豨薟의 Nitric Oxide 유리를 통한 평활근세포에서의 Apoptosis 유도

전수영 · 신동훈 · 손창우 · 신흥묵*

동국대학교 한의과대학 생리학교실

Production of Nitric Oxide by *Siegesbeckia Glabrescens* is Associated with Apoptosis of Vascular Smooth Muscle Cell

Soo Young Jun, Dong Hoon Shin, Chang Woo Son, Heung Mook Shin*

Department of Physiology, College of oriental Medicine, Dongguk University

Apoptosis is the ability of cells to self-destruct by the activation of an intrinsic cellular suicide program when the cells are no longer needed or when they are seriously damaged. Morphologically, apoptosis is characterized by the appearance of membrane blebbing, cell shrinkage, chromatin condensation, DNA cleavage, and the fragmentation of the cell membrane-bound apoptotic bodies. Siegesbeckia glabrescens Makino (Siegesbeckiae Herba, SG) has been widely used as treatments for arthritis, and fever, as well as detoxification properties. The present studies were undertaken to evaluate if SG has an anti-apoptotic property. Cell viability was measured by XTT and tryphan blue stain. Morphological characteristic of human aortic smooth muscle cells(HASMC) were visualized with a phase-contrast microscope. SG significantly reduced HASMC, but not human umbilical vein endothelial cell(HUVEC), viability in a dose-dependent manner. Confluent untreated cells at 24hrs showed normal morphology, flat with a uniform polygonal shape. SG-treated cells (0.5mg/ml) at 24hrs showed apoptotic morphology. Cells became irregular with elongated lamellipodia, and exhibited condensed chromatin in nuclei with occasional endoucleation. There was an increase in the number of apoptotic cells rounding-up and being detached from the substrate. TUNEL staining of SG-treated cells showed dark-brown stains in nuclei and cytosol. Caspases are central components of the machinery responsible for apoptosis and are generally divided into two categories; the initiator caspases, which include caspases-2,-8,-9, and -10, and the effector caspases, which include caspases-3,-6, and -7. SG decreased anti-caspase-3 protein expression, which means activation of caspases-3 activity. It has been reported that there is a link between NO formation and apoptosis. NO production was accelerated by SG treatment in HASMC. L-NNA, NOS inhibitor, inhibited SG-induced apoptosis. These results, therefore, indicated that both caspases-3 and NO production are involved in apoptosis in smooth muscle cells. According to these results, SG may have a potential effect in the treatment of hypertensive atherosclerosis.

Key words : Siegesbeckia glabrescens Makino, apoptosis, caspases-3, NO

서 론

고혈압은 한의학의 두통, 현훈의 범주에서 인식되며, 肝陽의 병리적 상태를 중요한 원인의 하나로 보고 있다. 또 중풍(뇌졸중), 심혈관계 질환의 최고 위험인자로서 이의 치료와 관리에 관심이 집중되고 있다. 더욱이 합성의약품의 많은 부작용이 보고되면서 상대적으로 부작용이 적고 장기 사용이 가능한 한약재나 한약제제의 효능과 치료기전에 대한 연구에 관심이 쏠리고 있다.

희렴은 그 氣味가 苦辛하고, 肝經에 작용하여 風濕을 제거하고 淸熱解毒하며, 通絡하는 효능[1,2]으로 고혈압의 치료에 일정한 작용을 할 것으로 생각된다. 또 四肢麻痺, 腰膝無力, 口眼喎斜, 半身不遂의 주치증[3,4]은 뇌졸중의 전구증상이나 후유증에서 나타나는 증상으로 심혈관계질환에의 응용 가능성을 시사하는 것이

* 교신저자 : 신흥묵, 경북 경주시 석장동 707 동국대학교 한의과대학
· E-mail : heungmuk@dongguk.ac.kr, · Tel : 054-770-2372
· 접수 : 2004/06/01 · 수정 : 2004/06/30 · 채택 : 2004/07/29

다. 최근에는 혈압강하 작용이 있는 것으로 알려지면서[1,5] 고혈압의 치료에 대한 효능과 기전의 연구가 진행되고 있다. 고혈압의 치료와 관련한 희렴의 실험적 연구로는 고혈압 흰쥐에서의 혈압강하 효과[6,7], 혈청지질함량의 감소[8,9], 혈관이완효능[10] 및 그 혈관이완효능의 내피세포 의존성[11]이 보고 된 바 있다. 한편 고혈압의 발생기전에 혈관의 리모델링이 중요하게 관여함이 밝혀지면서 고혈압의 진행에 있어서 혈관 리모델링의 역할이 강조되고 있다. 혈관 리모델링은 세포의 크기 및 수의 증가와 세포외 기질성분(collagen, elastin, and fibronectin)의 침착을 통하여 혈관벽이 두꺼워지는 혈관구조의 변화로, 고혈압의 치료에 있어 혈관 리모델링 억제의 중요성이 강조되고 있다. 혈관 리모델링의 조절에 관여하는 apoptosis는 세포의 비정상적 증식에 의한 혈관의 리모델링을 억제하므로 서 고혈압성 동맥경화나 죽상동맥경화의 치료기전으로 작용할 수 있다. 또 혈관이완 과정에서 처음으로 밝혀진 nitric oxide(NO)는 혈관확장 및 신호전달 외에 그 농도에 따라 세포의 apoptosis 또는 necrosis를 유도할 수가 있다. 이에 그동안 연구된 희렴의 항고혈압 작용에 대한 결과를 기초로 고혈압치료에서의 혈관 리모델링의 억제를 중재할 가능성을 확인하기 위하여 HUVEC(human umbilical vein endothelial cell)과 HASMC(human aortic smooth muscle cell)에서의 apoptosis 유도 여부와 그 기전을 NO와 연계하여 관찰한바 유의한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 한약 추출물의 제조

희렴(Siegesbeckia glabrescens; SG) 200g을 round flask에 넣고, 증류수 1000ml을 가하여 가열 추출한 후 추출액을 여과지로 여과하고, 이 여액을 rotary evaporator로 감압 농축하고 동결 건조하여 22.28g의 분말을 얻었다.

2. 방법

1) 혈관 장력 측정

95%의 O_2와 5%의 CO_2를 혼합한 가스가 연속적으로 공급되고 37±0.5 ℃로 유지되는 Krebs-Ringer bicarbonate 용액이 peristaltic pump를 통하여 4 ml/min의 속도로 흐르고 있는 organ bath(용량 25 ㎖)에 혈관절편을 현수하여 한쪽 끝은 organ bath의 저부에 고정시키고 다른 쪽 끝은 근 수축변환기에 연결하여 등장성 수축(isometric contraction) 및 이완을 기록하였다. 혈관의 긴장성 측정은 미세장력 조절장치(Grass FT-03)를 이용하여 초기 장력을 1g 부하하고 1시간 이상 회복시킨 후, 3×10^{-7}M의 phenylephrine과 65.4mM KCl을 사용하여 최고 수축기에 이르렀을 때, 희렴 추출물을 용량별로 투여하여 나타나는 반응을 physiograph(Grass 7, USA)로 연속 기록하였다.

2) 세포배양

세포들은 [human umbilical vein endothelium cell(HUVEC), human aortic smooth muscle cell(HASMC)] 95% air/5% CO_2의 humidified atmosphere, 37℃의 조건에서 10% fetal bovine serum과 1% penicillin-streptomysin을 포함하는 DMEM을 이용하여 배양하였으며 90% confluence 자랐을 때, trypsin-EDTA를 처리하여 분양하였다.

3) 세포 생존율 측정

96 wells plate에 cell (5×10^3 cells/100㎕)을 분주하고 24 시간 배양 후, 희렴 또는 희렴 및 L-NNA를 처리하고 다시 24 시간 배양하였다. Well 당 50㎕의 XTT를 처리후 4시간 반응시킨 후 490nm에서 ELISA reader를 이용하여 흡광도의 변화를 관찰하였다. 세포를 뺀 배지를 같이 배양하여 실험군의 흡광도와 비교하여 세포 생존율을 백분율(%)로 표시하였다.

4) 생존 세포 수 측정

1×10^5cells/ml로 배양된 세포에 희렴을 처리하고 24시간 배양하였다. trypsin-EDTA를 처리하고 원심 분리하여 세포들을 모아서 tryphan blue (0.4%)로 염색하고 hematocytometer를 이용하여 살아있는 세포의 수를 측정하였다.

5) TUNEL 염색

세포를 1% paraformaldehyde에 15시간동안 4℃에서 고정시키고 3% H_2O_2로 실온에서 5분간 반응 시킨 후, equilibration buffer로 실온에서 10초 동안 반응 시켰다. TdT(terminal deoxynucleotidyl transferase) enzyme으로 37℃에서 한 시간 반응시킨 후 stop/wash buffer를 첨가하여 반응을 중단시키고 anti-dioxigenin peroxidase conjugate를 첨가하여 실온에서 30분간 반응 후 PBS로 씻어내었다. 암실환경에서 peroxidase substrate를 첨가하여 반응시킨 후, 0.5% (W/V) methyl green으로 대조염색을 시행 하였다.

6) Nitric oxide 측정

세포배양액에 축적된 NO의 농도는 Griess 法[12]에 따라 ELISA microplate reader(Behring EL311)로 흡광도를 측정하였다. 간략히 기술하면, 50㎕의 검액과 Griess 시약 (1% sulfanilamide, 0.1% naphtyl-ethylendiamine dihydrochloirde, 2.5% H_3PO_4) 50 ㎕을 혼합하여 상온에서 15분간 반응시킨 후 ELISA reader로 A570에서 흡광도를 측정하였다. NO의 농도는 sodium nitrite의 농도를 기준으로 작성한 표준곡선으로 환산하여 계산하였으며, 각 실험에서 기본 대조군은 세포 배양액을 사용하였다.

7) Western blot

세포로부터 NP-40을 포함하는 RIPA buffer (10㎍/㎖ leupeptin, 10㎍/㎖ aprotinin & 1mM PMSF 포함)로 단백질을 추출한 뒤 Bio-Rad kit (Lowery methods)를 이용하여 정량하였다. 정량 후 10% sodium dodesyl sulfate-polyacrylamide gel electrophorisis(SDS-PAGE)에 의해 단백질을 분리하고, nitrocellulose membrane으로 transfer 한 후 blocking buffer 즉, TBS에 녹인 3% nonfat dry milk로 한 시간 반 반응시켰다. 그리고 dry milk에 녹인 anti-caspase-3 antibody(1:1,000)에 한 시간 반응시켰다. TBST로 세척 (10 min×3)하고, horse-radish peroxydase-conjugated secondary antibody와 ECL kit (Amersham Pharmacology)로 발색시켰다.

실험성적

1. 희렴의 혈관이완 효능

희렴의 혈관이완 작용을 확인하기 위하여 phenylephrine (PE)와 KCl 유도 수축혈관에 대한 이완 효능을 측정하였다. 희렴은 PE와 고농도 KCl(65.4mM) 유도 최대 수축에 대하여 농도 의존적으로 유의한 혈관이완 활성을 나타내었다. 그러나 KCl에 의한 수축 보다 PE에 의한 수축에 대하여 보다 높은 혈관 이완활성을 보였다.

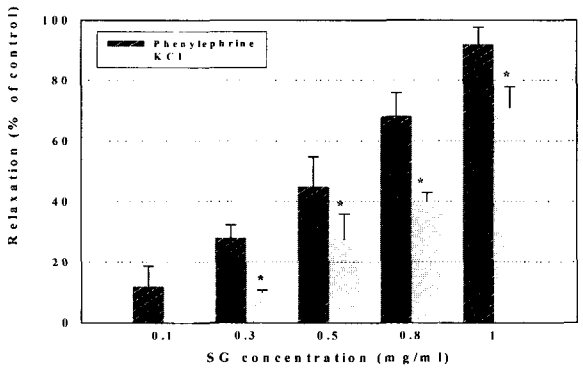

Fig. 1. Dose-dependent relaxation effects of Siegesbeckia glabrescens (SG) on PE or KCl-induced contractions in rat thoracic aorta. *p<0.05, as compared with each PE-treated group.

2. 희렴이 세포사멸에 미치는 영향

HASMC와 HUVEC에 대한 희렴의 세포사멸에 대한 영향을 확인하기 위하여 XTT, 현미경관찰, tryphan blue exclusion 방법을 이용하여 농도별 세포 생존율을 관찰하였다. 희렴은 HUVEC에는 유의한 영향을 미치지 않았으나, HASMC에 대하여 0.1mg/ml의 농도에서 약 50%, 0.3mg/ml 이상의 농도에서 약 70% 내외의 세포사멸은 초래하였다(Fig. 2A).

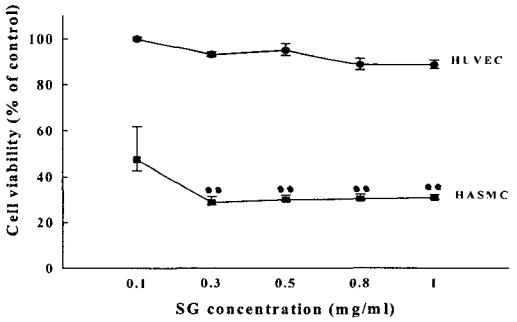

Fig. 2A. Effect of SG on cell viabilities of the HASMC and HUVEC. Each cell line (5×10⁴ cells/ml) was incubated in the presence of different concentrations of SG for 24hrs. Cell viability was measured by XTT assay as described in Materials and Methods. Values are mean ± S.D., n= 8. **, p<0.005 as compared with the normal group.

Tryphan blue 염색을 이용하여 직접 생존 세포수를 측정한 결과도 농도 의존적으로 생존 세포의 수가 유의하게 감소하였다(Fig 2B). 또 형태적으로 정상세포에서는 세포질과 핵이 뚜렷하게 보이는 반면에 희렴을 처리한 경우 0.1mg/ml에서 부터 다소 검게 보이는 죽은 세포와 죽은 세포의 부유 및 핵의 농축, 세포질의 수축과 같은 apoptosis의 현상이 관찰되었다(Fig 2C).

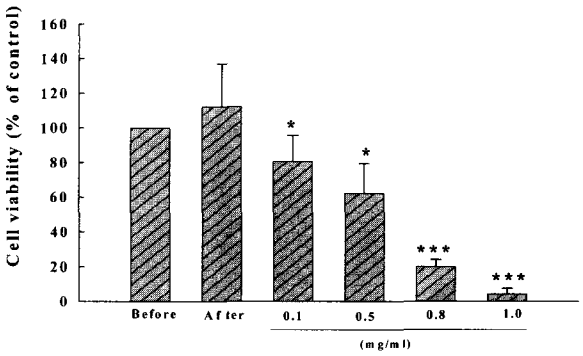

Fig. 2B. Effect of SG on the viability of HASMC cells. Cell viability was determined by tryphan blue exclusion. Bars represent the means of 5 experiments. *p<0.05, ***p<0.0001, as compared with the control group.

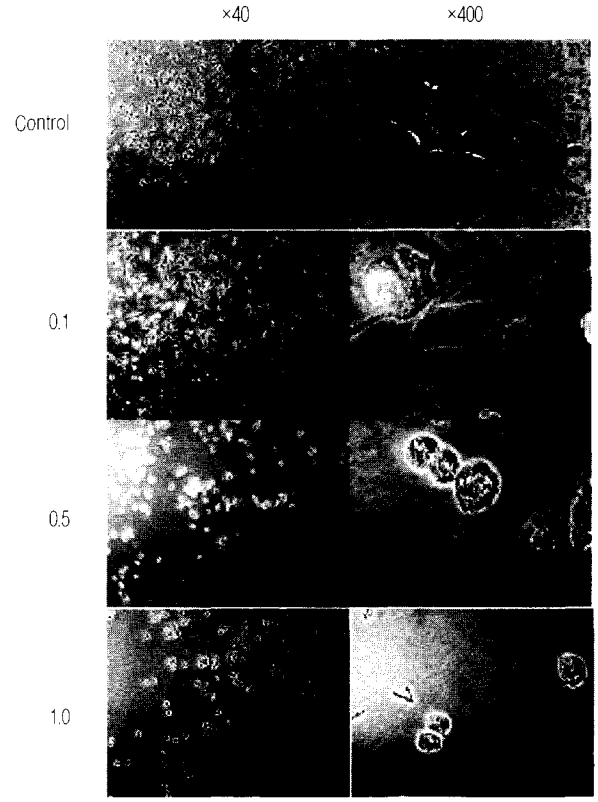

Fig. 2C. Dose-dependent morphological changes of HASMC by SG. The regular shape of cells are shown in the control group. SG(0.1mg/ml) treated cells undergoing apoptosis are shown by their characteristically shrunken cytosol, cell condensation and membrane blebbing. SG(0.5mg/ml) treated cells showed more apoptotic cells with condensed and fragmented nuclei. Almost all cells were floating in SG(1.0mg/ml)-treated cells.

3. 희렴의 평활근 세포 apoptosis 유도

희렴에 의한 혈관평활근 세포의 죽음이 apoptosis의 양상을 보이므로 세포사가 apoptosis에 의한 것인지를 확인하기 위하여 DNA를 특징적으로 염색하는 TUNEL 염색을 수행하였다. 그 결과 Fig. 3에서 보는 것처럼 대조군에서는 핵이 염색이 되지 않은 반면에 0.1mg/ml의 희렴을 24시간 처리한 세포의 경우 세포사멸의 특징인 DNA 분절을 나타내는 핵에서의 진한 갈색의 염색을 볼 수 있었다.

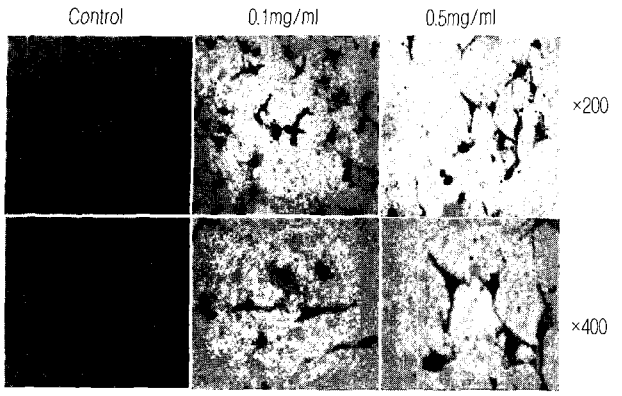

Fig. 3. TUNEL staining of HASMC. HASMC was treated with 0.1mg/ml and 0.5mg/ml of SG for 24 hrs.

4. 희렴이 Nitric Oxide의 생성에 미치는 영향

NO는 혈관확장 및 신경전달 등 세포와 세포사이의 전령자로서 역할과 함께 강력한 세포 독성물질로 작용하는데[15], 세포 또는 NO의 생성량에 따라 apoptosis를 항진시키거나 억제하는 역할을 한다[16]. 희렴에 의한 혈관평활근의 apoptosis 유도와 NO의 관련성을 파악하기 위하여 Griess 반응을 이용 농도별, 시간별 NO의 생성량을 조사하였다. 희렴은 농도 의존적으로 NO 생성을 증가시켰으며, 0.5mg/ml의 농도에서 시간별 생성량을 보면 5분에서 최고 생성량의 약 80% 정도가 생성되었고 10분 이후 최고 생성을 나타내었다(Fig 4).

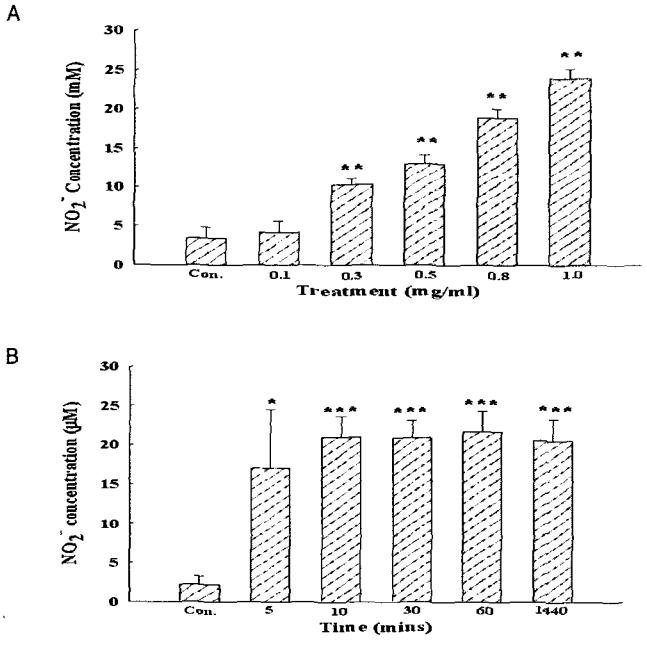

Fig. 4. The nitric oxide production by SG in HASMC. A. Dose-dependent nitric oxide production in HASMC by SG treatment. B. Time course production of nitric oxide in HASMC by SG (0.5mg/ml) treatment. Three independent experiments. *p<0.05, ***p<0.001 as compared with the control group.

5. 희렴의 평활근세포 apoptosis 유도에 미치는 L-NNA의 영향

희렴에 의한 apoptosis 유도가 NO 경로에 의한 것인지를 확인하기 위하여 NOS inhibitor인 L-NNA의 처치가 희렴의 apoptosis 유도에 미치는 영향을 관찰하였다. Fig. 5에서 보는바와 같이 L-NNA의 처치는 희렴 0.1mg/ml의 농도에서는 희렴의 약 45%의 생존율에 비하여 약 95%의 세포생존율을 나타내었으며, 0.3mg/ml 이상의 농도에서는 희렴의 약 20~30%의 세포생존율에 대하여 약 70~80%의 세포생존율로 apoptosis를 유의하게 억제시켰다(Fig 5).

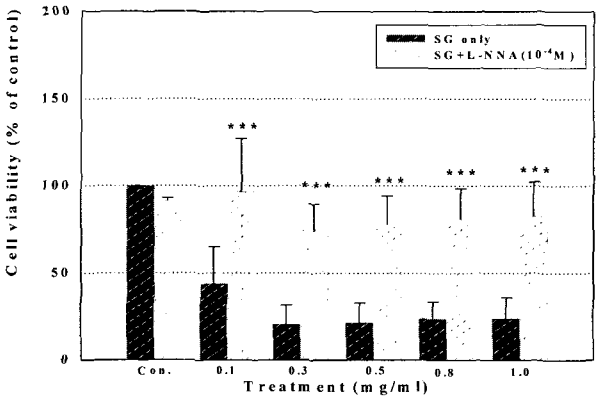

Fig. 5. The effect of L-NNA on SG-induced HASMC apoptosis. HASMC were treated with L-NNA (10^{-4}M) alone or SG (0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1.0 mg/ml) only and both for 24hrs. ***p<0.001, as compared with each group.

6. 희렴이 caspase-3 활성에 미치는 영향

Apoptosis에 관여하는 단백질 분해효소로서 apoptosis에 중추적 역할을 하는 caspase-3의 활성에 대한 희렴의 영향을 관찰하였다. Anti-apoptotic protein인 caspase-3에 대한 영향을 Western blot을 통해서 확인한 결과 대조군에 비해 유의한 procaspase-3의 분해를 확인할 수 있었다(Fig 6). 따라서 희렴은 caspase-3의 활성 유도를 통해 혈관평활근 세포의 apoptosis를 유도함을 알 수 있다.

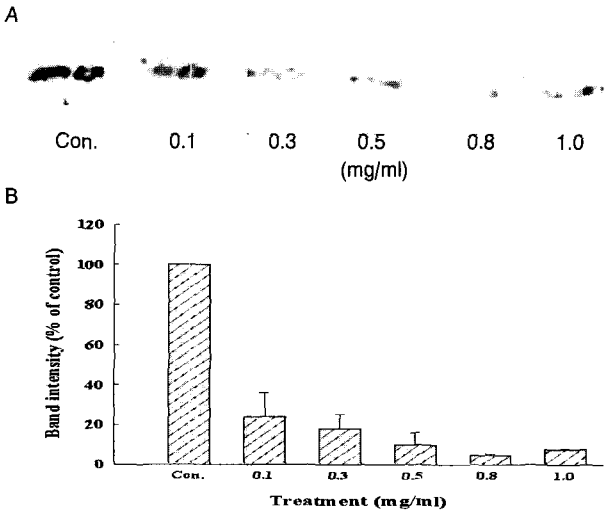

Fig 6. Induction of caspase-3 degradation by SG. A. A representative western blot image. B. The relative amounts of procaspase-3 protein were quantitated by densitometric analysis of 4 independent experiments.

고 찰

고혈압은 암과 뇌졸중에 이어 현재 우리나라 사망원인 3위

인 심장병의 3대 위험요인이다. 의학 교과서엔 높은 콜레스테롤 수치를 가장 위험한 것으로 싣고 있으나, 이것은 서양인을 대상으로 한 연구결과이며 실제 한국인에겐 콜레스테롤보다 고혈압이 더욱 위험한 요인이라고 심장 전문가들은 강조한다. 이처럼 심장병의 가장 위험한 요인인 고혈압은 그 자체가 두려운 것이 아니라 동맥경화, 뇌출혈, 뇌경색, 뇌혈전, 심근경색, 협심증 및 신부전 등 합병증을 일으키기 때문에 조기치료와 관리가 중요하다.

고혈압 치료제는 비교적 부작용이 적은 것으로 알려진 안지오텐신 전환효소 억제제를 중심으로 연구가 활발히 이루어지고 있으나 역시 마른기침, 혈관부종, 고칼륨증, 신기능저하와 같은 부작용이 보고 되고 있다. 따라서 경험적으로 안정성이 입증된 한약재나 그 제제(처방)의 임상적 효과에 대한 체계적 연구는 한약의 객관화와 한약제제(처방) 개발을 위한 기반구축에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

희렴은 그 氣味가 苦辛하고, 肝經에 작용하며 祛風除濕, 淸熱解毒, 活血通絡의 효능[1,2]과 四肢麻痺, 腰膝無力, 口眼喎斜, 半身不遂 등의 주치증[3,4]은 고혈압 및 뇌졸중의 전구증상이나 후유증의 치료는 물론 심혈관계질환에의 응용가능성을 시사한다. 특히, 혈압 강하작용이 있는 것으로 알려지면서[1,5] 임상에서 고혈압의 치료에 널리 사용되고 있으며, 이에 대한 효능과 기전에 대한 실험적 연구가 보고 되고 있다[13,14]. 본 연구에서는 희렴의 혈관이완 효능을 확인하고, 세포사멸에 미치는 영향과 기전을 연구하기 위하여 XTT, tryphan blue exclusion, 광학현미경 관찰을 통한 세포생존률 측정, TUNEL 염색을 통한 apoptosis의 확인, NO 생성능과 L-NNA의 처치가 희렴의 apoptosis 유도에 미치는 영향 및 caspase-3의 활성을 관찰하였다. 세포생존에 미치는 영향을 파악하기 위한 XTT 측정에서 희렴은 내피 세포인 HUVEC에 대하여 유의한 영향을 미치지 않았으나, 평활근세포인 HASMC에 있어서는 0.3mg/ml 이상의 농도에서 약 30% 내외의 세포 생존율을 보였으며, tryphan blue exclusion 방법을 이용한 관찰에서도 농도 의존적 세포 생존율의 감소를 관찰할 수 있었다. 이러한 세포의 죽음이 necrosis(세포괴사)인지 apoptosis(세포자연사)에 의한 것인지를 확인하기 위한 형태학적 관찰에서 세포질의 농축, 핵의 분절(fragmentation), 세포의 수축을 관찰할 수 있었으며 또, TUNEL 염색을 통한 DNA 분절을 나타내는 핵에서의 진한 갈색의 염색을 확인할 수 있었다. Apoptosis는 다세포 생물의 성장과 항상성에 있어서 중요한 역할을 한다. Caspase는 시스테인계의 단백질 분해효소로서 apoptosis의 중심이 되는 조절자로서 apoptosis를 억제하는 단백질을 분해하여 apoptosis를 유도한다. 현재까지 알려진 caspase 중 caspase-3은 평상시 불활성 상태의 단백질로 존재하나 다양한 apoptosis 자극에 의해 활성화되면 세포내 여러 종류의 단백질을 절단하여 apoptosis를 유도한다. 희렴에 의해 유도되는 apoptosis가 caspase-3와 관련이 있는지를 Western blot으로 확인하였다. 희렴은 농도 의존적으로 비활성화 형태의 caspase-3 단백질의 양적 감소를 초래하였다. 비활성화 형태의 caspase-3 단백질의 양적 감소는 caspase-3 활성을 의미하므로 희렴에 의한 평활근세포의 apoptosis에 caspase-3의 활성화가 관여함을 알 수 있다. 한편 NO는 혈관계에서 혈압조절과 혈소판의 응집, 세포의 분화나 세포내 신호전달 등 중요한 조절 물질로 알려져 있으며, 세포증식 억제나 세포독성의 활성에 관여한다[15]. 최근에는 NO가 apoptosis에 관여하는 물질로 밝혀지면서 이에 대한 연구가 진행되고 있다. NO의 apoptosis에 대한 작용은 일반적으로 정확한 기전은 밝혀져 있지 않으나 생산된 NO의 농도 및 세포에 따라 apoptosis를 항진시키거나 억제하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다[16-18]. 즉 저 농도의 NO는 apoptosis를 억제하는 작용이 있는 반면, 고농도의 경우 apoptosis를 유도한다. 또한 iNOS 자극에 의해 NO가 생성되거나 외부에서 NO 형성 물질을 투여할 경우 mM 범위의 NO 생성은 apoptosis를 유도하는데, eNOS에 의해 자극되거나 저 mM 범위의 NO가 생산되면 apoptosis가 억제되는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 희렴은 혈관 평활근세포에 대하여 NO의 생성을 농도 의존적으로 유의하게 증가시켰으며, 시간상 5분에서 최고 생성량의 약 80%를, 10분 이후 최고 생성을 보였다. 또 NOS 억제제인 L-NNA의 처치에 의하여 유의하게 apoptosis가 억제되므로 서 희렴은 NO의 생성을 통하여 평활근세포의 apoptosis를 유도함을 알 수 있다. 한편 혈관 리모델링은 혈류, 혈압의 변화 및 동맥경화에 대한 생리적 반응이지만 고혈압의 중요한 병리적 특징으로 세포 크기와 수의 증가, 세포외 기질성분(collagen, elastin, and fibronectin)의 침착을 통하여 혈관 벽이 두꺼워지는 것이 특징이다. Tronc 등[19]에 의하면 혈류 의존성 outward remodeling의 약 70%가 NO의 생성에 기인하며, Cho 등[20]은 감소된 혈류에 의한 inward remodeling 동안에 혈관벽 기질의 감소에 따른 VSMC의 apoptosis 증가와 proliferation의 감소 있음을 보고하였다. 이에 따르면 희렴의 혈관이완 작용과 NO 생성을 통한 혈관평활근의 apoptosis 유도는 비정상적인 혈관 벽의 증식을 억제하고 혈관의 내강을 확장시켜 원활한 혈류를 가능케 하며 혈관의 저항을 낮춤으로써 고혈압의 치료에 유효한 효능을 발휘할 것으로 기대된다. 본 실험에서의 희렴의 apoptosis는 그 淸熱解毒의 한의약적 효능에 기인할 것으로 생각되며, 이는 세포사멸에 의한 혈관리모델링의 억제로 동맥경화는 물론 혈관의 저항성을 개선하여 고혈압 치료 특히, 동맥경화성 고혈압의 치료에 그 효과가 기대되는데 희렴의 活血通絡의 효능에 연계하여 분자 의학적 실험기전을 설명할 수 있을 것으로 보인다.

이상의 실험결과로부터 희렴에 의한 apoptosis는 NO의 생성 및 caspase-3의 활성화가 관련되어 있음을 알 수 있었다. 따라서 희렴은 고혈압의 치료 및 비정상적 평활근세포의 증식에 의한 고혈압성 동맥경화의 치료에도 유용하게 작용할 것으로 생각된다.

결 론

혈관 평활근세포(HASMC)에 대한 희렴의 apoptosis 유도 및 그 기전에 대한 연구를 통하여 다음의 결론을 얻었다.

희렴은 XTT와 tryphan blue exclusion 방법을 이용한 세포 생존율의 측정에서 혈관 평활근세포의(HASMC) 유의한 세포사멸을 초래하였다. 또 형태학적으로 죽은 세포의 부유, 핵 농축 및 세포

질 수축의 apoptosis(세포자연사) 현상을 보였다. TUNEL 염색을 통하여 희렴에 의한 세포사멸이 apoptosis를 나타내는 핵에서의 진한 갈색의 염색을 볼 수 있었다. 희렴은 농도 의존적 nitric oxide(NO) 생성을 증가시켰다. 시간적으로 5분에서 최고 생성량의 80%를 나타내었고, 10분 부터에서 최고 생성을 보였다. NOS 저해제인 L-NNA의 처치는 희렴에 의한 apoptosis를 유의하게 억제하였으며, 단백질 분해효소인 caspase-3의 활성을 증가시켰d음을 알 수 있었다. 이상의 결과로부터 희렴의 apoptosis 유도는 NO pathway 및 caspase-3의 활성화가 관련되어 있음을 알 수 있다. 또 희렴의 apoptosis 유발은 임상적으로 고혈압성 동맥경화의 치료에 대한 가능성을 시사한다고 생각된다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 한방치료기술연구개발사업의 지원(03-PJ9-PG3-21600-0047) 에 의하여 이루어 졌으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 高學敏, 中藥學, 北京, 北京中醫學院, pp. 155-156, 1986.
2. 吳儀洛, 本草從新, 서울, 杏林書院, p.62, 1982.
3. 康秉秀, 金永坂, 本草學, 서울, 圖書出版 永林社, pp. 276-277, 1944.
4. 黃宮繡, 本草求眞, 台北, 宏業書局有限公司, pp. 129-130, 中華民國七十年.
5. 王裕生, 中藥藥理與應用, 北京, 人民衛生出版社, pp. 1221-1222, 1983.
6. 高昌男, 高血壓, 稀簽丸과 hydralazine, atenolol, nifedipine 및 furosemide의 併用 投與에 關한 實驗的 硏究, 경희대학교 대학원, 1993.
7. 남상수, 박동석, 희렴약침 자극이 자발성 고혈압 흰쥐의 혈압에 미치는 영향 및 강압기전에 대한 연구, 대한한의학회지, 18(1): 218-237, 1997.
8. 沈在錄, 稀簽의 藥理學的 硏究, 경희대학교 대학원, 1988.
9. 장동순, 희렴이 실험적 고지혈증의 예방과 치료 효과에 미치는 영향, 경희대학교 대학원, 1994.
10. 신흥묵, 稀簽의 혈관이완 효능과 항산화 동태에 관한 연구, 대한한의학회지, 21(1): 77-83, 2000.
11. 金昊顯, 申興默, 金吉萱, 稀簽이 收縮된 血管에 미치는 影響, 東醫生理學會誌, 10(1): 25-36, 1995.
12. Griess P. Bemerkungen zu der abhandlung der H. H. Weselsky und Benedikt. "Ueber einige azoverbindungen." Chem. Ber., 12: 426. 1879.
13. 김호현, 김길훤, 희렴이 가토의 혈관내피세포성 이완인자에 미치는 영향, 대한한의학회지, 18(2): 15-32, 1997.
14. 김호철, 생희렴과 주증희렴 추출물이 자발성 고혈압 흰쥐의 항 고혈압 작용에 미치는 영향, 본초학회지, 13(1): 53-58, 1998.
15. Bruch-Gerharz D, Ruzicka T, Kolb-Bachoten V. Nitric oxide in human skin: current status and future prospects. J Invest Dermatol., 110: 1-7, 1998.
16. Dimmeler S, Zeiher AM. Nitric oxide and apoptosis: another paradigm for the double-edged role of nitric oxide. Nitric Oxide, 1: 275-281, 1997.
17. Esperanza R. Matarredona, Maribel M, Bernardo M, Carmen E. Nitric Oxide synthesis inhibition increase proliferation of neural precursors isolated from the postnatal mouse subventricular zone. Brain Research, 995: 274-284, 2004.
18. Kurose I, Higuchi H, et al. Rat Kupffer cell-derived nitric oxide suppresses proliferation and induces apoptosis of syngeneic hepatoma cells. Gastroenterology., 111(4): 1058-1070, 1996.
19. Tronc F, Wassef M, Esposito B, Henrion D, Glagov S, and Tedgui A. Role of NO in flow-induced remodeling of the rabbit commo carotid artery. Arterioscler Thromb Vasc Biol., 16: 1256-1262, 1966.
20. Cho A, Mitchell L, Koopmans D, and Langille BL. Effects of changes in blood flow rate on cell death and cell proliferation in cartid arteries of immature rabbit. Circ Res., 81: 328-337, 1977.