

원 저

산화적 손상으로 유발된 심근세포 고사에 대한 瓊玉膏의 방어효과

신신희, 양경석

원광대학교 전주한방병원 심계내과교실

Protective Effects of *Gyungokgo* on Oxidative Stress-Induced Apoptosis of H9c2 Cardiomyoblast Cells

Sun-Ho Shin, Kyung-Suk Yang

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

Backgrounds & Objectives : The water extract of *Gyungokgo* (*GOG*) has traditionally been used for treatment of general weakness and hemoptysis in oriental medicine. However, little is known about the mechanism by which the water extract of *GOG* rescues cells from these damages. This study was designed to investigate the protective mechanisms of *GOG* on H₂O₂-induced cell death in H9c2 cardiomyoblasts.

Methods : In this study, we used H9c2 cells. Cells were treated with oxidative stress in the absence and presence of 1000 μ g/ml *GOG* for 12hrs. Cells were treated with various concentrations of *GOG* for 12hrs. Cell viability was measured by MTT assay. Oxidative stress, which markedly decreased the viability of H9c2 cells, was characterized by apparent apoptotic features such as chromatin condensation as well as fragmentation of genomic DNA and nuclei.

Results : *GOG* significantly reduced H₂O₂-induced cell death and apoptotic characteristics. The cotreatment of *GOG* and H₂O₂ in H9c2 cells also induced the phosphorylation of ERKs in a time-dependent manner. Moreover, PD098059, a MEK1 (upstream activator of ERK) inhibitor attenuated the protective effect of *GOG* on H₂O₂-induced cytotoxicity in H9c2 cardiomyoblast cells.

Conclusions : These results suggest that MEK/ERK pathways play important roles in the protective effects of *GOG* in H9c2 cells. Taken together, they suggest that the protective effects of the water extracts of *GOG* against oxidative damages may be mediated by the regulation of HO-1, Fas/FasL and Bcl-XS proteins.

Key Words: *Gyungokgo*, oxidative stress-induced apoptosis, cardiomyoblast cells

서 론

瓊玉膏는 許¹⁾의 【東醫寶鑑】에서 填精補髓, 調眞養性, 返老還童하며 補百損, 除百病, 萬神俱足, 五藏盈溢, 髮白復黑, 齒落更生, 行如奔馬한다고 수록되어 있으며, 延年益壽, 不死強精하는 효능으로 제반 전신허약 증에 응용되고 있는 처방이다.

세계적으로 증가추세에 있는 심혈관계 질환은 고혈압, 고지혈증, 죽상동맥경화증 등을 원인으로 심장

- 접수 : 2004년 7월 28일 · 논문심사 : 2004년 8월 15일
- 채택 : 2004년 8월 25일
- 교신저자 : 신신희, 전주시 덕진구 덕진동2가 142-1번지 원광대학교 전주한방병원 2내과
(Tel: 063-270-1013, Fax: 063-270-1199, E-mail: shshin@wonkwang.ac.kr)
- 본 논문은 2004년도 원광대학교 교비 연구비 지원에 의해 이루어짐

에 허혈상태를 초래하여 심근세포 손상을 일으키는 것으로 알려졌으며, 이 때 관여하는 산화적 손상은 심혈관계 질환의 주요 발생원인으로 작용하고 있다. 동맥경화증, 대동맥협착증, 판막질환 등은 일시적 혹은 지속적인 허혈상태를 야기하고 약물이나 수술에 의한 재관류시 심근세포에서 활성산소종이 생성되어 심근세포를 손상시킨다²⁾. 활성산소종은 활성화된 호중구, xanthine oxidase, 미토콘드리아 호흡 및 아라키돈산 대사 과정을 통해서 생성되는데³⁾, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 효소 등이 세포내에서 생성된 활성산소종을 제거하기 위한 생리적 방어기전으로 작용하지만 과도한 활성산소종은 방어체계를 초과하여 세포손상을 초래한다⁴⁾.

瓊玉膏에 대한 실험적 연구로는 서 등⁵⁾의 瓊玉膏 및 瓊玉膏加味方이 폐암에 미치는 영향, 이 등⁶⁾의 瓊玉膏와 瓊玉膏加味方의 면역활성에 관한 연구, 황 등⁷⁾의 瓊玉膏의 생리활성-고혈당, 고혈압, 지구력 및 체중감소에 미치는 영향, 황 등⁸⁾의 瓊玉膏의 생리활성-염증, 위궤양, 진통 및 정상체온에 미치는 영향 등이 보고되고 있지만, 심혈관계에 대한 작용에 관해서는 보고되지 않았다.

특히 심혈관계 질환은 발병 후 심각한 합병증 및 지속적인 치료가 요구되는 질환으로 질병의 예방이 치료보다도 더욱 중요하게 인식되고 있다.

이에 저자는 심근세포의 산화적 손상에 미치는 瓊玉膏의 방어효과를 구명하기 위하여 H9c2 세포에서 H₂O₂에 의해 산화적 손상을 유발시킨 후, 산화적 세포독성에 대한 瓊玉膏의 효과를 알아보고, 이 때 관여하는 항산화 관련 효소인 Heme Oxygenase-1 및 관련 단백질의 발현양상을 조사하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 材料

1) 세포주

Embryonic rat 심장에서 유래한 세포주인 H9c2(ATCC, CRL1446)는 CO₂ 세포배양기에서(37℃, 5% CO₂) 10%

Table 1. Prescription of GOG

Herb	Scientific Name	Dose(g)
生地黃	<i>Rehmanniae Rhizoma</i>	9,600g
人蔘	<i>Ginseng Radix</i>	960g
白茯苓	<i>Hoelen Alba</i>	1,920g
白蜜	<i>Mel</i>	6,000g
Total amount		18,480g

우태아 혈청이 포함된 DMEM에서 배양하였다. 48시간 주기로 0.05% Trypsine-EDTA를 사용하여 계대 배양하였으며, 분주 12시간 후에 약재를 처리하여 세포 죽음과 연관된 생화학적 실험을 수행하였다.

2) 약재

본 실험에 사용된 瓊玉膏의 처방내용과 제조방법은 許⁹⁾의 【東醫寶鑑】에 의거하였으며, 약재는 원광대학교 전주한방병원에서 구입하여 정선한 것으로 사용하였고 한 제의 내용과 분량은 다음과 같다(Table. 1)

3) 시약 및 기기

H₂O₂, methylthizol-2-yl-2, 5-diphenyl, tetrazolium bromide(MTT) 및 crystal violet은 Sigma사(St. Louis, Missouri, USA)로부터 구입하여 사용하였다. Duplecco's modified Eagle's medium(DMEM), 항생제, trypsin 및 우태아 혈청(fetal bovine serum)은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA)에서, 배양용기(24-well plate, 10cm dish)는 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. HO-1, Fas/FasL, Bcl-X_L, ERK1/2 및 phospho-ERK1/2 등에 대한 항체는 Santa Cruz사(San Diego, CA, USA)에서, anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase와 Enhanced chemiluminescence kit(ELC kit)는 Amersham사(Buckinghamshire, England)에서 구입하여 사용하였다.

2. 方法

1) 시료의 조제

실험에 사용된 약재는 물을 용매로 추출하였다. 물 추출물은 고형제제인 瓊玉膏 100g에 물 1,000ml와 함께 냉각기를 부착한 환저 플라스크에서 3시간 끓인 다음 거즈로 여과하고 3,200rpm으로 20분간 원심분리를 시행한 후 농축기(rotary evaporator)로 농축한

다음 -70℃(deep freezer)에서 12시간 이상 동결시키고 freeze dryer로 동결건조시킨 것을 시료로 사용하였다.

2) H9c2 세포주 배양 및 시약처리

H9c2는 CO₂ 세포배양기(37℃, 5% CO₂)에서 10% 우태아 혈청이 포함된 DMEM으로 배양하였으며, 24시간 간격으로 배양액을 교체하여 log phase에 있는 세포에 瓊玉膏를 처리한 후 세포고사 현상과 이에 연관된 생화학적 실험을 수행하였다.

3) 세포생존을 측정

세포생존율은 세포배양판(24-well plate)에 세포(1×10⁵cells/ml)를 1ml씩 분주하여 12시간 이상 CO₂ 세포배양기 안에서 안정시킨 후, 실험에 필요한 시약을 처리한 다음, 배양액 최종부피의 1/10 MTT 용액(5mg/ml in PBS)을 첨가하여 4시간 반응하였다. 생존 세포에 의해 형성된 보라색 formazan은 10% sodium-dodesyl sulfate(SDS)가 포함된 0.01N HCl 용액 0.1ml/well을 세포에 첨가하여 용해시킨 다음 분광광도계(ELISA reader, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

4) Protocol

산화적 손상에 의한 심장질환 모델을 만들고 瓊玉膏의 효과를 알아보기 위하여 다양한 실험 group을 만들었다. 먼저 산화적 손상을 주기 위하여 H₂O₂를 세포에 직접 주입하였으며, 한약재는 동시처리, 30분 전처리 및 12시간 전처리를 시행하여 효과를 비교하였다(Fig. 1).

5) DAPI 염색

瓊玉膏를 처리한 세포를 4% formaldehyde 용액에 고정시킨 후 PBS로 세척하고 0.01mM DAPI로 10분간 염색한 후 다시 PBS로 세척하여 형광현미경(Leica MPS 60, Germany)으로 DNA의 분절현상을 관찰하였다.

6) H₂O₂ 생성의 측정

H9c2 세포의 상층액을 세포배양판에 0.1ml씩 분주하고, 0.2-0.4μM HRP와 1-2μM scopoletin을 실온에서 10분간 반응시켰다. 생성된 H₂O₂에 의해 감소된 scopoletin의 형광을 대조군과 비교하여

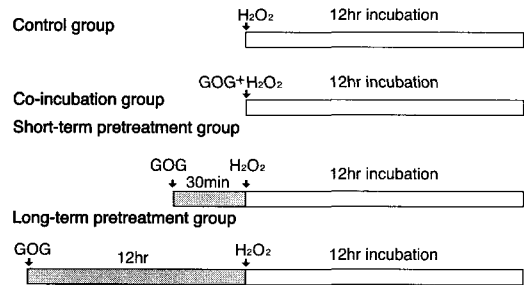


Fig. 1. The experimental protocol

fluorometer(Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA)로 450nm의 파장에서 측정하였다.

7) Western blot analysis

세포는 瓊玉膏를 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. 세포파쇄액은 13,000rpm에서 20분간 원심분리하여, 상층액은 BCA용액을 이용하여 단백질을 정량하였다. 동량의 세포파쇄액(단백질 : 0.2mg)은 2× sample buffer와 혼합하여 100℃에서 5분간 가열한 후 12.5% SDS-PAGE를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질은 semi-dry방법으로 실온에서 단위 면적당 0.8mA 전하를 2시간 걸어주어 nitrocellulose membrane 상에 이동시켰다. Nitrocellulose membrane은 blocking buffer(5% skim milk)와 상온에서 1시간 반응시켜 비특이적 항체결합을 예방하였다. HO-1, Bcl-X_Ls, Fas, FasL, ERK1/2 및 phospho-ERK1/2에 대한 항체는 0.01%(v/v)의 Tween-20이 포함된 3% skim milk/TBS에 1:1,000으로 희석하여 상온에서 3시간 반응시킨 후, 이차항체(anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase)와 1시간 반응시켰다. Nitrocellulose membrane은 TBS로 3회 세척한 후 ECL kit를 사용하여 ECL 필름에 현상하였다.

8) 통계처리

표시된 결과는 3회 이상의 독립적인 실험결과이

며, 실험결과의 통계처리는 Student's *t*-test에 준하여 처리하였고, *p*-value가 최대치 0.05(*p*<0.05)이하인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 산화적 손상에 의한 H9c2 심근세포의 생존율 변화
산화적 손상에 의한 H9c2 심근세포의 생존율 변화를 알아보기 위하여 다양한 농도의 H₂O₂를 12시간 처리하여 MTT 방법으로 측정하였다. 세포의 생존율을 살펴보면 0.05mM H₂O₂ 처리군에서는 대조군의 73%, 0.1mM 농도에서는 31%로 현저히 감소하였으며, 0.2mM의 농도에서는 25% 미만으로 감소하였다(Fig. 2A). 또한, 0.15mM H₂O₂를 다양한 시간으로 처리한 결과, 처리 2시간 후부터 서서히 감소하기 시작하여 처리 6시간에는 약 62%의 세포생존율을 보였으며, 처리 10시간에는 38%, 12시간에는 34%로 급격히 감소하여(Fig. 2B) H₂O₂에 의한 H9c2 세포독성은 시간이 경과함에 따라 축적되었고, DNA의 분절을 보이는 전형적인 세포고사임을 DAPI염색을 통하여 확인하였다(Fig. 3).

2. 瓊玉膏가 H₂O₂에 의한 H9c2 세포고사에 미치는 영향

H9c2 세포주에서 H₂O₂에 의해 유발되는 세포고사에서 瓊玉膏의 방어효과를 조사하고자 하였다. 먼저 세포에 0.5mg/ml 및 1mg/ml의 瓊玉膏를 실험 protocol에 따라 동시처리, 30분 및 12시간 전처리한 후 H₂O₂(0.15mM)을 처리하여 세포생존율의 변화를 MTT 방법으로 조사하였다. 그 결과 1mg/ml의 농도에서 瓊玉膏 단독처리에 의한 세포독성은 관찰되지 않았으며 H₂O₂(0.15mM)를 12시간 처리한 H9c2 세포의 생존율은 39%미만으로 감소하였으나, 瓊玉膏의 경우 동시처리시 0.5mg/ml의 농도에서 44%, 1mg/ml의 농도에서 48%의 세포생존율을 보였으며, 30분 전처리시 약 52%, 82%의 세포생존율을 보였으며, 12시간 전처리군에서는 72%와 89%로 현저한 세포생존율의 회복을 보였다(Fig. 4A). 또한 세포배양판(24-well

plate)에서 crystal violet으로 염색하여 瓊玉膏의 효과가 농도 의존적이었다(Fig. 4B).

3. 瓊玉膏가 H₂O₂에 의한 H9c2 세포고사에서 Heme Oxygenase-1의 발현 변화에 미치는 영향

H₂O₂에 의한 산화적 손상에 대한 瓊玉膏의 방어효과에서 생체내 항산화효소인 heme oxygenase-1(HO-1)의 발현에 따른 영향을 알아보하고자 western blot analysis를 시행하였다. H₂O₂ 단독처리시 시간 의존적으로 HO-1의 발현이 감소하였으며, 처리 10시간 후에는 발현이 관찰되지 않았다. 따라서 본 실험에서는 瓊玉膏의 HO-1의 발현에 대한 영향을 알아보기 위하여 H₂O₂ 처리시 50%의 세포생존율을 보이는 6시간 처리군에서 확인하였고(Fig.5A), 이 때 瓊玉膏 30분 전처리시 뚜렷한 방어효과를 보였으며, 그림 5A에서 처럼 발현이 감소하였던 HO-1은 瓊玉膏 처리시 농도 의존적으로 발현이 증가하여 대조군 수준으로 회복하였다. 이 때 단백질은 β -actin을 통하여 동량임을 확인하였다(Fig. 5B).

4. 瓊玉膏가 H₂O₂에 의한 H9c2 세포고사에서 Fas/FasL의 단백질 발현 변화에 미치는 영향

H₂O₂에 의한 산화적 손상에 대한 瓊玉膏의 방어효과에서 세포고사 조절 관련 단백질인 Fas/FasL의 발현에 따른 영향을 알아보하고자 Western blot analysis를 시행하였다. 0.15mM 농도의 H₂O₂ 처리 4시간 후부터 Fas 단백질의 발현 증가가 관찰되었다. 또한 Fas에 결합하는 FasL 단백질도 4시간 이후부터 발현이 증가하였다. 따라서 본 실험에서는 瓊玉膏의 Fas/FasL의 발현에 대한 영향을 알아보기 위하여 발현 증가가 시작되는 4시간에 0.5mg/ml 및 1mg/ml의 瓊玉膏를 H₂O₂ 30분 전처리를 시행한 후 그림 6A에서처럼 발현이 증가하였던 Fas는 瓊玉膏 농도 의존적으로 발현이 감소하였고, FasL의 발현도 감소하여 대조군 수준으로 회복하였다(Fig. 6B). 이때 단백질은 β -actin을 통하여 동량임을 확인하였다(Fig. 6C).

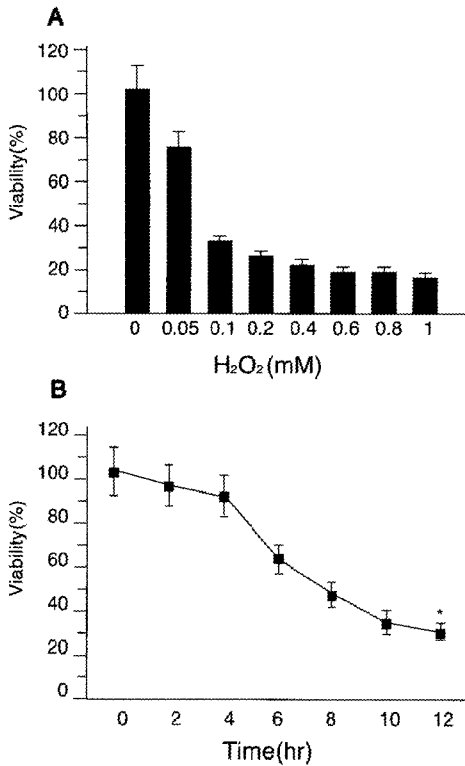


Fig. 2. H₂O₂ decreased the viability of H9c2 cells in a dose-dependent and time-dependent manner. Cells were treated with various concentration of H₂O₂ for 12 hrs (A), and were treated with 0.15mM of H₂O₂ for various times (B). Cell viability was measured by MTT assay. Results were expressed as mean ± S.D.(Standard deviation) of quadruplicates. * *p*<0.05, ** *p*<0.01 by Student's *t*-test, compared with control group.

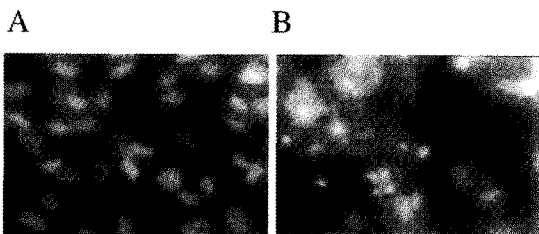


Fig. 3. H₂O₂ induced the death of H9c2 cells and DNA fragmentation. Cells were stained with DAPI and observed under fluorescence microscope. (A) control cells ; (B) Cells treated with 0.15mM H₂O₂ for 12hr

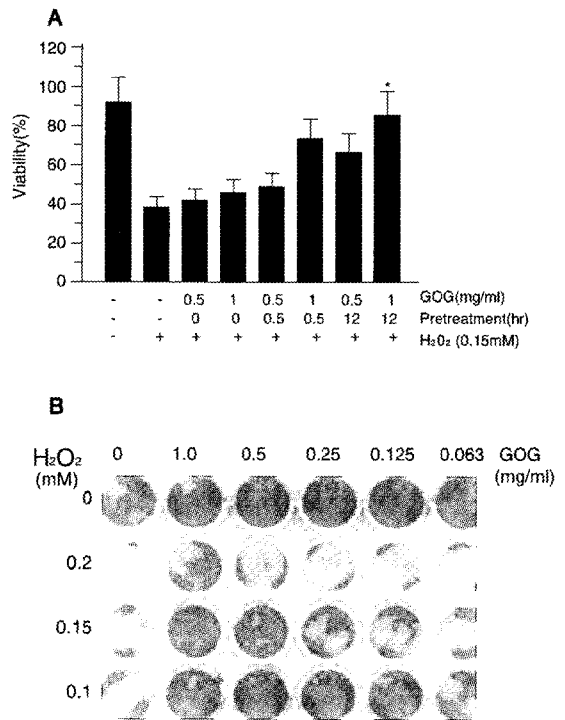


Fig. 4. GOG extract prevented the cytotoxicity by H₂O₂ in H9c2 cells in a dose-dependent manner. (A) Cells were pretreated with various concentrations of GOG for indicated time. Cell viability was measured by MTT assay. Results were expressed as mean ± S.D. of quadruplicates. * *p*<0.01 by Student's *t*-test. (B) Cells were stained with crystal violet.

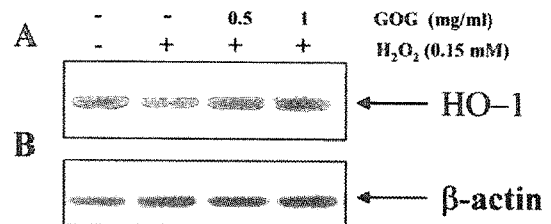


Fig. 5. GOG inhibited the increase in HO-1 expression by H₂O₂ in H9c2 cells in a dose-dependent manner. Cells were treated with various concentrations of GOG for 6hr. Cell lysates were used to measure the HO-1 and β-actin expression by Western blot analysis with anti HO-1 and anti β-actin antibodies.

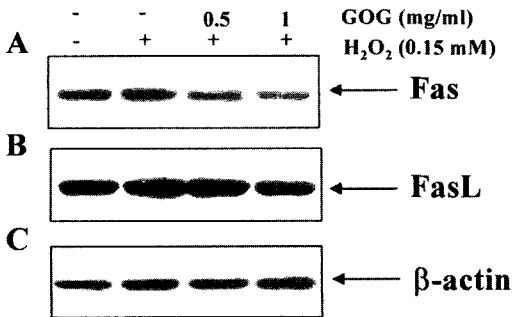


Fig. 6. GOG inhibited the increase in Fas and FasL expression by H₂O₂ in H9c2 cells in a dose-dependent manner. Cells were treated with various concentrations of GOG for 4hr. Cell lysates were used to measure the Fas, FasL and β-actin expression by Western blot analysis with anti Fas, anti FasL and anti β-actin antibodies.

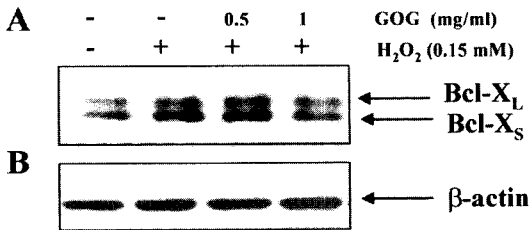


Fig. 7. GOG inhibited the increase in Bcl-XS expression as well as decrease in Bcl-XL expression by H₂O₂ in H9c2 cells in a dose-dependent manner. Cells were treated with various concentrations of GOG for 12hr. Cell lysates were used to measure the Bcl-X_{Us} and β-actin expression by Western blot analysis with anti Bcl-X_{Us} and anti β-actin antibodies.

5. 瓊玉膏가 H₂O₂에 의한 H9c2 세포고사에서 Bcl-XL과 Bcl-Xs의 발현 변화에 미치는 영향

H₂O₂에 의한 H9c2 세포고사에 대한 瓊玉膏의 방어 효과에서 세포고사 신호전달계중 미토콘드리아의 기능에 중요한 Bcl-X_L 및 Bcl-X_S의 발현에 따른 영향을 알아보기 위하여 western blot analysis를 시행하였다. H9c2 세포의 pro-apoptotic Bcl-X_S 단백질의 발현은 H₂O₂ 12시간 처리시 대조군에 비해 현저히 증가하였으나, 瓊玉膏 처리시 농도 의존적으로 발현이 감소하

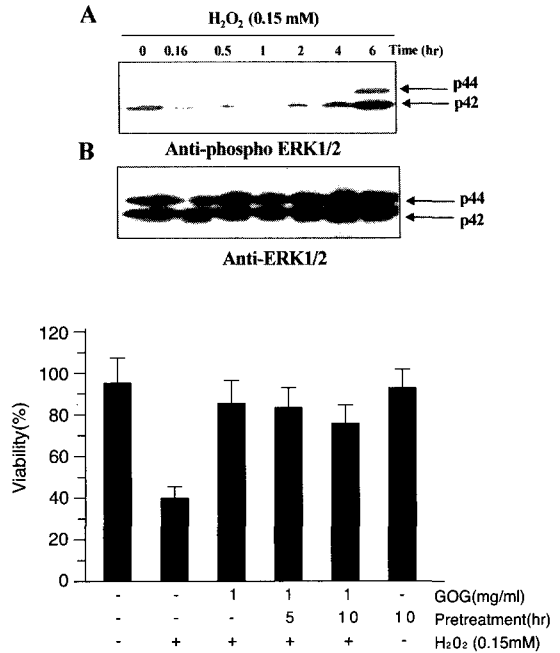


Fig. 8. Cell lysates were collected, and equal amounts of protein separated by 12.5% SDS-PAGE and analyzed by immunoblotting with anti-phospho ERK1/2 antibody(A). The same immunoblots were stripped and reprobed with anti-ERK1/2 antibody(B). (C) Effects of ERK1/2 inhibitor, PD98059 and GOG on H₂O₂-induced cell death of H9c2. Cells were treated with 0.15mM of H₂O₂. Cell viability was measured by MTT assay.

였다. 그러나 anti-apoptotic Bcl-X_L 단백질의 발현은 H₂O₂ 및 瓊玉膏 12시간 처리후 뚜렷한 발현 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 7A). 이 때 단백질은 β-actin을 통하여 동량임을 확인하였다(Fig. 7B).

6. 瓊玉膏가 H₂O₂에 의한 H9c2 세포고사에서 ERK1/2의 활성화에 미치는 영향

세포의 성장과 분화를 조절하는 주요 신호전달계인 MAPK 활성화에 대한 瓊玉膏의 관여 여부를 알아보

고자, 먼저 다양한 시간의 H_2O_2 (0.15mM) 단독처리군에서 ERK1/2 활성정도를 비교하였다. H_2O_2 에 의해 일어나는 H9c2의 세포고사에서는 6시간 이후에 활성화되어 나타났다(Fig. 8A). 이때 ERK1/2의 활성화는 단백질의 양적 변화가 아니라 인산화에 의해 이루어짐을 ERK1/2 antibody를 통해 동일한 membrane을 통해 strip하는 방법으로 확인하였다(Fig. 8B). 또한 ERK1/2의 상위단계인 MEK1의 특정 저해제인 PD98059를 瓊玉膏와 처리한 후 H_2O_2 (0.15mM)를 처리하여 생존율의 변화를 측정하였다. 瓊玉膏에 의해 40%에서 85%로 회복되었던 세포생존율이 PD98059에서는 최고 20 μ M 농도 처리시에 약 77% 수준으로 세포생존율이 감소되었다(Fig. 8C).

고 찰

생활환경의 변화로 인해 증가추세에 있는 동맥경화, 대동맥협착증, 판막질환 등은 일시적 또는 지속적인 허혈상태를 야기하고, 약물이나 수술적인 요법에 의한 개관류시 심근세포에서 O_2^- , H_2O_2 , 그리고 OH $^-$ 등의 활성산소종이 발생된다⁸⁾. 이러한 활성산소종 등은 활성화된 호중구세포, xanthine oxidase, mitochondrial respiration, 아라키돈산 등의 대사 등, 다양한 과정을 통해서 생성된다⁹⁾. 비록 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 효소 등의 세포내 생리적 방어체계가 작동하지만 과도한 활성산소종의 발생은 이러한 방어체계의 능력을 초과하여 세포손상을 초래하게된다¹⁰⁾. 이러한 활성산소종에 의한 심근세포의 손상은 세포고사로 알려져 있으며, 그 기전으로는 c-Jun NH2-terminal kinase(JNK)에 의한 caspase의 활성화와 그에 따른 DNA의 분절 등이 보고 되었다¹¹⁾.

심근세포의 산화적 손상에 대한 한약재의 방어효과에 관한 연구로는 한¹²⁾의 失笑散 煎湯液이 배양 심근세포에 미치는 영향, 조¹³⁾의 九香蟲 煎湯液이 배양 심근세포에 미치는 영향, 이¹⁴⁾의 炙甘草湯이 배양 심근세포에 미치는 영향, 박¹⁵⁾의 奪命散이 배양 심근세포 및 혈관평활근 세포에 미치는 영향 그리고 정¹⁶⁾의

배양 심근세포의 산화적 손상에 대한 四君子湯의 방어효과 등의 많은 연구가 진행되고 있으며, 여러 종류의 세포에서 세포고사를 방어하는 한약처방의 효능이 보고 되어 있다¹⁷⁾.

瓊玉膏는 人蔘, 生地黃, 白茯苓, 白蜜로 구성된 처방으로 填精補髓, 調眞養性, 返老還童하며, 補百損, 除百病하는 효능이 있는 것으로 알려져 있다¹⁾. 人蔘은 大補元氣, 補脾益氣, 寧心益智, 生津하는 효능이 있으며¹⁸⁻²⁰⁾, 生地黃은 清熱涼血, 滋陰生血하는 효능이 있다¹⁸⁻²⁰⁾. 白茯苓은 健脾補中, 利水滲濕, 寧心安神하는 효능이 있으며¹⁸⁻²⁰⁾, 白蜜은 補中潤燥, 解毒止痛하고 滋養緩和시키는 효능이 있다¹⁸⁻²⁰⁾. 또한 人蔘은 白茯苓과 배합하여 心氣不足, 心臟動悸로 인한 氣短, 脫力感を 치료하고, 地黃과 배합하여 氣血兩虛症을 치료한다²¹⁾.

약리작용을 살펴보면 人蔘은 강심작용, 혈압하강작용, 산소결핍상태에서 심근괴사를 억제하는 작용이 있고, 중추신경계에 대한 진정작용 등의 약리작용이 있으며, 生地黃은 강심작용, 이노작용, 혈당강하작용이 있으며, 혈액응고를 촉진한다. 茯苓은 이노작용, 항균작용, 혈당강하작용이 있으며, 정신안정의 효과가 있다²¹⁻²³⁾.

그러나, 허혈상태에서 야기되는 H_2O_2 에 의한 심근세포의 산화적 손상에 대한 한약처방의 방어효과 및 기전연구는 미흡한 실정이다. 이에 저자는 瓊玉膏에 의한 처방이 H_2O_2 등의 산화적 손상에 의한 H9c2 심근세포의 세포독성을 예방할 수 있는 가능성을 조사하고, 작용 기전 및 작용 표적 단백질을 발굴하고자 본 실험을 시행하였다.

먼저 H9c2 심근세포에 산화적 손상을 일으킬 수 있는 조건으로 0.15mM의 H_2O_2 에 직접 처리하였다. 그 결과 세포의 형태학적인 변화와 함께 핵의 응축과 분절이 관찰되었으며, 세포생존율이 39% 정도로 감소되었고(Fig. 2A), 또한 핵의 DAPI staining에서도 H_2O_2 에 의한 H9c2 세포 핵산의 DNA 분절과 chromatin의 응축이 관찰되는 실험조건을 수립하였다. 이렇게 유발된 H9c2 세포고사에 대한 瓊玉膏의 방어효과를 알아보기 위하여 동시처리군, 30분 전처리군 및 12시간 전처리군으로 구분하여 실험 protocol

을 정하였으며, 다양한 농도에서 세포생존율을 확인하였다. 그 결과 瓊玉膏 처리시 농도 의존적으로 산화적 손상에 대한 세포독성을 현저히 억제하였으며, 瓊玉膏 전처리 시간에 의존적으로 방어효과를 보였다(Fig. 4A). 瓊玉膏의 산화적 손상에 대한 방어효과는 neonatal primary cardiomyocyte에서도 동일한 효과를 보였다.

신체의 각 장기는 환경에서 오는 다양한 스트레스로부터 항상성을 유지하기 위하여 즉각적으로 반응한다. 카드뮴, 납, 수은과 같은 중금속이나 endotoxin이 체내에 들어오거나 heat shock, 자외선 활성산소, 저산소 상태에 노출되면, 장기는 스트레스에 대한 반응으로 다양한 단백질과 효소가 유도되면서 생체방어 작용이 일어난다. 대표적인 예로 헤모글로빈을 비롯한 heme 단백질의 보결분자족인 bilirubin, 그리고 일산화탄소와 환원철(Fe^{2+})로 분해하는 heme oxygenase(HO)를 들 수 있다. Bilirubin은 강력한 radical 보조작용을 통한 항염증작용 및 항산화작용이 있고, 일산화탄소는 혈관확장을 통한 장기의 혈류 유지 작용과 저산소증에 의한 산화적 손상에서 항염증작용을 통한 세포고사 방어작용이 알려져 있다²⁶. HO는 3가지 isozyme이 알려져 있는데, HO-2와 HO-3는 구성형 효소이고, HO-1은 각종 스트레스원에 반응하여 세포내에서 유도 발현되는 효소로 이 효소의 반응을 조사하여 스트레스 검출에 이용 할 수 있다. 또한 HO-1의 발현을 유도함으로써 산화적 손상에 의한 세포고사로부터 세포를 방어할 수 있음이 보고되었다²⁶.

본 실험에서는 H_2O_2 (0.15mM) 처리시 HO-1은 시간 의존적으로 발현이 감소되었고, 瓊玉膏 전처리에 의해 대조군 수준으로 회복되었다(Fig. 5A). 이상의 결과는 瓊玉膏가 세포내 HO-1의 발현에 직접적으로 관여하였으며, 이렇게 증가된 HO-1에 의해 H_2O_2 와 같은 산화적 손상으로부터 H9c2 세포를 방어하는 것으로 생각된다.

세포고사를 조절하는데 관여하는 여러 가지 유전자 산물 중에서 제일 먼저 알려진 암 유발 유전자 산

물의 하나인 Bcl-2 family 단백질 중 Bcl-X_L 단백질은 다른 암 유전자와는 달리 세포증식에는 관여하지 않고 세포고사를 억제한다²⁶. 그러나 Bcl-X_L의 short form인 Bcl-X_S는 세포고사를 촉진한다²⁷. 또한 Bcl-2 family 단백질은 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 있다²⁷. 특히 Bcl-2 family 단백질은 c-terminal이 소수성 막으로 구성되어 미토콘드리아의 막에 결합할 수 있다²⁸. 다양한 자극시 Bcl-2나 Bcl-X_L을 과발현시켰을 경우, 미토콘드리아 막전위의 상실이나 cytochrome c의 방출이 방지됨이 보고되었다²⁹. 반대로 Bax나 Bak 단백질을 과발현시켰을 경우에는 cytochrome c의 방출을 촉진하였고, 미토콘드리아 막탈전극을 유도한다³⁰. H_2O_2 는 H9c2 세포고사에서 Bak이나 Bax의 발현 증가와 Bcl-2 및 Bcl-X_L의 발현 감소를 초래하였고, 이러한 apoptogenic Bak의 발현 증가와 비교된 antiapoptotic Bcl-2 및 Bcl-X_L 발현 감소에 따른 비율의 감소가 초래되어 H_2O_2 에 의한 H9c2 세포고사를 촉진함이 보고되었다³¹.

본 실험에서도 瓊玉膏는 증가된 세포고사 촉진 단백질인 Bcl-X_S의 발현 감소를 유도하여 H_2O_2 세포독성을 방어하였다. 그러나 세포고사 억제 단백질인 Bcl-X_L의 발현에는 변화가 없었다(Fig. 7A). 한편, FasL에 결합함으로써 세포의 고사를 유발시킨다고 알려진 세포막 단백질인 Fas 단백질의 발현 양상도 동일하였다(Fig. 6A and 6B). Fas는 자외선, 바이러스 감염, wild-type p53, 저산소증 등에 의해 림프구 및 간세포 등에서 발현되어 진다. Resting 상태의 림프구는 Fas의 발현이 낮거나 없는 상태이며 세포의 활성화시 발현이 증가되어 Fas-FasL 매개성 세포고사를 촉진시키게 된다^{32,33}. 본 실험에서도 다양한 시간 동안 Fas와 FasL 단백질의 발현양상을 관찰한 결과, 4시간 이후부터 증가하기 시작하였다. 그러나 瓊玉膏 처리시에는 세포생존을 회복과 비례하여 대조군 수준으로 발현이 감소되었다(Fig. 6A and 6B). 또한 세포의 분화와

증식에 관한 FasL의 연구 결과가 보고되고 있어 H₂O₂ 유도성 세포고사에서 Fas의 역할에 대한 연구가 요구되어진다.

MAPK는 성장인자 등이 세포막에 위치한 수용체를 활성화하면 이 신호를 세포막에서 핵으로 전달함으로써 세포의 성장과 분화를 조절하는 주요 신호전달계이다. 포유동물에서 MAPK는 지금까지 3가지 (ERK, JNK/SAPK, p38) 이상이 발견되어 family를 이루고 있다³⁴⁻³⁵. MAPK는 MAPKKK→MAPKK→MAPK로 연결된 protein kinase cascade를 통하여 활성화된 후, 여러 가지 표적 유전자의 발현을 조절함으로써 세포반응을 유발한다³⁶. 성장인자는 주로 ERK 경로를 활성화하고 자외선 등의 스트레스, 그리고 TNF 등의 염증성 사이토카인은 주로 JNK와 p38의 경로를 활성화시킨다³⁷⁻³⁸. 그러나 이 경로들은 완전히 독립된 것이 아니어서, 자극이나 세포의 종류에 따라서 여러 가지의 MAPK가 서로 다른 정도로 활성화되고, 이에 따라 서로 다른 기질을 서로 다른 정도로 인산화함으로써 다양한 신호에 따르는 세포 반응의 특이성을 나타내는 것으로 보고되었다³⁹.

본 실험에서는 0.15mM의 H₂O₂ 처리시 ERK1/2의 활성화 정도와 ERK1/2의 저해제인 PD98059를 각각 한약재와 처리한 후 H₂O₂(0.15mM)를 처리하여 신호 전달의 경로를 알아보았다. Western blot을 통해 ERK1/2의 활성을 확인한 결과 H₂O₂ 단독처리 6시간에 활성화가 관찰되었으나, PD98059에 의해서는 세포생존율의 변화는 관찰되지 않았다(Fig. 8C). 그러나 박³⁹의 연구결과에 의하면, ERK1/2의 저해제인 PD98059에 의해 四物湯의 H₂O₂에 의한 세포죽음에 대한 방어효과가 저해되었고, Western blot을 통해 ERK1/2의 활성을 확인한 결과 H₂O₂ 단독처리시보다 이른 시간대에 활성화가 이루어져 세포생존의 기전은 ERK1/2의 활성화 경로가 밀접하게 관여되어 있음이 보고되었다.

이상의 연구 결과를 종합하면 H₂O₂에 의해 유도된 H9c2 심근세포의 죽음은 세포의 형태적 변화를 동반한 DNA의 분절, HO-1의 발현 감소, Fas/FasL 및 Bcl-XS 단백질의 발현 증가를 보이는 전형적인 세포고사

현상이었다. 이에 대한 방어효과를 보이는 瓊玉膏는 DNA 분절 및 세포고사성 단백질의 발현 조절을 통하여 H₂O₂에 의한 직접적인 산화적 손상의 방어 기작을 수행한 것으로 생각되며 이외의 작용기전에 대한 연구가 계속되어야 할 것으로 사료된다.

결론

H₂O₂의 산화적 손상으로 유도된 H9c2 심근세포의 죽음에 대한 瓊玉膏의 방어효과를 확인하기 위하여 세포생존율 변화, DNA 분절, HO-1의 단백질 발현, Fas, FasL 및 Bcl-XLs 단백질의 발현, ERK1/2의 활성화에 대한 영향을 관찰한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. H9c2 심근세포의 세포생존율은 H₂O₂ 시간 의존적으로 감소하였으며, 핵의 응축과 분절을 보이는 세포고사현상을 나타내었다.
2. 瓊玉膏는 H₂O₂에 의한 H9c2 심근세포의 세포고사를 전처리 시간과 농도에 의존적으로 유의성 있게 감소시켰다.
3. 瓊玉膏는 H₂O₂에 의해 발현이 감소된 HO-1 단백질의 발현을 농도 의존적으로 증가시켰다.
4. 瓊玉膏는 H₂O₂에 의해 발현이 증가된 Fas와 FasL 발현을 농도 의존적으로 감소시켰다.
5. 瓊玉膏는 H₂O₂에 의해 발현이 증가된 세포죽음 촉진 단백질 Bcl-XS의 발현을 농도 의존적으로 감소시켰다.

이상의 결과에서 瓊玉膏는 H₂O₂에 의한 산화적 손상으로부터 심근세포를 방어하는 효과를 나타냈으므로 허혈성 심장질환 등의 심혈관계 질환에 유효하게 활용될 수 있을 것으로 보이며, 산화적 손상을 예방하는 물질을 개발하는데 응용될 수 있으리라 생각된다.

參 考 文 獻

1. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:법민문화사. 1999:131-132.
2. Halliwell B and Gutteridge JMC. Protection against oxidants in biological systems: the superoxide theory of oxygen toxicity. In Free radicals in biology and medicine.

- 2nd Ed. Oxford:Clarendon Press. 1989:86-89.
3. 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.* 2001;43(2):173-178.
 4. 서부일 외. 瓊玉膏 및 瓊玉膏 加味方이 폐암에 미치는 영향. *대한본초학회지.* 2002;17(2):101-109.
 5. 이준우 외. 瓊玉膏와 瓊玉膏 加味方의 면역활성에 관한 연구. *대한본초학회지.* 2002;17(2):95-100.
 6. 황완균 외. 瓊玉膏의 생리활성(Ⅱ)-고혈당, 고혈압, 지구력 및 체중감소에 미치는 영향. *생약학회지.* 1994;25(1):51-58.
 7. 황완균 외. 瓊玉膏의 생리활성(Ⅲ)-염증, 위궤양, 진통 및 정상체온에 미치는 영향. *생약학회지.* 1994;25(2):153-159.
 8. Muscari C, Giaccari A, Giodafno E, Clo C, Guarnieri C and Caldarera CM. Role of reactive oxygen species in cardiovascular aging. *Mol Cell Biochem.* 1996;159-66.
 9. Kehrer JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease. *Crit Rev Toxicol.* 1993;23:21-48.
 10. Schlafer M, Myers CL, Adkins S. Mitochondrial hydrogen peroxide generation and activities of glutathione peroxidase and superoxide dismutase following global ischemia. *J Mol Cell Cardiol.* 1987;119:1195-206.
 11. Raff MC, Bares BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD. Programed cell death and the control of cell survival. *Science.* 1993;262:695-700.
 12. 한동훈. 失笑散 煎湯液이 배양 심근세포에 미치는 영향. *원광대학교 대학원.* 1999.
 13. 조현익. 九香蟲 煎湯液이 배양 심근세포에 미치는 영향. *원광대학교 대학원.* 2000.
 14. 이래춘. 炙甘草湯이 배양 심근세포에 미치는 영향. *동의생리병리학회지.* 1999; 14(2):179-187.
 15. 박세홍. 奪命散 煎湯液이 배양 심근세포 및 혈관평활근에 미치는 영향. *원광대학교 대학원.* 1999.
 16. 정우철. 배양 심근세포의 산화적 손상에 대한 四君子湯의 방어효과. *원광대학교 대학원.* 2002.
 17. Ishikawa Y, Kitamura M. Anti-apoptotic effect of quercetin intervention in the JNK- and ERK-mediated apoptotic pathways. *Kidney Int.* 2000;58(3):1078-1087.
 18. 兪小平 編著. 本草綱目精釋. 북경:과학기술문헌출판사. 1999:194-198, 312-3, 674-5.
 19. 黃官綉. 本草求真. 서울:의성당. 1997:2-4, 32-3, 137-8.
 20. 김창민 외. 한역. *중약대사전.* 서울:정담출판사. 1998:168-176, 2319-2326, 2365-2369, 4477-4498.
 21. 강병수. *임상배합본초학.* 서울:영림사. 1994:108-112, 264-267, 540-543.
 22. 육창수. *한약의 약리, 성분, 임상응용.* 서울:계축문화사. 1982:392-394, 453-455, 663-684.
 23. 김형균 외. *한약의 약리.* 서울:고려의학. 2000:29-32, 149-50, 323-4.
 24. Goda N, Suzuki K, Naito M, Takeoka S, Tsuchida E, Ishimura Y, Tamatani T, Suematsu M. Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver. Topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation. *J Clin Invest.* 1998;101(3):604-12.
 25. Hayashi S, Takamiya R, Yamaguchi T, Matsumoto K, Tojo SJ, Tamatani T, Kitajima M, Makino N, Ishimura Y, Suematsu M. Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme. *Circ Res.* 1999;85(8):663-71.
 26. Kroemer G, Dallaporta B, Resche-rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Nature Med.* 1998;6:614-620.
 27. Allen RT, Cluck MW, Agrawal DK. Mechanism controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases. *CMLS.* 1998;54:427-445.
 28. 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.* 1989;245:301-305.
 29. Herr I, Wilhelm D, Bohler T, Angel P and Debatin KM. Activation of CD95 (APO-1/Fas) signaling by ceramide mediates cancer therapy-induced apoptosis. *EMBO.* 1997;16:6200-6208.

30. Heibein JA, Barry M, Motyka B, Bleackley RC. Granzyme B-induced loss of mitochondrial inner membrane potential cytochrome-c release are caspase independent. *J Immunology*. 1999;163(9):4683-4693.
31. Park C, So HS, Shin CH, Back SH, Moon BS, Shin SH, Lee HS, Lee DW, Park R. Quercetin protects the hydrogen peroxide-induced apoptosis via inhibition of mitochondrial dysfunction in H9c2 cardiomyoblast cells. *Biochem Pharmacol*. 2003;66(7):1287-95.
32. Klaus SO, Davide F. Apoptosis signal by death receptors. *Eur. J. Biochem*. 1998;254:439-459.
33. Williams GT. programmed cell death, apoptosis and oncogenesis. *Cell*. 1991;45:1097-1098.
34. Blenis J. Signal transduction via the MAP kinase. *Proc. Nat. Acad. sci. USA*. 1993;90:5889-5994.
35. Chen WC, Chen CC. Signal transduction of arginine vasopressin-induced arachidonic acid release in H9c2 cardiac myoblasts. role of Ca²⁺ and the protein kinase C-dependent activation of p42 mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology*. 1999;140(4):1639-48.
36. Mizukami Y, Kobayashi S, Uberall F, Hellbert K, Kobayashi N, Yoshida K. Nuclear mitogen-activated protein kinase activation by protein kinase ζ during reoxygenation after ischemic hypoxia. *J Biol Chem*. 2000;275(26):19921-7.
37. Nagarkatti DS, Sha'afi RI. Role of p38 MAP kinase in myocardial stress. *J Mol Cell Cardiol*. 1998;30(8):1651-64.
38. Xia Z, Dickens M, Raingaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effect of ERK and JNK-p38 MAP kinase on apoptosis. *Science*. 1995;270: 1326-1331.
39. 박종운. H₂O₂에 의한 배양 심근세포 고사에 미치는 四物湯의 방어효과. 원광대학교 대학원. 2000.