

血府逐瘀湯이 大動脈 平滑筋 細胞에서 NO 生成에 미치는 影響

한중민¹⁾, 고창보^{1,2)}, 박창민^{1,2)}, 정명수¹⁾, 박래길^{1,2)}, 이기남¹⁾
원광대학교 한의학 전문대학원¹⁾, 의과대학 미생물학교실²⁾

Effects of *Hyeolbuchukeo-tang* (*Xiefuzhuyutang*) on NO Production in Aortic Vascular Smooth Muscle Cells

Jong-Min Han¹⁾, Chang-Bo Ko^{1,2)}, Chang-Min Park^{1,2)}, Myong-Soo Chung¹⁾,
Rae-Kil Park^{1,2)}, Ki-Nam Lee¹⁾

Professional Graduate School of Oriental Medicine¹⁾ and Department of Microbiology,
School of Medicine²⁾, Wonkwang University

Objective : This study was designed to investigate the effect of *Hyeolbuchukeo-tang* (HCT) on NO production and the molecular mechanism of NO production modulated by HCT in the primary VSMC (vascular smooth muscle cells).

Method : Primary VSMC was established from aorta and cultured VSMC used in this study. NO production of VSMC was assayed by Griess reagent and the expression of iNOS gene was assayed by Western, RT-PCR.

Result : TNF- γ induced NO production, but IFN- γ or HCT alone did not induce NO production in cultured VSMC. However, IFN- γ or HCT potentiated NO production in TNF- γ -treated VSMC in a time- and dose-dependent manner. TNF- γ induced the iNOS gene expression corresponding to NO production in TNF- γ -treated VSMC. HCT potentiated NO production in TNF- γ -treated VSMC by about 20%, but HCT did not increase the level of iNOS mRNA in TNF- γ -treated VSMC. HCT slightly increased the level of iNOS protein in TNF- γ -treated VSMC. Calcium ionophore A23187 decreased NO production in TNF- γ -treated VSMC, but HCT attenuated the effect of A23187.

Conclusion : As NO is deeply involved in the development of arteriosclerosis and dilation of blood vessels, drugs or chemicals modulating NO production in VSMC could be used for preventing and treating arteriosclerosis. Considering the effect of HCT on the modulation of NO production in VSMC, HCT has a potential capacity for preventing and treating diseases of the circulation system including arteriosclerosis. (*J Korean Oriental Med* 2002;23(2):19-27)

Key Words: *Hyeolbuchukeo-tang* (HCT), Nitric Oxide, TNF- α , iNOS

서론

- 접수 : 2001년 11월 6일 · 채택 : 2002년 3월 12일
- 교신저자 : 이기남, 우편번호: 570-749 전북 익산시 신용동
원광대학교 한의과대학 예방의학교실
(Tel. 063-850-6836, Fax: 063-852-5594, E-mail: kinam1@wonkwang.ac.kr)
- 본 논문은 BK21 한의학 전문 대학원(2001)에서 지원하는 연구비에 의하여 지원되었음

血府逐瘀湯은 清代 王¹⁾의《醫林改錯》에 처음으로 수록된 이래로, 氣滯血瘀·瘀血內阻를 원인으로 하는 心腦血管 疾患, 婦人科 疾患, 消化器 疾患, 腫瘍, 各種 出血性 疾患 등을 치료하는데 사용되어 왔다^{2,3)}.

瘀血은 각종 원인에 의하여 체내에 발생된 일종의

病理的 産物로 혈액순환장애로 인한 각종 症候를 나타내며^{9,13}, 특히 虛血性 心臟疾患이나 中風 등의 病因인 동맥경화증의 유발요인의 하나로 작용하고 있다^{2,15-17}).

동맥경화증은 동맥벽의 비후, 경화 등이 발생하는 국한성의 병변을 총칭하는 것으로 이중 죽상동맥경화증은 주로 冠狀動脈 및 腦動脈, 腎動脈 등에 발생하여 虛血性 心臟疾患이나 虛血性 腦疾患의 중요한 원인이 되고 있다^{17,18}).

血府逐瘀湯에 관한 실험연구로는, 金¹⁹은 thioacetamide에 의한 白鼠 肝損傷에, 崔²⁰는 血栓症과 皮下血腫에, 李²¹는 癌轉移 抑制에, 吳²²는 白鼠 子宮內膜症에, 白²³은 實驗的 高脂血症에 미치는 영향 등이 보고되고 있으나 血府逐瘀湯이 대동맥 평활근 세포에 NO 생성에 미치는 영향에 대한 연구는 아직 보고되지 않았다.

Nitric oxide(NO)는 확산되고 작으며 비교적 불안정하고 잠정적으로 유해한 자유 라디칼 로서 척추동물 세포의 생리활성물질이다. NO는 세포질 내의 NO 합성효소(NOS)에 의하여 생성되어 면역기능과 혈관 확장 등의 심혈관계를 조절하는 2차 정보물질로도 작용하며, 뇌와 말초신경계의 신경전달물질로도 작용하고 있다.

Nitroglycerin과 기타 유기 nitrate가 협심증 등의 심혈관계 치료제로 사용되어왔는데 치료기전이 이들의 대사산물인 NO가 혈관확장에 관여하고 있음이 밝혀졌고, 혈관내피세포가 acetylcholine으로 활성화되었을 때 불안정한 endothelium-derived relaxing factor (EDRF)을 분비하여 혈관확장을 유도하는 것으로 밝혀졌는데 이 물질 또한 유리 라디칼 NO임이 밝혀졌다²⁴. 따라서 최근에는 동맥경화를 포함하는 심혈관계 및 순환계 질환에 NO를 생성하는 치료제의 개발과 NOS 유전자를 이용한 유전자 치료에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다^{24,27}).

이에 저자는 瘀血을 치료하는 血府逐瘀湯이 대동맥 평활근 세포에서 NO 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 흰쥐의 대동맥 평활근 세포를 분리·배양하고, cytokine(TNF- α)으로 활성화시켜 NO 생성을

유도한 후, 血府逐瘀湯을 처리하여 NO 농도 측정, iNOS mRNA 및 iNOS 효소 합성을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

실험 재료 및 방법

1. 材料

1) 實驗 動物

대동맥 평활근 세포를 분리 배양하기 위하여 성체 레드 (Sprague-Dawley)를 한국화학연구소로부터 분양 받아 사용하였다.

2) 藥材

본 실험에 사용한 血府逐瘀湯의 處方은 王²⁸의《醫林改錯》에 의거하였고, 藥材는 圓光大學校 益山韓方病院에서 구입한 후 精選하여 사용하였으며, 1貼의 內容과 分量은 다음과 같다.

3) 試藥 및 機器

세포배양에 사용한 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배양액, 우태아 혈청(Fetal bovine serum:FBS), 항생제와 항균제 등과 역전사 효소중합반응(RT-PCR)에 사용한 MMLV reverse transcriptase, RNase inhibitor 등은 Gibco BRL사에서 구입하였고, cytokines(IFN- γ , TNF- α)는 R&D 회사로부터 구입하였다. iNOS에 대한 항체 등 Western blot analysis에 사용되는 시약은 Santa Cluz사에서 구입하였다.

<Prescription of Hyeolbuchukeo-tang>

韓藥名	生藥名	重量(g)
當歸	<i>Angelicae gigantis Radix</i>	11.25
生地黃	<i>Rehmanniae Radix</i>	11.25
桃仁	<i>Persicae Semen</i>	15
紅花	<i>Carthami Flos</i>	11.25
枳殼	<i>Ponciri Eructus</i>	7.5
赤芍藥	<i>Paeoniae Radicis rubra</i>	7.5
元柴胡	<i>Bupleuri Radix</i>	3.75
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	3.75
川芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	3.75
桔梗	<i>Platycodi Radix</i>	5.625
牛膝	<i>Achyranthis Radix</i>	11.25
Total amount		211.875

Oligonucleotide는 Genotech사에 주문 제작하여 사용하였고, PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate), PDTC (Pyrrolidine dithiocarbamate), cycloheximid, actinomycin 등과 기타 실험에 사용된 시약은 Sigma사에서 구입하여 사용하였다.

2. 方法

1) 試料調製

한약제 10g당 6배의 증류수 (60ml)을 넣고, 70℃에서 24시간 중탕을 하였다. 중탕한 약제를 거름종이 (Wattman paper)에 여과시키고 여과되지 않은 약제에 다시 6배의 증류수를 첨가한 후 70℃에서 24시간 중탕과 여과 과정을 2회 더 반복하였다. 각각의 단계에서 여과된 중탕용액을 모으고 이것을 70℃에서 완전히 건조시켰다. 건조된 추출물을 DMSO (Dimethyl sulfoxide)에 녹여서 65mg/ml의 농도로 만들어 사용하였다.

2) 대동맥 평활근 세포의 배양

대동맥 평활근 세포의 배양은 Shichiri등³⁰⁾의 방법에 따라 수행하였다. 간단히 기술하면 흰쥐 대동맥을 적출한 후, 혈관 내피세포를 제거하고 분리한 혈관세포를 10% 우태아 혈청이 함유된 DMEM 배양액으로 37℃ 배양기에서 배양하였다. 3~5일 간격으로 배양액을 갈아주면서 배양한 후, 6~15회 계대배양된 세포를 본 실험에 사용하였다.

3) Nitrite의 측정

배양액에 측정된 NO의 농도는 Griess 法³¹⁾에 따라 분광 광도계로 흡광도를 측정하였다. 간단히 기술하면, 시료를 동량의 Griess 시약 (1% sulfanilamide, 0.1% naphthyl-ethylendiamine dihydrochloride, +2.5% H₃PO₄)과 상온에서 5분 반응시킨 후, 분광광도계로 A560에서 흡광도를 측정하였다. NO의 농도는 sodium nitrite의 농도를 기준으로 작성한 표준곡선으로 환산하여 계산하였으며 각 실험에서 기본 대조군은 세포 배양액을 사용하였다.

4) Western blot analysis

세포를 extraction buffer(EB용액: 1% Triton X-100, 10mM phenyl-methylsulfonyl fluoride, 1% aprotinin, 5mM EDTA, 50mM NaF, 0.01% 2-mercaptoethanol, 5mM phenylarsine oxide, 그리고 100μM sodium orthovanadate)와 함께 4℃에서 30분 반응시켜서 세포파쇄액을 만든다. 세포파쇄액의 단백질을 정량한 후, 직접적인 Western blot analysis나 면역침전에 이용하였다. 면역침전은 세포파쇄액을 일차항체(primary antibodies, 1μg/107세포)와 4℃에서 1시간 반응시킨 후, 10% Pansorbin용액 (fixed staphylococcus aureus) 100μl을 부가하고 4℃에서 반응시켰다. 형성된 항원-항체 및 Pansorbin 복합체는 EB 용액으로 3,000 rpm에서 5분씩 3회 원심세척 후, lamine 용액이 포함된 25μl로 현탁하여 98℃에서 5분 중탕한다. 면역침전물은 7.5~15% sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE) 전기영동으로 단백질을 분리한 다음, Semi-dry electrotransfer system (1 mA/cm²)을 통하여 nitrocellulose membrane에 이동시켰다. Membrane은 5% skin milk로 blocking시킨 후에 TBS-T용액으로 3회 세척하여 일차항체와 상온에서 2시간 이상 반응시킨 후 30분 세척하였다. 일차항체와 반응시킨 membrane을 다시 이차항체(secondary antibody)와 1시간 이상 반응시킨 후, Enhanced chemiluminescence (ECL) 방법으로 발색시키고 X-ray film에 감광하여 분석하였다.

5) Total RNA의 분리

배양 세포로부터 total RNA의 분리는 RNAzol B (Tel-Test, USA)로 제조회사가 제공하는 방법에 따라 수행하였다. 100mm culture dish에서 배양된 3~5×10⁶ 세포를 PBS로 세척한 후 1.5ml tube에 옮기고 3,000 rpm에서 5분 원심분리하여 수거하였다. 상층액을 제거한 세포 침전물은 600 μl RNAzol B로 용해시킨 후 60 μl chloroform을 첨가하여 얼음속에서 5분 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 13,000 rpm, 4℃에서 20분 원심분리하여 상층액을 새로운 tube에 옮긴다. 위 상층액에 동량의 isopropanol을 첨가하여 섞어준 후

얼음에서 30분 반응시킨다. 반응이 끝난 후, 13,000 rpm, 4℃에서 20분 원심분리하고, 침전물을 80% EtOH로 세척하였다. 세척된 RNA를 건조시킨 후 DEPC가 처리된 증류수 20μl로 녹이고 분광광도계에서 흡광도를 측정하여 정량하였다.

6) 역전사 효소중합반응 (RT-PCR)

역전사 반응(reverse transcription reaction)은 3~5 μg total RNA와 reverse transcriptase(MMLV; GIBCO, BRL)를 이용하여 제조회사에서 제공하는 방법에 따라서 수행하였다. Total RNA를 70℃에서 10분 변성시킨 후, 얼음 속에서 급냉시켜서 사용하였다. 역전사 반응은 total RNA(3~5μg), oligo d(T)12-18 (1μg), 2ul dNTP (10mM), MMLV reverse transcriptase (200U), DTT (10mM), RNasin (1μl; Promega, USA)이 20μl 완충용액 (50mM Tris-Cl pH 8.3, 75mM KCl, 3mM MgCl2)에 함유된 반응액으로 42℃에서 60분 반응하여 수행하였다.

역전사 반응액의 2μl가 함유된 30μl의 반응액으로 효소중합반응(Polymerase Chain Reaction; PCR)을 수행하였다. 약술하면, 2μl reverse transcription 반응액, 2μl dNTP (2.5mM), 3μl primer (5μM), Taq DNA polymerase (0.6U; TAKARA)가 함유된 30μl 반응액 (20mM Tris-Cl pH8.0, 100mM KCl, 0.1mM EDTA, 1mM DTT)을 94℃에서 5분 predenaturation 시킨 후, denaturation (94℃, 45초), annealing(58℃, 45초), elongation(72℃, 60초)의 조건에서 33 cycles을 수행하였다. 이 때 사용한 iNOS 유전자에 대한 sense primer인 5'-CCCTTCCGAAGTTTCTGGCA

GCAGCGC-3' 와 antisense primer인 5'-ACCGAAGATATCTTCATGATAACG-3' 을 사용하였고, β-actin에 대한 sense primer로 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3' 와 antisense primer로 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3' 으로 합성하여 사용하였다. PCR 증폭후, PCR 산물을 1.5% agarose gel에 전개하여 확인하였다.

7) 통계학적 분석

결과의 통계학적 분석은 Student's t-test의 방법으로, P<0.05 이하를 유의성 있는 결과로 분석하였다.

실험 성적

1. 血府逐瘀湯이 대동맥 평활근 세포의 NO 생성과 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향

1) 血府逐瘀湯이 TNF-α로 활성화된 평활근 세포의 NO 생성에 미치는 영향

TNF-α로 24, 36, 48시간 활성화시킨 세포에서는 각각 2.3±0.1, 5.5±0.1, 7.4±0.3 μM 의 NO가 생성되었고 血府逐瘀湯과 TNF-α를 처리한 실험군에서는 血府逐瘀湯이 TNF-α에 의해 생성된 NO의 양을 각각 2.3±0.1, 5.5±0.1, 7.4±0.3 μM에서 5.8±0.2, 8.7±0.1, 11.5±0.3 μM로 유의성 있게 증가시킴을 알 수 있다(Fig. 1). 또한 血府逐瘀湯을 130 및 260μg/ml 농도별로 처리하였을 때 농도에 따라 血府逐瘀湯이 TNF-α로 활성화된 평활근 세포의NO의 양을 증가시키는 것을 알 수 있었다(Table 1). 따라서 이 약제가 시간 및 농도 의존적으로 NO의 생성을 증가시키는

Table 1. *Hyeolbuchukeo-tang* (HCT) Increased the Generation of NO from VSMC Induced by TNF-α in a Dose Dependent Manner.

TNF-α(25ng/ml)	HCT(μg/ml)	Nitrite(μM)
-	0	0
+	0	2.3±0.12
+	130	5.8±0.2*
+	260	7.3±0.16*

Cells (1 105) were pretreated with HCT (130, 260μg/ml) for 1 hr and followed by stimulation with TNF-α (25ng/ml) plus TNF-α for 24 hr. Nitrite concentration was measured by using Griess reagent. Results represented as the meanSD of three independent experiments.

*P<0.05 by student t-test, compared to the only TNF-α treated group.

효과가 있음을 확인하였다. 血府逐瘀湯을 단독 처리한 실험군에서는 NO의 생성이 유도되지 않았으며, 血府逐瘀湯과 IFN- γ 를 처리한 실험군에서 NO는 $0.2 \pm 0.1 \mu\text{M}$ 로 유의한 생성의 변화는 없었으며, IFN- γ 와 TNF- α 를 같이 처리한 실험군에서는 $7.8 \pm 0.1 \mu\text{M}$ 로 TNF- α 로 활성화된 평활근 세포의 NO 생성을 증가시켰다(Table 2).

2) 血府逐瘀湯이 TNF- α 로 활성화된 평활근 세포의 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향

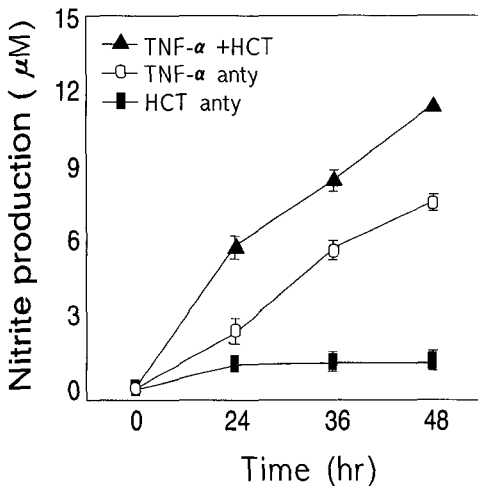


Fig. 1 *Hyeolbuchukeo-tang* (HCT) increased NO production induced by TNF- α in VSMC. Cells (1 105) were seeded in 24-well plate for 20 hr and pretreated with *Hyeolbuchukeo-tang* (130 $\mu\text{g/ml}$) for 1 hr and followed by stimulation with TNF- α (25ng/ml) for 24 hr. Nitrite concentration was measured by using Griess reagent. Results represented as the mean \pm SD of three independent experiments.

血府逐瘀湯이 NO의 생성을 촉진하는 iNOS 유전자의 발현을 어떻게 조절하고 있는가를 알아보기 위하여 血府逐瘀湯을 1시간 전 처리한 후, TNF- α 로 평활근 세포를 12시간 활성화시키고, NO의 합성을 유도하는 iNOS의 mRNA량을 역전사 효소중합반응으로 증폭하였으며 (Fig. 2), 또한 iNOS 단백질의 발현을 Western blot analysis로 조사하였다(Fig. 3). 위 실험결과 血府逐瘀湯은 TNF- α 로 활성화된 대동맥 평활근 세포에서 iNOS mRNA의 합성에는 영향을 주

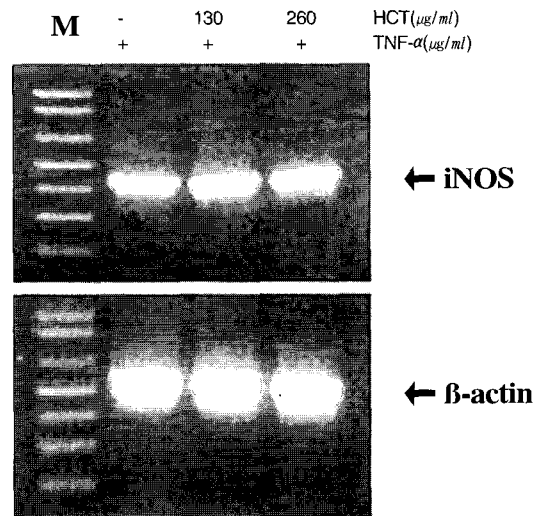


Fig. 2 *Hyeolbuchukeo-tang* (HCT) did not affect the accumulation of iNOS mRNA of VSMC. Cells were pretreated with *Hyeolbuchukeo-tang* (130, 260 $\mu\text{g/ml}$) for 1 hr and then followed by the addition of TNF- α (25 ng/ml) for 9 hr. RT-PCR was performed with 2 μg of total RNA, and the same amount of loaded RNA was confirmed by β -actin expression. Marker: 1kb plus DNA ladder

Table 2. *Hyeolbuchukeo-tang* (HCT) Increased NO Production Induced by Cytokines in VSMC.

TNF- α (25ng/ml)	IFN- γ (25ng/ml)	HCT	Nitrite(μM)
-	-	-	0
-	+	-	0.2 ± 0.01
-	+	+	0.22 ± 0.01
+	+	-	7.8 ± 0.1
+	+	+	$9.7 \pm 0.2^*$

Cells (1 105) were pretreated with HCT (130 $\mu\text{g/ml}$) for 1 hr and followed by stimulation with TNF- α (25ng/ml), IFN- γ (25ng/ml) or IFN- γ plus TNF- α for 24hours. Nitrite concentration was measured by using Griess reagent. Results represented as the mean \pm SD of three independent experiments.

*P<0.05 by student' t-test, compared to the IFN- γ plus TNF- α treated group

지 않았다(Fig. 2). 그러나, 세포내의 iNOS 효소의 양은 血府逐瘀湯의 처리 농도에 의존적으로 증가하였다(Fig. 3). 이상의 결과는 血府逐瘀湯이 iNOS 효소의 양을 증가시킴으로서 대동맥 평활근 세포서 NO 생

성을 증가시켰음을 시사하였다.

2. 血府逐瘀湯이 A23187에 의한 평활근세포의 NO 생성과 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향

세포내 유도성 유전자 발현 (inducible gene expression)은 세포내 증가된 calcium 농도가 2차 신호전달분자로 작용하여 유전자의 발현을 조절하게 된다. 본 실험에서는 TNF- α 로 자극한 대동맥 평활근 세포에서 세포내 증가된 calcium 이온이 NO 생성 및 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 세포질내 calcium 농도 증가제인 A23187을 처리한 후 NO 생성을 관찰하였다. A23187을 0.5 μ M 농도를 1시간 전처리한 후 TNF- α 를 36시간 처리한 실험군에서는 NO 생성이 5.5 \pm 0.2 μ M에서 3.2 \pm 0.1 μ M로 감소되는 결과를 확인하였다(Fig. 4). 血府逐瘀湯이 A23187에 의한 NO 감소에 어떠한 영향을 미치는 지 알아보기 위하여 A23187 단독 혹은 血府逐瘀湯 병용으로 1시간 전처리 한 후 TNF- α 로 12시간 활성화시킨 후 NO의 생성량을 비교한 결과 A23187은 TNF- α 에 의하여 활성화된 대동맥 평활근 세포에서 분비하는 NO의 양을 감소시켰으나, 血府逐瘀湯을 동시에 처리한 경우 A23187 단독 전처리군보다 NO 생성이 증가되었다. 따라서 血府逐瘀湯은 A23187에 의해 감소된 NO의 생성을 증가시키는 효능이 있음을 나타내었다(Fig. 4).

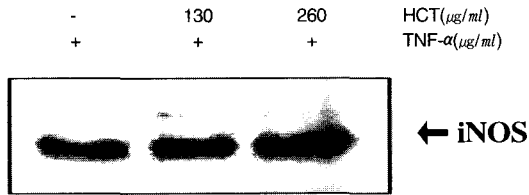


Fig. 3 *Hyeolbuchukeo-tang* (HCT) increased the expression of iNOS protein by TNF- α . Cells were pretreated with *Hyeolbuchukeo-tang* (130, 260 μ g/ml) for 1 hr and then followed by the addition of TNF- α (25 ng/ml) for 12 hr. Cell lysate was separated on 10% SDS-PAGE and then, subjected to Western blot analysis with anti-iNOS antibody.

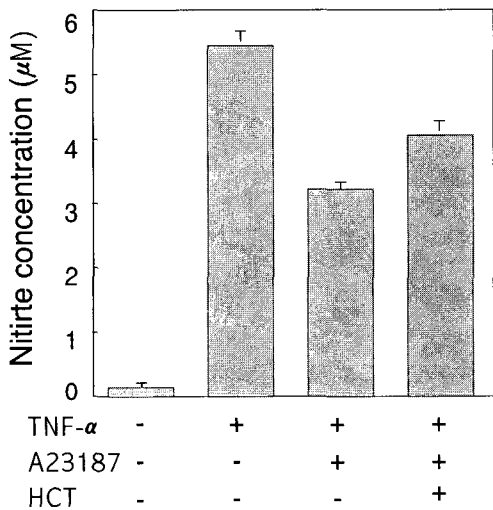


Fig. 4 Effect of *Hyeolbuchukeo-tang* (HCT) on the A23187-induced production of NO by TNF- α in VSMC. Cells were pretreated with 0.5 μ g/ml A23187 or 0.5 μ g/ml A23187 plus 260 μ g/ml *Hyeolbuchukeo-tang* (HCT) for 1 hr before treatment with TNF- α (25 ng/ml) for 36 hr. Nitrite concentration was measured by using Griess reagent. Results represented as the meanSD of three independent experiments. *P<0.05 compared to the only A23187 treated group.

고찰

瘀血은 각종 원인에 의하여 체내에 발생된 일종의 病理的 產物로 단순히 血毒으로서의 非生理的 血液만을 의미하는 것이 아니라 血滯라는 循環障礙의 病理的 상태를 기반으로 나타나는 어떤 특수한 症候群까지도 포함하며^{9,13)} 특히 허혈성 심장질환이나 中風 등의 주된 病因인 동맥경화증의 유발요인의 하나로 작용하고 있으며^{2,14,16)}, 이에 대한 治法으로는 活血祛瘀法이 제시되고 있다.

血府逐瘀湯은 清代 王¹⁾의《醫林改錯》에 처음으로

수록된 以來로, 氣滯血瘀·瘀血內阻로 인한 胸脇疼痛, 頑固性頭痛, 內熱煩悶, 失眠多夢, 心悸怔忡 등에 사용할 목적으로 立方되었으며, 근래에는 心·腦血管疾患, 婦人科 疾患, 消化器 疾患, 腫瘍, 各種 出血性疾患 등에 行氣·活血祛瘀를 목적으로 활용되고 있는 處方이다^{2,8)}.

血府逐瘀湯은 活血化瘀하는 桃仁 紅花 川芎 赤芍 藥 牛膝, 養血活血하는 生地黃 當歸, 疏肝理氣하는 柴胡 枳殼, 宣肺祛痰하는 桔梗, 諸藥을 調和시키는 甘草로^{4,7)} 구성되어 活血祛瘀·行氣하는 效能이 있어서 氣滯血瘀·瘀血內阻로 질환에 응용되고 있다.

活血祛瘀 效能이 있는 處方이나 單味에 대한 연구에서 血栓症²³⁾이나 高粘度血症²³⁾, 高脂血症²³⁾에 관한 실험 연구가 매우 활발하게 보고되고 있고 瘀血이 동맥경화의 주된 인자로 제시되고 있으므로 活血化瘀의 效能으로 諸疾患에 응용되고 있는 血府逐瘀湯이 경화된 혈관에 대하여 혈관 확장 작용을 하는 NO 생성에 미치는 영향을 알아보려 하였다.

Nitric oxide (NO)는 비교적 불안정하고, 잠정적으로 유해한 자유 라디칼로서 면역기능과 혈관확장을 조절하는 2차 정보물질로도 작용하며, 뇌와 말초신경계의 신경전달물질로도 작용하고 있는 생리활성물질이다. 이러한 정상적인 기능 외에도 NO는 고혈압, 퇴행성 뇌질환, 뇌졸중, 폐혈성 속과 같은 병리학적인 면과도 관계가 있다.

NO가 척추동물에서 생성된다는 것이 Green 등에 의하여 최초로 보고되었고, 세균내독소(lipopolysaccharide; LPS)로 활성화시킨 대식세포에서 nitrate와 nitrite의 형태로 과량 합성됨이 보고되었다. 대식세포가 종양세포와 곰팡이를 죽이는 능력은 외부 arginine 에 의존적이고, 이 arginine으로부터 NO가 대식세포 기능의 중요한 조절인자임이 밝혀졌다.

평활근세포를 Cytokine인 IFN- γ 과 TNF- α 로 활성화시키고 NO의 생성량을 측정할 결과 평활근세포에서 NO의 생성은 주로 TNF- α 에 의하여 조절되는 신호전달 경로에 의하여 매개됨을 알 수 있었다(Fig 1, Table 2). 최근에 LPS나 TNF- α 의 자극에 의해서 NO의 생성이 증가하고 iNOS의 발현이 유도되며,³⁴⁾ 또한

IFN- γ 의 자극에 의해서도 NO의 생성이 증가된다는 보고가 있다.³⁵⁾ 본 연구에서는 TNF- α 의 농도에 비례하여 NO의 생성이 IFN- γ 에 의하여 유도되는 양보다 많고, 농도 의존적으로 NO를 생성하는 것으로 나타났다.

TNF- α 는 생리활성이 있는 cytokine의 한 종류로서, 정상조직 세포에서는 신호를 전달하는 정보물질로서의 기능 및 표적세포의 생리활성을 조절하는 기능이 있다. 또한 생물체가 항상성을 유지하기 위하여 불필요하거나 잠정적으로 유해한 세포를 제거하는데 신호전달물질로도 작용을 하고 있다.

따라서 NO와 TNF- α 는 생체에서 생리활성의 조절과 세포고사에 관여하는 상반된 두 가지 기능을 수행하게 된다. 이러한 기능이 동맥세포의 생리적 활성을 유지하거나, 불필요한 세포의 제거에도 관여한다.

동맥경화증의 초기 상태에는 대식세포를 비롯한 면역계의 면역반응에 관여하는 세포들이 동맥경화가 발생하는 부위에 군집하여 각각의 세포에서 cytokine을 포함한 여러 가지 생리활성 물질을 과량으로 분비한다. 이와 같이 분비된 cytokine에 의하여 생성된 NO는 평활근 세포를 자극하여 혈관확장 등의 작용을 일으켜 동맥경화의 병인을 제거하는데 관여하게 될 것으로 추정된다. 따라서 생체내에는 iNOS를 비롯한 여러 가지 유전자 발현의 조절이 엄격하고 세밀하게 이루어지고 있으며, 이들 유전자의 발현이 제어되지 못하면 세포고사를 비롯한 병리적 현상을 유발하게 된다.

血府逐瘀湯은 대동맥 평활근 세포에서 TNF- α 와 IFN- γ 혹은 TNF- α 에 의하여 조절되는 NO의 생성을 상향 조절하는 효능이 있는 것으로 나타났으며 (Fig. 1, Table 2), 이러한 효능은 iNOS 유전자의 전사활성에 관여하는 mRNA의 축적을 증가시키는 작용보다는 세포질 내의 iNOS 효소의 양을 증가시켜서 유발되는 것으로 나타났다(Fig. 2,3).

외부 자극에 의하여 활성화된 세포는 세포 내에 Ca²⁺ 농도가 증가하는데, 세포 내 증가된 Ca²⁺는 유전자 발현의 2차 정보물질로서 유전자의 발현을 조절하게 된다. 세포질내 calcium 농도 증가제인 A23187

은 TNF- α 에 의해서 활성화된 평활근 세포에서 분비하는 NO의 양을 감소시켰으나, 血府逐瘀湯은 A23187에 의해 감소된 NO의 양을 유의성 있게 증가시켰다(Fig. 4).

위의 조건에서 血府逐瘀湯은 NO의 생성 및 iNOS 유전자 발현을 증가시키는 효능이 있는 것으로 나타났다. 血府逐瘀湯은 세포의 활성화에 따른 세포질 내에 증가된 Ca²⁺에 의하여 감소된 NO의 양을 증가시키는 효능을 알 수 있었다.

위의 결과를 종합하면 血府逐瘀湯은 TNF- α 로 활성화시킨 대동맥 평활근 세포에서 iNOS mRNA의 합성에는 영향을 주지 않고, mRNA의 반감기를 연장시켜 iNOS 단백질을 증가시킴으로써 NO 생성을 증가시키는 효능이 있음을 알 수 있었다.

NO는 동맥경화증과 혈관확장에 밀접하게 관련되어 있으므로 평활근 세포에서 NO의 생성을 조절할 수 있는 약이나 화학물질은 동맥경화증의 예방과 치료에 사용될 수 있을 것으로 여겨지고 있다. 따라서 최근에는 NOS 유전자를 이용하여 동맥경화증 및 순환기계의 질병을 치료하는 유전자치료에 관한 실험 모델의 제공과 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다²⁸⁾. 이러한 관점에서 평활근 세포에서 NO의 생성을 상향 조절하는 血府逐瘀湯은 동맥경화증 등 과도한 혈관수축과 관련된 심혈관계 질환의 예방 및 치료제로서의 활용이 가능할 것으로 보이며, 이에 대한 지속적인 연구가 필요하리라 사료된다.

결론

血府逐瘀湯이 대동맥 평활근 세포에서 NO 생성에 미치는 영향을 규명하기 위하여 레드 대동맥 평활근 세포를 분리·배양하고, cytokine으로 활성화된 대동맥 평활근 세포에 血府逐瘀湯을 처리한 후, NO의 생성, iNOS mRNA와 단백질 생합성 등을 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 血府逐瘀湯은 TNF- α 로 처리한 대동맥 평활근 세포의 NO 생성을 시간과 농도에 비례하여 증가시켰다.

2. 血府逐瘀湯은 TNF- α 로 처리한 군에서 iNOS mRNA의 생합성에는 유의성 있는 영향을 주지 못하였으나, iNOS mRNA의 분해를 억제하여 mRNA의 안정성을 높였다.

3. 血府逐瘀湯은 TNF- α 로 처리한 군에서 세포질내 축적된 iNOS 단백질을 증가시킴으로써 NO의 생성을 증가시켰다.

4. 血府逐瘀湯은 대동맥 평활근 세포에서 Ca²⁺에 의하여 감소된 NO 생성을 증가시켰다.

이상의 실험결과는 血府逐瘀湯이 대동맥 평활근 세포에서 NO의 생성을 유의성 있게 상향조절한 것으로, 이와 관련된 동맥경화증 등 과도한 혈관수축과 관련된 심혈관계 질환에 대한 지속적인 연구가 필요하다고 사료된다.

감사의 말씀

본 연구는 BK21 한의학 전문대학원(2001)에서 지원하는 연구비에 의해서 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 王勳臣 編著. 醫林改錯. 서울:醫聖堂. 1994:61-65.
2. 康舜洙. 韓醫學에서의 瘀血에 대한 概念. 대한한의학회지. 1984;5(1):138-140.
3. 정우열, 안규석. 韓方臨床病理學. 서울:永林社. 1988:353.
4. 尹吉榮. 東醫臨床方劑學. 서울:明寶出版社. 1992:265-266.
5. 원광대학교 한의과대학 제18기 졸업준비위원회. 譯釋中醫方劑問答. 익산:원광대학교 출판국. 1995:539-540, 602-603.
6. 康舜洙. 바른方劑學. 서울:大星文化社. 1996:258-259.
7. 尹用甲. 東醫方劑와 處方解說. 서울:醫聖堂. 1998:199.
8. 강혜영, 강순수. 活血祛瘀劑에 관한 文獻的 考察. 서울:方劑學會誌. 1991;2(1):47-58.

9. 전병훈, 우원홍, 정우열. 瘀血의 概念에 관한 東醫學的 考察. 동의병리학회지. 1989;4:93-102.
10. 鄭遇悅. 韓方病理學(各論). 전주: 三進社. 1988:52-53.
11. 金定濟. 瘀血에 對한 考察. 동양의학 1권. 1977:31-34.
12. 楊醫亞. 中醫學問答(上). 北京: 人民衛生出版社. 1985:56, 118.
13. 鄭遇悅. 瘀血의 東西醫學的 研究過程과 發展方向. 97國際瘀血심포지움論文集. 1977:1-23.
14. 李京燮. 動脈硬化症의 病因에 관한 考察. 東洋醫學. 1984;10:81-85.
15. 崔榮植. 麝香祛瘀丸이 동맥경화증에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 1996.
16. 최현, 문구, 문석재. 中風의 血瘀論의 考察 및 活血祛瘀法에 의한 治療 近況. 대한한의학회지. 1990; 11(1):145-150.
17. 大韓病理學會. 병리학. 서울: 고문사. 1995:474-476.
18. 해리슨내과학 편찬위원회. 해리슨내과학. 서울: 정담. 1997:1189-1202.
19. 金榮睦. 血府逐瘀湯이 thioacetamide에 의한 白鼠 肝 損傷에 미치는 영향. 원광대학교 대학원. 1984.
20. 崔昇勳. 血府逐瘀湯이 血栓症과 皮下血腫에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 1986.
21. 이진화, 최승훈, 안규석, 심범상. 血府逐瘀湯이 癌轉移 抑制에 미치는 영향. 대한한방중앙학회지. 1999;5(1): 61-75.
22. 吳奎錫. 血府逐瘀湯이 子宮內膜症 白鼠에 미치는 영향. 동국대학교 대학원. 1996.
23. 백광현, 김경철, 이용태. 血府逐瘀湯이 흰쥐의 實驗의 高脂血症에 미치는 影響. 동의생리학회지. 1998; 13(1):102-109.
24. Arnold WP, Mittal CK, Katsuki S and F. Murad. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1977;74:3203-3207.
25. Ignarro, L. J., T. M. Burke, K. S. Wood, M. S. Wolin, and P. J. Kadowitz. Association between cyclic GMP acculation and acetylcholine-elicited relaxation of bovine intrapulmonary artery. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1984;228:682-690.
26. Furchgott, R. F., and J. V. Zawadzki. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature. 1980; 288:373-376.
27. Garthwaite, J., S. L. Charles, and R. Chess-Williams. Endothelium-derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain. Nature. 1988;336:385-388.
28. Michael J. Mann. Gene therapy for peripheral arterial disease. Molecular Medicine Today. 2000;6:285-291.
29. Hidde, G., A. G. Herman, and K. E. Matthys. Antiarterosclerotic activity of drugs in relation to nitric oxide function. Europ. J. Pharm. 1999;375:157-176.
30. Shichiri, M., M. Yokokura, F. Marumo, and Y. Hiata. Endothelin-1 inhibits apoptosis of vascular smooth muscle cells induced by nitric oxide and serum deprivation via MAP Kinase pathway. Arterioscler Thromb. Vas. Biol. 2000;20:989-997.
31. Iyengar, R., D. J. Stuehr, and M. A. Marletta. Macrophage synthesis of nitrite, nitrate, and N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1987;84:6369-6373.
32. 최승훈, 안규석. Endotoxin으로 유발된 白鼠의 血栓症에 身痛逐瘀湯이 미치는 영향. 동의병리학회지. 1989;4:47-56.
33. 정찬길, 안규석, 문준진. 血栓症과 高粘度血症에 미치는 黃芪, 桂枝 및 紅花의 效能에 관한 實驗의 研究. 동의병리학회지. 1989;4:74-92.
34. Green, L. C., S. R. Tannenbaum, and P. Goldmann. Nitrite synthesis in the germfree and conventional rat. Science. 1981;212:56-59.
35. Stuehr, D. J., and M. A. arletta. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1982;82:7738-7742.