복분자 추출물의 항고혈압 활성

이정현 · 최혜란 · 이수정 · 이민정 · 고영종 · 권지웅 · 이희권 · 정종태 · 이태범*
고창복분자연연구소

Blood Pressure Modulating Effects of Black Raspberry Extracts *in vitro* and *in vivo*

Jung-Hyun Lee, Hye Ran Choi, Su Jung Lee, Min Jung Lee, Young Jong Ko, Ji Wung Kwon,
Hee Kwon Lee, Jong Tae Jeong, and Tae-Bum Lee*
Gochang Black Raspberry Research Institute

Abstract This study aimed to investigate the effects of 50% ethanol extract of ripe black raspberry (*Rubus occidentalis*, RBR) on hypertension in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) and in spontaneously hypertensive rats (SHR). Angiotensin converting enzyme (ACE) inhibition and activation of nitric oxide production by endothelial nitric oxide synthase were significantly regulated by RBR in HUVEC cells. Moreover, the SHR showed significantly higher levels of blood pressure, ACE, renin, endothelin-1, and interleukin-6 than Wistar Kyoto rats (WKY). However, treatment with captopril and RBR decreased the levels of these hypertension-related events in the SHR. The renal arteriole showed greater media thickness/lumen diameter (%) in the SHR than in the WKY. However, media thickness/lumen diameter (%) was reduced in SHR by treatment with captopril and RBR. In addition, the number of eosinophilic cardiac muscle cells was decreased in the heart muscles after treatment with captopril and RBR. Therefore, this study suggests that 50% ethanol extract of RBR may be useful for the prevention and treatment of high blood pressure.

Keywords: black raspberry, blood pressure, renin-angiotensin system, human umbilical vein endothelial cell line, spontaneously hypertensive rat

서 론

최근 서구화된 식습관, 운동부족, 과도한 스트레스, 노령화 등의 원인으로 인해 심혈관계 질환의 발병률이 두드러지게 증가하고 있다(1). 2012년 한국 통계청 사망원인 조사 결과 심장 질환 및 뇌혈관 질환과 같은 심혈관계 질환이 두 번째 사망원인으로 나타났으며 30대 한국인 남성의 3분의 1, 여성의 4분의 1, 60세 이상은 절반 이상이 고혈압을 가지고 있을 만큼 유병률이 높아 고혈압의 치료 및 예방이 더욱 더 중요시되어지고 있다(2-4).

혈압의 조절에 있어서 중요한 역할을 하는 기전인 renin-angiotensin system (RAS)은 혈관 수축뿐만 아니라 신장에서 나트륨을 재흡수 시킴으로써 혈압과 체액의 항상성을 유지시킨다고 알려져 있다. 신장의 혈류 감소로 인해 수입세동맥압이 낮아지면서 평활근세포인 juxtaglomerular (JG)로부터 renin이 분비되며, 분비된 renin은 혈중의 angiotensinogen을 angiotensinI (AngI)으로 변환시키며, AngI은 다시 angiotensin converting enzyme (ACE)에 의해 강력한 혈관수축작용을 하는 angiotensinII (AngII)로 변환된다. AngII는 결과적으로 AngII 수용체와 결합함으로써 그 작용이 나

타난다(5). AngII 수용체에는 크게 AngII type 1 receptor (AT1-R)와 AngII type 2 receptor (AT2-R)가 존재하며 AT1-R의 경우 혈관의 수축이나 심장의 비대, 알도스테론 분비와 나트륨 재흡수, 그리고 renin 분비의 억제 등 대부분의 작용을 매개하는 반면 AT2-R는 혈관의 이완작용에 관여하는 물질로 그 발현은 매우 적은 것으로 알려져 있다(5). RAS 이외에도 다양한 인자들이 혈압이 조절에 관여한다. 내피세포에서 생성되는 endothelin-1 (ET-1)은 혈관의 수축과 심장비대를 유발하는 인자로 알려져 있으며(6) 이와 반대로 nitric oxide (NO)는 혈관을 이완시키는 인자로 endothelial NO synthase (eNOS), inducible NOS (iNOS) 및 neuronal NOS (nNOS)에 의해 생성되는 것으로 알려져 있다(7). 또한 RAS의 AngII와 ET-1 및 NO는 서로 밀접한 관련이 있다고 보고되고 있다. ET-1의 유전자 발현은 AngII 및 NO의 활성화도 저하에 의해 촉진되며 AngII는 NO의 파괴를 촉진하여 내피세포의존성 혈관확장을 억제한다(8-10).

고혈압의 치료제로 1960년대 최초의 ACE 억제제인 captopril이 개발되면서 다양한 ACE 억제제가 변형되어 사용되어져 왔으나 ACE 비의존성 경로로 AngII가 생성됨이 밝혀지면서 이후 안지오텐신 수용체 차단제(AngII receptor blocker, ARB)인 losartan이 개발되어 RAS에서 조금 더 원위부의 차단이 가능해졌고 현재 여러 종류의 ARB가 사용되어지고 있다. 그러나 ACE 억제제나 ARB 역시 복용 시 마른기침, 혈관부종, 고칼륨혈증, 신장 기능장애 등의 부작용이 보고되어지고 있다(5). 때문에 부작용이 없는 천연물 소재의 혈압강화 효과에 대한 다양한 연구가 진행되어져 왔으며 그 예로 Kang 등(11)의 연구에서 홍삼에서 추출한

*Corresponding author: Tae-Bum Lee, Gochang Black Raspberry Research Institute, Gochang, Jeonbuk 525-943, Korea
Tel: 82-63-560-5170
Fax: 82-63-563-6680
E-mail: tblee01@gbri.re.kr
Received Januray 16, 2014; revised March 19, 2014;
accepted March 19, 2014

사포닌이 혈압 강하에 효과적이라고 보고하였으며, 발아현미의 γ -aminobutyric acid (12), 감귤에서 추출한 bioflavonoids (13), 맹종죽 줄기 추출물(2) 등의 혈압 강하 효과에 대한 연구 등이 보고된 바 있다.

고창이 최대 생산지인 복분자(*Rubus occidentalis*)는(14) anthocyanins (cyanidin 3-sambubioside, cyanidin 3-glucoside, cyanidin 3-xylosylrutinoside, cyanidin 3-rutinoside, pelargonidin 3-rutinoside), flavonoids (flavonols and flavanols), tannins (proanthocyanidins, ellagitannins, gallotannins), stilbenoids (resveratrol), phenolic acids 및 lignans와 같은 생리활성물질이 풍부하게 존재하는 것으로 보고되었으며 항염증효과, 항암활성효과, 및 항산화효과 등 다양한 생리활성에 대한 효능이 알려져 있다(15-17).

따라서 본 연구에서는 인간제대정맥내피세포주인 human umbilical vein endothelial cell line (HUVEC) 및 본태성 고혈압 동물 모델인 spontaneously hypertensive rat (SHR)을 이용하여 혈압 조절에 있어서 중요한 역할을 하는 RAS의 활성 및 기타 고혈압 관련 인자들에 미치는 복분자 추출물의 효과를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

세포주와 세포배양

복분자 추출물의 혈압 조절과 RAS에 미치는 영향을 알아보고자 인간제대정맥내피세포주인 HUVEC를 실험에 사용하였다.

HUVEC cell line은 한국세포주은행에서 분양 받았으며 Roswell Park Memorial Institute (RPMI) medium에 56°C에서 30분간 열처리된 fetal bovine serum (PAA, Etobicoke, ON, Canada) 10%와 항생제(penicillin/streptomycin, Lonza, Walkersville, MD, USA) 1%를 첨가하여 37°C, 습도 90%, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

추출물 제조

복분자 추출물은 미숙과와 완숙과 중량의 10배 용량의 용매(water, 25, 50, 75% 에탄올)를 첨가한 후 2시간 동안 환류추출장치를 이용하여 물 추출의 경우 100°C, 에탄올 추출의 경우 80°C로 2회 가열 추출하였다. 추출물은 여과하여 농축한 후 동결건조(PVTFD10R, Ilsinbiobase, Dongducheon, Korea)하여 사용하였으며 추출 수율은 Table 1에 나타내었다.

총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis 법(18)을 응용하여 측정하였다. 복분자 미숙과와 완숙과를 에탄올 농도별(water, 25, 50, 75%)로 제조한 추출 분말 1 mg을 용매 1 mL에 용해시켜 Folin-Ciocalteu's 시약 1 mL를 가하고 3분간 반응 후 10% Na₂CO₃ 용액(w/v) 1 mL를 넣어 1시간 실온에서 반응시킨 후 UV/VIS spectrophotometer (UV-2450, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 사용하여 700 nm에서 비색정량 하였다. Gallic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo, USA)를 표준물질로 사용하여 검량곡선을 작성하고 이로부터 총 폴리페놀 함량을 구하였다.

총 플라보노이드 함량은 Davis 방법(19)을 이용하여 측정하였는데, 시료 1 mg을 용매 1 mL에 용해시키고 diethylene glycol 2 mL, 1 N-NaOH 0.02 mL를 가한 다음 37°C 항온수조에서 1시간 동안 반응시킨 후 UV/VIS spectrophotometer (UV-2450, Shimadzu)를 사용하여 420 nm에서 비색정량 하였다. Rutin (Sigma-Aldrich)을 이용하여 검량곡선을 구하여 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

세포독성실험(MTT assay)

배양이 끝난 세포의 생존율은 MTT [3-(4, 5-dimethylthiazole-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide] 환원 방법을 이용하여 측정하였다. MTT assay는 살아있는 세포의 미토콘드리아에 존재하는 succinic dehydrogenase에 의해 MTT tetrazolium이 formazan으로 환원되는 것을 이용하여, formazan의 농도를 흡광도 450 nm에서 측정함으로써 생존한 세포수를 확인하는 방법이다.

HUVEC 세포는 96 well culture plate에 1×10⁴ cells/mL 농도로 90 µL씩 분주 한 뒤 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 복분자 추출물들을 농도별로 제조하여 처리한 후 24시간 동안 배양기에서 배양하였다. MTT assay는 cell viability assay kit (EZ-Cytox, Dogen, Seoul, Korea)를 이용하였고, 모든 well에 MTT 용액 10 µL를 가해주고 다시 37°C, 5% CO₂에서 4시간 배양하여 MTT가 환원되도록 하여, 흡광도 측정을 위해 1분 정도 부드럽게 shaking을 한 뒤 microplate reader (Synergy HT, Bio-Tek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Western blot

HUVEC 세포를 60 mm dish에 6×10⁵ cells/mL의 농도로 24시간 동안 배양 후 복분자 미숙과 및 완숙과 추출물을 처리하여 ACE 단백질의 발현 변화를 확인하였다. 양성대조군으로 ACE 억제제로 시판되어 사용되고 있는 captopril (Sigma-Aldrich)을 처리하였다. 복분자 추출물과 captopril 처리 24시간 후 차가운 PBS로 dish를 washing하고 lysis buffer를 dish에 뿌린 후 스크래퍼를 이용하여 세포를 획득 하였다. 단백질 추출을 위해 30분 동안 5분에 한 번씩 vortex mixing을 하였고, 13,000 rpm으로 15분 동안 원심분리한 후 상층액을 획득 하였다. Bradford 정량법을 이용하여 단백질 정량을 시행하였고, SDS-page gel에 loading 하였다. Loading을 마친 후 transfer turbo (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용해 PVDF membrane (Bio-rad)에 단백질을 transfer 시킨 후 5% blocking buffer (skim milk, Sigma-Aldrich)를 사용해 blocking 과정을 진행하였다. Transfer된 membrane을 1×TBS-T로 washing 후 5% blocking buffer에 1차 antibody (ACE: Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)를 희석하여 4°C에서 overnight 시켰다. 다음날 1×TBS-T로 membrane을 washing 한 뒤 2차 antibody (Santa Cruz Biotechnology)를 4°C에서 1시간 반응 시켰다. 이를 다시 1×TBS-T로 washing 후 ECL western blotting substrate (Promega, Madison, WI, USA)로 단백질의 발현정도를 확인하였다.

NO production

HUVEC 세포를 12 well culture dish에 1×10⁵ cells/mL의 농도로 희석하여 분주하였다. 24시간 뒤 복분자 추출물 및 양성대조군으로서 sodium nitroprusside (SNP)를 처리하였고, 처리 24시간 뒤 세포배양액을 획득하였다. 처리군의 세포 배양액을 원심분리하여 상층액을 획득한 후 상층액 150 µL, griess reagent 시약 20 µL, 그리고 130 µL의 H₂O를 혼합하여 상온에서 30분간 반응시켰다. 이후 반응물의 흡광도는 microplate reader (Bio-Tek)을 사용하여 흡광도 548 nm에서 측정하였다.

실험동물의 사육환경 및 식이

본 연구에서 사용한 실험동물은 250±10 g인 특정병원체부재(specific pathogen free, SPF) 상태의 수컷 10주령 SHR과 wistar

kyoto rats (WKY)을 중앙실험동물(Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 1주간 예비 사육기간을 거친 뒤 37°C heating chamber 내 보정틀에서 주 2회 혈압측정에 적응시킨 후, 고혈압이 발현된 수컷 SHR 35마리를 선별하여 체중을 기초로 'Z'자 식으로 군 분리하였고, 주 1회 일정한 시간에 디지털 계량기를 사용하여 체중을 측정하였다. 사료는 실험동물용 고형사료(Cargill Agri Purina, Inc., Seongnam, Korea)와 펠릿 및 자외선 살균기로 여과 살균된 정제수를 자유롭게 섭취하도록 하였다. 실험동물 사육실은 12시간 간격으로 명암을 조절하였고, 온도는 22±2°C, 습도는 50±5%를 유지하였다.

본 동물실험은 원광대학교 동물실험윤리위원회의 허가(WKU12-54)를 받아 시행하였다.

실험군의 구성 및 투여

실험군은 7마리를 한 군으로 하여 총 6개의 실험군으로 분류하였다. SHR 중 수축기 혈압이 150 mmHg 이상으로 고혈압 유발이 확인된 동물을 선별하여 5개 실험군으로 분리하고 WKY를 정상혈압 대조군으로 설정하였다.

SHR 실험군은 고혈압대조군, 복분자 추출물 투여군, 양성대조군으로 설정하였고, 복분자 추출물 투여군은 복분자 원숙과 에탄올 50% 추출물 저농도군(125 mg/kg), 중농도군(250 mg/kg), 고농도군(500 mg/kg)으로 나누었다. 양성대조군으로는 captopril (20 mg/kg)을 사용하였고, 각 투여물은 경구용 주사기를 이용하여 8주간 매일 일정한 시간대(AM. 10시)에 경구 투여하였으며, 고혈압대조군에는 같은 양의 증류수를 투여하였다.

수축기 혈압 측정

실험기간 중 주 1회 수축기 혈압을 측정하였다. 혈압 측정의 오차범위를 줄이기 위해 실험동물을 혈압측정기(BP-2000 blood pressure analysis system, rat platform 2-channel, Visitech Systems, Apex, NC, USA)의 홀더에 보정한 후 37°C heating chamber에서 30분간 적응시켜 혈압을 3회 반복 측정하였다.

실험동물의 혈액 채취 및 혈액분석

투여 8주 후 모든 실험동물을 12시간 동안 절식시키고 ether 마취 후 후대정맥에서 혈액을 얻었다. 혈액은 EDTA를 처리하여 4°C 3,000 rpm으로 15분간 원심분리 하여 혈장을 분리하였다.

혈장 ACE 활성 및 C-reactive protein 측정

ACE 활성(rat ACE ELISA kit, CUSABIO, Newark, DE, USA)과 C-reactive protein (CRP, rat CRP ELISA kit, ALPCO, Salem, NH, USA)의 측정은 rat에서 분리한 혈장을 이용해 흡광도 450 nm에서 측정하였다.

RNA 분리

신장조직으로부터 RNA를 추출하기 위하여 실험동물의 신장 30 mg을 tri reagent (RNAiso PLUS, TAKARA, Otsu, Japan) 1 mL에 넣고, homogenizer로 균질화한 후 5분 동안 상온에 방치하였다. 이후 chloroform 200 µL를 넣어 20초간 vortex mixing하였고 15,000 rpm으로 10분 동안 원심분리한 후 상층액을 새로운 튜브에 옮겼다. 상층액과 동량으로 isopropanol을 첨가한 후 10분 동안 방치하였다. 이를 다시 15,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 RNA 침전물을 획득하였다. RNA 침전물을 0.1% diethyl pyrocarbonate (DEPC)와 혼합한 70% 에탄올을 넣어 washing한 후 15,000 rpm에서 5분 동안 원심분리 하였다. 에탄올을 제거한 후 수분 간 침전물을 건조시켜 0.1% DEPC water에 녹였다. RNA 농도(1 OD=40 µg/mL)는 DU^R730 spectrophotometer (Beckman, Fullerton, CA, USA)를 이용하여 260 nm에서 측정하였다.

실시간 역전사 중합효소 연쇄반응(real-time RT-PCR quantification)

First strand cDNA를 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1 U/µL RNasin (Invitrogen), 1 mM each dNTP, oligo(dT)₂₀ 100 ng과 MMLV reverse transcriptase (Invitrogen) 200U가 함유된 20 µL의 용액에서 총 RNA 2 µg으로부터 합성하였다. Real-time PCR은 Fast Start DNA Master SYBR Green I kit (Roche, Mannheim, Germany)을 이용하여 Light Cyclers 2.0에서 증폭하였다. 유전자 분석에 primer (renin, AT1-R, ET-1, IL-6)를 사용하였고 primer sequence 및 PCR 조건은 Table 2과 같으며 유전자의 정량 분석은 Light Cyclers Software 4.0 (Roche)을 이용하였다.

조직학적검사

병리조직학적 검사를 위해 적출된 조직의 일부를 10% 중성 formalin에 고정하고, paraffin으로 포매하여 4 µm 두께로 절편한

Table 1. Total polyphenol, total flavonoid content and extraction yields of different ethanol extracts from black raspberry (unripe and ripe)

Material	Extraction	Yield (%)	Total polyphenol content (GAE/g)*	Total flavonoid content (RE/g)**
UBR	Water	5.10±0.44 ^d	129.34±0.13 ^d	33.34±0.25 ^d
	25% Ethanol	6.96±0.35 ^c	143.29±0.21 ^c	36.51±0.11 ^c
	50% Ethanol	6.35±0.71 ^c	164.56±0.09 ^b	44.43±0.67 ^b
	75% Ethanol	6.30±0.55 ^c	181.04±0.41 ^a	51.43±0.81 ^a
RBR	Water	9.00±0.35 ^b	46.75±0.28 ^b	17.31±0.42 ^g
	25% Ethanol	10.31±0.45 ^a	59.40±0.36 ^e	21.08±0.22 ^f
	50% Ethanol	10.02±0.38 ^a	63.79±0.24 ^f	21.69±0.41 ^f
	75% Ethanol	8.66±0.42 ^b	66.71±0.37 ^e	24.92±0.38 ^e

*Gallic acid (GAE) was used as a standard for measuring of the total polyphenol content.

**Rutin (RE) was used as a standard for measuring of the total flavonoid content.

Each value represents the mean±SE (n=3).

Different alphabets in each values show statistically difference at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

UBR; unripe black raspberry, RBR; ripe black raspberry

후 hematoxylin and eosin (H&E) 염색 후 광학현미경으로 40배 또는 100배의 배율에서 관찰하였다.

병리조직학적 검사는 Nikon eclipse E200 (Nikon, Kanagawa, Japan) 현미경을 이용하여 그룹 당 7마리씩 한 개체에 대하여 3 개의 조직 절편을 만들어 eosinophilic band (E.P)가 있는 변성된 심근세포를 관찰하였고 image analyzer (Focus technology, Hamburg, Germany)를 이용하여 그룹별 신세동맥의 혈관 내부 직경 (lumen diameter, μm)과 벽두께(media thickness, μm) 평균값 및 표준편차를 구하고 벽두께/직경 비율(media thickness/lumen) (%) 을 구하여 군간 차이를 비교하였다.

통계분석

모든 분석 자료는 평균 $\pm$ 표준오차(mean $\pm$ SE)로 나타내었으며 실험결과는 SPSS 12.0K (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서 통계처리 하였고 t -test와 duncan's multiple range test로 검증하였다.

결과 및 고찰

HUVEC에서 복분자 추출물의 세포독성검사

복분자 미숙과와 완숙과 물 추출물 및 에탄올 25, 50, 75% 추출물의 세포독성을 확인하기 위해 HUVEC 세포를 이용하여 미숙과 및 완숙과를 1-100 $\mu\text{g/mL}$ 까지 처리하여 24시간 후의 세포 독성 여부를 확인한 결과 모든 농도에서 세포독성을 보이지 않는 것으로 나타났다(data not shown).

복분자 추출물의 ACE 단백질 발현 억제 효과

복분자 추출물의 세포 내 ACE 단백질 발현 억제 효과를 알아보기 위하여 인간체대정맥내피세포주인 HUVEC 세포를 이용하여 실험을 실시한 결과 복분자 완숙과 및 미숙과 추출물을 추출 용매별(water, 25, 50, 75% 에탄올)로 100 $\mu\text{g/mL}$ 처리하였을 때 복분자 완숙과 및 미숙과 모두 물 추출물 보다는 에탄올 50%와 75% 추출물에서 뛰어난 ACE 단백질 발현 억제능력을 보였다. 또한 양성대조군으로 사용되어진 captopril의 경우 10 nM과 100 nM의 농도에서 높은 억제능력을 보였다(Fig. 1A). 산업적 이용 가치 등을 고려하여 복분자 완숙과 에탄올 50% 추출물을 100, 200, 400 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 HUVEC 세포에 처리를 하였고 그 결과 처리한 추출물의 농도 의존적으로 ACE 단백질 발현이 억제됨을 확인하였다(Fig. 1B).

RAS에서 ACE는 AngI을 AngII로 전환시킴으로써, 결과적으로 혈압을 상승시키는 중요한 효소이다(5). 최근에는 천연물에서 추출한 단일물질의 ACE 활성억제효과에 대한 연구가 다양하게 진행되고 있다.

Ojeda 등(20)은 delphinidin-3-*O*-sambubiosides 및 cyanidin-3-*O*-sambubiosides와 같은 안토시아닌이 ACE 활성 억제작용을 한다고 보고하였고, 이외에 폴리페놀의 대표물질인 kaempferol, quercetin, myricetin이 ACE 억제에 효과적인 것으로 밝혀졌다(21-23). 따라서 복분자의 ACE 억제 효과에는 복분자에 다량 함유되어있는 안토시아닌과 폴리페놀이 크게 영향을 미치는 것으로 사료되어진다.

본 실험에서 복분자 미숙과 및 완숙과 모두 물 추출물 보다는

Fig. 1. Effect of black raspberry extracts (unripe and ripe) on expression of ACE protein and NO production. Values are expressed as mean $\pm$ SE (n=3). Different superscripts in the same column indicate significant differences between groups at $p < 0.05$ by Duncan's multiple comparison test. SNP; sodium nitroprusside

에탄올 추출물에서 ACE 단백질 억제효과가 뛰어났다. 이와 관련하여 Song 등(24)은 감귤박의 열수 및 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량 및 항산화 활성 등을 비교하였고, 두 추출물의 총 폴리페놀 함량은 차이가 없었지만 열수추출물 보다는 에탄올추출물의 항산화 활성이 더 뛰어나며, 이는 항산화 활성에 관여하는 폴리페놀이 에탄올 추출물에 더 많이 함유되어있기 때문이라고 보고한 바 있다. 본 연구에 사용된 추출물의 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량 분석 결과 물 추출물보다 에탄올 추출물에서 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량이 더 높게 나타났으며(Table 2) 이러한 결과가 ACE 억제효과에 반영된 것으로 사료된다.

복분자 추출물의 NO 생성에 미치는 영향

복분자 추출물이 혈관이완인자인 NO의 생성에 미치는 영향을 조사하였다. HUVEC 세포를 이용하여 복분자 미숙과와 완숙과 물 추출물 및 에탄올 추출물(25, 50, 75% 에탄올)을 각각 200 µg/mL의 농도로 처리를 하였고 그 결과 복분자 미숙과 추출물보다 완숙과 추출물에서 NO 증가 효과가 더 뛰어나게 나타났으며, 완숙과 중에서도 물 추출물 보다 에탄올 추출물의 NO 증가 효과가 더 뛰어나게 나타났다(Fig. 1C). 이 결과를 토대로 복분자 완숙과 에탄올 50% 추출물을 농도별(100, 200, 400 µg/mL)로 처리하였을 때 HUVEC 세포의 NO 생성에 미치는 영향을 확인하였으며 그 결과 복분자 완숙과 에탄올 50% 추출물을 100 µg/mL 처리 했을 때 2.3배, 200 µg/mL로 처리 한 경우 3.9배, 그리고 400 µg/mL의 농도로 처리 했을 때 6.2배 NO의 생성이 증가됨을 확인하였다. 또한 양성대조군으로 사용되어진 SNP (20 µM)의 경우 NO의 생성이 7.3배 증가되었다(Fig. 1D).

NO는 혈관평활근세포 내의 guanylate cyclase (GC)를 자극하여 3', 5'-cyclic guanosine monophosphate (cGMP)를 증가시킴으로써 혈관이완을 일으킨다고 알려져 있다(25). 이와 유사한 결과로 Yoon 등(26)은 국내산 복분자를 농도별로 처리하였을 때 NO의 생성이 농도 의존적으로 증가하였고, 또한 국내산 복분자의 이러한 NO의 생성은 eNOS의 활성과 관련이 깊다고 보고한 바 있다. 양성대조군으로 사용되어진 SNP는 oxyhemoglobin과의 상호작용을 통하여 cyanide과 NO로 분리되며, 분리된 NO가 평활근의 GC를 자극시켜 cGMP의 생성을 증가시킴으로써 혈관이완을 야기하는 것으로 알려져 있다(27).

체중변화

In vitro 실험 결과, ACE 단백질 발현 억제효과 및 NO의 생성에 복분자 완숙과 에탄올 50% 추출물이 가장 효과적인 것으로

Table 3. Changes of body weight after treatment of different concentration of RBR (50% EtOH) and captopril in SHR for 8 weeks

Group	Body weight (g)	
	Before treatment	After treatment
WKY	336.18±3.29	423.13±5.35
SHR	295.36±7.16	356.40±7.78
SHR+RBR 125	295.46±6.71	349.73±9.92
SHR+RBR 250	288.50±4.53	350.34±10.44
SHR+RBR 500	293.63±4.96	347.06±3.90
SHR+C 20	287.43±4.32	346.15±4.89

Data are presented as mean±SE (n=7).

RBR 125, RBR 125 mg/kg; RBR 250, RBR 250 mg/kg; RBR 500, RBR 500 mg/kg; C 20, captopril 20 mg/kg

판단하여 *in vivo*에서는 복분자 완숙과 에탄올 50% 추출물을 농도별로 처리하여 실험을 진행하였다.

각 실험군에서 실험 전과 복분자 에탄올 50% 추출물 및 captopril 투여 8주 후 체중의 변화를 조사하였다(Table 3). 정상대조군에 비하여 고혈압대조군 및 약물 투여군의 체중이 다소 낮은 경향을 보였으며, 고혈압대조군과 비교하였을 때 복분자 에탄올 50% 추출물 투여군과 양성대조군에서 체중의 유의적인 차이는 보이지 않았다.

수축기혈압

복분자 완숙과 에탄올 50% 추출물이 본태성 고혈압 흰쥐의 혈압에 미치는 영향을 알아보기로 실험동물을 정상대조군, 고혈압대조군, 복분자 완숙과 에탄올 50% 추출물 저농도 투여군(125 mg/kg), 중농도 투여군(250 mg/kg), 그리고 고농도 투여군(500 mg/kg)과 양성대조군(captopril 20 mg/kg)으로 나누어 8주 동안 경구 복용시킨 후 혈압을 측정하였다(Table 4). 고혈압대조군은 실험 전과 후 일정하게 높은 혈압을 유지하였으며 투여 8주 후 복분자 완숙과 에탄올 50% 추출물 저농도 투여군(198.33±4.20 mmHg)의 수축기 혈압은 미미한 효과를 보였지만, 중농도 투여군 및 고농도 투여군의 수축기혈압은 각각 172.23±9.65 mmHg과 180.07±7.61 mmHg로 고혈압대조군과 비교하였을 때 눈에 띄게 혈압이 감소되어 양성대조군(183.50±6.47 mmHg)의 혈압강하 효과보다 더 뛰어난 효과를 보였다. 또한 각 군의 약물 투여 전과 후의 수축기 혈압을 비교하였을 때, 복분자 완숙과 에탄올 50% 추출물의 경우 저농도 투여군은 투여 전 수축기 혈압보다 10.20±4.81 mmHg 상승하여 혈압 강하효과를 나타내지 않았지만 중농도 투여군은

Table 2. PCR primers for real-time PCR

Gene		Primer	Length of PCR products
Renin	S	5'-TGCTAAAGGAGGAAGTGTTT-3'	104 bp
	AS	5'-TGATGCTCACGTAGTGAAAG-3'	
AT1-R	S	5'-CACCTATGTAAGATCGCTTC-3'	445 bp
	AS	5'-GCACAATCGCCATAATTATCC-3'	
ET-1	S	5'-GCCAAGCAGACAAAGAACTCCGAG-3'	248 bp
	AS	5'-GCTCTGTAGTCAATGTGCTCGGTT-3'	
IL-6	S	5'-CCCAACTTCCAATGCTCTCCTAATG-3'	141 bp
	AS	5'-GCACACTAGGTTTGCCGAGTAGACC-3'	
β-actin	S	5'-GGAAATCGTGCGTGACATTA-3'	152 bp
	AS	5'-ATCGGAACCGCTCATTG-3'	

Table 4. Changes of systolic blood pressure after treatment of different concentration of RBR (50% EtOH) and captopril in SHR for 8 weeks

Group	Systolic blood pressure (mmHg)		
	Before treatment	After treatment	Variation of blood pressure
WKY	141.07±4.85 ^c	136.93±2.60 ^d	-4.13±5.24 ^{bc}
SHR	202.33±3.15 ^a	212.5±4.16 ^a	10.17±4.49 ^c
SHR+RBR 125	188.13±4.29 ^b	198.33±4.20 ^{ab}	10.20±4.81 ^c
SHR+RBR 250	200.77±5.39 ^a	172.23±9.65 ^c	-28.54±12.36 ^d
SHR+RBR 500	208.60±3.02 ^a	180.07±7.61 ^c	-28.53±7.23 ^a
SHR+C 20	197.86±2.01 ^{ab}	183.50±6.47 ^{bc}	-14.36±6.61 ^{ab}

Data are presented as mean±SE (n=7).

Different alphabets in each values show statistically difference at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

28.54±12.36 mmHg, 고농도 투여군은 28.53±7.23 mmHg로 수축기 혈압이 눈에 띄게 감소되었다. 따라서 복분자 완숙과 에탄올 50% 추출물이 혈압 강하에 유효한 영향을 미치는 것으로 사료되며, 이는 앞서 밝힌 세포실험의 결과와 부합되는 결과로 복분자 내에 함유하고 있는 cyanidin, kaempferol, quercetin, myricetin 등의 생리활성물질의 작용(20-23)이 혈압 강하에 도움이 되는 것으로 사료된다.

복분자 추출물의 ACE 저해활성

*In vivo*에서의 복분자 완숙과 에탄올 50% 추출물의 ACE 저해활성을 측정하기 위해 8주 간의 복분자 완숙과 에탄올 50% 추출물 투여 후 동물의 후대정맥에서 혈액을 채취하였다. 이후 EDTA를 처리하여 3,000 rpm, 15분 원심분리를 통해 획득한 혈장을 이용하여 ACE의 저해활성을 측정하였다(Fig. 2). 그 결과 고혈압대조군은 정상혈압대조군에 비해 혈장의 ACE가 26.5% 증가하였다. 복분자 완숙과 에탄올 50% 추출물을 125 mg/kg의 농도로 투여한 저농도군은 고혈압대조군과 비교하였을 때 미미한 효과를 나타내었지만, 중농도군(250 mg/kg)과 고농도군(500 mg/kg)은 고혈압대조군과 비교하였을 때 각각 42.3% 및 30.4% ACE 활

Fig. 2. Inhibitory effect of RBR extracts (50% EtOH) and captopril on ACE activity in the plasma of the arterial blood of SHR. Data are plotted as mean±SE (n=7). Different superscripts in the same column indicate significant differences between groups at $p<0.05$ by Duncan's multiple comparison test.

성을 억제하는 것으로 나타났다. 이러한 복분자 완숙과 에탄올 50% 추출물의 ACE 억제효과는 양성대조군으로서 ACE 억제제로 작용하는 captopril (20 mg/kg) 투여군의 ACE 억제효과 보다는 뛰어나지 않았으나, ACE의 활성을 정상수준으로 낮출 만큼 효과적이었다. ACE는 RAS의 핵심적인 효소로서 AngI을 AngII로 전환시켜 혈관의 수축을 야기할 뿐만 아니라 혈관을 이완시키는 작용을 하는 bradykinin을 불활성 시킴으로써 혈압을 상승시키는 것으로 알려져 있다(5). Kim 등(28)의 연구에서는 SHR에 무청 건조분말을 4주간 투여한 후 폐와 신장 조직 및 혈청에서 ACE의 활성도를 측정하였고 그 결과 무청 건조분말 투여군이 고혈압대조군에 비해 폐 조직에서의 ACE 활성도가 현저히 감소되었지만 신장 조직이나 혈청에서의 ACE 활성도는 변화가 없었다고 보고하였다.

복분자 추출물의 Renin, AT1-R, ET-1 유전자 발현에 미치는 영향

복분자 완숙과 에탄올 50% 추출물이 RAS의 renin과 AT1-R 및 ET-1 유전자 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 투여 8주 후 희생된 동물의 신장 조직에서 RNA를 추출하였고 이를 실시간 역전사 중합효소 연쇄반응을 통하여 확인하였다(Fig. 3). 그 결과 정상혈압대조군과 비교하였을 때 고혈압대조군의 renin 유전자 발현이 68.7% 증가하였다. 복분자 완숙과 에탄올 50% 추출물 투여군들의 경우 저농도 및 중농도 투여군의 renin 유전자 발현이 고혈압대조군 보다 눈에 띄게 억제되는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3A). AT1-R의 유전자 발현은 정상대조군과 비교하여 고혈압대조군이 63.1% 증가하였으며, 고혈압대조군과 비교하였을 때 복분자 완숙과 에탄올 50% 추출물 투여군들의 경우 AT1-R의 유전자 발현이 감소하는 경향은 보였으나 통계적으로 유의성을 나타내지는 않았다(Fig. 3B). Renin이나 AT1-R과 같은 RAS 관련 물질 이외에 ET-1 역시 혈관을 수축시킴으로써 혈압을 상승시키는 인자로 알려져 있다. 복분자 완숙과 에탄올 50% 추출물의 ET-1의 유전자 발현에 미치는 영향은 Fig. 3C에 나타내었다. 고혈압대조군의 ET-1 유전자 발현이 정상대조군보다 36.2% 증가된 것을 확인하였으며 복분자 완숙과 에탄올 50% 추출물 투여군 및 양성대조군 모두 ET-1 유전자 발현을 효과적으로 억제시켰다. Renin은 RAS의 첫 단계의 물질로 혈류량이 감소하거나 신장에서의 나트륨의 부하가 감소하는 등의 생리적 요인에 반응하여 분비된다. Na 등(29)은 신장 동맥을 silver clip으로 조임으로써 고혈압을 유발시킨 백서에게 배에서 추출한 pear phenolic compounds를 2일에 1회 3주간 투여하였고 그 결과 혈장의 renin 농도가 유의하게 감소되는 결과를 얻어 배에서 추출된 phenolic compounds가 혈압강하에 효과가 있음을 보고하였다. AT1-R은 AngII와 결합함으로써 혈관의 수축이나 심장의 비대, 알도스테론 분비와 나트륨 재흡수, 그리고 renin 분비의 억제 등을 유발하여 혈압을 상승시키는 작용을 하는 것으로 알려져 있다. 최근 항고혈압제 중 ACE inhibitor 보다 그 효율성이 뛰어나다고 알려진 ARB는 RAS의 AngII와 AT1-R의 결합을 억제시킴으로써 혈압의 상승을 억제시킨다(5).

본 실험에서 고혈압대조군의 AT1-R 유전자 발현이 유의적으로 증가함으로써 고혈압과 AT1-R 간의 연관성이 확인되었다. 그러나 복분자 완숙과 에탄올 50% 추출물 투여 결과 AT1-R 유전자 발현은 통계적인 유의성을 보이지 않았다. 따라서 복분자 완숙과 에탄올 50% 추출물은 RAS의 AT1-R 보다는 renin 및 ACE에 작용하여 혈압 감소에 영향을 미치는 것으로 사료된다. ET-1은 내피세포에서 생성되어 혈관의 수축과 심장비대를 유발시키

Fig. 3. Effects of RBR extracts (50% EtOH) and captopril on expression of renin (A), AT-1R (B), ET-1 (C) and IL-6 (D) mRNA in the kidney tissue of SHR. Data shown in graphs are the mean $\pm$ SE (n=7). Different superscripts in the same column indicate significant differences between groups at $p < 0.05$ by Duncan's multiple comparison test.

는 물질로, 심장 조직 내의 ET-1 수준은 심혈관계 질환을 가지고 있을 경우 현저히 증가한다(6). 또한 ET-1은 NO의 활성도가 저하됨으로서 생성이 촉진된다고 알려진 바 있다(9). 본 실험에서 복분자 원숙과 추출물은 RAS에 영향을 미칠 뿐만 아니라 NO의 생성을 증가시키고 ET-1의 유전자 발현을 억제시키는 등 고혈압 관련 인자를 조절함으로써 혈압의 감소에 도움이 되는 것으로 사료된다.

복분자 추출물이 염증관련 지표(IL-6, CRP)에 미치는 영향

복분자 원숙과 에탄올 50% 추출물이 고혈압과 관련된 염증지표인 interleukin-6 (IL-6)의 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 고혈압대조군의 IL-6 유전자 발현이 정상대조군에 비해 유의하게 증가하였으며, 복분자 원숙과 에탄올 50% 추출물을 투여한 군의 경우 저농도 투여군과 중농도 투여군에서 IL-6 유전자 발현이 눈에 띄게 감소되어 뛰어난 억제효과를 보였다. 고농도 투여군의 경우 IL-6 유전자 발현이 감소되긴 하였으나 그 억제 효과가 미미하였다(Fig. 3D). IL-6는 염증성 사이토카인으로 혈관평활근세포의 증식을 매개한다. 또한 초기 고혈압에 의한 산화 스트레스의 증가 및 AngII의 혈관평활근세포의 자극이 IL-6의 발현을 증가시킨다(30).

복분자 원숙과 에탄올 50% 추출물이 CRP의 생성에 미치는 영향을 확인하기 위해 실험 종료 후 얻은 혈장에서 CRP의 농도를 측정하였다. 그 결과 모든 군의 혈장 CRP의 농도에 차이가 없었다(data not shown). CRP는 급성상반응(acute phase reactant) 단백질 중의 하나로 고혈압을 가지고 있는 경우 혈중 CRP 농도가 상승한다고 알려져 있다(31). 그러나 Hong 등(32)은 SHR에서 ACE-inRNA 투여 후 혈압의 변화, ACE, ET-1 및 CRP의 변화를 조사

하였고, 그 결과 혈압 과 ACE 및 ET-1의 단백질발현이 유의하게 감소하였지만 CRP는 모든 군에서 차이를 보이지 않았다. 또한 Bautista 등(30)은 고혈압환자의 IL-6와 TNF- α (tumor necrosis factor- α) 및 CRP 간의 연관성에 대해 조사하였고, 그 결과 고혈압환자에서 IL-6와 TNF- α 는 증가하였지만 CRP에는 변화가 없음을 보고하였다.

병리조직학적 검사 결과

복분자 원숙과 에탄올 50% 추출물이 본태성 고혈압 흰쥐의 신세동맥에 미치는 영향을 알아보기로 실험 8주 후 실험동물을 희생하여 신장조직을 적출하였고, 조직의 일부를 10% 중성 formalin에 고정한 후 paraffin으로 포매하여 4 μ m 두께로 절편한 후 H&E 염색을 하여 100배의 배율에서 관찰하였다(Fig. 4A). 그 결과 고혈압대조군의 신세동맥의 혈관이 정상대조군에 비해 눈에 띄게 좁아진 것을 확인 할 수 있었고, 복분자 원숙과 에탄올 50% 추출물 투여군 및 captopril을 처리한 양성대조군에서 혈관 벽의 두께가 얇아짐이 관찰되었다. 이를 뒷받침 하는 근거로, 신세동맥의 혈관 내부직경(lumen diameter)과 벽두께(media thickness)를 측정하였으며, 혈관의 직경 대비 벽두께(media thickness/lumen diameter (%))를 구하였다(Fig. 4C). 그 결과 정상대조군의 경우 40 $\pm$ 3.02%, 고혈압대조군의 경우 83.8 $\pm$ 16.36%로 직경 대비 벽의 두께가 유의하게 증가됨을 확인하였다. 이에 반해 복분자 원숙과 에탄올 50% 추출물 투여군은 저농도, 중농도 및 고농도 투여군에서 각각 31.8 $\pm$ 4.78, 32.2 $\pm$ 5.09, 27.8 $\pm$ 3.04%로 효과적으로 혈관 벽의 두께가 감소됨을 확인하였다. Captopril을 사용한 양성대조군은 33.5 $\pm$ 2.40%로 복분자 원숙과 에탄올 50% 추출물 투여군과 비슷한 결과를 보였다. 또한 고혈압에 의해 유발될 수 있는 심장

Fig. 4. Histologic findings of renal arteriole (A) and cardiac muscle (B) by treatment of RBR extracts (50% EtOH) and captopril in the SHR. Bar graphs represent media thickness/lumen diameter of renal arteriole (C) and the number of eosinophilic cardiac muscle cells (D) in SHR, respectively. H&E stain, X100. Scale bar=100 μ m. Graphs represents mean $\pm$ SE (n=7). Different superscripts in the same column indicate significant differences between groups at $p<0.05$ by Duncan's multiple comparison test.

근육세포들의 변성을 확인한 결과 고혈압대조군에서 세포질에 강한 호산성 염색 소견인 E.P가 있는 변성세포들이 눈에 띄게 발견되었고(Fig. 4B) 변성세포 수를 계측한 결과 고혈압대조군이 정상대조군에 비해 변성세포의 수가 현저히 증가된 것을 확인 하였으며 복분자 완속과 에탄올 50% 추출물 투여군 및 양성대조군에서는 변성세포의 수가 눈에 띄게 줄어들었다(Fig. 4D). 이러한 결과로 복분자 추출물이 고혈압에 의해 유발될 수 있는 심장의 병변 완화에 도움이 되는 것으로 사료되어진다. Kang 등(33)은 monocrotaline으로 유발된 고혈압 흰쥐에게 현삼단삼을 4주간 경구투여 하였고 그 결과 고혈압군보다 현삼단삼을 투여군의 폐동맥근의 비대가 감소되었으며, 호산성으로 염색된 심근세포의 수가 현저히 감소됨을 확인한 바 있다.

요 약

본 연구는 복분자 완속과 50% 에탄올 추출물을 이용하여 인간 간세포대정맥내피세포주(HUVEC)에서 복분자 추출물이 NO의 생성에 미치는 영향과 ACE 단백질 발현을 조사하였으며, 본태성 고혈압 흰쥐(SHR)에서 혈압강하 효과 및 혈압의 조절과 관련 깊은 인자들(renin, AT1-R, ET-1, IL-6)의 유전자 발현 그리고 혈관조직의 변화를 조사하였다. 그 결과 복분자 완속과 50% 에탄올 추출물은 HUVEC 세포주에서 NO의 생성을 촉진하였으며 혈관수축 활성을 가지는 ACE 단백질의 발현을 억제하였고 본태성 고혈압 흰쥐에게 복분자 완속과 에탄올 50% 추출물을 8주간 투여한 결과 혈액 내 ACE의 활성이 억제되었으며 renin 및 혈관 수축인자인 ET-1 유전자의 발현이 억제되고 염증관련 유전자인 IL-6의 발현이 억제됨을 확인하였다. 그리고 신세동맥의 두께 및 심근 호산성세포수를 감소시켜 혈관내피세포의 손상을 보호하며 심장의 병변을 경감시키는 효과가 있음을 확인하였다. 본 연구 결과 복

분자 완속과 추출물은 혈압 조절과 연관된 단백질 및 유전자의 발현과 활성을 조절하고, 혈관의 두께 및 심근의 변성을 감소시켜 혈압 강하에 도움이 되는 것으로 나타났으며 향후 심혈관계 질환을 개선시킬 수 있는 식품소재로서의 가능성이 있음을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 지역 농식품 선도클러스터 육성사업의 2012년도 연구비 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

References

- Kim EJ, Kim HY, Lee JY, Lee JK, Kim SJ, Choi KM, Kang DG. Effect of samhwangsasim-tang, samigangap-tang and bangtan-tang on blood pressure in stroke prone spontaneously hypertensive rats. Korean J. Herbology 26: 75-80 (2011)
- Kim JS, Kim MJ, Park MH, Ryu BM, Moon GS. Angiotensin converting enzyme inhibition and antihypertensive effects of *Phyllostachys pubescens* culm extracts in spontaneously hypertensive rats. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 37: 27-34 (2008)
- Korea National Statistical Office. Death statistics in 2012. Korea National Statistical Office, Daejeon, Korea. pp. 3-4 (2012)
- Ministry of Health and Welfare. The third Korea national health and nutrition examination survey; health examination. Ministry of Health and Welfare, Sejong, Korea. pp. 61-66 (2005)
- Atlas SA. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. J. Manag. Care Pharm. 13: S9-20 (2007)
- Dhaun N, Goddard J, Kohan DE, Pollock DM, Schiffrin EL, Webb DJ. Role of endothelin-1 in clinical hypertension: 20 years on. Hypertension. 52: 452-459 (2008)
- Cho HS. Effect of regular swimming training on myocardium eNOS, iNOS gene expression & elasticity of aorta in hyperten-

- sive rats. Korean J. Sport Sci. 16: 21-33 (2005)
8. Imai T, Hirata Y, Emori T, Yanagisawa M, Masaki T, Marumo F. Induction of endothelin-1 gene by angiotensin and vasopressin in endothelial cells. Hypertension 19: 753-757 (1996)
9. Barton M, Cosentino F, Brandes RP, Moreau P, Shaw S, Lüscher TF. Anatomic heterogeneity of vascular aging: role of nitric oxide and endothelin. Hypertension 30: 817-824 (1997)
10. Schmieder RE, Hilgers KF, Schlaich MP, Schmidt BM. Renin-angiotensin system and cardiovascular risk. Lancet 369: 1208-1219 (2007)
11. Kang SY, Kim ND. The antihypertensive effect of red ginseng saponin and the endothelium-derived vascular relaxation. Korean J. Ginseng Sci. 16: 175-182 (1992)
12. Choi HD, Kim YS, Choi IW, Park YK, Park YD. Hypotensive effect of germinated brown rice on spontaneously hypertensive rats. Korean J. Food Sci. Technol. 38: 448-451 (2006)
13. Son HS, Kim HS, Kwon TB, Ju JS. Isolation, purification and hypotensive effect of bioflavonoids in *Citrus sinensis*. J. Korean Soc. Food Nutr. 21: 136-142 (1992)
14. Eu GS, Chung BY, Bandopadhyay R, Yoo NH, Choi DG, Yun SJ. Phylogenetic relationships of *Rubus* species revealed by randomly amplified polymorphic DNA markers. J. Crop Sci. Biotech. 11: 39-44 (2008)
15. Jeong JH, Jung HN, Lee SR, Lee HJ, Hwang KT, Kim TY. Antioxidant, anti-proliferative and anti-inflammatory activities of the extracts from black raspberry fruits and wine. Food Chem. 123: 338-344 (2010)
16. Zhang Z, Knobloch TJ, Seamon LG, Stoner GD, Cohn DE, Pas-kett ED, Fowler JM, Weghorst CM. A black raspberry extract inhibits proliferation and regulates apoptosis in cervical cancer cells. Gynecol. Oncol. 123: 401-406 (2011)
17. Wnag SY, Lin HS. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. J. Agr. Food Chem. 48: 140-146 (2000)
18. Amerine MA, Ough CS. Methods for Analysis of Musts and Win. Wiley. New York, NY, USA. pp. 176-180 (1980)
19. Chang CC, Yang MH, Wen HM, Chern JC. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. J. Food Drug Anal. 10: 178-182 (2002)
20. Ojeda D, Jimenez-Ferrer E, Zamilpa A, Herrera-Arellano A, Tor-toriello J, Alvarez L. Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) activity by the anthocyanins delphinidin- and cyanidin-3-O-sambubiosides from *Hibiscus sabdariffa*. J. Ethnopharmacol. 127: 7-10 (2010)
21. Ahmed F, Siddesha JM, Urooj A, Vishwanath BS. Radical scavenging and angiotensin converting enzyme inhibitory activities of standardized extracts of *Ficus racemosa* stem bark. Phytother. Res. 24: 1839-1843 (2010)
22. Pintoa Mda S, Kwon YI, Apostolidis E, Lajoloa FM, Genovesea MI, Shetty K. Potential of *Ginkgo biloba* L. leaves in the management of hyperglycemia and hypertension using *in vitro* models. Bioresource Technol. 100: 6599-6609 (2009)
23. Godse S, Mohan M, Kasture V, Kasture S. Effect of myricetin on blood pressure and metabolic alterations in fructose hypertensive rats. Pharm. Biol. 48: 494-498 (2010)
24. Song YW, Moon KS, Cho SK. Antioxidant activity and nutrient content of ethanol and hot-water extracts of *Citrus unshiu* pomace. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 42: 1345-1350 (2013)
25. Murad F. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. J. Clin. Invest. 78: 1-5 (1986)
26. Yoon HJ, Park SY, Oh ST, Lee KY, Yang S. Extract of *Rubus coreanus* fruits increases expression and activity of endothelial nitric oxide synthase in the human umbilical vein endothelial cells. J. Life Sci. 21: 44-55 (2011)
27. Friederich JA, Butterworth JF 4th. Sodium nitroprusside: twenty years and counting. Anesth. Analg. 81: 152-162 (1995)
28. Kim BR, Park JH, Kim SH, Cho KJ, Chang MJ. Antihypertensive properties of dried radish leaves powder in spontaneously hypertensive rats. Korean J. Nutr. 43: 561-569 (2010)
29. Na CS, Yun H, Choi DH, Kim JS, Jo CH, Eun JB. Effects of pear phenolic compound on blood pressure, plasma renin, ANP and cardiac hypertrophy in hypertensive rat induced by 2K1C. Korean J. Orient. Physiol. Pathol. 17: 363-367 (2003)
30. Bautista LE, Vera LM, Arenas IA, Gamarra G. Independent association between inflammatory markers (C-reactive protein, interleukin-6, and TNF- α) and essential hypertension. J. Hum. Hypertens. 19: 149-154 (2005)
31. Park EJ, Kim YA, Lim DS, Gee MS, You SW, Woo HY. Comparison of hs-CRP and lipid values between hypertensive and normotensive groups. Korean J. Clin. Lab. Sci. 37: 185-189 (2005)
32. Hong YM, Lee HR, Kim KC. Effect of small hairpin RNA molecules targeting angiotensin-converting enzyme gene in spontaneously hypertensive rats. J. Korean Soc. Hypertens. 18: 105-116 (2012)
33. Kang CS, Jeon SY, Hong S. Effect of hyeonsamdansameum on hypertension rat induced monocrotaline. Korean J. Orient. Physiol. Pathol. 22: 1223-1235 (2008)