

## 鎖陽의 내피세포 의존성 혈관이완효과

박선영\*

세명대학교 한의과대학 생리학교실

### The Endothelium-Dependent Vasorelaxation Effect of *Cynomorii Herba*

Sun-Young Park\*

Department of Physiology, College of Korean Medicine, Semyung University

#### ABSTRACT

**Objectives** : The purpose of this study was to investigate the endothelium-dependent vasorelaxation effect of *Cynomorii Herba*(CH) extract on contracted rabbit carotid artery.

**Methods** : To clarify the vasorelaxation effect of CH extract, arterial strips with intact was used, to endothelium-dependent vasorelaxation effect of CH extract, arterial strips damaged endothelium was used for experiment using organ bath. Arterial strips was contracted with phenylephrine(PE) before treated with CH extract(0.01, 0.03 and 0.1 mg/ml). To study mechanisms of CH-induced vasorelaxation effect, CH extract infused into arterial rings after treatment by indomethacin(IM), tetraethylammonium chloride(TEA), N $\omega$ -nitro-L-arginine (L-NNA), methylene blue(MB) for comparing with non-treated. And calcium chloride(Ca<sup>2+</sup>) 1 mM was treated into precontracted arterial ring induced by PE after treatment of CH extract in Ca<sup>2+</sup>-free krebs solution, Cytotoxic activity of CH extract on human umbilical vein endothelial cell(HUVEC) was measured by MTT assay, and nitric oxide(NO) concentration was measured by Griess reagent.

**Results** : PE-induced arterial strips was significantly relaxed, but the damaged endothelium arterial ring wasn't relaxed by CH extract. Pretreatment of IM, TEA didn't inhibit the vasorelaxation of CH extract, but pretreatment of L-NNA, MB inhibited the vasorelaxation of CH extract. Pretreatment of CH extract reduced the increase of contraction by influx of extracellular Ca<sup>2+</sup> in contracted arterial ring induced by PE, CH extract increased nitric oxide concentration on HUVEC significantly.

**Conclusions** : This study shows that CH extract have the vasorelaxation effect by blocking the influx of extracellular Ca<sup>2+</sup> through the activating NO-cGMP system.

**Key words** : *Cynomorii Herba*, vasorelaxation effect, nitric oxide, cyclic GMP

#### 서론

鎖陽은 鎖陽科에 속하는 鎖陽의 육질 줄기로, 性味는 甘溫, 無毒하며, 주로 脾, 腎, 大腸, 肝經에 들어가서 補腎陽, 益精血, 強壯筋骨, 潤腸通便하므로 腰膝痠軟, 陽痿, 滑精, 精冷不育, 筋骨無力, 骨軟, 血虛津虧로 인한 便秘 등의 치료에 활용되는 약물이다<sup>1,2)</sup>.

또한 鎖陽의 성분으로는 naringenin, naringenin-4'-O- $\beta$ -pyranoglucose, isoquercetin, (+)catechin, (-)epicatechin,

acetylursolic acid, glucose, ursolic acid,  $\beta$ -sitosterol, palmitic acid, daucosterol 등이 밝혀져 있다<sup>3)</sup>.

鎖陽에 대한 연구로 골다공증을 유발한 흰쥐에서 척추골밀도, 대퇴 골밀도, 비골경골밀도의 증가<sup>4)</sup>를 나타내었고, DPPH radical 소거활성과 산화 스트레스에 대한 보호효과<sup>5)</sup>, 생쥐의 총 정자수, 활동정자수, 정상형태 정자수, 고환조직의 세정관 사이간격과 혈관 증식 등 생식능력을 향상<sup>6,7)</sup>시킨다고 보고되었으나 혈관에 미치는 영향에 대한 연구는 보이지 않는다.

그러나 鎖陽의 성분에 해당하는 naringenin과 palmitic

\*Corresponding author : Sun-Young Park, Department of Physiology, College of Korean Medicine, Semyung University 65, Semyung-ro, Jecheon-si, Chungcheongbuk-do, Korea

· Tel : +82-43-649-1345 · E-mail : sypark@semyung.ac.kr

· Received : 2 October 2015 · Revised : 5 November 2015 · Accepted : 6 November 2015

acid는  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$ (BKCa) channel을 통한 혈관이완 효과<sup>8,9)</sup>, ursolic acids는 NO를 매개로 한 혈관이완효과<sup>10)</sup>, catechin과  $\beta$ -sitosterol은 혈관평활근에 대한 직접적인 이완 효과<sup>11,12)</sup>가 있는 것으로 연구보고 되었다. 따라서 이 성분들을 포함하고 있는 鎖陽 역시 혈관에 대한 이완효과를 나타낼 가능성이 있으며, 또한 陽痿의 치료효능 역시 음경의 혈관과 평활근 이완을 통하여 나타낼 가능성이 있다.

혈관의 긴장성 조절은 혈관저항 조절을 의미하는 것으로 말초혈관의 저항이 증가할 경우 동맥혈압의 상승을 초래하여 고혈압과 뇌졸중 등의 주요한 원인으로 작용한다.

고혈압은 심박출량의 증가나 말초혈관의 수축으로 평균동맥혈압이 상승되는 것이며<sup>13,14)</sup>, 평균동맥혈압의 결정에는 심박출량과 심박동수 및 총말초혈관 저항이 관계되는데, 특히 총말초혈관 저항이 큰 영향을 미치기 때문에 혈관저항의 조절이 혈압조절에 효과적이다<sup>15)</sup>.

혈관의 긴장도는 신경전달물질, 내피인자, 대사성영양, 체액성 물질, 근육성 영양에 의해 조절되는데, 그 중 혈관 내피인자는 혈관내피세포에서 분비되는 혈관 이완인자와 수축인자를 통하여 혈관의 이완과 수축을 조절한다<sup>16)</sup>. 즉, 혈관내피세포는 nitric oxide(NO), prostacyclin(PGI<sub>2</sub>), endothelium-derived hyperpolarizing factor(EDHF) 등의 혈관이완인자들을 분비하여 혈관을 이완시키고 endothelin 같은 강력한 혈관 수축인자들을 분비하여 혈관을 수축시킴으로써 혈압의 조절에 관여한다<sup>17-20)</sup>.

따라서 여러 가지 혈관이완효과가 있는 성분을 함유한 鎖陽 역시 혈관 긴장성 조절에 관여하는 인자들을 통하여 혈관 긴장도에 영향을 미칠 가능성이 있을 것으로 예상된다.

이에 저자는 혈압의 조절에 중요한 영향을 미치는 내피세포성 이완인자를 중심으로 한 organ bath study를 통하여 鎖陽의 내피세포 의존성 혈관이완효과를 검증함으로써 새로운 鎖陽의 효능을 밝히고 활용 범위를 확대시키는 방안을 모색하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험동물

체중 2 kg 내외의 New zealand white 수컷 토끼(שמ타코, 한국)를 고형사료와 물을 충분히 공급하면서 1주 이상 실험실 환경에 적응시킨 후 사용하였다.

본 동물실험은 세명대학교 동물실험윤리위원회의 승인(smecac 15-06-05)하에 실시되었다.

### 2. 鎖陽 추출물 제조

鎖陽(*Cynomorii Herba*, CH) 200 g을 증류수 2000 ml과 함께 round flask에 넣고 2시간 동안 100 °C에서 가열 추출한 다음 rotary evaporator(Eyela, Japan)로 감압 농축한 후 동결 건조기로 건조하여 얻은 44.2 g의 분말을 실험에 사용하였다.

### 3. 혈관이완효과 측정

#### 1) 혈관절편의 제작

토끼를 urethane(2.5 g/kg, 정맥주사)로 마취한 후 경부를

절개하고 경동맥을 적출하여 4 °C의 modified krebs-ringer bicarbonate solution(125.4 mM NaCl, 4.9 mM KCl, 2.8 mM CaCl<sub>2</sub>, 1.2 mM MgSO<sub>4</sub>, 15.8 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 12.2 mM glucose, pH 7.4)에 담았다. 경동맥은 혈관주위의 지방조직을 제거하고 2 mm 길이가 되도록 횡으로 절단하여 고리모양의 혈관절편을 만들었다.

혈관절편은 내피세포가 존재하는 절편과 내피세포가 제거된 절편으로 구분하여 제작하였으며, 내피세포의 제거는 가슴 막대로 문질러 제거하였다.

#### 2) 등장성 수축 측정

혈관절편은 95%의 O<sub>2</sub>와 5%의 CO<sub>2</sub> 혼합가스로 포화된 37 °C의 modified krebs-ringer bicarbonate solution이 peristaltic pump를 통하여 3 ml/min의 속도로 흐르고 있는 organ bath(용량 1.5 ml)에 현수하였다. 혈관절편의 한쪽 끝은 organ bath의 바닥에 고정시키고 다른 쪽은 force transducer에 연결하여 장력을 측정하고 그 결과를 physiograph (PowerLab, Australia)로 기록하였다.

실험시작 전 혈관절편을 organ bath에서 1시간 안정시킨 후 micromanipulator (Narishige N2, Japan)를 이용하여 피동장력 1 g을 가하고 다시 1시간 안정시킨 다음 실험을 진행하였으며, 연속되는 실험에는 다른 처치 전에 다시 1시간 안정시킨 다음 시행하였다.

## 4. 내피세포 의존성 이완효과와 작용기전 검증

내피세포가 존재하는 혈관절편과 내피세포가 제거된 혈관절편에 phenylephrine(PE,  $5 \times 10^{-6}$  M)을 투여하여 수축을 유발시킨 다음 鎖陽 추출물을 농도별(0.01, 0.03, 0.1 mg/ml)로 투여하여 내피세포의 유무에 따른 이완효과의 변화를 기록하였다.

내피세포 의존성 이완효과의 기전을 검증하기 위하여 내피세포가 존재하는 혈관절편에 PE를 수축을 유발시킨 다음 鎖陽 추출물(0.1 mg/ml)을 투여하여 수축의 변화를 기록하였다. 동일한 혈관절편을 1시간 회복시킨 후 각각 indomethacin (IM,  $10^{-5}$  M), tetraethylammonium chloride(TEA,  $10^{-4}$  M), N $\omega$ -nitro-L-arginine(L-NNA,  $10^{-4}$  M), methylene blue(MB,  $10^{-5}$  M)을 15분간 전처리하고 PE로 수축을 유발시킨 다음 鎖陽 추출물(0.1 mg/ml)을 투여하여 수축의 변화를 기록하여 blocker를 전처리하기 전과 비교하였다.

鎖陽의 혈관이완효과에서  $Ca^{2+}$ 의 관계 여부를 검증하기 위하여  $Ca^{2+}$ -free solution에서 혈관절편을 PE로 수축시킨 후  $Ca^{2+}$ (1 mM)을 투여하여 수축의 변화를 기록하였다. 동일한 혈관절편을 1시간 회복시킨 후 鎖陽 추출물(0.1 mg/ml)을 10분간 전처리하고 PE로 수축시킨 다음  $Ca^{2+}$ (1 mM)을 투여하여 수축의 변화를 기록하여 鎖陽을 전처리하기 전과 비교하였다.

## 5. 세포실험

사람의 제대정맥내피세포인 human umbilical vein endothelial cells(HUVEC)은 Clonetics™ and Poietics™ (Lonza, USA)에서 구입하여 passage 3~7번까지 사용하였으며, 세포

배양을 위해 endothelial cell basal medium-2(EBM-2) bullet kit (Lonza, USA)을 이용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 배양하였다. EBM-2 배지는 사용 전 EGM-2 SingleQuots (10% fetal bovine serum, hydrocortisone, hFGF-B, vEGF, R3-IGF-I, ascorbic acid, hEGF, GA-1000, heparin)을 넣고 잘 섞어서 사용하였다.

70~80%정도 confluent한 세포는 HEPES-buffered saline solution을 주입하여 씻어내고, trypsin/EDTA solution(2 ml)을 넣어 flask에 부착된 세포를 떼어낸 후 trypsin neutralizing solution을 첨가하여 원심분리(220 xg, 5분)하였다. 침전물에 새로운 배지를 넣어서 cell count하여 세포를 96-well plate(5 × 10<sup>3</sup> cells/well)에 심은 다음 24시간 동안 CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다.

1) 세포독성 측정

Endothelial cell basal medium-2(EBM-2) 배지로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 하에서 24시간 배양한 human umbilical vein endothelial cells(HUVEC)에 鎭陽 추출물을 농도별로 처리한 다음 12시간 배양하여 세포생존율을 MTT assay로 측정하였다<sup>21)</sup>. MTT(methylthiazol-2-yl-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide, 5 mg/ml)를 20 μl 넣고, 세포 배양기에서 4시간 방치하였다. 상층액을 제거한 뒤 formazan 침전물은 DMSO를 200 μl씩 넣어 약 15분간 녹였다. 540 nm의 파장에서 ELISA microplate reader로 흡광도를 측정하여 세포생존율을 계산하였다.

2) Nitric oxide 측정

Nitric oxide(NO) 생성 정도는 Griess reaction<sup>22)</sup>에 준하여 microplate reader로 NO 생성의 지표인 배지에 생성된 nitrite 양을 측정하여 결정하였다. 鎭陽 처리 12시간 후에 배양액 50 μl에 Griess reagent(1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylene diamide 및 2.5% 인산)를 동량 혼합하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 550 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다.

Nitrite 양의 측정은 sodium nitrite를 농도별로 조절하여 만든 표준곡선을 이용하여 산출하였고, 생성된 nitrite의 양은 μM로 환산하여 나타내었으며, 각 실험에서 기본 대조군은 세포 배양액을 사용하였다.

6. 통계처리

실험결과는 SPSS 20.0을 사용하여 평균과 표준편차로 나타내었으며, 혈관수축의 변화는 실제 수축의 크기와 PE로 유발된 최고 수축에 대한 백분율로 표현하였다. 실험결과의 비교는 student's t-test를 시행하였고, 유의성은 p < 0.05로 판정하였다.

결 과

1. 鎭陽의 내피세포 의존성 이완효과

鎭陽은 PE로 수축시킨 혈관절편에 대하여 내피세포가 존재

하는 경우는 鎭陽 추출물 0.03, 0.1 mg/ml에서 유의성있는 이완효과를 나타내었으나, 내피세포가 제거된 경우는 유의한 이완효과를 나타내지 않았다(Table 1, Fig. 1).

Table 1. Effects of *Cynomorii Herba* extract on the contraction of arterial smooth muscle with intact endothelium or damaged endothelium induced by PE.

Treatment	Intact endothelium(n=11)		Damaged endothelium(n=6)	
	Contraction(g)	Relaxation(%)	Contraction(g)	Relaxation(%)
PE	1.33 ± 0.21	0	1.31 ± 0.32	0
PE + CH 0.01	1.39 ± 0.19	-4.9 ± 6.5	1.33 ± 0.31	-1.9 ± 1.6
PE + CH 0.03	0.72 ± 0.39***	44.5 ± 29.9	1.35 ± 0.32	-3.0 ± 1.7##
PE + CH 0.10	0.24 ± 0.12***	82.1 ± 8.6	1.35 ± 0.32	-3.5 ± 1.6###

CH extract-induced relaxation was expressed as percentage of PE-contraction. CH, *Cynomorii Herba* extract(mg/ml) ; \*\*\*p < 0.001 compared with PE ; ##p < 0.01, ###p < 0.001 compared with PE + CH in intact endothelium.

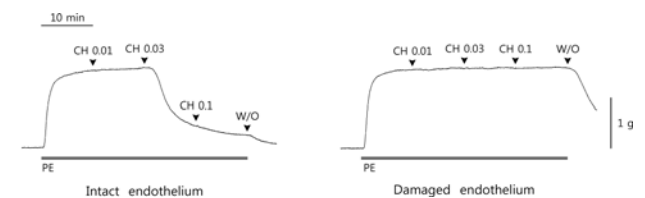


Fig. 1. The concentration-response curve of *Cynomorii Herba* in isolated strips of rabbit arterial smooth muscle precontracted with PE. W/O, wash out or change of bath medium with a solution to which no drug is applied.

2. IM의 전처치가 鎭陽의 혈관이완효과에 미치는 영향

혈관절편을 PE로 수축시키고 鎭陽 추출물을 투여하였을 때, IM을 전처치하지 않은 경우와 IM을 전처치한 경우 모두 유의성 있는 이완효과를 나타내어 IM의 전처치가 鎭陽 추출물의 혈관이완효과에 유의한 영향을 미치지 않았다(Table 2, Fig. 2).

Table 2. Effects of pre-treatment of IM on the endothelium dependent relaxation induced by *Cynomorii Herba* extract.

Treatment	Non treatment of IM		Treatment of IM	
	Contraction(g)	Relaxation(%)	Contraction(g)	Relaxation(%)
PE	1.36 ± 0.12	0	1.17 ± 0.30	0
PE + CH 0.1	0.32 ± 0.13***	76.6 ± 9.4	0.31 ± 0.09***	72.1 ± 9.2

Values are mean ± standard deviation(n=11). CH extract-induced relaxation was expressed as percentage of PE-contraction. CH, *Cynomorii Herba* extract(mg/ml) ; \*\*\*p < 0.001 compared with PE.

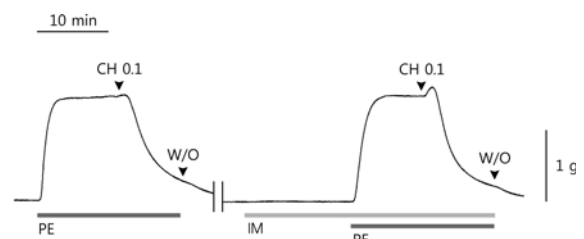


Fig. 2. Effects of pre-treatment of IM on relaxation effects of *Cynomorii Herba* in isolated rabbit arterial smooth muscle.

### 3. TEA의 전처치가 鎭陽의 혈관이완효과에 미치는 영향

혈관절편을 PE로 수축시키고 鎭陽 추출물을 투여하였을 때, TEA를 전처치하지 않은 경우와 TEA를 전처치한 경우 모두 유의성 있는 이완효과를 나타내어 TEA의 전처치가 鎭陽 추출물의 혈관이완효과에 유의한 영향을 미치지 않았다 (Table 3, Fig. 3).

Table 3. Effects of pre-treatment of TEA on the endothelium dependent relaxation induced by *Cynomorii Herba* extract.

Treatment	Non treatment of TEA		Treatment of TEA	
	Contraction(g)	Relaxation(%)	Contraction(g)	Relaxation(%)
PE	1.41 ± 0.22	0	1.50 ± 0.27	0
PE + CH 0.1	0.30 ± 0.10 <sup>***</sup>	77.8 ± 10.0	0.33 ± 0.14 <sup>***</sup>	77.4 ± 11.2

Values are mean ± standard deviation (n=10). CH extract-induced relaxation was expressed as percentage of PE-contraction. CH, *Cynomorii Herba* extract (mg/ml) ; <sup>\*\*\*</sup> p < 0.001 compared with PE.

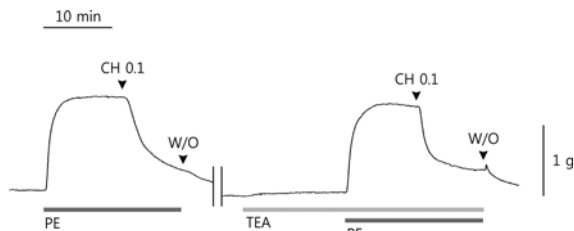


Fig. 3. Effects of pre-treatment of TEA on relaxation effects of *Cynomorii Herba* in isolated rabbit arterial smooth muscle.

### 4. L-NNA의 전처치가 鎭陽의 혈관이완효과에 미치는 영향

혈관절편을 PE로 수축시키고 鎭陽 추출물을 투여하였을 때, L-NNA를 전처치하지 않은 경우는 유의성 있는 이완효과를 나타내었다. 그러나 L-NNA를 전처치한 경우는 유의한 이완효과를 나타내지 않아 L-NNA의 전처치가 鎭陽 추출물의 혈관이완효과를 유의성 있게 억제하였다 (Table 4, Fig. 4).

Table 4. Effects of pre-treatment of L-NNA on the endothelium dependent relaxation induced by *Cynomorii Herba* extract.

Treatment	Non treatment of L-NNA		Treatment of L-NNA	
	Contraction(g)	Relaxation(%)	Contraction(g)	Relaxation(%)
PE	1.49 ± 0.27	0	1.96 ± 0.42	0
PE + CH 0.1	0.37 ± 0.30 <sup>***</sup>	74.6 ± 21.5	1.79 ± 0.52	9.8 ± 12.8 <sup>###</sup>

Values are mean ± standard deviation (n=11). CH extract-induced relaxation was expressed as percentage of PE-contraction. CH, *Cynomorii Herba* extract (mg/ml) ; <sup>\*\*\*</sup> p < 0.001 compared with PE ; <sup>###</sup> p < 0.001 compared with PE + CH in non treatment of L-NNA.

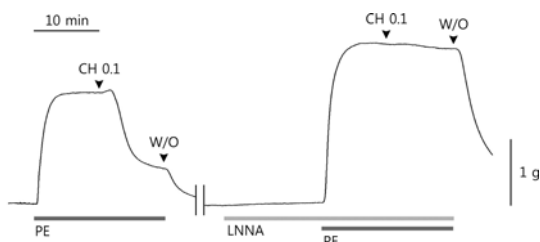


Fig. 4. Effects of pre-treatment of L-NNA on relaxation effects of *Cynomorii Herba* in isolated rabbit arterial smooth muscle.

### 5. MB의 전처치가 鎭陽의 혈관이완효과에 미치는 영향

혈관절편을 PE로 수축시키고 鎭陽 추출물을 투여하였을 때, MB를 전처치하지 않은 경우는 유의성 있는 이완효과를 나타내었다. 그러나 MB를 전처치한 경우는 유의한 이완효과를 나타내지 않아 MB의 전처치가 鎭陽 추출물의 혈관이완효과를 유의성 있게 억제하였다 (Table 5, Fig. 5).

Table 5. Effects of pre-treatment of MB on the endothelium dependent relaxation induced by *Cynomorii Herba* extract.

Treatment	Non treatment of MB		Treatment of MB	
	Contraction(g)	Relaxation(%)	Contraction(g)	Relaxation(%)
PE	1.56 ± 0.31	0	2.27 ± 0.51	0
PE + CH 0.1	0.39 ± 0.23 <sup>***</sup>	74.2 ± 15.0	2.27 ± 0.47	-0.2 ± 2.5 <sup>###</sup>

Values are mean ± standard deviation (n=8). CH extract-induced relaxation was expressed as percentage of PE-contraction. CH, *Cynomorii Herba* extract (mg/ml) ; <sup>\*\*\*</sup> p < 0.001 compared with PE ; <sup>###</sup> p < 0.001 compared with PE + CH in non treatment of MB.

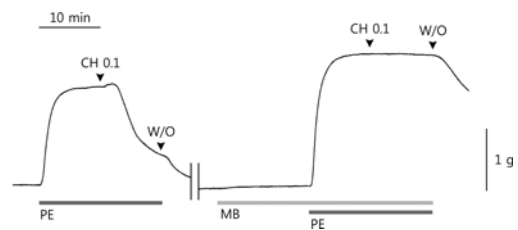


Fig. 5. Effects of pre-treatment of MB on relaxation effects of *Cynomorii Herba* in isolated rabbit arterial smooth muscle.

### 6. 鎭陽의 전처치에 따른 Ca<sup>2+</sup> 의존성 수축의 변화

Ca<sup>2+</sup>이 제거된 상태의 krebs-ringer solution에서 PE로 수축을 유발시킨 후 Ca<sup>2+</sup> 1 mM을 투여하였을 때 1.17 ± 0.24 g의 수축을 나타내었으나, 鎭陽을 전처치한 다음 PE로 수축을 유발시킨 후 Ca<sup>2+</sup> 1 mM을 투여하였을 때는 0.34 ± 0.31 g의 수축을 나타내어 鎭陽 추출물은 Ca<sup>2+</sup> 유입에 따른 수축의 증가를 유의성 있게 억제하였다 (Table 6, Fig. 6).

Table 6. Effects of pre-treatment of *Cynomorii Herba* on calcium-induced contraction of arterial strip in calcium free media.

Treatment	Non treatment of CH 0.1	Treatment of CH 0.1
	Contraction(g)	Contraction(g)
PE	0.49 ± 0.11	0.17 ± 0.16
PE + Ca	1.17 ± 0.24	0.34 ± 0.31 <sup>###</sup>

Values are mean ± standard deviation (n=6). CH, *Cynomorii Herba* extract (mg/ml) ; Ca, calcium chloride 1 mM ; <sup>###</sup> p < 0.001 compared with PE + Ca in non treatment of CH.

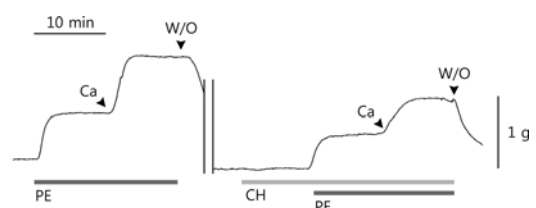


Fig. 6. Effects of pre-treatment of *Cynomorii Herba* on calcium-induced contraction of arterial strip in calcium free media.

### 7. 鎭陽의 세포독성 측정

Human umbilical vein endothelial cell(HUVEC)에 鎭陽 추출물을 농도별로 12시간 처치한 후 MTT assay를 통해 세포 생존율을 측정된 결과 鎭陽 추출물의 농도 0.1, 0.3, 0.5, 1 mg/ml에서 모두 세포 생존율에 변화가 없었다(Fig. 7).

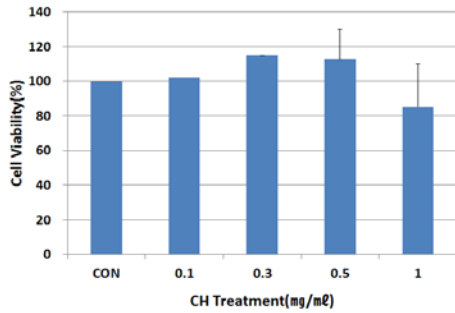


Fig. 7. Effects of *Cynomorii Herba* extract on the viability of human umbilical vein endothelial cell(HUVEC). Representative bars are shown as the cell viability in HUVEC treated with CH extract(0.1, 3, 5 and 1 mg/ml) for 12 hr at 37°C. CH, *Cynomorii Herba* extract.

### 8. 鎭陽이 NO의 생성에 미치는 영향

Human umbilical vein endothelial cell(HUVEC)에 鎭陽 추출물을 농도별로 12시간 처치한 후 NO 량을 측정하였을 때 control에서 측정된 NO 량인  $4.80 \pm 0.01 \mu\text{M}$ 에 비하여 鎭陽 추출물 1 mg/ml의 농도에서  $5.55 \pm 0.12 \mu\text{M}$ 의 NO가 측정되어 유의성 있는 증가를 보였다(Fig. 8).

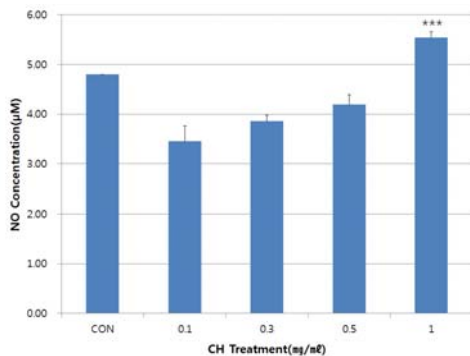


Fig. 8. Effects of *Cynomorii Herba* extract on nitric oxide concentration in human umbilical vein endothelial cell(HUVEC). Representative bars are shown as the nitric oxide concentration in HUVEC treated CH extract(0.1, 3, 5 and 1 mg/ml) for 12 hr at 37°C. CH, *Cynomorii Herba* extract ; NO, nitric oxide ; \*\*\*  $p < 0.001$  compared with Control

## 고찰

고혈압은 혈관에 미치는 압력이 지속적으로 높아진 상태로 수축기 혈압 140mmHg이상, 이완기 혈압 90 mmHg 이상으로 정의하고 있다. 또한 수축기와 이완기 혈압이 각각 140-159 mmHg, 90-99 mmHg일 때를 1도 고혈압, 160-179 mmHg, 100-109 mmHg일 때를 2도 고혈압, 180 mmHg 이상, 110 mmHg 이상일 때를 3도 고혈압으로 분류한다<sup>23)</sup>.

고혈압은 크게 본태성 고혈압과 이차성 고혈압으로 구분한다. 본태성 고혈압은 전체 고혈압 환자의 80~90% 이상을 차지하고 있으며 정확한 발병원인이 밝혀지지 않았고 이차성 고혈압은 신장과 심장, 내분비 등의 이상으로 발생한다<sup>24)</sup>.

혈압을 결정하는데 중요한 두 인자는 심박출량과 총 말초저항인데, 총 말초저항은 동맥혈관 반지름의 영향을 받고 반지름의 크기는 혈관내피세포에 의해 영향을 받는다<sup>24)</sup>. 혈관내피세포는 혈관평활근의 증식과 이동 등을 조절할 뿐만 아니라 혈관의 이완과 수축을 조절하는 중요한 인자로, NO, PGI<sub>2</sub>, EDHF 등을 분비하여 혈관을 이완시켜서 혈압을 하강시키거나 endothelin 등을 분비하여 혈관을 수축시켜서 혈압을 상승시키는 등 혈압의 조절에 관여한다<sup>17-20)</sup>.

NO는 L-arginine로부터 산화질소 합성효소(nitric oxide synthase, NOS)에 의해 합성되는 물질로 혈관에는 총 3가지 종류의 NOS가 존재하며 그 중 하나인 혈관내피세포 유래 산화질소 합성효소(eNOS)에 의해 생성된 NO는 혈관 평활근으로 이동하여 soluble guanylate cyclase(sGC)를 활성화하고 cyclic guanosin-3,5-monophosphate(cGMP)의 생성을 증가시키는데 혈관 평활근 내 cGMP의 농도가 증가되면 세포내의 칼슘 농도가 감소하고 이로 인해 혈관은 이완된다<sup>25,26)</sup>.

PGI<sub>2</sub>는 arachidonic acid로부터 cyclooxygenase(COX)에 의하여 생성되고 생성된 PGI<sub>2</sub>가 cAMP의 생성을 증가시켜 혈관이완 작용을 하며<sup>27)</sup>, EDHF는 세포막의 K<sup>+</sup> 통로를 열어 세포막 칼륨 유출의 증가로 과분극을 초래하여 혈관이완 작용을 한다<sup>28,29)</sup>.

鎭陽은 補腎壯陽하는 효능으로 인하여 陽痿증상을 치료하며 精液의 遺泄을 固精하는 효능이 있어 鎭陽이라 불리며 2) 補陽처방과 肝腎虛弱으로 인한 下肢痿軟 증상의 치료 처방에 사용되고 있다<sup>30)</sup>. 또한 鎭陽의 성분으로 밝혀진 ursolic acid는 NO를 매개로 한 혈관내피세포 의존성 이완효과를 나타낸다는 보고가 있다<sup>10)</sup>.

따라서 鎭陽의 구성 성분 중의 하나인 ursolic acid가 NO를 매개로 한 혈관내피세포 의존성 이완효과가 있기에, 鎭陽 추출물이 직접 혈관 긴장성 조절에 영향을 미칠 가능성이 있을 것으로 예상되어 저자는 鎭陽의 혈관이완효과에 대해 알아보기 위해 내피세포 의존성 이완인자를 중심으로 organ bath study를 시행하였다.

PE로 수축시킨 혈관절편에 대하여 내피세포가 존재하는 경우는 鎭陽 추출물 0.03, 0.1 mg/ml에서 유의성있는 이완효과를 나타내었으나, 내피세포가 제거된 경우는 이완효과가 억제된 것으로 나타났다. 따라서 鎭陽 추출물은 수축된 혈관에 대한 이완효과가 있으며, 혈관이완효과는 내피세포 의존성인 것으로 밝혀졌다.

鎭陽의 혈관내피세포 의존성 이완효과와 내피세포에서 유리되는 이완인자와의 상관성을 규명하고자 이완인자의 작용을 차단시키는 blocker를 사용하여 organ bath study를 시행하였다.

IM과 TEA를 전처치한 후 혈관절편을 PE로 수축시키고 鎭陽 추출물을 투여하였을 때, 鎭陽 추출물의 혈관이완효과는 IM과 TEA에 유의한 영향을 받지 않았다.

IM은 prostacyclin의 생성을 방해하는 비 선택성 COX 억제제<sup>31)</sup>이고, TEA는 K<sup>+</sup>의 유출에 관여하여 과분극을 억제함으로써 EDHF의 작용을 차단시키는 칼륨 통로 억제제<sup>32)</sup>로,

IM과 TEA의 전처치에 鎖陽 추출물의 혈관이완효과가 영향을 받지 않았다는 실험결과를 통해 鎖陽의 내피세포의존성 혈관이완효과는 prostacyclin과 EDHF의 작용과는 무관하다는 것을 알 수 있다.

L-NNA와 MB를 전처치한 후 혈관절편을 PE로 수축시키고 鎖陽 추출물을 투여하였을 때, 鎖陽 추출물의 혈관이완효과는 L-NNA와 MB의 전처치로 유의성 있게 억제되었다.

L-NNA는 NOS 억제제<sup>33)</sup>로 혈관내피세포에서 NO의 생성을 차단시키고 혈관평활근에서 cGMP의 활성을 억제하는 것으로 알려져 있다<sup>34,35)</sup>. 본 실험에서 L-NNA를 전처치하여 NO의 생성을 차단하였을 때 鎖陽의 혈관이완효과가 억제된 결과는 鎖陽이 NO를 매개로 하여 효과를 나타낸다는 것을 의미한다.

또한 MB는 sGC 억제제<sup>36)</sup>로 NO가 혈관평활근에 작용하여 cGMP를 활성화시키는 경로를 억제하는 것으로 알려져 있다<sup>37)</sup>. 본 실험에서 MB를 전처치하여 cGMP의 활성을 억제하였을 때 鎖陽의 혈관이완효과가 억제된 결과는 鎖陽이 cGMP의 활성화를 통하여 효과를 나타낸다는 것을 의미한다.

이를 종합하면 鎖陽이 혈관내피세포에서 NOS의 활성화를 통하여 NO를 생성시키고, NO가 다시 평활근에서 cGMP를 활성화시키는 NO-cGMP 경로를 통하여 혈관이완효과를 나타낸다는 것을 알 수 있다.

또한 鎖陽 추출물을 HUVEC에 처치하였을 때 NO 생성량이 유의하게 증가되는 결과를 나타내었다. 이는 organ bath study에서 밝혀진 바와 같이 鎖陽이 NO 생성을 통하여 혈관이완효과를 나타낸다는 것과 동일한 결과로 생각된다.

단, organ bath study와 cell study에서 효과를 나타내는 쇄양의 농도에 차이를 보이는 점은 organ bath study는 생체 조직에서 10분 이내에 나타난 변화로 NO 이외의 다른 이완인자의 작용이 있을 가능성도 완전히 배제할 수는 없고, cell study는 배양된 세포에 12시간 약물 처리 후 나타난 NO의 변화만 측정할 것으로 약물 처리 시간에 따라 차이를 나타낼 가능성도 있다고 생각된다. 따라서 생체 조직과 배양한 cell에서의 NO 생성에 관계되는 환경조건이 다른 점을 고려할 필요가 있는 것으로 생각된다.

혈관 평활근의 세포막 전위는 주로  $Ca^{2+}$ 과  $K^+$  이온의 유출과 유입에 의하여 조절되고 이러한 세포막 전위에 의해 혈관의 긴장도가 조절된다. 그 중 평활근의 수축과 이완에서 가장 중요하고 기본적인 요소는  $Ca^{2+}$ 이며, 세포내  $Ca^{2+}$ 의 농도가 증가하게 되면 calmodulin과 결합한 calcium-calmodulin이 myosin light chain의 인산화를 촉진하여 혈관이 수축된다<sup>38,39)</sup>.

본 실험에서  $Ca^{2+}$ 의 유입에 따른 鎖陽 추출물의 작용을 알아보기 위해  $Ca^{2+}$ 이 제거된 상태의 krebs-ringer solution에서 PE로 수축을 유발시키고  $Ca^{2+}$  1 mM의 투여에 따른 수축의 크기를 鎖陽의 전처치 유무에 따라 비교해보았다. 그 결과 鎖陽을 전처치하였을 때  $Ca^{2+}$ 의 유입에 따른 수축의 증가가 감소하였으며 이러한 결과로 鎖陽 추출물이 세포외로부터의  $Ca^{2+}$  유입을 차단하여 혈관을 이완시킨다는 사실을 알 수 있다.

위의 실험결과를 종합해보면, 鎖陽 추출물은 혈관내피세포에서 NO의 생성을 증가시키고, 생성된 NO가 혈관평활근 내 cGMP를 증가시키는 NO-cGMP계 활성화를 통하여 세포의

$Ca^{2+}$  유입을 차단함으로써 내피세포 의존성으로 혈관이완효과를 나타낸다는 것을 알 수 있다. 또한 鎖陽은 혈관확장작용을 통하여 혈관저항을 감소시킴으로써 혈압강화작용에 기여할 수 있으므로 고혈압의 치료약물로 활용할 가능성이 있는 약물로 생각된다.

## 결론

鎖陽 추출물의 혈관이완효과를 알아보기 위하여 내피세포에서 분비되는 혈관이완인자를 중심으로 organ bath study를 진행하였으며 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. PE로 수축시킨 혈관절편에 대하여 내피세포가 존재하는 경우는 鎖陽 추출물 0.03, 0.1 mg/ml에서 유의성있는 이완효과가 관찰되었으나, 내피세포가 제거된 경우는 유의한 이완효과가 관찰되지 않았다.
2. 혈관절편을 PE로 수축시키고 鎖陽 추출물을 투여하였을 때, IM과 TEA의 전처치는 鎖陽 추출물의 혈관이완효과에 유의한 영향을 미치지 않았다.
3. 혈관절편을 PE로 수축시키고 鎖陽 추출물을 투여하였을 때, L-NNA와 MB의 전처치는 鎖陽 추출물의 혈관이완효과를 유의성 있게 억제하였다.
4.  $Ca^{2+}$ 이 제거된 상태의 krebs-ringer solution에서 PE로 수축을 유발시키고  $Ca^{2+}$  1 mM를 투여하였을 때, 鎖陽의 전처치에 의해  $Ca^{2+}$ 의 유입에 따른 수축의 증가가 감소되었다.
5. HUVEC에 鎖陽 추출물을 농도별로 처치한 후 NO량을 측정하였을 때, 1 mg/ml의 농도에서 NO량은 유의하게 증가되었다.

이상의 결과로 鎖陽 추출물은 NO-cGMP계 활성화를 통하여 세포의  $Ca^{2+}$ 의 유입을 차단함으로써 혈관을 이완시키는 것으로 생각된다.

## 감사의 글

이 논문은 2015학년도 세명대학교 교내학술연구비 지원에 의해 수행된 연구임

## References

1. State Administration of Traditional Chinese medicine, Herbiology in Chinese medicine, 1st, Shanghai : Shanghai Science Technology Publisher company, 1999 : 722-4,
2. Seo BI, Jung KY. Easy Herbiology, 1st, Daegu : Daegu hani University press, 2007 : 415-6, 425-6,

3. Zhang SJ, Wang YW, Liu L, Yu JY, Hu JP. Studies on chemical constituents of herba cynomorii. *Zhong Yao Cai*. 2007 ; 42(13) : 975-7.
4. Choi HS. The efficacy of *Cynomorii herba* and *Eucommiae cortex* on treatment of osteoporosis in ovariectomized rats. *Kor J Herbol*. 2008 ; 23(2) : 19-24.
5. Chang MS, Yang WM, Kim DR, Park EH, Park SY, Park SK. Antioxidant effect of *cynomorii Herba* on HepG2 cells and diphenyl-picryl-hydrazyl(DPPH) radical scavenging activity. *Herbal Formula Sci*. 2007 ; 15(2) : 139-45.
6. Choi EM, Lee JM, Lee CH, Cho JH, Jang JB, Lee KS. Administration duration dependent effects of *Cynomorii* herbs extract solution on the reproductive capacities in the mice. *J Orient Obstet Gynecol*. 2007 ; 20(1) : 16-31.
7. Han JY, Lee CH, Cho JH, Jang JB, Lee KS. Effects of *Cynomorii herba* extract solution on reproductive capacities in Mice. *J Orient Obstet Gynecol*. 2006 ; 19(2) : 62-76.
8. Saponara S, Testai L, Iozzi D, Martinotti E, Martelli A, Chericoni S, Sgaragli G, Fusi F, Calderone V. (+/-)-Naringenin as large conductance  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$ (BK<sub>Ca</sub>) channel opener in vascular smooth muscle cells. *Br J Pharmacol*. 2006 ; 149(8) : 1013-21.
9. Ahn DS, Kim YB, Lee YH, Kang BS, Kang DH. Fatty acids directly increase the activity of  $Ca^{2+}$ -activated  $K^+$  channels in rabbit coronary smooth muscle cells. *Yonsei Med J*. 1994 ; 35(1) : 10-4.
10. Aguirre-Crespo F, Vergara-Galicia J, Villalobos-Molina R, Javier López-Guerrero J, Navarrete-Vázquez G, Estrada-Soto S. Ursolic acid mediates the vasorelaxant activity of *Lepechinia caulescens* via NO release in isolated rat thoracic aorta. *Life Sci*. 2006 ; 79(11) : 1062-8.
11. Emile A, Andrei LK, Bernard M, Alain B, Jean CS, Ramarosan A. Nitric oxide production and endothelium-dependent vasorelaxation induced by wine polyphenols in rat aorta. *Br J Pharmacol*. 1997 ; 120(6) : 1053-8.
12. Navala R, Korpela R, Vapaatalo H. Plant derived estrogens relax rat mesenteric artery in vitro. *Life Sci*. 1998 ; 63(6) : 95-100.
13. Seoul national university college of medicine. *Cardiology*. 1st. Seoul : Seoul national university press. 1987 : 207-11.
14. Gross F, Robertson JIS. *Arterial Hypertension* 5. 1st. Boston : G.K. Hall&Co. 1980 : 1-6.
15. Levi R. Therapies for perioperative hypertension: pharmacodynamic considerations. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl*. 1993 ; 99 : 16-9.
16. Bosnjak ZJ. Ion channels in vascular smooth muscle. *Physiology and pharmacology. Anesthesiology*. 1993 ; 79(6) : 1392-401.
17. Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. *Br J Pharmacol*. 1990 ; 101(3) : 746-52.
18. Vane JR, Anggard EE, Botting RM. Regulatory functions of the vascular endothelium. *N Engl J Med*. 1990 ; 323(1) : 27-36.
19. Luscher TF. The endothelium as a target and mediator of cardiovascular disease. *Eur J Clin Invest*. 1993 ; 23(11) : 670-85.
20. Stankevicius E, Kevelaitis E, Vainorius E, Simonsen U. Role of nitric oxide and other endothelium-derived factors. *Medicina(Kaunas)*. 2003 ; 39(4) : 333-41.
21. Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: Assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res*. 1987 ; 47(4) : 936-42.
22. Tracey WR, Linden J, Michae IJP, Roger AJ. Comparison of spectrophotometric and biological assay for nitric oxide and endothelium-derived relaxing factor(EDRF) : Neurospecificity of the diazotiazation reaction for NO and failure to detect EDRF. *J Pharmacol Exp Ther*. 1990 ; 252(3) : 922-8.
23. Withworth JA. 2003 World Health Organization (WHO)/International Society of Hypertension (ISH) statement on management of hypertension. *J Hypertens*. 2003 ; 21(11) : 1983-92.
24. Lauralee Sherwood. *Human physiology*. 7th. Seoul : Life Science. 2011 : 374-81.
25. Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1991 ; 43(2) : 109-42.
26. Arnaol WP, Mittal CK, Katsuki S, Murad F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increases guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977 ; 74(8) : 3203-7.
27. Hutcheson IR, Griffith TM. Central role of intracellular calcium stores in acute flow- and agonist-evoked endothelial nitric oxide release. *Br J Pharmacol*. 1997 ; 122(1) : 117-25.
28. Chen G, Yamamoto Y, Miwa K, Suzuki H. Hyperpolarization of arterial smooth muscle induced by endothelial humoral substances. *Am J Physiol*. 1991 ; 260(6/2) : H1888-92.
29. Nagao T, Fujishima M, Vanhoutte PM. Hyperpolarization as a mechanism for endothelium-dependent relaxations in the porcine coronary artery. *Jpn J Pharmacol*. 1992 ; 28(2) : 342.

30. Park SG, Kim YK, Oh MS. Study of prescription and formulation, 1st. Seoul : Younglim press, 2006 : 210-2.
31. Sharma NR, Davis MJ. Substance P-induced calcium entry in endothelial cells is secondary to depletion of intracellular stores. *Am J Physiol*, 1995 ; 268(3/2) : H962-73.
32. Ko FN, Huang TF, Teng CM. Vasodilatory action mechanisms of apigenin isolated from *Apium graveolens* in rat thoracic aorta. *Biochim Biophys Acta*, 1991 ; 1115(1) : 69-74.
33. Mori A, Cohen BD, Koide H. Guanidines 2. 1st. Newyork : Plenum Press, 1989 : 118-22.
34. Ignarro LJ, Gold ME, Buga GM, Byrns RE, Wood KS, Chaudhuri G, Frank G. Basic polyamino acids rich in arginine, lysine, or ornithine cause both enhancement of and refractoriness to formation of endothelium-derived nitric oxide in pulmonary artery and vein. *Circ Res*, 1989 ; 64(2) : 315-29.
35. Marczin N, Ryan US, Catravas JD. Endothelial cGMP does not regulate basal release of endothelium-derived relaxing factor in culture. *Am J Physiol*, 1992 ; 263(1/1) : 113-21.
36. Ignarro LJ, Bush PA, Buga GM, Wood KS, Fukuto JM, Rajfer J. Nitric oxide and cyclic GMP formation upon electrical field stimulation cause relaxation of corpus cavernosum smooth muscle. *Biochem Biophys Res Commun*, 1990 ; 170(2) : 843-50.
37. Kelm M, Feelisch M, Krebber T, Deussen A. Role of nitric oxide in the regulation of coronary vascular tone in hearts from hypertensive rats: maintenance of nitric oxide-forming capacity and increased basal production of nitric oxide. *Hypertension*, 1995 ; 25(2) : 186-93.
38. Karaki H, Ozaki H, Hori M, Mitsui-Saito M, Amano K, Harada K, Miyamoto S, Nakazawa H, Won KJ, Sato K. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol Rev*, 1997 ; 49(2) : 157-230.
39. Lemos VS, Freitas MR, Muller B, Lino YD, Queiroga CE, Cortes SF. Dioclein, a new nitric oxide- and endothelium-dependent vasodilator flavonoid. *Eur J Pharmacol*, 1999 ; 386(1) : 41-6.