

# 정향피 추출물의 혈관 이완효과 및 작용기전에 대한 연구

송철민 · 신선호 · 정현애 · 이준경<sup>1</sup> · 조려화<sup>1</sup> · 강대길<sup>1</sup> · 이호섭<sup>1\*</sup>

원광대학교 한의과대학, 1: 한의학전문대학원

## Study on the Mechanism of Vascular Relaxation Induced by *Cortex Caryophylli*

Chul Min Song, Sun Ho Shin, Hyun Ae Jung, Jun Kyoung Lee<sup>1</sup>, Li Hua Cao<sup>1</sup>, Dae Gill Kang<sup>1</sup>, Ho Sub Lee<sup>1\*</sup>

College of Oriental Medicine, 1: Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University

The aqueous extracts of *Cortex Caryophylli* (AEC) induced dose-dependent relaxation of phenylephrine-precontracted aorta, which was abolished by removal of functional endothelium. Pretreatment of the endothelium-intact aortic tissues with N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) or 1H-[1,2,4]-oxadiazole-[4,3- $\alpha$ ]-quinoxalin-1-one (ODQ) inhibited the relaxation induced by AEC. AEC-induced vascular relaxations were also markedly attenuated by addition of verapamil, diltiazem and glibenclamide, tetraethylammonium (TEA), respectively, while the relaxation effect of AEC was not blocked by indomethacin, atropine, or propranolol. Moreover, incubation of endothelium-intact aortic rings with AEC increased the production of cGMP. These results suggest that AEC dilates vascular smooth muscle via endothelium-dependent nitric oxide/cGMP signaling, which seems to be causally related with L-type Ca<sup>2+</sup> and K<sup>+</sup> channels.

Key words : aqueous extracts of *Cortex Caryophylli* (AEC), NO/cGMP, vasodilation

### 서 론

혈압이란 혈액이 혈관내로 통과하면서 혈관벽에 미치는 압력으로, 일반적으로 동맥압을 의미한다. 동맥압은 심박출량과 전체 말초혈관저항에 의해서 결정되며, 말초혈관저항은 세동맥 평활근의 수축-이완에 따른 혈관내경의 변화에 의해서 주로 조절된다<sup>1)</sup>. 순환기계 질환중 하나인 고혈압은 심박출량의 증가나 말초혈관의 수축으로 인해 동맥 혈압이 상승하는 것으로, 특히 말초혈관의 저항은 혈압의 변동과 밀접하기 때문에, 혈관의 긴장도는 혈압의 조절에 중요하다<sup>2)</sup>. 혈관 평활근의 긴장도를 좌우하는 여러 인자로는 신경전달물질, 내피인자, 대사성 영향, 체액성 물질, 근육성 영향 등이 있다<sup>3)</sup>. 이 중 혈관 내피세포는 혈관 이완인자와 수축인자를 방출하여 혈압조절에 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며<sup>4,6)</sup>, 혈관 내피세포에서 방출되는 혈관이완인자 중 하나가 nitric-oxide(NO)인데, 최근 혈관 내피세포에서 NO의 생성을 증가시켜 혈관을 이완시키는 약재로 조구동<sup>7,9)</sup>, 단삼<sup>10)</sup>, 동충하초<sup>11)</sup>, 산사<sup>12,13)</sup>, 황련<sup>14)</sup> 등이 보고된 바 있다.

정향피는 도금양과에 속하는 정향나무의 樹皮로, 性味는 辛

溫無毒하고 中寒, 腕腹脹痛, 泄瀉, 齒痛 등의 병증을 치료한다고 하였으며<sup>15)</sup>, 주요 약리 성분으로는 eugenol, eugenone, eugenin 이 밝혀져 있고, 약리 작용에 대한 연구로는 향균, 구충, 건위에 대한 연구가 보고되고 있으나, 혈관이완에 대한 연구는 아직 보고되지 않았다.

본 연구에서는 정향피 물 추출물의 혈관 내피세포 의존적 이완효과를 확인하고, 내피세포 유래 인자들과 정향피의 혈관 이완효과와의 관련성을 알아보기 위하여 산화질소 차단제, 가용성 guanylate cyclase 억제제, K<sup>+</sup>통로에 대한 억제제, Ca<sup>2+</sup> 통로 차단제와 같은 여러 가지 약물들을 사용하여 그 기전에 대한 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

### 재료 및 방법

#### 1. 재료

##### 1) 실험동물

실험동물은 체중 200 g 정도의 Sprague-Dawley계 수컷 흰 쥐를 (주)샘타코바이오코리아(경기도, 오산)로부터 구입하여 사용하였으며, 2 주일 이상 실험실 환경에 적응시키는 동안 고형사료와 물을 충분히 공급하면서, 표준적인 사육조건인 온도 23±2°C, 상대습도 50±10%의 환경조건을 유지하였다.

\* 교신저자 : 이호섭, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학

· E-mail : host@wonkwang.ac.kr, · Tel : 063-850-6841

· 접수 : 2006/08/10 · 수정 : 2006/09/19 · 채택 : 2006/10/04

2) 시약

본 연구에 사용된 acetylcholine (ACh), phenylephrine HCl, NG-nitro arginine methyl ester (L-NAME), 1H-[1,2,4]-oxadiazole-[4,3-a]-quinoxalin-1-one(ODQ), indomethacin, glibenclamide, tetraethylammonium (TEA), verapamil, atropine, propranolol 등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)으로부터 구입하여 사용하였다.

3) 약재

실험약재인 정향피는 원광대학교 익산한방병원에서 구입한 후 정선하여 사용하였다.

Table 1. 실험약재

韓藥名	生藥名(學名)	重量(g)
丁香皮	<i>Cortex Caryophylli</i> ( <i>Eugenia Caryophyllata</i> THUMB)	300

2. 방법

1) 추출물의 제조

정향피 300 g을 건조시킨 후, 100°C 3차 증류수에서 2 시간 동안 추출하였다. 정향피 전탕액을 2500 g 4°C 조건에서 20 분간 원심분리 시킨 후, Whatman NO. 3 여과지를 이용하여 여과하였다. 감압 농축 후 동결 건조하여 얻은 정향피 물 추출물은 약 57.2 g 으로 4°C 냉장 보관하였다가 3차 증류수에 다시 녹여 실험에 사용하였다.

2) 흉부 대동맥의 분리

Sprague-Dawley 백서(몸무게 약 250-300 g)를 단두한 후 흉부 대동맥을 분리하였다. 분리된 흉부 대동맥을 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1.2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.5 mM CaCl<sub>2</sub>, 25 mM NaHCO<sub>3</sub>, 10 mM glucose가 들어있는 차가운 Krebs용액 (pH 7.4)에 넣고 연결 조직과 지방을 제거한 후 약 3 mm의 길이의 절편으로 만들었다.

3) 혈관 장력의 측정

흉부 대동맥 절편에 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> 기체로 포화시킨 37°C의 Krebs용액에서 고정시킨 후 isometric tension을 force-displacement transducer(Grass FT 03, GRASS Instrument, MA, USA)가 장착된 생리 기록계(Grass Model 7E, Grass Instrument, MA, USA)를 이용하여 측정하였다.

먼저 1 × 10<sup>-6</sup> M의 phenylephrine으로 수축시키고 10 분후 1 × 10<sup>-6</sup> M의 acetylcholine (ACh)으로 이완반응을 시켜 혈관 내피 세포의 안전성을 측정한 후 Krebs용액으로 3회 세척하고 실험을 수행하였다. 여러 가지 약물들에 의한 정향피 물 추출물의 혈관 이완효과 변화 측정은 먼저 약물을 20 분간 전 처리하고 phenylephrine으로 수축시킨 후 정향피 물 추출물에 의한 이완반응을 농도 의존적으로 관찰하였다. 혈관 내피세포 비의존형 실험을 수행할 때에는 혈관 내피세포를 작은 면봉으로 제거한 후 phenylephrine 수축과 ACh 이완반응으로 혈관 내피세포의 제거를 확인 후 실험을 수행하였다.

4) cGMP 생성량의 측정

흉부 대동맥 절편을 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> 가스를 공급해 주면서 Krebs 용액에서 30 분간 평형을 시킨 후 1 × 10<sup>-4</sup> M

3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX)을 넣어주었다. 1 × 10<sup>-6</sup> M의 phenylephrine을 넣어 10 분간 더 평형을 시킨 후 농도별로 정향피 물 추출물(3 × 10<sup>-5</sup>, 1 × 10<sup>-4</sup>, 3 × 10<sup>-4</sup> g/ml)과 함께 3 분간 반응시켰다. 혈관 조직은 바로 액체 질소에 넣어 반응을 정지시킨 다음 -76°C에 보관한 후 cGMP 농도를 측정하였다. 무게(wet weight)를 측정한 혈관 조직을 6% trichloroacetic acid 존재 하에서 균질화시킨 후 13,000 g에서 15 분간 원심 분리하여 얻은 상층액을 물이 포화된 diethylether를 이용하여 4회 추출하였다. 추출액은 Speed-vac 농축기를 이용하여 농축하였고, cGMP 측정은 방사면역 분석법을 이용하여 분석하였다<sup>16)</sup>. 간단히 설명하면, 시료와 표준물질을 50 mM sodium acetate 완충용액(pH 4.8)에 최종 용적이 100 μl 가 되도록 첨가한 후 100 μl의 희석된 cGMP 항체(Calbioche m-Novabiochem, Co., San Diego, CA, USA)와 125I 가 결합된 cGMP (10,000 cpm per 100 μl, specific activity 2200 ci mmole<sup>-1</sup>, Dupont-New England Nuclear, Wilmington, DE, USA)를 함께 넣은 다음 4°C에서 24 시간 반응시켰다. 결합형과 비 결합형은 charcoal을 이용하여 분리하였으며, γ-counter를 이용하여 방사능을 측정하였다.

5) 통계 처리

실험 결과의 유의성은 실험 결과를 Student's t-test 나 one-way ANOVA test를 통하여 p가 0.05 이하인 경우를 유의한 차이로 판정하였다.

결 과

1. 혈관 내피세포 의존성

흉부대동맥을 Phenylephrine(1 × 10<sup>-6</sup> M)으로 수축시킨 후 정향피 물 추출물의 농도에 따른 혈관 이완효과를 측정된 결과, 농도 의존적으로 혈관을 이완시켰으며, 1 × 10<sup>-4</sup> g/ml의 정향피 물 추출물 농도에서는 91.24 ± 1.78%의 혈관 이완효과를 관찰할 수 있었다. 정향피 물 추출물의 혈관 이완효과가 혈관 내피세포 의존적인지를 밝히기 위하여 혈관 내피세포를 제거한 후 혈관 이완효과를 측정된 결과 거의 완벽하게 혈관 이완효과가 억제되었다(Fig. 1).

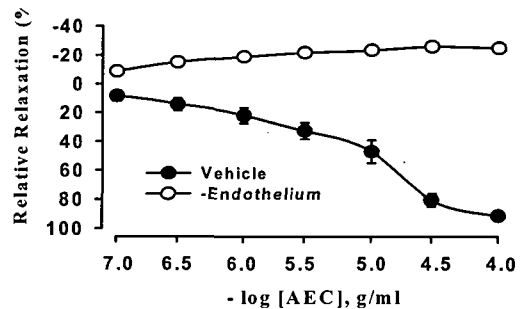


Fig. 1. Dose-response curves for the vascular relaxant effect of AEC in the phenylephrine-precontracted endothelium-intact aortic ring (vehicle), or endothelium-deducted aortic ring(-endothelium). Each value shows mean ± SEM of four experiment.

2. 산화질소 합성 효소 의존성

정향피 물 추출물의 혈관 이완효과가 산화 질소계와 관련

이 있는지를 알아보기 위하여 비 특이적인 산화질소 억제제인 L-NAME( $1 \times 10^{-5}$  M)을 전 처리하고 정향피 물 추출물의 혈관 이완효과를 측정한 결과, 혈관 이완효과가 완전히 억제되었다(Fig. 2).

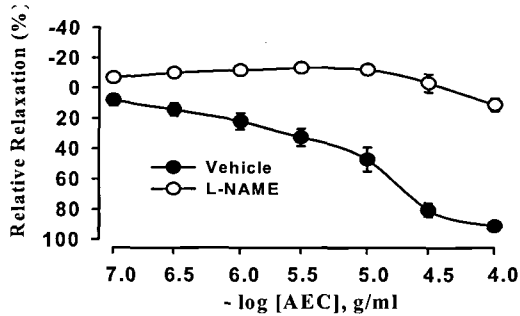


Fig. 2. Dose-response curves for the vascular relaxant effect of AEC in the phenylephrine-precontracted endothelium-intact aortic ring (Vehicle) and in the presence of L-NAME ( $1 \times 10^{-5}$  M). Each value shows mean  $\pm$  SEM of four experiments.

### 3. Guanylate cyclase 의존성

정향피 물 추출물의 혈관 이완효과가 cGMP와 관련이 있는지를 알아보기 위하여 세포질 guanylate cyclase 억제제인 ODQ( $1 \times 10^{-6}$  M)를 전 처리한 후 혈관 이완효과를 측정하였다. 그 결과 정향피 물 추출물의 혈관 이완효과가 완전히 억제되었다(Fig. 3).

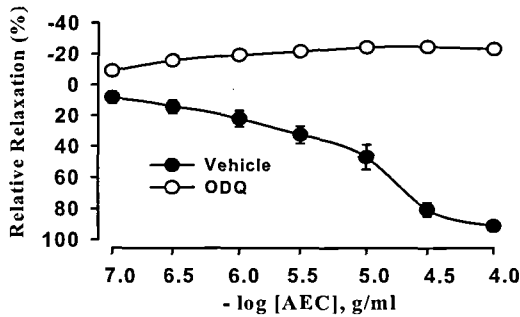


Fig. 3. Dose-response curves for the vascular relaxant effect of AEC in the phenylephrine-precontracted endothelium-intact aortic ring (Vehicle) and in the presence of ODQ ( $1 \times 10^{-6}$  M). Each value shows mean  $\pm$  SEM of four experiments.

### 4. cGMP 생성 효과

정향피 물 추출물이 혈관 조직에서 cGMP의 생성에 영향을 미치는지를 관찰하기 위하여 정향피 물 추출물을 흉부대동맥에 직접 투여한 후 흉부대동맥에서 cGMP 생성량을 측정한 결과, 정향피 물 추출물을 투여하지 않은 군에 비해 정향피 물 추출물을 투여한 군이 농도 의존적으로 cGMP의 생성량을 증가시킴을 관찰할 수 있었다(Fig. 4).

### 5. Cyclooxygenase 의존성

혈관 이완효과가 있는 prostacyclin이 정향피 물 추출물의 혈관 이완효과에 영향을 미치는지를 판단하기 위하여 비 선택성 cyclooxygenase 억제제인 indomethacin을  $1 \times 10^{-5}$  M 전 처리한 후 정향피 물 추출물의 혈관 이완 효과를 측정한 결과, indomethacin 전 처리하지 않은 군과 유의한 차이가 없었다(Fig. 5).

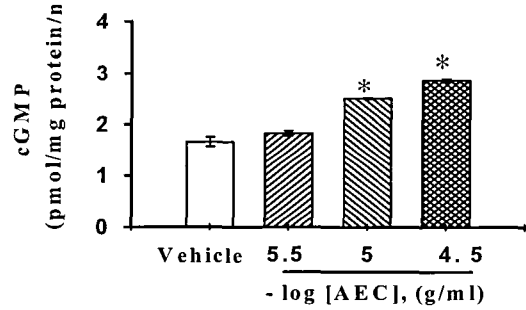


Fig. 4. Effect of AEC on cGMP production in the thoracic aorta functional endothelium. Each value shows mean  $\pm$  SEM of six experiments. \* $p < 0.05$ , vs. vehicle group.

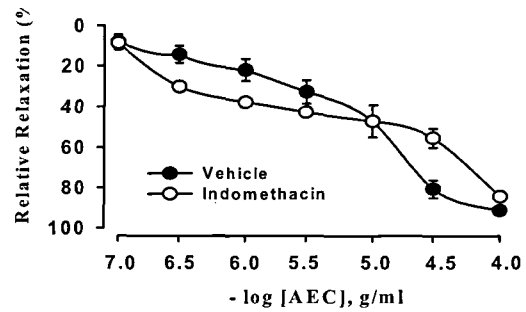


Fig. 5. Concentration-response curves for the relaxant effect of AEC in the endothelial intact aortic rings in the presence of indomethacin ( $1 \times 10^{-5}$  M). Each value shows mean  $\pm$  SEM of four experiments.

### 6. 교감 및 부교감 신경 의존성

정향피 물 추출물에 의한 혈관 이완효과와 신경계와의 연관성을 알아보기 위하여 비 선택성  $\beta$ -아드레날린성 길항제인 propranolol, 항 무스카린성 약물인 atropine을  $1 \times 10^{-6}$  M로 각각 전 처리한 후 정향피 물 추출물의 혈관 이완 효과를 측정한 결과, propranolol과 atropine을 전 처리하지 않은 군과 유의한 차이가 없었다(Fig. 6).

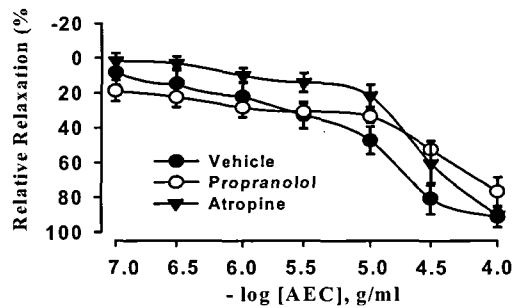


Fig. 6. Concentration-response curves for the relaxant effect of AEC in the endothelial intact aortic rings in the presence of atropine ( $1 \times 10^{-6}$  M) or propranolol ( $1 \times 10^{-6}$  M). Each value shows mean  $\pm$  SEM of four experiments.

### 7. Ca<sup>2+</sup> 통로 의존성

Ca<sup>2+</sup> 통로 차단이 정향피 물 추출물에 의한 혈관 이완효과에 미치는 영향을 측정하기 위하여 Ca<sup>2+</sup> 통로 차단제인 verapamil( $1 \times 10^{-6}$  M)과 diltiazem ( $1 \times 10^{-5}$  M)을 각각 전 처리한 후 정향피 물 추출물에 의한 혈관 이완 정도를 측정한 결과, verapamil과 diltiazem 모두 정향피 물 추출물  $3 \times 10^{-5}$  g/ml 농도까지는 혈관 이완효과가 완전히 억제되었고,  $10^{-5}$  g/ml 이상의 농도에서는 혈

관 이완효과가 부분적으로 억제되었다(Fig. 7).

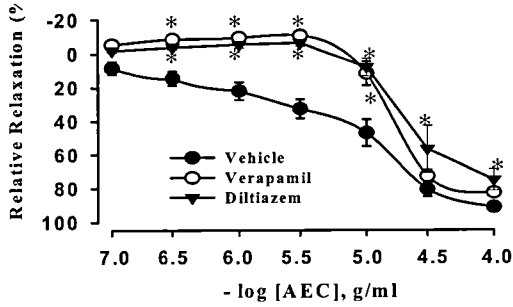


Fig. 7. Concentration-response curves for the relaxant activity of AEC in the endothelial intact aortic rings in the presence of verapamil ( $1 \times 10^{-6}$  M) or diltiazem ( $1 \times 10^{-6}$  M). Each value shows mean  $\pm$  SEM of four experiments. \*p<.05, vs. vehicle group.

### 8. K<sup>+</sup> 통로 의존성

K<sup>+</sup> 통로 차단이 정향피 물 추출물의 혈관 이완효과에 영향을 주는지를 측정하기 위하여 ATP-감수성 K<sup>+</sup> 통로 억제제인  $1 \times 10^{-6}$  M glibenclamide 와 비 선택적 K<sup>+</sup> 통로 억제제인  $1 \times 10^{-5}$  M TEA를 전 처리한 결과, TEA를 전 처리한 경우 정향피 물 추출물  $3 \times 10^{-5}$  g/ml 농도까지는 혈관 이완효과가 완전히 억제되었고,  $1 \times 10^{-5}$  g/ml 이상의 농도에서는 혈관 이완효과가 부분적으로 억제되었다. 또한 glibenclamide를 전 처리한 경우 정향피 물 추출물의 혈관 이완효과가 낮은 농도에서부터 부분적으로 억제되었다(Fig. 8).

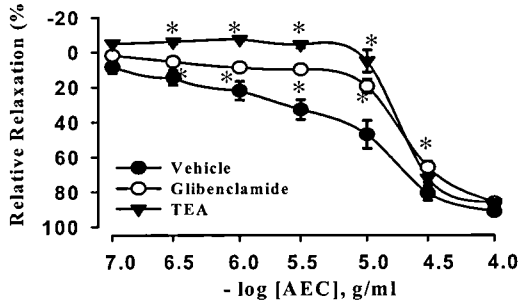


Fig. 8. Concentration-response curves for the relaxant activity of AEC in the endothelial intact aortic rings in the presence of glibenclamide ( $1 \times 10^{-6}$  M) or tetraethylammonium ( $1 \times 10^{-4}$  M) (TEA). Each value shows mean  $\pm$  SEM of four experiments. \*p<.05, vs. vehicle group.

## 고찰

순환기계 기능은 五臟의 生理的 機能의 협조를 바탕으로 발현되는 기능으로, 心이 血脈을 주관하는 기능에 의하여 혈액의 순환이 推動되고, 肝의 藏血機能에 의하여 각 조직과 기관으로 혈류량이 조절 된다<sup>17)</sup>. 이 때, 혈액이 혈관벽에 대해 발현하는 압력인 혈압의 변동에 영향을 미치는 인자는 심박출량 또는 심박동수의 증가 및 말초혈관의 저항증가이며, 혈관의 긴장은 말초혈관의 저항에 영향을 주어 혈압의 조절에 작용하게 된다.

혈관 내피세포에서 방출되는 혈관 이완인자 (endothelium-derived relaxing factor, EDRF) 중 하나가 산화질소(nitric oxide, NO)인데, NO는 혈관 내피세포 외에 평활근과

혈구 그리고 중추신경계의 뉴런 등으로부터 생성될 수 있으며<sup>18)</sup>, 적어도 3가지 이상의 NO 합성 동위효소의 작용에 의해 아미노산인 L-arginine으로부터 합성된다<sup>19)</sup>. 그 중 2가지는 내피세포와 뉴런에서 칼슘과 칼모듈린을 필요로 하는 유도효소(inducible enzyme)인데, 이러한 구성효소와 유도효소의 활동은 L-arginine의 가까운 유도체인 NG-nitro-L-Arg(L-NNA)에 의해 억제된다<sup>20,21)</sup>. 또한 NO와 같은 EDRF는 정상 상태에서도 내피세포에서 합성 및 분비가 이루어지고 acetylcholine, histamine, substance P 및 isoproterenol 등의 효능제에 의해 합성 및 분비가 증가된다<sup>22,23)</sup>.

1986년 Furchgott 및 Ignarro는 EDRF가 NO 혹은 이것과 연관된 물질일 것으로 추정하였다. 그 후 1987년 Palmer 등은<sup>24)</sup> 혈관 평활근에 미치는 EDRF와 NO의 약리학적 성질을 비교하여 EDRF와 NO는 같은 물질임을 주장하였으며, 배양된 혈관 내피세포에서 분비되는 NO를 chemiluminescence 및 spectrophotometric assay 방법으로 측정하여 EDRF는 NO임을 증명하였다<sup>20)</sup>. 고혈압 치료에 사용되는 organic nitrate의 작용은 가용성 guanylate cyclase를 활성화시켜 cGMP를 상승시킴으로써 이루어지며, 또한 이 약제는 비효소 작용(noenzymatic reaction)에 의해 NO를 발생시키므로 EDRF의 혈관 이완작용도 guanylate cyclase의 활성에 의한 cGMP에 의한 것으로 여겨졌다<sup>25)</sup>. Iyenger 등은<sup>26)</sup> 활성화된 대식세포가 L-arginine으로부터 NO<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub>를 형성하는 것을 관찰하여 NO의 전구 물질이 L-arginine일 것으로 생각하였고, NO의 전구물질이 L-arginine이라고 확인된 것은 mass spectrometry와 15N-L-arginine을 이용하여 L-arginine의 말단 guanidino nitrogen atom으로부터 <sup>15</sup>NO가 생성되는 것을 발견한 이후이다<sup>27)</sup>.

정향피는 도금양과에 속한 常綠喬木인 정향나무의 樹皮로, 性味는 辛溫無毒하고 脾胃虛冷, 心腹連脇肋痛, 胸膈痞悶, 背膊連項拘急疼痛, 不思飲食, 霍亂轉筋, 腹冷泄瀉, 膀胱氣刺, 小腸 및 外腎腫痛, 婦人血氣攻刺, 癥瘕塊硬, 赤白帶下, 惡寒發熱, 胎前產氣, 惡血不止, 臍腹疼痛등의 병증이 있을 때 배합하여 응용하는데<sup>15)</sup>, 주요 약리 성분으로는 eugenol, eugenone, eugenin이 밝혀져 있고, 약리 작용으로는 항균, 구충, 건위 작용이 연구되어져 있으나, 혈관이완에 대한 연구는 보고되지 않았다.

본 연구는 정향피 물 추출물이 백서에서 적출한 흥부 대동맥의 phenylephrine에 의한 혈관 수축을 이완시키는 효과가 있음을 보여준다. 혈관 내피세포를 제거한 후 정향피의 혈관 이완효과가 차단된 것은 정향피의 혈관 이완효과가 혈관 내피세포 (endothelium)에 의존적임을 의미한다. 혈관 평활근의 이완은 혈관 내피세포에서 분비되는 여러 종류의 혈관 활성인자(vasoactive factor)에 의해 조절되는데, 이러한 혈관 활성인자에는 NO, prostacyclin, 내피세포 유래 과분극 인자(endothelium-dependent hyperpolarizing factor, EDHF) 등이 알려져 있다<sup>28)</sup>.

내피세포 유래 인자들과 정향피의 혈관 이완효과와의 관련성을 알아보기 위하여 산화질소 차단제, 가용성 guanylate cyclase 억제제, K<sup>+</sup>통로에 대한 억제제, Ca<sup>2+</sup> 통로 차단제와 같은 여러 가지 약물들을 실험에 사용하였다.

내피세포 유래 혈관 이완인자의 본체인 산화질소(NO)가 정

항피 물 추출물의 혈관 이완효과에 관여하는지를 알아보고자 먼저 산화질소 합성 억제제인 L-NAME를 전 처리한 후 측정된 결과, 정향피의 혈관 이완효과가 완전히 차단되었다. 산화질소는 L-arginine으로부터 산화질소 합성 효소(NOS)에 의하여 합성되고, 혈관에는 산화질소 합성 효소인 3가지의 동위 효소가 존재한다<sup>29</sup>. 첫 번째 유형은 뇌형 산화질소 합성 효소(bNOS, nNOS, NOS I)로 뇌 조직에서 처음 발견되었고, 주로 신경 전달 물질로서의 산화질소를 합성하는 역할을 하고 있다. 두 번째 동위 효소는 유도형 산화질소 합성효소(iNOS, NOS II)로서 주로 면역계에 작용하는 산화질소를 합성하고 있다. 세 번째 동위 효소는 혈관 내피세포에 주로 분포하면서 혈관을 이완시키는데 작용하는 혈관 내피세포형 산화질소 합성효소(ecNOS, eNOS, NOS III)로서 acetylcholine에 의하여 활성화되어 혈관을 이완시킨다<sup>30</sup>. 이러한 산화질소는 세포질의 guanylate cyclase를 활성화시키고 cGMP의 생성을 증가시켜 신호 전달체계를 통해 혈관 평활근을 이완시킨다<sup>31</sup>. 본 연구에서 L-NAME의 전 처리에 의해 정향피의 이완효과가 억제되는 것으로 보아 정향피에 의한 혈관 이완효과는 산화질소계를 경유하여 일어나는 것으로 생각된다.

일반적으로 잘 알려진 혈관 이완 효현제인 ACh은 NO 중재 내피 의존성 이완효과를 야기하며, ACh에 의한 NO의 유리는 내피세포 M3 수용체를 경유한다고 알려져 있다<sup>32</sup>. ACh에 의한 내피세포 내  $Ca^{2+}$  증가는 IP<sub>3</sub>에 의한 세포 내 저장소로부터  $Ca^{2+}$  유출과 세포외로 부터의  $Ca^{2+}$  유입의 결과이다<sup>33,34</sup>. 증가된  $Ca^{2+}$ 에 의해 nitric oxide synthase(NOS)가 활성화되고, L-arginine을 기질로 하여 산화질소(NO)가 유리된다. 이때 생성된 산화질소는 혈관 평활근으로 확산되며, 다시 세포질 guanylate cyclase를 활성화시킨다. 세포질 guanylate cyclase는 GTP를 cGMP로 전환시키며, cGMP는 다시 cGMP 의존적 단백질 활성화 효소를 활성화시킨다. 이 효소가 혈관 평활근에  $Ca^{2+}$  유입을 억제하고 세포 내  $Ca^{2+}$ 의 수축적인 요인에 대한 감수성을 감소시킴으로써 혈관 평활근을 이완시킨다<sup>24</sup>.

NO/cGMP 계가 정향피에 의한 혈관 이완효과에 관여한다면 산화질소에 의하여 활성화 되는 가용성 guanylate cyclase 또한 정향피에 의한 혈관 이완효과에 관여할 것으로 유추되어 가용성 guanylate cyclase 억제제인 ODQ를 전 처리한 후 혈관 이완효과를 측정된 결과, 정향피 의한 혈관 이완효과가 억제되었다. 이러한 결과는 정향피에 의한 혈관 이완효과가 NO/cGMP 계를 경유하여 일어나는 것을 의미한다.

정향피에 의한 혈관 평활근의 이완효과가 NO/cGMP 계를 경유하여 일어난다면, 정향피를 혈관 평활근과 반응시키면 cGMP의 생성을 변화시킬 것으로 생각되어, 정향피를 혈관 평활근과 반응시킨 결과 혈관 평활근의 cGMP의 생성량이 증가되었다. 이러한 결과로 볼 때, 정향피는 혈관 내피세포에서 산화질소의 합성을 증가시키고 가용성 guanylate cyclase를 활성화시켜 cGMP의 생성을 증가시킴으로써 혈관을 이완시키는 것으로 생각된다<sup>35,36</sup>.

혈관 평활근의 긴장도를 조절하는 또 다른 내인성 인자로는 prostacyclin (PGI<sub>2</sub>)이 있다. Prostacyclin은 arachidonic acid로부터

cyclooxygenase에 의하여 생성되고, 이때 생성된 prostacyclin은 혈관 이완작용을 갖는다. 정향피의 혈관 이완효과가 prostacyclin의 생성과 관련이 있는지를 알아보기 위하여 cyclooxygenase 억제제인 indomethacin을 전 처리하고 정향피의 이완효과를 측정된 결과 indomethacin을 전 처리하지 않은 군과 비교하여 차이가 없었다. 이와 같은 결과로 볼 때 prostacyclin계는 정향피의 혈관 이완작용과는 무관한 것으로 생각된다<sup>36,37</sup>.

혈관 평활근의 긴장도는 또한 자율 신경계의 조절에 의해 조절된다. 이 연구에서는 정향피가 자율 신경계의 수용체를 경유하여 혈관을 이완시키는지 여부를 알아보기 위하여 콜린성 수용체 중에서 무스카린성 수용체를 선택적으로 차단하는 atropine과  $\beta$  수용체를 선택적으로 차단하는 항 아드레날린성 약물인 propranolol을 전 처리한 결과, atropine을 전 처리한 경우, propranolol과 atropine을 전 처리하지 않은 군과 유의한 차이가 없었다. 이와 같은 결과로 볼 때, 정향피의 혈관 이완효과는 교감 신경계와 무관한 것으로 보여 진다<sup>38,39</sup>.

혈관 평활근의 긴장도는 혈관 평활근 세포막 전위 차이에 의하기 때문에 세포막간의 이온채널의 변화는 직접적인 이완작용의 설명을 가능하게 한다. van Breeman<sup>40</sup> 등에 의하면 혈관 평활근 세포막의 이온 통로로는  $Na^+/K^+$  pump와  $Ca^{2+}$  pump 뿐만 아니라  $Na^+/H^+$ ,  $HCO_3^-/Cl^-$ ,  $Na^+/Ca^{2+}$  exchanger가 있는데, 혈관 평활근의 세포막 전위는 주로  $Ca^{2+}$ 과  $K^+$  이온의 유출과 유입에 의하여 조절된다. 혈관 긴장도는 막전위에 의해 조절되며 막전위 증가 시 전압에 의존하는  $Ca^{2+}$  통로인 Voltage Operated Channel(VOC)을 통하여  $Ca^{2+}$ 이 증가한다. 이러한  $Ca^{2+}$ 의 증가로 수축성 단백질이 활성화되어 수축이 초래되며 이는 전기 기계적으로 일치(electro-mechanical coupling)를 보인다.

혈관 세포내  $Ca^{2+}$  농도는 혈관의 수축과 이완에서 가장 중요한 인자이다. 세포내  $Ca^{2+}$  농도가 증가하면 calmodulin과 결합하여 myosine light chain (MLC)의 인산화를 촉진시켜 평활근을 수축시킨다. 정향피의 혈관 이완 효과가  $Ca^{2+}$  통로와 연관이 있는지를 알아보기 위하여  $Ca^{2+}$  통로 차단제인 verapamil과 diltiazem을 전 처리한 후 혈관 이완효과를 측정된 결과, verapamil과 diltiazem 모두 정향피 물 추출물  $3 \times 10^{-5}$  g/ml 농도까지는 혈관 이완효과가 완전히 억제되었고,  $10^{-5}$  g/ml 이상의 농도에서는 혈관 이완효과가 부분적으로 억제되었다. 이와 같은 결과로 볼 때, 정향피에 의한 혈관 이완효과에서  $Ca^{2+}$  통로가 어느 정도 역할을 하고 있는 것으로 보여진다.

$K^+$  통로는 활성화시 세포막의 과분극(hyperpolarization)을 유도하여 VOC를 통한  $Ca^{2+}$ 의 유입 억제를 통하여 혈관을 이완시킨다. 이 또한 혈관 긴장도를 조절하는데 있어 중요한 내인성 혈관 이완 기전으로 알려져 있다<sup>41</sup>. 혈관 평활근에서  $K^+$  통로로는  $Ca^{2+}$ -activated K 통로(KCa), ATP-sensitive K(KATP)통로 등이 있는데, 내피세포 의존 과분극 인자(endothelium-dependent hyperpolarizing factor, EDHF)는  $K^+$  통로를 활성화시키고 막 과분극(hyperpolarization)을 유발하게 된다.  $K^+$  통로의 활성화에 의한  $K^+$ 의 세포 내 유출은 세포막의 과분극을 일으켜, voltage-sensitive  $Ca^{2+}$  통로의 불활성화로 이어져 세포 내  $Ca^{2+}$

농도 감소를 초래하게 되고 결국은 혈관 이완을 유발하게 된다. K<sup>+</sup>통로에 대한 억제제로는 KCa를 차단하는 TEA와 sulfonylurea 계 약물인 glibenclamide로 후자는 혈관 평활근에서 KCa 통로에 는 영향을 미치지 않고 KATP 만을 차단한다.

정향피의 혈관 이완효과가 KCa 또는 KATP를 경유하여 일 어나는지 알아보기 위하여 KCa 차단제인 TEA와 KATP 차단제 인 glibenclamide를 전 처리한 후 혈관 이완효과를 측정 한 결과, TEA를 전 처리한 경우 정향피 물 추출물 3 × 10<sup>-5</sup> g/ml 농도까 지 혈관 이완효과가 완전히 억제되었고, 10<sup>-5</sup> g/ml 이상의 농도 에서는 혈관 이완효과가 부분적으로 억제되었다. 또한 glibenclamide를 전 처리한 경우 혈관 이완효과가 낮은 농도에서 부터 부분적으로 억제되었다. 이러한 결과로 볼 때 정향피에 혈 관 이완효과에 K<sup>+</sup> 통로가 일부 관여하는 것으로 생각된다<sup>42)</sup>.

NO/cGMP계는 혈관 평활근의 이완뿐만 아니라, 혈관 평활 근 세포의 증식과 혈소판, 백혈구 유착을 억제시키며, 혈관 내피 세포의 삼투성을 낮추고 세포 외 간질단백의 합성을 억제하는 역할을 하고 있다. 혈관 내피세포에서 NO 생성의 감소는 혈관 내피세포의 기능장애나 손상에 의한 것이며, 이는 동맥경화증과 고혈압의 주요한 병리적인 요인이 된다<sup>43)</sup>. 또한 동물의 실험 모 델에서 NO 합성효소의 만성적인 억제는 고혈압과 같은 혈관염 을 유발한다. 그러므로 NO/cGMP계의 회복을 통한 혈관 이완인 자 활성의 증가는 심혈관계 질환을 치료하는데 있어서 중요한 의미를 지닌다.

최근 생약 제제에 대한 많은 연구에서 항고혈압과 항동맥경 화증에 대한 실험이 수행되었다. 산사(*Hawthorn*), 소목 (*Caesalpinia sappan*), 조구등(*Uncaria rhynchophylla*), 동충하초 (*Cordyceps sinensis*), 돌외(*Gynostemma pentaphyllum*) 등의 추출물 에서 내피세포 의존적인 혈관 이완효과 또는 직접적인 NO/cGMP 신호 전달계의 자극을 경유한 항고혈압 효과가 밝혀 졌으며, 구지뽕나무(*Curdrania tricuspidata*), 패모(*Fritillaria ussuriensis*), 정공피(*Sorbus commixta*) 등에서도 역시 NO/cGMP 신호 전달계의 활성화를 통한 항고혈압 효과가 나타났다<sup>44,47)</sup>.

그러므로 본 연구는 정향피 물 추출물의 NO/cGMP계를 통 한 혈관 내피세포 의존적 이완효과를 보고하고 있으며, 이 결과 는 심혈관계 질환의 동물모델에 있어서 정향피의 연구에 유용한 정보를 제시해준다.

## 결 론

혈관 평활근의 수축과 이완은 혈압을 조절하는 중요한 기전 으로 본 연구에서는 정향피 물 추출물이 지닌 혈관이완효과의 기전에 대해 연구하였다. 정향피 물 추출물은 농도 의존적으로 흥부 대동맥을 이완시켰으며 이러한 혈관 이완효과는 혈관 내피 세포를 제거함에 따라 사라졌다. 정향피 물 추출물에 의한 혈관 이완효과는 비 특이성 산화질소 합성효소(nitric oxide synthase) 의 억제제인 NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME)나 가 용성 guanylate cyclase의 억제제인 1H-[1,2,4]-oxadiazole-[4,3-a]-quinoxalin-1-one (ODQ)를 전 처리하면 사라졌다. 정향피 물

추출물에 의한 혈관 이완효과는 Ca<sup>2+</sup> 통로 차단제인 verapamil 과 diltiazem, K<sup>+</sup> 통로 차단제인 glibenclamide, tetraethylammonium(TEA)에 의하여 유의하게 억제 되었지만 indomethacine, atropine, propranolol 등의 전 처리에 의해서는 억제되지 않았다. 게다가 정향피 물 추출물을 혈관 절편과 반응 시켰더니 조직 내 cGMP의 생성량이 농도 의존적으로 증가하였 다. 이와 같은 결과를 종합하여 볼 때 정향피 물 추출물은 혈관 내피세포 의존적이고 NO/cGMP 계 의존적으로 혈관을 이완시 키고, 이 과정에서 L-형 Ca<sup>2+</sup> 통로와 K<sup>+</sup> 통로가 부분적으로 관여 하는 것으로 사료된다.

## 감사의 글

이 연구는 보건복지부의 뇌질환 한방연구센터 (03-PJ9-PG6-SO02-0001)의 연구비 지원에 의해 수행 되었습니다.

## 참고문헌

1. 全韓國醫科大學心系內科學教室. 心系內科學, 서울, 書苑堂, p 22, 1999.
2. Levi, R. Therapies for perioperative hypertension: Pharmacodynamic consideration. Acta Anaesthesiol. Acand Suppl. 37(99):16-19, 1993.
3. Bosnjak, Z.J. Ion channels in vascular smooth muscle. Anesthesiology, 403: 120-127, 1993.
4. Rees, D.D., Palmer, R.M., Schulz, R., Hodson, H.F., Moncada, S. Characterization of three inhibitors endothelial Nitric oxide synthase in vitro and in vivo. Br. J. Pharmacol. 101: 746-752, 1990.
5. Vane, J.R., Anggard, E.E., Botting, R.M. Regulatory function of the vascular endothelium. New Med. 323: 27-36, 1990.
6. Luscher, T.F. Endothelium-derived nitric oxide: the endogenous nitrovasodilator in the human cardiovascular system. Eur. Heart J. 12 Suppl E:2-11, 1991.
7. Kuramochi, T., Chu, J., Suga, T. Gou-Teng (From Uncaria rhynchophylla Miquel)-induced endothelium-dependent and independent relaxations in the isolated rat aorta. Life Sci. 54: 2061-2069, 1994.
8. Goto, H., Shimada, Y., Tanigawa, K., Sekiya, N., Shitani, T., Terasawa, K. Effect of *Uncariae ramulus* et *Uncus* on endothelium in spontaneously hypertensive rats. Am. J. Chin. Med. 27: 339-345, 1999.
9. Goto, H., Sakakibara, I., Shimada, Y., Kasahara, Y., Terasawa, K. Vasodilator effect of extract prepared from *Uncariae ramulus* on isolated rat aorta. Am. J. Chin. Med. 28: 197-203, 2000.
10. Kamata, K., Noguchi, M., Nagai, M. Hypotensive effects of thospermic acid B isolated from the extract of *Salviae*

- miltiorrhizae* radix in the rat. Gen. Pharmacol. 25: 69-73, 1994.
11. Chiou, W.F., Chang, P.C., Chou, C.J., Chen, C.F. Protein constituent contributes to the hypotensive and vasorelaxant activities of *Cordyceps sinensis*. Life Sci. 66: 1369-1376, 2000.
  12. Chen, Z.Y., Zhang, Z.S., Kwan, K.Y., Zhu, M., Ho, W.K., Huang, Y. Endothelium-dependent relaxation induced by hawthorn extract in rat mesenteric artery. Life Sci. 63: 1983-1991, 1998.
  13. Kim, S.H., Kang, K.W., Kim, K.W., Kim, N.D. Procyanidins in *Crataegus* extract evoke endothelium-dependent vasorelaxation in rat aorta. Life Sci. 67: 121-131, 2000.
  14. Kang, D.G., Sohn, E.J., Kwon, E.K., Han, J.H., Oh, H., Lee, H.S. Effects of berberine on angiotensin-converting enzyme and NO/cGMP system in vessels. Vascul. Pharmacol. 39: 281-286, 2002.
  15. 신민교. 臨床本草學. 서울, 영림사, p 823, 1997.
  16. Kim, S.Z., Kim, S.H., Park, J.K., Koh, G.Y., Cho, K.W. Presence and biological activity of c-type natriuretic peptide-dependent guanylate cyclase-coupled receptor in the penile corpus cavernosum. J. Urol. 159: 1741-1746, 1998.
  17. 허준. 東醫寶鑑. 서울, 대성출판사, p 106, 1984.
  18. Moncada, S., Palmer, R.M., Higgs, E.A. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology and pharmacology. Pharmacol. Rev. 43: 109-142, 1993.
  19. Forstermann, U., Closs, E.I., Pollock, J.S., Nakane, M., Schwarz, P., Gath, I., Kleinert, H. Nitric oxide synthase isozyme-characterization, purification, molecular cloning and function. Hypertension 23: 1121-1131, 1994.
  20. Moncada, S., Radomski, M.W., Palmer, R.M. Endothelium-derived relaxing factor: Identification as nitric oxide and role in the control of vascular tone and platelet function. Biochem. Pharmacol. 37: 2495-2501, 1990.
  21. Ishii, K., Kerwin, J.F., Huang, Z.Y., Murad, F. NG-Nitro-L-arginine : a potent inhibitor of endothelium-derived relaxing factor formation. Eur. J. Pharmacol. 176(216):219-223, 1990.
  22. Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature 288: 373-376, 1980.
  23. Peach, M.J., Loeb, A.L., Singer, H.A., Saye, J. Endothelium-derived vascular relaxing factor. Hypertension 7: 94-100, 1985.
  24. Palmer, R.M., Ferrige, A.G., Moncada, S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature. 327: 542-546, 1987.
  25. Sa85, Skuma, I.D., Stuehr, D.J., Gross, S.S., Nathan, C., Levi, R. Identification of arginine as a precursor of endothelium-derived nitric oxide. Proc Natl Acad Sci 864-8867, 1989.
  26. Iyengar, R., Stuehr, D.J., Marletta, M.A. Macrophage synthesis of nitrite, nitrate and N-nitrosamones: Precursors and role of the respiratory burst. Proc Natl Acad Sci 84: 6369-6379, 1987.
  27. Schmidt, H.H., Nau, H., Wittfoht, W., Gerlach, J., Prescher, K.E., Klein, M.M., Niroomand, F., Bohme, E. Arginine is physiological precursor of endothelium-derived nitric oxide. Eur. J. Pharmacol. 154: 213-216, 1988.
  28. Rubanyi, G.M. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. J. Cell. Biochem. 46: 27-36, 1991.
  29. MacNaul, K.L., Hutchinson, N.I. Differential of iNOS and cNOS mRNA in human vascular smooth muscle cells and endothelial cells under normal and inflammatory conditions. Biochem. Biophys. Res. Commun. 196: 1330-1334, 1993.
  30. Meng, W., Ma, J., Ayata, C., Hara, H., Huang, P.L., Fishman, M.C., Moskowitz, M.A. ACh dilates pial arterioles in endothelial and neuronal NOS knockout mice by NO-dependent mechanisms. Am. J. Physiol. 271: H1145-H1150, 1996.
  31. Arnold, W.P., Mittal, C.K., Katsuki, S., Murad, F. Nitric oxide activates guanylate cyclase and increase guanosine 3':5'-cyclic monophosphate levels in various tissue preparations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 3203-3207, 1977.
  32. Jaiswal, N.L., Lambrecht, G., Mutschler, E., Tache, R., Malik, K.U. Pharmacological characterization of the vascular muscarinic receptors mediating relaxation and contraction in rabbit aorta. J. Pharmacol. Exp. Ther. 258: 842-850, 1991.
  33. Hutcheson, I.R., Griffith, T.M. Central role of intracellular calcium stores in acute flow- and agonist-evoked endothelial nitric oxide release. Br. J. Pharmacol. 122: 117-125, 1997.
  34. Sharma, N.R., Davis, M.J. Substance P-induced calcium entry in endothelial cells is secondary to depletion of intracellular stores. Am. J. Physiol, 268: H962-H973, 1995.
  35. Guerrero, M.F., Puebla, P., Carron, R., Martin, M.L., San Roman, L. Quercetin 3,7-dimethyl ether: a vasorelaxant flavonoid isolated from *Croton schiedeanus* Schlecht. J. Pharm. Pharmacol. 54: 1373-1378, 2002.
  36. Lemos, V.S., Freitas, M.R., Muller, B., Lino, Y.D., Queiroga, C.E., Cortes, S.F. Dioclein, a new nitric oxide- and endothelium-dependent vasodilator flavonoid. Eur. J. Pharmacol. 386: 41-46, 1999.
  37. Ko, F.N., Huang, T.F., Teng, C.M. Vasodilatory action mechanisms of apigenin isolated from *Apium graveolens* in rat thoracic aorta. Biochim. Biophys. Acta 1115: 69-74, 1991.
  38. Mikkelsen, E.O., Thastrup, O., Christensen, S.B. Effects of thapsigargin in isolated rat thoracic aorta. Pharmacol. Toxicol. 62: 7-11, 1988.
  39. Delaflotte, S., Auguet, M., DeFeudis, F.V., Baranes, J., Clostre, F., Drieu, K., Braquet, P. Endothelium-dependent relaxations

- of rabbit isolated aorta produced by carbachol and by *Ginkgo biloba* extract. Biomed. Biochim. Acta 43: S212-216, 1984.
40. Van Breeman, C., Cauvin, C., Johns, A., Leijten, P., Yamamoto, H.  $Ca^{2+}$  regulation of vascular smooth muscle. Fed. Proc. 45: 2746-2751, 1986.
41. Okabe, K., Kitimura, K., Kuriyama, H. Features of 4-aminopyridine sensitive outward current observed in single smooth muscle cells from the rabbit pulmonary artery. Pflugers Arch. 409: 561-568, 1987.
42. Nevala, R., Paukku, K., Korpela, R., Vapaatalo, H. Calcium-sensitive potassium channel inhibitors antagonize genistein- and daidzein-induced arterial relaxation in vitro. Life Sci. 69: 1407-1417, 2001.
43. Busse, R., Fleming, I. Endothelial dysfunction in atherosclerosis. J. Vasc. Res. 33(3):181-194, 1996.
44. Tanner, M.A., Bu, X., Steimle, J.A., Myers, P.R. The direct release of nitric oxide by gypenosides derived from the herb *Gynostemma pentaphyllum*. Nitric Oxide 3: 359-365, 1999.
45. Kang D.G., Hur, T.Y., Lee, G.M., Kwon, T.O., Sohn, E.J., Lee, H.S. Effects of *Cudrania tricuspidata* water extract on blood pressure and renal functions in NO-dependent hypertension. Life Sci. 70: 2599-2609, 2002.
46. Kang, D.G., Oh, H., Cho, D.K., Kwon, E.K., Han, J.H., Lee, H.S. Effects of bulb of *Fritillaria ussuriensis* MAXIM on angiotensin converting enzyme and vascular release of NO/cGMP in rats. J. Ethnopharmacol. 81: 49-55, 2002.
47. Kang, D.G., Lee, J.K., Choi, D.H., Sohn, E.J., Moon, M.K., Lee, H.S. Vascular relaxation by the methanol extract of *Sorbus cortex* via NO/cGMP pathway. Biol. Pharm. Bull. 28(5):860-864, 2005.