

천연물 복합 추출물 (HAE-06)의 기관지 확장에 미치는 영향

김대성 · *김혜음*

한풍제약 연구부 부장, *원광대학교 한방심신증후군연구센터 연구교수

Effect of Natural Product Complex Extract (HAE-06) on Bronchial Dilation

Dae Sung Kim and *Hye Yoom Kim*

General Manager, Dept. of Research, Hanpoong Pharm & Foods Co., Wanju 54843, Korea

*Research Professor, Hanbang Cardio-Renal Syndrome Research Center, Wonkwang University, Iksan 54538, Korea

Abstract

HAE-06 extract is a mixture of four medicinal plants, namely *Lonicerae Folium et Caulis* (*Lonicera japonica*), *Scutellariae Radix* (*Scutellaria baicalensis*), *Adenophorae Radix* (*Adenophora triphylla* var. *japonica*), and *Polygonati Oddorati Rhizoma* (*Polygonatum odoratum* var. *pluriflorum*). The HAE-06 extract demonstrated a concentration-dependent relaxing effect and enhanced cAMP production in bronchial smooth muscle that had been stimulated to contract with acetylcholine. Using a blocker, it was confirmed that the effect was through the β_2 -adrenergic receptor/cAMP/PKA pathway. In addition, it is thought that the HAE-06 extract has a bronchial smooth muscle relaxation effect by reducing the inflow of Ca^{2+} through the K^+ and Ca^{2+} channels present in the sarcoplasmic membrane. If research continues in the future, it is believed that it will be possible to use it as a material for pharmaceuticals and functional foods.

Key words: natural product complex extract, HAE-06, bronchial dilation

서론

만성 폐쇄성 폐질환(COPD)은 매년 전 세계적으로 300만 명 이상을 사망에 이르게 한다(Rabe & Watz 2017). 만성폐쇄성폐질환은 초기에는 증상을 못 느끼고 기침과 호흡곤란이 흔한 증상이기에 단순히 증상이 가라앉으면 질병이 없어졌거나 나아갔다고 인식하곤 하곤 한다(Brandsma 등 2020; Ritchie & Wedzicha 2020). 가래, 기침과 함께 기관지 확장증, 기관지 천식, 폐렴, 심부전, 폐암 등 여러 질환에서도 발병되기 때문에 호흡기에 관련하여 급성 및 만성 기관지염, 감기, 기타 호흡기 감염 등의 질환과 관련하여 치료제로써 다양한 진해거담제 및 기관지 확장제가 많이 사용되고 있다(Brandsma 등 2020). 기관지 점막에 알레르기성 염증이 생기는 질환인 기관지 천식을 치료하기 위해서 좁아진 기관지를 넓게 만들어 급성 호흡기 질환에 효과적인 ‘기관지 확장

제(bronchodilator)’나 알레르기의 근본인 염증을 제거하고 만성 호흡기 질환에 효과적이라는 ‘기관지 염증 치료제’를 사용하여 치료를 한다(Williams & Rubin 2018). 기관지 확장제는 대표적으로 교감신경 자극제(β_2 -adrenergic agonist)로써 기관지 근육의 경련을 완화시켜 확장효과를 보인다(Cazzola 등 2012). 기도가 좁아지게 되면 기관지를 확장하기 위하여 부교감 신경의 효과를 차단시켜주는 항콜린성 약물(anticholinergics)도 널리 사용되고 있다(Matera 등 2020). 임상적으로 기관지 확장제는 급성 천식 발작 시 사용하며 강력한 기관지 확장작용을 나타낸다(Williams & Rubin 2018). 기관지 항염증제는 기관지의 알레르기 염증 반응을 억제하여 천식 발작을 예방하는 작용을 나타낸다(Kim & Criner 2013). 대표적으로 스테로이드(steroid)가 가장 효과적인 천식 치료 약물로 알려져 있으며, 아젤라스틴(Azelastine), 크로몰린제(cromolyn), 트롬복산조절제(thromboxanes) 등이

* Corresponding author: Hye Yoom Kim, Research Professor, Hanbang Cardio-Renal Syndrome Research Center, Wonkwang University, Iksan 54538, Korea. Tel: +82-63-850-6447, Fax: +82-63-850-7260, E-mail: hyeyoomc@naver.com

사용되고 있다(Dasgupta 등 2013). 그 중, 천식 발작시 완화시키기 위해 기관지 확장효과가 있다고 알려진 테오필린(theophylline)은 기관지 확장 효과 외에도 항 알레르기 염증 효과가 있다고 알려져 있다(Cazzola 등 2012).

기도의 평활근은 부교감신경(muscarinic receptors) 및 교감신경(adrenergic receptor)의 지배를 받고 있으며 기도의 과민반응은 신경들 간의 불균형에 의하여 유발된다고 볼 수 있다(Cazzola 등 2012). 사람과 포유동물에서는 기관지에 손상을 입게 되면 부교감신경이 자극되어 아세틸콜린(acetylcholine, ACh)의 분비에 의하여 기관지 경련이 유발되며 그 외 매개물질의 분비와 더불어 직접적으로 평활근에 작용하여 기관지 수축을 유발 한다(Kume 등 2018). 한편 기관지 과민성에 의하여 기관 상피세포의 기능장애나 손상이 일어나 기도 감염이나 천식을 유발시킬 수 있다(Wasilewski 등 2014; Lourenço 등 2020). 기관 내로 자극물질들이 들어왔을 경우 기관 상피세포가 손상되어 있으면 외피유도인자(epithelium-derived relaxing factor, EDRF)의 생성 방해, 신경전달물질들의 효소 분해 작용의 감소 등에 의해 장벽이 손상되어 기도를 자극하여 기도의 과민반응을 초래할 수 있다(Farah 등 2009; Vanhoutte PM 2013). 세포 내 칼슘(Ca^{2+})이 증가하게 되면 Ca^{2+} 이 calmodulin이라는 단백질과 결합하여 Ca^{2+} -calmodulin 복합체를 형성하게 된다. 이 복합체는 마이오신 경쇄(myosin light chain, MLC) kinase를 활성화시켜 myosin의 light chain을 인산화와 이로 인해 actin-myosin의 상호작용이 향진되게 되어 평활근이 수축된다(Coultrap & Bayer 2014). 기관지 평활근은 근수축과 관련된 무스카린성 수용체(Muscarinic acetylcholine receptor, mAChR)를 보유하고 있어, 고리형아데노신일인산(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)의 감소 및 K^+ 통로의 폐쇄로 인한 세포 내 Ca^{2+} 이온의 이동 증가나 β -아드레날린성 수용체(β_2 -adrenergic receptor) 활성화 작용 등으로 인하여 평활근 수축을 유도하게 된다(Semenov & Brenner 2018). 기관지 확장제 중 β_2 항진제는 β_2 수용체에 선택적으로 작용하여 세포내 cAMP를 상승시켜 기도 평활근을 이완시킴으로써 기관지확장 효과를 나타 낸다(Ehlert FJ 2003).

천연물 기능성 소재들은 오랜 기간의 경험을 근거로 생리활성 효능이 검증되었고, 낮은 부작용이 있다는 장점이 있다(Stamatiou & Pierris 2013). 이를 바탕으로 천연물 기능성 소재로부터 생리활성 물질을 탐색하여 질병의 예방 및 효과를 갖는 제품을 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있다(Kim SH 2010; Akopov 등 2015). 천연물 복합 소재는 천연물로 구성된 여러 물질의 복합적인 구성이므로 다양한 성분이 복합적으로 광범위한 효능을 나타낼 수 있으며, 추출 방법 또는 배합비에 따라 효능이 달라질 수 있다(Lee 등 2011;

Yoon WH 2013; Shin 등 2021). 따라서 천연물 기능성 소재로부터 새로운 효능을 확인하기 위한 연구의 일환으로 HAE-06 추출물이 백서의 기관지 평활근 확장 효과에 대한 작용 기전을 검토하고자 했다. 본 연구에서는 사용된 HAE-06 추출물은 인동(Honeysuckle), 황금(Skullcap), 잔대(Japanese lady bell) 및 등굴레(Solomon's seal)의 혼합물로서, 학명 및 약명은 *Lonicera japonica*(인동등), *Scutellariae Radix*(황금), *Adenophora triphylla*(사삼), *Polygonatum odoratum*(옥죽)으로 불리고 있다. 우리의 연구는 HAE-06 추출물의 새로운 호흡기증상 완화제 및 기관지 확장에 도움을 줄 수 있는 기능성 소재로서 개발에 필요한 기초 자료를 제공하려고 한다.

재료 및 방법

1. 천연물 복합 소재(HAE-06)의 추출 및 제조

본 실험에 사용한 HAE-06 천연물 복합 소재는 인동, 꿀풀, 잔대, 및 등굴레로 구성되어 있으며, 그 비율은 8.8:1:1이다(Table 1). 인동, 황금, 잔대 및 등굴레는 동경종합상사에서 구입하였으며, 30% 주정에 식초가 3% 되도록 혼합한 용매로 추출 하였다(Table 1). 인동은 줄기와 잎을, 황금과 잔대는 뿌리를 사용했으며, 등굴레는 뿌리와 줄기를 사용했다. 95°C에서 3시간 동안 시료 중량의 10배 양을 가한 추출을 두 번 반복 했으며, 완료된 HAE-06 추출물은 원심 분리하여 여과하였고, 추출물을 농축하여 동결건조 후 냉동실에 보관했다. 인동, 꿀풀, 잔대, 및 등굴레를 8.8:1:1:1의 비율로 혼합한 HAE-06의 각각 추출 수율은 28.8, 26.75, 31.4, 31.6, 22.05 및 25.25%였다.

2. HAE-06 추출물의 high performance liquid chromatography (HPLC) 분석

천연물 복합 소재인 HAE-06 중 꿀풀의 성분인 baicalin 및 baicalein의 함량을 HPLC를 이용하여 분석하였다. HPLC는 Waters 2695, Waters™ 996 photodiode array detector (PDA)를 사용하였고, 컬럼은 Shiseido Capcell Pak C18 column을 사용하였다. 꿀풀 분석용 이동상은(A)1% acetic acid, (B)acetonitrile과 MeOH(7:3) 혼합액의 1% acetic acid가 첨가된 두 용매를 45분간 변화시켰다(Table 2). 인동 분석용 이동상은(A)0.1% formic acid, (B)100% MeOH에 0.1% formic acid가 첨가된 두 용매를 45분간 변화시켰다(Table 3).

3. 기관지 분리

몸무게 약 250~300 g의 수컷 백서(Sprague-Dawley)의 탈골시킨 이후 흉곽을 절제하여 기관지를 분리한다. 분리된 기관지를 혼합기체(5% CO₂와 95% O₂)로 포화된 차가운

Table 1. Mixing ratio of HEA-06 extract

Natural products	Scientific name	Mixing ratio
Honeysuckle	<i>Lonicera japonica</i>	8.8
Skullcap	<i>Scutellaria baicalensis</i>	1
Japanese lady bell	<i>Adenophora Radix</i>	1
Solomon's Seal	<i>Polygonatum odoratum</i>	1

Table 2. HPLC gradient conditions for the measurement of baicalin and baicalein in *Scutellariae Radix*

Time (min)	Mobile phase (%)	
	A	B
0	75	25
10	68	32
20	55	45
24	55	45
35	52	48
40	75	25
45	75	25

Table 3. HPLC gradient conditions for the measurement of loganin, organic acid, and sweroside in *Lonicera japonica*

Time (min)	Mobile phase (%)	
	A	B
0	90	10
5	80	20
10	75	25
35	70	30
40	90	10
45	90	10

Krebs 용액(118 mM NaCl, 25 mM NaHCO₃, 10 mM glucose, 4.7 mM KCl, 1.5 mM CaCl₂, 1.2 mM KH₂PO₄, 1.1 mM MgSO₄, pH 7.4)에 넣고 평활근을 손상시키지 않도록 결합조직 및 주위에 붙은 지방을 제거한 후 약 길이 3~4 mm의 절편을 만들었다. 본 연구는 원광대학교 동물실험 윤리위원회의 규정에 따라 심의를 받은 후 진행하였으며, 동물관리 규정을 준수했다(승인번호: WKU20-28).

4. 기관지의 장력 측정

기관지 절편을 37.4°C의 Krebs 용액에 혼합기체로 포화시킨 organ chamber에 넣어 장력(isometric tension)을 힘-변위 변환기(Grass FT 03, GRASS Instrument, MA, USA)가 장착된 생리 기록계(Grass Model 7E, Grass Instrument, MA,

USA)를 이용하여 측정한다. 이때 순환기(circulator, Model CW-10GL, JEIO TECH, Korea)에 의해 일정한 온도를 유지한다. 기관지의 장력을 천천히 증가시켜 최적의 장력(2 g)에 도달하도록 하였으며, 90분 동안 안정적인 상태로 유지하도록 했다. 기관지 절편은 아세틸콜린(acetylcholine, 100 μM)으로 수축을 유도했으며, HAE-06 추출물을 농도 누적적으로 첨가하여 기관지의 긴장도 변화를 측정했다. 아세틸콜린으로 유도한 수축력을 100%로 가정하고 HAE-06 추출물의 이완율(%)을 산출했다.

5. 기관지 cAMP의 측정

Krebs 용액에 혼합기체(5% CO₂와 95% O₂)를 공급해 주면서 기관지 절편을 넣어 30분간 유지 시킨 후 3-isobutyl-1-methylxanthine(IBMx, 100 μM)과 아세틸콜린(100 μM)을 넣어 HEA-06 추출물(1, 2.5, 5 mg/mL)을 처리하여 반응 시켰다. 반응 정지를 위해 기관지 조직은 곧바로 액체 질소에 넣어 cAMP 농도 측정에 이용했다. 기관지 조직을 염산(0.1 M, hydrochloric acid) 존재 하에서 균질화시킨 후 15분간 원심 분리(13,000 g)하여 얻은 상층액을 direct cAMP ELISA kit(Enzo, ADI-900-066)를 이용하여 측정했다.

6. 통계분석

실험의 결과들은 평균±표준편차로 표기하였으며, student *t*-test를 이용하여 유의성을 검증했다(Sigma plot 10.0 프로 그래프). 통계적인 유의성은 *p*값이 0.05 이하인 경우를 기준으로 판정했다.

결과 및 고찰

1. 천연물 복합 소재(HAE-06)의 함량 분석

HAE-06 추출물 중 황금의 대표적인 성분인 바이칼린(baicalin) 및 바이칼레인(baicalein) 함량을 분석하였다(Bae 등 2005; Woo 등 2007). 바이칼린의 retention time은 8.041분으로 나타났으며 함량은 36.8 mg/g으로 확인되었다. 바이칼레인은 retention time이 16.382분이었고 함량은 1.4 mg/g으로 확인되었다(Fig. 1A). HAE-06 중 인동등의 로가닌(loganin)(Jeong 등 2015)은 retention time이 18.574분이며 함량은 16.2 mg/g, 로가닉산(loganic acid)은 retention time이 12.01분이며 함량은 5.8 mg/g, 스웨로사이드(sweroside)는 retention time이 16.383분이며 함량은 4.3 mg/g으로 확인되었다(Fig. 1B).

2. HEA-06 추출물의 기관지 이완 효과

기관지평활근은 수축-이완 양상이 매우 유사해 보이지만

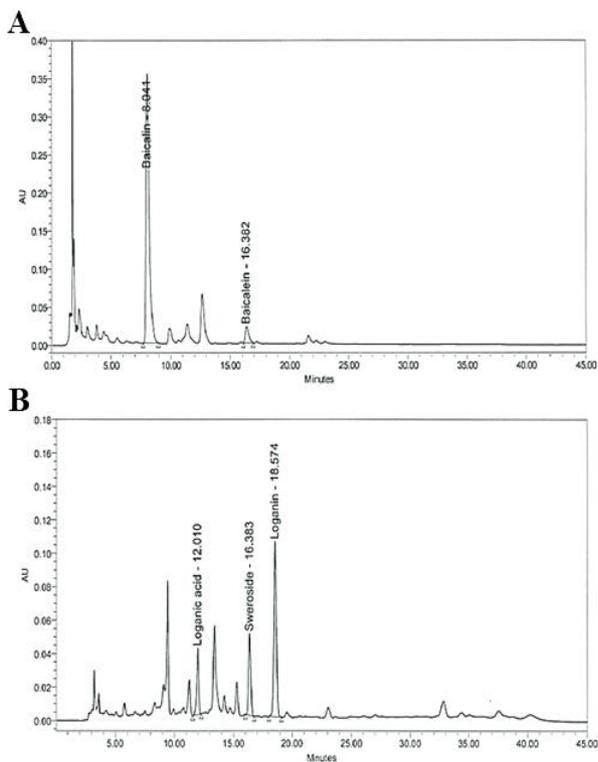


Fig. 1. HPLC chromatograms showing peaks corresponding to the marker compounds, baicalin and baicalein (A); loganin, loganic acid, and sweoside (B) of HEA-06 extract. HPLC, high performance liquid chromatography.

분포하고 있는 수용체는 각각 다르다고 알려져 있다. 백서의 기관지에는 muscarine 수용체가 존재하여 carbachol이나 acetylcholine과 같은 약물에 반응하는 반면, histamine 수용체는 존재하지 않는다(Ishii & Kurachi 2006; Kume 등 2018). 따라서 본 실험에서는 무스카린 수용체를 통한 수축에 대하여 HEA-06 추출물의 기관지 이완 효과를 확인했다. 기관지의 부교감신경이 자극되어 아세틸콜린(acetylcholine, ACh)의 분비를 초래하게 되면 평활근에 대한 무스카린 수용체 M3(muscarinic acetylcholine receptor M3)에 직접적인 작용으로 기관지 수축을 유발 시킨다(Ishii & Kurachi 2006). 따라서, 본 연구에 기관지에 아세틸콜린(acetylcholine)을 사용하여 수축을 유도한 후 HEA-06의 이완 효과를 확인했다. HEA-06 추출물의 이완효과를 알아보기 위하여 아세틸콜린 (10 μM)으로 기관지 평활근 수축을 유도한 후 HEA-06 추출물을 0.5, 0.75, 1, 2.5, 및 5 g/mL의 농도로 누적하여 처리한 결과 이완효과가 나타났으며(Fig. 2A), 5 mg/mL 농도에서 69.8±5.96 %의 이완효과를 보였다(Fig. 2B). 기관지 평활근 이완 기전을 알아보고자 다음 실험을 진행했다.

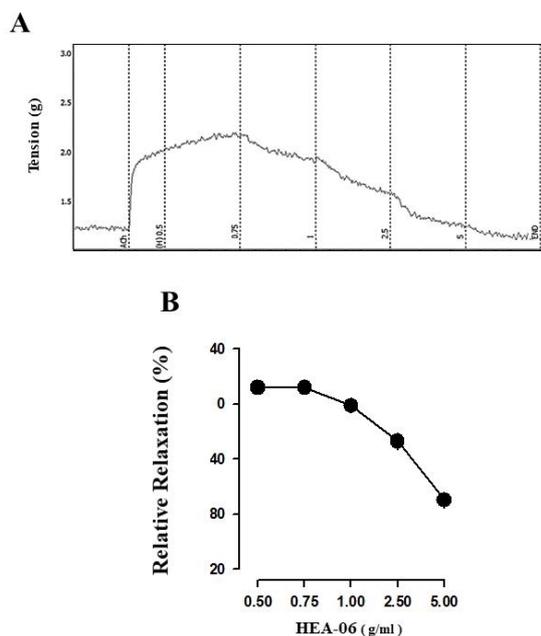


Fig. 2. Dose-response curves by HEA-6 treatment in acetylcholine-induced bronchi. (A) Representative response physiological activity diagram by HEA-06 dose-dependent treatment in intact rat bronchi. (B) HEA-06 extract treatment has bronchial dilatation effect in the state of bronchoconstriction by acetylcholine 100 μM (B) (n=8).

3. HEA-06 추출물의 β₂-adrenergic receptor/cAMP/PKA 경로를 통한 기관지 이완 효과

자율신경계 중 β₂-아드레날린성 수용체(β₂-adrenergic receptor)는 기관지를 이완시킨다고 알려져 있다(Barisione 등 2010). β₂-아드레날린성 수용체를 활성화하면 흥분성 G 단백질(stimulated G protein, G_s)에 결합하여 아데닐릴 고리화효소(adenylyl cyclase, AC)를 흥분시키고 세포 내 2차 전령인 고리형아데노신일인산(cAMP)의 농도를 증가시킨다. 이어 cAMP의존적이 단백질 키나아제 A(protein kinase A, PKA)를 활성화시켜 마이오신 경쇄(myosin light chain, MLC) kinase의 억제와 MLC phosphatase의 활성을 유도하여 칼슘이온(Ca²⁺) 레벨을 감소시킴으로써 최종적으로 기관지를 확장시킨다고 알려져 있다(Barisione 등 2010). 따라서, HEA-06 추출물의 이완효과가 기관지 확장기 치료물질의 대표적인 경로(Taouil 등 2003)인 ‘β₂-adrenergic receptor/cAMP/PKA’ 경로를 통해서 일어나는지 확인하기 위하여 실험을 진행했다.

먼저, HEA-06 추출물의 기관지 확장효과가 β-아드레날린성 수용체를 통해 일어나는지 확인하기 위하여 비선택적 β-아드레날린성 길항제인 propranolol(1 μM)(Al-Majed 등 2017)을 전처리 한 후 기관지 이완효과를 살펴본 결과 유의

한 차단효과를 보였다(Fig. 3A). 따라서 HEA-06 추출물이 β -아드레날린성 수용체에 관여한다는 것을 확인 할 수 있었다. 그 다음, 아데닐릴고리화효소(AC)에 관여하는지 확인하기 위하여 활성제(forskolin) 및 길항제(SQ22536)를 처리하여(Insel & Ostrom 2003) HEA-06 추출물의 기관지 이완에 미치는 영향을 살펴봤다. 아데닐릴고리화효소 활성 유도물질인 forskolin(10 μ M)을 전처리 한 후에 HEA-06 추출물의 이완효과를 알아본 결과, 96.16 \pm 8.96%로 유의한 증가 효과를 확인할 수 있었다(Fig. 4A). 반면 SQ22536(100 μ M, 아데닐릴고리화효소 차단제)을 전처리 한 후 HEA-06 추출물의

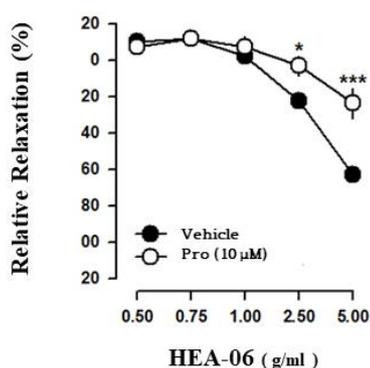


Fig. 3. Dose-response curves by HEA-6 treatment in acetylcholine-induced bronchi. Bronchial relaxation effect of HEA-06 treated with (A) non-selective β -adrenergic receptor antagonist, Pro (10 μ M). pro, propranolol. Data are expressed as mean \pm standard error of the mean (n=5). * p <0.05, *** p <0.001 vs. vehicle.

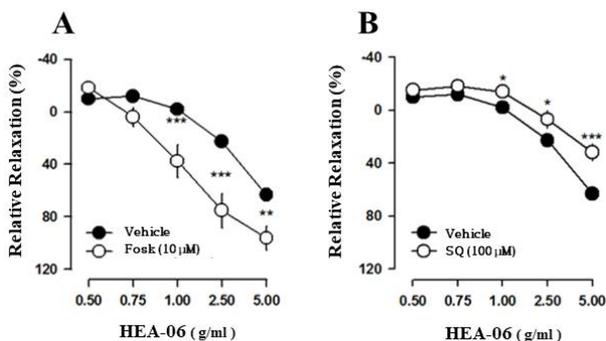


Fig. 4. Dose-response curves by HEA-6 treatment in acetylcholine-induced bronchi. Bronchial relaxation effect of HEA-06 treated with (A) adenylyl cyclase inhibitor and (B) PKA inhibitor. Fosc, forskolin 10 μ M, inhibitor of adenylyl cyclase; SQ, SQ22536 100 μ M, selective inhibitor of protein kinase A. Data are expressed as mean \pm standard error of the mean (n=4). * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 vs. vehicle.

이완효과를 알아본 결과 유의성 있는 차단 효과를 확인할 수 있었다(Fig. 4B). 기관지 평활근 조직에서 HEA-06 추출물이 cAMP-PKA에 영향을 미치는지 관찰하기 위하여 HEA-06 추출물을 농도별(0, 1, 2.5, 및 5 g/mL)로 처리하여 cAMP 생성량을 측정된 결과, HEA-06 추출물을 처리하지 않은 군에 비하여 농도 의존적으로 cAMP생성량이 control군에 비하여 유의성 있는 차이를 보였다(Fig. 5A). 또한, cAMP의존적 단백질 키나아제 A(PKA)의 억제제로 알려진 KT5720 (Townsend 등 2012)을 10 또는 100 μ M 전처리 하여 HEA-06 추출물의 이완효과를 알아본 결과, 100 μ M 농도에서 이완효과가 유의하게 차단됨을 확인할 수 있었다(Fig. 5B). 따라서 HEA-06 추출물은 β_2 -아드레날린성 수용체를 통한 cAMP 증가와 PKA의 활성화에 관여하여 이완효과를 보인다고 사료된다.

4. HEA-06 추출물의 포타슘(K^+) 및 칼슘(Ca^{2+}) 통로 차단 시 이완 효과

세포 내 칼슘 이온이 증가하면 수축이 유도되는데 이때 세포 외 포타슘(K^+) 농도가 증가 한다. 포타슘의 세포내 유출은 세포막의 과분극을 일으켜 전압 의존성 칼슘 통로(voltage-sensitive Ca^{2+} channel)의 불활성화로 이어져 평활근 세포내 칼슘의 농도 감소를 초래하게 되어 이완을 유발한다(Kitsiopoulou 등 2007). 평활근 세포내 칼슘(Ca^{2+}) 농도가 증가하면 칼모듈린(calmodulin)과 결합하여 미오신 경쇄연쇄 키나아제(myosin light chain kinase, MLCK)는 미오신

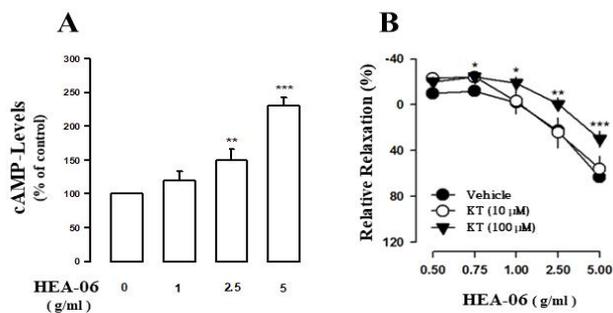


Fig. 5. Effect of cAMP-PKA pathway activation by treatment on HAE-06 extract. (A) The amount of cAMP produced by HAE-06 concentration in the bronchi was compared and shown as a graph. (B) Dose-response curves on the bronchodilation induced by HEA-06 in the acetylcholine-contracted trachea in the absence or presence of selective inhibitor of protein kinase A, KT (10 or 100 μ M). cAMP, cyclic adenosine monophosphate; KT, KT5720. Data are expressed as mean \pm standard error of the mean (n=5). * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 vs. vehicle.

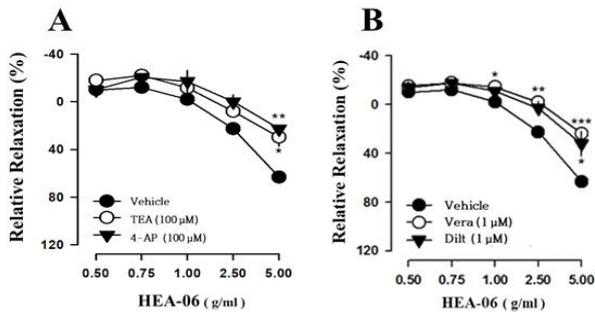


Fig. 6. Dose-response curves for HEA-06-induced bronchodilation in acetylcholine contractile bronchi in the absence or presence of blockers. Treatment results of non-selective K^+ channel blockers TEA(100 μ M) and 4-AP(100 μ M)(A) and L-type Ca^{2+} channel blockers Vera(1 μ M) and Dilt(1 μ M)(B). TEA, tetraethylammonium; 4-AP, 4-aminopyridine; Vera, verapamil; Dilt, diltiazem. Data are expressed as mean \pm standard error of the mean. * p <0.05, ** p <0.01 vs. vehicle. Data are expressed as mean \pm standard error of the mean (n=4). * p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 vs. vehicle.

조절 경쇄(myosin light chain, MLC)의 인산화를 촉진시켜 평활근을 수축 시키는 것으로 알려져 있다(Zhang 등 2010). 근소포체(sarcoplasmic Reticulum)에서의 저장된 Ca^{2+} 의 방출은 리아노딘 수용체(RyR)라고 하는 Ca^{2+} 방출통로를 거쳐 일어난다(Delmotte & Sieck 2015). 이러한 기전을 바탕으로 포타슘 및 칼슘 통로에 영향을 받아 이온의 유입에 영향을 주어 이완효과가 일어나는지 알아보기 위하여 실험을 진행했다. HEA-06 추출물의 기관지 이완 효과가 포타슘 통로가 영향을 있는지 알아보기 위하여 비 선택적 포타슘 통로 억제제인 tetraethylammonium(TEA, 100 μ M)와 4-aminopyridine(4-AP, 100 μ M)을 전처리하여 살펴본 결과, HEA-06 추출물의 이완 효과가 유의하게 차단되는 것으로 확인하였다(Fig. 6A). 또한, L형 Ca^{2+} 통로를 통해 HEA-06 추출물의 이완효과가 일어나는지 확인하기 위하여 L형 칼슘 통로 차단제인 diltiazem(1 μ M)과 verapamil(1 μ M)을 전처리한 결과 HEA-06에 의한 이완효과가 유의하게 차단되는 것을 확인했다(Fig. 6B). 따라서 HEA-06 추출물의 이완 효과에 있어서 포타슘 채널의 영향으로 세포내 칼슘 방출을 유도하여 이완에 영향을 미치는 것으로 사료된다.

요약 및 결론

본 연구를 통하여 천연물 기능성 소재인 HAE-06 혼합 추출물의 기관지 평활근 이완 효과 및 그 기전을 확인했다. 사용된 HAE-06 추출물은 인동(*Lonicera japonica*), 황금(*Scutellariae*

Radix), 잔대(*Adenophora triphylla*), 등글레(*Polygonatum odoratum*)의 8.8:1:1의 비율로 에탄올+식초용매로 추출한 혼합물이다. 아세틸콜린으로 수축을 유도한 기관지 평활근은 HAE-06 추출물에 의해서 농도 의존적으로 이완 효과를 보였으며, 이 효과는 β_2 -adrenergic receptor/ cAMP/PKA 경로를 통해서 나타남을 확인할 수 있었다. 또한, 근형질막에 존재하는 K^+ 과 Ca^{2+} 통로를 통한 Ca^{2+} 의 유입을 감소시킴으로써 HAE-06 추출물의 기관지 평활근 이완효과가 있을 것으로 사료된다, 따라서 기관지 확장에 있어서 HEA-06 추출물이 유용한 정보를 제시해 준다고 할 수 있으며, 앞으로 연구들이 지속된다면 기능성식품 소재로서의 이용이 가능할 것으로 생각된다.

감사의 글

본 논문은 (유)한풍제약을 통하여 HEA-06 시료 및 분석 자료를 제공받아 실험을 진행 했으며, 한국연구재단(NRF-2019R111A3A01062432)의 연구비를 지원을 받았습니다.

References

- Al-Majed AA, Bakheit AHH, Abdel Aziz HA, Alajmi FM, AlRabiah H. 2017. Propranolol. In Brittain HG (Ed.), Profiles of Drug Substances, Excipients and Related Methodology, volume 42. pp.287-338
- Akopov AL, Aleksandrova EB, Il'kovich MM, Petrov DV, Trofimov VI. 2015. Rengalin, a new efficacious and safe antitussive agent. Results of a randomized, comparative, multicenter clinical trial in patients with acute respiratory tract infections. *Antibiot Khimioter* 60:19-26
- Bae J, Lee M, Lee S. 2005. Antimicrobial effect of *Cutellaria baicalensis* George extracts on food-borne pathogens. *Kor J Micribiol Biotechnol* 33:35-40
- Barisione G, Baroffio M, Crimi E, Brusasco V. 2010. Beta-adrenergic agonists. *Pharmaceuticals* 3:1016-1044
- Brandsma CA, Van den Berge M, Hackett TL, Brusselle G, Timens W. 2020. Recent advances in chronic obstructive pulmonary disease pathogenesis: From disease mechanisms to precision medicine. *J Pathol* 250:624-635
- Cazzola M, Page CP, Calzetta L, Matera MG. 2012. Pharmacology and therapeutics of bronchodilators. *Pharmacol Rev* 64:450-504
- Coultrap SJ, Bayer KU. 2014. Nitric oxide induces Ca^{2+} -independent activity of the Ca^{2+} /calmodulin-dependent

- protein kinase II (CaMKII). *J Biol Chem* 289:19458-19465
- Dasgupta A, Neighbour H, Nair P. 2013. Targeted therapy of bronchitis in obstructive airway diseases. *Pharmacol Ther* 140:213-222
- Delmotte P, Sieck GC. 2015. Interaction between endoplasmic/sarcoplasmic reticulum stress (ER/SR stress), mitochondrial signaling and Ca²⁺ regulation in airway smooth muscle (ASM). *Can J Physiol Pharmacol* 93: 97-110
- Ehlert FJ. 2003. Contractile role of M₂ and M₃ muscarinic receptors in gastrointestinal, airway and urinary bladder smooth muscle. *Life Sci* 74:355-366
- Farah OR, Li D, McIntyre BAS, Pan J, Belik J. 2009. Airway epithelial-derived factor relaxes pulmonary vascular smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 296:L115-L120
- Ishii M, Kurachi Y. 2006. Muscarinic acetylcholine receptors. *Curr Pharm Des* 12:3573-3581
- Insel PA, Ostrom RS. 2003. Forskolin as a tool for examining adenylyl cyclase expression, regulation, and G protein signaling. *Cell Mol Neurobiol* 23:305-314
- Jeong YT, Jeong SC, Hwang JS, Kim JH. 2015. Modulation effects of sweroside isolated from the *Lonicera japonica* on melanin synthesis. *Chem Biol Interact* 238:33-39
- Kim SH. 2010. Antitussives, mucolytic agents and expectorants in clinical practice. *Korean J Med* 78:682-686
- Kim V, Criner GJ. 2013. Chronic bronchitis and chronic obstructive pulmonary disease. *Am J Respir Crit Care Med* 187:228-237
- Kitsiopolou E, Hatziefthimiou AA, Gourgoulialis KI, Molyvdas PA. 2007. Resting tension affects eNOS activity in a calcium-dependent way in airways. *Mediators Inflamm* 2007:024174
- Kume H, Nishiyama O, Isoya T, Higashimoto Y, Tohda Y, Noda Y. 2018. Involvement of allosteric effect and K_{Ca} channels in crosstalk between β_2 -adrenergic and muscarinic M₂ receptors in airway smooth muscle. *Int J Mol Sci* 19:1999
- Lee SG, Jeong HJ, Lee EJ, Kim JB, Choi SW. 2011. Antioxidant and anti-inflammatory activities of ethanol extracts from medicinal herb mixtures. *Korean J Food Sci Technol* 43:200-205
- Lourenço LO, Ramos Lopes AC, Zavan B, Soncini R. 2020. Vagotomy influences the lung response to adrenergic agonists and muscarinic antagonists. *Respir Physiol Neurobiol* 274:103358
- Matera MG, Page CP, Calzetta L, Rogliani P, Cazzola M. 2020. Pharmacology and therapeutics of bronchodilators revisited. *Pharmacol Rev* 72:218-252
- Rabe KF, Watz H. 2017. Chronic obstructive pulmonary disease. *Lancet* 389:1931-1940
- Ritchie AI, Wedzicha JA. 2020. Definition, causes, pathogenesis, and consequences of chronic obstructive pulmonary disease exacerbations. *Clin Chest Med* 41:421-438
- Semenov I, Brenner R. 2018. Voltage effects on muscarinic acetylcholine receptor-mediated contractions of airway smooth muscle. *Physiol Rep* 6:e13856
- Shin HY, Kim H, Shin JY, Lee SJ, Yu KW. 2021. The physiological activity of crude polysaccharide solvent extracted from herbal medicine mixture. *Korean J Food Nutr* 34:36-46
- Stamatiou K, Pierris N. 2013. *Serenoa repens* extract additionally to quinolones in the treatment of chronic bacterial prostatitis. The preliminary results of a long term observational study. *Arch Ital Urol Androl* 85: 190-196
- Taouil K, Hinnrasky J, Hologne C, Corlieu P, Klossek JM, Puchelle E. 2003. Stimulation of beta 2-adrenergic receptor increases cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression in human airway epithelial cells through a cAMP/protein kinase A-independent pathway. *J Biol Chem* 278:17320-17327
- Townsend EA, Sathish V, Thompson MA, Pabelick CM, Prakash YS. 2012. Estrogen effects on human airway smooth muscle involve cAMP and protein kinase A. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 303:L923-L928
- Vanhoutte PM. 2013. Airway epithelium-derived relaxing factor: Myth, reality, or naivety? *Am J Physiol Cell Physiol* 304:C813-C820
- Wasilewski NV, Loughheed MD, Fisher JT. 2014. Changing face of β_2 -adrenergic and muscarinic receptor therapies in asthma. *Curr Opin Pharmacol* 16:148-156
- Williams DM, Rubin BK. 2018. Clinical pharmacology of bronchodilator medications. *Respir Care* 63:641-654
- Woo IT, Park KN, Lee SH. 2007. Antimicrobial activities of *Scutellaria baicalensis* Georgi against various pathogens and spoilage bacteria isolated from Tofu. *J*

Korean Soc Food Sci Nutr 36:470-475

Yoon WH. 2013. Genotoxicological safety evaluation of the solvent extracts for medicinal herbs that are of highly domestic spendings. *Korean J Food Nutr* 26:814-823

Zhang WC, Peng YJ, Zhang GS, He WQ, Qiao YN, Dong YY, Gao YQ, Chen C, Zhang CH, Li W, Shen HH,

Ning W, Kamm KE, Stull JT, Gao X, Zhu MS. 2010. Myosin light chain kinase is necessary for tonic airway smooth muscle contraction. *J Biol Chem* 285:5522-5531

Received 10 September, 2021

Revised 01 October, 2021

Accepted 14 October, 2021