

## 鬱金에서 분리된 demethoxycurcumin이 백서의 혈관재협착에 미치는 효과

길인호<sup>1)</sup> · 정명수<sup>1)</sup> · 신창호<sup>2)</sup> · 배현옥<sup>3)</sup> · 정헌택<sup>3)</sup> · 이기남<sup>2)</sup>\*

<sup>1)</sup>원광대학교 한의과대학 예방의학교실

<sup>2)</sup>원광대학교 한의학전문대학원 제3의학과

<sup>3)</sup>원광대학교 의과대학 미생물면역학교실

## Effects of Demethoxycurcumin Isolated from Radix Curcumae on Arterial Restenosis in Rats

Inho Kil,<sup>1)</sup> Myongsoo Chong,<sup>1)</sup> Changho Shin,<sup>2)</sup> Hyunock Pae,<sup>3)</sup>  
Huntaeg Chung<sup>3)</sup> & Kinam Lee<sup>2)</sup>\*

<sup>1)</sup>Dept. of Preventive Oriental Medicine, College of Oriental Medicine,

<sup>2)</sup>Dept. of the Third Medicine, Professional Graduate School of Oriental Medicine,

<sup>3)</sup>Dept. of Microbiology and Immunology, College of Medicine,  
Wonkwang University, Iksan, 570-749, Republic of Korea

### Abstract

The pathobiologic process of arterial stenosis following balloon angioplasty continues to be an enigmatic problem in clinical settings. This study investigates the ability of demethoxycurcumin, a curcuminoid isolated from Radix Curcumae, to attenuate balloon injury-induced neointima(NI) formation in the rat carotid artery. It was found that demethoxycurcumin induced inducible heme oxygenase(HO-1) expression and inhibited dose-dependently cellular proliferation in rat vascular smooth muscle cells. Perivascular application of demethoxycurcumin immediately following injury significantly reduced NI area and NI thickness 2 weeks post-injury. Interestingly, treatment with tin-protoporphyrin IX, a HO inhibitor, reversed the effects of demethoxycurcumin on NI formation. These results implicate demethoxycurcumin as a potent new therapeutic agent that is capable of reducing post-angioplasty arterial stenosis through

· 접수: 2008년 12월 5일 · 논문심사: 2008년 12월 12일 · 채택: 2008년 12월 15일

\* Corresponding author: Kinam Lee, Department of Third Medicine, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan, 570-749, Korea. Tel: 82-63-850-6836  
E-mail: kinaml@wonkwang.ac.kr

induction of the HO-1 expression.

**Key words** : demethoxycurcumin, Radix Curcumae, Arterial Restenosis

### I. 序論

血은 脈 속을 운행하고 脈은 血行의 隧道이며 心氣는 脈에 있어서 血行을 推動하는 動力이다. 心·血·脈의 세 가지는 一體이고 협조하여 血液의 순환운동을 완성시키고 있다. 그러나 瘀血이나 痰濁이 包絡을 痹阻하면 가슴이 막혀 괴롭고(心胸蔽悶) 때로는 찌르는 것 같은 胸痛이 나타나며 역대 醫籍에는 “卒心痛”·“厥心痛”·“眞心痛”이라고 하고 《金匱要略》에서는 “胸痹”라고도 하는데 현대의학과 결합하면 주로 관상동맥죽상경화증, 심근경색증, 협심증 등의 심장계통 질환들로서 鬱金·丹蔘·三七根·川芎·赤芍藥 등의 活血祛瘀 行氣시키는 약물들로서 치료하였다.<sup>1,2)</sup>

최근 서구화된 생활의 변화에 따라서 협심증·심근경색증 및 돌연사로 대표되는 심장혈관(관상동맥) 질환의 발생률이 급격히 증가하고 있으며, 치료 면에 있어서 지난 10년간 괄목할 만한 발전을 이루어 왔다. 약물치료 이외에 수술적 방법으로 좁아진 혈관 부위를 이어 붙이는 관동맥 우회로술과 그물망 형태의 스텐트(stent)를 삽입하는 시술 등의 여러 치료법이 발달하여 동맥경화증으로 관상동맥이 좁아져 고통을 받는 환자들에게 희망을 주고 있으며, 심장질환의 치료에 새로운 전기가 되었다.<sup>3)</sup>

1977년 Andreas Grüentzig에 의하여 경피적 풍선성형시술(percutaneous transluminal coronary angioplasty)이 처음으로 임상에 도입된 후 관상동맥 및 경동맥 협착증(stenosis)의 획기적인 치료방법으로 생각되었으나, 시술 후 6개월 내에

30~60%에서 발생하는 혈관재협착(restenosis)이 문제로 제기되었다.<sup>4)</sup> 그러나 임상적인 효과가 매우 우수하여 이러한 제한점에도 불구하고 관상동맥중재시술(percutaneous coronary intervention)은 지금까지도 허혈성 심질환의 치료법으로 적응증을 넓혀가며 많은 환자에게 시술되고 있다.

鬱金(Radix curcumae)은 生薑科에 속한 多年生 草本인 울금(Curcuma aromatica)의 덩이 뿌리로 味辛苦涼 無毒하며 心·膽·肝 三經에 작용하고 活血破瘀·祛瘀止痛·涼血清心·行氣解鬱 등의 효능이 있다고 알려져 있다.<sup>5)</sup> 최근 鬱金을 이용한 실험적 연구로는 鬱金이 胃癌細胞에 미치는 影響,<sup>6)</sup> 鬱金이 angiogene 抑制機轉에 미치는 影響,<sup>7)</sup> 鬱金 에탄올 추출물의 항산화활성 비교,<sup>8)</sup> 葛花와 鬱金 및 苦蔘의 抗酸化作用에 關한 比較 研究<sup>9)</sup> 등이 있으며, 이들 연구결과 鬱金이 胃癌에 대한 抗癌作用과 癌細胞의 apoptosis를 유도하는 작용, angiogenesis를 억제하는 효과, 뛰어난 抗酸化力이 있음을 밝혀냈으며, 실험적으로 구강암,<sup>10)</sup> gastrin 수용체,<sup>11)</sup> 신경세포독성,<sup>12)</sup> 만성간질환,<sup>13)</sup> 담즙분비<sup>14)</sup>에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

鬱金の 塊根에는 한의학적으로 독성이 없고, 혈액순환을 촉진시키며 瘀血을 제거하여 혈류의 흐름을 개선하는 혈관보호효과가 있다.<sup>15)</sup> 鬱金の 塊根에는 curcumin, demethoxycurcumin (DMC) 및 bis-demethoxycurcumin 등 다양한 유효성분이 함유되어 있는데, 이들 중 curcumin은 혈관평활근세포의 세포증식을 억제하고, 혈액순환을 촉진시키며, 어혈을 제거하여 혈류의 흐름을 개선하는 효과가 있다고 보고되고 있으며, 혈관평활근 세포 세포증식억제 활성 및

혈관재협착 방지 활성이 있는 것으로 보고되었다.<sup>16)</sup> 그러나 DMC에 의한 세포증식 억제활성이 heme oxygenase-1(HO-1)의 기전으로 세포증식 억제 활성이 얻어진다는 사실은 보고된 바 없으며, 또한 혈관평활근세포 세포증식 억제 활성 및 혈관재협착 방지 효과는 아직까지 연구된 바 없다.

이에 저자는 천연 식물자원에서 독성이 없는 활성물질을 개발하기 위하여 鬱金에서 분리된 demethoxycurcumin이 백서의 혈관재협착에 미치는 효과를 연구한 결과 유의성을 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 실험동물 및 재료

본 연구에 이용되는 시약, 시료 및 실험동물은 다음과 같이 입수하였다. 10주령의 체중 230~250g의 수컷 Sprague-Dawley 종 백서(중앙실험동물(주), 서울, 대한민국)를 구입하여, 실험 전 2주간 안정 기간을 거친 뒤 실험에 사용하였다. 본 발명에서 사용한 백서들은 무게를 제한하여 크기에 의한 차이를 배제하였으며, 모두 숫놈의 백서를 사용하여 성별에 의한 차이 점도 없었다. 세포배양배지 둘백코씨 수정 이글씨 배지(Dulbecco's modified Eagle's media, DMEM), 페니실린(penicillin), 암포테리신(amphotericin), 스트렙토마이신(streptomycin), 3-[4,5-디메틸티아졸-2-일]-2, 5-디페닐테트라졸리움 브로마이드(MTT), 코발트 프로토포르피린(cobalt protoporphyrin, CoPP), 주석 프로토포르피린(tin protoporphyrin, SnPP), 트립신/이디티에이(trypsin/EDTA) 및 한크씨 염조절 완충용액(Hank's balanced salt solution, HBSS)은 시그마사(Sigma Chemical, St. Louis, MO, U.S.A.)에서 구입하였다. 항 험옥시게나제-1(HO-1; anti-

goat rat HO-1), 항 베타-액틴(anti-goat rat  $\beta$ -actin) 항체 및 2차 항체(horseradish peroxidase anti-goat IgG antibody) 등은 모두 산타크루즈사(Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. 우태아혈청(fetal bovine serum, FBS)은 기브코사(GIBCO Laboratories, Grand Island, NY, U.S.A.)에서 구입하고, 혈소판 유도 성장인자(platelet-derived growth factor, PDGF)는 알앤디 시스템(R&D Systems, Minneapolis, MN, U.S.A.)으로부터 구입하였다. 그 외 모든 용매는 분석등급인 것을 사용하였으며, 머크사(Merck, Darmstadt, Germany)로부터 모두 구입하였다.

### 2. DMC 분리

울금의 덩이뿌리에서 DMC를 추출 및 분리하는 과정을 Fig. 1에 도시하였다.

#### <제1단계, 울금의 덩이뿌리 시료 수집과 조제 및 $\text{CHCl}_3$ 분획 획득>

울금의 덩이뿌리는 한국 전라북도 익산시에 소재한 건재한약판매소에서 구매하여, 동결건조시킨 후에 분말로 만들어 시료로 사용하였다. 시료 600g를 2배(w/v)의 에탄올에 침지한 다음 실온에서 7일간 2회 추출 여과하였다. 그 후, 추출액을 감압농축기(vacuum evaporator)를 이용하여 40°C 이하에서 감압농축하여 추출용매를 제거하고 에탄올 추출물을 얻었다. 유기용매가 갖고 있는 극성을 활용하여 상기 농축액에 함유된 유효성분을 분획하기 위하여 다음의 과정을 실시하였다. 에탄올 추출물 51.6g를 60% 메탄올에 분산시켜 분액여두에 넣고, 동일 분량의 n-헥산을 가하여 상층의 n-헥산층과 하층의 메탄올층으로 분획 추출하는 과정을 각각 3회 반복하였다. 상층 n-헥산층을 제거하고, 하층을 따로 분리한 다음 여기에  $\text{CHCl}_3$ 을 부피의 2배로 첨가하여 3회 분획 추출하여  $\text{CHCl}_3$  층을 감압농축하였다. 이런 방

법으로 36.2 g의 CHCl<sub>3</sub> 분획추출물을 얻었다 (Fig. 1의 Step 1 참조).

<제 2단계, CHCl<sub>3</sub> 분획에서 단일성분 획득 >

CHCl<sub>3</sub> 분획 10g을 취하여 실리카겔 칼럼 크로마토그래피를 실시함으로써 DMC을 분리 및 정제할 수 있었다. 즉, 실리카겔 칼럼 크로마토

그래피(0.063~0.200mm)시 용출용매는 CHCl<sub>3</sub>: 메틸알콜 = 80:1에서부터 메틸알콜의 혼합비를 점차 증가시켜 CHCl<sub>3</sub>: 메틸알콜의 비가 10:1 이 될 때까지 용출시켜 총 10개의 용출분획을 얻고 이들 중에서 7번째 용출분획(0.34g)은 박층크로마토그래피(thin layer chromatography)에서 단일성분으로 확인되었다(Fig. 1의 Step 2 참조).

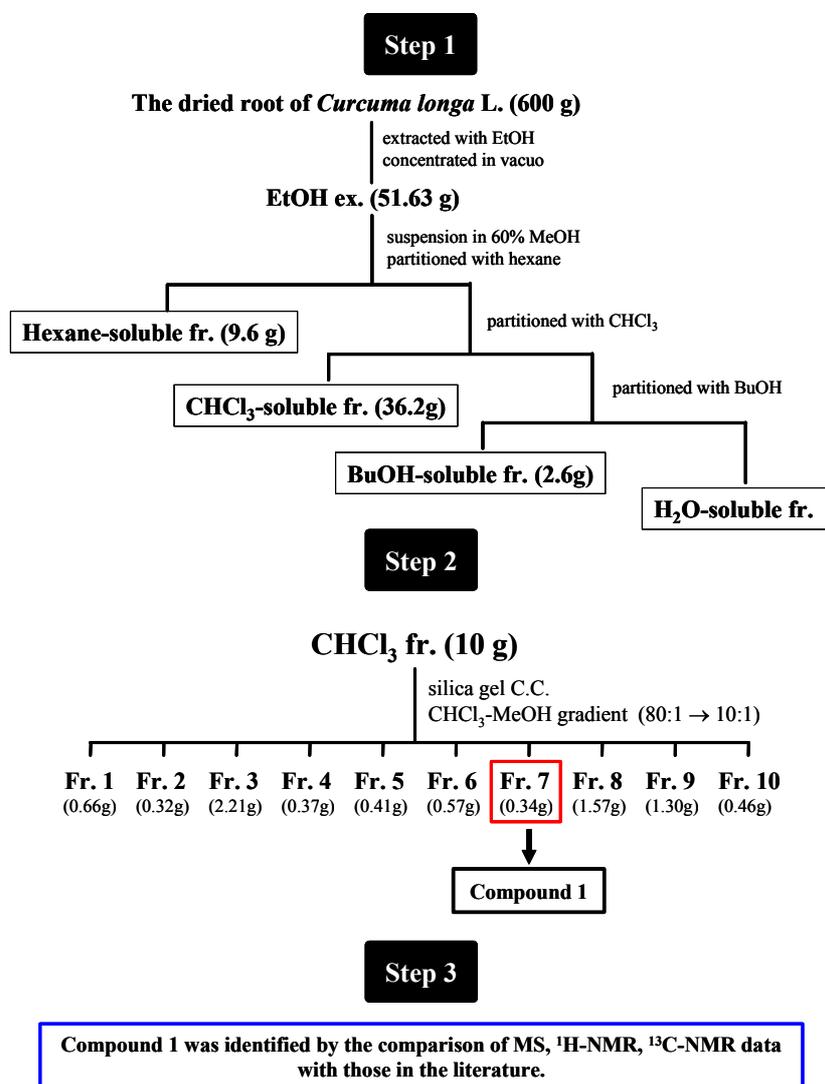


Figure 1. Steps in isolation of demethoxycurcumin from Radix Curcumae

### <제 3단계, DMC 화학구조 확인>

단일성분으로 확인된 7번째 화합물의 화학적 구조를 확인하기 위하여 이 화합물의 물성 및 스펙트럼 분석을 실시하였다. 즉, 핵자기공명스펙트럼(NMR)은 JEOL Eclipse-500MHz 분광계를 이용하여 CDCl<sub>3</sub> 용매 하에서 측정하였으며, 화학적 이동은 상대적으로 상응하는 잔류용매신호를 참조하였다. 또한 질량스펙트럼 분석(MS)을 실시하여 분자량을 얻을 수 있었으며, 분석결과 DMC로 밝혀졌다.

### 3. 혈관평활근세포 분리 및 배양

생후 12주된 스프라규-다우레이 백서의 대동맥을 적출하여 HBSS가 담긴 배양 접시에서 결체 조직을 제거한 후 잘게 썰어 배양 접시 바닥에 부착시킨 다음 50% FBS와 항생제(페니실린 100U/ml, 암포테리신 2.5µg/ml, 스트렙토마이신 100µg/ml)를 포함한 DMEM을 37°C로 미리 데워 2ml 정도 넣고 세포 배양기에서 (5% CO<sub>2</sub>-95% O<sub>2</sub>, 37°C) 하루를 보냈다. 그 후 10% FBS를 포함한 DMEM으로 바꿔 3~4일마다 배지를 교환하였다. 어느 정도 시간이 경과하여 세포가 조직 절편에서 자라 나와서 배양 접시에 밀생상태에 가까워지면 계대 배양하였다. 이차 배양 세포가 밀생상태에 가까워지면 배지를 제거하고 칼슘과 마그네슘이 들어 있지 않은 HBSS로 씻어 주었다. 그 다음 트립신/이디티에이 용액을 배양 접시에 골고루 넣어서 상온에서 세포의 부착 상태가 약해질 때까지 두었다가 트립신/이디티에이 용액을 제거한 후 배양기에 1~2분 정도 넣었다가 꺼내서 10% FBS 배지를 넣어 주었다. 이 때 세포의 수를 확인하여 적당한 희석 배수로 희석시켜 새로운 배양접시로 옮겨 주었다. 본 실험에서는 4~6계대 배양한 세포를 사용하였다.

### 4. 웨스턴 블로팅 분석(Western blotting analysis)

HO-1 단백질의 발현 또는 총 단백질 수준을 분석하기 위하여, 배양한 세포를 0°C 이하 인산염완충식염수(8.0g/l NaCl, 0.2g/l KCl, 1.44g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.24g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4)로 2회 세척한 다음, 라이시스 완충용액(lysis buffer; 50mM Tris-HCl(50mM), 1% NP-40, 0.25% Na-deoxycholate, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 1mM PMSF, µg/ml aprotinin, 1µg/ml leupeptin, 1µg/ml pepstatin, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1mM NaF, pH 7.4)으로 세포를 분쇄하였다. 세포 분쇄액은 4°C에서 15,000rpm(Micro 17R, 한일과학, 한국)으로 20분간 원침한 후에, 상층액을 4배의 SDS 시료 완충용액(sample buffer)으로 혼합하고 5분간 끓인 다음, 단백질량을 정량하였다. 단백질량의 정량은 먼저 Bradford reagent를 1:5의 비율로 증류수에 희석하여 working solution을 만들고, BSA standard를 준비한다(1mg, 2mg, 4mg, 6mg, 8mg, 10mg, 12mg, 14mg, 16mg, 18mg, 20mg). 그 다음 1ml Bradford reagent working solution에 BSA standard를 넣어주고 5분간 상온에 방치한 후 spectrophotometer를 이용하여 595nm에서 흡광도를 측정한다. Spectrophotometer에서 제공하는 자체 내장 프로그램을 이용하여 regression curve를 작성한다. 다음 시료단백질을 같은 방법으로 처리하여 상기에서 얻은 standard curve로부터 단백질량을 도출한다. 상기와 같이 단백질을 정량한 다음 동일한량의 단백을 취하여, 8% SDS-PAGE 겔에 적하하였다. 전기영동 후, 분리된 단백질을 나일론 막에 옮겼다. 전기영동 조건은 sample loading buffer(125mM Tris-HCl, pH 6.8, 20% Glycerol, 2% beta-mecaptoethanol, 0.04% bromophenol Blue, 4% SDS)와 running buffer(0.025M Tris-HCl(pH 8.3), 0.192M Glycine, 0.1% SDS) 존재하에서 정

전압 100V로 1시간 동안 전기영동하였다. 한편 transfer buffer(3.03g/L Trisma-base, 14.4g/L Glycine, 20% methanol) 존재하에서 정전압 100V로 1시간 동안 겔의 단백질을 나일론 막으로 이동시켰다. 이후에 나일론 막을 5% 탈지유(skim milk)로 1시간 동안 반응시켜 비특이적 결합을 저해하고, 수세하여 완충용액으로 희석한 1차 항체(anti-HO-1 antibody)를 4°C에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 남은 1차 항체를 제거한 다음, 발광 표지가 붙은 2차 항체로 2분 동안 실온에서 반응시켰다. 밴드 확인은 완충용액으로 세척한 후, 검출 시약(enhanced chemiluminescence(ECL) 용액; 이 용액은 peroxidase의 기질인 luminol이 peroxidase에 의해 산화되면서 푸른색 빛을 내는 것으로 X-선 필름을 감광시킨다)으로 반응시킨 다음 X-선 필름으로 확인하였다.

#### 5. 실험동물(in vivo)에서 경동맥 손상 모형

백서에 케타민(ketamine) 50 mg/kg과 자라진(xylazine) 6.7mg/kg을 복강에 투여하여 마취시킨 후, 우측 경부를 절개하여 총경동맥, 외경동맥 및 내경동맥을 분리하였다. 미세혈관 클램프(Microvascular clamp, Acland, S&T, Switzerland)를 총경동맥의 기시부와 내경동맥의 원위부에 착용시켜 혈류를 일시적으로 중단시킨 상태에서 외경동맥을 절개하였다. 절개부위에 2F-형 풍선도자(Fogarty catheter, Baxter Healthcare Corporation, U.S.A.)를 우측 총경동맥으로 삽입하고, 총경동맥의 직경보다 크게 풍선을 부풀린 상태에서 3회를 왕복시켜 인위적으로 혈관내피세포를 제거한 다음 미세혈관 클램프를 제거하여 혈류를 재관류시켰다. 경동맥의 외부에 분비물 및 혈액을 깨끗이 제거한 후, 도포하기 위해 미리 준비된 DMC-플루로닉 겔(pluronic gel)과 DMC이 포함되지 않는

플루로닉 겔을 대조군과 DMC 치료군에 순서를 번갈아가며 각 실험동물의 경동맥 윗부분에 18게이지의 끝부분을 마모시킨 주사바늘(blunted needle)을 가진 주사기를 이용하여 100  $\mu$ L씩 고르게 도포한 다음 절개부위를 봉합하였다. 수술로 노출되어 도포가 가능한 경동맥 부위는 원위부 1.5cm 가량이며, 근위부는 흉곽내에 위치하므로 도포가 불가능하다. 이러한 일련의 시술과정에서 시술자는 대조군과 DMC 치료군을 사전에 전혀 알지 못하도록 하는 맹검법을 이용하여 실시가 이루어졌다.

#### 6. 조직염색 및 혈관내막의 상대적 두께 측정

실험동물에서 얻은 표본은 자일렌과 에탄올의 순차적 농도조절 방법으로 탈수하고 파라핀에 포매하였다. 박절기로 5 $\mu$ m 크기 단면적으로 자르고, 헤마톡실린과 에오신 염료로 표본 조직 염색을 수행하였다. 혈관을 중심으로 상하측과 좌우측 4부위에서 속막, 중간막 및 바깥막의 두께와 관의 직경을 측정하고 평균치를 취하여 각 군간의 바깥막, 중간막 및 속막 두께의 차이와 관의 크기를 비교하였다. 각 측정치는 평균과 표준편차를 구하고 정상군과 대조군, 대조군과 치료군 사이의 각 층별 두께의 차이와 전체 동맥벽 두께의 차이를 통계학적으로 유의성 검정을 실시하였다.

#### 7. 유의성 검증

유의성 검정은 독립표본 T-검정(Student's t-test) 혹은 일원배치 분산분석(one way ANOVA)을 이용하였다.

## 2. 혈관평활근세포에서 세포증식 억제효과

### III. 結果

#### 1. 혈관평활근세포에서 HO-1 발현효과

혈관평활근세포를 분리하고 10% FBS 및 DMEM 배지로 배양한 다음,  $6 \times 10^6$  cells/ml 농도의 혈관평활근세포를 6칸-접시(6-well dishes)에 다시 분주하고 10% FBS 및 DMEM 배지를 첨가하여 12시간 동안 안정화시키고 DMC를 5, 10, 15 및 20 $\mu$ g/ml 농도로 12시간 처리하였다. 또한, HO-1을 유도하는 활성을 가진 CoPP를 상기와 같은 방법으로 처리하여 양성 대조군(positive control)으로 보았다. 이후에 세포를 회수하여 웨스턴 블로팅 분석을 실시하였으며, HO-1 발현 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 총 단백질 적재 양을 보여주는 액틴(actin) 발현과 CoPP에 의한 HO-1 발현을 대조하여 HO-1 발현 정도를 분석한 결과, DMC 처리한 경우에 HO-1을 농도 의존적으로 발현시켰다(Fig. 2). 이와 같은 검증은 총 3번 실시하였으며 매번 실시 결과는 동일하였다. Fig. 2에 나타난 결과는 3번 중에 한번을 나타낸 것이다. 이 결과로부터 DMC의 농도에 의존하여 HO-1 발현이 증가함을 알 수 있었다.

혈관평활근세포를 분리하고 10% FBS 및 DMEM 배지로 배양한 다음,  $1 \times 10^5$  cells/ml 농도의 혈관평활근세포를 12칸-접시(12-well dishe)에 다시 분주하고 10% FBS 및 DMEM 배지를 첨가하여 12시간 동안 안정화시키고 DMC를 5, 10, 15 및 20 $\mu$ g/ml 농도로 12시간 처리한 후 배지를 신선한 DMEM 배지로 전환하였다. 여기에 5% FBS를 첨가하고 10ng/ml 농도의 PDGF를 모든 칸에 처리하여 24시간동안 혈관평활근세포의 과다 증식을 유도하였다. 이 때, HO-1의 역할을 규명하기 위하여 HO-1 활성을 차단하는 10 $\mu$ g/ml 농도의 SnPP를 처리하여 비교하였다. 24시간이 지난 다음에 신선한 DMEM 배지로 다시 전환하고, 50mg/ml 농도의 MTT를 4시간 첨가하여 상대적인 세포증식 정도를 측정하였으며, 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3의 결과에 의하면, DMC는 농도 의존적으로 혈관평활근세포의 과다증식을 억제시켰고( $p < 0.01$ ), 이러한 과다증식의 억제효과는 DMC에 의한 HO-1 발현과 밀접한 관계가 있었다( $p < 0.01$ ). 그 이유는 HO-1 효소 활성을 차단하는 SnPP를 처리한 결과 DMC의 혈관평활근세포의 과다증식 억제활성이 유의하게 감소하였기 때문이다.

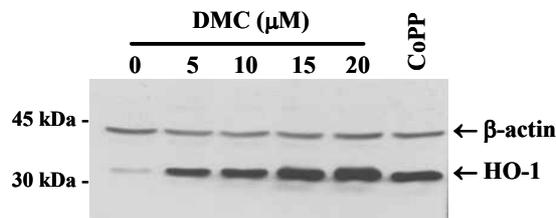


Figure 2. Effects of demethoxycurcumin(DMC) on HO-1 expression in rat vascular smooth muscle cells. The cells were incubated with indicated doses of DMC for 6 hrs, and HO-1 expression was determined by Western blotting analysis.

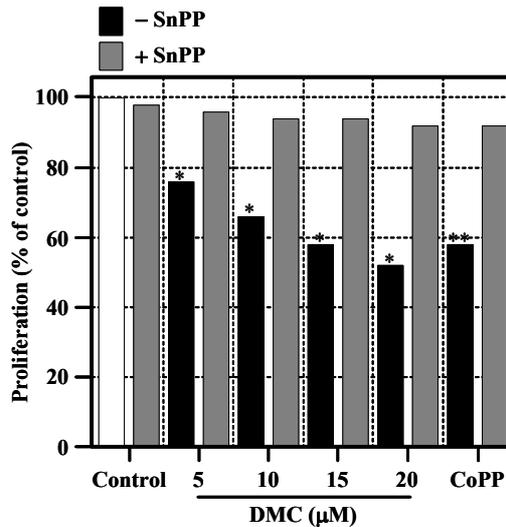


Figure 3. Effects of demethoxycurcumin(DMC) on cellular proliferation in rat vascular smooth muscle cells. The cells were pre-incubated with indicated doses of DMC or 20 μM of CoPP for 12 hrs, washed 3 times with flash media, further incubated for 24 hrs in the presence of PDGF, and cellular proliferation was determined by MTT assay. Results were expressed as the mean for 6 independent experiments. Asterisks show a significant difference from control: \*, indicates  $p < 0.01$ ; \*\*, indicates  $p < 0.01$ .

### 3. 신생혈관 내막 과다증식 억제효과

40% 플루로닉 겔(pluronic gel)에 DMC 10μg을 포함하도록 만들어, 백서경동맥을 혈관성형 수술 직후 혈관외벽에 국소 도포하여 신생내막의 과다증식을 억제하는 효과를 평가하였다. 경동맥 혈관에 풍선손상을 유발한 다음, 약물치료군(n=12)에는 DMC 10μg이 포함된 플루로닉 겔을, 혈관손상 대조군(n=11)에는 DMC를 함유하지 않는 플루로닉 겔을 혈관외벽에 각각 국소도포하였다. 실험의 실효성을 검증하기 위해서 10μg paclitaxel을 DMC 처리와 동일하게 하여 참고 대조군으로 활용하였다. 한편, DMC에 의한 예측되는 효과가 HO-1 활성화와 관련이 있는지 조사하기 위하여 HO-1 활성화 저해제를 10μg SnPP를 약물에 혼합하여

처리하였다. 경동맥에 풍선확장 손상을 가한 14일째에는 병리조직학적 검사를 시행하여 두군의 경동맥의 형태조직학적 분석을 시행하였다. 검사결과는 Fig. 4, Fig. 5 및 Fig. 6에 나타내었다. Fig. 4의 결과에서, 혈관손상 후에 DMC의 약물을 처리한 군(n=12)의 신생내막의 면적은  $0.10 \pm 0.05\text{mm}^2$ , 혈관손상 대조군(n=11)은  $0.21 \pm 0.05\text{mm}^2$ 으로 약물처리군에서 신생내막의 형성이 의미 있게 감소하였다 ( $p < 0.05$ ). Fig. 5의 결과에서, 참고 대조군(n=5)과 DMC 처리군과는 큰 차이가 없었다. SnPP 처리군(n=5)과 처리하지 않은 군과 비교에서 DMC에 의한 신생내막 과다증식 억제활성은 HO-1 활성화와 관련이 있음을 알 수 있었다 ( $p < 0.05$ ). 조직검사소견상 도포된 디메톡시큐민은 매우 국소적으로 신생내막의 형성을 억제하였다. DMC 10μg 약물처리군(n=12)에서는

길인호 외 5인 :鬱金에서 분리된 demethoxycurcumin이 백서의 혈관재협착에 미치는 효과

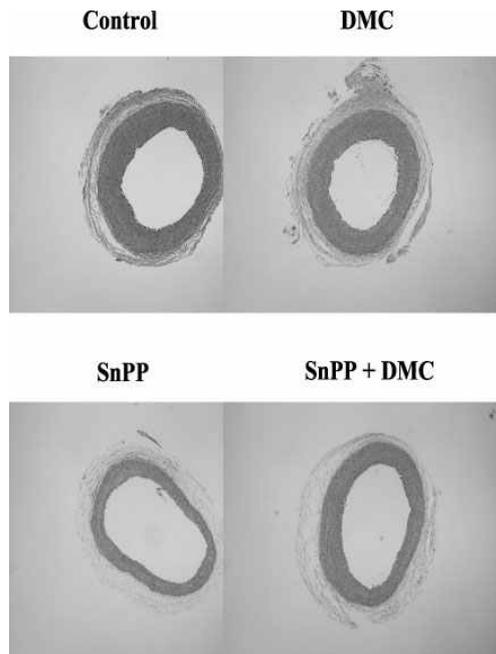


Figure 4. Representative photomicrographs of balloon-injured, perfusion-fixed, and left carotid arteries 14 days after injury. demethoxycurcumin(DMC)-treated arteries exhibit significant reduction of neointima formation compared with vehicle-treated arteries. SnPP treatment reversed DMC effect. 10 $\mu$ g of DMC, 10 $\mu$ g of SnPP, or DMC in combination with SnPP were used (for details see the test).

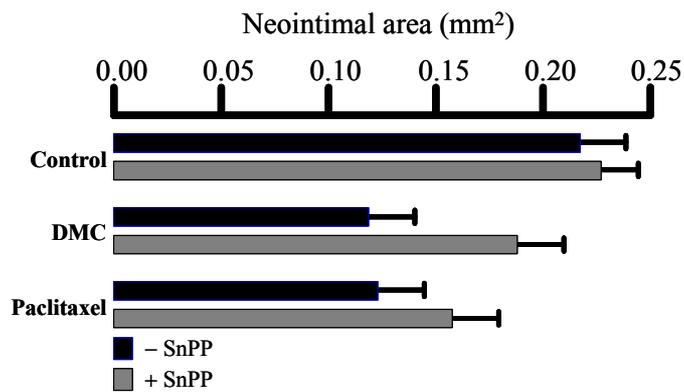


Figure 5. Demethoxycurcumin(DMC) and paclitaxel suppressed neointimal hyperplasia associated with balloon injury. The carotid arteries were treated with DMC(10 $\mu$ g) alone or in combination of SnPP(10 $\mu$ M) and, as positive control, with paclitaxel(1 $\mu$ g) alone or in combination of SnPP(10 $\mu$ g).

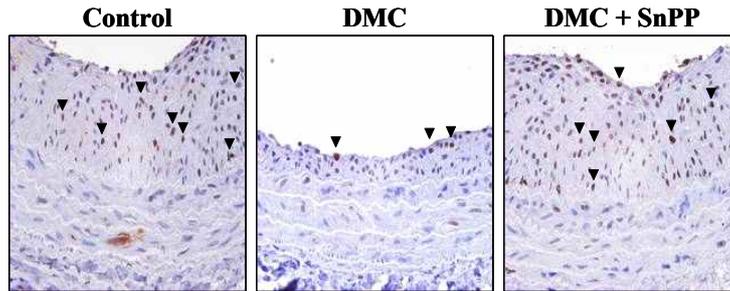


Figure 6. Demethoxycurcumin(DMC) suppressed VSMC proliferation induced by balloon injury. The carotid arteries were treated with DMC(10 $\mu$ g) alone or in combination of SnPP (10 $\mu$ M). Tissue sections were examined 2 weeks after balloon injury. The symbol ▼ indicates VSMC.

심각한 독성효과가 나타나지 않았다. Fig. 6에 의하면 DMC에 의한 신생내막 억제효과는 혈관평활근세포의 과다 증식억제와 관련이 있으며, 이 효과는 HO-1 활성화와 관련이 있음을 알 수 있었다.

#### IV. 考 察

鬱金은 生薑科에 속한 다년생 草本인 울금의 塊根으로서 玉金, 乙金, 蔚金, 深黃이라고도 하며, 性味는 辛·苦, 寒 無毒하고 心·膽·肝 三經에 작용하는데, 活血止痛, 行氣解鬱, 清心涼血, 疏肝利膽 등의 효능이 있어 胸腹脇肋諸痛, 婦女痛經, 經閉, 癥瘕結塊, 熱病神昏, 癲狂, 驚癇, 吐血, 衄血, 血淋, 砂淋, 黃疸 등을 치료한다고 알려져 있다.<sup>5, 30)</sup>

鬱金の 效能에 관한 研究로서 Jentzsch와 Höller<sup>17)</sup>는 鬱金の 주성분인 curcumin이 璜귀에서 利膽作用을, Ramprasad와 Sirsi<sup>18, 19)</sup>는 sodium curcumat와 精油가 抗菌作用을 나타냄을 報告한 바 있으며, Robbers<sup>20)</sup>는 curcumin 誘導體의 膽汁排泄 推進效果와 膽管收縮作用과 脂質代謝에 미치는 影響 등에 관하여 究明되는 등 curcumin과 精油를 분리하여 방향성 건위약,

이뇨약, 해열약, 소화제, 급만성 담낭염 치료약, 담도염약, 카타르성 황달약, 담석증, 급성 간염약 등에 사용되고 있다.<sup>10-14)</sup>

以上과 같이 鬱金이 廣範圍하게 사용되고 있음은 잘 알려져 있으며, 鬱金の 成分으로는 薑黃色素로서 curcumin이 0.3%~4.8%, 精油 1~5%, 澱粉 30~40%와 소량의 脂肪油 등이며 精油의 主成分으로 turmerone 등이 究明되어 있다.<sup>21, 31)</sup> 鬱金の 成分에 관한 研究로서 Kelkar와 Sanjiva<sup>22)</sup>는 精油를 처음으로 分離하였고, Khaliq<sup>23)</sup>는 黃色色素인 1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione을 確認한 바 있으며, Janaki와 Bose<sup>24)</sup>는 鬱金에서 curcumin의 分離方法을 밝힌 바 있다.

최근 급격히 증가하고 있는 협심증, 심근경색증 등 관상동맥 질환의 치료는 지난 10년간 괄목할 만한 발전을 이루어 왔다. 약물치료 이외에 수술적 방법으로 좁아진 혈관 부위를 이어 붙이는 관동맥 우회로술과 그물망 형태의 스텐트(stent) 삽입 시술 등의 여러 치료법이 개발하여 동맥경화증으로 관상동맥이 좁아져 고통을 받는 환자들에게 희망을 주고 있으며, 심장질환의 치료에 새로운 전기가 되었다.

관상동맥 확장성형술은 비수술적인 방법으로 좁아진 혈관에 대한 근본적인 치료가 가능

하고, 협심증의 증상 완화에 효과적이며 항협심증 약물의 복용을 줄이거나 하지 않아도 된다는 장점이 있으나 혈관재협착(restenosis)이 문제로 제기되었다.<sup>4)</sup>

이러한 혈관재협착 방지를 위하여 스텐트 삽입 등의 기술발전과 약물요법, 유전자요법 등이 시도되고 있으나 아직까지 관상동맥중재시술 또는 스텐트시술 후 발생하는 혈관재협착은 여전히 문제점으로 남아 있다.<sup>25)</sup>

약물치료로는 협착부위를 근본적으로 해결할 수 없으며, 지속적으로 항협심증 약물을 복용해야 하고 약물치료에 한계가 있어서 약을 복용해도 계속 협심증에 의한 흉통이 있을 수 있다. 이에 반하여 관상동맥 확장성형술은 비수술적인 방법으로 좁아진 혈관에 대한 근본적인 치료가 가능하고, 협심증의 증상 완화에 효과적이며 항협심증 약물을 복용하지 않거나 줄여도 된다는 장점이 있다.

동맥경화에 의한 관상동맥의 협착은 수년에 걸쳐 서서히 일어나는 반면, 혈관재협착은 관상동맥의 확장에 의해 혈관벽 내부에서 일어나는 여러 가지 분자생물학적 및 세포생물학적 연쇄반응의 결과로 불과 수주에서 수개월 내에 발생하게 된다. 따라서 혈관재협착의 병태생리학적 특징은 일반적인 동맥경화의 발생과는 차이가 있으며, 관상동맥중재시술 과정에서 혈관벽에 인위적인 기계적 손상이 가해지고 이에 대한 자연적인 치유과정으로써 수많은 혈관활성 물질, 혈전생성 물질 및 분열촉진 물질이 분비되어 격렬한 세포반응이 일어나는 것이다. 그 결과 신생혈관내막 과다증식(neointimal hyperplasia)이 일어나면서 혈관 내강이 좁아져 결국에는 상하좌우 혈관의 재협착이 발생한다. 최근 관련 연구에 따르면 대부분의 신생혈관내막 과다증식은 다음과 같은 중요한 두 단계로 이루어진다.<sup>4)</sup>

제 1단계는 염증반응기(inflammation phase)로, 풍선성형시술 또는 스텐트 삽입에 의하여

손상을 받은 혈관은 치유과정으로서 국소적인 혈전형성을 일으키고, 이에 따라 염증세포가 혈관내피에 침윤을 활발하게 일으키게 된다. 시술 후 3~7일 사이에 염증세포들의 침윤이 주로 일어난다. 제2단계는 세포증식기(proliferative phase)로, 침윤된 염증세포가 혈관평활근세포를 자극하여 세포증식을 과다하게 유발하며, 주로 시술 후 1주일 후부터 발생하게 된다. 따라서 효과적으로 혈관재협착을 방지하기 위해서는 전술한 두 단계 중에서 적어도 어느 한 단계에 효과가 있어야 한다. 현재 혈관재협착 방지에 사용되는 약물인 면역억제제 시로리무스(sirolimus [rapamycin])는 전술한 제 1단계에 가장 큰 효과가 있고, 다른 약물인 항암제 택솔(taxol [paclitaxel])은 전술한 제 2단계에 가장 큰 효과가 있다.<sup>26)</sup>

최근 혈관재협착의 원인으로 작용하는 혈관평활근세포의 과다증식과 신생혈관내막의 비정상적인 증식을 효율적으로 차단하는 생체단백질 분자인 HO-1이 발견되어, 이것을 이용한 혈관재협착 방지용 약물의 개발이 기대된다. HO-1은 혈관 등이 손상을 받을 경우에 신속하게 손상된 부위를 복구하고, 손상에 의한 염증을 적절한 시기에 종결시키는 세포보호 및 염증차단 단백질이다. 이렇게 발현된 HO-1은 염증유발 물질인 산화성 핵을 분해하여 제거하고, 분해산물로 빌리루빈, 철 이온 및 일산화탄소를 생성한다. 이렇게 생성된 빌리루빈 및 일산화탄소는 혈관평활근세포를 자극하여 혈관평활근세포의 과다증식을 억제한다. 반면, 이것들은 혈관내피세포를 자극하여 혈관내피세포가 관여하는 염증반응을 차단하고, 혈관내피세포의 적절한 증식을 유도한다. 종합적으로, 손상된 혈관부위에 있어서 HO-1 발현 및 이것에 의한 분해산물은 혈관평활근세포의 과다증식을 억제하고 동시에 혈관내피세포의 증식을 유도하여 혈관의 재협착을 유발하는 신생혈관내막 증식을 효과적으로 차단한다. 따라서

HO-1 발현을 유도할 수 있는 약물 또는 HO-1 분해산물은 혈관재협착 방지에 사용될 수 있을 것이다.<sup>27)</sup>

본 연구는 천연 식물자원에서 독성이 없는 혈관재협착 방지 활성물질을 개발하기 위하여 연구한 결과, 鬱金에서 혈관재협착 방지 효과가 우수한 demethoxycurcumin을 분리할 수 있었다. 鬱金の 건조된 塊根 분말가루를 에탄올로 추출하고 그것을 다시 CHCl<sub>3</sub> 추출용매를 사용하여 분획한 여러 가지 분획추출물을 획득하였고, 이것을 다시 실리카겔 칼럼 크로마토그래피를 실시하여 화학식 1로 표현되는 demethoxycurcumin을 분리하였다. 이 활성물질이 HO-1 발현과 혈관평활근세포의 세포증식 억제 활성을 가짐으로써 신생혈관내막의 과다증식을 차단하는 활성을 제공하여 혈관재협착을 방지할 수 있음을 확인할 수 있었다.

鬱金の 塊根에는 혈액순환을 촉진시키고 瘀血을 제거하여 혈류의 흐름을 개선하여 혈관을 보호하는 효과가 있다.<sup>15)</sup> 鬱金の 塊根에는 다양한 생물활성 성분이 함유되어 있는데, 이들 중에서 커큐민(curcumin)과 demethoxycurcumin은 인간이 음식에 첨가하여 사용할 수 있을 정도로 독성이 없다.<sup>28)</sup> Demethoxycurcumin의 화학적 구조에 있어서 커큐민의 화학적 구조와 다소 유사한 점이 있지만, 이들이 나타내는 생물학적 활성은 크게 다르다.<sup>29)</sup>

본 연구에서는 생물활성 검정 결과를 통하여 혈관평활근세포에서 HO-1을 발현하여 세포증식 억제 활성이 우수한 것으로 입증된 분획에 함유된 화합물이 화학식 1로 표현되는 demethoxycurcumin을 밝혔다. 실험동물을 이용한 생물활성 검정 결과, demethoxycurcumin은 풍선 카테터를 이용한 백서 경동맥 손상 모형에서 신생혈관내막의 과다증식(neointimal hyperplasia)을 억제하는 활성이 우수하였다.

Demethoxycurcumin의 상기 활성은 풍선성형시술 또는 스텐트 삽입 등에 의한 혈관손상

으로 신생혈관내막 과다증식이 나타나고 그 결과로 혈관 내강이 좁아져 중국에는 혈관재협착이 발생하는 질환을 방지하는 치료제로 사용할 수 있음을 의미한다. 따라서 본 연구에 따른 화합물 demethoxycurcumin은 혈관재협착 방지에 유효성분으로 사용될 수 있다고 사료된다.

## V. 結 論

화학식 1로 표현되는 demethoxycurcumin(DMC)을 유효성분으로 함유하는 혈관재협착 방지용 약물에 대하여 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

- 1) DMC는 혈관평활근세포에서 HO-1의 발현을 유도한다.
- 2) DMC는 혈관평활근세포의 세포증식을 차단한다.
- 3) DMC는 신생내막의 과다증식 억제한다.
- 4) DMC의 신생내막 과다증식 억제효과는 DMC의 혈관평활근세포 증식억제와 관련이 있었다.
- 5) DMC의 신생내막의 과다증식 억제효과와 혈관평활근 증식억제 효과는 HO-1 활성과 관계가 있었다.

본 연구 결과는 DMC에 의한 혈관재협착 방지용 약물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 HO-1 발현에 의한 혈관평활근세포의 세포증식을 억제하고 이를 통하여 신생혈관내막의 과다증식을 차단하는 활성을 제공함으로써 혈관재협착을 방지할 수 있을 것이다.

## 감사의 글

이 논문은 원광대학교 2007년도 교내연구비

의 지원에 의해 수행됨.

### 參考文獻

- 1) 정우열, 안규석 : 한방임상병리학, 서울, 영림사, 1998, pp.437-454.
- 2) 김광호 편저 : 예방한의학(하), 서울, 서원당, 2001, p.858.
- 3) Chainani-Wu, N. : Safety and anti-inflammatory activity of curcumin : a component of tumeric (*Curcuma longa*). *J. Altern. Complement Med.* 2003 ; 9(1) : 161-168.
- 4) Tung, R., Kaul, S., Diamond, G. A., Shah, P. K. : Narrative review : drug-eluting stents for the management of restenosis : a critical appraisal of the evidence. *Ann. Intern. Med.* 2006 ; 144(12) : 913-919.
- 5) 신민교 : 임상본초학, 서울, 영림사, 1997, pp.468-469.
- 6) 조유경, 유봉하, 김병우, 윤상협, 김진성, 유기원 : 鬱金이 위암세포에 미치는 영향, 대한한방중양학회지, 2003 ; 9(1) : 15-38.
- 7) 성희근, 최승훈, 안규석 : 鬱金이 Angiogenesis 억제기전에 미치는 영향, 대한동의학학회지, 1999 ; 13(2) : 66-78.
- 8) 강우석, 김정한, 박은주, 윤광로 : 鬱金 에탄올 추출물의 항산화활성 비교, 한국식품과학회지, 1998 ; 30(2) : 266-271.
- 9) 박용기 : 葛花와 鬱金 및 苦參의 항산화작용에 관한 비교연구. 대한본초학회지, 2001 ; 16(1) : 41-53.
- 10) Zhang, W. X., Hu, H. F., Li, W. G., Zhou, Z. T. : Intercepting effects of seven Chinese herb drugs on experimental oral carcinogenesis, *Shanghai Kou Qiang Yi Xue*, 2004 ; 13(1) : 34-37.
- 11) Xiao, X., Zhao, Y., Yuan, H., Xia, W., Zhao, J., Wang, X. : Study on the effect of *Rhizoma Curcuma Longa* on gastrin receptor, *Zhong Yao Cai*, 2002 ; 25(3) : 184-185.
- 12) Irie, Y., Keung, W. M. : *Rhizoma acori graminei* and its active principles protect PC-12 cells from the toxic effect of amyloid-beta peptide, *Brain Res.*, 2003 ; 963(1-2) : 282-289.
- 13) Xie, F., Li, X., Sun, K., Chu, Y., Cao, H., Chen, N., Wang, W., Liu, M., Liu, W., Mao, D. : An experimental study on drugs for improving blood circulation and removing blood stasis in treating mild chronic hepatic damage., *J. Tradit. Chin. Med.*, 2001 ; 21(3) : 225-231.
- 14) Matzkies, F., Webs, B. : Effect of a plant extract combination preparation on gastrointestinal transit time and bile acid excretion, *Fortschr. Med.*, 1983 ; 101(27-28) : 1304-1306.
- 15) 김형균, 김형민, 송봉근, 이연정, 정현택 : 한약의 약리, 서울, 고려의학, 2000, pp.234-235.
- 16) Maheshwari, R. K., Singh, A. K., Gaddipati, J., Srimal, R. C. : Multiple biological activities of curcumin. *Life Science*. 2006 ; 78(18) : 2081-2087.
- 17) Jentzsch, K., Höller, H. : Paper chromatography and pharmacologic action of the Pigments of *Curcuma* *Pharm. Acta Helv.* 1959 ; 34 ; 181 53;17324, 1959.
- 18) Ramprasad, C., Sirsi, M. : *Crcuma longa* ; in vitro antibacterial activity of curcumin and the essential oil, *J. Sci. Ind. Research (India)*, 15C ; 239(1956). C.A.(1957) 51 ; 7057.
- 19) Ramprasad, C., Sirsi, M. : *Crcuma longa* and bile secretion; quantitative changes

- in the bile constituents induced by sodium curcumin, J. Sci. Ind. Research (India), 16C; 108(1957). C.A.(1957) 51; 7057.
- 20) Robbers, H. : The effect of some Curcuma derivatives on biliary secretion, Arch. Exptl. Path. Pharmacol., 1936; 181: 328. C.A. 1936; 30: 6822.
- 21) 刈米達夫, 木村雄四郎 : 和漢藥用植物, 廣川書店, 日本, 1968, pp.366-367.
- 22) Kelkar, N. C., Sanjiva Rao, B. : Essential oil from the rhizomes of curcuma longa L. J. Indian Inst. Sci.(India) 17A; 7(1933). C.A.(1934) 28; 3523.
- 23) Khaliq, A., Amin, M. N. : Constituents of the rhizome of curcuma longa L., Sci. Res., Pakistan, 1967; 4(4): 193.
- 24) Janaki, N., Bose, J. L. : An improved method for the isolation of curcumin from turmeric(Curcuma longa), J. Indian Chem. Soc., 44(11); 985. C.A.(1968) 68; 46988, 1967.
- 25) Radke, P. W., et al. : Outcome after treatment of coronary in-stent restenosis; results from a systematic review using meta-analysis techniques. Eur. Heart J. 2003; 24(3): 266-273.
- 26) Wessely, R., et al. Sirolimus and paclitaxel on polymer-based drug-eluting stents: similar but different. J. Am. Coll. Cardiol. 2006; 47(4): 708-714.
- 27) Tulis, D. A, et al. : Adenovirus-mediated heme oxygenase-1 gene delivery inhibits injury-induced vascular neointima formation. Circulation. 2001; 104(22): 2710-2715.
- 28) Schwartz, R. S., Chronos, N. A., Virmani, R. : Preclinical restenosis models and drug-eluting stents: still important, still much to learn. J. Am. Coll. Cardiol. 2004; 44(7): 1373-1385.
- 29) Song, E. K., et al. : Diarylheptanoids with free radical scavenging and hepatoprotective activity in vitro from Curcuma longa. Planta Med. 2001; 67(9): 876-877.
- 30) 國家中醫藥管理局 : 中華本草 8卷, 上海, 上海科學技術出版社, 1999, pp.637-643.
- 31) 강소신의학원 원저, 김창민, 신민교, 이경순, 안덕균 역 : 중약대사전, 서울, 정담, 1998, pp.4236-4242.
- 32) Syu, W. J., Shen, C. C., Don, M. J., Ou, J. C., Lee, G. H, Sun, C. M. : Cytotoxicity of curcuminoids and some novel compounds from Curcuma zedoaria. J. Nat. Prod. 1998; 61(12): 1531-1534.