

Paeonol의 잠재적인 항부정맥 효과의 컴퓨터 시뮬레이션 연구

이수진*

상지대학교 한의과대학 생리학교실

Computer Simulation Study of the Potential Anti-arrhythmic Properties of Paeonol

Soojin Lee*

Department of Physiology, College of Korean Medicine, Sangji University

Paeonol is a major component found in the Paeoniaceae family such as *Paeonia suffruticosa* Andrews. *Paeonia suffruticosa* Andrews has traditionally been used to enhance blood flow and relieve joint pain in east Asian countries including China, Korea and Japan. Current research has shown that paeonol blocked the voltage-gated sodium channel and L-type calcium channel. However, there is a lack of research to reveal the relation between cardiac function and blockade of ion channels by paeonol. Therefore, the aim of this study is to investigate whether paeonol has anti-arrhythmic effects *via* modulating cardiac ion channels. It is collected that the effects of paeonol on multiple ion channels such as the fast sodium channel and L-type calcium channel from published papers. To incorporate the information on multi-channel block, we computed the effects using the mathematical cardiac model of the guinea-pig and rat ventricular cells (Noble 1998 and 1991 model) and induced early after-depolarizations (EADs) to generate an arrhythmia in the whole heart. Paeonol slightly shortened the action potential duration in the normal cardiac ventricular action potential by the inhibition of sodium channel and L-type calcium channel. Paeonol presented the protective effect from EADs by the inactivation of sodium channel but not L-type calcium channel. Paeonol did not show any changes when it treated on normal ventricular cells through the inhibition of sodium channel, but the protective effect of paeonol through sodium channel on EADs was dose-dependent. These findings suggest that paeonol and its original plant may possess anti-arrhythmic activity, which implies their cardioprotective effects.

keywords : Systems biology, Computational modelling, Anti-arrhythmia, Cardiac ion channel, Paeonol

서론

건강보험심사평가원 자료에 따르면 국내의 부정맥 환자 수는 2012년 11만 9,805명에서 2014년 12만 2,678명으로 증가추세에 있으며 진료비 지출은 2012년 257억여 원에서 2014년 326억여 원으로 27% 증가하고 있다¹⁾. 부정맥은 심장이 정상적으로 뛰지 않는 것을 의미하는데 부정맥이 생기면 심장 박동이나 맥박이 불규칙해 지거나, 분당 60회 미만으로 느려지는 서맥이나 분당 100회 이상으로 빨라지는 빈맥을 동반하기도 한다²⁾. 부정맥은 심장 돌연사를 일으키는 기저 질환이 되기도 하는데 특히 심실세동은 심정지를 일으키는 가장 흔한 실질적 기전으로 60-80%의 심장 돌연사는 심실세동이 원인이 되어 발생하는 것으로 알려져 있다^{3,4)}.

생명현상에 대한 연구는 개체, 장기, 조직 등에 관한 거시적 연구로부터 세포, 단백질, 유전자로 이어지는 미시적 연구에 이르기까지 막대한 분량의 생명현상에 대한 자료가 축적되어 왔으며 근

래 genome project의 완료, high throughput 기술 등 다양한 연구기법의 발전 등에 힘입어 자료의 양은 기하급수적으로 늘어나고 있다. 현재 개개의 유전자보다 인간 게놈의 유전자들의 상호작용, 그 유전자들이 코딩하는 단백질들의 상호작용 및 이들에 의한 생리 기능들의 복잡한 네트워크에 대한 관심이 증대되고 있으며 데이터 분석 및 처리기술의 발전에 힘입어 복잡한 생명현상에 대한 다양한 정보를 계통적으로 해석하고 이해하고자 하는 시도가 증가하고 있는데⁵⁾ 특히 생명현상의 복잡한 기능과 기전에 관한 유전자 수준에서부터 개체에 이르기까지의 연구결과들이 어떻게 연결되어 생명현상을 설명해 낼 수 있을 지에 대한 관심이 고조되고 있다. 이러한 생명현상을 계통적으로 이해하고자 하는 과정 속에서 출발한 것이 시스템 생리학이라는 분야인데 이는 이미 축적된 막대한 분량의 생명현상에 관한 자료를 유전자, 세포로부터 기관, 개체에 이르기까지 통합하여 생명체의 생리기능을 종합적으로 이해하고자 하는 것이다. 시스템 생리학의 연구방법론으로 많이 활용되는 것이 생명현

* Corresponding author

Soojin Lee, Department of Physiology, College of Korean Medicine, Sangji University, Sangjidae-gil, Wonju-si, Gangwon-do, Korea

E-mail : jinlee@sangji.ac.kr Tel : +82-33-730-0673

Received : 2015/07/10 Revised : 2015/08/10 Accepted : 2015/08/24

© The Korean Society of Oriental Pathology, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 <http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2015.08.29.4.305>

Available online at http://society.kisti.re.kr/sv/SV_svjsj03L.do?method=list&poid=ksomp&kojic=DRSRDH&sVnc=v28n5&menuid=1&subid=13

상의 다양한 단계에 관한 수치적 기반의 컴퓨터 모델을 활용하여 복합적인 기능이나 효과를 시뮬레이션 하는 방법으로 궁극적으로는 인체 전체의 생리기능에 관한 데이터를 모두 모아서 가상 인간 모델을 만들고자 하는 프로젝트가 진행되고 있다⁶⁻⁸⁾.

심장모델에 의한 연구는 1962년 최초의 심근 이온 채널에 관한 모델이 발표된 이래⁹⁾ 가장 많은 발전을 이룩한 분야 중 하나로 CellML에서도 800개 이상의 심장모델을 찾을 수 있다¹⁰⁻¹²⁾. 그 중에서도 심장 평활근의 이온 채널에 관한 다양한 모델이 개발되어 있는데 심장 평활근의 이온 조절기전의 이상은 심장근육의 수축 장애나 부정맥을 초래할 수 있어 건강에 심각한 위해를 초래할 수 있기 때문에 관심의 대상이 되고 있다. 특히 이온 채널 중에서도 나트륨 이온의 내향전류의 과다는 조기후탈분극(early after-depolarization, EAD)을 통하여 심실세동을 거쳐 부정맥을 유발하는 주요 원인으로 알려져 있으며, 미국에서 심장질환으로 인한 급사의 가장 중요한 원인으로 심실세동을 꼽고 있다^{13,14)}.

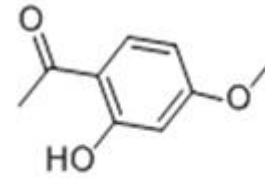
작약과의 한약재인 목단피 및 그 주요성분인 paeonol은 심혈관계통에 주로 작용하는데 허혈성 심질환에 대한 보호효과, 혈압하강 효과, 혈액순환개선 효과, 심근 이온 채널 억제효과 등이 이미 밝혀져 있다¹⁵⁻¹⁸⁾. 그러나 paeonol의 심근 이온 채널에 대한 조절 효과가 심실세동이나 부정맥과 직접적으로 연관을 가지고 있는지에 관하여 연구된 바는 아직 없다. 따라서 본 연구에서는 심근 이온 채널의 컴퓨터 모델을 이용하여 심근의 이온 채널을 조절하는 paeonol이 부정맥에 미치는 효과 및 심근 보호효과에 대하여 분석하였다.

재료 및 방법

1. 데이터 수집 및 추출

본 연구에서는 작약과의 한약재인 牡丹皮에 함유되어 있는 주요 성분인 paeonol(Fig. 1)이 심장의 여러 이온 채널에 대한 효과를 탐색한 논문을 검색하고 그 자료를 활용하여 심장의 이온 채널을 억제하는 paeonol이 부정맥으로부터 심장을 보호하는 효과를 가지고 있는지를 분석하였다. Paeonol의 심근의 이온 채널에 대한 효과를 patch clamp 방법을 사용하여 분석한 연구를 대상으로 하기 위하여 PubMed를 사용하여 관련 논문을 검색하되 검색어는 "paeonol", "cardiac ion channel"로 하였다. 검색결과 심장의 이온 채널에 대한 paeonol의 효과에 관한 논문은 두 편이 검색되어 연구에 활용되었다(Table 1). 심근 이온 채널의 컴퓨터 모델에 기존 연구 결과를 적용하여 부정맥에 대한 보호효과를 조사하기 위하여 paeonol의 각 이온 채널에 대한 IC50 농도를 확보하였다. Paeonol의 정상 및 EAD가 유도된 심장근에 대한 농도에 따른 효과를 관찰

하기 위하여 두 일차연구의 sodium channel의 억제효과에 관한 농도-반응 그래프로^{17,18)}부터 Engauge Digitizer version 4.1 (<http://digitizer.sourceforge.net>)을 사용하여 10 μ M ~ 320 μ M 농도에서의 이온 채널 억제 비율을 추출하여 연구에 활용하였다.



C₉H₁₀O₃, Molecular weight = 166.17

Fig. 1. Chemical structure of paeonol.

2. 심장 평활근 컴퓨터 모델 및 컴퓨터 기반 시뮬레이션

심장 평활근에 관한 컴퓨터 모델은 컴퓨터 기반의 다양한 생체 내 네트워크 모델을 모아놓은 CellML (<http://www.cellml.org>)¹⁰⁾에서 guinea-pig 심근세포의 이온 채널 모델(Noble 1998 model)¹⁹⁾ 및 rat 심근세포의 이온 채널 모델(Noble 1991 model)²⁰⁾을 선택하였다. 심장 평활근의 컴퓨터 모델을 구동하기 위해서는 옥스퍼드 대학에서 개발된 Cellular Open Resource version (COR) 0.9^{21,22)}를 활용하였다. 부정맥을 심근세포 모델에 유발하기 위해서는 기존에 연구를 통하여 확립된 방법인 심근세포의 이온 채널 모델에 나트륨 이온의 투과성을 급격하게 증가키는 변수를 입력하여 조기후탈분극(early after-depolarization, EAD)을 유도하는 방법을 사용하였다²³⁾. 심장 평활근의 이온 채널 중 나트륨 채널과 L-type 칼슘 채널 각각에 대한 paeonol의 효과를 관찰하기 위해서는 정상 심장의 활동전위 모델 또는 부정맥 유도 모델에 다른 이온채널의 변수는 변화시키지 않고 관찰하고자 하는 이온 채널에 해당하는 변수의 수치를 paeonol에 의해 억제된 비율만큼 감소시켜 입력하여 시뮬레이션 하였다.

결 과

1. 연구에 사용된 일차 연구의 특성

심장의 이온 채널에 대한 paeonol의 효과를 patch clamp 방법을 사용하여 분석한 연구 두 편이 본 연구에 사용되었으며 한 편은 중국, 다른 한 편은 영국에서 수행된 연구였고 두 편 모두 2000 년대에 발표된 연구였다. 사용된 세포는 rat의 심근세포와 guinea-pig의 심근세포로 차이가 있었으며 사용된 paeonol의 농도는 최저 10 μ M부터 1,000 μ M까지 다양하였다. Zhang¹⁸⁾은

Table 1. Summary of paeonol studies on cardiac ion channels

| Author | Year | Journal | Country | Experiment | Cells | Concentration of paeonol | Cardiac ion channels | IC50 of inhibition of ion channel |
|---------------------------------------|------|---------------------------------|---------|-----------------------|---------------------------------|----------------------------|--|-----------------------------------|
| Ma Y. <i>et al</i> ⁷⁾ | 2006 | Eur J Pharmacol | UK | Patch clamp technique | Guinea-pig ventricular myocytes | 10 μ M ~ 320 μ M | I _{Na} [*] I _{Ca-L} [†] | 17 μ M No inhibition |
| Zhang G.Q. <i>et al</i> ⁸⁾ | 2003 | Methods Find Exp Clin Pharmacol | China | Patch clamp technique | Rat ventricular myocytes | 10 μ M ~ 1,000 μ M | I _{Ca-L} [†] | 561 μ M |

*, I_{Na}, fast sodium current, †, I_{Ca-L}, L-type calcium current

paenonol의 L-type 칼슘 채널에 대한 억제효과를 rat 심근세포에서 관찰하여 IC50는 561 μM 이었으며, Ma^{17} 는 나트륨 이온 채널 및 L-type 칼슘 채널에 대한 효과를 guinea-pig 심근세포에서 분석하되 Zhang에 비해 낮은 농도(10 ~ 320 μM)에서 연구를 진행하였는데 나트륨 이온 채널에 대한 억제효과는 확인하였으나(IC50 = 17 μM) L-type 칼슘 채널에 대한 억제효과는 확인하지 못하였다(Table 1).

2. 심근 컴퓨터 모델에 유도된 정상적인 활동전위 및 부정맥

Noble에 의해 개발된 심근세포의 이온 채널에 관한 컴퓨터 모델은 guinea-pig 모델(Noble 1998 model)과 rat 모델(Noble 1991 model) 두 가지를 사용하였다. COR에서 심근세포 모델들을 구동하여 정상적인 심장근의 활동전위가 유도되는 것을 확인하였고(Fig. 2A & 2B) 나트륨 이온의 내향성 흐름을 급격히 증가시키는 변수를 입력함으로써 컴퓨터 모델 상에 실험적으로 부정맥이 유도되어 정상적인 활동전위가 만들어지지 않음을 확인하였다(Fig. 2C & 2D).

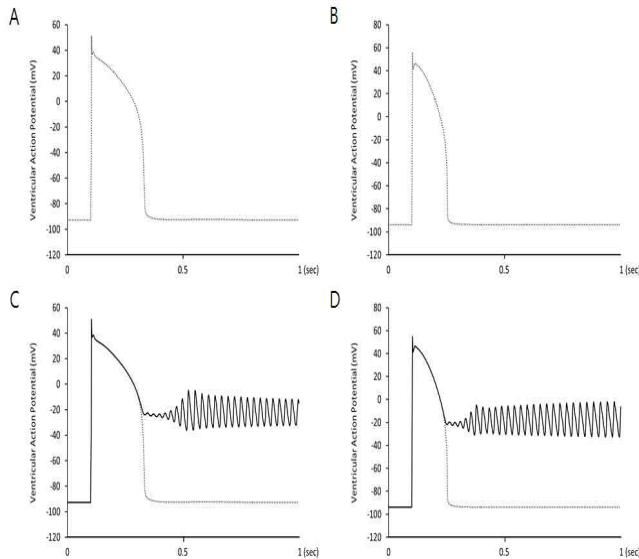


Fig. 2. Cardiac ventricular cell membrane action potential based on Noble 1998 and Noble 1991 model. A & B. Normal guinea-pig and rat ventricular cell membrane action potential (dotted line) of Noble 1991 and Noble 1998 model each. C & D. Normal guinea-pig and rat ventricular cell membrane action potential (dotted line) and membrane action potential of early after-depolarizations (EADs) induced by I_{Na} (fast sodium current) inactivation shift on the mathematical model (solid line).

3. Paeonol의 심근세포의 나트륨 채널 및 L-type 칼슘 채널에 대한 효과

Paeonol이 심근세포의 이온 채널의 흐름을 억제하는 효과가 있는지를 컴퓨터 모델을 활용하여 정상 심근 및 부정맥이 유도된 심근에서 확인하였다. 빠른 나트륨 채널(fast sodium channel)의 흐름을 50% 억제하는 농도(17 μM)에서 paeonol은 정상적인 guinea-pig 심근의 활동전위에 거의 영향을 미치지 않았으나(Fig. 3A) L-type 칼슘 채널의 흐름을 50% 억제하는 농도(561 μM)에서는 정상적인 심근의 활동전위의 지속시간을 약간 단축시켰다(Fig. 3B). 컴퓨터 모델에 부정맥을 실험적으로 유도한 뒤 나트륨 채널 및 칼륨

채널의 흐름을 50% 억제하는 농도가 심근세포의 활동전위에 미치는 영향을 살펴본 결과, 나트륨 채널의 IC50 농도(17 μM)에서는 거의 완벽하게 부정맥을 억제하고 정상적인 활동전위의 주기로 돌려놓았으며(Fig. 3C), 칼슘 채널의 IC50 농도(561 μM)에서는 부정맥을 억제하는 효과를 거의 보이지 않음을 관찰할 수 있었다(Fig. 3D).

나트륨 채널의 흐름을 50% 억제하는 농도가 17 μM 로 상당히 낮은 편이나 본 연구에서 참조한 일차 연구에서는 다양한 농도의 paeonol이 사용되었으므로 농도에 따른 정상 심근 및 EAD가 유도된 심근의 활동전위에 어떠한 영향을 미치는지 확인하였다. 농도별로 나트륨 이온 채널의 흐름을 어느 정도 억제하는지 보다 정확한 정보를 얻기 위하여 Engauge digitizer 4.0을 사용하여 일차연구에서 제시된 농도-반응 그래프¹⁷⁾로부터 데이터를 추출하였다. L-type 칼슘 채널의 경우, IC50에서 부정맥에 대한 억제 효과를 나타내지 않았으므로 더 낮은 농도를 추가로 분석할 필요가 없다고 판단되어 제외하였다. Paeonol 10 μM 은 나트륨 채널의 흐름을 약 21% 억제하였고, 17 μM 에서 50%(IC50), 80 μM 에서 약 54%, 320 μM 에서 약 61% 억제하였다. 이 결과를 guinea-pig의 심근세포 모델에 나트륨 채널에 대한 변수로 입력하여 시뮬레이션을 진행하였다. 10 μM 에서 320 μM 까지의 다양한 농도에서 paeonol은 guinea-pig의 정상 심근의 활동전위에는 영향을 미치지 않았다(Fig. 4A). 부정맥을 유도하였을 경우, paeonol 10 μM 의 농도에서도 나트륨 채널의 억제를 통해 부정맥을 완화시켰으며 IC50 농도인 17 μM 이상의 농도에서는 거의 정상적인 활동전위로 회복시키는 경향을 나타냈다(Fig 4B).

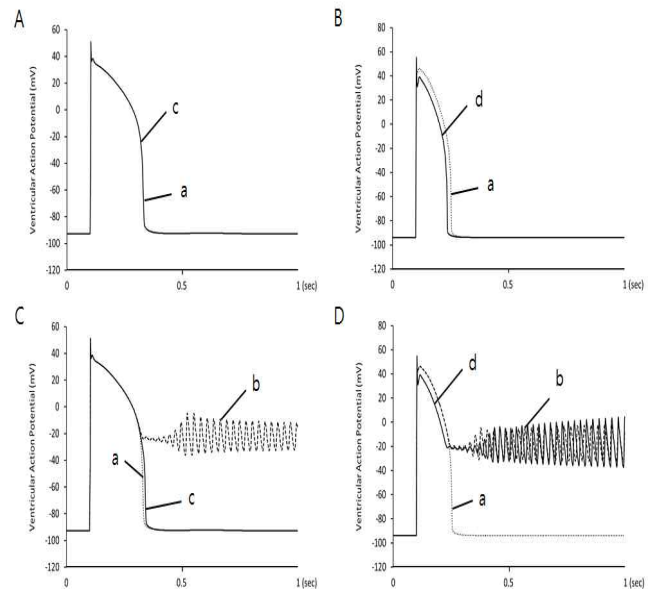


Fig. 3. Effect of paeonol on the ventricular cell action potential. A. Effect of inactivation of I_{Na} by paeonol on normal guinea-pig ventricular cell membrane action potential. B. Effect of inactivation of $I_{\text{Ca-L}}$ by paeonol on normal rat ventricular cell membrane action potential. C. Effect of inactivation of I_{Na} by paeonol on EADs-induced guinea-pig ventricular cell membrane action potential. D. Effect of inactivation of $I_{\text{Ca-L}}$ by paeonol on EADs-induced rat ventricular cell membrane action potential. a, ventricular cell membrane action potential; b, action potential with induced EADs; c, action potential with application of 17 μM of paeonol (A & C); d, action potential with application of 561 μM of paeonol (B & D).

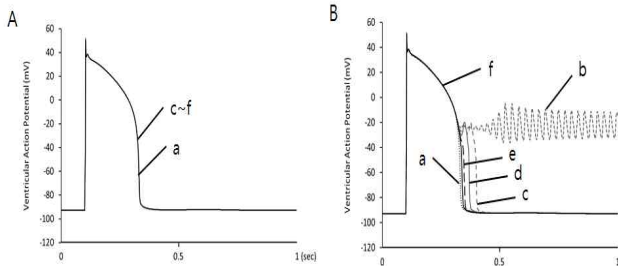


Fig. 4. Concentration dependent effect of paeonol on the ventricular cell membrane action potential. A. Effect of inactivation of I_{Na} by paeonol (10 ~ 320 μ M) on normal guinea-pig ventricular cell membrane action potential. B. Effect of inactivation of I_{Na} by paeonol (10 ~ 320 μ M) on the EADs-induced guinea-pig ventricular cell membrane action potential. a, ventricular cell membrane action potential; b, action potential with induced EADs; c~f, action potential with application of 10, 17 (IC50), 80, and 320 μ M of paeonol.

고찰

牡丹皮는 작약과에 속한 모란의 근피를 건조한 것으로 淸熱涼血하고 活血散瘀하여 전통적으로 혈액 순환을 조절하고 어혈을 없애는 효능을 가진 것으로 알려져 있다^{24,25}. 최근의 연구 결과에 의하면 진정, 최면, 진통, 해열 작용을 가지고 있고 관상동맥 폐쇄에 의한 허혈성 심질환에 대한 보호효과를 가지며 혈압을 낮추고 심박동수를 감소시키는 등의 효능을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다^{16,25,26}. 작약과의 식물에 함유되어 있으며 특히 목단피의 주요 약효성분인 paeonol은 벤젠노이드 화합물의 일종(Fig. 1)으로 항염증, 항산화 효과를 가지고 있으며^{26,27} 뇌경색의 크기를 유의하게 감소시키고 심근허혈로부터의 심장에 대한 보호효과를 가지는 등 심혈관계 질환에 효과적이며 특히 심근을 보호하는 효과가 탁월한 것으로 보고되고 있다^{15,16}. 또한 paeonol의 심혈관계에 대한 효능의 기전을 탐구하는 과정에서 심장근의 이온 채널의 흐름을 조절하는 기능을 가진다는 연구 결과가 보고된 바 있다^{17,18}. 그러나 paeonol의 심장근 이온 채널에 대한 조절효과가 심장질환과 어떻게 연관을 가지고 있는지에 대해서 깊이 있게 연구된 바는 없으므로 본 연구에서는 심근 이온 채널의 컴퓨터 모델을 이용하여 paeonol의 심장근 이온 채널 조절효과가 심정지를 일으키는 주요 원인인 심실세동에 의한 부정맥에 어떠한 효과를 미치는지 평가하였다.

심근세포에 관한 컴퓨터 모델은 1960년대부터 개발되기 시작했으며 동방결절, 심방근, 심실근 세포에 이르기까지 여러 부분에 걸쳐 개발되고 수정, 보완되어 왔다^{9,19,28}. 본 연구에서는 다양한 심근세포에 관한 모델 중 Noble에 의해 개발, 수정된 guinea-pig 및 rat의 심근세포 이온 채널에 관한 모델을 선정하여 활용하였다. Paeonol의 심근보호효과를 정상 심근세포에서 뿐만 아니라 부정맥이라는 병리적 상황 하에서도 확인하기 위해서 심근세포 모델을 시뮬레이션 할 때 부정맥을 유도할 필요가 있다. 최근 활동전위의 재분극 초기 또는 재분극 종료 직후에 일어나는 탈분극이 부정맥이 원인이 될 수 있다고 보고되고 있는데 본 연구에서는 심장 평활근 모델에 나트륨 이온의 투과성을 급격히 증가시켜 EAD에 의한 유발활동(triggered activity)을 일으켜 부정맥을 유도하는 방법을 사

용하였다(Fig. 2)^{23,29}. 이는 aconitine과 같은 강심배당체가 부정맥을 일으키게 되는 기전과 관련되어 있으며³⁰ 이미 Noble 1998 모델에 완전 부정맥(complete arrhythmia)을 유도하는 방법이 확립되어 있기에 guinea-pig 심근세포 모델로 이를 선정하였으며²³, 이와 유사한 구조를 가지고 있는 rat의 심근세포 모델인 Noble 1991 모델도 함께 선정하였다. 한 가지 종류의 컴퓨터 모델을 사용하여 시뮬레이션 한다면 복합효과까지 관찰할 수 있는 장점이 있지만, 어떤 동물을 사용한 연구인가에 따라서 심근세포 또는 이온 채널의 특징이 달라지기 때문에 다른 동물의 모델에 연구결과를 적용할 경우 심근세포에 대한 정확한 효과를 확인하기 어려운 문제점이 있어 guinea-pig와 rat의 두 가지 동물의 심근세포 모델을 선정하여 연구에 활용하였다.

현재 심근세포를 포함한 생명현상에 관한 다양한 컴퓨터 기반의 수학적 모델들이 호환 가능한 데이터 언어로 정리되어 인터넷 상에서 제공되는 경우가 많은데 그 중에서도 XML에 기반을 둔 시스템 언어로 정리되어 있는 CellML에서 Noble 1998 모델 및 Noble 1991 모델의 기본 소스를 제공받았고¹⁰ 컴퓨터 모델을 구동하기 위한 프로그램은 옥스퍼드 대학에서 개발된 COR를 활용하였다²¹, COR은 Microsoft Windows 환경 하에서 모델을 구동하기 위한 프로그램으로 처음에는 심장모델을 다루기 위하여 개발되었고 현재 다양한 모델의 시뮬레이션에 활용되고 있으며 CellML과 호환이 가능한 시스템으로 널리 활용되고 있다.

Paeonol의 나트륨 채널에 대한 IC50는 17 μ M이라 보고되었고¹⁷ L-type 칼슘 채널에 대한 IC50를 561 μ M로 보고되었다¹⁸. 이온 채널의 종류에 따른 IC50의 차이가 상당히 크기는 하나 일단 각각의 이온 채널에 대한 IC50의 농도에서 해당하는 심근세포 모델의 활동전위에 어떤 영향을 미치는지를 평가하였다. 17 μ M의 농도로 나트륨 채널을 50% 억제했을 때 정상적인 guinea-pig 심근세포의 활동전위에 거의 영향을 미치지 않았으나(Fig. 3A) 561 μ M의 농도로 처리하여 L-type 칼슘 채널을 50% 억제했을 경우에는 rat 심근세포의 활동전위의 지속시간(APD, Action potential duration)을 약간 단축시키는 경향을 나타냈다(Fig. 3B). EAD를 유도하고 guinea-pig의 심근세포의 나트륨 채널을 50% 억제했을 때에는 EAD가 거의 완전히 사라져 정상과 거의 차이가 없는 활동전위의 양상을 보였다(Fig. 3C). 그러나, EAD를 유도하고 rat 심근세포의 칼슘 채널을 50% 억제했을 때에는 EAD를 억제하는 효과를 거의 나타내지 않아(Fig. 3D) paeonol의 부정맥에 대한 심근 보호효과는 나트륨 채널을 조절함에 의한 것임을 알 수 있었다. Paeonol은 심장의 이온 채널 및 활동전위에 여러 가지 영향을 미치는데 paeonol은 탈분극의 빠른 상승을 줄이고 활동전위의 지속기간을 감소시키며 활동전위의 진폭 또한 감소시킨다¹⁷. 이는 주로 나트륨 이온 채널의 억제를 통해 나타나는 것으로 보이며 따라서 전압의존성 나트륨 통로를 봉쇄하면서 활동전위의 지속기간을 단축시키는 lidocaine과 같은 제1형 항부정맥 약물과 유사한 효과를 나타내는 것으로 판단할 수 있다³¹.

EAD는 심장의 활동전위가 불규칙하게 되는 것을 말하는데 비정상적인 탈분극이 phase 2 또는 3에서 일어나 재분극이 일어나야 하는 시점에서 활동전위가 갑자기 탈분극으로 이동하여 활동전위의

이차 상향파가 나타나게 되는 것을 일컫는다. Phase 2에서 일어나는 EAD는 칼슘 채널이 과도하게 열리는 것이, 그리고 phase 3에서 일어나는 EAD는 나트륨 채널의 흐름이 증가하는 것이 주된 원인으로 알려져 있는데 EAD가 발생하게 되면 Long QT 증후군이나 빈맥 등이 발생하고 이것이 부정맥을 일으키게 된다³²⁾. 컴퓨터 모델에서 부정맥을 유도하여 시뮬레이션 하는 방법은 나트륨 이온의 내향성 흐름을 급격히 증가시키는 방법을 많이 사용하고 있으며^{23,33)}. 그 밖에 칼슘 이온이나 칼륨 이온의 흐름을 조절하는 방법도 사용하고 있다^{34,35)}. 본 연구에서는 나트륨 이온의 내향성 흐름을 증가시킴으로써 EAD를 유도하였는데 그에 따라 유도된 EAD 모델이 나트륨 이온의 흐름이 변화함에 따라 쉽게 영향을 받게 될 가능성이 있다. 그러나 또한 활동전위의 후기에 내향성 나트륨 이온의 증가가 심혈관계 질환의 중요한 병인인이 이미 널리 알려져 있으므로²³⁾ 자주 일어나는 이온 흐름의 변화에 의한 병리적 상황에 paeonol이 어떠한 효과를 나타내는지를 알 수 있는 장점도 있다고 할 수 있다.

활동전위의 과정 중 빠른 나트륨 채널이 닫히더라도 계속적으로 열려있는 일부 나트륨 채널이 존재하며 이 채널에 의해 증가하는 세포 내 나트륨 농도는 세포 내 칼슘 농도에도 영향을 미치게 된다³⁶⁾. 또한 나트륨 펌프에 문제가 생겨 세포 내 나트륨 이온의 농도가 증가할 경우 심근세포에서는 세포막의 칼슘 펌프가 세포 내 칼슘 농도를 상대적으로 낮게 유지하기 위해 $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ 교환 펌프가 평상시와는 반대로 작용하여 나트륨 이온을 세포 밖으로 퍼내게 된다³⁷⁾. 즉, 본 연구에서 나트륨 이온의 내향성 흐름을 증가시켜 EAD를 유도하였음에도 칼슘 채널 억제시 일정 정도의 심근세포에 대한 효과를 관찰할 수 있었던 것은 이온 채널들 간의 상보적인 효과가 나타남이 시뮬레이션 된 결과라고 해석할 수 있다. 다만 여기에는 나트륨 채널과 칼슘 채널 이외의 다른 채널들의 영향 역시 반영되었을 것이므로 정확한 기전을 알기 위해서는 추가 연구가 필요하다.

Paeonol의 농도에 따른 심장 평활근의 활동전위에 미치는 영향을 분석하기 위하여 나트륨 채널의 억제 효과에 대한 농도-반응 그래프¹⁷⁾로부터 Engauge digitizer 4.0을 사용하여 paeonol의 농도 및 나트륨 채널의 억제 비율을 추출하였다(10 μM ~ 320 μM). L-type 칼슘 채널의 경우, IC50에서 부정맥에 대한 억제효과를 나타내지 않았으므로 더 낮은 농도를 추가로 분석할 필요가 없다고 판단되어 제외하였다. Paeonol 10 μM 은 나트륨 채널의 흐름을 약 21% 억제하였고, 17 μM 에서 50%(IC50), 80 μM 에서 약 54%, 320 μM 에서 약 61% 억제하였다. 이 결과를 guinea-pig의 심근세포 모델에 나트륨 채널에 대한 변수로 입력하여 시뮬레이션을 진행하였다. 모든 농도에서 정상적인 심근세포의 활동전위에는 거의 영향을 미치지 않았으나(Fig. 4A) EAD 유도에 의한 부정맥에 대해서는 매우 다른 효과를 나타냈는데 paeonol 10 μM 에서 EAD를 약간 완화시키는 경향을 보였고 그 이상의 농도에서는 EAD를 정상적인 활동전위로 거의 회복시킴을 확인할 수 있었다.

컴퓨터 시뮬레이션 연구에서는 이온 채널에 대한 IC50 이하의 농도를 사용하는 것이 적절하다고 보고 있으며, 유효혈장치료농도(ETPC, effective therapeutic plasma concentration)는 이온 채널

에 대한 IC50보다 낮은 것으로 알려져 있다³⁸⁾. 따라서, IC50에서 효과를 보이지 않은 rat의 L-type 칼슘 채널에 대한 데이터는 추가 분석에서 제외하는 것이 적절하다고 생각되어 제외하였다. 그러나, L-type 칼슘 채널의 흐름이 억제되는 rat의 심근세포를 사용한 시뮬레이션에서 부정맥에는 전혀 영향을 미치지 못했으나 정상 심근세포의 APD를 감소시키는 경향을 보였다(Fig. 3B). 또한 guinea-pig의 심근세포를 이용한 연구에서 paeonol은 심근세포의 활동전위의 APD를 감소시켰다¹⁷⁾. APD의 감소는 심근 활동전위의 고원기에서 내향성 칼슘이온의 흐름이 감소하고 외향성 칼륨이온의 흐름이 증가하는 경우 발생할 수 있는데³⁹⁾ guinea-pig의 심근세포에서는 paeonol이 칼슘 채널에 대한 효과를 나타내지 않았으나¹⁷⁾ rat 심근세포의 칼슘 채널은 효과적으로 억제했던 연구 결과¹⁸⁾를 참고할 때 guinea-pig가 아닌 다른 종의 심근세포에서는 paeonol이 나트륨 이온 채널 이외의 다른 이온 채널에 대해서도 효과를 나타낼 가능성도 여전히 존재한다. 또한, 본 연구를 통하여 guinea-pig의 나트륨 이온의 흐름을 억제하는 것이 부정맥으로부터 심근을 보호하는 효과와 연결된다는 것을 밝혔으므로 다른 종의 심근세포에서 paeonol이 나트륨 이온 채널의 흐름에 어떠한 영향을 미치는지 및 그 결과가 심근세포의 보호효과와도 연결되는지도 연구해 볼 과제이다.

생체에서는 빠른 나트륨 채널, 지연 나트륨 채널(delayed sodium channel), L-type 칼슘 채널, 칼륨 채널 등 다양한 이온의 복합적인 작용에 의해 심장기능이 결정된다. 현재 paeonol의 이온채널에 대한 연구가 guinea-pig의 경우 빠른 나트륨 채널, L-type 칼슘 채널에 대하여 진행되었고 rat의 경우 L-type 칼슘 채널에 대한 연구 이외에는 진행된 바가 없다. 그러나 생체에서는 그 밖에도 지연 나트륨 채널, 나트륨-칼슘 교환 채널, 클로라이드 이온 채널 및 다양한 종류의 칼륨 채널 등 여러 가지 종류의 이온의 흐름이 존재하고 있으며 이러한 다양한 이온들의 복합적인 작용에 의해 심장기능이 결정되게 된다. 다행히 활동전위에서 중요한 역할을 하는 L-type 칼슘 채널과 나트륨 채널에 관한 연구결과가 존재하고 연구에서 사용된 paeonol의 농도범위가 넓은 편이기에 농도별 이온 채널에 대한 효과를 추출하여 분석에 활용할 수 있었다. 그러나, 두 가지 이온 채널에 대한 결과로 심장의 복합적인 기능을 모두 설명하기에는 부족함이 있다.

또한, 두 일차연구에서 사용한 동물세포가 guinea-pig와 rat으로 차이가 있었기에 하나로 통합하여 여러 이온 채널의 심근에 대한 효과를 동시에 시뮬레이션 하는 것은 어려움이 있었다. 이는 한약재, 처방 및 한약재 추출 성분에 대한 다양한 현대적인 연구가 아직 부족하기 때문에 생길 수밖에 없는 문제점이나, 본 연구와 같은 시뮬레이션 연구를 통하여 임상에서의 효과를 예측하는 것과 동시에 어떠한 실험실 연구를 진행하는 것이 필요할지 방향을 제시할 수 있으므로 의미를 가진다고 할 수 있다. 장기적으로 볼 때, paeonol의 심근세포 보호효과에 관한 정확한 기전을 이해하기 위해서는 rat 및 guinea-pig 심근세포에서의 다양한 이온 채널의 흐름에 대한 paeonol의 효과를 확인하는 것이 필요할 것으로 생각되며 이러한 실험실 연구의 결과는 다시 시뮬레이션 연구와 접목되어 생체 환경과 더욱 유사한 컴퓨터 시뮬레이션이 가능하게 해 줄 것

이라고 본다.

본 연구에서는 심근 이온 채널의 컴퓨터 모델을 활용한 시뮬레이션 통하여 paeonol의 이온 채널에 대한 억제효과가 항부정맥, 심근 보호 효과로 연결되는지에 대하여 분석하였다. 컴퓨터 모델을 활용한 시뮬레이션으로 patch clamp 방법을 이용한 실험연구에서는 얻을 수 없었던 임상적인 약효 예측을 해 볼 수 있었다. 먼저 이온 채널을 억제하는 효과가 항부정맥 효과로 연결될 수 있는지 확인할 수 있었고, 이온 채널 중에서 어느 이온 채널을 억제하는 것이 항부정맥 효과에 큰 영향을 미치는지 예측해 볼 수 있었다. 또한, 과연 어느 정도의 농도를 사용하는 것이 적절한 약효를 얻을 수 있을 것인가를 시뮬레이션을 통하여 확인할 수 있으리라는 가능성 또한 열어 놓을 수 있었다. 따라서 이러한 컴퓨터 모델의 시뮬레이션을 이용한 방법은 한약물처럼 다양한 약효를 가진 여러 약재 및 성분으로 구성되어 있어 복합적인 효과를 나타내는 한약물의 연구에서 시간적, 비용적인 절감을 가져오면서 실험실 연구 결과를 이용하여 임상적인 효과를 보다 쉽게 예측할 수 있는 방법으로 널리 활용할 수 있을 것이다.

결 론

심근 이온 채널의 컴퓨터 모델에서 작약과 목단피의 주요 성분인 paeonol의 이온 채널 억제효과를 시뮬레이션 한 결과, paeonol은 나트륨 채널의 흐름을 억제하여 guinea-pig의 정상 심근세포의 활동전위를 농도에 관계없이 거의 정상 상태로 유지시키는 경향을 보였고, EAD로 유도한 부정맥으로부터 심장을 보호하는 효과를 나타내었다. L-type 칼슘 채널의 억제를 통해서 rat의 정상 심근세포의 활동전위 지속시간을 약간 단축시키는 경향을 나타냈다. 이상의 결과는 paeonol의 심근 이온 채널 억제가 부정맥으로부터 심근세포를 보호하는 효과를 가지며 그 기전은 활동전위 초기에 일어나는 빠른 나트륨 채널 흐름을 억제하는 것에 의함을 컴퓨터 모델의 시뮬레이션을 통해 검증하였다. L-type 칼슘 채널의 경우 IC50 농도에서도 rat 심근세포에 유도된 부정맥에 전혀 효과를 미치지 못하였다. 이 연구 결과를 통하여 다양한 약효를 가진 여러 약재나 성분이 복합적으로 작용하는 한약물의 연구에서 컴퓨터 모델을 이용한 시뮬레이션이 실험실 연구 결과가 임상적으로 유효한지 예측하는 데 있어 유용한 연구방법론임을 보여준다.

감사의 글

이 논문은 2012년도 상지대학교 교수 연구년제 지원에 의한 것임

Reference

1. Health Insurance Review and Assessment Service. Health Insurance Statistics Annual Reports 2012, 2013, 2014. [online] [cited 2015 Jun 10]. Available from URL: <https://www.hira.or.kr/dummy.do?pgmid=HIRAA02004501>
2. On, Y.K. Catheter Ablation for Tachycardia-Bradycardia Syndrome. *J Card Arrhythmia* 11(3): 23-28, 2010.
3. Lee, M.Y. Sudden Cardiac Death and Prevention. *J Card Arrhythmia* 11(2): 17-23, 2010.
4. Lee, J.E., Ham, H.U., Lee, K.Y., Roh, J.W., Yu, J.S., Chung, W.B. Early Repolarization Syndrome with Idiopathic Ventricular Fibrillation. *Ewha Med J* 37: 112-115, 2014.
5. Bard, J., Melham, T., Werner, E., Noble, D. Plenary Discussion of the Conceptual Foundations of Systems Biology. *Prog Biophys Mol Biol* 111: 137-140, 2013.
6. Hunter, P., Coveney, P.V., de Bono, B., Diaz, V., Fenner, J., Frangi, A.F., Harris, P., Hose, R., Kohl, P., Lawford, P., McCormack, K., Mendes, M., Omholt, S., Quarteroni, A., Skar, J., Tegner, J., Randall Thomas, S., Tollis, I., Tsamardinos, I., van Beek, J.H., Viceconti, M. A Vision and Strategy for the Virtual Physiological Human in 2010 and Beyond. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* 368: 2595-2614, 2010.
7. Fenner, J.W., Brook, B., Clapworthy, G., Coveney, P.V., Feipel, V., Gregersen, H., Hose, D.R., Kohl, P., Lawford, P., McCormack, K.M., Pinney, D., Thomas, S.R., Van Sint Jan, S., Waters, S., Viceconti, M. The EuroPhysiome, STEP and a Roadmap for the Virtual Physiological Human. *Philos Transact A Math Phys Eng Sci* 366: 2979-2999, 2008.
8. Leem, C.H. The Global Trend of Physiome Research. *J KSME* 49: 39-45, 2009.
9. Noble, D. A Modification of the Hodgkin-Huxley Equations Applicable to Purkinje Fibre aAction and Pace-maker Potentials. *J Physiol* 160: 317-352, 1962.
10. CellML [online]. Available from: URL:<https://models.physiomeproject.org/cellml>
11. Lloyd, C.M., Halstead, M.D.B., Nielsen, P.F. CellML: Its Future, Present and past. *Prog Biophys Mol Biol* 85: 433-450, 2004.
12. Beard, D.A., Britten, R., Cooling, M.T., Garny, A., Halstead, M.D., Hunter, P.J., Lawson, J., Lloyd, C.M., Marsh, J., Miller, A., Nickerson, D.P., Nielsen, P.M., Nomura, T., Subramaniam, S., Wimalaratne, S.M., Yu, T. CellML Metadata Standards, Associated tools and repositories. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* 367: 1845-1867, 2009.
13. Zimik, S., Vandersickel, N., Nayak, A.R., Panfilov, A.V., Pandit, R. A Comparative Study of Early Afterdepolarization-Mediated Fibrillation in Two Mathematical Models for Human Ventricular Cells. *PLoS*

- One 10: e0130632, 2015.
14. Okin, P.M., Bang, C.N., Wachtell, K., Hille, D.A., Kjeldsen, S.E., Dahlöf, B., Devereux, R.B. Relationship of Sudden Cardiac Death to New-Onset Atrial Fibrillation in Hypertensive Patients with Left Ventricular Hypertrophy. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 6: 243-251, 2013.
 15. Hsieh, C.L., Cheng, C.Y., Tsai, T.H., Lin, I.H., Liu, C.H., Chiang, S.Y., Lin, J.G., Lao, C.J., Tang, N.Y. Paeonol Reduced Cerebral Infarction Involving the Superoxide Anion and Microglia Activation in Ischemia-Reperfusion Injured Rats. *J Ethnopharmacol* 106: 208-215, 2006.
 16. Nizamutdinova, I.T., Jin, Y.C., Kim, J.S., Yean, M.H., Kang, S.S., Kim, Y.S., Lee, J.H., Seo, H.G., Kim, H.J., Chang, K.C. Paeonol and Paeoniflorin, the Main Active Principles of *Paeonia Albiflora*, Protect the Heart from Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury in Rats. *Planta Med* 74: 14-18, 2008.
 17. Ma, Y., Bates, S., Gurney, A.M. The Effects of Paeonol on the Electrophysiological Properties of Cardiac Ventricular Myocytes. *Eur J Pharmacol* 545: 87-92, 2006.
 18. Zhang, G.Q., Hao, X.M., Zhou, P.A., Wu, C.H. Effect of Paeonol on L-Type Calcium Channel in Rat Ventricular Myocytes. *Medhocs Find Exp Clin Pharmacol* 25: 281-285, 2003.
 19. Noble, D., Varghese, A., Kohl, P., Noble, P. Improved Guinea-pig Ventricular Cell Model Incorporating a Diadic Space, IKr and IKs, and Length- and Tension-Dependent Processes. *Can J Cardiol* 14: 123-134, 1998.
 20. Noble, D., Noble, S.J., Belt, G.C.G., Earm, Y.E., Ho, W.K., So, I.K. The Role of Sodium-Calcium Exchange during the Cardiac Action Potential. *Ann N Y Acad Sci* 639: 334-353, 1991.
 21. Cellular Open Resource [online]. Available from URL:<http://COR.physiol.ox.ac.uk>
 22. Garny, A., Kohl, P., Noble, D. Cellular Open Resource (COR): A Public CellML Based Environment for Modeling Biological Function. *Int J Bifurcat Chaos* 13: 3579-3590, 2003.
 23. Noble, D., Noble, P.J. Late Sodium Current in the Pathophysiology of Cardiovascular Disease: Consequences of Sodium-Calcium Overload. *Heart* 92: iv1-iv5, 2006.
 24. Kim, M.S. The Effects of Moutan in Streptozotocin-Induced Diabetic Nephropathy Rats. Doctor's dissertation. Dongshin University. 2013.
 25. Park, S., Jun, D.W., Park, C.H., Jang, J.S., Park, S.K., Ku, B.S., Kim, B.J., Choi, S.B. Hypoglycemic Effects of Crude Extracts of Moutan Radicis Cortex. *Kor J Food Sci Technol* 36: 472-477, 2004.
 26. Wang, R.R., Li, N., Zhang, Y.H., Ran, Y.Q., Pu, J.L. The Effects of Paeoniflorin Monomer of a Chinese Herb on Cardiac Ion Channels. *Chin Med J* 124: 3105-3111, 2011.
 27. Lee, Y.S., Shin, W.S., Cho, S.Y., Ze, K.R., Lee, H.M., Jeong, C.S. Effects of Sterilization for Quality Control on the Content of Paeonol in Moutan Radicis Bark. *J Pharm Soc Kor* 49: 180-184, 2005.
 28. Lei, M., Kohl, P., Brown, H., Noble, D. Non-Muscarinic and Non-Nicotinic Inhibition by the Acetylcholine Analogue Carbachol of the Delayed Rectifier Potassium Current, IK, in Rabbit Isolated Sino-Atrial Node Cells. *Exp Physiol* 84: 631-638, 1999.
 29. Burashnikov, A., Antzelevitch, C. Reinduction of Atrial Fibrillation Immediately after Termination of the Arrhythmia is Mediated by Late Phase 3 Early Afterdepolarization-Induced Triggered Activity. *Circulation* 107: 2355-2360, 2003.
 30. Suzuki, K., Matsumoto, A., Nishida, H., Reien, Y., Maruyama, H., Nakaya, H. Termination of Aconitine-Induced Atrial Fibrillation by the KACH-Channel Blocker Tertiapin: Underlying Electrophysiological Mechanism. *J Pharmacol Sci* 125: 406-414, 2014.
 31. Clarkson, C.W., Follmer, C.H., Ten Eick, R.E., Hondeghem, L.M., Yeh, J.Z. Evidence for Two Components of Sodium Channel Block by Lidocaine in Isolated Cardiac myocytes. *Circ Res* 63: 869-878, 1998.
 32. Amanfu, R.K., Saucerman, J.J. Cardiac Models in Drug Discovery and Development: a Review. *Clit Rev Biomed Eng.* 39: 379-395, 2011.
 33. Asakura, K., Cha, C.Y., Yamaoka, H., Horikawa, Y., Memida, H., Powell, T., Amano, A., Noma, A. EAD and DAD Mechanisms Analyzed by Developing a New Human Ventricular Cell Model. *Prog Biophysic Mol Biol.* 116: 11-24, 2014.
 34. Christophe, B. Simulation of Early After-Depolarisation in Non-Failing Human Ventricular Myocytes: Can This Help Cardiac Safety Pharmacology? *Pharmacol Rep* 65: 1281-1293, 2013.
 35. Xie, Y., Grandi, E., Puglisi, J.L., Sato, D., Bers, D.M. Beta-Adrenergic Stimulation Activates Early Afterdepolarizations Transiently via Kinetic Mismatch of PKA Targets. *J Mol Cell Cardiol* 58: 153-161, 2013.
 36. Belardinelli, L., Shryock, J.C., Fraser, H. Inhibition of the Late Sodium Current as a Potential Cardioprotective

- Principle: Effects of the Late Sodium Current Inhibitor Ranolazine. *Heart* 92: iv6-iv14, 2006.
37. Chen, S., Li, S. The Na⁺/Ca²⁺ Exchanger in Cardiac Ischemial/Reperfusion Injury. *Med Sci Monit* 18:RA161-RA165, 2012.
38. Mirams, G.R., Cui, Y., Sher, A., Fink, M., Cooper, J., Heath, B.M., McMahon, N.C., Gavaghan, D.J., Noble, D. Simulation of Multiple Ion Channel Block Provides Improved Early Prediction of Compounds' Clinical Torsadogenic Risk. *Cariovasc Res* 91: 53-61, 2011.
39. Whalley, D.W., Wendt, D.J., Grant, A.O. Basic Concepts in Cellular Cardiac Electrophysiology: Part II: Block of Ion Channels by Antiarrhythmic Drugs. *Pacing Clin Electrophysiol* 18: 1686-1704, 1995.