

蓮子肉의 심근 경색 모델에 대한 Proteom 분석

안창준 · 이기현 · 김양석 · 홍무창 · 배현수 · 김종훈¹ · 신민규*

경희대학교 한의과대학 생리학교실, 1: 전북대학교 수의과대학 수의생리학교실

Effect Of Nelumbinis Semen On The Recovery Of The Cardiac Muscle Activity by Proteome Analysis

Chang Joon Ahn, Gi Hyun Lee, Yang Seok Kim, Moo Chang Hong, Hyun Su Bae, Jong Hoon Kim¹, Min Kyu Shin*

Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University,

1: Department of Veterinary Physiology, College of Veterinary Medicine, Chonbuk National University

The purpose of this investigation was to confirm the effect of Nelumbinis Semen on the recovery of the cardiac muscle activity. We studied the effect of Nelumbinis Semen on the recovery of ischemic SD rat hearts perfused with Nelumbinis Semen, using a model of ex-vivo perfusion (Non-working Langendorff perfusion system) and working heart perfusion system at the same time. To explore the effect of Nelumbinis Semen at the level of proteome, two-dimensional electrophoresis and MALDI-TOF analysis were performed. We found out that the proteins increased after perfusion of Nelumbinis Semen are Mitochondrial aconitase, ATP synthase alpha chain, Lactate dehydrogenase B, Creatine kinase, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, Alpha B-crystallin, Myosin and Heart fatty acid binding protein. Almost, all of them are concerned with ATP production in the cardiac muscle with glucose metabolism.

Key words : Nelumbinis Semen, cardiac muscle activity, proteome

서 론

허혈성 심장질환은 관상동맥의 죽상경화등에 의해 심장 근육에 대한 혈류가 감소하여 초래되는 심장질환으로 임상적으로 협심증, 심근경색증, 심인성급사 및 심부전 등으로 나타나며 한의학적으로 胸痺, 胸痛, 厥心痛, 卒心痛, 眞心痛등의 범주에 속한다¹⁾. 일반적으로 허혈성 심장질환에는 혈전용해 약물요법 또는 침습적 방법 등의 재관류 요법이 사용되나 재관류 요법은 그 자체가 조직의 손상을 초래할 수 있다는 실험적 근거가 제시되고 있다²⁾. 기존의 치료법을 보완 할 수 있는 치료약물이 개발된다면 임상치료에 도움이 될 것이다.

蓮子肉은 수련과에 속한 다년생 수생식물인 연꽃(Nelumbo nucifera Gaertn)의 성숙된 종자를 건조한 것으로, 성미가 甘澁하고 心脾腎經에 귀경한다. 腎經으로 들어가 益腎 固精시키며, 心經을 들어가 養心 安神시키며 脾經으로 들어가 補脾 止瀉시키는

효과가 있다³⁾.

Langendorff 실험법은 동물의 심장을 적출하여 비작업성 관류장치로 연결한 것으로 심장의 산소공급, 관류액 공급, 실험결과 측정에서 간편성과 정확도를 기할 수 있다⁴⁾. 최근 한의학에서도 Langendorff 실험법을 이용한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 현재까지 芎夏湯⁵⁾, 勝金湯⁶⁾, 苓桂朮甘湯⁷⁾, 半夏白朮天麻湯, 瓜蒌薤白半夏湯, 加味瓜蒌薤白半夏湯⁸⁾, 麝香蘇合元⁹⁾, 導赤散¹⁰⁾ 등을 이용한 處方 위주로 연구가 진행되었으나, 單味를 이용한 실험적 연구나 투여 약제가 효과를 나타내는 작용 기전에 대한 연구는 찾아 볼 수 없다.

분자생물학적인 연구방법 중, 프로테오믹스(Proteomix)기법을 이용하면 단백질의 발현을 종합적이고 정량적으로 측정할 수 있기 때문에 빠른 시간 내에 특정 단백질의 존재나 그 양을 파악할 수 있어 특정 질환에서의 단백질변화 관찰이 가능하며¹¹⁾, 이를 통해 질병의 발현 및 약물 작용 기전을 총괄적으로 이해할 수 있어 유용하게 응용되고 있다¹²⁾.

이에 저자는 蓮子肉의 심근 보호 효과에 대한 작용기전과 관련된 심장 단백질을 밝혀내기 위하여 흰쥐의 심장에 연자육을 투여한 후 적출하여 프로테오믹스(Proteomix)기법을 이용하여

* 교신저자 : 신민규, 서울시 동대문구 회기동 경희대학교 한의과대학

· E-mail : shinmk@khu.ac.kr, · Tel : 02-961-9316

· 접수 : 2010/08/23 · 수정 : 2010/10/22 · 채택 : 2010/11/04

다음과 같은 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 동물

본 실험에 사용한 雌性 흰쥐(Sprague-Dawley 계)의 체중은 250~300 g이었다. 실험동물의 사육환경은 온도 24~26℃, 상대 습도 50~60%로 유지시켰으며, 자동전원장치에 의해 12시간 간격으로 사육실의 조명을 통한 명암을 조절하였다. 또한 동물은 cage내에서 음용수와 사료를 자유롭게 섭취할 수 있게 하였다. 실험동물은 각각 蓮子肉을 투여한 실험군(Nelumbinis semen group)과 관류액만을 이용한 대조군(Control group), 심장 체외 순환 모델을 거치지 않은 정상군(Normal group)으로 분류하였다.

2. 약제와 검액 조제

본 실험에서는 蓮子肉 엑기스(順天堂, Taiwan)를 1 mg/ml 농도로 PBS에 희석하여 사용하였다. 蓮子肉에 포함하는 total alkaloid의 함량을 측정하고, 이를 다변량 pattern recognition analysis를 이용하여 Sunten 제품과 蓮子肉 추출물을 비교하여 Sunten 제품의 total alkaloids의 함량치를 비교분석 하였는데 다음과 같다(Table 1).

Table 1. The comparison results of chromatographic HPLC pattern analysis of the total alkaloids of Nelumbinis Semen original oriental medicine(standard, left, 1 mg/ml) and Sunten products(tested sample, right, 1 mg/ml)

Sample	Simple mean (Ms)	weighted mean (Mw)	Matching ratio (%)	Similarity (%)
	280 nm	280 nm	280 nm	280 nm
NS OOM	1.000±0.000	1.000±0.000	100.0±0.0	100.0±0.0
Sunten products(b)	1.747±0.040	1.071±0.022	83.3±0.0	62.1±0.8

3. 체외순환 실험모형

본 실험에 이용한 심장체외순환 회로는 변형 Langendorff 순환장치(Modified Langendorff perfusion system)로, Langendorff에 의해 고안된 비작업성 체외순환장치(Non-working Langendorff perfusion system)와 Neeley에 의해 고안된 작업성 체외순환장치(Working heart perfusion system)를 동시에 부착한 것이다. 비작업성 체외순환장치는 관상동맥 관류를 통해 심장기능을 유지시키지만 좌심실을 통한 심적출을 없게 만들어 비작업성 심장 상태를 활용하는 방법으로, 실험초기 15분 및 심근경색유도 후 회복기의 첫 15분 동안 이용하며, 심장 적출시 및 심근경색시의 효소결핍에 대한 심장의 회복을 유도케 한다¹³⁾.

한편, 작업성 체외순환장치는 Neeley, Chain 등에 의해 고안된 것으로 심장 상방 20 cm 높이의 좌심방 저류조(Atrial bubble trap)을 통해 20 cmH₂O 압으로 좌심방내 순환되는 좌심방 장치(Left heart preperation)이다. 대동맥 박출량은 좌심방 내로 유입된 관류액이 좌심실을 통해 심장박동시마다 100 cmH₂O압에 해당되는 높이의 좌심방 저류조로 분당 20~30 ml씩 유출되는 양

으로 측정하였다. 이때 심박동에는 전기적 심실자극장치(Electrical pacin)는 이용하지 않았다. 작업성 심장은 심근경색 유도전 20분 및 심근경색 유도 후 비작업성 체외순환을 15분간 실시한 다음에 60분간 이용되며 심근경색 유도전후의 심장 회복 상태를 비교하는데 유의하다¹⁴⁾. 본 실험에서 대동맥 박출액과 관상동맥의 관류액은 재순환에 이용하지 않았다. 또 실험 시 심근 경색 후 작업성 심장박동을 실시하였을 때, 심근손상으로 인해 기능이 회복불량상태인 경우에는 비작업성 체외순환으로 유도하지 않음으로써 각 군이 동일한 조건하에서 실험되도록 하였다.

4. 단백질 분석

1) 시료의 적출

심장 체외 순환 과정이 끝난 후 심장을 곧바로, deep freezer(UNAIR, USA)에서 -76℃로 급속하게 냉동시켰다. 정상군은 실험동물과 같은 조건에서 사육한 흰쥐를 2시간 정도 절식시킨 후 pentobarbital을 5 mg/100 g 농도로 복강에 투여하여 마취시키고 개복하여 적출하였다. 각각 4개의 정상군, 5개의 대조군, 5개의 실험군을 시료 분석에 사용하였다.

2) 시료 용해 및 재수화(Rehydration)

실험 동물의 심장에서 추출한 left ventricle 40 mg을 7 M urea(Amresco Inc. Ohio, USA), 2 M thiourea(Amresco Inc. Ohio, USA), 100 mM DTE(Amresco Inc. Ohio, USA), 4% CHAPS(Amresco Inc. Ohio, USA), 40 mM Tris(Amresco Inc. Ohio, USA), 0.002% bromophenol blue dye(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)를 함유한 sample buffer 600 μl에 넣고, 전체 시료에 1X DNAase1(Roche Diagnostics Corporation, Indianapolis, USA), 1X protease inhibitor(Protease Inhibitor Cocktail Set I, Calbiochem, Darmstadt, Germany)를 첨가하였다. 전체 시료를 얼음 상자를 이용하여 4℃를 유지한 상태에서 homogenizer(Iwaki Pyrex, Ashahi, Japan)를 이용하여 분쇄 하였다. 전체 시료를 ultracentrifuge(Beckman Instruments Inc. USA)에서 55,000 rpm으로 1시간 원심분리시키고 상층액을 조심스럽게 분리하였다.

상층액 5 μl에 증류수를 45 μl 넣어서 50 μl를 만든 후 이중 5 μl, Bio-Rad Protein Assay 시약(Bio-Rad Laboratories, Inc. California, USA) 200 μl, 증류수 795 μl 넣고 spectrophotometer(DU500, Beckman Instruments Inc. Fullerton, USA)를 이용, 595 nm에서 흡광도를 측정하여 심장 단백질의 농도를 1.5 μg/ml로 조정하였다.

1.5 μg의 정량한 심장 단백질을 600 μl의 sample buffer에 첨가한 시료를 준비하고 Bio-Lyte Ampolite(Bio-Rad Laboratories, Inc. California, USA) 12 μl를 시료에 첨가하였다. 전체 시료를 잘 섞고 centrifuge로 spindown하여 이물질들을 가라 앉히고 상층액만을 분리하였다.

Rehydration tray(Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)에 분리한 상층액 600 μl를 넣고, 24 cm의 pH 3-10 non-linear immobilized pH gradient IPG strip(Bio-Rad Laboratories, Inc. California, USA)을 공기방울이 생기지 않게

설치하고 mineral oil(Drystrip Cover Fluid, Pharmacia Biotech, AB, Uppsala, Sweden)로 strip을 덮은 후 24시간 실온에서 보관하여 재수화시켰다.

3) 이차원 전기영동

재수화된 IPG Strip은 Multiphor II(Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)를 이용하여 100 V에서 1시간, 300 V에서 1시간, 600 V에서 1시간, 1000 V에서 1시간, 2000 V에서 1시간, 3000 V에서 22시간 처리하여 등전화(Isoelectric Focusing: IEF)시켰다. IEF후에 IPG strip은 3.6 g의 Urea, 2% SDS, 5 M Tris 2 ml, 50% glycerol 4 ml, 25% acrylamide 1 ml, 200 mM TBP 250 μ l가 함유된 동질 완충액으로 처리하여 교반기(Twist Shaker TW3, Finepcr, Korea)에서 1.5 Speed로 20분간 동질화(Equilibration)시켰다.

Acrylamide(Amresco Inc. Ohio, USA) 200 ml, 1.5 M Tris-HCl(pH 8.8) 150 ml, 증류수 237 ml, 10% SDS(Amresco Inc. Ohio, USA) 6 ml, 10% APS(Amresco Inc. Ohio, USA) 6 ml, 10% TEMED(Amresco Inc. Ohio, USA) 6 ml를 혼합하여 Gel Caster(Ettan DALT six Electrophoresis Unit Gel Caster, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)에 주형하고 16시간 방치하여 6장의 10% homogeneous Gel (24 cm \times 24 cm \times 1.5 mm)을 제작하였다.

동질화가 끝난 IPG strip을 완성된 homogeneous gel위에 embedding시키고 0.5% agarose, 0.001% bromophenol blue dye가 함유된 agarose 완충액 2 ml로 IPG strip을 덮은 후 50 mM glycine, 23.8 mM Tris, 0.2% SDS에 증류수 4 l로 맞춘 cathode running buffer를 첨가한 이차전기 영동기(Ettan DALT six Electrophoresis Unit, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)를 이용하여 전기영동을 시행하였다.

4) Colloidal Stain (Coomassie G250)

17% ammonium sulfate(Amresco Inc. Ohio, USA), 3% phosphoric acid(Duksan Pure Chemical, Co, LTD, KOREA), 0.1% coomassie G-250(Amresco Inc. Ohio, USA), 34% methanol(TEDIA Company. Inc. Ohio, USA), 증류수 980 ml에 gel을 넣고 교반기(Green Seriker, Sangwoo. Korea)를 이용하여 30 rpm의 회전으로 24시간 염색하였다. 염색액을 제거하고 증류수를 충분히 첨가하여 35 rpm으로 교반기(Green Seriker, Sangwoo. Korea)에서 6시간 방치한 후 증류수를 교체해주는 과정을 3회 반복하여 세척하였다.

5) 프로테오미 지도의 비교 분석

염색이 끝난 후 이차원 전기영동 젤을 탈색과정을 거치지 않고 scanner(PowerLook 1100, UMAX, Taiwan)를 이용하여 스캐닝한 후 데이터화하였다. ImageMaster 2D Platinum 5.0(Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)를 사용하여 protein spot을 양적으로 측정하여 각 군의 프로테오미 지도를 얻었다.

6) MALDI-MS 분석

ImageMaster 2D(Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)를 이용하여 이미지 분석을 하여 의미 있게 증가하거나

감소, 없어지거나 새로 생긴 protein spot을 찾아낸 후 gel을 잘라내어 e-tube 에 옮겼다. 50 mM의 ammonium bicarbonate(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)와 acetonitrile(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)을 3:2로 혼합한 용액 50 μ l를 넣어서 섞었다. 20분 실온에서 incubate한 후 gel 조각의 염색이 제거된 것을 확인하고 용액을 제거 하였다. 탈수하기 위하여 50 μ l의 acetonitrile(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)을 더하고 5분간 실온에서 incubate하였다. acetonitrile(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)을 제거하고 gel을 말린 후 100-400 ng/ μ l의 trypsin(Promega, Madison, WI, USA)을 넣고 20 μ l 25 mM ammonium bicarbonate(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)를 넣은 다음 37°C에서 16시간 펩타이드를 추출해냈다. 펩타이드가 추출된 상층액을 다른 e-tube 에 옮기고 젤조각에 50 mM ammonium bicarbonate(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)와 100% acetonitrile(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)로 반복하여 α -cyano-4-hydroxycinnamic acid(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)가 포함된 50% acetonitrile/0.1% trifluoroacetic acid(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)와 잘 섞어 MALDI 펩타이드를 추출해낸 다음 다른 튜브에 옮겨 놓았던 펩타이드 추출 용액과 합치고 SpeedVac Concentrator(Thermo Savant, Holbrook, NY, USA)을 이용하여 10 μ l 정도 남을 때까지 건조 시켰다. 이렇게 추출한 펩타이드는 PerSeptive Biosystems MALDI-TOF Voyager DE-STR Mass Spectrometer(Framingham, MA, USA)에서 loading 하고 펩타이드 스펙트라를 얻었다. 이렇게 얻어진 펩타이드 스펙트라를 인터넷으로 검색가능한 단백질 분석 전문 사이트인 ExPASy Peptident(<http://www.expasy.org/tools/peptident.html>)나 MS-Fit(<http://prospector.ucsf.edu/ucsfhtml4.0/msfit.htm>)과 같은 데이터베이스를 검색하여 단백질명을 시행하였다.

결 과

좌심실을 이용하여 이차원 전기영동을 시행한 후 여기서 얻어진 정상군 4장, 대조군 5장, 실험군 5장의 gel을 ImageMaster 2D Platinum 5.0(Amersham Biotech, Uppsala, Sweden)로 분석하여 전체 gel에서 spot이 차지하는 상대 밀도(% Intensity)를 계산하였다. 이를 서로 비교하여 유의하게 증가 또는 감소한 spot을 찾아 각각 증가율과 감소율을 확인하였다. 이러한 spot을 MALDI TOFF 분석을 통하여 단백질명을 확인하였다(Fig. 1, 2).

이들 단백질 중 mitochondrial aconitase, ATP synthase alpha chain, lactate dehydrogenase B, creatine kinase, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, alpha B-crystallin, myosin, heart fatty acid binding protein 등 8개 단백질은 모두 대조군에서는 정상군에 비하여 20%에서 90%까지 감소한 후 실험군에서는 대조군에 비하여 136%에서 760%까지 증가하는 결과를 나타내었다. 특히 lactate dehydrogenase B와 myosin은 유의성 있는 변화(P<0.05, One-Way Analysis of ANOVA Test)를 보였고 heart fatty acid binding protein은 높은 유의성 있는 변화

($P < 0.01$, One-Way Analysis of ANOVA Test)를 나타내었다 (Table 2, 3, Fig. 3).

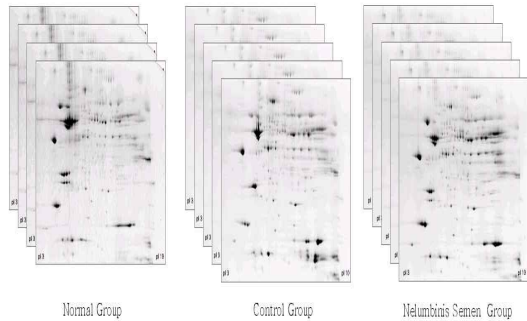


Fig. 1. Each groups of Two-dimensional gel spot from the rat left ventricle. Spots located at the same position are regarded as same protein. (Normal Group n=4, Control group n=5, Nelumbinis Semen Group n=5)

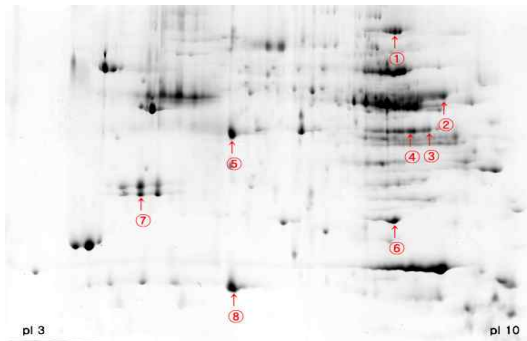


Fig. 2. Spots of Two-dimensional gel spot from the rat left ventricle. Pick up 8 spots in the gel and analyse with MALDI-TOFF; 1) mitochondrial aconitase, 2) ATP synthase alpha chain, 3) lactate dehydrogenase 4) creatine kinase, 5) glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, 6) alpha B-crystallin, 7) myosin, 8) heart fatty acid binding protein.

Table 2. Proteins identified in the rat's right ventricle.

Spot	Mowse Score	Protein Name
Spot 1	6.84E+19	Mitochondrial aconitase(nuclear aco2 gene)
Spot 2	3.31E+17	ATP synthase alpha chain, Mitochondrial precursor
Spot 3	2.04E+11	Lactate dehydrogenase B
Spot 4	4.01E+11	Creatine kinase, Sarcomeric mitochondrial precursor
Spot 5	2.85E+10	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)
Spot 6	3.75E+04	Alpha B-crystallin
Spot 7	1.05E+10	Myosin, light polypeptide 3, Cardiac ventricles
Spot 8	4811	Heart fatty acid binding protein

Table 3. Spots % intensity results made with ImageMaster 2DE platinum by relative method in the program.

Spot Number	Normal Group	Control Group	Nelumbinis Semen Group	Decreasing Rate (%)	Increasing Rate (%)
Spot 1	1.147 ± 0.414	0.618 ± 0.084	1.264 ± 1.270	53.89	104.59
Spot 2	0.703 ± 0.526	0.633 ± 0.191	1.605 ± 1.255	90.06	153.47
Spot 3(+)	0.736 ± 0.170	0.414 ± 0.216	2.114 ± 1.035	56.22	410.66
Spot 4	0.950 ± 1.012	0.865 ± 0.623	1.175 ± 0.712	90.99	35.94
Spot 5	0.876 ± 0.478	0.714 ± 0.398	1.385 ± 1.397	81.42	94.16
Spot 6	1.149 ± 0.726	0.864 ± 0.478	1.018 ± 0.715	75.18	17.85
Spot 7(+)	1.259 ± 0.985	0.256 ± 0.025	1.934 ± 0.320	20.35	654.81
Spot 8(**)	1.094 ± 0.370	0.229 ± 0.196	2.048 ± 0.631	20.90	795.28

Decreasing rate is taken by decreasing rate of intensity from Normal group to Control group and increasing rate is that from Control group to Nelumbinis Semen group. (*: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$, one-way analysis of ANOVA test)

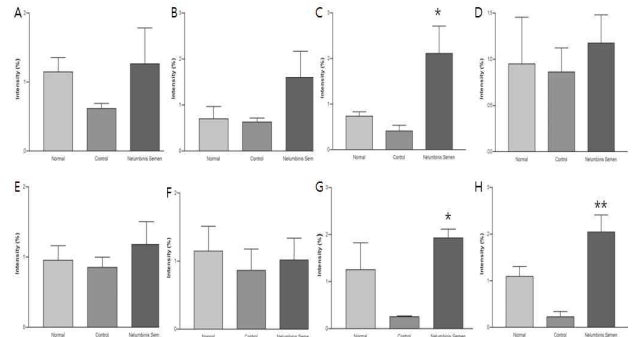


Fig. 3. Intensity(%) of two-dimensional gel spot from the rat left ventricle. A) mitochondrial aconitase, B) ATP synthase alpha chain, C) lactate dehydrogenase, D) creatine kinase, E) glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, F) alpha B-crystallin, G) myosin, H) heart fatty acid binding protein (+ $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ increasing rate, compared to Control.)

1. Mitochondrial aconitase

Mitochondrial aconitase는 대조군에서 정상군에 비하여 53.89% 감소하였다. 실험군에서는 대조군에 비하여 104.59% 증가하였다. One-Way ANOVA Test에 의한 통계적인 유의성은 없었다(Fig. 3A).

2. ATP synthase alpha chain

ATP synthase alpha chain은 대조군에서 정상군에 비하여 90.06% 감소하였다. 실험군에서는 대조군에 비하여 153.47% 증가하였다. One-Way ANOVA Test에 의한 통계적인 유의성은 없었다(Fig. 3B).

3. Lactate dehydrogenase B

Lactate dehydrogenase B는 대조군에서 정상군에 비하여 56.22% 감소하였다. 실험군에서는 대조군에 비하여 410.66% 증가하였다. One-Way ANOVA Test에 의한 통계에서 유의성이 있게 증가하였다(Fig. 3C).

4. Creatine kinase

Creatine kinase는 대조군에서 정상군에 비하여 90.99% 감소하였다. 실험군에서는 대조군에 비하여 35.94% 증가하였다. One-Way ANOVA Test에 의한 통계적인 유의성은 없었다(Fig. 3D).

5. Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase는 대조군에서 정상군에 비하여 81.42% 감소하였다. 실험군에서는 대조군에 비하여 94.16% 증가하였다. One-Way ANOVA Test에 의한 통계적인 유의성은 없었다(Fig. 3E).

6. Alpha B-crystallin

Alpha B-crystallin은 대조군에서 정상군에 비하여 75.18% 감소하였다. 실험군에서는 대조군에 비하여 17.85% 증가하였다. One-Way ANOVA Test에 의한 통계적인 유의성은 없었다(Fig. 3F).

7. Myosin

Myosin은 대조군에서 정상군에 비하여 20.35% 감소하였다. 실험군에서는 대조군에 비하여 654.81% 증가하였다. One-Way ANOVA Test에 의한 통계에서 유의성이 있게 증가하였다(Fig. 3G).

8. Heart fatty acid binding protein

Heart fatty acid binding protein은 대조군에서 정상군에 비하여 20.90% 감소하였다. 실험군에서는 대조군에 비하여 795.28% 증가하였다. One-Way ANOVA Test에 의한 통계에서 유의성이 있게 증가하였다(Fig. 3H).

고찰

한의학에서는 허혈성심질환을 眞心痛, 積心痛, 厥心痛, 胸痛 등의 범주에 해당한다고 보고 있다. 眞心痛은 內經의 厥病篇에 그 症狀을 手足青至節 心痛甚하면 旦發夕死, 夕發旦死라 하고, 舉痛論에 寒氣客於背俞之脈 하면 脈澁하여 血虛하게 되어 心痛하며 相引而痛한다 하여 그 症候가 卒急하며 寒邪와 血虛에서 온다 하였다. 邪氣라는 것은 臟腑가 虧損되거나 기능이 失調되었을 때 생기는 것으로 病의 발생과정상, 陰寒, 痰濁, 瘀血 등도 모두 虛로 인해 생기는 것이라고 할 수 있다. 결국 심혈관계에 관련된 강심작용과 혈관확장작용 등은 심장의 정상적 기능 회복에 관련되며 한의학적으로는 陰虛로 인한 驚悸, 怔忡, 煩燥 등의 증상에 대한 養心安神과 관련이 있다고 판단할 수 있다. 이러한 상태를 蓮子肉의 補陰, 強心作用을 통하여 심박출량이 증대되고 혈류순환 속도가 증가하여 心臟의 정상생리상태 회복이 가능할 것이라 예측 할 수 있다.

蓮子肉의 주요성분은 Aporphine alkaloid 계인 Anonaine, Asimilobine(R-form), Nuciferine(R-form), Nornuciferine, Dehydroanonaine, Dehydronuciferine, Roemerine, Dehydroroemerine 등이 알려져 있으며, Phytosteroid계인 β -sitosterol, Flavonoids계인 Quercetin, Quercetin-3-O-beta-D-diglucoopyranoside, Quercetin-3-beta-glucuronide 등이 알려져 있으며, 혈액내의 산화손상에 대한 방어 효과를 가지고 있고¹⁵⁾, 고지혈증을 억제하는 것으로 보고되었으나¹⁶⁾, 심근보호에 대한 직접적인 효능과 기전을 증명한 논문은 보고된 바 없다.

본 연구에 이용된 이차원 전기영동을 이용한 단백질 분석은 25년 전 O'Farrell에 의해 처음 기술된 방법으로 단백질 혼합물을 등전점(Isoelectric point)과 분자량에 의해 분리하여 단백질을 양적, 질적으로 동시에 분석하는 기술이다. 최근에는 고해상도 이차원 Polyacrylamide gel 전기영동(High resolution 2D-PAGE)이 단백질의 구성을 분석하는 정형화된 방법으로 사용되고 있으며, 전기영동의 결과를 스캐닝한 후 이미지 분석을 하고 이러한 전기영동의 결과에서 자동적으로 단백질을 규명하는 새로운 방법들이 소개되고 있다¹⁷⁾.

프로테오믹 연구기법을 이용하면 빠른 시간 내에 단백질들의 발현을 종합적이고 정량적으로 측정할 수 있기 때문에 시간과

인력이 현저히 단축되는 장점이 있다¹⁸⁾. 질량분석기(Mass spectrometry: MS)을 이용한 단백질 스폿의 펩타이드 분석은 단백질의 용해도를 향상시키는 기술과 Immobline pH gradient (IPG)기법이 발전됨으로 인해 단백질 분리기술이 좋아졌을 뿐 아니라 여기에 Matrix assisted laser desorption ionization/time of flight(MALDI-TOF)와 Electrospray ionization(ESI) MS를 통한 질량 분석 기술이 접목되어 단백질의 동정이 용이해지게 되었고 이와 더불어 이는 인간의 유전자 서열이 데이터 베이스화 되어 정보사용이 가능해지면서 대량발굴 탐색이 가능하게 되었다¹⁹⁾.

그리하여 본 실험에서는 허혈성 심근모델에서 蓮子肉 투여에 의한 심근 단백질의 변화를 연구하여 다음과 같은 단백질의 증감을 확인하였다.

Mitochondrial aconitase는 대조군에서 정상군에 비하여 53.89% 감소하였으며 실험군에서는 대조군에 비하여 104.59% 증가하였다. One-Way ANOVA Test에 의한 통계적인 유의성은 없었다. 이 단백질은 Tricarbozylic Acid회로에서 구연산(Citrate)과 이소구연산(Isocitrate)의 변화에 관여하는 효소이다. 포유동물의 세포에서는 두가지 다른 이성질체로 존재하는데 세포질 Aconitase와 미토콘드리아 Aconitase이다. Tricarbozylic Acid회로의 주요 기능은 Acetyl-Coa 기질을 이산화탄소와 수소원자로 분해시키는 것으로 이 회로는 미토콘드리아 내에서 일어난다. 이렇게 생성된 수소 원자는 산화적 인산화와 그에 따른 ADP 재생성을 가능하게 하는 전자전달계를 통해 산화된다. Oxaloacetate의 4탄소 분자가 acetyl-Coa의 2-탄소 아세틸기와 중합하고 연이어 가수분해될 때, 6-탄소 트리카르복시산인 구연산이 생성된다. 이 반응은 구연산 합성(Citrate synthase)에 의해 촉매된다. 즉 Mitochondrial aconitase는 미토콘드리아 내의 ATP 생성에 주요한 역할을 담당하고 있다.

ATP synthase β chain(Mitochondrial precursor)는 대조군에서 정상군에 비하여 90.06% 감소하였으며 실험군에서는 대조군에 비하여 153.47% 증가하였다. One-Way ANOVA Test에 의한 통계적인 유의성은 없었다. ATP는 아데노신 삼인산(Adenosine Triphosphate)으로서 아데노신(아데닌에 리보오스가 결합된 것)에 인산기가 3개 붙어 있는 모양이다. 인산기를 하나 잃어 2개가 되면 ADT라고 하는데, 보통은 ADT와 ATP 사이를 왕복한다. 에너지를 흡수하면 ATP가 되고 다시 에너지를 방출하면 ADP가 된다. ATP는 모든 생물에서 에너지 이용의 형태인데도, 포도당을 분해할 때 생성된 에너지를 ATP형태로 저장해 두었다가 물질운반, 합성, 전환, 근육축, 발열, 발전, 발광, 발음, 능동수송 등과 같은 생활에너지에 이용하는 것이다. 미토콘드리아는 Glucose와 산소를 이용하여 ATP합성, 분해작용을 통해 세포의 이동, 분화, 물질분비, 접촉에 필요한 에너지를 만들어낸다. 박테리아 정도의 크기이지만 세포의 형태에 따라 다양한 모양으로 존재한다. 결국 ATP synthase beta chain는 ATP synthase chain의 subunit으로서 전반적인 세포 에너지 합성에 관여한다.

Lactate dehydrogenase B(젖산탈수소효소 B)는 대조군에서 정상군에 비하여 56.22% 감소하였으며 실험군에서는 대조군에 비하여 410.66% 증가하였다. One-Way ANOVA Test에 의한 통

계에서 유의성이 있게 증감하였다(* $P < 0.05$). Lactate dehydrogenase(LDH)는 Lactate와 Pyruvate의 변환에 Nicotinamide adenine dinucleotide(NAD^+)와 함께 조효소로 작용한다²⁰. LDH는 Tetrameric 효소로 척추동물과 식물, 박테리아에 광범위하게 존재한다. LDH 효소 활성은 에너지 물질대사에 중요한 역할을 담당한다. 이 효소는 산소 이용에 따라 Pyruvate를 Lactate로 변화시키는 작용을 촉진시키고 조절한다²¹. 척추동물에서는 LDH-A, LDH-B, LDH-C의 3가지 이성질체로 존재한다²². LDH-A는 Pyruvate 감소에 가장 알맞은 효과를 보이는 반면, LDH-B는 호기성 세포(심장 세포)에서 Lactate의 산화에 가장 큰 영향을 준다²³.

Creatine kinase는 대조군에서 정상군에 비하여 90.99% 감소하였으며 실험군에서는 대조군에 비하여 35.94% 증가하였다. One-Way ANOVA Test에 의한 통계적인 유의성은 없었다. Creatine kinase는 에너지 변환에 중요한 역할을 담당하는 효소이다. 현재 ubiquitous Mitochondrial Creatine kinase (uMi-CK)와 Sarcomeric Mitochondrial Creatine kinase (sMi-CK)의 2가지 이성질체로 존재하는 것이 알려졌다^{24,25}. 분자세포적으로 정확한 결합 기전은 밝혀지지 않았으나 내부세포벽의 외반구위에 있는 카디오리핀에 결합하는 것은 확인 되었다²⁶. Mitochondrial creatine kinase는 근육에서 높은 에너지의 인산염을 크레아틴으로 옮기고 유지시킴으로서 에너지를 생산하는 역할을 한다²⁷. 또한 Apoptosis에 중요한 역할을 하는 미토콘드리아의 투과 전이 구멍을 조절하는 것으로 알려져 있다²⁸. 암의 증식이나 에너지 대사에 중요한 역할을 한다²⁹. 또한 신경근질환의 환자에게서 관찰할 수 있는 미토콘드리아 내부의 크리스탈린 관입에 주요한 구성성분이 된다³⁰. 열이 심하거나 과도한 운동으로 급속하게 상승할 경우도 있지만, 일반적으로 심근경색의 지표로 사용된다.

Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase는 대조군에서 정상군에 비하여 81.42% 감소하였으며 실험군에서는 대조군에 비하여 94.16% 증가하였다. One-Way ANOVA Test에 의한 통계적인 유의성은 없었다. Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase(GAPDH)는 해당작용과 연관된 촉매효소이다. 이 효소에 의해 생성되는 1,3-BPG는 고에너지 화합물이다. 이 효소는 산화와 인산화를 수반하는 반응을 촉매하며 산화반응에서 유리된 자유에너지의 대부분은 Thiohemiacetal intermediate에 보존되었다가 인산화에 이용된다. G-3-P의 카르보닐 기에서 Hydride ion(H)가 떨어져나오는 반응에 GAPDH는 탄소원자를 낮은 양으로 하전된 상태로 만들어 줌으로써 이 반응을 가능케 한다. 이를 위해 GAPDH의 활성부위에 있는 Cysteine 잔기의 SH 기에 의한 친핵성 첨가반응이 일어난다. 이러한 산화과정에서 나오는 에너지는 Acyl intermediate에 보존되고, NADH가 떨어져나가면서 인산기가 결합한다. 뿐만 아니라 DNA 복사, DNA 회복, 핵 RNA 방출, 세포벽 융합, 미세소관융합과 같은 작용과도 연관된다.

Alpha B Crystallin은 대조군에서 정상군에 비하여 75.18% 감소하였다. 실험군에서는 대조군에 비하여 17.85% 증가하였다.

One-Way ANOVA Test에 의한 통계적인 유의성은 없었다. Alpha B Crystallin은 심장에서 존재하는 친수성 단백질의 3%를 차지하는데 허혈상태에서의 전위를 확실히 관찰할 수 있다. alpha B Crystallin은 열에 민감한 크기가 작은 단백질이다. 이러한 전위는 다양한 스트레스에 대항하기 위한 적응, 보호 대사작용의 일환이라고 가정되었다³¹. Alpha B Crystallin을 포함한 과다한 분비는 허혈상태에 대한 내성을 증가시키는 결과를 나타낸다³². 잠재적인 심장보호 역할을 하므로 alpha B Crystallin은 허혈성 전구상태(Ischemic Preconditioning, IPC)에 중요한 역할을 한다고 추측된다³³. 허혈성 전구상태는 발현 단백질의 인산화를 통한 심장 보호의 유도를 뜻한다. Alpha B Crystallin을 포함한 스트레스 단백질은 인산화 과정에 의하여 기능적으로 조정된다.

Myosin은 대조군에서 정상군에 비하여 20.35% 감소하였으며 실험군에서는 대조군에 비하여 654.81% 증가하였다. One-Way ANOVA Test에 의한 통계에서 유의성이 있게 증감하였다. Myosin은 액틴(Actin)과 함께 근수축에 관여하는 2가지 주요한 단백질 중의 하나이다. 2가지의 Heavy Chain과 4가지의 Light Chain 으로 구성되어 있다. Light Polypeptide는 칼슘 이온에 높은 친화성을 가지고 있으며 Myosin의 ATPase 활성을 조절하는 역할을 하며 또한 Thick Filaments 내부로의 Myosin의 결합을 조절한다³⁴.

Heart fatty acid binding protein은 대조군에서 정상군에 비하여 20.90% 감소하였으며 실험군에서는 대조군에 비하여 795.28% 증가하였다. One-Way ANOVA Test에 의한 통계에서 유의성이 있게 증감하였다. Heart fatty acid binding protein (H-FABP)는 지방산 운반과 사용에 관여하는 세포내 단백질의 다중유전자군이다³⁵. 이 단백질은 척추동물과 비척추동물의 심장을 비롯한 골격근에서 발현되는 것을 관찰 할 수 있다³⁶. 친소수성 지방산 분자구조의 의하여 세포 구조의 전위적인 손상을 막기 위하여 자유 지방산의 cytosol 농축을 유지시키는 역할을 한다. 또한 H-FABP는 지질 대사에서도 중요한 역할을 하는데, 특정 유선 종양의 증식을 억제시키는 역할을 한다³⁷. 실험적으로는 쥐의 長期 전기적 자극에 의하여 증가된 지방산 의존 대사작용에 의해서 생체내에 유도된다는 것이 밝혀졌다. 척추동물이나 비척추 동물의 미성장 근육에서 H-FABP의 발현양은 거의 없으나 성장과 더불어 급격하게 증가하여 높은 지방산 이용율을 보인다.

이상의 이차원 전기 영동 실험 결과를 살펴볼 때 실험군에서 증가한 단백질이 대부분 ATP와 에너지 증가, 심근 회복 촉진 단백질로 판명되었다.

결 론

흰쥐의 심장에 Langendorff 모델을 이용하여 蓮子肉을 투여하고 단백질 발현 양상의 차이를 비교 분석하여 다음과 같은 결론을 도출하였다.

蓮子肉은 심장에서 ATP 생성과 관련된 Mitochondrial aconitase, ATP synthase beta chain의 발현을 증가시켰다. 蓮子

肉은 에너지 물질대사와 관련된 Lactate dehydrogenase B, Creatine kinase, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, Heart fatty acid binding protein의 발현을 증가시켰다. 蓮子肉은 심장보호의 유도를 촉진하는 Alpha B-crystallin의 발현을 증가시켰다. 蓮子肉은 근수축에 관여하는 Myosin의 발현을 증가시켰다. 蓮子肉에 의한 Lactate dehydrogenase B, Myosin, Heart fatty acid binding protein의 발현 증가는 통계적으로 유의한 수준이나 ATP synthase beta chain, Creatine kinase, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, Alpha B-crystallin의 발현을 증가시키는 유의한 정도는 아니다.

이상의 결과로 볼 때 蓮子肉은 허혈성 심장에서 ATP의 증가와 에너지 물질대사의 활성화를 통하여 심장 기능의 회복을 촉진하는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 전국한의과대학 심계내과학교실, 韓方 순환·신경내과학, 서울, 군자출판사, p 190, 2010.
2. Brawnwald, E., Kloner, R.A., Myocardial reperfusion. A double edged sword J Chin Invest 76: 1713-1719, 1985.
3. 전국한의과대학 공동교재편찬위원회, 본초학, 서울, 영림사, p 684, 2004.
4. 임종윤 외. 허혈심근 Mitochondria의 Superoxide Anion 생성 및 세포손상기전. 순환기학회지 21(6):1137-1151, 1991.
5. 姜秉宗. 芎夏湯이 再灌流將置下의 昏厥 摘出 心藏에 미치는 영향. 서울, 慶熙大學校大學院, 1997.
6. 全燦鎔. 虛血性心臟에 대한 勝金湯의 실험적 연구. 서울, 경희대학교대학원, 1994.
7. 朴貞美. 苓桂朮甘湯이 虛血性疾患에 미치는 영향. 경희대학교, 74: 414-422, 1991.
8. 金仁燮. 枳實白朮湯 및 가미과루해백반하탕 허혈성심질환에 미치는 경향. 한방성인병학회지 11: 187-216, 1995.
9. 李英彬. 麝香蘇合元이 再灌流將置下의 昏厥 심장에 미치는 영향. 서울, 경희대학교대학원, 1996.
10. 崔赫鎧. 導赤散이 적출 昏厥 심장의 혈액학적 기능에 미치는 영향. 서울, 慶熙大學校大學院, 1996.
11. Pandey, A., Mann, M. Proteomics to study genes and genomes. Nature. Jun 15: 405(6788):837-846, 2000.
12. 이진우. 蓮子肉의 항우울 효과 및 프로티움 분석을 통한 기전 연구. 서울, 경희대학교 대학원 학위논문, 2004.
13. Pedro Monteiro, Ana I. Duarte, Lino M. Goncalves, Antonio Morenoc, Luis A. Providencia, Protective effect of trimetazidine on myocardial mitochondrial function in an ex-vivo model of global myocardial ischemia, European Journal of Pharmacology, 503: 123-128, 2004.
14. Dillmann, W.H., Mehta, H.B., Barrieux, A., Guth, B.D., Neeley, W.E., Ross J Jr. Ischemia of the dog heart induces the appearance of a cardiac mRNA coding for a protein with migration characteristics similar to heat-shock/stress protein 71, Circ Res. 59(1):110-114, 1986.
15. Liu, J.H., Ho, S.C., Lai, T.H., Liu, T.H., Chi, P.Y., Wu, R.Y. Protective effects of Chinese herbs on D-galactose-induced oxidative damage, 25(6):447-452, 2003.
16. la Cour B., Molgaard P. and Yi Z. Traditional Chinese medicine in treatment of hyperlipidaemia. J Ethnopharmacol. 46(2):125-129, 1995.
17. Klose J. Large-gel 2D electrophoresis. Methods Mol Biol 112: 147-172, 2000.
18. Pandey, A., Mann, M. Proteomics to study genes and genomes. Nature 405: 837-846, 2000.
19. Leimgruber, R.M., Malone, J.P., Radabaugh, M.R., Laporte, M.L., Violand, B.N., Monahan, J.B. Development of improved cell lysis, solubilization and imaging approaches for proteomic analyses. Proteomics 2: 135-144, 2002.
20. Hobrook, J.J., Liljas, A., Steindel, S.J. & Rosmann, M.G. in The Enzymes: Oxidation-Reduction, eds. Boyer, P. (Academic, New York), Vol. 11, Part A: 191-192, 1975.
21. RUSSELL J. BUONO and ROBYN K. LANG, Exp. Eye Res. Hypoxic Repression of Lactate Dehydrogenase-B in Retina, 69: 685-693, 1999.
22. Markert, C.L., shaklee, J.B. & Whitt, G.S. Science 189: 102-114, 1975.
23. Tsuji, S., Qureshi, M.A., Hou, E.W., Fitch, W.M., Li, S.S. Evolutionary relationships of lactate dehydrogenases(LDHs) from mammals, birds, an amphibian, fish, barley, and bacteria: LDH cDNA sequences from Xenopus pig and rat, Proc Natl Acad Sci 91: 9392-9396, 1994.
24. W. Qin, Z. Khuchua, J. Cheng, J. Boero, R.M. Payne, A.M. Strauss, Mol. Cell. Biochem 184: 153, 1998.
25. K. Anflous, V. Veksler, P. Mateo, F. Samson, V. Saks, R. Ventura-Clapier, Biochem. J. 322: 73, 1997.
26. Muller, M., et al. J. Biol. Chem. 260: 3839-3843, 1985.
27. Payne, R.M., Haas, R.C. and Strauss, A.W. Structural characterization and tissue-specific expression of the mRNAs encoding isoenzymes from two rat mitochondrial creatine kinase genes, Biochim. Biophys. Acta 1089(3): 352-361, 1991.
28. O'Gorman, E., Beutner, G., Wallimann, T., and Brdiczka, D. Differential effects of creatine depletion on the regulation of enzyme activities and on creatine-stimulated mitochondrial respiration in skeletal muscle, heart, and brain. Biochim. Biophys. Acta 1276: 161-171, 1996.
29. Martin, K.J., Winslow, E.R., O'Keefe, M.O., Khandekar, V.S., Hamlin, A., Lillie, J.W., and Kaddurah-Daouk, R. Specific targeting of tumor cells by the creatine analog cyclocreatine. Int J. Oncol. 9: 993-999, 1996.

30. Stadhouders, A.M., Jap, P., Winkler, H.P., Eppenberger, H.M., and Wallimann, T. Mitochondrial creatine kinase: A major constituent of pathological inclusions seen in mitochondrial myopathies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 91: 5089-5094, 1994.
31. Philip Eaton, William Fuller, James R. Bell and Michael J. Shattock, B Crystallin Translocation and Phosphorylation: Signal Transduction Pathways and Preconditioning in the Isolated Rat Heart, *J Mol Cell Cardiol* 33: 1659-1671, 2001.
32. Ray, P.S., Martin, J.L., Swanson, E.A., Otani, H., Dillman, W.H. Genetically engineered mice overexpressing alpha beta crystallin exhibit protection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *J Am Coll Cardiol*, 35(2):401A. (Abstract), 2000.
33. Eaton, P., Awad, W.I., Miller JIA., Hearse, D.J., Shattock, M.J. Ischemic preconditioning: A potential role for constitutive low molecular weight stress protein translocation and phosphorylation. *J Mol cell Cardiol* 32(6): 961-971, 2000.
34. <http://www.neuro.wustl.edu/neuromuscular/mother/myosin.htm>
35. Veerkamp, J.H. & Maatman, R.G.H.J. Cytoplasmic fatty acid-binding proteins: their structure and genes. *Prog. Lipid Res.* 34: 17-52, 1995.
36. Haunerland, N.H. Fatty acid binding proteins in locust and mammalian muscle. Comparison of structure, function, and regulation. *Comp. Biochem. Physiol.* 109B: 199-208, 1994.
37. Bohmer, F., Kraft, R., Otto, A., Wernstedt, C., Hellman, U., Kurtz, A., Muller, T., Etzold, G., Lehmann, W., Langen, P., Heldin, C. & Grosse, R. Identification of a polypeptide growth inhibitor from bovine mammary gland. *J. Biol. Chem.* 262: 15136-15143, 1987.