

心適丸이 산화적 손상에 따른 신경교세포 보호효과 및 국소 뇌혈류량 변화에 미치는 영향

권태우¹, 손영수¹, 조수인², 김영균^{1*}

1: 동의대학교 한의과대학, 2: 부산대학교 한의학전문대학원

Protective Effects of Cardiotonic Pills (CP) on Neuroglia Cells Against Oxidative Stress and the Effects on Regional Cerebral Blood Flow in Normal Rats

Tae-Woo Kwon¹, Young-Soo Son¹, Su-In Cho², Young-Kyun Kim^{1*}

1: College of Oriental Medicine, Dong-Eui University
2: School of Korean Medicine, Pusan National University

ABSTRACT

Objectives : SimJeok-Hwan (CP, Cardiotonic Pills) was made to treat patients with coronary arteriosclerosis, angina pectoris and hyperlipidemia. This study was designed to investigate the effects of CP on Proliferation rates neuroglia cells and protective effect of CP against oxidative stress, and also investigate the effects on regional Cerebral Blood Flow (rCBF) in normal rats.

Methods : In this experiment, effects of CP on proliferation rates of neuroglia cells were measured using modified MTT methods. Oxidative stress was induced by treatment with 200 mM of hydrogen peroxide for 2 hr. rCBF and MABP were measured using Laser doppler flowmeter.

Results : Treatment with CP elevated proliferation rates in C6 cells. In addition, CP protected cell death of C6 cells induced by oxidative stress. In results, rCBF was elevated by treatment with CP in normal rats. But, Mean Arterial Blood Pressure (MABP) did not affected by CP. In addition, the elevation of rCBF was blocked by pre-treatment with 1 mg/kg of indomethacin effectively. On the other hand, pre-treatment with 0.01 mg/kg of methylene blue did not affect rCBF level in normal rats.

Conclusions : In conclusion, these results suggest that CP can act as anti-oxidant to protect neuroglia cells and also suggest that CP can elevate rCBF, which are involved in cyclooxygenase pathway.

Key words : Cardiotonic Pills (CP), neuroglia cells, regional Cerebral Blood Flow

서 론

최근들어 식생활이 서구화되고 정신적 스트레스의 증가 등으로 고혈압을 위시한 각종 성인병이 증가하

고 있고, 의료의 발달로 인하여 평균 수명이 증가하면서 노인성 질환들의 발생이 증가하고 있다. 그 중에서도 뇌혈관계 질환의 발생 빈도가 높아 사회적으로 많은 관심이 요구되고 있다^{1,2)}.

* 교신저자 : 김영균, 부산시 부산진구 양정동 동의대학교 한의과대학

· Tel : 051-867-5105 · E-mail : lab3402@hanmail.net

· 접수 : 2008년 11월 8일 · 수정 : 2008년 12월 19일 · 채택 : 2008년 12월 22일

허혈성 뇌질환은 한의학에서 中風의 범주에 속하며^{3,4)}, 이는 순환장애 등의 뇌혈관 병변으로 인해 국소적인 신경학적 결손을 나타내는 뇌혈관질환을 포함하는 것으로 人事不省, 手足癱瘓, 口眼喎斜, 言語蹇澁, 偏身麻木 등의 임상증상을 나타내는 질환이⁵⁾. 실제 임상에서 中風은 발병률이 매우 높을 뿐 아니라, 사망률이 높고 후유증이 많아 예로부터 한의학에서 중요한 위치를 차지하여 왔다^{4,5)}.

심적환(CP, Cardiotonic Pills, 心適丸)은 중국 상위 제약 그룹인 타슬리(天士力) 제약에서 생산되어 우리나라뿐만 아니라 미국에까지 진출 하는 등 세계적으로 큰 각광을 받고 있는 약품이다. CP는 丹蔘(*Salvia Miltiorrhizae Radix*)을 주재료로 하고 여기에 三七(*Notoginseng Radix*)과 龍腦(*Borneolum syntheticum*) 추출물을 첨가하여 만든 제품으로 타슬리에서는 관상동맥 경화, 협심증 및 고지혈증의 치료 및 증상 완화에 효과가 있다고 설명하고 있다.

CP에 대한 연구로는 Horie 등⁶⁾이 발표한 알코올 섭취에 의하여 발생하는 간 조직 내의 미세혈관 기능 손상을 방지 기능, Wang 등⁷⁾의 혈관 내 응고를 방지 기능, Zhang 등⁸⁾이 발표한 고지방 식이에 의한 혈소판 응집 반응을 억제 하는 기능이 등이 있으며, 우리나라에서도 김 등⁹⁾이 고지방 식이에 의한 고지혈증에 효과가 있음을 보고한바 있다. 이에 부가하여 CP의 주약인 丹蔘에 대하여서는 항혈전¹⁰⁾ 및 심근세포에 대한 보호작용¹¹⁾, 혈관 평활근에서 Migration and matrix metalloproteinase (MMPs)의 발현을 억제¹²⁾하는 등이 알려져 있으며, 삼칠의 항혈전 작용¹³⁾이 알려져 있다. 또한 단삼에 대하여 항산화효과가 알려져 있다¹⁰⁾.

중추 신경계는 Neuron과 교세포(Glial cell)로 구성되어 있으며, 이중 교세포는 여러 가지 자극으로부터 뉴런을 보호하고 산소와 각종 영양분을 공급하여 주는 역할을 한다¹⁴⁾. 특히 산화적 스트레스로부터 뉴런을 보호하는 기능은 Glial cell의 가장 중요한 기능 중의 하나이다¹⁵⁾.

상기한 바와 같이 CP에 대한 연구는 주로 심혈관계에 관련된 내용이나, 主藥인 丹蔘의 연구를 상기할 때, 혈관 평활근의 이완 및 수축과 관련 깊은 국소뇌혈류량(regional cerebral blood flow, rCBF)이나 신경교세포(Neuroglia cell)에 대한 보호 효과 등이 있을 가능성에 착안하였다.

이에 저자는 CP의 신경교세포주에 대한 세포 독성 및 국소뇌혈류량에 미치는 영향을 실험적으로 구명하기 위하여 시험관 내에서 신경교세포주에 대하여

직접적인 세포독성(cytotoxicity)을 관찰하고 산화적 스트레스로부터 신경교세포주의 보호 효과를 관찰 한 다음, 정상 흰쥐에서 국소뇌혈류량에 미치는 영향을 관찰하였다. 아울러 어떤 기전에 의하여 국소뇌혈류량이 변동하는지를 살펴본 바, 유의한 결과가 도출되어 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 세포주

본 연구에 사용된 세포주는 흰쥐의 뇌에서 분리해 낸 신경교세포(Neuroglial cell)를 무한분열하도록 변형하여 만들어진 C6 세포주로 한국세포주은행(서울, 한국)으로부터 구입하여 사용하였다. 분주 받은 세포주는 해동되어 배양액 속에 분주 된 후, 2주 이상 계대 배양하여 실험실 환경 및 기타 배양 환경에 충분히 적응시킨 후 증식률(Doubling Time)이 한국세포주은행에서 제공한 자료와 거의 일치하게 되었을 때, 충분히 적응하였다고 생각하고 실험에 사용하였다.

2) 동물

동물은 체중 300 g 내외의 웅성 Sprague-Dawley 계 흰쥐를 (주) 다물 사이언스(대전, 한국)에서 구입하여 사용하였다. 동물은 항온항습 장치가 부착된 사육장에서 고형사료와 물을 충분히 공급하면서 실험실 환경(실내온도 24±2°C, 습도 55±5%, 12시간 dark/light)에 1주일 이상 적응시킨 후 사용하였다.

3) 약재

심적환(CP, Cardiotonic Pills, 心適丸)은 중국 상위 제약 그룹인 타슬리(天士力) 제약에서 생산한 제제로 삼천당제약(서울, 한국)으로부터 구입하여 사용하였으며, CP 1환당 丹蔘 17.5 mg, 三七 3.4 mg, 龍腦 0.2 mg를 함유하고 있다.

2. 방법

1) 세포주 배양

신경교세포주인 C6의 생육 배지로는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Sigma, USA) 배지를 사용하였고, 배지에는 10% fetal bovine serum (FBS, Gibco LOT. NO. 1006842)와 penicillin-

streptomycin(100 units/ml, 100 mg/ml)을 첨가하였다. 세포주의 계대 배양은 2일 간격으로 시행하였고, 부착세포의 탈착을 위해서 Trypsin-EDTA (Sigma, USA)를 사용하였다. C6 세포주는 5% CO₂가 공여되는 배양기 속에서 37°C를 유지하며 배양되었다.

2) 시료의 준비

삼첨당제약을 통하여 구입된 CP는 실험 직전에 인산완충액(PBS, phosphate buffered saline)에 녹여 사용하였다. 인산완충액에 완전히 녹여진 CP 용액은 0.22 μ m 크기의 필터(Syringe filter, Whatman)로 걸러 멸균을 대신 하였다.

3) 세포 증식을 측정

3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2, 5-diphenyl -2H-tetrazolium bromide (MTT)법을 변형하여 살아있는 세포를 정량하는 방법¹⁶⁾을 사용하였다. 먼저 96-well plate (Nunc, Netherlands)에 측정하고자 하는 대상 세포주를 웰당 5 x 10³개의 분량으로 분주 하고, 37°C, 5% CO₂가 공여되는 환경에서 24시간을 배양하여 부착 및 안정화를 시행하였다. 24시간의 배양이 끝난 후, 상기한 방법으로 제조된 CP를 최종 농도 1000 μ g/ml, 500 μ g/ml, 250 μ g/ml, 125 μ g/ml 62.5 μ g/ml이 되게 배양액에 희석하여 부착 및 안정화된 세포주에 공급하고, 24시간 동안 배양 하였다. 24시간 동안의 배양이 끝난 후, 각 well당 10 μ l의 Cell Counting Kit-8 (CCK-8 sol., Dojindo, Japan) 용액을 첨가하고 37°C, 5% CO₂가 공여되는 환경에서 3시간 동안 방치하였다. 3시간 후, Micro-plate reader (Bio-rad, CA)를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 정상 대조군으로는 약물을 첨가하지 않은 well을 사용하였고, 결과는 정상 대조군에 대한 백분율로 환산하여 나타내었다.

4) 산화적 스트레스에 대한 C6 세포주 보호 효과 측정

과산화수소(Hydrogen peroxide, H₂O₂)가 신경교세포주에 대해 미치는 산화적 스트레스를 방지 할 수 있는지를 알아보기 위하여 O'Toole 등¹⁷⁾의 방법을 변형하여 측정하였다. 먼저 96-well plate에 측정하고자 하는 대상 세포주를 well당 5 x 10³개의 분량으로 분주 하고, 37°C, 5% CO₂가 공여되는 환경에서 24시간을 배양하여 부착 및 안정화를 시행하였다. 24시간의 배양이 끝난 후, 최종 농도 125 μ g/ml, 250 μ g/ml로 희석된 CP 용액을 뇌교세포주에게 투여하고 24시

간 동안 배양하였다. 24시간의 배양이 끝나고, CP 용액이 함유된 배양액을 깨끗이 제거 한 후, 최종 농도 200 mM의 과산화수소를 함유한 배양액을 투여하고 2시간 동안 방치하였다. 2시간이 지난 후, 과산화수소가 함유된 배양액을 깨끗이 제거하고, 각 well당 10 μ l의 CCK-8 용액을 첨가하고 37°C, 5% CO₂가 공여되는 환경에서 3시간 동안 방치하였다. 3시간 후, Micro-plate reader(Bio-rad, CA)를 이용하여 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 정상 대조군으로는 약물을 첨가하지 않은 well을 사용하였고, 결과는 정상 대조군에 대한 백분율로 환산하여 나타내었다.

5) 국소 뇌혈류량 및 평균 동맥 혈압 변화 측정

흰쥐를 750 mg/kg의 urethane (Sigma, USA)으로 마취시킨 후 체온이 37~38°C로 유지될 수 있도록 heat pad가 깔린 stereotaxic frame (DKI, USA)위에 복외위로 고정시켰다. 국소 뇌혈류량 측정을 위하여 정중선을 따라 두피를 절개하여 두정골을 노출시킨 후 bregma의 4~6 mm 측방, -2~1 mm 전방에 직경 5~6 mm의 두개창 수술을 시행하였다. 이때 두개골의 두께를 최대한 얇게 남겨 경막의 출혈을 방지하도록 하였다. Laser doppler flowmeter (Transonic Instrument, USA)용 needle probe (직경 0.8 mm)를 대뇌(두정엽) 피질 표면에 수직이 되도록 stereotaxic micromanipulator를 사용하여 뇌연막 동맥에 조심스럽게 근접시켰다. 일정시간 동안 안정시킨 후 실험 절차에 따라 CP를 용량별(0.01 mg/kg, 0.1 mg/kg, 1.0 mg/kg, 10.0 mg/kg, i.p.)로 투여한 다음 변화되는 국소 뇌혈류량 (regional cerebral blood flow)을 각각 30분 동안 측정하였다¹⁸⁾. 평균 동맥 혈압(mean arterial blood pressure) 변화는 흰쥐의 대퇴동맥에 삽입된 polyethylene tube에 연결된 pressure transducer (Grass, U.S.A.)를 통하여 MacLab 과 macintosh computer로 구성된 data acquisition system으로 각각 30분 동안 측정하였다¹⁸⁾.

6) 정상 흰쥐의 뇌혈류역학 변화에 미치는 기전 관찰

CP가 국소 뇌혈류량 및 평균 혈압 변화에 미친 작용 기전을 알아보기 위하여 두 가지 종류의 혈관 확장 인자 억제제를 전처치하고 CP를 투여한 다음 국소뇌혈류량 및 평균동맥혈압 변화를 관찰하였다. 혈관 확장인자 억제제로는 cyclooxygenase의 억제제인 인도메타신(indomethacin, i.p., IDM, Sigma I7378) 과 guanylate cyclase의 억제제인 메틸렌블루(methylene blue 0.01 mg/kg, i.p., MTB, Sigma M9140)를 사용하였다. 1 mg/kg의 IDM 또는, 0.01 mg/kg의 MTB를 전

처치한 후 CP의 투여 용량 (0.01, 0.1, 1.0, 10.0 mg/kg, i.p.)에 따라 변화되는 국소 뇌혈류량 및 평균 혈압을 각각 30분 동안 측정하였다¹⁹⁾.

3. 통계처리

실험 자료에 대한 통계적 분석은 통계 패키지인 Sigma plot (Sigma plot for Windows, ver. 9.0, USA)를 이용하였으며, 실험 성적은 평균±표준편차 (mean±SD)로 나타내었다.

① 세포증식률 및 산화적 스트레스 방지 효과와 국소뇌혈류량 및 평균동맥혈압에 미치는 영향에서 각 실험군 간의 유의성 검증에는 student's t-test를 사용하였다.

② 정상 동물에서 국소뇌혈류량 및 평균동맥혈압 변화에 미치는 기전 연구에서는 paired t-test를 시행하여 p-값이 0.05 미만일 때 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

성 적

1. CP가 신경교세포주의 증식률에 미치는 영향

시험관 내에서 CP의 신경교세포주의 증식률에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 재료 및 방법에서 논술한 바와 같이 24시간 동안 CP를 투여하고 변화를 관찰한 결과 250 µg/ml 이상의 농도에서 유의한 수준의 신경교세포주 증식률의 증가가 관찰되었다. CP를 투여하지 않은 세포군을 100%로 하였을 때, 250, 500,

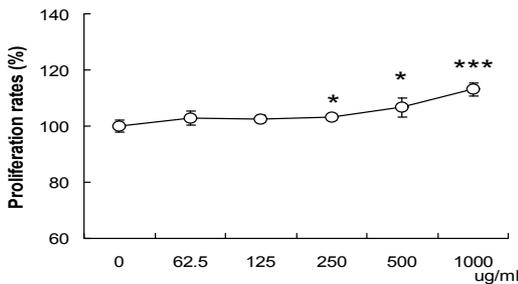


Fig. 1. Effects of CP on proliferation rates of C6 cells *in vitro*
 5 x 10³ cells were seeded in 96-well plate and incubated for 24 hr. After incubation, CP was added into each well in various concentration and cells were incubated for 24 hr again, then Optical Density of each wells were measured using micro-plate reader. Values are represented as mean±SD of three experiments which were carried out independently. *P < 0.05, ***P < 0.001 as compared to non-treated control.

1000 µg/ml 농도의 CP투여는 각각 103±1%, 107±3%, 113±2%였다(Fig. 1).

2. CP의 산화적 스트레스에 대한 신경교세포주 보호 효과

세포증식률에 미치는 영향 연구에서 유의한 결과가 도출된 두 가지 농도인 250, 500 µg/ml 농도의 CP를 전처치한 다음 200 mM의 과산화수소에 의하여 발생하는 산화적 스트레스로부터 신경교세포주를 보호 할 수 있는지 살펴본 결과 500 µg/ml 농도의 CP를 투여한 군에서 유의한 수준의 세포사멸 방지 효과를 관찰할 수 있었다. 아무것도 투여하지 않은 세포군의 생존율을 100%로 하였을 때, 과산화수소만을 처리한 군은 51±11%, 500 µg/ml 농도의 CP를 투여한 군은 87±3%의 생존율을 보였다(Fig. 2).

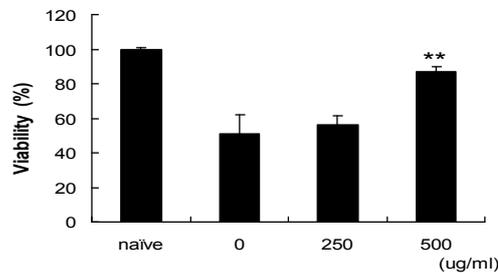


Fig. 2. Protective effects of CP against oxidative stress induced by hydrogen peroxide in C6 cells

5 x 10³ cells were seeded in 96-well plate and incubated for 24 hr. After incubation, 250 and 500 ug/ml of CP was added in each well and re-incubated for 24 hr. After washing, 200 mM of Hydrogen peroxide was added and cells, except naive group, were incubated for 2 hr, then Optical Densities were measured using micro-plate reader. Values are represented as mean±SD of three experiments which were carried out independently. **P < 0.01 as compared to Hydrogen peroxide only group (0 group).

3. CP의 투여가 국소 뇌혈류량 및 평균동맥혈압에 미치는 영향

CP를 0.01, 0.1, 1 mg/kg으로 복강 투여하였을 때의 국소 뇌혈류량은 CP를 투여하지 않은 흰쥐와 비교하여 유의한 증가를 보였다. CP를 투여하지 않은 흰쥐의 기저치를 100%로 환산하였을 때, 0.01, 0.1, 1 mg/kg의 CP 투여군은 각각 127±10%, 139±20%, 142±19%의 국소뇌혈류량을 보였다. 정상 흰쥐에 CP를 투여하고 평균 혈압의 변화를 관찰한 결과 모든 농도에서 특별한 변화를 관찰할 수 없었다(Fig. 3).

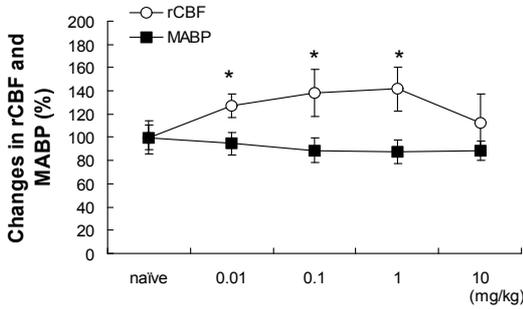


Fig. 3. Effects of CP on the rCBF and MABP in normal rats

rCBF and MABP were measured using Laser doppler flowmeter at increasing concentration of CP. The present data were expressed as mean±SD of 6 animals. *P<0.05, compared to non-treated control (naive).

4. Cyclooxygenase 관련 국소뇌혈류량 작용기전 관찰

국소뇌혈류량 변화는 혈관의 이완 및 수축과 직접적인 관련이 있으므로 먼저 Cyclooxygenase의 차단제인 인도메타신(IDM)을 전처치하고 CP가 국소뇌혈류량에 미치는 영향을 관찰한 결과 IDM을 전처치한 후 CP를 처리한 IDM군의 국소 뇌혈류량은 CP를 단독으로 투여한 경우에 비하여 통계적으로 유의한 감소를 보였다. CP를 투여하지 않은 흰쥐의 기저치를 100%로 환산하였을 때, IDM전처치 후 0.01, 0.1, 1, 10 mg/kg의 CP 투여군에서는 각각 99±11%, 101±24%, 110±24%, 110±22%의 국소뇌혈류량을 보였다 (Fig. 4).

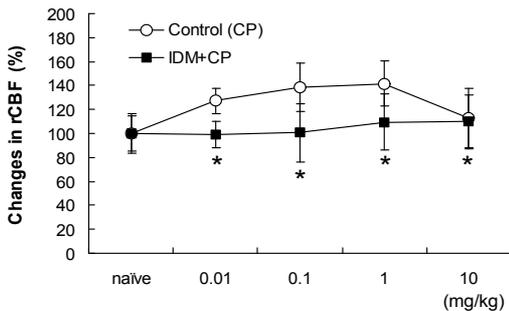


Fig. 4. Inhibitory effects of IDM on elevated rCBF induced by CP in normal rats

After treatment with 1 mg/kg of IDM, CP were treated at indicated dosage, rCBF were measured using Laser doppler flowmeter at each dosage for 30 min. rCBF ; regional cerebral blood flow, IDM : indomethacin (1 mg/kg, i.p.) pre-treated group. Control : only CP treated group. The present data were expressed as mean±SD of 6 animals. *P<0.05 compared to CP-treated group.

5. Cyclooxygenase 관련 평균동맥혈압 작용기전 관찰

IDM을 전처치한 후 CP를 처리한 IDM군의 평균 혈압은 CP를 단독으로 투여한 경우에 비교하여 특별한 차이를 나타내지 않았다(Fig. 5).

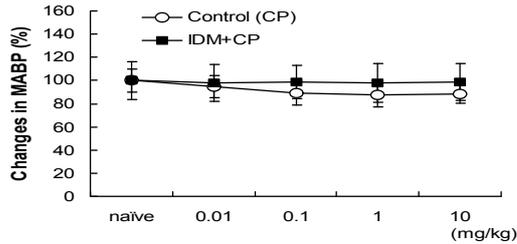


Fig. 5. Inhibitory effects of IDM on MABP induced by CP in normal rats

After treatment with 1 mg/kg of IDM, CP were treated at indicated dosage, MABP were measured using Laser doppler flowmeter at each dosage for 30 min. MABP ; mean arterial blood pressure, IDM : indomethacin (1 mg/kg, i.p.) pre-treated group. Control : only CP treated group. The present data were expressed as mean±SD of 6 animals.

6. Guanylate cyclase 관련 국소뇌혈류량 작용기전 관찰

국소뇌혈류량 변화는 혈관의 이완 및 수축과 직접적인 관련이 있으므로 Cyclooxygenase관련 경로와 또 다른 경로인 Guanylate cyclase경로의 차단제인 메틸렌블루 (MTB)를 전처치하고 CP가 국소뇌혈류량에 미치는 영향을 관찰한 결과 MTB를 전처치한 후 CP를 처리한 MTB군의 국소 뇌혈류량은 CP를 단독으로 투여한 군과 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 6).

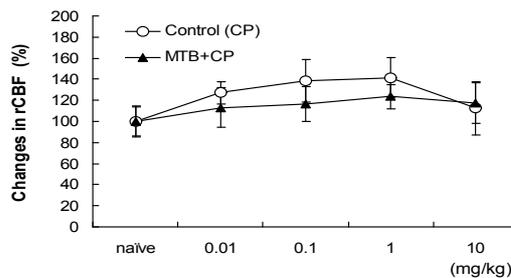


Fig. 6. Inhibitory effects of MTB on elevated rCBF induced by CP in normal rats

After treatment with 10 µg/kg of IDM, CP were treated at indicated dosage, rCBF were measured using Laser doppler flowmeter at each dosage for 30 min. rCBF ; regional cerebral blood flow, MTB : methylene blue (10 µg/kg, i.p.) pre-treated group. Control : only CP treated group. The present data were expressed as mean±SD of 6 animals.

7. Guanylate cyclase 관련 평균 혈압 작용기전 관찰

MTB를 전처치한 후 CP를 처리한 MTB군의 평균 혈압은 CP를 단독으로 투여한 경우에 비교하여 특별한 차이를 나타내지 않았다 (Fig 7).

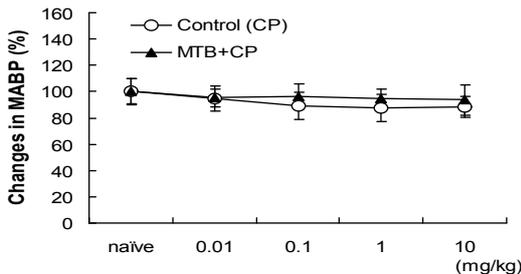


Fig. 7. Inhibitory effects of MTB on MABP induced by CP in normal rats

After treatment with 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ of MTB, CP were treated at indicated dosage, MABP were measured using Laser doppler flowmeter at each dosage for 30 min. MABP ; mean arterial blood pressure, MTB : methylene blue (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, i.p.) pre-treated group. Control : only CP treated group. The present data were expressed as mean \pm SD of 4 animals.

고찰

2004년 통계청 자료에 따르면, 우리나라 사망원인의 2위와 3위가 뇌혈관 질환과 심장 질환인 것으로 발표 되었다²⁰. 최근 우리나라의 식생활 변화와 각종 스트레스 요소의 증가로 인하여 이러한 심혈관계 질환은 지속적인 증가 추세에 있다.

뇌혈관 질환은 성인병 중에서 가장 흔한 질환 중의 하나이며, 그 후유증은 심각하고 오래가는 병으로²¹ 그 특징은 국소 뇌혈류의 장애로 인하여 초래되는 신경학적 결함과 돌발적인 발병을 특징으로 한다²².

정상적인 뇌혈류량은 50 ml/100 g/min만큼씩의 뇌혈류가 전달되어야 하지만 국소 뇌혈류의 순환에 문제가 발생하여 10 ml/100 g/min이하로 감소하게 되면 glutamate 과잉분비 등으로 허혈성 뇌손상이 나타나 운동마비·지각마비 등의 신경학적 증상들이 출현하게 되고, 산소 결핍으로 인한 뇌세포의 괴사가 진행된다^{23,24}.

뇌 조직은 크게 신경세포 (neuron)과 교세포 (glial cell)로 구성되어 있으며 그 비율은 대략 5 : 5 정도라 할 수 있다. 교세포는 다시 성상세포 (astrocyte)와 미세교세포 (microglial cell) 등으로 나뉘게 된다. 교세포들은 신경세포의 활성물질을 조절하거나, 각종

면역 반응에 관여하는 세포들로 허혈성 뇌질환으로 인한 뇌조직 손상 시에 염증 반응을 일으킴으로써 손상의 치료와 증상의 악화 등에 직·간접적으로 관여한다²⁵⁻²⁷. C6 신경교세포주는 교세포를 기원으로 하는 세포주로 교세포의 특성을 연구하는 각종 연구에 사용되고 있다²⁸.

심적환(CP, Cardiotonic Pills, 心適丸)은 중국의 타슬리(天士力)제약에서 생산한 제제로 丹蔘(*Salvia Miltiorrhizae Radix*)이 주원료로 1환당 17.5 mg이 함유되어 있고, 이 외에 三七(*Notoginseng Radix*) 3.4 mg, 龍腦(*Borneolum syntheticum*)가 0.2 mg 함유되어 있다. 심적환은 일반의약품의 기타순환기계용약에 속하며 제조사에서는 관상동맥경화, 협심증, 고지혈증의 치료 및 증상 경감에 주로 활용할 수 있다고 설명한다. 본 제제는 미국의 식품의약품안전청 (FDA)로부터 IND (Investigational new drug)승인을 획득 하였다.

CP에 대한 연구는 중국, 일본, 한국을 중심으로 활발히 진행되고 있다. 최근 Horie 등⁶)은 CP가 장기간 알코올 섭취에 의하여 발생하는 간 조직 내의 미세혈관 기능 손상을 방지함을 보고하였고, Wang 등⁷)은 CP가 광화학적 반응에 의한 혈관 내 응고를 방지함을 보고 하였으며, Zhang 등⁸)은 고지방 식이에 의한 혈소판 응집 반응을 억제 하는 기능이 있음을 보고하였다. 또한 국내에서도 장 등²⁹)이 다기관 무작위 배정 이중맹검 임상연구를 통하여 흉통, 흉민 증상 개선에 효과가 있음이 보고 된 바 있으며, 김 등은 CP가⁹)이 고지방 식이에 의한 고지혈증에 효과가 있음을 보고한바 있다.

CP의 主藥인 丹蔘은 꿀풀과(Labiatae)에 속한 多年生 草本인 丹蔘(*Salvia Miltiorrhizae Bge.*)의 뿌리와 根莖을 건조한 것으로 性味는 苦, 微寒하고 歸經은 心, 肝經이다. 예로부터 活血祛瘀, 調經止痛, 涼血消腫, 清心安神의 효능이 있어 月經不調, 痛經, 血瘀經閉 등의 婦人科 疾患과 心腹刺痛, 脇痛胸痞 등의 心系질환 뿐만 아니라 心悸, 失眠과 같은 질환에도 사용하고 있다³⁰. 최근 양 등¹⁰)이 단삼 메탄올 추출물의 항혈전 및 항산화 효과를 보고하였다. 또한 이 등¹¹)은 단삼이 활성산소로 손상된 배양 심근세포의 세포사멸 방지 효과를 보고하였다. 특히 Jin 등¹²)은 CP가 혈관 내벽에 영향을 줄 가능성을 제시하였는데, 연구보고서에서 혈관 평활근에서 Migration and matrix metalloproteinase (MMPs)의 발현을 억제하여 혈관 평활근 세포의 이주를 억제함으로써 궁극적으로 동맥경화증을 예방 할 수 있다고 하였다.

이러한 연구들을 바탕으로 본 저자는 CP가 허혈

성 뇌손상에서 발생할 수 있는 신경교세포의 손상을 방지하고 국소 뇌혈류량을 증가시켜 궁극적으로 허혈성 뇌손상에서 나타나는 신경학적 병변을 감소시킬 수 있다는 가설을 세우고 본 연구를 기획하였다.

중추 신경계는 Neuron과 교세포(Glial cell)로 구성되어 있으며, 뉴런(Neuron)이 중추신경계의 거의 절반을 차지하고 있고, 교세포가 나머지 절반을 구성하고 있다. 교세포는 뉴런을 여러 가지 자극으로부터 보호하는 역할을 할 뿐만 아니라 산소와 각종 영양분을 공급하여 주는 역할을 한다¹⁴⁾.

Glial cell은 뉴런의 성장과 시냅스의 형성 및 유지에도 관여할 뿐만 아니라, 뇌 내에서 죽은 세포들 및 병원균 등을 탐식하는 등의 일차적 면역 세포로서의 기능 또한 매우 중요하다³¹⁾. 특히 산화적 스트레스로부터 뉴런을 보호하는 기능은 Glial cell의 가장 중요한 기능 중의 하나로 노화 및 치매의 과정에서 또한 허혈성 뇌질환 이후의 뇌세포 괴사과정 등의 질병 전변 과정에서 매우 중요한 역할을 한다¹⁵⁾.

본 연구의 결과에서 CP의 투여는 시험관 내에서 신경교세포주의 증식률을 유의한 수준으로 향상시켰다(Fig. 1). 125 $\mu\text{g/ml}$ 이하에서는 유의한 변화를 보이지 않았지만, 250 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서는 유의한 증식률의 상승을 보였으며, 반응은 농도의존적이었다. 이러한 결과로부터 CP는 신경교세포주에 특별한 세포독성을 나타내지 않으며, 비록 10% 내외였다 할지라도 유의한 수준의 증식률 증가를 보임을 알 수 있었다.

산화적 스트레스(Oxidative stress)와 활성 산소(Reactive Oxygen Species)는 인체에서 발생하는 거의 모든 병의 발생과 진행에 관여한다. 특히 인체의 거의 모든 세포에서의 노화, 유전적 변형에는 가장 중요한 병리적 요소로 알려져 있다³²⁾. 본 연구에서는 CP가 산화적 스트레스로부터 신경교세포주를 보호할 수 있는지를 살펴보았다. 본 연구의 결과에서 200 mM의 과산화수소 투여는 거의 50% 정도의 신경교세포주를 사멸시켰다. CP의 투여는 이러한 산화적 스트레스로부터 신경교세포주를 효과적으로 보호함을 알 수 있었다(Fig. 2). 이러한 결과들에서 CP가 산화적 스트레스로부터 신경교세포를 보호해 줄 수 있는 가능성을 발견하였으며, 이러한 특성은 노화뿐만 아니라 허혈성 뇌질환 이후 발생하는 각종 손상을 예방하여 줄 수 있을 것으로 기대된다.

뇌혈류량은 뇌관류압과 비례하고, 뇌혈관 저항과는 반비례한다. 또한 뇌관류압은 평균동맥압과 비례하며 뇌혈관 저항은 뇌혈관 직경과 반비례한다. 이러한 이유로 정상적인 뇌혈류 유지를 위해서는 혈압이 하강

될 경우 뇌혈관은 확장되어야 하고, 혈압이 상승하게 될 경우 반대로 뇌혈관은 수축되어야 한다^{24,33)}.

본 논문의 결과에서 CP의 복용 투여는 국소 뇌혈류량은 증가시켰으나, 평균 동맥 혈압에는 특별한 영향을 미치지 않았다(Fig. 3). 이는 뇌혈류량이 평균 혈압과 뇌혈관의 직경에 비례한다는 것³⁴⁾에 비추어 볼 때, CP는 평균 혈압에 작용하기 보다는 뇌혈관의 직경을 확장시킴으로써 국소 뇌혈류량을 유의하게 증가시킨 것으로 생각된다.

인도메타신(IDM)은 prostaglandin의 생성효소인 cyclooxygenase를 억제하는 약물이며, cyclooxygenase에 의한 최종 산물인 prostaglandin은 강력한 혈관 확장 물질 중의 하나이다⁷⁾. 메틸렌블루(MTB)는 cGMP의 생성효소인 guanylate cyclase를 억제하는 약물³⁵⁾로 궁극적으로 NO에 의한 혈관 이완을 방지한다³⁶⁾.

본 논문의 결과에서 IDM의 전처치는 CP 투여에 의한 국소뇌혈류량의 증가를 효율적으로 억제하였다(Fig. 4). 이러한 결과는 CP가 국소뇌혈류량을 증가시키는 기전은 혈관 확장과 관련 있고, 특히 혈관 확장의 기전 중에서 Cyclooxygenase와 관련된 기전과 밀접한 관계가 있는 것으로 해석된다. 또한 본 연구에서 IDM을 전처치한 다음, 평균혈압의 변화 또한 살펴본 결과 CP를 단독으로 투여한 경우에 비교하여 특별한 차이를 나타내지 않았다(Fig. 5).

본 연구의 결과에서 MTB 전처치는 CP에 의한 국소뇌혈류량 변화 및 평균동맥혈압에 특별한 영향을 미치지 않았다(Fig. 6, 7). 이러한 결과는 CP의 혈관 확장 기전이 guanylate cyclase 경로와는 특별한 관련성이 없다는 것으로 해석된다.

이상의 결과들을 종합하여 보면, CP는 정상 동물의 뇌혈류를 증가시켜 주며, 혈관 확장에 관여하는 여러 가지 인자 중에서 내피세포기원 확장인자(EDRF)와는 특별한 관계가 없는 것으로 생각되며, cyclooxygenase 관련 기전이 관여한다고 할 수 있다.

위의 결과들에서 본 저자는 心積丸(CP)이 산화적 스트레스로 인한 각종 세포 손상으로부터 보호해 줄 수 있는 가능성과 아울러 중풍 질환에도 응용될 수 있는 가능성을 발견할 수 있었다. 추후 각종 뇌혈관 질환에 CP의 적용 가능성을 타진 할 수 있는 후속 연구가 계속 되어야 한다고 생각한다.

결 론

心積丸 (CP)의 산화적 스트레스로부터 뇌세포 작용, 허혈성 뇌질환의 증상 개선을 위한 국소뇌혈류량

개선, 그와 관련된 기전 탐구를 위하여 시험관 내에서 신경교세포주에서 증식을 및 산화적 스트레스로부터의 보호능을 관찰하고, 실제 흰쥐에서 국소뇌혈류량 및 평균 동맥혈압, 혈관 확장과 관련된 두 가지 기전에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. CP의 처리는 신경교세포주의 증식률을 농도의존적으로 증가시켰다.
2. CP의 처리는 과산화수소에 의해 발생하는 산화적 스트레스로부터 신경교세포주의 사멸을 효율적으로 방지하였다.
3. CP의 투여는 국소뇌혈류량을 유의한 수준으로 증가시켰고, 평균동맥혈압에는 특별한 영향을 미치지 않았다.
4. Cyclooxygenase 경로의 차단제인 인도메타신을 전처치하였을때, CP에 의한 국소뇌혈류량 상승은 효과적으로 억제 되었고, 평균동맥혈압은 특별한 영향을 받지 않았다.
5. Guanylate cyclase 경로의 차단제인 메틸렌블루 전처치는 국소뇌혈류량 및 평균동맥혈압 모두에 특별한 영향을 미치지 않았다.

감사의 글

이 논문은 2005년도 동의대학교 교내 연구비 지원에 의해 연구되었음(과제번호 : 2005AA108)

참고문헌

1. 박종광, 최학주, 김동희. 가미제습순기탕(加味除濕順氣湯)이 고지혈증을 유발시킨 고혈압 백서에서의 혈액학적 변화에 미치는 영향. 한의학논문집. 2006 ; 15(1) : 19-31.
2. 나영설, 윤상협, 민병일. 최근 뇌졸중에 대한 역학적 고찰. 서울. 경희의학. 1991 ; 7 : 280-6.
3. 김영석. 임상중풍학. 서울 : 서원당. 1997 : 303-8.
4. 전국한외과대학 심계내과학교실. 심계내과학. 서울 : 군자출판사. 2006 : 331-42.
5. 이광우. 신경과학. 서울 : 범문사. 2005 : 198.
6. Horie Y, Han JY, Mori S, Konishi M, Kajihara M, Kaneko T, Yamagishi Y, Kato S, Ishii H and Hibi T. Herbal cardiotoxic pills prevent gut ischemia/reperfusion-induced hepatic microvascular dysfunction in rats fed ethanol chronically. *World J Gastroenterol.* 2005 ; 11(4) : 511-5.
7. Wang Q, Pelligrino DA, Paulson OB and Lassen NA. Comparison of the effects of NG-nitro-L-arginine and indomethacin on the hypercapnic cerebral blood flow increase in rats. *Brain Res.* 1994 ; 641(2) : 257-64.
8. Zhang L, Zheng J, Li HM, Meng YX. Inhibitory effects of cardiotoxic pills on platelet function in dogs fed a high-fat diet. *Blood Coagul Fibrinolysis.* 2006 ; 17(4) : 259-64.
9. 김형우, 권태우, 정선, 조수인, 김영균, 봉승진. 심적환이 고지혈증 흰쥐의 혈중 지질 변화에 미치는 영향. 대한분초학회지. 2008 ; 23(2) : 145-50.
10. 양신아, 임남경, 이인선. 단삼 메탄올 추출물의 항혈전 및 항산화 효과. 한국식품과학회지. 2007 ; 39(1) : 83-7.
11. 이종화, 이병찬, 박승택, 이정현, 이강창, 서부일, 송호준. 단삼이 활성산소로 손상된 배양 심근세포에 미치는 영향. 대한분초학회지. 2003 ; 18(3) : 21-5.
12. Jin UH, Kang SK, Suh SJ, Hong SY, Park SD, Kim DW, Chang HW, Son JK, Lee SH, Son KH and Kim CH. Inhibitory effect of *Salvia miltiorrhiza* BGE on matrix metalloproteinase-9 activity and migration of TNF- α -induced human aortic smooth muscle cells. *Vascul Pharmacol.* 2006 ; 44(5) : 345-53.
13. 박정애, 최승훈, 안규석, 문준진. 삼칠근이 어혈병태모형에 미치는 영향. 동의병리학회지. 1992 ; 7(0) : 15-26.
14. KJ Issebacher, E Braunwald, JD Wilson, JB Martin, AS Fauci, DL Kasper. *Harrison's principles of internal medicine.* 13th ed. Seoul : Jung Dam. 1997 : 2377-80.
15. Min Sik Choi, Chan Young Shin, Jae Ryun Ryu, Woo Jong Lee, Jae Hoon Cheong, Chang Rak Choi, Won Ki Kim, Kwang Ho Ko. Lead increases Nitric Oxide Production in Immunostimulated Glial Cells. *Biomolecules & Therapeutics.* 2004 ; 12(4) : 209-14.
16. Roslev P and King GM. Application of a Tetrazolium Salt with a Water-Soluble Formazan as an Indicator of Viability in Respiring

- Bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1993 ; 59(9) : 2891-6.
17. O'Toole EA, Goel M and Woodley DT. Hydrogen peroxide inhibits human keratinocyte migration. *Dermatol Surg.* 1996 ; 22(6) : 525-9.
 18. Chen ST, Hsu CY, Hogan EL, Maricque H and Balentine, JD. A model of focal ischemic stroke in the rat : reproducible extension cortical infarction. *Stroke.* 1986 ; 17 : 738-43.
 19. 김경환. 이우주의 약리학 강의(제4판). 서울 : 의학문화사. 1998 ; 82, 120-4, 146, 355, 397, 404, 432-42.
 20. Korea National Statistical Office. *Statistics of Death cause.* Seoul. 2004.
 21. 구본홍. 뇌졸중(중풍)의 동서의학적 치료에 대한 임상적 연구. 경희대학교 대학원. 1985 ; 1-2, 30-5.
 22. 강명석, 전찬용, 박종형. 뇌졸중환자 161례에 대한 임상적 고찰. 대한한의학회지. 1995 ; 16(2) : 17-35.
 23. Wieloch T and Siesjo BK. Ischemic brain injury; the importance of calcium, lipolytic activities and free fatty acids. Paris : *Pathol Biol.* 1982 ; 30 : 269-77.
 24. 대한신경외과학회. *신경외과학.* 서울 : 중앙문화사. 1997 ; 276-9, 284-5, 299.
 25. Norenberg MD. *Immunology of the nervous system.* New York : Oxford University press. 1997 ; 173-99.
 26. Perry VH and Gordon S. *Immunology of the nervous system.* New York : Oxford University press. 1997 ; 155-72.
 27. 성정훈, 최동희, 김동훈, 전보권, 최상현. 고려인삼에 의한 신경면역 및 염증반응 조절: 백삼사포닌에 의한 교세포에서의 TNF- α , IL-1 β 및 NO 생성 증가. *고려인삼학회지.* 2004 ; 28(2) : 120-6.
 28. 김인애, 진은정, 조은정, 손시환, 이철영. C6 Rat Glioma Cell에서 리튬에 의한 성장 억제와 Insulin-like Growth Factor System Components의 발현과의 관계. *한국동물자원과학회지.* 2004 ; 46(4) : 563-70.
 29. 장인수, 고창남, 이 인, 박정미, 김세현, 김상우. 심적환R이 흉통 흉민에 대하여 미치는 영향에 대한 다기관 무작위배정 이중맹검 임상연구. *大韓韓醫學會誌.* 2005 ; 26(2) : 95-104.
 30. 전국한의과대학 본초학교수 공저. *본초학.* 서울 : 영림사. 2004 ; 461.
 31. Kyoung Ja Jeon, Jae Kyoung Kim, Sang Hee Kim, Sang Hak Jeon. Regulation of Drosophila Glial Cell Formation by spi/Egfr signaling. *한국유전학회지.* 2004 ; 26(1) : 91-7.
 32. 임인수. 노화와 운동 효과에 대한 항산화, 내분비, 면역학적 접근. *운동과학.* 2002 ; 11(1) : 35-51.
 33. Harris RJ, Symon L, Branston NM and Bayhan M. Changes in extracellular calcium activity in cerebral ischemia. *J. Cereb Blood Flow Metab.* 1981 ; 1 : 203-9.
 34. 김우겸. *인체의 생리.* 서울 : 서울대학교 출판부. 1985 ; 30-47, 107-18.
 35. Iwamoto J, Yoshinaga M, Yang SP, Krasney E. and Krasney J. Methylene blue inhibits hypoxic cerebral vasodilation in awake sheep. *J Appl Physiol.* 1992 ; 73(6) : 2226-32.
 36. Okura Y, Takeda K, Honda S, Hanawa H, Watanabe H, Kodama M, Izumi T, Aizawa Y, Seki S and Abo T. Recombinant murine interleukin-12 facilitates induction of cardiac myosin-specific type 1 helper T cells in rats. *Circ Res.* 1998 ; 82(10) : 1035-42.