

온담탕이 고혈압 백서와 인간유래 혈관내피세포주(ECV 304)에 미치는 영향

백일성, 박창국, 박치상, 이소연, 윤현덕, 신오철
대구한의대학교 한의학과 내과학전공

Abstract

An Experimental Study of Effect on ECV 304 Cells, Platelet Rich Plasma and Rats treated with L-NAME by *Ondamtang* extract

Il-Sung Baek, Chang-Gook Park, Chi-Sang Park, So-Yeon Lee,
Hyeon-Deok Yoon, Wo-Chul Shin

Department of Oriental Medicine Graduate school of Daegu Haany University
Gyeongbuk, Korea

Nitric oxide(NO) play an important role in normal and pathophysiological cells including as a messenger molecule, neurotransmitter, microbicidal agent, or dilator of blood vessels and arteriosclerosis, hypertension, myocardial infarction, respectively.

To investigate that *Ondamtang* in the potential contribution of the levels of nitric oxide generated by endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and the mechanisms of protection against L-NAME, human ECV304 cells, which normally do not express eNOS, were expressed by L-NAME. L-NAME stimulated rat or cells were found to be resistant to injury and delayed death following the *Ondam-tang*. Inhibition of nitric oxide synthesis abolished the protective effect against L-NAME, thrombin and collagen exposure.

교신저자 : 박 치 상

대구광역시 수성구 상동 대구한의대학교 심계내과학 교실

Tel: 053-770-2179, 011-506-3079, E-mail: stephano@dhu.ac.kr

접수 : 2004/ 12/ 15 채택 : 2004/ 12/ 27

Interestingly, such effects have been observed during stimulation with agents such as KCl on L-NAME mediated rats, were damaged by the NOS inhibitor NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME).

Cardiovascular diseases is one of the blood vessels and renin-angiotensin system dysfunction. So we studied on herbal medicine that have a relation of vessels endothelium necrosis. In Oriental Medicine, *Ondam-tang* has been used for disease in relation to cardiovascular system. We studied on the protection and inhibitory effects of cardiovascular diseases in L-NAME induced rat or ECV304 cell lines through the Cell morphological pattern, Tunel assay, LDH activity, heart rate, blood pressure and immunohistochemistic analysis by *Ondam-tang*.

As the result of this study, In group, the anti-apoptosis and necrosis in the cardiovascular system have a potential capacity for prevented, protected and treating the diseases of cardiovascular system, against the necrosis of rat and ECV304 cells with eNOS and calpain expression by L-NAME is promoted.

Key Word : *Ondamtang*, hypertension, myocardial infarction, ECV304, collagen, thrombin

I. 緒 論

심장을 비롯하여 동맥에서 모세혈관에 이르기까지 우리 몸의 각 부분에 혈액을 순환시키는 기관을 모두 합쳐 심혈관계통 혹은 심혈관계라고 하며 심장 및 혈관에 생기는 질병을 심혈관 질환이라고 한다¹⁻²⁾. 최근 급격한 경제의 발전, 사회적 여건의 변화, 식생활의 변화, 인구구조의 노령화 등으로 인하여 폐원성 심장병, 심내막염, 부정맥, 동맥경화증, 고혈압성 심장병, 허혈성 심장질환 등 심혈관계 질환이 급속히 증가하는 추세이다³⁻⁴⁾.

심혈관계를 총체적으로 유지하는데 중요한 조직인 혈관내피세포(Endothelium)는 주로 혈관 운동성 및 투과성, 혈액응고와 분해, 염증세포나 혈관 평활근 세포의 이동이나 증식을 조절함으로써 혈관의 항상

성을 유지시킨다⁵⁾. 혈관내피세포의 생존과 기능을 유지하는데 중요한 인자로 알려져 있는 nitric oxide(NO)를 생성하는 효소인 nitric oxide synthase(NOS)의 작용을 저해하는 L-NAME는 심장이나 혈관에서 NO가 생성될수록 혈압이 감소하고 반대로 NO가 감소할 경우 혈압이 상승하면서 심혈관 질환을 야기한다는 연구가 보고되었다⁹⁻¹²⁾.

일반적으로 증가추세에 있는 동맥경화, 대동맥협착증, 판막질환, 심장경색 등은 만성적인 염증과 면역세포의 cytokine의 분비, 화학적, 물리적으로 손상받은 혈관의 부위에 혈소판의 점착-->방출-->응집반응이라는 일련의 혈소판 활성화반응이 일어나는데 collagen, thrombin, ADP을 가하면 연쇄적으로 혈전이 유도되거나 근육세포의 단백질 분비에 의해 혈전을 유도하는 일련의 과정이 일어나 과산화지질화에 의

한 혈관내피세포 파괴가 발생한다¹¹⁻¹⁴⁾.

또한 혈관내피세포는 여러 자극에 의하여 기능이상이 초래되면 항혈전성의 소실과 함께 백혈구와의 친화력이 강해지면서 혈전을 형성하게 되는데⁶⁻⁸⁾ 이러한 과정을 거쳐 생성된 혈전이 고혈압이나 동맥경화증, 심혈관질환 등을 일으키는데 중요한 역할을 함은 주지의 사실이다⁸⁾.

한편 溫膽湯은 唐代 孫思邈의 <備急千金要方¹⁵⁾>에 처음 수록된 이래 역대의가들에 의해 心膽虛怯을 치료하는데 다용되어 왔는데¹⁶⁻⁸⁾ 최근에는 본방을 心膽虛怯을 동반하는 심장병 및 고혈압, 신경쇠약, 노인성 치매, 현훈, 전증에 응용하고 있다¹⁹⁻²⁷⁾.

그동안 溫膽湯에 관한 연구로는 金²⁸⁾이 중추억제작용이 있음을, 嚴²⁹⁾은 수면시간을 연장시킴을, 任³⁰⁾은 강심작용이 있음을 보고하였으나 溫膽湯이 고혈압에 미치는 영향 및 혈관내피세포의 과사방어 효과에 관한 연구는 아직 보고된 바가 없다.

이에 저자는 溫膽湯의 심혈관계 질환에 미치는 영향을 규명하기 위하여 인간유래 혈관내피(ECV 304) 세포주와 혈소판 혈장을 이용하여 collagen과 thrombin으로 유도한 혈소판 응집과 혈관내피세포사에 대한 溫膽湯 수추출물의 영향을 연구하였다. 또한 저자는 백서에서 L-NAME로 유도한 고혈압 실험모델을 이용하여 심박동수, 혈압, 혈관내피세포에 대한 영향 등을 연구하여 유의한 결과를 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

Ⅱ. 實 驗

1. 材料

1) 動物

본 연구는 (주)중앙실험동물로부터 구입한 체중 200~250g의 Sprague-Dawley계 백서 암컷을 대상으로 실험을 실시하였으며 항온 항습 (20±1℃, 55±3%)의 조건하에서 물과 사료는 제한하지 않고 공급하면서 사육하였다.

2) 試料의 調製

본 실험에 사용한 溫膽湯(Ondam-tang; ODT)은 총 용량 1.8 kg을 대구한의대학교 부속 대구한방병원 약제과에서 엄선하여 細末한 다음 3차 증류수 10l를 첨가하여 85℃에서 6시간 전탕 후 식혀 2,000ml로 농축시켰다. 이를 gauze로 1차 여과 후 -70℃(Deep Freezer)에서 12시간 동결시켜 Freeze Dryer로 동결 건조하여 200g을 회수하여 실험에 사용하기 전까지 -80℃에 보관하다가 실험에 사용하기 직전에 3차 증류수로 적당한 농도로 희석한 후 실험에 사용하였다.

溫膽湯 1貼의 藥物 구성은 다음과 같다 (Table. 1).

3) 試藥

실험에 필요한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), 항생제 (penicillin/streptomycin; P/S), trypsin 및 fetal bovine serum (FBS)은 Gibco BRL Co. (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며, 배양용기인 96 well plate, 10Cm culture dish는 Falcon Co.(Lincoln, USA)

에서 구입하여 사용하였다. methylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), Hoechst 33258, L-NAME, collagen type I, sodium citrate, thrombin은 Sigma Co.(St. Louis, USA)에서, anti rabbit/mouse 결합 calpain, eNOS-conjugated antibody는 Santa Cruz Co.(NY, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2. 方法

1) 溫膽湯이 ECV 304 세포주의 세포사에 미치는 영향

① ECV 304 세포주의 배양

본 실험에 사용된 ECV 304 세포주는 충북대학교 의과대학에서 분양받아 계대배양시킨 다음 5% FBS와 항생제를 함유하는 DMEM 배지에서 penicillin/streptomycin을 첨가하여 flask에 배양한 세포를 96Well plate의 well당 분주하여 37°C에서 하룻밤 배양하여 80% 정도 조밀하게 배양한 다음 serum free medium (SFM)으로 2회 세척한 후 1ml SFM을 첨가하여 사용하였다.

② ECV 304 세포주의 세포증식도 측정

ECV 304 세포주를 10^3 세포수로 96-well에 분주하여 하룻밤 배양한 다음 정상군, 10nM thrombin이나 100 μ g/ml collagen을 처리한 대조군, 대조군에 ODT를 투여한 실험군으로 구분하는데, 실험군은 ODT를 1, 10, 25, 50, 100 μ g/ml 농도로 첨가하였다. 상기와 같이 처리한 12시간 후에 세포괴사 억제효과를 확인하기 위해 MTT assay를 측정하여 미리 IC₅₀을 결정하였으며 세포사가 유도시 세포핵내의 핵분절을 확인하기 위한 관찰로 round slide

glass에 ECV 304 cell lines를 10^3 세포수로 분주하고 하룻밤 배양한 다음 10nM thrombin와 collagen을 처리하고 IC₅₀가 35 μ g/ml 농도로 동시에 처리하여 6시간 배양하고 상등액을 제거한 후 세포를 PBS로 2회 세척한 다음 acridine orange(1 μ g/ml) 50 μ l로 염색하고 PBS로 세척하고 형광현미경하에서 세포 200개를 촬영하여 세포사 억제정도를 관찰하였다.

③ LDH assay에 의한 ECV 304 세포주 생존율 측정

ECV 304 세포주를 정상군, agonist인 10nM thrombin이나 collagen(100 μ g/ml)을 처리한 대조군, 대조군에 ODT를 35, 50 μ g/ml의 농도로 처리한 실험군으로 구분하여 37°C에 12시간 배양한 다음 각 군의 배양액 100 μ l를 96-well plate에 옮기고 pyruvate substrate (NADH 1mg/ml)를 20 μ l씩 가한 다음 상온에서 2분간 혼합한 후 37°C에서 30분간 더 흔들었다. 그후 발색시약(color reagent, Sigma 505-2)을 20 μ l씩 가하고 상온에서 20분간 혼합한 다음 0.4N NaOH를 100 μ l씩 가하고 상온에서 15분간 더 혼합한 후 ELISA reader로 흡광도를 측정하여 배양액으로 유리된 LDH의 활성도를 평가하였다.

④ Tunel assay에 의한 ECV 304 세포주 세포사 관찰

상기와 같이 배양한 ECV 304 세포주를 정상군, agonist인 10nM thrombin이나 100 μ g/ml collagen을 처리한 대조군, 대조군에 ODT를 처리한 실험군으로 구분하여 37°C에 12시간 배양한 다음 cover glass에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 ODT를 35,

50 μ g/ml의 농도로 처리한 다음 6시간 후에 세포사의 억제효과를 알아보기 위하여 세포사로 인한 세포핵의 3'-OH 존재를 확인하는 방법인 TUNEL assay법을 수행하였다. 즉 배지를 제거하고 PBS로 세척한 다음 세포를 4% p-formaldehyde로 12시간동안 4 $^{\circ}$ C에서 고정시킨 다음 0.5% Tween 20, 0.2% bovine serum albumin (BSA)를 첨가하여 실온에서 15분간 침투과정을 실시하고 PBS로 3회 세척을 실시하고 세포내 염색체 DNA nick 말단을 표지하기 위해 terminal deoxynucleotidyl transferase 5 μ l를 떨어뜨린 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 유지하고 증류수로 3회 세척한 다음 blocking 용액인 0.5% BSA를 50 μ l정도 첨가하여 실온에서 10분간 정치한 다음 streptavidine-FITC용액 50 μ l를 첨가하여 30분간 실온에서 유지하고 PBS로 3회 세척한 다음 slide glass 위에 mounding 용액을 약간 떨어뜨려 얹어놓고 형광현미경하에서 관찰하여 녹색의 형광염색 유무를 판정하여 세포사를 확인하였다.

2) 溫膽湯이 혈소판 혈장에 미치는 영향

① 혈소판 혈장의 조제와 응집력 측정

0.38% sodium citrate와 1% glucose를 사용하여 항응고시킨 혈액을 2500rpm에서 10분간 원심분리하여 백혈구, 적혈구 등 혈소판이외의 혈구세포들은 침전시켜 제거하고 혈소판은 혈장에 남아 있도록 하여 혈소판 혈장(platelet rich plasma:PRP)을 조제한 다음 10mM HEPES buffer (pH7.4:140mM NaCl, 5mM NaHCO₃, 0.5mM MgCl₂, 3mM KCl, 140mM glucose)가 들어 있는 혈소판 혈장 160 μ l에 ODT를 35, 50 μ g/ml 농도로 20 μ l을 넣

고 37 $^{\circ}$ C에서 2분간 배양하고 혈소판 응집 유도물질인 collagen과 thrombin 20 μ l을 첨가하여 응집을 유도하여 약물의 응집 억제력을 관찰하였다. 배양이 끝난 후 유리 슬라이드에 도말표본을 만들어 완전히 건조시킨 다음 wright염색을 한 후 물로 씻어주고 오븐에서 충분히 말리고 200x 배율에서 관찰하여 혈소판의 응집도를 판정하였다.

② Clot retraction 측정

상기 방법으로 분리하여 세척한 혈소판을 시험관에 넣고 재현탁시킨 다음 2mM calcium이 들어 있는 10nM thrombin으로 반응시켜 약물을 처리하고 30분간 실온에서 반응을 지켜 본 후 혈전형성 유무를 관찰하였다.

③ Microparticle shedding 분석

thrombin과 collagen으로부터 혈장내 혈소판의 활성화를 유도하면 혈전과정에 microparticles²⁷⁾의 shedding을 수반되는데 따라서 혈소판 응집에 있어 MP의 양적 변화를 Dachary-Prigent방법²⁸⁾을 변형시켜 확인하기 위해 혈소판 procoagulant surface 발현시 혈소판 미세입자가 shedding되는 혈소판 수가 10,000정도로 해서 혈소판을 10nM thrombin 및 100 μ g/ml collagen과 반응시킨 후 35, 50 μ g/ml 농도의 ODT로 처리하고 30분간 실온에 둔 다음 혈소판 표면에 Microparticle의 표식을 위하여 FITC-conjugated anti-GPIIb으로 염색한 후 유리 슬라이드에 올려놓고 형광현미경에서 관찰하였다.

3) 溫膽湯이 L-NAME 유도 고혈압 백서의 심혈관계에 미치는 영향

① L-NAME 유도 고혈압 백서의 제작
백서에게 비선택적 eNOS 억제제인 L-NAME를 매일 50mg/kg의 농도로 14일간 피하주사하여 고혈압을 유도하였다.

② 백서의 심박수 및 혈압 측정

백서를 각 군별로 6마리씩 정상군, 대조군, 실험군으로 나누고 대조군은 NAME를 50mg/kg 농도로 매일 피하주사하고 실험군은 50 mg/kg 농도의 NAME를 피하주사함과 동시에 35, 50mg/ml 두가지 농도의 ODT를 투여하였다. 실험 14일째 백서에게 urethane 1.5 g/kg을 복강투여하여 마취시킨 후 기관지에 삽관하여 호흡을 원활하게 하고 경동맥과 경정맥에 heparin(50 IU/ml)을 함유한 생리 식염수로 채운 관(0.80 mm 내경)을 삽입하여 physiography를 통하여 심박수를 측정하였으며 tail-cuff방법으로 꼬리동맥의 수축기혈압을 측정하였다.

③ 혈관운동성 실험

상기와 같이 3군으로 나누어 14일간 약물을 투여한 백서를 실험 14일째 백서를 단두하여 실험 치사시킨 후 심장대동맥을 잘라 냉각한 Krebs 용액(119mM NaCl, 4.6mM KCl, 15mM Na₂CO₃, 1.5mM CaCl₂, 1.2mM MgCl₂, 1.2mM NaH₂PO₄, 11mM glucose)에 담그고 혈관 주위의 지방과 결체조직을 조심스럽게 제거한 후 5ml의 길이로 잘랐다. 자른 대동맥 절편을 37°C의 5ml 이중병 안에 현수하고 Krebs 용액에 95% O₂- 5% CO₂를 계속 공급하면서 force transducer에 연결하여 혈관의

수축력을 physiography로 기록하였다. 혈관의 기본장력(resting tension)이 안정적으로 1.5g을 유지할 때까지 수차례 장력을 조절하면서 15분마다 새로운 Krebs용액으로 갈아주어 혈관을 90분 이상 안정화시킨 후 25mM KCl을 함유한 Krebs 용액으로 최고 수축력을 측정 한 후 혈관을 세척하고 다시 혈관을 30분 이상 안정화시킨 후 실험하고자 하는 약물의 수축작용을 측정하였다.

④ 면역조직화학분석

백서의 심장 주변부인 동맥내피세포의 조직괴사가 약물에 의해 억제되었는가를 확인하기 위해 각 군 6마리씩 정상군, NAME (50mg /kg)로 2주간 피하주사한 대조군과 대조군에 35, 50 mg/ml의 ODT를 경구투여한 실험군으로 나누고 흰쥐를 ketamin으로 마취한 다음 절개한 후 심장 동맥을 중심으로 주변부를 paraffin 포매하여 면역조직화학 염색을 수행하였다. 2주간 약물을 경구투여를 실시한 후 교살하여 심장 조직부위를 formalin으로 고정 한 후 5 μ m 두께로 절단하고 연속절편을 4°C에서 2N HCl용액에서 20분간 반응시켜 DNA-denaturation을 수행하였다. 다시 0.1M borate 완충액을 처리하여 안정시킨 후 비특이적 면역반응을 억제하기 위해 0.01%의 proteinase K (DAKO, Denmark)가 포함된 0.5% BSA를 1시간 동안 반응시킨 다음 1차 항체인 calpain, iNOS와 CPP는 4°C 냉장실에서 12시간동안 반응시켰다. 그 후 Horseradish peroxidase-antibody가 표지된 avidin biotin complex(ABC: Vector Lab, USA)와 실온에서 1시간동안 반응시킨 후 0.05%

3,3-diaminobenzidine (DAB : Sigma)과 0.01% HCl이 포함된 0.05M Tris-HCl 완충액(pH 7.4)에서 발색시킨 후 100x 광학현미경하에서 H/E염색을 관찰하였다.

4) 통계처리

모든 실험은 최소한 3회 수행하였으며 대조군은 백분율로 표시하였으며 통계학적으로 유의성은 Student t-test 의한 $P < 0.05$ 의 유의성으로 나타내었다.

Ⅲ. 成 績

1. 溫膽湯이 ECV 304 세포주에 미치는 영향

1) ECV 304 세포주의 괴사에 미치는 영향

혈관 내피세포의 정상군과 혈소판 활성화 유도물질인 collagen과 thrombin $20\mu\text{l}$ 에 의해 괴사를 유도한 대조군 및 collagen과 thrombin $20\mu\text{l}$ 와 함께 ODT를 투여한 실험군의 괴사 저해능력을 관찰하여 본 결과 정상군은 내피세포의 괴사에 별 영향이 없었고 대조군은 100% 이내로 유도되었지만 실험군의 경우 50% 저해되는 약물범위인 IC_{50} 는 약 $35\mu\text{g/ml}$ 정도였다(Fig 1). 두 유도물질의 첨가에 의해 세포괴사가 활발하게 유도되었지만 실험군은 내피세포의 괴사가 저해되었다.

2) ECV 304 세포주의 형태학적인 영향

혈관 내피세포의 정상군, 혈소판 활성화 유도물질인 thrombin $20\mu\text{l}$ 에 의해 괴사를 유도한 대조군, 35, 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로

ODT을 첨가하여 투여한 실험군의 세포 형태학적인 변화를 관찰하여 본 결과 정상군은 내피세포의 증식이 왕성하게 진행되어 괴사가 보이지 않지만 대조군은 세포괴사가 강하게 진행되고 실험군은 괴사정도가 약하게 억제되는 경향을 보였다(Fig 2). 또한 collagen에 의한 형태학적인 변화는 정상군은 별 변화가 없고 대조군에서는 세포괴사를 유도하지만 실험군에서는 내피세포의 괴사가 억제되었다(Fig 3).

3) ECV 304 세포주의 세포사에 미치는 영향

혈관 내피세포의 정상군, 혈소판 활성화 유도물질인 collagen과 thrombin에 의해 세포사를 유도한 대조군, 35, $50\mu\text{g/ml}$ 농도의 ODT을 첨가한 실험군의 세포사를 조사한 결과 정상군은 내피세포의 세포사가 약 $6\pm 1.3\%$ 정도로 미미하지만 대조군은 세포사가 강하게 진행하여 약 $91\pm 2.0\%$ 정도로 진행되었으며, 실험군은 $35\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 48 ± 1.4 , $50\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 $45\pm 3.5\%$ 로 나타나 유의성($p < 0.05$)있는 감소를 보였다(Fig. 4).

4) ECV 304 세포주의 LDH 활성도에 미치는 영향

혈관 내피세포의 정상군, 혈소판 활성화 유도물질인 collagen과 thrombin에 의해 괴사를 유도한 대조군, 35, $50\mu\text{g/ml}$ 농도의 ODT을 처리한 실험군의 세포 생존율을 조사한 결과, 정상군은 내피세포의 LDH 활성도가 $12\pm 3.5\%$, 대조군은 세포괴사가 강하게 진행하여 $88\pm 2.0\%$, 실험군은 각각 $40\pm 1.5\%$, $35\pm 3.4\%$ 로 나타나 유의성($p < 0.05$)있는 감소를 보였다(Fig. 5).

5) ECV 304 세포주의 세포핵에 미치는 영향

혈관 내피세포의 상해는 심장 내지 동맥혈관내의 내피세포 주변부에서 혈소판의 응집반응 내지 혈전시 마크로파지가 변형된 거품세포에 의해 평활근세포나 내피세포의 세포사로 인해 세포핵의 분절이 일어나서 세포사의 영향을 나타내므로 이를 확인하기 위해 혈전 유도제를 처리하여 정상군, 대조군, 실험군의 세포핵을 조사하여 세포사의 변화를 조사한 결과 정상적인 세포핵에서는 acridine orange가 형광현미경 하에서 녹색형광으로 나타났으나 세포사가 일어나는 대조군의 세포핵은 적색 내지 오렌지색으로 나타났으며 실험군의 경우 세포핵이 녹색 형광으로 나타났다(Fig. 6).

6) TUNEL assay에 의한 ECV 304 세포주 세포핵의 변화

혈관 내피세포의 상해로 인한 세포사의 억제효과를 알아보기 위하여 세포사로 인한 세포핵의 3'-OH 존재를 확인하는 방법인 TUNEL assay법을 시행한 결과 정상군은 미미하게 TUNEL assay의 반응으로 형광이 보인 반면 대조군은 강한 녹색형광을 보임으로써 세포핵의 분절이 유도됨을 보여주었고 실험군은 약한 녹색 형광신호가 존재하는 경향을 보였다(Fig 7).

2. ODT가 혈소판 혈장에 미치는 영향

1) 혈소판 응집에 미치는 영향

정상군, 대조군 및 실험군의 응집 억제력을 조사하기 위해 200 x 배율의 현미경 하에서 혈소판의 응집도를 판정하여 본 결과 정상군은 응집이 없었으나 대조군은 응집이 유도되었으며 실험군은 대조군에 비

해 강하게 감소하는 경향을 보였다(Fig 8).

2) 혈소판 응집에 미치는 MP유도 영향
혈소판 응집에 있어 MP의 양적 변화를 Dachary-Prigent 방법²⁸⁾을 변형시켜 확인하기 위해 혈소판을 MP의 표지자로 FITC-conjugated anti-GPIIb으로 염색하여 유리 슬라이드에 올려놓고 200 x 배율의 형광현미경하에서 형광신호를 관찰하여 본 결과 정상군은 응집 유도인자인 MP수가 약 2.5 ± 1.2 였고 대조군은 27.5 ± 3.2 이고 35, 50 $\mu\text{g/ml}$ ODT농도의 실험군에서는 각각 6.0 ± 3.2 그리고 2.8 ± 1.5 으로 유의성 ($p < 0.05$)있게 감소하는 결과를 보였다(Fig. 9).

3) fibrin용해에 미치는 영향

심근경색이나 고혈압 그리고 동맥경화 같은 심혈관질환은 혈관내의 상해로 내피세포의 파괴를 초래하기도 하므로 혈액내 fibrin의 침착정도를 분석한 결과 정상군은 혈전이 거의 나타나지 않은 반면 혈전 유도물질인 2mM calcium이 들어 있는 10nM thrombin 20 μl 을 첨가하여 혈전을 유도한 대조군은 혈전이 강하게 유도되었고 35, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 ODT를 첨가한 실험군은 모두 대조군에 비해 혈전이 감소하는 경향을 보였다(Fig. 10).

3. ODT가 L-NAME 유도 고혈압 백서에 미치는 영향

1) 백서의 심박수 및 혈압에 미치는 영향

심혈관 내지 혈관 내피세포의 상해를 유도시 NO생성 감소로 혈관수축이 초래되어 혈압이 증가된다는 결과를 분석하기 위해 NO의 생성 유도 효소인 NOS의 저해

제인 L-NAME 50 mg/kg를 매일 백서에 피하 주사한 후 14일째에 혈압과 심박수를 관찰하였는데 심박수에서는 정상군의 경우 320±10 bpm, 대조군의 경우 430±10 bpm, 실험군인 ODT 경우 35mg/ml 농도에서는 380±10 bpm, 50mg/ml 농도에서는 360±5 bpm로 나타나 ODT가 L-NAME에 의해 NO감소로 인한 심박수의 증가는 유의성 있게 감소시켰다(Fig 11).

또한 백서의 꼬리에서 혈압을 측정할 결과 정상군은 100±10 mmHg, 대조군은 130±5 mmHg, 실험군은 35mg/ml 농도에서는 116±3 mmHg, 50mg/ml 농도에서는 113±1 mmHg으로 나타나 L-NAME에 의해 NO의 감소는 백서의 혈압을 증가시키지만 본 약물에 의해 유의성 있게 감소시킴을 보여주었다(Fig 12).

2) 백서의 혈관운동성에 미치는 영향

정상군은 1.3±0.2 g, 대조군은 2.1±0.5 g 그리고 35, 50 mg/ml ODT는 1.6±0.5 g, 1.4±0.3 g의 수축이 일어나 본 약물이 혈관 수축력에 대한 저항성이 유의성 있게 감소하였다(Fig. 13).

3) 백서의 혈관내피세포의 단백질 발현에 미치는 영향

흰쥐의 흉부를 절개하고 심장동맥을 중심으로 주변부를 paraffin 포매를 실시하여 H/E 염색을 수행한 결과 정상군은 동맥부가 잘 발달되어 있는 반면 L-NAME 처리군은 피사가 진행되어 동맥부가 소실되거나 파괴된 흔적이 보였는데 특히 주변 혈관내피세포의 두께가 감소하였다. 실험군의 경우 35, 50 mg/ml 농도 모두 세포증식을 유도하여 동맥의 두께가 정상군과 유

사한 결과를 보였다(Fig 14).

한편 상기와 동일한 실험으로 백서의 심장동맥을 중심으로 주변부를 paraffin 포매를 실시한 후 면역조직화학염색법을 수행한 결과 정상군은 동맥부 주변부에 eNOS가 강하게 갈색반응을 보였고(Fig. 15 a), 대조군은 eNOS의 발현이 감소하여 NO의 생성이 억제되므로 세포피사가 강하게 유도되었고 실험군은 대조군에 비해 eNOS의 발현 감소를 지연 내지 억제시켜서 약하게 발현되었다(Fig. 15 b).

또한 정상군은 내피세포 피사에 관련되는 단백질인 calpain의 경우 거의 미미하나 대조군은 강하게 발현을 유도되어 세포피사가 유도되었으나 실험군의 경우 내피세포 주변부가 갈색반응이 약하게 발현하지만 발현을 억제함을 알 수 있었다(Fig 15 b).

IV. 考 察

현대사회로 오면서 급격한 경제의 발전, 사회적 여건의 변화, 생활의 변화, 인구구조의 노령화 등으로 인해 질병양상에 많은 변화를 가져오게 되었다. 과거에는 감염성 질환이 사망의 주요원인이 되었으나 근래는 심혈관계 질환이 가장 중요한 사망원인으로 보고되고 있다²⁹⁻³⁰.

심장을 비롯하여 동정맥에서 모세혈관에 이르기까지 우리 몸의 각 부분에 혈액을 순환시키는 기관을 모두 합쳐 심혈관계라고 하며 심장 및 혈관에 생기는 질병을 심혈관 질환이라 한다. 심혈관 질환은 한의학에서는 胸痺, 驚悸, 健忘, 中風, 昏迷, 癡呆, 百合病 등의 범주에서 다루고³¹⁻²⁾, 서

양의학에서는 심근경색, 고혈압, 폐원성 심장병, 심근염(감염성, 바이러스성, 원발성), 심내막염, 부정맥, 동맥경화증, 고혈압성 심장병, 저혈압, 뇌혈관질환, 혈관주위질환, 허혈성심장질환 등으로 분류한다^{30,33)}.

심근내피세포의 피사를 유발하는 물질은 adriamycin(ADR), dichloromethane 등의 화학약제³⁴⁾가 대부분인데 특히 항암제로 사용되는 ADR은 암세포의 DNA의 합성억제를 비롯하여³⁵⁻⁶⁾, RNA 및 단백질의 합성억제³⁷⁻⁸⁾등과 관련이 있으며 또한 세포내에 많은 생화학적 변화를 나타내는데 이들 변화의 대부분은 mitochondrial dysfunction³⁷⁾, 산소유리기 혹은 lipid peroxidation의 축적³⁹⁻⁴⁶⁾, 핵산합성의 억제⁴⁷⁻⁸⁾, 전해질 균형의 변화⁴⁹⁻⁵¹⁾ 등에 기인한다.

한편 산소유리기는 정상상태에서는 산화작용에 의하여 소량 형성되어 superoxide dismutase나 glutathione peroxidase 및 catalase에 의하여 소실되거나 저산소증, 허혈과 같은 병적인 상태에서 비정상적으로 생성된 산소유리기는 세포막의 지방을 과산화시킬뿐만 아니라 각종 효소나 단백질을 불활성화시킴으로써 세포나 조직의 손상을 초래하게 된다⁴¹⁻³⁾. 이러한 산소유리기에 의하여 심근독성이 유발되며⁴³⁾ 사람이나 동물에서 심부전을 비롯하여 심근경색 등을 유발한다는 보고가 된 바 있는데 심근세포의 피사에 관한 질환의 병인에 대한 기전을 비롯하여 치료방법의 접근에 대한 활발한 연구가 진행중에 있다⁴⁹⁻⁵¹⁾.

혈압 및 심박수, 혈류량의 조절 등과 직접적 관련이 있는 심혈관 긴장도에 영향을 줄 수 있는 대표적인 요인은 혈관내피세포

로 유리되는 내피의존성이완물질과 내피의존성수축물질인데 내피세포는 endothelium-derived relaxing factor(EDRF)²⁻³⁾, prostacyclin⁴⁾과 같은 혈관확장인자, prostaglandin H₂/Thromboxane A₂ 그리고 endothelin-1 (ET-1)과 같은 혈관수축인자를 동시에 유리한다⁵⁻⁶⁾. 특히 EDRF는 혈관평활근으로 유리되어 혈관을 이완시키는 작용을 가지는데 최근에 NO와 동일시되며 세포내로 유입되어 guanylated cyclase를 활성화시켜서 혈관 평활근을 이완시킨다는 것으로 알려져 있다⁵²⁾. 혈관내피세포에서 유리되는 내피의존성이완물질의 유리에 영향을 주는 물질은 말초저항에 영향을 주어 혈압에 변화를 일으킬 수 있다. 최근에 ET-1(수축성 endothelin -1)은 대동맥의 내피세포에 관여하는 인자로 심혈관계에 중요한 요인이 된다고 보고하였으며⁴⁾, angiotensin II(Ang II)는 고혈압에 있어서 주목되는 인자로 혈관에서의 RAS(renin-angiotensin system)가 고혈압의 병인에 깊어 관여한다고 보고되었다.²⁾

한편 혈관내피세포의 생존과 기능을 유지하는데 중요한 인자로 알려져있는 NO를 생성하는 효소인 nitric oxide synthase의 작용을 저해하는 L-NAME는 심장이나 혈관에서 NO가 생성될수록 혈압이 저하되지만 NO가 감소할 경우 혈압이 상승하고 심혈관 질환을 야기한다는 연구가 보고되었다⁷⁻¹⁰⁾. 혈관내피세포에서 NO의 합성은 주로 endothelial nitric oxide synthase (eNOS)에 의하여 이루어지며, 허혈성 손상과 같은 저산소 조건에서 eNOS의 발현 및 활성의 변화는 내피세포의 손상에 중요한 요인으로 예측되고 있다.

일반적으로 증가추세에 있는 동맥경화,

대동맥협착증, 판막질환, 심장경색 등은 만성적인 염증과 면역세포의 cytokine의 분비, 화학적, 물리적으로 손상받은 혈관의 부위에 혈소판의 점착-->방출-->응집반응이라는 일련의 혈소판 활성화반응이 일어나는데 collagen, thrombin, ADP을 가하면 연쇄적으로 혈전이 유도되거나 근육세포의 단백질 분비에 의해 혈전을 유도하는 일련의 과정이 동맥경화, 고혈압, 뇌세포의 파괴, 심근세포의 괴사로 출혈이 일어나거나 내피세포의 과산화지질화에 의한 혈관내피세포 파괴로 일어나게 된다. 이는 일시적 또는 지속적인 허혈을 심혈관계에 야기시킬 수 있으며 다시 약물이나 수술적인 요법등에 의하여 재판류시 심근세포에서 활성화된 neutrophils⁵³⁾, xanthine oxidase⁵⁴⁾, mitochondrial respiration⁵⁵⁾, arachidonic acid 등의 다양한 대사과정을 통하여 활성산소종(O₂, H₂O₂, OH⁻ 등)⁷⁾이 발생한다. 비록 세포의 생리적 방어체계인 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 등이 작동하지만 과도한 활성산소종의 발생은 이러한 능력을 초과하여 세포손상을 초래하게 된다.

한편 심혈관계 중에서 동맥경화증은 형태학적으로 죽상동맥경화증, Monckerberg 경화증, 세동맥경화증의 3종류가 있으며 특히 죽상동맥경화증은 동맥 내벽에 지질과 혈소판이 침착되어 국소적 비후, 섬유화, 괴사가 일어나는 병리적 과정을 통하여 죽종이 형성되고 혈관내 혈류의 흐름을 방해하게 되며 이로 인해 혈관내 혈전을 발생하게 하는 것으로 허혈성 심장질환 및 뇌질환 등의 중요한 원인이 되고 있다⁹⁾. 최근 연구보고에 의하면 NO가 세포의 괴사를 억제하고 순환기와 중추신경계의 평

활근 이완이나 혈소판 응집력에 영향을 미쳐 세포손상을 방지하며 혈소판이나 백혈구의 흡착을 방지하고 혈관내벽의 투과성을 유지시킨다고 하였으며 심근세포뿐만 아니라 혈관의 평활근 세포에서 guanylate cyclase를 활성화 시켜 혈관이완효과를 나타낸다고 하였다. 그리고 NO는 고혈압, 퇴행성, 뇌질환, 폐혈성 속과 같은 병리학적인 면에서도 관련되어 있다고 보고하였다¹⁰⁾.

한편 국내에서는 심혈관계 질환에 대한 NO에 대한 연구로 Han⁵⁶⁾ 등은 고려인삼의 사포닌이 NO를 유리시키고 NO의 합성효소의 활성을 증가시킨다고 보고하였으며, 전⁵⁷⁾ 등은 백서에서 고려인삼 사포닌은 NO 유리를 증가시킨다고 보고하였다. 이러한 보고들을 종합해 볼 때 고려인삼의 사포닌은 혈관내피세포를 자극하여 NO를 유리함으로써 말초저항을 감소시켜 혈압을 감소시킬 가능성이 있다고 생각되나 고려인삼이 혈압에 어떠한 영향을 주는지는 잘 알려져 있지 않다. 심근세포의 산화적 손상에 대한 한약제의 방어효과에 대한 연구로는 한⁵⁸⁾의 失笑散 煎湯液이 배양 심근세포에 미치는 영향, 허등⁵⁹⁾의 生脈散이 배양 대동맥 평활근세포에 미치는 영향 등이 있다.

본 연구에 사용된 溫膽湯은 唐代 孫思邈의 <備急千金要方>¹¹⁾에 “治大病後 虛煩不得眠 此膽寒故也 此藥主之 又治驚悸”라고 하여 처음 수록된 이래 역대 역가들이 心膽虛怯을 치료하는데 사용하였다^{11,14)}.

본방은 二陳湯에 枳實, 竹茹를 가한 처방으로 方 중의 半夏는 降逆和胃·燥濕化痰하고 竹茹는 清熱化痰·止嘔除煩하며 枳實은 行氣消痰·使痰隨氣下하며 陳皮는 理氣燥濕하며 茯苓은 健脾滲濕·卑濕去痰消

하고 生薑·大棗·甘草는 益脾和胃하고 協調諸藥하여 膽府의 少陽溫和之氣를 회복시켜주는 효능이 있다. 이러한 효능을 바탕으로 최근에는 본방을 心膽虛怯으로 발생하는 심장병, 고혈압, 신경쇠약, 노인성 치매, 현훈, 전증 등에도 응용하고 있다⁶²⁻⁷⁾.

지금까지 溫膽湯에 관한 연구보고로는 金²⁴⁾의 “溫膽湯 수성액기스의 증추억제작용에 관한 연구”, 嚴²⁵⁾의 “加味溫膽湯 투여가 수면시간에 미치는 영향에 관한 실험적 연구”, 任²⁶⁾의 “溫膽湯 전탕액이 심장기능에 미치는 영향” 등이 있었으나 본방을 심혈관계질환에 관련해서 L-NAME의 유도에 의한 고혈압동물모델이나 인간유래 혈관내피세포인 ECV 304 세포주에 투여한 연구는 전무한 상태이다.

이에 저자는 혈소판 활성물질인 thrombin과 collagen을 투여하여 인위적으로 혈전을 유도한 혈소판 혈장(PRP)에 ODT를 투여한 후 응집력, Clot retraction, Microparticle shedding 등을 측정분석함으로써 溫膽湯의 항혈전 작용을 알아보고자 하였으며, 다음으로 ECV 304 세포주에 thrombin과 collagen을 투여하여 혈전을 유도한 뒤 ODT를 투여하고 세포증식도 측정, LDH assay, Tunel assay, 면역조직화학분석법을 통해 溫膽湯이 혈관내피세포에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 또한 대표적인 NO 억제제인 L-NAME를 매개로 고혈압을 유도한 백서 병태모델을 이용하여 ODT 투여후 대조군과 실험군의 혈압과 혈관운동성을 비교하여 溫膽湯이 백서의 심혈관계에 미치는 영향을 실험적으로 알아보고자 하였다.

모든 실험은 최소한 3회 수행하였으며 대조군은 백분율(% Control)로 표시하였고

통계학적 유의성은 Student t-test에 의한 $P < 0.05$ 의 유의성으로 나타내었다.

먼저 ECV 304 세포주의 정상군과 혈소판 활성 유도물질인 collagen과 thrombin에 의해 피사를 유도한 대조군 및 collagen, thrombin과 함께 ODT를 투여한 실험군의 피사 저해능력을 관찰하여 본 결과 정상군은 내피세포의 피사가 100% 이내로 유도되지만 실험군의 경우에는 50% 저해되는 약물범위인 IC_{50} 가 약 $35 \mu\text{g/ml}$ 정도로 나타나 실험군이 대조군에 비해 세포피사가 저해되었다.

형태학적인 영향을 관찰한 결과에서도 정상군은 ECV 304 세포주의 증식이 왕성하게 진행되지만 대조군은 세포피사가 강하게 진행되고 실험군은 피사정도가 약하게 억제되는 경향을 보였다. 또한 collagen에 의한 형태학적인 변화로 대조군은 세포피사를 유도하지만 실험군은 내피세포의 피사를 억제하므로 본 약물이 내피세포를 보호하여 내피세포의 상해에 의한 피사를 회복할 수 있는 가능성을 시사해주고 있다고 사료된다.

ECV 304 세포주의 세포 피사도를 조사한 결과 정상군은 피사가 약 $6 \pm 1.3\%$ 정도로 미미하지만 대조군은 피사가 강하게 진행하여 약 $91 \pm 2\%$ 정도로 나타났고 실험군은 $35 \mu\text{g/ml}$ 농도에서는 48 ± 1.4 , $50 \mu\text{g/ml}$ 농도에서는 $45 \pm 3.5\%$ 로 Fig 1.의 IC_{50} 농도인 $35 \mu\text{g/ml}$ 와 유사한 결과를 나타내었다. 이 연구결과로부터 혈관내피세포에서 유발한 세포피사가 溫膽湯에 의해 유의하게 저해됨을 알 수 있으며 따라서 溫膽湯은 심장이나 내상에 의한 혈관내피세포의 파괴를 회복하는데 있어 유의성($p < 0.05$)이 있음을 보였다(Fig. 4).

溫膽湯이 ECV 304 세포주의 LDH 활성도에 미치는 영향을 알아본 결과 정상군은 내피세포의 LDH활성도가 $12 \pm 3.5\%$, 대조군은 세포괴사가 강하게 진행하여 $88 \pm 2.0\%$, 실험군은 $40 \pm 1.5\%$, $35 \pm 3.4\%$ 로 나타났다. 이는 ODT가 내피세포의 괴사로 인한 LDH 활성도를 저해하여 혈관내피세포의 파괴를 보호하거나 회복하는데 유의성($p < 0.05$)이 있는 것으로 나타났다(Fig. 5).

혈관 내피세포의 생존율은 세포질에도 영향을 주므로 정상군, 대조군, 실험군의 세포 괴사에 따른 세포질의 변화를 조사한 결과 정상적인 세포질에서는 acridine orange가 형광현미경하에서 녹색형광으로 나타났으나 괴사가 일어나는 대조군의 세포질은 적색 내지 오렌지색으로 나타났으며 실험군의 경우 세포질이 녹색 형광으로 나타났다(Fig. 6).

ECV 304 세포주의 세포 생존율을 세포핵의 절단유무를 통해 핵 분절을 억제하는지 알아보기 위해 Tunel assay를 시행한 결과 정상군은 미미하게 반응을 보인 반면 대조군은 강한 녹색형광을 보임으로써 세포핵의 분절이 유도됨을 보여주었고 실험군은 약한 녹색형광신호가 존재하였다(Fig 7).

다음으로 혈소판 혈장에 collagen과 thrombin을 투여하여 혈전을 유도한 뒤 정상군, 대조군 및 실험군의 응집 억제력을 조사하기 위해 200x 배율의 현미경하에서 혈소판의 응집도를 판정하여 본 결과 정상군은 응집이 없었으나 대조군은 응집이 유도되었으며 실험군은 대조군에 비해 강하게 감소하는 경향을 보였다(Fig 9). 혈장내 혈소판의 활성화는 염증 장애와 혈전

과정에 수반되는 microparticles²⁷⁾ shedding을 수반되는데 이의 양적 변화를 Dachary-Prigent방법²⁸⁾을 변형시켜 확인하여 본 결과 정상군은 응집 유도인자인 MP수가 약 2.5 ± 1.2 였고 대조군은 27.5 ± 3.2 이고 35, 50 $\mu\text{g/ml}$ ODT농도에서는 각각 6 ± 3.2 그리고 2.8 ± 1.5 으로 유의성($p < 0.05$) 있게 감소하는 결과를 보였다(Fig. 10).

또한 혈소판 혈장에 혈전을 안정화시키는 fibrin을 첨가한 결과 정상군은 혈전이 거의 나타나지 않은 반면 대조군은 혈전이 강하게 유도되었고 35, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 ODT을 첨가한 실험군은 두가지 농도군 모두 대조군에 비해 혈전이 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 11)

溫膽湯이 L-NAME 유도 고혈압 백서에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험에서 심박수는 정상군의 경우 320 ± 10 bpm, 대조군의 경우 430 ± 10 bpm, 실험군의 경우 ODT 35mg/ml 농도에서는 380 ± 10 bpm, 50mg/ml 농도에서는 360 ± 5 bpm로 나타나 ODT가 L-NAME에 의해 증가한 백서의 심박수를 유의성 있게 감소시켰다(Fig 12). 또한 백서의 꼬리에서 혈압을 측정한 결과 정상군은 100 ± 10 mmHg, 대조군은 130 ± 5 mmHg, 실험군은 35mg/ml 농도에서는 116 ± 3 mmHg, 50mg/ml 농도에서는 113 ± 1 mmHg으로 나타나 L-NAME에 의해 상승한 백서의 혈압을 유의성 있게 감소시킴을 보여주었다(Fig 13).

溫膽湯이 백서의 혈관운동성에 미치는 영향을 알아보는 실험에서는 백서 심장 대동맥 절편의 수축력이 정상군은 $1.3 \pm 0.2\text{g}$, 대조군은 $2.1 \pm 0.5\text{g}$ 그리고 35, 50 mg/ml ODT는 $1.6 \pm 0.5\text{g}$, $1.4 \pm 0.3\text{g}$ 의 수축이 일어나 본 약물이 혈관수축력에 대한 저항성이

유의성 있게 감소하였다(Fig. 14).

백서의 심장에 대한 L-NAME의 영향을 단백질 발현으로 알아보기 위하여 심장 동맥을 중심으로 주변부를 paraffin 포매를 실시하여 H/E 염색을 수행한 결과 정상군은 동맥부가 잘 발달되어 있는 반면 L-NAME 처리군은 괴사가 진행되어 동맥부가 소실되거나 파괴된 흔적이 보였는데 특히 주변 혈관내피세포의 두께가 감소하였다. 실험군의 경우 35, 50 mg/ml 농도 모두 세포증식을 유도하여 동맥의 두께가 정상군과 유사한 결과를 보였다(Fig 15). 백서의 심장동맥을 중심으로 주변부를 paraffin 포매를 실시한 후 면역조직화학염색법을 수행한 결과에서도 정상군은 동맥부 주변부에 eNOS가 강하게 갈색반응을 보였고(Fig. 16 a), 대조군은 eNOS의 발현이 감소하여 NO의 생성이 억제되므로 세포괴사가 강하게 유도되었고 실험군은 대조군에 비해 eNOS의 발현 감소를 지연내지 억제시켜서 약하게 발현되었다(Fig. 16 b). 또한 내피세포 괴사에 관련되는 단백질인 calpain의 경우 대조군은 강하게 발현을 유도되어 세포괴사가 유도되었으나 실험군의 경우 내피세포 주변부가 갈색반응이 보여 calpain 발현양상이 약하게 억제함을 알 수 있었다(Fig 16b).

상기와 같은 실험을 실시한 결과를 종합하면 溫膽湯은 L-NAME 및 thrombin과 collagen 처리에 의한 혈청학적인 항상성을 증진시켜 심장주변의 미세 환경을 원활하게 유지하지만 심장과 혈관내피세포의 괴사를 약하게 지연시키거나 다소 심장이나 혈관내피세포 산화적 손상을 저해하는 정도의 효과를 가지는 유의성 있는 결과를 나타냈다.

V. 結 論

溫膽湯 水抽出液을 collagen과 thrombin으로 손상을 유도한 ECV 304 세포주와 혈소판 혈장 및 L-NAME를 매개로 고혈압을 유도한 백서에 투여하여 溫膽湯의 세포사 방어효과 및 항혈전 효과를 규명하고자 본 실험을 실시한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 溫膽湯은 ECV 304 세포주의 collagen 및 thrombin에 의한 괴사를 저해시키고 세포생존율을 증가시키는 효과를 보였다.
2. ECV 304 세포주의 LDH 활성도가 溫膽湯 투여군은 35 μ g/ml, 50 μ g/ml의 농도 모두 감소하였다.
3. ECV 304 세포주의 acridine orange에 의한 세포질 염색에서 온담탕 투여군은 세포질 파괴가 감소되었다.
4. Tunel assay에서 溫膽湯은 ECV 304 세포주의 세포핵 분절을 감소시키는 효과를 나타내었다.
5. 혈소판 혈장에 collagen 및 thrombin을 투여한 후 200x 배율 현미경하에서 관찰한 결과 溫膽湯이 35, 50 μ g/ml 농도에서 모두 혈소판 응집을 강하게 감소시켰다.
6. microparticles shedding에서 응집 유도 인자인 MP수를 조사한 결과 溫膽湯 투여군은 50 μ g/ml 약물농도에서 유의성 있는 감소를 보였다.
7. L-NAME 유도에 의한 고혈압 백서모델에서 심박수와 혈압을 측정된 결과 溫膽湯 투여군은 35, 50 μ g/ml 농도에서

모두 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다.

8. L-NAME 유도에 의한 고혈압 백서 모델의 동맥내피세포의 H/E 염색에서 溫膽湯은 혈관내피세포의 파괴를 억제하고 세포의 증식을 증가시키는 효과를 나타내었다.

이상의 실험결과를 종합하면 첫째, 溫膽湯 수추출액이 인간유래 혈관내피세포인 ECV 304 세포주에 있어 collagen과 thrombin으로부터 세포괴사 방어효과와 항혈전 효과가 있으며 둘째, L-NAME 유도 고혈압 백서의 혈압과 심박수를 유의성 있게 감소시키고 동맥 내피세포를 보호하는 효과가 있음이 입증되었다. 따라서 溫膽湯은 심혈관계에 있어서 대동맥이나 혈관내피세포의 조직괴사에 따른 뇌질환이나 심장질환에 대한 임상 응용이 가능할 것으로 사료된다.

參 考 文 獻

1. 김정순 · 김철준 · 문옥륜 · 박명윤 · 백도명 · 송윤미, 일반보건의학(2), pp226-38, 서울대학교 출판부, 서울, 1996.
2. 屈松栢 · 李家康, 實用中醫心血病學(제2판), p3, 科學技術文獻出版社, 北京, 2000.
3. Cheung F, Siow YL, Chen WZ, O K. Inhibitory effect of Ginkgo biloba extract on the expression of inducible nitric oxide synthase in endothelial cells. *Biochem Pharmacol.* Nov 15;58(10):1665-73. 1999.
4. Moon SK, Kim YS, Ko CN, Bae HS, Cho KH, Lee KS. Effect of Uwhangchungsimwon on expression of nitric oxide synthase and vascular cell adhesion molecule-1 in human endothelial cells. *Am J Chin Med.* 31(3):389-402. 2003.
5. Luscher TF, Baron M : Biology of endothelium in insulin resistance and diabetes. *Diabet* 352, 1997.
6. Palmer, R. M., Ferrige, A. G. and Moncada, S.: Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327, 524. 1987.
7. Moncada, S. and Vane, J. R : Pharmacology and endogenous roles of prostaglandin endoperoxidase, thromboxane A2 and prostaglandin. *Pharmacol. Rev.* 30, 293. 1978.
8. Yanagisawa, M., Kurihara, H.,

- Kimura, S., Tomobe, Y., Kobayashi, M., Mitsui, Y., Yazaki, Y., Goto, K. and Masaki T.: A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332, 411. 1988.
9. Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., Kasuya, Y., Miyachi, T., Goto, K. and Masaki.: The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Acad. Sci. USA* 86, 2863. 1989.
 10. Luscher, T. F., Boulanger, C. M., Dohi, Y. and Yang Z.: Endothelin-derived contraction factors. *Hypertension* 19, 117. 1992.
 11. Kaya M, Kalayci R, Kucuk M, Arican N, Elmas I, Kudat H, Korkut F.: Effect of losartan on the blood-brain barrier permeability in diabetic hypertensive rats. *Life Sci*. 2003 7;73(25):3235-44.
 12. Jones S, Greer JJ, Kakkar AK, Ware PD, Turnage RH, Hicks M, Van Haperen R, De Crom R, Kawashima S, Yokoyama M, Lefler DJ.: Endothelial Nitric Oxide Synthase Overexpression Attenuates Myocardial Reperfusion Injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003.
 13. Liu P, Xu B, Forman LJ, Carsia R, Hock CE.: L-NAME enhances microcirculatory congestion and cardiomyocyte apoptosis during myocardial ischemia-reperfusion in rats. *Shock*. Mar;17(3):185-92. 2002.
 14. Czarnowska E, Kurzelewski M, Beresewicz A, Karczmarewicz E.: The role of endogenous nitric oxide in inhibition of ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis. *Folia Histochem Cytobiol*. ;39(2):179-80.2001.
 15. 孫思邈：備急千金要方，北京，人民衛生出版社，p.217, 1982.
 16. 上海中醫學院編：中醫內科學，香港，商務印書館，p.28, 1975.
 17. 中國中醫研究院：中國證候鑑別診斷學，北京，人民衛生出版社，p.81, 83, 180, 203, 1987.
 18. 沈金鰲：沈氏尊生書(上·六卷)，臺北，自由出版社，p.293, 651, 1972.
 19. 黃志孝：溫膽湯臨床運用體會，山東中醫雜誌，11: 29, 1992.
 20. 巫紹中：老年性痴呆從“膽”從“痰”論治初探，湖南中醫雜誌，8:3-5, 1992.
 21. 大塚敬節：症候에 의한 韓方治療의 實際，서울，書苑堂，p.79, 1963.
 22. 矢數道明：臨床應用 韓方處方解說，서울，東洋綜合通信教育出版社，p.45-46, 1978.
 23. 許鴻源 外：圖說常用漢方方劑，臺北，黃安出版社，p.79, 1980.
 24. 揚蘊祥 外：古今名方，河南，河南科學技術出版社，p.289, 298, 1983.
 25. 李大琦 外：中國方劑與治法，四川，四川科學技術出版社，p. 488, 1985.
 26. 張錦清 外：方劑學，上海，上海科學技術出版社，p.196, 1970.
 27. 楊醫亞 外：中醫學問答(上冊)，北京，

- 人民衛生出版社, p.688, 669, 1985.
28. 金昌德 : 溫膽湯 수성액기스의 中樞抑制作用에 關한 研究, 慶熙大學校 大學院, 藥學碩士學位論文, 1980.
 29. 嚴洙勳 : 加味溫膽湯의 投與가 睡眠時間에 미치는 影響에 關한 實驗的 研究, 慶熙大學校 大學院, 韓醫學碩士學位論文, 1983.
 30. 任竣模, 文炳淳, 金世吉. 溫膽湯 煎湯液이 심장기능에 미치는 영향. 원광한의학 1993 ;3(1).
 31. 통계청, 사망원인통계연보, 1983-1999.
 32. 蕉增綿·干全俊, 中西醫臨床 心血管病學, pp2-4, 中國中醫藥出版社, 北京, 2000.
 33. Bertam, G. and Katzung, Katzung's 임상병리학, pp363-369, 한우리, 서울, 1998.
 34. Christou L, Hatzimichael E, Chaidos A, Tsiara S, Bourantas KL. : Treatment of plasma cell leukemia with vincristine, liposomal doxorubicin and dexamethasone. Eur J Haematol. Jul;67(1):51-3. 2001.
 35. Chugun A, Temma K, Oyamada T, Suzuki N, Kamiya Y, Hara Y, Sasaki T, Kondo H, Akera T. Doxorubicin-induced late cardiotoxicity: delayed impairment of Ca²⁺-handling mechanisms in the sarcoplasmic reticulum in the rat. Can J Physiol Pharmacol. Apr;78(4):329-38. 2000.
 36. Scholz J, Klapperstuck M, Weise M, Hoffmann P. Acute effects of dichloromethane on arrhythmia development during the early phase of myocardial ischemia and reperfusion in the rat. Arch Toxicol Suppl. 14:128-31. 1991.
 37. Casal AJ, Silvestre JS, Delcayre C, Capponi AM. Expression and modulation of steroidogenic acute regulatory protein messenger ribonucleic acid in rat cardiocytes and after myocardial infarction. Endocrinology. May;144(5):1861-8. 2003.
 38. Chun TY, Bloem LJ, Pratt JH. Aldosterone inhibits inducible nitric oxide synthase in neonatal rat cardiomyocytes. Endocrinology. May ;144(5):1712-7. 2003.
 39. Tasca RJ., Hillman N. : Effect of actinomycin D and cyclohexamide on RNA and protein synthesis in cleavage stage mouse embryo. Nature 225:1022-1025, 1970.
 40. Park ST., Kim JJ., Mun YJ., Lim KT., Choi MK., Chung YT. : Effect of methylmercury on the fetal mouse cerebral neurone. J. Environ. 4: 27-32, 1995.
 41. Vanncci RC., Vasta F., Vanncci SJ. : Cerebral methabolic response of hyperglycemic immature rats to hypoxia-ischemia. Pediatr. Res. 21 p524-529, 1987.
 42. Cao W., Carney LM., Duchon A., Floyd RA., Chevion M. : Oxygen free radical involvement in ischemia and reperfusion injury to brain. 88 p233-238, 1988.

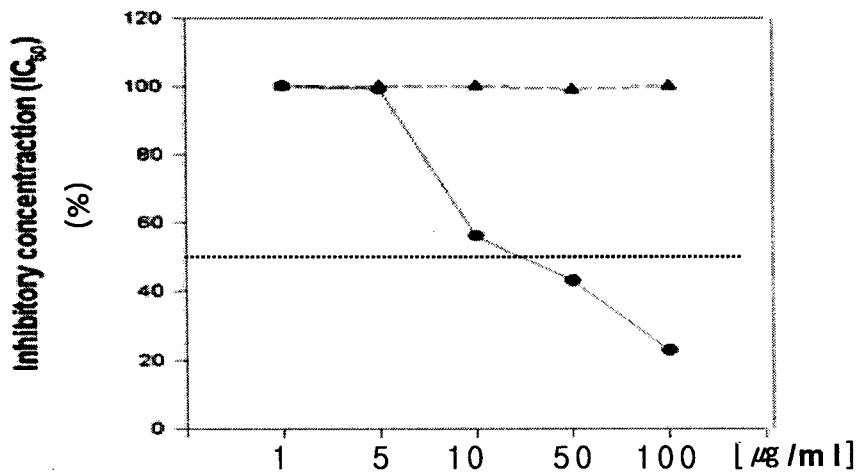
43. Myers ML., Bolli R., Lekich RF., Hartley CJ., Roberts R. : Enhancement of recovery of myocardial function by oxygen free radical scavengers after reversible regional ischemia. *Circulation* 72: 915-921, 1985.
44. Pellegrini-Giampietro DE, Cherici G, Alesiani M, Carla V, Moroni F. Excitatory amino acid release from rat hippocampal slices as a consequence of free-radical formation. *J Neurochem.* 51(6):1960-3. 1988.
45. Mayer ML, Westbrook GL. : Permeation and block of N-methyl-D-aspartic acid receptor channels by divalent cations in mouse cultured central neurones. *J Physiol.* 394:501-27. 1987.
46. Zeman S, Lloyd C, Meldrum B, Leigh PN.: Excitatory amino acids, free radicals and the pathogenesis of motor neuron disease. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 20(3):219-31. 1994.
47. Quiles JL, Huertas JR, Battino M, Mataix J, Ramirez-Tortosa MC. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. *Toxicology.* Oct 30;180(1) :79-95. 2002.
48. Clementi ME, Giardina B, Di Stasio E, Mordente A, Misiti F. Doxorubicin-derived metabolites induce release of cytochrome C and inhibition of respiration on cardiac isolated mitochondria. *Anticancer Res.* 23(3B):2445-50. 2003.
49. uchiba M, Okajima K, Kaun C, Binder BR, Wojta J.: Gabexate mesilate, a synthetic anticoagulant, inhibits the expression of endothelial leukocyte adhesion molecules in vitro. *Crit Care Med.* 31(4):1147-53.2003.
50. Choi YJ, Kang JS, Park JH, Lee YJ, Choi JS, Kang YH.: Polyphenolic flavonoids differ in their antiapoptotic efficacy in hydrogen peroxide-treated human vascular endothelial cells. *J Nutr.* 133(4):985-91.2003.
51. Schafer C, Walther S, Schafer M, Dieterich L, Kasseckert S, Abdallah Y, Piper HM.: Inhibition of contractile activation reduces reoxygenation-induced endothelial gap formation. *Cardiovasc Res.* 1;58(1):149-55.2003.
52. Furchgott, R. F. and Zawadzki, J. V.: The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373. 1980.
53. 박준배, 권강범, 이호승, 김희찬, 김우경, 오광수, 류도곤: 감두탕 및 가미감두탕 전탕액이 배양 심근세포의 총단백질량에 미치는 영향, 대한동의생리병리학회지, 15: 459-463.2001.
54. 성은경, 권강범, 김인수, 강길성, 김인규, 김인섭, 류도곤: 통령산과 구성약물 추출물이 배양 심근세포에 미치는 영향, 대한동의생리병리학회지, 17: 1031-1036. 2003.

55. 장승호, 권강범, 김인수, 강길성, 김인규, 김인섭, 류도곤: XO/HX에 의해 손상된 배양 심근세포에 대한 지실회백 계지당과 구성약물 추출물의 방어 효과, 대한동의생리병리학회지, 17: 952-957, 2003.
56. 한동훈, 권강범, 김우경, 오광수, 김인규, 류도곤: 실소산 전탕액과 구성약물이 배양 심근세포의 LDH활성도에 미치는 영향. 동의생리병리학회지, 15(5) p770-774 2001.
57. 전병화, 김희숙, 장석종: 신성고혈압백서에서의 혈압에 미치는 고려홍삼사포닌과 배사포닌의 효과. J. Ginseng Res. 23(2), 81-87. 1999.
58. 한동훈, 권강범, 김우경, 오광수, 김인규, 류도곤: 실소산 전탕액과 구성약물이 배양 심근세포의 LDH활성도에 미치는 영향, 대한동의생리병리학회지 15, 770-774, 2001.
59. 허윤, 나영훈, 한상혁, 장호연, 임준모, 이인, 진희준, 류지용, 문병순 : 생맥산이 대동맥 평활근 세포에서 NO생성에 미치는 영향. 동의생리병리학회지, 15(5) p770-774 2001.
60. 楊維傑 編 : 黃帝內經譯解, 서울, 成輔社, (素問) p.76,77, (靈樞) p.86, 89, 1980.
61. 梁運通 外 : 黃帝內經類析, 蒙古, 內蒙古人民出版社, p.178, 256, 261, 262, 1986.
62. 南京中醫學院 : 中醫方劑學, 上海, 上海科學技術出版社, p.277, 1982.
63. 陳佯路 外 : 方劑學, 上海, 上海中醫學院出版社, p.418, 419, 1990.
64. 廣州中醫學院 : 方劑學, 北京, 人民衛生出版社, p.186, 1983.
65. 李尙仁 外 : 韓藥臨床應用, 서울, 成輔社, p.56, 57, 171-173, 252-255, 258, 259, 360-363, 504-507, 514-517, 1982.
66. 楊東喜 : 本草備要解析, 臺北, 國興出版社, p.18, 67, 303, 339, 400, 407, 416, 485, 1980.
67. 江蘇新醫學院 : 中藥大辭典, 上海, 上海科學技術出版社, p.101, 567, 655, 775, 900, 1508, 1596, 1978.

Table 1. Composition of *Ondam-tang*

藥 物	學 名	用 量
半 夏	<i>Pinelliae Rhizoma</i>	8g
陳 皮	<i>Citri Pericarpium</i>	8g
白 茯苓	<i>Poria cocos</i>	8g
枳 實	<i>Aurantii Immaturus Fructus</i>	8g
竹 茹	<i>Bambusae Caulis Taeniam</i>	4g
甘 草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	2g
生 薑	<i>Zingiberis Rhizoma Recens</i>	5g
大 棗	<i>Jujubae Fructus</i>	2g
計		45g

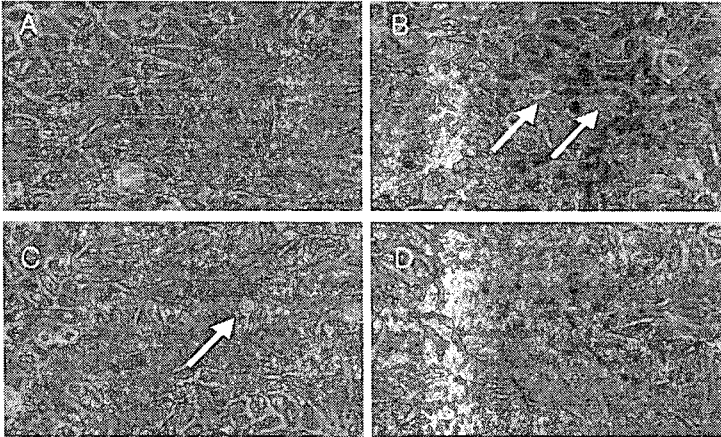
Fig.1. Inhibition of necrosis induced by thrombin and collagen in ECV 304 cells by ODT.



ECV 304 cells were treated by thrombin and collagen in the absence and presence of ODT, and necrotic cells were counted in each group as described in the Materials and methods. Data are presented as percent inhibition of necrotic cell number relative to thrombin and collagen-treated controls (mean±SD).

▲: control, ●: ODT

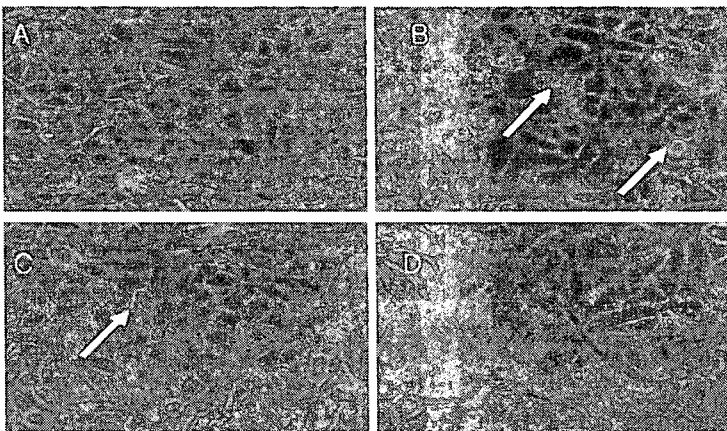
Fig. 2. Inhibition of thrombin-induced morphological changes of ECV 304 cells by ODT.



ECV 304 cells were treated with 10nM thrombin (B) in the absence or presence of ODT(35, 50 μ g/ml, C and D, respectively). There was morphological change in the 10nM thrombin-treated cells(B) in comparison with untreated control cells(A).

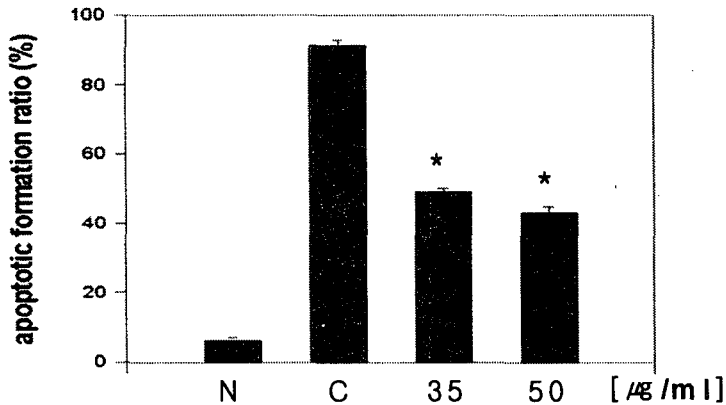
Magnification, 200 \times .

Fig. 3. Inhibition of collagen-induced morphological changes of ECV 304 cells by ODT.



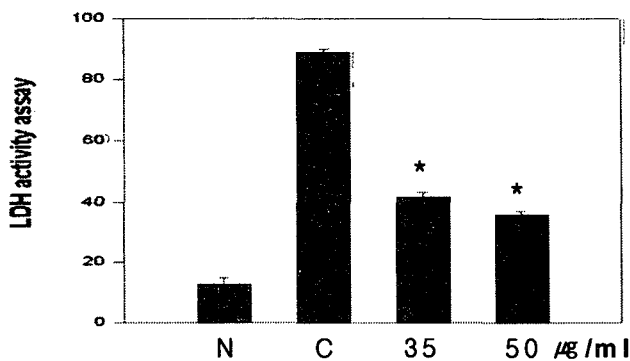
ECV304 cells growing in complete media were treated with collagen (100 μ g/ml). There was morphological change in the collagen-treated cells (panel B) in comparison with untreated control cells (panel A), suggesting that the inhibition of apoptosis alone does induce changes of cell morphology. Magnification, 200 \times .

Fig. 4. Inhibition of thrombin and collagen-induced cell death by ODT.



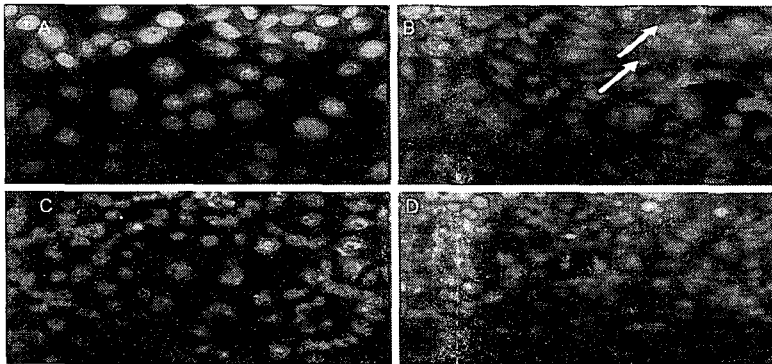
ECV 304 cells were treated with thrombin and collagen in the absence or presence of ODT(35, 50 $\mu\text{g/ml}$), and MTT assays were carried out as described. Data represent the mean \pm S.D. of least 3 measurements. *, $p < 0.05$

Fig 5. Inhibition of thrombin and collagen-induced LDH activity by ODT.



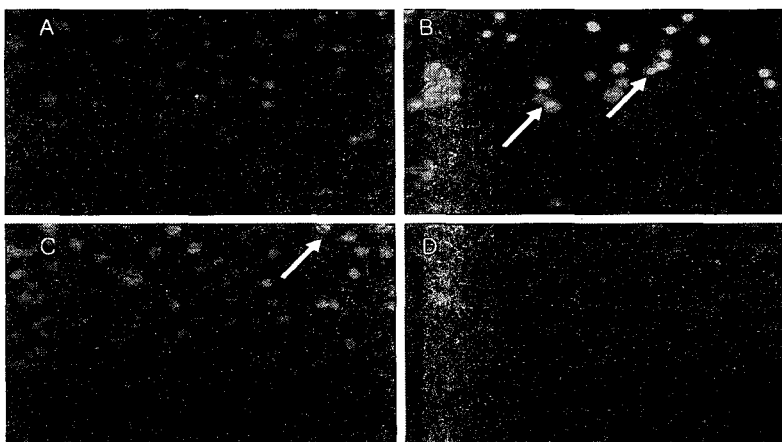
ECV 304 cells were treated with thrombin and collagen in the absence or presence of ODT(35, 50 $\mu\text{g/ml}$), and LDH activity released into the culture medium was measured as described. Data represent the mean \pm S.D. of least 3 measurements. *, $p < 0.05$.

Fig. 6. Acridine orange labeling of ECV 304 cells.



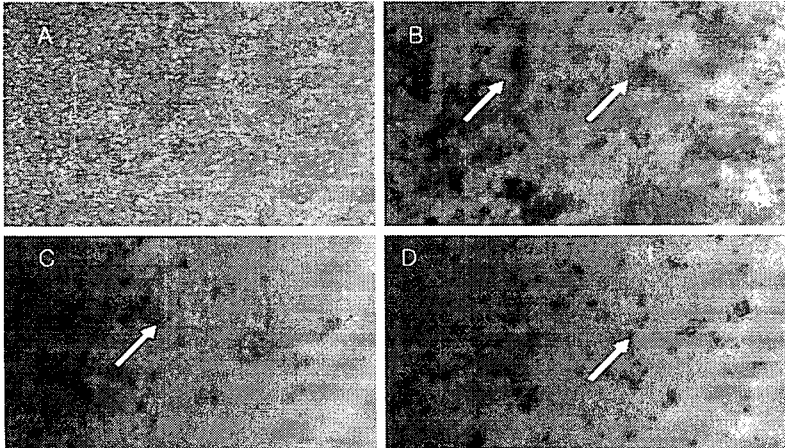
AO accumulates in acidic compartments, producing a red fluorescence(B). (A) In drug-sensitive ECV 304 cells the AO fluorescence was a relatively even green with no red-orange fluorescence. Punctate red-orange fluorescence, indicative of acidified organelles, was observed in the cytoplasm of: (B) no ODT treatment in ECV 304, (C) ODT-ECV 304 cells, (D) ODT had no effect on the fluorescence of ECV 304 cells. Cells were incubated with 1 μ g/ml AO as described in Materials and Methods and examined under immunofluorescence microscopy. (Bar is 10 μ m.)

Fig. 7. Inhibition of thrombin and collagen-induced apoptosis by ODT in ECV 304 cells.



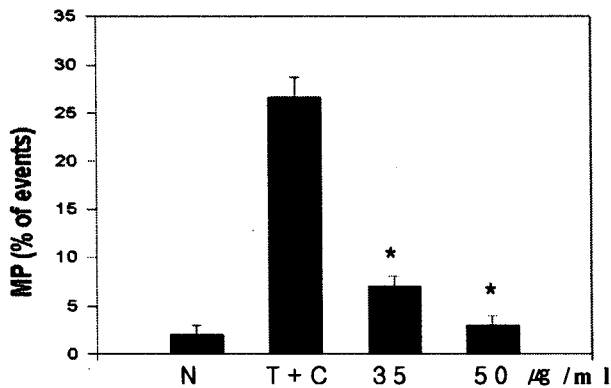
Samples were labeled by using a combined method of TUNEL reaction (strongly green; B) and immunostaining (slightly green) on the same section. (A, C and D), TUNEL reaction. Arrows indicate cells that display simultaneously a TUNEL-positive nucleus as well as a strong immunostaining for TdT. The intensity of the TdT immunostaining is lower at 8 hrs than at 12 hrs after thrombin and collagen stimulation. Note the very important DNA fragmentation and the presence of numerous apoptotic bodies 12 hr after thrombin and collagen stimulation.(25 μ m.)

Fig 8. ODT inhibits thrombin and collagen-induced platelet aggregation.



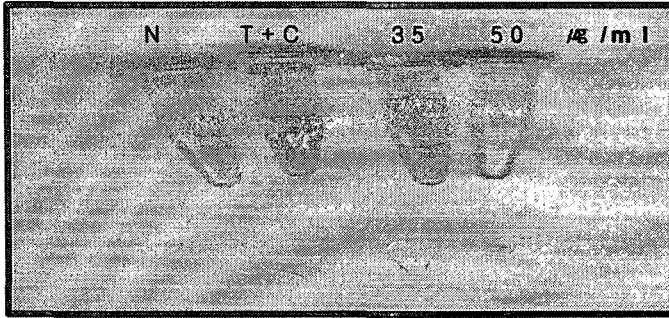
Platelet aggregation induced by 10 nM thrombin and collagen (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was measured at 37 $^{\circ}\text{C}$ in the presence and absence of ODT(35, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$). The rate of platelet aggregation was determined in three separate experiments. Arrow indicated platelet aggregated particles.

Fig 9. Inhibition of Microparticles shedding by ODT.



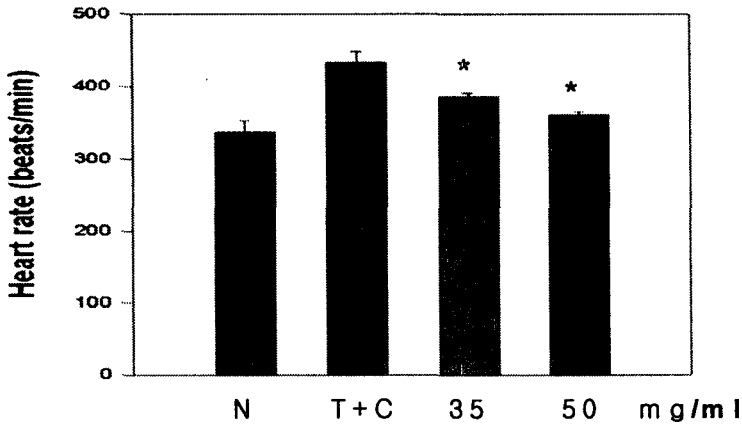
The amount of MPs, the number of platelet related events was expressed as the percent of total platelet events. Platelet were stimulated for 10 min by thrombin and collagen on platelets. Platelet suspension was prewarmed at 37 $^{\circ}\text{C}$ in the presence of ODT before addition of 10 nM thrombin and collagen (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$). * $p < 0.05$, These experiments have been replicated three times with similar results.

Fig 10. Clot retraction by ODT in rat platelet cells.



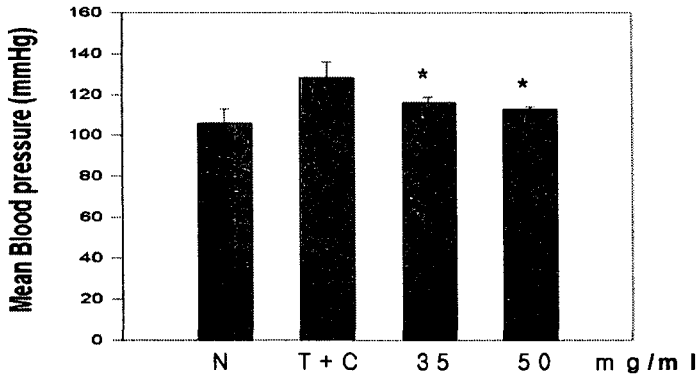
All fibrins induced at addition of 10 nM thrombin with 2 mM calcium in PRP. PRP suspension was prewarmed at 37°C in the presence of ODT before addition of 10 nM thrombin.

Fig 11. Effects of ODT and multi-subcutaneous injection with L-NAME (50mg/kg) on the heart rate of rats for 14 days.



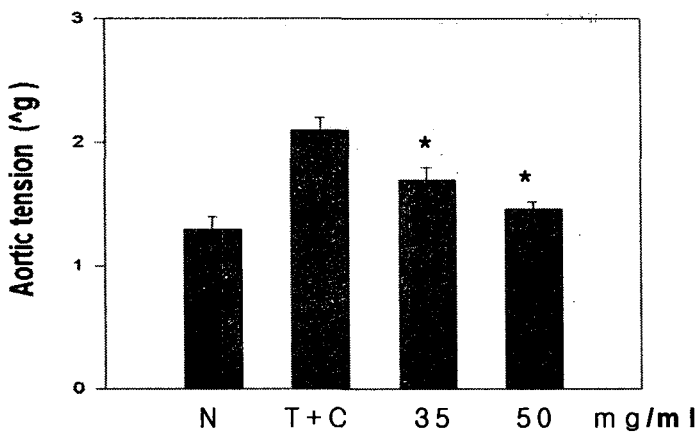
Blood pressure was measured after treatment of NOS inhibitor. Each value represents the mean±S.D. L-NAME: 50 mg/kg (n=6), vesicle (n=6) 1ml/kg, *p<0.05, These experiments have been replicated three times with similar results.

Fig 12. Effects of ODT and multi-subcutaneous injection with L-NAME (50mg/kg) on the blood pressure of rats for 14 days.



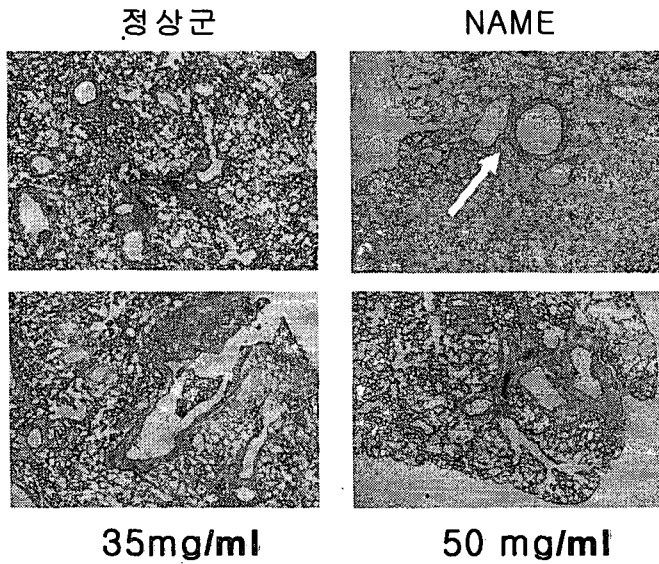
Blood pressure was measured after treatment of NOS inhibitor by tail-cuff method. Each value represents the mean±S.D. L-NAME: 50 mg/kg (n=6), vesicle (n=6) 1ml/kg, *p<0.05, These experiments have been replicated three times with similar results.

Fig 13. Effects of ODT on the isolated thoratic aortic ring segment from the rats treated with L-NAME (50mg/kg) for 14 days.



Each value represents the mean±S.D. of aortic tension (g). L-NAME: 50 mg/kg (n=6), vesicle (n=6) 1ml/kg, *p<0.05, These experiments have been replicated three times with similar results.

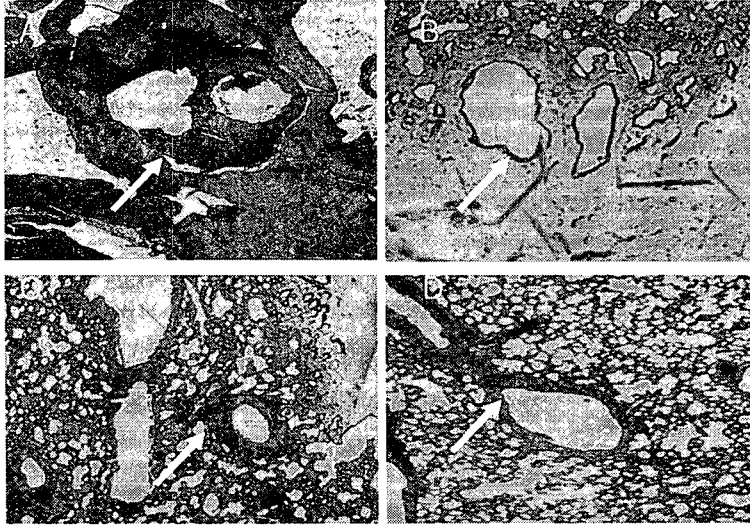
Fig 14. Photomicrographs of normal and L-NAME-induced hearts structure(X50) inoculated in normal rat and L-NAME induced heart not injected with ODT.



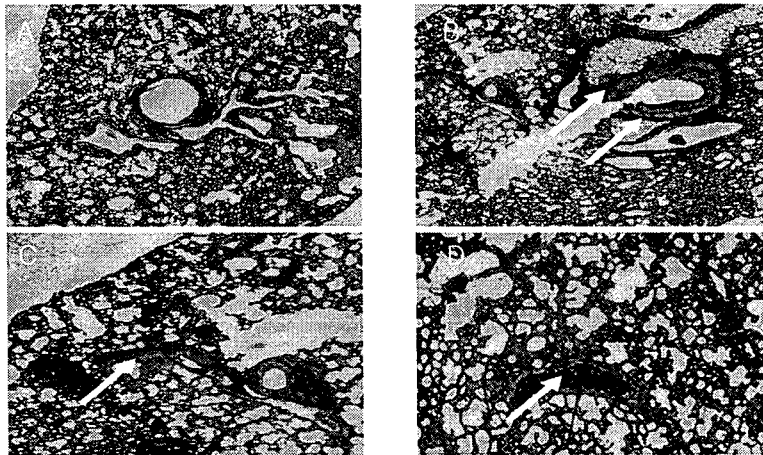
Arrows indicated arterial around the injured regions.
H&E staining.

Fig 15. Immunohistochemistry analysis of eNOS(a) and calpain(b) expression in L-NAME-induced rat heart tissues.

a)



b)



Immunohistochemistry for detecting eNOS and calpain expression in normal(A) and L-NAME heart tissues(B, C and D) sections of the indicated cases was performed as described in "Materials and Methods." eNOS and calpain staining are visualized in heavy brown around vessel endothelium.