

三黃瀉心湯의 혈관이완 효능과 기전

김종봉 · 권오규 · 손창우 · 신희묵*

동국대학교 한의과대학 생리학교실

Vasodilatory Effects of Samhwangsasim-tang on Vascular Smooth Muscle

Jong Bong Kim, Oh Kui Kwon, Chang Woo Son, Heung Mook Shin*

Department of Physiology, College of oriental Medicine, Dongguk University

This study was performed for the investigation of vasodilatory efficacy and its underlying mechanisms of Samhwangsasim-tang(SST), herbal remedy. SST relaxed vascular strips precontracted with phenylephrine or KCl(51mM), but the magnitude of relaxation was greater in phenylephrine(PE) induced contraction. The relaxation effects of SST was endothelium-independent. L-NAME, iNOS inhibitor, and methylen blue(MB), cGMP inhibitor, did not attenuate the relaxation responses of SST. In the absence of extracellular Ca²⁺, pre-incubation of the aortic rings with SST significantly reduced the contraction by PE, suggesting that the relaxant action of the SST includes inhibition of Ca²⁺ influx and release of Ca²⁺ from intracellular stores (SR). In addition, the cell death was induced by SST in human aortic smooth muscle cells but not that of human umbilical vein endothelial cells. We conclude that in rat thoracic aorta, SST may induce in part vasodilation through inhibition of Ca²⁺ influx and release of Ca²⁺ from intracellular stores.

Key words : Samhwangsasim-tang(三黃瀉心湯), Vasodilatory effect, Ca²⁺, Intracellular store (SR)

서 론

심혈관계 질환에 의한 사망이 급속하게 증가하면서 심혈관계 질환을 예방하기 위하여 위험인자들을 규명하기 위한 연구들이 활발히 진행되고 있다.

고혈압은 잘 알려진 심혈관계 위험인자로 유병률이 성인 인구의 약 30%에서 발생하며 뇌졸중, 관상동맥질환, 심부전, 말기 신장질환, 급사 등의 중요한 원인이 된다. 의학통계가 잘 되어 있는 미국의 경우 병원을 찾는 이유 중에서 제1위를 차지하고 있으며 국내에서도 경제 및 사회적으로 서구화, 선진화되면서 유병률이 증가하고 있다. 지금까지 많은 고혈압 치료제들이 개발되어 있지만, 최근 보고서에 의하면 고혈압 환자 중의 약 40-50% 정도가 관상동맥경화(coronary atherosclerosis), 울혈성 심부전(congestive heart failure), 두통, 마른기침 등과 같은 부작용으로 인해, 약물 요법을 시작한지 6개월 이내에 약물 복용을 그만 둔다고 한다. 또한 2002년 국내 의약품 시장에서 고혈압 치료제가 매출 1위를 기록하고 있는 것은 고혈압환자의 급속한 증가를 시

사한다. 따라서 오늘날 합성의약품 보다는 상대적으로 부작용이 적고 장기간 사용이 가능하며 개발에 따르는 비용과 시간이 적게 드는 한약재를 이용한 고혈압의 치료에 주목하고 있다. 이러한 시점에서 오랜 사용경험을 바탕으로 축적된 임상효과에 근거하여 항 고혈압 효능이 알려진 한약재의 혈관이완 효과와 그 기전의 연구는 한약제제 개발의 기반구축에 중요한 자료를 제공할 것으로 기대된다.

三黃瀉心湯은 瀉心湯이라고도 하며 心氣不足, 吐血 및 衄血에 쓴다^{1,2)}. 이 처방은 大黃, 黃蓮, 黃芩으로 구성된 순수한 苦寒한 약물로서 實熱의 사기를 배설하는 효능으로 裏熱實證에 적용한다. 변증논치의 관점에서 三焦의 實火를 清泄하는 효능으로 頭暈, 眼花, 肩凝, 耳鳴, 頭重, 失眠, 不安을 수반하는 고혈압증과 鼻出血, 便秘 및 갱년기장애 및 혈관질환에 효능이 있는 것으로 알려지고 있다^{3,4)}. 三黃瀉心湯의 고혈압과 연계한 실험적 연구로는 혈압강하효과와 혈청 지질대사의 감소 및 aconitine 유도 심독성에 의한 혈청중 효소활성의 증가에 대한 유의한 억제효과를 보고한 바 있다^{5,6)}. 그러나 고혈압치료가 있어서 기본이 되는 혈관의 긴장성 조절과 그 기전에 대한 실험적 연구는 보이지 않는다.

이에 저자는 三黃瀉心湯이 효현제 유도 수축혈관에 대한 이완효과와 그 기전을 관찰하여 결과를 보고하고자 한다.

* 교신저자 : 신희묵, 경북 경주시 석장동 707, 동국대학교 한의과대학

· E-mail : heungmuk@dongguk.ac.kr, · Tel : 054-770-2372

· 접수 : 2004/07/20 · 수정 : 2004/08/25 · 채택 : 2004/09/23

재료 및 방법

1. 재료

실험동물은 체중 300-350g의 雄性 Sprague-Dawley계 흰쥐를 恒溫恒濕 장치가 부착된 사육장에서 고형사료를 충분히 공급하면서 2주일 이상 실험실 환경(온도, 21±2℃; 습도, 50~60%)에 적응시킨 후 사용하였다. 본 실험에 사용한 三黃瀉心湯은 大黃 40g, 黃連 40g, 黃芩 20g으로 구성하였다. 각 약재는 동국대학교 부속한방병원에서 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) 三黃瀉心湯의 추출

2점 분량인 200g을 round flask에 넣고, 증류수 1,200ml를 가하여 가열 추출한 후 추출액을 여과지로 여과하고, rotary evaporator로 감압 농축한 후 동결 건조하여 19.28g의 분말을 얻었다.

2) 혈관절편의 제작

흰쥐를 마취하여 희생시킨 다음, 즉시 복강을 열고 흉부 대동맥을 적출하였다. 이들 조직을 혼합기체(95%O₂+5%CO₂)로 포화시킨 Krebs-Ringer bicarbonate 용액(NaCl 119.8, KCl 4.6, CaCl₂ 2.5, MgCl₂ 1.2, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.2, glucose 10 mM, pH 7.4)에 넣고 실온에서 혈관주위의 결합조직과 지방을 제거하고 약 2mm 정도로 잘라 고리형태의 대동맥환(aortic ring)을 제작하였다. 이렇게 만든 표본을 physiograph 장치에 연결하여 실험에 사용하였다.

3) 혈관 장력의 측정

95%의 O₂와 5%의 CO₂를 혼합한 가스가 연속적으로 공급되고 37±0.5℃로 유지되는 Krebs-Ringer bicarbonate 용액(NaCl 119.8, KCl 4.6, CaCl₂ 2.5, MgCl₂ 1.2, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.2, glucose 10mM, pH 7.4)을 채운 organ bath(용량 20 ml)에 혈관절편을 현수하여 한쪽 끝은 organ bath의 저부에 고정시키고 다른 쪽 끝은 근 수축변환기에 연결하여 등장성 장력을 기록하였다. 미세장력 조절장치(Grass FT-03)를 이용하여 초기 장력을 1g 부하하고 1시간 이상 회복시킨 후 실험에 이용하였다. 혈관절편을 10⁻⁶M의 phenylephrine (PE) 또는 51mM의 고농도 KCl로 수축시킨 후 최고 수축기에 이르렀을 때 농도별(0.1, 0.3, 0.5mg/ml) 三黃瀉心湯의 물 추출물 및 L-NAME(10⁻⁴M), MB(10⁻⁵M) 전처치 후 혹은 Ca²⁺ free 용액에서 PE 수축에 대한 三黃瀉心湯(0.5mg/ml)의 이완반응을 physiograph(Grass 7, USA)로 연속 기록하였다.

4) 세포배양

세포들은 [human umbilical vein endothelium cell(HUVEC), human aortic smooth muscle cell(HASMC)] 95% air/5% CO₂의 humidified atmosphere, 37℃의 조건에서 10% fetal bovine serum과 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM을 이용하여 배양하였으며 90% confluence 자랐을 때, trypsin-EDTA를 처리하여 분양하였다.

5) 세포 생존율 측정

세포 생존율은 XTT assay 방법을 이용하였다⁷⁾. 96 wells

plate에 cell (5×10³ cells/100μl)을 분주하고 24 시간 배양 후, 三黃瀉心湯 또는 三黃瀉心湯 및 L-NAME(10⁻⁴M)를 처리하고 다시 24 시간 배양하였다. Well 당 50μl의 XTT를 처리후 4시간 반응시킨 후 490nm에서 ELISA reader를 이용하여 흡광도의 변화를 관찰하였다. 세포를 뺀 배지를 같이 배양하여 실험군의 흡광도와 비교하여 세포 생존율을 백분율(%)로 표시하였다.

실험성적

1. PE-유도 수축혈관에 대한 이완효과

내피세포 존재하에서 10⁻⁶M의 PE에 의한 수축혈관에 대하여 三黃瀉心湯 추출물의 농도별 이완효과를 관찰하였다. 추출물은 0.1mg/ml에서 16.66±7.07%, 0.3mg/ml에서 61.20±13.54%, 0.5mg/ml에서 88.8±9.65%의 농도 의존적 이완작용을 보였다(Fig. 1).

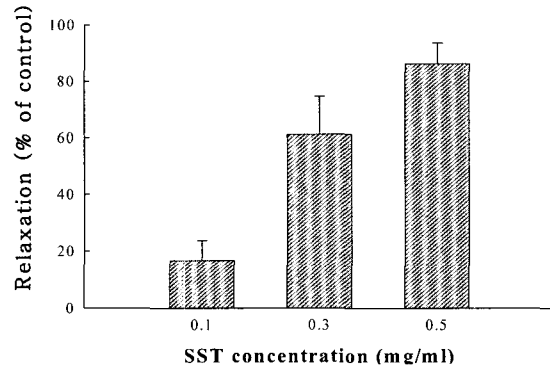


Fig. 1. Vasorelaxation effects of the water extract of Samhwangsasim-tang(SST) on the PE-induced contraction in rat thoracic aorta. Values are mean±S.D.(n=7).

2. KCl의 수축에 대한 三黃瀉心湯의 이완 효과

三黃瀉心湯은 KCl(51mM)의 세포막 탈분극에 의한 최대 수축에 대하여 0.1mg/ml, 0.3mg/ml 그리고 0.5mg/ml에서 각각 -1.1±7.1%, 14.09±8.30%, 47.95±11.72%의 이완을 나타내었다(Fig. 2).

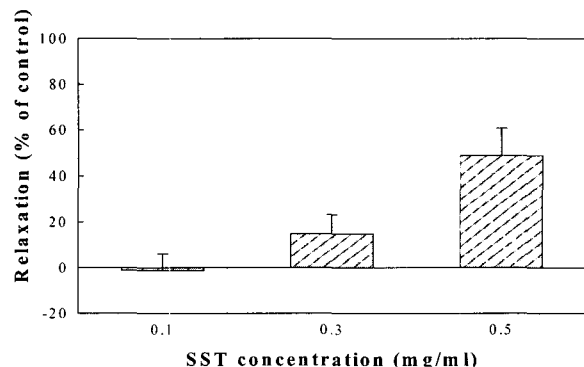


Fig. 2. Relaxation effect of SST on KCl-induced contraction in rat thoracic aorta. Percentages are referred to KCl contraction levels. Values are mean ± S.D.(n=5).

3. 三黃瀉心湯의 내피세포 비 의존적 이완효능

三黃瀉心湯의 혈관이완 작용이 내피세포에서 분비되는 혈관

이완 인자와 관계가 있는지를 규명하기 위하여 내피세포의 존재 유무에 따른 혈관평활근의 PE 수축에 대한 三黃瀉心湯의 혈관이완 효능을 관찰하였다. 三黃瀉心湯은 내피세포 유무시 0.1mg/ml에서 각각 -0.9 ± 0.61 , 1.84 ± 0.25 , 0.3mg/ml에서 각각 $43.61 \pm 11.3\%$, $37.76 \pm 1.6\%$, 0.5mg/ml에서 각각 $85.67 \pm 1.3\%$, $83.58 \pm 3\%$ 의 이완효과를 나타내어 내피세포 비 의존적 이완작용을 나타내었다(Fig 3).

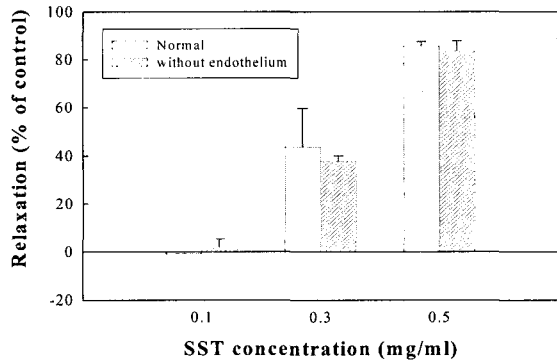


Fig. 3. Relaxation effect of SST in the presence or absence of endothelium on PE-induced contraction in rat thoracic aorta. Values are mean \pm S.D. (n = 5)

4. L-NAME 및 MB가 三黃瀉心湯의 혈관이완에 미치는 영향

三黃瀉心湯에 의한 혈관이완 작용이 내피세포 비 의존성을 나타내므로 그 이완효능이 NO 경로와는 무관함을 확인하기 위하여 NOS inhibitor인 L-NAME(10^{-4} M), cGMP inhibitor인 MB(10^{-5} M)의 전 처치가 三黃瀉心湯의 혈관이완 효능에 미치는 영향을 관찰하였다. Fig. 4에서 보는바와 같이 L-NAME과 MB는 PE 수축에 대한 三黃瀉心湯의 혈관이완 효능에 유의한 영향을 미치지 않았다(Fig 4).

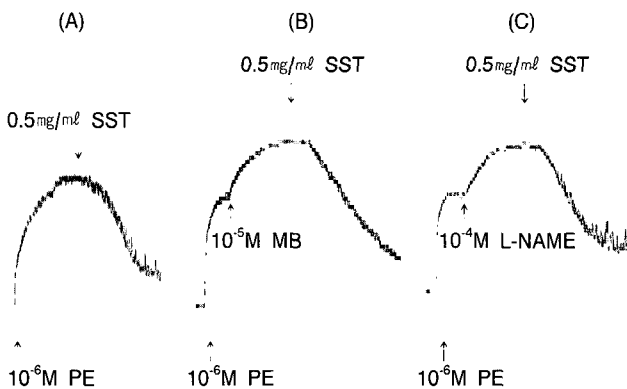


Fig. 4. Representative trace of vasodilation of SST(0.5mg/ml; A) with MB(10^{-5} M; B) or L-NAME(10^{-4} M; C) against PE-induced contractions in rat thoracic aorta.

5. 소포체의 Ca^{2+} 유리에 미치는 三黃瀉心湯의 영향

三黃瀉心湯의 소포체 Ca^{2+} 유리에 대한 효과를 측정하였다. PE에 의한 초기의 유도성 수축은 intracellular store(소포체)로부터의 Ca^{2+} 의 유리에 기인하는데⁸⁾, 세포내 Ca^{2+} 이 없는 상태에서 PE는 약 199 ± 49 mg의 수축을 보였다. 三黃瀉心湯을 전 처치한 경

우 103 ± 45 mg의 수축력을 보여 PE에 의한 일시적 수축을 유의하게($p < 0.001$) 감소시켰다(Fig 5).

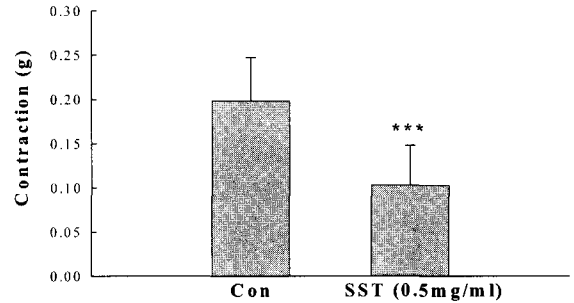


Fig. 5. Effect of SST on PE-induced transient contraction in Ca^{2+} -free solution. Data represent mean \pm SD of 5 or 6 experiments. *** $p < 0.001$ vs control.

6. 三黃瀉心湯의 세포독성에 미치는 영향

HASM C와 HUVEC에 대한 三黃瀉心湯의 세포사멸에 대한 영향을 확인하기 위하여 XTT 방법을 이용하여 농도별 세포 생존율을 관찰하였다. 三黃瀉心湯은 0.5mg/ml의 농도까지 HUVEC에 대하여 세포를 증식시켰으나, HASM C의 경우 0.1mg/ml의 농도부터 유의한 세포사멸은 초래하여 0.5mg/ml의 농도에서 $46.85 \pm 4.30\%$ 의 세포사멸을 나타내었다(Fig. 6).

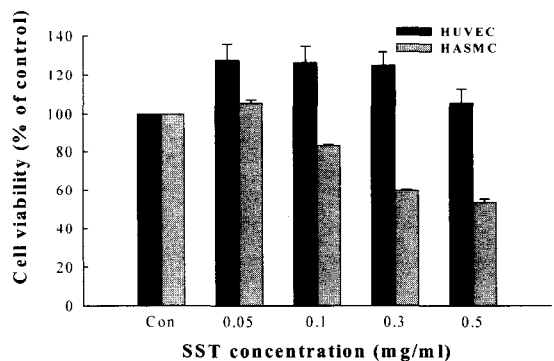


Fig. 6. Effect of SST on the cell viability of HASM C or HUVEC. Cell viability was determined by XTT assay. Bars represent the means of 5 experiments.

고찰

고혈압은 뇌출혈과 심부전의 주 원인으로 작용하며 동맥경화를 일으켜 협심증과 심근경색의 원인이 되기도 한다. 따라서 고혈압의 예방과 치료는 심뇌혈관 질환의 위험인자를 제거하고 뇌동맥질환과 심장병으로 인한 사망률을 감소시킬 수 있다.

한의학에서 고혈압의 치료는 단순한 혈압의 강하에 있지 않고 변증논치를 통한 음양평형을 조절함으로써 근본적으로 고혈압의 발생과 진행의 내재적 원인을 제거하는데 있다. 최근 오랜 사용 경험을 바탕으로 축적된 한약재로부터 부작용이 적고 장기간 사용이 가능한 치료 약제를 개발하기 위해 한의학의 원리를 바탕으로 처방의 효능을 객관적으로 분석하기 위한 시도가 많이 이루어지고 있다. 따라서 경험적으로 안정성이 입증된 한약재로

부터 활성성분을 규명하고 그에 따른 생리활성을 연구하는 것은 중요한 천연물신약 한방제제 개발의 한 방법이라 할 수 있다.

三黃瀉心湯은 大黃, 黃蓮, 黃芩이 2:2:1의 비율로 배합된 처방으로 三焦의 實火를 清泄하는 효능으로 頭暈, 眼花, 肩凝, 耳鳴, 頭重, 失眠, 不安을 수반하는 고혈압증과 鼻出血, 便秘 및 갱년기장애 및 혈관질환에 효능이 있는 것으로 알려지고 있다²⁾. 최근 혈압강화 작용이 알려지면서 고혈압의 치료에 처방하고 있다. 三黃瀉心湯의 심혈관계와 관련한 실험적 연구로는 심장 독성 물질인 aconitine 투여에 의한 혈압의 조절과 혈청효소활성에 미치는 영향⁶⁾, 자발성고혈압 흰쥐의 혈압강화와 혈청중 지질감소 효과⁹⁾가 보고된 바 있다. 그러나 고혈압의 치료에 있어서 가장 기본이 되는 三黃瀉心湯의 혈관이완에 대한 연구는 없다. 이에 혈관이완 효능과 약리기전을 파악하기 위하여 三黃瀉心湯의 agonist 유도 혈관수축에 대한 혈관이완 효능과 기전을 연구하였다. 三黃瀉心湯의 혈관 이완효능은 KCl 보다 PE 유도 수축에 있어서 그 효과가 우수하였다. 한편 三黃瀉心湯의 혈관이완 작용이 내피세포에서 분비되는 혈관이완 인자와 관계가 있는지를 규명하기 위하여 내피세포가 존재하는 경우와 내피세포를 제거한 혈관평활근의 PE 수축에 대한 三黃瀉心湯의 혈관이완 효능을 관찰한 결과 유의한 차이가 없었다. 이는 三黃瀉心湯의 혈관이완 작용의 내피세포 의존적 성으로 내피세포에서 유리되어 혈관을 이완시키는 NO 경로와는 무관함을 시사하는 것으로 이를 확인하기 위하여 NO 생성효소 억제제인 L-NAME과 cGMP 억제제인 MB의 전처치가 三黃瀉心湯의 혈관이완 효능에 미치는 영향을 관찰하였다. L-NAME과 MB의 처리는 PE 수축에 대한 三黃瀉心湯의 혈관이완 효능에 유의한 영향을 미치지 않았다. 따라서 三黃瀉心湯의 혈관이완 작용은 내피세포로부터의 NO의 유리와는 관계가 없는 것으로 나타났으며, agonist의 수용체 활성화 이후 다른 여러 경로의 억제에 의하여 이완작용을 발휘할 것으로 생각되며 이에 대한 연구가 기대되는 바이다.

PE에 의한 흰쥐의 흉부대동맥의 수축은 초기에 세포내 Ca²⁺의 유리에 의하여 이어서 전압과 수용체 의존성 Ca²⁺ channel에 의한 Ca²⁺ 유입에 의하여 tonic 수축이 뒤 따른다⁹⁾¹⁰⁾. 三黃瀉心湯의 혈관이완작용에 소포체로부터의 Ca²⁺의 유리와 관련이 있는지를 확인하기 위한 Ca²⁺ free 용액에서의 PE에 의한 초기 수축에 대한 三黃瀉心湯의 영향을 관찰하였다. 三黃瀉心湯은 PE에 의한 초기의 일시적 수축을 유의하게 감소시켰다. 이는 三黃瀉心湯의 혈관이완 작용에 소포체로부터의 Ca²⁺의 유리 억제가 관여함을 시사하는 것이다.

한편 세포 독성에 미치는 영향을 관찰하기 위한 XTT 측정에서 三黃瀉心湯은 0.5mg/ml의 농도까지 HUVEC의 증식을 초래하였으나, 0.8mg/ml, 1.0mg/ml의 농도에서 각각 49.74±7.3%, 21.54%의 생존율을 보여 유의한 세포사를 초래하였다. HASMC의 경우에는 0.1mg/ml의 농도부터 유의한 세포사멸은 초래하여 1.0mg/ml의 농도에서 13.22±6.34%의 생존율을 보였다. 특히 HASMC의 선택적 세포사멸은 고혈압성 동맥경화의 혈관평활근 증식의 억제나 혈관성형술 이후 세포조직의 과다증식을 방지함으로써 재협착의 치료나 예방에의 응용 가능성을 제시하는 것

으로 생각된다.

이상의 실험적 결과로부터 三黃瀉心湯은 한의학적 변증론치에 근거하여 혈관이완작용을 통한 혈액순환개선과 고혈압의 치료에 적용할 수 있으며, 그 이완작용의 기전에 소포체로부터의 Ca²⁺ 유리의 억제가 관여하는 것을 확인할 수 있었다. 그 기전에 대한 지속적인 연구가 필요하다고 사료된다.

결론

三黃瀉心湯의 효현제 유도 수축혈관에 대한 혈관이완 효과와 그 기전의 연구를 통하여 다음의 결론을 얻었다.

三黃瀉心湯은 PE와 KCl의 수축에 대하여 혈관 이완작용을 보였으며 그 이완효능은 PE-유도 수축의 경우에 있어서 보다 효과적이었다. 三黃瀉心湯의 혈관 이완작용은 내피세포 비 의존적 경향을 나타내었다. L-NAME과 MB의 처리는 三黃瀉心湯의 혈관 이완작용에 유의한 영향을 미치지 않았다. 三黃瀉心湯은 세포내 Ca²⁺이 없는 상태에서 PE에 의한 일시적 수축을 유의하게 억제시켰다. 三黃瀉心湯은 내피세포의 경우 증식효과를 나타내었으나 혈관 평활근세포에 대하여는 유의한 세포사멸을 초래하였다.

이상의 결과로부터 三黃瀉心湯은 유도성 수축혈관에 대한 혈관이완 작용을 나타내며, 그 이완작용에 소포체로부터의 Ca²⁺ 유리의 억제가 관여함을 알 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술연구개발사업의 지원(03-PJ9-PG3-21600-0047)에 의하여 이루어 졌으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 張仲景, 金匱要略方論, 北京, 人民衛生出版社, p56, 1966.
2. 汪訥庵, 醫方集解, 台北, 旋風出版社, p.214, 中華民國66年.
3. 譚日強, 金匱要略淺述, 北京, 人民衛生出版社, pp.310-312, 1981.
4. 高山宏世 原著, 趙蘊坤, 張文劍, 段苦寒 編譯, 中醫方劑病證圖解, 山西, 山西科學技術出版社, pp. 84-85, 1991.
5. 李星斗, 裴亨燮, 具本淵. 三黃瀉心湯이 자발성고혈압 흰쥐의 혈압 및 혈청에 미치는 영향, 경희한의대논문집, 7:181-191, 1984.
6. 沈良洙, 文炳淳, 金世吉. 三黃瀉心湯이 Aconitine 투여 흰쥐의 혈압 및 혈청 효소활성도에 미치는 영향, 원광한의학, 4(1):251-267, 1994.
7. DA Scudiero, RH Shoemaker, KD Paull, A Monks, S Tierney, TH Nofziger, MJ Currens, D Seniff and MR Boyd. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. Cancer Research.. 48:4827-4833. 1988.
8. Cauvin C, Malik S. Induction of calcium influx and intracellular calcium release in isolated rat aorta and

- mesenteric resistance vessels by norepinephrine activation of α -receptors, *Journal of pharmacology and Experimental Therapeutics* 230: 413-418, 1984.
9. Bolton TB. Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth muscles. *Physiological Reviews*, 59: 606-718, 1979
10. Karaki H, Weiss GB. Calcium channels in smooth muscle, *Gastroenterology*, 87: 960-970, 1984.