

奪命散이 培養心筋細胞 및 血管平滑筋細胞에 미치는 影響

박세홍, 성강경

원광대학교 광주한방병원

Effects of Talmyung-san on the Cultured Rat Myocardial Cell and Vascular Smooth Muscle Cell

Bag Se Hong, Seong Gang Gyeong

Wonkwang University Kwangju Medical Center

Objectives : Talmyung-san(TMS) has been used for treatment of brain diseases in Chinese traditional medicine. However, little is known about the mechanism by which TMS rescues brain cells from ischemic damages. To elucidate the protective mechanisms of TMS, we execute experiments.

Methods : The effects of TMS on ischemia/reperfusion-induced cytotoxicity and generation of nitric oxide(NO) are investigated in primary neonatal myocardial cells and A7r5, aortic smooth muscle cell line.

Results : Ischemia/reperfusion itself induces severe myocardial cell death in vitro. However, treatment of the cells with TMS significantly reduces both ischemia/reperfusion-induced myocardial cell death and LDH release. In addition, pretreatment of TMS before reperfusion recovers the lose of beating rates after ischemia/reperfusion. For a while, the water extract of TMS stimulates myocardial cells to produce NO in a dose dependent manner and it protects the damage of ischemia/reperfusion-induced myocardial cells. Furthermore, the protective effects of the water extract of TMS is mimicked by treatment of sodium nitroprusside, an exogenous NO donor. NG-monomethyl-L-arginine (NGMMA), a specific inhibitor of nitric oxide synthase(NOS), significantly blocks the protective effects of TMS on the cells after ischemia/reperfusion. In addition, on ischemia the water extract of TMS induce NO in A7r5 cell.

Conclusions : Taken together, we suggest that the protective effects of TMS against ischemia/reperfusion-induced myocardial damages may be mediated by NO production of myocardial and vascular smooth muscle cell during ischemic condition.

Key Word : Brain ischemic damage. Ischemia/reperfusion injury. Nitric Oxide production. Talmyung-san(奪命散)

I. 緒 論

奪命散은 清代 吳¹⁾의 《醫宗金鑑》에 '藏府閉證 腹滿閉 昏瞶痰結在喉間 危急 湯藥不能下' 라고 收錄되어 風痰壅盛으로 인한 卒中風의 閉證 및 大小便閉, 神昏 등에 痰飲을 除去할 목적으로 사용된 處方이다.^{1,2)}

痰飲은 肺, 脾, 腎의 機能失調와 三焦의 氣化作用 異常 및 寒, 濕, 火, 熱 등 外邪의 侵入으로 津液代謝가 障礙를 받아 水濕이 停聚하여 形成된 것으로 諸病의 誘因이 되며 또는 續發性 疾病의 原因이 되기도 하는 것으로^{3,4,22)}, 高血壓性腦症, 腦

卒中, 熱性痙攣, 腦軟化症, 癲癇 등의 病證과 관련이 있으며, 動脈內膜에 이러한 病理的 產物이 形成되면 脂質代謝의 異常을 초래하여 動脈壁에 脂質과 血小板이 침착되어 局所의 肥厚, 纖維化, 壞死가 일어나 冠狀動脈에 血行障礙를 誘發하여 狹心症, 心筋梗塞症 등 虛血性心疾患을 惹起하는 것으로 알려져 있다.²³⁻²⁵⁾

虛血性心臟疾患은 冠狀動脈의 粥狀動脈硬化에 의해 血流가 저류 혹은 차단되어 心筋에 산소와 에너지원의 공급이 부족해져 心筋의 壞死나 梗塞으로 진행되어 사망을 일으키게 된다.^{6,8,12,16,44)}. 이러한 虛血狀態가 지속되면 정상 血流를

다시 心筋으로 보내어도 心筋損傷이 회복되지 않고 오히려 악화되고 기능이 마비되어 心筋細胞의 죽음을 초래하는 再貫流損傷을 일으키게 된다.^{19,20,27-29)}. 最近의 研究에 의하면 再貫流前 虛血狀態에서 NO를 처리하면 心筋細胞의 再貫流 損傷을 현저히 줄일수 있다고 보고되었다.^{12,19,20,45-47)}

最近 韓藥製劑의 細胞損傷 抑制에 대한 研究에서 炙甘草湯은 心筋細胞에서 虛血後 再貫流損傷을 NO의 生成을 통하여 抑制하였으며¹⁶⁾, 生脈散은 心筋細胞에서 LDH 漏出과 細胞의 活性度 및 總蛋白質合成 減少를 抑制시켜 細胞損傷을 防禦하였다.¹⁵⁾

이에 著者는 奪命散이 心筋細胞 및 血管平滑筋細胞의 損傷을 抑制하는 지

교신저자 : 박세홍 (광주광역시 남구 주월동 543-8번지 원광대학교 광주한방병원 2내과, 전화 : 062)670-6412, FAX : 062)670-6529, E-mail : eumyang@gaebok.wonkwang.ac.kr)

* 본 논문은 1999학년도 원광대학교 교내 연구비 지원에 의해 이루어짐

를 알아보기 위하여, 培養心筋細胞에 虛血狀態를 유발한 다음 奪命散을 투여한 후, Nitrite농도측정, MTT 정량, LDH 활성도측정, 心筋細胞박동수 變化, 세포 형태학적 變化를 觀察하였으며, 血管平滑筋細胞에서 奪命散의 NO 生成效果를 觀察하여 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 材料

1) 細胞

實驗에 사용된 細胞는 생후 3일된 Sprague-Dawley종 흰쥐의 心筋細胞와 ATCC에서 구입한 大動脈 平滑筋細胞柱인 A7r5 및 大食細胞柱인 Raw cell 을 3일 동안 배양하여 안정화된 細胞를 사용하였다.

2) 藥材

본 實驗에 사용한 奪命散의 處方內容은 《東醫寶鑑》²⁾에 의거하였으며, 藥材는 圓光大學校 韓醫科大學 光州韓方病院에서 구입한 후 精選하여 사용하였고, 그 內容과 分量은 다음과 같다(Table 1).

2. 方法

1) 檢液調製

奪命散 5첩 분량인 120g에 증류수 1.2l 를 넣고 3시간 동안 끓인 다음 거즈로 濾過하고 3200 rpm으로 30분간

원심분리하여 상등액만을 취하였다. 상등액은 -70℃에서 Freeze Dryer로 凍結乾燥 시킨 후 18.5g의 檢液을 얻어 사용하였으며, 檢液은 細胞에 투여하기 전 0.22µm pore의 濾過紙로 濾過 멸균하여 농도를 조정한 다음 사용하였다.

2) 細胞培養

본 實驗에 사용한 心筋細胞는 생후 1-3일째의 Sprague-Dawley계통의 雌雄 白鼠 心臟에서 분리 배양하였다. 白鼠의 胸部를 正中線을 따라 절개한 후 心臟을 적출하고 心室만을 분리하여 잘게 잘라 직경 100mm 배양용 petri dish(Nunc)에서 phosphate buffered saline(PBS)으로 3회 세척한 후 4℃ 0.125% trypsin-0.1% collagenase 용액에서 하룻밤 방치하고, 다음날 37℃ 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 1×10⁵cells/well로 분주하였다. 분주한 心筋細胞는 37℃, 5% CO₂ 정온기(Bellco)에서 배양하였으며, 24시간 배양하여 心筋細胞가 24well plate 바닥에 완전히 부

착된 후 배양액을 교환하여 실험에 사용하였다. 배양 72시간이 경과하여 心筋細胞의 동시박동이 관찰되면 실험하였다.

3) Nitrite 농도 측정

心筋細胞와 血管 平滑筋細胞(A7r5)를 奪命散으로 24시간 처리한 후 다시 24시간동안 虛血狀態를 유지시킨 후, 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℃에서 1,500g의 속도로 15분간 원심분리를 한 후 세포성분들을 침전시키고 부유액만을 취하여 Griess reagent와 동량으로 혼합하여 실온에서 10분간 반응시키고 550nm의 파장으로 흡수도를 측정하였다.

4) MTT 정량

대조군과 실험군들을 각각 8개의 well을 한 군으로 하였으며, MTT[3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, Sigma]정량은 Mosmann³⁾의 방법에 따랐다. 즉 心筋細胞를 배양한 후 상층액을 버리고 사용 당일 제조한 500µg/ml MTT를 배양용기당 10%로 만들어 은박지로 포장한 후 3시간 동안 37℃, 5% CO₂로 유지된 정온기 내에서 배양하였다. 배양 완료 후 細胞內의 formazan을 용해시키기 위하여 상층액을 버리고 dimethyl sulfoxide (DMSO, Merck)를 배양용기당 1ml(24 well), 100µl(96 well)씩 넣고 15분간 실온에서 방치한 후 흡광광도계로 540nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

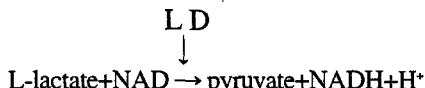
5) Lactate dehydrogenase(LDH) 활성도 측정

대조군과 실험군들을 각각 8개의

Table 1. Prescription of Talmyung-san

韓物名	Drug name	用量(g)
天南星	Stem of Rhizoma Arisaematis	4.00
子	Seed of Semen Lepidii	4.00
白芷	Root of Radix Angelicae Dahuricae	4.00
半夏	Stem of Tuber Pinelliae	4.00
巴豆(去油)	Extracted Oil Seed of Semen Tigllii	4.00
生薑	Root of Rhizoma Zingiberis	4.00
總量		24.00

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



lactate dehydrogenase 활성도는 340nm에서 NADH양을 측정함으로써 간접적인 방법으로 구하였다.

6) 心筋細胞 박동수 조사

대조군과 실험군들을 각각 8개의 well을 한 군으로 하여 72시간 배양한 후 전체 心筋細胞가 규칙적으로 박동하는 것을 확인한 다음, 온도와 CO₂농도가 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.

7) 細胞의 形態學的 觀察

細胞의 形態學的 變化를 조사하기 위하여 배양중인 배양용기(well plate)를 도립위상차 현미경(Nikon)에서 관찰하였고, 필요시 부착된 사진기를 사용하여 촬영하였다.

8) 統計處理

실험결과의 통계처리는 Anova test에 준하였고, P-value가 0.05이하일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

III. 實驗成績

1. 心筋細胞에 대한 奪命散의 毒性 檢定

心筋細胞에 대한 奪命散의 毒性檢定

을 하고자 배양중인 心筋細胞에 奪命散의 농도가 5mg/ml에서 40mg/ml까지 농도별로 처리한 결과 奪命散은 5mg/ml에서 40mg/ml까지의 실험 전 농도에서 心筋細胞의 生存率에는 전혀 손상을 주지 않았다(Fig. 1 A). 그리고, LDH release를 관찰하여 心筋細胞의 세포막 손상을 측정된 결과 奪命散 5mg/ml, 10mg/ml, 20mg/ml, 40 mg/ml 각각의 농도에서 대조군과 유의한 차이를 보이지 않아, 奪命散 자체로는 세포막 손상을 야기하지 않음을 알 수 있었다(Fig. 1 B).

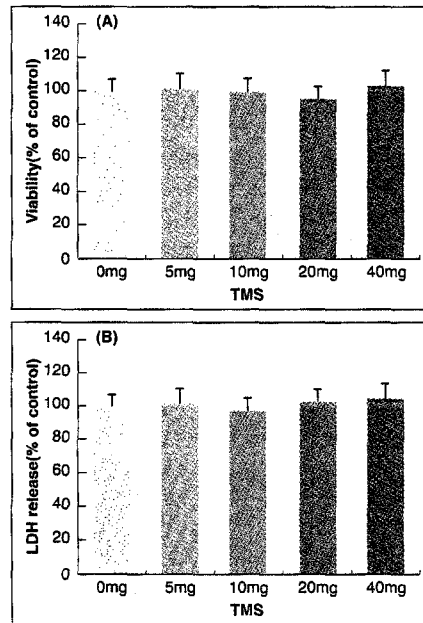


Fig 1. Effect of the water extract of TMS on viability of neonatal myocardial cells. The cells were treated with various concentrations of the extract up to 40 mg/ml for 72h. The cell viability was measured by MTT assay(A) and LDH release from cell into media(B) as described in Materials and Methods. Results were expressed the mean and standard deviation (SD) of three independent experiments. The data were comparison with control group.

2. 心筋細胞에서 奪命散의 NO 생성

心筋細胞에서 奪命散의 NO 생성량을 측정된 결과, 奪命散 1mg/ml, 5mg/ml, 10 mg/ml까지는 奪命散에 농도 의존적으로 NO 생성이 증가하였다(Fig. 2 A). 이러한 奪命散의 NO 생성 효과가 세균의 오염에 의한 것인지를 확인하기 위하여 대식세포주인 Raw세포에 LPS와 interferon을 처리하였다. Interferon을 세포에 단독으로 처리하였을 때 NO 생성량 3.8 μ M에 비하여 LPS와 interferon을 처리한 경우 12 μ M로 nitrite의 생성이 현저히 증가하였으나, interferon과

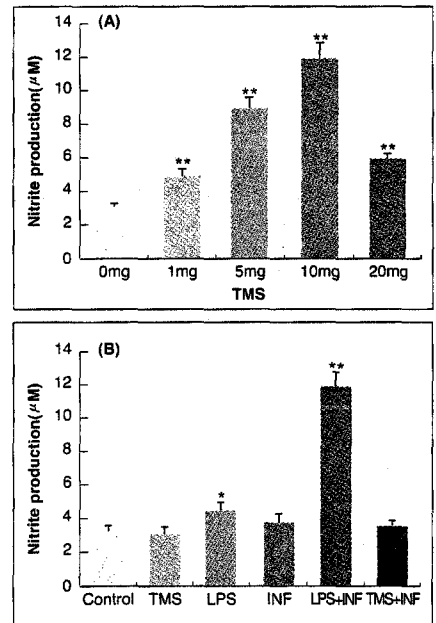


Fig 2. The generation of NO in neonatal myocardial cells with or without various concentrations of TMS(A). To investigate bacterial contamination of TMS, raw cell was cultured with LPS combined INF and TMS combined INF for 24h (B). NO released was enzymatically measured by using Griess reagent. The values are the mean \pm SE (standard error). The data were comparison with control group. * P < 0.05, ** P < 0.01

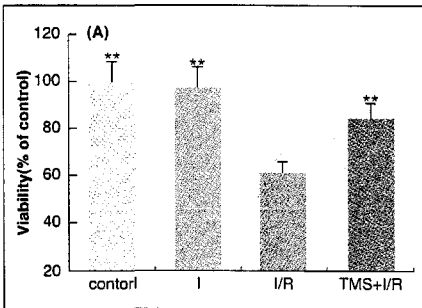


Fig 3 A. Effect of the water extract of TMS on MTT assay of rat neonatal myocardial cells after ischemia/reperfusion. The cells were cultured with or without the extract in humidified mixture of 95% N₂-5% CO₂ to provide ischemic condition for 24h, whereas control cultures were maintained in 5% CO₂ with humidified air at 37°C. Then, the cells were further cultured in 50% O₂-5% CO₂ with humidified air as a reperfusion for 3h at 37°C. MTT assay was measured as described in Materials and Methods(A). Results were expressed the mean and standard deviation (SD) of three independent experiments. The data were comparison with I/R group.(I : ischemia, I/R : ischemia/reperfusion) * P < 0.05, ** P < 0.01

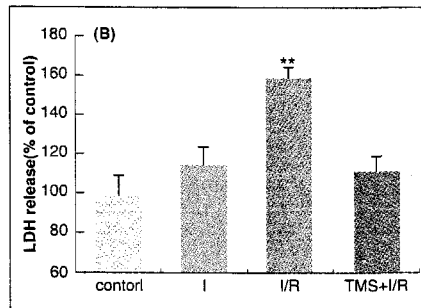


Fig 3 B. Effect of the water extract of TMS on LDH release into media of rat neonatal myocardial cells after ischemia/reperfusion. The cells were cultured with or without the extract in humidified mixture of 95% N₂-5% CO₂ to provide ischemic condition for 24h, whereas control cultures were maintained in 5% CO₂ with humidified air at 37°C. Then, the cells were further cultured in 50% O₂-5% CO₂ with humidified air as a reperfusion for 3h at 37°C. LDH release was measured as described in Materials and Methods(B). Results were expressed the mean and standard deviation (SD) of three independent experiments. The data were comparison with control group.(I : ischemia, I/R : ischemia/reperfusion) * P < 0.05, ** P < 0.01

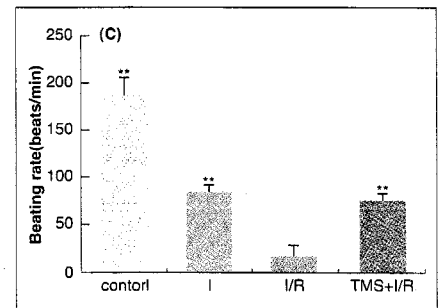


Fig 3 C. Effect of the water extract of TMS on beating rate of rat neonatal myocardial cells after ischemia/reperfusion. The cells were cultured with or without the extract in humidified mixture of 95% N₂-5% CO₂ to provide ischemic condition for 24h, whereas control cultures were maintained in 5% CO₂ with humidified air at 37°C. Then, the cells were further cultured in 50% O₂-5% CO₂ with humidified air as a reperfusion for 3h at 37°C. Beating rate was measured by counting beating number per min(C). Results were expressed the mean and standard deviation(SD) of three independent experiments. The data were comparison with I/R group. (I : ischemia, I/R : ischemia/reperfusion) * P < 0.05, ** P < 0.01

奪命散을 처리하였을 때는 interferon 단독 처리군에 비하여 nitrite 생성량에 큰 변화가 나타나지 않았다(Fig. 2 B).

3. 奪命散의 虛血後 再貫流 毒性에 대한 防禦效果

1) 미토콘드리아내의 succinic dehydrogenase 의 활성측정

배양중인 心筋細胞를 95% 질소와 5% 이산화탄소로 24시간 무산소 처리후 50% 산소와 5% 이산화탄소의 혼합가스

로 충분히 포화시킨 배양액으로 37°C에서 3시간 동안 再貫流하면 대조군에 비하여 succinic dehydrogenase의 활성이 62%로 감소하였지만 奪命散을 10 mg/ml 처리한 후 무산소, 再貫流를 하면 succinic dehydrogenase의 활성이 대조군의 85%로 succinic dehydrogenase의 활성이 많이 남아 있었다(Fig. 3 A).

2) LDH 분비 측정

배양중인 心筋細胞에서 虛血後 再貫流에 의한 막독성에 대한 奪命散의 효과

를 규명하기 위하여 LDH 분비량을 측정한 결과, 虛血後 再貫流시 心筋細胞의 LDH 분비량은 대조군에 비하여 158%로 증가하였으나, 奪命散을 10mg/ml 처리한 후 再貫流를 하였을 경우 LDH 분비량은 대조군에 비하여 112%밖에 증가하지 않아 奪命散은 虛血後 再貫流에 의한 心筋細胞의 막독성 또한 많이 감소시킴을 알 수 있었다(Fig. 3 B).

3) 세포박동수 조사

虛血後 再貫流시 心筋細胞의 박동수를

측정하여 奪命散의 心筋細胞의 기능에 대한 보호효과를 조사하였는데, 대조군의 心筋細胞가 1분에 190회 정도 박동을 하는데 비하여 再貫流後 細胞의 박동수는 1분에 28회로 박동수가 크게 줄어들었을 뿐만 아니라 박동 또한 매우 불규칙하였다. 그러나 奪命散을 10mg/ml 처리한 후 再貫流를 실시한 경우 心筋細胞의 박동수는 83회로 나타났고 박동 또한 매우 규칙적이었다(Fig. 3 C).

4) 細胞의 形態學的 觀察

細胞의 形態學的 變化를 관찰하기 위해 대조군(Fig. 4 A)과 虛血後 再貫流를 한 군, 그리고 奪命散을 10mg/ml 처리한 후 再貫流를 실시한 군으로 나누어 광학현미경으로 形態學的인 觀察을 실시하였다.

虛血後 再貫流를 실시한 군은 대조군에 비하여 心筋細胞의 돌기가 많이 축소되었으며 살아있는 細胞의 數도 많이 감소되었다. (Fig. 4 B). 그러나 奪命散을 10mg/ml 처리한 후 再貫流를 실시한 군에서는 정상대조군과 큰 차이를 나타내지 않았다(Fig. 4 C).

4. 虛血後 再貫流시 心筋細胞損傷에 대한 奪命散의 防禦機轉

虛血後 再貫流시 心筋細胞 損傷에 대한 奪命散의 보호효과가 虛血시 NO 생성에 의한 것인지를 알아보기 위하여 NO donor인 Sodium nitroprusside (SNP)를 저농도 처리하였다. 우선 Ischemia/reperfusion 군(I/R), SNP를 저농도 처리하고 ischemia/reperfusion 군(SNP+I/R), 奪命散 처리후 ischemia/reperfusion 군(TMS+I/R), 奪命散과 NGMMA 처리후 ischemia/reperfusion 군(TMS+NGMMA +I/R)으로 나누어 각각의 양상을 비교한 결과, 정상대조군의 心筋細胞 生存率을 1로 하였을 경우

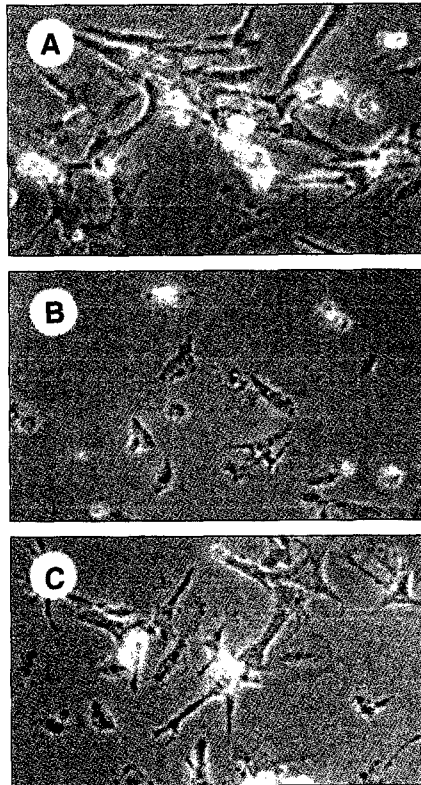


Fig 4. Effects of the water extract of TMS on the morphological changes of rat neonatal myocardial cells after ischemia/reperfusion. The cells were cultured with(C) or without(B) the extract in humidified mixture of 95% N₂-5% CO₂ as an ischemia injury for 24h, whereas control cultures(A) were maintained in 5% CO₂ with humidified air at 37°C. Then the cells were further cultured in 50% O₂-5% CO₂ with humidified air as a reperfusion for 3h at 37°C. The morphological changes were observed in light microscope (200 X).

ischemia/reperfusion군은 細胞生存率이 59.3%를 보인 반면, SNP+I/R군은 92.1%로 細胞生存率이 증가하였고, TMS+I/R군 역시 SNP+I/R군보다는 못하지만 I/R군에 비하여 높은 증가를 보였다. 또한 이러한 증가는 NOS 활성

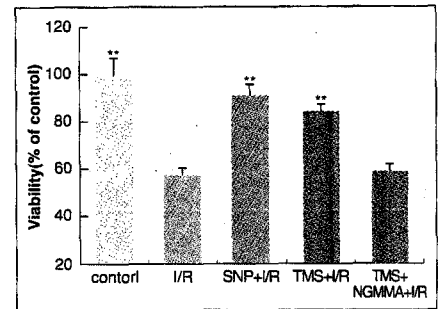


Fig 5. Effects of endogenous and exogenous NO on the viability of rat neonatal myocardial cells after ischemia /reperfusion. The cells were treated with SNP(100µ M), TMS and NGMMA in ischemia. Then the cells were further cultured in 50% O₂-5% CO₂ with humidified air as a reperfusion for 3h at 37°C. The cell viability was measured by MTT assay as described in Materials and Methods. Results were expressed the mean and standard deviation (SD) of three independent experiments. The data were comparison with I/R group. * P < 0.05, ** P < 0.01

억제제인 NGMMA 처리후 奪命散의 效果를 觀察한 TMS+NGMMA+I/R 군은 I/R 군과 매우 유사한 결과를 나타내어 奪命散의 心筋細胞의 보호효과는 NO의 생성과 깊은 관련이 있다고 추정된다(Fig. 5).

5. 血管 平滑筋細胞(A7r5)에 대한 奪命散의 毒性檢定

血管 平滑筋細胞(A7r5)에 대한 奪命散이 미치는 細胞毒性作用의 여부를 알아보기 위하여, 奪命散 5mg/ml, 10mg/ml, 20 mg/ml, 40mg/ml을 각각 농도별로 처리한 후 細胞生存率을 측정하였다. 奪命散을 처리한 각각의 전농도에서 정상대조군과 비교하여 유의한 차이를 보이지 않았으며, 實驗 최고 농도인 40mg/ml에서도 血管 平滑筋細胞의 細胞生存率에는 影響을 미치지 않았다(Fig. 6).

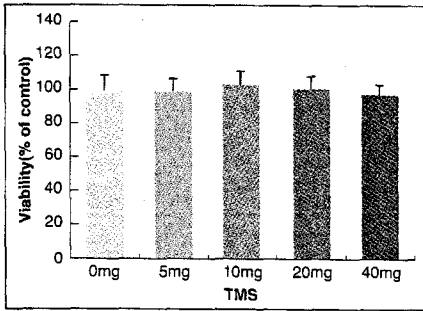


Fig 6. Effect of the water extract of TMS on viability of A7r5 cells. The cells were treated with various concentrations of the extract up to 40mg/ml for 72h. The cell viability was measured by MTT assay(A) as described in Materials and Methods. Results were expressed the mean and standard deviation (SD) of three independent experiments.

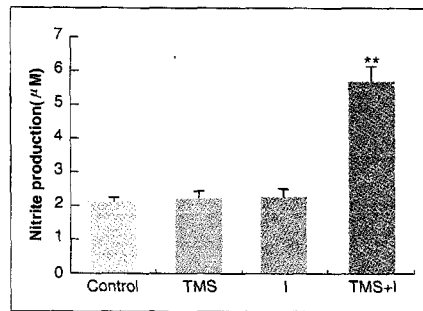


Fig 7. The generation of NO in A7r5 cells with or without TMS in ischemia. The cells were cultured with (C) or without (B) the extract in humidified mixture of 95% N₂-5% CO₂ as an ischemia injury for 24h. NO released was enzymatically measured by using Griess reagent. The values are the mean±SE (standard error). The data were comparison with control group.
* P < 0.05, ** P < 0.01

6. 虛血시 血管 平滑筋細胞(A7r5)에서 NO 生成에 대한 奪命散의 效果

血管 平滑筋細胞(A7r5)에서 虛血시 奪命散 단독처리군과 虛血을 만든 경우에서의 NO 生成 與否를 조사하였다. 血管 平滑筋細胞(A7r5)에 奪命散을 단독으로 처리하거나 虛血만을 준 경우에 NO의 生成은 대조군에 비하여 거의 변화가 없었다. 虛血시 NO의 生成량은 2.25 μM에 비하여 虛血시 奪命散을 處理한 경우에는 NO의 生成량이 5.6 μM로 현저히 증가하여 奪命散이 血管 平滑筋細胞에서 虛血시 Nitrite를 生成함을 알 수 있었다(Fig. 7).

IV. 考 察

虛血性 心臟疾患은 고지혈증, 고혈압, 당뇨병, 운동부족, 비만, 노화 등으로 發生하는 粥狀動脈硬化症이나 動脈炎, 狹

窄, 攣縮, 血栓, 塞栓 등 주로 閉塞性 病變으로 인하여 發生된다^{6-8, 10, 12}.

粥狀動脈硬化는 血管內膜에 cholesterol이 침착하여 內皮細胞(endothelium)가 損傷되며, 損傷된 內皮細胞의 表面에 단핵구와 T-림파구가 접착되고, 혈소판이 內膜에 부착되어 內膜의 하부에 섬유화가 發生하여 粥腫(Atheroma)이 형성되어 血管내 血液의 흐름을 방해하게 되며, 이로 인해 혈소판 침착이 더욱 심해져 血管내에 血栓이 發生하는 것으로^{3, 12}, 心筋細胞에 산소와 에너지원의 공급이 부족해지고, 心筋虛血로 一過性的 痛症을 호소하거나 心筋의 壞死나 梗塞으로 진행된다^{9, 16, 44}.

心臟은 好氣性 器官이므로 冠狀動脈硬化, 血栓症, 攣縮 등으로 인하여 心筋에 공급되는 혈류가 차단될 경우 心筋細胞는 虛血狀態에 빠지게 된다고 한다¹⁹. 虛血狀態의 心筋細胞는 20분 이내에 壞死가 일어나기 시작하고 虛血狀態가 3

시간 정도 계속되면 心筋細胞 대부분에서 心筋梗塞이 일어나 心筋損傷은 비가역적 상태가 되므로 임상적으로 빠른 시간안에 冠狀血流을 재개시켜주어야 한다²⁰.

虛血로 인한 心筋細胞 損傷은 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 있으며, 회복여부는 虛血의 정도나 虛血狀態의 지속기간에 따라 영향을 받게 된다^{6, 7, 9, 10, 12, 16}. 損傷된 心筋의 기능이 원래의 상태로 회복될 수 있는 지속기간을 벗어나면 정상 혈류를 다시 心筋으로 보내어도 心筋損傷이 회복되기 보다는 오히려 더욱 惡化되고 기능이 마비되어 임상적으로 부정맥, 심실세동, 심정지, 心筋細胞의 사망을 초래하게 되는 '再貫流損傷(reperfusion injury)' '산소재공급 손상(oxygen paradox)을 일으키게 된다^{19, 20, 27-29}. 이러한 再貫流 損傷을 發生시키는 중요한 因子는 세포내 Ca²⁺축적, ATP와 creatine phosphate의 고갈, 내인성 catecholamine의 유리, 산소자유기 등이 있으며, 특히 산소자유기중 하나인 NO가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다³⁰⁻³⁷.

최근의 연구보고에 따르면 NO는 細胞의 apoptosis를 억제하고²¹, 순환기계와 중추신경계의 平滑筋弛緩이나 血小板凝集力에 영향을 미쳐 細胞損傷을 방지하고, 血小板이나 白血球의 흡착을 방지하며, 血管內皮의 투과성을 유지시킨다고 하였으며, 心筋細胞뿐만 아니라 血管의 平滑筋細胞에서 guanylate cyclase를 활성화시켜서 血管弛緩效果를 나타낸다고 하였다^{11, 20}.

이러한 NO를 再貫流 전 虛血狀態에서 處理하면 細胞機能을 保護하고 細胞損傷을 줄이게 된다고 밝혀져있다^{11,16,20,45-47}.

NO 전처리에 의한 細胞損傷 防禦機轉은 guanylate cyclase를 활성화시켜 세포내 c-GMP를 높여 冠狀動脈을 확장시키고, 血液의 흐름을 원활히 해주며, 血管擴張에 의한 低血壓를 유도하여 心筋細胞의 산소요구량을 줄임으로써 心筋細胞의 再貫流 損傷을 防禦한다고 한다^{11,48}.

虛血性心臟疾患은 韓醫學의 病證으로는 胸痺, 胸痛, 厥心痛, 卒心痛, 眞心痛의 範疇에 속하며 痰飲, 寒邪內侵, 情志失調, 飲食不當, 年老體虛 혹은 過勞 등이 原因이 된다^{3,14}.

痰飲은 肺·脾·腎·膀胱 등의 臟腑機能이 失調되어 津液의 代謝와 輸布, 排泄에 障礙가 發生하여 水液이 體內에 停留, 蓄積되어 發生하거나, 三焦氣化作用의 異常, 寒·濕·火熱 등 外邪의 侵入으로 인하여 發生하는 것으로^{14,25}, 心血管系 및 腦에 미치는 疾病으로는 高血壓性腦證, 腦卒中, 熱性痙攣, 腦軟化證, 癲癇 등에서 보이며, 冠狀動脈不全, 狹心症, 心筋梗塞 등도 관련이 있다^{14,24,26}.

奪命散은 風痰壅盛으로 인한 卒中風의 閉證 및 大小便閉, 神昏 등에 사용된 處方으로 構成藥物別 效能과 藥理作用을 살펴보면, 天南星, 白芷, 半夏는 燥濕化痰祛風의 效能과 鎮靜, 鎮痛 및 中추 신경계 흥분의 作用이 있고^{4,5,13,17,18}, 子是 瀉肺定喘, 行水消腫하며 強心, 心收縮 增強, 心律調節의 作用이 있으며, 巴豆는 瀉下祛積 逐水退腫하며 항균, 진통의 作用이 있고, 生薑은 發汗解表 溫中止嘔하며 혈관운동중추흥분, 호흡중추흥분, 혈액순환촉진의 作用^{4,5,13}이 있는 것으로 보아 奪命散은 逐水, 消腫, 散結, 燥濕, 化痰의 效能으로 痰飲과 水濕

을 除去하는 處方임을 알 수 있다.

이에 著者は 奪命散이 心筋細胞 및 血管平滑筋細胞의 損傷 防禦效果를 알아보기 위하여, 培養心筋細胞에 虛血狀態를 유발한 다음 奪命散을 투여한 후, Nitrite농도측정, MTT 정량, LDH활성도측정, 心筋細胞박동수 變化, 세포형태학적 變化를 觀察하였으며, 血管平滑筋細胞에서 NO 生成效果를 觀察하였다.

心筋細胞에 대한 奪命散의 毒性檢定에 있어서 奪命散을 5mg/ml에서 40mg/ml까지 處理시 心筋細胞의 生存率에 전혀 損傷을 주지 않았으며(Fig. 1 A), 세포막 손상을 측정하기 위해 LDH release를 觀察하였으나 정상대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 1 B).

奪命散의 心筋細胞에서 NO 生成效果에 있어서 奪命散 1mg/ml, 5mg/ml, 10mg/ml 투여군에서 유의성 있는 결과를 나타냈고(Fig. 2 A), 이러한 NO 생성이 세균의 오염에 의한 것인지를 확인하기 위하여 대식세포주인 Raw세포에 interferon을 단독 처리하였을 때에 비하여 LPS와 interferon을 동시 처리하였을 때는 nitrite의 생성이 현저히 증가하였으나, 奪命散과 interferon을 동시 처리하였을 때는 정상대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 2 B).

細胞의 生存率을 관찰하기 위하여 미토콘드리아내의 succinic dehydrogenase의 활성과 LDH의 분비를 측정된 결과 虛血시 奪命散을 투여하고 再貫流를 한 군은 奪命散을 투여하지 않고 虛血後 再貫流를 한 군에 비해서 損傷을 적게 받았다(Fig. 3 A, B).

이런 양상은 虛血시 NO를 투여하고 再貫流를 주었을 때의 양상과 일치하였으며(Fig. 5), In vivo model에서 虛血시 NO를 再貫流전에 전처리하면 細胞

의 損傷을 줄일 수 있고, 虛血시 NO의 生成을 감소시키면 再貫流시 細胞의 損傷을 막을 수 없다는 기존의 보고와도 일치하였다³⁶⁻⁴³.

기능적인 면을 조사하기 위하여 心筋細胞의 박동을 측정된 결과에서도 虛血시 奪命散을 투여하지 않고 再貫流를 한 군은 분당 세포의 박동수가 28회로 대조군 190회에 크게 떨어질뿐만 아니라 세포의 박동이 매우 불규칙하였다. 그러나 奪命散을 處理한 후 再貫流를 한 군은 분당 細胞의 박동수가 83회였으며, 박동도 매우 규칙적이었다(Fig. 3 C). 이러한 결과는 Vegh 등이 虛血시 iNOS의 발현을 증가시킨 후, 再貫流하였을 때 antiarrhythmic effect를 觀察하였다는 보고와도 일치하였다⁴⁴. 따라서 虛血시 奪命散을 투여하면 再貫流시 일어나는 細胞의 損傷을 NO의 생성을 통해서 막을 수 있을 뿐만 아니라 細胞의 機能을 유지하는데 크게 도움이 되리라고 思料된다.

細胞의 形態學的 變化를 觀察한 결과, 奪命散을 투여하지 않고 虛血後 再貫流를 시행한 군을 광학현미경하에서 관찰하면 細胞의 들기의 발달이 대조군에 비해서 크게 감소되고 細胞의 數도 감소되었다. 그러나 奪命散을 處理한 후 再貫流를 한 군은 대조군과 차이가 없었다(Fig. 4).

따라서 本 實驗에서 虛血시 奪命散에 의한 心筋細胞의 保護作用이 NO의 生成이 增加하여 나타나는지를 확인하기 위하여 NO donor인 SNP와 NOS 활성 억제제인 NGMMA를 處理하고 細胞生存率을 觀察하여 본 결과, SNP와 奪命散을 處理한 후 再貫流를 한 군은 정상대조군과 큰 차이를 보이지 않았으며, 奪命散과 NGMMA를 處理한 후 再貫流를 한 군은 奪命散 處理後 再貫

류를 한 군에 비해 현저히 감소되었다. 이러한 결과로 보아 虛血後 再貫流시 奪命散에 의한 細胞保護 效果는 NO의 生成과 매우 밀접한 관계가 있다고 思料된다.

또한 奪命散이 血管 平滑筋細胞에 미치는 效果를 알아보고자, 血管 平滑筋細胞에 대한 奪命散의 毒性檢定을 하기 위해 奪命散 5mg/ml에서 40mg/ml까지 處理해 본 결과, 實驗 전농도에서 血管 平滑筋細胞의 生存率에는 影響을 주지 않았다(Fig. 6)

虛血시 血管 平滑筋細胞에서 NO 生成 效果를 알아본 결과, 奪命散은 虛血시 血管 平滑筋細胞에서 정상대조군에 비해 NO의 生成을 현저히 증가시켰다.

以上の 결과로 보아 虛血시 心筋細胞 및 血管平滑筋細胞에서의 NO 生成의 增加는 冠狀動脈 및 末梢血管의 확장을 유도해 再貫流시 心筋細胞의 損傷을 줄이고 血壓을 떨어뜨려서 心筋細胞의 산소요구량을 역시 떨어뜨림으로써 心筋細胞의 損傷을 막을 수 있다고 思料된다.

그러나 以上の 結果들은 細胞培養 모델에서의 결과들이기 때문에 앞으로 더 많은 보조적인 實驗들이 進行되어야 한다고 思料되나, 本 實驗의 結果를 통해 奪命散이 虛血性心臟疾患 治療에 尤의한 作用을 할 수 있을 것이라고 思料된다.

V. 結 論

心筋細胞와 血管平滑筋細胞에서 虛血後 再貫流損傷에 대한 奪命散의 防禦작용을 알아보기 위하여 新生 白鼠의 心筋細胞와 大動脈 平滑筋細胞柱를 이용하여 培養心筋細胞에 虛血狀態를 유발한 다음 NO 농도측정, MTT 정량, LDH 활성도측정, 心筋細胞 박동수 측

정 및 細胞의 形態學的 觀察을 하였으며, 血管平滑筋細胞에 虛血狀態를 유발한 다음 NO 농도를 측정하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

1) 奪命散은 40mg/ml에서도 心筋細胞의 생존률과 細胞膜 損傷에 影響을 주지 않았다.

2) 奪命散은 1mg/ml에서 10mg/ml까지 농도의존적으로 NO 生成을 增加시켰다.

3) 奪命散은 虛血後 再貫流시 미토콘드리아의 독성, 心筋細胞 박동수 감소, 細胞 돌기의 수축 및 細胞의 수적 감소를 억제시켰다.

4) 虛血시 SNP를 前處理 한 후 再貫流를 실시한 경우와, 奪命散 處理후 再貫流를 실시한 경우의 心筋細胞 生存率은 유사하게 증가되었으나, NGMMA를 前處理한 경우에서 奪命散은 細胞損傷에 대한 防禦作用을 나타내지 못하였다.

5) 奪命散은 血管 平滑筋細胞에서 생존률에는 影響을 주지 않았으나, 虛血시 NO 생성은 유의성 있게 증가시켰다.

以上の 結果로 보아 奪命散은 虛血시 心筋細胞와 血管 平滑筋細胞에서 NO의 生成을 增加시켜 細胞를 保護하고 再貫流시 發生하는 細胞損傷을 防止하는 作用이 있으므로 虛血性心臟疾患 등의 治療에 尤효하게 活用될 수 있을 것으로 思料된다.

VI. 參考文獻

1. 吳謙. 醫宗金鑑(中). 서울 : 大星文化社 : 1991, p.339,341
2. 許浚. 東醫寶鑑. 서울 : 南山堂 : 1991. p.362
3. 全國韓醫科大學心系內科學教室. 心系內科學. 서울 : 書苑堂 : 1999, p.215-226
4. 顏正華. 中藥學. 北京 : 人民衛生出版社 : 1991, p.68-71,77-79,258-260,593-599,642-643

5. 辛民教. 臨床本草學. 서울 : 南山堂 : 1986, p.254-256,488-490,506-508,556-558,624-627
6. 해리슨 번역 편찬위원회. HARRISON'S 내과학. 서울 : 도서출판 정담 : 1997, p.1157-1165
7. 강병철. 오늘의 진단 및 치료. 서울 : 도서출판 한우리 : 1999, p.401-432
8. Forbes : Jackson. Color Atlas 임상의학. 서울 : 도서출판 한우리 : 1998, p.228-236
9. 서울대학교의과대학. 심장학. 서울 : 서울대학교출판부 : 1994, p.247-257
10. 醫學教育研修院. 家庭醫學. 서울 : 서울대학교출판부 : 1996, p.300-319
11. Bertram G. Katzung. Katzung's 임상약리학. 서울 : 도서출판 한우리 : 1998, p.363-369
- 12.李文鎬. 內科學(下). 서울 : 학림사 : 1986, p.1450-1471
13. 申佶求. 申氏本草學. 서울 : 壽文社 : 1979, p.242-245,271-275,416-419,427-431
14. 金完熙, 崔達永. 臟腑辨證論治. 서울 : 成輔社 : 1990, p.71,170,175,178,191
15. 申善濬. 生脈散이 實驗動物의 心筋細胞에 미치는 影響. 圓光大學校大學院. 1998
16. 李來春. 炙甘草湯이 培養心筋細胞에 미치는 影響. 圓光大學校大學院. 1998
17. 朴炯植. 天南星의 修治方法에 따른 細胞毒性 研究. 大田大學校大學院. 1993
18. 李秀禧. 半夏의 修治方法에 따른 細胞毒性 研究. 大田大學校大學院. 1993
19. 김대중. 허혈성 전처치의 심장보호 효과에 관한 연구: adenosine, protein kinase C 그리고 ATP 의존성 potassium channel의 역할. 중앙대학교대학원. 1996
20. 김현. 허혈성 전처치에 의한 심장보호 효과에 관한 연구. 중앙대학교대학원. 1996
21. 박현철. Nitric Oxide와 Peroxynitrite가 Murine Bladder Tumor-2 세포주의 고사에 미치는 영향. 圓光大學校大學院. 1996
22. 全熙浚. 三生飲이 實驗動物의 心血管系 및 血流障礙改善에 미치는 效果. 大韓韓醫學會誌. 1997 ; 18(1) : 267-277
23. 이원철. 赤何首烏가 高Cholesterol食餌에 의하여 誘發된 家兔 冠狀動脈의 粥狀硬化에 미치는 影響. 大韓韓醫學會誌. 1995 ; 16(1) : 425-434
24. 孫成熙. 導痰湯이 高脂血症 實驗動物에 미치는 效果. 東義大學校大學院. 1994
25. 金鍾和. 桂朮甘湯 煎湯液이 心臟 및 腎

- 臟의 機能에 미치는 影響. 圓光大學校大學院. 1990
26. 李承幸. 四君子湯 二陳湯 및 六君子湯이 高脂血症에 미치는 影響. 圓光大學校大學院. 1992
 27. Hearse DJ, Humphrey SM, Chain EB. Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat heart : a study of myocardial enzyme release. *J Mol Cell Cardiol* 1973 ; 5 : 395-407
 28. Burton KP, McCord JM, Ghai G. Myocardial alteration due to free radical generation. *Heart Circ Physiol* 1984 ; 15 : H776-H783
 29. Siegmund B, Klietz T, Schwartz P, Piper HM. Temporary contractile blockade prevents hypercontracture in anoxic -reoxygenated cardiomyocytes. *Heart Circ Physiol* 1991 ; 29 : H426-H435
 30. Wildenthal K. Lysosomal alterations in ischemic myocardium : results or causes of myocardial damage. *J Mol Cell Cardiol* 1978 ; 10 : 595-603
 31. Katz AM, Reuter H. Cellular calcium and cardiac cell death. *Am J Cardiol* 1979 ; 44 : 188-190
 32. Jennings RB, Reimer KA. Lethal myocardial ischemic injury. *AM J Pathol* 1981 ; 102 : 241-255
 33. Jennings RB, Reimer KA, Hill ML, Mayer SE. Total ischemia in dog hearts in vitro I. Comparison of high energy phosphate production, utilization, and depletion, and of adenine nucleotide catabolism in total ischemia in vitro VS severe ischemia in vivo. *Cir Res* 1981 ; 49 : 892-900
 34. Nayler WG. The role of calcium in the ischemic myocardium. *Am J Pathol* 1981 ; 102 : 262-270
 35. Goldhaber JI, Weiss JN. Oxygen free radicals and cardiac reperfusion abnormalities. *Hypertension* 1992 ; 20 : 118-127
 36. Bolli R, Bhatti ZA, Tang X-L, Qiu Y, Zhang Q, Guo Y, et al. Evidence that late preconditioning against myocardial stunning in conscious rabbits is triggered by the generation of nitric oxide. *Circ Res* 1997 ; 81 : 42-52
 37. Takano H, Tang XL, Qiu Y, Guo Y, French BA, Bolli R. Nitric oxide donors induce late preconditioning against myocardial stunning and infarction in conscious rabbits via an antioxidant-sensitive mechanism. *Circ Res* 1998 ; 83 : 73-84
 38. Yin DP, Sankary HN, Chong AS, Ma LL, Shen J, Foster P, et al. Protective effect of ischemic preconditioning on liver preservation-reperfusion injury in rats. *Transplantation* 1998 ; 66 : 152-157
 39. Takano H, Manchikalapudi S, Tang XL, Qiu Y, Rizvi A, Jadoon AK, et al. Nitric oxide synthase is the mediator of late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits. *Circulation* 1998 ; 98 : 441-449
 40. Thanos T, Maniatis T. NF-kB : a lesson in family values. *Cell* 1995 ; 80 : 529-532
 41. Zhao L, Weber PA, Smith JR, Comerford ML, Elliott GT. Role of inducible nitric oxide synthase in pharmacological preconditioning with monophosphoryl lipid A. *J Mol Cell Cardiol* 1997 ; 29 : 1567-1576
 42. Vegh A, Papp JG, Parratt JR. Prevention by dexamethasone of the marked antiarrhythmic effects of preconditioning induced 20h after rapid cardiac pacing. *Br J Pharmacol* 1994 ; 113 : 1081-1082
 43. Lander HM, Sehajpal P, Levine DM, Novogrodsky A. Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nitric oxide generating compounds. *J Immunol* 1993 ; 150 : 1509-1516
 44. 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 : 268-277
 45. Baxter GF, Goma FM, Yellon DM. Involvement of protein kinase C in the delayer cyprotection following sublethal ischemia in rabbit myocardium. *Br J Pharmacol* 1995 ; 115 : 222-224.
 46. Takano H, Manchikalapudi S, Tang X-L, Qiu Y, Rizvi A, Jadoon AK, et al. Nitric oxide synthase is the mediator of late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits. *Circulation* 1998 ; 98 : 441-449
 47. Bolli R. The early and late phases of preconditioning against myocardial stunning and the essential role of oxyradicals in the late phase : an overview. *Basic Res Cardiol* 1996 ; 91 : 57-63
 48. Nonami Y. The role of nitric oxide in cardiac ischemia-reperfusion injury. *Jpn Circ J* 1997 ; 61(2) : 119-132
 49. Mosman T. Rapid for cellular growth and survival, application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immune Meth* 1983 ; 65 : 55-63