

원 저

豨薟의 혈관이완 효능과 항산화 동태에 관한 연구

신 흥 목

동국대학교 한의과대학 생리학교실

Effects of *Siegesbeckia Glabrescens* on the Vascular Relaxation and Antioxidative Status

Heung-Mook Shin

Dept. of Physiology, College of Oriental Medicine, Dongguk University

This study investigated the effects of *Siegesbeckia glabrescens*, an antihypertensive remedy, on the contraction evoked by phenylephrine and KCl in isolated rat thoracic aorta, and also analyzed antioxidative status in vitro.

Siegesbeckia glabrescens revealed dose-dependent relaxation on phenylephrine(PE)/KCl-induced arterial contraction and more markedly on PE-induced contraction.

Siegesbeckia glabrescens reduced malondialdehyde(MDA)levels, Phosphatidyl choline-liposome(PC-OOH) contents, linoleic acid-induced lipid peroxidation and exerted 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH) radical scavenging effect, in vitro.

These results indicated that *Siegesbeckia glabrescens* doesn't relax artery through a blocking α -adrenergic receptor and calcium channel mediated by voltage-operated calcium channel, and it's antioxidative effects may be involved in endothelium-dependent relaxation of arteries via vascular protective properites. (J Korean Oriental Med 2000;21(1):77-83)

Key Words: *Siegesbeckia glabrescens*, Arterial contraction, Endothelium-dependent relaxation, Antioxidative status

서 론

최근 심혈관계 질환에 의한 현대인의 사망률이 계속 증가추세에 있으나 치료 및 예방에 한계가 드러나고 있어 새로운 치료기술의 개발에 관심이 집중되고 있다. 한의학적으로 심혈관계의 생리에 중요한 역할을 하는 체내 시스템은 肝藏血, 心主血脈, 脾統血, 肺朝百脈 등 五臟기능의 조화를 바탕으로 이루어 진다. 따라서 순환기계 질환의 병태생리 역시 이들 기능을 중심으로 이해되어야 한다. 이중 고혈압에 수반되는 여러 증상은 한의학적으로 肝腎陰虛, 肝風內動, 肝陽上亢, 陰陽陽虛 등의 범주에 귀속시켜 파악하고 있으며 淸熱瀉火, 祛風, 滋陰, 涼肝, 化痰의 처방을 기본으로 하여 상응하는 藥材를 활용하고 있다^{1,2,3}.

희침은 味가 苦辛하고 性이 寒하며 肝·腎經으로 歸經한다. 그 祛風濕, 通經絡, 利筋骨, 淸熱解毒의 효능으로 血脈凝澁, 四肢麻木, 筋骨冷痛, 腰膝無力, 口眼喎斜, 手足不遂, 言語蹇澁에 응용되는데, 임상에서 중풍, 고혈압, 중풍의 예방 및 혈관질환의 치료 목적으로 활용되고 있다^{4,5,6}. 이에 기초하여 희침의 심혈관계 질환과 관련한 약리작용의 연구로는 혈압강하^{7,8}, 혈중지질의 감소⁹ 및 혈관이완^{10,11}의 효과가 보고된 바 있다. 그러나 혈관이완 효능에 있어 KCl이 일으키는 세포막 탈분극에 의한 수축에 미치는 영향, α -adrenalin 수용체 차단제로서의 가능성과 세포막 지질의 과산화에 관여하여 혈관 내피세포의 손상을 유발하는 reactive oxygen radical(ROS)에 대한 항산화작용의 동태와 연계하여 연구한 실험은 찾아볼 수 없었다.

이에 저자는 희침이 α -adrenalin 수용체와 결합하는 phenylephrine(PE) 및 KCl의 세포막 탈분극에 의한 수축 혈관에 대한 이완효과를 관찰하고, 아울러 항산화작용의 동태로서 PC-OOH 함량, DPPH-radical의 소거 및 linoleic acid 유도 지질과산화에 미치는 영향을 관찰한 바유의한 지견을 보고하고자 한다.

· 접수 : 2000년 4월 25일 · 수정 : 5월 26일 · 채택 : 5월 29일
· 교신저자 : 신흥목, 경북 경주시 석장동 707 동국대 한의대 생리학교실
(Tel. 0561-770-2372)

* 본 연구는 1998년도 한의학발전 연구지원사업에 의하여 수행되었음
(HMP-99-O-11-0002-D).

材料 및 方法

1. 材料

1) 약재

본 실험에 사용한 회침(*Siegesbeckia glabrescens* Makino; *Siegesbeckiae Herba*)은 정선하고 九蒸九晒하여 사용하였다.

2) 동물

실험동물은 체중 $300 \pm 20g$ 의 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley)를 사용하였다.

2. 方法

1) 회침추출물의 제조

회침 200g을 round flask에 넣고, 증류수 1000ml을 가하여 가열 추출한 후 추출액을 여과지로 여과하고, 이 여액을 rotary evaporator로 감압 농축한 후 동결건조하여 21.59g의 분말로 제조하였다. linoleic acid 유도 지질과산화반응 억제효과와 DPPH radical 소거효과 측정시 사용한 회침의 분말은 증류수에 녹여 사용하였다.

2) 혈관절편의 제작

흰쥐를 ether로 마취하여 실험시키고 복강을 열어 흉부 대동맥을 적출하였다. 이들 조직을 Krebs-Ringer bicarbonate 용액에 넣고 실온에서 혈관주위의 연조직과 지방을 제거하여 약 2mm정도로 잘라내어 고리형태의 혈관절편을 제작하였다.

3) 영양액 제조

혈관근육의 정상적인 유지를 위해 Krebs-Ringer bicarbonate solution을 사용하였으며, 그 조성은 95%의 O₂와 5%의 CO₂를 혼합한 가스를 계속 주입시킨 상태에서 NaCl 119.8, KCl 4.6, CaCl₂ 2.5, MgCl₂ 1.2, NaHCO₃ 25, KH₂PO₄ 1.2, glucose 10mM로 하여 pH를 7.4로 조정하였다.

4) 혈관수축 억제작용 측정

95%의 O₂와 5%의 CO₂를 혼합한 가스가 연속적으로 공급되고 $37 \pm 0.5^\circ C$ 로 유지되는 Krebs-Ringer bicarbonate 용액이 peristaltic pump를 통하여 4 ml/min의 속도로 흐르고 있는 organ bath(용량 1.5 ml)에 혈관절편을 현수하여 한쪽 끝은 organ bath의 저부에 고정시키고 다른쪽 끝은 근 수축변환기에 연결하여 등장성 수축 및 이완을 기록하였다. 미세장력 조절장치(Grass FT-03)를 이용하여 초기 장력을 1g 부하하고 1시간 이상 회복시킨 후 실험에 이용하였다. 실험절편을 0.1μM의 phenylephrine을 사용하여 최고 수축기에 이르렀을 때, 회침을 농도별로 희석하여 투여하였을 때 나타나는 반응을 physiograph(Gass 7, USA)로 연속 기록하였다. 또한 0.1μ

M의 phenylephrine 대신 0.01μM부터 3μM까지 phenylephrine의 농도를 증가시켰을 때 나타나는 수축반응에 대하여 회침(1.0mg/ml, 3.0mg/ml)을 phenylephrine 투여 10분전에 전처리하여 수축억제 효과를 관찰하였다. KCl이 일으키는 세포막 탈분극에 의한 수축에 대한 이완 효과는 실험전 65.4mM의 KCl로 3회 이상 수축시켰을 때 일정한 크기의 수축을 일으키는 절편만을 사용하여 농도별로 첨가하여 나타난 반응을 physiograph로 연속 기록하였다.

5) Calcium에 의한 혈관수축 억제작용 측정

Krebs-Ringer bicarbonate 용액의 CaCl₂ 2.5mM 대신 EGTA 1mM을 넣어 calcium free 용액을 제조한 후, 제작 표본을 현수하여 등장성 수축을 기록할 수 있도록 장치하였다. 이 상태에서 phenylephrine을 10μM 처리후, calcium ion을 0.1mM, 0.5mM, 1mM, 2.5mM, 5mM을 투여하여 발생하는 크기를 기록한 후, 시료약물을 10분 전에 전처리하여 calcium에 의한 수축을 기록하였다.

6) Linoleic acid-유도 지질과산화도 측정

Linoleic acid emulsion은 Osawa⁹⁾등의 방법에 따라 제조하였다. 즉 linoleic acid 0.39ml, 99% ethanol 10ml, 50mM phosphate buffer(pH 7.0) 10ml를 혼합하고 증류수로 전체 용액이 25ml가 되도록 하였다.

Linoleic acid emulsion 600μl에 회침을 농도별로 첨가한 다음, 증류수로 전체 용액이 8ml가 되도록 조절하여 이 혼합액을 Falcon tube에 넣고, 순환진탕기에서 37℃에서 72시간 배양하여 자동산화를 촉진시켰다.

지질과산화는 malondialdehyde(MDA) 농도로 나타내었으며 MDA 정량은 TBA법에 의하여 Ohkawa¹⁰⁾등의 방법에 따라 다음과 같이 실시하였다. 37℃에서 배양시킨 linoleic acid 혼탁액 0.8ml에 8.1% SDS 0.2ml, 20% acetic acid(pH 3.5) 1.5ml, 0.8% TBA 1.5ml를 가한 다음, 95℃에서 1시간동안 반응시킨 뒤, 냉각시켜 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. MDA농도는 free MDA로 표준선을 구하여 계산하였다.

7) Phosphatidyl choline-liposome에서 PC-OOH 측정

PC-OOH의 생성량은 Bligh-Dyer 방법¹¹⁾을 이용하여 측정하였다. 즉 10mg의 PC에 대해 0.1%(W/W)의 sample을 10mM의 Tris-HCl buffer(pH 7.4) 0.9ml에 녹여 1분간 vortex mixer로 혼합하여 실온에서 1분간 초음파를 가하여 multilamellar liposomes을 만든 다음 37℃, 암실에서 흔들어 주면서 5분간 예비반응시킨 후, radical initiator로서 AAPH(2,2'-azobis(2-amidinopropane dihydrochloride) 0.1ml을 넣어 37℃, 암실에서 흔들어 반응을 개시시키고나서, 반응액을 1시간 마다 100μl씩 chloroform 250μl와 methanol 125μl를 가해 2분간 흔들

어 하층을 취하고, 다시 chloroform 250 μ l를 넣고 흔들어서 PC-OOH를 추출한 후 20 μ l를 HPLC에 주입하여 PC-OOH의 생성량을 조사하였다.

8) DPPH radical 소거효과 측정

희침 추출액의 free radical에 대한 소거효과를 보기 위해 Yoshida¹²⁾ 방법에 따라 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)에 의한 radical의 소거효과를 측정하였다. 농도별 희침 희석액과 증류수 혼합물 4ml에 1.5 \times 10⁻⁴M DPPH/MeOH 1ml를 첨가하여 혼합하고 실온에서 30분 동안 방치한 후, 517nm에서 흡광도를 측정하였다. Vehicle로는 1% CMC(carboxymethyl cellulose sodium salt)를 포함한 0.9% NaCl을 사용하였다.

9) 희침의 세포독성 측정

세포에 대한 독성 실험은 배양 Hep 3B cell(human liver cancer cell)과 Chang cell(human liver normal cell)을 96-well plate에 1 104 cell을 넣고, 10% FBS-DMEM 배지로 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 하에서 24시간 배양한 후 희침을 농도별(0, 0.1mg, 0.2mg, 0.5mg, 1.0mg, 1.5mg, 2.0mg)로 첨가하여 다시 24시간 배양하여 세포 생존률을 MTT assay로 측정하였다¹³⁾. 즉 Hep 3B cell과 Chang cell을 배양시킨 96-well plate에 MTT(methylthiazol-2-yl-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)를 total volume의 10%가 되도록 넣고, 4시간 배양시킨 다음 90 g에서 10분간 원심분리하였다. 그 후 배지를 제거하고 EtOH/DMSO(1:1 v/v)를 200 μ l씩 넣고 20분간 shaking 한 다음, ELISA microplate reader(Behring EL 311)로 630 nm에서 흡광도를 측정하였다.

10) 단백질 정량

단백질 정량은 Lowry¹⁴⁾등의 방법에 준해 bovine serum

albumin을 표준단백으로하여 측정하였다.

11) 통계처리

실험결과는 평균값과 표준편차로 표현하고, 유의성 검증은 Sigma Plot을 이용하여 unpaired t-test를 실시하여 p<0.01일 때 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

實驗成績

1. PE에 의한 혈관수축 억제효과

희침은 phenylephrine(PE, 0.1 μ M)의 혈관수축에 대하여 농도 0.1mg/ml에서 12.0 \pm 4.72%, 0.3mg/ml에서 28.05 \pm 3.02%, 0.5mg/ml에서 44.94 \pm 6.95%, 0.8mg/ml에서 68.21 \pm 5.46%, 1.0mg/ml에서 91.88 \pm 4.09%의 이완효과를 나타내었다(Fig. 1).

2. PE와 KCl의 혈관수축에 대한 희침의 이완작용 비교

희침은 PE에 의한 혈관수축을 0.1mg/ml에서 12.0 \pm 4.72%, 0.3mg/ml에서 28.05 \pm 3.02%, 0.5mg/ml에서 44.94 \pm 6.95%, 0.8mg/ml에서 68.21 \pm 5.46%, 1.0mg/ml에서 91.88 \pm 4.09%의 이완효과를 보였다. 또 희침은 KCl의 최대 수축(65.4mM)에 대하여 0.1mg/ml에서 0.78 \pm 1.10%, 0.3mg/ml에서 9.89 \pm 0.62%, 0.5mg/ml에서 27.59 \pm 5.88%, 0.8mg/ml에서 39.92 \pm 2.13%, 1.0mg/ml에서 70.85 \pm 5.03%의 이완효과를 보여 졌다(Fig. 2).

3. PE의 농도변화에 따른 이완효과

희침의 혈관이완 효과가 KCl에 의한 수축보다는 PE에 의한 수축에 보다 강한 이완작용을 보이므로써 혈관 평활근의 α -adrenalin 수용체 차단제로서의 가능성을 조사하

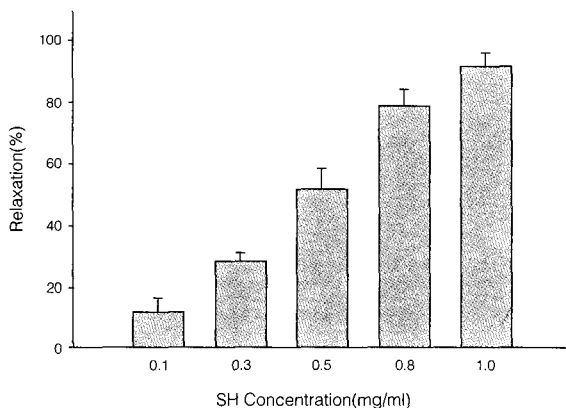


Fig. 1. Relaxation effect of SH on PE-induced contraction in rat thoracic aorta. Percentages are referred to PE levels. Values are mean \pm S.D.(n=7). SH : Siegesbeckiae Herba.

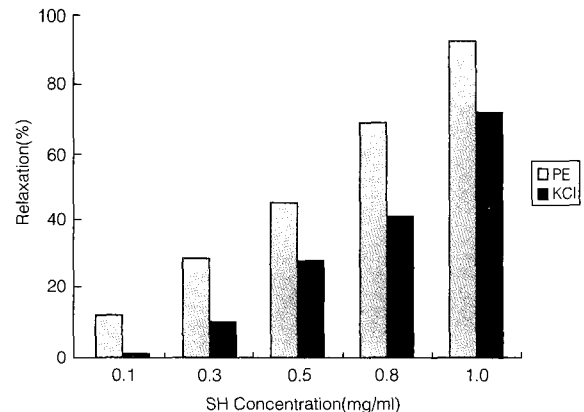


Fig. 2. Dose-dependent relaxation effects of SH on PE/KCl-induced contractions in rat thoracic aorta. SH : Siegesbeckiae Herba.

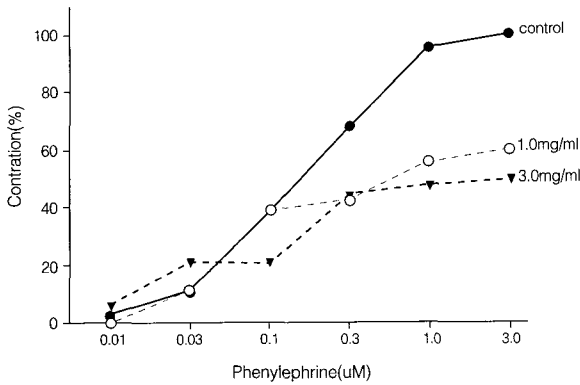


Fig. 3. Concentration response curves of PE-induced contraction in rat thoracic aorta in the presence of Siegesbeckiae Herba.

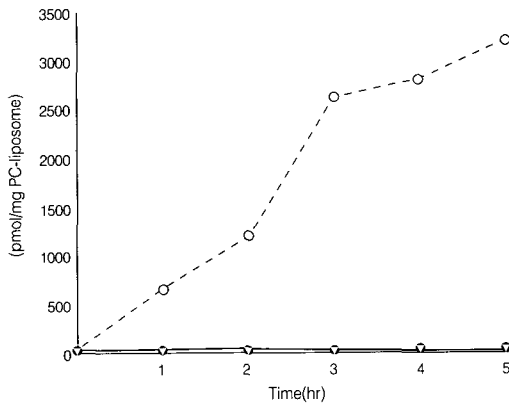


Fig. 5. Effect of SH on lipid peroxidation in PC-liposomes. The reaction system consisted of PC(10mg), AAPH(1B), HE(0.1%) in Tris-HCl buffer(10mM, pH 7.4). SH, Siegesbeckiae Herba. ○, Control; ●, Normal; ▽, SH

기 위하여 PE의 농도에 따른 이완효과를 관찰하였다. 쥐의 흉부 대동맥은 PE의 농도에 의존하여 수축을 나타내었으며 3 10-6M의 PE를 투여한 대조군이 100%의 수축을 보이고 있는데 비하여 회침은 1.0mg/ml에서 60.2 1.7%, 3.0mg/ml에서 49.1 9.2%의 수축을 나타내었다(Fig. 3).

4. Ca²⁺의 수축에 의한 수축억제 작용

회침의 전처리는 칼슘농도에 따른 수축을 억제하지 못하였다. 즉 Ca²⁺ 농도의 증가 즉 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 mM에서 각각 28.8±0%, 67.6±4.5%, 84.9±10.0%, 96.5±1.2%, 100±0%의 수축에 대하여 회침(1mg/ml)을 전처리한 경우 각각 26.1±12.5%, 68.9±14.5%, 81.5±11.2%, 87.3±12.6%, 92.2±13.8%의 수축을 보여 Ca²⁺ 농도에 따른 수축을 억제하지 못하였다.

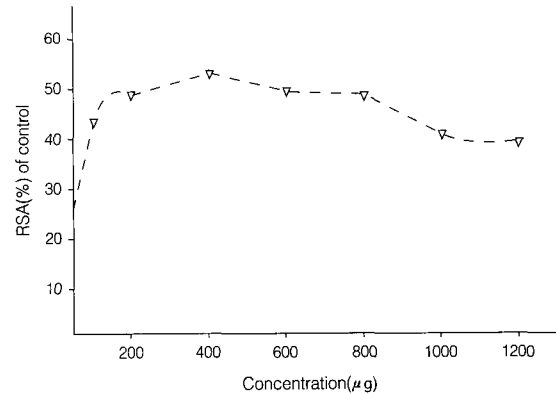


Fig. 4. Scavenging effect of SH on DPPH radical. RSA, radical scavenging activity. SH, Siegesbeckiae Herba. ▽ : Control vs SH

5. DPPH-radical scavenging effect

회침은 농도 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200ug에서 각각 43.4%, 48.9%, 53.5%, 50.3%, 49.5%, 41.5%, 40.3%의 radical 소거 효과를 보여 400ug에서 최대의 소거효과를 보였다(Fig. 4).

6. PC-OOH content

PC-OOH의 생성량에 대한 회침의 억제작용을 보면 0hr, 1hr, 2hr, 3hr, 4hr, 5hr에서 대조군의 38.35 pmol/mg PC-liposome, 680.24 pmol/mg PC-liposome, 1207.26 pmol/mg PC-liposome, 2633.34 pmol/mg PC-liposome, 2817.93 pmol/mg PC-liposome, 3207.77 pmol/mg PC-liposome에 비하여 회침을 처리한 군은 42.87 pmol/mg PC-liposome, 35.11 pmol/mg PC-liposome, 42.61 pmol/mg PC-liposome, 50.03 pmol/mg PC-liposome, 39.75 pmol/mg PC-liposome, 54.42 pmol/mg PC-liposome로 PC-OOH의 생성을 억제하였다(Fig. 5).

7. Linoleic acid 자동산화 억제효과

회침의 과산화지질 억제효과는 배양 4일째부터 linoleic acid의 자동산화를 유의하게 억제하기 시작하였다. 반응 마지막 날을 기준으로 대조군의 100.13 nmole에 비하여 200ug에서 5.72 nmole, 400ug에서 8.88 nmole, 600ug에서 14.42 nmole, 800ug에서 13.48 nmole, 1000ug에서 14.93 nmole, 1200ug에서 14.67 nmole로 현저하게 억제효과를 나타내었다(Table 1).

8. 회침의 세포독성 측정

세포배양에 대한 독성 실험에서 회침은 배양 Hep 3B cell(human liver cancer cell)에 대하여 0.5mg/4ml 이상의

Table 1. Effects of SH on Linoleic acid-Induced Lipid Peroxidation, in Vitro

SH (μ g)	MDA nmole/incubation period(day)									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
0	0.00	1.64	2.76	4.47	6.64	10.79	24.14	81.97	100.13	
200	0.00	0.65	0.98	1.31	1.90	1.97	3.81	5.19	5.72	
400	0.00	1.97	2.43	2.82	4.27	5.25	5.72	7.36	8.88	
600	0.00	0.92	2.03	2.43	4.53	5.72	7.43	10.98	14.42	
800	0.0	1.84	2.69	3.09	5.85	7.03	10.46	13.55	13.48	
1000	0.00	1.64	3.15	3.48	6.72	7.23	9.14	12.03	14.93	
1200	000	1.44	3.15	4.34	2.77	7.76	10.32	12.10	14.67	

After auto-oxidation of linoleic acid in the water-Alcohol system for eight days, the degree of oxidation was measured by the TBA method. Each values are mean, n=3. SH, Siegesbeckiae Herba; MDA, malondiadehyde.

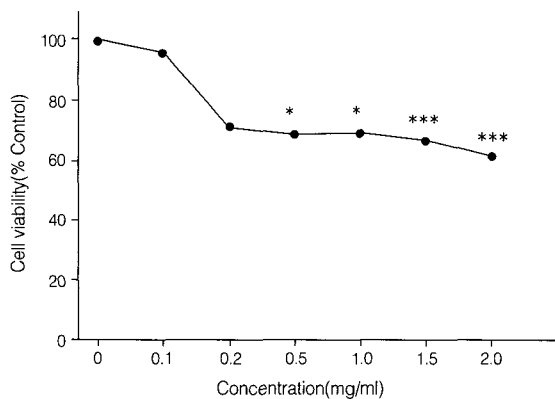


Fig. 6. Effects of Siegesbeckiae Herba on cell viability of the Hep3B cell line. Hep3B cell line(1×10^4 per well plate) were incubated in the presence of different concentration of Siegesbeckiae Herba Extract for 24h. Cell viability was measured by MTT assay as described in materials in methods. Values are mean \pm S.D, n=4. *, p<0.05 as compared with the normal group. ***, p<0.001 as compared with the normal group.

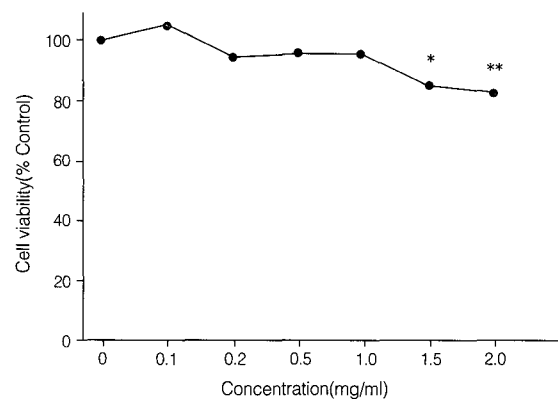


Fig. 7. Effects of Siegesbeckiae Herba on cell viability of the Chang cell line. Chang cell line(1×10^4 per well plate) were incubated in the presence of different concentration of Siegesbeckiae Herba Extract for 24h. Cell viability was measured by MTT assay as described in materials in methods. Values are mean \pm S.D, n=4. *, p<0.05 as compared with the normal group. **, p<0.01 as compared with the normal group.

농도에서 세포의 생존률을 유의하게 감소시켰으나, 정상 세포인 Chang cell에 대하여는 1.0mg/4ml까지 독성을 나타내지 않았다(Fig. 6,7).

고 찰

심·뇌혈관계 질환의 하나인 고혈압은 만성 순환기계 질환 중 발생 병생 빈도가 가장 높은 질환으로 특별한 자각증상이 없는 경우가 많아 방치해 둘 경우 뇌 심장 신장 등 주요 장기에 치명적인 합병증을 초래할 수 있으므로 이에 대한 관심이 증가하고 있다. 한의학에서는 고혈압에 대한 직접적인 명칭이 없으며 頭痛, 眩暈, 肝陽, 肝風, 中風, 厥證의 범주에 귀속시켜 인식하고 있다³⁾.

최근 고혈압의 치료에 새로운 강압제가 많이 개발되어 선택의 폭이 많이 넓어졌으나 강압효과는 우수하더라도

부작용이 많으며 계속 복용하기가 어려우므로 강압제의 선택에 있어서 부작용이 중요하게 고려되어야 한다. 이러한 시점에서 심 뇌혈관계 질환에 다용하고 있는 희침의 약리적 효과를 규명하는 작업은 중요한 의미가 있을 것으로 생각된다.

희침은 味가 苦辛하고 그 性은 生用하면 寒하고 熟用하면 溫하며 肝腎으로 歸經하는 약제로서 血脈凝滯, 四肢麻木, 筋骨酸軟, 腰膝無力, 中風의 후유증, 口眼喎斜, 手足不遂, 言語蹇澀 및 중풍의 예방에 사용한다³⁾. 이러한 적응증에 기초하여 임상에서 중풍, 고혈압, 기타 혈관질환의 치료목적으로 처방되고 있다.

희침의 혈관이완 효능에 대한 실험적 연구로는 내피세포 의존성 혈관이완¹⁰⁾ 및 Ca²⁺의 유입차단을 통한 혈관이완¹¹⁾의 효능이 보고되고 있다. 그러나 뇌혈관계나 심혈관계질환의 형성과정에 중요한 병태생리로 알려진 reactive

oxygen radical(ROS)^{17,18,19}에 대한 항산화 작용과 연계하여 보고된 연구는 없다.

이에 저자는 회침의 phenylephrine(PE)와 KCl이 일으키는 수축 혈관에 대한 이완효능 및 내피세포의 손상을 유발하는 free radical에 대한 항산화작용을 규명하기 위하여 PC-OOH와 DPPH radical의 소거효과 및 linoleic acid 유도 지질과산화반응의 억제에 미치는 영향을 검증하였다.

회침은 α -adrenalin 수용체와 결합하는 phenylephrine(PE)의 수축 혈관에 대하여 농도의존적으로 이완효과를 나타내었다. 또 KCl이 일으키는 세포막 탈분극에 의한 혈관의 수축에 대하여도 농도 의존적으로 수축을 억제하였다. 그러나 KCl에 의한 수축 보다는 PE에 의한 수축에서 보다 강한 이완작용을 보였다. 이에 α -adrenalin 수용체 차단제로서의 가능성을 조사하기 위하여 PE의 농도별 수축에 의한 이완효능을 관찰하였다. 그 억제 양상은 상경적 길항이 아닌 비상경적 길항작용을 나타내었으며 또 혈관의 수축과 관련하여 Ca^{2+} 이 매우 중요하므로 Ca^{2+} 의 농도에 따른 수축을 관찰한 결과 수축의 억제효과가 없었다. 이는 회침의 혈관이완 기전이 적어도 α -adrenalin 수용체 차단이나 Ca^{2+} 차단작용에 의한 것이 아님을 반영한다. 따라서 회침은 혈관내의 cAMP 또는 cGMP를 증가시켜 혈관이완 작용을 나타낼 가능성을 시사하는 것으로 향후 phosphodiesterase제 효과와 cyclic nucleotide 함량의 측정이 요구된다.

한편 허혈·재순환과 같은 뇌혈류 이상으로 나타나는 질환이나 Alzheimer, 혈관성 치매 등 대부분의 난치성 뇌질환들의 병태생리는 reactive oxygen radical(ROS)이 유도하는 oxidative stress와 밀접한 상관관계가 있음이 밝혀져 있는데, 회침의 free radical 소거능을 알아보기 위한 DPPH radical의 소거효과에서 농도 400 μ g에서 53.5%의 소거율을 나타내었다. 또한 PC-OOH의 생성량에 대한 항산화 활성에서 반응 마지막 시간(5hr)을 기준으로 98.3%의 지질과산화 억제율을 나타내었으며, linoleic acid-유도 지질의 과산화반응에서도 회침은 유의하게 지질과산화물의 생성을 억제하였다. 이처럼 항산화작용의 동태와 관련한 회침의 DPPH에 의한 radical의 소거, PC-OOH의 생성 및 linoleic acid-유도 지질과산화반응의 유의한 억제는 free radical이 지질의 과산화를 유도하여 혈관내피세포의 손상에 연루되어 있다는 사실에 비추어 볼 때, 회침은 항산화작용을 통하여 내피세포의 손상을 억제하므로써 고혈압을 비롯한 혈관계질환에 대하여 일정한 치료효과를 기대할 수 있을 것으로 생각된다. 특히 내인성 O_2^- 가 endothelium-dependent arterial relaxation(EDR)에 있어서 NO의 생활성을 방해한다는 보고²⁰, 저산소 상태에서

free radical이 흥부대동맥의 긴장성 조절에 관여한다는 보고²¹, 동맥경화 당뇨병 신성고혈압에서의 superoxide(O_2^-)의 생성은 NO의 대사를 증가시키고²², hydrogen peroxide(H_2O_2)가 적절한 농도에서 Ca^{2+} 의존성 이완효과를 나타낸다²³는 보고 및 vitamine E, probucol, GSH 및 vitamine C의 항산화제가 과잉발현된 superoxide(O_2^-)의 소거를 통하여 hyperglycemic 상태에서의 내피세포 Ca^{2+} /cGMP 반응을 억제한다²⁴는 보고로 미루어 볼 때, 회침의 항산화작용은 혈관내피세포에서의 endothelial nitric oxide synthase(eNOS)의 활성을 자극하고 이는 nitric oxide (NO)의 생성과 대사를 증가시켜 Ca^{2+} 의 유입을 차단하는 기전에 의하여 수축혈관에 대하여 이완효능에 관여할 것으로 생각되며, 앞으로 정확한 기전에 대한 실험적 연구가 있어야 할 것으로 생각된다.

한편 회침추출물의 세포독성을 MTT assay로 측정한다면, 정상세포에 대하여 1.0mg의 농도까지 독성을 나타내지 않았고, 간암세포에 대하여는 0.5mg 이상에서 암세포의 성장을 유의하게 억제하였다.

이상의 실험적 결과를 통하여 회침은 ROS와 혈관수축이 관여하는 여러 형태의 혈류장애와 심뇌혈관질환에 대해 혈관의 저항을 낮추므로써 血脈凝滯의 개선과 혈압강하는 물론 혈관보호의 특성을 나타낼 것으로 기대된다.

결론

회침의 phenylephrine과 KCl이 일으키는 수축 혈관에 대한 이완효능 및 내피세포의 손상을 유발하는 free radical에 대한 항산화작용을 규명하기 위하여 PC-OOH와 DPPH radical의 소거효과 및 linoleic acid 유도 지질과산화반응의 억제에 미치는 영향을 관찰한 결과 다음의 결론을 얻었다.

1. 회침은 phenylephrine에 의한 수축혈관에 대하여 유의한 이완효과를 나타내었으며 그 효과는 KCl에 의한 수축 보다는 phenylephrine에 의한 수축에서 보다 강하게 나타났다.
2. Phenylephrine의 농도별 수축에 의한 이완효능에서 상경적 길항이 아닌 비상경적 길항작용을 나타내었다.
3. 회침의 전처리 농도에 따른 수축을 억제하지 못하였다.
4. 회침은 PC-OOH와 DPPH radical의 소거효과 및 linoleic acid 유도 지질과산화반응에 대하여 항산화작용을 나타내었다.
5. 회침은 정상세포에 대하여 1.0mg의 농도까지 독성을 나타내지 않았고, 간암세포에 대하여는 0.5mg 이

상에서 암세포의 성장을 유의하게 억제하였다.

이상의 결과를 종합하면 희蓂의 혈관 이완효능은 α -adrenalin 수용체 차단작용이나 전압-의존성 칼슘통로 (voltage-operated Ca^{2+} channel)의 차단에 의한 것이 아님을 알 수 있다. 또한 희蓂의 항산화작용은 ROS에 의한 혈관내피세포의 손상에 대하여 혈관보호의 특성을 나타낼 것으로 생각된다.

참고문헌

1. 趙光勝. 高血壓. 上海:上海科學出版社. 1991:123-125.
2. 何紹奇. 現代中醫內科學. 北京:中國醫學科學技術出版社. 1991:263-268.
3. 鮑學全, 仝小林 主編. 疑難病中醫治療及研究. 北京:人民衛生出版社. 1995:508-526.
4. 黃宮繡. 本草求真(영인본). 서울:一中社. 1992:129-130.
5. 王浴生. 中藥藥理與應用. 北京:人民衛生出版社. 1983:1221-1222.
6. 陳可冀 主編. 抗衰老中藥學. 北京:中醫古籍出版社. 1989:279-280.
7. 高昌男, 辛吉祚, 曹基湖, 金永錫, 裴享燮, 李京燮. 고혈압에 丸과 Hydralazine, Atenolol, nifedipine 및 furosemide의 병용투여에 관한 실험적 연구. 慶熙醫學. 1993; 9(2):158-169.
8. 南相水, 朴東錫. 稀蓂藥針刺戟이 自發性 고혈압 흰쥐의 血壓에 미치는 영향 및 血壓機轉에 관한 研究. 大韓韓醫學會誌. 1997;18(1):218-237.
9. 金光湖, 張東淳. 稀蓂이 실험적 고지혈증의 예방 및 치료 효과에 미치는 영향. 경희한의대논문집. 1994;17(1):29-43.
10. 金昊顯, 申興默, 金吉萱. 稀蓂이 收縮된 血管에 미치는 影響. 東醫生理學會誌. 1995;10(1):25-36.
11. 金昊顯, 金吉萱. 稀蓂이 家兎의 血管內皮細胞性 弛緩因子에 미치는 影響. 大韓韓醫學會誌. 1997;18(2):15-32.
12. Osawa, T., Namiki, M. A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of Eucalyptus leaves. Agric. Biol. Chem. 1981;45:735-739.
13. Ohkawa, H., Ohishi, N., Yaki, K. Assay for lipid peroxide in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. Anal Biochem. 1979;95:351-358.
14. Bligh, E.G. and W. J. Dyer. Can. J. Biochem. Physiol. 1959;31:911-917.
15. Yoshida T., Mori, K., Hatano, T., Okumura, T., Uehara, I., Momagoe, K., Fujita, Y., Okuda., T. Studies on inhibition mechanism of autooxidation by Tannins and Flavonoids. V. Radical-Scavenging effects of tannins and related polyphenols on 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. Chem pharm Bull. 1989;37(1):1919-1921.
16. Lowry, O.H.: Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 1951;193:265-275.
17. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Diabetes mellitus, hypertension and cardiovascular disease: which role for oxidative stress? Metabolism. 1995;44:363-8.
18. Harrison DG. Endothelial function and oxidant stress. Clin. cardiol. 1997;20:11-7.
19. Greib P, Ryba MS, Debicki GS, Gordon-krajcer W, Januszewski S, Chrapusta SJ. Changes in oxidative stress in the rat brain during post-cardiac arrest reperfusion, and the effect of treatment with the free radical scavenger idebenone. Resuscitation. 1998;39(1-2):107-13.
20. Pagano P.J., Griswold M.C., Najibi S, Marklund S.L., Cohen R.A. Resistance of endothelium-dependent relaxation to elevation of O_2^- levels in rabbit carotid artery. Am J Physiol. 1999 Nov;277(5 Pt 2):H2109-14.
21. Saiag B, Shacoori V, Bodin P, Pape D, Allain H, Burnstock G. Free radical involvement in endothelium-dependent responses of the rat thoracic aorta in moderate hypoxic conditions. Eur J Pharmacol. 1999 May 7;372(1):57-63.
22. Munzel T, Heitzer T, Harrison DG. The physiology and pathophysiology of the nitric oxide/superoxide system. Herz. 1997 Jun;22(3):158-72.
23. Yang ZW, Zhang A, Altura BT, Altura BM. Endothelium-dependent relaxation to hydrogen peroxide in canine basilar artery: a potential new cerebral dilator mechanism. Brain Res Bull. 1998 Oct;47(3):257-63.
24. Graier WF, Simecek S, Hoebel BG, Wascher TC, Dittrich P, Kostner GM. Antioxidants prevent high-D-glucose-enhanced endothelial Ca^{2+} /cGMP response by scavenging superoxide anions. Eur J Pharmacol. 1997 Mar 12;322(1):113-22.