

XO/HX에 의해 손상된 배양 심근세포에 대한 枳實薤白桂枝湯 과 구성약물 추출물의 방어효과

장승호 · 권강범 · 김인수 · 강길성 · 김인규 · 김인섭 · 류도곤*

원광대학교 한의과대학 생리학교실

Protective Effects of Jisilhaebaekgyeji-tang and Constituents Extract on Cultured Rat Myocardial Cell treated by XO/HX

Seung Ho Jang, Kang Beom Kwon, In Su Kim, Gil Seong Kang, In Gyu Kim, In Seob Kim, Do Gon Ryu*

Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

To certify the protective effect of herbal medicine against oxygen free radical-induced cardiotoxicity, cytotoxicity was measured using LDH activity and TBARS assay in the presence of Jisilhaebaekgyejitang(JHGT) extracts or single constituents of this prescription. In the present study, xanthine oxidase/hypoxanthine (XO/HX) resulted in a cell damage such as increases in LDH activity in culture medium and lipid peroxidation in cultured myocardial cells. In the effect of JHGT extract and its single constituents, which are Fructus Ponciri Seu Aurantii Immaturus (FPSAI), Cortex Magnoliae Officinalis (CMO), Bulbus Allii Macrostemi (BAM), Ramulus Cinnamomi (RC) and Fructus Trichosanthis (FT), they showed the prevention from the XO/HX-induced cardiotoxicity by the decrease of LDH activity and lipid peroxidation. From these results, they show that XO/HX is cardiotoxic in cultured myocardial cells derived from neonatal rat, and it suggests that JHGT, FPSAI, PT, CMO, BAM, RC and FT extracts are positively effective in the blocking in XO/HX-induced cardiotoxicity.

Key words : Jisilhaebaekgyeji-tang(枳實薤白桂枝湯), Fructus Ponciri Seu Aurantii Immaturus, Cortex Magnoliae Officinalis, Bulbus Allii Macrostemi, xanthine oxidase/ hypoxanthine, Myocardial cell

서 론

한의학에서 고지혈증으로 인한 관상동맥경화¹⁾와 이로 인해 유발되는 협심증은 胸痺에 해당되며²⁾, 【金匱要略】³⁻⁷⁾에 胸痺⁸⁾를 치료하는 처방으로 瓜蒌薤白白酒湯, 瓜蒌薤白半夏湯, 枳實薤白桂枝湯 등이 기록되어 있다. 이중 枳實薤白桂枝湯은 瓜蒌薤白白酒湯에서 白酒를 去하고 枳實, 厚朴, 桂枝를 加한 것으로 通陽散結하고 消痞除滿하는 효능이 있어 胸痺氣結이 胸中에 있어서 心中이 痞滿하고, 氣가 脇下에서 上逆하여 搶心하는 胸痺의 重症을 치료하는 처방⁹⁾으로 알려져 있다.

다양한 심장질환의 원인의 하나인 심근 세포의 손상이 산소 자유기에 의하여 유발된다¹⁰⁾고 보고되어 있는데 산소자유기는

최외각 전자궤도에 쌍을 이루고 있지 않는 홀수개의 전자가 존재하는 원자나 분자를 지칭하는 것으로써 이러한 특수구조때문에 대단히 큰 반응성을 보여 생체내의 여러 가지 병태생리적인 반응에 관여하고 있어, 생체막의 불포화지방산을 과산화시키거나 단백질, DNA를 변화시킨다^{11,12)}. 실험적으로 산소자유기는 xanthine 혹은 hypoxanthine이 oxygen에 의해서 산화되는데 이 반응은 xanthine oxidase에 의해서 촉매되어 superoxide radical (O²⁻)과 hydrogen peroxide(H₂O₂)가 생성되며^{13,14)} 또한 철(iron)과 반응하여 hydroxyl radical(OH)을 생성한다^{15,16)}고 한다. 최근에 한약재가 산소자유기에 대한 심근세포 독성을 방어한다는 실험적 보고가 있는데¹⁷⁻²⁴⁾ 안 등²¹⁾은 胸痺를 치료하는 처방중의 하나인 瓜蒌薤白半夏湯 추출물이 산소자유기에 의한 심근세포의 락동수의 감소와 LDH 활성도의 증가를 유의하게 억제한다고 보고하였으나 枳實薤白桂枝湯에 대한 연구보고는 접할 수 없었다.

이에 저자는 枳實薤白桂枝湯과 그 구성약물인 枳實, 厚朴,

* 교신저자 : 류도곤, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학
· E-mail : tkryu@wonkwang.ac.kr · Tel : 063-850-6846
· 접수 : 2003/04/14 · 수정 : 2003/05/21 · 채택 : 2003/07/19

薤白, 桂枝 및 瓜蒌實이 산소자유기로 손상된 배양 심근세포에 미치는 영향을 구명하기 위하여 산소자유기인 xanthine oxidase/hypoxanthine(XO/HX)의 심근세포 독성을 관찰하였으며 枳實薤白桂枝湯과 그 구성약물을 전처리한 심근세포를 XO/HX에 노출시킨 후 Lipid peroxidation 정량, Lactate dehydrogenase (LDH) 활성도 측정을 통하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험동물

동물은 Sprague Dawley 계통의 건강상태가 양호한 생후 3 일된 백서를 사용하였다.

2. 세포배양

심장조직에서 분리된 심근세포를 Ca^{2+} , Mg^{2+} -free인 Hank's balanced salt solution(HBSS, Gibco)으로 3회 세척한 후 1,000rpm에서 20분간 원심시켰다. 심장조직을 0.05% trypsin으로 20분 동안 항온기에 넣은 다음 Pasteur pipette으로 3, 4회 분쇄한 후 800×g에서 10분간 원심시킨다. 원심된 세포를 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 1×10^6 cell/well의 세포 밀도로 분주하였다. 분주된 세포는 3일 간격으로 새로운 배양액으로 교환하여 주었으며 산소자유기가 포함되지 않은 배양액을 대조군으로 하여 비교 조사하였다. 실험전 배양액을 버리고 세포를 PBS로 3-4회 세척하였으며 세포는 배양 7일 후 본 실험에 사용하였다.

3. 추출물의 제조

실험에 사용한 약재는 枳實 45g, 厚朴 45g, 薤白 100g, 桂枝 18.75g, 瓜蒌實 25g을 합한 枳實薤白桂枝湯(Jisilhaebaekgyeji-tang, JHGT)³⁾ 233.75g과 개별 약재인 枳實(Fructus Ponciri Seu Aurantii Immaturus, FPSAI), 厚朴(Cortex Magnoliae Officinalis, CMO), 薤白(Bulbus Allii Macrostemi, BAM), 桂枝(Ramulus Cinnamomi, RC) 그리고 瓜蒌實(Fructus Trichosanthis, FT) 각각 200g을 9배용의 3차 증류수와 함께 환저플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 3시간 동안 전열기로 전탕한 후 3,000rpm에서 20분간 원심분리하고 회전 진공 농축기로 감압농축한 후 동결건조기에서 건조하여 각각 枳實薤白桂枝湯 26.56g, 枳實 54.14g, 厚朴 18.43g, 薤白 15.41g, 桂枝 19.44g, 瓜蒌實 15.82g의 분말 시료를 얻었다. 枳實薤白桂枝湯의 분량은 다음과 같다.

Table 1. Prescription of Jisilhaebaekgyeji-tang

韓藥名	Pharmacognostic Name	Weight
枳實	Fructus Ponciri Seu Aurantii Immaturus	45g
厚朴	Cortex Magnoliae Officinalis	159g
薤白	Bulbus Allii Macrostemi	300g
桂枝	Ramulus Cinnamomi	37.5g
瓜蒌實	Fructus Trichosanthis	25g
Total Weight		233.75g

4. Xanthine oxidase(XO)/Hypoxanthine(HX)의 제조 및 처리

본 실험에 사용한 시약으로는 xanthine oxidase(XO, Sigma)와 hypoxanthine(HX, Sigma)으로 XO의 경우 100 mU/ml, 10 mU/ml, 1 mU/ml의 저장액을, HX의 경우 1 M, 100 mM, 10 mM의 저장액을 만들어 냉암소에 보관한 후 실험 당일 적당한 양으로 희석 사용하거나 필요한 양을 직접 배양액에 첨가하여 사용하였다.

5. 추출물의 처리

실험에 사용한 각각의 검액을 여러 농도로 하여, 백서의 배양 심근세포를 XO/HX에 노출시키기 3시간 전에 각각 전처리한 다음 XO/HX에 노출시킨 후 이들 한약재가 XO/HX의 심근세포 독성에 미치는 효과를 조사하였다.

6. 세포독성 및 방어효과 검증

1) Lipid peroxidation 정량²⁵⁾

XO/HX과 한약재를 일정시간 동안 처리한 후 배양 심근세포의 상층액과 세포용해액내의 TBARS (thiobarbituric acid reactive substances)를 측정하는 것으로, 위의 액에 12N H₂SO₄와 10% phosphotungstic acid를 각각 2.0 ml와 0.3 ml를 넣고 10분 동안 반응시켰다. 반응 완료후 TBA(thiobarbituric acid)를 1.0 ml를 가한 후 90도에서 1시간 동안 가열한 다음 냉각후 n-butanol로 처리하였다. n-butanol 처리완료 후 원심하여 이를 제거한 다음 553nm에서 형광측정법에 의해 측정하였다.

2) Lactate dehydrogenase 활성도 측정

LDH 활성도의 측정은 최적화 된 LDH/LD procedure (Sigma)를 이용하여 하였으며 배양액의 일부를 사용하였다. 즉 phosphate buffer (pH 7.5)에 등몰농도의 NADH를 pyruvate로 환원시키는 반응을 이용한 것이다. 340nm의 흡광도의 감소율은 배양액의 LDH 활성도에 비례하게 됨을 이용하여 LDH 활성도를 측정하는 방법이다.

7. 통계처리

실험결과에 대한 유의성의 검정은 ANOVA후에 Student t-test에 의하였으며 p값이 0.05 이하인 것만 유의한 것으로 하였다.

실험성적

1 Lipid peroxidation 정량

1) XO/HX가 lipid peroxidation에 미치는 영향

XO/HX의 농도에 따른 lipid peroxidation을 측정하기 위하여 0.1 mM HX에 4~32 mU/ml의 농도로 XO가 각각 포함된 배양액에서 심근세포를 48시간 동안 처리한 후 TBARS와 세포의 생존율을 대조군과 비교 조사하였다. 그 결과 처리한 농도에 비례하여 세포생존율의 감소와 TBARS의 증가를 보였다. 특히 16 mU/ml, 32 mU/ml XO 처리에서는 대조군에 비하여 각각 152.6%(p<0.05), 173.2%(p<0.01)로 TBARS의 유의한 증가를 나타냈다. MCV값은 16 mU/ml XO 처리에서 나타났다 (Fig. 1)

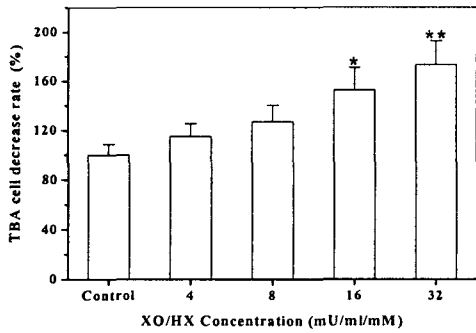


Fig. 1. Dose-response relationship of XO/HX on lipid peroxidation in cultured rat myocardial cells. Cultured rat myocardial cells were exposed to various concentrations of XO in 0.1 mM HX for 48 hours. Thiobarbituric acid(TBA) fluorometric assay was adopted to analyse lipid peroxidation and TBA reactive substance(TBARS) were represent as pmol/10⁶ cells. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisk. *p<0.05; **p<0.01

2) XO/HX 처리에 의해 증가한 lipid peroxidation에 미치는 한 약재의 효과

배양 심근세포에 대한 XO/HX의 세포독성에 대한 枳實薤白桂枝湯과 그 구성약물인 枳實, 厚朴, 薤白, 桂枝, 瓜蒌實 추출물의 효과를 TBA fluorometric assay를 통하여 lipid peroxidation 양의 측면에서 조사하기 위하여 MCV값인 16 mU/ml XO/0.1 mM HX의 농도에서 48시간 동안 노출시키기 3시간 전에 각각 60~150 µg/ml의 한약재 추출물이 포함된 배양액에서 전처리한 후 이의 방어효과를 조사하였다.

枳實薤白桂枝湯의 경우 배양한 후 XO/HX를 처리하지 않고 枳實薤白桂枝湯 추출물을 농도별로 처리한 경우 lipid peroxidation에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 16 mU/ml XO/HX를 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 58.2%가 증가하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 枳實薤白桂枝湯 추출물을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 lipid peroxidation이 감소하여 XO/HX에 의한 독성을 방어하였으며 특히 150 µg/ml 枳實薤白桂枝湯 추출물을 전처리한 경우에 枳實薤白桂枝湯 추출물을 전 처리하지 않고 XO/HX만을 처리한 군에 비하여 통계적으로 유의하게 감소하였다 (Fig. 2).

枳實의 경우 배양한 후 XO/HX를 처리하지 않고 枳實 추출물을 농도별로 처리한 경우 lipid peroxidation에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 16 mU/ml XO/HX를 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 lipid peroxidation이 60.3% 증가하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 枳實 추출물을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 lipid peroxidation이 감소하여 XO/HX에 의한 독성을 방어하였으나 통계적으로 유의성은 나타나지 않았다 (Fig. 2).

厚朴의 경우 배양한 후 XO/HX를 처리하지 않고 厚朴 추출물을 농도별로 처리한 경우 lipid peroxidation에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 16 mU/ml XO/HX를 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 lipid peroxidation이 59.6% 증가하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 厚朴 추출물을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 lipid peroxidation이 감소하여 XO/HX에 의한 독성을 방어하였으나 통계적으로 유의성은 나타

나지 않았다 (Fig. 2).

薤白의 경우 배양한 후 XO/HX를 처리하지 않고 薤白 추출물을 농도별로 처리한 경우 lipid peroxidation에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 16 mU/ml XO/HX를 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 lipid peroxidation이 60.3% 증가하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 薤白 추출물을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 lipid peroxidation이 감소하여 XO/HX에 의한 독성을 방어하였으나 통계적으로 유의성은 나타나지 않았다 (Fig. 2).

桂枝의 경우 배양한 후 XO/HX를 처리하지 않고 桂枝 추출물을 농도별로 처리한 경우 lipid peroxidation에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 16 mU/ml XO/HX를 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 lipid peroxidation이 58.6% 증가하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 桂枝 추출물을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 lipid peroxidation이 감소하여 XO/HX에 의한 독성을 방어하였으나 통계적으로 유의성은 나타나지 않았다 (Fig. 2).

瓜蒌實의 경우 배양한 후 XO/HX를 처리하지 않고 瓜蒌實 추출물을 농도별로 처리한 경우 lipid peroxidation에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 16 mU/ml XO/HX를 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 lipid peroxidation이 53.6% 증가하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 瓜蒌實 추출물을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 lipid peroxidation이 감소하여 XO/HX에 의한 독성을 방어하였으나 통계적으로 유의성은 나타나지 않았다 (Fig. 2).

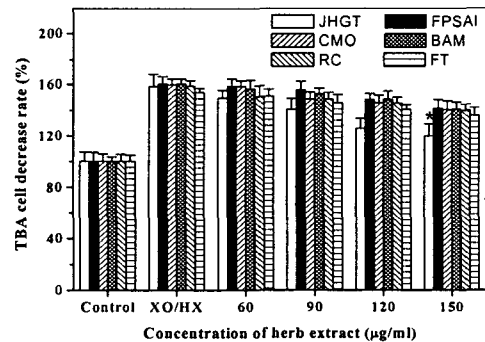


Fig. 2. Dose-response relationship of Jisilhaebaekgyejitang(JHGT), Fructus Ponciri Seu Aurantii Immaturus (FPSAI), Cortex Magnoliae Officinalis (CMO), Bulbus Allii Macrostemii (BAM), Ramulus Cinnamomi (RC) and Fructus Trichosanthis (FT) water extract for lipid peroxidation in cultured rat myocardial cells. Cultured rat myocardial cells were preincubated with various concentrations of herb extracts for 3 hours, and then exposed to 16 mU/ml XO in 0.1 mM HX for 48 hours. Amount of lipid peroxidation was measured by TBA fluorometric assay (TBARS). The values represent the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the XO/HX-treated group are marked with asterisk. *p<0.05

2. LDH 활성도 측정

1) XO/HX가 LDH 활성도에 미치는 영향

XO/HX의 농도에 따른 LDH 활성도를 측정하기 위하여 0.1 mM HX에 5~40 mU/ml 농도로 XO가 각각 포함된 배양액에서 심근세포를 48시간 동안 처리한 후 세포의 생존율을 LDH 활성도를 이용하여 대조군과 비교 조사하였다. 그 결과 처리한 농도

에 비례하여 LDH 활성도가 증가하여 세포의 생존율을 감소시켰으며 특히 20 mU/ml, 40 mU/ml XO 처리에서는 대조군에 비하여 통계적으로 유의한 증가를 나타냈다. MCV값은 20 mU/ml XO 처리에서 나타났다 (Fig. 3).

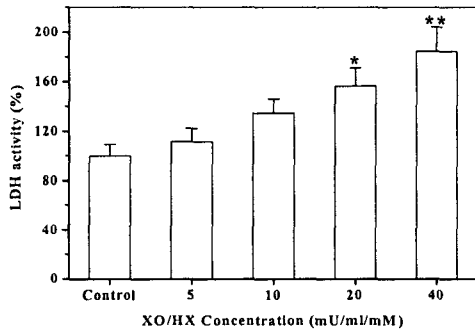


Fig. 3. Dose-response relationship of XO/HX on LDH activity in culture medium of rat myocardial cells. Cultured rat myocardial cells were exposed to various concentrations of XO in 0.1 mM HX for 48 hours. LDH release was measured at wavelength of 340 nm. The control value represents 136±1.42 umol/min/mg protein. The values are the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisk. *p<0.05, **p<0.01

2) XO/HX에 의해 증가한 LDH 활성도에 미치는 한약재의 효과
 배양 심근세포에 대한 XO/HX의 LDH 분비에 의한 세포독성에 대하여 枳實薤白桂枝湯, 枳實, 厚朴, 薤白, 桂枝, 瓜蒌實 추출물의 효과를 LDH 활성도의 측면에서 조사하기 위하여 0.1 mM HX에 MCV값인 20 mU/ml XO의 농도에서 48시간 동안 노출시키기 3시간 전에 각각 80~140 µg/ml의 한약재 추출물이 포함된 배양액에서 전처리한 후 세포외액내로 분비된 LDH의 양을 조사하였다.

枳實薤白桂枝湯의 경우 배양한 후 XO/HX를 처리하지 않고 枳實薤白桂枝湯 추출물을 농도별로 처리한 경우 LDH 활성도에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 20 mU/ml XO/0.1 mM HX을 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 60.3% 증가하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 枳實薤白桂枝湯 추출물을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 LDH 활성도가 감소하여 XO/HX에 의한 독성을 방어하였으며 특히 140 µg/ml 枳實薤白桂枝湯 추출물을 전처리한 경우에 枳實薤白桂枝湯 추출물을 전 처리하지 않고 XO/HX만을 처리한 군 160.3%에 비하여 119.8%(p<0.05)로 유의하게 감소하였다 (Fig. 4).

枳實의 경우 배양한 후 XO/HX를 처리하지 않고 枳實 추출물을 농도별로 처리한 경우 LDH 활성도에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 20 mU/ml XO/0.1 mM HX을 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 LDH 활성도가 158.2%로 증가하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 枳實 추출물을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 LDH 활성도가 감소하여 XO/HX에 의한 독성을 방어하였으나 통계적인 유의성은 나타나지 않았다 (Fig. 4).

厚朴의 경우 배양한 후 XO/HX를 처리하지 않고 厚朴 추출물을 농도별로 처리한 경우 LDH 활성도에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 20 mU/ml XO/0.1 mM HX을 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 163.2%로 LDH 활성도

가 증가하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 厚朴 추출물을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 LDH 활성도가 감소하여 XO/HX에 의한 독성을 방어하였으나 통계적인 유의성은 나타나지 않았다 (Fig. 4).

薤白의 경우 배양한 후 XO/HX를 처리하지 않고 薤白 추출물을 농도별로 처리한 경우 LDH 활성도에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 20 mU/ml XO/0.1 mM HX을 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 LDH 활성도가 168.2%로 증가하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 薤白 추출물을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 LDH 활성도가 감소하여 XO/HX에 의한 독성을 방어하였으나 통계적인 유의성은 나타나지 않았다 (Fig. 4).

桂枝의 경우 배양한 후 XO/HX를 처리하지 않고 桂枝 추출물을 농도별로 처리한 경우 LDH 활성도에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 20 mU/ml XO/0.1 mM HX을 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 LDH 활성도가 165.3%로 증가하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 桂枝 추출물을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 LDH 활성도가 감소하여 XO/HX에 의한 독성을 방어하였으나 통계적인 유의성은 나타나지 않았다 (Fig. 4).

瓜蒌實의 경우 배양한 후 XO/HX를 처리하지 않고 瓜蒌實 추출물을 농도별로 처리한 경우 LDH 활성도에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 20 mU/ml XO/0.1 mM HX을 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 LDH 활성도가 163.5%로 증가하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 瓜蒌實 추출물을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 LDH 활성도가 감소하여 XO/HX에 의한 독성을 방어하였으나 통계적인 유의성은 나타나지 않았다 (Fig. 4).

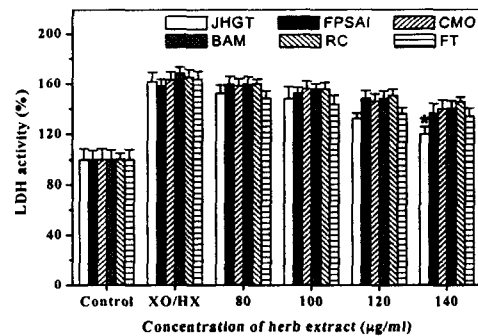


Fig. 4. Dose-response relationship of Jisilhaebaekgyeji-tang(JHGT), Fructus Ponciri Seu Aurantii Immaturus (FPSAI), Cortex Magnoliae Officinalis (CMO), Bulbus Allii Macrostemis (BAM), Ramulus Cinnamomi (RC) and Fructus Trichosanthis (FT) water extract for LDH activity in cultured rat myocardial cells. Cultured rat myocardial cells were preincubated with various concentrations of herb extracts for 3 hours, and then exposed to 20 mU/ml XO in 0.1 mM HX for 48 hours. LDH release was measured at wavelength of 340 nm. The values represent the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the XO/HX-treated group are marked with asterisk. *p<0.05

고찰

枳實薤白桂枝湯은 瓜蒌薤白白酒湯에서 白酒를 去하고 枳實 厚朴 桂枝를 加한 것으로 通陽散結하고 消痞除滿하는 효능이 있

어 胸痺氣結이 胸中에 있어서 心中이 痞滿하고, 氣가 脇下에서 上逆하여 搶心하는 胸痺의 重證을 치료하는 처방으로서⁹⁾ 枳實, 厚朴, 薤白, 桂枝, 瓜蒌實로 구성되어 있다.

다양한 심장질환의 원인의 하나인 심근 세포의 손상이 산소 자유기에 의하여 유발된다¹⁰⁾고 보고되어 있는데 산소자유기는 정상상태에서 산화·환원작용이나 사립체의 산화인산화작용에 의하여 소량 형성되어 항산화제인 superoxide dismutase(SOD)나 사립체와 세포질내의 glutathione peroxidase 및 catalase에 의하여 소실되어 진다²⁶⁾. 그러나 저산소증이나 허혈과 같은 병적인 상태에서 비정상적으로 생성된 산소자유기는 세포막의 지방을 과산화시킬 뿐만 아니라 각종 효소나 단백질을 불활성화시킴으로써 세포 및 조직의 손상을 초래하게 된다²⁶⁾. 최근의 연구에서 심근세포독성은 산소자유기에 의하여 유발된다고 보고된 바 있는데²⁶⁾, 산소자유기란 최외각 전자계도에 쌍을 이루고 있지 않은 홀수개의 전자가 존재하는 원자나 분자를 지칭하는 말로써 이러한 특수 구조 때문에 대단히 큰 반응성을 보여 생체내의 여러 가지 병태생리화학적 반응에 참여하고 있다²⁷⁻³¹⁾.

지질의 과산화반응은 보통 생성 산물인 Malondialdehyde (MDA)를 thiobarbituric acid(TBA)와 반응시켜 생성되는 붉은색의 물질(TBA reactive substance, TBARS)을 측정하여 표시하는데²⁵⁾ 지질과산화반응에서 XO/HX의 독성을 조사한 결과 농도의존적으로 TBARS양을 증가시켜 세포에 독성을 나타냈다(Fig. 1). 16 mU/ml XO의 농도에서 대조군에 비하여 TBARS가 약 50% 증가하여 枳實薤白桂枝湯과 구성약물을 60~150 µg/ml의 농도로 3시간 전처리한 후 16 mU/ml의 XO를 48시간 처리하여 XO/HX에 의해 증가한 TBARS에 대한 억제효과를 조사하였다. 그 결과 단백질 합성의 억제에 대한 방어효과에 나타난 효과와 같이 枳實薤白桂枝湯 추출물은 160 µg/ml의 농도에서 유의한 억제효과를 나타내고 단일약재는 유의한 억제효과를 나타내지 못하였다(Fig. 2). LDH는 살아있는 세포의 형질막의 손상으로 인하여 누출되는 효소이므로 세포막손상의 지표가 되는 효소이다. XO/HX는 농도의존적으로 LDH 활성도를 증가시킴으로서 세포독성을 나타냈다(Fig. 3). 이러한 XO/HX의 심근세포독성에 대하여 枳實薤白桂枝湯과 그 구성약물들은 억제효과를 나타냈으며 枳實薤白桂枝탕은 140 µg/ml의 농도에서는 유의한 억제효과가 나타났다. 구성약물은 약간의 억제효과가 나타났으나 통계적으로 유의한 억제효과를 나타내지 못하였다(Fig. 4). 이러한 결과는 처방을 구성하는 개별약재 각각의 효과를 통하여 이루어지는 것이 아니라 각각의 한약재들이 한의학적 君臣佐使 이론으로 구성되었을 효과적인 결과를 가져올 수 있음을 시사한다고 보여진다.

결 론

枳實薤白桂枝湯과 그의 구성약물인 枳實, 厚朴, 薤白, 桂枝 및 瓜蒌實 추출물이 산소자유기에 의한 심근세포 손상에 미치는 영향을 구명하기 위하여 백서에서 분리하여 배양한 심근세포에 이들 한약재 추출물을 전 처리한 후 xanthine oxidase/

hypoxanthine(XO/HX)의 세포독성효과와 이에 대한 방어효과를 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

XO/HX는 농도와 시간의존적으로 심근세포 생존율의 감소시켰으며 枳實薤白桂枝湯 추출물은 XO/HX에 의한 LDH 활성도와 lipid peroxidation의 증가를 유의하게 억제하였다.

이상의 결과에서 XO/HX는 심근세포에 독성을 나타냈으며 枳實薤白桂枝湯, 그 구성약물인 枳實, 厚朴, 薤白, 桂枝, 瓜蒌實을 전 처리하여 방어효과를 보여 주었다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술개발사업의 지원(00-PJ9-PG1-CO03-0001)에 의하여 이루어진 것임.

참고문헌

1. Chen K. : Certain progress in the treatment of coronary heart disease with traditional medicinal plants in china, Amer. J. Chin. Med., 9:193-196, 1981.
2. 全國韓醫科大學 心系內科學教室 編 : 東醫心系內科學(上), 서울, 書苑堂, pp.202-224, 448-455, 1995.
3. 醫學研究社 譯編 : (正統)金匱要略, 서울, 醫學研究社, pp.190-193, 1996.
4. 李克光 主編 : 金匱要略, 서울, 아울로스출판사, pp.218-225, 1994.
5. 李東建 編著 : (國譯)金匱要略, 서울, 書苑堂, pp.136-138, 1996.
6. 再先德 主編 : 金匱要略, 北京, 春秋出版社, pp.79-83, 1998.
7. 李文瑞 主編 : 金匱要略湯證論治, 北京, 中國科學技術出版社, pp.271-282, 1993.
8. 具本泓, 李京變, 裒亨變, 金永錫, 李源哲 共編著 : 東醫心系內科學, 서울, 書苑堂, p.58, 1992.
9. 李尙仁, 金東傑, 李暎鐘, 盧昇鉉, 朱榮丞 共編譯 : 方劑學, 서울, 圖書出版 永林社, pp.233-234, 1990.
10. Cao W., Carney J. M., Duchon A., Floyd R. A., Chevion M. : Oxygen free radical involvement in ischemia and reperfusion injury to brain. 88, pp.233-238, 1988.
11. Pellegrini-Giampietro D. E., Cherici G., Alesiani M., Carrla V., Moroni F. : Excitatory amino acid release from rat hippocampal slices as a consequence of free-radical formation, J. Neurochem. 51:1960-1963, 1988.
12. Pellegrini-Giampietro D. E., Cherici G., Alesiani M., Carrla V., Moroni F. : Excitatory amino acid and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage, J. Neurosci. 10:1035-1041, 1990.
13. Fridovich I. : Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. J. Biol. Chem. 245:4053-4057, 1970.
14. Killogg E. W. and Fridovich I. : Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymatically generated superoxide

- and hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 252:6721-6728, 1977.
15. Harber F. and Weiss J. : The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by anion salts. *Proc. Roy. Soc. London A.* 147:333-351, 1934.
 16. Graf E., Mahoney J. R., Bryant R. G. and Eaton J. W. : Iron-catalyzed hydroxyl radical formation: Stringent requirement for free iron coordination site. *J. Biol. Chem.* 259:3620-3624, 1984.
 17. 한동훈, 권강범, 황인진, 김우경, 김희찬, 오광수, 이호승, 류도곤 : 失笑散 전탕액이 XO/HX에 의해 손상된 배양 심근세포 박동수에 미치는 영향, *대한동의생리병리학회지* 15(4), 566-570, 2001.
 18. 손창식, 권강범, 정종선, 황인진, 김우경, 김희찬, 오광수, 이호승, 류도곤 : 丹參飲 전탕액이 산소자유기에 의해 손상된 심근세포의 LDH 활성도에 미치는 영향, *대한동의생리병리학회지* 15(4):621-625, 2001.
 19. 박준배, 권강범, 김우경, 오광수, 김인규, 이호섭, 기영운, 금경수, 류도곤 : 甘豆湯 및 加味甘豆湯 전탕액이 배양 심근세포의 LDH 활성도에 미치는 영향, *대한동의생리병리학회지* 15(5):730-734, 2001.
 20. 한동훈, 권강범, 김우경, 오광수, 김인규, 류도곤 : 失笑散 전탕액과 구성약물이 배양 심근세포의 LDH 활성도에 미치는 영향, *대한동의생리병리학회지* 15(5):770-774, 2001.
 21. 안효창, 권강범, 박은영, 장승호, 류도곤 : 瓜薤薤白半夏湯 추출물이 배양 심근세포의 박동수와 LDH 활성도에 미치는 영향, *대한동의생리병리학회지*, 16(2):289-295, 2002.
 22. 전영석, 권강범, 박은영, 성은경, 박승택, 류도곤 : 手拈散 전탕액이 배양심근세포에 미치는 영향, *대한동의생리병리학회지*, 16(2):353-358, 2002.
 23. 손창식, 권강범, 김상범, 이호승, 이호섭, 서은아, 류도곤 : 丹參飲전탕액이 心筋細胞 박동수에 미치는 영향, *대한동의생리병리학회지* 15(2):241-245, 2001.
 24. 박준배, 권강범, 이호승, 김희찬, 김우경, 오광수, 류도곤 : 甘豆湯 및 加味甘豆湯 전탕액이 배양 심근세포의 총단백질량에 미치는 영향, *대한동의생리병리학회지*, 15(3):459-463, 2001.
 25. Buege J. A., Aust S. D. : Microsomal lipid peroxidation. In "Methods in enzymology" Vol. 52, Academic Press, New York. p.306, 1978.
 26. Myers M. L., Bolli R., Lekich R. F., Hartley C. J., Roberts R. : Enhancement of recovery of myocardial function by oxygen free radical scavengers after reversible regional ischemia. *Circulation* 72:915-921, 1985.
 27. Fridovich, I. : The biology of oxygen radicals. *Sci.*, 201:875-880, 1978.
 28. Hertz F., Cloarec A. : Pharmacology of free radicals: Recent views on their action to inflammatory mechanism. *Life Sci.* 34:713-720, 1984.
 29. Klebanoff S.J. Oxygen metabolism and the toxic properties of phagocytes. *Ann. Int. Med.* 93:480-489, 1980.
 30. Mason R. P., Chignell C. F. : Free radicals in pharmacology and toxicology-Selected topics. *Pharmacol. Rev.* 33(4):189-211, 1982.
 31. McCord J. M., Fridovich I. : The biology and pathology of oxygen free radicals. *Ann. Int. Med.* 89:122-127, 1978.