

XO/HX에 의하여 손상된 심근세포에 대한 瓜蒌薤白白酒湯 추출물의 방어효과

박준수 · 권강범 · 문형철¹ · 김인수 · 강길성 · 김인규 · 김인섭 · 류도곤*

원광대학교 한의과대학 생리학교실, 1: 원광대학교 한의과대학 침구학교실

Protective Effects of Guaruhaebaekbaekju-tang Extract in XO/HX-treated Rat Myocardial Cells

Jun Su Park, Kang Beom Kwon, Hyoung Chul Moon¹, In Su Kim,
Gil Seong Kang, In Gyu Kim, In Seob Kim, Do Gon Ryu*

Department of Physiology, College of Oriental Medicine,

1: Department of Acupuncture and Moxibustion, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

To certify the protective effect of herbal medicine on myocardial damage against oxygen free radical-induced cardiotoxicity, cytotoxicity was measured using by MTT assay, LDH activity and thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) assay in the presence of Guaruhaebaekbaekju-tang(GHBT) extracts or single constituents of this prescription. Myocardial toxicity was evaluated in neonatal rat cardiocytes in cultures. In the present study, xanthine oxidase/hypoxanthine (XO/HX) resulted in a decrease in cell viability, an increase in LDH activity in culture medium and lipid peroxidation in cultured myocardial cells. In the effect of GHBT extract, it showed the prevention from the XO/HX-induced cardiotoxicity such as the decrease of LDH activity and lipid peroxidation. In the protective effect of Fructus Trichosanthis (FT) and Bulbus Allii Macrostemi (BAM), all the extracts were significantly effective in the protection of XO/HX-induced cardiotoxicity in cultured myocardial cells. From these results, they show that XO/HX is cardiotoxic in cultured myocardial cells derived from neonatal rats, and it suggests that GHBT, FT and BAM extracts are positively effective in the blocking XO/HX-induced cardiotoxicity.

Key words : Guaruhaebaekbaekju-tang(瓜蒌薤白白酒湯), Fructus Trichosanthis, Bulbus Allii Macrostemi, xanthine oxidase/hypoxanthine, Myocardial cell, Cardiotoxicity

서 론

瓜蒌薤白白酒湯은 張仲景의 金匱要略에 「胸痹로 臥할 수 없고 心痛이 背部에 徹하는 者를 主治」한다고 記載¹⁾된 瓜蒌薤白半夏湯에서 半夏를 제거한 처방¹⁾으로 性은 無毒하고 味는 苦甘하여 除結胸. 潤心肺의 효능이 있는 瓜蒌實^{2,3)}과 性은 溫無毒味는 辛苦하여 滑利·散結·利竅하는 작용을 하는 薤白^{4,5)}으로 구성되어 있으며 白酒를 가하여 煎탕을 한후 복용을 하는 것으로 알려져 있다.

산소자유기는 최외각 전자궤도에 쌍을 이루고 있지 않는 홀수개의 전자가 존재하는 원자나 분자를 지칭하는 것으로써 이러

한 특수구조때문에 대단히 큰 반응성을 보여 생체내의 여러 가지 병태생리적인 반응에 관여하고 있어, 생체막의 불포화지방산을 과산화시키거나 단백질, DNA를 변화시킨다^{6,7)}고 알려져 있다. 특히, 산소자유기는 흥분성아미노산(excitatory amino acid, EAA)의 분비를 촉진시키고^{6,7)}, 세포내 Ca²⁺의 농도를 증가시켜 결국 세포의 사멸을 초래한다^{8,9)}. 실험적으로 산소자유기는 xanthine 혹은 hypoxanthine이 oxygen에 의해서 산화되는데 이 반응은 xanthine oxidase에 의해서 촉매되어 superoxide radical(O³⁻)과 hydrogen peroxide(H₂O₂)가 생성되며^{10,11)} 또한 철(iron)과 반응하여 hydroxyl radical(OH)을 생성한다^{12,13)}고 한다. 근래에 심장질환의 원인의 하나인 심근 세포의 손상이 산소자유기에 의하여 유발된다¹⁴⁾고 보고되어 있으며 최근 한약재가 산소자유기에 대한 심근세포 독성을 방어한다는 실험적 연구가 있는데¹⁵⁻²²⁾ 박 등은 甘豆湯 및 加味甘豆湯 추출물이 산소자유기에 의한

* 교신저자 : 이강창, 경기도 군포시 산본동 1126-1, 원광대학교 군포병원

· E-mail : kcl207@wonkwang.ac.kr Tel : 031-390-2367

· 접수 : 2003/02/11 · 수정 : 2003/03/08 · 채택 : 2003/04/07

Lactate dehydrogenase (LDH)의 누출증가를 차단하였다¹⁷⁾고 하였고 전 등은 手拈散 추출물의 심근세포에서의 항산화효과 등을 보고하였으며²⁰⁾, 특히 안 등¹⁹⁾은 瓜蒌薤白半夏湯과 그 구성약물인 瓜蒌實, 薤白, 半夏 추출물이 배양 심근세포에서 산소자유기에 의해 증가한 LDH의 누출과 박동수의 감소를 유의하게 방어하고 이러한 결과는 단일약재보다 처방에서 효과적이라고 하였으나 瓜蒌薤白白酒湯에 대한 보고는 접할 수 없었다.

이에 저자는 瓜蒌薤白白酒湯과 그 구성약물인 瓜蒌實, 薤白의 산소자유기에 의한 심근세포 손상에 미치는 영향을 구명하기 위하여 본 실험을 시도하였다. 먼저 XO/HX의 심근세포 독성을 MTT 정량을 이용하여 관찰하였으며 瓜蒌薤白白酒湯과 그 구성약물을 전처리한 심근세포를 XO/HX에 노출시킨 후 Lipid peroxidation 정량, Lactate dehydrogenase (LDH) 활성도 측정을 통하여 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^{2+} , Mg^{2+} -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 분쇄한 후 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 1×10^6 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 phosphate buffered saline (PBS)로 3-4회 세척하였으며 세포는 배양 7일 후 본 실험에 사용하였다.

3. 추출물의 제조

실험에 사용한 약재는 瓜蒌薤白白酒湯(Guaruhaebaekbaekju-tang, GHBT)¹⁾ 瓜蒌實(Fructus Trichosanthis, FT) 및 薤白(Bulbus Allii Macrostemi, BAM) 200g에 각각 9배용의 白酒를 가하여 환저플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 3시간 동안 전열기로 전당하였다. 이후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 회전 진공농축기로 감압농축한 후 동결건조기에서 건조하여 각각 瓜蒌薤白白酒湯 11.44g, 瓜蒌實 15.82g, 薤白 15.41g의 분말 시료를 얻었다. 枳實薤白白酒湯의 분량은 Table 1과 같다.

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 100mU/ml, 10mU/ml, 1 mU/ml의 저장액을, HX의 경우 1M, 100mM, 10 mM의 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 후 실험 당일 적당한 양으로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다.

Table 1. Prescription of Guaruhaebaekbaekju-tang

韓藥名	Pharmacognostic Name	Weight
薤白	<i>Bulbus Allii Macrostemi</i>	100g
瓜蒌實	<i>Fructus Trichosanthis</i>	100g
Total Weight		200g

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) 정량²³⁾은 XO/HX를 처리한 배양 심근세포를 PBS로 3회 세척한 다음, 전날 제조한 50 mg/ml의 MTT를 well당 최종농도로 희석하여 넣어 37℃, 5% CO₂로 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) Lipid peroxidation 정량²⁵⁾

XO/HX과 한약재를 일정시간 동안 처리한 후 배양 심근세포의 상층액과 세포용해액내의 TBARS (thiobarbituric acid reactive substances)를 측정하는 것으로, 위의 액에 12N H₂SO₄와 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 원심하여 이를 제거한 다음 553nm에서 형광측정법에 의해 측정하였다.

3) Lactate dehydrogenase (LDH) 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 측정하는 방법이다.

7. 통계처리

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

실험성적

1. MTT 정량

XO가 배양 심근세포에 미치는 독성을 관찰하기 위하여 1~30 mU/ml 농도로 54시간 동안 처리한 배양 심근세포에 세포생존율을 MTT 정량법에 의하여 측정하고 처리한 XO의 농도에 비례하여 세포의 생존율이 감소하였다. 특히 15 mU/ml, 30 mU/ml XO의 처리에서는 세포의 생존율이 대조군에 비하여 48.7%($p<0.05$), 35.7%($p<0.01$)로 유의한 감소를 나타냈다(Fig. 1).

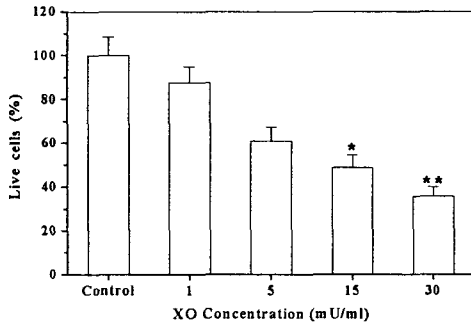


Fig. 1. Dose-response relationship of XO treatment in cultured rat myocardial cells. Cultures were exposed to various concentrations of XO for 54 hours, respectively. Cell viability was measured by MTT assay and determined as % of control. The results indicate the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the control group are marked with asterisk. * $p<0.05$, ** $p<0.01$

또한 15 mU/ml의 XO/HX가 포함된 배양액에서 심근세포를 42~60시간동안 배양한 후 시간의 경과에 따른 세포의 생존율을 MTT 정량법에 의하여 조사하였다. 그 결과 처리한 시간에 의존적으로 세포 생존율이 감소하였으며 특히 54시간, 60시간에서 대조군에 비하여 각각 49.7%($p<0.05$), 25.3%($p<0.01$)로 유의한 감소를 나타냈다 (Fig. 2).

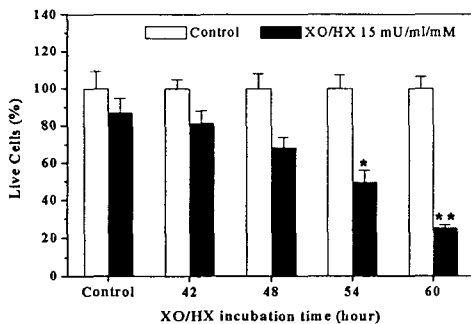


Fig. 2. Time-response relationship of XO/HX treatment in cultured rat myocardial cells. Cultured rat myocardial cells were treated with 15 mU/ml XO in 0.1 mM HX for various time intervals. Cell viability was measured by MTT assay and determined as % of control. The values are the mean±SE for 6 experiments. Asterisk indicates the significant differences between groups. * $p<0.05$; ** $p<0.01$

2. Lipid peroxidation 정량

1) XO/HX가 lipid peroxidation에 미치는 영향

XO/HX의 농도에 따른 lipid peroxidation을 측정하기 위하여 0.1 mM HX에 1~45 mU/ml의 농도로 XO가 각각 포함된 배양액에서 심근세포를 54시간 동안 처리한 후 TBARS와 세포의

생존율을 대조군과 비교 조사하였다. 그 결과 처리한 농도에 비례하여 세포생존율의 감소와 TBARS의 증가를 보였다. 특히 30 mU/ml, 45 mU/ml XO 처리에서는 대조군에 비하여 각각 151.4%($p<0.05$), 186.4%($p<0.01$)로 TBARS의 유의한 증가를 나타냈다. MCV값은 30 mU/ml XO 처리에서 나타났다 (Fig. 3).

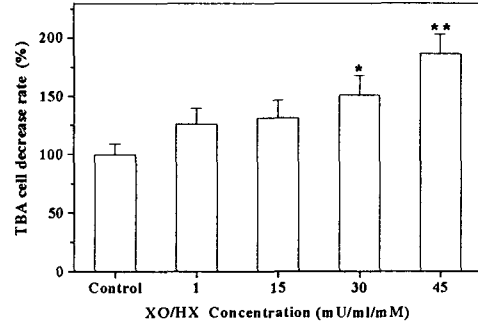


Fig. 3. Dose-response relationship of XO/HX on lipid peroxidation in cultured rat myocardial cells. Cultured rat myocardial cells were exposed to various concentrations of XO in 0.1 mM HX for 54 hours. Thiobarbituric acid(TBA) fluorometric assay was adopted to analyse lipid peroxidation and TBA reactive substance(TBARS) were represent as pmol/10⁶ cells. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisk. * $p<0.05$; ** $p<0.01$

2) XO/HX 처리에 의해 증가한 lipid peroxidation에 미치는 한약재의 효과

배양 심근세포에 대한 XO/HX의 세포독성에 대한 瓜蒌薤白白酒湯과 그 구성약물인 瓜蒌實, 薤白의 효과를 TBA fluorometric assay를 통하여 lipid peroxidation량의 측면에서 조사하기 위하여 MCV값인 30 mU/ml XO/0.1 mM HX의 농도에서 54시간 동안 노출시키기 3시간 전에 각각 40~100 μg/ml의 한약재 추출물이 포함된 배양액에서 전처리한 후 이의 방어효과를 조사하였다. 瓜蒌薤白白酒湯의 경우 배양한 후 XO/HX를 처리하지 않고 瓜蒌薤白白酒湯 추출물을 농도별로 처리한 경우 lipid peroxidation에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 30 mU/ml XO/HX를 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 66.2%가 증가하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 瓜蒌薤白白酒湯 추출물을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 lipid peroxidation이 감소하여 XO/HX에 의한 독성을 방어하였으며 특히 100 μg/ml 瓜蒌薤白白酒湯 추출물을 전 처리한 경우에 瓜蒌薤白白酒湯 추출물을 전 처리하지 않고 XO/HX만을 처리한 군에 비하여 통계적으로 유의하게 감소하였다 (Fig. 4).

瓜蒌實의 경우 배양한 후 XO/HX를 처리하지 않고 瓜蒌實 추출물을 농도별로 처리한 경우 lipid peroxidation에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 30 mU/ml XO/HX를 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 lipid peroxidation이 68.3% 증가하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 瓜蒌實 추출물을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 lipid peroxidation이 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 lipid peroxidation에 유의한 변화는 나

타나지 않았다. 30 mU/ml XO/HX를 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 lipid peroxidation이 56.8% 증가하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 薤白 추출물을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 lipid peroxidation이 감소하여 XO/HX에 의한 독성을 방어하였으며 특히 100 µg/ml 薤白 추출물을 전 처리한 경우에 薤白 추출물을 전 처리하지 않고 XO/HX만을 처리한 군에 비하여 통계적으로 유의하게 감소하였다(Fig. 4).

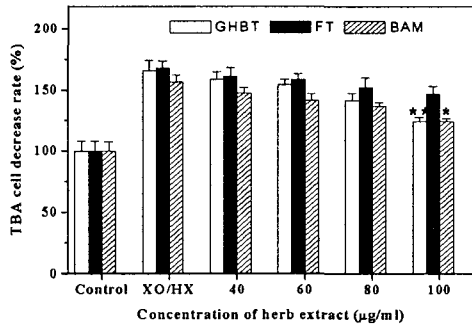


Fig. 4. Dose-response relationship of Guaruhaebaekbaekju-tang (GGBT), Fructus Trichosanthis (FT) and Bulbus Allii Macrostemi (BAM) extract for lipid peroxidation in cultured rat myocardial cells. Cultured rat myocardial cells were preincubated with various concentrations of herb extracts for 3 hours, and then exposed to 30 mU/ml XO in 0.1 mM HX for 54 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

3. LDH 활성도 측정

1) XO/HX가 LDH 활성도에 미치는 영향

XO/HX의 농도에 따른 LDH 활성도를 측정하기 위하여 0.1 mM HX에 3~24 mU/ml 농도로 XO가 각각 포함된 배양액에서 심근세포를 54시간 동안 처리한 후 세포의 생존율을 LDH 활성도를 이용하여 대조군과 비교 조사하였다. 그 결과 처리한 농도에 비례하여 LDH 활성도가 증가하여 세포의 생존율을 감소시켰으며 특히 12 mU/ml, 24 mU/ml XO 처리에서는 대조군100%에 비하여 각각 162.5% (p<0.05), 173.4% (p<0.01)로 유의한 증가를 나타냈다. MCV값은 12 mU/ml XO 처리에서 나타났다 (Fig. 5).

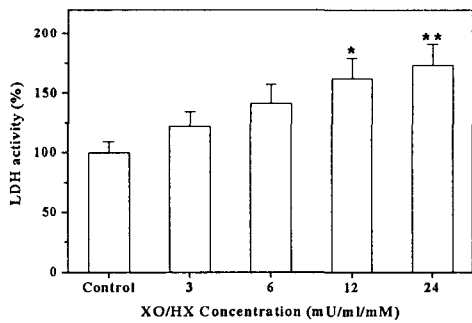


Fig. 5. Dose-response relationship of XO/HX on LDH activity in culture medium of rat myocardial cells. Cultured rat myocardial cells were exposed to various concentrations of XO in 0.1 mM HX for 54 hours. LDH release was measured at wavelength of 340 nm. The control value represents 12.8±1.1 umol/min/mg 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 세포 독성에 대하여 瓜蒌薤白白酒湯, 瓜蒌實, 薤白의 효과를 LDH 활성도의 측면에서 조사하기 위하여 0.1 mM HX에 MCV값인 12 mU/ml XO의 농도에서 54시간 동안 노출시키기 3시간 전에 각각 15~150 µg/ml의 한약재 추출물이 포함된 배양액에서 전처리한 후 세포외액내로 분비된 LDH의 양을 조사하였다. 瓜蒌薤白白酒湯의 경우 배양한 후 XO/HX를 처리하지 않고 瓜蒌薤白白酒湯 추출물을 농도별로 처리한 경우 LDH 활성도에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 12 mU/ml XO/0.1 mM HX을 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 63.9% 증가하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 瓜蒌薤白白酒湯 추출물을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 LDH 활성도가 감소하여 XO/HX에 의한 독성을 방어하였으며 특히 150 µg/ml 瓜蒌薤白白酒湯 추출물을 전처리한 경우에 瓜蒌薤白白酒湯 추출물을 전 처리하지 않고 XO/HX만을 처리한 군 163.9%에 비하여 122.5% (p<0.01)로 유의하게 감소하였다 (Fig. 6). 瓜蒌實의 경우 배양한 후 XO/HX를 처리하지 않고 瓜蒌實 추출물을 농도별로 처리한 경우 LDH 활성도에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 12 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 통계적으로 유의한 변화는 나타나지 않았다 (Fig. 6).

薤白의 경우 배양한 후 XO/HX를 처리하지 않고 薤白 추출물을 농도별로 처리한 경우 LDH 활성도에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 12 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 통계적으로 유의한 변화는 나타나지 않았다 (Fig. 6).

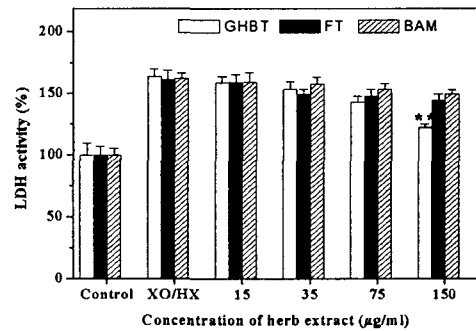


Fig. 6. Dose-response relationship of Guaruhaebaekbaekju-tang (GGBT), Fructus Trichosanthis (FT) and Bulbus Allii Macrostemi (BAM) water extract for LDH activity in cultured rat myocardial cells. Cultured rat myocardial cells were preincubated with various concentrations of herb extracts for 3 hours, and then exposed to 12 mU/ml XO in 0.1 mM HX for 54 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<0.01

고찰

瓜蒌薤白白酒湯은 胸陽의 不振 氣滯, 痰阻로 인하여 발생 하는 胸痺의 輕證을 主治하는 方劑이다^{27,32}. 胸陽이 부진하면 痰이 氣機를 阻塞하므로 胸部가 隱痛하고 혹은 胸痛이 背에까지 미치게 된다. 痰濁이 氣滯하면 肺氣의 宣降이 失常하여 喘息 咳唾, 短氣, 苔白, 脈象의 沈弦 또는 緊 등의 증상이 나타난다. 이러한 病證에는 通陽散結, 行氣祛痰하는 枳實白朮湯을 活用한다고 한다^{27,32}. 본 방은 祛痰, 散結開胸하는 효능이 좋은 瓜蒌를 君藥으로 하였고, 溫通滑利하고 通陽行氣, 止痛하는 薤白을 臣藥으로 하였으며, 白酒의 行氣活血하는 힘을 빌어 薤白의 行氣, 通陽作用을 더욱 강하게 하므로 佐·使藥으로 하였다. 이와같이 諸藥이 合用하여 胸中의 陽氣를 宣通하면 痰濁이 消散하고, 氣機가 舒暢하면 胸痺諸症이 自除되어³¹ 협심증·심부전·심장신경증·심장조절이상·심장성전식·심장관막증·심근경색증·늑간신경통 등에 사용된다³³고 알려져 있다. 심장질환의 원인의 하나인 심근 세포의 손상이 산소자유기에 의하여 유발된다¹⁴고 보고되어 있으며, 산소자유기는 xanthine 혹은 hypoxanthine이 oxygen에 의해서 산화되는데 이 반응은 xanthine oxidase에 의해서 촉매되어 superoxide radical(O²⁻)과 hydrogen peroxide(H₂O₂)가 생산된다^{10,11}. 또한 저산소증이나 허혈 및 중풍과 같은 병적인 상태에서는 산소자유기가 비정상적으로 형성되어³⁴, 그 결과 세포막의 지질과산화반응을 촉진³⁵시킬 뿐만 아니라 protein kinase C(PKC)나 lipidphosphatase A2와 같은 이차전달자를 비롯하여 각종 효소나 단백질을 불활성시킴으로써 세포의 손상 및 조직의 괴사를 초래한다³⁶고 한다. 최근에 한약재가 산소자유기에 대한 심근세포 독성을 방어한다는 실험적 보고가 있는데^{15,22} 특히 안 등¹⁹은 瓜蒌薤白半夏湯과 그 구성약물인 瓜蒌實, 薤白, 半夏 추출물이 배양 심근세포에서 산소자유기에 의해 증가한 LDH의 누출과 박동수의 감소를 유의하게 방어하고 이러한 효과는 단일약재보다 처방으로서의 효과가 더 뛰어난 것으로 보고하였다. 金匱要略^{27,29,31,32}에 瓜蒌薤白白酒湯은 瓜蒌薤白半夏湯과 더불어 胸痺를 치료하는 처방으로 알려졌다³⁷.

본 실험은 심근세포에 산소자유기를 유발하기 위하여 xanthine oxidase/hypoxanthine(XO/HX)를 이용하였으며 이에 대한 瓜蒌薤白白酒湯의 방어효과를 다양한 지표를 이용하여 조사하였다. 먼저 XO/HX의 심근세포 독성효과를 MTT 정량을 이용하여 조사하였다. MTT 정량²³은 세포의 생존율을 측정하는 방법으로서 이 실험에서 XO/HX를 처리한 후 위의 방법에 의하여 세포의 생존율을 조사한 결과 농도와 시간에 의존적으로 생존율을 감소시켰다(Fig. 1~2). 이러한 XO/HX의 심근세포 독성에 대하여 瓜蒌薤白白酒湯과 구성약물인 瓜蒌實, 薤白 방어효과를 lipid peroxidation, LDH activity를 이용하여 조사하였다. 지질의 과산화반응은 보통 생성 산물인 Malondialdehyde(MDA)를 thiobarbituric acid(TBA)와 반응시켜 생성되는 붉은색의 물질(TBA reactive substance, TBARS)을 측정하여 표시하는데²⁵ 지질과산화반응에서 XO/HX의 독성을 조사한 결과 농도

의존적으로 TBARS양을 증가시켜 세포에 독성을 나타냈다(Fig. 3). 30 mU/ml XO의 농도에서 대조군에 비하여 TBARS가 약 50% 증가하여 瓜蒌薤白白酒湯과 구성약물을 1~45 µg/ml의 농도로 3시간 전처리한 후 30 mU/ml의 XO를 54시간 처리하여 XO/HX에 의해 증가한 TBARS에 대한 억제효과를 조사하였다. 그 결과 瓜蒌薤白白酒湯 추출물은 100 µg/ml의 농도에서 유의한 억제효과를 나타냈으며 구성약물 중 薤白 추출물이 100 µg/ml의 농도에서 유의한 억제효과를 나타냈으나 瓜蒌實 추출물은 유의한 억제효과를 나타내지 못하였다(Fig. 4). LDH는 살아있는 세포의 형질막의 손상으로 인하여 누출되는 효소이므로 세포막손상의 지표가 되는 효소이다. XO/HX의 세포독성을 Zhang 등의 보고³⁹에 근거하여 조사한 결과 농도의존적으로 LDH 활성도를 증가시킴으로써 세포독성을 나타냈다(Fig. 5). 이러한 XO/HX의 심근세포독성에 대하여 瓜蒌薤白白酒湯과 구성약물을 3시간 동안 전처리한 후 세포배양액내로 누출된 LDH의 양을 조사하였다. 瓜蒌薤白白酒湯 추출물은 구성약물에 비하여 LDH 누출의 억제 효과가 뛰어났으며 150 µg/ml의 농도에서는 유의한 억제효과가 나타났다. 구성약물은 약간의 억제효과가 나타났으나 통계적으로 유의한 억제효과를 나타내지 못하였다(Fig. 6).

이상을 종합해보면 瓜蒌薤白白酒湯은 배양 심근세포의 XO/HX에 의한 산화적 손상에 대하여 방어효과를 나타냈으며 그 작용은 구성약물중 薤白과 관련이 깊을 것으로 생각된다. 앞으로 이에 대한 정확한 기전 구명 및 in vivo 모델에서의 효과확인이 필요하리라 사료된다.

결론

瓜蒌薤白白酒湯과 그의 구성약물인 瓜蒌實, 薤白 추출물이 산소자유기에 의한 심근세포 손상에 미치는 영향을 구명하기 위하여 백서에서 분리하여 배양한 심근세포에 이들 한약재의 白酒 추출물을 전 처리한 후 xanthine oxidase/hypoxanthine(XO/HX)의 세포독성효과와 이에 대한 방어효과를 관찰한 결과 XO/HX는 농도와 시간의존적으로 심근세포 생존율의 감소를 나타냈으나 瓜蒌薤白白酒湯 추출물을 전처리한 군에서는 XO/HX에 의한 지질과산화의 증가와 LDH 활성도의 증가가 나타나지 않았다. 종합하면 XO/HX는 심근세포에 독성을 나타냈으며 瓜蒌薤白白酒湯, 그 구성약물 중 瓜蒌實에 비해 薤白에서 효과적인 방어를 보여 주었으나 복합처방에는 미치지 못하였다. 이는 한약의 配伍효능에 대한 근거로 생각되며 이를 기초로 다양한 in vitro, in vivo 모델에서의 기전구명이 필요하리라 사료된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술개발사업의 지원(HMP-CO-03-0003)과 2002년도 원광대학교 교비지원에 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. 申佶求 : 申氏本草學, 서울, 壽文社, pp.407-409,594-596,617-620,697-699, 1982.
3. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순: 中藥大辭典, 서울, 도서출판 정담, p.470- 482, 1997.
4. 辛民教: 臨床本草學, 서울, 永林出版社, p.398,556,563,624,636, 1986.
5. 李尙仁, 安德均, 辛民教: 漢藥臨床應用, 서울, 成輔社, pp.266-269, 500- 503,514-519, 1982.
6. Pellegrini-Giampietro D. E., Cherici G., Alesiani M., Carla V., Morroni F. : Excitatory amino acid release from rat hippocampal slices as a consequence of free-radical formation. *J. Neurochem.*, 51:1960-1963, 1988.
7. Pellegrini-Giampietro D. E., Cherici G., Alesiani M., Carla V., Morroni F. : Excitatory amino acid and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. *J. Neurosci.* 10:1035-1041, 1990.
8. Mayer M. L., Westbrook G. L. : Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurons. *J. Physiol.*, 394:501-527, 1987.
9. Zeman S., Llyod C., Meldrum B., Leigh P. N. : Excitatory amino acid, free radicals and yhe pathogenesis of motor neuron disease, *Neuropathol, Appl. Neurobiol.*, 20:219-231, 1994.
10. Fridovich I. : Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, 245:4053-4057, 1970.
11. Killogg E. W., Fridovich I. : Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymatically generated superoxide and hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.*, 252:6721-6728, 1977.
12. Harber F., Weiss J. : The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by anion salts. *Proc. Roy. Soc. London A.* 147:333-351, 1934.
13. 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.
14. 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.
15. 한동훈, 권강범, 황인진, 김우경, 김희찬, 오광수, 이호승, 류도곤 : 失笑散 전탕액이 XO/HX에 의해 손상된 배양 심근세포 박동수에 미치는 영향, *대한동의생리병리학회지* 15(4), 566-570, 2001.
16. 손창식, 권강범, 정종선, 황인진, 김우경, 김희찬, 오광수, 이호승, 류도곤 : 丹參欬 전탕액이 산소자유기에 의해 손상된 심근세포의 LDH 활성도에 미치는 영향, *대한동의생리병리학회지* 15(4):621-625, 2001.
17. 박준배, 권강범, 김우경, 오광수, 김인규, 이호섭, 기영운, 금경수, 류도곤 : 甘豆湯 및 加味甘豆湯 전탕액이 배양 심근세포의 LDH 활성도에 미치는 영향, *대한동의생리병리학회지* 15(5):730-734, 2001.
18. 한동훈, 권강범, 김우경, 오광수, 김인규, 류도곤 : 失笑散 전탕액과 구성약물이 배양 심근세포의 LDH 활성도에 미치는 영향, *대한동의생리병리학회지* 15(5):770-774, 2001.
19. 안효창, 권강범, 박은영, 장승호, 류도곤 : 瓜蒌薤白半夏湯 추출물이 배양 심근세포의 박동수와 LDH 활성도에 미치는 영향, *대한동의생리병리학회지*, 16(2):289-295, 2002.
20. 전영석, 권강범, 박은영, 성은경, 박승택, 류도곤 : 手拈散 전탕액이 배양심근세포에 미치는 영향, *대한동의생리병리학회지*, 16(2):353-358, 2002.
21. 손창식, 권강범, 김상범, 이호승, 이호섭, 서은아, 류도곤 : 丹參欬전탕액이 心筋細胞 박동수에 미치는 영향, *대한동의생리병리학회지* 15(2):241-245, 2001.
22. 박준배, 권강범, 이호승, 김희찬, 김우경, 오광수, 류도곤 : 甘豆湯 및 加味甘豆湯 전탕액이 배양 심근세포의 총단백질량에 미치는 영향, *대한동의생리병리학회지*, 15(3):459-463. 2001.
23. Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. *J. Immunol. Methods*, 65:55-63, 1983.
24. K. Takahashi, Y. Fujita, T. Mayumi, T. Hama and T. Kishi : Effect of adriamycin on cultured mouse embryo myocardial cells. *Chem. Pharm. Bull.*, 35(1):326-334, 1987.
25. Buege J. A., Aust S. D. : Microsomal lipid peroxidation. In "Methods in enzymology" . Vol. 52, Academic Press, New York. p.306, 1978.
26. Zhi Xiu Lin, J.R.S. Hoult, Amala Raman : Sulphorhodamine B assay for measuring proliferation melanocyte cell line and its application to the evaluation of crude drugs used in the treatment of vililigo. *J. of Ethnopharmacology*, 66. 141-150, 1999.
27. 醫學研究社 譯編 : (正統)金匱要略, 서울, 醫學研究社, pp.190-193, 1996.
28. 李克光 主編: 金匱要略, 서울, 아울로스출판사, pp.218-225, 1994.
29. 李東建 編著: (國譯)金匱要略, 서울, 書苑堂, pp.136-138, 1996.
30. 李尙仁, 金東傑, 李暎鐘, 盧昇鉉, 朱榮丞 共編譯 : 方劑學, 서울, 圖書出版 永林社, pp.233-234, 1990.
31. 再先德 主編 : 金匱要略, 北京, 春秋出版社, pp.79-83, 1998.
32. 李文瑞 主編 : 金匱要略湯證論治, 北京, 中國科學技術出版社, pp.271-282, 1993.
33. 具本禮: 新漢方處方解說, 서울, (株)保健新報, pp.57-60, 1985.
34. Jesberger J. A., Richardson J. S. : Oxygen free radicals and

- brain dysfunction. *Int. J. Neurosci* 57:1-17, 1991.
35. 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.
36. Floyd R. A. : Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia. *FASEB J.* 4:2587-2597, 1990.
37. 具本汎, 李京變, 裴亨變, 金永錫, 李源哲 共編著 : 東醫心系內科學, 서울, 書苑堂, p.58, 1992.
38. 全國韓醫科大學 心系內科學教室 編 : 東醫心系內科學(上), 서울, 書苑堂, pp.202-224, 448-455, 1995.
39. Zhang R., Pinson A., Samuni A. : Both hydroxylamine and nitroxide protect cardiomyocytes form oxidative stress. *Free Radical Biology & Medicine* 24(1):66-75, 1998.
40. Waalkes M. P., Pvirier L. A. : In vitro cadmium-DNA interactions: Cooperativity of binding and competitive antagonism by calcium, magnesium and zinc. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 75:539-549, 1984.