

2013년 2월

博士學位論文

해방풍의 프로스타그란딘 E₂ 증가와
지질 개선 효과

조선대학교 대학원

의학과

선경훈

해방풍의 프로스타그란딘 E₂ 증가와 지질 개선 효과

Effects of *Glehnia littoralis* on Prostaglandin E₂ and
Lipid metabolism

2013 년 2 월 25 일

조선대학교 대학원

의 학 과

선 경 훈

해방풍의 프로스타그란딘 E₂ 증가와 지질 개선 효과

지도교수 조 수 형

이 논문을 의학 박사학위신청 논문으로 제출함

2012년 10월

조선대학교 대학원

의 학 과

선 경 훈

선경훈의 박사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 교수 조남수(인)

위 원 조선대학교 교수 조성동(인)

위 원 조선대학교 교수 최철희(인)

위 원 조선대학교 교수 문영숙(인)

위 원 조선대학교 교수 조수형(인)

2012년 12월

조선대학교 대학원

TABLE OF CONTENTS

TABLE OF CONTENTS	I
표 목차.....	IV
그림 목차.....	V
ABBREVIATIONS.....	VI
ABSTRACT.....	VII
I. 서론.....	1
II. 재료 및 방법.....	9
1. 15-PGDH의 발현 확인.....	9
(1) 15-PGDH의 발현 및 정제.....	9
(2) Coomassie blue염색.....	10
(3) 15-PDGH활성 분석.....	10
2. 세포 생존능 분석.....	11
(1) 세포 배양.....	11
(2) 세포 독성평가.....	11
3. 단백질 정량분.....	12

4. PGE ₂ 측정.....	12
5. 정량적 RT-PCR 분석.....	13
6. 시험관 상처 치유분석.....	13
7. ApoB100/ApoA-1 mRNA 비율 측정.....	14
8. Dual luciferase reporter 분석을 이용한 PPAR/활성 측정.....	14
9. HMG-CoA reductase 분석.....	15
10. Real-time PCR.....	15
11. 통계처리.....	16
III. 결과.....	17
1. GLEA의 15-PGDH 저해 효능.....	17
2. GLEA의 세포 독성평가.....	17
3. GLEA의 PGE ₂ 농도에 영향을 주는 유전자 발현에 미치는 영향.....	18
4. GLEA 처치 후 PGE ₂ 농도의 변화.....	18
5. 시험관 scratch 분석을 이용한 GLEA의 상처 치유효과 검증.....	19

6. GLEA의 ApoB100/ApoA-1비율에 미치는 영향.....	19
7. GLEA의 PPAR γ 활성 효과.....	19
8. GLEA의 HMG-CoA reductase억제효과.....	20
IV. 고찰.....	21
요약문.....	46
참고문헌.....	48
감사의 글.....	57

표 목차

표 1. 한국인의 평균수명.....	25
표 2. Real-time PCR의 Primer.....	26
표 3. 해방풍 추출용매에 따른 15-PGDH억제효과.....	27
표 4. GLEA의 HaCaT세포 내부 및 외부의 PGE ₂ 농도에 미치는 효과.....	28
표 5. GLEA(50 µg/mL)의 HaCaT세포의 시간별 PGE ₂ 농도 변화에 미치는 효과.....	29
표 6. Apo B100/Apo A-1비율에 GLEA가 미치는 효과.....	30
표 7. GLEA의 농도에 따른 HMG-CoA reductase활성억제 효과.....	31

그림 목차

그림 1. 한국인의 사망원인.....	32
그림 2. Prostaglandin의 생합성 기전.....	33
그림 3. 15-PGDH의 구조.....	34
그림 4. 15-PGDH에 의한 prostaglandin의 분해기전.....	35
그림 5. 콜레스테롤 생성 기전.....	36
그림 6. Apo B100과 Apo A-1의 역할.....	37
그림 7. 해방풍의 앞과 뿌리.....	38
그림 8. 15-PGDH발현벡터(PGEX-2T).....	39
그림 9. GLEA가 HaCaT세포의 생존에 미치는 영향.....	40
그림 10. GLEA가 PGE ₂ 대사에 관여하는 유전자 발현에 미치는 영향.....	41
그림 11. GLEA가 HaCaT세포의 상처치유에 미치는 영향.....	42
그림 12. GLEA가 PPAR γ mRNA발현에 미치는 영향.....	43
그림 13. GLEA을 이용한 PPAR γ 의 활성화도 측정.....	44
그림 14. Dual luciferase reporter 분석의 원리.....	45

ABBREVIATIONS

ApoA-1	Apolipoprotein A-1
ApoB100	Apolipoprotein B100
COX-1/2	Cyclooxygenase-1/2
cDNA	Complementary DNA
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's media
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylene diamine tetra acetic acid
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
GST	Glutathione-S-transferase
HMG CoA	3-Hydroxy-3-methylglutaryl CoA
HDL	High density lipoprotein
LDL	Low density lipoprotein
MRA	Magnetic resonance angiography
MRI	Magnetic resonance imaging
PCR	Polymerase chain reaction
PG	Prostaglandin
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
15-PGDH	15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase
PPAR γ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
SDS	Sodium dodecyl sulfate
TGF- β 1	Transforming growth factor- β 1
t-PA	tissue type plasminogen activator

ABSTRACT

Effects of *Glehnia littoralis* on Prostaglandin E₂ and Lipid metabolism

Kyung Hoon Sun

Advisor: Prof. Soo hyung Cho M.D. Ph.D.

Department of Medicine

Graduate School of Chosun University

Ischemic heart diseases and stroke are major causes of death in Korea. Their risk factors include dyslipemia, hypertension, diabetes mellitus, smoking, family history and so on. Many drugs and natural plants have been applied for prophylaxis and treatment of them. Of them, *Glehnia littoralis* (Haebangpoog in Korean) has calcium channel blocking, anticoagulatory, anticonvulsive, antioxidant and antiinflammatory effects, which is literally known to be effective in stroke. As potential mechanisms of this, effects of *Glehnia littoralis* on prostaglandin E₂ and lipid metabolism were investigated in this study. Cytotoxicity was determined by MTT assay. For assay of inhibitory activity of 15-prostaglandin dehydrogenase (15-PGDH), NADH formation was detected

by fluorescence spectrophotometer. And PGE₂ was determined by enzyme immunoassay in HaCaT cells. mRNA expressions of specific genes were analyzed by RT-PCR assay. *In vitro* scratch test was done using in HaCaT cells. Dual luciferase reporter assay was performed for the activation of PPAR α . HMG-CoA reductase activity was determined using the assay kit. *Glehnia littoralis* root extracts showed differential 50 % inhibitory concentration (IC₅₀) of 15-PGDH (13.0 μ g/mL ~ 393.1 μ g/mL according to solvents). *Glehnia littoralis* leaf extracts also showed various IC₅₀ values (1.7 μ g/mL ~ > 500 μ g/mL according to solvents). Among them, *Glehnia littoralis* leaf ethyl acetate extract (GLEA) showed the strongest 15-PGDH inhibitory activity (IC₅₀, 1.7 μ g/mL). It also down-regulated 15-PGDH mRNA expression without effects on those of genes influencing on PGE₂ fate. In addition, GLEA (50 μ g/mL) showed wound healing effect comparable with that obtained with TGF- β 1 (100 μ g/mL). GLEA (50 μ g/mL) decreased the ratio of ApoB100/A-1 by 84.4% of the control in HepG2 cells. In addition, GLEA inhibited the activity (IC₅₀, 635.8 μ g/mL) of HMG-CoA reductase, a rate limiting enzyme of cholesterol synthesis. Moreover, GLEA up-regulated mRNA expression of PPAR α with activation of PPAR α .

Taken together, GLEA can increase PGE₂ level by inhibiting its inactivating enzyme 15-PGDH. Also, it decreases ApoB100/ApoA-1 ratio, inhibits HMG-CoA reductase activity and activates PPAR α . It is thus implicated that *Glehnia*

littoralis could increase blood flow and decrease peripheral resistance, resulting in positive effects on ischemic heart disease and stroke.

I. 서론

매년 한국 인구의 평균수명이 증가하고 있고(표 1), 건강 수명에 대한 관심이 높아지고 있는 가운데, 악성신생물 (폐암, 간암, 위암 등)에 이어 심장질환 및 뇌혈관 질환이 3대 사망원인으로 자리잡고 있다(그림1). 통계에 집계된 심장질환에는 허혈성 심장질환 (27.1%)과 그 외 (22.7%) 심부전과 심내막염이 있으며, 뇌혈관 질환 (50.7%)은 뇌출혈과 뇌경색이 포함된다(2011, 통계청).

심장질환에서 사망원인에 가장 많은 비중을 차지하는 허혈성 심장질환은 심장근육에 혈액을 공급하는 관상동맥이 좁아져 심장근육이 요구하는 혈액보다 적은 혈액을 공급하게 되어 발생하는 질환으로, 관상동맥이 완전히 막히게 되어 심장근육이 괴사되는 질환을 급성심근경색증이라 한다(Braunwald, Jones et al. 1994; Buja 1998). 허혈성 심장질환은 가슴이 조여드는 또는 누르는 듯한 통증을 주로 호소하며 왼쪽 어깨 및 턱으로 방사되는 통증을 동반하는 것이 특징적인 증상이지만, 오심, 구토, 발한, 어지러움의 증상만 호소할 수 있다(Alpert, Thygesen et al. 2000). 흉통을 호소하는 환자가 병원에 내원하였을 때 급성심근경색증이 의심되면 심전도, 심근효소(Myoglobin, LDH, Creatine kinase, Troponin 등), 심초음파로 진단할 수 있다(Menown, Mackenzie et al. 2000; Collinson and Gaze 2007). 응급실에서 근무하는 의사들은 급성심근경색증의 빠른 진단과 처치에 능숙해야 하는데, 관상동맥이 완전히 막힌 후 30분 후부터 심장근육의 괴사가 시작되고 6시간이 지나면 거의

과사되어 치명적 부정맥 및 심부전으로 환자가 사망할 확률이 증가하기 때문이다(Lamas, Flaker et al. 1995). 2010년 미국심장학회의 권고에 의하면 급성심근경색이 의심되는 환자가 병원에 왔을 때 먼저 아스피린 경구투여, 니트로글리세린 설하투여, 모르핀, 산소 공급을 우선 시행하고, 심전도 및 기본 검사를 시행한다. 증상이 12시간이 넘지 않고, 심전도 검사에서 ST 분절 상승이 되어 있는 환자에서는 혈전용해제 및 응급관상동맥중재술을 시행하게 되고, ST 분절 상승이 되어 있지는 않지만 심근효소가 상승되어 있는 환자에서는 적절한 약물치료 (아스피린, 니트로글리세린, 헤파린, 베타 수용체 차단제, 항혈소판제, HMG-CoA reductase억제제 등)를 시행하고 경과관찰 후 적절한 처치를 선택하게 된다 (King 2010).

뇌혈관 질환에서 뇌혈관이 막혀서 발생하는 질환을 뇌경색 이라 하는데 (Bamford, Sandercock et al. 1991), 임상증상으로는 의식, 지남력, 명령순응, 주시, 시야, 안면근육, 운동, 감각, 보행실조, 언어 등의 장애를 호소할 수 있다.(Kothari, Barsan et al. 1995; Goldstein and Samsa 1997). 최근의 연구에 의하면 뇌혈관 질환이 의심되는 환자가 병원에 내원하였을 경우 먼저 뇌의 컴퓨터단층촬영(Brain CT)을 시행하여, 뇌출혈이 있는지를 확인하고, 없다면 뇌경색으로 의심하고 바로 신경학적 재신체검사 및 처치에 들어가게 된다(1995; Adams, Brott et al. 1996). 뇌기능의 신체검사는 National Institutes of Health Stroke Scale (NIHSS)에 근거하여 시행하여 점수화 시키며(Goldstein and Samsa 1997), 증상발현이 3시간 이내이고 NIHSS총점이 5점 이상이며 혈전용

해제의 금기사항이 없다면 tissue type-plasminogen activator (t-PA)를 사용하여 뇌혈관의 재관류를 시도한다(Wardlaw, Lindley et al. 2002; Adams, del Zoppo et al. 2007). t-PA 사용의 금기사항이 있다면 항혈소판작용제, 혈압조절, HMG-CoA reductase 억제제 등의 증상악화 방지 및 예방치료를 시행하게 되고, 동맥내유로키나아제를 사용하기도 한다(Adams, del Zoppo et al. 2007). 정확한 뇌경색 병변의 위치 및 범위를 알기 위해서 자기공명영상(Magnetic resonance imaging)을 촬영하기도 하고, 막힌 혈관을 진단하기 위해서 자기공명혈관촬영(Magnetic resonance angiography)을 시행한다(Mohr, Biller et al. 1995; Lovblad, Baird et al. 1997; Barber, Darby et al. 1998; Kidwell, Alger et al. 2003).

Prostaglandin (PG)은 1935년에 처음 발견된 지방산 유도체로서 지속적인 연구가 진행되어 많은 기능이 밝혀졌다(Schlondorff 1986). PG의 생성은 화학적 자극 및 신경자극이 세포막을 자극하면 세포질에 있는 phospholipase A₂가 arachidonic acid를 분해하여 세포내로 유리시키고, arachidonic acid는 환원된 glutathione과 Cyclooxygenase (COX)에 의해 산화되어 prostaglandin G₂ (PGG₂)가 만들어진다. 이 PGG₂는 prostaglandin endoperoxidase에 의하여 PGH₂로 변형되고, 이로부터 PGE₂, thromboxane A(TXA), PGI등 여러가지 물질이 합성된다(그림 2)(Golino, Ambrosio et al. 1993; Murakami, Naraba et al. 2000; Burdan, Chalas et al. 2006; Cui, Yang et al. 2006). PG는 polyunsaturated fatty acid로부터 합성되어 빠른 시간 내에 대사된다고 알려져 있으며 근육

수축 및 이완, 혈압 강하(Cong, Xiao et al. 2007; Tokanovic, White et al. 2010; Klausner, Johnson et al. 2011; Kobayashi, Murata et al. 2011), 혈액의 응집력을 약화 또는 강화시키고(Matijevic-Aleksic, McPhedran et al. 1996; Brideau, Van Staden et al. 2001; Knijff-Dutmer, Van der Palen et al. 2003; Cheng, Cao et al. 2005), 세포막에 대한 이온 수송을 촉진시키며, 염증반응을 활발히 하게하여 심혈관 질환을 억제하는 작용을 하는 것으로 밝혀졌다(Drvota, Wei et al. 1995). 그 중 PGE₂는 진피가 손상을 받았을 경우 세포 내에 COX-2가 증가하여 상처부위에서 섬유아세포(fibroblast)를 조절하여 상처치유를 촉진해 주고(Fujii, Irie et al. 1997; Ghosh, Hirasawa et al. 2000; Gallo, Franchi et al. 2001; Futagami, Ishizaki et al. 2002; Wilgus, Bergdall et al. 2004; Parekh, Sandulache et al. 2009; Sandulache, Singh et al. 2009), 위 수축억제, 십이지장의 HCO₃⁻ 분비자극, 점액분비 및 혈관내피 성장인자의 분비를 촉진시켜 소화성 궤양에 긍정적 치료효과를 보여주며(Bryant, Appleton et al. 1998; Halter, Tarnawski et al. 2001; Knox, Corbett et al. 2001; Araki, Komoike et al. 2002; Sales, Katz et al. 2002; Miura, Tatsuguchi et al. 2004; Stocks, Bradbury et al. 2005; Sola-Villa, Camacho et al. 2006; Hatazawa, Tanaka et al. 2007; Wallace 2008; Takeuchi 2010), 모발형성 및 골형성, 말초혈관질환 예방에 중요한 매개 인자로 알려져 있다(Colombe, Vindrios et al. 2007; Colombe, Michelet et al. 2008). 그러나, PGE₂는 체내 반감기가 매우 짧다고 알려져 있다. 그 이유는 NAD⁺ 의존형 15-hydroxyprostaglandin dehydrogen-

ase (15-PGDH)(그림 3)에 의해 빠르게 대사되어 불활성화 되기 때문이다(그림. 5)(Ensor and Tai 1995). 15-PGDH는 PG를 분해하는 효소로서 15-PGDH가 발현되지 않은 조직에는 PG가 증가되어 있으며, 15-PGDH가 활성화 되어 있는 조직에서는 PG가 감소되어 있다(Ensor and Tai 1995). 그렇기 때문에, 15-PGDH를 억제하면 PG의 농도가 증가되어 PG의 약리 작용이 더 활성화되는 효과를 얻을 수 있다.

콜레스테롤은 동물의 세포막을 구성하는 필수적인 성분으로, 그 외 호르몬, 담즙산 및 비타민 D을 생성하는데 중요한 역할을 하는 지질단백질(lipoprotein)이다(Hanukoglu 1992; Prospective Studies, Lewington et al. 2007). 콜레스테롤은 생명유지에 필수적인 성분이지만 과도한 혈중농도는 심혈관계에 악영향을 미친다(Prospective Studies, Lewington et al. 2007). 특히, 나쁜 콜레스테롤이라 알려져 있는 low density lipoprotein (LDL)이 높고, 좋은 콜레스테롤이라 알려져 있는 high density lipoprotein (HDL)이 낮은 사람에서 심혈관질환 (뇌경색, 허혈성 심장질환, 말초혈관 질환)의 발병과 밀접하게 관련되어 있다(Gordon, Probstfield et al. 1989; Lewis and Rader 2005; Weingartner, Pinsdorf et al. 2010). 콜레스테롤 생성에 결정적인 역할을 하는 효소는 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA (HMG-CoA) reductase이다. HMG-CoA reductase는 Acetyl-CoA 에서 생성된 HMG-CoA를 mevalonic acid로 변환시켜 콜레스테롤의 형성을 촉진시킨다(Brown and Goldstein 1997)(그림 5). 이러한 이유로, 임상에서도 콜레스테롤 수치를 낮추기 위해 HMG-CoA

reductase억제제(atorvastatin, Fluvastatin, Lovastatin, Pitavastatin, Pravastatin, Rosuvastatin, Simvastatin)를 사용하고 있다(Shepherd, Cobbe et al. 1995; Heart Protection Study Collaborative 2002; Grundy 2007; Kendrick 2007; Nicholls 2008). 다른 콜레스테롤 농도의 조절 기전으로 apolipoprotein의 역할이 중요하다. Apolipoprotein은 지방에 결합되어 있는 단백질로 지질단백을 구성하며 지질단백질의 운반체로써 역할을 하여 지질단백의 대사와 세포로의 흡수를 조절한다. Apolipoprotein A-1 (apoA-1)과 B100 (apoB100)가 대표적인 예이다(그림 6). ApoA-1은 HDL의 운반 역할을 하며 apoB100은 LDL의 운반역할을 한다(Sniderman, Shapiro et al. 1980; Brunzell, Sniderman et al. 1984; Genest, Bard et al. 1991). 그렇기 때문에, apoA-1이 증가되어 있으면, HDL의 세포농도가 증가하고 apoB100이 증가되어 있으면 LDL의 세포농도가 증가되게 된다. 지질대사의 다른 기전으로 peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR γ)의 작용이 있다. PPAR γ 는 당과 지질대사에 관여한다. 특히 간과 골격근의 triglyceride함량을 크게 줄여 인슐린 저항성을 개선시키며, 말초조직의 지방의 분화를 높이고, 지방분해를 억제하여 혈중의 지방산 함량을 낮추는 기전을 지니고 있다. 그리하여, PPAR γ 작용제(Pioglitazone, Rivoglitazone, Rosiglitazone, Troglitazone)는 임상에서 지질장애와 고혈당증에 치료제로 사용되어지고 있다(Jones, Barrick et al. 2005; Li, Qi et al. 2008).

예로부터 한의학과 민간요법에서는 갑자기 풍을 맞아서 정신을 차리지 못하고 눈과 입이 비뚤어지며 몸 한쪽을 쓰지 못하고 말을 하지 못하며 팔다리에 감

각이 둔해지고 어지러운 것과 중풍의 초기에 땀이 나지 않는 표실증(表實證)과 모든 풍증을 치료하기 위해서 소속명탕 (방풍, 방기, 육계, 황금, 백작약, 인삼, 천궁, 마황, 감초, 부자, 생강, 대추)을 처방하였고, 원기가 허약한데 주색이 지나치고, 외감이 겹쳐서 중풍이 되어 한쪽 몸 또는 온몸을 쓰지 못하는 것을 치료하기 위해서 소풍순기탕 (인삼, 방풍, 마황, 강활, 승마, 길경, 석고, 황금, 형개수, 천마, 천남성, 박하, 갈근, 작약, 행인, 당귀, 천궁, 백출, 세신, 조협, 생강)을 처방하였다 (동의보감). 민간요법에서 가슴이 답답하고, 심장이 빨리 뛸 때 사용하는 우황청심원 (산약, 감초, 인삼, 포황신국서각, 대두황권, 육계, 아교, 백작약, 맥문동, 황금, 당귀, 방풍, 주사, 백출, 시호, 길경, 행인, 백복령, 천궁)과 더불어 위의 처방약 모두 공통적으로 방풍이 포함되어 있다(동의보감).

해방풍(海防風)(그림7)은 방풍이라고 부르기도 하는 갯기름나물(*Glehnia littoralis*)로 본초학적으로 성미가 미온(微溫), 신감(辛甘)하며, 방광, 간, 비장에 들어가 몸을 이롭게하고 풍사(風邪)를 제거하여 치풍(治風)에 통용되고, 해표거풍(解表祛風), 지경(止癢). 승습(勝濕)으로 중풍과 가래, 기침, 두통, 전신마비, 해열 그리고 신경통 등에도 사용 되어지고 있다(대한약전 외 한약(생약)규격집. 2008, 본초학. 2004, 한약약리학. 2004). 해방풍의 주요 약리활성은 여러 coumarin 유도체에 기인함이 밝혀졌으며(Zhao and Yuan 2007), Ca²⁺채널차단(Aida, Kasama et al. 1998), 혈액응고 억제(Takeuchi, Kasama et al. 1991), 항경련(Aida, Kasama et al. 1998), monoamine oxidase 억제활성(Huong, Choi et al. 1999), NO와 cGMP 경로를 통한 혈압강하(Lee, Roh et al. 2002),

항당뇨(Lee, Choi et al. 2004), 항산화(Ng, Liu et al. 2004) 및 항염증(Yoon, Lee do et al. 2010), 항고지혈작용(Li, Ma et al. 2006; Hsu and Yen 2007)등이 보고되었다. 해방풍의 주요 효능인 중풍 예방 효능에 대한 연관성은 단순한 혈소판 응집인자 억제 등의 혈액응고 억제능력이 보고되어 있으나 그 외의 기전 및 효능평가 연구가 체계적으로 이루어지지 않고 있다. 본 저자는 이번 연구를 통해 먼저 혈류개선, 혈소판 응집저해, 혈관확장 및 혈압강하의 주요 매개인자인 PGE₂의 농도 증대를 해방풍 유래 15-PGDH 저해물질의 탐색을 통해 규명하고자 하였다. 더불어 PGE₂에 의한 상처치유 효능을 평가하여 다양한 질병치료제로의 가능성을 타진하고자 하였다. 그리고 심장 및 뇌혈관 질환을 유발하는 위험요인으로 밝혀진 콜레스테롤을 조절하는 HMG-CoA reductase를 억제하는 효과를 평가하고 Apolipoprotein, PPAR에 미치는영향을 확인하고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 15-PGDH의 발현 확인

(1) 15-PGDH의 발현 및 정제

*Bam*H I 및 *Eco*R I 위치 사이에 재조합 15-PGDH를 함유하는 PGEX-2T 발현 벡터로 *Escherichia coli* BL21 DE3 세포들을 형질전환 하였다(그림 8).

세포들을 50 µg/mL 암피실린을 함유하는 500 mL배지에서 37 °C 및 220 rpm 하에 성장시켜 600 nm에서 O.D가 0.6에 이르게 하였다. IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside)을 첨가하고 상기 세포들을 12 시간 동안 25 °C에서 배양하였다. 그 후, 세포들을 30 분 동안 4 °C에서 4000 x g으로 원심분리 하여 수득하고 상기 세포 펠렛들을 20mL의 차가운 용해 버퍼 (1mM EDTA를 함유한 1 x PBS buffer pH 7.4 및 0.1 mM DTT)에 재현탁하고, 초음파로 분해하였다(4 x 10 s 4 °C). 파쇄된 세포들을 4 °C에서 20 분 동안 4000 x g으로 원심분리 하였다. 상등액을 천천히 글루타치온-세파로오즈 4B 컬럼에 적용하여 4 °C에서 용해버퍼로 평형화시켰다. 상기 컬럼을 280 nm에서 O.D가 0.005 이하에 이르기까지 용해버퍼로 세척하였다. 그 후, 글루타치온-세파로오즈 4B 컬럼으로부터 상온에서 5 분 동안 용리버퍼 (10 mM reduced- glutathione를 포함한 50 mM Tris-HCl pH 8.0와 1 mM EDTA and 0.1 mM DTT)를 이용하여 15-PGDH를 용리하였다. 15-PGDH의 농도는 Bradford 정량법(Schleicher and Wieland 1978)으로 측정하고 15-PGDH (분자량 29KD)의 순도를 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacryl amide gel electrophoresis) 및 Coomassie

blue 염색으로 확인하였다. 글루타치온-세파로오즈(Glutathione Sepharose) 4B, DTT (dithiothreitol), SDS (sodium dodecyl sulfate), EDTA, 환원 글루타치온 (reduced glutathione)은 (Sigma Aldrich Co. St Louis, USA)에서 구입하여 사용하였다.

(2) Coomassie blue 염색

SDS-PAGE 겔을 염색용액 (0.1% Coomassie brilliant blue R 250, 50% methanol 및 10% glacial acetic acid)으로 20 분 동안 염색하였다. 상기 겔을 탈염색 용액(10% methanol, 7% glacial acetic acid in water)으로 겔의 배경이 완전히 탈색될 때까지 여러 번 세척하였다. 최종적으로 상기 겔을 저장 용액(5% glacial acetic acid in water)에 저장하고 검출을 위해 스캔하였다.

(3) 15-PGDH 활성 분석

형광 분광광도계를 이용하여 15-PGDH 저해제의 활성 분석을 468 nm 및 340 nm 에서 NADH 의 형성을 측정함으로써 수행하였다. 0.1 mM DTT, 0.25 mM NAD⁺, 정제된 효소 (10 µg), 21 µM PGE₂ 및 다양한 농도의 15-PGDH 저해제 를 함유하는 Tris-HCl 버퍼 (50 mM, pH 7.5)를 각 반응 혼합물에 첨가하였다. 각각 3 회 반복하여 각 농도를 분석하였다. 반응 혼합물의 흡광도를 NADH 의 표준곡선으로부터 15-PGDH 저해제 활성으로 보정하였다. NAD⁺, NADH, DTT 는 (Sigma Aldrich Co. St Louis, USA)에서 구입하여 사용하였다.

활성 분석은 Shimadzu RF5301IPC Fluorescence spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan)을 사용하여 UV 스펙트럼을 얻었다.

2. 세포 생존능 분석

(1) 세포 배양

인체유래 Keratinocyte세포주인 HaCaT세포와 인체 간암 세포주인 HepG2 세포를 가열 불활성화된 10% FBS, 100 µg/mL 항생제로 보충된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's media)로, 37 °C, 습한 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 모든 배양된 배지들은 10% 가열 불활성화된 FBS 및 100 µg/mL 페니실린으로 보충되어 있다. 선종(adenocarcinoma), 인간폐포(alveolar) 타입II로부터 유래된 A549 세포를 RPMI 배지로 37 °C하에 습윤화 한 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

(2) 세포 독성 평가

MTT 분석(Mosmann 1983)에 의해 세포 독성을 측정하였다. 96 웰 플레이트에 DMEM 배지 90 µL 당 HaCaT 세포 (1×10^4 /mL)들을 종분 하였다. 배양 후 약들을 72 시간 동안 처리하고 MTT (5 mg/mL stock solution) 10 µL 로 4 시 간 배양 하였다. 그 후 배지를 제거하고 DMSO 150 µL 를 첨가하여 포마잔을 용해 시켰다. ELISA microplate reader (PerkinElmer, California,

USA)을 이용하여 540 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 대조군 대비 세포 생존률을 계산하여 IC₅₀ 값으로 세포독성의 정도를 표시하였다.

3. 단백질 정량 분석

단백질 농도는 Bradford(Schleicher and Wieland 1978)에 기반을 둔 BioRad 단백질 분석법에 의해 측정하였다. 표준 곡선을 BSA (bovine serum albumin)의 연속적 희석을 이용하여 준비하고 BioRad 단백질 분석 염색 시약을 1:4 의 비율로 희석하였다. 4 µL 의 표준 및 샘플들을 1 mL 의 희석된 염색 시약에 첨가하고 흡광도를 595 nm 에서 측정하였다. 샘플단백질 농도를 BSA 로 준비한 표준곡선으로 부터 결정하였다.

4. PGE₂ 측정

PGE₂ 방출을 알아보기 위해 HaCaT 세포들을 37 °C 및 습윤화된 5% CO₂ 배양기에서 FBS 및 항생제가 함유된 DMEM 의 각 배지에서 6 웰 배양 플레이트에 종분하고(5×10^5 cells/well) 상이한 농도의 15-PGDH 저해제를 처리한 후 배지들을 약 처리 후 특정 시간마다 상층액을 수집하였다. 세포 내 및 세포 외 PGE₂ 수준을 PGE₂ 효소 면역분석 키트(Thermo Scientific, Rockford , IL, USA)를 이용하여 측정하였다.

5. 정량적 RT-PCR 분석

세포 내(intra-cellular) 및 세포 외(extra-cellular) PGE₂ 수준은 COX-1/2, MRP4, 15-PGDH 및 PGT 의 유전자 발현 수준과 기능적 관계가 있다. 상기 유전자들에 미치는 해방풍의 영향을 알아보기 위해, HaCaT 세포에서 GLEA (2, 10, 50 µg/mL) 처리 후 COX-1/2, MRP4 및 PGT 의 mRNA 발현을 측정하였다. 분석에 사용된 GLEA 농도(1.7 µg/mL, 10 × ED50)는 이전 실험을 통해 세포독성을 가지지 않는 충분한 15-PGDH 저해활성을 보이는 농도를 사용하였다. 이를 위해 TRI 시약(RNAiso Plus, Takara)을 이용하여 세포로부터 전체 세포 RNA 를 분리하였다. 각 RNA 샘플로부터 cDNA 20 µL 를 합성하였다(Invitrogen, CA, USA). PCR 반응은 4 µL 의 1:5 희석된 cDNA, 4 mM MgCl₂, 10 µmole 의 각 프라이머 및 4µL 의 Fast Starter Mix buffer (dNTPs, SYBR Green dye 와 Tag polymerase)를 포함하였다. RT-PCR 에 활용한 프라이머 및 조건들을 이하 표 2 에 기재된 바와 같다.

6. 시험관상처 치유 분석

In vitro 스크래치 분석(Hintermann, Bilban et al. 2001; Koivisto, Jiang et al. 2006)을 위해 HaCaT 세포들을 각 웰당 3 × 10⁵ 밀도로 6 웰 플레이트에 종분하고 80% 풍부해질 때까지 배양하였다. 그 후 배지들을 마이토마이신 (10 µg /mL)(Sigma Aldrich Co, St Louis, USA)함유하는 무혈청 DMEM 으로

교체하였고 세포들을 2 시간 동안 배양하여 상처 증식을 막고 PBS 로 깨끗하게 세척 하였다. 멸균된 200 μ L 피펫 팁으로 스크래치를 만들고 재세척 하였다.

양성 대조군으로 TGF- β 1 (100 μ g/mL) (Biovision Pharmacia Co., New Jersey, USA)을 사용하여 약물처리군과의 결과를 비교하였다. 스크래치한 직후 현미경 (x 100)으로 사진을 찍고 배양 후 48 시간 후 다시 한번 동일 위치에서 사진을 찍어 상처 치유 진행을 관찰하였다. 이때 해방풍 추출물의 농도는 15-PGDH IC₅₀ 농도의 10 배가 되는 농도를 포함한 범위로 하여(17 μ g/ml), 2 μ g/ml, 10 μ g/ml, 50 μ g/ml 농도로 시행하였다. 실험들을 3 회 반복하고 대표적인 사진들을 도시하였다. 실험결과 촬영은 역상현미경(Hitachi, Tokyo, Japan)으로 사진을 찍어 확인하였다.

7. ApoB100/ Apo A-1 mRNA 비율 측정

HepG2 세포를 24 well 에 종분하여 (1.5×10^5 /well) 2일 동안 배양 후에 PBS로 2번 washing한 후에 1% BSA in FBS-free DMEM media (250 μ L) 에 약물을 가하여 4일 동안 배양한 후에 세포 펠렛을 수거하였다. 수거된 펠렛 으로부터 RNA를 뽑아 cDNA를 합성하여 ApoB100과 ApoA-1의 mRNA 발현에 미치는 영향을 측정하였다.

8 . Dual luciferase reporter 분석을 이용한 PPAR γ 활성 측정

HepG2세포 (12.5×10^4)를 12 well 배양 플레이트에 종분하여 24시간 동안

배양한 후 PPAR γ reporter 1 μ g, PPAR γ vector (ME0004, Panomics, USA) 1 μ g
를 각각 transfection reagent jetPEI (Polyplus-transfection Inc., Illkirch,
France)를 사용하여 transfection 시켰다. 24시간 되는 시점에 약물을 16시간
동안 투여하여 passive lysis 방법으로 세포 분획물을 얻은 다음 SignalTMPPAR γ
Reporter Assay Kit(CCS-3026L, SABiosciences Co., Frederick, USA)를 이용
하여 luminoscence의 정도를 측정함으로써 PPAR γ 활성의 정도를 확인하였다.
또한 luminescence를 측정하기 위한 dual-luciferase reporter assay systems
E1960 (Promega Co., California, USA)을 구입하여 사용하였다.

9 . HMG-CoA reductase 분석

HMG-CoA reductase Assay Kit(Sigma ; CS1090)를 사용하여 해방풍
추출물에 의한 HMG-CoA reductase 활성억제 정도를 측정하였다. 약물존재하
에 96 well plate에서 37 °C에서 10분 동안 반응시켰다. 340 nm에서 HMG-CoA
reductase의 cofactor인 NADPH의 흡광도 변화를 측정하여 HMG-CoA reduc-
tase 활성억제정도를 IC₅₀값으로 나타내었다. 양성대조군으로 kit 에서 제공하
는 pravastatin을 사용하여 system을 점검하고, atrovastatin(2.5 μ M)과 억제정도
를 비교하였다.

10. Real-time PCR

합성된 cDNA를 5배 희석하여 Sybr green Master Mix (Roche or Takara)와

각각 유전자에 해당되는 primer 10 μ m을 섞어 Real-time PCR을 수행하여 특정 유전자(PPAR γ , ApoA-1 및 ApoB100)의 발현 정도를 측정하였다. PCR 수행은 Light Cycler 2.0 Instrument (Roche, Mannheim, Germany)를 사용하였고, internal control로 β -actin 또는 GAPDH를 사용하였다.

11. 통계처리

실험결과는 평균 \pm 표준편차 형태로 나타내며, 두 그룹간의 통계적인 분석은 Student's *t* test 방법을 이용하였다. $p < 0.05$ 인 경우 통계적인 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

III. 결과

1. GLEA의 15-PGDH 저해 효능

각 시료에 대한 효소의 활성 저해능은 형광광도계(Shimadzu RF-5301IPC, Japan)를 이용하여 340 nm에서 여기시킨(excitation) 후 480 nm에서 방출된 스펙트럼을 통해 NADH의 생성을 측정함으로써 이루어졌다. NADH의 표준곡선을 통해 시료 적용 후 효소활성의 변화 유무를 흡광도를 바탕으로 도출하여 이 결과를 50% 효소활성 저해능에 필요한 시료의 농도(IC₅₀, µg/mL)로 표시하였다. 상기 시료 일부를 적용하여 15-PGDH의 효능을 평가한 결과, 해방풍 뿌리추출물은 추출용매 (메탄올, 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물)에 따라 13.0 µg/mL ~ 393.1 µg/mL의 IC₅₀값을 보였으며, 해방풍 잎 추출물의 경우 1.7 µg/mL ~ > 500 µg/mL의 IC₅₀을 나타내었다. 특히 잎의 에틸아세테이트 추출물은 1.7 µg/mL을 나타내어 강력한 15-PGDH 효소활성 저해능을 지님을 확인할 수 있었다(표 3). 이는 해방풍이 강력한 15-PGDH 억제능을 가지고 있다는 것을 시사해 주고 있다.

2. GLEA의 세포 독성평가

15-PGDH 저해 활성이 가장 강한 것으로 판명된 해방풍 잎 EtOAc 추출물(GLEA)에 대한 세포독성 유무를 판별하기 위하여 HaCaT 세포주를 이용하여 MTT법으로 세포생존율을 평가하였다. 그 결과 50%의 세포 생존을 보이는 농도(IC₅₀)가 154.89 µg/mL, 80%의 세포생존을 보이는 농도가 29.45 µg/mL로

나타났으며 이는 해방풍 잎 추출물의 15-PGDH 활성저해능이 세포의 사멸 또는 독성에 의한 결과가 아님을 나타내었다(그림 9).

3. GLEA의 PGE₂ 농도에 영향을 주는 유전자 발현에 미치는 영향

Quantitative Real-time PCR 분석을 통해 PGE₂대사와 연관된 여러 인자들의 mRNA 발현 변화를 검증하였다. HaCaT 세포주를 이용하여 48시간 동안 시료 GLEA에 노출시켰을 때, PGE₂와 깊이 연관된 대표인자 cyclooxygenase-1과 2 (COX-1 및 COX-2), prostaglandin transporter (PGT)와 multidrug resistance-associated protein 4 (MRP4)의 mRNA 변화를 측정된 결과 COX-1은 약간 증가하였으나, COX-2, PGT, MRP4 등은 변화를 보이지 않았다. 반면 15-PGDH의 mRNA는 유의성 있는 발현 감소를 뚜렷하게 보여주었다(그림 10).

4. GLEA 처치 후 PGE₂ 농도의 변화

위 결과를 바탕으로 HaCaT 세포주를 이용하여 세포 내·외에서의 PGE₂의 증가 유무를 측정하였다. PGE₂ immunoassay kit를 이용하여 GLEA (50 µg/mL) 투여 후 12시간 후의 세포 내외 PGE₂ 농도를 측정된 결과, 세포 내에서는 PGE₂의 증가를 보였으나 세포 외 농도는 오히려 감소하였다(표 4). 이에 세포 외 PGE₂ 농도 변화를 시간 (3, 6, 12시간) 별로 측정된 결과 시료 투여 후 초기 3시간에는 대조군 보다 높은 PGE₂ 증가를 나타내고 있으며 이 후 빠르게 소모됨을 보여주었다(표 5).

5. 시험관 scratch 분석을 이용한 GLEA의 상처 치유효과 검증

PGE₂의 농도 증가는 상처 치유를 촉진하는 것으로 알려져 있다. 이에 시험관 scratch 회복 촉진 여부를 가능하기 위하여 HaCaT 세포의 scratch 손상에 GLEA를 2, 10, 50 µg/mL을 처리하고 48시간 후 손상 부위의 회복 촉진 유무를 평가하였다. GLEA(50 µg/mL)를 처리하였을 때 양성 대조군 TGF-β1 (100 µg/mL)에 필적하는 scratch 회복 촉진효능을 보여주었다(그림11).

6. GLEA의 Apo B100/Apo A1비율에 미치는 영향

GLEA로 처리한 세포군에서 대조군에 비하여 ApoB100 mRNA 발현 감소를 가져왔다. 그러나 ApoA-1의 mRNA발현은 대조군 대비 증가를 가져왔다. 특히 심혈관질환(cardiovascular disease, CVD)의 새로운 위험인자로 중요한 ApoB100/ApoA-1 비율에 미치는 효과를 비교해 보았을 때 대조군에 비하여 비율이 84.4%로 나타나 혈중 지방 감소효능을 지님을 보여주었다(표 6).

7. GLEA의 PPAR γ 활성 효과

본 연구에서 PPAR γ mRNA 발현에 미치는 영향을 보기 위하여 HepG2 세포(3 x 10⁵/ well)를 6 well 에 증분하여 충분히 attach 시켰다. 이 후 12 시간 동안 FBS 를 제거 한 상태를 만든 후 GLEA 농도별로 24 시간 동안 처리하여 세포 펠렛을 얻어 RNA 를 뽑은 다음 cDNA 를 만들어 Real-time PCR 을 수행하였다. 본 실험에서 대조군에 비하여 실험군이 PPAR γ mRNA 발현증가에 관여함을 알

수 있었다(그림 12). 또한 직접적인 PPAR γ 활성화에 관여함을 알아보기 위하여 reporter 측정을 수행하였다. 양성대조군으로 PPAR γ agonist 로 알려진 rosiglitazone (1 μ M)을 사용하였고, PPAR γ 활성 정도를 dual-luciferase (firefly/renilla) assay system 으로 luminometer 를 사용하여 측정하였다(그림 14). GLEA 가 PPAR γ activation 증가에 유의한 연관성이 있음이 p value 가 0.05 이하로 나타나 의미가 있는 것으로 나타났다(그림 13).

8. GLEA 의 HMG CoA reductase 억제 효과

임상적으로 고콜레스테롤혈증을 치료하는 약의 기전인 HMG-CoA reductase 억제효과를 해방풍이 가지고 있는지 알아보기 위하여 enzyme kinetic assay 를 실시하였다. 본 실험에서 GLEA 의 농도가 증가 할수록 HMG-CoA reductase 를 억제하는 효과가 증가 되었다. HMG-CoA reductase 를 억제하는 IC₅₀ 값은 635.8 μ g/mL 를 나타내어 흔히 사용하는 statin 계열의 약물에 비하면 약하지만 일부 효능을 지님을 알 수 있었다(표 7).

IV. 고찰

PGE₂ 는 15-PGDH 에 의해 분해되기 때문에, 15-PGDH 의 활성을 억제하면 PGE₂ 는 농도가 증가하게 된다(Coggins, Latour et al. 2002). 본 연구를 통해 GLEA 의 15-PGDH 활성 저해능을 평가하여 PGE₂ 농도에 미치는 영향을 평가하였다.

해방풍은 혈액응고억제(Takeuchi, Kasama et al. 1991), 혈압강하(Lee, Roh et al. 2002), 항당뇨(Lee, Choi et al. 2004), 항산화(Ng, Liu et al. 2004), 항고지혈 작용(Li, Ma et al. 2006)등의 약리작용을 가지고 있다고 지금까지 보고되었지만, 15-PGDH 의 작용을 억제하여 PGE₂ 의 혈중농도를 증가시킨다는 보고는 없었다.

본 저자는 15-PGDH 의 생산을 위해서 재조합 15-PGDH cDNA 가 발현된 PGEX-2T expression vector 를 내재한 *Escherichia coli* BL-21 DE3 를 이용하였으며 이후 정제과정을 거쳐 순수한 15-PGDH 를 획득하였다(그림 8). 그 결과, GLEA 가 15-PDGH 의 활성을 억제하여 PGE₂ 의 농도를 증가시킴을 알 수 있었다(표 3).

PGE₂ 는 위궤양 및 상처치유에 긍정적인 효과가 있는 것으로 알려져 있다(Fujii, Irie et al. 1997; Ghosh, Hirasawa et al. 2000; Gallo, Franchi et al. 2001; Futagami, Ishizaki et al. 2002; Wilgus, Bergdall et al. 2004; Parekh, Sandulache et al. 2009; Sandulache, Singh et al. 2009). 최근에 연구된 결과에 따르면 소장상피 아래 세포에 상처를 낸 후 PGE₂ receptor 길항제를 투여 하였을 때 상처치유가 지연됨을 보여주었다(Iwanaga, Okada et al. 2012). 이는

PGE₂ 가 상처의 빠른 치유에 역할을 하는 것이라 할 수 있다. 본 연구에서도 PGE₂ 의 농도를 올리는 GLEA 의 상처치유의 효과를 알기 위해 종래 상처 치유 효과가 있는 것으로 알려진 TGF-β1 과 함께 in vitro scratch 실험을 하였다. 그 결과 TGF-β1 과 동등 또는 더 우수한 상처치유 능력이 있는 것으로 확인 되었다(그림 7). 즉, GLEA 는 외상으로 인한 상처 및 소화기 궤양 등 빠른 치유가 필요한 곳에 유용한 치료제가 될 수 있을 것으로 사료된다.

PGE₂ 는 허혈성 심장질환 환자에서 심근의 수축력은 높이고 혈관의 저항을 낮추며 협심증의 재발을 낮추었고(Agapov 1982; Degousee, Fazel et al. 2008), 뇌의 기능의 향상에도 도움을 줄 수 있다는 연구 결과도 있다(Cruz Duarte, St-Jacques et al. 2012). PGE₂ 가 혈류개선에 효과가 있기 때문에(Colombe, Vindrios et al. 2007; Colombe, Michelet et al. 2008) GLEA 가 허혈성 심장질환 및 뇌질환의 예방 및 치료에 효과가 있을 것으로 생각되지만 아직 실험실적 연구만 시행되어 동물 및 인체에 미치는 영향에 대해서는 추가적인 연구가 필요하다.

허혈성 심장질환 및 뇌질환은 그 질환을 유발시키는 또 다른 여러가지 위험 요인(King 2010)을 가지고 있기 때문에 해방풍이 다른 위험요인에 미치는 영향에 대해서도 실험을 하게 되었다. 대표적인 위험요인으로는 고지질혈증 및 당뇨병이 있는데 콜레스테롤이 증가되고, LDL 이 HDL 에 비해 증가되어 허혈성 심뇌혈관 질환을 유발시킨다고 알려져 있다(Haase, Tybjaerg-Hansen et al. 2010). 콜레스테롤은 HMG-CoA reductase 에 의해 생성되는데(그림 5), 건강에

좋다고 알려진 HDL 와 나쁘다고 알려진 LDL 의 혈중농도에 의해 허혈성 심장질환과 뇌혈관 질환의 위험요인의 유무를 말할 수 있고(Haase, Tybjaerg-Hansen et al. 2010), ApoB100 과 ApoA-1 은 각각 LDL 과 HDL 을 운반하는 역할을 하며 ApoB100/ApoA-1 의 비율이 증가하면 LDL 의 농도가 증가하여(그림 6) 허혈성 질환의 발병위험이 증가하는 것으로 알려져 있다(Sniderman, Shapiro et al. 1980; Brunzell, Sniderman et al. 1984; Genest, Bard et al. 1991). 임상에서 statin 계열의 약물을 고콜레스테롤혈증의 치료제로 사용하고 있고(Wensel, Waldrop et al. 2010; Tani, Nagao et al. 2011) 미국심장학회에서 HMG-CoA reductase 억제제를 허혈성 심·뇌혈관 질환의 치료에 권고하고 있다(King 2010).

GLEA 는 콜레스테롤의 생성을 억제시키는 중요한 효소인 HMG-CoA reductase(Brown and Goldstein 1997)의 활성을 억제하여, 콜레스테롤의 혈중 농도를 감소시키고, ApoB100/ApoA-1 의 비율을 감소시켜 HDL 에 비해 LDL 가 혈중에서 증가되는 것을 억제하는 효과가 있는 것을 본 실험에서 최초로 밝혀냈다.

또한, 지방의 재분포를 활성화 시키고, 혈당을 낮춰주어 고지질혈증과 고혈당증 에서 임상적으로 사용되고 있는 PPAR γ 작용제의 효과(Jones, Barrick et al. 2005; Li, Qi et al. 2008)를 가지고 있는지에 대해 연구해 본 결과 GLEA 가 PPAR γ mRNA 를 증가시키는 작용이 있음이 밝혀졌다. PPAR γ 는 최근 급성 관상동맥질환(Luo, Wan et al. 2009)에도 긍정적인 효과가 있다는 결과도 있으며 아직도 약리작용이 다 규명되지 않아 활발히 연구 중이다. GLEA 도 실험실적

연구결과를 바탕으로 당뇨 및 고지질혈증의 in vivo 실험이 추가로 필요할 것으로 사료된다.

본 연구결과에 따르면 GLEA 는 상처치유에 효과가 있을 뿐 아니라 한국에서 사망원인의 많은 비중을 차지하고 있는 허혈성 심혈관 및 뇌혈관 질환의 예방 및 치료에 효과가 있을 것을 것으로 사료된다. 더 나아가 당뇨 등의 대사질환의 치료에 좋은 신약의 기틀을 마련할 수 있을 것으로 기대된다. 본 저자는 위 실험(in vitro) 결과를 토대로 동물실험 및 임상시험을 통해 동물 및 인체의 해방풍 효능의 검증이 필요하리라 생각되고, 그 후 더 나아가 치료 약물의 개발도 가능하리라 사료된다.

표 1. 한국의 평균수명

나이	2010(A)			2011(B)			차이(B-A)		
	전체	남	여	전체	남	여	전체	남	여
0	80.8	77.2	84.1	81.2	77.6	84.5	0.4	0.4	0.4
20	61.3	57.8	64.5	61.7	58.2	64.9	0.4	0.4	0.4
40	42.0	38.6	45.0	42.4	39.0	45.4	0.4	0.4	0.4
60	23.9	21.1	26.2	24.2	21.4	26.5	0.3	0.3	0.3
80	9.1	7.6	9.8	9.2	7.6	9.9	0.1	0.1	0.1

(2011, 통계청)

표 2. Real-time PCR 의 primer

Gene	Primer	
PGT	Sense	5'-GGATGCTGTTTGGAGGAATCCTCA-3'
	Antisense	5'-GCACGATCCTGTCTTTGCTGAA-3'
MRP4	Sense	5'-AACCTCTAACCGACATTCCTG-3'
	Antisense	5'-TCAACATATTACAGCCACCATC-3'
COX-1	Sense	5'-CCTCATGTTTGCCTTCTTTGC-3'
	Antisense	5'-GGCGGGTACATTTCTCCATC-3'
COX-2	Sense	5'-GATCTACCCTCCTCAA-3'
	Antisense	5'-GAACAACCTGCTCATCAC-3'
β-actin	Sense	5'-GACTATGACTTAGTTGCGTTA-3'
	Antisense	5'-GTTGAACTCTCTACATACTCCG-3'

표 3. 해방풍 추출용매에 따른 15-PDGH 억제효과

추출용매	IC ₅₀ (μg/mL)	
	<i>G. littoralis</i> 뿌리	<i>G. littoralis</i> 잎
MeOH	99.3	136.8
<i>n</i> -Hexane	21.5	> 500
EtOAc	13.0	1.7
<i>n</i> -BuOH	387.0	25.4
H ₂ O	393.1	244.0

표 4. GLEA의 HaCaT 세포 내부 및 외부의 PGE₂농도에 미치는 효과

시료	세포내 PGE ₂ (ng/mL)	세포외 PGE ₂ (pg/mL)
대조군	2.4	397.5
GLEA(50 µg/mL)	2.9	240.9

표 5. GLEA(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)의 HaCaT세포의 시간별 PGE₂양 변화에 미치는 효과

시간 (hr)	시료	세포 외 PGE ₂ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
0	CTL	58.2
	GLEA	58.2
3	CTL	452.5
	GLEA	472.0
6	CTL	674.8
	GLEA	629.2
12	CTL	327.2
	GLEA	170.5

표 6. ApoB100/ApoA-1비율에 GLEA가 미치는 효과

시료	mRNA ratio (ApoB100/ApoA1)	% Control
대조군	2.28	100
GLEA (50 µg/mL)	1.92	84.4

표 7. GLEA의 농도에 따른 HMG-CoA reductase 활성억제효과

시료	억제효과(%)	시료	IC ₅₀ for HMG-CoA reductase
GLEA (μg/mL)			
10	17.5 ± 9.2	GLEA	635.8 μg/mL
50	28.0 ± 2.8	Atorvastain	1.9 μM
100	18.5 ± 9.1		
200	30.2 ± 14.8		
400	41.0 ± 7.4		
800	56.0 ± 1.2		
Atorvastatin (2.5 μM)	89.4 ± 10.6		

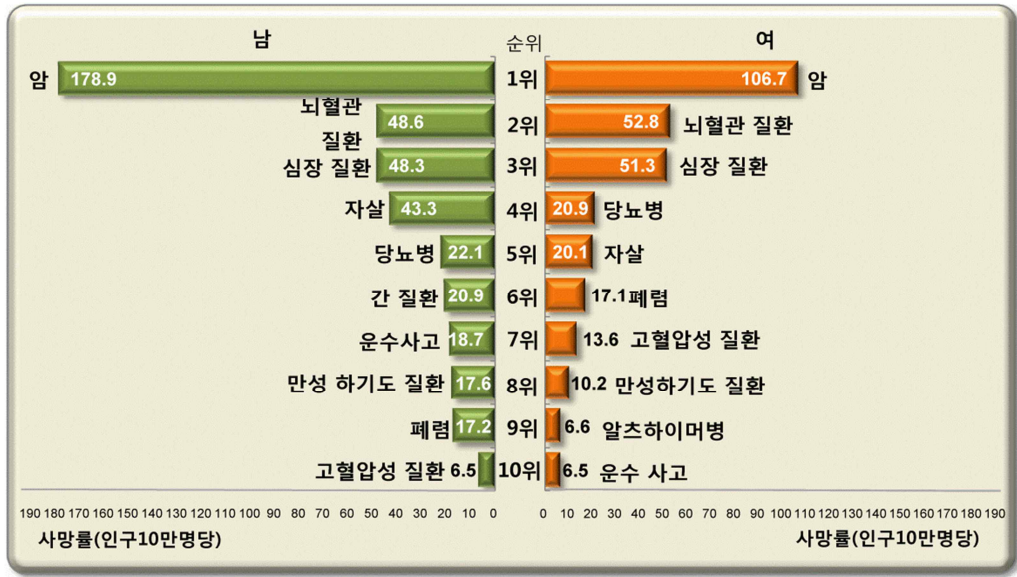


그림 1. 한국의 사망원인 (2011, 통계청).

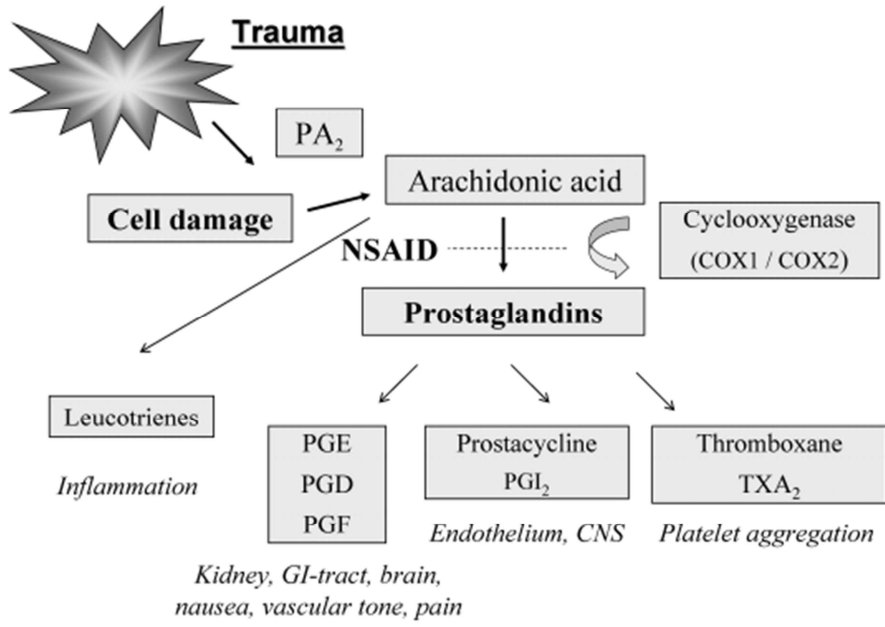


그림 2. Prostaglandin 의 생합성 경로(Naesh 2006).

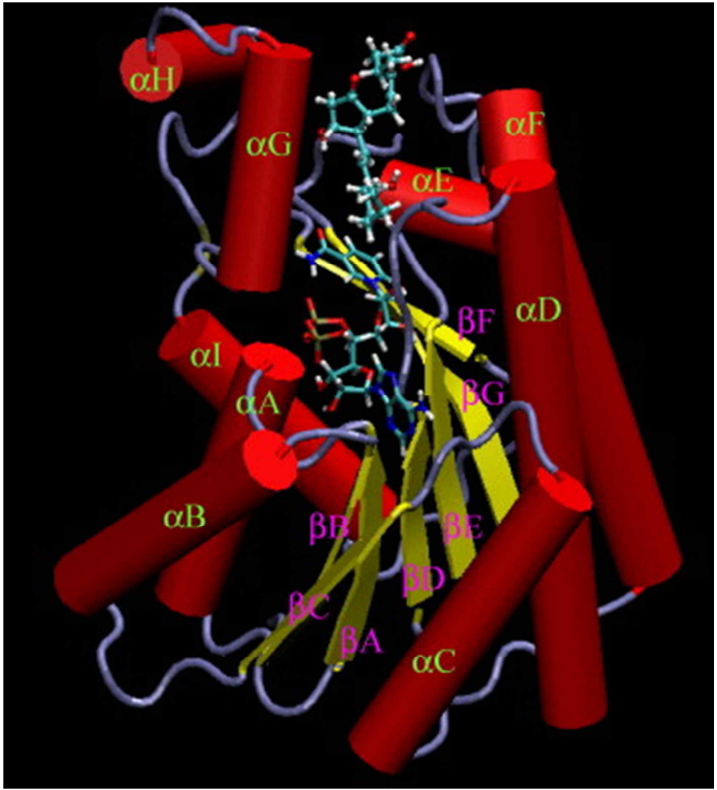


그림 3. 15-PGDH의 구조(Hamza, Cho et al. 2005).

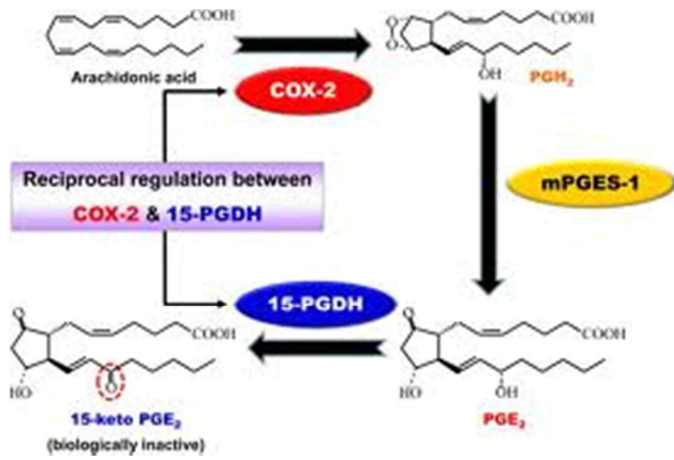
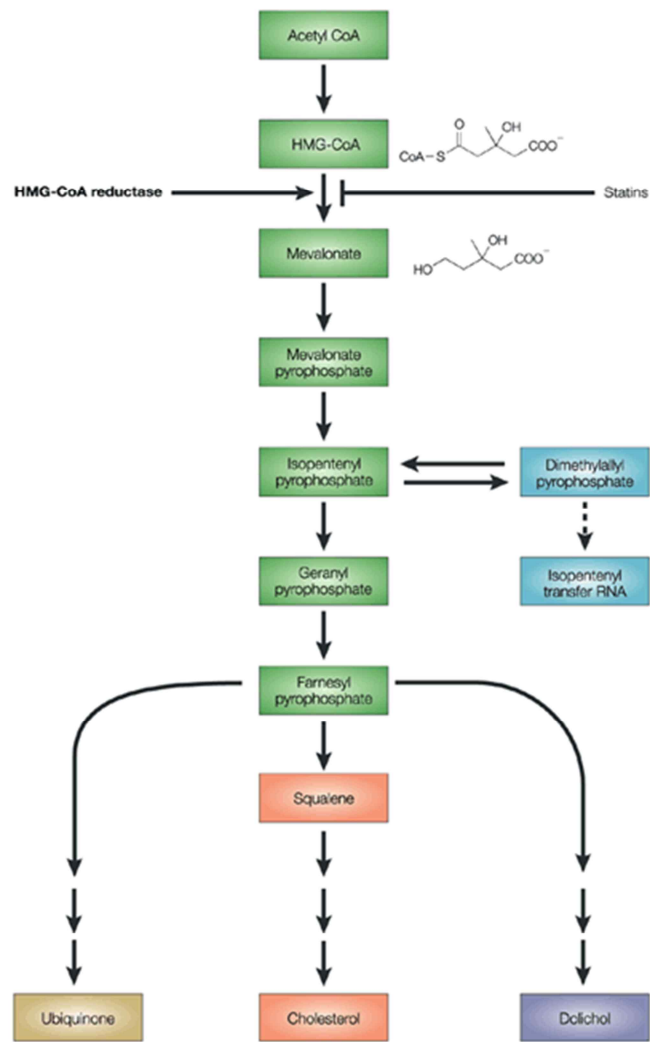


그림4. 15-PGDH에 의한 prostaglandin의 분해기전(Na, Park et al. 2011).



Nature Reviews | Drug Discovery

그림 5. 콜레스테롤 생성기전(Tobert 2003).

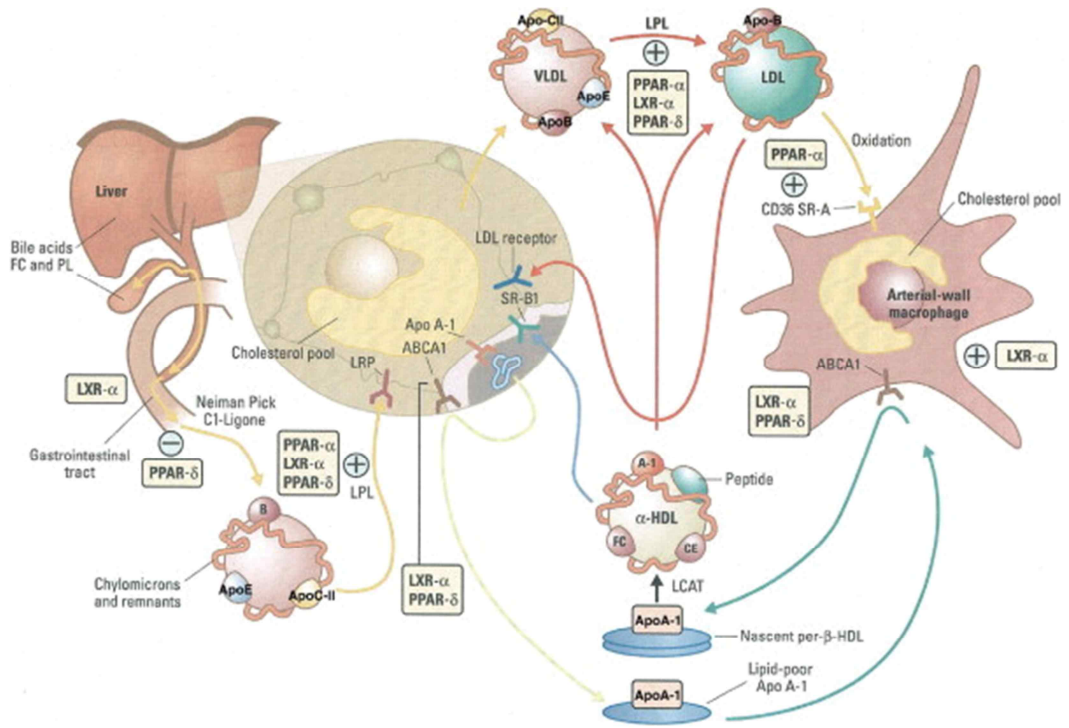


그림 6. ApoB100과 ApoA-1의 역할(Rosenson 2007)



그림 7. 해방풍 잎과 뿌리 (울산토종약초연구회, 식품의약품안전청).

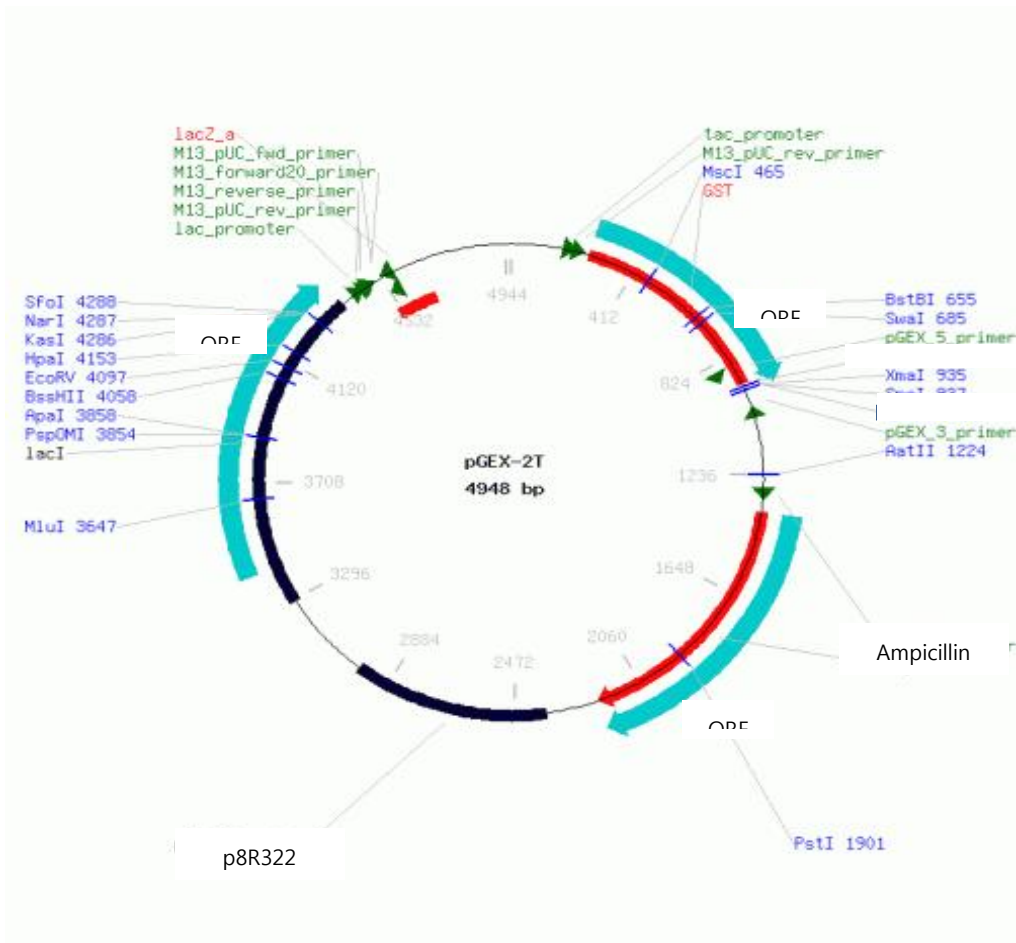


그림 8. 15-PGDH 발현 벡터(pGEX-2T).

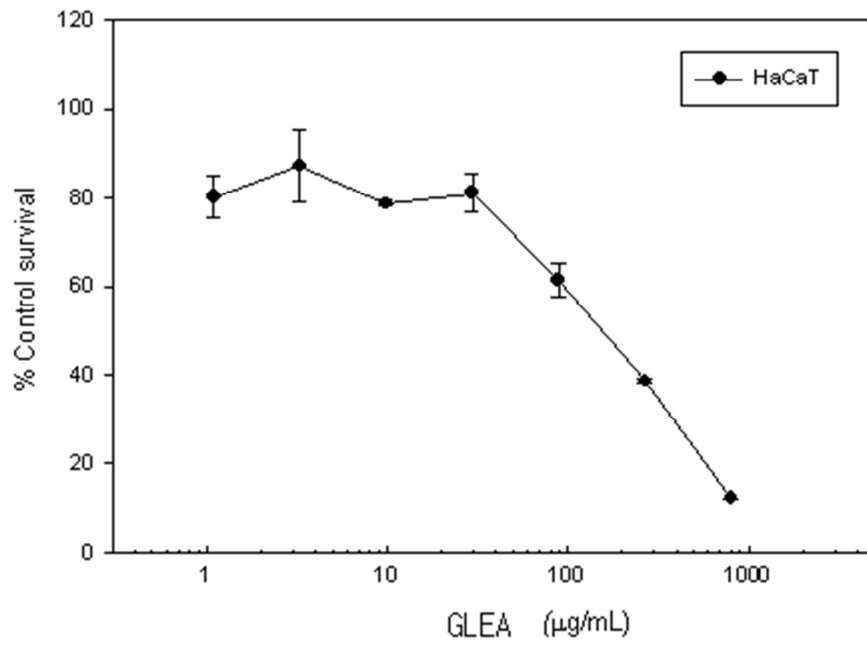


그림 9. GLEA가 HaCaT세포의 생존에 미치는 영향.

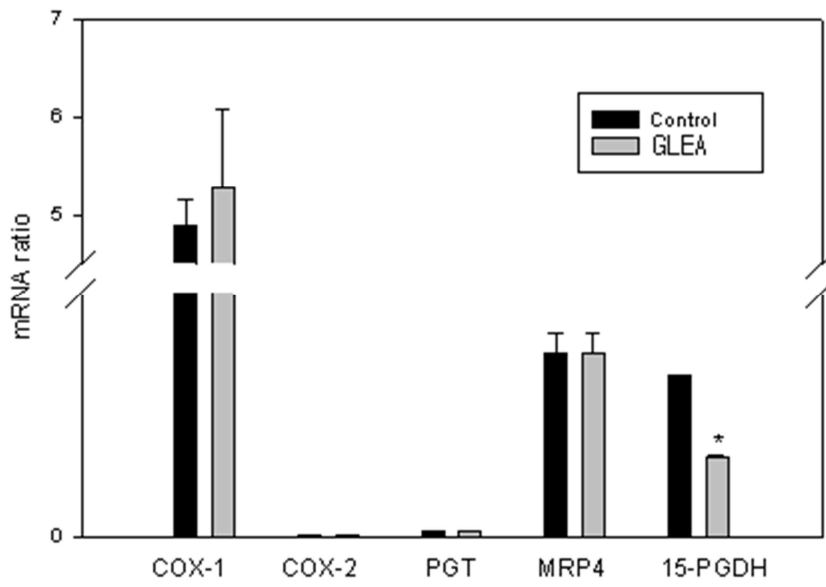


그림 10. GLEA가 PGE₂ 대사에 관여하는 유전자 발현에 미치는 영향.

*, $p < 0.05$.

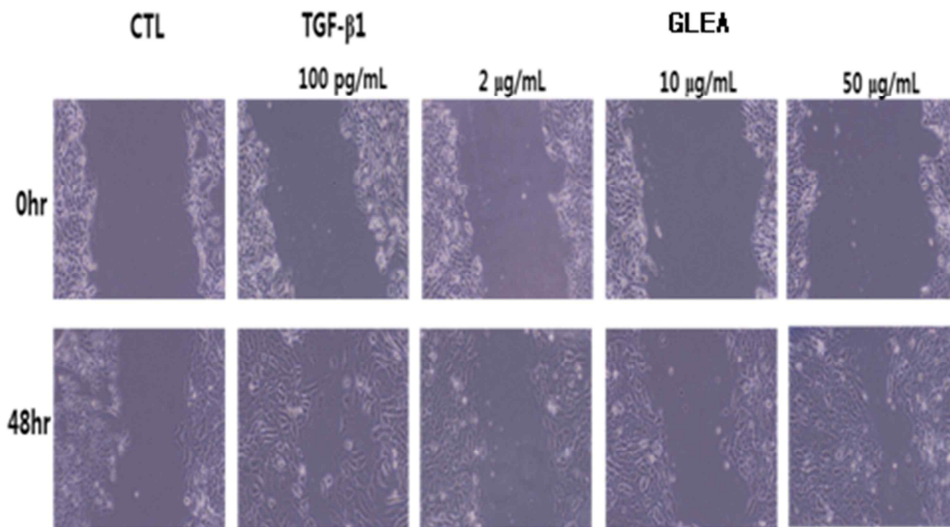


그림 11. GLEA가 HaCaT세포의 상처치유에 미치는 영향.

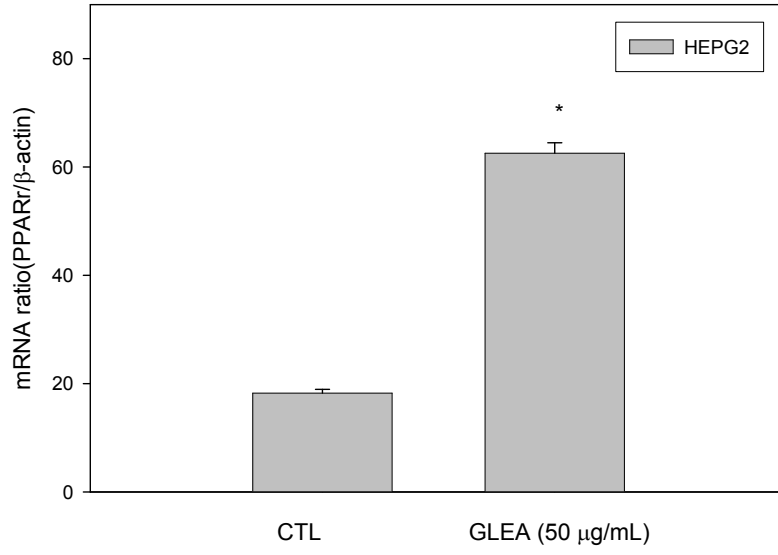


그림 12. GLEA가 PPAR r mRNA 발현에 미치는 영향. *, $p < 0.05$.

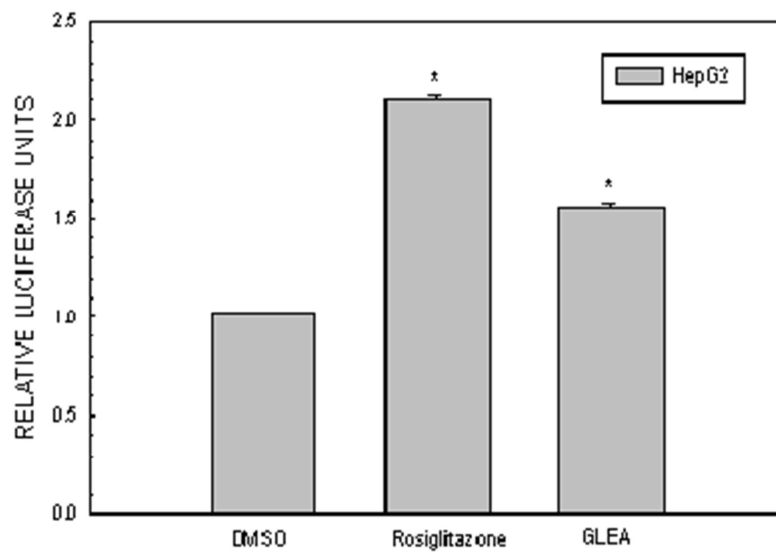
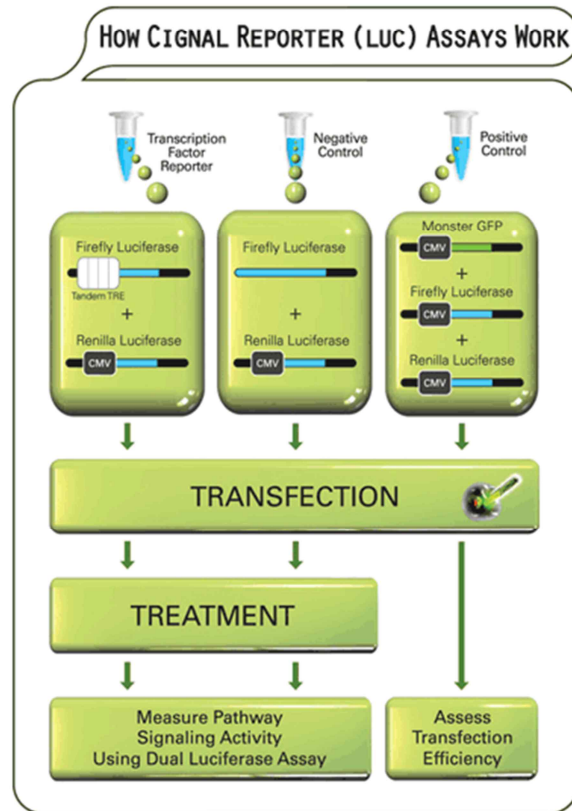


그림 13. GLEA을 이용한 PPAR γ 의 활성화도 측정. *, $p < 0.05$.

- Brief Protocol



The Signal Reporter Assays (luc) include pre-formulated, transfection-ready reporter, negative control, and positive control. The transcription factor reporter and negative control are transfected and subjected to experimental treatments, in parallel. Dual-luciferase results are calculated for each transfectant. The change in the activity of each signaling pathway is determined by comparing the normalized luciferase activities of the reporter in treated versus untreated transfectants. The identically treated negative control transfectants serve as a specificity control. The positive control serves as a control for transfection efficiency, by monitoring GFP expression, as well as a positive control for both the firefly and Renilla luciferase assays.

그림 14. Dual luciferase reporter 분석의 원리(SA biosciences).

요약문

GLEA 는 15-PGDH 를 억제함으로써 PGE₂ 를 증가시키는 탁월한 약리작용을 가지고 있는데, 이를 입증할 수 있는 결과로서 해방풍요과 뿌리 추출물(methanol, n-hexane, ethylacetate, n-butanol 및 water)의 15-PGDH 효소활성 억제효능(ED₅₀)이 1.7 µg/mL ~ > 500 µg/mL 로 다양하게 나타났고, 특히 위의 에틸 아세테이트 추출물(GLEA)의 경우 1.7 µg/mL 의 ED₅₀ 값을보여 그 억제효능이 뛰어남을 보여주었다. 그리고 GLEA 는 15-PGDH 의 mRNA 발현을 감소시키는 작용을 가지고 있었다. 또한 HaCaT 세포주에 GLEA 를 처치 후 시간에 따른 농도를 측정해 보았을 때 3 시간을 정점으로 PGE₂ 농도가 대조군 대비 증가하였다가 급속히 떨어짐을 알 수 있었는데, 이는 이미 지금까지 밝혀진 바와 같이 PGE₂ 가 15-PGDH 에 의해 빨리 대사되기 때문으로 생각된다. 따라서 GLEA 는 15-PGDH 발현 및 활성의 억제를 통한 PGE₂ 증가를 매개하여 허혈성 심혈관 질환, 뇌혈관 질환, 창상, 화상, 소화성궤양 및 위염의 치유효능을 발휘하리라 생각된다.

또한 GLEA 는 HaCaT 세포주에서 *in vitro* 스크래치 분석(상처 치유 효능)을 통해 GLEA 가 TGF-β1 에 버금가는 창상치유 효능이 있을 을 알 수 있었다.

더불어 본 연구를 통해 GLEA 가 콜레스테롤 대사에 영향을 미치는 것을 알 수있었다. 콜레스테롤 생성에 가장 중요한 역할을 하는 HMG-CoA reductase 의 활성을 HMG-CoA reductase 의 cofactor 인 NADPH 의 흡광도 변화로

측정하여 HMG-CoA reductase 활성 억제정도를 측정한 결과 통계적으로 유의한 억제 효과를 가지고 있음을 알 수 있었다. 그 외 LDL 및 HDL 과 연관되어 세포 내로의 이동 및 흡수에 관여하는 apolipoprotein B100/A-1 의 비율에 영향을 미치는 효과에 대해 연구한 결과 GLEA 를 처치한 군에서 대조군과 비교 하였을 때 비율을 유의하게 감소시키는 것을 알 수 있었다. 이 결과로 GLEA 가 허혈성 심혈관 및 뇌혈관 질환의 예방효과가 있을 것으로 사료된다. 그리고, 당과 지질대사에 관여하며 지방산이 콜레스테롤로 변화하는 과정을 촉진시키는 PPAR γ mRNA 에 GLEA 가 미치는 영향을 분석한 결과 대조군에 비해 mRNA 의 발현이 증가함을 알 수 있었다.

참고문헌

- (1995). "Tissue plasminogen activator for acute ischemic stroke. The National Institute of Neurological Disorders and Stroke rt-PA Stroke Study Group." N Engl J Med **333**(24): 1581-1587.
- Adams, H. P., Jr., T. G. Brott, et al. (1996). "Guidelines for Thrombolytic Therapy for Acute Stroke: a Supplement to the Guidelines for the Management of Patients with Acute Ischemic Stroke. A statement for healthcare professionals from a Special Writing Group of the Stroke Council, American Heart Association." Stroke **27**(9): 1711-1718.
- Adams, H. P., Jr., G. del Zoppo, et al. (2007). "Guidelines for the early management of adults with ischemic stroke: a guideline from the American Heart Association/American Stroke Association Stroke Council, Clinical Cardiology Council, Cardiovascular Radiology and Intervention Council, and the Atherosclerotic Peripheral Vascular Disease and Quality of Care Outcomes in Research Interdisciplinary Working Groups: The American Academy of Neurology affirms the value of this guideline as an educational tool for neurologists." Circulation **115**(20): e478-534.
- Agapov, A. A. (1982). "[Effect of intravenous prostaglandin E2 administration on central hemodynamics in ischemic heart disease patients]." Biull Vsesoiuznogo Kardiol Nauchn Tsentra AMN SSSR **5**(1): 86-88.
- Aida, Y., T. Kasama, et al. (1998). "Pharmacological activities of khellactones, compounds isolated from *Peucedanum japonicum* THUNB. and *Peucedanum praeruptorium* DUNN." Methods Find Exp Clin Pharmacol **20**(4): 343-351.
- Alpert, J. S., K. Thygesen, et al. (2000). "Myocardial infarction redefined--a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction." J Am Coll Cardiol **36**(3): 959-969.

- Araki, H., Y. Komoike, et al. (2002). "Healing of duodenal ulcers is not impaired by indomethacin or rofecoxib, the selective COX-2 inhibitor, in rats." Digestion **66**(3): 145-153.
- Bamford, J., P. Sandercock, et al. (1991). "Classification and natural history of clinically identifiable subtypes of cerebral infarction." Lancet **337**(8756): 1521-1526.
- Braunwald, E., R. H. Jones, et al. (1994). "Diagnosing and managing unstable angina. Agency for Health Care Policy and Research." Circulation **90**(1): 613-622.
- Brideau, C., C. Van Staden, et al. (2001). "In vitro effects of cyclooxygenase inhibitors in whole blood of horses, dogs, and cats." Am J Vet Res **62**(11): 1755-1760.
- Brown, M. S. and J. L. Goldstein (1997). "The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor." Cell **89**(3): 331-340.
- Brunzell, J. D., A. D. Sniderman, et al. (1984). "Apoproteins B and A-I and coronary artery disease in humans." Arteriosclerosis **4**(2): 79-83.
- Bryant, C. E., I. Appleton, et al. (1998). "Vascular endothelial growth factor upregulates constitutive cyclooxygenase 1 in primary bovine and human endothelial cells." Life Sci **62**(24): 2195-2201.
- Buja, L. M. (1998). "Modulation of the myocardial response to ischemia." Lab Invest **78**(11): 1345-1373.
- Burdan, F., A. Chalas, et al. (2006). "[Cyclooxygenase and prostanoids--biological implications]." Postepy Hig Med Dosw (Online) **60**: 129-141.
- Cheng, L., W. Cao, et al. (2005). "Platelet-activating factor and prostaglandin E2 impair esophageal ACh release in experimental esophagitis." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **289**(3): G418-428.
- Coggins, K. G., A. Latour, et al. (2002). "Metabolism of PGE2 by prostaglandin dehydrogenase is essential for remodeling the ductus arteriosus." Nat Med **8**(2): 91-92.
- Collinson, P. O. and D. C. Gaze (2007). "Biomarkers of cardiovascular damage

- and dysfunction--an overview." Heart Lung Circ **16 Suppl 3**: S71-82.
- Colombe, L., J. F. Michelet, et al. (2008). "Prostanoid receptors in anagen human hair follicles." Exp Dermatol **17**(1): 63-72.
- Colombe, L., A. Vindrios, et al. (2007). "Prostaglandin metabolism in human hair follicle." Exp Dermatol **16**(9): 762-769.
- Cong, P., Z. L. Xiao, et al. (2007). "Prostaglandins mediate tonic contraction of the guinea pig and human gallbladder." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **292**(1): G409-418.
- Cruz Duarte, P., B. St-Jacques, et al. (2012). "Prostaglandin E2 contributes to the synthesis of brain-derived neurotrophic factor in primary sensory neuron in ganglion explant cultures and in a neuropathic pain model." Exp Neurol **234**(2): 466-481.
- Cui, X., S. C. Yang, et al. (2006). "IL-4 regulates COX-2 and PGE2 production in human non-small cell lung cancer." Biochem Biophys Res Commun **343**(4): 995-1001.
- Degousee, N., S. Fazel, et al. (2008). "Microsomal prostaglandin E2 synthase-1 deletion leads to adverse left ventricular remodeling after myocardial infarction." Circulation **117**(13): 1701-1710.
- Drvota, V., H. Wei, et al. (1995). "Beta-adrenergic receptor function in cultured AT-1 cardiomyocytes." Biochem Biophys Res Commun **207**(1): 13-19.
- Ensor, C. M. and H. H. Tai (1995). "15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase." J Lipid Mediat Cell Signal **12**(2-3): 313-319.
- Fujii, E., K. Irie, et al. (1997). "Role of nitric oxide, prostaglandins and tyrosine kinase in vascular endothelial growth factor-induced increase in vascular permeability in mouse skin." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol **356**(4): 475-480.
- Futagami, A., M. Ishizaki, et al. (2002). "Wound healing involves induction of cyclooxygenase-2 expression in rat skin." Lab Invest **82**(11): 1503-1513.
- Gallo, O., A. Franchi, et al. (2001). "Cyclooxygenase-2 pathway correlates with VEGF expression in head and neck cancer. Implications for

- tumor angiogenesis and metastasis." Neoplasia **3**(1): 53-61.
- Genest, J. J., Jr., J. M. Bard, et al. (1991). "Plasma apolipoprotein A-I, A-II, B, E and C-III containing particles in men with premature coronary artery disease." Atherosclerosis **90**(2-3): 149-157.
- Ghosh, A. K., N. Hirasawa, et al. (2000). "Cyclooxygenase-2-mediated angiogenesis in carrageenin-induced granulation tissue in rats." J Pharmacol Exp Ther **295**(2): 802-809.
- Goldstein, L. B. and G. P. Samsa (1997). "Reliability of the National Institutes of Health Stroke Scale. Extension to non-neurologists in the context of a clinical trial." Stroke **28**(2): 307-310.
- Golino, P., G. Ambrosio, et al. (1993). "Endogenous prostaglandin endoperoxides may alter infarct size in the presence of thromboxane synthase inhibition: studies in a rabbit model of coronary artery occlusion-reperfusion." J Am Coll Cardiol **21**(2): 493-501.
- Gordon, D. J., J. L. Probstfield, et al. (1989). "High-density lipoprotein cholesterol and cardiovascular disease. Four prospective American studies." Circulation **79**(1): 8-15.
- Grundy, S. M. (2007). "Should women be offered cholesterol lowering drugs to prevent cardiovascular disease? Yes." BMJ **334**(7601): 982.
- Haase, C. L., A. Tybjaerg-Hansen, et al. (2010). "Genetically elevated apolipoprotein A-I, high-density lipoprotein cholesterol levels, and risk of ischemic heart disease." J Clin Endocrinol Metab **95**(12): E500-510.
- Halter, F., A. S. Tarnawski, et al. (2001). "Cyclooxygenase 2-implications on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing: controversial issues and perspectives." Gut **49**(3): 443-453.
- Hamza, A., H. Cho, et al. (2005). "Understanding human 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase binding with NAD⁺ and PGE₂ by homology modeling, docking and molecular dynamics simulation." Bioorg Med Chem **13**(14): 4544-4551.
- Hanukoglu, I. (1992). "Steroidogenic enzymes: structure, function, and role

- in regulation of steroid hormone biosynthesis." J Steroid Biochem Mol Biol **43**(8): 779-804.
- Hatazawa, R., A. Tanaka, et al. (2007). "Cyclooxygenase-2/prostaglandin E2 accelerates the healing of gastric ulcers via EP4 receptors." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **293**(4): G788-797.
- Heart Protection Study Collaborative, G. (2002). "MRC/BHF Heart Protection Study of cholesterol lowering with simvastatin in 20,536 high-risk individuals: a randomised placebo-controlled trial." Lancet **360**(9326): 7-22.
- Hintermann, E., M. Bilban, et al. (2001). "Inhibitory role of alpha 6 beta 4-associated erbB-2 and phosphoinositide 3-kinase in keratinocyte haptotactic migration dependent on alpha 3 beta 1 integrin." J Cell Biol **153**(3): 465-478.
- Hsu, C. L. and G. C. Yen (2007). "Effects of flavonoids and phenolic acids on the inhibition of adipogenesis in 3T3-L1 adipocytes." J Agric Food Chem **55**(21): 8404-8410.
- Huong, D. T., H. C. Choi, et al. (1999). "Inhibitory activity of monoamine oxidase by coumarins from *Peucedanum japonicum*." Arch Pharm Res **22**(3): 324-326.
- Iwanaga, K., M. Okada, et al. (2012). "Prostaglandin E2 promotes wound-induced migration of intestinal subepithelial myofibroblasts via EP2, EP3, and EP4 prostanoid receptor activation." J Pharmacol Exp Ther **340**(3): 604-611.
- Jones, J. R., C. Barrick, et al. (2005). "Deletion of PPARgamma in adipose tissues of mice protects against high fat diet-induced obesity and insulin resistance." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(17): 6207-6212.
- Kendrick, M. (2007). "Should women be offered cholesterol lowering drugs to prevent cardiovascular disease? No." BMJ **334**(7601): 983.
- King, S. B., 3rd (2010). "2009 update of the ACC/AHA guidelines for the management of patients with ST-elevation myocardial infarction and guidelines on percutaneous coronary intervention: what should we change in clinical practice?" Pol Arch Med Wewn **120**(1-2): 6-8.

- Klausner, A. P., C. M. Johnson, et al. (2011). "Prostaglandin E(2)mediates spontaneous rhythmic contraction in rabbit detrusor muscle." Can J Urol **18**(2): 5608-5614.
- Knijff-Dutmer, E. A., J. Van der Palen, et al. (2003). "The influence of cyclo-oxygenase specificity of non-steroidal anti-inflammatory drugs on bleeding complications in concomitant coumarine users." QJM **96**(7): 513-520.
- Knox, A. J., L. Corbett, et al. (2001). "Human airway smooth muscle cells secrete vascular endothelial growth factor: up-regulation by bradykinin via a protein kinase C and prostanoid-dependent mechanism." FASEB J **15**(13): 2480-2488.
- Kobayashi, K., T. Murata, et al. (2011). "Prostaglandin E2-prostanoid EP3 signal induces vascular contraction via nPKC and ROCK activation in rat mesenteric artery." Eur J Pharmacol **660**(2-3): 375-380.
- Koivisto, L., G. Jiang, et al. (2006). "HaCaT keratinocyte migration is dependent on epidermal growth factor receptor signaling and glycogen synthase kinase-3alpha." Exp Cell Res **312**(15): 2791-2805.
- Kothari, R., W. Barsan, et al. (1995). "Frequency and accuracy of prehospital diagnosis of acute stroke." Stroke **26**(6): 937-941.
- Lamas, G. A., G. C. Flaker, et al. (1995). "Effect of infarct artery patency on prognosis after acute myocardial infarction. The Survival and Ventricular Enlargement Investigators." Circulation **92**(5): 1101-1109.
- Lee, J. W., T. C. Roh, et al. (2002). "Mechanisms of relaxant action of a pyranocoumarin from Peucedanum japonicum in isolated rat thoracic aorta." Planta Med **68**(10): 891-895.
- Lee, S. O., S. Z. Choi, et al. (2004). "Antidiabetic coumarin and cyclitol compounds from Peucedanum japonicum." Arch Pharm Res **27**(12): 1207-1210.
- Lewis, G. F. and D. J. Rader (2005). "New insights into the regulation of HDL metabolism and reverse cholesterol transport." Circ Res **96**(12): 1221-1232.
- Li, B. H., X. F. Ma, et al. (2006). "Inhibitory activity of chlorogenic acid on

- enzymes involved in the fatty acid synthesis in animals and bacteria." IUBMB Life **58**(1): 39-46.
- Li, Y., Y. Qi, et al. (2008). "Pomegranate flower: a unique traditional antidiabetic medicine with dual PPAR-alpha/-gamma activator properties." Diabetes Obes Metab **10**(1): 10-17.
- Luo, Y. M., X. H. Wan, et al. (2009). "[Effects of PPAR-gamma agonist rosiglitazone on MMP-9 and TIMP-1 expression of monocyte-derived macrophages isolated from patients with acute coronary syndrome]." Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi **37**(8): 739-745.
- Matijevic-Aleksic, N., P. McPhedran, et al. (1996). "Bleeding disorder due to platelet prostaglandin H synthase-1 (PGHS-1) deficiency." Br J Haematol **92**(1): 212-217.
- Menown, I. B., G. Mackenzie, et al. (2000). "Optimizing the initial 12-lead electrocardiographic diagnosis of acute myocardial infarction." Eur Heart J **21**(4): 275-283.
- Miura, S., A. Tatsuguchi, et al. (2004). "Cyclooxygenase-2-regulated vascular endothelial growth factor release in gastric fibroblasts." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **287**(2): G444-451.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." J Immunol Methods **65**(1-2): 55-63.
- Murakami, M., H. Naraba, et al. (2000). "Regulation of prostaglandin E2 biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E2 synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2." J Biol Chem **275**(42): 32783-32792.
- Na, H. K., J. M. Park, et al. (2011). "15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase as a novel molecular target for cancer chemoprevention and therapy." Biochem Pharmacol **82**(10): 1352-1360.
- Naesh, O. (2006). "Back to the future: postoperative pain management beyond COX-2 inhibitors." N Z Med J **119**(1242): U2170.
- Ng, T. B., F. Liu, et al. (2004). "The antioxidant effects of aqueous and organic extracts of *Panax quinquefolium*, *Panax notoginseng*,

- Codonopsis pilosula, Pseudostellaria heterophylla and Glehnia littoralis." J Ethnopharmacol **93**(2-3): 285-288.
- Nicholls, S. J. (2008). "Rosuvastatin and progression of atherosclerosis." Expert Rev Cardiovasc Ther **6**(7): 925-933.
- Parekh, A., V. C. Sandulache, et al. (2009). "Prostaglandin E2 differentially regulates contraction and structural reorganization of anchored collagen gels by human adult and fetal dermal fibroblasts." Wound Repair Regen **17**(1): 88-98.
- Prospective Studies, C., S. Lewington, et al. (2007). "Blood cholesterol and vascular mortality by age, sex, and blood pressure: a meta-analysis of individual data from 61 prospective studies with 55,000 vascular deaths." Lancet **370**(9602): 1829-1839.
- Rosenson, R. S. (2007). "Effects of peroxisome proliferator-activated receptors on lipoprotein metabolism and glucose control in type 2 diabetes mellitus." Am J Cardiol **99**(4A): 96B-104B.
- Sales, K. J., A. A. Katz, et al. (2002). "Cyclooxygenase-1 is up-regulated in cervical carcinomas: autocrine/paracrine regulation of cyclooxygenase-2, prostaglandin e receptors, and angiogenic factors by cyclooxygenase-1." Cancer Res **62**(2): 424-432.
- Sandulache, V. C., T. Singh, et al. (2009). "Prostaglandin E2 is activated by airway injury and regulates fibroblast cytoskeletal dynamics." Laryngoscope **119**(7): 1365-1373.
- Schleicher, E. and O. H. Wieland (1978). "Evaluation of the Bradford method for protein determination in body fluids." J Clin Chem Clin Biochem **16**(9): 533-534.
- Schlondorff, D. (1986). "Renal prostaglandin synthesis. Sites of production and specific actions of prostaglandins." Am J Med **81**(2B): 1-11.
- Shepherd, J., S. M. Cobbe, et al. (1995). "Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. West of Scotland Coronary Prevention Study Group." N Engl J Med **333**(20): 1301-1307.
- Sniderman, A., S. Shapiro, et al. (1980). "Association of coronary

- atherosclerosis with hyperapobetalipoproteinemia [increased protein but normal cholesterol levels in human plasma low density (beta) lipoproteins]." Proc Natl Acad Sci U S A **77**(1): 604-608.
- Sola-Villa, D., M. Camacho, et al. (2006). "IL-1beta induces VEGF, independently of PGE2 induction, mainly through the PI3-K/mTOR pathway in renal mesangial cells." Kidney Int **70**(11): 1935-1941.
- Stocks, J., D. Bradbury, et al. (2005). "Cytokines upregulate vascular endothelial growth factor secretion by human airway smooth muscle cells: Role of endogenous prostanoids." FEBS Lett **579**(12): 2551-2556.
- Takeuchi, K. (2010). "Prostaglandin EP receptors and their roles in mucosal protection and ulcer healing in the gastrointestinal tract." Adv Clin Chem **51**: 121-144.
- Takeuchi, N., T. Kasama, et al. (1991). "Pharmacological activities of the prenylcoumarins, developed from folk usage as a medicine of *Peucedanum japonicum* THUNB." Chem Pharm Bull (Tokyo) **39**(6): 1415-1421.
- Tani, S., K. Nagao, et al. (2011). "HMG-CoA reductase inhibitor (Statin) therapy and coronary atherosclerosis in Japanese subjects: role of high-density lipoprotein cholesterol." Am J Cardiovasc Drugs **11**(6): 411-417.
- Tobert, J. A. (2003). "Lovastatin and beyond: the history of the HMG-CoA reductase inhibitors." Nat Rev Drug Discov **2**(7): 517-526.
- Tokanovic, S., C. W. White, et al. (2010). "Characterisation of the prostanoid receptor mediating inhibition of smooth muscle contractility in the rat prostate gland." Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol **381**(4): 321-328.
- Wallace, J. L. (2008). "Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself?" Physiol Rev **88**(4): 1547-1565.
- Wardlaw, J. M., R. I. Lindley, et al. (2002). "Thrombolysis for acute ischemic stroke: still a treatment for the few by the few." West J Med **176**(3):

198-199.

Weingartner, O., T. Pinsdorf, et al. (2010). "The relationships of markers of cholesterol homeostasis with carotid intima-media thickness." PLoS One **5**(10): e13467.

Wensel, T. M., B. A. Waldrop, et al. (2010). "Pitavastatin: a new HMG-CoA reductase inhibitor." Ann Pharmacother **44**(3): 507-514.

Wilgus, T. A., V. K. Bergdall, et al. (2004). "The impact of cyclooxygenase-2 mediated inflammation on scarless fetal wound healing." Am J Pathol **165**(3): 753-761.

Yoon, T., Y. Lee do, et al. (2010). "Anti-inflammatory effects of *Glehnia littoralis* extract in acute and chronic cutaneous inflammation." Immunopharmacol Immunotoxicol **32**(4): 663-670.

Zhao, Y. and Z. Yuan (2007). "[A new coumarin glycoside from *Glehnia littoralis*]." Yao Xue Xue Bao **42**(10): 1070-1073.

감사의 글

1998년 의과대학에 입학하여 조선대학교와 인연을 맺은 후 10년 이상, 학사, 석사 학위와 인턴, 레지던트를 마칠 때 까지 20대 와 30대 초반을 서석동에서 보냈습니다. 그 동안 많은 은사님들과, 그 외 좋으신 분들과 인연을 맺었고, 제가 응급의학과 전문의가 되는데, 많은 도움을 주셨습니다. 드디어, 학위로는 마지막인 박사학위를 취득하게 되었습니다. 지금이 있기까지 저에게 많은 가르침을 주신 분들과, 논문을 도와주신 분들, 그리고, 부모님께 감사의 글을 전합니다.

먼저, 의약분업 투쟁 당시 약리학 실험실에서 인연을 맺게 되어, 부족한 저를 품어주시고, 많은 지식과 의사, 학자가 나아갈 방향을 가르쳐 주신 조선대학교

의과대학 약리학교실의 최철희 교수님께 감사의 말씀을 드립니다. 이 은혜는 평생동안 갚아도 못 갚을 것 같지만, 최선을 다해서 사는 모습으로 보답해 나가겠습니다. 그리고, 제가 전문의로서의 길을 나아갈 수 있게 해주신 응급의학과교실의 조남수원장님, 조수형센터장님, 김성중 학생처장님, 김선표 과장님께 감사의 말씀을 드립니다. 마지막으로, 부족한 능력으로 논문을 준비할 때, 많은 지도를 해주시고 조언을 해주신 문영숙 교수님 정말 감사합니다.

지금의 저를 있게 해주신 위분들 모두의 기대에 부응하도록 살아갈 것을 약속드리며, 이에 감사의 글을 갈음하려 합니다. 정말 감사합니다.