

원저

苦蔘 煎湯液이 培養心筋細胞에 미치는 影響

김현규* · 박준수* · 권강범* · 이호섭* · 한종현** · 박승택*** · 류도곤*

ABSTRACT

Effects of Sophorae Radix Water Extract on Cultured Rat Myocardial Cells

Kim, Hyun-Kyu* · Park, Jun-Su* · Kwon, Kang-Beom* · Lee, Ho-Sub*
Han, Jong-Hyun** · Park, Seung-Taeck*** · Ryu, Do-Gon*

* Dept. of physiology

** Dept. of phamacology, college of oriental medicine

*** Dept. of Anatomy, college of medicine, Wonkwang Univ., Iksan

In order to elucidate toxic the mechanism of myocardial damage and the protective effect of herbal extract, Sophorae Radix(SR) against myocardiotoxicity, the cytotoxic effect of adriamycin and cardioprotective effect of SR were examined by MTT assay, LDH activity, heart beat rate and light microscopy after cultured myocardial cells derived from neonatal mouse were treated with various concentrations of adriamycin, an inducer of myocardiotoxicity.

Adriamycin induced a decrease of cell viability, an increase in the amount of lactate dehydrogenase(LDH), and a decrease in the heart beat rate and a decrease in the number of cells, when administered to cultures myocardial cells in a dose-dependent manner. In cardioprotective effect of SR, SR showed the decrease of amount of LDH, and an increase of heart beating rate and cells in number on cultured myocardial cells damaged by adriamycin.

From the above results, it is suggested that adriamycin shows toxic effect in cultured myocardial cells derived from a neonatal mouse, and herbal extract such as SR is very effective in the prevention of adriamycin-induced cardiotoxicity.

key word : Adriamycin, Myocardial Cell, MTT, Sophorae Radix(SR), Beating Rate

* 원광대학교 한의과 대학 생리학 교실

** 약리학 교실

*** 의과대학 해부학교실

접수일: 99. 5. 27 연락처: 신홍복 T. 0561-770-2372/2651

※ 본 연구는 한국과학재단 지정, 원광대학교 의약자원 연구센터 및 전라북도 도청 (99-16-03-03-A-3)의 지원에 의한 것입니다

I. 서 론

苦蔘(Sophorae Radix)은 『神農本草經』¹⁾에 最初로 記載된 이래 藥性 및 主治, 效能이 研究되어 졌으며 그 歸經은 心, 肝, 胃 大腸, 膀胱 等이라고 하였고, 味苦, 性寒, 無毒하다고 하였으며, 本 藥物의 效能으로는 淸熱燥濕, 祛風殺蟲, 利水 等이라고 하였다²⁻¹⁰⁾. 또한 本 藥物에 대한 實驗研究로는 李 등¹¹⁾이 急性 附子 草烏 中毒에서 甘豆湯과 苦蔘의 應用에 관한 研究에서 苦蔘이 實驗的으로 誘發된 不整脈에 대하여 抗不整脈作用이 있다고 報告하였고, 最近의 研究結果에 의하면 苦蔘 單味 煎湯液은 強心, 抗不整脈 등의 作用이 있다고 하였으며^{12-16,25)}, 또한 血管擴張으로 因한 心筋의 虛脫을 抑制하는 作用이 있다고 하였다¹⁴⁾.

Adriamycin은 인체 임파구세포내의 자매염색분체의 빈도증가를 비롯하여 햄스터의 난소세포의 발생억제등과 같은 부작용을 초래함으로써 세포에 毒性效果를 나타낸다고 한다¹⁷⁻¹⁸⁾. 특히, adriamycin은 streptomycetes var. caesius에서 추출된 anthracycline 계통의 약제로서 dichloromethane처럼 심근세포에 독성을 가지고 있어¹⁹⁾, 사람이나 동물에서 심부전을 비롯하여²⁰⁾, 심경색 등을 유발한다고 보고된 바 있다²¹⁻²²⁾. 最近의 소수의 연구에서 心筋毒性은 adriamycin외에도 酸素自由基에 의하여서도 유발된다고 보고된 바 있다²³⁾. 따라서 국내의 많은 학자들은 adriamycin의 심근독성에 대한 기전을 규명하기 위하여 여러 동물을 대상으로 이에 대한 研究를 꾸준히 진행하여 왔다.^{24,27)} 그러나 아직까지 adriamycin의 독성에 대하여 苦蔘의 방어효과에 대한 보고는 접할 수 없었다.

이에 著者は 심근독성에 대한 苦蔘 煎湯液의 효과를 관찰하기 위하여 생쥐로부터 분리하여 순수 배양한 심근세포에 苦蔘 煎湯液을 전처리한 후 심근독성을 유발하는 adriamycin이 여러 농도로 포함된 배양액에서 일정시간 동안 배양한 후에 苦蔘 煎湯液의 방어효과를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 材 料

1) 동물 : 본 실험에 사용한 동물은 ICR 계통의 생후 3일된 건강상태가 양호한 생쥐를 사용하였다.

2) 약재 : 본 실험에 사용한 苦蔘(Sophorae Radix)은 원광대학교 한의과대학 부속 한방병원에서 구입한 후 본초학 교실에서 精選하여 사용하였다.

2. 方 法

1) 전탕액의 제조

苦蔘 200g에 3차 증류수 1.8 l를 각각 환저 플라스크에 넣고 冷却器를 附着하여 2시간동안 電熱器로 煎湯한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 진공 농축기로 감압농축한 후 凍結乾燥器에서 24시간 凍結乾燥하여 각각 23.86g의 분말 시료를 얻었다.

2) 세포배양

심장조직에서 분리된 심근세포를 Ca²⁺, Mg²⁺-free인 Hank's balanced salt solution (HBSS, GIBCO)으로 3회 세척한 후 1,000rpm에서 20분간 원심시켰다. 원심된 세포들을 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 1×10⁶cell/well의 세포 밀도로 분주하였다. 분주된 세포는 3일 간격으로 새로운 배양액으로 교환하여 주었으며 adriamycin이 포함되지 않은 배양액을 대조군으로 하여 비교 조사하였다.

3) Adriamycin 처리

Adriamycin이 생쥐의 심근세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 일정시간 배양한 심근세포를 phosphate buffered saline(PBS)으로 3회 세척한 후 adriamycin이 1-20 μg/ml까지의 각각의 농도로 포함된 배양액에서 1-96시간 동안 배양한 다음, adriamycin이 심근세포에 미치는 영향을 분석하였다.

4) 한약제의 처리

본 실험에 사용한 苦蔘 煎湯液를 여러 농도로 하여, 생쥐의 배양 심근세포를 adriamycin에 노출시키기 전에 3시간 동안 전처리한 다음 이를 adriamycin에 72시간 동안 노출시킨 후 苦蔘 煎湯液이 심근세포에 미치는 영향을 조사하였다.

5) 세포생존을 분석

MTT<3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(Sigma) 정량은 Adriamycin나 苦蔘 煎湯液를 처리한 배양 척수신경운동신경세포를 PBS로 3회 세척한 다음 전날 제조한 50 mg/ml의 MTT를 well당 최종농도로 희석하여 넣어 37℃, 5% CO₂ 로 조절된 정온기에서 배양하였다. 배양 완료후 dimethylsulfoxide(DMSO, Merk)를 처리한 다음 spectrophotometer로 540nm에서 흡광도를 측정후 대조군과 비교 조사하였다.

6) Lactate Dehydrogenase(LDH) 활성 조사

LDH활성의 측정은 kit(Japan)의 효소 기질액 1.0ml를 tube(Palcon)에 넣은 후 검체인 배양액을 넣어 잘 혼합한 후 37℃로 조절된 정온기에서 반응시켰다. 반응 완료후 희석반응 정지액을 3.0ml를 넣고 잘 혼합한 후 spectrophotometer로 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) Beating Rate 측정

배양 심근세포의 beating rate의 측정을 위하여 일정 시간 배양한 심근세포에 여러 농도의 adriamycin이 포함된 배양액에서 72시간 동안 배양한 후 약제가 포함되지 않은 배양액을 대조군으로 하여 분당 심근의 박동수를 대조군과 비교 조사하였다. 또한 한약추출물의 영향을 조사하기 위하여 여러 농도의 苦蔘 煎湯液이 포함된 배양액에서 배양 심근세포를 3시간 동안 전처리한 다음 이를 다시 adriamycin이 포함된 배양액에 노출시킨 후 분당 심근세포의 박동을 비교 조사 하였다.

8) 세포의 형태적 관찰

세포의 형태적 관찰은 세포를 배양중인 배양용기를 직접 도립위상차현미경(Nikon)하에 놓고 검경하였으며 필요시 부착된 사진기로 촬영하였다.

9) 통계 처리

실험 결과에 대한 유의성의 검정은 Anova 후에 Tukey-Kramer multiple comparison test에 의하였으며 p값이 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

Ⅲ. 실험성적

1. 세포생존을 분석

1) MTT 정량

가. Adriamycin의 농도별 영향

Adriamycin이 배양 심근세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 adriamycin이 1 µg/ml에서 12 µg/ml 까지의 각각의 농도로 포함된 배양액에서 72시간 동안 배양한 후 adriamycin의 독성효과를 MTT assay법에 의하여 조사한 결과 1 µg/ml adriamycin 처리에서는 세포의 생존율이 대조군(100%)에 비하여 85.1%로 나타났다. 그러나 3 µg/ml의 처리에서는 73.8%로 다소 낮게 나타났다. 또한 6 µg/ml와 12 µg/ml adriamycin을 처리한 경우 생존율은 각각 51.2%(p<0.05)와 38.1%(p<0.01)로 대조군에 비하여 모두 유의하게 낮게 나타났다 (Table 1).

Table. 1.

Absorbance (% of control) at 540nm wavelength for the MTT assay in cultured mouse myocardial cells

ADR(µg/ml)	MTT absorbance(540nm)	Decrease of cell viability(%)
0	1.68±0.14	-
1	1.43±0.15	14.9
3	1.24±0.15	26.2
6	0.86±0.03 *	48.8
12	0.64±0.06 **	61.9

Cultured mouse myocardial cells were treated with various concentrations of adriamycin(ADR) for 72 hours. The values are the mean±SE for 5 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. *p<0.05; **p<0.01

나. Adriamycin의 시간별 영향

Adriamycin의 처리 시간에 따라 배양 심근세포에 미치는 영향을 조사하기 위하여 6 µg/ml adriamycin이 포함된 배양액에서 심근세포를 각각 24시간에서 96시간 동안 배양한

후 세포의 생존율을 MTT assay법에 의하여 대조군과 비교 조사한 결과 24시간 배양에서는 대조군(100%)에 비하여 69.4%의 세포생존율을 보였다. 또한 48시간 배양에 있어서는 61.9%로 대조군에 비하여 다소 낮은 생존율을 나타냈으며 72시간 배양에서는 대조군에 비하여 49.2%($P<0.05$)의 생존율을, 96시간 배양에 있어서는 21.2%($p<0.01$)의 생존율을 각각 나타냈다(Table 2).

Table 2.

Time-response relationship of adriamycin(ADR) by MTT assay in cultured mouse myocardial cells

ADR($\mu\text{g/ml}$)	MTT absorbance(540nm)			
	24hr	48hr	72hr	96hr
0	1.21 \pm 0.13	1.28 \pm 0.17	1.26 \pm 0.11	1.32 \pm 0.16
6	0.84 \pm 0.07	0.79 \pm 0.09	0.62 \pm 0.06 *	0.28 \pm 0.03 **

Cultured mouse myocardial cells were treated with 6 $\mu\text{R/ml}$ ADR for various time intervals. The values are the mean \pm SE for 5 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. * $p<0.05$; ** $p<0.01$

2) LDH 활성 측정

ㄱ. Adriamycin의 영향

Adriamycin의 농도에 따른 LDH 활성도를 측정하기 위하여 adriamycin이 1-20 $\mu\text{g/ml}$ 까지의 농도로 각각 포함된 배양액에서 배양 심근세포를 72시간 동안 처리한 후 세포배양액내로 유출된 LDH양을 대조군과 비교 조사하였다. 그 결과 1 $\mu\text{g/ml}$ adriamycin 처리에서는 대조군100%(10.5 \pm 1.5)에 비하여 117.1%(12.3 \pm 1.4)로 나타났다. 또한 5 $\mu\text{g/ml}$ adriamycin을 처리한 경우 126.7%(13.3 \pm 1.6)($p<0.05$)로 나타났으며 10 $\mu\text{g/ml}$ 와 20 $\mu\text{g/ml}$ adriamycin 처리에서는 각각 대조군에 비하여 148.6%(15.6 \pm 1.5)($p<0.01$)와 175.2%(18.4 \pm 1.7)($p<0.01$)로 나타났다. LDH활성도의 MCV값은 10 $\mu\text{g/ml}$ adriamycin의 처리에서 나타났다(Table 3).

Table 3.

Dose-responce relationship of adriamycin(ADR) on lactate dehydrogenase(LDH) in cultured mouse myocardial cells

ADR ($\mu\text{g/ml}$)	control	1	5	10	30
Amount of LDH Release	10.5 \pm 1.5	12.3 \pm 1.4	13.3 \pm 1.6 *	15.6 \pm 1.5 **	18.4 \pm 1.7 **

Cultured mouse myocardial cells were treated with various concentrations of adriamycin(ADR) for 72 hours. LDH activity was measured at wavelength of 570nm. The values are the mean \pm SE for 5 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. * $p<0.05$; ** $p<0.01$

ㄴ. Sophorae Radix(SR)의 효과

배양 심근세포에 대한 adriamycin의 세포 독성에 있어서 SR의 효과를 LDH활성측면에서 조사하기 위하여 adriamycin의 MCV 값(midcytotoxicity value)인 10 $\mu\text{g/ml}$ adriamycin 농도에서 72시간 동안 노출시키기 3시간 전에 15-60 $\mu\text{g/ml}$ SR이 각각 포함된 배양액에서 전처리한 후 이의 방어효과를 조사하였다. 그 결과 10 $\mu\text{g/ml}$ adriamycin만을 처리한 경우 대조군 100%(14.6 \pm 1.6)에 비하여 156.2%(22.8 \pm 2.8)로 나타났다. 그러나 15 $\mu\text{g/ml}$ SR의 처리에서는 대조군 100%(13.1 \pm 1.5)에 비하여 132.8%(17.4 \pm 1.6)($p<0.05$)로 나타났으며 30 $\mu\text{g/ml}$ SR처리에서는 대조군 100%(14.9 \pm 1.7)에 비하여 110.7%(16.5 \pm 1.5)($p<0.01$)로 나타났다. 또한 60 $\mu\text{g/ml}$ SR처리에 있어서는 대조군 100%(14.1 \pm 1.5)에 비하여 104.3%(14.7 \pm 1.7)($p<0.01$)로 나타났다(Table 4, Fig. 1).

Table 4.

Dose-reponse relationship of Sophorae Radix for its cardioprotective effect on adriamycin(ADR) in LDH release

ADR ($\mu\text{g/ml}$)	Amount of LDH Release			
	concentration of <i>Sophorae Radix</i>			
	0 $\mu\text{g/ml}$	15 $\mu\text{g/ml}$	30 $\mu\text{g/ml}$	60 $\mu\text{g/ml}$
0	14.6 \pm 1.6	13.1 \pm 1.5	14.9 \pm 1.7	14.1 \pm 1.5
10	22.8 \pm 2.8	17.4 \pm 1.6 *	16.5 \pm 1.5 **	14.7 \pm 1.7 **

Cultured mouse myocardial cells were treated with 15, 30 and 60 $\mu\text{g/ml}$ Sophorae Radix respectively were preincubated with Sophorae Radix for 3 hours, after then cultures were exposed to 10 $\mu\text{g/ml}$ ADR for 72 hours. LDH activity was measured at wavelength of 570nm. The values are the mean \pm SE for 5 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. * $p<0.05$; ** $p<0.01$

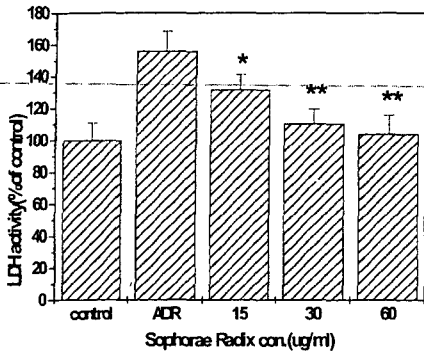


Fig 1.

Dose-dependency of Sophorae Radix in LDH activity. Cardioprotective effect of Sophorae Radix on adriamycin(ADR)-induced cardiotoxicity was measured in cultured mouse myocardial cells. Cultures were preincubated with 15, 30 and 60 µg/ml Sophorae Radix, respectively before exposure of 10 µg/ml ADR for 72 hours. LDH activity was determined as % of control. The results indicate the mean ± SE (n=5).

*p<0.05; **p<0.01

3) Beating Rate(BR)의 측정

ㄱ. Adriamycin(ADR)의 영향

Adriamycin(ADR)의 농도에 따른 심근박동의 측정을 위한 조사를 위하여 adriamycin이 2-16 µg/ml까지의 농도로 각각 포함된 배양액에서 심근세포를 72시간 동안 처리한 후 세포의 BR을 대조군과 비교 조사하였다. 그 결과 2 µg/ml ADR 처리에서는 세포의 BR은 대조군(100%)에 비하여 86.8%로 나타났으며, 4 µg/ml 처리에서는 63.2%로 나타났다. 또한 8 µg/ml의 경우는 52.9%(p<0.05)의 BR을 보여 MCV값(midcytotoxicity value)을 나타냈으며, 16 µg/ml ADR의 처리에서는 30.9%(p<0.01)의 BR을 나타냈다(Table 5).

Table 5.

Dose-response relationship of adriamycin(ADR) on beating rate in cultured mouse myocardial cells

ADR(µg/ml)	Beating rate (number/min)	Decrease of Beating rat (% of control)
0	136±13.8	-
2	118±11.2	13.2
4	86±6.8	36.8
8	72±7.4 *	47.1
16	42±5.1 **	69.1

Cultured mouse myocardial cells were treated with various concentrations of adriamycin(ADR) for 72 hours. Beating rate was measured by count of beating number per minute, compared with control. The values are the mean ± SE for 5 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks.

*p<0.05; **p<0.01

ㄴ. Sophorae Radix(SR)의 효과

배양 심근세포에 대한 adriamycin(ADR)의 심근독성에 있어서 SR의 효과를 Beating Rate(BR)의 양적변화측면에서 조사하기 위하여 ADR의 MCV값(midcytotoxicity value)인 8 µg/ml ADR농도에서 72시간 동안 노출시키기 3시간 전에 10-40 µg/ml SR이 각각 포함된 배양액에서 전처리한 후 이의 방어효과를 조사하였다. 그 결과 8 µg/ml ADR만을 처리한 경우 세포의 BR은 대조군(100%)에 비하여 43.5%로 나타났다. 그러나 10 µg/ml SR의 처리에서는 대조군에 비하여 62.5%로 나타났다. 또한 20 µg/ml와 40 µg/ml SR처리에서는 각각 87.1%(p<0.05)와 98.5%(p<0.01)로 나타났다(Table 6, Fig. 2).

Table 6.

Dose-reponse relationship of Sophorae Radix for its cardioprotective effect on adriamycin(ADR) in beating rate

ADR(µg/ml)	Beating rate(Number/Min)			
	Concentration of Sophorae Radix			
	0 µg/ml	10 µg/ml	20 µg/ml	40 µg/ml
0	124±11.5	128±9.6	116±13.2	131±12.4
8	56±6.1	80±5.2	101±8.4 *	129±10.8 **

Cultured mouse myocardial cells were treated with 10, 20 and 40 µg/ml Sophorae Radix for 72 hours. Cultured were preincubated with Sophorae Radix for 3 hours, after then cultures were exposed to 8 µg/ml ADR for 72 hours. Beating rate was measured by count of beating number per minute. The values are the mean ± SE for 5 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisks. *p<0.05; **p<0.01

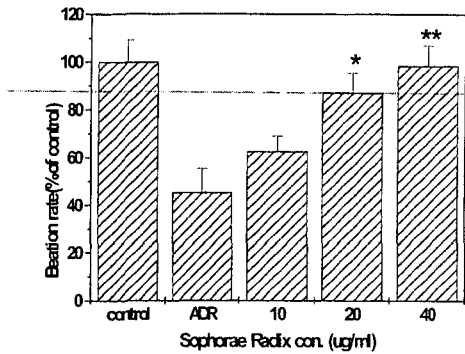


Fig 2.

Dose-dependency of Sophorae Radix in beating rate. Cardioprotective effect of Sophorae Radix on adriamycin(ADR)-induced cardiotoxicity was measured by count of beating number per minute in cultured mouse myocardial cells. Cultures were preincubated with 10, 20 and 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Sophorae Radix, respectively before exposure of 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ADR for 72 hours. Beating rate was determined as % of control. The results indicate the mean \pm SE(n=5). *p<0.05; **p<0.01

2. 세포의 형태적 관찰

1) 대조군

Adriamycin이 들어 있지 않은 배양액에서 심근세포를 72시간 동안 배양한 결과 숫적으로 많은 다각형 모양의 세포들이 배양용기에 부착하고 있었으며 서로 돌기를 내어 긴밀하게 열락하고 있었다(Fig. 3A).

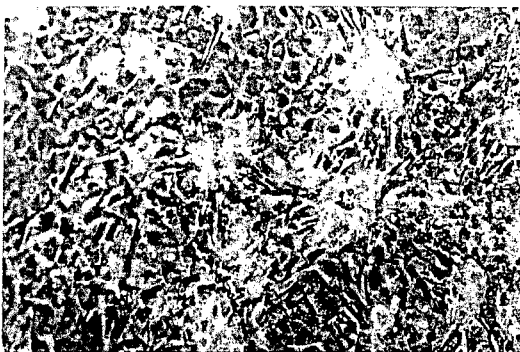


Fig. 3A.

A inverted photomicroscopy of mouse myocardial cells cultured for 72 hours in control medium. x100

2) Adriamycin 처리군

Adriamycin을 처리한 실험군에서는 일부 손상을 입은 세포들이 배양용기로 부터 부착

성을 잃고 배양액 위로 떠올라 부유하고 있었으며 세포의 모양도 다각형에서 원형으로 변하였다. 그 결과 세포의 밀도가 감소하였다. 또한 세포간 돌기도 소실되어 세포끼리의 연결이 감소되었다(Fig. 3B).

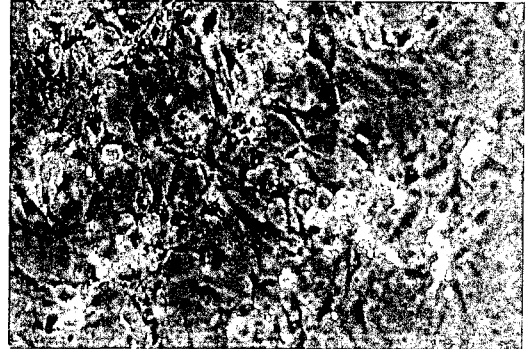


Fig. 3B.

A inverted photomicroscopy of mouse myocardial cells cultured for 72 hours in medium containing adriamycin at the concentration of 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$. x100

3) Sophorae Radix(SR) 처리군

SR을 3시간 동안 전처리한 실험군에서는 adriamycin만을 처리한 실험군에 비하여 세포의 수나 돌기가 대조군과 비슷한 양상을 나타냈다(Fig. 3C).

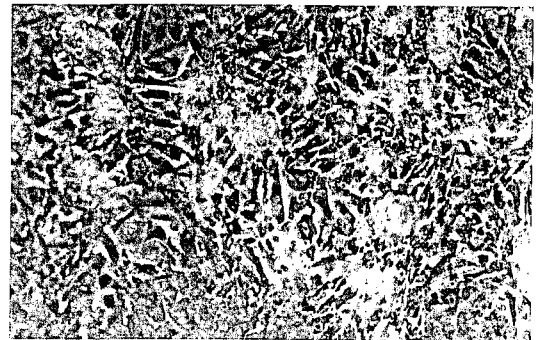


Fig. 3C.

A inverted photomicroscopy of mouse myocardial cells preincubated for 3 hours in the medium containing Sophorae Radix(SR) at the concentration of 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ before exposure of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ adriamycin for 72 hours. x100

IV. 고 찰

苦蔘(Sophorae Radix)은 豆科에 屬한 도독
 념의 지팡이(Sophora flavescens Ait.)의 根으
 로서 최초로 《神農本草經》¹¹⁾에 “主心腹結氣,
 癥瘕, 積聚…”라고 記載되어 心血管 疾病 治
 療의 根據가 되고 있으며, 味苦, 性寒하고 歸
 經은 心, 肝, 胃, 大腸, 膀胱 등이라고 하였으
 며, 滯熱燥濕, 利尿, 健腸胃, 祛風殺蟲의 效能
 이 있고, 濕熱下利, 黃疸, 赤白帶下, 陰部癢瘡,
 疥癩頑癬 等に 使用하며²⁻¹⁰⁾, 특히 그 苦味로
 心經의 火를 다스린다고 하였다²⁵⁾. 藥理實驗
 上으로 強心, 健胃, 子宮收縮, 抗潰瘍抑菌, 殺
 蟲 등의 作用이 있고^{9,15-16,25)}, 특히 循環器系에
 미치는 影響으로는 強心, 不整脈과 頻脈을 抑
 制하는 效果^{11,14)}가 있다고 하였으며, 動物實驗
 上 冠狀動脈을 擴張하여 冠狀動脈血流를 增
 가시킬 수 있다고 하였다¹⁴⁾.

成分은 matrine, oxymatrine이 주요 alkalo
 id이며 그 외에 sophocarpine, soph-oranol, all
 omatrine, cytosine, methylcystine 등이 包含
 되어 있다^{9,15-16,25)}. 또한 最近의 研究에 의하면
 實驗動物에서 BaCl₂나 aconitine, ouabaine 등
 에 의해서 誘發된 不整脈에 대하여 抗不整脈作
 用이 있으며, 일부의 研究에서는 sophocarpine
 이 主作用을 나타낸다고 보고하였다¹¹⁾.

심근세포에 毒性을 誘發하는 물질은 중금속
 을 비롯하여²⁶⁾, adriamycin 및 dichloromethane
 등과 化學藥劑가 있다^{19,27)}. 따라서 본 실험은
 adriamycin의 심근독성효과와 이에 대한 苦
 蔘 煎湯液의 영향을 조사하기 위하여 생쥐에
 서 순수 분리하여 배양한 심근세포를 배양한
 다음 여러 농도의 adriamycin이 포함된 배양
 액에 세포를 72시간 동안 노출시킨 후
 adriamycin이 심근세포에 미치는 영향을
 MTT assay에 의하여 조사하였다. 그 결과
 adriamycin은 배양 심근세포에 처리한 농도
 에 비례하여 세포의 생존율을 유의하게 감소
 시켰다. 이같은 결과는 adriamycin이 심근독
 성을 가지고 있음을 말해주고 있으며 이는
 또한 Olson등²⁰⁾이 adriamycin 으로 처리한 토
 끼에서 심부전증을 보고한 결과나 Takahashi등

²⁷⁾이 배양한 심근세포에 대한 adriamycin의
 세포독성을 보고한 결과와 일치하였다.
 Adriamycin의 심근독성에 대하여서는 DNA
 나 RNA의 합성저해를 비롯하여²⁸⁾, 단백질 합
 성의 저해²⁹⁾ 및 사립체와 같은 세포소기관의
 기능소실¹⁸⁾ 등을 초래함으로써 유발된다고 한
 다. 본 실험에서는 adriamycin이 생쥐의 배양
 심근세포에 독성을 나타낸 것은 adriamycin
 이 DNA나 RNA 및 단백질 합성계에 영향을
 미치는 것을 배제할 수는 없지만, 아마도 사
 립체(mitochondria)와 같은 세포소기관의 기
 능에 손상을 주어 석신산과 같은 효소들의
 활성을 저해하였을 가능성이 클 것으로 생각
 된다. 이러한 이유로는 MTT assay의 정량에
 의하면 adriamycin의 농도에 비례하여 세포
 의 생존율이 현저히 감소되었기 때문이다. 한
 편, Myers 등²³⁾은 adriamycin과 같은 약제외
 에 심근허혈과 같은 병변에 있어서 산화적
 손상이 심근세포의 퇴화를 유발한다고 보고
 한 바 있다. 이러한 가설을 증명할 수 있는
 것으로는 심근허혈시 항산화제를 처리함으로
 서 산화적 손상으로 부터 심근세포의 퇴화가
 방어되었다는 것이 제시된 바 있다.

Adriamycin의 독성에 대한 LDH활성의 측
 정에 있어서 adriamycin의 처리 농도에 비례
 하여 LDH의 양적 증가를 보였다. 이같은 현
 상은 adriamycin의 독성에 의하여 세포가 손상
 받은 것을 증명하고 있으며, 이는 Takahashi등²⁷⁾
 이 심근세포에서 adriamycin이 세포질막의
 용해를 촉진시킴으로서 단백질합성의 감소를
 비롯하여 ATP량의 감소를 초래한다고 한 보
 고가 이를 뒷받침하고 있다고 하였다. 한편
 adriamycin의 심근독성효과에 대한 한약추출
 물의 영향을 조사하기 위하여 LDH50인 10
 $\mu\text{g/ml}$ adriamycin의 농도에서 심근세포를 72
 시간 동안 처리하기 전 15-60 $\mu\text{g/ml}$ 까지의
 苦蔘 煎湯液이 각각 포함된 배양액에서 3시
 간 동안 전처리한 다음 LDH의 활성을 조사
 한 결과 苦蔘 煎湯液을 심근세포에 처리
 한 농도에 비례하여 유의하게 감소되는
 LDH의 양적 변화를 보였다. 특히, 30 $\mu\text{g}/$
 ml 와 60 $\mu\text{g/ml}$ 의 苦蔘 煎湯液 처리에서는

adriamycin만의 처리(156.2%)에 비하여 각각 110.7%($p < 0.01$)와 104.3%($p < 0.01$)로 나타나 매우 유의하게 감소되었음을 알 수 있었다. 이러한 결과는 adriamycin의 심근독성으로 부터 苦蔘 煎湯液이 세포의 손상을 방어하는데 매우 효과적 이었음을 제시하고 있다 하겠다. 본 실험의 심근박동에 대한 조사에 있어서 adriamycin이 2-16 $\mu\text{g/ml}$ 까지의 농도로 각각 포함된 배양액에서 72시간 동안 배양한 결과 adriamycin을 세포에 처리한 농도에 비례하여 박동수가 유의하게 감소되었다. 이러한 이유의 하나로는 본 실험에서 에너지와 밀접한 관계가 있는 사립체에 손상을 준 결과라고 제시할 수 있다. 심근의 박동은 심근의 손상정도를 측정할 수 있는 척도라고 하였다²⁷⁾. 심근박동의 측면에서 adriamycin의 독성에 대한 苦蔘 煎湯液의 영향을 조사하기 위하여 배양 심근세포를 MTT50인 8 $\mu\text{g/ml}$ 의 adriamycin 농도에서 처리하기 전 10-40 $\mu\text{g/ml}$ 까지의 苦蔘 煎湯液이 각각 포함된 배양액에서 심근세포를 3시간 동안 전처리한 후 심근박동에 미치는 苦蔘 煎湯液의 영향을 조사한 결과 苦蔘 煎湯液을 심근세포에 처리한 농도에 비례하여 심근박동을 증가시켰다. 특히 20 $\mu\text{g/ml}$ 와 40 $\mu\text{g/ml}$ 의 苦蔘 煎湯液 농도에서는 adriamycin만을 처리한 경우의 박동수(43.5%)에 비하여 각각 87.1%($p < 0.05$)와 98.5%($p < 0.01$)로 나타남으로서 현저한 박동수의 증가를 나타냈다. 이같은 결과는 이마도 苦蔘 煎湯液이 adriamycin으로 손상된 심근세포를 방어하는데 매우 효과적 이었음을 말해주고 있다고 하겠다. Adriamycin에 대한 본 실험의 형태학적 관찰조건에 있어서 adriamycin을 처리한 실험군에 있어서는 대조군에 비하여 세포의 수적감소를 보였으며 또한 세포간 돌기의 감소를 나타냈다. 이같은 현상은 adriamycin의 독성에 의하여 세포가 손상됨에 따라 세포들이 배양용기로 부터 떨어져 나간 결과라고 하겠다. 그러나 苦蔘 煎湯液을 3시간 동안 전처리한 경우 adriamycin만을 처리한 실험군에 비하여 세포의 수의 감소나 돌기의 소실이 현저히 감소됨으로서 苦蔘 煎

湯液이 adriamycin의 독성으로 부터 심근세포를 방어하는데 매우 효과적이었음을 말해주고 있다.

V. 결 론

심근손상에 대한 기전과 심근손상에 대한 苦蔘 煎湯液의 영향을 조사하기 위하여 생쥐에서 순수분리하여 배양한 심근세포를 배양한 후 심근독성을 유발하는 adriamycin이 여러 농도로 포함된 배양액에서 세포를 배양한 다음 adriamycin의 독성효과를 조사하고 동시에 adriamycin의 심근독성에 대한 苦蔘 煎湯液의 방어효과를 MMT assay를 비롯하여 LDH활성, 심근박동 및 광학현미경적 관찰을 시행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. Adriamycin는 농도에 비례하여 심근세포의 생존율을 비롯하여 LDH의 양적 증가, 심근박동의 감소 및 세포의 수적감소를 나타냈다.

2. 苦蔘 煎湯液은 adriamycin에 의한 LDH의 양적증가를 유의하게 감소시켰다.

3. 苦蔘 煎湯液은 adriamycin에 의한 심근박동의 감소를 유의하게 회복시켰다.

4. 苦蔘 煎湯液은 adriamycin에 의한 심근세포의 감소를 수적으로 증가를 시켰다.

이상의 결과로 부터 adriamycin은 생쥐의 배양 심근세포에 독성효과를 나타냈으며 苦蔘과 같은 선택적인 한약추출물이 adriamycin의 심근독성을 방어하는데 효과적인 것으로 나타났다.

참고문헌

1. 吳 普 : 神農本草經, 서울, 醫聖堂, p. 7, 1994.
2. 黃官綉 : 本草求真, 서울, 醫聖堂, p. 145, 1997.
3. 王好古 : 湯液本草, 서울, 醫聖堂, pp. 111-112, 1994.
4. 唐愼微 : 重修政和經史證類備急本草, 北京, 人民衛生出版社, p. 198, 1982.
5. 上海中醫學院 : 中草藥學, 香港, 常務印書館香港分館, pp. 205-206, 1983.
6. 汪 昂 : 本草備要解析, 新竹, 國興出版社,

- pp. 186-187, 1985.
7. 李時珍 : 本草綱目, 北京, 人民衛生出版社, pp. 798-802, 1995.
 8. 吳儀洛 : 本草從新, 서울, 행림출판, p. 20, 1989.
 9. 문관삼 : 약초의 성분과 이용, 서울, 일월서각, pp. 342-344, 1991.
 10. 陳嘉謨 : 本草蒙筌, 北京, 人民衛生出版社, p. 162, 1988.
 11. 李承武 外 : 急性附子草烏中毒에서 甘豆湯과 苦參의 應用, 大韓韓醫學會誌, 14(2) : 399-405, 1993.
 12. 董黎明 : 實用中醫內科學, 上海, 上海科學技術出版社, pp. 62-65, 82-83, 330, 451-458, 1986.
 13. 侯阿兩 外 : 苦參藥用綜論, 中醫藥學報, 3(48), 1994.
 14. 邱建榮 外 : 苦參在心血管疾病中的應用, 浙江中醫雜誌, p. 473, 1995.
 15. 張寶鳳 外 : 苦參總鹽抗實驗性心律失常作用的研究, 中藥通報, 10(5) : 37-38, 1985.
 16. 李 丹 外 : 苦參鹽類生物鹽的研究進展及臨床應用, 中草藥, 27(5) : 308-310, 1996.
 17. Barranco SC, Germmer EW, Humphery RM : Survival and cell kinetics effect of adriamycin on mammalian cells. *Cancer Res.*, 33: 11-16, 1973.
 18. Muhammed H, Ramakrishna kurup CK : Influence of ubiquinone on the inhibitory effect of adriamycin on mitochondria oxidative phosphorylation. *Biochem. J.*, 217:493-498, 1984.
 19. Hoffman P, Muller SP, Heinroth K, Buchner E, Richards A, Toraason M : Cardiotoxicity of dichloromethane in rats and in cultured rat cardiac myocyte. *Toxic. in Vitro*, 9 : 489-492, 1995.
 20. Olson FC, Massaro EJ : Effects of methylmercury on murine fetal amino acid uptake, protein synthesis and palate closure. *Teratology*, 16:187-194, 1977.
 21. Cefrak EA, Pitha J, Rosenheim S, Gottlieb JA : A clinicopathologic correlation. *Cancer(phila.)*, 32:302-314, 1973.
 22. Denine EP, Schmidt LH : Adriamycin-induced myopathies in the rhesus monkey with emphasis on cardiomyopathy. *Toxicol Appl. Pharmacol.*, 33:162-167, 1975.
 23. Myers ML, Bolli R, Lekich RF, Hartley CJ, Roberts R : Enhancement of recovery of myocardial function by oxygen free radical scavengers after reversible regional ischemia. *Circulation*, 72: 915-921, 1985.
 24. Chung YT, Choi MK, Kim JJ, Kim JM, Park ST : A study on the cytotoxicity of adriamycin on cultured rat myocardial and endothelial cells. *J. Chonnam Med. Sci.*, 1: 221-229, 1988.
 25. 陸昌洙 外 : 韓藥學Ⅱ, 서울, 光明醫學社, pp. 114-118, 1992.
 26. Chen WJ, Body RL, Motilet NK : Some effects of continuous low dose congenital exposure to methylmercury on organ in the rat fetus. *Teratology*, 20:31-36, 1979.
 27. Takahashi K, Fujita T, Mayum T, Hama T, Kish T : Effect of adriamycin on cultured mouse embryo myocardial cells. *Chem. Pharm.*, 35(1) : 326-334, 1987.
 28. Furlong NB, Suto J, Brown T, Chavez H, Huriberi RB : Induction of limited DNA damage by the antitumor agent Canis acridine. *Cancer Res.*, 38:1329-1335, 1978.
 29. Momparler JW, Sim SK, Majumdar KC, Chang RY : Effect of adriamycin on DNA, RNA and protein synthesis in cell-free system and intact cell. *Cancer Res.* 36:2891-2895, 1976.