

고혈압 흰쥐에서 Cumambrin A의 혈압 강하 효과

홍용근, 양민석¹, 박윤배*

경상대학교 자연과학대학 생화학과, 심혈관연구소
¹농과대학 농화학과

Effect of Cumambrin A Treatment on Blood Pressure in Spontaneously Hypertensive Rats

Yonggeun Hong, Min-Suk Yang¹ and Yunbae Pak*

Department of Biochemistry and Cardiovascular Research Institute,
¹Department of Agricultural Chemistry, Gyeongsang National University,
Chinju 660-701, Korea

Abstract - We have isolated a sesquiterpene lactone, cumambrin A from the dried flowers of *Chrysanthemum boreale* Makino and reported its chemical structure. The aim of the present study was to investigate whether the exogenous administration of cumambrin A has a pharmacological effect on normalization of blood pressure in the spontaneously hypertensive rats (SHR). *In vitro* studies: Relaxative response induced by cumambrin A was increased with dose-dependent manner and showed maximizing response at a concentration of 5×10^{-4} M. Further, this relaxative response was significantly increased at a condition of endothelium present than that of endothelium denuded. *In vivo* studies: The normalizing effect of cumambrin A on blood pressure was also increased with time-dependent manner and then gradually recovered to normal condition at approximately 4 hrs after cumambrin A treatment.

Key words - Cumambrin A; spontaneously hypertensive rat (SHR); normotensive Wistar Kyoto rat (WKY); blood pressure.

산국(山菊, *Chrysanthemum boreale* M.)은 국화과에 속하는 야생국화로서 9-11월에 전국의 산야에 자생하며, 1-1.5 cm 크기의 노란색 꽃을 피우는 다년생 초본이다.^{1,2)} 또한 이러한 야생국화를 원료로 하여 만들어진 국화주는 자양강장제 또는 두통 치료제로 효과가 있다고 하여 예로부터 가정에서 상비약처럼 즐겨 담그던 술이었다고 한다.^{3,4)} 과학적으로 검증되지 않은 국화의 이와 같은 작용은 현대의학적 연구를 통해서 조금씩 구체화 되기 시작했다.

그 예로 산국꽃의 추출물에는 중추신경의 진정작용, 혈압강하작용, 결핵균 및 각종 바이러스에 대한 억제효과가 있다는 것이 증명되었고,^{4,5)} 폐암과 간암에도 효과가 있는 것으로 알려져 있다.⁶⁾

특히, 혈압의 강하작용에 있어서 현재까지 보고된 자료에 따르면, 골격근의 수축이완 뿐만 아니라 혈관과 같은 평활근, 그리고 심장근 세포의 수축이완에 있어서의 Ca^{2+} 의 역할은 매우 중요하며,^{7,8,9,10)} 이들 Ca^{2+} 의 세포내·외로의 유입 및 유출을 조절함으로써 세포내에 적정농도를 유지하는 것이 고혈압

*교신저자 : Fax 0591-759-9363

치료의 관건이라고 할 수 있다.¹¹⁻¹⁴⁾

이와 같은 Ca^{2+} 의 적정 농도 유지는 주로 Ca^{2+} -channel 및 Ca^{2+} -ATPase에 의해 이루어지며, 현대의학에서 사용되고 있는 고혈압 치료를 위한 관련 약물들은 주로 Ca^{2+} -channel 차단제 및 Ca^{2+} -ATPase 억제제이다.^{15,16)} 또한 ubiquitous sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 억제제 중 현재 가장 널리 사용되고 있는 thapsigargin¹¹⁾이 식물유래의 sesquiterpene lactone 계열 중 guaianolide 합성물로서 세포내 Ca^{2+} -신호전달 기작의 연구에 직접적으로 이용되는 물질인 점을 고려한다면 guaianolide type sesquiterpene lactone의 일종이며 산국의 주성분 중 하나인 cumambrin A에 대한 연구가 요구된다고 생각된다.

따라서 본 연구에서는, 산국에서 분리한 다양한 sesquiterpene lactone 중에서 수율이 가장 높은 cumambrin A^{17,18)}가 어떠한 기작을 통해서 혈압강화작용을 하며 약리학적으로 사용이 가능할 것인가를 실험적으로 확인하기 위하여 *in vitro* 혈관이완실험과 *in vivo* 혈압강화실험을 병행해서 실시하였다.

재료 및 방법

시약-Phenylephrine (Sigma), Heparin (중외제약), Pentobarbital-Na (삼성제약)을 사용하였으며 그외 모든 시약은 특급시약을 사용하였다. 혈관이완실험에 사용한 Krebs 용액의 조성은 다음과 같다. NaCl, 120; KCl, 4.75; Glucose, 6.4; $NaHCO_3$, 25; KH_2PO_4 , 1.2; $MgSO_4$, 1.2; $CaCl_2$, 1.7(mM, pH 7.4).

검액의 조제-Cumambrin A (Fig. 2, MW: 308)는 양 등^{17,18)}이 분리, 보고한 바와 같이 NMR로 구조동정된 것을 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 녹여 사용하였으며, Mathis 등¹⁴⁾과 같이 DMSO의 최종 희석 액의 농도가 0.5% 이하가 되게 함으로써 DMSO의 반응을 배제하였다.

실험동물-본 실험에 사용한 실험동물은 고혈압 모델 동물인 10~12 개월령 (350 ± 20 g)의 spontaneously hypertensive rat (SHR) 중 혈압이 190 mmHg 이상인 것을 암수 구별 없이 7마리 선발하여 *in vivo* 혈압강화실험에 이용하였으며, 대조

군으로써 동일 연령의 Normotensive Wistar Kyoto Rat (WKY)을 사용하였다. *In vitro* 혈관이완실험을 위하여 10~12 개월령 (350 ± 20 g)의 WKY를 10마리 이용하였다.

혈관 ring 제작-실험동물을 경추탈골법에 의해 실신 시킨 뒤 즉시 복강 정중선으로부터 흉곽상부까지 절개하여 심장과 내장장기를 완전 노출시킨 뒤 흉대동맥으로부터 복대동맥까지 채취하고 95% 산소와 5% CO_2 가 농축된 4°C Krebs 용액에 보관하였다. 이렇게 보관된 조직은 당일에 사용하는 것을 원칙으로 하였으며, 혈관 주위 결합조직을 해부용 현미경하에서 완전히 제거하고, 4-5 mm 길이의 혈관 ring를 제작하여 *in vitro* 혈관이완실험에 이용하였다. 혈관 내피세포의 제거는 air bubbling를 강하게 시킴으로써 제거하였고 조직학적 방법으로 확인하였다(Fig. 1).

혈관 ring의 장력 기록장치-혈관 ring은 water-jacked organ bath(10 ml)에 평형하게 위치시키고 $37 \pm 0.5^\circ C$ 로 유지하였다. 혈관 ring의 상부는 isometric force transducer(FT03, Grass)에 연결하여 ink-writing curvilinear polygraph

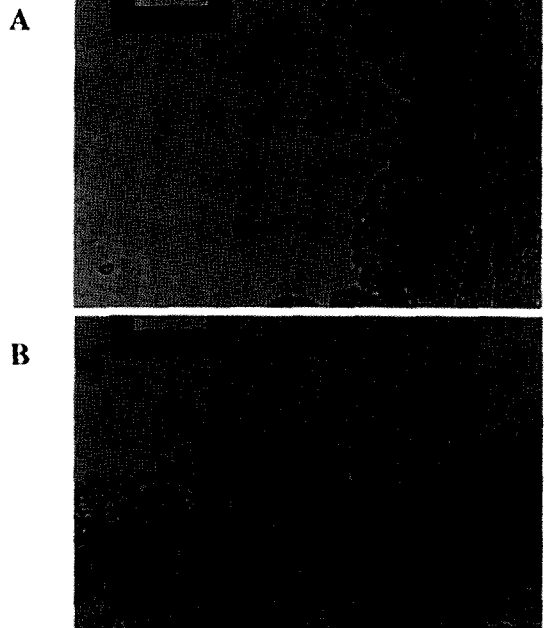


Fig. 1. Histological appearance of endothelium containing (A) and denuded (B) aortic artery (Hematoxylin-Eosin stain, $\times 400$).

(79, Grass)로 기록하였다. 혈관 ring의 초기장력은 2 g으로 하였고 최소한 60분이 경과한 뒤 실험을 시작하였다.

혈압의 측정 - 혈압강하실험에는 SHR(197±12 mmHg, 7마리)과 WKY(112±8 mmHg, 10마리)를 이용하였으며, 먼저 12시간 굶긴 뒤 항응고제 (heparin: 4 unit/g, 체중)를 복강내 주사하고, 30분 후에 Pentobarbital-Na(60 mg/kg, 체중)을 주사하고, 약 5분 후 좌측 경부를 둔성절개방법으로 경동맥과 경정맥을 노출시켜 각 혈관에 멸균된 23 gage catheter를 삽입하였다. 경동맥의 catheter는 혈압측정기(PowerLab/400)에 연결시켜 직접법으로 혈압을 monitoring 하였고, 경정맥의 catheter는 멸균된 주사기에 연결하여 cumambirin A와 마취제를 주입할 수 있게 하였다.

통계처리 - 결과분석은 평균±표준편차로 나타내고 각군간의 유의성 검정은 student-t test 분석을 하고, p<0.05인 경우 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

결과 및 고찰

본 실험에 사용한 cumambirin A (Fig. 2)는 물에는 극히 낮은 용해도를 보여 수용성 상태에서는 생리 활성을 확인할 수 있는 농도의 처리가 불가능했다. 그러나 DMSO에는 높은 용해도를 보였으므로 DMSO의 양적인 조절로 cumambirin A의 농도를 다르게 하였으며, DMSO의 양은 재료 및 방법에서 기술한 바와 같이 최종 희석액이 0.5%를 넘지 않게 함으로써 DMSO 자체의 생리 약리적 효과를 배제 하였다.¹⁴⁾ 그리고 *in vivo* 혈압강하실험에서의 DMSO의 양은 table legend에서 언급한 바와 같

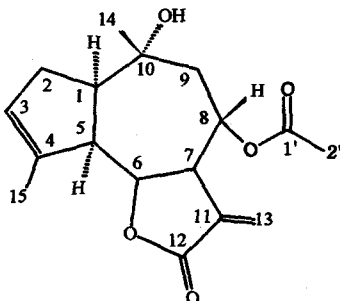


Fig. 2. Chemical structure of cumambirin A.

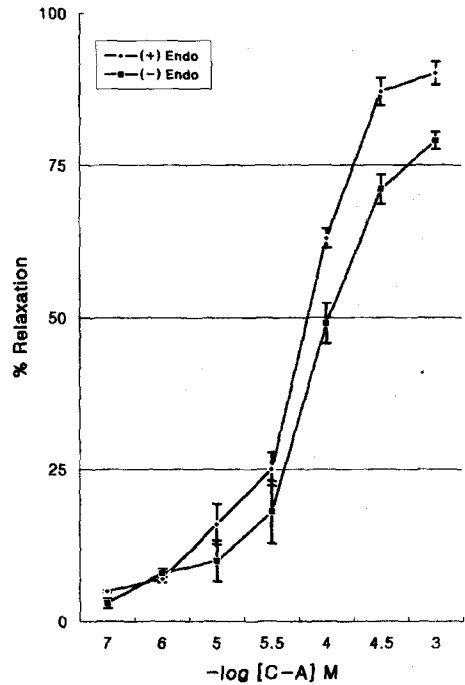


Fig. 3. Dose response curves showing the effects of cumambirin A on the endothelium containing and denuded aortic artery rings. The results are measured as peak amplitudes and expressed as percentages of the phenylephrine-induced contraction in the same strips. Values represent the means of 3 separated experiments performed. (+) Endo represents the endothelium present and (-) Endo represents the endothelium denuded aortic artery rings. See "Materials and Methods" for further details.

이 0.2 ml로 하였다.

혈관이완효과 - 재료 및 방법에서 서술한 바와 같이 정상적인 쥐로부터 분리한 대동맥을 organ chamber 내에 위치시키고 phenylephrine (10⁻⁶ M)을 처리함으로써 전 수축시킨 뒤 cumambirin A를 지시된 농도별로 처리하면서 혈관의 이완을 관찰하였다 (Fig. 3). Cumambirin A의 효과는 10⁻⁶ M에서 이완을 나타내기 시작하여 10⁻⁴ M의 농도에서 현저한 이완을 나타내었으며 5×10⁻⁴ M에서 최대의 이완을 나타내었다. 또한 혈관의 내피세포의 유무에 따라 이완의 정도가 유의적인 차이를 나타내었는데, 이는 cumambirin A가 혈관 내피세포에 작용하여 혈관의 이완인자 (EDRF: Endothelium derived Relaxing Factors)의 유리에도 관여할

뿐만 아니라, 직접적으로 혈관의 평활근에 작용하는 효과도 있는 것으로 추측되어진다. 뿐만 아니라 cumambrin A의 세포 내의 Ca^{2+} 의 mobilization에 대한 관련성을 확인하고자 실시한 실험에서 세포의 Ca^{2+} 의 유입의 차단뿐만 아니라 세포내 저장 Ca^{2+} 의 유리 또한 억제 시키는 효과가 있는 것으로 관찰 되어 계속해서 실험을 진행 중에 있다. 혈관 내피세포의 유무에 대한 cumambrin A의 ED_{50} 은 각각 7.5×10^{-5} M과 10^{-4} M이었으며 cumambrin A의 농도가 증가할수록 이완정도의 차이는 현저해 짐을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

혈압강하효과 - *In vivo* 혈압강하실험은 재료 및 방법에서 서술한 바와 같이 동맥에 catheter를 주입함으로써 혈압을 장시간 직접법으로 관찰하였다. Table I에서 보여주는 바와 같이 시간의 경과에 따라 혈압의 현저한 감소를 관찰할 수 있었고, cumambrin A를 처리한 후 4시간 경에는 대조군의 정상혈압에 거의 근접하는 결과를 보였다. 또한 cumambrin A의 혈압강하 효과의 지속시간은 적어도 6시간 이상인 것으로 추측되며 (Table I), 혈액분석을 통한 효소학적 간 기능검사 결과, GOT, GTP 그리고 alkaline phosphatase (ALP)의 수치가 Table I의 시간경과에서 정상적인 범위를 유지하여 Table I에서 관찰된 혈압강하를 유도하는 cumambrin A의 농도(10 mg)는 간(liver)을 통한 대사과정에서 원활히 이루어지는 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 cumambrin A의 생리 활성 작용이 혈압을 강하 시키는 효과를 가지고 있으며, 간 기능에 대한 독성은 거의 없는 것을 시사하는 것으로 사려 된다. 이는 곧, 국화를 민간요법으로 섭취하는 것과 같은 결과로 받아들여진다. Cumambrin A의 생체 내 잔류 시간을 알아보기 위해 동일한

양의 cumambrin A를 처리하고 미동맥을 통해 시간별로 혈압을 확인해 보았을 때도 Table I의 결과와 동일했으며, 2주 후 이들의 혈압을 다시 측정해 본 결과 원래의 상태로 회복된 것을 관찰 할 수 있었다. 그리고 무엇보다 흥미로운 사실은, Table I에서 보는 바와 같이 정상적인 쥐(WKY)의 혈압에는 유의적인 변화를 일으키지 않는다는 것이었다. 이와 같은 결과는 cumambrin A에 대한 앞으로의 연구 방향을 세포수준에서 진행할 수 있는 가능성을 제시함과 동시에 약리학적 활용 가능성을 의미한다고 할 수 있을 것이다.

결론

산국으로부터 분리된 다양한 sesquiterpene lactones 중에서 cumambrin A로 명명한 물질의 혈관 장력 및 혈압 강하 작용을 확인하기 위하여 *in vitro*와 *in vivo* 실험을 동시에 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다. *In vitro* 혈관이완 효과: Phenylephrine으로 유도된 혈관 장력은 cumambrin A의 농도 증가에 따라 감소함으로써 이완하는 경향을 보였으며 5×10^{-4} M에서 최대의 이완을 나타내었다. 또한 혈관 내피세포의 유무에 따라 혈관 이완의 크기가 유의적인 차이를 나타내었다. *In vivo* 혈압강하에 대한 효과: SHR에서 cumambrin A를 처리하기 전 평균혈압이 cumambrin A를 처리한 후 시간의 경과에 따라 유의적인 혈압의 강하가 관찰되었으며, 6시간 경과 후에는 점진적으로 회복되는 경향을 나타내었다. 또한 2주 후 이들의 혈압을 확인한 결과 cumambrin A의 처리 전과 같은 상태로 회복되었다.

이와 같은 혈관이완효과와 혈압강하효과에 대한

Table I. Effect of cumambrin A on blood pressure in SHR and WKY

Rats	Time	0	5 min	10 min	30 min	1 h	2 h	4 h	6 h	16 h
		Blood Pressure (mmHg)								
SHR		197±12 (203)	173±6 -	165±3 -	161±8 (197)	159±6 -	158±5 (200)	137±4 -	164±7 (205)	152±5 (195)
	WKY	112±8 (125)	110±11 -	- -	125±10 (115)	- -	105±12 (117)	- -	- (123)	122±15 (123)

SHR: spontaneously hypertensive rat, WKY: normotensive Wistar Kyoto rat.

Cumambrin A was intravenously administered as follows: SHR, WKY: 10 mg/0.2 ml DMSO. Each value represents means±SE of 7 SHR or 10 WKY rats. The parentheses represent the changes of blood pressure in DMSO treated rats.

cumambrin A의 작용은 혈관의 수축성 작용의 억제효과와 심장의 수축력의 완화효과가 조화된 결과일 것으로 추측되어 심장세포와 혈관세포를 이용한 더욱 구체적인 실험의 필요성과 연구의 가능성을 제시한다.

감사의 말씀

저자들은 *in vitro* 혈관이완실험을 위한 장비 사 용을 허락해 준 경상대학교 수의과대학의 김주현 교 수께 감사의 마음을 전한다. 본 연구는 1996년도 한 국학술진흥재단의 대학부설연구소(경상대학교 심혈 관 연구소)연구비에 의해 지원되었다.

인용문헌

- 고경식 (1991) 한국식물검색도감. 329. 아카데미서적.
- 이창복 (1989) 대한식물도감. 817. 향문사.
- 최옥자 (1991) 약초의 성분과 이용. 110. 일월서각.
- 최영전 (1992) 한국민속식물. 82. 아카데미서적.
- Dan, B. and Andrew, G. (1986) Chinese herbal medicine. 59. Eastland press, Seattle.
- 김수철 (1993) 1993年度 天然抗癌資源의 開發에 關한 國際學術會議-백두산 항암식물 유전자원의 조사연구. 東洋資源植物學會, Symposium proceeding.
- Failli, P., Ruocco, C., Fazzini, A. and Giotti, A. (1997) Calcium waves in unstimulated left ventricular cardiomyocytes isolated from aged spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237: 103-106.
- Zhong, L. and Inesi, G. (1998) Role of the S3 stalk segment in the thapsigargin concentration dependent of sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase inhibition. *J. Biol. Chem.* 273: 12994-12998.
- Low, A. M., Kwan, C. Y. and Daniel, E. E. (1992) Evidence for two types of internal Ca^{2+} stores in canine mesenteric artery with different refilling mechanisms. *Am. J. Physiol.* 262: H31-H37.
- Meldolesi, J. and Pozzan, T. (1998) The endoplasmic reticulum Ca^{2+} store: a view from the lumen. *Trends Biochem. Sci.* 23: 10-14.
- Treiman, M., Caspersen, C. and Christensen, S. B. (1998) A tool coming of age: thapsigargin as an inhibitor of sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPases. *Trends Biochem. Sci.* 19: 131-135.
- Moolenaar, W. H., Tertoolen L. G. J. and de Laat, S. W. (1984) Growth factors immediately raise cytoplasmic free Ca^{2+} in human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 259(13): 8066-8069.
- Foletti, D., Guerini, D. and Carafoli, E. (1995) Subcellular targeting of the endoplasmic reticulum and plasma membrane Ca^{2+} pumps: a study using recombinant chimeras. *FASEB J.* 9: 670-680.
- Mathis, S. A., Criscimagna, N. L. and Leeb-Lundberg, F. (1996) B1 and B2 kinin receptors mediate distinct pattern of intracellular Ca^{2+} signaling in single cultured vascular smooth muscle cells. *Mol. Pharmacol.* 50: 128-139.
- Smitt, U. W., Jager, A. K., Adersen, A. and Gudiksen, L. (1995) Comparative studies in phytochemistry and fruit anatomy of *Thapsia garganica* and *T. trabsitagana*, Apiaceae (Umbelliferae). *Botanical J. Linnean Soci.* 117: 281-292.
- Santella, L. and Carafoli, E. (1997) Calcium signaling in the cell nucleus. *FASEB J.* 11: 1091-1109.
- Yang, M. S., Park, K. H., Jang, D. S., Choi, S. U., Nam, S. H. and Shiro, M. (1996) Cumambrin A in *Chrysanthemum boreale* makino preparation, X-ray crystal structure and ^{13}C - and 1H -NMR study of cumambrin A. *Kor. J. Pharmacogn.* 27(3): 207-211.
- 남상해, 최상도, 최진상, 장대식, 최상욱, 양민석. (1997) 산국으로부터 분리한 sesquiterpene lactones의 흰쥐 복수압에 대한 효과. *한국식품영양과학회지* 26(1): 144-147.

(1999년 4월 8일 접수)