

酸素分壓에 의한 心筋細胞變化에 미치는 生脈散의 效果

신 선 호* · 류 도 곤** · 문병순*

ABSTRACT

Effects of Saengmaegsan Extract on Cultured Myocardial Cells induced by Oxygen Tension

Shin, Sun-Ho* · Ryu, Do-Gon** · Moon, Byung-Sun*

*Dept. of Cardiovascular Internal Medicine,

**Dept. of physiology, college of oriental medicine, Won-Kwang Univ., Iksan, Korea.

This study is designed to investigate the effects of *Saengmaegsan* extract on cultured myocardial cell sheets affected by oxygen tension change.

The results were as follows :

1. *Saengmaegsan* meaningfully restored the cellular activity decrease in the cultured myocardial cells affected by high oxygen tension.
2. *Saengmaegsan* meaningfully lessened the degree of total protein decrease in the myocardial cells caused by high oxygen tension.

* 원광대학교 한의과대학 순환기내과학교실

** 원광대학교 한의과대학 생리학교실

※ 본 연구는 한국 과학재단 지정, 원광대학교 의약자원 연구센터 및 전라북도 도청 (98-16-03-03-A-3)의 지원에 의한 것입니다.

3. *Saengmaegsan* meaningfully refrained from syntetic decrease of 4-hydroxyproline in both low oxygen tension group and high oxygen tension group.

Key Word : Oxygen tension, Curtured myocardial cell, Cellular activity, Total protein, 4-hydroxyproline

I. 緒論

生脈散은 陽邪暑熱로 인해 氣陰이 損傷되어 發生하는 氣短, 倦怠, 口渴, 汗出, 喘咳 等の 症狀를 治療하는데 使用되어 온 處方이다¹⁻³²⁾.

暑熱로 인해 肺가 損傷을 받으면 肺氣가 虛해져 氣短, 倦怠가 發生하고, 肺가 皮毛를 主管하는 作用이 喪失되어 肌表가 不堅해지면 汗出이 發生하며, 汗은 心主液이므로 汗出過多로 津液이 損傷되면 口渴, 心煩 等이 나타나며, 喘咳는 虛火가 乘肺하여 發生한다^{7, 8, 15, 21, 25, 30, 32, 33)}.

本方은 暑熱에 쓰이는 藥이긴 하나 治暑뿐만 아니라 淸熱 生津 補氣 作用이 있어서 全身의 生理機能을 推進하는데, 全身의 生理機能은 心臟에 依하여 調節되고^{5, 11, 34)} 心臟의 狀態는 脈으로 表現되기³⁵⁻³⁷⁾ 때문에 生脈散은 心臟疾患에 많이 응용되어 왔다.

心臟疾患은 最近 食生活의 西歐化, 老齡人口의 增加 等으로 因해서 發生率이 계속 增加하고 있으며, 우리나라 國民들의 重要한 死亡原因이 되고 있다³⁸⁾.

生脈散에 관한 實驗的 研究로는 金³⁹⁾의 血壓上升, 心搏動數 低下 및 心筋收縮力 增強, 李⁴⁰⁾의 運動持續時間의 延長 및 心搏數 低下, 李⁴¹⁾와 張 等⁴²⁾의 運動持續時間의 延長 및 血漿 滲透質 濃度의 上升의 抑制, 申 等⁴³⁾의 局所 腦血流量增加에 대한 報告 等이 있으며, 生脈散이 白鼠의 培養된 心筋細胞에 미치는 影響에 관한 研究가 報告되어 있으나 酸素分壓에 依한 損傷

에 관한 研究는 接할 수 없었다.

이에 著者는 生脈散이 調整된 酸素分壓條件에서 心筋細胞에 미치는 效果를 究明하기 위하여 調整된 酸素分壓條件에서 心筋細胞活性, 總蛋白質 合成, 4-hydroxyproline 合成을 測定하여 有意한 結果를 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 材料

1) 動物

실험동물로는 생후 3일 이내 Sprague-Dawley 종의 흰쥐를 암수 구별없이 사용하였다.

2) 藥材

본 실험에 사용한 生脈散의 處方內容은 《外傷辨惑論》¹⁾에 依據하였으며, 藥材는 원광대학교 익산한방병원에서 精選하여 使用하였고, 1貼의 內容과 分量은 다음과 같다.

生脈散의 處方構成

韓藥名	生藥名	重量
人蔘	Ginseng Radix	4g
五味子	Schizandrae Fructus	4g
麥門冬	Lirioepis Tuber	8g
總計 (Total amount)		16g

2. 方法

1) 檢液의 調製

生脈散粉末 500g을 3,000ml 증류수와 함께 환저플라스크에 넣고 냉각기를 부착하여 2시간 동안 전열기로 전탕한 후 냉각시키고, 3,000rpm에서 20분간 원심분리하여 상청액을 취한 다음 여과지로 여과한 濾液을 감압회전증발기를 이용하여 감압농축한 후 동결건조기로 완전히 건조하여 시료를 調製하였다. 시료를 세포에 접종하기 전에 0.22 μ m pore의 여과지로 여과 멸균하여 농도를 조정하여 다음 사용하였다.

2) 세포의 배양

생후 3일된 Sprague-Dawley 종의 흰쥐를 70% ethanol로 소독하고 犧牲시킨 뒤 즉시 흉강을 열고 심실만을 적출하여 준비된 4°C Ham's Balanced Salt Solution (HBSS)에 담구어 두었다. 10마리의 심실을 모아 1mm 두께로 잘게 썰어 4°C HBSS로 세척하여 혈액을 씻어낸 후, trypsinizing flask에 심근조직과 세포분리효소인 0.125% collagenase를 10ml 넣고 magnetic bar를 이용하여 60-100회/분의 속도로 교반하였다. 처음 5분간 해리되어 나오는 세포는 적혈구나 섬유모세포가 많으므로 버리고 새로운 collagenase를 조직에 넣고 15분 동안 처리한 후 상청액을 취하여 얼음 위에 저장하였다. 이러한 일련의 조작을 4회 반복하여 심근세포가 포함된 효소액 40ml를 얻었다. 각각 1,000rpm으로 3분간 원심분리하여 침전시킨 후 심장실질 이외의 적혈구와 세포찌꺼기가 많이 포함된 상청액을 제거하였다. 남아 있는 세포덩어리에 HBSS를 첨가하여 pasteur pipette을 사용하여 섞은 후 1,000rpm으로 3분간 원심분리시켜 침전한 다음 상청액을 제거하고, 남아 있는 세포덩어리에 배양액을 넣어 충분히 섞어주었다. 그 중 일부를 채취하여 0.1% trypan blue로 염색한

후 위상차현미경하에서 hemocytometer를 이용하여 세포의 수를 측정하였다. 살아있는 세포의 숫자를 확인한 후, 세포수가 4×10^5 개/ml가 되도록 배양액을 이용하여 희석하였다. 희석된 세포를 Falco flask에 옮겨 심어서 배양기에 90분간 배양하였다. 90분이 지나면 심장내피세포와 섬유모세포는 배양용기의 바닥에 부착되나 심근세포는 여전히 배양액에 떠 있는 상태가 된다. 따라서 flask의 상청액을 모아서 다시 1,000rpm으로 3분간 원심분리하여 침전시킨 후 상청액을 제거하고, 남아 있는 세포덩어리에 배양액을 넣어 pasteur pipette을 사용하여 충분히 섞어 준 후 위상차현미경하에서 hemocytometer를 이용하여 세포의 수를 측정하였다. 세포의 최종 개수를 10^5 개/cm²가 되도록 배양액으로 희석한 후 배양용기에 심었다.

4) 산소분압의 형성

gaspack system(Becton Dickinson)을 고무관으로 가스통과 연결시키고 고무관에서 gaspack system으로 연결되는 부위에 0.2 μ m millipore filter를 사용하여 세균감염을 방지하였다. gaspack system 뚜껑의 마개를 먼저 연 상태에서 가스통의 코크를 열어 gaspack system 내부가 연결시킨 가스로 교환되게 하고 phenol red가 첨가된 배양액을 넣어 진분홍색에서 연분홍색으로 바뀌는 것으로 가스가 교환됨을 확인하였다. 60mm 배양 접시에 심근세포를 1×10^4 cell/dish로 넣고 배양액 3ml를 주입한 후 gaspack system에 넣었다. 저산소군은 10% O₂, 5% CO₂, 85% N₂의 가스조건에서 세포를 배양하고, 5% CO₂, 95% 공기에서 배양한 심근세포를 대조군으로 사용하였다. 각 군은 37°C에서 2, 4, 6일간 배양한 후 결과를 측정하였다.

5) 세포 활성의 측정

살아있는 세포의 mitochondria dehydrogenase

에 의해 3-(4,5-dimethyl thiazoyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)가 spectrometor로 측정 가능한 blue formazan product로 cellular reduction 되는 것에 근거하여 MTT검색법을 실시하였다. 각 실험 조건에서 세포를 배양한 후 생리적 식염수에 용해한 MTT 용액(최종농도 5mg/ml) (Sigma Co., MO., U.S.A.)을 각 well에 20 μ l씩 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 4시간동안 반응시킨 후 MTT용액을 제거하였다. 형성된 formazan crystal을 용해시키기 위해 dimethyl sulphoxide(DMSO)를 50 μ l씩 첨가하고 plate를 잘 흔든 후 ELISA reader(Molecular Devices, USA)로 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) 총 단백질 합성 측정

세포를 밝은 분홍색으로 염색시키는 sulforhodamine B(SRB)검색법은 세포가 합성한 총 단백질을 측정하는 방법이다. 각 실험 조건에서 배양한 세포에 50% cold trichloroacetic acid (TCA)를 50 μ l/well씩 가하여 최종 농도 10%에 달하게 하여 4 $^{\circ}$ C에서 1시간동안 방치하고 단백질 침전에 의해 세포0000포를 고정하였다. 증류수로 5회 세척하고 나서 1% acetic acid에 용해시킨 0.4% SRB용액 50 μ l/well을 가하여 상온에서 30분간 염색한 후 1% acetic acid로 5회 세척하여 결합하지 않은 염색물을 제거하였다. 세포를 잘 건조시킨 후 10mM/1 unbufferedtris(hydroxy) aminomethane(Tris base) 150 μ l로 SRB-bound protein을 잘 용해시키고 ELISA reader를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

7) 4-hydroxyproline 측정

교원질 합성을 측정하기 위해 Jammal 등⁽⁶⁸⁾의 방법을 약간 개선하여 시행하였으며 사용된 시약은 다음과 같이 조제하였다.

acetate-citrate buffer (pH 6.0) : 3.75g trisod-

ium citrate와 5.5g의 citric acid monohydrate를 395ml isopropyl alcohol에 용해시킨 후 증류수를 가하여 최종적으로 1000ml를 만들었다.

chloramine-T 용액 : 672mg chloramine-T를 10ml acetate-citrate buffer에 용해시켰다.

Ehrlich's reagent solution : 10g p-dimethylaminobenzaldehyde를 11ml 60% perchloric acid에 용해시켜 stock solution을 만들었다. stock solution 3ml에 50% isopropyl alcohol 8ml를 혼합하여 사용하였다.

각 실험 조건에서 세포를 배양한 후 2ml 6N HCl에 넣고 110 $^{\circ}$ C에서 12시간 가수분해시켜 30분간 실온에서 방치한 후 여과하여 50 μ l 씩을 취했다. 완전히 건조시킨 다음 methanol 50 μ l를 가하고 남아있는 염산이 제거될 때까지 110 $^{\circ}$ C에서 반응시켰다. 50% isopropyl alcohol 1.2ml을 넣어 남은 침전물을 용해하고 200 μ l chloramine-T를 첨가하여 상온에서 10분간 방치하였다. 1.0ml Ehrlich's reagent solution을 가하여 혼합하고 50 $^{\circ}$ C에서 90분간 배양한 후 상온에서 식혀 ELISA reader를 이용하여 558nm에서 흡광도를 측정하였다. 4-hydroxyproline의 표준용액을 만들기 위해 1mg의 trans 4-hydroxyproline (Sigma Co., St.,Lous, MO., U.S.A.)을 1ml 6N HCl에 녹여 stock solution을 만들고 0, 8, 16, 24, 32, 40 μ g/ml 6N-HCl이 되게 희석한 후 110 $^{\circ}$ C에서 12시간 가수분해하였다. 각 시료에 함유된 4-hydroxyproline의 양은 다음의 식으로 구하였다.

$$B/A \times 2000\text{ml}/C \times 1.0\text{g}/D$$

$$= 4\text{-hydroxyproline } \mu\text{g}/\text{ml}$$

A : 558nm에서 표준검체 1.0g의 흡광도

B : 시료의 흡광도

C : 시료의 량

D : 시료의 무게

8) 통계처리

실험결과의 통계처리는 Mac Stat View TM + 512를 이용하여 student's t-test에 준하였고, 실험치의 표현은 Mean±SE로 하였다.

III. 實驗成績

1. 심근세포활성에 미치는 영향

10%의 O₂를 처리한 저산소군의 세포활성은 대조군(5% CO₂, 95% 공기에서 배양한 심근세포)보다 약간 높게 나타나는 경향을 보였으나 유의성있는 결과는 아니었으며, 과산소군은 대조군보다 세포활성이 낮게 나타났으며 통계적으로 대조군과 유의성있는 차이를 보였다. 실험처리를 한 시간의 경과에 따라 2일 이후부터 4일 6일 째에 계속하여 세포의 활성이 감소하는 결과를 나타냈다(p<0.05) (Table I).

生脈散 10μg/ml을 처리한 실험군에서는 산소분압을 저농도로 처리한 군에서 대조군에 비하여 세포활성의 정도가 큰 차이를 보이지 않았으며, 과산소분압을 처리한 실험군에서는 대조군의 심근세포의 활성이 감소한 것에 비하여 세포활성감소의 정도가 유의성있게 회복되는 결과를 나타냈다 (p<0.05, p<0.01) (Table II).

Table I. EFFECT of OXYGEN TENSION on THE CELLULAR ACTIVITY in THE CULTURED MYOCARDIAL CELLS

Experimental Group	Cellular Activity by MTT(%)		
	2 day	4 day	6 day
Control	102.4±2.3	99.6±2.6	100.5±2.9
10% O ₂	111.7±5.6	107.8±3.2	106.8±3.5
90% O ₂	86.4±4.8*	79.3±6.4*	72.1±5.9*

Values are mean±SE of 10 experiments. The cultured cells were exposed to the mixed gas which were composed of 10% O₂, 8% CO₂, 85% N₂ in hypoxic group, 90% O₂, 5% CO₂, 5% N₂ in hyperoxic group, and 5% CO₂, 95% air for control group. It were treated for the period of 2, 4, 6 days in incubator. Statistical significance compared to normal conditioned air treated control. * p<0.05.

Table II. THE EFFECT of *Saengmaegsan* (SMS) EXTRACT on THE CHANGE of CELLULAR ACTIVITY INDUCED by OXYGEN TENSION in THE CULTURED MYOCARDIAL CELLS

Experimental Group	Cellular Activity by MTT(%)			
	0 day	2 day	4 day	6 day
10% O ₂ SMS 10μg/ml	100	104.8±4.3	103.4±3.6	105.1±3.9
90% O ₂ SMS 10μg/ml	100	91.4±4.9*	84.3±5.1**	83.5±4.7**

Values are mean±SE of 10 experiments. The cellular activity was assayed by MTT assay. The cultured cells were exposed to the mixed gas which were composed of 10% O₂, 8% CO₂, 85% N₂ in hypoxic group, 90% O₂, 5% CO₂, 5% N₂ in hyperoxic group, and 5% CO₂, 95% air for control group. It were treated for the period of 2, 4, 6 days in incubator. The experimental group were treated by the extract of *Saengmaegsan* 10 μg/ml. Statistical significance compared to normal conditioned group of 0 day. * p<0.05, ** p<0.01.

2. 심근세포내의 총 단백질 합성에 미치는 영향

산소분압의 변화로 유발한 심근세포내의 총 단백질 합성의 변화는 저산소농도군에서는 약간 감소하는 양상을 보이거나 큰 차이를 보이지 않았으며 배양기간이 2일 4일 6일간의 경시적 변화에도 차이를 나타내지 않았다. 과산소군은 배양 2일째에는 거의 변화를 보이지 않았다가 4일째와 6일째에 80%정도의 수준으로 심근세포의 총 단백질의 합성량의 변화가 유의성있게 감소하는 양상을 보였다($p<0.05$, $p<0.01$) (Table III). 生脈散 $10\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 실험군에서는 산소분압을 저농도로 처리한 군에서 대조군에 비하여 총 단백질 합성의 정도가 2일 4일 6일 등의 경시적 차이에 따라 약간씩 증가하는 결과를 나타냈으며, 과산소분압을 처리한 실험군에서는 대조군의 심근세포의 총 단백질의 합성량이 감소하는 정도가 심한 것에 비하여 총 단백질량의 감소정도가 유의성있게 緩和되는 결과를 나타냈다($p<0.05$) (Table IV).

Table III. EFFECT of OXYGEN TENSION on THE PRODUCTION of TOTAL PROTEIN in THE CULTURED MYOCARDIAL CELLS

Experimental Group	Total Protein(%)			
	0 day	2 day	4 day	6 day
10% O ₂	100	101.5±3.1	99.8±3.9	98.4±3.3
90% O ₂	100	97.5±4.3	81.7±3.6*	79.6±3.2**

Values are mean±SE of 10 experiments. The cultured cells were exposed to the mixed gas which were composed of 10% O₂, 8% CO₂, 85% N₂ in hypoxic group, 90% O₂, 5% CO₂, 5% N₂ in hyperoxic group. It were treated for the period of 2, 4, 6 days in

incubator. Statistical significance compared to normal conditioned group of 0 day. * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

Table IV. THE EFFECT of *Saengmaegsan* (SMS) EXTRACT on THE CHANGE of TOTAL PROTEIN PRODUCTION in THE CULTURED MYOCARDIAL CELLS INDUCED by THE OXYGEN TENSION

Experimental Group	Total Protein(%)			
	0 day	2 day	4 day	6 day
10% O ₂ SMS $10\mu\text{g/ml}$	100	102.3±3.8	104.2±4.7	107.8±5.4
90% O ₂ SMS $10\mu\text{g/ml}$	100	98.9±4.5	91.2±4.2*	92.8±5.1*

Values are mean±SE of 10 experiments. The cultured cells were exposed to the mixed gas which were composed of 10% O₂, 8% CO₂, 85% N₂ in hypoxic group, 90% O₂, 5% CO₂, 5% N₂ in hyperoxic group. It were treated for the period of 2, 4, 6 days in incubator. The experimental group were treated by the extract of *Saengmaegsan* $10\mu\text{g}$

Statistical significance compared to normal conditioned group of 0 day. * $p<0.05$.

3. 4-hydroxyproline 합성에 미치는 영향

4-hydroxyproline의 합성은 저산소분압을 처리한 실험군에서 대조군에 비하여 2일 째에 유의한 감소효과를 나타냈으며 4일과 6일 째에도 감소하는 결과를 나타냈다. 90% 과산소분압으로 처리한 실험군에서는 2일 째에 대조군에 비하여 교원질의 생성이 매우 유의성있게 감소하는 결과가 나타났다. 또한 4일째에도 유의한 감

소결과를 나타냈으며 6일째에도 유사한 결과를 나타냈다($p<0.05$, $p<0.01$) (Table V). 산소분압의 변화로 유발한 심근세포의 교원질 합성의 변화에 미치는 生脈散의 효과를 관찰하기 위하여 유의한 세포배양농도로 생각되는 生脈散 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 처리한 실험군에서는 산소분압을 저농도로 처리한 군에서 대조군에 비하여 교원질합성의 정도가 감소하는 결과를 緩和시켰으며, 90% 과산소분압으로 처리한 실험군에서는 대조군의 심근세포의 교원질합성이 감소한 것에 비하여 유의성있게 회복되는 결과를 나타냈다($p<0.05$) (Table VI).

Table V. THE EFFECT of OXYGEN TENSION on THE PRODUCTION of 4-HYDROXYPROLINE in THE CULTURED MYOCARDIAL CELLS

Experimental Group	Level of 4-hydroxyproline($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
	2 day	4 day	6 day
Control	9.21 ± 0.69	8.39 ± 0.56	7.58 ± 0.36
10% O ₂	$6.47\pm 0.47^*$	7.17 ± 0.63	7.41 ± 0.56
90% O ₂	$6.14\pm 0.53^{**}$	$6.84\pm 0.59^*$	6.43 ± 0.61

Values are mean \pm SE of 10 experiments. The cultured cells were exposed to the mixed gas which were composed of 10% O₂, 8% CO₂, 85% N₂ in hypoxic group, 90% O₂, 5% CO₂, 5% N₂ in hyperoxic group, and 5% CO₂, 95% air for control group. It were treated for the period of 2, 4, 6 days in incubator. Statistical significance compared to normal conditioned air treated control. * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

Table VI. THE EFFECT of *Saengmaegsan* (SMS) EXTRACT on THE CHANGE of 4-HYDROXYPROLINE PRODUCTION in THE CULTURED MYOCARDIAL CELLS INDUCED by THE OXYGEN TENSION

Experimental Group	Level of 4-hydroxyproline($\mu\text{g}/\text{ml}$)		
	2 day	4 day	6 day
Control	9.23 ± 0.56	8.46 ± 0.52	8.13 ± 0.45
10% O ₂ SMS $10\mu\text{g}/\text{ml}$	$6.47\pm 0.47^*$	7.47 ± 0.63	8.15 ± 0.56
90% O ₂ SMS $10\mu\text{g}/\text{ml}$	$6.57\pm 0.51^*$	7.23 ± 0.53	7.76 ± 0.63

Values are mean \pm SE of 10 experiments. The cultured cells were exposed to the mixed gas which were composed of 10% O₂, 8% CO₂, 85% N₂ in hypoxic group, 90% O₂, 5% CO₂, 5% N₂ in hyperoxic group. It were treated for the period of 2, 4, 6 days in incubator. The experimental group were treated by the extract of *Saengmaegsan* $10\mu\text{g}/\text{ml}$. Statistical significance compared to normal conditioned group of 0 day. * $p<0.05$.

IV. 考察

生脈散은 低血壓, shock, 心不全, 不整脈, 冠狀動脈疾患 等の 心臟疾患에 應用되고 있는 處方^{31, 32)}으로 暑熱에 쓰이는 藥이긴 하나 治暑뿐만 아니라 清熱生津補氣作用이 있어서 全身의 生理機能을 推進하는데, 全身의 生理機能은 心臟에 依하여 調節되고^{5, 11, 44)} 心臟의 狀態는 脈으로 表現되기³⁵⁻³⁷⁾ 때문에 生脈散은 心臟疾患에 많이 응용되어 왔다.

本方을 構成하는 人蔘은 性味が 甘, 微苦, 溫, 無毒하고 補脾益氣, 生津, 寧神益智의 效能이 있으며⁴⁴⁻⁵⁴), 神經系의 興奮, 하수체-부신피질계의 興奮, 強心, 高脂血症 防止 等の 藥理作用이 있고⁵⁵⁻⁵⁷), 麥門冬은 性味が 甘, 微苦, 寒, 無毒하고 滋陰瀉熱, 潤肺生津, 強心利尿의 效能이 있으며⁴⁴⁻⁵⁴), 多量의 葡萄糖과 粘液質로 強心, 血壓上升 및 酸素缺乏症에 대한 抵抗力을 增強시키는 藥理作用이 있으며^{40, 55-57}), 五味子는 性味が 酸, 溫, 無毒하고 斂肺滋腎, 生津斂汗, 澁精止瀉의 效能이 있으며⁴⁴⁻⁵⁴), 中樞神經系의 興奮, 血壓降下, 強心 等の 藥理作用이 있어⁵⁵⁻⁵⁷) 本方은 補氣, 瀉熱, 生津의 效能으로 氣短, 倦怠, 口渴, 汗出, 喘咳 等を 治療하는데 使用한다.

實驗報告에 의하면 生脈散은 rat의 出血에 의한 心搏動停止까지의 시간을 延長하고 心筋中에 glycogen이나 RNA의 함유량을 증가시키고 심근의 β 受容器를 직접 자극하여 強心效果를 생기게 하며³³), 熱射病, 肺結核, 慢性氣管炎, 低血壓, shock, 心不全, 不整脈, 冠狀動脈疾患 等の 疾患에 效果的으로 應用할 수 있다고 하였다.^{15, 17, 19, 25})

심장박동과 심근세포박동의 변화는 Kessler-Icekson 등⁵⁸)이 분리한 심장에서 배양한 심근세포의 박동을 측정하여, 심근세포독성으로 인한 심장기능의 표시자로서 이용되어왔다⁵⁹⁻⁶¹). 배양세포를 이용하는 방법^{62, 63})은 짧은 시간에 독성검사를 하기에 편리하고 외부의 유해인자에 대한 활성 및 기능 변화를 측정하기에 실험동물 모형에 비하여 간편하고 정확하며 또한 효율적으로 대량으로 검사할 수 있으며 재현성이 높기 때문에⁶⁴) 여러 가지 목적을 위하여 사용되는 실험모형이다.

본 연구에서는 심근세포의 손상에 대한 生脈散의 效果를 觀察하기 위하여, mitochondria에 대한 손상은 tetrazolium MTT assay를 거쳐 mitochondria의 inner membrane에 존재하는 succinic dehydrogenase의 활성을 측정하였고,

in vitro MTT assay를 통하여 관찰하였다^{65, 66}). 한편 세포외막의 손상의 정도는, 세포외로 漏出되는 lactic dehydrogenase(LDH) volume을 측정하여 관찰하였다⁶⁷). 또한 세포가 합성하는 총 단백질의 양과 세포 간질조직의 주성분인 hydroxyproline을 측정하여 세포활성을 간접적으로 관찰하고자 하였다⁶⁸).

심근세포의 일차배양에는 여러 가지 제한점이 있었다. 먼저 심근세포는 출생 전에 분화가 거의 끝난 상태이고 대부분 더이상의 증식을 하지 않는다. 본 실험에서는 배양과정 중 심근세포의 증식은 거의 없는 반면, 배양세포에 일부 포함되어 있던 심장내피세포나 섬유모세포와 같은 비심근세포들이 과다한 성장이 일어나 지속적인 배양이 어려워 다른 세포들과 세포융합이나 혼합배양을 통하여 계속적인 증식을 유도하고자 하는 노력도 하였다. 따라서 본 연구에서는 각 군마다 쥐 10마리의 심실을 모아 수치를 반복하여 측정하므로써 오차를 줄이고자 하였다.

심근세포들이 어떻게 자극을 인지하며, 외부의 손상에 대하여 어떻게 반응하는가를 살펴보고 生脈散이 심근세포에 미치는 영향을 조사하였다. 동맥경화 등으로 인한 혈류장애는 심근세포에 혈류공급을 차단하고 심근세포는 저산소 상태에 빠지며, 세포대사에도 중요한 변화가 생겨 결국 심장 및 전체생리대사에 장애를 초래할 수 있는 것이다. 산소 조건이 in vitro 상태에서 심근세포에 미치는 영향을 관찰하는 것은 많은 문제점이 있어 정상 생리상태를 재현하기 쉽지 않으나 실험수치를 반복해서 측정하고 일정한 산소조건을 유지하여 오차를 줄이고자 하였다. 본 연구에서는 심근세포에 일정한 산소 분압을 주기 위해서 산소를 각각 10%, 90%로 하고, 이산화탄소는 세포 생육에 최적 조건인 5%로 유지하고 나머지는 질소로 채웠다. 세균 감염의 문제를 해결하기 위해 0.2 μ m millipore filter를 부착한 gasepack system에 가스를 연결시켜 교환해줌으로써 세포 배양액내의 pH에 큰 변화를

주지 않으면서 저산소 조건과 과산소 조건을 형성해 줄 수 있었다.

본 연구에서는 손상된 심근세포에 대한 한약재의 효과를 평가하기 위하여 동맥경화증 등의 혈류변화로 인하여 유발되는 혈류공급장애로 산소분압이 심근세포에 미치는 영향과 生脈散 투여후의 효과를 비교관찰하였다. 산소분압의 변화로 유발된 세포의 증식과 성장의 차이를 비교할 때 저산소군에서는 대조군과 같은 정도의 양상을 보였고, 과산소군에서는 6일 후부터 유의한 차이를 보였다. 이러한 차이는 사람의 치근막세포가 10%산소 농도에서 증식이 변하지 않았다는 보고와 같은 결과이며, 백서에서 유래한 섬유아세포 증식이 저산소 상태에서 촉진된다고 보고한 것보다 크게 다르지 않았다. MTT assay는 Mosmann⁶⁰⁾에 의하여 화학물질에 대한 세포독성효과의 검사를 위하여 시행되었다. 이러한 방법은 세포내의 mitochondria의 내막에 존재하는 succinic dehydrogenase로부터 tetrazolium MTT에 의하여 생성되는 불용성의 blue formazan을 용매를 이용하여 용해하므로써 측정할 수 있는 것이다. 따라서 본 실험의 결과는 세포의 손상과 활성 회복의 지표가 되는 것이다. MTT assay의 결과는 生脈散 추출물 10 μ g/ml의 농도는 산소분압의 변화로 유발되는 심근세포의 변화를緩和시켜주는 효과가 있는 것으로 생각된다.

세포가 성장, 분화하는데도 정상적인 효소와 단백질 합성이 이루어져야 하므로 본 연구에서는 총 단백질 생산을 SRB 측정법을 이용하여 대조군과 상대적인 합성 정도로 비교한 결과 저산소 조건은 단백질 합성에 별 영향을 미치지 않은 것으로 보이며, 과산소군에서 4일 후 일시 감소되었으나 다시 회복되는 양상을 볼 수 있었다. 본 연구에서는 저산소군보다 과산소군에서 총 단백질 합성의 감소를 보였다.

본 연구 결과 生脈散 추출물은 총 단백질 합성과 교원질 합성의 정도가 저산소 조건이나 과

산소 조건 모두 세포 기능을 억제하는 기전에 약간의 변화를 초래하였으므로, 本方은 심장질환의 예방 및 치료에 많은 도움을 줄 것으로 생각되나 이에 대한 자세한 기전에 관한 연구가 지속적으로 필요하리라고 생각된다.

V. 結 論

心臟疾患에 사용되는 生脈散의 效能을 實驗的으로 究明하고자 生脈散 추출물이 산소분압의 변화로 손상을 誘發시킨 白鼠의 心筋細胞에 미치는 영향을 관찰한 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 生脈散은 저산소분압으로 유발시킨 심근세포 활성 감소에 대해서는 有意性있는 변화가 없었으나, 과산소분압으로 유발시킨 심근세포 활성 감소를 有意性있게 恢復시켰다.
2. 生脈散은 저산소분압으로 유발시킨 심근세포의 총 단백질합성 감소에 대해서는 有意性있는 변화가 없었으나, 과산소 분압으로 유발시킨 총 단백질합성 감소를 有意性있게 緩和시켰다.
3. 生脈散은 산소분압의 변화로 유발시킨 심근세포의 4-hydroxyproline합성의 減少를 저산소분압 실험군, 과산소분압 실험군 모두에서 有意性있게 緩和시켰다.

以上の 結果로 보아 生脈散은 산소분압의 변화로 유발시킨 심근세포손상을 緩和시켰으므로 心臟疾患의 豫防과 治療에 有效하게 活用될 수 있을 것으로 思料된다.

參考文獻

1. 李東垣: 東垣十種醫書, 서울, 大星文化社, pp.41, 90-91, 339, 1983.
2. 朱丹溪: 丹溪心法, 台北, 五洲出版社,

- pp.141-142, 1981.
3. 張景岳: 景岳全書, 대구, 東洋綜合通信教育院, p.1064, 1978.
 4. 李梴: 醫學入門, 서울, 高麗醫學, p.493, 1989.
 5. 許浚: 東醫寶鑑, 서울, 南山堂, p.74, 292, 1992.
 6. 龔廷賢: 萬病回春, 台北, 大中國圖書公司, pp.89-90, 1975.
 7. 吳謙: 醫宗金鑑, 서울, 大星文化社, p.27, 1983.
 8. 汪昂: 醫方集解, 台北, 文光圖書有限公司, pp.173-174, 1986.
 9. 黃度淵: 方藥合編, 서울, 南山堂, p.132, 1988.
 10. 王肯堂: 六科準繩, 서울, 大星文化社, p.45, 1992.
 11. 謝觀: 中國醫學大辭典, 上海, 商務印書館, p.827, 2309, 1975.
 12. 張璠: 張氏醫通, 台北, 金藏書局, p.68, 117, 1976.
 13. 楊蘊祥 外: 古今名方, 河南, 河南科學技術出版社, p.124, 1983.
 14. 吳克潛: 古今醫方集成, 上海, 上海大眾書局, p.561, 1980.
 15. 上海中醫學院: 中醫內科學, 上海, 商務印書館, p.314, 1983.
 16. 成都中醫學院: 中醫眼科學, 北京, 人民衛生出版社, p.408, 1985.
 17. 上海中醫學院: 方劑學, 上海, 商務印書館, pp.241-243, 1993.
 18. 江育仁: 中醫兒科學, 北京, 人民衛生出版社, p.300, 1987.
 19. 張伯叟: 中醫內科學, 北京, 人民衛生出版社, p.115, 207, 1993.
 20. 冷方南: 中國基本中成藥, 北京, 人民衛生出版社, pp.214-215, 1988.
 21. 李慶業: 方劑學, 北京, 中國醫藥科技出版社, pp.140-141, 1989.
 22. 王義烈: 吳中醫集, 江蘇, 江蘇科學技術出版社, p.696, 1992.
 23. 石學敏: 中醫綱目, 天津, 人民日報出版社, p.2220, 1993.
 24. 江克明 外: 方劑大辭典, 서울, 醫聖堂, p.307, 1991.
 25. 路一平 外: 方劑學, 서울, 醫聖堂, pp.200-203, 1993.
 26. 金定濟: 診療要鑑, 서울, 東洋醫學研究院, p.342, 1974.
 27. 東醫科學院: 東醫處方大全(I), 서울, 麗江出版社, p.112, 1993.
 28. 康舜洙: 方劑學, 서울, 癸丑文化社, pp.159-160, 1984.
 29. 康舜洙: 바른방제학, 서울, 大星文化社, pp.92-93, 1996.
 30. 李德新: 氣血論, 沈陽, 遼寧科學技術出版社, pp.83, 116, 155, 346-347, 1990.
 31. 李鐘朴: 現代中醫生理學基礎, 서울, 醫聖堂, p.97, 1993.
 32. 彭懷仁: 中醫方劑大辭典(第 三冊), 北京, 人民衛生出版社, pp.578-581, 1994.
 33. 鄭津牟: 中醫處方解說臨床應用, 서울, 癸丑文化社, pp. 94-95, 1986.
 34. 傅青主: 傅青主男女科, 서울, 大成文化社, p. 54, 1995.
 35. 孫思邈: 千金要方, 서울, 행림출판사, p. 233, 238, 1976.
 36. 馬元臺·張隱庵: 黃帝內經素問 張馬合註, 서울, 成輔社, p. 23, 24, 41, 50, 80, 109, 125, 126, 128, 1975.
 37. 樓全善: 醫學綱目, 台北, 北一出版社(券1), p. 3, 1973.
 38. 보건복지부: 보건복지통계연보, 과천, 문영사, pp.16-17, 1997.
 39. 金世吉: 生脈散이 白鼠의 心血管系에 미치는 영향, 圓光大學校大學院 博士學位論文, 1986.
 40. 이응세: 生脈散이 스포츠 飲料로서 運動遂

- 行能力과 血液學的 變化에 미치는 영향, 慶熙大學校大學院 碩士學位論文, 1988.
41. 이한구: 生脈散 및 生脈散加味方の 效能에 대한 實驗的 研究, 慶熙大學校大學院 博士學位論文, 1991.
 42. 장주익, 김광호: 生脈散이 暑病豫防效能에 미치는 實驗的 研究, 慶熙韓醫大 論文集, 14:247-254, 1991.
 43. 申大澈 外: 生脈散이 血壓 및 局所腦血流量에 미치는 影響, 大韓韓方內科學會誌, 18(2):167-176, 1997.
 44. 中華人民共和國衛生部藥典委員會: 中華人民共和國藥典, 北京, 人民衛生出版社, pp.4-5, 48, 126-127, 1985.
 45. 李時珍: 本草綱目, 北京, 人民衛生出版社, pp.699-710, 1033-1035, 1238-1240, 1995.
 46. 金昌謙: 本草從新, 서울, 杏林出版社, pp.1-3, 49-50, 90-91, 1974.
 47. 陳嘉謨: 本草蒙筌, 北京, 人民衛生出版社, pp.23, 26, 43-45, 1988
 48. 鄒澍: 本草疏證, 上海, 上海科學技術出版社, pp.15-21, 41-43, 73-78, 1991.
 49. 張錫純: 醫學衷中參書錄, 石家莊, 河北科學技術出版社, pp.20-27, 102-103, 131-132, 1985.
 50. 上海中醫學院: 中草藥學, 上海, 商務印書館, pp.590-592, 574-575, 511-515, 1983.
 51. 楊東喜: 本草備要解析, 新竹, 國興出版社, pp.22-28, 49-51, 53-55, 1985.
 52. 新文豐出版公司: 新編中藥大辭典, 台北, 新文豐出版公司, pp.30-37, 283-287, 1945-1949, 1982.
 53. 辛民教: 原色臨床本草學, 서울, 南山堂, pp.166-167, 232-233, 241-242, 1986.
 54. 申佶求: 申氏本草學, 서울, 壽文社, pp.1-8, 112-114, 183-187, 1979.
 55. 문관심: 약초의 성분과 리용, 평양, 과학백과사전출판사, pp.205-208, 420-425, 679, 1984.
 56. 이상인 外: 漢藥臨床應用, 서울, 成輔社, pp.345-350, 414-415, 431-433, 1990.
 57. 東醫學研究所: 本草學, 서울, 麗江出版社, pp.345-346, 367, 390, 391, 1994.
 58. Kessler-Ickson G., Sperling O., Rotem C., Wasserman L. : Cardiomyocytes creatine kinase activity. *Exp. Cell Res.*, 155 : 133-120, 1984.
 59. Takahashi K., Fujita Y., Mayumi T., Hama T., Kishi T. : Effect of adriamycin on cultured mouse embryo myocardial cells. *Chem. Pharm. Bull*, 35 : 326-334, 1987.
 60. Jim K.F., Mathews W.D. : An investigation of the cardiotoxic action of vancomycin in the isolated working rat heart. *Toxicol. in vitro* 3 : 27-32, 1989.
 61. Richards I.S., Kulkarni A.P., Bremner W.F. : Cocaine-induced arrhythmia in human fetal myocardium in vitro : Possible mechanism for fetal death in utero. *Pharmacol. Toxicol.*, 66 : 150-154, 1990.
 62. Borenfreund E., Puerner J.A. : A simple quantitative procedure using monolayer culture for cytotoxicity assays(HTD/NR-90). *J. Tiss Cult. Meth.*, 9: 7-9, 1984.
 63. Galli C.L., Viviani B., Marinovich M. : Cell cultures, A toll for the study of mechanisms of toxicity. *in vitro. Toxicol.*, 7 : 559-568, 1993.
 64. Carmicichael J., Degraff W.G., Gazdar A.F., Minna J.D., Mitchell J.B. : Evaluation of a tertazolium based semiautomated calorimetric assay : assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res.*, 47 : 936-942, 1987.
 65. Mosmann T. : Rapid for cellular growth and survival, Application to proliferation

-Shin, Sun-Ho et al : Effects of Saengmaegsan Extract on Cultured Myocardial Cells induced by Oxygen Tension -

- and cytotoxicity assays. *J. immune. Meth.*, 65 : 55-63, 1983.
66. Keeper Y.P., Piazio P.E., Peter G.J. : Comparison of the sulforrhodamine B protein and tetrazolium(MTT)assays for in vitro Chemosensitivity testing. *Eur. J. Cancer*, 27 : 897-900, 1991.
67. Seraydarian M., W. and naginei C. N. : adriamycin toxicity in heart cells in culture . ed. by A. Pinson, pp.20-34. CRC Press Boca Raton. FL., 1987.
68. Jammal L.S. Finelli, V.N., Que Hee S. : A single method to determine nanogram of levels of 4-hydroxyproline in biological tissue, *Annal. Biochem.*, 112:70-75, 1981.