

分心氣飲이 고혈압 백서와 인간유래 혈관내피세포주(ECV 304)에 미치는 영향에 대한 연구

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

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

Yeon-Yi Jeon, Chang-Gook Park, Chi-Sang Park, So-Yeon Lee, Hyeon-Deok Yoon, Wo-Cheol Shin

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

Object: This study was designed to research whether the protection and inhibitory effects of cardiovascular diseases in L-NAME induced rat or ECV 304 cell lines through the Cell morphological pattern, Tunel assay, LDH activity, heart rate, blood pressure and immunohistochemistic analysis by *Boonsimgieum* water extract

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

Endothelial cell products can modulate the magnitude of a response to a vasoconstrictor, as evinced by the greater constriction after endothelium removal or NO synthesis blockade. To investigate that *Boonsimgieum* in the potential contribution of the levels of nitric oxide generated by endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and the mechanisms of protection against NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), human ECV 304 cells, which normally do not express eNOS, were expressed by L-NAME. L-NAME stimulated rat or cells were found to be resistant to injury and delayed death following the *Boonsimgieum*. Inhibition of nitric oxide synthesis abolished the protective effect against L-NAME, thrombin and collagen exposure. Interestingly, such effects have been observed during stimulation with agents such as phenylephrine and KCl on L-NAME mediate rats, were damaged by the NOS inhibitor L-NAME.

Result: As the result of this study, In group, the anti-apoptosis and necrosis in the cardiovascular system have a potential capacity for prevented, protected and treating the diseases of cardiovascular system, against the necrosis of rat and ECV 304 cells with Caspase 3 and calpain expression by L-NAME is promoted.

Conclusion: these results demonstrate neuroprotective and memory enhancing effects of ZIBU, suggesting its beneficial actions for the treatment of AD.

Key Words: *Boonsimgieum*, ECV 304 Cells, Nitric oxide, endothelial nitric oxide synthase, thrombin, collagen

1. 緒 論

혈관내피(Endothelium)는 심혈관계를 총체적으로 유지하는데 중요한 조직으로 주로 혈관 운동성 및

투과성, 혈액의 응고와 분해, 염증세포나 혈관 평활근 세포의 이동이나 증식을 조절함으로써 혈관의 항상성을 유지시킨다¹.

이러한 여러 기능 중 혈압과 밀접한 관련이 있는 심혈관 긴장도에 관련하여 혈관내피세포는 혈관이 원인자를 분비하는 동시에 혈관수축인자를 분비함으로써 혈관의 이완과 수축의 균형을 이루게 된다^{1,2}. 또한 혈액의 응고와 분해 기능의 경우 정상상태

· 접수 : 2005. 2. 6 · 채택 : 2005. 2. 28
· 교신저자 : 박치상, 대구광역시 수성구 상동
대구한의대학교 심계내과학 교실
(Tel. 053-770-2179 Fax.
E-mail : stephano@dhu.ac.kr)

의 혈관내피세포는 그 자체가 혈전형성에 저항성이 있을 뿐 아니라 혈전형성 능력을 나타내는 내피하 결합조직과 혈액을 격리시키며 항혈전성 인자와 혈전 촉진인자를 동시에 분비함으로써 혈액내 균형을 유지하는 역할을 한다².

혈관내피세포가 분비하는 인자 중 특히 NO는 내피세포의 괴사를 억제하고 심근세포와 혈관 평활근 세포에서 guanylate cyclase를 활성화시켜 혈관이완 효과를 나타내며 혈소판 응집력에 영향을 미쳐 혈소판이나 백혈구의 흡착을 방지하여 혈전 형성을 억제하고 혈관내벽의 투과성을 유지시키는 등 혈관 내피의 생존과 유지에 중요한 역할을 한다⁶.

한편 分心氣飲은 <太平惠民和劑局方>에 처음 기재된 처방으로 “憂愁, 思慮, 怒氣로 인하여 神을 상했을 때 時候에 구애받지 않고 쓸 수 있으며 停滯된 氣를 소통시키고 陰陽을 昇降시키며 三焦를 고르게 조화시키고 脾臟을 和하게 하는 효능이 있다⁷고 하였다. 현재까지 分心氣飲에 대한 증례보고는 없으나 문헌상 임상적으로 七情損傷으로 鬱結된 氣가 胸中에 머물러 心胸痞悶, 胸脇虛脹, 塞不通, 噯氣吞酸, 嘔噦, 惡心, 頭目昏眩, 四肢倦怠, 勞倦, 面色萎黃, 口苦舌乾, 攝食減少 등의 증상이 나타날 때 사용된다⁸⁻¹⁰고 나타나 있다.

分心氣飲에 관한 실험적 연구로는 수면장애¹¹, 우울증¹², 스트레스¹³ 등과 관련한 내용이 주류를 이루며 그 외 항암작용¹⁴ 및 혈압강하 효과¹⁵가 보고되었으나 分心氣飲이 심혈관계 및 혈관내피세포에 미치는 영향에 관한 연구는 없었다.

이에 저자는 大小便通利를 통하여 心胸悶의 停滯된 氣를 풀어주고 三焦를 조화롭게 하는 分心氣飲이 심혈관 질환에 효능이 있을 것으로 사료되어 分心氣飲 水抽出液을 대표적인 eNOS 저해제인 NG-nitro-L-arginine methyl ester(이하 L-NAME)¹⁶⁻⁸를 매개로 고혈압을 유도한 백서 병태모델에게 투여하여 심혈관에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 아울러 혈소판 활성화물질인 thrombin과 collagen으로 인위적으로 혈전을 유도한 혈소판 혈장과 인간 제대혈관 유래 내피세포인 ECV 304 세포주에 分心氣

飲 水抽出液을 투여하여 分心氣飲의 세포사 방어효과 및 항혈전 효과에 대하여 실험적으로 규명하고자 하였다.

II. 材料와 方法

1. 材料

1) 動物

L-NAME로 고혈압을 유도하는 동물모델은 (주) 중앙실험동물에서 분양 받은 체중 200~250g의 Sprague-Dawley계 백서 암컷을 사용하였다. 구입한 동물은 온도(20±1℃)와 습도(55±3%)가 유지되는 사육실에서 명암을 12시간 주기로 하여 적응시킨 후 실험에 사용하였으며 물과 사료는 제한하지 않았다.

2) 試料의 調製

본 실험에 사용한 分心氣飲(Boonsimgieum; BSGM)은 대구한의대학교 부속 대구한방병원에서 엄선하여 40첩 분량을 細末한 다음 20L의 3차 증류수를 첨가하여 85℃에서 4시간 煎湯한 후 식혀 分心氣飲 水抽出物을 조제한 후 gauze로 1차 여과 후 -70℃(Deep Freezer)에서 12시간 동결시키고 다시 Freeze Dryer로 동결 건조하여 200g을 회수하였으며 사용 전 -80℃에 보관하다가 3차 증류수로 적당한 농도로 희석한 후 실험에 사용하였다.

分心氣飲 1첩의 약물구성은 다음과 같다(Table 1).

3) 試藥

실험에 필요한 Duplecco's modified Eagle's medium(DMEM), penicillin/streptomycin(P/S), trypsin 및 fetal bovine serum(FBS)은 GIBCO BRL CO. (Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며, 배양용기인 96 well plate 10Cm dish는 Falcon Co.(Lincoln, USA)에서 구입하여 사용하였다. methylthiol-2-yl-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT), acridine orange, L-NAME, collagen type I, sodium citrate, thrombin은 Sigma사(St. Louis, USA)에서, anti rabbit/mouse 겸용 calpain, CPP3-conjugated antibody는 Santa Cruz사(NY, USA)에서

Table 1. Composition of *Boonsimgieum*

構成藥物	學名	用量(g)
蘇葉	Perillae Folium	5
炙甘草	Glycyrrhizae Radix	2.8
半夏	Pinelliae Rhizoma	2.4
枳殼	Aurantii Fructus	2.4
陳皮	Citri Pericarpium	2
青皮	Citri Reticulatae viride Pericarpium	2
木通	Akebiae Caulis	2
大腹皮	Arecae Pericarpium	2
桑白皮	Mori Cortex	2
木香	Aucklandiae Radix	2
赤茯苓	Poria Cocos	2
檳榔	Arecae Semen	2
蓬朮	Zedoariae Rhizoma	2
麥門冬	Liriopsis Tuber	2
桔梗	Platycodi Radix	2
桂皮	Cinnamomi Cortex	2
香附子	Cyperi Rhizoma	2
藿香	Pogostemonis Herba	2
燈心	Junci Medulla	1
生薑	Zingiberis Rhizoma Recens	3
大棗	Zizyphi intermis Fructus	2
計		46.6

구입하여 사용하였다.

2. 方法

1) 分心氣飲이 혈전이 유도된 혈소판 혈장에 미치는 영향

(1) 혈소판 혈장의 조제와 혈전의 유도

0.38% sodium citrate 와 1% glucose를 사용하여 항응고시킨 혈액을 2500rpm에서 10분간 원심분리하여 백혈구, 적혈구 등 혈소판 이외의 혈구세포들은 침전시켜 제거하고 혈소판은 혈장에 남아 있도록 하여 혈소판 혈장(PRP:platelet rich plasma)을 조제한 뒤 10mM HEPES buffer (pH7.4:140mM NaCl, 5mM NaHCO₃, 0.5mM MgCl₂, 3mM KCl, 140mM glucose) 용액을 첨가하여 실험에 사용하였다.

(2) 혈전의 유도과 약물의 투여

상기와 같이 제작한 혈소판 혈장을 각각 160 μ l 용량으로 정상군(normal group) 1군과 대조군(control group) 1군, 실험군(experimental group) 2군으로 나누어 정상군은 0.9% 생리식염수 20 μ l을 첨가하고 대조군에는 혈소판 응집 유도물질인 collagen와 thrombin 20 μ l을, 실험군에는 collagen, thrombin 20 μ l와 함께 分心氣飲 水抽出液을 각 10, 50 μ g/ml 농도로 20 μ l 첨가한 뒤 37 $^{\circ}$ C에서 2분간 배양한 다음 실온에서 30분간 정치하고 혈전의 유도를 육안적으로 관찰하였다.

또한 배양이 끝난 후 유리 슬라이드에 도말표본을 만들어 완전히 건조시킨 다음 wright염색을 한 후 물로 씻고 오븐에서 충분히 말린 뒤 200x 배율

에서 관찰하여 혈소판의 응집도를 판정하였다.

(3) Microparticle shedding 분석

혈장내 혈소판의 활성화는 염증 장애와 혈전과정에 수반되는 microparticles의 shedding을 수반하는데¹⁸⁻⁹ 이것의 양적 변화를 Dachary-Prigent방법¹⁹을 변형시켜 확인하였다.

즉 혈소판 procoagulant surface 발현시 혈소판 미세입자가 shedding되는 수가 10,000정도로 해서 대조군은 10nM thrombin 및 100 μ g/ml collagen과 반응시키고 실험군 2군은 10nM thrombin 및 100 μ g/ml collagen과 반응시킴과 동시에 각각 10, 50 μ g/ml 농도의 분심기음 추출액으로 처리하여 30분간 실온에 둔 다음 혈소판 표면에 Microparticle의 표식을 위하여 FITC-conjugated anti-GPIIb으로 염색한 후 유리 슬라이드에 올려놓고 형광현미경에서 관찰하였다.

2) 分心氣飲이 L-NAME 유도 고혈압 백서의 심혈관에 미치는 영향

(1) L-NAME 유도 고혈압 백서 제작과 약물의 투여

실험동물 6마리를 1군으로 하여 정상군 1군과 대조군 1군, 실험군 2군으로 나누고 정상군에는 0.9% 생리식염수를, 대조군에는 L-NAME를 50mg/kg의 농도로, 실험군에는 50mg/kg 농도의 L-NAME와 0.9% 생리식염수에 현탁시킨 分心氣飲 水抽出液을 매일 1회 14일간 피하주사한 후 실험에 투여하였다. 실험군의 경우 용량-반응의 관계를 알아보기 分心氣飲 水抽出液를 1군은 10 μ g/ml의 농도로, 또 다른 1군은 50 μ g/ml의 농도로 피하주사하였다.

(2)혈압 및 심박수, 혈관 운동성의 측정

分心氣飲 水抽出液이 L-NAME 유도 고혈압 백서의 혈압에 미치는 영향을 알아보기 위해서 상기와 같이 제작한 동물모델에게 약물투여 14일째 urethane 1.5g/kg를 복강주사하여 마취시킨 후 기관지에 삽관(cannulation)하여 호흡을 원활하게 하고 경동맥과 경정맥에 heparin(50 IU/ml)을 함유한 생리식염액으로 채운 관(0.80 mm ID)을 삽입하여 physiography를 통하여 심박수를 측정하였으며

tail-cuff방법으로 백서의 꼬리동맥의 수축기혈압을 측정하였다.

또한 分心氣飲 水抽出液이 L-NAME 유도 고혈압 백서의 혈관 운동성에 미치는 영향을 알아보기 위해서 약물투여 14일째 백서를 단두하여 실험치사시킨 후 심장대동맥을 잘라 냉각한 Krebs 용액(119mM NaCl, 4.6mM KCl, 15mM Na₂CO₃, 1.5mM CaCl₂, 1.2mM MgCl₂, 1.2mM NaH₂PO₄, 11mM glucose)에 담그고 혈관 주위의 지방과 결체조직을 조심스럽게 제거한 후 5mm의 길이로 잘랐다. 자른 대동맥 절편을 37℃의 5ml 이중병 안에 현수하고 Krebs 용액에 95% O₂ - 5% CO₂를 계속 공급해 주면서 force transducer에 연결하여 physiography로 혈관의 수축력을 측정하였다. 측정값은 혈관의 기본장력(resting tension)이 안정적으로 1.5g을 유지할 때까지 수차례 장력을 조절하고 15분마다 새로운 Krebs용액으로 갈아주었다. 혈관을 90분 이상 안정화시킨 후 25mM KCl을 함유한 Krebs 용액으로 최고 수축력을 측정한 후 혈관을 세척하고 다시 혈관을 30분이상 안정화시킨 후 측정하여 나온 값으로 하였다.

(3) 동맥 내피세포의 면역조직 화학분석

分心氣飲 水抽出液이 L-NAME 유도 고혈압 백서의 심장 주변 동맥내피세포에 미치는 영향을 알아보기 위하여 상기와 같이 제작한 동물모델을 약물투여 14일째 ketamin으로 마취한 다음 흉부를 절개하여 심장동맥을 중심으로 주변부를 paraffin 포매한 후 면역조직화학 염색을 수행하였다. 즉 심장 조직부위를 formalin으로 고정하고 5 μ m 두께로 microtome으로 절단한 뒤 연속절편을 4℃ 2N HCl 용액에서 20분간 반응시켜 DNA-denaturation을 수행하고 0.1M borate 완충액을 처리하여 안정시킨 후 비특이적인 면역반응을 억제하기 위해 0.01%의 proteinase K(DAKO, Denmark)가 포함된 0.5% bovine serum albumin을 1시간 동안 반응시켰다. 그후 1차 항체인 calpain과 iNOS, CPP3(Caspase-3)를 4℃에서 12시간동안 반응시키고 다시 Horseradish peroxidase-antibody가 표지된 avidin

biotin complex(ABC: Vector Lab, USA)에 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 0.05% 3,3-diaminobenzidine(DAB)과 0.01% HCl이 포함된 0.05M Tris-HCl 완충액(pH 7.4)에서 발색시킨 후 100x 광학현미경하에서 관찰하였다.

3) 分心氣飲이 혈전이 유도된 ECV 304 세포주에 미치는 영향

(1) ECV 304 세포주의 배양

본 실험에 사용된 인간 제대혈관 유래 내피세포인 ECV 304 세포주는 충북대 의과대로부터 분양받아 계대배양시커 5% FBS가 함유한 DMEM 배지에 penicillin/streptomycin을 첨가하여 cell culture용 dish에 배양하면서 10^3 세포를 96-well plate에 분주하고 37°C에서 하룻밤 배양하여 80%정도 도달하게 배양한 다음 serum free medium으로 2번 세척한 후 1ml serum free medium을 첨가하여 실험에 사용하였다.

(2) 혈전의 유도와 약물의 투여

상기와 같이 배양한 10^3 개 ECV 304 세포주를 1군으로 하여 무처리 정상군(N) 1군, 10nM thrombin과 100 μ g/ml collagen을 투여하여 인위적으로 혈전을 유도한 대조군(C) 1군, 대조군과 동일한 방법으로 혈전을 유도한 뒤 10, 50 μ g/ml 分心氣飲 水抽出液을 처리한 실험군(S) 2군으로 분류하여 실험에 투여하였다.

(3) MMT assay를 통한 IC₅₀ 측정

ECV 304 세포주 정상군(N), 대조군(C) 및 실험군(S)을 10^3 세포수로 96-well plate에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 대조군과 실험군은 10nM thrombin와 100 μ g/ml collagen을 처리하고 실험군은 다시 分心氣飲 水抽出液을 1, 5, 10, 50, 100 μ g/ml 농도로 첨가하여 12시간 후에 세포피사 억제효과를 확인하기 위해 MTT assay를 측정하여 IC₅₀를 확인하였다.

(4) acridine orange 염색을 통한 세포사 관찰

ECV 304 세포주 정상군(N), 대조군(C) 및 실험군(S)을 10^3 세포수로 round slipe glass에 분주하고 하룻밤 배양한 다음 대조군과 실험군은 10nM

thrombin와 100 μ g/ml collagen을 처리하고 실험군은 다시 分心氣飲 水抽出液을 10, 50 μ g/ml의 2가지 농도로 처리한 후 6시간 배양하고 상등액을 제거한 후 세포를 PBS로 2회 조심스레 세척한 다음 acridine orange(1 μ g/ml 농도) 50 μ l로 염색하고 PBS로 세척하고 형광현미경하에서 200개 세포수를 촬영하여 세포사 억제정도를 관찰하였다.

(5) LDH assay를 통한 세포 생존율 측정

ECV 304 세포주를 통해 分心氣飲이 thrombin, collagen에 의해 손상된 혈관내피세포에 대한 세포 보호 효과를 알아보기 위하여 LDH 활성도를 측정하였다. 즉 ECV 304 세포주를 정상군(N), agonist를 처리한 대조군(C) 그리고 agonist와 10, 50 μ g/ml 分心氣飲 水抽出液을 처리한 실험군(S)으로 구분하여 37°C에 12시간 배양한 다음 각 군의 배양액 100 μ l를 96-well plate에 옮기고 pyruvate substrate (NADH 1mg/ml)를 20 μ l씩 가한 다음 상온에서 2분간 혼합 후 37°C에서 30분간 더 흔들었다. 여기에 발색시약(color reagent, Sigma 505-2)을 20 μ l씩 가하고 상온에서 20분간 혼합한 다음 0.4N NaOH를 100 μ l씩 가하고 15분간 더 혼합 후 ELISA reader로 흡광도를 측정하였다.

(6) Tunel assay를 통한 세포사 관찰

ECV 304 세포주를 통해 分心氣飲이 thrombin에 의해 손상된 혈관내피세포에 대한 세포사 억제효과를 조사하기 위해 ECV 304 세포주를 37°C에 12시간 배양한 다음 10^3 세포수로 cover glass에 4군으로 분주하고 정상군(N), agonist를 처리한 대조군(C), agonist와 각각 10, 50 μ g/ml 分心氣飲 水抽出液을 처리한 2개의 실험군(S)으로 구분하여 하룻밤 배양한 다음 Tunel assay방법을 수행하였다.

Tunel assay를 수행한 순서는 먼저 배지를 제거하고 PBS로 세척한 다음 세포를 4% p-formaldehyde로 12시간동안 4°C에서 고정시킨 다음 0.5% Tween 20, 0.2% BSA(bovine serum albumin)을 첨가하여 실온에서 15분간 침투과정을 실시하고 PBS로 3회 세척한 다음 세포내 염색체 DNA nick 말단을 표지하기 위해 terminal deoxynucleotidyl transferase

(TdT)용액(TdT완충액: biotin-dUTP: TdT=18:1:1) 5 μ l를 떨어뜨려서 37°C에서 1시간 유지시킨 다음 증류수로 3회 세척한다. 증류수 세척 후 blocking 용액인 0.5% BSA를 50 μ l정도 첨가하여 실온에서 10분간 정지한 후 streptavidine-FITC용액 50 μ l첨가하여 30분간 실온에서 유지하고 PBS로 3회 세척한 다음 slide glass 위에 mounding 용액을 약간 떨어뜨리고 얼어서 형광현미경하에서 관찰하여 녹색의 형광염색 유무를 관찰하여 세포사를 확인하였다.

4) 통계처리

모든 실험은 최소한 3회 수행하였으며 대조군은 백분율(% Control)로 표시하였으며 통계학적 유의성은 Student t-test에 의한 $P<0.05$ 의 유의성으로 나타내었다.

III. 結果

1. 分心氣飲이 혈전이 유도된 혈소판 혈장에 미치는 영향

1) fibrin-용해 및 혈소판 응집에 미치는 영향

혈전 유도 정도를 육안적으로 관찰한 결과 정상군(N)은 혈전이 거의 나타나지 않은 반면 대조군(C)은 강하게 유도되었으며 실험군(S)은 10, 50 μ g/ml 농도에서 모두 약하게 유도되었다(Fig. 1).

200x 배율의 현미경하에서 혈소판의 응집도를 관찰하여 본 결과 정상군(N)은 응집이 없었으나 대조군(C)은 강하게 유도된 반면 分心氣飲 水抽出液을 투여한 실험군(S)은 두가지 농도에서 모두 대조군에 비해 응집도가 40% 정도 감소하는 경향을 보였다. 그러나 농도간의 유의성은 인정되지 않았다(Fig. 2).

2) 혈소판 응집에 미치는 MP 유도 영향

정상군은 MP 수가 약 2.5 ± 1.2 였고 대조군은 27.5 ± 3.2 이고 10, 50 μ g/ml 농도에서는 각각 7.0 ± 2.2 그리고 3.1 ± 1.5 으로 나타나 두가지 농도에서 모두 유의성 있게 감소하는 경향을 보였다(Fig. 3).

2. 分心氣飲이 L-NAME 유도 고혈압 백서의 심혈관에 미치는 영향

1) 심박수와 혈압에 미치는 영향

백서의 경동맥 심박수를 physiography를 통하여 측정된 결과 정상군(N)은 320 ± 10 bpm, L-NAME를 피하주사한 대조군(C)은 430 ± 10 bpm 그리고 L-NAME와 10, 50 μ g/ml 농도의 分心氣飲 水抽出液을 투여한 실험군(S)의 경우는 385 ± 5 bpm, 362 ± 3 bpm로 나타나 대조군에 비해 유의성($p<0.05$)있게 감소하는 경향을 보였다(Fig. 4).

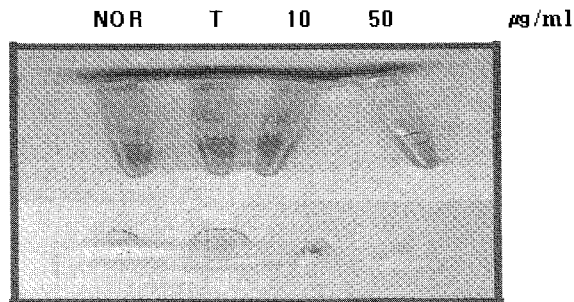


Fig. 1. Clot retraction by Boonsimgieum in rat platelet cells

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

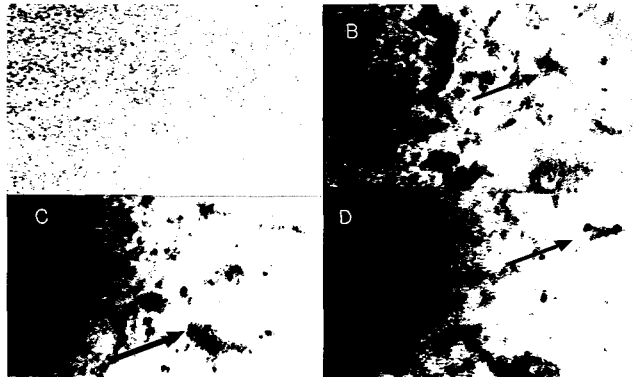


Fig. 2. Boonsimgieum inhibits thrombin and collagen-induced platelet aggregation.

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

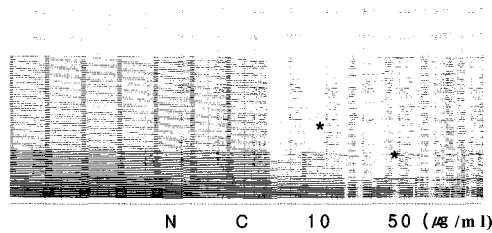


Fig. 3. Inhibition of Microparticles shedding by Boonsimgieum.

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

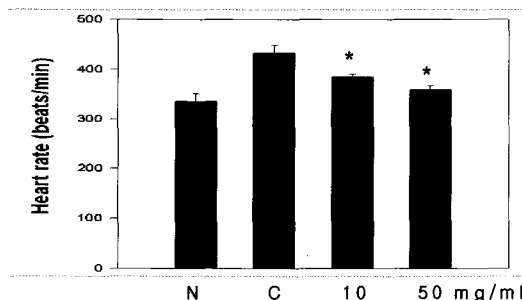


Fig. 4. Effects of Boonsimgieum on heart rate in rats treated by multi-subcutaneous injection with L-NAME (50mg/kg) for 14days.

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

백서 꼬리동맥의 수축기혈압을 측정된 결과 정상군(N)은 100±10 mmHg, 대조군(C)은 130±5 mmHg, 실험군(S)은 10µg/ml 농도에서는 118±5 mmHg, 50µg/ml 농도에서는 115±2 mmHg으로 나타나 대조군에 비해 유의성(p<0.05) 있는 감소는 보였다(Fig. 5).

2) 혈관운동성에 미치는 영향

Krebs 용액으로 최고 수축력을 측정된 결과 정상군(N)은 1.3±0.2g, 대조군(C)은 2.1±0.5g, 실험군은

10, 50µg/ml 농도에서 각각 1.7±0.6g, 1.5±0.3g의 수축이 일어나 범위에서 유의성(p<0.05) 있게 감소하였다(Fig. 6).

3) 동맥 내피세포의 면역조직화학분석

정상군(N)은 동맥부가 잘 발달되어 있었으나 (Fig. 7a) 대조군(C)은 괴사가 진행되어 동맥부가 소실되거나 파괴된 양상을 보였는데 특히 주변 혈관내피세포의 두께가 감소한 양상을 보였다. 반면 실험군(S)은 내피세포의 증식이 유도하거나 파괴가

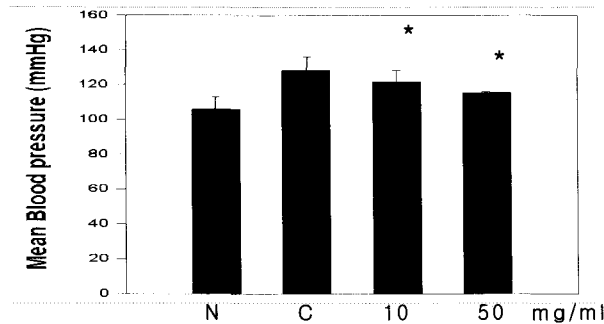


Fig. 5. Effects of Boosimgieum on blood pressure in rats treated by multi-subcutaneous injection with L-NAME (50mg/kg) for 14 days.

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

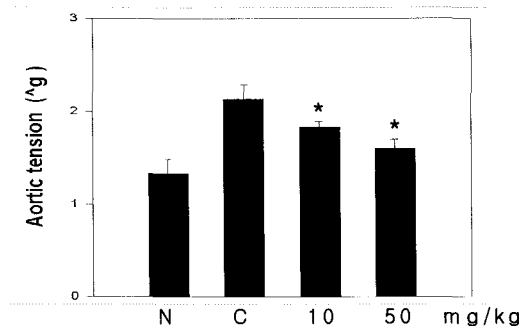


Fig. 6. Effects of Boosimgieum on the isolated thoracic aortic ring segment from the rats treated with L-NAME (50mg/kg) for 14 days.

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

억제되어 심장 내피세포의 두께가 정상군과 유사한 결과를 보였다. 혈관주변의 파괴정도를 관찰해 본 결과 대조군은 혈관이 괴사로 인한 파괴가 일어나지만 실험군은 정상군과 유사하게 내피세포의 분포도가 균일하게 유지되었다(Fig. 7b).

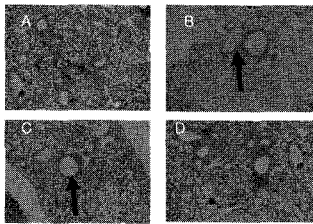
한편 혈압상승으로 인한 내피세포 주변조직의 파괴에 관여하는 단백질의 발현을 조사하여 심장 동맥내피세포의 조직괴사가 약물에 의해 보호를 받았는지 확인하기 위해 심장동맥을 중심으로 주변부를 paraffin 포매를 실시하여 면역조직화학염색법을 수행하여 calpain, CPP3 존재를 확인하였다. 그 결과 대조군은 calpain이 강하게 발현되어 세포괴사가 유

도됨을 알 수 있었고 실험군의 경우 내피세포 주변부가 약한 갈색반응을 보여 calpain이 다소 약하게 발현됨을 알 수 있었다. 또한 세포사의 대표적인 단백질인 CPP3의 발현을 확인한 결과 정상군은 동맥 주변부가 약한 갈색인 반면 대조군은 강하게 갈색 반응을 나타냈고 실험군은 정상군과 비슷한 정도의 약한 갈색반응을 보였다(Fig. 8b).

3. 分心氣飲이 혈전이 유도된 ECV 304 세포주에 미치는 영향

- 1) ECV 304 세포주에 대한 형태학적인 영향
- 각 군의 세포 형태학적인 변화를 관찰한 결과 정

a) x50



b) x200

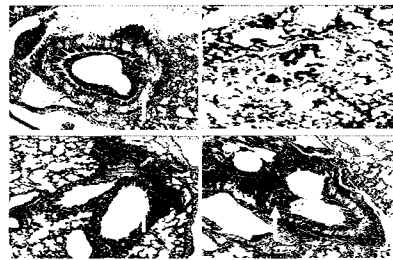
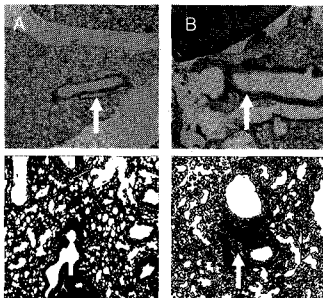


Fig. 7. Photomicrographs of normal and L-NAME-induced hearts structure(a:x150, b:x200) inoculated with (left) and L-NAME induced heart (right) not injected with Boonsimgieum.

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

a) calpain



b) CPP3

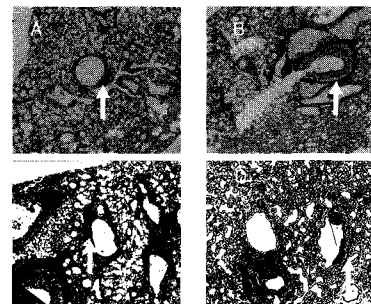


Fig. 8. Immunohistochemistry analysis of calpain(a) and CPP3(b) expression in L-NAME-induced rat heart tissues.

Immunohistochemistry for detecting calpain and CPP3 expression in normal(A) and L-NAME heart tissues(B, C and D) sections of the indicated cases was performed as described in "Materials and Methods." calpain and CPP3 staining are visualized in heavy brown around vessel endothelium.

상군(N)은 내피세포의 증식이 왕성하게 진행되지만 thrombin을 투여한 대조군(C)은 세포괴사가 강하게 진행되었고 실험군(S)의 경우는 分心氣飲 水抽出液의 농도가 10 μ g/ml에서는 약하게 괴사가 유도되고 50 μ g/ml 농도에서는 괴사정도가 강하게 억제되는 경향을 보였다(Fig. 9).

또한 collagen에 의한 형태학적인 변화로 대조군

은 세포괴사를 유도하지만 실험군의 경우 10 μ g/ml 농도에서는 뚜렷한 변화가 없었으나 50 μ g/ml 농도에서 내피세포의 괴사가 강하게 억제되었다(Fig. 10).

2) ECV 304 세포주의 세포사에 미치는 영향

정상군(N)은 내피세포의 괴사가 약 6 \pm 1.3%정도로 미미하지만 대조군(C)은 세포괴사가 강하게 진행하여 약 91 \pm 2.0%정도로 진행되었고 실험군(S)은

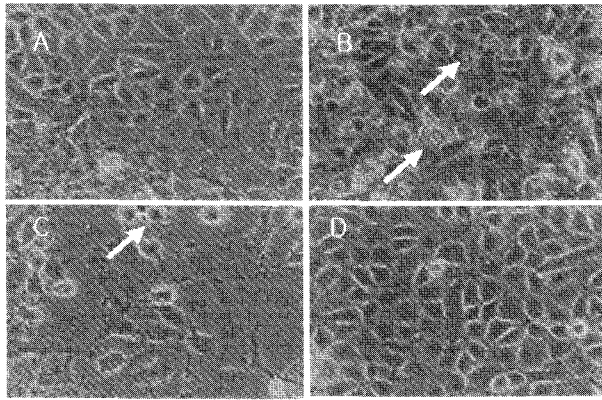


Fig. 9. Inhibition of cell death does induce morphology change in ECV 304 cells.

ECV 304 cells growing in complete media were treated with 10nM thrombin. The treatment of ECV 304 cells with Boonsimgieum resulted in almost complete necrosis or/and apoptosis. There was morphological change in the Boonsimgieum-treated cells (panel B) in comparison with untreated control cells (panel A), suggesting that the inhibition of apoptosis alone does induce changes of cell morphology. Magnification, 200 \times .

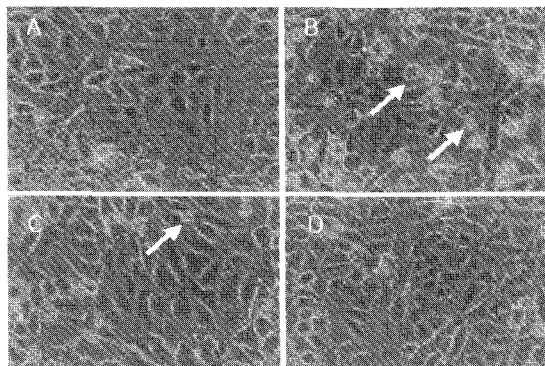


Fig. 10. Inhibition of cell death does induce morphology change in ECV 304 cells.

ECV 304 cells growing in complete media were treated with collagen (100 μ g/ml). The treatment of ECV 304 cells with Boonsimgieum resulted in almost complete necrosis or/and apoptosis. There was morphological change in the Boonsimgieum-treated cells (panel B) in comparison with untreated control cells (panel A), suggesting that the inhibition of apoptosis alone does induce changes of cell morphology. Magnification, 200 \times .

10, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 $42\pm 1.5\%$, 19 ± 1.4 로 나타나 내피세포의 괴사를 억제하고 파괴를 회복하는데 농도 의존적으로 유의성($p < 0.05$) 있게 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 11).

MTT assay를 시행한 결과 대조군은 내피세포의 괴사가 100% 이내로 유도되었으나 실험군은 1, 5, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 모두 세포사가 억제되었으며 IC_{50} 이 약 $11\mu\text{g/ml}$ 정도로 나타났다(Fig. 12).

3) ECV 304 세포주의 세포핵에 미치는 영향

정상군은 형광현미경하에서 세포핵이 녹색형광을 나타냈으나 괴사가 진행된 대조군의 세포핵은 적색 내지 오렌지색으로 염색되었고 실험군의 경우 세포핵이 녹색 형광으로 나타났다(Fig. 13).

또한 TUNEL assay를 시행하여 ECV 304 세포주의 세포핵의 절단 유무를 조사한 결과 정상군은 미미하게 반응을 보인 반면 대조군은 강한 녹색형광을 보임으로써 세포핵의 절단이 유도되었음을 나타내었고 실험군은 약한 녹색 형광신호를 보였다(Fig. 14).

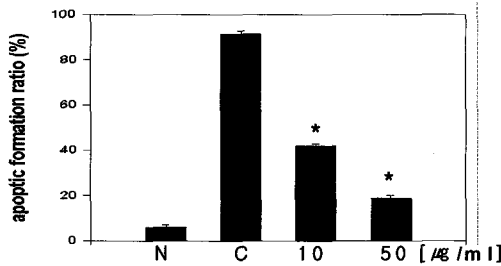


Fig. 11. Effects of Boosimjeum on the induction of apoptosis in ECV 304 cells.

Cells were analyzed by MTT assay, and the percentage of cells in the apoptotic cell was determined. Values are means of at least three data sets mean \pm S.D. * $p < 0.05$.

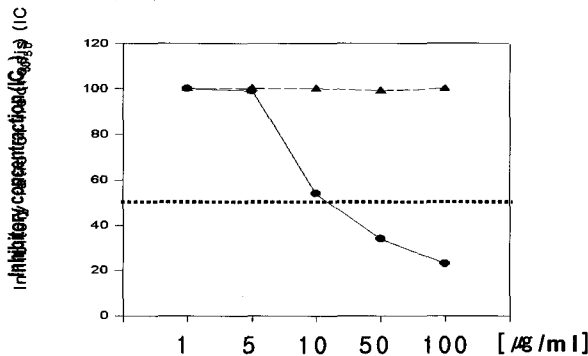


Fig. 12. Inhibitory effects of Boosimjeum on the ECV 304 cells by thrombin and collagen.

Effect of Boosimjeum on necrosis in ECV304 cell lines was determined at various concentrations in the presence and absence of a dose of thrombin and collagen. Data are reported as percent inhibition of necrotic cell number relative to thrombin and collagen-treated controls (mean \pm SD). ▲: control, ●: Boosimjeum

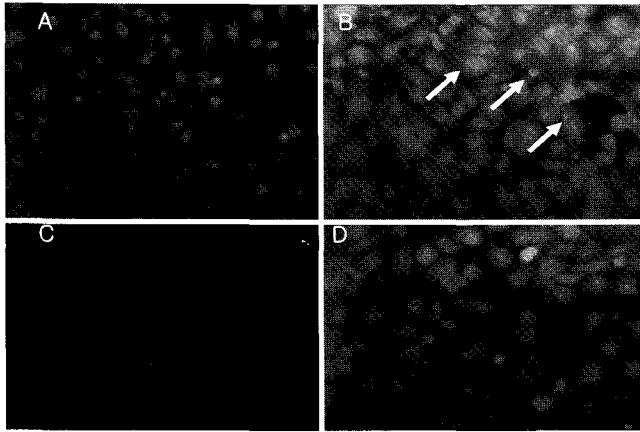


Fig. 13. Acridine orange labeling of ECV 304 cells.

Acridine orange accumulates in acidic compartments, producing a red fluorescence(B). (A) In drug-sensitive ECV 304 cells the Acridine orange fluorescence was a relatively even green with no red-orange fluorescence. Punctate red-orange fluorescence, indicative of acidified organelles, was observed in the cytoplasm of: (B) no Boonsimgieum treatment in ECV304, (C) ECV 304 cells treated with Boonsimgieum, (D) Boonsimgieum had no effect on the fluorescence of ECV304 cells. Cells were incubated with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ AO as described in Materials and Methods and examined under immunofluorescence microscopy. (Bar is 10 μm .)

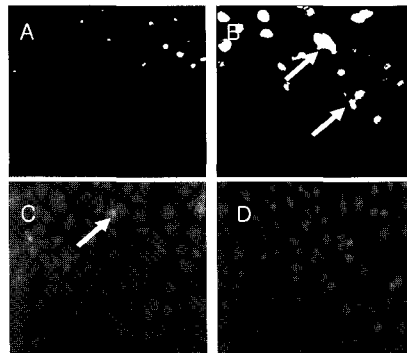


Fig. 14. Effect of Boonsimgieum on Thrombin and collagen-induced necrosis occurs in TUNEL-positive apoptotic ECV 304 cells.

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

4) ECV 304 세포주의 LDH 활성도에 미치는 영향
정상군은 내피세포의 LDH 활성도가 약 12 \pm
3.5%정도이지만 대조군은 세포괴사가 강하게 진행

하여 약 90 \pm 1.0%정도로 나타났고 실험군은 10, 50
 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 각각 78 \pm 2.0%, 23 \pm 4.0%로 나타났
다(Fig. 15).

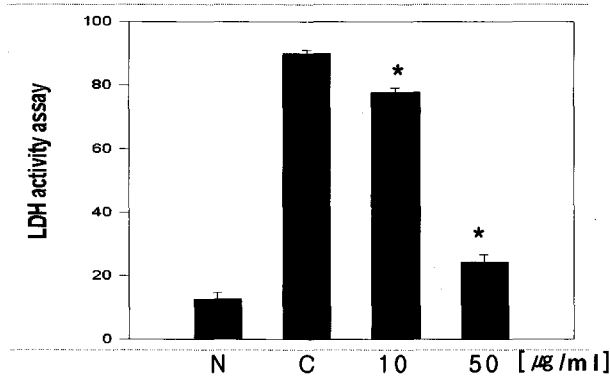


Fig. 15. LDH release by ECV 304 cells exposed to thrombin and collagen.

The cells was cultured for 12hr, and LDH release was measured in samples of the culture medium 12 hr after Boonsingieum treatment. In some experiments the culture medium of the ECV 304 contained the agonist thrombin and collagen. The levels of LDH were measured in medium samples 12 hr after Boonsingieum treatment. Each value represents the mean (±SD) of three independent experiments performed in triplicate. * p< 0, 05.

IV. 考 察

심장을 포함하여 동정맥에서 모세혈관에 이르기 까지 우리 몸의 각 부분에 혈액을 순환시키는 모든 기관을 합쳐 심혈관계라고 하며 심장 및 혈관에 생기는 질병을 심혈관질환이라 하는데¹⁹, 근래 전세계적으로 심혈관계 질환이 급속히 증가하는 추세이다²⁰.

심혈관 질환은 韓醫學에서는 胸痺, 驚悸, 健忘, 中風, 昏迷, 癱瘓, 百合病 등의 범주에서 다루고¹⁹, 서양의학에서는 심근경색, 고혈압, 폐원성 심장병, 심근염(감염성, 바이러스성, 원발성), 심내막염, 부정맥, 동맥경화증, 고혈압성 심장병, 저혈압, 뇌혈관 질환, 혈관우위질환, 허혈성 심장질환으로 분류하고 있다²¹. 이러한 심혈관계를 총체적으로 유지하는데 가장 중요한 조직은 혈관내피세포로 여러 자극에 의하여 기능이 상실되면 결과적으로 혈관손상이 일어나 심혈관 질환이 발생하게 된다^{1,22}.

혈관내피세포는 주로 혈관운동성 및 투과성, 혈액응고 및 분해, 염증세포나 혈관 평활근세포의 이동이나 증식을 조절함으로써 혈관의 항상성을 유지시키는데^{1,23}, 최근 보고된 바로 혈관내피세포는

EDRF와 동일시되는 NO, brain natriuretic peptide, prostacyclins, 및 EDHF와 같은 혈관이완인자와 ET-1, AT-II, thromboxane, prostaglandin H2와 같은 혈관수축인자를 동시에 분비하여 혈관의 긴장도를 유지함으로써 혈압과 혈류의 균형을 이루게 된다⁴. 또한 interleukin, monocyte chemotactic protein (MCP)-1, tumor necrosis factor- α (TNF- α)와 같은 cytokine뿐만 아니라 transforming growth factor (TGF), platelet derived growth factor(PDGF), insulin-like growth factor(IGF)-1과 같은 성장인자를 생성 분비하는 작용도 가지고 있다고 알려져 있다^{1,4,24}.

혈관내피세포에서 분비하는 상기의 인자 중 NO는 L-arginine으로부터 eNOS에 의해 합성되는 물질로 내피세포의 생존과 유지에 가장 중요한 인자이다⁵. 최근 연구보고에 의하면 NO의 가장 주된 작용은 혈관이완으로 심근세포뿐만 아니라 혈관의 평활근 세포에서 guanylate cyclase를 활성화시켜 혈관이완효과를 나타내며, 그 외 세포의 괴사를 억제하고 순환기와 중추신경계의 혈소판 응집력에 영향을 미쳐 세포손상을 방지하며 혈소판이나 백혈구의 흡

착을 방지하고 혈관내벽의 투과성을 유지시킨다⁶. NO와 eNOS의 생성 및 활성도에 관여하는 인자로는 acetylcholine, histamine, thrombin, bradykinin, shear stress, cyclic strain, 산화저밀도 지단백, 저산소증, 운동, 인슐린, 인슐린양 성장인자, 고혈당, tumor necrosis factor 등이 있다⁴. 최근 NOS의 활성화와 비활성화에 칼슘과 caveolin이 중요하며 특히 caveolin이 혈관내피세포에서 유래된 eNOS의 작용에 중요한 역할을 한다는 것이 밝혀졌다²⁵.

한편 본 연구에 사용된 分心氣飲이 처음 수록된 것은 陳師文의 <太平惠民和劑局方⁷>으로 “憂愁, 思慮, 怒氣로 인하여 神을 상해 男子 및 婦人이 一切의 氣不和가 생기게 되고 抑鬱된 氣가 停滯되어 흠어지지 못해 胸中에 머물러 소통되지 못함으로 인해 心胸痞悶, 胸膈虛脹, 塞不通, 噎氣吞酸, 嘔噦, 惡心, 頭目昏眩, 四肢倦怠, 勞倦, 面色萎黃, 口苦舌乾, 攝食減少 혹은 大腸虛閉하게 되는 경우에 時候에 구애받지 않고 쓸 수 있으니 停滯된 氣를 소통시키고 陰陽을 昇降시키고 三焦를 고르게 조화시키며 脾臟을 和하게 하여 음식을 먹을 수 있게 한다”라고 하였다.

본방의 약물구성 및 효능을 살펴보면 방중의 蘇葉은 解表散寒·行氣寬中하고 炙甘草는 和中緩急·潤肺하며 半夏는 燥濕化痰·降逆止嘔·消痞散結하고 枳殼과 枳實, 陳皮는 疏肝理氣·散結消痰하며 木通은 瀉火行水·通利血脈하고 大腹皮와 檳榔, 赤茯苓은 下氣行水하는 效能이 있다²⁶ 한 木香과 香附子, 蓬朮은 理氣行氣·止痛하고 桑白皮는 瀉肺平喘·利水消腫하며 桔梗은 宣肺利咽·祛痰排膿, 藿香은 芳香化濕·和中止嘔·發表解暑, 麥門冬은 滋陰潤肺·清心除煩·益胃生津, 桂皮는 補元陽·暖脾胃·通血脈, 燈心은 利水滲濕·清心除煩하며 生薑은 溫中止嘔·化痰止咳, 大棗는 補脾和胃하면서 調和諸藥하는 效能이 있다²⁶.

分心氣飲을 현대적으로는 우울증이나 스트레스성으로 인한 제증상에 다용하고 있으며^{12-3,27} 방에 대한 임상적인 연구보고로는 “分心氣飲加味方이 수면장애와 정서성에 미치는 영향”¹¹, 등이 있으며 실

험적인 연구보고로는 “Chronic mild stress로 유발된 우울증 모델 흰쥐에 대한 分心氣飲의 실험적 연구”¹², “分心氣飲 투여에 따른 stress관련 Hormone의 함량변화에 관한 실험적 고찰”¹³ 등이 있으나 아직까지 分心氣飲을 실험관계질환에 관련해서 고혈압 동물모델이나 혈관내피세포에 투여한 연구보고는 전무하다.

이에 저자는 大小便通利를 통하여 心胸間의 停滯된 氣를 풀어주고 三焦를 調和롭게 하는 分心氣飲이 심혈관계질환에 효능이 있을 것으로 사료되어 이를 실험적으로 규명하고자 본 연구를 실시하였다.

먼저 分心氣飲이 혈전이 유도된 혈소판 혈장에 미치는 영향을 알아보기 위하여 혈소판 혈장에 thrombin 및 collagen을 투여하여 혈전을 유도한 뒤 分心氣飲 水抽出液을 투여한 결과 대조군은 혈전이 강하게 유도되었으나 실험군은 10, 50 μ g/ml 농도에서 모두 약하게 유도되었다. 200x 배율의 현미경하에서 혈소판의 응집도를 판정하여 본 결과에서도 대조군에 비해 실험군은 두가지 농도에서 모두 40%정도 감소하는 경향을 보여 分心氣飲이 혈소판의 응집을 억제하는 효과가 있음을 알 수 있었으나 농도간의 유의성은 인정되지 않았다.

둘째 分心氣飲이 L-NAME를 투여하여 고혈압을 유도한 백서에 게 미치는 영향을 혈압과 심박수, 혈관 운동성, 동맥내피세포의 변화 등을 통하여 알아본 결과 분심기음 수추출액 투여군이 10, 50 μ g/ml 농도에서 모두 혈압 및 심박수가 유의하게 감소하는 경향을 보였으며 혈관 수축력 역시 $p < 0.05$ 범위에서 유의성 있게 감소하였다. 또한 백서의 동맥내피세포의 조직괴사가 分心氣飲에 의해 보호를 받았는지의 여부를 확인하기 위해 分心氣飲 水抽出液을 경구투여한 후 심장동맥을 중심으로 주변부를 paraffin 포매를 실시하여 H/E 염색을 수행하고 동맥을 종횡단면으로 절단하여 관찰한 결과 L-NAME 처리군은 혈관의 괴사가 진행되고 주변 혈관내피세포의 두께가 감소가 관찰되었다. 이와 반대로 分心氣飲 水抽出液 투여군은 L-NAME에 의해 NO의 형성을 억제하여 세포증식을 유도하거나 내피세포의

파괴를 억제되어 심장 내피세포의 두께가 정상군과 유사한 결과를 보였다. 혈관주변의 파괴정도 역시 대조군은 혈관의 괴사로 인한 파괴가 관찰되었으나 실험군은 정상군과 유사하게 균일한 내피세포의 분포도를 보였다.

한편 혈압상승으로 인한 동맥내피세포의 조직괴사 정도를 세포사에 관여하는 대표적인 단백질인 calpain 및 CPP3의 존재로 확인하기 위해 면역조직화학염색법을 수행한 결과 대조군은 혈관 주변부가 강한 갈색반응을 보여 세포괴사가 유도됨을 보여주었으나 실험군의 경우 약한 갈색반응을 보여 세포괴사가 억제되거나 세포 증식이 촉진됨을 보여주었다.

이와 같은 결과는 分心氣飲이 L-NAME에 의한 혈압상승으로 심장 및 동맥의 조직괴사를 억제하고 내피세포에 대한 보호효과가 있는 것으로 사료되며 동시에 L-NAME의 투여가 calpain과 CPP3의 발현을 동시에 유도하는 것으로 보아 L-NAME에 의한 내피세포의 세포사는 eNOS의 작용을 억제시켜 NO의 합성을 저해함으로써 동맥경화나 심장조직의 파괴가 가능할 수 있음을 시사한다.

셋째 분심기음이 인간 제대혈관 유래 혈관내피세포인 ECV 304 세포주에 미치는 영향을 알아보기 위해 ECV 304 세포주에 혈소판 활성화 유도물질인 collagen 와 thrombin을 처리하여 괴사를 유도한 뒤 1, 5, 10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 分心氣飲 水抽出液을 투여한 결과 分心氣飲 水抽出液에 의해 내피세포의 괴사가 저해되므로 내피세포 상해를 보호하는 양상은 결국 심장이나 내상에 의한 혈관내피세포의 파괴를 회복하는데 유의성이 있을 것으로 사료된다.

ECV 304 세포주의 형태학적 변화를 관찰한 결과에서도 대조군은 상기의 두 유도물질에 의해 세포괴사가 강하게 진행되었으나 실험군은 10 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서는 약하게 괴사가 유도되고 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에는 괴사정도가 강하게 억제되는 경향을 보여 分心氣飲이 세포를 보호하고 내피세포의 상해에 의한 괴사를 회복할 수 있을 것으로 사료된다.

혈관 내피세포의 생존율을 LDH 활성도로 알아보기 위하여 LDH assay를 시행한 결과 정상군은

내피세포의 LDH 활성도가 약 12 \pm 3.5%정도이지만 대조군은 세포괴사가 강하게 진행하여 약 90 \pm 1%정도였으며 分心氣飲 水抽出液 투여군은 10, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 각각 78 \pm 2%, 23 \pm 4%로 나타났다. 이는 分心氣飲이 내피세포의 괴사로 인해 발생하는 LDH의 활성도가 저해시켜 내피세포 상해를 보호하여 심장이나 내상에 의한 혈관내피세포의 파괴를 보호하거나 회복하는 유의성이 있음이 사료된다.

혈관 내피세포의 상해는 심장내지 동맥혈관 내피세포의 주변부에서 혈소판의 응집반응이나 혈전을 유도하는데 이때 형성된 마이크로파지가 변형된 거품세포에 의해 평활근세포나 내피세포의 세포핵 분열을 일으켜 세포사에 영향을 줄 수 있다. 이를 확인하기 위해 정상군, 대조군, 실험군을 acridine orange 염색을 실시한 결과 정상군은 형광현미경하에서 녹색형광으로 나타났으나 세포사가 일어나는 대조군의 세포핵은 적색 내지 오렌지색으로 나타났으며 실험군의 경우 녹색 형광으로 나타났다. 또한 TUNEL assay를 통한 세포핵의 절단 유무 관찰에서도 대조군은 강한 녹색형광을 보임으로 세포핵의 절단이 유도되었다는 결과를 보였고 分心氣飲 水抽出液을 투여한 군은 10, 50 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 모두 다소 약한 형광신호를 보였다.

이와 같은 두가지 결과는 모두 分心氣飲이 혈전 유도를 통해 야기된 내피세포의 세포사를 억제하는 효과를 가지는 것으로 사료된다.

分心氣飲에 관한 상기와 같은 실험을 실시한 결과를 종합하여 볼 때 分心氣飲은 L-NAME 및 thrombin과 collagen에 의한 혈관내피세포의 괴사를 억제시키고 혈청학적인 항상성을 증진시켜 심장주변의 미세 환경을 원활하게 유지하는데 효과가 있을 것으로 사료된다.

V. 結 論

分心氣飲 水抽出液을 L-NAME를 매개로 고혈압을 유도한 백서와 thrombin 및 collagen으로 손상을 유도한 혈소판 혈장과 인간 제대혈관 유래 내피세포

인 ECV 304 세포주에 투여하여 分心氣飲의 세포사 방어효과와 심장혈전에 미치는 영향을 규명하고자 본 실험을 실시한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 혈소판 혈장에 collagen 및 thrombin을 투여한 결과 分心氣飲 투여군은 10, 50 μ g/ml 농도에서 모두 혈소판 응집을 40% 정도 감소시켰으며 농도간의 유의성은 인정되지 않았다
2. 혈소판 혈장에 collagen 및 thrombin을 투여한 후 MP의 수를 조사한 결과 分心氣飲 투여군은 10, 50 μ g/ml 농도에서 모두 MP의 수를 감소시켰다.
3. L-NAME 유도 고혈압 백서의 심박수를 측정할 결과 分心氣飲 투여군은 10, 50 μ g/ml 농도에서 모두 감소하였다.
4. L-NAME 유도 고혈압 백서의 혈압을 측정할 결과 分心氣飲 투여군은 10, 50 μ g/ml 농도에서 모두 감소하였다.
5. L-NAME 유도에 의한 고혈압 백서모델의 동맥 수축력 측정에서 分心氣飲 투여군은 10, 50 μ g/ml 농도에서 모두 수축력이 감소하여 혈관 이완 효과를 나타내었다.
6. L-NAME 유도에 의한 고혈압 백서모델의 동맥 내피세포 면역조직화학 분석을 실시한 결과 分心氣飲 투여군은 L-NAME에 의한 NO의 형성을 억제하여 세포증식을 유도하거나 내피세포의 파괴를 억제시켰다.
7. 分心氣飲은 ECV 304 세포주의 collagen 및 thrombin에 의한 괴사를 저해시키고 세포생존율을 증가시키는 효과를 보였으며 IC₅₀은 11 μ g/ml로 나타났다.
8. ECV 304 세포주의 LDH 활성도는 分心氣飲 10, 50 μ g/ml 농도에서 농도의존적으로 세포 생존에 강한 유도효과를 나타내었다.
9. ECV 304 세포주의 acridine orange 염색 및 Tunel assay를 시행한 결과 分心氣飲은 10, 50 μ g/ml 농도에서 모두 세포핵 분절을 감소시켰다.

이상의 실험에서 分心氣飲은 혈소판 혈장에서 collagen 및 thrombin에 의한 혈소판 응집과 혈전형

성을 억제하는 효과가 있으며 인간 제대혈관 유래 혈관내피세포인 ECV 304 세포주에 대하여 collagen과 thrombin으로부터 세포괴사와 혈전형성을 억제하는 효과가 있으며, L-NAME 유도 고혈압 백서의 혈압과 심박수를 유의성있게 감소시키고 동맥 내피세포를 보호하는 효과가 있음이 입증되었다. 따라서 分心氣飲은 심혈관계에 있어서 대동맥이나 혈관내피세포의 조직괴사에 따른 뇌질환이나 심장 질환에 대한 임상 응용이 가능할 것으로 사료된다.

參考文獻

1. Hsueh WA, Quinones MJ, Creager MA. Endothelium in insulin resistance and diabetes. *Diabetes Rev* 1997;5:343-52.
2. Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med* 1990;323:27-36.
3. Furchgott, R. F. and Zawadzki, J. V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980;288:373.
4. Harrison DG. Perspective series; nitric oxide and nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 1997; 100:2153-57.
5. Schmidt HHHW, Walter U. NO at work. *Cell* 1994;78:919-25.
6. Gibbons GH, Dzau VJ. Molecular therapy for vascular diseases. *Science* 1996;272:689-93.
7. 김경욱. 分心氣飲加味方이 흰쥐의 수면장애와 불안에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 2001.
8. 이주은. Chronic Mild Stress로 유발된 憂鬱症 모델 흰쥐에 대한 分心氣飲의 실험적 연구. 경희대학교 대학원. 2000.
9. 이승기. 分心氣飲의 憂鬱症 모델 흰쥐에 대한 실험적 연구. 경희대학교 대학원. 2000.
10. 지선영. 分心氣飲 투여에 따른 stress 관련 호르몬의 함량변화 관한 실험적 연구. 대구한의과대

- 학. 1990.
11. 김기욱. 分心氣飲과 分心氣飲加味方の 항 스트레스 효과에 대한 실험적 연구. 경희대학교 대학원. 1994.
 12. 김지욱. 分心氣飲의 스트레스 억제효과에 대한 실험적 연구. 경희대학교 대학원. 1989.
 13. 박세광. 分心氣飲이 家兔의 血壓降下에 미치는 영향. 대전대학교. 1990.
 14. 한동훈, 권강범, 김우경, 오광수, 김인규, 류도곤. 실소산 전당액과 구성약물이 배양 심근 세포의 LDH활성도에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 2001;15(5):770-774.
 15. 허윤, 나영훈, 한상혁, 장호연, 임준모, 이인, 전희준, 류지용, 문병순. 생맥산이 대동맥 평활근 세포에서 NO생성에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 2001;15(5):770-774.
 16. Czarnowska E, Kurzelewski M, Beresewicz A, Karczmarewicz E.: The role of endogenous nitric oxide in inhibition of ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis. *Folia Histochem Cytobiol.* 2001;39(2):179-80.
 17. Kaya M, Kalayci R, Kucuk M, Arican N, Elmas I, Kudat H, Korkut F.: Effect of losartan on the blood-brain barrier permeability in diabetic hypertensive rats. *Life Sci.* 2003;7:73(25):3235-44.
 18. Cheung F, Siow YL, Chen WZ, O K. Inhibitory effect of Ginkgo biloba extract on the expression of inducible nitric oxide synthase in endothelial cells. *Biochem Pharmacol.* Nov 1999;15:58(10):1665-73.
 19. 屈松栢·李家康, 實用中醫心病學(제2판). 北京: 科學技術文獻出版社; 2000, p.3.
 20. 김정순, 김철준, 문옥륜, 박명윤, 백도명, 송윤미, 일반보건학(2). 서울: 서울대학교 출판부; 1996, p.226-38.
 21. DiSilvestro RA, Liu J, Klaassen CD. Transgenic mice overexpressing metallothionein are not resistant to adriamycin cardiotoxicity. *Res Commun Mol Pathol Pharmacol.* 1996;93(2):163-70.
 22. 이인규. 혈관질환에 대한 분자생물학적 치료. 당뇨병 1997;21:122-6.
 23. Moon SK, Kim YS, Ko CN, Bae HS, Cho KH, Lee KS. Effect of Uwhangchungsimwon on expression of nitric oxide synthase and vascular cell adhesion molecule-1 in human endothelial cells. *Am J Chin Med.* 2003;31(3):389-402.
 24. Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., Kasuya, Y., Miyachi, T., Goto, K. and Masaki.: The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes. *Proc. Acad. Sci. USA.* 1989;86:2863.
 25. Michel T, Feron O : Perspective series; nitric oxide and nitric oxide synthase. *J Clin Invest* 1997;100:2146-52.
 26. 本草學. 전국한의학대학 본초학 교실. 서울: 도서출판 영림사; 1992, p.125, 136, 292, 302, 315, 326, 336, 347-9, 351-4, 365, 378, 417, 448, 460, 484, 540-2, 588.
 27. 김지욱, 김지혁, 황의완. 分心氣飲의 항 스트레스 효과에 관한 실험적 연구. 대한한의학회지 1989;10(1):47-52.