大韓方劑學會誌 : 제8권 1호
KOMP Vol. 8. No. 1. 2000.

培養된 血管 內皮細胞에서 酸化性 細胞 損傷에 미치는 星香正氣散의 保護 效果

Protection by Sunghyangchungisan against Oxidative Endothelial Cell Injury

-李 東 彦 · 金 瑩 均-
Dong-Uhn Lee, Young-Kyun Kim
(東義大學校 大學院 韓醫學科 內科學 敎室)

Abstract

Protection by Sunghyangchungisan against Oxidative Endothelial Cell Injury

Dong-Uhn Lee*, Young-Kyun Kim*

Dept. of Oriental Medicine, Graduate School, Dong Eui University

Reactive oxygen species(ROS) play an important role in the pathogenesis of a variety of life threatening conditions such as atherosclerosis, myocardial infarction and cerebral stroke. In this study, the effect of Sunghyangchungisan (SHCS) as a cytoproctant against ROS-induced cell injury was studied by investigating its effect on H_2O_2-induced cell injury in cultured endothelial cells derived from the human umbilical vein.

SHCS effectively proteced the cells against H_2O_2-induced injury determined by trypan blue exclusion ability and lactate dehydrogenase (LDH) release. The effect of SHCS was concentration-dependent and the concentrations to inhibit by 50% the cell death and LDH release were 0.9 ± 0.1 and 1.2 ± 0.1 mg/ml, respectively. In addition, SHCS effectively protected the cells against

t-butylhydroperoside- and menadione-induced injury as well. SHCS inhibited lipid peroxidation determined by malondialdehyde production. SHCS exerted as an effective scavenger of ROS produced by exposing the cells to H_2O_2. The activities of the intracellular ROS scavenging enzymes such as superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase were not influenced by SHCS.

These results indicate that SHCS might exert as an effective cytoprotectant against ROS-induced cell injury. Further intensive studies would provide us insights into mechanisms of the pharmacological actions of SHCS.

I. 緖 論

星香正氣散은 戴[1]의《證治要訣》에 처음 收載된 處方으로 藿香正氣散과 星香散을 合方한 處方으로 理氣祛痰의 效能이 있어[2] 中風, 中氣, 痰厥, 食厥, 등證에 先用되는 代表的인 方劑이며[3-5], 臨床에서 中風昏倒, 人事不省, 痰涎壅盛, 등證에 調氣의 目的으로 活用되고 있는 救急處方이다[6,7]. 代表的인 循環器系疾患의 하나인 中風의 主要 症狀은 意識障碍, 運動痲痺, 言語障碍 등으로[6,8,9] 그 原因은 風, 火, 濕痰 및 虛 등이 爲主가 되고[8,10-12], 이에 대한 治法은 疎風, 淸熱瀉火, 理氣祛痰 및 補虛를 基本으로 하며[12-14], 中風 初期의 救急處方으로 星香正氣散을 活用하고 있다[2-4,15-18].

最近 成人 死亡 原因에 대한 統計에 의하면 腦血管 疾患, 高血壓, 虛血性 心疾患 등 循環器系 疾患이 우리나라에서의 死亡 原因 중 1/3 以上을 차지하고 있으며, 中風을 포함한 癌, 動脈硬化, 本態性高血壓, 糖尿病, Parkinson씨병, 癡呆 등 老化와 연관된 많은 疾患 들에서 活性 酸素 (reactive oxygen species)가 주요 病因으로 주목받고 있다[19]. 특히 血管의 老化에 該當하는 動脈 硬化는 生體 內에서 끊임없이 生成되고 있는 活性酸素와 또 活性 酸素의 細胞 作用의 結果로 形成되는 脂質過酸化 및 그 分解産物과 密接한 關係를 가지고 있다[20]. 活性酸素는 生體의 여러 生化學反應에서 發生하여 正常細胞의 代謝活動에 必要한 中間體 구실을 하지만 이들의 높은 化學反應性 때문에 過多히 生成되거나 適切히 消去 되지 않으면 生體成分에 여러 가지 有害한 作用을 하는 것으로 알려져 있다[21]. 따라서 本 硏究에서는 活性酸素에 의한 血管細胞의 損傷이 心血管系疾患의 重要 誘發因子로 보고[22], 中風 初期의 救急處方으로 活用되는 星香正氣散을 實驗에 應用하였다.

星香正氣散에 關한 實驗的 硏究로는 安[23], 文[24], 柳[25]등이 實驗 動物을 利用하여 血壓, 心搏動, 腦損傷 등에 미치는 影響을 報告한 바 있으나, 血管의 緊張度를 調節하는 주된 기전을 提供할 뿐만 아니라 動脈 硬化 등 血行 障碍와 聯關된 循環器系 疾患의 주된 病因이 시작되는 部位인 血管 內皮細胞에서 酸化性 細胞損傷에 대한 保護 效果에 關한 硏究는 報告된 바가 없었다.

이에 著者는 中風등 腦血管障碍의 治療에 使用되는 星香正氣散이 培養된 血管 內皮細胞에서 hydrogen peroxide 등 酸化劑에 의한 細胞 損傷을 防止하는 效果가 있음을 觀察하고 그 硏究 結果를 報告하는°바이다.

II. 實 驗

1. 實驗材料

1) 藥材

星香正氣散은《方藥合編》[3]에 依據하였고, 藥材는 東義大學校 韓方病院에서 良質의 것을 精選하여 使用하였다. 處方의 內容과 1貼의 分量은 다음과 같다.

Prescription of Sunghyangjunggisan

韓 藥 名	生藥名	重 量(g)
藿 香	*Herba Pogostemi*	5.625
蘇 葉	*Folium Perillae*	3.75
白 芷	*Radix Angelicae Dahuricae*	1.875
大腹皮	*Pericarpium Arecae*	1.875
白茯苓	*Poria*	1.875
厚 朴	*Cortex Magnoliae*	1.875
白 朮	*Rhizoma Atractylodis Macrocephalae*	1.875
陳 皮	*Pericarpium Citri Nobilis*	1.875
半夏製	*Tuber Pinelliae*	1.875
桔 梗	*Radix Platycodi*	1.875
甘草炙	*Radix Glycyrrhizae*	1.875
生 薑	*Rhizoma Zingiberis*	3.0
大 棗	*Fructus Zizyphi Jujubae*	3.0
南 星	*Rhizoma Arisaematis*	3.75
木 香	*Radix Saussurea*	3.75
	Total amount	39.750

2. 實驗方法

1) 星香正氣散 엑기스의 調製

星香正氣散 10貼 分量인 397.5 g을 둥근 플라스크에 넣고 증류수 3ℓ를 加한 後 3時間 동안 煎湯하고 濾過液을 凍結乾燥하여 엑기스 粉末을 얻었다.

2) 細胞의 培養

血管 內皮細胞는 10% fetal bovine serum, 50 IU/ml penicillin G 및 50 μg/ml streptomycin이 包含된 細胞 培養液 Medium-119를 이용하여 플라스틱 細胞 培養 플라스크에서 유지 培養하였다. 細胞 培養 條件은 37℃, 5% CO_2, 포화습도 狀態였으며 이틀에 한번씩 細胞 培養液을 갈아주었다. 細胞가 培養 플라스크에 완전히 차게 자라면 0.05% trypsin-0.53 mM EDTA 溶液으로 처리하여 細胞를 분리한 후 약 1/4의 細胞 密度로 재분주하여 繼代培養(subculture)하였다.

3) H_2O_2 및 酸化劑의 處理

細胞를 12-well culture plates에 분주 培養하여 분주 후 3-4일의 細胞를 實驗에 使用하였다. 細胞 培養液을 세척하고 Hank's balanced salt solution (HBSS)에서 일정 시간 평형 시킨 후 각 實驗 濃度의 H_2O_2를 加하고 특별한 언급이 없는 경우 3시간 동안 處理하였다. t-buyl hydroperoxide 및 menadione 등도 같은 方法으로 處理하였다.

4) 細胞 生存律 (viability)의 測定

細胞 生存率은 trypan blue exclusion assay법[26]으로 測定하였다. 細胞를 實驗 條件에 노출시킨 후 0.05% trypsin-0.53 mM EDTA 용액으로 細胞를 分離, 收去한 後, 4% trypan blue가 包含된 HBSS 용액에서 15분간 培養하였다. 生存 細胞는 色素를 細胞 外로 排出하여 염색이 되지 않지만 死亡 細胞는 이 色素에 염색이 된다. 따라서 色素에 염색이 된 細胞를 광학현미경 하에서 혈구 계산판을 이용하여 色素에 염색된 細胞와 염색되지 않은 細胞를 세어 細胞 生存率을 測定하였다.

5) LDH 遊離의 測定

細胞 損傷을 추정하는 또 다른 지표의 하나로 lactate dehydrogenase (LDH) 遊離를 測定하였다. 細胞를 實驗 條件에 노출시킨 후 溶液과 細胞를 따로 分離하였다. 細胞는 0.2% triton X-100이 包含된 溶液에서 초음파를 이용하여 細胞膜을 파괴하여 細胞 抽出液을 얻었다. 溶液과 細胞 抽出液에 包含된 LDH 活性은 LDH 分析 試藥 (Iatron lab사, 일본)을 이용하여 測定하였다. LDH의 遊離는 細胞抽出液과 溶液에서 測定한 LDH 活性의 合인 總 LDH 活性에 대한 溶液으로 遊離된 LDH 活性의 퍼센트 비로 나타내었다.

6) 脂質 過酸化의 測定

脂質 過酸化는 그産物인 malondialdehyde (MDA)의 量을 Uchiyama와 Mihara의 方法[27]으로 測定하였다. 實驗 條件에 노출 後 細胞를 1.15% KCl 溶液에서 초음파를 이용하여 細胞를 파쇄한다. 細胞 파쇄액 0.5 ml에 1% 인산 溶液 3 ml과 0.6% thiobarbituric acid 溶液 1 ml을 添加하여 끓는 물 속에서 45분간 중탕하였다. 중탕이 끝나면 실온의 물속에 담가서 식힌 후 n-butanol 4 ml을 添加하여 완전히 섞은 다음 2,000g에서 20분간 遠心分離한다. 상층의 n-butanol 층에 抽出된 MDA의 分光 光度計 (Hewlett Packard, 8451B)를 이용하여 吸光度 536 nm 및 520 nm에서의 吸光度 차이를 測定하고 MDA 溶液을 標準으로 하여 蛋白質 mg 당 pmole로 計算하였다.

7) 活性 酸素 量의 測定

細胞內 活性 酸素의 生成量은 DCF 형광을 分析하여 測定하였다[28]. 먼저 細胞를 DCFDA가 包含된 溶液에서 30분간 평형시켜 細胞내에 DCFDA가 부하되도록 한 후 實驗 條件에 노출시켰다. DCFDA는 脂溶性으로 細胞內로 쉽게 확산해 들어가며 細胞 內에 들어가면 細胞 內에 存在하는 esterase에 의해서 비형광성인 DCFH로 탈아세틸화된다. DCFH는 活性 酸素에 의해 酸化되면 강한 형광을 내는 DCF로 되며 이 DCF의 형광을 分析하면 細胞내 活性 酸素의 量을 測定할 수 있다. DCF의 형광은 형광 分析器 (Bio-Tex, FL500)를 이용하여 여기(excitation) 파장 485 nm 및 방출(emission) 파장 530 nm에서 120분간 기록, 分析하였다.

8) Superoxide dismutase 活性의 測定

Superoxide dismutase 活性은 xabthuine -xanthine oxidase와 superoxide에 의해 ferricytochrome C가 환원되는 反應을 superoxide dismutase가 抑制하는 原理를 이용하여 그 活性을 測定하였다[29]. 細胞를 50 mM 인산 완충액(pH 7.8)에서 파쇄하여 細胞 抽出液을 얻었다. 5 ml 용량의 시험관에 50 μM xanthine, 0.1 mM NaOH, 20 μM cytochriome C, 0.1 mM EDTA, 50 mM phosphate buffer (pH 7.8)로 造成된 incubation 溶液 2.9 ml을 넣고 細胞 抽出液 50 μl 및 0.2 U/ml xanthine oxidase/0.1 mM EDTA 50 μl을 添加하여 잘 섞은 후 550 nm에서 吸光度를 測定하였다.

9) Catalase 活性의 測定

Catalase 活性의 測定은 Aebi의 方法[30]에 따라 H_2O_2의 分解 정도를 分光 光度計로 測定하였다. Triton X-100 0.02%가 包含된 50 mM 인산 완충액에서 細胞를 파쇄한 후 10,000 g에서 30분간 遠心分離하여 상층액을 취하였다. 자외선 영역 파장 測定用의 수정 큐벧에 2 mℓ의 細胞 抽出液을 넣고 30 mM H_2O_2 1 mℓ을 添加하여 反應을 시작하고 240 nm에서 吸光度의 變化를 測定하였다.

10) Glutathione peroxidase 活性의 測定

Glutathione peroxidase 活性은 Flohe와 Gunzler의 方法[31]으로 測定하였다. 100 mM phosphate buffer 500 μℓ에 細胞 抽出液 100 μℓ, 2.4 U/mℓ glutathione reductase 100 μℓ, 100 mM glutathione 100 μℓ를 넣어 37°C에서 10분간 preincubation하였다. Preincubation이 끝나면 1.5 mM NADPH 溶液을 100 μℓ 넣어 hydroperoxide와 무관한 NADPH 소모를 약 3분간 기록하였다. 그 후 1.5 mM H_2O_2 100 μℓ를 첨가하여 340 nm 또는 365 nm에서 吸光度의 減少를 약 5분 동안 觀察하였다.

11) 資料 分析

實驗 經過들은 平均과 標準誤差로 표시하였으며 實驗群 間의 差異를 檢定할 必要가 있을 때는 student's t-test, 혹은 ANOVA test를 施行하였으며 P 값이 0.05 以下일 때 有意한 差異가 있는 것으로 간주하였다.

III. 實 驗 成 積

1. H_2O_2에 의한 血管 內皮細胞의 損傷과 星香正氣散에 의한 損傷防止 效果

H_2O_2는 그 自體로서도 有害 活性 酸素基의 一種이기도 하지만 細胞에서 superoxide 및 hydroxyl radical 등의 다른 活性 酸素基를 生成하는 供與 物質로도 作用하기 때문에(그림 1 참조) 活性 酸素基에 의한 細胞 損傷의 實驗에 가장 흔히 사용되는 物質이다. 그림 2는 血管 內皮 細胞를 여러 농도의 H_2O_2에 노출시켰을 때 나타나는 細胞 損傷의 정도를 보여주고 있다. 細胞 損傷의 정도는 trypan blue exclusion assay와 LDH 遊離의 정도로 分析하였다. Trypan blue exclusion assay의 原理는 살아 있는 細胞는 trypan blue 色素를 細胞 外로 排出하는 能力을 지녀 이 色素에 염색되지 않는데 비해서 死亡 細胞는 이 色素가 細胞내로 蓄積되어 細胞가 염색이 되는 原理를 이용한 것이다. LDH는 細胞 내에 存在하는 酵素로서 細胞 損傷時 細胞 外部로 遊離되어 이를 分析하면 組織이나 細胞의 損傷 정도를 推定하는 간단하고 有用한 指標로 흔히 使用할 수 있다. 血管 內皮 細胞에서도 細胞의 損傷을 測定하는 有用한 指標로 使用될 수 있음이 立證된 바 있다.

血管 內皮細胞를 여러 濃度의 H_2O_2에 3시간 동안 노출시켰을 때 trypan blue exclusion assay로 測定한 細胞 死亡이나 LDH 遊離로 分析한 細胞 損傷의 정도가 모두 H_2O_2의 濃度에 비례하여 增加하였으며 0.5 mM의 濃度에서 48.1±7.6%의 細胞 死亡과 12.8±1.4%의 LDH 遊離를 보였다. 한편 星香正氣散 1 mg/ml을 添加한 경우 細胞 死亡 및 LDH 遊離를 顯著히 抑制하였으며 0.5 mM H_2O_2를 基準으로 하였을 때 그 抑制 效果는 각각 53.4±7.8 및 46.7±6.4%이었다. 星香正氣散에 의한 細胞 損傷의 防止 效果는 全 濃度 範圍의 H_2O_2에 의한 細胞 損傷에 비슷한 정도의 保護 效果를 보였다(그림 2).

그림 3은 0.5 mM의 H_2O_2에 의한 細胞 死亡 및 LDH 遊離에 미치는 星香正氣散의 防止 效果를 濃度에 따라 觀察한 結果로 細胞 死亡 및 LDH 遊離 모두 濃度에 의존적으로 防

止 效果를 나타내었다. 0.5 mM H_2O_2에 의한 細胞 死亡과 LDH 遊離를 50% 抑制한 星香正氣散의 濃度는 각각 0.9±0.1 및 1.2±0.1 mg/ml이었다.

2. t-Butylhydroperoxide 및 menadione에 의한 內皮細胞 損傷에 미치는 星香正氣散의 效果

星香正氣散의 內皮細胞 損傷에 미치는 保護 效果가 H_2O_2에 特異한 기전으로 나타나는 지를 확인하기 위해서 H_2O_2 外에 活性 酸素基를 生成하여 酸化性 細胞 損傷을 일으키는 實驗 모델로 흔히 쓰이는 t-butylhydroperoxide (t-BHP) 및 menadione으로 細胞 損傷을 誘發하고 星香正氣散이 미치는 效果를 確認하였다. 그림 4에서 나타내었듯이 t-BHP 및 menadione에 의한 內皮細胞 損傷도 星香正氣散이 效果的으로 防止함으로서 星香正氣散의 細胞 損傷 保護 效果가 다양한 要因에 의해 초래되는 活性 酸素基에 의한 酸化性 細胞 損傷을 效果的으로 防止하는 效果가 있음을 시사한다.

3. 脂質 過酸化에 미치는 效果

活性 酸素基에 의한 細胞 損傷의 기전은 명확히 밝혀져 있지 않지만 遺傳子 損傷, 미토콘드리아 機能 沮害 등과 함께 細胞膜 脂質의 過酸化가 重要하게 關與하는 것으로 알려져 있다[32]. 따라서 星香正氣散에 의한 細胞 損傷의 防止 效果가 脂質 過酸化의 抑制와 聯關이 있는 지를 確認하기 위해서 H_2O_2에 의한 脂質 過酸化 정도와 이에 미치는 星香正氣散의 效果를 觀察하였다. 이와 竝行하여 脂質過酸化를 效果的으로 防止하는 것으로 잘 알려진 DPPD[33]의 效果를 함께 觀察하여 比較하였다. 0.5 mM의 H_2O_2에 3 시간 동안 노출시킨 細胞에서는 正常 細胞에 비해 脂質過酸化가 5 배 이상 增加하였으며 星香正氣散은 이를 有意하게 抑制하였다(그림 5). 그러나 細胞 死亡에 미치는 防止하는 效果와 脂質 過酸化 抑制 效果를 DPPD의 效果와 比較하였을 때 脂質 過酸化를 抑制하는 效果는 DPPD가 가장 크게 나타났으나 細胞 死亡을 防止하는 效果는 星香正氣散보다 DPPD의 效果가 더 낮게 나타났다(그림 6). 이와 같은 結果는 星香正氣散이 脂質過酸化를 抑制하는 效果가 있지만 이것이 細胞 損傷을 防止하는 決定的인 기전은 아님을 시사한다.

4. 細胞내 活性 酸素基 生成에 미치는 效果

星香正氣散이 活性 酸素基를 除去하는 效果가 있는 지를 확인하기 위해서 DCF 형광分析法을 利用하여 細胞內 活性 酸素基 生成에 미치는 效果를 觀察하였다. 0.5 mM의 H_2O_2 存在 下에서 活性 酸素基가 時間에 比例하여 增加하였으며, 1 mg/ml의 星香正氣散을 添加한 경우 時間에 따른 活性 酸素基의 增加를 顯著히 抑制하였다(그림 7). 그림 8에 나타낸 結果에서는 星香正氣散에 의한 活性 酸素基를 減少시키는 效果를 正常 細胞에서 細胞內 活性 酸素基를 除去하는 酵素들인 superoxide dismutase 및 catalase를 添加하거나 hydroxyl radical의 效果적인 除去劑로 알려진 dimethylthiourea를 添加하여 이들 物質들에 의한 活性 酸素基의 除去 效果와 比較하였다. 그 結果 1 mg/ml의 星香正氣散에 의한 活性酸素基의 除去 效果가 이들보다 크게 나타나 星香正氣散에 아주 效果的으로 活性 酸素基를 除去하는 成分이 包含되어 있음을 나타낸다.

5. 細胞內 活性 酸素基 除去 酵素들의 活性에 미치는 效果

어떤 物質이 活性 酸素基를 除去하는 效果는 직접 活性 酸素基를 除去하는 作用에 의해 나타날 수도 있고 細胞內 活性 酸素基 除去 기전을 活性化시켜서 나타날 수도 있다. 따라서 星香正氣散이 細胞內 代表的인 活性 酸素基 除去 酵素들의 活性에 變化를 주는지를 觀察하였다. Superoxide dismutase, catalase 및 glutathione peroxidase는 細胞內에서 活性 酸素基를 除去하는 代表的인 酵素들로 이들 酵素의 活性에는 星香正氣散이 아무런 效果를 미치지 못하였다(표 1).

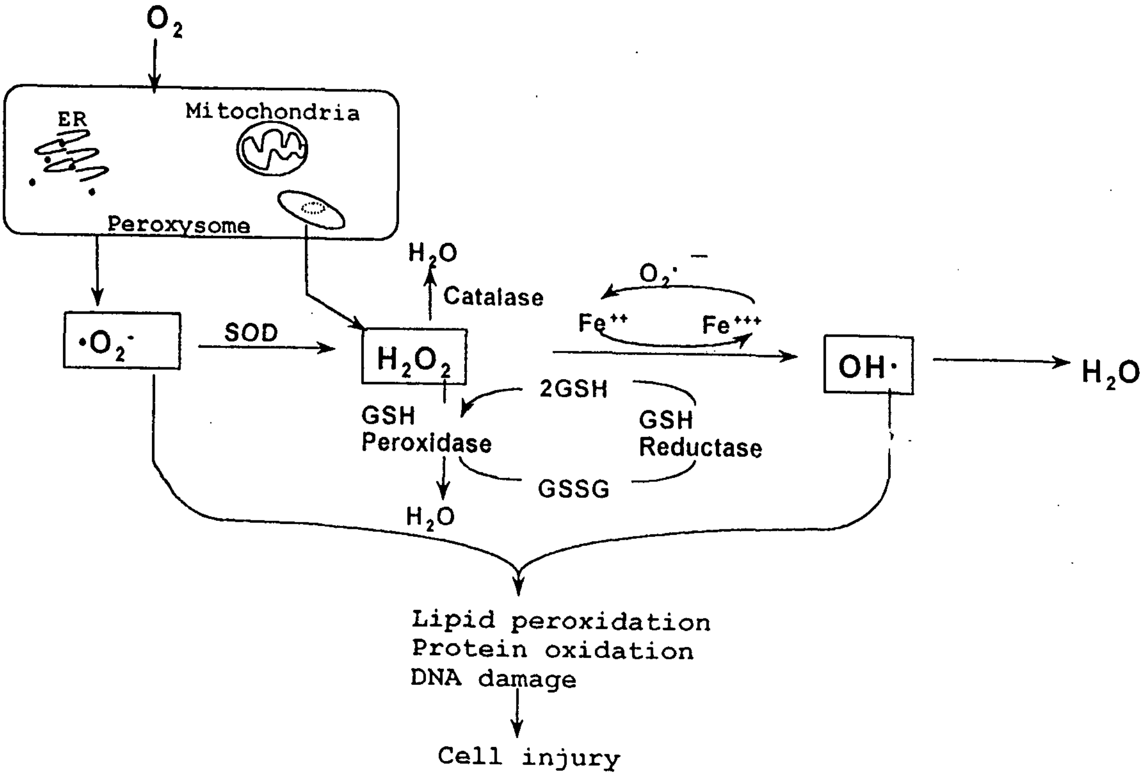

Fig. 1. Formation of reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in biological systems.

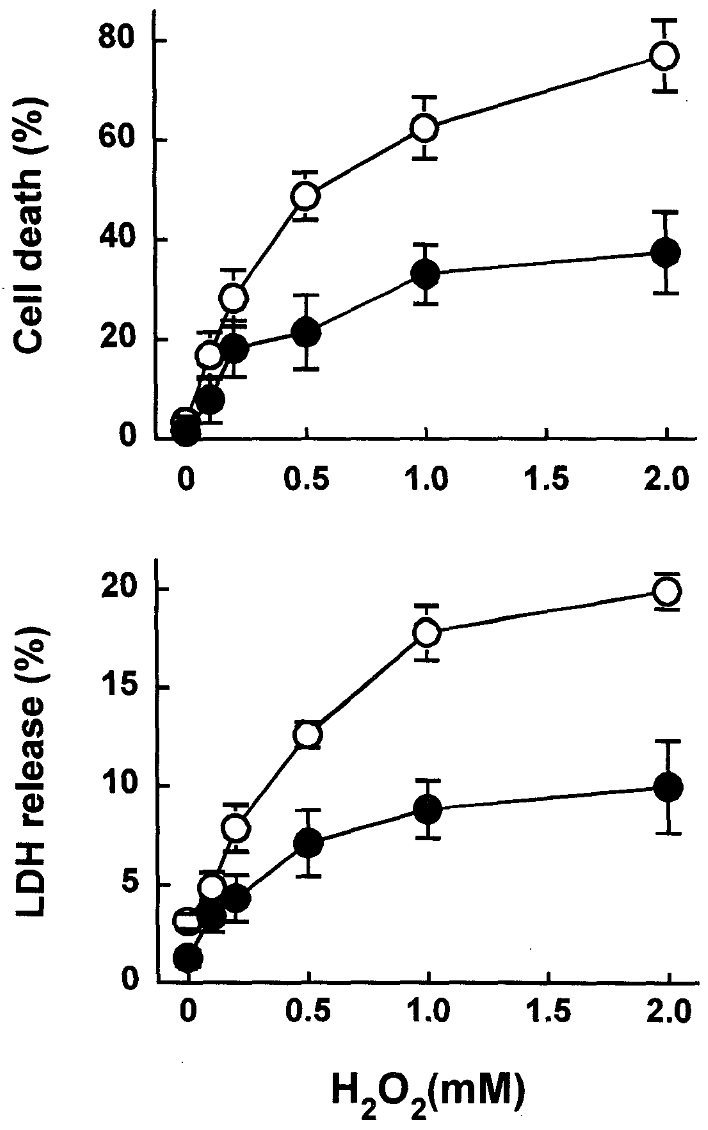

Fig. 2. Effect of Sunghyangchungisan on H_2O_2-induced cell death and LDH release in cultured human umbilical vein endothelial cells. Cells were treated with indicated concentrations of H_2O_2 for 3 hr at 37°C in the absence(○) and presence(●) of

Sunghyangchungisan(SHCS, 1 mg/ml), and cell viability and LDH release were determined. Each point represents mean±S.E. of 6 experiments.

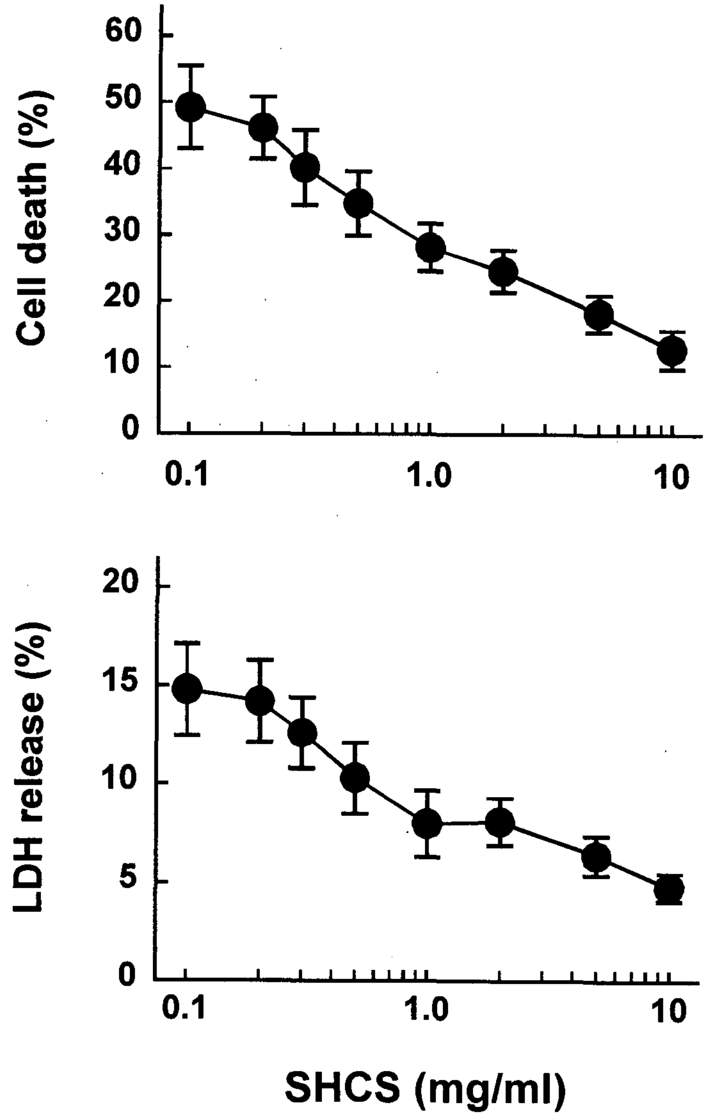

Fig. 3. Concentration-dependent protection by Sunghyang- chungisan against H_2O_2-induced cell death and LDH release in cultured human umbilical vein endothelial cells. Cells were treated with 0.5 mM H_2O_2 for 3 hr at 37°C in the presence of indicated concentrations of Sunghyang-chungisan(SHCS), and cell viability and LDH release were determined. Each point represents mean±S.E. of 8 experiments.

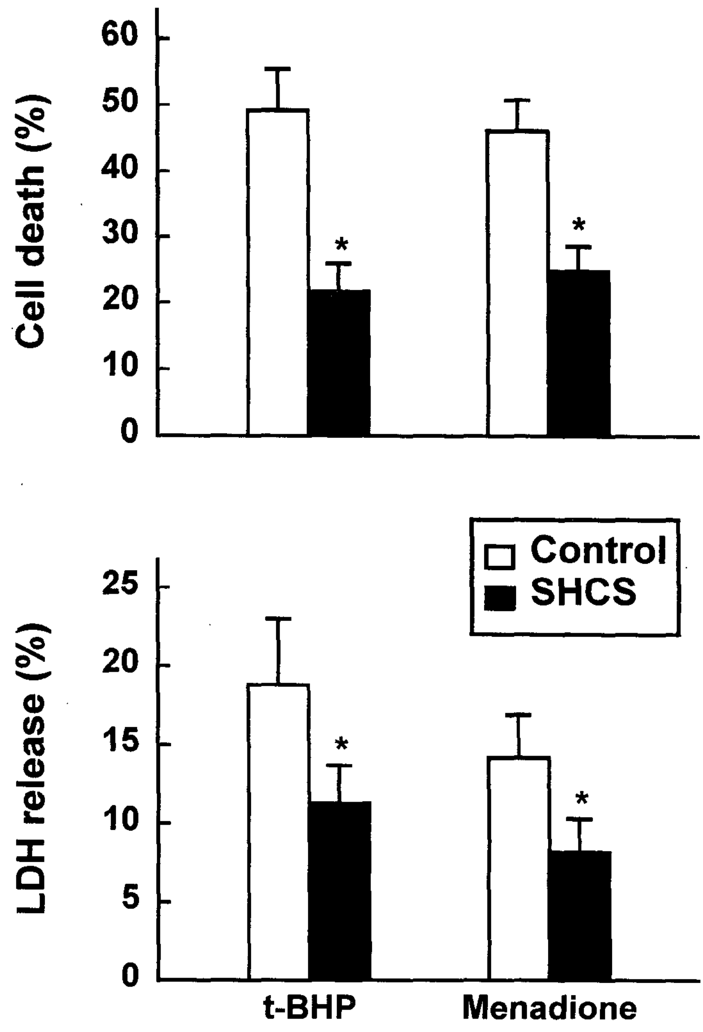

Fig. 4. Effect of Sunghyangchungisan on t-butylhydroperoxide- and menadione-induced cell death and LDH release in cultured human umbilical vein endothelial cells. Cells were treated with t-butylhy-droperoxide(t-BHP, 0.5 mM) or menadione (2 mM) for 3 hr at 37°C in the absence

and presence of Sunghyang- chungisan(SHCS, 1 mg/ml), and cell viability and LDH release were determined. Each point represents mean±S.E. of 5 experiments. *P<0.01 vs. control.

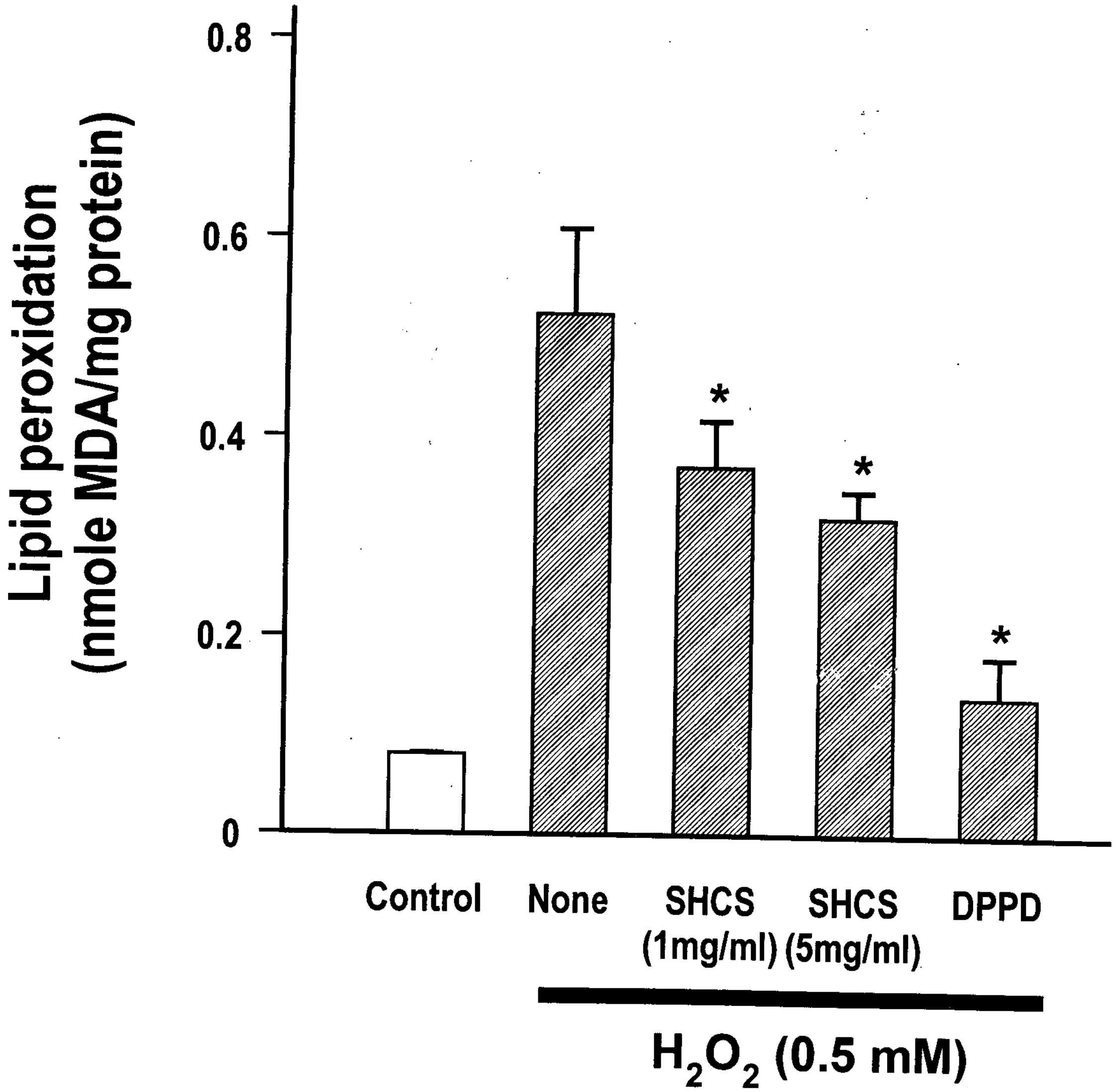

Fig. 5. Effect of Sunghyangchungisan and N.N'-diphenyl-p-phenylene-diamine on H_2O_2-induced lipid peroxidation in cultured human umbilical vein endothelial cells. Cells were treated with 0.5 mM H_2O_2 in the absence and presence of Sunghyangchungisan(SHCS), or N.N'-diphenyl-p-phenylenediamine(DPPD, 20 μM), and malondialdehyde(MDA) production was determined. Each point represents mean±S.E. of 5 experiments. *P<0.01 vs. H_2O_2 alone.

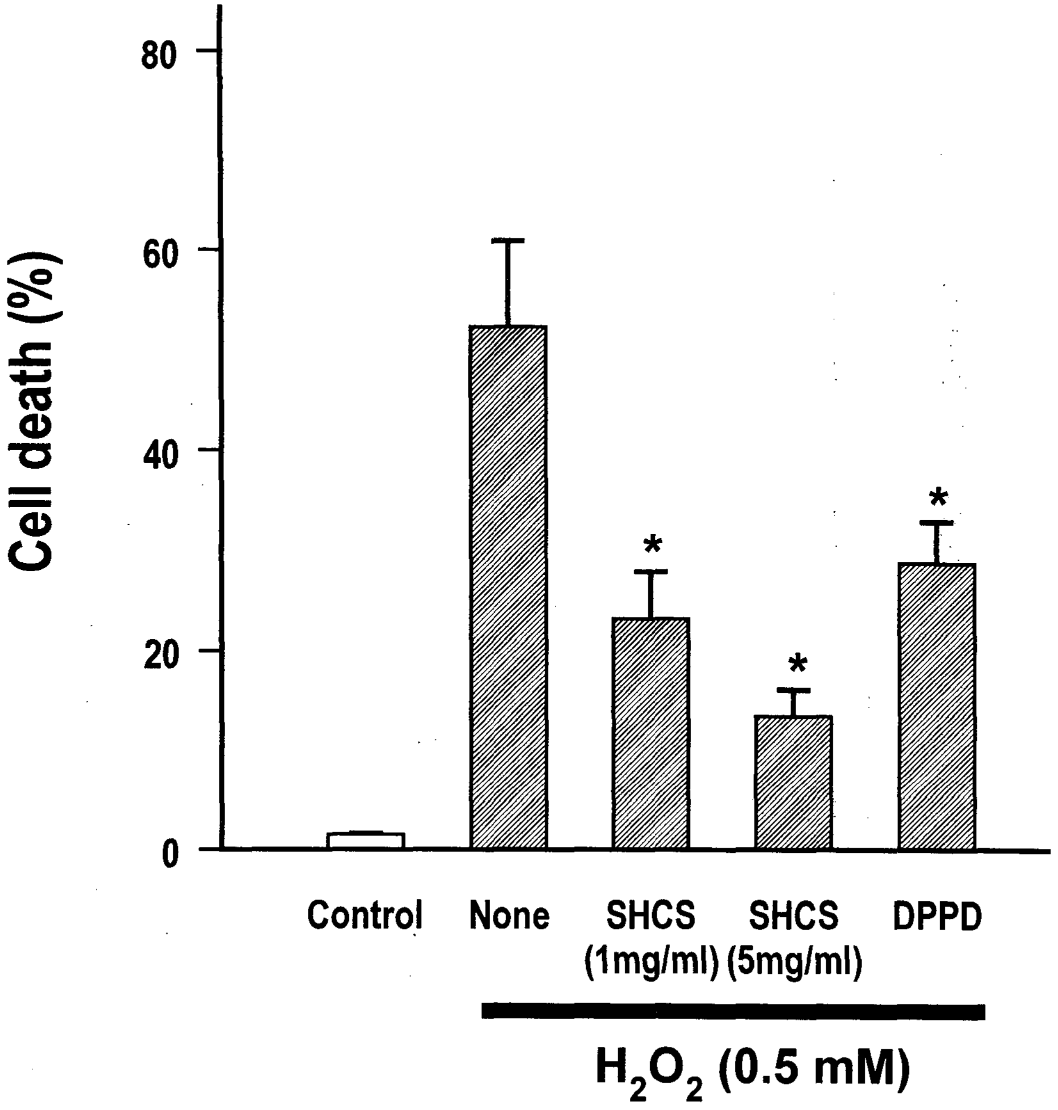

Fig. 6. Effect of Sunghyangchungisan and N.N'-diphenyl-p-phenylenediamine on H_2O_2-induced cell death in cultured human umbilical vein endothelial cells. Cells were treated with 0.5 mM H_2O_2 in the absence and presence of Sunghyang-chungisan(SHCS), or N.N'-diphenyl-p-phenylenediamine (DPPD, 20 μM), and cell viability was determined. Each point represents mean$\pm$S.E. of 5 experiments. *P<0.01 vs. H_2O_2 alone.

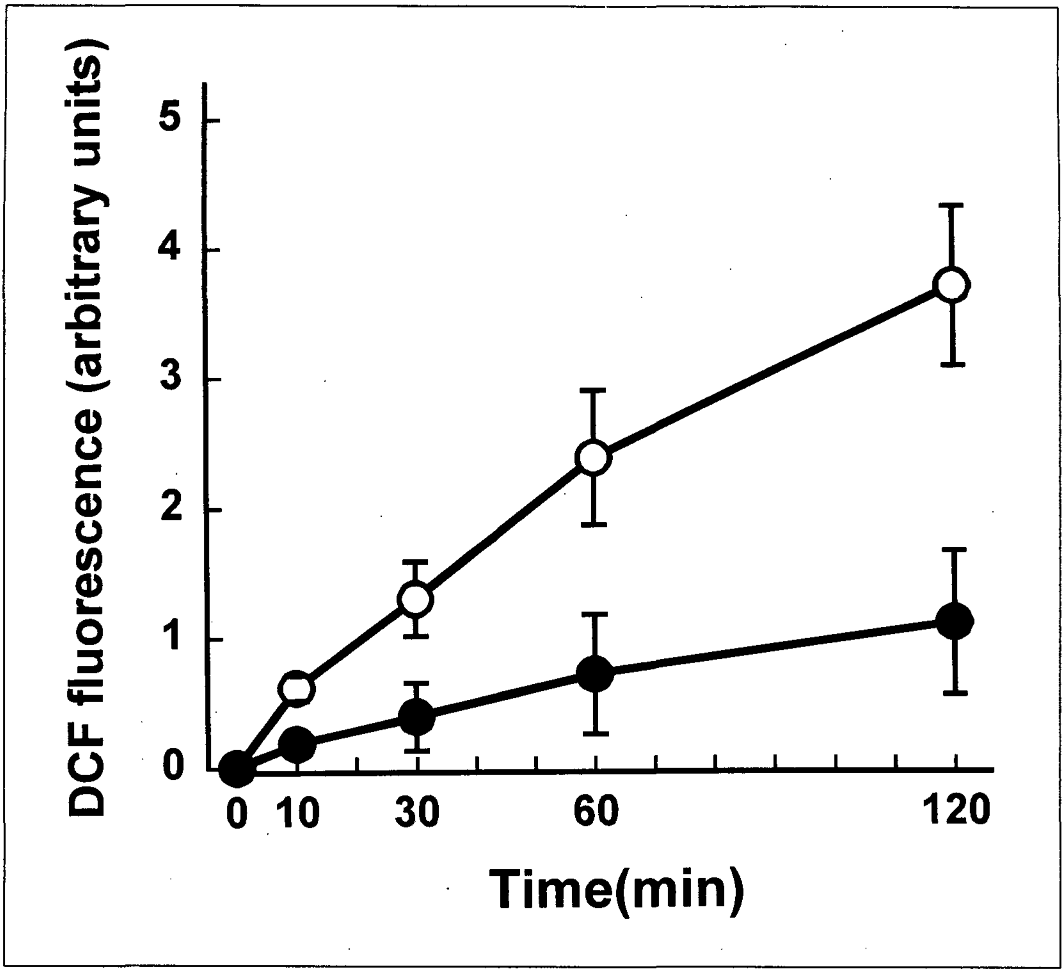

Fig. 7. Effect of Sunghyangchungisan on H_2O_2-induced formation of oxygen free radicals in cultured human umbilical vein endothelial cells. Time dependent increase in oxygen free radicals was determined by assaying the DCF flroroscence in the absence(○) and presence(●) of Sunghyangchungisan(1 mg/ml). Each point represents mean±S.E. of 6 experiments.

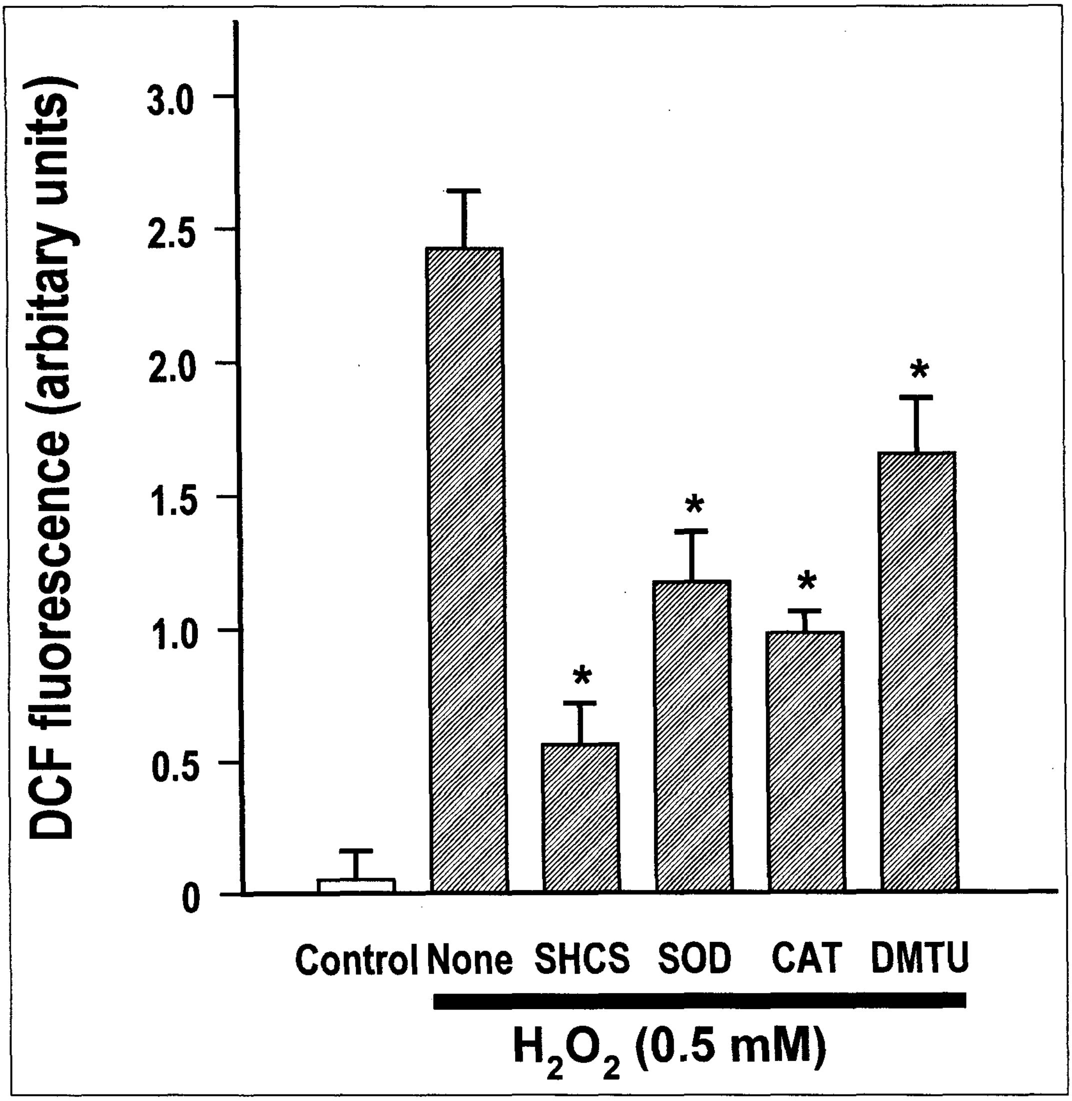

Fig. 8. Effect of Sunghyangchungisan and various oxygen radical scavengers on H_2O_2-induced formation of oxygen free radicals in cultured human umbilical vein endothelial cells. H_2O_2(0.5 mM)-induced increase in oxygen free radical formation for 60 min was determined by DCF fluorescence assay in the absence and presence of Sunghyangchungisan(SHCS, 1 mg/ml), superoxide dismutase (SOD, 200 U/ml), catalse (CAT, 200 U/ml), and dimethylthiourea(DMTU, 10 mM). Each point represents mean±S.E. of 6 experiments. *P<0.01 vs. H_2O_2 alone.

Table 1. Effect of Sunghyangchungisan (SHCS, 1 mg/ml) on the activities of antioxidant enzymes in human umbilical vein endothelial cells.

	Superoxide dismutase (μU/mg protein)	Catalase (mU/mg protein)	Glutathione peroxidase (μU/mg protein)
Control	17.54±3.11	2.11±0.03	7.72±1.11
SHCS	19.31±2.63	2.23±0.04	7.68±1.74

Mean±S.E. of 4 determinations

Ⅳ. 考　察

最近 成人 死亡 原因에 대한 統計에 의하면 腦血管 疾患, 高血壓, 虛血性 心疾患 등 循環器系 疾患이 우리 나라에서의 死亡 原因 중 1/3 以上을 차지하고 있으며, 中風을 포함한 癌, 動脈 硬化, 本態性 高血壓, 糖尿病, Parkinson씨병, 癡呆 등 老化와 연관된 많은 疾患 들에서 活性 酸素 (reactive oxygen species)가 주요 病因으로 주목받고 있다[19]. 특히 血管의 老化에 該當하는 動脈 硬化는 生體 內에서 끊임없이 生成되고 있는 活性 酸素와 또 活性 酸素의 細胞 作用의 結果로 形成되는 脂質過酸化 및 그 分解産物과 密接한 關係를 가지고 있다[20]. 酸素는 强한 酸化力을 지니고 있으며 그 중 일부는 反應性이 强한 活性 酸素로 代謝되어 生體 여러 構成 成分들을 酸化시켜, 여러 細胞 및 組織의 機能 底下를 招來한다.

東洋 醫學에서는 腦卒中, 動脈硬化症, 高血壓 등의 疾病을 中風의 範疇에 속한다고 보았다[10,12,34-36]. 中風의 原因에 대하여 內徑 以後 歷代 醫家들의 主張이 多樣하지만 大體로 風, 火, 濕痰, 虛의 四大 原因으로 要約되고[8,34,37], 中風 初期의 治療에 있어서 嚴등[1,38]은 調氣를 우선으로 하였으며, 朱[39]는 治痰을 우선으로 하였으나 肥人中風, 痰涎壅盛에는 먼저 理氣로써 急治하라 하였고, 盧는 中風 急性期의 病機의 關鍵은 氣機의 升降逆亂에 있으므로 治療는 마땅히 通利中焦하고 調理升降하라고 하였다[24].

星香正氣散 構成藥物의 藥理作用을 보면, 藿香은 理氣和中, 兼治表裏하며, 藿香, 白芷, 蘇葉은 寒邪를 溫散하고, 利膈하며 表邪를 發散시키고, 芳香으로써 濁氣를 化한다. 桔梗, 厚朴, 大腹皮는 調氣하고, 消脹除滿하며 行水한다. 半夏, 陳皮, 生薑은 降逆하여 除濕化痰하고 裏滯를 疏通시킨다. 茯苓, 白朮, 甘草, 大棗는 健脾祛濕하고 正氣를 補한다[4,40]. 南星은 燥濕化痰, 祛風解痙하는 效能이 있어 風痰, 濕痰을 除去하며, 木香은 行氣止痛, 健脾消食하는 效能이 있어 腸胃의 氣滯를 疏通시킨다[4,40,41]. 星香正氣散은 藿香正氣散에 南星과 木香을 加한 處方으로 中風, 中氣, 痰厥, 食厥 등症에 先用 一, 二貼하여 正其氣한 後에 隨症治之하는 救急處方으로 널리 活用되고 있다[3,4,7].

西歐化된 生活 樣式이 普遍化되면서 食生活 및 여러 가지 環境的 要因들의 變化로 因

하여 動脈 硬化등 循環器 疾患의 頻度가 점차 增加하고 있다. 動脈 硬化는 老化와도 密接한 聯關이 있으며 이에는 活性 酸素가 重要한 病因이 됨은 잘 알려진 事實이다. 老化 및 이에 聯關된 疾患들이 活性 酸素와 聯關이 있다고 主張되는 根據는 年齡의 增加나 이와 동반된 疾患과 聯關되어 還元性 glutathione과 酸化性 glutathione의 比가 減少하고, 細胞膜 脂質의 過酸化가 增加하며, 酸化에 의해 損傷된 蛋白質의 濃度가 增加하고, 여러 組織에서 DNA의 酸化性 損傷의 指標인 8-hydroxydeoxyguanosine의 濃度가 增加하는 등의 實驗的 觀察에 根據하고 있다[32]. 實際로 細胞 內 抗酸化 酵素의 濃度를 增大시킨 結果 平均 壽命이 年長된다는 實驗 報告는 이러한 假定을 뒷받침하고 있다[42]. 따라서 活性 酸素를 除去함으로써 老化 및 이와 同伴되는 여러 疾患들을 防止하려는 努力들이 進行되고 있지만 지금까지 滿足할 만한 成果는 없는 狀態이다. 體內에서는 細胞 內에 存在하는 抗酸化 酵素들 외에 serotonin계 物質이나[43] 腦의 송과선에서 分泌되는 indole 誘導體의 一種인 melatonin이[44,45] 活性 酸素를 除去하는 탁월한 機能을 함이 알려져 있으며 이중 melatonin은 일반인들에게도 老化 防止劑로 알려져 주목을 받기도 하였다.

天然物質 중에도 抗酸化 機能을 지닌 物質이 存在할 可能性은 많으며 茶는 抗酸化 機能이 알려진 代表的인 天然物의 하나이다. 最近 多樣한 天然 物質들에서 硏究가 進行되고 있지만 現在까지 그 成果는 미미한 실정이다. 天然 物質 中 특히 韓藥劑로 쓰이는 物質들은 그 알려진 臨床 藥效 등으로 보아 抗酸化劑로서의 效果를 나타낼 可能性이 아주 높을 것으로 생각된다. 現在까지 이 分野에 대한 硏究는 미미한 실정이지만 최근 丹蔘이 강력한 抗酸化 效果를 나타냄이 報告되었으며[46,47] 이에 대한 硏究가 활발히 進行되고 있다. 이외에도 蠐螬[48], 白何首烏[49] 등도 抗酸化 作用을 나타냄이 報告된 바 있다.

本 硏究에서 中風등 血行 障碍를 나타내는 循環器系 疾患에서 광범위하게 쓰이는 韓方處方劑인 星香正氣散이 血管 內皮細胞에서 强力한 抗酸化劑 機能이 있음을 보였다. 星香正氣散은 濃度에 依存的으로 H_2O_2에 의한 內皮 細胞의 損傷을 效果적으로 防止하였으며 脂質 過酸化도 抑制하였다. 이러한 星香正氣散의 效果는 H_2O_2에 의한 細胞 損傷 뿐만 아니라 t-butylhydroperoxide 및 menadione에 의한 細胞 損傷도 防止함으로서 여러 要因들에 의한 酸化성 細胞 損傷에 效果的인 保護劑로 作用할 수 있음을 시사하였다. 血管 內皮細胞는 血管의 彈性을 調節하여 組織 血流量을 調節하는데 핵심적인 機能을 할뿐만 아니라 動脈 硬化 등 老化와 聯關된 血管 疾患의 始發 部位이다. 動脈 硬化 특히 粥狀 動脈硬化(atherosclerosis)는 活性 酸素와 反應해서 생기는 脂質 過酸化와 密接한 聯關이 있다[20]. "사람은 動脈과 더불어 늙는다"는 말이 나타내듯이 血管性 疾患은 나이와 관련된 一種의 老人性 疾患으로, 나이가 들어감에 따라 動脈 硬化가 顯著히 增加하며 動脈 硬化가 原因이 되는 腦血管 疾患, 心臟 疾患도 나이에 따라 급속히 增加한다. 動脈 硬化가 進行되면 動脈의 彈性이 減少하고, 두꺼워지며 動脈 內壁이 여러 가지 形態로 狹窄, 閉鎖, 剝離 或은 破裂되면서 重要 臟器에 營養分과 酸素를 충분히 供給하지 못하는 血行 障碍를 초래하게 된다. 侵犯하는 臟器와 정도에 따라 나타나는 症候는 다른데 心臟의 冠狀動脈을 侵犯하면 冠狀動脈 硬化症이라 하며 狹心症, 心筋梗塞症이 초래되어 結局 心不全症으로 死亡까지 이르게 된다. 腦血管을 侵犯하면 腦梗塞, 腦出血을 초래하여 中風의 原因이 되며 때로는 老人性 癡呆도 초래한다.

心臟이나 腦 등에서 血行 障碍 或은 虛血後 血液 再灌流에 의한 損傷時에도 活性 酸素가 決定的인 役割을 하기 때문에 本 硏究에서 觀察된 血管 內皮細胞에 대한 酸化性 細胞 損傷을 防止하는 星香正氣散의 效果는

여러 가지 面에서 意味가 深化될 수 있을 것으로 사료된다. 먼저 血管 內皮細胞의 損傷保護 效果는 老化나 여러 가지 다른 要因들에 의해 活性 酸素基를 媒介로한 內皮 細胞의 損傷을 防止함으로서 이와 聯關된 動脈硬化 등 血管 疾患의 發生 或은 進行을 防止하거나 遲延시키는 效果가 기대된다. 또 다른 觀點에서 冠狀 動脈 血行 障碍에 의한 虛血性 心疾患 或은 腦血管 障碍에 의한 中風 등에서 活性 酸素에 의한 이들 組織 損傷의 進行을 防止 혹은 緩和시키는 效果를 기대할 수 있을 것이다. 이는 星香正氣散이 中風 初期의 救急處方으로 效果的으로 活用되고 있다는 점에서 아주 흥미로우며, 腦 或은 心筋組織을 이용하거나 生體 實驗 등을 통해서 究明해야 할 必要가 있을 것으로 사료된다.

星香正氣散이 脂質 過酸化도 抑制하였으나 이는 脂質 過酸化 기전에 作用하기보다는 活性 酸素의 除去 效果에 기인한 것으로 보인다. 특히 脂質 過酸化를 가장 效果的으로 抑制한 DPPD보다 脂質 過酸化에 대한 抑制 效果가 상대적으로 낮게 나타난 星香正氣散이 오히려 細胞 死亡을 防止하는 效果가 크게 나타남은 星香正氣散에 의한 細胞 損傷 保護 效果에 脂質 過酸化의 抑制는 決定的인 要因이 아님을 나타낸다. 星香正氣散이 細胞內 抗酸化 酵素들의 活性에는 變化를 주지 않는 것으로 보아 活性 酸素를 除去하는 效果는 星香正氣散에 의한 직접 作用으로 보인다. 體內에서 或은 合成 物質 들 중에서 活性 酸素와 反應하여 이를 직접 除去한 것으로 가장 잘 알려진 物質들 중의 하나가 indole 誘導體들이다. Indole 誘導體들이 活性 酸素 除去機能을 나타낼 수 있는 것은 이 化合物의 構造가 pyrrol환에 안정된 indolyl radicals을 形成함으로서 前者 親和性이 있는 化合物에 效果的으로 活性 酸素基들을 除去한다고 알려져 있다. 星香正氣散은 單一 物質 製劑가 아니 15 종류의 韓藥劑로 이루어진 複合 處方劑이기 때문에 어떠한 成分이 抗酸化 作用을 나타내는 지는 추정하기 어렵다. 藥劑에 包含된 많은 成分들 중 2 가지 以上의 成分들이 複合的으로 抗酸化 作用을 나타낼 可能性도 많으며, 또한 이들 여러 成分들에 의한 物理, 化學 反應의 結果 새로운 物質이 생겨나 抗酸化 作用을 나타낼 可能性도 있다. 이에 대한 硏究는 各各의 單一 弱弟들의 效果를 確認하고 또 이들 藥劑에서 機能性 成分을 分析하고 分離하는 등의 많은 過程이 必要할 것으로 사료된다.

以上의 硏究 結果를 要約하면 培養된 血管內皮細胞에서 星香正氣散은 活性 酸素基에 의한 細胞損傷을 强力하게 防止하였으며 이는 星香正氣散에 活性 酸素基를 效果的으로 除去하는 成分이 包含되어 있음을 시사한다. 星香正氣散의 이러한 作用은 血行 障碍와 聯關된 여러 疾患들에 동반되는 活性 酸素基에 의한 組織 損傷을 防止 或은 緩和시키는 效果를 나타낼 수 있을 것으로 기대되며 이는 지금까지 알려진 星香正氣散의 臨床 效果에 대한 理解를 돕고 治療 藥劑로서의 活用 範圍를 넓히는데 중요한 情報를 提供할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 結 論

최근 老化性 血行 障碍의 가장 重要한 原因이 되는 動脈 硬化 및 이로 因해서 發生하는 虛血性 心疾患, 腦血管性 疾患 등 血行 障碍와 聯關된 많은 疾患들에서 活性 酸素基에 의한 細胞 損傷이 이들 疾患의 發病이나 進行을 決定하는 중요한 要因임이 밝혀지고 있다. 本 硏究에서는 培養된 사람의 血管 內皮細胞에서 活性 酸素基에 의한 細胞 損傷에 미치는 星香正氣散의 效果를 觀察하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 星香正氣散은 濃度에 의존적으로 H_2O_2에 의한 細胞 損傷을 效果的으로 防止하였으

며, trypan blue exclusion assay로 分析한 細胞 死亡 및 lactate dehydrogenase 遊離로 分析한 細胞 損傷을 50% 抑制한 濃度는 각각 0.9±0.1 및 1.2±0.1 mg/ml 이었다. 또한 香正氣散은 t-butylhydroperoxide 및 menadione에 의한 細胞 損傷도 效果적으로 抑制하였다.

2. 星香正氣散은 H_2O_2에 의한 脂質 過酸化를 有意하게 차단하였다. 그러나 星香正氣散보다 더 效果적으로 脂質 過酸化를 차단한 DPPD가 細胞 損傷을 防止하는 效果에서는 星香正氣散보다 더 낮게 나타나 星香正氣散에 의한 脂質 過酸化 抑制가 細胞 損傷 防止의 가장 중요한 기전은 아닌 것으로 보인다.

3. DCF 형광分析法으로 細胞內 活性 酸素基의 生成에 미치는 星香正氣散의 效果를 觀察한 結果 1 mg/ml의 濃度에서 H_2O_2에 의한 活性 酸素基의 增加를 顯著히 차단하였다.

4. 細胞內 活性 酸素基 除去 酵素들인 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 活性에는 星香正氣散이 有意한 영향이 없었다.

以上의 結果에서 星香正氣散은 活性 酸素基에 의한 血管 內皮細胞의 損傷을 效果的으로 防止하는 抗酸化劑로서의 作用을 지니며 이는 中風 등의 救急處方으로 널리 이용되는 星香正氣散의 藥理 作用을 理解하고 이의 臨床的 應用 範圍를 넓히는데 중요한 資料를 提供할 것으로 사료된다.

< 參 考 文 獻 >

1. 戴思恭, 證治要訣(卷四), 北京, 人民衛生出版社, 1983, p.35~36.
2. 龔延賢, 新刊醫林狀元濟世全書, 新文豊出版社, 臺北, 1982, p.21,23,27.
3. 黃度淵, 證脈方藥合編, 서울, 南山堂, 1978, pp.138~140.
4. 尹吉榮, 東醫方劑學, 서울, 高文社, 1980, p.40,41,108,144,155,173.
5. 李麟星, 藿香正氣散과 夏節病, 醫林, 1987 180:4~7,12
6. 具本泓, 東醫心系內科學, 서울, 書苑堂 1985, pp.305~311.
7. 金定濟,診療要鑑, 서울 ,東洋醫學硏究院,1974 (上)pp.448~449,453,(下)p.431.
8. 金定濟, 中風證의 病理的 考察, 東洋醫學 1978, 4:33~38.
9. 김상현, 腦卒中의 症狀과 豫後, 大韓醫學協會誌, 1977, 20:1037~1042.
10. 金永錫, 中風의 病因病理에 關한 文獻的 考察, 東洋醫學, 1981, 7:4 2~54.
11. 宋孝貞 · 文濬典, 淸上瀉火湯이 血壓 및 脂質代謝에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集, 1982, 5:131~146.
12. 李京燮 · 具本泓, 竹瀝湯,加味竹瀝湯이 高血壓 및 血糖에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集, 1980, 3:91~108
13. 朴鍾榮 · 李京燮, 祛風續命湯이 脂質代謝에 미치는 影響에 關한 硏究, 慶熙韓醫大論文集, 1982, 5:335~343
14. 權寧哲 · 李京燮, 疎風湯 및 加味疎風湯이 高脂血症에 미치는 影響, 慶熙韓醫大論文集, 1982, 5:269~279
15. 王肯堂, 證治準繩(Ⅰ), 新文豊出版公司, 臺北, 1974, p.37, 40, 41
16. 孫東宿, 赤水玄珠(Ⅰ)(影印本), 海著易堂藏版, 1914, p.7, 11
17. 徐春甫, 古今醫統秘方大全(Ⅲ), 新文豊出版公司, 서울, 1982, pp1106~1109
18. 方 賢, 奇效良方(Ⅰ), 商務印書館, 香港, 1977, p.2,5.
19. 김종평 · 유익동, 新物質探索,

자유아카데미, 1996, pp.325~329.
20. Mugge A. The role of reactive oxygen species in atherosclerosis. Z Kardiol 87(11):851-864, 1998.
21. 이동철, 활성산소에 의한 DNA의 분해, 전북대학교
22. A. E. Favier: Analysis of free radicals in biological systems. Basel; Boston; Berlin; Birkhauser. 1995, 80~88.
23. 安恭立, 星香正氣散이 家猫의 血壓 및 心搏動에 미치는 影響, 圓光大韓醫大論文集, 1982, 2:199~217.
24. 文炳淳, 星香正氣散이 家兎의 頭蓋內壓 및 血壓에 미치는 影響, 圓光大學校,1988.
25. 柳鍾三, 星香正氣散이 흰쥐의 腦損傷에 미치는 影響, 大田大學校, 1992
26. Bjorkerud S, Bondjers G. Endothelial integrity and viability in the aorta of the normal rabbit and rat as evaluated with dye exclusion tests and interference contrast microscopy. Atherosclerosis 15(3):285-300, 1972.
27. Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. Anal Biochem 86(1):271-278, 1978.
28. Shen HM, Shi CY, Shen Y, Ong CN. Detection of elevated reactive oxygen species level in cultured rat hepatocytes treated with aflatoxin B1. Free Radic Biol Med 21(2):139-146, 1996.
29. Oyanagui Y. Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. Anal Biochem 142(2):290-296, 1984.
30. Aebi H. Catalase in vitro. Methods Enzymol 105:121-126, 1984.
31. Tappel AL. Glutathione peroxidase and hydroperoxides. Methods Enzymol 52:506-513, 1977.
32. Mylonas C, Kouretas D. Lipid peroxidation and tissue damage. In Vivo 13(3): 295-309, 1999.
33. Sandy MS, Di Monte D, Smith MT. Relationships between intracellular vitamin E, lipid peroxidation, and chemical toxicity in hepatocytes. Toxicol Appl Pharmacol 93(2):288-297, 1988.
34. 上海中醫學院 編, 中醫內科學, 香港, 商務印書館, 1981, pp.297~308.
35. 蔡仁植, 韓方臨床學, 서울, 大星文化社, 1987, pp.145~150.
36. 黃文東 外, 實用中醫內科學, 上海, 上海科學技術出版社, 1986, pp.414~415.
37. 許在淑, 高血壓에 對한 韓方臨床, 杏林, 第144號, p.6.
38. 嚴用和, 濟生方(醫部全錄-VI), 宇光出版社, 香港, 1976, p.16.
39. 朱震亨, 丹溪心法, 서울, 杏林書院, 1965, p.70,306,310.
40. 申載鏞 編著, 方藥合編解說, 서울, 成輔社, 1989, pp.98~99.
41. 辛民敎, 原色臨床本草學, 서울, 南山堂, 1986, pp.172~181,294~295,329~331, 460~461,464~465,469~470,590~593,598~600,649~652,724~726,744~747,749~750, 819~821.
42. Sohal RS, Weindruch R. Oxidative stress, caloric restriction, and aging. Science 273(5271):59-63, 1996.
43. Daniels WM, van Rensburg SJ, van Zyl JM, van der Walt BJ, Taljaard JJ. Free radical scavenging effects of melatonin and serotonin: possible mechanism.Neuroreport 7(10):1593-1596, 1996.
44. Beyer CE, Steketee JD, Saphier D. Antioxidant properties of melatonin--an

emerging mystery. Biochem Pharmacol 56(10):1265-1272, 1998.

45. Reiter RJ, Tan DX, Cabrera J, D'Arpa D, Sainz RM, Mayo JC, Ramos S. The oxidant/antioxidant network: role of melatonin. Biol Signals Recept 8(1-2):56-63, 1999.

46. 정지천, 김상범. H_2O_2에 의한 신장 細胞 損傷에 대한 단삼 추출물의 防止 效果. 대한한의학회지, 19:38-48, 1998.

47. 정지천, 김상범. Oxidant에 의한 신장 세뇨관 물질 이동계의 장애에 대한 단삼의 效果. 대한한방내과학회지, 18:147-155, 1997.

48. 정지천, 문상원. 제조원 t-butylhydroperoxide에 의한 신장 조직 損傷에 미치는 영향. 한방성인병확회지 3:123-132, 1997.

49. 이종현, 성낙기, 김성훈. 백하수오 약침의 항酸化작용에 대한 실험적 연구. 대한한의학회지, 18:278-298, 1997.