

원저

## 심근세포의 산화적 손상에 대한 五味子湯의 효과 및 작용기전 연구

황보연, 양경석, 이상관, 이기상, 문병순, 신선호  
원광대학교 한의과대학 내과학교실

### Effects & Mechanism of *Omija-tang* on Oxidative Stress-Induced Death of H9c2 Cardiomyoblast Cell

Bo-Yeon Whang, Kyoung-Suk Yang, Sang-Kwan Lee, Ki-Sang Lee, Byoung-Soon Moon, Sun-Ho Shin

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

**Objectives:** The water extract of *Omija-tang* (OMJT) has traditionally been used for treatment of ischemic heart and brain damage in oriental medicine. However, little is known about the mechanism by which the water extract of OMJT rescues cells from these damages. Therefore, this study was designed to investigate the protective mechanisms of OMJT on oxidative stress-induced toxicity in H9c2 cardiomyoblast cells.

**Methods:** Treatments of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> or ZnCl<sub>2</sub> markedly induced death of H9c2 cardiomyoblast cells in a dose-dependent manner. The characteristics of oxidative stress-induced death of H9c2 showed apparent apoptotic features such as DNA fragmentation. OMJT significantly reduced both H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death and chromatin fragmentation. The decrease of Bcl-XL expression by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> were inhibited by OMJT. In addition, the increase of Bcl-XS expression was also inhibited by OMJT. In particular, Fas expression, which is generally recognized as cell death-inducing signal by Fas/FasL interaction, was markedly increased by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in a time-dependent manner. Also, the expression profile of proteins in Chang cells were screened by using two-dimensional (2-D) gel electrophoresis. Among 300 spots resolved in 2-D gels; the comparison of control versus apoptotic cells revealed that signal intensity of 6 spots decreased and 11 spots increased.

**Results and Conclusions:** Taken together, this study suggests that the protective effects of the water extract of OMJT against oxidative damages may be mediated by the modulation of Bcl-XL/S Fas expression. (*J Korean Oriental Med* 2002;23(4):140-150)

**Key Words:** *Omija-tang*, oxidative damage, cardiomyoblasts.

## 서론

五味子湯은 張<sup>1)</sup>의 【景岳全書】에 腎水枯涸 口燥舌

乾에 사용한다고 수록된 것으로, 심장질환에 많이 응용되고 있는 生脈散<sup>2,3)</sup>에 益氣固表하는 黃芪<sup>4,5)</sup>와 補脾益氣하는 甘草<sup>6)</sup>를 가미한 처방이다.

전 세계적으로 증가추세에 있는 심혈관계 질환은 고혈압, 고지혈증, 죽상경화증 등이 원인으로 심장에 허혈상태를 초래하여 심근세포 손상을 일으키는 것으로 알려졌으며<sup>7)</sup>, 이 때 관여하는 산화적 손상은 심혈관계 질환의 주 발생 원인 인자로 작용하고 있다<sup>8)</sup>

· 접수 : 2002년 8월 21일 · 채택 : 2002년 10월 25일  
· 교신저자 : 황보연, 전북 익산시 신룡동 원광대학교 한의과대학 심계내과학교실  
(Tel. 063-270-1013, Fax : 063-270-1199, E-mail : mehwngga@hanmail.net)

\* 본 논문은 원광대학교 교비 연구비지원에 의해 이루어짐

9). 특히 동맥경화증, 대동맥협착증, 판막질환 등은 일시적 혹은 지속적인 허혈상태를 야기시킬 수 있고, 약물이나 수술에 의한 재관류시에 심근세포에서 활성산소종(O<sup>2</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH 등)이 발생하여 심근세포를 손상시킨다<sup>10-12)</sup>.

본 처방에 대한 기존의 실험논문에서 심근세포의 산화적 손상에 보호효과가 있다고 보고되었으며<sup>13)</sup>, 黃芪와 甘草를 제외한 처방인 生脈散에 대해서는 김<sup>14)</sup>의 혈압상승, 심박동수 저하 및 심근 수축력 증강, 이<sup>15)</sup>의 운동지속시간의 연장 및 심박수 저하, 신 등<sup>16)</sup>의 심근세포 손상 완화에 대한 보고와 허<sup>17)</sup> 등의 대동맥 평활근세포에서 NO 생성에 미치는 영향에 대한 보고가 있다.

따라서 본 실험에서는 益氣生津하는 生脈散에 黃芪, 甘草를 가미한 처방인 五味子湯의 물 추출액이 H9c2 심근세포에서 직접 혹은 간접적인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해서 유도되는 세포손상을 줄일 수 있는 지를 알아 보고, 이 때 세포고사에 관여하는 신호전달 분자인 Bcl2-family 단백질군, 수용체 막단백질인 Fas 및 세포고사에 관여하는 효소인 ICAD/DFF45 단백질과 신호전달 분자들의 발현 양상을 2-dimensional gel electrophoresis를 통하여 단백질에 대한 정보와 그 발현 양상에 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 실험재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 세포주

Embryonic rat 심장에서 유래한 H9c2(CRL1446) 심근세포주는 ATCC(American Type Culture Collection)로부터 구입하여 계대 배양하면서 실험을 실시하였다.

#### 2) 약재

본 실험에 사용된 五味子湯의 처방내용은 張<sup>18)</sup>의 景岳全書에 의거하였으며, 약재는 원광대학교 익산한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 한 접분량은 다음과 같다.(Table 1)

#### 3) 시약 및 기기

실험에 필요한 Duplecco's modified Eagle's

Table 1. Prescription of Omija-tang.

한약명	생약명	중량
黃芪	<i>Astragali Radix</i>	120g
人蔘	<i>Ginseng Radix</i>	80g
五味子	<i>Schizandrae Fructus</i>	40g
麥門冬	<i>Ophiopogonis Radix</i>	40g
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	20g
Total amount		300g

medium(DMEM), 항생제, trypsin 및 fetal bovine serum(FBS)은 GIBCO BRL Co.(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며, 배양용기(96-well plate, 10cm dish)는 Falcon Co. (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다. MTT (methylthiazol-2-yl-2, 5-diphenyl, tetrazolium bromide), Hoechst 33342는 Sigma Co. (St. Louis, Missouri, USA)로부터 구입하여 사용하였다. Bcl2, Bax 등의 항체들은 모두 Santa Cruz Co. (San Diego, CA, USA)에서, anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase 와 Enhanced chemiluminescence kit(ELC kit)는 Amersham Co. (Buckinghamshire, England)에서 구입하여 사용하였다. Genomic DNA 추출에 사용한 Wizard Genomic DNA purification kit는 Promega Co. (Medison, WI)에서 구입하였다.

## 2. 실험방법

### 1) 감염조제

五味子湯 1/3접 분량인 100g을 물 1 l 와 함께 냉각기를 부착한 환저 플라스크에서 3시간 끓인 다음 거즈로 여과하고 3,200rpm으로 20분간 원심분리 후 농축기(Rotary evaporater)로 농축한 다음 -70℃(Deep Freezer)에서 12시간 이상 동결시키고 Freeze Dryer로 동결건조시킨 후 20.0g의 시료를 얻어 세포에 투여하기 전 농도를 조정하여 사용하였다.

### 2) H9c2 심근세포주 배양

Embryonic rat 심장에서 유래한 H9c2 세포주는 10% fetal bovine serum(FBS: PAA Laboratories, Austria)이 포함된 Duplecco's modified Eagle's medium(DMEM)에서 CO<sub>2</sub> 세포배양기(37℃, 5% CO<sub>2</sub>)를 이용하여 배양하였다. 48시간 주기로 0.05%

Trypsine-EDTA를 사용하여 이차 배양하였으며, 분주 12시간 후에 약제를 처리하여 세포 죽음과 연관된 생화학적 실험을 수행하였다.

### 3) 세포생존을 측정

세포 활성도는 MTT assay를 이용하였다. 세포 배양판(24-well plate)에 세포( $1 \times 10^5$  세포수/ml)를 1ml/well씩 분주하여 12시간 이상 CO<sub>2</sub> 세포배양기 안에서 안정화시킨 후 실험에 필요한 각 조건의 시약 등을 처리한 다음, MTT 용액(5mg/ml in PBS)을 배양액 부피에 최종적으로 1/10이 되도록 첨가하였다. 4시간 후 10% sodium-dodesyl sulfate(SDS)가 포함된 0.01N HCl 용액 0.1ml/well을 첨가하여 살아있는 세포에 의해 생성된 보라색 formazan을 용해시킨 다음 분광광도계(ELISA reader, Molecular Devices Co., Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 570nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

### 4) 세포내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 생성 측정

배양된 H9c2 세포에 ZnCl<sub>2</sub>를 다양한 시간동안 처리하여 50 $\mu$ M의 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA)로 30분간 배양한 후 생리식염수로 세척하여 형광현미경(Leica MPS 60, Germany)으로 관찰하였다. DCF-DA는 세포내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해서 diacetylation되어 dichlorofluorescein이 형광을 내는 물질로 전환되었다.

### 5) Western blot analysis

배양된 H9c2 세포에 五味子湯 등을 처리 후 세포를 포집하여 차가운 생리식염수로 2회 세척하였다. 얻어진 세포는 세포 파쇄용액(50mM HEPES pH 7.4, 150mM NaCl, 1% deoxy-cholate, 1mM EDTA, 1mM PMSF, 1 $\mu$ g/ml aprotinin)과 4 $^{\circ}$ C에서 30분 처리하였다. 13,000rpm에서 20분 원심분리하여 얻은 세포 파쇄액은 BCA 용액을 이용하여 단백질을 정량하였다. 동량의 세포 파쇄액(단백질: 200 $\mu$ g)은 2 $\times$  sample buffer와 섞어 100 $^{\circ}$ C에서 5분 끓인 후에 12.5% SDS-PAGE를 시행하였다. 전기영동이 끝난 gel의 단백질은 semi-dry 방법으로 실온에서 단위 면적당 0.8mA 전하를 2시간 걸어주어 nitrocellulose membrane상에 이동시켰다. nitrocellulose membrane은 blocking buffer(5%

skim milk)와 상온에서 1시간 반응시켜 비특이적 항체결합을 억제시켰다. Bcl-XL/S, Bax, PARP, Fas 그리고 ICAD/DFP45에 대한 항체는 0.01%(v/v)의 Tween-20이 포함된 3% skim milk/TBS에 1:1000으로 희석하여 상온에서 3시간 반응 후 이차항체 anti-rabbit IgG conjugated horse-radish peroxidase와 1시간 반응시켰다. nitrocellulose membrane은 TBS로 3회 세척 후 ECL kit를 사용하여 ECL 필름에 감광시켰다.

### 6) 2-D gel electrophoresis

(1) 시료 준비와 등전위 전기영동(sample preparation Isoelectric focussing(IEF))-1차 분리 : 배양된 H9c2 세포에 한약제와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리한 일정 시간 후에 포집하여 sample lysis buffer(8M urea, 4% CHAPS, 50mM DTT, 20 mM Tris base, 0.2% ampylte)를 상온에서 가한 후 5초 간격으로 1분 동안 sonication하였다. 고속원심분기로 13,000rpm에서 18 $^{\circ}$ C에서 20분간 원심분리하고 상층액을 취하여 BCA법으로 정량한다. Bio-rad Co.에서 구입한 isoelectronic focussing 기계를 20 $^{\circ}$ C로 맞춘 후 준비된 sample과 rehydration buffer (8M urea, 2% CHAPS, 0.2% IPG buffer, bromophenol blue, 18mM DTT)를 rehydration tray에 분주하고, 상용화된 IPG strip(Bio-rad)을 떼어내어 sample solution에 strip이 gel면이 닿도록 sliding하였다. 1시간 후 mineral oil을 strip위에 덮어주어 gel이 마르거나 urea가 적출되지 않도록 하고 11-15시간동안 방치 후 Strip을 IEF tray로 옮기고, mineral oil로 덮은 후 IEF를 Bio-rad Co.에서 제공하는 방법으로 수행한 후 strip을 사용하기 전까지 -80 $^{\circ}$ C에 보관하였다.

(2) 2-dimentional electrophoresis(2-D)-2차 분리 : IPG strip을 이차원 분리 과정인 SDS-PAGE에서 사용하는 SDS buffer system으로 평형화(equilibration) 후 strip에 SDS equilibration buffer I(50mM Tris-Cl(pH 8.8), 6M Urea, 30% Glycerol, 2% SDS, bromophenol blue, 2% DTT, 2.5% Idoacetamide, 1% DTT)을 충분히 잠기도록 넣고 20분 반응시킨 후 SDS equilibration buffer II(buffer I + 2.5% Idoacetamide)를 넣고 20분 반응시켰다. 미리 준비해

든 SDS-PAGE에 IPG strip을 gel쪽이 유리판 앞으로 향하도록 하여 SDS gel 상단에 얹는다. strip의 acidic 한 부분에 단백질 size marker(Bio-rad)를 적재한 후 agarose를 40-50℃로 식혀, 천천히 IPG strip 위쪽에 흘러 넣어 strip을 고정하고 1-2분 후 agarose가 굳은 것이 확인되면 전기영동을 실시하였다. Polyacryamide gel의 silver staining은 Pharmacia Co.에서 제공하는 kit를 사용하였으며, gel내에 단백질을 불용화시키고 방해되는 compound를 제거하는 fixation단계(30분), image 형성을 증가시키는 sensitization(30분), silver nitrate나 ammoniacal silver를 사용한 silver impregnation(20분), 마지막 단계인 2-5분의 development로 수행하였다. 2-D gel를 분석하기 위하여 먼저 imaging system을 이용하여 gel spot을 digital form으로 얻은 후 이를 analysis software(PDQuest(Bio-rad))를 이용하여 분석하였다.

7) 통계처리

실험결과와 통계처리는 student's t-test에 준하여 처리하였으며, P-value가 최대치 0.05(P<0.05) 이하인 경우를 유의한 것으로 판정하였다.

실험결과

1. 五味子湯이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 H9c2 세포죽음에서 세포생존율에 미치는 영향

산화적 손상에 의한 H9c2 심근세포의 독성을 알아보기 위하여 다양한 농도의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하여 세포생존율의 변화를 MTT 방법으로 측정하였다. 50μM 저농도에서 약 73%이상의 세포생존율을 나타내었고, 100μM 농도에서는 31%로 유의성 있는 세포생존율 감소를 나타내었으며, 200μM의 농도에서는 25%로 급격한 세포생존율 감소를 나타내었다(Fig. 1A). 또한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 시간 의존적인 세포독성을 확인하기 위하여 약 70%의 세포생존율 감소를 나타낸 150μM 농도의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 다양한 시간별로 처리하여 측정한 결과, 4시간 후부터 약 88.24±7.1%로 세포생존율이 감소하기 시작하였고, 6시간 이후에는 59.39±4.5%로 급격한 세포생존율 감소가 관찰되었으며, 12시간 이후에는 29.23±3.0%의 세포생존율을 나타내어 유의성 있는 세포생존율 감소를 나타내었다.

이러한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유발된 심근세포의 세포죽음에서 五味子湯이 미치는 세포생존율의 변화를 알아보기 위하여 다양한 농도의 한약재를 30분 전처리한 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(150μM)를 처리하여 세포생존율의 변화를 MTT 방법으로 측정하였다.

五味子湯 75μg/ml의 농도에서는 H9c2 심근세포가

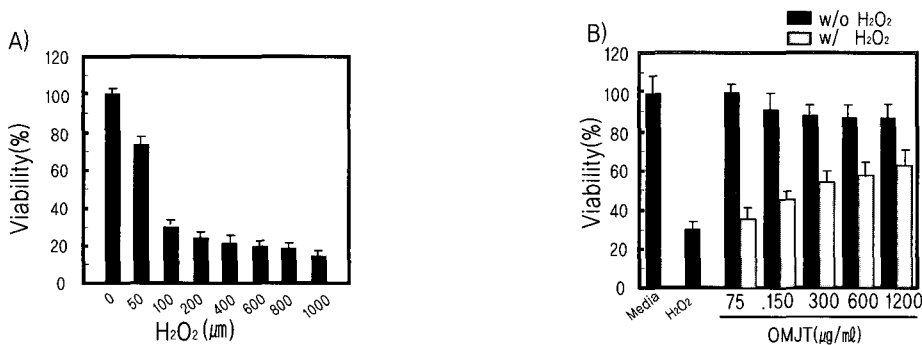


Fig. 1. Effects of hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and *Omija-tang* extract on the viability in H9c2 cells in a dose dependent manner. Cell viability was measured by MTT assay as described in Materials and Methods. Results were expressed as mean ± S.D. of quadruplicates.

35%의 세포생존율을 보였으며, 150 $\mu$ g/ml의 농도에서는 46% 그리고 300 $\mu$ g/ml에서는 54%의 세포생존율을 각각 보였다. 그리고 600 $\mu$ g/ml의 五味子湯을 처리하였을 경우에는 58%의 세포생존율을 나타내어 약 20% 이상의 세포생존율 증가를 보이기 시작하였고, 1200 $\mu$ g/ml에서는 63%의 세포생존율을 나타내어 유의성 있는 세포생존율 증가를 나타내었다(Fig. 1B)

2. 五味子湯이 ZnCl<sub>2</sub>에 의한 H9c2 세포죽음에서 세포생존율에 미치는 영향

Fig.1에서의 결과와 마찬가지로 또 다른 산화적 손상에 의한 H9c2 심근세포의 손상과 五味子湯의 방어효과를 알아보기 위하여 심근 세포손상을 초래한다고 알려진 ZnCl<sub>2</sub>을 처리하여 세포생존율의 변화를 MTT 방법으로 측정하였다. 62.5 $\mu$ M 저농도에서 약 93%이상의 세포생존율을 나타내었고, 125 $\mu$ M 농도에서는 82%, 250 $\mu$ M 농도에서는 33%로 유의성 있는 세포생존율 감소를 나타내었으며, 500 $\mu$ M의 농도에서는 11%로 급격한 세포생존율 감소를 나타내었다(Fig. 2A). 또한 ZnCl<sub>2</sub>의 시간 의존적인 세포독성을 확인하기 위하여 약 70%의 세포생존율 감소를 나타낸 200 $\mu$ M 농도의 ZnCl<sub>2</sub>를 다양한 시간별로 처리하여 측정한 결과, 12시간 이후에는 28.89 $\pm$ 2.5%의 세포생존율을 나타내어 유의성 있는 세포생존율 감소

를 나타내었다(미발표 성적). 또한 ZnCl<sub>2</sub>에 의한 산화적 손상에 의한 세포죽음에서 五味子湯의 방어효과를 확인하기 위하여 다양한 농도의 五味子湯을 30분 전처리한 후 ZnCl<sub>2</sub>(200 $\mu$ M)를 처리하여 세포생존율의 변화를 MTT 방법으로 측정하였다. 五味子湯 400 $\mu$ g/ml의 농도에서는 H9c2 심근세포가 42%의 세포생존율을 보였으며, 600 $\mu$ g/ml의 농도에서는 58% 그리고 800 $\mu$ g/ml에서는 59%의 세포생존율을 각각 보였다. 그리고 1200 $\mu$ g/ml의 五味子湯을 처리하였을 경우에는 98%의 세포생존율을 나타내어 약 70% 이상의 유의성 있는 세포생존율 증가를 나타내었다(Fig. 2B)

3. ZnCl<sub>2</sub>에 의한 H9c2 세포죽음에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 생성에 미치는 영향

ZnCl<sub>2</sub>에 의해 일어나는 H9c2 심근세포의 세포죽음의 과정에서 작용기전을 밝히기 위하여 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA)를 이용하여 세포내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 생성을 형광 현미경과 Flow cytometry를 통하여 관찰하였다. 그 결과 ZnCl<sub>2</sub> 처리 4시간 이후부터 DCF-DA의 형광 변화가 관찰되었으며, 처리 6시간 이후에 최대의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성을 보였다(Fig. 3A and B). 이러한 결과는 ZnCl<sub>2</sub>에 의한 산화적 손상은 세포내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성에 의한 것으로 사료되며, 五味子湯의 산화적 손상에 대한 방어 효과는 직접적인 산화

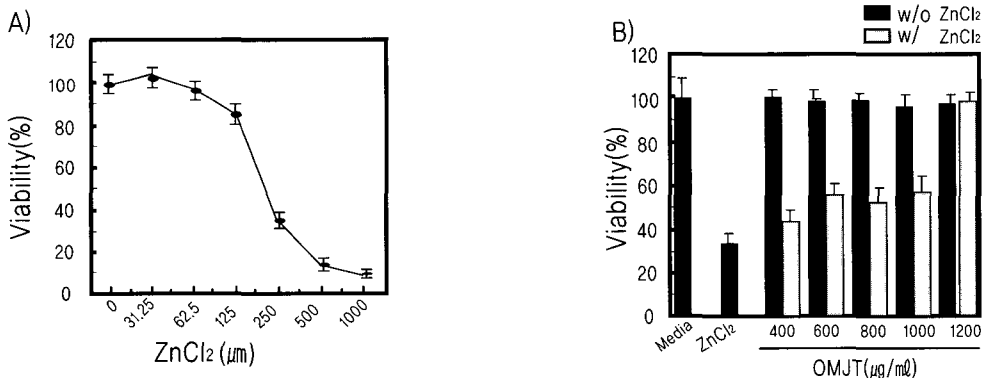
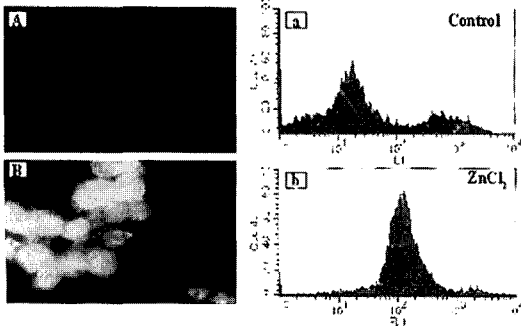


Fig. 2. Effects of ZnCl<sub>2</sub> and *Omija-tang* extract on the viability in H9c2 cells in a dose dependent manner. Cell viability was measured by MTT assay as described in Materials and Methods. Results were expressed as mean  $\pm$  S.D. of quadruplicates.

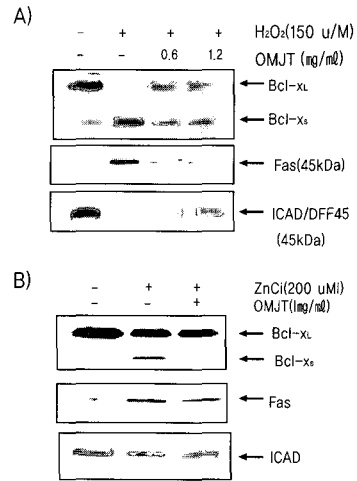


**Fig. 3.** Reduction of intracellular peroxide by ZnCl<sub>2</sub>-treated H9c2 cells. Cells were treated with ZnCl<sub>2</sub> in H9c2 cells for 6hr. Then, cells were incubated with the dye 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA, 50uM) and the fluorescence intensity of more than 10,000 cells was analyzed using a flow cytometry and visualized under a fluorescent microscope. The data were one of three independent experiments.

적 손상뿐만 아니라 세포내에서 미지의 기전에 의하여 생성되는 산화적 손상에 대해서도 방어기전을 나타내는 것을 알 수 있었다.

4. 五味子湯이 Bcl-XL, Bcl-XS, Fas 및 ICAD/DFF45 단백질에 미치는 영향

산화적 손상에 대한 방어효과를 나타내는 五味子湯이 단백질의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 세포고사 신호전달계의 중요 신호전달 분자인 Bcl2-family 단백질군, 수용체 막단백질인 Fas 및 세포고사의 주도적인 역할을 하는 DNA분절 억제효소인 ICAD/DFF45 단백질의 발현을 600, 1200µg/ml의 五味子湯에 30분 전처리한 후 150µM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 6시간 처리한 다음 세포를 포집, 분쇄한 세포 파쇄액에서 단백질 농도를 정량한 후 세포질내의 단백질의 변화를 각각의 항체를 이용하여 Western blot을 시행하였다. 먼저 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 단독으로 다양한 시간동안 처리하여 시간 의존적인 Bcl-XL과 Bcl-XS의 발현 증감을 관찰하여 발현의 최대 시간을 6시간으로 결정하고 다음 실험을 시행하였다. 그 결과, Fig. 4A처럼 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리시 발현 증가하였던 Bcl-XS 단백질은 五味子湯



**Fig. 4.** Protective effects of OMJT on protein expression in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated H9c2 cells. Cells were treated with 15µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Cell lysates were prepared and analyzed by western blotting with anti-Bcl-XL/S, Fas and ICAD/DFF45 antibodies.

전처리에 의해 농도 의존적으로 감소하였으며, 세포고사 억제단백질인 Bcl-XL 단백질은 대조군 수준으로 회복되었다(Fig. 4A). 또한 세포막 수용체 단백질인 Fas의 발현이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 증가하였으나 五味子湯 전처리에 의해 농도 의존적으로 발현이 감소되었으며, 분해되었던 ICAD/DFF45 단백질도 五味子湯 전처리에 의해 농도 의존적으로 회복되었다(Fig. 4A). 또한 세포내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 생성시켜 세포고사를 유도하는 ZnCl<sub>2</sub> 처리에서도 동일한 효과를 보였다(Fig. 4B).

5. 五味子湯이 2-D를 통한 단백질의 발현에 미치는 영향

五味子湯의 산화적 손상에 대한 방어효과가 세포고사 신호전달 단백질에 미치는 작용기전을 구명하기 위하여 2-D를 통한 단백질 발현의 변화에 미치는 영향을 살펴보았다. 배양된 H9c2 세포에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(150µM) 단독 4시간 처리군과 五味子湯(1200µg/ml) 30분 전처리한 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(150µM) 4시간 처리한 세포를 포집하여, 파쇄한 후 단백질 추출물을 2-D electrophoresis



Fig. 5A. Silver staining of 2D-PAGE in control H9c2 cells.

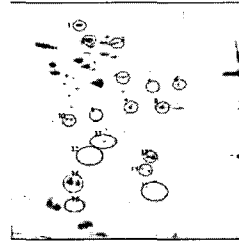


Fig. 5B. Silver staining of 2D-PAGE in H9c2 cells treated with 150uM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 5hr. Lysate was subject on 2-D electrophoresis and stained with silver staining.

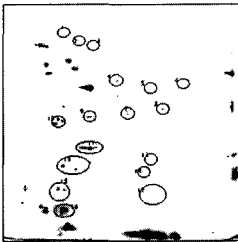


Fig. 5C. Protective effects of OMJT on protein expression in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated H9c2 cells. Lysate was subject on 2-D electrophoresis and stained with silver staining.

를 시행하였다. 단백질 spot은 silver staining으로 가시화 하였다. Fig. 5는 단백질 200 $\mu$ g을 2-D gel 상에서 분리하여 약 300여개의 spot을 비교하였다. 먼저 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(150 $\mu$ M)를 단독으로 4시간 처리하였을 경우 대조군에 비하여 11개 부분의 유의한 증가와, 5개 부분의 감소가 관찰되었다(Fig. 5A and B). 또한 五味子湯 전처리에 의해 증가하였던 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 13, 14, 및 15번 spot이 대조군 수준으로 증가하였으며, 9, 10, 11, 12 및 17번 spot은 감소하였다. 특히 16번 spots은 한약재 처리에 의해서만 발현이 증가되었다(Fig. 5C).

### 고 찰

최근 인간 염색체 염기서열의 구조적 완성을 계기로 생물학 분야는 새로운 전기를 맞고 있다. 인간 유전자는 약 2만 8천개로 추정되고 그 기능은 아직 완전히 밝혀지지 못하였지만 최근의 유전체학 연구와 생물정보학의 업적은 세포고사 신호전달계 지도를 규명할 수 있는 많은 정보를 제공하고 있다<sup>18)</sup>.

또한, 생활환경의 변화로 인해 증가추세에 있는 동맥경화, 대동맥협착증, 판막질환 등은 일시적 또는 지속적인 허혈을 심혈관계에 야기시킬 수 있으며, 다시 약물이나 수술적인 요법 등에 의하여 재관류시 심근세포에서 활성화된 neutrophils, xanthine oxidase, mitochondrial respiration, arachidonic acid 등의 다양한 대사과정을 통하여 활성산소종(O<sup>2</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH 등)이 발생한다<sup>10-12,19-21)</sup>. 비록 세포의 생리적 방어체계인 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 등이 작동하지만, 과도한 활성산소종의 발생은 이러한 능력을 초과하여 세포손상을 초래하게 된다<sup>22-24)</sup>. 최근 adriamycin같은 항암제에 의해 심근독성이 초래되는 rat(Sprague-Dawley)의 심장세포에 아연(Zn<sup>2+</sup>)의 축적이 이루어 진다는 보고가 있으나<sup>25)</sup>, 이러한 아연축적의 기전 및 심근독성에 미치는 영향 등에 대해서는 아직까지 밝혀져 있지 않다.

심근세포의 산화적 손상에 대한 한약재의 방어효과에 관한 연구로는 한<sup>20)</sup>의 失笑散 煎湯液이 배양 심근세포에 미치는 영향, 조<sup>27)</sup>의 九香蟲液이 배양 심근세포에 미치는 영향, 이<sup>28)</sup>의 炙甘草湯이 배양 심근세포에 미치는 영향, 최<sup>16)</sup>의 五味子湯이 심근세포에 미치는 영향 등이 보고되었다.

五味子湯은 益氣生津하는 효능으로 심장질환에 많이 응용되고 있는 生脈散<sup>2-3)</sup>에, 益氣固表作用이 있다고 보고된 黃芪<sup>46)</sup>와 補脾益氣作用이 있다고 보고된 甘草<sup>6)</sup>가 가미되어진 처방으로, 人蔘은 甘溫無毒하고 補脾益氣, 生津의 효능이 있으며<sup>4-6,29-31)</sup>, 麥門冬은 甘苦

寒하고 滋陰生津의 효능이 있고<sup>4,6,29-31</sup>, 五味子は 酸溫하고 益氣, 生津斂汗의 효능이 있으며<sup>4,6,29-31</sup>, 黃芪는 甘溫하고 益氣補氣, 固表의 효능이 있고<sup>4,6,29-31</sup>, 甘草는 甘溫하여 補脾益氣, 養心作用이 있다<sup>4,6,29-31</sup>.

人蔘은 甘草와의 배합에서 補氣生津, 養心作用을 증가시키고, 五味子와의 배합은 益氣生津하는 효능을 증가시키며, 또한 人蔘과 黃芪와의 배합은 補氣作用이 증가하여 氣虛衰弱症과 心氣不足에 사용한다<sup>6,31</sup>. 麥門冬은 五味子와의 배합에서 津液을 생성하고 心肺의 소모된 기를 보충한다고 하였고<sup>6,31-32</sup>, 甘草는 通心陽作用이 있는 약물과 배합하여 心動悸에 사용한다<sup>4,6,29</sup>고 하였다.

약리작용을 살펴보면, 人蔘은 인체의 유해한 자극에 대하여 생체의 저항력을 증가시키고 강심작용이 있어 심장쇠약, Shock에 사용한다고 하였으며, 麥門冬은 관상동맥 혈류와 심근의 수축력을 증가시킨다<sup>32</sup>고 하였다. 五味子は 혈압하강작용과 심근수축작용을 증가시킨다<sup>32-35</sup>고 하였고, 黃芪는 강심작용이 있어 중독 및 피로한 심장을 수축시키는 작용과 강압작용이 보고되었으며<sup>5,32-35</sup>, 甘草는 고혈압 환자의 혈중 콜레스테롤의 함량을 저하시켜 혈압하강작용이 있다고 보고되었다<sup>6</sup>.

본 실험에서는 五味子湯이 심근세포의 산화적 손상에 대한 효과를 알아보기 위하여 rat의 심장에서 분리하여 배양한 H9c2 심근세포주에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 세포내 미지의 기전에 의하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 생성시킨다고 알려진 ZnCl<sub>2</sub>를 처리하여 심근세포의 산화적 손상을 유도한 후, 세포생존율의 변화, 세포고사 신호전달 단백질인 Bcl2 family, 세포막 단백질 Fas 및 DNA 분절 억제 효소인 ICAD/DFP45 등의 발현 변화와 2-D를 통한 단백질 발현 양상을 통하여 五味子湯의 방어 효과와 그 작용 기전을 관찰하였다.

H9c2 심근세포에 직접적으로 산화적 손상을 일으킬 수 있는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 다양한 농도별로 처리하여 세포생존율을 측정된 결과, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50μM의 저농도에서는 약 23%의 세포생존율의 감소를 나타내었으며, 100μM 이상의 고농도에서는 약 70% 이상의 세포생존율 감소를 나타내었다. 또한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 유발된 심근세

포죽음에서 五味子湯의 방어효과를 알아보기 위하여 약 30%의 세포생존율을 나타내는 농도 150μM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 실험조건으로 결정하여 다양한 농도의 五味子湯을 전처리하여 세포생존율의 변화를 측정된 결과, 300μg/ml 농도의 五味子湯 처리시 약 15% 정도의 세포생존율 회복이 관찰되어 600μg/ml, 1200μg/ml에서 각각 58%, 63%로 현저한 세포생존율의 회복을 보여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 산화적 손상에 대해서 五味子湯의 방어효과를 확인할 수 있었다.

또한 다른 기전에 의하여 세포내 활성산소종인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 생성하여 심근세포인 H9c2에 세포독성이 보고된<sup>36</sup> ZnCl<sub>2</sub>를 다양한 농도별로 처리하여 세포생존율을 측정된 결과, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 62.5μM의 저농도에서는 약 7%의 세포생존율의 감소를 나타내었으며, 250μM 이상의 고농도에서는 약 67% 이상의 세포생존율 감소를 나타내었다. ZnCl<sub>2</sub>에 의해 유발된 심근세포죽음에서 五味子湯의 방어효과를 알아보기 위하여 약 30%의 세포생존율을 나타내는 농도 200μM의 ZnCl<sub>2</sub>에 다양한 농도의 五味子湯을 전처리하여 세포생존율의 변화를 측정된 결과, 400μg/ml 농도의 五味子湯 처리시 약 13% 정도의 세포생존율 회복이 관찰되었고, 1200μg/ml에서 98%로 현저한 세포생존율의 회복을 보였다. 특히 이러한 ZnCl<sub>2</sub>에 의한 손상은 세포내 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 생성에 의한 것으로 확인되어 직접적인 산화적 손상에 의한 심근세포 손상뿐만 아니라 미지의 기전에 의한 간접적 손상에서도 五味子湯이 방어기전을 보임을 알 수 있었다.

Neil 등<sup>37</sup>은 산화적 손상이 Menadione이나 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 H9c2 심근세포의 DNA 분절과 Caspase의 활성을 통한 세포고사임을 보고하였다<sup>21</sup>.

또한 종양 괴사 인자 수용체(Tumor necrosis factor receptor)군의 하나로서 세포막에 위치하면서 세포의 자극을 받아 세포고사 신호를 전달한다고<sup>38-39</sup> 알려진 Fas 단백질의 발현이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>나 ZnCl<sub>2</sub> 처리에 의해 증가하였으나 五味子湯의 전처리에 의해 농도 의존적으로 발현이 감소되는 것을 확인하였다.

Bcl2-family 단백질은 사람의 림프종(human follicular lymphoma)과 밀접하게 관련된 유전자로서



크게 세포사멸 촉진 단백질과 세포사멸 억제 단백질의 두 부류가 존재한다<sup>40</sup>. 이중 Bcl-XL 단백질은 다른 암 유전자와는 달리 세포증식에는 관여하지 않고 세포사멸의 억제기능에 관여하고 있다. 세포고사를 억제하는 Bcl-XL의 작용기전은 산화환원반응의 조절, 세포내 이온의 분포조절, caspase protease의 효소적 활성조절, 미토콘드리아 막 전위, 핵 DNA 분절, 스트레스 연관 MAP kinase인 JNK 및 p38 kinase의 효소 활성을 조절한다고 알려져 있다. 한편, Bax 단백질은 Bcl2와는 달리 오히려 세포사멸을 촉진시키는 기능을 수행한다고 알려져 있다. 특히 Bcl2-family 단백질은 c-terminal이 소수성 막으로 구성되어 미토콘드리아의 막에 결합할 수 있다<sup>41</sup>. 다양한 자극시 Bcl2나 Bcl-XL을 과발현시켰을 경우 미토콘드리아 막 전위(MPT)의 상실이나 cytochrome c의 방출이 방지됨이 보고되었다<sup>33</sup>. 반대로 Bax나 Bcl-Xs 단백질을 과발현시켰을 경우에는 cytochrome c의 방출을 촉진하였고, 미토콘드리아의 막 탈분극을 유도함이 보고되었다<sup>40</sup>.

본 연구에서도 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(150μM)나 ZnCl<sub>2</sub>(200μM) 처리시 세포사멸 촉진 단백질인 Bcl-Xs의 발현이 증가되었고, 세포사멸 억제 단백질인 Bcl-XL의 발현이 감소하였으나 五味子湯 전처리에 의하여 대조군 수준으로 회복되었다. 또한 세포막에 위치하면서 세포고사 신호를 전달하는 세포막 수용체 단백질인 Fas 단백질은 산화적 처리에 의해 증가하였으나 五味子湯 전처리에 의하여 대조군 수준으로 감소하였고, DNA 분절 억제효소이면서 caspase-3 protease의 세포내 기질 단백질인 ICAD/DFF45의 분해현상도 五味子湯 전처리에 의해 감소되었다.

1980년 이래 20년 동안 유전자 조작기술의 발달과 더불어 DNA 및 RNA를 포함한 유전자에 대한 연구가 활발히 진행되어 high-throughput 유전자 분석기술이 크게 발달되었다<sup>42</sup>. 이를 이용하여 인간게놈 프로젝트가 진행되어 전체 인간 유전자의 염기 서열이 모두 밝혀졌으나 그 유전자에서 발현되는 단백질의 기능에 대한 연구는 현재 진행중이다<sup>43</sup>. 본 연구에서도 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 五味子湯 전처리시 세포 내에서 발현되

는 단백질들을 분리, 확인하기 위하여 기존의 생화학적 방법으로 2-dimensional gel electrophoresis를 실시하였다.

2-D gel electrophoresis를 이용하여 세포 단백질을 분리하였고, 약 300여개의 spot을 비교하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 처리시 유의하게 증가하는 11개의 spot과 감소하는 5개의 spot이 五味子湯 전처리에 의해 대조군 수준으로 회복되는 것을 확인하였으며, 五味子湯 처리시에만 유의하게 발현이 증가하는 1개의 spot을 관찰하였다. 발현이 증가 혹은 감소하는 각각의 spot은 MALD-TOF등을 통한 아미노산 서열의 분석이 필요할 것으로 사료된다.

이상의 연구결과를 종합하면 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 ZnCl<sub>2</sub>에 의해 유도된 H9c2 심근세포죽음은 Bcl-XL의 발현 감소, Fas, Bcl-XS의 발현 증가 및 ICAD/DFF45의 분해 감소를 보이는 전형적인 세포고사성 죽음이었으며, 이에 대한 보호효과를 보이는 五味子湯은 DNA 분절 및 세포고사성 단백질의 발현조절을 통하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 H9c2 심근세포의 산화적 손상에 방어효과를 나타낸 것으로 사료되어지며 2-D를 통해 확인한 이들 단백질은 추후에 아미노산 서열 분석을 통하여 질병의 진단, 예방 및 치료에 기여할 것으로 사료된다.

## 결론

五味子湯이 심근세포의 산화적 손상에 대한 효과 및 작용기전을 구명하기 위하여 H9c2의 심근세포주에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 및 ZnCl<sub>2</sub>을 처리하여 심근세포의 산화적 손상을 유도한 후, 五味子湯을 전처리하여 세포생존율 변화, Fas, Bcl-XL/S 및 ICAD/DFF45 단백질의 발현 변화를 관찰하였으며, 2-D를 통해 단백질의 발현 양상을 비교한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 五味子湯은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 세포고사에서 농도의 존적으로 세포생존율을 회복시켰다.
2. 五味子湯은 ZnCl<sub>2</sub>에 의한 세포고사에서 농도의 존적으로 세포생존율을 회복시켰다.
3. 五味子湯은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 발현 감소한 Bcl-XL 단백질을 농도의존적으로 증가시켰다.

4. 五味子湯은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 발현이 증가한 Bcl-XS와 Fas 단백질을 농도의존적으로 감소시켰다.
5. 五味子湯은 2-D을 통한 단백질의 발현에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 변화된 spot은 손상된 단백질을 11개의 발현 증가된 spots과 감소된 5개의 spots의 대조군 수준으로 회복시켰으며, 새로운 단백질의 발현을 초래하였다.

五味子湯은 허혈상태에서 야기되는 심근세포의 산화적 손상에서 Bcl2 family 단백질, Fas 단백질, ICAD/DFF45 등의 발현 조절을 통해 산화적 손상에 방어효과를 나타내므로 허혈성 심장질환 등의 심혈관계 질환에 유효하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다. 또한 2-D를 통해 확인한 이들 단백질은 아미노산 서열 분석을 통하여 확인한 후, 산화적 손상에 방어효과를 보이는 五味子湯의 방어기전에서의 역할을 연구할 것이다.

### 참고문헌

1. 장개빈. 경약전서(하). 서울:대성문화사. 1992:476.
2. 이종박. 현대중의생리학기초. 서울:의성당. 1993:97.
3. 팽부인. 중의방제대사전(제삼책). 북경:인민위생출판사.1994:578-81.
4. 신민교. 본초학. 서울:영림사. 1994:166-7, 169-71, 175-7, 232-3, 241-2.
5. 장백수. 중의내과학. 북경:인민위생출판사. 1993:115, 207, 207-16.
6. 강병수. 임상배합본초학. 서울:영림사. 1994:95-7, 108-12, 112-6, 173-5, 677-8.
7. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993;90:7915-22.
8. 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.
9. Apostolova MD, Ivanova IA, Cherian MG. Signal transduction pathways and nuclear translocation of zinc and metallothionein during differentiation of myoblasts. *Biochem Cell Biol*. 2000;78(1):27-37.
10. Bromme HJ, Holtz J. Apoptosis in the heart:when and why? *Mol Cell Biochem*. 1996: 163-4, 261-75.
11. 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.
12. Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen is poisonous-an introduction oxygen toxicity and free radicals. In *free radicals in biology and medicine*. 2nd Ed. Clarendon Press. Oxford. 1989:1-7, 22-31.
13. 최진영. 오미자탕이 심근세포에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2002;23(2):181-90.
14. 김세길. 생맥산이 백서의 심혈관계에 미치는 영향. 원광대학교 박사학위논문.
15. 이응세. 생맥산이 스포츠 음료로서 운동수행 능력과 혈액학적 변화에 미치는 영향. 경희대학교 석사학위논문.
16. 신선호. 산소분압에 의한 심근세포변화에 미치는 생맥산의 효과. 대한한의학회지. 1998;19(2):100-10.
17. 허윤. 생맥산이 대동맥 평활근 세포에서 NO 생성에 미치는 영향. 동의생리학회지. 2001;15(5):775-82.
18. Garin J, Diez R, Kieffer S, Dermine JF, Duclos E, Sadoul R, Rondeau C, Desjardins M. The phagosome proteome. Insight into phagosome functions. *J Cell Biol*.2001;152(1):165-80.
19. Flitter WD. Free radicals and myocardial reperfusion injury. *Br Med Bull*. 1993;49:545-55.
20. Kloner RA, Przyklenk K, Whittaker P. Deleterious effects of oxygen radicals in ischemia/reperfusion. Resolved and unresolved issues. *Circulation*. 1989;80:1115-27.
21. MacLellan WR, Schneider MD. Death by design. Programmed cell death in cardiovascular biology and disease. *Cir Res*. 1997;81:137-44.
22. Chen WC, Chen CC. Signal transduction of arginine

- vasopressin-induced arachidonic acid release in H9c2 cardiac myoblasts role of Ca<sup>2+</sup> and the protein kinase C-dependent activation of p42 mitogen-activated protein kinase. *Endocrinology*. 1999;140(4):1639-48.
23. Choi DW, Maulucci-Gedde MA, Kriegstein AR. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture. *J Neurosci*. 1989;7:357-68.
  24. Choi DW, Koh JY. Zinc and brain injury. *Annu Rev Neurosci*. 1998;21:347-75.
  25. Morishima I, Okumura K, Matsui H, Kaneko S, Namaguchi Y, Kawakami K, Mokuno S, Hayakawa M, Toki Y, Ito T, Hayakawa. Zinc accumulation in adriamycin-induced cardiomyopathy in rats. effects of melatonin. a cardioprotective antioxidant. *J Pineal Res*. 1999;26:204-10.
  26. 한동훈. 실소산 전당액이 배양 심근세포에 미치는 영향. 원광대학교 석사학위논문.
  27. 조현익. 구향충 전당액이 배양 심근세포에 미치는 영향. 원광대학교 석사학위논문.
  28. 이래춘. 자감초탕이 배양 심근세포에 미치는 영향. 동의생리학회지. 1999;14(2):179-87.
  29. 이시진. 본초강목. 북경:인민위생출판사. 1995:699-710, 1033-5, 1238-40.
  30. 강병수 외. 본초학. 서울:영림사. 1991:531-3, 534-6, 540-1, 588-9, 622-3.
  31. 신민교. 임상본초학. 서울:남산당. 1994:166-9, 169-71, 175-8, 232-3, 241-2.
  32. 신민교 외. 본초방제학연구. 서울:영림사. 2000:1617, 18-20, 22-3, 93-4, 99-100.
  33. 김창민 외 완역. 중약대사전. 서울:도서출판 정담. 1998:88-103, 1648-57, 3958-68, 4477-98, 6460-71.
  34. 정보섭 외. 향약대사전. 서울:영림사. 1991:177-8, 439-43, 471-3, 663-4, 684-88.
  35. 김형균 외 편역. 한약의 약리. 서울:고려의학. 2000:29-32, 62-3, 100.
  36. 박찬희, 소홍섭, 최현준, 김영희, 오재민, 최민규, 정연태, 박래길. H9c2 심장근육세포에 미치는 아연 세포독성의 기전. *대한해부학회지*. 2000;33(6):635-42.
  37. Neil A. Turner, Fen Xia, Gohar Azhar, Xiaomin Zhang, Lixin Liu, Jeanne Y. Wei. Oxidative Stress Induces DNA Fragmentation and Caspase Activation Via the c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal Kinase Pathway in H9c2 Cardiac Muscle Cells. *J Mol Cell Cardiol*. 1998;30:1789-801.
  38. Kasibhatla S, Genestier L, Green R. Regulation of FasLigand expression during activation-induced cell death in T-lymphocytes via nuclear factor. *B J Biol Vhem*. 1999;274:987-2.
  39. Klaus SO, Davide F. Apoptosis signal by death receptors. *Eur J Biochem*. 1998;254:439-459.
  40. Gross A, McDonnell J M, Korsmeyer S J. Bcl-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev*. 1999;13:1899-911.
  41. Kato S, K Negishi, K Mawatari, CH Kuo. A mechanism for glutamate toxicity in the C6 glioma cells involving inhibition of cystine uptake leading to glutathion depletion. *J Neurosci*. 1992;48:903-14.
  42. Mills PB, Mills K, Johnson AW, Clayton PT, Winchester BG. Analysis by matrix assisted laser desorption/ionisation-time of flight mass spectrometry of the post-translational modifications of alpha 1-antitrypsin isoforms separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Proteomics*. 2001;1(6):778-86.
  43. Wulfkuhle JD, McLean KC, Paweletz CP, Sgroi DC, Trock BJ, Steeg PS, Petricoin EF 3rd. New approaches to proteomic analysis of breast cancer. *Proteomics*. 2001;1(10):1205-15.