

豨薺의 iNOS 발현과 PKCa 억제를 통한 혈관평활근세포의 apoptosis 유도

이승렬 · 전수영 · 김종봉 · 장효일 · 김길훤 · 신흥묵*

동국대학교 한의과대학 생리학교실

Mechanisms of *Siegesbeckia Glabrescens*-induced Smooth Muscle Cell Apoptosis: Role of iNOS and PKCa

Seung Yeul Lee, Soo Young Jun, Jong Bong Kim, Hyo Oil Jang, Gil Whon Kim, Heung Mook Shin*

Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Dongguk University

We have recently demonstrated that *Siegesbeckia glabrescens*(SG), a herbal medicine, induces apoptosis via nitric oxide(NO) production in human aortic smooth muscle cells(HASMCs). However, the molecular pathways involved in SG-mediated apoptosis are not fully understand. In the present study, we investigated the cellular mechanisms of SG-induced apoptosis in HASMCs. SG induced NO production through inducible nitric oxide synthase(iNOS) induction. The apoptotic effect of SG was attenuated by L-NNA, a NOS inhibitor. In the presence of L-NNA, the degradation of procaspase-3 by SG was inhibited. SG treatment induced a decrease in Bcl-2 expression but did not affect the expression of Bax. In addition, SG treatment evoked both down-regulation of PKC α and inhibition of PKC α phosphorylation. These downregulations were reversed by addition of L-NNA. It seems likely to be a downregulation of PKCα due to long term treatment with PMA. Taken together, these results suggest that apoptotic effects of SG may be due to NO production via iNOS mRNA expression. Furthermore, Bcl-2 and PKCα downregulation, and caspase-3 activation may be involved in the mechanisms for apoptotic effects by SG.

Key words : *Siegesbeckia glabrescens* Makino(SG), Human aortic smooth muscle cell, Apoptosis, iNOS, Bcl-2, PKCa, Caspase-3

서 론

한의학에서 고혈압의 직접적인 병명은 없다. 그러나 肝陽上亢, 肝風內動, 肝腎陰虛, 心火上炎 등의 병리로 발현하는 두통, 현훈, 안구충혈, 躁急, 肢體麻木, 卒然昏倒, 口眼窩斜, 半身不遂 및 言語不利의 증상으로 인식하고 있다.

고혈압의 치료는 涼肝, 清熱, 熄風, 滋陰의 치법과 이에 상응하는 약물을 응용하는데, 豨薺(*Siegesbeckia glabrescens*; SG)의 苦辛하고 寒한 性味는 肝腎의 風濕을 제거하고 清熱解毒의 효능으로^{1,2)} 四肢麻痺, 口眼窩斜, 半身不遂의 증상^{3,4)}을 다스리며 임상에서 고혈압의 치료에 사용하여 유효한 정보를 축적하고 있다.

豨薺의 고혈 치료와 관련한 실험적 연구로는 고혈압 흰쥐에서의 혈압강하효과^{10,11)}, 수축 혈관에 대한 내피세포 의존성 이완효과^{12,13)} 및 혈관확장과 항산화의 작용¹⁴⁾이 보고된 바 있다.

한편 nitric oxide(NO)가 hypertrophy, hyperplasia 및 apoptosis의 조절에 관여하며, 혈관리모델링 과정의 중요한 조절자로서 작용함이 보고 되고^{5,6)}, 혈관평활근의 apoptosis가 평활근의 비정상적 증식을 억제함으로 고혈압성 동맥경화 및 다양한 심혈관계 질환의 원인으로 그 중요성이 부각되면서^{7,9)}, NO생성을 통한 apoptosis의 작용이 연구되어 고혈압성 동맥경화의 치료에 대한 잠재적 가능성을 시사하고 있다. 최근에 본 연구실에서는 豨薺의 NO 생성을 통한 평활근세포의 apoptosis 유도를 보고한바³⁾, 그 유도 기전을 연구하기 위해 inducible nitric oxide synthase(iNOS), procaspase-3, protein kinase C α(PKCa), Bcl-2 및 Bax 등 관련 유전자의 발현과 단백질 발현을 조사하여 유익한 결과를 보고한다.

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

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

· 접수 : 2006/08/30 · 수정 : 2006/09/15 · 채택 : 2006/10/10

재료 및 방법

1. 재료

한약 추출물의 제조로는 稀薹(九蒸) 200g을 round flask에 넣고, 증류수 1,000ml을 가하여 3시간 가열 추출한 후 추출액을 여과지로 여과하고, 이 여액을 rotary evaporator로 감압 농축하고 동결 건조하여 22.28g의 분말을 얻었다.

2. 방법

1) 세포배양

Human aortic smooth muscle cell (HASMC)을 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 10% fetal bovine serum과 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 Dulbecco's modified eagle medium(DMEM, GIBCO BRL) 배지로 배양하였다. 각 세포는 90% 정도 자랐을 때, trypsin-EDTA를 처리하여 계대 배양한 후 포집하여 사용하였다.

2) 세포 생존율 측정

세포 생존율은 XTT assay 방법을 이용하였다¹⁵⁾. 96 wells plate에 cell (5×10^3 cells/100 μ l)을 분주하고 24시간 안정화시킨 후 serum free media로 24시간 배양하였다. 검액, NG-nitro-L-arginine (L-NNA; 10^{-4} M, Sigma), PMA(10^{-7} M, Sigma)를 각각 또는 함께 처리하여 24시간 배양하였다. Well당 50 μ l의 XTT(Roche, USA)를 처리하고 시간별(4hr, 8hr, 12hr 및 24hr) 반응을 ELISA reader(Bio-tek instruments EL321e)를 이용 490nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율(%)로 표시하였다. 검액이 가지는 흡광도를 보정하기 위하여 세포를 뱀 배지를 같이 배양하여 대조군과 실험군의 흡광도를 비교·보정하여 세포 생존율을 백분율(%)로 표시하였다.

3) Nitric oxide 측정

세포 배양액에 축적된 NO의 농도는 Griess 방법¹⁶⁾에 따라 ELISA reader (Bio-tek instruments EL312e)로 흡광도를 측정하였다. 24 wells plate에 1×10^4 cells/ml을 분주하고 24시간 배양한 다음, serum free media로 다시 24시간을 배양하였다. 희럼 추출물, L-NNA(10^{-4} M, Sigma), PMA(10^{-7} M, Sigma)를 각각 또는 함께 처리하고 24시간 동안 배양 후, 각 sample로부터 배지를 E-tube에 옮겼다. 모은 배지를 96 wells plate에 50 μ l씩 분주한 후 50 μ l의 1% sulfanilamide in phosphoric acid를 첨가하였다. Shaker에서 10분간 반응시킨 후, 다시 50 μ l의 0.1% naphthyl-ethylendiamine dihydrochloride를 혼합하여 상온에서 10분간 반응시킨 후 ELISA reader로 A570에서 흡광도를 측정하였다. NO의 농도는 sodium nitrite의 농도를 기준으로 작성한 표준곡선으로 환산하여 계산하였으며, 각 실험에서 기본 대조군은 세포 배양액을 사용하였다.

4) Western blot

세포에 희럼 추출물, L-NNA(10^{-4} M, Sigma), PMA(10^{-7} M, Sigma)를 24시간 동안 각각 또는 함께 처리한 후, NP-40을 포함하는 RIPA buffer (20 μ g/ml Na₃VO₄, 10 μ g/ml leupeptin, 10 μ g/ml aprotinin, 1 μ M PMSF)로 단백질을 추출한 뒤 Lowery

method(Bio-Rad kit)를 이용하여 정량하였다¹⁷⁾. 정량 후 7.5% (PKCa, p-PKCa, ERK1/2, p-ERK1/2), 12.5% (Procaspase-3) SDS-PAGE에 의해 단백질을 분리하고, nitrocellulose membrane으로 transfer 한 후, TBS에 녹인 3% nonfat dry milk로 90분동안 반응시켰다. 그리고 dry milk에 녹인 PKCa (Upstate), p-PKCa (Upstate), ERK1/2(Santa Cruze), p-ERK1/2(Cell Signal), procaspase-3 (Alexis) antibody (1:1000)에 60분 동안 반응시켰다. TBST로 세척(10min \times 3)하고, horseradish peroxydase-conjugated secondary antibody와 ECL kit (Amersham Biosciences)로 발색시켰다. 밴드의 density는 densitometry (Gel pro 3.1)에 의하여 측정하였다.

5) RT-PCR

일정한 농도로 (1×10^5 cells/ml) 배양된 세포에 희럼 추출물, L-NNA(10^{-2} M, Sigma)를 정해진 시간 동안 각각 또는 함께 처리한 후 배양하였다. 배지를 제거한 후, 500 μ l TRI reagent (Molecular Research Center, Inc.)를 더하였다. 몇 차례의 pipetting 후, E-tube로 옮긴 다음 상온에서 5분간 반응시켰다. 100 μ l의 chloroform을 각 샘플에 더한 다음, inverting과 vortexing을 15초 정도 수행 한 후, 12,000rpm에서 15분간 4°C에서 원심분리하여 상층액을(150 μ l) 취하였다. 취해진 상층액에 250 μ l isopropanol을 더한 다음 다시 inverting과 vortexing을 한 후, 상온에서 10분동안 반응시켰다. 12,000rpm에서 8분간 4°C에서 원심분리 후, 상층액을 버린 다음 500 μ l 75% ethanol을 더한 다음 약하게 vortexing을 하였다. 7,500rpm에서 5분동안 원심분리 후, 상층액을 버린 다음 4분정도 air dry 시킨 후, 각 샘플당 10 μ l의 DEPC-treated water를 더하였다. 1.0%의 gel에 각 2.5 μ l sample에 0.5 μ l loading dye를 더하여 3 μ l를 loading하여 동일한 RNA가 획득되었는지 확인하였다. RNA로부터 cDNA를 만들기 위해 다음의 RT를 수행하였다. 샘플당 1 μ l oligo dT와 2 μ l D.W 반응물에 2 μ l의 RNA를 더한 다음 65°C에서 5분간, 8°C에서 5분간 반응시킨 후, 샘플당 0.5 μ l RT, 0.5 μ l RI, 1 μ l 10mM dNTP, 4 μ l 5 \times Reaction Buffer, 9 μ l D.W.를 더하였다. 42°C에서 1시간, 95°C에서 Heat inactivation 시킨 후, PCR 과정을 수행하였다. PCR을 수행하기 위해 다음의 primer를 제작하였다. iNOS-[forward;acatggcagcggaaattggg, reward;ttgcaggggagtgctcagtt]¹⁸⁾, PKC α -[forward;cgactgtctgtagaatctgg, reward;caccatggctcactccagtc]¹⁹⁾, Bcl-2-[forward; gacaaccgggagatagtgat, reward; actcaagaaggccaatcc]²⁰⁾, Bax- [forward;accaagaagctgagcagtgctc, reward; a c a a g a t g g t c a c g g t c t g c c]²¹⁾, GAPDH-[forward;ccatggagaaggctggg, reward;caaagttgtcatggatgacc]. 0.5 μ l의 RT product에 0.2 μ l taq, 2.5 μ l 10 \times Reaction Buffer, 1 μ l 10mM dNTP, 2 μ l primer, 18.8 μ l D.W.를 더한 다음, 다음의 조건으로 PCR를 수행하였다. (Solgent, co.)

95°C 2min, 95°C 20sec, AT [iNOS=40°C, PKC α =58°C, Bcl-2=45°C, Bax=52°C, GAPDH=59°C] 45sec, 72°C 1min, 72°C [iNOS and Bcl-2 and Bax=10min, PKC α and GAPDH=5min]. 1.0%의 gel에 5-10 μ l를 loading한 뒤, EtBr로 염색 후 같이 loading한 standard Marker에 의해 분자량을 확인하였다.

실험성적

1. 쐐藨의 평활근세포에 대한 세포사멸 효과

일정 농도로 배양한 평활근세포에 쐐藨을 농도별, 시간별로 처리한 후, 광학 현미경 관찰과 XTT를 통해 평활근세포에 대한 세포사멸효과를 관찰하였다. Fig. 1A에서와 같이 쐐藨의 처리에 의해 세포의 수축, cytoplasm 농축으로 세포가 둥글게 변하고, 죽은 세포의 부유가 관찰되었다. 또 XTT의 결과 쐐藨은 농도 의존적으로 세포의 증식을 현저하게 억제하였으며 0.3mg/ml 이상의 농도에서 약 68%의 세포사멸을 초래하였다(Fig 1B).

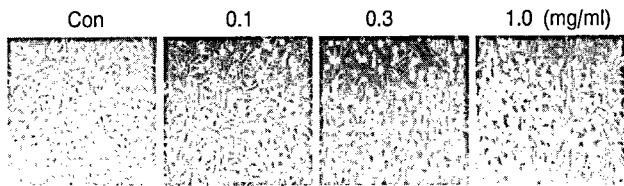


Fig. 1A. Morphologic changes in HASMCs by SG. The cell lines were incubated with SG for 24h in DMEM and observed by using the phase contrast microscope. Magnification X100.

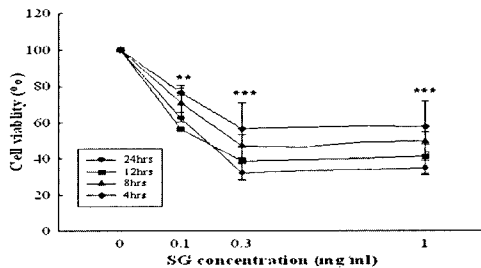


Fig. 1B. Antiproliferative effect of SG on HASMCs. Cell lines (5×10^4 cells/ml) were incubated in the different concentrations of SG for the indicated periods. Cell viability was measured by XTT assay as described in Materials and Methods. Values are mean \pm S.D., $n=8$. **, $p<0.005$. ***, $p<0.001$ as compared with the control group.

2. iNOS mRNA 발현을 통한 쐐藨의 NO 생성

쐐藨의 평활근세포에 대한 세포사멸은 TUNEL staining을 통한 세포핵의 농축과 분절, TdT의 분절된 DNA 결합에 의한 진한 갈색의 염색에 의하여 apoptosis가 확인되었으며, apoptosis의 과정에 NO가 관여하는 것으로 밝혀졌다³¹⁾. Apoptosis에 관여하는 쐐藨의 NO 생성능을 농도별 (0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1.0mg/ml), 시간별(5, 10, 30, 60, 1440 분; 0.5mg/ml) NO² 생성에 기초하여 측정한 결과 쐐藨은 농도 의존적으로 NO²의 생성을 증가시켰으며 NO² 생성은 0.5mg/ml의 쐐藨 추출물 처리 5분부터 증가하여 24시간까지 지속되는 것을 볼 수 있었다(Fig. 2).

평활근세포의 apoptosis 유도에 관여하는 쐐藨의 NO생성이 iNOS 발현에 의한 것인지를 RT-PCR을 통하여 관찰하였다. Fig. 2C에서 보는바와 같이 iNOS mRNA의 발현은 쐐藨의 처리에 의하여 측정 5분에서부터 24시간까지 지속되었다.

3. L-NNA가 쐐藨의 apoptosis, procaspase-3 및 iNOS mRNA 발현에 미치는 영향

쐐藨에 의한 평활근세포의 apoptosis가 iNOS 활성을 통한 NO의 생성과 관련이 있으므로 이를 확인하기 위하여 NOS 저해

제인 L-NNA 처리가 세포사멸, western blot 및 procaspase-3 단백질 분해 및 iNOS mRNA의 유전자 발현에 미치는 영향을 XTT, western blot 및 RT-PCR 분석에 의하여 관찰하였다. 그 결과 L-NNA(10^{-4} M)는 쐐藨에 의한 세포사멸과 procaspase-3 분해를 저해하였다(Fig. 3A and 3B). 또 L-NNA는 쐐藨에 의한 iNOS mRNA 발현을 유의하게 억제하였다(Fig. 3C).

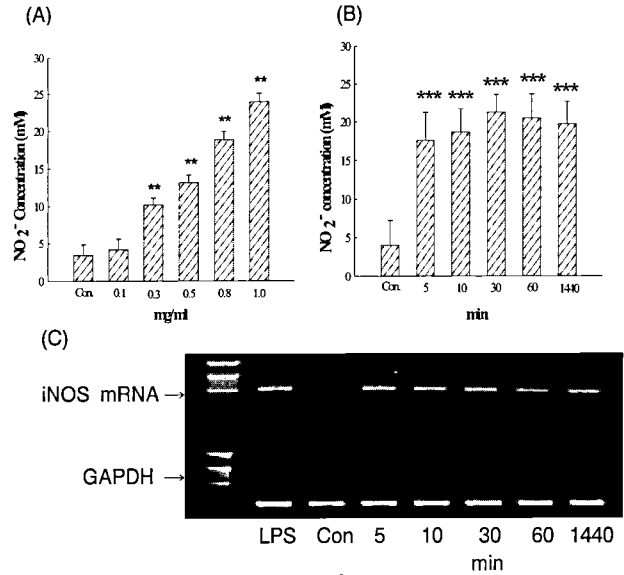


Fig. 2. Effects of SG on nitrite(NO²) production and iNOS mRNA expression on HASMCs. (A) Dose-dependent increases of nitrite. HASMC was treated with different concentration of SG for 24 hr. (B) NO² production at the indicated time point. HASMC was treated with SG(0.5mg/ml). $n=4$. **, $p<0.05$. ***, $p<0.001$ as compared with the control group. (C) Induction of iNOS mRNA in HASMCs at indicated time point. Total RNA was isolated from HASMCs treated with LPS(100ng/ml) for 1 hr, and SG(0.5mg/ml) for 5, 10, 30, 60, 1440 mins and analyzed by RT-PCR to measure mRNA for iNOS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) as described in Methods and Materials. LPS was used as a positive control for iNOS expression. $n=3$.

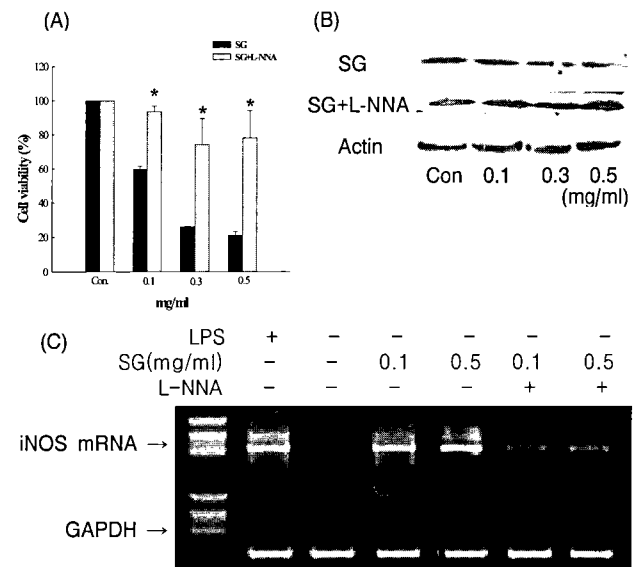


Fig. 3. Effects of L-NNA treatment on SG-induced cell apoptosis, procaspase-3 degradation and iNOS mRNA expression. (A) Inhibition of SG-induced cell apoptosis. (B) L-NNA(10^{-4} M) inhibited procaspase-3 degradation by SG. (C) Inhibition of SG-induced iNOS mRNA expression by L-NNA(10^{-4} M) in HASMCs. HASMCs were incubated with LPS (100ng/ml) and SG (0.1, 0.5 mg/ml) in the absence or presence of L-NNA for 1h. $n=3$, * $p<0.05$.

4. 菝葜이 apoptosis 유도 관련 유전자 발현에 미치는 영향

희림의 평활근 세포 apoptosis 유도에 관여하는 신호전달 유전자 발현의 변화를 RT-PCR을 통해 파악하였다. 菝葜은 농도 의존적으로 Bcl-2의 발현을 감소시켜 1.0mg/ml의 농도에서 완전히 억제시켰다. 그러나 Bax의 발현에는 영향을 미치지 않았다(Fig. 4).

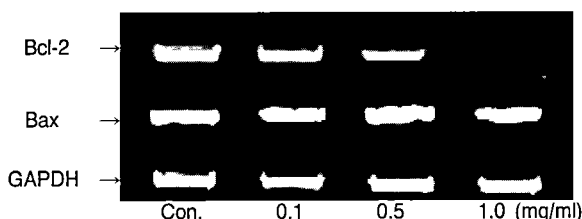


Fig. 4. Expression of apoptosis-related genes in SG-treated cultured HASMCs. HASMCs were treated with SG for 24 hr in the different concentrations.

5. 菝葜이 PKC α 및 phospho-PKC α 활성화에 미치는 영향

PKC는 세포 종류 및 환경에 따라 세포 성장 및 분화와 같은 다양한 세포의 반응을 유도하는 신호전달계에서 중요한 역할을 한다. 菝葜의 평활근세포의 apoptosis 유도시 PKC α 의 관련성을 검증하기 위해 菝葜을 24시간 농도별로 처리한 후 Western blot을 통해 PKC α 및 phospho-PKC α 의 활성을 관찰하였다. 菝葜은 농도 의존적으로 PKC α 와 phospho-PKC α 의 단백질 발현을 억제하였다(Fig. 5A). 또 PKC α 의 mRNA 수준에 미치는 영향을 파악하기 위해, 0.5mg/ml의 菝葜을 시간별로 처리 (5, 10, 30, 60, 1440 min)하여 그 결과를 RT-PCR을 통해 파악하였다. 菝葜은 PKC α mRNA 발현을 시간경과에 따라 유의하게 감소시켰다(Fig. 5B).

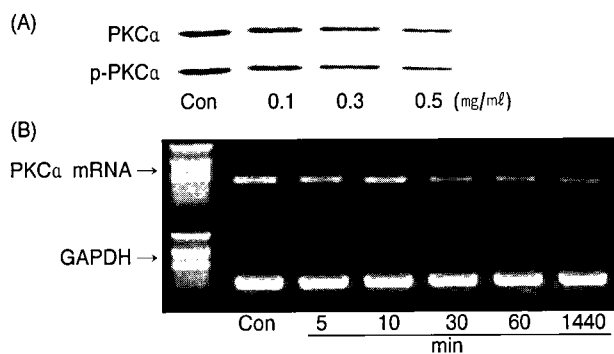


Fig. 5. A, Representative Western blot for PKC α /p-PKC α protein expression levels and PKC α expression by SG in HASMCs. Activation of PKC α was assessed with a phosphospecific antibody for PKC α on whole cell lysates. HASMCs were treated with SG for 24 hr, n=6. B, Expression of PKC α in HASMCs treated with SG (0.5mg/ml) at the indicated time point. Total RNA was extracted from the cells and reverse transcribed into cDNA. The cDNA was subjected to PCR, and the PCR products were electrophoresed on 1% agarose gel and visualized by ethidium bromide staining. GAPDH was used as a control to confirm equal loading of mRNA in each well, n=3

6. L-NNA가 菝葜의 PKC α , p-PKC α 활성화 및 PKC α mRNA 발현에 미치는 영향

菝葜의 apoptosis 유도시 PKC α 및 p-PKC α 의 활성억제가 NO pathway에 의한 것인지를 확인하기 위해 L-NNA 처리 후 PKC α , p-PKC α 및 PKC α mRNA의 변화를 관찰하였다. L-NNA(10^{-4} M, 24hr)는 菝葜에 의한 PKC α 와 p-PKC α 의 활성억제를 유의하게 억제하였다(Fig. 6A). 그러나 L-NNA(10^{-4} M)의 처

리(1시간)는 혈관평활근 자체의 PKC α mRNA의 발현을 억제하였으나, 菝葜에 의한 PKC α mRNA 발현의 감소에는 영향을 미치지 않음을 RT-PCR을 통하여 확인하였다(Fig. 6B).

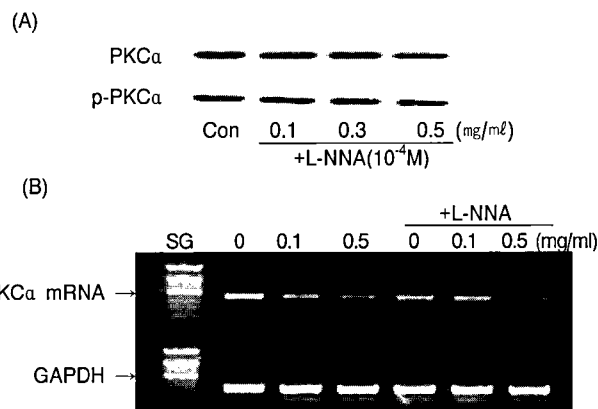


Fig. 6. Effects of L-NNA (10^{-4} M) on PKC α and p-PKC α protein expression (A), and PKC α mRNA expression (B) by SG. HASMCs were treated with SG plus L-NNA for 24 hr for PKC α and p-PKC α protein expression and 1h for PKC α mRNA expression, n=6.

7. 菝葜 및 L-NNA가 ERK1/2 에 미치는 영향

Mitogen-activated protein (MAP) kinase는 신호전달계에서 중요한 단백질이며 세포의 성장, 분화 및 apoptosis에 중요한 역할을 한다. 菝葜에 의한 apoptosis와 ERK1/2의 관계를 확인하였다. ERK1/2는 菝葜 및 菝葜과 L-NNA 동시 처리에도 유의한 변화가 없었다(Fig. 7).

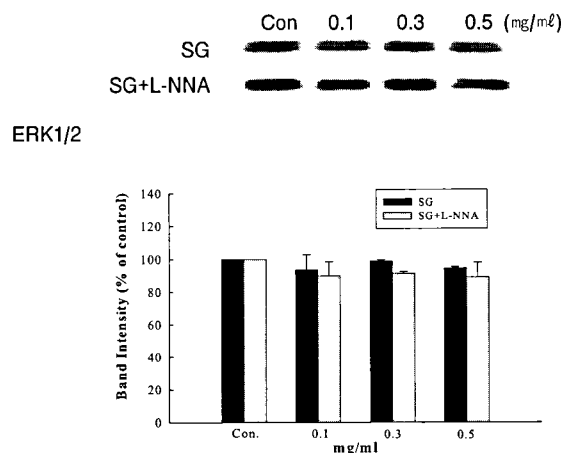


Fig. 7. Western blot analysis of ERK1/2 expression by SG in the presence or absence of L-NNA(10^{-4} M). n=6.

고찰

菝葜은 진득찰 속 식물로 진득찰(Siegesbeckia glabrescens), 제주진득찰(Siegesbeckia orientalis L.), 털진득찰(Siegesbeckia pubescens)로 구분된다. 본 실험에 사용한 菝葜은 진득찰로 祛風濕, 通經絡, 清熱解毒, 強筋骨의 효능이 있으며, 清熱작용은 肝火로 인한 頭痛과 眩暈을 치료하고, 解毒작용은 창용, 癰腫, 사교상 및 급성 황달을 치료한다.

췌장의 실험적 연구로는 혈관확장 기능과 항산화 작용, 혈압 강하효과와 혈중총 지질함량의 감소 및 혈관평활근 세포에서의 NO를 매개로 한 apoptosis의 유도가 보고 되었다. 이러한 실험적 보고는 췌장의 혈압 강하 작용과 고혈압 치료에 대한 근거를 제시하는 것으로 본 실험에서는 췌장의 apoptosis 유도에 대한 분자 생물학적 기전을 조사하였다.

혈관평활근의 apoptosis는 죽상동맥경화나 혈관 재협착의 중요한 억제인자인 동시에^{7,9)} restenosis나 vascular remodeling의 intimal hyperplasia를 억제하는 역할을 가지고 있다^{22,23)}. 한편 NO는 혈관에 대한 platelet와 monocyte의 adhesion과 migration을 저해하며 또 혈관평활근 세포의 증식을 억제한다^{5,24)}. 저농도에서 cGMP를 통해 직접적으로 caspase 활성을 억제함으로써 apoptosis를 억제하나^{25,26)}, 고농도의 NO는 macrophage, chondrocytes, fibroblasts와 smooth muscle를 포함한 다양한 세포에서 apoptosis를 유도한다. 이 경우 NO는 cGMP-비의존적 경로를 따른다^{27,28)}. 또 NO는 peroxynitrite가 DNA 손상을 유도 p53을 활성화 시킴으로써 apoptosis를 유도한다고 알려져 있으나^{29,30)} NO 유도의 정확한 기작은 분명하게 밝혀져 있지 않다.

이전의 연구에서, TUNEL staining와 procaspase-3의 degradation을 통해 췌장이 평활근 apoptosis를 유도하며 이 과정에 NO가 관계함을 보고한 바 있다³¹⁾. 그러나 췌장의 apoptosis 유도시 NO의 역할과 기전은 정확히 연구되어 있지 않다. 본 실험에서는 췌장의 iNOS 유도를 통한 고 농도의 NO 생성이 PKC α 및 Bcl-2의 발현을 억제하여 평활근세포의 apoptosis를 유도함을 확인하였다.

NO는 guanylyl cyclase를 활성화시키고 cGMP 함량을 증가시켜 혈관이완을 유도하며³²⁾, 혈관확장 기능 이외에 adhesion molecule의 발현억제, 평활근세포의 성장 및 유주(migration)의 억제를 통하여 항 동맥경화(anti-atherogenesis)의 효과를 가진다^{33,34)}. 또한 NO는 자발성 고혈압쥐(SHR)에 있어서 심장비대를 감소시키고³⁵⁾, 심근세포의 apoptosis를 촉진함으로써 remodeling 과정에 영향을 미친다.

췌장의 NO 생성은 농도 의존적(0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1.0mg/ml)이었으며, 0.5mg/ml의 농도에서 5분에 최고 생성량의 약 80%를 나타내어 30분에 최고 생성을 보였다. 이러한 췌장의 농도별, 시간별 NO² 생성 및 apoptosis는 신³¹⁾의 연구결과와 일치하였다.

NO 생성에 관여하는 nitric oxide synthase(NOS)는 세가지 형태로 L-arginine로부터 생성된다. 크게 constitutive와 inducible로 나뉘며, constitutive는 주로 내피세포에서 발견되며 칼슘 의존성 효소인 ecNOS, 신경세포에 풍부한 ncNOS 및 endotoxin이나 cytokine에 의해 유도되고 대부분 macrophage와 smooth muscle에 많이 분포하고 내피세포에는 적은 iNOS로 구성되어 있다³⁶⁻³⁸⁾. 이 세 가지 효소는 모두 L-arginine analogue NG-nitro L-arginine(L-NNA)에 의해 활성이 억제된다.

한편 Nishio 등³⁹⁾은 고농도의 포도당에 의한 혈관 평활근세포에서 iNOS의 발현 감소가 PKC 억제제에 의해 회복됨을 보고하였는데, 이는 PKC의 억제가 iNOS의 발현을 증가시킬 수 있다는 가능성을 시사한다. 또 당뇨병 환자나 동물모델의 저항 혈관

에서 아세틸콜린의 혈관이완 반응이 감소하고⁴⁰⁻⁴²⁾ PKC 억제제에 의하여 회복되는데^{43,44)}, 이는 당뇨병에서 PKC의 활성화가 cNOS의 발현억제와 인산화의 증가를 통해 혈관이완을 억제시킬 수 있음을 시사한다고 하겠다.

Cytokines에 의한 세포사에 iNOS의 유도가 관여하며⁴⁵⁾, 특히 iNOS는 혈관 평활근세포, 섬유아세포 및 대식세포에서 면역학적 자극이나 염증성 자극에 의하여 합성되는데, 췌장이 iNOS mRNA 발현을 선택적으로 활성화시키지는지를 reverse transcriptase polymerase chain reaction(RT-PCR)을 통하여 측정하였다. 그 결과 측정 5분에서부터 24시간까지 iNOS mRNA의 발현이 지속되어 iNOS mRNA의 발현과 NO 생성이 일치하였다. 이는 iNOS negative인 평활근세포의 iNOS transfection이 apoptosis를 유도한다는 보고⁴⁶⁾와 같이 췌장의 평활근세포의 apoptosis 유도는 iNOS 활성을 통한 NO의 생성과 관련이 있음을 시사한다. 따라서 이를 확인하기 위하여 NOS 저해제인 L-NNA 처리에 의한 평활근세포의 세포사멸의 억제 유무와 iNOS mRNA의 발현에 미치는 영향을 RT-PCR과 XTT분석에 의하여 관찰하였다. 그 결과 L-NNA는 췌장에 의한 세포사멸과 iNOS mRNA의 발현을 유의하게 억제하였다. 또 caspase는 apoptosis 억제 단백질을 분해하여 apoptosis를 유도하며 caspase-3는 불활성 형태로 존재하나 활성화되면 apoptosis를 유도한다. 췌장에 의한 caspase-3의 활성화는 L-NNA(10⁻⁴M)의 처리에 의하여 억제되었다. 이상의 결과로부터 췌장의 apoptosis 유도는 iNOS mRNA 발현 유도를 통한 NO의 생성과 caspase-3의 활성이 관여함을 알 수 있다.

한편 apoptosis 유도에 관여하는 신호전달 유전자발현과 단백질의 변화에 미치는 영향을 RT-PCR과 western blot을 통해 관찰하였다. Follicular lymphoma에서 처음으로 발견된 Bcl-2는 apoptosis를 억제하는 미토콘드리아 의존성 anti-apoptosis 단백질이다. 이러한 Bcl-2의 anti-apoptosis 활성화는 pro-apoptotic 단백질인 Bax에 의해 억제되며, Bcl-2 와 Bax의 세포내 비율이 apoptosis 유도를 결정짓는다⁴⁷⁻⁴⁹⁾. 또한 Bcl-2를 overexpression 시킨 세포에서 PKC α 특이적 저해제인 Go 6976의 처리는 Bcl-2 발현의 감소에 의해 apoptosis가 유도된다고 보고된 바 있다⁵⁰⁾. 췌장은 세포의 apoptosis를 방어하는 Bcl-2의 발현을 농도 의존적으로 감소시켜 1.0mg/ml의 농도에서 완전히 억제하였다. 그러나 Bax의 발현에는 영향을 미치지 않았다.

Protein kinase C (PKC)는 심장 및 다양한 세포들의 신호전달계에서 중요한 역할을 하는 serine/threonine kinase들이다. 지금까지의 총 11개의 PKC가 밝혀졌으며 크게 세 가지로 나뉘어진다. 첫째, 칼슘 의존적 효소인 conventional, cPKC (α, β I, β II와 γ) 둘째, 칼슘 비의존적 효소인 novel, nPKC (δ, ε, η, θ) 셋째, phorbol ester에 반응하지 않는 atypical PKC(ζ, λ/ι) 그리고 가장 최근에 밝혀진 PKC-μ는 protein kinase D family와 구조적으로 유사성을 가지고 있다⁵¹⁻⁵³⁾. 각각의 PKC isoforms은 조직 및 세포내 분포 및 기질 특이성을 가진다⁵⁴⁻⁵⁷⁾. 이러한 자료들은 생체 내에서 isoform 특이적 기능이 존재함을 암시한다⁵⁸⁻⁶⁰⁾. Harsdorf 등^{61,62)}에 의하면 smooth muscle에서는 PKC α, β, δ, ζ, ε이 발현

되며, H₂O₂의 PKC 활성화로 인한 평활근세포의 apoptosis를 유도 시 β, δ, ζ의 위치 변화나 활성화에는 변화가 없었으나, PKC α, ε의 경우 측정 2분의 최대 활성시점에서 모두 핵으로 translocation 되나 이후 30분 까지 회복됨을 보고하였다. 또한 hyperglycemia에 의한 평활근세포의 apoptosis 저해시 p-PKC α의 지속적 활성화가 보고된 바 있다.⁶³⁾

본 실험에서 繇藪은 PKC α 및 p-PKC α의 활성을 억제하였으며, ERK1/2의 활성에는 영향을 미치지 못하였다. 따라서 繇藪은 PKCa/p-PKCa의 활성억제를 통하여 apoptosis를 유도함을 알 수 있다. 즉 繇藪의 NO-유도 apoptosis 신호전달에 PKCa, p-PKCa의 negative modulation이 관여함을 시사한다.

한편 PKC α가 LPS 또는 cytokine 유도 NO 생성시 iNOS를 유도하는 역할⁶⁴⁾과 고농도의 NO가 세포내 PKC 활성을 저해하고 PKG를 활성화 하여 DNA 합성을 저해한다는 보고⁶⁵⁾에 근거하여 繇藪의 apoptosis 유도시 PKC α와 iNOS의 상관관계를 규명하기 위해 NOS 저해제인 L-NNA의 처리가 PKCa mRNA 발현에 미치는 영향을 RT-PCR(1시간)과 Western blot (24시간) 분석을 통하여 확인하였다. L-NNA의 처리는 繇藪의 PKC α /p-PKC α 단백질 발현의 저해를 유의하게 억제시켰다. 그러나 繇藪의 PKCa mRNA 발현에 영향을 미치지 않았다. 이는 L-NNA가 PKCa의 유전자 발현에 영향을 미치지 않고 생성된 PKCa의 단백질 작용을 막는 것으로 생각되며, 繇藪이 apoptosis 유도는 혈관 remodeling의 억제는 물론 혈관병증의 예방과 치료에 있어 PKC 활성 억제제로서 중요한 역할을 할 것으로 기대된다. 또 apoptosis 과정에서의 PKC α의 저해가 가지는 역할을 규명하기 위해 PKC α 효현제인 PMA를 30분 동안 처리하였을 때 세포생존율은 오히려 감소되었으며, 繇藪에 의한 PKC α 활성억제는 더욱 증가 되었다(data no tshown). 이는 초기에는 PMA에 의해 PKC α가 활성화 되지만 이후 PMA에 의한 PKC down regulation과 NO의 상승작용으로 인한 apoptosis의 증가로 해석된다.

이상의 결과로부터 繇藪의 혈관 평활근세포의 apoptosis 유도는 iNOS에 의한 NO 생성을 통한 PKC α의 활성억제와 Bcl-2의 발현 감소가 관계함을 알 수 있다. 또한 최근에 Li 등⁶³⁾은 H₂O₂의 PKC α 활성화로 인한 평활근세포의 apoptosis 억제를 막기 위해 PKC α 억제제를 사용한 결과 necrosis가 일어남을 보고하였다. 이는 단순한 PKC α 활성 억제제의 사용이 혈관평활근의 apoptosis 유도에 제한적임을 시사하는 내용이다. 따라서 희렴의 apoptosis 유도에서의 PKC α의 저해의 역할에 대한 세밀한 연구가 필요하며 이러한 과정을 통해 기존의 신약과는 다른 부작용이 적은 새로운 항고혈압, 항동맥경화제로 개발할 수 있을 것으로 기대된다.

결 론

繇藪에 의한 혈관 평활근세포의 apoptosis의 신호전달에 관한 연구를 통해 다음의 결론을 얻었다. 繇藪은 농도 및 시간의 존적 세포사멸을 증가시켰으며, 0.3mg/ml 이상의 농도부터 최고의 세포사멸을 보였다. 또 혈관 평활근세포의 NO 생성을 농도

의존적으로 증가시켰으며, 그 생성은 iNOS mRNA 발현과 일치하였다. 그러나 NOS 억제제인 L-NNA(10⁻⁴M)의 처리는 繇藪의 세포사멸과 iNOS mRNA의 발현을 억제, caspase-3의 활성 및 Bcl-2의 발현 억제하였다.

한편 혈관 평활근세포에 있어서 iNOS의 NO 생성에 의한 繇藪의 apoptosis 유도 신호전달에 관한 실험에서 다음의 결과를 얻었다. NOS 억제제인 L-NNA(10⁻⁴M)의 처리는 繇藪의 세포사멸과 iNOS mRNA의 발현을 억제하였다. 또한 L-NNA의 처리는 繇藪의 caspase-3의 활성, Bcl-2의 발현 억제하였다. 繇藪은 PKC α 및 phospho-PKC α의 단백질 발현을 유의하게 감소시켰으며 이는 L-NNA의 처리에 의해 억제되었다. 그러나 L-NNA는 PKC α의 유전자 발현에는 영향을 미치지 않았다.

이상의 결과로부터 繇藪에 의한 혈관 평활근세포의 apoptosis는 iNOS 발현에 의한 NO의 생성을 통한 PKCa의 활성 억제 및 Bcl-2의 발현억제 및 caspase-3 활성이 하위 신호전달 단백질로서 작용함을 알 수 있다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술연구개발사업(B050042)의 지원에 의하여 이루어 졌으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 高學敏. 中藥學. 北京, 北京中醫學院, p 155, 156, 1986.
2. 吳儀洛. 本草從新. 서울, 杏林書院, p 62, 1982.
3. 康秉秀, 金永坂. 本草學. 서울, 圖書出版 永林社, p 276, 277, 1944.
4. 黃宮繡. 本草求真. 台北, 宏業書局有限公司, pp 129-130, 中華民國七十年.
5. Garg, U.C., Hassid, A. Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromo-cyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. J Clin Invest., 83: 1774-1777, 1989.
6. Wollert, K.C., Drexler, H. Regulation of cardiac remodeling by nitric oxide: Focus on cardiac myocyte hypertrophy and apoptosis. Heart Failure Reviews, 7: 317-325, 2002.
7. Isner, J.M., Kearney, M., Bortman, S., Passeri, J. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. Circulation, 91: 2703-2711, 1995.
8. Bennett, M.R., Evan, G.I., Schwartz, S.M. Apoptosis of human vascular smooth muscle cells derived from normal vessels and coronary atherosclerotic plaques. J Clin Invest, 95: 2266-2274, 1995.
9. Geng, Y.J., Libby, P. Evidence for apoptosis in advanced human atheroma: colocalization with interleukin-1beta-converting enzyme. AmJ Pathol, 147: 251-266, 1995.
10. 남삼수, 박동석. 繇藪약침 자극이 자발성 고혈압 흰쥐의 혈압에 미치는 영향 및 강압기전에 대한 연구. 대한한의학회지

- 18: 218-237, 1997.
11. 金昊顯, 申興默, 金吉萱. 稀莖이 收縮된 血管에 미치는 影響. 東醫生理學會誌 10: 25-36, 1995.
 12. 김호철. 생희침과 주중희침 추출물이 자발성 고혈압 흰쥐의 항고혈압작용에 미치는 영향. 본초학회지 13(1):53-58, 1998.
 13. 김호현, 김길훤. 稀莖이 가토의 혈관내피세포성 이완인자에 미치는 영향. 대한한의학회지 18(2):15-32, 1997.
 14. 신흥목. 稀莖의 혈관이완 효능과 항산화 동태에 관한 연구. 대한한의학회지 21(1):77-83, 2000.
 15. Scudiero, D.A., Shoemaker, R.H., Paul, K.D. 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.
 16. Griess, P. Bemerkungen zu der abhandlung der H.H. Weselsky und Benedikt "Ueber einige azoverbindungen." *Chem. Ber*, 12: 426, 1879.
 17. Lowery, O.H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193: 265-275, 1951.
 18. Wang, X., Christopher, G.A.M., Virginia, M.M. Induction and cDNA sequence of inducible nitric oxide synthase from canine aortic smooth muscle cells. *Am J Physiol*, 275: H1122-H1129, 1998.
 19. Shin, H.G., Joey, V.B., Paul, C., Seenu, R., Davis, C.D., Richard, N.P., Ronald, G.W., Katherine, T.M. Molecular heterogeneity of protein kinase C expression in human ventricle. *Cardiovascular Research*, 48: 285-299, 2000.
 20. Gene Bank Accession No.: M13994, Human Bcl-2 complete CDS.
 21. Wu, S., Ko, Y.S., Teng, M.S., Ko, Y.L., Hsu, L.A., Chueh, Chou, Y.Y., Liew, C.C., Lee, Y.S. Adriamycin-induced cardiomyocyte and endothelial cell apoptosis: in vitro and in vivo studies. *J Mol Cell cardiol*, 34: 1595-1607, 2002.
 22. Han, D.K., Haudenschild, C.C., Hong, M.K., Tinkle, B.T., Leon, M.B., Liau, G. Evidence for apoptosis in human atherosclerosis and in a rat vascular injury model. *Am J Pathol*, 147: 267-277, 1995.
 23. Isner, J.M., Kearney, M., Bortman, S., Passeri, J. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. *Circulation*, 91: 2703-2711, 1995.
 24. Radomski, M.W., Rees, D.D., Dutra, A., Moncada, S. S-nitroso-glutathione inhibits platelet activation in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol*, 107: 745-749, 1992.
 25. Dimmeler, S., Haendeler, J., Nehls, M., Zeiher, A.M. Suppression of apoptosis by nitric oxide via inhibition of interleukin-1-beta converting enzyme (ICE)-like and cysteine protease protein(CPP)-32-like proteases. *J Exp Med*, 185: 601-607, 1997.
 26. Kim, Y.M., Talanian, R.V., Billiar, T.R. Nitric oxide inhibits apoptosis by preventing increases in caspase-3-like activity via two distinct mechanisms. *J Biol Chem*, 272: 31138-31148, 1997.
 27. Pollmann, M.J., Yamada, T., Horiuchi, M., Gibbons, G.H. Vasoactive substances regulate vascular smooth muscle cell apoptosis. *Circ Res*, 79: 748-756, 1996.
 28. Nishio, E., Fukushima, K., Shiozaki, M., Watanabe, Y. Nitric oxide donor SNAP induces apoptosis in smooth muscle cells through cGMP-independent mechanism. *Biochem Biophys Res Com*, 221: 163-168, 1996.
 29. Messmer, U.K., Bernhard, BRUNE. Nitric oxide-induced apoptosis: p53-dependent and p53-independent signaling pathways. *Biochem J*, 319: 299-305, 1995.
 30. Filippov, G., Bloch, D.B., Bloch, K.D. Nitric oxide decreases stability of mRNAs encoding soluble guanylate cyclase subunits in rat pulmonary artery smooth muscle cells. *J Clin Invest*, 100: 942-948, 1997.
 31. 신동훈. 稀莖의 Nitric Oxide 유리를 통한 평활근세포에서의 Apoptosis유도. 동국대학교 대학원, 2003.
 32. Gruetter, C.A., Gruetter, D.Y., Lyon, J.E., Kadowitz, P.J., IG-Narro, L.J. Relationship between cyclic guanosine 3':5'-monophosphate formation and relaxation of coronary arterial smooth muscle by glyceryl trinitrate, nitroprusside, nitrite and nitric oxide: *Effects of methylene blue and methemoglobin*, *J Pharmacol Exp Ther*, 219: 181-186, 1981.
 33. Gibbons, G.H., Dzau, V.J. Molecular therapy for vascular diseases. *Science*, 272: 689-693, 1996.
 34. De Caterin, R., Libby, P., Peng, H.B., Thannickal, V.J., Rajavashisth, T.B., Gimbrone, M.A. Jr, Shin, W.S., Liao, J.K. Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric Oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines. *J Clin Invest*, 6: 60-68, 1995.
 35. Matsuoka, H., Nakata, M., Kohno, K., Koga, Y., Nomura, G., Toshima, H., Imaizumi, T. Chronic L-arginine administration attenuates cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*, 27: 14-18, 1996.
 36. Forstermann, U., Schmidt, HHHW, Pollock, J.S., Sheng, H., Mitchell, J.A., Warner, T.D., Nakane, M., Murad, F. Isoforms of nitric oxide synthase. Characterization and purification from different cell types. *Biochem Pharmacol*, 42: 1849-1857, 1991.
 37. Moncada, S., Palmer, R.M.J., Higgs, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev*, 43: 109-142, 1991.
 38. Nathan, C., Xie, Q. Nitric Oxide synthases: roles, tolls and controls. *Cell*, 78: 915-918, 1994.

39. Nishio, E., Watanabe, Y. Glucose-induced down-regulation of NO production and inducible NOS expression in cultured rat aortic vascular smooth muscle cells: role of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun*, 229: 857-863, 1996.
40. 김정국, 김신우, 김수동, 서예경, 하승우, 김보완, 백운이, 권삼, 강승완. Streptozotocin 당뇨병 백서에서 당뇨병의 이환 기간에 따른 대동맥의 이완능의 저하 및 oxygen free radical 에 의한 이완능의 손상정도. *대한내과학회지*, 50: 19-26, 1996.
41. Calver A, Collier J, Vallance P. Inhibition and stimulation of nitric oxide synthase in the human forearm arterial bed of patients with insulin-dependent diabetes. *J Clin Invest*, 90: 2548-2554, 1992.
42. Johnstone MT, Creager SJ, Scales KM, Cusco JA, Lee BK, Creager MA. Impaired endothelium-dependent vasodilation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation*, 88: 2510-2516, 1993.
43. Sobrevia L, Mann GE. Dysfunction of the endothelial nitric oxide signaling pathway in diabetes and hyperglycemia. *Experimental Physiol*, 82: 423-452, 1997.
44. Park JY, Ha SW, King GL. The role of protein kinase C activation in the pathogenesis of diabetic vascular complications. *Perit Dial Int*, 19: S222-S227, 1999.
45. Moncada, S., and Higgs, E.A. Endogenous nitric oxide: Physiology, pathology and clinical relevance. *Eur. J. Clin. Invest*, 21: 361-374, 1991.
46. Masatora I, MD; Masayoshi S, MD; Fumiaki M, MD; Yukio H, MD. Transfection of inducible Nitric Oxide Synthase gene causes apoptosis in vascular smooth muscle cells. *Circulation*, 98: 1212-1218, 1998.
47. Reed, J.C. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J cell biol*, 124: 1-6, 1994.
48. Oltvai, Z.N., Millman, C.L., Korsmeyer, S.J. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax that accelerates programmed cell death. *Cell*, 74: 609-619, 1993.
49. Sato, T., Hanada, M., Bodrug, S., Irie, S., Iwama, N., Boise, L.H., Thompson, C.B., Golemis, E., Fong, L., Wang, H.G., Reed, J.C. Interaction among members of the Bcl-2 protein family analyzed with a yeast two-hybrid system. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 9238-9242, 1994.
50. Huigsloot, M., Tijdens, R.B., van de Water, B. Inhibition of protein kinase C α enhances anticancer agent-induced loss of anchorage-independent growth regardless of protection against apoptosis by Bcl-2. *Mol Pharmacol*, 64: 965-973, 2003.
51. Liu, J.P. Protein kinase C and its substrates. *Mol Cell Endocrinol*, 116:1-29, 1996.
52. Mellor, H., Parker, P.J. The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J*, 332: 281-292, 1998.
53. Sugden, P.H., Bogoyevitch, M.A. Intracellular signalling through protein kinases in the heart. *Cardiovasc Res*, 30: 478-492, 1995.
54. Harrington, E.O., Ware, J.A. Diversity of the protein kinase C gene family: Implications for cardiovascular disease. *Trends Cardiovascular Medicine*, 5: 193-199, 1995.
55. Bareggi, R., Narducci, P., Grill, V., Lach, S., Martelli, A.M. Selective distribution of multiple protein kinase C isoforms in mouse cerebellar cortex. *Biol Cell*, 87: 55-63, 1996.
56. Disatnik, M.H., Buraggi, G., Mochly-Rosen, D. Localization of protein kinase C isozymes in cardiac myocytes. *Exp Cell Res*, 210: 287-327, 1994.
57. Dekker, L.V., Parker, P.J. Protein kinase C- α a question of specificity. *Trends Biochem Sci*, 19: 73-77, 1994.
58. Zhang, Z.H., Johnson, J.A., Chen, L., El-Sherif, N., Mochly-Rosen, D., Boutjdir, M. C2 region-derived peptides of beta-protein kinase C regulate cardiac Ca^{2+} channels. *Circ Res*, 80: 720-729, 1997.
59. Johnson, J.A., Mochly-Rosen, D. Inhibition of the spontaneous rate of contraction of neonatal cardiac myocytes by protein kinase C isozymes. A putative role for the epsilon isozyme. *Circ Res*, 76: 654-663, 1995.
60. Kiley, S.C., Jaken, S., Whelan, R., Parker, P.J. Intracellular targeting of protein kinase C isoenzymes: functional implications. *Biochem Soc Trans* 23: 601-605, 1995.
61. PF, Li., Christian, M., Hermann, H., Rainer, D., Rudiger, von H. Requirement for protein kinase C in reactive oxygen species-Induced apoptosis of vascular smooth muscle cells. *Circulation*, 100: 967-973, 1999.
62. Ohanian, V., Ohanian, J., Shaw, L., Scarth, S., Parker, P.J., Heagerty, A.M. Identification of protein kinase C isoforms in rat mesenteric small arteries and their possible role in agonist-induced contraction. *Circ Res*, 78: 806-812, 1996.
63. Jennifer, L.H., Christian, M.M., Wang, X.H., Gary, H.G. Hyperglycemia inhibits vascular smooth muscle cell apoptosis through a protein kinase C-dependent pathway. *Circulation Research*, 87: 574-580, 2000.
64. Li, S.H., Freesia, L., Huang, Feng, O.P., Liu, J., Sharon, X.F., Thomas, M.M. Overexpression of protein kinase C α enhances lipopolysaccharide-induced nitric oxide formation in vascular smooth muscle cell. *J. Cell. Physiol*, 176: 402-411, 1998.
65. Guh, J.H., Hwang, T.L., Ko, F.N., Chueh, S.C., Lai, M.K., Teng, C.M. Antiproliferative effect in human prostatic smooth muscle cells by nitric oxide donor. *Mol Pharmacol*, 53: 467-474, 1998.