

## 櫻葉 에탄올 추출물의 혈관이완 효능 및 작용기전에 대한 연구

이경진<sup>#</sup>, 김광우, 허희승, 함인혜, 이미화, 김범정, 부영민, 김호철, 최호영<sup>\*</sup>

경희대학교 한의과대학 본초학교실

### Vasorelaxant Effect of *Prunus yedoensis* leaf on Rat Aortic Rings

Kyungjin Lee<sup>#</sup>, Kwang-Woo Kim, Heeseung Heo, Inhye Ham, Mi-Hwa Lee, Bumjung Kim, Youngmin Bu, Hocheol Kim, Ho-Young Choi<sup>\*</sup>

Department of Herbology, College of Korean Medicine, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Republic of Korea

#### ABSTRACT

**Objectives** : The purpose of present study was to investigate the vasorelaxant activities and mechanisms of action of the ethanol extract of *P. yedoensis* leaf (PYL) on isolated rat aortic rings.

**Methods** : Dried *P. yedoensis* leaves were extracted 3 times with 100% ethanol for 3 h in a reflux apparatus. Isolated rat aortic rings were suspended in organ chambers containing 10 ml Krebs-Henseleit (K-H) solution. The rings were maintained at 37°C and aerated with a mixture of 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. Changes in their tension were recorded via isometric transducers connected to a data acquisition system.

**Results** : PYL relaxed the contraction of aortic rings induced by phenylephrine (PE, 1 μM) or KCl (60 mM) in a concentration dependent manner. However, the vasorelaxant effects of PYL on endothelium-denuded aortic rings were lower than endothelium-intact aortic rings. And the vasorelaxant effects of PYL on endothelium-intact aortic rings were reduced by pre-treatment with N<sup>ω</sup>-Nitro-L-arginine methyl ester (10 μM), methylene blue (10 μM), 1-H-[1,2,4]-oxadiazolo-[4,3-α]-quinoxalin-1-one (10 μM), tetraethylammonium (5 mM). In addition, PYL inhibited the contraction induced by extracellular Ca<sup>2+</sup> in endothelium-denuded aortic rings pre-contracted by PE or KCl in Ca<sup>2+</sup>-free K-H solution.

**Conclusions** : These results suggest that PYL exerts its vasorelaxant effects via the activation of Nitric Oxide (NO) formation by means of L-arginine and NO-cGMP pathways and via the blockage of receptor operated calcium channels, voltage dependent calcium channels and calcium-activated potassium channels.

**Key words** : *Prunus yedoensis*, vasorelaxant, vascular endothelium, hypertension, calcium channel

## 서론

왕벚나무 *Prunus yedoensis* Matsum.는 장미과(Rosaceae) 벚나무 속(*Prunus*) 교목으로 해발 500~900 m 사이의 한라산에 자생하고 있으며, 우리나라 제주도가 원산지로서 알려져 있다. 특히, 제주도 신례리와 봉개동, 전라남도 대둔산에서 자생하고 있는 왕벚나무는 천연기념물로 지정하여 보호되고 있는 식물이다<sup>1)</sup>. 또한, 왕벚나무는 벚나무 *Prunus serrulata* var. *spontanea* (Max.) Wils.와 함께 전국적으로 관상수 및

가로수로 많이 재식된 낙엽활엽교목이다<sup>2)</sup>.

우리나라와 중국 및 일본에서는 왕벚나무 등 벚나무류의 수피를 오래전부터 櫻皮라는 약재로 사용해오고 있다. 櫻皮의 약성은 寒하고 味는 苦하며, 緩和, 鎮咳, 解毒하는 효능이 있어, 喘息 紅疫 蕁麻疹 搔痒症 皮膚炎 등을 치료하는 목적으로 사용되어져 왔다<sup>3,4)</sup>.

왕벚나무를 이용한 연구로는 Jo 등<sup>5)</sup>은 왕벚나무 잎 추출물이 L6 myotubes에서 PI3K/Akt와 MPK-p38 MAPK signalling pathway를 통해 glucose uptake를 자극하여 항과혈당증 효

\*교신저자 : 최호영, 서울시 동대문구 경희대로 26, 경희대학교 한의과대학 본초학교실  
· Tel : 02-961-9372 · E-mail : hychoi@khu.ac.kr  
#제1저자 : 이경진, 서울시 동대문구 경희대로 26, 경희대학교 한의과대학 본초학교실  
· Tel : 02-961-0325 · E-mail : dostudy@naver.com  
· 접수 : 2013년 6월 19일 · 수정 : 2013년 7월 3일 · 채택 : 2013년 7월 17일

능을 나타낸다고 보고하였고, Jung 등<sup>6)</sup>은 왕벚나무를 포함한 벚나무 속 여러 식물들이 항산화 효과가 있다고 보고한 바 있으며, 본 연구진도 이전 연구에서 왕벚나무 수피 메탄올 추출물과 에틸아세이트 분획물이 LPS로 염증을 유도한 Raw 264.7 macrophage cell에 대하여 nuclear factor- $\kappa$ B를 억제하여 항염효과를 나타낸다고 보고하였고<sup>7)</sup>, 왕벚나무 수피 에탄올 추출물이 페닐에프린과 KCl로 유도한 흰쥐 흉부 대동맥 절편의 수축을 이완시키는 효능이 있다고 보고한 바 있다<sup>8)</sup>. 성분연구로는 왕벚나무의 주성분인 prunetin이 항염 효과<sup>9)</sup>, 항비만효과<sup>10)</sup> 등이 있다고 최근 보고된 바 있다.

이와 같이 櫻皮는 咳嗽, 皮膚炎, 蕁麻疹, 搔痒症 등을 치료할 뿐만 아니라, 최근 연구 보고에 의하면 고혈압과 같은 심뇌혈관질환에도 응용 가능성이 있는 한약재이지만, 그 약용부위인 수피의 剝取로 인한 왕벚나무의 손상을 예상할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 약용 자원의 보호 및 개발을 위하여, 현재는 식용 및 약용으로 사용되고 있지 않는 왕벚나무 잎(櫻葉)의 약용가치를 연구하고자 하였다.

벚나무 속 식물들이 심혈관질환을 예방하고 치료하는 효과가 있으며, 櫻皮가 혈관이완 효과가 있다는 선행 연구에 착안하여, 櫻葉의 혈관이완 효과 및 그 기전을 연구하였다. 연구 결과 櫻葉 에탄올 추출물은 페닐에프린 또는 KCl로 수축을 유도한 흰쥐 흉부대동맥 절편을 혈관내피의존적인 기전과 비의존적인 기전을 통하여 혈관을 이완시키는 유의한 효과가 있었기에 이에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 1) 약재

본 실험에 사용된 櫻葉은 2011년 5월 서울 경희대학교에 식재된 왕벚나무 *P. yedoensis*의 신선한 잎을 채취하여 건조한 것이며, 시료의 일부는 경희대학교 한의과대학 본초학교실에 보관하고 있다 (Table 1).

Table 1. Plant and Herbal Materials Used for Experiments

Sample	Abbreviation	Vouchers	Collected site	Date
<i>P. yedoensis</i> leaf	PYL	PYL001	Korea : Seoul	May, 2011

#### 2) 시료의 제조

건조된 櫻葉 100 g을 100% 에탄올 4 L에 넣고, 환류냉각 추출장치를 이용하여 60℃에서 2시간 추출하였다. 추출물을 거름종이로 여과하여 감압농축장치로 농축한 후 동결건조시켜 고형의 추출물 13.21 g을 얻었다.

실험에 사용된 모든 염업 에탄올 추출물은 0.1 g/ml의 농도로 DMSO에 우선 녹인 후 Krebs-Henseleit solution에 녹여서 사용하였다.

#### 3) 실험동물

실험동물은 체중 300 - 350 g의 수컷 흰쥐 (나라바이오, 서울, 한국)를 고형사료 (중앙실험동물, 한국)와 물을 충분히 공급하면서 일주일 동안 실험실 환경 (22 ± 2° C;

lighting, 07:00-19:00)에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 동물은 모두 경희대학교 동물윤리위원회의 animal welfare guidelines를 준수하였다.

### 4) 시약 및 기기

#### (1) 시약

시약 중 phenylephrine hydrochloride (PE), MgSO<sub>4</sub>, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, calcium chloride (CaCl<sub>2</sub>), glucose, L-N<sup>ω</sup>-nitro arginine methyl ester (L-NAME), methylene blue (MB), atropine, indomethacin, ethyleneglycol-bis(β-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), tetraethylammonium (TEA), glybenclamide, 4-aminopyridine (4-AP), 1-H-[1,2,4]-oxadiazolo-[4,3-α]-quinoxalin-1-one (ODQ), dimethyl sulfoxide (DMSO) 등은 미국 Sigma 제품을 사용하였으며, NaCl은 일본 Wako 제품을 사용하였고, KCl, NaHCO<sub>3</sub>, ethyl ether, ethyl alcohol 등은 한국 덕산 약품공업주식회사 제품을 사용하였다.

#### (2) 기기

시료의 제조에는 Rotary evaporator (Eyela, Japan), 동결건조기 PVTFD 30R (Ilshin Lab, Korea) 등을 사용하였으며, 혈관 장력 측정은 force-displacement transducer가 장착된 polygraph (Grass instrument Co., USA)와 PowerLab (ADI instrument Co., Australia)을 사용하였다.

## 2. 실험방법

### 1) 혈관절편의 제작 및 준비

흰쥐를 ethyl ether로 흡인마취 시킨 후 즉시 흉부를 절개하여 흉부대동맥을 적출하였다. 적출한 혈관은 즉시 95%의 O<sub>2</sub>와 5% CO<sub>2</sub>로 혼합된 가스가 공급되고 37℃로 유지되고 있는 Krebs-Henseleit solution (K-H solution, composition, mM : NaCl, 118.0; KCl, 4.7; MgSO<sub>4</sub>, 1.2; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2; CaCl<sub>2</sub>, 2.5; NaHCO<sub>3</sub>, 25.0 ;and glucose, 11.1; pH 7.4)에 넣고 혈관 주위 조직과 지방을 제거한 다음 약 2 mm 길이의 고리형태로 잘라 혈관절편을 제작하였다. 혈관절편 제작에는 혈관내피가 손상되지 않도록 하였다. 혈관내피 제거가 필요한 실험의 경우에는 가는 면봉으로 혈관내피를 제거하였다. 칼슘이 제거된 K-H solution은 CaCl<sub>2</sub> 대신 EGTA 1 mM을 추가하여 제조하였다.

2 mm 길이의 고리형태로 제작된 혈관절편의 아래 위를 각각 텅스텐 고리로 걸고 아래쪽은 organ bath (용량 10 ml)의 바닥에 장치된 고리에 연결하고, 위쪽은 physiograph에 연결된 isometric force transducer에 연결하여 등장성 수축의 변화를 PowerLab (ADI instrument Co., Australia) 프로그램으로 연속 기록하였다. Organ bath는 10 ml의 K-H solution으로 채우고, 실험하는 동안 항상 95%의 O<sub>2</sub>와 5% CO<sub>2</sub>로 혼합된 가스가 공급되도록 하고, 37℃로 유지하였다. 혈관절편은 30분 동안 organ bath에서 안정시킨 후 파동장력 1 g을 부하하고 다시 1시간 안정시킨 후 다음 실험을 진행하였다. 안정시키는 동안 organ bath내의 K-H solution은 매 20분마다 신선한 용액으로 바꿔주었다.

2) 혈관 장력 변화 측정

앵엽 에탄올추출물의 혈관이완 활성을 확인하기 위하여 PE (1 μM) 또는 KCl (60 mM)로 흰쥐의 흉부대동맥 절편을 수축시킨 후 최고 수축에 도달하였을 때 앵엽 에탄올 추출물을 농도별로 (10, 30, 100, 300, 500 μg/ml) 투여하여 나타나는 혈관 장력 변화를 측정하였다. 혈관내피의 유무에 따른 앵엽 에탄올 추출물의 혈관 장력 변화를 비교하기 위하여 혈관내피를 제거한 혈관 절편과 내피를 제거하지 않은 혈관절편을 PE (1 μM)로 수축하여 앵엽 에탄올 추출물을 농도별로 (10, 30, 100, 300, 500 μg/ml) 투여하여 나타나는 혈관 장력 변화를 비교하였다. 그리고 앵엽 에탄올 추출물의 혈관이완 기전을 규명하기 위하여 칼슘이 제거된 K-H solution이 채워진 organ chamber 속에 혈관내피가 제거된 혈관절편을 걸고 앵엽 에탄올 추출물 300 μg/ml를 20분간 전처리 한 후 PE (1 μM) 또는 KCl (60 mM)로 수축시키고, CaCl<sub>2</sub>를 농도별로 (0.3, 1, 3, 10 mM) 투여하여 나타나는 혈관 장력 변화를 측정하였으며, L-NAME (10 μM), MB (10 μM), ODQ(10 μM), indomethacin (1 μM), atropine (1 μM), TEA (5 mM), glybenclamide (10 μM), 또는 4-AP (1 mM)를 20분간 전처리한 후 PE (1 μM) 수축에 대한 앵엽 에탄올 추출물의 혈관 장력 변화도 측정하였다.

3) 통계처리

모든 측정결과는 평균 ± 표준편차(mean ± SEM)로 나타내었으며, 대조군과 실험군의 차이의 검정은 SPSS 13.0을 이용하여 Student's T-test를 시행하였고, 유의성은 P < 0.05로 판정하였다.

결 과

1. 앵엽 에탄올 추출물의 PE, KCl로 수축을 유도한 혈관에 대한 이완 효과

앵엽 에탄올 추출물의 혈관이완 활성을 확인하기 위하여 PE 또는 KCl로 혈관절편을 수축시켜 앵엽 에탄올 추출물을 농도별로 투여한 결과 10, 30, 100, 300, 500 μg/ml 의 농도에서 PE로 수축한 혈관절편은 각각 2.0 ± 1.0, 6.0 ± 1.4, 51.5 ± 4.3, 74.6 ± 2.8, 73.2 ± 3.1% 이완되었으며(Fig. 1A), KCl로 수축한 혈관절편은 각각 0.5 ± 0.3, 2.4 ± 0.6, 15.9 ± 3.6, 31.4 ± 2.3, 35.4 ± 1.8% 이완되었다(Fig. 1B).

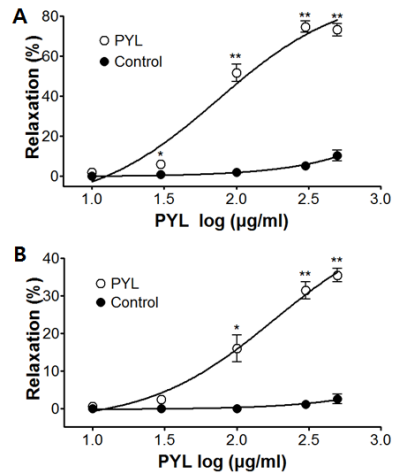


Fig. 1. Concentration-dependent relaxant effect of PYL on PE (1 μM)(A) or KCl (60 mM)(B)-pre-contracted aortic rings. Control groups were not treated with PYL. Values are expressed as mean ± SEM (n = 6). \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 vs. control.

2. 앵엽 에탄올추출물의 혈관 내피세포 유무에 따른 혈관이완 효과

앵엽 에탄올 추출물의 혈관이완 효과가 혈관 내피세포와 관련이 있는지를 확인하기 위하여 혈관 내피세포 유무에 대한 혈관이완 효과를 비교하였다. 혈관내피 세포가 있는 경우 PE로 수축한 혈관절편을 앵엽 에탄올 추출물은 10, 30, 100, 300, 500 μg/ml 의 농도에서 각각 2.0 ± 1.0, 6.0 ± 1.4, 51.5 ± 4.3, 74.6 ± 2.8, 73.2 ± 3.1% 이완시켰으나, 혈관내피 세포가 없는 경우에는 1.1 ± 0.4, 3.9 ± 0.6, 11.4 ± 1.0, 26.9 ± 2.7, 49.5 ± 3.3% 이완시켰다(Fig. 2). 이와 같이, 내피세포가 제거된 경우 혈관이완 효과가 감소하였으므로 앵엽 에탄올 추출물은 혈관 내피세포 의존적인 기전에 작용함을 알 수 있었다. 그러나 내피세포가 제거되어도 혈관이완 반응이 나타나는 것으로 보아 앵엽 에탄올 추출물은 내피세포 비의존적인 기전에도 작용함을 알 수 있었다(Fig. 2). 따라서 본 연구에서는 내피세포 의존적인 기전과 비의존적인 기전에 대한 세부 연구를 모두 진행하였다.

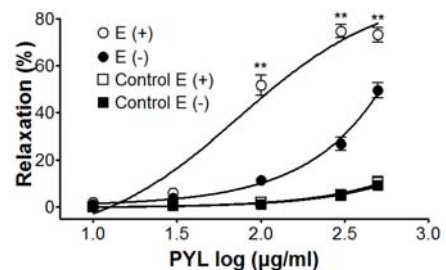


Fig. 2. Concentration-dependent relaxant effect of PYL on PE (1 μM)-pre-contracted aortic rings with [(E+)] or without [(E-)] endothelium. Control groups were not treated with PYL. Values are expressed as mean ± SEM (n = 10 - 12). \*\*P < 0.01 vs. E (-).

3. L-NAME 전처치가 앵엽 에탄올 추출물의 혈관이완에 미치는 영향

PE (1  $\mu$ M)로 수축한 혈관 절편에 대한 앵엽 에탄올 추출물의 혈관이완 효과는 L-NAME (10  $\mu$ M)를 20분간 전처치 한 경우 앵엽 에탄올 추출물 300 과 500  $\mu$ g/ml 농도에서 각각  $17.1 \pm 0.8$ ,  $24.2 \pm 1.2\%$ 로 L-NAME를 전처치 하지 않은 경우와 비교하였을 때 혈관 이완효과가 유의하게 억제되었다(Fig. 3).

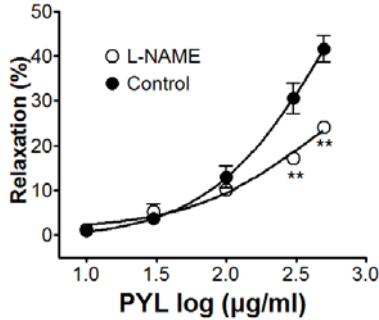


Fig. 3. Relaxant responses of PYL on PE (1  $\mu$ M)-pre-contracted aortic rings in the presence or absence (Control) of L-NAME (10  $\mu$ M). Values are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 6). \*\**P* < 0.01 vs. Control.

#### 4. MB 전처치가 앵엽 에탄올 추출물의 혈관이완에 미치는 영향

PE (1  $\mu$ M)로 수축한 혈관 절편에 대한 앵엽 에탄올 추출물의 혈관이완 효과는 MB (10  $\mu$ M)를 20분간 전처치 한 경우 앵엽 에탄올 추출물 30, 100, 300 과 500  $\mu$ g/ml 농도에서 각각  $0.8 \pm 0.2$ ,  $3.7 \pm 0.7$ ,  $11.2 \pm 1.5$ ,  $19.0 \pm 2.0\%$ 로 MB를 전처치 하지 않은 경우와 비교하였을 때 혈관이완효과가 유의하게 감소되었다(Fig. 4).

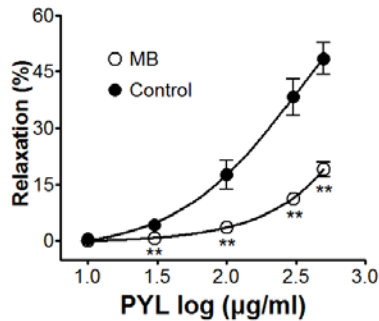


Fig. 4. Relaxant responses of PYL on PE (1  $\mu$ M)-pre-contracted aortic rings in the presence or absence (Control) of MB (10  $\mu$ M). Values are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 6). \*\**P* < 0.01 vs. Control.

#### 5. ODQ 전처치가 앵엽 에탄올 추출물의 혈관이완에 미치는 영향

PE (1  $\mu$ M)로 수축한 혈관 절편에 대한 앵엽 에탄올 추출물의 혈관이완 효과는 ODQ (10  $\mu$ M)을 20분간 전처치 한 경우 앵엽 에탄올 추출물 100, 300 과 500  $\mu$ g/ml 농도에서 각각  $4.0 \pm 0.4$ ,  $10.9 \pm 1.3$ ,  $17.5 \pm 2.1\%$ 로 ODQ를 전처치 하지 않은 경우와 비교하였을 때 혈관이완효과가 유의하게 감소되었다(Fig. 5).

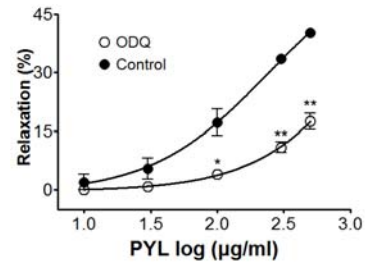


Fig. 5. Relaxant responses of PYL on PE (1  $\mu$ M)-pre-contracted aortic rings in the presence or absence (Control) of ODQ (10  $\mu$ M). Values are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 4). \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01 vs. Control.

#### 6. Indomethacin 전처치가 앵엽 에탄올 추출물의 혈관이완에 미치는 영향

PE (1  $\mu$ M)로 수축한 혈관 절편에 대한 앵엽 에탄올 추출물의 혈관이완 효과는 indomethacin (1  $\mu$ M)을 20분간 전처치 한 경우에도 유의한 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 6).

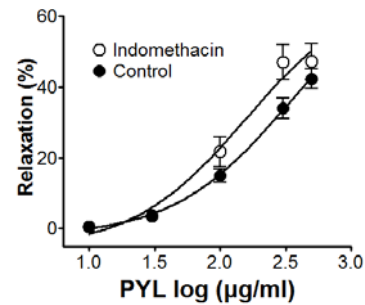


Fig. 6. Relaxant responses of PYL on PE (1  $\mu$ M)-pre-contracted aortic rings in the presence or absence (Control) of indomethacin (1  $\mu$ M). Values are expressed as mean  $\pm$  SEM (n = 6).

#### 7. 앵엽 에탄올 추출물이 Ca<sup>2+</sup> 통로에 미치는 영향

앵엽 에탄올 추출물이 칼슘 통로를 통한 칼슘유입 차단을 통하여 혈관이완 효과를 나타내는지 확인하기 위하여 칼슘이 제거된 K-H solution이 채워진 organ chamber 속에 혈관 내피가 제거된 혈관절편을 걸고 앵엽 에탄올 추출물 300  $\mu$ g/ml를 20분간 전처치 한 후 PE (1  $\mu$ M) 또는 KCl (60 mM)로 수축시키고, CaCl<sub>2</sub>를 농도별로 (0.3, 1, 3, 10 mM) 투여하여 organ chamber 속의 Ca<sup>2+</sup>의 농도를 증가시켰다. 그 결과 PE와 KCl로 수축 유도한 혈관절편에 대하여 앵엽 에탄올 추출물 300  $\mu$ g/ml 전처치는 Ca<sup>2+</sup>의 농도 증가에 따른 혈관의 수축력을 모두 유의하게 감소시켰다 (Fig. 7A, 7B)

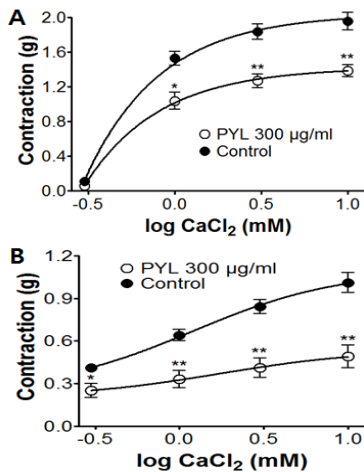


Fig. 7. Inhibitory effect of PYL (300 µg/ml) on the contraction induced by extracellular Ca<sup>2+</sup> in endothelium-denuded aortic rings pre-contracted by PE (1 µM)(A) or KCl (60 mM)(B) in Ca<sup>2+</sup>-free solution. Values are expressed as mean ± SEM (n = 4). \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 vs. control.

### 8. 앵엽 에탄올 추출물이 K<sup>+</sup> 통로에 미치는 영향

앵엽 에탄올 추출물의 혈관이완 효과가 K<sup>+</sup> 통로와 관련이 있는지를 확인하기 위하여 glybenclamide (ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel 억제제), 4-AP (voltage-gated K<sup>+</sup> channel 억제제) 및 TEA (Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels 차단제)를 각각 혈관내피를 제거하지 않은 혈관절편에 전처리 한 후 PE로 수축하여 앵엽 에탄올 추출물을 농도별로 (10, 30, 100, 300, 500 µg/ml) 투여한 결과, glybenclamide와 4-AP 전처치는 앵엽 에탄올 추출물의 혈관이완 효과에 영향을 미치지 않았지만, TEA를 전처리한 경우에는 300 µg/ml 농도와 500 µg/ml 에서 각각 29.0 ± 5.8, 36.0 ± 4.4%로 전처리하지 않은 대조군에 비하여 혈관이완 효과가 유의하게 감소하였다(Fig. 8).

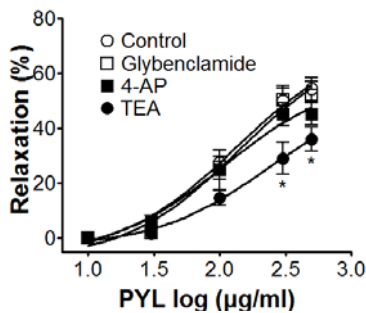


Fig. 8. Relaxation responses induced by PYL on endothelium-intact aortic rings pre-contracted with PE (1 µM) in the presence of glybenclamide (10 µM), tetraethylammonium (TEA; 5 mM), or 4-aminopyridine (4-AP; 1 mM). Control group was not treated with glybenclamide, TEA or 4-AP. Values are expressed as mean ± SEM (n = 4-6). \*P < 0.05 vs. control.

### 9. Atropine 전처치가 앵엽 에탄올 추출물의 혈관이완에 미치는 영향

PE (1 µM)로 수축한 혈관 절편에 대한 앵엽 에탄올 추출물의 혈관이완 효과는 atropine (1 µM)을 전처리 한 경우에도 유의한 변화가 관찰되지 않았다(Fig. 9).

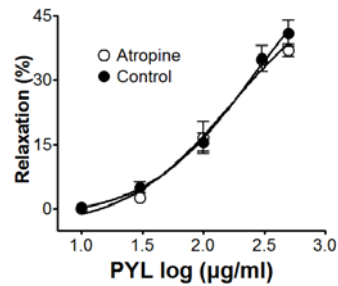


Fig. 9. Relaxant responses of PYL on PE (1 µM)-pre-contracted aortic rings in the presence or absence (Control) of atropine (1 µM). Values are expressed as mean ± SEM (n = 6).

## 고찰

한의학에서 櫻皮는 喘息, 紅疫, 蕁麻疹, 搔痒症, 皮膚炎<sup>3,4)</sup> 등의 호흡기 및 피부질환을 치료하는 목적으로 사용되어 왔다. 또한 앵피는 LPS로 염증을 유도한 Raw 264.7 macrophage cell에 효과가 있으며<sup>7)</sup>, 페닐에프린 또는 KCl로 수축을 유도한 흰쥐 흉부대동맥절편을 이완시키는 효과가 있음이 보고되었다<sup>8)</sup>. 또한 앵피의 성분 중의 하나인 prunetin은 염증에 효과가 있음이 보고되었다<sup>9)</sup>. 이러한 연구 보고를 통하여 앵피는 고혈압, 동맥경화 등의 심혈관질환에도 응용될 수 있음을 시사해준다.

그러나 앵피는 벗나무류의 수피를 벗긴 후 건조하여 사용하는 약재로 剝取로 인한 나무의 손상 및 고사의 우려가 있다. 일반적으로 수피보다는 잎의 채취가 쉬우며, 나무의 손상도 적다. Jung 등<sup>6)</sup>은 벗나무 *P. serrulata* var. *spontanea* 잎에서 prunetin, genistein, quercetin 등을 분리하여 항산화 활성을 보고한 바도 있어, 벗나무류 잎의 약용자원으로 이용 가능성이 높을 것으로 생각되었다. 또한, 최근 왕벗나무 수피가 혈관이완 효능이 있다<sup>8)</sup>는 보고가 있어, 왕벗나무 잎(櫻葉)도 유사한 효능이 있을 것으로 기대하여, 혈관이완 효과에 대하여 연구해 보고자 하였다.

본 연구에서 앵엽 에탄올 추출물은 페닐에프린과 KCl로 수축한 흰쥐 흉부대동맥 절편을 농도 의존적으로 이완시켰으며, 혈관 내피를 제거한 경우 앵엽 에탄올 추출물의 혈관이완 효과는 현저하게 감소하였다. 앵엽 에탄올 추출물의 혈관이완 효과에 대한 기전 연구를 위하여 흉부대동맥 절편을 L-NAME, MB, ODQ, indomethacin, glybenclamide, 4-AP, TEA, atropine 등으로 전처리하고 페닐에프린으로 수축을 유도한 후 앵엽 에탄올 추출물을 농도별로 투여한 결과 L-NAME, MB, ODQ, TEA를 전처리한 경우에는 전처리하지 않은 경우에 비해 혈관이완 효과가 유의하게 감소하였다. 또한 칼슘 통로에 대한 혈관이완 효과 기전 연구에서는 칼슘을 제거한 K-H 용액에서 앵엽 에탄올 추출물은 Ca<sup>2+</sup> 첨가에 따른 혈관의 수축을 유의하게 감소시켰다.

지속적인 혈관긴장도의 증가는 혈관수축과 혈관이완 능력 장애에 기인하며, 나아가 병적인 고혈압을 유발하게 된다. 따라서 혈관긴장도의 조절은 혈압을 조절하는 가장 중요하고 기본적인 치료법이다<sup>11)</sup>. 본 연구에서 혈관 내피를 제거한 경우, 앵엽 에탄올 추출물의 혈관이완 효과는 혈관내피를 제거하지 않은 경우에 비하여 현저하게 감소하였다. 이와 같은 결과는

앵엽 에탄올 추출물은 혈관내피에 작용하여 혈관을 이완시키는 효능이 있음을 나타내는 것이다.

혈관내피세포는 혈관평활근의 증식과 이동, 혈전 생성과 용해 등을 조절할 뿐만 아니라 혈관의 이완과 수축을 조절하는 매우 중요한 인자이다. 혈관내피는 nitric oxide (NO), prostacyclin (PGI<sub>2</sub>), bradykinin, endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF) 등의 혈관 이완 인자들을 분비하여 혈관을 이완시키며, endothelin과 angiotensin II 같은 강력한 혈관 수축 인자들을 분비하여 혈관을 수축시키는 작용을 한다<sup>12)</sup>. 혈관내피세포내 칼슘의 농도가 증가하게 되면 칼슘은 calmodulin에 결합하게 되고, 이렇게 결합된 calcium-calmodulin은 NO-synthase (NOS)를 자극하여 L-arginine으로부터 NO를 생성하게 한다. 이렇게 생성된 NO는 혈관평활근에서 soluble guanylyl cyclase (sGC)를 활성화시켜 세포 내 cyclic guanosine monophosphate (cGMP) 농도를 증가시킨다. cGMP의 농도가 증가하게 되면 혈관평활근 세포내의 칼슘의 농도가 감소하게 되고 이로 인해 혈관은 이완하게 된다<sup>12)</sup>. 본 연구에서 NOS 억제제인 L-NAME와 sGC 억제제인 MB, ODQ를 전처리한 경우 혈관 이완 효과가 유의하게 감소하였다. 이러한 결과는 앵엽 에탄올 추출물은 혈관내피세포에서 NO-cGMP 경로를 통해 혈관을 이완시키고 있음을 의미하는 것이다.

혈관내피세포에서 유리되는 또 다른 혈관이완 물질인 PGI<sub>2</sub>는 cyclooxygenase (COX)에 의해 생성된다<sup>12)</sup>. 본 연구에서 비 선택성 COX 억제제인 indomethacin을 전처리한 경우, 그렇지 않은 경우와 비교하여 앵엽 에탄올 추출물의 혈관이완 효과는 유의한 차이가 없었다. 이러한 결과는 앵엽 에탄올 추출물의 혈관이완 효과는 PGI<sub>2</sub>와는 관련이 없음을 나타내는 것이다.

이와 같이 앵엽 에탄올 추출물은 혈관내피 의존적인 기전으로 혈관을 이완시키고는 있었으나, 혈관내피를 제거한 경우와 L-NAME, MB, 그리고 ODQ를 전처리한 경우 모두에서 혈관이완 효과가 완전히 억제되지는 않았다. 이러한 결과는 앵엽 에탄올 추출물은 혈관내피 의존적인 기전뿐만 아니라 혈관내피 비의존적인 기전을 통해서도 혈관을 이완시키는 효능이 있음을 시사해준다.

혈관내피세포뿐만 아니라 혈관평활근 또한 혈관의 수축과 이완에 매우 중요한 역할을 담당하고 있다. 세포 내의 Ca<sup>2+</sup> 농도가 증가하게 되면 calmodulin과 결합한 calcium-calmodulin이 myosine light chain의 인산화를 촉진하여 혈관은 수축하게 된다<sup>13)</sup>. 따라서 혈관평활근의 수축과 이완에서 가장 중요하고 기본적인 요소는 Ca<sup>2+</sup>이라고 할 수 있으며, 현재 개발되고 있는 고혈압 치료제들 또한 칼슘 차단제가 가장 많은 비중을 차지하고 있다. 이러한 Ca<sup>2+</sup>의 유입과 유출은 주로 receptor-operative Ca<sup>2+</sup> channel (ROCC)과 voltage-dependent Ca<sup>2+</sup> channel (VDCC)을 통하여 이루어진다<sup>13)</sup>. 본 연구에서 각 channel을 통한 칼슘의 유입에 대한 앵엽 에탄올 추출물의 작용을 알아보기 위하여 칼슘이 제거된 K-H solution이 채워진 organ chamber 속에 앵엽 에탄올 추출물을 전처리한 후 PE 또는 KCl로 수축시키고, CaCl<sub>2</sub>를 농도별로 투여하여 organ chamber 속의 Ca<sup>2+</sup>의 농도를 증가시킨 결과 PE와 KCl로 수축 유도한 혈관절편에 대하여 앵엽 에탄올 추출물 전처리는 Ca<sup>2+</sup>의 농도 증가에 따른

혈관의 수축력을 모두 유의하게 감소시켰다. 이러한 결과들은 앵엽 에탄올 추출물은 ROCC와 VDCC를 통한 세포외로부터의 Ca<sup>2+</sup>의 유입을 차단하여 혈관을 이완시키고 있음을 나타내는 것이다.

혈관평활근에서 혈관의 수축과 이완을 조절하는 또 다른 중요한 기전은 K<sup>+</sup> 통로들이다. K<sup>+</sup>은 Na<sup>+</sup>와 함께 세포막 전위에 관여하는 중요한 인자 중 하나이다. K<sup>+</sup> channel이 활성화되면 세포막의 과분극이 발생하여 VDCC를 통한 세포외로부터 Ca<sup>2+</sup>의 유입을 억제하여 혈관을 이완시킨다. 이러한 K<sup>+</sup> channel에는 Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel (KCa), ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel (KATP), voltage-gated K<sup>+</sup> channel (Kv) 등이 대표적으로 잘 알려져 있다<sup>14)</sup>. 따라서 본 연구에서는 각각의 K<sup>+</sup> channel 차단제인 TEA, glybenclamide, 4-AP를 전처리하여 앵엽 에탄올 추출물의 혈관이완 효과를 전처리하지 않은 군과 비교하여 보았다. 그 결과 glybenclamide와 4-AP 전처리는 앵엽 에탄올 추출물의 혈관이완효과에 아무런 영향도 끼치지 못하였지만, TEA를 전처리한 경우 앵엽 에탄올 추출물의 혈관이완효과는 유의한 감소를 보였다. 이러한 결과는 앵엽 에탄올 추출물의 혈관이완효과는 K<sup>+</sup> 통로들 중 Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel (KCa)에 관여하여 나타나는 것임을 의미한다.

혈관의 긴장도는 내피세포 유래 인자들, 혈관평활근의 Ca<sup>2+</sup> 통로들, K<sup>+</sup> 통로들 외에도 자율 신경계에 의해서도 조절된다. 혈관내피세포에는 무스카린성 수용체가 존재하며 콜린성 자극에 의해 NO를 유리시켜 혈관을 이완하게 한다<sup>15)</sup>. 본 연구에서 무스카린성 수용체를 선택적으로 차단하는 atropine을 전처리하여 앵엽의 혈관이완 효과를 측정할 결과 atropine 전처리는 앵엽 에탄올 추출물의 혈관이완효과에는 전혀 영향을 미치지 않았다. 이러한 결과는 앵엽 에탄올 추출물의 혈관이완효과는 자율신경계와는 관련이 없음을 나타내는 것이다.

이상에서 살펴본 바와 같이 앵엽 에탄올 추출물은 NO-cGMP 경로를 활성화시키고, ROCC와 VDCC 같은 Ca<sup>2+</sup> 통로들과 Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> 통로를 차단하여 혈관을 이완시키는 효능을 가지고 있다고 설명할 수 있으며, 이러한 결과는 향후 고혈압 등과 같은 심혈관계 질환의 연구와 치료에 앵엽 또한 유용한 본초 자원으로써의 가치가 있음을 제시해줄 것이다.

## 결론

본 연구에서는 에탄올로 추출한 櫻葉의 흰쥐 흉부대동맥 절편에 대한 혈관이완 효과 및 기전을 연구하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 櫻葉 에탄올 추출물은 페닐에프린과 KCl로 수축한 흰쥐 흉부대동맥 절편을 농도 의존적으로 이완시켰으며, 혈관 내피를 제거한 경우 앵엽 에탄올 추출물의 혈관이완 효과는 현저하게 감소하였다.
2. 櫻葉 에탄올 추출물의 혈관이완 효과에 대한 기전 연구를 위하여 흉부대동맥 절편을 L-NAME, MB, ODQ, indomethacin, glybenclamide, 4-AP, TEA, atropine

등으로 전처치하고 페닐에프린으로 수축을 유도한 후 앵엽 에탄올 추출물을 농도별로 투여한 결과 L-NAME, MB, ODQ, TEA를 전처치한 경우에는 전처치하지 않은 경우에 비해 혈관이완 효과가 유의하게 감소하였고 indomethacin, glybenclamide, 4-AP, atropine 등의 전처치는 앵엽 에탄올 추출물의 혈관이완효과에 아무런 영향을 끼치지 않았다.

3. 칼슘을 제거한 K-H 용액에서 페닐에프린과 KCl로 수축을 유도한 혈관에 대하여 櫻葉 에탄올 추출물은  $Ca^{2+}$  첨가에 따른 혈관의 수축을 유의하게 감소시켰다.

이상의 결과를 통해 櫻葉 에탄올 추출물의 혈관이완 효과는 NO-cGMP 경로를 활성화시키고, ROCC와 VDCC 같은  $Ca^{2+}$  통로들과  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  통로를 차단하여 나타나는 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것임 (B110081).

## Reference

1. An HC, Choo GC, Park SB. Taxonomic studies to morphological characteristics of the Korean Prunus. J Agric Tech Res. 2007 ; 20 : 7-16.
2. Korea Forest Service. Statistical yearbook of forestry 2011. Daejeon : Korea Forest Service, 2011 : 370.
3. Kim JG. In Illustrated Natural Drugs Encyclopedia (Color Edition). Seoul : Yeokang Press, 1997 : 437.
4. Ahn DK. Illustrated book of Korean medicinal herbs. Seoul : Kyohak publishing, 1998 : 188-9.
5. Jo K, Lee SE, Lee SW, Hwang JK. *Prunus yedoensis* Matsum. stimulates glucose uptake in L6 rat skeletal muscle cells by activating AMP-activated protein kinase and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathways. Nat Prod Res. 2012 ; 26(17) : 1610-5.
6. Jung HA, Kim AR, Chung HY, Choi JS. *In vitro* antioxidant activity of some selected *Prunus* species in Korea. Arch Pharm Res. 2002 ; 25(6) : 865-72.
7. Lee J, Yang G, Lee K, Lee MH, Eom JW, Choi HY. Anti-inflammatory effect of *Prunus yedoensis* through inhibition of nuclear factor- $\kappa$ B in macrophages. BMC Complement Altern Med. 2013 ; 13 : 92.
8. Lee K, Ham I, Yang G, Lee M, Bu Y, Kim H, Choi HY. Vasorelaxant effect of *Prunus yedoensis* bark. BMC Complement Altern Med. 2013 ; 13 : 31.
9. Yang G, Ham I, Choi HY. Anti-inflammatory effect of prunetin via the suppression of NF- $\kappa$ B pathway. Food Chem Toxicol. 2013 ; 58 : 124-32.
10. Ahn TG, Yang G, Lee HM, Kim MD, Choi HY, Park KS, Lee SD, Kook YB, An HJ. Molecular mechanisms underlying the anti-obesity potential of prunetin, an O-methylated isoflavone. Biochem Pharmacol. 2013 ; 85(10) : 1525-33.
11. The Korean Society of Hypertension. Textbook of Hypertension. Seoul : Medbook, 2009 : 43-50, 449-53, 479-87.
12. Stankevičius E, Kėvelaitis E, Vainorius E, Simonsen U. Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors. Medicina. 2003 ; 39(4) : 333-41.
13. Karaki H, Ozaki H, Hori M, Mitsui-Saito M, Amano K, Harada K, Miyamoto S, Nakazawa H, Won KJ, Sato K. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. Pharmacol Rev. 1997 ; 49(2) : 157-230.
14. Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. Am J Physiol. 1995 ; 268 : 799-822.
15. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature. 1980 ; 288(5789) : 373-6.