

炙甘草湯이 培養心筋細胞에 미치는 影響

Effects of Jagamchotang on the Cultured Rat Neonatal Myocardial Cells

이래춘* · 조남수** · 조동기** · 임상섭** · 강성도** · 이춘우** · 고정수** · 성은경** · 이관형** ·
성기호** · 박준수** · 류도곤** · 문병순*

I. 緒論

炙甘草湯은 張¹⁾의 《傷寒論》에 “治傷寒 脈結 代 心動悸”라고 처음 收錄된 처방으로 一名 “復脈湯”이라고도 稱하며²⁾, 以後 後世醫家들에 의하여 虛勞·肺癆·呃逆등을 치료하는데 활용되고 있다^{2,3)}.

脈은 《醫學入門》⁴⁾에 “古脈者從血從瓜 所以使 氣血 各依分派而行經絡也”라고 하여 氣血이 經絡으로 運行할 때 나타나는 波動을 意味하며, 이 波動은 《靈樞·本神篇》⁵⁾에 “心藏脈 脈舍神”이라 하여 心에서 비롯되고 있음을 나타내고, 許⁶⁾는 “一息四至號平和”라고 하여 脈動에는 일정한 規律이 있음을 나타내고 있다.

《脈經》⁷⁾에서는 結脈의 體狀은 “往來緩時 一止復來”이고, 代脈의 體狀은 “動而中止 不能自還 因而復動”이라 하여 結代脈이 부정기적인 脈動임을 말하고 있다.

不整脈은 心臟의 電氣刺戟形成이나 자극전도에

이상 이 있을 때 발생하여 不規則의이기도 하며, 徐脈, 正常脈, 頻脈 等の 여러형태로 나타나고, 발생원인으로는 心臟疾患, 肺疾患, 藥物副作用, 電解質作用, 電解質代謝異常 등이 있다.⁸⁾

炙甘草湯에 對한 實驗的 研究로는 金⁹⁾의 “炙甘草湯의 效能에 대한 實驗的 研究”와 文 等¹⁰⁾의 “炙甘草湯이 재관류장치하에 흰쥐의 적출심장에 미치는 影響” 등이 있었으나, 본 方이 心筋細胞의 損傷을 줄이는 기전에 대한 연구는 아직 보고된 바가 없었다.

이에 著者는 炙甘草湯이 心筋細胞에서의 虛血後 再貫流損傷에 미치는 影響을 알아보기 위하여 MTT assay, LDH 分泌 測定, 心拍動數 測定, nitric oxide (NO)測定, LM study를 施行하여 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 材料

1) 動物 및 細胞

실험동물로는 生후 3일된 Sparague-Dawley 종의 흰쥐를 암수 구별없이 사용하였으며, 대조군으로는 정상적인 心筋細胞를 3일 동안 배양하여 細胞가 안정화되고 동시수축을 하는 細胞를

* : 원광대학교 한의과대학 순환기내과학교실

** : 원광대학교 한의과대학 생리학교실

* 본 연구는 한국 과학재단 지정, 원광대학교 의학자원연구센터 및 전라북도 도청(99-16-03-03-A-3)의 지원에 의한 것입니다.

대상으로 하였고, 실험군은 95% 질소와 5% 이산화탄소로 24시간 무산소 처리 후 50% 산소와 5% 이산화탄소의 혼합가스로 충분히 포화시킨 배양액으로 37°C에서 3시간 동안 처리한 군으로 하였다.

2) 藥材

본 실험에 사용한 炙甘草湯의 處方內容은 許⁶⁾에 準하였으며, 藥材는 원광대학교 부속 의산한방병원에서 구입한 후 精選하여 사용하였고, 1貼의 分量과 內容은 다음과 같다.

藥物名	生藥名	重量(μ)
甘草炙	<i>Glycyrrhizae Radix(boiled)</i>	8.00
生薑	<i>Zingiberis Rhizoma</i>	6.00
桂枝	<i>Cinnamomi Ramulus</i>	6.00
大棗	<i>Zizyphi Fructus</i>	4.00
生地黃	<i>Rehmanniae Radix</i>	6.00
麥門冬	<i>Liriopsis Tuber</i>	6.00
麻子仁	<i>Cannabis Fructus</i>	6.00
人參	<i>Ginsene Radix</i>	4.00
阿膠	<i>Gelatinum</i>	4.00
Total amount		50

2. 方法

1) 檢液의 調製

炙甘草湯 4貼分量인 200g을 증류수 1,800ml와 함께 환저플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 2시간동안 가열한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리 하였다. 이후 얻은 상청액을 감압회전증발기를 이용하여 감압농축한 후 freeze dryer로 동결건조하여 42.15g의 분말 extract를 얻어 실험에 사용하였다.

2) 細胞培養

본 실험에 사용한 心筋細胞는 생후 1-3일째의 Sprague-Dawley 계통의 백서 심장에서 분리 배양하였다. 백서의 흉부를 정중선을 따라 절개한 후 심장을 적출하고 심실만을 분리하여 잘게 잘라 직경 100mm 배양용 petri dish(Nunc)에서 phosphate buffered saline(PBS)으로 3회 세척한 후 4°C의 0.125% trypsin-0.1% collagenase 용액

에서 하룻밤 방치하고, 다음날 37°C shaking water bath(Precision Co.)에서 60회/분으로 10분간 진탕하여 細胞를 분리하였다. 배양액은 alpha-minimum essential medium(a-MEM, Gibco)에서 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco)을 넣어 사용하였다.

분리된 細胞를 2시간 동안 배양하면 먼저 內皮細胞가 petri dish에 부착하므로 부착되지 않은 細胞만을 모아서 24well plate(Nunc)에 1×10^5 cells/well로 분주하였다. 분주한 心筋細胞는 37°C, 5% CO₂ 정온기(Bellco)에서 배양하였으며, 24시간 배양하여 心筋細胞가 24well plate 바닥에 완전히 부착된 후 배양액을 교환하여 실험에 사용하였다. 배양 72시간이 경과하여 心筋細胞의 동시박동이 관찰되면, 배양액을 마취제가 포함된 배양액으로 교환하여 24시간 배양한 후 각종 분석 및 형태학적 관찰을 시행하였으며, 대조군으로는 마취제가 포함되지 않은 배양액에서 배양한 細胞를 사용하였다.

3) Nitrite 濃度 測定

心筋細胞를 새로운 배양액으로 교환한 후 90분간 배양하면서 배양액으로 유리되어 나온 nitrite의 양을 15분마다 6회에 걸쳐 측정함으로써 대조군과 실험군의 iNOS의 활성도를 비교하였다. 먼저 알고 있는 농도의 sodium nitrite를 이용하여 표준곡선을 구하고, 대조군과 실험군의 배양액을 각각 150μl씩 얻어 4°C에서 1,500rpm의 속도로 15분간 원심분리를 한 후 細胞成分들을 침전시키고 부유액만을 취하여 Griess reagent와 동량으로 혼합하여 실온에서 10분간 반응시키고 550nm의 파장으로 흡수도를 측정하였다.

4) 光學顯微鏡的 觀察

細胞의 형태학적 변화를 조사하기 위하여 배양 중인 배양용기(well plate)를 도립위상차 현미경(Nikon)에서 관찰하였고, 필요시 부착된 사진기로 촬영하였다.

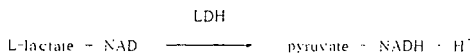
5) MTT 定量

대조군과 실험군들을 각각 8개의 well을 한 군으로 하였으며, MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma]정량은 Mosmann²⁶⁾의 방법에 따랐다. 즉 心筋細胞를 배양한 후 상층액을 버리고 사용당일 제조한 500 μ g/ml MTT를 배양용기당 1ml씩 넣어 은박지로 포장한 후 3시간 동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 로 유지된 정온기내에서 배양하였다. 배양 완료 후 細胞內의 formazan을 용해시키기 위하여 상층액을 버리고 dimethyl sulfoxide(DMSO, Merck)를 배양용기당 1ml씩 넣고 15분간 실온에서 방치한 후 흡광광도계로 540nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

6) lactate dehydrogenase(LDH) 活性度 測定

대조군과 실험군들을 각각 8개의 well을 한 군으로 하여 각 well의 상층액을 tube에 담아 1,000rpm으로 7분간 원심분리시킨 후, tube의 부유액을 검체량 50 μ l와 효소기질액 kit인 LD-D 1.0ml를 섞어 30 $^{\circ}$ C, 340nm에서 Gilford-Impact 400E로 setting하여 측정하였다.

측정원리는 다음과 같다.



lactate dehydrogenase 활성도는 340nm에서 NADH양을 측정함으로써 간접적인 방법으로 구하였다.

7) 心筋細胞 搏動數 調査

대조군과 실험군들을 각각 8개의 well을 한 군으로 하여 72시간 배양한 후 전체 心筋細胞가 규칙적으로 박동하는 것을 확인한 다음, 온도와 CO₂ 농도가 정온기와 같은 상태로 유지되는 소형 chamber (Nikon, NP-2)내에서 대조군과 실험군 모두 동일한 시간대에 1분 동안의 心筋細胞 박동수를 3회 반복 측정하여 평균치를 구하고 이를

대조군과 비교 조사하였다.

8) 統計處理

실험결과와 통계처리는 Anova test에 準하였고, P-value가 0.05이하일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

III. 實驗成績

1. 心筋細胞에 대한 炙甘草湯의 毒性檢定

心筋細胞에 대한 炙甘草湯의 독성검정을 하고자 배양중인 心筋細胞에 炙甘草湯의 농도가 20 μ g/ml까지 농도 의존적으로 처리하고 viability를 조사한 결과 20 μ g/ml에서도 心筋細胞는 전혀 손상받지 않았다 (Table I).

Table I. The Effects of *Jagamchotang*(JGCT) on the production of MTT formazan in rat neonatal myocardial cells

	JGCT(μ g/ml)				
	cont.	2.5	5	10	20
Cellular activity by MTT(% of cont.)	100 \pm 1	103 \pm 1.14	96.6 \pm 1.364	96 \pm 2.828	98 \pm 1.924

The MTT values of cultured rat myocardial cells treated with various concentrations of *Jagamchotang* for 48 hours. The values are the mean \pm SE (standard error).

2. 炙甘草湯의 虛血後 再貫流 毒性에 對한 防禦 效果

1) 미토콘드리아내의 succinic dehydrogenase의 活性測定 (MTT assay)

배양중인 心筋細胞를 95% 질소와 5% 이산화탄소로 24시간 무산소 처리 후 50% 산소와 5% 이산화탄소의 혼합가스로 충분히 포화시킨 배양액으로 37 $^{\circ}$ C에서 3시간 동안 재관류하면 대조군에 비하여 succinic dehydrogenase의 활성이 62%로 감소하였지만 炙甘草湯을 5 μ g/ml 처리한 후 무산소, 재관류를 하면 succinic dehydrogenase의 활성이 대조군의 92%로 succinic dehydrogenase의 활성이 많이 남아 있었다 (Table II).

Table II. The Effects of Jagamchotang(JGCT) on the production of MTT formazan in rat neonatal myocardial cells suffered ischemia coupled reperfusion

	JGCT($\mu\text{g}/\text{ml}$)				
	cont.	I/R	I/R(2.5)	I/R(5)	I/R(10)
Cellular activity by MTT (% of cont.)	100	74.4	89.8	94	62
	± 1.414	± 1.166	± 2.764	± 1.304	± 1.414

The MTT values of cultured rat myocardial cells suffered ischemia coupled reperfusion with or without various concentrations of Jagamchotang. Ischemia (I) : Rat neonatal myocardial cells were cultured in 4 % O₂ saturated medium for 24 hours. Reperfusion (R) : Rat neonatal myocardial cells were cultured in 50 % O₂ saturated medium for 3 hours. I/R : Ischemia coupled with reperfusion. The values are the mean \pm SE (standard error). * p < 0.05. ** p < 0.01

2) LDH 分泌 測定

배양중인 心筋細胞에서 허혈후 재관류에 의한 막독성에 대한 炙甘草湯의 효과는 재관류시 대조군에 비하여 159%로 많이 증가하였으나 炙甘草湯을 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리한후 재관류를 하면 대조군에 비하여 118%밖에 증가하지 않아 炙甘草湯이 허혈후 재관류에 의한 막독성 역시 많이 감소시켰다 (Table III).

Table III. The amount of released LDH into the medium in rat neonatal myocardial cells suffered ischemia coupled reperfusion

	JGCT($\mu\text{g}/\text{ml}$)				
	cont.	I/R	I/R(2.5)	I/R(5)	I/R(10)
Amounts of LDH Release (% of cont.)	100	159	121.2	118	147
	± 1.581	± 1.414	± 3.382	± 2.881	± 2.302

The beating rate of cultured rat myocardial cells suffered ischemia coupled reperfusion with or without various concentrations of Jagamchotang. Ischemia (I) : Rat neonatal myocardial cells were cultured in 4 % O₂ saturated medium for 24 hours. Reperfusion (R) : Rat neonatal myocardial cells were cultured in 50 % O₂ saturated medium for 3 hours. I/R : Ischemia coupled with reperfusion. The values are the mean \pm SE (standard error). * p < 0.05. ** p < 0.01

3) 細胞搏動數 測定

허혈후 재관류시 心筋細胞의 搏動數를 측정하여 炙甘草湯의 心筋細胞의 기능에 대한 보호효과를 조사하였는데 재관류후 心筋細胞의 搏動數는 대조군 179회에 비하여 34회로 搏動數도 크게 줄어들었을 뿐만 아니라 搏動도 매우 불규칙하였다. 그러나 炙甘草湯을 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리한 후 재관류를 하면 心筋細胞의 搏動數는 115회였고 박동도

매우 규칙적이었다 (Table IV).

Table IV. The beating number per minute of rat neonatal myocardial cells suffered ischemia coupled reperfusion

	JGCT($\mu\text{g}/\text{ml}$)				
	cont.	I/R	I/R(2.5)	I/R(5)	I/R(20)
Beating Rate of Myocardial cell(%)	179	34.2	96	115	64.6
	± 5.138	± 8.845	± 3.421	± 3.86	± 4.423

The beating rate of cultured rat myocardial cells suffered ischemia coupled reperfusion with or without various concentrations of Jagamchotang. Ischemia (I) : Rat neonatal myocardial cells were cultured in 4 % O₂ saturated medium for 24 hours. Reperfusion (R) : Rat neonatal myocardial cells were cultured in 50 % O₂ saturated medium for 3 hours. I/R : Ischemia coupled with reperfusion. The values are the mean \pm SE (standard error). ** p < 0.01

4) 細胞의 형태조사

허혈후 재관류시 대조군에 비하여 心筋細胞의 돌기가 많이 축소되었고 살아있는 心筋細胞의 수도 많이 감소되었다. 그러나 炙甘草湯을 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 처리한 후 재관류를 했을 때는 대조군과 크게 차이가 없었다 (Fig. 1)

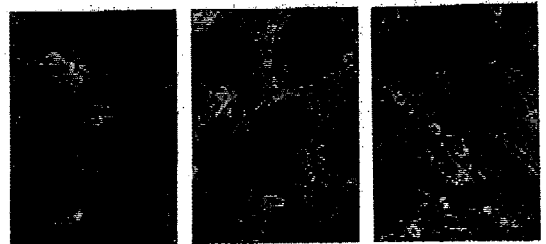


Fig. 1. a. An inverted phase contrast microscope of neonatal myocardial cells (control). The most cells were communicated with each other by network of cell process. X 100

b. An inverted phase contrast microscope of neonatal myocardial cells treated ischemia/reperfusion with Jagamchotang (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). The most of cells project slender branches from cell body and maintain the network of cell processes. X 100

c. An inverted phase contrast microscope of neonatal myocardial cells treated ischemia/reperfusion without Jagamchotang. The network of cell processes was destroyed and the granulation of cytoplasm and cell loss were increased. X 100

3. 虛血後 再貫流時 心筋細胞損傷에 對한 炙甘草湯의 防禦效果

배양중인 心筋細胞에 허혈시 炙甘草湯을 5 μg

/ml 처리하면 Nitric oxide(NO)가 대조군에 비하여 1.9배 증가하였다 (Table V). 따라서 허혈후 재관류시 心筋細胞의 보호효과가 NO에 의한 것 인지를 알아보기 위하여 허혈시 NO를 처리하였다 더니 저농도의 NO 처리군에서 炙甘草湯의 효과와 비슷한 효과를 나타냈다 (Table VI).

Table V. In ischemia, the effect of *Jagamchotang* on the generation of nitric oxide in rat neonatal myocardial cells

	JGCT($\mu\text{g}/\text{ml}$)				
	cont.	1	1(2.5)	1(20)	
NO production (% of cont.)	100 \pm 3.479	130 \pm 3.13	169 \pm 3.406	191 \pm 5.63	162 \pm 4.278

In ischemia, the generation of nitric oxide (NO) in neonatal myocardial cells with or without various concentrations of *Jagamchotang*. Ischemia (I) : Rat neonatal myocardial cells were cultured in 4 % O₂ saturated medium for 24 hours. Reperfusion (R) : Rat neonatal myocardial cells were cultured in 50 % O₂ saturated medium for 3 hours. I/R : Ischemia coupled with reperfusion. The values are the mean \pm SE (standard error). ** p < 0.01

Table W. The effects of the exogenous nitric oxide (NO, SNP) on the production of MTT formazan in rat neonatal myocardial cells suffered ischemia coupled reperfusion

	Nitrite(nM)				
	cont.	I/R	I/R (S, 10nM)	I/R (S, 50nM)	I/R (S, 100nM)
SNP (nM)	100 \pm 2	65 \pm 2.168	82 \pm 1.378	90 \pm 2	79 \pm 2.025

The MTT values of cultured rat myocardial cells suffered ischemia coupled reperfusion with or without various concentrations of sodium nitroprusside (SNP). Ischemia (I) : Rat neonatal myocardial cells were cultured in 4 % O₂ saturated medium for 24 hours. Reperfusion (R) : Rat neonatal myocardial cells were cultured in 50 % O₂ saturated medium for 3 hours. I/R : Ischemia coupled with reperfusion. The values are the mean \pm SE (standard error). ** p < 0.01

IV. 考察

脈은 《醫學入門》⁴¹⁾에 “古脈字從血從瓜 所以使氣血 各依分派而行經絡也”라고 하여 氣血이 各其經絡을 運行할 때 나타나는 波動을 意味하는 것으로 脈의 發生에 對하여 馬¹¹⁾는 “人之脈藏於心 脈則爲神之舍”라고 하여 心에서 간직하고 있다가 發顯한다 하였고, 그 機能에 대하여 劉¹²⁾는 “脈者 血氣之先 斯論得之矣 人身之脈 血氣之所爲而不知 所以周流不息”이라 하여 氣血이 運行하기 전에 脈이 먼저 運行하여 氣血의 運行을 調節하는 機能을 한다고 하였다.

正常的인 脈動은 숨을 한번 내쉬고 들이쉬는

동안에 두 번 뛰어야 하는데⁵⁾ 여러 가지 原因으로 正常的인 脈動에 미치지 못하거나 지나친 경우를 病理的인 脈動狀態로 規定하고 있다.

결結結脈은 “往來遲緩時 一止復來”라고 하여 脈이 뛰는 것이 느리고 한번씩 멎었다 뛰는 것을 말하며, “結爲陰盛 爲積聚”라고 하여 陰이 盛할 때와 積聚가 있을 때 나타나고, 代脈은 “動而中止 不能自還 因而復動 由是復止 尋之良久 乃復強起 曰代”라고 하여 脈이 뛰다, 멎었다, 다시 뛰고, 다시 멎고, 한참있다 다시 세게 뛰는 것을 말하며, “代者 臟氣絕危亡之脈也 代爲脾元氣衰”라고 하여 五臟의 氣運이 끊어진 위험할 때나 脾의 元氣가 쇠약해질 때 나타난다¹³⁾.

따라서, 結脈과 代脈은 모두 陰證에 나타나며 積聚, 五臟의 氣가 끊어진 때, 脾의 元氣가 衰弱해질 때 나타나는 불규칙적인 脈動임을 알 수 있다.

炙甘草湯은 張¹⁾의 《傷寒論》에 脈結代 心動悸를 治療하는 代表的인 處方으로 記載되어 있으며, 그후 唐의 孫²⁾은 虛勞를 主治한다 하였고, 王³⁾은 肺痿를, 葉⁴⁾은 肝陽偏亢에, 喻⁵⁾는 補衛生津 兼散寒에, 汪⁶⁾은 呃逆을, 張⁷⁾은 心動悸를 治療하는데 廣範圍하게 活用되어 왔다.

炙甘草湯은 甘·溫하고 補中益氣하여 肺의 本源을 도우며 緩急定痛, 止心悸強心, 通利血脈하는 炙甘草¹⁸⁻²⁰⁾, 辛·微溫하고 溫中, 解毒, 健胃, 溫行陽氣하는 生薑¹⁹⁻²⁰⁾, 辛·甘·溫하고 溫經通脈, 調和營衛, 鎮靜, 鎮痛, 健胃, 入心助陽하는 桂枝¹⁹⁻²⁰⁾, 甘·微溫하고 大補元氣, 補肺益脾, 安神益智, 止驚悸, 通血脈, 利血氣, 堅筋骨, 強心固脫, 益氣生津하는 人參¹⁸⁻²⁰⁾, 甘·寒하고 清熱涼血, 補陰, 消瘀通經, 補五臟, 除痺, 強心利尿하는 生地黃¹⁸⁻²⁰⁾, 甘·平하고 補血止血, 滋陰潤肺, 增血作用을 하는 阿膠^{18,20)}, 甘·微寒하고 清心除煩, 清熱滋陰, 養胃生津, 潤肺止咳, 消炎, 強心強壯滋養하는 麥門冬¹⁸⁻²⁰⁾, 甘·平하고 潤肺滑腸, 滋養肝腎緩脾, 滋陰生津하는 麻子仁²⁰⁾, 甘·平하고 補脾益胃, 生津止瀉, 助營衛, 緩陰血, 鎮痙鎮靜作用을 하는 大棗¹⁸⁻²⁰⁾로 구성되어 있으며, 方劑學的으로는 炙甘草는 益氣

補中, 化生氣血의 效能이 있어 復脈의 本이 되고, 人蔘과 大棗는 益氣補脾養心의 效能으로 氣血生化의 本이 되며, 生地, 阿膠, 麥門冬, 麻子仁은 養心陰, 充血脈의 作用을 하고, 桂枝와 生薑은 行陽氣하고 通血脈하는 效能이 있으므로²¹⁾ 結代脈을 수반한 各種 虛血性 心臟疾患, 肺結核, 甲狀腺疾患, 神經衰弱, 自律神經失調症 等 多方面에 應用되고 있다²¹⁻²²⁾.

虛血性 心臟疾患은 관상동맥에 발생한 죽상동맥경화에 의해 혈류가 저류 혹은 차단됨으로 인해서 심장활동의 근원인 심근에 산소와 에너지원의 공급이 부족해져서 발생하게 되는데, 일시적인 심근허혈로 인한 일과성의 통증이 나타나며, 심하면 심근의 괴사나 경색으로 진행되어 사망을 일으키기도 하는 질환을 말한다²³⁻²⁴⁾. 또한 현대인의 식생활 등이 점차로 서구화되면서 허혈성 심장질환이 급속히 증가하는 추세로 재발률이 높고 치명적이기 때문에 관심의 대상이 되고 있다²⁵⁻²⁶⁾. 한편, 생체에서 심장근육층에 산소와 영양분을 공급하는 관상동맥이 협착이나 폐쇄하게 되면 心筋細胞는 심각한 손상을 받아 심근경색이나 부정맥 등을 일으킨다. 이러한 허혈성 병변은 심근손상의 회복이 가능한 초기에는 혈전용해약물의 투여, 경피적 경혈관 관상동맥 확장술, 관상동맥 우회술 등 내과적 혹은 외과적 방법으로 혈류를 재개시켜 줌으로써 心筋細胞의 대사이상 및 수축능력의 저하를 정상으로 회복시킬 수 있다. 그러나 어느 정도 허혈상태가 지속되었을 때에는 정상 혈류를 다시 심근으로 보내어도 심근 손상이 회복되기 보다는 오히려 더욱 악화되고 기능이 마비되기도 하는데 이를 “재관류 손상(reperfusion injury)” 혹은 “산소재공급 손상(oxygen paradox)”이라고 한다²⁷⁻²⁸⁾.

이와 같은 재관류 손상은 여러 인자들의 복합적인 작용에 의하여 나타나는 것으로 알려져 있다. 재관류 손상의 기전에 관여되는 학설로는 ATP와 creatine phosphate의 고갈, 細胞內 Ca⁺⁺ 축적, 용해소체효소의 활성화, 인지질 분해효소 활성화 등이 알려져 있지만 아직까지 기전에 대

한 확실한 규명을 하지 못하고 있다²⁹⁾. 한편, 최근보고에 의하면 in vivo에서 재관류전에 NO를 비롯하여 ROS를 처리하면 細胞機能을 보호하고 細胞損傷을 줄인다는 보고가 있다. 따라서 재관류전의 preconditioning에 대한 연구가 계속 진행되고 있다³¹⁻³²⁾.

따라서, 炙甘草湯이 不整脈과 心動悸에 使用되는 處方이라는 점에 착안하여 炙甘草湯이 心筋細胞에 미치는 影響을 實驗的으로 알아보기 위하여 MTT assay, LDH 分泌 測定, 心搏動數 測定, nitric oxide (NO) 測定, LM study를 施行하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

炙甘草湯을 투여하지 않고 허혈후 재관류를 시행한 군을 광학현미경하에서 관찰하면 心筋細胞의 돌기의 발달이 대조군에 비하여 크게 감소되고 細胞의 수도 감소되었다. 그러나 炙甘草湯을 투여한 재관류군은 대조군과 차이가 없었다(Fig. 1). 미토콘드리아내벽에 존재하는 succinic dehydrogenase의 활성도는 미토콘드리아에 대한 손상의 지표가 되며, lactic dehydrogenase(LDH)는 살아있는 細胞의 형질막의 손상으로 인하여 漏出되는 효소이므로 細胞膜 損傷의 지표가 되는 효소이다. NO는 반감기가 매우 짧은 free-radical로서 주로 포유류의 細胞에서 생성되어지며, 혈관계, 신경계 및 면역계에서 다양한 역할을 수행하는 새로운 종류의 전달물질로 알려졌다³³⁾. 大食細胞에서 만들어지는 nitric oxide(NO)는 면역계에서 생체가 만들어내는 가장 강력한 細胞毒性物質로 알려져 있으며, 미세량의 NO는 혈관을 확장시키는 성질이나 神經細胞의 신호전달물질임도 밝혀지고 있다. NO는 이웃하는 細胞 뿐만 아니라 생성하는 자신의 細胞에게도 확산되어 생화학적 역할을 수행한다. NO는 혈관계에서는 혈관내피세포에 의해 분비되어 인접한 筋細胞에 영향을 주어 혈관이완과 혈류를 조절하는 신호전달자(signaling molecule)로서 작용하고, 면역계에 있어서는 활성화된 大食細胞나 중성구(neutrophil) 등에 의해 생성되어 외부에서 침입한 미생물이나 내부에서 발생한 종양세포의 사멸에 영향을 주는

면역 방어 분자(immune defence molecule)로서 인식되고 있다³⁴⁾. 또한 1988년에는 뇌조직에서 NO-like인자가 동정된 이후 NO가 새로운 신경 전달물질로서 이 분야에서 급속한 연구가 진행되고 있다³⁵⁻³⁶⁾. 인체에 NO가 적용된 예로는 1867년 glyceryl trinitrate가 협심증(angina)에 효과적으로 사용되었지만 그 당시에는 작용기전을 이해할 수 없었다. 현재는 NO에 의한 혈관벽의 확장에 의해 내부에서 생성되는 NO를 이러한 약제가 대신할 수 있는 것으로 생각되어지고 있으며³⁷⁾ NO gas의 흡입으로 호흡기 질환과 관련된 고혈압을 치료하는 등 선진국에서는 이미 NO를 이용한 임상적 응용측면을 고려하고 있는 실정이다^{34,37)}.

따라서, 細胞의 생존률을 조사하기 위하여 미토콘드리아내의 succinic dehydrogenase의 활성(MTT assay)과 LDH의 분비를 측정된 결과 허혈시 炙甘草湯을 투여하고 재관류를 한 군은 炙甘草湯을 투여하지 않고 허혈후 재관류를 한 군에 비하여 손상을 적게 받았다(Table II). 이런 양상은 허혈시 nitric oxide를 투여하고 재관류를 주었을 때의 양상과 일치하였다(Table VI). 이는 문 등¹⁰⁾이 Langendorff model에서 허혈시 炙甘草湯을 주었을 때 細胞毒성을 막는 다는 報告와 일치하고 있으며, In vivo model에서 허혈시 reactive nitric oxide를 재관류전에 전 처리하였을 때 細胞損傷을 줄이고 허혈시 nitric oxide의 생성을 줄이면 재관류시 細胞의 손상을 막을 수 없다는 기존의 보고와도 일치하였다³¹⁻³²⁾. 따라서 본 실험에서 허혈시 炙甘草湯에 의한 心筋細胞의 보호작용이 nitric oxide의 생성이 증가하여 나타나는지를 확인하기 위하여 炙甘草湯을 5 μ g/ml을 처리하고 nitric oxide의 농도를 조사한 결과 대조군에 비하여 炙甘草湯을 투여한 군에서 nitric oxide가 1.9배 증가함을 관찰하였다(Table. V). 따라서 허혈후 재관류시 炙甘草湯에 의한 細胞保護 효과는 nitric oxide의 생성과 매우 밀접한 관계가 있을 것이라고 생각된다.

기능적인 면을 조사하기 위하여 心筋細胞의 박동을 측정된 결과에서도 허혈시 炙甘草湯을 투여

하지 않고 재관류를 한 군은 분당 細胞의 박동수가 34회로 대조군 179회에 비하여 크게 떨어질 뿐만 아니라 細胞의 박동이 매우 불규칙하였다. 그러나 炙甘草湯을 투여한 재관류 군은 분당 細胞의 박동수가 115회였을 뿐만 아니라 박동도 매우 규칙적이었다(Table IV). 이러한 결과는 문 등¹⁰⁾이 Langendorff model에서 허혈시 炙甘草湯을 투여하고 재관류를 하였을 때가 炙甘草湯을 투여하지 않고 허혈후 재관류를 한 군에 비하여 細胞의 박동수가 많았다는 보고와 일치하였고, Vegh³²⁾등이 허혈시 iNOS의 발현을 증가시킨 후, 재관류 하였을 때 antiarrhythmic effect를 관찰하였다는 보고와도 일치하였다.

따라서 허혈시 炙甘草湯을 투여하면 재관류 시에 일어나는 細胞의 손상을 nitric oxide의 생성을 통해서 막을 수 있을 뿐만 아니라 細胞의 기능을 유지하는데 크게 도움이 되리라 생각된다. 그러나 이상의 결과들은 세포배양모델에서의 결과들이기 때문에 앞으로 더 많은 보조적인 실험들이 진행되어야 할 것으로 생각된다.

V. 結論

心筋細胞에서 허혈후 재관류손상에 대하여 炙甘草湯이 어떤 기전에 의하여 細胞의 손상을 방어하는지 조사하기 위하여 MTT assay, LDH 분비 측정, 심박동수 측정, nitric oxide (NO) 측정, LM study를 시행한 결과 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 炙甘草湯은 20 μ g/ml에서도 細胞에 손상을 주지 않았다.

2. 炙甘草湯은 허혈후 재관류시 미토콘드리아의 독성, 막독성을 억제하였고 心筋細胞 돌기의 수축이나 細胞의 수적 감소를 억제하였다. 또한 규칙적인 박동을 유지하였고 박동수의 감소도 줄여주었다.

3. 虛血時 炙甘草湯에 의하여 NO의 합성이 대조군에 비하여 1.9배 증가하였다.

4. 虛血時 NO donor인 sodium nitroprusside

(SNP)를 주고 재관류를 하였을 때는 虛血時 炙甘草湯을 투여하고 재관류를 하였을 때와 마찬가지로 미토콘드리아의 毒性을 抑制하였다.

이상의 結果들을 綜合하여 볼 때, 虛血時 炙甘草湯의 效果는 NO의 生成과 매우 密接한 關係가 있을 것이라고 思料된다.

(SNO), NO donor in ischemia repressed the toxicity of mitochondria as the case of reperfusing with *Jagamchotang* in ischemia.

Therefore, putting these findings together, it can be said the effect of *Jagamchotang* in ischemia will be closely related with generation of NO.

= Abstract =

參考文獻

Effects of *Jagamchotang* on the Cultured Rat Neonatal Myocardial Cells

Lee, Iae-Chun* · Cho, Nam-su · Cho, Dong-ki · Sang Sub · Kang, Sung-do · Lee, Chun-woo · Go, Jeong-roo · Sung, Yeun-Kyung · Lee, Kwan-hyung · Sung, Ki-ho · Jun-su · Ryu, Do-Gon · Moon, Byung-sun***

*Dept. of Cardiovascular Internal Medicine,

**Dept. of Physiology, college of oriental medicine, Won-Kwang Univ., Iksan, Korea.

To investigate how *Jagamchotang* prevent cellular injury by a certain starting point on reperfusion injury after ischemia in myocardial cell, conducted MTT assay, LM study and measured LDH secretion, heart rate and nitric oxide(NO), and got the following results.

1. *Jagamchotang* did not injure cells even in 20µg/ml.
2. *Jagamchotang* repressed the toxicity of mitochondria and cell membrane in reperfusing after ischemia and repressed the contraction of promontory of myocardial cell and reduction of the number of cells. Also maintained regular heart rate and reduced the number of heart rate.
3. Synthesis of NO by *Jagamchotang* in ischemia increased 1.9 times than a control.
4. When reperfusing with sodium nitroprusside

1. 張仲景 : 傷寒論, 上海, 上海科技出版社, pp.50-51, 1983.
2. 孫思邈 : 千金翼方, 서울,杏林出版社, pp.231-232, 1976.
3. 王 燾 : 外臺秘要, 台北, 文光圖書有限公司, p.279, 1979.
4. 李 梴 : 偏註醫學入門, 서울, 大星文化社, p.380, 1981.
5. 程士德 : 內經, 서울, 醫聖堂, p.190, 489, 1969.
6. 許 浚 : 原本東醫寶鑑, 서울, 南山堂, pp.290-293, 1994.
7. 王叔和 : 脈經, 北京, 科學技術文獻出版社, p.2, 1996.
8. 醫學教育研究院 : 家庭醫學, 서울, 서울대학교출판부, p.326, 1987.
9. 金萬基 : 炙甘草湯의 效能에 關한 實驗的 研究, 慶熙大學校 韓醫科大學 碩士學位論文, 1989.
10. 文亨權 外 : 炙甘草湯이 재관류장치하에서 心臓의 摘出心臟에 미치는 影響. 大韓韓醫學會誌. 18(2) : 340-354, 1997.
11. 馬元臺 外 : 黃帝內經素問靈樞合編(靈樞經), 台北, 台聯國風出版社, p.60, 1981.
12. 樓 英 : 醫學綱目, 北京, 中國中醫藥出版社, pp.1-2, 1996.
13. 서민욱 : 脈學原論, 서울, 杏林出版, pp.303-307, 1998.
14. 葉天士 : 臨証指南醫案, 서울, 翰成社, p.18, 31, 1982.
15. 喻 昌 : 尙論後篇(卷3)(中國醫學大系·卷15), 서울, 驪江出版社, p.225, 1986.
16. 汪訥庵 : 醫方集解, 서울, 成輔社, pp.257-258,

- 1983.
17. 張仲景 : 金匱要略方論, 서울, 成輔社, p.39, 43, 1985.
 18. 醫學研究會 : 增補 本草備要, 서울, 高文社, pp.2-4, 13-14, 40-41, p.108, 142, 208, 1974.
 19. 辛民教 : 原色臨床本草學, 서울, 南山堂, pp.166-167, 174-177, 197-198, 224-225, 232-233, 254-255, 518-519, 561-562, 1986.
 20. 康秉秀 外 : 臨床配合本草學, 서울, 圖書出版永林社, pp.94-97, 99-100, 108-112, 161-163, 173-175, 263-267, 450-453, 464-467, 515-516, 1994.
 21. 許濟群 外 : 方劑學, 北京, 人民衛生出版社, pp.259-262, 1995.
 22. 上海中醫學院 : 方劑學, 香港, 商務印書館香港分館, pp.233-234, 1975.
 23. 卞一 : 心痛의 原因에 對한 文獻的 考察. 大韓韓方內科學會誌 12(1) : 19-31, 1991.
 24. 成彊慶 外 : 真心痛과 虛血性心臟疾患의 發病機轉에 對한 文獻的 考察. 大韓韓醫學會誌 13(1) : 85-89, 1990.
 25. Gergorty A. Eward, Clark R. Mcjenzie : The Washington Manual (Manual of Medical Therapeutics), Department of Medicine, Washington University, pp.85-113, 1995.
 26. Madsen E.B., Gilpin E., Henning H., Ahnve S., Lewinter M., Ceretto W., Joswing W., Collins D., Pitt W., Ross J : Prediction of late mortality after myocardial infarction from variables measured at different times during hospitalization, Am J Cardiol, 53 : 47, 1984.
 27. Hearse D.J., Humphrey S.M., Chain E.B. : Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat heart, A study of myocardial enzyme release, J. Mol Cell Cardiol, 5 : 395-407, 1973.
 28. Burton K.P., McCord J.M., Ghai G. : Myocardial alteration due to free radical generation, Heart Circ Physiol, 15 : H776-H783, 1984.
 29. Wildenthal K., Lysosomal alterations in ischemic myocardium : Results or causes of myocardial damage?, J. Mol Cell Cardiol, 10 : 595-603, 1978.
 30. Katz A.M., Reuter H. : Cellular calcium and cardiac cell death, Am J. Cardiol, 44 : 188-190, 1979.
 31. Takano H., Tang X.L., Qiu Y., Guo Y., French B.A., Bolli R. : Nitric oxide donors induce late preconditioning against myocardial stunning and infarction in conscious rabbits via an antioxidant-sensitive mechanism, Circ Res, 83 : 73-84, 1998.
 32. Vegh A., Papp J.G., Parratt J.R. : Prevention by dexamethasone of the marked antiarrhythmic effects of preconditioning induced 20h after rapid cardiac pacing, Br J Pharmacol, 113 : 1081-1082, 1994.
 33. Lin J., Y., and K. Chadee : Macrophage cytotoxicity against Entamoeba histolyca trophozoites is mediated by nitric oxide from L-arginine, J. Immunol, 148 : 3999-4005, 1992.
 34. Snyder S.H., and D.S. Bredt : Biological roles of nitric oxide. Scientific american review, pp.28-35, 1992.
 35. Simmons M.L., S. Gredt : Induction of nitric oxide synthase in glial cells, J. Neurochem, 59 : 897-905, 1992.
 36. Chao C.C., S. Hu, T. Molitor, E.G. Shaskan and P.K. Peterson : Activated microglia mediate neuronal cell injury via a nitric oxide mechanism, J. Immunol, 149 : 2736-2741, 1992.
 37. Flitny F.W., I.L. Megson, L.M. Thomson, G.D. Kennovin and A.R. Butler : Vasodilator responses of rat isolated tail artery enhanced by oxygen-dependent, photochemical release of nitric oxide from iron-sulphur-nitrosyl, Br. J. Pharmacol, 117 : 1549-1557, 1996.