

가미천마구등음이 고혈압 병태모델에 미치는 영향

송병용 · 홍 석 · 김동희¹ · 전상윤*

동신대학교 한의과대학 내과학교실, 1:대전대학교 한의과대학 병리학교실

Effect of Kamicheonmagudeungeum on Hypertension

Byoung Yong Song, Suk Hong, Dong Hee Kim¹, Sang Yun Jeon*

Department of Internal medicine, College of Oriental Medicine, Dongshin University,
1: Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University

Kamicheonmagudeungeum(KCGE), a traditional herbal medicine, has been used as a therapeutic agent for the treatments of acute stage of hypertension. We evaluated the effects of KCGE on hypertension induced by DOCA-salt in rats. The systolic blood pressure and pulse rate significantly lowered by oral administration with KCGE. The levels of plasma hormones including dopamine, epinephrine and norepinephrine, and serum electrolyte were also reduced in KCGE treated rats. In addition, the production of reactive oxygen species (ROS) were greatly decreased by the treatment with KCGE in cultured bovine endothelial cells and angiotensin converting enzyme (ACE) activities were also inhibited by KCGE in a dose dependent manner. This study indicated that KCGE is a safe and effective treatment for hypertension.

Key words : Kamicheonmagudeungeum(KCGE), DOCA-salt, hypertension, free radical

서 론

고혈압은 발생 빈도가 매우 높은 질환의 하나로, 90 %를 차지하는 본태성 고혈압과 2차성 고혈압으로 분류된다. 이 중 본태성 고혈압은 Na⁺ 축적이 쉽게 일어나는 등의 유전적 요인과 염분의 과도한 섭취, 운동부족, 비만, 금연, 음주 및 스트레스 등 일상생활에서 습관적으로 일어나는 환경적인 요인에 의해 발병한다¹⁾. 특히 특정한 원인에 의한 것이 아닌 복수의 원인에 의해 발병하는 질병으로 알려져 있어, 이에 관한 연구도 다각적인 측면에서 진행되고 있다.

현재 다용되는 치료제로는 이뇨제, ACE 저해제, 안지오텐신 수용체 차단제, K⁺ 채널 차단제 등이 사용되고 있으나, 투여량과 투여 기간에 따른 부작용과 혈관 부종, 신기능장애, 두통, 변비 등 직·간접적인 부작용^{2,3)} 등이 나타나고 있다. 한의학에서 고혈압은 '頭痛', '眩暈' 등의 병증에 해당되고, 광범위하게는 '心悸', '中風'과도 일정한 관계가 있는 것으로 인식되고 있다^{4,6)}. 치료 원칙은 이 역시 먼저 虛實을 판단하는데, 實證은 대체로 風陽痰火로 인한 경우가 많아 平肝熄風, 清火化痰 등의 치법이, 虛證은 肝

腎陰虛, 心陰虛로 인한 경우가 많아 滋養肝腎, 養心 등의 치법이 보편적으로 활용되고 있다^{7,8)}.

본 시료인 加味天麻鉤藤飲(KCGE)은 《雜病證治新義方》에 기재된 天麻鉤藤飲⁹⁾의 變方으로 임상에서 실증으로 나타나는 두통, 현훈, 이명, 고혈압 등에 응용되고 있는 처방이다. 비록 본 시료와 구성 약물과 용량은 다르지만 이에 관한 실험적 연구로 박¹⁰⁾은 '항스트레스효과'를, 배¹¹⁾는 '심혈관작용'을, 정¹²⁾은 '항간질성효과'를, 강¹³⁾은 '뇌조직에서 생화학적 변화에 미치는 영향을 각각 보고한 바가 있다.

본 연구에서는 임상에서 초기 실증성 고혈압에 활용되고 있는 가미천마구등음(KCGE)의 항고혈압 작용을 규명하기 위하여 DOCA-salt에 의해 유도된 고혈압 rat에서의 관련 인자들에 대한 변화 및 항산화 효과를 측정하였다.

실 험

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 가미천마구등음 (Kamicunmagudeungeum, 이하 KCGE로 지칭함)의 구성 약물은 대전대학교 부속한방병원에서 구입 후 정선하여 사용하였다.

* 교신저자 : 전상윤, 광주시 남구 월산동 377-12, 동신대학교 한의과대학

· E-mail : damiano70@hanmail.net, · Tel : 062-350-7207

· 접수 : 2007/03/09 · 채택 : 2007/04/09

Table 1. The Composition of Kamicheonmagudeungeum (KCGE)

韓藥名	生藥名	用量 (g)
鈎鈎藤	<i>Uncaria Ramulus et Uncus</i>	16
石決明	<i>Concha Haliotidis</i>	16
龍骨	<i>Fossilia Ossid Mastodi</i>	16
牡蠣	<i>Concha Ostreae</i>	16
白何首烏	<i>Cynanchi Wilfordii Radix</i>	8
杜沖	<i>Eucomiae Cortex</i>	8
夏枯草	<i>Prunellae Spica</i>	8
牛膝	<i>Achuranthis Radix</i>	6
甘菊	<i>Chrysanthemi Flos</i>	6
決明子	<i>Cassiae Semen</i>	6
天麻	<i>Gastrodiae Rhizoma</i>	4
黃芩	<i>Scutellariae Radix</i>	4
遠志	<i>Polygalae Radix</i>	4
石菖蒲	<i>Acori Graminei Rhizoma</i>	4
豨薟(酒蒸)	<i>Siegesbeckiae Herba</i>	8
丹蔘	<i>Salviae Radix</i>	6
山查肉	<i>Crataegi Fructus</i>	6
荊芥	<i>Nepetae Spica</i>	6
Total amount		148

2) 동물

본 실험에 사용된 실험용 쥐는 7주령, 체중 200-220 g의 雄性 SD (Sprague- Dawley Rat, 대한바이오링크, 충주, Korea)은 실험 당일까지 고형사료 (슈퍼피드, 강원도, Korea)를 자유 식이 하면서 물을 충분히 공급하였다. 실온 22 ± 2 °C, 상대습도 50 ± 10 %, 조명시간 12시간 (07:00 ~ 19:00), 조도 150 ~ 300 Lux로 설정하여 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 체중 변화가 일정하고 건강한 쥐만을 선별하여 실험에 사용하였다.

2. 방법

1) 약물 추출

시료 추출 방법은 KCGE 5첩을 한약 약탕기 (DWP-1800T, 대웅)에 넣고, 정제수 (동원샘물) 1500 ml와 같이 혼합하여 3시간 열탕하여 추출한 후 흡입 여과하였다. 이를 rotary vacuum evaporator (Büchi 461, EYELA)에서 감압 농축하여 KCGE를 분리한 후, 다시 동결건조기 (EYELA, FDU-540, Japan)에서 24시간 동결 건조하여 분말 35 g을 얻었으며, 얻어진 분말은 초저온냉동고 (-80 °C)에서 보관하면서, 실험에 따라 필요한 농도로 증류수에 희석하여 사용하였다.

2) Human fibroblast cells(hFCs) 배양

피부 조직을 cool D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단한 다음, conical tube (15 ml)에 넣어 1,400 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 이 tube에 RPMI 1640 {containing collagenase A (5 mg/ml, BM, Indianapolis, IN, USA)와 DNase type I (0.15 mg/ml, Sigma. Co., U.S.A.), antibiotics (penicillinm 10⁴ U/ml, streptomycin 10 mg/ml, amphotericin B 25 µg/ml)}를 넣고 37 °C CO₂ 배양기에서 hFCs를 2 시간 동안 배양하였다. 여기에 0.5 % trypsin-0.2 % EDTA를 첨가하여 30 분간 배양하고, 인산완충 생리식염수 (PBS)로 약 2회 1,500 rpm에서 원심분리한 후 RPMI 1640-10 % FBS로 1주일 동안 배양하였다. 이를 다시 0.5 % trypsin-0.2 % EDTA로 분리하였으며, 이를 연속으로 1주일씩 3

회 반복한 후 살아있는 부착세포를 RPMI 1640-10% FBS 배양액에서 배양하였다.

3) Cell viability 측정

세포독성 측정은 MTT assay로 하였다. 배양한 human fibroblast cells를 96 well plate에 2×10⁴ cell 씩 분주한 후 배양하고, 24시간 후 KCGE를 500, 250, 125, 62.5, 31.25 µg/ml 농도로 투여하였다. 다시 48시간 배양 후 부유액을 제거하고, 각 well에 MTT solution (0.5 mg/ml) 100 µl 씩 첨가하여 4시간 동안 배양하였다. 배양 후 부유액을 제거하고 각 well에 100 µl의 DMSO를 첨가하여 37 °C CO₂ 배양기에서 30분 동안 반응시킨 후 ELISA reader를 사용하여 wave length 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) 항산화 활성 측정

(1) 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 소거능 측정

150 mM DPPH/EtOH 450 에 KCGE를 1000, 500, 250, 125, 62.5 µg/ml 농도로 희석하여 50 µl씩 첨가한 후 37 °C에서 30분간 반응시켰다. 이를 흡광도 517 nm에서 측정하여 아래의 방법으로 계산하였다.

$$\text{DPPH 소거능 (\%)} = \left(\frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{KCGE 투여군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

(2) Reactive Oxygen Species(ROS) 측정

Bovine endothelial cells (CPEA) 내에서 생성된 ROS를 측정하기 위하여 24 well plate의 각 well에 5 × 10⁵ cells씩을 분주하고, 50 µM의 H₂O₂를 처리한 후 KCGE 100, 50 µg/ml를 처리하고, 37 °C, CO₂ 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichloro dihydrofluorescein diacetate, acetylesther (CM-H₂DCFDA) 50 mM을 처리하여 5 분간 배양한 후, 2회 수세하였다. 이를 유세포형광분석기로 세포내형광 ROS를 측정하였으며, 대조군은 H₂O₂만 처리하였다.

5) Angiotensine converting enzyme(ACE) 저해능 측정

Cushman & Cheung 의 방법¹⁴⁾으로 측정하였다. 각 농도 (1000, 500, 250, 125, 62.5 µg/ml)의 KCGE 10 µl, 기질 Hip-His-Leu 110 µl, 그리고 ACE 용액 30 µl을 혼합하여 37°C에서 60분 동안 반응시킨 후 1N HCl 110 µl를 넣어 반응을 정지시켰다. 이 반응액에 1 ml의 ethyl acetate를 넣고 교반 후 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 얻은 상층액 750 µl를 95°C에서 10분 동안 건조하여 용매를 완전히 제거하고, 1 ml의 증류수로 용해시켜 228 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료 대신 증류수를 혼합시켰다.

$$\text{ACE inhibition activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{KCGE 투여군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

6) DOCA-salt에 의한 고혈압 유발

Sprague-Dawley (SD) rat 을 무작위로 6마리씩 나누어 정상군 (Normal), 대조군(Control) 그리고 실험군 (KCGE)으로 설정하였다. 대조군과 KCGE 투여군은 deoxycorticosterone acetate (DOCA) 25 mg/kg을 주 3회씩 8주간 피하 주사와 함께 1 %

NaCl을 식수로 제공 하였고, 실험군은 KCGE를 성인 기준 하루 두 첩 분량 (117 mg/kg)으로 매일 투여하였다.

7) 체중 및 장기 무게 측정

몸무게는 실험 종료 하루 전에 전자저울 (CAS, Korea)을 이용하여 측정하였다. 심장과 신장은 ether로 마취 후 채혈한 다음에 적출하여 지방과 다른 조직들을 제거 하였다. 그리고 10% 포르말린에 넣어서 3시간 정도 방치 후 무게를 측정하여 몸무게에 대한 무게를 나타내었다.

8) 혈압 및 심박수 측정

혈압과 심박수는 혈압측정기 (CODA6, Kent, U.S.A)를 사용하여 측정하였다. 동물들의 안정을 위해 측정 전에 3회 이상 휴더에 적응을 시켰고, 혈압과 심박수는 10회 이상 측정하여 평균을 결과로 사용하였다.

9) 채혈 및 혈장 성분 측정

KCGE의 투여 종료 후 12시간 절식 후 ether로 마취시킨 다음 심장에서 12 ml이상의 혈액을 취하여 5 ml을 15 ml conical tube에 넣어 6,500 rpm에 15분간 원심 분리시켜 혈청을 분리하였다. 나머지 6 ml의 혈액을 EDTA 첨가 튜브에 넣어 혈장을 분리하였다. 분리한 혈청은 생화학 기기 (AU400, Olympus, U.S.A)를 이용하여 GOT, GPT, BUN, creatinine, uric acid를 측정하였고, Na⁺, K⁺, Cl⁻의 측정은 전해질 측정기 (NOVA5, Japan)를 이용하였다. 혈장 성분은 감마 카운터기 (WIZARD 1470, Finland)를 이용하여 핵의학적인 방법으로 aldosterone, dopamine, epinephrine, norepinephrine, 을 측정하였다.

10) 통계처리

본 실험에서 얻은 결과를 ANOVA multi t-test (JAVA, Bonferroni Ver 1.1)로 분석하여 p값을 구하였다. 각 실험군을 대조군 및 정상군과 비교하여 p<0.05 일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 독성검사

hFCs에 대한 세포독성을 관찰한 결과, 대조군의 세포생존율이 100±2.4 (%)인데 비하여, KCGE 투여군 500, 250, 125, 62.5, 31.25 (µg/ml)의 농도에서는 각각 82.4±1.8, 93.3±3.2, 93.6±3.6, 94.1±0.9, 95.2±4.6 (%)로 나타났다. KCGE의 투여에 의한 간 기능을 측정한 결과 모든 실험군에서 GOT와 GPT의 수치가 정상 범위로 KCGE에 의한 간 독성이 없는 것으로 나타났다(Table 2).

Table 2-1. Cytotoxicity of KCGE on Human Fibroblast Cells(hFCs).

Dose (ug/ml)	control	500	250	125	62.5	31.25
Cell viability(%)	100±2.4	82.4±1.8	93.3±3.2	93.6±3.6	94.1±0.9	95.2±4.6

Human lung fibroblast cells (hFCs) were treated with various concentration (31.25, 62.5, 125, 250, 500 µg/ml) of the KCGE extract.

Table 2-2. Effect of KCGE on the GOTand GPT in DOCA-salt hypertensive rat.

Group	Normal	Control	KCGE
GOT (I.U/l)	134.7±5.9	194.0±28.9*	138.7±10.2
GPT (I.U/l)	48.0±6.1	57.2±12.8	52.5±5.1

Normal : Normal SD rat. Control : DOCA-Salt, KCGE : DOCA-Salt and KCGE. Values represent the means ± SD of 6 rats. * : P <0.05 compared to normal

2. DPPH 소거능에 미치는 영향

KCGE에 의한 DPPH의 소거 활성은 1000, 500, 250, 125, 62.5 (µg/ml) 농도에서 각각 75.5±1.5, 73.6±0.8, 73.1±0.4, 63.6±1.9, 51.8±1.7 (%)의 소거활성 효과를 나타내었다(Fig. 1).

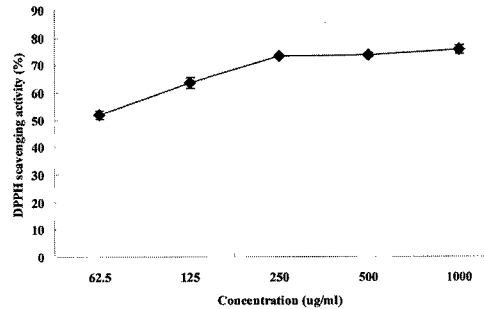


Fig. 1. Scavenging activity of KCGE on DPPH free radical. KCGE were reacted with DPPH for 30 minutes at 37 °C, and the absorbance at 517nm due to DPPH radical was determined. The results are the mean ± SD of three independent experiments.

3. ROS에 미치는 영향

Bovine 혈관 내피 세포에서 KCGE에 의한 ROS의 감소 효과를 측정된 결과, 대조군에 비하여 KCGE투여로써 ROS의 생성량이 농도 의존적으로 감소하였다(Fig. 2).

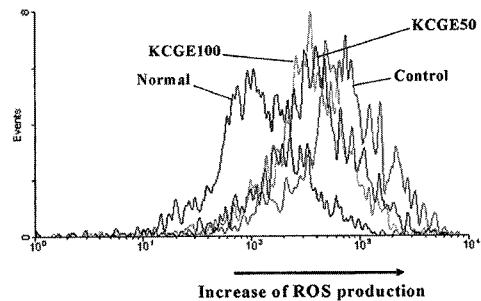


Fig. 2. The inhibitory effect of KCGE on Radical Oxidative Species. CPEA cells were incubated with KCGE for 24hr at 37 °C. The cells were stressed with hydrogen peroxide(H₂O₂) for 30min and were labeled with DCF-DA for 5min. Normal: CPEA cells, Control: CPEA cells and H₂O₂, KCGE100: CPEA cells and H₂O₂ and KCGE 100µg/ml, KCGE 50: CPEA cells and H₂O₂ and KCGE 50 µg/ml.

4. ACE 저해능에 미치는 영향

ACE저해 활성을 측정된 결과, 1000, 500, 250, 125, 62.5 (µg/ml) 농도에서 각각 67.1±4.9, 64.6±1.30, 60.3±2.5, 48.7±2.2, 27.1±1.8 (%)의 저해 효과를 나타내었다(Fig. 3).

5. 체중 및 장기 무게에 미치는 영향

DOCA-salt 고혈압 쥐의 몸무게를 측정된 결과, 대조군은 420.8±27.9 (g), 정상군은 488.3±12.1 (g)으로 나타나, 정상군에 비하여 대조군에서 유의성 있는 (***) : P <0.001) 감소를 나타내었다. KCGE 투여군은 469.3±14.8 (g)으로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 (++) : P <0.01) 증가하여 정상군에 가까운 몸무게를 유지하였다. 몸무게에 대한 심장과 신장의 무게에 미치는 영향을

측정한 결과, 심장은 대조군이 4.1±0.2/Body Weight (mg/g), 정상군은 3.5±0.2/BW (mg/g)으로 나타나 유의성이 없었고, KCGE 투여군은 3.6±0.2/BW (mg/g)으로 나타나 이 역시 유의성 있는 차이를 나타내지 않았다. 신장의 무게는 대조군이 4.7±0.3/BW (mg/g), 정상군이 3.2±0.1/BW (mg/g)으로 나타나 정상군에 비하여 대조군에서 유의성 있는 (***) : P <0.001) 증가를 나타내었다. 반면 KCGE 투여군은 3.9±0.2/BW (mg/g)으로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 (+ : P <0.05) 증가하여, 정상군에 가까운 신장 무게를 유지하였다(Table 3).

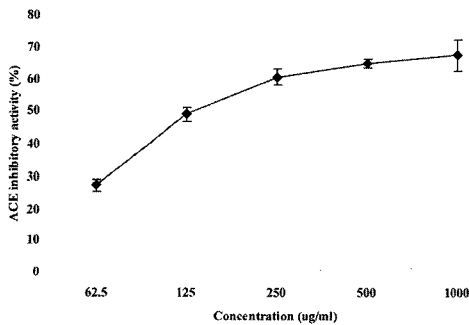


Fig. 3. The inhibitory effect of KCGE on ACE. Inhibitory activity on angiotensin converting enzyme of KCGE at final concentration 62.5, 125, 250, 500, 1000 µg/ml. The results are the mean ± SD of three independent experiments.

Table 3. Effect of KCGE on the Weight of Body, Heart and Kidney in DOCA-salt Hypertensive Rat

Group	Normal	Control	KCGE
Body weight(g)	488.3±12.1	420.8±27.9***	469.3±14.8 ⁺⁺
Heart weight/ Body weight (mg/g)	3.5±0.2	4.1±0.2	3.6±0.2
Heart weight/ Body weight (mg/g)	3.2±0.1	4.7±0.3***	3.9±0.2 ⁺

The control group were injected subcutaneous with DOCA for 8 weeks (three times a week, 25 mg/kg). The KCGE group were injected subcutaneous with DOCA and orally administered with KCGE extract for 8 weeks (once a day, 0.15 g/kg/200 ul). Normal : Normal SD rat. Control : DOCA-Salt, KCGE : DOCA-Salt and KCGE. Values represent the means ± SD of 6 rats. *** : P <0.001 compared to normal group. ++ : P <0.01, + : P <0.05 compared to control group.

6. 혈압과 심박수에 미치는 영향

DOCA-salt 고혈압 쥐의 혈압에 미치는 영향을 측정한 결과, 대조군은 175.2±5.4 (mmHg), 정상군은 129.1±1.2 (mmHg)로 나타나 정상군에 비하여 대조군에서 유의성 있는 (***) : P <0.001) 증가를 나타내었다. KCGE 투여군은 149.8±6.2 (mmHg)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (+++ : P <0.001) 강압 효과를 나타내었다(Fig. 8). 심박수에서는 대조군은 419.8±36.3 (times/min), 정상군은 336.1±7.1 (times/min)로 나타나 정상군에 비하여 대조군이 유의성 있는 (** : P <0.01) 증가를 나타내었다. KCGE 투여군은 353.3±25.4 (times/min)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (+ : P <0.05) 감소 효과를 나타내었다(Table 4).

7. 혈청내 hormone 농도 변화에 미치는 영향

DOCA-salt 고혈압 쥐의 plasma aldosterone에 미치는 영향을 측정한 결과, 대조군은 117.2±24.2 (pg/ml), 정상군은 44.1±9.9 (pg/ml)로 나타나 정상군에 비하여 대조군에서 유의성 있는 (** : P <0.01) 증가를 나타내었다. 반면 KCGE 투여군은 57.9±18.2 (pg/ml)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (++) : P <0.01) 감소 효과를 나타내었다. Dopamine에서도 대조군은 165.2±29.2 (pg/ml), 정상군은 102.5±0.9 (pg/ml)로 나타나, 정상군에 비하여 대조군에서 유의성 있는 (* : P <0.05) 증가를 나타내었다. KCGE 투여군은 115.9±3.6 (pg/ml)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (+ : P <0.05) 감소 효과를 나타내었다. Epinephrine 에서는 대조군은 4772.2±267.5 (pg/ml), 정상군은 2640.5±159.5 (pg/ml)로 나타나 정상군에 비하여 대조군에서 유의성 있는 (** : P <0.01) 증가를 나타내었다. KCGE 투여군은 3287.7±767.4 (pg/ml)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (+ : P <0.05) 감소 효과를 나타내었다. Norepinephrine에서는 대조군은 511.2±32.9 (pg/ml), 정상군은 415.8±2.5 (pg/ml)로 나타나 정상군에 비하여 대조군에서 유의성 있는 (** : P <0.01) 증가를 나타내었다. KCGE 투여군은 463.2±44.7 (pg/ml)으로 나타나 대조군에 비하여 감소 하였으나 유의성은 나타나지 않았다(Table 5).

Table 4. Effect of KCGE on the Blood Pressure and the Heart Rate in DOCA-salt Hypertensive Rat

Group	Normal	Control	KCGE
Blood pressure (mmHg)	129.1±1.2	175.2±5.4***	149.8±6.2 ⁺⁺⁺
Pulse rate (times/min)	336.1±7.1	419.8±36.3**	353.3±25.4 ⁺

Normal : Normal SD rat. Control : DOCA-Salt, KCGE : DOCA-Salt and KCGE. Values represent the means ± SD of 6 rats. *** : P <0.001, ** : P <0.01 compared to normal group. +++ : P <0.001, + : P <0.05 compared to control group.

Table 5. Effect of KCGE on the Plasma Aldosterone, Dopamine, Epinephrine, Norepinephrine in DOCA-salt Hypertensive Rat.

Group	Normal	Control	KCGE
Aldosterone (pg/ml)	44.1±9.9	117.2±24.2**	57.9±18.2 ⁺⁺
Dopamine(pg/ml)	102.5±0.9	165.2±29.2*	115.9±3.6 ⁺
Epinephrine(pg/ml)	2640.5±159.5	4772.2±267.5**	3287.7±767.4 ⁺
Norepinephrine(pg/ml)	415.8±2.5	511.2±32.9**	463.2±44.7

Normal : Normal SD rat. Control : DOCA-Salt, KCGE : DOCA-Salt and KCGE. Values represent the means ± SD of 6 rats. ** : P <0.01, * : P <0.05 compared to normal group. ++ : P <0.01, + : P <0.05 compared to control group.

8. 전해질 농도 변화 미치는 영향

DOCA-salt 고혈압 쥐의 혈청 중의 전해질 농도에 미치는 영향을 측정한 결과, sodium (Na⁺)의 농도에서는 대조군은 150.1±1.0(mEq/l), 정상군은 140.1±0.8 (mEq/l)로 나타나 정상군에 비하여 대조군에서 유의성 있는 (** : P <0.01) 증가를 나타내었다. KCGE 투여군은 144.8±2.3 (mEq/l)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 (+ : P <0.05) 감소하였다. Potassium (K⁺) 농도에서는 대조군은 5.8±0.2 (mEq/l), 정상군은 4.9±0.3 (mEq/l)로 나타나 정상군에 비하여 대조군에서 유의성 있는 (***) : P <0.001) 증가를 나타내었다. KCGE 투여군은 5.6±0.3 (mEq/l)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (+ : P <0.05) 감소 효과를 나타내었다. Chloride (Cl) 농도에서는, 대조군은 104.3±0.5 (mEq/l), 정상군은 95.6±1.1 (mEq/l)로 나타나 정상군에 비하여 대조군에서 유의성 있는 (** : P <0.01) 증가를 나타내었다. KCGE 투여군은

98.6±0.5 (mEq/l)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (+ : P<0.05) 감소 효과를 나타내었다(Table 6).

Table 6. Effect of KCGE on the Na⁺, K⁺ and Cl⁻ in DOCA-salt Hypertensive Rat

Group	Normal	Control	KCGE
Na ⁺ (mEq/l)	140.1±0.8	150.1±1.0**	144.8±2.3*
K ⁺ (mEq/l)	4.9±0.3	5.8±0.2***	5.6±0.3*
Cl ⁻ (mEq/l)	95.6±1.1	104.3±0.5**	98.6±0.5*

Values represent the means ± SD of 6 rats. *** : P <0.001, ** : P <0.01 compared with normal group. + : P <0.05, + + : P <0.01, + : P <0.05 compared with control group.

9. 신장 기능에 미치는 영향

혈청 중의 uric acid의 농도를 측정 한 결과, 대조군은 3.5±0.7 (mg/dl), 정상군은 1.5±0.3 (mg/dl)로 나타나 정상군에 비하여 대조군에서 유의성 있는 (** : P <0.01) 증가를 나타내었다. KCGE 투여군은 1.9±0.7 (mg/dl)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (+ : P <0.05) 감소 효과를 나타내었다. BUN 농도에서는 대조군은 31.4±2.4 (mg/dl), 정상군은 17.9±4.1 (mg/dl)로 나타나 정상군에 비하여 대조군에서 유의성 있는 (** : P <0.01) 증가를 나타내었다. KCGE 투여군은 23.5±4.9(mg/dl)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (+ : P <0.05) 감소 효과를 나타내었다. Creatinine 농도를 측정 한 결과, 대조군은 0.76±0.05 (mg/dl), 정상군은 0.62±0.04 (mg/dl)로 나타나 정상군에 비하여 대조군에서 유의성 있는 (***) : P <0.001) 증가를 나타내었다. KCGE 투여군은 0.70±0.01 (mg/dl)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (+ : P <0.05) 감소 효과를 나타내었다(Table 7).

Table 7. Effect of KCGE on the Uric acid, BUN and Creatine in DOCA-salt Hypertensive Rat

Group	Normal	Control	KCGE
Uric acid (mg/dl)	1.5±0.3	3.5±0.7**	1.9±0.7*
BUN (mg/dl)	17.9±4.1	31.4±2.4**	23.5±4.9*
Creatinine (mg/dl)	0.62±0.04	0.76±0.05***	0.70±0.01*

Values represent the means ± SD of 6 rats. *** : P <0.001, ** : P <0.01 compared with normal group. + : P <0.05 compared with control group.

고찰

2003년 미국 NIH의 합동위원회의 제 7차 보고서 (JNC VII)¹⁵⁾를 통해 120-139/80-90 mmHg를 고혈압 전단계로 규정함으로써 2004년 대한고혈압학회는 120/80 mmHg를 넘지 않을 때에만 정상혈압으로 판정한다고 발표하였다. 실제로 고혈압 전단계의 혈압인 경우는 4.5년이 지나면 고혈압이 발생하는 것으로 보고하고 있어 고혈압의 인구는 새로운 기준에 의해 급증하고 있다.

고혈압 원인은 크게 일차성 고혈압 즉 본태성 고혈압과 이차성고혈압으로 나눌 수 있다. 본태성 고혈압은 단일 질병이라기 보다는 증후군으로 분류되기도 하는데 그 원인으로는 유전적 인자에 환경적 인자가 더해져서 일으키는 것으로 생각되어 진다. 유전적 인자로는 Na⁺/H 교환체 활성화, 인슐린 저항성, renin-angiotensin계 유전자, 베타 수용체 유전자, α-adduction 유전자 등의 이상이 있으며, 단일 유전자가 고혈압을 일으키고 있다기보다는 혈압의 일부를 규정하고 있다고 생각되어진다. 한편

환경적 인자로서는 식염섭취량, 비만도, 스트레스, 알코올섭취량, 등이 있으며 환경적 요인도 단독으로는 고혈압이 발생하지 않지만 유전적 요인에 더해져서 고혈압이 쉽게 발생하는 것으로 알려져 있다^{16,17)}. 이차성고혈압은 원인을 알 수 있는 고혈압으로 부신에 생긴 종양의 영향으로 알도스테론이 과도하게 분비되어 고혈압이 일어나는 원발성 aldosterone증, 부신에 생긴 선종에 의해 신경전달물질인 Catecholamine계 호르몬 분비 이상으로 생기는 갈색 세포종, 당뇨병이나 신염 등의 영향에 의한 신부전이나 신혈관성 고혈압이 있다¹⁸⁾.

고혈압은 우리나라의 7대 만성질환의 하나로 단일 질병으로는 발병률이 낮지만 뇌혈관질환, 심장질환, 당뇨병 등의 발생과 악화로 연관되고 있어¹⁹⁾, 현재 한의학계에서도 임상 및 실험에서 많은 연구가 이루어지고 있다.

본 연구 역시 EBM 구축 일환으로, DOCA-salt에 의해 유도된 고혈압 rat에서 가미천마구등음이 고혈압 관련 인자들과 산화적 변화에 대하여 어떠한 작용을 하는지에 대한 검색을 실시하였다.

먼저 한약의 독성에 대한 논란에 따라 세포독성과 in vivo 투여 후 간 독성 검사를 실시한 결과 Table 2-1,2에서와 같이 독성이 없는 것으로 나타났다.

고혈압의 한 원인으로 동맥경화나 혈관 염증을 들 수 있는데, 이는 혈관 내 활성산소의 역할의 크다고 할 수 있다. 활성산소는 여러 가지 경로를 통해 혈관내피 세포를 직접 공격하여 염증을 일으키거나 monocyte등이 혈관내피로의 침윤을 유도하기도 한다. 혈관내피에 침윤된 monocyte는 macrophage로 변하여 foam cell이 되며, 이는 혈관의 경화를 가져와서 고혈압을 일으킨다. Wilson등²⁰⁾은 안지오텐신 II에 의해 유도된 고혈압 모델 rat을 통해 활성산소가 혈관 손상을 가져오며 항산화효소(SOD) 유사 치료제가 혈압 상승을 억제한다고 보고하고 있다. 본 연구에서도 KCGE가 DPPH 소거능(Fig. 1), 세포내 ROS생성량 저해능 측정(Fig. 2)에서 모두 농도 의존적으로 항산화 활성을 가지고 있는 것으로 나타나 고혈압으로 인한 혈관 손상에 유의성 있는 방어 작용이 있음을 시사하였다.

고혈압의 발병의 중요한 기전인 renin-angiotensin계의 angiotensin II는 특이적수용체를 통해서 혈압을 상승시키는 기능을 가지고 있는데, 이는 간에서 생산되는 안지오텐시노젠이 신장에서 분비되는 레닌에 의해서 angiotensin I으로 분해되며, 다시 angiotensin 전환효소 (ACE)에 의해서 angiotensin II로 분해되어 angiotensin 수용체(AT1)와 결합하여 혈관 수축, 혈압 상승, 혈관내피세포의 증식 등을 가져온다. 따라서 angiotensin II의 생성을 억제하여 혈압 상승 요인을 제거하려는 연구가 진행되어 왔으며, angiotensin I의 angiotensin II로의 전환효소인 ACE의 저해제가 개발되어 시판 중이다^{21,22)}. 본 시료는 Fig. 3에서 나타난 바와 같이 ACE에 대하여 농도 의존적으로 저해하는 효과를 나타냄으로써, angiotensin II의 생성을 억제함을 알 수 있었다. 이 같은 결과는 도 등²³⁾의 연구 결과와 부합되는 결과라 할 수 있다.

KCGE의 항산화 효과와 ACE에 대한 저해능을 확인하고, Hernandez 등²⁴⁾의 연구를 바탕으로 동물 병태 모델로 DOCA 고혈압 모델을 유도하여 항고혈압 작용을 평가하였다. 먼저

DOCA-salt의 투여에 의해 대조군의 몸무게는 감소한 반면 몸무게에 대한 심장과 신장의 무게는 증가하였다. 이러한 결과는 Isabel 등²⁵⁾ DOCA-salt 고혈압 모델에서 공통적으로 나타나는 결과로 식염수 음용에 의한 것으로 보여진다. 이에 비해 KCGE의 투여군은 대조군에 비하여 몸무게와 몸무게에 대한 심장과 신장의 무게가 정상군과 유사하게 유지되었다(Table 3).

고혈압 판단의 중요한 기준이 되는 혈압 측정에서는 대조군에서 175.2±5.4 mmHg, KCGE 투여군에서는 149.8±6.2 mmHg로 나타내었고, 심박수에서도 대조군은 419.8±36.3 (times/min), KCGE의 투여군은 353.3±25.4 (times/min) 로 유의성 있게 나타나 혈압 강하 효과가 있음을 시사하였다(Table 4).

고혈압과 관련이 깊은 호르몬은 주로 부신에서 생산되어 신장의 신 세뇨관에 발현하는 미네랄코르티코이드수용체에 작용하여 나트륨의 재흡수를 촉진하는 알도스테론을 들 수 있다. Navar 등²⁶⁾의 최근 연구에 의하면 알도스테론은 부신피질호르몬, 칼륨, angiotensin II 등의 자극에 의하여 생산, 분비되어 혈압에 영향을 미치는 것으로 보고하고 있는데, 본 연구에서는 KCGE 투여군에서 대조군에 비하여 현저하게 감소하는 것으로 나타났다. 그리고 catecholamine계 호르몬인 dopamine, norepinephrine, epinephrine의 수치 역시 대조군에 비해 KCGE 투여군에서 유의성 있는 감소 나타내었다(Table 5).

혈압 유지의 주요 요소로 Na⁺, K⁺ 등의 미네랄 밸런스를 들 수 있는데, Meneely²⁷⁾, Dahl²⁸⁾등에 의해 오래전부터 Na⁺이 고혈압과 밀접한 관계가 있으며, K⁺이 Na⁺의 혈압 상승에 대해 길항 작용을 하는 것으로 알려져 왔다. 본 실험에서도 DOCA와 1%의 NaCl이 함유된 식염수의 지속적인 투여로 인해 혈청 내 Na⁺의 양이 대조군에서 증가하였고, KCGE에 의해 유의성 있게 감소하였으며, K⁺과 Cl⁻도 같은 결과가 나타났다(Table 6).

신장은 체액량을 조절하는 기능을 가진 장기로서 고혈압과 밀접한 관계를 가지고 있다. 신장 장애에 의한 고혈압은 Hayashi 등²⁹⁾에 의하면 다른 원인에 의한 고혈압 보다 30% 이상 높으며, 염분 배출 장애에 의한 체액량의 증가 등의 원인에 의한 것으로 보고하고 있다. 본 실험에서도 지속적인 투여 DOCA 투여와 1% NaCl에 의해 대조군에서의 신장 장애 관련 인자인 Uric acid, BUN, creatinine의 수치가 높게 나온 반면, KCGE 투여군에서는 상대적으로 낮아 유의성 있는 결과를 나타내었다(Table 7). 이는 신장 기능과 혈압 유지의 상관 관계로 볼때 KCGE에 의해 신장 기능 검사 수치가 대조군에 비하여 정상군에 가깝게 유지되는 것으로 나타나 KCGE가 DOCA-salt에 의한 고혈압 억제에 효과가 있음을 입증하는 결과라 하겠다.

결 론

가미천마구등음이 DOCA-salt에 의한 고혈압 동물 병태(*in vivo*)와 산화적 손상(*in vitro*)에 미치는 영향을 검색한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. 먼저 시료 독성 검색에서는 정상세포인 hFCs 세포에 대하여 독성이 나타나지 않았으며, 고혈압 동물 병태의 간기능 수치에서도 정상군과 차이가 없어 안정성이 평가되

었다. *In vitro*에서 angiotensin I의 angiotensin II로의 전환효소인 ACE에 대하여서는 농도 의존적인 저해 효과를 나타냄으로써, ACE 억제제로써 항고혈압 효능이 입증되었다. *In vivo* 실험에서는 고혈압의 최종 결과인 혈압, 심박수에서 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내어 ACE 저해 효과와 부합되었다. 또한 고혈압 병리 기전에 관여하는 호르몬, 전해질 그리고 신장 기능 등에서도 모두 대조군에 비하여 유의성 있는 감소가 확인되었다. DPPH 소거능, 세포내 ROS 생성량 저해능의 측정을 통한 산화적 손상에 대한 검색에서도 모두 농도 의존적으로 억제하여 고혈압으로 인한 혈관 손상에 유의성 있는 방어 작용이 있음을 시사 하였다. 이상의 결과로 본 시료의 항고혈압 작용이 객관적으로 규명되어, 임상에서 안정성 있는 항고혈압제로 지속적인 활용이 기대된다. 단 기존 처방 연구와의 상대적인 치료 기전 차이에 대한 연구는 구성 약물에 대한 지속적인 검색과 더불어 보다 심도 있는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Shibada, Y.H., Sato, B. 이차성고혈압증의 역학 日本臨床 58: 439-442, 2000.
2. Strauch, B., Petrak, O., Wichterle, D., Zelinka, T., Holaj, R., Widimsky, J. Jr. Increased arterial wall stiffness in primary aldosteronism in comparison with essential hypertension. *Am J Hypertens.* 19(9):909-914, 2006.
3. Sumiazu Akima. Blood clinical data and drug side-effects that require attention during physical therapy *Rigakuryoho kagaku* 20(1):69-73, 2005.
4. 김병문 외. 간계내과학, 동양의학연구원 출판부, p 481, 1989.
5. 장원창 외. 실용중의내과학(상), 인민위생출판사, 1981.
6. 상해중의학원 편. 중의내과학, 상무인서관, p 150, 1977.
7. 배경일 외. 疎風補心湯이 고혈압, 혈전 및 뇌손상에 미치는 영향, 동생리병리학회지 16(2):245-256, 2002.
8. 한덕희 외. 肝陽上亢方이 고혈압에 미치는 영향, 대한동의생리병리학회지 20(3):663-669, 2006.
9. 허점민 외. 중의대사전, 인민위생출판사, p 76, 1980.
10. 박정준 외. 가미천마구등음의 항스트레스 효과에 대한 실험적 연구, 동의병리학회지 16(2), 2002.
11. 배남규 외. 마취취에서 천마구등음의 심혈관작용에 대한 연구, 대한본초학회지 12(2), 1997.
12. 정대영. 천마구등음의 항간질성 효과에 대한 실험적 연구, 원광대학교대학원, 1998.
13. 강익현. 천마구등음이 뇌조직의 생화학적 변화에 미치는 영향, 원광대학교 대학원, 1996.
14. Cushman, D.W., Cheung, H.S., Sabo, E.F., Ondetti, M.A. Development and design of specific inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *Am J Cardiol.* 49(6):1390-1394, 1982.
15. Chobanian, A.V., Bakris, G.L., Black, H.R., Cushman, W.C.,

- Green, L.A., Izzo, J.L. Jr, Jones, D.W., Materson, B.J., Oparil, S., Wright, J.T. Jr, Roccella, E.J. National Heart, Lung, and Blood Institute Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure; National High Blood Pressure Education Program Coordinating Committee: The Seventh Report of the Joint National Committee on Prevention, Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure: The JNC 7 Report. *JAMA* 289: 2560-2571, 2003.
16. Bartel, S., Hoch, B., Vetter, D., Krause, E.G. Expression of human angiotensinogen-renin in rat: effects on transcription and heart function. *Hypertension*. 39(2):219-223, 2002.
 17. Tsuda, K., Tsuda, S., Nishio, I., Masuyama, Y. Role of dihydropyridine-sensitive calcium channels in the regulation of norepinephrine release in hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol. Suppl 1*: S27-31, 2001.
 18. Mirkovic, S., Seymour, A.M., Fenning, A., Strachan, A., Margolin, S.B., Taylor, S.M., Brown, L. Attenuation of cardiac fibrosis by pirfenidone and amiloride in DOCA-salt hypertensive rats. *Br J Pharmacol*. 135(4):961-968, 2002.
 19. 김효미 외. 질병 및 질병유전자의 발현에 영향을 주는 요인 발굴 및 위험요인 평가도구. 개발 국립보건연구원보. 제42권 pp 274-288, 2005.
 20. Wilson, S.K. Role of oxygen-derived free radicals in acute angiotensin II-induced hypertensive vascular disease in the rat. *Circ Res*. 66(3):722-734, 1990.
 21. Takeuchi, K., Ideishi, M., Tashiro, T., Morishige, N., Yamada, T., Saku, K., Urata, H. Higher small arterial elasticity in hypertensive patients treated with angiotensin II receptor blockers. *Hypertens Res*. 28(8):639-644, 2005.
 22. Casas, J.P., Chua, W., Loukogeorgakis, S., Vallance, P., Smeeth, L., Hingorani, A.D., MacAllister, R.J. Effect of inhibitors of the renin-angiotensin system and other antihypertensive drugs on renal outcomes: systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 366(9502):2026-2033, 2005.
 23. Jeong-Ryong Do, In-Sook Heo, Jin-Ho Jo, Dong-Su Kim, Seong-Su kim, and Chan-Ku kim. Effect of antihypertensive peptides originated from various marine proteins on ACE inhibitory activity and systolic blood pressure in spontaneously hypertensive rats. *Korea J food sci technol*. 38(4):567-570, 2006.
 24. Hernandez, N., Torres, S.H., Finol, H.J., Sosa, A., Cierco, M. Capillary and muscle fiber type changes in DOCA-salt hypertensive rats. *Anat Rec*. 246(2):208-216, 1996.
 25. Isabel Rodriguez-Gomez, I., Wangensteen, R., Atucha, N.M., O'Valle, F., Del Moral, R.G., Garcia-Estan, J., Vargas, F., Osuna, A. Effects of omapatrilat on blood pressure and renal injury in L-NAME and L-NAME plus DOCA-treated rats. *Am J Hypertens*. 16(1):33-38, 2003.
 26. Navar, L.G., Harrison-Bernard, L.M., Nishiyama, A., Kobori, H. Regulation of intrarenal angiotensin II in hypertension. *Hypertension*. 39(2 Pt 2):316-322, 2002.
 27. Meneely, G.R., Ball, C.O. Experimental epidemiology of chronic sodium chloride toxicity and the protective effect of potassium chloride. *Am J Med*. 25(5):713-725, 1958.
 28. Dahl, L.K., Leitel, G., Heine, M. Influence of dietary potassium and sodium/potassium molar ratios on the development of salt hypertension. *J Exp Med*. 136(2):318-330, 1972.
 29. Hayashi, M. 고혈압 -신장장애환자를 중심으로- 日本腎臟學會誌 44(5):432-438, 2002.