

HMC05의 혈관이완 활성화와 신호전달 작용기전

문국진 · 장효일 · 김길현 · 신흥묵*

동국대학교 한의과대학 생리학교실

Signaling Mechanisms on the Vascular Relaxation of HMC05

Kug Jin Moon, Hyo Oil Jang, Gil When Kim, Heung Mook Shin*

Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Dongguk University

This study investigated the signaling mechanisms contributed to the vasodilatory effects of HMC05, a herbal prescription. HMC05 acted in an endothelium-independent manner. To elucidate the fundamental mechanisms of its vascular actions, we focused on the signaling molecules involved in actin-myosin filament regulation including 20 kDa myosin light chains (LC20), Rho-associated kinase (ROCK), PKC, JNK and extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) in the endothelium-denuded thoracic aorta or isolated smooth muscle cells (SMCs). It lowered the phosphorylation level of LC20 and showed that ROCK, ERK, JNK and PKC α pathways played important roles in the effects, as confirmed by the observations with a specific inhibition or activation, and with the activity and the subcellular localization of these molecules. In particular, HMC05 dramatically inhibited the activity of ERK and the downstream signaling of ROCK. It also changed the subcellular localization of the phosphorylated PKC α as well as the amount of phosphorylation. Taken together, these data indicate that the vascular relaxation effects of HMC05 are attributed to the regulation of these signaling mechanisms.

Key words : HMC05, vascular relaxation, signaling mechanisms

서 론

고혈압은 한의학에서 頭痛, 眩暈, 肝陽上亢 등의 범주로 분류된다.¹⁻⁴⁾ 고혈압은 뇌졸중, 동맥경화를 포함한 심혈관 질환 및 심부전, 콩팥질환 등 각종 성인병을 유발하는 요인이 되므로 근본적인 치료의 중요성이 부각되고 있다. 사회적으로도 국내 30세 이상의 성인 남성의 34.4%, 여성의 26.5% 이상이 고혈압에 이환되는 것으로 나탄 의료 및 사회적 비용의 부담을 증가시키고 있다. 그러나, Ca²⁺ channel 길항제, Angiotension converting enzyme (ACE) 저해제, 안지오텐신 수용체 길항제 (ARB), α_1 , β -차단제 및 이뇨제 등의 고혈압 치료제는 피로, 부종, 두통, 변비, 마른기침 및 발기부전 등의 부작용으로 인해 새로운 약리작용점의 개발 및 한방치료기술의 개발 필요성이 요구되고 있는 실정이다.

HMC05는 Clinical Handbook of Internal Medicine⁵⁾에 수록된 半夏白朮天麻湯의 처방을 기본으로 혈관 동력학 조절에 대한

연구를 통해 최적의 조성비율을 개발하여⁶⁾ 심혈관질환의 치료를 목표로 구성된 처방으로 특히 등록을 통해 HMC05로 명명하였다. 半夏白朮天麻湯은 足太陰의 痰厥頭痛을 主治로 한 방제로 脾胃內傷으로 인한 頭痛如裂, 身重如山, 惡心煩悶, 四肢厥冷, 嘔吐, 眩暈 증상에 처방하며^{7,8)}, 그 除濕化痰의 효능으로 최근 痰濕의 阻滯로 인한 고혈압, 동맥경화 및 뇌혈관질환의 예방과 치료에도 범용되고 있다. 半夏白朮天麻湯의 실험적 연구로는 鎮痛, 鎮靜 및 장관이완 효과를 비롯하여⁹⁾ protein kinase C (PKC) 억제와 nitric oxide (NO)의 생성을 통한 혈관이완활성의 연구에서 고혈압 치료제로서의 가능성이 보고된 바 있다¹⁰⁾.

한편, 혈관 평활근세포는 내피세포와 함께 혈관을 구성하는 주세포로서 혈관의 수축이완을 직접적으로 조절하는 것으로 알려져 있다. 이에 관련된 신호조절 경로로서는 크게 thick (Myosin) filament regulation과 thin (Actin) filament regulation으로 설명될 수 있다¹¹⁾. Thick filament regulation은 20 kDa Myosin light chains (LC20)의 인산화를 조절하는 Myosin light chain phosphatase (MLCP) 및 Myosin light chain kinase (MLCK)의 경로로서 Ca²⁺ activation 및 sensitization 과정을 모두 포함하며, thin filament regulation은 Caldesmon (CaD)의 인

* 교신저자 : 신흥묵, 경북 경주시 석장동 707 동국대학교 한의과대학

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

· 접수 : 2008/03/11 · 채택 : 2008/03/21

산화를 통해 actin과 myosin간의 상호작용이 저해되는 경로로서 요약할 수 있다¹¹⁾. 현재까지 보고 된 바에 따르면, Ca²⁺ 의존적인 Calmodulin과 PKC 경로를 포함하여, Rho-associated kinase (ROCK) 및 extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) 등의 신호전달 경로가 중요한 작용 경로로서 제시되고 있으며, 각 물질의 활성 기작을 통해 혈관의 수축이완이 조절되는 것으로 알려져 있다¹²⁻¹⁵⁾.

본 연구에서는 HMC05에 의한 혈관 평활근세포의 혈관이완 활성 및 작용기전을 규명하기 위하여, 흰쥐의 흉부대동맥으로부터 내피를 제거하고 phenylephrine (PE) 및 sodium fluoride (NaF) 유도 수축혈관에 미치는 영향을 혈관 수축이완에 관련된 대표적인 신호전달 물질을 중심으로 조사하였다. 연구의 주요 내용은 HMC05의 혈관이완 효능을 세포 생화학적인 수준에서 검증하였고, 특히 PKC α 의 세포내 위치이동 및 ERK를 포함한 다른 아종의 Mitogen-activated protein (MAP) kinases, Rho kinase (ROCK)의 신호전달 경로를 조절함으로써 혈관이완활성의 효능을 나타내는 작용기전을 제시하였다.

재료 및 방법

1. 재료

실험동물은 체중 300~350 g의 웅성 Sprague-Dawley계 흰쥐를 항온항습 장치가 부착된 사육장에서 고형사료를 충분히 공급하면서 2 주일 이상 실험실 환경(온도, 21±2°C; 습도, 50~60%)에 적응시킨 후 사용하였다. 본 실험에 사용한 HMC05의 각 약재는 동국대학교 부속한방병원에서 구입하여 사용하였다.

2. 방법

1) 한약 추출물의 제조

HMC05 (半夏 9 g, 白朮 12 g, 天麻 6 g, 陳皮 6 g, 茯苓 9 g, 山楂 9 g, 薤白 9 g, 黃連 9 g) 69 g을 둥근 flask에 넣고, 증류수 500 ml를 가하여 100 °C에서 1 시간 30분 전탕한 후 추출액을 여과지로 여과하였다. 진공회전증발기 (rotary evaporator)를 이용하여 감압 농축한 후 동결 건조하여 12.1 g의 분말을 수득하였다. 분말은 -20 °C 냉동 보관하였으며 하루 이내에 쓸 분량만 덜어서 실험에 사용하였다.

2) 혈관절편의 제작

흰쥐를 마취하여 희생시키고, 즉시 복강을 열어 흉부 대동맥을 적출하였다. 적출한 조직은 Krebs-Ringer bicarbonate 용액 (NaCl 119.8 mM, KCl 4.6 mM, CaCl₂ 2.5 mM, MgCl₂ 1.2 mM, NaHCO₃ 25 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, glucose 10 mM, pH 7.4)에 넣고 실온에서 혈관주위의 결합조직과 지방을 제거한 후, 약 3 mm의 길이로 절단하여 고리형태의 대동맥 환 (aortic ring)을 제작하였다.

3) 혈관장력의 측정

용량 5 ml의 Krebs-Ringer bicarbonate 용액이 담겨있는 organ bath 는 95%의 O₂와 5%의 CO₂를 혼합한 가스가 연속적으로 공급되며 37 ± 0.5°C로 유지되는 환경으로, 방법 2)에서 제

작된 대동맥 환을 physiograph 장치에 연결하여 혈관절편의 한쪽 끝은 organ bath의 저부에 고정하고, 다른 쪽 끝은 근 수축변환기에 연결하여 등장성 장력을 기록하였다. 혈관의 장력측정은 미세장력 조절장치 (Grass FT-03)를 이용하여 초기 장력을 2 g 부하하고 1 시간 이상 회복시킨 후, 1 μM의 PE로 수축시켜 조직의 신선한 상태를 확인하고, PE-유도 수축혈관에 대한 농도별 이완효능을 관찰하였다. 내피의존성 여부의 실험에서는 acetylcholine으로 내피의 제거를 확인한 후 실험에 이용하였다. Western blot analysis 를 위하여 1 μM의 PE 또는 8 mM의 NaF로 수축시켜 최고 수축기에 도달했을 때 0.5 mg/ml의 HMC05를 1 시간 처리하거나, 30 분간 전 처리한 후 1 μM의 PE 또는 8 mM의 NaF 유도 수축억제 효과를 시간별(0, 5, 10 and 20 min)로 관찰하였다.

4) 단백질 추출, SDS-PAGE 및 Western blot analysis

혈관장력의 측정 후 조직을 10% TCA/acetone/DTT 용액으로 -80°C에서 한 시간 동결 고정시키고, DTT/acetone용액으로 씻어낸 후 단백질을 분리하였다. 동일한 양으로 SDS-PAGE gel 전기영동하고 전기이동의 방법으로 단백질을 nitrocellulose 막으로 옮긴 후, 5% skim milk를 함유한 TBS 용액의 처리 후 해당 1 차 항체 및 peroxidase가 부착된 2 차 항체를 반응한 후 각각 0.1% Tween 20을 함유한 TBST 용액으로 30 분간 세척하였다. Enhanced chemiluminescence (ECL) (Amersham, IL, USA)를 처리하고 X-ray film에 감광하여 인화하였다. 실험에 사용된 항체들은 Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하여 사용하였다.

5) Glycerol-Urea gel 전기영동 및 LC20의 인산화 측정

혈관장력의 측정 후 조직을 10% TCA/acetone/DTT 용액으로 -80°C에서 한 시간 동결 고정시킨 후 DTT/acetone용액으로 씻어내고 8 M urea가 들어있는 시료 완충액으로 단백질을 분리하여 Glycerol-Urea gel에서 전기영동하고 전기이동의 방법으로 단백질을 nitrocellulose 막으로 옮겼다. 이후 과정은 방법 4)와 동일하게 수행하였다.

6) 혈관 평활근세포의 배양

흰쥐의 혈관 평활근세포는 Sprague-Dawley Rat의 흉부 대동맥으로부터 기존에 확립된 분리법¹⁶⁾에 따라 분리 및 배양하였으며, human의 혈관 평활근세포 (AoSMC)는 Cambrex에서 구입하고 각 세포가 요구하는 배지와 환경을 조성하여 배양하였다. 세포배양용 dish에 평활근세포를 분주하여 약 90%의 밀도가 되었을 때, 무혈청 배지로 교체하여 20 시간을 배양한 후 HMC05 추출물을 처리하였다. 평활근세포로서의 형질유지 여부를 확인하기 위하여 200 배 배율의 도립 현미경 (inverted microscope, Carl Zeiss, Germany)을 이용하여 수축제 처리에 따른 세포형태의 변화를 관찰하였다.

7) 면역형광 염색법

Cover slip위에서 자란 세포를 무혈청 배지에서 20 시간 동안 배양한 후 HMC05를 처리하며, 5% BSA의 blocking 용액을 처리 후 각각의 1 차 항체와 형광 염색제가 붙은 2 차 항체를 이용하여 염색하고 형광현미경으로 관찰하였다.

8) 세포분획법

배양조에서 자란 세포를 무혈청 배지에서 20 시간 동안 배양한 후 HMC05를 처리하고 세포질, 세포막 및 핵으로의 분획화에 적절한 완충액과 원심분리를 이용하여 각각의 분획을 획득하였다. 이후 과정은 방법 4)와 동일하게 수행하였다.

성 적

1. HMC05의 내피 비의존성 이완효능

1 μM PE에 의한 수축에 대하여 HMC05의 혈관이완 작용이 내피세포와 관련이 있는지를 조사하기 위하여 내피존재 유무에 따라 추출물의 농도별 이완효과를 관찰하였다. HMC05는 각 농도에서 내피의 존재 유무에 따른 활성화도의 차이를 나타내지 않았으며, 두 그룹 모두 0.1 mg/ml, 0.3 mg/ml, 0.5 mg/ml 및 1.0 mg/ml의 농도에서 농도 의존적인 이완활성 효능을 나타내었다.

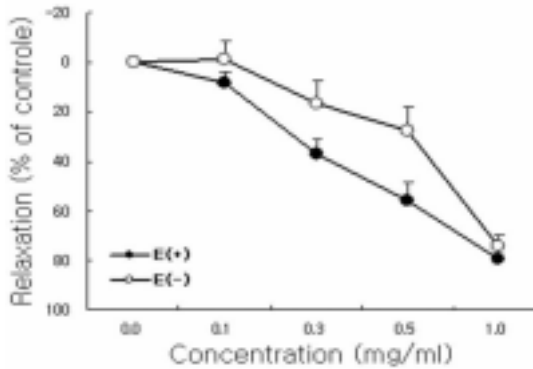


Fig. 1. Vasorelaxation effect of HMC05 in the presence and absence of endothelium on the PE-induced contraction in rat thoracic aorta. Values are mean±SEM (n=10).

2. LC20의 인산화에 대한 HMC05의 영향

HMC05의 혈관이완 효능을 혈관 수축의 기본 경로인 LC20의 인산화에 미치는 영향을 시간별로 측정함으로써 재확인 하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이, HMC05는 PE 유도 LC20의 인산화를 억제하였다.

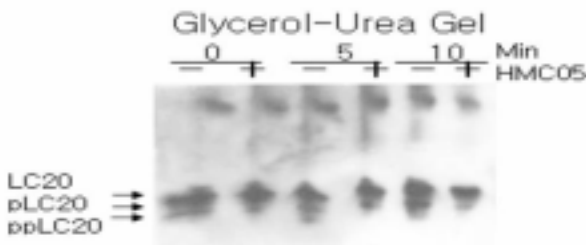


Fig. 2. Effect of HMC05 on LC20 phosphorylation in the absence of endothelium on the PE-induced contraction in rat thoracic aorta.

3. HMC05의 혈관동력학 제어약리작용점으로서 ROCK 경로 확인

혈관수축이완과정을 조절하는 주요 신호인자로서 ROCK의

경로가 잘 알려져 있으므로, HMC05가 ROCK의 신호경로를 경유하는 지 조사하였다. HMC05를 30 분 전 처리한 후 1 μM PE를 10 분간 또는 8 mM NaF를 20 분간 처리함으로써 수축을 유도하였다. PE와 NaF는 ROCK의 신호경로를 활성화함으로써 ROCK의 기질로서 하위신호인자에 속하는 adducin (A), MLCK과 MYPT1 (B)과 같은 기질의 인산화를 유도하였고, HMC05의 전처리는 이러한 인산화의 증가를 저해하는 것으로 관찰되었다.

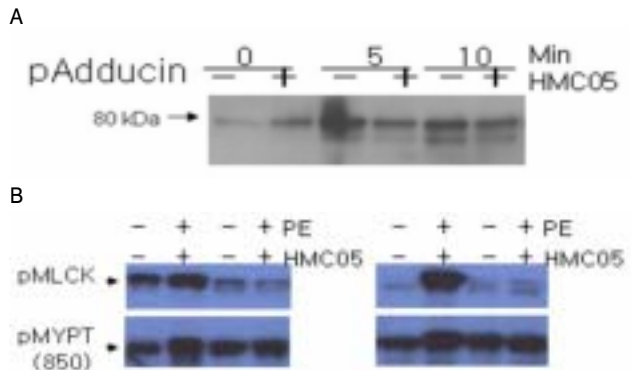


Fig. 3. Effect of HMC05 on ROCK pathways in the absence of endothelium on the 1 μM PE (for 10 min) (A, B) or 8 mM NaF (for 20 min) (B)-induced contraction in rat thoracic aorta.

4. HMC05의 약리작용점으로서 ERK 확인

혈관수축이완과정을 조절하는 주요 신호인자로서 ERK의 경로 또한 잘 알려져 있다. HMC05가 ERK의 신호경로를 경유하는 지 조사하였다. HMC05를 30 분 전 처리한 후 1 μM PE를 10 분간 처리함으로써 수축을 유도하였고, ERK의 활성을 측정하기 위하여 ERK 인산화의 변화를 관찰하였다. HMC05는 PE에 의한 ERK 인산화의 증가를 저해하였다.

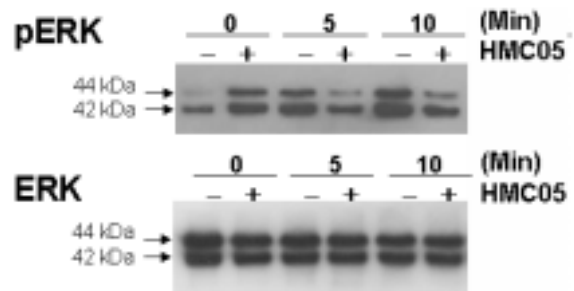


Fig. 4. Effect of HMC05 on ERK activity in the absence of endothelium on the PE-induced contraction in rat thoracic aorta.

5. HMC05의 약리작용점으로서 JNK 확인

HMC05가 혈관이완을 조절하는 주요 신호인자로서 MAP kinases의 아형인 c-Jun NH2-terminal kinase (JNK)의 경로 또한 확인하였다. HMC05를 30 분 전 처리한 후 1 μM PE를 10 분간 처리함으로써 수축을 유도하였고, JNK의 활성을 측정하기 위하여 JNK 인산화의 변화를 관찰하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이, PE에 의하여 JNK의 활성이 유도됨을 확인하였고 HMC05의 처리는 이러한 인산화를 저해하는 것으로 관찰되었다.

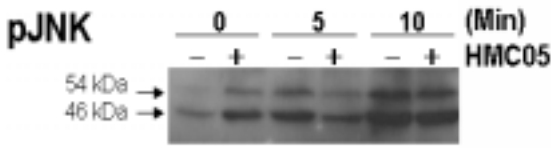


Fig. 5. Effect of HMC05 on JNK activity in the absence of endothelium on the PE-induced contraction in rat thoracic aorta.

6. HMC05가 CaD의 인산화에 미치는 영향

동일한 방법으로 혈관수축이완과정을 조절하는 신호인자로서 thin filament (Actin)의 주요 조절인자인 CaD 신호경로를 경유하는 지 조사하였다. HMC05를 30 분 전 처리한 후 1 uM PE를 10 분간 처리함으로써 수축을 유도하였고 CaD의 인산화 변화를 관찰하였다. Fig. 6에서 보는 바와 같이, CaD의 인산화에는 PE와 같은 수축제나 HMC05의 처리에 의해서 어떠한 변화도 관찰되지 않았다.

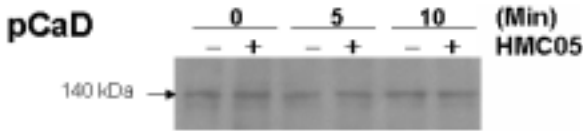


Fig. 6. Effect of HMC05 on CaD phosphorylation and IκB protein level in the absence of endothelium on the PE-induced contraction in rat thoracic aorta.

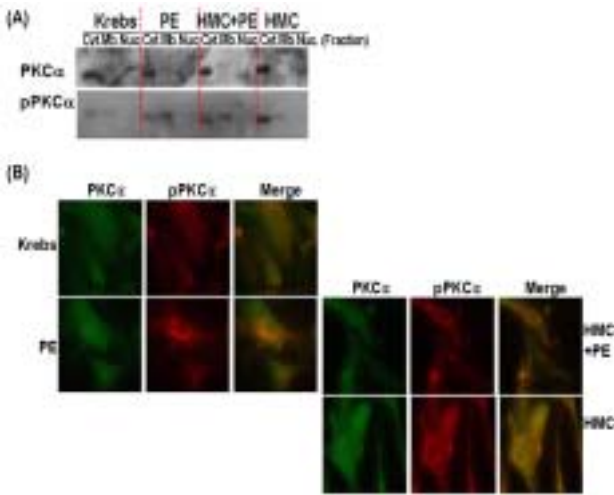


Fig. 7. Subcellular translocation of PKC α and phospho-PKC α in HMC05-treated rat aortic vascular smooth muscle cells (n=3).

7. HMC05가 혈관평활근 세포의 PKC활성에 미치는 영향

PKC에 대한 HMC05의 활성조절의 가능성은 혈관 평활근세포에서 수행하였다. 혈관 평활근세포에 0.5 mg/ml HMC05을 처리하고 1 μ M PE를 시간별로 처리하여 세포분획 (세포질, 막, 핵) 별로 단백질을 추출하거나 (A), PKC α 및 인산화된 PKC α 의 면역형광 염색법 (B)을 수행함으로써 세포내 각 분획으로의 이동정도를 측정하였다. Fig. 7에서 보는 바와 같이, PE의 처리에 의하여 인산화된 PKC α 의 분획화 정도는 PKC α 의 분획화 정도에 비해서

도 더욱 큰 차이를 보이며 막 분획으로 이동하였고, HMC05의 처리에 의해서 막 분획으로의 이동이 또한 차단됨을 관찰하였다.

고 찰

HMC05는 문헌에 설명된 각 약재의 효능과 실험적 연구에 기초하여 半夏白朮天麻湯을 바탕으로 심혈관질환을 치료하기 위해 개발된 처방이다¹⁶⁻²². 그 조성은 半夏, 白朮, 天麻, 茯苓, 陳皮, 山楂, 黃連, 豨薺의 8가지 약재로 구성되어 있다. 半夏白朮天麻湯은 한의학에서 痰厥頭痛의 치료를 목표로 사용되어 처방으로 실험적으로 LC20의 인산화와 PKC α 활성 억제⁸ 및 NO 경로²³를 통한 혈관이완활성이 보고되었다. 이는 半夏白朮天麻湯이 혈관확장을 통한 혈액순환개선이 고혈압에 적용될 수 있음을 객관적으로 제시한 것이다.

본 연구에서는 새로이 조성된 HMC05의 혈관이완 활성을 생리화학적 방법으로 검증한 후, 그 작용 기전을 세포 내 신호전달 체계를 중심으로 한 생화학적인 방법으로 검증하고자 하였다.

혈관을 구성하는 혈관 평활근은 내피조직과 함께 혈관의 수축이완을 직접적으로 조절하는 것으로 알려져 있으며, 이에 관련된 신호조절 경로로서 LC20의 인산화를 조절하는 경로 및 CaD의 인산화를 통해 actin과 myosin간의 상호작용이 저해되는 경로로서 요약할 수 있다¹¹. 현재까지 보고된 바에 의하면, Ca²⁺ 의존적인 Calmodulin과 PKC 경로를 포함하여, ROCK 및 ERK 등의 신호전달 경로가 중요한 작용 경로로서 제시되고 있으며, phosphorylation 및 translocation 등에 의한 각 물질의 활성 기작을 통해 혈관의 수축이완이 조절되는 것으로 알려져 있다¹²⁻¹⁵.

흰 쥐의 흉부대동맥으로부터 내피를 제거하고 PE 및 NaF에 의해 유도된 수축 과정에서 HMC05의 혈관 이완의 효능은 내피 비존존적으로 작용하며(Fig. 1), 혈관 수축의 기본 경로인 LC20의 인산화 또한 억제함을 확인하였다(Fig. 2). 이는 이미 보고된 半夏白朮天麻湯의 내피존존적 혈관이완 작용이 처방의 가감을 통해 혈관평활근에 직접 작용하여 혈관을 이완시키는 것으로 혈관이완활성의 증가와 더불어 그 상이한 작용기전을 나타내었다. 나아가 HMC05가 혈관 수축이완 과정을 조절하는 세포 내 주요 신호인자를 경유하는 지 확인하기 위하여 최근에 활발히 연구되고 있는 ROCK를 비롯하여 기존에 많이 보고된 MAP kinase 및 PKC 경로를 경유하는 지를 조사하였다. 비록 실험상의 제약으로 ROCK의 직접적인 활성도는 확인하지 못하였지만, ROCK의 기질로서 하위신호인자에 속하는 adducin, MLCK, MYPT1의 인산화를 간접적으로 조사하였다. NaF의 처리는 이미 보고¹⁵된 바와 같이 ROCK의 신호경로로서 MYPT1의 인산화를 유도하였으며 이는 HMC05의 전처리에 의하여 억제되었다. 또 PE나 NaF(data not shown)는 ROCK의 하위신호인자 adducin의 인산화를 유도하였고, HMC05의 전처리는 이러한 인산화의 증가를 저해하였다. 또 이들 수축제에 의한 MLCK, MYPT1의 인산화 역시 억제되었다(Fig. 3).

본 연구에서 나타낸 ROCK 경로는 HMC05를 30 분간 전처리가 1 μ M PE (10분) 또는 8 mM NaF (20분)에 의한 수축의

유도시에 미치는 영향을 모두 제시하였으며, 이외는 1 μ M PE로 수축을 유도한 결과만을 제시하였다. 그러나 NaF 역시 ROCK 경로 뿐만 아니라 다른 신호전달 경로에서도 모두 동일한 결과를 관찰할 수 있었다. 또한 PE나 NaF에 의해 수축이 최고점에 도달한 후 HMC05를 1 시간동안 후 처리한 경우에도 결과는 동일하였다.

혈관수축이완과정을 조절하는 주요 신호인자로서 ERK의 경로 또한 잘 알려져 있다. ERK의 활성을 측정하기 위하여 PE 유도 ERK의 인산화에 미치는 영향을 관찰하였다. PE의 처리는 기존에 보고 된 바¹⁴⁾와 같이 ERK의 인산화를 유도하였고, HMC05의 전처리는 이러한 인산화의 증가를 저해하였다(Fig. 4). 한편, MAP kinase의 아형으로서 JNK는 혈관수축이완과정에서 그 역할이 아직 분명하지 않다. 본 결과에서는 HMC05가 혈관이완을 조절하는 주요 신호인자로서 JNK의 경로 또한 확인하였으며, 수축제의 처리에 의한 JNK의 활성 유도와 HMC05의 처리에 의한 인산화 및 활성의 저해를 관찰하였다(Fig. 5). 그러나, HMC05는 thin filament (Actin) 조절의 주요인자인 CaD의 인산화에는 별 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. CaD은 인산화에 따라 myosin과 actin과의 cross-bridge를 조절함으로써 혈관수축을 조절하는 것으로 알려져 있으므로, HMC05가 이러한 조절과정에는 영향을 미치지 않는 것으로 사료된다.

한편, PKC의 활성은 인산화의 변화 뿐 아니라 세포 내 위치 이동 (translocation)이 수반되어야 하는데, 적출된 혈관조직으로부터 세포 내 위치이동을 확인하는 데에는 한계가 있으므로, PKC에 대한 HMC05의 활성조절 가능성은 혈관 평활근에서 분리한 세포에서 수행하였다. 혈관 평활근세포에 HMC05를 처리하고 PE를 시간별로 처리하여 세포분획 (세포질, 막, 핵)별로 단백질을 추출한 후 Western blotting analysis를 하거나, PKC α 및 인산화 된 PKC α 의 면역형광 염색법을 수행함으로써 세포내 각 분획으로의 이동 정도를 측정하였다. PE의 처리에 의하여 인산화 된 PKC α 의 분획화 정도는 PKC α 의 분획화 정도에 비해서도 더욱 큰 차이를 보이며 막 분획으로 이동하였고, HMC05의 처리에 의해서 막 분획으로의 이동이 또한 차단됨을 관찰하였다(Fig. 7).

인상의 연구로부터 각 신호인자의 특이적인 저해나 활성 조절을 통한 작용 원인의 명확한 규명은 더 진행되어야 할 부분으로 남아 있으나, HMC05의 혈관이완 효능이 ROCK, ERK, JNK 및 PKC α 의 활성을 억제하는 신호경로를 경유함으로써 작용하는 것으로 사료되는 바이다. 본 연구는 신규 도출된 HMC05의 혈관이완효능과 기전을 객관적으로 규명한 것으로도 그 의의를 찾을 수 있으며, 질환모델동물에서의 혈압강하 효능 검증을 통한 고혈압치료의 가능성 또한 제시할 수 있을 것으로 기대된다.

결 론

半夏白朮天麻湯을 기초로 조합과 가감의 선행 연구를 통하여 새로이 개발된 HMC05의 항고혈압 효능을 조사하기 위하여 PE와 NaF 유도 수축혈관에 대한 혈관이완활성 및 작용기전을 연구함으로써 다음의 결과를 얻었다.

HMC05는 내피에 비 의존적으로 혈관이완효능을 나타내었으며, 혈관 평활근세포의 수축과 직접적으로 관련된 LC20의 인산화를 저해하였다. 또한 HMC05는 혈관동역학 제어 약리작용점으로서 ROCK, ERK 및 JNK의 활성 조절에 관여함을 확인하였다. 나아가 혈관 평활근세포에서 HMC05는 PE에 의해 유도된 PKC α 의 세포막으로의 이동을 차단함으로써 PKC α 의 활성을 조절하였다. 그러나 HMC05는 CaD의 인산화 조절과는 무관하였으며, 이상의 결과로부터 HMC05는 내피 비의존적으로 평활근에 직접 작용하며, ROCK, ERK, JNK 및 PKC α 를 포함하는 평활근세포의 신호전달 경로를 조절함으로써 혈관이완활성을 나타내는 것으로 사료된다.

감사의 글

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

참고문헌

1. 裴元植. 最新韓方臨床學. 서울, 南山堂, pp 281-294, 753, 1982.
2. 黃文東. 實用中醫內科學. 上海, 上海科學技術出版社, pp 414-422, 558-559, 1986.
3. 陳貴廷. 實用中西醫結合診斷治療學. 北京, 中醫醫藥科學出版社, pp 366-371, 689-694, 1991.
4. 屈松柏, 李家庚. 實用中醫心血管病學. 北京, 科學技術文獻出版社, pp 290-295, 1993.
5. Maclean, W., Lyttleton, J. Phlegm Damp. Clinical Handbook of Internal Medicine, 2nd ed. University of Western Sydney Macarthur, Campbelltown, Australia, pp 548-551, 2000.
6. 이현제, 성유진, 김상대, 문국진, 김종봉, 김길원, 신홍목. 半夏白朮天麻湯의 조성에 따른 혈관이완활성과 기전. 동의생리병리학회지 19(5):1311-1316, 2005.
7. 李東垣. 東垣醫集. 脾胃論. 北京, 人民衛生出版社, p 111, 1995.
8. 汪初庵. 醫方集解. 台北, 旋風出版社, p 251, 中華民國66年.
9. 金洛雄, 宋一炳. 半夏白朮湯이鎮痛鎮靜鎮痙 효과에 미치는 영향. 경희한의대논문집, 7: 301-311, 1984.
10. Nby banhabackchul-chunmatang, a Chinese medicine, is associated with negative modulation of PKC α activation and NO production. Life Sciences 74: 723-732, 2003.
11. Wier, W.G., Morgan, K.G. α 1-Adrenergic signaling mechanism in contraction of resistance arteries. Rev Physiol Biochem Pharmacol. 150: 91-139, 2003.
12. Touyz, R.M., Schiffrin, E.L. Signal Transduction Mechanisms Mediating the Physiological and Pathophysiological Actions of Angiotensin II in Vascular Smooth Muscle Cells Pharmacol. Rev. 52: 639-672, 2000.
13. Zhao, Y., Zhang, L., Longo, L.D. PKC-induced ERK1/2 interactions and downstream effectors in ovine cerebral arteries. Am J

- Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol. 289: R164-R171, 2005.
14. N. ERK-mediated uterine artery contraction: role of thick and thin filament regulatory pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 286: H1615-H1622, 2004.
 15. Jeon, S.B., Jin, F., Kim, J.I., Kim, S.H., Suk, K., Chae, S.C., Jun, J.E., Park, W.H., Kim, I.K. A role for Rho kinase in vascular contraction evoked by sodium fluoride. *Biochem Biophys Res Commun.* 343(1):27-33, 2006.
 16. Lee, H.J., Choi H.J., Kim G.W., Shin H.M. Effect of Butanol Fraction of *Crataegi Fructus* on the Translocation of PKCa and Myosin subunits in Vascular Smooth Muscle. *동의생리병리학회지.* 16(5):1060-1065, 2002.
 17. 손창우, 채종구, 김길훤, 신흥묵. 산사 혈관이완효능과 항산화 작용. *동의생리병리학회지* 16(1):67-71, 2002.
 18. 유가량, 최호정, 김길훤, 신흥묵. 산사 butanol 분획이 PGF2a-유도 혈관평활근수축의 억제에 미치는 신호전달 연구. *동의생리병리학회지* 17(2):461-466, 2003.
 19. 채종구, 김길훤, 신흥묵. 내피세포 Nitric Oxide 유리를 통한 산사의 혈관이완 작용. *동의생리병리학회지* 17(1):146-150, 2003.
 20. 최호정, 신동훈, 김길훤, 신흥묵. 산사분획의 혈관이완 활성과 성분분석에 관한 연구. *동의생리병리학회지* 17(5):1235-1242, 2003.
 21. 장동순. 희림이 실험적 고지혈증의 예방과 치료 효과에 미치는 영향, 경희대학교 대학원, 1994.
 22. 신흥묵. 獐豨의 혈관이완 효능과 항산화 동태에 관한 연구, 대한한의학회지 21(1):77-83, 2000.
 23. 김윤태, 채종구, 김길훤, 신흥묵. 혈관긴장성조절에 미치는 반하백출천마탕의 효능. *동의생리병리학회지* 16(1):62-66, 2002.