

# 瓜蒌薤白半夏湯 추출물이 배양 심근세포의 박동수와 LDH 활성도에 미치는 영향

안효창 · 권강범 · 박은영 · 장승호 · 류도곤\*

원광대학교 한의과대학 생리학교실

## Effects of Guaruhaebaekbanha-tang Extract on Beating Rate and LDH Activity in Cultured Rat Myocardial Cells

Hyo Chang An, Kang Beom Kwon, Eun Young Park, Seung Ho Jang, Do Gon Ryu\*

Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

To certify the protective effect of herbal medicine against oxygen free radical-induced myocardiotoxicity, cytotoxicity was measured using MTT, LDH activity and Beating rate assay in the presence of Guaruhaebaekbanha-tang(GHBT) extracts or single constituents of this prescription. Myocardial toxicity was evaluated in neonatal rat myocardiocytes in cultures. In the present study, xanthine oxidase/hypoxanthine(XO/HX) resulted in a decrease in cell viability, increases in LDH activity in culture medium and decreases in beating rate in cultured myocardial cells. In the effect of GHBT extract, it showed the prevention from the XO/HX-induced cardiotoxicity by the increases of cell viability and beating rate as well as the decrease of LDH activity. In the protective effect of Fructus Trichosanthis(FT), Bulbus Allii Macrostemi(BAM) and Rhizoma Pinelliae(RP), all the extracts were significantly effective in the protection of XO/HX-induced cardiotoxicity in cultured myocardial cells by the increase of beating rate as well as the decrease of LDH activity. From these results, they show that XO/HX is cardiotoxic in cultured myocardial cells derived from neonatal rat, and it suggests that GHBT, FT, BAM, RP extracts are positively effective in the blocking in XO/HX-induced cardiotoxicity.

**Key words :** Guaruhaebaekbanha-tang(瓜蒌薤白半夏湯), Fructus Trichosanthis, Bulbus Allii Macrostemi, Rhizoma Pinelliae, xanthine oxidase/hypoxanthine, Myocardial cell, Cardiotoxicity.

### 서론

瓜蒌薤白半夏湯은 張仲景의 金匱要略에 「胸痺로 臥할 수 없고 心痛이 背部에 徹하는 者를 主治」한다고 記載<sup>1)</sup>된 이후 胸痛, 痰濁內阻로 인한 心陽虛, 心脈痺阻, 痰濁閉塞으로 인한 真心痛<sup>2-5)</sup> 등에 사용되어 왔다. 근래 임상에서 동맥경화증, 협심증, 심근경색, 갑상선기능항진성심장병, 감염성심장질환 등에 활용되고 있다<sup>6)</sup>고 알려져 있다. 본 처방의 구성은 性은 無<sup>7)</sup>과 性은 溫無毒味는 辛苦하여 滑利·散結·利竅하는 작용을 하는 薤白<sup>8)</sup> 및 性은 平無毒하고 味는 大辛하고 味苦하여 除濕·化痰·開鬱의 효능이 있는 半夏<sup>9)</sup>로 되어 있다. 심장질환의 원인의 하나인 심근세포의 손상이 산소자유기에 의하여 유발된다<sup>10)</sup>고 보고되어 있

으며, 산소자유기는 xanthine 혹은 hypoxanthine이 oxygen에 의해서 산화되는데 이 반응은 xanthine oxidase에 의해서 촉매되어 superoxide radical(O<sup>2-</sup>)과 hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)가 생성된다<sup>11,12)</sup>. 이렇게 생성된 산소자유기는 철(iron)과 반응하여 hydroxyl radical(OH)을 생성한다<sup>13,14)</sup>. Superoxide나 hydrogen peroxide와 같은 산소자유기는 정상적인 대사과정에서 사립체의 전자전달계에 의한 산화적인산화작용에 의하여 형성되며, 이는 superoxide dismutase(SOD)나 catalase에 의하여 물로 변환되어 소실되어진다. 그러나 저산소증이나 허혈 및 중풍과 같은 병적인 상태에서는 산소자유기가 비정상적으로 형성되어<sup>15)</sup>, 그 결과 세포막의 지질과산화반응을 촉진<sup>16)</sup>시킬 뿐만 아니라 protein kinase C(PKC)나 lipidphosphatase A2와 같은 이차전달자를 비롯하여 각종 효소나 단백질을 불활성시킴으로써 세포의 손상 및 조직의 과사를 초래한다<sup>17)</sup>고 한다. 최근의 연구보고에서 沒藥 추출물이 산소자유기에 의한 심박동수 감소와 Lactate dehydrogenase (LDH)의 누출증가를 차단하였다<sup>18)</sup>고 하였고 丹參飲과 그 구성약물의 추출

\* 교신저자 : 류도곤, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학

E-mail : tkryu@wonkwang.ac.kr, Tel : 063-850-6846

· 접수: 2002/01/30 · 수정: 2002/03/15 · 채택: 2002/03/27

물이 XO/HX에 의한 심박동수의 감소를 효과적으로 증가시켰다<sup>19)</sup>고 하였으며 薤白 추출물이 adriamycin에 의한 LDH의 누출증가와 심박동수의 감소를 방어하였다고 보고<sup>20)</sup>하였으나 본 처방에 대한 연구보고는 접할 수 없었다.

이에 저자는 瓜蒌薤白半夏湯과 그 구성약물인 瓜蒌實, 薤白, 半夏 등이 산소자유기로 손상된 배양 심근세포에 미치는 영향을 구명하기 위하여 본 실험을 시도하였다. 먼저 XO/HX의 심근세포 독성을 MTT 정량을 이용하여 관찰하였으며 瓜蒌薤白半夏湯과 그 구성약물을 전처리한 심근세포를 XO/HX에 노출시킨 후 심근세포 박동수 측정과 Lactate dehydrogenase (LDH) 활성도 측정을 통하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

동물은 Spragne Dawely 계통의 건강상태가 양호한 생후 3 일된 백서를 사용하였다.

### 2. 세포배양

심장조직에서 분리된 심근세포를 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>-free인 Hank's balanced salt solution(HBSS, Gibco)으로 3회 세척한 후 1,000rpm에서 20분간 원심시켰다. 심장조직을 0.05% trypsin으로 20분 동안 항온기에 넣은 다음 Pasteur pipette으로 3,4회 분쇄한후 800×g에서 10분간 원심시킨다. 원심된 세포를 Eagle's minimum essential medium(MEM, Gibco)에 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco)과 penicillin G(25 unit/ml)가 첨가된 혼합액에 부유시킨 다음 96-multiwell plate(Gibco)에 1×10<sup>6</sup>cell/well의 세포 밀도로 분주하였다. 분주된 세포는 3일 간격으로 새로운 배양액으로 교환하여 주었으며 산소자유기가 포함되지 않은 배양액을 대조군으로 하여 비교 조사하였다. 실험전 배양액을 버리고 세포를 PBS로 3-4회 세척하였으며 세포는 배양 7일 후 본 실험에 사용하였다.

### 3. 추출물의 제조

실험에 사용한 약재는 瓜蒌實 28g, 薤白 78.75g, 半夏 78.75g을 합한 瓜蒌薤白半夏湯(Guaruhaebaekbanhatang, GHBT) 202.5g과 개별 약재인 瓜蒌實(Fructus Trichosanthis, FT), 薤白(Bulbus Allii Macrostemi, BAM), 半夏(Rhizoma Pinelliae, RP) 각각 200g을 9배용의 청주와 함께 환저플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 3시간 동안 전열기로 전탕한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 회전 진공 농축기로 감압농축한 후 동결건조기에서 건조하여 각각 瓜蒌薤白半夏湯 38.2g, 瓜蒌實 15.82g, 薤白 15.41g, 半夏 18.2g의 분말 시료를 얻었다. 瓜蒌薤白半夏湯의 1점 분량은 Table 1과 같다.

Table 1. Prescription of Guaruhaebaekbanha-tang(GHBT)

韓藥名	生藥名	重量(g)
瓜蒌實	Fructus Trichosanthis	4.0
薤白	Bulbus Allii Macrostemi	11.25
半夏	Rhizoma Pinelliae	11.25
	總計	26.5

### 4. Xanthine oxidase(XO)/Hypoxanthine(HX)의 제조 및 처리

본 실험에 사용한 시약으로는 xanthine oxidase(XO, Sigma)와 hypoxanthine (HX, Sigma)으로 XO의 경우 100 mU/ml, 10 mU/ml, 1 mU/ml의 저장액을, HX의 경우 1 M, 100 mM, 10 mM의 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 후 실험 당일 적당한 양으로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다.

### 5. 추출물의 처리

실험에 사용한 각각의 검액을 여러 농도로 하여, 백서의 배양 심근세포를 XO/HX에 노출시키기 3시간 전에 각각 전처리한 다음 XO/HX에 노출시킨 후 이들 한약재가 XO/HX의 심근세포 독성에 미치는 효과를 조사하였다.

### 6. 세포독성 및 방어효과 검정

#### 1) MTT 정량

세포생존을 측정을 위한 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (Sigma) 정량<sup>21)</sup>은 XO/HX를 처리한 배양 심근세포를 PBS로 3회 세척한 다음, 전날 제조한 50 mg/ml의 MTT를 well당 최종농도로 희석하여 넣어 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 로 조절된 정온기에서 배양한 후 하였다. 배양 완료 후 dimethylsulfoxide (DMSO, Merck)를 처리한 다음 ELISA Reader (Molecular Device, USA)로 570nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

#### 2) Lactate dehydrogenase 활성도 측정

LDH 활성도의 측정은 최적화 된 LDH/LD procedure (Sigma)를 이용하여 하였으며 배양액의 일부를 사용하였다. 즉 phosphate buffer (pH 7.5)에 등몰농도의 NADH를 pyruvate로 환원시키는 반응을 이용한 것이다. 340nm의 흡광도의 감소율은 배양액의 LDH 활성도에 비례하게 됨을 이용하여 LDH 활성도를 측정할 방법이다.

#### 3) 심근세포 박동수(beatting rate, BR) 측정<sup>22)</sup>

배양 심근세포의 BR의 측정을 위하여 일정 시간 배양한 심근세포에 여러 농도의 XO/HX이 포함된 배양액에서 24시간 동안 배양한 후 약제가 포함되지 않은 배양액을 대조군으로 하여 분당 심근세포의 박동수를 대조군과 비교하였다.

### 7. 통계처리

실험결과에 대한 유의성의 검정은 ANOVA후에 Student-t test에 의하였으며 p값이 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

## 결 과

### 1. XO/HX가 배양 심근세포의 생존율에 미치는 영향

#### 1) 심근세포 생존율 : MTT 정량

XO가 배양 심근세포에 미치는 독성을 관찰하기 위하여 5~40 mU/ml 농도로처리한 배양 심근세포에 세포생존율을 MTT 정량법에 의하여 측정된 결과 처리한 XO의 농도에 비례하여 세포의 생존율이 감소하였다. 특히 20 mU/ml, 40 mU/ml XO

의 처리에서는 세포의 생존율이 대조군에 비하여 48.6%( $p<0.05$ ), 42.4%( $p<0.01$ )로 유의한 감소를 나타냈다 (Fig. 1).

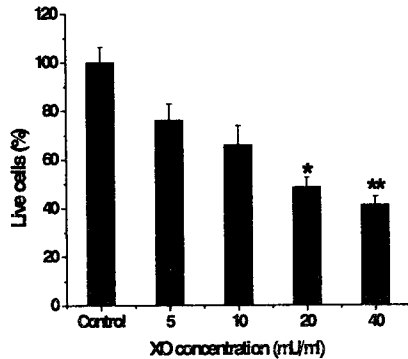


Fig. 1. Dose-response relationship of XO treatment in cultured rat myocardial cells. Cultures were exposed to various concentrations of XO for 42 hours, respectively. Cell viability was measured by MTT assay and determined as % of control. The results indicate the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the control group are marked with asterisk. \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$

또한 20 mU/ml의 XO/HX가 포함된 배양액에서 심근세포를 30~48시간동안 배양한 후 시간의 경과에 따른 세포의 생존율을 MTT 정량법에 의하여 조사하였다. 그 결과 처리한 시간에 의존적으로 세포 생존율이 감소하였으며 특히 42시간, 48시간에서 유의한 감소를 나타냈다 (Fig. 2).

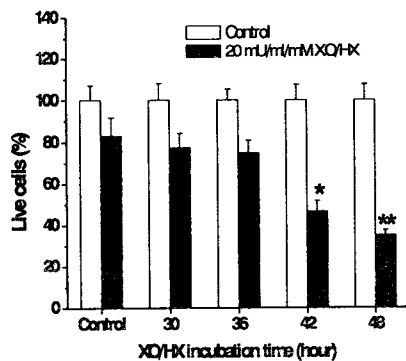


Fig. 2. Time-response relationship of XO/HX treatment in cultured rat myocardial cells. Cultured rat myocardial cells were treated with 20 mU/ml XO in 0.1 mM HX for various time intervals. Cell viability was measured by MTT assay and determined as % of control. The values are the mean±SE for 6 experiments. Asterisk indicate the significant differences between groups. \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$

## 2. XO/HX의 심장세포 손상에 대한 한약재의 영향

### 1) LDH 활성도 측정

#### (1) XO/HX가 LDH 활성도에 미치는 영향

XO/HX의 농도에 따른 LDH 활성도를 측정하기 위하여 0.1 mM HX에 4~32 mU/ml 농도로 XO가 각각 포함된 배양액에서 심근세포를 42시간 동안 처리한 후 세포의 생존율을 LDH 활성도를 이용하여 대조군과 비교 조사하였다. 그 결과 처리한 농도에 비례하여 LDH 활성도가 증가하여 세포의 생존율을 감소시켰으며 특히 16 mU/ml, 32 mU/ml XO 처리에서는 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 증기를 나타냈다. MCV값은 16 mU/ml XO 처리에서 나타났다 (Fig. 3).

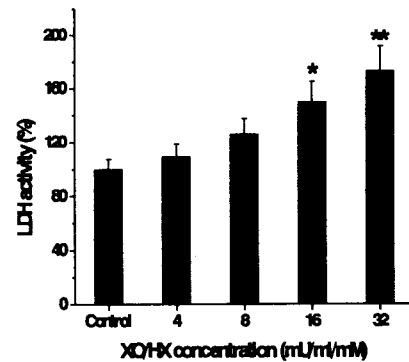


Fig. 3. Dose-response relationship of XO/HX on LDH activity in culture medium of rat myocardial cells. Cultured rat myocardial cells were exposed to various concentrations of XO in 0.1 mM HX for 42 hours. LDH release was measured at wavelength of 340 nm. The control value represents 16.2±2.8 umol/min/mg protein. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisk. \* $p<0.05$ ; \*\* $p<0.01$

#### (2) XO/HX에 의해 증가한 LDH 활성도에 미치는 한약재의 효과

배양 심근세포에 대한 XO/HX의 LDH 분비에 의한 세포독성에 대하여 瓜蒌薤白半夏湯, 瓜蒌實, 薤白, 半夏 추출물의 효과를 LDH 활성도의 측면에서 조사하기 위하여 0.1 mM HX에 MCV값인 16 mU/ml XO의 농도에서 42시간 동안 노출시키기 3시간 전에 각각 1~120 μg/ml의 한약재 추출물이 포함된 배양액에서 전처리한 후 세포외액 내로 분비된 LDH의 양을 조사하였다. 瓜蒌薤白半夏湯의 경우 배양한 후 XO/HX를 처리하지 않고 瓜蒌薤白半夏湯 추출물을 농도별로 처리한 경우 LDH 활성도에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 16 mU/ml XO/0.1 mM HX을 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 58.6% 증가하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 瓜蒌薤白半夏湯 추출물을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 LDH 활성도가 감소하여 XO/HX에 의한 독성을 방어하였으며 특히 80 μg/ml, 120 μg/ml 瓜蒌薤白半夏湯 추출물을 전 처리한 경우에 瓜蒌薤白半夏湯 추출물을 전 처리하지 않고 XO/HX만을 처리한 군 158.6%에 비하여 각각 146.7%( $p<0.05$ ), 143.0%( $p<0.05$ )로 유의하게 감소하였다 (Fig. 4).

瓜蒌實의 경우 배양한 후 XO/HX를 처리하지 않고 瓜蒌實 추출물을 농도별로 처리한 경우 LDH 활성도에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 16 mU/ml XO/0.1 mM HX을 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 LDH 활성도가 증가하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 瓜蒌實 추출물을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 LDH 활성도가 감소하여 XO/HX에 의한 독성을 방어하였으나 통계적인 유의성은 나타나지 않았다 (Fig. 4). 薤白의 경우 배양한 후 XO/HX를 처리하지 않고 薤白 추출물을 농도별로 처리한 경우 LDH 활성도에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 16 mU/ml XO/0.1 mM HX을 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 LDH 활성도가 증가하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 薤白 추출물을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 LDH 활성도가 감소하여 XO/HX에 의한 독성을 방어하였으나 통계적인 유의성은 나타나지 않았다 (Fig. 4). 半夏의 경우 배양한 후 XO/HX를 처리하지 않고 半夏 추출물을 농도별로 처리한 경우 LDH 활성도에 유의한 변화는

나타나지 않았다. 16 mU/ml XO/0.1 mM HX을 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 LDH 활성도가 증가하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 半夏 추출물을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 LDH 활성도가 감소하여 XO/HX에 의한 독성을 방어하였으나 통계적인 유의성은 나타나지 않았다 (Fig. 4).

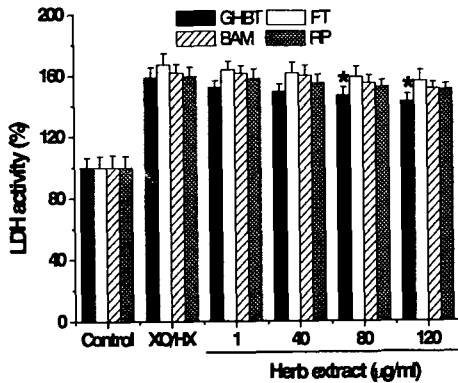


Fig. 4. Dose-response relationship of Guaruaebaekbanha-tang (GHBT), Fructus Trichosanthis(FT), Bulbus Allii Macrostemi (BAM) and Rhizoma Pinelliae(RP) for LDH activity in cultured rat myocardial cells. Cultured rat myocardial cells were preincubated with various concentrations of herb extracts for 3 hours, and then exposed to 16 mU/ml XO in 0.1 mM HX for 42 hours. LDH release was measured at wavelength of 340 nm. The values represent the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the XO/HX-treated group are marked with asterisk. \*p<0.05

2) 심근세포 박동수의 측정

(1) XO/HX가 심근세포 박동수에 미치는 영향

XO/HX의 농도에 따른 심근세포 박동수를 측정하기 위하여 0.1 mM HX에 15~30 mU/ml XO의 농도가 각각 포함된 배양액에서 심근세포를 42시간 동안 처리한 후 세포의 박동수 변동을 대조군과 비교 조사하였다. 그 결과 처리한 XO의 농도에 비례하여 박동수가 감소하였으며 25 mU/ml, 30 mU/ml XO의 처리에서는 심근박동수가 대조군100%(126±12.9 beats/min)에 비하여 각각 41.5%(p<0.05), 32.5%(p<0.01)로 통계적으로 유의한 감소를 나타냈다 (Fig. 5).

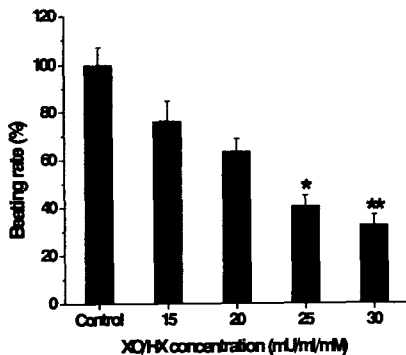


Fig. 5. Dose-response relationship of XO/HX on beating rate in cultured rat myocardial cells. Cultured rat myocardial cells were treated with various concentrations of XO in 0.1 mM HX for 42 hours. Beating rate was measured by count of beating frequency per minute. Control value represent 126±12.9 beat/min. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisk. \*p<0.05; \*\*p<0.01

(2) XO/HX에 의해 감소한 심근세포 박동수에 미치는 한약제의 효과

배양 심근세포에 대한 XO/HX의 세포독성에 대한 瓜蒌薤白半夏湯, 瓜蒌實, 薤白, 半夏 추출물의 효과를 심근세포 박동수의 측면에서 조사하기 위하여 XO/HX의 MCV값인 25 mU/ml 농도에서 42시간 동안 노출시키기 3시간 전에 각각 15~100 µg/ml의 한약제 추출물이 포함된 배양액에서 전처리한 후 심근세포 박동수를 조사하였다. 瓜蒌薤白半夏湯의 경우 배양한 후 XO/HX를 처리하지 않고 瓜蒌薤白半夏湯 추출물을 농도별로 처리한 경우 심근세포 박동수에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 25 mU/ml XO/0.1 mM HX를 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 47.1%로 감소하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 瓜蒌薤白半夏湯 추출물을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 심근세포 박동수 감소효과가 감소되어 XO/HX에 의한 독성을 방어하였다. 특히 50 µg/ml, 100 µg/ml 瓜蒌薤白半夏湯 추출물을 전처리한 경우에 瓜蒌薤白半夏湯 추출물을 전 처리하지 않고 XO/HX만을 처리한 군 47.1%에 비하여 각각 72.7%(p<0.05), 89.3%(p<0.01)로 XO/HX에 의한 감소효과를 유의하게 억제하였다(Fig. 6).

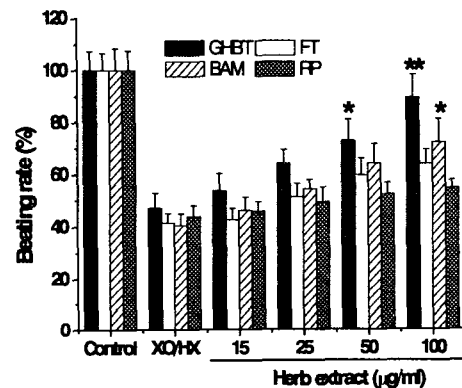


Fig. 6. Dose-response relationship of Guaruaebaekbanha-tang (GHBT), Fructus Trichosanthis(FT), Bulbus Allii Macrostemi (BAM) and Rhizoma Pinelliae(RP) for beating rate in cultured rat myocardial cells. Cultured rat myocardial cells were preincubated with various concentrations of agents for 3 hours, and then exposed to 25 mU/ml XO in 0.1 mM HX for 42 hours. Beating rate was measured by count of beating number per minute. The values represent the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the XO/HX-treated group are marked with asterisk. \*p<0.05; \*\*p<0.01

瓜蒌實의 경우 배양한 후 XO/HX를 처리하지 않고 瓜蒌實 추출물을 농도별로 처리한 경우 심근세포 박동수에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 25 mU/ml XO/0.1 mM HX를 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 심근세포 박동수가 41.5%로 감소하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 瓜蒌實 추출물을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 심근세포 박동수가 증가하여 XO/HX에 의한 독성을 방어하였으나 통계적인 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 6). 薤白의 경우 배양한 후 XO/HX를 처리하지 않고 薤白 추출물을 농도별로 처리한 경우 심근세포 박동수에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 25 mU/ml XO/0.1 mM HX를 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 심근세포 박동수가 40.5%로 감소하여 세포에 독성을 나타냈다.

그러나 薤白 추출물을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 심근세포 박동수가 증가하여 XO/HX에 의한 독성을 방어하였으며 특히 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  薤白 추출물을 전처리한 경우에 薤白 추출물을 전 처리하지 않고 XO/HX만을 처리한 군 40.5%에 비하여 71.9%( $p<0.05$ )로 증가하여 통계적으로 유의성을 나타냈다(Fig. 6). 半夏의 경우 배양한 후 XO/HX를 처리하지 않고 半夏 추출물을 농도별로 처리한 경우 심근세포 박동수에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 25  $\text{mU}/\text{ml}$  XO/0.1  $\text{mM}$  HX를 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 심근세포 박동수가 41.5%로 감소하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 半夏 추출물을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 심근세포 박동수가 증가하여 XO/HX에 의한 독성을 방어하였으나 통계적인 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 6).

## 고찰

瓜蒌薤白半夏湯은 瓜蒌實, 薤白, 半夏로 구성된 처방으로 그 개별약물의 性味, 歸經, 효능을 살펴보면 다음과 같다.

瓜蒌實은 瓜蒌仁이라고도 하며 性味는 甘·寒·無毒하며 肺·胃·大腸經에 歸經하고 潤燥化痰, 滑腸通便의 효능이 있어 熱痰, 咳嗽, 咯痰稠厚, 咳吐不利 등의 症을 다스린다 하였다<sup>23</sup>. 薤白은 百合科에 속한 多年生 草本인 小根蒜(산달래) 및 산부추의 鱗莖으로, 性味는 辛 苦 溫 無毒하고 肝 心 肺 大腸의 4經으로 歸經한다<sup>24-26</sup>. 薤白의 效能은 溫中通陽, 行氣導滯, 下氣散結을 主 效功能으로 삼고, 溫中通陽 行氣導滯 散結의 효능에 의한 胸痹證을 치료하는데 이용하고 있다<sup>27-29</sup>. 半夏는 味辛 性溫, 有毒하며 散結除痰, 和胃降逆燥濕하는 효능이 있으며 麻醉한 개에게 靜脈注射時 잠시동안의 血壓降下作用이 나타난다 하였다<sup>30-32</sup>. 근래에 세포배양기술이 널리 보급되면서 각종 독성물질의 유해 또는 무해에 대한 검정이 활발히 진행되고 있는 실정이며<sup>33,34</sup> 심근세포와 같은 각종 세포종을 병변의 모델로 하여 질환의 병인에 대한 기전을 비롯하여 작용현상 및 치료적 방법의 접근에 대한 활발한 연구를 진행중에 있다<sup>35,36</sup>. 산소자유기는 최외각 전자궤도에 쌍을 이루고 있지 않는 홀수개의 전자가 존재하는 원자나 분자를 지칭하는 것으로서 이러한 특수구조 때문에 대단히 큰 반응성을 보여 생체내의 여러가지 병태생리적인 반응에 관여하고 있으며, 생체막의 불포화지방산을 과산화시키거나 단백질, DNA를 변성시키는데<sup>37</sup>, 특히 산소자유기는 흥분성아미노산(excitatory amino acid, EAA)의 분비를 촉진시키고<sup>38</sup>, 세포내  $\text{Ca}^{2+}$ 의 농도를 증가시켜 결국 세포의 사멸을 초래하는 물질이다<sup>39</sup>. 산소자유기는 배양심근세포에 독성을 나타내며 이런 독성에 대하여 한약재 추출물이 방어효과를 나타낸다고 보고되고 있다<sup>19,20</sup>. 본 실험에 사용된 산소자유기인 xanthine oxidase/hypoxanthine(XO/HX)는 Zhang 등의 보고<sup>40</sup>에 의하면 LDH 활성도를 증가시키고 심근세포 박동수를 감소시키며 ATP 양을 감소시켜 심근세포에 독성을 일으킨다 하였다.

실험에서는 먼저 XO/HX의 심근세포 독성효과를 MTT 정량을 이용하여 조사하였다. MTT 정량<sup>21</sup>은 세포의 생존율을 측정하는 방법으로서 이 실험에서 XO/HX를 처리한 후 위의 방법에

의하여 세포의 생존율을 조사한 결과 농도와 시간에 의존적으로 생존율을 감소시켜 (Fig. 1~2) 세포에 독성을 유발하여 Zhang 등<sup>40</sup>이 보고한 결과와 일치하였다. 이러한 XO/HX의 심근세포독성에 대하여 瓜蒌薤白半夏湯과 구성약물인 瓜蒌實, 薤白, 半夏의 방어효과를 LDH activity 및 심근박동수( beating rate)를 이용하여 조사하였다. LDH는 살아있는 세포의 형질막의 손상으로 인하여 누출되는 효소이므로 세포막손상의 지표가 되는 효소이다. XO/HX의 세포독성을 Zhang 등의 보고<sup>40</sup>에 근거하여 조사한 결과 농도의존적으로 LDH 활성도를 증가시킴으로서 세포독성을 나타냈다(Fig. 3). 이러한 XO/HX의 심근세포독성에 대하여 瓜蒌薤白半夏湯과 구성약물을 3시간 동안 전처리한 후 세포배양액내로 누출된 LDH의 양을 조사하였다. 瓜蒌薤白半夏湯 추출물은 구성약물에 비하여 LDH 누출의 억제 효과가 뛰어나며 80  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 120  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서는 유의한 억제효과가 나타났다. 구성약물은 약간의 억제효과가 나타났으나 통계적으로 유의한 억제효과를 나타내지 못하였다(Fig. 4). 이러한 결과는 심부전이나 심근경색과 연관이 있으며 심근세포에 독성을 유발하는 adriamycin (ADR)<sup>22</sup>의 손상으로 인한 LDH 누출을 薤白 물추출물에서 유의하게 억제하였다는 보고<sup>20</sup>와 비교하여 볼 때 ADR과 XO/HX의 독성차이나 용매의 다른점과 관련이 있을 것으로 사료된다. Takahashi 등<sup>22</sup>은 심근세포 박동수의 조사는 심근세포의 손상을 예측할 수 있는 지표라 하였다. XO/HX는 처리한 농도에 비례하여 심근세포 박동수가 감소하여(Fig. 5) 전 실험자 들의 결과<sup>22,40</sup>와 일치하였다. XO/HX에 의해 감소한 심근세포 박동수에 대하여 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 瓜蒌薤白半夏湯 추출물을 전처리한 결과 농도의존적으로 심근세포 박동수의 감소가 억제되어 방어효과를 나타냈으며 특히 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 유의한 억제를 나타냈으며 구성약물 중 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 薤白 추출물을 전 처리한 군에서만 유의한 억제효과를 나타내 ADR로 인한 심근박동수의 감소를 薤白 물추출물이 효과적으로 방어하였다는 박의 보고<sup>20</sup>와 일치하였으나 瓜蒌薤白半夏湯 추출물의 억제효과에 비해 상대적으로 약한 억제반응을 보였다. 이는 한의학에서 단미보다 처방에서의 작용이 효과적이라는 相須·相使작용과 관련이 있음을 시사하는 것으로 보여진다(Fig. 6).

위의 결과는 임상에서 한약재의 처방구성이 개별약재의 단미 사용시 보다 효과적임을 구명하는 실험적 계기가 될 수 있으리라 사료되며 구성약물 및 가미 처방간의 효과비교는 심근세포에 대한 다른 지표나 진행된 연구내용을 통하여 그 실험이 지속되어야 할 것으로 생각된다.

## 결론

瓜蒌薤白半夏湯과 그의 구성약물인 瓜蒌實, 薤白, 半夏 추출물이 산소자유기에 의한 심근세포 손상에 미치는 영향을 구명하기 위하여 백서에서 분리하여 배양한 심근세포에 이들 한약재 추출물을 전 처리한 후 xanthine oxidase /hypoxanthine (XO/HX)의 세포독성효과와 이에 대한 방어효과를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

XO/HX는 농도와 시간의존적으로 심근세포 생존율의 감소

를 나타냈다. 瓜蒌薤白半夏湯 추출물은 XO/HX에 의하여 증가된 LDH 활성도를 유의하게 억제하였다. 瓜蒌實 薤白 및半夏 추출물은 XO/HX에 의하여 유발된 심근세포 박동수의 감소에 대하여 유의한 방어효과를 나타냈다.

이상의 결과에서 XO/HX는 심근세포에 독성을 나타냈으며 瓜蒌薤白半夏湯, 그 구성약물인 瓜蒌實, 薤白,半夏를 전처리하여 유의한 방어효과를 보여 주었다. 이러한 결과는 단일약재보다 복합처방이 효과적임을 시사하며 이러한 상호간의 효과비교는 다른 지표나 in vivo 등의 진행된 실험에서 지속적으로 연구하여 구명되어야 할 것으로 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술개발사업의 지원(HMP-CO-03-0003)에 의하여 이루어진 것임.

### 참고문헌

1. 金一赫, 趙弼衡 : 譯漢方醫藥學, 서울, 東南出版社, p.145,193, 194,198, 1984.
2. 蔡仁植: 傷寒論譯註, 서울, 高文社, p.338,339, 1971.
3. 朴炳昆: 增補漢方臨床四十年, 서울, 大光文化社, p.48, 1971.
4. 具本淵: 新漢方處方解說, 서울, (株)保健新報, pp.57-60, 1985.
5. 失數道明: 漢方治療百話 第一卷, 서울, 東南出版社, pp.84-89, 1989.
6. 李京燮 外 18名: 東醫心系內科學(下), 서울, 書苑堂, p.178, 179,243, 1995.
7. 申信求: 申氏本草學, 서울, 壽文社, pp.407-409, 594-596, 617-620, 697-699, 1982.
8. 辛民教: 臨床本草學, 서울, 永林出版社, p.398,556,563,624,636, 1986.
9. 김창민, 신민교, 이경순, 안덕균 역: 中藥大辭典, 서울, 도서출판 정담, p. 1960-1971, 1998.
10. Cao W., Carney J. M., Duchon A., Floyd R. A., Chevion M. : Oxygen free radical involvement in ischemia and reperfusion injury to brain. 88, pp.233-238, 1988.
11. Fridovich I. : Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. J. Biol. Chem. 245:4053-4057, 1970.
12. Killogg E. W., Fridovich I. : Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymatically generated superoxide and hydrogen peroxide. J. Biol. Chem. 252:6721-6728, 1977.
13. Harber F., Weiss J. : The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by anion salts. Proc. Roy. Soc. London A. 147:333-351, 1934.
14. Graf E., Mahoney J. R., Bryant R. G., Eaton J. W. : Iron-catalyzed hydroxyl radical formation: Stringent requirement for free iron coordination site. J. Biol. Chem. 259:3620-3624, 1984.

15. Jesberger J. A., Richardson J. S. : Oxygen free radicals and brain dysfunction. Int. J. Neurosci 57:1-17, 1991.
16. Zhang Y., Tatsuno T., Carney J. M., Mattson M. P. : Basic FGF, NGF, and IGFs protect hippocampal and cortical neurons against iron-induced degeneration. J Cereb Blood Flow Metab 13:378-388, 1993.
17. Floyd R. A. : Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. FASEB J. 4:2587-2597, 1990.
18. Jo H. I., Kim G. H., Hwang W. J., Park S. T., Ryu D. G. : Effects of Myrrha Water Extract on Rat Myocardial Cells in Cultures. J. Korean Oriental Med. 21(2):79-86. 2000.
19. Son C. S., Kwon K. B., Kim S. B., Lee H. S., Seo E. H., Lee H. S., Ryu D. G. : Effects of Dansamyeum Water Extract on Heart Beating Rate in Cultured Mouse Myocardial Cells. Korean Journal of Oriental Medical Physiology & Pathology 15(2):241-245. 2001.
20. 박철민 : 薤白煎탕액이 배양 심근세포에 미치는 영향. 원광대학교 대학원 석사학위논문, 2000.
21. Mosmann T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. J. Immunol. Methods 65:55-63, 1983.
22. Takahashi K., Fujita Y., Mayumi T., Hama T., Kishi T. : Effect of adriamycin on cultured mouse embryo myocardial cells. Chem. Pharm. Bull. 35(1) 326-334, 1987.
23. 辛民教 : 臨床本草學, 서울, 영림출판사. pp.563-564. 1989.
24. 辛民教 : 臨床本草學, 南山堂, 서울, pp.398-399, 1986.
25. 胡世林 : 中國道地藥材原色圖說, 山東科學技術出版社, 山東, p.57, 1998.
26. 柳庚華 外 : 實用植物本草, 天津科學技術出版社, 天津, pp.209-210, 1998.
27. 高學敏 : 中藥學. 中國醫藥科技出版社, 北京, p.190, 1990.
28. 尹古榮 : 東醫方劑學, 慶熙大學校醫科大學, 서울, p.254, 1971.
29. 圓光 韓醫大 圖書部 : 本草備要解釋, pp.483-484.
30. 張錦清 : 實用中醫方劑學, 樂群出版社業有限公司, 台北, p.316, 317, 1983.
31. 方藥中等 : 實用中醫內科學, 上海科學技術出版社, 上海, p.435, 436, 1988.
32. 李尙仁 等 : 漢藥臨床應用, 成輔社, 서울, pp.48-49,171-175, 243-245,515- 518, 1985.
33. Chung Y. T., Choi M. K., Kim J. J., Kim J. M., Park S. T. : A study on the cytotoxicity of adriamycin on cultured rat myocardial and endothelial cells. J. Chonnam Med. Sci. 1: 221-229, 1988.
34. Unuma T., Senda R., Muramatsu M. : Mechanism of nucleolar segregation-Differences in effects of actinomycin D and cyclohexamide on nucleoli of rat liver cells. Electro Microscopy 22:205-216, 1973.
35. Tasca R. J., Hillman N. : Effect of actinomycin D and cyclohexamide on RNA and protein synthesis in cleavage

- stage mouse embryo. *Nature* 225:1022-1025, 1970.
36. Park S. T., Kim J. J., Mun Y. J., Lim K. T., Choi M. K., Chung Y. T. : Effect of methylmercury on the fetal mouse cerebral neurons. *J. Environ.* 4:27-32, 1995.
37. Pellegrini-Giampietro D. E., Cherici G., Alesiani M., Carrla V., Moroni F. : Excitatory amino acid release from rat hippocampal slices as a consequence of free-radical formation, *J. Neurochem.* 51:1960-1963, 1988.
38. Pellegrini-Giampietro D. E., Cherici G., Alesiani M., Carrla V., Moroni F. : Excitatory amino acid and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage, *J. Neurosci.* 10:1035-1041, 1990.
39. Zeman S., Lloyd C., Meldrum B., Leigh P. N. : Excitatory amino acids, free radicals and the pathogenesis of motor neuron disease, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 20:219-231, 1994.
40. Zhang R., Pinson A., Samuni A. : Both hydroxylamine and nitroxide protect cardiomyocytes form oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine* 24(1):66-75, 1998.