

원 지

清心蓮子飲이 Mouse 유래 C₂C₁₂세포주에서 심근세포 손상의 보호 효과

이상현, 박치상

대구한의대학교 한의과대학 심계내과학교실

Effect of *Chungsimyeonjaeum* on myocardiac cell injury in mouse myoblast C₂C₁₂ cells

Sang-Heon Lee, Chi-Sang Park

Department of Internal Medicine, College of Oriental medicine,
Daegu Haany University

Determination and differentiation of cells in the skeletal muscle lineage is positively regulated by cell-cell contact. Differentiation proteins proposed to mediate this effect include both classical MyoD and MEF members; potential interactions between the promyogenic activities of these classes of protein, however, are unknown.

We show here that MyoD and MEF, two promyogenic family members that relate to each other in a cis fashion, form interactions with MyoD and MEF. These proteins contain myosin-heavy chains and are enriched at sites of cell-cell contact between myoblasts. Therefore, in differentiation of MyoD and MEF from *Chungsimyeonjaeum* interact dependently, suggesting that the interactions occur in a cis fashion; consistent with this conclusion, MyoD-mediated differentiation is required for myoblasts to occur by *Chungsimyeonjaeum*. Inhibition in myoblasts of a MyoD by Staurosporine in its ability to associate with MEF interferes with differentiation as assessed by morphological and transcription levels, suggesting that this interaction is functionally important in myogenesis. Also, some of the differentiation-mediated proteins that are required for myogenesis seem to be based on interdependent activities of the promyogenic classical smad-subfamily.

Key Words: MyoD, MEF, *Chungsimyeonjaeum*

緒 論

심장을 포함하여 동맥에서 모세혈관에 이르기까지 우리 몸의 각 부분에 혈액을 순환시키는

모든 기관을 합쳐 심혈관계라고 하며 심장 및 혈관에 생기는 질병을 심혈관 질환이라 한다¹⁾. 최근 증가추세에 있는 심혈관 질환은 고혈압, 고지혈증, 동맥경화 등의 원인으로 심장에 허혈상태를 초래하여 심근세포에 손상을 일으키는 것으로 알려져 있다. 이 때 관여하는 산화성 손상은 이러한 수많은 심혈관계 질환의 주 발생 원인인자로 작용하고 있다²⁾. 특히 동맥경화, 대동맥협착증, 혈관질환 등은 일시적 혹은 지속적인 허혈을 야기시킬 수 있으며, 다시 약물이나 수술적인 요법 등에 의

· 접수 : 2006년 7월 10일 · 논문심사 : 2006년 7월 12일
· 채택 : 2006년 7월 25일
· 교신저자 : 박치상, 대구 수성구 상동 165번지 대구한의대
부속대구한방병원 심계내과학교실
(Tel: 053-770-2178, Fax: 053-770-2169
E-mail: damoongo@hanmail.net)

Table 1. Prescription of *Chungsimeonjaeum*

Herbs	Pharmacological Name	Dose(g)
蓮子	Nelumbo Semen	7.5
人蔘	Ginseng Radix	3.75
黃芪	Astragali Radix	3.75
赤茯苓	Pachymae Fungus	3.75
黃芩	Scutellariae Radix	2.62
車前子	Plantaginis Semen	2.62
麥門冬	Liriopsis Tuber	2.62
地骨皮	Lycii Cortex Radicis	2.62
甘草	Glycyrrhizae Radix	2.62
Total Amount		31.85

하여 재관류시에 심근세포에 O₂⁻, H₂O₂, 그리고 OH⁻ 등의 활성산소종이 발생하여 심근세포를 손상시킨다³⁾.

활성산소종(Reactive Oxygen Species:이하 ROS)은 활성화된 호중구, xanthine oxidase, 미토콘드리아 호흡 및 아라키돈산 대사 과정을 통해서 생성되는데⁴⁾, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 효소 등이 세포내에서 생성된 ROS를 제거하기 위한 생리적 방어기전으로 작용하지만 과도한 ROS는 방어체계를 초과하여 세포손상을 초래하게 된다⁵⁾. 이러한 ROS에 의한 심근세포의 손상은 세포고사로 알려져 있으며, 그 기전으로는 c-Jun NH₂-terminal kinase(JNK)에 의한 caspase의 활성화와 그에 따른 DNA의 분절 등이 보고되었다⁶⁾.

淸心蓮子飲은 《太平惠民和劑局方》⁷⁾에 처음으로 收載된 처방으로, 益氣陰, 淸心火, 交心腎하는 효능이 있어 口乾, 煩渴, 小便白濁, 遺精淋瀝, 尿赤濁, 四肢倦怠, 五淋帶下 등의 치료에 사용된다⁸⁾.

이전까지의 淸心蓮子飲에 대한 연구로는 消渴症⁹⁻¹¹⁾과 면역조절기능¹²⁾에 대한 연구는 있으나, 심혈관계 질환에 밀접한 관계가 있는 ROS 생성 및 심근세포의 사멸유도에 관한 연구는 아직 접하지 못한 실정이다.

이에 저자는 淸心瀉火, 益氣養陰¹³⁾의 효능이 있는 淸心蓮子飲이 심혈관계 질환에도 효과가 있을 것으로 생각되어 mouse 유래 심장근육 모근세포주인 C₂C₁₂ cell lines에서 세포사멸을 유도한 후 이에 대한 억제 효과를 비교 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

實 驗

1. 材料

1) 試料의 調製

실험에 사용한 淸心蓮子飲은 대구한의대학교 부속 대구한방병원 약제과에서 엄선하여 細末한 다음 1000g을 적당량의 3차 증류수를 첨가하여 85℃에서 6시간 열탕을 가한 후 식혀 淸心蓮子飲 수추출물을 조제하였다. Gauze로 1차 여과 후 -70℃에서 12시간 동결 건조하여 150g을 회수하고 사용 전 -80℃에 보관하다가 3차 증류수로 적당농도로 희석한 후 실험에 사용하였다. 처방의 구성은 《東醫寶鑑》¹⁴⁾을 기준으로 하였고 내용과 용량은 다음과 같다(Table 1).

2) 試藥

실험에 필요한 Duplecco's modified Eagle's medium (DMEM), 항생제, trypsin 및 fetal bovine

serum (FBS)은 GIBCO BRL Co.에서 구입하였고 배양용기인 96 well plate, 10cm dish는 Falcon Co.에서 구입하여 사용하였다. Staurosporine, fluorescentprobe, 2,7-dichlorofluorescin diacetate (DCF-DA)은 Sigma Co.에서 구입하였고, anti rabbit/ mouse 결합 Caspase3, MEF, MyoD-conjugated antibody 등은 Santa Cruz Co.에서 구입하였고, 그 이외의 시약은 일급시약을 구입하여 사용하였다.

2. 方法

1) C₂C₁₂ 심장근육 모근세포 세포주의 세포배양 실험에 사용된 세포주인 C₂C₁₂ 심장근육 모근세포 세포주는 Dr. Jian Wang(Children's Hospital, Boston MA)으로부터 제공받았다. 20% FBS를 함유한 DMEM 배지에 100% confluence한 세포를 phosphate-buffered saline(PBS)로 세척한 다음 DMEM/2% horse serum/PS로 48시간에서 72시간 정도 배양하여 분화를 유도하였다.

2) TUNEL assay를 통한 세포사 관찰

심장근육 모근세포인 C₂C₁₂ myoblasts를 통해 淸心蓮子飲의 세포사 억제효과를 조사하기 위해 C₂C₁₂ myoblasts를 37℃에서 12시간 배양한 다음 10³ 세포수로 cover glass에 4군으로 분주하였다. 즉 정상군, 0.1% DMSO으로 녹인 0.5 μM staurosporin(이하 STP)를 처리한 대조군, 대조군에 각각 25, 75 μg/ml 淸心蓮子飲을 처리한 실험군으로 구분하여 하룻밤 배양한 다음 분화유도시 관여하는 Myoblast Determining(이하 MyoD) 발현을 관찰하기 위해 TUNEL assay방법을 수행하였다.

TUNEL assay를 시행한 순서는 먼저 PBS로 세척한 다음, 세포를 4% p-formaldehyde로 12시간동안 4℃에서 고정시켰고, 0.5% Tween 20, 0.2% BSA (bovine serum albumin)을 첨가하여 실온에서 15분간 침투과정을 실시하였다. PBS로 3회 세척을 실시하고 세포내 염색체 DNA nick 말단을 표지하기 위해 terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)용액(TdT원충액, biotin-dUTP, TdT=18:1:1)

5μl를 떨어 뜨려서 37℃에서 1시간 유지하고 증류수로 3회 세척하였다. 증류수 세척 후 blocking 용액인 0.5% BSA를 50μl정도 첨가하여 실온에서 10분간 정치한 후 streptavidine-Texas Red 50μl를 첨가하여 30분간 실온에서 유지하고 PBS로 3회 세척하였다. Slide glass 위에 mounding 용액을 약간 첨가하여 형광현미경하에서 관찰하였고, 적색의 형광염색 유무를 통하여 세포사 억제를 확인하였다.

한편, 모근세포가 분화배지에서 분화를 유도하기 위해 전사인자인 myocyte enhancer factor(이하 MEF)가 유도 되는지를 분석하기 위해 상기 방법으로 TUNEL assay를 수행하였고, 단지 streptavidine-FITC 50μl만 다르게 하여 위상차현미경하에서 관찰한 다음 형광현미경에서 발현을 관찰하였다.

3) 활성산소종 분석

활성산소종(Reactive Oxygen Species:이하 ROS)을 분석하기 위해 미리 분주한 세포에 STP를 24시간 처리하는 동시에 淸心蓮子飲을 처리하여 ROS의 생성을 유도한 다음, 1시간동안 37℃에서 fluorescentprobe, 2,7-dichlorofluorescin diacetate (DCF-DA, 10 μM)을 처리하여 관찰하였다.

ROS에 의해 분화유도가 방해를 받아 모근세포의 기능이 저하되는지는 MyoD의 발현을 확인하여 예측할 수 있으므로 동시에 면역세포화학분석 방법으로 확인하였다. 따라서 PBS로 MyoD의 발현을 1차항체인 anti-MyoD mouse conjugated antibody를 표지하고, 2차항체인 anti-mouse FITC를 표지하여 confocal imaging system(Bio-Rad MRC 600 attached to a Zeiss Axiovert inverted microscope으로 ×100 Zeiss Plan-Neofluar objective)으로 관찰하였다.

4) 면역세포화학 분석법

심장근육 모근세포의 분화를 확인하고 STP에 의해 세포 상해가 유도되었는지를 확인하기 위해 정상군, STP로 처리한 대조군, 대조군에 淸心蓮子

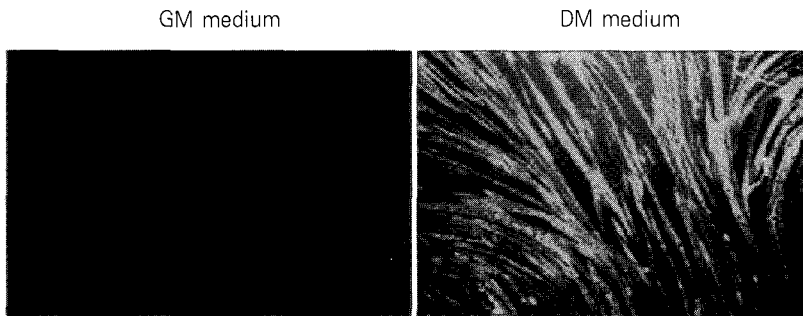


Fig. 1. Immunofluorescence detection of MyoD using monoclonal antibodies against MyoD with FITC-secondary antibodies in C₂C₁₂ myoblast cells in DM medium. Immunofluorescence staining for MyoD using FITC-labeled secondary antibodies. MyoD staining was visualized by using a red filter. Magnification: x100

飲을 처리한 실험군으로 나누어 면역세포화학 분석법으로 염색을 수행하였다. 근섬유의 분화를 유도하는 것으로 알려진 MyoD 단백질의 발현유무를 확인하기 위해 C₂C₁₂ myoblasts를 분화배지에서 1주일간 분화를 유도하였다. 모근세포를 3% acetone으로 10분간 고정한 다음 MyoD monoclonal anti myosin antibody를 1시간 동안 표지하였다. PBS로 세척한 다음 탈지분유로 blocking을 수행하여 여타의 단백질에 반응하는 것을 배제하였다. 30분간 반응시킨 다음 PBS로 반응후 2차항체인 Alexa Fluor568로 발색시킨 후 형광현미경 (×200)으로 관찰하였다.

또한 C₂C₁₂ myoblasts를 coverslips glass 위에 분주하여 수행하였고, PBS, 1mM MgCl₂, 0.1mM CaCl₂로 2번 세척 후 2% paraformaldehyde/HEPES buffer으로 실온에서 10분간 고정하였다. PBS, 1mM MgCl₂, 0.1mM CaCl₂, 100mM Tris-HCl(pH 7.4)로 세척한 다음 37°C에서 normal goat serum으로 30분간 비특이항체 결합을 제거하기 위해 blocking을 하였다. Caspase3 일차항체를 표지하고 monoclonal anti-FITC antibody (1:500) in PBS, 1mM MgCl₂, 1mM CaCl₂, 1% bovine serum albumin, 1% normal goat serum(staining buffer)으로 30분간, 37°C에서 수행하였다. 여러번

세척한 후 gel mount, 2.5% 1,4-diazobicyclo-[2.2.2]-octane으로 mount solution으로 처리하고 nail polish으로 slide를 에워싼 다음 confocal imaging system(Bio-Rad MRC 600 attached to a Zeiss Axiovert inverted microscope으로 × 100 Zeiss Plan-Neofluar objective)으로 관찰하였는데, FITC-conjugated secondary antibody(excitation:488nm)범위에 해당되는 argon-krypton mixed gas laser으로 confocal microscope을 통하여 관찰하였다.

5) Total RNA로부터 RT-PCR분석

STP의 세포상해로부터 유발된 ROS생성이 MyoD의 전사 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 RT-PCR을 수행하였다. Total RNA는 Ultraspec reagent를 이용하여 추출하였고, specific mRNAs는 1μg의 total RNA에 125ng of random hexamers, 50mM Tris-HCl buffer, pH 8.3, 75mM KCl, 3mM MgCl₂, 10mM dithiothreitol, 200units Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase, 20units RNasin, 0.5mM each dNTP으로 총부피 20μl되게 하여 37°C, 60분간 반응시켰다. 각 PCR 반응물 25μl에 1.2mM MgCl₂, 200μM dNTPs, 1unit의 Taq polymerase, MyoD 0.5μg, 20mM Tris-HCl, pH 8.5으로 반응시켰다. Initial denaturation은 각각 94°C와 92°C에서 1분간 반복해서 수행하였고, annealing

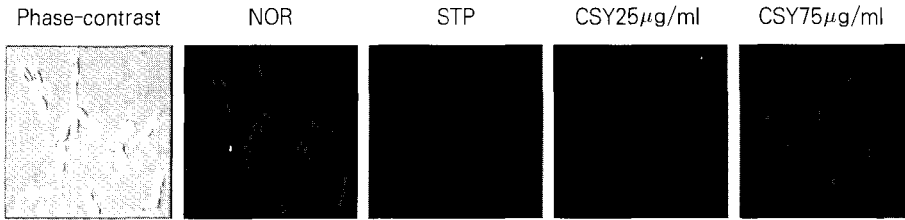


Fig. 2. Phase-contrast and immunofluorescence detection of MyoD Type using monoclonal antibodies against MyoD with Texas red-secondary antibodies in C_2C_{12} myoblast cells on DM medium. Immunofluorescence staining for MyoD using FITC-labeled secondary antibodies. MyoD staining was visualized by using a green filter. Magnification: $\times 100$
 STP : staurosporin
 CSY : *Chungsimyeonjaeum*

은 60°C 에서 1분간, elongation은 72°C 에서 1분간 반복하여 35cycle을 수행한 다음, 72°C 에서 5분간을 더 수행한 다음, PCR반응을 정지하여 1% agarose gel을 제조한 후 PCR산물을 gel에 loading시켰다.

6) Western blot

C_2C_{12} myotubes를 2% horse serum를 첨가한

DMEM에 5일 동안 배양한 다음, RIPA buffer에 phosphatase inhibitors와 protease inhibitor mixture를 첨가하여 분획하였다. 8% SDS/PAGE에 용출한 후 poly vinylidene difluoride membranes에 전이시킨다. Western blot analysis을 수행하기 위해 rabbit antibodies recognizing MyoD, MEF, MHC,

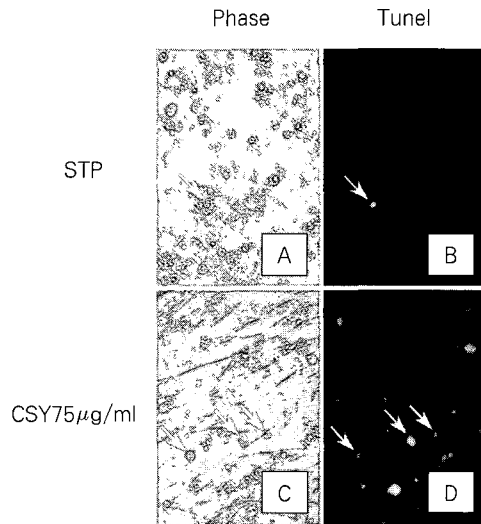


Fig. 3. Characterization of the staurosporine-induced cell death in mouse C_2C_{12} cells by CSY. Left panel (upper): phase-contrast microscopy shows cell morphological behavior in STP-treated cells. Right panel(upper): C_2C_{12} cells stained using the terminal deoxynucleotidy transferase (TdT)-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) assay. White arrows indicate positive-Tunel assay. The scale bar represents $50\ \mu\text{m}$
 STP : staurosporin
 CSY : *Chungsimyeonjaeum*

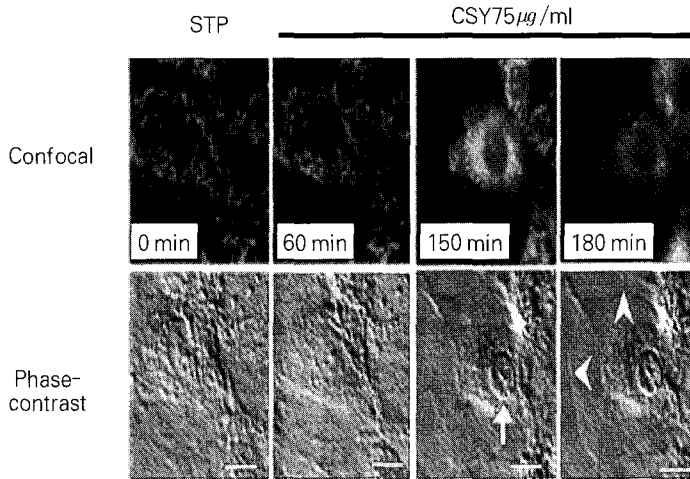


Fig. 4. CSY decreases the ROS formation in Cultured C₂C₁₂ myoblasts with STP and CSY for 0-180 min. STP codistributes with internalized ROS formation. Confocal microscopy sections of C₂C₁₂ cells observed with ROS and MyoD when not challenged CSY treatment. White arrows indicates MyoD expression. STP : staurosporin
CSY : *Chungsimyaeonjaeum*

actin(1:1,000 희석배)으로 표지하고, ECL Western blotting detection reagents으로 발색을 확인하였다.

성績

1. DM배지에서 MyoD발현유도에 미치는 영향

심장근육 모근세포인 C₂C₁₂ 세포주를 제대로 분화하는지 분석하기 위하여 성장배지(GM)와 분화배지(DM)하에서 배양하였다. 성장배지에서는 분화에 관여하는 단백질인 MyoD의 발현이 유도되지 않는 반면, 분화배지에서는 강하게 녹색형광을 나타내는 것을 관찰하였다(Fig. 1).

2. MyoD 발현에 미치는 영향

STP를 처리하여 세포상해를 유발한 상태에서 淸心蓮子飲이 MyoD 발현에 미치는 영향을 관찰하였다. 정상군에서는 세포가 잘 자란 상태에서 MyoD 양성인 Fusion-competent myoblast(FC-MB)에서 발현이 유도되었으나, STP로 처리시 MyoD의

발현이 억제되어 음성으로 나타났다. 그러나 淸心蓮子飲을 25, 75µg/ml로 처리한 군에서는 25µg/ml에서는 발현이 되지 않았으나, 75µg/ml에서는 강하게 발현을 유도하였다(Fig. 2).

3. MEF의 발현에 미치는 영향

STP를 처리하여 세포상해를 유발한 MyoD 발현에 대하여 MEF를 확인한 결과, 위상차 현미경 하에서 STP처리한 세포에서는 MEF의 발현이 약하게 존재하였으나, 淸心蓮子飲 75µg/ml을 처리한 군에서는 강하게 MEF 발현을 유도하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

4. ROS 생성과 MyoD 발현에 미치는 영향

STP를 처리 후 ROS가 강하게 생성되는 시점에서부터 75µg/ml 淸心蓮子飲을 처리하여 0, 60, 150 및 180분의 처리시간 동안 ROS 생성과 MyoD 발현을 조사하였다. 최초에는 ROS 생성이 강하게 발생되어 MyoD의 발현이 거의 없었으나, 淸心蓮

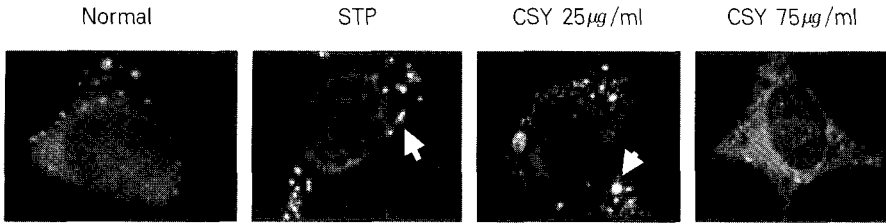


Fig. 5. ROS formation is inhibited by CSY.

Formation of ROS is decreased by CSY. Cells were challenged with FITC-Caspase3 for 4 days, after 12 hours of pre-incubation in the presence of the indicated STP. Inhibition of Caspase3 by CSY was concentration dependent; STP did not alter Caspase3 expression. White arrows indicate Caspase3 expression.

STP : staurosporin

CSY : *Chungsimyeonjaeum*

子飲을 처리한 150분 후부터 ROS 생성이 거의 소멸되면서 MyoD의 발현이 강하게 유도되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

5. Caspase3 발현에 미치는 영향

STP의 세포상해로부터 세포사멸의 유발을 확인하기 위하여 세포사멸에 대표적인 단백질인 Caspase3 단백질을 확인하였다. 정상군에서는 Caspase3가 거의 발현되지 않았고, STP로 처리한 군에서는 강하게 발현된 반면, 淸心蓮子飲을 25, 75 μ g/ml 처리한 실험군에서는 75 μ g/ml를 처리한 군에서 Caspase3의 발현이 억제됨을 관찰할 수 있었다 (Fig. 5).

6. MyoD의 전사발현 양상에 미치는 영향

RT-PCR을 수행하여 1% agarose gel에서 MyoD의 전사수준을 관찰한 결과, STP를 처리한 lane에서는 mRNA가 전혀 나타나지 않았으나, 淸心蓮子飲을 처리 후 4, 6일 경과시 mRNA가 강하게 유도됨을 알 수 있었다(Fig. 6).

7. MyoD와 MEF의 단백질 발현에 미치는 영향

C₂C₁₂세포주에서 STP와 淸心蓮子飲 처리에 대해 MyoD와 MEF에 대한 단백질 발현에 미치는 영향을 분석하였다. 정상군에서는 MyoD와 MEF 단백질이 강하게 발현되었으나, STP 처리군에서는 발현이 억제되었으며, 淸心蓮子飲군은 25, 75 μ g/ml

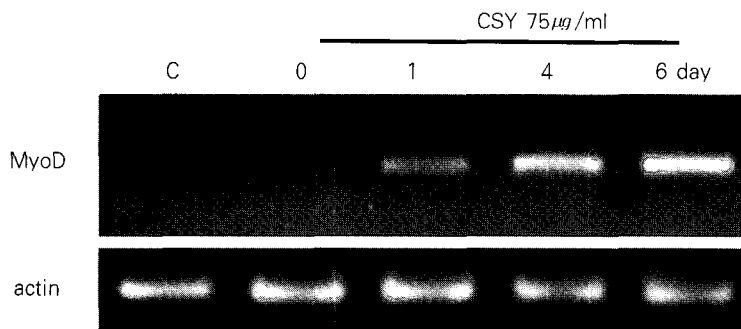


Fig. 6. Expression profile of MyoD transcripts in C₂C₁₂ mouse myoblasts. A semi-quantitative PCR method was used to screen mouse C₂C₁₂ cells cDNA panels to identify cells that express MyoD.

CSY : *Chungsimyeonjaeum*

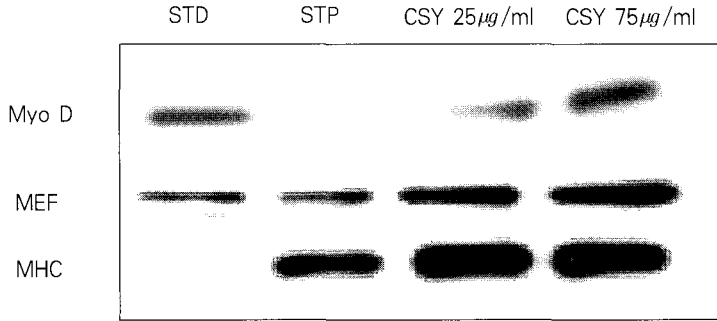


Fig. 7. Western blot analysis of MyoD and MEF in C₂C₁₂ myoblast cell growth undergoes STP and CSY. C₂C₁₂ cells were cultured in a differentiation medium in the absence or presence of CSY with STP treatment. MEF and MyoD expression was analyzed by western blot. Similar results were obtained in three additional experiments.
STP : staurosporin
CSY : *Chungsimyaeonjaeum*

농도에서 대조군에 비해 단백질 발현이 증가하였다(Fig. 7).

考 察

심혈관계는 심장을 비롯하여 동정맥에서 모세혈관에 이르기까지 우리 몸의 각 부분에 혈액을 순환시키는 기관들을 포함하며, 이들을 모두 합쳐 심혈관계통 혹은 심혈관계라고 한다. 따라서 심장 및 혈관에 생기는 질병을 심혈관 질환이라 할 수 있으며, 심근경색, 협심증, 고혈압, 심내막염, 부정맥, 동맥경화증, 고혈압성심장병, 뇌혈관질환, 혈관주위질환 등의 많은 질병들이 포함된다.^{1,15-6}

허혈성 심장질환은 관상동맥의 죽상동맥경화에 의해 혈류가 저류 혹은 차단되어 심근에 산소와 에너지원의 공급이 부족해져 심근의 괴사나 경색으로 진행되어 사망을 일으키게 된다.¹⁷⁻⁹ 이러한 허혈 상태의 병리적 요인은 다양하고 질환 발생시 여러 요인이 복합적으로 작용하여 나타나기 때문에 치료적 어려움이 따르게 된다.²⁰ 그러나 최근 심근경색이나 심허혈에 활성산소가 관여하고 있음이 제시되면서 발병원인을 활성산소의 산화적 손상의 측면에서 규명하려는 연구가 계속되고 있다.²¹

활성산소는 자외선, X-선 및 γ-선 등의 전리방사선에 노출되거나 대기 오염물질, 발암물질 또는 활성산소를 발생시키는 bleomycin, adriamycin 등의 특별한 화학 물질에 노출되었을 때 체내에서 발생할 수 있고, 이외에 정상적인 생체 방어작용 중에도 발생할 수 있다.⁵ 이 ROS들은 반응성이 대단히 높아 세포의 주요 구성물질인 지질, 단백질 및 핵산을 파괴하여 조직에 산화적 손상을 초래하게 되고 만성적인 산화적 손상은 세포의 기능 저하 뿐만아니라 노화나 암과 같은 각종 만성 질환을 유발하는 원인이 된다.²²⁻³

현재까지 심근세포의 산화적 손상에 대한 한약재의 방어효과에 관한 연구로는 이²⁴의 炙甘草湯이 배양 심근세포에 미치는 영향, 한 등²⁵의 失笑散煎湯液과 구성약물이 배양 심근세포의 LDH활성도에 미치는 영향, 박 등²⁶의 XO/HX에 의하여 손상된 심근세포에 대한 瓜蒌薤白白酒湯 추출물의 방어효과, 이 등²⁷의 과산화수소로 손상된 배양 심근세포에 대한 骨碎補의 영향 그리고 유 등²⁸의 산화적 손상에 의해 유발된 심근세포 독성에 대한 桃紅四物湯의 방어효과 등의 많은 연구가 진행되고 있으며, 여러 종류의 세포에서 세포고사를 방어하는 한약처방의 효능이 보고 되고 있다.

한편 본 실험에 사용된 淸心蓮子飲은 《太平惠民和劑局方》⁷⁾에 최초로 收載된 처방으로 후대 여러 의가들²⁹⁻³³⁾에 의하여 消渴의 치료에 활용되어 왔다. 본방은 蓮子, 人蔘, 黃芪, 赤茯苓, 黃芩, 車前子, 麥門冬, 地骨皮, 甘草로 구성되어 있다. 蓮子は 淸心火하여 心腎을 交通하고, 黃芩과 麥門冬은 淸心肺上焦之熱, 養陰하고, 地骨皮는 淸虛熱하고, 茯苓과 車前子는 分利濕濁하고, 人蔘, 黃芪, 甘草는 益氣扶正한다. 따라서 淸心蓮子飲은 淸心火, 益氣陰, 分利濕濁의 효능으로 心火가 妄動하고, 氣陰이 兩虛하거나 濕熱이 下注하여 발생하는 여러 병증을 다스린다^{14,29-36)}.

淸心蓮子飲에 대한 연구로는 김 등⁹⁾의 淸心蓮子飲이 Streptozotocin으로 유발한 백서의 고혈당에 미치는 영향, 이 등¹⁰⁾의 淸心蓮子飲과 玉女煎이 Streptozotocin 투여로 유발된 백서의 고혈당에 미치는 영향, 이 등¹¹⁾의 소갈증 치료제가 실험적 당뇨 흰쥐에 미치는 영향 등 消渴症에 대한 연구와 이 등¹²⁾의 미세변화 신증후군에서 淸心蓮子飲과 大分清飲이 면역조절기능에 미치는 영향 등에 대한 연구는 있었으나, 심혈관계 질환에 밀접한 관계가 있는 ROS 생성 및 심근세포의 사멸유도에 관한 연구보고는 미미한 실정이다.

이에 저자는 淸心瀉火, 益氣養陰¹³⁾의 효능이 있는 淸心蓮子飲이 심혈관계 질환에도 효과가 있을 것으로 생각되어 이를 규명하기 위해 mouse 유래 심장근육 모근세포주인 C₂C₁₂ cell lines에서 Staurosporine을 사용하여 동일한 세포의 세포사멸을 유도한 후 모근세포의 분화를 유도하기 위한 전사인자인 MEF에 미치는 영향, ROS 생성과 MyoD 발현에 미치는 영향, caspase3 발현에 미치는 영향, MyoD 전사발현 양상에 미치는 영향 등을 관찰하였다.

먼저 심장근육 모근세포인 C₂C₁₂ 세포주가 제대로 분화하는지 분석하기 위해 성장배지와 분화배지에서 배양한 결과, 성장배지에서는 분화에 관여하는 단백질인 MyoD의 발현이 유도되지 않는

만면 분화배지에서는 강하게 녹색형광을 나타내는 것으로 보아 분화배지에서 MyoD의 발현이 강하게 유도될 수 있다고 생각된다.

MyoD는 myogenin과 함께 근섬유의 성장 및 비대와 재생을 조절하는 핵내 전사 조절인자로서, 성장하는 동안 MyoD는 myoblast lineage를 결정하는 중요한 인자로서 somite cell을 myoblast로 성장하도록 한다. 그리고 MyoD는 근섬유가 재생되는 동안 손상된 근섬유에서 활성화된 위성세포의 핵과 근섬유내 myonuclei에서 발현된다³⁷⁻⁴⁰⁾.

따라서 분화배지에서 C₂C₁₂ 세포주에 STP를 처리하여 세포상해를 유도한 상태에서 淸心蓮子飲이 MyoD 발현에 미치는 영향을 확인하였다. STP로 처리한 대조군에서는 MyoD의 발현이 억제되어 음성으로 나타났으며, 淸心蓮子飲을 25 μ g/ml로 처리한 군에서는 발현이 되지 않았으나, 75 μ g/ml로 처리한 군에서는 강하게 발현을 유도하였다. 그리고 STP를 처리하여 세포상해를 유발한 MyoD 발현에 대하여 MEF를 확인한 결과, STP를 처리한 세포에서는 MEF의 발현이 약하게 존재하였으나, 淸心蓮子飲을 75 μ g/ml로 처리한 군에서는 MEF 발현을 유도하는 것을 관찰할 수 있었다.

또한 STP를 처리 후 ROS가 강하게 생성되는 시점에서부터 75 μ g/ml 淸心蓮子飲을 처리하여 0, 60, 150 및 180분의 처리시간 동안 ROS 생성과 MyoD 발현을 추적한 결과, 최초에는 ROS 생성이 강하게 발생되어 MyoD의 발현이 거의 없었으나, 淸心蓮子飲을 처리한 150분후부터 ROS생성이 거의 소멸되면서 MyoD의 발현이 강하게 유도되는 것을 관찰할 수 있었다.

상기의 실험 결과로 淸心蓮子飲은 ROS의 생성을 억제하여 MyoD와 MEF의 발현을 유도하여 손상된 심근세포의 회복을 활성화 시킨다고 생각된다.

STP의 세포상해로부터 세포사멸의 유발을 확인하기 위하여 세포사멸에 대표적인 단백질인 Caspase3 단백질을 확인한 결과, 정상군에서는

Caspase3가 거의 발현되지 않았고, STP로 처리한 군에서는 강하게 발현된 반면, 淸心蓮子飲을 75 μ g/ml 처리한 실험군에서는 Caspase3 발현이 억제됨을 관찰할 수 있었다. 이것은 STP에 의해 생성된 ROS가 淸心蓮子飲에 의해 소거된 결과로 淸心蓮子飲에 항산화기능을 가진 성분이 존재한다고 생각된다.

RT-PCR을 수행하여 1% agarose gel에서 MyoD의 전사수준을 관찰한 결과, STP를 처리한 lane에서는 mRNA가 전혀 나타나지 않았으나, 淸心蓮子飲을 처리 후 4, 6일 경과시 mRNA가 강하게 유도됨을 알 수 있었다. 이것은 이미 STP에 의해 생성된 ROS를 淸心蓮子飲이 소거하여 정상적인 발현수준으로 회복하는데 소요되는 시간과 회복될 수 있는 요구시간을 예측할 수 있었다.

또한 C₂C₁₂세포주에서 STP와 淸心蓮子飲 처리에 대해 myoD와 MEF에 대한 단백질 발현에 미치는 영향을 분석한 결과, 정상군에서는 MyoD와 MEF 단백질이 강하게 발현되었으나, STP를 처리한 대조군에서는 발현이 억제되었으며, 淸心蓮子飲을 25, 75 μ g/ml 농도로 처리한 실험군에서는 대조군에 비해 단백질 발현이 증가하였다. 이는 STP에 의해 MEF의 억제는 MyoD의 발현 감소를 동반하는데 淸心蓮子飲에 의해 회복되어 강하게 유도되는 것으로 보아 淸心蓮子飲이 ROS의 생성을 차단하고, 다시 분화 유도에 관여하는 MyoD 단백질의 발현을 촉진한다는 것을 알 수 있었다.

상기 실험 결과들을 통하여 淸心蓮子飲은 심혈관계 질환의 주요 원인인자인 ROS의 발생을 억제시키고, 세포분화에 관여하는 인자인 MyoD 단백질과 MEF의 발현을 촉진하여 심근세포의 손상을 회복시키는 효능이 있는 것으로 추정되며, 향후 淸心蓮子飲을 이용한 다각적인 임상 및 실험적 연구가 병행되어야 할 것으로 생각된다.

結 論

淸心蓮子飲의 심근세포 상해에 대한 보호 및

회복효과를 규명하기 위해 mouse 유래 심장근육 모근세포주인 C₂C₁₂ cell lines에서 Staurosporine을 사용하여 동일한 세포의 세포사멸을 유도한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 淸心蓮子飲은 ROS의 생성을 억제하여 MyoD의 발현을 유도하였다.

2. 淸心蓮子飲은 MyoD의 발현 유도에 관여하는 전사인자인 MEF의 발현을 유도하였다.

3. 淸心蓮子飲을 처리한 150분 후부터 ROS 생성이 거의 소멸되면서 MyoD의 발현이 강하게 유도되었다.

4. 淸心蓮子飲은 세포사멸에 대표적인 단백질인 Caspase3의 발현을 억제하였다.

5. 淸心蓮子飲을 처리한 후 4, 6일 경과시 mRNA가 강하게 유도되어 MyoD의 전사발현을 유도하였다.

6. 淸心蓮子飲은 MyoD와 MEF에 대한 단백질 발현을 유도하였다.

이상과 같은 결론으로 淸心蓮子飲은 Staurosporine을 사용하여 세포상해를 유도한 C₂C₁₂ 세포주에서 심근세포의 세포사를 효과적으로 억제하고 심근세포 상해에 대한 보호 및 회복효과가 있는 것이 관찰되었다.

參考文獻

1. 屈松栢, 李家康. 實用中醫心血病學. 제2판. 北京:科學技術文獻出版社. 2000:3.
2. Apostolova MD, Ivanova IA, Cherian MG. Metallothionein and apoptosis during differentiation of myoblasts to myotubes protection against free radical toxicity. Toxicol Appl Pharmacol. 1999;159(3):175-84.
3. Chen QM, Tu VC, Wu Y, Bahl JJ. Hydrogen peroxide dose dependent induction of cell death or hypertrophy in cardiomyocytes. Arch Biochem Biophys. 2000;373(1):242-8.

4. 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):173-8.
5. 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 Edition. Oxford: Clarendon Press. 1989:86-9.
6. Raff MC, Bares BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD. Programmed cell death and the control of cell survival. *Science.* 1993;262:695-700.
7. 陳師文. 太平惠民和劑局方. 臺北:大中國圖書公司. 1975:4.
8. 申載鏞. 方藥合編解說. 서울:傳統醫學研究所. 1993:137-8.
9. 金秀雄, 嚴賢燮, 金完熙. 清心蓮子飲이 Streptozotocin으로 유발한 백서의 고혈당에 미치는 영향. *동의병리학회지.* 1991;6:63-86.
10. 李東昊 外. 清心蓮子飲과 玉女煎이 Streptozotocin 투여로 유발된 백서의 고혈당에 미치는 영향. *경희의학.* 1990;12:500-10.
11. 이인자, 이다미. 소갈증 치료제가 실험적 당뇨병 흰쥐에 미치는 영향; 청심연자음, 가미조위승기탕, 기국지황탕. *약학회지.* 1994;10:555-61.
12. 李明圭 外. 미세변화 신증후군에서 清心蓮子飲과 大分清飲이 면역조절기능에 미치는 영향. *경희한의대논문집.* 2000;7:51-70.
13. 楊醫亞 主編. 中國醫學百科全書 方劑學. 上海:上海科學技術出版社. 1988:67.
14. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:대성출판사. 1996:333.
15. 蕉增綿, 干全俊. 中西醫臨床心血管病學. 北京:中國中醫藥出版社. 2000:2-4.
16. Chung YT, Choi MK, Kim JJ, Kim JM, Park ST. A study on the cytotoxicity of adriamycin on cultured rat myocardial and endothelial cells. *J Chonnam Med. Sci.* 1998;1:221-9.
17. 해리슨 번역 편찬위원회. HARRISON'S 내과학. 서울:도서출판 정담. 1997:1157-65.
18. Forbes, Jackson. Color Atlas 임상의학. 서울:도서출판 한우리. 1998:228-36.
19. Schaper W, Schaper J, Pulmowski J, Thiedmann V, Hehrlein F. Ischemia tolerance following cardioplegia arrest in human patients and in experimental animals. *J Cardiovascular Surgery.* 1975;16:268-77.
20. Hoffman P, Muller SP, Heinroth K, Buchner E, Richards R, Torrson M. Cardiotoxicity of dichromomethane in rats in cultured rat cardiac myocyte. *Toxic in Vitro.* 1995;9:489-92.
21. Krause SM, Jacobus WE, Becker LC. Alternation in cardiac sarcoplasmic reticulum calcium transport in the post-ischemic 'stunned myocardium'. *Circ Res.* 1986;65:526-30.
22. Aust SD, Chignell CF, Bray TM, Kalyanaraman B, Mason RP. Free radicals in toxicology. *Toxicology and Applied Pharmacology.* 1993;120:168-78.
23. Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Laboratory Investigation.* 1982;47:412-26.
24. 이래춘. 炙甘草湯이 배양 심근세포에 미치는 영향. *동의생리병리학회지.* 1999;14(2):179-87.
25. 한동훈, 권강범, 김우경. 失笑散 煎湯液과 구성약물이 배양 심근세포의 LDH 활성도에 미치는 영향. *동의생리병리학회지.* 2001;15(5):770-4.
26. 박준수, 권강범, 문형철. XO/HX에 의하여 손상된 심근세포에 대한 瓜蒌薤白白酒湯 추출물의 방어효과. *동의생리병리학회지.* 2003

- ;17(2):486-92.
27. 이병찬, 이종화, 이환봉. 과산화수소로 손상된 배양 심근세포에 대한 骨碎補의 영향. 동의생리병리학회지. 2003;17(3):662-5.
 28. 유봉선, 정재은, 박진영. 산화적 손상에 의해 유발된 심근세포 독성에 대한 桃紅四物湯의 방어효과. 동의생리병리학회지. 2004;18(5):1374-81.
 29. 周命新 編著. 新增醫門寶鑑. 대구:동양종합통신교육원출판부. 1987:287.
 30. 李泰浩 編. 新訂對譯 大方藥合編. 서울:杏林出版社. 1977:158-9.
 31. 龔廷賢. 萬病回春. 臺北:大中國圖書公司. 1981:237(上), 70-1(下).
 32. 吳儀洛. 成方切用. 上海:上海科學技術出版社. 1982:328-9.
 33. 汪詡庵. 醫方集解. 서울:成輔社. 1983:295-6.
 34. 尹吉榮. 東醫臨床方劑學. 서울:明寶出版社. 1985:318.
 35. 方廣 註. 丹溪心法附餘(下). 서울:대성문화사. 1982:503-9.
 36. 中山醫學院. 中國方劑選講. 廣東:廣東科學技術出版社. 1983:315-6.
 37. Grounds, M.D., K.L. Garrett, M.C. lai, W.E. Wright, and M.W. Beilharz. Identification of skeletal muscle precursor cells in vivo by use of MyoD1 and myogenin probes. Cell Tissue Res. 1992;267:99-104.
 38. Lowe, D.A., T. Lund, and S.E. Alway. Hypertrophy-stimulated myogenic regulatory factor mRNA increases are attenuated in fast muscle of aged quails. Am. J. Physiol. 1998;275:C155-62.
 39. Koishi, K.M., Zhang, I. McLennan, and J. Harris. MyoD protein accumulates in satellite cells and is neurally regulated in regenerating myotubes and skeletal muscle fiber. Dev. Dyn. 1995;202:244-54.
 40. Olson, E.N, and W.H. Klein. bHLH factors in muscle development: dead lines and commitments, what to leave in and what to leave out. Gens. Dev. 1994;8:1-8.