

人蔘을 經口投與한 흰쥐 心臟內 Calcium 함량의 變動에 관한 研究

金 永 美 · 金 洛 斗

서울大學校 藥學大學

(Received April 3, 1987)

Study on the Changes of Calcium Contents in the Rat Heart Treated with Ginseng

Young Mi Kim and Nak Doo Kim

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151, Korea

Abstract—The effects of orally administered ginseng ethanol extract on the calcium release from sarcoplasmic reticulum (SR) calcium pool and on the calcium content in the rat heart perfused with the Langendorff apparatus. The total amount of calcium released from SR calcium pool and the total calcium content in the rat heart were significantly decreased by 43% and 26%, respectively compared with the control.

1882년 Ringer에 의해 심근 수축에 Ca^{2+} 의 중요성이 시사된¹⁾ 이래, 근수축기전에서 Ca^{2+} 의 기계적 및 전기적 역할에 대한 많은 연구가 보고되었다.²⁻⁶⁾

심장은 구조적으로 골격근에 비해 sarcoplasmic reticulum(SR)이 적게 발달되어 있어 세포외액의 calcium농도에 의해 영향을 받으며³⁾ 이러한 심장의 excitation-contraction coupling에는 최소한 2개의 source로부터 나오는 calcium ion이 관여하고 있음이 알려져 있다.

Winegrad⁷⁾와 Niedergerke⁸⁾는 심근이 흥분되었을때, carrier와 결합하여 세포막을 통과하는 세포외액의 calcium을 “activator Ca”이라고 하는 하나의 pool로서 제시하였고⁹⁾, Chapman과 Niedergerke^{10,11)}는 저장 pool로서의 2번째 pool을 제시하고 이 pool은 SR일 것이며 activator Ca와의 협동작용, 즉 첫째 pool은 수축과정을 시작하고, 2번째 pool은 긴장도를 유지하는 작용에 의해 심근 수축이 일어난다고 하였다. 이에 SR내에서 Ca^{2+} 의 동태를 밝히려는 많은 연구들이 최근까지 계속되고 있다.¹²⁻¹⁶⁾ 이러한 사실을 기본으로 동양에서 5000년이상 신비스러운

영약으로 사용되어온 인삼의 심장에 대한 약리 작용을 과학적으로 규명하려는 연구를 Ca^{2+} 변화에서 관찰하고자 하였다.

이미 발표된 심장에 대한 인삼의 약리작용은 크게 in vitro에서의 심근억제 작용(negative inotropic and chronotropic effect)¹⁷⁻²¹⁾과 심근수축력 흥분작용²²⁻²⁵⁾으로 나눌 수 있으며, 이러한 현상적으로 상반된 심장에 대한 인삼의 효과를 구체적으로 설명하기 위해 인삼을 경구투여했을 때 심장내 Ca^{2+} pool에서의 Ca^{2+} 의 유리, 특히 Ca^{2+} 에 의한 SR로부터의 Ca^{2+} 유리에 어떤 변화가 나타나는가를 관찰하였다.

실험재료 및 실험방법

홍삼 에탄올 엑기스—한국 인삼연초연구소로부터 제공받은 홍삼을 세절하여 75%에탄올로 70°C에서 추출하고, 이 추출액을 로타리 증류기에서 감압 농축하여 분말상태(수분함량 4~5%)로 조제한 것을 사용하였다.

실험동물—생후 8주 정도된 170~230g의 건강한 자성 Sprague-Dawley 계 흰쥐를 실험에 사용

하였다.

인삼성분의 투여—인삼투여군에는 전술한 방법으로 얻은 홍삼에탄올 역기스를 증류수에 용해하여 100mg/kg의 용량으로 10일간 1일 1회 경구투여하였으며, 대조군에는 증류수를 같은 기간동안 같은 용량으로 경구투여하였다.

심장의 관류—흰쥐의 두부를 절단하여 실험, 치사시킨후, 심장을 신속하게 적출하여 95% O₂—5% CO₂혼합 가스로 포화시킨 Krbs-Henseleit 용액이 들어있는 petri-dish에 넣고 지방 및 결합조직을 제거하였다. 프라스틱 캐누러를 대동맥에 삽입하여 결찰하고, 유출액의 유출을 용이하게 하기 위해 적출 심장의 우심방과 폐동맥을 절개한 다음 Langendorff장치(Fig. 1)에 현수하였다. 관류액의 조성은 Table I과 같으며, 심장으로부터 80cm 높이에 있는 reservoir에서 일정한 압력을 유지하면서 향온 condensor를 경유하여 심장으로 송부되도록 하였다. 관류액에

Table I—The composition of the modified Krebs-Henseleit solution

	g/l	mM
NaCl	6.90	118
NaHCO ₃	2.10	25
KCl	0.35	4.7
KH ₂ PO ₄	0.163	1.2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.29	1.2
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.37	2.5
glucose	2.05	11

는 95% O₂—5% CO₂혼합 가스를 실험중 계속 공급하여 포화시켰으며 pH는 7.4, 온도는 37°C로 유지하였다. 심첨에 나이론실을 연결한 백금 clip을 꽂아 활차를 통해 isometric force transducer에 연결하고 심장의 수축력(longitudinal isometric contractile force)을 physiograph(Washington MD 400)로 기록하였다.

심장은 Langendorff장치에 현수한 다음 5분동안 심첨에 아무 힘도 가하지 않은 채 자연적으로 박동하도록 하고, 이후 2.0g의 靜止張力(resting tension)을 가함과 동시에 심장 수축력의 기록을 시작하였다.

유출액의 유출속도는 흰쥐 개체에 따라 차이가 있었으나 5~10ml/min를 유지하였고, 아무런 전기자극도 주지 않은 채 박동하는 심박동수는 관류기간동안 237±18 bpm(beats per minute)를 유지하였다.

이상의 조건에서 심장을 관류하여 일정한 수축력과 심박동수를 보이면(약 10~15분 소요) 다음의 실험을 계속하였다.

⁴⁵Ca²⁺함유 Krebs-Henseleit 용액의 관류—심장의 수축력과 심박동수가 일정해지면 ⁴⁵Ca²⁺를 함유한 Krebs-Henseleit용액(20,000 cpm/ml)으로 관류액을 전환하여 3분동안 labeling하고, 유출액을 받아 그 일부를 관류액의 specific activity를 결정하는데 사용하였다.

Ca²⁺-free EGTA용액의 관류—labeling기간이 끝나자마자 관류액은 Ca²⁺-free EGTA wash solution(Table II)으로 전환하고, 관류액의 온도와 장기육조의 온도도 23°C로 전환시켜 7분

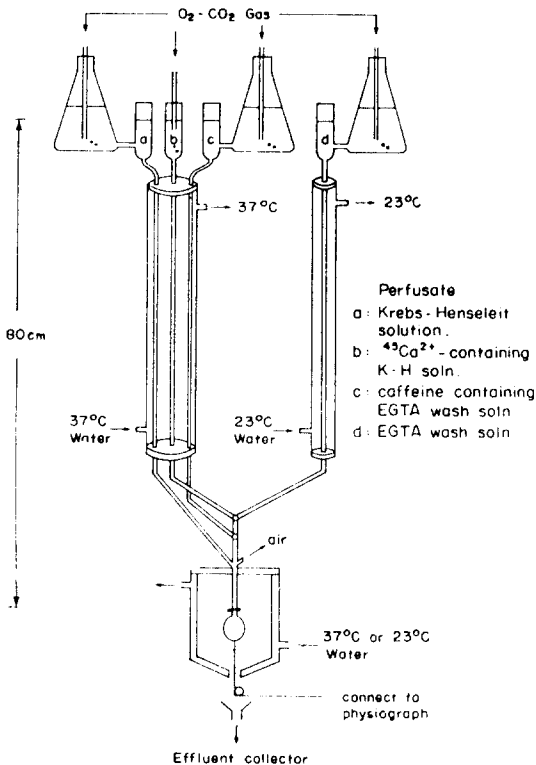


Fig. 1—Langendorff apparatus for heart perfusion experiment.

Table II—The composition of the EGTA^a wash solution.

	g/l	mM
NaCl	6.90	118
NaHCO ₃	2.10	25
KCl	0.35	4.7
KH ₂ PO ₄	0.163	1.2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.29	1.2
glucose	2.05	11
sucrose	6.846	20
EGTA	0.19	0.5

a : EGTA²⁶ is ethylene glycol bis-(β-aminoethyl ether)-N, N, N', N'-tetra acetic acid.

동안 관류하였다.

Krebs-Henseleit용액(Ca²⁺ 2.5mM 함유) 혹은 caffeine 함유 Ca²⁺-free EGTA용액의 관류—Ca²⁺-free EGTA용액으로 7분간 관류후 정상 Krebs-Henseleit용액 또는 10mM Caffeine 함유 EGTA세척액 중 하나로 관류액을 전환하여 세포내에 존재하는 Ca²⁺을 유리시켰고 이때는 온도를 37°C로 하였다. 10mM caffeine으로 관류할 때는 6분간 관류한 후, 정상 Krebs-Henseleit용액으로 4분간 재관류 하였다. 관류기간중 유출되는 유출액을 1분간격으로 받아서 방사능을 liquid scintillation counter(packard)로 측정하였고, 사용한 scintillation cocktail의 조성은 Table III과 같다. 1분동안에 유리된 Ca²⁺의 양은 다음식에 의해 계산하였다.

1분간에 유리된 Ca²⁺의 량

$$= [Ca^{2+}]$$

$$= \frac{\text{the radioactivity of each sample}}{\text{the specific activity of the perfusate}}$$

Table III—The composition of Bray's solution.

PPO(2,5-diphenyl oxazol)	4g
POPOP(1,4-bis [5-phenyl-2-oxazolyl] benzene)	0.2g
Naphthalene	60g
Ethylene glycol	20ml
Absolute methanol	100ml
in p-dioxane(1,4-dioxane)	880ml

× effluent collected

$$\times \frac{1}{\text{wet weight of heart}} \\ = \text{nmole/min/g}$$

심장내 Ca진류량 측정—관류가 끝나면 심장을 Langendorff장치에서 분리하여 양분하였다. 한부분은 110°C oven에서 건조한 후, 건조중량을 측정하고 나머지 부분은 심장내 남아있는 Ca²⁺량을 측정하기 위해 14ml의 Krebs-Henseleit 용액에 넣어 homogenize 한 후, 37°C에서 10분간 incubation하고 1,300g에서 15분간 원심분리하여 얻은 상정액의 방사능을 측정하였다.

통계처리—Two-tail t-test를 사용하였으며 p < 0.05를 유의성이 있다고 판정하였다.

실 험 결 과

인삼을 투여한후 적출한 심장에서 Ca²⁺에 의한 세포내 Ca²⁺의 유리에 미치는 효과—Langendorff 장치에 현수한 심장의 수축력과 심박동수가 일정해진 후, ⁴⁵Ca²⁺함유 Krebs Henseleit용액으로 3분간 labeling 한 후, Ca²⁺-free EGTA용액으로 7분간 관류하였고 7분째에 2.5mM Ca²⁺함유 Krebs-Henseleit용액으로 교환하여 관류하였다. 이때 유출액으로 유리되는 Ca²⁺의 시간경과에 따른 변화는 Fig. 2와 같다.

Ca²⁺-free EGTA세척용액으로 세척함으로써 세포외액 Ca²⁺과 Ca²⁺ independent Ca²⁺이 유리되었고, 2.5mM Ca²⁺이 함유된 Krebs-Henseleit용액을 관류하였을때 다량의 Ca²⁺-dependent Ca²⁺이 세포내에서 유리되었다. 인삼투여군에서는 비슷한 패턴의 Ca²⁺ 유리를 나타내었으며, 2.5mM Ca²⁺투여시 peak에서(7~8분사이) 44%의 유의성 있는 (p < 0.05) 감소를 나타내었다.

관류하는 동안 심장 수축력의 변화를 Fig. 3에 나타냈다. Ca²⁺ free 용액으로 관류시 수축력이 소실되었다가 Ca²⁺을 넣어 주었을때, 순간적으로 발작적인 수축을 보이고 일시 수축력이 마

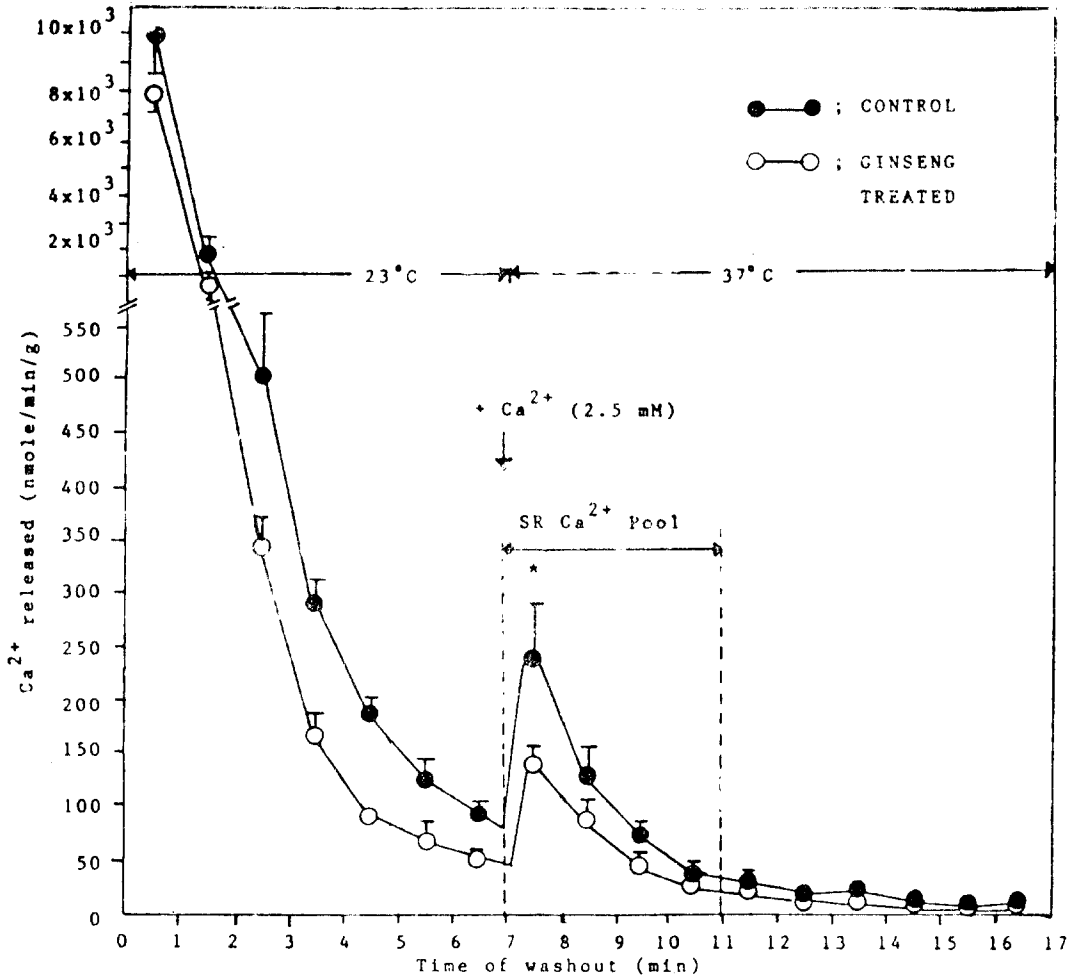


Fig. 2—The amount of calcium released during Ca^{2+} -free perfusion(1~7 min) and Krebs-Henseleit perfusion(8~17 min).

Bars indicate S.E.

* indicates a significant difference. ($p < 0.05$)

비되었다가 점차 수축력을 회복하였다. 회복되는 속도는 Ca^{2+} 의 유리량이 적은 인삼투여군에서 약간 늦은 경향을 보였으나 대조군에 비해 유의성있는 차는 없었다.

관류액과 관류조건을 변화시키에 따른 유출액량의 변화를 Table IV에 표시하였다. 전반적으로 인삼투여군이 대조군에 비해 유출액의 양이 많았으나, equilibration기간과 Ca^{2+} -free용액으로 세척시에만 유의성 있는 차가 있었다.

인삼을 투여한 적출심장에서 Caffeine에 의한

Table IV—The amount of effluent collected at each minute (ml/min)

Washout Duration	Control	Ginseng treated
0	5.27±0.25	6.85±0.60*
1	5.93±0.32	7.08±0.45
3~7	5.57±0.48	7.33±0.49*
8	5.00±0.53	6.00±0.37
9~17	4.79±0.51	5.03±0.49

Data are shown as Mean±S.E.

*indicates a significant difference ($p < 0.05$)

The time of 0 is the duration of equilibration.

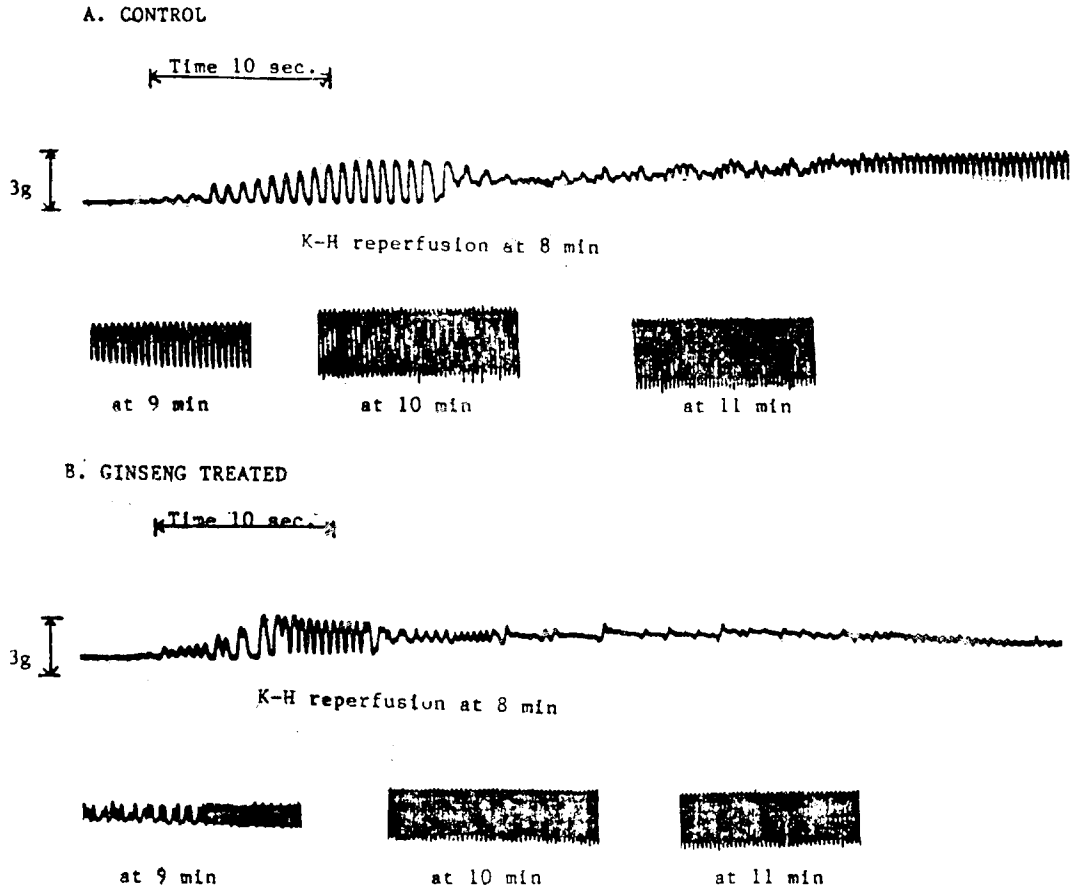


Fig. 3—Effect of Krebs-Henseleit reperfusion on the contractile force during 8~17 min of washout period.

세포내 Ca^{2+} 의 유리에 미치는 효과—10mM의 caffeine을 함유한 Ca^{2+} -free EGTA wash solution으로 관류하였을 때, Ca^{2+} 에 의한 것과 같이 다량의 Ca^{2+} 을 유리하였고 그 유리된 양도 비슷하였다(Fig. 4). 인삼투여군에서도 2.5mM Ca^{2+} 관류시와 거의 같은 양의 Ca^{2+} 이 유리되었고, 대조군에 비해 40%의 유의성 있는 감소를 보였다.

관류액을 변화시켰을 때 수축력 변화를 Fig. 5에 나타내었다. Ca^{2+} -free용액 관류시 수축력이 소실되었다가 caffeine함유용액으로 교환하였을 때 일시적으로 수축이 되었다가 점차 소실되어 지속적 수축을 나타냈고, 14분에 Ca^{2+} 을 넣어주

면 역시 발작적인 수축을 보였다. 대조군과 인삼투여군 사이에서 어떤 유의성 있는 차이도 인정할 수 없었다.

관류조건과 관류액을 변화시키에 따른 유출액 양의 변화를 Table V에 나타냈다. Caffeine투여시 유출액양에서 대조군과 인삼투여군 사이에 차이가 있었으나 다른 기간중에서는 거의 동일하였다.

인삼이 S.R.에서 유리된 Ca^{2+} 의 총량에 미치는 효과— Ca^{2+} 또는 Caffeine으로 재관류한 처음 4분간 유리된 총량을 Table VI에 표시하였다. 대조군에서 Ca^{2+} 과 caffeine에 의해 유리된 양이 각각 414.5 nmole/g wet heart, 409.5 nmole/g wet

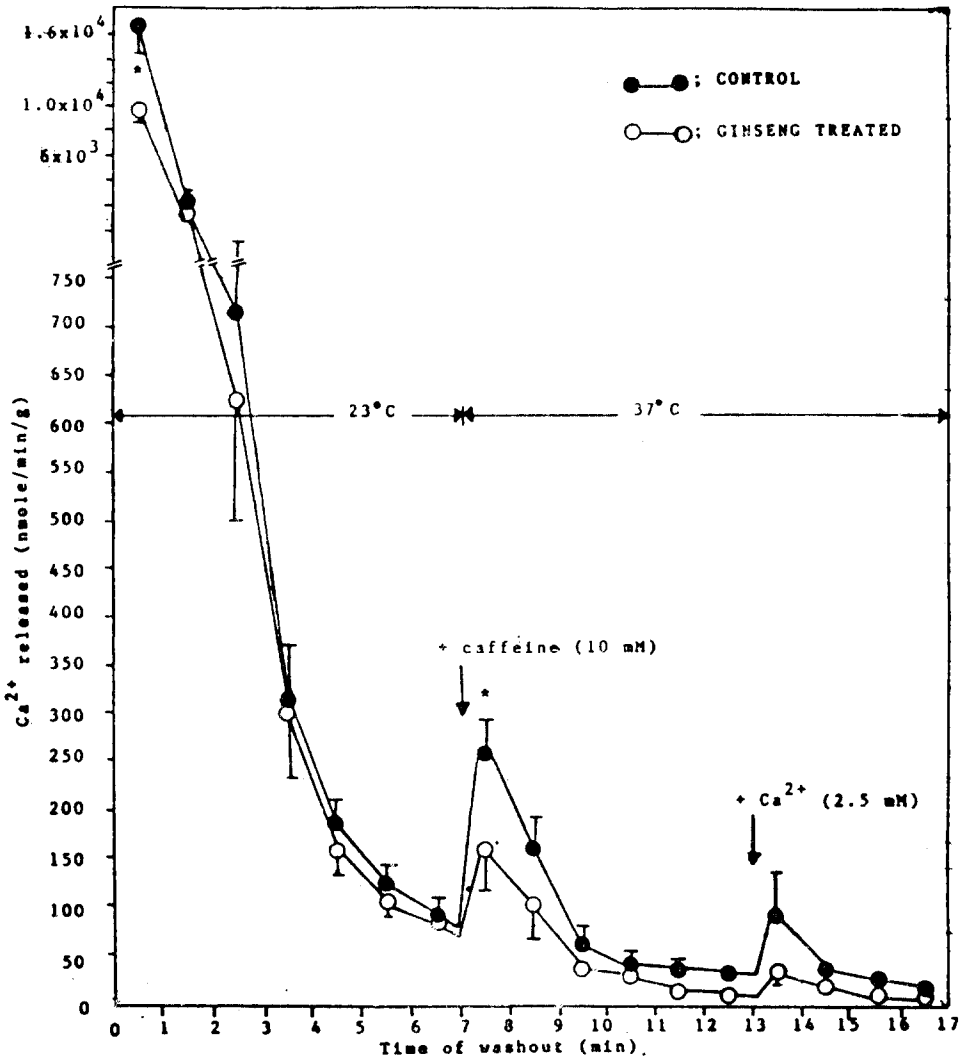


Fig. 4—The amount of calcium released during Ca²⁺-free, caffeine-EGTA and Krebs-Henseleit perfusion. Bars indicate S.E. * indicates a significant difference. (p < 0.05)

Table V—The amount of effluent collected each minute (ml/min)

Washout Duration	Control	Ginseng treated
0	5.25 ± 0.31	4.46 ± 0.43
1~7	6.33 ± 0.33	5.50 ± 0.71
8~13	6.58 ± 0.33	5.40 ± 0.81*
14~17	3.83 ± 0.53	3.90 ± 0.40

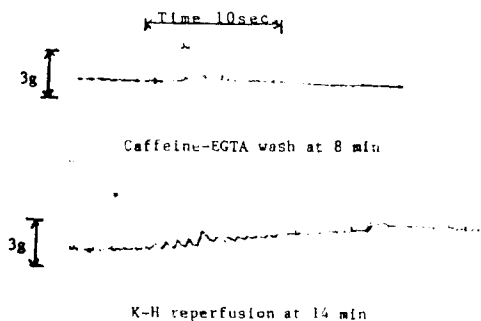
Data are shown as Mean ± S.E.
* indicates a significant difference. (p < 0.05)
The time of 0 is the duration of equilibration.

heart로 거의 비슷하고 인삼투여군에 있어서 Ca²⁺과 caffeine에 의해 유리된 양이 235.5 nmole/g wet heart와 250.1 nmole/g wet heart로 대조군에 비해 약 43% 및 63% 감소하였다(p < 0.05).

인삼이 심근내 잔류 Ca²⁺양에 미치는 효과—관류가 끝난후 심장내 Ca²⁺의 잔류량은 대조군에 비해 인삼투여군이 Ca²⁺과 caffeine 재관류시 각각 73%와 50% 감소했다. (Table VII) (p < 0.05)

고 찰

A. CONTROL



B. GINSENG TREATED

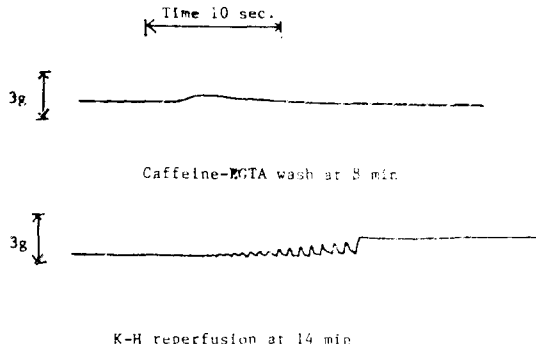


Fig. 5—Effect of caffeine and calcium on the contractile force.

Table VI—Total amount of Ca^{2+} released from sarcoplasmic reticulum (nmole/g)

	Control	Ginseng treated	2-Tail probability
Ca^{2+}	414.5 ± 74.8	235.5 ± 47.6	0.077
Caffeine	409.5 ± 82.1	250.1 ± 69.9	0.178

Data are expressed as Mean ± S.E.

Table VII—Residual amount of Ca^{2+} in the heart (nmole/g)

	Control	Ginseng treated	2-Tail probability
Ca^{2+}	41.1 ± 14.0	11.2 ± 2.0	0.030
Caffeine	46.1 ± 21.8	22.6 ± 2.7	0.336

Data are expressed as Mean ± S.E.

심장의 contractile activity를 유지하면서 sarcoplasmic reticulum(SR)으로부터 Ca^{2+} 유리가 인삼투여군과 대조군 사이에 어떤 차이가 있는지 알아보기 위해 Langendorff 관류장치로 연구하였다.

인삼을 경구투여하였을때, 이 SR Ca^{2+} pool의 크기 및 시간에 따른 Ca^{2+} 유리량의 변화를 보았다.

Fig. 2에서 보는 바와 같이 Ca^{2+} 에 의해 유리된 Ca^{2+} 의 양이 대조군에 비해 인삼투여군에서 44%의 감소를 보였고, 이때의 수축력에 있어서는 두 군 사이에 거의 차이가 없었으나(Fig. 3), 그 회복속도는 약간 느린 경향을 보여주고 있다. 관류기간중 유출된 관류액의 양이 인삼투여군에서 약 1.5ml정도 많았는데, 이는 두 군간에 심박동수에서 큰 차가 없었고, 수축크기도 거의 같았다는 점에서 인삼이 혈관 평활근을 이완시킨다는 보고²⁷⁾가 있으므로 인삼의 혈관이완작용에 의한 효과가 아닌가 사료된다.

Fig. 4에서 caffeine에 의해 유리된 Ca^{2+} 양은 Fig. 2의 Ca^{2+} 에 의해 유리된 Ca^{2+} 양과 거의 같았고, 14분에서 Ca^{2+} 재관류시 peak가 작아짐으로써 같은 pool로부터 유리된 Ca^{2+} , 즉 SR에서 유리된 Ca^{2+} 임을 확인할 수 있었다. 그러나 이때의 수축력을 측정할 결과는(Fig. 5) 일시적 수축을 보이나가 지속적 수축을 나타내지는 했으나 정상적인 수축, 이완운동을 보이지 않았고, 이 현상은 대조군과 인삼투여군에서 거의 같았다. (Fig. 5A, B의 time 8분) 이것은 Kurebayashi²⁸⁾의 Caffeine이 Ca-ATPase activity를 증가시키기 위해서는 Ca^{2+} 이 존재해야 한다는 실험 결과에 비추어 볼때, 세포외에 Ca^{2+} 이 존재하지 않기 때문이고, 또 caffeine에 의해 SR의 Ca^{2+} sequestration이 일어나지 않아 근이완이 일어나지 않는 것으로 설명될 수 있다. Caffeine관류로 SR내에 존재하는 Ca^{2+} 이 거의 고갈되었기 때문에 14분에서 Ca^{2+} 재관류시의 발작적인 수축크기도 Fig. 3에 비해 감소되었고 Ca^{2+} 유리량도 적

어졌다. Caffeine관류후 여러가지 변화는 대조군과 인삼투여군에서 유의성있는 차이를 보이지 않았으나 Ca^{2+} 유리량은 역시 인삼투여군에서 40% 감소하였다. SR로부터 유리되는 총 Ca^{2+} 양과 심장내 Ca^{2+} 잔류량도 인삼투여군이 각각 약 43%, 70% 감소하였다(Table VI, Table VII).

Fig. 2와 Fig. 4에서 보여지는 인삼투여군에 의한 SR에서의 Ca^{2+} 유리의 감소는 수축력의 억제와 관련지어 생각할 수 있으나¹⁷⁻²¹⁾ 본 실험에서의 수축력에서는 대조군과 인삼투여군 사이에 수축력의 변화를 인정할 수 없었다. 따라서 인삼투여군에서 labeling시 $^{45}Ca^{2+}$ uptake가 지체되었다는 가정도 가능할 것이다. 인삼에 의한 Ca^{2+} 이동억제는 Hab 등²⁰⁾이 in vitro실험으로 증명하였고 인 및 쇠²⁹⁾, 김³⁰⁾ 등도 세포막에서의 Ca^{2+} 이동을 인삼이 억제한다고 하였으므로 이러한 가정을 뒷받침할 수 있다. 또한 세포막의 변성에 의해 Ca^{2+} 유입 보다 유출의 속도가 커졌기 때문이라는 가정 또한 배제할 수 없다.

이상의 결과들을 종합해 볼때, 인삼으로 인한 수축력의 변화와 SR로부터의 Ca유리와 어떤 상관성을 유도할 수는 없었으며 인삼투여군의 SR Ca^{2+} pool로부터 유리되는 Ca^{2+} 양이 감소되었음을 관찰하였다.

본 실험을 보완하기 위하여 in vivo로 $^{45}Ca^{2+}$ 을 투여하여 인삼의 효과를 관찰하면 심장에서의 Ca의 동태를 좀더 정확히 규명될 것으로 사료된다.

결 론

인삼의 심장에 대한 작용을 밝히기 위하여 인삼을 경구투여하였을때, 심장내 SR Ca^{2+} pool에서의 Ca^{2+} 유리률 $^{45}Ca^{2+}$ 과 Langendorff관류장치를 사용하여 정량하였다.

대조군의 흰쥐 적출심장으로부터 SR에 의한 Ca^{2+} 유리량은 414.5±74.8(nmolc/g)이었고 인삼투여군에서는 235.5±47.6으로 약 43% 유의성있게 감소하였다. 이때 유리된 Ca^{2+} 은 Caffeine에 의해 SR Ca^{2+} pool에서 유리된 것임을 확인하였다.

1985년도 서울대학교 병원 특진연구비 보조로 이루어진 것임.

文 獻

- 1) Ringer, S., *J. Physiol.*, **4**, 29 (1882).
- 2) Fleckenstein, A., *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **17**, 149 (1977).
- 3) Andersson, K.E., *Pharmacologica Toxicologica Acta* **43**, Supp 1, 5 (1978).
- 4) Landmark, K. and Refsum, H., *Pharmacologica Toxicologica Acta* **43**, Supp 1, 15 (1978).
- 5) Morad, M. and Maylie, J., *Chest* **78**, Supp, 166 (1980).
- 6) Triggle, D.J. and Swamy V.C., *Chest* **78**, Supp, 174 (1980).
- 7) Winegrad, S., *Circulation* **24**, 523 (1961).
- 8) Niedegerke, R.J., *J. Physiol.* (London) **167**, 515 (1963).
- 9) Niedegerke, R.J., *J. Physiol.* (London) **167**, 551 (1963).
- 10) Chapman, R.A. and Niedegerke, R.J., *J. Physiol.* (London) **211**, 389 (1972).
- 11) Chapman, R.A., and Niedegerke, R.J. *J. Physiol.* (London) **211**, 423 (1972).
- 12) Sacko, D.W., Kim, N.O. and Harrison, Jr. C.E., *Am. J. Physiol.* **226**, 756 (1974).
- 13) Takakuwa Y., and Kanazawa, T. *J. Biol. Chem.* **256**, 269 (1981).
- 14) Takenaka, H., Alder, P.N. and Katz, A.M., *J. Biol. Chem.* **257**, 12649 (1982).
- 15) Highsmith, S.R., *Biochemistry.* **21**, 3786 (1982).
- 16) Kranias, E.G., and Solaro, R.J., *Fed. Proc.* **42**, 33 (1983).
- 17) Rhim, J.D., *Korean J. Intern. Med.* **10**, 401 (1967).
- 18) Song, S.K., *Korean J. Pharmacol.* **6**, 9 (1970).
- 19) Wood, W.B., *Jap. J. Pharmacol.* **14**, 284 (1964).
- 20) Hah, J.S., *Yonsei Med. J.* **19**, 11 (1978).
- 21) Kaku, J., *Arzeim-Forsch.* **25**, 539 (1975).
- 22) Kim, N.D. and Oh, U.T., *Yakhak Hoeji* **27**, 155 (1983).
- 23) Kim, N.D. and Kim, B.K. *Yakhak Hoeji* **21**, 15 (1980).

- 24) Kim, N.D., Kim, B.K. and Lee, H.S., *Yakhak Hoeji* 26, 239 (1982).
- 25) Toh, H.Y., Koh, T.Y. Ong, K.K., *4th Asian Symposium on Medicinal Plants and Spices*. 971 (1980).
- 26) Schmid, R.W. and Reilley, C.N., *Anal. Chem.*
- 27) 한국인삼사 下, 고려인삼의 과학적 연구. 230.
- 28) Kurebayashi, N. and Oguwa, Y., *J. Biochem.* 92, 907 (1982).
- 29) 임인경, 최홍식, 연세의대 학생연구 논문집 3, 35 (1975).
- 30) 김희중, 이종우, 강두희, 연세의대 논문집 10, 116 (1977).