

심근세포에서 苦蔘 에틸 아세테이트 분획의 항산화 효과

권강범 · 김은경 · 임양의¹ · 송용선¹ · 박종하¹ · 문형철² · 류도곤*

원광대학교 한의과대학 생리학교실, 1: 원광대학교 한의과대학 재활의학교실, 2: 원광대학교 한의과대학 침구학교실

Anti-oxidant Effect of the Ethyl Acetate Soluble Fraction of *Sophorae Radix* in H9c2 Cells

Kang Beom Kwon, Eun Kyung Kim, Yang Eui Lim¹, Jong Ha Park¹, Yung Sun Song¹, Hyung Cheal Moon², Do Gon Ryu*

Department of Physiology, 1: Department of Oriental Rehabilitation Medicine, 2: Department of Acupuncture & Moxibustion, School of Oriental Medicine, Wonkwang University

To test the cytoprotective effect of *sophorae radix* (SR) against hydrogen peroxide (H₂O₂)-induced cytotoxicity, we investigated the cell viability using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) assay in the presence of ethyl acetate subfractions of SR water extracts in H9c2 cells. And to clarify the cytoprotective mechanism of SR extracts, we evaluated the cellular glutathione (GSH) contents in the presence of subfraction 1, 2, 3, and 4 of SR ethyl acetate soluble fractions. Among 1~12 subfractions of SR ethyl acetate soluble fractions, 1, 2, 3 and 4 subfractions have an efficacy inhibiting the cytotoxicity induced by H₂O₂ in H9c2 cells. Also, the protective effects of 1, 2, 3 and 4 subfractions of SR ethyl acetate soluble fractions resulted from the anti-oxidant effects. These results suggest that ethyl acetate soluble fractions of SR water extracts is effective in the prevention of H₂O₂-induced cytotoxicity and 1, 2, 3 and 4 subfraction of ethyl acetate soluble fractions possess the anti-oxidant component.

Key words : *Sophorae Radix*, Hydrogen Peroxide, H9c2 Cells, glutathione, ethyl acetate subfractions

서 론

苦蔘(*Sophorae Radix*)은 豆科에 속한 도둑놈의 지팡이(*Sophora flavescens* Ait.)의 根으로서¹⁾ 성분은 *matrine*, *oxymatrine*이 주요 alkaloid이며 그 외에 *sophocarpine*, *sophoranol*, *allomatrine*, *cytisine*, *methylcystine* 등이 포함되어 있다²⁻⁶⁾.

활성산소는 정상상태에서 산화-환원작용이나 사립체의 산화인산화작용에 의하여 superoxide anion(O²⁻)이 형성되고 superoxide dismutase(SOD)에 의하여 hydrogen peroxide(H₂O₂)가 형성되고 glutathione peroxidase 및 catalase에 의하여 소실되어 진다⁹⁾. 그러나 저산소증이나 허혈과 같은 병적인 상태에서 비정상적으로 생성된 산소자유기는 세포막의 지방을 과산화시킬 뿐만 아니라 각종 효소나 단백질을 불활성화시킴으로써 세포 및

조직의 손상을 초래하게 된다⁹⁻¹¹⁾.

苦蔘 추출물의 항산화 효과에 대하여 서 등¹²⁾은 苦蔘의 ethyl acetate와 n-butanol 추출물에서 *adrymycin*에 대한 방어효과를 나타낸다고 보고하였다.

이에 저자는 slicagel column를 이용하여 고삼 못 추출물의 ethyl acetate 수용성 추출물에 대한 12종류의 subfraction을 획득한 후 H₂O₂에 대한 세포 독성 방어효과를 조사하고 세포내 glutathione 함량을 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 시약 및 기기

추출 및 분획용 용매는 EP급 용매를 사용하였고, column용 용매는 EP급 용매를 재증류하여 사용하였다. Column packing용 silica gel은 Kiesel gel 60 (Merck, USA)으로 230-240 mesh를 사용하였다. 세포 배양은 CO₂ incubator(Optima, USA)를 이용하였

* 교신저자 : 류도곤, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학

· E-mail : tkryu@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6846

· 접수 : 2004/03/29 · 수정 : 2004/04/17 · 채택 : 2004/05/19

고, 세포수의 계산은 Hemocytometer를 사용하였으며 현미경은 도립현미경(Inverted Microscope, Olympus IX-71, JAPAN)을 사용하였다. 세포 생존율 및 세포내 GSH 함량의 측정에는 ELISA(E-max, Molecular Device, USA)를 사용하였다.

2. H9c2 심근 세포주 배양

Embryonic rat 심장에서 유래한 세포주인 H9c2(ATCC, CRL1446)¹³⁾는 CO₂ 세포배양기에서(37℃, 5% CO₂) 10% 우태아 혈청이 포함된 DMEM에서 배양하였다. 48시간 주기로 0.05% Trypsin-EDTA를 사용하여 계대 배양하였으며, 분주 12시간 후에 약재를 처리하여 세포 생존율과 GSH 함량을 측정하였다.

3. 苦蔘 전탕액 및 용매 추출

苦蔘 200g에 3차 증류수 1.8 l를 각각 환저플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 2시간동안 전열기로 전탕한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 진공 농축기로 감압농축한 후 동결건조기에서 24시간 동결건조하여 57.0g의 분말 시료를 얻었다. 위의 과정을 2회 반복하여 모은 苦蔘 전탕액을 한 등의 방법¹⁴⁾에 따라 계통분획을 하였다. 계통분획방법은 위에서 얻은 물 가용부 28.5g을 methylene chloride, ethyl acetate, n-butanol 및 H₂O 가용부로 분획하여 각각 1.98g, 4.6g, 33.07g, 35.33g을 얻었다. 이 중 ethyl acetate 분획물을 silica gel로 코팅한 후 증발시켜서 silica gel로 충전한 column에서 flash chromatography 방법을 이용하여, ethyl acetate와 n-hexane을 점차 올리면서 분획하였다. 도표화하면 다음과 같다.

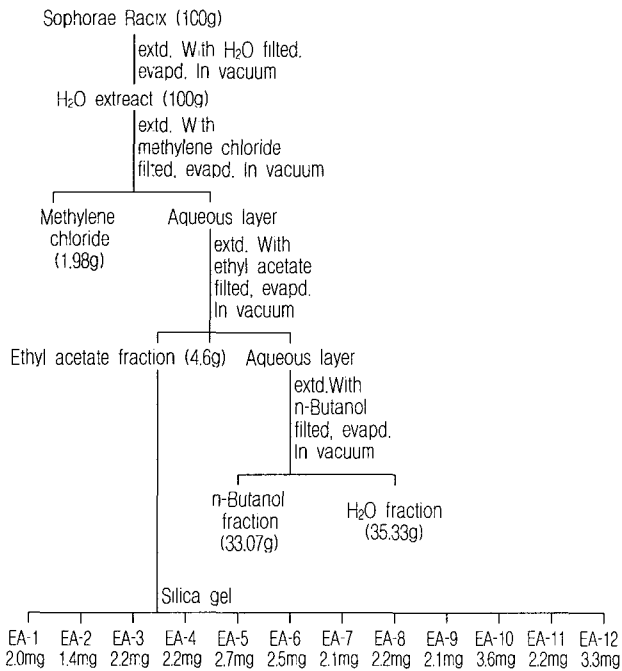


Fig. 1. Extraction and fractionation of Sophorae Radix

4. Hydrogen peroxide 및 苦蔘 추출물의 처리

본 실험에 사용한 시약으로는 hydrogen peroxide(H₂O₂,

Sigma)로 1, 0.5, 0.25mM의 저장액을 만들어 -4℃에 보관한 후 실험당일 50, 100, 250, 500 μM의 농도로 희석하여 사용하였다. 또한 苦蔘 물 추출물은 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)으로 100mg/ml의 농도로 저장액을 만들어 -20℃에 보관한 후 실험당일 적당한 농도로 희석하여 사용하였으며 유기용매 추출물은 dimethyl sulfoxide(DMSO, Sigma)에 녹여 -20℃에 보관한 후 적당한 양으로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다.

5. 세포 생존율 측정

세포 생존율은 세포 배양관(24-well plate)에 세포(1×10⁵ cells/ml)를 1ml씩 분주하여 12시간 이상 CO₂ 세포 배양기 안에서 안정시킨 후, 실험에 필요한 시약을 처리한 후, 배양액 최종 부피의 1/10 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, Sigma)을 첨가하여 4시간 반응하였다. 생존 세포에 의해 형성된 보라색 formazan은 DMSA를 첨가하여 용해시킨 다음 분광광도계(ELISA reader, E-max, Molecular Devices, USA)를 이용하여 570nm 파장에서 흡광도(absorbance)를 측정하였다.

6. 총 glutathione 함량 측정

세포내 glutathione(GSH) 함량의 측정에는 Total Glutathione Quantification Kit T419(Dojindo Molecular Technologies, INC., USA)를 이용하여 측정하였다. 요약하면 세포를 배양관(6-well plate)에 세포(5×10⁵ cells/ml)를 분주한 후 분주하여 12시간 이상 CO₂ 세포 배양기 안에서 안정시킨 후, 실험에 필요한 시약을 처리한 후, 200×g에서 10분간 원심분리 하여 세포를 획득하였다. 획득한 세포를 PBS로 washing 한 후 200×g에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 버리고 10mM HCl을 첨가한 후 freezing/thawing을 2번 반복하여 세포를 용해하였다. 5% 5-sulfosalicylic acid(SSA, Sigma)를 첨가한 후 8,000×g에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 새로운 tube에 옮긴 후 manual에 따라 총 GSH 함량을 측정하였다. 표준 곡선은 1.56 μM, 3.13 μM, 6.25 μM, 12.5 μM, 25 μM, 50 μM의 standard GSH를 이용하여 작성하였다.

7. 통계처리

실험결과에 대한 유의성의 검정은 ANOVA one-way test(Microcal Origin, ver. 6.0, IBM, USA)에 의하였으며 p값이 0.05, 0.01, 0.001 이하인 것을 유의한 것으로 하였다.

실험성적

1. 苦蔘 Ethyl Acetate Silica gel Column 분획물의 영향

苦蔘 유기용매 분획물 중 ethyl acetate 분획물에서 hydrogen peroxide에 의한 H9c2 세포 생존율 감소에 대하여 방어효과를 나타냈으므로 silica gel column을 이용하여 12개의 분획물을 획득한 후 이들의 방어효과를 조사하였다.

1) 苦蔘 ethyl acetate(EA) subfraction #1~#4 분획물의 방어효과
 苦蔘 EA silica gel column 분획물 중 subfraction #1, 2, 3, 4(SR EA SF-1~4)가 hydrogen peroxide(H₂O₂)에 의해 감소하는 H9c2 세포 생존율에 대한 방어효과를 관찰하기 위하여 250 μM H₂O₂에 노출시키기 3시간 전에 苦蔘 2.5, 5.0, 10, 20 μg/ml SR EA SF-1~4 분획물을 처리한 후 세포 생존율을 MTT 정량법에 의하여 조사하였다. 그 결과 2.5, 5.0, 10, 20 μg/ml SR EA SF-1 분획물을 처리한 군의 세포 생존율은 각각 72.2, 83.5(p<0.05), 87.0(p<0.01), 90.9(p<0.01)로 나타나 H₂O₂만 처리한 군의 세포 생존율 55.5%에 비하여 유의한 증가를 나타냈으며 SR EA SF-2 분획물을 처리한 군의 세포 생존율은 각각 61.2, 66.7, 86.5(p<0.05), 92.2(p<0.01)로 나타나 H₂O₂만 처리한 군의 세포 생존율 52.9%에 비하여 유의한 증가를 나타냈다(Table 1). 또한 SR EA SF-3 분획물을 처리한 군의 세포 생존율은 각각 79.7, 80.9, 87.9(p<0.05), 90.8(p<0.01)로 나타나 H₂O₂만 처리한 군의 세포 생존율 57.7%에 비하여 유의한 증가를 나타냈으며 SR EA SF-4 분획물을 처리한 군의 세포 생존율은 각각 75.1, 73.4, 86.2(p<0.05), 89.1(p<0.01)로 나타나 H₂O₂만 처리한 군의 세포 생존율 52.9%에 비하여 유의한 증가를 나타냈다(Table 2).

Table 1. A protective effects of Sophorae radix(SR) ethyl acetate(EA) silica gel column fractions(#1~#2) in hydrogen peroxide(HP)-treated H9c2 cells.

SR EA SF-1(μg/ml)	H ₂ O ₂ (μ M)	Viability (% of control)	SR EA SF-2(μg/ml)	H ₂ O ₂ (μ M)	Viability (% of control)
0	0	100	0	0	100
0	250	55.5±1.5 [~]	0	250	52.9±3.2 [~]
2.5	250	72.2±3.2	2.5	250	61.2±4.8
5	250	83.5±4.1 [*]	5	250	66.7±6.3
10	250	87.0±3.3 ^{**}	10	250	86.5±2.6 ^{**}
20	250	90.9±2.3 ^{**}	20	250	92.2±3.1 ^{**}

Cells were treated with 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 μg/ml SR EA silica gel fractions(SF) fractions (#1 and #2) for 3 hours, and then exposed to 250 μM H₂O₂ for 24 hours. Cell viability was measured by MTT assay and determined as % of control. The results indicate the mean±SE for 4 experiments. Significant differences from the control group and HP treated group are marked with asterisk. [~]p<0.05, ^{*}p<0.01 vs control; ^{**}p<0.01 vs H₂O₂.

Table 2. A protective effects of Sophorae radix(SR) ethyl acetate(EA) silica gel column fractions(#3~#4) in hydrogen peroxide(HP)-treated H9c2 cells.

SR EA SF-3(μg/ml)	H ₂ O ₂ (μ M)	Viability (% of control)	SR EA SF-4(μg/ml)	H ₂ O ₂ (μ M)	Viability (% of control)
0	0	100	0	0	100
0	250	57.7±1.5 [~]	0	250	51.4±2.9 [~]
2.5	250	79.7±0.7	2.5	250	75.1±3.1
5	250	80.9±2.6	5	250	73.4±2.5
10	250	87.9±5.8 [*]	10	250	86.2±3.4 [*]
20	250	90.8±2.1 ^{**}	20	250	89.1±4.9 ^{**}

Cells were treated with 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 μg/ml SR EA silica gel fractions(SF) fractions (#3 and #4) for 3 hours, and then exposed to 250 μM H₂O₂ for 24 hours. Cell viability was measured by MTT assay and determined as % of control. The results indicate the mean±SE for 4 experiments. Significant differences from the control group and HP treated group are marked with asterisk. [~]p<0.05, ^{*}p<0.01 vs control; ^{**}p<0.01 vs H₂O₂.

2) 苦蔘 ethyl acetate(EA) subfraction #5~#8 분획물의 방어효과
 苦蔘 EA silica gel column 분획물 중 subfraction #5, 6, 7, 8(SR EA SF-5~8)가 hydrogen peroxide(H₂O₂)에 의해 감소하는

H9c2 세포 생존율에 대한 방어효과를 관찰하기 위하여 250 μM H₂O₂에 노출시키기 3시간 전에 苦蔘 2.5, 5.0, 10, 20 μg/ml SR EA SF-5~8 분획물을 처리한 후 세포 생존율을 MTT 정량법에 의하여 조사하였다. 그 결과 2.5, 5.0, 10, 20 μg/ml SR EA SF-5 분획물을 처리한 군의 세포 생존율은 각각 55.3, 55.9, 57.2, 57.5%로 나타나 H₂O₂만 처리한 군의 세포 생존율 55.6%에 비하여 유의한 변화를 나타내지 않았으며 SR EA SF-6 분획물을 처리한 군의 세포 생존율은 각각 54.6, 55.4, 56.2, 56.8%로 나타나 H₂O₂만 처리한 군의 세포 생존율 54.8%에 비하여 유의한 변화를 나타내지 않았다(Table 3). 또한 SR EA SF-7 분획물을 처리한 군의 세포 생존율은 각각 52.3, 54.8, 55.0, 57.0%로 나타나 H₂O₂만 처리한 군의 세포 생존율 53.6%에 비하여 유의한 변화를 나타내지 않았으며 SR EA SF-8 분획물을 처리한 군의 세포 생존율은 각각 53.1, 55.0, 56.2, 56.3%로 나타나 H₂O₂만 처리한 군의 세포 생존율 52.8%에 비하여 유의한 변화를 나타내지 않았다(Table 4).

Table 3. A protective effects of Sophorae radix(SR) ethyl acetate(EA) silica gel column fractions(#5~#6) in hydrogen peroxide(HP)-treated H9c2 cells.

SR EA SF-5(μg/ml)	H ₂ O ₂ (μ M)	Viability (% of control)	SR EA SF-6(μg/ml)	H ₂ O ₂ (μ M)	Viability (% of control)
0	0	100	0	0	100
0	250	55.6±2.3 [~]	0	250	54.8±2.1 [~]
2.5	250	55.3±3.5	2.5	250	54.6±3.3
5	250	55.9±4.6	5	250	55.4±4.2
10	250	57.2±2.3	10	250	56.2±3.5
20	250	57.5±6.2	20	250	56.8±5.5

Cells were treated with 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 μg/ml SR EA silica gel fractions(SF) fractions(#5 and #6) for 3 hours, and then exposed to 250 μM H₂O₂ for 24 hours. Cell viability was measured by MTT assay and determined as % of control. The results indicate the mean±SE for 4 experiments. Significant differences from the control group are marked with asterisk. [~]p<0.01.

Table 4. A protective effects of Sophorae radix(SR) ethyl acetate(EA) silica gel column fractions(#7~#8) in hydrogen peroxide(HP)-treated H9c2 cells.

SR EA SF-7(μg/ml)	H ₂ O ₂ (μ M)	Viability (% of control)	SR EA SF-8(μg/ml)	H ₂ O ₂ (μ M)	Viability (% of control)
0	0	100	0	0	100
0	250	53.6±3.6 [~]	0	250	52.8±2.4 [~]
2.5	250	52.3±6.3	2.5	250	53.1±5.5
5	250	54.8±2.3	5	250	55.0±4.1
10	250	55.0±4.8	10	250	56.2±3.8
20	250	57.0±3.6	20	250	56.3±5.3

Cells were treated with 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 μg/ml SR EA silica gel fractions(SF) fractions(#7 and #8) for 3 hours, and then exposed to 250 μM H₂O₂ for 24 hours. Cell viability was measured by MTT assay and determined as % of control. The results indicate the mean±SE for 4 experiments. Significant differences from the control group are marked with asterisk. [~]p<0.01.

3) 苦蔘 ethyl acetate(EA) subfraction #9~#12 분획물의 방어효과
 苦蔘 EA silica gel column 분획물 중 subfraction #9, 10, 11, 12(SR EA SF-9~12)가 hydrogen peroxide(H₂O₂)에 의해 감소하는 H9c2 세포 생존율에 대한 방어효과를 관찰하기 위하여 250 μM H₂O₂에 노출시키기 3시간 전에 苦蔘 2.5, 5.0, 10, 20 μg/ml SR EA SF-9~12 분획물을 처리한 후 세포 생존율을 MTT 정량법에

의하여 조사하였다. 그 결과 2.5, 5.0, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SR EA SF-9 분획물을 처리한 군의 세포 생존율은 각각 52.4, 53.6, 54.8, 55.5%로 나타나 H_2O_2 만 처리한 군의 세포 생존율 55.8%에 비하여 유의한 변화를 나타내지 않았으며 SR EA SF-10 분획물을 처리한 군의 세포 생존율은 각각 53.1, 53.4, 54.9, 55.2%로 나타나 H_2O_2 만 처리한 군의 세포 생존율 54.2%에 비하여 유의한 변화를 나타내지 않았다(Table 5). 또한 SR EA SF-11 분획물을 처리한 군의 세포 생존율은 각각 53.6, 53.3, 53.5, 54.5%로 나타나 H_2O_2 만 처리한 군의 세포 생존율 53.5%에 비하여 유의한 변화를 나타내지 않았으며 SR EA SF-12 분획물을 처리한 군의 세포 생존율은 각각 53.1, 54.6, 55.6, 55.3%로 나타나 H_2O_2 만 처리한 군의 세포 생존율 52.3%에 비하여 유의한 변화가 나타나지 않았다(Table 6).

Table 5. A protective effects of Sophorae radix(SR) ethyl acetate(EA) silica gel column fractions(#9~#10) in hydrogen peroxide(HP)-treated H9c2 cells.

SR EA SF-9($\mu\text{g}/\text{ml}$)	H_2O_2 (μM)	Viability (% of control)	SR EA SF-10($\mu\text{g}/\text{ml}$)	H_2O_2 (μM)	Viability (% of control)
0	0	100	0	0	100
0	250	55.8 \pm 3.1*	0	250	54.2 \pm 2.3*
2.5	250	52.4 \pm 3.5	2.5	250	53.1 \pm 3.1
5	250	53.6 \pm 2.4	5	250	53.4 \pm 3.3
10	250	54.8 \pm 5.5	10	250	54.9 \pm 4.2
20	250	55.5 \pm 3.5	20	250	55.2 \pm 3.5

Cells were treated with 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SR EA silica gel fractions (SF) fractions(#9 and #10) for 3 hours, and then exposed to 250 μM H_2O_2 for 24 hours. Cell viability was measured by MTT assay and determined as % of control. The results indicate the mean \pm SE for 4 experiments. Significant differences from the control group are marked with asterisk. **p<0.05.

Table 6. A protective effects of Sophorae radix(SR) ethyl acetate(EA) silica gel column fractions(#11~#12) in hydrogen peroxide(HP)-treated H9c2 cells.

SR EA SF-11($\mu\text{g}/\text{ml}$)	H_2O_2 (μM)	Viability (% of control)	SR EA SF-12($\mu\text{g}/\text{ml}$)	H_2O_2 (μM)	Viability (% of control)
0	0	100	0	0	100
0	250	53.5 \pm 2.3**	0	250	52.3 \pm 2.3**
2.5	250	53.6 \pm 2.6	2.5	250	53.1 \pm 2.6
5	250	53.3 \pm 2.3	5	250	54.6 \pm 3.1
10	250	53.5 \pm 4.6	10	250	55.6 \pm 2.6
20	250	54.5 \pm 3.5	20	250	55.3 \pm 2.6

Cells were treated with 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SR EA silica gel fractions (SF) fractions(#11 and #12) for 3 hours, and then exposed to 250 μM H_2O_2 for 24 hours. Cell viability was measured by MTT assay and determined as % of control. The results indicate the mean \pm SE for 4 experiments. Significant differences from the control group are marked with asterisk. **p<0.01.

2. 苦蔘 Ethyl Acetate Silica gel Column 분획물(#1~#4)이 세포내 GSH양에 미치는 영향

苦蔘 유기용매 분획물 중 ethyl acetate silica gel column 분획물 중 #1, #2, #3, #4 층에서 hydrogen peroxide에 의한 H9c2 세포 생존율 감소에 대하여 방어효과를 나타냈으므로 이에 대한 항산화 효과를 조사하고자 세포내 glutathione(GSH)양을 조사하였다.

1) 苦蔘 ethyl acetate(EA) subfraction #1 분획물의 효과

苦蔘 EA silica gel column 분획물 중 subfraction #1(SR EA

SF-1)이 hydrogen peroxide(H_2O_2)에 의해 감소하는 H9c2 세포 GSH양에 대한 방어효과를 관찰하기 위하여 250 μM H_2O_2 에 노출시키기 3시간 전에 苦蔘 2.5, 5.0, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SR EA SF-1 분획물을 처리한 후 세포내 GSH양을 측정하였다. 그 결과 2.5, 5.0, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SR EA SF-1 분획물을 처리한 군의 세포내 GSH양은 각각 9.4(p<0.01), 14.5(p<0.01), 12.5(p<0.01), 12.5 μM (p<0.01)로 나타나 H_2O_2 만 처리한 군의 2.8 μM 에 비하여 유의한 증가를 나타냈다(Fig. 2).

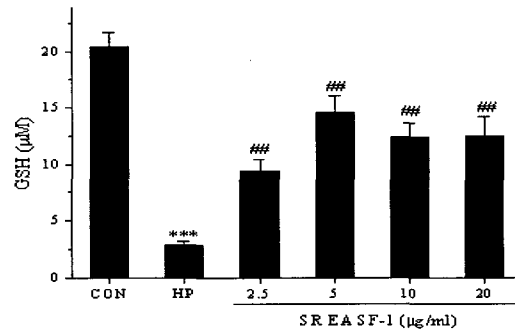


Fig. 2. A protective effects of Sophorae radix ethyl acetate silica gel column fractions #1 in(SR EA SF-1) hydrogen peroxide (HP)-decrease of glutathione(GSH) in H9c2 cells. Cells were treated with 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SR EA SF-1 for 3 hours, and then exposed to 250 μM H_2O_2 for 24 hours. Cellular GSH was measured as described in Materials and Methods. The results indicate the mean \pm SE for 4 experiments. Significant differences from the control group and HP treated group are marked with asterisk. ***p<0.001 vs control; ##p<0.01 vs H_2O_2 .

2) 苦蔘 ethyl acetate(EA) subfraction #2 분획물의 효과

苦蔘 EA silica gel column 분획물 중 subfraction #2(SR EA SF-2)이 hydrogen peroxide(H_2O_2)에 의해 감소하는 H9c2 세포 GSH양에 대한 방어효과를 관찰하기 위하여 250 μM H_2O_2 에 노출시키기 3시간 전에 苦蔘 2.5, 5.0, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SR EA SF-2 분획물을 처리한 후 세포내 GSH양을 측정하였다. 그 결과 2.5, 5.0, 10, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SR EA SF-2 분획물을 처리한 군의 세포내 GSH양은 각각 10.2(p<0.05), 24.6(p<0.01), 31.3(p<0.01), 14.7 μM (p<0.05)로 나타나 H_2O_2 만 처리한 군의 3.4 μM 에 비하여 유의한 증가를 나타냈다(Fig. 3).

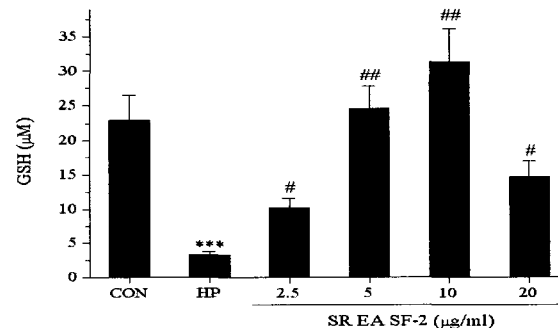


Fig. 3. A protective effects of Sophorae radix ethyl acetate silica gel column fractions #2 in(SR EA SF-2) hydrogen peroxide (HP)-decrease of glutathione(GSH) in H9c2 cells. Cells were treated with 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ SR EA SF-2 for 3 hours, and then exposed to 250 μM H_2O_2 for 24 hours. Cellular GSH was measured as described in Materials and Methods. The results indicate the mean \pm SE for 4 experiments. Significant differences from the control group and HP treated group are marked with asterisk. ***p<0.001 vs control; #p<0.05, ##p<0.01 vs H_2O_2 .

3) 苦蓼 ethyl acetate(EA) subfraction #3 분획물의 효과

苦蓼 EA silica gel column 분획물 중 subfraction #3(SR EA SF-3)이 hydrogen peroxide(H₂O₂)에 의해 감소하는 H9c2 세포 GSH양에 대한 방어효과를 관찰하기 위하여 250 μM H₂O₂에 노출시키기 3시간 전에 苦蓼 2.5, 5.0, 10, 20 μg/ml SR EA SF-1 분획물을 처리한 후 세포내 GSH양을 측정하였다. 그 결과 2.5, 5.0, 10, 20 μg/ml SR EA SF-3 분획물을 처리한 군의 세포내 GSH양은 각각 5.8, 7.8(p<0.05), 12.4(p<0.05), 21.4 μM(p<0.01)로 나타나 H₂O₂만 처리한 군의 3.5 μM에 비하여 유의한 증가를 나타냈다(Fig. 4).

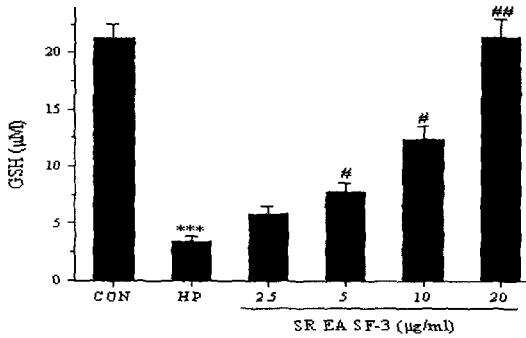


Fig. 4. A protective effects of Sophorae radix ethyl acetate silica gel column fractions #3 in(SR EA SF-3) hydrogen peroxide (HP)-decrease of glutathione(GSH) in H9c2 cells. Cells were treated with 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 μg/ml SR EA SF-3 for 3 hours, and then exposed to 250 μM H₂O₂ for 24 hours. Cellular GSH was measured as described in Materials and Methods. The results indicate the mean±SE for 4 experiments. Significant differences from the control group and HP treated group are marked with asterisk. ***p(0.001) vs control; #p(0.05), ##p(0.01) vs H₂O₂.

4) 苦蓼 ethyl acetate(EA) subfraction #4 분획물의 효과

苦蓼 EA silica gel column 분획물 중 subfraction #4(SR EA SF-4)이 hydrogen peroxide(H₂O₂)에 의해 감소하는 H9c2 세포 GSH양에 대한 방어효과를 관찰하기 위하여 250 μM H₂O₂에 노출시키기 3시간 전에 苦蓼 2.5, 5.0, 10, 20 μg/ml SR EA SF-4 분획물을 처리한 후 세포내 GSH양을 측정하였다. 그 결과 2.5, 5.0, 10, 20 μg/ml SR EA SF-4 분획물을 처리한 군의 세포내 GSH양은 각각 4.1, 6.3, 11.9(p<0.05), 7.9 μM로 나타나 H₂O₂만 처리한 군의 3.7 μM에 비하여 유의한 증가를 나타냈다(Fig. 5).

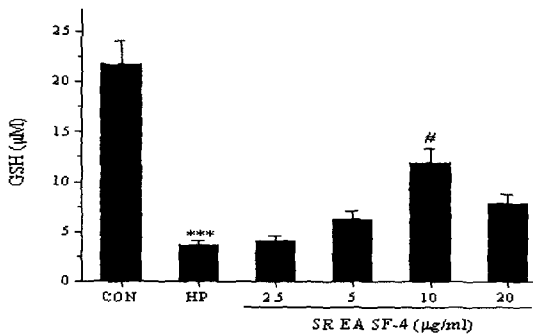


Fig. 5. A protective effects of Sophorae radix ethyl acetate silica gel column fractions #4 in(SR EA SF-4) hydrogen peroxide (HP)-decrease of glutathione(GSH) in H9c2 cells. Cells were treated with 2.5, 5.0, 10.0, 20.0 μg/ml SR EA SF-4 for 3 hours, and then exposed to 250 μM H₂O₂ for 24 hours. Cellular GSH was measured as described in Materials and Methods. The results indicate the mean±SE for 4 experiments. Significant differences from the control group and HP treated group are marked with asterisk. ***p(0.001) vs control; #p(0.05) vs H₂O₂.

고 찰

苦蓼은 구강 점막세포에서 세포주기 단백질에 대한 변화를 유도하는 효과¹⁵⁾ 만성 B형 간염에 대한 치료효과¹⁶⁾, 항 알레르기 효과¹⁷⁾가 있는 것으로 보고되었으며 Okawa 등은 苦蓼 추출물의 항산화효과¹⁸⁾를 보고하였다. 본 논문은 Okawa 등¹⁸⁾의 논문을 토대로 苦蓼 ethyl acetate(EA) 추출물의 심근 세포주인 H9c2 세포에서 활성산소종의 하나인⁹⁾ 과산화수소(hydrogen peroxide, H₂O₂)에 의해 유도된 세포 독성에 대한 방어효과를 조사하였다.

이에 저자는 苦蓼 EA 분획층을 silica gel column을 이용하여 12 종류의 소분획층을 얻은 후 과산화수소의 H9c2 세포 독성에 대한 방어효과를 조사하였다. EA 소분획층 1, 2, 3, 4는 처리한 농도에 의존적으로 과산화수소에 대한 세포 독성을 방어하는 것으로 나타났다(Table 1, 2). 특히 소분획 1, 2, 3, 4 20ug/ml의 농도로 전 처리한 군 세포 생존율은 대조군(100%)에 비하여 각각 90.7%, 92.2%, 90.8%, 89.1%로 나타나 거의 대조군 수준으로 과산화수소 세포독성에 대하여 억제하였다. 그러나 나머지 EA 소분획층 5~12는 과산화수소에 의한 세포독성을 방어하지 못하였다(Table 3-6). 이상의 결과로 苦蓼 물 추출물 중 과산화수소에 의한 방어효과를 나타낸 성분은 EA에 의해 용해되는 물질인 것을 추측할 수 있었다.

생체는 외부와 관계없이 스스로 유리기를 발생시키는 기전이 있는데 그 중 현저한 것은 산소를 중심으로 하는 일련의 유리기들로서 호기성 호흡을 하는 생물이 최종 전자수용체로 이용하는 산소를 4가 환원시켜 물로 배설하는데 그 중간물질로 생성되는데 이들을 활성산소라고 한다^{10,19)}. 이들 활성산소는 자체의 반응성이 높아 생체막의 불포화 지방산을 과산화시키거나 단백질, DNA를 변형시킬 수 있으므로¹¹⁾ 생체내에서도 이들을 제거해야 한다. 이러한 활성산소가 과량으로 생산되면 심근세포에 독성을 나타내는 것으로 알려져 있다^{20,22)}. 특히 세포내 glutathione (GSH)은 직접 혹은 간접적으로 glutathione peroxidase의 보조인자로서 작용하여 세포내 과산화수소의 탈독성화 작용에 관여하는 것으로 알려져 있다^{23,25)}. 또한 심근세포 독성시 GSH는 감소하여 활성산소가 세포내 단백질의 thiol group과 반응한다는 보고가 있다^{26,27)}. 이러한 세포내 GSH 생합성의 억제제인 buthionine sulfoximine을 심근세포에 처리했을 때 세포내 GSH 함량을 감소시켜 산화적 손상을 유도한다^{28,29)}.

이에 저자는 苦蓼 EA 소분획층 1, 2, 3, 4가 과산화수소에 의한 독성에 대하여 방어효과를 나타낸 것이 세포내 GSH 함량과 관련이 있는지 조사하고자 苦蓼 EA 소분획층을 H9c2에 처리하기 3시간 전처리한 후 과산화수소를 24시간 동안 처리한 후 세포내 GSH양을 측정하였다. 그 결과 苦蓼 EA 소분획층 1은 5.0ug/ml의 농도에서 과산화수소에 의해 감소한 GSH양(2.8 μM)을 14.5 μM로 유지시켜 세포 독성을 방어하는 것으로 나타났다(Fig. 2). 또한 EA 소분획층 2는 10ug/ml의 농도까지 과산화수소에 의한 GSH양의 감소를 억제하였으나 20ug/ml의 농도에서는 감소하였다(Fig. 3). EA 소분획층 3은 처리한 농도에 의존적으로 과산화수소에 의한 GSH양의 감소를 억제하였으며 특히

20ug/ml의 농도에서는 21.4 μM GSH로 나타나 대조군 수준으로 완벽하게 방어하는 것으로 나타났다(Fig. 4). EA 소분획층 4는 10ug/ml의 농도로 전 처리한 군에서 GSH의 양이 11.9 μM로 나타나 약간 방어하는 것으로 나타났으나 다른 농도에서는 유의한 방어효과가 나타나지 않았다(Fig. 5).

이상의 결과를 종합해보면 苦蔘 EA 소분획층 중 1, 2, 3 소분획은 심근 세포주인 H9c2 세포의 과산화수소에 의한 독성에 대하여 방어효과를 나타냈으며 이러한 방어효과는 과산화수소에 의한 GSH 함량의 감소에 대한 억제에 기인한 것으로 나타났다. 앞으로 苦蔘 물 추출물에서 단일 구조 결정을 위한 NMR 연구 및 다른 세포에서의 항산화 효과 연구가 필요하리라 사료된다.

결 론

苦蔘 ethyl acetate 수용성 소분획층의 과산화수소에 의한 H9c2 심근 세포주 독성에 대한 방어효과 및 GSH 감소에 대한 억제효과를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다. 苦蔘 ethyl acetate 소분획층 1, 2, 3, 4는 과산화수소에 의한 H9c2세포 독성을 유의하게 억제하였으며 이러한 결과는 과산화수소에 의한 H9c2세포내 GSH양의 감소를 유의하게 방어하여 나타난 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술개발사업의 지원(00-PJ9-PG1-CO03-0001)에 의하여 이루어진 것임.

참고문헌

1. 吳 普 : 神農本草經, 서울, 醫聖堂, p.7, 1994.
2. 李承武 外 : 急性附子草烏中毒에서 甘豆湯과 苦蔘의 應用, 大韓韓醫學會誌, 14(2) : 399-405, 1993.
3. 董黎明 : 實用中醫內科學, 上海, 上海科學技術出版社, pp. 62-65, 82-83, 330, 451-458, 1986.
4. 문관심 : 약초의 성분과 이용, 서울, 일월서각, p.342-344, 1991.
5. 江蘇新醫學院 : 新編中藥大辭典, 臺北, 新文豐出版公司, p.1368-1370, 1982.
6. 申佶求 : 申氏本草學, 서울, 壽文社, p.658-661, 1979.
7. 李尙仁 外 : 漢藥臨床應用, 서울, 成輔社, p.137-138, 1990.
8. 차진현 : 실용동약학, 서울, 일월서각, p.513-515, 1990.
9. Maestro R. F., Thaw H. H., Bjo가 J., Planker M., Arfors K. E. : Free radicals as mediators of tissue injury. Acta. Physiol. Scand. Suppl., 492:43-57, 1980.
10. Frank L., Massaro D. : Oxygen toxicity. Am. J. Med. 69: 117-126, 1980.
11. Maestro R. F., Thaw H. H., Bjork J., Planker M., Arfors K. E. : Free radicals as mediators of tissue injury. Acta Physiol. Scand. Suppl. 492:43-57, 1980.

12. 서재영, 권강범, 조현익, 이호섭, 서은아, 김인숙, 류도곤 : 苦蔘 전탕액 분획물이 배양 심근세포에 미치는 영향. 동의생리학회지 15(1):149-155, 2000.
13. Kimes BW, Brandt BL. Properties of a clonal muscle cell line from rat heart. Exp Cell Res 98:367-81, 1976.
14. 한두석 외 5인 : 한국산 생약으로부터 항암물질의 개발(제 6 부); 금은화 · Ethyl Acetate 가용성 분획의 인체 구강유상피암 종세포에 미치는 독성작용, 한국생약학회지, 29(1):22-27, 1998.
15. Kim HA, You HK, Shin HS, Kim YC, Kang TH, Yu HH, You YO. Effects of aqueous extract of Sophora flavescens on the expression of cell cycle regulatory proteins in human oral mucosal fibroblasts. Am J Chin Med 31:563-72, 2003.
16. Liu J, Zhu M, Shi R, Yang M. Radix Sophorae flavescens for chronic hepatitis B: a systematic review of randomized trials. Am J Chin Med 31:337-54, 2003.
17. Ho-sub L, Kwan-Ha P, Kang-Beom K, Byeong-Sun M, Cheol-Min S, Yong-Seon S, Eun AS, Young-suk K, Kang-Jeon K, Do-Gon R. Anti-allergic activity of the Sophorae radix water extract in experimental animals. Am J Chin Med 29:129-39, 2001.
18. Okawa M, Kinjo J, Nohara T, Ono M. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging activity of flavonoids obtained from some medicinal plants. Biol Pharm Bull 24:1202-5, 2001.
19. Fridovich, I. : The biology of oxygen radicals. Sci., 201:875-880, 1978.
20. Newman WH, Castresana MR, Webb JG, Detmer K, Wang Z. Isoproterenol inhibits transcription of cardiac cytokine genes induced by reactive oxygen intermediates. Anesthesiology 96:947-54, 2002.
21. Yamamoto S, Seta K, Morisco C, Vatner SF, Sadoshima J. Chelerythrine rapidly induces apoptosis through generation of reactive oxygen species in cardiac myocytes. J Mol Cell Cardiol 33:1829-48, 2001.
22. Tanaka H., Sakurai K., Takahashi K. and Fujimoto Y. Requirement of intracellular free thiols for hydrogen peroxide-induced hypertrophy in cardiomyocytes. J Cell Biochem 89:944-55, 2003.
23. Meister A. Glutathione metabolism and its selective modification. J Biol Chem 263:17205-8, 1988.
24. Sies H. Glutathione and its role in cellular functions. Free Radic Biol Med 27:916-21, 1999.
25. Carmel-Harel O. and Storz G. Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the Escherichia coli and saccharomyces cerevisiae responses to oxidative stress. Annu Rev Microbiol 54:439-61, 2000.
26. Werns SW, Fantone JC, Ventura A, Lucchesi BR. Myocardial glutathione depletion impairs recovery of isolated

- blood-perfused hearts after global ischaemia. *J Mol Cell Cardiol* 24:1215-20, 1992.
27. Baines CP, Goto M, Downey JM. Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 29:207-16, 1997.
28. Chen Q. and Cederbaum AI. Cytotoxicity and apoptosis produced by cytochrome P450 2E1 in Hep G2 cells. *Mol Pharmacol* 53:638-48, 1998.
29. Sakurai K, Katoh M, Fujimoto Y. Alloxan-induced mitochondrial permeability transition triggered by calcium, thiol oxidation, and matrix ATP. *J Biol Chem* 276:26942-6, 2001.