

BSNB1260-2000055-3

GOVP 12016029

**심혈관계 효능검색을 통한 국내 유용식물자원의
탐색 및 이용성 개발**

**Development of useful resources for cardiovascular
disease from indigenous plants**

**연구기관
생명공학연구소**

과학기술부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “심혈관계 효능검색을 통한 국내 유용식물자원의 탐색 및 이용성 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2000. 9.

주관연구기관명 : 생 명 공 학 연 구 소

주관연구책임자 : 이 현 선 (생명공학연구소 책임연구원)

연 구 원 : 안 순 철 (생명공학연구소 선임연구원)

오 원 근 (생명공학연구소 선임연구원)

고 학 룡 (생명공학연구소 연 구 원)

이 준 원 (생명공학연구소 연 구 원)

최 희 철 (생명공학연구소 연 구 원)

노 태 철 (생명공학연구소 연 구 원)

위탁연구기관명 : 순 천 향 대 학 교

위탁연구책임자 : 이 종 화 (순천향대학교 부교수)

여 백

요 약 문

I. 제 목

심혈관계 효능검색을 통한 국내 유용식물자원의 탐색 및 이용성 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

최근 순환계 질환이 날로 증가함으로 인해 혈액순환 조절기전에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 혈관을 이완시키는 다양한 인자들과 그들간의 상관성에 대한 연구에 많은 진전이 이루어졌다. 여러 인자들 중에서 cyclic guanosine 3,5-monophosphate (cyclic-GMP)는 질소 혈관이완제, 내피의존성 혈관이완제 및 동맥 나트륨이노성 펩타이드에 의해 유발되는 혈관 평활근 이완에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

NO를 경유한 혈관 이완기전은 세포내 Ca^{2+} 의 유입을 증가시키는 물질-acetylcholine, bradykinin, electrical current 또는 shear force 등에 의해 세포내 Ca^{2+} 의 유입이 증가되면 내피에 있는 NO 합성효소 (NO synthase, NOS)가 활성화되어 NO가 합성·분비된다. 합성된 NO는 인접한 평활근 세포로 쉽게 확산되어 soluble guanylate cyclase (sGC)를 활성화시켜 cyclic GMP를 증가시킴으로써 결국 단백질의 인산화 반응이 촉진되어 평활근 이완이 일어난다. Sodium nitroprusside 나 nitroglycerin과 같은 nitro-vasodilators는 내피 NO 생성효소를 경유하지 않고 약물 자체가 대사되면서 NO를 생성하여 평활근의 guanylate cyclase를 활성화시킴으로써 이완작용을 나타낸다.

한편, 혈관 이완작용에 중요한 역할을 하는 NO의 생성이 저하되면 과도한 혈관 수축이 일어나게 되어 허혈로 인한 장기의 기능장애 즉 허혈성 심질환 등을 초래할 수 있으며, 고혈압 및 동맥경화의 병리기전에도 관여한다. 이와는 반대로 NO

의 과도한 생성은 과도한 혈관 이완으로 인한 순환계 쇼크 및 패혈증에 관여한다.

최근에 NO의 여러 가지의 중요한 생리적·병리적 기능이 밝혀짐으로 인해 심혈관계 질환에서 패혈성 쇼크에 이르기까지 다양한 치료목적으로 nitric oxide량을 조절하는 약물개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

따라서 전 세계적으로 심혈관계질환이 성인 사망의 주된 원인 중의 하나이며, 국내의 경우 생활 수준의 향상으로 심혈관계의 질환이 증가하고 있는 실정을 감안할 때 국내 고등식물자원으로부터 심혈관계 질환을 개선할 수 있는 유용자원의 탐색 및 유용물질의 분리를 통하여 새로운 자원의 개발, 보존함으로써 생물다양성관련 국제보호체제에 대처하고 자원의 유용성을 밝힘으로써 경제적 가치를 부여하고 고부가가치의 생리활성 물질의 의약품으로 개발에 이용할 수 있을 것이다.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

1. 식물자원의 추출물 조제

기존 한의서와 문헌을 통하여 심장순환계 질환의 치료효과가 기대되는 생약을 1차적으로 선별한다. 건조한 시료 50g을 MeOH 추출한 후 10 mg/ml이 되도록 DMSO 또는 MeOH에 녹여 stock solution을 만들어 1차 검색 시액으로 사용한다. 1차 활성검색 결과, 강한 활성을 보여주는 시료에 대해서는 용매분획을 행하여 2차 탐색을 행한다.

2. 유용물질의 분리정제 및 구조해석

1차 효능 검색에 의해 선정된 후보 유용 식물자원의 MeOH 추출물에 대한 pH 안정성, 용매 추출성, resin의 흡착성 등을 조사한다. 얻어진 정보에 따라 분리정제 scheme을 정하고, 여러 종류의 흡착제 등에 대한 chromatographic technique을 이용하여 활성물질을 분리하고 이화학적 특성과 기기분석학적 방법을 통하여 구조를 규명한다.

3. 안지오텐신 II 수용체 결합저해제 탐색

식물 추출물에 대한 1차 탐색을 행하여 강한 수용체 결합 저해활성을 보이는 자원에 대해 크로마토그래피법을 통하여 활성물질을 분리하고 그 구조를 규명한다.

4. 적출 동맥혈관에 대한 작용 검색

rat 나 토끼의 흉부 대동맥혈관을 적출하여 식물 추출물 또는 활성물질들의 혈관에 대한 수축·이완작용을 평가하고 이들의 작용가작을 밝힌다.

5. 분리된 활성물질의 특성, 작용기작 및 생물학적 활성을 검토하여 활성물질 및 활성물질을 함유하는 고등식물 자원의 경제적 이용성을 검토한다.

IV. 연구개발결과

1. 국내 자생 유용 식물자원의 수집

민간약과 기존의 한의서에 수재된 심혈관계 작용약물 40종을 비롯하여 총 300종의 국내 자생 식물자원을 수집·동정하였으며, 이들을 메탄올로 추출한 후 용매분획을 통하여 CHCl₃, BuOH, H₂O층으로 분획하여 검정시료 추출물 library를 조제하였다.

2. 심혈관계 효능검색을 통한 유용성 탐색 및 유용식물자원 발굴

100여종의 식물자원 추출물에 대한 안지오텐신 II 수용체 결합 저해제를 탐색하여 2종의 자원 P008과 P014을 선정하였으며, rat의 흉부대동맥에 작용하는 약물 검색을 통하여 혈관 이완작용을 갖는 6종의 자원 (P004, P011, 051, 108C, 102H, 098C)과 수축작용을 갖는 3종의 식물자원 (P009C, 091C, P012)을 선정하였다.

3. 선발된 유용식물자원에 대한 활성물질의 분리, 구조규명 및 성분화학적 연구

P014(Evodiae Fructus)의 MeOH 추출물로부터 안지오텐신 II 수용체 결합 저해물질, 7종을 순수 분리하여 quinolone계 alkaloid로 그 구조를 밝혔으며, 051

(Peucedani Radix)의 CHCl_3 추출물로부터 동맥혈관의 이완 작용을 갖는 물질 1종 ($\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_7$, Mw 387), 과 4종의 furanocoumarin을 분리하여 그 구조를 밝혔다.

또한, 식물자원 P009의 CHCl_3 추출물로부터 강력한 흉부대동맥 혈관 수축작용이 있는 1종의 물질($\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_6$, Mw 260)을 분리하여 그 구조를 밝혔다.

4. 효능과 작용 기작을 조사하여 새로운 유용자원으로서의 이용성 개발

3종의 식물자원 (Evodiae Fructus, Peucedani Radix, P009)을 발굴하여 그 효능과 유용물질을 규명하였다.

① P014 (Evodiae fructus)의 효능 및 유용성분

선정된 자원 P014의 MeOH 추출물로부터 안지오텐신 II 수용체 결합 저해활성과 토끼의 적출 흉부 대동맥 혈관의 안지오텐신 II에 대한 수축작용에 효과적으로 길항하여 혈관을 이완시키는 7종의 유용물질을 분리하고 그 구조를 밝혔다. 이들 물질들은 rat의 간으로부터 분리한 안지오텐신 II 수용체에 대하여 30-50 μM 의 결합 저해활성을 보였으며, 안지오텐신 II 길항제로 분리된 evocarpine ($3.3 \times 10^{-7} - 3.3 \times 10^{-6}\text{M}$)은 안지오텐신 II에 의해 유발된 토끼의 흉부 대동맥의 혈관 수축을 농도 의존적으로 저해하여 혈관을 이완 시켰다.

또한 angiotensin II의 CRC (concentration-response curve)를 우측으로 이동시켰으며, 최대 수축력도 3.3×10^{-7} , 1×10^{-7} , $3.3 \times 10^{-6}\text{M}$ 농도에서 각각 51, 65, 95% 감소시켰으며, 이 물질 ($3.3 \times 10^{-7} - 1 \times 10^{-6}\text{M}$) 자체는 혈관 평활근에 대한 영향이 관찰되지 않았으며, phenylephrine ($3 \times 10^{-6}\text{M}$)으로 유발된 수축에도 영향(이완작용이나 수축작용)이 없었다.

② 식물자원 051 (Peucedani Radix)의 효능 및 유용성분

선정된 식물자원 051의 CHCl_3 추출물로부터 SD rat의 흉부 대동맥 혈관을 이완시키는 물질을 분리하여 그 구조를 밝히고 작용기전을 조사하였다.

이 물질은 구조분석에 의해 coumarin계 물질인 (+)-cis-4'-acetyl-3'-angeloyl-khelactone ($\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_7$, Mw 386)으로 결정했으며, 혈관내피 유래 NO-guanylyl

cyclase pathway와 Ca^{2+} channel blockade를 통하여 혈관이완 작용을 보이는 것으로 판명됐다.

Nitric oxide(NO) synthase inhibitor인 L-N^G-nitro-arginine와 guanylyl cyclase inhibitor인 methylene blue는 이 물질의 이완작용을 내피를 제거한 혈관과 같은 수준으로 억제하는 것으로 보아 이완작용에는 NO와 guanylyl cyclase가 어느 정도 관여하는 것으로 생각된다. 반면에 cyclooxygenase inhibitor인 indomethacin은 O15C-1의 이완작용에 영향이 없었다.

이 물질의 이완작용에 특이한 수용체가 관련하는지를 밝히기 위하여 atropine (muscarinic receptor antagonist), triprolidine (histamine H₁ receptor antagonist) 및 propranolol (β -adrenoceptor antagonist)의 영향을 관찰하였으나 이 물질의 이완작용은 영향을 받지 않았다. 이 결과로 보아 이완작용은 이들 수용체를 매개하여 나타나는 것은 아닌 것으로 판단된다.

③ 식물자원 P009 효능 및 유용성분

식물자원 P009의 CHCl₃ 추출물로부터 강력한 혈관수축 작용을 보이는 물질 P009를 분리하여 그 구조와 혈관수축 작용기작을 조사했다

이 물질은 구조분석에 의해 naphthoquinone계 물질로 분자량 260으로 C₁₄H₁₂O₆의 분자식을 갖는 물질로 그 구조를 밝혔으며, 혈관 평활근에서 phenylephrine의 수축작용을 증가시키며, soluble guanylate cyclase를 활성화시키는 이완제들의 혈관 이완작용에 효과적으로 길항하고, LPS에 의한 phenylephrine에 대한 혈관 반응성 감소를 회복시키는 것으로 확인되었다.

V. 연구개발결과의 활용계획

Evodiae Fructus와 Peucedani Radix은 한방과 민간에서 사용되는 생약자원으로 독성면에서 안전한 자원으로 *in vivo animal model*에서의 그 효능을 입증한 후 식품의약 (nutraceutical)의로의 개발을 추진할 계획이다.

또한, 식물자원 P009의 강력한 동맥혈관 수축작용, LPS에 의해 초래된 phenylephrine에 대한 혈관 반응성의 감소의 원상회복 효능, endotoxin에 의한 *in vivo* sepsis animal model에 있어서 사망률의 저하 등의 결과로부터 P009의 shock, 폐혈증 치료제로의 가능성을 모색하고자 한다.

SUMMARY

I. Title

Development of useful resources for cardiovascular disease from indigenous plants

II. Objectives and Importance of Research

Plant-derived natural products have long been and will continue to be extremely important as sources of medicinal agents. However, despite these many important past contributions from the plant kingdom, a great many plant species have never been described and remain unknown, and relatively few have been surveyed systematically to any extent for biologically active chemical constituents. Thus, it is reasonable to expect that new plant sources of valuable and pharmaceutically interesting materials remain to be discovered and developed. Regrettably, if the current trends of destruction of genetic resources continue at their present rate, many opportunities of successful drug development will almost be lost. It is therefore imperative that endangered, fragile, and over-exploited genetic resources be preserved to the greatest extent possible for future generations

From these backgrounds and importance, in this project We would like to discover new useful resources from indigenous higher plants. During three years of the second period investigation, we have tried to screen, purify, and identify active compounds which inhibit the angiotensin II receptor binding and modulate the vasorelaxation/vasocontraction of isolated thoracic aorta

III. Scope and Content of Research

1. Preparations of herbal extract library

The MeOH extracts of about one hundred of medicinal herbs were prepared and fractionated with CHCl_3 , BuOH, H_2O . Test samples were prepared in the concentration of 10 mg/ml (DMSO or MeOH)

2. Screening of angiotensin II antagonist from medicinal herbs

Using angiotensin II receptor binding assay, angiotensin II antagonists would be purified by plant extracts and the chemical structures of antagonists would like to be determined.

3. Screening of active compounds acting vascular smooth muscle relaxation or contraction

The vasorelaxants or contractants from plant extract were screened using thoracic aorta of rat or rabbit, and then the action mechanisms were investigated by using pharmacological tools

IV. Results and Applications of Results

The following results could be obtained the investigation of this research project.

1. The MeOH extract of about one hundred of medicinal herbs was screened by angiotensin II binding method and plant sample No. P014 (*Evodiae Fructus*) and P008 (*Alismatis Rhizoma*) were selected.

2. Seven quinolone alkaloids were isolated from the fruit of *Evodiae rutaecarpa* as angiotensin II antagonists and showed IC_{50} s of 30~40 μM . Evocarpine (3.3×10^{-7} - $3.3 \times 10^{-6}\text{M}$), one of the active compounds, inhibited contractile responses to angiotensin II in rabbit thoracic aorta and reduced

the maximal contractile response to angiotensin II by 50~95%

3. The effects of the MeOH extract of about one hundred of medicinal herbs was screened on vascular smooth muscle contractility. the MeOH extracts of six medicinal herbs (P004, P011, 051, 108C, 102H, 098C) showed vasolelaxing effect and the MeOH extracts of three medicinal herbs(P009C, 091C, P012) had vasocontracting effect.

4. The vasorelaxing compound, 051 was isolated from CHCl_3 extract of *Peucedanum japonicum*. It was elucidated as (+)-*cis*-4'-acetyl-3'-angeloyl-khelactone ($\text{C}_{21}\text{H}_{22}\text{O}_7$, Mw 386) on the basis of physico-chemical and spectroscopic methods. This compound (10^{-6} - 10^{-4}M) concentration-dependently relaxed the isolated rat thoracic aorta precontracted with phenylephrine (PE). This vasorelaxant potency was diminished by endothelial removal (by 20%). Pretreatments of L- N^{G} -nitro arginine and methylene blue (MB) attenuated the vasorelaxing effect of 051. But indomethacin did not affect the vasorelaxant potency. These indicate that the vasorelaxant effect of this compound was partially endothelium dependent and mediated by nitric oxide and cyclic GMP pathway.

To determine if it's effect was mediated through the activation of some of the receptor known to lead to vascular relaxation. Vasorelaxation was not affected by atropine, triprolidine and propranolol.

It inhibited high potassium (80 mM)-induced, calcium-dependent contraction in a concentration-dependent manner. But compound 051 slightly relaxed the rat aorta precontracted with PE in the presence of nifedipine, a blocker of voltage-operated calcium channels. TEA (a nonspecific K^+ channel blocker) did not affect the vasodilatory effect of this compound against PE-induced contraction.

Mechanisms of its vasorelaxant effect were multiple, including endothelium dependence and Ca^{2+} channel blockade.

5. P009 was isolated from chloroform extract of plant No. P009 (Polygonaceae) as inhibitory compound of vascular smooth muscle relaxation. It was elucidated as $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{O}_6$ (Mw 260), one of naphthoquinones on the basis of physico-chemical and spectroscopic methods.

In this study, we examined the ability of P009 to antagonize vascular smooth muscle relaxation elicited by a number of vasodilators, and to recover the hyporeactivity to phenylephrine caused by lipopolysaccharide in rings of rat aorta. In rings with endothelium, P009 (60 -200 nM) did not significantly alter the basal tone of aorta smooth muscle. Contraction elicited by phenylephrine (3.0 μM) were significantly potentiated by P009.

P009 (0.06-2.0 μM) dose-dependently inhibited relaxant responses to acetylcholine (Ach), calimycin and adenosine triphosphate (ATP) in endothelium-intact aorta rings. P009 reduced significantly the maximal responses of Ach, calimycin and ATP. P009 (at higher concentration, 2.0 μM) also inhibited relaxant responses to sodium nitroprusside (SNP) in endothelium-denuded preparations, whereas the maximal responses of SNP was not affected. P009 did not inhibited relaxant responses to artiopeptin III and papaverine in endothelium-denuded preparations.

Incubation of rat aorta with LPS (600 mg/mL) for 1 hr caused a right shift of the concentration-response curve to phenylephrine. Coincubation of vessels with LPS and P009(2.0 μM) restored significantly the contractile response to phenylephrine.

The results of this study show that P009 antagonize those vasodilators which are thought to act via stimulation of soluble guanylate cyclase. The

nonsurmountable inhibition of relaxation to Ach, climycin and ATP probably reflects a limited maximal capacity of the endothelium to release EDRF in response to P009. The results also suggest that the effects of P009 are probably mediated by NO production.

여 백

CONTENTS

Chapter 1. INTRODUCTION-----	19
Chapter 2. STATE of DOMESTIC and FOREIGN ART-----	25
Chapter 3. SCOPE AND METHODS OF RESEARCH-----	29
1. Materials and Methods-----	29
1-1. Preparation of medicinal herbs	
1-2. materials	
1-3. Isolation and structure determination of bioactive compounds	
2. Biological activity-----	30
2-1. angiotensin II receptor binding assay-----	30
2-2. Testing for effects on isolate thoracic aorta-----	32
3. Results-----	34
3-1. Screening of angiotensin II antagonists from medicinal herbs-----	34
3-2. angiotensin II antagonists from the fruit of <i>Evodiae rutaecarpa</i> -----	35
3-3. Vasolelaxant from the root of <i>Peucedanum japonicum</i> -----	43
Chapter 4. ACCOMPLISHMENT and CONTRIBUTION-----	57
Chapter 5. FUTURE APPLICATIONS-----	59
Chapter 6. REFERENCES-----	61
Chapter 7. REPORT OF SUB-RESAERCH PROGECT-----	65

여 백

목 차

제 1 장 서론-----	19
제 2 장 국내외 기술개발 현황-----	25
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과-----	29
제 1 절 실험재료 및 방법-----	29
1-1. 검색용 시료의 조제	
1-2. 사용 시약 및 기기	
1-3. 물질의 분리 정제 및 구조분석	
제 2 절 생물활성-----	30
2-1. 안지오텐신 II 수용체 결합 저해제 검색-----	30
2-2. 적출장기에 대한 약물의 수축·이완 작용 검색-----	32
제 3 절 실험 결과-----	34
3-1. 안지오텐신 II 수용체 결합 저해활성 유용 식물자원의 선발-----	34
3-2. 오수유 (<i>Evodiae Fructus</i>)의 안지오텐신 II 수용체 결합저해제-----	35
3-3. 혈관의 수축·이완에 작용하는 유용자원의 검색-----	43
3-4. 식방풍 (<i>Peucedanum japonicum</i>)의 동맥혈관 이완작용 물질-----	44
제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도-----	57
제 5 장 연구개발결과의 활용계획-----	59
제 6 장 참고문헌-----	61
제 7 장 위탁연구과제-----	65
제 목 : 국내 유용식물자원의 심혈관계 효능검색	

여 백

제 1 장 서 론

현재 고등식물자원에 대한 생리활성탐색의 대상은 항암제가 대부분 차지하고 있으며, 그 외에 항산화제, 항균제, 항염증제, 진통제 등에 대한 연구가 주종을 이루고 있다. 그러나, 현재 전 세계적으로 심혈관계질환이 성인 사망의 주된 원인 중의 하나이며, 국내의 경우 생활 수준의 향상으로 심혈관계의 질환이 증가하고 있는 실정을 감안 할 때 국내 고등식물자원으로부터 심혈관계 질환을 개선할 수 있는 유용자원의 탐색 및 유용물질의 분리를 통하여 새로운 자원의 개발, 보존함으로써 생물다양성관련 국제보호체제에 대처하고 자원의 유용성을 밝힘으로써 경제적 가치를 부여하고 고부가가치의 생리활성 물질의 창출이 가능하다고 사료된다.

우리나라의 경우 고혈압의 유병율은 성인에서 15~20% 정도로 추정되고 있으며 40대 이후 중년층 이상에서 가장 많이 발생하고 있는 뇌출혈, 심장병, 신장병 등의 합병증으로 인한 높은 사망율을 초래하여 큰 문제로 나타나고 있다. 이들 질환의 증가는 삶의 질적 향상을 저해하고 있으며 이들 질환의 효과적인 치료가 요구되고 있다. 이를 위해서 전 세계적으로 선진 제약회사에서는 심장순환계질환의 치료제의 개발에 박차를 가하고 있다. 세계 의약품시장에서 볼 때 다른 약물에 비하여 심장순환계질환 치료제가 차지하는 비중이 크며 빠른 성장이 예측되고 있다. 특히, 질환별 분석을 보면 고혈압 치료제가 가장 큰 시장을 형성하여 90년도 72억불, 2천년에는 5백억불로 성장이 기대되고 있다.

최근 순환계 질환이 날로 증가함으로 인해 혈액순환 조절기전에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 혈관을 이완시키는 다양한 인자들과 그들간의 상관성에 대한 연구에 많은 진전이 이루어졌다. 여러 인자들 중에서 cyclic guanosine 3,5-monophosphate (cyclic-GMP)는 질소 혈관이완제, 내피의존성 혈관이완제 및 동맥 나트륨이뇨성 펩타이드에 의해 유발되는 혈관 평활근 이완에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다.

혈관 내피는 동맥 평활근의 반응에 중요한 역할을 한다. 내피-의존성 기전은 많

은 혈관 이완제들의 작용을 포함하고 있다. 이들 이완제들은 대부분 그들의 수용체를 통하여 내피에 작용함으로써 내피-유래 이완인자(EDRF)나 prostacyclin을 분비시키고, 분비된 이 물질들은 각각 guanylyl cyclase나 adenylyl cyclase의 활성화를 통해 혈관 평활근(VSM, vascular smooth muscle) 장력에 대한 억제효과를 나타낸다.

Furchgott 등 과 Palmer 등은 NO (nitric oxide)를 내피에서 분비되는 이완인자로 보고하였으며, 그 후로 NO의 혈관이완 작용 외의 다양한 생리활성에 관한 연구가 많이 보고되고 있다. NO를 경유한 혈관 이완기전은 세포내 Ca^{2+} 의 유입을 증가시키는 물질- acetylcholine, bradykinin, electrical current 또는 shear force 등에 의해 세포내 Ca^{2+} 의 유입이 증가되면 내피에 있는 NO 합성효소(NO synthase, NOS)가 활성화되어 NO가 합성·분비된다. 합성된 NO는 인접한 평활근 세포로 쉽게 확산되어 soluble guanylate cyclase(sGC)를 활성화시켜 cyclic GMP를 증가시킴으로써 결국 단백질의 인산화 반응이 촉진되어 평활근 이완이 일어난다. Sodium nitroprusside나 nitroglycerin과 같은 nitro-vasodilators는 내피 NO 생성효소를 경유하지 않고 약물 자체가 대사되면서 NO를 생성하여 평활근의 guanylate cyclase를 활성화시킴으로써 이완작용을 나타낸다.

한편, 혈관 이완작용에 중요한 역할을 하는 NO의 생성이 저하되면 과도한 혈관 수축이 일어나게 되어 허혈로 인한 장기의 기능장애 즉 허혈성 심질환 등을 초래할 수 있으며, 고혈압 및 동맥경화의 병리기전에도 관여한다. 이와는 반대로 NO의 과도한 생성은 과도한 혈관 이완으로 인한 순환계 쇼크 및 패혈증에 관여한다.

패혈증은 그람음성 endotoxemia 및 그람양성 세균감염과 관련된 말초순환 혈류 저류에 기인하는 것으로 최근 산업발달과 더불어 증가하고 있다. 패혈증 치료제의 첫 번째 대상은 그람음성균의 바깥 세포막을 형성하고 있는 lipopolysaccharide (LPS)로서 1980년 중반에 LPS의 주요성분인 lipid A에 대한 항체가 개발되어 치료에 사용되고 있으나 치료에 한계가 있는 것으로 나타났다. 최근에는 패혈증의 초기 이후에 관여하는 nitric oxide(NO)에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. Bacterial endotoxin은 혈관평활근, 혈관내피, macrophage 등에 널리 존재하는

nitric oxide synthase(NOS)를 활성화시켜 다량의 NO를 생성하고, 생성된 NO는 guanylate cyclase(GC)를 활성화하여 혈관 평활근을 이완한다. 따라서 최근에 NO의 여러 가지의 중요한 생리적·병리적 기능이 밝혀짐으로 인해 심혈관계 질환에서 패혈성 쇼크에 이르기 까지 다양한 치료목적으로 NO량을 조절하는 약물개발에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

또 한편, 대부분의 심장순환기계 질환이 방치된 고혈압증상에서 비롯되는 경우가 많고, 고혈압은 치명적이기는 하나 자각증상이 적기 때문에 약물의 장기간 투여에 따른 부작용을 줄이고 경구투여가 가능한 것으로 기존의 의약품으로는 치료되지 않는 종류의 고혈압의 개선을 위한 새로운 고혈압 치료제의 개발이 요구되고 있다. 심장순환계질환에서 고혈압을 일으키는 작용기전은 여러 가지가 알려져 있고 따라서 고혈압을 치료하는 방법으로서 이러한 발병기작에 근거한 새로운 약물의 연구가 진행되고 있다.

사람의 혈압의 조절과 electrolyte/fluid 항상성에 중요한 역할을 하고 있는 system중의 하나가 renin-angiotensin system (RAS)이다. captopril과 enalapril과 같은 ACE 저해제가 고혈압과 울혈성 심부전의 치료에 임상적, 상업적으로 큰 성공을 거둠에 따라 RAS cascade를 조절함으로써 새로운 효능을 갖는 약물탐색의 방향을 제시했다. 이렇듯 ACE 저해제가 큰 성공을 거두었음에도 불구하고 ACE 저해제는 비특이적 protease로서 bradykinin, substance P와 enkephalin같은 다른 peptide를 분해한다. ACE 투여시 5-10 %의 환자에서 나타나는 마른 기침의 부작용과 드물게 혈관부종 (angioedema)도 ACE의 특이성의 부족의 결과로 부작용이 나타나며, 이들 부작용은 bradykinin 작용의 증대에 기인되는 것으로 생각되고 있다. 또한, RAS에 관련된 새로운 효소저해제의 탐색으로서 renin 저해제의 탐색이 활발하게 이루어 졌으나 경구투여시 낮은 생체이용율, 빠른 담즙 배설과 대부분의 renin 저해제의 구조상 복잡성등으로 인해 약물로의 개발이 방해를 받고 있다. 이와 같이 renin과 ACE 저해제는 그 치료효과에 있어 한계점을 안고 있어 작용기전이 명확하고 부작용이 없는 새로운 고혈압 치료제의 개발이 요구된다.

특히 RAS의 마지막 과정을 저해하는 ang II 수용체의 길항제가 이 system을

매우 특이적으로 차단하여 ACE에도 영향을 주지 않기 때문에 ang II blocker에 의한 치료시 bradykinin 작용의 증가에 의한 부작용도 줄일 수 있어 이에 대한 개발이 진행되어 Merck에서 개발한 Losartan (Cozaar)을 선두로 Novatis의 Valsartan (Diovan, Tareg, Nisis), Bristol-Myers의 Irbesartan (Aprovel)등 5종의 안지오텐신 II 길항제가 상품화에 성공하였다.

Ang II 수용체에 관한 연구는 방사선 동위원소나 특이성이 높은 peptide성 및 비peptide성 Ang II 수용체 길항물질을 사용한 실험에 의해 Ang II 수용체는 적어도 기능적으로 다른 subtype이 존재하며, 조직에 따라 그것의 분포가 다르다는 것이 명확하게 되었다. AT₁ 수용체의 angiotensin에 대한 친화성은 Ang II > Ang III > Ang I의 순으로 비peptide성 길항제인 DuP 753과 특이적으로 결합하며 SH 화합물인 dithiothreitol (DTT)에 의해 불화성화 되는것으로 알려졌으며, AT₂ 수용체의 경우 angiotensin에 대한 친화성은 AIII > AII > AI의 순으로 이 type은 peptide성 길항제인 CGP-42112A나 비peptide성의 PD123177, PD123319와 특이적으로 결합하며, DTT에 의해 불화성화되지 않는 것으로 알려졌다.

수용체 subtype의 생체내 분포를 보면, 혈관 평활근에는 AT₁ 수용체만 존재하여 혈관수축을 일으키며, 그외에 AT₁ 수용체는 뇌, 간, 신장, 부신피질, 폐, 비장등에 존재하는 반면 AT₂ 수용체는 혈관 평활근에는 존재하지 않으며 뇌, 부신피질, 자궁, 난소등에 존재한다. 또 rat를 사용한 실험에서는 AT₂ 수용체는 성장과 함께 그의 발현량이 큰 변동을 나타내서 뇌, 피부, 근육등에서는 어린 rat에서의 발현량이 크고, 성숙함에 따라 발현이 감소하여 Ang II 수용체의 subtype의 생체내 분포의 변동이 발생과정과 밀접하게 관련되어 있을 가능성이 지적되고 있다.

AT₁ 수용체는 G-protein을 매개하여 adenylate cyclase 활성 억제에 의한 세포내 cAMP의 양을 감소시키며, 세포막의 phospholipase C를 활성화 하여 생성된 IP₃에 의한 세포내 유리 칼슘의 농도를 상승시켜 세포내 정보를 전달하는 것으로 알려져 있다. AT₂ 수용체는 최근 클로닝되어 AT₁ 수용체와 32-34 %의 homology를 갖고 있는 것으로 밝혀졌으며, 이 수용체 또한 AT₁과는 다른 G-protein을 매개하

여 활성화되는 것으로 알려져 있으나 IP₃, diacylglycerol, 세포내 칼슘농도, cAMP, 세포내 인산화등의 변동은 특별히 인지되지 않고 최근들어 cGMP 양의 감소가 관여되는 것으로 보고되었으나 현재까지 상세한 것은 불명이다.

본 연구에서는 국내 자생 고등식물의 추출물 및 분리한 유용물질들의 혈관에 대한 작용을 관찰하고, 수종의 약물들과의 상호작용을 검색함으로써 그 작용 기전을 밝히고자 한다. 또한, Ang II 수용체 길항제를 탐색할 수있는 검색계를 구축하고 전통 생약자원을 포함한 천연물로부터 수용체 결합저해활성 물질의 탐색을 시도했다.

여 백

제 2 장 국내외 기술개발 현황

인류역사가 시작된 이래 천연물은 인간의 질병치료에 사용되어 왔으며 오늘날 질병치료에 사용되는 의약품 중 약 50% 이상이 천연물로부터 유래된 것이며 그중 약 25% 이상이 고등식물로부터 유래된 것이다. 지난 200년 동안 민간약이나 전승 토착약물로 사용되어 오던 고등식물로부터 많은 생리활성물질이 분리되어 그 구조가 밝혀졌고 이들이 새로운 의약품으로 개발되는 등 천연자원에 대한 인식이 높아지고 있다.

몇 가지 예를 열거하면, 남미 원주민들에 의해 화살독으로 사용해 오던 민간약인 *Strychnos toxifera*에서 분리된 curare alkaloid인 tubocurarine는 근 이완제로, 아프리카산 고등식물인 *Strophanthus species*에서 분리된 강심배당체인 ouabain(G-strophanthin)은 심부전의 치료제로, *Physostigma benenosum* 유래의 physostigmine은 녹내장과 근무력증의 치료에 사용되어 오고있다. 그 이외에 *Digitalis species* 유래의 강심배당체인 digoxine과 digitoxine, cinchona alkaloid인 quinine과 quinidine, *Papaver somniferum* 유래의 opium alkaloid인 codein과 morphine, tropane alkaloid 계열의 물질인 atropine, hyoscyamine, scopolamine등이 현재 임상적으로 사용되고 있다. 또한 동인도의 민간약인 *Rauwolfia serpentina*의 뿌리에서 분리된 reserpine이 고혈압 치료제로 개발되어 사용되고 있으며 일일초 *Cathranthus roseus*에서 분리된 vinblastine과 vincristine은 급성 백혈병의 치료제로 개발되었고 주목, *Taxus brevifolia* 유래의 taxol은 난소암 치료제로 1993년 승인되었으며, *Artemisia annua*에서 분리된 artemisin은 새로운 말라리아 치료제로 승인되었다.

현재 개발이 진행중인 의약품 중 고등식물유래의 의약품을 살펴보면 대부분을 항암제가 차지하고 있다. taxane계의 diterpenoid인 taxol의 유도체인 docetaxel, *Podophyllum peltatum*유래의 podophyllotoxin의 유도체인 etoposide, NK-611, camptothecin유도체인 topotecan, irinotecan등이 항암제로 개발되어 임상시험 중에

있다. 근이완제인 atracurium besylate는 천연유래의 curare alkaloid로부터 새롭게 합성되었으며 합성 Δ^9 -tetrahydrocannabinol과 그 유도체인 nabilone은 항암제 투여시 부작용으로 나타나는 오심(메스꺼움)의 치료제로 승인되었다. 또한 동인도의 전통약물인 *Coleus forskohlii*의 뿌리에서 분리된 labdane diterpene계 물질인 forskolin은 고혈압치료제, 강심제로 개발되고 있으며 간장보호제로 개발된 gomisin A와 silybin이 임상중에 있으며 마늘과 양파 유래의 황함유 화합물이 심장순환계 질환 치료제로, ellagic acid, β -carotene과 vitamin E가 항돌연변이 효과와 암 예방 효능을 갖는 물질로 개발되고 있다.

전체 의약품시장에서 고등식물 유래 의약품이 차지하는 비중이 크게 높아지고 있으며 미국내의 통계에 의하면 1980년에 고등식물 유래 의약품이 약 10억불의 판매고를 보여주고 있다. 그러나 실제로 고등식물 유래의 세계 의약품 시장을 평가하는 것에 어려움이 있으나 반합성이나 전합성에 의해 조제된 것까지 포함한다면 그 시장 규모는 엄청나게 커질 것으로 사료된다.

국내의 경우 1960년 후반부터 기기분석적 data를 통하여 화합물을 동정하기 시작하여 1962년 신나무 (*Acer ginnala*)의 잎에서 우리나라 최초의 신물질인 polygagallicin이 분리 보고된 후 분리정제용 기기와 분석기기의 도입으로 국내 고등식물 자원에 대한 본격적인 연구가 이루어 졌다. 그동안 국내 연구자에 의해 성분연구가 진행된 고등식물자원은 54과 98속 133종으로 우리나라 총 약용식물 중 15% 정도에 불과하다. 1988년부터 1992년까지 4년 간 약 500여종의 성분이 분리되었으며 그중 100여종의 신물질이 국내 고등식물 자원으로부터 보고되었다.

주로 연구된 대상 고등식물 자원은 인삼, *Acanthopanax*속, *Kalopanax*속, 대극과의 *Euphorbia*속, 산형과의 *Angelica*속 들로서 전통 천연약물과 이들의 근연식물이 연구대상이 되어왔으며, 분리된 물질을 group별로 나누어 보면 alkaloid, coumarin, flavonoid, saponin이 대부분을 차지하고 있다. 1980년 후반 물질특허의 도입으로 신의약품의 개발의 필요성이 요구되면서 다양한 생물학적 시험법을 통하여 고등식물 자원으로부터 새로운 의약품의 개발이 추진되고 있으나 아직 실질적인 효과는

얻지 못하고 있는 실정으로 이에 대한 체계적인 연구가 필요하다. 고등식물자원의 성분 및 활성연구는 다른 타 학문에 비해 연구자의 수가 부족하며 각 대학의 약학대학과 일부 화학과, 농대등에서 이루어지고 있으며 연구기관으로는 생명공학연구소와 화학연구소의 일부 팀이 참여하고 있는 실정이다. 아직 연구가 되지 않은 많은 국내 고등식물 자원에 대한 유용성을 탐색하고 보존하는데는 많은 전문화된 연구 인력과 연구투자가 절실하게 요청된다

천연물에 대한 가장 체계적인 연구는 미국의 국립암연구소에 의해 1960년부터 1986년까지 25년 간 이루어진 고등식물자원에 대한 항암제 탐색 프로그램으로 약 35,00여종의 고등식물을 대상으로 세포독성과 항종양 활성을 대상으로 연구를 진행시켜 taxol과 camptothecin같은 항암제를 개발하는 성과를 거두었지만 막대한 비용, 인력과 시간투자 그리고 항암활성이외의 다른 생리활성에 대해서는 연구가 이루어지지 못한 점등은 문제점으로 지적될 수 있다.

고등식물자원에 대한 생리활성탐색의 대상은 항암제가 대부분 차지하고 있으며, 그 외에 항산화제, 항균제, 항염증제, 진통제 등에 대한 연구가 주종을 이루고 있다. 현재 전세계적으로 심혈관계질환이 성인 사망의 주된 원인 중의 하나이며 국내의 경우 생활 수준의 향상으로 심혈관계의 질환이 증가하고 있는 실정을 감안할 때 국내 고등식물자원으로부터 심혈관계 질환을 개선할 수 있는 자원의 탐색 및 유용물질의 분리를 통하여 새로운 자원의 개발, 보존함으로써 생물다양성관련 국제보호체제에 대처하고 자원의 유용성을 밝힘으로써 경제적 가치를 부여하고 고부가가치의 생리활성 물질의 창출이 가능하다고 사료된다.

여 백

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 실험재료 및 방법

1-1. 검색용 시료의 조제

기존 한의서와 문헌을 통하여 심장순환계 질환의 치료효과가 기대되는 생약을 1차적으로 선별한 후 시중 건재상 또는 소백산, 모약산, 두륜산 등에서 직접 채취·음건하여 사용하였다. 건조한 시료 50g을 MeOH (250ml)로 실온에서 3일간 추출한 후 40℃ 이하에서 감압·농축하여 10 mg/ml이 되도록 DMSO또는 MeOH에 녹여 stock solution을 만들어 1차 검색 시액으로 사용했다. 1차 활성검색 결과, 강한 활성을 보여주는 시료에 대해서는 CHCl₃과 BuOH을 사용한 용매분획을 행하여 2차 탐색을 행하였다.

1-2. 사용 시약 및 기기

박층크로마토그래피는 pre-coated TLC plate silica gel 60F₂₅₄ (Merck, Art. 5554)와 RP-18F_{254s} (Merck)를 사용하여 실시하였고, 컬럼크로마토그래피용 담체로는 Kieselgel 60 (70-230 mesh, Merck), YMC-gel (ODS-A, 60-230 mesh), Sephadex LH-20 (Pharmacia)을 사용하였다.

Ang II 수용체 결합시험시 사용되는 기질로는 [³H]-angiotensin II (NEN, NET-446)을, 표준물질로서 angiotensin II (Sigma, A-8776), saralasin (Sigma, A-2275), [Sar¹-Ile⁸]-Ang II 과 DuPont/Merk Pharma. Co.로부터 공급받은 DuP 753 (Losartan)을 사용했다. protease inhibitor로서는 aprotinin (Sigma, A-4328), leupeptin (Sigma, L-2884), pepstatin A (Sigma, P-4265), benzamidin (Sigma, B-6506) 및 PMSF (Sigma, F-7626)을 사용하였다. scintillation counter로는 Beckman LS-6800 Analyzer를 이용하여 radioactivity를 측정하였다.

혈관의 수축·이완 시험시 사용되는 phenylephrine (PE)·HCl, acetylcholine·

HCl, calimycin, ATP, atriopeptin III, SNP, papaverine 및 DMSO는 Sigma Chemical에서 구입하였다. PE는 0.1% ascorbic acid를 함유한 0.9% 생리식염수에 녹여 냉동 보관하여 사용할 때마다 Krebs 용액으로 희석하였다.

사용된 실험동물은 중량 200~250g인 male Sprague-Dawley (SD) rat를 생명공학연구소의 유전자원센터로부터 분양 받아 사용하였다.

1-3. 물질의 분리 정제 및 구조분석

활성 검색에 의해 선정된 후보 생약자원의 MeOH 추출물에 대한 pH 안정성, 용매 추출성, resin의 흡착성 등을 조사하였다. 얻어진 정보에 따라 분리정제 scheme을 정하고 Diaion-HP, SiO_2 , Sephadex LH-20, ion exchange column chromatography와 HPLC 등의 chromatographic technique을 이용하여 활성물질을 분리하고 mp, 비선광도, R_f value, 발색반응 등의 이화학적 성질과 UV, IR, MS, NMR등의 기기분석 방법을 통하여 구조를 동정한다
구조분석을 위한 NMR 분석은 Varian Unity 300 spectrometer, FAB-MS는 Kratos Concept-1S, EI-MS는 Hewlett-Packard MS Engine 5989A mass spectrometer를 사용하여 측정하였다.

제 2 절 생물활성 측정

2-1. 안지오텐신 II 수용체 결합 저해제 검색

2-1-1. 시약 및 실험동물

Ang II 수용체 결합시험시 사용되는 기질로는 [3H]-angiotensin II (NEN, NET-446)을, 표준물질로서 angiotensin II (Sigma, A-8776), saralasin (Sigma, A-2275), [Sar¹-Ile⁸]-Ang II, AT₁에 선택적인 길항제로서 DuP 753 (Losartan)을 사용했다. protease inhibitor로서는 aprotinin (Sigma, A-4328), leupeptin (Sigma, L-2884), pepstatin A (Sigma, P-4265), benzamidin (Sigma, B-6506) 및 PMSF (Sigma, P-7626)을 사용하였으며 scintillation counter를 이용하여 radioactivity를

측정하였다.

2-1-2. 완충용액의 조제

angiotensin II receptor의 분리를 위해 10 mM HEPES, pH 7.4, 및 protease inhibitors (10 µg/ml of aprotinin, leupeptin, pepstatin, 16 µg/ml of bezamidine, 1 mM PMSF)등으로 구성된 buffer A를 사용하였고, 수용체 결합 측정에 사용한 assay buffer로는 10 mM MgCl₂와 0.25 % BSA를 함유하는 10 mM HEPES, pH 7.4 를 사용하였다.

2-1-3. angiotensin II 수용체의 분리 와 수용체 결합시험법

Ang II 수용체의 분리는 Sprague-Dawley (SD) rat 로부터 Dudley의 방법을 기초로 약간 수정하여 분리하였다. SD rat에 20% urethane을 약 1.5~2 ml 복강내 주사하여 마취시키고 절개한 후 식염수로 관류하여 간을 적출하였으며 이하의 모든 조작은 4°C에서 실시 하였다.

적출한 간을 buffer A로 세척하고 약 10 g을 30 ml의 buffer A에 넣어 homogenizer로 분쇄한 후 3,000×g에서 10분간 원심분리하여 일차적으로 침전물을 제거하였다. 상등액을 합하여 다시 10,000×g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취한 후 이것을 100,000 × g에서 30분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 생긴 침전물을 cold buffer로 세척하여 100,000 × g에서 30분간 원심분리 하였다. 최종적으로 얻은 침전물을 assay buffer에 균질화 시키고 1.5 ml 씩 나누어 -70°C의 냉동고에 보관하였으며 필요시 단백질의 농도가 0.5~1 mg/ml로 되게 침전물을 assay buffer에 현탁시켰다

수용체 결합시험은 assay buffer를 사용하여 glass tube에서 최종 부피가 0.5 ml 로 되게 실시하였다. total binding에는 기질로 2 nM [³H] -Ang II를, non-specific binding (비특이적 결합)에는 2 nM [³H] -Ang II와 1 µM의 cold-Ang II가 포함되게 하고 수용체 분획 (30~50 µg protein)과 생약시료 (10 µl)을 첨가한 후 25°C에서 50 분간 shaking water bath상에서 반응시켰다. cold assay buffer 3 ml를 가하여 반응을 종결시킨 후 여지(GF/C glass fiber filter, Whatman)로 여과하여 liquid

scintillation counter로 radioactivity를 측정하였으며 시료에 의한 Ang II 수용체 결합 저해율은 다음 식에 의해 산출하였다. 저해율은 2회 측정한 평균치로 나타내었다.

$$\% \text{ of inhibition} = (Sc - Ss) / Sc \times 100 = [(Tc - Nc) - (Ts - Ns)] / Tc - Nc \times 100$$

Sc = specific binding of control, Ss = specific binding of sample,

Tc = total binding of control, Ts = total binding of sample,

Nc = nonspecific binding of control, Ns = nonspecific binding of sample

2-2. 적출장기에 대한 약물의 수축·이완 작용 검색

흰쥐 및 토끼에서 분리한 흉부 대동맥에 대해 일정한 농도의 평활근 수축제를 사용하여 수축을 유발시킨 후 고등식물자원의 추출물 및 분리된 활성물질의 평활근 이완 효과를 검색하였다.

2-2-1. 흉곽 대동맥 ring 절편 조제

200~280g의 Sprague-Dawley 흰쥐의 두부를 강타하여 실험치사 및 1,500g의 토끼의 정맥에 공기를 주입하여 치사시키고, 재빨리 흉곽 대동맥(thoratic aorta)을 적출한 후 산소를 공급한 Krebs solution에서 내피가 손상되지 않도록 주의하며 대동맥에 붙어있는 결합조직을 제거하였다. 4mm 정도의 ring을 만들어 Organ bath에 현수한 후 physiography (Havard Osiloscophy)의 sensor에 연결하였다.

Organ bath에 5 ml Krebs solution을 넣고 95% O₂ / 5% CO₂ 혼합가스를 공급하면서 37 °C를 유지하였다. 장력조절기로 ring의 기본장력을 2g 정도로 부하하고 30분간 안정화시킨 후에 3.3 x 10⁻⁶M phenylephrine (PE)을 가하여 수축을 확인하였다. 새로운 Krebs solution으로 수회 세척 후 30분 정도 더 안정화시켰다. 다시 3.3 x 10⁻⁶M phenylephrine (PE)을 가하여 최대 장력에 도달하였을 때 1.0 x 10⁻⁶M acetylcholine을 가하여 이완반응을 관찰하여 내피의 손상여부를 확인한 후에 계속적으로 실험에 사용하였다.

2-2-2. 적출혈관에 미치는 영향

선정한 자원들의 혈관이완작용의 특성과 효력을 평가하기 위하여 먼저 내피를 제거하지 않은 흉곽 대동맥에 phenylephrine ($3 \times 10^{-6}M$)을 가하였고, 내피를 제거한 흉곽 대동맥에 phenylephrine ($1 \times 10^{-6}M$)을 가하여 최대 수축력의 80%정도로 수축시켰다. 수축반응이 최대치에서 안정화되었을 때(약 10분) 농도-반응곡선을 그리기 위하여 식물자원들의 추출물을 낮은 농도에서 높은 농도로 누적적으로 가하였다. 반응은 physiography (Havard Oscilloscopy)의 기록지에 그렸으며, 검정시료들에 의해 나타나는 억제작용은 이완력의 백분율로 나타냈다.

2-2-3. 내피의 역할에 대한 평가

내피를 제거한 것과 제거하지 않은 혈관에 대한 식물자원들의 혈관 이완작용을 비교함으로써 내피의 관련 여부를 관찰하였다. 내피는 여지 (Watman No. 1)를 이용하여 혈관 내벽을 수회 앞뒤로 슬라이딩하여 제거하였으며, 내피의 기능 손상은 $3 \times 10^{-6}M$ 의 acetylcholine을 가하여 이완력의 손상으로 확인하였다.

PE로 유발한 수축에 대한 물질들의 이완작용 기전을 밝히고자 nitric oxide (NO) synthase inhibitor인 L-N^G-nitro arginine, guanylyl cyclase inhibitor인 methylene blue 및 cyclooxygenase inhibitor인 indomethacin을 전처리한 후에 물질들의 이완작용을 관찰하였다.

2-2-4. 혈관 이완작용을 나타내는 식물자원들의 약리학적 기전 검색

혈관 이완작용을 나타내는 자원들의 약리학적 기전을 밝히고자, 혈관 이완을 매개하는 것으로 알려진 수용체에 대한 작용을 검색하기 위하여 atropine (muscarinic receptor antagonist), triprolidine (histamine H₁ receptor antagonist) 및 propranolol (β -adrenoceptor antagonist)의 영향을 관찰하였다. 수용체 길항제를 처리하기 전과 처리 10분 후에 자원들의 이완작용을 비교하였다. 또한 자원들의 이완작용이 K⁺ channel의 활성화에 의한 것인가를 알기 위하여 K⁺ channel blocker로 알려진 tetraethylammonium (TEA)의 영향을 관찰하였다.

제 3 절 실험 결과

3-1. 안지오텐신 II 수용체 결합 저해활성 유용 식물자원의 선발

100 종의 메탄올 추출물의 SD rat의 간으로부터 분리한 Ang II 수용체에 대한 결합 저해활성을 조사하였다. 검색 결과, 길경, 백출, 소자, 오수유, 포공영, 후박, 황금을 포함한 25종의 시료에서 30%이상의 저해활성을 나타냈다. 1차 검색 결과, 선정된 시료중 12종 생약시료의 MeOH ext.를 각각 CHCl₃ 층과 H₂O 층으로 나누어 10 mg/ml의 농도로 한 후 2차 검색을 실시하여 그 결과를 Table 1에 나타냈다. 백출, 오수유, 황금, 후박의 경우 CHCl₃ 층으로 활성물질이 이행되어 total MeOH ext.보다 강한 활성을 보여주고 있으며, 최종농도 200 µg/ml의 농도에서 각각 94%, 78%, 67%, 92% 의 Ang II 결합저해활성을 보였다. 이는 서론에서 언급했듯이 펩타이드성 길항제의 문제점 때문에 탐색하고자 하는 Ang II 수용체 길항제가 비펩타이드성 물질을 목표로 하고 있는 점을 고려할 때 활성물질이 CHCl₃층으로 이행됨은 바람직하다고 생각된다.

Table 2. Inhibition of receptor binding of angiotensin II by the chloroform fraction and H₂O fraction of some medicinal plants

Samples	% Inhibition ^{a)}		
	total MeOH ext.	CHCl ₃ fr.	H ₂ O fr.
<i>Euphorbia kansui</i>	45	55	-
<i>Platycodon grandiflorum</i>	60	66	74
<i>Atractylodes japonica</i>	72	94	34
<i>Torilis japonica</i>	40	42	-
<i>Perilla frutescens</i>	54	62	30
<i>Bupleurum falcatum</i>	48	60	-
<i>Evodia rutaecarpa</i>	67	78	-
<i>Taraxacum mongolicum</i>	58	62	-
<i>Scutellaria baicalensis</i>	44	67	34
<i>Machilus thunbergii</i>	47	92	-

a) final concentrations: 200 µg/ml b) -: less than 30% inhibition

3-2. 오수유 (*Evodiae Fructus*)의 안지오텐신 II 수용체 결합 저해제

3-2-1. 수용체 결합 저해제의 분리

오수유 (*Evodia rutaecarpa*, Rutaceae)로부터의 활성물질 분리과정을 Fig. 1에 나타냈다. 오수유 5 Kg을 methanol에 침적하여 실온에서 7일간씩 3회 추출하였다. 농축한 MeOH 추출물 (80% inhibition, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 을 증류수에 현탁하여 butanol로 추출한 후 농축하여 BuOH 추출물 220 g을 얻었다. BuOH 추출물에 200 g의 silica gel (70 -230 mesh)을 가하여 흡착시킨 다음 silica gel column chromatography에 적용하였다. hexane으로 용출시키기 시작하여 hexane-ethylacetate (20 : 1 \rightarrow 1 : 1)로 용매의 극성을 증가하면서 용출하여 16개의 분획(한 분획당 1000 ml)으로 나누었다. 각 분획에 대한 안지오텐신 II 수용체 결합 저해활성을 검정하여 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 50%-70%의 저해활성을 보이는 7-9번 분획을 모아 농축하여 활성 분획 18.4 g을 얻었다. 이 분획을 RP-18 (YMC*GEL, ODS-A, 60 \AA , 70/230 mesh) column chromatography에 적용하여 MeOH/H₂O를 용출용매 (50% MeOH \rightarrow 70% MeOH \rightarrow 100% MeOH)로 용출하여 3개의 소분획, EB-1(13.6 g), EB-2 (0.7 g), EB-3 (0.5 g)으로 나누었다. 이들은 각각 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도에서 80%, 50%, 30%의 수용체 결합 저해활성을 나타냈다.

계속해서 소분획 EB-1으로부터 semi-preparative HPLC (column, J'sphere ODS-80, 4 μm , 80 \AA , i.d. 20 \times 150 mm; MeOH-H₂O(90:10); flow rate, 8ml/min; UV, 254 nm)를 사용하여 5개의 활성물질, 1-5를 순수 분리하였으며, 소분획, EB-2와 EB-3으로부터 거의 동일한 HPLC 조건으로 물질 6과 7을 분리하였다.

Evocarpine (1)- C₂₃H₃₃N₂O, colorless oil. UV λ_{max} (MeOH): 213, 239, 321, 333 nm. EIMS m/z: 339(M⁺), 186, 173, 144. ¹H-NMR[CDCl₃, 300MHz, δ (ppm)] 8.50(1H, dd, J=2, 8.0Hz, H-5), 7.3 ~ 7.8(3H, m, H-6,7,8), 6.26(1H, s, H-3), 5.40(2H, m, olefinic proton), 3.76(3H, s, N-Me), 2.07(4H, m), 1.70(2H, m, H-2'), 1.29 ~ 1.53(12H, m), 0.90(3H, t, J=7.0Hz, H-13'). ¹³C-NMR(75Mz, CDCl₃): 158.8(C-2), 111.1(C-3), 179.6(C-4), 127.0(C-4a), 126.7(C-5), 125.1(C-6), 133.8(C-7),

117.8(C-8), 143.5(C-8a), 35.4(N-Me), 35.6, 29.6, 30.2, 30.8, 28.1, 130.7, 130.9, 27.9, 29.7, 33.1, 23.3, 14.3

1-Methyl-2-[(4Z,7Z)-4,7-tridecadienyl]-4(1H)-quinolone (**2**)- colorless oil, C₂₃H₃₁NO. UV λ_{max}(MeOH): 213, 239, 321, 333 nm. EIMS m/z: 337(M⁺), 186(92), 173(100), 144(23). ¹H-NMR[CDCl₃, 300MHz, δ (ppm)] .44(1H, dd, J=2, 8.0Hz, H-5), 7.3 ~ 7.7(3H, m, H-6,7,8), 6.24(1H, s, H-3), 5.40(2H, m, olefinic proton), 3.73(3H, s, N-Me), 2.07 ~ 2.8(4H, m), 2.0 ~ 2.2(4H, m), 1.80(2H, m, H-2'), 1.2 ~ 1.4(6H, m), 0.90(3H, t, J=7.0Hz, H-13'). ¹³C-NMR(75Mz, CDCl₃): 155.9(C-2), 110.4(C-3), 176.4(C-4), 125.3(C-4a), 126.5(C-5), 124.1(C-6), 132.7(C-7), 115.6(C-8), 141.7(C-8a), 34.6(N-Me), 34.3, 28.4, 26.6, 130.6, 127.3, 25.7, 127.8, 130.1, 27.2, 29.3, 31.5, 22.5, 14.0

1-Methyl-2-[(6Z,9Z)-6,9-pentadecadienyl]-4(1H)-quinolone (**3**)- colorless oil, C₂₅H₃₅NO, UV λ_{max}(MeOH): 213, 240, 321, 334 nm. EIMS m/z: 365(M⁺), 186(100), 173(86), 144(19). ¹H-NMR[CDCl₃, 300MHz, δ (ppm)] .44(1H, dd, J=2, 8.0Hz, H-5), 7.25 ~ 7.8(3H, m, H-6,7,8), 6.15(1H, s, H-3), 5.40(4H, m, olefinic proton), 3.69(3H, s, N-Me), 2.70(4H, m), 2.08(4H, m), 1.40(12H, m, H-2'), 0.90(3H, t, J=7.0Hz, H-15'). ¹³C-NMR(75Mz, CDCl₃): 154.9(C-2), 110.8(C-3), 177.5(C-4), 126.2(C-4a), 126.4(C-5), 123.3(C-6), 132.0(C-7), 115.3(C-8), 141.8(C-8a), 34.1(N-Me), 34.6, 28.4, 28.8, 29.1, 26.9, 129.4, 127.6, 25.6, 128.4, 130.3, 27.1, 29.1, 31.4, 22.5, 14.0.

1-Methyl-2-undecyl-4(1H)-quinolone (**4**)- colorless powder, C₂₁H₃₁NO. UV λ_{max}(MeOH): 213, 240, 321, 333 nm. EIMS m/z: 313(M⁺), 186(100), 173(86), 144(19). ¹H-NMR[CDCl₃, 300MHz, δ (ppm)] 8.50(1H, dd, J=2, 8.0Hz, H-5), 7.3 ~ 7.8(3H, m, H-6,7,8), 6.28(1H, s, H-3), 3.78(3H, s, N-Me), 2.73(2H, brt, J=8Hz), 2.0 ~ 2.2(4H, m), 1.80(2H, m, H-2'), 1.27(18H, m), 0.90(3H, t, J=7.0Hz, H-11').

¹³C-NMR(75Mz, CDCl₃):154.7(C-2), 111.1(C-3), 177.7(C-4), 126.2(C-4a), 126.6(C-5)
 123.2(C-6), 132.0(C-7), 115.3(C-8), 142.0(C-8a), 34.1(N-Me), 34.7, 28.5, 29.3
 29.5, 29.6, 31.9, 22.7, 14.1

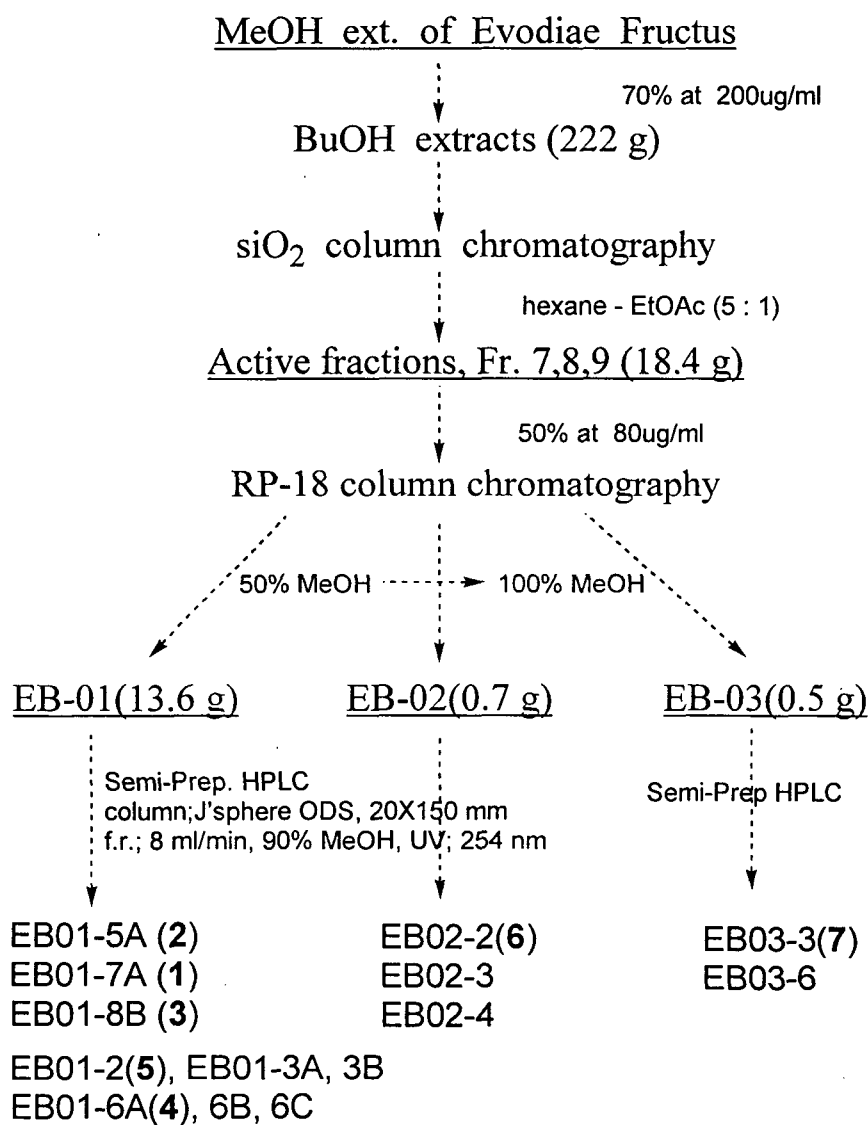


Fig. 1. Isolation scheme of active compounds from Evodiae Fructus

1-Methyl-2-nonyl-4(1H)-quinolone (**5**) - colorless oil. $C_{19}H_{27}NO$, UV $\lambda_{max}(MeOH)$ 213, 240, 321, 334 nm. EIMS m/z : 285(M^+)(100), 173(86), 144(19). $^1H-NMR[CDCl_3, 300MHz, \delta (ppm)]$ 8.50(1H, dd, $J=2, 8.0Hz$, H-5), 7.3 ~ 7.8(3H, m, H-6,7,8), 6.28(1H, s, H-3), 3.78(3H, s, N-Me), 2.73(2H, brt, $J=8Hz$), 2.0 ~ 2.2(4H, m), 1.80(2H, m, H-2'), 1.27(14H, m), 0.90(3H, t, $J=7.0Hz$, H-9'). $^{13}C-NMR(75Mz, CDCl_3)$: 154.2(C-2), 111.1(C-3), 177.7(C-4), 126.2(C-4a), 126.6(C-5), 123.2(C-6), 132.0(C-7), 115.3(C-8), 142.0(C-8a), 34.1(N-Me), 34.7, 28.5, 29.3, 29.5, 29.6, 31.9, 22.7, 14.1

Dihydroevocarpine (**6**) - colorless powder, $C_{23}H_{35}NO$, UV $\lambda_{max}(MeOH)$: 213, 239, 321, 333 nm. EIMS m/z : 341(M^+)(100), 173(96), 144(16). $^1H-NMR[CDCl_3, 300MHz, \delta (ppm)]$ 8.50(1H, dd, $J=2, 8.0Hz$, H-5), 7.3 ~ 7.8(3H, m, H-6,7,8), 6.24(1H, s, H-3), 3.76(3H, s, N-Me), 2.70(2H, brt, $J=8Hz$), 1.60(2H, m), 1.27(20H, m), 0.90(3H, t, $J=7.0Hz$, H-13'). $^{13}C-NMR(75Mz, CDCl_3)$: 154.7(C-2), 111.1(C-3), 177.7(C-4), 126.2(C-4a), 126.6(C-5), 123.2(C-6), 132.0(C-7), 115.3(C-8), 142.0(C-8a), 34.1(N-Me), 34.7, 28.5, 29.3, 29.5, 29.6, 31.9, 22.7, 14.1

1-Methyl-2-pentadecyl-4(1H)-quinolone (**7**) - colorless powder. $C_{25}H_{39}NO$. UV $\lambda_{max}(MeOH)$: 213, 239, 321, 333 nm. EIMS m/z : 369(M^+)(100), 173(93), 144(10). $^1H-NMR[CDCl_3, 300MHz, \delta (ppm)]$ 8.50(1H, dd, $J=2, 8.0Hz$, H-5), 7.3 ~ 7.8(3H, m, H-6,7,8), 6.26(1H, s, H-3), 3.79(3H, s, N-Me), 2.76(2H, brt, $J=8Hz$), 1.64(2H, m), 1.28(24H, m), 0.90(3H, t, $J=7.0Hz$, H-15') $^{13}C-NMR(75Mz, CDCl_3)$: 155.2(C-2), 111.1(C-3), 177.8(C-4), 126.2(C-4a), 126.2(C-5), 123.0(C-6), 131.8(C-7), 115.4(C-8), 142.0(C-8a), 34.3(N-Me), 34.9, 28.7, 29.4, 29.7, 29.9, 32.0, 22.8, 14.0

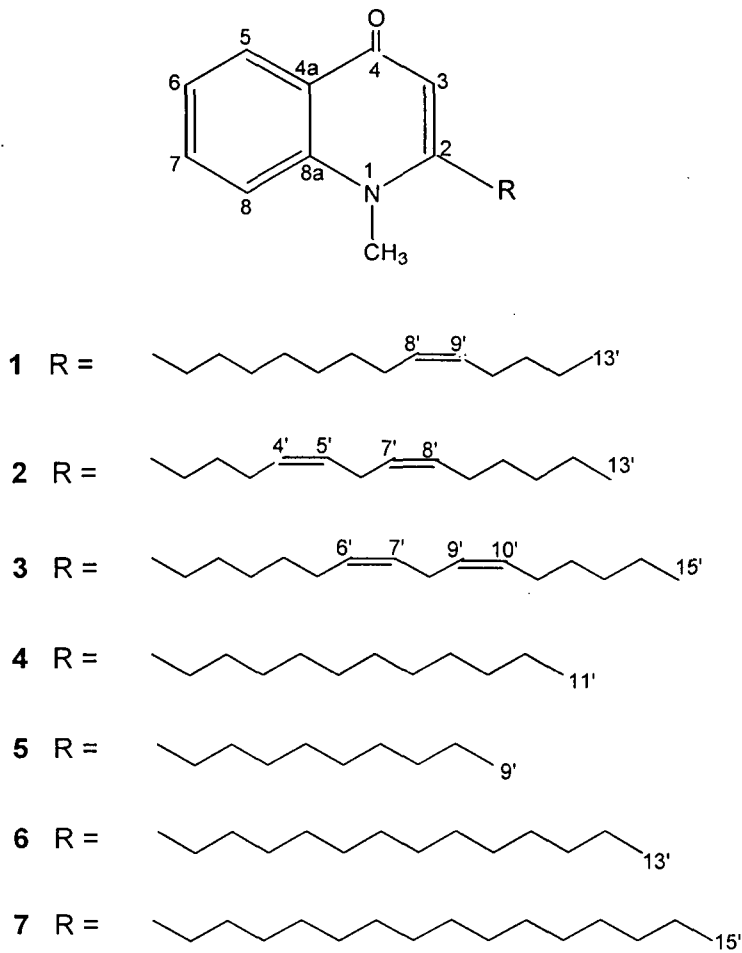


Fig. 2. Structures of active compounds from Evodiae fructus

3-2-2. 물질 1, 2 및 3의 안지오텐신 II 수용체 결합 저해 활성 측정

오수유 (Evodiae Fructus)로부터 최종적으로 분리된 물질 1 (evocarpine), 물질 2 (1-Methyl-2-[(4Z, 7Z)-4, 7-tridecadienyl]-4(1H)-quinolone) 및 물질 3 (1-Methyl-2-[(6Z, 9Z)-6, 9-pentadecadienyl]-4(1H)-quinolone)의 안지오텐신 2 수용체 결합 저해 활성을 측정하여, 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다.

Fig. 2에서 확인할 수 있듯이, 물질 1, 2 및 3은 안지오텐신 II와 안지오텐신 II 수

용체의 결합을 농도 의존적으로 저해함을 알 수 있었다. 각각의 물질들의 IC₅₀, 즉 50%의 수용체 결합 저해율을 나타내는 농도는 물질 1의 경우는 43.4 μM, 물질 2의 경우는 34.1 μM, 그리고 물질 3의 경우는 48.2 μM로, 안지오텐신 2 결합 저해 활성이 우수함을 알 수 있었다.

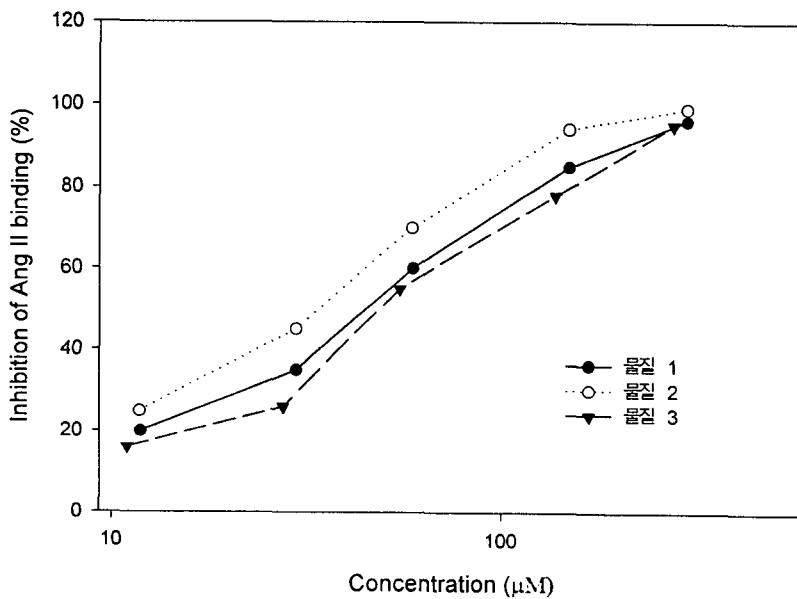


Fig. 3. Inhibition of [³H]-angiotensin II binding to the rat liver membrane by quinolones isolated from fruit of *Evodiae fructus*

3-2-3. 물질 1 (evocarpine)의 흉곽 대동맥의 Ang II에 대한 길항효과

안지오텐신 II에 의해 유도된 토끼의 흉곽 대동맥의 수축에 대하여 안지오텐신 II 수용체 결합 저해제로 분리된 물질 1의 길항효과를 다음과 같이 확인하였다.

우선, 1.5 ~ 2.0 kg 토끼의 이(耳)정맥에 펜토바비탈을 체중 1 kg당 30 mg의 양으로 투여하여 마취시킨 후에 실험 치사시키고, 신속하게 흉곽 대동맥을 적출한 다음, 산소를 공급한 타이로드 용액에서 내피가 손상되지 않도록 주의하면서 대동맥에 붙어있는

결합조직을 제거하였다. 이어, 직경 4 mm 정도의 링을 반응조 (organ bath)에 현수한 후, 피지오그래피 (Harvard Osiloscophy)의 센서에 연결하고, 상기 반응조에 5 ml 타이로이드 용액을 넣은 다음, O₂ / CO₂가 95:5로 되어 있는 혼합가스를 공급하면서 37°C를 유지하였다.

물질 1의 혈관 이완작용의 특성과 효력을 평가하기 위하여 먼저, 내피를 제거하지 않은 상기 흉곽 대동맥에 3×10^{-6} M의 농도로 페닐에프린을 가하여 최대 수축력의 80% 정도까지 수축시켰다. 이어, 수축반응이 최대치에서 안정화되었을 때 농도-반응곡선을 그리기 위하여 화합물 1을 낮은 농도에서부터 높은 농도로 누적적으로 가하였고, 이에 따른 반응은 상기 피지오그래피의 기록지에 나타내었다. 이 실험 결과, 물질 1은 전체농도에서 페닐에프린에 의해 유발된 혈관수축을 이완하지 않음을 확인하였다.

한편, 안지오텐신 II에 의해 유도된 혈관의 수축에 대한 물질 1의 길항작용을 확인하기 위하여, 상기 적출된 토끼 흉곽 대동맥에 3.3×10^{-6} M의 페닐에프린을 가하고, 최대 장력에 도달하였을 때 1.0×10^{-6} M의 아세틸콜린을 가하여 이완반응을 관찰하여 내피의 손상여부를 확인한 후에 안지오텐신 II를 3.3×10^{-10} M ~ 3.3×10^{-8} M의 농도로 누적적으로 가하여 농도-반응곡선을 얻었다. 또한, 물질 1의 안지오텐신 II에 대한 길항작용을 확인하기 위하여, 안지오텐신 II 처리, 15분전에 물질 1을 가하여 혈관의 이완작용을 피지오그래피로 조사하였으며, 그 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 이때, 물질 1 자체가 토끼 흉곽 대동맥혈관 수축에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 물질 1만을 처리하였는 바, 물질 1은 혈관 평활근에 대하여 어떠한 영향도 미치지 않음을 확인하였다.

Fig. 3에서 대조군은 물질 1을 처리하지 않는 경우를 나타낸 것이다.

Fig. 3에서 알 수 있듯이, 물질 1은 3.3×10^{-7} M ~ 3.3×10^{-6} M의 농도에서 안지오텐신 II에 의해 유발된 수축을 현저히 감소시킴을 나타내었다. 또한, 물질 1은 안지오텐신 II의 농도-반응곡선을 우측으로 이동시켰으며, 혈관의 최대 수축력을 화합물 1의 3.3×10^{-7} M, 1.0×10^{-7} M 및 3.3×10^{-6} M 농도에서 각각 51%, 65% 및 95% 감소시켰다.

따라서, 물질 1(evocarpine)은 안지오텐신 II에 대해 특이적인 길항제임을 확인할 수 있었다.

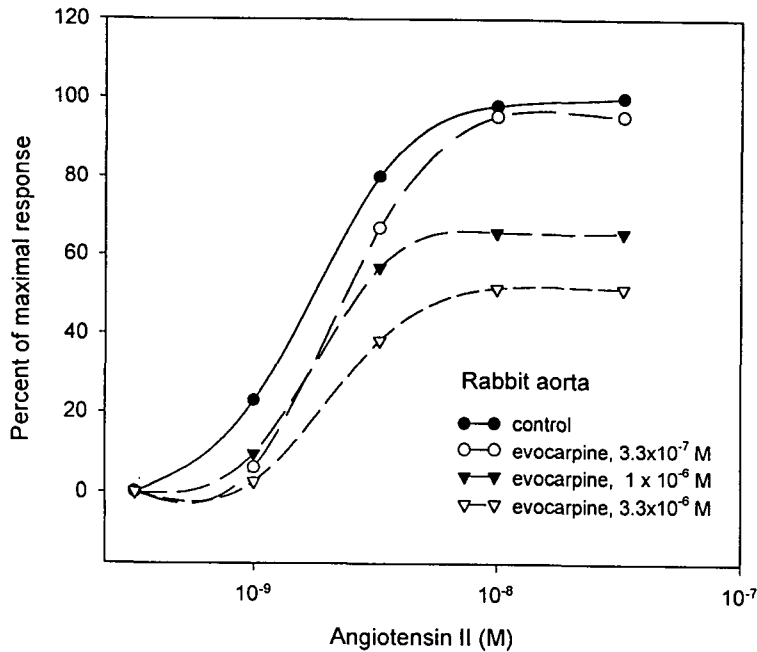


Fig. 4. Concentration-response curve for the antagonism of the angiotensin II-induced contraction by evocarpine (1)

3-2-4. 활성물질의 기타 활성

Evodiae Fructus로부터 얻은 알칼로이드에 대하여 *Helicobacter pylori* 저해활성을 조사하여 다음과 같은 결과를 얻었다. (Table 2.)

bacterial strain으로 사용된 HP ATCC43504, NCTC11637과 NCTC11638은 ATCC와 NCTC로부터 구입, HP82516, HP82548, HP4는 korean gastroscopic sample로부터 분리하여 사용하였으며 37°C에서 3일간, 혐기성 조건으로 7% horse serum이 첨가된 brucella agar plate상에서 배양하였다.

Table 2은 HP의 growth, HP-urease 활성에 대한 quinolone alkaloid의 효능에 대한 활성을 나타낸 표이다. 이들 물질들의 HP 성장저해에 대한 MICs가 10-20 µg/ml로

Table 2. MICs of quinolone alkaloids (1-6) isolated from *Evodiae fructus* on the growth of *Helicobacter pylori*.

Compd.	MIC ($\mu\text{g/ml}$)						Inhibition (%) Urease activity
	HP ATCC43504	HP NCTC11637	HP NCTC11638	HP 82516	HP 82548	HP 4	
1	10	10	0	10	20	10	0
2	10	10	10	10	10	10	0
3	10	10	20	10	10	10	0
4	10	10	20	10	10	10	0
5	10	10	20	10	10	10	0
6	10	10	20	10	10	10	0
Ampicillin	1	1	0.5	1	2	2	0
AHA ^{b)}	-	-	-	-	-	-	95

a) HP urease activities were tested at the concentration of 300 $\mu\text{g/ml}$.

b) AHA, acetohydroxamic acid

나타났으나 HP-urease의 저해활성은 보여주지 못했다.

3-3. 혈관의 수축·이완에 작용하는 유용자원의 검색

식물자원의 total MeOH 추출물과 용매분획인 CHCl_3 분획, BuOH 분획, H_2O 분획에 대하여 최종농도 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 검색계에 적용하였다. 그 결과, 흥부 대동맥 혈관의 이완작용을 갖는 자원으로 *Leonuri sibiricus* (70% at 100 $\mu\text{g/ml}$, CHCl_3 > BuOH), *Siegesbeckia glabrescens* (43%, at 100 $\mu\text{g/ml}$, MeOH ext.), *Cinnamomum cassia* (70% relaxation at 100 $\mu\text{g/ml}$), *Curcuma zedoaria* (83% at 100 $\mu\text{g/ml}$, H_2O ext.), *Foeniculum vulgarire*, *Clerodendron trichotonum*을 선정했으며, 수축작용을 갖는 자원으로 P009의 CHCl_3 ext., *Perilla frutescen var. acuta*의 CHCl_3 ext., *Pulsatilla koreana*의 total MeOH ext.을 선정할 수 있었다.

3-4. 식방풍 (*Peucedanum japonicum*)의 동맥혈관 이완작용 물질

3-4-1. 혈관 이완 물질의 분리·정제

이들 활성물질의 분리는 개략적인 도표로 Fig. 5에 나타내었다. 건조된 식방풍의 뿌리 1.2 kg을 분쇄기로 잘게 마쇄한 후 MeOH 10 l로 실온에서 7일간 2회 추출, 감압·농축하여 얻은 MeOH 추출물 (111 g)을 CHCl₃층과 물층으로 분획하였다. CHCl₃추출물 50 g을 silica gel column chromatography (hexane-EtOAc, 10:1→3:1)를 실시하여 활성 Fr. A (9.8 g)을 얻고 계속해서 Sephadex LH-20 column chromatography (CHCl₃-MeOH, 1:1)를 실시하여 두 부분의 활성 Fr. B-1과 B-2을 얻었다. 활성 Fr. B-1과 B-2를 RP column chromatography (40% MeOH→70% MeOH)와 Prep. HPLC (column: J'sphere ODS-H80, 4 μm, 80 Å, 150×20 mm I.D, flow rate: 7 ml/min, UV detector: 254 nm, solvent: 70% MeOH)를 실시하여 Fr. B-1으로부터 화합물 1 (34 mg)을, Fr. B-2로부터 recyclic Prep. HPLC (column: J' shere ODS-H80, flow rate: 5 ml/min, 80% MeOH)를 실시하여 화합물 2 (18 mg)와 화합물 3 (7 mg), 화합물 4 (2 mg), 화합물 5 (4.2 mg)을 각각 분리하였다 (Fig. 5).

3-4-2 활성물질의 구조해석

식방풍 뿌리의 CHCl₃ 추출물로부터 분리된 5종의 물질들은 ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR, FAB-MS, EI-MS 등의 data를 통하여 coumarin계 물질로 확인되었으며 동맥혈관 이완작용을 갖는 물질 1은 (+)-cis-4'-acetyl-3'-angeloylkhellactone으로 그 구조를 밝혔으며 나머지 4종의 물질은, xanthotoxin, psoralen, isopimpinellin, bergapten으로 동정하였다.

(+)-cis-4'-acetyl-3'-angeloylkhellactone (1)-white crystal; C₂₁H₂₂O₇; FAB-MS, m/z 387(M⁺+H), 379, 349, 287, 245, 229, 133, 115; ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR spectrum은 Fig. 6에 나타내었으며 이들의 구조해석 결과는 Table 3에 정리하였다.

H와 C의 정확한 위치를 결정하기 위해서 heteronuclear multiplebond correlation (HMBC) spectrum을 실시하였다 (Fig. 7). Fig. 8는 HMBC에 의한 H와 C의 상관관계를 보여주고 있다.

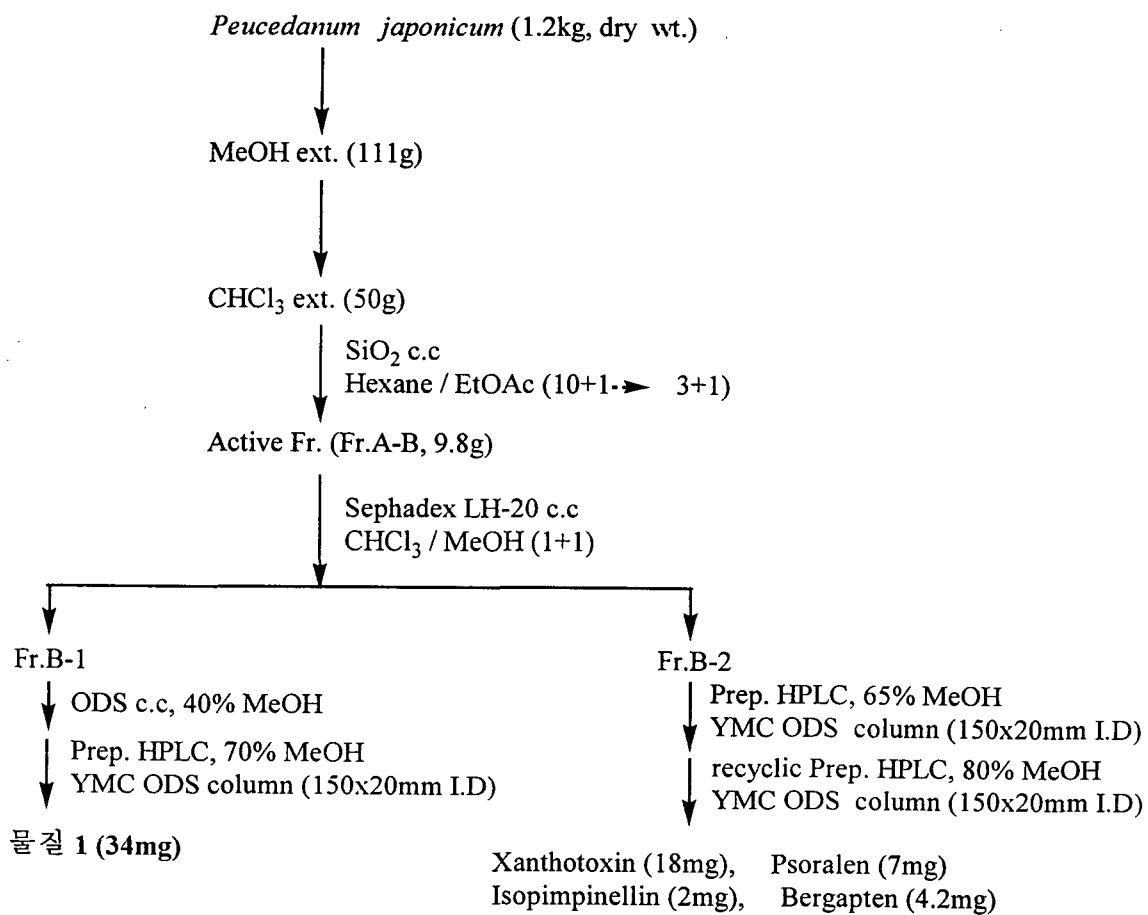


Fig. 5. Isolation scheme of active compounds from the root of *Peucedanum japonicum*.

Table 3. NMR data of (+)-cis-4'-acetyl-3'-angeloylkhellactone(1).

No.	δ ¹ H(mult., J*) ^a	δ ¹³ C ^b	HMBC
2	—	159.7	—
3	6.22(d, 9.3)	113.3	112.5
4	7.59(d, 9.3)	143.2	129.3, 154.0, 159.7
5	7.36(d, 8.4)	129.3	143.2, 154.0, 156.6
6	6.81(d, 8.4)	114.4	107.3, 112.5
7	—	156.6	—
8	—	107.3	—
9	—	154.0	—
10	—	112.5	—
2'	—	77.3	—
3'	5.35(d, 4.8)	70.5	22.2, 77.3
4'	6.63(d, 4.8)	60.1	77.3, 156.6
2'-germ (CH ₃) ₂	1.43(s) 1.46(s)	25.3 22.2	not detected not detected
α	—	127.5	—
α -CO	—	169.8	—
α -CH ₃	1.95(s)	20.4	137.8
β	6.03(aq, 6.9, 1.8)	137.8	169.8
β -CH ₃	2.01(s)	15.6	169.8
γ	—	166.9	—
γ -CH ₃	2.09(s)	20.8	not detected

*J value represented in Hz, ^a(CDCl₃, 300MHz). ^b(CDCl₃, 75MHz).

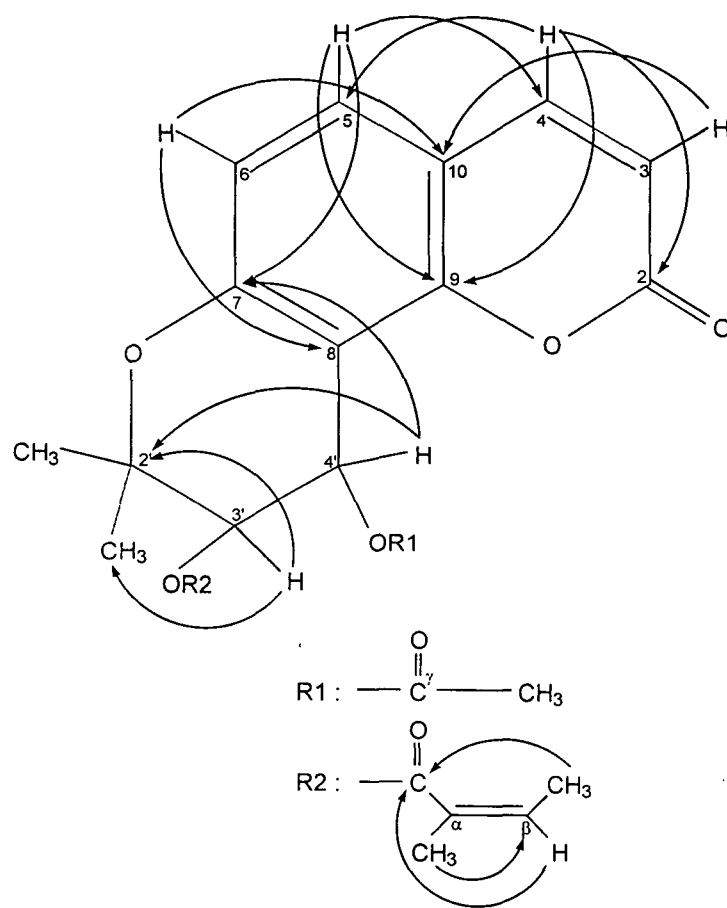


Fig. 8. HMBC spectrum of (+)-cis-4'-acetyl-3'-angeloylkhellactone (1)

→ : $^1\text{H-}^{13}\text{C}$ long range correlations from HMBC spectrum.

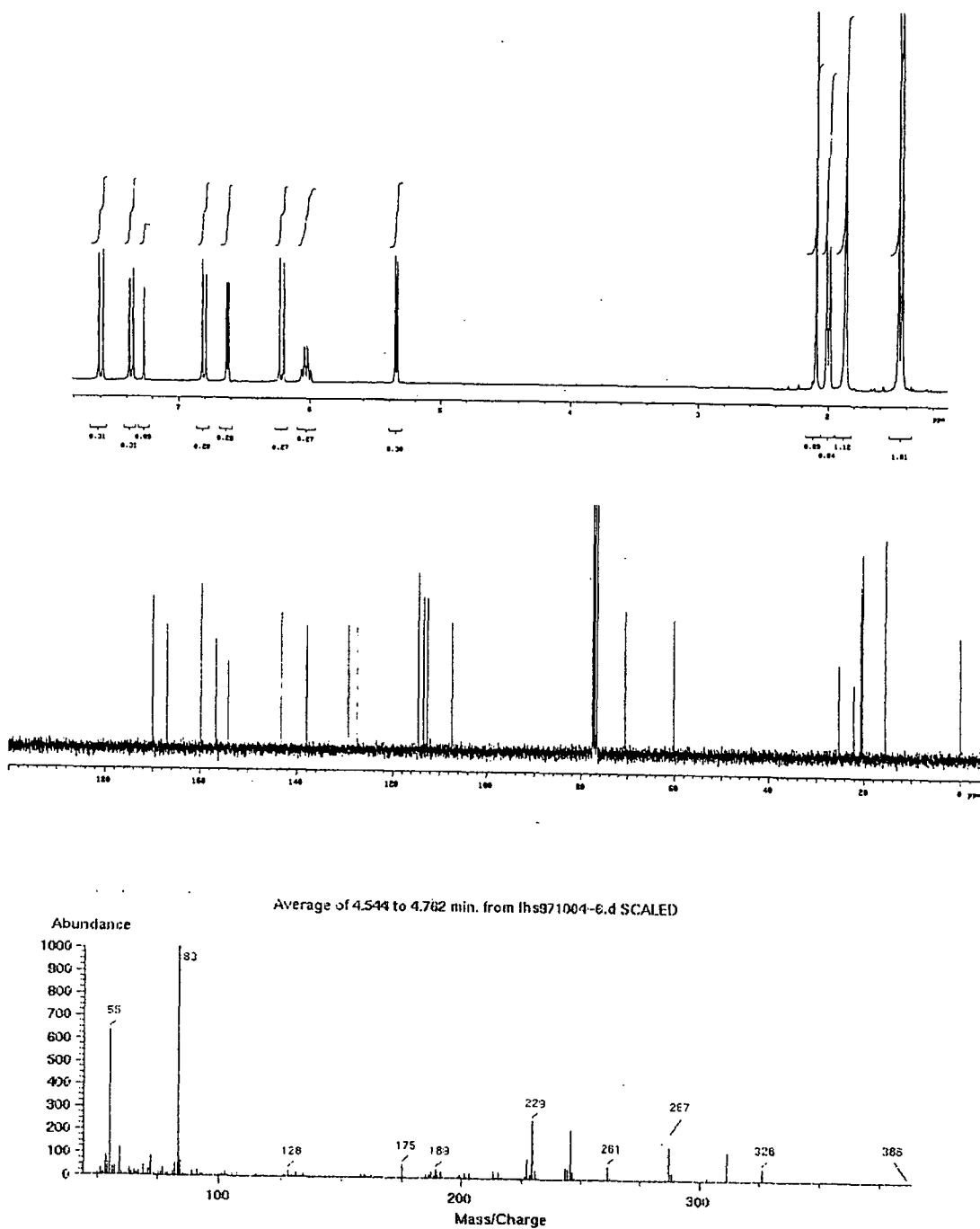


Fig. 6. $^1\text{H-NMR}$ (upper), $^{13}\text{C-NMR}$ (middle) and FAB-MS (lower) spectrum of (+)-cis-4'-acetyl-3'-angeloylhellactone A (1).

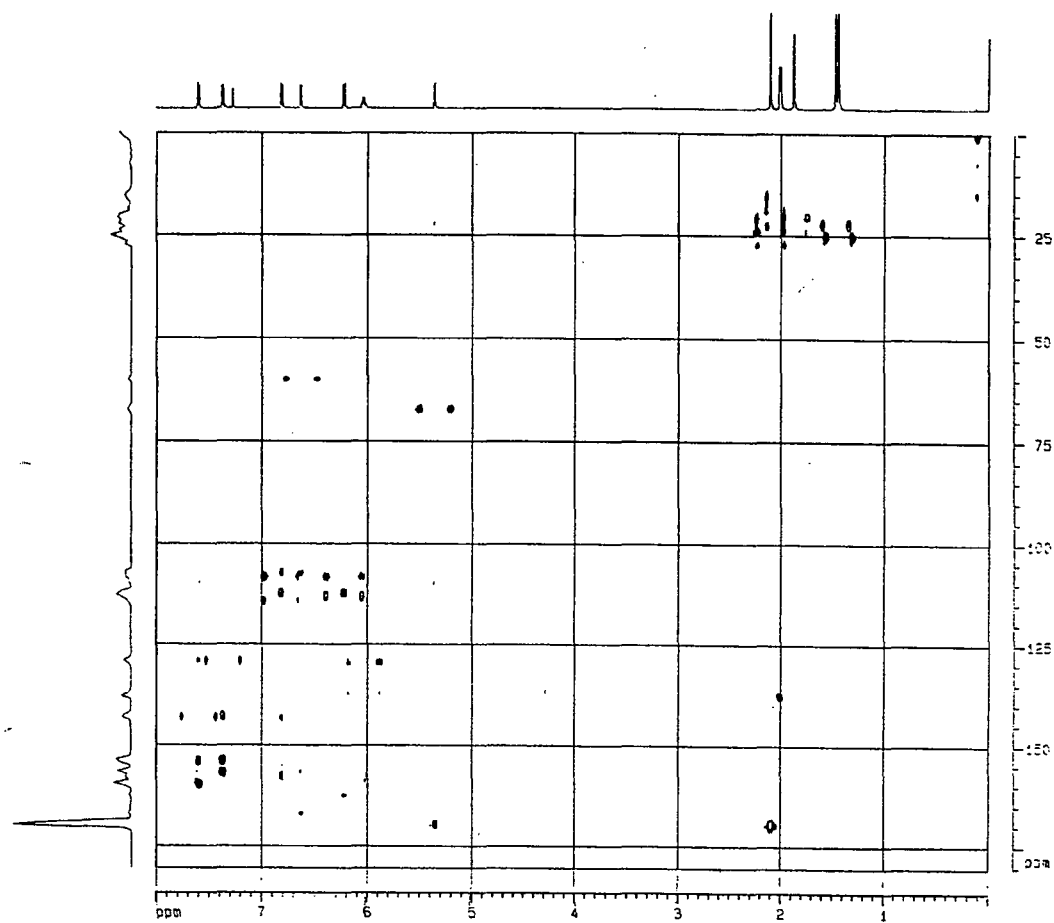


Fig. 7. HMBC spectrum of (+)-cis-4'-acetyl-3'-angeloylkhellactone A (1)

3-4-3. (+)-cis-4'-acetyl-3'-angeloylkhellactone (1)의 혈관 이완 작용

(1) PE로 미리 수축시킨 동맥에 대한 DMSO의 영향

미리 수축시킨 흉곽 대동맥 실험에서 (+)-cis-4'-acetyl-3'-angeloyl khellactone(1)를 녹이기 위해 DMSO를 사용하였기 때문에 일련의 실험에서 DMSO의 영향을 관찰하였다. DMSO는 0.2%(vol/vol) 이하에서 어떠한 영향도 보이지 않았다.

(2) (+)-cis-4'-acetyl-3'-angeloylkhellactone (1)의 혈관 이완 작용

PE로 미리 수축시킨 흉곽 대동맥에서 물질 1(10^{-6} - 10^{-4} M)는 농도 의존적인 이완작용을 나타냈다. 물질 1이 잘 녹지 않기 때문에 더 이상의 높은 농도에서는 관찰할 수 없었다. 물질 1의 EC_{50} 은 1.78×10^{-5} M이었다 (Fig. 9). 또한 내피를 제거한 혈관에서는 물질 1의 이완작용이 감소하였으며 EC_{50} 는 3.8×10^{-5} M이었다. 이완작용은 물질 1을 가한지 30-60초 후에 나타나서 10-12분 후에 최대치에 도달하였다. 높은 농도에서 Krebs 용액으로 씻은 후 PE에 대한 반응성이 원래 상태로 회복되는데 50분 정도 소요되었다.

(3) 내피의 역할

내피를 제거한 혈관에서 PE의 수축작용에 대한 물질 1의 억제작용은 감소하였다. 물질 1 3.3×10^{-5} M의 농도에서 내피가 존재하는 혈관의 경우에 63.7%의 이완작용이 나타났으나, 내피를 제거한 혈관의 경우에 42.0%의 이완작용이 나타났다. 내피를 제거한 혈관에서 IC_{50} 은 3.80×10^{-5} M이었다 (Fig. 9).

L-N^G-nitro arginine (10^{-4} M, 10 min)을 전처리하였을 때 물질 1의 Concentration Response Curve는 우측으로 이동되었다. 그러나 물질 1 (10^{-4} M)에 의해 유발된 최대 이완작용은 영향을 받지 않았다. Guanylyl cyclase inhibitor인 methylene blue (10^{-5} M, 10 min)를 전처리하였을 때 물질 1에 의해 유도된 이완작용은 현저히 억제되었으며, 물질 1 (10^{-4} M)에 의해 유발된 최대 이완작용도 현저히

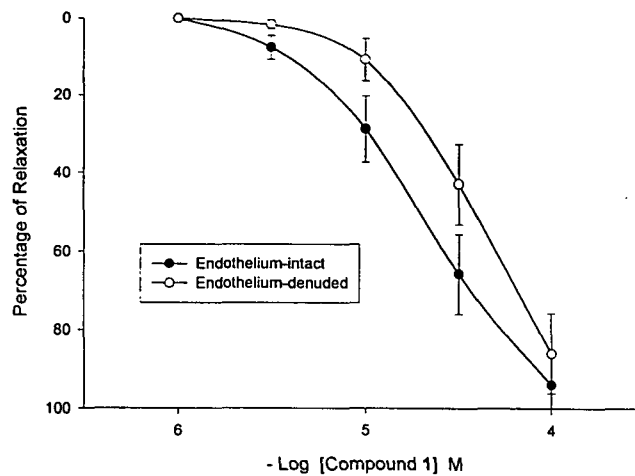


Fig. 9. Concentration-response curve for the vasorelaxant effect of compound 1 ($1.0 \mu\text{M} \sim 100 \mu\text{M}$) on the PE-evoked contraction in isolated rat thoracic aorta.

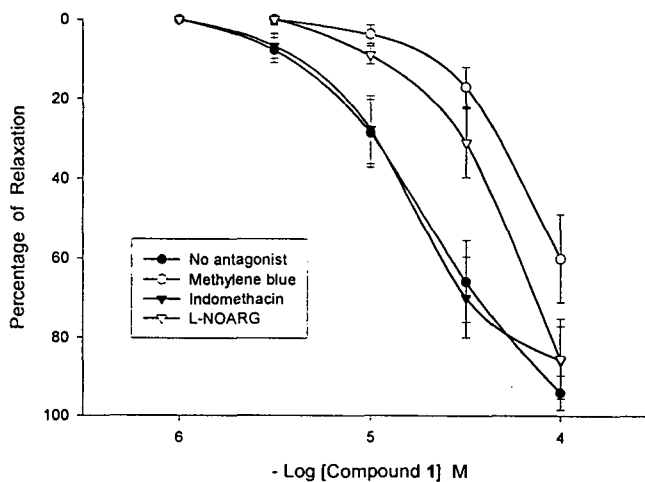


Fig. 10. Effect of L- N^{G} -nitro arginine (L-NOARG), methylene blue and indomethacin on the vasorelaxant effect of compound 1. The vasorelaxant potency was tested before and after treatment with L-NOARG ($100 \mu\text{M}$, 10 min) and indomethacin ($30 \mu\text{M}$, 45 min). Endothelium intact preparations were used in each case.

억제되었다. 그러나 cyclooxygenase inhibitor인 indomethacin($3 \times 10^{-5}M$, 45min)은 물질 1에 의해 유도된 이완작용에 대한 영향이 없었다 (Fig. 10).

(4) 물질 1의 이완작용의 약리학적 특성

Fig. 11에 나타났듯이 atropine ($2 \times 10^{-7}M$), triprolidine ($5 \times 10^{-6}M$) 및 propranolol ($3 \times 10^{-6}M$)을 10분 전에 전처리 하였을 때 물질 1에 의해 유도된 이완작용은 영향을 받지 않았다.

(5) 물질 1의 이완작용과 Ca^{2+} channel 차단작용과의 관련성 평가

PE에 의해 유도된 혈관 수축에 대한 물질 1의 이완력은 $2 \mu M$ 의 nifedifine을 15분동안 전처리 함으로써 유의성 있게 감소했다. $2 \mu M$ 의 nifedifine의 경우 고 K^+ (80 mM)에 의해 유발된 혈관의 수축작용을 완벽하게 차단하고 있으며, PE에 의해 유발된 혈관 수축 반응성을 50%까지 감소시켰다.

80 mM의 K^+ 를 포함한 Ca^{2+} -제거 Krebs 용액에 Ca^{2+} ($0.03-3 \text{ mM}$)을 누적적으로 가하였을 때에 내피의 유무에 관계없이 단계적인 수축작용이 나타났다. 물질 1($3.3 \times 10^{-6} - 3.3 \times 10^{-4} M$)은 Ca^{2+} 에 의한 수축작용을 용량 의존적으로 억제하였다. (Fig. 13).

(6) 물질 1의 이완작용에 대한 tetraethylammonium (TEA)의 영향

물질 1의 이완작용에 K^+ channel의 관련 여부를 밝히기 위하여 비특이적 K^+ channel opener인 tetraethylammonium (60min, $1 \times 10^{-2}M$)을 전처리하여 그 영향을 관찰하였다. TEA는 PE에 의해 유도된 수축에 대한 물질 1의 이완작용에 영향이 없는 것으로 나타났다. (Fig. 14)

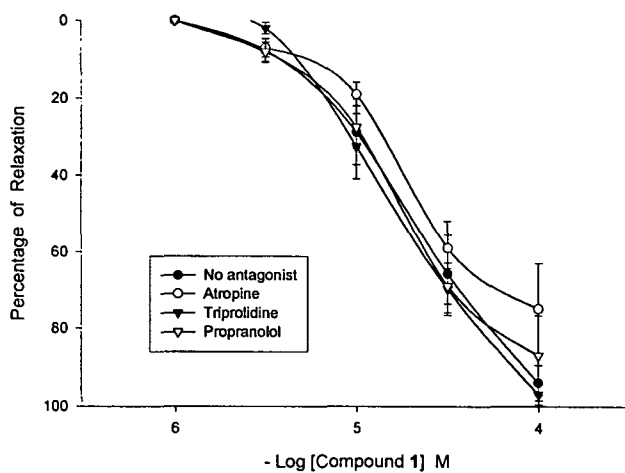


Fig. 11. Effect of atropine, triprolidine and propranolol on the vasorelaxant effect of compound 1 in the endothelium-intact preparation. The vasorelaxant potency was tested before and after treatment with atropine ($0.2 \mu\text{M}$, 10 min), triprolidine ($5 \mu\text{M}$, 10 min) and propranolol ($3 \mu\text{M}$, 10 min)

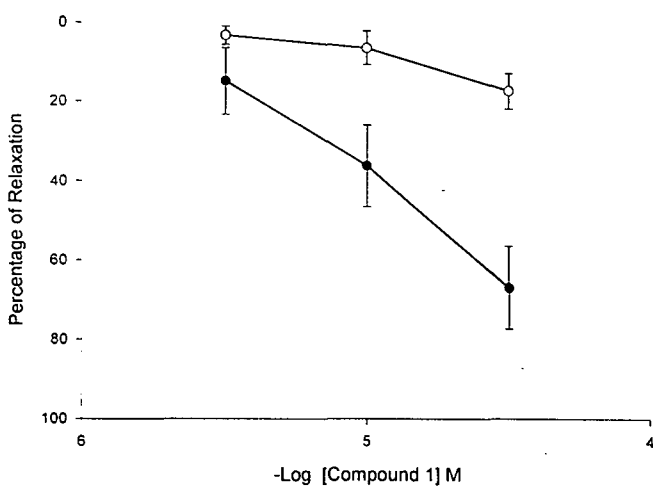


Fig. 12. Relaxing effect of compound 1 on PE-induced contraction in the presence (○) and absence (●) of nifedifine. After treatment of denuded rat aorta with nifedifine ($2 \mu\text{M}$, 15 min), PE ($1 \mu\text{M}$) was used to induce contraction.

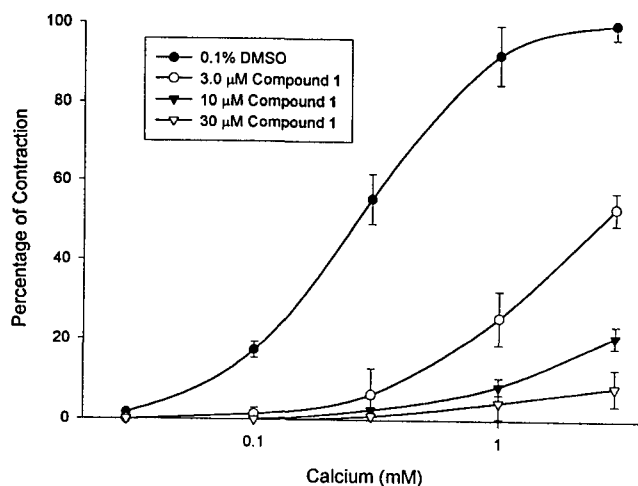


Fig. 13. Effect of compound 1 on the contraction of high potassium-depolarized preparation of rat aorta. Aorta was preincubated with compound 1 ($3.0 \mu\text{M}$ - $30 \mu\text{M}$) for 20 min, and then cumulative concentrations of calcium (0.03 mM - 3 mM) were used to introduce the contraction.

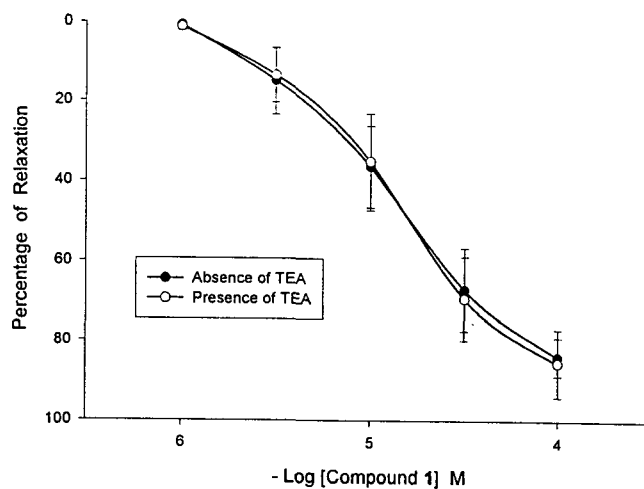


Fig. 14. Relaxing effect of compound 1 on PE-induced contraction in the presence (\circ) and absence (\bullet) of tetraethylammonium After pretreatment of the rat aorta with TEA (10 mM) for 60 min

(7) (+)-cis-4'-acetyl-3'-angeloylkhellactone (1)의 이완작용에 대한 고찰
본 연구에서는 흰쥐 흉곽 대동맥에서의 물질 1의 이완작용을 관찰하였으며, 물질 1의 이완작용 기전을 밝히고자 내피-관련 인자 및 수용체-매개 인자에 대한 약물 상호작용을 조사하였다.

물질 1는 농도-의존적으로 이완작용을 나타냈으며, 내피를 제거한 혈관의 경우는 CRC가 우측으로 평형적으로 이동하는 것으로 보아 물질 1의 이완작용에는 내피-관련 인자가 관여하는 것으로 생각된다. 내피에서 유리되는 혈관 이완물질들은 EDRF, prostacyclin, EDHF (endothelium-derived hyperpolarizing factor) 및 기타 물질들이다. EDRF는 NO 및 L-arginine의 생성으로 간주되나 guanylyl cyclase도 평활근을 이완을 매개하는 signal transduction mediator로 작용하는 것으로 알려지고 있다. Nitric oxide (NO) syntase inhibitor인 L-N^G-nitro arginine와 guanylyl cyclase inhibitor인 methylene blue는 물질 1의 이완작용을 내피를 제거한 혈관과 같은 수준으로 억제하는 것으로 보아 물질 1의 이완작용에는 NO와 guanylyl cyclase가 어느 정도 관여하는 것으로 간주된다. 반면에 cyclooxygenase inhibitor인 indomethacin은 물질 1의 이완작용에 영향이 없었다.

물질 1의 이완작용에 특이한 수용체가 관련하는지를 밝히기 위하여 atropine (muscarinic receptor antagonist), triprolidine (histamine H₁ receptor antagonist) 및 propranolol (β -adrenoceptor antagonist)의 영향을 관찰하였다. 이상의 수용체 길항제들을 물질 1를 가하기 10분 전에 전처치하였을 때의 이완작용은 영향을 받지 않았다. 이 결과로 보아 물질 1의 이완작용은 muscarinic receptor, histamine H₁ receptor 및 β -adrenoceptor를 매개하여 나타나는 것은 아닌 것으로 판단된다.

본 연구에서 물질 1는 흰쥐 흉곽 대동맥에서 농도-의존적인 혈관 이완작용을 나타냈으며, 이 이완작용에는 NO 및 guanylyl cyclase를 통한 내피가 관련된 것으로 판단된다.

여 백

제 4 장 연구개발목표 달성도 및 대외기여도

1. 국내 자생 유용 식물자원의 수집

민간약과 기존의 한의서에 수재된 심혈관계 작용약물 40종을 비롯하여 총 300종의 국내 자생 식물자원을 수집·동정하였으며, 이들을 메탄올로 추출한 후 용매분획을 통하여 CHCl_3 , BuOH, H_2O 층으로 분획하여 검정시료 추출물 library를 조제하였다.

2. 심혈관계 효능검색을 통한 유용성 탐색 및 유용식물자원 발굴

100여종의 식물자원 추출물에 대한 안지오텐신 II 수용체 결합 저해제를 탐색하여 2종의 자원 P008과 P014을 선정하였으며, rat의 흉부대동맥에 작용하는 약물 검색을 통하여 혈관 이완작용을 갖는 6종의 자원 (P004, P011, 051, 108C, 102H, 098C)과 수축작용을 갖는 3종의 식물자원 (P009C, 091C, P012)을 선정하였다.

3. 혈압조절 작용을 갖는 유용 식물자원으로 오수유(*Evodia rutaecarpa*)를 발굴하고 유용성분으로 안지오텐신 II 수용체 결합 저해활성 물질로서 7종의 quinolone alkaloid를 밝혀냈으며, 이들 물질의 토끼의 적출 흉부대동맥 혈관의 안지오텐신 II에 대한 수축작용에 효과적으로 길항함을 밝힘으로써 오수유의 새로운 이용성을 발굴했다

4. rat의 적출 흉부 대동맥을 효과적으로 이완시키는 유용 식물자원으로 갯기름나물(*Peucedanum japonicum*)을 발굴하고 활성물질로서 (+)-cis-4'-acetyl-3'-angeloylhelactone을 분리하여 그 구조를 밝혔으며, 작용기전으로서 혈관 내피 (endothelium)유래 NO-guanylyl cyclase pathway와 Ca^{2+} channel blockade를 통하여 혈관이완 작용을 보이는 것을 밝힘으로써 갯기름나물(식방풍)의 새로운 용도를 발굴했다.

5. rat의 적출 흉부 대동맥을 효과적으로 수축시키는 유용 식물자원, P009을 발굴하고 유용물질로서 naphthoquinone를 분리하여 그 구조를 밝혔으며, 작용기작은 혈관평활근에서 phenylephrine의 수축작용을 증가시키며 soluble guanylate cyclase를 활성화 시키는 이완제들의 작용에 효과적으로 길항하고, LPS에 의해 유발된 혈관의 반응성을 회복시킴을 밝힘으로써 호장근의 새로운 용도를 발굴했다.

6. 또한, P009로부터 nitric oxide 생성 저해제인 2종의 coumarin계 물질을 분리하여 그 구조를 밝히고, lipopolysaccharide에 의해 유발된 in vivo sepsis animal model에서 저해활성을 보여주고 있음을 밝힘으로써 P009의 새로운 효능을 발굴했다.

7. 오수유로부터 분리된 quinolone계 물질이 위궤양과 위암의 원인균으로 밝혀진 *Helicobacter pylori*에도 강한 활성을 나타냄을 밝힘으로써 한방에서의 오수유의 효능을 부분적으로 뒷받침 할 수 있는 결과를 부수적으로 얻었다.

제 5 장 연구개발 결과의 활용계획

Evodiae Fructus와 Peucedani Radix은 한방과 민간에서 사용되는 생약자원으로 독성면에서 안전한 자원으로 in vivo animal model에서의 그 효능을 입증한 후 식품의약 (nutraceutical)의로의 개발을 추진할 계획이다.

또한, 식물자원 P009의 강력한 동맥혈관 수축작용, LPS에 의해 초래된 phenylephrine에 대한 혈관반응성의 감소의 원상회복 효능, endotoxin에 의한 in vivo sepsis animal model에 있어서 사망률의 저하등의 결과로부터 P009의 shock, 폐혈증 치료제로의 가능성을 모색하고자 한다.

여 백

제 6 장 참고문헌

1. Kinghorn, A. D. and Balandrin, M. F. In Human Medicinal Agents from Plants; Kinghorn, A. D. and Balandrin, M. F., Eds; American Chemical Society: Washington, DC, USA, 1993; pp 1-12
2. Marderosian, A. D. and Liberti, L. E. In Natural Product Medicine; The George F. Stickley Company: USA, 1988; pp 1-22
3. 강삼식, 윤혜숙, 장일무, 천연물과학, 서울대학교 출판부, 1988, pp 2-27
4. Furchgott RF(1984) The role of Endothelium in the response of vascular smooth muscle to dog. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 24:175-197
5. Vanhoutte PM(1989) Endothelium and control of vascular function. *Hypertension* 13:558-667
6. De Mey JG, Claeys M, Vanhoutte PM(1982) Endothelium dependent inhibitory effects of acetylcholine, adenosine, triphosphate, thrombin, and arachidonic acid in the canine femoral artery. *J Pharmacol Exp Ther* 222:166-173
7. Nakahata N, Suzuk T(1981) Effect of prostaglandin E, I₂ and isoproterenol on the tissue cyclic AMP content in longitudinal muscle of rabbit intestine. *Prostaglandins* 22:159-165
8. Chiou WF, Chou CJ, Liao JF, Shum AYC, Chen CF(1994) The mechanism of the vasodilator effect of rutaecarpine, an alkaloid isolated from *Evodia rutaecarpa*. *Eur J Pharmacol* 257:59-66
9. Martin W, Villani GM, Furchgott RF(1984) Hemoglobin and methylene blue selectively inhibit relaxation of rabbit aorta by agents which increase cyclic GMP levels[abstract]. *Fed Proc* 43:737
10. Furchgott RF(1988) Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite. In: Vascular Smooth Muscle, Peptide, Autonomic Nerves and Endothelium, Vanhoutte, P.M.(eds) Raven Press, New York pp401-414

11. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moneada S(1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327(11):524-526
12. Moneada S, Palmer RMJ, Higgs EA(1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Am Soc Pharmacol Exp Ther* 43:109-142
13. Azuma JA, Ishikawa M, Sekizaki S(1986) Endothelium-dependent inhibition of platelet aggregation. *Br J Pharmacol* 88:411-415
14. Smith, R. D., Chiu, A. T., Wong, P. C., Herblin, W. F. and Timmermans, P. B. M. W. M. (1992) Pharmacology of nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 32: 135-165.
15. Vallotton, M. B. (1987) The renin-angiotensin system. *TIPS* 8: 69-74.
16. Streeten, D. H. P., Anderson, G. H., Freiberg, J. M. and Dalakos, T. G. (1975) Use of an angiotensin II antagonist (Saralasin). *N. Engl. J. Med.* 292: 657-662.
17. Chui, A. T., MaCall, D. E., Nguyen, T. T., Carini, D. J., Duncia, J. V., Herblin, W. F., Uyeda, R. T., Johnson, A. L. and Timmermans, P. B. M. W. M. (1989) Discrimination of angiotensin II receptor subtypes by dithiothreitol. *Eur. J. Pharmacol.* 170: 117-118.
18. Whitebread S., Mele, M., Kamber, B. and Gasparo, M. (1989) Preliminary biochemical characterization of two angiotensin II receptor subtypes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163: 284-291.
19. Pasque MK and Wechsler AS: Metabolic intervention to affect myocardial recovery following ischemia. *Ann. Surgery*, 1984, 200: 1-12,
20. Cavero I, Boudot JP and Feuvray D: Diltiazem protects the isolated rabbit heart from the mechanical and ultrastructural damage produced by transient hypoxia, low-flow ischemia and exposure to Ca⁺⁺-free medium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1983, 226: 258-268.
21. Ashraf M and Rahmathulia PM: Cardiac injury in short duration anoxia

and modification by diltiazem, a calcium channel blocking agent. *J. Am. Coll. Cardiol.* 1984, 3:1237-1244.

22. Esser E, Loschen G and Flohe L: Phorbol ester cardiotoxicity: Are O₂-radicals involved? *Arch. Toxicol.* 1991, 65:335-339.
23. Manning AS, Coltart DJ and Hearse DJ: Ischemia and reperfusion-induced arrhythmias in the rat. Effects of xanthine oxidase inhibition with allopurinol. *Circ. Res.* 1984, 55:545-548.
24. Singal PK, Beamish RE and Dhalia NS: Potential oxydative pathways of catecholamines in the formation of lipid peroxides and genesis of heart disease., *In Myocardial Injury*, edited by Spitzer JJ, Plenum, NY, 1983, pp391-401.

여 백

위탁과제

국내 유용 고등식물의 심혈관계에 대한 효능 검색

2000. 9

연구기관명 : 순천향대학교

연구책임자 : 이종화(순천향대학교 환경보건학과 부교수)

연구원 : 박종범(순천향대학교 환경보건학과 석사과정)

민준호(순천향대학교 환경보건학과 석사과정)

장지선(순천향대학교 환경보건학과 석사과정)

여 백

제 1 장 서 론

혈관 내피는 동맥평활근의 반응에 중요한 역할을 한다[1, 2]. 내피-의존성 기전은 많은 혈관이완제들의 작용을 포함하고 있다[3]. 이들 이완제들은 대부분 그들의 반응성 수용체를 통하여 내피에 작용함으로써 내피-유래 이완인자 (EDRF)나 prostacyclin를 분비시키고, 분비된 이 물질들은 각각 guanylyl cyclase나 adenylyl cyclase의 활성화를 통해 혈관 평활근 (VSM, vascular smooth muscle) 장력에 대한 억제효과를 나타낸다[4-6].

Furchgott 등[7] 과 Palmer 등[8]은 NO(nitric oxide)를 내피에서 분비되는 이완인자로 보고하였으며, 그 후로 NO의 혈관이완 작용 외의 다양한 생리활성에 관한 연구가 많이 보고되고 있다[9-12].

NO를 경유한 혈관 이완기전은 세포내 Ca^{2+} 의 유입을 증가시키는 물질-acetylcholine, bradykinin, electrical current 또는 shear force 등에 의해 세포내 Ca^{2+} 의 유입이 증가되면 내피에 있는 NO 합성효소(NO synthase, NOS)가 활성화되어 NO가 합성·분비된다. 합성된 NO는 인접한 평활근 세포로 쉽게 확산되어 soluble guanylate cyclase(sGC)를 활성화시켜 cyclic GMP를 증가시킴으로써 결국 단백질의 인산화반응이 촉진되어 평활근 이완이 일어난다. Sodium nitroprusside나 nitroglycerin과 같은 nitro-vasodilators는 내피 NO 생성효소를 경유하지 않고 약물 자체가 대사되면서 NO를 생성하여 평활근의 guanylate cyclase를 활성화시킴으로써 이완작용을 나타낸다[13, 14].

한편, 혈관 이완작용에 중요한 역할을 하는 NO의 생성이 저하되면 과도한 혈관 수축이 일어나게 되어 허혈로 인한 장기의 기능장애 즉 허혈성 심질환 등을 초래할 수 있으며, 고혈압 및 동맥경화의 병리기전에도 관여한다. 이와는 반대로 NO의 과도한 생성은 과도한 혈관 이완으로 인한 순환계 쇼크 및 패혈증에 관여한다. 패혈증은 그람음성 endotoxemia 및 그람양성 세균감염과 관련된 말초순환 혈류저류에 기인하는 것으로 최근 산업발달과 더불어 증가하고 있다[14].

패혈증 치료제의 첫 번째 대상은 그람음성균의 바깥 세포막을 형성하고 있는 lipopolysaccharide(LPS)로서 1980년 중반에 LPS의 주요성분인 lipid A에 대한 항체가 개발되어 치료에 사용되고 있으나 치료에 한계가 있는 것으로 나타났다[14].

최근에는 패혈증의 초기 이후에 관여하는 nitric oxide(NO)에 대한 연구가 활

발히 진행되고 있다. Bacterial endotoxin은 혈관평활근, 혈관내피, macrophage 등에 널리 존재하는 nitric oxide synthase(NOS)를 활성화시켜 다량의 NO를 생성하고, 생성된 NO는 guanylate cyclase(GC)를 활성화하여 혈관 평활근을 이완한다.

본 연구에서는 혈관 평활근에서 phenylephrine에 의해 유도된 수축 증가작용이 있는 식물자원 P009가 수종의 혈관 이완성 물질에 미치는 영향을 관찰함으로써 여러 이완제에 대한 이완억제 효능과 그 작용기전을 밝히고, LPS에 의해 유도된 혈관의 수축반응성 저하에 미치는 영향을 관찰함으로써 패혈증에의 적용가능성을 조사하였다.

제 2 장 연구내용 및 방법

2-1. 흉곽 대동맥 ring 절편 조제

200~280g의 Sprague-Dawley 흰쥐의 두부를 강타하여 실험치사시키고, 재빨리 흉곽 대동맥(thoracic aorta)을 적출한 후 산소를 공급한 Krebs solution에서 내피가 손상되지 않도록 주의하며 대동맥에 붙어있는 결합조직을 제거하였다. 길이 4mm 정도의 ring을 만들어 organ bath에 현수한 후 physiography (Havard Osiloscophy)의 sensor에 연결하였다. Organ bath에 5mL Krebs solution을 넣고 95% O₂ - 5% CO₂ 혼합가스를 공급하면서 37°C를 유지하였다. 장력조절기로 ring의 기본장력을 2g 정도로 부하하고, 30분간 안정화시킨 후에 3.3 x 10⁻⁶M phenylephrine (PE)을 가하여 수축을 확인하였다. 새로운 Krebs solution으로 수회 세척 후 30분 정도 더 안정화시켰다. 다시 3.3 x 10⁻⁶M phenylephrine (PE)을 가하여 최대 장력에 도달하였을 때 1.0 x 10⁻⁶M acetylcholine을 가하여 이완반응을 관찰하여 내피의 손상여부를 확인한 후에 계속적으로 실험에 사용하였다.

2-2. 혈관에 미치는 영향

수종의 약물들이 혈관에 미치는 작용의 특성과 효력을 평가하기 위하여 먼저 내피를 제거하지 않은 흉곽 대동맥에 phenylephrine(3.0 x 10⁻⁶M)을 가하였고, 내피를 제거한 흉곽 대동맥에 phenylephrine(3.0 x 10⁻⁶M)을 가하여 최대 수축력의 80% 정도로 수축시켰다. 수축반응이 최대치에서 안정화되었을 때(약 10분) 농도-반응곡선을 그리기 위하여 약물을 낮은 농도에서 높은 농도로 누적적으로 가하였다. 반응은 physiography (Havard Osiloscophy)의 기록지에 그렸으며, 약물에 의해 나타나는 억제작용은 이완력의 백분율로 나타냈다.

2-3. 내피 의존성 이완작용에 대한 영향

혈관 링을 30분 정도 안정화시킨 후에 3.0 x 10⁻⁶ M phenylephrine(PE)을 영양액에 가하여 생존능을 관찰하였다. 조직을 씻고, 기준선까지 안정화되면 장력을 다시 2 g으로 조절하였다. 3.0 x 10⁻⁶ M PE를 가하여 수축 정도를 관찰하였다. P009(10⁻¹⁰⁰ nM, 그림 1)를 15분간 전처리한 후에 PE를 가하여 PE의 수축력에 미치는 영향을 관찰하였다.

한편, P009의 작용기전을 밝히고자 내피의존적 혈관 이완성 물질의 작용에 미치는 영향을 조사하였다. 3.0×10^{-6} M PE를 가하고, 최대 장력에 도달하였을 때에 수종의 이완성 물질(acetylcholine, calimycin 및 ATP)을 가하여 누적 용량반응곡선을 작성하였다. P009를 15분간 전처리하여 이완제의 이완작용에 미치는 영향을 관찰하였다.

2-4. 내피 비의존성 이완작용에 대한 영향

내피 비의존성 이완제의 이완작용에 대한 영향을 관찰하고자 내피를 제거한 혈관 링을 사용하였다. 내피는 슝막대를 이용하여 혈관 내벽을 수회 앞뒤로 슬라이딩하여 제거하였으며, 내피의 기능 손상은 3×10^{-6} M acetylcholine을 가하여 이완력의 손상으로 확인하였다.

3.0×10^{-6} M PE를 가하고, 최대 장력에 도달하였을 때에 수종의 이완성 물질(nitroprusside, atriopeptin III 및 papaverine)을 가하여 누적 용량반응곡선을 작성하였다. P009를 15분간 전처리한 후에 이완제의 PE의 수축에 대한 이완작용에 미치는 영향을 관찰하였다.

2-5. Endotoxin에 의해 유도된 혈관의 수축반응성 저하에 대한 P009의 영향

혈관 링을 organ bath에 현수한 후에 KCl (60 mM)에 대한 반응성을 관찰하고, 혈관을 LPS (600 mg/mL)를 첨가한 Krebs 용액에 한 시간 배양하였다. 배양 최종 20분 동안 P009(0.2 또는 2.0 μ M)을 처리하고, 한 시간 배양이 끝난 시점에서 phenylephrine (3 nM에서 10 μ M까지)을 가하여 용량-반응곡선을 그렸다.

2-6. 시약

Phenylephrine(PE) HCL, Ach HCL, calimycin, ATP, atriopeptin III, SNP, papaverine 및 DMSO는 Sigma Chemical에서 구입하였다.

PE는 0.1% ascorbic acid를 함유한 0.9% 생리식염수에 녹여 냉동 보관하여 사용할 때 마다 Krebs 용액으로 희석하였다. P009는 DMSO에 10^{-3} M 모액을 만들어 Krebs 용액으로 희석하여 사용하였다. P009를 제외한 모든 시약은 Krebs 용액에 녹여 사용하였다.

2-7. 결과 처리

약물의 농도는 영양액 내의 최종 농도로 나타냈다. 결과는 평균 \pm 표준오차로 표시

하였으며, Student's t -test로 통계분석하여 p 값이 0.05 이하인 경우에 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

여 백

제 3 장 결과 및 고찰

3-1. 식물자원 P009의 혈관 수축작용 물질의 분리·정제

식물자원 P009의 뿌리 24 Kg을 분쇄하여 실온에서 MeOH로 2회 추출하여 MeOH 추출물 500 g을 얻었다. 이것을 증류수에 현탁시켜 CHCl₃로 추출하여 1차 siO₂ 컬럼크로마토그래피(용매 CHCl₃)를 행하여 활성분획을 얻고 계속해서 hexane/EtOAc (100:1 → 30:1)로 2차 siO₂ 컬럼크로마토그래피를 행하여 10개의 분획으로 나누었다. 이들 중 6번, 7번으로부터 semi-peparative HPLC (column, J'sphere ODS-80, 4 μm, 80 Å, i.d. 20×150 mm; MeOH-H₂O (75:25); flow rate, 8ml/min; UV, 254 nm)를 통하여 활성물질 P009를 얻었다.

Table. 1. NMR Data of P009

Position	$\delta^1\text{H}$ (mult., J*) ^a	$\delta^{13}\text{C}^b$	HMBC
1	12.5 (s)	158.2	112.4, 136.7, 158.2
2	—	30.5	—
3	—	143.5	—
4	7.52 (s)	121.7	20.0, 112.4, 143.5, 179.1
5	—	179.1	—
6	—	161.0	—
7	6.11 (s)	109.6	112.4, 161.0, 179.1, 190.3
8	—	190.3	—
9	—	112.4	—
10	—	136.7	—
1'	—	202.9	—
1'-CH ₃	2.59 (s)	31.9	202.9
OCH ₃	3.93 (s)	56.8	not detected
3-CH ₃	2.35 (s)	20.0	121.7, 136.7, 143.5

*J value represented in Hz, ^a(CDCl₃, 300MHz). ^b(CDCl₃, 75MHz).

3-2. P009의 혈관 평활근에 대한 작용과 PE에 의한 수축에 대한 작용

내피가 존재하는 혈관에서 P009는 낮은 농도(60 - 200 nM)에서 기준 장력에 영향이 없었으나 2.0 μ M에서는 기준 장력을 0.1 g에서 0.5 g까지 다양하게 증가시켰다. 내피가 존재하는 혈관에서 phenylephrine(3×10^{-6} M)에 의해 유도된 수축은 P009에 의하여 유의하게 증가되었으나 내피를 제거한 경우에는 수축 증가작용이 나타나지 않았다 (Table 2).

Table 2. Potentiation effect of P009 on the Phenylephrine-evoked contraction

Concentration of P009	Potentiation Effect on PE-evoked Contraction (%)
6.0×10^{-8} M	30 - 50
2.0×10^{-7} M	68 - 158
2.0×10^{-6} M	217 - 265

3-3. 내피 의존성 이완제의 반응에 대한 P009의 영향

내피가 존재하는 혈관 평활근에서 acetylcholine은 PE에 의해 유도된 수축을 최대 $88.5 \pm 1.6\%$ 이완하였다. P009는 Ach의 용량반응곡선을 우측으로 이동시켰으며, 최대 이완작용을 현저히 감소시켰다. P009 60 nM 및 200 nM를 전처리하였을 때 acetylcholine의 PE-유도 수축에 대한 최대 이완작용은 각각 $77.9 \pm 2.5\%$ 및 $32.4 \pm 2.1\%$ 로 감소하였으며, P009 2.0 μ M를 처리하였을 경우에는 Ach의 이완작용은 완전히 차단되었다 (Fig. 1).

ATP는 내피가 존재하는 혈관 평활근에서 PE에 의해 유도된 수축을 최대 $92.1 \pm 1.9\%$ 이완하였다. P009(60 nM 및 200 nM)를 전처리하였을 때 ATP의 PE-유도 수축에 대한 최대 이완작용은 각각 $78.8 \pm 2.5\%$ 및 $45.1 \pm 2.6\%$ 로 감소하였으며, P009 2.0 μ M를 처리하였을 경우에는 ATP의 이완작용은 완전히 차단되었다(Fig. 2).

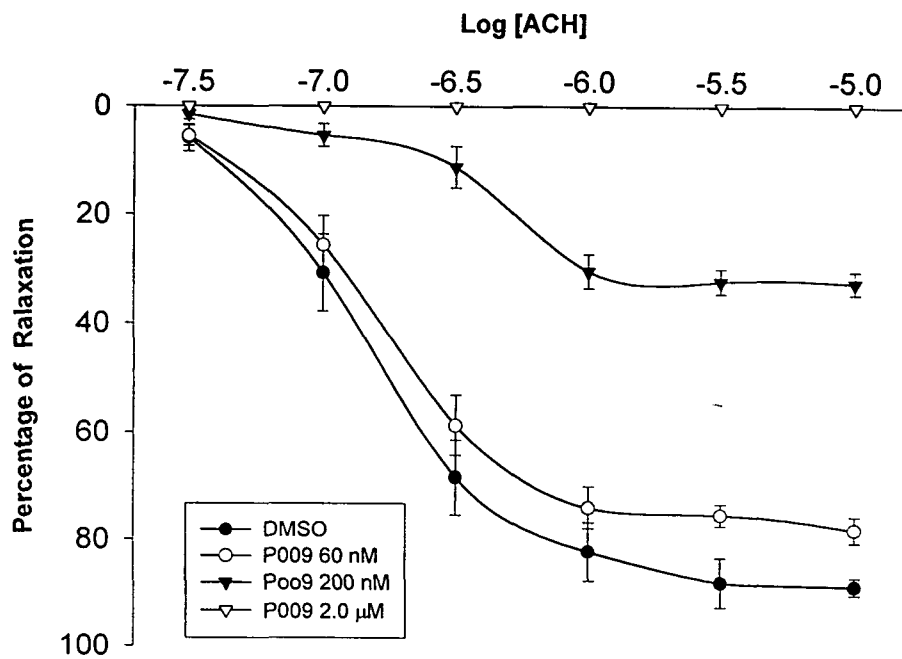


Fig. 1. Concentration-response curves for acetylcholine in the absence and presence of P009 (0.06, 0.2 and 2.0 μM). Responses are expressed as percentage relaxation of the contraction to phenylephrine (3 μM). each point represents the mean \pm S. E. M. 4 experiments.

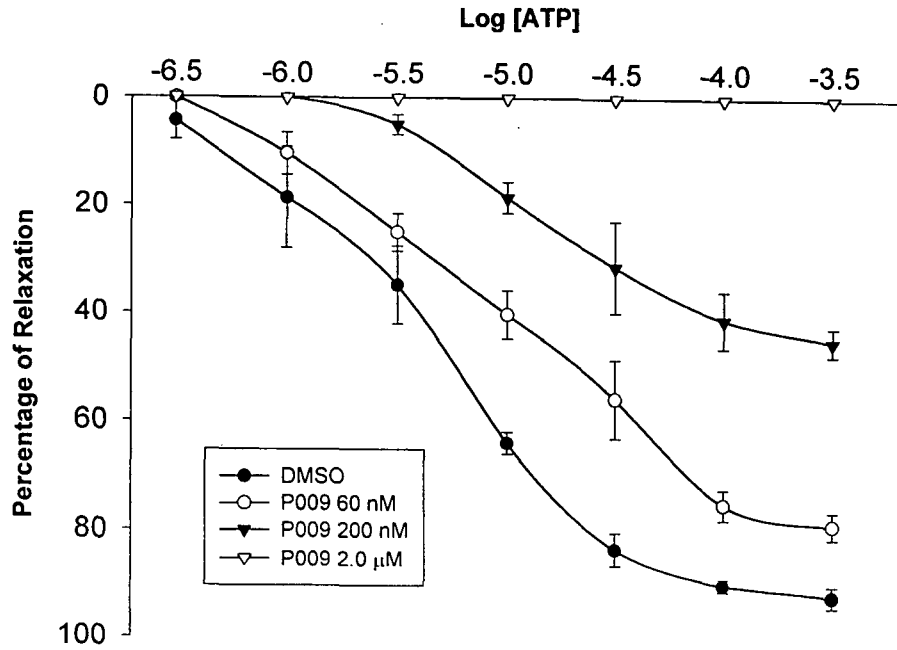


Fig. 2. Concentration-response curves for ATP in the absence and presence of P009 (0.06, 0.2 and 2.0 μ M). Responses are expressed as percentage relaxation of the contraction to phenylephrine (3 μ M).

Calimycin은 내피가 존재하는 혈관 평활근에서 PE에 의해 유도된 수축을 최대 $72.6 \pm 3.9\%$ 이완하였다. P009(60 nM 및 200 nM)를 전처리하였을 때에 calimycin의 PE-유도 수축에 대한 최대 이완작용은 각각 $52.7 \pm 6.2\%$ 및 $22.0 \pm 2.1\%$ 로 감소하였으며, P009 2.0 μ M를 처리하였을 경우에는 calimycin의 이완작용은 완전히 차단되었다 (Fig. 3).

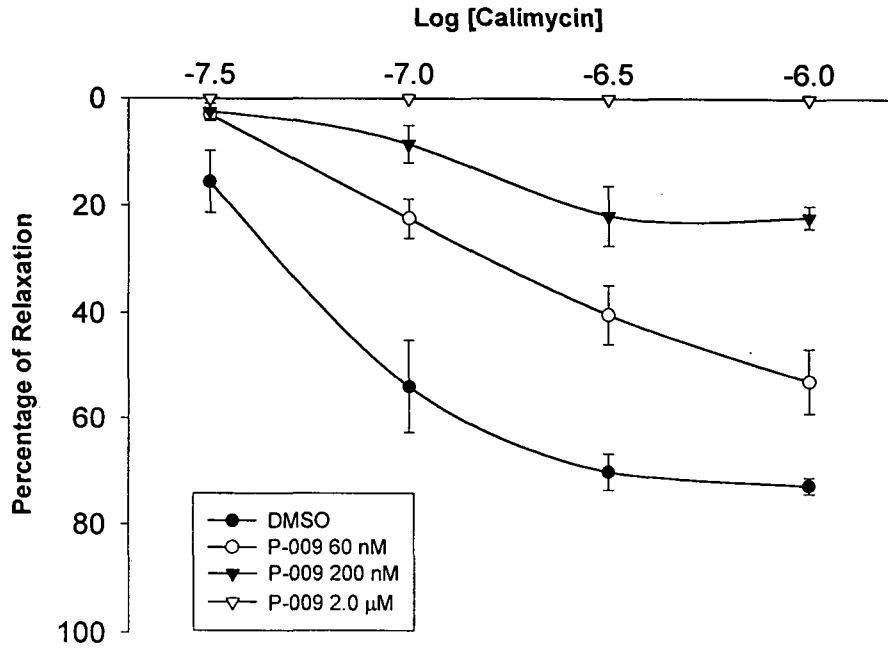


Fig. 3. Concentration-response curves for calimycin in the absence and presence of P009 (0.06, 0.2 and 2.0 μM). Responses are expressed as percentage relaxation of the contraction to phenylephrine (3 μM). Each point represents the mean \pm S. E. M. 4 experiments.

3-4. 내피 비의존성 이완제의 반응에 대한 P009의 영향

내피를 제거한 혈관 평활근에서 sodium nitroprusside (0.003 - 1.0 μM)는 PE에 의해 유도된 수축을 용량의존적으로 이완하였다. P009는 높은 농도(2.0 μM)에서 nitroprusside의 이완작용을 이완시켰으나 최대이완작용에는 영향이 없었다 (Fig. 4).

내피를 제거한 혈관 평활근에서 atriopeptin III (1 - 10 nM)는 PE에 의해 유도된 수축을 용량의존적으로 이완하였다. P009는 높은 농도(2.0 μM)에서 atriopeptin

III의 이완작용에 영향이 없었다(Fig. 5).

Papaverine(3 - 300 μM)은 서서히 PE에 의해 유도된 수축을 용량의존적으로 이완시켰다. P009 100 μM 은 papaverine의 이완작용에 대한 영향이 없는 것으로 관찰되었다(Fig. 6).

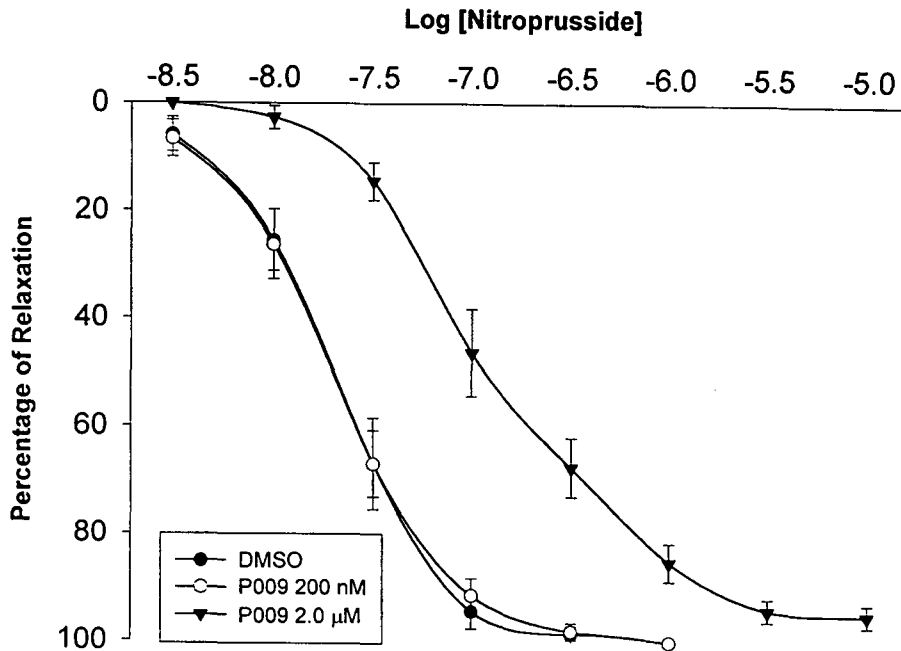


Fig. 4. Concentration-response curves for sodium nitroprusside (SNP) in the absence and presence of P009 (0.2 and 2.0 μM). Responses are expressed as percentage relaxation of the contraction to phenylephrine (3 μM). each point represents the mean \pm S. E. M. 4 experiments.

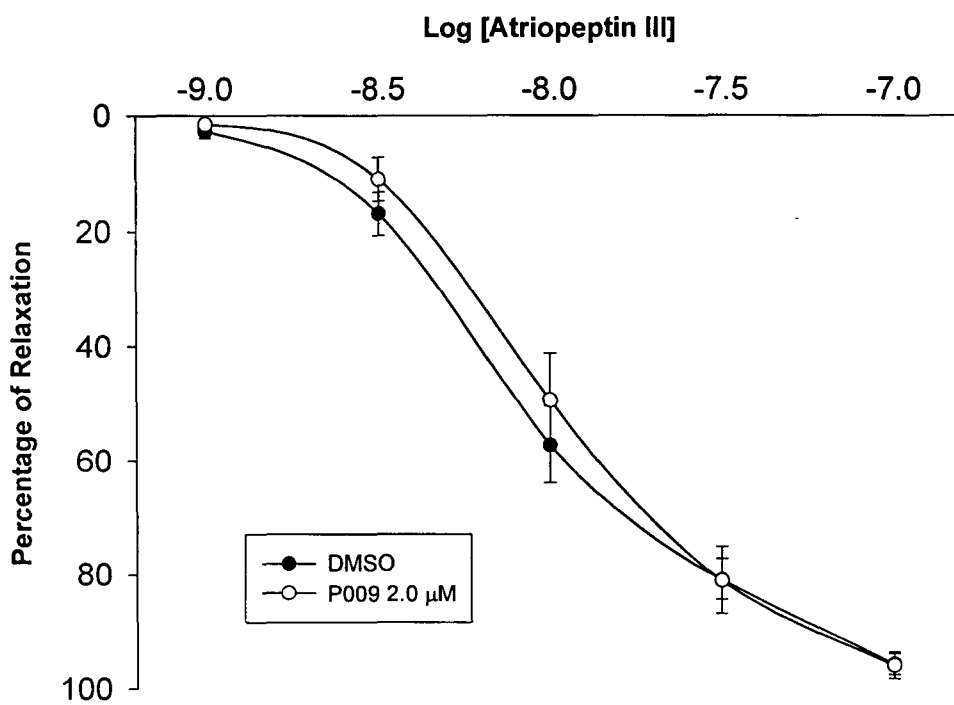


Fig. 5. Concentration-response curves for atriopeptin III in the absence and presence of P009 (2.0 μM). Responses are expressed as percentage relaxation of the contraction to phenylephrine (3 μM).

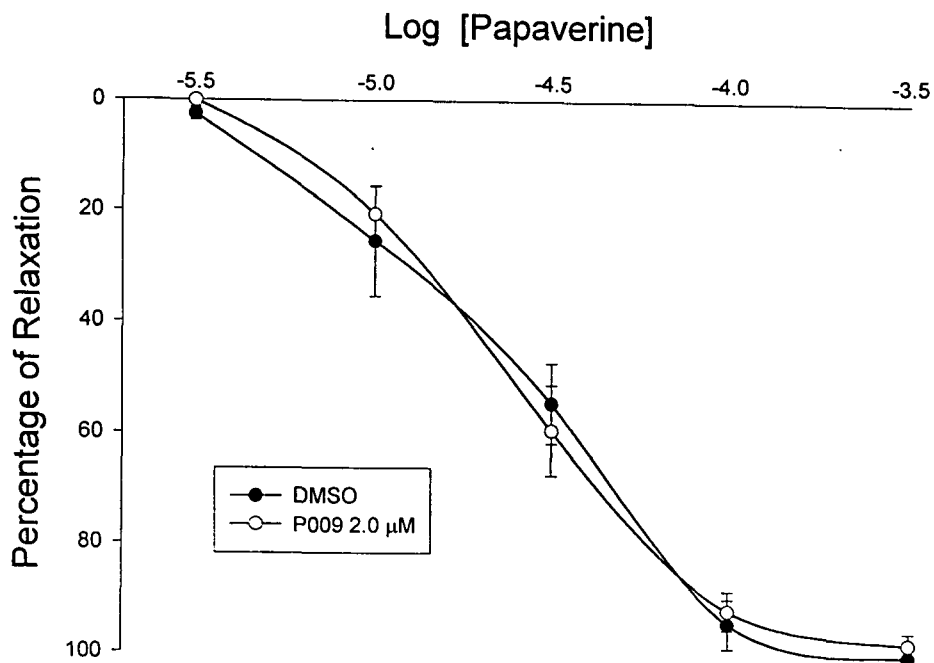


Fig. 6. Concentration-response curves for papaverine in the absence and presence of P009 (2.0 μ M). Responses are expressed as percentage relaxation of the contraction to phenylephrine (3 μ M).

3-5 Endotoxin에 의해 유도된 혈관의 수축반응성 저하에 대한 P009의 영향

혈관을 LPS (600 mg/ml)를 함유한 Krebs 용액에 한 시간 배양하였을 때 phenylephrine에 대한 용량-반응곡선을 우측으로 이동시켰다 (Fig. 7). LPS와 함께 배양하였을 때 phenylephrine에 대한 최대 수축도 현저하게 감소되었다 (대조 및 LPS-처리 혈관에서 KCl에 대한 반응성과 비교하여 각각 129 ± 11.2 와 92.9 ± 7.9)

혈관을 LPS 및 P009(0.2 또는 2.0 μ M)와 함께 배양하였을 때 고농도에서 혈관의 phenylephrine에 대한 반응성이 회복되는 것으로 나타났다. P009 2.0 μ M에서 phenylephrine에 대한 최대 수축은 130 ± 8.9 였다.

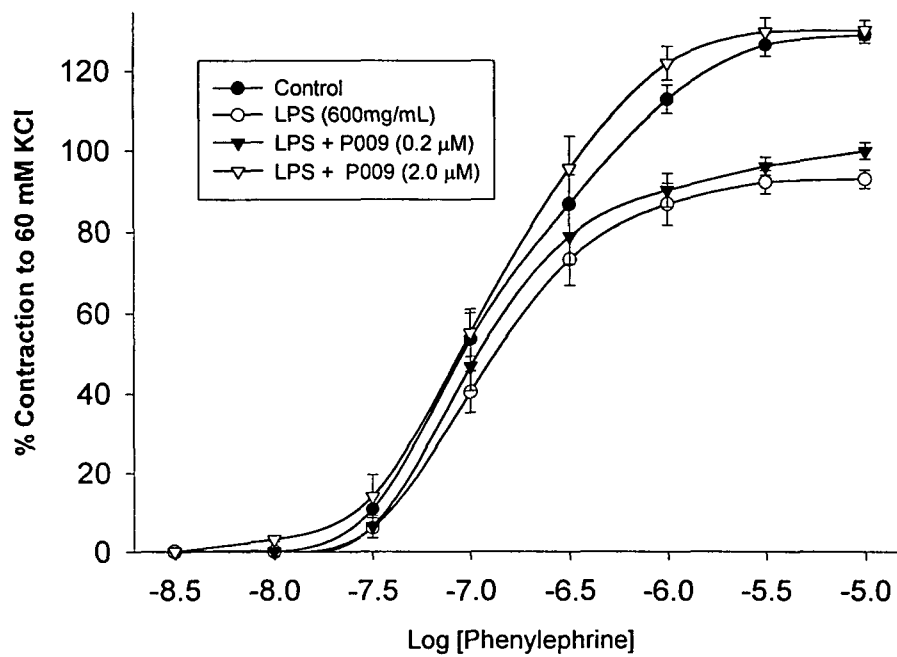


Fig. 7. Concentration-response curves for phenylephrine in the absence and presence of LPS (600 mg/ml) and P009 (0.2 or 2.0 μ M). Values are expressed as percentage of maximal KCL (60 mM), each point represents the mean \pm S. E. M. 4 experiments.

여 백

제 4장 결론 및 활용계획

P009는 혈관 평활근의 기준장력에는 현저한 영향이 없었으나, phenylephrine에 의해 유도된 수축을 증가시켰다. 이 결과는 P009가 endothelium-derived relaxing factor(EDRF)의 자발적인 유리에 의한 이완작용을 방해하는 것을 의미한다.

P009의 이러한 작용은 endothelium의 파괴나 muscarinic receptor에 대한 작용에 기인할 수 있다. 그러나 본 연구에서 P009 (2.0 μ M)는 endothelial cell layer를 파괴하지 않는 것으로 나타났으며, Ach뿐만 아니라 ATP 및 calcium ionophore인 calimycin의 이완작용에도 같은 영향을 미치는 것으로 보아 항무스카린 작용은 없는 것으로 판단된다. 또한 고농도(2.0 μ M)의 P009는 내피를 제거한 혈관 평활근에서 SNP에 의한 이완작용도 길항하는 것으로 나타났다. 그러나 SNP에 대한 길항작용은 내피의존성 이완제에 대한 작용보다 현저히 낮았다. P009는 particulate guanylate cyclase의 활성화를 통하여 cGMP를 증가시킴으로써 혈관평활근을 이완하는 atriopeptin III와 phosphodiesterase를 억제하여 조직의 cGMP 함량을 증가시킴으로써 이완작용을 유발하는 papaverine에 대하여는 영향이 없었다. 이상의 결과에서 P009는 particulate form of guanylate cyclase보다는 soluble guanylate cyclase를 활성화시키는 이완제들의 이완작용을 효과적으로 길항하는 것으로 생각된다.

Ignarro 등[16]은 NO가 SNP로부터 유리되는 활성형 물질이라고 보고하였으며, Palmer 등[7]은 NO(nitric oxide)가 내피에서 분비되는 이완인자(EDRF)로 보고하였다. 본 연구에서는 P009는 내피를 경유하여 이완작용을 나타내는 Ach, calimycin 및 ATP의 경우에 고농도로 가하여도 최대 이완작용이 회복되지 않았다. 그러나 SNP의 경우에는 용량-반응 곡선이 기울기가 감소하는 형태로 우측으로 이동하였으며, 고농도에서 P009에 의해 억제된 최대 이완작용이 극복되었다. 이러한 결과는 P009가 내피 의존성 이완제들과 sodium nitroprusside에 대하여 다른 억제기전을 나타내는 것을 의미한다. 이것은 내피 의존성 이완제들은 EDRF의 유리를 통하여 간접적으로 작용하는 반면 SNP는 직접적으로 작용하기 때문인 것으로 간주된다.

대동맥 링을 LPS로 처리하였을 때에 혈관의 phenylephrine에 대한 반응성이 감

소되었다. P009는 2.0 μ M에서 LPS에 의하여 감소된 반응성을 대조군 수준으로 회복시켰다. 많은 연구자들이 *in vivo* 및 *vitro* 실험을 통하여 inducible nitric oxide synthase (iNOS)의 유도에 의한 과도한 NO의 생성은 저혈압 및 혈관수축성 물질들에 대한 반응성 감소에 중요한 역할을 하는 것으로 보고하였다[17]. 또한 NOS 억제제인 dexamethasone, N^G-methyl-L-arginine 및 aminoguanidine이 endotoxin에 의한 반응성 감소를 회복시킨다는 사실은 NO 생성 증가가 endotoxin에 의해 초래된 혈관의 반응성 저하에 관련이 있음을 강하게 시사하고 있다[18, 19]. 본 연구에서 P009는 비교적 높은 농도에서 SNP의 혈관이완작용을 억제하고, LPS에 의한 혈관의 반응성 감소를 회복하는 것으로 보아 NO를 매개하여 나타나는 혈관이완 기전에 영향을 미치는 것으로 생각된다. 그러나 P009의 명확한 작용기전을 밝히기 위해서는 NO의 생성을 증가시키는 여러 가지의 경로에 대한 추가적인 연구가 진행되어야 할 것이다.

이상의 결과에서 P009는 혈관 평활근에서 phenylephrine의 수축작용을 증가시키며, soluble guanylate cyclase를 활성화시키는 이완제들의 혈관 이완작용을 효과적으로 길항하고, LPS에 의한 phenylephrine에 대한 반응성 감소를 회복시키는 것으로 확인되었다.

제 5 장 참 고 문 헌

1. Furchgott RF(1984) The role of Endothelium in the response of vascular smooth muscle to dog. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 24:175-197
2. Vanhoutte PM(1989) Endothelium and control of vascular function. *Hypertension* 13:558-667
3. De Mey JG, Claeys M, Vanhoutte PM(1982) Endothelium dependent inhibitory effects of acetylcholine, adenosine, triphosphate, thrombin, and arachidonic acid in the canine femoral artery. *J Pharmacol Exp Ther* 222:166-173
4. Nakahata N, Suzuki T(1981) Effect of prostaglandin E, I₂ and isoproterenol on the tissue cyclic AMP content in longitudinal muscle of rabbit intestine. *Prostaglandins* 22:159-165
5. Chiou WF, Chou CJ, Liao JF, Shum AYC, Chen CF(1994) The mechanism of the vasodilator effect of rutaecarpine, an alkaloid isolated from *Evodia rutaecarpa*. *Eur J Pharmacol* 257:59-66
6. Martin W, Villani GM, Furchgott RF(1984) Hemoglobin and methylene blue selectively inhibit relaxation of rabbit aorta by agents which increase cyclic GMP levels[abstract]. *Fed Proc* 43:737
7. Furchgott RF(1988) Studies on relaxation of rabbit aorta by sodium nitrite. In: *Vascular Smooth Muscle, Peptide, Autonomic Nerves and Endothelium*, Vanhoutte, P.M. (eds) Raven Press, New York pp401-414
8. Palmer RMJ, Ferrige AG, Moncada S(1987) Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327(11):524-526
9. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA(1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Am Soc Pharmacol Exp Ther* 43:109-142
10. Azuma JA, Ishikawa M, Sekizaki S(1986) Endothelium-dependent inhibition

- of platelet aggregation. *Br J Pharmacol* 88:411-415
11. Garthwaite J(1991), Glutamate, nitric oxide and cell-cell signaling in the nervous system. *Trend Neurosci* 14:60-67
 12. Bon C, Bogme GA, Doble A, Stuzman JM, Blanchard JC(1992) A role for nitric oxide in the long-term potentiation *Eur J Neurosci* 4:420-424
 13. Schultz KD, Schultz K, Schultz G(1977) Sodium nitroprusside and other smooth muscle relaxants increase cyclic GMP levels in rats ductus deferens. *Nature* 265:750-751
 14. Rapoport RM, Murad F(1983) Agonist-induced endothelium-dependent relaxation in the rat thoracic aorta may be mediated through cGMP. *Circ Res* 52:352-357
 15. Stone R(1994) Search for sepsis drugs on despite past failure. *Science*, 264:365-367
 16. Ignarro LJ, Gruetter CA, Hyman AL, Kadowitz PJ(1984) Molecular mechanisms of vasodilation. In: Pate G, Crooke ST(eds) Dopamine receptor agonists. Plenum Press, New York, pp259-288
 17. Thiemeermann C (1994) The role of L-arginine nitric oxide pathway in circulatory shock. *Adv. Pharmacol.*, 182:591-595
 18. Paya D, Gray GA, Fleming I and Stoclet JC (1993) Effect of dexamethasone on the onset persistence of vascular hyporeactivity induced by E. coli lipopolysaccharide in rats. *Circ. Res.*, 41:103-112
 19. Joly GA, Ayres M, Chelly P and Kilbourn RG (1994) Effect of N^G-methyl-L-arginine, N^G-nitro-L-arginine and aminoguanidine on constitutive and inducible nitric oxide synthase in rat aorta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 199:147-154