

황련 기관지평활근에 대한 황련류의 이완효능

이동웅 · 장기철*

동국대학교 자연과학대학 생화학과, 경상대학교 의과대학 심혈관연구소 및 약리학교실*

(Received August 14, 1997)

Bronchodilatory Effects of Coptidis Rhizomas in Isolated Rat Trachea

Dong-Ung Lee and Ki-Churl Chang*

Department of Biochemistry, College of Natural Science, Dongguk University,
Kyongju, Kyongbuk 780-714, Korea

*Department of Pharmacology, College of Medicine, and Cardiovascular Research
Institute, Gyeongsang National University, Chinju 660-280, Korea

Abstract—Recently we reported that water extracts of Coptidis rhizomas showed calcium antagonistic action and alpha-adrenoceptor inhibitory action in the vascular smooth muscle. Since calcium antagonistic properties are important in the treatment of various diseases including asthma. In the present study, the bronchodilatory effects of crude extract of three kinds of *Coptidis rhizoma* (*Coptidis chinensis*, *Coptis japonica* and root hair of *Coptis japonica*) was investigated using rat isolated trachea. The result showed that all extracts relaxed carbachol-contracted tracheal smooth muscle, concentration-dependently, in which the root hair of *Coptis japonica* was the least potent. The inhibitory potency expressed in terms of IC_{50} against carbachol contraction was 1.8 $\mu\text{g/ml}$ and 2.7 $\mu\text{g/ml}$ for *Coptidis chinensis* and *Coptis japonica*, respectively. These extracts also inhibited KCl-contracted tracheal smooth muscle, but the relative potency (IC_{50}) was 3.5 and 4.1 folds weaker than carbachol-induced contraction for *Coptidis chinensis* and *Coptis japonica*, respectively. Pretreatment of crude extracts also inhibited carbachol- or KCl-induced contraction, non-competitively. These findings indicate that the extracts have muscarinic blocking as well as Ca^{2+} channel blocking action. When provoked intracellular stored Ca^{2+} release by carbachol in Ca^{2+} -free conditions, initial phasic contraction due to Ca^{2+} release was significantly inhibited by the extracts. As taken together, we conclude that water extracts of *Coptidis rhizoma* may be beneficial in bronchospasm or other broncheal tube narrowing conditions such as asthma.

Keywords □ Coptidis rhizoma, Ca^{2+} antagonist, carbachol, rat trachea, intracellular Ca^{2+} .

황련은 미나리아재비과(Ranunculaceae)에 속하는 다년생 초목인 황련 및 동속근연식물의 근경으로 우리나라에서는 일황련(*Coptis japonica* Makino), 천황련(*Coptis chinensis* Franch), 모황련(Root hair of *Coptis japonica*)이 통용되고 있는데, 일반적으로 일본산을 일황련, 중국산을 천황련, 그리고 일황련의 수염뿌리나 갯쟁이풀(매자나무과)의 근경을 모황련이라 칭하고 있다.^{1,2)}

황련은 민간과 한방에서 고미건위, 정장, 충혈, 정신 불안등에 사용하고 있으나³⁾, 주성분인 berberine이 항균⁴⁾, 항암⁵⁾, 항말라리아⁶⁾, 소염⁷⁾ 등의 작용을 가지고 있는 것으로 보고되면서 황련의 다양한 약리효능을 발견하고 나아가 berberine의 각종 유도체를 합성함으로써 보다 우수한 약리활성을 가진 화합물을 탐색하기 위한 연구가 계속 진행되고 있다.

또한 최근에 저자들⁸⁾은 천황련과 일황련의 추출물이 현저한 혈관이완작용을 가지고 있음을 확인하고 이들의 작용이 alkaloid성분인 berberine과 palmatine에

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 0591-50-8741 (팩스) 0591-759-0609

일부 기인함을 보고한 바 있다. 그러나 황련추출물 및 황련의 유효성분이 기관지 평활근에 미치는 영향에 대해서는 아직 연구, 보고된 바 없다.

이에 저자들은 한방에서 중요하게 처방되는 약재인 황련의 새로운 효능을 확인하기 위한 연구의 일환으로 흰쥐의 기관지 평활근에 대한 황련추출물의 이완효과, 수축억제효과 및 세포내 Ca^{2+} 유리에 대한 수축억제효과등을 검토하고 아울러 3종 황련의 효능차이를 상호 비교하였다.

실험방법

실험재료, 시약 및 기기 - 천황련과 모황련은 각각 시장에서 구입하여 사용하였으며 일황련은 일본품을 구입하여 사용하였다. 실험동물은 Sprague-Dawley계 rat (체중 250~300 g)를 암수구분없이 사용하였다. Indomethacin, Carbachol hydrochloride 및 EGTA (ethleneglycol-bis(β -aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid)는 Sigma Chemical Co. (MO, USA)의 제품을 사용하였으며 기타 시약은 모두 국산특급을 사용하였다. 생리기록계(ink-writing curvilinear polygraph)는 Grass Phylograph(Model 7D, USA)를, 근수축변환기(isometric force-displacement transducer)는 Grass FT03C를, 그리고 미세장력조절장치로는 Micromanipulator (Narishige, M-3, JAPAN)를 사용하였다. 항은 bath는 circulating bath(Eyela, NTT-1100)를 사용하였다.

황련추출물의 제조 - 미세하게 분쇄한 천황련, 일황련 및 모황련의 분말을 물로 수욕상에서 2시간동안 추출하였다. 각 황련추출액을 온시여과하고 여액을 감압, 농축한 다음, 추출물을 냉동건조기로 완전 건조시킨후 증류수에 녹여 사용하였다.

기관지 고리절편의 제작 - 실험동물을 실신시켜 혈액을 제거하여 회생시킨 다음, 즉시 기관지를 적출하였다. 기관지근에 붙어있는 지방질 및 연조직(connective tissue)을 제거하고 길이 3 mm의 기관지 고리절편을 제작하여 실험에 사용하였다. 이 고리절편을 특수하게 고안된 텅스텐선에 걸어 영양액내에서 일어나는 장력변화를 기록하였다.

영양액의 제조 - 영양액의 조성(mM)은 NaCl 118, KCl 4.7, $CaCl_2$ 2.5, $MgSO_4$ 1.2, $NaHCO_3$ 25, KH_2PO_4 1.2, glucose 11의 비율로 혼합하여 사용하였다.

이때, 95% O_2 -5% CO_2 혼합가스를 계속 주입시킨 상태에서 제조하였다. Ca^{2+} -free 용액은 Krebs 용액에서 $CaCl_2$ 대신 2 mM의 EGTA를 첨가하여 제조하였다.

Carbachol 및 KCl 수축에 대한 기관지 이완효과 측정 - 기관지 고리절편을 수직으로 현주하여 한쪽 끝은 bath의 저부에 고정시키고 다른쪽 끝은 근 수축변환기에 연결하였다. 미세장력 조절장치를 이용하여 초기 장력을 1 g 부하하고 최소한 1시간 이상 평형을 유지시켰다. 이 기간동안 영양액은 3회 교환하였으며 이때 부하장력을 재조절하였다. 평형상태가 유지된 다음, cyclooxygenase에 의한 생성물을 억제하기 위하여 조직을 indomethacin(10 μ M)으로 처리하였다. Indomethacin은 각 실험동안 계속 조직중에 존재하도록 하였다. 실험전에 65.4 mM의 KCl로 3회 이상 수축시켰을 때, 일정한 크기의 수축을 일으키는 절편만을 사용하였으며 carbachol(3×10^{-7} M) 또는 65.4 mM의 KCl로 최고 수축기에 이르렀을 때, 시료약물을 첨가하여 나타난 이완반응을 Van Rossum의 방법⁹⁾에 따라 생리기록계에 연속 기록하였다.

KCl 및 Carbachol 수축유도에 대한 황련추출물의 수축억제력 측정 - KCl의 농도에 따른 기관지 수축에 대하여 황련추출물의 수축억제효과를 확인하기 위하여 고¹⁰⁾의 방법을 사용하였다. 즉, 대조군으로서 KCl을 15 mM, 45 mM, 135 mM 및 180 mM 농도로 증가시키면서 수축의 정도를 먼저 측정한다. 다음, 시료약물을 KCl로 처리하기전 15분전에 전처리한 후, KCl 농도에 따른 수축억제 효과를 분석하였다. Carbachol의 농도 증가에 따른 수축반응에 대하여 황련추출물을 carbachol투여 10분전에 농도별로 전처리한 후, 수축억제효과를 고¹⁰⁾의 방법에 따라 생리기록계에 연속 기록하였다.

Calcium-free 용액에서 carbachol에 의한 세포내 Ca^{2+} 유리에 대한 황련추출물의 수축억제력 측정 - Calcium-free 용액에 기관지 절편을 현주한 후, carbachol 10^{-4} M 첨가에 의한 일시적 수축현상에 대하여 황련추출물이 어떠한 반응을 보이는지를 검토하기 위하여 시료약물을 carbachol투여 10분전에 전처리한 후, 그 수축억제효과를 장등¹¹⁾의 방법에 따라 생리기록계에 기록하였다.

Data 분석 - 시료약물의 50% 억제농도(IC₅₀)는 Computer Program¹²⁾(Pharmacological Calculation Version 4.1)을 이용하여 산출하였으며 각 실험에

는 rat 10마리를 사용하여 시료약물의 효과를 3회 측정
한 다음, 평균치(%)를 산출하였다.

결과 및 고찰

천황련, 일황련 및 모황련의 물추출물은 흰쥐의 기관
평활근에 대하여 carbachol이나 KCl에 의한 수축을 모
두 억제하였으며 그 억제효과는 천황련 > 일황련 > 모
황련의 순서로 나타났다. 즉, KCl에 의한 최대수축
(65.4 mM)에 대하여 0.01 mg/ml용량의 천황련, 일황

련, 모황련 추출물은 각각 $67.0 \pm 3.4\%$, $52.0 \pm 6.0\%$ 및
 $2.3 \pm 0.2\%$ 의 이완 효과를 나타내었다. 이들의 KCl에
대한 최대이완의 50%를 나타내는 농도(IC₅₀)는 천황
련, 일황련, 모황련의 경우 각각 0.0063 mg/ml, 0.011
mg/ml 및 0.068 mg/ml로 나타났다(Fig. 1).

혈관평활근이나 기관지평활근의 수축과 이완양상은
매우 유사하지만 이들 기관에 분포하고 있는 수용체는
각각 다른 것으로 여겨지고 있다. Rat의 기관지에는
carbachol이나 acetylcholine과 같은 약물에 반응하는
muscarine 수용체가 존재하나 histamine 수용체는
존재하지 않는다.¹¹⁾ 따라서 본 실험에서는 muscarine
수용체를 통한 수축에 대하여 시료약물의 이완효과와
아울러 carbachol에 의한 수축억제효과를 실험하였다.

황련의 추출물의 carbachol에 의한 기관지 수축에 대
하여 이완효과를 측정해 본 결과, 용량의존적으로 이완
시키는 것으로 나타났다(Fig. 2). 천황련 0.001 mg/ml
와 0.003 mg/ml의 농도에서 각각 $17.0 \pm 4.3\%$ 와 60.0
 $\pm 6.5\%$ 의 이완효과를 보여주었으며 일황련의 추출물은
0.001 mg/ml와 0.003 mg/ml에서는 각각 $9.5 \pm 5.0\%$
및 $42.0 \pm 7.0\%$ 를 나타내어 천황련보다 이완효과가 다소
약하였다. 일황련도 천황련과 마찬가지로 KCl에 의한
수축보다 carbachol에 의한 수축에 대해 보다 효과적이
었다. 모황련의 경우, 0.01 mg/ml이상의 농도에서만 이
완효과를 보였는데 0.03 mg/ml와 0.1 mg/ml에서의 이
완효과가 각각 천황련 0.003 mg/ml와 0.01 mg/ml에서
의 효과와 동일하게 나타남으로써 천황련의 약 1/10정도
의 효과밖에 없음을 알 수 있었다.

KCl에 의한 수축은 세포막 탈분극에 의하여 세포외액
의 Ca²⁺을 유입시킴으로써 궁극적으로 세포내 Ca²⁺이
증가하여 근육의 수축을 나타내는데 Fig. 3에서 밝힌바
와 같이 황련류는 모두 KCl에 의한 수축을 억제하였으며
그 EC₅₀값은 58.7 mM로서 천황련의 경우, 0.1 mg/ml
존재시 동일한 수축을 일으키는데 필요한 KCl의 농도는
166.8 mM이었으며 일황련의 경우에는 154.7 mM이, 그
리고 모황련은 68.1 mM인 것으로 나타났다. 이러한 사
실로 미루어 보아 이들 추출물이 KCl에 의한 탈분극시
유입되는 Ca²⁺을 억제하기 때문인 것으로 생각된다. 황
련 추출물은 이미 쥐의 대동맥 혈관에서 이완 효과를 나
타내었으며 그 약리기전의 일부를 α -adrenaline 수용체
차단작용과 Ca²⁺통로 차단작용일 가능성을 제시한 바 있
다.⁸⁾ 그러나 흰쥐의 기관지평활근에서는 α -adrenaline 수
용체가 존재하지 않으므로 이의 작용기전은 Ca²⁺통로 차

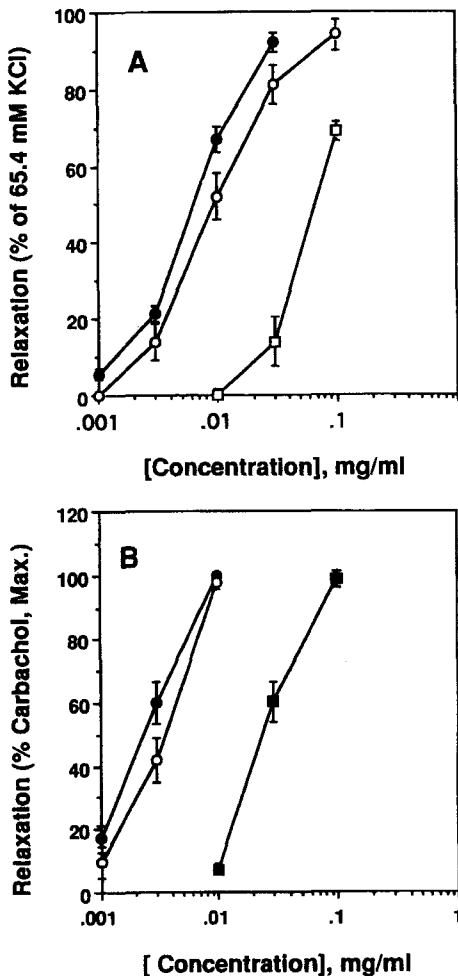


Fig. 1—Bronchodilatory effects of *Coptidis rhizoma* extracts (●, *Coptis chinensis*; ○, *Coptis japonica* and ■, root of *Coptis japonica*) on KCl-(A) and carbachol-(B) contracted rat tracheal smooth muscle. Data represent mean \pm S.E. of 3 experiments.

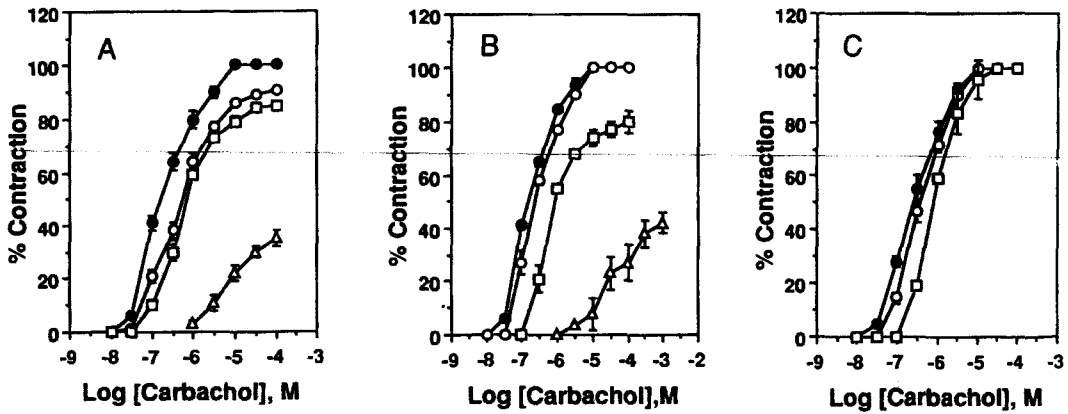


Fig. 2—Effects of pretreatment of *Coptidis rhizoma* extracts (*Coptis chinensis* (A); *Coptis japonica* (B) and root of *Coptis japonica*, (C) on carbachol-induced concentration response curves. ●: control, ○: 0.001 mg/ml, □: 0.01 mg/ml, △: 0.1 mg/ml. Data represent mean \pm S. E. of 3 experiments.

단작용일 가능성이 크다.

따라서 Ca^{2+} 억제에 대한 작용을 보다 확실히 확인하기 위하여 Ca^{2+} -free 용액에서 muscarine 수용체를 자극시 세포내 Ca^{2+} 을 유리시키는 것으로 알려진 carbachol을 사용하여 이들 시료약물이 세포내 Ca^{2+} 유리에 대한 영향을 살펴본 결과, Fig. 4에서 보는바와 같이 천황련추출물은 세포내 칼슘유리 억제효과가 있었다. 그러나 모황련 추출물은 고농도(0.1 mg/ml)에서도 거의 영향이 없었다. 이러한 사실로 미루어 볼 때, 황련류

는 세포내 칼슘유리 억제작용이 있으며 이러한 작용은 적어도 carbachol수축에 의한 이완작용과 수축억제 작용에 기인하리라 사료된다.

KCl수축에 대한 최대수축(E_{max})이 감소하는 것과 같이 carbachol에 의한 수축에서도 E_{max} 가 감소함으로써 적어도 이들 시료가 muscarine 수용체에 경쟁적으로 억제하지는 않는 것으로 생각된다. 즉, 이것은 수용체와 약물(carbachol)이 결합된 뒤, 이어서 일어나는 일련의 cascade 반응중 일부에 이들 시료가 관여함으로써 기관지 이완효과가 일어날 가능성을 시사하고 있다.

최근, Bova등¹³⁾에 의하면 혈관에서 berberine은 수축작용과 관계있는 수용체와 관련된 inositol lipid signaling system을 억제함이 보고되었는데 이러한

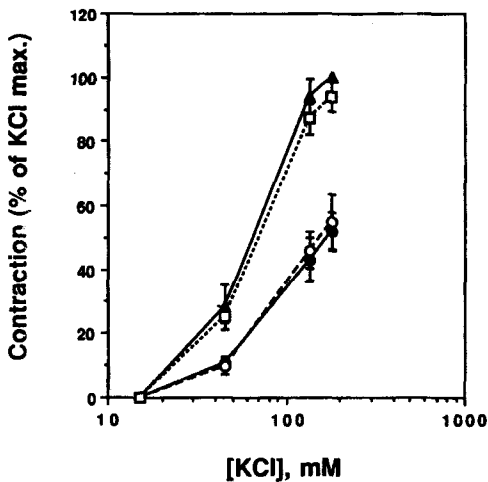


Fig. 3—Inhibitory effects of 0.1 mg/ml of each *Coptidis rhizoma* extracts (●, *Coptis chinensis*; ○, *Coptis japonica* and □, root of *Coptis japonica*) on KCl-induced contraction. Data represent mean \pm S. E. of 3 experiments.

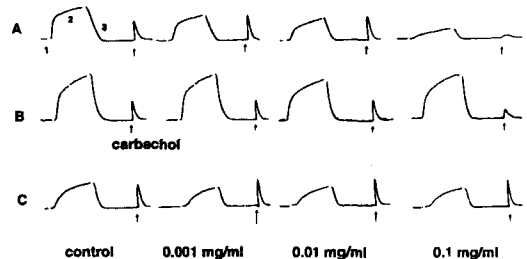


Fig. 4.—Typical tracing of carbachol-induced initial phasic contraction in rat tracheal smooth muscle in Ca^{2+} -free solution. A: *Coptis chinensis*, B: *Coptis japonica* and C: root hair of *Coptis japonica*. Arrow indicates addition of carbachol (10^{-4} M). 1: high K^+ - Ca^{2+} -free Krebs solution and 2: high K^+ , Ca^{2+} -containing Krebs solution and 3: high K^+ , Ca^{2+} -free Krebs solution.

사실은 위의 실험결과를 더욱 뒷받침한다고 할 수 있다.

따라서 보다 정확한 작용기전을 밝히기 위해서는 분자수준에서의 추가 연구가 필요하다. 그러나 본 연구에서 나타난 결과만으로 볼 때, 적어도 기관지 이완작용의 일부 기전도 세포내 칼슘저장소로부터 칼슘의 유리억제와 세포내부로 칼슘의 유입억제에 의하여 나타나는 것으로 보인다.

결론적으로 본 연구에서는 황련의 추출물이 기관지 이완작용을 가지고 있음을 처음으로 확인하였으며 또한 이들의 작용기전도 혈관에서 보인바와 같이⁸⁾ 칼슘 유입억제 효과와 세포내 칼슘유리 억제작용이 깊이 관여되는 것으로 생각된다.

결 론

천황련, 일황련, 모황련의 물추출물이 쥐의 기관지 평활근 이완 및 수축 억제에 미치는 효능을 실험하여 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. Carbachol 및 KCl에 의한 기관지근 수축에 대한 이완작용은 천황련, 일황련의 순서로 강하였으며 모황련은 효과가 매우 약하였다.

2. 3종 황련추출물 모두 KCl에 의한 수축보다는 carbachol에 의한 수축에 대해 더 강한 이완반응을 나타내었다.

3. 천황련 및 일황련은 기관지 평활근의 세포내 칼슘유리 억제작용이 있으며 이러한 작용은 칼슘유입억제작용과 더불어 기관지 수축억제 및 이완작용에 중요한 역할을 할 것으로 생각된다.

4. 황련 추출물들은 수용체(carbachol)를 통한 반응에 대하여 탈분극(KCl)을 통한 자극보다 더욱 민감한 반응을 보임으로서 칼슘유입 억제 작용이외에도 수용체를 통한 여러과정 반응단계에 관여하여 기관지 평활근의 이완이 일어 날 것으로 사료된다.

문 헌

- 1) 申信求 : 申氏本草學, 壽文社, 641 (1988).
- 2) 申民教 : 原色韓國藥用植物圖鑑, 아카데미서적, 591 (1986).
- 3) 약품식물학연구회 : 藥品植物學各論, 진명출판사, 159

- (1980).
- 4) Iwasa, K., Kamigauchi, M., Ueki, M. and Taniguchi, M. : Antibacterial activity and structure-activity relationships of berberine analogs. *Eur. J. Med. Chem.* **31**, 469 (1996).
- 5) Hoshi, A., Ikekawa, T., Ikeda, Y., Shirakawa, S. and Iigo, M. : Antitumor activity of berberrubine derivatives. *Gann.* **67**, 128 (1976).
- 6) Vennerstrom, J.L. and Klayman, D.L. : Protoberberine alkaloids as antimalarials. *J. Med. Chem.* **31**, 1084 (1988).
- 7) Ivanovska, N. and Philipov, S. : Study on the anti-inflammatory action of Berberis vulgaris root extract, alkaloid fractions and pure alkaloids. *Int. J. Immunopharmacol.* **18**, 553 (1996).
- 8) Lee D.U and Chang K.C. : Calcium channel and α -receptor-blocking action of the extracts of coptidis rhizomas and their alkaloid components. *Arch. Pharm. Res.* **19**, 456 (1996).
- 9) Van Rossum J.M. : Cumulative dose-response curves. Technique for the making of dose-response curves in isolated organs and the evaluation of drugparameters. *Arch. Int. Pharmacodyn.* **143**, 299 (1963).
- 10) 고태준 : 1-(4'-Methoxybenzyl)-6, 7-dimethoxy-3, 4-dihydroisoquinoline (GS386) inhibits Ca^{2+} movement in isolated rat and guinea-pig trachealis. 경상대학교 의과대학 대학원 박사학위논문 (1992).
- 11) Chang K. C, Ko H. J, Cho S. D, Yoon Y. H. and Kim J. H. : Pharmacological characterization of effects of verapamil and GS283 on isolated guinea pig and rat trachealis. *Eur. J. Pharmacol.* **236**, 51 (1993).
- 12) Tallarida, R. J. and Murray, R. B. : *Manual of pharmacologic calculations with computer programs*, 1st ed. Springer-Verlag, p.9, New York (1988).
- 13) Bova, S., Padriani, R., Goldman, W. F., Berman, D. M. and Cargnell, G. : On the mechanism of vasodilating action of berberine: possible role for inositol lipid signaling system. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **261**, 318 (1992).