대한한의학 방제학회지 제17권 2호 THE KOREAN JOURNAL OF ORIENTAL MEDICAL PRESCRIPTION 17(2):175~186, 2009

담죽엽 추출물의 혈관이완 기전에 대한 연구

김혜윰[1], 리 향[1], 이윤정[1], 서환호[3], 조남근[3], 강대길[1,2], 이호섭[1,2]
[1]원광대학교 한의학전문대학원, [2]한의과대학 생리학교실, [3]침구학교실

ABSTRACT

Effect of *Lophatherum gracile* on the mechanism of vasorelaxation in thoracic aorta

Hye-Yoom Kim[1], Xiang Li[1], Yun-Jeong Lee[1], Hwan-Ho Seo[3],
Nam-Geun Cho[3], Dae-Gill Kang[1,2], Ho-Sub Lee[1,2]
[1]Professional Graduate School of Oriental Medicine, [2]Dept. of Physiology,
[3]Dept. of Acupuncture and Moxibustion, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

The vasorelaxant effect of an extract of *Lophatherum gracile* Brongn (ELB) and its possible action mechanism were ascertained in aortic tissues isolated from rats. ELB relaxed endothelium-intact thoracic aorta in a dose-dependent manner. However, the induced vascular relaxation was abolished by removal in endothelium of the thoracic aorta. Pretreatment of endothelium-intact vascular tissues with N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) or 1H-[1,2,4]-oxadiazole-[4,3-α]-quinoxalin-1-one (ODQ) significantly inhibited vascular relaxation induced by ELB. Moreover, ELB significantly increased cGMP production in aortic tissues, which was blocked by pretreatment with L-NAME or ODQ. The vasorelaxant effect of ELB was attenuated by tetraethylammonium (TEA), and glibenclamide. ELB-induced vasorelaxation

• 교신저자 : 이호섭
• 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학 생리학교실
• Tel : 063-850-6841 Fax : 063-850-7260 E-mail : host@wku.ac.kr
• 접수 : 2009/ 12/ 08 수정 : 2009/ 12/ 10 채택 : 2009/ 12/ 18

was not blocked by atropine, propranolol, indomethacin, verapamil, and diltiazem. Taken together, the present study demonstrates that ELB dilates vascular smooth muscle via an endothelium-dependent NO-cGMP signaling pathway, which may be at least in part related with the function of K^+ channels.

Key word : ethanol extract of *Lophatherum gracile Brongn* (ELB), aortic tissues, endothelium, nitric oxide/cGMP, vascular relaxation

Ⅰ. 서 론

혈압은 하루 중에도 정신적, 육체적 활동에 따라 동요를 거듭하면서 변동하고 있는데, 이것은 인체가 내적 환경의 변화 또는 외적 자극에 대응해서 적정한 혈압을 유지함으로써 궁극적으로 인체의 여러 장기 및 조직에 필요한 혈액량을 흐르게 해서 원활한 생체기능을 수행 할 수 있게 하기 위한 것이다[1].

순환기계 질환은 초기 증상이 미약하여 평소의 무관심으로 인해 발병하는 경우가 많은데, 심혈관계 질환중 대표적인 질병인 고혈압 (hypertension)의 경우 침묵의 살인자 (silent killer)라 불리고 있다. 고혈압 환자의 90~95%에 있어서는 아직도 그 원인을 모르며, 대부분의 경우 비 특이적인 방법으로 치료하고 있다[2]. 고혈압은 30세 이상 성인에서 30%이상 (남자 34.4%, 여자 26.5%)으로 유병률이 매우 높은 질환 중 하나이며, 더욱이 나이가 증가함에 따라 이와 비례하여 급격히 증가 (30대 2.3%, 40대 8.7%, 50대 23.2%, 60대 35.6% 70세 이상 42.4%)한다고 보고되어 지고 있다[3].

특히 심혈관계 질환에 대한 예방이나 치료 인자로는 식이, 운동, 음주, 흡연, 스트레스 등 생활습관과 관련된 환경적 인자 조절이나 한의학과 민간요법을 근거로 밝혀진 다양한 한약재와 식품 섭취를 통하여 혈관계 질환의 원인 물질인 체내 지질 성분들에 대한 축적 예방과 제거에 있다[4-6]. 이외에도 한의학적 치료방법으로서 침, 경락, 뜸 등을 이용하여 풍(風), 한(寒), 서(署), 습(濕), 조(燥), 화(火)의 육음(六淫)의 외인성 요인 및 칠정(七情)의 내인성 요인에 의해 혈액의 혼탁이나 혈행 장애를 유발하는 어혈(瘀血)이나 습열(濕熱), 담음(痰飮) 등의 제거를 통한 혈관계 질환의 예방과 치료가 이루어진다[7-8]. 오늘날, 치료제의 선택에 있어서 부작용이 중요하게 고려되고 있으며, 합성의약품보다는 이를 대체할 천연물과 한약재를 이용한 한방 치료 기술 개발에 대한 관심이 증가되고 있다.

순환기계 질환의 하나인 고혈압은 심박출량의 증가나 말초혈관의 수축으로 동맥 혈압이 상승하는 것으로, 혈압의 변동에 영향을 미치는 인자로 심박출량 또는 심박동수의 증가 및 말초혈관의 저항증가를 들 수 있으며, 특히 말초혈관의 저항이 큰 영향을 미치므로 혈관의 긴장성 조절은 혈압의 조절에 효과적으로 작용한다[9]. 산화질소 (Nitro oxide, NO)는 활성라디칼로서 매우 불안정하며 반응성이 강한 화학물질이다. 또한 간단한 구조로 인하여 생체 내에서 흔히 볼 수 있는 구조 특이성

을 가질 수 없을 것으로 생각되어 80년대 초반까지 주목을 받지 못하였다[10]. 그러나, Acetylcholine (ACh)에 의한 혈관확장을 유발시킬 수 있는 내피세포유래 혈관이완인자 (endothelium-derived relaxing factor: EDRF)가 NO와 생리적인 작용이 같을 뿐만 아니라 화학적인 성질도 NO와 구분할 수 없는 물질임이 밝혀진 후에, NO는 내피세포유래 혈관이완인자로써 심혈관계의 중요한 조절인자로 여겨지고 있다[11].

이에 본 연구에서는 전통생약의 효능을 과학적으로 검정하고 나아가 천연물로부터 고혈압 치료제의 개발 가능성을 탐색하기 위해 담죽엽 추출물에 대하여 쥐의 흉부대동맥 혈관을 이용한 혈관이완 효과를 검토하였다.

담죽엽의 성질은 차며[寒] 맛은 달고[甘] 독이 없다. 담을 삭이고 열을 내리며 중풍으로 목이 쉬어 말 못하는 것, 열이 세게 나고 머리가 아픈 것[壯熱頭痛] 등을 낫게 하며, 경계증, 온역(瘟疫)으로 발광하며 안타까워하는 것[狂悶], 기침하면서 기운이 치미는 것, 임신부가 어지럼증이 나서 넘어지는 것, 어린이의 경간(驚癎), 천조풍(天弔風) 등을 낫게 한다고 보고되어지고 있다[12].

담죽엽의 성분으로는 줄기, 잎에는 triterpenoid 화합물인 arundoin, cylindrin, taraxerol 및 friedelin이 들어 있다. 이 밖에 지상부에는 phenol 성분, amono acids, 유기산, 당류도 들어 있다[27]. 일본에서 실험한 것에 따르면 담죽엽 추출물은 간 복수, 암세포에 대해 100% 억제 작용이 있고, 동물실험에 암세포를 옮긴 흰쥐한테 담죽엽 추출물을 먹였더니 30일 뒤에 종양세포의 70 - 90%가 줄어들었다고 밝혀졌다[13]. 그러나 담죽엽 추출물을 이용한 혈관 이완효과와 그 작용기전은 아직까지 밝혀진 바가 없다. 따라서 이 실험에서는 Phenylephrine (PE) 전 처리로 수축시킨 백서의 흉부 대동맥에서 담죽엽 추출물을 이용하여 혈관 이완효과와 그 작용기전을 밝히고자 한다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 담죽엽 추출물의 제조

담죽엽 1 kg을 건조시킨 후 분쇄기를 이용하여 분말로 하였으며 3 리터의 ethanol (EtOH)로 1주일간 추출한 후 회전식 감압농축기 (CCA-1100, Eyela, Tokyo, Japan)를 사용하여 농축 하였다. 이를 다시 물에 녹인 후 동결 건조 (PVTFD 10AT, Ilsin, Korea) 과정을 거쳐 분말로 만들어 시료를 사용하였다. 추출하여 얻은 담죽엽 추출물 (ELB)을 distilled Water를 이용하여 각각의 농도 (10^{-6} g/ml, 3×10^{-6} g/ml, 10^{-5} g/ml, 3×10^{-5} g/ml, 10^{-4} g/ml, 3×10^{-4} g/ml, 10^{-3} g/ml)로 만든 후 용량의존적으로 처리하였다.

2. 생리 영양액의 제조

혈관 평활근의 정상적인 생리활성 유지를 위해 Krebs 용액 (Krebs-Henseleit Solution)을 사용하였으며, 그 조성은 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.1 mM $MgSO_4$, 1.2 mM KH_2PO_4, 1.5 mM $CaCl_2$, 25 mM $NaHCO_3$, 10 mM glucose이고, pH는 7.4로 보정하였다.

3. 흉부 대동맥의 분리

건강한 Sprague-Dawley 백서 (몸무게 약 250 - 300 g)의 두부를 탈골시킨 후 흉곽을 절제하고 흉부 대동맥을 분리하였다. 신속하게 분리된 흉부 대동맥을 95% O_2와 5% CO_2의 혼합기체로 포화된 ice-cold Krebs 용액 (pH 7.4)에 넣고 내부의 혈액과 혈관 주위 지방 및 결합조직을 제거한 후 약 3 mm의 길이의 절편으로 만들었다. 이때 혈관 내피세포의 보존을 위해 혈관 내벽을 손상시키지 않도록 신중을 기하였다. 목적에 따라 혈관 내에 200 μm의 steel을 집어넣어 물리적인 방법으로 혈관 내피 세포를 제거하였다.

4. 흉부대동맥의 장력의 측정

준비 되어진 흉부 대동맥 절편은 orgam chamber 안 95 % O_2, 5 % CO_2 혼합가스로 포화시킨 37.4℃의 Krebs 용액에서 고정시킨 후 isometric tension을 force-displacement transducer (Grass FT 03, GRASS Instrument, MA, USA)가 장착된 생리 기록계 (Grass Model 7E, Grass Instrument, MA, USA)를 이용하여 측정하였다. 이때 heat/circulator (Model CW-10GL, JEIO TECH, Korea)에 의해 일정한 온도를 유지하였다. 본 실험을 시작하기 전에 90분 동안 방치하여 평형상태에 도달하게 하였는데, 초기 60분간 점진적으로 tension을 증가시켜 1g의 optimum tension에 도달하도록 하였다. 백서의 흉부대동맥의 이완 반응은 먼저 1×10^{-6} M의 phenylephrine (PE)으로 수축시킨 후 평형에 도달하였을 때 1×10^{-6} M의 acetylcholine (ACh)에 의한 이완 반응을 관찰하였다. 본 논문에서 사용한 모든 실험은 ACh을 통한 혈관 내피 세포의 안전성을 확보한 후 실시하였다.

5. 흉부대동맥에 대한 혈관이완 작용

담죽엽 추출물의 혈관 이완 기전을 알아보기 위하여 여러 가지 약물들을 이용하여 혈관 이완 효과 변화를 측정하였다. 먼저 이들 약물을 organ chamber에 20분간 전 처리한 후 PE으로 수축시켰고, 이어서 담죽엽 추출물에 의한 이완반응을 용량 의존적으로 관찰하였다. 혈관 내피세포 비의존형 실험을 수행할 때에는 혈관 내피 세포를 물리적은 방법으로 제거하였으며, PE 수축과 ACh 이완 반응으로 혈관 내피 세포의 제거를 확인 후 실험을 수행하였다. 이후에는 Krebs 용액으로 3회 세척하고 다음 실험을 수행하였다.

5. RIA(radioimmunoassay)를 통한 cGMP의 측정

흉부 대동맥 절편을 95 % O_2, 5 % CO_2 혼합가스를 공급해 주면서 Krebs 용액에서 30분간 평형을 시킨 후 1×10^{-4} M 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) 과 1×10^{-6} M의 PE을 넣어 5 분간 더 평형을 시킨 후 농도별로 담죽엽 추출물 (10^{-4} g/ml, 3×10^{-4} g/ml, 10^{-3} g/ml)을 처리 하여 4분간 반응을 시켰다. 혈관 조직은 바로 액체 질소에 넣어 반응을 정지시킨 후 -70℃에 보관한 후 cGMP (cyclic guanosin-3,5,-monophosphate) 농도 측정에 이용하였다. 무게를 측정한 혈관 조직을 6 % trichloroacetic acid (TCA) 존재 하에서 균질화 시킨 후 13,000 g에서 15분간 원심 분리하여 얻은 상층액을 물이 포화된 diethyl ether를 이용하여 3회 추출하였다. 추출액은 Speed-vac 농축기를 이용하여 농축하고 cGMP 측정은 ^{125}I을 이용한 방사면역 분석법 (radioimmunoassay, RIA)을 이용하여 측정하였다[14]. 간단히 설명하면, 시료와 표준물질을 50 mM sodium acetate 완충용액 (pH 4.8)에 최종 용적이 100 µl 가 되게 첨가한 후 100 µl의 희석된 cGMP 항체 (Calbiochem- Novabiochem, Co., San Diego, CA, USA) 와 ^{125}I가 결합된 cGMP (10,000 cpm/100 µl)를 함께 넣은 후 4℃ 에서 24시간 반응시켰다. 항체와 결합한 ^{125}I-cGMP와 비 결합형 ^{125}I--cGMP은 charcoal을 이용하여 분리하였으며 γ-카운터를 이용하여 방사능을 측정하였다.

6. 사용시약

이 연구에 사용된 acetylcholine (ACh), phenylephrine HCl (PE), N^G-nitroarginine methyl ester (L-NAME), 1H-[1,2,4]-oxadiazole-[4,3-α]-quinoxalin-1-one (ODQ), indomethacin, tetra-ethylammonium (TEA), glibenclamide, verapamil, atropine, propranolol 등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)으로부터 구입하여 사용하였다.

7. 통계처리

실험 결과의 유의성은 실험 결과를 Students t-test 나 one-way ANOVA test를 통하여 p가

0.05 이하인 경우 유의한 차이로 판정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. 담죽엽 추출물의 혈관 이완 효과

담죽엽 추출물이 백서의 혈관 평활근에 미치는 영향을 관찰 하기 위하여 PE (1×10^{-6} M)으로 수축한 후 담죽엽 추출물을 투여하여 혈관 이완효과를 측정한 결과, 혈관은 용량 의존적으로 이완되어짐을 관찰 할 수 있었다(Fig. 1).

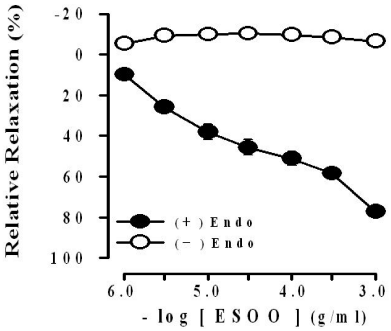

Fig. 1. Vascular relaxation effect of ELB in endothelium -intact aortic ring (vehicle), or endothelium -denuded aortic ring (-endothelium) on PE (1×10^{-6} M) -precontracted rat thoracic aorta.

Each value shows mean ± SEM of four experiments.

2. 담죽엽 추출물이 혈관 내피세포에 미치는 영향

담죽엽 추출물이 어떠한 기전을 통하여 이완효과를 보이는지 알아 보기 위하여 여러 가지 방법을 통하여 실험을 진행하였다. 먼저 담죽엽 추출물이 내피세포 의존적인지 알아보기 위해 Krebs 용액에서 유지된 백서 흉부대동맥 절편을 물리적인 방법을 이용하여 내피 세포를 제거(-endothelium) 하였다. PE (1×10^{-6} M)으로 수축을 유도하였으며, ACh에 의한 반응은 이전의 연구에서 알려진 바와 같이 내피 의존적 이여서[15], 이를 통한 내피세포의 유무를 확인 한 후 실험을 진행하였다. 내피세포의 유무가 확인되어진 혈관에 담죽엽 추출물을 용량 의존적으로 처리하여 혈관 이완 효과를 측정한 결과, 내피 세포가 존재 하지 않을 경우 혈관 이완 효과는 결과 1과 비교하였을 때 현저하게 억제 되었음을 관찰 할 수 있었다(Fig. 1).

3. L-NAME 전처리에 의한 영향

담죽엽 추출물의 혈관 이완 효과가 혈관내피세포 유래 산화 질소계 nitric oxide (NO) 생성과 관련이 알아보기 위하여 비 특이적인 nitric oxide synthesis 억제제 (non-selective nitric oxide synthesis, NOS, inhibitor)인 L-NAME (1×10^{-5} M)을 전 처리하고 담죽엽 추출물의 혈관 이완 효과를 관찰하였다. 그 결과, 담죽엽 추출물의 혈관 이완 효과는 L-NAME에 의해 현저히 억제됨을 관찰 할 수 있었다(Fig. 2).

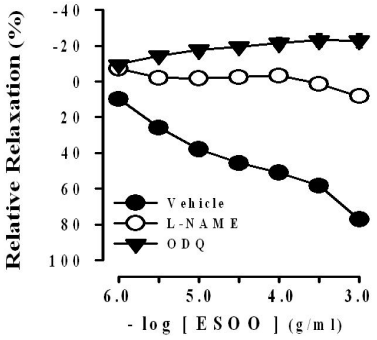

Fig. 2. Vascular relaxation effect of ELB in the PE-precontracted endothelium-intact aortic ring (Vehicle), in the presence of L-NAME (1×10^{-5} M), or ODQ (1×10^{-5} M) in endothelial intact aortic rings.

Each value shows mean ± SEM of four experiments.

4. ODQ 전처리에 의한 영향

담죽엽 추출물에 의한 혈관 이완 효과의 또 다른 기전인 cGMP와 관련이 있는지를 확인하기 위하여 세포질 guanylyl cyclase 억제제(soluble guanylyl

cyclase, sGC, inhibitor)인 ODQ (1×10^{-6} M)를 전처리한 후 담죽엽 추출물을 용량 의존적으로 처리하여 혈관 이완 효과를 관찰 하였다. 그 결과 담죽엽 추출물의 혈관 이완 효과가 완전히 억제됨을 관찰 할 수 있었다(Fig. 2).

5. Indomethacin 전처리에 의한 영향

담죽엽 추출물에 의한 혈관 이완효과가 cycloosygenase (COX)의 활성에 따른 prostacyclin (PGI_2)의 생성과의 연관성을 관찰하기 위하여 비 선택성 COX 억제제 (non-selective COX inhibitor)인 indomethacin (1×10^{-5} M) 전처리 후 담죽엽 추출물의 혈관 이완 효과를 측정한 결과, indomethacin 전 처리 하지 않은 군과 유의한 차이가 없었다 (Fig. 3).

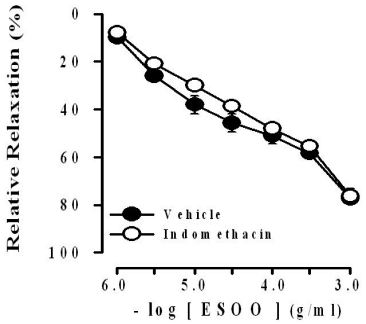

Fig. 3. Vascular relaxation effect of ELB in the endothelial intact aortic rings (vehicle) or in the presence of indomethacin (1×10^{-5} M).

Each value shows mean ± SEM of four experiments.

6. Atropine 및 propranolol 전처리에 의한 영향

담죽엽 추출물에 의한 혈관 이완 효과가 자율신경계 수용체와의 연관성을 알아보기 위하여 비 선택성 교감신경 β 수용체 차단제인 propranolol (1×10^{-6} M, non-selective blocker of β-adrenoceptor), 부교감 신경 수용체 차단제인 atropine (1×10^{-6} M, muscarinic receptor blocker)을 각각 전 처리한 후 담죽엽 추출물의 혈관 이완 효과를 측정하였다. 그 결과 propranolol은 담죽엽 추출물의 혈관이완에 영향을 미치지 못하였다. 그러나 atropine은 담죽엽 추출물의 혈관이완을 부분적으로 유의적 차이를 보였다(Fig. 4).

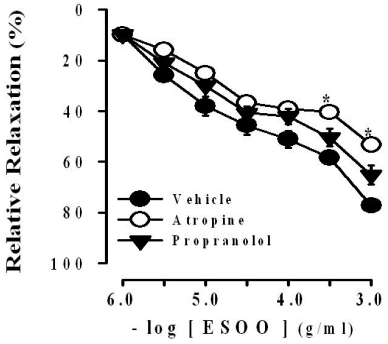

Fig. 4. Vascular relaxation effect of ELB in the endothelial intact aortic rings (vehicle)or in the presence of atropine (1×10^{-6} M), or propranolol (1×10^{-6} M).

Each value shows mean ± SEM of four experiments. *p<0.05, **p<0.01 vs. vehicle group.

7. TEA 및 Glibenclamide 전처리에 의한 영향

평활근 세포의 안정막 전압 유지에 관여하여 평활근 세포에 중요한 역할을 하는 전압 의존성 K^+ 통로 (potassium channel)가 담죽엽 추출물의 혈관 이완 효과에 영향을 주는지를 측정하기 위하여 비 선택적 K^+ 통로 억제제인 TEA (1×10^{-5} M, non-selective channel K^+ blocker)와ATP-감수성 K^+ 통로 차단제인 glibenclamide (1×10^{-5} M, ATP-sensitive K^+ channel blocker)를 전 처리한 결과 담죽엽 추출물의 혈관 이완 효과에 유의적인 차이를 보여주었다(Fig. 5).

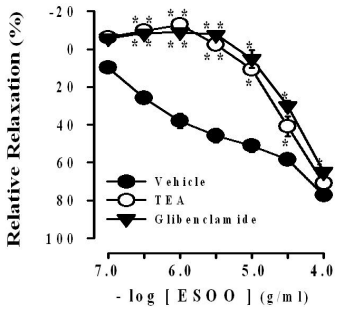

Fig. 5. Vascular relaxation effect of ELB in the endothelial intact aortic rings (vehicle) in the presence of glibenclamide (1×10^{-5} M), or TEA (1×10^{-5} M).

Each value shows mean ± SEM of four experiments. *p<0.05, **p<0.01 vs. vehicle group.

8. Verapamil 및 diltiazem 전처리에 의한 영향

세포 외로부터 유입되는 칼슘이온 (Ca^{2+})은 평활근에 중요한 역할을 하며 Ca^{2+} 통로 (Ca^{2+} channel)를 통해 세포 내로 유입된다. 특히 L형 Ca^{2+} 통로 (L-type Ca^{2+} channel)가 평활근에 가장 많은 형태로서, L형 Ca^{2+} 통로 차단이 담죽엽 추출물의 혈관 이완 효과에 미치는 영향을 측정하기 위하여 L형 Ca^{2+} 통로 차단제인 verapamil과 diltiazem (1×10^{-6} M, L-type Ca^{2+} channel blocker)을 전 처리한 후 담죽엽 추출물에 의한 혈관이완 정도를 측정하였다. 그 결과 verapamil과 ditiazem은 담죽엽 추출물의 혈관이완 이완 효과에 영향을 주지 못하였다(Fig. 6).

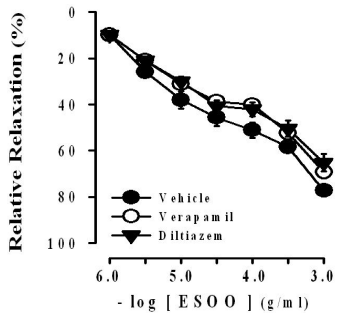

Fig. 6. Vascular relaxation effect of ELB in the endothelial intact aortic rings (vehicle) in the presence of verapamil (1×10^{-6} M) or diltiazem (1×10^{-6} M).

Each value shows mean ± SEM of four experiments. *p<0.05, **p<0.01 vs. vehicle group.

9. cGMP 생성 효과

담죽엽 추출물이 혈관 조직 내 cGMP의 생성량에 영향을 미치는 지를 관찰하기 위하여 실험을 진행하였다. In vitro에서 담죽엽 추출물을 흉부대동맥에 직접 투여한 후 흉부대동맥에서 ^{125}I을 이용한 방사면역 분석법 (radioimmunoassay, RIA)을 통하여 cGMP 생성량을 측정하였다. 그 결과, 담죽엽 추출물을 투여하지 않은 군에 비해 투여한 군은 농도 의존적으로 cGMP를 생성량이 증가함을 확인 할 수 있었다.

분비된 NO는 sGC를 활성화 시켜 cGMP 생성을 촉진 하게 한게 되는데, 이를 비 특이적 NO 억제제인 L-NAME (1×10^{-5} M)와 GC 억제제인 ODQ (1×10^{-5} M)를 전처리 한 후 담죽엽 추출물의 cGMP 생성량을 측정해 본 결과, 담죽엽 추출물을 단독으로 처리한 군에 비하여 전처리 한 군에서 cGMP의 생성량이 유의한 차이를 보였다(Fig. 7).

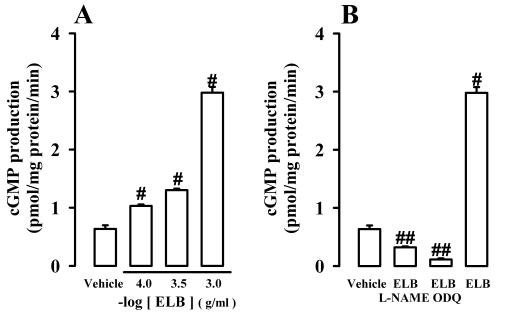

Fig. 7. Dose-dependent cGMP production by ELB in the thoracic aorta ring (A) and in the presence or absence of L-NAME (1×10^{-5} M) or ODQ (1×10^{-5} M) (B).

Each value shows mean ± SEM of four experiments. #p<0.01 vs. vehicle group. ##p <0.001 vs. ELB.

Ⅳ. 고 찰

본 연구는 담죽엽 추출물(*Lophatherum gracile Brongn*, ELB)이 백서의 흉부 대동맥에서 α-adrenaline 수용체를 선택적으로 흥분시킴으로써 혈관을 수축시키는 약물인 phenylephrine (PE)에 의한 혈관 수축을 용량 의존적으로 현저하게 이완시켰다. 혈관 내피 세포를 제거 한 후 혈관 이완 효과가 완전히 차단된 것은 담죽엽 추출물이 내피세포 의존적으로 혈관을 이완시키는 것을 의미한다.

혈관 내피 세포는 혈액과 혈관 평활근세포 사이에 위치하면서 생리적 방어벽으로 서의 역할 뿐만 아니라, 혈관 운동성 및 투과성, 혈액 응고 및 분해, 염증세포나 혈관 평활근의 이동이나 증식을 조절함으로서 혈관의 항상성 유지에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 그리고 혈관 내피세포의 기능이상은 혈관 이완 능력의 손상과 염증세포들의 혈관 내피에 대한 부착력 증가가 나타난다고 보고되어지고 있다[16]. 혈관 평활근의 이완은 혈관 내피세포에 존재하는 수용체나 소기관들에 의해 분비되는 여러 종류의 혈관 활성 인자(vasoactive factor)에 의해 조절되는데, 이러한 혈관활성 인자에는 nitric oxide (NO, EDRF, Endothelium-derived relaxing factor) prostacyclin (PGI_2), 내피세포 유래 과분극 인자 (EDHF, endothelium-derived hyper- polarizing factor) 등이 알려져 있다[17]. 따라서 담죽엽 추출물의 혈관 이완 효과와 여러 다양한 혈관활성 인자들과의 연관성 및 그 기전을 알아보기 위하여 자율신경계 차단, 칼슘 및 칼륨 이온통로의 억제, cycloosygenase (COX)의 억제, NO 생성 차단과 같은 방법을 이용하였다. 내피세포 유래 혈관 이완 인자의 본체인 NO가 담죽엽의 혈관 이완에 관여하는지를 알아보고자 먼저 NO 합성 억제제인 L-NAME를 전처리한 후 측정하였다. 그 결과, 담죽엽의 혈관 이완 효과가 현저히 차단되었다.

생체 내에서 생성되는 작은 분자인 NO는 내피세포 의존 혈관 이완 인자로써 혈압 강하 효과가 큰 것으로 밝혀졌다. NO는 L-arginine으로부터 NO-synthase (NOS)에 의하여 합성되는 물질로 혈관 이완작용을 통해 혈관 긴장도를 조절할 뿐만 아니라, 혈관 평활근 세포의 증식과 이동의 억제 작용, 염증세포의 혈관 내피로의 부착을 억제 하는 작용 등이 있는 것으로 알려져 있다[16].

혈관에는 NO 합성 효소인 3가지의 동위 효소(bNOS, iNOS, eNOS)가 존재한다. 첫 번째 유형은 뇌형 NO 합성 효소 (bNOS)로 뇌 조직에서 처음 발견되었고 주로 신경 전달 물질로서의 NO를 합성하는 역할을 하고 있다. 두 번째 동위 효소는 유도형 NO 합성 효소 (iNOS)로써 주로 면역계에 작용하는 NO를 합성하고 있다. 세 번째 동위 효소는 혈관 내피세포에 주로 분포하면서 혈관을 이완시키는데 작용하는 혈관 내피세포 유래 NO 합성효소 (eNOS)로써 acetylcholine (ACh)에 의하여 활성화되어 혈관을 이완시킨다[18]. 이러한 NO는 세포질의 soluble guanylyl cyclase (sGC)를 활성화 시켜 cGMP의 생성을 증가시켜 신호 전달 체계를 통해 혈관 평활근을 이완 시킨다[19]. 본 연구에서 L-NAME의 전 처리에 의해 담죽엽의 이완 효과가 현저히 억제되는 것으로 보아 담죽엽에 의한 혈관 이완 효과는 산화질소계를 경유하여 일어나는 것으로 사료된다.

NO/cGMP계는 혈관 평활근의 이완뿐만 아니라, 혈관 평활근 세포의 증식과 혈소판, 백혈구 유착을 억제시키며, 내피세포의 삼투성을 낮추고 세포 외 간질단백의 합성을 억제하는 역할을 하고 있다. 혈관 내피세포에서 NO 생성의 감소는 혈관 내피세포의 기능장애나 손상에 의한 것이며, 이는 동맥경화증과 고혈압의 주요한 병리적인 요인이 된다. 또한 동물의 실험 모델에서 NO 합성효소의 만성적인 억제는 고혈압, 혈관염 등을 유발한다. 그러므로 NO/cGMP계의 회복을 통한 혈관이완활성의 증가는 심혈관계 질환을 치료하는데 있어 중

요한 의미를 지닌다. NO/cGMP계가 담죽엽에 의한 혈관 이완 효과에 관여한다면 NO에 의하여 활성화 되는 가용성 구아닐산 고리화효소 또한 담죽엽에 의한 혈관 이완 효과에 관여할 것으로 사료되어 가용성 구아닐산 고리화 효소 억제제인 ODQ를 전 처리 한 후 혈관이완 효과를 측정한 결과, 담죽엽에 의한 혈관 이완 효과가 억제되었다. 따라서 담죽엽에 의한 혈관 이완 효과는 NO/cGMP계를 경유하여 일어나는 것을 의미한다. 게다가 in vitro 에서 혈관조직과 담죽엽를 반응시킨 결과 혈관에서 cGMP의 생성량이 증가하였다.

혈관 평활근의 긴장도를 조절하는 또 다른 내인성 인자로 PGI_2이 있다. PGI_2은 arachidonic acid로부터 COX에 의하여 생성되고, 이 때 생성된 PGI_2은 혈관 이완 작용을 갖는다. 담죽엽 추출물의 혈관 이완 효과가 PGI_2의 생성과 관련이 있는지를 알아보기 위하여 COX 억제제인 indomethacin을 전 처리하고 담죽엽의 이완 효과를 측정한 결과 indomethacin을 전 처리하지 않은 군과 비교하여 차이가 없었다. 이와 같은 결과로 볼 때 PGI_2은 담죽엽 추출물의 혈관 이완 작용과는 무관한 것으로 사료된다[20,21].

혈관 평활근 세포막 전위차는 혈관 평활근의 긴장도에 영향을 미치며 따라서 세포막간의 이온들의 변화로 혈관이완작용을 설명할 수 있다. Van Breeman등에 의하면 혈관 평활근세포막의 ion pump로는 Na^+/K^+ pump와 Ca^{2+} pump 뿐만 아니라 Na^+/H^+, HCO_3^-/Cl^-, Na^+/Ca^{2+} exchanger가 있는데[22], 혈관 평활근의 세포막 전위는 주로 Ca^{2+} 과 K^+ 이온의 유출과 유입에 의하여 조절된다. 혈관 긴장도는 막전위에 의해 조절되며 막전위 증가 시 전압에 의존하는 Ca^{2+} channel인 voltage operated channel (VOC)을 통하여 Ca^{2+}이 증가한다. 이러한 Ca^{2+}의 증가로 수축성 단백질이 활성화되어 수축이 초래되며 이는 전기 기계적으로 일치 (electro-mechanical coupling)를 보인다. 한편 K^+ channel은 활성화시 세포막의 과분극(hyperpolarization)을 유도하여 VOC를 통한 Ca^{2+}의 유입 억제를 통하여 혈관을 이완시킨다. 이 또한 혈관 긴장도를 조절하는데 있어 중요한 내인성 혈관 이완 기전으로 알려져 있다[23].

혈관 평활근에서 K^+ 통로는 Ca^{2+}-activated K 통로 (K_{Ca}), ATP-sensitive K (K_{ATP}) 통로등이 있는데, EDHF는 K^+ 통로를 활성화 시키고 막과분극 (hyper- polarization)을 유발하게 된다. K^+ 통로의 활성화에 의한 K^+의 세포 내 유출은 세포막의 과분극을 일으켜, voltage-sensitive Ca^{2+} 통로의 불활성화로 이어져 평활근세포 내 Ca^{2+} 농도 감소를 초래하게 되고 결국은 혈관 이완을 유발하게 된다. K^+통로에 대한 억제제로는 K_{Ca}을 차단하는 TEA와 sulfonylurea계 약물인 glibenclamide로 후자는 혈관 평활근에서 K_{Ca} 통로에는 영향을 미치지 않고 K_{ATP} 만을 차단한다. 담죽엽 추출물의 혈관 이완 효과가 K_{Ca} 또는 K_{ATP}를 경유하여 일어나는지 알아보기 위하여 K_{Ca} 차단제인 TEA와 K_{ATP} 차단제인 glibenclamide를 전 처리한 후 혈관 이완 효과를 측정한 결과, 담죽엽 추출물은 혈관 이완 효과는 유의한 차이를 보였다. 따라서 담죽엽 추출물의 혈관 이완 효과에 K^+ 통로 중 K_{ATP}로 영향을 주고 있는 것으로 사료된다[24].

혈관 평활근의 정상상태는 세포내 Ca^{2+} 이온의 농도에 의해 결정된다. 혈관 평활근 의 수축과 이완에 있어서도 Ca^{2+} 농도는 단연 가장 중요한 인자이다. 교감 신경 자극에 의해 α_1-수용체가 활성화 되면 근소포체에서 Ca^{2+} 유리를 촉발하게 되므로 세포내 Ca^{2+} 농도가 증가한다. 또한 수용체에 의해 작용하는 양이온 채널에 의해 유입된 양이온들이 세포의 탈분극화 시키고 voltage- dependent (L-type) Ca^{2+} channel 을 개발시켜 추가적으로 Ca^{2+} 유입을 일으킨다.

세포 내 칼슘이 증가하면 calmodulin 이라는 단백질과 Ca^{2+}이 결합해서 Ca^{2+}-calmodulin 복합체를 형성한다. 이 복합체는 myosin light-chain kinase를 활성화시켜 myosin의 light chain을 인산

화시키고 이로 인해 actin과 myosin의 상호작용이 항진되어 혈관이 수축된다. 칼슘통로 길항제는 평활근에서 전위의존성(voltage-dependent) Ca^{2+} 통로를 차단하는데, 세포 내 Ca^{2+}의 유리를 방해하거나 수용체-작동성 (receptor-operated) Ca^{2+} 통로를 차단하기 위해 필요한 용량보다 아주 낮은 농도에서 작용을 나타낸다[25]. Ca^{2+} 길항제는 L-type Ca^{2+} 통로에 결합하여 Ca^{2+}의 유입을 차단함으로써 동맥의 평활근을 이완시킨다. 이에 따라 말초저항이 감소하고 혈압이 떨어진다. 담죽엽의 혈관이완 효과가 L-type Ca^{2+} 통로와 연관이 있는지 알아보기 위하여 L-type Ca^{2+} 통로 차단제인 verapamil과 diltiazem을 전 처리 한 후 혈관 이완효과를 측정한 결과, verapamil과 diltiazem은 담죽엽의 혈관 이완효과는 차단되지 않았다. 따라서 이와 같은 결과로 볼 때, 담죽엽에 의한 혈관 이완에 L^{-}형 Ca^{2+} 통로는 관여하지 않는 것으로 사료된다.

혈관 평활근의 긴장도는 또한 자율 신경계에 의해서도 조절된다. 혈관 내피세포에는 혈관을 이완시키는 무스카린성 수용체가 존재하며 콜린성 자극에 의해 내피세포 의존적 이완인자인 NO를 유리시켜 혈관을 이완시킨다. 일반적으로 잘 알려진 혈관 이완 효현제인 ACh은 NO 중재 내피 의존성 혈관이완을 야기하며 ACh에 의한 NO의 유리는 내피세포 M3 수용체를 경유한다고 알려져 있다[26]. ACh에 의한 내피세포 내 Ca^{2+} 증가는 IP3에 의한 세포 내 저장소로부터 Ca^{2+} 유출과 세포외로부터의 Ca^{2+} 유입의 결과이다[27,28]. 증가된 Ca^{2+}에 의해 NOS가 활성화되고 L-arginine을 기질로 하여 NO가 생성된다. 이 때 생성된 NO는 혈관 평활근으로 확산되며, 다시 세포질 GC를 활성화 시킨다. 세포질 GC는 GTP (guanosine triphosphate)를 cGMP로 전환시키며, cGMP는 다시 cGMP 의존적 단백질 인산화 효소를 활성화시킨다. 이 효소가 혈관 평활근에 Ca^{2+} 유입을 억제하고 세포 내 Ca^{2+}의 수축요인에 대한 감수성을 감소시킴으로써 혈관 평활근을 이완시킨다[29].

이 연구에서는 담죽엽 추출물이 자율 신경계 수용체를 경유하여 혈관을 이완시키는지 여부를 알아보기 위하여 콜린성 수용체 중에서 무스카린성 수용체를 선택적으로 차단하는 atropine과 β 수용체를 선택적으로 차단하는 항 아드레날린성 약물인 propranolol을 전 처리한 결과, 담죽엽의 혈관이완 효과는 항 아드레날린성 약물인 propranolol을 전 처리하였을 시에는 영향을 받지 않았으나, atropine을 전 처리하였을 혈관이완의 정도에는 부분적으로 유의한 차이를 보였지만 완전히 억제되지는 않았다.

이상의 결과를 종합하여 보면 담죽엽 추출물은 NO/cGMP계를 활성화시킴으로써 혈관이완효과를 가지고 있음을 제시 할 수 있으며, 이러한 결과는 심혈관계 질환에 유용하게 사용될 수 있는 가능성을 제시하였으며 동물모델을 이용한 연구에 유용한 정보를 제시해 준다.

V. 결 론

본 연구는 담죽엽 추출물의 혈관이완 효과 및 그 작용 기전을 추정하였다. 담죽엽 추출물은 내피 세포 의존적으로 혈관 평활근을 이완시켰고, 이와 같은 효과는 용량 의존적으로 나타났으며, NO/cGMP 신호 전달계를 차단하면 완전히 억제되었다. 더욱이 혈관 조직을 담죽엽 추출물과 반응 시키면 cGMP의 생성이 증가하였고, 이러한 증가는 혈관 내피세포의 제거나 NO 합성효소나 세포질 구아닐산 고리화 효소 차단 시 나타나지 않았다. 또한 K^{+} 통로 차단함으로 인해 이완효과에 영향을 받는 것으로 나타났다. 그러나 담죽엽 추출물의 혈관 이완효과는 PGI_2 생성 차단이나, Ca^{2+} 통로 차단 등에 의해서는 영향을 받지 않았다. 또한, 무스카린성 수용체 차단 및 β-아드레날린성 수용체 차단제 등에 의해서도 영향을 받지 않았다.

이와 같은 결과로 볼 때, 담죽엽 추출물의 혈관 평활근 이완 기전은 내피세포에서의 NO/cGMP 경로 및 K^+ 통로를 활성화 시켜 나타나는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 원광대학교 연구비지원(2008)에 의하여 수행되었음.

참고문헌

1. 신영기. 주치의와 환자가 함께 보는 교양서 고혈압. 서울:계축문화사. 2000:40.
2. E Braunwald, Fauci Kasper, Hauser Longo, Jameson. 국역 Harrison's principles of internal medicine. 서울:도서출판 MIP. 2003:1456-60.
3. Major Disease and Health-related behaviors in Korea : An In depth analysis of 2001 National Health and Nutrition Examination survey. KIHASA, Seoul:Ministry of Health and Welfare. 2003:76.
4. Martin N. Experimental cardiovascular depressant effect of garlic dialysate. J Ethnopharmacol. 1992;37:145-53.
5. Park PS, Sung NJ, Park MY. Effects of Dioscorea batatas and Gastrodiae rhizoma on lipid composition changes of liver, brain and kidney in rats. J East Asian Soc Dietary Life. 1999;9:188-94.
6. Choi YJ, Park YS, Kim C, Chang YK. Evaluation of functional ability and nutritional risk according to self-rated health (SRH) of the elderly in Seoul and Kyunggi-do. Kor J Nutr. 2004;37:223-35.
7. Kim NJ, Jung EA, Kim DH, Lee SI. Studies on the development of antihyperlipidemic drugs from Oriental Herbal Medicines (I) - Antihyperlipidemic activities of Oriental herbal medicines. Kor J Pharmacol. 1999;30:368-76.
8. 이상인, 박선동. 한방임상처방학(韓方臨床處方學): 방제구성의 이론과 실제, 영림사. 1998:361-84.
9. Levi R. Therapies for perioperative hypertension: Pharmacodynamic consideration. Acta Anaesthesiol Scand. 1993;37:16-9.
10. 권년수. 산화질소 생성의 생화학. 심혈관 질환의 기초의학 심포지움. 1995:41-5.
11. Vanhoutte Paul M. Endothelium-dependent hyperpolarizations: the history. Pharmacol Res. 2004;49:503-8.
12. 생약학교재편찬위원회. 생약학. 동명사. 1998:479.
13. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순. 완벽 중약대사전. 정담. 제2권, 1999:881-8.
14. Kim SZ, Kim SH, Park JK, Kho GY, Cho KW. Presence and biological activity of C-type natriuretic peptide-dependent guanylate cyclase-coupled receptor in the penile corpus cavernosum. J Urol. 1998;159:1741-6.
15. Furchgott RF, and Zawadzki JU. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature. 1980;288:373-6.
16. Hau C, and David GH. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases ; the role of oxidant stress. Circ Res. 2000;87:840-4.
17. Rubanyi GM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. J Cell Biochem. 1991;46:27-36.
18. MacNaul KL, Hutchinson NI. Differential of iNOS and cNOS mRNA in human vascular smooth muscle cells and endothelial cells under normal and inflammatory conditions. Biochem

Biophys Res Commun. 1993;196:1330-4.
19. Meng W., Ma J, Ayata C, Hara H, Huang PL, Fishman MC, Moskowitz MA. Ach dilates pial arterioles in endothelial and neuronal NOS knockout mice by NO-dependent mechanisms. Am J Physiol. 1996;271:1145-50.
20. Hutcheson IR, and Griffith TM. Central role of intracellular calcium stores in acute flow- and agonist-evoked endothelial nitric oxide release. Br J Pharmacol. 1997;122:117-25.
21. Sharma NR, and Davis MJ. Substance P-induced calcium entry in endothelial cells is secondary to depletion of intracelluar stores. Am J Physiol. 1995;268:962-73.
22. Guerrero MF, Puebla P, Carron R, Martin ML, San Roman, L. Quercetin 3,7-dimethyl ether: a vasorelaxant flavonoid isolated from Croton schiedeanus Schlecht. J Pharm Pharmacol. 2002;54:1373-8.
23. Lemos VS, Freitas MR, Muller B, Lino YD, Queiroga CE, Cortes SF. Dioclein a new nitric oxide- and endothelium-dependent vasodilator flavonoid. Eur J Pharmacol. 1999;386:41-6.
24. Ko FN, Huang TF, Teng CM. Vasodilatory action mechanisms of apigenin isolated from Apium graveolens in rat thoracic aorta. Biochim Biophys Acta. 1991;1115:69-74.
25. Loeb AL, Izzo NJ, Johnson RM, Garrison JC, Peach MJ. Endothelium-derived relaxing factor release associated with increased endothelial cell inositol triphosphate and intracellular calcium. Am J Cardiol. 1988;62:36-40.
26. Van Breemen C, Cauvin C, Johns A, Leijten P, Yamamoto H. Ca^{2+} regulation of vascular smooth muscle. Fed Proc. 1986;45:2746-51.
27. Okabe K, Kitamura K, Kuriyama H. Features of 4-aminopyridine sensitive outward current observed in single smooth muscle cells from the rabbit pulmonary artery. Pflugers Arch. 1987;409:561-8.
28. Nevala R, Paukku K, Korpela R, Vapaatalo H. Calcium-sensitive potassium channel inhibitors antagonize genistein-and daidzein-induced arterial relaxation in vitro. Life Sci. 2001;69:1407-17.
29. Furchgott RF. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: the basis for the proposal that the acid-activatable inhibitory factor from retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide. In Vasodilation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, and Endothelium (P.M. Vanhoutte, ed.), Raven Press, New York. 1988:401-14.