

본태성 고혈압 쥐에서 복분자 완숙과 추출물의 혈압 개선 효과

이정현¹ · 최혜란¹ · 이수정¹ · 이민정¹ · 장지은¹ · 권지웅¹ · 박필재² · 이태범¹

¹베리 & 바이오식품연구소

²고창군농업기술센터

Anti-Hypertensive Effects of Black Raspberry (*Rubus occidentalis*) in Spontaneously Hypertensive Rats (SHR)

Jung-Hyun Lee¹, Hye Ran Choi¹, Su Jung Lee¹, Min Jung Lee¹, Ji Eun Jang¹,
Ji Wung Kwon¹, Pill Jae Park², and Tae-Bum Lee¹

¹Berry & Biofood Research Institute

²Agriculture Technology Center

ABSTRACT The purpose of this study was to investigate the effects of 50% ethanol extracts of ripe black raspberry (*Rubus occidentalis*, RBR) on hypertension in spontaneously hypertensive rats (SHR). The final systolic blood pressure of the group treated with RBR for 12 weeks was significantly lower than that of the SHR group. The mRNA expression level of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) was significantly decreased in SHR. However, treatment with RBR and captopril increased the level of eNOS mRNA in SHR. Moreover, plasma levels of homocysteine and plasminogen activator inhibitor-1 were significantly reduced by RBR. Plasma total cholesterol, high-density lipoprotein, and low-density lipoprotein cholesterol levels were lower in SHR than Wistar Kyoto rats (WKY). However, there was no significant difference in plasma triglyceride level between WKY and SHR. The number of eosinophilic cardiac muscle cells was reduced in heart muscles after treatment with captopril and RBR. Therefore, this study suggests that RBR extracts may be useful for improvement of hypertension.

Key words: black raspberry, hypertension, endothelial nitric oxide synthase, homocysteine, plasminogen activator inhibitor-1

서 론

고혈압은 한국의 30대 남성의 3분의 1(30%), 여성의 4분의 1(25%)이 가지고 있을 만큼 유병률이 높은 질병으로 심혈관계 질환을 야기하며 그 위험성을 증가시키는 요인으로 작용한다(1). 혈압은 신체의 여러 요인에 의해 조절되며 그 중심에는 renin-angiotensin system(RAS)이 존재한다. RAS는 angiotensinogen을 angiotensin I로 변환시키는 renin의 작용에서 시작된다. Renin에 의해 변환된 angiotensin I은 angiotensin converting enzyme(ACE)에 의해 angiotensin II로 변환되고 angiotensin II type 1 receptor와 결합하여 혈관의 수축, 심장 비대, 나트륨 재흡수 등의 작용을 통해 혈압을 조절한다(2). 또한 endothelial nitric oxide synthase(eNOS)에 의해 생성되는 nitric oxide(NO)는 혈관의 이완 작용을 통해 혈류 및 말초의 혈관 저항을 조절하며, 평활근세포의 증식, 혈소판 응집 및 백혈구의 점

착을 감소시켜 동맥경화의 예방에 중추적인 역할을 수행한다(3). 더불어 혈압의 조절과 관련이 깊은 내피세포의 기능장애의 주요 원인이 eNOS의 발현 저하 및 eNOS에 의해 생성되는 NO의 감소 등에 있다고 보고된 바 있다(4). 고혈압은 단지 수축기 혈압을 측정함으로써 그 질병 여부를 판단하는 것 이외에 다양한 예측 인자들을 이용하여 질환의 발생 가능성 여부를 판단하기도 한다. 이와 관련된 인자로 homocysteine은 methionine이 cysteine으로 변환되는 과정의 중간 대사물질로 혈중 homocysteine의 증가는 내피세포의 기능장애, 평활근세포의 증식, 산화적 스트레스 등 체내에 여러 가지 악영향을 미친다(5). 이와 마찬가지로 plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1) 역시 고혈압과 관련이 깊다. 고혈압을 가지고 있는 환자의 경우 그 수준이 증가한다고 알려져 있는 PAI-1은 활성화된 혹은 손상된 내피세포 및 평활근세포에서 증가되며, PAI-1을 증가시키는 요인으로는 cytokines, tumor necrosis factor- α , transforming growth factor- β , angiotensin II 그리고 insulin 등이 있는 것으로 알려져 있다(6). 더불어 혈중 지질 함량 또한 심혈관계 질환과 관련된 위험요소 중 하나로 여러 연구에서 고혈압을 가지고 있는 환자의 경우 정상인에 비해 혈중 지질 함량

Received 16 December 2014; Accepted 26 February 2015

Corresponding author: Tae Bum Lee, Berry & Biofood Research Institute, Jeonbuk 525-943, Korea
E-mail: tblee01@gbri.re.kr, Phone: +82-63-560-5170

이 높은 것으로 나타났다(7).

고혈압을 치료하기 위해 사용되고 있는 치료제의 경우 마른기침, 혈관부종, 고칼륨혈증 등 여러 가지 부작용을 유발할 수 있기 때문에 최근 천연물을 이용한 질병의 치료에 대한 연구가 다양하게 진행되고 있다(8). 고장이 최대 생산자인 복분자(*Rubus occidentalis*)는(9) phenolic acids, flavonoids(flavonols, flavanols), anthocyanins(cyanidin 3-sambubioside, cyanidin 3-glucoside, cyanidin 3-xylosylrutinoside, cyanidin 3-rutinoside, pelargonidin 3-rutinoside), tannins(proanthocyanidins, ellagitannins, gallotannins), stilbenoids(resveratrol) 및 lignans와 같은 생리활성 물질이 풍부하게 존재하는 것으로 알려져 있다(2). Lee 등(10)의 연구에서는 HUVEC 세포를 이용하여 복분자 완숙과 에탄올 50% 추출물 및 부산물인 복분자 나뭇잎과 줄기 추출물의 혈압 개선 효과를 확인한 바 있다. 이외에도 복분자는 항염증 효과, 항암 활성 효과 및 항산화 효과, 콜레스테롤 개선 효과 등을 가지고 있는 것으로 알려져 있다(11-14). 본 연구 이전에 행해진 연구에서 본태성 고혈압 쥐(spontaneously hypertensive rat, SHR)에서 복분자 완숙과 에탄올 50% 추출물의 RAS 기전 중 renin 및 ACE의 억제를 통한 항고혈압 효과를 밝힌 바, 본 실험에서는 본태성 고혈압 쥐를 이용하여 RAS 이외의 혈압 관련 인자에 미치는 복분자 추출물의 효과를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

추출물 제조

복분자 추출물은 완숙과 중량의 10배 용량의 용매(50% EtOH)를 첨가한 후 2시간 동안 농축 추출기(Cosmo 660, Kyungseo Machine, Incheon, Korea)를 이용하여 80°C로 2회 가열 추출하였다. 추출물은 여과하여 농축한 후 동결건조(PVTFD10R, Ilsinbiobase, Gyeonggi, Korea) 하여 사용하였다.

실험동물의 사육환경 및 식이

본 연구에서 사용한 실험동물은 250±10 g인 특정병원체 부재(specific pathogen free, SPF) 상태의 수컷 7주령 SHR과 Wistar Kyoto rats(WKY)로 Halran(Indianapolis, IN, USA)에서 구입하여 사용하였다. 1주간 예비 사육기간을 거친 뒤 37°C heating chamber 내 보정 틀에서 주 1회 혈압 측정에 적응시킨 후 고혈압이 발현된 수컷 SHR 45마리를 선별하여 체중을 기초로 'Z'자 식으로 군 분리하였고, 주 1회 일정한 시간에 디지털 계량기를 사용하여 체중을 측정하였다. 사료는 실험동물용 고형사료(Cargill Agri Purina, Inc., Seongnam, Korea)와 필터 및 자외선 살균기로 여과 살균된 정제수를 자유롭게 섭취하도록 하였다. 실험동물 사육실은 12시간 간격으로 명암을 조절하였고, 온도는 22±2°C, 습도는 50±5%를 유지하였다. 본 동물실험은 (재)고창복분

자연연구소 동물실험윤리위원회의 승인(GBRI-IACUC-13-001)을 받아 시행하였다.

실험군의 구성 및 투여

실험군은 15마리를 한 군으로 하여 총 4개의 실험군으로 분류하였다. SHR 중 수축기 혈압이 150 mmHg 이상으로 고혈압 유발이 확인된 동물을 선별하여 3개 실험군으로 분리하고 WKY를 정상혈압 대조군으로 설정하였다. SHR 실험군은 다시 고혈압대조군, 복분자 추출물 투여군 및 양성대조군으로 나누었다. 복분자 추출물 투여군은 복분자 완숙과 50% 에탄올 추출물(250 mg/kg)을 사용하였으며, 양성대조군의 경우 captopril(35 mg/kg)을 사용하였다. 각 시험물질은 경구용 주사기를 이용하여 12주간 매일 일정한 시간대(오전 10시)에 경구 투여하였으며, 정상대조군 및 고혈압대조군에는 같은 양의 증류수를 투여하였다.

장기 중량 측정

실질 장기인 흉부대동맥, 신장, 심장, 간, 폐를 적출하여 무게 측정 후 실험동물의 체중에 대한 상대 장기 중량을 구하였다. 상대 장기 중량(%)은 '(장기 무게/체중)×100'으로 계산하였다.

수축기 혈압 측정

실험기간 중 주 1회 수축기 혈압을 측정하였다. 혈압 측정의 오차 범위를 줄이기 위해 실험동물을 혈압측정기(BP-2000 blood pressure analysis system, rat platform 2-channel, Visitech Systems, Apex, NC, USA)의 홀더에 보정한 후 37°C heating chamber에서 30분 간 적응시켜 혈압을 2회 반복 측정하였다.

혈액 채취 및 혈액 분석

투여 12주 후 모든 실험동물을 12시간 동안 절식시키고 ether 마취 후 후대정맥에서 혈액을 얻었다. 혈액은 EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid)를 처리하여 4°C 3,000 rpm으로 15분간 원심분리 하여 혈장을 분리하였다.

Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)

Homocysteine(rat homocysteine ELISA kit, Cusabio Biotech Co., Ltd., Newark, DE, USA), PAI-1(rat plasminogen activator inhibitor ELISA kit, Cusabio Biotech Co., Ltd.)의 활성 측정은 rat에서 분리한 혈장을 이용하여 흡광도 450 nm에서 측정하였다.

혈중 지질 함량 분석

Rat에서 분리한 혈장에서 triglyceride(TG), total cholesterol(TCHO), high-density lipoprotein(HDL) 콜레스테롤 함량 및 creatinine, albumin 함량을 생화학측정기(FUJI DRI-CHEM 4000, FUJIFILM, Tokyo, Japan)를 이

용하여 측정하였으며, low-density lipoprotein(LDL) 콜레스테롤 함량은 Friedwald 공식(LDL=TCHO-HDL-TG/5)을 이용하여 계산하였다(15).

RNA 분리

신장 조직으로부터 RNA를 추출하기 위하여 실험동물의 신장 30 mg을 tri reagent(RNAiso PLUS, TAKARA, Otsu, Japan) 1 mL에 넣고 homogenizer로 균질화한 후 5분 동안 상온에 방치하였다. 이후 chloroform 200 µL를 넣어 20초간 voltex mixing 하였고 15,000 rpm으로 10분 동안 원심분리 한 후 상층액을 새로운 튜브에 옮겼다. 상층액과 동량으로 isopropanol을 첨가한 후 10분 동안 방치하였다. 이를 다시 15,000 rpm에서 10분 동안 원심분리 하여 RNA 침전물을 획득하였다. RNA 침전물을 0.1% diethyl pyrocarbonate(DEPC)와 혼합한 70% 에탄올을 넣어 washing 한 후 15,000 rpm에서 5분 동안 원심분리 하였다. 에탄올을 제거한 후 수분 간 침전물을 건조시켜 0.1% DEPC water에 녹였다. RNA 농도(1 OD=40 µg/mL)는 DU^R730 spectrophotometer(Beckman, Fullerton, CA, USA)를 이용하여 260 nm에서 측정하였다.

실시간 역전사 중합효소 연쇄반응(real-time RT-PCR quantification)

First strand cDNA를 50 mM Tris-HCl(pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1 U/µL RNasin(Invitrogen), 1 mM each dNTP, oligo(dT)20 100 ng과 MMLV reverse transcriptase(Invitrogen) 200 U가 함유된 20 µL의 용액에서 총 RNA 2 µg으로부터 합성하였다. Real-time PCR은 Fast Start DNA Master SYBR Green I kit(Roche, Mannheim, Germany)을 이용하여 Light Cycler 2.0에서 증폭하였다. 유전자 분석을 위한 β-actin의 primer(sense, 5'-GGAAATCGTGCG-TGACATTA-3'; antisense, 5'-ATCGGAACCGCTCAT-TG-3')와 eNOS의 primer(sense, 5'-TTCCGGCTGCC-ACCTGATCCTAA-3'; antisense, 5'-AACATGTGTCC-TTGCTCGAGGCA-3')는 NCBI data base로부터 확보하여 제작 및 사용하였다.

병리조직학적 검사

병리조직학적 검사를 위해 적출된 조직의 일부를 10% 중성 formalin에 고정하고 paraffin으로 포매하여 4 µm 두께로 절편한 후, hematoxylin과 eosin(H&E) 염색 후 광학현미경으로 40배 또는 100배의 배율에서 관찰하였다. 병리조직학적 검사는 Nikon eclipse E200(Nikon, Kanagawa, Japan) 현미경을 이용하여 그룹당 15마리씩 한 개체에 대하여 3개의 조직 절편을 만들어 eosinophilic band(E.P)가 있는 변성된 심근세포를 관찰하였고 image analyzer(Focus Technology, Hamburg, Germany)를 이용하여 그룹별 신세동맥의 혈관 내부 직경(lumen diameter, µm)과 벽두께(media thickness, µm) 평균값 및 표준편차를 구하고 벽두께/직경 비율(media thickness/ lumen)(%)을 구하여 군 간 차이를 비교하였다.

통계분석

모든 분석 자료는 평균±표준오차(mean±SE)로 나타내었으며 실험 결과는 SPSS 12.0K(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 P<0.05 수준에서 통계처리 하였고 t-test와 Duncan's multiple range test로 검증하였다.

결과 및 고찰

체중 및 식이, 음수 측정

복분자 완속과 에탄올 50% 추출물 및 양성대조군으로 사용된 captopril을 투여한 12주 동안 매주 1회 체중 증가량, 식이섭취량 및 음수섭취량을 측정하였다(Table 1). WKY에 비해 SHR의 실험개시 시 체중이 다소 낮은 경향을 보였으나 실험 12주 후에는 각 군 간에 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 또한 식이섭취량 및 음수섭취량 측정 결과 모든 군에서 유의적인 차이를 보이지 않았다.

장기 중량 비교

복분자 완속과 에탄올 50% 추출물을 급여한 본태성 고혈압 쥐를 12주 동안 사육 후 측정한 각 장기의 상대 중량은 Table 2와 같다. 심장의 상대 중량은 WKY에 비해 SHR이 더 높은 것으로 나타났으며, 복분자 완속과 에탄올 50% 추출물 처리군 및 captopril을 투여한 양성대조군의 경우 다소

Table 1. Average initial body weight, final body weight, body weight gain, water intake, and food intake in SHR for 12 weeks (unit: g/100 g body weight)

| Group ¹⁾ | Initial body weight | Final body weight | Food intake | Water intake |
|---------------------|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| WKY | 249.8±2.89 ^{b2)3)} | 340.0±4.19 ^a | 15.84±0.15 ^a | 33.84±1.63 ^a |
| SHR | 283.4±4.19 ^a | 340.7±5.80 ^a | 15.87±0.25 ^a | 37.76±1.29 ^a |
| SHR+RBR 250 | 282.8±3.20 ^a | 349.0±4.35 ^a | 16.05±0.18 ^a | 34.44±1.56 ^a |
| SHR+C 35 | 287.2±3.82 ^a | 346.1±5.16 ^a | 16.18±0.18 ^a | 32.18±2.34 ^a |

¹⁾WKY: Wistar Kyoto rats, SHR: spontaneously hypertensive rat, RBR 250: ripe black raspberry 50% ethanol extract 250 mg/kg, C 35: captopril 35 mg/kg.

²⁾Values are expressed as mean±SE (n=15).

³⁾Means with different letters within a column are significantly different at P<0.05 by Duncan's multiple range test.

Table 2. The relative weight of heart, liver, kidney, and lung of the SHRs for 12 weeks

| Group ¹⁾ | Heart | Liver | Kidney | Lung |
|---------------------|----------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| WKY | 0.34±0.01 ^{b2)3)} | 2.00±0.02 ^b | 0.60±0.01 ^a | 0.34±0.01 ^b |
| SHR | 0.39±0.01 ^a | 2.36±0.02 ^a | 0.60±0.01 ^a | 0.40±0.02 ^a |
| SHR+RBR 250 | 0.38±0.01 ^{ab} | 2.32±0.02 ^a | 0.60±0.01 ^a | 0.36±0.02 ^{ab} |
| SHR+C 35 | 0.35±0.02 ^{ab} | 2.35±0.03 ^a | 0.61±0.01 ^a | 0.33±0.01 ^b |

¹⁾Abbreviations: See the Table 1.
²⁾Values are expressed as mean±SE (n=15).
³⁾Means with different letters within a column are significantly different at *P*<0.05 by Duncan's multiple range test.

감소하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 보이지 않았다. 간의 상대 중량은 WKY에 비해 SHR이 더 높게 나타났으며 복분자 완속과 에탄올 50% 추출물 및 양성대조군 역시 WKY에 비해 높은 수치를 보였다. 신장의 상대 중량은 모든 군에서 유의적인 차이를 보이지 않았으며, 폐의 상대 중량은 WKY에 비해 SHR이 유의하게 증가하는 경향을 보였다. 또한 복분자 완속과 에탄올 50% 추출물 투여군의 폐의 상대 중량이 SHR에 비해 감소하는 경향을 보이긴 하였지만 유의적인 차이는 보이지 않았으며, 양성대조군의 경우 유의하게 폐의 상대 중량이 감소하였다.

Systolic blood pressure(SBP)

복분자 완속과 에탄올 50% 추출물이 본태성 고혈압 쥐의 수축기 혈압에 미치는 영향을 알아보기 위해 실험 12주 동안 주 1회 rat의 꼬리 정맥에서 혈압을 측정하였다(Fig. 1). 그 결과 정상대조군은 실험기간 동안 일정하게 낮은 혈압을 유지하였고, 고혈압대조군의 경우 실험 개시 시 수축기 혈압이 203.26±1.46 mmHg로 고혈압이 유발되었음을 확인하였으며 12주 동안 높은 혈압을 유지하였다. 반면 복분자 완속과 에탄올 50% 추출물 투여군의 12주 후 수축기 혈압이 189.83±2.92 mmHg로 12주 후의 고혈압대조군의 평균 혈압치인 215.77±1.20 mmHg에 비해 약 13.1% 감소하였다. 또한 captopril을 투여한 양성대조군의 12주 후 수축기 혈압은 174.09±2.17 mmHg로 고혈압대조군과 비교하였을 때

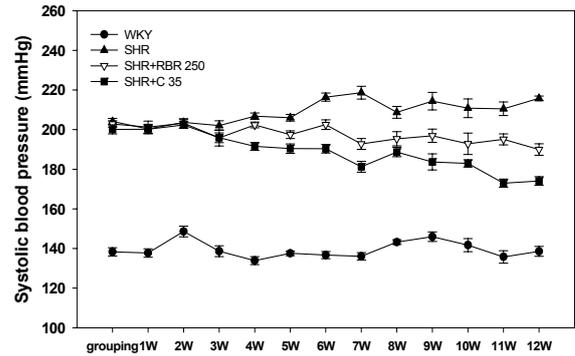


Fig. 1. Changes of systolic blood pressure after treatment of RBR extract (50% EtOH) and captopril in SHR for 12 weeks. Abbreviations: See the Table 1. Values are expressed as mean±SE (n=15).

약 19.4% 혈압이 감소하였다. 더불어 실험 개시 전과 12주 후의 혈압 차이를 비교한 결과 복분자 완속과 에탄올 50% 추출물 투여군과 양성대조군의 혈압이 각각 12.18±3.76 mmHg, 26.11±2.30 mmHg 감소하였다.

복분자 완속과 추출물의 homocysteine 저해 활성

고혈압 및 동맥경화증과 같은 혈관질환을 야기하는 것으로 알려져 있는 homocysteine에 대한 복분자 완속과 에탄올 50% 추출물의 효과를 알아보기 위해 실험 12주 후 실험 동물의 혈액에서 분리한 혈장을 이용하여 혈중 homocysteine 활성을 조사하였다(Fig. 2A). 정상대조군에 비하여 고혈압대조군의 혈중 homocysteine 활성이 약 2배 증가하여 고혈압과 homocysteine 사이에 연관성이 있음을 확인하였다. 또한 복분자 완속과 에탄올 50% 추출물 투여군과 양성대조군 모두 고혈압대조군에 비하여 유의하게 혈중 homocysteine 활성이 감소하여 복분자 완속과 에탄올 50% 추출물의 혈관 보호 효과를 확인할 수 있었다. Homocysteine은 methionine이 cysteine으로 전환되는 대사과정에서 생기는 중간대사물질로 재메틸화 과정에 의해 다시 methionine으로 재합성되거나 cysteine으로 전환되며, 이 과정에

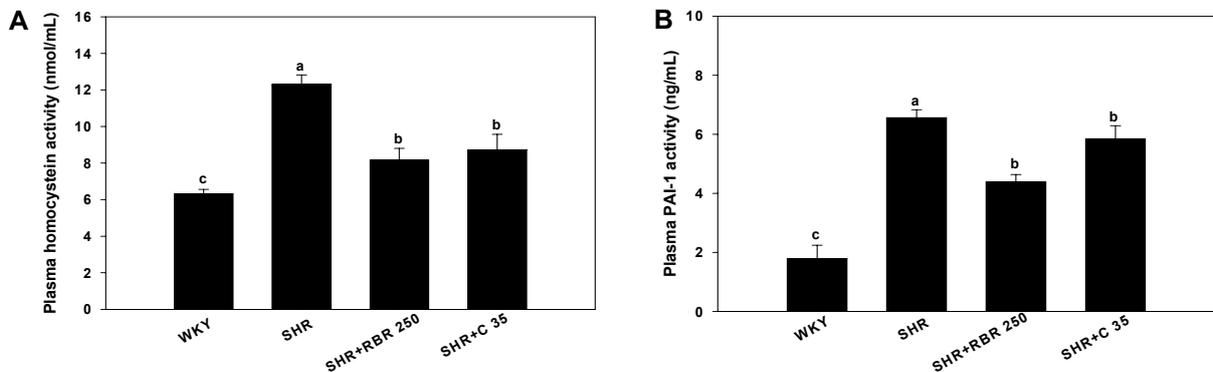


Fig. 2. Effect of RBR extracts (50% EtOH) and captopril on homocysteine (A) and PAI-1 (B) in the plasma of the arterial blood of SHR. Abbreviations: See the Table 1. Values are expressed as mean±SE (n=15). Means with different letters (a-c) above the bars are significantly different between groups at *P*<0.05 by Duncan's multiple range test.

서 보조인자 역할을 하는 folic acid(B₉), pyridoxine(B₆) 그리고 cobalamin(B₁₂)의 결핍은 homocysteine의 고농도화를 야기한다(16). Homocysteine은 혈액의 응고, 평활근세포의 증식 및 산화적 스트레스를 유발하여 NO의 생성을 저해함으로써 내피세포의 기능장애를 일으키는 것으로 알려져 있다(5). 또한 homocysteine은 혈관 평활근세포에서 monocyte chemoattractant protein-1(MCP-1), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6(IL-6), matrix metalloproteinase-2(MMP-2) 등의 방출을 자극하여 염증반응을 매개하고 이를 통해 혈전증을 비롯한 아테롬성 동맥경화증 및 심근경색의 증가를 야기하는 것으로 알려져 있다(17-20). 이전에 선행되었던 연구에서 복분자 완속과 에탄올 50% 추출물의 투여가 본태성 고혈압 쥐의 IL-6 mRNA 발현을 유의하게 감소시켜 본 연구에서의 homocysteine 활성화에 미치는 복분자 완속과 에탄올 50% 추출물의 영향과 연관이 있는 것으로 사료된다.

복분자 완속과 추출물이 PAI-1 활성화에 미치는 영향

실험 12주 후의 실험동물에서 얻은 혈장을 이용하여 복분자 완속과 에탄올 50% 추출물이 혈장의 PAI-1 활성화에 미치는 영향을 조사하였다(Fig. 2B). 정상대조군과 비교하여 고혈압대조군의 혈장 PAI-1 활성이 3.6배 증가하여 고혈압과 PAI-1 사이에 밀접한 연관성이 있음을 확인하였다. 또한 복분자 완속과 에탄올 50% 추출물 투여군의 경우 고혈압대조군과 비교하여 유의적으로 PAI-1 활성이 감소하였으며, captopril을 투여한 양성대조군의 경우 또한 복분자 완속과 에탄올 50% 추출물보다는 미미하지만 유의하게 혈장 PAI-1 활성이 감소하였다. 손상된 내피세포 또는 평활근세포 등에서 생성이 증가되는 PAI-1은 cytokines, tumor necrosis factor- α , transforming growth factor- β , angiotensin II, insulin 등에 의해 발현이 증가되며, 혈장 내의 plasminogen 활성화인자와 결합하여 plasminogen의 혈장 내 섬유소 용해능을 감소시켜 관상동맥 심장질환, 폐혈증, 아테롬성 동맥경화증 등과의 연관성이 보고되고 있다(6,21). 본 실험에서 고혈압대조군의 PAI-1 활성이 크게 증가한 것은 본 실험에서의 homocysteine 활성화 증가로 인한 내피세포의 손상에 의한 것으로 사료된다. 높은 농도의 homocysteine은 혈전증을 야기하는 것으로 알려져 있으며(17), Midorikawa 등(22)의 연구에서 혈관 내피세포 및 평활근세포에 homocysteine을 처리한 결과 농도 의존적으로 PAI-1의 mRNA 및 단백질 발현이 증가하여 homocysteine과 PAI-1 사이에 밀접한 관련이 있음을 증명하였다. PAI-1은 homocysteine 이외에도 혈압을 조절하는 중심 기전인 RAS와 관련이 깊다. 몇몇 연구에 따르면 angiotensin II 및 angiotensin IV에 의해 PAI-1의 발현이 증가됨을 보고하였으며, angiotensin I을 angiotensin II로 전환시키는 ACE는 plasminogen 활성화인자의 생성을 촉진시키는 bradykinin의 활성을 저해시켜 RAS가 PAI-1의 조절과 밀접한 관련이 있음을 보고하였다

(23-26). 이전에 선행되었던 연구 결과 복분자 완속과 에탄올 50% 추출물을 투여한 본태성 고혈압 쥐의 혈장 ACE 활성 및 renin의 mRNA 발현이 고혈압대조군과 비교하여 유의하게 감소되어 이미 복분자 완속과 에탄올 50% 추출물이 RAS의 개선에 도움이 됨을 밝힌 바 있다(2). 더불어 Lee 등(10)은 HUVEC 세포에 복분자 완속과 및 잎, 줄기 추출물을 각각 200 μ g/mL 처리한 결과 ACE 단백질 발현이 유의하게 감소하였으며, 복분자에 함유되어 있는 폴리페놀 중 gallic acid와 myricetin이 ACE 단백질 발현 억제에 효과가 있음을 보고하였다. 따라서 직접적이지는 않지만 본 실험에서 복분자 추출물의 PAI-1 활성화 억제 효과가 RAS의 개선 효과와 관련이 있는 것으로 사료된다.

복분자 완속과 추출물(50% EtOH)이 eNOS 유전자 발현에 미치는 영향

복분자 완속과 에탄올 50% 추출물이 NO 합성효소인 eNOS 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보기로 실험 12주 후 동물을 희생하여 적출한 심근에서 eNOS 유전자 발현을 조사하였다(Fig. 3). 그 결과 정상대조군과 비교하여 고혈압대조군의 eNOS 유전자 발현이 약 41% 감소하였다. 이는 앞서 설명한 homocysteine과 같은 염증인자에 의한 내피세포의 손상에 의한 것으로 생각된다. 반면 복분자 완속과 에탄올 50% 추출물 투여군의 eNOS 유전자 발현이 고혈압대조군과 비교하여 32% 증가하였으며 captopril을 투여한 양성대조군의 경우 eNOS 유전자 발현이 증가하는 경향을 보였으나 고혈압대조군과 유의적인 차이를 나타내지는 않았다. eNOS에 의해 생성된 NO는 혈관확장 작용을 하며 혈소판의 응집을 저해함으로써 혈전증으로부터 혈관을 보호한다(27). Huang 등(28)의 연구에 따르면 eNOS 유전자에 결함이 있는 mice의 경우 NO에 의한 내피 의존적 혈관확장이 결여되며, 이와 마찬가지로 NOS의 억제를 통한 NO 생성의 차단이 말초 혈관수축 및 고혈압을 야기하는 것으로 알려져

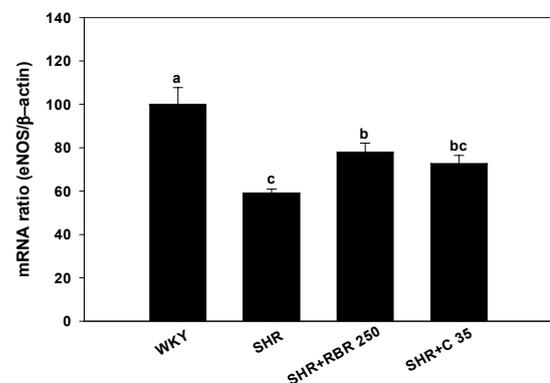


Fig. 3. Effects of RBR extracts (50% EtOH) and captopril on expression of eNOS mRNA in the heart tissue of SHR. Abbreviations: See the Table 1. Values are expressed as mean \pm SE (n=15). Means with different letters (a-c) above the bars are significantly different between groups at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 3. Plasma albumin (ALB) and creatinine concentration (CRE) in SHR for 12 weeks

| Group ¹⁾ | WKY | SHR | SHR+ RBR 250 | SHR+ C 35 |
|---------------------|----------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| ALB (g/dL) | 5.35±0.09 ^{b2)3)} | 5.60±0.07 ^a | 5.68±0.08 ^a | 5.58±0.06 ^a |
| CRE (mg/dL) | 0.29±0.01 ^a | 0.23±0.01 ^b | 0.23±0.01 ^b | 0.21±0.01 ^b |

¹⁾Abbreviations: See the Table 1.

²⁾Values are expressed as mean±SE (n=15).

³⁾Means with different letters within a row are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

있다(29,30). 본 실험에서 복분자 완속과 50% 에탄올 추출물 투여 결과 eNOS의 유전자 발현이 눈에 띄게 증가하였다. 이와 관련하여 이전에 선행했던 연구에서 복분자 완속과 50% 에탄올 추출물이 HUVEC 세포의 NO 생성을 증가시킨다는 연구 결과를 얻은 바 있다(2). Lee 등(10)의 연구에서는 HUVEC 세포에서 복분자 열매(완속과), 줄기 추출물이 NO 생성 및 eNOS 단백질 발현을 증가시키며, 나아가 복분자에 함유되어 있는 폴리페놀(ellagic acid, gallic acid, rutin, quercetin, ferulic acid, *p*-coumaric acid, caffeic acid, luteolin, myricetin) 중 gallic acid와 myricetin이 NO 생성 및 eNOS 단백질 발현의 증가에 뛰어난 효과가 있다고 보고하였다. 또한 Yoon 등(4)의 연구에서 복분자 추출물을 HUVEC에 처리하여 eNOS의 단백질 발현을 확인한 결과 농도 및 시간 의존적으로 eNOS의 단백질 발현이 증가하였음을 보고하여 본 실험과 유사한 양상을 보였다.

Albumin/creatinine 농도

복분자 완속과 에탄올 50% 추출물이 신기능에 미치는 영향을 알아보기 위해 실험 12주 후 채취한 혈장을 이용하여 creatinine 및 albumin의 농도를 측정하였다(Table 3). 그 결과 creatinine의 경우 WKY군이 SHR군(고혈압대조군, 복분자 완속과 에탄올 50% 추출물 투여군, 양성대조군)들에 비해 혈중 creatinine의 농도가 유의적으로 높았으며, SHR군 간에는 creatinine의 농도에 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 또한 혈중 albumin 수치의 경우 WKY군이 SHR군들에 비해 그 수치가 상대적으로 낮았으며 고혈압대조군과 복분자 완속과 에탄올 50% 추출물 투여군 및 양성대조군 사이에는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 신장은 고혈압과 밀접한 관련이 있는 장기 중 하나로 체액의 전해질량 및 삼투압의 조절 등 항상성의 유지에 중요한 역할을 하며 신장의

기능 저하는 고혈압과 밀접한 관련이 있다(31). Creatinine은 근육의 에너지 대사서 생성되는 부산물로 신장을 통해 뇨로 배출된다(32). 하지만 신장 기능에 이상이 있을 경우 creatinine은 뇨로 배출되지 못하고 혈액 내에 쌓이게 되며, 이는 신장 기능 저하의 지표로 활용되고 있다(33). Albumin 또한 신장의 기능을 판단하는 지표로 사용되는데, 정상적인 신장은 albumin을 여과하여 다시 체내로 재흡수 시키며 미량만을 뇨를 통해 배출한다(34). 또한 여러 연구들에서 증가된 혈청 albumin 수치와 고혈압과의 관계에 대해 보고한 바 있다(35-37).

혈중 지질 함량

복분자 완속과 50% 에탄올 추출물이 혈중 지질 함량에 미치는 효과를 알아보기 위해 실험 12주 후 rat의 혈액을 채취하여 분리한 혈장을 이용해 혈중 지질 함량을 측정하였다(Table 4). 혈장의 TG 함량을 비교한 결과 정상대조군, 고혈압대조군, 복분자 완속과 에탄올 50% 추출물 투여군 및 양성대조군의 TG 함량에 유의적인 차이가 없었다. 하지만 TCHO, HDL 및 LDL 콜레스테롤의 경우 정상대조군으로 사용된 WKY에 비해 본태성 고혈압 모델인 SHR에서 그 함량이 상대적으로 낮게 나타났다. 동맥경화를 유발시킬 수 있는 혈중 지질의 증가는 고혈압에 영향을 미칠 수 있으며 이로 인한 고지혈증 및 고혈압은 관상동맥 질환의 위험성을 증가시킨다고 알려져 있다(6). 본 실험과 유사한 결과로 Jung 등(38)은 일반식으로 사육한 WKY에 비해 SHR이 기본적으로 혈청 콜레스테롤 농도가 낮았으며 고콜레스테롤 식이로 인한 혈청 콜레스테롤 농도의 증가 또한 완만하였다고 보고하였다.

병리조직학적 검사 결과

복분자 완속과 에탄올 50% 추출물이 본태성 고혈압 쥐의 심장 병변에 미치는 영향을 알아보기 위해 실험 12주 후 실험 동물을 희생하여 심장조직을 적출하여 H&E 염색을 한 후 100배의 배율에서 관찰하였다(Fig. 4). 그 결과 고혈압대조군의 심근에서 E.P를 가진 변성세포들의 수가 69.53±3.74로 정상대조군의 24.36±4.09에 비하여 유의하게 증가하였다. 또한 복분자 완속과 에탄올 50% 추출물 투여군(51.44±3.71)이 고혈압대조군(69.53±3.74)에 비해 변성세포의 수가 유의적으로 감소하여 이전의 연구(2)에서 수행된 결과

Table 4. Contents of triglyceride (TG), total cholesterol (TCHO), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) in plasma (unit: mg/dL)

| Group ¹⁾ | TG | TCHO | HDL-C | LDL-C |
|---------------------|-----------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
| WKY | 76.40±6.47 ^{a2)3)} | 101.08±1.93 ^a | 52.00±0.92 ^a | 32.80±1.61 ^a |
| SHR | 66.18±2.54 ^a | 57.43±1.45 ^b | 26.07±0.42 ^b | 18.84±1.06 ^b |
| SHR+RBR 250 | 68.75±2.67 ^a | 57.63±1.80 ^b | 26.69±0.79 ^b | 18.28±1.36 ^b |
| SHR+C 35 | 68.47±2.56 ^a | 56.00±1.32 ^b | 26.73±0.37 ^b | 16.92±1.10 ^b |

¹⁾Abbreviations: See the Table 1.

²⁾Values are expressed as mean±SE (n=15).

³⁾Means with different letters within a column are significantly different at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

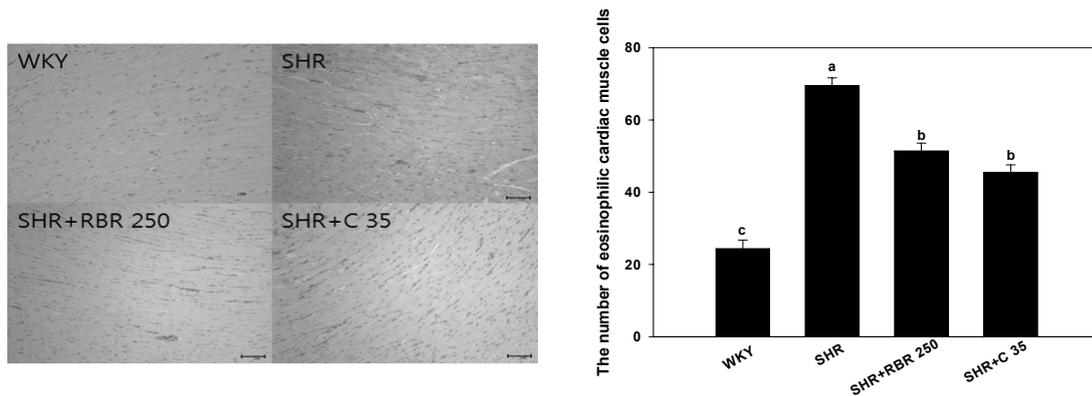


Fig. 4. Histologic findings of cardiac muscles and the number of eosinophilic cardiac muscle cells by treatment of RBR extracts (50% EtOH) and captopril in SHR, respectively. Abbreviations: See the Table 1. Values are expressed as mean±SE (n=15). Hematoxylin and eosin stain, ×100. Scale bar=100 μm. Means with different letters (a-c) above the bars are significantly different between groups at $P<0.05$ by Duncan's multiple range test.

와 비슷한 양상을 보이는 바 복분자 완속과 에탄올 50% 추출물이 심장의 병변 완화에 효과가 있는 것으로 사료된다.

요 약

본 연구는 본태성 고혈압 쥐인 SHR을 이용하여 복분자 완속과 에탄올 50% 추출물의 혈압 강하 효과 및 그와 관련된 인자들[endothelial nitric oxide synthase(eNOS), homocysteine, plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1), albumin, creatinine, blood lipid 등]에 미치는 영향을 조사하였다. 본태성 고혈압 쥐에게 복분자 완속과 에탄올 50% 추출물을 12주간 투여한 결과 수축기 혈압이 고혈압대조군에 비하여 약 12% 억제되었다. 또한 eNOS 유전자 발현을 유의하게 증가하였으며 혈청 homocysteine 및 PAI-1의 활성이 눈에 띄게 감소됨을 확인하였다. 또한 심근 호산성 세포수를 감소시켜 심장의 손상 및 병변을 경감시키는 효과가 있음을 확인하였다. 그러나 혈중 지질 및 혈청 albumin, creatinine의 농도에는 각 군 간의 변화가 뚜렷하게 나타나지 않았다. 본 연구 결과 복분자 완속과 에탄올 50% 추출물은 혈관의 손상을 야기할 수 있는 homocysteine이나 PAI-1과 같은 염증성 인자로부터 혈관을 보호하고 이를 통해 eNOS의 유전자 발현을 개선시킴으로써 혈압의 조절에 영향을 미치는 것으로 나타났으며, 향후 심혈관계 질환의 개선에 도움이 되는 식품소재로서의 가능성이 있음을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 지역 농식품 선도클러스터 육성사업의 2013년도 연구비 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Ministry of Health and Welfare. 2006. *The third Korea National Health and Nutrition Examination Survey*. Sejong,

Korea. p 61-66.
 2. Lee JH, Choi HR, Lee SJ, Lee MJ, Ko YJ, Kwon JW, Lee HK, Jeong JT, Lee TB. 2014. Blood pressure modulating effects of black raspberry extract *in vitro* and *in vivo*. *Korean J Food Sci Technol* 46: 375-383.
 3. Gielis JF, Lin JY, Wingler K, Van Schil PE, Schmidt HH, Moens AL. 2011. Pathogenetic role of eNOS uncoupling in cardiopulmonary disorders. *Free Radic Biol Med* 50: 765-776.
 4. Yoon HJ, Park SY, Oh ST, Lee KY, Yang SY. 2001. Extract of *Rubus coreanus* fruits increases expression and activity of endothelial nitric oxide synthase in the human umbilical vein endothelial cells. *J Life Sci* 21: 44-45.
 5. Faeh D, Chiolero A, Paccaud F. 2006. Homocysteine as a risk factor for cardiovascular disease: should we (still) worry about it? *Swiss Med Wkly* 136: 745-756.
 6. Yamamoto K, Takeshita K, Kojima T, Takamatsu J, Saito H. 2005. Aging and plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) regulation: implication in the pathogenesis of thrombotic disorders in the elderly. *Cardiovasc Res* 66: 276-285.
 7. Lee SW, Koo ES, Kim BS, Kang JH, Lee MH, Park JR, Shin HC, Jung HW, Lee HS. 1998. The relationships between blood pressure and serum lipids in Korean adults. *Korean Circ J* 28: 1552-1560.
 8. Atlas SA. 2007. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. *J Manag Care Pharm* 13: S9-20.
 9. Lee J, Dossett M, Finn CE. 2013. Anthocyanin fingerprinting of true bokbunja (*Rubus coreanus* Miq.) fruit. *J Funct Foods* 5: 1985-1990.
 10. Lee MJ, Lee SJ, Choi HR, Lee JH, Kwon JW, Chae KS, Jeong JT, Lee TB. 2014. Improvement of cholesterol and blood pressure in fruit, leaf and stem extracts from black raspberry *in vitro*. *Korean J Medicinal Sci* 22: 177-187.
 11. Jeong JH, Jung H, Lee SR, Lee HJ, Hwang KT, Kim TY. 2010. Anti-oxidant, anti-proliferative and anti-inflammatory activities of the extracts from black raspberry fruits and wine. *Food Chem* 123: 338-344.
 12. Zhang Z, Knobloch TJ, Seamon LG, Stoner GD, Cohn DE, Paskett ED, Fowler JM, Weghorst CM. 2011. A black raspberry extract inhibits proliferation and regulates apoptosis in cervical cancer cells. *Gynecol Oncol* 123: 401-406.
 13. Wang SY, Lin HS. 2000. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with

- cultivar and developmental stage. *J Agric Food Chem* 48: 140-146.
14. Lee MJ, Lee SJ, Choi HR, Lee JH, Jeong JT, Choi KM, Cha JD, Hwang SM, Park JH, Lee JH, Lee TB. 2014. Cholesterol improvement effects of co-treatment with black raspberry and red ginseng extracts in mice fed a high cholesterol diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 1491-1499.
 15. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18: 499-502.
 16. Ghassibe-Sabbagh M, Platt DE, Youhanna S, Abchee AB, Stewart K, Badro DA, Haber M, Salloum AK, Douaihy B, el Bayeh H, Othman R, Shasha N, Kibbani S, Chammas E, Milane A, Nemr R, Kamatani Y, Hager J, Cazier JB, Gauguier D, Zalloua PA. 2012. Genetic and environmental influences on total plasma homocysteine and its role in coronary artery disease risk. *Atherosclerosis* 222: 180-186.
 17. Pang X, Liu J, Zhao J, Mao J, Zhang X, Feng L, Han C, Li M, Wang S, Wu D. 2014. Homocysteine induces the expression of C-reactive protein via NMDAR-ROS-MAPK-NF- κ B signal pathway in rat vascular smooth muscle cells. *Atherosclerosis* 236: 73-81.
 18. Undas A, Brozek J, Szczeklik A. 2005. Homocysteine and thrombosis: from basic science to clinical evidence. *Thromb Haemost* 94: 907-915.
 19. Unlü Y, Keleş S, Becit N, Koçoğullari CU, Koçak H, Bakan E. 2005. Hyperhomocysteinaemia as a risk factor for deep-vein thrombosis. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 30: 315-318.
 20. den Heijer M, Blom HJ, Gerrits WB, Rosendaal FR, Haak HL, Wijermans PW, Bos GM. 1995. Is hyperhomocysteinaemia a risk factor for recurrent venous thrombosis? *Lancet* 345: 882-885.
 21. Kang HJ, Han KH, Choe SC, Kim HS, Sohn DW, Oh BH, Lee MM, Park YB, Choi YS, Lee YW. 1998. 4G/5G polymorphism of plasminogen activator inhibitor-1 gene and its effects on coronary artery disease. *Korean Circ J* 28: 1105-1111.
 22. Midorikawa S, Sanada H, Hashimoto S, Watanabe T. 2000. Enhancement by homocysteine of plasminogen activator inhibitor-1 gene expression and secretion from vascular endothelial and smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 272: 182-185.
 23. Kerins DM, Hao Q, Vaughan DE. 1995. Angiotensin induction of PAI-1 expression in endothelial cells is mediated by the hexapeptide angiotensin IV. *J Clin Invest* 96: 2515-2520.
 24. Vaughan DE. 1998. Fibrinolytic balance, the renin-angiotensin system and atherosclerotic disease. *Eur Heart J* 19: G9-12.
 25. Nishimura H, Tsuji H, Masuda H, Kasahara T, Yoshizumi M, Sugano T, Kimura S, Kawano H, Kunieda Y, Yano S, Nakagawa K, Kitamura H, Nakahara Y, Sawada S, Nakagawa M. 1999. The effects of angiotensin metabolites on the regulation of coagulation and fibrinolysis in cultured rat aortic endothelial cells. *Thromb Haemost* 82: 1516-1521.
 26. Brown NJ, Nadeau JH, Vaughan DE. 1997. Selective stimulation of tissue-type plasminogen activator (t-PA) *in vivo* by infusion of bradykinin. *Thromb Haemost* 77: 522-525.
 27. Li H, Förstermann U. 2000. Nitric oxide in the pathogenesis of vascular disease. *J Pathol* 190: 244-254.
 28. Huang PL, Huang Z, Mashimo H, Bloch KD, Moskowitz MA, Bevan JA, Fishman MC. 1995. Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 377: 239-242.
 29. Aisaka K, Gross SS, Griffith OW, Levi R. 1989. NG-methylarginine, an inhibitor of endothelium-derived nitric oxide synthesis, is a potent pressor agent in the guinea pig: does nitric oxide regulate blood pressure *in vivo*? *Biochem Biophys Res Commun* 160: 881-886.
 30. Rees DD, Palmer RM, Moncada S. 1989. Role of endothelium-derived nitric oxide in the regulation of blood pressure. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 3375-3378.
 31. Park SH, Hahm TS, Han JH. 2005. Effects of ethanol-extract of lotus root in the renal function and blood pressure of fructose-induced hypertensive rats. *J East Asian Soc Dietary Life* 15: 165-170.
 32. Henry JB. 2001. *Clinical diagnosis and management by laboratory methods*. 20th ed. WB Saunders Company, Philadelphia, PA, USA. p 17-19.
 33. Pagana KD, Pagana TJ. 1998. *Mosby's manual of diagnostic and laboratory test*. Mosby Inc., St. Louis, MO, USA. p 97-100.
 34. Glodny B, Unterholzner V, Taferner B, Hofmann KJ, Rehder P, Strasak A, Petersen J. 2009. Normal kidney size and its influencing factors: a 64-slice MDCT study of 1,040 asymptomatic patients. *BMC Urol* 9: 19.
 35. Høstmark AT, Tomten SE, Berg JE. 2005. Serum albumin and blood pressure: a population-based, cross-sectional study. *J Hypertens* 23: 725-730.
 36. Menne J, Chatzikyrkou C, Haller H. 2010. Microalbuminuria as a risk factor: the influence of renin-angiotensin system blockade. *J Hypertens* 28: 1983-1994.
 37. Hu H, Sparrow D, Weiss S. 1992. Association of serum albumin with blood pressure in the normative aging study. *Am J Epidemiol* 136: 1465-1473.
 38. Jung YS, Kim IS, Park SJ, Kim KM, Lee KJ, Kwak MH, Kim TH, Kim CJ, Ryu WS, Ryoo UH, Song KY, Cho SH. 1997. Ultrastructural changes of the aorta in spontaneously hypertensive rats and the effect of high cholesterol diet. *Korean Circ J* 27: 633-643.