

山楂의 혈관이완 효능과 항산화 작용

손창우 · 채종구 · 김길원 · 신흥묵*

동국대학교 한의과대학 생리학교실

Effects of Crataegi Fructus on the Vascular Relaxation and Antioxidative Status

Chang Woo Son, Jong Koo Chae, Gil Whon Kim, Heung Mook Shin*

Department of Physiology, College of Oriental Medicine, Dongguk University

This study investigated the relaxation effects of Crataegi Fructus(CF, *Crataegus pinnatifida* Bunge) on the contraction evoked by phenylephrine in rabbit carotid artery, and also analyzes antioxidative status in vitro. CF revealed significant relaxation on phenylephrine-induced arterial contraction. It's relaxant effect statistically significant in both in the presence of endothelium and absence of endothelium, but statistically exerted more strong relaxation in the presence of endothelium. CF increased in vitro nitric oxide(NO) production in dose-dependent manner. Also, they reduced malondialdehyde(MDA) concentrations, phosphatidyl choline-liposome(PCOOH) contents, linoleic acid-induced lipid peroxidation and exerted 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH) radical scavenging effect, in vitro. These results indicate that Crataegi Fructus would be effective in relaxing arterial contraction and it's antioxidative effects may be involved in endothelium-dependent relaxation of artery via vascular protective properties.

Key word : Crataegi Fructus(CF), arterial contraction, nitric oxide, phosphatidyl choline-liposome, malondialdehyde, DPPH.

서 론

山楂는 薔薇科(Rosaceae)에 屬한 落葉喬木인 山楂나무(아구 베나무)의 성숙한 果實을 말한다. 그 性이 微溫하고 味는 酸甘하며, 脾·胃·肝에 歸經한다. 그 효능은 健脾行氣, 消食磨積의 작용이 있어 食滯를 소화시키고 食積으로 발생하는 腐부팽만이나 소화불량, 설사의 증을 치료하며, 活血散瘀의 효능은 분만 후의 瘀血로 인한 복통, 惡露不盡을 다스린다^{1,2,3,4,5}. 특히 活血과 瘀血을 제거하는 작용은 혈관의 수축이 주 원인으로 작용하는 혈류장애, 동맥경화 및 고혈압과 같은 심혈관계 질환의 치료에 유효한 효과가 기대되며, 근래에 혈압강하, 강심 및 혈관확장의 작용이 알려지면서 고혈압이나 관상동맥경화에 사용한다. 고혈압의 치료는 혈관의 수축성 조절이 중요한 역할을 하며, 혈관의 수축성 조절 및 동맥경화, 고혈압에 reactive oxygen species(ROS)가 연루되어 있음이 보고되고 있다^{6,7,8,9,10}. ROS의 증가에 의한 세포막의 지질과산화는 세포막의 생화학적 성질을 변화시키는 요인이 되는데, 막 성질의 변화는 세포막을 통과하는 분자나 이온의 투과성을 결정하는 결정적 역할을 수행하고, 지질과산화에 의한 세포막의 손상은 혈관내피세포의 손상을 유도하여 심혈관계 질환

환의 원인으로 작용하고 있다. 나이가 다양한 실험적, 임상적 상태에서 고혈압, 동맥경화, 허혈성 심장질환에 있어서 항산화제에 의한 치료가 유익한 효과를 나타내고 있음이 관찰되고 있다. 한편 山楂에 대한 실험적 연구로는 항산화작용에 기초한 위점막의 방어효과가 보고 된 바 있으며¹¹, 혈압강하작용이 알려져 있으나 이에 대한 체계적인 연구는 보이지 않는다. 이에 저자는 山楂의 phenylephrine의 수축혈관에 대한 수축성 조절과 혈관 내피세포의 손상을 유발하는 ROS에 대한 항산화작용으로서 PCOOH의 함량, DPPH radical의 소거효과 및 linoleic acid 유도 지질과산화반응의 억제에 미치는 영향 등을 관찰하여 지견을 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

실험동물은 체중 2kg 내외의 家兔를 恒溫恒濕 장치가 부착된 사육장에서 고형사료와 야채를 충분히 공급하면서 2주일 이상 실험실 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 본 실험에 사용한 山楂(*Crataegus pinnatifida* Bunge. var. major N. E. Br. ; *Crataegi Fructus*)는 시중에서 구입 정선하여 사용하였다.

2. 방법

1) 한약 추출물의 제조 : 山楂 200g을 round flask에 넣고, 증류

* 교신저자 : 신흥묵, 경북 경주시 석장동 707 동국대학교 한의과대학

E-mail : heungmuk@dongguk.ac.kr, Tel : 054-770-2372

접수: 2001/11/13 · 수정: 2001/12/29 · 채택 : 2002/01/23

수 1000ml을 가하여 가열 추출한 후 추출액을 여과지로 여과하고, 이 여액을 rotary evaporator로 감압농축 한 후 동결건조하여 32.95g의 분말을 얻었다.

2) 혈관절편의 제작

家兔를 Urethane(2 g/kg, 복강주사)으로 마취하여 실험시키고 희생시킨 다음, 즉시 경부를 절개하여 총경동맥을 적출한다. 이들 조직을 Krebs-Ringer bicarbonate 용액에 넣고 실온에서 혈관주위의 연조직과 지방을 제거하여 약 2mm정도로 잘라내어 고리형태의 혈관절편을 제작하였다. 실험절편은 내피세포가 존재하는 절편과 내피세포가 제거된 절편으로 구분하여 제작하였으며, 내피세포의 제거는 1 μM의 phenylephrine으로 수축을 유발한 후 acetylcholine에 의한 이완 반응의 消失 유무를 관찰하여 확인하였다. 이렇게 만든 표본을 physiograph 장치에 연결하여 실험에 사용하였다.

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±0.5°C로 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. 혈관절편이 1 μM의 phenylephrine을 사용하여 최고 수축기에 이르렀을 때, 시료약물을 용량별로 투여하여 나타나는 이완반응을 physiograph(Gass 7, USA)로 연속 기록하였다. 내피세포 의존성 여부 역시 phenylephrine 1 μM의 수축에 대한 이완반응을 생리기록계로 기록하였다.

5) Nitric oxide의 측정

배양액에 측정된 NO의 농도는 Griess 法¹²⁾에 따라 ELISA microplate reader(Behring EL 311)로 흡광도를 측정하였다. 우선, 검액을 Griess 시약 (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride, 2.5% H₃PO₄)으로 상온에서 각각 10분간 반응시킨 후 분광광도계로 A570에서 흡광도를 측정하였다. NO의 농도는 sodium nitrite의 농도를 기준으로 작성한 표준곡선으로 환산하여 계산하였으며, 각 실험에서 기본 대조군은 세포 배양액을 사용하였다.

6) Linoleic acid-유도 지질과산화도 측정

Linoleic acid emulsion은 Osawa¹³⁾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 600 μl에 藜蘆을 농도별로 첨가한 다음, 증류수로 전체 용액이 8ml가 되도록 조절하여 이 혼합액을 Falcon tube에 넣고, 순환진탕기에서 37°C

에서 72시간 배양하여 자동산화를 촉진시켰다. 지질과산화는 malondialdehyde(MDA) 농도로 나타내었으며 MDA 정량은 TBA법에 의하여 Ohkawa¹⁴⁾등의 방법에 따라 다음과 같이 실시하였다. 37°C에서 배양시킨 linoleic acid 혼합액 0.8ml에 8.1% SDS 0.2ml, 20% acetic acid(pH 3.5) 1.5ml, 0.8% TBA 1.5ml를 가한 다음, 95°C에서 1시간동안 반응시킨 뒤, 냉각시켜 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. MDA농도는 free MDA로 표준선을 구하여 계산하였다.

7) Phosphatidyl choline-liposomes에서 PCOOH 측정

Phosphatidyl choline hydroperoxide(PCOOH)의 생성량은 Bligh and Dyer¹⁵⁾ 방법을 이용하여 측정하였다. 즉 10mg의 PC(Phosphatidyl- choline)에 대해 0.1%(W/W)의 sample을 10mM의 Tris-HCl buffer(pH 7.4) 0.9ml에 녹여 1분간 vortex mixer로 혼합하고 실온에서 1분간 초음파를 가하여 multilamellar liposomes을 만든 다음 37°C, 암실에서 흔들며 주면서 5분간 예비반응을 시킨 후, radical initiator로서 AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride) 1ml를 넣어 37°C, 암실에서 흔들며 반응을 개시시키고 나서, 반응액을 1시간 마다 100 μl씩 취해 chloroform 250 μl와 methanol 125 μl를 가해 2분간 흔들며 하층을 취하고, 다시 chloroform 250 μl를 넣고 흔들어서 PCOOH를 추출한 후 20 μl를 HPLC에 주입하여 PCOOH의 생성량을 조사하였다.

8) DPPH radical 소거효과 측정

山樅 추출액의 free radical에 대한 소거효과를 보기 위해 Yoshida¹⁶⁾ 방법에 따라 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH)에 의한 radical의 소거효과를 측정하였다. 농도별 山樅 희석액과 증류수 혼합물 4ml에 1.5×10⁻⁴M 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) 山樅의 세포독성 측정

세포에 대한 독성 실험은 Human Umbilical Vein Endothelial Cell(ECV304)을 24-well plate에 1×10⁴ cells/well이 되도록 cell을 심은 다음, 10% FBS-DMEM 배지로 37 °C, 5% CO₂ 하에서 24시간 배양한 후, serum-free 배지로 山樅을 농도별로 첨가하여 다시 24시간 배양한 뒤 세포 생존률을 MTT assay로 측정하였다¹⁷⁾. 즉 ECV304을 배양시킨 24-well plate에 MTT (methylthiazol- 2- yl- 2,5- diphenyl tetrazolium bromide)를 total volume의 10%가 되도록 넣고, 4시간 배양시킨 다음 그 후 최대한의 배지를 제거한 뒤, DMSO를 50 μl씩 넣고 10분간 shaking 한 다음, ELISA microplate reader(Behring EL 311)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

10) 단백질 정량

단백질 정량은 Lowry¹⁸⁾ 등의 방법에 준해 bovine serum albumin을 표준단백으로하여 측정하였다.

11) 통계처리

실험결과는 평균값과 표준편차로 표현하고, 유의성 검증은 Sigma Plot을 이용하여 paired t-test를 실시하여 유의성 검증을 실시하였다.

실험결과

1. PE-유도 수축혈관에 대한 산楂의 이완효과

1 μ M의 PE에 의한 수축혈관에 대하여 산楂의 이완효과를 관찰하였다. 산楂는 PE에 의한 $0.79 \pm 0.23g(100\%)$ 의 수축에 대하여 1mg/ml에서 $0.26 \pm 0.08g(34.91 \pm 11.96\%)$, 3mg/ml에서 $0.08 \pm 0.05g(10.78 \pm 8.57\%)$ 의 수축을 나타내었고, 10mg/ml에서는 수축을 100% 억제하였다(Fig. 1).

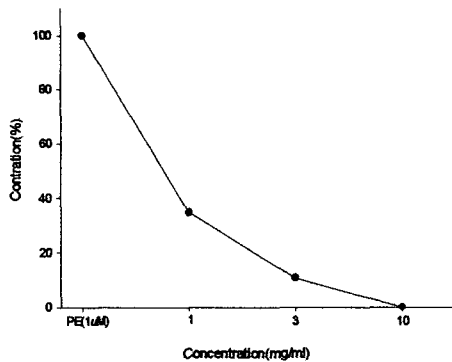


Fig. 1. Effects of Crataegi Fructus in PE-induced rabbits carotid arterial contraction.

2. 내피세포 의존성 이완효과

산楂는 3mg/ml의 농도에서 PE 1 μ M의 $0.78 \pm 0.23g(100\%)$ 의 수축에 대하여 내피세포 존재시 $0.03 \pm 0.04g(3.64 \pm 4.23\%)$ 의 유의한($p < 0.001$) 수축의 억제를 나타내었다. 내피세포 제거시는 $1.00 \pm 0.22g(100\%)$ 의 수축에 대하여 $0.64 \pm 0.14g(64.95 \pm 9.41\%)$ 의 수축을 나타내어 역시 유의하게($p < 0.01$) 수축을 억제하였다. 그러나 내피세포 존재시에 보다 강한 수축의 억제를 나타내었다(Table 1).

Table 1. Comparison Effects of Crataegi Fructus extract in PE-induced rabbit carotid arterial strips contraction with endothelium or denuded endothelium.

| Treatment | With endothelium | | Without endothelium | |
|-----------|-----------------------|-----------------|----------------------|------------------|
| | Contraction(g) | % | Contraction(g) | % |
| PE | 0.78 ± 0.23 | 100 | 1.00 ± 0.22 | 100 |
| CF 3mg/ml | $0.03 \pm 0.04^{***}$ | 3.64 ± 4.23 | $0.64 \pm 0.14^{**}$ | 64.95 ± 9.41 |

PE:phenylephrine 1 μ M, CF:Crataegi Fructus. Percentages are referred to PE levels. Values are mean \pm S.D(n=6). **p<0.01, ***p<0.001 as compared with the PE group.

Table 2. Dose dependent of Nitrite Formation by Crataegi Fructus(CF) in Human Umbilical Vein Endothelial Cell(ECV304).

| CF(mg/ml) | Nitrite Production (μ M) | | | |
|-------------|-------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | 4hr | 8hr | 12hr | 24h |
| 0 (control) | 0.867 ± 0.1 | 0.742 ± 0.1 | 0.616 ± 0.1 | 0.951 ± 0.2 |
| 0.1 | 1.035 ± 0.1 | 1.118 ± 0.2 | $1.160 \pm 0.1^{**}$ | 1.453^* |
| 1 | $1.620 \pm 0.3^{**}$ | $1.202 \pm 0.1^{**}$ | $1.202 \pm 0.1^{**}$ | $1.871 \pm 0.1^{**}$ |
| 5 | $3.336 \pm 0.1^{**}$ | $2.708 \pm 0.1^{**}$ | $3.210 \pm 0.1^{**}$ | $4.633 \pm 0.1^{**}$ |
| 10 | $5.720 \pm 0.1^{**}$ | $6.264 \pm 0.1^{**}$ | $6.222 \pm 0.2^{**}$ | $9.486 \pm 0.2^{**}$ |

The cells were treated with various concentration of water extract of CF. The values stand for the mean \pm SE of four independent experiments. *, P<0.05 **; p<0.01

3. 산楂의 농도별 NO 생성 효과

산楂의 혈관이완 효능이 NO의 생성과 관련이 있는지를 확인하기 위하여 산楂의 농도별 NO 생성을 시간대별로 측정하였다. 산楂는 Human Umbilical Vein Endothelial Cell(ECV304)에 대하여 농도 의존적으로 NO의 생성을 유의하게 증가시켰다(Table 2).

4. DPPH-radical의 소거효과

산楂는 농도 100, 200, 400, 600, 800, 1000, 1200 μ g에서 각각 37.9%, 49.4%, 57.1%, 59.2%, 60.4%, 59.5%, 52.7%로 800 μ g에서 최대 60.4%의 소거효과를 보였다(Fig. 2).

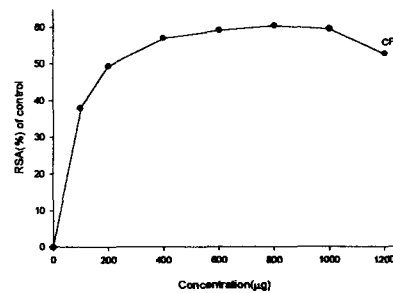


Fig. 2. Scavenging effect of Crataegi Fructus Extract on DPPH radical. RSA, radical scavenging activity.

5. PCOOH 함량변화

PCOOH의 생성은 반응 0hr, 1hr, 2hr, 3hr, 4hr, 5hr에서 정상군이 42.38 pmol/mg PC-liposome, 40.89 pmol/mg PC-liposome, 56.06 pmol/mg PC-liposome, 56.34 pmol/mg PC-liposome, 47.82 pmol/mg PC-liposome, 36.16 pmol/mg PC-liposome 이었으며, 대조군은 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-liposome으로 시간경과에 의하여 증가하였다. 산楂를 처리한 군은 32 pmol/mg PC-liposome, 113.82 pmol/mg PC-liposome, 234.95 pmol/mg PC-liposome, 506.13 pmol/mg PC-liposome, 628.83 pmol/mg PC-liposome, 665.65 pmol/mg PC-liposome로 대조군에 비하여 PCOOH의 생성을 현저하게 억제하였다. 반응 마지막 시간을 기준으로 산楂는 79.25%의 지질과산화 억제율을 나타내었다(Fig. 3).

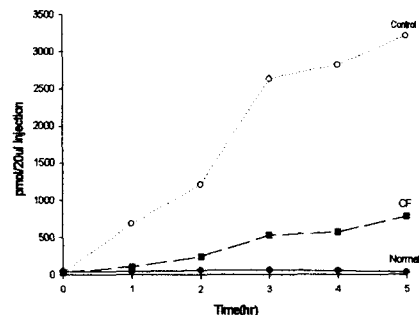


Fig. 3. Effect of Crataegi Fructus Extract on lipid peroxidation in PC-liposomes. The reaction system consisted of PC(10mg), AAPH(1ml), HE(0.1%) in Tris-HCl buffer(10mM, pH 7.4). CF : Crataegi Fructus

6. Linoleic acid 자동산화 억제효과

농도별 山楂의 과산화지질 억제효과는 배양 3일째부터 linoleic acid의 자동산화를 유의하게 억제하기 시작하였다. 반응 8일째를 기준으로 대조군의 104.67nmole에 비하여 농도 200 μ g에서 3.55nmole(96.6%), 600 μ g에서 6.58nmole(93.7%), 1200 μ g에서 7.30nmole(93.0%)의 억제효과를 나타내었다(Table 3).

Table 3. Effect of Crataegi Fructus(China), in vitro on linoleic acid-induced lipid peroxidation.

| CF, μ g | MDA nmole/incubation time (day) | | | | | | | | |
|--------------|---------------------------------|------|------|------|------|-------|-------|-------|--------|
| | 0 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
| 0 | 0.00 | 1.39 | 1.69 | 4.40 | 6.30 | 10.77 | 24.43 | 71.64 | 104.67 |
| 200 μ g | 0.00 | 0.99 | 1.18 | 1.25 | 1.91 | 1.64 | 2.11 | 2.24 | 3.55 |
| 400 μ g | 0.00 | 0.86 | 1.25 | 1.51 | 2.50 | 2.63 | 3.88 | 3.62 | 5.92 |
| 600 μ g | 0.00 | 1.46 | 1.51 | 0.97 | 3.03 | 3.22 | 4.93 | 4.28 | 6.58 |
| 800 μ g | 0.00 | 1.12 | 1.45 | 2.43 | 3.42 | 3.36 | 4.34 | 3.22 | 5.86 |
| 1000 μ g | 0.00 | 0.99 | 1.51 | 2.50 | 3.62 | 3.75 | 4.44 | 3.88 | 5.79 |
| 1200 μ g | 0.00 | 1.12 | 1.71 | 2.83 | 4.14 | 3.95 | 5.53 | 3.88 | 7.30 |

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. CF, Crataegi Fructus; MDA, malondialdehyde.

7. 山楂의 세포독성 측정

山楂의 세포독성 정도를 측정한 결과 Human Umbilical Vein Endothelial Cell(ECV304)에 대하여 0.5mg/ml과 1mg/ml에서 102%, 5mg/ml에서 107%, 10mg/ml에서 109%, 15mg/ml에서 112%의 생존률을 나타내었다(Fig. 4)

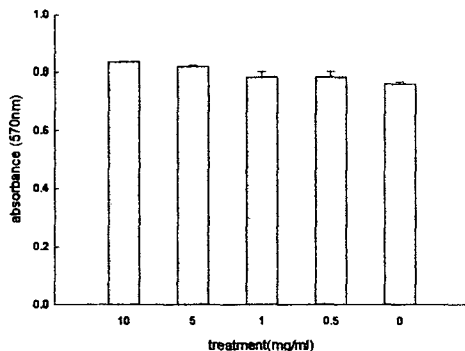


Fig. 4. Effects of Crataegi Fructus on cell viability of the Human Umbilical Vein Endothelial Cell(ECV304). HUVEC were incubated in the presence of different concentration of Crataegi Fructus extract for 24h without serum. Cell viability was measured by MTT assay as described in materials & methods. Values are mean \pm S.D, n=4

고찰

뇌혈관계나 심혈관계 장애에 의한 현대인의 사망률은 계속 증가추세에 있으며 이에 대한 치료제가 많이 개발되어 선택의 폭이 많이 넓어졌으나 그 부작용으로 계속복용하기가 어려우므로 치료제의 선택에 있어서 부작용이 중요하게 고려되고 있다. 이러한 시점에서 한의학의 심혈관계에 대한 생리를 바탕으로 고혈압, 중풍 및 기타 뇌혈관질환의 치료와 예방에 대한 한방 치료 기술개발에 관심이 증가되고 있다. 山楂는 그 성이 微溫하고 味

는 酸甘하며, 脾·胃·肝經으로 歸經한다. 그 健脾行氣, 消食磨積의 효능은 食滯를 소화시키고, 食積으로 발생하는 복부팽만이나 소화불량, 설사의 증을 치료한다. 특히 活血散瘀의 효능은 혈류의 개선과 瘀血을 제거하는 작용이 있어 産後의 兒枕痛과 惡露不盡^{23,4,5}은 물론 심혈관계의 생리에 유익하게 작용하여 심혈관계 질환의 치료에 유익할 것으로 기대된다. 山楂에 대한 실험적 연구로는 脾胃의 기능활성화를 통한 위점막의 방어에 일정한 효과가 있음을 자유기(free radical)의 소거 및 생성의 억제 등의 항산화작용에 기초하여 보고된 바 있으나¹⁴, 혈관의 수축성 조절 및 다양한 병태에서의 혈관의 변화에 연루되어 있는 ROS와 연계한 실험적 연구는 보이지 않는다.

이에 저자는 고혈압 및 심혈관질환에 처방되는 山楂의 혈관 긴장성 조절과 혈관 내피세포의 손상을 유발하는 자유기에 대한 항산화 작용으로서 DPPH radical의 소거효과, PCOOH의 함량 변화 및 linoleic acid 유도 지질과산화반응의 억제에 미치는 영향을 관찰하였다. 山楂는 1mg/ml의 농도에서 65.09%, 3mg/ml의 농도에서 89.22%, 10mg/ml의 농도에서 100%의 이완효과를 나타내어 phenylephrine에 의한 수축을 유의하게 억제하였다. 또 혈관의 긴장성 조절은 내피세포가 있는 경우는 약물에 따라 내피세포-의존적 이완 물질 (endothelium derived relaxing factor, EDRF)을 유리함으로 이완을 일으키므로 이를 확인하기 위하여 내피세포의 존재 여부에 의한 山楂의 수축혈관에 미치는 영향을 관찰하였다. 山楂는 내피세포 존재시 PE의 수축에 대하여 강한 수축의 억제를 보이므로서 山楂의 혈관이완효과는 EDRF의 유리와 직접적인 연관이 있는 것으로 생각된다. EDRF는 후에 nitric oxide(NO) 임이 밝혀진 바, 山楂의 수축혈관에 대한 이완의 기전이 NO의 생성을 통한 Ca²⁺ 유입의 억제와 직접적인 연관이 있는지는 조사하기 위하여 먼저 in vitro에서 NO 생성을 측정할 결과 山楂는 농도 의존적으로 유의하게 NO의 생성을 증가시켰다. 이는 그 이완의 기전에 NO 생성이 관여함을 시사하는 것으로 이에 대한 자세한 연구가 지속되어야 할 것이다. 한편, 항산화 작용에 있어 山楂는 800 μ g까지 용량 의존적으로 DPPH radical의 소거 효과를 보여 최고 60.4%의 소거율을 나타내었다. 이는 superoxide anion(O²⁻)이 내피세포 의존성 동맥이완에 있어서 nitric oxide(NO)의 생활성을 방해한다¹⁹는 보고와 저산소 상태에서 자유기(free radical)이 흉부대동맥의 긴장성 조절에 관여한다²⁰는 보고에 기초하면 山楂의 자유기 소거효과는 산화적 스트레스에 의한 혈관의 긴장성 조절에 일정한 치료작용을 발휘할 것으로 기대된다. 이러한 효과는 山楂의 健脾行氣의 효능과 연계하여 유추할 수 있는데, 脾胃의 기능활성과 氣의 원활한 유행은 혈류의 개선(脾統血)으로 이어지고 이는 자유기의 생성과 소거에 영향을 미칠 것으로 보인다. 또 PCOOH의 함량은 반응 마지막 시간(5h)을 기준으로 79.25%의 지질과산화 억제율을 나타내었으며, linoleic acid에 의한 지질의 과산화를 현저하게 억제하였다. ROS에 의한 세포막의 지질과산화가 세포막의 생화학적인 성질을 변화시키는 요인이 되며, 막 성질의 변화는 세포막을 통과하는 분자나 이온의 투과성을 결정하는 결정적 역할을 수행하고 지질과산화에 의한 세포막의 손상은 혈관내피세포의 손상을 유도하여 고혈압, 동맥경화 및 뇌혈관질환의 원인으로 작용하므로,

山楡의 지질과산화 억제효과는 이들 질환의 치료에 유의할 것으로 보인다. 지질의 과산화는 지질대사의 산물로서 한의학적 痰飲의 범주에 귀속시켜 생각할 수 있으므로 이러한 효과는 山楡의 化痰作用에 기인한다고 할 수 있다. 이상의 결과로부터 山楡는 α -receptor의 차단 및 NO의 분비와 관련하여 수축혈관에 대한 이완효능을 발휘하므로써 혈류장애와 심뇌혈관계 질환에 있어서 혈관의 저항을 개선할 수 있을 것으로 생각된다. 또 그 항산화작용은 산화적 스트레스에 의한 혈관내피세포의 손상에 대하여 혈관보호의 특성을 나타낼 것으로 생각된다.

결 론

Phenylephrine 수축에 대한 山楡의 혈관이완 작용과 항산화 작용에 미치는 효과를 관찰한 결과 다음의 결론을 얻었다. 山楡는 phenylephrine에 의한 혈관수축을 농도 의존적으로 유의하게 억제하였다. 내피세포 의존성 이완효과에서 山楡는 3mg/ml의 농도에서 내피세포 존재에 관계없이 유의한 이완효과를 나타내었으나, 내피세포가 있는 경우에 그 이완효과가 강하게 나타났다. In vitro에서 山楡는 NO의 생성을 농도 의존적으로 유의하게 증가시켰다. 山楡는 DPPH radical의 소거, PCOOH의 생성 억제 및 linoleic acid 유도 지질과산화 반응을 억제하였다. 세포독성 정도를 측정하기 위해 MTT를 수행 하였으나 山楡는 Human Umbilical Vein Endothelial Cell(ECV304)에 대하여 독성을 나타내지 않았다.

이상의 결과로부터 山楡는 혈관수축이 관여하는 혈류장애와 심뇌혈관계 질환에 있어서 혈압강화와 혈관의 저항을 개선할 목적으로 응용할 수 있을 것으로 생각된다. 그 수축혈관에 대한 이완의 기전은 α -receptor의 차단이나 NO의 생성이 관여하는 것으로 사료된다. 또 그 항산화작용은 산화적 손상으로부터 혈관을 보호하는 특성이 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

이 논문은 1998년도 한방치료 기술개발 연구개발사업(HMP-99-O-0002-D)의 지원에 의하여 연구되었음

참고문헌

- 李尙仁, 本草學, 서울, 修書院, 380-381, 1981.
- 康秉秀, 金永坂, 臨床配合本草學, 서울, 永林社, 477-478, 1994.
- 姚瀾, 本草分經, 上海, 上海科學技術出版社, 104, 1994.
- 李時珍: 本草綱目, 서울, 고문사, 1014, 1980.
- 仲昂庭, 本草崇原集說, 北京, 人民衛生出版社, 89-91, 1997.
- Dhalla N. S., Temsah R. M., Netticadan T. Role of oxidative stress in cardiovascular disease. J. Hypertens, 18(6):655-73, 2000.
- Sagar S., Kallo I. J., Kaul N., Ganguly N. K., Sharma B. K., Oxygen free radicals in essential hypertension. Mol. cell Biochem. 111(1-2):103-8, 1992.
- Jun T., Ke-yan F., Catalano M. Increased superoxide anion production in human: a possible mechanism for the pathogenesis of hypertension. J. Hum. Hypertens, 10(5):305-9, 1996.
- Soths S. J. The role of free radicals in toxicity and disease. J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol, 6(3-4):205-28, 1995.
- Li P. F., Maasch C., Haller H., Dietz R., von Harsdorf R. Requirement for protein kinase C in reactive oxygen species-induced apoptosis of vascular smooth muscle cells. Circulation, 100(9):967-73, 1999.
- 신흥목, 신동훈, 김길원, 위점막 보호효과에 대한 山楡의 항산화작용과 SH기의 영향. 東醫生理學會誌, 15(1):127-135, 2000.
- Iyengar, R., D.J. Stuehr and M.A. Marletta, Macrophage synthesis of nitrite, nitrate and N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 6369-6373, 1987.
- Osawa, T., Namiki, M. A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of Eucalyptus leaves. Agric. Biol. Chem. 45: 735-739, 1981.
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yaki, K. : Assay for lipid peroxide in animal tissue by thiobarbituric acid reaction, Anal Biochem, 1979; 95: 351~358.
- Buege, J.A. and Aust S.D. Microsomal lipid peroxidation. Methods Enzymol. 52:302-301, 1978.
- 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. 37(1): 1919-1921, 1989.
- Carmichael, J., DeGraff, W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.D and Mitchell, J.B. Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. Cancer Res. 47: 936-942, 1987.
- Lowry, O.H.: Rosehrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., Protein measurement with folin phenol reagent, J. Biol. Chem. 193: 265~275, 1981.
- Pagano P.J., Griswold M.C., Najibi S, Marklund S.L., Cohen R.A. Resistance of endothelium-dependent relaxation to elevation of O² levels in rabbit carotid artery. Am. J. Physiol. 277(5 Pt 2): H2109-14, 1999.
- 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; 372(1): 57-63.