

가미방풍통성산의 항고혈압 작용

하여태·김동희*

The Preventative Effect of Gamibangpungtongsungsan (KBTS) on Hypertension

Yeo-Tae Ha, Dong-Hee Kim

Dept. of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University

In oriental medicine, Gamibangpungtongsungsan (KBTS) has been used as a therapeutic agent for the treatments of acute stage of cerebrovascular diseases and hypertension. In the present study, underlying mechanism on KBTS effects was investigated using spontaneously hypertensive rats (SHR) by determining related parameters such as blood pressure, heart-beat rates; and hormones and plasma constituents. The major finding are summarized as follows.

1. KBTS treatment at concentrations lower than 125 $\mu\text{g}/\text{ml}$ did not show any cytotoxicity on cultured human fibroblast cells.
2. KBTS treatment in SHR significantly decreased blood pressure and heart-beat rate compared with untreated control.
3. KBTS treatment in SHR decreased aldosterone levels in the blood compared with untreated control, but the difference was not statistically significant.
4. KBTS treatment in SHR significantly decreased dopamine, norepinephrine and epinephrine levels in the blood compared with untreated control.
5. KBTS treatment in SHR decreased plasma ion concentrations such as Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Cl^- compared with untreated control; decreases in Na^+ and Cl^- were statistically significant.
6. KBTS treatment in SHR significantly decreased $\text{TNF-}\alpha$, IL-6, and IL-10 levels in the blood compared with untreated control.

Thus, the present data show evidence on anti-hypertension activity of KBTS in an experimental animal system, which can provide further insights into the development of anti-hypertension therapeutic agents.

I. 緒論

고혈압은 수년 또는 수십 년의 시간에 걸쳐서 진행되는 생활습관병이다. 일반적으로 나이를 들

면 누구든지 생기기 쉬운 병이라는 인상이 강하며, 암과 비교해서 비교적 사망률이 낮다고 생각하지만, 실제 고혈압은 암보다 사망에 이를 확률이 높은 병이다. 높은 사망률을 보이는 뇌혈관 질환이나 심장병 등도 고혈압에 의해 진행되기 때문이다¹⁾. 최근 유병률 및 사망률에 대한 통계청 자료가 이를 잘 반영하고 있다.

* 대전대학교 한의과대학 병리학교실
· 교신저자 김동희, dhkim@dju.ac.kr
· 채택일 : 2005년 11월 26일

따라서 여러 질병의 원인이 되는 고혈압 치료제 개발은 시급한 사회적 과제라고 할 수 있어, 우리나라뿐만 아니라 세계적으로도 이에 대한 많은 투자가 이루어지고 있다. 특히 최근 부작용이 적은 천연 물질에 의한 치료제 개발에 관심이 높아가면서 한약을 비롯한 생약에 대한 연구가 활발해지고 있다.

한의학에서는 고혈압이란 肝陽上亢, 中風, 頭痛, 眩暈 및 心火亢炎의 범주에 가장 근접한다고 볼 수 있는데²⁻⁵⁾, 이는 이들로 인한 증상이나 원인이 현대 고혈압과 가장 유사하기 때문이다. 특히 고래로 증풍은 병인, 병기 및 치료에 대하여 한의학적으로 많은 연구가 되어 있고, 치료 결과 역시 우수하여 고혈압에 대한 이들 치료 처방과 구성 약물에 대한 연구⁴⁻¹⁰⁾가 꾸준히 이루어지고 있는 실정이다.

본 연구의 시료인 加味防風通聖散은 防風通聖散에 鈞鈎藤, 豨薺, 鷄血藤 등을 가미한 처방으로 현재 임상에서 고혈압 초기에 응용되고 있는 처방이다. 특히 본 방인 防風通聖散과 가미된 약물은 기존에 이미 항고혈압 작용이 밝혀진 바가 있어¹¹⁻¹⁵⁾, 유의성 있는 결과가 예상된다.

따라서 본 연구에서는 임상에서의 유의성있는 결과를 실험적으로 규명함으로써 객관성을 확보하고, 향 후 보다 효과적인 치료 처방의 개발을 위한 기초 자료를 확보하기 위한 일환으로 기본적인 실험 방법을 통해 고혈압 치료 효과를 검증하였다. 먼저 세포독성 실험을 통해 한약재의 무해성을 입증하였고, 자발성 고혈압동물인 SHR (Spontaneously hypertensive rat)의 혈압과 심박수의 변화, 고혈압에 중요한 역할을 하는 호르몬 catecholamine, adrenaline, noradrenalin, epinephrine 등의 변화와 전해질(Na, K, Cl, Ca) 변화 및 사이토카인의 변화 등을 검색하였다.

II. 실험

1. 재료

1) 동물

본 실험에 사용된 실험용 쥐는 체중 180~220g

의 옹성 SHR(Spontaneous Hypertensive Rat, 자발성고혈압백서-중앙실험동물센터)과 SD(대한동물센터)로서 실험 당일까지 고형사료(조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, calcium 0.6% 이상, 인 0.4% 이상, 삼양사 배합 사료 Co. Korea)와 물을 충분히 공급하고, 실온 22±2℃, 상대습도 50±10%, 조명시간 12시간(07:00~19:00), 조도 150~300Lux로 설정하여 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 체중 변화가 일정하고 건강한 쥐만을 선별하여 실험에 사용하였다.

2) 약물

본 실험에 사용한 加味防風通聖散(KBTS) 구성 약물은 대전대학교부속한방병원에서 구입하였고, 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다(Table 1)

한약명	학명	용량(g)
환석	Talcum	6.5
감초	Glycyrrhiza uralensis	4.5
석고	Gypsum Fibrosum	3
황금	Scutellariae Radix	3
길경	Platycodi Radix	2
방풍	Ledebouriellae Radix	2.5
천궁	Cnidium officinale	2.5
당귀	Angelicae gigantis Radix	2.5
적작약	Paeonia Radix Rubra	2.5
대황	Rhei Rhizoma	2.5
마황	Ephedrae Herba	2.5
박하	Menthae Herba	2.5
연교	Forsythiae Fructus	2.52
망초	Natrii Sulfas	2
형계	Schizonepetae Herba	2
백출	Atractylodis Macrocephalae Rhizoma	2
치자	Gardeniae Fructus	2
조구등	Uncariae Ramulus Et Uncus	12
곽향	Pogostemonis Herba	6
진피	Citri Pericarpium	6
오약	Linderae Radix	6
석창포	Acori Graminei Rhizoma	6
생강	Zizyphi inermis Fructus	4
우슬	Achyranthis Bidentatae Radix	8
회침(주중)	Siegesbeckia glabrescens	12
계혈등	Spatholobus suberectus	6
Total amount		113.02

Table 1. The Compositions of Gami-bangpungtongsungsan(KBTS)표 17

3) 시약 및 기기

실험에 사용한 시약은 DMEM(Sigma Co., U.S.A.), FBS(Sigma Co., U.S.A), antibiotic(Sigma Co., U.S.A.), trichloroacetic (Sigma Co., U.S.A), H₂O₂ (Sigma Co., U.S.A.), formalin(Sigma Co., U.S.A.), glutaraldehyde(Sigma Co., U.S.A.), OsO₄ (Sigma Co., U.S.A.), EDTA(Sigma Co., U.S.A.), HClO₄(Sigma Co., U.S.A.), toluidine blue(Sigma Co., U.S.A.), hematoxylin(Sigma Co., U.S.A.), eosin(Sigma Co., U.S.A.), xylene(Sigma Co., U.S.A.), acid washed alumina(Sigma Co., U.S.A.), norepinephrine (Sigma Co., U.S.A.), epinephrine (Sigma Co., U.S.A.), dopamine(Sigma Co., U.S.A.), dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS-A)(Sigma Co., U.S.A.), ether (Sigma Co., U.S.A.), alcohol(중외제약, Korea), Au(중외제약, Korea), paraffin(중외제약, Korea), normal saline (중외제약, Korea), serum blocking solution(Bayer Dental Co., Japan), biotinylated anti-mouse immunoglobulin (Bayer Dental Co., Japan), streptavidin conjugate(Bayer Dental Co., Japan), DAB- chromogen(Bayer Dental Co., Japan), aldosterone RIA diagnostic kit(Abbott Co., U.S.A.), histostain plus kit(Zymed Co., U.S.A.), gamma count Cobra II(Packard Co., U.S.A), Na(Toshiba, Japan), K (Toshiba, Japan), Cl(Toshiba, Japan) 등을 사용하였다.

기기는 Milli-QTM waters system(Sigma Co., U.S.A.), ion depositor (Sigma Co., U.S.A.), distiller(Büchi 461, Swiss), rotary vaccum evaporator (Büchi 461, Swiss), deep freezer(Sanyo Co., Japan), freeze dryer(Eyela Co., Japan), 생화학 자동분석기(Toshiba, Japan), serum separator(녹십자, Korea), micro slide(Surgipath Co., U.S.A.), minos-ST(Cobas Co., France), ultrasonic cleaner(Branson Ultrasonics Corp., U.S.A.), roller mixer(Gowon scientific technology Co., Korea), vortex(Vision Co.,

Korea), centrifuge(Beckman Co., U.S.A.), physiograph Model 7(GRASS Instrument Co.,

Quincy, Mass., U.S.A.), ACL-100 (Instrumentation Laboratory, U.S.A.), autoclave (Hirayama, Japan), data module(Waters Model 745, U.S.A.), HPLC(Waters Model U6K Injector, 510 pump, U.S.A.), C18 stainless steel column(Waters Model 460, U.S.A.), gel/mount(Biomedica Co., U.S.A.), camera (Nikon, Japan), optical microscope (Olympus BH-2, Japan), transmission electron microscope(Hitachi H-600, Japan), scanning electron microscope(Hitachi S-2500, Japan), 한약유출기 (S-15000, 새일메디칼, Korea) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 검액의 제조

KBTS 2첩 분량을 깨끗이 씻어 3,000ml round flask에 넣고 증류수 2,000ml와 함께 3시간 동안 가열한 후 추출한 침전물을 3차례 여과(3M filter paper)하고, 이 여과액을 rotary vaccum evaporator에서 감압 농축하였다. 농축된 용액을 -70℃ deep freezer에서 4시간 동안 방치하고, 24시간 동안 freeze dryer로 동결 건조하여 1첩 당 22.5 g의 분말을 얻어서 실험에 필요한 농도로 생리식염수에 희석하여 사용하였다.

2) Human fibroblast cells (hFCs) 배양

피부 조직을 cool D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단한 다음, conical tube(15ml)에 넣어 1,400rpm에서 5분간 원심분리하였다. 이 tube에 DMEM {containing collagenase A (5mg/ml, BM, Indianapolis, IN, USA)와 DNase type I (0.15mg/ml, Sigma), antibiotics (penicillin 104U/ml, streptomycin 10mg/ml, amphotericin B 25µg/ml)}를 넣고 37℃ CO₂ 배양기에서 hFCs를 2시간 동안 배양하였다. 여기에 0.5% trypsin-0.2% EDTA를 첨가하여 30분간 배양하고, 인산완충생리식염수 (PBS)로 약 2회 1,500rpm에서 원심분리한 후 DMEM-10% FBS로 1주일 동안 배양하였다. 이를 다시 0.5% trypsin-0.2% EDTA로 분리하여 연속으로 1주

일씩 3회 반복하여 살아있는 부착세포를 DMEM -5% FBS 배양액에서 배양하였다.

3) 안정성 평가

세포독성 측정은 SRB assay법을 약간 변형하여 사용하였다. hFCs 세포는 37°C, 5%CO₂ 배양기에서 자란 것을 Trysin- EDTA 용액으로 단일 세포들이 되도록 떼어낸 후, 2.0x 10⁴개 세포로 96 well plate에 분주한 후 배양기 (37°C, 5% CO₂)에서 2시간 배양하였다. 배양 후 KBTS (최종 농도 1,000µg/ml, 500µg/ml, 250µg/ml, 125µg/ml, 62.5µg/ml, 32µg/ml, 16µg/ml, 1.6µg/ml)을 48시간 동안 처리하였다. 배양 종료 후에 배양액을 버리고 인산완충용액 (PBS)로 2회 세척하고, 각 well에 50% TCA (trichloroacetic acid)를 50µl를 가하여 1시간 동안 4°C에 방치하였다. 이 후 증류수로 5회 세척한 다음 well plate를 공기중에서 건조하였다. 여기에 SRB (0.4%/1% acetic acid) 용액을 100µl/well로 가하고, 실온에서 30분간 염색하였다. 그리고 0.1% acetic acid 용액으로 약 4~5회 세척한 다음 공기중에서 건조하고 10 mM Tris Base로 100µl/well로 용해시켰다. 이 plate를 plate shaker (Lab-Line, USA)에서 3.5 speed로 5분간 shaking하고 Elisa leader (molecular devices, USA) 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) 혈압 및 심박수 측정

혈압 강하 효과를 평가하기 위해 SHR을 대조군과 KBTS 투여군으로 나누어 대조군에는 생리식염수를 매일 2ml/day씩, KBTS 투여군에는 KBTS 검액을 매일 224.4mg/day의 농도로 물에 타서 각각 5주간 경구 투여하였다.

5주 동안 KBTS를 투여한 후, 대조군과 KBTS 투여군의 혈압과 심박수를 측정하였다. 혈압 측정은 최종 약물 투여 후 SHR을 cage에서 2시간 동안 안정시킨 다음, 꼬리를 alcohol로 잘 닦고 37.5°C의 예비 보온기에 10분 동안 넣어 두었다가 physiograph Model 7의 7P8 channel로 마취하지 않은 상태에서 각 군의 혈압을 측정하였다. chart

paper 1cm에 혈압은 50mmHg (baseline:0)으로 보정하였다.

5) 채혈 및 혈장 분리

최종일까지 시료를 투여한 SHR을 ether로 마취시킨 후, 쇄골하정맥에서 혈장 1ml를 채혈하여 3 mg/ml EDTA 용액을 0.5ml로 채운 용기에 가하여 4°C에서 3,000rpm으로 15분간 원심분리시킨 다음, 혈장내 catecholamine과 aldosterone의 함량 측정을 위해 -80°C에서 보관하였다.

6) 혈장 성분의 측정

(1) Aldosterone의 정량

RIA법에 따라 동위원소 I-125 추적자를 이용한 시판용 aldosterone RIA diagnostic kit를 사용하였고, gamma counting은 gamma count Cobra II를 이용하여 정량하였다.

(2) Catecholamine의 정량

Hjendahl 변법에 따라 혈장내의 catecholamine을 4°C에서 추출하였다. 채혈한 혈장에 0.1M의 HClO₄를 가하여 단백을 제거한 후, acid washed alumina에 흡착시킨 다음 증류기로 수세하고, 0.1M의 HClO₄에 다시 용출시켜 용출액 20µl를 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)에 주입하여 norepinephrine, epinephrine, dopamine의 함량을 측정하였다. HPLC에서 분리된 물질들을 data module을 통해 정량하였으며, 이 때 C18 stainless steel column(5µ, 150mm×4.6mm; KCl reference electrode)에 가해진 전압은 +0.63V였다. 측정에 필요한 시약은 norepinephrine, epinephrine, dopamine 등으로 특급품을 사용하였으며, 증류수는 millipore(Milli-QTM waters system)를 통과시킨 초순수를 사용하였다.

(3) 전해질 검사

Indirect electrode법에 따라 혈장내의 생화학 자동화분석기(Toshiba)에 시판용시약 Na, K, Cl, Ca을 사용하여 장착된 각각의 전극을 통하여 전해질의 양을 측정하였다.

7) 혈청내 싸이토카인 농도 측정

IL-10, IL-6, TNF- α , 혈청내 농도 측정은 고혈압 실험 종료 후에 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA, Endogen, USA)로 생산량을 측정하였다. 각 well에 SHR의 혈청 100 μ l (1/100 dilution)씩 분주하고, 1 시간 동안 실온에서 방치한 후 2회 washing 완충용액으로 세척한 다음 antibody Avidin-HRP conjugated 100 μ l를 처리하고 1 시간 실온에서 방치한 후 다시 세척하였다. 여기에 TMB 기질을 100 μ l씩 분주하고 암실에서 30분간 방치한 후 50 μ l의 stop 용액을 처리한 후 ELISA reader 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

8) 통계 처리

각 실험군 결과값은 ANOVA, unpaired student's T-test(Scheffler, 1980) 및 SPSS/PC 통계프로그램을 사용하여 통계 처리하였으며, $P < 0.05$ 이하의 수준에서 유의성 검정을 실시하였다.

III. 성 적

1. Human Fibroblast Cell(hFCs)에 대한 세포독성

hFCs에 대한 세포독성을 관찰한 결과, 대조군의 세포생존율이 $100 \pm 5.80(\%)$ 인데 비하여, KBTS 투여군 1.6, 16, 32, 62.5, 125, 250, 500, 1000 μ g/ml의 농도에서는 각각 102.4 ± 6.4 , 98.8 ± 4.6 , 97.2 ± 3.6 , 95.8 ± 3.5 , 94.2 ± 5.2 , 84.3 ± 3.6 , 80.6 ± 6.5 , $76.2 \pm 5.2(\%)$ 로 나타났다 (Table 2).

Drug	Dose (μ g/ml)	% of Control Data hFCs
Control	0	100 ± 5.8
KBTS	1000	76.2 ± 5.2
	500	80.6 ± 6.5
	250	84.3 ± 3.6
	125	94.2 ± 5.2
	62.5	95.8 ± 3.5
	32	97.2 ± 3.6
	16	98.8 ± 4.6
	1.6	102.4 ± 6.4

Table 2. Cytotoxicity of KBTS on Human Fibroblast Cells(hFCs)

2. 혈압에 미치는 영향

SHR의 혈압 측정 결과, 대조군은 185.4 ± 5.2 mmHg인데 비하여, KBTS 투여군은 147.8 ± 3.5 mmHg으로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는($p < 0.01$) 강압 효과를 보였다 (Table 3, Fig. 1).

Table 3. The Effect of KBTS on Blood Pressure in SHR

	Control	KBTS
BP (mmHg)	185.4 ± 5.2	$147.8 \pm 3.5^{**}$

*: Statistically significant value compared with control data by T-test.

(* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$)

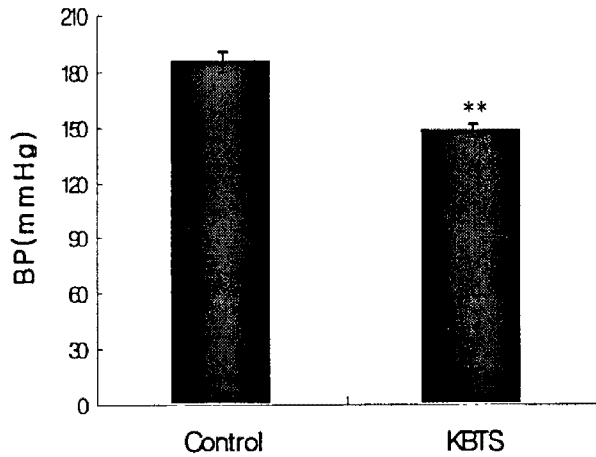


Fig. 1. The effect of KBTS on blood pressure in SHR

Control : Normal saline(day/2 ml) treated group

KBTS : KBTS(224.4mg/day/2 ml) treated group

*:Statistically significant value compared with control data by T-test.

(* : P<0.05, ** : P<0.01, *** : P<0.001)

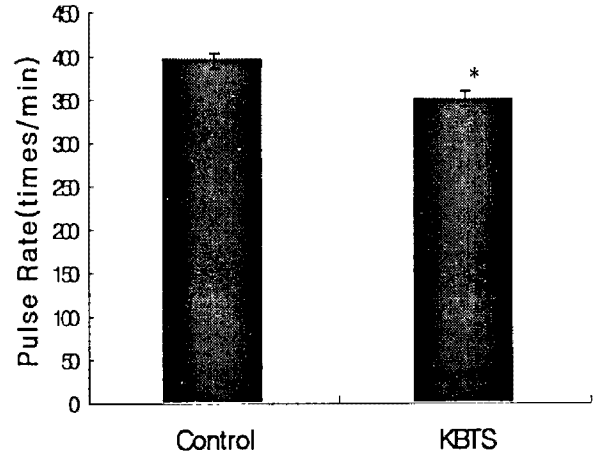


Fig. 2. The effect of KBTS on pulse rate in SHR

Control : Normal saline(day/2 ml) treated group

KBTS : KBTS(224.4mg/day/2 ml) treated group

*:Statistically significant value compared with control data by T-test.

(* : P<0.05, ** : P<0.01, *** : P<0.001)

3. 심박수에 미치는 영향

SHR의 심박수 측정 결과, 대조군은 395.2±9.0 (회/분), KBTS 투여군은 350.6±9.2(회/분)으로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는(p<0.05) 감소가 나타났다(Table 4, Fig. 2).

Table 4. The Effect of KBTS on Pulse Rate in SHR

	Control	KBTS
Pulse Rate (times/min)	395.2±9.0	350.6±9.2*

*:Statistically significant value compared with control data by T-test.

(* : P<0.05, ** : P<0.01, *** : P<0.001)

4. Aldosterone의 농도 변화에 미치는 영향

Aldosterone 농도 측정에서는 대조군이 31.2±2.5pg/ml, KBTS 투여군이 29.4±3.01pg/ml로 나타나 대조군에 비해 감소하였다(Table 5, Fig. 3).

Table 5. The Effect of KBTS on the Plasma Levels of Aldosterone in SHR

	Control	KBTS
Plasma Aldosterone Levels(pg/ml)	31.2±2.5	29.4±3.01

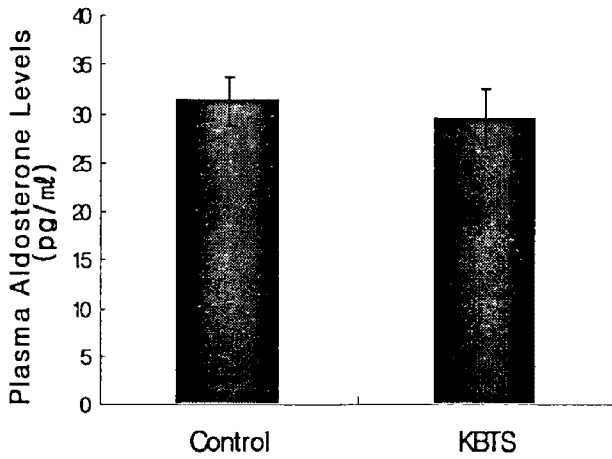


Fig. 3. The effect of KBTS on the plasma levels of aldosterone in SHR.

Control : Normal saline(day/2 ml) treated group

KBTS : KBTS(224.4mg/day/2 ml) treated group

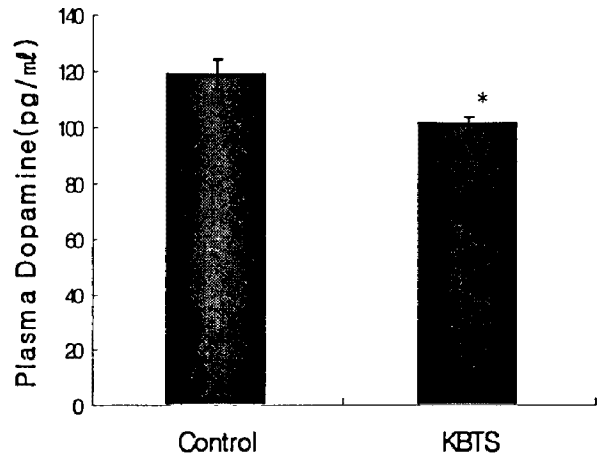


Fig. 4. The effect of KBTS on the plasma dopamine concentration in SHR.

Control : Normal saline(day/2ml) treated group

KBTS : KBTS(224.4mg/day/2ml) treated group

*:Statistically significant value compared with control data by T-test.

(* : P<0.05, ** : P<0.01, *** : P<0.001)

5. Catecholamine의 함량 변화에 미치는 영향

1) Dopamine의 농도 변화

Dopamine의 농도는 대조군이 118.9±5.1 pg/ml, KBTS 투여군이 101.1±2.3 pg/ml로 나타나 대조군에 비해 유의성 있게(p<0.05) 감소하였다 (Table 6, Fig. 4).

Table 6. The Effect of KBTS on the Plasma Dopamine Concentration in SHR

	Control	KBTS
Plasma Dopamine Levels(pg/ml)	118.9±5.1	101.1±2.3*

*:Statistically significant value compared with control data by T-test.

(* : P<0.05, ** : P<0.01, *** : P<0.001)

2) Norepinephrine의 농도 변화

Norepinephrine의 농도는 대조군이 572.7±14.38pg/ml, KBTS 투여군이 494.2±10.1pg/ml로서 대조군에 비하여 유의성 있게(p<0.05) 감소되었다(Table 7, Fig. 5).

Table 7. The Effect of KBTS on the Plasma Norepinephrine Concentration in SHR

	Control	KBTS
Plasma Norepinephrine Levels(pg/ml)	572.7±14.38	494.2±10.1*

*:Statistically significant value compared with control data by T-test.

(* : P<0.05, ** : P<0.01, *** : P<0.001)

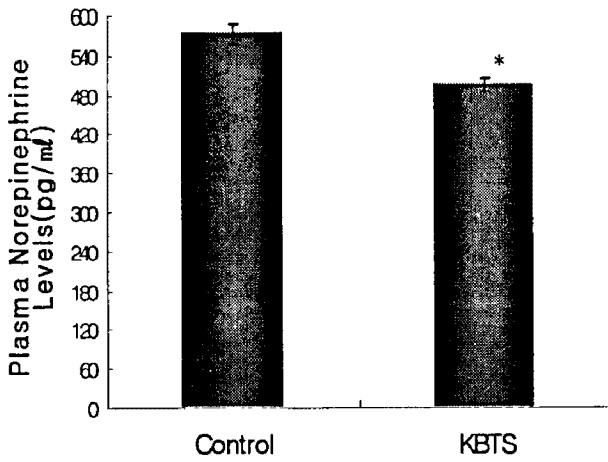


Fig. 5. The effect of KBTS on the plasma norepinephrine concentration in SHR
 Control : Normal saline(day/2 ml) treated group
 KBTS : KBTS(224.4mg/day/2 ml) treated group

*:Statistically significant value compared with control data by T-test.
 (* : P<0.05, ** : P<0.01, *** : P<0.001)

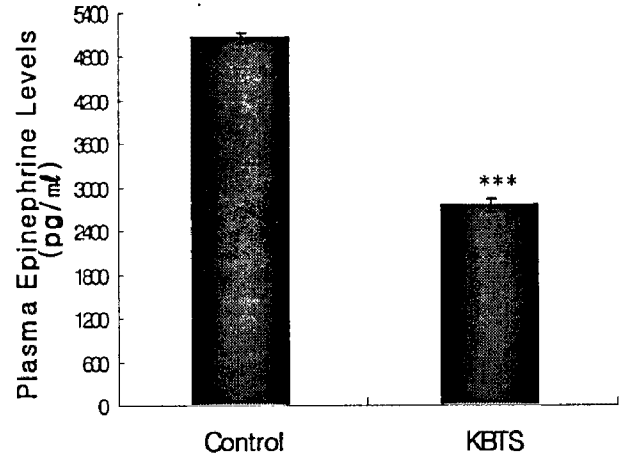


Fig. 6. The effect of KBTS on the plasma epinephrine concentration in SHR.
 Control : Normal saline(day/2 ml) treated group
 KBTS : KBTS(224.4mg/day/2 ml) treated group

*:Statistically significant value compared with control data by T-test.
 (* : P<0.05, ** : P<0.01, *** : P<0.001)

3) Epinephrine의 농도 변화

Epinephrine의 농도는 대조군이 5060.4±67.2 pg/ml, KBTS 투여군이 2742.2±86.0 pg/ml로 나타나 대조군에 비해 유의성 있게(p<0.001) 감소되었다(Table 8, Fig. 6).

Table 8. The Effect of KBTS on the Plasma Epinephrine Concentration in SHR

	Control	KBTS
Plasma Epinephrine Levels (pg/ml)	5060.4±67.2	2742.2±86.0***

*:Statistically significant value compared with control data by T-test.
 (* : P<0.05, ** : P<0.01, *** : P<0.001)

6. 전해질 변화에 미치는 영향

1) Sodium (Na) 변화에 미치는 영향

Sodium (Na)의 농도는 대조군이 174.3±0.98 (mEq/L), KBTS 투여군이 147.0±6.9 (mEq/L)로 나타나 대조군에 비해 유의성 있는(p<0.05) 감소 효과를 보였다(Table 9, Fig. 7).

Table 9. The Effect of KBTS on the Blood Levels of Sodium (Na) in SHR

	Control	KBTS
Sodium (Na)(mEq/L)	174.3±0.98	147.0±6.9*

*:Statistically significant value compared with control data by T-test.
 (* : P<0.05, ** : P<0.01, *** : P<0.001)

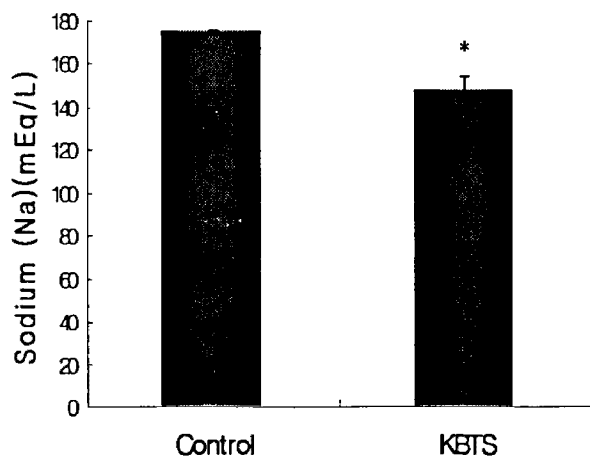


Fig. 7. The effect of KBTS on the blood levels of sodium (Na) in SHR

Control : Normal saline(day/2ml) treated group

KBTS : KBTS(224.4mg/day/2ml) treated group

*:Statistically significant value compared with control data by T-test.

(* : P<0.05, ** : P<0.01, *** : P<0.001)

2) Potassium (K) 변화에 미치는 영향

혈중 Potassium (K)의 농도는 대조군이 8.4±0.4 (mEq/L), KBTS 투여군이 7.0±0.6(mEq/L)로 나타나 대조군에 비해 감소하였다(Table 10, Fig. 8).

Table 10. The Effect of KBTS on the Blood Levels of Potassium (K) in SHR

	Control	KBTS
Potassium(K) (mEq/L)	8.4±0.4	7.0±0.6

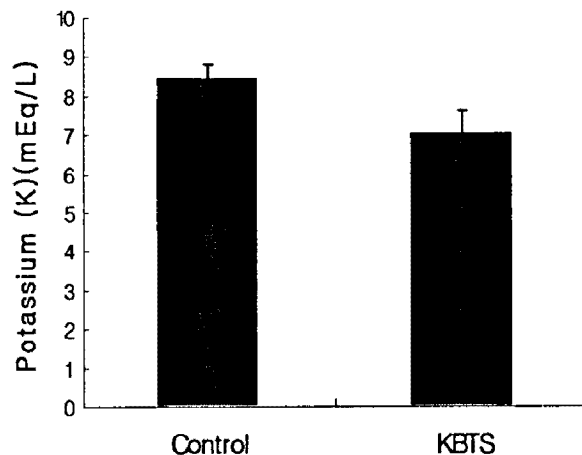


Fig. 8. The effect of KBTS on the blood levels of potassium (K) in SHR.

Control : Normal saline(day/2 ml) treated group

KBTS : KBTS(224.4mg/day/2 ml) treated group

3) Chloride (Cl) 변화에 미치는 영향

혈중 Chloride (Cl) 농도는 대조군이 97.4 ± 3.5 (mEq/L), KBTS 투여군이 97.0 ± 2.7 (mEq/L)로 나타나 대조군에 비해 감소하였다 (Table 11, Fig. 9).

Table 11. The Effect of KBTS on the Blood Levels of Chloride (Cl) in SHR

	Control	KBTS
Chloride (Cl) (mEq/L)	97.4±3.5	97.0±2.7

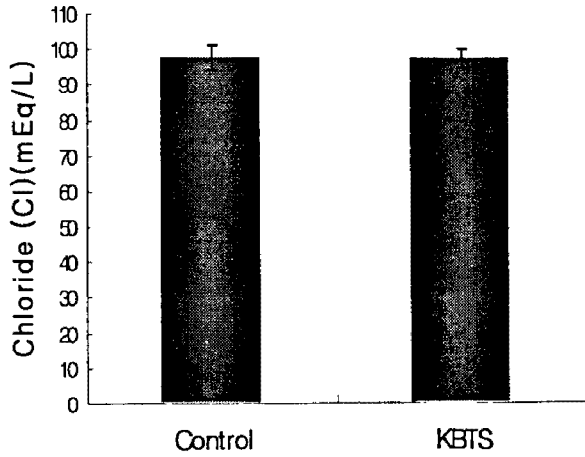


Fig. 9. The effect of KBTS on the blood levels of chloride (Cl) in SHR.

Control : Normal saline(day/2ml) treated group

KBTS : KBTS(224.4mg/day/2ml) treated group

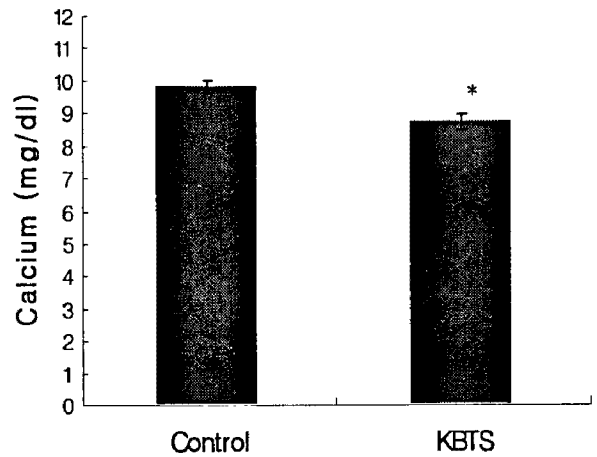


Fig. 10. The effect of KBTS on the blood levels of calcium in SHR.

Control : Normal saline(day/2ml) treated group

KBTS : KBTS(224.4mg/day/2ml) treated group

4) Calcium 변화에 미치는 영향

혈중 Calcium 농도는 대조군이 9.8 ± 0.19 mg/dl, KBTS 투여군이 8.71 ± 0.23 mg/dl로 나타나 대조군에 비해 유의성 있게($p < 0.05$) 감소하였다(Table 12, Fig. 10).

Table 12. The Effect of KBTS on the Blood Levels of Calcium in SHR

	Control	KBTS
Calcium (mg/dl)	9.8 ± 0.19	$8.71 \pm 0.23^*$

*:Statistically significant value compared with control data by T-test.

(* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$)

7. 싸이토카인 발현에 미치는 영향

1) TNF-a 발현에 미치는 영향

혈청내의 TNF-a 발현을 분석한 결과, 대조군이 26.5 ± 1.5 pg/ml, KBTS 투여군이 17.5 ± 3.9 pg/ml으로 나타나 대조군에 비하여 유의성있는 ($p < 0.05$) 감소 효과를 나타내었다(Table 13, Fig. 11).

Table 13. Effect of KBTS on the TNF-a Level in SHR

Group	TNF-a (pg/ml)
Control	26.5 ± 1.5
KBTS	$17.5 \pm 1.9^*$

*:Statistically significant value compared with control data by T-test.

(* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$)

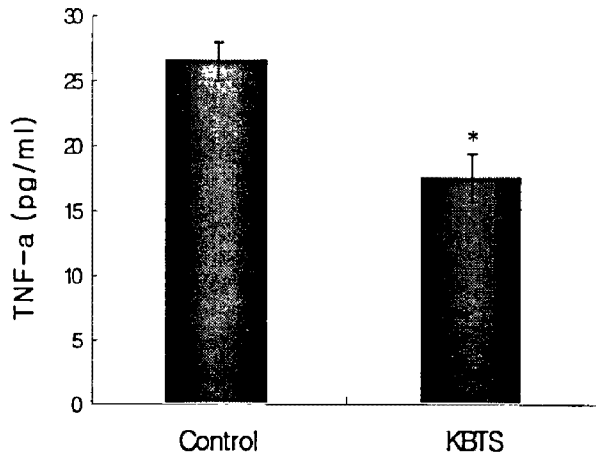


Fig. 11. Effect of KBTS on the TNF-a level in SHR

Control : Normal saline (day/0.2ml) treated group

KBTS : KBTS (22.4mg/day/0.2ml) treated group

*:Statistically significant value compared with control data by T-test.

(* : P<0.05, ** : P<0.01, *** : P<0.001)

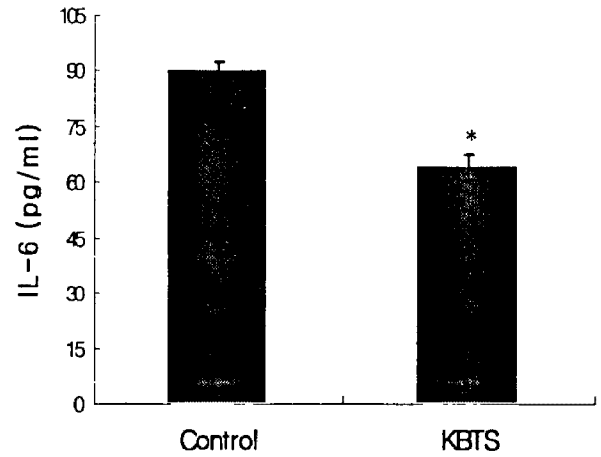


Fig. 12. Effect of KBTS on the IL-6 level in SHR

Control : Normal saline(day/2ml) treated group

KBTS : KBTS(224.4mg/day/2ml) treated group

*:Statistically significant value compared with control data by T-test.

(* : P<0.05, ** : P<0.01, *** : P<0.001)

2) IL-6 발현에 미치는 영향

혈청내의 IL-6 발현을 분석한 결과, 대조군에서는 89.7±2.8pg/ml, KBTS 투여군은 63.8±3.3pg/ml으로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는(P<0.05) 감소효과를 나타내었다(Table 14, Fig. 12)

Table 14. Effect of KBTS on the IL-6 Level in SHR

Group	IL-6(pg/ml)
Control	89.7±2.8
KBTS	63.8±3.3*

* : Statistically significant value compared with control data by T-test.

(* : P<0.05, ** : P<0.01, *** : P<0.001)

3) IL-10 발현에 미치는 영향

혈청내의 IL-10 발현을 분석한 결과, 대조군은 34.0±2.9pg/ml, KBS 투여군은 52.1±4.4pg/ml으로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는(p<0.001) 감소효과를 나타내었다(Table 15, Fig. 13).

Table 15. Effect of KBTS on the IL-10 Level in SHR

Group	IL-10(pg/ml)
Control	34.0±2.9
KBTS	52.1±4.4**

*:Statistically significant value compared with control data by T-test.

(* : P<0.05, ** : P<0.01, *** : P<0.001)

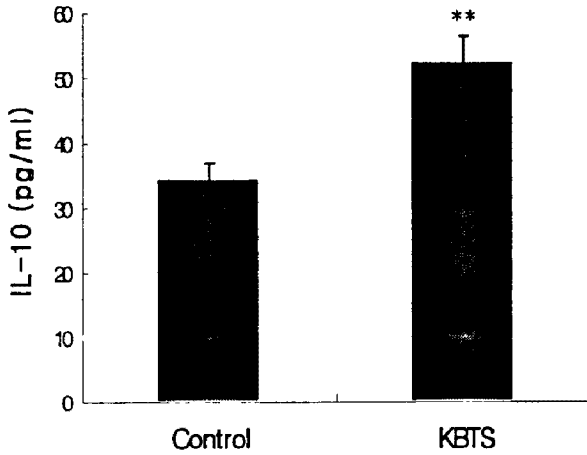


Fig. 13. Effect of KBTS on the IL-10 level in SHR

Control : Normal saline(day/2ml) treated group

KBTS : KBTS(224.4mg/day/2ml) treated group

*:Statistically significant value compared with control data by T-test.

(* : P<0.05, ** : P<0.01, *** : P<0.001)

IV. 考 察

고혈압은 단순히 혈압이 높은 것이 아니라 높은 혈압이 장시간 걸쳐서 유지되는 것으로 많은 문제를 일으킬 수 있다. 혈관이 좁아지거나 탄력을 잃거나 심장으로부터 혈액량이 증가하면 혈압이 상승한다. 일시적인 스트레스 등으로 인해 혈관이 좁아지는 경우는 생체내의 혈압 조절기능에 의해 스트레스를 해소하게 되면 본 상태로 돌아오게 된다. 그러나 자주 또는 만성적으로 혈압이 높은 상태를 오랫동안 유지하게 되면 몸은 그 자체를 정상으로 인식하게 되고 고혈압을 유지하게 된다. 그래서 높은 혈압에 적응하기 위해 혈관의 벽은 두꺼워지고 결과적으로 혈관은 좁아져서 보다 혈압이 높아지게 된다. 좁아진 혈관에는 콜레스테롤 등이 축적되기 쉬우며 따라서 혈관이 막

히게 되고 혈압은 더욱 상승하게 된다. 콜레스테롤이나 중성지방등이 혈관에 축적되면 혈관이 손상을 입고 탄력이 없어지며 굳은 혈관은 더욱 좁아지고 혈압은 더욱더 높아진다. 고혈압이 유지되면 심장의 근육이 비대해지며, 이에 따라 심장이 약해지고 혈액 공급이 어려워진다. 이러한 결과로 고혈압은 뇌졸중과 관상동맥질환 그리고 심부전증 등 심혈관 질환의 가장 흔한 위험 인자가 된다^{1,16)}.

고혈압을 두 가지로 분류하는데 현재 의학적 검사로 혈압이 상승하는 명확한 원인이 밝혀지지 않은 고혈압을 본태성고혈압이라고 하며, 고혈압의 95% 이상을 차지하고 있다. 그리고 검사 결과 혈압이 상승하는 원인이 밝혀진 것인데 이를 이차적 또는 징후성 고혈압이라고 부른다¹⁶⁾.

유전적 요인이나 염분의 과다섭취, 스트레스, 운동부족, 음주, 비만 등 생활습관에 의한 고혈압 외에 원인을 알 수 없는 본태성고혈압은 일반적으로 양친이 본태성고혈압인 경우 자녀의 약 절반이 본태성고혈압으로 나타난다. 따라서 유전적 요인과 생활 습관은 본태성고혈압 발병에 각각 절반 정도는 기여한다고 생각된다. 일반적으로 혈압은 나이를 먹어가면서 상승하는데 이는 사회활동에 따른 생활 습관이 원인이 되기 때문에 본태성고혈압은 중년 이후에 발병하는 경우가 많고 고지혈증, 지질대사이상, 당뇨병, 비만 등의 성인병 합병증으로 나타나기 쉽다.

본태성고혈압 환자에서는 정상인 사람에 비해서 당뇨병을 겸하는 경우가 2배 이상 높고, 역시 당뇨병 환자들 중에는 당뇨병이 아닌 사람들에 비해서 고혈압이 합병증으로 나타는 경우가 2배 이상 높은 것으로 알려져 있다^{17,18)}. 따라서 본태성고혈압의 유전적 요인과 당뇨병의 유전적 요인은 일부분 같다고 생각되어 지게 되었다. 또 이러한 요인은 고지혈증, 지질대사이상 그리고 비만의 원인과도 공통점이 있을 가능성이 대두되고 있다¹⁹⁾.

고혈압의 발생 기전에 대해서는 완전하게 밝혀 지지지는 않았지만 혈압은 renin- angiotensin계의 활성화에 의한 혈관 수축과 이에 따른 aldosterone 분비에 의한 혈장량 증가, 교감신경 활성화도 증가

에 의한 심박동수 및 심박출량 증가, 세포내 Na⁺ 증가로 인한 말초혈관평활근의 긴장도 증가 등에 의해 상승하는 것으로 보고되고 있다^{20~22}).

본 실험에서는 먼저 가미방풍통성산(KBTS)의 안정성 검사를 위해 hFCs에 대한 세포 독성을 관찰한 결과 대조군의 세포생존율이 100±5.80(%)인데 비하여, KBTS 투여군 1.6, 16, 32, 62.5, 125, 250, 500, 1000µg/ml의 농도에서는 각각 102.4±6.4, 98.8±4.6, 97.2±3.6, 95.8±3.5, 94.2±5.2, 84.3±3.6, 80.6±6.5, 76.2±5.2(%)로 나타나 125µg/ml 이하의 농도에서 90% 이상의 생존율을 보였다. 대부분 임상에서 사용되는 처방이 500µg/ml 농도 이하에서 독성을 나타낸 기존의 실험 결과를 볼 때, 비교적 타 처방에 비해 세포독성이 있다고 볼 수 있으나, 125µg/ml 농도 역시 고농도점으로 보아 절대적으로 독성이 있다고 평가하기 어렵다. 차후 동물 실험을 통한 안정성 검사가 요구된다.

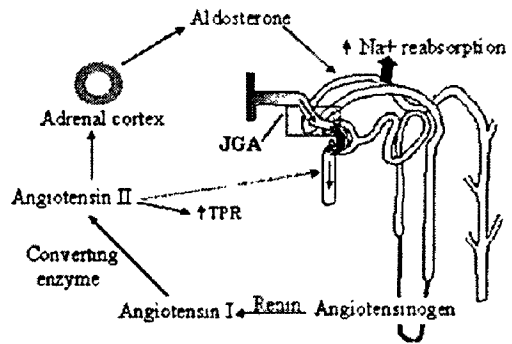
자발성 고혈압 동물 모델인 SHR은 생후 약 7주 부터 혈압이 올라가기 시작하는데 13주가 되면 수축기 혈압이 200 이상을 유지하는 백서로 원인이 불분명하여 고혈압 연구에 많이 이용된다²³).

먼저 심장의 수축과 이완 및 말초혈관의 탄성에 따라서 변하는 생리적인 변수의 하나로 혈관 질환을 진단하고 치료함에 있어서 중요한 지표가 되는 혈압과 심박수를 측정 한 결과 혈압은 대조군이 185.4±5.2mmHg인데 비하여, KBTS 투여군이 147.8±3.5mmHg으로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는(p<0.01) 강압 효과를 보였고, 심박수도 대조군이 395.2±9.0(회/분), KBTS 투여군이 350.6±9.2(회/분)으로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는(p<0.05) 감소가 나타났다. 이 같은 결과는 기존의 동일 실험 결과에 비해 보다 유의성있는 결과로 본 시료가 항고혈압 작용이 실험적으로도 입증되었다고 볼 수 있다.

호르몬은 혈액 중에 흘러서 전신의 장기에 이르러 각 장기의 여러 가지 기능을 조절하는 중요한 물질의 총칭이다. 이 호르몬 안에는 심장, 혈관, 신장 등에 작용해서 혈압을 유지하고 장기에 혈액을 원활히 하는 기능을 갖고 있는 것도 있다. 그러나 이러한 혈압 상승 호르몬이 과도하게 분

비되면 고혈압이 된다^{24,25}). 많은 양의 나트륨과 물을 배설함으로써 혈압을 조절하는 기능을 하는 신장의 전체의 활동이 저하되면 나트륨(Na)이나 수분의 배설 기능이 약해져서 혈압이 상승한다. 또 신장에 혈액을 공급하는 혈관인 신동맥이 동맥경화나 동맥 염증 등으로 좁아지면 신장으로부터 혈압을 조절하는 물질인 Renin이 방출되는데 Renin은 혈관을 수축시켜 혈압을 올리는 작용을 한다^{26,27}). 대표적인 것으로 신장에 작용해서 나트륨(Na), 수분을 일정하게 보유시켜서 혈압을 유지시키는 aldosterone 호르몬이 과도하게 분비되면 고혈압이 되어 원발성 aldosterone증이 된다. 또 심장이나 혈관에 작용해서 혈압을 상승시키는 catecholamine계의 adrenaline, noradrenalin, epinephrine 등이 과도하게 분비되어 고혈압이 되는 갈색세포종 등의 내분비성 고혈압이 있다²⁸).

The Renin-Angiotensin System



따라서 본 실험에서는 혈압 조절과 전해질 균형의 조절에서 가장 중요한 역할을 담당하고 있는 Renin-angiotensin-aldosterone system에 미치는 영향을 관찰하기 위해 먼저 혈장내의 aldosterone의 함량을 측정하여 비교한 결과, 대조군이 31.2±2.5pg/ml, KBTS 투여군이 29.4±3.01pg/ml으로 대조군에 비해 감소하였으며, 혈장내의 catecholamine계의 dopamine, noradrenalin, epinephrine을 측정 한 결과 dopamine의 농도는 대조군이 118.9±5.1pg/ml, KBTS 투여군이 101.1±2.3pg/ml로 나타나 대조군에 비해 유의성 있게(p<0.05) 감소하였고, norepinephrine의 농도는 대조군이 572.7±14.38

pg/ml, KBTS 투여군이 494.2±10.1pg/ml로서 대조군에 비하여 유의성 있게(p<0.05) 감소하였으며, epinephrine의 농도는 대조군이 5060.4±67.2pg/ml, KBTS 투여군이 2742.2±86.0pg/ml로 나타나 이 역시 대조군에 비해 유의성 있게(p<0.001) 감소하였다. 결과적으로 가미방풍통성산이腎性 hormone에 의한 혈압 조절 체계에 작용하여 혈장량의 증가에 의한 혈압 상승을 억제함과 동시에, 신경성 혈압 조절 작용이 있음을 알 수 있다. 이 같은 결과는 나의 결과²⁹⁾와 비교하여 볼 때 상호 부합되는 결과로, 防風通聖散이 고혈압과 관련된 내분비 호르몬에 매우 유의성 있는 작용을 함을 알 수 있다. 그러나 구성 약물 중 특정 약물에 의한 것인지, 防風通聖散에 의한 것인지는 차 후 심도있는 연구가 필요하다.

다음으로 상기한 바와 같이 혈압 상승에 중요한 역할을 하는 전해질³⁰⁻³³⁾인 Sodium(Na), Potassium(K), Chloride(Cl), Calcium(Ca)등을 측정을 측정한 결과, 혈중 Sodium (Na)의 농도는 대조군이 174.3±0.98(mEq/L), KBTS 투여군이 147.0±6.9(mEq/L)로 나타나 대조군에 비해 유의성 있게(p<0.05) 감소하였고, 혈중 Potassium (K)의 농도는 대조군이 8.4±0.4(mEq/L), KBTS 투여군이 7.0±0.6(mEq/L)로 나타나 대조군에 비해 감소하였으며, 혈중 Chloride(Cl) 농도는 대조군이 97.4±3.5(mEq/L), KBTS 투여군이 97.0±2.7(mEq/L)로 나타나 대조군에 비해 감소하였다. 그리고 혈중 Calcium(Cl) 농도는 대조군이 9.8±0.19 mg/dl, KBTS 투여군이 8.71±0.23 mg/dl로 나타나 대조군에 비해 유의성 있게(p<0.05) 감소하였다. 가미방풍통성산의 투여에 의해 혈중 K와 Ca는 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었고, 혈중 Na과 Cl은 유의성 있는 감소 효과를 나타내는 것으로 보아 加味防風通聖散이 전해질 조절을 통한 혈압 조절에 긍정적 영향을 미치는 것으로 생각되어진다.

마지막으로 TNF- α , IL-6, IL-10의 분비량 측정을 측정하였는데, 이는 SHR 고혈압 흰쥐가 NF[kappa]B/I[kappa]B system에 의하여 혈관염증 반응이 일어나, 염증 관련 사이토카인인 IL-1 β , IL-6 그리고 TNF- α 의 mRNA와 혈청 내

수준이 정상 WKY 흰쥐보다 높게 나타난다는 연구 보고^{33,34)}와 더불어 이러한 염증 사이토카인의 유전자 발현이 IL-10에 의하여 조절되어, SHR 고혈압 흰쥐에 recombinant IL-10을 주사한 결과 혈관성 염증이 현저히 줄었다는 보고³⁵⁾에 준한 것이다. 본 실험에서 혈청내의 TNF- α 발현은 대조군이 26.5±1.5pg/ml, KBTS 투여군이 17.5±3.9pg/ml으로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 (p<0.05) 감소하였고, 혈청내의 IL-6 발현은 대조군이 89.7±2.8pg/ml, KBTS 투여군은 63.8±3.3pg/ml으로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는(P<0.05) 감소를 나타내었다. 혈청내의 IL-10 발현 역시 대조군이 34.0±2.9pg/ml, KBS 투여군은 52.1±4.4pg/ml으로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는(p<0.001) 증가를 나타냄으로써, 최근 결과와 모두 부합되었다.

V. 결론

加味防風通聖散이 고혈압에 미치는 효과를 검증하기 위하여 SHR의 혈압, 심박수, aldosterone, catecholamine 함량, 전해질 및 관련 사이토카인 변화 등을 측정한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 가미방풍통성산은 Human Fibroblast Cells에 대하여 125 μ g/ml 이하에서는 세포독성을 나타내지 않았다.
2. 가미방풍통성산은 대조군에 비하여 유의성 있는 혈압 및 심박수 강하 효과를 나타냈다.
3. 가미방풍통성산은 대조군에 비하여 aldosterone의 함량을 감소시켰으나, 유의성은 나타나지 않았다.
4. 가미방풍통성산은 대조군에 비하여 dopamine, norepinephrine, epinephrine의 함량을 유의성 있게 감소시켰다.
5. 가미방풍통성산은 대조군에 비하여 Sodium, Potassium, Chloride, Calcium 함량을 감소시

켰으며, Sodium, Chloride 함량은 유의성 있게 감소시켰다.

6. 가미방풍통성산은 대조군에 비하여 혈청내 TNF-a, IL-6, IL-10 발현을 유의성 있게 감소시켰다.

이상의 결과로 미루어 보아 현재 임상에서 활용되는 加味防風通聖散의 항고혈압 작용이 실험적으로 검증되어, 향후보다 유의성 있는 항고혈압 처방 개발에 객관적 자료로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 이영우: 순환기학, 서울, 일조각, 2001. pp.193-195, p. 205.
2. 上海中醫學院 편: 中醫內科學, 상해, 1977. 상무인서관, p. 150
3. 굴송백 외: 實用中醫心血管病學, 북경, 과학기술문헌출판사, 1993. pp. 347-354
4. 全國韓醫科大學心系內科學教室 편: 심계내과학, 서울, 서원당, 1999. pp. 189-201
5. 남창규: 涼膈散火湯이 고혈압 및 고지혈증에 미치는 영향, 대전대학교 대학원 韓醫學科碩博論考, 1999. 2:226-228
6. 김종인: 地黃飲子가 뇌손상 및 고혈압에 미치는 영향, 대전대학교 대학원, 2001.
7. 한승동: 대시호탕가미방이 고혈압 및 고지혈증에 미치는 영향, 경산대학교 대학원, 1999.
8. 이정수: 柴苓湯이 고혈압 및 고지혈증에 미치는 영향, 대전대학교 대학원 韓醫學科碩博論考, 1999.2:374 -376
9. 조봉현: 加味四物湯이 고혈압에 미치는 영향, 대전대학교 대학원, 2005.
10. 신황수: 加味導赤散이 고혈압에 미치는 영향, 대전대학교 대학원, 2004.
11. 이남훈: 防風通聖散이 고혈압 고지혈에 미치는 영향, 경희대학교 대학원, 1991.
12. 김경선: 防風通聖散이 백서의 뇌혈류역학에 미치는 기전 연구, 동신대학교 대학원, 2001.
13. 유병찬: 加味鷄血藤湯이 고혈압에 미치는 영향, 대전대학교 대학원, 2003.
14. 조현모: 豨薺이 혈압과 혈당에 미치는 영향, 대전대학교 대학원, 1998.
15. 박석기: 釣鉤藤의 혈관긴장성 조절 및 그 기전에 관한 연구, 동신대학교 대학원, 1998.
16. WHO-ISH: 1999 World Health Organization- International Society of Hypertension Guide lines of the Management of Hypertension, Journal of Hypertension, 1999.17:151-183.
17. Merle L. Foss, 위승두 외 옮김, Fox's 운동생리학, 서울, 대한 미디어, 2001.
18. 구한서: 고혈압과 당뇨에 대한 고찰, 한국정신과학회, 학술대회논문집 제3회, 1995, pp. 80-90.
19. 배형섭 외: 방풍통성산이 고혈압, 고지혈에 미치는 영향, 경희의학, 7권, 1호, 1991. pp. 110-119.
20. 전국의과대학임상교수 편: 임상의학, 서울, 한우리, 1999., pp. 255-256
21. 해리슨번역편찬위원회 역: Harrison 내과학, 서울, 정담, 1997. pp. 341-346, 451-453, 1145-1165, 1944-1958, 2409-2435.
22. 김종규: 생리학, 서울, 정문각, 1998, p. 46, pp. 300-301.
23. 이영우 외: 고혈압, 서울, 고려의학, 2000, pp. 11-55.
24. 이원로: 임상심장학, 서울, 고려의학, 1998, pp. 479-481.
25. Eugene Braunwald, Stephen L, Anthony S, Dan L, Dennis L, J. Larry Jameson: harrison's principles of internal medicine 15th edition, McGrawHill, 2001, pp. 1414-1430.
26. 김정진: 생리학, 서울, 고문사, 1997, pp. 115-118.
27. Walter F, Emile L: medical physiology,

- saunders, 2003, pp. 534-545, pp. 1057-1061.
28. 서울대학교 의과대학 편: 내분비학, 서울, 서울대학교출판부, 1994, p. 199, p. 203-204.
29. 나영철: Protective effects of Kami-bang-tong-sung-san on the cardiovascular and nervous systems, 대전대학교 대학원, 2004.
30. 양재하, 김미려, 권용준 : 천마엑기스가 선천성 고혈압쥐에서 혈장 전해질 및 Aldosterone 함량과 혈장 Renin 활성도 변화에 미치는 영향, 동서의학, 1997, 22권, 4호, p. 1-22.
31. 박정아: 고혈압인에서 renin 활성도, 호르몬 수준 그리고 나트륨과 칼슘 섭취 습관과의 관련성, 계명대학교 대학원, 1998.
32. 손숙미 , 본태성 고혈압 환자와 치료받은 고혈압 환자에 있어 마그네슘과 다른 전해질 (Ca , Na , K) 의 수준 차이에 관한 연구, 대한보건의학회학술지, 1988, 14권, 2호, p. 115-126.
33. Sanz-Rosa, David a., Cediel, Eva a., Heras, Natalia de las a., Miana, Maria a., Cachofeiro, Victoria a. Participation of aldosterone in the vascular inflammatory response of spontaneously hypertensive rats: role of the NF[κ]B/I[κ]B system. *Journal of Hypertension*. 2005, 23(6):1167 -1172, June
34. Akio Nakamura, Edward J. Johns, Toshiaki Abe and Takao Kohsakas. Role of beta-adrenoceptor on renal IL-6 and TNF in SHR, *Life sciences*, Vol. 62. No. 26, 1998, pp. zun-ula
35. Patricia A. Spera, Julie A. Ellison, Giora Z. Feuerstein, Frank C. Barone. IL-10 reduces rat brain injury following focal stroke, *Neuroscience Letters* 251, 1988, 189-192