대한한의학회지 제23권 제2호(2002년 6월)
J Korean Oriental Med 2002;23(2):164-179

원 저

牛黃淸心元이 당뇨병 Rat의 혈액순환장애에 미치는 영향

황성록, 정승현, 신길조, 이원철
동국대학교 한의과대학 내과학교실

The Effect of *Woohwangcheongsim-won* on Circulatory Disturbance in Diabetes

Seong-Rok Hwang, Sung-Hyun Jeong, Gil-Cho Shin, Won-Chul Lee
Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dongguk University

Object : Death rate due to hypertension, atherosclerosis, ischemic heart disease and cerebral infarction induced by Westernized diet and increased average life span is on the rise. Decrease in blood circulation, activation of thrombus generation and intravascular lipid accumulation, cited as the principal causes of the above mentioned diseases in recent studies, result in circulatory disturbance and blood vessel obstruction leading to ischemic cell death of heart, brain and peripheral vessels.

Method : We investigated the biochemical changes in microvascular permeability, aggregation of platelet and the intravascular lipid accumulation in induced-diabetic rat using Streptozotocin. We also studied the effects of Woohwangcheongsim-won after oral administration on blood circulation, platelet function and lipid metabolism.

The results are as follows :

1. *Woohwangcheongsim-won* increased blood circulation in microvessels.
2. *Woohwangcheongsim-won* increased the reduced erythrocyte deformability in diabetes.
3. *Woohwangcheongsim-won* induced the reduction of contents of 2,3-DPG, but failed to affect the reduced contents of ATP in erythrocyte in diabetes.
4. *Woohwangcheongsim-won* reduced the activity of Ca^{2+}-ATPase in the membrane of erythrocyte.
5. *Woohwangcheongsim-won* reduced the platelet aggregation evoked by platelet agglutinin factor.
6. *Woohwangcheongsim-won* reduced the production of platelet-derived granules.
7. *Woohwangcheongsim-won* reduced the production of metabolites of arachidonic acid in diabetes, and also reduced the production of increased thromboxane B2.
8. *Woohwangcheongsim-won* reduced the synthesis of oxidized LDL-cholesterol.

In conclusion, *Woohwangcheongsim-won* enhanced blood circulation in microvesseles, erythrocyte deformability and inhibited the increased platelet aggregation and the synthesis of oxidized LDL-cholesterol in diabetes. Therefore *Woohwangcheongsim-won* is believed to positively affect blood circulation *(J Korean Oriental Med 2002;23(2):164-179)*

Key Words: diabetes, *Woohwangcheongsim-won*, 2,3-DPG, Ca^{2+}-ATPase, TB2,. LDL-cholesterol.

서 론

최근 식생활이 서구화되고 평균 수명이 연장됨에

· 접수 : 2002년 2월 19일 · 채택 : 2002년 4월 30일
· 교신저자 : 김경훈, 경기도 성남시 분당구 수내동 87-2번지
동국대학교 분당 한방병원 의국
(Tel. 031-710-3734(3754), Fax : 031-710-3780, E-mail: farmer0@hanmail.net)

따라 고혈압, 동맥경화, 허혈성 심질환, 뇌경색 등 혈관계 질환의 증가로 인한 사망률이 점차 높아지고 있다[1].

이들 질환의 중요한 발생기전으로 혈류속도의 감소, 혈전생성요인의 활성화 및 혈관내 지질침착 등이 알려져 있는데[2], 이로 인해 혈액의 점조도가 높아지고 혈전이 과도하게 생성되어 혈류장애 및 혈관 폐색 등이 초래되고 결국에는 심장, 뇌조직 및 말초혈관 등에 허혈성 세포손상이 발생된다[3].

특히 당뇨병이 있는 경우에는 비만, 고혈압, 고지혈증 등이 쉽게 유발되며, 뇌혈관, 관상동맥 및 말초혈관질환의 발병율이 정상인에 비해 2~5배 높아진다. 이는 당뇨로 인한 고혈당, 고인슐린혈증, 비만 등이 혈전생성요인을 더욱 활성화시키거나 혈액 응고 작용을 증가시키기 때문이다[4].

따라서 이들 혈관계 질환의 예방과 치료에는 적혈구 변형능을 개선시켜 충분한 혈류속도를 확보하고, 혈액응고항진에 따른 혈전생성 증가를 감소시키며, 혈액내 지질대사 이상을 교정하여 혈액내 점조도를 낮추는 것이 중요하다고 할 수 있다[5].

牛黃淸心元은 中風 中臟腑의 陽閉證에 사용되는 대표적인 處方으로, 淸熱瀉火解毒, 開竅化痰 등의 效能이 있어, "卒中風, 人事不省, 痰涎壅塞, 精神憒憒, 語言蹇澁, 口眼喎斜, 手足不隨" 등을 치료한다[6]. 최근에는 급성기 중풍 의식장애에 주로 응용되고 있으며[7], 이외에도 허혈성 심질환[8], 고열, 경련[9] 등에 널리 사용되고 있다. 최근 실험적 연구에서 허혈성 뇌손상 보호작용[10], 혈관확장작용, 혈압강하작용 및 심장수축력 억제작용[8,11] 그리고 기타 이뇨작용, 진통, 항경련작용에 대한 연구[12] 등이 보고되었으나, 牛黃淸心元이 당뇨병 상태의 혈액순환장애에 미치는 영향에 관한 연구는 없었다.

이에 저자는 牛黃淸心元이 당뇨병 상태의 혈액순환장애에 미치는 영향을 알아보고자 당뇨병이 유발된 rat에 牛黃淸心元을 투여한 후 혈류속도의 변화와 밀접한 관련이 있는 적혈구 변형능, 혈전형성과 관련이 있는 혈소판 응집능, 혈중내 지질침착과 관련이 있는 LDL-cholesterol의 산화 및 대식세포와의 관계에 대하여 살펴보고 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실 험

1. 材料

1) 藥物

方藥合編[9]에 수록된 牛黃淸心元(Table Ⅰ)을 사용하였다. 단 이 실험에서는 국제보호동물로 지정되어 사용이 금지된 犀角과 비소(AsS)와 수은의 독성 때문에 각각 石雄黃과 朱砂는 뺀 채로 사용하였다. 경구투여시에는 牛黃淸心元을 증류수에 현탁시켜 용량을 조절하여 사용하였다. 비경구적 투여시에는 牛黃淸心元을 증류수에 현탁시키고 초음파 발생기에서 3시간 동안 처리한 후 milipore filter를 사용하여 여과하고 동결건조시켜 사용하였다.

2) 動物

(1) 選擇 및 飼育條件

체중 200~250g의 Sprague-Dawley系 rat(대한실험동물센터, 서울)로 14일 이상 실험 사육장 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 사육장내의 조명은 인공조명설비로 오전 7시부터 오후 7시까지 12시간 동안으로 하였다. 실내온도는 22℃ 내외, 습도는 60%로 유지하였다. 사료는 고형사료(단백질 21%, 지방 3.5%, 셀룰로오즈 5.0%, 무기질 8.0%)를 사용하였으며, 급수는 일반 수돗물을 사용하였다. 사료와 급수는 제한하지 않았다.

(2) Rat의 당뇨병 유발

Rat를 당뇨 유발전 24시간 동안 절식시킨 후 citrate buffer(pH 4.5)에 녹인 streptozotocin(Sigma chem. CO.)을 50㎎/kg용량으로 尾靜脈에 주사하였다. Streptozotocin은 냉장상태로 보관하였으며, 실온에 꺼낸 후에는 10분 이내에 사용하였다. Streptozotocin주사 2일 후 혈당을 측정하여 300㎎/*dl* 이상인 rat를 취하여 실험에 사용하였다.

(3) 실험군

실험동물을 정상대조군, 당뇨대조군, 牛黃淸心元투

Table 1. The Prescription of *Woohwangcheongsim-won*

Species	Part used	Latin name	Weight(㎎/pill)
Dioscorea japonica DECNE	Root	*Rhizoma Discoreae*(山藥)	280.0
Glycyrrhiza uralensis FISCH(baked)	Root	*Radix Glycyrrhizae*(甘草)	200.0
Panax ginseng C.A. MEY.	Root	*Radix Ginseng*(人蔘)	100.0
Typhae latifolia L(baked)	Pollen	*Typhae Pollen*(蒲黃)	100.0
Trictium sativum L(baked)	Seed	*Massa Medicata Fermentata* (神麴)	100.0
Glycine max MERR(baked)	Seed	*Glycine Semen Germinatum* (大豆黃卷)	70.0
Cinnamomum cassia PRESL	Cortex	*Cortex Cinnamomi*(肉桂)	70.0
Equus asinus L(baked)	Gelatin	*Asini Gelantium*(阿膠)	70.0
Paeonia lactiflora PALL	Root	*Radix Paeoniae*(白芍藥)	60.0
Liriope platyphylla WANG	Root	*Radix Liriopis*(麥門冬)	60.0
Scutellaria baicalensis GEORGI	Root	*Radix Scutellariae*(黃芩)	60.0
Angelica gigas NAKAI	Root	*Radix Angelicae*(當歸)	60.0
Ledebouriella divaricata HIROE	Root	*Radix Ledebouriellae*(防風)	60.0
Atractylodes macrocephala KOIDZ	Root	*Rhizoma Atractylis*(白朮)	60.0
Bupleurum falcatum L	Root	*Radix Bupleuri*(柴胡)	50.0
Platycodon grandiflorum A. DC.	Root	*Radix Platycodi*(桔梗)	50.0
Prunus armeniaca L	semen	*Semen Armeniacae Amarum*(杏仁)	50.0
Poria cocos WOLF	Mycelium	*Poria*(白茯苓)	50.0
Cnidium officinale MAKINO	Root	*Rhizoma Cnidii*(川芎)	50.0
Bos taurus domesticus GMELIN	Gallstone	*Calculus Bovis*(牛黃)	48.0
Saiga tatarica L	Cornu	*Cornu Tataricae*(羚羊角)	40.0
Moschus moschiferus L	Resin	*Moschus*(麝香)	40.0
Dryobalanops aromatica GAERTN. f	Resin	*Borneolum*(龍腦)	40.0
Ampelopsis japonica MAKINO	Root	*Radix Ampelopsis*(白蘞)	30.0
Zingiberis officinale ROSC(baked)	Root	*Rhizoma Zingiberis*(乾薑)	30.0
Zizyphus jujuba MILL	Fruit	*Jujubae Fructus*(大棗)	230.0
Gold		*Gold*(金箔)	
Total			2,070.0

여군으로 분류하였고, 각 군당 6마리로 하였다. 牛黃淸心元투여군은 300㎎, 600㎎을 필요에 따라 적절히 투여하였으며, 투여 용량은 몸무게 ㎏당 2㏄씩 생리식염수에 녹여 주 6일, 2주간 총 12일 경구투여하였다.

2. 方法

1) 全血의 유리세관 통과속도에 미치는 영향 측정

Rat를 diethylether로 마취시킨 후 개복수술을 시행하고 heparin으로 처리한 syringe를 이용하여 복대동맥으로부터 혈액을 취한 다음, 全血을 Tris-NaCl buffer pH 7.4 용액으로 5배 희석하여 사용하였다. 牛黃淸心元 을 첨가한 다음, 37℃에서 5분 동안 배양하고 직경 0.5㎜의 유리세관을 통과하는 시간을 측정하였다.

In vivo 실험의 경우 14일 동안 牛黃淸心元을 경구투여한 다음 복대동맥으로부터 혈액을 얻고 위의 방법으로 측정하였다.

2) 적혈구 변형능 및 적혈구 관련인자에 미치는 영향 측정

(1) 적혈구 분리

Rat를 diethylether 마취시킨 후 개복수술을 시행하고, heparin으로 처리한 syringe를 이용하여 복대동맥으로부터 혈액을 취한 다음, 全血을 1,500×g에서 10분동안 원심분리하여 상층액을 조심스럽게 제거하고 남은 적혈구를 Tris-NaCl buffer pH 7.4 용액으로 2~3회 세척하고 부유시켜 사용하였다.

(2) 적혈구 변형능에 미치는 영향 측정

분리한 적혈구를 Tris-NaCl buffer pH 7.4 용액(0.25% albumin 함유)에 부유시켜 20% 적혈구 용액을

만들어 사용하였다. 희석된 적혈구 용액에 牛黃淸心元을 가하고 37℃에서 5분 동안 배양한 다음 직경 4㎛의 pore를 가진 membrane을 통과하는 시간을 측정하였다. 측정된 시간을 기준으로 적혈구 변형능을 계산하였다. 기계장치는 hydrostatic mechanism에 따라 일정한 압력(10㎝ H_2O)이 주어지도록 고안하였다.

(3) 적혈구 2,3-DPG 함량변화에 미치는 영향 측정

Rat를 diethylether 마취시킨 후 개복수술을 시행하고 heparin으로 처리한 syringe를 이용하여 복대동맥으로부터 혈액을 취한 다음, 원심분리를 행하여 RBC pellet를 분리하였다. RBC pellet 1㎖를 8% TCA(Trichloroacetic acid)용액 3㎖에 잘 혼합한 후 초음파분쇄를 하고 5분 동안 냉각시켰다. 이 용액을 10분동안 원심분리한 후 상층액 0.25㎖를 취하여 Troethanolamine buffer에 녹인 NADH용액 2.5㎖와 섞고, ATP용액 0.1㎖를 첨가하였다. 여기에 GAPD(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)와 PGK(3-ph-osphoglyceric p-hosphokinase)용액 0.02㎖와 phosphoglycerate mutase 용액 0.02㎖를 넣고 5분 동안 방치한 후 340㎚에서 흡광도를 측정하고 다시 이 용액에 phosp-hoglycolic acid 용액 0.1㎖를 가하고 30분 동안 방치후 흡광도를 측정한 수치를 차감하여 얻어진 값을 2,3-DPG(Diphosphoglycerate)함량으로 하였다.

(4) 적혈구 ATP 함량변화에 미치는 영향 측정

Rat를 diethylether로 마취시킨 후 개복하여 복대동맥에서 채혈하였으며, 항응고제로는 sodium citrate를 사용하였다. 채혈된 혈액 1㎖을 12% TCA용액 1㎖와 잘 섞은 다음 5분 동안 얼음에 담궈 놓았다. 1분 동안 3,000rpm에서 원심분리후 상층액 0.5㎖를 cuvatte에 넣고 NADH 2.5㎖를 첨가하여 발색시킨 후 336㎚에서 흡광도를 측정하고 다시 이 용액에 0.04㎖의 GAPD/PGA(Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase/3-phosphoglyceric phosphokinase)enzyme mixture를 넣어 잘 섞어 주고 상온에서 10분 동안 방치한 후 흡광도를 측정한 수치를 차감하여 얻어진 값을 ATP 함량으로 하였다.

(5) 적혈구막에서 ATPase 활성에 미치는 영향 측정

① 적혈구막의 분리

Rat를 diethylether 마취시킨 후 개복수술을 시행하고 heparin으로 처리한 syringe를 이용하여 복대동맥으로부터 채혈하고, 채혈한 전혈을 1,500×g에서 10분동안 원심분리하여 상층액과 buffy coat를 조심스럽게 제거하고 남은 적혈구를 Tris-NaCl buffer pH 7.4 용액으로 세척하여 차가운 Tris-HCl buffer pH 7.4로 희석시킨 후 초음파로 10초 동안 세포막을 분쇄하여 용혈시킨 RBC를 1,500×g에서 10분 동안 원심분리하여 상층액을 취하고 이 상층액을 24,000rpm에서 40분 동안 2회 원심분리하여 pellet을 얻었다.

② Ca^{2+}-ATPase 활성에 미치는 영향 측정

시험관에 총 반응양이 0.7㎖가 되도록 하였다. 반응액의 조성은 다음과 같다.

; 3.1mM $MgCl_2$, 2.1mM disodium ATP, 68mM NaCl, 28mM KCl, 68.5mM Histidine(pH 7.5), 4.8㎛M $CaCl_2$, 180㎛M EGTA, 0.5mM Ouabain, 3.0nM calmodulin, Membrane Suspension 0.1㎖.

효소의 반응은 ATP를 넣는 시점을 시작으로 37℃에서 1시간 반응시켰다. 15% TCA 0.7㎖를 가하여 반응을 종결시키고, 효소에 의해 ATP로부터 방출된 Pi의 양을 측정하였다. 반응을 종결시킨 후 1,500×g에서 10분 동안 원심분리하여 상층액을 1㎖ 취했다. 상층액 1㎖에 0.25% $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 4.6% $NaCH_3CO \cdot 3H_2O$ / 2n CH_3COOH 3㎖와 5% Ammonium Molybdate 0.5㎖를 첨가하여 vortex mixer로 잘 혼합한 후 다시 2% Elon in 5% sodium sulfite 0.5㎖를 가하고 37℃에서 7분 동안 배양한 후 870㎚에서 흡광도를 측정하였다.

3) 혈소판의 기능에 미치는 영향 측정

(1) 혈소판 분리

Rat를 diethylether로 마취시킨 후 개복하여 복대동맥에서 채혈하였다. 항응고제인 sodium citrate(최종농도 3.8%) 용액을 전체의 10%가 되도록 하였으며, 용혈에 의한 혈소판 활성화를 방지하기 위하여 18-ga㎛ge needle이 부착된 syringe를 사용하였다. 채혈한 후 상온에서 160×g으로 10분 동안 원심분리를 행하

여 적혈구와 백혈구를 침강시키고 상층액을 취해 자동혈구계산기 Minos-ST를 이용하여 3×10^8cells/m의 혈소판수를 맞추어 PRP(Platelet rich plasma)를 제조하였다. 제조한 PRP를 1,500×g에서 10분동안 다시 원심분리하여 얻은 침전을 Tyrode's buffer(138.3mM NaCl, 2.68mM KCl, 1.048mM $MgCl_2 \cdot H_2O$, 4.0mM NaHCO3, 10mM HEPES) pH 6.35 용액으로 2~3회 세척한 후 Tyrode's buffer pH 7.35 용액으로 부유하여 WPS(Washed platelets suspension)를 제조하였다.

(2) 혈소판의 응집능에 미치는 영향 측정

혈소판 응집능은 Bone(1962) 등의 방법으로 platelet aggregometer를 이용하여 탁도의 변화에 따른 응집 정도를 측정하였다. WPS를 silicon coating된 cuvette에 넣고 37℃에서 1,200rpm으로 攪拌시키면서 실험하였다. 牛黃淸心元을 농도별로 투여하고 3분 동안 배양한 후 thrombin(0.1U/㎖)을 첨가하여 혈소판 응집능을 측정하였다. Aggregation inhibition정도를 %로 나타내었고 구하는 식은 다음과 같다.

Inhibition % = A - B/A

(A : Control의 aggregation % B : 藥物處置時 aggregation %)

(3) 혈소판의 과립유리에 미치는 영향 측정

혈소판중의 과립유리에 미치는 영향을 측정하기 위하여 혈소판 과립에 함유된 ATP를 parameter로 선정하였다. WPS를 silicon coating된 cuvette에 넣고 37℃에서 1,200rpm으로 攪拌시키면서 실험하였다.

CaCl2를 최종 1mM이 되게 첨가한 후 牛黃淸心元을 농도별로 투여하고 3분 동안 배양한 다음, ATP를 측정하기 위하여 Luciferase-luciferin Reagent를 첨가한 다음 thrombin(0.2U/㎖)을 가하여 혈소판을 자극하였다. 유리된 ATP는 luminescence 측정기로 측정하였다.

(4) 혈소판의 arachidonic acid 대사에 미치는 영향 측정

분리된 혈소판을 Tyrode's buffer pH 7.4 용액으로 3×108/㎖ 정도로 현탁하여 현탁액 200㎕에 牛黃淸心元을 넣고 37℃에서 3분 동안 배양시켰다. 여기에 thrombin(0.5U/㎖)을 투여하여 5분 동안 반응시킨 후, 0.6M HCl에 녹인 20%의 TCA를 가하여 반응을 중지시켰다.

Arachidonic acid 대사결과 생성되는 MDA(Malonadialdehyde)를 측정하기 위하여 TBA(Triobarbituric acid)를 가하고 20분 동안 끓는 물에서 가열한 다음 얼음물에서 냉각시켰다. 반응액을 2,000×g에서 5분 동안 원심분리하여 얻어진 상층액을 550nm에서 spectro-fluorimeter로 측정하였다.

(5) Thromboxane B2(TXB2)의 생성에 미치는 영향 측정

Rat의 WPS(3×10^8cells/㎖, 450㎕)를 thermomixer에서 37℃, 1,200rpm으로 攪拌시키면서 3분 동안 먼저 배양시켰다. 여기에 thrombin(0.5U/㎖)을 가하여 6분 동안 반응시킨 후 냉장 상태의 EGTA(2mM)와 indomethacin(50㎛M)용액 100㎕를 가하여 TXB2의 생성을 중지시킨 후 4oC에서 12,000×g으로 2분 동안 원심분리하고 상층액만을 취하여 -70℃에 보관한 후 실험에 사용하였다. 항체가 코팅된 각 well에 sample 100㎕와 TXB2 conjμgate 50㎕, TXB2 antibody solution 50㎕를 첨가하고, 상온에서 500±50 rpm으로 회전시켜 섞은 후 2시간 동안 배양하였다. Washing buffer(200㎕)로 3回 세척하고 각 well에 p-nitrophenyl phosphate 200㎕를 가하여 상온에서 1시간 배양한 후에 trisodium phosphate solution 50㎕로 반응을 종료시켰다. 발색된 반응액을 이용하여 405㎚에서 TXB2 kit로 측정하였다.

4) 산화형 LDL-cholesterol 생성 및 관련 대식세포에 미치는 영향 측정

(1) 대식세포 배양

Murine macrophage cell line인 RAW 264.7 세포 배양은 10% WCS(Fetal bovine serum), 3.7g/l sodium bicarbonate, penicillin(100U/㎖), strept-omycin(100ng/㎖)이 첨가된 DMEM(Dulbecoo's modified Eagle's medium, Gibco.)에서 membrane filter로 여과한 배지

를 사용하여 습기가 충분한 5% CO_2 배양기에서 37℃를 유지하면서 배양하였다. 매주 2~3회씩 배지를 교환해 주고 계대배양시는 배양에 사용한 배지를 제거하고, trypsin-EDTA(Ethylenediamine tetraacetic acid) 용액을 10배 가한 후, 방치하여 부착된 세포를 분리하였다. 실험시 사용할 세포는 5×10^5 cells/㎖를 24wells에 seeding하였고, 세포가 바닥에 잘 부착하도록 배양하였다.

(2) 대식세포에 의한 LDL-cholesterol의 지질 산화에 미치는 영향 측정

대식세포에 의한 LDL-cholesterol의 산화 억제를 평가하기 위하여, LDL-cholesterol의 산화 결과 생성되는 MDA를 측정하였다. 위에 기술한 방법과 동일한 방법으로 배양한 각 실험군을 24wells로부터 취하여 초음파로 처리하였다. 각 실험군 200㎕에 同量의 20% TCA와 HCl 용액 및 0.26M Tris buffer에 녹인 TBA 400㎕를 넣어 95℃에서 반응시켰다. 반응을 종결시키기 위해 -2℃에서 1분 정도 유지시킨 후, 5분 동안 원심분리하여 얻은 상층액의 흡광도를 550nm에서 측정하였다.

(3) 대식세포에 의한 LDL-cholesterol의 단백질 산화에 미치는 영향 측정

대식세포에 의한 LDL-cholesterol의 산화를 억제하는지를 평가하기 위하여, LDL-cholesterol의 산화 결과 나타나는 단백질 분해 정도를 측정하였다. 위에 기술한 방법과 동일한 방법으로 24 wells에 배양한 세포를 PBS로 2회 세척한 후, 牛黃淸心元을 배지에 가한 후, 37℃상태의 CO 배양기에서 8시간 동안 배양하였다. 여기에 200㎍/㎖ 농도의 LDL-cholesterol(Sigma Chemical Co.)을 가한 후 90시간 다시 배양하였다. 각 실험군을 24wells로부터 취하여 초음파로 용해 시킨 다음, 5분 동안 원심분리하여 얻어진 상층액의 흡광도를 550nm에서 측정하였다.

(4) 대식세포에 의한 Nitrite생성에 미치는 영향 측정

LDL-cholesterol을 90시간 투여하고 대식세포를 배양한 다음, 각 실험군의 배지 상층액을 취하였다. $NaNO_2$ solution의 연속적인 dilution을 만들어 최종농도를 적당히 조절하였다. 배양액을 취하고 $NaNO_2$희석액에 동량의 Greiss reagent solution(N-1-naphthylethylen diamine 0.1% in H_2O, sulfa-nilamide 1% in 5% H_3PO_4)을 넣고 15분 동안 상온에 방치한 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

(5) 산화형 LDL-cholesterol 처리 대식세포에 미치는 영향 측정

① 산화형 LDL-cholesterol 처리 대식세포의 생존능에 미치는 영향 측정

5×105 cells/㎖ RAW 264.7 세포를 24wells에 분주하여 4-5시간 동안 배양시켜 부착시킨 후, 100, 200㎍/㎖ 농도의 牛黃淸心元을 첨가하였다. 6-7시간 배양한 후, LDL-cholesterol을 산화시키는 CuSO4(5㎛M)에 20시간 노출시켰다. PBS(Phosphate buffered saline)로 희석한 MTT[3-(4,5-dimethyl thiazo 1-2-yl)-2,5-diphyltetrazolium bromide] 용액 50㎕를 첨가하여 4시간 배양한 다음, 상층액을 제거하고 DMSO(Dimethylsulfoxide)를 첨가하여 650㎚에서 흡광도를 측정하였다.

② 산화형 LDL-cholesterol처리 대식세포의 LDH 유리에 미치는 영향 측정

LDL-cholesterol를 첨가한 대식세포를 5㎛M CuSO4에 20시간 노출시킨 다음, 먼저 상층액을 취하여 배지로 누출된 LDH(Lactic dehydrogenase) 양을 LDH kit(LDH / LD, Sigma)로 측정하였다.

또한 세포내에 존재하는 LDH 양은 lysis buffer(50mM Tris / 5mM EDTA) 500㎕ 넣고 cell scraper로 긁은 다음, 초음파 처리에 의해 세포막을 용해시켜 측정하였다.

LDH kit의 반응원리는 다음과 같다.

Lactic acid + NAD+ -------> Pyruvic acid + NADH + H+

↑

LDH

세포로부터 유리되는 LDH의 백분율은 다음의 공식을 사용하여 결정하였다.

Release(%) = LDH activity in medium / (LDH activity in medium + LDH activity in cell lysate)

(6) 대식세포의 활성에 미치는 영향 측정

대식세포의 활성화 여부를 알아보기 위하여 Suzuki(1989) 등의 방법에 따라 활성화된 대식세포로부터 분비되는 acid phosphatase의 활성을 측정하였다.

시약 및 재료에서 0.02M p-nitrophenyl phosphate/0.1M citrate buffer(pH 5.0)는 0.1M citrate acid와 0.1M sodium citrate를 약 1:1.5(v/v)로 혼합하여 pH 5.0으로 조정한 후 p-nitrophenyl phosphate(Sigma Chemical Co., U.S.A)를 0.02M이 되도록 가하였으며, 0.2M borate buffer(pH 9.8)는 0.2M sodium borate에 0.2M NaOH를 가하여 pH 9.8로 조정하였다.

5μM $CuSO_4$에 20시간 노출시킨 다음 상층액을 취하여 실시하였다. 0.1% Triton X-100을 100μl를 가한 다음 0.02M p-nitrophenyl phosphate/0.1M citrate buffer(pH 5.0)를 0.5ml 가해 37℃, 5% CO2 incubator에서 1시간 반응시킨 후 1,500 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 얻은 상층액에 4℃상에서 0.2M borate buffer(pH 9.8) 1ml씩을 가하여 반응을 종결시킨 후 405㎚에서 흡광도를 측정하였다. 대식세포의 활성은 다음 식에 따라 계산하였다.

Acid phosphatase activity (p-nitrophenyl phosphate μM / 106macrophage / 60 mins) = 1.15 × O.D.

3. 통계처리

실험결과는 Mean±S.D.로 표시하였다. 각 군과의 유의성 검증을 위하여 Student's T-test를 실시하고, P값이 0.01 및 0.05 보다 작은 경우 유의성이 있는 것으로 인정하였다.

결 과

유의성 없는 결과는 생략하였다. 기타 결과는 다음과 같다.

1. 全血의 유리세관 통과속도에 미치는 영향

당뇨대조군에서 혈액의 유리세관 통과속도는 정상대조군에 비해 현저히 저하되어 있었다. 牛黃淸心元투여군 중 in vivo에서 당뇨대조군에서 저하되어 있던 혈류속도가 유의성있게 증가되었다(Fig. 1).

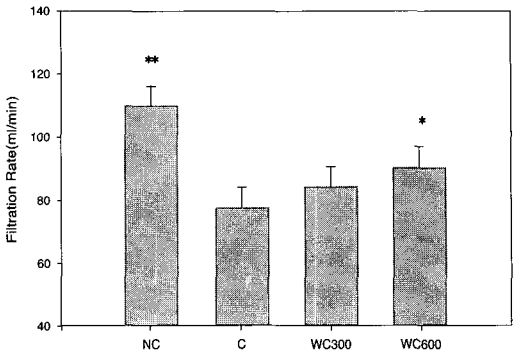

Fig. 1. Effects of *Woohwangcheongsim-won* on filtration rate of whole blood from diabetic rats in vivo.
Filtration rate was measured with 20% whole blood suspension in Tris-NaCl buffer.
NC: Normal control group(non-treated)
Control: Diabetic control group(non-treated)
WC300: 300 ㎎/㎏ of WC administered in diabetic group
WC600: 600 ㎎/㎏ of WC administered in diabetic group
*: P < 0.05 vs Control
**: P < 0.01. vs Control

2. 적혈구 변형능 및 적혈구 관련인자에 미치는 영향

1) In vivo에서 적혈구 2,3-DPG 함량변화에 미치는 영향

당뇨대조군에서 적혈구내 2,3-DPG의 함량은 정상대조군에 비해 증가되어 있었다. 牛黃淸心元투여군 모두에서는 당뇨대조군에서 증가되었던 2,3-DPG의 함량이 감소되었는데, 특히 WC600투여군에서 보다 유의성있게 감소되었다(Fig. 2).

2) 적혈구막에서 Ca^{2+}-ATPase활성에 미치는 영향

牛黃淸心元투여군 모두에서 적혈구막내 Ca^{2+}-ATPase 활성이 당뇨대조군에 비해 감소되었다. 특히 WC500투여군에서는 유의성있게 감소되었다(Fig. 3).

3. 혈소판의 효능에 미치는 영향

1) In vitro에서 혈소판 응집능에 미치는 영향

牛黃淸心元투여군 모두에서 혈소판 응집능이 당뇨대조군에 비해 감소되었다. 특히 WC500투여군에서 유의성있게 감소되었다(Fig. 4).

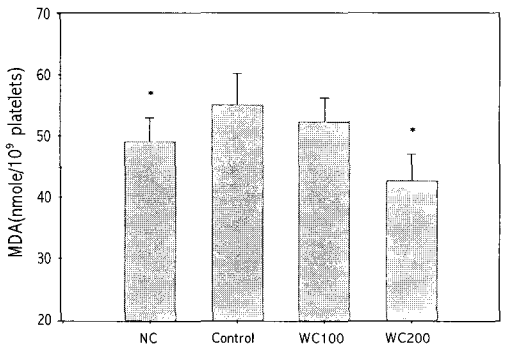

Fig. 2. Effects of *Woohwangcheongsim-won* on 2,3-DPG contents in diabetic erythrocytes in vivo.
NC: Normal control group(non-treated)
Control: Diabetic control group(non-treated)
WC300: 300 ㎎/㎏ of WC administered in diabetic group
WC600: 600 ㎎/㎏ of WC administered in diabetic group
*: P < 0.05 vs Control

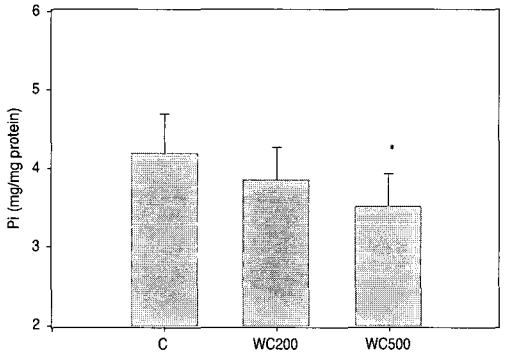

Fig. 3. Effects of *Woohwangcheongsim-won* on Ca^{2+}-ATPase activity obtained from erythrocyte membrane.
Control: Diabetic controp group(non-treated)
WC200: 200㎍/㎖ of WC treated group in diabetic membrane
WC500: 500㎍/㎖ of WC treated group in diabetic membrane
*: P < 0.05 vs Control

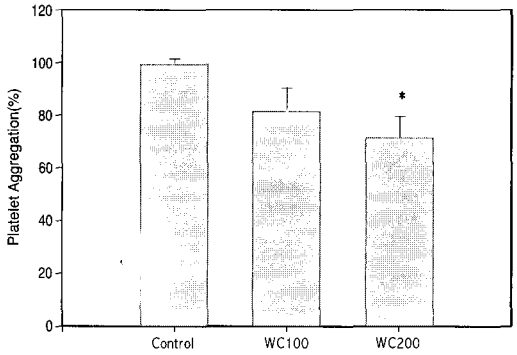

Fig. 4. Effects of *Woohwangcheongsim-won* on platelet aggregation in diabetic rats in vitro.
Control: Diabetic control group(non-treated)
WC200: 200㎍/㎖ of WC treated group in diabetic platelets
WC500: 500㎍/㎖ of WC treated group in diabetic platelets
*: P < 0.05 vs Control

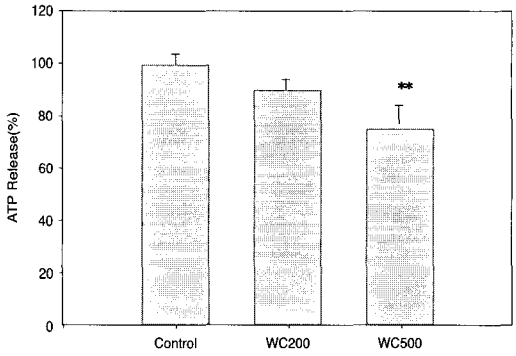

Fig. 5. Effects of *Woohwangcheongsim-won* on ATP release from washed platelet in diabetic rats in vitro.
Control: Diabetic control group(non-treated)
WC200: 200㎍/㎖ of WC treated group in diabetic platelets
WC500: 500㎍/㎖ of WC treated group in diabetic platelets
**: P < 0.01. vs Control

2) In vitro에서 혈소판의 과립유리에 미치는 영향

牛黃淸心元투여군 모두에서 ATP과립 유리 정도가 당뇨대조군에 비해 감소되었다. 특히 WC500투여군에서 유의성있게 감소되었다(Fig. 5).

3) In vivo에서 혈소판 과립유리에 미치는 영향

당뇨대조군에서는 ATP과립유리정도가 정상대조군에 비해 증가되어 있었다. 牛黃淸心元투여군 모두에서는 당뇨대조군에서 증가되었던 ATP과립 유리정도가 감소되었는데, 특히 WC600투여군에서 유의성있게 감소되었다(Fig. 6).

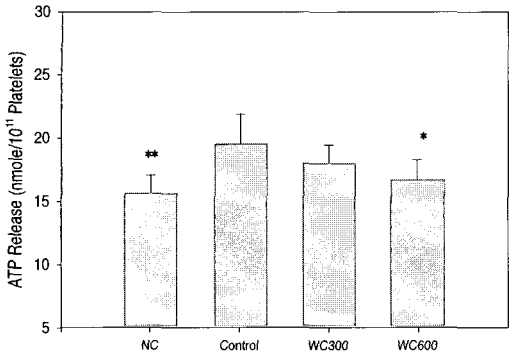

Fig. 6. Effects of *Woohwangcheongsim-won* on ATP release from washed platelet in diabetic rats in vivo.
NC: Normal control group(non-treated)
Control: Diabetic control group(non-treated)
WC300: 300 ㎎/㎏ of WC administered in diabetic group
WC600: 600 ㎎/㎏ of WC administered in diabetic group
*: P < 0.05 vs Control
**: P < 0.01. vs Control

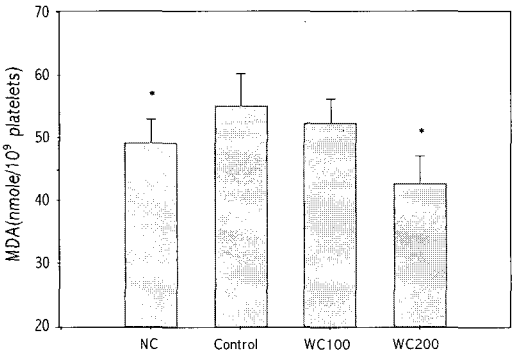

Fig. 7. Effects of *Woohwangcheongsim-won* on prostaglandin production from washed platelet in diabetic rats in vivo.
NC: Normal control group(non-treated)
Control: Diabetic control group(non-treated)
WC300: 300 ㎎/㎏ of WC administered in diabetic group
WC600: 600 ㎎/㎏ of WC administered in diabetic group
*: P < 0.05 vs Control

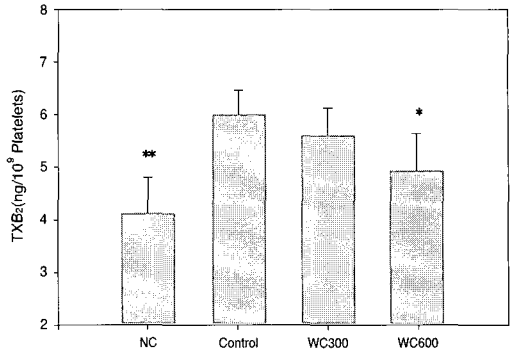

Fig. 8. Effects of *Woohwangcheongsim-won* on thrombin induced TXB2 formation from washed platelet in diabetic rats in vivo.
NC: Normal control group(non-treated)
Control: Diabetic control group(non-treated)
WC300: 300 ㎎/㎏ of WC administered in diabetic group
WC600: 600 ㎎/㎏ of WC administered in diabetic group
*: P < 0.05 vs Control
**: P < 0.01. vs Control

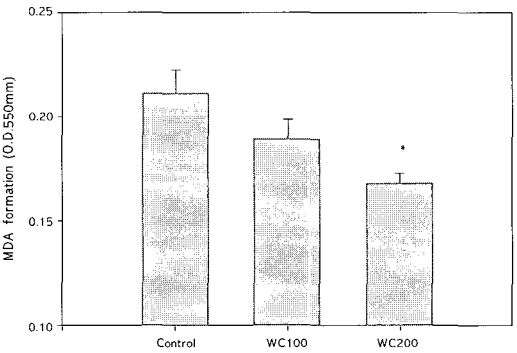

Fig. 9. Effcts of *Woohwangcheongsim-won* on oxLDL-cholesterol formation in macrophage cells.
MDA was measured in macrophage cells incubated with native LDL-cholesterol for 90 hrs.
Control : Vehicle
WC100: 100㎍/㎖ of WC treated group
WC200: 200㎍/㎖ of WC treated group
*: P < 0.05 vs Control

4) In vivo에서 혈소판의 arachidonic acid 대사에 미치는 영향

당뇨대조군에서는 arachidonic acid 대사산물인 MDA가 정상대조군에 비해 증가되어 있었다. 牛黃淸心元투여군 모두에서는 당뇨대조군에서 증가되었던 MDA수치가 감소되었는데, 특히 WC600투여군에서 유의성있게 감소되었다(Fig. 7).

5) TXB2의 생성에 미치는 영향

당뇨대조군에서 TXB2의 생성이 정상대조군에 비해 증가되어 있었다. 牛黃淸心元투여군 모두에서는 당

뇨대조군에서 증가되었던 TXB2가 감소되었는데, 특히 WC600투여군에서 유의성있게 감소되었다(Fig. 8).

4. 산화형 LDL-cholesterol 생성 및 관련 대식세포에 미치는 영향

1) 대식세포에 의한 LDL-cholesterol의 지질산화에 미치는 영향

牛黃淸心元투여군 모두에서 MDA가 당뇨대조군에 비해 감소되었다. 특히 WC500투여군에서 유의성있게 감소되었다(Fig. 9).

2) 대식세포에 의한 LDL-cholesterol의 단백질산화에 미치는 영향

牛黃淸心元투여군 모두에서 산화되지않고 남아있는 LDL수치가 당뇨대조군에 비해 증가되었다. 특히 WC100투여군에서 유의성있게 증가되었다(Fig. 10).

3) 대식세포에 의한 Nitrite 생성에 미치는 영향

牛黃淸心元투여군 모두에서 Nitrite가 당뇨대조군에 비해 증가되었다. 특히 WC100투여군에서 유의성있게 증가되었다(Fig. 11).

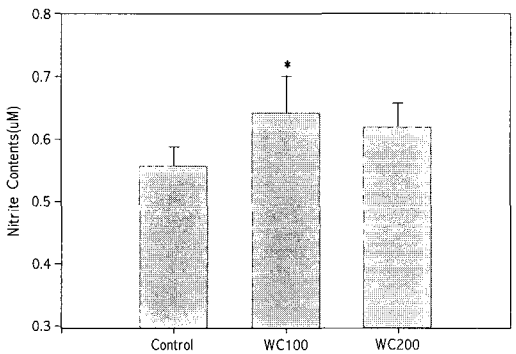

Fig. 10. Effects of *Woohwangcheongsim-won* on oxidized LDL-cholesterol formation in macrophage cells.
Remained protein in LDL-cholesterol was measured in macrophage cells incubated with native LDL-cholesterol for 90 hrs.
Control : Vehicle
WC100: 100㎍/㎖ of WC treated group
WC200: 200㎍/㎖ of WC treated group
*: P < 0.05 vs Control

4) oxLDL-cholesterol에 의한 대식세포 LDH 유리에 미치는 영향

$CuSO_4$로 처리된 당뇨대조군에서 LDH 유리가 정상대조군보다 증가되어 있었다. 牛黃淸心元투여군 모두에서는 당뇨대조군에서 증가되었던 LDH 유리 정도가 유의성 있게 억제되었다.(Fig. 12).

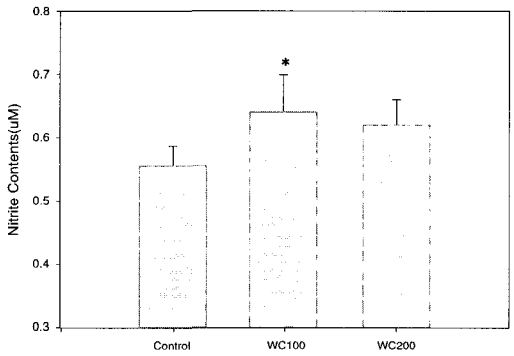

Fig. 11. Effects of *Woohwangcheongsim-won* on nitric oxide synthesis in macrophage cells.
Control : Vehicle
WC100: 100㎍/㎖ of WC treated group
WC200: 200㎍/㎖ of WC treated group
*: P < 0.05 vs Control

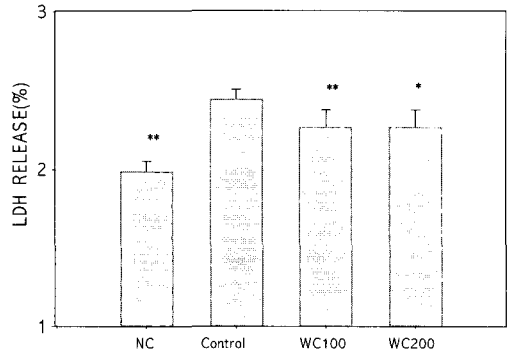

Fig. 12. Effects of *Woohwangcheongsim-won* on CuSO4 induced LDH release from macrophage cells.
Murine macrophage cells were incubated with 100㎍/㎖, 200㎍/㎖ of *Woohwangcheongsim-won* in the presence of 5㎛M CuSO4.
NC : Vehicle
Control : Vehicle + 5㎛ CuSO4
WC100: 5㎛M CuSO4 + 100㎍/㎖ of WC
WC200: 5㎛M CuSO4 + 200㎍/㎖ of WC
*: P < 0.05 vs Control
**: P < 0.01. vs Control

고 찰

일반적으로 혈관계 질환의 중요한 원인이 되는 혈류속도의 감소, 혈전생성요인의 활성화 및 혈관내 지질침착 등은 당뇨병에 있어서도 혈관합병증의 중요한 원인이 된다[3]. 또한 혈당이 잘 조절되지 않는 당뇨병이나 혈당이 잘 조절되는 당뇨병 모두에서 혈액내 지질치의 변화가 많고, 지질치가 정상범위에 있더라도 지단백의 대사나 구성성분에 변화가 있으며 이로 인한 혈관계 질환 발생이 증가된다는 보고도 있다[4].

전체적으로 혈관계 질환은 당뇨병, 고혈압, 고지혈증 등의 합병증으로 적혈구 변형능의 감소, 혈소판 응집능의 증가, 혈액점조도의 증가 등이 주요원인으로 작용하여 발생된다. 따라서 혈관계 질환의 치료 및 예방에 적혈구 변형능, 혈소판 기능 및 혈중지질대사과정 등을 조절하는 것이 중요하다고 할 수 있다.

적혈구 변형능은 미세혈관의 혈류 흐름 속도와 밀접한 연관이 있다[15]. 적혈구 변형능은 membrane stiffness, cell shape, intracellular viscosity 등에 의해 영향을 받는데, 특히 membrane stiffness가 가장 중요하며 이는 cytoskeletal dynamic structure의 조정을 통하여 조절된다[16]. Cytoskeletal dynamic structure는 주로 spectrin이란 단백질로 구성되어 있으며, 적혈구의 형태 유지에 중요한 역할을 하는데, cytoskeleton을 구성하는 actin, ankyrin, band4.1, band3 등의 다른 단백질간의 상호작용들도 구조 유지에 관여한다[17]. Cytoskeletal dynamic structure를 이루고 있는 단백질간의 구조적인 상호 작용은 적혈구 세포내로의 칼슘 유입과 ATP 함량에 의해서 좌우된다. 또 다른 측면에서의 적혈구 변형능은 적혈구 내부의 미토콘드리아 구조를 변화시키는 2,3-DPG의 함량에 의해 좌우된다.

혈액의 점조도와 밀접한 관련이 있는 혈전생성은 혈류역학적 변화, 혈관내피세포의 기능이상, 혈소판 응집능 항진, 혈장내 응고인자 활성증가 및 섬유소용해능 감소 등에 의해 유발된다. 그 중 혈소판의 응집능 항진은 혈전생성을 증가시키는데 중요한 역할을 한다[18]. 심근경색증, 죽상동맥경화증, 염증성판막질환, 고혈압, 당뇨병, 고지혈증 및 비만 등의 질환이나 방사선손상, 화학물질 및 세균독소 등의 외인성 인자에 의해 혈관내피세포가 손상되면 지혈을 시키기 위하여 혈소판이 혈관내피세포 손상부위에 점착되고, 혈소판 형태의 변화가 발생되며 혈소판응집이 되는 일련의 혈전형성 단계의 반응이 일어나 혈관내에 혈전이 형성된다. 과도한 혈전형성은 동맥이나 정맥을 폐색시키고 색전을 유발함으로써 정맥에서는 혈전성 폐색전증 및 폐경색을, 동맥에서는 심근경색, 뇌경색 등을 일으킨다. 당뇨병 환자에 있어서 혈소판 응집능의 증가는 혈소판 세포막에서 응집유발물질에 대한 당단백 수용체 발현의 증가, 섬유소원 유착의 증가, 혈소판 세포막 유동성의 감소, arachidonic acid pathway 활성화와 thromboxane A2 생성의 증가, 플라스미노겐 활성인자 억제물질의 증가, 칼슘의 세포내 유리 및 단백질의 인산화 등에 의한다[19].

혈관내 지질침착은 혈중 cholesterol 상태와 혈관내피세포의 상태에 많은 영향을 받는다. 혈중 cholesterol 중에서 triglyceride와 LDL-cholesterol치의 증가는 혈액점조도 증가를 유발하여 혈관벽에서 혈액성분의 점착능을 증가시켜 동맥경화증 등을 유발하고 혈관의 탄력성을 잃게 하여 뇌졸중, 심근경색, 신부전 등의 심각한 합병증을 유발시킨다. 특히 LDL-cholesterol이 HDL-cholesterol보다 상대적으로 우세한 과지질단백혈증(Hyperlipoproteinemia)에서 혈관계질환이 보다 잘 발생되는데, 발생기전으로 내피세포 손상설이 가장 유력하다[20,21]. 내피세포 손상설은 여러 가지 자극요인에 의해 손상된 혈관부위에 순환단핵구, 임파구 등이 부착한 후 여러 가지 요인에 의해서 내피세포내로 이동하게 되고 이동한 단핵구가 대식세포로 변화하여 지질을 탐식한 후 포말세포를 형성한다는 것으로, 이 과정에서 정상적인 LDL-cholesterol 보다는 산화된 형태의 LDL-cholesterol이 중심적인 역할을 하는 것으로 밝혀졌다[22]. 이런 연구 결과를 바탕으로 과거에는 동맥경화의 예방 및 치료를 위해 혈중 콜레스테롤을 억제하고

비수용성인 LDL-cholesterol치를 낮추기 위한 연구가 주를 이루었으나, 최근에는 대식세포와 산화된 LDL-cholesterol에 관한 연구가 주를 이루고 있다. 대식세포는 LDL-cholesterol을 산화시키는 것 이외에 산화된 LDL-cholesterol을 포식하여 면역복합체를 형성한 후 혈관벽에 침식되어 혈관벽을 비후시키기도 하고 염증반응을 유발하여 혈관벽을 파열시키기도 한다.

牛黃淸心元은 中風 中臟腑 陽閉證에 多用되는 처방으로[7] 1107년 경 陳師文[23]의 <太平惠民和劑局方>에 처음 수록되었다. 30여종의 약물로 구성된 牛黃淸心元의 전체적인 藥性은 凉하며 淸熱瀉火, 解毒, 開竅化痰, 養血生津, 補脾胃, 安神 등의 效能이 있어, 중풍 급성기의 의식혼미, 口眼喎斜, 半身不遂 등의 증상에 사용되고 이외에도 심장질환, 신경계질환에 널리 응용되고 있다. 牛黃淸心元에 대한 실험적 연구로는 고[24]의 평활근 이완효과, 홍[25]의 혼수시간 단축, 무산소 부하시 생존시간 증가, 홍 등[12]의 혈관확장작용, 이뇨작용, 고[8]의 적출심장의 관류장치 하에서 심근 허혈 유발 후 좌심실압 증가 및 이완기 심근능력 증가, 백[26]의 흰쥐에서 학습능력 증가, 이[11]의 고혈압에 양방 고혈압 치료제와 병용투여시 단독투여군보다 혈압강하효과 증가, 조 등[10]의 뇌부종, 충혈 감소, 문[27]의 NOS 유전자 발현 촉진, VCAM-1 유전자 발현 억제, 세포분열주기 억제효과 등이 있으며, 임상연구로서 김 등[28]의 牛黃淸心元이 정상인의 뇌혈류 및 혈압에 미치는 영향, 이 등[29]의 현탁액, 환제 등 제형에 따른 효능 차이 분석, 김 등[7]의 중풍환자의 의식장애 개선효과 등이 있었지만, 혈관계질환의 중요한 원인이 되는 혈류속도의 저하, 혈전생성요인의 활성화 및 혈관내 지질침착에 미치는 영향에 대한 실험은 없었다. 이에 당뇨병이 유발된 상태에서의 적혈구 변형능, 혈소판 응집능 및 혈중 지질 침착에 대한 牛黃淸心元의 효과에 대해 실험하고 다음과 같은 결과를 얻었다. 단 이 실험에서는 국제보호동물로 지정되어 사용이 금지된 犀角과 비소(AsS)와 수은의 독성 때문에 각각 石雄黃과 朱砂는 뺀 채로 사용하였다.

혈류속도 및 적혈구 변형능은 말초혈관에서의 혈류순환을 결정하는 중요한 인자가 된다[15]. 즉, 적혈구보다 직경이 훨씬 작은 미세혈관을 적혈구가 수월하게 통과할 수 있는 정도가 적혈구 변형능으로 결정된다. 당뇨병이나 고지혈증에서 적혈구 변형능은 감소되어 말초혈관에서의 혈류속도는 저하된다[30].

적혈구 변형능에는 membrane stiffness가 많은 영향을 미친다[13]. 이 membrane stiffness를 구성하는 spectrin, ankyrin, actin, band 3, band 4.1 등의 단백질 상호작용에 따라 중합(polymerization) 또는 비중합(depolymerization)되어 영향을 미친다. 이 단백질들의 작용은 크게 적혈구 세포내의 칼슘유입 정도와 ATP함량에 의해 좌우된다. 적혈구내 ATP는 cytoskeleton를 구성하는 단백질간의 상호작용을 증가시켜 단단한 구조를 이루게 한다. 즉, 적혈구 내에 cytoskeletal network를 구성하는 actin 상호간의 결합이 강화되어 적혈구 변형능이 감소된다. 결론적으로 세포내 ATP함량의 증가는 actin 상호간의 결합이 저하되어 있다는 것을 시사하고 세포내 ATP함량이 적다는 것은 actin 상호간의 결합이 증가되어 있음을 시사한다. 적혈구내 칼슘함량의 증가는 세포질 cytoskeleton의 상호작용을 증가시켜 적혈구 변형능을 감소시키는 요인으로 작용한다. 칼슘 함량이 증가되면, 여러 가지 중요한 세포내 작용을 칼슘에 의존하는 calmodulin이 활성화되어 spectrin이나 ankyrin 등의 상호 작용을 증가시켜 cytoskeleton의 구조를 단단하게 하여 적혈구 변형능을 감소시키는데, *calmodulin*이 *spectrin-actin cytoskeleton*에 직·간접으로 영향을 미치는지, 세포내 ATP 함량 또는 칼슘 함량에 영향을 미쳐서 조절하는지는 명확하지 않다[31].

이에 반해 2,3-DPG는 calmodulin이 세포막의 cytoskeletal struture에 영향을 미치는 것과 달리 헤모글로빈 내부에서 cross link가 형성되는데 영향을 미친다. 즉, 2,3-DPG가 증가되면 헤모글로빈내의 cross link가 형성되어 적혈구 변형능이 감소된다.

이 실험에서 당뇨대조군과 牛黃淸心元투여군에서 유리세관 통과속도와 적혈구 변형능을 비교한 결과, 당뇨대조군에서 감소되었던 유리세관 통과속도 및 적혈구 변형능은 牛黃淸心元투여군에서 모두 증가되었다. 이는 牛黃淸心元이 적혈구 변형능을 증가시켜

말초혈관에서의 혈액순환을 원활하게 할 수 있음을 의미한다. 이와 같은 실험 결과를 얻은 후, 牛黃淸心元이 적혈구 변형능과 관련된 인자들에 대한 구체적인 영향을 살펴보기 위해 적혈구 내의 ATP, calmodulin 및 2,3-DPG의 함량에 대해 실험을 실시하였다.

당뇨병 상태의 적혈구에서 증가된 2,3-DPG는 牛黃淸心元을 투여한 in vivo, in vitro 실험 모두에서 감소되는 경향을 보였으며, 당뇨병 상태에서 감소된 ATP 함량은 牛黃淸心元을 투여한 in vivo, in vitro 실험 모두에서 증가되었으나 유의성은 없었다. Calmodulin과 관련된 Ca^{2+}-ATPase의 활성은 牛黃淸心元투여군에서 감소되었는데, 이는 牛黃淸心元이 칼슘관련인자 및 헤모글로빈 관련 인자에 영향을 미쳐 적혈구 변형능을 조절하는 것으로 추정되나 어느 기전에서 보다 주도적으로 작용하는지에 대해서는 추후 부가적인 실험이 필요할 것으로 생각된다.

혈전을 생성하는 여러 가지 요인들 중 특히 혈소판 응집능 항진이 중요한 역할을 한다[32]. 기본적인 혈소판 응집과정은 thrombin, collagen, epinephrine, ADP 등과 같은 혈소판 응집유도물질에 반응하여 혈소판 자체의 생리적 활성이 증가되어 혈소판들이 응집하는 과정으로 이루어진다. 특히 동맥경화증, 고혈압, 심근경색, 당뇨병 등과 같은 질환에서는 혈소판 내 과립물질 분비와 thromboxane A2(TXA2) 및 MDA의 생성 등이 증가되어 혈소판 응집능이 항진되지만, 혈당, 혈구세포수, 당화혈색소 등과는 유의한 상관관계가 없다는 보고[33]도 있다. 혈소판 응집에 관련된 모든 응집유도 물질이 공유하는 주된 응집유도 경로는 과립분비를 통한 ADP 유리 및 arachidonate pathway 활성화를 통한 TXA2 생성이다. 혈소판내에 저장되어 있던 과립은 외부자극에 의해 혈소판이 활성화되면 신호전달계의 전달과정을 거쳐 exocytosis 현상을 통해 세포 밖으로 분비된다. 특히, dense granule에는 ADP, ATP 등의 adenine nucleotide 등을 비롯한 다양한 성분이 저장되어 있어 혈소판이 응집될 때 유리되어 또 다른 혈소판 응집을 유발하게 되므로 dense granule의 2차적 분비가 혈소판 응집을 유발시킨다고 할 수 있다[34]. 또 다른 혈소판 응집 경로인 arachidonate pathway는 다음과 같다. 혈소판 응집유발물질이 수용체에 결합하면 혈소판막에 존재하는 칼슘의존형 효소인 PLA2(phospholipase A2)가 활성화되어 혈소판막의 인지질로부터 arachidonic acid가 유리되어 나오며, 유리된 arachidonic acid는 cycloxygenase에 의해 prostagladin endoperoxide 중간체를 생성한다. 이 endoperoxide들은 효소적 또는 비효소적 작용을 받아 TXA2, MDA 등의 prostaglandin류를 생성한다. TXA2는 혈소판 고착능 증가, 혈소판 형태 변화 및 fibrinogen receptor의 유출확대 등을 통하여 2차적인 혈소판 대량응집을 유발하며 곧바로 Thromboxane B2(TXB2)로 변하여 불활성화된다[35].

이 실험에서 牛黃淸心元이 혈소판의 응집능에 미치는 영향을 살펴본 결과 thrombin에 의해 유도된 당뇨대조군에서의 혈소판 응집능은 牛黃淸心元투여군(in vitro)에서 억제되었다. 이 같은 실험 결과를 얻은 후, 牛黃淸心元이 혈소판 응집능과 관련된 인자들에 대한 구체적인 영향을 살펴보기 위해 혈소판에서의 2차적 과립유리, ara-chidonic acid 대사 및 TXB2의 생성에 대해 실험을 실시하였다. 2차적 혈소판 응집을 유발하는 과립유리는 牛黃淸心元투여군 모두에서 (in vivo, in vitro) 억제되었으며, 역시 2차적 대량응집을 유발하는 arachidonic acid 및 응집 결과물인 TXB2는 牛黃淸心元투여군에서 모두 유의성 있게 감소되었다. 실험결과 응고와 관련된 중요한 두가지 기전 모두에서 牛黃淸心元투여군이 유의성 있는 혈소판 응집능을 억제하는 효과를 얻을 수 있었지만, 어떠한 기전이 보다 중심적으로 작용하는지에 대해서는 추후 부가적인 실험이 필요할 것으로 생각된다.

혈관계 질환의 또 다른 중요한 원인이 되는 혈관 비후는 지방성분의 결집과 혈관벽에의 침착, LDL-cholesterol의 산화 등으로 유발되며, 그 중에서도 병적상태를 유발하는 가장 핵심적인 역할은 LDL-cholesterol의 산화된 형태(이하 oxLDL-cholesterol)가 담당한다. 이러한 oxLDL-cholesterol 생성에는 대식세포와 Nitric oxide(이하 NO)가 중요한 작용을 한다[36].

NO는 내피세포나 신경세포, 대식세포에서 nitric

oxide synthetase(이하 NOS)에 의해 생성된다. 대식세포는 endotoxin, LPS, 특정 cyto-kine의 자극에 의해 유도된 NO를 유리시킨다. 대식세포에서 유리된 NO는 비교적 안정적인 자유기로 정상적인 pH에서는 LDL-cholesterol을 산화시킬 수 없고, 대식세포나 혈관내피세포에서 생성된 supero-xide와 반응하여 peroxynitrite를 생성하는데, 이 질소 화합물이 LDL-cholesterol을 산화시키고 나면, 대식세포가 청소수용체(scavenger re-ceptor)를 통해 oxLDL-cholesterol을 인지하고 흡수한다. 이와는 달리 혈관내피세포에서 생성되는 NO는 혈관을 이완시키고 혈소판 응집능을 저해하며, 혈관내피세포의 혈관 투과성과 면역세포 등의 혈관점착능을 저하시키고, cGMP 분해효소인 phosphodiesterase를 억제하여 fibroblast, lymphocyte 및 smooth muscle cell 증식을 감소시켜 혈관비후를 억제하는 것으로 알려져 있다[37]. Nitrite 및 nitrate는 NO의 대사산물로 내피세포나 대식세포로부터 생성되는 NO의 생성 지표로 측정된다. 즉, 혈중내에 고농도의 지질로 인해 내피세포가 손상되면 oxLDL-cholesterol가 손상된 부분을 통해 내피세포 내부로 유입되고, 단핵구에서 분화된 대식세포가 청소수용체(scavenger receptor)를 통해 내피세포내로 유입된 oxLDL-choleste-rol을 탐식한 후 포말세포를 형성한다. 이렇게 대식세포나 혈관내피세포에 의해 생성된 oxLDL-cholesterol은 대식세포의 세포질내 칼슘농도를 높이고 PKC(protein kinase C)의 활성을 증가시킴으로 GM-CSF(granulocyte macrophage colony stimulating factor)를 유리시킨다. 대식세포로부터 유리된 GM-CSF는 세포를 증식시켜 더 많은 oxLDL-cholesterol을 생성하여 혈관벽 침착을 촉진시킨다. 또한 GM-CSF는 혈관내피세포 및 혈관평활근 세포의 증식을 자극하여 oxLDL-cholesterol의 혈관벽 침착과 함께 혈관벽 비후화를 유발한다[38]. 또한 oxLDL-cholesterol은 상호작용을 통하여 응집되면서 면역복합체를 형성하여 혈관벽에 섬유상 반점을 형성하는 경우, 혈관벽에서 돌출되어 혈액 순환을 직접적으로 저해할 수 있다[39]. 따라서 혈중 cholesterol 함량을 낮추는 것과 oxLDL-cholesterol의 형성을 차단하는 것이 혈관벽비후로 인한 혈액순환장애의 예방 또는 치료에 필수적인 단계가 될 수 있다.

이 실험에서 배양된 대식세포에 LDL-cholesterol을 첨가하여 생성된 oxLDL-cholesterol양을 측정하기 위하여 LDL-cholesterol내의 인지질의 산화 및 분해를 측정하였다. 지표로 지질과산화 결과인 MDA를 측정한 결과, 牛黃淸心元투여군에서 당뇨대조군에 비해 MDA 수치가 감소되었다. 다른 실험방법으로 LDL-cholesterol의 산화 후 남은 단백질량을 측정한 결과 牛黃淸心元투여군에서 oxLDL-cholesterol 생성과정에서 일어나는 단백질 산화가 현저히 억제되는 결과가 나타났다. 이어 NO생성지표로 사용되는 nitrite의 농도를 살펴본 결과 牛黃淸心元투여군에서 당뇨대조군에 비해 다소 증가되어 있었다. 이는 牛黃淸心元이 oxLDL-cholesterol에 의해 반응이 자극되는 NOS의 활성을 증가시킨 결과로 보인다.

LDH는 세포손상시 투과성이 증가된 세포막을 통하여 세포로부터 누출되는 세포내의 효소로, LDH의 측정은 세포손상의 정도를 판정하는 기준이 된다. 이에 이 실험에서는 $CuSO_4$를 첨가하여 세포를 손상시킨 후 牛黃淸心元을 투여하여 대식세포에서 유리되는 LDH 및 대식세포의 기능측정 지표인 acid phosphatse를 측정하였다. $CuSO_4$를 첨가하지 않은 상태에서 대식세포의 생존정도를 측정한 결과 牛黃淸心元투여군에서 당뇨대조군에 비해 증가되었다. 다음으로 $CuSO_4$를 첨가하여 대식세포를 손상시킨 뒤 유리된 LDH의 양을 비교한 결과 牛黃淸心元투여군에서 당뇨대조군에 비해 LDH량이 감소되었다. 마지막으로 $CuSO_4$에 의해서 손상받은 대식세포에 牛黃淸心元을 투여한 다음 acid phosphatase의 양을 측정한 결과 정상대조군에 비해 당뇨대조군에서 감소되어 있던 acid phosphatase 양이 牛黃淸心元투여군에서 증가되었으나 유의성은 없었다. 따라서 牛黃淸心元은 대식세포에서 oxLDL-cholesterol 생성을 억제하지만, 대식세포의 기능에는 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 보여지며 LDL-cholesterol의 산화를 억제하는 기전에 대해서는 추후 부가적인 실험이 필요할 것으로 생각된다.

이상의 결과, 牛黃淸心元은 당뇨병 상태에서 감소된 적혈구 변형능을 증가시켰으며, 증가된 혈소판 응집능을 감소, oxLDL-cholesterol 형성능을 억제하는 것으로 확인되어 혈관계질환에 유의한 치료 및 예방효과가 있을 것으로 추정된다.

결 론

牛黃淸心元이 혈액순환 관련인자에 미치는 영향을 평가하기 위하여 streptozotocin을 투여하여 유발시킨 당뇨병 상태에서 혈액순환관련인자인 유리세관통과능, 혈소판 응집능, 적혈구 변형능, oxLDL-cholesterol 형성능 등을 측정하여 아래와 같은 결과를 얻었다.

1. 牛黃淸心元은 전혈의 유리세관 통과속도를 증가시켰다.

2. 牛黃淸心元은 당뇨병 상태에서 감소된 적혈구 변형능을 증가시켰다.

3. 牛黃淸心元은 당뇨병 상태의 적혈구에서 증가된 2,3-DPG를 감소시켰으나, 감소된 ATP 함량에는 영향을 주지 못하였다.

4. 牛黃淸心元은 적혈구 막에 존재하는 Ca^{2+}-ATPase의 활성을 감소시켰다.

5. 牛黃淸心元은 혈소판응집능을 억제하였으며, 혈소판에서 과립물질의 유리를 억제하였다.

6. 牛黃淸心元은 당뇨병 상태에서 증가한 혈소판내의 arachidonic acid 대사를 억제하였으며, Thromboxane B2의 생성을 억제하였다.

7. 牛黃淸心元은 대식세포에서 oxLDL-cholesterol 생성을 억제하였다.

8. 牛黃淸心元은 대식세포의 기능에는 영향을 주지 않았다.

참고문헌

1. 통계청. 사망원인 통계연보. 서울:문전사. 1998:20.
2. Kume-N., Murase-T., Moriwaki-H., Aoyama-T., Sawamura-T., Masaki-T., Kita-T. Inducible expression of lectin-like oxidized LDL-cholesterol receptor-1 in vascular endothelial cells. Cire-Res. 1998;83(3):322-7.
3. Badimon L., Badimon J.J., Penny W., Webster M.W., Chesebro J.H. and Fuster V. Endothelium and atherosclerosis. J Hypertens(Suppl). 1992;10:S43-S50.
4. 박기락 外. 당뇨병환자의 말초혈관 질환 빈도와 위험인자에 관한 연구. 당뇨병 학회지. 1995;19(3):313-317.
5. Jacob F., et al. Plasma viscosity in ischemic heart disease. An Heart J. 1984;108:435.
6. 許俊. 東醫寶鑑. 서울: 대성문화사. 1981:171-3.
7. 김동웅, 오승환, 안일회, 이언정, 이형균, 이승무, 나성수. 의식장애를 동반한 졸중풍 급성기 환자에서 우황청심원 투여에 관한 고찰. 대한한의학회지. 1994;15(1):203-210.
8. 고창남. 우황청심원이 흰쥐의 적출심장에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 1997.
9. 신재용. 方藥合編解說. 서울: 성보사. 1988:100.
10. 조태순, 이선미, 이은방, 조성익, 김용기, 신대희, 박대규. 신우황청심원의 뇌허혈 및 중추신경계에 대한 약효. 약학회지. 1998;41(6):817-828.
11. 이영빈. 고혈압에 우황청심원과 Hydralazine, Atenolol, Captopril 및 Furosemide의 병용투여에 관한 실험적 연구. 경희대학교 대학원. 1992.
12. 홍남두, 김남재, 김규섭. 우황청심원의 순환기계에 미치는 영향. 생약학회지. 1988;18(4):241-248.
13. 최영길. 당뇨병성 혈관합병증 진단과 치료. 서울:훈의학. 1998:7-9,35-51,5-66,69-77, 81-90, 225-37.
14. 김영설. 고지혈증과 동맥경화증. 서울:훈의학. 1999:46-57, 149-155.
15. 安貞熙. 환경물질의 생체반응성에 관한 연구(ⅩⅩⅩⅠ)- 랫드 적혈구막의 Calmodulin-sensitive 및 insensitive ATPase 활성에 미치는 Hematoxylin의 영향. 서울대학교 대학원. 1990.
16. Cohen C.M. The molecular organization of the red cell membrane skeleton, Semin. Hematol. 1983;20:141-158.
17. Sobue K., Muramoto Y., Fujita M. and Kakiuchi S.

Calmodulin-binding protein of erythrocyte cytoskeleton, Biochem. Biophys. Res. Commun. 1981;100:1063-1070.

18. 홍시내. 蟾蜍의 血栓溶解酵素分離 및 그 特性에 관한 연구. 대한한방내과학회지. 1999;20(1):198-209.
19. Knobler H., Savion N., Shenkman B., Kotev-Emeth S., Varon D. Shear-induced platelet adhesion and aggregation on subendothelium are increased in diabetic patients. Thromb Res. 1998;90(4):181-90.
20. Kullo K.J., Gau G.T., Tajik J. Novel risk factors for atherosclerosis. Mayo Clin Proc. 2000;75:369-80.
21. Fostegard J., Nilsson J., Haegerstrand A., Hamsten A., Wigzell H., Giglund M. Oxidized low densitylipoprotein induces differentiation and adhesion of human monocytes and monocytic cell line U937. Proc Natl Acad Sci(USA). 1990;87:904-908.
22. Steinbrecher U.P., Parthasarathy S., Witzum J.L., Steinberg D. modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degeration of low density lipoprotein phospholipids. Proc. Natl. Acad. Sci(USA). 1984;81:3883-3887.
23. 陳師文. 太平惠民和劑局方. 臺北: 旋風出版社. 1975:3,25,26.
24. 고용석. 우황청심원이 평활근에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 1977.
25. 홍석. 우황청심원이 백서의 뇌손상에 미치는 영향. 대전대학교 대학원. 1993.
26. 백지성. 우황청심원이 NOS inhibitor에 의한 흰쥐의 학습 및 기억장애에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 1999.
27. 문상관. 우황청심원이 인체내피세포의 NOS 및 세포부착인자 유전자 발현에 미치는 영향에 관한 분자생물학적 연구. 경희대학교 대학원. 2000.
28. 김영석. 우황청심원이 정상인의 뇌혈류 및 혈압에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 1999;20(1):222-231.
29. 이원철, 김영석, 배형섭, 구본홍. 우황청심원의 제형별 임상에 관한 연구. 대한한의학회지. 1990;11(2):102-105.
30. Dormandy J., Byod M., Errist E., Redcell filterability after myocardial infarction, Scan J. Clin. Lab. Invest. 1981;41(Suppl. 156):195-198.
31. Bruce Alberts, Dennis Bray, Alexander Johnson, Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter. Essential cell biology. New York:Garland publishing, Inc. 1998:530-5.
32. Holmsen H. Platelet metabolism and activation. Semin Hematol. 1985;22:219.
33. 김응진. 당뇨병학. 서울:고려의학. 1992:383-7.
34. Shuman M.A. and Levine S.P. Relationship between secretion of platelet factor 4 and thrombin generation during in vitro. J Clin Invest. 1980;65:307.
35. Gachest C., Hechler B., Leon C., Vial C. et al. Activation of ADP receptor and platelet function. Thromb Haemostasis. 1997;78:271-5.
36. 고지혈증 치료지침 제정위원회 편. 고지혈증의 진단과 치료. 서울: 흔의학. 2000:75-91, 221-6, 305-12.
37. Alheid U., Frolich J.C. and Forstermann U. Endothelium derived relaxing factor from cultured human endothelial cell inhibits aggregation of human platelets. Throm Res. 1994;47:561-71.
38. Huang-Y., Mironova-M., Lopes-Virella-M.F. Oxidized LDL-ch-olesterol stimulates matrix metalloproteinase-1 expression in human vascular endothelial cell. Arterioscler-Thromb-Vasc-Biol. 1999;19(11):2640-7.
39. 윤철호. 左歸飮과 右歸飮이 노화 Rat의 과산화지질 생성 및 활성산소 생성계 효소활성에 미치는 영향. 동국대학교 대학원. 1994.