

원 저

## 혈관내피세포의 산화적 손상에 대한 地黃飲子の 방어기전 연구

정용준, 장재호, 이대용, 이민구, 전인철, 정대영<sup>1)</sup>, 이인<sup>1)</sup>, 신선호<sup>1)</sup>, 문병순  
원광대학교 한의학전문대학원, 원광대학교 심계내과학교실<sup>1)</sup>

### Protective Effects of *Jihwangeumja* on Oxidative Stress-induced Injury of Human Umbilical Vein Endothelial Cells

Yong-Jun Jeong, Jae-Ho Jang, Dae-Yong Lee, Min-Goo Lee, In-Cheol Jeon, Dae-Yeong Jeong<sup>1)</sup>, In Lee<sup>1)</sup>, Sun-Ho Sin<sup>1)</sup>, Byung-Soon Mun

Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang university  
Department of internal medicine, College of Oriental medicine, Wonkwang university<sup>1)</sup>

**Objectives** : Oxidative stress can induce negative responses such as growth inhibition or cell death by necrosis or apoptosis due to the intensity of the oxidative stress, as well as positive responses such as cellular proliferation or activation. We examined the effect of *Jihwangeumja* on this process.

**Methods and Results** : We analyzed the influence of oxidative stress and agents that modify its effect in human umbilical vein endothelial cell (HUVEC). Oxidative stress was induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. With induced oxidative stress the results obtained indicate that it has a harmful effect over cell function and viability, and that this effect is dose and time dependent. When oxidative stress increased, *Jihwangeumja* reduced cell damage and had protective functions. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced the apoptosis of HUVEC through the activation of intrinsic caspases pathway as well as mitochondrial dysfunction. A significant increase in cell survival was observed in culture cells with oxidative stress when they were treated with *Jihwangeumja*.

**Conclusions** : These results suggest that *Jihwangeumja* may be potentially useful to treat HUVEC against oxidative damages mediated by modulation of caspase protease and mitochondrial dysfunction.

**Key Words**: *Jihwangeumja*, oxidative stress-induced injury, human umbilical vein endothelial cells

## 서 론

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, OH 등의 활성산소종(Reactive oxygen species : ROS)은 산소를 이용한 산화과정 중 발생하며 불특정 생화학적 물질들과 반응하여 세포에 상해를 주고 신호전달체계에 영향을 미쳐 심한 경우 세포죽음을 유도하기도 한다. 최근에는 활성산소종에 대한 많은 연구 중 항산화 효소 등으로 세포고사를 억제하는 방법에 대한 연구들이 활발하게 진행되고

· 접수 : 2004년 4월 28일 · 논문심사 : 2004년 5월 2일  
· 채택 : 2004년 5월 13일  
· 교신저자 : 문병순, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의학전문대학원  
(Tel: 063-850-2102, Fax: 063-841-0033, E-mail: mbs@wonkwang.ac.kr)

있다<sup>15)</sup>.

혈관을 조성하는 세포 가운데 혈관내피세포는 혈관내막의 가장 내부에 위치하여 혈관벽에 혈액성분이 침습되는 것을 보호하는 역할을 할 뿐만 아니라 혈소판의 기능을 억제하는 성분을 생산하여 혈액 응고를 방지하는 기능을 함으로써 혈액의 정상순환을 도와준다. 혈관내피세포를 손상시키는 인자는 여러 가지로 연구되고 있으며, 그 중 활성산소는 화학적인 작용을 통한 병리적인 작용으로 혈소판의 침착, 응집을 형성하고 동맥벽을 약화시켜 혈관 내막의 괴열, 동맥류와 출혈 등을 일으키기도 한다. 혈관내피세포의 손상은 결국 죽상동맥경화증의 발생을 촉진하게 되는데 뇌, 심장, 신장 및 기타 부위에서 발생한 죽상동맥경화증은 협심증, 심근경색 등의 심장질환과 뇌경색, 뇌동맥류 등 뇌혈관 질환의 중요한 요인이 된다<sup>6-8)</sup>.

地黃飮子は 劉<sup>9)</sup>의 《宣明論方》에 처음 수록된 이후 많은 역대 醫家들에 의해 中風 치료에 응용되어 왔으며<sup>10-13)</sup>, 특히 《東醫寶鑑》에서는 “治中風 舌瘡 足廢 腎虛 氣厥 不至舌下”의 경우에 사용한다고 하여<sup>14)</sup> 노화와 동반한 각종 中風 후유 증상 뿐만 아니라 고혈압, 동맥경화증 등의 혈관계 질환에 활용되고 있다<sup>15,16)</sup>.

이에 저자는 혈관내피세포의 산화적 손상에 대한 地黃飮子の 방어기전을 알아보기 위하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 혈관내피세포의 산화적 손상과 세포고사 유도기전을 조사하고, 地黃飮子の 세포고사 억제 효과에 대한 기전을 究明하고자 地黃飮子를 전처리한 후 혈관내피세포에서의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 세포 생존율 변화, caspase 활성화, mitochondria 막전위 변화, 세포고사 관련 단백질의 발현 및 활성화를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재 료

#### 1) 세포주

사람 혈관내피세포(HUVEC)는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 분

양받아 10% 우태아혈청(Fetal bovine serum ; FBS, Gibco BRL Co.)이 포함된 RPMI1640 (Gibco BRL Co, Gettysburg, MD, USA)에서 배양하였다.

#### 2) 약 재

실험에 사용한 地黃飮子の 처방은 許<sup>14)</sup>의 《東醫寶鑑》에 의거하였으며, 약재는 원광대학교 한의과대학 익산한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 1貼의 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1).

#### 3) 시약 및 기기

본 실험에 사용된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 Sigma Chemical 社(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, 세포배양에 필요한 RPMI1640, 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS), 항생제 및 trypsin 등은 GIBCO BRL 社 (Gaithersburg, MD, USA)로부터 구입하였다. 세포배양에 사용된 24-well plate와 10 cm dish 등 배양용기는 Falcon 社(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), sodium dodecyl sulfate (SDS), dimethylsulfoxide (DMSO), Hoechst 33342 등 실험에 사용된 시약은 Sigma 社(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 각 caspase protease 기질은 Calbiochem 社(San Diego, CA, USA)에서 구입하여 사용하였고, Western blotting에 사용된 각각의 항체들은 Santa Cruz 社(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다.

## 2. 방 법

### 1) 검액의 조제

地黃飮子 5貼 분량인 216.875 g을 증류수 1,800 ml와 함께 환저플라스크에 넣고, 냉각기를 부착하여 2시간 동안 가열한 후 3,000 rpm에서 20분 원심분리하였으며, 이때 얻어진 상층액을 감압회전 증발기를 이용하여 감압농축한 후 freeze dryer로 동결건조하여 42.17 g의 분말 extract를 얻어 실험에 사용하였다.

### 2) 세포 활성화도 측정

세포의 활성화도는 MTT assay를 이용하였다. 세포 배양판(24-well plate)에 세포는 10<sup>5</sup> cell/ml씩 분주하여 16시간 CO<sub>2</sub> 배양기에서 안정화하였으며, 실험에 필요한 각 조건의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 다음, MTT를 100 μl

ml씩 첨가하였다. 4시간 후 살아있는 세포에 의해 생성된 formazan의 검출은 MTT가 들어있는 배지를 제거하고 DMSO를 1 ml씩 부가하여 충분히 용해한 후 96-well plate에 100  $\mu$ l를 넣어 분광광도계(Thermo max, USA)로 545 nm 파장에서 흡광도를 측정한다. formazan 생성 정도를 정상 대조군의 값과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

### 3) Caspase계 cysteine protease 활성도 측정

HUVEC 세포를 4°C에서 20분 lysis buffer (1% Triton X-100, 0.32 M sucrose, 5 mM ethylene diamine tetraacetic acid, 1 mM phenylmethyl- methylsulfonyl fluoride, 1  $\mu$ g/ml aptotinin, 1  $\mu$ g/ml leupeptin, 2 mM dithio- threitol, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0)로 용해하여 14,000 rpm으로 15분 원심 분리를 하였고, 이때 얻어진 상층액은 bicinchoninic acid (BCA) 용액과 30분 반응시켜 분광 광도계를 이용하여 540 nm에서 정량하였다. 세포 파쇄액은 caspase assay buffer (100mM HEPES, 10% sucrose, 0.1% chaps, 1 mM PMSF, 1  $\mu$ g/ml aprotinin, 1  $\mu$ g/ml leupeptin, 2 mM DTT, pH 7.5)로 희석된 형광기질과 37°C에서 30분 반응시킨 후 fluorometer로 caspase 활성도를 측정하였다. Caspase-3 protease에 의한 AMC-DEVD의 절단능력은 excitation wavelength (380 nm)/emission wavelength (460 nm)에서 측정하였다.

### 4) Western blotting

배양된 HUVEC 세포는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 일정시간 후에 세포를 포집하여 PBS로 세척한 후 lysis buffer (1% Triton X-100, 10 mM Tris, pH 7.6, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.1% bovine serum albumin (BSA), 50 mM NaF, 1 mM PMSF, 1% aptotinin)를 부가하고 4°C에서 30분 용해한 다음, 12,000 rpm, 4°C, 15분 조건으로 원심 분리하여 얻은 추출액을 Bradford's method로 단백질을 정량하였다. 이 추출액은 2×sample buffer를 혼합하여 100°C에서 3분 가열하여 단백질을 변성하고 10% 및 16.5% SDS-polyacryl amide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 시행하였다. 전기영동 후 gel에 있는 단백질은 nitro-cellulose membrane (Hybond™ • C, Amersham, England)으로 상온에서 3시간 이동한 후 blocking buffer (10% skim milk)와 상온에서 1시간

반응시켰다. Anti-Bax, anti-Bcl<sub>2</sub>, anti-PARP, anti-phospho-p53 (Ser15) polyclonal IgG, anti-p53 and anti-cytochrome c monoclonal 항체를 0.05%의 Tween-20이 함유된 Tris-buffered saline (TBS-T)에 1:1,000으로 희석하여 nitro-cellulose membrane과 상온에서 2시간 반응하였다. 2차 항체인 anti-rabbit IgG conjugated horseradish peroxidase (TBS-T로 1:3,000으로 희석)와 상온에서 1시간 반응 후 enhanced chemiluminescence kit (ECL kit, Amersham, England)을 이용하여 필름에 노출하여 현상하였다.

### 5) Mitochondria 막전위차 (MPT) 측정

HUVEC 세포를 20  $\mu$ M JC-1 용액으로 30분 반응시킨 다음 포집하여 PBS로 용해하고 세포 부유액 중 약 4×10<sup>4</sup> 세포에서 FACS Vantage (Becton -Dickinson, CA, USA)를 이용하여 형광을 측정하였다. JC-1은 argon laser (488 nm)에서 활성화되고 초록 형광(530 nm)과 빨간 형광(>570 nm)을 동시에 발광하였다. 결과분석은 "Cell Quest" v.3.1f software (Becton-Dickinson)를 이용하였다.

### 6) 세포질과 mitochondria 분획의 분리

포집한 HUVEC 세포를 4°C buffer A (20 mM HEPES, pH 7.5, 10 mM KCL, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 1 mM DTT)로 세척하고 100  $\mu$ l buffer A를 넣어 4°C에서 30분 반응시킨 후 26-gauge needle로 세포를 분쇄하였다. 분쇄된 세포 파쇄액은 750 rpm으로 10분 원심 분리하였으며, 이 때 얻은 상층액을 다시 10,000 rpm에서 25분 원심 분리하여 세포질 분획만을 얻었고, 이 때의 pellet을 buffer A로 세척하고 lysis buffer로 용해하여 얼음 위에서 30분 반응시킨 후 10,000 rpm으로 25분 원심 분리하여 mitochondria 분획을 분리하였다.

### 7) Hoechst staining

세포고사 과정의 HUVEC 세포들을 4% formaldehyde 용액에서 고정시킨 후 PBS로 세척하고, Hoechst 33342 (Sigma 社, St. Louis, Missouri, USA) 염색약을 PBS에 20  $\mu$ M/ml이 되도록 희석하여 10분 염색한 후 다시 PBS에서 세척하여 형광현미경 아래에서 DNA의 분절현상을 관찰하였다.

9) 통계처리

표시된 결과는 4회 이상의 독립적인 실험결과로서 통계처리는 student's t-test을 이용하였으며, p-value가 최대값 0.01 이하의 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 HUVEC 세포의 생존율에 미치는 영향

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 HUVEC 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리 후 세포 생존율을 MTT방법으로 측정하였다. 다양한 농도의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 24 시간까지 처리 후 세포 생존율을 조사한 결과 75 μM에서 시간, 농도 의존적으로 세포 생존율이 지속적으로 감소하기 시작하여 150 μM 농도 이상에서는 현저한 세포 생존율의 저하가 관찰됐다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 세포의 사멸이 세포고사 기전에 의하여 매개된다는 보고가 있으므로<sup>3,17)</sup>, 이를 확인하기 위하여 세포고사 현상의 형태학적 특징인 DNA 분절현상을 Hoechst staining 방법으로 확인하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150 μM을 12시간 처리한 후 HUVEC 세포의 DNA는 현저한 분절현상을 나타냈다. 이상의 결과로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 HUVEC 세포의 세포생존율 감소는 세포고사 기전에 의해 매개됨을 확인할 수 있었다.

2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 HUVEC 세포의 caspase 활성화에 미치는 영향

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 HUVEC 세포의 생존율을 감소시키는 기전이 세포고사로 확인됐기 때문에, 세포고사를 매개하는 가장 중요한 세포신호전달분자인 caspase protease의 활성을 조사하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 HUVEC 세포에서 caspase family cysteine -3, -8 및 -9의 활성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 HUVEC 세포에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 150 μM 처리한 후 시간 경과에 따른 Caspase 활성을 측정하였다. Caspase-3 protease는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 6시간 후 활성이 증가하여 12시간에는 대조군에 비하여 약 4배의 활성 증가를 나타냈으며, 24시간에는 다시 감소하는 경향을 보였다. 또한 Caspase-9 protease는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 12시간 이후부터 약 1.5배의 활성 증가를 나타냈다.

그러나 Caspase-8 protease는 활성의 유의한 변화가 없었다.

Caspase-3 protease의 효소적 활성증가를 확인하였기 때문에 caspase-3 protease 기질의 하나인 PARP의 분절을 western blotting으로 조사하였다. HUVEC 세포에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 150 μM을 처리한 24시간 후에 세포파쇄액으로부터 caspase-3 protease와 PARP의 발현을 조사한 결과, caspase-3 protease의 발현감소와 유관하게 PARP의 단백질은 116 kDa의 정상적인 형태가 85 kDa로 분절되는 현상이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 6시간 후부터 나타나서 24시간 이후에는 더욱 현저하였다.

3. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 HUVEC 세포의 mitochondria의 막전위 변화에 미치는 영향

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 HUVEC 세포의 caspase-3 및 -9 protease의 활성을 증가시켰기 때문에 이들 protease의 활성화에 중요한 mitochondria의 기능이상을 조사하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 mitochondria의 막전위 변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 mitochondria의 막전위차 및 세포질내로의 cytochrome c 방출을 western blotting으로 관찰하였다(Fig. 1). 세포질에서 cytochrome c 방출은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리 후 6시간에 시작되어 12시간 이후에는 현저히 증가하는 반면, mitochondria에서는 24시간 이후에는 실험군에서 단백질 발현이 현저히 감소하였다. 또한 mitochondria와 세포질 분획이 정확히 분리되었음을 확인하기 위하여 VDAC에 대한 항체를 이용하여 mitochondria 분획에만 존재하는 VDAC 단백질을 확인하였다.

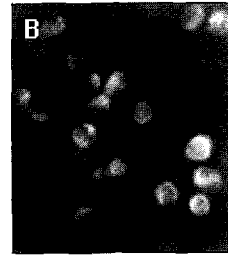
또한 mitochondria 막전위의 손상을 알아보기 위하여 형광현미경을 이용하여 막전위차(mitochondria permeability transition : MPT)를 측정하였다(Fig. 2). 형광현미경 사진에서 대조군(Fig. 2a)은 오렌지색 형광을 발광하였으나, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 군(Fig. 2b)은 녹색형광을 발광하였다 이 결과로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 HUVEC 세포의 mitochondria 막전위를 변화시켰음을 알 수 있었다.

4. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 HUVEC 세포의 p53, p21 및 Bcl2의 발현변화에 미치는 영향



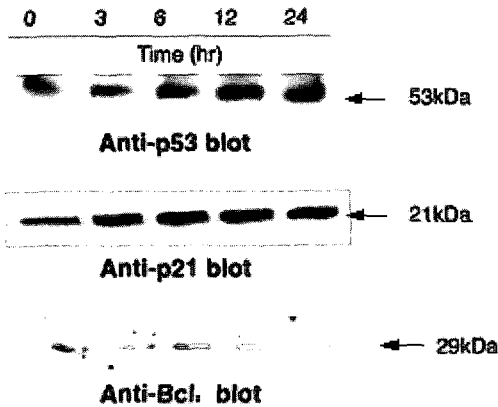
**Fig. 1.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Induced the Cytosolic Release of Cytochrome c from mitochondria.

Cells were treated with 150 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for different time periods. Cytosolic and mitochondria fractions of lysates were isolated and used to carry out western blot analysis with anti-cytochrome c and anti-VDAC antibodies.



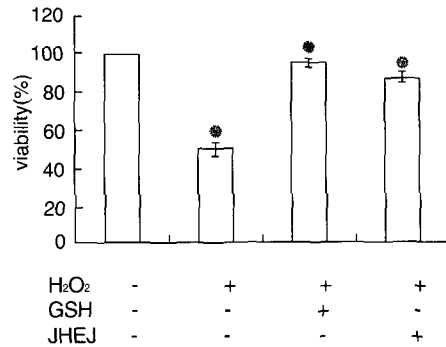
**Fig. 2.** H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Induced the Changes of the Mitochondria Membrane Potential Transition(MPT).

Cells were treated with (B) or without H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A), for 12 hrs. Then, cells were stained with JC-1 for 30 mins and visualised under inverted fluorescent microscope.



**Fig. 3.** Treatment of HUVEC with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Increased the Accumulation of p53, p21 Whereas Decreased the Bcl<sub>2</sub> Expression.

Cells were treated with 150 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for different periods. Lysates from cells were used to measure the expression of p53, p21 and Bcl<sub>2</sub> by Western blotting.



**Fig. 4.** Inhibition of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Cytotoxicity in HUVEC.

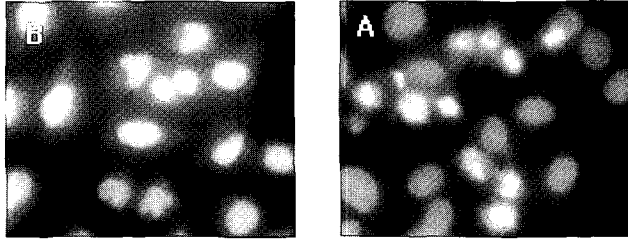
Cells were preincubated with *Jihwangeumja*(JHEJ) and GSH for 2 hrs before treat with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Viability was determined by MTT assay.

Results represent the mean ± SD of quadruplicates. (\* *pp*<0.01, \*\* *p*<0.001)

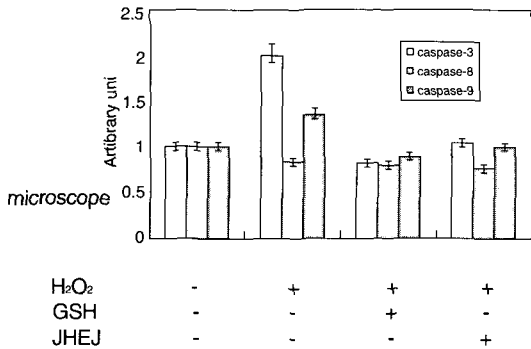
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 HUVEC 세포의 세포고사에서 p53, p21 단백질의 발현 여부를 알아보기 위하여 western blotting을 실시한 결과 p53 단백질의 발현이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 후 6시간부터 시간 의존적으로 증가하는 것을 관찰하였고, 세포주기에 영향을 미치는 p21 단백질의 발현도 시간 의존적으로 증가하는 것을 관찰하였다. 또한 세포의 생존을 자극하며 세포사멸로부터 세포를 보호하는 기능이 있는 Bcl<sub>2</sub> 단백질의 발현여부를

관찰한 결과, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 후 24시간에서 감소하는 경향을 나타냈다(Fig. 3).

5. 地黃飲子가 HUVEC 세포의 생존율에 미치는 영향  
地黃飲子가 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 HUVEC 세포의 생존율에 미치는 영향을 알아보기 위하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 2시간 전에 地黃飲子, 항산화제(GSH)를 전처리한 실험군과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>만 처리한 대조군을 24시간 배양하여 각각의 생



**Fig. 5.** Protective Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced DNA Fragmentation in HUVEC by *Jihwangeumja*(JHEJ). Cells were pre-incubated with (B) or without *Jihwangeumja*(JHEJ) (A), and both treated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 12 hrs. The nuclei of cells was observed with Hoechst dye under fluorescent



**Fig. 6.** *Jihwangeumja*(JHEJ) Inhibited the Catalytic Activation of Caspase-3 Protease. Cells were preincubated with *Jihwangeumja*(JHEJ) and GSH for 2 hrs before treat with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Lysate from cells was used to measure the activity of caspase family proteases including caspase-3, caspase-8 and caspase-9 proteases by using fluorogenic tetra peptides as substrates. Results represent the mean (%)±S.D. of quadruplicates. (\* PP<0.01, \*\* PP<0.001)

존율을 비교하였다. 그 결과 항산화제를 5 mM 전처리한 실험군은 대조군과 유사한 생존율을 보였고, 地黃飲子 1000  $\mu\text{g/ml}$ 를 전처리한 실험군의 생존율은 대조군의 80%까지 회복됐으며, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리군의 생존율은 대조군의 50% 정도로 감소하였다(Fig. 4).

地黃飲子에 의한 세포 생존율의 증가가 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 HUVEC 세포의 세포고사에 미치는 영향을 알아보기 위하여 위와 동일한 실험 조건으로 DNA 분절현상의 변화를 Hoechst staining 방법으로 확인하였다(Fig. 5). 이 결과 地黃飲子를 전처리한 실험군에서는

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 HUVEC 세포의 DNA 분절현상이 현저히 감소하였다.

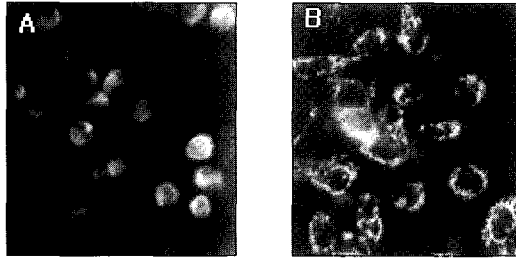
#### 6. 地黃飲子가 HUVEC 세포의 caspase 활성화에 미치는 영향

地黃飲子에 의한 HUVEC 세포의 세포고사 억제 효과가 caspase protease의 기능과 어떤 관계인지 알아보기 위하여 地黃飲子 1000  $\mu\text{g/ml}$ 를 2시간 전에 처리하고 150  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 24시간 처리한 후에 caspase 효소의 활성을 측정하였으며(Fig. 6), 항산화제(GSH)는 비교군으로 활용하였다.

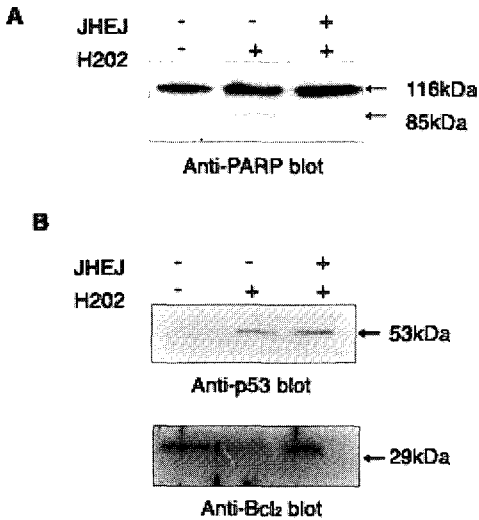
Caspase-3 protease의 활성은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>만 단독 처리한 실험군과 비교하여 약 2배 이상의 활성을 보였으나 地黃飲子和 GSH를 전처리한 실험군에서는 대조군 수준으로 감소하였다. Caspase-9 protease 역시 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 후 약 1.5배의 활성증가가 나타났으나 地黃飲子和 GSH를 전처리한 실험군에서는 그 활성이 대조군 수준으로 관찰됐다. 그러나 caspase-8 protease는 유의한 변화를 나타내지 않았다.

#### 7. 地黃飲子가 HUVEC 세포의 mitochondria 막전위 변화에 미치는 영향

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 HUVEC 세포의 mitochondria 막전위 변화에 대한 地黃飲子の 영향을 알아보기 위하여 형광 현미경을 이용하여 막전위차(MPT)를 측정하였다. 地黃飲子를 2시간 전처리한 후에 150  $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 실험군 세포의 mitochondria는 정상대조군(Fig.



**Fig. 7.** *Jihwangeumja*(JHEJ) Inhibited the Changes of the Mitochondria Membrane Potential Transition (MPT). Cells were pre-incubated with (B) or without *Jihwangeumja*(JHEJ) (A), and both treated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 12 hrs. The nuclei of cells was observed with Hoechst dye under fluorescent



**Fig. 8.** The Variation of Apoptotic Signal Protein Expression by *Jihwangeumja*(JHEJ).

Cells were preincubated with *Jihwangeumja*(JHEJ) for 2 hrs before treat with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 hrs. Lysates from cells were used to measure the expression of PARP, p53 and Bcl<sub>2</sub> by Western blotting.

2A)과 유사한 오렌지색 형광을 나타냈으나(Fig. 7B), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 단독처리한 실험군(Fig. 7A)은 mitochondria 막 전위차 변화를 의미하는 녹색형광을 나타냈다.

8. 地黃飲子가 HUVEC 세포의 PARP, p53 및 Bcl<sub>2</sub> 발현변화에 미치는 영향

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 HUVEC 세포의 PARP의 분절과 p53 및 Bcl<sub>2</sub> 단백질의 발현에 대한 地黃飲子의 영향을 알

아보기 위하여 western blotting을 실시하였다. 地黃飲子 1000 μg/ml를 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리 2시간 전에 전처리한 실험군과 150 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>만 24시간 처리한 실험군에서 PARP의 발현을 비교하였다(Fig. 8A). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>만 단독처리한 실험군에서는 PARP의 분절체인 85 kDa 형태가 관찰됐으나 地黃飲子를 전처리한 실험군에서는 대조군과 유사하게 116 kDa의 온전한 형태만이 관찰됐다.

동일한 실험조건에서 地黃飲子의 전처리는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 p53 발현에는 현저한 영향을 미치지 못하였으나 Bcl<sub>2</sub>는 대조군 수준으로 회복함을 확인할 수 있었다(Fig. 8B).

고 찰

노화는 일반적으로 신체 내의 평형이 깨어져 내적 및 외적 환경에 대한 적응을 어렵게 만드는 신체의 구조적 혹은 기능적인 저하를 의미하는데 연령이 증가함에 따라 발생하는 변화로서 질병이나 사고에 기인하지 아니하고 궁극적으로는 사망을 초래하는 것으로 정의하기도 한다<sup>18)</sup>. 특히 혈관계통의 노화로 인한 혈액 순환의 장애를 일으키는 순환기 질환은 고혈압, 관상동맥 질환 및 심부전 혹은 뇌졸중의 직접적인 발생요인으로 여겨지며 이들 질환은 고령자의 사망원인 가운데 수위를 차지하고 있다<sup>19)</sup>.

노화의 원인을 밝히기 위하여 많은 연구가 이루어지고 있으나 정확한 원인은 밝혀지지 않았으며 크게 두 가지로 구별할 수 있는데 첫째는 유전자에 의해

생명체의 노화와 수명이 예정되어 있다는 ‘노화에정설’ 이고, 둘째는 여러 가지 해로운 인자들에 의한 생체 물질의 손상이 축적되어 노화에 이른다는 ‘유해인자 손상설’ 이다. ‘유해인자 손상설’ 중 최근에 가장 많이 연구되고 있는 것은 ‘활성 산소설’ 이다. 이것은 정상적인 대사과정 중에 부수적으로 발생하는 여러 가지 활성산소들에 의해 생체 물질이 산화적 손상을 받게 되고 이러한 손상들이 축적되어 노화에 이르게 된다는 설이다<sup>18)</sup>.

구체적으로 산화적 손상은 중앙의 형성, 혈관내 지방 축적, 진성 당뇨병과 노화 등 병리학적 질병을 유발하며, 특히 활성산소종은 일반적으로 생체내 구성요소들과 반응하여 세포 손상에 중요한 역할을 한다. 세포내 활성산소종의 증가는 혈관내피세포 손상을 초래하고 산화된 저밀도 지방 단백질의 활동은 활성산소종의 증가와 관련이 있다고 알려져 최근에는 활성산소종이 혈관계에 미치는 영향에 대한 연구가 지속되고 있으며, 세포고사와 관련된 많은 연구가 진행 중이다<sup>19)</sup>.

혈관내피세포의 활성은 산화적 손상 뿐만 아니라 cytokine(TNF, IL-1)에 의한 자극이나 염증, 감염, 재관류, 동종 혹은 타종 이식에 의한 변화에 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 또한 혈전증 유도 물질이나 cytokine 등을 포함하는 유전자의 발현을 유도하게 되고 세포고사와 많은 관련이 있는 것으로 보고되고 있다.

韓醫學에서 血은 精, 氣, 神과 함께 인체의 생명현상을 구성하는 기본요소이며 전신의 각 부분이 모두 血로부터 충분한 영양 공급을 받아 정상적인 생리 기능 활동을 유지하게 된다고 하였다. 《張氏醫通》<sup>20)</sup>에서는 “總由水穀精微所化 ..... 得脾之鼓運 如霧之上蒸于肺而爲氣, 氣不泄 歸精於腎而爲精, 精不泄, 歸精於肝而化清血” 이라고 하여 血의 생성은 脾로부터 水穀精微를 받아 腎에서 化生하고 陰血이 생성된 후에는 肝에 저장되어 心脈에 의하여 운행되는데, 특히 인체의 기능이 저하된 경우 血은 腎精에서 化生하므로 心, 肝의 血이 損耗하였을 때는 腎精을 소비하여 腎虛를 일으키게 된다<sup>6,16,21,22)</sup>.

韓醫學에서 腎은 <素問·六節藏象論>에서 “腎者主蛰 封藏之本 精之處也” 라고 하였고, <素問·上古天真論>에서는 “腎者主水 受五臟六腑之精而藏之” 라고 하여 精을 간직하고 생장 발육을 주관한다고 하였는데 특히 <素問·上古天真論>에서는 “丈夫八歲 腎氣平均 筋骨勁強 ..... 腎氣衰 髮墮齒槁 ..... 腎臟衰 形體皆極 .....” 이라고 하여 腎氣의 衰退를 老化的 원인이라고 보았다<sup>21,23)</sup>.

地黃飲子 是 劉<sup>9)</sup>의 《宣明論方》에 처음 수록됐으며, <素問·脈解篇><sup>24)</sup>에서 “內奪而厥 則爲瘡痍 此腎虛也 少陰不至者 厥也” 라는 내용에 근거하여 腎虛로 인한 瘡痍 및 足廢를 비롯한 中風 후유증 치료에 응용되어 왔다<sup>10,12)</sup>.

본 처방의 약물 구성을 살펴보면 地黃飲子是 八味丸에서 山藥, 澤瀉, 牡丹皮를 去하고 巴戟, 肉蓯蓉, 石斛, 遠志, 五味子, 麥門冬, 石菖蒲를 加味한 것으로 熟地黃, 巴戟, 山茱萸, 肉蓯蓉, 附子, 肉桂 등은 滋腎 壯陽 益精하고 命門火를 補하는 작용이 있으며, 遠志, 石菖蒲, 白茯苓은 寧神 益智 開心竅 出聲音 하는 작용이 있다. 麥門冬, 五味子是 生脈 滋潤 生津하고, 石斛은 強筋骨 開竅하여 痰飲으로 인한 心竅 閉塞의 방지를 補助한다고 할 수 있다. 그러므로 本方은 腎氣가 虛한 사람이 中風으로 인하여 손발이 자유롭지 못하고 언어장애가 있을 때 활용하는 方劑가 되며, 최근에는 고혈압, 동맥경화, 만성 신염 등의 질환에도

Table 1. Prescription of Jihwangeumja

韓藥名	生藥名	重量(g)
熟地黃	<i>Rhizoma Rehmanniae</i>	3.750
巴戟	<i>Radix Morindae</i>	3.750
山茱萸	<i>Fructus Corni</i>	3.750
肉蓯蓉	<i>Caulis Cistanchis</i>	3.750
石斛	<i>Herba Dendrobii</i>	3.750
遠志	<i>Radix Polygalae</i>	3.750
五味子	<i>Fructus Schizandrae</i>	3.750
白茯苓	<i>Poria</i>	3.750
麥門冬	<i>Radix Ophiopogonis</i>	3.750
附子	<i>Radix Aconitii</i>	1.875
肉桂	<i>Cortex Cinnamomei</i>	1.875
石菖蒲	<i>Rhizoma Acori Graminei</i>	1.875
生薑	<i>Rhizoma Zingiberis</i>	2.000
大棗	<i>Fructus Zizyphi Jujubae</i>	2.000
Total amount		43.375



활용되고 있다<sup>15,16)</sup>.

우선 HUVEC 세포에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 후 세포 생존율을 측정된 결과, 시간 및 농도 의존적으로 세포 손상이 증가하는 것을 관찰하였고, 형광염색법(Hoechst staining)을 이용하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>을 처리한 후 12시간부터 HUVEC 세포에서 DNA 분절이 나타났다. 이 결과로 세포독성이 세포고사의 기전임을 확인할 수 있었다.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 혈관내피세포의 세포독성이 세포고사 기전임을 확인하였기에 그 작용기전을 究明하기 위하여 먼저 caspase family cysteine protease의 활성 여부를 조사하였다. 1986년 *ced-3* 및 *ced-4*의 돌연변이가 세포고사를 억제한다는 보고가 발표된 이후, *ced-3*의 포유류 동족체인 ICE가 caspase-1 protease로 명명됐는데, 계속된 연구로 약 12종류의 caspase family cysteine protease가 밝혀졌으며, 이들 유전자는 cysteine기만을 선택적으로 절단하는 단백질 분해효소를 가지고 있다고 보고됐다. 본 연구 결과에서는 caspase-3 protease의 활성이 관찰됐으며, caspase-9 protease도 약간의 활성을 보였으나 caspase-8 protease의 활성은 관찰할 수 없었다. Caspase-3 protease는 ICE라고도 알려져 있으며, 세포질에서는 proenzyme 형태로 존재한다. Proenzyme 형태의 caspase-3 protease는 caspase-8 및 -9 protease 같은 initiator caspase에 의해 pro-form이 절단되어 활성화된 형태로 변환된다. 세포고사 과정에서 caspase-3 protease의 세포내 표적인자로는 protein kinase c (PKC), lamin 및 PARP 등이 알려져 있으며, endonuclease의 활성화도 caspase-3 protease의 활성화에 의존적이라고 알려져 있다. 본 실험에서는 caspase-9 protease의 활성이 약하지만 나타나고 있는 것을 관찰하였고, 이는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 HUVEC 세포의 고사가 mitochondria를 경유하는 세포고사 기전임을 시사하는 것이다.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 HUVEC 세포의 고사에서 p53, p21 및 Bcl2 단백질의 발현변화를 알아보기 위하여 western blotting을 실시하였다.

p53은 종양을 억제하는 대표적인 유전자로서 DNA 손상, 종양의 형성, 성장인자의 상실 등의 세포내 이상에 대해 전체적인 반응을 나타낸다. 또한 p53

은 다양한 항암제나  $\gamma$ -irradiation 등에 의해 유도되는 세포고사 과정에 많은 영향을 미치는 것으로 알려져 있으나 세포고사 유도기전에 대한 작용기전은 정확하게 밝혀지지 않았다.

Bcl2는 사람의 림프종과 관련한 유전자로 다른 암 유전자와는 달리 세포종식에는 관여하지 않고 세포사멸의 억제기능에 관여한다고 알려져 있으며, p21은 세포주기에 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 HUVEC 세포에서 p53, p21 및 Bcl2 단백질의 발현을 관찰한 결과 p53과 p21은 시간의존적으로 증가하는 것을, Bcl2는 시간의존적으로 감소하는 것을 관찰하였다(Fig. 3). 이러한 결과는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 HUVEC 세포에 대하여 p53, p21 및 Bcl2 단백질에 영향을 미쳐 세포고사를 유도함을 알려 주는 것이다.

Mitochondria는 세포의 생존과 죽음을 조절하는 중요한 구성요소로서 mitochondria 막전위(mitochondrial transmembrane potential(MPT,  $\Delta\psi_m$ ))의 적당한 유지는 ATP 합성과 산화적 인산화 유지를 통하여 세포의 생존을 유지하는 근본적인 역할을 하고 있으며<sup>25,26)</sup>, 최근의 연구 동향은 세포고사 조절에 mitochondria 기능의 변화가 중요한 역할을 한다는 것에 초점을 맞추고 있다. 본 연구에서도 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 HUVEC 세포의 mitochondria 기능 변화를 조사하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 세포군에서 mitochondria로부터 cytochrome c가 방출됨을 관찰하였는데(Fig. 1), 이는 Apaf-1 및 dATP와 함께 복합체를 형성하여 caspase-9 protease의 활성을 유도한다는 보고와 일치하는 결과를 나타냈다<sup>44,45)</sup>. 또한 mitochondria 막전위 변화를 JC-1 염색법으로 관찰한 결과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 막전위의 변화를 관찰할 수 있었다(Fig. 2). 정상 세포의 경우 mitochondria가 세포질 주변에 주로 분포되어 있으나 mitochondria의 기능이 손상될 경우에는 핵과 세포질 주변에 균일하게 분포되는 양상을 보이게 된다. 이 경우 JC-1 염색법으로 염색을 하여 관찰하면 오렌지 빛 형광이 녹색 형광으로 변하게 된다.

이상의 실험으로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 HUVEC 세포의 고사는 mitochondria에서 cytochrome c가 방출되면서 caspase-9 protease가 활성화되고, 이것이 caspase-3

protease의 활성을 야기하면서 PARP의 cleavage가 일어나 결과적으로 세포고사가 유도됨을 알 수 있었다.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 HUVEC 세포의 세포고사 기전을 밝힌 후 본 저자는 地黃飮子에 의한 세포독성 억제기전이 세포고사 신호전달체계에 미치는 영향을 알아보기 위하여 동일한 실험을 地黃飮子를 2시간 전처리한 세포군으로 진행하여 세포고사 억제기전을 구명하고자 하였다.

地黃飮子를 전처리한 세포군은 항산화제인 GSH를 처리한 세포군과 비슷한 수준으로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 세포독성을 감소시켰고(Fig. 4), DNA 분절 현상을 억제하였다(Fig. 5). 또한 Caspase-3와 -9 protease의 활성을 정상 세포 수준으로 감소시켰으며(Fig. 6), mitochondria의 막전위 변화도 정상 세포와 비슷한 수준으로 변화시켰다(Fig. 7). 또한 地黃飮子 전처리 후 PARP의 분절과 Bcl<sub>2</sub>의 발현 증가를 확인하였으나, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의하여 증가된 p53은 地黃飮子の 전처리에 유의한 변화를 나타내지 않았다(Fig. 8).

이상의 실험으로 地黃飮子が HUVEC 세포의 산화적 손상에 의한 세포고사 기전에서 mitochondria의 기능 손상과 caspase family cysteine protease의 활성을 억제하고, Bcl<sub>2</sub>의 발현을 조절하여 결과적으로 세포고사를 억제하였음을 알 수 있었으며, 地黃飮子에 의한 단백질 발현 양상의 변화를 확인하였다. 본 실험의 연구 결과를 토대로 地黃飮子是 혈관내피세포의 산화적손상에 대한 방어효과가 예상된다.

## 결론

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 혈관내피세포의 산화적 손상에 대한 地黃飮子の 효과 및 기전을 구명하기 위하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 단독처리한 세포군과 地黃飮子를 전처리한 세포군의 세포의 생존율, DNA 분절, caspase family cysteine protease의 효소 활성 및 관련 단백질의 발현 등을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 HUVEC 세포의 산화적 손상은 세포 생존율을 감소시켰고, DNA 분절과 caspase family cysteine protease의 효소적 활성,

mitochondria 기능 장애, 세포고사 관련 단백질 발현 변화 등을 초래하여 세포고사를 유도하였다.

2. 地黃飮子是 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 HUVEC 세포의 생존율을 유의성 있게 회복시켰으며, DNA 분절을 억제하였다.
3. 地黃飮子是 caspase-3, -9 protease의 활성을 유의성 있게 감소시켰으며, mitochondria의 기능 장애를 억제하였다.
4. 地黃飮子是 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 분절된 PARP를 정상적으로 조절하였으며, 발현 감소한 Bcl<sub>2</sub>의 발현을 유의성 있게 증가시켰다.

이상의 결과로 보아 地黃飮子是 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유도된 산화적 손상을 억제시키는 효과가 있었으며, 이는 세포고사 기전인 caspase family cysteine protease, mitochondria의 변화에 관여되는 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. Berlett B.S., Stadtman E.R. Protein oxidation in aging, disease, and oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 1997; 272(33):20313-20316.
2. Midwinter R.G., Vissers M.C., Winterbourn C.C. Hypochlorous acid stimulation of the mitogen-activated protein kinase pathway enhances cell survival. *Arch. Biochem. Biophys.* 2001;394(1):13-20.
3. Yuan J., Cheng J., Qin X. The role of released cytochrome c from mitochondria in the apoptosis of HUVECs induced by hydrogen peroxide. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi.* 2001; Dec. 17(6):360-363.
4. Czapski G.A., Avram D., Sakharov D.V., Wirtz K.W., Strosznajder J.B., Pap E.H. Activated neutrophils oxidase extracellular proteins of endothelial cells in culture : effect of nitric oxide donors. *Biochem. J.* 2001;365(Pt3):897-902.
5. Estrada-Garcia L., Carrera-Rotllan J., Puig-Parellada P. Effects of oxidative stress and antioxidant treatments on eicosanoid synthesis and lipid peroxidation in long term human umbilical vein endothelial cells culture. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2002;67(1):13-25.
6. 南昌圭. 四物湯이 血管內皮細胞에 미치는 影響. 원광대학교 대학원. 1998.

7. 대한병리학회. 병리학. 서울:고문사. 1997:439-449.
8. 헤리슨 번역 편찬위원회. HARRISON'S 내과학. 서울: 정담. 1997:1189-1193.
9. 劉河間. 宣明論方(醫方類聚卷五). 臺北:中和世界資料供應出版社. 1980:4393.
10. 전통의학연구소. 동양의학대사전. 서울:정보사. 2000:2164.
11. 彭懷仁. 中國處方大辭典. 서울:영신문화사. 1990:3794-3795, 3844.
12. 王肯堂. 證治準繩(卷一). 上海:上海科學技術出版社. 1984:9-10.
13. 黃度淵. 證脈方藥合編. 서울:南山堂, 2000:121-122.
14. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:南山堂, 2000:518.
15. 尹用甲. 東醫方劑와 處方解說. 서울:醫聖堂, 1998:373-374.
16. 鄭遇悅, 安圭錫. 한방임상병리학. 서울:永林社. 1998:530-532.
17. Mitumoto A., Takanezawa Y., Okawa K., Iwamatsu A., Nakagawa Y. Variants of peroxiredoxins expression in response to hydroperoxide stress. *Free Radic Biol. Med.*, 2001 ; 30(6) : 625-635.
18. 김숙희, 김화영. 노화. 서울:민음사. 1995:13-17.
19. 의학교육연수원. 노인의학. 서울:서울대학교출판부. 1997:27-35, 275-277.
20. 張璐. 張氏醫通. 서울:一中社. 1991:205.
21. 羅昌洙, 孟雄在, 蔡禹錫. 한의학기초이론. 서울:의성당. 2000:140-153.
22. 朴鍾雲. 四物湯이 老化白鼠 腦組織의 生化學的 變化에 미치는 影響. 원광대학교 대학원. 1997.
23. 楊維傑. 內經靈樞解析. 서울:대성문화사. 1990:1-12.
24. 洪元植 편저. 黃帝內經. 서울:高文社. 1974:126-127.
25. Green D.R., Reed J.C.. Mitochondria and apoptosis. *Science*. 1998 ; 281(5381) : 1309-1312.
26. Gottlieb R.A.. Mitochondria and apoptosis. *Biol. Signals Recept*. 2001 ;10(3-4) : 147-161.
27. Yuan J., Cheng J., Qin X. The role of released cytochrome c from mitochondria in the apoptosis of HUVECs induced by hydrogen peroxide. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi*. 2001;17(6) : 360-363.
28. Newton K., Strasser A.. Ionizing radiation and chemotherapeutic drugs induce apoptosis in lymphocytes in the absence of Fas or FADD/MORT1 signaling. Implications for cancer therapy. *J. Exp. Med.* 2000; 191(1) : 195-200.