

산화적 손상에 의해 유발된 심근세포 독성에 대한 桃紅四物湯의 방어효과

유봉선¹ · 정재은¹ · 박진영¹ · 윤종민^{1,2} · 이 인¹ · 문병순^{1,2,*}

1: 원광대학교 한의과대학 심계내과학교실, 2: 원광대학교 한의학전문대학원

Protective Effects of *Dohongsamul-tang* on Zinc-mediated Cytotoxicity in H9c2 Cardiomyoblast Cells

Bong Sun You¹, Jae Eun Jung¹, Jin Young Park¹, Jong Min Yun^{1,2}, In Lee¹, Byung Soon Moon^{1,2,*}

1: Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

2: Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University

The water extract of *Dohongsamul-tang*(*DHSMT*) has been traditionally used for treatment of ischemic heart in oriental medicine. However, little is known about the mechanism by which the water extract of *DHSMT* rescues cells from these damages. Therefore, this study was designed to evaluate the protective effects of *DHSMT* on zinc-mediated cytotoxicity in H9c2 cardiomyoblast cells. This study demonstrates that treatment of H9c2 cells with zinc caused a decrease in cell viability in a dose dependent manner and a chromatin condensation. Zinc induced the cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP). In addition, zinc induced the decrease of Bcl-2, as well as increase of Bak expression and mitochondrial dysfunction. Zinc-induced H9c2 cell death was remarkably prevented by the pretreatment of *DHSMT* with consistent suppression of the cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), mitochondrial dysfunction and the expression of Bak and Bcl-2. Taken together, the results suggest that zinc induced severe cell death in H9c2 cardiomyoblast cells via intracellular GSH(reduced glutathione) depletion and the protective effects of *DHSMT* against oxidative injuries may be achieved through modulation of mitochondrial dysfunction and scavenging of ROS(reactive oxygen species).

Key words : *Dohongsamul-tang*(*DHSMT*), zinc-mediated cytotoxicity, H9c2 cardiomyoblast cells

서 론

桃紅四物湯은 朱¹⁾의 《丹溪心法》에 “中風 在左屬死血少血 左以四物湯加桃仁紅花... 人身諸病 多生於鬱 血鬱 桃仁紅花...” 라고 수록되어 있으며, 瘀血性 貧血²⁾, 高血壓³⁾, 血流改善⁴⁾ 등의 심혈관계 질환과 血虛 및 血不和로 인한 허혈성 심장질환^{5,6)}의 기본방제로 활용되고 있는 四物湯에 活血通經, 破血祛瘀의 작용이 있는 桃仁, 紅花를 加味한 처방이다.^{7,8)}

최근 식생활과 생활환경의 변화로 인해 증가하고 있는 고혈압, 고지혈증 및 죽상동맥경화증 등의 심혈관계 질환은 심장

일시적 혹은 지속적인 허혈상태를 야기시키며, 심근에 대한 산소 공급의 부족을 초래한다. 이때 손상된 부위에 약물이나 수술적인 요법 등에 의한 재관류시에 심근세포에서 O₂⁻, H₂O₂, OH⁻ 등의 활성산소종이 발생하는데⁹⁾, 비록 세포의 생리적 방어체계인 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 등이 작동하지만 과도한 활성산소종의 발생은 이러한 능력을 초과하여 심근세포 손상을 초래하게 된다.

四物湯의 심혈관계에 관한 실험적 연구로는 南¹⁰⁾의 혈관내 파손상에 대한 회복, 河¹¹⁾의 혈전증 억제효과, 姜³⁾의 혈압강하, 朴⁹⁾과 趙⁹⁾의 배양 심근세포의 산화적 손상에 대한 방어효과 등이 있다. 또한 桃紅四物湯에 관한 연구로는 郭⁷⁾과 田⁸⁾의 혈전생성억제 효과와 趙¹²⁾의 항암 및 항전이 효능 등에 대한 보고가 있다.

이에 저자는 桃紅四物湯 추출액이 쥐의 H9c2 심근세포에서

* 교신저자 : 문병순, 익산시 신양동 344-2 원광대학교 익산한방병원 내과2

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

· 접수 : 2004/08/04 · 수정 : 2004/09/09 · 채택 : 2004/10/07

아연에 의한 심근세포 독성과 산화적 손상 기전을 관찰하고, 桃紅四物湯을 전처리한 후 H9c2 심근세포에 아연을 처리하여 심근세포 손상을 유발한 다음 세포 생존율에 미치는 변화와 caspase protease 활성도, PARP 분절, 미토콘드리아 막전위 변화, Bak와 Bcl-2 단백질군의 발현 변화 및 histone 단백질 H2AX의 인산화에 미치는 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 세포주

Embryonic rat의 심장에서 유래한 세포주인 H9c2세포는 ATCC(American Type Culture Collection)로부터 구입하여 계대 배양하면서 실험을 실시하였다.

2) 약재

본 실험에 사용된 桃紅四物湯의 처방내용은 吳¹³⁾의 《醫宗金鑑》에 의거하였으며, 약재는 원광대학교 익산한방병원에서 구입하여 정선한 것으로 사용하였고, 한 첩의 내용과 분량은 <Table 1>과 같다.

Table 1. Prescription of Dohongsamul-tang

韓藥名	生藥名	重量 (g)
桃仁	SEMEN PERSICAE	7.50g
紅花	FLOS CARTHAMI	3.75g
生地黃	RHIZOMA REHMANNIAE	7.50g
當歸	RADIX ANGELICAE GIGANTIS	7.50g
赤芍藥	RADIX PAEONIAE RUBRA	3.75g
川芎	RHIZOMA CNIDII	3.75g
Total amount		33.75g

3) 시약 및 기기

실험에 필요한 DMEM, 항생제, trypsin 및 우태아 혈청(FBS)은 GIBCO BRL사(Grand Island, NY, USA)제품을, 배양용기(24 well plate와 10cm dish)는 Falcon사(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphe-nyltetra zolium bromide (MTT), Hoechst 33342, bicinchoninic acid(BCA), dimethyl sulfoxide(DMSO), Reduced glutathione(GSH), N-acetyl-L-cysteine(NAC)는 Sigma사(St. Louis, Missouri, USA)에서, JC-1은 Molecular probe사(Eugene, OR, USA)에서 구입하였다. PARP, Bcl-2, 및 Bak의 항체는 Santa Cruz사(San Diego, CA, USA)에서 구입하였고, phospho-H2AX는 Pharmingen사(Franklin Lakes, NJ, USA)에서 그리고 anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase와 ECL kit는 Amersham사(Buckinghamshire, England)제품을 사용하였다.

2. 방법

1) 시료의 조제

실험에 사용된 藥材는 물을 용매로 사용한 추출방법을 사용하여 본 실험에 이용하였다. 물 추출물 (H₂O extract)은 음건된 桃紅四物湯 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 CO₂ 세포 배양기(37℃, 5% CO₂)에서 10% 우태아 혈청이 포함된 DMEM으로 배양하였으며, 24시간 간격으로 배양액을 교체하여 log phase에 있는 세포에 아연 및 桃紅四物湯을 처리한 후 세포 고사현상과 이에 연관된 생화학 실험을 수행하였다. ZnCl₂는 100mM 농도로 증류수에 녹여서 사용하였다.

3) 세포생존율 측정

세포의 생존율 측정은 MTT 분석법으로 측정하였다. 세포 배양판(24-well plate)에 세포(1×10⁵ 세포수/ml)를 1ml씩 분주하여 12시간 이상 CO₂ 세포배양기 안에서 안정시킨 후 시료를 각각의 조건에 따라 처리하였다. 각각의 배양세포에 배양액의 1/10로 MTT용액(5mg/ml in PBS)을 첨가하였다. 4시간 후, 배양액을 제거하고 1ml DMSO를 첨가하여 세포를 용해시킨 다음, 분광광도계(THERMO max, USA)를 이용하여 540nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 정상 대조군과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

4) Hoechst 염색

ZnCl₂을 처리한 세포를 4% formaldehyde 용액에 고정시킨 후 PBS로 세척하고, 10μM Hoechst 33342로 10분간 염색한 후 다시 PBS로 세척하여 형광현미경(Leica MPS60, Germany)으로 핵의 형태학적 변화를 관찰하였다.

5) Caspase계 cysteine protease 활성도 측정

아연 및 桃紅四物湯 처리 후 포집된 H9c2 세포(1×10⁶)를 4℃에서 15분 lysis buffer(1% Triton X-100, 0.32M sucrose, 10mM Tris/HCl, pH 8.0, 5mM EDTA, 2mM DTT, 1mM PMSF, 1μg/ml aprotinin, 1μg/ml leupeptin)로 용해하고 13,000rpm으로 15분간 원심분리 하였다. 원심분리하여 얻은 세포 파쇄액은 bicinchoninic acid(BCA, Sigma Co., MO, USA)법으로 단백질을 정량하고, 세포 파쇄액을 분석 완충용액(100mM HEPES, pH 7.5, 10% sucrose, 1.0% Chaps, 2mM DTT, 1mM PMSF, 1μg/ml aprotinin, 1μg/ml leupeptin)에 희석된 형광기질과 37℃에서 30분간 반응시켰다. Caspase protease의 활성측정은 fluorogenic substrate를 사용하였으며, 이 기질의 proteolytic cleavage에 의하여 생성되어지는 형광값의 차이를 형광분광 광도계(Molecular Devices Co., USA)로 측정하여 caspase 활성을 결정하였다.

6) Western blot analysis

배양된 H9c2 세포는 아연 및 桃紅四物湯을 일정시간 처리한 후에 세포를 포집하여, 차가운 PBS로 2회 세척하였다. 얻어진 세포는 파쇄용액(50mM HEPES, pH7.4, 150mM NaCl, 1% deoxycholate, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 1μg/ml aprotinin)으로 얼음 속에서 30분간 파쇄하였다. 13,000rpm에서 20분간 원심분리하여 얻은 세포 파쇄액은 BCA 용액을 이용하여 단백질을 정량하였다. 동량의 세포 파쇄액은 2×sample buffer와 혼합하여 100℃에서 3분간 가열한 후 12.5% SDS-PAGE를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질은 semi-dry방법으로 실온에서 단위면적당 0.8mA 전하를 2시간 부하하여 nitrocellulose membrane

상에 이동시켰다. Nitrocellulose membrane은 blocking buffer (5% skim milk)와 상온에서 1시간 반응시켰다. PARP, Bcl-2, Bak 및 phospho-H2AX에 대한 항체는 0.05%(v/v)의 Tween-20이 함유된 Tris-buffered saline(TBS-T)에 1:1000으로 희석하여 nitrocellulose membrane과 상온에서 2시간 반응시켰다. PARP, Bcl-2, Bak, Bid 및 phospho-H2AX는 이차항체 anti-rabbit IgG conjugated HRP 항체를 상온에서 1시간 반응시키고, ECL kit (Amersham, England)를 이용하여 필름에 노출시켜 현상하였다.

7) 미토콘드리아 막전위 측정

세포내 소기관의 하나인 미토콘드리아의 막전위(transmembrane potential)의 변화를 조사하기 위하여 JC-1염색을 시행하였다. 세포를 PBS로 2회 세척하여 10µg/ml JC-1을 각각 DMEM배지에 희석하여 20분간, CO₂ 세포배양기에 반응시킨 후 다시 PBS로 세척하고 형광현미경(Leica MPS 60, Germany)으로 관찰하였다.

8) 통계처리

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

결 과

1. 아연이 H9c2 심근세포에 미치는 독성 작용

아연이 H9c2 세포의 생존율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 다양한 농도로 12시간 처리한 후 생존율을 MTT 방법으로 측정하였다. 아연 0.125mM 이상의 농도에서 현저한 생존율 저하가 시작되어 0.25mM 이상에서는 30% 미만의 생존율이 관찰되었다(Fig. 1A). 또한 아연(0.2mM ZnCl₂)을 12시간 처리한 결과, 처리 시간에 의존적으로 생존율이 감소되었다(Fig. 1B).

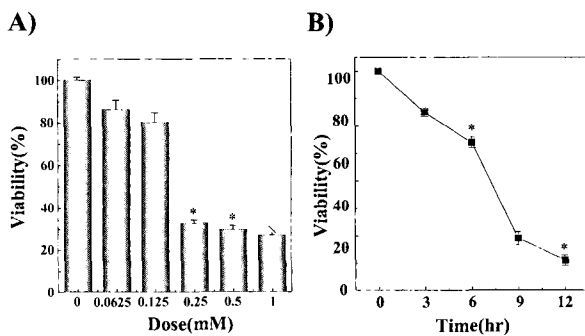


Fig. 1. Zinc decreased the viability of H9c2 cells in a dose and time dependent manner. A), cells were treated with various concentrations of 0.0625 mM ZnCl₂ for 12hr. B), cell viability was determined by MTT assay at various periods after 0.2mM ZnCl₂ treatment. Data represent the mean±S.D. of quadruplicate. *, p < 0.005 compared with control.

아연에 의해 유도되는 세포사멸의 특성을 알아보기 위하여 hoechst 염색법을 통해 핵의 형태학적 변화를 관찰하였다. H9c2 세포에 아연(0.2mM ZnCl₂)을 6시간 처리한 후 hoechst 염색을 시행한 결과, 정상 대조군의 핵은 타원형의 온전한 형태로 관찰되었다(Fig. 2A). 그러나 아연 처리군의 핵은 세포고사의 형태학

적 특징인 염색사 응축(chromatin condensation)이 관찰되었으나 핵 분절(nuclear fragmentation)은 관찰되지 않았다(Fig. 2B).

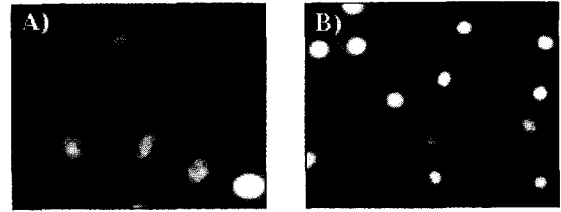


Fig. 2. Effect of ZnCl₂ on photomicrograph of nuclei by hoechst staining. H9c2 cells were treated with 0.2mM ZnCl₂ for 6hr, stained with hoechst dye 33342, and observed under fluorescence microscope. A), control cells. B), cells treated with 0.2mM ZnCl₂.

2. 桃紅四物湯이 아연에 의한 H9c2 세포의 생존율에 미치는 영향

H9c2 세포주에서 아연에 의해 유발되는 세포사멸에 대해 桃紅四物湯의 방어효과를 알아보기 위하여 세포에 500µg/ml 및 1000µg/ml의 桃紅四物湯을 전처리한 후 아연(0.2mM)을 처리하여 세포생존율을 관찰하였다. 이때 산화적 손상과의 연관성을 조사하기 위하여 항산화제인 GSH(5mM)와 NAC(5mM)를 30분 전 처리한 후 아연(0.2mM)을 처리하여 아연에 의한 세포생존율의 변화를 MTT 방법으로 조사하였다. 그 결과 桃紅四物湯 단독 처리에 의한 세포독성은 관찰되지 않았으며, 아연(0.2mM)을 12시간 처리한 H9c2 세포의 생존율은 30% 미만으로 감소하였으나, 500µg/ml의 桃紅四物湯 처리시 56%, 1000µg/ml의 桃紅四物湯 처리시 89%의 세포생존율을 보였다. 또한 GSH와 NAC의 단독 처리는 H9c2 세포의 생존율에 유의한 변화를 초래하지 않았으며, 항산화제인 GSH와 NAC 전처리에 의하여 아연에 의한 세포독성이 억제되어, H9c2 세포의 생존율은 대조군과 유사한 수준으로 회복되었다(Fig. 3). 이상의 결과로 보아 아연에 의한 H9c2의 세포독성은 산화적 손상에 의한 것이며, 桃紅四物湯에 의해 H9c2 심근세포의 산화적 손상이 억제되었다.

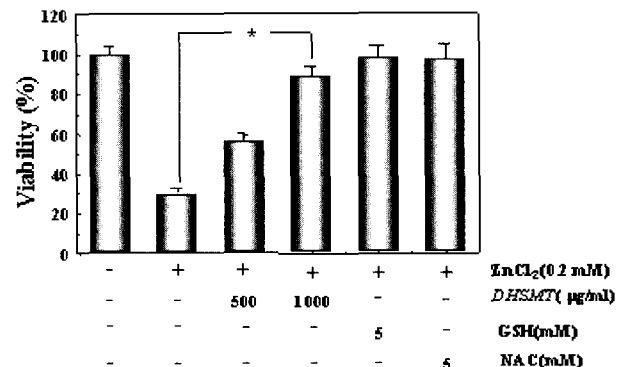


Fig. 3. Effect of DHSMT on the death of H9c2 cells by zinc. Antioxidants, including GSH (5mM) and NAC (5mM), were preincubated for 30minutes in H9c2 cells and followed by the addition of 0.2mM ZnCl₂ for 12hrs. Then, cell viability was determined by MTT assay. Data represent the mean±S.D. of quadruplicate. *, p < 0.005 by compared with proportions.

3. 桃紅四物湯이 아연에 의한 caspase protease의 활성화와 PARP 분절에 미치는 영향

세포고사의 특징적인 현상을 초래하는 세포내 신호전달 기전에서 caspase의 중요성은 이미 잘 알려져 있다¹³⁻¹⁵. 아연에 의한 H9c2 세포의 고사현상이 caspase 활성화와 관계가 있는지를 확인하기 위하여 caspase-3, -6, -8, 및 -9 proteases의 효소적 활성화에 대해 이들 효소의 형광기질(fluorogenic substrate)을 이용하여 조사하였다. H9c2 세포에 아연(0.2mM)을 처리한 후, 2시간 간격으로 caspase protease의 활성을 측정하였다. 그 결과 caspase-3, -6, -8 및 -9 protease의 활성은 대조군에 비교하여 유의한 변화가 없었다(Fig. 4A). caspase-3 protease의 기질인 PARP는 아연 처리시 116kDa의 온전한 형태의 PARP 단백질이 시간 의존적으로 분절되었으며, 55-60kDa과 45-50kDa 사이의 분절된 절편이 관찰되었다(Fig. 4B). 또한 桃紅四物湯(500, 1000 µg/ml) 30분 전처리에 의하여 PARP 단백질은 대조군 수준으로 회복되었다(Fig. 4C).

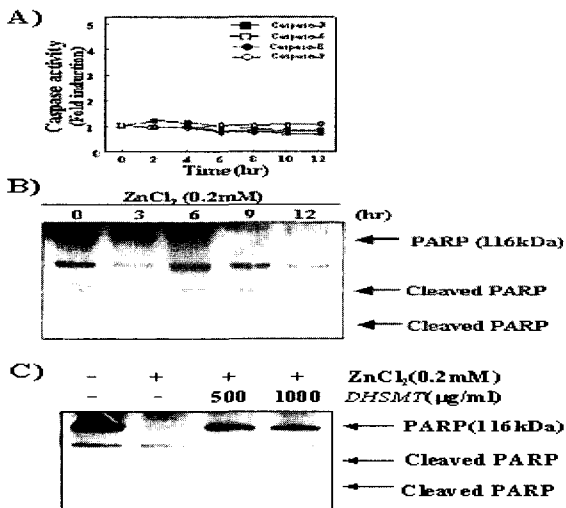


Fig. 4. Effect of *DHSMT* on catalytic activity of caspase family cysteine proteases and pattern of PARP cleavages in zinc-treated H9c2 cells. A) cells were treated with 0.2mM ZnCl₂ for various periods and lysed to measure the activity of caspase proteases by using fluorogenic biosubstrates. Data represent the mean±S.D. of quadruplicates. B) and C) PARP cleavage was tested by western blot analysis.

4. 桃紅四物湯이 아연에 의한 H9c2 세포의 미토콘드리아에 미치는 영향

아연이 미토콘드리아의 기능에 미치는 영향을 평가하고자 미토콘드리아의 막전위 변화와 Bcl-2 family 단백질 발현 변화를 관찰하였다. 미토콘드리아 막전위 변화는 H9c2 세포에 아연(0.2mM)을 6시간 처리 후 JC-1으로 염색하여 형광현미경하에서 관찰하였다. 그 결과 대조군 H9c2 세포의 미토콘드리아는 오렌지 형광이 세포질에서 점상형태(punctuated)로 분포하다가, 아연 처리에 의하여 세포질과 핵을 포함한 세포 전체에 미만성(diffuse)으로 산재하는 녹색 형광으로 변화하였다. 그러나 桃紅四物湯(1000 µg/ml) 전처리에 의하여 대조군 수준의 점상 상태로 회복되었다(Fig. 5).

본 실험에서는 아연에 의해 유도된 세포사멸에서 Bak, Bcl-2 단백질의 발현 양상을 조사하였다. H9c2 세포에 아연을 처리한

경우에는 시간 의존적으로 pro-apoptotic 기능을 갖는 Bak 단백질의 발현을 증가시켰지만(Fig. 6A), anti-apoptotic 기능을 갖는 Bcl-2 단백질의 발현은 감소시켰다(Fig. 6B). 그러나 桃紅四物湯(1000 µg/ml) 처리에 의하여 대조군 수준으로 회복되었다(Fig. 6C).

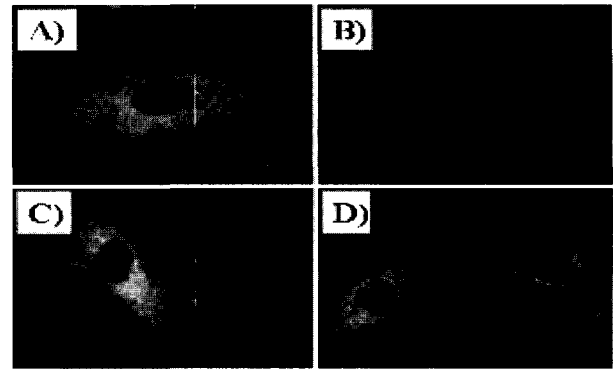


Fig. 5. Effect of *DHSMT* on zinc induced the mitochondrial membrane potential transition of H9c2 cells. Cells were treated with 0.2mM ZnCl₂ for 6hr, stained with 10 µg/ml of JC-1 (10×40) and visualized under fluorescent microscope. A), control cells. B), cells treated with ZnCl₂. Cells treated with 500 µg/ml(C) and 1000 µg/ml(D) *DHSMT*.

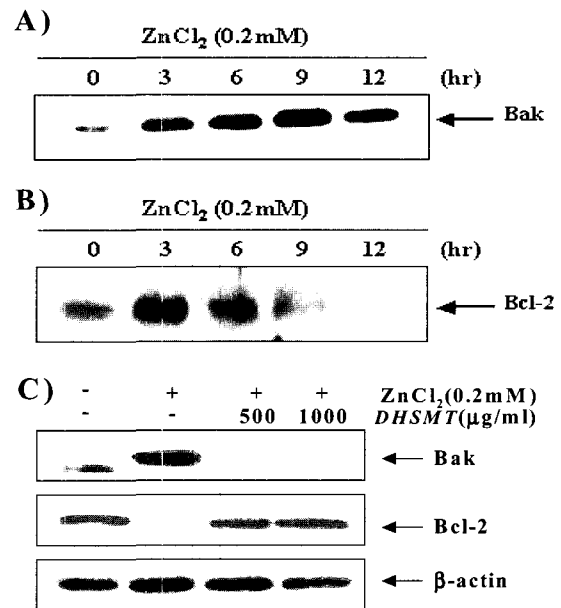


Fig. 6. Effect of *DHSMT* on zinc increased the Bak expression whereas decreased the Bcl-2 in H9c2 cells. Cells were treated with 0.2mM ZnCl₂ for various periods. The protein from cell lysate was subjected on 15% SDS-PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane and immunoblotted with Bak(A) and Bcl-2 antibodies(B). The immunoreactive signals were visualized by ECL.

5. 桃紅四物湯이 아연에 의한 histone 단백질 H2AX의 인산화에 미치는 영향

세포고사에 의한 세포사멸 초기에 이중가닥 DNA 손상이 유도되고, 손상된 DNA에 의하여 histone 단백질은 인산화가 된다¹⁶⁻¹⁸. 아연에 의한 세포고사에서 histone 단백질 중 H2AX의 인산화와 이때 방어작용을 하는 桃紅四物湯의 효과를 확인하기 위하여 western blot 분석으로 조사하였다. H2AX의 인산화는

H9c2 세포에 아연(0.2mM)을 처리한 후 3시간부터 시간 의존적으로 증가하였다(Fig. 7A). 그러나 桃紅四物湯 전처리시 현저한 인산화의 감소를 보여 대조군 수준으로 회복되었다(Fig. 7B).

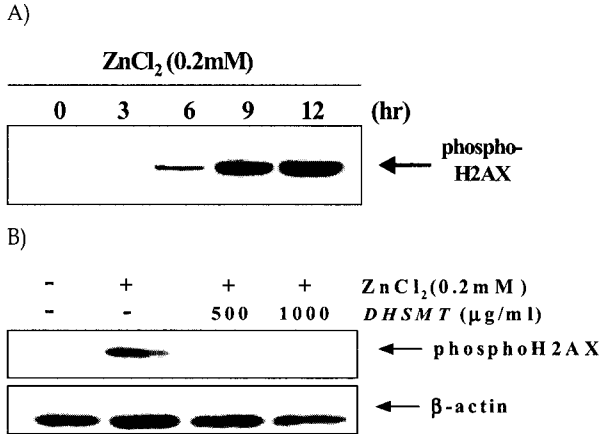


Fig. 7. Effect of DHSMT on zinc induced the phosphorylation of histone H2AX in H9c2 cells. Cells were treated with 0.2mM ZnCl₂ for various periods. The protein from cell lysate was subjected on 15% SDS PAGE, transferred onto nitrocellulose membrane and immunoblotted with anti-phospho H2AX antibody. The immunoreactive signals were visualized by ECL.

고찰

桃紅四物湯은 養血造血하는 四物湯에 活血化瘀의 효능이 있는 桃仁, 紅花를 加한 처방으로서 朱¹⁾는 《丹溪心法》에서 補血, 活血, 祛風에 사용하였으며, 吳는 《醫宗金鑑》에서 婦女の 月經不調와 痛經에 사용하였고, 郭²⁾은 血栓症의 치료에, 權¹⁹⁾은 사구체 경화증에 사용하였으며, 최근에는 血虛瘀血로 인한 심혈관계 질환, 부인과 질환, 신장병 등에 응용되고 있다.

본방을 구성하는 약물 중 桃仁은 破血祛瘀하는 효능이 있어 血滯經閉, 痛經 등에 사용하고 있으며, alcohol 추출물에서는 항혈액 응고작용과 약한 용혈작용이 있는 것으로 알려져 있다²⁰⁾. 紅花는 活血通經, 祛瘀止痛의 효능으로 血滯經閉, 瘀血疼痛, 瘡癰腫毒의 症에 사용되며, 血中之氣藥이 되어 少用하면 血을 補하고, 多用하면 行導活血하는 작용이 있다²¹⁾. 또한 少量에서는 심근에 대해 가벼운 흥분작용이 있고, 大量에서는 심근수축 억제작용이 있으며, 혈압을 하강시키고, 추출액은 심장의 관상동맥을 확장시키며, 산소결핍에 대한 내성을 증가시킨다. 또한, 혈액응고에 대해 강한 길항작용이 있어 止血의 응고시간을 연장시키는 효능이 있다^{22,23)}. 生地黃은 清熱涼血, 生津止渴하는 효능이 있어 口渴, 吐血, 衄血, 骨蒸勞熱 등에 사용하고, 심장에 대해 강심이뇨 작용을 하며, 骨髓에 작용하여 造血을 촉진시키는 작용이 있다²⁴⁾. 當歸는 補血, 調經, 和血하는 효능으로 頭痛, 眩暈, 跌打損傷과 月經不順, 經閉 등의 婦人科 疾患에 사용되며, 심혈관계에 대해서는 심근중의 불응기를 연장시키고, 혈압을 낮추며, 관상동맥 확장, 항혈소판 작용, 혈중 콜레스테롤치 저하 등의 작용을 한다²⁵⁾. 川芎은 行氣, 祛風, 活血, 止痛의 효능이 있어 血中の 氣藥으로 頭痛, 眩暈, 月經不順, 產後 瘀血塊痛에 사용되며, 심장에 대해서 직접 말초혈관을 확장시키고, 大量을 사용하면 혈압이 下

降되며, 심근수축력을 증가시키고, 심박동수를 저하시켜 관상동맥 혈류량을 개선시키고, 심근에서의 산소 소비량을 감소시킨다. 또한, 항동맥경화증 및 항고콜레스테롤 제제로도 사용되며, 혈관신경에 작용하여 순환축진과 혈액의 신진대사에 관여한다²⁶⁾. 赤芍藥은 養血活血, 消癰散腫의 효능이 있어 婦人月經閉塞이나 產後瘀血積聚로 인한 疼痛과 血熱로 因한 衄血 등에 사용하고, 관상동맥을 확장시키며, 중추신경을 억제하는 효능이 있다.

허혈성 심질환은 관상동맥의 죽상경화 등에 의해 심근에 대한 혈류와 산소의 부족을 초래하는 질환으로서 협심증, 심근경색증, 급사 등이 있다²⁷⁾. 심근에 허혈상태가 지속되면 활성산소종이 발생하는데, 비록 세포내 생리적 방어체계가 작동하지만 과도한 활성산소종의 발생은 이러한 방어체계의 능력을 초과하게 되어 심근세포의 손상을 야기시킨다^{28,29)}. 최근에 보고된 실험에서 심근세포의 산화적 손상에 대해 방어효과를 나타내고 있는 한약재로는 失笑散 煎湯液³⁰⁾, 九香蟲 煎湯液³¹⁾, 奪命散 煎湯液³²⁾, 炙甘草湯³³⁾, 五味子湯^{34,35)}, 四君子湯³⁶⁾, 四物湯⁵⁻⁶⁾ 등이 있다.

한편, 아연(Zinc)은 세포막의 주요 구성성분이며, 막의 구조와 기능, 그리고 효소의 활성화에 중요한 기능을 수행하고³⁷⁾, 중추신경계에서는 세포와 세포간 신호전달의 매개체로서의 역할을 한다. 특히 뇌세포 내에서 아연 농도는 zinc transporters(ZnT1, ZnT2, ZnT3) 및 metallothionein(MT) 등에 의해 조절된다³⁸⁾. 뇌세포에서 다량의 자유상태 아연이 중추 흥분 신경세포의 연결이전세포에 존재하고 있다가 신경자극에 의해 방출된다³⁹⁾. 방출된 아연의 정확한 역할에 대해서는 아직 잘 밝혀져 있지 않지만 N-methyl-D-aspartate(NMDA), GABA(Gamma-Amino-Butyric Acid) 및 voltage-gated calcium channel 등을 통한 이온 혹은 전기적 신호 등을 방해한다. 또한 대뇌결절의 신경세포에서는 아연의 짧은 기간 노출만으로도 신경세포 독성을 야기시킨다. 많은 뇌질환에 있어서 흥분독성이 신경세포 사멸의 주요한 기작으로 알려져 있지만 최근 전일과성 허혈(global transient ischemia)이나 발작(seizures) 등에서 보여지는 뇌세포 내의 아연의 이동 및 축적과정이 신경세포의 사멸을 초래하는 또다른 주요 기작의 하나로 대두되고 있다. 최근 Morishima 등은 Adriamycin(ADR)에 의한 심장근육 독성 발생시 심장근육 세포층에 현저한 아연의 축적이 이루어짐을 보고하였으나 심장 근육세포에 미치는 아연의 축적기전과 산화적 손상에서의 역할 등에 대해서는 아직까지 명확히 밝혀진 바가 없다.

본 연구에서는 ADR에 의한 심장근육 독성에서 관찰되는 아연의 축적이 산화적 손상과 심장세포의 사멸에 밀접하게 연관되어 있을 것으로 생각하여 이를 증명하기 위해 심근세포주인 H9c2를 이용하여 아연의 영향을 조사한 바 아연에 의한 세포 내의 항산화작용 관련 인자의 변화에 의한 직접적인 산화적 손상이 세포독성의 주요 작용기전임을 확인하였으며, 이때 桃紅四物湯의 아연에 의한 심근세포 손상에 대한 방어효과 및 작용기전을 관찰하였다.

그 결과, 아연은 H9c2 세포에서 농도, 시간 의존적으로 세포 사멸을 유도하였으며, 염색질의 응축현상이 관찰되었다. Caspase family cysteine protease는 염증반응 및 세포고사 유도

에 핵심적인 역할을 수행하는 효소로서, 정상적으로 세포 내에서 불활성화 형태로 존재하다가 외부 자극에 의하여 활성화된다^{14,16}). 아연은 H9c2 세포의 caspase-3, -6, -8, 및 -9 protease의 활성화를 유도하지는 못했지만, PARP의 비전형적인 분절을 유도하였다. 아연 처리시 116kDa의 온전한 형태의 단백질이 분절되었으며, 55-60kDa과 45-50kDa으로 분절된 절편이 관찰되었다. 이러한 결과는 caspase-independent한 비전형적인 세포고사성 사멸 기작이 아연에 의한 세포사멸에 관여되어 있음을 시사하였고, PARP의 분절은 caspase-3 protease가 아닌 다른 protease에 의해 매개되었을 가능성을 제시하였다. 이렇게 유발된 H9c2 세포사멸에 대한 桃紅四物湯의 방어효과는 처리 농도에 의존적으로 ZnCl₂의 세포독성을 억제하였다. 이 연구에서 桃紅四物湯은 ZnCl₂(0.2mM)에 의한 H9c2 세포의 염색사 응축을 억제하여 대조군과 유사한 형태적 소견을 보였다.

세포고사(apoptosis)는 다세포 생물의 정상적인 기관 발달과 조직의 항상성 유지에 필수적인 생리현상의 하나인 계획된 세포의 사멸로 빠른 세포탈수 현상에 의한 세포의 수축, 세포막의 기포화 현상, 세포질 내의 칼슘농도의 증가, 염색체의 응축, endonuclease의 활성화에 의한 DNA의 사다리 모양의 분절, transglutaminase의 활성화 및 핵의 절단과 아포토틱 소체(apoptotic body)의 형성이 동반된다. 세포고사의 신호전달 경로는 Fas, TNF와 같은 막단백질을 통한 신호경로와 미토콘드리아를 통한 신호경로 크게 두가지로 나뉘어진다. 막단백질을 통한 신호경로는 Fas와 같은 막단백질이 caspase-8 protease의 활성화를 유도하며, 활성화된 caspase-8은 cytochrome c를 방출하여 effector caspase의 활성화와 세포고사가 유도된다. 미토콘드리아를 통한 세포고사 신호경로는 미토콘드리아에서 세포질로 방출되어지는 cytochrome c가 apoptotic protease activation factor-1 (Apaf-1)과 결합하여 procaspase-9 protease를 활성화 형태로 전환시키고, 이 효소가 caspase-3 protease를 활성화시켜 세포고사 현상을 유도한다¹⁴).

세포고사의 조절에 중요한 역할을 담당하고 있는 미토콘드리아에 대한 최근 보고에 의하면 미토콘드리아의 기능조절은 세포질로 방출되는 cytochrome c, caspase activators, 막전위의 변화 그리고 Bcl-2 family 단백질 등이 관여하는 것으로 알려져 있다¹⁶). Bcl-2 단백질은 대표적인 세포고사 억제 단백질로서 미토콘드리아의 막에 존재하면서 세포의 운명을 결정한다. 세포고사를 억제하는 Bcl-2나 Bcl-XL 단백질 등은 세포고사 촉진 단백질인 Bax와 heterodimer를 형성하거나 암세포에서 항암제 처리시 인산화되어 그 기능을 상실하게 된다. 그러나 Bax, Bak, Bad, 그리고 Bcl-Xs 같은 세포고사 촉진 단백질은 미토콘드리아로 이동되어 cytochrome c를 방출할 수 있는 pore를 형성하게 하여 세포고사를 촉진시키는 역할을 하는 것으로 추정되고 있다.

아연에 의해 유도되는 H9c2 세포의 세포고사 현상에서도 미토콘드리아의 변화를 관찰할 수 있었다. 아연은 미토콘드리아의 막전위 변화, 세포질 내로의 cytochrome c의 방출 그리고 Bak 및 Bcl-2 단백질 발현 변화 등을 유도하여 세포고사의 전형적인 미토콘드리아의 기능이상을 유도하였다. 桃紅四物湯은 세포사멸 억제 단백질인 Bcl-2의 발현 증가와 세포사멸 촉진 단백질인 Bak

의 발현 감소를 유도하여 아연의 세포독성을 방어하였다.

세포고사를 유도하는 신호전달 경로 중의 하나는 death receptor에 의한 세포사멸로서 TNF/nerve growth factor(NGF) receptor family를 의미하며, 수용체의 세포질에 존재하는 death domain(DD)을 통해 세포 내로 신호를 전달하여 세포고사를 유도한다. 현재 TNF receptor-1, CD95(Fas/APO-1) 및 TRAIL 1/2과 같은 death receptor가 알려져 있다. 한편, 전일과정 허혈(global transient ischemia)이나 발작(seizure) 등에서 관찰되는 아연의 축적에 의한 신경세포의 사멸과정에서 활성산소의 형성이 중요한 기전 중의 하나로 보고되고 있다. 또한 Turner 등은 고농도의 산화적 손상 조건하에서는 세포괴사가, 저농도에서는 세포고사가 발생한다고 보고하였다. 세포 내에는 이러한 활성산소에 의한 산화적 손상을 방지하기 위하여 여러가지 항산화물질을 가지고 있으며, 그 중 수용성인 환원형 GSH는 그 자체가 강력한 환원제로서 체내에서 항산화물로서 작용할 뿐만 아니라 여러 항산화 효소의 보조인자로 작용하여 이들의 항산화 작용을 돕기도 한다. 본 연구에서도 외부에서 GSH와 NAC 첨가시에 아연에 의한 세포사멸을 유의성 있게 감소시켰다. 이는 아연에 의해 유발되는 세포사멸이 활성산소 등의 산화적 손상에 기인된 것임을 시사한다. 아연 처리는 세포내 GSH 양의 감소에 의한 세포독성으로 추정되며, 또한 아연에 의한 산화적 손상은 세포내 항산화 기능의 저하에 기인된 H₂O₂ 등의 활성산소종의 생성 증가에 의한 보고와 일치하였다. 이러한 결과는 桃紅四物湯이 산화적 손상에 의한 심근세포 독성을 방어할 수 있는 항산화제로서의 가능성을 시사하고 있다.

이상의 결과를 종합하면 아연은 H9c2 세포에서 미토콘드리아를 경유하는 신호전달 기전에 의하여 세포고사를 유도하고, caspase-independent한 비전형적인 세포고사성 사멸 기작이 관여되어 있으며, 아연에 의한 H9c2 세포사멸은 GSH 고갈로 초래되는 산화적 손상을 통해 유발되었다. 또한, 桃紅四物湯의 전처리 는 아연에 의한 산화적 손상으로부터 PARP 단백질 발현 증가, 미토콘드리아 막전위 감소로 인한 Bak와 Bcl-2 단백질 발현 조절, histone 단백질의 인산화 감소를 통해 H9c2의 심근세포를 방어하는 효과를 나타내었다. 따라서 桃紅四物湯은 산화적 손상으로 인한 허혈성 심질환 등의 심혈관계 질환에 유효하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

결론

桃紅四物湯 추출액이 아연에 의한 심근세포 독성과 산화적 손상에 대한 효과 및 작용기전을 究明하기 위하여 H9c2 세포주에 아연을 처리하여 심근세포의 산화적 손상을 유도한 후 桃紅四物湯을 처리하여 세포생존율 변화, caspase protease의 활성화와 PARP 분절에 미치는 영향, 미토콘드리아 막전위 변화 및 Bcl-2 family 단백질 발현 변화와 histone 단백질 H2AX의 인산화에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

아연의 H9c2 심근세포에 대한 세포독성은 전형적인 산화적 손상에 의한 세포고사를 유도하였다. 桃紅四物湯은 아연에 의한 H9c2 심근세포에 대한 산화적 손상을 농도 의존적으로 유의성있

게 억제하였다. 桃紅四物湯은 아연에 의한 H9c2 심근세포의 고사에서 caspase-3의 세포내 표적 기질인 PARP 단백질의 분해를 억제하고, 온전한 PARP 단백질의 발현을 증가시켰다. 桃紅四物湯은 아연에 의한 미토콘드리아 막전위 감소에 의해 발현이 증가한 Bak 단백질의 발현을 감소시키고, 아연에 의해 발현이 감소한 Bcl-2 단백질을 농도 의존적으로 증가시켰다. 桃紅四物湯은 아연에 의해 증가된 histone 단백질 H2AX의 인산화를 억제하였다.

이상의 결과로 보아 桃紅四物湯은 아연에 의한 심근세포 독성에서 histone 단백질의 인산화 감소, 미토콘드리아 막전위 감소로 인한 Bak와 Bcl-2 단백질의 발현 조절을 통해 심근세포 방어효과를 나타내었으므로 산화적 손상으로 인한 허혈성 심질환 등에 유효하게 활용될 것으로 사료된다.

감사의 글

본 논문은 2003년도 원광대학교 교비 연구비 지원에 의해 연구되었습니다.

참고문헌

1. 朱崑亨 : 新編 丹溪心法附餘, 서울, 大星文化社, p.67, 515, 533, 541, 1982.
2. 李相弦 : 四物湯 構成藥物的 配合이 白鼠의 溶血性 貧血에 미치는 영향, 원광대학교 대학원, 1992.
3. 姜昌洙 : 四物湯 煎湯液이 家兔의 血壓降下에 미치는 영향, 원광대학교 대학원, 1984.
4. 權在龍 : 四物湯 및 季節別 活用方이 血液에 미치는 영향, 대구한의과대학대학원, 1990.
5. 朴鍾雲 : H₂O₂에 의한 培養心筋細胞枯死에 미치는 四物湯의 防禦效果, 원광대학교 대학원, 1998.
6. 趙權一 : 배양심근세포의 산화적 손상에 대한 四物湯의 방어 효과, 원광대학교 대학원, 2002.
7. 郭瑾信 : 桃紅四物湯이 Endotoxin으로 유발된 血栓症에 미치는 영향, 원광대학교 대학원, 1989.
8. 田炳薰 外: 實驗的 血栓症에 미치는 韓藥材의 抗血栓效果에 관한 연구, 대한 동의병리학회지, 10(1):72-78, 1996.
9. Kloner RA, Przyklenk K, Whittaker P : Deleterious effects of oxygen radicals in ischemia/reperfusion. Resolved and unresolved issues. Circulation, 80:1115-1127, 1989.
10. 南昌圭 : 四物湯이 血管內皮細胞에 미치는 영향, 원광대학교 대학원, 1998.
11. 河智容 : 四物湯 및 四君子湯이 Endotoxin으로 유발된 血栓症에 미치는 영향, 경희대학교 대학원, 1988.
12. 趙漢慶 外 : 桃紅四物湯加減方의 抗黏 및 抗轉移 효과에 관한 연구, 대한 동의병리학회지, 13(1):76-90, 1999.
13. 吳謙 外 : 醫宗金鑑(中), 서울, 大成文化社, pp.428-429, 1983.
14. Cryns V, Yuan J : Proteases to die for, Genes Dev, 12(11):1551-1570, 1998.

15. Alnemri ES : Mammalian cell death proteases ; a family of highly conserved aspartate specific cysteine proteases. J cell Biochem, 64(1):33-42, 1997.
16. Cohen GM : Caspases the executioners of apoptosis. Biochem J, 326 (Pt 1):1-16, 1997.
17. Ward IM, Chen J : Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. J Biol chem, 276(51):47759-47762, 2001.
18. Paull TT, Rogakou EP, Yamazaki V, Kirchgessner CU, Gellert M, Bonner WM. A. : Critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. Curr Biol, 10(15):886-895, 2000.
19. Burma S, Chen BP, Murphy M, Kurimasa A, Chen DJ : ATM phosphorylates histone H2AX in response to DNA double-strand breaks. J Biol chem, 276(45):42462-42467, 2001.
20. 권영구 외 : 桂枝茯苓丸, 小腹逐瘀湯, 桃紅四物湯이 메산지움세포 증식과 Fibronectin 합성에 미치는 영향, 대한한방내과학회지, 24(1):94-103, 2003.
21. 康舜洙 : 巴東方劑學, 서울, 大成文化社, pp.122-123, 1996.
22. 전국의과대학 교수 번역 : 임상의학 오늘의 진단 및 치료, 서울, 도서출판 한우리, pp.401-432, 1999.
23. Singh N, Dhalla AK, Seneviratne C, Singal PK : Oxidative stress and heart failure. Mol Cell Biochem, 147:77-81. 1995.
24. Halliwell B and Gutteridge, J.M.C. : 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.
25. 韓東勳 : 失笑散 煎湯液이 배양 심근세포에 미치는 영향, 원광대학교 대학원, 1999.
26. 趙賢翼 : 九香蟲 煎湯液이 배양 심근세포에 미치는 영향, 원광대학교 대학원, 2000.
27. 朴洗鍊 : 奪命散이 배양 심근세포 및 혈관 평활근세포에 미치는 영향, 원광대학교 대학원, 1999.
28. 李來春 : 炙甘草湯이 배양 심근세포에 미치는 영향, 원광대학교 대학원, 1999.
29. 黃普淵 : 심근세포의 산화적 손상에 대한 五味子湯의 효과 및 작용기전 연구, 원광대학교 대학원, 2001.
30. 崔眞榮 : 五味子湯이 심근세포에 미치는 영향, 원광대학교 대학원, 2001.
31. 鄭雨哲 : 배양심근세포의 산화적 손상에 대한 四君子湯의 방어효과, 원광대학교 대학원, 2002.
32. Bettger WJ, O'Dell BL : A critical physiological role of zinc in the structure and function of biomembranes. Life Sci, 28(13):1425-1438, 1981.
33. Cuajungco MP, Lees GJ : Zinc metabolism in the brain : relevance to human neurodegenerative disorders. Neurobiol Dis, 4(3-4):137-169, 1997.
34. Chung KC, Park JH, Kim CH, Lee HW, Sato N, Uchiyama

- Y, Ahn YS: Novel biphasic effect of pyrrolidine dithiocarbamate on neuronal cell viability is mediated by the differential regulation of intracellular zinc and copper ion levels, NF-kappa B, and MAP kinases. *J Neurosci Res*, 59(1):117-125, 2000.
35. Perez-Clausell J, Danscher G : Intravesicular localization of zinc in rat telencephalic boutons. A histochemical study, *Brain Res*, 337(1):91-98, 1985.
36. Yokoyama M, Koh J, Choi DW : Brief exposure to zinc is toxic to cortical neurons. *Neurosci Lett*, 71(3):351-355, 1986.
37. Morishima I, Okumura K, Matsui H, Kaneko S, Numaguchi Y, Kawakami K, Mokuno S, Hayakawa M, Toki Y, Ito T, Hayakawa T :Zinc accumulation in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats: effects of melatonin, a cardioprotective antioxidant. *J Pineal Res*, (4):204-210, 1999.
38. Luo X, Budihardjo I, Zou H, Slaughter C, Wang X : Bid, a Bcl-2 interacting protein, mediates cytochrome c release from mitochondria in response to activation of cell surface death receptors. *Cell*, 94(4):481-490, 1998.
39. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, Srinivasula SM, Ahmad M, Alnemri ES, Wang X : Cytochrome c and dATP- dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91(4):479-489, 1997.
40. Zou, Li Y, Liu X, Wang X : An APAF-1 : Cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9. *J Biol Chem*, 274(17): 11549-11556, 1999.