월견자 물 분획층을 이용한 혈관이완 기전에 관한 연구

김혜윰[1,2,3] · 이윤정[1,2,3] · 윤정주[1,2,3] · 고민철[1,2,3] · 한병혁[1,2,3,4] · 최은식[1,2,3] · 박지훈[1,2,3] · 강대길[1,2,3,4] · 이호섭[1,2,3,4*]

1 : 원광대학교 한의과대학 생리학교실, 2 : 원광대학교 한의학전문대학원,
3 : 원광대학교 한방체액조절연구센터, 4 : Brain Korea(BK) 21 플러스 사업단

Vascular Relaxation Induced by the Water Soluble Fraction of the Seeds from *Oenothera Odorata*

Hye Yoom Kim[1,2,3], Yun Jung Lee[1,2,3], Jung Joo Yoon[1,2,3], Min Chol Kho[1,2,3], Byung Hyuk Han[1,2,3,4], Eun Sik Choi[1,2,3], Ji Hun Park[1,2,3], Dae Gill Kang[1,2,3,4], Ho Sub Lee[1,2,3,4]*

1 : College of Korean Medicine, 2 : Professional Graduate School of Korean Medicine, 3 : Hanbang Body-fluid Research Center, Wonkwang University, 4 : Brain Korea (BK) 21 plus team

In the present study, vasorelaxant effect of the extract of seeds of *Oenothera odorata* (SOO) and its possible mechanism responsible for this effect were examined in vascular tissues isolated from rats. Changes in vascular tension, 3',5'-cyclic monophosphate (cGMP) levels were measured in thoracic aorta rings from rats. Methanol extract of seeds of *Oenothera odorata* relaxed endothelium-intact thoracic aorta in a dose-dependent manner. A dose-dependent vascular relaxation was also revealed by treatment of ethylacetate, n-butanol, and H_2O (aqua extract of seeds of *Oenothera odorata*, ASOO) extracts partitioned from methanol, but not by hexane extract. However, the vascular relaxation induced by ASOO were abolished by removal of endothelium of aortic tissues. Pretreatment of the endothelium-intact vascular tissues with N^G-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) or ^{1}H-[1,2,4]-oxadiazole-[4,3-α]-quinoxalin-1- one (ODQ) significantly inhibited vascular relaxation induced by ASOO. Moreover, incubation of endothelium-intact aortic rings with ASOO increased the production of cGMP. However, ASOO-induced increases in cGMP production were blocked by pretreatment with L-NAME or ODQ. The vasorelaxant effect of ASOO was attenuated by tetraethylammonium (TEA), 4-aminopyridine, and glibenclamide attenuated. On the other hand, the ASOO-induced vasorelaxation was not blocked by verapamil, and diltiazem. Taken together, the present study demonstrates that ASOO dilate vascular smooth muscle via endothelium-dependent NO-cGMP signaling pathway, which may be closely related with the function of K^+ channels.

keywords : *Oenothera odorata*, Vasodilation, NO, eNOS, cGMP

서 론

발생빈도가 높다고 알려진 순환기계 질환 중 하나인 고혈압은 심박출량의 증가나 말초혈관의 수축으로 인해 동맥 혈압이 상승한다. 특히 혈관 긴장성 조절에 있어 말초혈관의 저항이 큰 영향을 미치므로 혈압조절에 있어 중요한 역할을 하고 있다고 볼 수 있다[1]. 또한 만성퇴행성 질환인 고혈압은 합병증인 뇌졸중, 심부전, 관상동맥질환 등이 나타날 경우 치명적인 합병증을 일으켜 사망에 이를 수 있을 만큼 치사율이 높다. 유전적 인자와 환경적 인자를 통하여 고혈압이 유발되어 진다고 보고 있으며, 환경적 인자로서 식사 상태, 스트레스, 생활습관 등이 중요하게 지적되고 있고 그로인한 유병율 증가현상이 나타나고 있다[2]. 이와 같은 이유에 따른 결과로써 국민 건강영양조사에 따르면 30세 이상의 인구의 심뇌혈관 질환 관련 선행질환인 고혈압 유병율은 2007년 24.6%, 2009년 26.4%, 2011년 28.5%로 증가하다가 건강에 관심이 많아진 최근 2013년 27.3%, 2014년 25.5%로 감소하는 경향이지만 꾸준히 높을 유병율을 보이는 것으로 보고되어졌다[3]. 고혈압은 적절히 관리하면 심근경색이나 뇌졸중 등 심각한 질환으로 이어지는 것을 예방가능하므로 관리 필요성이 크다. 따라서 그 치료 방법 및 예방 조치가 무엇보다 중요한 것으로 사료된다.

혈관 평활근의 긴장도를 유지하는데 있어서 신경전달물질(norepinephrine, adenosine triphosphate, nitric oxide), 내피

* Corresponding author
Ho Sub Lee, College of Korean Medicine, Wonkwang University, 344-2, Sinyong-dong, Iksan-si, Jeollabuk-do, Korea
·E-mail : host@wku.ac.kr ·Tel : +82-63-850-6841

·Received : 2015/11/17 ·Revised : 2015/12/07 ·Accepted : 2015/12/10

ⓒ The Korean Society of Oriental Pathology, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2015.12.29.6.492
Available online at http://www.hantopic.com/kjopp/KJOPP.htm

인자 (endothelium-derived relaxing factor: EDRF, endothelium-derived hyperpolarizing factor: EDHF, endothelins) 등은 중요인자이다. 특히 혈관 평활근에서 혈관 내피세포성 이완인자 (endothelium-derived relaxing factor, EDRF)와 내피세포성 수축인자 (endothelium-derived constricting factor)의 방출은 혈압조절에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다[4,5]. 이러한 EDRF 중 하나인 nitric-oxide (NO)는 혈관 내피세포 외에 평활근과 혈구 그리고 중추신경계의 뉴론 등으로부터 생성되어지고, NO synthase 동위효소의 작용에 의해 아미노산인 L-arginine으로부터 합성된다. NO는 내피세포에서 L-arginine으로부터 산화질소 합성효소 (nitric oxide synthase, NOS)에 의해 생성되는데 생성된 NO는 soluble guanylate cyclase (sGC)를 활성화하여 cyclic guanosine-3,5,-monophosphate (cGMP)의 생성을 증가 시켜 신호전달체계를 통해 혈관 평활근을 이완 시킨다. 고혈압 치료에 사용되어 온 organic nitrate의 작용은 가용성 guanylate cyclase (GC)를 활성화시켜 cGMP를 상승시킴으로써 이루어지며 비효소 작용 (nonenzymeatic reaction)에 의해 NO를 발생시키므로, EDRF의 혈관 이완작용도 GC의 활성에 의한 cGMP에 의한 것으로 밝혀졌다[6,7]. 이러한 기전을 통하여 달맞이꽃 종자 추출물이 GC에 매개된 NO/cGMP 경로에 따른 혈관이완 효과를 나타내는지 알아보기 위하여 연구를 진행하였다.

달맞이꽃(*Oenothera odorata*)은 남아메리카가 원산지인 귀화식물중의 하나로 전국의 산과 들에 널리 서식하고 있으며, 바늘꽃 한해살이풀 달맞이꽃 (*Oenothera odorata* Jacq), 큰달맞이꽃 (*Oenothera lamarchiana* Ser), 애기달맞이꽃 (*Oenothera laciniata* Hill)의 종자를 월견자(月見子)라고 기록되어있다[8]. 월견자의 경우 오일을 추출하여 피부노화나 미백 및 아토피성 피부염에 사용되고 있고[9], 불포화 오메가지방산인 감마리놀렌산 (γ-linolenic acid)이 7-10%, 리놀산 (linoleic acid)이 65-75%, 그 외에 올레익산 (oleic acid)과 팔미틱산 (palmitic acid) 같은 성분들이 다량 포함되어 있어 항산화를 비롯한 항암[10], 항고혈압[11] 및 항염과 같은 다양한 생리활성을 나타낸다고 알려져 있다[12]. 앞서 2011년에 발표한 본 저자의 연구[13]를 통하여 월견자 에탄올 추출물이 랫드 경동맥의 혈관이완에 효과적임을 보고하였다. 분획의 특성상 용매의 극성에 따라 시료의 추출성분이 달라진다는 것을 착안하여 월견자 추출물의 유효성분이 어느 극성의 용매에서 효과를 보이는지 확인하고자 본 연구를 진행하였다. 그러므로 phenylephrine 전 처리로 수축시킨 백서의 흉부대동맥에 월견자 분획 추출물을 이용하여 혈관 이완효과를 확인하고 그 작용기전을 밝히고자 한다.

재료 및 방법

1. 시약

이 연구에 사용된 acetylcholine (ACh), phenylephrine HCl (PE), N^G-nitroarginine L-methyl ester (L-NAME), ^{1}H-[1,2,4]-oxadiazole-[4,3α]-quinoxalin-1-one (ODQ), glibenclamide, tetraethylammonium (TEA). (±)-verapamil HCl, diltiazem, 3-isobutyl-1- methylxanthine (IBMX)는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)으로부터, 4-aminopyridine은 Tocris Cookson Ltd. (Avonmouth, UK)으로부터 구입하여 사용하였다.

2. 월견자 추출물의 분획 제조

월견자 1.2 kg을 경북 영천에서 구입하여 12 L의 메탄올 (Voucher number; HBH 171-02)로 1주일간 추출한 후 회전식 감압농축기를 사용하여 농축하였다. 농축된 추출물을 물에 현탁 시킨 후 n-hexane 층 (1.1 g, HBH 171-02-H), ethyl acetate층 (14.73 g, HBH 171-02-EA), n-buthanol층 (13.43 g, HBH 171-02-B), H_2O층 (6.22 g, HBH 171-02-W)을 각각 수득하였다 (Fig. 1). 이중 이완효과가 좋은 H_2O층을 이용하여 실험을 진행하였다.

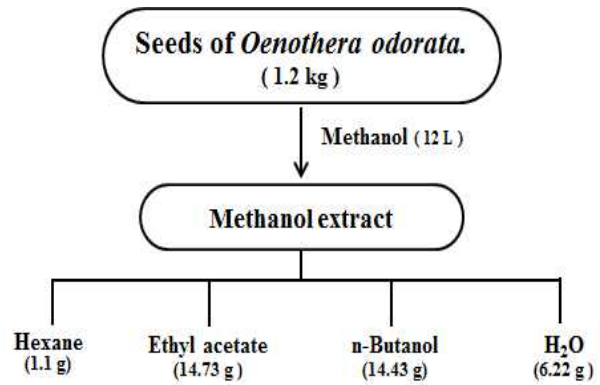

Fig. 1. Scheme for fractionation of the methanol extract by seed of *Oenothera odorata*.

3. 혈관조직 절편의 제작

건강한 Sprague-Dawley 백서 (몸무게 약 250-300 g)를 경추탈골 한 후 흉부대동맥을 분리하였다. 분리된 흉부대동맥을 차가운 Krebs 용액 (pH 7.4)에 넣고 연결 조직과 지방을 제거한 후 흉부대동맥은 약 3 mm 길이의 절편으로 만들었다. 혈관 평활근의 정상적인 생리활성 유지를 위해 Krebs 용액 (Krebs-Henseleit Solution)을 사용하였으며, 그 조성은 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.1 mM $MgSO_4$, 1.2 mM KH_2PO_4, 1.5 mM $CaCl_2$, 25 mM $NaHCO_3$, 10 mM glucose이고, pH는 7.4로 보정하였다.

4. 혈관 장력의 측정

흉부대동맥 절편에 95% O_2, 5% CO_2 혼합가스로 포화시킨 37℃의 Krebs 용액에서 고정시킨 후 isometric tension을 force-displacement transducer (FT103E, Grass Instrument CO) 를 사용하였으며, 장착된 생리 기록계 (Power Lab; ML870/P, AD Instruments)를 이용하여 혈관의 장력을 측정하였다. 월견자 추출물의 이완효과를 측정하기 전, 흉부대동맥 절편에 1 g의 기저 긴장도를 부하하고, 10분 간격으로 Kreb's용액을 교환해 주면서 90분간 평형을 유지시켰다. 일정한 기저선이 유지되면 1 μM의 PE로 5분간 수축시키고 1 μM의 acetylcholine (ACh)으로 이완시켜 이완율이 90% 이상이었을 경우 혈관 내피세포가 손상 받지 않은 것으로 판정하고 실험을 진행하였다. 월견자 추출물의 이

완효과의 기전을 밝히고자 여러 약물들을 20분간 전처리 하였고, PE으로 혈관 수축을 유도한 후 월견자 추출물의 농도 의존적인 이완 반응을 살펴보았다. 혈관 내피세포 비의존형 실험을 수행할 때에는 혈관 내피 세포를 물리적은 방법으로 제거하였으며, 이후 ACh에 의한 이완율이 10% 이하였을 경우 혈관 내피 세포의 손상으로 확신한 후 실험을 수행하였다.

5. cGMP의 측정

흉부대동맥 절편을 95% O_2, 5% CO_2 혼합가스를 공급해 주면서 Krebs 용액에서 30분간 평형을 시킨 후 100 μM의 IBMX와 1 μM의 PE을 넣어 5 분간 더 평형을 시킨 후 농도별로 월견자 추출물 10, 30 그리고 100 μg/ml을 처리 하여 4분간 반응을 시켰다. 혈관 조직은 바로 액체 질소에 넣어 반응을 정지시킨 후 -70℃에 보관한 후 cGMP 농도 측정에 이용하였다. 무게 (weight)를 측정한 혈관 조직을 6% trichloroacetic acid (TCA) 존재 하에서 균질화시킨 후 13,000 g에서 15분간 원심 분리하여 얻은 상층액을 물이 포화된 diethyl ether를 이용하여 3회 추출하였다. 추출액은 Speed-vac 농축기를 이용하여 농축하고 cGMP 측정은 방사면역분석법을 이용하여 분석하였다. 간단히 설명하면, 시료와 표준물질을 50 mM sodium acetate 완충용액 (pH 4.8)에 최종 용적이 100 μl 가 되게 첨가한 후 100 μl 의 희석된 cGMP 항체 (Calbiochem-Novabiochem, Co., San Diego, CA, USA) 와 125I 가 결합된 cGMP (10,000 cpm/100 μl)를 함께 넣은 후 4℃에서 24시간 반응시켰다. 항체와 결합한 125I-cGMP와 비 결합형 125I-cGMP은 charcoal을 이용하여 분리하였으며 ϒ-카운터를 이용하여 방사능을 측정하였다[14].

6. 통계 처리

실험 결과의 유의성은 검증은 Sigma Plot 10.0 프로그램을 이용하였으며, 실험 결과는 Students t-test를 통하여 p-value가 0.05 이하인 경우 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 월견자 추출물의 농도 의존성 혈관 이완효과

분획 제조한 월견자 추출물을 각각의 이완효과를 알아보기 위하여 흉부대동맥 평활근을 PE (1 μM)으로 수축한 후 농도 의존성 효과를 알아본 결과, Hexane층을 제외한 모든 층에서 이완효과를 보였으며(Fig. 2A), 그 효과는 내피세포 제거 시 이완효과를 나타내지 않았다(Fig. 2B). 앞의 결과를 바탕으로 분획 추출물중 H_2O 층 (ASOO)을 이용하여 흉부대동맥에서의 이완효과를 실험해 본 100 μg/ml 농도에서 98.8 ± 0.88%의 이완효과가 나타났으며, 기전을 알아보고자 실험을 더 진행하게 되었다.

2. 혈관 내피세포 의존적 이완 효과

앞서 실험을 바탕으로 ASOO의 혈관 이완효과의 기전을 알아보기 위하여 실험을 진행하였다. Krebs 용액에서 유지된 백서 흉부대동맥 절편을 phenylephrine (1 μM)으로 수축한 후 ASOO의 농도 의존적인 혈관 이완 효과를 측정한 결과, 농도 의존적으로 혈관을 이완시켰다 (Fig. 3A). 또한, 혈관 내피세포를 제거한 후 ASOO의 혈관 이완 효과를 측정한 결과, 이완효과가 억제된 것으로 보아 혈관 내피세포 의존적임을 확인하였다(Fig. 3A).

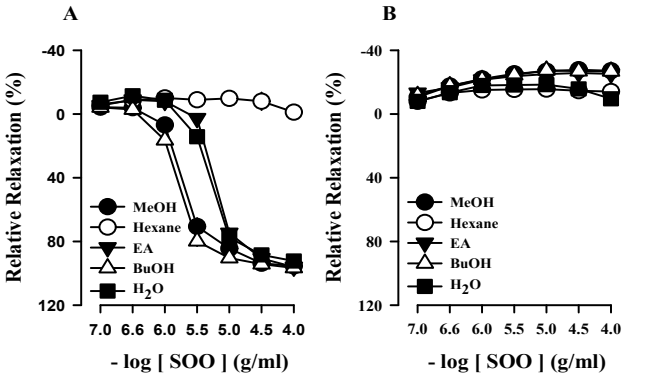

Fig. 2. Dose-dependent response curves of the vascular relaxant activities of methanol, hexane, ethylacetate, n-butanol, and H_2O (ASOO) extracts of seeds of *Oenothera odorata* in endothelium-intact (A) or –denuded (B) aortic ring. Each value show mean ± S.E. of four experiments.

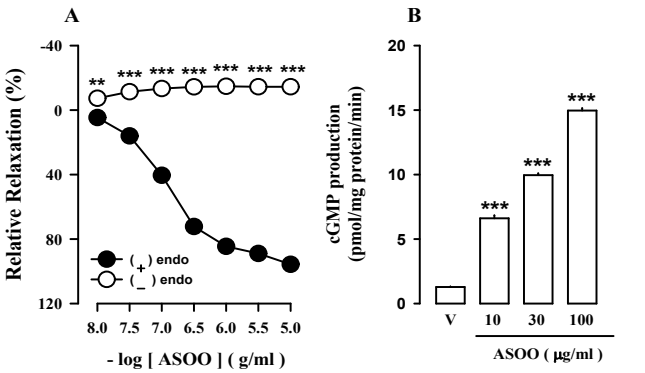

Fig. 3. Dose-response curves on the vascular relaxant effect of ASOO in rat thoracic aorta in the PE-precontracted endothelium-intact (+) or endothelium-denuded (-) aortic ring. **p<0.01, and ***p<0.001 vs. vehicle. Each value shows mean ± S.E. of four experiments.

3. 산화질소 합성 효소 및 sGC (soluble Guanylate cyclase) 억제시 혈관 이완 효과

ASOO의 혈관 이완 효과가 혈관내피세포 유래 산화 질소계와 cGMP의 관련성을 알아보기 위하여 비 특이적인 산화질소 억제제인 L-NAME (100 μM)와 guanylate cyclase 억제제인 ODQ (10 μM)를 전 처리하고 ASOO의 혈관 이완 효과를 측정하였다. 그 결과, 월견자 추출물의 혈관 이완 효과는 L-NAME 및 ODQ에 의해 현저히 억제되었다(Fig. 4A).

4. cGMP 생성 효과

흉부대동맥 조직에서 cGMP의 생성에 ASOO가 영향을 미치는지를 관찰하기 위하여 in vitro상태에서 cGMP 생성량을 측정하였다. 그 결과, ASOO를 처리하지 않은 군에 비해 투여한 군은 농도 의존적으로 cGMP를 생성이 증가했다(Fig. 3B). 또한 비 특이적 산

화질소 억제제인 L-NAME (100 μM)와 guanylate cyclase 억제제인 ODQ (10 μM)를 전처리 한 후 ASOO의 cGMP 생성량을 측정해 본 결과, ASOO를 단독으로 처리한 군에 비하여 전처리 한 군에서 cGMP의 생성량이 유의성 있게 감소하였다(Fig. 4B).

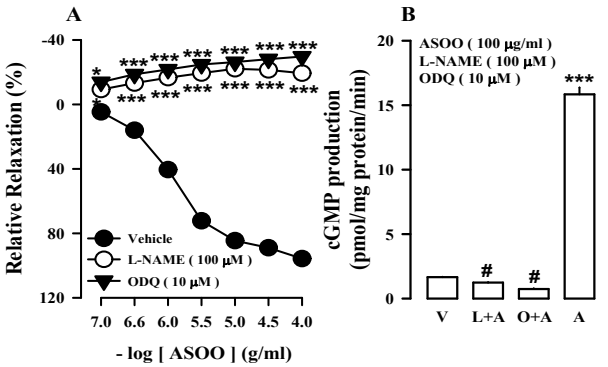

Fig. 4. Dose-response curves on the vascular relaxation induced by ASOO in the PE-contracted thoracic aorta in the absence or presence of L-NAME (L+A) or ODQ (O+A). *p<0.05, and ***p<0.001 vs. vehicle; #p<0.001 vs. ASOO. Each value shows mean ± S.E. of four experiments.

5. 혈관 수축 억제 효과

ASOO가 PE에 의한 혈관 수축에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 0.01 또는 1 mg/ml의 농도의 ASOO를 전처리 한 후 phenylephrine을 농도 의존적으로 투여하였을 때 수축력을 비교해 보았다. 그 결과 ASOO에 의하여 PE에 의한 수축력은 농도 의존적으로 감소시켰다 (Fig. 5).

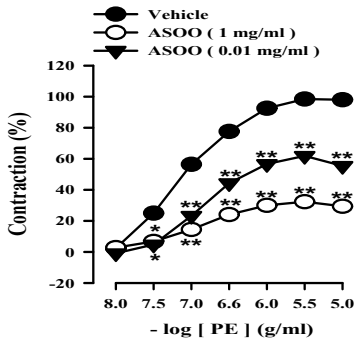

Fig. 5. Effects of ASOO on the PE-induced vascular contraction in thoracic aorta. *p<0.05, and **p<0.01 vs. vehicle. Each value shows mean ± S.E. of four experiments.

6. K^+ 통로 및 L형 Ca^{2+} 통로 차단시 이완 효과

ASOO의 혈관 이완 효과가 K^+ 통로와 영향이 있는지 알아보기 위하여 비 선택적 K^+ 통로 억제제인 TEA (100 μM) 와 4-aminopyridine (100 μM), 그리고 ATP-감수성 K^+ 통로 차단제인 glibenclamide (100 μM)를 전 처리하여 이완효과를 살펴본 결과, ASOO의 혈관 이완 효과가 유의하게 차단되는 것으로 확인하였다(Fig. 6A). L형 Ca^{2+} 통로와의 연관성을 알아보기 위하여 L형 Ca^{2+} 통로 차단제인 verapamil (1 μM)과 diltiazem (1 μM)을 전처리하여 진행한 결과, ASOO의 이완효과가 차단되지 않는 것을 확인하였다 (Fig. 6B).

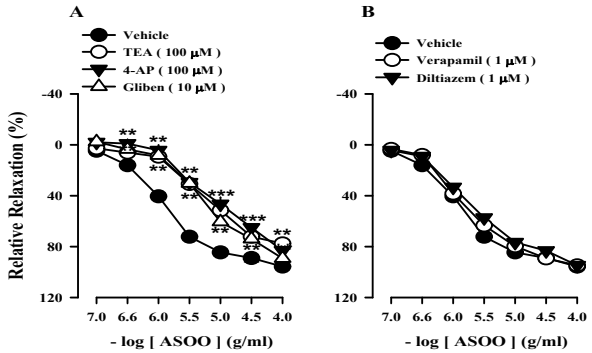

Fig. 6. Dose-response curves on the vascular relaxation induced by ASOO in the PE-contracted thoracic aorta in the absence or presence of TEA, 4-aminopyridine (4-AP), and glibenclamide (Gliben). **p<0.01, and ***p<0.001 vs. vehicle. Each value shows mean ± S.E. of four experiments.

고 찰

본 연구는 월견자 메탄올 추출물을 n-hexane, ethyl acetate, n-butanol, H_2O층으로 분획하여 얻은 추출물들의 백서의 흉부대동맥에서 혈관 이완효과를 측정하였다. 그 결과, hexane층을 제외한 분획 층에서 이완효과가 나타났으며, 그 효과는 내피세포 의존적으로 나타났다. 따라서 분획층에서 용매에 따라 이완효과가 달리 나타나는 것을 확인하였고, 본 연구에서는 월견자 H_2O층 추출물(ASOO)을 선택하여 백서의 흉부대동맥에서 혈관 이완효과 및 그 기전에 대해 알아보았다.

혈관 내피세포는 혈관의 정상 생리를 유지하는데 중요한 역할을 하며, 혈관 활성인자(vasoactive factor)들에 의하여 긴장도를 변화 시킨다. 이러한 혈관 활성 인자에는 산화질소(NO), prostacyclin, 내피세포 유래 과분극 인자 (endothelium-depent hyperpolarizing factor, EDHF) 등이 알려져 있다[15]. 혈관 활성물질들은 혈관 이완에 영향을 미치므로 혈압조절에 있어 정상 혈압을 유지하는데 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 앞서 월견자는 수축기 혈압을 낮추는 항고혈압[11] 효과가 있다고 보고 되었기 때문에 혈관이완을 효과 및 기전을 확인하는 것은 중요한 연구가 될 것이다. 따라서 ASOO의 혈관 이완효과가 내피세포 및 활성인자들에 의해 나타나는지 확인하기 위해서 실험을 진행하였다. 혈관 조직의 내피세포를 통한 이완 효과를 확인하기 위해 물리적으로 내피세포를 제거하고 실험을 진행한 결과, ASOO의 혈관 이완효과는 완전히 차단되었다. 그러므로 기존 연구 보고와 실험결과를 근거로 할 때 ASOO의 혈관 이완 효과는 내피세포 의존적이며 이를 통해 항고혈압 효과가 있을 것으로 사료된다. 또한 혈관 내피세포 유래 혈관 이완 인자로서 혈압 강하 효과가 큰 NO는 L-arginine으로부터 산화질소 합성 효소(NOS)에 의하여 합성된다. 뇌형 산화질소 합성 효소 (bNOS)는 신경전달 물질로 알려져 있고, 면역계에 작용하는 유도형 산화질소 합성 효소 (iNOS)와 관 내피세포에 주로 분포하면서 ACh에 의해 활성화되어 혈관을 이완작용을 한다고 알려진 혈

관 내피세포 유래 산화질소 합성효소 (eNOS)이 세가지 동위효소로 존재한다[16]. eNOS는 세포질의 가용성 구아닐산 고리화효소 (soluble guanylate cyclase, sGC) 를 활성화 시켜 cGMP의 생성을 증가시키는 신호 전달체계를 통해 혈관 평활근을 이완 시킨다[17]. 본 연구에서 비특이적인 NOS 억제제인 L-NAME의 전 처리에 의해 ASOO의 이완 효과가 현저히 억제되는 것으로 보아 혈관 이완 효과는 산화질소계를 경유하여 일어나는 것으로 사료된다.

NO/cGMP계의 회복을 통한 혈관이완활성은 심혈관계 질환을 치료하는데 있어 중요한 의미를 지닌다. NO 생성의 감소는 혈관 내피세포의 기능장애나 손상에 의한 것으로 동맥경화증이나 고혈압의 중요한 병리적 요인으로 본다. 한 실험 동물 모델에서 NO 합성효소의 만성적인 억제는 고혈압, 혈관염 등을 유발한다고 알려져 있다[18]. 따라서, NO/cGMP계가 ASOO에 의한 혈관 이완 효과에 관여한다면 NO와 NO에 의하여 활성화 되는 sGC 또한 ASOO에 의한 혈관 이완 효과에 관여할 것으로 사료되어 NO 합성억제제인 L-NAME와 sGC 억제제인 ODQ를 전 처리 한 후 혈관이완 효과를 측정한 결과, ASOO에 의한 혈관 이완 효과가 억제되었다. 게다가 in vitro 에서 혈관조직과 ASOO를 반응시킨 결과 혈관에서 cGMP의 생성량이 증가하였고, 이 역시 L-NAME와 ODQ에 의하여 억제되는 것으로 확인하였기에 ASOO는 NO/cGMP 계를 경유하여 일어나며 그 반응은 cGMP의 생성 증가에 의한 것임을 의미한다.

혈관 이완에 있어서 K^+ 통로로는 Ca^{2+}-activated K^+ 통로 (K_{Ca2+}), ATP-sensitive K^+ (K_{ATP}) 통로 등이 있는데, 내피세포 의존 과분극 인자 (endothelium-dependent hyperpolarizing factor, EDHF)는 K^+ 통로를 활성화 시키고 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 평활근세포 내 Ca^{2+} 농도 감소를 초래하게 되고 결국은 혈관 이완을 유발하게 된다[19]. ASOO가 이러한 이완기전에 관여하는지 살펴보기 위하여 K^+통로에 대한 억제제로서 비 특이적 K^+ 차단제인 4-aminopyridine, TEA와 K^+_{ATP} 만을 차단하는 sulfonylurea계 약물인 glibenclamide를 이용하여 이완효과를 살펴보았다. 그 결과, K^+통로를 차단함으로써 ASOO의 이완효과가 억제되는 것을 확인하였고 K^+ 통로 중 K^+_{ATP} 통하여 이완효과를 보이는 것으로 사료된다.

선택적 아드레 날린성 α1 수용체에 작용하는 phenylephrine은 Gq 단백을 경유하여 phospholipase-C를 활성화 시켜 세포막의 phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate (PIP_2)를 가수분해하고, 제 전령 물질인 inositol 1, 4, 5-trisphosphate (IP_3)와 diacylglycerol (DAG)이 생성된다. IP_3는 세포내 Ca^{2+} 저장부위로부터 Ca^{2+} 유리를 촉진하고 DAG는 protein kinase C (PLC)를 활성화 시킨다. 따라서 근육의 수축에 가장 중요한 인자인 평활근 세포내 Ca^{2+}은 농도가 증가하면 calmodulin과 결합하여 myosine light chain (MLC)의 인산화를 촉진시켜 평활근을 수축시킨다[20,21]. 이러한 이론을 바탕으로 phenylephrine의 수축반응이 ASOO에 의하여 농도 의존적으로 유의하게 억제됨을 확인한 결과, ASOO에 의하여 억제됨을 확인하여 아드레 날린성 α1 수용체 작용함을 확인 할 수 있었다. 반면에, L-형 Ca^{2+} 통로를 통한 혈관 수축과 연관이 있는지 알아보기 위하여 L-형 Ca^{2+} 통로 차단제인 verapamil과 diltiazem을 전 처리 한 후 혈관 이완 효과를 측정한 결과, ASOO의 혈관 이완효과는 차단되지 않은 것으로 보아 L-형 Ca^{2+} 통로는 관여하지 않는 것으로 확인하였다. 따라서 ASOO는 내피세포에 존재하는 아드레날린성 α1 수용체에 대하여 직접 길항하는 효과를 통한 세포내 Ca^{2+} 유입을 억제시켜 혈관이완 효과를 보인다고 볼 수 있다.

이상의 결과를 종합해보면 ASOO의 혈관 평활근 이완 기전은 내피세포에서의 NO/cGMP 경로를 활성화 시키고, K^+_{ATP} 통로를 통한 혈관이완효과를 나타낸다고 할 수 있다. 따라서, 본 실험을 통하여 혈관이완에 탁월한 효과를 확인하였으므로 앞으로 심혈관계 질환의 연구에 유용한 정보를 제시해 줄 수 있을 것으로 사료된다.

결 론

월견자 메탄올 분획물 추출물은 내피 세포 의존적으로 혈관 평활근을 이완시켰고, 그 중 물층 분획물 추출물(ASOO)을 선택하여 기전을 알아본 결과, 혈관 이완효과는 농도 의존적으로 나타났다. 혈관 조직에서의 cGMP의 생성량의 증가로 혈관이완효과가 일어남을 확인하였고, 이러한 효과는 혈관 내피세포의 제거나 산화질소 합성효소 또는 세포질 구아닐산 고리화 효소 차단 시 나타나지 않았으며, K^+_{ATP} 통로의 차단시에도 이완효과가 나타나지 않았다. 이와 같은 결과로 볼 때, ASOO의 혈관 평활근 이완 기전은 내피세포에서의 NO/cGMP 경로를 활성화 시켜 나타나며, KATP 통로를 통한 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2014학년도 원광대학교 교비지원에 의해서 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. Contreras, F., Parte, M.A., Cabrera, J., Ospino, N., Israili, Z.H., and Velasco, M. Role of angiotensin II AT1 receptor blockers in the treatment of arterial hypertension. Am J Ther. 10(6):401-408, 2003.
2. Yu, M.H., Im, H.G., Im, N.K., Hwang, E.Y., Choi, J.H., Lee, E.J., Kim, J.B., Lee, I.S., Seo, H.J. Anti-hypertensive activities of Lactobacillus isolated from Kimchi. Korean J Food Sci Technol. 41: 428-434, 2009.
3. Ministry of Health and Welfare. Korea health statistics 2014 : Korea national health and nutrition examination survey, 2014.
4. Ruslan, R., Fabio, V., Sanjiv, K., Daniel, P., Charles D., Shawn, E., David, F., Stephen, M. eNOS activation and NO function: Structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide

synthase activity J Endocrinol. 210(3):271-284, 2011.
5. Iwatani, Y., Kosugi, K., Isobe-Oku, S., Atagi, S., Kitamura, Y., Kawasaki, H. Endothelium removal augments endothelium-independent vasodilatation in rat mesenteric vascular bed. Br J Pharmacol. 154(1):32-40, 2008.
6. Richard, C. and Joseph L. Vascular nitric oxide: formation and function. J Blood Med. 1: 147-162, 2010.
7. Francis, S.H., Busch, J.L., Corbin, J.D., Sibley, D. cGMP-dependent protein kinases and cGMP phosphodiesterases in nitric oxide and cGMP action. Pharmacol Rev. 62(3):525-563, 2010.
8. Jung, B.S, and Shin M.K. Traditional drugs of the east color edition, seoul, Yunglimsa, pp 724-725, 2002.
9. Burns, E., Blamey, C., Ersser, S.J., Lloyd, A.J., Barnetson, L. The use of Aromatherapy in intrapartum midwifery practice an observation study. Complement Ther. Nurs Midwifery. 6(1):33-34, 2000.
10. Larsson, S.C., Kumlin, M., Ingelman-Sundberg, M., Wolk, A. Dietary long-chain n-3 fatty acids for the prevention of cancer: a review of potential mechanism. Am. J. Clin. Nutr. 79(6):935-945, 2004.
11. Bachhav, S.S., Patil, S.D., Bhutada, M.S., Surana, S.J. Oleanolic acid prevents glucocorticoid-induced hypertension in rats. Phytother Res. 25(10):1435-1439, 2011.
12. Nettleton, J.A., and Katz, R. n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in type 2 diabetes: a review. J. Am. Die. Assoc. 105(3):350-351, 2005.
13. Kim, H.Y., Oh, H., Li, X., Cho, K.W., Kang, D.G., Lee, H.S. Ethanol extract of seeds of Oenothera odorata induces vasorelaxation via endothelium-dependent NO-cGMP signaling through activation of Akt-eNOS-sGC pathway. J Ethnopharmacol. 133(2):315-323, 2011.
14. 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 cyclse-coupled receptor in the penile corpus cavernosum. J Urol. 159: 1741-1746, 1998.
15. Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E., Chaudhuri, G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. Proc Natl Acad Sci U S A. 84(24):9265-9269, 1987.
16. Pitocco, D., Tesauro, M., Alessandro, R., Ghirlanda, G., Cardillo, C. Oxidative stress in diabetes: implications for vascular and other complications. Int J Mol Sci. 14(11):21525-21550, 2013.
17. Tsutsui, M., Shimokawa, H., Otsuji, Y., Yanagihara, N. Pathophysiological relevance of NO signaling in the cardiovascular system: novel insight from mice lacking all NO synthases. Pharmacol Ther. 128(3):499-508, 2010.
18. Pereira, A.C., Paulo, M., Araújo, A.V., Rodrigues, G.J., Bendhack, L.M. Nitric oxide synthesis and biological functions of nitric oxide released from ruthenium compounds. Braz J Med Biol Res. 44(9):947-957, 2011.
19. Farouque, H.M., Meredith, I.T. Effect of adenosine triphosphate-sensitive potassium channel inhibitors on coronary metabolic vasodilation. Trends Cardiovasc Med. 17(2):63-68, 2007.
20. Sauer, H., Sharifpanah, F., Hatry, M., Steffen, P., Bartsch, C., Heller, R., Padmasekar, M., Howaldt, H.P., Bein, G., Wartenberg, M. NOS inhibition synchronizes calcium oscillations in human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells by increasing gap-junctional coupling. J Cell Physiol. 226(6):1642-1650, 2011.
21. Wang, Y.G., Dedkova, E.N., Ji, X., Blatter, L.A., Lipsius, S.L. Phenylephrine acts via IP3-dependent intracellular NO release to stimulate L-type Ca^{2+} current in cat atrial myocytes. J Physiol. 567: 143-157, 2005.