

어성초 추출물의 혈관 평활근 세포 이주 및 증식 억제 활성화에 관한 연구

한정호 · 박선남 · 윤미소 · 최옥병*

호서대학교 자연과학부 생의학연구소

Effects of *Houttuynia cordata* Thunb Extract Inhibits on the Migration and Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cell

Jung-ho Han, Seon-nam Park Mi-so Yoon and Ok-Byung Choi*

Department of Bio medicine Institute, College of Natural Science, Hoseo University, Asan 336-795, Korea

Abstract – *Houttuynia cordata* Thunb.[*H.cordata*]belonging to Saururaceae, is a wild medicinal herb of perennial plants, and grows well in a place with a lot of shade and moisture. The medical action of *H.cordata* is reported to have an antitumor effect, toxicity-suppressive effect, antifungal effect, diuretic effect, and antioxidative action, but its effect hasn't been reported on cardiovascular diseases, such as atherosclerosis and hypertension yet. This study intended to confirm the effect of the water extract of *H.cordata* on the migration and proliferation of rat aortic smooth muscle cells. Such results show that the water extract of *H.cordata* suppresses the migration and proliferation of rat aortic smooth muscle cells. It is believed that a useful clue will be offered later to the prevention of cardiovascular diseases such as atherosclerosis and hypertension, and the development of their medicines on the basis of the fact.

Key words – *Houttuynia cordata* Thunb.[*H.cordata*], migration, proliferation, PDGF-BB(Platelet-Derived Growth Factor)

어성초는 삼백초과(Saururaceae)로서 학명은 *Houttuynia cordata* Thunb. 이며 다년생 초본의 야생약초로서 그늘지고 물기가 많은 곳에서 잘 자라며, 한국에서는 어성초, 약모밀이라고 불리어진다. 원산지는 한국, 중국, 일본이며, 잎과 줄기에서 생선비린내가 난다고 하여 어성초라고 불리게 되었다.¹⁾ 어성초는 예로부터 생약제로 이용되어 왔으며 이뇨, 강심, 해열 및 배농작용, 항균작용, 피부의 염증에 주로 사용되어 왔다.²⁾

어성초추출물의 약리작용으로는 항종양효과,³⁾ 카드뮴에 대한 독성억제 효과⁴⁾, 휘발성 향기성분 추출물의 항균효과⁵⁾, 뿌리에서 추출한 순차 분획물의 항균활성⁶⁾, 이뇨작용⁷⁾, 천식⁸⁾, 항염증작용⁹⁾, 해독작용¹⁰⁾이 있는 것으로 보고되고 있다. 어성초의 성분으로는 지금까지 22종의 화학성분이 밝혀져 있으며, 그 중 가장 많이 함유된 성분으로는 flavonoids의 일종인 quercetin, quercetrin이 함유되어 있어 항균, 항암작용을 나타내어주며, 비린내 성분의 일종인 decanoyl acetaldehyde는 몸의 신진대사를 도와주며, 신장기능을 촉진시켜 체내독소를 배출 시키게 하고, K, Ca, P, Mg 등의 무

기성분도 다량 함유되어 있다.¹¹⁾

혈관 평활근 세포의 증식과 이동은 동맥경화증을 일으키는 원인물질로서의 역할이 부각되고 있으며,¹²⁾ 재협착증에 관해서도 기인한다고 알려져 있다.¹³⁾ 혈관 손상이 일어나면 PDGF, TGF- β 1, 안지오텐신II, 인슐린 등 다양한 성장인자들과 함께 혈관 평활근 세포의 증식과 신호전달계가 활성화 되어진다.¹⁴⁾ 혈관 평활근 세포의 가속화는 혈관 손상으로 인해서 내피세포의 성장인자들과 사이토카인의 분비로 인해 중막층에서 세포증식이 일어나 내피로 이동이 일어나게 된다.¹⁵⁾ PDGF-BB는 혈관 평활근 세포의 증식을 유발한다는 연구가 보고되어져 있고¹⁶⁾, MAPK 활성화가 세포 증식에 중요한 역할을 한다는 사실도 보고되었다.¹⁷⁾ 또한 p38 MAPK의 활성화가 혈관 평활근 세포의 증식에 관여한다는 사실도 보고되었다.¹⁸⁾

본 연구에서는 어성초 추출물이 가지고 있는 유효성분들을 이용해서 혈관 평활근 세포의 증식과 이주에 어떤 연관이 있는지를 알아보기 위해서 migration, proliferation, aortic ring assay를 수행하여 혈관질환에 사용할 수 있는 치료제와 예방을 위한 정보를 제공하게 될 것이다.

*교신저자(E-mail): choiob@hoseo.edu
(Tel): +82-41-540-5971

재료 및 방법

시료의 준비 - 경남 함양군 여항면에서 2009년 4-8월에 채집한 것을 기증받아 실험에 사용한다. *H.cordata*을 막자사발과 액체질소를 이용하여 분말 형태로 만들고, 어성초 분말(25 g)을 증류수 200 ml과 함께 상온(20°C)에서 24시간 동안 혼합하였다. 이 혼합물을 1,500 xg에서 10 분간 원심 분리하여 상층액을 얻어, 2,500 xg에서 10분간 원심분리 하고, 10,000 xg에서 20분간 원심분리 한 후 상층액을 얻어 syringe filter를 사용하여 여과하였다. 여과액은 -80°C에서 동결한 후 동결 건조 과정을 통하여 3.875 g의 분말을 얻었다.

시약 - PDGF-BB는 R&D System(Minneapolis, MN, USA)에서 구매하였고, Matrigel은 BD Bioscience(San Jose, CA)에서 구매하였다.

세포 준비와 배양 - 모든 실험은 호서대학교와 건국대학교 연구 윤리위원회의 규정을 따랐다. 혈관 평활근 세포는 Sprague Dawley 종, 수컷 Rat(6주령, 180 g, n=4)으로부터 효소처리 하여 분리하였고, 10% Fetal Bovine serum(FBS), 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin과 200 mM glutamine을 포함한 DEME으로 배양하였다. 대동맥 혈관 평활근 세포는 passage 5-8까지 사용하였고, 60-70% 정도 자라면 FBS가 없는 DEME 으로 24시간 동안 starvation 시킨 후 실험에 사용하였다.

Migration assay - Cell migration은 48-well Boyden microchemotaxis chamber(Neuro Probe, Cabin John, MD, USA)에서 실험하였다. 8 µm pore의 poly-carbonate membrane (Neuro Probe, Cabin John, MD, USA)은 collagen type (BD Bioscience)을 0.1 mg/ml 으로 coating 하고 60분 이상 말려주었다. 아래쪽 chamber에는 3×10^4 cell/ml의 세포를 처리하고, 그 위에 membrane을 올려놓았다. micro-chamber를 뒤집어서 37°C에서 150분 동안 반응시키고, chamber를 다시 원래대로 놓고 upper chamber에 0.1% BSA, PDGF-BB 및 어성초추출물을 농도별로 처리하였다. Membrane을 통과하여 이동한 세포의 수를 현미경($\times 400$)아래에서 각각의 well 중 4군데를 무작위로 선택하여 수를 세어준 후, 결과에 이용하였다.

Proliferation assay - 혈관 평활근 세포 증식 실험은 5-bromo-2'-deoxyuridine(BrdU) incorporation assay로 수행하였다. 세포는 96-well microtiter plate에 2×10^3 cell/well 수의 세포를 12시간 동안 배양하고, FBS가 들어있지 않은 DEME에서 6시간 동안 starvation하였다. 그 후, 어성초 추출물과 PDGF-BB를 24시간동안 처리하고 세포에 BrdU-labeling solution (10 µm)을 첨가하여 12시간동안 반응시켜, 새롭게 합성되어진 DNA의 양을 확인하였다. DNA 양의 측정은 DNA를 변성 시킨 후, peroxidase-labeled anti-BrdU monoclonal antibody를 이용하여 실온에서 90분 동안 반응시켰다. 그 후

에 BrdU-antibody 복합체의 양을 victor 3 luminometer를 이용하여 검출하였다.(PerkinElmer)

Aortic ring assay - RASMCs의 ex vivo migration은 이전의 방법을 수정하여 Matrigel을 사용한 aortic ring assay를 시행하였다. Sprague Dawley 쥐(6주, n=8) 동맥의 endothelium과 adventitium을 효소적의 처리를 통해 제거하고 혈관 평활근 세포층을 1 mm 두께로 잘라주었다. Matrigel로 coating한 48-well plate에 혈관을 넣고, 동시에 FBS가 들어있지 않은 medium에 PDGF-BB(10 ng/ml)와 어성초 추출물을 첨가한 용액을 더해주었다. 5일동안 배양한 후 Diff-Quick으로 염색하고 사진을 찍어 Scion Image software를 사용하여 sprout의 길이를 분석하였다.

통계 및 분석 - 실험 결과는 mean \pm SEM(평균 \pm 표준오차)으로 처리하였다. Student's t test에 의해 비교하고 검사하여, $p < 0.05$ 수준에서 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

혈관 평활근 세포의 이주와 증식에 PDGF-BB가 미치는 영향 - 혈관 평활근 세포의 이주와 증식에 PDGF-BB가 미치는 영향을 확인하였다. 세포의 이주에서 PDGF-BB에 의해 농도 의존적으로 세포의 이주를 확인할 수 있었다. 1 ng/ml에서 뚜렷하게 이주된 것을 볼 수 있었고, 가장 많이 이주된 것은 PDGF-BB 10 ng/ml에서 나타났다(Fig. 1). 또한, 세포의 증식에서도 PDGF-BB에 의해서 확인할 수 있다. 1 ng/ml에서까지는 정상세포와 별 차이가 나지 않았지만 5 ng/ml에서부터 증식이 나타나는 것을 확연히 볼 수 있었다. 세포의 증식에서는 20 ng/ml에서 가장 많은 증식이 나타났다(Fig. 2).

PDGF-BB에 의해 유도된 혈관 평활근 세포의 이주와 증식에 어성초추출물이 미치는 영향 - PDGF-BB에 의해 유도되어진 혈관 평활근 세포의 이주와 증식에 어성초 추출물이 어떠한 영향을 미치는지에 대해 확인하기 위해서

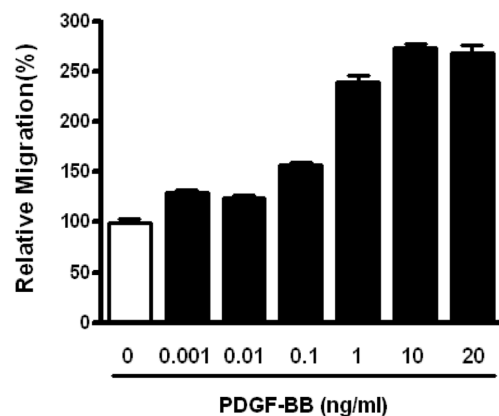


Fig. 1. Effect of PDGF-BB stimulated RSMC migration.

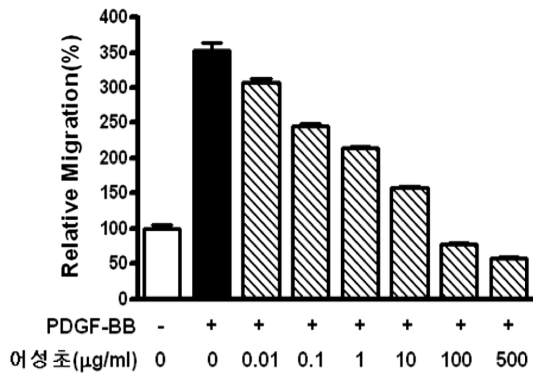


Fig. 2. Effects of *H.cordata* on PDGF-BB stimulated RASMC migration.

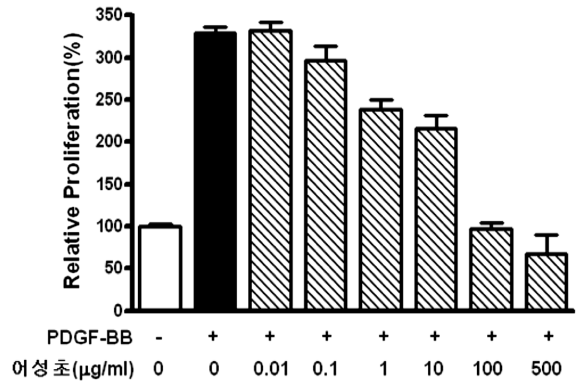


Fig. 4. Effects of *H.cordata* on PDGF-BB stimulated RASMC proliferation.

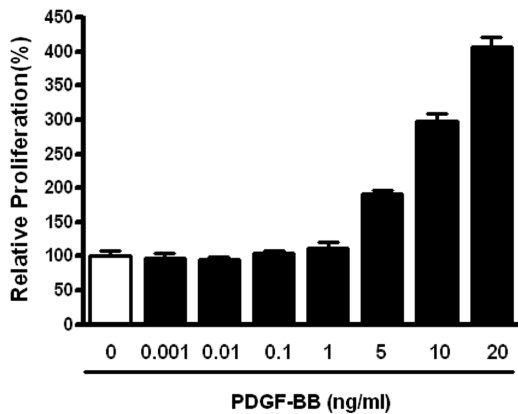


Fig. 3. Effect of PDGF-BB stimulated RASMC proliferation.

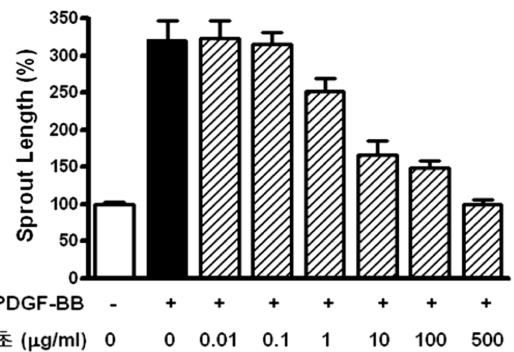
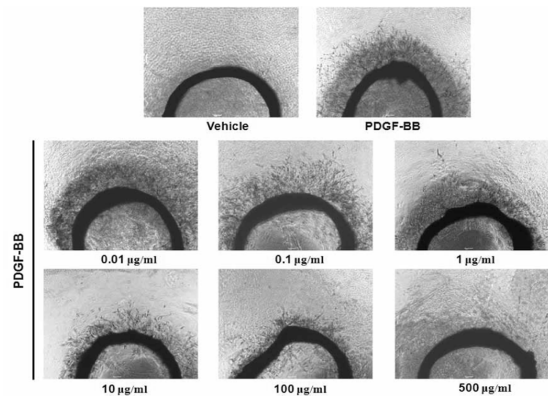


Fig. 5. Effects of *H.cordata* extract on sprout formation from aortic rings in response to PDGF-BB. Aortic rings (1 mm) were embedded in Matrigel and cultured. Results were obtained on day 5. Graph shows statistical results.

Boyden chamber를 사용하여 실험하였다. PDGF-BB에 의해서 유도되었던 혈관 평활근 세포의 이주에서 어성초 추출물(0.01-500 µg/ml)의 처리에 의해서 혈관 평활근 세포의 이주가 억제되었으며, 어성초 추출물 100 µg/ml에서 부터는 PDGF-BB를 처리하기 전보다 낮게 나타났으며 500 µg/ml에서 가장 많이 억제되었다(Fig. 3). 또한, 세포의 증식에서도 어성초 추출물(0.01-500 µg/ml)의 처리에 의해 혈관 평활근 세포의 증식이 억제되었으며, 어성초 추출물 100 µg/ml에서 PDGF-BB를 처리하기 전보다 낮게 나타났다. 500 µg/ml에서 가장 많이 억제되었다(Fig. 4).

어성초 추출물이 PDGF-BB에 의해 유도된 Aortic ring sprout 형성에 미치는 영향 - Ex vivo에서 혈관 평활근 세포의 이주와 증식에 대한 어성초 추출물의 효과를 확인하기 위해서 matrigel aortic ring assay를 하였다. PDGF-BB에 의해 Aortic ring sprout의 outgrowth는 증가 되어졌다. 어성초 추출물(0.01-500 µg/ml)의 처리에 의해서 농도 의존적으로 aortic sprout의 형성이 감소되어졌는데, 이 반응은 최대 500 µg/ml의 농도에서 aortic sprout의 형성이 가장 많이 감소되어졌으며, PDGF-BB를 처리하기 전과 동일한 수준으로 감소가 나타났다(Fig. 5).

고찰

혈관 평활근세포의 비이상적 증식은 동맥경화로의 진행을 알려주는 주요 기전이며, 혈관조영술 후에 발생하는 혈관 손상에서도 일어날 수 있는 재협착 과정에서도 함께 일어나는 현상이다¹⁹⁾. 또한 평활근 세포의 증식과 더불어 세포 이동은 죽종 생성과 혈관 협착 그리고 혈관 경화의 유발

과 진행에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다²⁰). 또한 혈관 평활근 세포의 증식은 고혈압이나 죽상 경화증이 발생하는 데도 중요한 원인 인자이다²¹). PDGF는 일부 결체조직의 성장과 생존에 관여하며, 각종 암, 동맥경화 그리고 세포증식성 질환과 관련된 성장인자들 중 하나로서, 섬유아 세포나 평활근 세포에서 중요한 인자로 작용한다고 볼 수 있다. PDGF는 여러 가지 세포내 작용을 수행하는 cytokine으로, 현재까지 네 가지의 펩타이드로 구성된다고 알려져 있다(PDGF-AA, AB, BB, CC and DD dimmers). 인체의 여러 부분과 상황에서 PDGF의 자극은 일반적으로 세포의 이주와 세포자멸사(apoptosis)에 대항하는 생존, 증식 반응을 유발한다²²). 본 연구에서는 PDGF의 네 가지 펩타이드 중에서 가장 강력한 증식유발이 있는 PDGF-BB²³)를 사용하여 세포의 이주와 증식에 관하여 연구하였다. 혈관 평활근 세포는 PDGF에 의해서만 되는 것이 아니라 PDGF와 연관되어진 MAPK의 세 가지 형태인 p38, JNK, ERK 와도 연관이 되어져 있다²⁴). 본 연구에서는 MAPK의 세 가지 형태의 인산화 과정을 실험하지 않아 어성초추출물이 인산화 과정에 영향을 미치는지 확인할 수는 없었다. 이를 확인하기 위해 좀 더 많은 연구가 필요하다고 사료되어 진다.

결 론

본 연구에서 PDGF-BB를 사용하여 혈관 평활근 세포의 이주와 증식을 유도하였고, 유도되어진 혈관 평활근 세포를 어성초 추출물이 억제함을 볼 수 있었다. 혈관 평활근 세포의 이주에서는 어성초 추출물 100 µg에서부터 정상세포와 비슷한 수준으로 떨어졌으며 최대 500 µg에서는 정상세포보다 더 낮은 수준을 보여주었다. 또한 증식에서는 어성초 추출물 100 µg에서부터 확연히 억제됨을 볼 수 있었으며 500 µg에서는 정상세포보다 더 낮은 수준을 보여주었다. 이로 인해 어성초 추출물은 혈관 평활근 세포에서 이주와 증식을 억제하는 효능을 가지고 있다고 볼 수 있다. 그러므로 혈관질환의 예방과 치료에 이용될 수 있을 것으로 예상된다.

사 사

본 연구는 호서대학교 교내 학술연구비 지원으로 수행한 연구결과입니다.

인용문헌

1. Kwun, J. A. (1998) About *Houttuynia cordata* Thunb. *Korean Oriental Drug*, **2**: 218-221.
2. 송주택, 박만규, 김용철, 1974 한국자원식물총감, 국제문화사, p. 56.
3. Kim, S. K., Ryu, S. Y., Choi, S. U. and Kim, Y. S. (2001) Cytotoxic alkaloids from *Houttuynia cordata*. *Arch. Pharm. Res.* **24**: 518-521.
4. Lee, J. H., Jeong, S. I., You, I. S., Kim, S. J., Lee, K. N. Han, D. S. and Back, S. H. (2001) The inhibitory effects of the methanol extract of *Houttuynia cordata* Thunb against cadmium induced cytotoxicity(V). *Kor. J. Pharmacogn.* **31**: 228-234.
5. Shin, S. E., Suh, D. S., Jilu, D. and Cha, W. S. (2006) Chemical characterization and antibacterial effect of volatile flavor concentrate from *Houttuynia cordata* Thunb. *J. Life Sci.* **16**: 297-301.
6. Song, J. H., Kim, M. J., Kwon, H. D., Park, I. H. (2003) Antimicrobial activity of fractional extracts from *Houttuynia cordata* root. *J. Kor. Sci. Nutr.* **32**: 1053-1058.
7. Lu, M. H., Liang, Y. Z., Yi, L. Z. and Wu, X. J. (2006) Anti-inflammatory Effect of *Houttuynia cordata* injection. *J. Ethnopharmacol.* **104**: 245-249.
8. Lee, E., Haa, K., Yook, J. M., Jin, M. H., Seo, C. S., Son, K. H., Kim, H. P., Bae, K. H., Kang, S. S., Son, J. K. and Chang, H. W. (2006) Anti-asthmatic activity of an Ethanol extract from *Saururus chinensis*. *Bial. Pharm. Bull.* **29**: 211-215.
9. Hwang, B. Y., Lee, J. H., Koo, T. H., Kim, H. S., Hong, Y. S., Ro, J. S., Lee, K. S. and Lee, J. J. (2002) Furanoligularenone, an Eremophilane from *Ligularia Fischeri*, inhibits the LPS-induced Production of Nitric Oxide and Prostaglandin E2 in Macrophage RAW-264.7 Cells *Planta. Med.* **68**, 101-105.
10. Cho, E. J., Yokozawa, T. Rhyu, D. Y., Kim, S. C., Shibahara, N. and Park, J. C. (2003) Study on the inhibitory effects of Korean medicinal plants and their main compounds on the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Phytomedicine* **10**: 544-551.
11. Cho, Y. S., Kim, Y. T., Shon, M. Y. and Choi, S. H. (2000) Comparison of chemical compositions of *Houttuynia cordata* Thunb cultivated from different local area. *Korean J. Postharvest. Sci.* **7**: 108-112.
12. Hattori, Y., Matsumura, M. and Kasai, K. (2003) Vascular smooth muscle cell activation by C-reactive protein. *Cardiovasc. Res.* **58**: 186-195.
13. Kearney, M., Pieczek, A., Haley, L., Losordo, D. W., Andres, V., Schainfeld, R., Rosenfield, K. and Isner, J. M. (1997) Histopathology of in-stent restenosis in patients with peripheral artery disease, *Circulation.* **95**: 1998-2002.
14. Ross, R. (1995) Cell biology of atherosclerosis. *Ann Rev, Physiol.* **57**: 791-804.
15. Braun-Dullaeus, R. C., Mann, M. J. and Dzau, V. J. (1998) Cell cycle progression; new therapeutic target for vascular proliferative disease. *Circulation* **98**: 82-89.
16. Mii, S., Khalil, R. A., Morgan, K. G., Ware, J. A. and Kent, K. C. (2000) Mitogen-activated protein kinase and proliferation of human vascular smooth muscle cells. *Am. J. Physiol.* **270**: 2026-2027.

17. Suh, Y. A., Arnold, R. S., Lassegue, B., Shi, J., Xu, X. and Sorescu, D. (1999) Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox 1. *Nature* **401**: 79-82.
18. Kanda, Y., Nishio, E., Kuroki, Y., Mizuno, K. and Watanabe, Y. (2001) Thrombin activates p38 mitogen-activated protein kinase in vascular smooth muscle cells. *Life Sci.* **68**: 1989-2000.
19. Korotaeva, A. A., Samoilova, E. V., Kaminsky, A. I., Pirkova, A. A., Resink, T. J., Erne, P., Prokazova, N. V., Tkachuk, V. A., and Chazov, E. I. (2005) The catalytically active secretory phospholipase A2 type IIA is involved in restenosis development after PTCA in human coronary arteries and generation of atherogenic LDL. *Mol. Cell Biochem.* **270**: 107-113.
20. Hong, Y., Hui, S. S., Chan, B. T. and Hou, J. (2003) Effect of berberine on catecholamine levels in rats with experimental cardiac hypertrophy. *Life Sci.* **72**: 2499-2507.
21. Garcia, M. J., McNamara, P. M., Gordon, T. and Kannel, W. B. (1974) Morbidity and mortality in diabetics in the Framingham population. *Diabetes* **23**: 105-111.
22. Tallquist, M. and Kazlauskas, A. (2004) PDGF signaling in cells and mice. *Cytokine Growth Factor Rev.* **15**: 205-213.
23. Jiang, B., Yamamura, S., Nelson, P. R., Mureebe, L. and Kent, K. C. (1996) Differential effects of platelet-derived growth factor isoforms on human smooth muscle cell proliferation and migration are mediated by distinct signaling pathways. *Surgery* **120**: 427-432.
24. Cospedal, R., Abedi, H. and Zchary, I. (1999) Platelet derived growth factor-BB (PDGF-BB) regulation of migration and focal adhesion kinase phosphorylation in rabbit aortic vascular smooth muscle cells. roles of phosphatidylinositol 3-kinase and mitogen-activated protein kinase. *Cardiovasc Res.* **41**: 708-721.

(2011. 3. 3 접수; 2011. 5. 19 심사; 2011. 5. 23 게재확정)