

# 三和散이 心臟 Na-K-ATPase 活性에 미치는 影響

申 鉉 喆 · 尹 哲 浩 · 鄭 智 天\*

## ABSTRACT

### Effect of Samhwasan on Na-K-ATPase Activity in Microsomal Fraction of Rabbit Heart Ventricles

Shin Hyeon-Chul, Yoon Cheol-Ho, Jeong Ji-Cheon  
Dept. of Internal Medicine, Dong Guk University

This study was carried out to evaluate the effect of Samhwasan on the Na-K-ATPase activity of heart muscle. The Na-K-ATPase activity was prepared from rabbit heart ventricles. Samhwasan markedly inhibited the Na-K-ATPase activity in a dose-dependent manner with an estimated  $I_{50}$  of 0.56%. Hill coefficient was 1.70, indicating that the enzyme has more than one binding site for the Samhwasan. Inhibition of enzyme activity by Samhwasan increased as pretreatment time was prolonged. Inhibition by the drug was not affected by a change in enzyme protein concentration. Kinetic studies of substrate activation of the enzyme indicated classical noncompetitive inhibition, showing significant reduction in  $V_{max}$  without a change in  $K_m$  value. Inhibitory effect by Samhwasan was not altered by changes in concentration of  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$  or  $K^+$ . dithiothreitol, a

---

\* 東國大學校 韓醫科大學 內科學敎室

sulfhydryl reducing reagent, did not protect the inhibition of Na-K-ATPase activity by Samhwasan. Combination of Samhwasan and ouabain showed a cumulative inhibition fashion. These results suggest that Samhwasan inhibits Na-K-ATPase activity of heart ventricles with an unique binding site different from that of ATP,  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$  and ouabain.

Key Word : Samhwasan, heart microsomal fraction, Na-K-ATPase, ouabain, rabbit

## I. 緒論

正常細胞들은細胞膜을境界로 하여  $K^+$  濃度は細胞外部에比하여細胞内部가 높으며  $Na^+$  濃度は細胞外部가内部에比하여 높게維持되고 있는데, 이들 양이온의濃度差異는細胞膜에 있는 Na-pump의作用에起因한다.<sup>1)</sup> Na-pump는  $K^+$ 은細胞外部에서内部로  $Na^+$ 은細胞内部에서外部로能動的으로移動시키고 있다. 이러한  $Na^+$ 과  $K^+$ 의能動運搬(active transport)으로因해 나타나는電解質의濃度差異는神經細胞나筋肉細胞가興奮을할수 있게 하며,細胞의容積이正常크기로維持될수 있도록 하기 때문에 Na-pump는細胞의正常機能에重要な役割을 하고 있다.<sup>2)</sup>

Skou<sup>3)</sup>는 개의末梢神經細胞에서  $Na^+$ 과  $K^+$ 에依하여活性化되는 adenosinetri-phosphatase (ATPase) 卽, Na-K-ATPase가存在하며 이酵素系가  $Na^+$ 과  $K^+$ 의能動運搬에關與하는酵素일 것으로主張한以來 여러種類의組織<sup>4,5,6)</sup>에서發見되었다. 또한 Skou<sup>7)</sup>는 Na-K-ATPase가 Na-pump와同一한것임을主張하였으며, Jorgensen 等<sup>8)</sup>도赤血球에서免疫學的으로觀察한結果,  $Na^+$ 의移動에關與하는ATPase는 Na-pump와同一한것임을 밝혔다.

특히心臟에서心筋의收縮力を增加시키는心臟配糖體藥物들이 Na-K-ATPase 活性을抑制함으로써 그效果를 나타낸 것으로 밝혀짐으로서心筋細胞에서 이酵素系는強心作用과聯關性을 가지고 있어 그重要性이認定되고 있다.<sup>9)</sup>

三和散은行氣·理氣<sup>10,11,12,13,14,15)</sup> 등의效能으로氣鬱而心痛·心腹痞悶·顔面手足微浮腫<sup>16,17,18,19)</sup> 等

에使用되어 왔는데大腦皮質<sup>20)</sup>, 腎臟組織<sup>21)</sup>의 Na-K-ATPase 活性을抑制하였다는研究報告로보아心臟의 Na-K-ATPase 活性에도影響을미칠것으로思料된다.

이에著者は三和散이心臟細胞의 Na-K-ATPase 活性에어떤影響을미치는지를檢討하고자托기心臟에서分離한microsome에서三和散의影響을觀察하여有意한結果를얻었기에報告하는바이다.

## II. 實驗材料 및 方法

### 1. 材料

#### 1) 藥材

實驗에使用된三和散은東國大學校附屬韓方病院에서使用하고 있는藥材를東醫寶鑑<sup>22)</sup>에收錄된데로處方을構成하였으며, 1貼分量은 다음과 같다.

川芎	Cnidii Rhizoma	4.0 g
沈香	Aquillariae Lignum	2.0 g
蘇葉	Perillae Folium	2.0 g
大腹皮	Arecae Pericarpium	2.0 g
羌活	Angelicae Koreanae Radix	2.0 g
木瓜	Chaenomelis Fructus	2.0 g
木香	Helenii Radix	1.2 g
白朮	Atractylodis Rhizoma	1.2 g
檳榔	Arecae Semen	1.2 g
陳皮	Aurantii nobilis Pericarpium	1.2 g
甘草(炙)	Glycyrrhizae Radix	1.2 g

總 20.0 g

2) 動物

體重 2kg 内外의 家兔를 암수 區別 없이 使用하였다.

한 濾液을 rotary vaccum evaporator를 利用하여 減壓 濃縮시켜 엑기스 粉末 21g을 얻어 本 實驗에 必要한 濃度로 蒸溜水에 稀釋하여 使用하였다.

2. 方法

1) 檢液의 調製

三和散 5貼 分量 100g을 細切하여 1,000ml round flask에 넣고 蒸溜水 500ml를 加한 다음 冷却器를 附着하여 2時間 동안 加熱 煎湯하고 2回 吸引 過

2) Microsome의 分離

心臟筋에서 microsome은 Matsui와 Schwartz의 方法<sup>23)</sup>(Fig. 1)으로 分離하였는데 이를 簡單히 說明하면 다음과 같다. 무게 2kg 内外의 토끼를 犧牲시켜 心臟을 들어 내어 心室 部分만을 分離하였다.

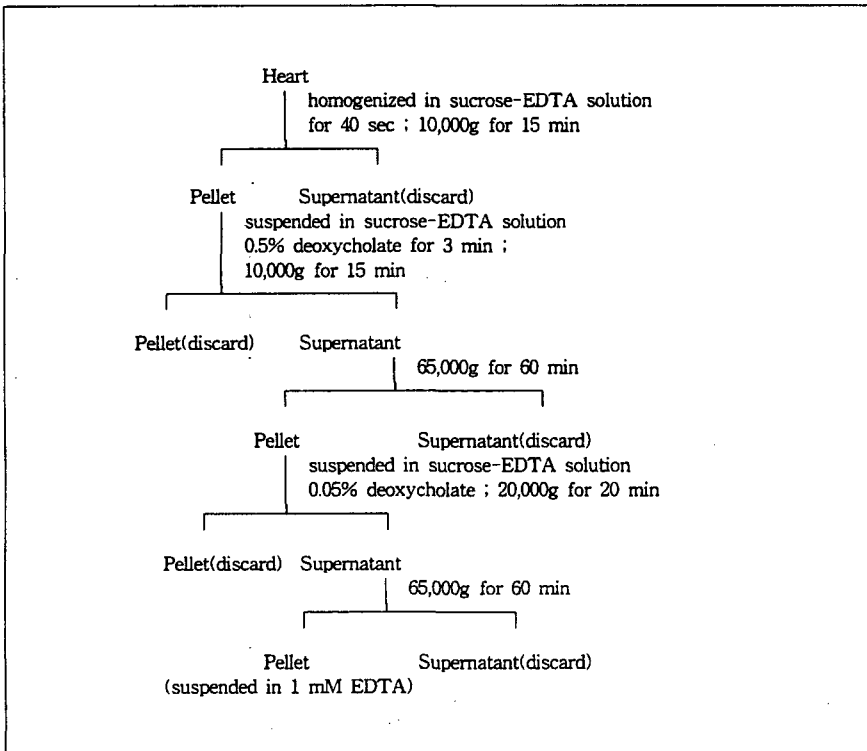


Fig. 1. Diagram of the purification procedure for the Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase.

Separation of the microsomal fraction(Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase) from rabbit heart ventricles.

組織을 가위로 작게 切開한 다음 sucrose-ethylenediaminetetraacetic acid(EDTA) 溶液(0.25M sucrose, 1mM EDTA)을 組織 무게의 9배가 되게 넣고 40秒 동안 Waring blender에서 均等質을 만들어 10,000g에서 15分 동안 遠心 沈澱시켜 上層液은 버리고 pellet를 얻었다. 여기에 다시 0.5% deoxycholate가 들어 있는 sucrose-EDTA 溶液을 8배되게 넣고 3分 동안 磨碎한 後 10,000g에서 15分 동안 遠心 沈澱시켰다. 여기서 얻은 上層液을 65,000g에서 60分 동안 遠心 沈澱시킨 後 上層液을 버리고 pellet를 0.05% deoxycholate가 들어 있는 sucrose-EDTA 溶液 속에 浮游시켜 이를 20,000g에서 20分 동안 遠心 分離하고 다시 65,000g에서 60分 동안 遠心 分離하여 pellet를 얻어 이를 1mM EDTA溶液 속에 浮游시켜 -20℃에 保管하여 實驗에 使用하였다.

分離된 microsome 分割內 蛋白質 含量은 標準溶液으로 bovine serum albumin을 利用하여 Lowry 等의 方法<sup>24)</sup>으로 定量하였다.

### 3) Na-K-ATPase 活性度 測定

總 ATPase 活性을 測定하기 爲한 incubation 溶液의 組成은 100mM NaCl, 10mM KCl, 2mM ATP로 하였으며, 여기에 適當量의 酵素 蛋白質을 添加하여 全體量이 1ml 되게 하였다. Mg-ATPase 活性度는 上記 組成 中 Na<sup>+</sup>과 K<sup>+</sup>이 없는 狀態에서 0.1mM ouabain 存在時에 測定하여 總 ATPase 活性度와 Mg-ATPase 活性度 差異를 Na-K-ATPase로 하였다. ATP가 없는 溶液에서 10分 동안 preincubation한 後 ATP를 添加하여 反應을 始作하였으며, 正確하게 10分 後 11.67% perchloric acid를 0.4ml 加하여 反應을 停止시켰다. 三和散은 preincubation 溶液內 添加하였다. ATP가 加水分解되어 遊離되는 無機磷酸의 濃度는 Fiske 및 SubbaRow의 方法<sup>25)</sup>으로 測定하였다.

### 4) 資料分析 및 統計處理

酵素의 最大速度(V<sub>max</sub>)와 Michaelis 常數(K<sub>m</sub>)

는 Sigma社에서 開發한 Enzfitter를 利用하여 分析하였으며, 두 平均值間의 有意性은 Student's t-test를 利用하여 檢定하였고 P값이 0.05 未滿일 때 有意한 것으로 判定하였다.

## III. 實驗成績

### 1. 三和散의 濃度에 따른 影響

三和散이 心臟 Na-K-ATPase 活性에 미치는 效果를 觀察하기 爲하여 三和散의 濃度를 0.1%에서 4%까지 變化시켜 實驗한 結果, 三和散은 心臟 Na-K-ATPase 活性을 強力하게 抑制하였으며, 50% 抑制을 나타내는 三和散의 濃度(I<sub>50</sub>)는 0.56%였다. 酵素 活性의 抑制 樣相은 S-字型 曲線(sigmoidal curve)을 나타내었으며 Hill plot으로 分析한 結果, Hill coefficient(直線의 기울기)는 1.70이었다. (Fig. 2)

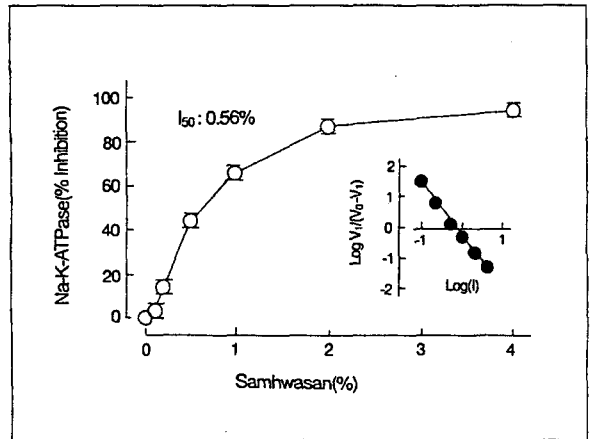


Fig 2. Effect of Samhwasan concentration on Na-K-ATPase activity in microsomal fraction of rabbit heart ventricles. I<sub>50</sub> indicates the concentration of the drug for 50% inhibition. Inset shows Hill plot from the same data. Data are mean ± S.E. of four determinations.

### 2. 藥物 處理 時間에 따른 效果

Na-K-ATPase 活性에 對한 三和散의 抑制 效果가 酵素에 對한 藥物의 處理 時間에 따라 影響을 받는 지를 確認하기 爲하여 0.5% 濃度 三和散의 濃度 處理 時間을 10分에서 60分까지 變動시켜 觀察한 結果, 酵素 活性의 抑制 程度는 處理 時間이 길어짐에 따라 增加하였다.(Fig. 3)

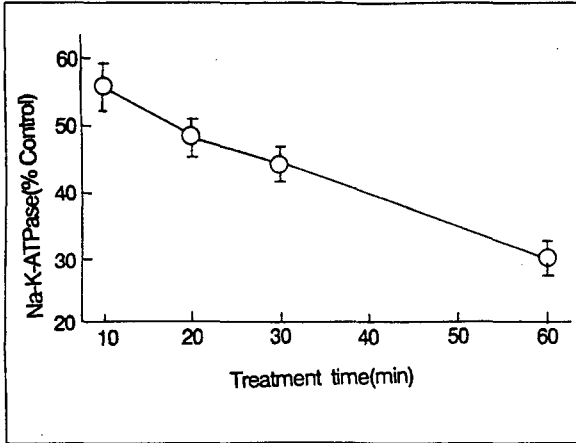


Fig. 3. Effect of pretreatment time on inhibition of Na-K-ATPase activity induced by Samhwasan (0.5%) in microsomal fraction of rabbit heart ventricles. Data are mean  $\pm$  S.E. of four determination.

### 3. Incubation 時間에 따른 效果

酵素 活性에 對한 三和散의 抑制 效果가 incubation 時間에 따라 變하는 지를 調査하기 爲하여 incubation 時間을 5分에서 30分까지 變化시켜 觀察한 結果, 藥物을 處理하지 않았을 境遇에는 incubation 時間이 길어짐에 따라 酵素 活性이 比例하여 增加하였다. 그러나 0.5% 濃度の 三和散을 添加하였을 境遇에는 incubation 時間이 10分에서 30分까지 延長되어도 酵素 活性의 增加가 크지 않아 三和散의 抑制 效果가 incubation 時間에 따라 增加하는 傾向을 보였다.(Fig. 4)

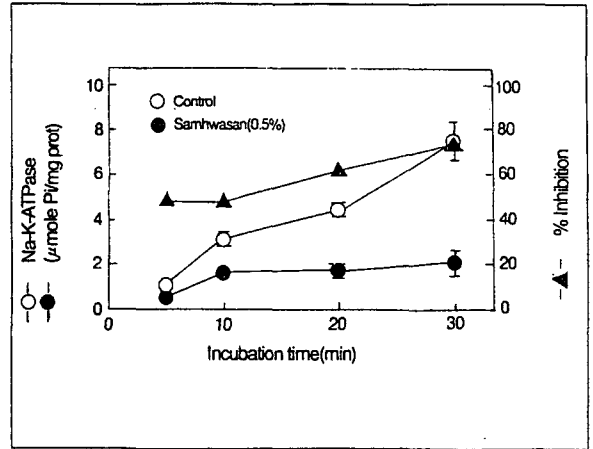


Fig. 4. Effect of incubation time on inhibition of Na-K-ATPase activity by Samhwasan in microsomal fraction of rabbit heart ventricles. Data are mean  $\pm$  S.E. of four determination.

### 4. 三和散의 抑制 作用에 對한 酵素 濃度の 效果

酵素 濃度 變化에 따른 三和散 0.5% 濃度の 抑制 效果를 觀察한 結果, 酵素의 濃도가 0.005mg/ml에서 0.03mg/ml까지는 ATP가 加水分解되는 程度가 酵素 濃度 增加에 따라 直線으로 增加하였으나, 0.05mg/ml로 더욱 增加되었을 境遇에는 酵素의 活性이 더 이상 增加하지 않았다. 따라서 이 實驗에서는 酵素의 濃도를 0.03mg/ml로 하였다. 三和散에 의한 酵素의 抑制 效果는 酵素 濃도에 따라 影響을 받지 않았다.(Fig. 5)

### 5. 溶液內 pH 變化의 影響

Incubation 溶液內 pH를 6.0에서 8.5까지 變化시키고 pH 變化에 따른 三和散 0.5% 濃度の 抑制 效果를 觀察한 結果, 酵素의 活性은 pH 7.5에서 最大 活性을 나타내었다. 三和散이 添加되었을 境遇에도 最適 pH는 變하지 않았으며 pH 變化에 따른 抑制 效果도 影響을 받지 않았다.(Fig. 6)

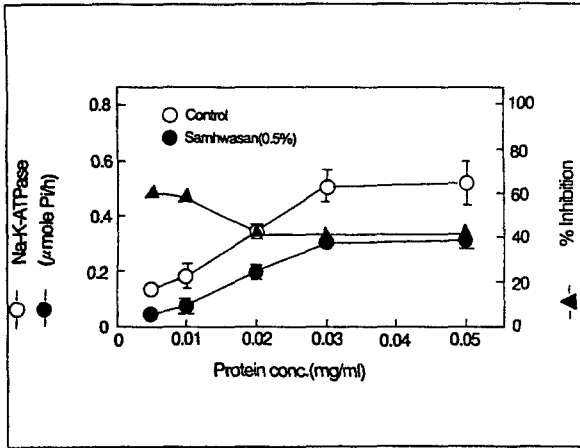


Fig. 5. Effect of enzyme concentration on inhibition of Na-K-ATPase activity by Samhwasan in microsomal fraction of rabbit heart ventricles. Data are mean  $\pm$  S.E. of four determinations.

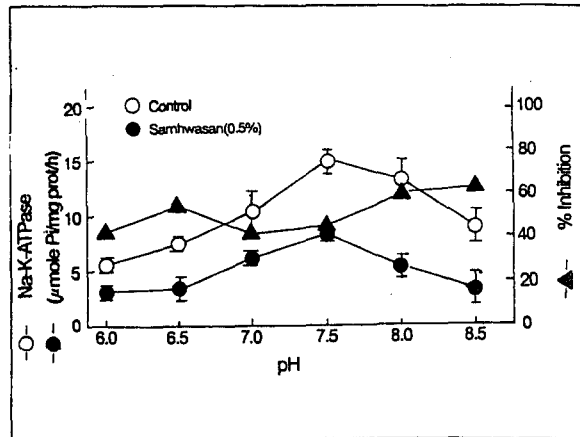


Fig. 6. Effect of medium pH on inhibition of Na-K-ATPase activity by Samhwasan in microsomal fraction of rabbit heart ventricles. Tris/HCl buffers were used at range of pH 7.0-8.5 and Mes/This buffers at pH 6.5 and 6.0. Data are mean  $\pm$  S.E. of four determinations.

### 6. Mg<sup>2+</sup> 濃度 變化에 따른 效果

Incubation 溶液에 Mg<sup>2+</sup> 濃度를 0.2mM에서

10mM까지 變動시키고 Mg<sup>2+</sup>에 依한 酵素 活性에 三和散이 어떤 影響을 미치는 지를 觀察한 結果, Mg<sup>2+</sup> 濃度를 0.2mM에서 1mM로 增加함에 따라 酵素의 活性이 急히 增加하였으나 Mg<sup>2+</sup> 濃度가 더욱 增加되었을 境遇에도 酵素의 活性은 增加하지 않았다. 또한 三和散의 抑制 效果도 Mg<sup>2+</sup> 濃度 變化에 따라 變하지 않았다.(Fig. 7)

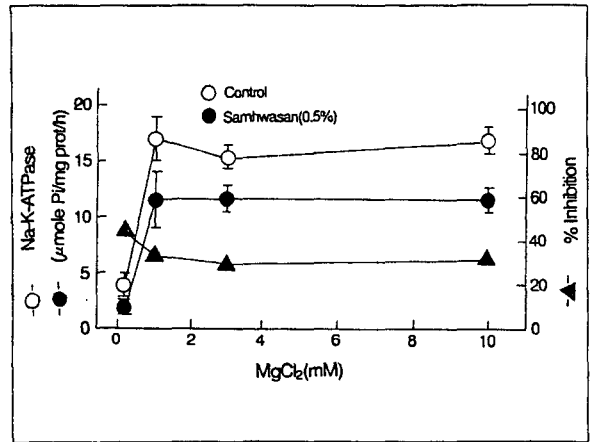


Fig. 7. Effect of Mg concentration on inhibition of Na-K-ATPase activity by Samhwasan in microsomal fraction of rabbit heart ventricles. Data are mean  $\pm$  S.E. of four determinations.

### 7. ATP 濃度 變化에 따른 效果

Incubation 溶液內 다른 條件은 一定하게 維持하고 ATP 濃度를 0.1mM에서 3mM까지 變化시키며 三和散이 ATP에 依한 Na-K-ATPase 活性에 미치는 效果를 觀察한 結果, ATP 濃度가 2mM까지 增加함에 따라 酵素의 活性이 增加하였으나 3mM까지 增加시켰을 때는 오히려 減少하는 現狀을 보였다. 三和散이 添加되었을 境遇에는 ATP 各 濃度에서 酵素 活性이 抑制되었다.(Fig. 8A)

三和散이 어떤 機轉으로 酵素의 活性을 抑制하는 지를 밝히기 위하여 Hofstee plot으로 分析하여 본 結果, y-축의 절편은 酵素의 最大速度(V<sub>max</sub>), 直線의 기울기는 Michaelis 常數(K<sub>m</sub>)를 나타내는데 기울기는 두 直線間에 差異가 없어 正常 對照群과

藥物 處理群에서 Km값은 각각  $0.73 \pm 0.09 \text{mM}$ 과  $0.72 \pm 0.05 \text{mM}$ 로 나타났다. 反面 Vmax값은 正常群의  $25.61 \pm 2.06 \mu\text{mole Pi/mg protein/hr}$ 에서 藥物 處理時  $16.14 \pm 0.72 \mu\text{mole Pi/mg protein/hr}$ 로 有意하게 減少하였다.(Fig. 8B)

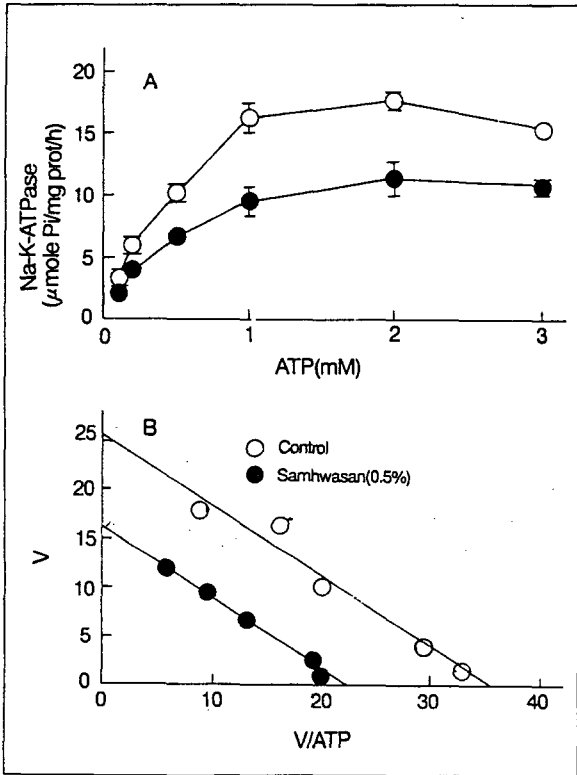


Fig. 8. Effect of ATP concentration on inhibition of Na-K-ATPase activity by Samhwasan in microsomal fraction of rabbit heart ventricles(A). Hofstee plot of the same data. Data are mean  $\pm$  S.E. of four determinations(B)

### 8. 三和散의 抑制 效果에 對한 dithiothreitol (DTT)의 影響

설프히드릴기(sulfhydryl group)는 Na-K-ATPase를 포함한 여러 酵素에서 그 活性을 維持하는 데 重要한 役割을 하고 있는 것으로 알려져 있

다.<sup>26)</sup> 따라서 藥物이 細胞膜에 있는 이 基와 結合하여 그 作用을 抑制하게 되면 酵素의 活性이 減少하게 될 것이다. 이 實驗에서 三和散이 설프히드릴기와 反應하여 Na-K-ATPase 活性을 抑制하는 지를 調査하기 爲하여 설프히드릴기의 保護 藥物인 DTT를 溶液內 添加한 狀態에서 三和散의 效果를 觀察한 效果, 正常 對照群에서나 三和散이 存在할 때에 2mM의 DTT를 添加하여도 酵素의 活性에는 影響이 없었다.(Fig. 9)

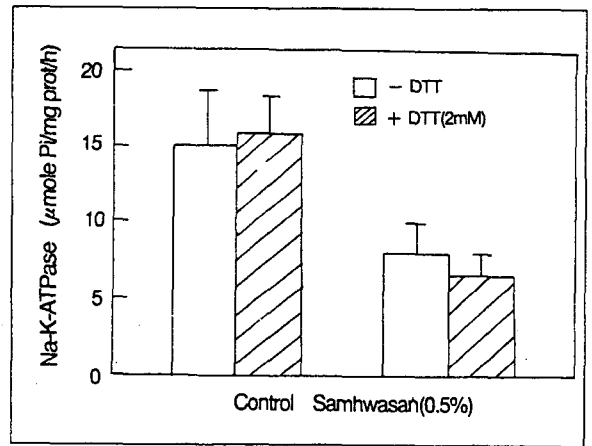


Fig. 9. Effect of dithiothreitol on inhibition of Na-K-ATPase activity by Samhwasan in microsomal fraction of rabbit heart ventricles. Dithiothreitol was added to the preincubation medium. Data are mean  $\pm$  S.E. of four determinations.

### 9. 溶液內 $\text{Na}^+$ 과 $\text{K}^+$ 濃度 變化에 따른 效果

三和散이  $\text{Na}^+$ 과  $\text{K}^+$ 에 依한 Na-K-ATPase 活性에 미치는 效果를 보고자 이들 이온의 濃度를 變化시켜 觀察한 結果, 溶液內 이들 이온들의 濃度가 變化하여도 三和散의 抑制 效果에는 影響을 받지 않았다.(Table I)

### 10. 三和散과 ouabain의 相互 作用

Ouabain은 다른 酵素에는 아무런 影響을 미치지 않는 濃度에서 Na-K-ATPase 活性만을 特異하게

抑制하는 효과를 나타내는 藥物로 잘 알려져 있으며, 이러한 抑制 效果는 心臟에서 強心作用을 나타내는 것과 密接한 聯關을 가지고 있다.<sup>9)</sup> 이 藥物이 Na-K-ATPase 活性을 抑制할 때는 細胞膜의 外部에 作用하여<sup>27)</sup> 酵素의 反應 過程中 磷酸化過程과 脫磷酸化過程을 抑制하는 것으로 알려져 있다.<sup>28,29)</sup> 三和散이 Na-K-ATPase 活性을 抑制할 때 ouabain과 同一 部位에 作用하는 지를 確認하기 爲하여 이들 두 藥物을 同時에 添加했을 때 酵素의 抑制 程度와 個個 藥物에 依한 抑制 程度를 同時에 觀察하였다. 만약 이들 藥物들이 獨立的으로 서로 다른 部位에 作用한다면 重複 抑制(cumulative inhibition) 樣相을 보일 것이고, 같은 部位에 作用한다면 個個 藥物에 依한 抑制 程度로부터 計算된 重複 抑制값 보다 낮은 값을 나타낼 것이다. 三和散(0.5%)과 ouabain ( $10^{-6}$ M)을 同時에 添加했을 때 觀察된 抑制값은 49.62%로서 計算된 重複 抑制값인 52.46%와 類似함으로서 두 藥物이 서로 다른 部位에 獨立的으로 作用한다는 것을 暗示하고 있다. 그러나 ouabain 濃도가  $5 \times 10^{-6}$ M로 높을 때는 觀察된 抑制값(66.17%)이 計算된 값(74.77%)보다 多少 낮았다.(Table II)

Table I. Effect of various Na<sup>+</sup> or K<sup>+</sup> Concentrations on Inhibition of Na-K-ATPase Activity by Samhwasan in Microsomal Fraction of Rabbit Heart Ventricles

Group	Activity ( $\mu$ mole Pi/mg/hr)	Observed Inhibition(%)
Control		
NaCl 5 mM		7.83±0.61
NaCl 100 mM		15.57±1.24
NaCl 150 mM		17.67±1.91
KCl 1 mM		11.25±0.02
KCl 5 mM		14.94±1.56
KCl 10 mM		15.57±1.24

Samhwasan (0.5%)

NaCl 5 mM	4.46±1.65	43.64±6.07
NaCl 100 mM	8.44±0.25	45.79±3.47
NaCl 150 mM	9.33±1.72	49.21±7.21
KCl 1 mM	5.75±0.26	50.85±4.12
KCl 5 mM	7.54±0.83	49.53±5.42
KCl 10 mM	8.44±0.25	45.79±3.47

Data are mean±S.E. of four determinations.

Table II. Effect of Combination of Samhwasan and Ouabain on Na-K-ATPase Activity in Microsomal Fraction of Rabbit Heart Ventricles

Group	Activity ( $\mu$ mole Pi/mg/hr)	Observed Inhibition(%)	Calculated Cumulative Inhibition(%)	
Control		14.64±0.57		
Ouabain $10^{-6}$ M		12.55±0.49	14.05±6.73	
Ouabain $5 \times 10^{-6}$ M		6.64±0.84	54.38±7.52	
Samhwasan 0.5%		8.02±1.65	44.69±13.42	
Ouabain $10^{-6}$ M+SHS		7.30±1.63	49.62±13.07	52.46
Ouabain $5 \times 10^{-6}$ M+SHS		4.89±1.48	66.17±11.41	74.77

Data are mean±S.E. of four determinations.

SHS : Samhwasan

IV. 考 察

三和散은 宋代 陳<sup>30)</sup>의 太平惠民和劑局方에 “治五臟不調 三焦不和 心腹痞悶 頭面虛浮 手足微腫”이라고 처음 記載된 以來 聖濟總錄<sup>35)</sup>에서는 “治三焦病氣不升降 水道不利 漸成水脹”이라고 하였다.

構成 藥物은 主코 性溫 味辛苦하며 行氣·理氣·下氣 및 利水·解鬱·活血·止痛·化濕 等の 效能<sup>11,12,13,14,15,31)</sup>이 있으므로 許<sup>16,17,18,19,22,23,32)</sup> 등은 或脹或痛, 氣血留滯, 浮腫, 氣鬱而心痛, 七情痞結, 心腹脹急 등 主로 三焦 氣化 作用의 失調로 因한 疾患에 使



用된다고 하였다.

氣化는 臟腑의 機能作用, 氣血의 輸布, 營衛流注, 氣의 升降開閉 등 人體內의 氣機의 運行 變化인 運動·變化·轉化하는 動態를 가리키고 三焦가 擔當한다고 하였다.<sup>34,35)</sup>

三焦에 對해서는 難經<sup>36)</sup> 三十一難에 “三焦者 水穀之道路 氣之所終始也”, 六十六難에 “三焦者··主通行三氣 經歷於五臟六腑”, 素問<sup>37)</sup> 靈蘭秘典論에 “三焦者 決瀆之官 水道出焉”, 靈樞<sup>38)</sup> 營衛生會篇에 “上焦如霧 中焦如溝 下焦如瀆”이라고 하여 人體 上·中·下焦 三個 部位의 總稱이고, 人體 氣機의 作用이며, 水穀傳輸의 通路로서 飲食物의 受納·腐熟, 精微의 運化 및 糟粕의 排泄 등과 有關한 것으로 알려져 있다.<sup>35)</sup> 西洋醫學의으로는 內分泌와 神經系<sup>35)</sup>, 神經系統에 依한 體液調節下의 新陳代謝過程<sup>34)</sup>, 人體의 體腔, 淋巴系統, 血管系統, 神經系統, 臟器·組織<sup>39,40,41)</sup> 등과 聯關지어 보는 見解가 있는데, 하나의 整體概念으로서의 三機能系로 各 部位에 所屬된 臟腑의 正常 生理活動을 維持하는 機能을 概括한 것이라고 하였다.<sup>35)</sup>

특히 上焦에는 心肺가 屬해 있는데<sup>35)</sup> 靈樞<sup>38)</sup> 營衛生會篇에 “上焦如霧”, “上焦出於胃上口 并咽以上 貫膈而布胸中 走腋”, 決氣篇에 “上焦開發 宣五穀味 熏膚 充身 澤毛 若霧露之漑 是謂氣”라고 하여 心의 推動과 肺의 宣發·肅降 機能을 利用하여 精微한 氣를 全身에 散布한다고 하였다.<sup>35,42,43)</sup>

金<sup>34)</sup>은 七情에 依해 心系의 氣機가 鬱滯되면 上焦가 不通해지므로써 各種 循環不全과 心系 症狀이 나타난다고 하였고, 氣의 循行이 凝滯되든가 逆行하여 氣血의 疏通이 沮害됨으로써 오는 痛症 全體를 氣痛<sup>44)</sup>이라 하였는데, 이러한 境遇에 三和散의 行氣·止痛 效能으로 治療될 수 있을 것으로 생각된다.

Na-K-ATPase는 모든 神經·筋肉細胞에서 興奮을 誘發하며<sup>2)</sup> 心筋의 收縮力을 增加시켜 強心作用과 聯關을 가지고 있다.<sup>9)</sup> 心筋의 收縮力을 增加시키는 代表的인 藥物은 digitalis 配糖體로서 作用 機

轉은 心筋膜에 있는 Na-K-ATPase를 抑制하면 Na의 能動 運搬이 抑制되므로 細胞內 Na은 增加되고 K은 減少한다. 心筋 纖維는 細胞外 Na과 細胞內 Ca을 交換하는 能力을 가지고 있어서 筋肉纖維內 Na이 增加되면 細胞外 Na과 細胞內 Ca의 交換이 抑制되므로 筋質(sarcoplasm)內의 Ca이 增加되어 sarcoplasmic reticulum內 結合 Ca이 增加된다. 그러므로 Digitalis를 投與하면 細胞內 Na 濃度 增加와 더불어 sarcoplasmic reticulum內의 Ca 濃度가 增加하므로 다음 活動 電位에 依하여 많은 量의 Ca이 細胞質內로 遊離되어 心筋 收縮力이 亢進된다. 卽 Digitalis는 Na-K-ATPase를 抑制하여 sarcoplasmic reticulum內 Ca을 增加시켜 心筋의 收縮力을 增強시킨다.<sup>10,45,46)</sup> 따라서 鬱血性 心不全의 治療에 Digitalis는 唯一한 藥物이며, 效果는 心筋의 收縮力을 增加시켜 心搏出量을 增加시키는데 있으므로 低 搏出性 不全에 特히 效果가 있다. 따라서 高血壓·心臟瓣膜障礙·動脈硬化症 등에서와 같이 心筋의 負擔이 過重하게 된 境遇에 效果가 크다.<sup>45,47,48,49)</sup>

心臟의 Na-K-ATPase와 關聯된 研究 報告로 全<sup>50)</sup>은 勝金散, 金<sup>51)</sup>은 瓜蒌薤白半夏湯이 心臟 瓣膜內의 酵素 活性度를 增加시킨다고 하였다. 心臟에 對하여 行氣之劑와 關聯된 研究 報告로는 朴<sup>52)</sup>은 分心氣飲이 Acetylcholin의 作用을 促進하여 心搏動數를 減少시킴으로서 血壓 降下作用을 나타낸다고 하였으며, 安<sup>53)</sup>은 莎芎散이 心筋 小胞體의 Mg<sup>2+</sup>-Ca<sup>2+</sup>-ATPase의 活性을 抑制하여 心筋 收縮을 強化하고 全身의 毛細血管 平滑筋을 弛緩시켜 血液循環을 促進하며 腦壓과 血壓을 降下시킨다고 하였다.

行氣之劑인 木香에 對하여 李<sup>12)</sup>는 上焦氣滯에 對하여 金鬱을 泄한다고 하였고, 吳<sup>54)</sup>는 “三焦氣分之藥 能升降諸氣··治一切氣痛”, 汪<sup>55)</sup>은 “治一切氣痛 九種心痛··”이라고 하여 心臟의 循環不全으로 인한 心系 疾患에 有效할 것으로 思料되며, 이는 “血爲氣配··氣行卽血行 氣止卽血止”, “諸痛皆因於氣”

<sup>22)</sup>라고 하여 行氣·理氣의 效能이 上焦의 氣血鬱滯에 對하여 心臟의 循環 機能을 促進시키는 것으로 생각된다.

三和散에 對한 研究 報告로는 鄭<sup>56)</sup>이 腸運動을 促進하는 作用이 있으며, 李<sup>57)</sup>는 抗stress 및 鎮痛 效果가 認定된다고 하였다. 또한 鄭<sup>21)</sup>은 腎臟 組織의 細胞膜에서 Na-K-ATPase 活性을 抑制한다고 하였고, 金<sup>20)</sup>은 大腦皮質의 Na-K-ATPase 活性을 抑制한다고 하였으나, 心臟 Na-K-ATPase에 미치는 影響에 對한 研究 報告는 없었다.

三和散이 行氣·理氣 效能으로 主로 三焦 氣化病變에 使用되므로 心臟에도 影響을 미칠 것으로 思料되어 家兔의 心臟 組織에 對한 變化를 檢討해 본바 三和散이 心臟에서 分離한 Na-K-ATPase 活性을 強力하게 抑制하였다. 이러한 結果는 三和散의 行氣·理氣 效能과 辛溫한 性味로 氣爲血帥·氣行卽血行·氣溫卽血滑<sup>22)</sup>과 辛甘發散爲陽<sup>37)</sup>의 理論에 依해 心系的 氣血鬱滯를 疏通시킴으로써 效果를 나타낸 것으로 생각된다.

三和散에 依한 酵素 活性의 抑制 樣相은 Hill plot으로 分析한 結果 기울기의 값이 1.7로 나타났는데 이것은 三和散이 酵素와 結合할 때 한 個 以上の 結合 部位를 가지고 있음을 暗示하고 있다. 또한 三和散을 酵素에 作用시키는 時間을 延長함으로써 抑制 程度가 時間에 比例하여 增加하였으며, incubation 時間이 增加함에 따라서도 抑制 程度가 增加하였다. 이것 또한 三和散이 酵素와 느리게 反應하고 있음을 가리킨다.

三和散의 抑制 作用은 溶液內의 pH 變化나  $Mg^{2+}$ 의 濃度 變化에도 影響을 받지 않았는데, 이것은 Na-K-ATPase가 活性을 爲해  $Mg^{2+}$ 을 必要로 하고 있지만 Mg이 三和散의 抑制 效果에는 影響을 미치지 못한다는 것을 意味한다. 또한 三和散이 있을 때나 없을 때나 最大活性은 pH 7.5에서 나타났다.

酵素力學的 分析 結果, 三和散은 ATP에 依한 酵素 活性의 最大速度( $V_{max}$ )를 減少시키고  $K_m$ 값에는 變化를 주지 못함으로써 이 藥物이 酵素와 基質

(ATP)의 結合 部位에는 直接 影響을 미치지 못하는 典型的인 非競爭 抑制樣相을 보임을 意味하고 있다. 또한 三和散의 抑制 效果는 설프히드릴기의 保護 藥物에 影響을 받지 않았으며, 溶液內  $Na^+$ ,  $K^+$ 의 濃度 變化에도 影響을 받지 않았는데 이는 三和散이 酵素의 活性을 抑制하는 作用 部位가  $Na^+$ 이나  $K^+$ 의 結合 部位와는 다르다는 것을 意味한다.

그리고 三和散과 Ouabain을 同時에 添加하여 抑制 程度를 관찰한 實驗에서는 重複 抑制樣相을 보여 서로 다른 部位에 作用하는 것으로 나타났다. 濃度가 높아질수록 두 藥物이 서로의 作用 部位에 影響을 미칠지도 모를 可能性을 보여 주었으나 서로의 結合 部位에 影響을 미친다는 明白한 結果는 얻지 못하였다.

이 實驗 結果들을 綜合해 보면 三和散은 心臟의 Na-K-ATPase 活性을 強力하게 抑制를 하는데 그 作用 部位는 最少한 한 個 以上이며 Na-K-ATPase 活性에 影響을 미치는 다른 因子와 別個의 獨立된 部位에서 抑制 效果를 나타내고 있다. 이러한 Na-K-ATPase 活性을 抑制하는 作用이 心臟 機能과 어떻게 聯關되는 지는 알 수 없으나, Na-K-ATPase 活性을 抑制하는 藥物인 心臟配糖體들이 強心作用을 가지고 있으며 特히 이들 藥物들이 強心作用을 나타내는 機轉이 Na-K-ATPase 活性을 抑制하는 效果와 聯關되어 있음이 밝혀져 있다. 따라서 三和散의 Na-K-ATPase 活性을 抑制하는 作用이 強心作用과 關聯이 있을 것으로 思料되므로 앞으로 이와 關聯한 具體的인 研究가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

## V. 結論

三和散이 心臟에 있는 Na-K-ATPase 活性에 어떤 影響을 미치는 지를 調査하기 爲하여 토끼 心臟에서 microsome을 分離하여 그 效果를 觀察한 바, 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 心臟 Na-K-ATPase 活性은 三和散의 濃度에

比例하여 抑制되었으며 酵素의 活性을 50% 抑制하는 濃度는 0.56%였다. 그 抑制 樣相을 Hill plot으로 分析한 結果 酵素에 對한 三和散의 結合 部位가 한 個 以上임을 보였다.

2. 三和散의 抑制 效果는 酵素蛋白質에 對한 藥物의 處理 時間이 길어짐에 따라 增加하였다.
3. 酵素의 活性은 酵素蛋白質의 濃度가 增加함에 따라 增加하였으나 三和散의 抑制效果는 影響을 받지 않았다.
4. 酵素의 活性은 溶液內의 pH가 7.5일 때 最大活性을 보였으며 三和散의 添加에 依하여 最大活性을 나타내는 pH는 變하지 않았다. 또한 三和散의 抑制 程度도 溶液內의 pH 變化에 依해 影響을 받지 않았다.
5. 三和散은 基質(ATP)에 依한 酵素 活性時 Km 값은 變化를 주지 않고 最大速度 (Vmax)를 減少시킴으로서 典型的인 非競爭 抑制樣相을 보였다.
6. 三和散의 抑制 效果는 溶液內의  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$  또는  $K^+$ 의 濃度 變化에 依해 影響을 받지 않았다.
7. 三和散의 抑制 效果에 있어서는 설프히드릴기의 保護 藥物에 依해 阻害되지 않았다.
8. 三和散을 ouabain과 同時에 添加했을 때는 重複 抑制(cumulative inhibition) 樣相을 보였다.

以上の 結果로 三和散은 心臟의 Na-K-ATPase 活性을 強力하게 抑制하는 效果를 나타내며, 그 作用 部位는 酵素 基質이나  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$  및  $K^+$ 의 結合 部位, 또는 ouabain의 結合 部位와는 다른 獨立의 作用 部位를 가지고 있는 것으로 思料된다.

### 參 考 文 獻

1. Albers, R. W.: Biochemical aspects of active transport Ann. Rev. Biochem., #6:727-756, 1967.
2. Katz, A. I. and Epstein, F. H.: Physiologic

role of Na,K-ATPase in the transport of cations across biologic membranes. N. Eng. J. Med., 2'8:253-361, 1968.

3. Skou, J. C.: The influence of some cations on an adenosinetriphosphat-ase from peripheral nerves. Biochem. Biophys. Acta, 23:394-401, 1957.
4. Bonting, S. L. and Caravaggio, L. L.: Studies on sodium potassium activated adenosine triphosphatase. V. Correlation of enzyme activity with cation flux in six tissues. Arch. Biochem. Biophys., 101:37-42, 1963.
5. Bonting, S. L., Simmon, K. A. and Hawkins, N. M.: Studies on sodium-potassium-activated adenosine triphosphatase. I. Quantitative in several tissues of the cat. Arch. Biochem. Biophys., 95:416-425, 1961.
6. Stahl, W. L. and Broderson, S. H.: Localization of Na,K-ATPase in brain. Fed. Proc., 35:1260-1265, 1976.
7. Skou, J. C.: The relationship of the (Na,K) activated enzyme to trans- port of sodium and potassium across the cell membrane. Bioenergetics, 4:203-230, 1972.
8. Jorgensen, P. L., Hansen, O., Glynn, I. M. and Carieres, J. D.: Actibodies to pig kidney (Na,K)-ATPase inhibit the Na pump in human red cells provided they have access to the inner surface of the cell membrane. Biochem. Biophys. Acta, 291:795-812, 1974.
9. Akera, T. and Brody, T. M.: The role of Na, K-ATPase in the inotropic action of digitalis. Pharmacol. Rev., 29:187-220, 1978.
10. 姜斗熙 : 生理學, 서울, 新光出版社, pp. 2·20-2·22, 4·15-4·16, p. 4·34, pp.8·20-8·22, 8·

- 33-8·35, 8·42-8·43, 1988.
11. 辛民教 : 臨床本草學, 서울, 南山堂, p. 172, 176, 249, 380, 381, pp. 387-388, 390-391, p. 395, 504, 519, pp. 668-669, 1986.
  12. 李尙仁 : 本草學, 서울, 學林社, p. 57, 59, 181, 194, 203, 230, 349, 375, 377, 402, 408, 563, 1986.
  13. 李尙仁·辛民教 外 : 漢藥臨床應用, 서울, 成輔社, pp. 39-40, p. 43, 183, 225, 228, 229, 233, 235, 267, 321, 324, 497, 1986.
  14. 上海中醫學院 編 : 中草藥學, 香港, 商務印書館香港分館, p. 29, 34, 42, 356, 360, 372, 378, 520, 525, 1985.
  15. 黃宮綉 : 本草求真, 北京, 人民衛生出版社, p. 6, 15, 27, 62, 72, 105, 127, 1987.
  16. 金相孝 : 東醫神經精神科學, 서울, 杏林出版, p. 366, 1989.
  17. 申載鏞 編著 : 方藥合編解說, 서울, 成輔社, p. 146, 1989.
  18. 廉泰煥 : 漢方處方解說, 서울, 杏林書院, p. 229, 1967.
  19. 黃度淵 : 方藥合編, 서울, 南山堂, p. 202, 1987.
  20. 金吉燮 : 三和散이 大腦皮質 microsome 分割에 서 Na-K-ATPase 活性에 미치는 影響, 東國大學校 大學院 碩士學位 論文, pp. 1-24, 1994.
  21. 鄭智天 : 三和散이 家兔 腎臟機能에 미치는 影響, 韓醫學研究所論文集 1(11):55-80, 1992.
  22. 許浚 : 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, p. 88, 106, 1989.
  23. Matsui, H. and Schwartz, A.: Purification and properties of a highly active ouabain-sensitive Na,K-dependent adenosine triphosphatase from cardiac tissue. *Biochem. Biophys. Acta*, 128:380-390, 1966.
  24. Lowry, O. H., Rosebrough, N. D., Farr, A. L. and Randall, R. L.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275, 1951.
  25. Fiske, C. H. and SubbaRow, Y.: The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, 66:375-400, 1925.
  26. Schwartz, A., Lindenmayer, G. E. and Allen, J. C.: The sodium-potassium adenosine triphosphatase: pharmacological, physiological and biochemical aspects. *Pharmacol. Rev.*, 27:3-134, 1975.
  27. Hoffman, J. F.: The red cell membrane and the transport of sodium and potassium. *Am. J. Med.*, 41:666-680, 1966.
  28. Banerjee, S. P., Dhanna, V. K. and Sen, A. K.: Inhibition of sodium-and potassium-dependent adenosine triphosphatase: Two modes of action. *Mol. Pharmacol.*, 6:680-689, 1970.
  29. Sen, A. K., Tobin, T. and Post, R. L.: A cycle for ouabain inhibition of sodium and potassium-dependent adenosine triphosphatase. *J. Biol. Chem.*, 244:6596-6603, 1969.
  30. 陳師文 外 : 太平惠民和劑局方, 北京, 人民衛生出版社, p. 92, 1985.
  31. 曹孝忠 外 : 聖濟總錄, 臺北, 新文風出版公司, p. 469, 1978.
  32. 康命吉 : 濟衆新編, 서울, 杏林書院, pp. 65-66, 1975.
  33. 周命新 : 醫門寶鑑, 臺北, 國風出版社, p. 72-73, 1985.
  34. 金完熙 外 : 臟腑辨證論治, 서울, 成輔社, pp. 75-77, 83-85, p. 87, 1988.
  35. 杜鎬京 : 東醫腎系學, 서울, 東洋醫學研究院, pp. 43-51, 832-834, 886-887, 906-913, 1993.
  36. 凌耀星 編著 : 難經校注, 서울, 一中社, p. 60, 70, 114, 1992.
  37. 王琦 編著 : 皇帝內經素問今釋, 서울, 成輔社, p. 49, 65, 127, 189, 1993.
  38. 楊維傑 : 黃帝內經靈樞譯解, 서울, 大星文化社,

- p. 41, 197, 201, 271, 295, 402, 589, 604, 1990.
39. 顧瑞生 : (傷寒雜病論)三焦析, 浙江中醫學院學報 5期, pp. 4-5, 1990.
40. 樊謹如 : 再論三焦的形質, 江西中醫藥 5期, pp. 56-57, 1991.
41. 程自勉 : “三焦”實義考辨, 河南中醫 1期, pp. 10-11, 1992.
42. 巢元方 : 諸病源候論, 서울, 大星文化社, pp. 130-131, 1992.
43. 張安玲 : 論心與津液代謝, 山東中醫學院學報 2期, pp. 13-17, 1990.
44. 黃義完·金知赫 : 東醫精神醫學, 서울, 現代醫學書籍社, p. 634, 654, 1989.
45. 김구자 外 : 생리학, 서울, 고려의학, pp. 22-25, 34-36, 1986.
46. 이우주 : 약리학강의, 서울, 선일문화사, pp. 337-349, p. 370, 1990.
47. 具本泓 外 : 東醫心系內科學, 서울, 書苑堂, p. 185-211, 1987.
48. 서울대학교 의과대학 : 심장학, 서울대학교 출판부, pp. 101-105, 1987.
49. 徐正燉 : 요약심장학, 서울, 고려의학, pp. 206-221, 1987.
50. 全燦鎔 : 虛血性 心臟에 對한 勝金散의 實驗的 研究, 慶熙大學校 大學院 博 士學位 論文, pp. 1-50, 1994.
51. 金仁燮 外 : 瓜蒌薤白半夏湯 및 加味瓜蒌薤白半夏湯이 虛血性 心疾患에 미치는 影響, 韓方成人病學會誌 1(1):187-216, 1995.
52. 朴世光 : 分心氣飲이 家兔의 血壓降下에 미치는 影響, 大田大學校 大學院 碩 士學位 論文, pp. 1-18, 1990.
53. 安日會 : 莎芎散이 實驗動物의 止血·腦壓·血壓 및 心血管系에 미치는 影響, 大韓韓方內科學會誌 15(1):80-98, 1994.
54. 吳儀洛 : 本草從新, 서울, 杏林出版, pp. 36-37, 1989.
55. 汪昂 : 本草備要解析, 新竹, 國興出版社, pp. 256-258, 1983.
56. 鄭智天 : 氣秘에 應用되는 三和散이 腸運動에 미치는 影響, 月刊韓醫學 1(1):110-120, 1988.
57. 李和信 : 三和散이 抗stress 및 鎮痛에 對한 實驗的 研究, 大邱韓醫科大學 大學院 碩 士學位 論文, pp. 1-18, 1991.