

虛血性心臟 및 心臟細胞에 對한 加味健心湯의 實驗的 研究

朴貞美 · 文祥官 · 高昌男 · 曹基湖 · 金永錫 · 裴亨燮 · 李京燮*

ABSTRACT

The Effects of Gamigunshimtang on the Ischemic Heart Disease & Heart cell in Rats

Jung-mi Park, O.M.D., Sang-kwan Moon, O.M.D., Chang-nam Ko, O.M.D., Ki-ho Cho, O.M.D.,
Kyung-suk Kim, O.M.D., Hyung-sup Bae, O.M.D., and Kyung-sup Lee, O.M.D.

Department of Circulatory Internal Medicine, College of Oriental Medicine,
Kyung Hee University, Seoul, Korea

The effects of *Gamigunshimtang* on the isolated perfused ischemic heart in rats, heart rates, left ventricular pressure, cardiac blood flow and cardiotoxicity were studied in H9C2 myoblast cell, myocardial slice culture

The results were as follows:

1. The administration of *Gamigunshimtang* to the rat recovered effectively heart rate, left ventricular pressure and flow rate from the experimental ischemia in perfused rat heart. The release of lactic dehydrogenase after the ischemia also decreased compared to the control group.

2. The administration of *Gamigunshimtang* to H9C2 myoblast culture enhanced the cell proliferation and protected against doxorubicin and allylamine induced release of the lactic dehydrogenase into the culture medium. It also protected effectively against doxorubicin and allylamine induced decrease of Ca ATPase activity and the increase of NADPH-cytochrome C reductase activity in the microsome.

* 慶熙大學校 韓醫科大學 心系內科學教室

3. The administration of *Gamigunshimtang* to the rat myocardial slice culture protected effectively against doxorubicin and allylamine induced decreases of protein synthesis and ATP content, and increases of cytosolic enzyme, creatin kinase into the medium and lipid peroxidation.

I. 서 론

加味健心湯은 慶熙大學校 附屬 韓方病院에서 활용하여 온 처방으로 心膈虛恟에 응용되는 加味溫膽湯과 氣滯, 痰飲, 食積을 治하는 正傳加味二陳湯을 合方加減하여 만든 補心健脾湯에 清心除煩하고 去心中惡血하는 瀉心湯을 合한 처방으로서,^{2,3,4,6,7,12)} 주로 氣滯, 痰飲으로 인한 虛血性心臟疾患에 활용할 수 있는 처방이다.

최근에 虛血性心臟疾患에 대한 실험 연구로서 Langendorff^{16,29)}의 摘出心臟灌流法으로 흰쥐 心臟에 직접적으로 虛血을 유발하는 방법을 이용하여 奎¹³⁾은 活血祛瘀之劑인 勝金散¹⁴⁾이, 金⁹⁾은 陽虛로 인한 痰濁에 쓰는 瓜蒌薤白半夏湯이, 李¹¹⁾는 氣滯血瘀에 쓰는 麝香蘇合元이 각각 虛血性 心臟에 효과가 있음을 보고 하였으나, 아직 氣滯痰飲으로 인한 실험보고는 없었다.

이에 저자들은 氣滯, 痰飲으로 인한 虛血性心臟疾患에 順氣, 化痰之劑인 加味健心湯으로 摘出心臟灌流法을 이용하여 虛血狀態에 대한 회복 실험으로는 心搏動數, 左心室壓, 回復灌流量 및 LDH 流出量 측정을 하였고, 심장세포 및 조직의 변화를 관찰하기 위해서는 직접 H9C2 심장근원세포 배양후 심장독성물질인 doxorubicin과 allylamine에 의해 유도된 LDH, Ca ATPase 측정, NADPH-cytochrome C reductase의 활성도 측정 및 흰쥐의 myocardial slice culture에서 doxorubicin과 allylamine에 의해 유도된 심장독성물질로 부터 加味健心湯이 심장세포를 보호하는 실험을 시행하였던 바 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 材料

1) 動物 및 培養細胞

실험동물은 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐(체중 250-280g)를 한국화학연구소에서 구입하여 사용하였으며, 각 군은 3마리로 하였다. 사료와 물은 자유롭게 먹도록 하였으며, 사육실내 온도는 21-24℃, 濕度는 40-60%를 유지하였고, 낮과 밤의 주기는 12시간으로 하였다. 흰쥐 심장 근원세포 H9C2 세포주는 American Type Culture Collection (ATCC CRL1446, Rockville, MD, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2) 藥材

실험에 사용된 韓藥材^{1,5,6)}는 경희대학교 부속 한방병원 조제실에서 구입하여 정선하여 사용하였으며, 加味健心湯 처방내용과 1첩의 분량은 Table I 과 같다.

3) 檢液

加味健心湯 20첩 분량(79.00g × 20貼=1580.00g)에 증류수 8,000ml을 가하여 3시간 동안 가열하여 extract를 추출한 다음 여과한 뒤에 다시 수욕에서 가열하여 얻은 최종 농축액 900ml을 검액으로 사용하였다.

2. 方法

1) 摘出心臟灌流法 實驗

Perfused rat heart 실험은 Langendorff 방법을 약간 수정하여 수행하였다.^{8,16,27,29)} 매일 1회 1ml 씩 생리식염수를 수컷 SD흰쥐(250-280g)에 경구

Table I. The composition of Gamigunshintang

한약명	생약명	학명	분량
香附子	Cyperi Rhizoma	Cyperus rotundus L.	4g
酸棗仁炒	Zizyphi Spinosae Semen (parched)	Zizyphus spinosa Hu.	4g
山查肉	Crataegii Fructus	C. pinnatifida BGE.	4g
陳皮	Citri Pericarpium	Citrus unshiu MARKOVICH	4g
半夏	Pinelliae Rhizoma	Pinellia temata(THUNB.) BREIT.	4g
枳實	Aurantii Immaturus Fructus	Poncirus trifoliata RAFIN.	4g
川芎	Cnidii Rhizoma	Cnidium officinale MAKINO.	4g
蒼朮	Atractylodis Rhizoma	Atractylodes japonica KOIDZ.	4g
白朮	Atractylodis Macrocephalae Rhizoma	Atractylodes macrocephala KOIDZ.	4g
白茯苓	Poria	Poria cocos (SCHW.)	4g
厚朴	Magnoliae Cortex	Magnolia officinalis REHD. et WILS.	4g
藿香	Pogostemonis Herba	Agastache rugosa (FISCH. et MEYER) O.KUNTZE.	4g
砂仁	Amomi Fructus	Amomum xanthioides WALL.	4g
麥芽炒	Hordei Fructus Germiniatus(parched)	Hordeum vulgare var. hexastichon ASCHEPS.	4g
神麴炒	Massa Medicata Fermentata(parched)	Triticum sativum Linne	4g
木香	Aucklandiae Radix	Aucklandia lappa DECIVE.	4g
大棗	Jujubae fructus	Zizyphus jujuba MILL.var. inermis REHDER	4g
生薑	Zingiberis Rhizoma Recens	Zingiber officinale ROSC.	4g
甘草炙	Glycyrrhizae Radix (broiled)	Glycyrrhiza uralensis FISCH.	4g
黃連	Coptidis Rhizoma	Coptis japonica MAKINO. var. dissecta NAKAI	1g
竹茹	Bambusae Caulis in Taeniam	Phyllostachys nigra(LODD.)	2g
TOTAL	AMOUNT		79g

투여한 것을 대조군으로 하고, 검액을 매일 1회 1ml씩 10일 동안 경구 투여한 것을 加味健心湯 투여군으로 하여, 최종 투여 1시간 후에 흰쥐를 경추탈골에 의해 죽인 후 40초 이내에 심장을 적출하여 上行大動脈에 導管을 삽입하여 혈액순환의 역방향으로 80mmHg의 일정 압력으로 관류를 시행하였다.

Modified Krebs-Ringer's bicarbonate buffer perfusate는 117mM NaCl, 6mM KCl, 3mM CaCl₂, 1mM MgSO₄, 0.5mM EDTA, 16.7mM glucose, 24mM NaHCO₃의 조성을 가지며 95% O₂/ 5% CO₂ 혼합가스를 연속적으로 泡沫 공급하였다²⁶⁾. 관류액의 온도는 실험 전체를 통해 37°C로 유지하였으며 열손실을 막기 위해 절연선을

사용하였다. 수축기능을 측정하기 위해서는 등장액을 넣은 latex 풍선(No 5, volume 0.2ml)을 승모판 구멍을 통해 좌심실에 넣었고 Stathams P23dB 압력전환기(Gould-Statham, Oxnard, CA., USA)에 연결하였다. 좌심실의 압력은 two-channel direct-writing recorder(Gould-Brush, Cleveland, OH, USA)에 의해 기록되었고 developed pressure는 수축기 압력과 이완기 압력 사이의 차이를 이용해 계산하였다. 기능적 그리고 대사적 회복의 측정은 Franconi 등의 방법²³⁾을 통해 수행되었다. 관류를 시작해 15분간의 안정기를 가진 후 안정된 baseline을 얻으면 心臟搏動數와 左心室 內壓 그리고 회복灌流量을 측정했다. 虛血유발은 관류액 밸브를 잠가 主灌流 및 산소공급을 차단한 후 15분간 수행하였으며, 再灌流는 관류액 밸브를 다시 열어 줌으로써 시작하였다¹⁶⁾. 재관류시의 관류량은 2-6분 사이의 5분간을 측정하였으며, 心搏數와 左心室壓은 재관류 개시 30분 후 측정하였다. 한편 재관류시 방출된 LDH는 모아진 관류액에서 흡광기를 이용하여 340nm에서 흡광도를 4분간 측정하였다^{25,35)}.

2) 心臟根源細胞(myoblast) 實驗

흰쥐 심장근원세포는 Dulbecco's modified Eagle's medium(DMEM)에 10% fetal bovine serum을 첨가한 배지를 사용하여 95% air/ 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

① 細胞增殖 反應測定^{32,36)}

심장 근원세포를 1.4 x 10⁴세포/well의 농도로 96-well culture plate에 옮겨 2일간 배양한 후 0.1% bovine serum albumin, 1mM glutamine, antibiotics를 포함한 DMEM배지에 검액을 1/100, 1/200, 1/500 및 1/1,000의 농도로 희석되게 처리한 후 7일 동안 배양하였다. 배양기간이 끝나면 1mg/ml의 MTT solution (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide)을 50 μ l/well씩 넣고 4시간을 더 배양하였다. Plate를 10

분간 600rpm에서 원심분리한 후 배양액을 제거하고 dimethylsulfoxide 150 μ l를 넣은 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

② Lactic dehydrogenase(LDH) 測定^{22,35)}

심장 근원세포를 1 x 10⁷세포씩 60mm petri dish에 옮겨 72시간 배양후 검액을 1/100, 1/200, 1/500 및 1/1,000의 농도로 희석되게 처리하여 48시간 더 배양하였다. 새로운 배지로 갈아준 후 검액과 doxorubicin(30 μ M) 또는 allylamine(10 μ M)을 처리하여³⁷⁾ 48시간 배양 후 배지내에 존재하는 LDH를 측정하였다. Cuvette에 3ml의 기질 용액(3.5g K₂HPO₄, 0.45g KH₂PO₄, 31mg sodium pyruvate, H₂O 450ml), 50 μ l NADH 용액(42mg NADH, 45ml 1% NaHCO₃)과 배지 200 μ l을 넣어 섞은 후 340nm에서 흡광도를 4분간 측정하였다.

③ Ca ATPase의 測定⁴¹⁾

심장 근원세포를 1 x 10⁷세포씩 100mm petri dish에 옮겨 24시간 배양후 새로운 배지에 검액을 1/100, 1/200, 1/500 및 1/1,000의 농도로 희석되게 처리하여 24시간 더 배양하였다. 그 후 검액과 doxorubicin(30 μ M) 또는 allylamine(10 μ M)를 첨가하여 24시간을 배양시켰다. 배양종료시 세포를 수거하여 0.1M phosphate buffer로 Teflon-glass homogenizer를 이용하여 homogenize시킨 후 9,000 x g 에서 15분 원심분리한 후 상등액을 105,000 x g에서 1시간 원심분리하여 microsomal pellet을 얻었다. Cuvette에 2ml의 reaction buffer(25mM HEPES, 125mM KCl, 2mM K₂HPO₄, 4mM MgCl₂, pH7.4)와 60 μ l microsomal protein(0.5mg/ml)을 넣고 100 μ M NADPH, 100 μ M H₂O₂, 5 μ M FeCl₃를 처리후 30분 후에 20 μ M CaCl₂, 30 μ M arsenazo(III), 100 μ M ATP를 첨가후 654nm에서 10분 동안 흡광도를 측정하였다.

④ NADPH-cytochrome C reductase 活性度 測定⁴¹⁾

심장 근원세포를 1×10^7 세포씩 100mm petri dish에 옮겨 24시간 배양후, 새로운 배지에 검액을 1/100, 1/200, 1/500 및 1/1,000의 농도로 희석되게 처리하여 24시간 더 배양하였다. 그 후 검액과 doxorubicin($30 \mu\text{M}$) 또는 allylamine($10 \mu\text{M}$)을 처리하여 24시간 더 배양시켰다. 배양종료 후 세포로부터 microsome을 분리하였다. Cuvette에 1ml의 cytochrome C(0.125mM), 0.2ml KCN(15mM), $60 \mu\text{l}$ microsome (0.5mg protein/ml)을 넣은 후 phosphate buffer를 가하여 volume을 2.4ml이 되도록 하였다. 10mM NADPH 용액 0.1ml 을 가한 후 37°C 에서 10분 동안 550nm의 흡광도를 측정하였다.

NADPH-cytochrome C reductase 활성도는 extinction coefficient = $21\text{cm}^2/\text{mmol}$ 를 이용하여 $\Delta 550\text{nm} \times 1,000/21 \times 2.5/\text{mg}$ microsomal protein의 공식에 의해 계산하여 nmol/min/mg protein으로 표시하였다.

3) 心臟切片(myocardial slice) 實驗

Myocardial slice는 Parrish등의 방법³⁴⁾에 따라 만들었다. 즉 흰쥐를 경추탈골에 의해 죽인 후 즉시 심장을 적출하여 4°C 의 calcium-free buffer에 담구어 blood를 제거한 후 ventricle을 atria와 분리하여 평평하게 한 후 8mm biopsy punch로 tissue core를 만들어 Brendle/Vitron tissue slicer(Vitron, Inc., Tucson, Az, USA)로 약 $350 \mu\text{m}$ 두께의 slice를 만들었다. Slice는 titanium screen holder에 loading시켜 6well tissue culture plate에 배양하였다. 배양액으로는 25mM HEPES, 2.4mM L-glutamine, $84 \mu\text{g/ml}$ gentamicin, 5% fetal calf serum이 포함된 Waymouth's medium을 사용하였다. 배양액에 검액을 1/100의 희석농도로 첨가하고 doxorubicin (10^{-5}M)과 allylamine (10^{-5}M)을 가한 후 24시간 배양하면서 단백질 합성, ATP량, creatin kinase 활성도¹⁰⁾ 및 malondialdehyde 생성량을 측정하였다. 단백질 합성량은 Smith등의 방법³⁹⁾에 따라 ^3H -leucine의 함량을 측정하였고 ATP량은 Kricka의 방법²⁸⁾에

따라 luciferin-luciferase bioluminescent assay를 수행하였다. 배양액 내의 creatin kinase량은 Sigma사의 enzyme kit(catalogue 47-20)를 사용하여 측정하였으며 lipid peroxidation량은 Halliwell과 Gutteridge의 방법²⁴⁾에 따라 thiobarbituric acid법으로 malondialdehyde량을 측정하였다.

4) 統計 分析

모든 실험결과 분석은 student t-test를 이용하여 유의성을 검증하였다.

III. 실험성적

1. 摘出心臟 灌流法을 이용한 虛血心臟에 대한 效果

검액의 허혈심장에 대한 효과를 검증하기 위하여 흰쥐의 심장을 적출하여 관류법을 이용한 실험을 수행하였다.

心臟搏動數는 대조군의 경우 $295 \pm 34\text{beats/min}$ 에서 재관류시 $28 \pm 13\text{beats/min}$ 으로 급격한 감소 현상을 보여 주었으나 검액 투여군은 관류시 $280 \pm 15\text{beats/min}$ 에서 재관류시 $158 \pm 30\text{beats/min}$ 으로 대조군에 비하여 $P < 0.05$ 의 有意性 있는 증가를 보여 주었다(Table II Fig. 1).

左心室壓에 대한 효과로서는 대조군의 경우 초기심압 $151 \pm 34\text{mmHg}$ 에서 실험적 허혈 유발후 재관류시 $12 \pm 5\text{mmHg}$ 로 현저한 감소현상을 보였으며 검액 처리군은 $143 \pm 25\text{mmHg}$ 에서 재관류시 $58 \pm 23\text{mmHg}$ 으로 $P < 0.05$ 의 有意性 있는 회복경향을 보여 주었다(Table III, Fig. 2).

실험적 허혈 유발후 回復灌流量은 대조군의 경우 $11.5 \pm 23\text{ml/min}$ 에서 재관류시 관류량이 $4.8 \pm 1.3\text{ml/min}$ 으로 $41.1 \pm 3.1\%$ 가 회복되었으나 검액 투여군은 $12.5 \pm 3.1\text{ml/min}$ 에서 재관류시 $8.3 \pm 2.1\text{ml/min}$ 로 $66.3 \pm 0.4\%$ 의 회복을 보여 주었다(Table IV, Fig. 3).

관류액내의 LDH 活性度에 대한 결과로서는 대조군의 경우 실험적 허혈 유발후 관류액내로 유출된 LDH의 활성도가 0.24 ± 0.02 units/min/g이었으며 검액 투여군은 0.15 ± 0.04 units/min/g으로서 세포의 손상으로 인한 LDH의 유출이 대조군에 비하여 $P < 0.05$ 의 有意性 있는 減少를 나타냈다(Table V, Fig. 4).

Table II. The effect of *Gamigunshimtang*(加味健心湯) on heart rate after ischemia in perfused rat heart.

Groups	No. of animals	Heart rate(beats/min)	
		Perfusion	Reperfusion
Control	3	$295 \pm 34^{a)}$	$28 \pm 13^*$
Treated	3	280 ± 15	$158 \pm 30^*$

a): Mean \pm Standard error.

Rats were administrated *Gamigunshimtang* 1ml/day for 10 days.

* $P < 0.05$

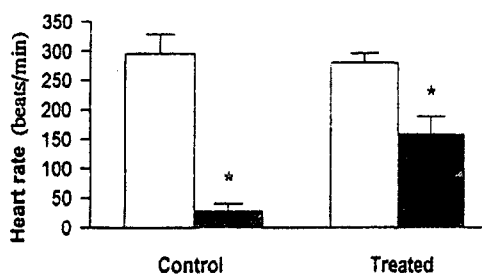


Fig. 1. The effect of *Gamigunshimtang*(加味健心湯) on heart rate after ischemia in perfused rat heart. Rats were administrated *Gamigunshimtang* 1ml/day for 10 days.

□: Perfusion, ■: Reperfusion

* $P < 0.05$

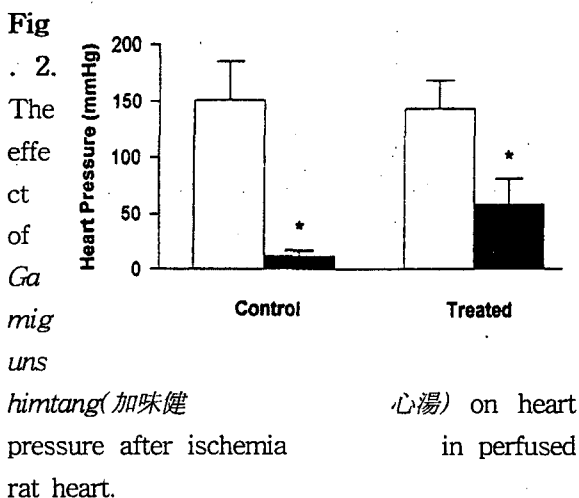
Table III. The effect of *Gamigunshimtang*(加味健心湯) on heart pressure after ischemia in perfused rat heart.

Groups	No. of animals	Heart Pressure(mmHg)		Developed pressure(%)
		Perfusion	Reperfusion	
Control	3	$151 \pm 34^{a)}$	$12 \pm 5^*$	0.75
Treated	3	143 ± 25	$58 \pm 23^*$	22.89

a): Mean \pm Standard error.

Rats were administrated *Gamigunshimtang* 1ml/day for 10 days.

* $P < 0.05$



□: Perfusion, ■: Reperfusion

* $P < 0.05$

Table IV. The effect of *Gamigunshimtang*(加味健心湯) on recovered flow rate after ischemia in perfused rat heart.

Groups	No. of animals	Flow rate(ml/min)		% Recovered
		Perfusion	Reperfusion	
Control	3	11.5 ± 2.3 ^{a)}	4.8 ± 1.3*	41.1 ± 3.1
Treated	3	12.5 ± 3.1	8.3 ± 2.1*	66.3 ± 0.4

a):Mean ± Standard error.

Rats were administrated *Gamigunshimtang* 1ml/day for 10 days.

* P < 0.05

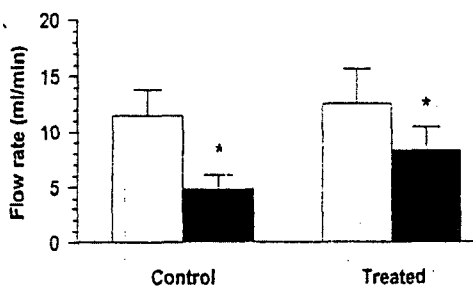


Fig. 3. The effect of *Gamigunshimtang*(加味健心湯) on recovered flow rate after ischemia in perfused rat heart.

Rats were administrated *Gamigunshimtang* 1ml/day for 10 days.

□: Perfusion, ■: Reperfusion

* P < 0.05

Table V. The effect of *Gamigunshimtang*(加味健心湯) on LDH release into the perfusion medium after ischemia in perfused rat heart.

Groups	LDH activity (unit/min/g of heart)
Control	0.24 ± 0.02 ^{a)}
Treated	0.15 ± 0.04*

a):Mean ± Standard error.

Rats were administrated *Gamigunshimtang* 1ml/day for 10 days.

* P < 0.05

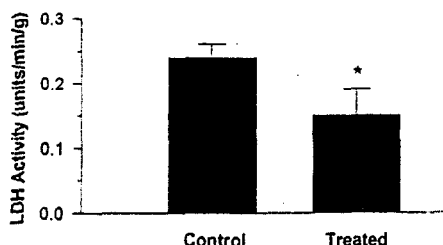


Fig. 4.. The effect of *Gamigunshimtang*(加味健心湯) on LDH release into the perfusion medium after ischemia in perfused rat heart.

Rats were administrated *Gamigunshimtang* 1ml/day for 10 days.

* P < 0.05

2. 心臟 根源細胞 培養에서 毒性物質에 대한 效果

H9C2 심장 근원세포의 성장에 대한 검액의 효과를 실험한 바, 대조군은 0.0550±0.0012(Absorbency at 540nm)에서 검액을 최종농도 1/100, 1/200, 1/500 및 1/1000로 세포배양액에 첨가하여 7일 동안 배양시켰을 때 1/200과 1/100의 농도에서 0.0770±0.0019(Absorbency at 540nm), 0.0890±0.0031(Absorbency at 540nm)로 대조군에 비해 P<0.05의 有意性 있는 增加를 보여 주었다(Table VI, Fig. 5).

심장 근원세포에서 심장 독성물질로 널리 알려진 doxorubicin과 allylamine에 의한 LDH의 유출에 대한 검액의 보호효과를 실험한 바, 세포배양에 doxorubicin을 첨가하여 배양하면 세포의 괴사에 의한 LDH의 유출로 배지내 LDH의 활성도

가 대조군의 $514 \pm 29\%$ 로 증가되었다. 그러나 검액을 처리한 군은 LDH의 유출이 약간 감소 경향을 보여, 특히 1/200과 1/100의 농도에서는 대조군에 비해 $398 \pm 17\%$ $376 \pm 10\%$ 만 증가되었다. Allylamine을 처리한 경우 LDH의 유출이 대조군에 비해 $209 \pm 10\%$ 증가되었으나 검액을 1/1000과 1/500의 희석농도로 첨가한 군은 $134 \pm 7.8\%$ $127 \pm 5.3\%$ 로 대조군의 150%이하로 감소되었으며 1/200과 1/100의 농도에서는 각각 $105 \pm 10.3\%$ 와 $102 \pm 5.2\%$ 로 대조군과 유사한 정도로 회복되었다(Table VII, Fig. 6).

Doxorubicin과 allylamine에 의한 Ca ATPase 활성도 감소에 대한 검액의 효과를 실험한 바 doxorubicin을 배양액에 첨가하여 배양후 microsome을 분리하여 Ca ATPase 활성도를 검정한 결과 대조군은 $0.0020 \pm 0.0004 \Delta A645/\text{min}$ 이고 doxorubicin을 배양액에 첨가한 군은 $0.0005 \pm 0.0001 \Delta A645/\text{min}$ 로 대조군에 비해 $P < 0.05$ 로 有意性 있게 減少되었으며 검액을 1/1000과 1/500의 농도로 첨가하여 doxorubicin과 함께 배양한 군은 Ca ATPase 활성도가 $0.0020 \pm 0.0003 \Delta A645/\text{min}$ 와 $0.0020 \pm 0.0002 \Delta A645/\text{min}$ 로 대조군의 수준으로 회복되었으며 1/200과 1/100의 검액농도 처리군은 오히려 대조군에 비해 $0.0030 \pm 0.0004 \Delta A645/\text{min}$, $0.0040 \pm 0.0003 \Delta A645/\text{min}$ 로 $P < 0.05$ 의 有意性 있는 增加를 보여 주었다. Allylamine의 경우에도 검액을 동시에 처리한 군은 Ca ATPase 활성도의 감소를 효과적으로 보호해 주었다. 특히 1/200의 검액농도 처리군은 대조군 $0.0029 \pm 0.0002 \Delta A645/\text{min}$ 에 비하여, $0.0036 \pm 0.0002 \Delta A645/\text{min}$ 로 도리어 $P < 0.05$ 의 有意性 있는 增加를 나타내었다(Table VIII, Fig. 7).

NADPH-cytochrome C reductase에 대한 검액의 효과를 실험한 바, H9C2 심장근원 세포에 doxorubicin을 첨가하여 배양하면 NADPH-cytochrome C reductase의 활성도가 대조군 $0.36 \pm 0.042 \text{nmole}/\text{min}/\text{mg}$ protein에 비해 $0.97 \pm 0.071 \text{nmole}/\text{min}/\text{mg}$

protein로 크게 증가되었다. 검액을 1/1000과 1/500의 희석농도로 첨가한 군은 doxorubicin만 처리한 군에 비해 $0.76 \pm 0.022 \text{nmole}/\text{min}/\text{mg}$ protein $0.74 \pm 0.013 \text{nmole}/\text{min}/\text{mg}$ protein으로 $P < 0.05$ 의 有意性 있는 감소를 보여 주었으며 1/200의 희석농도에서는 대조군과 유사한 $0.42 \pm 0.052 \text{nmole}/\text{min}/\text{mg}$ protein로 회복되었으나 有意性은 없고 1/100의 농도에서는 $0.12 \pm 0.035 \text{nmole}/\text{min}/\text{mg}$ protein로 대조군보다도 더 감소되었다. Allylamine의 경우도 doxorubicin과 유사한 결과를 보여 주어 검액 1/200과 1/100의 희석 농도군에서는 $0.52 \pm 0.052 \text{nmole}/\text{min}/\text{mg}$ protein, $0.39 \pm 0.061 \text{nmole}/\text{min}/\text{mg}$ protein로 allylamine에 의해 $1.17 \pm 0.042 \text{nmole}/\text{min}/\text{mg}$ protein로 증가된 NADPH-cytochrome C reductase의 활성도가 대조군 $0.43 \pm 0.031 \text{nmole}/\text{min}/\text{mg}$ protein의 수준으로 회복되었으나 有意性은 없다(Table IX, Fig. 8).

Table VI. Effects of *Gamigunshimtang*(加味健心湯) on cell proliferation in H9C2 myoblast cell.

Groups	Absorbency at 540nm
1	$0.0550 \pm 0.0012^{a)}$
2	0.0550 ± 0.0013
3	0.0570 ± 0.0024
4	$0.0770 \pm 0.0019^*$
5	$0.0890 \pm 0.0031^*$

a): Mean \pm Standard error.

1. Control
2. 1/1000 *Gamigunshimtang*
3. 1/500 *Gamigunshimtang*
4. 1/200 *Gamigunshimtang*
5. 1/100 *Gamigunshimtang*

* $P < 0.05$

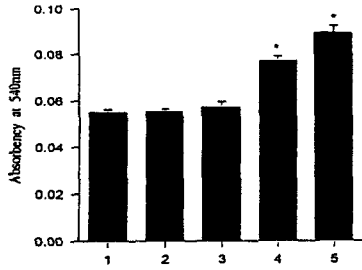


Fig. 5. Effects of *Gamigunshimtang*(加味健心湯) on cell proliferation in H9C2 myoblast cell.

1. Control
 2. doxorubicin only (A), allylamine only (B)
 3. 1/1000 *Gamigunshimtang*
 4. 1/500 *Gamigunshimtang*
 5. 1/200 *Gamigunshimtang*
 6. 1/100 *Gamigunshimtang*
- * P < 0.05

a): Mean \pm Standard error.

1. Control
 2. doxorubicin only (A), allylamine only (B)
 3. 1/1000 *Gamigunshimtang*
 4. 1/500 *Gamigunshimtang*
 5. 1/200 *Gamigunshimtang*
 6. 1/100 *Gamigunshimtang*
- * P < 0.05

Table VII. Effects of *Gamigunshimtang*(加味健心湯) on doxorubicin (A) and allylamine (B) induced lactic dehydrogenase release in H9C2 myoblast cell.

(A)

Groups	LDH activity (% of control)
1	100 \pm 12 ^{a)}
2	514 \pm 29*
3	491 \pm 9*
4	476 \pm 11*
5	398 \pm 17*
6	376 \pm 10*

(B)

Groups	LDH activity (% of control)
1	100 \pm 7 ^{a)}
2	209 \pm 10*
3	134 \pm 7.8*
4	127 \pm 5.3*
5	105 \pm 10.3*
6	102 \pm 5.2*

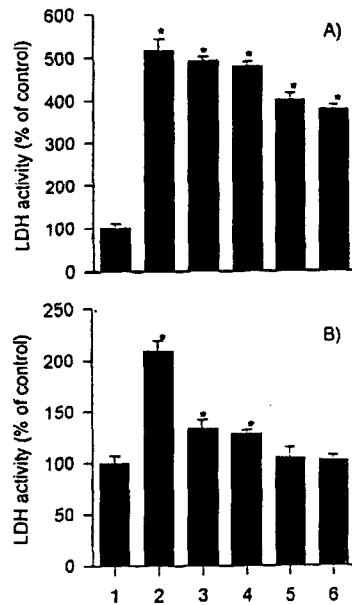


Fig. 6. Effects of *Gamigunshimtang*(加味健心湯) on doxorubicin (A) and allylamine (B) induced lactic dehydrogenase release in H9C2 myoblast cell.

1. Control
 2. doxorubicin only (A), allylamine only (B)
 3. 1/1000 *Gamigunshimtang*
 4. 1/500 *Gamigunshimtang*
 5. 1/200 *Gamigunshimtang*
 6. 1/100 *Gamigunshimtang*
- * P < 0.05

Table VII. The effect of *Gamigunshimtang*(加味健心湯) on doxorubicin (A) and allylamine (B) induced decrease of Ca ATPase activity in H9C2 myoblast cell.

(A)

Groups	Ca ATPase activity ($\Delta A_{645}/\text{min}$)
1	0.0020 \pm 0.0004 ^{a)}
2	0.0005 \pm 0.0001*
3	0.0020 \pm 0.0003
4	0.0020 \pm 0.0002
5	0.0030 \pm 0.0004*
6	0.0040 \pm 0.0003*

(B)

Groups	Ca ATPase activity ($\Delta A_{645}/\text{min}$)
1	0.0029 \pm 0.0002 ^{a)}
2	0.0014 \pm 0.0001*
3	0.0027 \pm 0.0003
4	0.0032 \pm 0.0002
5	0.0036 \pm 0.0002*
6	0.0023 \pm 0.0004*

a):Mean \pm Standard error.

1. Control
2. doxorubicin only (A), allylamine only (B)
3. 1/1000 *Gamigunshimtang*
4. 1/500 *Gamigunshimtang*
5. 1/200 *Gamigunshimtang*
6. 1/100 *Gamigunshimtang*

* P < 0.05

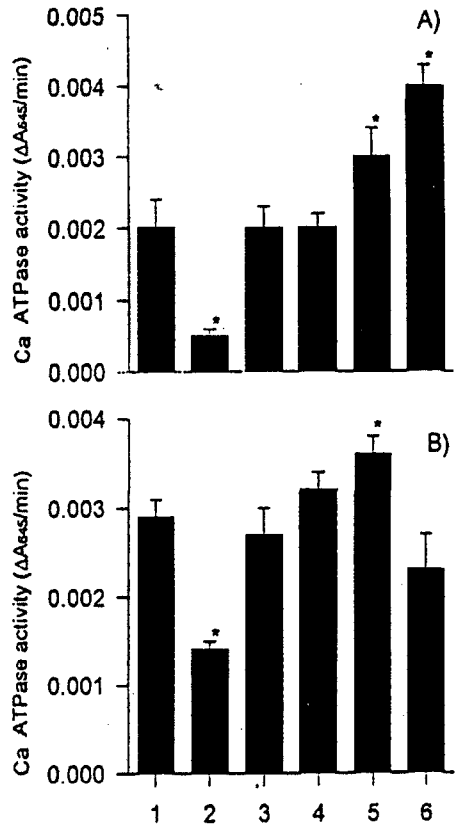


Fig. 7. The effect of *Gamigunshimtang*(加味健心湯) on doxorubicin (A) and allylamine (B) induced decrease of Ca ATPase activity in H9C2 myoblast cell.

1. Control
 2. doxorubicin only (A), allylamine only (B)
 3. 1/1000 *Gamigunshimtang*
 4. 1/500 *Gamigunshimtang*
 5. 1/200 *Gamigunshimtang*
 6. 1/100 *Gamigunshimtang*
- * P < 0.05

Table IX. The effect of *Gamigunshimtang*(加味健心湯) on doxorubicin (A) and allylamine (B) induced increase of NADPH-cytochrome C reductase activity in H9C2 myoblast cell.

(A)

Groups	NADPH-cytochrome C reductase (nmole/min/mg protein)
1	0.36 ± 0.042a ¹⁾
2	0.97 ± 0.071*
3	0.76 ± 0.022*
4	0.74 ± 0.013*
5	0.42 ± 0.052
6	0.12 ± 0.035*

(B)

Groups	NADPH-cytochrome C reductase (nmole/min/mg protein)
1	0.43 ± 0.031a)
2	1.17 ± 0.042*
3	0.91 ± 0.022*
4	0.83 ± 0.032*
5	0.52 ± 0.052
6	0.39 ± 0.061

a): Mean ± Standard error.

1. Control
 2. doxorubicin only (A), allylamine only (B)
 3. 1/1000 *Gamigunshimtang*
 4. 1/500 *Gamigunshimtang*
 5. 1/200 *Gamigunshimtang*
 6. 1/100 *Gamigunshimtang*
- * P < 0.05

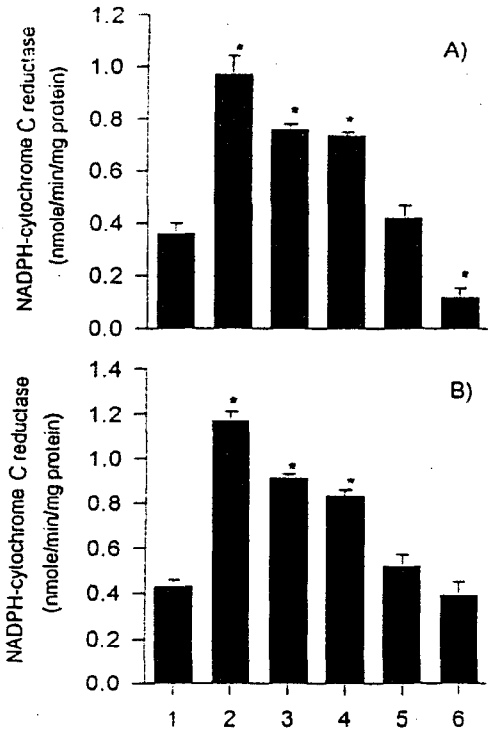


Fig. 8. The effect of *Gamigunshimtang*(加味健心湯) on doxorubicin (A) and allylamine (B) induced increase of NADPH-cytochrome C reductase activity in H9C2 myoblast cell

1. Control
 2. doxorubicin only (A), allylamine only (B)
 3. 1/1000 *Gamigunshimtang*
 4. 1/500 *Gamigunshimtang*
 5. 1/200 *Gamigunshimtang*
 6. 1/100 *Gamigunshimtang*
- * P < 0.05

3. Myocardial slice culture에서 毒性物質에 대한 效果

흰쥐의 myocardial slice culture에서 단백질 합성에 대한 검액의 효과를 실험한 바, 배양액에 doxorubicin(10⁻⁵M)을 첨가하면 단백질의 합성이

12시간 부터 대조군 220 ± 20 DPM/mg slice wet wt에 비해 180 ± 20 DPM/mg slice wet wt으로 $P < 0.05$ 로 有意性 있게 減少되었으나 검액을 1/100의 희석농도로 첨가한 군에서는 24시간 후 단백질 합성량이 대조군 880 ± 40 DPM/mg slice wet wt보다는 480 ± 80 DPM/mg slice wet wt로 감소되었지만 doxorubicin만 처리한 군의 150 ± 70 DPM/mg slice wet wt보다는 훨씬 더 증가되었다. Allylamine의 경우도 유사한 결과를 얻었다 (Table X, Fig. 9).

ATP함량에 대한 실험에서는 대조군의 경우 24시간 배양 동안 ATP함량에 변화가 거의 없었으나 doxorubicin(10^{-5} M) 또는 allylamine(10^{-5} M)을 첨가한 군은 Fig.9의 단백질합성 경우에서 처럼 12시간후 부터 대조군 115 ± 3 (nmole/g slice wet wt) $\times 1000$ 에서 83 ± 2 (nmole/g slice wet wt) $\times 1000$ 로, 대조군 110 ± 3 (nmole/g slice wet wt) $\times 1000$ 에서 70 ± 3 (nmole/g slice wet wt) $\times 1000$ 로 $P < 0.05$ 로 有意性 있게 減少하여 24시간 후에는 70 ± 3 (nmole/g slice wet wt) $\times 1000$, 60 ± 4 (nmole/g slice wet wt) $\times 1000$ 로 크게 감소되었다. 그러나 검액을 1/100의 희석농도로 동시처리한 군은 doxorubicin과 allylamine에 의한 ATP의 감소현상을 24시간 후 100 ± 6 (nmole /g slice wet wt) $\times 1000$ 과 90 ± 3 (nmole/g slice wet wt) $\times 1000$ 으로 상당히 보호해 주었다 (Table XI, Fig. 10).

세포질 내의 효소인 creatin kinase의 유출에 대한 실험에서는 배양액에 doxo- rubicin과 allylamine을 첨가하면 24시간 후 세포에서 creatin kinase가 유출되는 양은 대조군 980 ± 100 Units/L/mg slice wet wt, 1010 ± 40 Units/L/mg slice wet wt에서 1610 ± 20 Units/L/mg slice wet wt와 1910 ± 40 Units/L/mg slice wet wt로 $P < 0.05$ 로 有意性 있게 增加되었으며 검액을 동시에 처리한 군은 1220 ± 30 Units/L /mg slice wet wt과 1570 ± 100 Units/L/mg slice wet wt으로 독성물질만 처리한 군에 비해서 효소의 유출이

$P < 0.05$ 로 有意性 있게 減少되었다 (Table XII, Fig. 11).

Lipid peroxidation에 대한 검액의 보호 효과에 관한 실험을 한 바 myocardial slice culture에서 배양액에 allylamine과 doxorubicin을 첨가하면 lipid peroxidation에 의해 malondialdehyde의 생성이 대조군의 $60 \pm 5 \mu$ M MDA/mg slice에 비해 각각 $162 \pm 18 \mu$ M MDA/mg slice와 $315 \pm 16 \mu$ M MDA/mg slice로 $P < 0.05$ 로 有意性 있게 增加되었다. 검액을 1/100의 희석농도로 allylamine과 동시 처리한 군은 $118 \pm 10 \mu$ M MDA/mg slice이고 doxorubicin과 동시 처리한 군은 $200 \pm 16 \mu$ M MDA/mg slice로 $P < 0.05$ 로 有意性 있게 減少되었다 (Table XII Fig. 12).

Table X. The effect of *Gamigunshimtang* (加味健心湯) on doxorubicin (A) and allylamine (B) induced decrease of protein synthesis in cultured adult rat myocardial slices.

(A)

Groups	DPM/mg slice wet wt		
	Time(hr) 6	12	24
1	110 ± 20^{st}	220 ± 20	880 ± 40
2	120 ± 20	260 ± 20	$480 \pm 80^*$
3	100 ± 20	$180 \pm 20^*$	$150 \pm 70^*$

(B)

Groups	DPM/mg slice wet wt		
	Time(hr) 6	12	24
1	120 ± 10^{st}	250 ± 20	860 ± 50
2	120 ± 10	245 ± 15	$350 \pm 60^*$
3	120 ± 10	$100 \pm 20^*$	$110 \pm 10^*$

a): Mean \pm Standard error.

1. Control
2. Gamigunshimtang + toxicant
3. Toxicant only

* P < 0.05

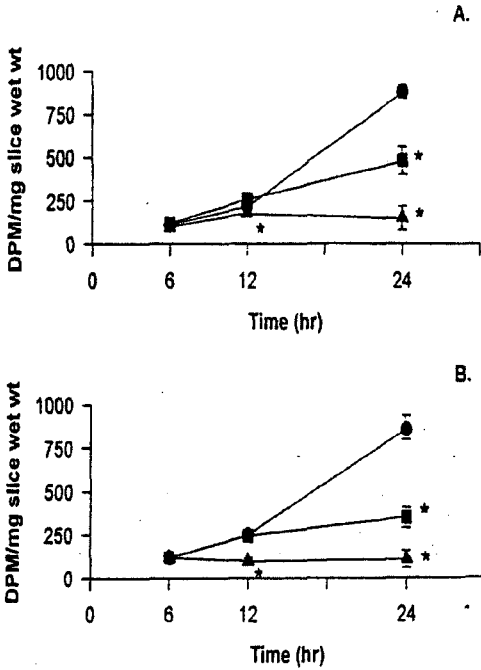


Fig. 9. The effect of *Gamigunshimtang*(加味健心湯) on doxorubicin (A) and allylamine (B) induced decrease of protein synthesis in cultured adult rat myocardial slices.

1. ●: Control
 2. ■: *Gamigunshimtang* + toxicant
 3. ▲: Toxicant only
- * P < 0.05

Table XI. The effect of *Gamigunshimtang*(加味健心湯) on doxorubicin (A) and allylamine (B) induced decrease of ATP content of cultured adult rat myocardial slices.

(A)

Groups	ATP (nmole/g slice wet wt)×1000		
	Time(hr) 6	12	24
1	105 \pm 4 ^{a)}	115 \pm 3	125 \pm 5
2	110 \pm 5	105 \pm 2	100 \pm 6
3	100 \pm 2	83 \pm 2*	70 \pm 3*

(B)

Groups	ATP (nmole/g slice wet wt)×1000		
	Time(hr) 6	12	24
1	100 \pm 5 ^{a)}	110 \pm 3	125 \pm 4
2	95 \pm 3	105 \pm 3	90 \pm 3
3	100 \pm 2	70 \pm 3*	60 \pm 4*

a): Mean \pm Standard error.

1. Control
2. *Gamigunshimtang* + toxicant
3. Toxicant only

* P < 0.05

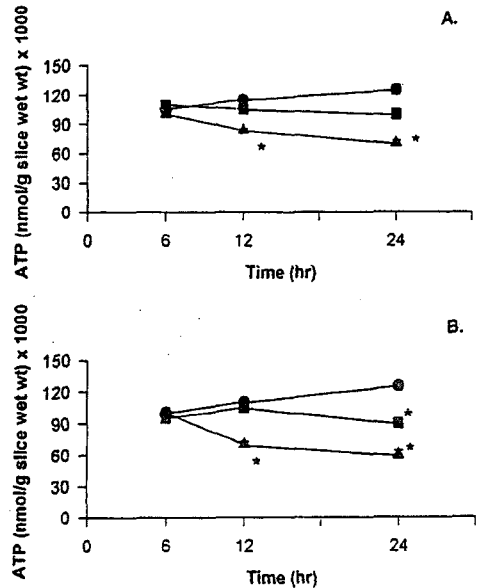


Fig. 10. The effect of *Gamigunshimtang* (加味健心湯) on doxorubicin (A) and allylamine (B) induced decrease of ATP content of cultured adult rat myocardial slices.

- 1. ●: Control
 - 2. ■: *Gamigunshimtang* + toxicant
 - 3. ▲: Toxicant only
- * P < 0.05

Table XII. The effect of *Gamigunshimtang* (加味健心湯) on doxorubicin (A) and allylamine (B) induced release of the cytosolic enzyme creatin kinase into the culture medium of adult rat myocardial slices.

(A)

Groups	Units/L/ mg slice wet wt		
	Time(hr) 6	12	24
1	600 ± 80 ^{a)}	980 ± 80	980 ± 100
2	600 ± 80	1100 ± 70	1220 ± 30*
3	600 ± 80	970 ± 80	1610 ± 20*

(B)

Groups	Units/L/ mg slice wet wt		
	Time(hr) 6	12	24
1	590 ± 30 ^{a)}	960 ± 50	1010 ± 40
2	610 ± 30	1110 ± 50	1570 ± 100*
3	650 ± 50	1400 ± 60	1910 ± 40*

a): Mean ± Standard error.

- 1. Control
 - 2. *Gamigunshimtang* + toxicant
 - 3. Toxicant only
- * P < 0.05

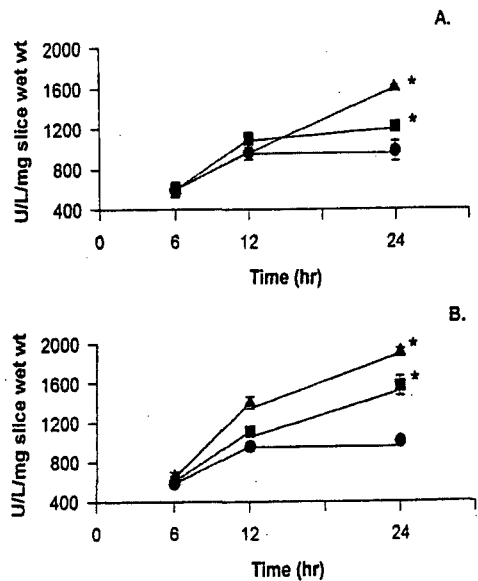


Fig. 11. The effect of *Gamigunshimtang* (加味健心湯) on doxorubicin (A) and allylamine (B) induced release of the cytosolic enzyme creatin kinase into the culture medium of adult rat myocardial slices.

- 1. ●: Control
 - 2. ■: *Gamigunshimtang* + toxicant
 - 3. ▲: Toxicant only
- * P < 0.05

Table XIII. The effect of *Gamigunshimtang* (加味健心湯) on doxorubicin and allylamine induced malondialdehyde(MDA) formation as an indication of lipid peroxidation in adult rat myocardial slices.

Groups	µM MDA/mg slice wet wt
1	60 ± 5 ^{a)}
2	162 ± 18*
3	315 ± 16*
4	118 ± 10*
5	200 ± 16*

a): Mean \pm Standard error

1. Control
2. Allylamine (10^{-5} M) only
3. Doxorubicin (10^{-5} M) only
4. Allylamine + *Gamigunshimtang*
5. Doxorubicin + *Gamigunshimtang*

* P < 0.05

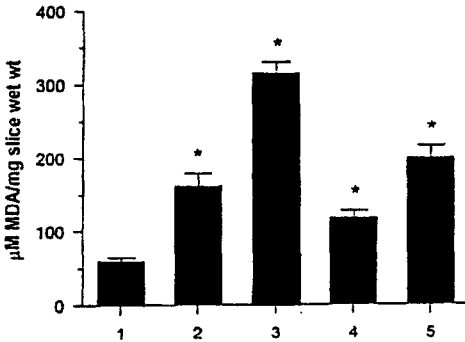


Fig. 12. The effect of *Gamigunshimtang*(加味健心湯) on doxorubicin and allylamine induced malondialdehyde(MDA) formation as an indication of lipid peroxidation in adult rat myocardial slices.

1. Control
2. Allylamine (10^{-5} M) only
3. Doxorubicin (10^{-5} M) only
4. Allylamine + *Gamigunshimtang*
5. Doxorubicin + *Gamigunshimtang*

* P < 0.05

IV. 고 찰

加味健心湯은 心膽虛恟, 觸事易驚에 응용되는 加味溫膽湯과 氣滯, 痰飲, 食積을 治하는 正傳加味二陳湯을 合方加減한 補心健脾湯에 心熱 및 惡血을 풀어주는 黃連이 主劑인 瀉心湯을 合한 처방으로서,^{2,3,7,12)} 저자들은 順氣化痰하는 加味健心湯의 임상적 효능을 실험적으로 규명하기 위하여

흰쥐의 적출심장 및 H9C2 심장 myoblast 세포, 흰쥐의 myocardial slice culture을 이용하여 효능을 비교 검토하였으며 대표적 심장 독성물질로는 doxorubicin과 allylamine을^{30,38)} 이용하였다.

Doxorubicin은 anthracycline계 물질로서 본래 *Streptomyces peucetius*에서 추출되어 항암제로서 쓰여 왔다²⁰⁾. 그러나 doxorubicin은 심한 심장 독성을 유발하는 부작용이 발견되어 사용이 제한되고 있다. Doxorubicin의 심장에 대한 독성기작으로는 oxygen free radical을 생성하므로써 심장 세포에 손상을 주는 것으로 알려져 있다.^{21,33,40)} Allylamine은 불포화아민으로서 의약품과 polymer의 생산에 이용되어 왔으나 체내에서 benzylamine oxidase에 의해 acrolein으로 변하여 심장독성을 유발하는 것으로 알려져 왔다.¹⁹⁾

摘出心臟灌流法은 Langendorff²⁹⁾가 개와 토끼의 심장관류법을 개발한 이래 실험동물을 사용한 것보다 체내 다른 기관의 영향을 배제하고 대상 기관만 실험할 수 있는 장점을 갖고 있기 때문에 심장연구의 대표적 *in vitro* system으로 이용되어 왔다. 본 실험에서는 흰쥐의 摘出心臟灌流法을 이용하여 관류 및 재관류를 통해 심장에 허혈을 유발하여 心臟搏動數, 左心室壓, 回復灌流量 및 LDH의 流出量^{17,18)}을 측정된 결과 心臟搏動數는 對照群이 관류시 295 \pm 34beats/min이던 것이 재관류시 28 \pm 13beats/min로 급격한 감소현상을 보여 주었으나, 加味健心湯 投與群은 관류시 280 \pm 15beats/min이던 것이 재관류시 158 \pm 30beats/min로 약간의 回復 傾向을 보여 주었다. 左心室壓에 대한 효과로서 對照群은 실험적 허혈유발 후 developed pressure가 0.75%로 거의 회복되지 않았으나, 加味健心湯 投與群은 143 \pm 25mmHg에서 재관류시 58 \pm 23mmHg로 developed pressure가 22.89%로서 약간의 회복 경향을 보여주었다. 虛血 誘發 後 재관류시의 回復灌流量은 對照群이 4.8 \pm 1.3ml/min으로서 41.1 \pm 3.1%가 회복 되었으나, 加味健心湯 投與群은 8.3 \pm 2.1ml/min로서

66.3±0.4%의 有意性 있는 增加를 보여 주었다. LDH流出量에 대한 效果로서는 對照群의 경우 虛血 誘發 後 관류액내 LDH流出量은 0.24±0.02unit/min/g of heart이었으나, 加味健心湯 投與群은 0.15±0.04unit/min/g of heart로서 對照群에 비해 有意性 있는 減少를 보여 주었다. 結果적으로 加味健心湯은 심장의 虛血 狀態를 對照群에 비해 월등히 개선시키는 效果를 보여 주었다.

H9C2 heart myoblast 세포는 원래 embryonic BDIX rat heart tissue에서 유도한 세포주로서 skeletal muscle의 많은 특징들을 갖고 있어 대표적 심장 세포주로서 많이 이용되어 왔다.³¹⁾ 세포의 증식은 일반적으로 [³H]-thymidine이 DNA로 유입되는 양을 측정하는 방법을 많이 사용하고 있으나 본 실험에서는 MTT chemical을 이용하여 동위원소의 사용없이 살아 있는 세포의 대사능력을 통하여 세포의 증식을 측정하였다. 즉 MTT 염료가 세포에 의해서 대사되어 생성된 MTT-formazan 생성물을 흡광도 측정하여 세포의 증식능력을 추정하였다. 본 실험의 결과 加味健心湯은 H9C2 심장 근원세포에서 대조군 0.0550±0.0012에서 0.0890±0.0031로 세포의 증식을 촉진시켰으며, LDH의 活性度에 대한 效果로서는 doxo - rubicin과 allylamine에 의해 유도 LDH의 活性度가 대조군의 514±29%와 209±10%로 증가되었다. 그러나 doxorubicin을 처리한 후 검액을 처리한 군은 LDH의 유출이 약간 감소 경향을 보여, 1/100의 농도에서는 대조군에 비해 376±10%만 증가되었고, Allylamine을 처리한 후 1/100농도의 검액을 첨가한 경우에는 102±5.2%로 대조군과 유사한 정도로 회복되었다. LDH 활성도 측정은 세포의 viability test 일종으로서 세포가 손상되면 세포막이 파괴되거나 permeability에 변화가 생기게 된다. 이때 cytosolic 효소인 LDH가 배양액으로 유출됨으로써 배양액 내의 LDH 활성도를 측정하여 세포의 viability를 추정하게 된다.¹⁵⁾ 본 방법은 dye

exclusion 방법보다는 훨씬 민감한 방법으로 알려져 왔다. Ca ATPase活性度에 대한 效果로서는 대조군은 0.0020±0.0004△A645/min이고 doxorubicin을 배양액에 첨가한 군은 0.0005±0.0001△A645/min로 대조군에 비해 有意性 있게 減少되었으며 1/100의 검액농도 처리군은 오히려 대조군에 비해 0.0040±0.0003△A645/min로 有意性 있는 增加를 보여 주었다. Allylamine의 경우에도 검액을 동시에 처리한 군은 Ca ATPase활성도의 감소를 效果적으로 보호해 주었다. 특히 1/200의 검액농도 처리군은 대조군 0.0029±0.0002△A645/min에 비하여 0.0036±0.0002△A645/min로 도리어 有意性 있는 增加를 나타내었다. 심장세포가 정상적으로 기능을 수행하기 위해서는 Ca²⁺ homeostasis를 유지시켜 주는 것이 중요하며 이는 Ca ATPase 역할에 의한 것으로 알려져 왔다.⁴¹⁾ 따라서 본 실험에서는 Ca ATPase활성도를 측정하여 세포의 Ca²⁺ homeostasis 기능을 추정하였다. NADPH-cytochrome C reductase活性度에 대한 效果로서는 H9C2 심장근원 세포에 doxorubicin을 첨가하여 배양하면 대조군 0.36±0.042nmole/min/mg protein에 비해 0.97±0.071nmole/min/mg protein로 크게 증가되었고, 검액을 1/500의 희석농도로 첨가한 군은 doxorubicin만 처리한 군에 비해 0.74±0.013nmole/min/mg protein으로 有意性 있는 減少를 보여 주었으며 1/100의 농도에서는 0.12±0.035nmole/min/mg protein로 대조군보다도 더 감소되었다. Allylamine의 경우도 doxorubicin과 유사한 결과를 보여 주어 검액 1/100의 희석 농도군에서는 0.39±0.061nmole/min/mg protein로 allylamine에 의해 1.17±0.042nmole/min/mg protein로 증가된 NADPH-cytochrome C reductase의 활성도가 대조군 0.43±0.031nmole/min/mg protein의 수준으로 회복되어 NADPH-cytochrome C reductase의 활성도 증가를 效果적으로 보호해 주었다. 심장세포에서 NADPH-cytochrome C reductase는 Fe³⁺, Fe³⁺-

ADP, Fe^{3+} -ferritin의 환원에 관여하며 이의 증가는 세포내에서 lipid peroxidation과 효소들의 inactivation을 유발한다.⁴¹⁾ 본 실험에서는 NADPH-cytochrome C reductase활성도를 측정하여 세포내 reduction potential을 검증하였다.

Precision-cut myocardial slice culture는 조직 내의 세포가 체내와 같은 3차원적인 형태를 유지하고 세포 배양의 장점을 살릴 수가 있기 때문에 심장 연구의 새로운 tool로서 각광을 받고 있다.³⁹⁾ 본 연구에서는 흰쥐의 myocardial slice culture에서 doxorubicin과 allyamine에 의해 유도된 독성에 대한 加味健心湯의 효과를 검증한 결과 독성물질에 의한 단백질 합성의 저해, ATP량의 감소, creatin kinase의 유출 및 lipid peroxidation의 증가를 효과적으로 보호하였다. 단백질 합성의 경우 12시간 뒤의 반응은 대조군 220 ± 20 DPM/mg slice wet wt에 비해 doxorubicin을 처리한 경우 180 ± 20 DPM/mg slice wet wt에서 검액을 처리하면 260 ± 20 DPM/mg slice wet wt로, allyamine을 처리한 경우는 대조군 250 ± 20 DPM/mg slice wet wt에서 100 ± 20 DPM/mg slice wet wt으로 단백질 합성의 저해가 현저하고 검액을 처리한 경우는 245 ± 25 DPM/mg slice wet wt로 독성물질로 부터 단백질 합성이 저해되는 것을 보호해 주었다. ATP의 양의 감소에 대한 효과를 보면 12시간 후 doxorubicin을 처리한 경우 대조군 115 ± 3 nmole/g slice wet wt) $\times 1000$ 에서 83 ± 2 nmole/g slice wet wt) $\times 1000$ 로 有意性 있는 減少를 보여 주었고 검액을 처리한 경우는 105 ± 2 nmole/g slice wet wt) $\times 1000$ 로 독성물질로 부터 감소를 보호해 주었다. allyamine의 경우도 유사하여 대조군 110 ± 3 nmole/g slice wet wt) $\times 1000$ 에서 70 ± 3 nmole/g slice wet wt) $\times 1000$ 으로 有意性 있는 減少를 보여 주었고 검액을 처리한 경우는 105 ± 3 nmole/g slice wet wt) $\times 1000$ 으로 독성물질로 부터 감소를 보호해 주었다. creatin kinase의 유출에 대한 효과를 보면

12시간 후 doxorubicin을 처리한 경우 대조군 980 ± 80 Units/L/mg slice wet wt에서 970 ± 80 Units/L/mg slice wet wt으로 검액을 처리한 경우는 1100 ± 70 Units/L/mg slice wet wt으로, allyamine을 처리한 경우는 대조군 960 ± 50 Units/L/mg slice wet wt에서 1400 ± 60 Units/L/mg slice wet wt으로 검액을 처리한 경우는 1100 ± 50 Units/L/mg slice wet wt으로 有意性 있는 차이가 없었다. lipid peroxidation에 의한 malon-dialdehyde의 생성에 대한 효과를 보면 대조군의 $60 \pm 5 \mu$ M MDA/mg slice에 비해 allyamine을 처리한 경우 $162 \pm 18 \mu$ M MDA/mg slice고 doxorubicin을 처리한 경우는 $315 \pm 16 \mu$ M MDA/mg slice로 有意性 있게 增加되었다. 검액을 1/100의 희석농도로 allyamine과 동시 처리한 군은 $118 \pm 10 \mu$ M MDA/mg slice이고 doxorubicin과 동시 처리한 군은 $200 \pm 16 \mu$ M MDA/mg slice로 有意性 있게 減少되었다. 이상의 결과로 보아 doxorubicin과 allyamine에 의한 단백질의 합성저해와 ATP의 양의 감소는 거의 비슷한 양상을 보여 주어 12시간 후 부터 有意性 있는 차이를 보여 주었으나 LDH와 유사한 cytosolic 효소인 creatin kinase의 유출은 보다 덜 민감하여 12시간에는 有意性 있는 차이가 없었다. lipid peroxidation의 경우 allyamine보다는 doxorubicin이 큰 증가를 보여 주었으며 이는 allyamine의 경우 lipid peroxidation이 primary toxic event가 아니라는 Chacon과 Acosta의 보고²¹⁾와 일치되었다.

이상의 실험 결과로 보아 加味健心湯이 心臟細胞 및 組織 器官의 각 level에서 有意性 있는 效果가 認定되었으므로 臨床에서 虛血性心臟疾患의 治療에 活用할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

加味健心湯의 虛血性心臟疾患에 대한 效能을 실험적으로 규명하기 위하여 摘出心臟灌流法으로

心搏動數, 左心室壓, 回復灌流量, LDH의 流出量測定 및 H9C2 心臟 根源細胞 培養, 흰쥐의 myocardial slice culture을 이용하여 실험한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 加味健心湯은 摘出心臟灌流法 실험에서 心臟搏動數, 左心室壓 및 回復灌流量을 有意性 있게 回復시켰으며, 灌流液內 LDH 活性度도 有意性 있게 減少시켰다.

2. 加味健心湯은 心臟 根源細胞의 增殖을 촉진시켰으며, 대표적 심장 독성물질인 doxorubicin과 allylamine에 의해 유도된 LDH의 세포로 부터 流出, Ca ATPase減少 및 NADPH-cytochrome C reductase의 活性度 增加를 有意性 있게 保護하였다.

3. 加味健心湯은 흰쥐의 myocardial slice culture에서 doxorubicin과 allylamine에 의해 유도된 단백질 합성의 저해, ATP량의 감소, creatin kinase의 세포외 유출 및 lipid peroxidation의 증가를 效果的으로 保護하였다.

참고문헌

1. 金在佶 : 原色 天然藥物大事典(2版), 서울, 南山堂, p.(上卷)41, 43, 69, 75, 158, 311, 358, 419, (下卷)91, 188, 189, 247, 265, 269, 314, 1989
2. 金定濟 : 東洋醫學 診療要鑑, 서울, 東洋醫學研究院, p.193, 211, 430, 1985
3. 宋炳基 : 方證新編, 서울, 東垣出版社, pp.595-596, 1988
4. 尹吉榮 : 東醫臨床方劑學, 서울, 明寶出版社, p.93, 94, 107, 1985
5. 李尙仁 : 本草學, 서울, 수서원, p.56, 58, 174, 203, 244, 281, 344, 354, 380, 381, 382, 501, 1983
6. 許 浚 : 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, p.140, pp.262-271, 1971
7. 全國韓醫科大學 本草學教授 : 本草學, 서울, 永林社, pp.136, 180, 291, 292, 294, 302, 347, 350, 353, 354, 366, 369, 370, 371, 448, 466, 493, 536, 540, 542, 1988
8. 김성구 : 적출가토 활동 심장에서 Allopurinol의 심근보호에 관한 연구, 순환기 학회지, 제22권 제1호, pp.7-17, 1992
9. 金仁燮 : 瓜蒌薤白半夏湯 및 加味瓜蒌薤白半夏湯이 虛血性心疾患에 미치는 影響, 서울, 慶熙 大學校 大學院, 1995
10. 이동준 : 冷血 potassium 心停止液을 이용한 心筋保護의 實驗的 研究, 大韓胸部外科學會誌, 제13권 제3호, pp.186-193, 1980
11. 李英彬 : 麝香蘇合元이 再灌流裝置下의 흰쥐 심장에 미치는 영향, 경희대학교대학원, 1996
12. 任峻模, 文炳淳, 金世吉 : 溫膽湯 煎湯液이 心臟機能에 미치는 影響, 圓光韓醫學, 제3권 제1 호, pp.99-113, 1993
13. 全燦鎔 : 虛血性 心臟에 대한 勝金散의 實驗的 研究, 서울, 慶熙大學校 大學院, 1994
14. 楊仁齊 : 仁齊直指方, 福州, 福建科學技術出版社, p.188, 1989
15. 陳秉良 : 心臟의 臨床檢査, 北京, 人民衛生出版社, pp.177-178, 1995
16. H. Dehnert, H. J. Döring : The isolated perfused warm-blooded heart according to Langendorff, New York, Biomesstechnik-Verlag March GmbH, D-7806 March, pp.8-13, 31-33, 1985
17. Harvey A. Mc Gehee : The principles and practice of medicine, Appleton & Lange pp.88-110, 127-144, 976-985, 1988
18. Plowman, P. N. : Cardiology, New York, John Wiley & Sons Ltd, pp.50-96, 1987

19. Boor, P J. and Nelson, T. J. : Biotransformation of cardiovascular toxin, allylamine, by rat and human cardiovascular tissue. *J.Mol. Biol. Cellular Cardiol.* 14: 679-682, 1982
20. Carter, S. K. : Adriamycin - a review. *J. Natl. Cancer Inst.* 155: 1265-1274, 1975
21. Chacon, E. and Acosta, D. : Mitochondrial regulation of superoxide by Ca^{2+} : an alternative mechanism for the cardiotoxicity of doxorubicin. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 107: 117-128, 1991
22. Davis, C. D., Farb, A., Thorgeirsson, S. S., Virmani, R., and Synderwine, E. G.: Cardiotoxicity of heterocyclic amine food mutagens in cultured myocytes and in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 124: 202-211, 1994
23. Fraconi, F., Isabella, S., Paola, F., rosanna, M., Baccaro, C., Montorsi, L., Bandinelli, R. and GioHi, A.: The protective effects of taurine on hypoxia (performed in the absence of glucose) and on reoxygenation (in the presence of glucose) in Guinea-pig heart. *Biochem. Pharmacol.* 34:2611-2615, 1985
24. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C.: Free radicals and metal ions in human disease. *In Methods in Enzymology.* Vol. 186. L. Packer and A. N. Glazer eds. pp. 67-70, Academic Press, 1990
25. Jeffrey C. Milliken, Anne M. Billingsley, and Hillel Laks, Modified Reperfusate After Long-Term Preservation of the Heart, *Ann. Thorac. Surg.* 47:725-8, 1989
26. John H. Rousou, Richard M. Engelman, William A. Dobbs, and Stanley Lemeshow, The Optimal Potassium Concentration in Cardioplegic Solutions, *Anne. Thorac. surg.* Vol.32 No.1, 1981
27. Khedun, S. M., Maharaj, B., Leary, W. P. and Lockett, C. J. : The effect of hexane on the ventricular fibrillation threshold of the perfused rat heart. *Toxicol.* 71: 145-150, 1992
28. Kricka, L. J. : Clinical and biochemical applicaitons of luciferases and luciferins. *Anal. Biochem.*, 175: 14-21, 1988
29. Langendorff, O. Untersuchungen and Ueberleberden Sagertierzen. *Pfugers Arch. Ges. Physiol.* 61:291-332, 1895
30. Lambert, C., Mossiat, C., Tanniere, Z. M., Maupoil, V. and Rochette, L. Antiarrhythmic effect of amiodarone on doxorubicin acute toxicity working rat hearts. *Cardiovasc. Res.* 24: 653-658, 1990
31. Morwinski, R. : The cultured myocardial cells as a model in cardiac research. *Biomed Biochem. Acta.*, 45: 237-240, 1986
32. Neuß, Regitz-Zagrosek, V., Hildebrandt, A., and Fleck, E. : Human cardiac fibroblasts express an angiotensin receptor with unusual binding characteristics which is coupled to cellular proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 204: 1334-1339, 1994
33. Olson, R. D. and Mushlin, P. S.: Doxorubicin cardiotoxicity: Analysis of prevailing hypothesis. *FASEB Journal* 4: 3070-3081, 1990
34. Parrish, A. R., Shipp, N. G., Spall, R. D., Dorr, R. T., Korumdieck, C. L., Gandolfi, A. J. and Brendel, K. : Organ culture of rat myocardial slices: An alternative in

- vitro* tool in organ specific toxicology. *Toxicol. Methods.*, 2:101-111, 1992
35. Santostasi, G., Kutty, R. K., Bartirelli, A. L., Yasumoto, T., and Krishna, G.: Maitotoxin-induced myocardial cell injury: Calcium accumulation followed by ATP depletion precedes cell death. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 102: 164-173, 1990
36. Shipp, N. g., Dorr, R. t., Alberts, D. S., Dawson, B. V., and Hendrix, M. : Characterization of experimental mitoxantrone cardiotoxicity and its partial inhibition by ICRF-187 in cultured neonatal rat heart cells. *Cancer Res.*, 53: 550-556, 1993
37. Schlafer M, Kane PF, et al : Possible role for cytotoxic oxygen metabolites in the pathogenesis of cardiac ischemic injury, *Circulation* 66:1-85-1-92, 1982
38. Sklar, J. L., Anderson, P. G. and Boor, P. J: Allylamine and acrolein toxicity in perfused rat hearts. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 107: 535-544, 1991
39. Smith, P. F., Gandolfi, A. J., Krumdieck, C. L., Putnam, C. W., Zukowski, C. F. III, Davis, W. D. and Brendel, K. : Maintenance of adult rat liver slices in dynamic organ culture. *Life Sci.*, 36: 1367-1375, 1985
40. Thompson JA, Hess ML : The oxygen free radical system : A fundamental mechanism in the production of myocardial necrosis, *Prog Cardiovasc dis.* 28:449-462, 1986
41. Vile, G. F., and Winterbourn, C. C.: di-N, N'-Dicarboxamidomethyl-N, N'-dicarboxymethyl-1, 2-diaminopropane (ICRF-198) and d-1, 2-Bis (3, 5-dioxopiperzine-1-yl) propane (ICRF-187) inhibition of Fe³⁺ reduction, lipid peroxidation, and CaATPase inactivation in heart microsomes exposed to Adriamycin. *Cancer Res.*, 50: 2307-2310, 1990