

혈관 평활근세포 증식에 대한 국내 자생종 승마의 효과

강영희¹ · 이동윤² · 최두석^{1,2} · 윤병구^{1,2} · 이영주³ · 류미라⁴

삼성생명과학연구소¹, 성균관대학교 의과대학 산부인과학교실², 세종대학교 생명공학과³, 한국식품연구원 대사기능연구본부⁴

Effect of Korean Native *Cimicifuga* Species on Proliferation of Vascular Smooth Muscle Cells

Young-Hee Kang, M.S.¹, Dong-Yun Lee, M.D.², Doo Seok Choi, M.D.^{1,2}, Byung-Koo Yoon, M.D.^{1,2}, Young Joo Lee, Ph.D.³, Mee-Ra Rhyu, Ph.D.⁴

Samsung Biomedical Research Institute¹, Department of Obstetrics and Gynecology, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine², Department of Bioscience and Biotechnology, Sejong University³, Seoul, Divisions of Metabolism and Functionality Research, Korea Food Research Institute⁴, Seongnam, Korea

Objectives: To examine the effect of extracts of Korean native *Cimicifuga* species on cell proliferation in vascular smooth muscle cells (VSMC).

Methods: VSMC were isolated from rat aorta. Cell proliferation was assessed by measure of bromodeoxyuridine incorporation into the cells. Differences in Reactive oxygen species (ROS) levels were examined after exposure to the extracts of Korean native *Cimicifuga* species using the detection reagents dichlorofluorescein diacetate. The rhizomes/roots were air-dried and milled with a commercial food mixer. Milled rhizomes/roots of each *Cimicifuga* species were separately extracted by 80% ethanol, absolute methanol, and 40% 2-propanol using homogenizer and evaporated under reduced pressure at low temperatures. Effects of extracts dissolved in phosphate-buffered saline (0.3 mg/mL) were examined.

Results: Ethanolic, methanolic or propanolic extracts of 4 Korean native *Cimicifuga* species (*Cimicifuga* [*C. davurica*, *C. japonica*, *C. heracleifolia* var. *bifida* Nakai, *C. simplex*) were screened. The addition of extracts of each Korean native *Cimicifuga* species to cells in the presence of 10% fetal bovine serum (FBS) potently inhibited cell proliferation. Significant decrease of 23%-30% was observed. Vitamin E, a potent antioxidant, inhibited 10% FBS-stimulated cell proliferation of VSMC. We also demonstrated that extracts of each Korean native *Cimicifuga* species decreased intracellular ROS generation induced with 10% FBS. The effect of Korean native *Cimicifuga* species was not species-specific and solvent-specific.

Conclusion: Extracts of Korean native *Cimicifuga* species inhibit VSMC proliferation via inhibition of intracellular ROS. These findings suggest that *Cimicifuga* species used for reducing menopause symptoms might be cardioprotective in women.

Key Words: Cardiovascular diseases, *Cimicifuga*, Estrogens, Vascular smooth muscle cell

심혈관 질환은 폐경 여성의 가장 중요한 사망원인 중 하나이며, 여성호르몬의 결핍으로 혈중 지질농도의 변화와 동맥혈관 벽의 변화로 동맥경화증 위험이 증가한다.¹ 동맥경화증은 내피세포의 기능장애, 염증, 기질변화 등을 포함하

는 복잡한 과정들이다. 주요 원인으로 혈관 평활근세포 증식 및 산화 스트레스의 증가가 있다.^{2~4}

혈관 벽에서 low-density lipoproteins (LDL)의 산화는 산화스트레스를 증가시킴으로써 동맥경화를 촉진시킨다. 산

Received: November 4, 2011 Revised: December 1, 2011 Accepted: December 1, 2011

Address for Correspondence: Byung-Koo Yoon, Department of Obstetrics and Gynecology, Samsung Medical Center, Sungkyunkwan University School of Medicine, 50 Irwon-dong, Gangnam-gu, Seoul 135-710, Korea
Tel: +82-2-3410-3519, Fax: +82-2-3410-0630, E-mail: bkyoon@skku.edu

Copyright © 2012 by The Korean Society of Menopause

© This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>).

화 LDL은 또한 내피세포와 평활근세포에서 기초 섬유아세포 성장인자의 발현을 유발하여 평활근세포 증식을 자극한다.^{5,6}

호르몬 대체요법 (hormone replacement therapy)은 에스트로겐 감소로 발생하는 폐경 증상을 완화시킨다. 그러나 호르몬 투여로 발생할 수 있는 유방통, 비정상 자궁출혈, 기분 변화 그리고 체중 증가와 같은 부작용과 함께 유방암 위험 증가에 대한 두려움으로 호르몬 치료를 기피하는 경향이 있다. 따라서 호르몬을 대신할 안전하고 효과적인 치료 방법의 필요성이 요구되고 있다. 최근 식물성 에스트로겐이 갱년기 증상, 골다공증, 악성 종양, 그리고 심장질환 등에 긍정적인 효과를 보이는 것으로 밝혀지고 있어 식물성 에스트로겐에 대한 관심이 높아지고 있다.⁷⁻¹²

승마 (black cohosh: *Cimicifuga racemosa*)는 북미에서 자생하는 식물로써 오래 전부터 월경 불순 또는 폐경과 관련된 부인과 질병 치료에 이용되었다. 현재 승마 추출물은 안면 홍조, 발한, 발열 등 폐경 증상의 치료에 흔히 쓰이고 있으며,¹³⁻¹⁵ 한국 여성에서 진행된 승마와 St. John's Wort의 복합제에 대한 임상 시험에서도 중증 열성 홍조¹⁶ 또는 갱년기 증상 완화¹⁷에 효과적이었다. 그러나, 심혈관계에 대한 승마의 영향 연구는 거의 없는 상태이다. 또한 국내 자생종 승마에 대한 연구가 전혀 이루어지지 않고 있다. 따라서 본 연구에서는 북미 승마 대체 소재로서의 활용성 제고를 위하여 국내 자생종 승마를 연구 대상으로 하였고, 천연 식물자원 유래의 식물성 에스트로겐인 승마가 갱년기 증상 완화 이외에도 심혈관계질환인 동맥경화증 예방 효과를 알아보고자 하였다.

본 연구 목적은 동맥경화증 발생의 대표적 기전인 혈관 평활근세포 증식에 대한 국내 자생종 승마의 효과를 밝히기 위해 시행되었다.

연구대상 및 방법

1. 혈관 평활근세포의 분리와 배양

3개월된 Sprague-Dawley rat에서 흉부대동맥을 떼어 내어 혈관 평활근세포를 분리하였다.¹⁸ 세포는 세포 배양액 (Dulbecco's Modified Eagle Medium [DMEM]/F12 supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 mg/mL penicillin, 0.1 mg/mL streptomycin)에서 37°C humidified 5% CO₂/95% air 환경에서 배양하였으며 5-10번 계대한 후의 세포를 실험에 사용하였다. 세포들이 70% confluence 상태에 도달하면 defined serum-free medium (DMEM/F12

medium containing insulin 5×10^{-7} M, transferrin 5 mg/mL, ascorbic acid 0.2 mM)로 배양액을 교환 후 48시간 배양하여 quiescent 상태의 세포를 사용하였다.

2. Bromodeoxyuridine (5-bromo-2'-deoxyuridine, BrdU) incorporation

세포 증식을 조사하기 위하여 BrdU cell proliferation assay kit (Calbiochem, La Jolla, CA)를 사용하였다. 10% FBS가 첨가된 배양액의 세포에 승마 추출물을 0.3 mg/mL 농도로 각각 24시간 동안 처리하였다. BrdU는 승마 추출물 처리 시간 24시간 중 마지막 4시간 전에 첨가하였다. Excitation 320 nm (wavelength) 와 emission 460 nm (wavelength)에서 fluorometer를 이용하여 세포의 BrdU incorporation 정도를 relative fluorescence unit (RFU)로 측정하였다.

3. Reactive oxygen species (ROS) 측정

10% FBS가 첨가된 배양액의 세포에 승마 추출물을 각각 0.3 mg/mL 농도로 24시간 동안 처리하였다. 10 uM 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (Calbiochem)을 첨가하여 30분간 배양한 후 fluorescence-activated cell sorter (FACs)를 이용하여 세포 내 ROS 생성을 측정하였다.

4. 시료 및 추출

강원도일대에서 채취한 자생종 눈빛승마 (*Cimicifuga* [*C. davurica*], 왜승마 (*C. japonica*), 세잎승마 (*C. heracleifolia* var. *bifida* Nakai), 촛대승마 (*C. simplex*) 4종을 한국자생식물원(강원도 평창군)으로부터 제공받아 연구대상으로 하였다. 각 승마 중 건조분말에 20배 가량의 80% ethanol, absolute methanol, 40% 2-propanol을 가하여 homogenizer (Ultra-Turrax T-25 basic, IKA Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Germany)로 추출한 후 원심분리 (3,700 × g, Sorvall RC50, GMI Inc., WA, USA), filtration한 여과액을 37-40°C에서 감압건조 (rotary evaporator RE121, Büchi, Switzerland), 동결 건조하여 추출물을 제조하였다. 추출물을 phosphate-buffered saline에 녹인 후 0.3 mg/mL 농도로 처리하였다.

5. 통계분석

결과는 평균 ± 표준오차로 표시하였고, n은 반복 실험한 횟수를 나타내었다. 실험한 결과를 Wilcoxon's signed rank test를 사용하여 통계 분석하였다. P 값이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의한 차이로 판정하였다.

결 과

고 찰

4종의 국내 자생종 승마 (왜, 세잎, 눈꽃, 촛대)에서 각각 추출한 추출물이 FBS 자극에 의해 유도된 혈관 평활근세포의 증식에 어떠한 영향을 미치는지 알아보았다. Quiescent 상태인 cells에 10% FBS를 첨가하고 각각의 승마 추출물을 혈관 평활근세포에 처리하였다. Figure 1은 FBS의 자극에 의해 증가된 세포 증식이 모든 추출물에 의해 유의하게 억제 되었음을 보여준다. 억제 효과가 23.83-30.08%까지 차이를 보였다. 추출 용매와 종에 따른 차이는 없었다.

ROS는 혈관 평활근세포 증식에 중요한 역할을 한다.²⁻⁴ 본 연구에서도 ROS inhibitor인 비타민 E가 10% FBS 자극에 의해 유도된 혈관 평활근세포 증식을 유의하게 억제시킴을 확인하였다 (Fig. 2).

Figure 3은 10% FBS 자극 하에서 승마 추출물이 ROS 생성에 미치는 영향을 조사한 결과이다. 승마 추출물의 처리는 대조군에 비해 ROS 생성을 유의하게 감소시켰다. 추출 용매와 종에 따른 차이는 볼 수 없었다. 이러한 결과는 국내 자생종 승마에 의한 혈관 평활근세포 증식 억제 효과의 기전으로 ROS 감소가 중요한 역할을 한다는 것을 보여준다.

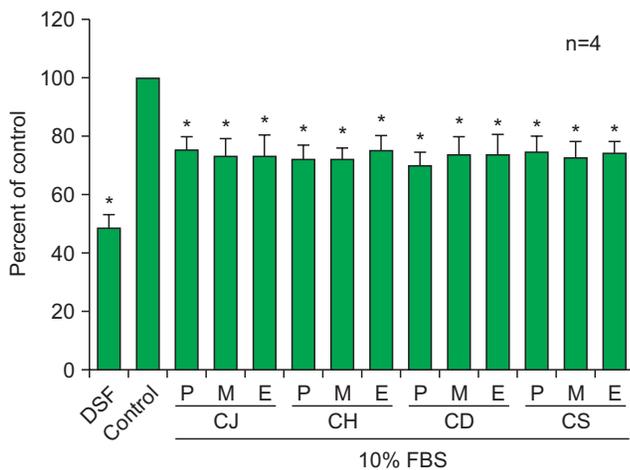


Fig. 1. The effects of extracts of *Cimicifuga* [C] species (0.3 mg/mL) on 10% fetal bovine serum (FBS)-stimulated proliferation of vascular smooth muscle cells. The extracts were added to the medium containing 10% FBS and the incubation proceeded for 24 h. Cell proliferation was measured by bromodeoxyuridine assay. CJ: *C. japonica*, CH: *C. heracleifolia* var. *bifida* Nakai, CD: *C. davurica*, CS: *C. simplex*, DSF: defined serum-free medium, P: 40% 2-propanol, M: absolute methanol, E: 80% ethanol. * $P < 0.05$ vs. control.

혈관 평활근세포 증식은 고혈압, 죽상경화증, 재발협착증과 같은 심혈관 질환의 잠재적 주요 원인이므로, 혈관 평활근세포 증식 억제는 심혈관 질환의 중요한 치료적 전략이다.^{2,19} 본 연구에서는 10% FBS 자극에 의해 유도된 혈관 평활근세포 증식을 국내 자생종 승마 추출물이 유의하게 억제시킴을 보였다. 또한 혈관 평활근세포 증식 억제 효과에 ROS 감소가 중요한 작용 기전임을 알 수 있었다. 이러한 결과는 혈관 평활근세포 증식 억제 효과가 있는 국내 자생종 승마가 심혈관 질환 예방에 효과적으로 이용될 수 있는 가능성을 보여준다.

심혈관 질환, 특히 관상동맥질환은 여성의 주요 사망원인 중 하나이며, 폐경 후 발병이 증가한다. 여성호르몬 감소가 가능한 원인이며, 에스트로겐 투여는 발병을 예방하는 것으로 믿어져 왔다.¹ 호르몬 대체요법은 폐경 증상에 대한 가장 우수한 치료법이지만 장기간 투여 시 유방암 위험이 증가할 수 있고 노인에서 시작한 경우 심혈관 질환을 오히려 증가시키므로 최근 들어 식물성 에스트로겐에 대한 관심이 높아지고 있다.^{20,21}

승마 (*C. racemosa*)는 오래 전부터 미국, 중국, 그리고 유럽에서 뇌하수체 장애의 치료, 그리고 월경 또는 폐경과 관련된 자율신경 증상을 치료하기 위한 천연 생약물질로 사용되어왔다.¹³⁻¹⁵ 승마 추출물은 triterpene glycosides, phenolic,

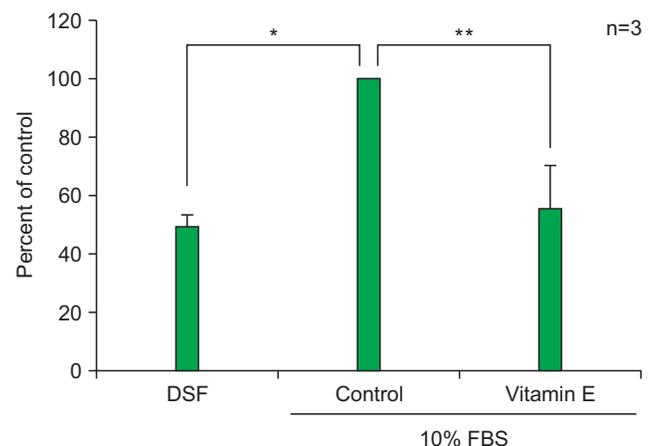


Fig. 2. The effect of vitamin E on 10% fetal bovine serum (FBS)-stimulated proliferation of vascular smooth muscle cells, as assessed by bromodeoxyuridine assay. Vitamin E (40 μ M) was added to the medium containing 10% FBS and the incubation proceeded for 24 h. DSF: defined serum-free medium. * $P < 0.05$ vs. DSF; ** $P < 0.05$ vs. 10% FBS.

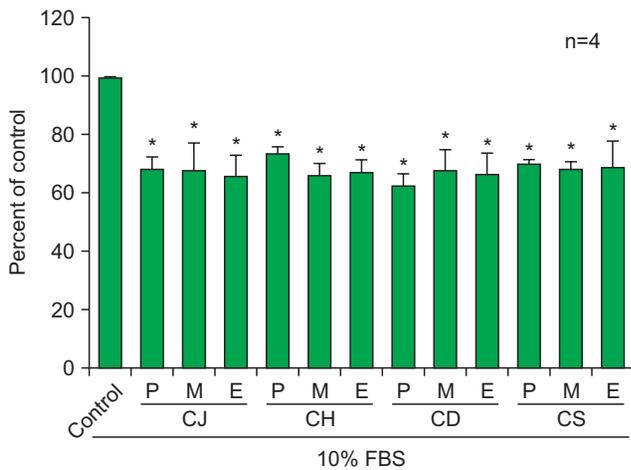


Fig. 3. The effects of extracts of *Cimicifuge* species (0.3 mg/mL) on reactive oxygen species (ROS) generation of vascular smooth muscle cells, as assessed by fluorescence-activated cell sorter (FACS) analysis. The extracts were added to the medium containing 10% fetal bovine serum (FBS). P: 40% 2-propanol, M: absolute methanol, E: 80% ethanol. * $P < 0.05$ vs. control. CJ: *C. japonica*, CH: *C. heracleifolia* var. *bifi da Nakai*, CD: *C. davurica*, CS: *C. simplex*.

flavonoids, volatile oils, tannins과 다른 pharmacologically 활성 성분들을 함유하고 있다.^{15,22} 또한 selective estrogen receptor modulator로서 잘 알려져 있다.¹³ 폐경 여성에게 승마 추출물의 투여가 조골세포의 활성을 증가시킴으로써 골다공증에 효과가 있을 것이라 생각되고, 최근에는 승마에서 추출된 triterpenoid glycoside가 *in vitro*에서 cytokines에 의한 파골세포 생성을 억제시키고 tumor necrosis factor에 의해 유도된 골 손실을 완화시킨다는 연구 결과가 있다.²³ 또한 질 점막에서는 에스트로겐과 비슷한 활성을 나타내었으나, 1년간 승마 추출물을 투여한 여성에게서 자궁내막증식증이 발견되지 않았다.^{24,25}

현재까지 승마는 폐경 증상 개선에 있어 효과적이며 안전한 물질로 판단된다. 그러나 심혈관계에 대한 승마의 영향 연구는 매우 미흡한 상황이다. 따라서 본 연구는 동맥경화증 발생의 대표적 기전인 혈관 평활근세포 증식 및 산화 스트레스에 대한 국내 자생종 승마의 효과를 밝히기 위해 시행되었다. 그 결과 국내 자생종 승마 추출물에 의해 혈관 평활근세포 증식이 억제 되었다. 또한 ROS 생성을 크게 감소시켰다. 추출 방법과 승마 종에 따른 증식 억제나 ROS 생성의 차이는 없었다. 결과로서 국내 자생종 승마가 동맥경화증 억제 효과가 있음을 확인하였다. 본 연구를 바탕으로 향후 다양한 심혈관계 영향에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론적으로 국내 자생종 승마 추출물이 산화 스트레스 감

소를 통하여 혈관 평활근세포 증식을 억제함을 확인하였다. 앞으로 승마가 폐경 증상의 조절과 함께 심혈관 질환을 예방할 수 있는 가능성이 기대된다.

감사의 글

본 연구는 삼성생명과학연구소 (#SBRI C-A5-322-1), 성균관대학교 산학협력단 (S-2011-0683-000), 그리고 농림수산식품부 농림기술개발사업 (109127-03-3-SB010)의 지원으로 시행되었음.

참고문헌

- Barrett-Connor E, Grady D. Hormone replacement therapy, heart disease, and other considerations. *Annu Rev Public Health* 1998; 19: 55-72.
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801-9.
- Schwartz SM, Virmani R, Rosenfeld ME. The good smooth muscle cells in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2000; 2: 422-9.
- Stocker R, Keaney JF Jr. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. *Physiol Rev* 2004; 84: 1381-478.
- Catapano AL, Maggi FM, Tragni E. Low density lipoprotein oxidation, antioxidants, and atherosclerosis. *Curr Opin Cardiol* 2000; 15: 355-63.
- Sherer Y, Shoenfeld Y. Mechanisms of disease: atherosclerosis in autoimmune diseases. *Nat Clin Pract Rheumatol* 2006; 2: 99-106.
- Hurd WW. Menopause. In: Berek JS, Adashi EY, Hillard PA, Rinehart RD, Novak HW, Hengst TC editors. *Novak's gynecology*. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 1996. p. 981-1011.
- Gennari C, Adami S, Agnusdei D, Bufalino L, Cervetti R, Crepaldi G, et al. Effect of chronic treatment with ipriflavone in postmenopausal women with low bone mass. *Calcif Tissue Int* 1997; 61 Suppl 1: S19-22.
- Ingram D, Sanders K, Kolybaba M, Lopez D. Case-control study of phyto-oestrogens and breast cancer. *Lancet* 1997; 350: 990-4.
- Anthony MS, Clarkson TB, Hughes CL Jr, Morgan TM, Burke GL. Soybean isoflavones improve cardiovascular risk factors without affecting the reproductive system of peripubertal rhesus monkeys. *J Nutr* 1996; 126: 43-50.
- Washburn S, Burke GL, Morgan T, Anthony M. Effect of

- soy protein supplementation on serum lipoproteins, blood pressure, and menopausal symptoms in perimenopausal women. *Menopause* 1999; 6: 7-13.
12. Gambacciani M, Ciaponi M, Cappagli B, Piaggese L, Genazzani AR. Effects of combined low dose of the isoflavone derivative ipriflavone and estrogen replacement on bone mineral density and metabolism in postmenopausal women. *Maturitas* 1997; 28: 75-81.
 13. Viereck V, Emons G, Wuttke W. Black cohosh: just another phytoestrogen? *Trends Endocrinol Metab* 2005; 16: 214-21.
 14. Tiran D. Integrated healthcare: herbal remedies for menopausal symptoms. *Br J Nurs* 2006; 15: 645-8.
 15. Foster S. Black cohosh: a literature review. *HerbalGram* 1999; 45: 35-50.
 16. Park HM, Kang BM, Kim JG, Yoon BK, Lee BI, Cho SH, et al. The Effect of black cohosh with St. John's wort (Feramin-Q(R)) on climacteric symptoms: multicenter randomized double-blind placebo-controlled trial. *Korean J Obstet Gynecol* 2005; 48: 2403-13.
 17. Chung DJ, Park KH, Jeong KA, Lee SK, Lee YI, Hur SE, et al. Black cohosh and St. John's Wort (GYNO-Puls®) for climacteric symptoms: a double-blind, randomized, placebo-controlled, multicenter trial. *J Korean Soc Menopause* 2006; 12: 56-64.
 18. Owens GK, Loeb A, Gordon D, Thompson MM. Expression of smooth muscle-specific alpha-isoactin in cultured vascular smooth muscle cells: relationship between growth and cytodifferentiation. *J Cell Biol* 1986; 102: 343-52.
 19. Schwartz SM, deBlois D, O'Brien ER. The intima. Soil for atherosclerosis and restenosis. *Circ Res* 1995; 77: 445-65.
 20. North American Menopause Society. Recommendations for estrogen and progestogen use in peri- and postmenopausal women: October 2004 position statement of The North American Menopause Society. *Menopause* 2004; 11: 589-600.
 21. U.S. Preventive Services Task Force. Hormone therapy for the prevention of chronic conditions in postmenopausal women: recommendations from the U.S. Preventive Services Task Force. *Ann Intern Med* 2005; 142: 855-60.
 22. Nuntanakorn P, Jiang B, Einbond LS, Yang H, Kronenberg F, Weinstein IB, et al. Polyphenolic constituents of *Actaea racemosa*. *J Nat Prod* 2006; 69: 314-8.
 23. Qiu SX, Dan C, Ding LS, Peng S, Chen SN, Farnsworth NR, et al. A triterpene glycoside from black cohosh that inhibits osteoclastogenesis by modulating RANKL and TNFalpha signaling pathways. *Chem Biol* 2007; 14: 860-9.
 24. Raus K, Brucker C, Gorkow C, Wuttke W. First-time proof of endometrial safety of the special black cohosh extract (*Actaea or Cimicifuga racemosa* extract) CR BNO 1055. *Menopause* 2006; 13: 678-91.
 25. Wuttke W, Seidlova-Wuttke D, Gorkow C. The *Cimicifuga* preparation BNO 1055 vs. conjugated estrogens in a double-blind placebo-controlled study: effects on menopause symptoms and bone markers. *Maturitas* 2003; 44 Suppl 1: S67-77.

국문초록

연구목적: 혈관 평활근세포 증식에 대한 국내 자생종 승마의 효과를 밝히기 위해 시행되었다.

연구재료 및 방법: 3개월된 암컷 Sprague-Dawley 쥐의 대동맥으로부터 혈관 평활근세포를 얻었다. 눈빛승마, 왜승마, 세잎승마, 촛대승마 등 4종의 자생 승마를 80% ethanol, absolute methanol 그리고 40% 2-propanol을 사용하여 추출하였다. 10% fetal bovine serum (FBS)에서 배양한 혈관 평활근세포를 승마 추출물 (0,3 mg/mL)로 24시간 동안 처리한 후 bromodeoxyuridine incorporation assay를 사용하여 세포증식을 조사하였다. dichlorofluorescein diacetate을 첨가한 후 flow cytometry를 이용하여 세포내 ROS 생성을 정량화하였다.

결과: 추출법이 다른 국내 자생종 승마 추출물을 처리한 결과, 혈관 평활근세포의 증식이 유의하게 23-30% 억제되었다. 또한 강력한 항산화제인 비타민 E는 10% FBS로 유도된 세포증식을 감소시켰다. 승마 추출물의 작용기전을 밝히기 위한 추가 연구 상 10% FBS에 의한 ROS 생성이 승마에 의해 감소되었다. 세포증식이나 ROS 생성에 대한 효과는 추출 방법과 승마 종에 따라 차이가 없었다.

결론: 국내 자생종 승마는 산화 스트레스 감소를 통하여 혈관 평활근세포 증식을 억제한다. 향후 다양한 심혈관계 영향에 대한 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

중심단어: 심혈관 질환, 승마, 에스트로젠, 혈관 평활근세포