

# 手拈散 전탕액이 배양 심근세포에 미치는 영향

전영석 · 권강범 · 박은영 · 성은경 · 박승택<sup>1</sup> · 류도곤\*

원광대학교 한의과대학 생리학교실, 1: 원광의과학연구소

## Effects of Sujeom-san Water Extract in Cultured Rat Myocardial Cells

Young Seok Jeon, Kang Beom Kwon, Eun Young Park, Eun Kyung Seong, Seung Taek Park<sup>1</sup>, Do Gon Ryu\*

Department of Physiology, College of Oriental Medicine, 1: Institution of Wonkwang Science, Wonkwang University

To test the protective effect of herbal medicine against oxygen free radical-induced myocardiotoxicity, cytotoxicity of xanthine oxidase/hypoxanthine (XO/HX) was examined using MTT, TBARS, and beating rate assay in the presence of water extract of Sujeom-san(SJS) or single constituents of its prescription. Myocardial toxicity was evaluated in neonatal rat myocardiocytes in cultures. In the present paper, XO/HX resulted in a decrease in viability and beating rate and increases in lipid peroxidation in cultured myocardial cells. In the effect of SJS water extract, it showed effects from the cardiocytotoxicity induced by XO/HX treatment such as increases in beating rate and decreases in lipid peroxidation. In the effect of Rhizoma Corydalis (RC), Faeces Trogopteroni (FT), Fructus Amomi Tsaoko (FAT) and Myrrha on the cardiocytotoxicity, they were significantly effective in blocking the XO/HX-induced cardiocytotoxicity by increase of beating rate in FAT and FT group as well as decrease of lipid peroxidation in FT and RC group. These results show that oxygen free radical elicits toxic effects in cultured myocardial cells derived from neonatal rat, and suggest that water extract of Sujeomsan, Rhizoma Corydalis, Faeces Trogopteroni, Fructus Amomi Tsaoko or Myrrha is very effective in the prevention of xanthine oxidase/hypoxanthine- induced cardiotoxicity.

Key words : Sujeom-san(手拈散), Rhizoma Corydalis, Faeces Trogopteroni, Fructus Amomi Tsaoko, Myrrha, xanthine oxidase/hypoxanthine, Myocardial cell, Cardiotoxicity.

### 서론

手拈散은 玄胡索, 五靈脂, 草果, 沒藥으로 구성된 처방으로 丹溪心法<sup>1,2)</sup>에 처음 수록된 이래 心痛<sup>3-11)</sup> 脾心痛<sup>4,7)</sup>, 心脾痛<sup>10-15)</sup>, 九種心痛<sup>3,5,11-15)</sup> 등에 활용되는 대표적인 처방이다. 이를 구성하고 있는 4종의 약물은 性이 모두 溫하고 味는 辛, 辛微苦, 甘苦鹹, 苦하며, 歸經은 肝·脾·胃 三經이고 止痛破滯, 化痰破瘀, 溫運中氣시키는 효능을 가지고 있어 草果를 제외한 세종류의 약물이 모두 活血祛瘀劑로 분류되므로 手拈散은 活血祛瘀止痛의 要劑라 한다<sup>3-15)</sup>. 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 생산된다<sup>16,17)</sup>. 이렇게 생성된 산소자유기는 철(iron)과 반응하여 hydroxyl radical(OH)이 생성된다<sup>18,19)</sup>. 산소자유기는 정상상태에서 산화-환원작용이나 사립체의 산화인산화작용에 의하여 소량

형성되어 항산화제인 superoxide dismutase(SOD)나 사립체와 세포질내의 glutathione peroxidase 및 catalase에 의하여 소실되어 진다<sup>20)</sup>. 그러나 저산소증이나 허혈과 같은 병적인 상태에서 비정상적으로 생성된 산소자유기는 세포막의 지방을 과산화시킬 뿐만아니라 각종 효소나 단백질을 불활성화시킴으로써 세포 및 조직의 손상을 초래하게 된다<sup>21)</sup>. 최근의 연구에서 심근세포독성은 산소자유기에 의하여 유발된다고 보고된 바 있는데<sup>21)</sup>, 산소자유기란 최외각 전자궤도에 쌍을 이루고 있지 않은 홀수개의 전자가 존재하는 원자나 분자를 지칭하는 말로써 이러한 특수 구조 때문에 대단히 큰 반응성을 보여 생체내의 여러 가지 병태생리학적인 반응에 참여하고 있다<sup>22-25)</sup>. 심장과 관련된 手拈散에 관한 실험적 연구로 재관류장치하에서 흰쥐의 추출심장에 심근세포효소에 미치는 영향을 보고하였고<sup>26)</sup> 허혈성 심장의 심근효소에 미치는 영향을 관찰하였으며<sup>27)</sup> 또한 본 처방이 심장과 소화기에 미치는 효과를 보고한 바 있으나 산소자유기에 의해 손상된 심근세포의 방어에 대한 보고는 접하지 못하였다.

이에 저자는 手拈散과 그 구성약물인 玄胡索, 五靈脂, 草果, 沒藥 등이 배양 심근세포 손상에 대한 방어효과를 구명하기 위하여 먼저 본 한약재를 전처리한 후 산소자유기인 xanthine

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

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

· 접수: 2002/02/15 · 수정: 2002/03/16 · 채택 : 2002/04/06

oxidase/hypoxanthine(XO/HX)<sup>28)</sup>로 흰쥐의 배양 심근세포에 독성을 유발시켰다. 이후 심근세포 박동수 측정과 Lipid peroxidation 정량을 측정하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

동물은 Sprague Dawley 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 원침시켰다. 심장조직을 0.05% trypsin으로 20분동안 항온기에 넣은 다음 Pasteur pipette으로 3, 4회 분쇄한 후 800×g에서 10분간 원침시킨다. 원침된 세포를 Eagle's minimum essential medium(EMEM, 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> cells/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. 전탕액의 제조

실험에 사용한 약재는 草果 50g, 玄胡索 50g, 五靈脂 50g, 沒藥 50g을 합한 手拈散(Sujeomsan, SJS) 200g과 개별 약재인 草果(Rhizoma Corydalis, RC), 玄胡索(Faeces Trogopteroni, FT), 五靈脂(Fructus Amomi Tsaoko, FAT), 沒藥(Myrrha) 각각 200g을 환저플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 3시간 동안 전열기로 전탕한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 회전 진공 농축기로 감압농축한 후 동결건조기에서 건조하여 각각 手拈散 21.89g, 草果 10.35g, 玄胡索 33.06g, 五靈脂 13.98g, 沒藥 40.93g의 분말 시료를 얻었다. 처방의 내용을 도표화하면 다음과 같다.

Table 1. Prescription of Sujeom-san(SJS)

韓藥名	生藥名	重量(g)
草果	Rhizoma Corydalis	50
玄胡索	Faeces Trogopteroni	50
五靈脂	Fructus Amomi Tsaoko	50
沒藥	Myrrha	50
	總計	200

### 4. XO/HX의 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. 전탕액의 처리

실험에 사용한 각각의 검액을 여러 농도로 하여, 생쥐의 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 검증

#### 1) MTT 정량

세포 생존율 측정을 위한 MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide] (Sigma) 정량<sup>29)</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 완료후 dimethylsulfoxide (DMSO, Merck)를 처리한 다음 ELISA Reader (Molecular Device, USA)로 570nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다.

#### 2) Lipid peroxidation 정량<sup>30)</sup>

XO/HX과 한약재를 일정시간 동안 처리한 후 배양 심근세포의 상층액과 세포용해액내의 TBARS (thiobarbituric acid reactive substances)를 측정하는 것으로, 위의 액에 12NH<sub>4</sub>SO<sub>4</sub>와 10% phosphotungstic acid를 각각 2.0 ml와 0.3 ml를 넣고 10분 동안 반응시켰다. 반응 완료 후 TBA(thiobarbituric acid)를 1.0 ml를 가한 후 90도에서 1시간 동안 가열한 다음 냉각 후 n-butanol로 처리하였다. n-butanol 처리완료 후 원침하여 이를 제거한 다음 553nm에서 형광측정법에 의해 측정하였다.

#### 3) 심근세포 박동수(beatting rate, BR) 측정<sup>31)</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 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 5~60 mU/ml 농도로처리한 배양 심근세포에 세포생존율을 MTT 정량법에 의하여 측정된 결과 처리한 XO의 농도에 비례하여 세포생존율이 감소하였다. 특히 30 mU/ml, 60 mU/ml XO의 처리에서는 세포생존율이 대조군에 비하여 51.2%(p<0.05), 39.7%(p<0.01)로 유의한 감소를 나타냈다 (Fig. 1).

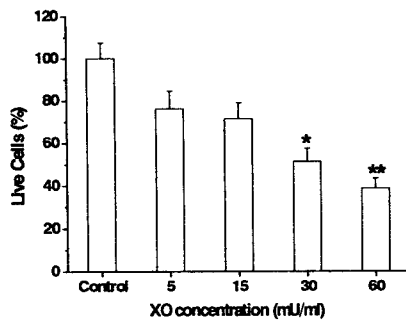


Fig. 1. Dose-response relationship of XO treatment in cultured rat myocardial cells. Cultures were exposed to various concentrations of XO for 60 hours, respectively. Cell viability was measured by MTT assay and determined as % of control. The results indicate the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the control group are marked with asterisk. \*p<0.05, \*\*p<0.01

또한 30 mU/ml의 XO/HX가 포함된 배양액에서 심근세포를 36~72시간 동안 배양한 후 시간의 경과에 따른 세포생존율을 MTT assay법에 의하여 조사하였다. 그 결과 처리한 시간에 의존적으로 세포 생존율이 감소하였으며 특히 60시간, 72시간에서 유의한 감소를 나타냈다 (Fig. 2).

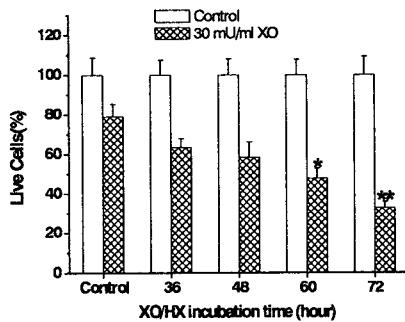


Fig. 2. Time-response relationship of XO/HX treatment in cultured rat myocardial cells. Cultured rat myocardial cells were treated with 30 mU/ml XO in 0.1 mM HX for various time intervals. Cell viability was measured by MTT assay and determined as % of control. The values are the mean±SE for 6 experiments. Asterisk indicate the significant differences between groups. \*p<0.05; \*\*p<0.01

2. XO/HX의 심근세포 손상에 대한 한약재의 영향

1) Lipid peroxidation 정량

(1) XO/HX가 lipid peroxidation에 미치는 영향

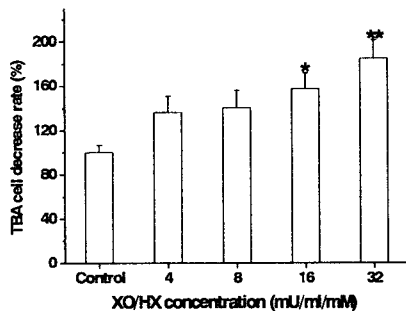


Fig. 3. Dose-response relationship of XO/HX on lipid peroxidation in cultured rat myocardial cells. Cultured rat myocardial cells were exposed to various concentrations of XO in 0.1 mM HX for 60 hours. Thiobarbituric acid(TBA) fluorometric assay was adopted to analyse lipid peroxidation and TBA reactive substance(TBARS) were represent as pmol/106 cells. Control value are represented 37.4±3.6 pmol/106 cells. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisk. \*p<0.05; \*\*p<0.01

XO/HX의 농도에 따른 lipid peroxidation을 측정하기 위하여 0.1mM HX에 4~32mU/ml의 농도로 XO가 각각 포함된 배양액에서 심근세포를 60시간 동안 처리한 후 TBARS와 세포생존율을 대조군과 비교 조사하였다. 그 결과 처리한 농도에 비례하여 세포생존율의 감소와 TBARS의 증가를 보였다. 특히 16mU/ml, 32mU/ml XO 처리에서는 대조군에 비하여 TBARS의 유의한 증가를 나타냈다. MCV값은 16mU/ml XO 처리에서 나타났다(Fig. 3).

(2) XO/HX에 의해 증가한 lipid peroxidation에 미치는 한약재의 효과

배양 심근세포에 대한 XO/HX의 세포독성에 대한 手拈散과 그 구성약물인 草果, 玄胡索, 五靈脂, 沒藥 전탕액의 효과를 TBA fluorometric assay를 통하여 lipid peroxidation양의 측면에서 조사하기 위하여 MCV값인 16 mU/ml XO/0.1 mM HX의 농도에서 60시간 동안 노출시키기 3시간 전에 각각 100~160 µg/ml의 한약재 전탕액이 포함된 배양액에서 전처리한 후 이의 방어효과를 조사하였다.

手拈散의 경우 배양한 후 XO/HX를 처리하지 않고 手拈散 전탕액을 농도별로 처리한 경우 lipid peroxidation에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 16 mU/ml XO/HX를 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 69.7%가 증가하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 手拈散 전탕액을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 lipid peroxidation이 감소하여 XO/HX에 의한 독성을 방어하였으며 특히 140 µg/ml, 160 µg/ml 手拈散 전탕액을 전처리한 경우에 手拈散 전탕액을 전 처리하지 않고 XO/HX만을 처리한 군에 비하여 통계적으로 유의하게 감소하였다 (Fig. 4). 玄胡索의 경우 배양한 후 XO/HX를 처리하지 않고 玄胡索 전탕액을 농도별로 처리한 경우 lipid peroxidation에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 16 mU/ml XO/HX를 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 lipid peroxidation이 증가하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 玄胡索 전탕액을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 lipid peroxidation이 감소하여 XO/HX에 의한 독성을 방어하였으나 통계적인 유의성은 나타나지 않았다 (Fig. 4). 草果의 경우 배양한 후 XO/HX를 처리하지 않고 草果 전탕액을 농도별로 처리한 경우 lipid peroxidation에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 16 mU/ml XO/HX를 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 lipid peroxidation이 증가하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 草果 전탕액을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 lipid peroxidation이 감소하여 XO/HX에 의한 독성을 방어하였으나 통계적인 유의성은 나타나지 않았다 (Fig. 4). 沒藥의 경우 배양한 후 XO/HX를 처리하지 않고 沒藥 전탕

액을 농도별로 처리한 경우 lipid peroxidation에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 16 mU/ml XO/0.1 mM HX를 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 lipid peroxidation이 증가하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 沒藥 전탕액을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 lipid peroxidation이 감소하여 XO/HX에 의한 독성을 방어하였으나 통계적으로 유의성은 나타나지 않았다 (Fig. 4).

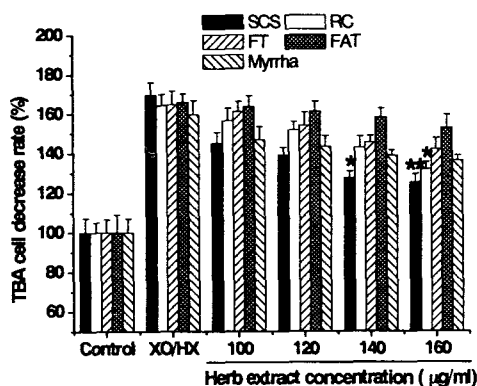


Fig. 4. Dose-response relationship of Sujeom-san(SJS), Rhizoma Corydalis(RC), Faeces Trogopteroni(FT), Fructus Amomi Tsaoko (FAT) and Myrrha water extracts for lipid peroxidation in cultured rat myocardial cells. Cultured rat myocardial cells were preincubated with various concentrations of herb extracts for 3 hours, and then exposed to 16 mU/ml XO in 0.1 mM HX for 60 hours. Amount of lipid peroxidation was measured by TBA fluorometric assay (TBARS). 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

2) 심근세포 박동수의 측정

(1) XO/HX가 심근세포 박동수에 미치는 영향

XO/HX의 농도에 따른 심근세포 박동수를 측정하기 위하여 0.1 mM HX에 1~30 mU/ml XO의 농도가 각각 포함된 배양액에서 심근세포를 60시간 동안 처리한 후 세포의 박동수 변동을 대조군과 비교 조사하였다. 그 결과 처리한 XO의 농도에 비례하여 박동수가 감소하였으며 20 mU/ml, 30 mU/ml XO의 처리에서는 심근박동수가 대조군100%(128±14.3 beats/min)에 비하여 각각 51.6%(p<0.05), 43.0%(p<0.01)로 통계적으로 유의한 감소를 나타냈다 (Fig. 5).

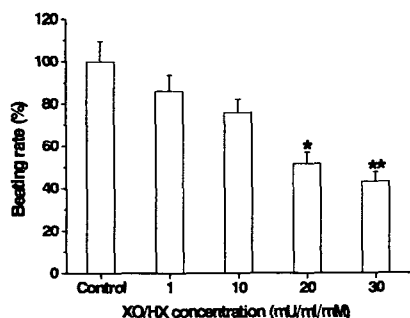


Fig. 5. Dose-response relationship of XO/HX on beating rate in cultured rat myocardial cells. Cultured rat myocardial cells were treated with various concentrations of XO in 0.1 mM HX for 60 hours. Beating rate was measured by count of beating frequency per minute. Control value represent 128±14.3 beats/min. The values are the mean±SE for 5 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisk. \*p<0.05; \*\*p<0.01

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

배양 심근세포에 대한 XO/HX의 세포독성에 대한 手拈散, 草果, 玄胡索, 五靈脂, 沒藥 전탕액의 효과를 심근세포 박동수의 측면에서 조사하기 위하여 XO/HX의 MCV값인 20 mU/ml 농도에서 60시간 동안 노출시키기 3시간 전에 각각 60~120 µg/ml의 한약재 전탕액이 포함된 배양액에서 전처리한 후 심근세포 박동수를 조사하였다. 手拈散의 경우 배양한 후 XO/HX를 처리하지 않고 手拈散 전탕액을 농도별로 처리한 경우 심근세포 박동수에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 20 mU/ml XO/0.1 mM HX를 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 45.2%로 감소하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 手拈散 전탕액을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 심근세포 박동수 감소효과가 감약되어 XO/HX에 의한 독성을 방어하였다. 특히 120 µg/ml 手拈散 전탕액을 전처리한 경우에 手拈散 전탕액을 전 처리하지 않고 XO/HX만을 처리한 군 45.2%에 비하여 87.8%(p<0.01)로 XO/HX에 의한 감소효과를 유의하게 억제하였다 (Fig. 6). 玄胡索의 경우 배양한 후 XO/HX를 처리하지 않고 玄胡索 전탕액을 농도별로 처리한 경우 심근세포 박동수에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 20 mU/ml XO/0.1 mM HX를 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 심근세포 박동수가 46.8%로 감소하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 玄胡索 전탕액을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 심근세포 박동수가 증가하여 XO/HX에 의한 독성을 방어하였으며 특히 120 µg/ml 五靈脂 전탕액을 전처리한 경우에 五靈脂 전탕액을 전 처리하지 않고 XO/HX만을 처리한 군 42.5%에 비하여 76.6%(p<0.05)로 증가하여 통계적으로 유의성을 나타냈다 (Fig. 6). 草果의 경우 배양한 후 XO/HX를 처리하지 않고 草果 전탕액을 농도별로 처리한 경우 심근세포 박동수에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 20 mU/ml XO/0.1 mM HX를 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 심근세포 박동수가 50.0%로 감소하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 草果 전탕액을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 심근세포 박동수가 증가하여 XO/HX에 의한 독성을 방어하였으나 통계적인 유의성은 나타나지 않았다 (Fig. 6). 沒藥의 경우 배양한 후 XO/HX를 처리하지 않고 沒藥 전탕액을 농도별로 처리한 경우 심근세포 박동수에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 20 mU/ml XO/0.1 mM HX를 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 심근세포 박동수가 54.0%로 감소하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 沒藥 전탕액을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 심근세포 박동수가 증가하여 XO/HX에 의한 독성을 방어하였으나 통계적인 유의성은 나타나지 않았다 (Fig. 6).

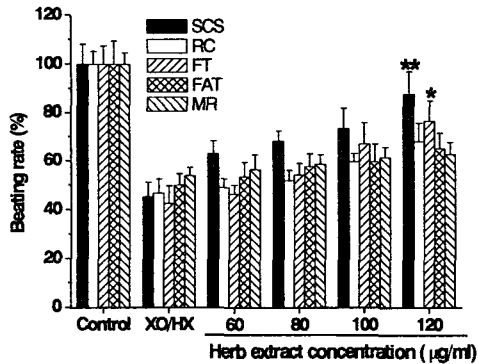


Fig. 6. Dose-response relationship of Sujeom-san(SJS), Rhizoma Corydalis(RC), Faeces Trogopterori(FT), Fructus Amomi Tsaoko (FAT) and Myrrha water extracts for beating rate in cultured rat myocardial cells. Cultured rat myocardial cells were preincubated with various concentrations of agents for 3 hours, and then exposed to 20 mU/ml XO in 0.1 mM HX for 60 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

## 고찰

手拈散은 朱丹溪의 丹溪心法<sup>1,2)</sup>에 心痛의 治方으로 처음 收錄된 처방으로 玄胡索, 五靈脂, 草果, 沒藥으로 구성되어 있다. 玄胡索은 性은 溫無毒하며 味는 辛微苦하고 肝脾經으로 歸經하여 活血하며 利氣止痛하여 血中氣滯를 풀어 癥瘕 積聚 胃痛 등의 일체 癰腫의 痛症을 치료한다 하였으며 五靈脂는 性은 溫하며 無毒하고 味甘苦鹹하며 入肝經하여 散瘀止痛하는 효능이 있어 行血止痛의 要藥이라 하였다. 草果는 性은 溫하고 味는 辛하며 入脾胃經하며 燥濕除寒 消食化積 祛痰破氣 祛寒濕의 효능이 있어 脾痛 心腹痛 脹滿을 치료한다 하였다. 沒藥은 性이 溫하고 無毒하며 味는 苦하고 入肝經하여 破血消腫 鎮痛生肌 消瘀血 散血結 活血止痛의 효과가 있어 經閉經痛 心腹諸痛 瘀血作痛을 치료한다고 했다<sup>32,34)</sup>. 이상의 活血祛瘀藥類와 理氣藥類의 4종으로 구성된 手拈散은 氣滯日久로 血行不暢하거나 久病入絡 혹은 胃絡受傷하여 離經之血이 體內에 留滯되어 瘀血이 阻滯하면 不通則痛하게 되는 血中氣滯·氣中血滯에 의한 일체 心痛을 다스린 다 알려져 있다<sup>35)</sup>. 생체는 외부와 관계없이 스스로 유리기를 발생시키는 기전이 있는데 그 중 현저한 것은 산소를 중심으로 하는 일련의 유리기들로서 호기성 호흡을 하는 생물이 최종 전자 수용체로 이용하는 산소를 4가 환원시켜 물로 배설하는데 그 중간물질로 생성되는 것들이 그것이다<sup>22,36)</sup>. 이들 유리기들도 자체의 반응성이 높아 생체막의 불포화 지방산을 과산화시키거나 단백질, DNA를 변성시킬 수 있으므로<sup>37)</sup> 생체내에서도 이들을 제거해야 한다. 호기성 생물에 존재하는 이들 방어체계는 산소가 1가 환원되어 발생하는 superoxide anion(O<sup>2-</sup>)을 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)로 변화시키는 효소인 superoxide dismutase(SOD) 및 과산화수소 처리효소인 catalase, peroxide 등이다<sup>22,36)</sup>. 외부에서 유리기를 내는 물질을 투여했을 경우에도 이들 유리기들이 반응성이 높아 쉽게 전자를 전달해 주므로 그 독작용을 방지하는데 다른 방어체계와 함께 이들 효소가 중요한 역할을 하리라 생각된다<sup>38,40)</sup>.

본 실험에 사용된 산소자유기인 xanthine oxidase/hypoxanthine (XO/HX)은 Zhang 등의 보고<sup>28)</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 assay<sup>29)</sup>는 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>28)</sup>이 보고한 결과와 일치하였다. 이러한 XO/HX의 심근세포독성에 대하여 手拈散과 구성약물인 玄胡索, 五靈脂, 草果, 沒藥의 방어효과를 lipid peroxidation과 심근박동수( beating rate)를 이용하여 조사하였다. 지질의 과산화반응은 보통 생성 산물인 Malondialdehyde (MDA)를 thiobarbituric acid(TBA)와 반응시켜 생성되는 붉은색의 물질(TBA reactive substance, TBARS)을 측정하여 표시하는데<sup>30)</sup> 지질과산화반응에서 XO/HX의 독성을 조사한 결과 농도 의존적으로 TBARS양을 증가시켜 세포에 독성을 나타냈다(Fig. 3). 16 mU/ml XO의 농도에서 대조군에 비하여 TBARS가 약 50% 증가하여 手拈散과 구성약물을 100~160 µg/ml의 농도로 3시간 전처리한 후 16 mU/ml의 XO를 60시간 처리하여 XO/HX에 의해 증가한 TBARS에 대한 억제효과를 조사하였다. 그 결과 手拈散 전탕액은 140 µg/ml과 160 µg/ml의 농도에서 유의한 억제효과를 나타냈으며 구성약물 중 玄胡索 전탕액이 160 µg/ml의 농도에서 유의한 억제효과를 나타냈으며 다른 구성약물들은 통계적으로 유의한 억제효과를 나타내지 못하였다(Fig. 4). Takahashi 등<sup>31)</sup>은 심근세포 박동수의 조사는 심근세포의 손상을 예측할 수 있는 지표라 하였다. XO/HX는 처리한 농도에 비례하여 심근세포 박동수를 감소시켜(Fig. 5) 전 실험자들의 결과<sup>28,31)</sup>와 일치하였다. XO/HX에 의해 감소한 심근세포 박동수에 대하여 60 µg/ml ~ 120 µg/ml의 手拈散 전탕액을 전처리한 결과 농도의존적으로 심근세포 박동수의 감소가 억제되어 방어효과를 나타냈으며 구성약물 중 120 µg/ml의 五靈脂 전탕액을 전 처리한 군에서 유의한 억제효과를 나타냈으나 手拈散 전탕액의 억제효과보다는 떨어지는 것으로 나타났다(Fig. 6).

위의 결과에서 개개의 구성약물보다 배합된 처방에서 효과적인 결과를 보였으며 이는 한의학적 처방의 구성이 방향전환이나 공력작용의 효능을 통하여 결과임을 시사한다. 앞으로 手拈散 및 그 구성약물의 각종 心痺에 대한 효과를 다양한 동물 병태모델의 개발을 통하여 이를 활용한 in vivo 실험을 적용함으로써 한의학적 배합처방의 유의한 결과를 구명할 지속적인 연구가 요구된다고 사료된다.

## 결론

手拈散과 그의 구성약물인 草果, 玄胡索, 五靈脂, 沒藥 전탕액이 심근세포 손상에 미치는 영향을 구명하기 위하여 백서에서 분리하여 배양한 심근세포에 이들 한약재 전탕액을 전 처리한 후 xanthine oxidase/hypoxanthine(XO/HX)의 세포독성효과와 이에 대한 방어효과를 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

XO/HX는 농도와 시간의존적으로 심근세포 생존율의 감소를 나타냈다. 手拈散 전탕액은 심박동수를 유의하게 증가시켜

XO/HX에 의하여 유발된 심근세포 독성을 효과적으로 차단하였다. 手拈散 전탕액은 XO/HX에 의한 과산화지질의 증가를 유의하게 억제하였다. 草果, 玄胡索, 五靈脂, 沒藥 전탕액은 XO/HX에 의한 심박동수의 감소를 유의하게 증가시켰으며 玄胡索과 五靈脂 전탕액은 XO/HX에 의한 과산화지질의 증가를 유의하게 억제하였다.

이상의 결과에서 XO/HX는 심근세포에 독성을 나타냈으며 手拈散 및 그 구성약물인 草果, 玄胡索, 五靈脂, 沒藥을 전처리한 후 유의한 방어효과를 보였다. 본 결과에서 단일약재보다 복합처방이 효과적임을 보였으며 이러한 상호간의 효능비교는 다른 지표나 in vivo 등의 진행된 실험에서 지속적으로 연구되어야 할 것으로 생각된다.

### 감사의 글

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

### 참고문헌

1. 朱震亨 : 丹溪心法附餘, 서울, 대성문화사, p.527, 1982.
2. 朱震亨 : 丹溪心法, 서울, 행림서원, p.16,195,278,320,324, 1965.
3. 方賢 : 奇效良方(IV), 香港, 商務印書館, p.276,551-563, 1977.
4. 許浚 : 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, pp.262-264, 1978.
5. 林佩琴 : 類證治裁, 서울, 成輔社, pp.407-416, 1980.
6. 閔仁植 : 古今醫方, 서울, 創美社, p.180, 1978.
7. 徐學山 : 醫學門經, 臺北, 新文豐出版公司, pp.329-331, 1977.
8. 周命新 : 醫門寶鑑, 서울, 三協出版社, p.231,232, 1964.
9. 王顯明 : 中醫內科辨證學, 北京, 人民衛生出版社, p.172-175, 1984.
10. 尹吉榮 : 東醫方劑學, 서울, 高文社, p.134,135, 1980.
11. 金定濟 : 診療要鑑(下), 서울, 東洋醫學研究院出版社, p.282,1974.
12. 李 挺 : 標準醫學入門, 서울, 大成文化社, p.461, 1984.
13. 申載鏞 : 方藥合編解說, 서울, 成輔社, p.174,175, 1988.
14. 趙世衡 : 東醫世臨床處方集, 서울, 高麗書店, p.146, 1971.
15. 黃度淵 : 證脈方藥合編, 서울, 南山堂, p.241, 1984.
16. Fridovich I. : Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. J. Biol. Chem. 245:4053-4057, 1970.
17. Killogg E. W., Fridovich I. : Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymatically generated superoxide and hydrogen peroxide. J. Biol. Chem. 252:6721-6728, 1977.
18. Harber F., Weiss J. : The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by anion salts. Proc. Roy. Soc. London A. 147:333-351, 1934.
19. Graf E, Mahoney JR, Bryant RG, Eaton JW : Iron-catalyzed hydroxyl radical formation : Stringent requirement for free iron coordination site. J. Biol. Chem. 259:3620-3624, 1984.
20. 黃官綉 : 本草求真, 서울, 醫聖堂, p.145, 1997.
21. Myers M. L., Bolli R., Lekich R. F., Hartley C. J., Roberts R.

22. Fridovich, I. : The biology of oxygen radicals. Sci., 201: 875-880, 1978.
23. Hertz F., Cloarec A. : Pharmacology of free radicals: Recent views on their action to inflammatory mechanism. Life Sci. 34:713-720, 1984.
24. Klebanoff S. J. : Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. Ann. Int. Med. 93:480-489, 1980.
25. McCord J. M., Fridovich I. : The biology and pathology of oxygen free radicals. Ann. Int. Med. 89:122-127, 1978.
26. 金城煥 : 手拈散이 再灌流裝置下의 心臓에 미치는 影響, 서울, 慶熙大學校 碩士學位論文, 1997.
27. 姜官昊 : 手拈散이 虛血生 心臓의 心筋 酵素에 미치는 影響, 서울, 慶熙大學校 碩士學位論文, 1998.
28. Zhang R., Pinson A., Samuni A. : Both hydroxylamine and nitroxide protect cardiomyocytes from oxidative stress. Free Radical Biology & Medicine 24(1):66-75, 1998.
29. Mosmann T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assay. J. Immunol. Methods 65:55-63, 1983.
30. Buege J. A., Aust S. D. : Microsomal lipid peroxidation. In 「Methods in enzymology」. Vol.52, Academic Press, New York. p.306, 1978.
31. 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.
32. 辛民教 : 臨床本草學, 서울, 南山堂, p.417,418,454,455,466,467, 470,471, 1986.
33. 申佶求 : 申氏本草, 서울, 壽文社, 539-541,581,582,605,606, 1973.
34. 江蘇新醫學院編 : 中藥大辭典(上,下), 香港, 上海科學技術出版社, pp.384- 386, 726,727,1167-1169,1574, 1975.
35. 朴 英 · 金泰熙, 漢方診斷學, 서울, 성보사, pp.194-197, 1986.
36. Frank L., Massaro D. : Oxygen toxicity. Am. J. Med. 69:117-126, 1980.
37. Maestro R. F., Thaw H. H., Bjork J., Planker M., Arfors K. E.: Free radicals as mediators of tissue injury. Acta Physiol. Scand. Suppl. 492:43-57. 1980.
38. Dodd N. J. F., Mukherjee T. : Free radical formation from anthracycline antitumor. agents and model system-I: Model naphthoquinones and anthraquinones. Biochem. Pharmacol. 33(3)379-385, 1984.
39. Mason R. P. : Free radical intermediates in the metabolism of toxic chemicals. In "Free radicals in biology"(Pryer, W. A. ed.). Academic Press, New York pp.161-222, 1982.
40. Sinha B. K., Trush M. A. Kalyanaraman B. : Free radical metabolism of VP-16 and inhibition anthracycline-induced lipid peroxidation. Biochem. Pharmacol 32(22):3495-3498. 1983.