods : In this study, we used H9c2 cells. Cells were subjected to hypoxia in the absence and presence of 1000 μ g/ml *Palmul-tang* for 24 hrs. Cells were treated with various concentrations of *Palmul-tang* for 24 hrs. Cell viability was measured by MTT assay. Hypoxia markedly decreased the viability of H9c2 cells, which was characterized with apparent apoptotic features such as chromatin condensation as well as fragmentation of genomic DNA and nuclei.

Results : *Palmul-tang* significantly reduced hypoxia-induced cell death and apoptotic characteristics. Also, *Palmul-tang* prevented mitochondrial dysfunction including the disruption of mitochondrial membrane permeability transition (MPT) and an increase in expression of apoptogenic Bcl-2 proteins in hypoxia-H9c2 cells.

Conclusions : This study suggests that the protective effects of *Palmul-tang* against hypoxic damages may be mediated by the modulation of Bcl-2, Bax expression.

Key Words: *Palmul-tang*, cardiomyoblast cells, hypoxia-induced apoptosis

1. 緒 論

八物湯은 元代 沙¹⁾의 《瑞竹堂經驗方》에 “八珍散 治月水不調…此藥 調暢營衛 滋養氣血 能補虛損” 이 라고 처음 수록된 처방으로 補氣의 代表方인 四君子 湯과 補血調血의 通用方인 四物湯으로 구성되어 氣

血兩虛로 인해 발생하는 面色萎黃, 心煩, 易驚, 口乾 등을 치료하는데 활용되어 왔으며, 최근에는 빈혈, 월 경장애, 만성 소모성 질환 등에 응용되고 있다²⁾.

세계적인 자연 사망의 주요 원인으로 증가추세에 있는 동맥경화증, 대동맥협착증, 판막질환 등의 심혈 관계 질환은 심장의 허혈상태로 인해 초래되는 심근 세포 손상으로부터 발생하는 것으로 알려져 있다³⁾. 이때 관여하는 활성산소종(reactive oxygen species: ROS)에 의한 산화적 손상은 심혈관계 질환의 주된 발병 인자로 작용한다^{4,5)}.

八物湯에 대한 연구로 姜⁶⁾은 虛證狀態의 恢復에, 吳⁷⁾와 李⁸⁾는 筋肉疲勞恢復에 金⁹⁾은 陽虛證에 有效하다

· 본 논문은 원광대학교 교비 연구비 지원에 의해 이루어짐
· 접수 : 2004년 2월 25일 · 논문심사 : 2004년 3월 1일
· 채택 : 2004년 3월 15일
· 교신저자 : 임은경, 전주시 덕진구 덕진동2가 142-1번지 원광대 학교 전주한방병원 2내과
(Tel : 063-270-1013, Fax : 063-270-1199, E-mail : boniboni@hanmail.net)

고 하였고, 河 등¹⁰은 抗癌 및 免疫調節作用이 있다고 하였으며, 田¹¹은 免疫反應을 活性化시킨다고 하였다.

八物湯의 심혈관계질환에 대한 작용은 아직 보고된 바 없지만 八物湯을 구성하고 있는 四君子湯과 四物湯에 대해서는 鄭¹²과 趙¹³의 배양심근세포 산화적 손상에 대한 방어효과, 李¹⁴의 고지혈증에 대한 효과, 河¹⁵의 血栓症에 대한 효과, 南¹⁶의 혈관내피손상 회복에 대한 효과 등의 보고가 있었던 바 四君子湯과 四物湯의 合劑인 八物湯이 심혈관계질환에 응용될 수 있을 것이라고 유추할 수 있다.

따라서 본 실험에서는 八物湯의 심근세포 산화적 손상에 대한 방어효과 및 기전을 실험적으로 구명하기 위하여 hypoxia에 의한 H9c2 심근세포의 산화적 세포 독성과 이에 대한 八物湯의 방어 효과 및 이때 관여하는 세포고사 신호전달 분자에 대해 관찰한 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 材料

1) 세포주

Embryonic rat의 심장에서 유래한 H9c2(CRL1446) 심근세포주는 ATCC (American Type Culture Collection)로부터 구입하여 계대배양 하면서 실험을 실시하였다.

2) 약재

본 실험에 사용된 八物湯의 처방내용은 《東醫寶鑑》¹⁷에 의거하였으며, 약재는 원광대학교 전주한방병원에서 구입하여 정선한 것으로 사용하였고, 한 접의 내용과 분량은 다음과 같다.(Table. 1)

Table 1. Prescription of Palmul-tang

Composition	Herb Name	Dose(g)
人蔘	<i>Ginseng Radix</i>	4
白朮	<i>Atractyloids Rhizoma alba</i>	4
白茯苓	<i>Hoelen alba</i>	4
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	4
熟地黃	<i>Rhemamiae Radix</i>	4
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	4
川芎	<i>Chidii Rhizoma</i>	4
白芍藥	<i>Paeniae Radix alba</i>	4
Total amount		32

3) 검액조제

팔물탕 1/3첩 분량인 100g을 물 1L와 함께 냉각기를 부착한 환저 플라스크에서 3시간 끓인 다음 거즈로 여과하고 3200rpm으로 20분간 원심분리 후 농축기로 농축한 다음 -70℃에서 12시간이상 동결시키고 Freeze Dryer로 동결건조시킨 후 20.0g의 시료를 얻어 세포에 투여하기 전 농도를 조정하여 사용하였다.

4) 시약 및 기기

실험에 필요한 Duplecco's modified Eagle's medium(DMEM), 항생제, trypsin 및 우태아 혈청(fetal bovine serum, FBS)은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며, 배양용기(96-well plate, 10cm dish)는 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. MTT(methylthizol-2-yl-2,5-diphenyl, tetrazolium bromide), crystal violet은 Sigma사(St. Louis, Missouri, USA)로부터 구입하여 사용하였다. Bcl-2, Bax 등의 항체들은 모두 Santa Cruz사(San Diego, CA, USA)에서, anti-rabbit IgG conjugated horseradish peroxidase와 Enhanced chemiluminescence kit(ELC kit)는 Amersham사(Buckinghamshire, England)에서 구입하여 사용하였다.

2. 方法

1) 세포생존율 측정

세포생존율은 세포 배양판(24-well plate)에 세포(1×10^6 cells/ml)를 1ml씩 분주하여 12시간 이상 CO₂ 세포배양기 안에서 안정 시킨 후 실험에 필요한 시약을 처리한 다음, 배양액 최종부피의 1/10 MTT 용액(5mg/ml in PBS)을 첨가하여 4시간 반응시켰다. 생존 세포에 의해 형성된 보라색 formazan은 10% sodium-dodesyl sulfate(SDS)가 포함된 0.01N HCl 용액 100μl/well을 세포에 첨가하여 용해시킨 후 분광광도계(ELISA reader, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

2) Hypoxia condition

허혈성 심장 질환 모델을 만들기 위하여 hypoxia chamber를 이용하였다. 실험을 위하여 5% CO₂, 95%

N₂의 혼합가스를 주입하여 37℃ 세포배양기에서 배양하였으며, 한약재의 효과를 비교하기 위하여 10% FBS가 포함된 일반 DMEM 배지와 glucose와 serum을 뺀 DMEM 배지를 사용하였고, 한약재는 일반배지에 희석하여 재관류하였다 (Fig. 1).

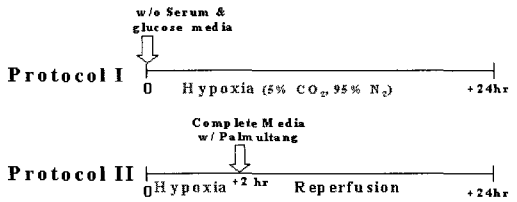


Fig. 1. Schematic representation of experimental paradigms used.

3) 세포의 형태적 변화 측정

세포의 형태적 변화를 조사하기 위하여 H9c2 세포에 八物湯(을 처리한 후 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)으로 2회 세척하였다. 세포는 포름 알데히드(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.

4) Hoechst 염색

세포핵의 형태학적 변화를 알아보기 위하여 Hoechst 염색을 시행하였다. 八物湯(500μg/ml 및 1000 μg/ml)을 처리한 세포는 4% 포름알데히드(formaldehyde) 용액에서 10분 고정시킨 후 생리식염수(PBS, pH 7.4)로 2회 세척하고, Hoechst 33342(Sigma Co. St. Louis, MO) 염색약을 생리식염수에 10μM이 되도록 희석하여 1시간 염색한 후 다시 생리식염수에서 세척하여 형광현미경(Leica, MPS 60, Germany)으로 관찰하였다.

5) Western blot analysis

세포는 八物湯을 처리한 후 포집하여 차가운 Hank's balanced salt solution(HBSS, pH7.4)으로 2회 세척하였다. 얻어진 세포는 파쇄용액(50mM HEPES pH 7.4, 150mM NaCl, 1% deoxy-cholate, 1mM EDTA,

1mM PMSF, 1μg/ml aprotinin)과 4℃에서 30분간 반응시켰다. 세포 파쇄액은 13,000rpm에서 20분간 원심 분리하여 상층액은 BCA 용액을 이용하여 단백질을 정량하였다. 동량의 세포파쇄액(단백질 : 200μg)은 2×sample buffer와 혼합하여 100℃에서 5분간 가열한 후에 12.5% SDS-PAGE를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질은 semi-dry 방법으로 실온에서 단위 면적당 0.8mA 전하를 2시간 걸어주어 nitrocellulose membrane상에 이동시켰다. Nitrocellulose membrane은 blocking buffer(5% skim milk)와 상온에서 1시간 반응시켜 비특이적 항체결합을 예방하였다. Bcl-2, Bcl-XL, Bak, Fas, PARP, ICAD/DF45, VDAC 및 cytochrome c에 대한 항체는 0.01%(v/v)의 Tween-20이 포함된 3% skim milk/TBS에 1:1000으로 희석하여 상온에서 3시간 반응 후 이차항체(anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase)와 1시간 반응시켰다. Nitrocellulose membrane은 TBS로 3번 세척 후 ECL kit를 사용하여 ECL 필름에 현상하였다.

6) Rhodamine 123 및 Mitotracker 염색

세포내 소기관의 하나인 미토콘드리아의 막 전위차 변화(membrane potential transition; MPT)를 확인하기 위하여 Rhodamine 123 형광 염색을 시행하였고, 이때 미토콘드리아의 세포내 위치를 정확히 알아보기 위하여 mitotracker 형광 염색을 시행하여 두 이미지를 합성(merge)하였다. 八物湯이 처리된 세포들은 PBS로 2회 세척하였다. Rhodamine 123(10μg/ml)과 Mitotracker(5μg/ml)를 DMEM 배지에 희석하여 20분간 CO₂ 배양기에서 반응시킨 후 다시 PBS로 세척하여 형광현미경(Leica MPS 60, Germany)으로 관찰하였다.

7) 통계처리

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

III. 結果

1. H₂O₂ 및 hypoxia/ischemia에 의한 H9c2 심근 세포의 생존율에 대한 효과

50 μ M H₂O₂ 처리군에서의 세포생존율은 비처리시 세포생존율의 73%, 100 μ M 농도에서는 31%, 200 μ M의 농도에서는 25% 미만으로 현저히 감소하였다(Fig. 2A). 또한, hypoxia에 의한 시간 의존적인 세포생존율의 감소는 chamber 배양 12시간 후부터 약 82%로 세포생존율이 감소하기 시작하였고, 18시간에는 69%, 24시간에는 65%로 감소하였으나, 글루코스와 혈청이 제거된 ischemia 상태에서는 배양 3시간 후부터 73%로 감소하기 시작하여 12시간 후에는 약 41%의 세포생존율을 보였으며, 24시간 후에는 8%로 세포생존율이 급격히 감소하였는데(Fig. 2B), 이때 H₂O₂에 의한 H9c2 세포독성 및 hypoxia/ischemia 조건에서의 세포독성은 시간이 경과함에 따라 축적되었고, DNA의 분절을 보이는 전형적인 세포고사임을 Hoechst 염색을 통하여 확인하였다(Fig. 3).

2. 八物湯의 hypoxia에 의한 H9c2 세포 사멸에 대한 효과

Hypoxia의 세포독성에 대한 八物湯의 효과를 조사하기 위하여 hypoxia 조건에서 2시간 동안 배양한 다음, 세포에 500 μ g/ml 및 1000 μ g/ml의 八物湯을 처리하여 총 24시간 배양한 후 세포 생존율, 세포의 형태학적 변화 및 세포핵의 분절을 관찰하였다. 세포생존율은 hypoxia 단독 처리시 62%를 보였으나 八物湯 처리 실험군은 500 μ g/ml의 농도에서는 68%, 1000 μ g/ml의 농도에서는 92%를 보여 현저하게 세포생존율이 회복되었다(Fig. 4A). 또한 이때 hypoxia에 의한 세포의 응축 및 세포수의 감소와 핵의 분절이 八物湯 처리에 의하여 대조군 수준으로 회복되었다(Fig. 4B).

3. 八物湯의 hypoxia에 의한 미토콘드리아 막전위 변화에 대한 효과

18시간동안 hypoxia 조건에 노출된 H9c2 세포에서는 형태학적인 변화와 함께 정상 대조군의 녹색 형

광이 diffused-pattern으로 변하면서 세포질 전체에 균질하게 분포함을 확인하였으나, 1000 μ g/ml 八物湯을 처리한 실험군에서는 미토콘드리아가 세포질에 국한되어 염색되면서 대조군과 동일한 punctuated-pattern을 보였다(Fig. 5). 이때 미토콘드리아는 붉은 색의 mitotracker로 염색되며 두 이미지를 merge하여 노랑색 형광을 보이는 부분에서 미토콘드리아의 막전위차 변화가 있음을 확인하였다.

4. 八物湯의 hypoxia에 의한 Bax 단백질 발현에 대한 효과

Hypoxia에 의한 세포고사 신호전달계에 중요한 기관인 미토콘드리아에 연관된 Bcl-2 단백질군 중 Bax와 Bcl-2의 발현을 조사하였다. H9c2 세포에 1000 μ g/ml 八物湯을 처리한 후 hypoxia 조건을 처치한 세포 부유액으로부터 Bax 및 Bcl-2 단백질의 발현을 Western blot 방법으로 조사하였다. H9c2 세포의 pro-apoptotic Bax 단백질의 발현은 hypoxia 12시간 처리시 대조군에 비교하여 현저히 증가하였으나 1000 μ g/ml 八物湯을 처리한 실험군에서는 대조군 수준으로 뚜렷하게 감소하였다. 또한 anti-apoptotic Bcl-2 단백질의 발현을 현저히 감소시켰으나 八物湯 처리에 의해 대조군 수준으로 회복되었다. 이때 단백질은 β -actin을 통하여 동량임을 확인하였다(Fig. 6).

IV. 考 察

八物湯은 元代 沙¹⁶⁾의 《瑞竹堂經驗方》에 八珍散 이라는 處方名으로 최초로 수록되었으며, 明代 薛¹⁸⁾은 《校註婦人良方》에서 八珍湯으로, 李¹⁹⁾는 《醫學入門》에서 八物湯으로 명한 이후, 후대 醫家들이 八物湯과 八珍湯이 동일한 處方이라고 明記하여 현재는 두 개의 名稱을 混用하여 사용하고 있으나, 韓國에서는 《東醫寶鑑》¹⁷⁾ 이후 대부분 八物湯으로 표기하고 있다.

약제의 구성은 補氣의 代表方인 四君子湯과 補血 調血의 通用方인 四物湯을 合方한 人蔘·白朮·白茯苓·甘草·熟地黃·當歸·川芎·白芍藥으로 구성되어 있다.¹⁷⁾

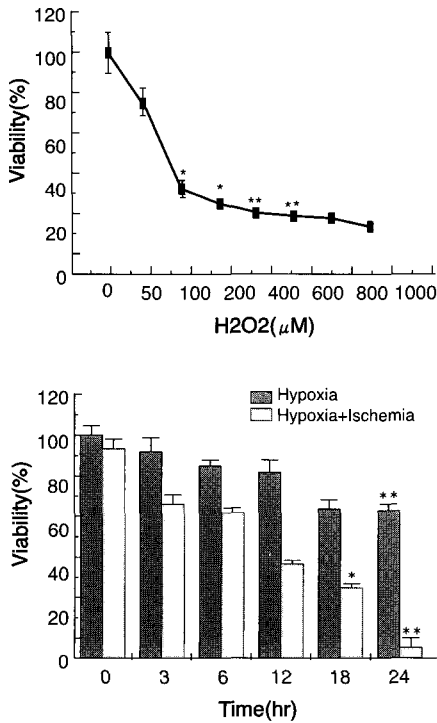


Fig. 2. H₂O₂ and hypoxia/ischemia decreased the viability of H9c2 cells in a dose and time dependent manner. Cells were treated with various concentrations of H₂O₂ for 12hrs (A), and hypoxia/ischemia condition for various times (B). Cell viability was measured by MTT assay. Results were expressed as mean ± S.D. of quadruplicates. * $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ by student's t-test, compared with control group.

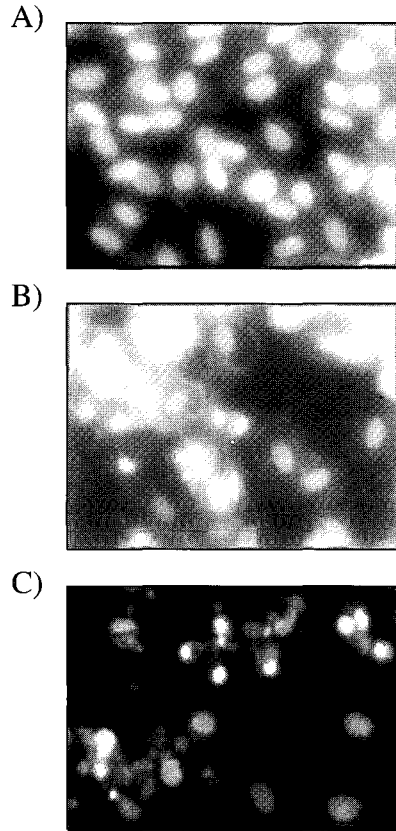


Fig. 3. H₂O₂ and induced the death of H9c2 cells and nuclear fragmentation. (A) control cells, (B) hypoxia/ischemia condition for 12hrs, and (C) 150 μM H₂O₂ treated cells for 12hrs. Cells were stained with Hoechst 33342, and observed under fluorescent microscope.

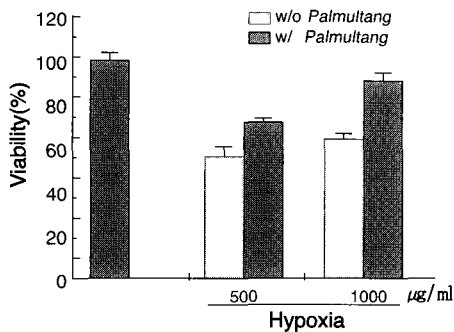


Fig. 4A. Palmul-tang prevented the cytotoxicity by hypoxia in H9c2 cells in a dose-dependent manner. Cells were treated with various concentrations of Palmul-tang for 24hrs. Cell viability was measured by MTT assay. Results were expressed as mean ± S.D. of quadruplicates. * $p < 0.01$ by student's t-test.

八物湯은 補氣, 補血하여 氣血兩虛를 다스리는 處方으로, 血은 心이 주관하고 氣는 肺가 주관하므로 本方은 心肺를 補強하는 處方이다. 心の 類機能系는 心主血脈, 心主神, 其華在面 하므로 本方은 血脈을 도와 精神活動의 物質의 基礎를 만들고, 進食조직을 營養하며, 心悸, 健忘, 失眠, 多夢, 貧血을 다스린다. 또 舌과 面에 화색을 띠게 하며, 神을 돕고 中樞神經機能을 복돋을 수 있다.

肺의 類機能系는 肺主皮毛, 肺主魄 등으로서 皮膚強化, 毛髮枯悴의 改善을 돕고 華蓋機能을 도와 방어력을 높이고, 魄을 充足시켜 知覺과 動作을 기민하게

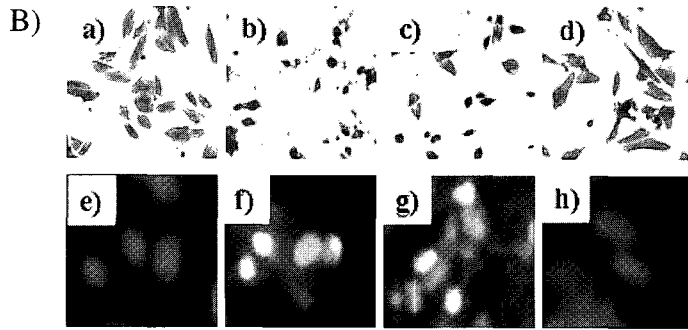


Fig. 4B. Treatment of H9c2 cells with *Palmul-tang* prevented the morphological change and DNA fragmentation by hypoxia. Cells were treated with hypoxia (24hrs) alone, *Palmul-tang* (500, 1000 μ g/ml) alone and *Palmul-tang* with hypoxia for 24hrs. Then, cells stained with crystal violet and observed under phase contrast microscopy. (a, e), control cells. (b, f), cells treated with hypoxia only. (c, g), cells treated with hypoxia and 500 μ g/ml *Palmul-tang*, and (d, h), cells treated with hypoxia and 1000 μ g/ml *Palmul-tang*.

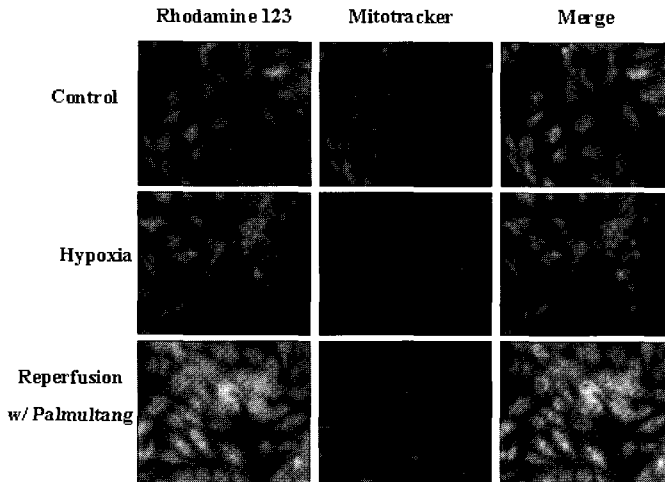


Fig. 5. *Palmul-tang* inhibited the disruption of mitochondrial membrane potential transition in hypoxia-induced H9c2 cells. Cells were treated with hypoxia in the absence and presence of 1000 μ g/ml *Palmul-tang* for 24hrs. Cells were stained with 10 μ g/ml of Rhodamine 123 or with 5 μ g/ml of mitotracker and visualized under a fluorescent microscope. The data were one of three independent experiments.

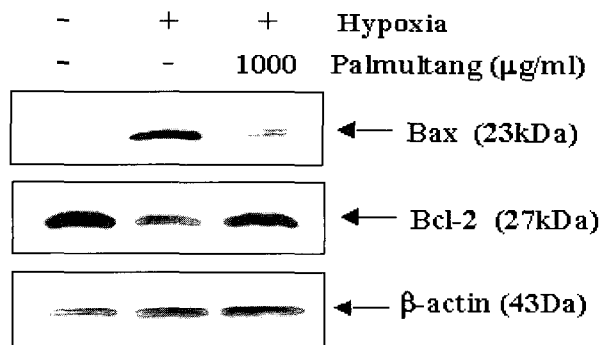


Fig. 6. *Palmul-tang* inhibited the decrease in Bcl-2 expression as well as increase in Bax expression by hypoxia in H9c2 cells. Cell lysates were used to measure the Bax, Bcl-2 and β -actin expression by Western blot analysis with anti-Bax, anti-Bcl-2 and β -actin antibodies.

한다. 이와 같이 本方은 心肺의 虛損으로 氣血이 兩虛하여 위와 같은 病證이 惹起한 것을 다스린다^{1,17-20}.

八物湯 중 人蔘은 性味が 溫 · 甘微苦하고, 大補元氣 · 補脾益氣, 白朮은 微溫 · 甘苦하고, 補脾益胃 · 燥濕利水하는 效能이 있으며, 白茯苓은 平 · 甘淡하고, 滲濕利水 · 益脾和胃, 甘草는 平 · 甘하며, 補脾益氣 · 調和諸藥, 熟地黃은 微溫 · 甘하고, 滋腎水 · 補益眞陰, 當歸는 溫 · 甘辛하며 補血和血, 川芎은 溫 · 辛하고, 活血行氣, 白芍藥은 涼 · 苦酸하며, 養血柔肝 · 斂陰의 效能이 있다²¹⁻²².

최근 심근세포의 산화적 손상에 대한 한약재의 방어 효과에 관한 연구로 申²³의 生脈散이 實驗動物의 心筋細胞에 미치는 影響, 孫²⁴의 丹參飲 煎湯液이 培養 心筋細胞에 미치는 影響, 黃²⁵의 五味子湯이 심근세포 산화적 손상에 미치는 影響, 成²⁶의 通靈散 抽出物이 培養 心筋細胞에 미치는 影響 등이 보고되었다. 그러나 아직까지 八物湯이 심근세포의 허혈상태에서 야기되는 H₂O₂에 의한 산화적 손상에 미치는 영향에 대해서는 보고된 바가 없다.

산화성 손상은 심혈관계 질환의 주요 발생 원인 인자로 작용하고 있다²⁷. 동맥경화, 대동맥협착증, 혹은 혈관질환 등은 일시적 혹은 지속적인 허혈 (ischemia)을 야기시킬 수 있으며, 재관류(reperfusion) 시에도 다량의 O₂, H₂O₂, 그리고 OH⁻ 등의 활성산소종이 생성된다⁴⁻⁵. 정상적인 생체에서는 활성화된 neutrophils, xanthine oxidase, mitochondrial respiration, arachidonic acid 등의 다양한 대사과정을 통하여 활성산소종이 생성되고, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 등의 생체 방어작용에 의해 소실되지만, 과도한 활성산소종의 발생은 이러한 능력을 초과하여 세포손상을 초래하게 된다. 허혈상태로 인한 세포손상시 회복가능한 시기에는 내과적 혹은 외과적 방법으로 혈류를 재개시키므로써 세포의 대사이상을 정상으로 회복시킬 수 있으며, 회복여부는 허혈의 정도와 지속시간에 따라 좌우된다. 그러나 어느정도 허혈상태가 지속되면 혈류를 재개시켜도 세포손상이 오히려 악화되기도 하는데 이는 재관류시에 발생하는 활성산소종의 작용이다. 이러한 활성산

소종에 의한 심근세포의 손상은 세포고사로 알려져 있으며, 그 기전으로는 c-Jun NH₂-terminal kinase(JNK)에 의한 caspase의 활성화와 그에 따른 DNA의 분절 등이 보고되었다^{28,31}.

세포고사, 혹은 예정된 세포사멸(programmed cell death)은 정상적인 발달과정에서 뿐만 아니라 독소(toxin), 성장인자 결핍(growth factor withdrawal) 및 hypoxia 같은 세포손상 자극에 의해 발생한다.

Hypoxia에 방어하여 세포내 정상산소분압을 유지하기 위한 다양한 세포반응들은 호흡증가, 혈관확장, 적혈구 생성증가, gluconeogenesis의 감소, ATP 생성반응 감소 등이 보고되어 있다³². 또한 hypoxia에 대한 다양한 in vitro 모델이 확립되어 있으며, 산소분압을 낮추기 위하여 95% N₂와 5% CO₂의 혼합가스 상태로 hypoxia를 유도한다³³. 이러한 hypoxia에 의한 심장근육세포의 세포독성은 PARP의 분절과 DNA 분절을 보이며, TUNEL 염색법을 통해 세포고사임이 이미 보고 되었다.

본 연구에서도 hypoxia를 유도하기 위하여 95% N₂와 5% CO₂의 혼합가스가 주입된 chamber에서 다양한 시간 동안 자극시 시간의존적인 세포생존율의 감소가 관찰되었으며, 이는 DNA 분절을 보이는 전형적인 세포고사임을 확인할 수 있었다. 이를 비교하기 위하여 심근세포에서 산화적 손상을 유도하는 H₂O₂를 처리하여 같은 현상임을 확인하였고, hypoxia 단독 자극시 약 62%의 세포생존율을 보이는 실험 조건을 수립하였다. 이렇게 유발된 H9c2 세포사멸에 대한 八物湯의 보호효과는 처리 농도에 의존적으로 hypoxia에 의한 세포독성을 억제하였다. 이 연구에서 八物湯은 hypoxia에 의해 유도되는 특징적인 세포고사 현상인 DNA의 사다리 모양 분절³⁴을 억제하였다(미발표 성적). 또한 핵의 Hoechst staining에서도 八物湯은 hypoxia에 의한 H9c2 세포 핵산의 DNA 분절과 chromatin의 응축을 억제하여 대조군과 유사한 형태적 소견을 보였으며, 세포독성에 의한 세포수의 감소와 형태학적 변화도 현저하게 감소시켰다.

Hypoxia 조건하에서는 전사인자인 hypoxia-inducing factor 1 α (HIF-1 α)의 안정성이 증가되고, 산소전달의

증가 및 산소소비의 감소에 관여하는 여러 유전자의 발현을 증가시키며, Bcl-2나 p53의 유전자 손상을 초래하여 Bax 및 Bak 단백질 발현을 증가시킨다. 이는 미토콘드리아의 기능유지에 중요하며, 심장에서 anti-apoptotic 기능을 담당하는 HSP60 같은 단백질이 Bax와 Bak 등의 단백질과 complex을 이루게 되어 세포고사로 진행하게 된다³⁹.

세포고사를 조절하는 Bcl-2는 사람의 림프종(human follicular lymphoma)과 관련된 유전자로서 크게 세포사멸 촉진 단백질과 세포사멸 억제 단백질의 두 종류가 존재한다(27, 51). 이중 Bcl-2 단백질은 다른 암 유전자와는 달리 세포증식에는 관여하지 않고 세포사멸만을 억제한다. Bcl-2는 산화환원반응의 조절, 세포내 이온의 분포 조절, caspase protease의 효소적 활성 조절, 미토콘드리아 막전위, 핵 DNA 분절, 스트레스 연관 MAP kinase인 JNK 및 p38 kinase의 효소적 활성을 조절한다고 알려져 있다³⁶. 한편, Bax 단백질은 Bcl-2와는 달리 오히려 세포사멸을 촉진시키는 기능을 수행한다³⁷. 특히 Bcl-2 family 단백질은 c-terminal이 소수성 막으로 구성되어 미토콘드리아의 막에 결합할 수 있다³⁸. 다양한 자극시 Bcl-2나 Bcl-XL을 과발현시켰을 경우 미토콘드리아 막전위(MPT, $\Delta\psi_m$)의 상실이나 cytochrome c의 방출이 방지됨이 보고되었다³⁹. 반대로 Bax나 Bak 단백질을 과발현시켰을 경우에는 cytochrome c의 방출을 촉진하고, 미토콘드리아 막 탈전극을 유도한다⁴⁰. 본 연구에서는 Rhodamine 123 염색을 통하여 hypoxia에 의한 H9c2 세포의 세포고사에서 미토콘드리아의 막전위차 감소에 의한 기능장애가 초래되었고, 이는 Bcl-2 단백질의 발현 감소와 Bax의 발현 증가가 미토콘드리아 기능장애와 유관함을 알 수 있었다. 그러나 八物湯 처리에 의하여 대조군 수준으로 회복되었다.

이상의 연구 결과를 종합하면 hypoxia에 의해 유도된 H9c2 심근세포 사멸은 H₂O₂에 의한 세포고사와 동일한 형태를 보이며, 세포의 형태적 변화를 동반한 DNA의 분절, Bcl-2의 발현 감소, Bax 단백질의 발현 증가에 의해 미토콘드리아 기능장애를 보이는 전형적인 세포고사 현상이었다. 그러나 八物湯은 이러한

산화적 손상으로부터 DNA 분절 및 세포고사성 단백질의 발현 조절을 통해 H9c2 심근세포를 보호하였다. 또한 이는 2-D를 통한 단백질 발현 및 관련 유전자의 변화 등 분자 생물학적 기전 연구가 지속되어야 할 것으로 사료된다.

V. 結 論

Hypoxia에 의한 심근세포 H9c2의 산화적 손상에 대한 八物湯의 보호 효과를 확인하기 위하여 심근세포의 세포생존을 변화, DNA 분절, Bcl-2, Bax 단백질의 발현, 및 미토콘드리아 막전위차를 비교, 분석하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 八物湯은 hypoxia에 의한 H9c2 심근세포의 세포사멸을 농도 의존적으로 감소시켰다.
2. 八物湯은 hypoxia에 의한 DNA fragmentation 현상을 감소시켰다.
3. 八物湯은 hypoxia에 의한 막전위차 감소와 미토콘드리아 기능장애를 방지하였다.
4. 八物湯은 pro-apoptotic Bax의 발현 감소, anti-apoptotic Bcl-2의 발현을 증가시켰다.

이상의 결과는 八物湯은 hypoxia에 의한 산화적 손상으로부터 심근세포를 보호하는 효과를 나타냈으므로 허혈성 심장질환 등의 심혈관계 질환에 유효하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

VI. 參考文獻

1. 沙圖穆蘇. 瑞竹堂經驗方: 欽定四庫全書(卷十四). 서울:大星文化社. 1995:30.
2. 王昂. 醫方集解. 서울:大星文化社. 1984:81, 262.
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. 263:1353-1357. 1988.
4. Singh N, Dhalla AK, Seneviratne C, Singal PK. Oxidative stress and heart failure. Mol Cell Biochem. 147:77-81. 1995.
5. 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.* 43(2):173-178. 2001.
6. 姜政秀. 기아회복시 대사기질, 호르몬, 혈액성분변화에 미치는 四君子湯, 四物湯 및 八物湯의 효과. 대전대학교대학원. 1995.
 7. 吳政錫. 八物湯 및 B.E.P.가 運動負荷로 惹起된 筋肉疲勞와 肝代謝酵素에 미치는 實驗的 研究. 대전대학교대학원. 1996.
 8. 李哲浚. 四君子湯, 四物湯 및 八物湯이 근육피로회복에 미치는 실험적 연구. 경희대학교대학원. 1988.
 9. 金鎮成. 少陰人 八物君子湯과 升陽益氣湯이 Hydrocortisone Acetate로 誘發된 陽虛證에 미치는 實驗的 研究. 경희대학교대학원. 1987.
 10. 河智容 외. 八物湯이 抗癌 및 免疫調節作用에 미치는 影響. 동의병리학회지. 1995;10:295-315.
 11. 田炳薰. 八物湯加味方이 마우스의 食食細胞機能 및 免疫反應에 미치는 影響. 원광대학교대학원. 1997.
 12. 鄭雨哲. 배양심근세포의 산화적 손상에 대한 四君子湯의 방어효과. 원광대학교대학원. 2002.
 13. 趙權一. 배양심근세포의 산화적 손상에 대한 四物湯의 방어효과. 원광대학교대학원. 2002.
 14. 李承宰. 四君子湯, 二陳湯, 六君子湯이 高脂血症에 미치는 影響. 원광대학교대학원. 1992.
 15. 河智容. 四物湯 및 四君子湯이 endotoxin으로 유발된 血栓症에 미치는 影響. 경희대학교대학원. 1988.
 16. 南昌圭. 四物湯이 血管內皮細胞에 미치는 影響. 원광대학교대학원. 1998.
 17. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:大星文化社. 1981:(雜病編.卷四)505, (雜病編.卷十)165-166, 170-171.
 18. 薛己. 校註婦人良方. 欽定四庫全書(卷三十一. 薛氏醫案). 서울:大星文化社. 1995:817, 819, 825, 826, 829, 831, 840, 959.
 19. 李梴. 醫學入門. 서울:大星文化社. 1984:外集.卷三 47-48, 52-53, 430.
 20. 孟華燮. 方藥指針講義抄錄(下). 익산:圓光大學校 韓醫科大學 生理學研究班. 1989:540, 572.
 21. 辛民教. 原色臨床本草學. 서울:南山堂. 1986:167, 172, 176, 219, 221-224, 249-252.
 22. 김창민 외. 完譯中藥大辭典. 서울:도서출판 정담. 1998:88-103, 1159-1168, 2179-2189, 2215-2228, 2319-2327, 3348-3354, 4477-4498, 5258-5264.
 23. 申善濂. 生脈散이 實驗動物의 心筋細胞에 미치는 影響. 원광대학교대학원. 1998.
 24. 孫昶翼. 丹參飲 煎湯液이 培養 心筋細胞에 미치는 影響. 원광대학교대학원. 2000.
 25. 黃普淵. 심근세포의 산화적 손상에 대한 五味子湯의 효과 및 작용기전 연구. 원광대학교대학원. 2002.
 26. 成恩慶. 通靈散 抽出物이 培養 心筋細胞에 미치는 影響. 원광대학교대학원. 2002.
 27. MacLellan WR, Schneider MD. Death by design. Programmed cell death in cardiovascular biology and disease. *Cir Res.* 81:137-144. 1997.
 28. Apostolova MD, Ivanova IA, Cherian MG. Metallothionein and apoptosis during differentiation of myoblasts to myotubes: protection against free radical toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol.* 159(3):175-184. 1999.
 29. Chen QM, Tu VC, Wu Y, Bahl JJ : Hydrogen peroxide dose dependent induction of cell death or hypertrophy in cardiomyocytes. *Arch Biochem Biophys.* 373(1):242-248. 2000.
 30. Raff MC, Bares BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD. Programed cell death and the control of cell survival. *Science.* 262:695-700. 1993.
 31. 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.* 78(4):564-572. 1996.
 32. Sowter HM, Raval R, Moore J, Ratcliffe PJ, Harris AL. Predominant Role of Hypoxia-Inducible Transcription Factor (Hif)-1alpha versus Hif-2alpha in Regulation of the Transcriptional Response to Hypoxia. *Cancer Res.* 1;63(19):6130-4. 2003.
 33. Calvert JW, Zhou C, Nanda A, Zhang JH. Effect of hyperbaric oxygen on apoptosis in neonatal hypoxia-ischemia rat model. *J Appl Physiol.* 95(5):2072-80. 2003.
 34. Naora, H., Nishida, T., Shindo, Y., Adachi, M., and Naora, H. Constitutively enhanced nbl expression is associated with the induction of inter-nucleosomal DNA cleavage by actinomycin D. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 224:258-264. 1996.
 35. Knowlton AA, Gupta S. HSP60, Bax, and Cardiac Apoptosis. *Cardiovasc Toxicol.* 3:263-268, 2003.
 36. Allen RT, Cluck MW, Agrawal DK. Mechanism controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases. *CMLS.* 54:427-445. 1998.
 37. Kroemer G, Dallaporta B, Resche-rigon M. The

mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Nature Med.* 6:614-620. 1998.

38. Trauth BC, Klas C, Peters A, MJ, Matzuku S, Moller P, Falk W, Debatin KM and Krammer PH. Monoclonal antibody-mediated tumor regression by induction of apoptosis. *Science.* 245:301-305. 1989.
39. Herr, I., Wilhelm, D., Bohler, T., Angel, P., and Debatin, K. M. Activation of CD95 (APO-1/Fas) signaling by

ceramide mediates cancer therapy-induced apoptosis. *EMBO.* 16; 6200-6208. 1997.

40. Ekhterae D, Lin Z, Lundberg MS, Crow MT, Brosius FC 3rd, Nunez G. ARC inhibits cytochrome c release from mitochondria and protects against hypoxia-induced apoptosis in heart-derived H9c2 cells. *Circ Res.* 85(12):70-77. 1999.