鬼箭羽 부탄올 추출물의 혈관이완 기전에 대한 연구

리 향 · 강대길 · 이준경 · 김승주[1] · 최덕호 · 이계복 · 최호진 · 염기복 · 이호섭*

원광대학교 한의학전문대학원, 1 : 한국 한의학 연구원

Study on the Vasorelaxant Mechanism of the Butanol Extract of *Euonymus alatus*

Xiang Li, Dae Gill Kang, Jun Kyoung Lee, Seung Ju Kim[1], Deok Ho Choi, Kye Bok Lee, Hao Zhen Cui, Ki Bok Yeom, Ho Sub Lee*

Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University, 1 : Korea Institute of Oriental Medicine

The butanol extract of Euonymus alatus (BEA) induced dose-dependent relaxation of phenylephrine-precontracted aorta, which was abolished by removal of functional endothelium. Pre-treatment of the endothelium-intact aortic tissues with N^G-nitro-L-arginine methylester (L-NAME), and 1 H-[1,2,4]-oxadiazole- [4,3-a]-quinoxalin-1-one (ODQ) inhibited the relaxation induced by BEA, respectively. BEA-induced vascular relaxation was not blocked by glibenclamide, tetraethylammonium (TEA), indomethacin, atropine, propranolol, verapamil, and diltiazem, respectively. Moreover, BEA inhibits phenylephrine-induced vascular constriction in a dose-dependent manner. These results suggest that BEA relaxes vascular smooth muscle via endothelium-dependent nitric oxide/cGMP signaling.

Key words : butanol extracts of *Euonymus alatus* (BEA), aortic tissues, endothelium, nitric oxide/cGMP signaling, relaxation

서 론

혈관 평활근의 긴장도는 신경전달물질 (norepinephrine, adenosine triphophate, NO), 내피인자(endothelium-derived relaxing factor; EDRF, endothelium-derived hyperpolarrizing factor: EDHF, endothelins), 대사성 영향 (PO_2, PCO_2. pH), 체액성 물질 (norepinephrine, epinephrine, vasopressin), 근육성 영향 (혈관의 신축성, 내압) 등 여러 중요인자에 의해 결정 된다[1]. 특히 혈관 내피세포는 혈관 내피유래 이완인자 (endothelium-derived relaxing factor)와 수축인자 (endothelium-derived constricting factor)를 방출하여 혈압조절에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다[2-4]. 이러한 EDRF (endothelium-derived relaxing factor)의 본체는 산화질소 (NO)인데 NO는 혈관 내피세포 외에 평활근과 혈구 그리고 중추신경계의 뉴론 등으로부터 생성될 수 있으며[5], 적어도 3가지 이상의 산화질소합성효소 동위효소들의 작용에 의해 아미노산인 L-arginine으로부터 합성 된다[6]. 또한 NO와 같은 혈관 이완 인자는 정상 상태에서도 내피세포에서 합성 및 분비가 이루어지고 acetylcholine, histamine, substance P 및 isoproterenol 등의 효능제에 의해서 합성 및 분비가 증가 된다[7,8].

고혈압 치료에 사용되어온 유기 nitrate의 작용은 가용성 guanylate cyclase를 활성화시켜 cGMP를 상승시킴으로써 이루어지며, 또한 이 약제는 비 효소 작용에 의해 NO를 발생시키므로, EDRF의 혈관이완작용도 가용성 guanylate cyclase의 활성에 의한 cGMP에 의한 것으로 밝혀졌다[9].

최근 혈관 내피 세포에서 산화질소의 생성을 증가시켜 혈관을 이완시키는 몇 가지의 한약이나 생약들이 보고된 바 있다. Kuramochi 등[10]은 釣鉤藤 전탕액이 산화질소 의존적으로 혈관 이완효과를 증가시킨다는 보고를 하였으며, Goto 등[11,12]은 일련의 연구결과에서 釣鉤藤 전탕액이 자연발증 고혈압 백서의 혈압을 강하시키고 butanol 추출물이 산화질소 의존적으로 흉부 대동맥의 혈관을 이완시킨다고 보고하였다. 또한 단삼의 lithospermic acid B[13], 冬蟲夏草의 단백질 성분[14] 등도 산화질소 의존적으로 혈관 이완을 증가시키는 것으로 알려졌다. 특히

* 교신저자 : 이호섭, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의학전문대학원
· E-mail : host@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6841
· 접수 : 2007/10/18 · 채택 : 2007/11/24

Kang 등은[15] 黃蓮으로부터 분리한 alkaloid 화합물인 berberine이 NO/cGMP계 의존적으로 혈관을 이완시킨다고 보고 하였다.

鬼箭羽는 위모 과에 속하는 낙엽관목 화살나무의 시상 부속물로서, 어혈을 치료하고 끊긴 월경을 통하게 하며 살충의 효과가 있어서 무월경(無月經), 산후어체(産後瘀體)에 의한 복통(腹痛), 충적(蟲積)에 의한 복통(腹痛)을 치료한다. 약리 성분은 잎에 함유된 epifriedelanol, quercetin, 종자유에 함유된 oleic acid, linoleic acid, linolenic acid, caproic acid[16] 등이며 혈관 이완에 대한 연구는 아직 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 귀전우의 혈관 이완효과와 그 기전을 연구하였다.

재료 및 방법

1. 추출물의 제조

건조시킨 귀전우 1 kg을 분쇄기를 이용하여 분말로 만들어 3 리터의 methanol (MeOH)로 1 주일간 추출한 후 회전식 감압 농축기를 사용하여 농축 하였다(61.4 g, 수율 6.14%). 이를 다시 물에 녹인 후 hexane, ethyl acetate, butanol, 물을 용매로 이용하여 차례로 분획하여 추출하였다. 탐색 결과 혈관 이완효과가 가장 뛰어난 butanol층 추출물(1.8 g, 수율 0.18%)을 10% dimethylsulfoxide (DMSO) 에 녹여서 사용하였다.

2. 생리 영양액의 제조

혈관 평활근의 정상적인 생리활성 유지를 위해 Krebs 용액(Krebs-Henseleit Solution)을 사용하였으며, 그 조성은 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.1 mM $MgSO_4$, 1.2 mM KH_2PO_4, 1.5 mM $CaCl_2$, 25 mM $NaHCO_3$, 10 mM glucose이고, pH는 7.4로 보정하였다.

3. 혈관조직 절편의 제작

몸무게 약 250~300 g의 건강한 수컷 Sprague-Dawley계 백서를 사용하였다. 경추를 탈골시켜 희생시킨 후, 즉시 복강을 열고 흉부 대동맥을 분리하였다. 분리된 흉부 대동맥을 4-6℃의 Krebs 용액에 넣고 연결 조직과 지방을 제거한 후 약 3 mm정도 길이의 고리형태의 절편으로 만들었다.

4. 혈관 장력의 측정

흉부 대동맥 절편을 95% O_2, 5% CO_2 혼합가스로 포화시킨 37℃의 Krebs 용액이 들어있는 organ bath의 저부에 한쪽 끝을 고정시키고, 다른 쪽 끝은 force-displacement transducer (Grass FT 03, GRASS Instrument, MA, USA)에 연결하여 고정시킨 후 isometric tension을 생리 기록계 (Grass Model 7E, Grass Instrument, MA, USA)를 이용하여 측정하였다. 이완률은 phenylephrine에 의한 수축에 대해 백분율로 계산하였다.

약물 실험을 하기 전 흉부 대동맥 절편에 1 g의 기저 긴장도를 부하하고, 10분 간격으로 Krebs 용액을 갈아주면서 90분간 평형을 유지시켰다. 일정한 기저선이 유지되면 $1x10^{-6}$ M의 phenylephrine으로 수축시키고 5분후 1×10^{-6} M의 ACh으로 이완시켜 이완률이 90%이상이었을 경우 혈관 내피세포가 손상받지 않은 것으로 판정하였다. 그 후 Krebs 용액으로 3회 세척하고 실험을 수행하였다. 여러 가지 약물들에 의한 귀전우 부탄올 추출물의 혈관 이완효과의 변화 측정은 약물을 20분간 전 처리하고 phenylephrine으로 수축시킨 후, 귀전우 부탄올 추출물에 의한 이완반응을 농도 의존적으로 관찰하는 방법으로 측정하였다. 혈관 내피세포 비의존형 실험을 시행할 때에는 혈관 내피세포를 작은 면봉을 사용하여 제거한 후, phenylephrine으로 수축시키고 ACh으로 이완시켜 혈관 내피세포의 제거를 확인 후 실험을 수행하였다.

5. cGMP(cyclic guanosin-3,5,-monophosphate)의 측정

흉부 대동맥 절편을 95% O_2, 5% CO_2 혼합가스를 공급해 주면서 Krebs 용액에서 30분간 평형을 유지시킨 후 1×10^{-4} M 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)을 넣어 주었다. 1×10^{-6} M의 phenylephrine을 넣어 10분간 더 평형을 유지시킨 후 농도별로 귀전우 부탄올 추출물 (3×10^{-5}, 1×10^{-4}, 3×10^{-4} g/ml)과 함께 3분간 반응시켰다. 혈관 조직은 바로 액체질소에 넣어 반응을 정지시킨 후 -76℃에 보관한 후 cGMP의 농도를 측정하였다. 무게 (wet weight)를 측정한 혈관 조직을 6% trichloroacetic acid 존재 하에서 균질화한 후 13,000 g에서 15분간 원심 분리하여 얻은 상층 액을 물에 포화된 diethylether를 이용하여 4회 추출하였다. 추출액은 Speed-vac 농축기를 이용하여 농축하고 cGMP의 측정은 방사면역 측정법을 이용하여 분석하였다. 간단히 설명하면, 시료와 표준물질을 50 mM sodium acetate 완충용액 (pH 4.8)에 최종 용적이 100 ㎕가 되게 첨가한 후 100 ㎕의 희석된 cGMP 항체(Calbiochem-Novabiochem, Co., San Diego, CA, USA)와 ^{125}I 가 결합된 cGMP (10000 cpm per 100 ㎕, specific activity 2200 Ci Mm, Dupont-New England Nuclear, Wilmington, DE, USA)를 함께 넣은 후 4℃에서 24시간 반응시켰다. 결합형과 비 결합형은 charcoal을 이용하여 분리하였으며 γ-counter를 이용하여 방사능을 측정하였다.

6. 시약

이 연구에 사용된 ACh, phenylephrine, HCl, N^G-nitroarginine methyl ester (L-NAME), 1 H-[1,2,4]-oxadiazole-[4,3-α]-quinoxalin-1-one (ODQ), indomethacin, glibenclamide, tetraethylammonium (TEA), verapamil, diltiazem, atropine, propranolol 등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)으로부터 구입하여 사용하였다.

7. 통계 처리

실험 결과의 유의성 검증은 Sigma Plot 2000 프로그램을 이용하여 처리하였으며, 실험 결과를 Students t-test나 one-way ANOVA test를 통하여 p가 0.05 이하인 경우 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 귀전우 부탄올 추출물의 농도 의존적인 혈관 평활근 이완효과

Phenylephrine (1×10^{-6} M)을 전 처리 하여 수축시킨 혈관

평활근에서 귀전우 부탄올 추출물은 농도 의존적으로 혈관을 이완시켰다. 그러나 혈관 내피세포를 완전히 제거하였을 시에는 귀전우 부탄올 추출물의 혈관 이완효과는 나타나지 않았다(Fig. 1).

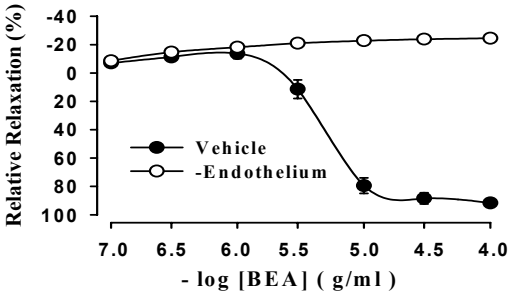

Fig. 1. Dose-response curves for the vascular relaxant effect of BEA in the phenylephrine-precontracted endothelium-intact aortic ring (Vehicle), or in the endothelium-deduced aortic ring (-endothelium). Each value shows mean ± SEM of four experiments.

2. 산화질소 합성효소 (nitric oxide synthase, NOS) 억제 시 혈관 이완효과

귀전우 부탄올 추출물의 이완효과가 산화 질소계와 관련이 있는지를 관찰하기 위하여 비 특이적인 산화질소 억제제인 L-NAME (1 x 10^{-5} M)를 전 처리하고 혈관 이완효과를 측정한 결과, 혈관 이완효과가 완전히 억제되었다(Fig. 2).

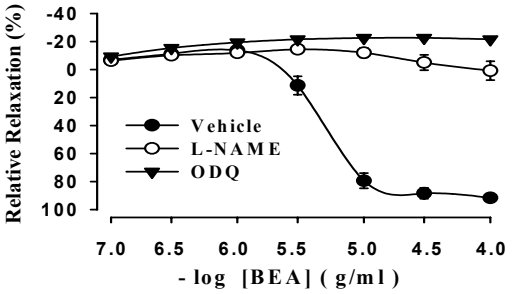

Fig. 2. Dose-response curves for the vascular relaxant effect of BEA in the phenylephrine-precontracted endothelium-intact aortic ring (Vehicle) or in the presence of L-NAME (1 x 10^{-5} M), ODQ (1 x 10^{-5} M). Each value shows mean ± SEM of four experiments.

3. sGC (soluble guanylate cyclase) 억제 시 혈관 이완효과

귀전우 부탄올 추출물의 혈관 이완효과가 cGMP와 관련이 있는지를 관찰하기 위하여 세포질 guanylate cyclase 억제제인 1 x 10^{-5} M ODQ 를 전 처리한 후 혈관 이완효과를 측정하였다. 그 결과 귀전우 부탄올 추출물의 혈관 이완효과가 완전히 억제되었다(Fig. 2).

4. Cyclooxygenase (COX) 차단 시 혈관 이완효과

귀전우 부탄올 추출물에 의한 혈관 이완효과가 prostacyclin과 연관이 있는지를 관찰하기 위하여 비 선택성 cyclooxygenase 억제제인 1 x 10^{-5} M imdomethacin 전 처리 후 귀전우 부탄올 추출물의 혈관 이완효과를 측정한 결과, indomethacin 전 처리하지 않은 군과 유의한 차이가 없었다(Fig. 3).

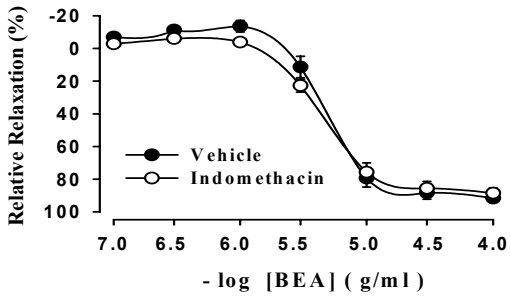

Fig. 3. Dose-response curves for the relaxant effect of BEA in the endothelial intact aortic rings (Vehicle) or in the presence of indomethacin (1 x 10^{-5} M). Each value shows mean ± SEM of four experiments.

5. 자율신경계 수용체 차단 시 혈관 이완효과

귀전우 부탄올 추출물에 의한 혈관 이완효과의 신경계와의 연관성을 알아보기 위하여 비 선택성 β-아드레날린성 길항제인 propranolol, 항 무스카린성 약물인 atropine을 1 x 10^{-6} M로 각각 전 처리한 후 귀전우 부탄올 추출물의 혈관 이완효과를 측정한 결과, propranolol과 atropine을 전 처리하지 않은 군과 각각 유의한 차이가 없었다(Fig. 4).

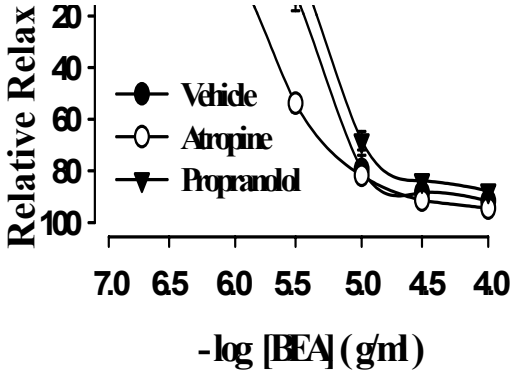

Fig. 4. Dose-response curves for the relaxant activity of BEA in the endothelial intact aortic rings (Vehicle) or in the presence of atropine (1 x 10^{-6} M), or propranolol (1 x 10^{-6} M). Each value shows mean ± SEM of four experiments.

6. Ca^{2+} 통로 차단 시 혈관 이완효과

Ca^{2+} 통로 차단이 귀전우 부탄올 추출물에 의한 혈관 이완효과에 미치는 영향을 측정하기 위하여 Ca^{2+} 통로 차단제인 verapamil 1 x 10^{-5} M과 diltiazem 1 x 10^{-6} M을 각각 전 처리한 후 귀전우 부탄올 추출물에 의한 이완 정도를 측정한 결과 verapamil과 diltiazem를 전 처리하지 않은 군과 유의한 차이가 없었다(Fig. 5).

7. K^+ 통로 차단 시 혈관 이완효과

K^+ 통로 차단이 귀전우 부탄올 추출물의 혈관 이완효과에 영향을 주는지를 측정하기 위하여 ATP-감수성 K^+ 통로 억제제인 1 x 10^{-5} M glibenclamide과 비 선택적 K^+ 통로 억제제인 1 x

10^{-5} M tetraethylammonium (TEA)를 각각 전 처리한 후 귀전우 부탄올 추출물의 이완효과를 측정한 결과 glibenclamide와 TEA를 전 처리하지 않은 군과 유의한 차이가 없었다(Fig. 6).

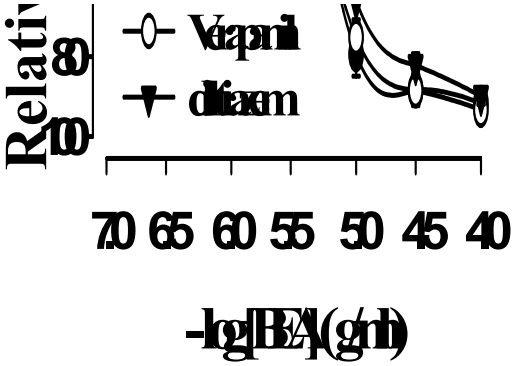

Fig. 5. Dose-response curves for the relaxant activity of BEA in the endothelial intact aortic rings (Vehicle) in the presence of verapamil (1 x 10^{-6} M), or diltiazem (1 x 10^{-5} M). Each value shows mean ± SEM of four experiments.

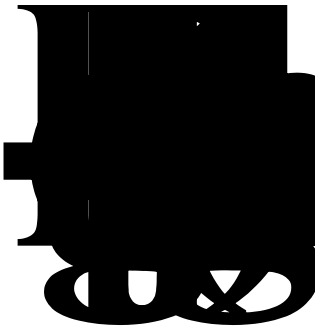

Fig. 6. Dose-response curves for the relaxant activity of BEA in the endothelial intact aortic rings (Vehicle) in the presence of glibenclamide (1 x 10^{-5} M), or tetraethylammonium (1 x 10^{-5} M) (TEA). Each value shows mean ± SEM of four experiments.

8. cGMP 생성 효과

귀전우 부탄올 추출물이 혈관 조직에서 cGMP의 생성에 영향을 미치는지를 관찰하기 위하여 귀전우 부탄올 추출물을 흉부대동맥 절편에 직접 투여한 후 cGMP의 생성량을 측정한 결과, 귀전우 부탄올 추출물을 투여하지 않은 군에 비해 귀전우 부탄올 추출물을 투여한 군이 농도 의존적으로 cGMP의 생성량을 증가시킴을 관찰할 수 있었다(Fig. 7).

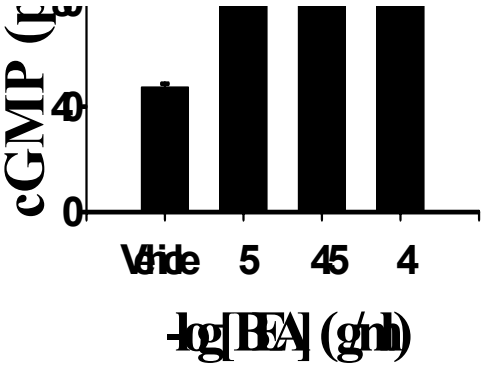

Fig. 7. Effect of BEA on cGMP production in the thoracic aorta functional endothelium. Each value shows mean ± SEM of six experiments. *P<0.05 vs. vehicle group.

9. 혈관 수축 억제 효과

귀전우 부탄올 추출물이 phenylephrine에 의한 혈관 수축에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 귀전우 부탄올 추출물을 각각 1 x 10^{-6} g/ml, 1 x 10^{-5} g/ml 처리한 후, phenylephrine (1 x 10^{-8} M - 1 x 10^{-5} M)을 투여하였다. 그 결과 대조군과 비교하여 phenylephrine으로 인한 혈관 수축이 귀전우 부탄올 추출물 농도 의존적으로 현저히 감소되었다(Fig. 8).

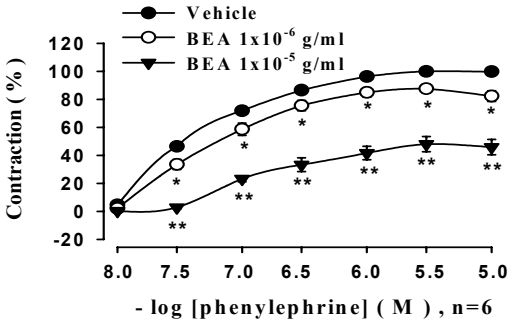

Fig. 8. Effect of BEA on dose-dependent phenylephrine-induced contraction in thoracic aortic rings. *P<0.05, **P<0.01, vs. control. Each value shows mean SEM of six experiments.

고 찰

본 연구는 귀전우 부탄올 추출물이 백서에서 적출한 흉부대동맥의 phenylephrine에 의한 혈관 수축을 이완하는 효과가 있음을 보여준다. 혈관 내피세포를 제거한 후 귀전우 부탄올 추출물의 혈관 이완효과가 차단된 것은 귀전우의 혈관 이완효과가 혈관 내피세포 (endothelium) 의존적임을 의미한다. 혈관 평활근의 이완은 혈관 내피세포에서 분비되는 여러 종류의 혈관 활성 인자(vasoactive factor)에 의해 조절되는데, 이러한 혈관활성 인자에는 산화질소(NO), prostacyclin, 내피세포 유래 과분극 인자 (endothelium-dependent hyperpolarizing factor, EDHF) 등이 알려져 있다[17]. 또한 내피세포 유래 혈관 이완 인자들과 귀전우 부탄올 추출물의 혈관 이완효과와의 관련성을 알아보기 위하여 자율신경계, 칼슘 이온통로, 칼륨 이온통로, cyclooxygenase, 산화질소 생성 차단제와 같은 여러 가지 약물들이 실험에 사용되었다. 내피세포 유래 혈관 이완 인자의 본체인 산화질소 (NO)가 귀전우 부탄올 추출물의 혈관 이완효과에 관여하는지를 알아보고자 먼저 산화질소 합성 억제제인 L-NAME를 전 처리한 후 측정한 결과, 귀전우의 혈관 이완효과가 완전히 차단되었다.

생체 내에서 생성되는 작은 분자인 산화질소 (NO)는 내피세포 의존 혈관 이완 인자로써 혈압 강하 효과가 큰 것으로 밝혀졌다. 산화질소는 L-arginine으로부터 산화질소 합성효소(NOS)에 의하여 합성되고 혈관에는 산화질소 합성효소인 3가지의 동위효소가 존재한다[18]. 첫 번째 유형은 뇌형 산화질소 합성효소 (bNOS, nNOS, NOS Ⅰ)로 뇌 조직에서 처음 발견되었고 주로 신경 전달 물질로서의 산화질소를 합성하는 역할을 하고 있다. 두 번째 동위 효소는 유도형 산화질소 합성효소(iNOS, NOS Ⅱ)로써 주로 면역계에 작용하는 산화질소를 합성하고 있다. 세 번

째 동위 효소는 혈관 내피세포에 주로 분포하면서 혈관을 이완시키는데 작용하는 혈관 내피세포형 산화질소 합성효소 (ecNOS, eNOS, NOS Ⅲ)로써 acetylcholine에 의하여 활성화되어 혈관을 이완시킨다[19]. 이러한 산화질소는 세포질의 guanylate cyclase를 활성화시켜 cGMP의 생성을 증가시켜 신호 전달체계를 통해 혈관 평활근을 이완 시킨다[20]. 본 연구에서 L-NAME의 전 처리에 의해 귀전우의 이완효과가 억제되는 것으로 보아 귀전우 부탄올 추출물에 의한 혈관 이완효과는 산화질소계를 경유하여 일어나는 것으로 사료된다.

일반적으로 잘 알려진 혈관 이완 효현제인 ACh은 NO 중재 내피 의존성 이완효과를 야기하며 ACh에 의한 NO의 유리는 내피세포 M_3 수용체를 경유한다고 알려져 있다[21]. ACh에 의한 내피세포 내 Ca^{2+} 증가는 IP_3에 의한 세포 내 저장소로부터 Ca^{2+} 유출과 세포외로부터의 Ca^{2+} 유입의 결과이다[22,23]. 증가된 Ca^{2+}에 의해 nitric oxide synthase (NOS)가 활성화되고 L-arginine을 기질로 하여 산화질소(NO)가 유리된다. 이 때 생성된 산화질소는 혈관 평활근으로 확산되며, 다시 세포질 guanylate cyclase를 활성화시킨다. 세포질 guanylate cyclase는 GTP (guanosine triphosphate)를 cGMP로 전환시키며, cGMP는 다시 cGMP 의존적 단백질 활성화 효소를 활성화시킨다. 이 효소가 혈관 평활근에 Ca^{2+} 유입을 억제하고 세포 내 Ca^{2+}의 수축적인 요인에 대한 감수성을 감소시킴으로써 혈관 평활근을 이완 시킨다[9].

NO/cGMP 계가 귀전우 부탄올 추출물에 의한 혈관 이완효과에 관여한다면 산화질소에 의하여 활성화되는 가용성 구아닐산 고리화효소 또한 귀전우 부탄올 추출물에 의한 혈관 이완효과에 관여할 것으로 사료되어 가용성 구아닐산 고리화효소 억제제인 ODQ를 전 처리 한 후 혈관이완효과를 측정한 결과, 귀전우에 부탄올 추출물에 의한 혈관 이완효과가 억제되었다. 따라서 이 연구 결과 귀전우 부탄올 추출물에 의한 혈관 이완효과는 NO/cGMP 계를 경유하여 일어나는 것을 의미한다. 이러한 결과로 볼 때, 귀전우 부탄올 추출물은 혈관 내피세포에서 산화질소의 합성을 증가시키고 가용성 구아닐산 고리화효소를 활성화시켜 cGMP의 생성을 증가시킴으로써 혈관을 이완시키는 것으로 사료 된다[24,25]. 혈관 평활근의 긴장도를 조절하는 또 다른 내인성 인자로는 prostacyclin (PGI_2)이 있다. Prostacyclin은 arachidonic acid로부터 cyclooxygenase에 의하여 생성되고, 이 때 생성된 prostacyclin은 혈관 이완 작용을 갖는다. 귀전우 부탄올 추출물의 혈관 이완효과가 prostacyclin의 생성과 관련이 있는지를 알아보기 위하여 cyclooxygenase 억제제인 indomethacin을 전 처리하고 귀전우 이완효과를 측정한 결과 indomethacin을 전 처리하지 않은 군과 비교하여 차이가 없었다. 이와 같은 결과로 볼 때 prostacyclin계는 귀전우 부탄올 추출물의 혈관 이완 작용과는 무관한 것으로 사료 된다[26,27].

혈관 평활근의 긴장도는 혈관 평활근 세포막 전위 차이에 의하기 때문에 세포막간의 이온채널의 변화는 직접적인 이완작용의 설명을 가능하게 해준다. Van Breeman 등에 의하면 혈관 평활근 세포막의 ion pump로는 Na^+/K^+ pump와 Ca^{2+} pump 뿐만 아니라 Na^+/H^+, HCO_3^-/Cl^-, Na^+/Ca^{2+} exchanger가 있는데[20], 혈관 평활근의 세포막 전위는 주로 Ca^{2+} 과 K^+ 이온의 유출과 유입에 의하여 조절된다. 혈관 긴장도는 막전위에 의해 조절되며 막전위 증가 시 전압에 의존하는 Ca^{2+} channel인 Voltage Operated Channel (VOC)을 통하여 Ca^{2+}이 증가한다. 이러한 Ca^{2+}의 증가로 수축성 단백질이 활성화되어 수축이 초래되며 이는 전기 기계적으로 일치 (electro-mechanical coupling)를 보인다. 한편 K^+ channel은 활성화시 세포막의 과분극 (hyperpolarization)을 유도하여 VOC를 통한 Ca^{2+}의 유입 억제를 통하여 혈관을 이완시킨다. 이 또한 혈관 긴장도를 조절하는데 있어 중요한 내인성 혈관 이완 기전으로 알려져 있다[28].

혈관 평활근에서 K^+ 통로로는 Ca^{2+} -activated K 통로(KCa), ATP-sensitive K(K_{ATP}) 통로 등이 있는데, 내피세포 의존 과분극인자 (endothelium-dependent hyperpolarizing factor, EDHF)는 K^+ 통로를 활성화시키고 막 과분극(hyperpolarization)을 유발하게 된다. K^+ 통로의 활성화에 의한 K^+의 세포 내 유출은 세포막의 과분극을 일으켜, voltage-sensitive Ca^{2+} 통로의 불활성화로 이어져 세포 내 Ca^{2+} 농도 감소를 초래하게 되고 결국은 혈관 이완을 유발하게 된다. K^+통로에 대한 억제제로는 KCa을 차단하는 TEA와 sulfonylurea계 약물인 glibenclamide 로 후자는 혈관 평활근에서 KCa 통로에는 영향을 미치지 않고 KATP 만을 차단한다. 귀전우 부탄올 추출물의 혈관 이완효과가 KCa 또는 KATP를 경유하여 일어나는지 알아보기 위하여 KCa 차단제인 TEA와 KATP 차단제인 glibenclamide를 전 처리한 후 혈관 이완효과를 측정한 결과, TEA와 glibenclamide를 전 처리하지 않은 군과 비교하여 귀전우의 혈관 이완효과에 영향이 없었다. 이러한 결과로 볼 때 귀전우의 혈관 이완효과는 K^+ 통로와 무관한 것으로 사료된다[29].

혈관 세포내 Ca^{2+} 농도는 혈관의 수축과 이완에서 가장 중요한 인자이다. 세포내 Ca^{2+} 농도가 증가하면 calmodulin과 결합하여 myosine light chain (MLC)의 인산화를 촉진시켜 평활근을 수축시킨다. 귀전우 부탄올의 혈관 이완효과가 Ca^{2+} 통로와 연관이 있는지 알아보기 위하여 L-type Ca^{2+} 차단제인 verapamil과 diltiazem을 전 처리 한 후 혈관 이완효과를 측정한 결과, verapamil과 diltiazem 전 처리하지 않은 군과 비교하여 귀전우 부탄올 추출물의 혈관 이완효과에 영향이 없었다. 이러한 결과로 볼 때 귀전우의 혈관 이완효과는 Ca^{2+} 통로와 무관한 것으로 사료된다.

혈관 평활근의 긴장도는 또한 자율 신경계의 조절에 의해 조절된다. 이 연구에서는 귀전우 부탄올 추출물이 자율 신경계의 수용체를 경유하여 혈관을 이완시키는지 여부를 알아보기 위하여 콜린성 수용체 중에서 무스카린성 수용체를 선택적으로 차단하는 atropine과 β 수용체를 선택적으로 차단하는 항 아드레날린성 약물인 propranolol과 atropine을 처리한 경우, propranolol과 atropine을 전 처리하지 않은 군과 유의한 차이가 없었다. 이와 같은 결과로 볼 때, 귀전우의 혈관 이완효과는 교감 신경계와 무관한 것으로 사료 된다[30,31].

또한 본 실험에서 귀전우 부탄올 추출물의 전 처리 후, phenylephrine에 의한 혈관 수축이 현저하게 억제되는 것을 알

수 있었다. 흉부 대동맥에서 선택적 α1 효능제인 phenylephrine에 의한 수축은 Ca^{2+} 통로를 통한 세포 내 Ca^{2+} 농도 증가에 의해 유지되므로 귀전우 부탄올 추출물은 부분적으로 아드레날린성 α1-수용체에 대하여 직접 길항하는 효과를 갖거나 α1 수용체를 통한 세포 내의 Ca^{2+} 유입을 억제할 것으로 사료 된다.

NO/cGMP계는 혈관 평활근의 이완뿐만 아니라, 혈관 평활근 세포의 증식과 혈소판, 백혈구 유착을 억제시키며, 내피세포의 삼투성을 낮추고 세포 외 간질단백의 합성을 억제하는 역할을 하고 있다. 혈관 내피세포에서 NO 생성의 감소는 혈관 내피세포의 기능장애나 손상에 의한 것이며, 이는 동맥경화증과 고혈압의 주요한 병리적인 요인이 된다[32]. 또한 동물의 실험 모델에서 NO 합성효소의 만성적인 억제는 고혈압과 같은 혈관염을 유발한다. 따라서 NO/cGMP계의 회복을 통한 혈관이완인자 활성의 증가는 심혈관계 질환의 치료에 있어서 매우 중요한 의미를 지님을 알 수 있다.

본 연구 결과를 종합해보면, 귀전우 부탄올 추출물은 NO/cGMP계를 경유해 혈관 내피세포 의존적인 이완효과를 나타내며, 이러한 결과는 심혈관계 질환의 유용한 치료제가 될 수 있음을 시사한다.

결 론

귀전우 부탄올 추출물은 내피세포 의존적으로 혈관 평활근을 이완시켰고, 이와 같은 효과는 농도 의존적으로 나타났으며, NO/cGMP 신호전달계를 차단하면 완전히 억제되었다. 더욱이 혈관 조직을 귀전우 부탄올 추출물과 반응시키면 cGMP의 생성이 증가하였고, 이러한 증가는 혈관 내피세포의 제거나 산화질소 합성효소나 세포질 구아닐산 고리화 효소 차단 시 나타나지 않았다. 그러나 귀전우 부탄올 추출물의 혈관 이완효과는 prostacyclin 생성 차단이나 K^+ 통로 차단, Ca^{2+} 통로 차단 등에 의해서는 영향을 받지 않았다. 또한, 무스카린성 수용체 차단 및 β-아드레날린성 수용체 차단제 등에 의해서도 영향을 받지 않았다.

이와 같은 결과로 볼 때, 귀전우 부탄올 추출물의 혈관 평활근 이완 기전은 내피세포에서의 NO/cGMP 경로를 활성화시켜 나타나는 것으로 사료된다.

감사의 글

이 연구는 2006년도 원광대학교 연구비 지원을 받아 수행하였습니다.

참고문헌

1. Bosnjak, Z.J. Ion channels in vascular smooth muscle: Anesthesiology. 79: 11392-11401, 1993.
2. Rees, D.D., Palmer, R.M., Schulz, R., Hodson, H.F., Moncada, S. Characterization of three inhibitors endotherial Nitric oxide synthase in vitro and in vivo: Br. J. Pharmacol. 101: 746-752, 1990.
3. Vane, J.R., Anggard, E.E., Botting, R.M. Regulatory function of the vascular endothelium: New Med. 323(1):27-36, 1990.
4. Luscher, T.F. The endothelium as a target and mediator of cardiovascular disease: Eur. J. Clin. Invest. 23: 670-685, 1993.
5. Moncada, S., Palmer, R.M., Higgs, E.A. Nitric oxide : Physiology, pathophysiology and pharmacology: Phamacol Rev. 43: 109-142, 1992.
6. Forstermann, U., Closs, E.I., Pollock, J.S., Nakane, M., Schwarz, P., Gath, I., Kleinert, H. Nitric oxide synthase isozyme-characterization, purification, molecular 4 cloning and function: Hypertension 23: 1121-1131, 1994.
7. Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V. The obligatory role of endothelial cells in therelaxation of arteterial smooth muscle by acetylcholine: Nature 288: 373-376, 1980.
8. Peach, M.J., Loeb, A.L., Singer, H.A., Saye, J. Endothelium-derived vascular relaxation factor: Hypertension 7: 94-100, 1985.
9. Sakuma, I.D., Stuehr, D.J., Gross, S.S., Nathan, C., Levi, R. Identification of arginine as a precursor of endothelium-derived nitric oxide: Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 8864-8867, 1989.
10. Kuramochi, T., Chu, J., Suga, T. Gou-Teng (From Uncaria rhynchophylla Miquel)-induced endothelium-dependent and independent relaxations in the isolated rat aorta: Life Sci. 54: 2061-2069, 1994.
11. Goto, H., Shimada, Y., Tanigawa, K., Sekiya, N., Shitani, T., Terasawa, K. Effect of Uncariae ramulus et Uncus on endothelium in spontaneously hypertensive rats: Am. J. Chin. Med. 27: 339-345, 1999.
12. Goto, H., Sakakibara, I., Shimada, Y., Kasahara, Y., Terasawa, K. Vasodilator effect of extract prepared from Uncariae ramulus on isolated rat aorta: Am. J. Chin. Med. 28: 197-203, 2000.
13. Kamata, K., Noguchi, M., Nagai, M. Hypotensive effects of thospermic acid B isolated from the extract of Salviae miltiorrhizae radix in the rat: Gen. Phamacol. 25: 69-73, 1994.
14. Chiou, W.F., Chang, P.C., Chou, C.J., Chen, C.F. Protein constituent contributes to the hypotensive and vasorelaxatant activities of Cordyceps sinensis: Life Sci. 66: 1369-1376, 2000.
15. Kang, D.G., Sohn, E.J., Kwon, E.K., Han, J.H., Oh, H.C., Lee, H.S. Effects of berberine on angiotensin-converting enzyme and NO/cGMP system in vessels: Vascul. Pharmacol. 39: 281-286, 2002.
16. 신민교 외. 中藥大辭典. 鼎談 2권, pp 514-516, 1997.
17. Rubanyi, G.M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors: J. Cell. Biochem. 46: 27-36, 1991.
18. MacNaul, K.L., Hutchinson, N.I. Differential of iNOS and

cNOS mRNA in human vascular smooth muscle cells and endothelial cells under normal and inflammatory conditions: Biochem. Biophys. Res. Commun. 196: 1330-1334, 1993.

19. Meng, W., Ma, J., Ayata, C., Hara, H., Huang, P.L., Fishman, M.C., Moskowitz, M.A. Ach dilates pial arterioles in endothelial and neuronal NOS knockout mice by NO-dependent mechanisms: Am. J. Physiol. 271: H1145-H1150, 1996.
20. Arnold, W.P., Mittal, C.K., Katsuki, S., Murad F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increase guanosine 3′:5′-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations: Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 3203-3207, 1977.
21. Jaiswal, N.L., Lambrecht, G., Mutschler, E., Tache, R., Malik, K.U. Pharmacological characterization of the vascular muscarinic receptors mediating relaxation and contraction in rabbit aorta: J. Pharmacol. Exp. Ther. 258: 842-850, 1991.
22. Hutcheson, I.R., Griffith, T.M. Central role of intracellular calcium stores in acute flow-and agonist-evoked endothelial nitric oxide release: Br. J. Pharmacol. 122: 117-125, 1997.
23. Sharma, N.R., Davis, M.J. Substance P-induced calcium entry in endothelial cells is secondary to depletion of intracelluar stores: Am. J. Physiol. 268: H962-H973, 1995.
24. Guerrero, M.F., Puebla, P., Carron, R., Martin, M.L., San, R.L. Quercetin 3,7-dimethyl ether: a vasorelaxant flavonoid isolated from Croton schiedeanus Schlecht: J. Pharm. Pharmacol. 54: 1373-1378, 2002.
25. Lemos, V.S., Freitas, M.R., Muller, B., Lino, Y.D., Queiroga, C.E., Cortes, S.F. Dioclein, a new nitric oxide- and endothelium-dependent vasodilator flavonoid: Eur. J. Pharmacol. 386: 41-46, 1999.
26. Ko, F.N., Huang, T.F., Teng, C.M. Vasodilatory action mechanisms of apigenin isolated from Apium graveolens in rat thoracic aorta: Biochim. Biophys. Acta. 1115: 69-74, 1991.
27. Van, B.C, Cauvin, C., Johns, A., Leijten, P., Yamamoto, H. Ca^{2+} regulation of vascular smooth muscle: Fed. Proc. 45: 2746-2751, 1986.
28. Nevala, R., Paukku, K., Korpela, R., Vapaatalo, H. Calcium-sensitive potassium channel inhibitors antagonize genistein- and daidzein-induced arterial relaxation in vitro: Life Sci. 69: 1407-1417, 2001.
29. Mikkelsen, E.O., Thastrup, O., Christensen, S.B. Effects of thapsigargin in isolated rat thoracic aorta: Pharmacol. Toxicol. 62: 7-11, 1988.
30. Delaflotte, S., Auguet, M., DeFeudis, F.V., Baranes, J., Clostre, F., Drieu, K., Braquet, P. Endothelium-dependent relaxations of rabbit isolated aorta produced by carbachol and by Ginkgo biloba extract: Biomed. Biochim. Acta 43: S212-216, 1984.
31. Busse, R., Fleming, I. Endothelial dysfunction in atherosclerosis: J. Vasc. Res. 33(3):181-194, 1996.
32. Tanner, M.A., Bu, X., Steimle, J.A., Myers, P.R. The direct release of nitric oxide by gypenosides derived from the herb Gynostemma pentaphyllum: Nitric Oxide 3(5):359-365, 1999.