

山楂 Butanol 분획이 PGF2 α -유도 혈관평활근수축의 억제에 미치는 신호전달 연구

유가량 · 최호정 · 김길현 · 신흥묵*

동국대학교 한의과대학 생리학교실

Vasorelaxation Effect of Butanol Fraction of Crataegi Fructus due to LC20 dephosphorylation via increase of Myosin Phosphatase activity

Liou Jia Liang, Ho Jeong Choi, Gil-Whon Kim, Heung Mook Shin*

Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Dongguk University

The primary mechanism of smooth muscle contraction is phosphorylation of the 20 kDa myosin light chains(LC20) by a myosin light chain kinase(MLCK). Relaxation, then, is generally the result of dephosphorylation of LC20 by myosin phosphatase(MP). Changes in MP activity is one of the important mechanisms in the regulation of Ca²⁺-sensitivity. Inhibition of MP activity is linked to an increase in phosphorylated myosin light chain(MLC) without an increase in [Ca²⁺]_i-levels. It is now generally accepted that Rho-kinase phosphorylates 130 kDa regulatory and myosin binding subunits(M130, MYPT) of MP, which results in an inhibition of MP activity. In addition Rho-kinase can also directly phosphorylate MLC. In the present study, LC20 phosphorylation and MP subunits translocation to the cell membrane were investigated in freshly isolated ferret portal vein smooth muscle single cells treated with PGF2 α . We also examined the effect of Y27632(10-5mol/L), Rho-kinase inhibitor, in the MP subunits localization to compare with butanol fraction of Fructus Crataegi in its effect. Butanol fraction of Fructus Crataegi(BFFC; 1mg/ml) was more effective in PGF2 α induced contraction than those of phenylephrine in its vasodilation effect. It significantly(P<0.05) dephosphorylated the LC20 at time indicated. In addition, the dissociation of subunits are inhibited by BFCF treatment. The results indicate that, in the smooth muscle cells, the relaxation effect of BFFC is associated with increase of MP activity based on inhibition of dissociation of the catalytic and targeting subunits of the phosphatase, and thus decrease the sensitivity of LC20 phosphorylation for Ca²⁺.

Key words : Butanol fraction of Fructus Crataegi, LC20 phosphorylation, myosin phosphatase(MP). MP subunits, vasodilation

서론

한의학의 眩暈, 頭痛의 범주에 속하는 고혈압은 가장 흔한 심혈관질환의 하나로 인류의 생명과 건강을 위협하고 있다. 치료는 단순한 혈압의 강하가 아닌 인체 陰陽平衡을 조절하므로써 고혈압의 발생과 진행을 해결할 수 있을 것이며, 혈압의 강하작용이 있는 復方, 古方 및 單味 제재의 약리기전 연구는 임상 변증론치의 방제구성과 치료효과를 높일 수 있는 주요한 관점이 될 것이다. 山楂는 그 性이 微溫하고 味는 酸甘하며, 脾·胃·肝의

經絡에 작용한다. 그 健脾行氣, 消食磨積의 효능은 食滯를 소화시키고 食積으로 발생하는 복부팽만이나 소화불량, 설사의 증을 치료하며, 活血散瘀의 효능은 行血과 瘀血을 제거하는 작용으로¹⁻⁴⁾ 혈류장애, 동맥경화 및 고혈압과 같은 심혈관계 질환의 치료에 유의한 효과를 나타낼 것으로 생각된다. 活血散瘀의 효능에 근거한 山楂의 고혈압에 대한 효능을 입증하기 위한 실험적 연구로는 수축혈관에 대한 이완효과로서 내피세포 의존성과⁵⁾ nitric oxide synthase(NOS)의 활성화에 의한 nitric oxide(NO)의 생성이 관련되어 있음이 보고된 바 있다⁶⁾.

한편 혈관의 긴장성 조절에 대한 분자 생물학적 생리와 관련하여 myosin light chain kinase(MLCK)에 의한 20 kDa myosin light chain(LC20)의 인산화는 평활근 수축의 주요한 기

* 교신저자 : 신흥묵, 경북 경주시 석장동 707 동국대학교 한의과대학

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

· 접수 : 2003/02/08 · 수정 : 2003/03/04 · 채택 : 2003/03/31

전이며, 이완은 일반적으로 myosin phosphatase(MP)에 의한 LC20의 탈 인산화의 결과이다^{7,8)}. 또 protein kinase C(PKC) 역시 평활근 수축에 중요한 영향을 미치는 것으로 알려져 있으며 PKC α 는 ferret 간 문정맥의 주요한 PKC의 아형으로 세포막 수용체의 활성화에 의하여 세포질에서 세포막으로 이동한다⁹⁾. 이상의 분자생물학적 기전에 기초한 山樅의 실험적 연구로 phenylephrine 유도 수축혈관에 대한 山樅 butanol 분획의 이완효과에 PKC α 의 인산화 및 MP 아형의 전위 억제에 관여함이 확인되었다¹⁰⁾. 그러나 MP 활성화의 억제에 의한 수축기구의 Ca^{2+} sensitization의 증가와 Ca^{2+} 의존성 LC20의 인산화에 의한 혈관수축을 야기하는 prostaglandin F₂ α (PGF₂ α)에 의한 혈관평활근 수축에 미치는 신호전달에 대한 연구는 보이지 않는다. 이에 대한 실험적 연구는 임상응용의 객관적 지표를 제시함은 물론 유효성분을 분석하기 위한 전 단계 실험으로서 의의가 있을 것으로 생각된다.

이에 저자는 PGF₂ α 로 유도된 수축혈관의 긴장성조절에 대한 山樅 butanol 분획의 신호전달체계를 single cell 수준에서 MP의 전위 및 LC20의 인산화에 미치는 영향을 관찰하여 유의한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 한약 추출물의 제조

山樅(*Crataegus pinnatifida* Bunge; *Crataegi Fructus*)의 butanol 분획은 山樅 200g을 round flask에 넣고, 80% methanol로 80℃에서 4시간 가열 추출한 후 추출액을 증발시켜 methanol을 제거하고, 상법에 따라 비극성에서 극성 용매의 순으로 순차적으로 추출하여 butanol 분획을 얻었다. 이 butanol 분획은 물에 녹지 않으므로 0.1%의 dimethylsulfoxide(DMSO)에 녹여 사용하였다.

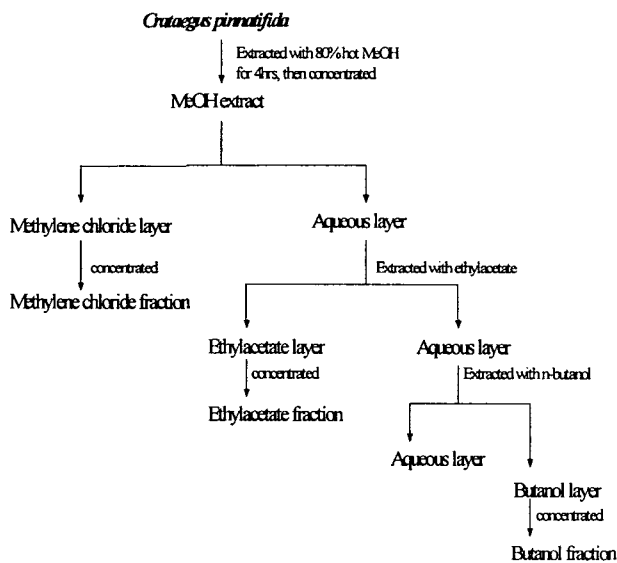


Fig. 1. Procedure of extraction and fractionation of n-butanol soluble fraction of *Crataegus Fructus*.

2. 혈관절편과 조직의 준비

Ferret을 chloroform으로 마취하여 portal vein을 적취하여 95%의 O₂와 5%의 CO₂를 혼합가스가 공급되는 physiological saline solution (PSS)를 채운 dish에 넣고 room temperature에서 혈관주위의 연조직과 지방을 제거하여 혈관조직을 제작하였다. 이렇게 만든 혈관조직은 긴장성 실험과 single cell의 isolation에 사용하였으며¹¹⁾, 모든 실험은 22℃에서 진행되었다.

3. single cell의 준비

Ferret의 portal vein으로부터의 single cells은 DeFeo 등¹²⁾의 방법을 변경하여 효소화적으로 분리하였다. Portal vein을 2 mm x 2 mm의 조각으로 절단하여 digestion medium이 채워진 silicon으로 처리된 flask에 넣었다. 50 mg의 portal vein(wet weight)을 4.2 mg CLS 2 collagenase(type II, 228 U/mg), 5.6 mg elastase (Grade II, 3.65 U/mg) 및 7.5ml의 Ca²⁺-Mg²⁺-free Hanks' solution(HBSS)에 5,000U soybean trypsin inhibitor (type II-S)을 포함한 digestion medium에 넣고 34℃의 100% 산소가 공급되는 진탕 상태에서 40분간 incubation시켰다. 그리고 나서 nylon mesh로 여과하고 10ml의 0.2% BSA가 포함된 Ca²⁺-Mg²⁺-free HBSS로 씻고 다시 20분간 digestion medium B(2mg으로 감소된 collagenase외에 동일한 medium)에서 incubation 하였다. 분리된 single cells을 얼음 위의 glass coverslip에 40분간 방치한 후 실험에 사용하였다. 모든 실험은 분리된 cell이 phenylephrine에 반응하여 수축되는지를 확인한 후 사용하였다.

4. 혈관수축 억제작용 측정

95%의 O₂와 5%의 CO₂를 혼합한 가스가 연속적으로 공급되고 22±0.5℃로 유지되는 Krebs 용액으로 채워진 organ bath(용량 50 ml)에 혈관절편을 현수하여 한쪽 끝은 organ bath의 저부에 고정시키고 다른쪽 끝은 근 수축변환기에 연결하여 등장성 수축 및 이완을 기록하였다. 미세장력 조절장치를 이용하여 초기 장력을 2g 부하하고 1시간 이상 회복시킨 후 실험에 이용하였다. 혈관절편이 10-5M의 PGF₂ α 를 사용하여 최고 수축기에 이르렀을 때, 山樅의 butanol 분획을 용량별로 투여하여 나타나는 이완 반응을 physiograph로 연속 기록하였다.

5. Digital imaging

Cell을 2% paraformaldehyde로 고정시키고 0.1% Triton X-100으로 투과시키고 10% goat serum으로 block 한 후, goat anti-rabbit Rhodamine Red-X의 2차 antibody에 뒤이어 M130a(F38.130 1:10000 polyclonal¹³⁾; Covance, Richmond, Calif) 및 C-2PP1 δ (1:1500)로 각각 반응시켜 분석전 Fluorosave (Calbiochem, San Diego, CA)로 고정시켰다. Image는 Kr/Ar laser (Radiance 2000) scanning confocal microscope가 장착된 Nikon X-60 (NA1.4)/ 40X (NA 1.4) oil immersion objective로 관찰하였다. 그리고 Windows NT를 위하여 Laser sharp 2000으로 기록되었다. MYPT1과 PP1c의 상대적 분포와 세포간의 차이를 확인하기 위하여 ratio analysis¹⁴⁾를 진행하였다.

6. LC20 인산화 측정

평활근의 절편을 10% trichloroacetic acid (TCA)과 10 mmol/L dithiothreitol(DTT)를 포함한 dry ice-acetone slurry에 급속히 동결하였다. Acetone/TCA/DTT내 조직을 room temperature에서 glass pestle로 간 후 TCA를 제거하기 위하여 ether로 세 번 세척하였다. 조직을 urea sample buffer로 추출하고 15% 10% polyacrylamide gel을 돌렸다. Protein을 transferred to polyvinylidene difluoride(PVDF) membrane에 전이시키고 LC20 antibody (1:1500, Sigma)로 immunoblot하였다. 2차 antibody 로 Anti-mouse IgG(Goat, conjugated with horseradish peroxidase; 1:2000)를 사용하였다. Band가 chemiluminescence (ECL)(Supersignal, Pierce) 로 시각화되고 NIH Image에 의하여 LC20의 인산화에 대한 비인산화의 비율을 분석하였다.

7. Solutions and Materials

PSS의 용액은(in mM) 120 NaCl, 5.9 KCl, 2.5 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 25 NaHCO₃, 1.2 NaH₂PO₄과 11.5 dextrose로 구성되었으며 pH 7.4로 맞추어 사용하였고, 제조시 95% O₂ + 5% CO₂를 공급하였다. HBSS는(in mM) 137 NaCl, 5.4 KCl, 0.44 KH₂PO₄, 0.42 NaH₂PO₄, 4.17 NaHCO₃, 5.55 glucose, 10 HEPES로 구성되었고, pH 7.4로 맞추었다. PBS-Tween 용액은(in mM) 80 Na₂HPO₄, 20 NaH₂PO₄, 100 NaCl 및 0.05% Tween으로 조성되었다. PGF2 α 는 Sigma로부터, 일반 시약은 analytical grade나 이상의 등급을 사용하였고 Sigma와 Fisher Scientific에서 구입하였다.

8. 통계처리

모든 수치는 mean \pm SE로 나타내었고 통계처리는 Student's t-test를 사용하였다. 유의성은 p-value가 <0.05 이하일 경우로 삼았다.

결 과

1. Agonists에 의한 수축혈관에 대한 이완효력

Agonist에 따른山楂의 butanol 분획의 이완효능을 비교하기 위하여 phenylephrine과 prostaglandin F2 α (PGF2 α)로 유도된 간 문정맥의 수축에 대한 이완효력을 측정하였다.

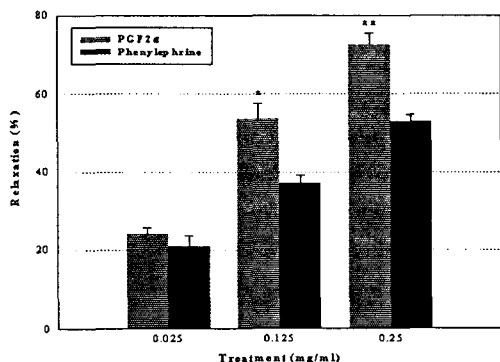


Fig. 2. Comparative relaxation effect of Butanol Fraction of Crataegi Fructus(BFCF) between PGF2 α and PE-induced contraction in ferret portal vein. * p<0.05, ** p<0.01, as compared with phenylephrine groups.

Fig. 2에서 보는바와 같이山楂의 butanol 분획은 phenylephrine과 prostaglandin F2 α 로 유도된 간 문정맥의 수축에 대하여 농도 의존적 이완효과를 나타내었으며, phenylephrine보다 prostaglandin F2 α 로 유도된 수축에 대하여 그 이완효력이 보다 유의하게(p<0.05) 나타났다.

2. Prostaglandin F2 α 에 의한 LC20 인산화에 미치는 영향

20-kDa myosin light chain(LC20)의 인산화는 PGF2 α 에 의한 지속적인 평활근의 수축에 중요한 역할을 한다. PGF2 α 의 처리에 의하여 간 문정맥의 인산화는 정상군의 21.92 \pm 1.04 mol Pi/mol LC20(n=4)에 비하여 30.59 \pm 1.79 mol Pi/mol LC20(n=4)으로 유의하게 증가하였고,山楂의 butanol 분획을 5분간 처치한 경우 18.78 \pm 2.55 mol Pi/mol LC20(n=4), 15분간 처치한 경우 12.93 \pm 3.95 mol Pi/mol LC20(n=4)로 유의하게(p<0.05) LC20의 인산화를 억제시켰다(Fig. 3).

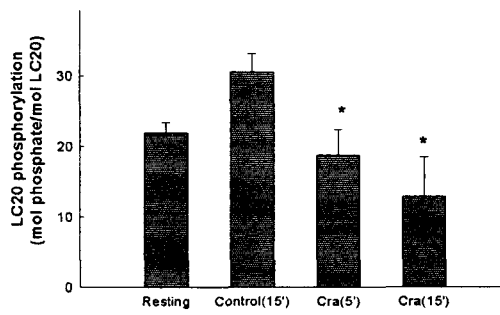


Fig. 3. Effect of BFCF(1 mg/ml) on LC20 phosphorylation in ferret-portal vein with PGF2 α . Values are mean \pm S.D(n=7). * p<0.05, as compared with control group.

3. Myosin phosphatase subunits(MPs)의 전위에 미치는 영향

정상상태의 단일 세포내에서 MP의 targeting subnit (MYPT1)과 catalitic subnit(PP1c)의 분포는 Fig. 4에서 보는 바와 같이 세포질내에 균등하게 분포하고 있다. PGF2 α 의 투여에 의하여 MYPT1은 5분, 8에서 각각 세포막으로의 이동을 보여주었으며, PP1c의 경우는 처음 5분에 세포막으로 이동하였다가 8분에 다시 세포질내로 균등하게 분포되었다. 그러나山楂의 butanol 분획은 이들 subnits의 세포막으로의 전위를 유의하게 억제하였다. MPs의 전위에 대한 세포막과 세포질의 fluorescence 비율을 보면 MYPT1이 정상세포에서 1.384 \pm 0.05, PP1c가 1.490 \pm 0.04이었다. 이들 비율은 PGF2 α 의 투여에 의하여 MYPT1이 5분, 8분에 각각 2.85 \pm 0.35, 2.73 \pm 0.21로 정상군에 비하여 유의하게(p<0.05) 증가되었다. PP1c는 각각 2.151 \pm 0.12, 1.485 \pm 0.08로 5분에 유의하게(p<0.05) 증가하였다가 8분에는 거의 정상 값으로 감소하였다. 그러나山楂의 butanol 분획을 처치 하였을 경우 MYPT1의 경우 5분에 1.787 \pm 0.11, 8분에 1.617 \pm 0.087로 모두 유의하게(p<0.05) 감소하였다. PP1c의 경우 5분에 1.459 \pm 0.06로 유의하게(p<0.05) 감소하여, 8분에 1.544 \pm 0.07로 정상군의 fluorescence 비율에 비하여 큰 차이를 나타내지 않았다. 한편 Rho-kinase 억제제인 Y27632의 처리에 의하여 MYPT1이 정상 상태에서 1.473 \pm 0.05, PGF2 α 투여 5분에서 1.969 \pm 0.12로 유의한

증가($p < 0.05$)를 유의한 증가를 보였으나 8분에서 1.61 ± 0.11 로 감소하였으며, PP1c의 경우 정상의 1.457 ± 0.04 에 비하여 5분에서 1.423 ± 0.56 , 8분에서 1.51 ± 0.06 으로 큰 차이를 보이지 않았다.



Fig. 4. Confocal immunofluorescence images of MYPT1 and PP1c in ferret portal vein smooth muscle single cells at rest. Bar, $10 \mu\text{m}$.

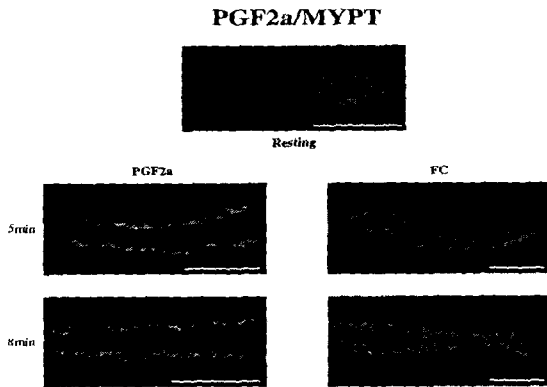


Fig. 5. Effect of BFCF(1mg/ml) on MYPT1 localization in smooth muscle single cells of ferret portal vein after $\text{PGF}_2\alpha$ stimulation. Bar $10 \mu\text{m}$.

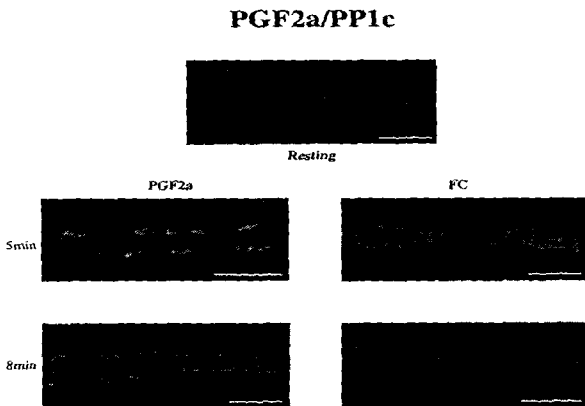


Fig. 6. Effect of BFCF(1mg/ml) on PP1c localization in smooth muscle single cells of ferret portal vein after $\text{PGF}_2\alpha$ stimulation. Bar $10 \mu\text{m}$.

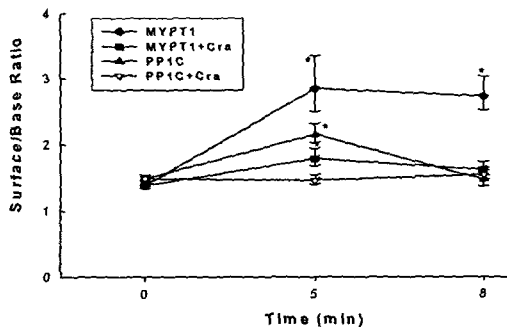


Fig. 7. Ratio of digital fluorescence at cell surface to that at cell base vs time after the addition of $\text{PGF}_2\alpha$ or $\text{PGF}_2\alpha$ plus BFCF(1mg/ml). BFCF was treated before $\text{PGF}_2\alpha$ stimulation. Values are mean \pm S.D. ($n = 6$). * $p < 0.05$, as compared with BFCF treated groups.

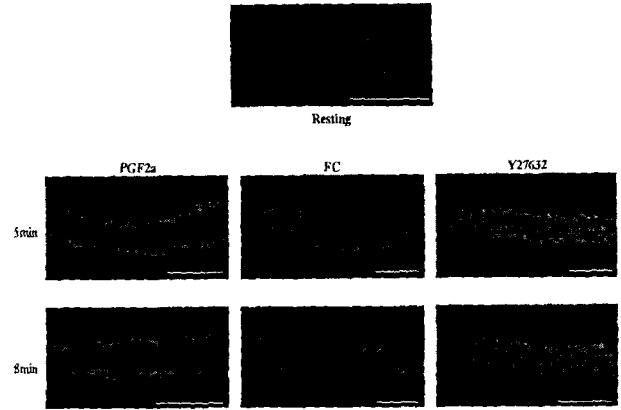


Fig. 8. Effect of BFCF(1mg/ml) or Y27632(10^{-5}mol/L) on MYPT1 localization in smooth muscle single cells of ferret portal vein after $\text{PGF}_2\alpha$ stimulation. Bar $10 \mu\text{m}$.

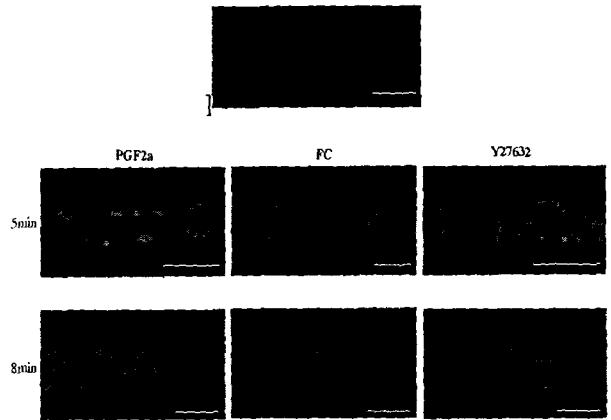


Fig. 9. Effect of BFCF(1mg/ml) or Y27632(10^{-5}mol/L) on PP1c localization in smooth muscle single cells of ferret portal vein after $\text{PGF}_2\alpha$ stimulation. Bar $10 \mu\text{m}$.

고찰

고혈압은 증풍(뇌졸중)의 발병원인이 되는 동맥경화의 선행 질환으로 뇌혈관질환에 의한 사망의 주원인이 된다. 한의학에서 고혈압은 頭痛, 眩暈의 범주에 속하며 다양한 혈관생리와 연계하여 인식되어 진다. 그 치료는 한의학의 특징인 변증논치를 기초로 감압효과가 있는 復方, 古方 및 單味 약재의 투여를 위주로 하고 있으며, 향후 이들 제제의 약리기전에 대한 연구는 변증론치에 대한 방제구성과 치료효과를 높일 수 있는 관건이 될 것이다. 나아가 고혈압의 치료에 있어서 현대 의학적 치료에 의한 부작용을 경감시키는 중요한 치료제로서의 역할을 수행할 것으로 기대된다.

山楂는 性이 微溫하고, 味는 酸甘하며, 脾·胃·肝經으로 歸經하는데, 그 活血散瘀의 효능으로 産後의 兒枕痛과 惡露不盡을 다스린다¹⁴⁾. 특히 活血散瘀의 효능은 行血하여 瘀血을 제거하는 작용으로 약리학적으로 심혈관계 질환의 개선과 혈압강하에 일정한 효과를 시사하는 내용으로 임상적으로 頭痛, 眩暈 및 고혈압에 효과를 나타내는 것으로 알려져 왔다^{16,17)}. 한편 혈관의 비정상적인 수축은 고혈압, 관상동맥 등의 지속적인 혈관수축과 같은 질병의 중요한 원인이 된다. 따라서 혈관의 긴장성 조절의 기전을 파악하는 것은 이들 질병에 대한 효과적인 치료 기술의 개발

을 할 수 있게 한다. 山植의 혈관이완의 효능에 대한 연구로는 항산화작용과 NO pathway의 관련성^{5,6)} 및 butanol 분획이 PKC α 의 전위 및 MP의 MYPT1과 PP1c의 해리 억제를 통한 MP의 활성을 증가시키는 신호전달이 관여함이 보고되었다¹⁰⁾. 그러나 MP 활성의 억제에 의한 수축기구의 Ca²⁺ sensitization의 증가와 Ca²⁺ 의존성 LC20의 인산화에 의한 혈관수축을 야기하는 prostaglandin F2 α (PGF2 α)에 의한 혈관평활근 수축에 미치는 신호전달에 대한 연구는 보이지 않는다. PGF2 α 에 의한 지속적인 평활근의 수축은 대부분 수용체 활성화 후 Ca²⁺ 통로가 활성화되고 세포내 Ca²⁺의 증가에 의한 LC20의 인산화에 기인한다. 또 Ca²⁺에 대한 MLCK의 민감성을 변화하거나 MP 활성의 감소에 의한 LC20 인산화의 민감성을 증가시키는 것이다. 이는 phenylephrine이 LC20의 인산화와는 다른 경로나 "latch"기전에 의한 수축의 기전과는 대조적이다¹⁸⁾. LC20의 인산화는 혈관평활근(vascular smooth muscle cell:VSMC)의 수축에 중요한 단계이다. 이러한 인산화의 정도는 MLC kinase(MLCK)와 MLC phosphatase(MP)에 의한 두 방면으로 조절된다. MP 활성의 억제는 LC20의 인산화의 증가와 Ca²⁺ sensitization에 의한 VSMC의 과도한 수축을 야기한다¹⁹⁾.

본 실험에서는 山植의 butanol 분획이 VSMC의 Ca²⁺ sensitization에 미치는 영향을 확인하고자 PGF2 α 로 유발된 평활근의 수축에 대하여 LC20의 인산화 및 MP subunits(아형)의 전위에 미치는 영향을 관찰하였다. 山植의 butanol 분획은 PGF2 α 로 유도된 LC20의 인산화를 유의하게 억제하였다. MP의 활성조절은 생리적, 병태생리적 상태에서의 평활근 수축의 중요한 조절 기전이다. MP의 MYPT1과 PP1c 두 아형은 PGF2 α 에 의하여 수축의 초기에 세포막으로 이동되며 이후 세포막에서 서로 분리되는데, PP1c는 세포질로 환원되며 MYPT1은 여전히 세포표면에 존재하게 된다. 이러한 두 아형의 분리는 ROK 인산화 site에서의 MYPT1의 인산화와 연계되어 있으며 이로 인한 LC20의 탈 인산화의 감소는 MP 활성의 감소에 대한 하나의 기전을 제공한다²⁰⁾. 山植의 butanol 분획은 PGF2 α 에 의한 MYPT1과 PP1c의 해리를 억제하는 것으로 나타났다. 이는 PP1c의 분리가 인산화된 LC20에 대하여 그 활성이 감소되어²¹⁾ MP를 비 활성화시키는 기전을 고려할 때, 山植는 두 아형의 복합체를 지속시키므로서 MP의 활성을 증가시키고 Ca²⁺에 대한 LC20 인산화의 sensitization을 감소시켜 그 이완효능을 발휘하는 것으로 생각된다.

이러한 결과는 山植의 혈관 이완효능이 PKC α 의 활성억제와 MP의 활성증가에 기인한다는 이 등²²⁾의 보고에 근거하면, 山植의 혈관이완의 신호전달체계는 Ca²⁺ 비 의존성 기전으로 PKC α 의 활성억제를 통한 MP의 활성증가, 그리고 Ca²⁺ 의존성 기전으로 MP의 활성증가에 의한 Ca²⁺ sensitization의 억제와 LC20 인산화의 억제로 볼 수 있다. 그러나 agonist에 따른 山植 butanol 분획의 이완효능을 비교하기 위하여 phenylephrine과 prostaglandin F2 α (PGF2 α)로 유도된 간 문정맥의 수축에 대한 이완효력을 관찰한 결과 PE보다 PGF2 α 로 유도된 수축에 대하여 그 이완의 효과가 우수하게 나타난 결과나, MP의 활성을 억제하여 Ca²⁺ sensitization과 혈관 평활근의 과도한 수축에 중요

한 역할을 하는 것으로 알려진 Rho-kinase 억제제인 Y27632와 山植의 MP 아형의 전위에 미치는 영향을 비교한 바 그 전위의 억제 효과가 유사하게 나타난 점을 생각할 때, 山植의 혈관이완에 대한 신호전달은 주로 MP 활성의 증가를 통한 LC20의 탈 인산화로 볼 수 있을 것이다. 이는 山植가 Rho-kinase 억제제로서의 가능성을 시사하는 것으로 이에 대한 지속적인 연구가 기대되는 바이다. 그러나 PGF2 α 에 의한 평활근의 수축에 Ca²⁺ 비 의존성 기전이 관여하므로 PKC α 의 활성억제를 통한 caldesmon이나 calponin과 같은 actin regulatory protein의 인산화를 억제하는 신호전달도 배제할 수는 없을 것이다.

한편 이러한 약리적 기전이 한의학적 歸經 및 효능과 어떤 함수관계를 찾을 수 있을지의 여부는 앞으로 다른 여러 한방제제의 실험적 연구를 통한 상관성을 비교하므로써 밝혀질 수 있을 것으로 생각된다.

결론

山植는 butanol 분획은 PGF2 α 에 의한 ferret 간 문정맥의 수축에 대하여 유의한 이완효과를 보였다. 또 PGF2 α 에 의한 LC20 인산화를 유의하게 억제하였으며, MP 아형의 세포질로부터 세포막으로의 전위를 차단하였다. 따라서 山植 butanol 분획의 혈관이완에 MYPT1과 PP1c의 결합에 의한 MP 활성증가가 Ca²⁺ sensitization의 억제에 관여할 것으로 생각되며, 또 LC20 탈 인산화가 관여함을 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. 康秉秀, 金永坂, 臨床配合本草學, 서울, 永林社, 477-478, 1984.
2. 姚瀾, 本草分經, 上海, 上海科學技術出版社, 104, 1994.
3. 李時珍: 本草綱目, 서울, 고문사, 1014, 1980.
4. 仲昂庭, 本草崇原集說, 北京, 人民衛生出版社, 89-91, 1997.
5. 손창우, 채종구, 김길현, 신흥목, 山植의 혈관이완 효능과 항산화작용. 동의생리병리학회지, 16(1): 67-71, 2002.
6. 채종구, 내피세포 nitric oxide 유리를 통한 山植의 혈관이완 작용. 동국대학교대학원 한의학박사 학위논문, 2002.
7. Haeberle J.R., Hathaway D.R. & DePaoli-Roach A.A. J Biol Chem 260:9965-9968, 1985.
8. Bialojan C., Ruegg J.C. & DiSalvo J. Pflüger's Arch 410: 304-312, 1987.
9. Horowitz A., Menice C.B., Laporte R. & Morgan K.G. Mechanism of Smooth Muscle Contraction. Physiological. 76(4): 967-1003, 1996.
10. Heon Jae Lee, Ho Jeong Choi, Gil Whon Kim & Heung Mook Shin. Effects of Butanol Fraction of Crataegi Fructus on the Translocation of PKC α and Myosin Phosphatase Subunits in Vascular Smooth Muscle. Korean J. Oriental Physiology & Pathology 16(5): 594-599, 2002.14.
11. Jain M., Dai H.B., Carozza J.P., Sellke F. & Morgan K.G.

- Intrinsic tone as potential vascular reserve in conductance and resistance vessels. *Circulation* 94:1083-1088, 1996.
12. DeFeo T.T., Morgan K.G. Responses of enzymatically isolated mammalian vascular smooth muscle cells to pharmacological and electrical stimuli. *Pflug Archiv* 404:100-103, 1985.
 13. Muranyi A., Erdodi F., Ito M., Gergely P. & Hartshorne D.J. Identification and localization of myosin phosphatase in human platelets. *Biochem J* 330:225-231, 1998.
 14. Taggart M. J., Lee Y. H. and Morgan K. G. : Cellular redistribution of PKC α , rhoA and ROK α following smooth muscle agonist stimulation. *Exp Cell Res* 251:92-101, 1999.
 15. Kim I., Je H.-D., Gallant C., Zhan Q., Van Riper D., Badwey J.A., Singer H.A. & Morgan K.G. Ca²⁺-calmodulin-dependent protein kinase II-dependent activation of contractility in ferret aorta. *J Physiol* 526(2):367-374, 2000.
 16. 高山宏世, 中醫方劑病証圖解, 山西, 山西科學技術出版社, 240-241, 1991.
 17. 張恩勤, 鄭貴力, 方劑學, 北京, 科學技術出版社, 386-387, 1996.
 18. Suematsu E., Resnick M. & Morgan K.G. Change of Ca²⁺ requirement for myosin phosphorylation by prostaglandin F₂ α . *Am J Physiol* 261:C253-8, 1991.
 19. Somlyo A.P., and Somlyo A.V. : Signal transduction by G-proteins, rho-kinase and phosphatase to smooth muscle and non-muscle myosin II. *J Physiol.* 522:177-185, 2000.
 20. Shin H. M., Je H. D., Gallant C., Tao T. C., Hartshorne D. J., Ito M. & Morgan K.G. Differential association and localization of myosin phosphatase subunits during agonist-induced signal transduction in smooth muscle. *Circ Res* 90:546-553, 2002.
 21. Ichkawa K., Hirano K., Ito M., Tanaka J., Nakano T. & Hartshorne D.J. Interaction and properties of smooth muscle myosin phosphatase. *Biochemistry* 35(20): 6313-6320, 1996.
 22. Lee, H.J., Choi O.J., Kim G.W. & Shin H.M. Effect of Butanol Fraction of *Crataegi Fructus* on the Translocation of PKC α and Myosin Phosphatase Subunits in Vascular Smooth Muscle. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology* 16(5): 594-599, 2002.