

# 항고혈압성 약용작물을 이용한 기능성 식품 소재 개발

Development of Hypotensive Food Materials  
with Medicinal Plants

연구기관  
한국식품개발연구원

농림부 도서실



0009646

농림부

## 제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “항고혈압성 약용작물을 이용한 기능성 식품 소재 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003 년 12 월 25 일

주관연구기관명 : 한국식품개발연구원  
총괄연구책임자 : 류 미 라(책임연구원)  
세부연구책임자 : 류 미 라(선임연구원)  
연 구 원 : 김 혜 영(선임연구원)  
연 구 원 : 장 영 상(중부대학교)  
연 구 원 : 성 낙 술(작물시험장)  
연 구 원 : 정 영 란(유진사이언스)  
연 구 원 : 김 은 영(위축연구원)  
연 구 원 : 김 정 현(위축연구원)  
위탁연구기관명 : 건국대학교 의과대학  
생리학교실  
위탁연구책임자 : 김 보 경

# 요 약 문

## I. 제 목

항고혈압성 약용작물을 이용한 기능성 식품 소재 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구는 국내에서 재배되는 약용작물의 혈압강하효과를 체계적으로 구명하고 활성성분을 이용한 기능성식품 또는 식품의약 소재로 개발하는데 그 목적이 있다.

고혈압을 비롯한 심순환계 질환은 우리나라 총 사망원인의 30%로 사망률 1위를 차지하고 있으며 이에 따라 순환계 질환치료제의 개발에 대한 연구들이 활발히 진행되고 있다. 그러나 이러한 합성 또는 정제된 약물들은 일부 증상에 대한 효과는 탁월하나 서로 관련된 질환에 대해서는 효과를 나타내지 못하는 등 약효적인 측면에서 부작용을 나타내거나 사용 범위가 제한된 것이 많아 상대적으로 부작용이 적은 천연물에서 그 효과를 찾기 위한 노력이 계속되어왔다. 더욱이 최근 동양의학에서 주로 이용되던 약용작물로부터 신약을 개발하려는 연구가 현대의학이 고도로 발달한 서구사회를 중심으로 이루어지고 있으며 이에 대한 관심 또한 집중되고 있다. 우리나라에서도 예로부터 약용작물들을 관련질환의 총체적 치료 또는 예방 용도로 처방, 이용해 왔으나 그 효능의 과학적 근거를 명확히 제시하지 못하여 상대적으로 그 활용도가 낮았으며 현재까지의 연구경향들도 이에 존재하는 물질을 분리하고 이의 작용을 확인하는 것에 포커스를 맞추고 있는 실정이다. 따라서 본 연구는 많이 사용되고 있는 약용작물을 중심으로, 사망률 1위를 차지하고 있는 심순환계 질환 중 가장 대표적인 질환인 고혈압의 치료효과를 가지는 작물을 선택하고 이에 대한 과학적 근거를 명확히 제시하여 이를 이용한 기능성 식품 또는 의약소재를 개발하고자 하므로 그 중요성이 매우 높은 것으로 사료된다.

### III. 연구개발 내용 및 범위

#### 1. 약용작물의 혈압강하효능 분석 및 식품소재화 기술 개발

본 연구의 목적달성을 위해 우선적으로 문헌상 혈압강하효과가 있는 것으로 보고된 천궁, 당귀, 노간주나무를 선택하여 이의 혈압강하 효능을 검색하고 이중 활성이 높은 것을 택하여 활성물질의 분리, 농축을 위한 최적 추출 및 분리조건을 확립하고 이의 기전을 확인하였으며 자연발증고혈압쥐(spontaneously hypertensive rats, SHR)를 이용하여 제조한 활성추출농축액의 효과를 시험하였다.

- 천궁, 당귀, 노간주나무의 혈압강하 효능 검색
- 최적의 활성농축액 제조조건 확립
- 활성농축액의 작용기전 확인
- 활성농축액이 자연발증고혈압쥐의 혈압에 미치는 영향 측정

#### 2. 혈관세포 및 혈관내피세포에 대한 작용평가

천궁의 심순환계에서의 기능을 연구하기 위하여 약리학적인 방법 (혈관 반응성에 미치는 NO 생산, 세포성장 및 독성, MAPK와 PKC를 중심으로 한 세포내 kinase계의 역할)과 SHR 및 DOCA 고혈압 동물을 이용하여 혈압 측정을 시도하였다.

- Cell growth and cytotoxicity
- NO production
- Vascular contractility and  $Ca^{2+}$ -sensitization
- Contribution of MAPK activity and other signal molecules on  $Ca^{2+}$ -sensitization
- Blood pressure measurement using direct and indirect methods

### IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

#### 1. 약용작물의 혈압강하효능 분석 및 식품소재화 기술 개발

항고혈압성 약용작물, 천궁, 당귀, 노간주나무에 대해 혈관확장 활성을 평가하고 기능성 식품소재로서의 개발가능성을 검토하기 위하여 각 시료의 용매별 추출물을 제조하였다. 그 중, phasic relaxation은 천궁에서, long-term relaxation은 당귀 추출물에서 나타났으며 각 추출물의 용매분획 시 phasic relaxation은 물층, long-term relaxation은

butanol층으로 각각 분리되었다. 천궁 phasic relaxation의 작용기전으로 혈관내피세포에서 분비되는 nitric oxide 및 muscarinic receptor가 추정되었으며 이 작용은 기 보고된 천궁의 혈관확장물질 tetramethylpyrazine(TMP)과는 다른 작용기전에 기인하는 것으로 확인되었다. 또한 butanol층의 long-term relaxation은  $K^+$  channel과는 직접적인 관련이 없으며  $Ca^{2+}$  channel antagonistic mechanism과 연관된 것으로 나타났다. 천궁과 당귀를 이용한 활성 농축액 제조를 위해 적정 추출법으로 ethanol 환류냉각추출법을 선정하고 천궁, 당귀 각각 및 적정비율(1:3, 1:1, 3:1)로 혼합하여 추출한 추출물에 대해 혈관확장활성을 평가하였다. 천궁:당귀 = 1:1 혼합 추출물의 활성이 가장 높게 나타났으며 특히 물층의 phasic relaxation(약 92%)은 다른 시료에 비해 유의적으로 높았다. 천궁, 당귀 1:1 혼합 추출물과 그 물층 및 butanol 층 회분을 SHR에 경구 투여하고 혈압의 변화를 관찰한 결과 모든 시료에서 투여 1시간 이후부터 혈압강하효과가 나타났으며 투여 24시간 후에는 초기수준으로 회복되었다. 본 연구결과, 천궁 및 당귀 혼합 추출액으로부터 제조한 활성 농축액의 항고혈압활성 식품소재로서의 활용이 기대된다.

## 2. 혈관세포 및 혈관내피세포에 대한 작용평가

약용작물 추출물들의 혈관세포 및 혈관내피세포에 대한 작용을 평가한 결과 천궁 추출물은 HUVEC 세포에서 NO 생산을 증가시켰으며 NE에 의한 대동맥 혈관의 수축을 억제하였다. 또한  $Ca^{2+}$ 이 없는 상태에서 DPB에 의한  $Ca^{2+}$ -sensitization도 천궁에 의해 억제되었다. 또한 NE는 MAPK (ERK1/2, p38 MAPK)의 활성을 시간 의존적으로 증가시켰다. 천궁추출물은 NE에 의한 ERK1/2의 활성을 유의하게 억제하였다. 그러나 p38 MAPK의 활성은 천궁 추출물에 의해 억제되지 않았다. 천궁은 PKC 및 Rho/RhoA 경로에는 영향을 미치지 못하였다. 이상의 결과로부터 천궁에 의한  $Ca^{2+}$ -sensitization의 억제는 천궁의 MAPK 억제 특히 ERK1/2의 억제에 의한 것임을 알 수 있었다. 한편 직접법으로 혈압을 측정한 실험에서 천궁 추출물은 SHR의 혈압을 유의하게 억제하였으며 DOCA 고혈압 쥐의 혈압은 약간 억제하였다.

이상의 연구결과를 통하여 천궁 및 당귀의 혈관 반응성 및 심혈관 질환에 대한 작용기전에 과학적 근거를 제시할 수 있었고 심혈관 질환 치료에 천연물인 약용작물을 사용에 대한 새로운 가능성을 제시하였으며 본 연구결과, 천궁 및 당귀 혼합 추출액으로부터 제조한 활성 농축액의 항고혈압성 식품소재로서의 활용이 기대된다.

### 3. 활용에 대한 건의

본 연구과제의 성공적 수행에 따라 전체 항고혈압치료 및 예방용 기능성 식품 및 의약품의 개발이 이루어 질 수 있을 것으로 예견되며 개발제품은 현재 사용되는 항고혈압약제를 일부 대체할 수 있을 것으로 기대된다. 또한, 연령증가에 따라 고혈압의 발생이 우려되는 사람이 常用할 수 있는 일반 건강식품소재로 활용할 수 있어 효능이 확인되어 선발된 약용작물은 농가의 안정적 고수익 확보를 위한 대체 작물로 활용이 가능할 것으로 사료된다.

# SUMMARY

## I. Title

Development of Hypotensive Food Materials with Medicinal Plants

## II. Objective and Significance

The aim of this study is to clarify the role of medicinal plant extracts on hypertension and develop hypotensive food material or nutraceuticals with biologically active components.

## III. Contents and Scope

### 1. Antihypertensive activity of medicinal plants and development of hypotensive food materials

This study was intended to determine the effect of some traditional herbal medicine, *Ligusticum wallichii*, *Angelica pubescens*, and *Juniperus squamata*, as on the vascular tone of rat thoracic aortic rings and develop hypotensive food material or nutraceuticals with biologically active components.

- Screening of antihypertensive activity of *L. wallichii*, *A. pubescens*, and *J. squamata*
- Establishment of optimal extraction conditions to manufacture for antihypertensive concentrate
- Mechanism of antihypertensive concentrate
- Effects of antihypertensive concentrate on blood pressure of spontaneously hypertensive rat

### 2. Effects of traditional herbal medicines in vascular endothelial cells and smooth

muscle cells

In this study, to clarify the roles of *L. wallichii* on cardiovascular disease, we focused on the roles of *L. wallichii* on NO production, cell growth and intracellular kinase system including MAPK and PKC in the regulation of the vascular contractility. Moreover, systemic blood pressure in SHR and DOCA-salt hypertensive rats were measured using extracts of *L. wallichii*.

- Cell growth and cytotoxicity
- NO production
- Vascular contractility and Ca<sup>2+</sup>-sensitization
- Contribution of MAPK activity and other signal molecules on Ca<sup>2+</sup>-sensitization
- Blood pressure measurement using direct and indirect methods

#### IV. Results and Opinion for Future Use

##### 1. Antihypertensive activity of medicinal plants and development of hypotensive food materials

Medicinal plants have been used widely as traditional remedies in Asian countries for hundreds of years. Current research efforts in science are narrowing the knowledge gap between the traditional and scientific use of plants in treating various health conditions. So, this study was intend to determine the effect of some medical plats, *L. wallichii*, *A. pubescens*, and *J. squamata*, as on hypertension and develop functional food or nutraceuticals with biologically active components.

Each extract, was extracted with different solvent, of *L. wallichii*, *A. pubescens*, and *J. squamata*, was examined on the angiotensin converting enzyme and the rat thoracic aortic rings. All of extracts were not inhibited the angiotensin converting enzyme, on the other hands a parts of extracts were showed vasorelaxing effects on rat thoracic aortic rings. The chloroform extract of *L. wallichii* was the most intensively induced endothelium dependent relaxation(93±13%). But, between components-induced endothelium-dependent relaxation and components-induced endothelium-independent relaxation in the chloroform extract of *L. wallichii* were not



divided after fractionation of the extract. Thus other extractions were tried and ethanol extraction was selected. After fractionation of ethanol extract, it was possible to divide distilled water fraction-induced endothelium-dependent relaxation and butanol fraction-induced endothelium-independent relaxation.

With the ethanol extraction, mixtures(1:3, 1:1, 3:1) of *L. wallichii* and *A. pubescens* were fractionated and each distilled water fraction was examined on the rat thoracic aortic rings. the most active one of them was distilled water fraction of 1:1 mixture-induced endothelium dependent relaxation(91±8%). This activity was through nitric oxide synthase and muscarinic receptor from endothelium. Butanol fraction: endothelium-independent relaxation was not related with K<sup>+</sup> channel but was related with Ca<sup>2+</sup> channel.

Each extract of the mixtures were orally administered to SHR. All of them reduced initial blood pressure in 1, 3, 5, 7 hr after an oral administration on SHR. The most active one of them was 1:1 mixture and distilled water fraction of 1:1 mixture. Initial blood pressure was recovered 24 hr after administration. According to this results, it was possible to manufacture antihypertensive concentrate using *L. wallichii* and *A. pubescens*.

## 2. Effects of traditional herbal medicines in vascular endothelial cells and smooth muscle cells

Extracts of *L. wallichii* increased the production of NO in HUVEC cells but not smooth muscle cells. Extracts of *L. wallichii* inhibited the muscle contraction induced by NE in aortic strips. *L. wallichii* also abolished Ca<sup>2+</sup>-independent contraction evoked by 12-deoxyphorbol 13-isobutyrate in Ca<sup>2+</sup>-free medium containing 1 mM EGTA. Furthermore, western blotting analysis using phosphorylated MAPK antibodies showed that NE increased the activity of both extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) and p38 MAPK, which were inhibited by PD98059 and SB203580, blockers of ERK1/2 and p38 MAPK, respectively. Furthermore, treatment with *L. wallichii* significantly abolished NE-mediated activation of ERK1/2, whereas the activity of p38 MAPK was not affected by the extract. The extract did not show

any effects on PKC and Rho/Rho kinase pathways in vascular smooth muscle cells. These results suggest that *L. wallichii* induces vasorelaxation in rat aortic smooth muscle, which may be mediated by the inhibition of ERK1/2 pathway, but not p38 MAPK. In direct blood pressure measurement experiment, extracts of *L. wallichii* significantly inhibited the systolic blood pressure in SHR, but slightly in DOCA-salt hypertensive rats. In indirect measurement, similar results were obtained by extract of *L. wallichii*.

### 3. Opinion for future use

From the present study, we could advance our knowledge on the action mechanism of *L. wallichii* and *A. pubescens* in vascular reactivity and cardiovascular diseases. This study may also provide new insights on traditional herbal medicines. This study should be useful not only for the herbal medicine but also for the development of new drugs for the cardiovascular disease, e.g. hypertension.

## CONTENTS

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| Chapert 1   | Synopsis .....   | 18 |
| Paragraph 1 | Objective and scope .....  | 18 |
| Paragraph 2 | Significance .....   | 18 |
| Chapter 2   | State of art .....   | 20 |
| Chapter 3   | Contents and Results .....   | 22 |
| Paragraph 1 | Introduction .....   | 22 |
| Paragraph 2 | Methods .....  | 24 |
| 1.          | Screening of antihypertensive activity .....                         | 24 |
| A.          | Sample .....   | 24 |
| B.          | Crude extract .....  | 24 |
| C.          | Screening of antihypertensive activity .....                         | 24 |
| 1)          | Inhibition of angiotensin converting enzyme .....                    | 24 |
| 2)          | Vasorelaxant effect .....  | 24 |
| 2.          | Extraction and Fractionation .....                                   | 25 |
| A.          | Chloroform extraction .....  | 25 |
| 1)          | Chloroform extraction .....  | 25 |
| 2)          | Hexane-pretreated chloroform extraction .....                        | 25 |
| B.          | Reflux extraction .....  | 25 |
| 1)          | Reflux extraction with ethanol .....                                 | 25 |
| 2)          | Reflux extraction with distilled water .....                         | 25 |
| 3)          | Fractionation .....  | 25 |
| 3.          | Optimal conditions for antihypertensive concentrate production ..... | 26 |
| 4.          | Vasorelaxant mechanism .....   | 26 |
| A.          | Endothelium-dependent relaxation .....                               | 26 |

|  |    |
|--|----|
| B. Endothelium-independent relaxation .....                              | 26 |
| 1) Measurement of long-term relaxation .....                             | 26 |
| 2) Effect on K <sup>+</sup> channel .....                                | 26 |
| 3) Effect on Ca <sup>2+</sup> channel .....                              | 26 |
| 5. Effect of antihypertensive concentrate on blood pressure of SHR ..... | 27 |
| A. Animals .....   | 27 |
| B. Measurement of blood pressure .....                                   | 27 |
| 6. Statistics .....  | 27 |
| Paragraph 3 Results and Discussion .....                                 | 28 |
| 1. Screening of antihypertensive activity .....                          | 28 |
| A. Crude extracts .....  | 28 |
| B. Antihypertensive activity of crude extracts .....                     | 28 |
| 1) Inhibition of angiotensin converting enzyme .....                     | 28 |
| 2) Vasorelaxation .....  | 29 |
| a) Vasorelaxation of <i>Ligusticum wallichii</i> .....                   | 29 |
| b) Vasorelaxation of <i>Angelica pubescens</i> .....                     | 32 |
| c) Vasorelaxation of <i>Juniperus squamata</i> .....                     | 33 |
| 2. Extraction and Fractionation .....                                    | 34 |
| A. Chloroform extraction .....   | 34 |
| 1) Vasorelaxation of chloroform extract .....                            | 34 |
| 2) Vasorelaxation of hexane-pretreated chloroform extract .....          | 34 |
| B. Reflux extraction .....   | 34 |
| 1) Vasorelaxation of reflux extract with distilled water .....           | 34 |
| 2) Vasorelaxation of reflux extract with ethanol .....                   | 35 |
| 3) Vasorelaxant mechanism of reflux extract with ethanol .....           | 36 |
| 3. Optimal conditions for antihypertensive concentrate production .....  | 41 |
| A. Extraction .....  | 41 |
| B. Fractionation of crude extract and its vasorelaxant effect .....      | 43 |
| 1) Fractionation of crude extract .....                                  | 43 |
| 2) Endothelium-dependent vasorelaxation .....                            | 43 |

|   |    |
|---|----|
| 3) Endothelium-independent vasorelaxation .....                                 | 47 |
| 4. Vasorelaxant mechanism .....   | 51 |
| A. Vasorelaxant mechanism of distilled water fraction .....                     | 51 |
| B. Vasorelaxant mechanism of butanol fraction .....                             | 53 |
| 1) Effects on K <sup>+</sup> channel .....                                      | 53 |
| 2) Effects on Ca <sup>2+</sup> channel .....                                    | 55 |
| C. Partial separation of distilled water fraction .....                         | 57 |
| 1) Separation using sephadex LH-20 .....  | 57 |
| 2) Separation using centricorn concentrators .....                              | 59 |
| 5. Hypotensive activity of essence on SHR .....                                 | 61 |
| Paragraph 4 Effects on vascular endothelial cells and smooth muscle cells ..... | 63 |
| 1. Introduction .....   | 63 |
| 2. Methods .....  | 64 |
| A. Cell isolation and culture .....   | 64 |
| B. Ca <sup>2+</sup> sensitization .....   | 64 |
| C. Nitric oxide production .....  | 65 |
| 1) Literature .....   | 65 |
| 2) Method .....   | 65 |
| D. Hypertension model animals .....   | 66 |
| 3. Results and Discussion .....   | 67 |
| A. <i>L. wallichii</i> -mediated NO production .....                            | 67 |
| B. Cell proliferation and cell growth .....                                     | 68 |
| C. Ca <sup>2+</sup> -sensitization .....  | 69 |
| 1) Effects of <i>L. wallichii</i> on vasoconstrictor-mediated contraction ..... | 69 |
| 2) Effects of <i>L. wallichii</i> on NE-mediated MAPK activation .....          | 70 |
| 3) Effects of <i>L. wallichii</i> on PKC and RhoA/Rho pathways .....            | 72 |
| 4) Summary of the results .....   | 72 |
| D. Effects of <i>L. wallichii</i> on blood pressure .....                       | 73 |
| 1) Direct measurement method .....  | 73 |
| 2) Indirect measurement method .....  | 74 |

|             |   |    |
|-------------|---|----|
| Chapter 4   | Achievement and Contribution .....            | 76 |
| Paragraph 1 | Achievement .....                             | 76 |
| Paragraph 2 | Contribution .....                            | 77 |
| Chapter 5   | Plan for Use .....                            | 78 |
| Paragraph 1 | Current use .....                             | 78 |
| Paragraph 2 | Future plan .....                             | 79 |
| Chapter 6   | Foreign Scientific Information Acquired ..... | 80 |
| Chapter 7   | References .....                              | 81 |

# 목 차

|   |    |
|---|----|
| 제 1 장 연구개발과제의 개요.....                               | 18 |
| 제 1 절 연구개발의 목적 및 범위 .....                           | 18 |
| 제 2 절 연구개발의 필요성 .....                               | 18 |
| 1. 기술적 측면 .....                                     | 18 |
| 2. 경제·산업적 측면 .....                                  | 19 |
| 3. 사회·문화적 측면 .....                                  | 19 |
| 제 2 장 국내외 기술개발 현황 .....                             | 20 |
| 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과.....                           | 22 |
| 제 1 절 서 설 .....                                     | 22 |
| 제 2 절. 실험방법 .....                                   | 24 |
| 1. 조추출물의 제조 및 활성검색 .....                            | 24 |
| 가. 시료 .....   | 24 |
| 나. 조추출물의 제조 .....                                   | 24 |
| 다. 혈압강하활성 검색 .....                                  | 24 |
| 1) Angiotensin converting enzyme(ACE) 저해효과 검색 ..... | 24 |
| 2) 혈관이완효과 검색 .....                                  | 24 |
| 2. 시료 추출 및 분획조건 확립 .....                            | 25 |
| 가. 침지추출 .....                                       | 25 |
| 1) Chloroform 침지추출 .....                            | 25 |
| 2) Hexane층 제거 후 Chloroform 침지 추출 .....              | 25 |
| 나. 환류냉각추출 .....                                     | 25 |
| 1) Ethanol을 이용한 환류냉각추출 .....                        | 25 |
| 2) 증류수를 이용한 환류냉각추출 .....                            | 25 |
| 3) 분획물의 제조 .....                                    | 25 |
| 3. 최적의 활성 추출농축액 제조 조건 확립 .....                      | 26 |

|   |    |
|---|----|
| 4. 각 활성 농축액의 혈관이완 작용기전확인 .....                      | 26 |
| 가. 내피존재 시의 활성기전 .....                               | 26 |
| 나. 내피를 제거한 혈관에서의 활성기전 .....                         | 26 |
| 1) 평활근세포 의존성이완(long-term relaxation)의 측정 .....      | 26 |
| 2) K <sup>+</sup> channel에 대한 작용 .....              | 26 |
| 3) Ca <sup>2+</sup> channel에 대한 작용 .....            | 26 |
| 5. 활성 추출물의 자연발증고혈압쥐의 혈압에 미치는 영향 .....               | 27 |
| 가. 실험동물의 사육 .....                                   | 27 |
| 나. 혈압강하물질의 투여 및 혈압측정 .....                          | 27 |
| 6. 통계분석 .....                                       | 27 |
| 제 3절 결과 및 고찰 .....                                  | 28 |
| 1. 조추출물 제조 및 혈압강하 활성검색 .....                        | 28 |
| 가. 조추출물의 제조 .....                                   | 28 |
| 나. 추출물의 혈압강하활성 검색 .....                             | 28 |
| 1) Angiotensin converting enzyme(ACE) 저해효과 검색 ..... | 28 |
| 2) 혈관이완효과 검색 .....                                  | 29 |
| 가) 천궁의 혈관이완작용 .....                                 | 29 |
| 나) 당귀의 혈관이완작용 .....                                 | 32 |
| 다) 노간주나무의 혈관이완작용 .....                              | 33 |
| 2. 시료 추출 및 분획 조건 확립 .....                           | 34 |
| 가. Chloroform 침지추출 .....                            | 34 |
| 1) Chloroform 추출 및 분획물의 혈관이완작용 .....                | 34 |
| 2) Hexane 전처리 후 chloroform 추출 및 분획물의 혈관이완작용 .....   | 34 |
| 나. 환류냉각 추출 .....                                    | 34 |
| 1) 증류수 환류냉각 추출 및 분획물의 혈관이완작용 .....                  | 34 |
| 2) Ethanol 환류냉각 추출 및 분획물의 혈관이완작용 .....              | 35 |
| 3) Ethanol 환류냉각 추출물의 혈관이완작용 기전 확인 .....             | 36 |
| 3. 최적의 활성 추출농축액 제조조건 확립 .....                       | 41 |
| 가. 추출물의 제조 .....                                    | 41 |
| 나. 추출물의 분획 및 활성측정 .....                             | 43 |



|   |    |
|---|----|
| 1) 조 추출물의 분획 .....  | 43 |
| 2) 분획물의 내피의존성 혈관이완활성 .....  | 43 |
| 3) 분획물의 내피세포 비의존성 혈관이완작용 .....  | 47 |
| 4. 각 활성 농축액의 혈관이완 작용 기전 및 부분분리 .....  | 51 |
| 가. 물층의 혈관이완 작용 기전 .....   | 51 |
| 나. Butanol층의 혈관이완 작용 기전 .....   | 53 |
| 1) K <sup>+</sup> channel과의 관련성 .....                                       | 53 |
| 2) Ca <sup>2+</sup> channel과의 관련성 .....                                     | 55 |
| 다. 물층의 활성물질 부분 분리 .....   | 57 |
| 1) Sephadex LH-20을 이용한 활성물질의 분리 .....                                       | 57 |
| 2) Centricorn concentrators(10, 3)을 이용한 활성물질의 분리 .....                      | 59 |
| 5. 활성농축액이 자연발증고혈압쥐의 혈압에 미치는 영향 .....  | 61 |
| 제 4 절 혈관세포 및 혈관내피세포에 대한 작용평가(협동과제) .....                                    | 63 |
| 1. 서설 .....   | 63 |
| 2. 연구 방법 .....  | 64 |
| 가. 세포의 초대, 계대배양 .....   | 64 |
| 나. Ca <sup>2+</sup> sensitization에 대한 효과 검토 .....                           | 64 |
| 다. Nitric oxide의 측정을 위한 실험 .....  | 65 |
| 1) 이론적 배경 .....   | 65 |
| 2) 방법 .....   | 65 |
| 라. 고혈압 동물 모델에서의 천궁의 효과 .....  | 66 |
| 3. 결과 및 고찰 .....  | 67 |
| 가. Nitric oxide 생산에 대한 효과 .....   | 67 |
| 나. MTT법을 이용한 세포증식 억제효과 측정 .....   | 68 |
| 다. Ca <sup>2+</sup> -sensitization에 대한 실험 .....                             | 69 |
| 1) NE, DPB에 의한 Ca <sup>2+</sup> -sensitization에 미치는 Ch1LW의 효과 .....         | 69 |
| 2) Ca <sup>2+</sup> -sensitization의 mediator MAPK의 활성화에 미치는 Ch1LW의 효과 ..... | 70 |
| 3) 그 외 Ca <sup>2+</sup> -sensitization의 mediator에 미치는 Ch1LW의 효과 .....       | 72 |
| 4) 결과의 종합 .....   | 72 |
| 라. 혈압에 대한 효과 .....  | 73 |

|                                      |    |
|--------------------------------------|----|
| 1) 직접 혈압 측정법을 이용한 결과 .....           | 73 |
| 2) 간접 혈압 측정법을 이용한 결과 .....           | 74 |
| <br>                                 |    |
| 제 4 장    목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....    | 73 |
| 제 1 절 연차별 연구개발 목표의 달성도 .....         | 73 |
| 제 2 절 관련분야에의 기여도 .....               | 77 |
| <br>                                 |    |
| 제 5 장    연구개발결과의 활용계획 .....          | 78 |
| 제 1 절 기존 활용실적 .....                  | 78 |
| 제 2 절 활용계획 .....                     | 79 |
| <br>                                 |    |
| 제 6 장    연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 ..... | 80 |
| <br>                                 |    |
| 제 7 장    참고문헌 .....                  | 81 |

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

### 제 1 절 연구개발의 목적 및 범위

최근 동양의학에서 주로 이용되던 약용식물로부터 신약을 개발하려는 연구가 현대의 학이 고도로 발달한 서구사회를 중심으로 이루어지고 있으며 이에 대한 관심이 집중되고 있다. 특히 기능성식품(Functional Food) 또는 식품의약(Nutraceuticals)의 제조에 천연 약용식물을 이용하려는 경향은 이미 선진국을 중심으로 널리 확대되어 있으며 유효한 약용작물을 확보하려는 작업이 국가 간의 '전쟁'으로까지 불려지고 있다. 우리나라는 약용작물들을 관련질환의 총체적 치료 또는 예방 용도로 처방, 이용해 왔으나 그 효능의 과학적 근거를 명확히 제시하지 못하여 상대적으로 그 활용도가 낮았다.

고혈압은 40세 이후 인구의 20~40%가 앓고 있을 만큼 순환기 질환 중 가장 흔한 질환이다. 고혈압은 혈압 조절작용의 이상에 의해 일어나며 발생기전에 대해서는 renin-angiotensin system에 대한 연구가 가장 많이 이루어져 있으나 혈압조절에는 혈관, 심장, 신장, 신경계, 내분비계 등이 복합적으로 상호작용하여 혈압의 항상성을 유지하며 vasoactive substance를 포함한 많은 생화학적 물질들이 관여하는 복잡한 질병이다. 따라서 고혈압의 치료를 위하여 여러 가지 약제들이 개발, 연구되고 있으나, 천연 약용작물을 이용한 연구는 많지 않은 실정이다. 따라서 본 연구는 국내에서 재배되는 약용작물의 혈압강하 효과를 체계적으로 구명하고 활성성분을 이용한 기능성식품 또는 식품의약 소재로 개발하는데 그 목적이 있다.

### 제 2 절 연구개발의 필요성

#### 1. 기술적 측면

국내 약용식물은 야생초의 채취이용에 그치다 약 100여 년 전 인삼재배를 기점으로 일부작물이 재배되기 시작하였으며 해방이후 서구에서 들여오는 항생제 등의 신약에 널리 이용도가 둔화되었으나 1970년대 이후 국민생활수준의 향상과 1987년 한방의료보험의 실시

등으로 그 수요가 급격히 증가하게 되었다. 1988년부터 수요가 많고 경제성이 있는 작물을 중심으로 국내재배 생산으로 자급하기 위하여 품종육성과 재배기술이 확립되어 왔다. 약용 가능한 고등식물 생약 중 우리나라에 야생 또는 재배로 생산 가능한 것은 305품목(289종)에 달하나 현재 농가에서 재배 생산되는 품종은 약 50여종, 재배면적으로는 약 10,900 ha, 약 2000억원의 시장을 형성하고 있는 경제작물이다.

현대의학에서 처방하고 있는 합성 또는 정제된 약물들은 일부 증상에 대한 효과는 탁월하나 서로 관련된 질환에 대해서는 효과를 나타내지 못하는 등 약효적인 측면 또는 사용범위의 측면 등에서 심각한 부작용을 일으키는 것이 많다. 약용작물은 관련질환의 총체적 치료 또는 예방 용도로 처방, 이용되어 왔으나 그 효능의 과학적 근거를 명확히 제시하지 못하여 그 활용도가 낮았다고 할 수 있다. 따라서 약용작물에 대한 효능을 과학적으로 평가하고 활성성분을 효율적으로 활용할 수 있는 기술의 개발이 필요하다.

## 2. 경제·산업적 측면

기능성식품은 일본에서 1993년 저 알레르겐 쌀 “Fine rice”를 시작으로 일반 건강보조식품과 구별된 ‘특정보건용식품’으로 허가된 이래 급격히 증가하여 현재 수십 종이 시판되고 있으며, 최근 북미나 유럽에서는 질병치료 및 예방에 보다 적극적 개념의 nutraceuticals에 대한 연구 및 그 성과의 활용이 급증하고 있다. 이러한 경향은 선진국을 중심으로 더욱 확대될 것으로 예상되며 따라서 해외에서 개발된 기술이나 제품의 수입보다는 자체기술의 개발이 필요하다. 또한 고혈압을 비롯한 심순환계질환 치료제의 사용량이 약물사용량의 50% 이상을 차지하는 것으로 추정될 만큼 압도적으로 많아 이들 질환에 효능이 있는 제품시장의 확대가 기대된다.

## 3. 사회·문화적 측면

고혈압은 대표적인 성인병의 하나로 우리나라뿐 아니라 세계적으로 그 관리방안이 필요시 되고 있으나 현재 고혈압의 치료를 위해 사용되는 여러 약물은 완전한 치료효과를 나타내고 있지 않다. 따라서 새로운 고혈압 치료제를 찾는 것은 심혈관 질병 치료적인 측면에서 꼭 필요하며, 식이요법이 중요한 관리방안의 하나로 활용될 수 있어 혈압강하기능성 식품소재의 개발을 통한 경증환자의 치료 또는 발병가능성이 있는 사람의 예방을 유도할 필요가 있다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

현재까지 고혈압의 치료를 위하여 많은 연구들이 수행되어 왔으며 대표적인 혈압 강하작용을 갖는 물질로 주로 이용되는 것은 이노제,  $\beta$  차단제,  $Ca^{2+}$  억제제, angiotensin converting enzyme(ACE) 저해제,  $\alpha$  억제제 등이 있다. 이 중 ACE에 대한 연구는 주로 천연 peptide들에 적용되어 왔으며, 직접적으로 혈관의 수축을 일으키는 혈관평활근세포 및 여러 가지 혈관활성물질들을 분비하는 혈관내피세포에 미치는 영향 등을 측정하여 혈압과의 관련성을 측정하고 있다.

### 1. 당귀(*Angelica gigas*)의 심순환계질환 관련 연구 현황

- 혈관평활근세포의 이상 증식은 동맥경화, 폐색성정맥질환 등 혈관질환을 일으키는 주요요인으로 당귀에서 분리된 osthole(7-methoxy-8-[3-methylpent-2-enyl] coumarin)은 rat의 혈관평활근세포를 이용한 실험에서 cell cycle의 초기  $G_1$  phase에서 cAMP와 cGMP의 형성을 선택적으로 증가시킴으로써 혈관평활근세포의 증식을 억제시키는 것으로 확인되었다(Guh et al, 1996).

- 당귀에서 분리된 'osthole'은 혈소판응집 및 혈관평활근의 수축을 저해하는 것으로 나타났다(Hoult and Paya, 1996).

### 2. 천궁(*Ligusticum wallichii* Franch)의 심순환계질환 관련 연구 현황

- 천궁에서 분리한 tetramethylpyrazine(TMP)을 마취시킨 쥐에 투여하였을때 혈압강하효과를 나타내었으며 혈관실험에서 혈관이완효과가 확인되었다. 또한 혈관평활근세포에서 세포내  $Ca^{2+}$  channel을 통한 세포외  $Ca^{2+}$ 의 유입 뿐 아니라 세포내 축적  $Ca^{2+}$ 의 방출을 저해하므로써 실질적으로  $Ca^{2+}$  antagonist로 작용하는 것으로 확인되었다 (Pang et al, 1996).

- 천궁과 당귀는 혈액순환 개선을 위한 생약제로서 함께 사용할 경우 상승효과를 나타내는 것으로 알려져 있다. 이 상승효과가 천궁의 주요 활성물질 TMP와 당귀의 ferulic acid에 의한 것인지 확인한 결과 이들 성분간의 상승효과는 명확히 인정되지 않았다 (Huang et al, 1996).

3. 노간주나무 (*Juniperus squamata*)의 심순환계질환 관련 연구 현황

- 현재 국내에서의 재배생산이 이루어지지 않고 있는 노간주나무로부터 토끼혈소판의 ATP 유리를 저해하므로써 항혈소판응집 작용을 나타내는 동시에 rat 대동맥의 혈관이완작용을 나타내는 물질 sesquiterpene 8, 14-cedranediol의 acetyl 유도체의 하나인 14-acetoxycedrol이 분리·보고되어 이 작물의 혈압강하 기능성식품소재로서의 활용가능성을 나타내고 있다 (Teng et al, 1994).

4. 한편 당귀와 천궁의 재배면적은 각각 1000, 359 ha로 비교적 많이 재배되고 있어 활용이 쉬우나 노간주나무는 현재 재배면적이 거의 확보되어 있지 않아 이의 활용을 위해서는 재배면적 확보가 우선적으로 필요한 점도 실용화 추진에 있어 문제점으로 지적되고 있다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 서 설

최근 노년인구의 급증에 따라 노인성 질환이 증가되어 고혈압을 비롯한 심순환계 질환에 의한 사망률이 총 사망원인의 30%로 사망율 1위를 차지하고 있으며(통계청자료, 1994~1996) 이에 따라 순환계질환이 주요 연구 대상이 되어 왔고 그 연구결과 새로운 순환기 질환치료제들이 개발되었다. 심혈관계 질환은 혈관내피기능의 과도작용, 혈관평활근의 수축 이상과 경련으로 야기되는 협심증, 고혈압, 허혈성 심장질환, 뇌졸중 등이 대표적이며 심각한 사회문제로 대두되고 있다. 따라서 순환기계 질환의 병태생리학적 작용기작을 규명하고 이해하는 것은 이러한 질병의 예방 및 치료를 위한 중요한 기초적인 자료가 될 수 있을 것이다.

심순환계 질환을 일으키는 가장 근본은 고혈압이라 할 수 있으며 40세 이후 인구의 20~40%가 앓고 있을 만큼 순환기 질환 중 가장 흔한 질환이다. 고혈압의 95% 이상은 뚜렷한 원인을 밝히기 어려우며 이를 본태성 고혈압이라 하고 나머지 5% 정도는 뚜렷한 원인이 있으며 이를 2차성 고혈압이라고 한다. 고혈압은 혈압 조절작용의 이상에 의하여 일어나며 고혈압의 발생기전에 대해서는 renin-angiotensin system에 대한 연구가 가장 많이 이루어져 있다. 또한 혈관, 심장, 신장, 신경계, 내분비계 등이 복합적으로 상호 작용하여 혈압의 항상성을 유지하며 vasoactive substance를 포함한 많은 생화학적 물질들이 혈압 조절작용에 관여하게 된다. 고혈압은 또한 혈관의 직경이 감소하여 혈관 내의 압력이 증가함에 따라 발생하며 이는 교감신경계의 흥분에 의한 혈관의 수축, 평활근 세포막 이상에 따른 세포내  $Ca^{2+}$  증가, 또는 혈관 이완·수축 기전의 변화에 의해 나타나게 된다.

일단 고혈압이 발생하면 혈관벽에 2차적인 구조적 재형성이 일어난다. 혈관벽은 혈관 내피세포와 혈관 평활근 세포로 이루어져 있다. 내피세포는 혈관의 가장 내벽을 이루는 단층의 세포로서 혈액과 직접 접촉하게되는 혈관벽세포이다. 과거에 내피세포는 혈관벽의 단순한 기계적 방어막으로만 인식되어 왔으나 실제로는 혈관의 병태생리에 영향을 미치는 여러 가지 물질들을 생산함이 알려져 있다. 평활근세포는 혈관중막의 여러개의 세포층을 구성하고 있으며 이의 수축 및 이완에 의해 혈관의 수축이완이 조절되므로 평

활근의 수축조절은 혈관의 저항 및 고혈압의 발생에 중요한 역할을 한다.

일반적으로 고혈압의 치료를 위해 사용되는 약물요법은 이뇨제,  $\beta$  차단제,  $Ca^{2+}$  억제제, ACE 억제제,  $\alpha$  억제제 등이 있으며 고혈압의 경우 이러한 차단제 또는 조절제를 복합적으로 처치하여 환자에 적용한다. 이러한 고혈압치료제의 작용기전을 보면 많은 수가 혈관에 직접 또는 간접적으로 이완시키는 작용을 한다는 것을 알 수 있으며 따라서 혈관의 운동성에 영향을 미치는 약물들이 고혈압의 조절에 중요한 역할을 수행함을 알 수 있다. 그러나 최근 들어 이러한 합성 또는 정제된 약물들은 일부 증상에 대한 효과는 탁월하나 서로 관련된 질환에 대해서는 효과를 나타내지 못하는 등 약효적인 측면 또는 사용 범위의 측면 등에서 심각한 부작용을 일으키는 것이 많기 때문에 상대적으로 부작용이 적은 천연물에서 그 효과를 찾고자 하는 경향이 증가하고 있다. 우리나라도 예전부터 이러한 천연물, 특히 약용작물을 관련질환의 총체적 치료 또는 예방 용도로 처방, 이용해 왔으나 그 효능의 과학적 근거를 명확히 제시하지 못하여 활용도가 낮았다고 할 수 있다.

따라서 본 연구는 오래 전부터 우리나라에서 사용되어 온 약용작물 중 최근 “혈관 이완 물질”, “혈관세포 증식억제물질”등 혈압상승억제 작용과 관련된 물질이 분리, 보고되고 있는 당귀, 천궁, 노간주나무를 이용하여 이들 작물의 혈압강하효과를 체계적으로 구명하고 활성성분을 이용한 기능성식품 또는 식품의약 소재의 개발을 목적으로 하여 수행되었다.



## 제 2 절. 실험방법

### 1. 조추출물의 제조 및 활성검색

#### 가. 시료

조추출물의 제조 및 활성검색을 위한 1차 시료는 천궁, 당귀, 노간주나무의 3종을 대상으로 하여 천궁과 당귀는 시중에서 유통되는 건조된 형태의 국내산 제품을 구입한 후 food mixer(FM-707T, Hanil)로 분쇄하였고, 노간주나무는 원목을 구입하여 목심부위를 2~3 cm 길이로 얇게 절단하였으며 모든 시료는 저온 저장하면서 사용하였다. (Table 1)

#### 나. 조추출물의 제조

조추출물 제조를 위하여 각각 극성이 0.0, 0.4, 0.9 및 >1인 hexane, chloroform, ethanol 및 물을 추출용매로 사용하였다. 천궁과 당귀 조추출물 제조를 위해 ethanol과 hexane 및 chloroform은 시료에 추출용매를 가하여 homogenize한 후 원심분리(8,000 xg, 20 min) 하고 여과하였다. 노간주나무는 homogenize가 불가능하여 시료에 추출용매를 가한 후 상온에서 24시간 정치 후 용매를 회수하고 이를 3회 반복하여 얻은 여액을 합쳐 조추출물로 하였다. 또한 각 시료의 물추출물은 90~100℃에서 약 9시간 환류냉각 추출후 8,000 xg로 30분간 원심분리, 여과하여 제조하였다. 모든 추출물은 감압건고, 동결건조하여 실험에 사용하였다.

#### 다. 혈압강화활성 검색

##### 1) Angiotensin converting enzyme(ACE) 저해효과 검색

ACE 저해활성은 각 시료의 물 추출물 (감압농축 前)에 대해 Cushman & Cheung 방법(1971)을 변형하여 측정하였다. 즉, rabbit lung acetone powder에서 추출한 crude ACE에 의해 기질, Hip-His-Leu에서 유리되는 hippuric acid를 ethyl acetate로 추출하여 228nm에서의 흡광도를 측정하였다.

##### 2) 혈관이완효과 검색

각 추출물의 응성 SD rats에서 적출한 하행흉부대동맥에 대한 혈관이완작용을 측정하였다. 즉, 적출한 혈관을 길이 약 2~3mm의 ring 형태로 잘라 4 ml의 PSS (NaCl

136.9, KCl 5.4, CaCl<sub>2</sub> 1.5, MgCl<sub>2</sub> 1.0, NaHCO<sub>3</sub> 23.8, glucose 5.5, EDTA 0.01mM) organ bath에 현수 시킨 후 1g 장력으로 60분간 평형화시키고 70 mM KCl 용액에 반응이 안정될 때까지 반복적으로 노출시켰다. Organ bath용액은 37°C, pH 7.5, 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> mixture 통기상태로 유지 시켰다. 혈관의 장력은 force-displacement transducer가 연결된 polygraph system과 computer analyser로 측정하였다. 필요에 따라 내피는 PSS 용액에 담근 솜으로 문질러 제거하였다. 시료 용매별 조추출물을 ethanol에 녹여 (0.5~1.0mg/ml) organ bath에 첨가하였으며 모든 실험에서 bath 내의 ethanol 첨가량이 0.1%를 넘지 않도록 하였다.

## 2. 시료 추출 및 분획조건 확립

### 가. 침지추출

#### 1) Chloroform 침지추출

시료에 10 배량의 chloroform을 가해 실온에서 약 15시간 stirring 한 후 여과하고 여과액을 35~40°C에서 감압농축 시킨 후 동결건조하여 조추출물을 제조하였다.

#### 2) Hexane층 제거 후 Chloroform 침지 추출

Büchner funnel을 이용하여 hexane 층을 제거한 시료에 10 배량의 chloroform을 가해 실온에서 약 15시간 stirring 한 후 여과하고 여과액을 35~40°C에서 감압농축 시킨 후 동결건조하여 조추출물을 제조하였다.

### 나. 환류냉각추출

#### 1) Ethanol을 이용한 환류냉각추출

시료에 10배량의 ethanol을 가해 80~90°C에서 약 2시간 동안 환류냉각 추출하고 여과액을 35~40°C, 감압하에서 농축 후 동결건조하여 조추출물을 제조하였다.

#### 2) 증류수를 이용한 환류냉각추출

시료에 20배량의 증류수를 가해 100°C에서 약 2시간 30분 동안 환류냉각추출 후 centrifuge(8000rpm, 20min) 한 상정액을 35~40°C에서 감압농축시킨 후 동결건조하여 조추출물을 제조하였다.

#### 3) 분획물의 제조

활성물질 농축액을 제조하기 위하여 조추출물을 물에 녹인 후 동량의 ethylacetate를

가하여 ethylacetate 층을 분리하고 다시 남은 여액에 butanol을 가하여 butanol 획분을 제조하였다. 각각을 모두 감압건고, 동결건조하여  $-20^{\circ}\text{C}$ 에서 저장하면서 실험에 사용하였다.

### 3. 최적의 활성 추출농축액 제조 조건 확립

쥐 대동맥에 대하여 최대의 혈관이완작용을 나타낼 수 있는 활성 추출농축액을 제조하기 위하여 천궁과 당귀를 각각, 1:3, 3:1 및 1:1로 혼합하여 시료를 제조하고 기 확립된 추출 및 분획조건에 따라 추출, 분획한 후 각각의 활성을 측정하였다.

### 4. 각 활성 농축액의 혈관이완 작용기전확인

#### 가. 내피존재 시의 활성기전

내피가 존재하는 혈관에서 나타나는 시료 추출물의 일과성 이완(phasic relaxation) 기전 확인을 위하여 nitric oxide synthase inhibitor인  $\text{N}^{\text{G}}$ -nitro-L-arginine(L-NNA), prostacyclin 합성 억제제인 indomethacin 및 muscarinic receptor antagonist인 atropin을 사용하였으며 이들은 각각 혈관을 NE로 수축시키기 20분 전에 bath에 첨가하여 시료 첨가에 따른 혈관이완작용에 미치는 영향을 관찰하였다.

#### 나. 내피를 제거한 혈관에서의 활성기전

##### 1) 평활근세포 의존성이완(long-term relaxation)의 측정

시료의 평활근세포 의존성 혈관이완작용은 내피세포를 제거한 혈관에서 실험하였으며, 이 경우 NE로 혈관을 수축시키고 10분~40분까지 10분 간격으로 혈관의 이완율을 측정하여 표시하였다.

##### 2) $\text{K}^+$ channel에 대한 작용

활성추출물의  $\text{K}^+$  efflux 조절에 대한 역할을 확인하기 위하여 selective  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel blocker인 charybdotoxin, selective ATP-dependent  $\text{K}^+$  channel blocker인 glibenclamide 및 nonspecific  $\text{K}^+$  channel blocker인 barium chloride 첨가 시 이완효과의 변화를 측정하였다. 각 저해제들은 시료 투입 20분전에 혈관에 첨가하였으며 이때 혈관은 고농도의 KCl을 이용하여 수축시켰다.

##### 3) $\text{Ca}^{2+}$ channel에 대한 작용

활성추출물의 혈관이완작용과  $\text{Ca}^{2+}$  channel의 관련성을 측정하기 위하여  $\text{CaCl}_2$  농도

증가에 따른 혈관의 반응을 측정하였다. 즉, 혈관의 평형화 및 최적 수축유도 후 다시 1 mM EGTA를 함유한  $Ca^{2+}$  free medium을 이용하여 10분 간격으로 3회 wash하고 혈관을  $Ca^{2+}$  free high KCl medium으로 자극하고  $CaCl_2$ 의 농도를 높여주면서 계속적으로 첨가하여 이에 따른 반응을 관찰하였다. 이때 시료는  $Ca^{2+}$  free high KCl medium 첨가 후 곧바로 첨가하였고 시료를 첨가하지 않은 혈관을 control로, L-type  $Ca^{2+}$  channel blocker인 nifedipine을 positive control로 사용하였다.

## 5. 활성 추출물의 자연발증고혈압쥐의 혈압에 미치는 영향

### 가. 실험동물의 사육

자연발증고혈압쥐(spontaneously hypertensive rat, SHR)는 Charles River Japan에서 7주령의 수컷을 구입하여 SPF(specific pathogen-free animals) system에서 사육하며 실험에 사용하였다. 실험동물실의 전반적인 운영은 미국 NIH 동물실험의 가이드라인인 “Guide for the Care and Use of Laboratory Animals” 및 “Institutional Administrator’s Manual for Laboratory Animal Care and Use”에 준하였다.

### 나. 혈압강하물질의 투여 및 혈압측정

경구투여시 시료는 oral zonde를 이용하여 투여하였으며, 대조군으로는 시료를 녹인액 (EtOH:PSS, 1:1)을 동량 투여하였다. 시료 투여 전에 초기혈압을 측정하고 투여 후 1, 3, 5, 7 및 24시간에 각각의 혈압을 측정하였다. 혈압측정은 외부로부터의 전자파에 의한 측정장애를 원천적으로 차단하기 위하여 RF shield room 내에서 실시하였다. SHR을 28°C로 조절된 항온조에 넣어 약 10분간 안정화 시킨 후 꼬리 동맥으로부터 IITC BP 혈압측정장치 (IITC Inc. California, USA)를 사용하여 수축기 혈압, 평균혈압, 이완기혈압 및 심장박동수를 측정하며 측정은 5회이상 반복 실시하여 그 평균값을 측정치로 하였다.

## 6. 통계분석

모든 실험은 4~6회 이상 반복 수행하였고, 결과는 SAS program을 이용하여 분산분석(ANOVA) 및 t-test를 수행하였다. 분산분석에 의해 차이가 유의적인 경우는 Student Newman Keul의 다중 비교법에 의하여  $\alpha=0.05$  수준에서 검정하였다.

## 제 3절 결과 및 고찰

### 1. 조추출물 제조 및 혈압강하 활성검색

#### 가. 조추출물의 제조

용매별로 추출한 천궁, 당귀 및 노간주나무 추출물은 ethanol과 chloroform 추출 시는 당귀(9.6%, 13.2%)가 가장 많았고, hexane 추출 시는 천궁(8.4%)이 가장 많았으나 전체적인 추출율 및 회수량은 낮은 것으로 나타났다(Table 1). 물 추출 시는 천궁 및 당귀는 모두 50%이상의 회수율을 보이는 것으로 나타났으나 노간주나무는 약 5%로 다른 용매 추출 시와 유사하여 노간주나무의 추출율이 가장 낮음을 알 수 있었다. 또한 물추출물은 불용성 물질이 많아 원심분리 후 상등액을 실험에 사용하였다.

Table 1. 각 작물의 용매별 조추출물의 회수율 (%)

| 시료<br>추출용매      | 천궁    | 당귀    | 노간주나무 |
|-----------------|-------|-------|-------|
| Distilled water | 54.35 | 57.49 | 4.94  |
| Ethanol         | 6.20  | 9.60  | 7.00  |
| Chloroform      | 5.10  | 13.20 | 4.30  |
| Hexane          | 8.40  | 3.00  | 4.40  |

#### 나. 추출물의 혈압강하활성 검색

##### 1) Angiotensin converting enzyme(ACE) 저해효과 검색

고혈압은 혈압조절 작용의 이상에 의하여 일어나며 고혈압의 발생기전에 대해서는 renin-angiotensin system에 대한 연구가 가장 많이 이루어져 있다. 따라서 우선적으로 각 작물 물 추출물을 동결건조 전 추출 상등액과 동결건조 후 일부를 취하여 물에 녹여 ACE 저해활성을 측정된 결과 모든 작물에서 활성이 나타나지 않았다. 따라서 각 작물이 renin-angiotensin system을 통하여 혈압에 관여하지 않음을 알 수 있었고, 다음 단계로 혈압과 관련있는 기전 중 하나인 혈관확장효과에 대한 실험을 수행하였다.

## 2) 혈관이완효과 검색

시료 용매별 조추출물의 혈압에 미치는 영향에 대한 기전확인을 위한 다음 단계로 각 추출물을 ethanol에 녹여 (0.5~1.0mg/ml) organ bath에 첨가하여 혈관이완효과를 검색하였으며 모든 실험에서 ethanol 첨가량은 0.1%를 넘지 않도록 하였다.

### 가) 천궁의 혈관이완작용

천궁은 각 용매추출물을 0.3 mg/mL 농도로 첨가 시 혈관이완작용이 일어났으며 특히 ethanol이나(46±9.7 %), hexane (45.4±2.4) 추출 시에 비해 chloroform 추출 시 (ChILW, 93.4±13.2)의 효과가 가장 컸다. 천궁 chloroform 추출물의 이러한 작용은 농도 의존적으로 나타났으며(Fig. 1) 내피세포를 제거한 혈관에서는 나타나지 않아 내피세포 의존적임을 알 수 있었다(Fig. 2a, 2b). 또한 이 작용은 내피세포에서의 nitric oxide(NO) 생성억제제 NAME, NMMA 및 L-NNA (Fig. 2c)에 의해서는 억제되었으나 cyclooxygenase inhibitor인 indomethacin, muscarinic receptor antagonist인 atropin에는 영향을 받지 않아 천궁의 내피세포 의존적 혈관이완작용은 혈관내피에서 분비되는 NO에 의한 것임을 알 수 있었다.

천궁에서 혈관이완작용을 갖는 물질로 분리, 보고되어 있는 tetramethylpyrazine (TMP)의 경우 NO와의 관련성에 대해 보고되지 않아 이에 대하여 확인실험을 한 결과 TMP는 내피세포의 유무에 관계없이 혈관을 이완시키며, nitric oxide synthase에 의해서도 영향을 받지 않아 NO와는 무관한 것으로 확인(Fig. 3)되어 본 연구결과는 학계 최초의 보고인 것으로 사료되었다.

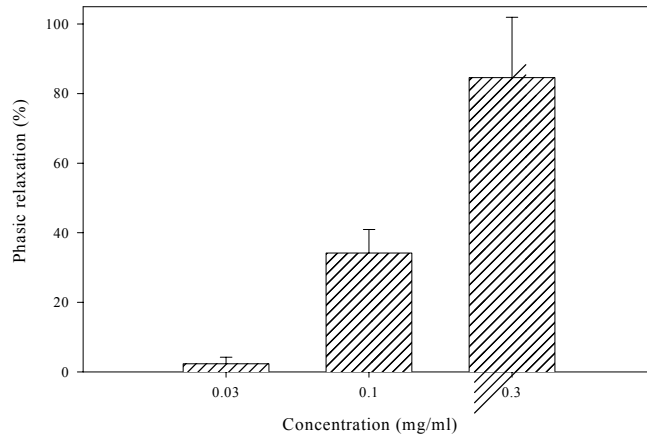


Fig. 1. The concentration-dependency of Ch1LW-induced vascular relaxation in the endothelium-intact rat aorta. The relaxation responses to Ch1LW, 0.03, 0.1 and 0.3 mg/ml, were expressed as a percent of the NE-induced tension.

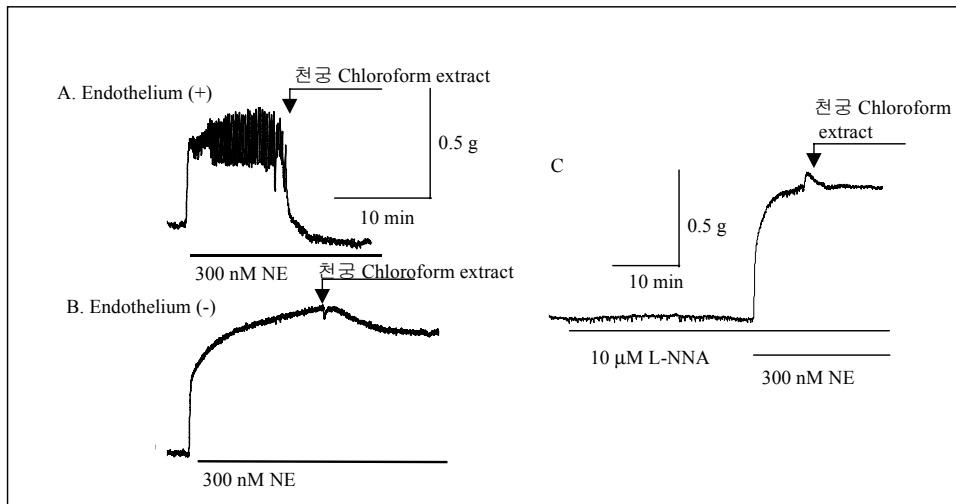


Fig. 2. Nitric oxide-mediated endothelium-dependent relaxation of rat thoracic aorta induced by chloroform extract of *Ligusticum wallichii*. Aortic rings with (A) or without (B) endothelium, and L-NNA (C) pretreated in the quiescent preparation. The rings were contracted with NE 300nM and then the extract was added to the muscle.

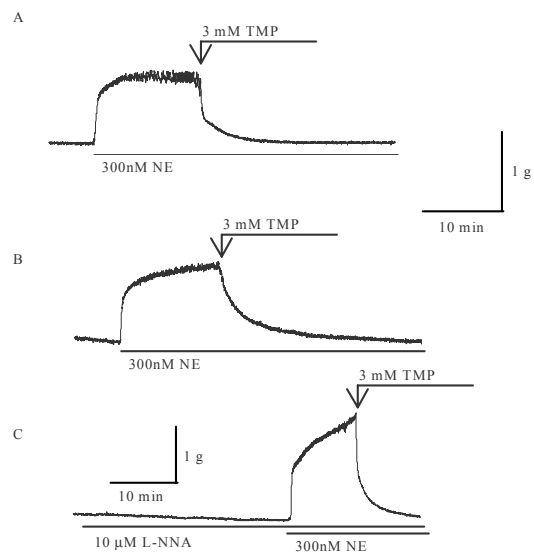


Fig. 3. Effects of TMP on aortic rings with (A) or without (B) endothelium and L-NNA on the TMP-induced endothelium-dependent relaxation (C).



나) 당귀의 혈관이완작용

당귀 각 용매 추출물을 0.3 mg/mL 농도로 첨가 시 시료 첨가후 즉시 나타나는 일과성이완(phasic relaxation)은 관찰되지 않았으며 오히려 혈관 수축 항진 효과를 나타내었고 이 효과는 즉시 회복되었다(Fig. 4). 또한 시간 경과에 따라 평활근 세포의존적 이완작용(long-term relaxation)이 관찰되었다. 당귀에서는 osthole (7-methoxy-8-[3-methylpent-2-enyl]coumarin)이 혈관평활근 수축 저해물질로 분리되어 있으나 본 실험에서 osthole은 혈관내피의 손상을 유발하는 것으로 확인되었다.

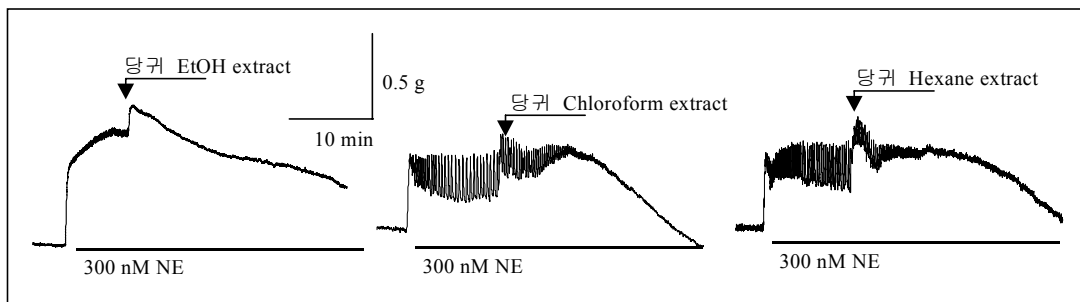


Fig. 4. Vasodilatory response of the extracts of *Angelica gigas* on endothelium-intact rat aorta.

다) 노간주나무의 혈관이완작용

노간주나무 각 추출물 0.3 mg/mL을 첨가 시 천궁이나 당귀에서 나타난 일과성 이완이나 long-term relaxation은 관찰되지 않았다. 추출물에 의한 혈관 수축항진효과가 나타났으나 이 효과는 즉시 회복되었다 (Fig. 5). 노간주나무에서는 sesquiterpene 14-acetoxycedrol이 혈관이완작용을 나타내는 것으로 보고되어 있으나 본 실험의 각 추출물에서는 이완작용이 나타나지 않았으며 혈관내피세포의 손상 또한 유발되지 않았다.

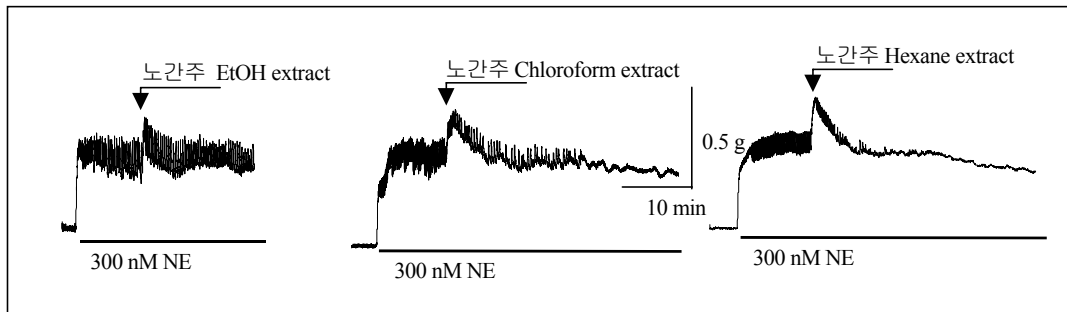


Fig. 5. Vasodilatory response of crude extracts from *Juniperus squamata* on endothelium-intact rat aorta.

## 2. 시료 추출 및 분획 조건 확립

조 추출물의 혈압에 미치는 영향분석 결과 이들은 renin-angiotensin system과는 관련이 없으며, 혈관의 이완작용을 나타내는 것으로 혈압을 조절할 수 있음을 알 수 있었다. 따라서 이러한 혈관이완작용을 나타내는 물질의 최적 추출조건 확립 및 활성성분의 부분분리를 위하여 혈관이완작용이 가장 컸던 천궁을 대상으로 하여 추출 및 분획 조건을 확립하고자 하였다.

### 가. Chloroform 침지추출

#### 1) Chloroform 추출 및 분획물의 혈관이완작용

조 추출물 제조 시 chloroform 침지추출에서 혈관이완작용이 나타났으므로 이를 용매 분획하여 활성이 큰 획분을 얻고자 하였다. Chloroform 침지하여 조 추출물을 제조한 후 이 추출물을 ethylacetate, butanol 및 물을 이용하여 용매분획하고 각각을 3 mg/mL의 농도로 첨가하여 혈관이완작용을 측정된 결과 내피세포 의존적 혈관이완작용(phasic relaxation)은 butanol과 ethyl acetate층에서는 일어나지 않았고 물층에서 약 59%의 활성을 나타내었다(Table 2). 또한 시료첨가 후 시간이 경과하면서 나타나는 long-term relaxation은 ethyl acetate층에서 약 96%로 가장 높았고 butanol층은 약 51%, 물층은 약 12%의 활성을 나타내어 활성물질들의 완전한 분획이 어려운 것으로 나타났다.

#### 2) Hexane 전처리 후 chloroform 추출 및 분획물의 혈관이완작용

Chloroform 추출 시 활성물질 중 내피세포의존적인 혈관이완작용물질은 분획이 가능하나 long-term relaxation을 일으키는 물질의 분획이 어려워 이의 개선을 위하여 hexane으로 지용성 성분을 일부 제거하고 분획을 시도한 결과 전처리 없이 chloroform 침지 추출 시와 마찬가지로 phasic relaxation을 일으키는 물질은 물층으로 분획되었으나 long-term relaxation을 나타내는 물질의 분획은 어려운 것으로 나타났다(Table 2).

### 나. 환류냉각 추출

#### 1) 증류수 환류냉각 추출 및 분획물의 혈관이완작용

조 추출물에서 높은 활성을 나타내었던 chloroform 추출물의 분획결과 활성성분의 완전한 분획이 어려워 용매 추출에 비해 추출율이 높았던 증류수 환류냉각법으로 시료를 추출한 후 분획하였다. 각 분획물의 혈관이완작용을 측정된 결과 chloroform 침지추출 시와는 달리 butanol층에서 phasic relaxation이 가장 높아 약 66%의 활성을 나타내었고(Table

3) 그 다음이 물층으로 확인되었다. Long-term relaxation은 3가지 획분에서 모두 90%이상의 활성을 나타내어 이 활성물질은 전혀 분획이 이루어지지 않았음을 알 수 있었다.

#### 2) Ethanol 환류냉각 추출 및 분획물의 혈관이완작용

증류수를 이용한 환류냉각 추출 시도 chloroform 침지추출시와 마찬가지로 활성물질의 분획이 잘 이루어지지 않아 다시 ethanol을 이용하여 환류냉각 추출하고 이를 분획하여 활성을 확인하였다. Phasic relaxation은 다른 획분에서는 거의 나타나지 않은 반면 물층에서 약 40%의 활성을 보였고(Table 3) long-term relaxation은 butanol층에서만 약 95%의 높은 활성을 보여 혈관이완활성물질의 완전한 분획이 가능한 것으로 나타났다.

Table 2. Chloroform 추출, 분획물의 혈관이완활성

|           | Chloroform extract |         |                 | Hexane-pretreated chloroform extract |         |                 |
|-----------|--------------------|---------|-----------------|--------------------------------------|---------|-----------------|
|           | Fraction           |         |                 | Fraction                             |         |                 |
|           | Ethyl acetate      | Butanol | Distilled water | Ethyl acetate                        | Butanol | Distilled water |
| Phasic    | -                  | -       | 58±9            | -                                    | -       | 50±8            |
| Long-term | 96±4               | 51±14   | 11±5            | 82±12                                | 60±9    | 24±3            |

Table 3. 환류냉각 추출, 분획물의 혈관이완활성

|           | Distilled water extract |         |                 | Ethanol extract |         |                 |
|-----------|-------------------------|---------|-----------------|-----------------|---------|-----------------|
|           | Fraction                |         |                 | Fraction        |         |                 |
|           | Ethyl acetate           | Butanol | Distilled water | Ethyl acetate   | Butanol | Distilled water |
| Phasic    | 7±3                     | 65±9    | 20±4            | -               | -       | 40±11           |
| Long-term | 94±4                    | 90±3    | 95±4            | -               | 94±6    | -               |

### 3) Ethanol 환류냉각 추출물의 혈관이완작용 기전 확인

일차적으로 확인한 chloroform 조추출물의 혈관이완작용 기전과 ethanol을 이용하여 환류냉각 추출 후 분획한 분획물의 혈관이완작용 기전의 차이를 확인하기 위하여 ethanol 추출, 분획물의 혈관이완작용 기전을 측정하였다.

내피가 온전히 보존 되어있는 혈관을 300nM NE로 최대 수축을 유도한 후 분획물의 농도가 1 mg/mL이 되도록 첨가한 결과 물층에서 phasic relaxation이 나타났으나 내피를 제거한 혈관에서는 이러한 작용은 관찰되지 않아(Fig. 6) 분획물의 혈관 확장작용은 내피세포 의존적인 것으로 확인되었다. 또한 내피 의존적인 이 혈관확장작용은 추출물의 농도 증가에 따라(0.3~1 mg/mL) 증가하는 농도 의존성을 나타내었으며(Fig. 7), nitric oxide synthase inhibitor L-NNA에 의하여 그 작용이 억제되어(Fig. 8) chloroform 조 추출물과 마찬가지로 분획물의 혈관이완작용이 내피세포에서 생성되는 nitric oxide와 관련있음을 알 수 있었다. Long-term relaxation을 나타내는 butanol층의 경우 분획물을 첨가하고 시간 경과에 따라 점차 이완작용이 나타나 최대 40분 후에는 약 100 %( $94\pm 6\%$ , 3 mg/mL)의 이완을 나타내었으며(Fig. 9), 추출물의 농도 증가에 따라(0.3~3 mg/mL) 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 10). 결과적으로 ethanol을 이용하여 환류냉각 추출한 추출물 및 그 분획물인 물층에서 1차 조추출물의 제조 시 chloroform으로 추출하여 얻은 활성물질과 유사한 것으로 생각되는 활성물질의 추출 및 분획이 가능하였고, 또한 이 경우 다른 추출법에 비하여 내피세포 의존적인 phasic relaxation과 평활근세포에 의해 주로 나타나는 long-term relaxation을 일으키는 물질들의 분획이 가장 용이하여 활성 농축액을 얻기 위한 다음 단계에서는 이 방법을 이용하여 추출하기로 결정하였다.

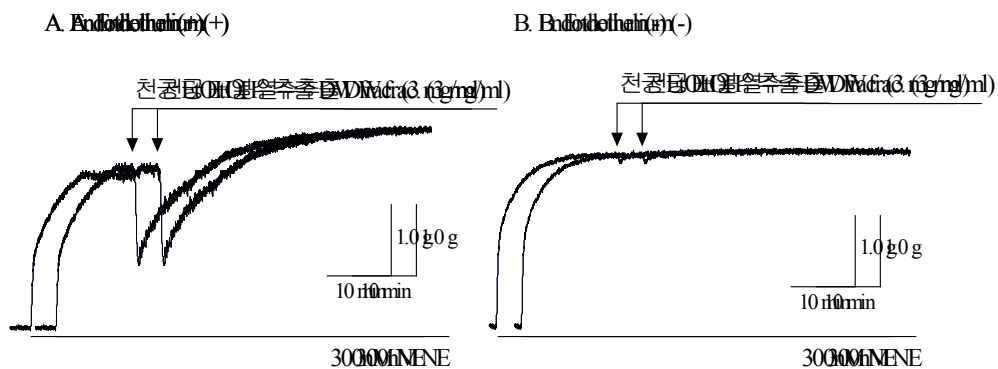


Fig. 6. Endothelium-dependent relaxation(phasic relaxation) of rat thoracic aorta induced by ethanol reflux extract's DW fraction of *Ligusticum wallichii*. Aortic rings with (A) or without (B) endothelium. The rings were contracted with NE 300nM and then the fraction was added to the muscle.

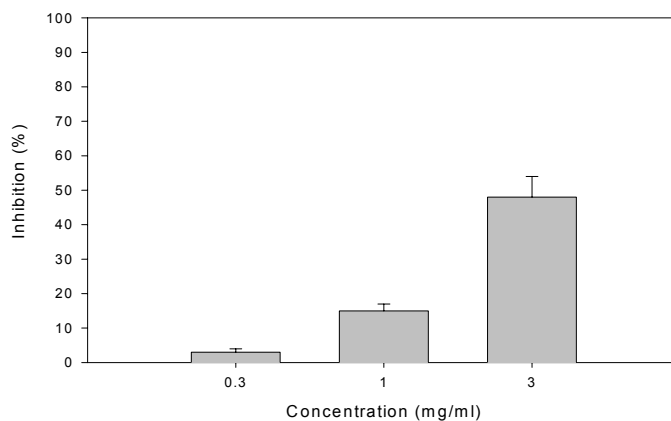


Fig. 7. The concentration-dependency of *Ligusticum wallichii*-induced vascular relaxation in the endothelium-intact rat aorta. The relaxation responses to *Ligusticum wallichii*, 0.3, 1, and 3 mg/ml, were expressed as a percent of the NE-induced tension.

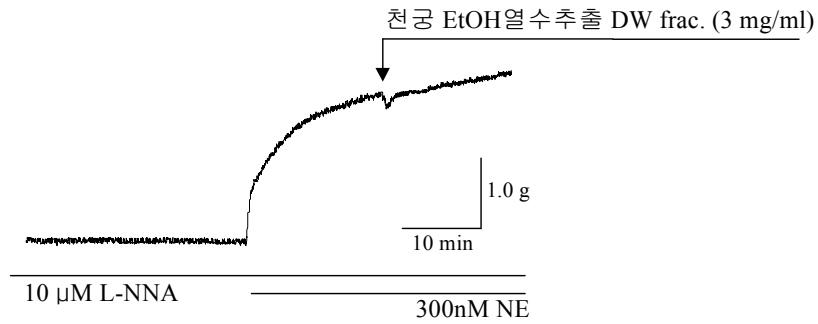


Fig. 8 Effect of nitric oxide synthase inhibitor on the extract of *Ligusticum wallichii*-induced endothelium-dependent relaxation. Endothelium-intact aortic rings were contracted with 300 nM NE.

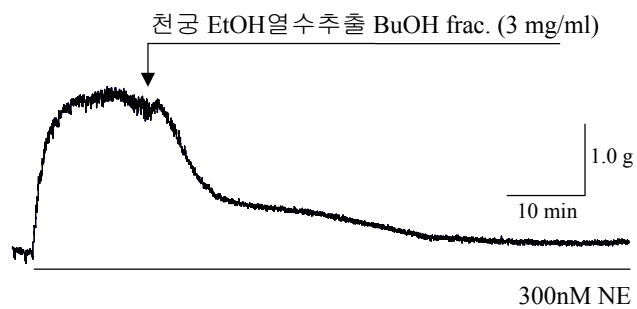


Fig 9. Endothelium-independent relaxation(long-term relaxation) of rat thoracic aorta induced by ethanol reflux extract's BuOH fraction of *Ligusticum wallichii*. The rings were contracted with NE 300nM and then the fraction was added to the muscle.





Fig 10. The concentration and time-dependency of the extracts of *Ligusticum wallichii*-induced vascular relaxation in the endothelium-intact rat aorta. The relaxation responses to the extracts, 0.3, 1.0, 3.0 mg/mL, were expressed as a percentage of the NE-induced tension.

### 3. 최적의 활성 추출농축액 제조조건 확립

시료 추출 및 분획조건 확립 후 혈관이완활성에서 최적의 phasic 및 long-term relaxation을 나타낼 수 있는 활성 추출농축액을 제조하기 위하여 조추출물에서 강력한 phasic relaxation을 나타낸 천궁과 long-term relaxation을 나타낸 당귀를 사용하여 활성의 차이를 측정하였다.

#### 가. 추출물의 제조

천궁 및 당귀와 이들의 혼합비율을 천궁:당귀=1:3, 3:1, 1:1로 변화시켜 각각을 ethanol을 이용하여 환류냉각추출한 결과 12~18%를 나타내어 추출율에서는 큰 차이를 나타내지 않았다. 이들의 혈관이완작용을 측정한 결과 모든 추출물에서 0.3~3 mg/mL 농도에서 phasic relaxation을 나타내지 않았으며 long-term relaxation은 3 mg/mL 농도에서 최대 40분 이후에 약 96~100%로 거의 차이가 없었으며(Fig. 11) 추출물의 농도를 0.3~3 mg/mL로 증가함에 따라 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 12).

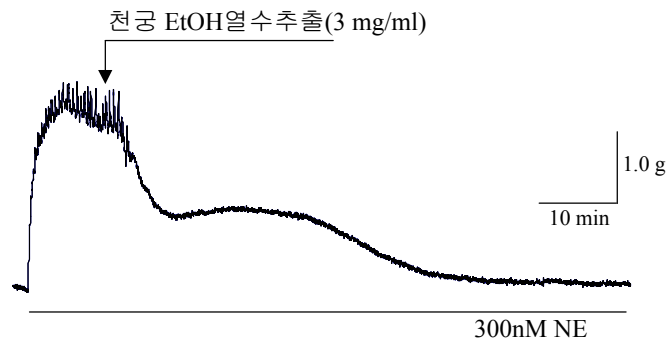


Fig 11. Endothelium-independent relaxation(long-term relaxation) of rat thoracic aorta induced by ethanol reflux extract of *Ligusticum wallichii*. The rings were contracted with NE 300nM and then the extract was added to the muscle.

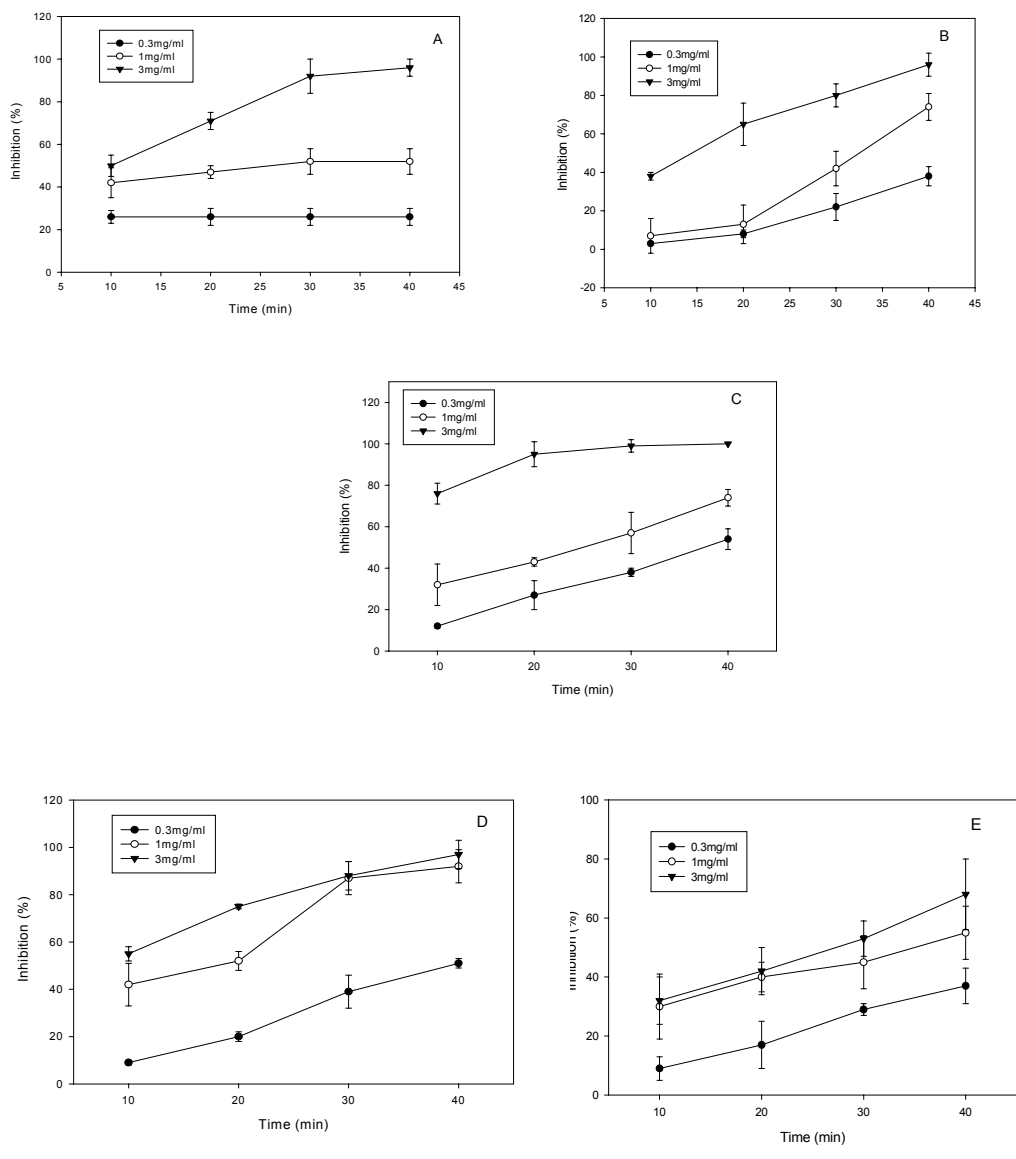


Fig 12. The concentration and time-dependency of the extracts of *Ligusticum wallichii* (A), *Angelica pubescens* (B), *Ligusticum wallichii* : *Angelica pubescens*= 1:3 (C), 3:1 (D) and 1:1(E)-induced vascular relaxation in the endothelium-intact rat aorta. The relaxation responses to the extracts, 0.3, 1.0, 3.0 mg/mL, were expressed as a percentage of the NE-induced tension.

나. 추출물의 분획 및 활성측정

1) 조 추출물의 분획

모든 시료의 조 추출물에서 거의 유사한 활성이 나타나 이를 다시 분획하여 각각의 활성 차이를 비교하였다. 각 조 추출물을 모두 물에 녹인 후 n-butanol을 첨가하여 4 ~ 5회 반복 분획하여 물 층과 butanol 층 분획물을 얻었으며, 각각의 분획물 회수율은 당귀에서 물층이 작았으며 나머지 추출물간에는 차이가 없는 것으로 나타났다(Table 4).

Table 4. 추출 분획물의 회수량

|        | 천궁 |      | 당귀 |      | 천궁:당귀=1:3 |      | 천궁:당귀=3:1 |      | 천궁:당귀=1:1 |      |
|--------|----|------|----|------|-----------|------|-----------|------|-----------|------|
|        | 물  | BuOH | 물  | BuOH | 물         | BuOH | 물         | BuOH | 물         | BuOH |
| 회수율(%) | 43 | 53   | 25 | 68   | 40        | 56   | 38        | 57   | 44        | 48   |

2) 분획물의 내피의존성 혈관이완활성

내피가 온전히 보존 되어있는 혈관 및 내피를 제거한 혈관에 대해 물층과 butanol층의 농도에 따른 효능을 측정하였다. 즉, 300nM NE로 최대 수축을 유도한 각 혈관에 분획물의 농도가 3 mg/mL이 되도록 각각 첨가하였다. 내피가 보존되어있는 혈관에 물층을 첨가 시 첨가한 순간 phasic relaxation이 나타났으며 곧바로 수축을 유도하기 전의 상태로 회복되었다. 그러나 내피를 제거한 혈관에서는 이러한 작용이 관찰되지 않아 (Fig. 13~17) 분획물의 phasic relaxation은 내피 의존적인 것으로 확인되었고 이 작용은 각 추출, 분획물 모두에서 관찰되었다. 또한 phasic relaxation은 추출물의 농도 증가를 변화시킨 결과 농도 증가에 따라(0.3~3 mg/mL) 이완작용이 증가하는 농도 의존성을 나타내었다(Fig. 18). 각 분획물 물층의 phasic relaxation의 차이를 비교한 결과 0.3~3 mg/mL까지의 모든 농도에서 천궁:당귀=1:1 추출물의 경우 다른 군에 비해 유의적으로 가장 이완이 크게 나타났으며 (Table 5) 다음으로 천궁:당귀=1:3 추출물에서 이완율이 컸고, 천궁이나 당귀 단독 추출이나 천궁:당귀=3:1 추출에서는 모든 농도에서 유의적인 차이가 없는 것으로 나타나 내피세포 의존적 혈관이완 작용물질의 분리에는 천궁:당귀=1:1 추출이 가장 효과적임을 알 수 있었다.

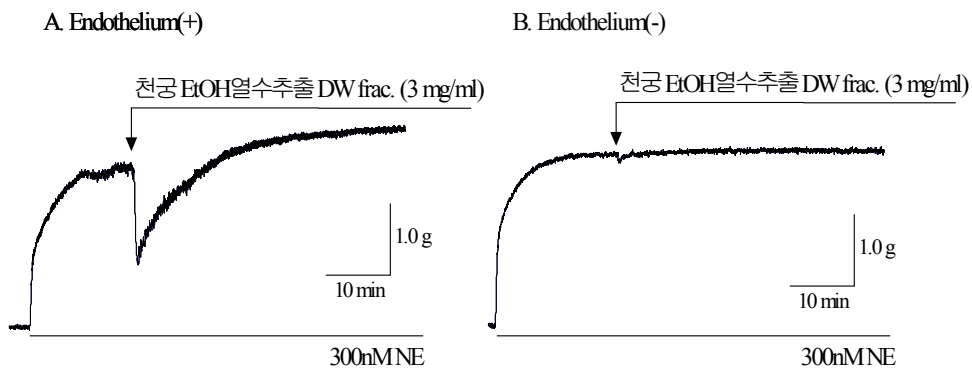


Fig 13. Endothelium-dependent relaxation(phasic relaxation) of rat thoracic aorta induced by ethanol reflux extract's DW fraction of *Ligusticum wallichii*. Aortic rings with (A) or without (B) endothelium. The rings were contracted with NE 300nM and then the fraction was added to the muscle.

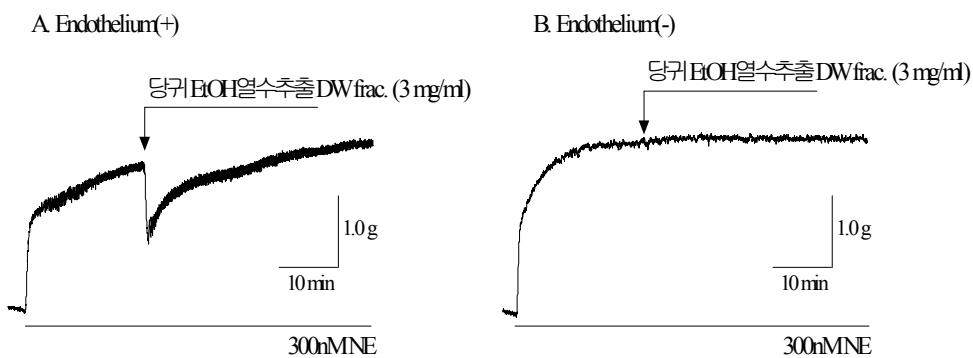


Fig 14. Endothelium-dependent relaxation(phasic relaxation) of rat thoracic aorta induced by ethanol reflux extract's DW fraction of *Angelica pubescens*. Aortic rings with (A) or without (B) endothelium. The rings were contracted with NE 300nM and then the fraction was added to the muscle.

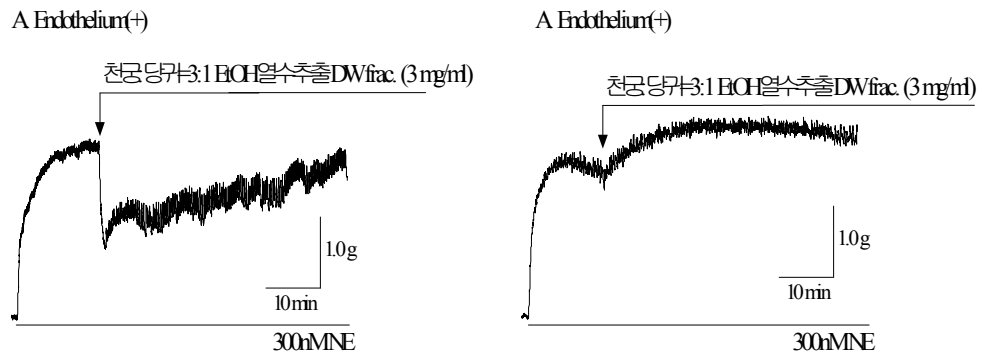


Fig 15. Endothelium-dependent relaxation(phasic relaxation) of rat thoracic aorta induced by ethanol reflux extract's DW fraction of *Ligusticum wallichii* : *Angelica pubescens* = 3 : 1. Aortic rings with (A) or without (B) endothelium. The rings were contracted with NE 300nM and then the fraction was added to the muscle.

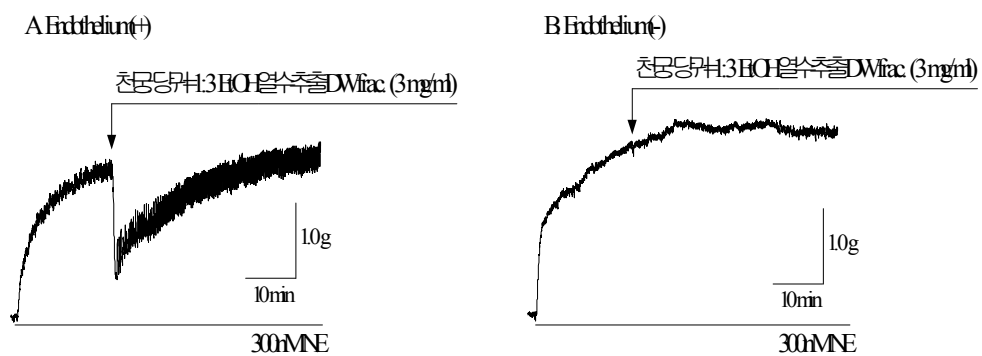


Fig 16. Endothelium-dependent relaxation(phasic relaxation) of rat thoracic aorta induced by ethanol reflux extract's DW fraction of *Ligusticum wallichii* : *Angelica pubescens* = 1 : 3. Aortic rings with (A) or without (B) endothelium. The rings were contracted with NE 300nM and then the fraction was added to the muscle.

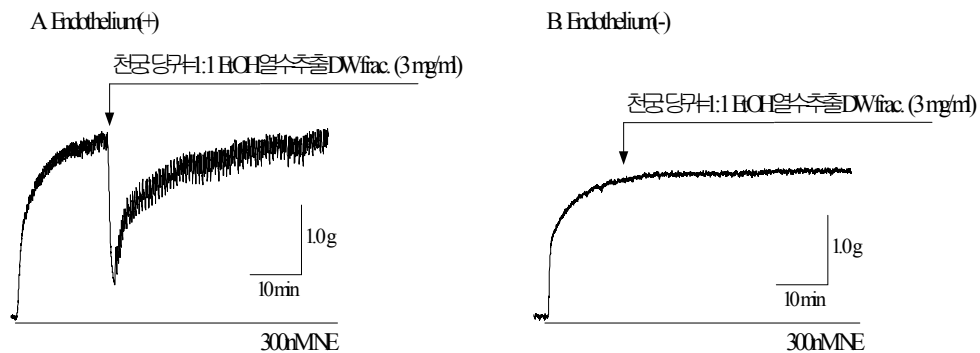


Fig 17. Endothelium-dependent relaxation(phasic relaxation) of rat thoracic aorta induced by ethanol reflux extract's DW fraction of *Ligusticum wallichii* : *angelica pubescens* = 1 : 1. Aortic rings with (A) or without (B) endothelium. The rings were contracted with NE 300nM and then the fraction was added to the muscle.

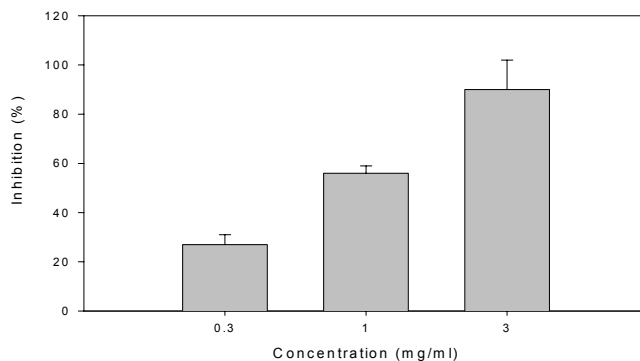


Fig 18. The concentration-dependency of *Ligusticum wallichii* : *Angelica pubescens* = 1 : 1-induced vascular relaxation in the endothelium-intact rat aorta. The relaxation responses to *Ligusticum wallichii* : *Angelica pubescens* = 1 : 1. 0.3, 1, and 3 mg/ml, were expressed as a percent of the NE-induced tension.

Table 5. 혼합물 물층의 phasic relaxation

|           | Phasic relaxation (%) |                     |                    |                   |                   |
|-----------|-----------------------|---------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
|           | 천궁                    | 당귀                  | 천궁:당귀=1:3          | 천궁:당귀=3:1         | 천궁:당귀=1:1         |
| 0.3 mg/mL | 9±1 <sup>c1)</sup>    | 10± 3 <sup>c</sup>  | 23±0 <sup>b</sup>  | 13±1 <sup>c</sup> | 27±4 <sup>a</sup> |
| 1 mg/mL   | 33±6 <sup>c</sup>     | 27± 8 <sup>c</sup>  | 47±6 <sup>b</sup>  | 36±8 <sup>c</sup> | 56±3 <sup>a</sup> |
| 3 mg/mL   | 66±5 <sup>bc</sup>    | 62±11 <sup>bc</sup> | 75±5 <sup>ab</sup> | 51±4 <sup>c</sup> | 91±8 <sup>a</sup> |

<sup>1)</sup> Values within the same row with different superscript are significantly different at  $\alpha = 0.05$  level.

### 3) 분획물의 내피세포 비의존성 혈관이완작용

각 추출분획물 중 butanol층은 물층에서 나타내는 phasic relaxation은 일어나지 않았으나, 물층에서는 나타나지 않은 내피세포 비의존성 long-term relaxation이 관찰되었다(Fig. 19~23). 이러한 혈관확장작용은 시간 경과에 따라 점차 증가하여 최대 40분 후에는 약 100 % (97±3 %, 3 mg/mL)의 이완을 나타내었으며, 추출물의 농도 증가에 따라(0.3~3 mg/mL 증가하는 것으로 나타났으며(Fig. 24) 각 추출분획물간의 차이는 없는 것으로 나타났다. 결과적으로 천궁과 당귀를 이용하여 최적의 혈관이완 효과를 나타내기 위하여 천궁:당귀=1:1로 혼합하여 추출하고 이를 물층과 butanol층으로 나누면 내피세포 의존적 또는 비의존적 혈관이완 물질을 가장 많이 함유한 활성 농축액의 제조가 가능함을 알 수 있었다.



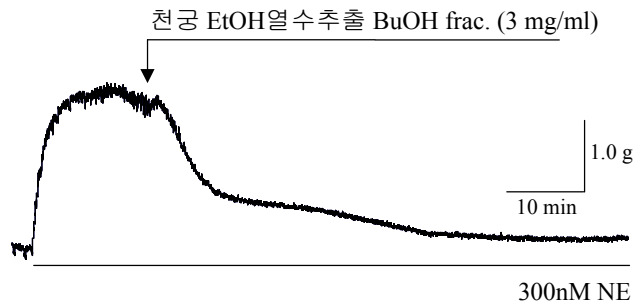


Fig 19. Endothelium-independent relaxation(long-term relaxation) of rat thoracic aorta induced by ethanol reflux extract's BuOH fraction of *Ligusticum wallichii*. The rings were contracted with NE 300nM and then the fraction was added to the muscle.

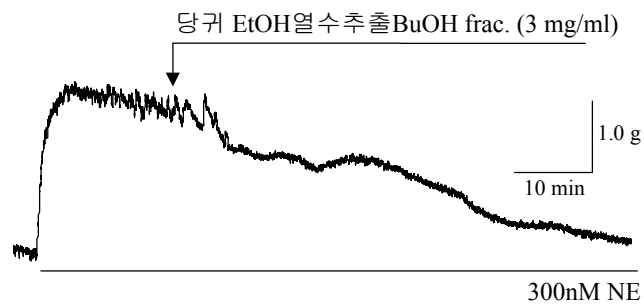


Fig 20. Endothelium-independent relaxation(long-term relaxation) of rat thoracic aorta induced by ethanol reflux extract's BuOH fraction of *Angelica pubescens*. The rings were contracted with NE 300nM and then the fraction was added to the muscle.

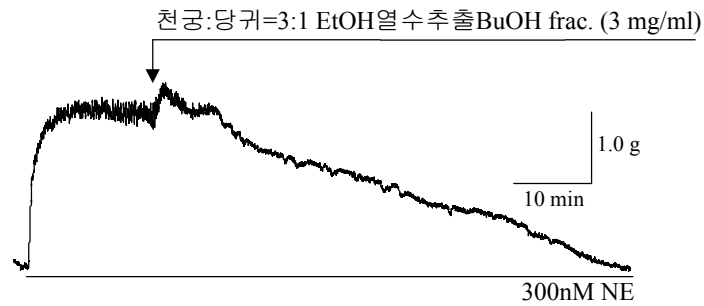


Fig 21. Endothelium-independent relaxation(long-term relaxation) of rat thoracic aorta induced by ethanol reflux extract's BuOH fraction of *Ligusticum wallichii* : *Angelica pubescens* = 3 : 1. The rings were contracted with NE 300nM and then the fraction was added to the muscle.

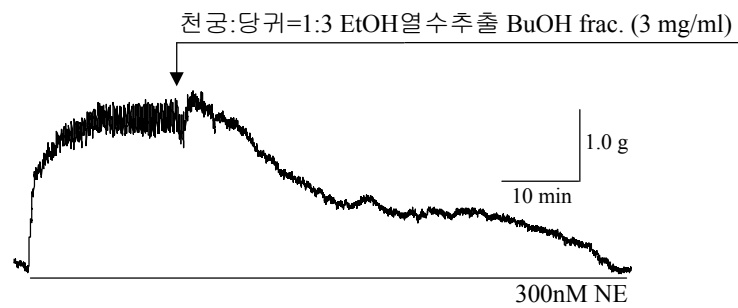


Fig 22. Endothelium-independent relaxation(long-term relaxation) of rat thoracic aorta induced by ethanol reflux extract's BuOH fraction of *Ligusticum wallichii* : *Angelica pubescens* = 1 : 3. The rings were contracted with NE 300nM and then the fraction was added to the muscle.

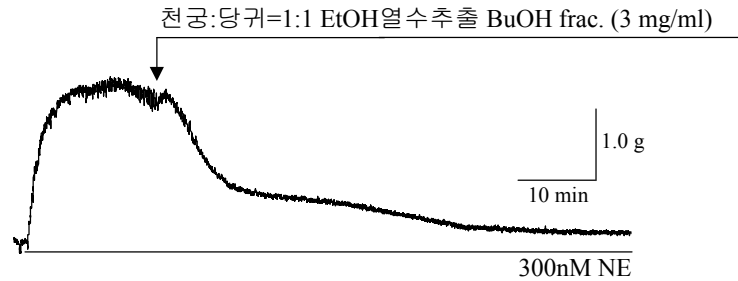


Fig 23. Endothelium-independent relaxation(long-term relaxation) of rat thoracic aorta induced by ethanol reflux extract's BuOH fraction of *Ligusticum wallichii* : *Angelica pubescens* = 1 : 1. The rings were contracted with NE 300nM and then the fraction was added to the muscle.

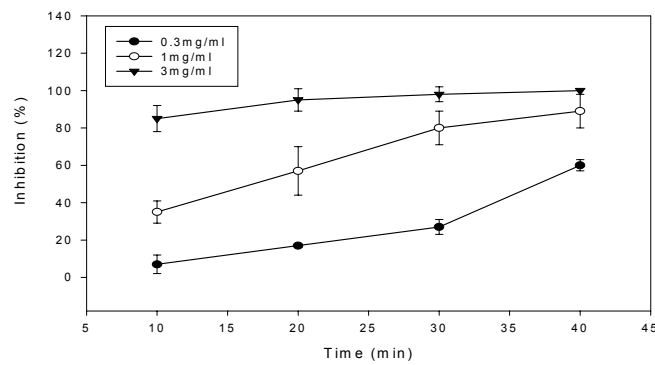


Fig 24 The concentration and time-dependency of the extracts of *Ligusticum wallichii* : *Angelica pubescens* = 1 : 1-induced vascular relaxation in the endothelium-intact rat aorta. The relaxation responses to the extracts, 0.3, 1.0, 3.0 mg/ml, were expressed as a percentage of the NE-induced tension.

#### 4. 각 활성 농축액의 혈관이완 작용 기전 및 부분분리

##### 가. 물층의 혈관이완 작용 기전

천궁:당귀=1:1 추출, 분획물중 물층의 phasic relaxation이 내피세포에서 어떤 기전에 의해 유발되는지 확인하기 위하여 nitric oxide synthase inhibitor, L-NNA 및 cyclooxygenase inhibitor, indomethacin, 그리고 acetylcholine receptor antagonist인 atropin이 물층의 혈관확장작용에 미치는 영향을 측정하였다.

혈관의 수축을 유도하기전에 L-NNA( $10^{-5}$  M)를 투여하여 20 분간 전처리 한 후 시료 (3 mg/mL)를 투여 시 phasic relaxation은 거의 저해되었고( $91 \pm 6$ , Fig. 25), atropin( $10^{-7}$  M)으로 전처리한 경우에도 완전히 저해되는 것으로 나타났다(100%). 그러나 동일한 실험 조건으로 indomethacin( $10^{-5}$  M)으로 전처리한 경우에는 phasic relaxation이 전혀 저해되지 않아 물층의 혈관 내피 의존성 phasic relaxation은 내피세포에서 생성되는 nitric oxide와 acetylcholine receptor의 작용이라는 두 가지 이상의 기전을 통해서 유발되는 것으로 추정할 수 있었다. 또한 기존에 알려져 있는 혈관이완 물질인 천궁의 TMP는 앞에서 언급하였듯이 내피세포 비의존적으로 혈관을 이완시키며 nitric oxide synthase inhibitor에 의해서도 활성이 저해를 받지 않으므로 본 연구결과 제조한 활성 농축액에는 TMP외의 다른 성분들이 함께 함유되어 있을 것으로 추정되었다.

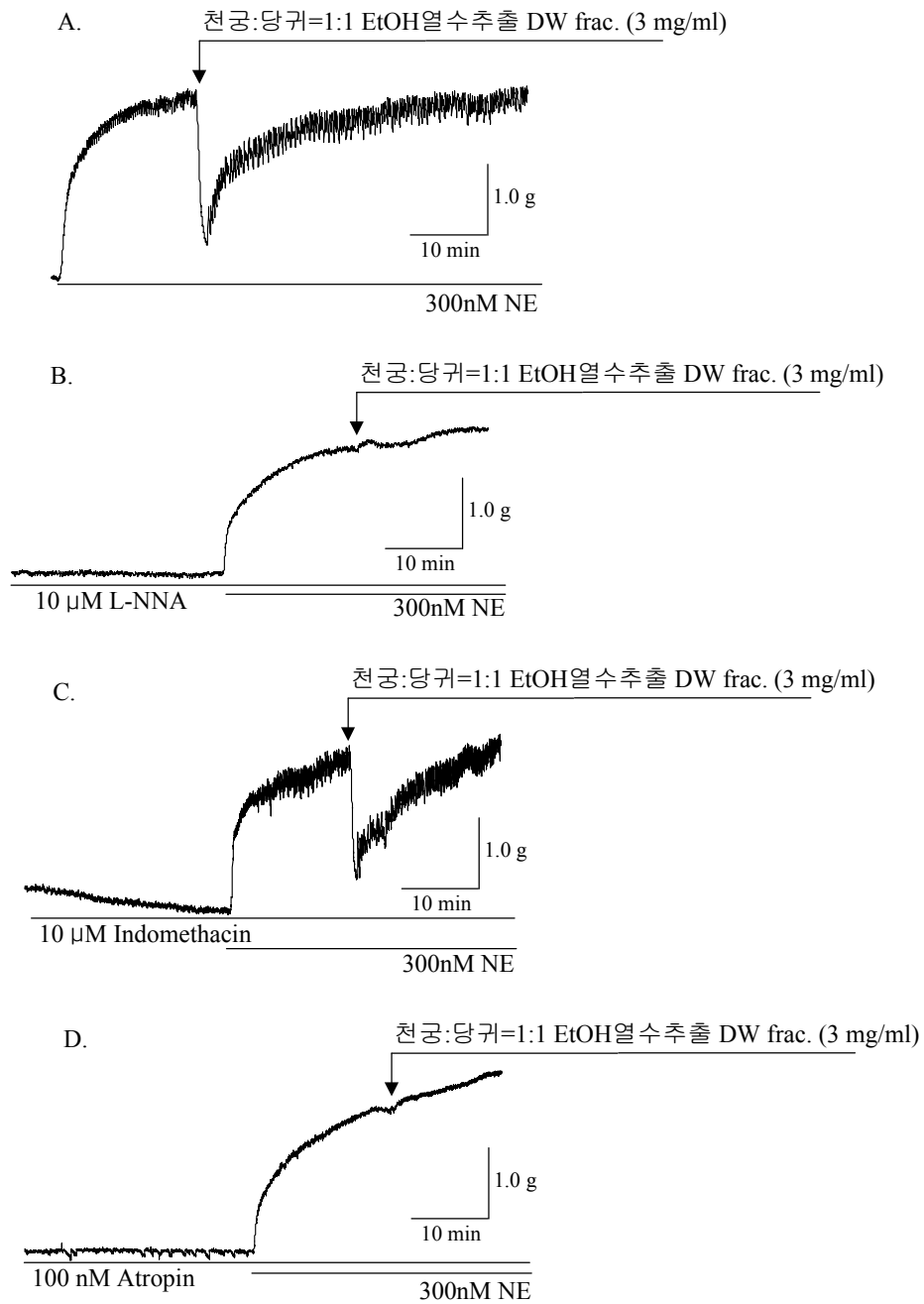


Fig 25. Effect of blank(A), nitric oxide synthase inhibitor(B), cyclooxygenase inhibitor(C), and acetylcholine receptor inhibitor(D) on the extract of *Ligusticum wallichii* : *Angelica pubescens* = 1 : 1-induced endothelium-dependent relaxation. Endothelium-intact aortic rings were contracted with 300 nM NE.

나. Butanol층의 혈관이완 작용 기전

1) K<sup>+</sup> channel과의 관련성

혈관의 수축과 이완은 평활근세포내의 Ca<sup>2+</sup> 이온의 농도변화에 따라 일어난다. 즉, 평활근세포내의 Ca<sup>2+</sup> 이온의 농도가 증가하면 혈관의 수축이 유도되고, 반대로 농도가 감소하면 혈관이 이완되는 것으로 알려져 있다(이원로, 1998). 또한 이 평활근 세포내의 Ca<sup>2+</sup> 이온의 농도는 여러 가지 기전에 의해 조절되는데 그 중 하나가 K<sup>+</sup> channel의 개통여부이다. 즉, K<sup>+</sup> channel을 열어 세포내에 Ca<sup>2+</sup>의 증가로 인한 탈분극을 해소하여 혈관을 확장시켜 준다. 따라서 본 연구결과 나타난 천궁:당귀=1:1 혼합추출액의 butanol 층이 나타내는 내피세포 비의존성확장작용(long-term relaxation)의 기전 확인을 위하여 우선적으로 K<sup>+</sup> channel과의 관련성을 측정하였다.

내피를 제거한 혈관에 Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel blocker인 charybdotoxin(10<sup>-7</sup> M), selective ATP-dependent K<sup>+</sup> channel blocker인 glibenclamide(3×10<sup>-6</sup> M) 및 nonspecific K<sup>+</sup> channel blocker인 barium chloride(7.5×10<sup>-5</sup> M)를 혈관 수축 유도 20분 전에 처리 한 후 72K 용액을 넣어주어 수축시킨 뒤 시료(3 mg/mL)를 투여하여 10분 간격으로 최대 40분까지 활성을 측정하였다. 실험 결과 butanol층의 long-term relaxation은 전처리 하지 않은 혈관에서 나타나는 활성에 (Table 6, Fig. 26) 비해 charybdotoxin과 glibenclamide를 처리한 경우는 저해되지 않았으나 barium chloride로 전처리한 경우 20분 이후에 나타나는 long-term relaxation이 저해되어 천궁:당귀=1:1 추출물의 butanol층의 long-term relaxation이 어느정도는 K<sup>+</sup> channel과 관련되어 있음을 알 수 있었다.

Table 6. K<sup>+</sup> channel blocker 처리에 따른 butanol층의 long-term relaxation

|                 | Long-term relaxation (%) |      |      |      |
|-----------------|--------------------------|------|------|------|
|                 | 10분                      | 20분  | 30분  | 40분  |
| Control         | 55±10                    | 85±6 | 92±4 | 94±4 |
| Charybdotoxin   | 55±10                    | 85±6 | 92±6 | 94±4 |
| Glibenclamide   | 52±10                    | 78±5 | 89±7 | 91±7 |
| Barium chloride | 48±7                     | 72±6 | 82±7 | 86±2 |

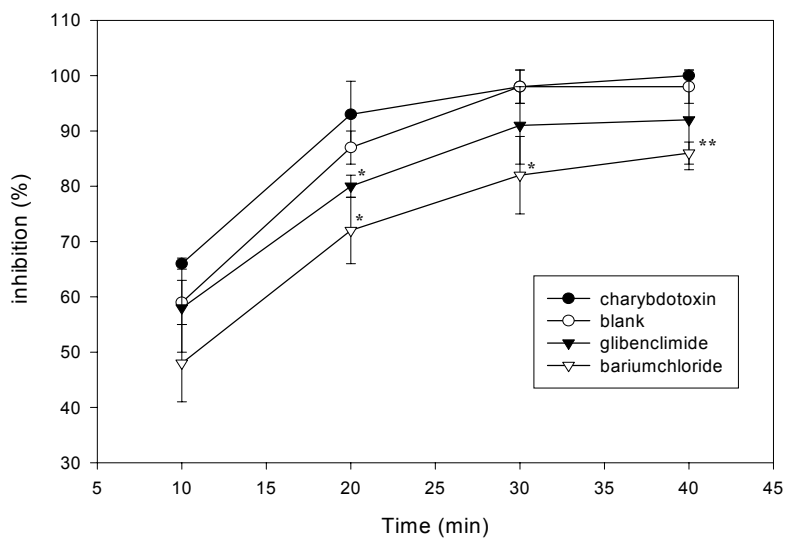


Fig. 26. Relaxant effects induced by the butanol fraction of *Ligusticum wallichii* : *Angelica pubescens* = 1:1 extracts in control conditions during incubation with the selective  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{K}^+$  channel blocker charybdotoxin, the selective ATP-dependent  $\text{K}^+$  channel blocker glibenclamide and the nonspecific  $\text{K}^+$  channel blocker barium chloride.

## 2) Ca<sup>2+</sup> channel과의 관련성

평활근 세포의 수축은 세포내의 Ca<sup>2+</sup> 농도의 지속적인 증가에 의하여 유지된다(이원로, 1998). 이는 수용체의 작용에 의해 작용하는 이온통로(receptor-operated Ca<sup>2+</sup> channel; ROC)와 막전압에 좌우되는 이온통로(voltage-operated Ca<sup>2+</sup> channel; VOC)에 의하여 일어난다. 임상적으로 널리 이용되는 calcium antagonist들은 이중 VOC를 억제하여 혈관확장 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구결과 나타난 천궁:당귀=1:1 추출물의 butanol층의 작용 기전 중 Ca channel과의 관련성을 측정하기 위하여 고농도의 K<sup>+</sup>로 탈분극을 시킨 후 calcium 농도를 증가시켜 첨가하면서 혈관의 반응을 관찰한 결과 시료를 0.03 mg/mL 이상의 농도로 첨가 시 혈관의 수축이 현저히 감소함을 알 수 있었다. 또한 이때 L-type Ca<sup>2+</sup> channel blocker인 nifedipine을 10<sup>-8</sup> M 농도로 첨가하여 시료와의 차이를 측정한 결과 0.3 mg/mL 농도에서는 nifedipine과 유의적으로 차이가 없이 혈관의 수축을 억제함으로써 천궁:당귀=1:1 추출물의 butanol 층은 Ca<sup>2+</sup> channel을 blocking하여 혈관 평활근 세포내로 calcium의 유입을 감소시키고 혈관을 이완시킴을 알 수 있었으며, 비교적 낮은 농도에서도 그 효과를 나타내어 강력한 Ca<sup>2+</sup> channel 억제제임을 알 수 있었다(Fig. 27). Ko등(1992)은 당귀에 존재하는 osthole을 강력한 Ca<sup>2+</sup> channel 억제제로 보고하고 있으나 osthole의 함량이 당귀양의 약 0.032%(Wu 등, 1990)인 점을 감안할 때 본 실험에서 nifedipine과 유사한 정도로 활성을 나타내는 0.3 mg/mL 농도로 첨가 시 포함되는 양이 단독으로 활성을 나타내는 양의 약 10%이고 활성 또한 더 강력하므로(Ko 등, 1992) osthole에 의한 것만이 아닌, 다른 물질이 함유되어 있음을 알 수 있었다.



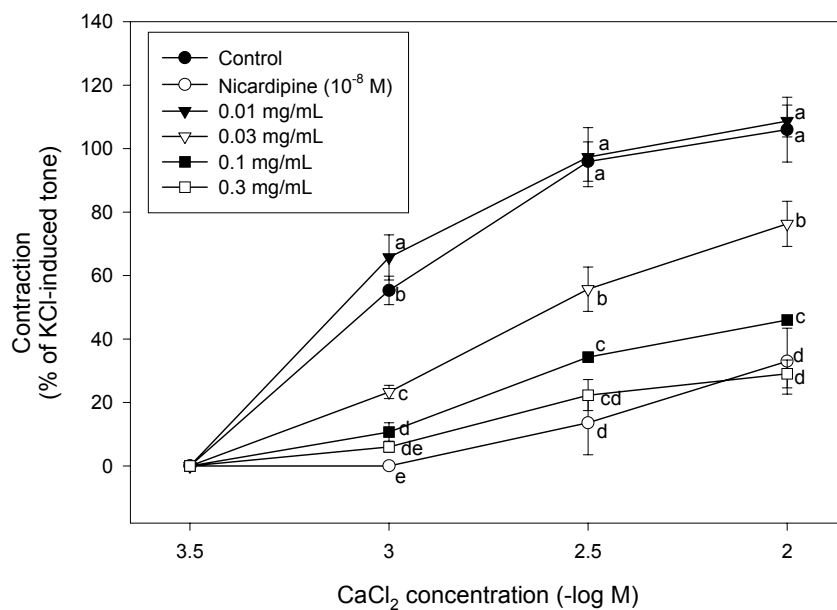


Fig. 27. Effects of preincubation of rat aorta with different concentration of the butanol fraction of *Ligusticum wallichii* : *Angelica pubescens* = 1:1 extracts on the concentration-dependent contraction induced by CaCl<sub>2</sub> in high K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> free medium. Values in same CaCl<sub>2</sub> concentration not followed by the same alphabetical letter are significantly different ( $\alpha=0.05$ ).

다. 물층의 활성물질 부분 분리

물층의 혈관 내피세포 의존성 확장작용(phasic relaxation)을 나타내는 활성물질을 분리하기 위하여 Sephadex LH-20과 Centricorn concentrators(10, 3)를 이용하여 분리를 시도하였다.

1) Sephadex LH-20을 이용한 활성물질의 분리

분획물 중 phasic relaxation을 나타내는 물층의 활성물질의 부분분리를 위하여 sephadex LH-20을 이용한 open column chromatography를 사용하였다. 즉 sephadex LH-20을 채운 column에 시료(물층)을 loading한 후 70%, 50%, 30%, 10% methanol을 각각 흘려주어 각 회분을 모아 각각의 혈관확장효능을 측정한 결과, 70% methanol 회분에서 phasic relaxation( $50 \pm 5$  %)이 나타났으며, 50, 30, 10% methanol.에서는 phasic relaxation이 관찰되지 않았다 (Fig. 28). 그러나 이 경우 70% methanol.회분의 회수율이 95%로 대부분을 차지하여 활성물질의 분리에 큰 의미를 가질 수 없었으며 이의 분리에는 sephadex LH-20이 효과적이지 못한 것으로 나타났다.

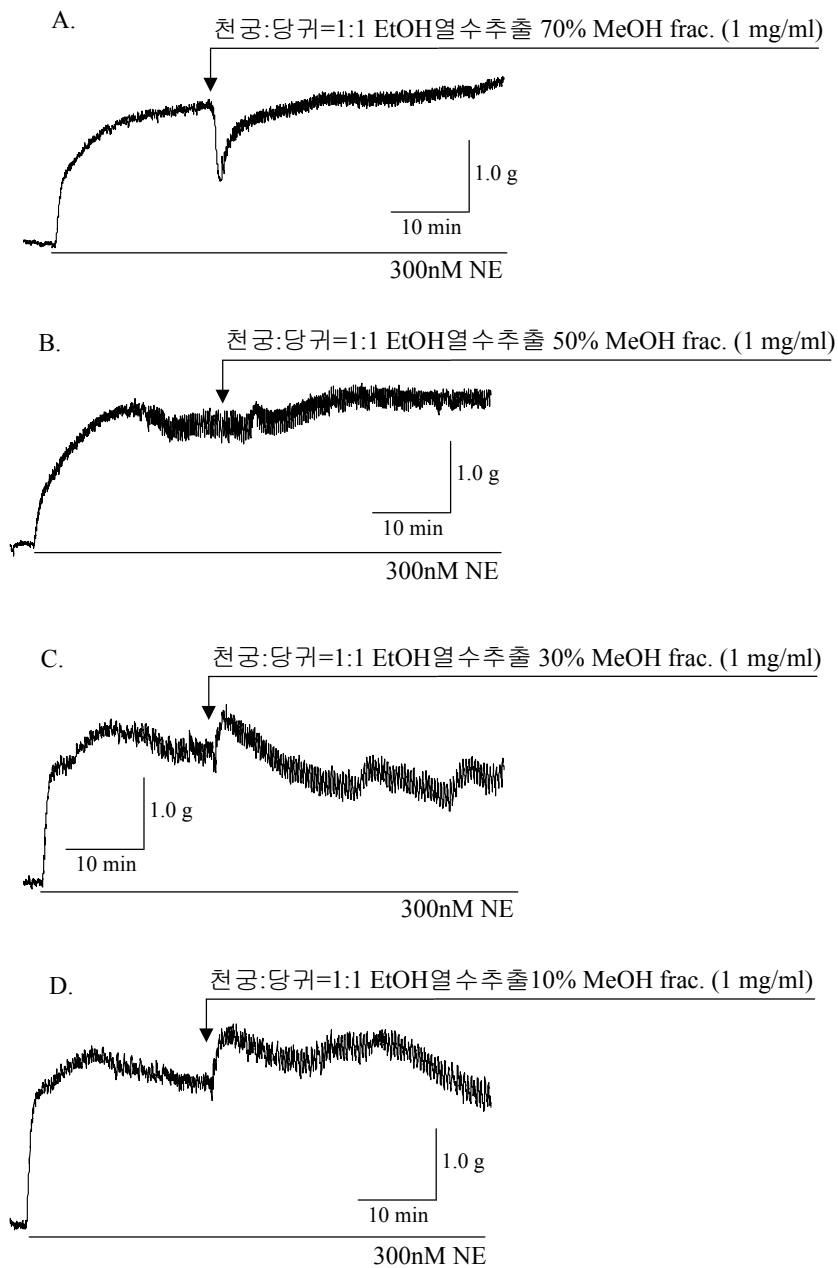


Fig 28. Effect of 70 % MeOH (A), 50 % MeOH (B), 30 % MeOH (C), and 10 % MeOH (D) on the DW fraction of *Ligusticum wallichii* : *Angelica pubescens* =1 : 1-induced endothelium-dependent relaxation. Endothelium-intact aortic rings were contracted with 300 nM NE.

2) Centricorn concentrators(10, 3)을 이용한 활성물질의 분리

Centricorn concentrators을 이용하여 물층을 분자량 10,000이상과 이하, 3,000이상과 이하로 나누어서 각각의 phasic relaxation을 측정한 결과 모든 분자량획분에서 phasic relaxation이 나타나(Fig. 29) 이 물질은 분자량에 따라 분리가 불가능함을 알 수 있었다.

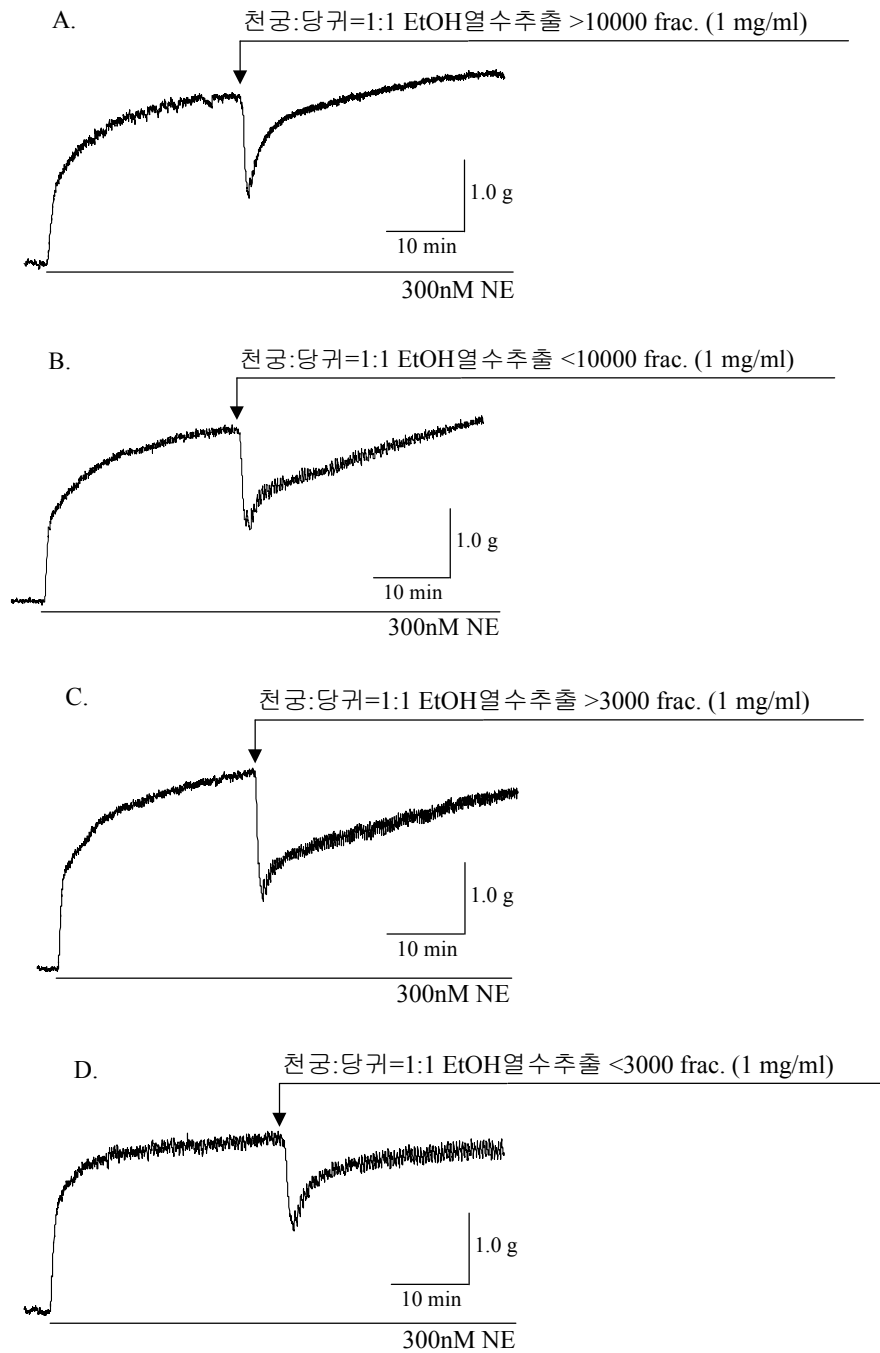


Fig 29. Effect of over 10,000 (A), under 10,000 (B), over 3,000 (C), and under 3,000 (D) on the DW fraction of *Ligusticum wallichii* : *Angelica pubescens* = 1 : 1-induced endothelium-dependent relaxation. Endothelium-intact aortic rings were contracted with 300 nM NE.

## 5. 활성농축액이 자연발증고혈압쥐의 혈압에 미치는 영향

천궁, 당귀와 혼합추출물 및 분획물의 혈관이완작용이 있음이 확인되어 이의 생체 내의 효과를 알아보기 위하여 자연발증고혈압쥐(spontaneously hypertensive rat, SHR)에게 체중 1 kg당 100, 200 mg을 경구투여한 후 혈압의 변화를 측정하였다.

실험결과 100 mg을 투여한 경우 대조군과 비교 시 천궁과 당귀를 1:1로 혼합추출한 추출물에서만 투여 3시간 이후부터 혈압 강하효과가 나타난 반면 다른 추출물들에서는 혈압이 저하되는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었다(Table 7). 따라서 투여량을 200 mg으로 증가 시 대조군을 제외한 모든 실험군에서 투여 1시간 이후부터 유의적으로 혈압이 저하되는 경향을 나타내었다. 또한 투여 24시간 이후에는 모든 실험군에서 혈압이 초기상태와 같은 정도로 회복되어 섭취 24시간 내에 체내에서 모두 이용되어 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다(Table 8).

Table 7. Changes of the systolic blood pressure in SHR after an oral administration of 100 mg/kg plant extract (mmHg)

|                   | Body weight(g) | Time after administration |                     |         |         |         |       |
|-------------------|----------------|---------------------------|---------------------|---------|---------|---------|-------|
|                   |                | 0 hr                      | 1 hr                | 3 hr    | 5 hr    | 7 hr    | 24 hr |
| Control           | 257± 6         | 191±5                     | 192±3               | 194±4   | 192±5   | 195±3   | 191±4 |
| <i>Ligusticum</i> | 265±13         | 197±2                     | 186±3 <sup>1)</sup> | 191±4   | 195±2   | 189±6   | 191±5 |
| <i>Angelica</i>   | 251±32         | 198±3                     | 194±6               | 197±9   | 191±4   | 182±3*  | 195±2 |
| <i>L:A=1:1</i>    | 268±15         | 198±2                     | 192±3               | 183±3** | 183±3** | 186±2** | 194±2 |
| BuOH-Fr           | 268±18         | 199±4                     | 188±5               | 194±1   | 188±6   | 189±5   | 192±4 |
| D.W-Fr            | 267±18         | 198±6                     | 187±3               | 191±2   | 182±5   | 184±5   | 192±4 |

<sup>1)</sup> \* and \*\* are significantly different at  $\alpha=0.05$  and 0.01.

Table 8. Changes of the systolic blood pressure in SHR after an oral administration of 200 mg/kg plant extract (mmHg)

|                   | Body weight(g) | Time after administration |         |         |         |         |       |
|-------------------|----------------|---------------------------|---------|---------|---------|---------|-------|
|                   |                | 0 hr                      | 1 hr    | 3 hr    | 5 hr    | 7 hr    | 24 hr |
| Control           | 257± 6         | 191±5                     | 192±3   | 194±4   | 192±5   | 195±3   | 191±4 |
| <i>Ligusticum</i> | 266±12         | 196±3                     | 182±4*  | 185±2*  | 183±3*  | 182±2*  | 195±2 |
| <i>Angelica</i>   | 268±15         | 200±3                     | 187±4*  | 185±3** | 184±3** | 183±2*  | 201±1 |
| <i>L:A=1:1</i>    | 274±10         | 197±3                     | 184±2** | 184±2** | 183±3** | 184±2** | 194±2 |
| BuOH-Fr           | 272±19         | 196±3                     | 171±15  | 185±3*  | 188±6*  | 183±2** | 200±3 |
| D.W-Fr            | 269±19         | 196±4                     | 185±2*  | 183±3*  | 182±5** | 180±3** | 196±3 |

<sup>1)</sup> \* and \*\* are significantly different at  $\alpha=0.05$  and 0.01.

## 제 4 절 혈관세포 및 혈관내피세포에 대한 작용평가(협동과제)

협동연구책임자 : 건국대학교 김 보 경

### 1. 서설

현대인의 사망 원인 중 심혈관계 질환은 양적 또는 질적으로 중요한 위치를 차지한 지 오래다. 심혈관계 질환은 혈관내피기능의 과도작용, 혈관평활근의 수축이상과 경련으로 야기되는 협심증, 고혈압, 허혈성 심장질환, 뇌졸중 등은 심각한 사회문제가 아닐 수 없다. 따라서 순환기의 병태생리학적 작용기작 특히 혈관내피 및 혈관평활근으로 대별되는 순환기관련 조직의 생리학적, 약리학적, 생화학적 기작을 규명하고 이해하는 것은 위의 질병의 예방 및 치료를 위한 중요한 기초적인 자료가 됨은 의심할 여지가 없다.

이러한 심순환 질환을 일으키는 가장 근본은 고혈압이라 할 수 있는데 이는 혈관의 직경의 감소에 의해 혈관의 압력이 증가하는 것을 말한다. 이는 교감신경계의 흥분에 의한 혈관의 수축, 평활근 세포막 이상에 따른 세포내  $Ca^{2+}$  증가, 또는 혈관 이완·수축 기전의 변화 등에 의해 발생한다. 이에서 보듯이 혈관의 이상운동성은 고혈압의 중요한 인자라 할 수 있다. 한편 고혈압의 치료를 위해 사용되는 약물요법으로는 이뇨제,  $\beta$  차단제,  $Ca^{2+}$  억제제, ACE 억제제,  $\alpha$  억제제 등이 있는데 고혈압의 경우 이러한 차단제 또는 조절제를 복합적으로 처치하여 환자에 적용한다. 그런데 이러한 고혈압치료제의 작용 기전을 보면 많은 수가 혈관에 직접 또는 간접적으로 이완시키는 작용을 한다는 것을 알 수 있다. 혈관 중막을 유지하는 평활근의 수축 및 이완에 의해 조절되므로 평활근의 수축조절은 혈관의 저항 및 고혈압의 발생에 중요한 역할을 한다. 따라서 고혈압의 많은 부분에서 혈관의 저항성의 중요성이 강조되어지고 있다 (Park et al, 2003).

한편 현재 고혈압의 치료를 위해 사용되는 여러 약물은 완전한 치료효과를 나타내고 있지 않다. 즉 이들은 단독 또는 복합 처방되어지고 있으나 이들의 부작용도 많이 보고되고 있다. 따라서 새로운 고혈압 치료제를 찾는 것은 심혈관 질병 치료적인 측면에서 꼭 필요하며 본 세부과제에서는 천연물질에서부터 고혈압을 경감시킬 수 있는 약물을 발굴하고 임상적으로 사용 가능한 지를 세포계 및 병태동물을 이용하여 평가하기 위하여 혈관평활근의 수축과 이완에 관여하여 혈관내피에 작용하는 항고혈압성 약용물질의 효과를 혈관 내피 및 평활근의  $Ca^{2+}$  sensitization과 관련하여 검토하였다. 또한 평활근의



수축을 일으키는 수축 단백질들의 발현에 대한 효과를 검증하여 항고혈압성 약용작물들의 혈관에 대한 직접적인 작용을 검토하였으며 고혈압 동물 모델을 이용하여 혈압 강화 작용을 평가하였다.

## 2. 연구 방법

### 가. 세포의 초대, 계대배양

본 연구에 사용된 혈관 평활근 세포는 6주령 SD의 대동맥에서 분리하였다. 혈관은 수축 측정 시와 같이 분리하였으나 무균상태를 유지하였다. 대동맥은 10 ml의 PBS가 든 멸균 원심관에서 물리적인 힘으로 대동맥내피를 제거하였다. 혈관에 효소액 (증식용 배지에 collagenase 0.03 g)을 주입하고 40분간 clean bench 안에서 소화한 후 증식용배지 [DMEM (400 ml), FCS (94.5 ml), penici-strepto (5.5 ml)]로 소화된 혈관을 씻어내어 800 rpm, 4°C, 5 min 간 원심하고 gelatin 처리된 샬레에 세포를 키웠다. 초대 배양 개시 후 confluent되면 계대배양을 하고 실험에 사용하였다.

또한 본 실험에서는 NO에 대한 효과를 검토하기 위해서 human umbilical vein endothelial cell (HUVEC)을 사용하였다. 세포들은 ATCC에서 구입하여 사용하였으며 DMEM (10% FBS)에서 배양하였다.

### 나. Ca<sup>2+</sup> sensitization에 대한 효과 검토

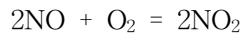
Immunoblotting을 위한 표본은 실험현미경하에서 대동맥의 근육만을 분리한 후 각 실험에 필요한 처치를 한 후 단백질변성 및 분해효소의 작용을 막기 위하여 액체질소에 보관하여 사용하였다. 각 조직은 액체 질소 하에서 파쇄한 후 균질화 용액 [Tris HCl (50 mM), EGTA (5 mM), DTT (5 mM), PMSF (300 µM), β-glycero phosphate (20 mM), NaF (1 mM), Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (2 mM), aprotinin (5 µg/ml), leupeptin (5 µM), Triton X100 (1%), glycerol (10%), NaCl (150 mM), pH 7.4]에서 다시 파쇄 (Homogenizer, Ultra-turrax T8, Ika, Germany)하여 균질화하였다. 균질화된 표본은 4°C에서 30 분간 혼화하였다. 그후 14,000 ×G에서 15 분간 원심분리하여 상층액을 분리하여 사용하였다. 단백질농도는 Bradford 법을 이용하여 측정하였으며 발색정도는 분광광도계 (Uvikon 860, Kontron, USA)로 파장 595 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Kim et al, 2003a, b).

단백질 표본은 겔 표본용액 (8% SDS, 80 mM Tris-HCl, 16 mM EDTA, 8% mercaptoethanol, 0.1% bromophenol blue, 40% glycerol, pH 6.8)과 3:1로 혼합한 후 약 5 분간 끓여서 변성시켜 사용하였다. SDS용 겔을 작성한 후 겔을 전기영동용 수조 (SE 250, Hoeffler Pharmacia Biotech, Sweden)에 장착한 후 Stacking 겔에서는 90 mV로 separating 겔에서는 80-100 mV로 약 2 시간 동안 영동하였다. 영동된 겔은 PVDF 막에 겔당 40 mA로 1-2 시간 전사 (Semi-dry transfer unit, TE70, Hoeffler Pharmacia Biotech, Sweden)하였다. 전사된 PVDF 막을 5% 탈지분유로 30 분간 blocking을 실시하였으며 1차 항체를 넣고 4°C에서 12 시간 반응시켰다. 각각의 Ca<sup>2+</sup> sensitization 관련 단백질의 활성을 관찰하기 위해서 인산화 특이적인 항체는 1:1000으로 희석하여 사용하였다. 이차항체로는 horseradish peroxidase-linked anti-rabbit IgG (1:2000)를 상온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 그후 ECL kit를 이용하였다 (Kim et al, 2003).

#### 다. Nitric oxide의 측정을 위한 실험

##### 1) 이론적 배경

L-Arg는 NOS에 의해 NO로 된다. 생성된 NO는 극도로 불안정한 물질로 O<sub>2</sub> 존재 시 및 중성용액 하에서 NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (nitrite, 아초산이온) 및 NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (nitrate, 초산이온)으로 변하는데 그 반응은 아래의 식과 같다.



따라서 본 연구에서는 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 양을 측정하여 NO의 정량에 사용하였다

##### 2) 방법

분리된 평활근세포를 12 well에 칸 후 24 시간 incubation 후 시료 및 대조약물 (10 μM histamine)을 처리하였다. 약물처리 12 시간 후 각 well에서 배지 200 μl를 채취하여 3000 rpm, 4°C, 5 분간 centrifuge하여 cell debris 등을 제거하였다. 이 supernatant 100 μl를 96 well plate에 넣어 Griess reagent A (1% sulfonilamide+5% phosphoric acid)와 B (0.1% N-(1-naphthyl ethylenediamide)를 1:1로 혼합하여 반응시키고 540 nm ELISA reader로 발색정도를 기록하였다. 동일한 배지에서 MTT를 실시하였다.

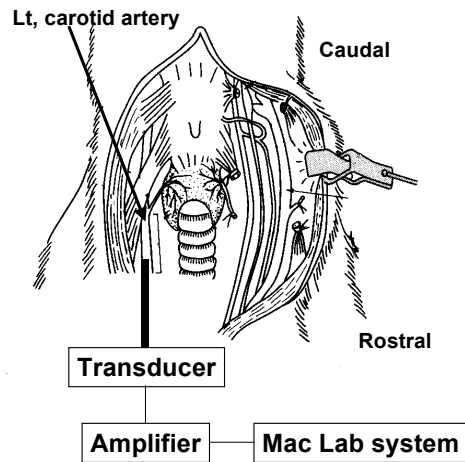
#### 라. 고혈압 동물 모델에서의 천궁의 효과

SHR은 사람의 본태성 고혈압에 대한 모델로서, 또한 DOCA salt는 내분비성 고혈압 (high aldosterone)의 모델로서 사용되는 것으로 본 세부과제에서는 이들 동물모델에서의 강압효과를 실험하였다.

SHR 동물은 수입하여 사용하였다. DOCA salt 랫드는 아래와 같이 당 교실에서 만들어 사용하였다. 하루를 금식시킨 200g 미만의 수컷 SD 랫드를 에테르 전 마취 후 35mg/kg의 pentobarbital을 복강내 주사로 마취시켰다. 마취된 랫드를 옆으로 누이고 좌측 늑골아래 상복부를 면도 및 소독하고 1-2cm 가량 피부와 복막을 절개하여 좌측신장이 드러나면 신문(hilus)부분에서 신경, 신관, 동정맥을 silk로 결찰한 후 한쪽 신장을 제거하였다 (uninephrectomy). DOCA (deoxycorticosterone acetate; Sigma D7000)와 실리콘 (한국 신에츠)을 1:2의 비율로 섞어 유리판으로 눌러 균한 DOCA patch를 만들고 uninephrectomy를 실시한 일주일 후 다시 에테르 마취하에서 600mg/kg (최종 DOCA 농도 200mg/kg)의 비율로 실리콘을 잘라 왼쪽 어깨 피하에 삽입한 후 봉합하였다 (이차 수술). 이차 수술을 한 날부터 쥐들에게 0.9% NaCl, 0.1% KCl R/O수를 먹이며 4주일 후 혈압을 재어 수축기혈압 180mmHg가 넘는 개체를 선발하였다.

혈압의 측정은 직접 및 간접측정법을 필요에 따라 선택하여 이용하였다. 간접측정법으로는 SHR 및 DOCA 고혈압쥐에 추출물을 경구 또는 정맥 투여하여 혈압의 변동을 관찰하였다. 혈압의 변동은 생리기록기로 기록하여 분석하였다. 먼저 쥐를 고정틀에 고정하고 가능한 움직이지 않게 고정한다. 꼬리에 혈압 cuff을 먼저 붙이고 sensor를 고정하였다. 혈관과 sensor가 잘 만나도록 하여 맥박기록 용이하게 하였으며 필요한 경우 동물에 히터를 가해 꼬리의 혈류량을 증가시켰다.

필요에 따라 직접법으로 혈압을 측정할 경우 ketamine 및 rumpun으로 마취한 후 외경동맥 (ext. carotid artery)에 삽관하여 혈관의 물리적인 압력을 측정한다. 전달된 압력은 transducer에 연결하고 Mac Lab system으로 관찰 관독한다. (아래 그림 참조)

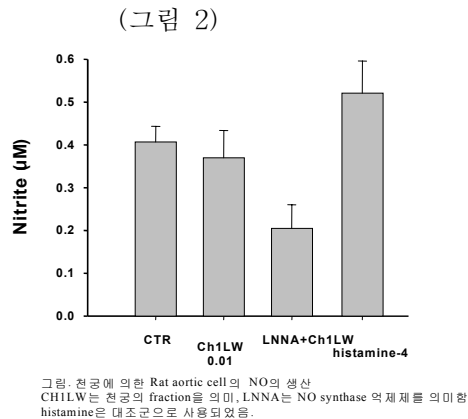
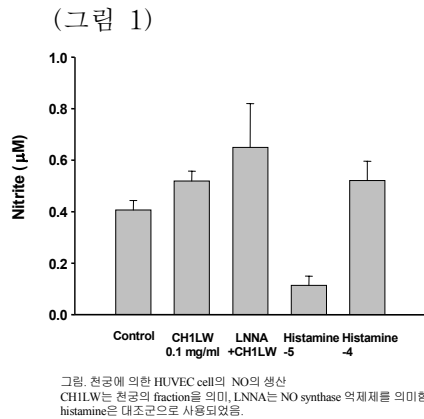


### 3. 결과 및 고찰

#### 가. Nitric oxide 생산에 대한 효과

천궁추출물의 NO 생산에 대한 효과를 명확히 검토하기 위하여 HUVEC cell을 이용하여 NO를 측정하였다. 12 well에 배양된 HUVEC cell에 천궁을 투여하면 NO 생산이 약간 증가하는 것을 알 수 있었다 (그림 1). 또한 positive 대조군으로 사용된 고농도의 histamine은 NO 농도를 증가시켰다. 그러나 NO synthase 억제제인 L-NNA 처리에 의해서 NO의 생산은 약간 억제되었으며, 저농도의 histamine에 의해서도 NO 생산이 감소하는 경향이 관찰되었다.

동일한 방법으로 rat 대동맥 내피세포에서 NO 생산 능력을 실험하였다. Ch1LW는 HUVEC에서와는 달리 rat 대동맥 내피세포에서는 NO 생산 능력이 나타나지 않았다 (그림 2).



한편 본 연구에서는 위의 천공 추출물에 대한 실험의 수행이전에 순환시스템에 영향을 미치는 것으로 알려진 천연물들의 NO 생산 능력에 대하여 검토하였다. 당귀의 chloroform, hexan 및 ethanol 추출과 두충의 ethanol 추출물의 HUVEC 세포에서의 NO 생산은 control에 비하여 유의한 증가를 일으키지 않았다 (그림 3).

(그림 3)

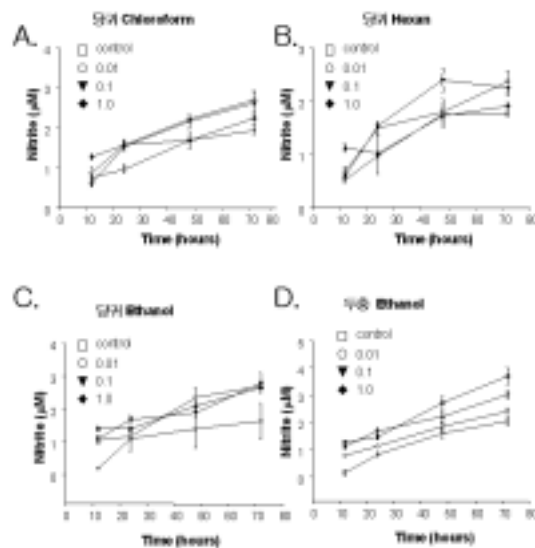


그림 3. 천연물에 의한 HUVEC cell의 NO생산 능력

#### 나. MTT법을 이용한 세포증식 억제효과 측정

천공 chloroform 추출물 Ch1LW의 세포 독성에 대한 효과를 관찰하였다. Ch1LW를 각 농도별로 투여한 후 혈관세포의 증식을 검토하였다. 24시간 Ch1LW를 처리한 군에서는 1 mg/ml에서 약간의 MTT 수치의 감소가 나타났다. 48시간 처리에서도 1 mg/ml에서 억제효과가 나타났으며 2시간 처리 군에서는 0.1 및 1에서 억제효과가 관

찰되었다 (그림 4, 5, 6). 이상의 결과로부터 Ch1LW는 세포독성이 비교적 적은 것을 알 수 있었다.

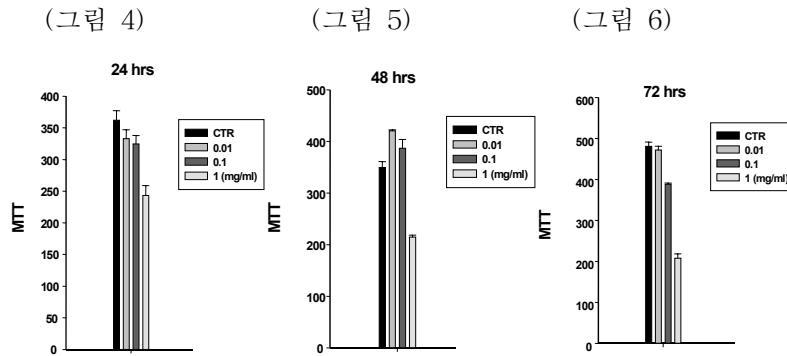


그림 4, 5, 6. 천궁 추출물 (Ch1LW)을 이용한 세포증식억제능 (세포독성) 검사  
 각 농도에 따른 처치시간 별 (24시간, 48시간, 72시간)로 나타내었다.

#### 다. $Ca^{2+}$ -sensitization에 대한 실험

##### 1) NE, DPB에 의한 $Ca^{2+}$ -sensitization에 미치는 Ch1LW의 효과

천궁 chloroform 추출물 Ch1LW의  $Ca^{2+}$  감수성에 대한 효과를 관찰하기 위하여 혈관 평활근의  $Ca^{2+}$  비의존성 운동성에 미치는 Ch1LW의 효과를 관찰하였다. 10  $\mu$ M의 NE를 투여하면 혈관의 장력이 증가하였다. 증가된 장력상태에서 Ch1LW를 투여하면 NE에 의한 장력이 감소하는 것을 알 수 있었다 (그림 7B). 한편  $Ca^{2+}$  sensitization에 직접적으로 작용하는지를 관찰하기 위하여  $Ca^{2+}$ 이 없이 1 mM EGTA가 첨가된 media에서 PKC 활성을 일으키는 DPB를 투여하였다. DPB는  $Ca^{2+}$ 이 없는 상태에서도 NE와 같은 큰 수축을 유발하였다. 이 DPB 수축에 Ch1LW를 투여하면 1 mg/ml과 10 mg/ml에서 강력한 이완이 관찰되었다 (그림 8B). 이상의 결과로부터 Ch1LW는 세포내  $Ca^{2+}$ 의 변화를 일으키지 않고 혈관 평활근의 수축을 억제하는 작용 ( $Ca^{2+}$ -sensitization의 감소)을 일으키는 것을 알 수 있었다.

한편 NE에 의한 수축은 cAMP의 analogue인 8-Bromo cyclic AMP에 의해 강력하게 억제되었다 (그림 7A). 그러나 NE에서와는 DPB에 의한  $Ca^{2+}$ -sensitization은 8-Bromo cyclic AMP에 의해 유의한 변화를 보이지 않았다 (그림 8A). 이상의 결과로부터 NE에 의한 수축은 cAMP에 의해 영향을 받으나 DPB에 의한  $Ca^{2+}$ -sensitization은 cMAP에 의해 억제되지 않는 것을 알 수 있었다.

(그림 7)

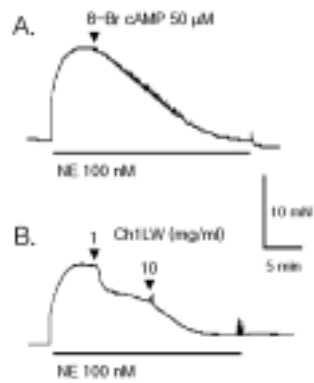


그림 7. NE 수축에 미치는 Ch1LW의 효과.

혈관 평활근 표본을 정상적인  $Ca^{2+}$ 에서 NE로 수축을 유도하였다. 그 후 8-Br-cAMP (A) 또는 Ch1LW (B)를 투여하여 억제효과를 관찰하였다.

(그림 8)

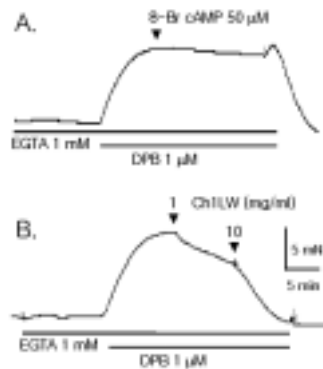


그림 8. DPB 수축에 미치는 Ch1LW의 효과.

혈관 평활근 표본을 EGTA 1 mM을 투여하여  $Ca^{2+}$ 을 제거한 media상태에서 DPB를 투여하여  $Ca^{2+}$  sensitization을 유도하였다.

그 후 8-Br-cAMP (A) 또는 Ch1LW (B)를 투여하여 억제효과를 관찰하였다.

## 2) $Ca^{2+}$ -sensitization의 mediator MAPK의 활성화에 미치는 Ch1LW의 효과

NE를 투여하여 MAPK의 활성화 정도를 관찰하였다. NE 10  $\mu$ M을 투여하면 수축이 발생하였는데 동일한 방법으로 MAPK의 활성을 측정하였다. ERK1/2 (p42 및 p44 MAPK)는 NE 처리 5분 후에 증가하기 시작하여 15분에 최대에 도달하였다. NE 처리 15분 후의 ERK1/2의 활성화는 210%까지 증가하였다. 그 후 NE 처리 30분경에는 그 활성화

이 약간 감소하였으나 유지되었다 (그림 9).

한편 또 다른 MAPK인 p38 MAPK는 NE 처리에 의해 시간 의존적으로 활성이 증가되었다. 38 MAPK 활성은 NE 처리 15분에서 처리 전에 비해 250%가 증가되어 최대치를 나타냈다. 또한 ERK1/2와 비슷한 경향으로 NE 처리 30분 후에는 활성이 200%로 떨어지는 것을 알 수 있었다 (그림 10). 위에서 설명한 ERK1/2의 활성은 ERK1/2 억제제인 PD98059에 의해 억제되었으며 p38 MAPK의 활성은 p38 MAPK의 억제제인 SB203580에 의해 억제되었다.

(그림 9)

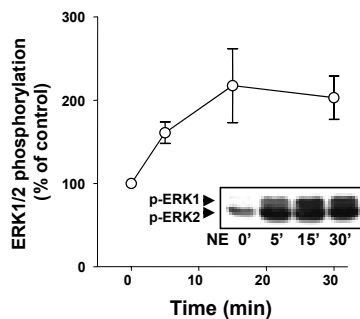


Fig. The activities of ERK1/2 during NE-stimulation in rat aortic smooth muscle. The time course of changes in phosphorylated ERK1/2 induced by NE. Strips were stimulated with 10  $\mu$ M NE for 0, 5, 15 and 30 min, respectively, and then western blotting analysis was carried out. Results are presented as percent of phosphorylation relative to resting state. Values are means  $\pm$  S.E.M. from three independent experiments. The insets indicate a representative result of western blotting with ERK1/2 antibody.

(그림 10)

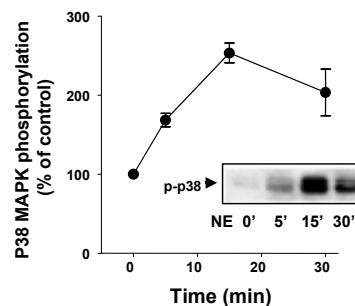
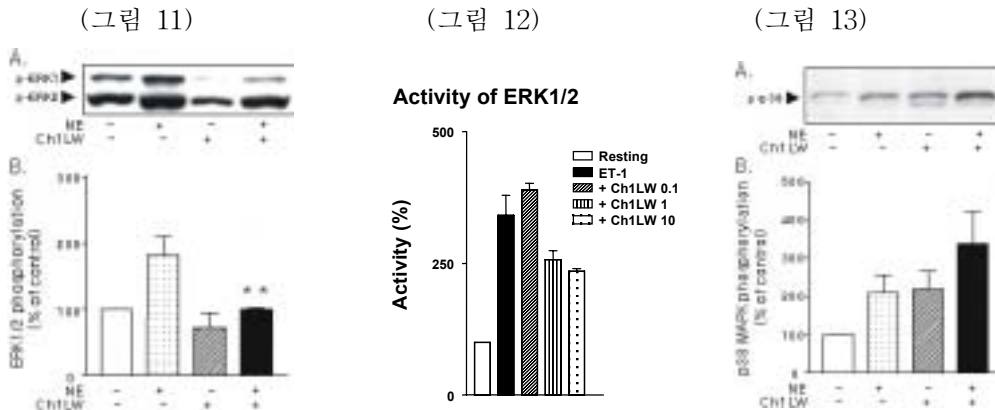


Fig. The activities of p38 MAPK during NE-stimulation in rat aortic smooth muscle. The time course of changes in phosphorylated p38 MAPK induced by NE. Strips were stimulated with 10  $\mu$ M NE for 0, 5, 15 and 30 min, respectively, and then western blotting analysis was carried out. Results are presented as percent of phosphorylation relative to resting state. Values are means  $\pm$  S.E.M. from three independent experiments. The insets indicate a representative result of western blotting with p38 MAPK antibody.

NE에 대한 Ch1LW의 효과를 검토하였다. Ch1LW 10mg/ml는 NE에 의해 증가된 ERK1/2의 활성을 억제시켰다 (그림 11). 이러한 Ch1LW의 ERK1/2 억제효과는 1 mg/ml에서도 동일하게 관찰되었다 (그림 12). 그러나 Ch1LW는 p38 MAPK의 활성을 억제 하지 않았으며 오히려 p38 MAPK의 활성을 증가시키는 경향이 있는 것으로 밝혀졌다 (그림 13). 이상의 결과로부터 Ch1LW는 NE에 의한 MAPK, 특히 ERK1/2의 활성을 억제한다는 것을 알 수 있었다. 따라서 생체 내 강력한 수축제로 알려진 endothelin-1에 대한 천궁 chloroform 추출물 Ch1LW의 효과를 검토하였다. Ch1LW는 endothelin-1에 의한 ERK1/2의 활성을 강력히 억제하였다 (data not shown). 따라서 Ch1LW는 혈관 수축제의 종류에 관계없이 이를 억제하며 특히 ERK1/2MAPK의 활성을 억제하는 것으로 이런 수축억제가 이루어지는 것을 알 수 있었다.



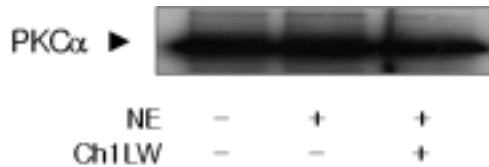


Figs. Effects of Ch1LW on NE-induced MAPK activity in rat aortic smooth muscles. The strips were stimulated with NE 10  $\mu$ M for 15 min, and then treated with Ch1LW for 15 min, respectively. The activities of MAPK were detected using phosphorylated MAPK antibodies. The change of phosphorylated MAPK induced by NE was defined as 100%. Each result represents the mean $\pm$ SEM of 3-4 experiments.

### 3) 그 외 $Ca^{2+}$ -sensitization의 mediator에 미치는 Ch1LW의 효과

천궁 chloroform 추출물 Ch1LW의 PKC 활성화에 대한 효과 (phosphorylated pan PKC 및 phosphorylated PKC $\alpha$  항체를 이용한 western blotting법 사용, Kim et al 2003b, c)와 Rho의 활성 측정 (Rho 및 Cdc42를 이용한 translocation의 측정법)를 검토한 결과, Ch1LW의 PKC 및 Rho 대한 효과는 없는 것으로 나타났다 (그림 14).

(그림 14)



Figs. Effects of Ch1LW on NE-induced PKC alpha activity in rat aortic smooth muscles. The strips were stimulated with NE 10  $\mu$ M for 15 min, and then treated with Ch1LW for 15 min, respectively. The activity of PKC alpha was detected using phosphorylated PKC alpha antibodies

### 4) 결과의 종합

천궁추출물 (Ch1LW)은 강한 NO 생산능 및 약한 세포증식억제(세포독성)을 보이는 것을 알 수 있었다. 또한 혈관세포의 MAPK의 활성을 억제하여  $Ca^{2+}$ -sensitization을 감소시키는 것을 알 수 있었다.

라. 혈압에 대한 효과

1) 직접 혈압 측정법을 이용한 결과

SHR 고혈압쥐에 천궁 추출물을 투여하여 혈압의 변동을 관찰하였다. 천궁 chloroform 추출물 Ch1LW 0.1-1.0 mg/ml/kg에서는 혈압이 약간 증가한 후 일정하게 유지되는 것을 알 수 있었다. 천궁 chloroform 추출물 10 mg/ml/kg에서는 혈압이 급격하게 증가한 후 천천히 억제되어 약물 처치 이전까지 감소하였다. 한편 물층에서는 혈압을 상승시키는 것을 알 수 있었다.

동일한 방법으로 DOCA 고혈압쥐에 천궁 추출물 Ch1LW를 투여하여 혈압의 변동을 관찰하였다. 천궁 chloroform 추출물 Ch1LW 0.1-1.0 mg/ml/kg에서는 혈압이 약간 증가한 후 일정하게 유지되는 것을 알 수 있었다. 천궁 chloroform 추출물 Ch1LW 10 mg/ml/kg에서는 혈압이 약간 억제되었으나 SHR 보다는 억제정도가 적었다.

(그림 15)

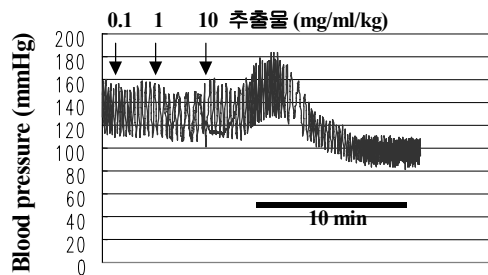


그림. SHR 고혈압 쥐에서 Ch1LW의 혈압 강하 효과

(그림 16)

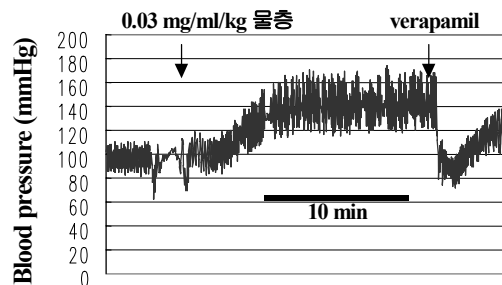


그림. SHR 고혈압 쥐에서 천궁 물층의 혈압 강하 효과

(그림 17)

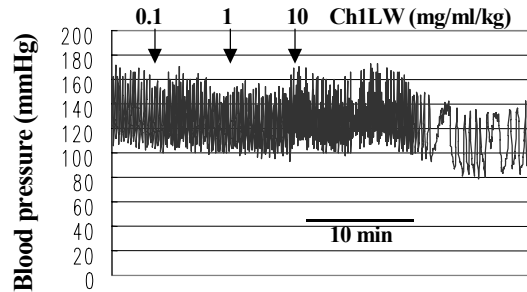


그림. DOCA 고혈압 쥐에서 Ch1LW의 혈압 강하 효과

## 2) 간접 혈압 측정법을 이용한 결과

천궁 분획을 L, A 및 ADW 로 나누어 혈압을 측정하였다. 먼저 extract A를 500 mg/kg로 투여한 SHR에서는 투여 후 8시간에서 saline 투여군에 비해 혈압이 유의하게 감소하였다. 감소된 혈압은 24 시간 후에 완전히 회복되었다 (그림 18). Extract L은 투여후 유의한 차이를 보이지 않았으며 (그림 19), ADW 투여군에서는 투여 초기는 saline 투여군과 비슷한 BP 변화를 보였으나 24시간 후에는 BP의 증가가 두드러져 나타났다 (그림 20). 이상의 SHR을 이용한 혈압실험에서 extract에 의한 강압효과는 extract A의 8시간에서만 나타났으며 이는 시간이 지남에 따라 회복되었다. 그러나 extract L은 혈압강하 효과가 없었으며 ADW는 투여 24시간 후 승압작용이 있어 체내 대사물에 의한 작용이 의심되었다.

(그림 18)

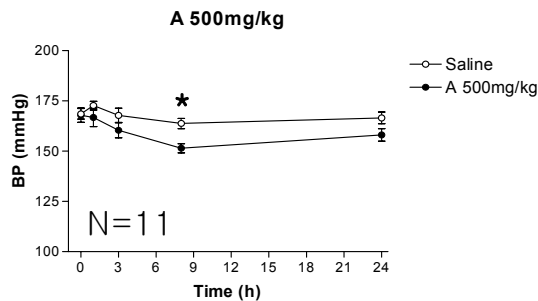


그림. SHR 고혈압 쥐에서 천궁 추출물 (extract A)의 혈압 강하 효과

(그림 19)

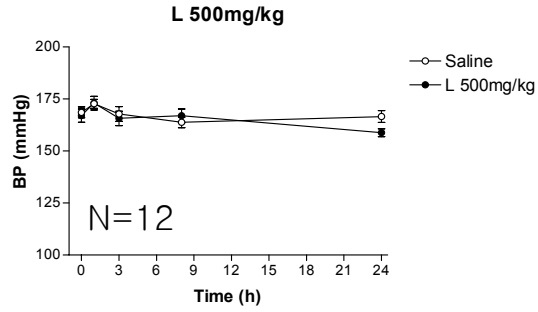


그림. SHR 고혈압 쥐에서 천궁 추출물 (extract L)의 혈압 강하 효과

(그림 20)

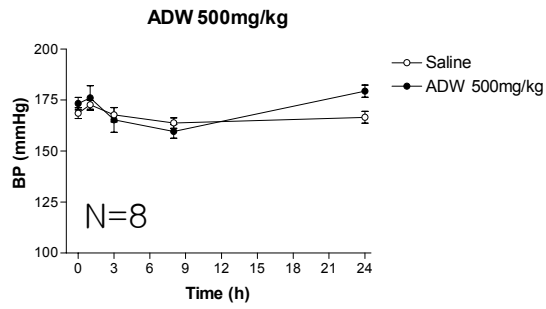


그림. SHR 고혈압 쥐에서 천궁 추출물 (extract ADW)의 혈압 강하 효과

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 연차별 연구개발 목표의 달성도

| 구 분            | 연구 개발 목표   | 평가의 착안점   | 달성도  |
|----------------|--|---|------|
| 1차년도<br>(2000) | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 약용작물의 혈압강하효능 분석 및 식품소재화 기술개발</li> <li>○ 혈관세포 및 혈관내피세포에 대한 작용평가</li> </ul> | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 조추출물 제조</li> <li>- 추출물의 혈압강하 효능 검색</li> <li>- 조추출물의 혈관세포에 대한 작용 검색</li> </ul>  | 100% |
| 2차년도<br>(2001) | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 활성물질의 분획 및 분획물의 특성 확인</li> <li>○ 활성물질의 혈관세포에 대한 효능 확인</li> </ul>          | <ul style="list-style-type: none"> <li>- ‘천궁’의 혈관이완작용 물질 분획</li> <li>- 분획물의 활성안정화 조건 분석</li> <li>- 효율적인 활성분획물 제조 기술개발</li> <li>- 활성물질의 분리 및 특성분석 (I)</li> <li>- 혈관세포의 성장억제 작용</li> <li>- 혈관세포에 대한 NO 생산능 측정</li> <li>- 혈관 Ca<sup>2+</sup>sensitization에 대한 효과 분석</li> </ul> | 100% |
| 3차년도<br>(2002) | <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 활성물질 분리 및 활성획분을 이용한 시제품 제조</li> </ul>                                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>- 활성이 강한 물질의 부분 분리</li> <li>- 활성농축액의 각 기전에 따른 효능 측정</li> <li>- 시제품의 효능확인</li> </ul>  | 100% |

각 연차별 연구목표 및 내용에 대한 실험을 수행하여 당귀와 천궁혼합 활성농축액을 제조하였고, 이의 SHR에 대한 혈압강하효능까지 확인하였으므로 목표를 100% 달성한 것으로 사료된다. 본 연구결과 우리나라에서 가장 많이 사용하는 한약재 중 하나인 천궁과 당귀를 혼합하여 혈관에 미치는 영향 및 이의 기전을 확인하고 그에 따른 혈압강하효과가 있는 혼합 활성농축액을 제조함으로써 추후 이 약재들의 사용에 대한 과학적 근거를 제시하였고 이를 이용한 다양한 시제품의 개발이 가능할 것으로 기대된다.

## 제 2절 관련분야에의 기여도

본 연구개발을 통하여 천궁 및 당귀의 혈관이완작용과 그 작용 기전에 대한 과학적 근거를 제시하였으므로 이들은 약용식물의 이용에 있어 기초 연구자료로서 뿐만 아니라 실제적용을 위하여도 중요한 가치를 지닌다. 따라서 본 연구결과가 관련분야의 기술발전에 다음과 같이 기여할 수 있으리라 기대된다.

- 천궁 및 당귀의 혈관이완작용기전을 구명하였으므로 이들의 이용에 과학적 근거를 제시하여 약용작물로써 사용 증대와 이에 따른 소비 촉진에 기여할 수 있을 것으로 기대된다.
- 천궁 및 당귀 혼합물의 각기 다른 활성 농축액을 제조함으로써 기능성 식품 및 의약소재의 개발에 활용가능할 것으로 사료된다.
- 천궁 및 당귀에 대하여 알려져 있지 않은 기전을 확인함으로써 이들에 대한 계속적인 연구 및 물질분리에 적용하여 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 제 1절 기존 활용실적

#### 1. 학술논문

- MR Rhyu, EY Kim and BK Kim. Nitric oxide-mediated vasorelaxation of rhizoma *ligusticum wallichii* in isolated rat thoracic aorta, *Phytomedicine*, 2003 in press.
- Kim B, J Kim, A Kim, YS Kim, YR Lee, YM Bae, SI Cho, MR Rhyu. *Ligusticum wallichii*-induced vasorelaxation mediated by mitogen-activated protein kinase in rat aortic smooth muscle, *Journal of Ethnopharmacology*, 2004 in press.

#### 2. 학회발표

- MR Rhyu, EY Kim and BK Kim. Nitric oxide mediated endothelium-dependent relaxation of rat thoracic aorta induced by *Ligusticum Wallichii*, EUROFOODCHEM XI, (Norwich Research Park, Norwich, UK), 2001. 9. 26~28.
- Kim B. Hypotensive effects of natural products, 제1회 바이오 식의약연구센터 국제 심포지움 (건국대학교), 2003. 3. 28.
- 김보경, 이연리, 김중환, 배영민, 조성일. Ch1LW, a chloroform extract of *Ligusticum wallichii* induces vasorelaxation mediated by inhibition of mitogen-activated protein kinase in rat aortic smooth muscle, 제11회 의과학학술대회 (건국대학교), 2003. 11. 26.

#### 3. 산업재산권

- 류미라, 김정현, 김은영. 천궁을 이용한 일산화질소 생성제 조성물 및 이를 이용한 약품 조성물, 출원일자 2002. 12. 10, 출원번호 10-2002-0078219
- 김보경, 류미라. 항고혈압 기능을 가지는 천궁 추출물, 출원일자 2003. 11. 28, 출원번호 10-2003-0085346

## 제 2절 활용계획

○ 본 연구결과 천궁 및 당귀 추출물의 혈관에 미치는 영향 및 그 기전을 확인하였으므로 이 약재들을 심혈관질환 예방용으로 사용함에 있어 과학적 근거가 될 수 있을 것으로 기대되었으며 이에 대한 결과를 학회지 등에 다수 게재하고자 한다.

○ 천궁과 당귀의 혼합 활성농축액을 제조하였고 이의 실험동물에 대한 효능 또한 확인하였으므로 이들을 이용한 심혈관질환 예방용 기능성 식품의 개발에 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

○ 천궁과 당귀 혼합 활성농축액 중 phasic relaxation을 일으키는 물 획득은 nitric oxide 생성 및 muscarinic receptor를 경유하여 혈관이완을 일으키며 이는 천궁에 함유되어 있는 혈관이완물질인 TMP와는 다른 것으로 확인되었으므로 이를 이용한 의약소재의 개발이 가능할 것으로 기대된다.

○ 천궁과 당귀 혼합 활성농축액 중 butanol 획득은 강력한  $Ca^{2+}$  channel blocker로써 작용하며 이는 임상적으로 혈관확장제로 이용되는 약제들과 같은 기전이므로 이를 이용한 기능성 식품 및 의약소재의 개발의 시도가 가능할 것으로 기대된다.

○ 본 연구 결과 MAPK 억제제로서의 천궁의 이용가능성을 연구할 필요가 있는 것으로 사료되었다. MAPK의 억제제의 개발은 암, 천식, 고혈압 등에 중요한 치료제로 대두되고 있고 많은 외국계 제약회사들이 이 억제제의 개발에 연구를 집중하고 있다. 따라서 천궁의 MAPK 억제제로 개발이 가능한 지에 대한 연구를 수행할 필요가 있으며 천궁을 포함한 천연물을 이용한 무독성 치료제로의 개발을 향후 시도하고자 한다.



## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

문헌분석 및 internet 조사 등을 통하여 본 연구 중 활용되었거나 향후의 계승발전 연구에 적용될 수 있는 다양한 해외과학기술정보가 수집되었다.

특히 EUROFOODCHEM은 2년에 한번 European Commission's quality of Life Programme의 지원을 받아 유럽지역을 중심으로 개최되는 학회로 매년 그때의 hot issue를 주제로 초청강연, 일반강연 및 poster 발표를 하며 본 연구개발과정 중 진행된 학회의 주제는 "Biologically-Active Phytochemicals in Food: Analysis, Metabolism, Bioavailability and Function"로 본 연구의 내용과 연관성이 많았다. 따라서 학회에 발표된 많은 논문들과 그 저자들로부터 phytochemicals의 분리 및 분석에 대한 자료들을 수집할 수 있었다.

## 제 7 장    참고문헌

- Amano M, M Ito, K Kimura, Y Fukata, K Chihara, T Nakano, Y Matsuura and K Kaibuchi (1996): Phosphorylation and activation of myosin by rho-associated kinase(Rho-kinase). *J. Biol. Chem.* 271, 20246-20249
- Azuma H, N Funayama, T Kubota and M Ishikawa (1990): Regeneration of endothelial cells after balloon denudation of the rabbit carotid artery and changes in responsiveness. *Jpn. J. Pharmacol.* 52, 541-552
- Beigel Y, Fuchs J, Snir M, Green P, Lurie Y, Djaldetti M. (1991): Lovastatin therapy in hypercholesterolemia: effect on fibrinogen, hemorrheologic parameters, platelet activity, and red blood cell morphology. *J. Clin. Pharm.* 31, 512-517
- Cheung H.S., Wang F.L., Ondetti M.A., Sabo E.F. and Cushman D.W. (1980): Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. *J. Biol. Chem.* 255, 401-407
- Chiou W.F., Chou C.J., Liao J.F., Sham A.Y.C. and Chen C.F. (1994): The mechanism of the vasodilator effect of rutaecarpine, an alkaloid isolated from *Evodia rutaecarpa*. *Eur. J. Pharm.* 257, 59-66
- Chiou W.F., Chou C.J., Sham A.Y.C. and Chen C.F. (1992): The vasorelaxant effect of evodiamine in rat isolated mesenteric arteries: mode of action. *Eur. J. Pharm.* 215, 277-283
- Chiou W.F., Liao J.F. and Chen C.F. (1996): Comparative study on the vasodilatroy effects of three quinazoline alkaloids isolated from *Evodia rutaecarpa*. *J. Nat. Prod.* 59, 374-378
- Cushman D.W. and Cheung H. S. (1971): Spectrophotometer assay and properties of the angiotensin converting enzyme of rabbit lung. *Bioche. Pharm.* 20, 1637
- Guh J.H., Yu S.M., Ko F.N., Wu T.S. and Teng C. M. (1996): Antiproliferative effect in rat vascular smooth muscle cells by osthole, isolated from *Angelica pubescens*. *Eur J Pharmacol* 298, 191-197
- Her, E., Lee S.T., Cho S.I. and Park D.K. (1997): The effect of LDL oxidation caused an atherosclerosis in macrophage cells. *Kor. J. Immun.* 19, 337-346
- Hoult J.R.S. and Paya M. (1996): Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: Natural products with therapeutic potential. *Gen Pharmac* 27, 713-722

- Huang X., Zang Y., Wang Y., Niu G., Wen A. and Ren P. (1996): Effects of tetramethyl-pyrazine phosphate and sodium ferulate alone or in combination on hemodynamics in anesthetized dog. *Am J Chin Med* 224, 169-176
- Kim A., Bae YM., Kim J., Kim B., Ho WK., Yerm YE., Cho SI. (2003): Direct blocked by bisindolylmaleimide of the voltage-dependent  $K^+$  currents in rat mesenteric arterial smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 479 (in press)
- Kim B, Kim YS, Ahn J, Kim J, Cho SI, Won KJ, Ozaki H, Karaki H, Lee S. (2003b): Conventional-type protein kinase C contributes to phorbol ester-induced inhibition of rat myometrial tension. *Br J Pharmacol* 139: 408-414.
- Kim B.K., Mitsui M. and Karaki H. (1992); The long term inhibitory effect of a  $Ca^{2+}$  channel blocker, nisoldipine, on cytosolic  $Ca^{2+}$  and contraction in vascular smooth muscle. *Eur. J. Pharm.* 223, 157-162
- Kim B.K., Ozaki H., Hori M. and Karaki H. (1996); Increased sensitivity of phorbol esters on cytosolic  $Ca^{2+}$  and contraction in the uterine smooth muscle. *Jpn. J. Pharm.* 72, 111-118
- Kim B.K., Ozaki H., Lee S.M. and Karaki H. (1995); Increased sensitivity of myometrium to the contractile effects of platelet activating factor(PAF) before delivery. *Brit. J. Pharma.* 115, 1211-1214
- Kim YS, Kim B, Karaki H, Hori M, Ozaki H (2003): Up-regulation of Rnd1 during pregnancy serves as a negative feedback control for  $Ca^{2+}$  sensitization of contractile elements in rat myometrium. *Biochem Biophys Res Commun* 311: 972-978
- Ko F.N., Wu T.S., Liou M.J., Huang T.F. and Teng C.M. (1992): Vasorelaxation of rat thoracic aorta caused by osthole isolated from *Angelica pubescens*. *Eur. J. Pharm.* 219(1): 29-34
- Lee Y.H., Kim B.K., Kim Y.S. et al (1998): Studies on the new factor on the regulation of contraction in the balloon injured rabbit carotid artery. *Korean J. Geront.* 8, 67-76
- Maruyama S. and Suzuki H. (1982): A peptide inhibitor of angiotensin I converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. *Agric. Biol. Chem.* 46, 1393-1398
- Maruyama S., Miyoshi S. and Tanaka H. (1989): Angiotensin-I-converting enzyme inhibitors derived from *Ficus carica*. *Agric. Biol. Chem.* 53, 2763-2767

- Matsunaga K., Shibuya M. and Ohizumi Y. (1994): Graminone B, a novel lignan with vasodilative activity from *Imperata cylindrica*. *J. Nat. Prod.* 57, 1734-1736
- Pang P.K.T., Shan J.J. and Chiu K.W. (1996): Tetramethylpyrazine, a calcium antagonist. *Planta Medica* 62, 431-435
- Park S., Kim B., Kim J., Won KJ., Lee S., Kwon S. and Cho S. (2003): Tamoxifen Induces Vasorelaxation via Inhibition of Mitogen-activated Protein Kinase in Rat Aortic Smooth Muscle. *J Vet Med Sci* 65(11): 1155-1160.
- Rhyu M.R., Kim D.K., Kim H.Y. and Kim B.K. (1999): Nitric oxide-mediated endothelium-dependent relaxation of rat thoracic aorta induced by aqueous extract of red rice fermented with *Monascus ruber*. *J. Ethnopharm.* in press
- Rhyu M.R., Nam Y.J. and Lee H. Y. (1996): Screening of Angiotensin I converting enzyme inhibitors in cereals and legumes. *Foods and Biotech.*, 5, 334-337
- Teng C.M., Lin C.H., Kuo Y.H., Lin Y.L. and Huang T.F. (1994): Antiplatelet and vasorelaxing actions of the acetoxy derivative of cedranediol isolated from *Juniperus squamata*. *Planta Med* 60, 209-213
- Wu T.S., Liou M.J., Ko F.N. and Teng C.M. (1990): Osthole, an antiplatelet aggregation principle from the root of *Angelica pubescens*. *Chin. Pharm. J.* 42(4): 317-321
- Yang M.C.M., Wu S.L, Kuo J.S. and Chen C.F. (1990): The hypotensive and negative chronotropic effects of dehydroevodiamine. *Eur. J. Pharm.* 182, 537-542
- Yoahikawa M., Shimada H., Matsuda H., Yamahara J. and Murakami N. (1996): Bioactive constituents of chinese natural medicines. I. New sesquiterpene kotonones with vasorelaxant effect from chinese moxa, the processed leaves of *Artemisia argyi* LEVL. et VANT.: Moxartenone and Moxartenolide. *Chem. Pharm. Bull.* 44, 1656-1662
- Zhang W.J, Wojta J. and Binder B.R. (1997): Regulation of the fibrinolytic potential of cultured human umbilical vein endothelial cells: astragaloside IV downregulates plasminogen activator inhibitor-1 and upregulates tissue-type plasminogen activator expression. *J. Vas. Res.* 34, 273-280

## 주 의

1. 이 보고서는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.