

사람 대동맥 평활근 세포에서 二妙散의 항동맥경화 활성

윤현정¹, 허숙경¹, 이효승^{1,2}, 김태훈², 김동완², 김선모², 박선동^{1,2*}

1: 동국대학교 한의과대학 심혈관계질환 천연물 연구개발센터 2: 동국대학교 한의과대학 방제학교실

Anti-atherosclerosis Effect of *Imyosan* Extract in Human Aortic Smooth Muscle Cells

Hyun-Jeong Yun¹, Sook-Kyoung Heo¹, Hyo-Seung Yi^{1,2}, Tae-Hoon Kim²,
Dong-Wan Kim², Sun-Mo Kim², Sun-Dong Park^{1,2*}

1: Cardiovascular Medical Research Center, College of Oriental Medicine, Dongguk University
2: Department of Prescriptionology, Collage of Oriental Medicine, Dongguk University

ABSTRACT

Objectives : This study was evaluated to elucidate the inhibitory potential of Imyosan (IMS) and its components, Phellodendri Cortex (PC; *Phellodendron amurense* Rupr., Hwangbaek in Korean) and Atractylodis Rhizoma (AR; *Atractylodes lancea* D.C., Changchool in Korean), on human aortic smooth muscle cells (HASMC) migration and production of matrix metalloproteinase (MMP)-2 and MMP-9 by TNF- α treatment.

Methods : Cytotoxic activity of IMS and its components on HASMC was using 5-(3-carboxy meth-oxyphenyl)-2H-tetra-zolium inner salt (MTS) assay. Effect of IMS, PC and AR on TNF- α -induced HASMC migration underside of matrigel filter was stained with hematoxylin-eosin. And total number of cells that migrated to the underside of the filter was counted. MMP-2 and MMP-9 activity was evaluated by gelatin zymography assay.

Results : The matrigel migration assay showed that IMS effectively inhibited the TNF- α -induced migration of HASMC. Moreover, IMS significantly inhibited MMP-9 activity. Our present study demonstrates that IMS and its components inhibit TNF- α -induced HASMC migration and MMP-9 activity. The inhibitory effect of IMS extract is more potent than that of its component herb extracts.

Conclusions : These results provide evidence that IMS has multiple effects in the inhibition of HASMC migration and may offer a therapeutic approach to block HASMC migration.

Key words : Imyosan (IMS), Phellodendri Cortex (PC), Atractylodis Rhizoma (AR), migration, matrix metalloproteinase (MMP)

* 교신저자 : 박선동, 경북 경주시 석장동 707 동국대학교 한의과대학 방제학교실, 심혈관계질환 천연물 연구개발센터
· Tel : 054-770-2654 · E-mail : sundong@dongguk.ac.kr
· 접수 : 2008년 11월 11일 · 수정 : 2008년 12월 17일 · 채택 : 2008년 12월 22일

서 론

二妙散의 原名은 蒼朮散으로 元代(1345년) 危亦林的 《世醫得效方》에 최초로 보이며, 다시 朱丹溪의 《丹溪心法》에서 二妙散으로 개명되어 알려진 처방으로, 黃柏(Phellodendri Cortex)과 蒼朮(Atractylodis Rhizoma)이 각각 같은 양으로 구성되어 가루약으로서 한번에 3-5g씩 복용하거나 또는 물에 끓여서 복용한다¹⁾.

本方은 清熱燥濕하는 효능으로 濕熱의 走注로 筋骨이 동통하거나 혹은 濕熱이 下注하여 兩足이 痿軟無力하고 足膝이 紅腫熱痛, 혹은 濕熱로 인한 帶下 또는 下部濕瘡, 小便短黃, 舌苔黃膩 등의 증상을 치료한다²⁾. 임상적으로는 脚氣病, 腰膝關節痛, 濕熱帶下, 細菌性 痢疾, 急性 傳染性 黃疸型 肝炎, 急性 腎盂腎炎, 週期性 痲痺, 그리고 神經性 皮膚炎 등에 활용되고 있다³⁾. 처방 중의 黃柏은 苦寒하여 清熱燥濕하고 오직 下焦로 작용하여 濕熱下注의 證을 치료하고, 蒼朮은 苦溫하여 燥濕健脾케 한다. 이와 같이 두 약물을 합용하면 清熱하나 脾陽을 손상하지 않고, 燥濕하나 助火하지 않아 清熱燥濕하는 효능을 갖추게 되므로 濕邪가 사라지게 되고, 열이 제거되어 諸症이 스스로 제거하게 된다하여 다양한 염증치료의 가능성을 제시하고 있다¹⁾.

동맥경화는 뇌졸중과 관상동맥질환 같은 혈관질환의 원인이 된다. 따라서 동맥경화의 병인 기전 및 치료에 관한 연구의 중요성이 점차 증대되고 있다. 동맥경화의 초기 병변은 혈관벽에 유입된 단구세포들이 대식세포로 분화하고, 나아가서 지질을 탐식하여 foam cell이 되어 이들이 축적되어 혈관벽에 fatty streak를 형성하게 된다. 활성화된 T-세포 및 거품세포는 cytokines 및 성장인자를 비롯한 여러 염증성 매개물질들을 발현시켜 염증반응을 지속시키며 smooth muscle cell의 증식을 유도하게 되어 혈관내벽이 두꺼워짐으로써 혈관내벽이 좁아져 협심증과 같은 심장질환의 원인이 된다. Atherosclerotic plaque의 형성에는 대식세포와 T-세포가 전반적으로 관여하고 있으며 이들에 의해 발현되는 adhesion molecules, proinflammatory cytokines, chemokines, matrix metalloproteinases (MMPs) 등이 염증반응과 유주를 증가시켜 동맥경화반의 형성 및 파열에 직접적인 영향을 미친다⁴⁾.

二妙散에 관한 연구로 임⁵⁾은 二妙散의 열수추출물이 collagen-induced arthritis 동물모델에서 ankylosis의 발생을 감소시킨다고 하였다. 김⁶⁾은 二妙散의 매

탄을 추출물이 대장암세포주인 HCT116의 생존율을 감소시키고, caspases를 매개로 하여 mitochondrial pathway를 경유하는 apoptosis를 유도한다고 하였다. Kong⁷⁾은 二妙丸과 黃柏의 물 추출물이 고요산혈증 모델 생쥐에 효과적이라고 하였다. 하지만 二妙散이 혈관에 작용하여 염증치료를 통한 항동맥경화 활성가능성에 대한 보고는 없었다.

따라서 저자는 염증으로 인한 사람동맥평활근세포의 migration의 증가와 함께 MMP-2, MMP-9의 발현이 증가한다는 보고⁸⁾를 근거로, 천연물로서의 MMPs 억제제에 관심이 있었다. 그의 일환으로 二妙散 및 그 구성약제가 TNF- α 에 의해 유도된 평활근세포의 염증반응으로 발현되는 동맥경화관련 지표인자인 MMPs에 작용기전을 파악하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 약재는 동국대학교 한의과대학 방제학교실에서 선별된 것을 정선하여 사용하였으며, 二妙散의 구성 및 총량은 Table 1과 같다. 약제 3배량의 80% methanol을 가한 다음 48시간 동안 추출하였다. 이 과정을 2회 반복한 후 여과하여 농축한 것을 동결 건조하여 분말을 얻어 실험에 사용하였다(수율 : 15.2%). 이 분말은 세포배양액인 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)에 녹여 사용하였다.

Table 1. Composition and contents of Imyosan (IMS)

| | 생약명 | 사용량(g) |
|----|--------------------------|--------|
| 황백 | Phellodendri Cortex(PC) | 250 |
| 蒼朮 | Atractylodis Rhizoma(AR) | 250 |
| 총량 | | 500 |
| 수율 | | 15.2% |

2) 시약

세포 배양액인 Smooth Muscle Cell Medium (SMCM), SMC growth supplement는 ScienCell사 (San Diego, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 시약 중 sodium dodesyl sulfate (SDS), acrylamide, bis는 Bio-Rad사(CA, USA)에서 구입하였고, gelatin은 Sigma (CA, USA)에서, traswell은 Corning사 (CA, USA)에서 구입하였다. Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) kit는 Promega사

(WI, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 모든 시약은 분석용 등급이상으로 사용하였다.

2. 방법

1) 세포배양

사람의 대동맥 평활근 세포주인 Human Aortic Smooth Muscle Cells (HASMC)은 ScienCell사 (Sandiego, CA)에서 분양받아 SMC growth supplement와 2% FBS과 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 SMCM에서 배양하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

2) 세포독성 측정

二妙散 및 각각의 약제 추출물의 세포에 대한 독성 측정은 5-(3-carboxymeth-oxypyhenyl)-2H-tetrazolium inner salt (MTS) assay 방법⁹⁾으로 분석하였다. 이는 mitochondrial dehydrogenases에 의하여 MTS가 formazan으로 전환되는 것을 측정하는 것이다. 96 well plate에 1×10⁴/well의 RAW 264.7 세포를 분주하고 약제를 농도별(0, 100, 300, 500, 700 µg/ml)로 24 시간 동안 처리하였다. Well당 20 µl의 MTS solution을 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간 동안 반응시킨 후, microplate reader (DYNEX, Opsys MR, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포생존율을 백분율로 표시하였다. 각 농도별 약제가 갖는 흡광도를 보정하기 위하여 세포를 뺀 배지를 같이 배양하여 대조군과 실험군의 흡광도를 비교 보정하여 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

3) Migration assay

HASMC의 유주능은 transwell chamber를 사용하여 측정하였다. 먼저 HASMC에 100 ng/ml의 TNF-α를 처리하여 24시간 배양한 후 배양액을 얻어 세포의 유주를 유도하는 conditioned medium을 준비한다. Upper chamber의 polycarbonate filter에 gelatin을 coating한 후 upper chamber 안에 세포를 1×10⁶ cells/ml로 seeding한다. Low chamber에는 conditioned medium을 1ml씩 넣은 후 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양한다. 배양후, filter를 4% paraformaldehyde 용액으로 고정시키고 PBS로 두 차례 세척한 다음 hematoxylin-eosin (H-E) 염색을 한다. 다시 PBS로 세척한 후 95% ethanol에서 탈수시킨 다음 filter를 slide glass로 옮겨 permount solution으로 sealing하

고 cover glass를 덮는다. 광학현미경을 통해 filter로 유주한 세포를 관찰하고 counting한다.

4) Gelatin zymography assay

MMP activity 측정을 위하여 24 well plate에 1×10⁵/ml로 세포를 분주하여 배양한 후 serum free medium으로 교체하여 16시간 동안 starvation하였다. 여기에 각각의 약제를 1시간 동안 전처리한 후 100 ng/ml의 TNF-α를 24시간 처리하였다. 각각의 세포 배양액을 수거하여 gelatin zymography를 수행하였다. 20 µl의 배양액을 reducing agent가 없는 SDS-sample buffer에 섞은 후 전기영동을 한 후, gel을 2.5% Triton X-100에서 30분간 2회 soaking시킴으로써 SDS를 제거하고 3차 증류수로 20분간 2회 세척하였다. 세척된 gel은 incubation buffer (50 mM Tris-HCl ; pH 7.6, 10 mM CaCl₂, 150 mM NaCl, 0.01% NaN₃)에 넣어 37°C incubator에서 24시간 동안 반응시킨 후 0.1% coomassie brilliant blue 용액으로 30분간 염색하여 gelatin이 분해되는 정도를 관찰하였다.

3. 통계처리

실험결과는 means±SEM으로 표시하고 유의성 검증은 Prism 4.00을 이용하여 one-way ANOVA를 실시하였다. Western blot를 통해 얻은 band의 density 분석은 GelDoc-It BioImaging System (UVP, USA)을 사용하여 측정하였다.

결 과

1. 二妙散 및 黃柏, 蒼朮의 HASMC에 대한 독성

사람 평활근 세포 HASMC에 대한 세포독성을 알아보기 위하여 二妙散, 黃柏, 蒼朮을 농도별 (0-700 µg/ml)로 처리한 후, MTS assay를 수행하였다. Fig. 1에서 보듯이 二妙散의 경우, 농도별로 24시간 동안 처리한 경우 100 µg/ml의 농도까지 세포독성이 거의 없었고 300, 500, 700 µg/ml의 농도에서 각각 59.6%, 41.8%, 30.7%까지 세포생존율이 감소하는 것으로 보아 300 µg/ml이상의 농도에서 세포독성을 가지는 것으로 확인되었다. 黃柏은 300 µg/ml까지 세포의 생존율의 감소가 없었고 500, 700 µg/ml의 농도에서 각각

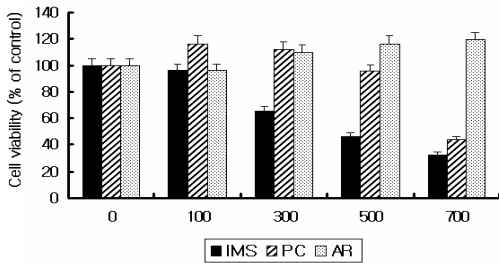


Fig. 1. Effect of IMS, PC and AR on the cell viability of HASMC

HASMC was treated with various concentrations (0, 100, 300, 500, 700 µg/ml) of IMS, PC and AR for 24 hr. Cell viability was measured by MTS assay as described in Materials and Methods. Data were chosen from three independent triplicate experiments.

90.7%, 45.7%의 생존율을 나타내었다. 蒼朮은 700 µg/ml까지 세포 독성이 나타나지 않았다. 따라서 二妙散, 黃柏, 蒼朮 모두 세포 생존율에 영향을 주지 않는 농도인 100 µg/ml으로 다음 실험을 진행하였다.

2. 二妙散 및 黃柏, 蒼朮이 HASMC의 세포 유주능에 미치는 영향

二妙散, 黃柏, 蒼朮이 TNF-α 처리시 증가하는 세포의 유주능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 migration assay를 수행하였다. HASMC에 100 ng/ml의 TNF-α를 24시간 처리하여 얻은 conditioned medium을 transwell의 lower chamber에 넣고, 100 µg/ml의 二妙散, 黃柏, 蒼朮을 1시간 동안 전처리한 후 100 ng/ml의 TNF-α를 24시간 처리한 HASMC를 upper chamber에 넣은 후 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 24시간 후 upper chamber에서 lower chamber로 유주한 세포를 관찰하기 위하여 upper chamber의 matrigel filter를 H-E 염색을 하여 광학 현미경으로 관찰하였다. 그 결과 TNF-α를 처리에 의해 세포의 유주가 약 5.4배 증가하는 것을 관찰할 수 있었고, 증가된 세포의 유주를 二妙散, 黃柏, 蒼朮이 각각 75.3%, 34.1%, 44.3% 감소시켰다 (Fig. 2). 二妙散 및 黃柏, 蒼朮 모두 TNF-α로 증가되는 HASMC의 유주를 감소시켰고 특히 복합방인 二妙散이 가장 탁월한 유주 억제 효과를 나타내었다.

3. 二妙散 및 黃柏, 蒼朮이 MMP-9의 활성화에 미치는 영향

MMPs는 혈관을 형성하는 내막, 중막, 외막의 구

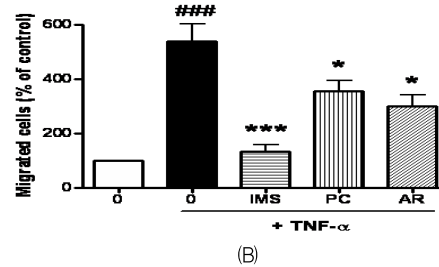
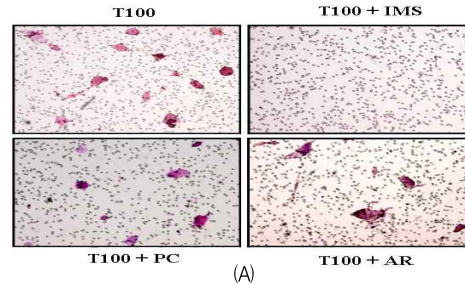


Fig. 2. Effect of IMS, PC and AR on TNF-α-induced migration in HASMC

HASMC was incubated with TNF-α alone (100 ng/ml) or 100 µg/ml of IMS, PC and AR for 1 hr and then treated with TNF-α for 24 hr. After 24 hr, the cells were collected and added to upper chamber. TNF-α-treated conditioned medium was collected and added to lower chamber. After 24 hr incubation, underside of matrigel filter was stained with hematoxylin and eosin. And total number of cells that migrated to the underside of the filter was counted. The values obtained were calculated by averaging the total number of cells from three independent triplicate experiments. Data are represented as means±SEM. Significantly different from control (#) or TNF-α alone (*); * : P < 0.05; ###, *** : P < 0.001. T, TNF-α.

성성분인 세포외 기질이나 기저막을 분해시킴으로써 평활근세포의 유주에 영향을 주는데, 이러한 MMPs의 활성을 조사하기 위해 gelatin zymography assay를 수행하였다.

HASMC에서 MMP-9은 TNF-α에 의해 그 활성이 증가한다^{10,11}. 따라서 본 실험에서는 TNF-α에 의해 유도된 MMP-9을 二妙散 및 구성약재인 黃柏과 蒼朮이 효과적으로 감소시키는지 알아보았다. 100 µg/ml의 二妙散, 黃柏, 蒼朮을 1시간 전처리하고 100 ng/ml의 TNF-α를 처리하여 24시간 후 세포 배양액을 얻어 gelatin zymography assay를 수행하였다. 그 결과, Fig. 3A에서 보듯이 TNF-α에 의해 유도되는 MMP-9이 二妙散 및 그 구성약재인 黃柏, 蒼朮에 의해 현저히 감소되는 것으로 나타났다. 또한 녹차에 많이 함유되어 있는 성분인 catechin의 유도체로 MMP inhibitor로 잘 알려져 있는 EGCG를 처리한 경우와 비교해 본 결과, EGCG의 MMP-9 저해 활성과 거의 비슷한 것으로 나타났다(Fig. 3B).

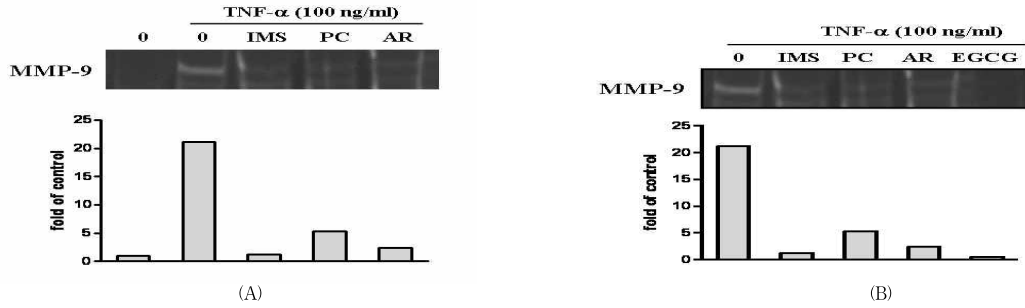


Fig. 3. Effect of IMS, PC and AR on MMP-9 activity in HASMC

HASMC was incubated with TNF- α alone (100 ng/ml) or 100 μ g/ml of IMS, PC, AR and EGCG (MMP inhibitor) for 1 hr and then treated with TNF- α for 24 hr. Gelatin zymography was performed with the medium. Inhibitory effects of IMS, PC and AR on MMP-9 activity was estimated in comparison with established MMP inhibitor, EGCG. The densitometric intensity of zymography bands was estimated as described in Materials and Methods.

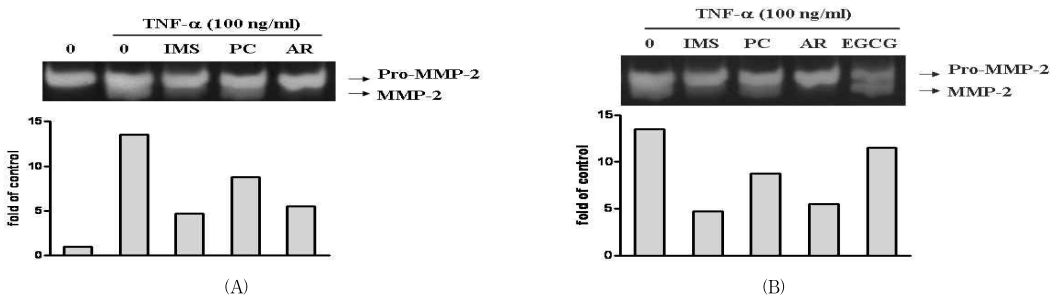


Fig. 4. Effect of IMS, PC and AR on MMP-2 activity in HASMC

HASMC was incubated with TNF- α alone (100 ng/ml) or 100 μ g/ml of IMS, PC, AR and EGCG (MMP inhibitor) for 1 hr and then treated with TNF- α for 24 hr. Gelatin zymography was performed with the medium. Inhibitory effect of IMS, PC and AR on MMP-2 activity was estimated in comparison with established MMP inhibitor, EGCG. The densitometric intensity of zymography bands was estimated as described in Materials and Methods.

4. 二妙散 및 黃柏, 蒼朮이 MMP-2의 활성에 미치는 영향

MMP-2의 활성을 알아보기 위하여 100 μ g/ml의 二妙散, 黃柏, 蒼朮을 1시간 전처리하고 100 ng/ml의 TNF- α 를 처리하여 24시간 후 세포 배양액을 얻어 gelatin zymography assay를 수행하였다. 그 결과 TNF- α 에 의해 MMP-2가 13.5배 증가되었고 二妙散, 黃柏, 蒼朮에 의해 각각 65.3%, 34.9%, 52.7% 감소되는 것으로 나타났다(Fig. 4A). 그 중 복합방인 二妙散의 MMP-2 저해 활성이 가장 좋은 것으로 나타났다. 녹차에 많이 함유되어 있는 성분인 catechin의 유도체로서 MMP inhibitor로 잘 알려져 있는 EGCG를 처리한 경우와 비교해 본 결과, 二妙散, 黃柏, 蒼朮은 EGCG의 MMP-2 저해 활성보다 더 뛰어난 것으로 나타났다(Fig. 4B).

고찰

東洋醫學, 즉 韓醫學에서는 예로부터 單方이 아닌 複合方을 통한 질병의 치료에 관심이 높았고 또한 실제 임상에서 적용되어 왔다. 그 가운데에서도 두 가지 약물이 작용하여 약효의 상승작용을 가지는 경우를 相須 혹은 相使라고 지칭하였다. 본인은 두 가지 약물로 처방이 구성된 《丹溪心法》에 나오는 二妙散¹¹⁾의 항염증작용에 관심을 가지고 있었다.

二妙散은 黃柏과 蒼朮이 동일비율로 적용되는데, 黃柏의 약리작용으로는 주성분인 berberine이 항균과 같이 항균, 항바이러스, 해독, 해열, 소염, 면역증강작용이 있으며, 항부정맥 및 혈압강하, 혈소판 응집 억제작용이 있고, 그리고 혈당강하 및 항암작용이 있다. 蒼朮은 혈당강하작용과 전해질대사에서 요중 Na⁺의 농도, 배출률 및 Na⁺/K⁺수치를 뚜렷하게 증가시키며, 진정, 항경련 작용이 있다. 또한 해독, 이담작용을 하

며, 항괴양작용과 혼증소독작용이 있다¹²⁾.

최근의 연구로 黃柏에 대해 Park¹³⁾은 黃柏메탄을 추출물이 LPS로 유도한 BV2세포와 primary mouse microglia에서 염증성 cytokine과 NO의 생성을 저해하므로 신경퇴화로 인한 인간뇌병변에서 항염증후보 인자가 될 수 있다고 주장하였다. 또한 Park¹⁴⁾은 항암활성을 갖는 黃柏열수추출 다당류 분획에 대해 암컷의 생쥐(C57BL/6XC3H) F1 (B6C3F1)의 비장을 이용한바 강한 B-임파구 자극활성을 나타내었다고 밝혔다. 그 외에 Kim¹⁵⁾은 黃柏이 PC-12세포에서 IL-1 β , IL-6, amyloid precursor proteins (APP), acetylcholinesterase (AChE), glial fibrillary acidic protein (GFAP)의 mRNA의 발현과 AChE의 활성을 억제하여 치매의 치료와 예방에 활용할 수 있을 것이라고 하였다. 한편 蒼朮에 대해서 Li¹⁶⁾는 蒼朮의 주성분인 atractylenolide I, III이 LPS로 유도된 복강대식세포염증에 대한 TNF- α 와 NO의 생성을 강력하게 저해함으로써 항염증인자로 효과적이라고 주장하였다. Jang¹⁷⁾도 蒼朮 물추출물이 LPS로 유도한 RAW264.7에서 NO나 PGE2 합성, 그리고 COX-2 발현을 억제한다고 하였다. 또한 Prieto¹⁸⁾는 蒼朮이 leukocytes와 platelets에서 lipoxigenase, cyclooxygenase 그리고 elastase 활성을 억제함으로써 만성염증을 포함한 피부병변에 특별한 역할을 할 것이라고 주장하였다. 허¹⁹⁾는 蒼朮이 생쥐의 microglia BV2 세포에서 LPS에 의해 유도된 iNOS 및 COX-2의 발현을 억제시켜 NO의 형성을 저해함으로써 염증성질환에 효과적이라고 하였다.

이러한 연구경향을 종합하면 두 약재가 가지는 항염증작용의 상승효과를 기대할 수 있다. 더 나아가 지금까지 시도되지 않은 혈관염증에 대한 억제효과를 나타낸다면 항동맥경화 활성제로서의 가능성을 예견할 수 있다.

동맥경화의 발생과 진행과정에 대해 이전에는 동맥벽에 지질이 축적되어 혈관이 좁아지고 일부 병변에 혈전이 동반되는 과정으로 인식되었다. 하지만 최근 죽상동맥경화가 진행되고 이에 의해 질병이 발생하는 과정이 일반적으로 염증반응과 매우 유사함이 관찰되어 죽상동맥경화를 염증성 질환으로 정의하고 있다²⁰⁾. 염증반응은 혈관의 내피세포와 평활근세포의 apoptosis를 유발하고, 평활근세포에 의한 collagen 생산을 감소시키는데 여기에 T 림프구가 분비하는 interferon- γ 가 관여한다. T 림프구나 대식세포에서 생성되는 염증성 사이토카인인 interleukin-1이나 TNF- α , 내피세포나 대식세포에서 생성되는 MCP-1, M-CSF 등의 물질이 내피세포와 대식세포에 작용하여 세포외기

질을 제거하는 MMPs의 분비를 촉진시킨다²¹⁾.

따라서 혈관내 염증으로 평활근세포가 혈관의 내막으로 유주하여 증식하는데 MMP-2와 MMP-9이 중요한 역할을 하고, 이는 많은 혈관질환의 원인이 되며 동맥경화를 더욱 심화시킨다는 사실에 착안하여, 한방 처방 중 蒼朮과 黃柏, 두 가지로 구성된 二妙散의 항염증작용 상승효과 가능성을 실험적으로 조사하여 항동맥경화활성을 탐색하였다.

먼저 사람 평활근 세포 HASMC에 대한 세포독성을 알아보기 위하여 二妙散, 黃柏, 蒼朮을 농도별(0~700 $\mu\text{g}/\text{ml}$)로 처리한 후, MTS assay를 수행하였다. 二妙散의 경우, 농도별로 18시간 동안 처리한 경우 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도까지 세포독성이 거의 없었고 그 이상의 농도에서 세포독성을 가지는 것으로 확인되었다. 黃柏은 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 세포의 생존률 감소가 없었고 그 이상의 농도에서 세포독성을 나타내었다. 蒼朮은 700 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 까지 세포 독성이 나타나지 않았다. 따라서 二妙散, 黃柏, 蒼朮 모두 세포 생존율에 영향을 주지 않는 농도인 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 다음 실험을 진행하였다. 이는 二妙散과 그 구성약재들이 나타내는 항유주 및 MMPs 활성억제효과가 세포 생존율의 감소에 의한 것이 아니라 각각 약재들의 고유한 특성임을 말한다.

二妙散, 黃柏, 蒼朮이 TNF- α 처리시 증가하는 세포의 유주능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 migration assay를 수행하였다. matrigel filter를 H&E 염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다. 그 결과 TNF- α 처리에 의해 세포의 유주가 약 5.8배 증가하는 것을 관찰할 수 있었고, 증가된 세포의 유주를 二妙散, 黃柏, 蒼朮이 효과적으로 감소시켰다. 그 중 복합방인 二妙散의 항유주 활성이 가장 탁월한 것으로 나타났다.

HASMC의 유주와 증식에 관여하는 MMP-9과 MMP-2의 활성에 미치는 영향을 알아보았다. TNF- α 에 의해 증가된 MMP-9을 二妙散 및 그 구성약재인 黃柏, 蒼朮이 효과적으로 감소시키는지 알아보기 위하여 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 二妙散, 黃柏, 蒼朮을 1시간 전 처리하고 100 ng/ml의 TNF- α 를 24시간 처리한 후 세포 배양액을 수거하여 gelatin zymography assay를 수행하였다. 그 결과 TNF- α 에 의해 유도되는 MMP-9이 二妙散, 黃柏, 蒼朮에 의해 효과적으로 감소되었으며, 녹차에 많이 함유되어 있는 성분인 catechin의 유도체로서 MMP inhibitor로 잘 알려져 있는 EGCG를 처리한 경우와 비교해 본 결과에서도 EGCG의 MMP-9 저해 활성과 거의 비슷한 것으로

나타났다. TNF- α 에 의해 증가되는 MMP-2가 二妙散, 黃柏, 蒼朮에 의해 효과적으로 감소되었고 그 중 복합방인 二妙散의 MMP-2 저해 활성이 가장 좋은 것으로 나타났다. EGCG를 처리한 경우와 비교해 본 결과, EGCG의 MMP-2 저해 활성보다 더욱 뛰어난 것으로 나타났다.

이러한 결과로 보아 黃柏과 蒼朮의 복합방인 二妙散에 의한 HASMC의 유주는 MMP-2, MMP-9의 활성 저해에 의한 것으로 볼 수 있으며, 二妙散이 동맥경화 치료제 및 예방물질로서 가능성을 가지는 것으로 보인다.

결론

二妙散 및 그 구성약재인 黃柏, 蒼朮이 혈관 평활근세포의 유주와 MMP 활성에 미치는 영향을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. HASMC에 대한 세포독성을 알아보기 위하여 二妙散, 黃柏, 蒼朮을 농도별로 18시간 처리한 후, MTS assay를 수행하여 二妙散, 黃柏, 蒼朮 모두 세포 생존율에 영향을 주지 않는 농도인 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 다음 실험을 진행하였다. 이는 二妙散과 그 구성약재들이 나타내는 항유주 및 MMPs 활성억제효과가 세포 생존율의 감소에 의한 것이 아니라 각각 약재들의 고유한 특성임을 말한다.

2. 二妙散, 黃柏, 蒼朮이 TNF- α 처리 시 증가하는 세포의 유주능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 migration assay를 수행하였다. H&E 염색을 하여 광학현미경으로 관찰하였다. 그 결과 TNF- α 를 처리에 의해 세포의 유주가 약 5.8배 증가하는 것을 관찰할 수 있었고, 증가된 세포의 유주를 二妙散, 黃柏, 蒼朮이 효과적으로 감소시켰다. 그 중 복합방인 二妙散의 항유주 활성이 가장 탁월한 것으로 나타났다.

3. 二妙散, 黃柏, 蒼朮이 HASMC의 유주와 증식에 관여하는 MMP-9과 MMP-2의 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해 gelatin zymography를 수행한 결과, TNF- α 에 의해 유도되는 MMP-9이 二妙散, 黃柏, 蒼朮에 의해 현저히 감소되었다. 또한 二妙散의 MMP-9 저해 활성은 MMP inhibitor로 잘 알려져 있는 EGCG의 MMP-9 저해 활성과 거의 비슷하게 나타났다.

MMP-2는 TNF- α 에 의해 13.5배 증가되었고 二妙散, 黃柏, 蒼朮에 의해 효과적으로 감소되는 것

로 나타났다. 그 중 복합방인 二妙散의 MMP-2 저해 활성이 가장 좋은 것으로 나타났다.

이러한 결과로 보아 二妙散에 의한 HASMC의 유주는 MMP-2, MMP-9의 활성 저해에 의한 것으로 볼 수 있으며, 二妙散이 동맥경화 치료제 및 예방물질로서 가능성을 가지는 것으로 보인다.

감사의 글

본 연구는 동국대학교 학술지원 사업비로 이루어진 논문임

본 연구는 과학기술부/한국과학재단 기초과학연구센터 육성사업의 지원으로 수행되었음(과제번호 : R13-2005-013-01000-0)

참고문헌

1. 주진형. 단계심법. 북경시중국서점출판. 1986 : 264.
2. 김상찬 외 10인. 방제학. 도서출판 영림사. 서울 : 1990 : 500-1.
3. 宗全和. 中醫方劑通釋 권 1. 중국 : 하북과학기술출판사. 1995 : 61-163.
4. Kodali R, Hajjou M, Berman AB, Bansal MB, Zhang S, Pan JJ, Schecter AD. Chemokines induce matrix metalloproteinase-2 through activation of epidermal growth factor receptor in arterial smooth muscle cells. Cardiovasc Res. 2006 ; 69(3) : 706-15, 2006.
5. 임창경. Anti-rhenmatiod arthritis effects of I-Myo-San water extract. 원광대학교 박사학위논문, 2003.
6. 김선모, 윤현정, 이현우, 김판준, 이창현, 박원환, 박선동. 二妙散에 의한 대장암 세포주 HCT116의 Caspases활성화를 매개로 한 세포사멸. 대한방제학회지. 2006 ; 14(2) : 21-32.
7. Kong LD, Yang C, Ge F, Wang HD, Guo YS. A Chinese herbal medicine Ermiao wan reduces serum uric acid level and inhibits liver xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase in mice. J Ethnopharmacol. 2004 ; 93(2-3) : 325-30.
8. Bendeck MP, Irvin C, Reidy MA. Inhibition of matrix metalloproteinase activity inhibits smooth

- muscle cell migration but not neointimal thickening after arterial injury. *Circ Res.* 1996 ; 78(1) : 38-43.
9. Desai A, Vyas T, Amiji M. Cytotoxicity and apoptosis enhancement in brain tumor cells upon coadministration of paclitaxel and ceramide in nanoemulsion formulations. *J Pharm Sci.* [Epub ahead of print], 2007.
 10. Moon SK, Cha BY, Kim CH. ERK1/2 mediates TNF- α -induced matrix metalloproteinase-9 expression in human vascular smooth muscle cells via the regulation of NF- κ B and AP-1: Involvement of the ras dependent pathway. *J Cell Physiol.* 2004 ; 198(3) : 417-27.
 11. Moon SK, Cha BY, Kim CH. *In vitro* cellular aging is associated with enhanced proliferative capacity, G1 cell cycle modulation, and matrix metalloproteinase-9 regulation in mouse aortic smooth muscle cells. *Arch Biochem Biophys.* 2003 ; 418(1) : 39-48.
 12. 김호철. 한약약리학. 집문당. 서울 : 2004 : 134-40, 209-11.
 13. Park YK, Chung YS, Kim YS, Kwon OY, Joh TH. Inhibition of gene expression and production of iNOS and TNF- α in LPS-stimulated microglia by methanol extract of Phellodendri cortex. *Int Immunopharmacol.* 2007 ; 7(7) : 955-62.
 14. Park JI, Shim JK, Do JW, Kim SY, Seo EK, Kwon HJ, Lee TK, Kim JK, Choi DY, Kim CH. Immune-stimulating properties of polysaccharides from Phellodendri cortex (Hwangbek). *Glycoconj J.* 1999 ; 16(3) : 247-52.
 15. Kim YP, Jung IG, Lee SR. Effects of Phellodendron amurense Extract on the Alzheimer's disease model. *Korean J Oriental Physiology & Pathology* 2005 ; 19(1) : 130-8.
 16. Li CQ, He LC, Jin JQ. Atractylenolide I and atractylenolide III inhibit Lipopolysaccharide-induced TNF- α and NO production in macrophages. *Phytother Res.* 2007 ; 21(4) : 347-53.
 17. Jang MH, Shin MC, Kim YJ, Kim CJ, Kim Y, Kim EH. Atractylodes japonica suppresses lipopolysaccharide-stimulated expressions of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in RAW 264.7 macrophages. *Biol Pharm Bull.* 2004 ; 27(3) : 324-7.
 18. Prieto JM, Recio MC, Giner RM, M \acute{a} ñez S, Giner-Larza EM, Ríos JL. Influence of traditional Chinese anti-inflammatory medicinal plants on leukocyte and platelet functions.1. *J Pharm Pharmacol.* 2003 ; 55(9) : 1275-82.
 19. 허인희, 심성용, 김경준. 창출 추출물의 BV2 cell 소염작용에 관한 실험적 연구. 한방안이비인후피부과학회지. 2007 ; 20(2) : 36-46.
 20. Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999 ; 340(2) : 115-26.
 21. Libby P. Coronary artery injury and the biology of atherosclerosis: inflammation, thrombosis, and stabilization. *Am J Cardiol.* 2000 ; 86(8B) : 3-8.