

산수유의 혈관이완효과 기전에 대한 연구

김형준 · 박선영¹ · 김태연^{2*}

세명대학교 한의과대학 부인과학교실, 1: 생리학교실, 2: 예방의학교실

Mechanism of Corni Fructus Induced Vasorelaxation in Rabbit Carotid Artery

Hyung Jun Kim, Sun Young Park¹, Tae Yeon Kim^{2*}

Department of Gynecology, 1: Department of Physiology,
2: Department of Preventive Medicine, College of Korean Medicine, Semyung University

This study is conducted to investigate vasorelaxant effect of Corni Fructus(CF) on rabbit carotid artery. To determine vasorelaxant effect of CF on rabbit carotid artery, arterial sections with intact or removed endothelium were used in this organ bath study. After being contracted by phenylephrine(PE), arterial sections were treated with CF extract in a dose-dependent manner. To identify its mechanism, the contracted arterial sections by PE were pretreated with indomethacin(IM), tetraethylammonium chloride(TEA), N ω -nitro-L-arginine(L-NNA) or methylene blue(MB) and 1.0 mg/mL CF extract. We also studied to confirm the effect on influx of extracellular calcium chloride(Ca²⁺) of the CF extract in rabbit carotid artery. To measure the cytotoxicity of the CF extract, cell viability of human umbilical vein endothelial cell(HUVEC) was measured by MTT assay. Generation of nitric oxide(NO) was also measured by Griess reagent. The arterial sections with intact endothelium were relaxed significantly by CF extract, but this effect was inhibited in the arterial sections with damaged endothelium. The vasorelaxant effect was inhibited significantly when arterial sections were pretreated with IM, TEA, L-NNA, MB. In Ca²⁺-free krebs solution, increasing of arterial contraction by Ca²⁺ was also inhibited by CF significantly. The treatment of CF extract increased NO concentration in HUVEC. This study suggested that the vasorelaxant effect of CF extract would be related with endothelium derived relaxing factor(EDRF) such as NO, prostacyclin(PGI₂), endothelium derived hyperpolarization factor(EDHF).

keywords : Corni Fructus(CF), Vasorelaxant effect, Organ bath study, Nitric oxide(NO)

서 론

2014년 우리나라 전체 사인의 10%를 차지한 고혈압성 질환은 우리나라 10대 사인 중 하나이다¹⁾. 고혈압의 사망률은 2013년도에 비하여 6.5% 증가하였고, 30세 이상 성인의 유병률 또한 2007년 24.6%에서 2012년 29.0%로 증가하여²⁾ 만성질환 중 높은 유병률을 갖고 있으며 치료가 적절히 시행되지 않을 경우 암과 더불어 3대 사망원인에 속하는 뇌심혈관계 질환과 같은 심각한 합병증을 초래하므로 국가적인 관리가 요구되는 매우 중요한 질환이다³⁾.

혈관내피세포는 혈관의 항상성을 유지하는 중요한 자가분비(autocrine), 주변분비(paracrine) 기관으로 혈관의 확장과 수축, 혈관 평활근 세포의 증식과 이주를 조절하며, 혈전의 생성과 억제에 관여한다^{4,5)}. 고혈압은 내피세포 기능부전의 대표적인 질환으로 명명되는데, 이는 고혈압 환자에게서 관찰되는 내피세포 기능부전

에 따른 혈관 이완장애가 심혈관계 질환에서 수반되는 혈관 내벽의 죽상동맥경화 발생에 선행하는 중요한 소견이 되기 때문이다^{6,7)}.

내피세포에서 분비되어 혈관을 확장시키는 물질인 endothelium derived relaxing factor(EDRF)에는 대표적으로 nitric oxide(NO), prostacyclin(PGI₂), endothelium derived hyperpolarization factor(EDHF)가 있으며 이들 인자들은 각기 다른 기전으로 혈관을 이완시킨다. Endothelial nitric oxide synthase(eNOS)에 의해 혈관내피세포에서 합성되는 NO는 혈관 평활근 내의 cyclic guanosine monophosphate(cGMP)를 증가시켜 세포내 Ca²⁺ 농도 감소로 인한 혈관 이완 작용을 유도한다⁸⁾. Arachidonic acid로부터 cyclooxygenase에 의해 생성되는 물질인 PGI₂는 혈관 평활근에서 cyclic adenosine-3', 5'-monophosphate(cAMP)를 활성화시키고⁹⁾, EDHF는 calcium-activated potassium channels의 활성화로 막전압을 과

* Corresponding author

Tae Yeon Kim, Department of Preventive Medicine, College of Korean Medicine, Semyung University, 65, Semyung-ro, Jecheon-si, Chungcheongbuk-do, Korea

E-mail : violet805@hanmail.net · Tel : +82-43-649-1339

Received : 2016/02/04 · Revised : 2016/03/28 · Accepted : 2016/03/29

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 <http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2016.04.30.2.101>

Available online at <http://www.hantopic.com/kjopp/KJOPP.htm>

분극시켜 혈관을 이완시킨다^{10,11}).

산수유(Corni Fructus)는 층층나무과(Cornaceae)에 속한 낙엽소교목인 산수유나무(Cornus officinalis Sieb. et. Zucc.)의 성숙한 과실을 건조한 것이다. 미온(微溫), 산삼(酸澁)하고 간신(肝腎)으로 귀경(歸經)하며 보익간신(補益肝腎), 삼정고탈(澀精固脫)의 효능이 있어 이명(耳鳴), 현훈(眩暈), 요슬산통(腰膝酸痛), 양위(陽痿), 유정(遺精), 뇨의빈삭(尿意頻數), 유뇨(遺尿), 붕루(崩漏), 대하(帶下), 내열소갈(內熱消渴), 대한허탈(大汗虛脫) 등을 치료한다¹². 산수유의 주성분은 triterpene 계열인 saponin, ursolic acid, stearic acid, linolenic acid, palmitic acid, oleic acid, morroniside, loganin, valine, tyrosine 등이 알려져 있으며¹³, 생리활성으로 혈관이완¹⁴, 항알리지¹⁵, 골다공증¹⁶, 간 보호¹⁷, 항산화^{18,19}, 항당뇨¹⁹, 항염증²⁰ 등의 효과 및 산수유를 포함한 복합제에서의 발기능 개선 효과가 보고되었다²¹⁻²⁴. 이처럼 산수유의 효과에 대하여 많은 연구가 진행되고 있으나 산수유의 혈관이완효과에 대한 직접적 작용 및 기전에 관한 연구는 미흡한 실정이다.

이에 저자는 토끼의 경동맥 적출혈관을 이용한 organ bath study를 통하여 혈관내피세포에서 분비되는 NO 및 prostacyclin, EDHF를 중심으로 한 산수유의 혈관이완효과에 대한 연구를 진행함으로써 유의한 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험동물

체중 2 kg 내외의 New Zealand white 수컷 토끼(שמ타코, 한국)를 사용하였으며, 고히사료와 물을 자유롭게 충분히 섭취하도록 하면서 1주 이상 실험실 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 본 동물 실험은 세명대학교 동물실험윤리위원회의 승인(smeac 14-10-02) 하에 실시되었다.

2. 산수유 추출물 제조

산수유(Corni Fructus, CF) 200 g을 증류수 2000 mL과 함께 round flask에 넣은 다음 3시간 동안 가열 추출하였다. 추출액은 rotary evaporator(Eyela, Japan)로 감압 농축한 다음 동결건조기로 건조하여 얻은 36.4 g의 산수유 추출 분말을 사용하였다.

3. 혈관이완효과 측정

1) 실험절편의 제작

토끼를 chloral hydrate(0.6 g/kg, 정맥주사)로 마취한 다음 경부를 절개하여 경동맥을 적출한 즉시 4°C의 modified krebs-ringer bicarbonate solution(NaCl 125.4, KCl 4.9, CaCl₂ 2.8, MgSO₄ 1.2, NaHCO₃ 15.8, KH₂PO₄ 1.2, glucose 12.2 mM, pH 7.4)에 담았다. 경동맥은 주위의 지방 조직을 제거하였고, 2 mm 길이의 횡으로 절단한 환형의 실험절편을 제작하였다.

실험절편은 내피세포가 부착된 실험절편과 내피세포가 제거된 실험절편으로 구분하여 제작하였고, 내피세포는 가는 슝 막대로 문질러 제거하였다.

2) 등장성 수축 측정

실험절편은 5%의 CO₂와 95%의 O₂ 혼합가스로 포화된 37°C modified krebs-ringer bicarbonate solution이 peristaltic pump를 통과하여 3 mL/min의 속도로 흐르는 organ bath(용량 1.5 mL)에 현수하였다. 실험절편은 한쪽을 force transducer에, 다른 한쪽은 organ bath의 바닥에 고정된 후 장력을 측정하였고, 수축 변화는 physiograph(PowerLab, Australia)를 이용하여 기록하였다.

실험 시작 전 organ bath에서 1시간 동안 실험절편을 안정시킨 후에 micromanipulator(Narishige N2, Japan)를 이용하여 피동장력 1 g을 가하였으며, 다시 1시간 동안 안정시킨 다음 실험을 진행하였다. 연속되는 실험의 경우에는 후속 처치 전 다시 1시간 동안 안정시킨 후 진행하였다.

3. 내피세포 의존성 이완효과와 작용기전 검증

내피세포 부착 실험절편과 내피세포 제거 실험절편에 모두 phenylephrine(PE, 5×10⁻⁶ M)을 투여하여 수축을 유발시킨 다음 산수유 추출물을 농도별(0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0 mg/mL)로 투여하여 내피세포 존재 여부에 따른 혈관의 수축 변화를 기록하였다.

내피세포 의존성 이완효과의 기전을 확인하기 위하여 내피세포 부착 실험절편에 PE를 투여하여 수축을 유발시킨 후 산수유 추출물(1.0 mg/mL)을 투여하여 이완효과 변화를 기록하였다. 동일 실험절편을 1시간 동안 회복시킨 다음 blocker로 작용하는 indomethacin(IM, 10⁻⁵ M), tetraethylammonium chloride(TEA, 10⁻⁴ M), Nω-nitro-L-arginine(L-NNA, 10⁻⁴ M), methylene blue(MB, 10⁻⁵ M)을 각각 15분 동안 전처치하고 PE로 수축을 유발시킨 후 산수유 추출물(1.0 mg/mL)을 투여하였을 때의 이완효과 변화를 기록하여 blocker 전처치 전후를 비교하였다.

산수유의 혈관이완효과가 Ca²⁺의 유입 기전과 관련되어 있는지를 확인하기 위하여 Ca²⁺-free solution에서 PE로 수축시킨 실험절편에 Ca²⁺(1 mM)을 투여하여 수축의 변화를 측정하였다. 동일 실험절편을 1시간 동안 회복시킨 다음 산수유 추출물(1.0 mg/mL)을 10분간 전처치하고 다시 PE로 수축시킨 후 Ca²⁺(1 mM)을 투여하였을 때의 수축 변화를 기록하여 산수유 전처치 전후의 수축 변화를 비교하였다.

4. 세포실험

사람의 제대정맥내피세포인 human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)은 Clonetics™ and Poietics™ (Lonza, USA)에서 구입하여 passage 3~7번까지 사용하였으며, 세포배양을 위하여 endothelial cell basal medium-2(EBM-2) bullet kit(Lonza, USA)를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 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)를 넣고 잘 섞어 사용하였다. 70~80%정도 confluent한 세포는 HEPES-buffered saline solution을 주입하여 세척하고, trypsin/EDTA solution(2 mL)을 넣어 flask에 부착된 세포를 떼어낸 다음 trypsin neutralizing solution을 첨가한 후 원심분리(220 x g, 5분) 하였

다. 침전물을 새로운 배지에 넣고 cell count하여 세포를 96-well plate(5×10^3 cells/well)에 심은 후 24시간 동안 CO₂ incubator에서 배양하였다.

1) 세포독성 측정

EBM-2 배지로 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양한 HUVEC에 산수유 추출물을 농도별로 처리하고 12시간 배양한 후 MTT assay로 세포생존율을 측정하였다. 각 well 당 MTT(methylthiazol-2-yl-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide, 5 mg/ml)를 20 µl 넣고, 세포 배양기에서 4시간 동안 방치하였다. 상층액을 제거한 후 formazan 침전물에 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 reaction에 의거하여 배지에 생성된 nitrite 양을 NO 생성 지표로서 삼아 측정하였다. 산수유를 농도별로 처리한 뒤 12시간 배양하고 배양액 50 µl에 Griess reagent(1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylene diamide 및 2.5% 인산)를 동량 혼합하여 실온에서 10분간 반응시킨 다음 550 nm의 파장에서 ELISA microplate reader로 흡광도를 측정하였다. Nitrite 양은 농도별로 조제한 sodium nitrite를 serial dilution 한 후 흡광도를 측정하여 얻은 표준곡선을 이용하여 산출하였고, 생성된 nitrite의 양은 µM로 환산하여 표기하였으며, 각 실험의 기본 대조군으로 세포 배양액을 사용하였다.

5. 통계처리

실험결과는 평균과 표준편차로 나타내었다. 실험결과 간 상호 비교는 sigma plot 4.1을 이용하여 Student's t-test를 시행하였고, 유의성은 p<0.05로 판단하였다.

결 과

1. 산수유의 내피세포 의존성 이완효과

산수유는 PE-수축 실험절편에 대하여 내피세포가 존재하는 경우 0.1, 0.3, 1.0 mg/ml의 농도에서 유의성 있는 이완효과를 나타내었으나, 내피세포가 제거된 경우 유의한 이완효과를 나타내지 않았다(Table 1, Fig. 1).

2. IM의 전처치가 산수유의 혈관이완효과에 미치는 영향

PE-수축 실험절편에 산수유 추출물을 투여하였을 때, IM을 전처치하지 않은 경우와 IM을 전처치한 경우 모두 유의성 있는 이완효과를 나타내었다. 그러나 IM을 전처치한 경우가 전처치하지 않은 경우에 비하여 산수유 추출물의 혈관이완효과가 유의성 있게 억제되었다(Table 2, Fig. 2).

3. TEA의 전처치가 산수유의 혈관이완효과에 미치는 영향

PE-수축 실험절편에 산수유 추출물을 투여하였을 때, TEA를 전처치하지 않은 경우와 TEA를 전처치한 경우 모두 유의성 있는 이완효과를 나타내었다. 그러나 TEA를 전처치한 경우가 전처치하

지 않은 경우에 비하여 산수유 추출물의 혈관이완효과가 유의성 있게 억제되었다(Table 3, Fig. 3).

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

Treatment	Intact endothelium(n=10)		Damaged endothelium(n=10)	
	Contraction(g)	Relaxation(%)	Contraction(g)	Relaxation(%)
PE	1.26±0.25	0	1.27±0.22	0
PE + CF 0.01	1.29±0.27	-2.9± 7.0	1.30±0.24	-1.9±3.1
PE + CF 0.03	1.30±0.27	-3.6±10.4	1.35±0.25	-6.0±3.0
PE + CF 0.10	0.88±0.45**	30.6±33.0	1.36±0.26	-7.2±3.5***
PE + CF 0.30	0.39±0.34***	69.8±25.9	1.37±0.27	-7.5±3.9***
PE + CF 1.00	0.19±0.10***	84.9± 7.7	1.34±0.27	-5.3±4.2***

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

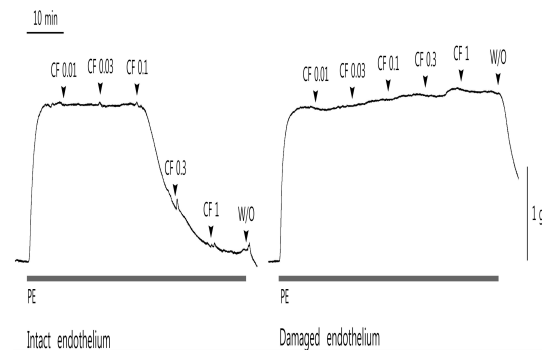


Fig. 1. The concentration-response curve of CF in isolated strips of rabbit arterial smooth muscle precontracted with PE. W/O, wash out or change of bath medium with a solution to which no drug is applied.

Table 2. Effects of pre-treatment of IM on the endothelium dependent relaxation induced by Corni Fructus extract

Treatment	Non treatment of IM		Treatment of IM	
	Contraction(g)	Relaxation(%)	Contraction(g)	Relaxation(%)
PE	1.38±0.25	0	0.93±0.33	0
PE + CF	0.25±0.11***	82.7±6.0	0.61±0.22*	32.9±14.0***

Values are mean±standard deviation(n=12). CF extract-induced relaxation was expressed as percentage of PE-contraction. CF, Corni Fructus extract(1.0 mg/ml) ; IM, Indomethacin(10^{-5} M) ; * p<0.05, *** p<0.001 compared with PE ; ### p<0.001 compared with PE+CF in non treatment of IM.

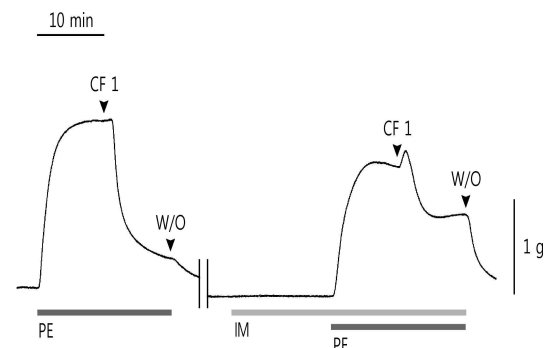


Fig. 2. Effects of pre-treatment of IM on relaxation effects of Corni Fructus in isolated rabbit arterial smooth muscle.

4. L-NNA의 전처치가 산수유의 혈관이완효과에 미치는 영향

PE-수축 실험절편에 산수유 추출물을 투여하였을 때, L-NNA

를 전처치하지 않은 경우는 유의성 있는 이완효과를 나타내었으나, L-NNA를 전처치한 경우는 유의한 이완효과를 나타내지 않아 L-NNA의 전처치가 산수유 추출물의 혈관이완효과를 유의성 있게 억제하였다(Table 4, Fig. 4).

Table 3. Effects of pre-treatment of TEA on the endothelium dependent relaxation induced by Corni Fructus extract

Treatment	Non treatment of TEA		Treatment of TEA	
	Contraction(g)	Relaxation(%)	Contraction(g)	Relaxation(%)
PE	1.26±0.19	0	0.98±0.23	0
PE + CF	0.19±0.07***	84.9±4.2	0.52±0.15***	44.8±20.4***

Values are mean±standard deviation(n=10). CF extract-induced relaxation was expressed as percentage of PE-contraction. CF, Corni Fructus extract(1.0 mg/ml); TEA, tetraethylammonium chloride(10⁻⁴ M); *** p<0.001 compared with PE; ### p<0.001 compared with PE+CF in non treatment of TEA.

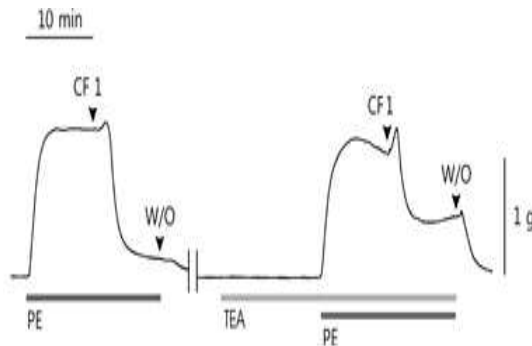


Fig. 3. Effects of pre-treatment of TEA on relaxation effects of Corni Fructus in isolated rabbit arterial smooth muscle.

Table 4. Effects of pre-treatment of L-NNA on the endothelium dependent relaxation induced by Corni Fructus extract

Treatment	Non treatment of L-NNA		Treatment of L-NNA	
	Contraction(g)	Relaxation(%)	Contraction(g)	Relaxation(%)
PE	1.62±0.10	0	1.98±0.23	0
PE + CF	0.27±0.08***	83.3±5.5	1.93±0.24	2.7±1.2***

Values are mean±standard deviation(n=6). CF extract-induced relaxation was expressed as percentage of PE-contraction. CF, Corni Fructus extract(1.0 mg/ml); L-NNA, Nω-nitro-L-arginine(10⁻⁴ M); *** p<0.001 compared with PE; ### p<0.001 compared with PE+CF in non treatment of L-NNA.

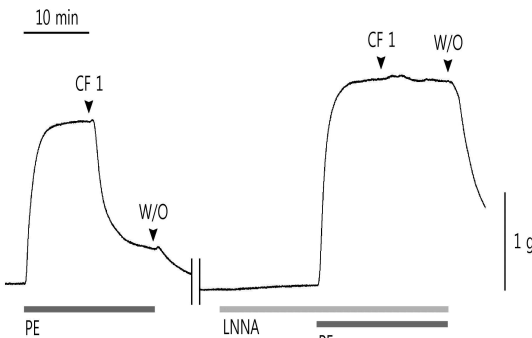


Fig. 4. Effects of pre-treatment of L-NNA on relaxation effects of Corni Fructus in isolated rabbit arterial smooth muscle.

5. MB의 전처치가 산수유의 혈관이완효과에 미치는 영향

PE-수축 실험절편에 산수유 추출물을 투여하였을 때, MB를 전처치하지 않은 경우와 MB를 전처치한 경우 모두 유의성 있는 이완효과를 나타내었다. 그러나 MB를 전처치한 경우가 전처치하지

않은 경우에 비하여 산수유 추출물의 혈관이완효과가 유의성 있게 억제되었다(Table 5, Fig. 5).

6. 산수유의 전처치에 따른 Ca²⁺ 의존성 수축의 변화

Ca²⁺이 제거된 krebs-ringer solution에서 PE-수축 실험절편에 Ca²⁺ 1 mM을 투여하였을 때 1.38±0.24 g의 수축을 나타내었으나, 산수유를 전처치한 PE-수축 실험절편에 Ca²⁺ 1 mM을 투여하였을 때는 0.58±0.33 g의 수축을 나타내어 산수유 추출물은 Ca²⁺ 유입에 따른 수축 증가를 유의성 있게 억제하였다(Table 6, Fig. 6).

Table 5. Effects of pre-treatment of MB on the endothelium dependent relaxation induced by Corni Fructus extract

Treatment	Non treatment of MB		Treatment of MB	
	Contraction(g)	Relaxation(%)	Contraction(g)	Relaxation(%)
PE	1.60±0.21	0	1.91±0.38	0
PE + CF	0.33±0.16***	74.2±15.0	1.31±0.41*	31.1±18.5***

Values are mean±standard deviation(n=7). CF extract-induced relaxation was expressed as percentage of PE-contraction. CF, Corni Fructus extract(1.0 mg/ml); MB, methylene blue(10⁻⁵ M); * p<0.05, *** p<0.001 compared with PE; ### p<0.001 compared with PE+CF in non treatment of MB.

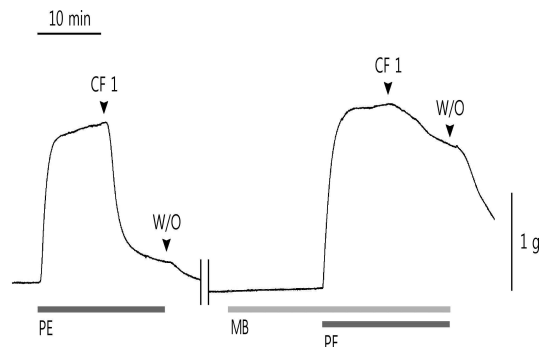


Fig. 5. Effects of pre-treatment of MB on relaxation effects of Corni Fructus in isolated rabbit arterial smooth muscle.

Table 6. Effects of pre-treatment of Corni Fructus on calcium-induced contraction of arterial strip in calcium free media

Treatment	Non treatment of CF	Treatment of CF
	Contraction(g)	Contraction(g)
PE	0.75±0.13	0.40±0.15
PE + Ca	1.38±0.24	0.58±0.33***

Values are mean±standard deviation(n=13). CF, Corni Fructus extract(1.0 mg/ml); Ca, calcium chloride(1 mM); *** p<0.001 compared with PE+Ca in non treatment of CF.

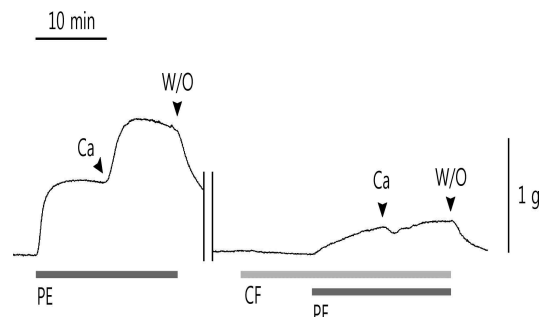


Fig. 6. Effects of pre-treatment of Corni Fructus on calcium-induced contraction of arterial strip in calcium free media.

7. 산수유의 세포독성 측정

HUVEC에 산수유 추출물을 농도별로 12시간 처치한 후 세포 생존율을 측정된 결과 산수유 추출물의 농도 100, 300, 500, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 모두 세포 생존율에 변화가 없었다(Fig. 7).

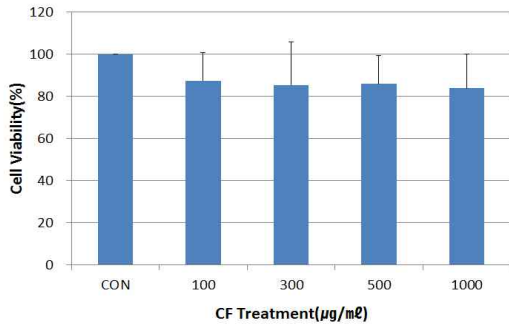


Fig. 7. Cell viability of CF extract(100, 300, 500 and 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in HUVEC for 12 hr at 37°C. CF, Corni Fructus extract.

8. 산수유가 NO의 생성에 미치는 영향

HUVEC에 산수유 추출물을 농도별로 12시간 처치한 후 NO를 측정하였을 때 control에서 측정된 NO에 비하여 산수유 추출물 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 유의성 있는 NO의 증가가 관찰되었다(Fig. 8).

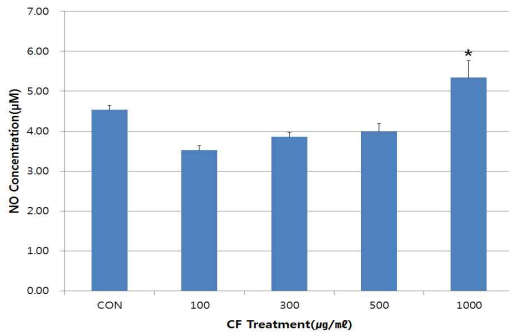


Fig. 8. Nitric oxide concentration of CF extract(100, 300, 500 and 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in HUVEC for 12 hr at 37°C. CF, Corni Fructus extract ; NO, nitric oxide ; * $p < 0.05$ significant compared with control.

고찰

전 세계적으로 25세 이상 성인의 약 40%가 진단받은 고혈압은 전세계 조기 사망 원인 1위이자 뇌혈관질환과 관상동맥질환의 가장 큰 요인 중에 하나이다. 고혈압의 유병률은 연령에 따라 증가하므로 고령화 사회에서 노인 건강과 관련하여 그 중요성은 날로 높아지고 있다²⁵. 이에 따라 심혈관 질환을 예방에 필수적인 고혈압 관리를 위하여 천연약물에 대한 관심 또한 증가되고 있는 실정이다²⁶. 따라서 이번 연구에서는 토끼 경동맥 절편을 이용하여 산수유의 혈관이완 효과 및 혈관내피세포에 미치는 영향을 조사함으로써 고혈압 조절을 통한 심혈관질환 관리에 있어 산수유 사용에 대한 과학적 근거를 제시하고자 하였다.

본 연구에서 PE로 수축시킨 경동맥 절편에 0.1, 0.3, 1.0 mg/mL 산수유 추출물 처리시 유의성 있는 이완효과가 관찰되었으나,

내피세포를 제거한 경우 유의한 이완효과가 나타나지 않았다(Table 1, Fig. 1). 이를 통해 산수유의 혈관이완효과가 내피세포 의존성임을 확인할 수 있었다.

내피세포성 혈관이완인자로는 PGI_2 , EDHF, NO가 있다. 이러한 혈관이완인자는 정상적인 상태에서 내피세포로부터 합성되어 분비되는데, isoproterenol, acetylcholine, substance P 및 histamine 등의 자극에 의해서도 합성·분비가 촉진된다²⁷.

먼저 산수유의 이완효과가 세포질 내 Ca^{2+} 농도 증가를 억제하고, proteinkinase A(PKA)를 활성화하여 myosin light chain kinase를 억제함으로써 해면체 평활근 이완 및 혈관 확장 작용 유발하는 cAMP를 생성²⁸하는 PGI_2 와 연관된 것인지 알아보기 위해 내피세포의 arachidonic acid로부터 PGI_2 가 생성되는 기전을 차단하는 COX inhibitor인 indomethacin(IM)을 처치²⁹하여 실험하였다. 산수유 추출물 1.0 mg/mL 을 투여하였을 때 IM 전처치 유무와 관계없이 모두 유의성 있는 이완효과가 나타났으나, IM을 전처치한 경우, 처치하지 않은 군에 비해 이완효과가 유의성 있게 억제되었다(Table 2, Fig. 2). 따라서 산수유의 혈관이완효과가 PGI_2 의 작용과 연관되어 있음을 알 수 있었다.

산수유의 혈관이완효과가 평활근세포에서 K^+ 통로를 개방함으로써 K^+ 의 세포외 유출로 초래되는 과분극을 통하여 이완을 발생시키는 EDHF와 연관된 것인지 알아보기 위하여 K^+ channel blocker로 알려진 TEA³⁰⁻³²를 이용하여 막전압의 과분극을 차단하였다. 그 결과 TEA를 전처치 유무와 관계없이 산수유 추출물에 의한 유의성 있는 이완효과가 나타났으나, TEA를 전처치한 경우 TEA를 전처치하지 않은 경우와 비교하여 이완효과가 유의하게 억제되었다(Table 3, Fig. 3). 이로써 산수유의 혈관이완효과가 EDHF의 작용과 연관되어 있다는 것을 알 수 있었다.

신체의 주요 신호 전달물질 중 하나인 NO는 혈관내피세포에서 endothelial nitric oxide synthases(eNOS)에 의해 L-arginine으로부터 합성된다. NO는 평활근 세포에서 guanylate cyclase를 활성화시키는데, 활성화된 guanylate cyclase는 평활근 세포 내의 guanosine triphosphate(GTP)를 cyclic guanosine monophosphate(cGMP)로 전환시킨다. 이처럼 혈관내피세포에서 생성된 NO가 평활근 세포에서 cGMP를 증가시키면 proteinkinase G(PKG)가 활성화되어 세포외 Ca^{2+} 유입이 차단되고 평활근 세포의 이완을 통한 혈관이완이 초래된다^{33,34}. 내피세포의 eNOS 효소를 억제하여 NO 생성을 막는 inhibitor인 L-NNA³⁵와 평활근 세포에서 NO에 의한 cGMP 활성화를 막는 inhibitor인 MB^{36,37}를 처치한 후 혈관이완정도를 측정된 결과, inhibitor 무처리군과 비교하여 각각 유의성 있게 이완이 억제됨을 확인할 수 있었다(Table 4, Fig. 4, Table 5, Fig. 5). 따라서 산수유의 혈관이완효과가 내피세포에서의 NO 생성 및 평활근 세포에서의 cGMP 활성화와 연관되어 있음을 알 수 있었다.

Ca^{2+} 은 혈관 수축을 야기하는 스위치 역할 뿐만 아니라 수축력을 조절하는 인자이다. 혈관 평활근 세포 내의 Ca^{2+} 농도가 증가하게 되면 calmodulin과 결합한 calcium-calmodulin이 myosin light chain의 인산화를 촉진하여 혈관이 수축하게 되며, Ca^{2+} 의 유입과 유출이 주로 이루어지는 receptor-operative Ca^{2+}

channel(ROCC)과 voltage-dependent Ca^{2+} channel(VDCC) 등과 같은 Ca^{2+} channel이 차단될 경우 세포내 Ca^{2+} 농도가 감소되어 혈관이 이완된다³⁸⁾.

본 연구에서는 각 channel을 통한 Ca^{2+} 의 세포외 유입과 산수유 추출물의 혈관이완작용과의 상관성을 알아보기 위해 Ca^{2+} -free krebs-ringer solution에서 PE로 수축을 유발시킨 후 Ca^{2+} 1 mM을 투여해보았다. Ca^{2+} 투여로 인한 수축의 증가는 산수유를 전처치한 경우에서 산수유를 전처치하지 않은 경우보다 유의성 있게 감소되었다(Table 6, Fig. 6). 따라서 산수유의 혈관 이완효과가 세포외 Ca^{2+} 유입의 차단과 관련되어 있음을 확인할 수 있었다.

Human umbilical vein endothelial cell(HUVEC)에 산수유 추출물을 농도별로 처리하고 24시간 배양한 후 MTT assay를 시행하여 세포 생존율을 확인한 결과, 산수유 추출물 100, 300, 500, 1000 μ g/ml 농도에서 모두 세포 생존율에 변화가 없었다(Fig. 7). 또한 HUVEC에 산수유 추출물을 농도별로 처리하고 24시간 배양한 후, 생성된 NO의 양을 측정하였을 때 1000 μ g/ml의 농도에서 control에 비하여 NO 생성이 유의성 있게 증가되었다(Fig. 8). 이를 통해 산수유가 혈관내피세포에서 NO 생성을 증가시킨다는 사실을 알 수 있었다.

이상의 실험결과를 통해 산수유는 내피세포 의존성 혈관이완효과를 가지고 있으며 그 기전은 EDHF를 통해 막전압을 과분극시키고 NOS로부터 NO의 생성을 도우며, NO-cGMP 경로를 활성화시키고, ROCC와 VDCC 같은 Ca^{2+} 통로를 차단하여 혈관을 이완시키는 효능을 가지고 있는 것으로 판단된다. 따라서 산수유는 혈관이완효과를 통해 고혈압을 비롯한 심혈관계 질환에 폭넓게 응용할 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

산수유의 혈관이완효과 및 그 기전을 알아보기 위하여 혈관내피세포 의존성 이완인자를 중심으로 실험을 진행하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

산수유는 PE로 수축시킨 혈관에 대해 유의성 있는 이완효과를 나타내었으며 내피세포를 제거한 경우 산수유의 혈관이완효과는 내피세포를 제거하지 않은 경우에 비해 유의하게 억제되어 나타났다. 또한 산수유의 혈관이완효과는 IM, TEA, L-NNA, MB의 전처치를 통해 유의성 있게 억제되어 나타났다. Ca^{2+} 을 제거한 krebs-ringer solution에서 산수유의 전처치는 Ca^{2+} 의 첨가에 의한 수축의 증가를 유의성 있게 억제하였다. HUVEC에 산수유 추출물을 농도별로 24시간 처리한 후 NO 생성량을 측정하였을 때 1000 μ g/ml 농도에서 control에 비해 NO의 생성이 유의하게 증가되었다. 따라서 산수유는 혈관내피세포에서의 NO 생성 및 평활근에서 cGMP를 증가시키고, EDHF를 통해 세포막의 막전압을 과분극시키며, Ca^{2+} 통로를 차단함으로써 혈관을 이완시키는 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 2015년도 세명대학교의 교내학술연구비 지원에 의

하여 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

References

1. Statistics Korea. 2014 Statistics on causes of death. p 1, 2015.
2. Ministry of Health and Welfare. 2012 National Health Statistics : National Health and Nutrition Examination Survey. 2013.
3. Kim, H.R., Son, H.G. Prevalence of Hypertension and Its Risk Factors among Aged 65 and over in Korea. Journal of Korean Biological Nursing Science 14(4):282-290, 2012.
4. Luscher T.F., Barton, M. Biology of the endothelium. clin cardiol 20(2):3-10, 1997.
5. Kinlat, S., Libby, P. Endothelial function and coronary artery disease. Curr Opin Lipidol 12: 383-389, 2001.
6. Shepherd, J.T., Increased systemic vascular resistance and primary hypertension: the expanding complexity. J Hypertens 8(7):15-27, 1990.
7. Vallance, P., Collier, J., Moncada, S. Effects of endothelium-derived nitric oxide on peripheral arteriolar tone in man. Lancet 2(8670):997-1000, 1989.
8. Huang, N., Ashrafpour, H., Levine, R.H., Forrest, C.R., Neligan, P.C., Lipa, J.E., Pang, Y.P. Vasorelaxation effect and mechanism of action of vascular endothelial growth factor-165 in isolated perfused human skin flaps. Journal of Surgical Research 172(1):177-186, 2012.
9. Baranowska-Kuczko, M.R., Maclean, M., Kozłowska, H., Malinowska, B. Endothelium-dependent mechanism of the vasodilatory effect of the endocannabinoid, anandamide, in the rat pulmonary artery. Pharmacological Research 66(3):251-259, 2012.
10. Kozłowska, H., Baranowska, M., Schlicker, E., Kozłowski, M., Laudanski, J., Malinowska, B. Identification of the vasodilatory endothelial cannabinoid receptor in the human pulmonary artery. Journal of hypertension 25(11):2240-2248, 2007.
11. Kozłowska, H., Baranowska, M., Schlicker, E., Kozłowski, M., Laudanski, J., Malinowska, B. Virodhamine relaxes the human pulmonary through the endothelial cannabinoid receptor and indirectly through a COX product. British Journal of Pharmacology 155: 1034-1042, 2008.
12. Professors of herbology in college of oriental medicine. Herbology. Seoul, Younglimsa. pp 687-688, 2004.
13. Seo, Y.B., Kil, G.J., Lee, Y.K., Lee, Y.C. Study on the effects of corni fructus about the anti-allergic action. Kor J Herbology 17(1):1-12, 2002.

14. Kang, D.G., Choi, D.H., Lee, J.K., Lee, Y.J., Moon, M.K., Yang, S.N., Kwon, T.O., Kwon, J.W., Kim, J.S., Lee, H.S. Endothelial NO/cGMP-dependent vascular relaxation of cornuside isolated from the fruit of *Cornus officinalis*. *Planta Med* 73(14):1436, 2007.
15. Kim, S.H., Kim, B.K., Lee, Y.C. Effects of corni fructus on ovalbumin-induced airway inflammation and airway hyper-responsiveness in a mouse model of allergic asthma. *J Inflamm(Lond)* 9(1):9-21, 2012.
16. Kim, K.S., Lee, B.R., Yang, G.Y., An, T.W., Yim, Y.K. Effects of the Herbal-Acupuncture with Corni Fructus Extract at Eumgok(KI10) on Osteoporosis in Ovariectomized Mice. *Korean Journal of Acupuncture* 27(1):63-85, 2010.
17. Jiang, Z.Q., Li, Y., Jiang, L.H., Gu, H., Wang, M.Y. Hepatoprotective effects of extracts from processed corni fructus against D-galactose-induced liver injury in mice. *Zhong Yao Cai* 36(1):85-89, 2013.
18. Park, E.B., Kim, H.S., Shin, S.Y., Ji, I.A., Kim, J.H., Kim, S.G., Yoo, B.H., Kim, B.W., Kwak, I.S., Kim, M.M., Chung, K.T. Antioxidative Activity of *Cornus officinalis* Extracts Obtained by Four Different Extraction Techniques. *Journal of Life Science* 22(11):1507-1514, 2012.
19. Kim, O.K. Antidiabetic and antioxidative effects of corni fructus in streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Oil Chemists' Soc* 22(2):157-167, 2005.
20. Sung, Y.H., Chang, H.K., Kim, S.E., Kim, Y.M., Seo, J.H., Shin, M.C., Shin, M.S., Yi, J.W., Shin, D.H., Kim, H., Kim, C.J. Anti-inflammatory and analgesic effects of the aqueous extract of corni fructus in murine RAW 264.7 macrophage cells. *J Med Food* 12(4):788-795, 2009.
21. Kam, S.C., Choi, S.M., Jeh, S.U., Lee, S.H., Hwa, J.S., Jung, K.H., Kang, C.W., Hyun, J.S. Efficacy and Safety of a Herbal Formula that Mainly Consists of *Cornus officinalis* for Erectile Dysfunction: A Double-blind, Placebo-controlled Study. *Korean Journal of Urology* 48(7):741-747, 2007.
22. Sohn, D.W., Yoon, B.I., Kim, S.D., Lee, E.J., Kim, H.S., Hwang, S.W., Hwang, S.Y., Kim, D.B., Kim, H.W., Kim, S.W., Cho, Y.H. The Effects of Herbal Formula (KH-204) on the Penile Erection and Corpus Cavernosum of Spontaneous Hypertensive Male Rats. *Kor J Pharmacogn* 38(3):239-244, 2007.
23. Lim, D.W., Lee, D.H., Song, M.K., Kim, M.Y., Bu, Y.M., Kim, H.C. Effect of HTE001, an Herbal Formulation, on Electric Stimulation-induced Penile Erection in Rats. *Kor J Herbology* 24(3):139-146, 2009.
24. Seo, I.B., Park, S.Y. Effects of Shingi-whan on the Male Reproductive and Sexual Function : Enhancing Spermatogenesis, Reducing Testicular Toxicity and Relaxing Smooth Muscle of Corpus Cavernosum. *Kor J Herbol* 30(3):55-61, 2015.
25. World Health Organization. A global brief on Hypertension: Silent killer, global public health crisis. Geneva, Switzerland. World Health Organization publication. 2013.
26. Bae, K.Y., Kim, E.Y., Rhyu, M.R. Roh, J.J., Kim, D.I. Vasodilatory Activities and Safety of the Water Extracts of Three Medicinal Remedy in Species of Insects. *The Journal of Oriental Obstetrics & Gynecology* 20(1):114-124, 2007.
27. Baranowska-Kuczko, M.R., Maclean, M., Kozłowska, H., Malinowska, B. Endothelium-dependent mechanism of the vasodilatory effect of the endocannabinoid, anandamide, in the rat pulmonary artery. *Pharmacological Research* 66(3):251-259, 2012.
28. Vanhoutte, P.M., Boulanger, C.M., Mombouli, J.V. Endothelium derived relaxing factors and converting enzyme inhibition. *The American Journal of Cardiology* 76(15):3E-12E, 1995.
29. Moncada, S., Gryglewski, R., Bunting, S., Vanem, J.R. An enzyme isolated from arteries transform prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation. *Nature* 263: 663-665, 1976.
30. Myers, P., Monor, R., Guerra, R., Bates, J., Harrison, D. Vasorelaxant properties of the endothelium-derived relaxing factor more closely resemble S-nitrosocysteine than nitric oxide. *Nature* 345: 161-163, 1990.
31. Palmer, R., Ferrige, A., Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327: 524-526, 1987.
32. Furchgot, R.F., Vanhoutte, P.M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* 3(9):2007-2018, 1989.
33. Lowenstein, C.J., Snyder, S.H. Nitric oxide, a novel biologic messenger. *Cell* 70(5):705-707, 1992.
34. Bredt, D.S., Ferris, C.D., Snyder, S.H. Nitric oxide synthase regulatory sites. *J Bio Chem* 267(16):10976-10981, 1992.
35. Angulo, J., Cuevas, P., Fernandez, A., Gabancho, S., Allona, A., Marin-Morales, A. Activation and potentiation of the NO/cGMP pathway by NG-hydroxyl-L-arginine in rabbit corpus cavernosum under normoxic and hypoxic conditions and ageing. *British Journal of Pharmacology* 138(1):63-70, 2003.

36. Akingba, A.G., Burnett, A.L. Endothelial nitric oxide synthase protein expression, localization, and activity in the penis of the alloxan-induced diabetic rat. *Molecular Urology* 5(4):189-197, 2001.
37. Gonzalez, C.M., Brannigan, R.E., Bervig, T., Zelner, D., Podlasek, C.A., Mckenna, K.E. Protein and gene expression of nitric oxide synthase isoforms I and III in the rat penile shaft. *Journal of Andrology* 22(1):54-61, 2001.
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* 49(2):157-230, 1997.