

흰쥐에서 Cumambrin A의 대동맥 이완작용

홍용근 · 양민석¹ · 박윤배*

경상대학교 응용생명과학원, 자연과학대학 생명과학부 생화학과, ¹농업생명과학대학 환경생명화학과

Effect of Cumambrin A on the Relaxation of Rat Aorta

Yonggeun Hong, Min-Suk Yang¹, and Yunbae Pak*

Department of Biochemistry, Division of Life Science, College of Natural Sciences, Graduate School of Applied Life Science,
¹Department of Agricultural Chemistry, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

Abstract – We previously reported that the exogenous administration of cumambrin A, a sesquiterpene lactone from the dried flowers of *Chrysanthemum boreale* Makino has a pharmacological effect on normalization of blood pressure in the spontaneously hypertensive rats (SHR). In the present study, we further investigated the effect of cumambrin A on the relaxation of phenylephrine-induced precontracted rat aortic artery rings. The potency of cumambrin A was then compared to verapamil, a well known Ca²⁺-channel blocker. The results demonstrate that the isolated rat aortic arteries are relaxed to basal tension at a concentration of 5×10⁻⁵M cumambrin A treatment. The results also show that the phenylephrine-induced contraction is inhibited by a pretreatment of cumambrin A. Co-treatment of cumambrin A and verapamil showed a strong synergetic effect on the relaxation of rat aortic artery rings. Thus, these data demonstrate that cumambrin A is a potent relaxant of rat aortic smooth muscle and suggest that cumambrin A modulates intracellular or extracellular Ca²⁺ mobilization.

Key words – Cumambrin A, sesquiterpene lactone, high blood pressure, smooth muscle relaxation

뇌혈관 및 심혈관질환은 고혈압이 주된 원인으로 성인 사망원인 중 암(癌) 다음으로 높은 비율을 차지한다. 본 연구는 고혈압 치료제 개발을 목적으로 고혈압 치료제의 가장 큰 단점인 고비용과 부작용을 최소화하기 위해 국내에 자생하는 산국(山菊, *Chrysanthemum boreale* M.)^{1,2)}으로부터 추출 분리한 cumambrin A^{3,4)}의 혈압강하 효능검증을 위하여 cumambrin A의 혈압 강하 작용 기작을 흰쥐의 혈관평활근을 이용하여 조사하였다.

정상적인 혈압은 Ca²⁺의 세포 내·외로의 유입 및 유출을 조절하여 세포 내에 Ca²⁺의 적정농도를 유지함으로써 골격근, 혈관과 같은 평활근, 심장근 세포의 수축이완을 조절하여 유지가 된다. 따라서 Ca²⁺의 역할은 매우 중요하며,^{5,6)} 세포 내 Ca²⁺의 농도를 적절히 조절하는 것이 고혈압 치료의 관건이라고 할 수 있다.^{7,8)} 세포에서 Ca²⁺의 적정 농도 유지는 주로 Ca²⁺-channel 및 Ca²⁺-ATPase에 의해 이루어지며, 현재 사용되고 있는 고혈압 치료를 위한 관련 약물들은 주로 Ca²⁺-channel 차단제 및 Ca²⁺-ATPase 억제제이다. 또한 ubiquitous sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase 억

제제 중 현재 가장 널리 사용되고 있는 thapsigargin^{7,9)}이 식물유래의 sesquiterpene lactone계열 중 guaianolide 합성물로서 세포내 Ca²⁺-신호전달 기작의 연구에 직접적으로 이용되는 물질인 점을 고려한다면 guaianolide type sesquiterpene lactone의 일종이며 산국의 주성분 중 하나인 cumambrin A에 대한 작용 기작 연구가 요구되어 본 실험을 실시하였다.

따라서 본 연구에서는, 산국에서 분리한 cumambrin A가 어떠한 기작을 통해서 혈압강하작용을 하며, 약리학적으로 사용이 가능할 것인가를 실험적으로 확인하기 위하여 WKY 흰쥐의 대동맥으로부터 혈관평활근을 분리하여 이완효과를 생리기록 장치로 조사하고, 기존의 고혈압 치료제인 Ca²⁺-channel 차단제 verapamil과 비교 분석하였다.

재료 및 방법

시약 – Phenylephrine, propranolol 및 verapamil (Sigma)을 사용하였으며 그 외 모든 시약은 특급시약을 사용하였다. 혈관이완실험에 사용한 Krebs' 용액의 조성은 다음과 같다. NaCl, 120; KCl, 4.75; Glucose, 6.4; NaHCO₃, 25; KH₂PO₄, 1.2; MgSO₄, 1.2; CaCl₂, 1.7 (mM, pH 7.4).

*교신저자(E-mail) : ybpak@nongae.gsnu.ac.kr
(FAX) : 055-752-7602

검액의 조제 - Cumambrin A (M.W: 308)는 Yang *et al.*,^{3,4)}과 Hong *et al.*,¹⁰⁾이 분리, 보고한 바와 같이 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 사용하였으며, DMSO의 최종 희석 액의 농도가 0.5% 이하가 되게 함으로써 DMSO의 반응을 배제하였다.

실험동물 - 본 실험에 사용한 실험동물은 10-12 개월령 (350 ± 20 g)의 Wistar Kyoto Rat (WKY)을 10마리 사용하였다.

혈관 ring 제작 - 실험동물을 경추탈골법에 의해 실신시킨 뒤 복강 정중선으로부터 흉곽상부까지 절개하여 심장과 내장장기를 완전 노출시킨 후 흉 대동맥으로부터 복대동맥까지 채취하여 95% 산소와 5% CO₂가 농축된 4°C Krebs 용액에 보관하였다. 보관된 조직은 당일에 사용하는 것을 원칙으로 하였으며, 혈관 주위 결합조직을 해부용 현미경하에서 완전히 제거하고, 4-5 mm 길이의 혈관평활근, 즉, 혈관 ring을 제작하여 혈관이완실험에 이용하였다.

혈관 ring의 장력 기록장치 - 혈관 ring은 water-jacked organ bath(10 ml)에 평행하게 위치시키고 37 ± 0.5°C로 유지하였다. 혈관 ring의 상부는 isometric force transducer(FT03, Grass)에 연결하여 ink-writing curvilinear polygraph(79, Grass)로 기록하였다. 혈관 ring의 초기장력은 2 g으로 하였고 최소한 60분의 평형시간이 경과한 뒤 실험을 시작하였으며, 각 실험간의 interval은 30분으로 하고 충분히 씻어낸 후 다음 실험을 하였다. Phenylephrine (10⁻⁶ M)을 이용하여 혈관 ring을 전 수축시킨 후 다양한 농도의 cumambrin A 와 verapamil의 효과를 혈관이완의 변화로 확인하였다.

결과 및 고찰

Cumambrin A의 혈관평활근 이완효과 - 재료 및 방법에서 서술한 바와 같이 WKY쥐로부터 분리한 대동맥을 organ chamber 내에 위치시키고 polygraph를 이용하여 혈관이완 실험을 실시하였다 (Fig. 1). 적출된 혈관평활근은 phenylephrine (PE) (10⁻⁶ M)을 처리하여 전 수축시킨 뒤 cumambrin A (C-A)를 지시된 농도 별로 처리하면서 혈관평활근의 농도의존적인 이완작용을 관찰하였다. Cumambrin A의 효과는 10⁻⁷ M에서 이완을 나타내기 시작하여 10⁻⁴ M의 농도에서 현저한 이완을 나타내었다. 따라서 1 uM 농도에서 50%의 이완을 보였고 100 uM 농도에서는 최대인 100%의 이완효과를 나타내었다 (Fig. 1A). Phenylephrine에 의한 혈관평활근의 수축이 세포 내·외의 Ca²⁺을 동원한 결과인 것을 감안할 때, Fig. 1A에서 보여준 cumambrin A에 의한 혈관 이완효과는 Ca²⁺이 직·간접적으로 관련되어 있음을 알 수 있었다. 그러나 이러한 혈관 이완효과가 혈관평활근의 이완성 자율신경을 통한 결과일수도 있으므로 이를 확인하기 위해 혈관이완신경 차단제 (beta-adrenoreceptor

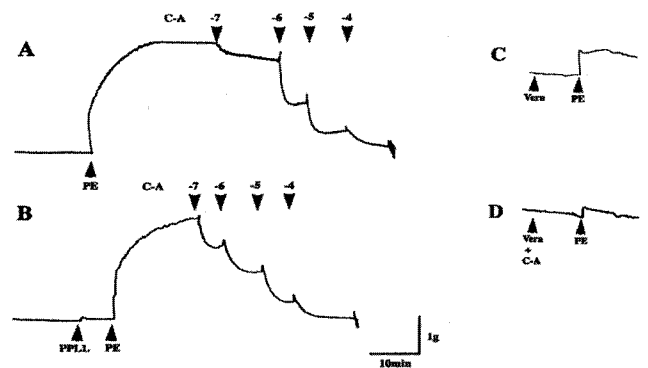


Fig. 1. Effects of cumambrin A and verapamil on the relaxation of phenylephrine-induced contraction in rat aortic artery rings. A, Cumambrin A (C-A) dose-dependent relaxation of the phenylephrine-induced precontracted rat aortic artery. B, Cumambrin A dose responsive relaxation effect on the phenylephrine-induced contraction in the propranolol (PPLL) (10⁻⁵ M) pretreated rat aortic artery. C, Verapamil (Vera) (10⁻⁶ M) alone and D, verapamil plus cumambrin A treatment showing the verapamil mimetic action of cumambrin A (10⁻⁵ M). Numbers indicate the applied concentration of cumambrin A at indicated time points and shown as Log(C-A) M.

blocker)인 propranolol (PPLL)을 전 처리한 후 cumambrin A를 처리하여 관찰한 결과, 역시 강한 이완효과를 나타내었다 (Fig. 1B). 이러한 결과는 cumambrin A에 의한 혈관 이완효과가 혈관에 분포하는 신경작용과 무관하다는 것을 간접적으로 암시하나, muscarinic-, histamine-관련 receptor-mediated relaxation에 대한 더욱 자세한 연구가 수행되어야 할 것이다. 흥미로운 점은 혈관 내피세포의 유무에 대한 cumambrin A의 ED₅₀은 각각 7.5 × 10⁻⁵ M과 10⁻⁴ M이였으며 cumambrin A의 농도가 증가할수록 이완 정도의 차이는 현저해짐을 관찰할 수 있었는데,¹⁰⁾ 이는 cumambrin A가 혈관 내피세포에 작용하여 혈관의 이완인자(EDRF: Endothelium derived Relaxing Factors)의 유리에도 관여할 뿐만 아니라, 직접적으로 혈관의 평활근에 작용하는 효과도 있는 것으로 추측된다.

따라서 Ca²⁺과의 관련성을 규명하기 위해 Ca²⁺-channel 차단제인 verapamil (Vera)과 cumambrin A를 동시에 처리하여 그 효과를 관찰하였다. Fig. 1C와 D에서 보여주는 바와 같이 phenylephrine에 의한 혈관평활근의 수축작용이 verapamil 과 cumambrin A의 복합처리에 의해 강하게 억제됨을 나타내었는데, 이러한 결과는 cumambrin A가 세포 외 Ca²⁺의 세포 내로의 동원을 억제시키는 작용을 하는 것을 보여주고 이로 인해 혈관 수축의 억제효과에 synergy 효과를 나타내었다.

Cumambrin A와 Ca²⁺-channel 차단제 verapamil의 혈관평활근 이완효능 비교 및 synergy 효과 - Fig. 1D에서 보여준 cumambrin A의 혈관 이완효과와 Ca²⁺과의 관련성

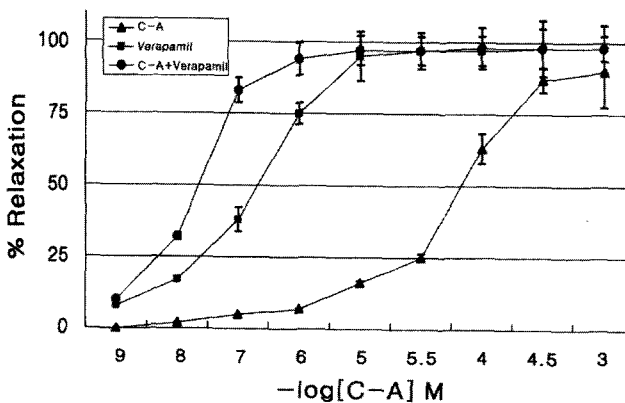


Fig. 2. Dose response curves showing the effects of cumambrin A (C-A), verapamil and cumambrin A plus verapamil (C-A + verapamil) on the relaxation of phenylephrine-induced contraction in rat aortic artery rings. The results are measured as peak amplitudes and expressed as percentages of the phenylephrine-induced contraction in the same strips. Values represent the means \pm S.E. of 5–7 separated experiments performed.

은 고혈압 모델 동물인 SHR쥐에서 보여준 cumambrin A의 혈압강하효과¹⁰⁾의 작용기작을 설명하여 준다. 따라서 더욱 자세한 약리학적 비교분석을 위해 기존의 고혈압 치료제로 사용되는 세포막의 Ca^{2+} -channel 차단제인 verapamil과 cumambrin A의 농도의존적 혈관평활근 이완효과를 조사하였다. Fig. 2에서 보여주는 바와 같이 저 농도 (10^{-9} – 5×10^{-5} M)에서는 cumambrin A의 potency가 verapamil에 비해 100배 이상 낮았으나 혈관이완 효과는 농도 의존적으로 상승하는 경향을 나타냈으며 고 농도 (100 μ M 이상)에서는 verapamil과 상응한 효과를 나타내었다. 또한 cumambrin A와 verapamil을 동시에 처리했을 때 Fig. 1D에서와 같이 아주 강한 synergy 효과를 보여주었고, 특히 100 nM의 농도에서는 verapamil 단독 처리 군보다 2배 이상 강한 이완효과를 나타내었다. 이러한 결과는 cumambrin A가 verapamil과 같이 세포외부의 Ca^{2+} 의 세포 내 유입을 차단해 주는 역할을 하고 있음을 다시 한번 검증하며, 특기할 사항은 기존의 고혈압 치료제인 verapamil은 비가역적 Ca^{2+} -channel 차단제인 반면 cumambrin A의 경우는 Hong *et al.*,¹⁰⁾의 고혈압 SHR쥐의 *in vivo* 혈압강하 실험에서 보여주었듯이 가역적 차단제로 작용하므로 부작용을 배제할 수 있다는 중요한 장점을 보여주었다.

결 론

산국으로부터 분리한 cumambrin A의 혈관평활근 이완효과의 약리학적 작용기작을 WKY 흰쥐의 흉 대동맥 혈관을 이용한 organ chamber 혈관 장력 실험으로 verapamil과 비교 하여 다음과 같은 결론을 얻었다. 1) Phenylephrine으로

유도된 혈관 장력은 cumambrin A의 농도 증가에 따라 감소하였고, 5×10^{-4} M에서 최대의 이완을 나타내었다. 2) Cumambrin A의 혈관 이완효과는 기존의 Ca^{2+} -channel 차단제인 verapamil에 비해 100배 이상 낮았지만 농도의존적으로 혈관이완 효과를 상승시켜 고농도의 cumambrin A에서는 verapamil에 상응한 효과를 보여주었다. 3) Cumambrin A를 verapamil과 복합 처리했을 때는 탁월한 synergy 혈관 이완효과를 나타내었다. 4) Cumambrin A의 혈관이완효과는 Ca^{2+} -channel을 통한 세포 외 Ca^{2+} 의 세포 내로의 동원을 차단함으로써 나타나는 결과임을 확인하였다. 따라서 고혈압 모델동물인 SHR쥐에서의 혈압강하효과가 혈관의 수축을 가역적으로 억제함으로써 혈압을 강하시킨다는 것과 cumambrin A가 저혈압을 유발하지 않으면서 가역적 대사를 통한 조적독성이 없다는 사실¹⁰⁾을 다시 한번 검증한다. 따라서 cumambrin A의 작용은 기존의 혈압강하제의 부작용을 교정하며 약리학적 단독 혹은 복합적용의 가능성을 제시한다.

감사의 글

저자들은 혈관이완실험을 위한 장비 사용을 허락해 준 경상대학교 수의과대학의 김주현 교수께 감사의 마음을 전한다. 본 연구는 KOSEF R01-1999-00091, 경상남도 생명공학 기술개발사업 2000 및 BRAIN KOREA 21의 지원으로 수행되었다.

인용문헌

- 고경식(1991) 한국식물검색도감. 아카데미서적 p.329.
- 이창복(1989) 대한식물도감, 향문사 p.817.
- Yang, M. S., Park, K. H., Jang, D. S., Choi, S. U., Nam, S. H. and Shiro, M. (1996) Cumambrin A in chrysanthemum boreale makino preparation, X-ray crystal structure and ^{13}C - and 1H -NMR study of cumambrin A. *Kor. J. Pharmacogn.* **27**: 207-211.
- 남상해, 최상도, 최진상, 장대식, 최상욱, 양민석(1997) 산국으로부터 분리한 Sesquiterpene lactones의 흰쥐 복수압에 대한 효과. *한국식품영양과학회지* **26**: 144-147.
- Failli, P., Ruocco, C., Fazzini, A. and Giotti, A. (1997) Calcium waves in unstimulated left ventricular cardiomyocytes isolated from aged spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **237**: 103-106.
- Meldolesi, J. and Pozzan, T. (1998) The endoplasmic reticulum Ca^{2+} store: a view from the lumen. *Trends Biochem. Sci.* **23**: 10-14.
- Treiman, M., Caspersen, C. and Christensen, S. B. (1998) A tool coming of age: thapsigargin as an inhibitor of sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases. *Trends Biochem.*

- Sci.* **19**: 131-135.
8. Mathis, S. A., Criscimagna, N. L. and Leeb-Lundberg, F. (1996) B1 and B2 kinin receptors mediate distinct pattern of intracellular Ca^{2+} signaling in single cultured vascular smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* **50**: 128-139.
 9. Smitt, U. W., Jager, A. K., Adersen, A. and Gudiksen, L. (1995) Comparative studies in phytochemistry and fruit anatomy of *Thapsia garganica* and *T. trabs tagana*, Apiaceae (Umbelliferae). *Botanical J. Linnean Soc.* **117**: 281-292.
 10. Hong, Y., Yang, M-S., and Pak, Y. (1999) Effect of cumambrin A treatment on blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Kor. J. Pharmacogn.* **30**: 226-231.

(2005년 1월 8일 접수)