

# 하백초 에탄올 추출물의 혈관이완 기전에 대한 연구

김혜움<sup>1</sup> · 최병선<sup>2</sup> · 조은희<sup>2</sup> · 최호진<sup>1</sup> · 강대길<sup>1,2\*</sup> · 이호섭<sup>1,2\*</sup>

1: 원광대학교 한의학전문대학원, 2: 원광대학교 한의과대학

## Study on the Mechanism of Vascular Relaxation of Ethanol Extract of *Persicaria Perfoliata* H. Gross

Hye Yoom Kim<sup>1</sup>, Byung-Sun Choi<sup>2</sup>, Eun-Hee Cho<sup>2</sup>, Hao Zhen Cui<sup>1</sup>, Dae Gill Kang<sup>1,2\*</sup>, Ho Sub Lee<sup>1,2\*</sup>

1: Professional Graduate School of Oriental Medicine, 2: College of Oriental Medicine, Wonkwang University

The ethanol extract of *Persicaria perfoliata* (EPP) induced relaxation of the phenylephrine-precontracted aorta in a dose-dependent manner, which was abolished by removal of functional endothelium. Pretreatment of the aortic tissues with NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) or 1H-[1,2,4]-oxadiazole-[4,3- $\alpha$ ]-quinixalin-1-one (ODQ) inhibited the relaxation induced by EPP. However, EPP-induced relaxation was not blocked by pretreatment with indomethacine, glibenclamide, tetraethylammonium (TEA), atropine, or propranolol. Incubation of endothelium-intact thoracic aortic ring with EPP increased the production of cGMP, which was also blocked by pretreatment with L-NAME or ODQ. These results suggest that EPP dilates vascular smooth muscle via endothelium-dependent NO/cGMP signaling.

**Key words :** ethanol extract of *Persicaria perfoliata* (EPP), aortic tissues, endothelium, nitric oxide/cGMP, vascular relaxation

### 서 론

고도의 경제 성장으로 인한 생활의 서구화는 환경오염과 과잉 영양 섭취, 신체활동 감소 등으로 인해 만성 퇴행성 질환인 심혈관계 질환, 비만, 당뇨병, 고혈압 및 조기사망 등을 증가시키고 있다. 이 만성 퇴행성 질환으로 인한 사망률 중에서도 순환계 질환이 30%, 이 중에서도 고혈압이 20%를 차지하는 것으로 보아 그 치료 방법 및 예방 조치가 무엇보다 중요한 것으로 사료된다<sup>1)</sup>.

순환기계 질환의 하나인 고혈압은 심박출량의 증가나 말초혈관의 수축으로 인해 동맥 혈압이 상승하는 것으로, 혈압의 변동에 영향을 미치는 인자로는 심박출량 또는 심박동수의 증가 및 말초혈관의 저항증가를 들 수 있다. 특히 말초혈관의 저항이 큰 영향을 미치므로 혈관의 긴장성 조절은 혈압의 조절에 중요한 역할을 하고 있다고 볼 수 있다<sup>2)</sup>.

혈관 평활근의 긴장도는 여러 중요인자에 의해 영향을 받는다.

\* 교신저자 : 강대길, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의과대학

이호섭, 전북 익산시 신용동 344-2, 원광대학교 한의과대학

· E-mail : dgkang@wku.ac.kr, host@wku.ac.kr

· Tel : 063-850-6933, 063-850-6841

· 접수 : 2009/02/25 · 수정 : 2009/03/23 · 채택 : 2009/04/10

데, 그 중 신경전달물질 (norepinephrine, adenosine triphosphate, nitric oxide), 내피인자(endothelium-derived relaxing factor: EDRF, endothelium-derived hyperpolarizing factor: EDHF, endothelins), 대사성 영향(PO<sub>2</sub>, PCO<sub>2</sub>, pH), 체액성 물질 (norepinephrine, epinephrine, vasopressin), 근육성 영향 (혈관의 신축성, 내압) 등이 대표적이다<sup>3)</sup>.

특히 혈관 내피세포는 혈관 이완인자 (EDRF)와 수축인자 (endothelium-derived constricting factor)를 방출하여 혈압조절에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다<sup>4,6)</sup>. 이러한 EDRF 중 하나가 nitric-oxide (NO)인데 NO는 혈관 내피세포 외에 평활근과 혈구 그리고 중추신경계의 뉴론 등으로부터 생성될 수 있는데<sup>6)</sup>, NO는 적어도 3가지 이상의 NO synthase 동위효소의 작용에 의해 아미노산인 L-arginine으로부터 합성된다<sup>7)</sup>. NO는 내피세포에서 L-arginine으로부터 산화질소 합성효소 (nitric oxide synthase, NOS)에 의해 생성되는데 생성된 NO는 soluble guanylate cyclase (sGC)를 활성화하여 cyclic guanosine-3,5-monophosphate (cGMP)의 생성을 증가시켜 신호전달체계를 통해 혈관 평활근을 이완 시킨다<sup>8)</sup>. 이러한 구성효소와 유도효소의 활동은 L-arginine의 가까운 유도체인 N<sup>G</sup>-nitro-L-Arginine (L-NNA)에 의해 억제된다<sup>9,10)</sup>. 또한 NO와 같은 혈관 이완 인자는 정상 상태에서도 내피

세포에서 합성 및 분비가 이루어지고 acetylcholine (ACh), histamine, substance P 및 isoproterenol 등의 효능제에 의해서 합성 및 분비가 조절된다<sup>11,12</sup>.

고혈압 치료에 사용되어온 organic nitrate의 작용은 가용성 guanylate cyclase (GC)를 활성화시켜 cGMP를 상승시킴으로써 이루어지며 또한 이 약제는 비효소 작용 (nonenzymatic reaction)에 의해 NO를 발생시키므로, EDRF의 혈관 이완작용도 GC의 활성화에 의한 cGMP에 의한 것으로 밝혀졌다<sup>13</sup>.

혈관 평활근의 긴장도를 조절하는 또 다른 내인성 인자인 prostacyclin (PGI<sub>2</sub>)은 arachidonic acid로부터 cyclo oxygenase (COX)에 의해 생성되고, 생성된 PGI<sub>2</sub>는 cyclic adenosine monophosphate (cAMP)의 생성을 증가시켜 혈관 이완작용을 갖는다<sup>14</sup>. 이외에 혈관 평활근의 긴장도는 자율신경계 등에 의해서도 조절된다.

생약 및 생약으로부터 분리한 단일물질에서 혈관 내피 세포 유래 NO를 증가시킴으로써 혈관을 이완시킨다는 최근의 연구결과 또한 많다. Kuramochi 등<sup>15</sup>은 조구등 전탕액이 NO 의존적으로 혈관이완 효과를 증가시킨다는 보고를 한 바 있고, Goto 등<sup>15,16</sup>은 일련의 연구결과에서 조구등 전탕액이 자연발증 고혈압의 혈압을 강하시키고 methanol 추출물이 NO 의존적으로 흉부 대동맥의 혈관을 이완시킨다고 보고하였다. 또한 단삼의 lithospermic acid B<sup>17</sup>, 동충하초의 단백질 성분<sup>17</sup> 등도 NO 의존적으로 혈관 이완을 증가시키는 것으로 알려졌다. 특히 Kim 등<sup>18</sup>은 산사로부터 분리한 procyanidin이 NO 의존적으로 혈관을 이완시키고 혈관 cGMP의 생성을 증가시킨다고 보고하였으며, Kang 등<sup>19</sup>은 또한 황련으로부터 분리한 alkaloid 화합물인 berberine이 NO/cGMP계 의존적으로 혈관을 이완시킨다고 보고 하였다. 또한 겨우살이, 은행잎, 방풍, 당귀, 익모초, 등의 한약재 추출물도 혈관 내피세포 의존적 또는 비 의존적으로 혈관 이완 효과를 보이고, 이들의 유효성분으로는 glycoside, procyanidine, flavonoid, polyphenyl성 화합물 alkaloid, sesquiterpene lactone 화합물들이 밝혀졌다<sup>20-25</sup>.

하백초 전초(全草)에 flavonoid 배당체, anthra배당체, carbon산, tannin 및 당류 (자당 7.48%, 환원당 3.4%, 전분 2.88%)가 함유되어 있고, 종자에는 유 3.3%, 수과에는 유 12.47%가 함유되어 있다. 근(根)과 경(莖)에는 indican 및 소량의 emodin 과 chrysophanol 이 함유되어 있고 근피(根皮)에는 33 %의 tannin 이 함유되어 있다<sup>26</sup>. 하백초는 혈당강하 효과가 있다고 알려져 있으나<sup>27</sup>, 하백초 잎 추출물을 이용한 혈관 이완효과와 그 작용기전은 아직까지 밝혀진 바가 없다. 따라서 이 실험에서는 phenylephrine (PE) 전 처리로 수축시킨 백서의 흉부 대동맥에 하백초 에탄올 추출물을 이용하여 혈관 이완효과와 그 작용기전을 밝히고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 하백초의 추출물의 제조

하백초 1 kg을 건조시킨 후 분쇄기를 이용하여 분말로 하였

으며 3 리터의 ethanol (EtOH)로 1 주일간 추출한 후 회전식 감압농축기를 사용하여 농축 하였다. 이를 다시 물에 녹인 후 동결 건조하여 얻어진 추출물을 이용하였다.

### 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<sub>4</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM glucose이고, pH는 7.4로 보정 하였다.

### 3. 흉부 대동맥의 분리

건강한 Sprague-Dawley 백서 (몸무게 약 250-300 g)를 경추 탈골 한 후 흉부 대동맥을 분리하였다. 분리된 흉부 대동맥을 차가운 Krebs 용액 (pH 7.4)에 넣고 연결 조직과 지방을 제거한 후 약 3 mm의 길이의 절편으로 만들었다.

### 4. 혈관 장력의 측정

흉부 대동맥 절편에 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> 혼합가스로 포화시킨 37℃의 Krebs 용액에서 고정시킨 후 isometric tension을 force-displacement transducer (Grass FT 03, GRASS Instrument, MA, USA)가 장착된 생리 기록계 (Grass Model 7E, Grass Instrument, MA, USA)를 이용하여 측정하였다. 먼저 1×10<sup>-6</sup> M의 PE으로 수축시키고 5 분후 1×10<sup>-6</sup> M의 ACh으로 이완 반응을 시켜 혈관 내피 세포의 안전성을 측정한 후 Krebs 용액으로 3회 세척하고 실험을 수행하였다. 여러 가지 약물들에 의한 혈관 이완 효과 변화 측정은 먼저 약물을 20 분간 전 처리한 후 PE으로 수축시켰고, 이어서 하백초 에탄올 추출물 (EPP)에 의한 이완반응을 농도 의존적으로 관찰하였다. 혈관 내피세포 비의존형 실험을 수행할 때에는 혈관 내피 세포를 물리적인 방법으로 제거하였으며, PE 수축과 ACh 이완 반응으로 혈관 내피 세포의 제거를 확인 후 실험을 수행하였다.

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

흉부 대동맥 절편을 95 % O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> 혼합가스를 공급해 주면서 Krebs 용액에서 30분간 평형을 시킨 후 1×10<sup>-4</sup> M 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX) 과 1×10<sup>-6</sup> M의 PE을 넣어 5 분간 더 평형을 시킨 후 농도별로 하백초 에탄올 추출물 (3×10<sup>-5</sup>, 1×10<sup>-4</sup>, 3×10<sup>-4</sup> g/ml)을 처리 하여 4분간 반응을 시켰다. 혈관 조직은 바로 액체 질소에 넣어 반응을 정지시킨 후 -70℃에 보관한 후 cGMP 농도 측정에 이용하였다. 무게 (weight)를 측정된 혈관 조직을 6% trichloroacetic acid (TCA) 존재 하에서 균질화 시킨 후 13,000 g에서 15분간 원심 분리하여 얻은 상층액을 물이 포함된 diethyl ether를 이용하여 3회 추출하였다. 추출액은 Speed-vac 농축기를 이용하여 농축하고 cGMP<sup>1</sup> 측정은 방사면역 분석법을 이용하여 분석하였다<sup>35</sup>. 간단히 설명하면, 시료와 표준 물질을 50 mM sodium acetate 완충용액 (pH 4.8)에 최종 용적이 100 μl 가 되게 첨가한 후 100 μl 의 희석된 cGMP 항체

(Calbiochem-Novabiochem, Co., San Diego, CA, USA) 와  $^{125}\text{I}$ 가 결합된 cGMP (10,000 cpm/100  $\mu\text{l}$ )를 함께 넣은 후 4°C 에서 24 시간 반응시켰다. 항체와 결합한  $^{125}\text{I}$ -cGMP와 비 결합형  $^{125}\text{I}$ -cGMP은 charcoal을 이용하여 분리하였으며  $\beta$ -카운터를 이용하여 방사능을 측정하였다.

6. 사용시약

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

7. 통계처리

실험 결과의 유의성은 실험 결과를 Students t-test 나 one-way ANOVA test를 통하여 p가 0.05 이하인 경우 유의한 차이로 판정하였다.

결 과

1. 하백초 에탄올 추출물의 농도 의존성 혈관 이완효과

혈관 평활근을 PE ( $1 \times 10^{-6}$  M)으로 수축한 후 하백초 에탄올 추출물을 투여하여 혈관 이완효과를 측정할 결과, 혈관은 농도 의존적으로 이완되었다.  $1 \times 10^{-4}$  g/ml 농도에서 하백초 에탄올 추출물에 의한 이완효과는  $97 \pm 0.8\%$ 였다(Fig. 1).

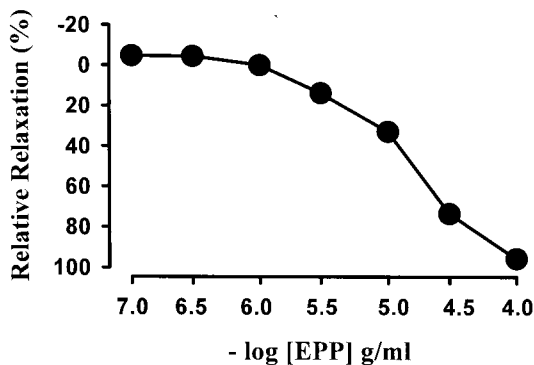


Fig. 1. Dose-response curve for the vascular relaxant effect of EPP in the PE-precontracted endothelium-intact aortic rings. Each value shows mean  $\pm$  SEM of four experiments.

2. 혈관 내피세포 의존적 이완 효과

Krebs 용액에서 유지된 백서 흉부대동맥 절편을 PE ( $1 \times 10^{-6}$  M)으로 수축한 후 하백초 에탄올 추출물의 농도 의존적인 혈관 이완 효과를 측정할 결과, 농도 의존적으로 혈관을 이완시켰다. 또한, 하백초 에탄올 추출물의 혈관 이완 효과가 혈관 내피세포 의존적인지를 밝히기 위하여 혈관 내피세포를 제거한 후 하백초 에탄올 추출물의 혈관 이완 효과를 측정할 결과 혈관 이완 효과는 완전히 억제 되었다(Fig. 2).

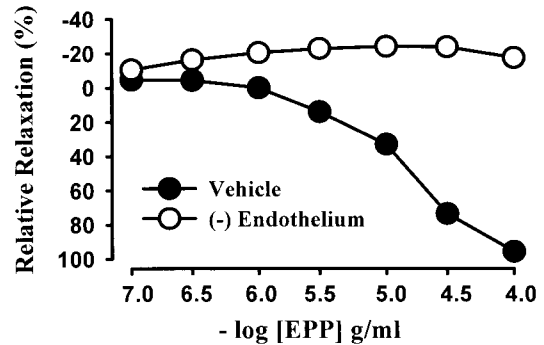


Fig. 2. Concentration-response curves for the vasorelaxant effect of EPP in PE-precontracted aorta. vasorelaxant effect of EPP in endothelium-intact aortic ring (vehicle), or endothelium-denuded aortic ring (-endothelium). Each value shows mean  $\pm$  SEM of four experiments.

3. NO 합성 효소 억제 효과

하백초 에탄올 추출물의 혈관 이완 효과가 혈관내피세포 유래 산화 질소계와 관련이 있는지를 알아보기 위하여 비 특이적인 NO 억제제인 L-NAME ( $1 \times 10^{-5}$  M)을 전 처리하고 하백초 에탄올 추출물의 혈관 이완 효과를 측정하였다. 그 결과, 하백초 에탄올 추출물의 혈관 이완 효과는 L-NAME에 의해 현저히 억제 되었다(Fig. 3).

4. GC 억제 효과

하백초 에탄올 추출물의 혈관 이완 효과가 cGMP와 관련이 있는지를 확인하기 위하여 세포질 GC 억제제인 ODQ ( $1 \times 10^{-6}$  M)를 전 처리한 후 혈관 이완 효과를 측정하였다. 그 결과 하백초 에탄올 추출물의 혈관 이완 효과가 완전히 억제되었다(Fig. 3).

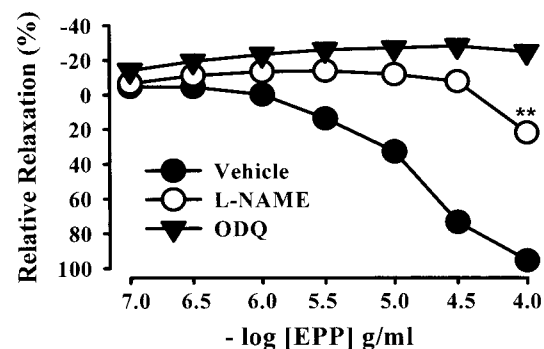


Fig. 3. Dose-response curves for the vascular relaxant effect of EPP in the PE-precontracted endothelium-intact aortic ring (Vehicle), in the presence of L-NAME ( $1 \times 10^{-5}$  M), or ODQ ( $1 \times 10^{-6}$  M) in endothelial intact aortic rings. Each value shows mean  $\pm$  SEM of four experiments. \*\*p<0.01 vs. vehicle group.

5. Cyclooxygenase (COX) 차단 시 혈관 이완효과

하백초 에탄올 추출물에 의한 혈관 이완효과가 PGI<sub>2</sub>과 연관이 있는지를 관찰하기 위하여 비 선택성 COX 억제제인 indomethacin ( $1 \times 10^{-5}$  M) 전처리 후 하백초 에탄올 추출물의 혈관 이완효과를 측정할 결과, indomethacin 전 처리 하지 않은 군과 유의한 차이가 없었다(Fig. 4).

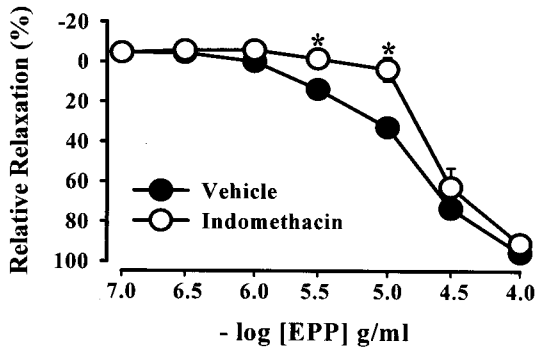


Fig. 4. Dose-response curves for the relaxant effect of EPP in the endothelial intact aortic rings (vehicle) or in the presence of indomethacin ( $1 \times 10^{-5}$  M). Each value shows mean  $\pm$  SEM of four experiments. \* $p < 0.05$  vs. vehicle group.

6. 자율 신경계 수용체 차단 효과

하백초 에탄올 추출물에 의한 혈관 이완 효과와 신경계와의 연관성을 알아보기 위하여 비 선택성  $\beta$ -아드레날린성 길항제인 propranolol ( $1 \times 10^{-6}$  M), 항 무스카린성 약물인 atropine ( $1 \times 10^{-6}$  M)을 각각 전 처리한 후 하백초 에탄올 추출물의 혈관 이완 효과를 측정된 결과 propranolol은 하백초 에탄올 추출물의 혈관이완에 영향을 미치지 못하였다. 그러나 atropine은 하백초 에탄올 추출물의 혈관이완을 부분적으로 영향을 주었다(Fig. 5).

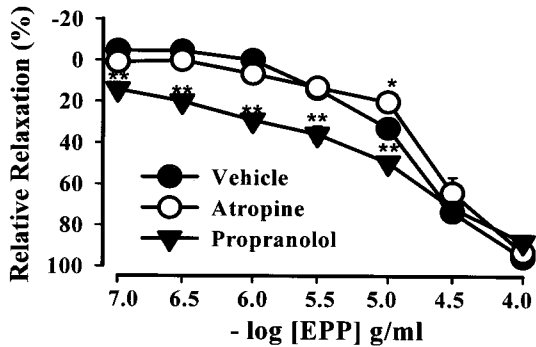


Fig. 5. Dose-response curves for the relaxant effect of EPP in the endothelial intact aortic rings (vehicle) or in the presence of atropine ( $1 \times 10^{-6}$  M), or propranolol ( $1 \times 10^{-6}$  M). Each value shows mean  $\pm$  SEM of four experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. vehicle group.

7. K<sup>+</sup> 통로 차단 효과

K<sup>+</sup> 통로가 하백초 에탄올 추출물의 혈관 이완 효과에 영향을 주는지를 측정하기 위하여 ATP-감수성 K<sup>+</sup> 통로 차단제인 glibenclamide ( $1 \times 10^{-6}$  M)와 비 선택적 K<sup>+</sup> 통로 억제제인 TEA ( $1 \times 10^{-5}$  M)를 전 처리한 결과 하백초 에탄올 추출물의 혈관 이완 효과에 영향을 주지 못하였다(Fig. 6).

8. L형 Ca<sup>2+</sup> 통로 차단 효과

L형 Ca<sup>2+</sup> 통로 차단이 하백초 에탄올 추출물의 혈관 이완 효과에 미치는 영향을 측정하기 위하여 L형 Ca<sup>2+</sup> 통로 차단제인 verapamil ( $1 \times 10^{-6}$  M)를 전 처리한 후 하백초에 의한 혈관이완 정도를 측정하였다. 그 결과 verapamil은 하백초의 혈관이완 이완 효과에 영향을 주지 못하였다(Fig. 7).

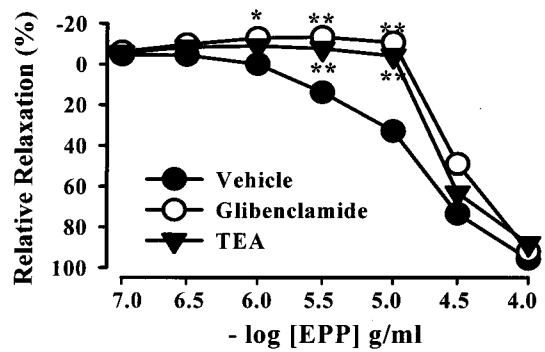


Fig. 6. Dose-response curves for the relaxant effect of EPP in the endothelial intact aortic rings (vehicle) in the presence of glibenclamide ( $1 \times 10^{-5}$  M), or TEA ( $1 \times 10^{-5}$  M). Each value shows mean  $\pm$  SEM of four experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. vehicle group.

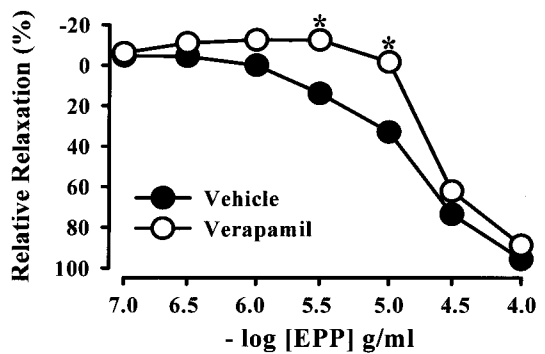


Fig. 7. Dose-response curves for the relaxant effect of EPP in the endothelial intact aortic rings (vehicle) in the presence of verapamil ( $1 \times 10^{-6}$  M). Each value shows mean  $\pm$  SEM of four experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. vehicle group.

9. Ca<sup>2+</sup>-free Krebs 용액에서 혈관 이완효과

Ca<sup>2+</sup>이 하백초 에탄올 추출물에 의한 혈관 이완효과에 연관이 있는지를 알아보기 위하여 Ca<sup>2+</sup>이 들어있지 않는 Krebs 용액과 Ca<sup>2+</sup>이 존재하는 Krebs 용액으로 실험을 진행하였다. Ca<sup>2+</sup>이 들어있지 않는 Krebs 용액에서 농도 의존적으로 하백초 에탄올 추출물의 혈관 이완 효과를 측정해본 결과, Ca<sup>2+</sup> 존재 할 때의 혈관 이완 효과에 비해 부분적으로 유의한 감소를 보였다(Fig. 8).

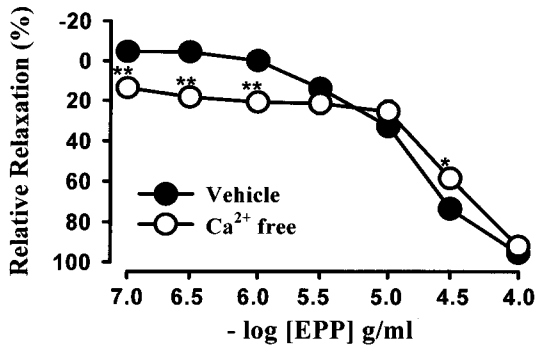


Fig. 8. Dose-response curves for the relaxant effect of EPP in the endothelial intact aortic rings in the presence of Ca<sup>2+</sup> solution (Vehicle), in the absence of Ca<sup>2+</sup> solution (Ca<sup>2+</sup>-free). Each value shows mean  $\pm$  SEM of four experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. vehicle group.

10. cGMP 생성 효과

하백초 에탄올 추출물이 혈관 조직에서 cGMP의 생성에 영향을 미치는지를 관찰하기 위하여 *in vitro*에서 하백초 에탄올 추출물을 흥부대동맥에 직접 투여한 후 흥부대동맥에서 cGMP 생성량을 측정하였다. 그 결과, 하백초 에탄올 추출물을 투여하지 않은 군에 비해 투여한 군은 농도 의존적으로 cGMP를 생성하였다(Fig. 9A). 또한 비 특이적 NO 억제제인 L-NAME ( $1 \times 10^{-5}$  M)와 GC 억제제인 ODQ ( $1 \times 10^{-5}$  M)를 전처리 한 후 하백초 에탄올 추출물의 cGMP 생성량을 측정해 본 결과, 하백초 에탄올 추출물을 단독으로 처리한 군에 비하여 전처리 한 군에서 cGMP의 생성량이 유의성 있게 감소하였다(Fig. 9B).

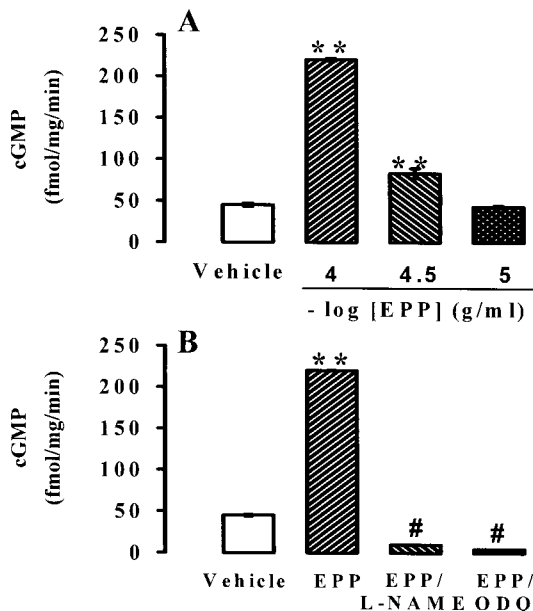


Fig. 9. Dose-dependent cGMP production by EPP in the thoracic aorta ring (A) and in the presence or absence of L-NAME ( $1 \times 10^{-5}$  M) or ODQ ( $1 \times 10^{-5}$  M) (B). Each value shows mean  $\pm$  SEM of four experiments. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. vehicle group. # $p < 0.01$  vs. EPP.

### 고찰

본 연구는 하백초 (*Persicaria perfoliata* H. Gross) 에탄올 추출물이 백서의 흥부 대동맥에서 PE의 전처리에 의한 혈관 수축을 현저하게 이완시켰다. 혈관 내피 세포를 제거 한 후 혈관 이완 효과가 완전히 차단된 것은 하백초 에탄올 추출물이 혈관 내피세포 의존적으로 혈관을 이완시키는 것을 의미한다. 혈관 평활근의 이완은 혈관 내피세포에 존재하는 수용체나 소기관들에 의해 분비되는 여러 종류의 혈관 활성 인자 (vasoactive factor)에 의해 조절되는데, 이러한 혈관활성 인자에는 NO, PGI<sub>2</sub>, 내피세포 유래 과분극 인자 (EDHF) 등이 알려져 있다<sup>28)</sup>. 따라서 하백초 에탄올 추출물의 혈관 이완 효과와 여러 다양한 혈관활성 인자들과의 연관성 및 그 기전을 알아보기 위하여 자율신경계 차단, 칼슘 및 칼륨 이온통로의 억제, COX의 억제, NO 생성 차단과 같은 방법을 이용하였다. 내피세포 유래 혈관 이완 인자의 본체인 NO가 하백초의 혈관 이완에 관여하는지를 알아보고자 먼저 NO 합성 억제제인 L-NAME를 전 처리한 후 측정하였다. 그 결

과, 하백초의 혈관 이완 효과가 현저히 차단되었다.

생체 내에서 생성되는 작은 분자인 NO는 내피세포 의존 혈관 이완 인자로서 혈압 강하 효과가 큰 것으로 밝혀졌다. NO는 L-arginine으로부터 NOS에 의하여 합성되고 혈관에는 NO 합성 효소인 3가지의 동위 효소 (bNOS, iNOS, eNOS)가 존재한다. 첫 번째 유형은 뇌형 NO 합성 효소 (bNOS)로 뇌 조직에서 처음 발견되었고 주로 신경 전달 물질로서의 NO를 합성하는 역할을 하고 있다. 두 번째 동위 효소는 유도형 NO 합성 효소 (iNOS)로써 주로 면역계에 작용하는 NO를 합성하고 있다. 세 번째 동위 효소는 혈관 내피세포에 주로 분포하면서 혈관을 이완시키는데 작용하는 혈관 내피세포 유래 NO 합성 효소 (eNOS)로써 ACh에 의하여 활성화되어 혈관을 이완시킨다<sup>29)</sup>. 이러한 NO는 세포질의 CG를 활성화 시켜 cGMP의 생성을 증가시켜 신호 전달체계를 통해 혈관 평활근을 이완 시킨다<sup>30)</sup>. 본 연구에서 L-NAME의 전 처리에 의해 하백초의 이완 효과가 현저히 억제되는 것으로 보아 하백초에 의한 혈관 이완 효과는 산화질소계를 경유하여 일어나는 것으로 사료된다.

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. 또한 동물의 실험 모델에서 NO 합성 효소의 만성적인 억제는 고혈압, 혈관염 등을 유발한다. 그러므로 NO/cGMP계의 회복을 통한 혈관이완활성의 증가는 심혈관계 질환을 치료하는데 있어 중요한 의미를 지닌다. NO/cGMP 계가 하백초에 의한 혈관 이완 효과에 관여한다면 NO에 의하여 활성화되는 가용성 구아닐산 고리화효소 또한 하백초에 의한 혈관 이완 효과에 관여할 것으로 사료되어 가용성 구아닐산 고리화효소 억제제인 ODQ를 전 처리 한 후 혈관이완 효과를 측정 한 결과, 하백초에 의한 혈관 이완 효과가 억제되었다. 따라서 하백초에 의한 혈관 이완 효과는 NO/cGMP 계를 경유하여 일어나는 것을 의미한다. 게다가 *in vitro* 에서 혈관조직과 하백초를 반응시킨 결과 혈관에서 cGMP의 생성량이 증가하였다.

혈관 평활근의 긴장도를 조절하는 또 다른 내인성 인자로 PGI<sub>2</sub>이 있다. PGI<sub>2</sub>은 arachidonic acid로부터 COX에 의하여 생성되고, 이 때 생성된 PGI<sub>2</sub>은 혈관 이완 작용을 갖는다. 하백초 에탄올 추출물의 혈관 이완 효과가 PGI<sub>2</sub>의 생성과 관련이 있는지를 알아보기 위하여 COX 억제제인 indomethacin을 전 처리하고 하백초의 이완 효과를 측정 한 결과 indomethacin을 전 처리 하지 않은 군과 비교하여 차이가 없었다. 이와 같은 결과로 볼 때 PGI<sub>2</sub>은 하백초 에탄올 추출물의 혈관 이완 작용과는 무관한 것으로 사료된다<sup>31,32)</sup>.

혈관 평활근 세포막 전위차는 혈관 평활근의 긴장도에 영향을 미치며 따라서 세포막간의 이온들의 변화로 혈관이완작용을 설명할 수 있다. Van Breeman등에 의하면 혈관 평활근세포막의 ion pump로는 Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump와 Ca<sup>2+</sup> pump 뿐만 아니라 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>/Cl<sup>-</sup>, Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger가 있는데<sup>33)</sup>, 혈관 평활

근의 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 억제에 통하여 혈관을 이완시킨다. 이 또한 혈관 긴장도를 조절하는데 있어 중요한 내인성 혈관 이완 기전으로 알려져 있다<sup>34</sup>.

혈관 평활근에서  $K^+$  통로는  $Ca^{2+}$ -activated K 통로 ( $K_{Ca}$ ), ATP-sensitive K ( $K_{ATP}$ ) 통로등이 있는데, EDHF는  $K^+$  통로를 활성화 시키고 막 과분극 (hyper-polarization)을 유발하게 된다.  $K^+$  통로의 활성화에 의한  $K^+$ 의 세포 내 유출은 세포막의 과분극을 일으켜, voltage-sensitive  $Ca^{2+}$  통로의 불활성화로 이어져 평활근세포 내  $Ca^{2+}$  농도 감소를 초래하게 되고 결국은 혈관 이완을 유발하게 된다.  $K^+$ 통로에 대한 억제제로는  $K_{Ca}$ 을 차단하는 TEA와 sulfonylurea계 약물인 glibenclamide로 후자는 혈관 평활근에서  $K_{Ca}$  통로에는 영향을 미치지 않고  $K_{ATP}$ 만을 차단한다. 하백초의 혈관 이완 효과가  $K_{Ca}$  또는  $K_{ATP}$ 를 경유하여 일어나는지 알아보기 위하여  $K_{Ca}$  차단제인 TEA와  $K_{ATP}$  차단제인 glibenclamide를 전 처리한 후 혈관 이완 효과를 측정할 결과, 하백초의 혈관이완 효과는 차단되지 않았다. 따라서 하백초의 혈관 이완 효과에  $K^+$  통로는 관여하지 않는 것으로 사료된다<sup>35</sup>.

근육의 수축과 이완에서 가장 중요한 이온은  $Ca^{2+}$ 이다. 혈관 평활근의 수축과 이완에 있어서도  $Ca^{2+}$  농도는 단연 가장 중요한 인자이다. 평활근 세포내  $Ca^{2+}$  농도가 증가하면 calmodulin과 결합하여 myosine light chain (MLC)의 인산화를 촉진시켜 평활근을 수축시킨다. 하백초의 혈관 이완 효과가 L형  $Ca^{2+}$  통로와 연관이 있는지 알아보기 위하여 L형  $Ca^{2+}$  통로 차단제인 verapamil을 전 처리 한 후 혈관 이완 효과를 측정할 결과, verapamil은 하백초의 혈관 이완효과는 차단되지 않았다. 따라서 이와 같은 결과로 볼 때, 하백초에 의한 혈관 이완에 L형  $Ca^{2+}$  통로는 관여하지 않는 것으로 사료된다.

혈관 평활근의 긴장도는 또한 자율 신경계에 의해서도 조절된다. 혈관 내피세포에는 혈관을 이완시키는 무스카린성 수용체가 존재하며 콜린성 자극에 의해 내피세포 의존적 이완인자인 NO를 유리시켜 혈관을 이완시킨다. 일반적으로 잘 알려진 혈관 이완 효현제인 ACh는 NO 중재 내피 의존성 혈관이완을 야기하며 ACh에 의한 NO의 유리는 내피세포 M3 수용체를 경유한다고 알려져 있다<sup>36</sup>. ACh에 의한 내피세포 내  $Ca^{2+}$  증가는 IP3에 의한 세포 내 저장소로부터  $Ca^{2+}$  유출과 세포외로부터의  $Ca^{2+}$  유입의 결과이다<sup>37,38</sup>. 증가된  $Ca^{2+}$ 에 의해 NOS가 활성화되고 L-arginine을 기질로 하여 NO가 생성된다. 이 때 생성된 NO는 혈관 평활근으로 확산되며, 다시 세포질 GC를 활성화 시킨다. 세포질 GC는 GTP (guanosine triphosphate)를 cGMP로 전환시키며, cGMP는 다시 cGMP 의존적 단백질 인산화 효소를 활성화시킨다. 이 효소가 혈관 평활근에  $Ca^{2+}$  유입을 억제하고 세포 내

$Ca^{2+}$ 의 수축요인에 대한 감수성을 감소시킴으로써 혈관 평활근을 이완시킨다<sup>39</sup>. 이 연구에서는 하백초가 자율 신경계 수용체를 경유하여 혈관을 이완시키는지 여부를 알아보기 위하여 콜린성 수용체 중에서 무스카린성 수용체를 선택적으로 차단하는 atropine과  $\beta$  수용체를 선택적으로 차단하는 항 아드레날린성 약물인 propranolol을 전 처리한 결과, 하백초의 혈관이완 효과는 항 아드레날린성 약물인 propranolol을 전 처리하였을 시에는 영향을 받지 않았으나, atropine을 전 처리하였을 혈관이완의 정도에는 부분적으로 영향을 주었지만 억제되지는 않았다.

이상의 결과를 종합해보면 하백초 에탄올 추출물은 NO/cGMP계를 활성화시킴으로써 혈관이완효과를 가지고 있음을 제시 할 수 있으며, 이러한 결과는 심혈관계 질환의 동물모델이 있어서 하백초의 연구에 유용한 정보를 제시해 준다.

## 결 론

하백초 에탄올 추출물은 내피 세포 의존적으로 혈관 평활근을 이완시켰고, 이와 같은 효과는 농도 의존적으로 나타났으며, NO/cGMP 신호 전달계를 차단하면 완전히 억제되었다. 더욱이 혈관 조직을 하백초 에탄올 추출물과 반응 시키면 cGMP의 생성이 증가하였고, 이러한 증가는 혈관 내피세포의 제거나 NO 합성 효소나 세포질 구아닐산 고리화 효소 차단 시 나타나지 않았다. 그러나 하백초 에탄올 추출물의 혈관 이완효과는  $PGI_2$  생성 차단이나  $K^+$  통로 차단,  $Ca^{2+}$  통로 차단 등에 의해서는 영향을 받지 않았다. 또한, 무스카린성 수용체 차단 및  $\beta$ -아드레날린성 수용체 차단제 등에 의해서도 영향을 받지 않았다.

이와 같은 결과로 볼 때, 하백초 에탄올 추출물의 혈관 평활근 이완 기전은 내피세포에서의 NO/cGMP 경로를 활성화 시켜 나타나는 것으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 보건복지부의 뇌질환항방연구센터의 연구비 (03-PJ9-PG6-SO02-0001) 및 한국과학재단의 한방체액조절연구센터 (No. R13-2008-028-01001-0)에 의하여 수행되었음.

## 참고문헌

1. 통계청 인구 분석과 2001년 사망원인 통계결과. 통계청, 2002.
2. Levi, R. Therapies for perioperative hypertension: Pharmacodynamic consideration. Acta Anaesthesiol., Acand Suppl. 37: 16-19, 1993.
3. Bosnjak, Z.J. Ion channels in vascular smooth muscle. Anesthesiology. 403: 120-127, 1993.
4. Rees, D.D., Palmer, R.M., Schulz, R., Hodson, H.F., Moncada, S. Characterization of three inhibitors endothelial Nitric oxide synthase in vitro and in vivo. Br. J.

- Pharmacol. 101: 746, 1990.
5. Vane, J.R., Anggard, E.E., Botting, R.M. Regulatory function of the vascular endothelium. *New Med.* 323: 27, 1990.
  6. Luscher, T.F. The endothelium as a target and mediator of cardiovascular disease. *Eur. J. clin. invest.* 23: 670, 1993.
  7. Moncada, S., Palmer, R.M., Higgs, E.A. Nitric oxide : Physiology. pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43: 109, 1993.
  8. Arnold, W.P., Mittal, C.K., Katsuki, S., Murad, F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increase guanosine 3',5'-cyclic monophosphate level in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci.* 74: 3203-3207, 1997.
  9. Forstermann, U., Closs, E.L., Pollock, J.S., Nakane, M., Schwarz, P., Gath, I. & Kleinert, H. Nitric oxide synthase isozyme-characterization, purification, molecular cloning and function. *Hypertension.* 23: 1121, 1994.
  10. Moncada, S., Radomski, M.W., Palmer, R.M.J. Endothelium-derived relaxing factor: Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. *Biochem Pharmacol.* 37: 2495, 1990.
  11. Ishii, K., Kerwin, J.F., Huang, Z.Y., Murad, F. NG-Nitro-L-arginine : a potent inhibitor of endothelium-derived relaxing factor formation. *Eur. J. Pharmacol.* 176: 216, 1990.
  12. Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature.* 288: 373-376, 1980.
  13. 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, 1989.
  14. Furchgott, R.F., Vanhoutte, P.M. Endothelium-derived relaxing and contracting actors. *FASEB J* 3(9):2007-2018, 1989.
  15. 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.
  16. Goto, H., Shimada, Y., Tanigawa, K., Sekiya, N., Shitani, T., Terasawa, K. Effect of *Uncaria ramulus et Uncus* on endothelium in spontaneously hypertensive rats. *Am. J. Chin. Med.* 27: 339-345, 1999.
  17. Kamata, K., Noguchi, M., Nagai, M. Hypotensive effects of lithospermic acid B isolated from the extract of *Salviae miltiorrhizae radix* in the rat. *Gen. Pharmacol.* 25: 69-73, 1994.
  18. Kim, S.H., Kang, K.W., Kim, K.W., Kim, N.D. Procyanidins in *Crataegus* extract evoke endothelium-dependent vasorelaxation in rat aorta. *Life Sci.* 67: 121-131, 2000.
  19. Kang, D.G., Sohn, E.J., Kwon, E.K., Han, J.H., Oh, H., Lee, H.S. Effects of berberine on angiotensin-converting enzyme and NO/cGMP system in vessels. *Vascul. Pharmacol.* 39: 281-286, 2002.
  20. Rodriguez-Cruz, M.E., Perez-Ordaz, L., Serrato-Barajas, B.E., Juarez-Oropeza, M.A., Mascher, D., Paredes-Carbajal, M.C. Endothelium-dependent effects of the ethanolic extract of the mistletoe *Psittacanthus calyculatus* on the vasomotor responses of rat aortic rings. *J. Ethnopharmacol.* 39: 281-286, 2002.
  21. Nishida, S., Satoh, H. Mechanism for the vasodilations induced by Ginkgo biloba extract and its main constituent, bilobalide, in rat aorta. *Life Sci.* 72: 2659-2667, 2003.
  22. Lee, T.H., Wang, G.J., Lee, C.K., Kuo, Y.H., Chou, C.H. Inhibitory effects of glycosides from the leaves of *Melaleuca quinquenervia* on vascular contraction of rats. *Planta Med.* 68: 891-895, 2002.
  23. Yuzurihara, M., Ikarashi, Y., Goto, K., Sakakibara, I., Hayakawa, T., Sasaki, H. Geissoschizine methyl ether, an indole alkaloid extracted from *Uncaria Ramulus et Uncus*, is a potent vasorelaxant of isolated rat aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 444: 183-189, 2002.
  24. Matsuura, M., Kimura, Y., Nakata, K., Baba, K., Okuba, H. Artery relaxation by chalcones isolated from the roots of *Angelica keiskei*. *Planta. Med.* 67: 230-235, 2001.
  25. Chen, C.X., Kwan, C.Y. Endothelium-independent vasorelaxation by leonurine, a plant alkaloid purified from Chinese motherwort. *Life Sci.* 68: 953-960, 2001.
  26. 이우철, 原色 韓國基準植物圖鑑. 아카데미서적, p 78 1996.
  27. 임숙자. 한국산 야생식용물의 혈당강하효과 (Hypoglycemic Effects of Korean Wild Vegetables), 한국영양과학회지 (KFN) 25(6):511-517, 1992.
  28. Rubanyi, G.M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *J. Cell. Biochem.* 46: 27-36, 1991.
  29. 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.
  30. 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.
  31. 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.

32. Sharma, N.R., Davis, M.J. Substance P-induced calcium entry in endothelial cells is secondary to depletion of intracellular stores. *Am. J. Physiol.* 268: H962-H973, 1995.
33. Guerrero, M.F., Puebla, P., Carron, R., Martin, M.L., San Roman, L. Quercetin 3,7-dimethyl ether: a vasorelaxant flavonoid isolated from *Croton schiedeanus* Schlecht. *J. Pharm. Pharmacol.* 54: 1373-1378, 2002.
34. 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.
35. 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.
36. Van Breeman, C., Cauvin, C., Johns, A., Leijten, P., Yamamoto, H.  $Ca^{2+}$  regulation of vascular smooth muscle. *Fed. Proc.* 45: 2746-2751, 1986.
37. Okabe, K., Kitimura, K., Kuriyama, H. Features of 4-aminopyridine sensitive outward current observed in single smooth muscle cells from the rabbit pulmonary artery. *Pflugers Arch.* 409: 561-568, 1987.
38. 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.
39. Furchgott, R.F. Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite: The basis for the proposal that the acid activatable inhibitory factor from bovine retractor penis is inorganic nitrite and the endothelium-derived relaxing factor is nitric oxide, in *Vasodilation: Vascular Smooth Muscle, Peptides, Autonomic Nerves, and Endothelium* (Vanhoutte PM ed), Raven Press, New York, pp 401-414, 1988.