

## 血府逐瘀湯이 대동맥 평활근 세포에서 NO 생성에 미치는 영향

허재혁, 박진영, 임준모<sup>1)</sup>, 장호현, 이 인, 문병순<sup>1)</sup>

원광대학교 한의과대학 심계내과학교실, 원광대학교 한의학전문대학원<sup>1)</sup>

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

Jae-Hyeok Huh, Gin-Young Park, Jun-Mo Im<sup>1)</sup>, Ho-Hyun Jang, In Lee, Byung-Soon Moon<sup>1)</sup>

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Wonkwang University,  
Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University<sup>1)</sup>

**Objectives :** Nitric oxide (NO) plays an important role in normal and pathophysiological cells as a messenger molecule, neurotransmitter, microbiological agent, or dilator of blood vessels and arteriosclerosis, respectively. This study was undertaken to understand the mechanism of NO production and effect of *Hyeolbuchukeo-tang* (*Xiefuzhuyu-tang*) on NO production in cultured vascular smooth muscle cell (VSMC).

**Methods and Results :** VSMC was isolated from aorta and cultured. Cultured primary cells were identified as VSMC with anti-smooth muscle actin antibody. A large amount of NO was produced in cultured VSMC treated with IFN- $\gamma$  plus TNF- $\alpha$  in a time- and dose-dependent manner. TNF- $\alpha$  was a more efficient stimulator than IFN- $\gamma$  in NO production of cultured VSMC. iNOS protein was detected within 3 hrs and it increased up to 12 hrs in a time-dependent manner. However, accumulated NO in cytokine-treated VSMC was not detected within 3 hrs. NO production in cytokine-treated VSMC showed the dose- and time-dependent manner, and increased up to 48 hrs. The activated VSMC produced a large amount of NO (about 60  $\mu$ M). *Hyeolbuchukeo-tang* (*Xiefuzhuyu-tang*) alone did not induce NO production, but it potentiated the effect of TNF- $\alpha$  on NO production and increased NO production by about 20%. *Hyeolbuchukeo-tang* (*Xiefuzhuyu-tang*) did not affect the transcriptional activity of iNOS gene, but increased the accumulation of iNOS. These results indicate that *Hyeolbuchukeo-tang* (*Xiefuzhuyu-tang*) could modulate the translational level of iNOS. PKC did not modulate NO production, but calcium ionophore A23187 decreased NO production. However, *Hyeolbuchukeo-tang* (*Xiefuzhuyu-tang*) elevated the decreased NO production in A23187-treated VSMC by modulating the stability of iNOS transcripts.

Half-life of the synthesized transcripts appeared to have about 6 hrs. PDTC, an NF- $\kappa$ B inhibitor, blocked the accumulation of iNOS mRNA, indicating that NF- $\kappa$ B served as an important modulator in the transcriptional regulation of iNOS. As *Hyeolbuchukeo-tang* (*Xiefuzhuyu-tang*) potentiated the effect of the TNF- $\alpha$  on NO production but had no additional effect on PDTC-modulated NO production, it is suggested that *Hyeolbuchukeo-tang* (*Xiefuzhuyu-tang*) enhances the TNF- $\alpha$ -mediated NO production of VSMC by modulating the iNOS activity and the stability of iNOS transcripts in activated VSMC having the elevated intracellular calcium ion.

**Conclusions :** This study suggests that *Hyeolbuchukeo-tang* (*Xiefuzhuyu-tang*) has a potential capacity for preventing and treating diseases of the circulation system, including arteriosclerosis. (*J Korean Oriental Med* 2003;24(2):166-178)

**Key Words:** Nitric oxide (NO), *Hyeolbuchukeo-tang* (*Xiefuzhuyu-tang*), vascular smooth muscle cell (VSMC)

· 접수 : 2003년 3월 17일 · 논문심사 : 2003년 4월 12일 · 채택 : 2003년 5월 1일  
· 교신저자 : 문병순, 원광대학교 한의과대학 익산한방병원 전북 익산시 신용동 344-2  
(Tel. 063-850-2102, Fax. 063-841-0033, E-mail: moonbs58@hanmail.net)  
· 본 연구는 원광대학교 학술연구비 지원에 의해 이루어졌습니다.

## 서론

血府逐瘀湯은 清代 王<sup>1)</sup>의《醫林改錯》에 처음으로 수록된 처방으로, 氣滯血瘀·瘀血內阻로 인한 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<sup>2,3)</sup>.

瘀血은 각종 원인에 의하여 체내에 발생된 일종의 病理的 產物로 혈액순환 장애로 인한 각종 症候를 나타내며<sup>4,5)</sup>, 특히 虛血性 心臟疾患이나 中風 등의 病因인 동맥경화증 유발요인의 하나로 작용하고 있다<sup>6,9)</sup>.

동맥경화증은 동맥벽의 비후, 경화 등이 발생하는 국한성의 병변을 총칭하는 것으로 형태학적으로 죽상동맥경화증, Mönckeberg 경화증, 세동맥경화증의 세 종류로 분류된다. 특히 죽상동맥경화증은 주로 관상동맥, 뇌동맥 등에 발생하여 虛血性 心臟疾患이나 虛血性 腦疾患의 중요한 원인이 되고 있으며<sup>10,11)</sup>, 최근에는 동맥경화증의 발병기전과 혈관확장을 유도시키는 nitric oxide (NO)에 대한 연구가 보고되고 있다<sup>12-13)</sup>.

NO는 반감기가 매우 짧은 free radical로서 주로 포유류의 세포에서 생성되어지며, 혈관계·신경계 및 면역계에서 다양한 역할을 수행하는 새로운 종류의 전달물질로 알려졌다. 생체 내에서 NO는 혈관의 이완, 자궁 이완, 신경계에서의 신호전달물질, 혈소판 응집 억제뿐만 아니라 염증세포가 혈관의 내피세포에 부착되는 것을 억제하는 등의 다양한 작용을 한다<sup>14,15)</sup>.

또한 협심증 치료에 사용되는 nitroglycerin과 기타 유기 nitrate의 작용기전은 이들의 대사산물인 NO의 혈관확장 작용과 관계있는 것으로 밝혀졌으며, 최근에는 동맥경화증을 포함한 心血管系疾患에 NO를 생성하는 치료제의 개발과 NOS 유전자를 이용한 유전자 치료에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다<sup>16,17)</sup>.

이에 저자는 瘀血을 치료하는 血府逐瘀湯이 대동맥 평활근 세포에서 NO 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 랫트의 대동맥 평활근 세포를 분리·배양하고, cytokine (TNF- $\alpha$ )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.

## 실험재료 및 방법

### 1. 實驗 材料

#### 1) 실험 동물

성체 랫트(Sprague-Dawley)를 한국화학연구소(대한민국, 청주)로부터 분양 받아 대동맥 평활근 세포를 분리 배양하여 사용하였다.

#### 2) 약재

본 실험에 사용한 血府逐瘀湯의 처방내용은 王1)의《醫林改錯》에 의거하였고, 약재는 원광대학교 익산한방병원에서 구입한 후 精選하여 사용하였다.

#### <Prescription of Hyeolbuchukeo-tang>

韓藥名	生藥名	重量(g)
當歸	Angelicae gigantis Radix	11.25
生地黃	Rehmanniae Radix	11.25
桃仁	Persicae Semen	15.00
紅花	Carthami Flos	11.25
枳殼	Ponciri Eructus	7.5
赤芍藥	Paeoniae Radicis rubra	7.5
元柴胡	Bupleuri Radix	3.75
甘草	Glycyrrhizae Radix	3.75
川芎	Cnidii Rhizoma	3.75
桔梗	Platycodi Radix	5.625
牛膝	Achyranthis Radix	11.25
Total amount		91.875

#### 3) 시약 및 기기

세포배양에 사용한 DMEM 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, cytokine (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ )은 R&D 회사로부터 구입하였다. iNOS에 대한 항체 등 Western blot analysis에 사용되는 시약은 Santa Cluz사에서 구입하였다. Oligonucleotide는 Genotech사에서 주문 제작하여 사용하였고, PMA, PDTC, cycloheximide, actinomycin 등과 기타 실험에 사용된 시약은 Sigma사에서 구입하여 사용하였다.

## 2. 方法

### 1) 검액조제

檢液은 증류수 용매를 이용한 추출방법을 사용하여 조제하였다. 먼저 血府逐瘀湯 2貼分量 183.75g을 증류수 1,000ml과 함께 환저 플라스크에 넣고, 70℃에서 24시간 중탕한 후 거름종이 (Wattman paper)에 여과시키고, 여과되지 않은 약제에 다시 600ml 증류수를 첨가한 후 70℃에서 24시간 중탕과 여과 과정을 2회 더 반복하였다. 각각의 단계에서 여과된 중탕 용액을 3,200rpm으로 20분간 원심분리 후 상층액을 취한 다음, 70℃에서 완전히 건조시켜 53.8g을 조제하였다. 조제된 시료를 65mg/ml 농도로 dimethylsulphoxide (DMSO)에 녹여 본 실험에 사용하였다.

### 2) 대동맥 평활근 세포의 배양

대동맥 평활근 세포의 배양은 Shichiri 등<sup>18)</sup>의 방법에 따라 랫트의 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<sup>19)</sup>에 따라 분광 광도계로 흡광도를 측정하였다. 간략히 기술하면, 검액을 동량의 Griess 시약 (1% sulfanilamide, 0.1% naphthyl-ethylendiamine dihydrochloride, +2.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)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 100 μM sodium orthovanadate)와 함께 4℃에서 30분 반응시켜 세포파쇄액을 만든다. 세포파쇄액의 단백질을 정량한 후 직접적인 Western blot analysis나 면역침전

에 이용하였다. 면역침전은 세포파쇄액을 일차항체 (primary antibodies, 1μg/10<sup>6</sup>세포)와 4℃에서 1시간 반응시킨 후 10% Pansorbin용액 (fixed *staphylococcus aureus*) 100μl을 부가하고 4℃에서 반응시켰다. 형성된 항원-항체 및 Pansorbin 복합체는 EB 용액으로 3,000rpm에서 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 (1mA/cm<sup>2</sup>)을 통하여 nitrocellulose membrane에 이동시켰다. Membrane은 5% skin milk로 blocking시킨 후에 TBS-T 용액으로 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)를 이용하여 제조회사가 제공하는 방법에 따라 수행하였다. 100mm culture dish에서 배양된 3-5×10<sup>6</sup> 세포를 PBS로 세척한 후 1.5ml tube에 옮기고 3,000rpm에서 5분동안 원심분리하여 수거하였다. 상층액을 제거한 세포 침전물은 600μl RNAzol B로 용해시킨 후 60μl chloroform을 첨가하여 얼음속에서 5분동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 13,000rpm, 4℃에서 20분동안 원심분리하여 상층액을 새로운 tube에 옮겼다. 위 상층액에 동량의 isopropanol을 첨가하여 섞은 후 얼음에서 30분동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 13,000rpm, 4℃에서 20분동안 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 3-5μg total RNA와 reverse transcriptase (MMLV; GIBCO,

BRL)를 이용하여 제조회사에서 제공하는 방법에 따라 수행하였다. Total RNA를 70℃에서 10분 변성시킨 후 얼음 속에서 급냉시켜 사용하였다. 역전사 반응은 total RNA (3-5 $\mu$ g), oligo d(T)<sub>12-18</sub> (1 $\mu$ g), 2 $\mu$ l dNTP (10mM), MMLV reverse transcriptase (200U), DTT (10mM), RNasin (1 $\mu$ l; Promega, USA)이 20 $\mu$ l 완충용액 (50mM Tris-Cl pH 8.3, 75mM KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>)에 함유된 반응액으로 42℃에서 60분동안 반응시켜 수행하였다.

역전사 반응액의 2 $\mu$ l가 함유된 30 $\mu$ l의 반응액으로 효소중합반응(Polymerase Chain Reaction; PCR)을 수행하였다. 약술하면, 2 $\mu$ l reverse transcription 반응액, 2 $\mu$ l dNTP (2.5mM), 3 $\mu$ l primer (5 $\mu$ M), Taq DNA polymerase (0.6U; TAKARA)가 함유된 30 $\mu$ l 반응액 (20mM Tris-Cl pH8.0, 100mM KCl, 0.1mM EDTA, 1mM DTT)을 94℃에서 5분동안 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'-CCCTTCCGAAGTTTCTGGCAGCAGCGC-3'와 antisense primer인 5'-ACCGAAGATATCTTCATGATAACG-3'을 사용하였고,  $\alpha$ -actin에 대한 sense primer로 5'-GTGGGGCGC-CCCAGGCACCA-3'와 antisense primer로 5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3'으로 합성하여 사용하였다. PCR 증폭 후 PCR 산물을 1.5% agarose gel에 전개하여 확인하였다.

#### 7) 통계학적 분석

결과의 통계학적 분석은 student's *t*-test를 사용하였으며, *p*-value가 0.05 이하인 것을 유의성이 있는 결과로 분석하였다.

## 실험성적

### 1. NO 생성에 대한 cytokine의 영향

1) 대동맥 평활근 세포의 NO 생성에 대한 IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$ 의 영향

렛트 대동맥 평활근 세포에 cytokine을 처리하면,

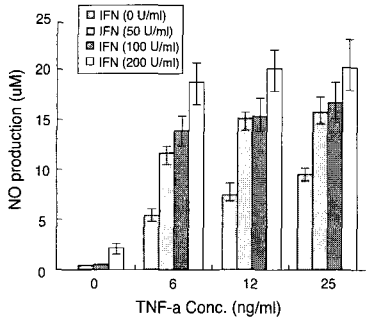
세포 내에 합성이 유도된 iNOS 효소에 의하여 과량의 NO가 생성된다. IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$ 로 렛트로부터 순수 배양한 대동맥 평활근 세포를 활성화시킨 후 세포에서 생성되는 NO의 양을 측정하여 NO의 생성에 대한 cytokine의 영향을 관찰하였다.

Cytokine을 처리하지 않은 대조군에서는 NO의 생성이 없는 반면, 24시간 200 U/ml IFN- $\gamma$ 를 단독 처리한 실험군에서는 약 2 $\mu$ M의 NO가 생성되었다 (Fig. 1). 그러나 25 ng/ml TNF- $\alpha$ 를 단독 처리한 실험군에서는 9 $\mu$ M의 NO가 생성되었다. 이 결과로부터 TNF- $\alpha$ 가 대동맥 평활근 세포에서 과량의 NO를 생성하게 하는 효과적인 cytokine임을 알 수 있었고 IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$ 를 동시에 처리하면 20.3 $\pm$ 2.9 $\mu$ M의 NO가 생성되어 각각을 단독으로 처리하여 생성되는 NO 양을 합한 양보다 많은 NO가 생성되는 상승효과가 있는 것으로 나타났다.

#### 2) Cytokine 처리 시간에 따른 NO의 생성

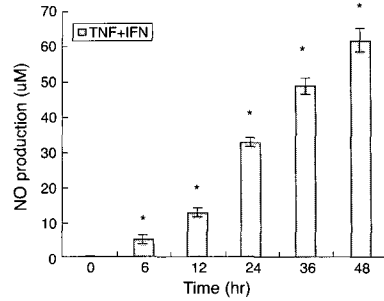
대동맥 평활근 세포를 IFN- $\gamma$  (200 U/ml)와 TNF- $\alpha$  (25 ng/ml)로 활성화시키고, 활성화 시간에 따른 NO 생성량을 Griess 法으로 정량하였다. 대동맥 평활근 세포를  $1 \times 10^6$ /ml의 농도로 분주하여 약 18시간 배양한 후 IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$ 로 활성화시키고, 48시간까지 활성화된 대동맥 평활근 세포에서 생성된 NO의 양을 측정하였다. Cytokine이 처리되지 않은 대조군 세포에서 NO의 생성은 측정이 불가능하였으나, 6, 24, 36시간에 각각 5.3 $\pm$ 0.6, 32.9 $\pm$ 1.5, 48.8 $\pm$ 2.1 $\mu$ M의 NO가 생성되었고 특히 48시간 실험군의 세포에서는 62.0 $\pm$ 3.5 $\mu$ M의 NO가 생성되었다 (Fig. 2).

Cytokine으로 활성화시킨 대동맥 평활근 세포에서 NO 생성을 조절하는 iNOS 효소에 대한 유전자 발현을 알아보기 위하여 동일 조건으로 세포를 활성화시킨 후 세포로부터 total RNA와 세포질 단백질을 분리하고, iNOS에 특이적인 primer와 iNOS에 대한 항체를 이용하여 역전사 효소중합반응과 Western blot analysis를 수행하였다 (Fig. 3). IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$ 로 활성화시킨 대동맥 평활근 세포에서 NO 생성을 조절하는 iNOS mRNA에 대한 평형상태 수준 (steady-state level)의 양은 6시간부터 48시간까지 양적 변화



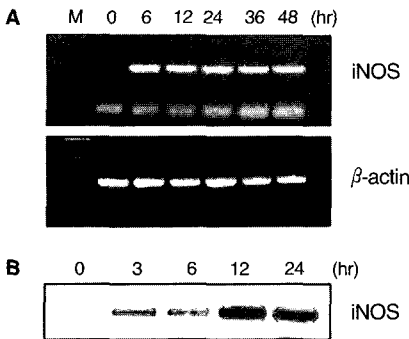
**Fig. 1.** IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  increased the generation of NO from primary rat VSMC in a dose-dependent manner.

Cells ( $10^6$  cells/ml) were treated with IFN- $\gamma$ (up to 200 U/ml), TNF- $\alpha$  (up to 25 ng/ml), or IFN- $\gamma$  plus TNF- $\alpha$  for 24 hr. NO concentration was measured by using Griess reagent. Results represented as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments.  $p < 0.05$  by student's *t*-test, compared to the control.



**Fig. 2.** Combination of IFN- $\gamma$  with TNF- $\alpha$  significantly increased the generation of NO from VSMC in a time-dependent manner.

Cells ( $10^6$  cells/well) were treated with IFN- $\gamma$  (200 U/ml) plus TNF- $\alpha$  (25 ng/ml) for various time period. NO concentration was determined by Griess reagents. Results represented as the mean  $\pm$  SD from three independent experiments. \* $p < 0.01$  by student's *t*-test, compared to the control.



**Fig. 3.** Combination of IFN- $\gamma$  with TNF- $\alpha$  time dependently increased the expression of iNOS mRNA as well as iNOS protein.

Cells were treated with IFN- $\gamma$  (100 U/ml) and TNF- $\alpha$  (12 ng/ml) for 48 hr. Total RNA was isolated from the cells and used for RT-PCR (A). Cell lysates were separated on 10% SDS-PAGE and then, subjected to Western blot analysis for iNOS (B).

가 관찰되지 않고 일정하였다 (Fig. 3A). 또한 동일한 조건으로 활성화시킨 실험군에서 iNOS mRNA로부터 합성된 iNOS 단백질은 활성화시킨 3시간 후부터 Western blot analysis로 관찰되었고, 그 양은 시간에 따라서 증가되는 것으로 나타났다 (Fig. 3B). 위 결과로부터 cytokine으로 활성화시킨 대동맥 평활근 세포

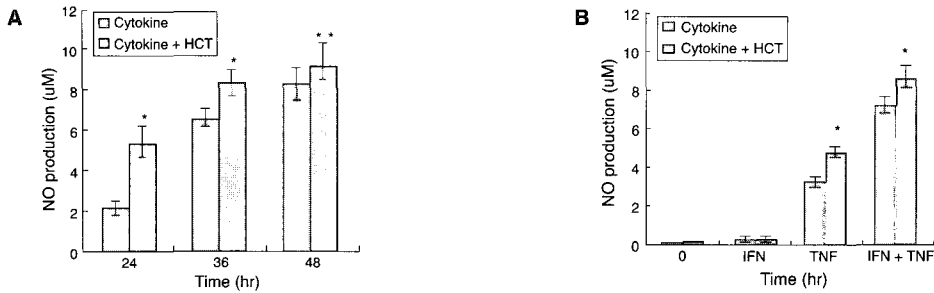
에서 NO의 생성을 조절하는 iNOS 유전자 발현은 상당히 빠른 시간에 유도되고 있음을 알 수 있었고, iNOS 단백질의 생합성도 매우 빠른 시간에 일어나고 있음을 알 수 있었다.

## 2. 대동맥 평활근 세포에서 NO 생성에 대한 血府逐瘀湯의 영향

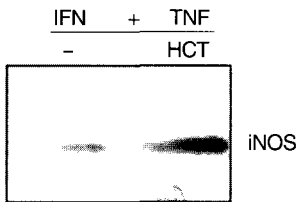
1) 血府逐瘀湯이 활성화된 대동맥 평활근 세포의 NO 생합성에 미치는 영향

Cytokine으로 활성화시킨 대동맥 평활근 세포에서 유도된 iNOS 유전자 발현이 NO의 생성을 조절함을 확인하였으며 (Fig. 1-3), 이러한 실험 조건에서 血府逐瘀湯이 대동맥 평활근 세포에서 NO의 생성을 조절하는 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향과 NO 생성에 대한 조절 기전을 알아보기 위하여 血府逐瘀湯을 1시간 전처리한 후 cytokine으로 36시간 활성화시킨 대동맥 평활근 세포에서 생성되는 NO의 양을 측정하였다 (Fig. 4).

血府逐瘀湯을 단독처리한 실험군에서 NO의 생성은 유도되지 않았지만, 血府逐瘀湯과 IFN- $\gamma$ 로 활성화시킨 실험군에서 NO는  $0.2 \pm 0.1 \mu\text{M}$ 로 나타나 유의한 생성의 변화는 없었다. 그러나 IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$



**Fig. 4.** *Hyeolbuchukeo-tang*(*Xiefuzhuyu-tang*) increased the NO production induced by cytokines in rat VSMC. A) Effect of *Hyeolbuchukeo-tang* on the NO production of cytokine-activated VSMC. B) Kinetic effect of *Hyeolbuchukeo-tang* on NO production. Nitrite concentration was determined by Griess reagents. Results represented as the mean  $\pm$  SD of the three independent experiments. \* $p < 0.001$  compared to  $TNF-\alpha$  only or  $TNF-\alpha$  plus  $IFN-\gamma$ , \*\* $p < 0.005$  compared to  $TNF-\alpha$  plus  $IFN-\gamma$ .



**Fig. 5.** *Hyeolbuchukeo-tang*(*Xiefuzhuyu-tang*) decreased the expression of iNOS protein by  $IFN-\gamma$  and  $TNF-\alpha$ . Cells were pre-treated with *Hyeolbuchukeo-tang* ( $260 \mu g/ml$ ) for 1 hr and then followed by the addition of  $IFN-\gamma$  ( $100 U/ml$ ) and  $TNF-\alpha$  ( $12 ng/ml$ ) for 12 hr. Cell lysate was separated on 10% SDS-PAGE and then, subjected to Western blot analysis with anti-iNOS antibody.

로 처리한 실험군의  $7.3 \pm 0.3 \mu M$ 에 비해  $IFN-\gamma$ ,  $TNF-\alpha$  및 血府逐瘀湯으로 처리한 실험군은  $8.6 \pm 0.7 \mu M$ 로 NO 생성이 약 25%가 증가되는 결과를 나타내었다 (Fig. 4A).

血府逐瘀湯을 대동맥 평활근 세포에 1시간 전처리하고 cytokine으로 세포를 24, 36, 48시간 활성화시킨 후 분비하는 NO 양을 측정된 결과,  $5.3 \pm 0.9$ ,  $8.4 \pm 0.6$ ,  $9.2 \pm 1.2 \mu M$ 로 血府逐瘀湯이 대동맥 평활근 세포에서 NO 생성을 상향 조절하고 있음을 확인하였다 (Fig. 4B). NO 생성을 증가시키는 血府逐瘀湯의 효능은 cytokine을 처리한 24시간 실험군에서 가장 현저하였다.

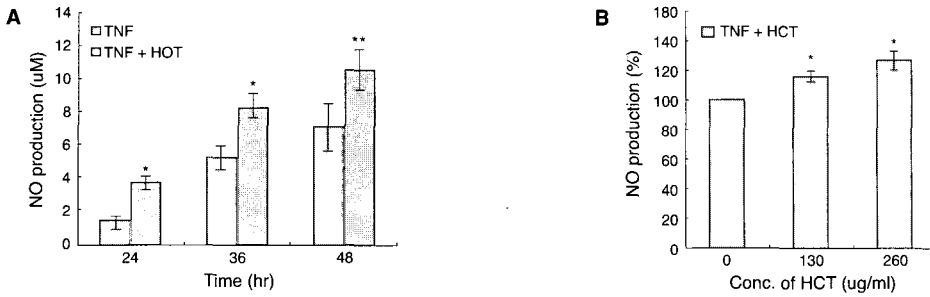
血府逐瘀湯이 NO 생성을 상향조절하는 결과로부터 血府逐瘀湯이 NO 생성을 조절하는 iNOS의 세포

내 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 血府逐瘀湯으로 세포를 1시간 전처리 한 후  $IFN-\gamma$  ( $100 U/ml$ )와  $TNF-\alpha$  ( $12 ng/ml$ )로 세포를 활성화시키고, iNOS에 대한 항체를 이용하여 Western blot analysis를 수행하였다 (Fig 5). 血府逐瘀湯이 NO 생성을 상향조절하는 효능은 세포내 iNOS의 합성량을 상향 조절함으로써 이루어진 결과임을 알 수 있었다.

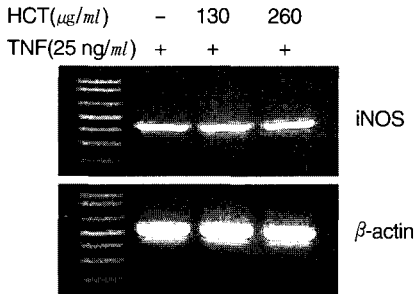
2) 血府逐瘀湯이  $TNF-\alpha$ 로 활성화된 대동맥 평활근 세포의 NO 생성에 미치는 영향

血府逐瘀湯이  $TNF-\alpha$ 로 활성화시킨 대동맥 평활근 세포에서 NO의 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 血府逐瘀湯을 1시간동안 전처리한 후  $TNF-\alpha$ 로 활성화시킨 24, 36, 및 48시간 후에 각각  $3.7 \pm 0.4$ ,  $8.2 \pm 0.8$ ,  $10.6 \pm 1.2 \mu M$ 의 NO가 생성되었다 (Fig 6A). 또한 血府逐瘀湯의 농도가 130 및  $260 \mu g/ml$ 일 때, 각각  $116 \pm 3.5$ ,  $127 \pm 6.3 \%$ 의 NO가 생성되었다 (Fig. 6B). 따라서 血府逐瘀湯은 시간 및 농도 의존적으로 NO의 생성을 증가시키는 효과가 있음을 알 수 있었다.

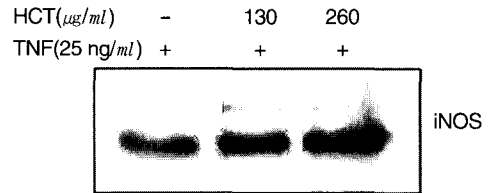
血府逐瘀湯이 NO의 생성을 촉진하는 iNOS 유전자의 발현을 어떻게 조절하고 있는가를 알아보기 위하여 血府逐瘀湯을 1시간 전처리한 후  $TNF-\alpha$ 로 평활근 세포를 9-12시간 활성화시키고, NO의 합성을 유도하는 iNOS의 mRNA량을 역전사 효소중합반응으로 증폭하였으며 (Fig. 7), 또한 iNOS 단백질의 발현을 Western blot analysis로 조사하였다 (Fig. 8). 위



**Fig. 6.** Effect of *Hyeolbuchukeo-tang*(*Xiefuzhuyu-tang*) on NO production in TNF- $\alpha$ -activated VSMC. *Hyeolbuchukeo-tang* increased the generation of NO from VSMC induced TNF- $\alpha$  by a time (A) and dose (B)-dependent manner. Cells were pre-treated with *Hyeolbuchukeo-tang* for 1 hr and followed by the addition of TNF- $\alpha$  for the indicated time (A) or 24 hr (B). NO concentration was determined by Griess reagents. Results represented as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \* $p < 0.001$  compared to TNF- $\alpha$  only, \*\* $p < 0.005$  compared to TNF- $\alpha$  only.



**Fig. 7.** *Hyeolbuchukeo-tang*(*Xiefuzhuyu-tang*) did not affect the accumulation of iNOS mRNA of VSMC. Cells were pre-treated with various concentrations of *Hyeolbuchukeo-tang* for 1 hr and followed by the addition of TNF- $\alpha$  for 9 hr. RT-PCR was performed with 2 µg of total RNA, and the same amount of loaded RNA was confirmed by  $\beta$ -actin expression.



**Fig. 8.** *Hyeolbuchukeo-tang*(*Xiefuzhuyu-tang*) increased the accumulation of the iNOS protein by TNF- $\alpha$  in VSMC. Cells were pre-treated with *Hyeolbuchukeo-tang* for 1 hr and followed by treatment of TNF- $\alpha$  for 12 hr. Western blot analysis from the lysates was performed with anti-iNOS antibody. Immunoreactive band was visualized by ECL kit.

실험결과 血府逐瘀湯은 TNF- $\alpha$ 로 활성화된 대동맥 평활근 세포에서 iNOS mRNA의 합성에는 영향을 주지 않았다 (Fig. 7). 그러나 세포내의 iNOS 효소의 양은 血府逐瘀湯의 농도에 의존적으로 증가되었다 (Fig. 8). 이상의 결과는 血府逐瘀湯이 iNOS 효소의 양을 증가시킴으로써 대동맥 평활근 세포에서 NO 생성을 증가시켰음을 시사한다.

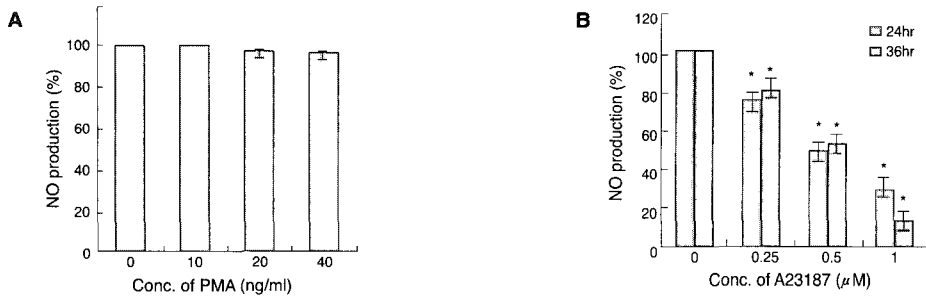
3. 血府逐瘀湯이 대동맥 평활근 세포의 NO 생성과 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향

1) PKC와 세포내 calcium 이온 농도가 NO 생성에

미치는 영향

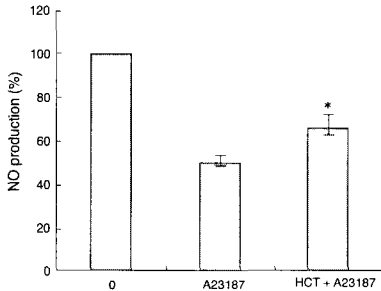
세포내 유도성 유전자 발현 (inducible gene expression)은 세포 외부의 자극에 의하여 세포내 protein kinase C (PKC)의 활성화와 세포내 증가된 calcium 농도가 2차 신호전달분자로 작용하여 유전자의 발현을 조절하게 된다. 본 실험에서는 cytokine으로 자극한 대동맥 평활근 세포에서 PKC와 세포내 증가된 calcium 이온이 NO 생성 및 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 PKC 활성물질로 알려진 phorhol 12-myristate 13-acetate (PMA)와 세포질내 calcium 농도 증가제인 A23187을 처리한 후 NO 생성을 관찰하였다.

다양한 농도의 PMA를 대동맥 평활근 세포에 1시간 전처리한 후 NO의 생성을 조사한 결과 PMA는



**Fig. 9.** Effect of PMA and A23187 on NO production from VSMC.

Cells were treated with various concentrations of PMA (A) and A23187 (B) for 24 hr or 36 hr. NO concentration was determined with Griess reagents. Results represented as the mean ± SD of three independent experiments. \* $p < 0.001$  by student's  $t$ -test, compared to the control (B).



**Fig. 10.** Effect of *Hyeolbuchukeo-tang*(*Xiefuzhuyu-tang*) on the A23187-induced production of NO by TNF- $\alpha$  in VSMC.

Cells were pre-treated with 0.5  $\mu\text{g/ml}$  A23187 or 0.5  $\mu\text{g/ml}$  A23187 plus 260  $\mu\text{g/ml}$  *Hyeolbuchukeo-tang* (HCT) for 1 hr before treatment with TNF- $\alpha$  (25  $\text{ng/ml}$ ) for 12 hr. NO concentration was measured by using Griess reagents. Results represented as the mean ± SD of three independent experiments. \* $p < 0.005$  compared to A23187 only.

NO의 생성에 영향을 주지 못했다 (Fig. 9A). 그러나 A23187을 0.25, 0.5, 및 1.0 $\mu\text{M}$  농도를 24시간 처리한 실험군에서는 NO 생성이 각각  $75 \pm 2.7$ ,  $48 \pm 6.8$ , 및  $29 \pm 5.5$  %, 36시간 처리한 실험군에서는 각각  $80 \pm 5.8$ ,  $52 \pm 5.6$ ,  $13 \pm 4.4$  %의 NO 생성 감소를 나타내었다 (Fig. 9B).

2) 血府逐瘀湯이 A23187로 활성화시킨 대동맥 평활근 세포의 NO 생성과 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향

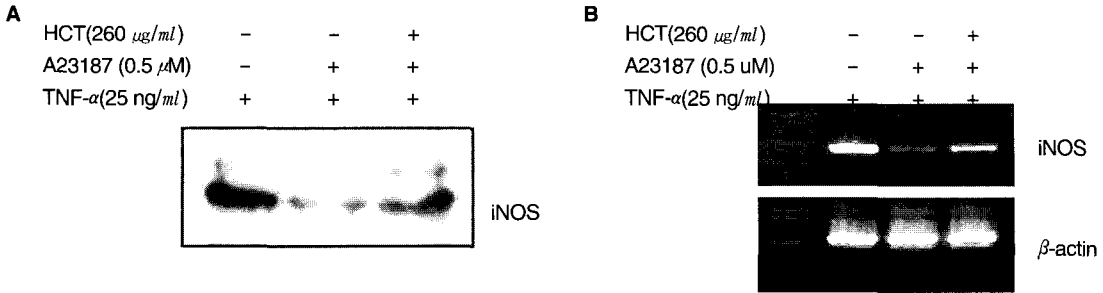
iNOS의 활성화는 세포내 calcium 이온에 무관하게

반응하고 있으나, 세포질 내에 증가된 calcium 이온은 NO의 생성을 감소시키고 있는 것으로 나타났다. 따라서 血府逐瘀湯이 대동맥 평활근 세포에서 A23187에 의한 NO의 생성과 iNOS 유전자의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 血府逐瘀湯과 A23187을 1시간 전 처리하였다. A23187 단독 (0.5 $\mu\text{M}$ ) 혹은 血府逐瘀湯과 병용으로 1시간 전처리한 후 TNF- $\alpha$ 로 12시간동안 대동맥 평활근 세포를 활성화시키고, NO의 생성량을 비교한 결과, A23187은 TNF- $\alpha$ 에 의하여 활성화된 대동맥 평활근 세포에서 분비하는 NO의 양을  $50.2 \pm 3.5$  %로 약 45 % 감소시켰으나, 血府逐瘀湯을 동시 처리한 경우  $66.7 \pm 5.4$  %로 약 30 % 감소시키는 결과로 보아 血府逐瘀湯은 A23187에 의해 감소된 NO의 생성을 증가시키는 효능이 있음을 나타내었다 (Fig. 10).

위와 동일한 조건에서 세포질내 존재하는 iNOS 단백질의 양을 Western blot analysis로 확인한 결과, 血府逐瘀湯 농도에 의존적으로 세포질내의 iNOS 단백질의 양이 증가되었다 (Fig. 11A). 이상의 결과는 血府逐瘀湯이 A23187로 활성화된 대동맥 평활근 세포에서 감소된 iNOS 단백질의 양을 증가시켜 NO의 생성을 증가시킴을 시사한다.

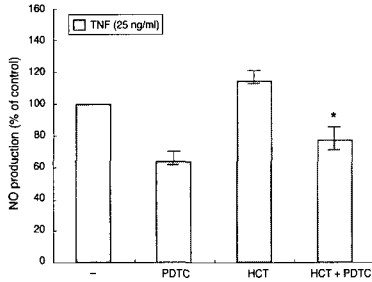
血府逐瘀湯이 A23187에 의하여 세포질내 iNOS 단백질의 감소를 회복시켰으며, 이러한 결과가 유전자의 발현 수준에서 iNOS mRNA의 양적 변화를 동반하는지 여부를 역전사 효소중합반응 방법으로 조





**Fig. 11.** Effect of *Hyeolbuchukeo-tang*(*Xiefuzhuyu-tang*) on the expression of iNOS protein and iNOS mRNA in TNF- $\alpha$ -treated VSMC.

Cells were treated with *Hyeolbuchukeotang* (260  $\mu\text{g/ml}$ ) only or *Hyeolbuchukeotang* (260  $\mu\text{g/ml}$ ) plus A23187 (0.5  $\mu\text{M}$ ) for 1 hr before treatment of TNF- $\alpha$  (25 ng/ml) for 12 hr (A) or 9 hr (B). Cell extracts were separated on 10% SDS-PAGE and then subjected to Western blot analysis with anti-iNOS antibody (A). RT-PCR was performed with 2  $\mu\text{g}$  total RNA and iNOS specific primers (B).



**Fig. 12.** Effect of *Hyeolbuchukeo-tang*(*Xiefuzhuyu-tang*) and PDTC on NO production by TNF- $\alpha$  in VSMC.

Cells were treated with PDTC alone, *Hyeolbuchukeotang* alone, and PDTC plus *Hyeolbuchukeo-tang*, for 1 hr before treatment of TNF- $\alpha$  for 12 hr. NO concentration was determined by Griess reagents. Results represented as the mean  $\pm$  SD of three independent experiments. \* $p < 0.005$  compared to TNF- $\alpha$  plus PDTC.

사하였다. 그 결과, 血府逐瘀湯은 A23187에 의하여 감소된 iNOS mRNA의 안정성을 증가시킴으로써 감소된 iNOS mRNA의 양을 증가시켰으며, 궁극적으로 iNOS 단백질의 증가와 함께 NO 생성을 증가시키는 효능이 있음을 나타내었다 (Fig. 11B).

3) 血府逐瘀湯이 PDTC에 의한 NO 생성과 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향

항산화제이며 전사조절인자 NF- $\kappa$ B의 저해제로 알려진 PDTC가 대동맥 평활근 세포의 NO 생성과 iNOS 유전자 발현에 미치는 영향과 PDTC에 의한

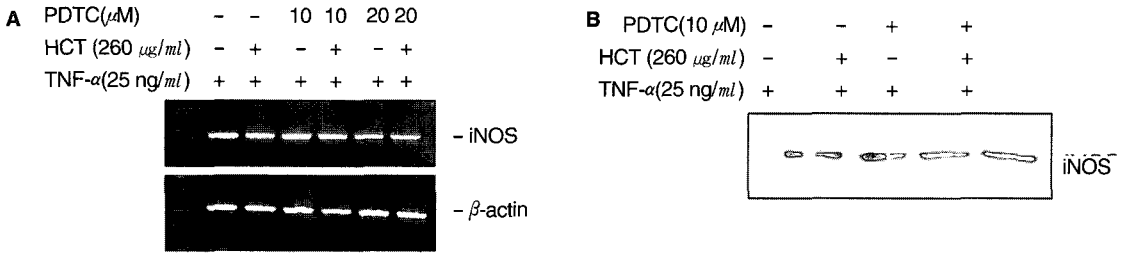
NO 생성에 대한 血府逐瘀湯의 영향을 알아보기 위하여 대동맥 평활근 세포에 PDTC 단독 혹은 血府逐瘀湯과 PDTC를 함께 1시간 전처리한 후 NO의 생성과 iNOS mRNA 및 단백질의 양적인 변화를 관찰하였다.

PDTC 단독 혹은 PDTC와 血府逐瘀湯을 1시간 전처리한 후 TNF- $\alpha$ 로 12시간 활성화시킨 대동맥 평활근 세포의 NO 생성은 각각  $65 \pm 5.8$ ,  $78 \pm 8.1$  %로 약 35 %와 20 %가 감소되었다 (Fig. 12).

PDTC가 NO 생성을 조절하는 iNOS 유전자의 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 동일 조건으로 1시간 전처리하고, TNF- $\alpha$ 로 세포를 각각 9시간 및 12시간 활성화시킨 후 역전사 효소중합반응과 Western blot analysis로 iNOS 유전자의 발현을 알아본 결과, 앞의 결과와 동일하게 血府逐瘀湯은 평활근 세포에서 NO 생성을 약 15 % 증가시키고 있으나, PDTC에 의한 NO 생성에 血府逐瘀湯의 영향이 없는 결과와 동일하게 역전사 효소중합반응과 Western blot analysis에 의한 iNOS 유전자의 발현에도 영향이 없음을 나타내었다 (Fig. 13).

## 고찰

瘀血은 각종 원인에 의하여 체내에 발생된 일종의



**Fig. 13.** Effect of *Hyeolbuchukeo-tang*(*Xiefuzhuyu-tang*) and PDTC on the expression of iNOS mRNA and iNOS protein in TNF- $\alpha$ -treated VSMC.

Cells were treated with mock, PDTC (10  $\mu M$ ) alone, and PDTC plus *Hyeolbuchukeo-tang* before treatment of TNF- $\alpha$  (25 ng/ml) for 9 hr (A) or 12 hr (B). RT-PCR was performed with 2  $\mu g$  total RNA and iNOS specific primers (A). Cell extracts were separated on 10 % SDS-PAGE and then subjected to Western blot analysis with anti-iNOS antibody (B).

病理的 産物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 症候群까지도 포함 하며<sup>6,7)</sup> 특히 虛血性 心臟疾患이나 中風 등의 주된 病因인 동맥경화증의 유발요인의 하나로 작용하고 있으며, 이에 대한 治法으로는 活血祛瘀法이 제시되고 있다<sup>8,9)</sup>.

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 구성되어 있으며 活血祛瘀·行氣의 效能이 있으므로 氣滯血瘀·瘀血內阻로 인한 諸疾患에 응용되고 있다<sup>3,5)</sup>.

活血祛瘀 效能이 있는 處方이나 單味에 대한 연구가 매우 활발하게 보고되고 있으며<sup>20,22)</sup>, 瘀血이 동맥경화증의 유발 인자로 제시되고 있으므로 瘀血을 치료하는데 활용되고 있는 血府逐瘀湯이 대동맥 평활근 세포에서 NO 생성에 미치는 영향을 究明하고자 하였다.

NO는 비교적 불안정하고, 잠정적으로 유해한 자유 라디칼 가스로서 면역기능과 혈관확장을 조절하는 2차 정보물질로도 작용하며, 뇌와 말초신경계의 신경전달물질로도 작용하고 있는 생리활성물질이다. 이러한 정상적인 기능 외에도 NO는 고혈압, 퇴행성 뇌졸중, 뇌졸중, 폐혈성 속과 같은 병리와도 관계가

있다<sup>12,13)</sup>.

iNOS는 여러 가지 cytokine과 세균내독소 등의 자극제에 의하여 많은 세포에서 발현이 유도되며, 생쥐 대식세포에서 최초로 분리되었다. iNOS는 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)상에서 125-135 kD의 수용성 단백질로 세포질에 존재하는 것으로 밝혀졌다. 대식세포, 종양세포, 간세포, 혈관간세포, 내피세포, 평활근세포, 심근세포, 신경교세포 및 각질세포에서 비교적 많은 양의 NO를 생성하는데, 이것은 iNOS 유전자 발현이 유도되어 많은 양의 iNOS가 생합성된 결과로 밝혀졌다<sup>23,28)</sup>.

iNOS는 전사단계에서 조절된다. 따라서 활성화되지 않은 세포에서의 iNOS의 발현은 극히 낮은 수준이거나 없으므로, 효소 활성이 전혀 나타나지 않는다. 대식세포 및 다른 세포에서 iNOS의 발현을 유도하는 물질로는 세균내독소와 interleukin-1 (IL-1), IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$  등과 같은 cytokine으로 밝혀졌다. 생쥐 대식세포에서 iNOS의 상승적 유도효과는 IFN과 LPS 혹은 IFN- $\gamma$ 와 TNF의 조합에 의하여 이루어지고, 사람과 랫트 간세포에서는 IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 와 세균내독소 등 4가지 자극제에 의하여 이루어진다. 섬유아세포와 혈관 평활근세포에서는 cyclic AMP를 증가시키는 forskolin이나 dibutyryl cAMP, protein kinase C (PKC) 자극제인 tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA or PMA)와 platelet-derived growth

factor (PDGF)와 fibroblast growth factor (FGF)인 성장인자 등의 자극제가 cytokine보다도 효과적인 iNOS 유전자 발현 유도물질로 밝혀졌다<sup>29-34)</sup>.

본 연구는 동맥경화를 포함하는 순환기계 질환에 밀접한 관계가 있는 NO에 대하여 血府逐瘀湯이 대동맥 평활근 세포에서 미치는 영향과 그의 기전을 구명하고자 시행하였다.

우선 Cytokine이 대동맥 평활근 세포의 NO 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 대동맥 평활근 세포를 cytokine인 IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$ 로 활성화시키고, NO 생성량을 측정 한 결과, 주로 TNF- $\alpha$ 에 의하여 조절되는 신호전달 경로에 의하여 매개됨을 알 수 있었다. TNF- $\alpha$ 에 의해 생성되는 NO량은 IFN- $\gamma$ 에 의하여 유도되는 양보다 많고, 농도 · 시간 의존적으로 생성되는 것으로 나타났다 (Fig. 1-3).

위 결과로 보아 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 여러 작용을 일으켜 동맥경화의 병인을 제거하는데 관여하게 될 것으로 추정된다. 따라서 생체 내에서는 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이 대동맥 평활근 세포에서 NO 생성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$ 와 동시에 혹은 TNF- $\alpha$ 와 동시에 처리한 결과, IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$  혹은 TNF- $\alpha$ 에 의하여 조절되는 NO의 생성을 상향 조절하는 효능이 있는 것으로 나타났으며 (Fig. 4, 6), 이러한 효능은 iNOS 유전자의 전사활성에 관여하는 mRNA의 축적을 증가시키는 작용보다는 세포질 내의 iNOS 효소의 양을 증가시켜서 유발되는 것으로 나타났다(Fig. 5, 7, 8).

세포 외부로부터의 자극은 일반적으로 세포 내 Ca<sup>2+</sup> 증가와 PKC 활성화를 유발하여 세포 생리활성

유전자를 발현시키는데, PKC는 평활근 세포의 NO 생성과는 무관하였고(Fig. 9A), 세포 내 Ca<sup>2+</sup>는 농도에 비례하여 NO 생성이 감소되었다(Fig. 9B).

외부 자극에 의하여 활성화된 세포는 세포 내에 Ca<sup>2+</sup> 농도가 증가하는데, 세포 내 증가된 Ca<sup>2+</sup>는 유전자 발현의 2차 정보물질로서 유전자의 발현을 조절하게 된다. 위 과정에서 세포질 내에 증가된 Ca<sup>2+</sup> 농도가 NO의 생성을 감소시키는 기전을 알아보기 위하여 역전사 효소중합반응과 Western blot analysis로 iNOS mRNA와 단백질의 세포질 내 농도를 확인한 결과, iNOS mRNA와 효소의 양적인 감소가 일어남을 알 수 있었다. 위의 결과는 대식세포에서 세포내 증가된 calcium 농도가 mRNA의 안정성을 감소시키는 기전과 일치함을 보였다.

위의 결과로 보아 血府逐瘀湯은 NO의 생성 및 iNOS 유전자 발현을 증가시키는 효능이 있는 것으로 나타났으며, 이는 血府逐瘀湯이 세포 내에 증가된 Ca<sup>2+</sup>로 인하여 감소된 mRNA의 안정성을 증가시킴으로써 조절됨을 알 수 있었다 (Fig. 10, 11)

iNOS mRNA의 안정성에 대한 血府逐瘀湯의 영향을 알아본 결과에서, 血府逐瘀湯은 세포 내 증가된 Ca<sup>2+</sup>에 의해 감소된 mRNA 안정성을 증가시키는 효능이 있는 것으로 나타났다. 또한 PDTC에 의한 NO의 생성에 대한 血府逐瘀湯의 영향도 actinomycin D를 처리한 경우와 동일한 결과로 나타났다 (Fig. 12, 13).

위의 결과로 보아 血府逐瘀湯은 세포의 활성화에 따른 세포질 내에 증가된 Ca<sup>2+</sup>에 의하여 감소되는 mRNA의 안정성을 증가시킴으로써 NO 생성을 상향 조절하는 효능이 있으며, cytokine에 의하여 축적되는 iNOS의 양을 증가시키는 효능이 여러 저해제의 처리에도 불구하고 유지되는 결과로 보아 mRNA 번역단계의 활성을 상향 조절하거나, 번역과정으로 합성된 iNOS의 안정성을 증가시키는 효능이 있는 것으로 추정된다.

위의 결과를 종합하면, TNF- $\alpha$ 와 동시처리한 血府逐瘀湯은 대동맥 평활근 세포에서 mRNA의 반감기를 연장시켜 iNOS 단백질을 증가시키므로써 NO 생성을 증가시키는 효능이 있음을 알 수 있었다.

NO는 동맥경화증과 혈관확장에 밀접하게 관련되어 있으므로 대동맥 평활근 세포에서 NO의 생성을 조절할 수 있는 약이나 화학물질은 동맥경화증의 예방과 치료에 사용될 수 있을 것으로 추정하고 있다. 따라서 최근에는 NOS 유전자를 이용하여 동맥경화증 및 순환기계의 질병을 치료하는 유전자치료에 관한 실험 모델의 제공과 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다<sup>16)</sup>. 이러한 관점에서 대동맥 평활근 세포에서 NO의 생성을 상향 조절하는 血府逐瘀湯은 동맥경화증과 같은 순환기계 질환에 대한 예방 및 치료제로서 응용되어질 수 있는 잠재적 가능성이 매우 큰 것으로 사료된다.

## 결론

血府逐瘀湯이 대동맥 평활근 세포에서 NO 생성에 미치는 영향을究明하기 위하여 랫트의 대동맥 평활근 세포를 분리·배양하고, cytokine으로 활성화시킨 대동맥 평활근 세포에 血府逐瘀湯을 처리한 후 NO의 생성, iNOS mRNA와 단백질 생합성 등을 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$ 에 의해 활성화시킨 대동맥 평활근 세포에서는 iNOS 유전자의 발현에 의해 시간 및 농도에 의존적으로 과량의 NO가 생성되었다.
  2. 血府逐瘀湯은 단독 혹은 IFN- $\gamma$ 와 병용처리한 대동맥 평활근 세포의 NO 생성을 조절하지 못하였으나, IFN- $\gamma$ 와 TNF- $\alpha$ 로 동시처리한 군에서는 시간의존적으로 NO 생성을 증가시켰다.
  3. 血府逐瘀湯은 TNF- $\alpha$ 로 처리한 대동맥 평활근 세포의 NO 생성을 시간 및 농도의존적으로 증가시켰다.
  4. 血府逐瘀湯은 TNF- $\alpha$ 로 처리한 군에서 iNOS mRNA의 분해를 억제하여 mRNA의 안정성을 증가시켰다.
  5. 血府逐瘀湯은 TNF- $\alpha$ 로 처리한 군에서 세포질 내 축적된 iNOS 단백질을 증가시킴으로써 NO의 생성을 증가시켰다.
  6. 血府逐瘀湯은 대동맥 평활근 세포에서 Ca<sup>2+</sup>에 의하여 감소된 iNOS mRNA의 반감기를 연장시켜 NO 생성을 증가시켰다.
- 이상의 결과로 보아 血府逐瘀湯은 대동맥 평활근 세포에서 iNOS mRNA의 안정성을 높이고, iNOS 단백질 합성을 증가시킴으로써 NO 생성을 증가시키는 효능이 있으므로 血府逐瘀湯은 동맥경화증을 포함한 心血管系 疾患에 대한 예방 및 치료에 유효하게 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

## 참고문헌

1. 王清任. 醫林改錯. 서울:醫聖堂.1994:61-65.
2. 鄭遇悅. 韓方臨床病理學. 서울:永林社.1998:353.
3. 尹吉榮. 東醫臨床方劑學. 서울:明寶出版社.1992:265-266.
4. 康舜洙. 바른方劑學. 서울:大星文化社.1996:258-259.
5. 尹用甲. 東醫方劑와 處方解說. 서울:醫聖堂.1998:199.
6. 田炳薰 外. 瘀血의 概念에 관한 東醫學의 考察. 동의 병리학회지.1989;4:93-102.
7. 宋驚冰. 中醫病因病機學. 北京:人民衛生出版社.1987:112-119,238.
8. 崔榮植. 麝香祛瘀丸이 동맥경화증에 미치는 영향. 경희대학교 대학원. 1996.
9. 崔賢 外. 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.
10. 大韓病理學會. 병리학. 서울:고문사.1995:474-476.
11. 해리슨내과학 편찬위원회. 해리슨내과학. 서울:도서출판 정담.1997:1189-1202.
12. Ignarro, L. J., T. M. Burke, K. S. Wood, M. S. Wolin and P. J. Kadowitz. Association between cyclic GMP accumulation and acetylcholine-elicited relaxation of bovine intrapulmonary artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*1984; 228:682-690.
13. 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.
14. Marletta, M. A. Nitric oxide synthase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.*1993;268:12231-12234.
15. Nathan, C. and Q. W. Xie. Regulation of the biosyn-

- thesis of nitric oxide. *J. Biol. Chem.*1994;269:13725-13728.
16. Michael J. Mann. Gene therapy for peripheral arterial disease. *Molecular Medicine Today.* 2000;6:285-291.
  17. 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.
  18. 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.
  19. 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.* 1987;84:6369-6373.
  20. 金東秀 外. Endotoxin으로 유발된 白鼠의 血栓症에 身痛逐瘀湯이 미치는 영향. 동의병리학회지.1989; 4:47-56.
  21. 李錫雨 外. 活絡效靈丹이 endotoxin으로 유발된 白鼠의 血栓症에 미치는 영향. 동의병리학회지1992;7:51-59.
  22. 蘇敬順. 豨薺이 endotoxin으로 유발된 흰쥐의 血栓에 미치는 영향. 대한예방한의학회지.1998; 2(1):165-173.
  23. Mayer, B., M. John, B. Heinzl, E. R. Werner, H. Wachter, G. Schultz and E. Bohme. Brain nitric oxide synthase is a bioprotein and falvin-containing multi-functional oxido-reductase. *FEBS Lett.*1991;288:187-191.
  24. Hevel, J. M., K. A. White and M. A. Marletta. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase : Identification as a falvoprotein. *J. Biol. Chem.*1991;266:22789-22791.
  25. Stuehr, D. J., H. J. Cho, N. S. Kwon, M. F. Weise and C. F. Nathan. Purification and characterization of the cytokine- induced macrophage nitric oxide synthase : an FAD- and FMN- containing flavoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*1991;88:7773- 7777.
  26. Robers, A. B., Y. Vodovotz, N. S. Roche, M. B. Sporn and C. Nathan. Role of nitric oxide in antagonistic effects of transforming growth factor- $\beta$  and interleukin- $1\beta$  on the beating rate of cultured cardiac myocytes. *Mol. Endocrinol.*1992;6:1921-1930, 1992.
  27. Galea, E., D. L. Reinstein and D. J. Reis. Induction of calcium-independent nitric oxide synthase activity in primary rat glial culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*1992;89:10945-10949.
  28. Heck, D. E., D. L. Laskin, C. R. Gardner and J. D. Laskin. Epidermal growth factor suppresses nitric oxide and hydrogen peroxide production by keratinocytes: Potential role for nitric oxide in the regulation of wound healing. *J. Bil. Che.*1992;267:21277-21280.
  29. Ding, A. H., C. F. Nathan and D. J. Stuehr. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokine and evidence for independent production. *J. Immunol.*1988;141:2407-2419.
  30. Drapier, J. C., J. Wietzerbin and J. B. Hibbs. Interferon-gamma and tumor necrosis factor induce the L-arginine-dependent cytotoxic effector mechanism in murine macrophages. *Eur. J. Immunol.*1988;18:1587-1592.
  31. Gilbert, R. S. and H. R. Herschman. Macrophage nitric oxide synthase is a glucocorticoid-inhibitable primary response gene in 3T3 cells. *J. Cell Physiol.*1993; 157:128-132.
  32. Koide, M., Y. Kawahara, I. Nakayama, T. Tsuda and M. Yokoyama. Cyclic AMP-elevating agents induce an inducible type of nitric oxide synthase in cultured vascular smooth muscle cells: Synergism with the induction elicited by inflammatory cytokines. *J. Biol. Chem.*1993;268:24959-24966.
  33. Hortelano, S., A. M. Genaro and L. Bosca. Phorbol esters induce nitric oxide synthase and increase arginine influx in cultured peritoneal macrophages. *FEBS Lett.*1993;320:135-139.
  34. Gilbert, R. S. and H. R. Herschman. Transforming growth factor beta deferentially modulates the inducible nitric oxide synthase gene in distinct cell types. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*1993;195:380-384.