

SHR(Spontaneously Hypertensive Rat)를 이용한 송엽, 익모초 추출물의 항고혈압 작용

박건구* · 류재원 · 최은경¹ · 노환성¹

아산생명과학연구소 분자유전연구실, ¹울산대학교 의과대학

Anti-hypertensive Effects of *Pini Folium* and *Leonuri Herba* Extract on Spontaneously Hypertensive Rat (SHR)

Kun-Koo PARK*, Je Won RYU, Eun Kyung CHOI¹ and Hwan Seong RO¹

Department of Molecular Genetics, Asan Institute for Life Sciences, Seoul 138-736 Korea,

¹University of Ulsan, College of Medicine, Seoul 138-736 Korea

(Received March 2, 1999; accepted March 18, 2000)

Abstract—The aim of this study was to investigate a potential effect of treatment of spontaneously hypertensive rats (SHR) with *Pini Folium* or *Leonuri Herba* extracts. Male SHR were treated with extracts for 2 or 4 weeks starting at 13 weeks of age. We found that oral treatment with the methanol extract from *Pini Folium* or *Leonuri Herba* (1 g/Kg/day) significantly decreased mean blood pressure to 85.4% and 78.6% respectively in compare with untreated control SHR. Treatment with the extract from *Pini Folium* for 4 weeks during hypertension development phase (starting 9 weeks of age) resulted in a partial prevention of hypertension development. There were no significant differences for body weight between untreated and *Pini Folium* treated SHR.

Keywords □ *Pini Folium*, *Leonuri Herba*, Hypertension, SHR

통계적인 조사에 의하면 선진국 성인의 약 20%가 고혈압으로 고생을 할뿐만 아니라, 고혈압은 뇌졸중이나 동맥경화와 같은 심혈관 질환의 중요한 원인 인자로 알려져 있다.¹⁾ 또한 Syndrome X라 하여 당뇨병, 동맥경화와 함께 성인병의 대표적인 질환중의 하나이기도 하다.^{2,3)} 이러한 성인병 치료의 일환으로 새로운 고혈압 치료제의 발견은 매우 의의가 깊다 하겠다.

이와 같은 고혈압 치료제 개발의 전략으로서 우선 민간에서 사용하고 있는 약제들의 효과를 검색함을 생각해 볼 수 있다. 상대적으로 독성이 적고, 어느 정도 임상적인 효과를 기대할 수 있기 때문이다. 중의학 서적에는 200종 이상의 항고혈압 약물이 기술되어 있으나 그들의 과학적인 방법에 의한 효능이 검증되지 않았고, 그중 일부는 정상 쥐인 Sprague-Dawley rat에 i.v. 주사에 의한 순간적 혈압 강하를 실험한 것에 그치고 있다.⁴⁾

본 실험에서 실험동물로 사용한 SHR(Spontaneously Hypertensive Rat)는 선천성 고혈압쥐이며 본태성 고혈압의 대표적 동물 모델이다. 이 모델은 1962년에 Okamoto와 Aoki등이 Wistar-Kyoto쥐들을 연속적으로 자매 근친 교배하

여 개발되었으며, 유전적인 요인에 의하여 고혈압이 자동적으로 발생한다.⁵⁾ SHR은 생후 약 7주부터 혈압이 올라가기 시작하여 13주가 되면 수축기 혈압이 200이상을 유지하는 백서로 그 원인이 불분명하여 본태성 고혈압 연구의 동물 모델로 이용되고 있다. 최근의 연구에 의하면 이들 백서는 AT1 receptor의 이상과 vascular smooth muscle cell의 과증식, 좌심실의 hypertrophy등을 보이고있어 사람의 고혈압에서 나타나는 증후를 잘 보여주고 있다.^{6,7,8)}

고혈압은 혈관손상과 말초장기의 합병증의 결과를 초래할 수 있다. 고혈압에서 혈액 동력학적인 변화는 이차적으로 미세혈관등의 혈관이 고혈압에 적응하는 변화를 일으킨다. 이런 변화들로는 혈관 평활근의 증대와 증식, 세포외 기질의 증가, 감소된 탄력성, 그리고 혈관의 증가된 저항력 등을 들 수 있다. 그러나 이들 혈관 변화 그 자체가 혈관 수축성을 더욱 증폭시키고 고혈압을 영속화 시킬 뿐만 아니라 동맥경화와 같은 혈관합병증의 발달을 촉진하는 것 같다.⁹⁾

또한 고혈압은 사람에서 동맥경화의 발달을 촉진시킨다. 즉 고콜레스테롤중이나 고혈당중에서는 고혈압의 혈관합병증이 대단히 심화된다. 이는 세포외 기질, autocrine또는 paracrine의 성장호르몬 발현, 그리고 성장 호르몬 수용체의 변화들이 고지혈증, 당뇨병과 같은 또 다른 혈관손상 인자

*To whom correspondence should be addressed.

에 대한 반응에 영향을 줄 수 있다.²⁾

기존의 항고혈압 제제들로는 calcium blocker인 Nifedipine과 angiotensin converting enzyme inhibitor인 Captopril이 임상에서 사용되고 있다.^{10,11)} 그러나 이들의 독성과 약효의 비효율성으로 인하여 새로운 형태의 항고혈압제의 개발이 요구되고 있다. 이에 저자들은 천연물로부터 항고혈압 작용이 있는 생약을 검색하여 이중 2가지에서 항고혈압 작용이 검증되어 이에 보고하고자 한다.

이들 백서가 혈압이 완전히 올라간 13주령의 SHR에 익모초 또는 송엽(Pini Folium) 추출물을 투여 하였을 경우 대조군에 비하여 혈압이 유의성 있게 하강하여 그 작용기전의 연구가 기대된다. 송엽은 소나무(Pinus Densiflora) 또는 곰솔(Pinus thunbergii)의 잎으로 향약집성방에는 풍습창을 치료하고, 머리칼을 나오게하며, 장을 편하게 하고, 오래살게 한다고 기록되어 있다.¹²⁾ 익모초는 익모초(Leonurus sibiricus)의 꽃이 피었을 때의 줄기 및 잎으로 rutin 및 leonurine이 분리 확인 되었고, 한방에서는 정혈, 이뇨 작용이 있다고 기록되어 있다.¹³⁾

실험 방법

SHR 사육

이산생명과학연구소의 SPF에서 계대증식된 SHR를 분양받아 온도, 습도 및 조도가 자동조절되는 동물실에서 표준사료(삼양사료)와 물을 자유로히 공급하는 조건에서 사육하였다.

엑스의 제조

송엽, 익모초, 상백피, 괴화, 두충 등은 80% 메탄올 용액으로 수욕상에서 환류냉각하에 3시간동안 3회 추출하여 감압농축 및 동결건조하여 엑스를 제조하였다. 위 시료들은 실험에 사용할때까지 -20°C의 냉장고에 보관하였다. 생약은 경동시장에서 구입하여 사용하였고, 송엽은 충청남도 수목원에서 채취하여 깨끗이 씻은후 세절하여 추출하였다. 송엽, 익모초, 상백피, 괴화, 두충은 각각 1500g, 600g, 500g, 700g, 500g의 생약을 사용 추출하였고, 수율은 각각 11.9%, 13.3%, 25.1%, 38.5%, 12.1%이었다.

대조군 및 실험군의 약물투여

대조군 및 약물투여군 각각 8마리씩을 한 군으로 하여 다음과 같이 투여 하였다.

대조군

고혈압이 발생된 SHR에 약물대신 단지 1% CMC(sodium carboxy methyl cellulose, vehicle)만을 연구 기간동안 1일 1회 경구 투여하였다.

약물투여군

고혈압이 발생된 SHR에 각 건조분말 생약을 1% CMC

에 현탁시켜서 연구 기간동안 1일 1회 경구투여하였다.

Nifedipine은 바이엘사의 아달라트 연질캡슐을, Captopril은 보령제약의 카프릴 정제를 투여 직전에 1% CMC에 녹여 투여 하였다.

혈압 및 심박동수의 측정

심박동수, 수축기혈압, 이완기혈압(계산치), 평균혈압은 모든 군에서 미취를 시키지 않고 tail cuff방법을 이용하여 BP Monitor(MK-1000, Muromachi Kikai Co., LTD, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. 이 장치는 크게 temperature control unit, main unit, preheat chamber, measuring chamber로 이루어져 있으며, 측정방법은 Muromachi Kikai Co., Ltd.의 website인 www.muromachi.com와 사용자 manual을 참고로 하였다. 약물투여는 매일 오전 10시와 12시 사이에 투여하고, 혈압은 오후 5시와 7시 사이에 측정하였다. 일 주일에 한번씩 혈압을 측정하고, 적어도 같은 쥐에 대하여 5번이상 측정하여 평균치를 취하였다. 혈압 측정시 쥐의 스트레스효과를 방지하기 위하여, 대조군 및 약물투여군의 쥐들은 preheat chamber에서 35°C에서 1시간 동안 holder에 고정시킨 후 안정화하고, 이 쥐를 measuring chamber(33°C)에 고정하고, 10분이 지난 후 측정하였다. 이런 과정에서 쥐는 매우 안정된 상태에서 혈압이 측정되고 모든 과정이 computer로 자동으로 측정된다. 이완기 혈압은 기계에 내장된 프로그램에 의하여 다음 식에 의하여 계산되었다.

$$BPd = (3BPm - BPs)/2$$

통계처리

각 군의 유의성은 Student's t-test로 검정하였으며, p값이 0.05보다 작을 때 유의적인 차이가 있는 것으로 하였다

결과 및 고찰

Spontaneously Hypertensive Rat(SHR)의 혈압 발달 및 유지

우선 정상쥐가 혈압이 주령에 따라 얼마만큼 변하는지를 보기위하여 Wistar Rat(WR)의 혈압을 시간에 따라 측정하였다. WR의 Systolic Blood Pressure(SBP)는 133.0 mmHg(8.4주) 그리고 130.5 mmHg(13.4주)로 약 5주 시간경과에 따른 혈압의 차이가 거의 없었다(Table I). 그러나 SHR에서는 비슷한 주령에 이미 높은 수치의 혈압을 보여 주었다. SBP의 경우 180.7 mmHg(9.4주), 203.0 mmHg(11.6주) 그리고 210.4 mmHg(13주)로 쥐의 주령에 따라 점차 증가하는 양상을 보여주었다.

뿐만 아니라 SHR의 13주령에서의 SBP(210.4 mmHg)는 17주에서의 혈압(213.7 mmHg)과 비교하여 비슷한 수치를 보여 13주령의 쥐는 거의 최고혈압에 도달하여 이 혈압이 계속 유지되고 있음을 알 수 있었다(Table I). 또한 Mean

Table I. Blood Pressure (mmHg) of Wistar and Spontaneously Hypertensive Rats

WR	Age(weeks)	8.4	13.4			
	BPs	133.0 ± 2.2	130.5 ± 2.7			
	BPm	97.2 ± 3.9	105.4 ± 3.8			
	BPd	78.3 ± 5.2	92.1 ± 4.3			
SHR	Age(weeks)	9.4	11.6	13	15	17
	BPs	180.7 ± 6.3	203.0 ± 5.0	210.4 ± 4.6	212.8 ± 1.5	214.6 ± 2.2
	BPm	130.0 ± 8.8	164.8 ± 5.2	168.2 ± 4.6	172.7 ± 1.8	169.4 ± 3.3
	BPd	104.6 ± 11.0	145.8 ± 5.7	146.9 ± 5.2	152.7 ± 2.1	146.8 ± 3.9

WR, Wistar Rats; SHR, Spontaneously Hypertensive Rats; BPs, Systolic Blood Pressure; BPm, Mean Blood Pressure; BPd, Diastolic Blood Pressure (calculated); Values are mean S.E., eight rats in each group

Blood Pressure(MBP)와 Diastolic Blood Pressure(DBP)도 13주령의 SHR에서 각각 168.2 mmHg, 146.9 mmHg를 기록하였고 4주가 더 지난 17주령의 쥐에서는 각각 169.1 mmHg, 146.8 mmHg를 기록하여 거의 최고치 혈압이 계속 유지되고 있는 양상을 보여 주었다. 이 정보에 근거하여 최고치 혈압에 도달한 13주령 부터 생약 추출물을 투여하기 시작하여 투여한지 2주와 4주에 각각 혈압을 측정, 효과를 판정하였다. 또한 송엽 추출물의 고혈압 발생 억제 효과 실험에서는 혈압이 올라가고 있는 단계인 9주령의 쥐에 투여하기 시작 하였다.

송엽 및 익모초 추출물 투여의 혈압 강하 효과

13주령의 SHR에 송엽 추출물을 매일 1 g/Kg씩 2주 동안 경구 투여한 결과 SBP, DBP 그리고 MBP 3가지 경우에 있어서 모두 혈압이 대조군에 비하여 유의하게($P<0.05$) 하강하였고, 2주 더 투여하였을 경우 수축기 혈압은 소폭 더 하강하였으나 하강폭은 크게 줄어들었다(Table II). 이것은 송엽 추출액을 2주간 투여하였을 경우에 이미 혈압하강 효과의 대부분이 나타났음을 의미한다. 대조군에서 주령 15주(투여2주)의 SBP, MBP, DBP를 각각 100%로 하였을 때, 송엽 추출물 투여군에서의 각각의 혈압이 각각 92.8%,

88.4%, 85.2%를 기록하여 수축기 혈압 보다는 확장기 혈압이 더 많이 하강 하였다 (Table II). 송엽추출물을 같은용량으로 2주 더 투여하여 총 4주를 투여한 17주령 쥐의 혈압은 SBP, MBP, DBP가 대조군에서 각각 100%로 하면, 송엽 추출액 투여군에서는 89.9%, 84.3%, 80.1%로 2주간 투여한 군과 약간의 차이가 있었다.

익모초 추출물을 2주간 경구 투여한 경우 BPS와 MBP에서 각각 90.4%, 78.6%로 혈압이 하강하였다. 2주를 더 투여하여 총 4주간 투여한 경우에는 BPS와 MBP각각에서 92.2%, 86.2%로 혈압이 하강하여 오히려 2주 투여한 경우보다 혈압 하강 정도가 줄어 들었다. 익모초의 주성분으로 알려져 있는 Leonurine이 고양에서 일과성 혈압하강 후 혈압상승의 효과를 보이고, 정유성분을 함유하고 있는 부분은 현저한 이뇨작용이 있다고 알려져 있으나(한방약리학, Takagi, K. and Kimura, S., Nanseitou, Tokyo, Japan, p373) 본 실험 결과가 그와 같은 이뇨작용의 결과인지는 더 연구가 필요하다. 뿐만 아니라 송엽과 익모초의 병용투여에 의한 상승작용의 유무도 더 실험할 필요가 있다.

투여 용량이 다르지만 이 혈압 하강 정도를 기존의 임상에서 사용하는 혈압강하제와 비교하기 위하여 대조약물로 Angiotensin Converting Enzyme의 억제제인 Captopril과

Table II. Effects of Herbal Medicines (1g/Kg/day) on Blood Pressure (% of control)

Treatment (weeks)	2			4		
Group	BPs	BPm	BPd	BPs	BPm	BPd
control	100	100	100	100	100	100
PF	92.8 ± 2.3*	5.4 ± 2.5*	85.2 ± 2.4*	89.9 ± 2.5*	84.3 ± 3.7*	80.1 ± 3.8*
EC	95.0 ± 3.3	94.3 ± 3.8	NS	93.5 ± 2.9	94.0 ± 2.0	NS
SF	99.2 ± 2.9	102 ± 3.1	NS	103 ± 2.7	108 ± 2.1	NS
LH	90.4 ± 3.6*	78.6 ± 13*	NS	92.2 ± 5.2*	86.2 ± 6.5*	NS
MCR	98.6 ± 3.3	91.8 ± 7.6*	NS	96.8 ± 3.8	95.3 ± 4.1	NS
Capto	83.8 ± 4.2	81.5 ± 4.6	79.9 ± 5.5	79.2 ± 4.2	68.8 ± 7.8	53.4 ± 9.2
Nifed	73.5 ± 1.1	73.6 ± 2.8	73.6 ± 4.1	NT	NT	NT

BPs, Systolic Blood Pressure; BPm, Mean Blood Pressure; BPd, Diastolic Blood Pressure (calculated); NT, not tested; NS, not shown; PF, Pini Folium; EC, Eucommiae Cortex; SF, Sophorae Flos; LH, Leonuri Herba; MCR, Mori Cortex Radicis; Capto, captopril (40 mg/Kg/day); Nifed, nifedipine (25 mg/Kg/day); Values are mean S.E., 8 rats in each group; *Significantly different from the control group ($P<0.05$).

Ca⁺⁺ Channel Blocker인 Nifedipine을 SHR에 투여하여 그 혈압하강정도를 살펴보았다(Table II). Captopril을 40 mg/Kg/day로 경구 2주간 투여후 SBP, MBP, DBP등이 각각 평균 83.3%, 81.5%, 79.9%로 하강하였고 4주 투여하였을 경우에도 79.2%, 68.8%, 53.4%로 하강하여 혈압하강정도는 송엽보다 컸다. Nifedipine을 2주간 투여한 쥐의 혈압은 Captopril을 투여한 쥐의 혈압보다 더 낮았다(Table II). 즉 이경우 BPS, MBP, BPD가 각각 73.5%, 73.6%, 73.6%로 하강 하였다.

다른 생약을 투여한 결과 괴화, 상백피, 두충등은 뚜렷한 효과를 발견 할 수 없었다. 상백피가 평균 혈압을 강하 시켰으나 유의하지는 않았다(Table II). 이 결과는 익모초, 송엽 추출물이 식물 공통 성분에 의하여 비특이적으로 혈압을 하강시키는 것이 아니라, 특이한 어떤 성분들에 의한 효과를 암시한다고 하겠다.

송엽 추출물의 혈압 상승 예방효과

SHR은 생후 약 7주부터 유전적인 요인에 의하여 혈압이 상승하기 시작한다. 송엽 투여가 이와 같은 혈압 상승의 예방 효과가 있는지 알아 보기 위하여 혈압이 올라가는 단계에 송엽 추출물을 투여하기 시작하였다. 생후 9주령의 SHR을 혈압을 측정하여 혈압이 낮은 것은 제외하고, 혈압이 올라간 것을 무작위로 2군으로 나누어 대조군에는 vehicle만을 그리고 투여군에는 송엽 추출물을 1 g/Kg/day로 투여하였다. 4주동안 투여한 후 혈압을 측정 하여 Table III에 정리하였다. 송엽 추출물의 투여군에서 심박동수는 변화가 없었다. 수축기 혈압은 유의하게 감소 하지 않았지만 확장

기 혈압과 평균혈압은 유의성있게 하강하여(P<0.05)송엽 투여가 혈압의 상승을 억제하였다.

송엽 투여군의 몸무게의 변화

13주령의 SHR의 평균 몸무게는 291.8g 으로 주령 13주 3일의 WR 몸무게 343.7g에 비교하여 약 51.9g 가벼웠다(Data not shown). 송엽 투여용량 (1 g/Kg/day)에서 독성여부를 간접적으로 보기위하여 솔잎 투여기간중의 몸무게 변화를 측정하였다(Table IV). 같은 연령의 대조군의 몸무게 301.4g(투여2주), 312.4g(투여4주)와 비교하여 볼 때, 송엽 투여군에서는 몸무게는 310.6g(투여2주), 320.2g(투여4주)으로 몸무게가 줄지 않았고 유의 하지는 않지만 오히려 더 많이 증가하였다. 뿐만 아니라 실험에서 사용한 용량에서는 투여중 치사한 쥐가 없었다. 이 결과는 송엽 추출액이 투여용량에서 독성이 없을 뿐만 아니라, 오히려 쥐의 고혈압스트레스의 생리적인 상태를 호전시키는 작용이 있는 것으로 보여진다. Captopril 투여군에서도 유의적인 차이는 없었다.

결 론

1. 송엽, 익모초 추출물은 SHR의 혈압을 유의적으로 하강시켰다.
2. 송엽 추출물을 SHR의 혈압 발달기간에 투여하면 확장기 혈압과 평균 혈압의 발달이 유의하게 억제되었고, 심 박동수에는 영향이 없었다.
3. 송엽 추출물 투여에 의하여 SHR의 몸무게는 줄지 않았다.

감사의 말씀

이 논문은 1994년, 1995년도 아산생명과학연구소 연구비의 연속과제 지원에 의하여 이루어 졌으며 이에 감사 드린다.

참고문헌

Alexander, R.W. (1995). Hypertension and the pathogenesis of atherosclerosis. *Hypertension* **25**, 155-161.
 Giles, T.D. (1997) Lipid factors in the hypertension syndrome. *J. Cardiovascular Risk* **4**, 257-259.
 Reaven, G.M. (1997) The kidney: an unwilling complice in syndrome X. *Am. J. Kidney Diseases* **30**, 928-931.
 Chiu, K.W., Wong, S.W. and Sham, S.K. (1995) Observation on blood pressure responses to injections of medicinal plant extracts in rats. *Am. J. Chinese Med.* **XXIII**, 91-99.
 Rapp, J.P. (1991) Dissecting the primary causes of genetic hypertension in rats. *Hypertension* **18** [suppl], I18-I28.
 Kost, C.K. and Jackson, E.K. (1993) Enhanced renal angio-

Table III. Effects of Pini Folium on hypertension development

Treatment (weeks)	4			
Group	HR	BPs	BPm	BPd
control	100	100	100	100
PF	104 ± 10.5	90.4 ± 9.5	89.3 ± 6.3*	88.0 ± 7.2**

HR, Heart Rate; PF, Pini Folium; BPs, Systolic Blood Pressur; BPm, Mean Blood Pressure; BPd, Diastolic Blood Pressure (calculated); Values are mean ± S.E., 7 rats in each group; *Significantly different from the control group (P<0.05).

Table IV. Effects of Pini Folium on the body weight (g) of SHR

Group	PF treatment (weeks)		
	0	2	4
SHR control	291.8 ± 5.9	301.4 ± 6.5	312.4 ± 6.2
SHR PF		310.6 ± 4.6	320.2 ± 5.2
Captopril		317.8 ± 5.5	316.2 ± 8.0

PF: Pini Folium; Values are mean ± SE, 8 rats in each group; SHR indicates spontaneously hypertensive rats

- tensin II subtype 1 receptor: responses in the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension* **21**, 420-431.
- Harrap, S.B., Mitchell, G.A., Casley, D.J., Mirakian, C. and Doyle, A.E. (1993) Angiotensin II, sodium, and cardiovascular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **21**, 50-55.
- Dilley, R.J., Kanellakis, P., Oddie, C.J. and Bobik, A. (1994) Vascular hypertrophy in renal hypertensive spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **24**, 8-15.
- Amann, K., Gharehbaghi, H. and Stephan, S., Mall, G. (1995) Hypertrophy and hyperplasia of smooth muscle cells of small intramyocardial arteries in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* **25**, 124-131.
- Wu, J.N. and Berecek, K.H. (1993) Prevention of genetic hypertension by early treatment of spontaneously hypertensive rats with the angiotensin converting enzyme inhibitor captopril. *Hypertension* **22**, 139-146.
- Rizzoni, D., Castellano, M., Porteri, E., Bettoni, G., Muiesan, M.L. and Rosei, E.A. (1994) Delayed development of hypertension after short-term nitrendipine treatment. *Hypertension* **24**, 131-139.
- 정보섭외 : 향약(생약)대사전, 영림사, 서울, p 106 (1989)
- 육창수외 : 현대생약학, 학창사, 서울, p 487 (1993).