

黃連解毒湯이 自發的 高血壓 白鼠의 血壓 및 腎臟 機能에 미치는 影響

국윤범

삼지대학교 한의과대학 본초방제학교실

Effect of Hwangryunhaedok-tang on Blood Pressure and Renal Functions in Spontaneously Hypertensive Rats

Kook Yoon-Bum

Department of Oriental Medical Prescription Sangji University

The present study designed to investigate whether hwangryunhaedok-tang show an anti-hypertensive effect and elucidate its possible mechanism in spontaneously hypertensive rats. The systolic blood pressures (SBP) were significantly decreased as an oral administration of hwangryunhaedok-tang compared with their control group. The urine volume was significantly increased by administration of hwangryunhaedok-tang but urinary sodium (UNaV), potassium (UKV), chloride excretion (UCIV) were not remarkably affected. The urinary creatinine excretion rate (UcrV) was significantly increased in rats administered with hwangryunhaedok-tang in association with increase of creatinine clearance (Ccr). The urine osmolality (Uosmol) was significantly decreased in SHR administered with hwangryunhaedok-tang without being changed in solute-free water reabsorption (Tch2O). The expressions of Aquaporin 2 (AQP-2), 3 and α 1, β 1 subunits of Na,K-ATPase were determined by Western blot analysis to assess the role of these proteins in association with changes of renal functions in SHR administered with hwangryunhaedok-tang. The expression of AQP-2 and 3 protein was significantly down-regulated in the kidney of SHR administered with hwangryunhaedok-tang compared with those in control rats without being altered expression of α 1, β 1 subunits of Na,K-ATPase. In the in vitro assay, Angiotensin converting enzyme (ACE) was inhibited by hwangryunhaedok-tang in a dose-dependent manner. Berberine and/or palmatine, which are well known as a main components of hwangryunhaedok-tang, also have an ACE inhibitory effects in a dose-dependent manner.

Taken together, these results suggest that hwangryunhaedok-tang lowered blood pressure through the increase of diuresis caused by down-regulation of water channels and the inhibition of Angiotensin converting enzyme.

Key word : hwangryunhaedok-tang, Blood Pressure, Renal Function, Angiotensin converting enzyme

교신저자: 국윤범

삼지대학교 한의과대학 본초방제학교실

Tel : 033-730-0661 E-mail : sangjikook@hanmail.net

접수 : 2002/5/18 수정 : 2002/5/10 채택 : 2002/6/15

I. 緒 論

黃連解毒湯은 黃芩, 黃連, 黃柏, 梔子로 구성된 方劑로 葛洪¹⁾의 肘後備急方에 처음으로 收錄되었으며, 王燾²⁾의 外臺秘要에서는 成方本旨와 病症을 詳論하였고, 金代에 이르러 劉³⁾에 의하여 本方의 加減 等 活用法을 提示한 바 있다. 明淸時代의 醫書^{4, 5)}에서도 類似的 證治가 提示되었으며 近代에 이르러 黃連解毒湯은 一切 實熱火證, 譫語昏狂 濕熱黃疸 嘔吐 錯語不眠 丹毒 一般炎症 및 糖尿病 等の 治療에 사용되고 있다.

構成 藥材의 各各의 成分 및 藥理作用을 살펴보면 먼저 黃連의 主成分은 berberine, coptisine, palmatine, jateorrhizine, worenine 等の alkaloid들이 多量 含有되어 있어 中樞 抑制作用, 血壓 降下作用, 殺菌作用, 胃腸 運動의 亢進, 抗消化性 潰瘍作用, 抗炎症作用 등이 밝혀져 있다⁷⁾. 黃芩은 baicalin, wogonin, baicalein, oroxylin-A, kobanebananine 等の flavonoids와 β -sitosterol, campesterol, stigmasterol 等の steroid類를 多量 含有하고 있어 抗 아나필락시스性作用, 抗炎症作用 등이 알려져 있다⁷⁾. 黃柏은 alkaloids로써 berberine, palmatine, jateorrhizine, magnoflorine, phellodendrine, norcoralydine, corexinine, guanidine, condicine, menispermine 等を 包含하고 있고, 苦味性 物質으로써 obakunone, limonin 等を 含有하고 있으며, β -sitosterol, γ -sitosterol, 7-dehydrostigmasterol 等の steroids를 含有하고 있다. 알려진 藥理作用으로는 癌의 發育을 抑制하고, 胃液의 分泌 亢進, 膽汁分泌의 亢進 등이 있다⁷⁾. 梔子는 crocin, iridoid 等の 色素와 geniposide 等の glycosides 등이 多量 含有되어 있고, 膽汁分泌 亢進, 降血壓作用, 抗炎排膿作用, 鎮靜作用 등이 알려져 있다.

高血壓은 慢性 循環系 疾患으로서 發生 頻도가 높고 頭痛, 眩暈, 項強, 耳鳴, 心悸亢進, 失眠, 健忘, 易怒, 眼昏, 發作的 全身 無力症, 失神 等の 症狀이⁶⁾

⁸⁾ 나타나 韓醫學의 眩暈, 肝陽上亢, 頭痛 等の 範疇에 屬하며⁹⁾ 高血壓으로 動脈硬化가 促進되며 血管의 狹窄이나 閉塞으로 인한 併發證으로 狹心症, 心筋梗塞, 腦梗塞, 末梢 血管 疾患 등이 惹起되고, 合併症으로 腦出血, 高血壓性 腦症, 腎不全, 心不全 等도 또한 惹起된다^{6, 8)}. 高血壓은 韓醫學적인 病名은 아니나 이로 因한 二次的인 症狀과 合併症이 火熱, 痰濁, 瘀血 等과 類似的한 것으로 認識되어 火熱을 治療하는 代表的인 處方인 黃連解毒湯이 有效한 것으로 報告되고 있다. 黃連解毒湯에 대한 實驗的 研究에서 杜와 朴¹⁰⁾은 黃連解毒湯을 自發的 高血壓 白鼠의 靜脈內로 投與한 結果 一過性 血壓 降下가 나타남을 報告한 바 있다.

金 等¹¹⁾도 自發的 高血壓 白鼠에 黃連解毒湯을 長期 口腔 投與한 結果 血中 알도스테론의 減少와 함께 血壓이 減少함을 報告하였다. 하지만 아직 黃連解毒湯의 血壓 降下에 대한 機轉은 더욱 研究해야 할 필요가 있다. 따라서 本 研究에서는 黃連解毒湯의 血壓 降下에 대한 機轉을 더욱 자세히 밝히기 위하여 自發的 高血壓 白鼠의 血壓에 미치는 影響, 血壓의 調節에 重要한 役割을 하는 腎臟 機能의 變化, 腎臟의 機能에 影響을 미치는 水分채널 (Aquaporin)과 Na,K-ATPase의 發現이 미치는 影響, 안지오텐신 이 轉換酵素에 미치는 影響을 觀察하여 報告합니다.

II. 實驗 材料 및 方法

1. 實驗 材料

1) 實驗 動物

本 研究에 使用된 實驗 動物은 약 180 g (8 週齡) 정도의 自發的 高血壓 白鼠 (spontaneously hypertensive rat, SHR)를 썬타코 (오산, 韓國) 實驗 動物로부터 購入한 후 1 週 以上 實驗室 環境에 適應시킨 후 實驗에 使用하였다.

2) 實驗 藥物

實驗에 使用한 黃連解毒湯의 處方은 黃¹²⁾의 『方藥合編』에 依據하였으며, 藥材는 圓光大學校 韓醫科大學 益山 韓方病院에서 購入한 후 精選하여 使用하였고, 1貼의 內容과 分量은 다음과 같다.

Prescription of Hwangryunhaedoktang

韓藥名	學 名	重 量 (g)
黃 連	Coptidis Rhizoma	4.70
黃 芩	Scutellariae Radix	4.70
黃 柏	Phellodendri Cortex	4.70
梔 子	Gardeniae Fructus	4.70
總 計		18.8

3) 試藥 및 抗體

本 實驗에 使用된 試藥은 bovine serum albumin, TEMED, glycerol, β -mercaptoethanol, glycine, His-Hip- Leu, Hip-Leu, o-phthaldialdehyde, phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris) 등은 Sigma 社 (St. Louis, MO, USA) 製品을 使用하였고, polyacrylamide, bis-polyacrylamide, bromophenolblue, tween-20 등은 Amresco 社 (Solon, OH, USA) 製品을 使用하였으며, Non-fat milk (NFM)는 Difco 社 (Spark, MD, USA) 製品을 使用하였고, Bradford 시약은 Bio-rad 製品을 使用하였으며 그의 시약들은 日製 試藥을 各各 使用하였다.

本 實驗에 使用된 aquaporin-2의 polyclonal 抗體는 Alomone 社 (Jerusalem, Israel) 製品을 使用하였고, Na,K-ATPase에 대한 α 1과 β 1 抗體는 UBI 社 製品을 使用하였고, Horse reddish peroxide (HRP)-conjugated 2次 抗體는 Amersham 製品 (Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)을 使用하였다.

2. 方 法

1) 檢體의 調製 및 投與

黃連解毒湯 188 g을 蒸溜水 1,000 ml 와 함께 넣고 煎湯한 후 冷却器를 設置하여 120 分間 加熱하였다. 770 ml의 抽出된 煎湯液을 3,000 rpm으로 30 分間 遠心分離하여 얻은 煎湯液을 凍結 乾燥하였다. 乾燥된 抽出物을 200 mg/ml 濃度로 물에 녹인 후 매일 0.8 g/kg 씩 胃腸管에 直接 投與하였다.

2) 採 尿

白鼠를 자유롭게 물과 먹이에 接近할 수 있는 metabolic cage에 넣어 1 週間 적응시킨 후 實驗을 시작하였다. 1週의 對照 期間 동안 24 시간 尿를 採取하였으며, cosy 용기, 먹이통, 물통, cage의 청소는 오전 10시 - 11시에 실시하였다.

3) 採 血

採血은 意識이 있는 狀態의 白鼠를 scaffold로 斷頭하여 1,000 U/ml의 heparin이 포함된 tube에 全血을 모았다. 血漿을 分離하기 위하여 4 °C, 1,000 g에서 10 分間 遠心分離 하여 血漿을 모아 實驗時까지 冷凍 保管하였다.

4) 血壓의 測定

血壓의 測定은 白鼠의 꼬리 動脈에서 血壓을 測定하였다. 卽 白鼠를 50 °C에서 10 分間 放置한 후 白鼠 固定臺에 固定하고, 꼬리에 pneumatic sensor를 부착하여 pneumatic pulse transducer에 연결하였으며, 이를 sphygmomanometer preamplifier에 連結하여 polygraph (Grass Model 7E, Quincy, MA, U.S.A)상 에 기록하여 收縮期의 血壓을 測定하였다.

5) 尿의 creatinine 및 전해질 농도의 측정

尿와 血漿의 creatinine은 Phillips 等¹⁵⁾의 方法으로 分光光度計 (Spectronic 200, B&L. Rochester, U.S.A)를 이용해 定量 하였으며, 電解質 濃度는 電解質 分析機 (NOVA 4, Newton, MA, U.S.A)를 이용해 分析하였고, osmolarity는 osmometer (3C2,

Advanced Instruments, Needham Heights, MA, U.S.A.)를 하여測定하였다.

6) 溶質-自由 水分 再吸收 ($T^{\circ}H_2O$) 의 測定

血漿과 尿의 滲透 濃度를 osmometer (3C2, Advanced Instruments, Needham Heighter, U.S.A)를 이용해 측정한 후 다음 식을 이용하여計算하였다.

$T^{\circ}H_2O = V(Uosmol/Posmol - 1)$, 단, $V =$ urine volume, $Uosmol =$ urinary osmolality, $Posmol =$ plasma osmolality.

7) 蛋白質의 分離 및 定量

意識이 있는 狀態에서 白鼠를 斷頭하여 腎臟을 재빨리 分離한 후 液體 窒素에서 얼린 후 사용시 까지 $-72^{\circ}C$ 에 保管한다. 保管된 腎臟은 250 mmol/L sucrose, 1 mmol/L ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.1 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)가 포함된 Tris-HCl 緩衝液(pH 7.6)에 넣고 3,000 rpm에서 3회 均質화한다. 均質화된 組織은 1,000 g에서 5분, 10,000 g에서 10분간 연속 遠心分離하여 큰 조각 덩어리나, 핵 조각은 제거하고 總蛋白質 抽出物만 얻는다. 總蛋白質 抽出物을 다시 100,000 g에서 1시간 동안 遠心分離하여 細胞質 내의 可溶性 蛋白質과 膜結合 蛋白質로 分離하고 蛋白質의 濃度는 소 혈청 알부민을 標準液으로 한 Bradford 法¹³⁾으로 定量化 하였다.

8) Western blot 분석

Western blot 용 단백질은 AQP-2는 세포막 단백질을 각각 15 μ g을 電氣泳動하였고, Na,K-ATPase의 $\alpha 1$ 및 $\beta 1$ 小單位體는 30 μ g의 세포막 단백질을 이용하여 電氣泳動하였다. Western blot을 위하여 단백질 시료를 polyacrylamide resolving gel (aquaporin2는 12.5%, Na,K-ATPase는 各各 $\alpha 1$ -subunit는 8%, $\beta 1$ -subunit는 10%)과 5% polyacrylamide stacking gel로 이루어진 非連續性系 (Xcell II Mini-Cell,

Novex)를 이용하여 電氣泳動하여 크기대로 分離하였다. 蛋白質을 blot module을 이용하여 電氣泳動하여 Nitrocellulose membrane 에 옮겼다. 이 membrane을 Tris로 완충한 식염수 (TBS)에 씻고 2시간 동안 TBS에 용해시킨 5% 無脂肪 乾燥 牛乳溶液 (NFM/TBS)에서 blocking하고, 2% NFM/TBS로 토끼에서 추출한 polyclonal anti-AQP 2 (Alomone, Israel; 1:750 희석), polyclonal anti-Na,K-ATPase $\alpha 1$ subunit, $\beta 1$ subunit (UBI; 1:5000 희석) 등의 1次 항체 용액에서 常溫에서 1시간 동안 반응시켰다. 그런 다음 membrane을 2% NFM/TBS에서 horse- reddish peroxidase (HRP)가 결합된 goat anti-mouse IgG (1:2000)나 goat anti-rabbit IgG (1:1,500)와 함께 1시간동안 incubation하였다. 결합된 항체를 enhanced chemiluminescence 溶液 (ECL, Amersham, Buckinghamshire, U.K.)을 이용하여 暗室에서 hyperfilm (Amersham, Buckinghamshire, U.K.)에 露出 시킨 후 현상하였다. 結果의 분석은 Image analyzer (Imager III, Bioneer, Korea)를 이용하여 發現의 정도를 測定하였다.

9) Angiotensin I 轉換酵素의 活性度 測定

ACE 活性度는 Santos 等¹⁴⁾의 方法을 參考로 하여 약간 變形하여 使用하였다. 10 μ l의 血漿을 5 mM Hip-His-Leu (in 0.4 M sodium borate buffer)이 들어 있는 490 μ l의 assay buffer에 넣어 $37^{\circ}C$ 에서 15분간 incubation한다. 이 반응을 정지하기 위해 1.2 μ l의 0.34 N NaOH를 넣고 여기에 螢光 物質을 生成하기 위해 100 μ l의 O-phthaldialdehyde 용액을 넣어 잘 섞고 10분 후에 3 N Hcl 200 μ l를 넣어 반응을 마치고 잘 섞었다. 실온에서 3,000 rpm 으로 10분간 원심 분리하여 마지막 生成物인 His-Leu을 excitation 365 nm, emission 495 nm의 파장에서 spectrofluorometer로 측정하였다.

標準 曲線은 His-Leu을 이용하여 作成하였으며 陰性 對照群은 血漿을 반응시키기 전에 NaOH를 먼저 넣어서 施行하였다.

10) 統計 處理

實驗群間的 有意性은 實驗 結果를 students' t-test 나 one-way ANOVA test를 통하여 $p < 0.05$ 인 境遇 有意한 差異로 判定하였고, 實驗置의 表現은 mean \pm S.E.로 하였다.

III. 實驗 結果

1. 血壓에 미치는 影響

實驗 시작時 10 週齡 (body weight, 239.9 ± 7.2 g) 인 自發的 高血壓 白鼠 (SHR)의 收縮期 平均血壓은 168.8 ± 3.1 mmHg로 이미 高血壓이 形成되어 있었으며, 實驗 시작 후 1週, 2週, 3週 동안 平均血壓은 各各 174.0 ± 3.7 , 178.6 ± 2.0 , 186.4 ± 3.2 mmHg로 점차 增加하였다. 黃連解毒湯을 投與한 自發的 高血壓 白鼠의 平均血壓은 1週, 2週 동안 各各 163.4 ± 4.9 , 166.0 ± 5.2 mmHg로 對照群과 比較하여 血壓의 增加가 有意하게 抑制되었으며 ($p < 0.05$), 3週 후에는 平均血壓이 169.6 ± 2.7 로써 對照群과 더 큰 差異를 보였다 ($p < 0.01$) (Fig 1).

2. 尿量에 미치는 影響

對照 期間에 自發的 高血壓 白鼠의 尿量은 26.2 ± 2.5 ml/kg/day이었고 0.5週, 1週, 2週, 3週 동안에 尿量은 26.0 ± 1.9 , 23.4 ± 1.4 , 20.2 ± 1.8 , 27.6 ± 1.2 ml/kg/day로 큰 變化가 없었다. 黃連解毒湯을 투여한 高血壓 白鼠의 尿量은 0.5週, 1週, 2週, 3週 동안에 37.0 ± 4.0 , 36.2 ± 5.8 , 32.8 ± 2.4 , 36.5 ± 3.7 ml/kg/day로 對照群의 尿量에 비해 相對的으로 增加하였다 (1주와 3주; $P < 0.05$, 0.5주와 2주; $p < 0.01$) (Fig 2).

3. Water Balance에 미치는 影響

對照 期間에 自發的 高血壓 白鼠의 water balance는 64.2 ± 5.7 ml/kg/day이었고 0.5週, 1週, 2週, 3週

동안에 water balance는 67.0 ± 11.6 , 58.0 ± 4.2 , 67.2 ± 6.2 , 67.2 ± 4.9 ml/kg/day로 큰 變化가 없었다. 黃連解毒湯을 투여한 高血壓 白鼠의 water balance는 0.5週, 1週, 2週, 3週 동안에 61.9 ± 2.6 , 40.5 ± 6.0 , 52.0 ± 4.1 , 40.5 ± 2.9 ml/kg/day로 對照群에 비해 점점 有意하게 減少하였다 (1주와 2주; $P < 0.05$, 3주; $p < 0.01$) (Fig 3).

4. 尿中 電解質 排泄量에 미치는 影響

對照 期間에 自發的 高血壓 白鼠의 尿中 Na^+ 排泄量(UNa^+V)은 1.26 ± 0.27 $\mu\text{Eq}/\text{min}/\text{kg}$ 이었고 0.5週, 1週, 2週, 3週 동안에 尿中 Na^+ 排泄量은 1.30 ± 0.03 , 1.38 ± 0.29 , 1.06 ± 0.10 , 1.33 ± 0.13 $\mu\text{Eq}/\text{min}/\text{kg}$ 로 큰 變化가 없었다. 黃連解毒湯을 투여한 高血壓 白鼠의 尿中 Na^+ 排泄量은 0.5週, 1週, 2週, 3週 동안에 各各 1.23 ± 0.20 , 1.10 ± 0.09 , 0.85 ± 0.09 , 1.39 ± 0.15 $\mu\text{Eq}/\text{min}/\text{kg}$ 로 對照群과 比較하여 有意한 差異가 없었다 (Fig 4).

對照 期間에 自發的 高血壓 白鼠의 尿中 K^+ 排泄量(UK^+V)은 5.96 ± 0.77 $\mu\text{Eq}/\text{min}/\text{kg}$ 이었고 0.5週, 1週, 2週, 3週 동안에 尿中 K^+ 排泄量은 6.32 ± 0.66 , 4.76 ± 0.29 , 4.84 ± 0.42 , 5.28 ± 0.25 $\mu\text{Eq}/\text{min}/\text{kg}$ 로 큰 變化가 없었다. 黃連解毒湯을 투여한 高血壓 白鼠의 尿中 K^+ 排泄量은 0.5 週, 1週, 2週, 3週 동안에 6.44 ± 0.79 , 5.42 ± 0.54 , 5.15 ± 0.25 , 5.22 ± 0.29 $\mu\text{Eq}/\text{min}/\text{kg}$ 로 對照群과 比較하여 有意한 差異가 없었다 (Fig 5).

對照 期間에 自發的 高血壓 白鼠의 尿中 Cl^- 排泄量(UCl^-V)은 9.65 ± 1.27 $\mu\text{Eq}/\text{min}/\text{kg}$ 이었고 0.5週, 1週, 2週, 3週 동안에 尿中 Cl^- 排泄量은 8.75 ± 2.03 , 13.34 ± 1.50 , 14.74 ± 1.04 , 12.58 ± 0.97 $\mu\text{Eq}/\text{min}/\text{kg}$ 로 큰 變化가 없었다. 黃連解毒湯을 투여한 高血壓 白鼠의 尿中 Cl^- 排泄量은 0.5 週, 1週, 2週, 3週 동안에 8.58 ± 1.50 , 11.95 ± 0.97 , 12.20 ± 0.77 , 10.63 ± 0.81 $\mu\text{Eq}/\text{min}/\text{kg}$ 로 對照群과 比較하여 有意한 差異가 없었다 (Fig 6).

5. 尿中 滲透質 濃度에 미치는 影響

對照 期間에 自發的 高血壓 白鼠의 尿中 滲透質 濃度(Uosmol)는 1094.6±105.4 mEq/kg H₂O이었고 0.5週, 1週, 2週, 3週 동안에 尿中 滲透質 濃度는 1102.8±198, 948.6±121, 1270.2±112, 1180.0±1.5 mEq/kg H₂O로 큰 變化가 없었다. 黃連解毒湯을 투여한 高血壓 白鼠의 尿中 滲透質 濃度는 0.5週, 1週, 2週, 3週 동안에 687.7±101.0, 614.3±134.8, 775.0±162.4, 747.0±103.0 mEq/kg H₂O로 對照群과 비교하여 有意한 減少를 보였다 (0.5週와 1週; p<0.05, 2週와 3週; p<0.01) (Fig 7).

6. Creatinine 排泄量 및 清掃率에 미치는 影響

對照 期間에 自發的 高血壓 白鼠의 尿中 creatinine 排泄量(UcrV)은 16.25±1.52 μg/min/kg이었고 0.5週, 1週, 2週, 3週 동안에 尿中 creatinine 排泄量은 16.63±1.03, 16.62±0.71, 20.00±0.75, 20.20±0.87 μg/min/kg로 큰 變化가 없었다. 黃連解毒湯을 투여한 高血壓 白鼠의 尿中 creatinine 排泄量은 0.5週, 1週, 2週, 3週 동안에 19.20±2.01, 18.75±1.00, 18.98±0.55, 25.25±1.50 μEq/min/kg로 0.5週, 1週, 2週 동안은 對照群과 비교하여 有意한 差異가 없었지만 3週째는 有意하게 增加하였다 (Fig 8).

3週 後 Creatinine 清掃率은 自發的 高血壓 白鼠가 1.39±0.04 ml/min/kg이었고, 黃連解毒湯을 投與한 高血壓 白鼠는 1.73±0.06ml/min/kg으로 有意하게 增加하였다 (Fig 9).

7. 溶質-自由 水分 再吸收에 미치는 影響

實驗 시작 3週 後 溶質-自由水分 再吸收量은 自發的 高血壓 白鼠가 45.0±9.0 μl/min/kg이었고, 黃連解毒湯을 投與한 高血壓 白鼠는 37.1±6.32 μl/min/kg으로 統計的으로 有意한 差異는 보이지 않았지만 減少하는 傾向을 보였다 (Fig 9).

8. 黃連解毒湯의 안지오텐신 轉換酵素 活性度에 미치는 影響

실험관내에서 黃連解毒湯이 안지오텐신 轉換酵素 活性度에 미치는 影響을 測定한 結果 5, 10, 50, 100, 200, 400, 800μg/ml의 黃連解毒湯의 存在 下에서 안지오텐신 轉換酵素 活性度는 對照群과 比較해 各各 100±0.0, 101.8±1.0, 97.4±2.9, 94.7±1.8, 88.2±2.7, 54.9±3.4, 38.3±2.6%의 活性度を 보임으로 濃度 依存的으로 酵素 活性度を 抑制하였다 (Fig 10).

9. Berberine과 palmatine의 안지오텐신 轉換酵素 活性度에 미치는 影響

실험관내에서 berberine이 안지오텐신 轉換酵素 活性度에 미치는 影響을 測定한 結果 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 200 μg/ml의 黃連解毒湯의 存在 下에서 안지오텐신 轉換酵素 活性度는 對照群과 比較해 各各 102.0±0.52, 101.8±1.60, 92.9±1.31, 84.6±1.54, 36.3±2.07, 23.1±0.86, 9.6±0.86%의 活性度を 보임으로 濃度 依存的으로 酵素 活性度を 抑制하였다 (Fig 11).

또한 실험관내에서 palmatine이 안지오텐신 轉換酵素 活性度에 미치는 影響을 測定한 結果 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 200 μg/ml의 黃連解毒湯의 存在 下에서 안지오텐신 轉換酵素 活性度는 對照群과 比較해 各各 102.6±1.76, 98.1±1.58, 92.8±1.30, 85.0±2.73, 35.1±1.55, 7.3±1.51, 3.0±1.53%의 活性度を 보임으로 容量 依存的으로 酵素 活性度を 抑制하였다 (Fig 11).

10. 水分 채널 (aquaporin 2)의 發現에 미치는 影響

自發的 高血壓 白鼠에서 黃連解毒湯이 腎臟에서 물의 再吸收에 중요한 역할을 하는 水分 채널인 AQP 2의 發現에 미치는 影響을 측정한 결과 自發的 高血壓 白鼠 腎臟에서의 相對的 發現 정도는 1.0

±0.06 인데 반해 黃連解毒湯을 투여한 白鼠의 腎臟에서는 0.41±0.09로 發現이 억제되었다 (p<0.01) (Fig 12).

11. Na,K-ATPase의 α1 및 β1의 發現에 미치는 影響

自發的 高血壓 白鼠에서 黃連解毒湯이 腎臟에서 Na⁺의 再吸收에 중요한 역할을 하는 sodium 채널인 Na,K-ATPase α1 小單位體의 發現에 미치는 影響을 測定한 결과 自發的 高血壓 白鼠 腎臟에서의 相對的 發現 정도는 1.0±0.17 인데 반해 黃連解毒湯을 투여한 白鼠의 腎臟에서는 1.06±0.13으로 發現이 변화하지 않았다 (Fig 13). Na,K-ATPase β1 小單位體의 發現에 미치는 影響을 측정한 결과 自發的 高血壓 白鼠 腎臟에서의 相對的 發現 정도는 1.0±0.03 인데 반해 黃連解毒湯을 투여한 白鼠의 腎臟에서는 1.02±0.04로 發現 정도가 차이가 없었다 (Fig 14).

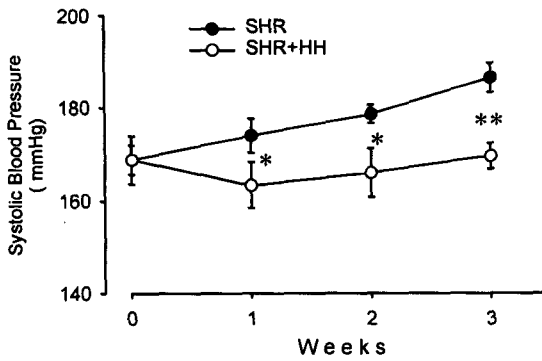


Fig 1. Effect of Hwangryunhaedok-tang (HH) on systolic blood pressure in spontaneously hypertensive rats. Values are mean±SE. There were seven experiments in each groups. *p<0.05, **p<0.01, compared with control.

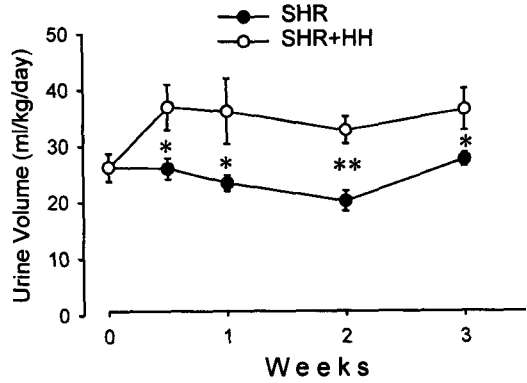


Fig 2. Effect of Hwangryunhaedok-tang (HH) on urinary flow rate in spontaneously hypertensive rats. Values are mean±SE. There were seven experiments in each groups. *p<0.05, **p<0.01, compared with control

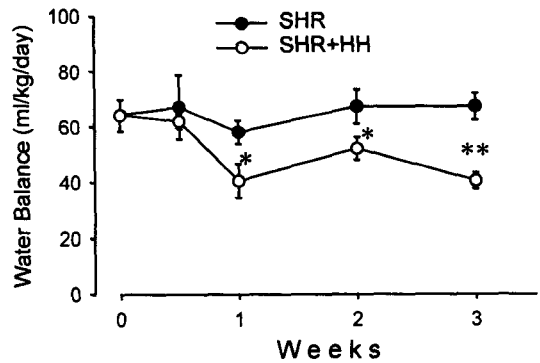


Fig 3. Effect of Hwangryunhaedok-tang (HH) on water balance in spontaneously hypertensive rats. Values are mean±SE. There were seven experiments in each groups. p<0.05, p<0.01, compared with control

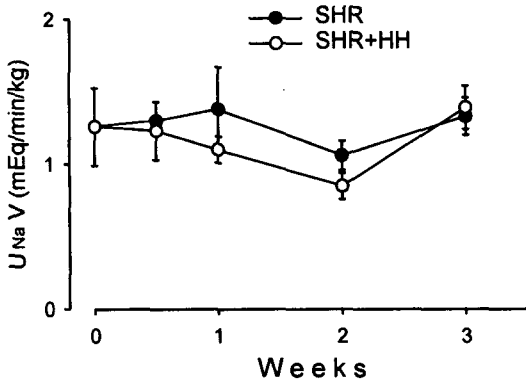


Fig 4. Effect of Hwangryunhaedok-tang (HH) on urinary potassium excretion rate in spontaneously hypertensive rats. Values are mean \pm SE. There were seven experiments in each groups.

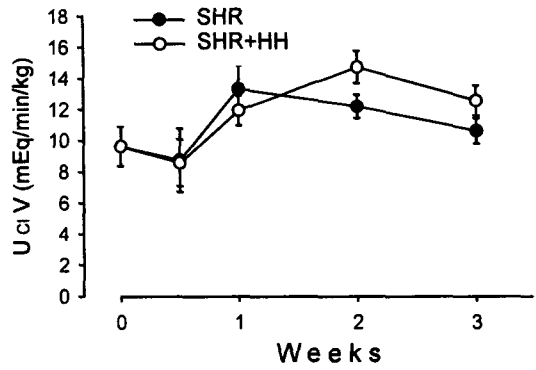


Fig 6. Effect of Hwangryunhaedok-tang (HH) on urinary chloride excretion rate in spontaneously hypertensive rats. Values are mean \pm SE. There were seven experiments in each groups.

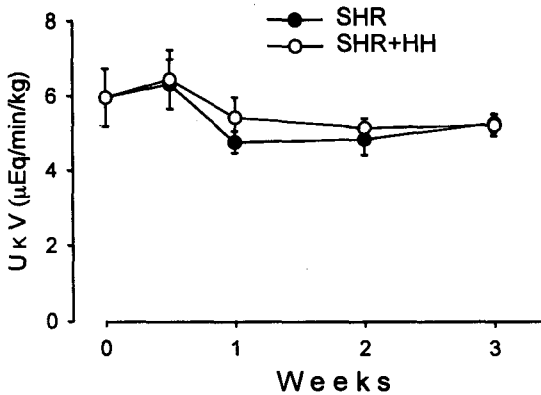


Fig 5. Effect of Hwangryunhaedok-tang (HH) on urinary potassium excretion rate in spontaneously hypertensive rats. Values are mean \pm SE. There were seven experiments in each groups.

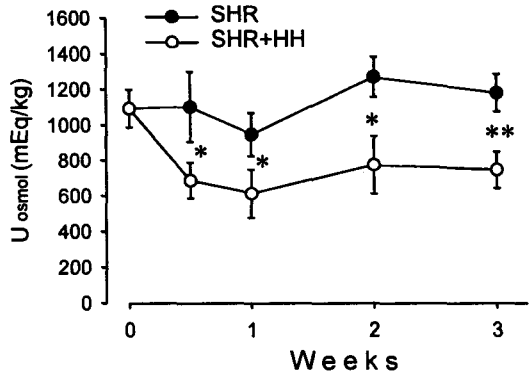


Fig 7. Effect of Hwangryunhaedok-tang (HH) on urinary osmolality in spontaneously hypertensive rats. Values are mean \pm SE. There were seven experiments in each groups. $p < 0.05$, $p < 0.01$, compared with control

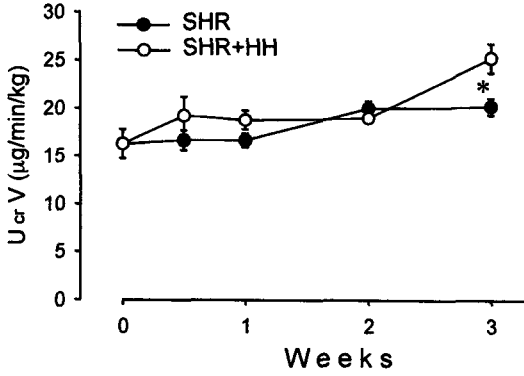


Fig 8. Effect of Hwangryunhaedok-tang (HH) on urinary creatinine excretion rate in spontaneously hypertensive rats. Values are mean±SE. There were seven experiments in each groups. $p < 0.05$, compared with control

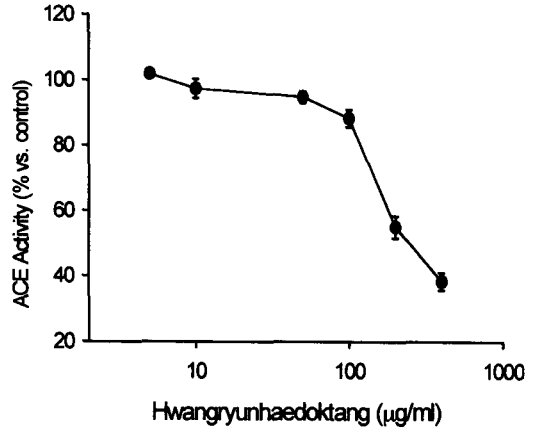


Fig 10. Effect of Hwangryunhaedok-tang on plasma angiotensin converting enzyme activity. Values are mean±SE (n=3).

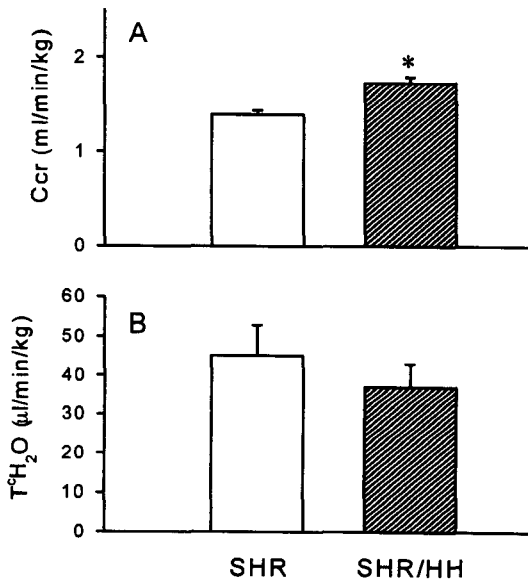


Fig 9. Effect of Hwangryunhaedok-tang (HH) on creatinine clearance (A) and solute-free water reabsorption in spontaneously hypertensive rats. Values are mean±SE. There were seven experiments in each groups. $p < 0.05$, compared with control

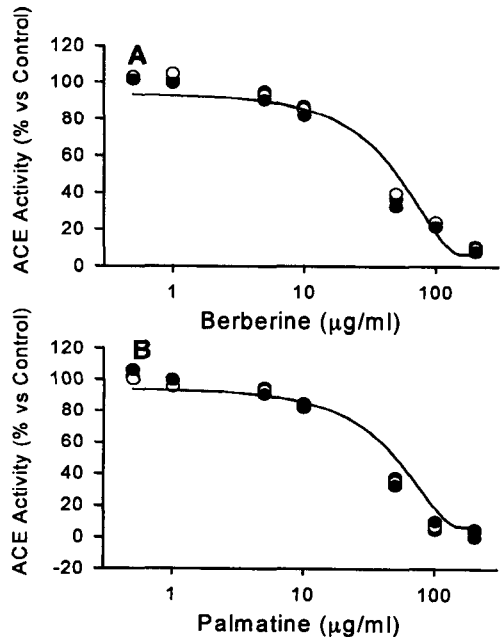


Fig 11. Effect of berberine and palmatine on plasma angiotensin converting enzyme activity. Values are mean±SE (n=3).

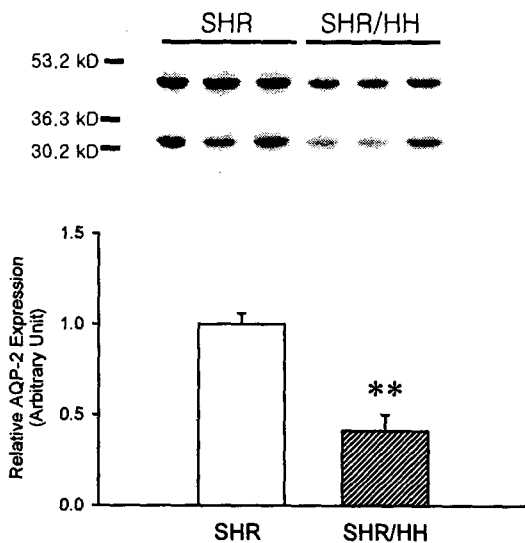


Fig 12. Representative Western blot of AQP 2 in the kidney and its densitometric analysis in spontaneously hypertensive rats (SHR) and SHR administered with Hwangryunhaedok-tang (SHR/HH). Each column represents mean \pm SEM of 6 experiments. * $p < 0.01$, compared with SHR.

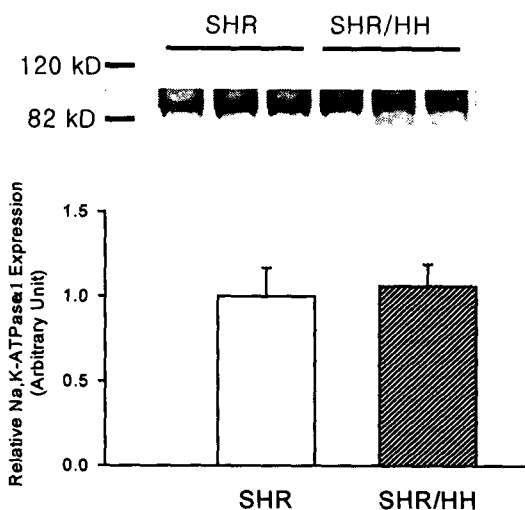


Fig 13. Representative Western blot of Na,K-ATPase α 1-subunit in the kidney and its densitometric analysis in SHR and SHR administered with Hwangryunhaedok-tang (SHR/HH). Each column represents mean \pm SEM of 6 experiments.

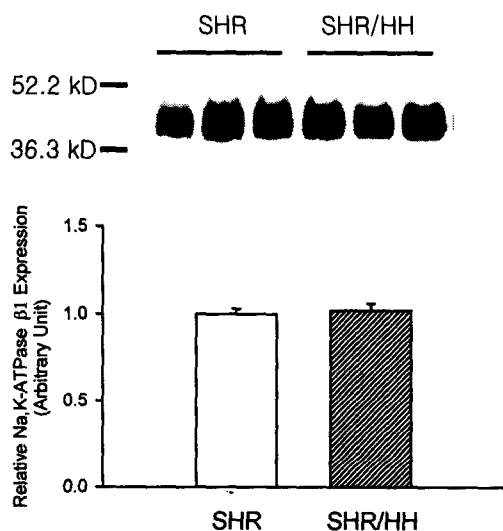


Fig 14. Representative Western blot of Na,K-ATPase β 1-subunit in the kidney and its densitometric analysis in SHR and SHR administered with Hwangryunhaedok-tang (SHR/HH). Each column represents mean \pm SEM of 6 experiments.

III. 考 察

高血壓은 慢性 循環器系 疾患 中에서 發生頻度가 높은 疾患으로 收縮期 動脈 血壓이 140 mmHg 以上, 그리고 擴張期 動脈 血壓이 90 mmHg 以上인 경우를 말한다. 高血壓은 比較的 自覺 症狀이 적고

高血壓 自體로서는 死亡에 이르지 않는지만 心不全, 狹心症, 心筋梗塞, 腦卒中, 網膜 出血, 腎不全, 動脈硬化 等 다른 臟器에 심각한 損傷을 입힐 수 있다⁸⁾. 高血壓은 高血壓을 일으키는 原因에 따라서 本態性 高血壓 (essential hypertension)과 二次性 高血壓 (secondary hypertension)의 두 가지로 分類한다. 本態性 高血壓은 全體 高血壓의 92~94%를 차지하고 있으며 現代 醫學으로도 아직 高血壓을 招來하는 正確한 原因을 모르고 있으며 一次性 (primary) 또는 特發性 (Idiopathic) 高血壓이라고도 한다. 本態性 高血壓의 發病 原因은 정확히 모르나 腦 神經系의 異常說, 腎臟의 나트륨 이온 排泄 異常說, 細胞膜 특히 血管壁을 收縮시키는 平滑筋 細胞膜의 異常에 의한 假說, 그리고 內分泌 異常說 等 다양한 假說 等이 있지만 本態性 高血壓은 同一한 要件에 의해서 發生된다고 하기보다는 證例에 따라 各 個人의 遺傳的, 環境的인 因子의 差異에 의하여 發生 原因이 다를 것으로 생각된다⁹⁾.

二次性 高血壓은 그 原因이 되는 疾患은 많지만 全體에서 차지하는 比率은 5% 內外에 지나지 않는다. 腎臟은 二次性 高血壓의 原因을 제공하는 重要한 臟器인데 腎臟의 異常에 의한 高血壓을 腎性 高血壓이라 하고 여기에는 急性 腎炎, 慢性 腎炎, 慢性 腎盂 腎炎, 糖尿病性 腎症 等이 原因이 되는 腎 實質性 高血壓과 腎動脈이나 그 分枝에 狹窄이 일어나서 腎臟에 충분한 血液 供給이 充分치 못함으로 renin-angiotensin-aldosterone系의 亢進으로 發生하는 腎-血管性 高血壓으로 구분한다.

二次性 高血壓의 또 다른 중요한 原因은 內分泌系의 異常이고, 內分泌系 臟器 가운데서 高血壓과 가장 밀접한 臟器는 副腎이다. 副腎性 高血壓은 原發性 알도스테론症 (primary aldosteronism)이나 쿠싱症候群 (Cushing's syndrome)과 같은 皮質性 高血壓과 褐色 細胞腫과 같은 髓質性 高血壓이 있다. 다른 內分泌性 高血壓은 腦下垂體性 高血壓, 甲状腺 機能 亢進 또는 低下로부터 오는 高血壓, estrogen 過剩으

로 生成된 高血壓 等이 있다. 西洋醫學에서는 高血壓에서 血壓을 降下시키는 것을 最優先으로 하며 血壓 降下劑로는 利尿劑, 抗 adrenalin劑, 血管擴張劑, angiotensin 轉換酵素 抑制劑, calcium 通路 拮抗劑 等을 使用한다⁹⁾.

韓醫學에서는 高血壓이라는 用語를 直接 쓰지는 않았으며, 陰虛陽亢, 肝陽上亢, 頭暈, 頭痛, 中風, 怔忡, 胸痞 等의 範疇에 屬하는 것으로 볼 수 있다. 高血壓은 陰虛하여 火가 上衝한 것으로 말할 수 있는데 高血壓의 發病 原因은 身體의 陰陽平衡의 失調, 長期間의 精神的인 緊張, 睡眠不足, 慾求不滿, 지나친 飲酒, 刺戟性이 강한 飲食, 過度한 肉食, 營養過剩, 過食 等을 들 수가 있다. 그리하여 心, 肝의 陽氣가 亢進되며, 肝, 腎의 陰이 虛하여 火를 發生하고 熱로 되어 風을 發한다고 하였다. 一般的으로 初期에는 頭痛, 眩暈, 面赤, 易怒 等の 症勢를 보이는데, 이는 肝과 腎臟의 虛損에 의하여 肝火가 亢盛하여 陰虛陽盛의 症候를 일으킨 것이며, 中期에는 虛實이 複雜하게 나타나고, 後期에는 추위를 싫어하고 손발이 차며 陽痿 夜尿 等の 症勢를 나타내는데, 이는 陰虛가 持續됨에 따라 腎精이 枯竭되어 오는 陰虛症勢를 兼發한 것이 많다.

治療에는 治風之劑로 防風通聖散, 牛黃清心丸 等 風熱을 없애는 것, 導赤散, 八正散 等の 利尿시키는 것, 大柴胡湯, 桃仁承氣湯 等の 瀉下시키는 것들을 使用할 수 있고, 治火之劑로 黃連解毒湯, 三黃瀉心湯, 加味逍遙散, 六鬱湯, 治痰之劑로 濕痰을 제거하는 半夏白朮天麻湯, 清暈化痰湯, 清熱導痰湯, 治氣之劑로 星香正氣散, 蘇合香元, 烏藥順氣散, 治虛之劑로 六味地黃丸, 左歸飲, 歸脾湯, 加味溫膽湯 等を 病症에 따라 運用한다. 黃連解毒湯은 清熱瀉火하는 작용을 하는 代表的인 處方으로 大苦大寒한 瀉火解毒藥인 黃連, 黃芩, 黃柏, 梔子 等으로 構成되어 있으며, 方 中에서 黃芩은 肺火를 上焦에서 瀉하고, 黃連은 脾火를 中焦에서 瀉하며, 黃柏은 腎火를 下焦에서 瀉하고, 梔子は 三焦의 火를 膀胱으로 誘導하여 排

출하게 된다.⁵⁸⁾

黃連解毒湯에 대한 實驗的 研究에서 鄭¹⁵⁾은 黃連解毒湯의 알콜 抽出液이 물 抽出液 보다 解熱 作用이 強하다는 報告를 하였고, 최¹⁶⁾는 黃連解毒湯 煎湯液이 thioacetamides 毒性으로 인한 代謝障礙에 有效함을 報告하였으며, 宋¹⁷⁾은 黃連解毒湯을 腹腔內 투여했을 때 體液性 免疫反應을 強化시키는 효과가 있음을, 杜¹⁰⁾는 黃連解毒湯에 解熱, 鎮痛 및 鎮靜, 中樞神經系에 대한 作用, 血糖 및 總 콜레스테롤의 抑制 作用, 腸管의 弛緩 作用 등이 있음을, 辛¹⁸⁾은 藥針 製造에 있어서 黃連解毒湯의 安定성을, 尹¹⁹⁾은 黃連解毒湯이 投與 經路에 따라 多様な 아나필락시스 抑制 效果가 있음을, 金 等¹¹⁾은 黃連解毒湯이 血壓 降下 效果가 있음을 各各 報告하였다.

하지만 아직 黃連解毒湯의 血壓 降下 作用에 대한 明確한 機轉은 確立되지 않았으므로 본 研究에서는 自發的 高血壓 白鼠에서 黃連解毒湯의 血壓 降下 作用과 그 機轉에 대한 研究를 修行하였다.

本 研究에서 自發的 高血壓 白鼠에 黃連解毒湯을 투여한 結果 1週 後부터 血壓이 降下하기 始作하였고 實驗 終了 期間인 3週 後까지 血壓 降下が 維持 되었다. 이러한 血壓 降下の 機轉을 밝히기 위하여 腎臟 機能과 腎臟 機能을 調節하는 단백질의 發現, 그리고 血壓 降下の 重要한 機轉인 안지오텐신 轉換 酵素에 대한 實驗을 修行하였다. 黃連解毒湯을 投與한 結果 0.5週 後부터 尿量이 增加하였고, 水分 平衡 (water balace)은 減少하였으며, 나트륨, 칼륨, 鹽化 이온 排泄 等の 有意한 差異가 없었다. Creatinine 排泄은 2 週까지는 變化가 없다가 3週 후에는 增加 하였으며, 絲球體 濾過率의 指標가 되는 creatinine 清除律 (Ccr)은 3 週때 增加하였다. 尿量의 增加와 함께 尿中 滲透質 濃度는 減少하였고 溶質-自由 水分 再吸收는 減少하는 傾向을 보였지만 統計的인 有意성은 없었다. 韓醫學에서의 腎은 生命의 基礎 物質인 發育과 生殖의 精을 主管하는 臟器로써 五臟六腑의 精氣를 貯藏하고 水液代謝를 主管하며 納氣의

機能을 가지고 있고²⁰⁾, 西洋醫學에서의 腎臟은 體內 老廢物의 除去, 體內 電解質濃度와 滲透質 濃度の 調節, 酸-鹽基 平衡 (acid-base balance)의 調節 등 生體 內 環境의 恒常性 維持에 重要한 役割을 하며, renin 과 erythropoietin의 合成과 같은 內分泌 機能도 담당 하고 gluconeogenesis와 같은 代謝機能에도 關여한다²¹⁻²³⁾. 腎臟에서 尿의 形成은 絲球體 濾過, 細尿管 再 吸收, 그리고 細尿管 分泌의 세 過程을 통하여 이루어진다. 本 研究 結果 尿量은 增加하였고 絲球體 濾過率이 增加하였지만 電解質의 排泄量은 變化가 없었다.

이러한 結果는 腎臟의 絲球體-細尿管 平衡 機轉으로 因한 結果라 思料된다²³⁾. 나트륨 이온의 排泄은 주로 細尿管 細尿管腔의 Na^+ 채널 (Na^+ -glucose transporter, Na^+ - HCO_3^- transporter, Na^+ - Cl^- co-transporter, Na^+ , K^+ , $2Cl^-$ transporter, etc.), 細尿管과 集合管의 Na^+ 채널 (epithelial Na^+ channel), 細尿管과 集合管의 基底膜의 Na^+ - K^+ -pump (Na , K -ATPase) 等の 調節에 의하여 決定된다^{22, 23)}. 그 중에서 Na , K -ATPase는 腎臟에서 Na^+ 再 吸收에 있어서 中樞的인 役割을 하는 Na^+ -pump이다^{24, 25)}. Na , K -ATPase는 活性 部位인 $\alpha 1$ 小單位體와 글리코 실화된 $\beta 1$ 小單位體, 그리고 γ 小單位體 등 세 개의 小單位體로 構成되어 있는데²⁶⁾, $\alpha 1$ 과 $\beta 1$ 이 腎臟에서 Na^+ 을 再 吸收하는 重要한 小單位體이다²⁷⁾.

Na , K -ATPase 活性도가 腎臟의 Na^+ 再 吸收에 있어서 重要한 役割을 하기 때문에 Na , K -ATPase의 $\alpha 1$ 및 $\beta 1$ 小單位體의 蛋白質 發現의 變化는 高血壓을 비롯한 여러 가지 病態生理에 있어서 重要한 役割을 한다. 실제 鹽-依存性 遺傳的 高血壓 모델인 Dahl-鹽 感受性 高血壓 白鼠 (Dahl-salt sensitive hypertensive rat) 및 Milan 高血壓 모델, 自發的 高血壓 白鼠 모델에서 Na , K -ATPase의 $\alpha 1$ 및 $\beta 1$ 小單位體의 蛋白質 發現은 正常 血壓 白鼠의 것보다 增加되어 있고 活性도 또한 增加되어 있다²⁸⁻³⁰⁾.

또한 Kang 等³¹⁾도 NO-依存性 高血壓 모델 等に

서 Na,K-ATPase의 發顯은 變化하지 않고 活性도는 增加한다는 報告를 한 바 있다. 이러한 一連의 研究 結果들은 高血壓의 生成과 維持에 있어서 Na, K-ATPase의 發現 增加가 중요한 役割을 한다는 것을 示唆하는데 本 研究에서는 黃連解毒湯이 Na^+ 의 排泄量이나 Na,K-ATPase의 發現에는 影響을 주지 않는 것으로 思料된다. 腎臟에서 利尿는 水分性 利尿와 滲透性 利尿로 區分할 수 있다. 그 중에서 水分性 利尿는 抗利尿호르몬 (antidiuretic hormone =ADH, arginine vasopressin =AVP)에 의하여 주로 調節을 받고 물 分子를 통과시키는 通路를 aquaporin (AQP)이라 한다^{32, 33).}

最近 aquaporin 水分 通路의 발견은 腎臟에서 수분 이동의 이해를 가능하게 해 주었다. AQP는 腎髓質 高張性 유지 및 集合管 水分 透過력을 조절하여 尿 濃縮력을 조절한다. 腎臟에는 적어도 6가지의 aquaporin 同位酵素 (AQP 1, 2, 3, 4, 6, 7)가 腎細尿管과 血管에 分포하고 있는 것으로 알려져 있고 최근에는 AQP 8, 10이 추가로 밝혀졌지만 아직 분포 및 그 機能은 알려져 있지 않다. 그 중에서 aquaporin 2는 ADH에 의하여 직접 調節을 받고 體液 調節에 있어서 中樞的인 役割을 한다. 따라서 aquaporin 2의 發現 變化는 다양한 疾病의 原因이 되는데, 先天性 尿崩症, 腎 症候群, 糖尿病性 腎症, 鬱血性 心不全, 腎不全, 尿路閉塞, 老化 등의 原因에 의하여 aquaporin 2의 發現이 變化한다^{32-36).} 더욱이 最近 研究 結果에 의하면 容量-依存型 高血壓 모델인 DOCA-鹽 高血壓 모델에서 aquaporin-2의 發顯 增加가 體液을 증가시켜 高血壓 形成의 病態 生理的 原因을 提供한다는 報告가 있었다^{37).}

本 研究에서 黃連解毒湯의 投與가 aquaporin의 發顯에 變化를 주어 利尿 效果를 나타낸 것인지를 觀察하기 위하여 aquaporin-2의 蛋白質 發顯 變化를 측정 한 結果 aquaporin-2의 發顯이 部分的으로 抑制되었다. 따라서 黃連解毒湯에 의한 利尿 效果는 어느 정도 水分 通路의 發顯 抑制에 의하여 나타난 結果

로 思料되고 이는 血壓의 降下에도 部分的으로 影響을 미쳤을 것으로 思料된다.

한편 高血壓의 生成과 維持에 있어서 renin-angiotensin系는 매우 重要的 役割을 한다. Renin-angiotensin系는 주로 腎臟에 分布하여 腎 機能과 血壓를 調節하지만 最近에는 心臟, 肝臟, 肺臟 등 多様な 組織에도 分布하는 것으로 알려져 그 重要性이 더욱 擡頭되고 있다. Renin-angiotensin系를 調節하는 段階중 가장 重要的 酵素는 안지오텐신 轉換酵素 (Angiotensin converting enzyme, EC.3.4.1.15)로써 angiotensin I을 生理 活性이 있는 angiotensin II로 轉換 시킨다. Angiotensin II는 直接 血管에 作用하여 血管을 收縮하게 함으로써 血管 抵抗을 增加시키고 따라서 血壓를 增加시킨다. 또한 副腎 皮質의 絲球帶에서 알도스테론의 分泌를 增加시켜 腎臟 內 鹽의 貯留를 誘發시켜 細胞外液을 增加하게 함으로써 血壓를 上昇시킨다.³⁸⁾ 안지오텐신 轉換 酵素는 kallikrein/kinin system에도 作用하여 血管 弛緩 物質인 bradykinin의 C-말단을 分解하여 血管 弛緩을 抑制함으로써 血壓를 增加시킨다^{39).} 안지오텐신 轉換 酵素는 肺臟, 心臟, 腎臟과 같은 多様な 組織 및 血漿 등에 分布하고 있다. 그러므로 안지오텐신 轉換 酵素 抑制劑는 angiotensin II의 生成과 bradykinin의 分解를 抑制시켜 血壓를 降下시킬 目的으로 開發되었다.

現在는 captopril, enalapril, lisinopril 및 temocapril 등이 開發되어 商業的으로 利用되고 있으며 高血壓, 鬱血性 心不全, 心筋梗塞, 糖尿病性 腎炎, 腎不全 등의 治療劑로 널리 使用되고 있다. 最近 研究에서 다양한 韓藥材 및 藥用植物로부터 안지오텐신 轉換 酵素 抑制劑를 開發하기 위하여 많은 研究 結果들이 發表되었다. 尹 等⁴⁰⁾은 韓藥에서 많이 이용되는 27종의 生藥으로부터 안지오텐신 轉換 酵素 抑制劑를 檢索하여 고사리, 薄荷, 운목향 등의 抽出物質이 안지오텐신 轉換 酵素 抑制 活性도가 높다는 것을 報告하였다. Inokuchi 等^{41,42)} 또한 日本의 傳統 生藥과 中

醫學에서 高血壓과 關聯이 있다고 알려진 生藥 65가지를 50% methanol로 抽出하여 안지오텐신 轉換酵素 抑制劑를 檢索한 바 있다.

또한 印度⁴³⁾, Reunion 섬⁴⁴⁾, 남아프리카⁴⁵⁾, 남아메리카⁴⁶⁾ 등에서 自生하는 傳統 醫藥材 抽出物에서 안지오텐신 轉換酵素 抑制劑를 檢索하였다. 藥用植物에서 抽出된 안지오텐신 轉換酵素 抑制劑는 tannin⁴⁷⁾, proanthocyanidins^{48,49)}, flavonoids^{50,51)}, xanthones⁵²⁾, fatty acid⁵³⁾, terpenoids⁵⁴⁾, oligosaccharides⁵⁵⁾ 그리고 peptides^{49,56)} 등이 있다. 最近 研究에서 姜 等⁵⁷⁾은 黃連解毒湯 構成 藥材 中에서 黃連, 黃芩, 梔子 등이 안지오텐신 轉換酵素 抑制 作用이 매우 크다는 報告를 한 바 있다.

本 研究에서도 黃連解毒湯이 안지오텐신 轉換酵素 抑制 作用이 있는지를 測定한 結果 用量-依存的으로 안지오텐신 轉換酵素 活性化도를 抑制하였다. 黃連, 黃芩, 黃柏 등의 藥理 作用을 나타내는 主 成分은 berberine, palmatine 等の alkaloid 類라는 것은 잘 알려져 있다. 그러므로 黃連解毒湯에서도 이러한 알칼로이드 등이 안지오텐신 轉換酵素 抑制 作用을 나타낼 것으로 判斷되어 berberine, palmatine의 안지오텐신 轉換酵素 抑制 作用을 測定한 結果, 이들 알칼로이드들이 강력하게 안지오텐신 轉換酵素 活性化도를 抑制하는 것으로 나타났다. 이와 같은 結果는 黃連解毒湯의 主 成分들이 안지오텐신 轉換酵素를 抑制하여 血壓를 降下시킨다는 것을 示唆한다.

以上과 같은 結果로 볼 때 黃連解毒湯의 血壓 降下 效果는 部分的으로 利尿效果와 안지오텐신 轉換酵素 抑制 作用이 關與하는 것으로 思料된다.

V. 結 論

黃連解毒湯이 自發的 高血壓 白鼠의 血壓에 미치는 影響과 그 作用 機轉을 밝히기 위하여 黃連解毒湯을 自發的 高血壓 白鼠에 投與하여 다음과 같은

結果를 얻었다.

1. 收縮期 血壓은 實驗 시작 1, 2, 3 週 後 對照群과 比較하여 有意하게 減少하였다.
2. 尿量은 有意하게 增加하였고 水分 平衡은 對照群과 比較하여 有意하게 減少하였다.
3. 尿中 Na^+ 排泄量과 K^+ 排泄量, Cl^- 排泄量은 對照群과 比較하여 變化가 없었다.
4. 尿中 creatinine 排泄量은 3週 後에만 有意하게 增加하였고, creatinine 清除率 또한 增加하였다.
5. 尿中 滲透質 濃度는 有意하게 減少하였으나, 溶質-自由 水分 排泄率은 統計的인 減少가 없었다.
6. 黃連解毒湯이 안지오텐신 轉換酵素의 活性化도를 濃度 依存的으로 抑制하였다.
7. Berberine과 palmatine 또한 안지오텐신 轉換酵素의 活性化도를 濃度 依存的으로 抑制하였다.
8. 腎臟內 Aquaporin-2의 蛋白質의 發現은 有意하게 減少하였다.
9. Na,K -ATPase의 $\alpha 1$, $\beta 1$ 小單位體의 發顯 變化는 보이지 않았다.

以上과 같은 結果로 볼 때 黃連解毒湯의 血壓 降下 效果는 部分的으로 利尿效果와 안지오텐신 轉換酵素 抑制 作用이 關與하는 것으로 思料되고 利尿效果는 Na,K -ATPase $\alpha 1$ 小單位體 및 $\beta 1$ 小單位體의 發現과는 關係가 없고 水分 채널인 AQP 2의 發現과는 關係가 있는 것으로 思料된다.

參 考 文 獻

1. 葛仙翁 : 肘後備急方. 臺北, 集文書局, pp.35, 277, 279, 282, 1968.
2. 王燕 : 外臺秘要. 臺北, 國立中醫藥學研究所, p.72, 1968.
3. 劉完素: 劉河間傷寒三六書. 臺北, 教育주부사출판
9184tv 2014.10.11 (1/1)

- 부, pp. 55, 181, 340, 341, 520, 1976.
4. 方賢: 奇効良方. 香港, 商務印書館, pp. 125-134, 1977.
 5. 汪訥庵: 醫方集解. 서울, 杏林出版社, pp.272, 1978
 6. 李京燮 등: 東醫心系內科學 (上), 1, 서울, 書苑堂, pp. 400-447, 1995.
 7. 生藥學研究會: 現代 生藥學, 서울, 學窓社, pp. 420-424, 422-423, 176-180, 1999.
 8. Harrison: Harrison's 內科學 (II),1, 서울, 정담. pp. 2234-2240, 1997.
 9. 裴元植: 最新韓方臨床學, 서울, 南山堂, pp. 281-294, 1982.
 10. 杜鎬京, 朴憲在: 慶熙韓醫大 論文集. 5, 103-114, 1982.
 11. 金恩善, 朴致相, 朴昌國: 黃連解毒湯과 溫清飲이 高血壓 및 高脂血症에 미치는 影響. 대한한의학회지 20(1), 185-196, 1999.
 12. 黃道淵: 辨證論治 方藥合編, 서울, 南山堂, pp. 138, 1995.
 13. Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 72:248-54, 1976.
 14. Santos R.A., Krieger E.M., Greene L.J.: An improved fluorometric assay of rat serum and plasma converting enzyme. Hypertension 7(2):244-52, 1985.
 15. 鄭遇悅: 黃連解毒湯 역기스가 家兔의 體溫 및 血壓에 미치는 影響, 慶熙大學校 大學院, 1988.
 16. 崔大善: 黃連解毒湯煎液이 thioacetamides 毒性으로 인한 代謝 障礙에 미치는 影響에 대한 實驗的 研究. 慶熙大學校 大學院, 1971.
 17. 宋昊竣: 黃連解毒湯이 緬羊赤血球에 대한 免疫反應에 미치는 影響, 圓光大學校 大學院, 1997.
 18. 辛吉祚: 黃連解毒湯 藥針製劑의 安定性 및 效能에 관한 研究. 慶熙大學校 大學院, 1994.
 19. 尹星燦: 黃連解毒湯加味方에 대한 免疫 글로블린 E 媒介性 아나필락시의 억제, 圓光大學校 大學院, 1997.
 20. 李兆華: 腎과 腎病의 證治, 서울, 圖書出版 醫聖堂, pp.5-11, 1992.
 21. 金宗규: 生理學, 서울, 정문각, pp.271-280, 1998.
 22. 金광진, 金창주, 金형진, 박사훈: 人體生理學, 서울, 정문각, pp.171-229, 1998.
 23. 서울대학교 의과대학: 전정관 腎臟學, 서울, 서울대학교 出版部, pp.87-110, 1993.
 24. Kinne R., Schmitz J.E., Kinne S.E.: The localization of the Na⁺-K⁺-ATPase in the cells of rat kidney cortex. A study on isolated plasma membranes. Pflugers Arch 329: 191-206, 1971.
 25. Schmidt U., Dubach U.C.: Na⁺,K⁺-ATPase in the rat nephron related to sodium transport: results with quantitative histochemistry. Part II. Curr Probl Clin Biochem 3: 320-44, 1971.
 26. Lingrel J.B., Kuntzweiler T.: Na,K-ATPase. J Biol Chem 269: 19659-19662, 1994.
 27. Orłowski J, Lingrel J.B.: Tissue-specific and developmental regulation of rat Na,K-ATPase catalytic alpha isoform and beta subunit mRNAs. J Biol Chem 263: 10436-42, 1988.
 28. Nishi A, Celsi G., Aperia A.: High-salt diet upregulates activity and mRNA of renal Na⁺,K⁺-ATPase in Dahl salt-sensitive rats. Am J Physiol 264: F448-F452, 1993.
 29. Ferrandi M., Tripodi G., Salardi S., Florio M., Modica R., Barassi P., Parenti P., Shainskaya A., Karlish S., Bianchi G., Ferrari P.: Renal Na,K-ATPase in genetic hypertension. Hypertension 28: 1018-1025, 1996.
 30. Soszynski P.A., Tao Q.F., Krep H.H., Hollenberg N.K., Graves S.W.: Renal sodium

- pump regulation in deoxycorticosterone salt hypertension in the rat. *Am J Hypertension* 10: 525-534, 1997.
31. Kang D.G., Kim J.W., Lee J.U.. Upregulation of Renal Na⁺,K⁺-ATPase in the L-NAME-induced hypertensive rats. *Pharmacological Research* 2000 41(1), 121-125
 32. Kim S.W., Jeon Y.S., Lee J.U., Kang D.G., Kook H., Ahn K.Y., Kim S.Z., Cho K.W. Kim N.H. Han J.S, Choi K.C.: Diminished adenylate cyclase activity and aquaporin 2 expression in acute renal failure rats. *Kidney Int.* 57(4): 1643-50, 2000.
 33. Xu, D.L., P.Y. Martin, M. Ohara, J. St John, T. Pattison, X. Meng, K. Morris, J.K. Kim, R.W. Schrier. Upregulation of aquaporin-2 water channel expression in chronic heart failure rat. *J. Clin. Invest.* 99(7):1500-5, 1997.
 34. Fernandez-llama, P., Andrews P., Nielsen S., Ecelbarger C.A., Knepper. M.A. Impaired aquaporin and urea transporter expression in rats with adriamycin-induced nephrotic syndrome. *Kidney Int.* 53: 1244-1253, 1998.
 35. Mulders, S.M., Bichet D.G., Rijss J.P., Kamsteeg E.J., Arthus M.F., Lonergan M., Fujiwara M., Morgan K., Leijendekker R., van der Sluijs P., van Os C.H., Deen P.M.: An aquaporin-2 water channel mutant which causes autosomal dominant nephrogenic diabetes insipidus is retained in the Golgi complex. *J. Clin. Invest.* 102(1): 57-66, 1998.
 36. Kwon, T.H., Frokiaer J., Fernandez-Llama P., Knepper M.A., Nielsen S.: Reduced abundance of aquaporins in rats with bilateral ischemia-induced acute renal failure: prevention by alpha-MSH. *Am J Physiol.* 277(3 Pt 2): F413-27, 1999.
 37. Lee, J.U., Kang D.G., Kim Y.J.: Increased expression and shuttling of aquaporin-2 water channels in the kidney in DOCA-salt hypertensive rats. 22(5): 531-541, 2000.
 38. Soffer R.L.: Angiotensin-converting enzyme and the regulation of vasoactive peptides. *Annu. Rev. Biochem.* 45:73-94, 1976.
 39. Stewart J.M., Ferreira S.H., Greene L.J.: Bradykinin potentiating peptide PCA-Lys-Trp-Ala-Pro. An inhibitor of the pulmonary inactivation of bradykinin and conversion of angiotensin I to II. *Biochem. Pharmacol.* 20(7):1557-67. 1971.
 40. Yun H.S., Chung S.H., Han B.H.: Screening of Plant Materials for the inhibitory activities against angiotensin converting enzyme. *Kor. J. Pharmacog.* 12(1):51-4, 1981.
 41. Inokuchi J., Okabe H., Yamauchi T., Nagamatsu A.: Inhibitors of angiotensin converting enzyme in crude drugs I. *Chem. Pharm. Bull.* 32(9): 3615-9. 1984.
 42. Inokuchi J., Okabe H., Yamauchi T., Nagamatsu A., Nonaka G., Nishioka I.: Antihypertensive substance in seeds of *Areca catechu* L. *Life Sciences* 38: 1375-82, 1986.
 43. Nyman U., Joshi P., Madsen L.B., Pedersen T.B., Pinstrup M., Rajasekharan S., George V., Pushpangadan P.: Ethnomedical information and in vitro screening for angiotensin-converting enzyme inhibition of plants utilized as traditional medicines in Gujarat, Rajasthan and Kerala (India) *J. Ethnopharmacol.* 60:247-63, 1998.
 44. Adersen A., Adersen H.: Plants from reunion island with alleged antihypertensive and diuretic effects-an experimental and ethnobotanical

- evaluation. J. Ethnopharmacol. 58:189-206, 1997.
45. Duncan A.C, Jäger A.K., van Stan J.: Screening of Zulu medicinal plants for angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors. J. Ethnopharmacol. 68:63-70, 1999.
 46. Hansen K., Nymann U., Smitt U.W., Adersen A., Gudiksen L., Rajasekharan S., Pushpangadan P.: In vitro screening of traditional medicines for anti-hypertensive effect based on inhibition of the angiotensin converting enzyme. J. Ethnopharmacol. 48:43-51, 1995.
 47. Ueno H., Horie S., Nishi Y., Shogawa H., Kawasaki M., Suzuki S., Hayashi T., Arisawa M., Shimizu M., Yoshizaki M., Mirita N.: Chemical and pharmaceutical studies on medicinal plants in Paraguay. Geraniin; an angiotensin-converting enzyme inhibitor from 'Paraparai mi', *Phyllanthanthus niruri*. J. Natl. Prod. 51: 357-9, 1988.
 48. Wagner H., Elbl G.: ACE-inhibitory procyanidins from *Lespedeza capitata*. Planta Med.. 58:297, 1992.
 49. Wagner H, Elbl G, Lotter H, Guinea M.: Evaluation of natural products as inhibitors of angiotensin I-converting enzyme (ACE). Pharmaceutical Pharmacol. Lett. 1:15-8, 1991.
 50. 조영재, 안봉천, 최창.: 한국산 녹차로부터 분리한 Flavan-3-ol 化合物의 angiotensin converting enzyme 阻害 効果. 韓國食品科學會誌 25(3): 238-42, 1993.
 51. Kameda K, Takaku T, Okuda H, Kimura Y, Okuda T, Hatano T.: Inhibitory effects of various flavonoids isolated from leaves of persimon on angiotensin-converting enzyme activity. J. Natl. Prod. 50(4):680-3, 1987.
 52. Chen CH, Lin JY.: Inhibition of angiotensin-I-converting enzyme by tetrahydroxyxanthones isolated from *Tripterospermum lanceolatum*. J. Natl. Prod. 55(5):691-5, 1992.
 53. Morota T, Sasaki H, Chin M, Sato T, Katayama N, Fukuyama K, Mitsuhashi H.: Studies on the crude drug containing the angiotensin-converting enzyme inhibitors I. On the active principles of *Lycium chinense* Muller. Shoyakugaku Zassi 41:169-73, 1987.
 54. Morigiwa A, Kitabatake K, Fujimoto Y, Ikekawa N.: Angiotensin converting enzyme-inhibitory triterpenes from *Gaboderma lucidum*.. Chem. Pharm. Bull. 34(7):3025-8, 1986.
 55. 홍상필, 김명희, 오세욱, 한찬규, 김용현.: Chitosan 올리고당의 안지오텐신 轉換酵素 活性 抑制 및 SHR에서의 高血壓 抑制 特性. 韓國食品科學會誌 30(6):1476-9, 1998.
 56. 오세종, 김세현, 김상교, 백영진, 조경현.: κ -Casein의 chymosin, pepsin 및 trypsin 加水 分解物에 대한 안지오텐신 變換 酵素 阻害 効果의 探索. 韓國食品科學會誌 29(6):1316-8, 1997.
 57. 강대길, 오현철, 손은진, 권태오, 이호섭: 韓藥材들의 안지오텐신 轉換酵素 抑制劑 作用의 檢索. 大韓韓醫學會誌 22(2): 3-9, 2001.
 58. 辛民教 : 臨床本草學, 서울, 永林社, pp 372-374, 400-406, 2000