大韓本草學會誌 제23권 제2호(2008년 6월)
Kor. J. Herbology 2008 ; 23(2) : 213-223

玄參의 유전자 분석 및 자발성 고혈압흰쥐의 혈압에 미치는 영향

박규하#, 함인혜, 최호영*

경희대학교 한의과대학 본초학교실

Hypotensive Effect of *Scrophularia buergeriana* and Gene Analysis of Scrophularia Species

Kyuha Park#, Inhye Ham, Hoyoung Choi*

Dept. of Herbalogy, College of Oriental Medicine, Kyung Hee University

ABSTRACT

Objectivies : This study was performed to prove the hypotensive effect of 70% MeOH extracts from *Scrophularia buergeriana* (SB) on rat's femoral artery.

Methods : We observed hypotensive effect of SB on rat's femoral artery. *Scrophularia buergeriana* Miquel., *S. kakudensis, S. koraiensis* and *S. ningpoenesis* Hemsl. were used by the RFLP method and sequence analysis of ITS regions, in order to compare and discriminate.

Results : SB 70% MeOH Ex., Water fraction, 40% MeOH fraction, 100% MeOH fraction didn't show significantly hypotensive effect. 20% fraction of SB 70% MeOH Ex. showed significantly hypotensive effect. The size of ITS region on Scrophularia sp. is 589~590bp and amount of G+C is 59.3% to 59.7%, and it showed the similar of ITS parts on Scrophularia sp.

Conclusions : We concluded that SB Ex. have hypotensive activity, and it's more efficient when separated. And Scrophularia sp. showed the similar of DNA analysis.

Key words : *Scrophularia buergeriana*, hypotensive effect, DNA analysis

서 론

玄參은 현삼과(Scrophulariaceae) 현삼(Scrophularia sp.)의 건조된 根으로, 대한민국[1]에서는 *Scrophularia buergeriana* Miquel.을, 중국[2]에서는 *Scrophularia ningpoensis* Hemsl를 기원으로 사용하고 있으며, 우리나라의 기원식물인 *S. buergeriana*는 北玄參이라 하여 玄參의 대용품으로 사용하고 있다[3,4].

歷代 本草書에 수재된 玄參은 주로 ≪神農本草經≫에 "味苦微寒, 生川谷, 治腹中寒熱積聚, 女子產乳餘疾. 補腎氣, 令人目明"이라 하여 滋陰降火, 凉血解毒의 要藥으로 사용되었으며[5], 시대에 따라 몇몇 主治

* 교신저자 : 최호영, 서울시 동대문구 회기동 1 경희대학교 한의과대학 본초학교실
· Tel: 02-961-9372 · E-mail: hychoi@khu.ac.kr
* 제1저자 : 박규하, 서울시 동대문구 회기동 1 경희대학교 한의과대학 본초학교실
· Tel : 02-961-0325 · E-mail : dustudy@naver.com
· 접수 : 2008년 5월 26일 · 수정 : 2008년 6월 20일 · 채택 : 2008년 6월 20일

들을 첨가해나가 현대에 ≪中國藥典≫[2], ≪中華本草≫[4]에서는 諸本草書의 主治를 종합, 정리하여 血病煩渴, 發斑, 骨蒸勞熱, 自汗盜汗, 咽喉腫痛, 癰腫, 瘰癧 등에 쓸 수 있다고 하였다.

우리나라에서 자생하는 玄參科의 식물 중 藥用 玄參으로 사용할 수 있는 것은 모두 4가지가 있다. ≪대한약전≫에 기재되어 있는 정품으로는 현삼(*S. buergeriana* Miquel)이 있으며, 그 외에 대용품으로 큰개현삼(*S. kakudensis* Franchet), 토현삼(*S. koraiensis* N_{AKAI}), 섬현삼(*S. takesimensis* N_{AKAI})이 玄參으로써 사용되었으나 현재는 수량과 채취상의 문제로 많이 사용되고 있지 않으며 그 외에 중국에서 수입한 중국현삼(*S. ningpoensis* Hemsl)를 사용하고 있다[6,7].

현삼(*S. buergeriana, SB*)에 관한 현대적 연구로는 황[6]의 玄參科 식물을 분류한 것과 안[7]의 현삼의 기원과 효능에 관한 연구, 박[8]의 항산화 작용에 관한 연구, 김[9]과 김[10] 우[11]의 현삼의 성분에 관한 연구, 김[12-14]의 뇌의 신경보호작용에 대한 연구가 있다. 또한 S. ningpoensis에 대해서는 혈관신생 억제효과와 항산화작용, 항가려움증, 항우울작용 등과 Iridoid성분에 대해 연구되었다.

이에 국내에서 玄參으로 규정한 4종의 현삼과, 중국산 종인 중국현삼을 DNA 중 Internal Transcribed Spacer (ITS) 부위를 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) 분석방법으로 분석, 비교하여 玄參을 보다 정확하게 사용하는 기틀을 마련하고자 하였다.

玄參은 옛 本草書들의 主治들을 살펴봤을 때, 주로 만성적이고 소모적인 熱性疾患에 많이 사용되어져 왔다. 이에 필자는 玄參이 만성질환의 하나인 고혈압에 대해 미치는 영향을 실험하고자, 玄參의 성분을 용매별 용해도 차이를 이용하여 분획한 후 SHR에 투여한 후 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

유전자 분석을 위하여 현삼 *S. buergeriana*은 경북 안동시 예안면에서 2004년 6월 5일에, 玄參 *S. ningpoensis*은 중국 항주식물원에서 2004년 7월 15일에, 큰개현삼 *S. kakudensis*은 수원 농촌진흥청 작물시험장에서 2004년 10월 7일에, 토현삼 *S. koraiensis*은 수원 농촌진흥청 작물시험장에서 2004년 10월 7일에, 섬현삼 *S. takesimensis*은 경북 울릉군 북면에서 2002년 5월 23일에 각각 채취하여 실험에 사용하였다.

2003년에 경북 안동시에서 재배한 현삼 *S. buergeriana*을 옴니허브(주)를 통하여 구입하여 TLC와 동물실험에 사용하였다. 각각의 샘플과 약재는 慶熙大學校 韓醫科大學 本草學敎室에 보관하고 있다(Table 1).

Table 1. Plant and Herbal Materials Used for DNA

Sample	Voucher	Locality	Date
S. buergeriana(SB)	HS001	Andong Korea	June, 2004
S. ningpoensis(SN)	HS002	Hangzhou China	July, 2004
S. kakudensis(SA)	HS003	Suwon Korea	Oct, 2004
S. koraiensis(SK)	HS004	Suwon Korea	Oct, 2004
S. takesimensis(ST)	HS005	Ullung Korea	May, 2002
S. buergeriana(SB)	HS006	Andong Korea	June, 2004

* For DNA analysis, SB, SN, SA, SK and ST were used.
** For Pharmacological Experiment, SB was used.

2) 시료 제조

한약재로 유통되는 국산 玄參(*S. buergeriana*)의 뿌리 4 kg을 70% MeOH에 전탕하여 감압농축, 동결건조시켜 2,564 g의 70% MeOH ex를 얻었다. 이 70% MeOH ex를 $CHCl_3$와 물을 사용하여 분리한 후, 물 부분을 Diaion HP 20 CC를 사용하여 water, 20%, 40%, 60%, 100% MeOH fraction으로 분획하였으며 $CHCl_3$ 부분도 감압농축 시켰다.

3) 실험동물

실험동물은 체중 325±25 g의 spontaneous hypertensive rat (SHR)계 수컷 흰쥐(샘타코(주))를 구입하였다. 동물실험윤리규정에 준수하여 22.0±2.0℃, 습도는 55±5%, 낮과 밤의 주기는 12시간으로 유지한 사육실 내에서 2주간 고형사료와 물을 충분히 공급하여 실험실 환경에 적응시킨 후 사용하였다.

2. 방법

1) TLC 분석

(1) 시료 제조 및 TLC분석

항고혈압 실험과 당뇨에 사용할 시료는 안동에서 생산된 玄參(SB) 4 kg을 환류추출기를 사용하여 70% MeOH로 4시간 전탕하여 얻은 용액을 감압농축

하여 玄參 MeOH Ex. 2,564 g을 얻었다. 이 MeOH Ex. 를 물에 현탁한 후 同量의 클로로포름으로 분획하여, 클로로포름 fraction Ex. 97.96 g을 얻었으며 나머지 물층을 Diaion HP 20 CC에 컬럼 크로마토그래피로 분획하여 감압농축 후 동결건조하여 water fraction 2,332.48 g, 20% MeOH fraction 50.0 g, 40 % MeOH fraction 33.96 g, 60 % MeOH fraction 47.24 g, 100 % MeOH fraction 2.4 g을 얻었으며, 400 mg/kg의 용량으로 증류수에 녹여 항고혈압 실험에 사용하였으며 일부는 메탄올로 녹여 TLC분석의 시료로 사용하였다.

(2) 기기 및 시약

Norvasc (Tab. 5mg, 한국화이자제약(주), 대한민국), Chloral hydrate(순정화학주식회사, 대한민국), 헤파린(중외제약(주), 대한민국), DNeasy plant DNA extraction kit (Qiagen Co, Germany), Geneclean Kit (QBIOgene, USA), Ex-Taq polymerase (Takara Co, Japan), QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Co, Germany), ABI PRISM 3100(PE Biosystems, Germany), TLC plates (Sillica gel 60, F254, Merck, USA), GRASS Model 7 ploygraph(Grass instruments, USA), MacLab 8/e(Adinstruments, Australia), Polyethylene tube(20FT, A-M Systems, Inc USA), Physiological pressure transducer (Spectramed, USA)

2) 혈압측정

(1)혈압측정

SHR에 20% chlorol hydrate 수용액을 복강주사하여 마취된 SHR를 고정대에 고정시킨 후 대퇴부를 수술용 가위로 절제하고 겸자와 핀셋을 사용하여 천근막층을 벌려 대퇴동맥을 확보하였다. 하지부 대퇴동맥의 말단을 의료용 봉합사로 묶어 폐쇄시키고 대퇴동맥의 복부쪽 부위는 미리 의료용 봉합사로 묶을 준비를 해 놓고 복부쪽 대퇴동맥을 micro vessel clip으로 폐쇄하였다. Vannas-Miniature로 하지부 대퇴동맥을 폐쇄한 봉합사와 micro vessel clip으로 폐쇄한 사이의 대퇴동맥에 수직으로 혈관직경의 1/3을 절개하고, 절개된 곳을 통해 polyethylene tube (PE-20)를 삽입하였다. 미리 묶어둔 봉합사를 이용하여 polyethylene tube를 혈관과 함께 묶어 고정시킨 후 micro vessel clip을 제거하였다. Polyethylene tube에 연결된 physiological pressure transducer로 측정된 혈압은 polygraph (Model 7, Grass instruments)를 통하여 전기적 신호로 바꾼 후 Maclab 8/e를 통해 PowerPC로 저장하였다. 혈압의 측정과 분석은 Chart 4.3.2를 사용하였다.

$$\text{Mean Blood Pressure Ratio}(\%) = \frac{B.P.\ after\ sample\ treated}{B.P.\ before\ sample\ treated} \times 100$$

(2) 통계처리

실험성적은 평균±표준오차(Mean±S.E.)로 나타내었으며, 대조군과 실험군과의 시간에 따른 mean B.P. Ratio의 평균의 차이를 검정할 때에는 paired Student's t-test로 검정하여 $p<0.05$일 때 통계적으로 유의한 것으로 간주하였다.

3) 유전자 분석

(1) Genomic DNA 추출 및 정제

모든 과정은 DNeasy plant DNA extraction kit (Qiagen Co, Germany)를 사용하였다. 먼저 액체질소를 이용하여 막자사발에서 시료를 분쇄하였다. 이를 100 mg 취하여 500 ㎕ AP1 lysis buffer, 5 ㎕ RNase(100 mg/ml)와 섞은 후 65℃에서 약 30분간 incubation 하였다. 여기에 130 ㎕ AP2 precipitation buffer를 넣고, ice에서 15분간 incubation하고 QIA shredder spin column으로 precipitates와 cell debris를 제거하였다. 0.5배 AP3 binding buffer 와 1배의 100% ethanol을 넣고 섞은 후 DNeasy mini spin column을 이용하여 추출된 DNA를 membrane에 binding 시킨 후 500 ㎕ buffer AW로 2번 세정 후 50-100 ㎕ Preheated elution buffer로 추출하였다. 추출된 genomic DNA는 Geneclean Kit(QBIOgene, USA)를 사용하였다. 추출된 DNA 100 ㎕에 300 ㎕ NaI solution과 5 ㎕ glass milk suspension을 첨가한 후 잘 섞었다. 상온에서 5분간 incubation 후, 13,000rpm으로 5초간 원심 분리하였다. 상등액을 버린 후 400 ㎕ New wash solution으로 3번 세척하고 상온에서 pellet을 완전히 건조시켰다. 건조된 pellet을 50 ㎕ elution buffer에 녹인 후 13,000 rpm에서 2분간 원심분리하여 상등액 90 ㎕를 얻었다.

(2) PCR amplification

반응액은 10 pmol/㎕의 한쌍의 primer를 각각 2 ㎕, 50 ng의 genomic DNA용액 1 ㎕, 2.5 mM의 dNTP mixture 4 ㎕, 10×exbuffer 5 ㎕, 5 unit의 Ex-Taq polymerase (Takara Co, Japan)에 증류수를 최종 50 ㎕가 되도록 첨가하였다. 증폭은 Biometra사의 PCR machine을 사용하여 94℃에서 7분간 전처리를 한 후, 94℃에서 1분 denaturation, 55℃에서 1분 annealing,

72℃에서 1분간 합성으로 이루어지는 온도변이 과정을 모두 30cycles을 반복하였으며, 72℃에서 7분간 최종 합성과정을 시켰다. 그러나, 몇몇의 것들은 annealing 온도가 50℃에서 증폭되었다. 증폭된 DNA는 1.0% agar-ose gel상에서 전기영동한 다음 ethidium bromide로 염색하여 UV light하에서 비교 관찰하였다(Table 2, Fig. 1).

Table 2. Primers for Amplifying

Primer	Sequence
ITS1	5'-TCCGTAGGTGAACCTGCG-3''
ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'

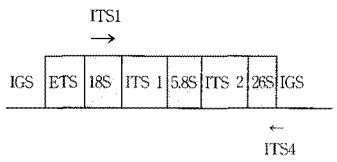

Fig. 1. The location of primers for PCR amplification and sequencing

ETS, external transcribed spacer; ITS 1, internal transcribed spacer 1; ITS 2, internal transcribed spacer 2; IGS, intergenic spacer; 18S, 5.8S, 26S, coding regions of nuclear ribosomal RNA; arrow, the location of each primer.

(3) 염기서열 결정 및 정렬

① 정제

증폭된 PCR 산물은 QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen Co., Germany)를 사용하여 정제하였다. 그 방법은 40 ㎕ PCR 산물에 200 ㎕ binding buffer를 첨가하고 잘 섞은 후 spin column을 통과시켜 column membrane에 DNA를 binding 시킨 후 0.75 ml washing buffer로 세정 후 binding buffer를 첨가하고 잘 섞은 후 50 ㎕ 10 mM Tris-Cl(pH 8.5) buffer로 추출하였다.

② Cloning

정제된 PCR product를 cloning 하기 위해서 invitrogen사에서 개발된 pCR2.1-TOPO vector를 사용하였다. 실험 방법은 정제된 PCR product 4 ㎕에 salt solution 1 ㎕, TOPO vector 1 ㎕를 첨가하고 실온(20-23℃)에서 30분간 배양하였다. 그 cloning 산물 중 2 ㎕를 E. coli 균주인 TOP10 competent cells 50 ㎕에 넣고 얼음에서 30분간 배양 후 42℃에서 30초간 heat shock을 주고 즉시 얼음에 넣어둔다. 그 배양액에 250 ㎕ SOC media를 첨가하여 37°C shaking incubator에서 1시간 동안 배양한 후 LB agar plate(with 100 ㎍/ml ampicillin)에 10-20 ㎕ 정도를 도말한 후 16시간 동안 37℃에서 배양하였다. 배양 후 colony를 확인하고 확인된 colony는 3ml LB media (with 100 ㎍/ml ampicillin)에서 16시간 동안 증식시킨 후 QIAGEN plasmid purification miniprep kit(Qiagen Co, Germany)을 이용하여 sequencing 분석에 사용할 plasmid를 정제하였다. 이를 EcoRI enzyme(Takara Co, Japan)으로 cutting 해보아 PCR 산물의 vector로의 삽입 여부를 확인하고 확인된 plasmid DNA를 sequencing에 사용하였다.

③ 염기서열 결정

ABI PRISM 3100(PE Biosystems, Germany)을 이용하였고 각 유전자를 포함한 plasmid DNA 300 ng에 sequencing primer 5.0 pmole과 2.0 ㎕의 reaction pre-mix를 첨가하고 최종 부피가 10 ㎕가 되도록 증류수를 첨가한 후 Perkin Elmer사의 DNA thermal cycler 480을 이용하여, 96℃ 10초, 50℃ 5초, 60℃ 4분 동안 총 25cycle을 수행하였다. Automatic sequencing에서 graph noise를 방지하기 위하여 alcohol 침전법을 사용하였다. 그 방법은 반응액에 95% EtOH를 50 ㎕첨가하고 3M NaOAc(pH 4.6)을 2 ㎕첨가하여 얼음하에서 10초간 incubation한 후 12,000 rpm에서 15분간 원심분리 한 후 상층액을 제거하고 70% 에탄올을 100 ㎕ 첨가하여 8분간 원심분리하여 NaOAc를 세척한 후 산물을 실온에서 건조하고 Hi-Di formamide를 15 ㎕첨가하여 섞은 후 90℃에서 4분 정도 열을 가한 후 얼음에서 식힌 상태에서 autosampler에 옮겨 sequencing을 실시하였다. Sequencing이 끝난 후 DNA sequencing Analysis Software (ver. 3.3)를 이용하여 염기서열을 분석하였다.

④ 염기서열 정렬 및 분석

ITS 염기서열은 Cluster X program(ver. 1.83)을 이용하여 정렬하였다. ITS 1, 5.8S와 ITS 2 region은 기존의 연구보고의 염기서열과 비교하여 결정하였다. 염기서열간의 divergence 및 분지도는 Kimura two parameter 및 Neighbor-Joining method을 이용하였으며, Phydit program(ver. 3.1)을 사용하였다.

실험결과

1. 玄參(*S. buergeriana*) 분획물의 TLC 비교

SB 70% MeOH Extract.(A), SB water fraction

(B), SB 20% MeOH fraction(C), SB 40% MeOH fraction(D), SB 60% MeOH fraction(E), SB 100% MeOH fraction(F), SB CHCl3 fraction(G)의 시료를 CMW 6 : 4 : 1의 용매로 전개하였다(Table 3, Fig. 2).

A를 분획한 B, C, D, E, F, G 분획 모두 각기 다른 전개상을 나타내고 있어 용매차에 의한 분리가 정확히 되었음을 알 수 있었다.

Table 3. Rf Values of SB Series

	SB 70% MeOH Extract(A)	SB water fraction(B)	SB 20% MeOH fraction(C)	SB 40% MeOH fraction(D)	SB 60% MeOH fraction(E)	SB 100% MeOH fraction(F)	SB CHCl3 fraction(G)
1	0.83*	0.52*	0.68*	0.77*	0.83*	0.98*	0.98*
2	0.66*	0.20*	0.57*	0.70*	0.77*	0.93*	0.93*
3	0.52*			0.59*	0.69*	0.88*	0.86*
4	0.20*			0.44*		0.79*	0.70*
5						0.69*	0.61*
6						0.61*	0.52*
7						0.52*	0.43*

* Rf value.

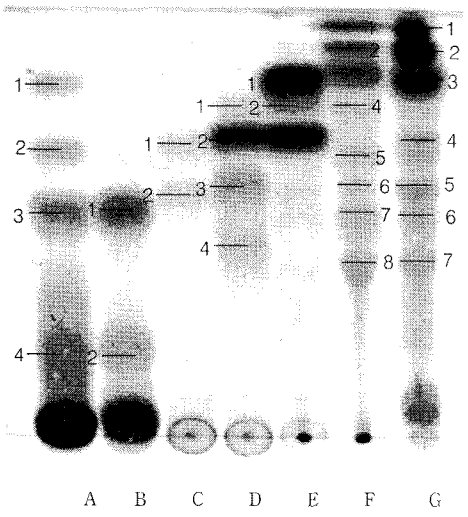

Fig. 2. TLC patterns of *S. buergeriana*

SB 70% MeOH Extract.(A), SB water fraction(B), SB 20% MeOH fraction(C), SB 40% MeOH fraction(D), SB 60% MeOH fraction(E), SB 100% MeOH fraction(F), SB CHCl3 fraction(G). Chloroform : MeOH : Water = 6 : 4 : 1.

2. 혈압에 미치는 영향

1) 玄參 70% MeOH Extract

양성 대조약물로 사용한 ACE 억제제인 Norvasc는 투여 후 5분부터 93.5±3.5%로 혈압강하효과가 나타나기 시작하여, 10분에는 86.4±4.7%, 15분에는 83.215±4.2%, 30분에는 79.1±3.3%, 45분에는 75.2±2.0%, 60분에는 78.5±3.0%, 75분에는 73.8±2.7%, 90분에는 70.8±2.8%의 변화를 나타내어 15분 이후부터는 지속적이고 유의성 있는 혈압강하효과를 나타내었다.

玄參 70% MeOH Ex. 400 mg/kg을 투여 한 후 15분에는 100.3±0.4%, 30분에는 100.7±0.7%, 45분에는 100.1±0.8%, 60분에는 98.0±1.4%, 75분에는 97.8±1.6%, 90분에는 99.5±1.5%의 변화를 나타내어 유의한 혈압강하효과가 나타나지 않았다(Fig. 3).

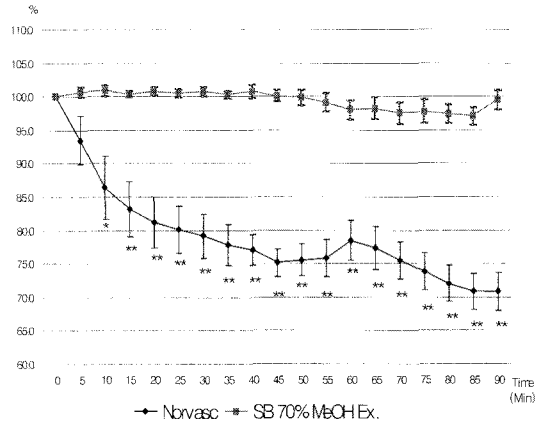

Fig. 3. Effect of SB 70% MeOH Ex on the Ratio of mean blood pressure in rats (n=5)

Each point represents the mean±S.E. * $p<0.05$, ** $p<0.01$.

2) 玄參 water fraction

양성 대조약물로 사용한 ACE 억제제인 Norvasc는 투여 후 5분부터 93.5±3.5%로 혈압강하효과가 나타나기 시작하여, 10분에는 86.4±4.7%, 15분에는 83.2

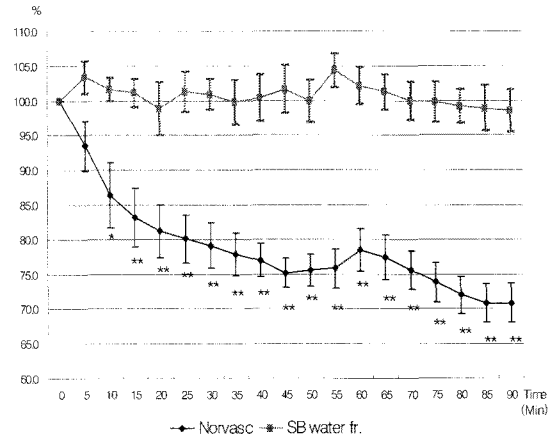

Fig. 4. Effect of SB water fraction on the Ratio of mean blood pressure in rats(n=5)

Each point represents the mean±S.E.(%) (* $p<0.05$, ** $p<0.01$).

±4.2%, 30분에는 79.1±3.3%, 45분에는 75.2±2.0%, 60분에는 78.5±3.0%, 75분에는 73.8±2.7%, 90분에는 70.8±2.8%의 변화를 나타내어 15분 이후부터는 지속적이고 유의성 있는 혈압강하효과를 나타내었다.

玄參 water fraction 400 mg/kg을 투여 한 후 15분에는 101.1±2.0%, 30분에는 100.9±2.1%, 45분에는 101.7±3.3%, 60분에는 102.1±2.6%, 75분에는 99.8±2.9%, 90분에는 98.6±2.9%의 변화를 나타내어 유의한 혈압강하효과가 나타나지 않았다(Fig. 4).

3) 玄參 20% MeOH fraction

양성 대조약물로 사용한 ACE 억제제인 Norvasc는 투여 후 5분부터 93.5±3.578%로 혈압강하효과가 나타나기 시작하여, 10분에는 86.4±4.7%, 15분에는 83.2±4.2%, 30분에는 79.1±3.3%, 45분에는 75.2±2.0%, 60분에는 78.5±3.0%, 75분에는 73.8±2.7%, 90분에는 70.8±2.8%의 변화를 나타내어 15분 이후부터는 지속적이고 유의성 있는 혈압강하효과를 나타내었다.

玄參 20% MeOH fraction은 투여 후 10분부터 96.3±1.4%로 혈압강하효과가 나타나기 시작하여, 15분에는 96.4±1.8%, 20분에는 95.1±3.7%, 30분에는 85.6±8.0%, 45분에는 76.0±8.7%, 60분에는 74.0±4.9%, 75분에는 68.8±5.0%, 90분에는 60.4±1.5%의 변화를 나타내어 35분 이후부터는 지속적이고 유의성 있는 혈압강하효과를 나타내었다 (Fig. 5).

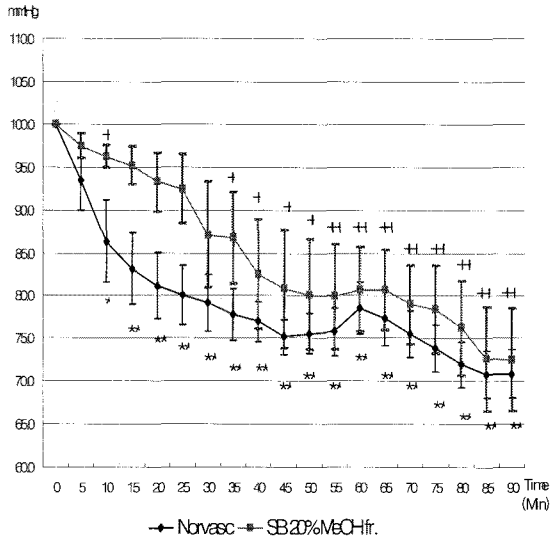

Fig. 5. Effect of SB 20% MeOH fraction on the Ratio of mean blood pressure in rats(n=5)

Each point represents the mean±S.E.(%) (*, + p<0.05, **, ++ p<0.01).

4) 玄參 40% MeOH fraction

양성 대조약물로 사용한 ACE 억제제인 Norvasc는 투여 후 5분부터 93.5±3.5%로 혈압강하효과가 나타나기 시작하여, 10분에는 86.4±4.7%, 15분에는 83.2±4.2%, 30분에는 79.1±3.3%, 45분에는 75.2±2.0%, 60분에는 78.5±3.0%, 75분에는 73.8±2.7%, 90분에는 70.8±2.8%의 변화를 나타내어 15분 이후부터는 지속적이고 유의성 있는 혈압강하효과를 나타내었다.

玄參 40% MeOH fraction 400 mg/kg을 투여 한 후 15분에는 99.6±1.3%, 30분에는 101.4±1.9%, 45분에는 97.8±2.4%, 60분에는 98.9±3.2%, 75분에는 97.9±3.8%, 90분에는 98.1±3.8%의 변화를 나타내어 유의한 혈압강하효과가 나타나지 않았다(Fig. 6).

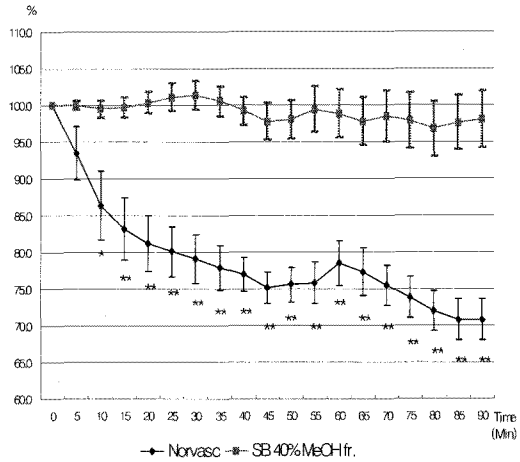

Fig. 6. Effect of SB 40% MeOH fraction on the Ratio of mean blood pressure in rats(n=5)

Each point represents the mean±S.E.(%) (* p<0.05, ** p<0.01).

5) 玄參 60% MeOH fraction

양성 대조약물로 사용한 ACE 억제제인 Norvasc는 투여 후 5분부터 93.5±3.5%로 혈압강하효과가 나타나기 시작하여, 10분에는 86.4±4.7%, 15분에는 83.2±4.2%, 30분에는 79.1±3.3%, 45분에는 75.2±2.0%, 60분에는 78.5±3.0%, 75분에는 73.8±2.7%, 90분에는 70.8±2.8%의 변화를 나타내어 15분 이후부터는 지속적이고 유의성 있는 혈압강하효과를 나타내었다.

玄參 60% MeOH fraction 400 mg/kg을 투여 한 후 15분에는 100.4±1.0%, 30분에는 101.2±1.7%, 45분에는 102.0±2.0%, 60분에는 103.0±1.1%, 75분에는 106.1±1.5%, 90분에는 107.6±1.7%의 변화를 나타내어 유의한 혈압강하효과가 나타나지 않았다(Fig. 7).

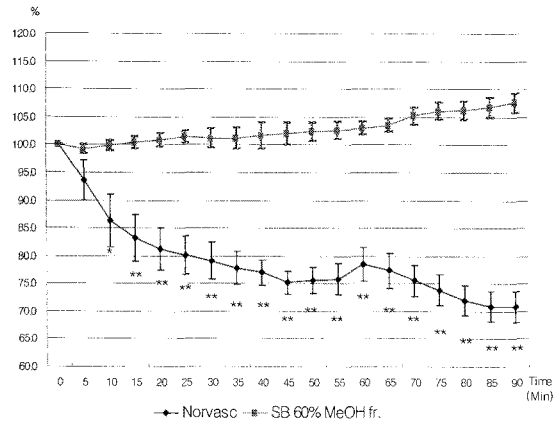

Fig. 7. Effect of SB 60% MeOH fraction on the Ratio of mean blood pressure in rats(n=5)

Each point represents the mean±S.E.(%) (* $p<0.05$, ** $p<0.01$).

6) 玄參 100% MeOH fraction

양성 대조약물로 사용한 ACE 억제제인 Norvasc는 투여 후 5분부터 93.5±3.5%로 혈압강하효과가 나타나기 시작하여, 10분에는 86.4±4.7%, 15분에는 83.2±4.2%, 30분에는 79.1±3.3%, 45분에는 75.2±2.0%, 60분에는 78.5±3.0%, 75분에는 73.8±2.7%, 90분에는 70.8±2.8%의 변화를 나타내어 15분 이후부터는 지속적이고 유의성 있는 혈압강하효과를 나타내었다.

玄參 100% MeOH fraction 400 mg/kg을 투여 한 후 15분에는 102.7±1.7%, 30분에는 103.8±1.5%, 45분에는 101.0±3.2%, 60분에는 101.3±3.4%, 75분에는 100.7±2.9%, 90분에는 100.2±3.1%의 변화를 나타내어 유의한 혈압강하효과가 나타나지 않았다(Fig. 8).

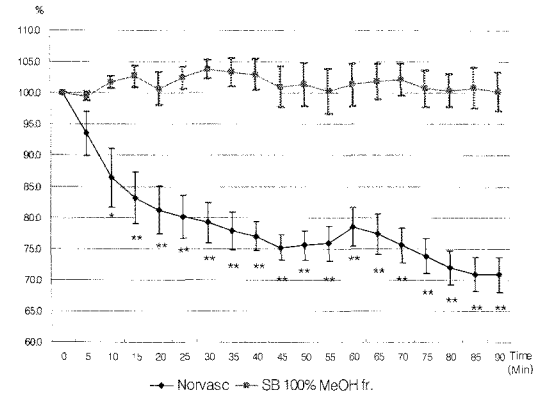

Fig. 8. Effect of SB 100% MeOH fraction on the Ratio of mean blood pressure in rats(n=5)

Each point represents the mean±S.E.(%) (* $p<0.05$, ** $p<0.01$).

7) 玄參 $CHCl_3$ fraction

양성 대조약물로 사용한 ACE 억제제인 Norvasc는 투여 후 5분부터 93.5±3.5%로 혈압강하효과가 나타나기 시작하여, 10분에는 86.4±4.7%, 15분에는 83.2±4.2%, 30분에는 79.1±3.3%, 45분에는 75.2±2.0%,60분에는 78.5±3.0%, 75분에는 73.8±2.7%, 90분에는 70.8±2.8%의 변화를 나타내어 15분 이후부터는 지속적이고 유의성 있는 혈압강하효과를 나타내었다.

玄參 $CHCl_3$ fraction 400 mg/kg을 투여 한 후 15분에는 102.6±5.8%, 30분에는 102.3±3.0%, 45분에는 107.0±6.5%, 60분에는 96.6±5.3%, 75분에는 103.4±5.3%, 90분에는 101.4±7.1%의 변화를 나타내여 유의한 혈압강하효과가 나타나지 않았다(Fig. 9).

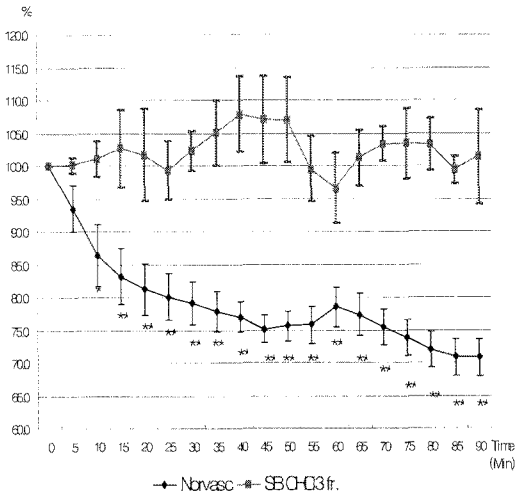

Fig. 9. Effect of SB $CHCl_3$ fraction on the Ratio of mean blood pressure in rats(n=5)

Each point represents the mean±S.E.(%) (* $p<0.05$, ** $p<0.01$).

3. ITS 부위의 염기서열 분석

1) 염기서열 정렬 및 GC 함량 분석

본 실험에 사용된 玄參류의 ITS region의 크기는 588~589bp였고, ITS region의 GC함량은 약 59.3~59.9%였다. 그 중 토현삼(SK)의 ITS region의 크기는 589bp였고, ITS region의 GC 함량은 59.5%였으며, 한국산 현삼(SB)의 ITS region의 크기는 589bp였고, ITS region의 GC 함량은 59.6%였으며, 큰개현삼(SA)의 ITS region의 크기는 588bp였고, ITS region의 GC 함량은 59.3%였으며, 중국현삼(SN)의 ITS region의 크기는 588bp였고, ITS region의 GC 함량은 59.7%였으며, 섬현삼(ST)의 ITS region의 크

Table 4. Size and Base Composition of ITS Gene

Species	ITS 1		5.8S		ITS 2	
	Length (bp)	G+C (%)	Length (bp)	G+C (%)	Length (bp)	G+C (%)
SK	208	62.9	168	53.5	214	60.7
SB	208	62.9	168	53.5	214	61.2
SA	208	60.6	168	53.5	213	62.4
SN	208	62.9	168	54.1	213	61.0
ST	208	60.1	164	54.3	217	64.1

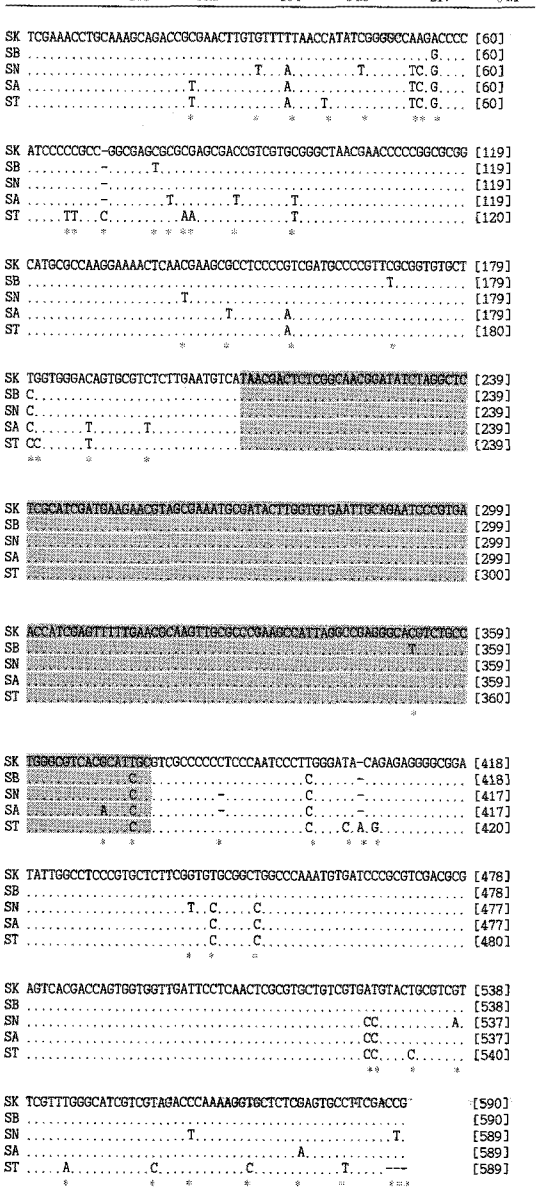

Fig. 10 Aligned sequences of ITS region from various Scrophularia species

5.8S region are shown in grey-coloured boxes. The symbol '*', '.', '-' indicate identical residues, positive residues, and empty space to enable alingment between sequences, respectively. See Table I for acronym.

기는 588bp였고, ITS region의 GC 함량은 59.9%였으며, Scrophularia 속 한약재의 ITS 부위의 염기서열은 유사함을 알 수 있었다. 다만 ITS 1 부위에서 각각의 GC함량이 SA가 60.6%, ST가 60.1%로 62.9%를 나타낸 SK, SB, SN과는 약간의 차이를 나타내었으며, ITS2부위에서는 GC함량이 SA(62.4%), SK(60.7%), SB(61.2%), SN(61.0%), ST(64.1%)로 각기 다른 수치를 나타내었다(Table 4. Fig. 10).

2) Sequence divergence

유사도 분석에서 토현삼(SK), 큰개현삼(SA), 중국玄參(SN), 현삼(SB)과 섬현삼(ST)을 Kimura two parameter distance 방법으로 분석한 결과 SA와 SN이 0.03, SK와 SB가 0.01로 서로 유사한 결과가 나왔으며 ST만이 다른 4종의 현삼과 다른 결과가 나왔다(Table 5).

또한 ITS 염기서열을 사용하여 현삼류에 대한 분지분석을 한 결과 종간의 차이가 크게 차이나지 않고 유집되는 것으로 나타났다(Fig. 11).

Table 5. Similarity Data Matrix Calculation with Sequences of ITS Region from Various Scrophularia Species. See Table I for Acronym.

	ST	SK	SA	SN	SB
ST	---	386/589	379/588	384/588	387/589
SK	1.57	---	171/589	168/589	7/589
SA	1.48	0.37	---	17/589	171/589
SN	1.54	0.36	0.03	---	168/589
SB	1.58	0.01	0.37	0.36	---

Lower-left triangle contains Kimura two parameter distance and upper-right triangle contains different/Total nucleotides.

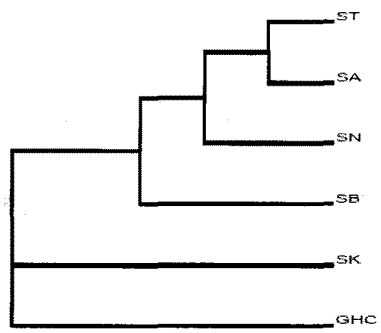

Fig. 11. Phylogenetic tree of the various Scrophularia species on ITS sequences. The tree was constructed by NJ method with a Kimura-2-parameter distance after ClusterX analysis

GHC : Glechoma hederacea var. longituba. See Table I for acronym.

고 찰

경제성장으로 인한 생활수준의 향상으로 달라진 식생활과 생활습관으로 현대인은 각종 成人病에 시달리고 있으며, 특히 고혈압, 동맥경화, 중풍 등의 순환기계 질환이 증가하고 있으며 이에 따라 예방 및 치료를 위한 약물의 연구가 많이 진행되고 있다.

玄參이 혈압에 미치는 영향에 대해 ≪中華本草≫에는 실험적으로 마우스의 정맥에 玄參 Extract를 투여했을 때, 소량이면 처음에 혈압이 약간 올라가다가 다시 내려가고, 대량을 투여하면 혈압이 낮아지며, 특히 腎臟性 고혈압인 개에 경구투여한 효력은 건강한 개보다 현저하다고 기재되어 있다.

현재까지의 모든 실험은 현삼을 물이나 70% MeOH 또는 100% MeOH이나 100% 에탄올 사용하여 추출, 농축하여 얻은 Extract를 가지고 한 것으로, Extract를 용매별 용해도 차이에 의한 성분 분리를 통한 실험은 없었다.

성분의 분리를 통하여 얻을 수 있는 이점은 여러 가지가 있다. 첫째 비 약용물질의 제거를 통해 약의 총 용량을 줄일 수 있으며, 둘째 약용물질의 순도를 높여 다른 물질로 인한 부작용을 줄일 수 있으며, 셋째 해마다 유효성분이 약간씩 차이가 나는 한약재의 특성을 보다 줄일 수 있어 약을 사용할 때 보다 정확하게 사용할 수 있다는 것이다.

따라서 성분 분리를 통한 약효의 차이를 玄參을 가지고 혈압 측정 실험을 해 보았으며 유의한 효과가 있었다.

70% MeOH로 추출하여 농축, 동결 건조시켜 만든 玄參(SB) Extract와 SB Extract를 분리하여 얻은 각각의 분획물(SB CHCl3 fraction, SB water fraction, SB 20% MeOH fraction, SB 40% MeOH fraction, SB 60% MeOH fraction, SB 100% MeOH fraction)들을 Chloroform : MeOH : Water = 6 : 4 : 1 의 용매로 TLC 상으로 전개하여 확인하였다.

SB 70% MeOH Extract(A), SB water fraction (B)., SB 20% MeOH fraction(C)., SB 40% MeOH fraction(D), SB 60% MeOH fraction(E), SB 100% MeOH fraction(F), SB CHCl3 fraction(G)의 시료의 Rf value는 A1=0.83, A2=0.66, A3=0.52, A4=0.20, B1=0.52, B2=0.20, C1=0.68, C2=0.57, D1=0.77, D2=0.70, D3=0.59, D4=0.44, E1=0.83, E2=0.77, E3=0.69, F1=0.98, F2=0.93, F3=0.88, F4=0.79, F5=0.69, F6=0.61, F7=0.52, G1=0.98, G2=0.93, G3=0.86, G4=0.70, G5=0.61, G6=0.52, G7=0.43을 나타내었으며, TLC 상으로 봤을 때 각각의 Extract가 잘 분리되었음을 확인할 수 있었다.

이 중에서 혈압의 변화에 유의한 결과를 보인 SB 20% MeOH fraction은 메인 분획이 Rf value C1=0.68, C2=0.57에 나타났으며, TLC 전개상과 혈압 실험의 결과로 추론했을 때 두 분획 중에 한 부분이나 혹은 두 분획 모두가 혈압 하강 작용에 관련되었으리라 사료된다.

양성 대조약물로 사용한 ACE 억제제인 Norvasc는 투여 후 5분부터 93.5±3.5%로 혈압강하효과가 나타나기 시작하여, 10분에는 86.4±4.7%, 15분에는 83.2±4.2%, 30분에는 79.1±3.3%, 45분에는 75.2±2.0%, 60분에는 78.5±3.0%, 75분에는 73.8±2.7%, 90분에는 70.8 ± 2.8%의 변화를 나타내어 15분 이후부터는 지속적이고 유의성 있는 혈압강하효과를 나타내었다. SB 70% MeOH Extract. 400 mg/kg, SB CHCl3 fraction 400 mg/kg, SB water fraction 400 mg/kg, SB 40% MeOH fraction 400 mg/kg, SB 100% MeOH fraction 400 mg/kg을 투여 한 후에는 유의한 혈압강하효과가 나타나지 않았으나, SB 20% MeOH fraction 400 mg/kg을 투여 한 후에는 유의한 혈압 강하 효과가 나타났으며, SB 60% MeOH fraction 400 mg/kg을 투여 한 후에는 오히려 유의한 혈압 상승 효과가 나타났다.

SB 20% MeOH fraction 400 mg/kg의 혈압 하강 효과와 SB 60% MeOH fraction 400 mg/kg의 혈압 상승 효과는 서로 영향을 끼쳐서 SB 70% MeOH Extract 400 mg/kg에서 유의한 혈압 하강의 효과가 없었다는 결과에 대한 하나의 근거가 될 수 있으리라 사료된다.

玄參의 혈압 강하 효과는 메탄올추출물보다는 성분을 분획하여 사용하는 것이 현저한 효과를 나타낸 결과를 볼 때, 앞으로 성분 분리를 통해 보다 간결화된 한약사용이 가능하리라 사료되며 한약의 효과 또한 증대되리라 기대한다.

국내에서 정품 玄參으로 인정되는 것은 玄參(*Scrophularia buergeriana* Miquel.)으로 큰개현삼(*S. kakudensis*), 土玄參(*S. koraiensis*), 섬현삼(*S. takesimensis*)은 대용품으로 인정되고 있으며, 중국산 현삼(*Scrophularia ningpoenesis* Hemsl.)도 사용되고 있다.

현삼을 구별하는 일차적인 평가는 형태학적인 관능검사를 통하며 이후 이화학적인 분석을 통해 구별할 수도 있지만, 보다 정확한 평가는 유전자 감별에 의한 것이 있다.

Polymerase Chain Reaction (PCR)의 개발 이후로

식물의 임의의 DNA 구간을 증폭할 수 있게 되었고, 극미량의 DNA로부터도 특정구간의 염기서열 결정(Sequencing)이 가능해졌기 때문에 식물체의 genomic DNA 분석을 통하여 감별하는 것이 보다 정확하고, 객관적인 분석이 될 수 있다고 생각된다.

ITS는 리보솜 DNA 중의 18S와 26S 유전자 사이에 위치하며, 5.8S 유전자를 포함하여 ITS1과 ITS2로 나누어진다. 대개 종 아래 수준의 유연관계 연구에 사용되며, 부모 양쪽으로부터 유전된 진화과정을 반영하므로, 식물체의 과·종·속 등의 유연관계를 연구하는 이러한 유전자를 통해 보다 정확한 식물체의 판별을 할 수가 있다.

본 실험에 사용된 玄參류의 ITS region의 크기는 589~590bp였고, ITS region의 GC함량은 약 59.3~59.7%였다. 그 중 토현삼(SK)의 ITS region의 크기는 590bp였고, ITS region의 GC 함량은 59.5%였으며, 한국산현삼(SB)의 ITS region의 크기는 590bp였고, ITS region의 GC 함량은 59.6%였으며, 큰개현삼(SA)의 ITS region의 크기는 589bp였고, ITS region의 GC 함량은 59.3%였으며, 중국현삼(SN)의 ITS region 크기는 589bp였고, ITS region의 GC 함량은 59.7%였으며, 섬현삼(ST)의 ITS region 크기는 589bp였고, ITS region의 GC 함량은 59.9%였으며, 또한 Scrophularia 속 한약재의 ITS 부위의 염기서열은 유사함을 알 수 있었다.

다만 ITS 1 부위에서 각각의 GC함량이 SA가 60.6%, ST가 60.1%로 62.9%를 나타낸 SK, SB, SN과는 약간의 차이를 나타내었으며, ITS2 부위에서는 GC함량이 SA(62.4%), SK(60.7%), SB(61.2%), SN(61.0%), ST(64.1%)로 각기 다른 수치를 나타내어 ITS부위를 통한 종별 구별을 할 수 있으리라 사료된다.

RFLP 방법을 통한 현삼류의 ITS 분석 비교는 현삼의 종을 구분하는데 유용하게 사용되리라 사료된다.

결 론

현삼이 혈압에 미치는 영향을 알아보기 위하여 현삼 70% MeOH Extract와 분획물에 따라 SHR의 혈압에 미치는 영향을 확인하기 위하여 SHR의 대퇴동맥에서 직접측정법으로 평균혈압을 측정하였으며, 보다 정확한 약재의 사용을 위하여 국내에서 자생하는 4종의 현삼류와 중국산 현삼을 ITS 비교를 통하여 구분한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 현삼의 분획에 따른 항고혈압 효과를 실험한 결과, 현삼 70% MeOH Extract와 water fraction, 40% MeOH fraction, 60% MeOH fraction, 100% MeOH fraction에서는 혈압 강하 효과가 없었으나, 20% MeOH 분획 Extract에서는 약물 처치 전 혈압과 비교하여 유의한 혈압 강하 효과를 나타내었다.

2. 국내에서 자생하고 약용으로 사용하는 4종의 현삼(현삼, 큰개현삼, 토현삼, 섬현삼)과 중국산 현삼의 ITS region은 589~590bp였고, GC함량은 약 59.3~59.9%이었으며, Scrophularia 속 한약재의 ITS 부위의 염기서열은 유사함을 알 수 있었으며, Phylogenetic tree상으로 약용으로 사용하는 종과 약용으로 사용하지 않는 종에 차이가 있음을 나타내었다.

이상의 결과로 볼 때 현삼의 성분을 분리한 경우가 분리하지 않았을 때보다 혈압 강하에 우수한 효과를 나타내었음을 알 수 있었다. 또한 약용으로 사용하는 Scrophularia 속의 현삼(*S. buergeriana*), 큰개현삼(*S.* kakudensis), 土玄參(*S. koraiensis*), 중국玄參(*S. ningpoenesis*), 섬현삼(*S. takesimensis.*)의 ITS 부위의 염기서열이 유사함을 알 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 2008년도 2단계 두뇌한국21 사업의 지원에 의하여 연구되었음

참고문헌

1. 식품의약품안전청. 대한약전외한약(생약)규격집. 제8개정. 서울 : 식품의약품안전청, 2008 : 460.

2. 국가약전위원회. 중화인민공화국약전(1부). 북경 : 화학공업출판사. 2005 : 76.

3. 중약대사전편찬위원회. 中藥大辭典-國譯. 서울 : 정담출판사. 2003 : 6169-4.

4. 國家中醫藥管理局 <中華本草>編委會. 中華本草. 上海科學技術出版社 1999 ; 7 : 392-6.

5. 孫星衍. 神農本草經. 文光圖書有限公司. 臺北. 1971 : 63-4.

6. 황성연, 변종호, 송호준, 신민교. 한국산 현삼과 식물에 관한 본초학적 연구. 대한본초학회지. 1998 ; 13(1) : 241-70.

7. 이영종, 안덕균. 현삼의 기원과 효능에 관한 고찰. 대한본초학회지. 1986 ; 1(1) : 63-72.

8. 朴涌基, 康秉秀. 현삼의 항산화 작용에 관한 연

구. 대한본초학회지. 1998 ; 13(1) : 201-20.

9. 김수정, 배경순, 서민지. 현삼의 성분에 관한 연구. 曉星藥誌. 1990 ; 115 : 73-85.

10. Yi-Ming Li, Shan-Hao Jiang, Wen-Yun Gao, Da-Yuan Zhu. Seasonal variations in the harpagoside content of Scrophularia scorodonia L. Phytochemistry 54. 2000 : 923-5.

11. 禹美熙. 현삼의 성분에 관한 연구. 효성기과집 제3권. 1989 : 129-44.

12. Kim SR and YC Kim. Neuroprotective phenylpropanoid esters of rhamnose isolated from roots of Scrophularia buergeriana. Phytochemistry. 54. 2002 ; 5 : 503-9.

13. Kim SR, KA Koo et al. Iridoids from Scrophularia buergeriana attenuate glutamate-induced neurotoxicity in rat cortical cultures. J Neurosci Res. 74. 2003 ; 6 : 948-55.

14. Kim SR, SY Kang et al. Anti-amnestic activity of E-p-methoxycinnamic acid from Scrophularia buergeriana. Brain Res Cogn Brain Res 17. 2003 ; 2 : 454-61.