

通靈散과 구성약물 추출물이 배양 심근세포에 미치는 영향

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

원광대학교 한의과대학 생리학교실

Effects of Tongryeong-san and Constituents Extract in Cultured Rat Myocardial Cells

Eun Kyung Seong, 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 TBARS assay and Beating rate in the presence of Tongryeong-san(TRS) extracts or single constituents of this prescription. Myocardial toxicity was evaluated in neonatal rat cardiocytes in cultures. In the present study, xanthine oxidase/hypoxanthine (XO/HX) resulted in a increase in lipid peroxidation and decreases in beating rate in cultured myocardial cells. In the effect of TRS extract, it showed the prevention from the XO/HX-induced cardiotoxicity by the increases of beating rate as well as the decrease of lipid peroxidation. In the protective effect of Faeces Trogopteroni(FT), Pollen Typhae(PT), Caulis Akebiae(CA) and Radix Paeoniae Rubra(PRR), all the extracts were significantly effective in the protection of XO/HX-induced cardiotoxicity in cultured myocardial cells by the increase of beating rate as well as th decrease of lipid peroxidation. From these results, they show that XO/HX is cardiotoxic in cultured myocardial cells derived from neonatal rat, and it suggests that TRS, FT, PT, CA and PRR extracts are positively effective in the blocking in XO/HX-induced cardiotoxicity.

Key words : Tongryeong-san(通靈散), Faeces Trogopteroni, Pollen Typhae, Caulis Akebiae, Paeoniae Rubra, xanthine oxidase/hypoxanthine, Myocardial cell, Cardiotoxicity

서 론

通靈散은 失笑散에 木通 赤芍藥을 加味한 처방로서 九種心痛을 治한다고 알려진 있으며¹⁾ 五靈脂, 蒲黃, 木通, 赤芍藥으로 구성되어 있다. 심장질환의 원인의 하나인 심근 세포의 손상이 산소자유기에 의하여 유발된다²⁾고 보고되어 있으며, 산소자유기는 xanthine 혹은 hypoxanthine이 oxygen에 의해서 산화되는데 이 반응은 xanthine oxidase에 의해서 촉매되어 superoxide radical(O⁻²)과 hydrogen peroxide(H₂O₂)가 생성되며^{3,4)} 또한 철(iron)과 반응하여 hydroxyl radical(OH)을 생성한다^{5,6)}. 산소자유기는 최외각 전자궤도에 쌍을 이루고 있지 않는 홀수개의 전자가 존재하는 원자나 분자를 지칭하는 것으로서 이러한 특수구조 때문에 대단히 큰 반응성을 보여 생체내의 여러 가지 병태생리적인 반응에

관여하고 있어, 생체막의 불포화지방산을 과산화시키거나 단백질, DNA를 변화시킨다⁶⁻⁹⁾. 특히, 산소자유기는 흥분성아미노산(excitatory amino acid, EAA)의 분비를 촉진시키고^{8,9)}, 세포내 Ca²⁺의 농도를 증가시켜 결국 세포의 사멸을 초래한다^{10,11)}.

최근에 한약재가 산소자유기에 대한 심근세포 독성을 방어한다는 실험적 보고가 있는데¹²⁻²⁰⁾ 권 등¹²⁾은 沒藥 추출물이 산소자유기에 의한 심박동수 감소와 Lactate dehydrogenase(LDH)의 누출증가를 차단하였다고 하였고 손 등¹⁴⁾은 丹參飲과 그 구성약물의 추출물이 XO/HX에 의한 심박동수의 감소를 효과적으로 증가시켰다고 보고하였으며 특히 한 등^{13,16)}은 失笑散 추출물의 산소자유기의 산화적 손상에 대한 항산화효과를 보고하였으나 본 처방에 대한 연구는 접할 수 없었다.

이에 저자는 通靈散과 그 구성약물인 五靈脂, 蒲黃, 木通, 赤芍藥이 산소자유기로 손상된 배양 심근세포에 미치는 방어효과를 심근세포 박동수 측정, Lipid peroxidation 정량을 통하여 조사한 결과 유의성을 나타내 보고하는 바이다.

* 교신저자 : 류도곤, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의과대학
· E-mail : tkryu@wonkwang.ac.kr · Tel : 063-850-6846
· 접수 : 2003/04/24 · 수정 : 2003/06/09 · 채택 : 2003/07/23

재료 및 방법

1. 실험동물

동물은 Sprague Dawely 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 1,000rpm 에서 20분간 원침시켰다. 심장조직을 0.05% trypsin으로 20분 동안 항온기에 넣은 다음 Pasteur pipette으로 3, 4회 분쇄한 후 800×g에서 10분간 원침시킨다. 원침된 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 교환 하여 주었으며 산소자유기가 포함되지 않은 배양액을 대조군으로 하여 비교 조사하였다. 실험전 배양액을 버리고 세포를 PBS로 3-4 회 세척하였으며 세포는 배양 7일 후 본 실험에 사용하였다.

3. 추출물의 제조

실험에 사용한 약제는 五靈脂 75g, 蒲黃 75g, 木通 37.5g, 赤芍藥 37.5g을 합한 通靈散(Tongryeongsan, TRS) 225.0g과 개별 약재인 五靈脂(Faeces Trogopterori, FT), 蒲黃(Pollen Typhae, PT), 木通(Caulis Akebiae, CA), 赤芍藥(Radix Paeoniae Rubra, RPR) 각각 200g을 9배용의 3차증류수와 함께 환저플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 3시간 동안 전열기로 전탕한 후 3,000rpm 에서 20분간 원심분리하고 회전 진공 농축기로 감압농축한 후 동결건조기에서 건조하여 각각 通靈散 28.64g, 五靈脂 18.11g, 蒲黃 24.44g, 木通 14.22g, 赤芍藥 56.6g의 분말 시료를 얻었다. 처방의 내용을 도표화하면 다음과 같다.(Table 1)

Table 1. Prescription of Tongryeongsan

韓藥名	Pharmacognostic Name	Weight(g)
五靈脂	Faeces Trogopterori	75
蒲黃	Pollen Typhae	75
木通	Caulis Akebiae	37.5
赤芍藥	Radix Paeoniae Rubra	37.5
Total Weight		225

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 한약재 추출물을 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 검정

1) 심근세포 박동수(beatting rate, BR) 측정²¹⁾

배양 심근세포의 BR의 측정을 위하여 일정 시간 배양한 심근세포에 여러 농도의 XO/HX이 포함된 배양액에서 24시간 동안 배양한 후 약제가 포함되지 않은 배양액을 대조군으로 하여 분당 심근세포의 박동수를 대조군과 비교하였다.

2) Lipid peroxidation 정량²²⁾

XO/HX과 한약재를 일정시간 동안 처리한 후 배양 심근세포의 상층액과 세포용해액내의 TBARS (thiobarbituric acid reactive substances)를 측정하는 것으로, 위의 액에 12N H_2SO_4 와 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 원침하여 이를 제거한 다음 553nm에서 형광측정법에 의해 측정하였다.

7. 통계처리

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

실험성적

1. 심근세포 박동수

1) XO/HX가 심근세포 박동수에 미치는 영향

XO/HX의 농도에 따른 심근세포 박동수를 측정하기 위하여 0.1 mM HX에 5~30 mU/ml XO의 농도가 각각 포함된 배양액에서 심근세포를 72시간 동안 처리한 후 세포의 박동수 변동을 대조군과 비교 조사하였다. 그 결과 처리한 XO의 농도에 비례하여 박동수가 감소하였으며 25 mU/ml, 30 mU/ml XO의 처리에서는 심근박동수가 대조군100% (110 ± 9.5 beats/min)에 비하여 각각 46.4% ($p < 0.05$), 34.5% ($p < 0.01$)로 통계적으로 유의한 감소를 나타냈다 (Fig. 1).

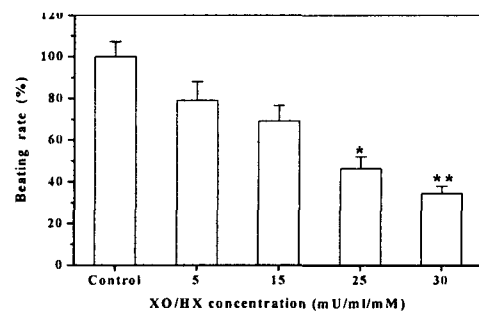


Fig. 1. Dose-response relationship of XO/HX on beating rate in cultured rat myocardial cells. Cultured rat myocardial cells were treated with various concentrations of XO in 0.1 mM HX for 72 hours. Beating rate was measured by count of beating frequency per minute. Control value represent 110 ± 9.5 beats/min. The values are the mean \pm SE for 6 experiments. Significant differences from the control are marked with asterisk. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

2) XO/HX에 의해 감소한 심근세포 박동수에 미치는 한약재의 효과

배양 심근세포에 대한 XO/HX의 세포독성에 대한 通靈散과 그 구성약물인 五靈脂, 蒲黃, 木通, 赤芍藥 추출물의 효과를 심근세포 박동수의 측면에서 조사하기 위하여 XO/HX의 MCV값인 25 mU/ml 농도에서 72시간 동안 노출시키기 3시간 전에 각각 90~120 µg/ml의 한약재 추출물이 포함된 배양액에서 전처리한 후 심근세포 박동수를 조사하였다.

通靈散의 경우 배양한 후 XO/HX를 처리하지 않고 通靈散 추출물을 농도별로 처리한 경우 심근세포 박동수에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 25 mU/ml XO/0.1 mM HX를 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 42.9%로 감소하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 通靈散 추출물을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 심근세포 박동수 감소효과가 감약되어 XO/HX에 의한 독성을 방어하였다. 특히 110 µg/ml, 120 µg/ml 通靈散 추출물을 전처리한 경우에 대조군에 비하여 각각 80.2%($p<0.05$), 94.4%($p<0.01$)로 XO/HX에 의한 심근박동수의 억제를 유의하게 방어하였다 (Fig. 2).

五靈脂의 경우 배양한 후 XO/HX를 처리하지 않고 五靈脂 추출물을 농도별로 처리한 경우 심근세포 박동수에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 25 mU/ml XO/0.1 mM HX를 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 심근세포 박동수가 43.2%로 감소하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 五靈脂 추출물을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 심근세포 박동수가 증가하여 XO/HX에 의한 독성을 방어하였으며 특히 110 µg/ml, 120 µg/ml 五靈脂 추출물을 전처리한 경우에 대조군에 비하여 각각 75.2%($p<0.05$), 87.0% ($p<0.01$)로 XO/HX에 의한 심근세포 박동수의 억제를 유의하게 방어하였다 (Fig. 2).

蒲黃의 경우 배양한 후 XO/HX를 처리하지 않고 蒲黃 추출물을 농도별로 처리한 경우 심근세포 박동수에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 25 mU/ml XO/0.1 mM HX를 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 심근세포 박동수가 41.4%로 감소하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 蒲黃 추출물을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 심근세포 박동수가 증가하여 XO/HX에 의한 독성을 방어하였으며 특히 120 µg/ml 蒲黃 추출물을 전처리한 경우에 대조군에 비하여 76.7%($p<0.05$)로 증가하여 XO/HX에 의한 심근박동수의 억제를 유의하게 방어하였다 (Fig. 2).

木通의 경우 배양한 후 XO/HX를 처리하지 않고 木通 추출물을 농도별로 처리한 경우 심근세포 박동수에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 25 mU/ml XO/0.1 mM HX를 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 심근세포 박동수가 40.0%로 감소하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 木通 추출물을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 심근세포 박동수가 증가하여 XO/HX에 의한 독성을 방어하였으나 통계적인 유의성은 나타나지 않았다 (Fig. 2).

赤芍藥의 경우 배양한 후 XO/HX를 처리하지 않고 赤芍藥 추출물을 농도별로 처리한 경우 심근세포 박동수에 유의한 변화

는 나타나지 않았다. 25 mU/ml XO/0.1 mM HX를 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 심근세포 박동수가 51.5%로 감소하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 赤芍藥 추출물을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 심근세포 박동수가 증가하여 XO/HX에 의한 독성을 방어하였으나 통계적인 유의성은 나타나지 않았다 (Fig. 2).

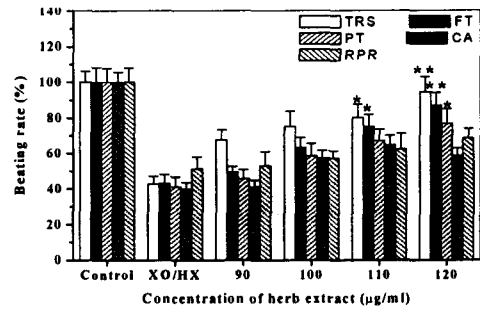


Fig. 2. Dose-response relationship of Tongryeongsan(TRS), Faeces Trogopterori (FT), Pollen Typhae (PT), Caulis Akebiae (CA) and Radix Paeoniae Rubra (PRR) for beating rate in cultured rat myocardial cells. Cultured rat myocardial cells were preincubated with various concentrations of agents for 3 hours, and then exposed to 25 mU/ml XO in 0.1 mM HX for 72 hours. Beating rate was measured by count of beating number per minute. The values represent the mean±SE for 6 experiments. Significant differences from the XO/HX-treated group are marked with asterisk. * $p<0.05$; ** $p<0.01$

2. Lipid peroxidation 정량

1) XO/HX가 lipid peroxidation에 미치는 영향

XO/HX의 농도에 따른 lipid peroxidation을 측정하기 위하여 0.1 mM HX에 5~35 mU/ml의 농도로 XO가 각각 포함된 배양액에서 심근세포를 72시간 동안 처리한 후 TBARS와 세포의 생존율을 대조군과 비교 조사하였다. 그 결과 처리한 농도에 비례하여 세포생존율의 감소와 TBARS의 증가를 보였다. 특히 25 mU/ml, 35 mU/ml XO 처리에서는 대조군에 비하여 각각 149.3% ($p<0.05$), 194.3%($p<0.01$)로 TBARS의 유의한 증가를 나타냈다. MCV값은 25 mU/ml XO 처리에서 나타났다 (Fig. 3).

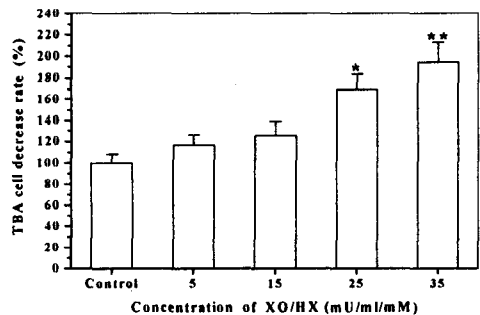


Fig. 3. Dose-response relationship of XO/HX on lipid peroxidation in cultured rat myocardial cells. Cultured rat myocardial cells were exposed to various concentrations of XO in 0.1 mM HX for 72 hours. Thiobarbituric acid(TBA) fluorometric assay was adopted to analyse lipid peroxidation and TBA reactive 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 한약재의 효과

배양 심근세포에 대한 XO/HX의 세포독성에 대한 通靈散과

그 구성약물인 五靈脂, 蒲黃, 木通, 赤芍藥 추출물의 효과를 TBA fluorometric assay를 통하여 lipid peroxidation양의 측면에서 조사하기 위하여 MCV값인 25 mU/ml XO/0.1 mM HX의 농도에서 72시간 동안 노출시키기 3시간 전에 각각 40~100 µg/ml의 한 약재 추출물이 포함된 배양액에서 전처리한 후 이의 방어효과를 조사하였다.

通靈散의 경우 배양한 후 XO/HX를 처리하지 않고 通靈散 추출물을 농도별로 처리한 경우 lipid peroxidation에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 25 mU/ml XO/HX를 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 63.5%가 증가하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 通靈散 추출물을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 lipid peroxidation이 감소하여 XO/HX에 의한 독성을 방어하였으며 특히 100 µg/ml 通靈散 추출물을 전 처리한 경우에 通靈散 추출물을 전 처리하지 않고 XO/HX만을 처리한 군에 비하여 통계적으로 유의하게 감소하였다 (Fig. 4).

五靈脂의 경우 배양한 후 XO/HX를 처리하지 않고 五靈脂 추출물을 농도별로 처리한 경우 lipid peroxidation에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 25 mU/ml XO/HX를 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 lipid peroxidation이 59.4% 증가하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 五靈脂 추출물을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 lipid peroxidation이 감소하여 XO/HX에 의한 독성을 방어하였으며 특히 100 µg/ml 五靈脂 추출물을 전 처리한 경우에 五靈脂 추출물을 전 처리하지 않고 XO/HX만을 처리한 군에 비하여 통계적으로 유의하게 감소하였다 (Fig. 4).

蒲黃의 경우 배양한 후 XO/HX를 처리하지 않고 蒲黃 추출물을 농도별로 처리한 경우 lipid peroxidation에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 25 mU/ml XO/HX를 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 lipid peroxidation이 46.9% 증가하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 蒲黃 추출물을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 lipid peroxidation이 감소하여 XO/HX에 의한 독성을 방어하였으나 통계적으로 유의성은 나타나지 않았다 (Fig. 4).

木通의 경우 배양한 후 XO/HX를 처리하지 않고 木通 추출물을 농도별로 처리한 경우 lipid peroxidation에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 25 mU/ml XO/HX를 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 lipid peroxidation이 34.8% 증가하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 木通 추출물을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 lipid peroxidation이 증가하여 XO/HX에 의한 독성을 방어하였으며 특히 100 µg/ml 木通 추출물을 전 처리한 경우에 木通 추출물을 전 처리하지 않고 XO/HX만을 처리한 군에 비하여 통계적으로 유의하게 감소하였다 (Fig. 4).

赤芍藥의 경우 배양한 후 XO/HX를 처리하지 않고 赤芍藥 추출물을 농도별로 처리한 경우 lipid peroxidation에 유의한 변화는 나타나지 않았다. 25 mU/ml XO/0.1 mM HX를 처리한 경우 XO/HX를 처리하지 않은 경우에 비하여 lipid peroxidation이 증가하여 세포에 독성을 나타냈다. 그러나 赤芍藥 추출물을 전 처리한 경우 처리한 농도에 비례하여 lipid peroxidation이 감소

하여 XO/HX에 의한 독성을 방어하였으나 통계적으로 유의성은 나타나지 않았다 (Fig. 4).

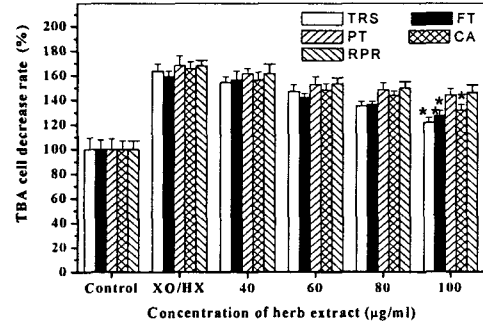


Fig. 4. Dose-response relationship of Tongryeongsan (TRS), Faeces Trogopteri (FT), Pollen Typhae (PT), Caulis Akebiae (CA) and Radix Paeoniae Rubra (RPR) for lipid peroxidation in cultured rat myocardial cells. Cultured rat myocardial cells were preincubated with various concentrations of herb extracts for 3 hours, and then exposed to 25 mU/ml XO in 0.1 mM HX for 72 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, **p<0.01

고찰

通靈散¹⁾은 五靈脂, 蒲黃, 木通 및 赤芍藥으로 구성되어 있는 처방으로서 구종심통을 치하는 처방으로 알려져 있다. 구성약물들의 효능 및 실험적 보고를 살펴보면 五靈脂는 鼯鼠科(하늘다람쥐과; Patauristidae)에 속한 脊椎動物인 하늘다람쥐 및 날쥐 등의 糞便으로서 苦·甘, 溫 無毒하고 肝經에 작용하며 活血止痛·散瘀止血·解毒 등의 효능이 있어 痛經, 經閉, 產後腹痛, 胸脇痛, 撲損瘀痛 등의 병증을 치료하며 성분은 다량의 수지와 노산을 함유하고 있어²³⁻²⁶⁾ 時²⁷⁾와 丘²⁸⁾는 調經劑로서 婦科血分要藥이라 하였다.

본 실험에 사용된 산소자유기인 xanthine oxidase/hypoxanthine(XO/HX)는 Zhang 등의 보고²⁹⁾에 의하면 LDH 활성도를 증가시키고 심근세포 박동수를 감소시키며 ATP 양을 감소시켜 심근세포에 독성을 일으킨다 하였다. 산소자유기는 정상 상태에서 산화·환원작용이나 사립체의 산화인산화작용에 의하여 소량 형성되며 항산화제인 superoxide dismutase (SOD)나 사립체와 세포질내의 glutathione peroxidase 및 catalase에 의하여 소실되고³⁰⁾, 저산소증이나 허혈과 같은 병적인 상태에서 비정상적으로 생성된 산소자유기는 세포막의 지방을 과산화시킬뿐만 아니라 각종 효소나 단백질을 불활성화시킴으로써 세포 및 조직의 손상을 초래하게 된다²⁾. 최근 산소자유기의 독성에 대한 한약재 추출물의 방어효과가 많이 보고되고 있다¹³⁻²⁰⁾. 본 실험은 구종심통에 사용되고 있는 通靈散(1)과 그 구성약물인 五靈脂, 蒲黃, 木通 및 赤芍藥의 XO/HX에 의하여 유도된 심근세포 독성에 대한 방어효과를 조사하였다. Takahashi 등²¹⁾은 심근세포 박동수의 조사는 심근세포의 손상을 예측할 수 있는 지표라 하였다. XO/HX는 처리한 농도에 비례하여 심근세포 박동수가 감소하여 (Fig. 1) 한 등의 결과^{13,17,19)}와 일치하였다. XO/HX에 의해 감소한 심근세포 박동수에 대하여 90 µg/ml ~ 120 µg/ml의 通靈散 추출물을 전처

리하여 방어효과를 조사한 결과 농도의존적으로 심근세포 박동수의 감소가 억제되어 방어효과를 나타냈으며 특히 110 $\mu\text{g/ml}$, 120 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 유의한 억제를 나타냈으며 구성약물 중 五靈脂 추출물 110 $\mu\text{g/ml}$, 120 $\mu\text{g/ml}$, 蒲黃 추출물 120 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 전처리 한 군에서 유의한 방어효과를 나타냈다(Fig. 2). 위의 결과는 XO/HX에 의한 심근세포 박동수의 감소에 대한 방어효과가 通靈散 추출물에서 나타났으며 이러한 방어효과는 通靈散 구성약물 중 五靈脂가 주된 역할을 하는 것으로 나타났다. 지질의 과산화반응은 보통 생성 산물인 Malondialdehyde (MDA)를 thiobar-bituric acid(TBA)와 반응시켜 생성되는 붉은색의 물질(TBA reactive substance, TBARS)을 측정하여 표시하는데²²⁾ 지질 과산화반응에서 XO/HX의 독성을 조사한 결과 농도 의존적으로 TBARS양을 증가시켜 세포에 독성을 나타냈다(Fig. 3). 25 mU/ml XO의 농도에서 대조군에 비하여 TBARS가 약 50% 증가하여 通靈散과 구성약물을 40~100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 3시간 전처리 한 후 25 mU/ml의 XO를 72시간 처리하여 XO/HX에 의해 증가하는 TBARS에 대한 억제효과를 조사하였다. 그 결과 通靈散 추출물은 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 유의한 억제효과를 나타냈으며 구성약물 중 木通 추출물이 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 유의한 억제효과를 나타냈으며 다른 구성약물들은 통계적으로 유의한 억제효과를 나타내지 못하였다(Fig. 4). 앞으로 通靈散의 산소자유기에 의한 심근세포 손상에 대한 방어효과에 대한 다른 지표나 진행된 연구내용을 통하여 실험이 지속되어야 할 것으로 생각된다.

결 론

通靈散과 그의 구성약물인 五靈脂, 蒲黃, 木通, 赤芍藥 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 생존율과 심근세포 박동수의 감소를 나타냈으며 通靈散 추출물은 XO/HX에 의한 지질과산화의 증가와 심근세포 박동수의 감소를 유의하게 방어하였고 通靈散 구성약물인 五靈脂 蒲黃 木通 및 赤芍藥 추출물은 XO/HX에 의하여 유발된 심근세포 독성에 대하여 고농도에서 유의한 방어효과를 나타냈다.

이상의 결과에서 XO/HX는 심근세포에 독성을 나타냈으며 通靈散, 그 구성약물인 五靈脂, 蒲黃, 木通, 赤芍藥을 전처리하여 유의한 방어효과를 보여 주었다. 이러한 결과는 단일약재보다 복합처방이 효과적임을 시사하며 이러한 상호간의 효과비교는 다른 지표나 in vivo 등의 진행된 실험에서 지속적으로 연구하여 구명되어야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

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

참고문헌

1. 윤용갑 : 동의방제와 처방해설, 서울, 의성당, p.503, 1998.
2. Cao W., Carney J. M., Duchon A., Floyd R. A. and Chevion M. : Oxygen free radical involvement in ischemia and reperfusion injury to brain. 88, pp. 233-238, 1988.
3. Fridovich I. : Quantitative aspects of the production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. J. Biol. Chem., 245:4053-4057, 1970.
4. 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.
5. Harber F. and Weiss J. : The catalytic decomposition of hydrogen peroxide by anion salts. Proc. Roy. Soc. London A. 147:333-351, 1934.
6. 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.
7. 姜益鉉 : 天麻鉤藤飲이 腦組織의 生化學的 變化에 미치는 影響, 圓光大學校 大學院, 1996.
8. Pellegrini-Giampietro D. E., Cherici G., Alesiani M., Carla V., Morroni F. : Excitatory amino acid release from rat hippocampal slices as a consequence of free-radical formation. J. Neurochem., 51:1960-1963, 1988.
9. Pellegrini-Giampietro D. E., Cherici G., Alesiani M., Carla V., Morroni F. : Excitatory amino acid and free radical formation may cooperate in the genesis of ischemia-induced neuronal damage. J. Neurosci., 10:1035-1041, 1990.
10. Mayer M. L., Westbrook G. L. : Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurons. J. Physiol., 394:501-527, 1987.
11. Zeman S., Liloyd C., Meldrum B., Leigh PN.: Excitatory amino acid, free radicals and yhe pathogenesis of motor neuron disease, Neuropathol. Appl. Neurobiol., 20:219-231, 1994.
12. Kang Beom Kwon, Hyun Ik Jo, Gu Hwan Kim, Sang Beom Kim, Ho Sub Lee, Woo Jun Hwang, Seung Taek Park, Do Gon Ryu. Effects of Myrrha Water Extract on Rat Myocardial Cells in Cultures. J. Korean Oriental. Med. 21(2):79-86, 2000.
13. 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.
14. 손창식, 권강범, 정종선, 황인진, 김우경, 김희찬, 오광수, 이호승, 류도곤 : 丹參飲 전탕액이 산소자유기에 의해 손상된 심근세포의 LDH 활성도에 미치는 영향, 대한동의생리병리

- 학회지 15(4):621-625, 2001.
15. 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.
 16. 한동훈, 권강범, 김우경, 오광수, 김인규, 류도곤 : 失笑散 전탕액과 구성약물이 배양 심근세포의 LDH 활성도에 미치는 영향, 대한동의생리병리학회지 15(5):770-774, 2001.
 17. 안효창, 권강범, 박은영, 장승호, 류도곤 : 瓜蒌薤白半夏湯 추출물이 배양 심근세포의 박동수와 LDH 활성도에 미치는 영향, 대한동의생리병리학회지, 16(2):289-295, 2002.
 18. 전영석, 권강범, 박은영, 성은경, 박승택, 류도곤 : 手拈散 전탕액이 배양심근세포에 미치는 영향, 대한동의생리병리학회지, 16(2):353-358, 2002.
 19. 손창식, 권강범, 김상범, 이호승, 이호섭, 서은아, 류도곤 : 丹參飲전탕액이 心筋細胞 박동수에 미치는 영향, 대한동의생리병리학회지 15(2):241-245, 2001.
 20. 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.
 21. K. Takahashi, Y. Fujita, T. Mayumi, T. Hama, T. Kishi : Effect of adriamycin on cultured mouse embryo myocardial cells. Chem. Pharm. Bull., 35(1) 326-334, 1987.
 22. Buege J. A., Aust S. D. : Microsomal lipid peroxidation. In "Methods in enzymology". Vol. 52, Academic Press, New York. p.306, 1978.
 23. 辛民教 : 臨床本草學. 서울, 영림출판사. pp.728-729, 1997.
 24. 申佶求 : 申氏本草學, 壽文社, 서울, pp.534,540, 1975.
 25. 陸昌洙, 安德均 : 現代本草學, 서울, 高文社, p.347,351, 1975.
 26. 李尙仁 : 本草學, 서울, 醫藥社, p.432,438, 1975.
 27. 時逸人 : 中國藥物學, 香港, 千頃堂, p.252,290, 1961.
 28. 丘晨波 : 中藥新編, 香港, 太平書局, p.309, 1968.
 29. Zhang R., Pinson A., Samuni A. : Both hydroxylamine and nitroxide protect cardiomyocytes form oxidative stress. Free Radical Biology & Medicine, 24(1):66-75, 1998.
 30. Vanncci R. C., Vasta F., Vannucci S. J. : Cerebral metabolic response of hyperglycemic immature rats to hypoxia-ischemia. Pediatr. Res. 21:524-529, 1987.