

# 黃連解毒湯이 저산소증에 의한 培養心筋細胞枯死에 미치는 영향

정재은 · 유봉선 · 박진영 · 전인철 · 박상범 · 이대용<sup>1</sup> · 이민구<sup>1</sup> · 이 인 · 문병순<sup>1\*</sup>

원광대학교 한의과대학 심계내과학교실, 1:원광대학교 한의학 전문대학원 제3의학과

## Protective Effects of Hwangryunhaedog-tang on Hypoxia-induced Apoptosis in H9c2 Cardiomyoblast Cells

Jae Eun Jeong, Bong Seon Yu, Jin Yeong Park, In Cheol Jeon, Sang Beom Park, Dae Yong Lee<sup>1</sup>, Min Goo Lee<sup>1</sup>, In Lee, Byun Soon Moon<sup>1\*</sup>

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University,  
1: Department of 3rd Medicine, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University

The water extract of *Hwangryunhaedog-tang*(*HRHDT*) has been traditionally used for treatment of ischemic heart and brain damage in oriental medicine. However, little is known about the mechanism by which the water extract of *HRHDT* rescues cells from these damages. This study was designed to investigate the protective mechanisms of *HRHDT* on hypoxia-induced cytotoxicity in H9c2 cardiomyoblast cells. 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. However, *HRHDT* significantly reduced hypoxia-induced cell death and apoptotic characteristics. Also, *HRHDT* prevented the mitochondrial dysfunction including the disruption of mitochondria membrane permeability transition (MPT) and an increase in expression of anti-apoptotic Bcl-2 proteins in hypoxia-H9c2 cells. Taken together, this study suggests that the protective effects of the water extract of *HRHDT* against hypoxic damages may be mediated by the modulation of Bcl-2 and Bak expression.

Key words : *Hwangryunhaedog-tang*, hypoxia, H9c2, MPT, anti-apoptotic Bcl-2 proteins

### 서 론

黃連解毒湯은 葛<sup>1)</sup>의 《肘後備急方》에 “時氣溫疫症 若已六七日 熱極心下煩悶 狂言見鬼 慾起走煩嘔 不得眠口燥呻吟....”이라고 최초로 기재된 이래 傷寒, 丹毒, 不眠과 上·中·下 三焦의 積熱을 풀어주는 등 熱로 인한 제반질환이나 火病을 치료하는 기본 방제로 사용하고 있다. 최근 전 세계적으로 증가추세에 있는 심혈관계 질환으로는 고혈압, 고지혈증, 죽상동맥경화증 등이 있으며 이러한 질환의 주요 원인은 심장의 허혈상태로 초래되는 심근세포 손상으로 알려져 있다<sup>2)</sup>. 이때 관여하는 산화적 손상은 심혈관계 질환의 주요 발병인자로 작용한다<sup>3)</sup>. 특히 동맥경화증, 대동맥협착증, 관막질환 등은 일시적 혹은 지속적인 허혈상태를 야기시키고 약물이나 수술에 의한 재관류시 심근세포에서 활성산소종(reactive oxygen species: ROS)이 생성되어 심근세포를 손상시킨다. 활성

산소는 심혈관 계통의 허혈성 손상<sup>4)</sup>뿐만 아니라 암 발생<sup>5)</sup>이나 노화의 원인<sup>6)</sup>으로 연구되고 있다. 최근 黃連解毒湯에 대한 실험적 연구로는 崔<sup>7)</sup>의 機能性 頭痛, 韓<sup>8)</sup>과 金<sup>9)</sup>의 高血壓과 腎臟機能에 미치는 영향, 金<sup>9)</sup>의 高脂血症에 미치는 영향 등의 심혈관계 질환과 신장질환을 비롯해 孫<sup>10)</sup>의 抗菌活性作用 및 尹<sup>11)</sup>의 알러지성 질환 억제효과 등 면역반응에 대한 연구까지 다방면에 걸쳐 보고 되었다. 이에 저자는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 및 hypoxia에 의한 H9c2 심근세포의 사멸에 있어 黃連解毒湯 투여가 세포의 형태적 변화와 세포생존율에 미치는 변화를 살펴보고 세포고사에 관여하는 신호전달 분자인 Bak와 Bcl-2 단백질의 발현 및 DNA, PARP 분절과 미토콘드리아의 막전위 변화에 미치는 영향을 관찰한 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

### 재료 및 방법

#### 1. 재 료

##### 1) 세포주

Embryonic rat의 심장에서 유래한 H9c2(CRL1446) 심근세포

\* 교신저자 : 문병순, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 익산한방병원

· E-mail : mbs@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-2102

· 접수 : 2004/09/24 · 수정 : 2004/10/21 · 채택 : 2004/11/24

주는 ATCC (American Type Culture Collection)로부터 구입하여 계대 배양하면서 실험을 실시하였다.

2) 약재

본 실험에 사용된 黃連解毒湯의 처방내용은 黃의 《方藥合編》에 의거하였으며, 약재는 원광대학교 익산한방병원에서 구입하여 정선한 것으로 사용하였고, 한 첩의 내용과 분량은 다음과 같다.

Table 1. Prescription of Hwangryunhaedog-tang

| 韓藥名          | 生藥名                 | 重量(g) |
|--------------|---------------------|-------|
| 黃連           | RHIZOMA COPTIDIS    | 4.70g |
| 黃芩           | RADIX SCUTELLARIAE  | 4.70g |
| 黃柏           | CORTEX PHELLODENDRI | 4.70g |
| 梔子           | FRUCTUS GARDENIAE   | 4.70g |
| Total amount |                     | 18.8g |

3) 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 (methylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl, tetrazolium bromide), crystal violet은 Sigma사(St. Louis, Missouri, USA)로부터 구입하여 사용하였다. Bcl-2, Bak등의 항체들은 모두 Santa Cruz사(San Diego, CA, USA)에서, anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase 와 Enhanced chemiluminescence kit(ELC kit)는 Amersham사(Buckinghamshire, England)에서 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) 시료의 조제

실험에 사용된 藥材는 물을 용매로 사용한 추출방법을 사용하여 본 실험에 이용하였다. 물 추출물 (H<sub>2</sub>O extract)은 음건된 黃連解毒湯 100g을 물 1ℓ와 함께 냉각기를 부착한 환저플라스크에서 3시간 끓인 다음 거즈로 여과하고 3200rpm으로 20분간 원심분리 후 농축기(Rotary evaporator)로 농축한 다음 -70℃ (Deep Freezer)에서 12시간 이상 동결시키고 Freeze Dryer로 동결건조 시킨 것을 시료로 사용하였다.

2) H9c2 세포주 배양 및 시약처리

H9c2는 CO<sub>2</sub> 세포 배양기(37℃, 5% CO<sub>2</sub>)에서 10% 우태아 혈청이 포함된 DMEM으로 배양하였으며, 24시간 간격으로 배양액을 교체하여 log phase에 있는 세포에 아연 및 黃連解毒湯을 처리한 후 세포 고사현상과 이에 연관된 생화학 실험을 수행하였다. ZnCl<sub>2</sub>는 100mM 농도로 증류수에 녹여서 사용하였다.

3) 세포생존율 측정

세포생존율은 세포 배양판(24-well plate)에 세포(1×10<sup>5</sup> cells/ml)를 1ml씩 분주하여 12시간 이상 CO<sub>2</sub> 세포배양기 안에서 안정시킨 후 실험에 필요한 시약을 처리한 다음, 배양액 최종 부피의 1/10MTT 용액(5mg/ml in PBS)을 첨가하여 4시간 반응시켰다. 생존세포에 의해 형성된 보라색 formazan은 10%

sodium-dodesyl su.fate(SDS)가 포함된 0.01N HCl 용액 100μℓ/well을 세포에 첨가하여 용해시킨 다음 분광광도계(ELISA reader, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

4) Hypoxia condition

허혈성 심장질환 모델을 만들기 위하여 hypoxia chamber를 이용하였다. 실험을 위하여 5% CO<sub>2</sub>, 95% N<sub>2</sub>의 혼합가스를 주입하여 37℃ 세포배양기에서 배양하였으며, 한약재의 효과를 비교하기 위하여 10% FBS가 포함된 일반 DMEM 배지와 glucose와 serum을 뺀 DMEM 배지를 사용하였으며, 한약재는 일반배지에 희석하여 재관류하였다 (Fig. 1).

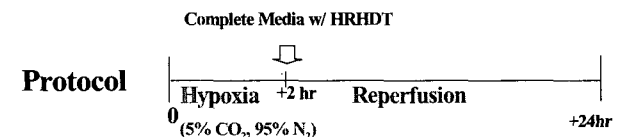


Fig. 1. Schematic representation of experimental paradigm used.

5) 세포의 형태적 변화 측정

세포의 형태적 변화를 조사하기 위하여 H9c2 세포에 黃連解毒湯을 처리한 후 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)으로 2회 세척하였다. 세포는 포르말데히드(3.7%)로 고정된 후 다시 PBS로 세척하여 위상차 현미경(Phase contrast microscope, Nikon, TE300, Japan)으로 관찰하였다.

6) Hoechst 염색

세포핵의 형태적 변화를 알아보기 위하여 hoechst 염색을 시행하였다. 黃連解毒湯을 처리한 세포는 4% 포르말데히드(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.

7) Western blot analysis

세포는 黃連解毒湯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 원심분리하여, 상층액은 BCA 용액을 이용하여 단백질질을 정량하였다. 동량의 세포 파쇄액(단백질 : 200μg)은 2×sample buffer와 혼합하여 100℃에서 5분간 가열한 후 12.5% SDS-PAGE를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질은 semi-dry 방법으로 실온에서 단위 면적당 0.8mA 전하를 2시간 부하하여 nitrocellulose membrane상에 이동시켰다. Nitrocellulose membrane은 blocking buffer(5% skim milk)와 상온에서 1시간 반응시켜 비특이적 항체결합을 예방하였다. Bcl-2, Bak 및 PARP에 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 1시

간 반응시켰다. Nitrocellulose membrane은 TBS로 3번 세척 후 ECL kit를 사용하여 ECL 필름에 현상하였다.

8) Rhodamine 123 염색

세포내 소기관인 하나인 미토콘드리아의 막전위(membrane potential)의 변화를 조사하기 위하여 Rhodamine 123 염색을 시행하였다. 黃連解毒湯이 처리된 세포들은 PBS로 2회 세척하였다. Rhodamine 123(10 $\mu$ g/ml)을 DMEM 배지에 희석하여 20분 CO<sub>2</sub> 배양기에서 반응시킨 후 다시 PBS로 세척하여 형광현미경 (Leica MPS 60, Germany)으로 관찰하였다.

9) 통계처리

표시된 결과는 3번 이상의 독립적인 실험결과이며, 실험결과 의 통계처리는 student's t-test에 준하여 처리하였고, p-value가 최대치 0.05(p < 0.05)이하인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

## 결 과

### 1. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 및 hypoxia에 의한 H9c2 심근세포의 생존율 변화

Hypoxia chamber를 이용하여 허혈상태에서 H9c2 심근세포 의 생존율 변화를 알아보기 위하여 산화적 손상의 조건으로 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하여 비교하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 H9c2 세포에 대한 세포독 성은 다양한 농도의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 12시간 처리하였으며, Hypoxia 조건 에서의 세포생존율의 변화는 10% FBS가 포함된 일반 DMEM 배 지와 글루코스 및 혈청이 빠진 DMEM 배지로 chamber에서 각 각 다양한 시간 동안 배양 후 세포생존율의 변화를 MTT 방법으 로 측정하였다. 세포의 생존율은 50 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리군에서는 대조 군의 73%, 100 $\mu$ M 농도에서는 31%로 현저히 감소하였으며, 200 $\mu$  M의 농도에서는 25% 미만으로 감소하였다(Fig. 2A).

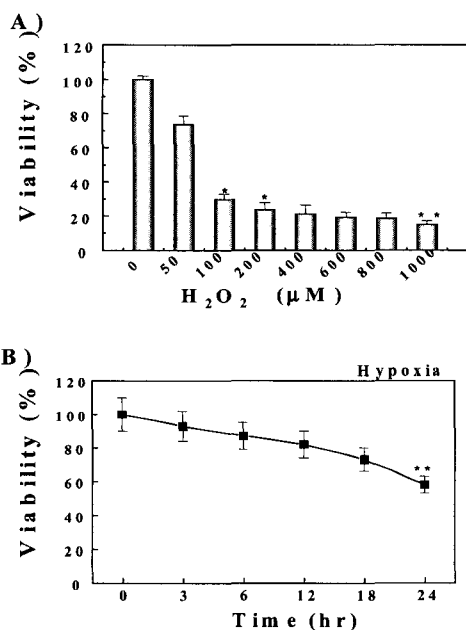


Fig. 2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and hypoxia decreased the viability of H9c2 cells in a dose and time dependent manner. Cells were treated with various concentrations of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 12hr(A), or hypoxia condition for various times(B). Cell viability was measured by MTT assay. Results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

또한, hypoxia에 의한 시간 의존적인 세포생존율의 감소는 chamber 배양 12시간 후부터 약 82%로 세포생존율이 감소하기 시작하였고, 18시간에는 69%, 24시간에는 65%로 감소하였으며 (Fig. 2B), 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 감소하였다(미발표 성적). 이때 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 H9c2 세포 독성 및 hypoxia 조건에서의 세포독성은 시간이 경과함에 따라 축적되었고, DNA의 분절을 보이는 전형적인 세포고사임을 hoechst 염색을 통하여 확인하였다(Fig. 3).

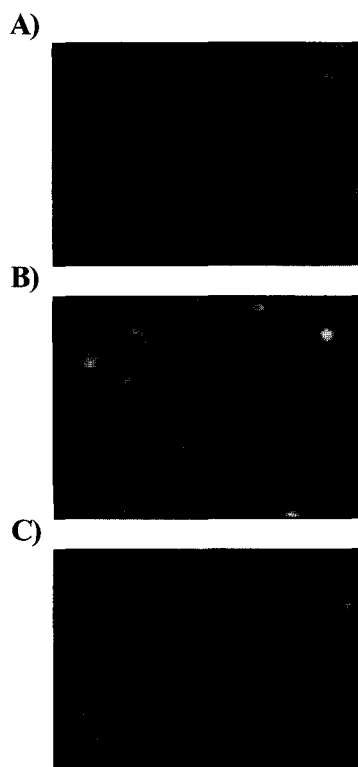


Fig. 3. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and hypoxia induced the death of H9c2 cells and nuclear fragmentation. Cells were treated with 150 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 12hr and hypoxia for 24hr. Cells were stained with hoechst 33342, and observed under fluorescence microscope. A), Control cells. B), 150 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> only and C), hypoxia condition only.

### 2. 黃連解毒湯이 hypoxia에 의한 H9c2 세포사멸에 미치는 영향

Hypoxia의 세포독성에 대한 黃連解毒湯의 효과를 조사하기 위하여 hypoxia 조건에서 2시간 동안 배양한 후 세포에 500 $\mu$ g/ml 및 1000 $\mu$ g/ml의 黃連解毒湯을 처리하여 총 24시간 배양 한 다음 세포생존율, 세포의 형태적 변화 및 세포핵의 분절을 관찰하였다. 세포생존율은 hypoxia 단독 처리시 58%를 보였으 나 黃連解毒湯 처리 실험군은 500 $\mu$ g/ml의 농도에서는 65%, 1000 $\mu$ g/ml의 농도에서는 93%를 보여 현저하게 세포생존율이 회복되었으며, 黃連解毒湯 자체 독성은 관찰되지 않았다(Fig. 4A). 또한 이때 hypoxia에 의한 세포의 형태적 변화 및 세포수의 감소가 黃連解毒湯 처리에 의하여 대조군 수준으로 회복되었다 (Fig. 4B).

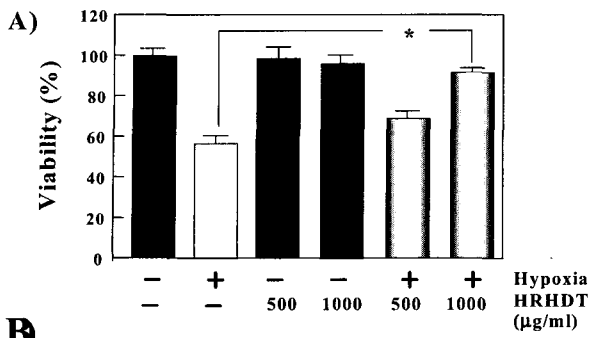


Fig. 4. A) HRHDT prevented the cytotoxicity by hypoxia in H9c2 cells in a dose-dependent manner. Cells were treated with various concentrations of HRHDT for 24hr. Cell viability was measured by MTT assay. Results were expressed as mean ± S.D. of quadruplicates. \* p<0.01 by student's t-test. B) Treatment of H9c2 cells with HRHDT prevented the morphological change by hypoxia. Cells were treated with hypoxia (24hr) alone, HRHDT (500, 1000µg/ml) alone and HRHDT with hypoxia for 24hr. Then, cells stained with crystal violet and observed under phase contrast microscopy.

3. 黃連解毒湯이 hypoxia에 의한 H9c2 세포의 DNA 분절에 미치는 영향

Hypoxia에 의한 H9c2 세포사멸의 특성을 알아보기 위하여 DNA 분절 현상을 hoechst 염색을 통해 확인하였다. Hypoxia 조건에서 24시간 단독으로 처리한 실험군과 黃連解毒湯(500, 1000 µg/ml)을 처리한 실험군에서 핵의 분절을 관찰하였다. Hypoxia 조건에서 배양한 H9c2 세포에서는 분절된 핵이 관찰되었으며, 이는 전형적인 세포고사에 의한 손상으로 생각되며, 黃連解毒湯 처리에 의해 대조군과 유사한 핵의 형태적 소견을 관찰할 수 있었다(Fig. 5).

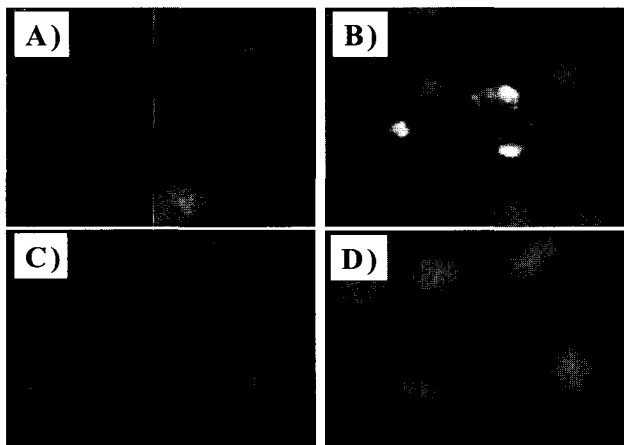


Fig. 5. Treatment of H9c2 cells with HRHDT prevented the morphological change and DNA fragmentation by hypoxia. Cells were treated with hypoxia (24hr) alone, and HRHDT with hypoxia for 24hr. Then, cells stained with hoechst and observed under florescence microscopy. A), control cells. B), cells treated with hypoxia. C), cells treated with hypoxia and 500µg/ml HRHDT, and D), cells treated with hypoxia and 1000µg/ml HRHDT.

4. 黃連解毒湯이 hypoxia에 의한 H9c2 세포의 PARP 분절에 미치는 영향

세포고사의 신호전달계에서 caspase family cysteine protease의 역할은 잘 알려져 있으며, caspase-3는 가장 중요한 effector 분자의 하나이다. Hypoxia에 의한 H9c2 세포의 고사기전에서 caspase-3의 세포내 표적 기질인 PARP의 발현을 western blot analysis로 조사하였다. Hypoxia 상태에서 18시간 단독처리시 PARP는 분절되어 이들 밴드가 사라지는 것으로 나타났다. 그러나 500µg/ml 및 1000µg/ml의 黃連解毒湯을 처리한 실험군에서는 hypoxia에 의한 이들 효소의 분해가 억제되어 대조군 수준의 발현을 나타내었다. 이때 단백질은 β-actin을 통하여 동량임을 확인하였다. 이상의 결과는 黃連解毒湯이 hypoxia에 의한 H9c2 세포의 세포고사에서 caspase-3 활성을 억제하는 효과가 있음을 시사한다(Fig. 6).

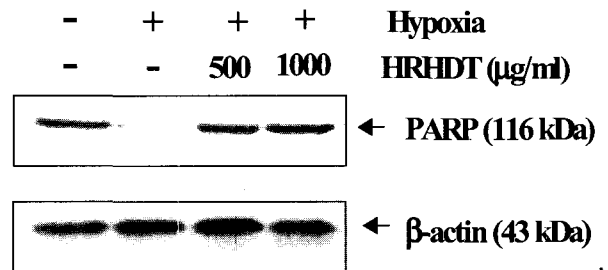


Fig. 6. HRHDT inhibited the degradation of PARP in hypoxia-treated H9c2 cells. Cells were incubated on hypoxia in the absence and presence of 500µg/ml and 1000µg/ml HRHDT for 18hr. Cell lysates were used to measure the expression of their patterns by western blotting with anti-PARP and β-actin antibodies.

5. 黃連解毒湯이 hypoxia에 의한 미토콘드리아 막전위에 미치는 영향

Hypoxia 처리에 의한 H9c2의 세포사멸은 핵의 분절을 보이는 전형적인 세포고사임을 확인하였다. 이에 미토콘드리아의 막전위 변화(membrane potential transition; MPT)를 관찰하기 위하여 Rhodamine 123 형광염색을 시행하였다. 18시간동안 hypoxia 조건에 노출된 H9c2 세포에서는 형태적인 변화와 함께 정상 대조군의 녹색 형광이 diffused-pattern으로 변하면서 세포질 전체에 균질하게 분포함을 확인하였으나, 500µg/ml 黃連解毒湯을 처리한 실험군에서는 미토콘드리아가 세포질에 국한되어 염색되면서 대조군과 동일한 punctuated-pattern으로 회복되었으며, 1000µg/ml의 黃連解毒湯 처리시 대조군과 유사한 수준으로 회복되는 소견을 보였다(Fig. 7).

6. 黃連解毒湯이 hypoxia에 의한 H9c2 세포고사에서 Bak 및 Bcl-2 단백질 발현에 미치는 영향

Hypoxia에 의한 세포고사 신호전달계에 있어 중요 기관인 미토콘드리아에서 Bak과 Bcl-2 단백질의 발현을 조사하였다. H9c2 세포에 500 및 1000µg/ml 黃連解毒湯을 처리한 후 hypoxia 조건을 처치한 세포부유액으로부터 Bak 및 Bcl-2 단백질의 발현을 western blot analysis로 조사하였다. H9c2 세포의

pro-apoptotic Bak 단백질의 발현은 hypoxia 12시간 처리시 대조군에 비교하여 현저히 증가하였지만 黃連解毒湯 처리시 농도 의존적으로 감소하였다. 또한 hypoxia 처리는 anti-apoptotic Bcl-2 단백질의 발현을 현저히 감소시켰으나 黃連解毒湯 처리에 의해 대조군 수준으로 회복되었다. 이때 단백질은  $\beta$ -actin을 통하여 동량임을 확인하였다(Fig. 8).

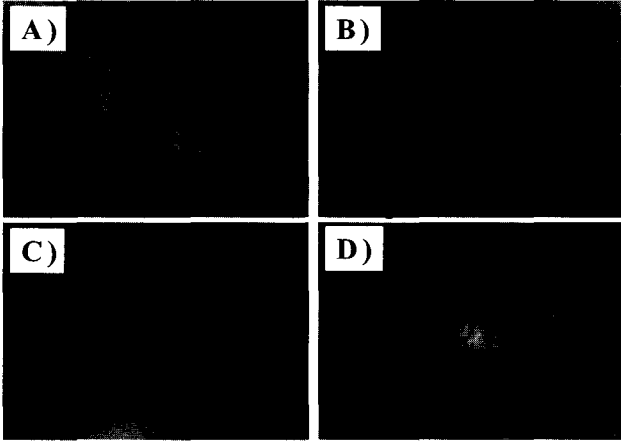


Fig. 7. HRHDT inhibited the disruption of mitochondrial membrane potential transition in hypoxia-induced H9c2 cells. Cells were treated with hypoxia in the absence(B) and presence of 500 $\mu$ g/ml(C) and 1000 $\mu$ g/ml(D) HRHDT for 19hr. (A), Control cells. Cells were stained with 10 $\mu$ g/ml of rhodamine 123 and visualized under a fluorescent microscope. The data were one of three independent experiments.

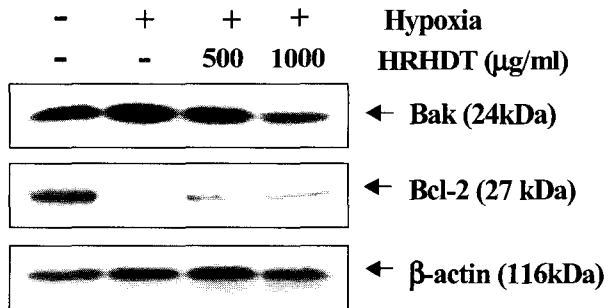


Fig. 8. HRHDT inhibited the decrease in Bcl-2 expression as well as increase in Bak expression by hypoxia in H9c2 cells. Cell lysates were used to measure the Bak, Bcl-2 and  $\beta$ -actin expression by western blot analysis with anti-Bak, anti-Bcl-2 and  $\beta$ -actin antibodies.

## 고찰

虛血性 心疾患은 어떤 원인으로 심근에 대한 산소공급이 부족하여 심근에 허혈을 유발시키는 급·만성 심근장애를 말하며, 주로 관상동맥의 죽상경화 등에 의해 심근에 대한 혈류의 감소로 산소의 공급과 수요 사이에 불균형을 초래하여 ischemia, injury, infarct의 3가지 병리화적인 현상을 가지는 심장질환으로 임상적으로는 협심증, 심근경색증, 심인성 급사 및 심부전 등으로 나타난다. 虛血性 心疾患은 우리나라에서 뇌혈관질환과 고혈압성 질환 다음으로 높은 사망률을 나타내며, 위험요인으로는 고혈압, 흡연, 고콜레스테롤증, 당뇨병, 비만, 운동부족 등이 있다.

한의학에서 虛血性 心疾患은 胸痺·胸痛·厥心痛·卒心痛·真心痛 등의 범주에 속하며, 心絞痛이라고도 한다. 黃帝內經《素問·藏氣法時論篇》<sup>13)</sup>의 “心病者 胸中痛 脇支滿 脇下痛 膺背肩甲間痛 兩臂內痛...”과 《素問·舉痛論》<sup>14)</sup>의 “寒氣客於背俞之脈 脈澁 血虛而心痛 相引而痛...”은 狹心症의 증세와 유사하며, 이 질환의 발생 원인은 寒邪內侵, 情志失調, 飲食不當, 汚血 등과 연관하다고 보았다. 黃連解毒湯은 黃芩, 黃連, 黃柏, 梔子로 구성된 처방으로 《外臺秘要》<sup>15)</sup>에서는 煩悶, 口乾, 不得臥를 치료하였고, 《醫方集解》에서는 一切火熱로 表裏가 모두 盛하여 발생하는 狂躁煩心, 口燥咽乾, 錯語不眠, 吐血, 衄血 등을 치료하였으며, 《東醫寶鑑》에서는 嘔血과 吐血, 血崩, 腸風, 煩燥不眠, 熱로 인한 疔癩反胃 등에 이용하는 등 火熱과 煩燥, 그리고 三焦의 實火를 치료하는 清熱瀉火의 기본방으로 사용하고 있다.

黃芩은 清熱燥濕, 瀉實火하는 효능이 있어 煩渴, 黃疸, 熱病의 壯熱不退, 肺熱咳嗽, 止血 등에 사용하며, 血壓降下, 利尿, 解熱作用 등이 있다. 黃連은 清熱燥濕, 清心除煩, 瀉火解毒의 효능이 있어 煩燥不眠, 口舌生瘡, 高熱煩悶 등에 사용하고, 순환기계 에 대해서는 무스카린성 자극효과와 cholinesterase의 활성억제에 의한 血壓降下 효과가 있으며, 관상동맥의 혈류량을 증가시킨다. 黃柏은 清熱燥濕, 退虛熱하는 효능이 있어 黃疸, 陰虛發熱, 相火亢盛 등을 다스리고, 혈관확장 작용이 있어서 관상동맥의 혈류를 증가시키며, 혈압을 하강시킨다. 梔子は 瀉火除煩, 泄熱利濕, 止血하는 효능이 있어 煩熱, 懊憹, 衄血, 肝熱目赤 등에 사용하며, 혈압을 내리는 작용이 있다. 최근 이러한 약리작용을 바탕으로 黃連解毒湯은 알러지성 질환을 포함한 고혈압, 두통, 고지혈증 등의 심혈관계 질환에 광범위하게 응용되고 있다.

허혈(ischemia)은 혈액의 관류가 저하되어 조직의 산소공급이 결핍되고 대사산물의 처리과정에 지장을 초래하는 상태로<sup>16)</sup>, 동맥경화, 대동맥협착증, 혹은 혈관질환 등에 의한 일시적 혹은 지속적인 허혈은 재관류시에도 다량의 O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 그리고 OH<sup>-</sup> 등의 활성산소종을 생성하게 된다. 또한, 활성산소종은 활성화된 neutrophils, xanthine oxidase, mitochondrial respiration, arachidonic acid metabolism 등의 다양한 과정을 통해서 생성되는데<sup>17)</sup>, 비록 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 효소 등이 세포내에서 생성된 활성산소종을 제거하기 위한 생리적 방어기전으로 작용하지만, 과도한 활성산소종은 이들 방어체계를 초과하여 세포손상을 초래한다<sup>18)</sup>. 이처럼 활성산소종에 의한 산화적 손상은 심혈관계 질환의 주요 발생원인으로 작용하고 있다<sup>19)</sup>.

허혈성 심질환의 원인이 되는 활성 산소종에 의한 심근세포의 손상은 세포고사로 알려져 있으며, 그 기전으로는 c-Jun, NH<sub>2</sub>-terminal kinase(JNK)에 의한 caspase의 활성화와 그에 따른 DNA의 분절 등이 보고되었다. 세포고사, 혹은 예정된 세포사멸(programmed cell death)은 정상적인 발달과정에서 뿐만 아니라 독소(toxin), 성장인자 결핍(growth factor withdrawal) 및 저산소증(hypoxia)과 같은 세포손상 자극에 의해 발생한다. Hypoxia는 고산시대에서 발생하는 호흡장애, 불충분한 폐의 가스교환, 심장의 혈액순환 장애 등으로 인한 general hypoxia와 암조직과

같이 세포증식이 왕성하게 되어 세포내에서 산소부족을 나타내는 local hypoxia로 분류된다. 이러한 hypoxia에 방어하여 세포 내 정상산소분압을 유지하기 위한 다양한 세포반응들은 호흡증가, 혈관확장, 적혈구 생성증가, 포도당생성(gluconeogenesis)의 감소, ATP 생성반응 감소 등이 보고되고 있다<sup>20</sup>. 또한 hypoxia에 대한 다양한 in vitro 모델이 확립되어 있으며, 산소분압을 낮추기 위하여 95% N<sub>2</sub>와 5% CO<sub>2</sub>의 혼합가스 상태로 hypoxia를 유도한다<sup>21</sup>. 이에 저자는 본 실험에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 및 hypoxia가 H9c2 심근세포의 산화적 세포 독성에 미치는 영향을 살펴보고 이러한 산화적 손상에 대한 黃連解毒湯의 방어효과 및 이때 관여하는 세포고사 신호전달 분자인 Bak와 Bcl-2 단백질의 발현과 아울러 DNA와 PARP 분절 및 미토콘드리아의 막전위 변화에 미치는 영향을 관찰하였다.

먼저 hypoxia를 유도하기 위하여 95% N<sub>2</sub>와 5% CO<sub>2</sub>의 혼합가스가 주입된 chamber에서 다양한 시간 동안 배양 후 세포생존율의 변화를 측정하고 결과 시간 의존적인 세포생존율의 감소가 관찰되었으며, 이는 DNA 분절을 보이는 전형적인 세포고사임을 hoechst 염색을 통하여 확인할 수 있었다. 이를 비교하기 위하여 심근세포에서 산화적 손상을 유도하는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하여 같은 현상임을 확인하였고, hypoxia 단독 자극시 약 58%의 세포생존율을 보이는 실험 조건을 수립하였다. 이렇게 유발된 H9c2 세포사멸에 대한 黃連解毒湯의 방어효과는 처리 농도에 의존적으로 hypoxia에 의한 세포독성을 억제하였다. 이 연구에서 黃連解毒湯은 hypoxia에 의해 유도되는 특징적인 세포고사 현상인 DNA의 사다리 모양 분절<sup>22</sup>을 억제하였다(미발표 성적). 또한 핵의 hoechst 염색에서도 黃連解毒湯은 hypoxia에 의한 H9c2 세포 핵산의 DNA 분절과 염색사의 응축을 억제하여 대조군과 유사한 형태학적 소견을 보였으며, 세포독성에 의해 야기된 세포수의 감소를 대조군 수준으로 회복시켰다. 이는 DNA 손상시 회복에 관여하는 PARP 단백질의 분해에 의한 세포고사에서 黃連解毒湯이 방어효과를 나타낸 것으로 판단된다.

Hypoxia 조건하에서는 전사인자인 hypoxia-inducing factor 1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )의 안정성이 증가되고, 산소전달의 증가 및 산소 소비의 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 complex를 이루게되어 세포고사로 진행하게 된다<sup>23</sup>. 세포고사를 조절하는 Bcl-2 단백질은 사람의 림프종(human follicular lymphoma)과 관련된 유전자로서 크게 세포사멸 촉진 단백질과 세포사멸 억제 단백질의 두 부류가 존재한다. 이중 Bcl-2 단백질은 다른 암 유전자와는 달리 세포증식에는 관여하지 않고 세포사멸만을 억제한다. Bcl-2는 산화환원반응의 조절, 세포내 이온의 분포 조절, caspase protease의 효소 활성 조절, 미토콘드리아 막전위, 핵 DNA 분절, 스트레스 연관 MAP kinase인 JNK 및 p38 kinase의 효소 활성을 조절한다고 알려져 있다<sup>24</sup>. 한편, Bax 단백질은 Bcl-2와는 달리 오히려 세포사멸을 촉진시키는 기능을 수행한다. 특히 Bcl-2 family 단백질은

c-terminal이 소수성 막으로 구성되어 미토콘드리아의 막에 결합할 수 있으며<sup>25</sup>, 다양한 자극시 Bcl-2나 Bcl-XL을 과발현 시켰을 경우 미토콘드리아 막전위의 상실이나 cytochrome c의 방출이 방지됨이 보고되었다. 반대로 Bax나 Bak 단백질을 과발현 시켰을 경우에는 cytochrome c의 방출을 촉진하였고, 미토콘드리아 막 탈전극을 유도한다. 본 연구에서는 Rhodamine 123 염색을 통하여 hypoxia에 의한 H9c2 세포의 세포고사에서 미토콘드리아의 막전위차 감소에 의한 기능장애가 초래되었고, 이는 Bcl-2 단백질의 발현 감소와 Bak의 발현 증가가 미토콘드리아 기능장애와 연관함을 알 수 있었다. 그러나 黃連解毒湯 처리시 농도 의존적으로 대조군 수준으로 회복되었다.

이상의 연구결과를 종합하면 hypoxia에 의해 유발된 H9c2 심근세포 사멸은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 세포 고사와 동일한 형태를 보이며, 세포의 형태적 변화를 동반한 DNA의 분절, Bcl-2의 발현 감소, Bak 단백질의 발현 증가에 의해 미토콘드리아 기능장애를 보이는 전형적인 세포고사 현상이었다. 또한 이러한 산화적 손상으로부터 黃連解毒湯은 DNA 분절과 Bak 및 Bcl-2 단백질의 발현 조절을 통해 hypoxia로 유발된 H9c2 심근세포의 방어효과를 나타내었다. 따라서 黃連解毒湯은 심혈관계 질환의 예방 및 치료에 유용하게 활용될 것으로 생각되며, 앞으로 심근세포의 산화적 손상에 대한 자세한 기전 연구와 2-D를 통한 단백질 발현 및 관련 유전자의 변화 등 분자생물학적 기전 연구가 계속되어야 할 것으로 생각된다.

## 결 론

Hypoxia로 인한 심근세포의 산화적 손상에 대하여 黃連解毒湯의 효과 및 작용기전을 구명하기 위하여 H9c2 심근세포에 산화적 손상을 야기시켜 黃連解毒湯을 투여한 후 세포생존율의 변화 및 형태학적 변화와 DNA 분절에 미치는 영향, PARP의 발현, 미토콘드리아 막전위 변화 및 Bak와 Bcl-2 단백질의 발현 변화를 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. Hypoxia에 의한 H9c2 심근세포 독성은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 세포독성과 마찬가지로 전형적인 산화적 손상에 의한 세포고사를 유도하였다. 黃連解毒湯은 hypoxia에 의한 심근세포의 세포생존율을 농도 의존적으로 유의성 있게 증가시켰으며, 세포의 형태학적 변화를 현저하게 억제하였다. 黃連解毒湯은 hypoxia에 의한 H9c2 심근세포의 전형적인 세포고사에서 발생하는 DNA 분절을 농도 의존적으로 억제하였다. 黃連解毒湯은 hypoxia에 의한 H9c2 심근세포의 고사에서 caspase-3의 세포내 표적 기질인 PARP의 발현을 농도 의존적으로 증가시켰다. 黃連解毒湯은 hypoxia에 의한 미토콘드리아 막 전위차 감소를 대조군 수준으로 회복하였다. 黃連解毒湯은 hypoxia에 의해 발현이 증가한 Bak 단백질을 농도 의존적으로 감소시키고, 발현이 감소한 Bcl-2 단백질을 농도 의존적으로 증가시켰다. 이상의 결과로 보아 黃連解毒湯은 hypoxia에 의해 야기되는 심근세포의 산화적 손상에서 caspase-3의 활성을 억제하고, DNA 분절과 Bak 및 Bcl-2 단백질의 발현 조절을 통하여 방어효과를 나타내었다. 따라서 황련해독탕은 허혈성 심질환 등의

심혈관계 질환에 유효하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

### 감사의 글

본 논문은 2003년도 원광대학교 교비 연구비 지원에 의해 연구되었습니다.

### 참고문헌

1. 葛 洪 : 肘後備急方, pp.34-37, 인민위생출판사, 臺北, 1996.
2. 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.
3. Bolli, R, Patel, BS, Jeroudi, MO, Lai, EK and McCay, PB : Demonstration of free radical generation in "stunned" myocardium of intact dogs with the use of the spin trap alpha-phenyl N-tert-butyl nitron. *J. Clin. Invest.*, 82:476-485, 1988.
4. Jolly SR, Kane WJ, Bailie MB, Abrams GD, Lucchesi BR : Canine myocardial reperfusion injury. Its reduction by the combined administration of superoxide dismutase and catalase. *Circ Res*, 54(3):277-284, 1984.
5. Cerutti PA : Prooxidant states and tumor promotion. *Science*, 227:375-381, 1985.
6. 丹羽鞠負 : 활성산소를 다스리면 무병장수 할 수 있다, pp.120-121, 문예출판사, 서울, 2001.
7. 鞠潤範 : 黃連解毒湯이 자발적 고혈압 백서의 혈압 및 신장 기능에 미치는 영향, 원광대학교 대학원, 2001.
8. 金福海 : 黃連解毒湯 合 六味地黃湯 加 釣鈎藤이 자발적 고혈압 백서의 혈압 및 신장기능에 미치는 영향, 원광대학교 대학원, 2002.
9. 김동현 外 : 대황황련해독탕의 항고지혈증 작용, *생약학회지*, 32(2): 145-152, 2001.
10. 孫昌鳳 : 抗菌活性作用에 대한 黃連解毒湯의 효능에 관한 연구, 원광대학교 대학원, 1986.
11. 尹星燦 : 黃連解毒湯加味方에 의한 면역글로블린E 매개성 아나필락시스의 억제, 원광대학교 대학원, 1997.
12. 新谷太 : Pathophysiology로 이해하는 내과학 (3卷), pp.136-159, 도서출판 정담, 서울, 2002.
13. 洪元植 譯 : 黃帝內經素問, p.147, 전통문화연구회, 서울, 1996.
14. 王水 註 : 注解補注 黃帝內經 素問, p.818, 醫聖堂, 서울, 2001.
15. 王燾 : 外臺秘要, p.72, 인민위생출판사, 臺北, 1968.
16. 이원로 編著 : *Clinical Cardiology*, pp.759-768, 고려의학, 1998.
17. 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.
18. 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., Clarendon Press, Oxford, pp86-89. 1989.
19. MacLellan WR, Schneider MD : Death by design. Programmed cell death in cardiovascular biology and disease. *Cir Res*, 81:137-144. 1997.
20. 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):6130-6134, 2003.
21. 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.
22. 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.
23. Knowlton AA, Gupta S : HSP60, Bax, and Cardiac Apoptosis. *Cardiovasc Toxicol*, 3:263-268, 2003.
24. Allen RT, Cluck MW, Agrawal DK : Mechanism controlling cellular suicide: role of Bcl-2 and caspases. *CMLS*, 54:427-445, 1998.
25. 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.