

발 간 등 록 번 호

안내서-0775-02

건강기능식품 기능성 평가 가이드

‘혈압조절에 도움을 줄 수 있음’ 편

2019. 6.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

지침서·안내서 제·개정 점검표

명칭

건강기능식품 기능성 평가 가이드
(‘혈압조절에 도움을 줄 수 있음’편)

아래에 해당하는 사항에 체크하여 주시기 바랍니다.

등록대상 여부	☐ 이미 등록된 지침서·안내서 중 동일·유사한 내용의 지침서·안내서가 있습니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☞ 상기 질문에 ‘예’라고 답하신 경우 기존의 지침서·안내서의 개정을 우선적으로 고려하시기 바랍니다. 그럼에도 불구하고 동 지침서·안내서의 제정이 필요한 경우 그 사유를 아래에 기재해 주시기 바랍니다. (사유 :)	
	☐ 법령(법·시행령·시행규칙) 또는 행정규칙(고시·훈령·예규)의 내용을 단순 편집 또는 나열한 것입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 단순한 사실을 대외적으로 알리는 공고의 내용입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 1년 이내 한시적 적용 또는 일회성 지시·명령에 해당하는 내용입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 외국 규정을 번역하거나 설명하는 내용입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 신규 직원 교육을 위해 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 정리한 자료입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
☞ 상기 사항 중 어느 하나라도 ‘예’에 해당되는 경우에 지침서·안내서 등록 대상이 아닙니다. 지침서·안내서 제·개정 절차를 적용하실 필요는 없습니다.		
지침서·안내서 구분	☐ 내부적으로 행정사무의 통일을 기하기 위하여 반복적으로 행정사무의 세부기준이나 절차를 제시하는 것입니까? (공무원용)	☐ 예(☞지침서) ☒ 아니오
	☐ 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것입니까? (민원인용)	☒ 예(☞안내서) ☐ 아니오
기타 확인 사항	☐ 상위 법령을 일탈하여 새로운 규제를 신설·강화하거나 민원인을 구속하는 내용이 있습니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☞ 상기 질문에 ‘예’라고 답하신 경우 상위법령 일탈 내용을 삭제하시고 지침서·안내서 제·개정 절차를 진행하시기 바랍니다.	
상기 사항에 대하여 확인하였음. 2019년 6 월 일 담당자 확 인(부서장) 이 혜 영		

이 안내서는 건강기능식품 기능성 원료 평가에 대하여 이해를 돕고자, 현재의 과학기술 수준에서 일반적인 사항과 시험방법 등이 제시된 참고자료이며, 질병에 관련된 내용이 포함되는 경우 기능성에 대한 전반적인 이해를 돕기 위한 것이지, 질병의 치료 및 예방을 목적으로 기능성을 설명하는 것은 아닙니다.

본 안내서는 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아니므로 본문의 기술방식('~하여야 한다' 등)에도 불구하고 민원인 여러분께서 반드시 준수하셔야 하는 사항이 아님을 알려드립니다. 또한, 본 안내서는 2019년 6월 현재의 과학적·기술적 사실 및 유효한 법규를 토대로 작성되었으므로 이후 최신 개정 법규 내용 및 구체적인 사실관계 등에 따라 달리 적용될 수 있음을 알려드립니다.

※ "민원인 안내서"란 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것(식품의약품안전처 지침서등의 관리에 관한 규정 제2조)

※ 본 안내서에 대한 의견이나 문의사항이 있을 경우 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 영양기능연구팀으로 문의하시기 바랍니다.

전화번호: 043-719-4416, 4421, 4423, 4428, 4430

팩스번호: 043-719-4420

제·개정 이력

연번	제·개정번호	승인일자	주요내용
1	11-1470000-002754-01	2012.5.	제정
2	안내서-0775-01	2017.7.28.	「식약처 지침서등의 관리에 관한 규정」에 따른 등록번호 일괄 정비 (규제개혁담당관실-3761호, 2017.5.16.)
3	안내서-0775-02	2019.6.	개정 (기능성 시험방법 등 업데이트)

CONTENTS

※ 건강기능식품의 기능성 개요	1
※ 약어	3
 I 서 론	4
 II 일반적 사항	4
1. 개요	4
2. 보건학적 중요성	11
 III 기능성 시험 방법	13
1. 바이오마커의 선정	13
2. 주요 바이오마커의 측정 방법	22
3. 시험 설계 시 고려사항	31
 IV 참고문헌	34

건강기능식품의 기능성 개요

□ 기능성 정의

건강기능식품법률 제3조(정의) : 기능성이란 인체의 구조와 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 말한다.

□ 기능성 구분

건강기능식품의 기능성은 3가지로 구분할 수 있다.

○ 건강기능식품의 기능성 구분

기능성 구분	기능성 내용	기능성을 가진 원료 또는 성분
영양소 기능	인체의 정상적인 기능이나 생물학적 활동에 대한 영양소의 생리학적 작용	영양소
생리활성 기능	인체의 정상기능이나 생물학적 활동에 특별한 효과가 있어 건강상의 기여나 기능 향상 또는 건강유지·개선을 나타내는 기능	기능성 원료
질병발생 위험감소 기능	질병의 발생 또는 건강상태의 위험감소와 관련한 기능	

□ 건강기능식품 기능성 원료의 기능성 내용과 인정기준

건강기능식품 기능성 원료의 기능성 내용과 인정기준은 다음과 같다.

○ 건강기능식품 기능성 원료의 기능성 내용과 인정기준

구분	기능성 내용	인정기준
질병발생 위험 감소 기능 ¹⁾	○○발생위험 감소에 도움을 줌	기반연구 자료를 통해 생리학적인 효과 또는 기전이 명확하게 입증되어야 하고 일관성 있는 바이오마커의 개선효과가 다수의 인체적용시험 (RCT)에서 확보되어야 함 ※ 질병 관련 바이오마커의 확인
생리활성 기능 ²⁾	○○에 도움을 줄 수 있음	기반연구 자료를 통해 기능성 있는 생리학적인 효과 또는 기전을 추측할 수 있어야 하고 일관성 있는 바이오마커의 개선효과가 최소 1건 이상의 인체적용시험(RCT)에서 확보되어야 함(추측 제안기전과 관련한 바이오마커가 기반연구시험과 인체적용시험에서 일관성 있게 확인되어야 함) ※ 생리활성 관련 바이오마커의 확인

- 1) 제출된 기능성 자료가 질병의 발생 위험 감소를 나타내며, 확보된 과학적 근거 자료의 수준이 상당한 과학적 합의(Significant Scientific Agreement)에 이를 수 있을 정도로 높을 경우 인정. 상당한 과학적 합의(Significant Scientific Agreement)란 성분 또는 원료와 건강효과 간의 상관성이 새로운 과학에 의해 뒤집어지지 않을 정도의 수준으로 관련 분야의 전문가들에 의한 만장일치에 가까운 합의 수준을 말함
- 2) 제출된 기능성 자료가 인체의 정상기능이나 생물학적 활동에 특별한 효과가 있어 건강상의 기여나 기능향상 또는 건강유지개선을 나타내는 경우 인정

약 어

ACE	angiotensin converting enzyme
ACS	acute voronary syndrome
BNP	B-type natriuretic peptide
CRP	C-reactive protein
DBP	diastolic blood pressure
ECG	electrocardiogram
eNOS	endothelial nitric oxide synthase
GFR	glomerular filtration ratio
IL-6	iterleukin-6
LVH	left centricular hypertrophy
MAP	mean arterial pressure
NO	nitric oxide
NT-proBNP	N-terminal proatrial natriuretic peptide
PAI-1	plasminogen activator inhibitor-1
PP	pulse pressure
RCT	randomized controlled trial
SBP	systolic blood pressure
SSA	significant scientific agreement
UACR	urinary albumin/creatinine ratio

I

서 론

이 가이드는 건강기능식품 기능성원료를 개발하는 연구자 및 영업자에게 식품의약품안전처의 기능성(혈압 조절에 도움) 평가 원칙 및 기준 등을 알림으로써 산업체의 기능성원료 연구개발에 적정을 기하고 효율성을 높이고자 작성되었다.

II

일반적 사항

1. 개요

가. 혈압

심장은 혈액을 순환시키는 역할을 하며, 혈액은 혈관을 통해 이동하면서 산소와 영양소를 공급하고 노폐물은 배설하는 역할을 한다. 혈액은 대동맥과 같이 큰 혈관에서 모세혈관처럼 점점 작은 혈관들로 나뉘며, 저항을 받게 된다. 대동맥 안에서 혈액의 진행이 저항을 받게 되면 이 힘이 대동맥의 벽을 밀게 되고 이때의 압력을 혈압(blood pressure)이라 한다(그림 1).

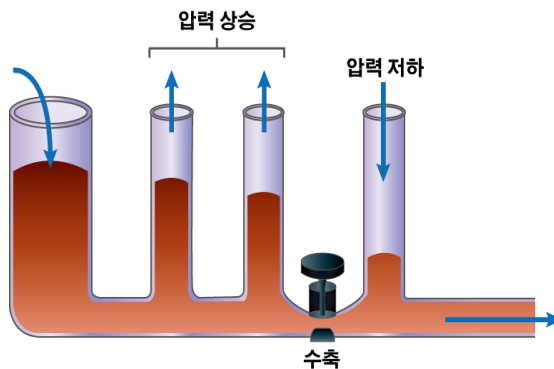


그림 1. 혈압과 혈류 저항

[출처: Stuart Ira Fox, 생리학 10판, 라이프사이언스, 2008]

혈액의 압력은 대동맥과 동맥에서 가장 높고, 소동맥, 모세혈관, 정맥으로 갈수록 점진적으로 낮아진다.(그림 2). 대동맥 내의 수축기압은 120 mmHg, 이완기압은 80 mmHg로 평균 100 mmHg를 유지한다. 동맥의 혈압이 높은 이유는 다량의 혈액이 좌심실에서 펌프 되어

대동맥으로 들어가기 때문이다. 동맥압이 가장 크게 감소되는 곳은 소동맥으로 평균 동맥압은 30 mmHg이다. 모세혈관에서는 압력이 10 mmHg로 더욱 감소된다. 모세혈관에서 압력이 많이 감소하는 이유는 흐름에 대한 마찰 저항과 모세혈관 밖으로 체액의 여과 때문이다. 혈액이 소정맥과 정맥에 도달하게 되면 압력은 더 낮아지며, 대정맥의 압력은 4~5 mmHg인데 비해 우심방에 도달하면 0~2 mmHg까지 압력이 낮아진다.

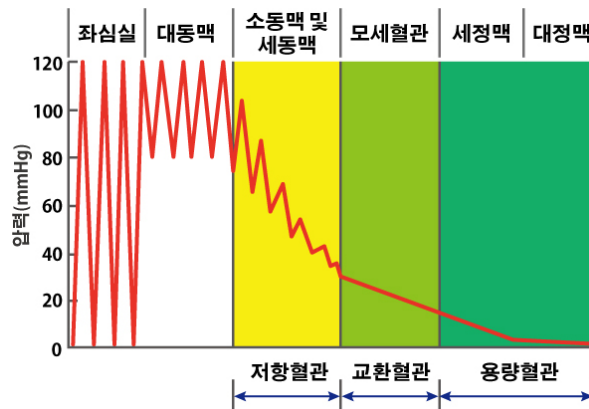


그림 2. 체순환계의 혈압

[출처: Stuart Ira Fox, 생리학 10판, 라이프사이언스, 2008]

동맥압은 심실 수축 시 심실에서 대동맥으로 이동하는 혈액이 대동맥의 벽에 미치는 압력을 말하는데, 일상적으로 말하는 혈압은 동맥압을 일컫는다. 혈압 관련 용어는 다음과 같이 정의할 수 있다.

- 수축기압(systolic blood pressure, SBP): 심장의 수축기 때 많은 양의 혈액이 좌심실에서 동맥계로 박출되면서 동맥내압이 증가될 때의 최고 압력을 말한다.
- 이완기압(diastolic blood pressure, DBP): 심장주기 동안 가장 낮은 동맥압으로 심장의 이완기에 혈액이 혈관으로 계속 흘러가면서 동맥벽에 부딪히는 최저 압력을 말한다.
- 맥압(pulse pressure, PP): 수축기압과 이완기압의 차이를 나타낸다.
- 평균 동맥압(Mean Arterial Pressure, MAP): 혈액을 체순환계로 밀어내는 평균 압력으로 ‘이완기압 + 1/3 맥압’의 공식으로 나타낼 수 있다.
- 맥파(pulse wave): 혈액이 동맥계로 박출 되어 대동맥이나 지름이 큰 동맥벽을 확장시켰을 때 탄력성이 있는 동맥벽에서의 진동파를 말한다.
- 맥박(pulse) : 심장박동으로 혈관 특히 동맥에 나타나는 혈압의 변동을 말한다.

나. 혈압의 조절 기전

(1) 신경성 조절(neural control)

발현시간이 가장 짧은 동맥압 조절기전이다. 부교감 신경은 주로 심장에 분포하여 심박동수 조절에 관여하고, 교감신경은 거의 모든 혈관에 분포하여 혈류량 조절에 관여한다.

(가) 구심성 자극

① 압력 수용기(pressor receptors) 또는 Baroreceptors

주로 대동맥궁(aortic arch)의 벽과 경동맥동(carotid sinus)의 벽에 위치하는 특수 신경 말단으로 흉부와 경부의 큰 동맥벽이 받는 압력의 변화를 예민하게 감지하는 일을 한다. 대동맥궁과 경동맥동에서 감지된 압력변화는 신경에 감지되어 이 자극이 연수의 심혈관조절 중추로 유입되는데 이 회로를 통한 반사를 감압반사(depressor reflex)라고 한다(그림 3).

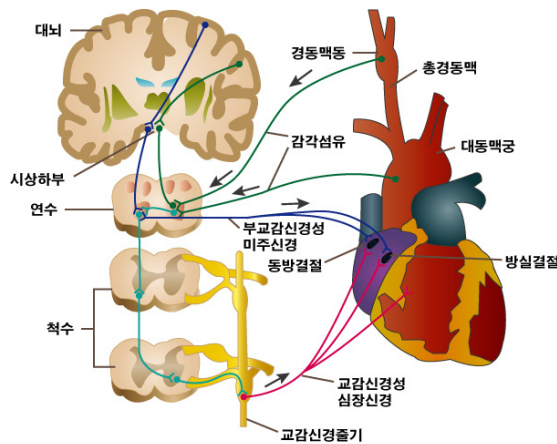


그림 3. 압수용체 반사에 관련된 연수

[출처: Stuart Ira Fox, 생리학 10판, 라이프사이언스, 2008]

② 신전 수용기(stretch receptors) 또는 정맥압 수용기(venous pressoreceptor)

신전 수용기는 우심방과 상대정맥 끝에 분포한다. 정맥으로부터 환류 되는 혈액량이 증가하여 우심방벽이 늘어나게 되면 이 수용기들이 감지하게 된다. 자극이 심장 촉진 중추에 전달되며 교감신경에 작용하여 반사적으로 심박수와 심박출량을 증가시킨다. 이런 반사를 승압반사(pressor reflex) 또는 bainbridge 반사라고 한다.

③ 화학 수용기(chemoreceptor)

대동맥 근처에 있는 대동맥소체(aortic body)와 내경동맥(internal carotid artery)에 있는 경동맥소체(carotid glomus)에 주로 있다. 호흡 조절에 관여하는 수용기이지만, 동맥 혈압에도 다소 영향을 미친다. PO_2 가 적거나 PCO_2 나 H^+ 농도가 증가하면 이들 수용기가 흥분하여 미주신경을 거쳐 혈관운동 중추로 자극을 보내고, 이로 인해 반사적으로 혈압이 상승된다. 또한 심혈관 중추에서 각 혈관계에 영향을 미쳐 혈관의 수축, 동맥압의 상승, 호흡의 항진 및 심박수의 증가 등이 일어나게 된다.

(나) 심혈관 조절 중추

혈압을 조절하는 중추는 연수에 위치하는 심혈관 조절중추이다. 심혈관 조절중추는 심장 중추(심장촉진중추와 심장억제중추)와 혈관운동중추(혈관수축중추와 혈관이완중추)가 있다. 심장중추는 교감신경과 부교감신경의 길항작용에 의해 심장 기능을 조절하며 혈관운동중추는 주로 소동맥의 평활근에 위치하는 교감신경의 흥분도를 조절함으로써 혈관을 수축 혹은 이완시킨다.

(다) 기타 신경성 조절

대뇌의 변연계(limbic system)가 활성화되면서 혈압의 상승과 심박동수의 증가가 나타난다. 대뇌피질 중 운동영역이 흥분하여 골격근으로 가는 운동신경이 흥분할 때에도 뇌간 수준에서 흥분파는 혈관운동중추를 자극하여 심장활동이 증가하게 된다.

(2) 체액성 조절 중추

체액성 조절이란 혈액량의 증감을 통해서 혈압을 조절하는 것을 말하며 이것은 신경성 조절기전에 비해 장기간에 걸쳐 조절이 일어난다.

(가) 레닌-안지오텐신계(renin-angiotensin system, RAS)

레닌-안지오텐신계는 혈압 조절과 관련된 가장 대표적인 시스템으로, 신장에서 작용함으로써 세포 외액 및 나트륨 이온(Na^+) 보유를 통해 동맥압을 조절한다. 즉 동맥압이 낮거나 체내 나트륨 이온(Na^+)이 부족하게 되면 간에서 생성된 당단백질인 안지오텐시노젠(angiotensinogen)이 단백질 가수분해 효소인 레닌의 작용으로 안지오텐신 I으로 전환된다. 다시 안지오텐신 전환 효소(angiotensin converting enzyme, ACE)는 안지오텐신 I에 작용하여 혈압상승인자인 안지오텐신 II를 생성하는 반응을 촉매 한다.

안지오텐신II는 말초 모세혈관을 수축시켜 교감신경이나 부신을 자극하여 카테콜라민(catecholamine)의 방출을 촉진함으로써 혈압을 상승시키는 작용을 한다. 또한 부신피질 호르몬인 알도스테론의 분비를 높여 나트륨 이온(Na^+)의 재흡수와 칼륨이온(K^+)방출을 촉진하고, 수분을 저장하며 순환 혈류량을 증가시킴으로써 혈압을 상승시킨다(그림 4). 식품성분은 이노작용과 안지오텐신 전환효소 저해작용 등에 관여함으로써 레닌-안지오텐신계에 작용할 수 있다.

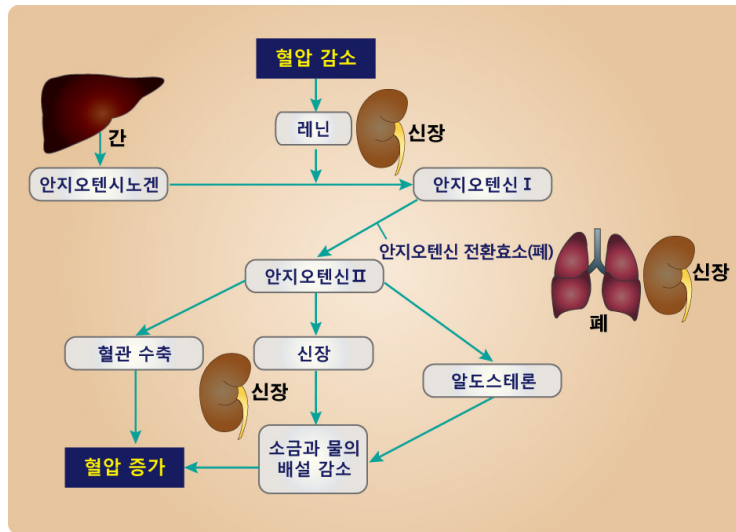


그림 4. 레닌-안지오텐신-알도스테론계

[출처: 김미경외. 건강기능식품. (주)교문사, 2010]

(나) 칼리크레인-키닌(Kallikrein-Kinin)계

칼리크레인-키닌계는 염증반응 및 혈압 조절에 관여하고 안지오텐신계와 밀접한 상호 관계가 있다. 키닌은 염증반응 매개체로서, 혈관 이완과 혈관 투과성을 증가시킨다.

칼리크레인은 생체의 선조직(gland)이나 혈장 중에 불활성형의 프리칼리크레인(prekallikrein)으로 존재하여 활성화되면 혈장의 키니노젠(kininogen)에 작용하여 키닌(브래디키닌)을 생성한다. 키닌은 강력한 혈관 확장제인 PGI_2 (prostaglandin I_2 , prostacyclin)와 PGE_2 를 증가시켜 나트륨 배설을 증가시킴으로써 혈압을 떨어뜨린다.

키닌은 키니네이스(kininase)라는 효소에 의해 파괴되며, 이 효소는 안지오텐신 I을 II로 바꾸는 효소이기도 하고, 신장 칼리크레인의 생산유출은 알도스테론에 의해 조절되어지므로 이들은 서로 밀접한 관계가 있다.

(3) 호르몬에 의한 조절

호르몬은 혈관 구경, 혈량, 심박출량, 심박수 등에 영향을 미칠 수 있다. 보통의 경우 혈압에 가장 큰 영향을 미치는 요인은 혈관 구경과 혈량이다. 혈관 구경을 조절하는 호르몬에는 에피네프린, 안지오텐신Ⅱ, 항이노호르몬이 있으며, 혈량을 조절하는 호르몬에는 항이노호르몬과 알도스테론이 있다. 또한 심박수와 심박출량을 조절하는 호르몬에는 에피네프린이 있다. 혈압에 영향을 미치는 호르몬의 기능은 다음과 같다.

(가) 에피네프린과 노르에피네프린

혈관 수축 및 항이노호르몬에 의한 혈량 증가를 통해 혈압을 증가시킨다.

(나) 항이노호르몬

혈액의 삼투압이 증가(주로 탈수에 의함)하면 뇌하수체 후엽에서 분비되어 신세뇨관에서 수분의 재흡수를 촉진하여 혈량을 증가시키고 소변량을 감소시키는 작용을 한다.

(다) 알도스테론

안지오텐신Ⅱ의 자극에 의해 부신피질에서 분비되는 호르몬으로서 신세뇨관에서 나트륨 이온(Na^+)의 재흡수를 촉진하고 이에 의해 수분의 보유를 유도하여 혈압을 증가시키는 역할을 한다.

(4) 기타

신경전달물질과 여러 펩타이드도 혈압조절에 관여한다.

(가) 심방성 나트륨 이노펩타이드(atrial natriuretic peptide)

Na 배설 및 혈관 확장작용을 한다.

(나) 세로토닌(serotonin)

혈액응고 반응 동안 혈소판에서 분비되어 칼슘이온(Ca^{2+}) 증가를 통해 혈관수축이 일어나게 한다.

(다) 히스타민(histamine)

Nitric oxide(NO) 생성을 통해 혈관을 이완시킨다.

다. 고혈압의 개념 및 분류

혈압은 연령에 따라 다르나 우리나라는 120/80 mmHg(수축기/이완기 혈압) 미만을 정상적인 혈압으로 분류한다. 140 mmHg 이상/90 mmHg 이상(수축기/이완기 혈압)을 고혈압으로 구분하는데, 수축기 혈압 혹은 이완기 혈압 중에서 어느 한 가지라도 기준치 이상에 해당 될 경우를 고혈압이라 판정한다. 2018년 대한고혈압학회에서 다음 표 1과 같이 혈압을 분류하였다.

표 1. 고혈압 진료지침 혈압분류 (mmHg)

혈압분류	수축기혈압		이완기혈압
정상혈압	<120	그리고	<80
주의혈압	120~129	그리고	<80
고혈압 전단계	130~139	또는	80~89
고혈압	≥140	또는	≥90
1기	140~159	또는	90~99
2기	≥160	또는	≥100
수축기 단독 고혈압	≥140	그리고	<90

자료: 대한고혈압학회, 고혈압 진료 지침, 2018

혈압은 발생 원인에 따라 본태성 고혈압 및 속발성 고혈압으로 분류한다. 전체 고혈압 환자의 85~90%를 차지하는 본태성 고혈압은 발생 원인이 명확하지 않지만 유전적 요인(가족력)을 비롯한 여러 요인들에 의해 복합적으로 유발되는 것으로 알려져 있다. 속발성 고혈압은 약 10% 정도를 차지하며 특정 원인에 의해 유발되는 질환으로 원인들로는 신장질환, 내분비질환, 신경계질환, 임신중독증, 유전적 요인 등이 있다.

- 본태성 또는 일차성 고혈압(essential or primary hypertension) : 다른 질병 없이 혈압만 상승하는 경우로, 전체 고혈압의 90% 이상을 차지하며 명백한 원인을 알 수 없다.
- 이차성 고혈압(secondary hypertension) : 신장병, 심장병, 내분비 호르몬 및 신경계 이상, 임신중독 등에 의해 유발되나 원인이 되는 질환을 치료하면 정상혈압으로 돌아올 수 있다.

2. 보건학적 중요성

가. 혈압 감소의 의의

(1) 고혈압 유병률

우리나라의 고혈압 유병률은 2016년 현재 남자 35.0%, 여자 22.9%이며, 연령이 증가할수록 고혈압의 유병률은 증가한다(그림 5).

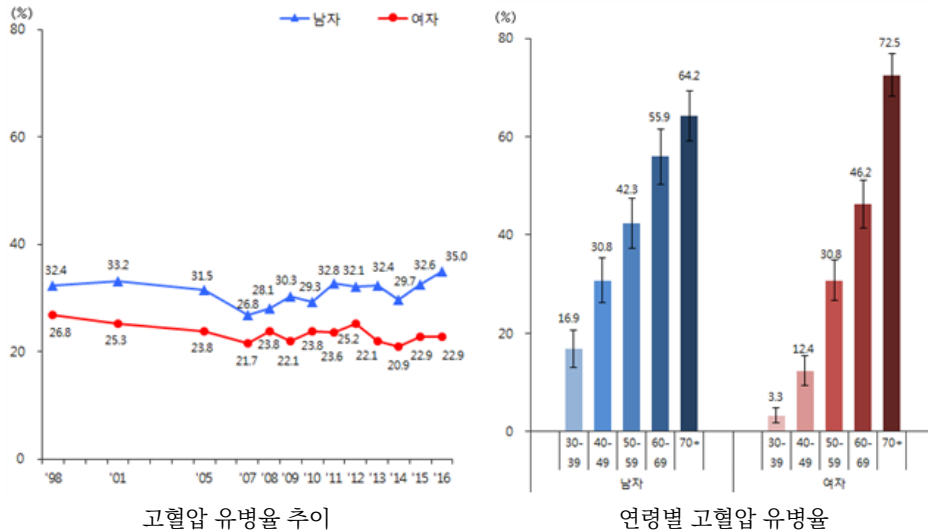


그림 5. 우리나라의 고혈압 유병률 추이 및 연령별 고혈압 유병률

[출처: 보건복지부, 질병관리본부, 2016 국민건강 통계I(2017)]

※ 고혈압 유병률 : 수축기혈압이 140 mmHg 이상이거나 이완기혈압이 90 mmHg 이상 또는 고혈압 약물을 복용한 분을, 만30세 이상

(2) 높은 혈압 감소의 효과

국민건강통계에 따르면 연령과 고혈압 유병률은 비례하는 것을 알 수 있다. 일반적으로 혈압이 높으면 심혈관계질환으로 진행할 위험이 높다고 알려져 있다. 고혈압은 일반적으로 뚜렷한 증상이 없으며, 원인을 알 수 없는 본태성 또는 일차성 고혈압은 유전적인 요인뿐만 아니라 비만, 운동 부족, 흡연, 음주, 소금의 과다섭취, 스트레스 등 여러 가지 요인에 의해 발생할 수 있다.

일반적으로 고혈압은 그 자체보다 고혈압이 지속되면서 발생할 수 있는 악성고혈압, 심부전, 뇌출혈, 신경화증, 대동맥질환 등 혈압 증가에 의해 유발되는 질환이 문제가 되고 있다.

고혈압은 한번 발병되면 완치가 어려우므로 식사 및 생활습관을 개선하여 정상적인 혈압을 유지하도록 하는 것이 중요하다.

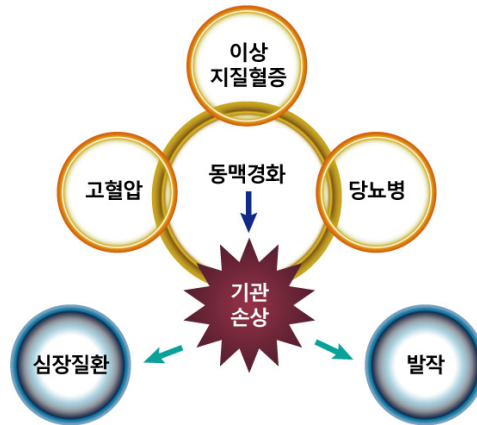


그림 6. 고혈압의 합병증

[출처: 김미경 외. 건강기능식품. (주)교문사, 2010]

Ⅲ

기능성 시험 방법

1. 바이오마커의 선정

가. 연구유형별 바이오마커

혈압조절의 기능을 평가하는 지표는 기본적으로 혈압 자체를 측정하는 것이 가장 중요하다. 그러나 정상 혈압의 개체 간 편차가 크므로 혈압의 변동을 예측하거나 혈압 변동과 연관된 질환의 발생 가능성을 예측하는 데 도움이 되는 바이오마커를 병행함으로써 개체 간의 혈압 편차를 보완할 필요가 있다. 표 2에는 혈압과 관련 있는 바이오마커를 요약해 놓았다.

표 2. 혈압 조절 기능성 확인을 위한 바이오마커

구 분	바이오마커	측정 가능한 연구유형		
		in vitro	in vivo	Human
혈압	수축기 혈압		○	○
	이완기 혈압		○	○
	평균 동맥압		○	○
	24시간 활동 혈압		○	○
	혈압변동성		○	○
레닌-안지오텐신계	레닌		○	○
	안지오텐시노젠		○	○
	안지오텐신 I		○	○
	안지오텐신 II		○	○
	안지오텐신-전환효소	○	○	○
	알도스테론		○	○
염증	고민감도 C반응성 단백(hs-CRP)		○	○
	인터루킨-6 (IL-6)	○	○	○
	TNF-alpha	○	○	○
	NF-kB	○	○	○
	호모시스테인		○	○

구 분	바이오마커	측정 가능한 연구유형		
		in vitro	in vivo	Human
섬유소용해	플라즈미노겐 활성화인자 억제자 1(PAI-1)		○	○
혈관 이완	수축/이완반응	○		
	산화질소(NO)	○	○	○
	내피 산화질소 합성효소(eNOS) (활성, 단백질, mRNA 발현)	○	○	
	NADPH oxidase (활성, 단백질, mRNA 발현)	○	○	○
심장 기능	좌심실비대 (LVH)		○	○
	B형 나트륨이뇨펩타이드(BNP)		○	○
	N-terminal proatrial natriuretic peptide (NT-proBNP)		○	○
	심박(동)수		○	○
	맥박수		○	○
	심장무게		○	
	심전도(ECG)		○	○
	심장 조직검사		○	
	심장 초음파			○
신장 기능	소변 알부민-크레아티닌 비(UACR)		○	○
	사구체여과율(GFR)		○	○
	이뇨작용	소변량	○	○
		Lipschitz value	○	○
		Na+Cl	○	○
		Na:K ratio	○	○
		Cl:(Na+K) ratio	○	○

나. 바이오마커 설명

(1) 혈압 측정

(가) 수축기 혈압(systolic blood pressure, SBP)

SBP는 심장이 수축되어 동맥벽에 미치는 압력이 최대일 때의 혈압이다. SBP는 고혈압, 울혈성 심부전, 심혈관계질환 발생의 주요 위험 요인이다. 약 백만 명의 환자를 대상으로 한 메타 분석 결과, SBP가 20 mmHg 증가하면 허혈성심질환, 심부전 또는 뇌졸중으로 인한 사망률이 2배 증가하는 것으로 나타났다. DBP를 감소시키는 것보다 SBP를 감소시키는 것이 다른 질병이 발생할 수 있는 위험을 감소시키는 데 더 효과적이다.

(나) 이완기혈압(diastolic blood pressure, DBP)

DBP는 심장이 이완되어 동맥벽에 미치는 압력이 최소일 때의 혈압으로, 심혈관계질환 또는 관상심혈관질환을 예측하는데 있어 좋은 지표이다. 메타분석 연구에서 DBP가 10 mmHg 증가하면 허혈성 심장질환, 심부전, 뇌졸중 등으로 인한 사망 위험이 2배 증가한다고 보고하였다. 60세 이하의 환자에서 DBP는 심혈관계질환과 사망률을 예측할 수 있는 좋은 지표이다.

(다) 평균 동맥압(mean arterial pressure, MAP)

MAP는 심장주기(cardiac cycle) 1회 동안의 평균 동맥압을 의미하며 이것은 ‘ $DBP + 1/3(SBP - DiBP)$ ’로 계산할 수 있다.

(라) 24시간 활동 혈압

혈압은 고정되어 있지 않고 다양한 외부 자극에 의해 일시적 혹은 만성적으로 다양하게 변화한다. 그러므로 한번의 혈압을 측정하는 것보다 24시간 활동 혈압을 측정하는 것이 중요하다.

(마) 혈압 변동성

혈압은 하루 중에서도 낮이나, 밤에 변화하고, 계절에 의해서도 변화한다. 즉, 하루 종일 누워 있어도 주간에는 높고 야간에는 혈압이 낮아지는 주기가 있는데 이와 같이 혈압이 변화하는 것을 혈압 변동성이라고 한다. 혈압 변동은 신체활동 및 정신 활동, 나이에 의해 영향을 받으므로 혈압의 변동성을 측정하는 것은 혈압을 정확하게 파악하기 위해 중요하다.

(2) 레닌-안지오텐신계

레닌-안지오텐신계는 가장 일반적으로 접근할 수 있는 혈압조절 기능성 평가방법으로 혈압 변동과 밀접한 관련이 있다.

신장은 Na의 함량을 조절하여 혈압을 일정하게 유지하는데, 신장에서 분비된 레닌에 의해 안지오텐신 I이 생성되고 안지오텐신 I은 안지오텐신 전환효소에 의해 안지오텐신 II로 변환된다.

안지오텐신 II는 혈관을 수축시키고, 신장에서 Na 재흡수를 통해 혈액량을 증가시켜, 결국 혈압을 상승시키는 역할을 한다. 이 과정에 관여하는 여러 단계를 조절해 주면 혈압 조절이 가능하다.

(가) 레닌, 안지오텐시노겐, 안지오텐신 I, 안지오텐신 II

레닌(renin)은 신장에서 분비되는 효소로, 간에서 생성되는 안지오텐시노겐(angiotensinogen)을 안지오텐신 I(angiotensin I)으로 전환시키는 역할을 한다. 레닌은 혈장에서 측정할 수 있으며 안지오텐시노겐은 혈장 또는 조직 내에서, 안지오텐신 I은 조직 내에서 측정할 수 있다.

안지오텐신 I은 안지오텐신-전환효소(angiotensin-converting enzyme)에 의해 안지오텐신 II로 전환된다. 안지오텐신 II는 교감신경계 활성화/알도스테론 분비/나트륨 재흡수/수분 보유/혈관 수축/항이노호르몬(ADH) 분비와 같은 작용을 한다.

(나) 안지오텐신-전환효소

안지오텐신-전환효소는 신장 또는 폐에서 분비되며 안지오텐신 I을 안지오텐신 II로 전환시키는 효소로 이 효소의 활성이 증가하면 안지오텐신 II양이 증가하고, 혈압이 증가할 수 있다.

(다) 알도스테론

알도스테론은 안지오텐신 II에 의해 분비되어 신장에서 나트륨과 염소이온을 재흡수 시키고 칼륨은 배설시켜 수분을 체내 보유하는 기능을 한다. 알도스테론양이 증가하면 혈압이 증가할 수 있다.

(3) 염증 관련 지표

(가) 고민감도 C 반응성 단백(high sensitive-C reactive protein, hs-CRP)

hs-CRP는 혈액에 있는 급성병기단백질(acute-phase protein)의 일종으로, 염증, 감염, 조직상해 시에 간에서 생성되며 또한 관상동맥의 심근세포와 병든 혈관에서도 생성된다. CRP는 염증반응에서 중요한 역할을 하는데, 혈관내피세포를 활성화시켜 점착분자(adhesion

molecules)와 사이토카인이 생성되게 하며, IL-6 분비를 촉진하고, 혈관내피세포에서 NO synthase의 생성과 활성을 감소시킨다.

hs-CRP 농도는 정상혈압을 가진 사람에서 미래 고혈압을 예견할 수 있는 지표이며, 고혈압 환자에서 미래 심혈관질환 발생을 예견할 수 있는 독립적인 바이오마커다. hs-CRP농도는 혈중 중성지방, 비만, 혈압, 공복 시 혈당 등과 상관관계가 높아 대사증후군 바이오마커로 이용된다.

(나) 인터루킨-6

인터루킨-6(interleukin-6, IL-6)는 일종의 친염증 사이토카인(pro-inflammatory cytokine)으로서 T-세포와 대식세포에서 염증, 화상, 외상, 신생물 생성에 반응하여 분비되는 물질이다. IL-6는 심근비대와 혈관수축을 촉진한다. IL-6는 심근 경색, 관상심장질환, 뇌졸중, 울혈성심부전 등 심혈관질환을 예측할 수 있는 독립적인 위험 인자이며, 고혈압의 바이오마커로도 제안되었다.

(다) TNF- α

염증은 혈관내피 세포를 손상시켜 혈압을 증가시키는 위험요인으로 작용한다. TNF- α 는 주요한 염증 유발 cytokine으로 TNF- α 가 감소하면 염증이 완화되어 혈압이 감소되는 가능성이 있다.

(라) NF- κ B

NF- κ B는 전사 인자(transcriptional factor)로 인산화되면 염증성 사이토카인들을 분비시키고, adhesion molecule(VCAM-1, ICAM-1, MadCAM-1, P-selectin 등)을 발현시킨다. 그러므로 NF- κ B의 양이나 발현이 감소하면 염증이 완화되고, adhesion molecule 생성이 감소하여 혈압이 감소될 수 있는 가능성이 있다.

(마) 호모시스테인

호모시스테인은 체내 아미노산 중 하나 인 메티오닌(methionine)이 분해되면서 생성되는 유해 물질로 티올(thiol)기를 포함한 아미노산의 일종이다. 심장병과 뇌졸중 등 혈관 질환을 유발시키는 위험요인으로 콜레스테롤 등이 중요한 위험인자로 생각되고 있으나 최근에는 콜레스테롤 수치가 정상이라도 호모시스테인 농도가 높으면 혈관 질환이 발생할 수 있다는 사실이 알려지고 있다.

호모시스테인은 혈관벽을 파괴시켜 혈전을 형성한다. 생성된 혈전으로 인하여 호모시스테인은 고혈압, 관상동맥질환 및 다양한 혈관질환의 발생에 관여하는 것이 보고되고 있다. 이와 같이 호모시스테인의 농도가 높은 사람은 현재에는 질환이 없더라도 고혈압, 심장병 등 혈관 손상 관련 질환이 발생할 가능성이 있다.

(4) 플라즈미노겐 활성화인자 억제자-1(plasminogen activator inhibitor-1, PAI-1)

플라즈미노겐 활성 인자 억제자 1은 혈관내피 세포, 혈관 평활근세포, 혈관사이세포(mesangial cell) 등 다양한 세포에서 생성되는 일종의 serine protease inhibitor이다. PAI-1는 주요 조직 플라즈미노겐 활성 억제제로서, 이것의 농도가 증가하면 fibrinolytic potential이 감소한 것으로 볼 수 있다.

PAI-1 농도가 높으면 혈관내피세포의 기능이 비정상적으로 되고, 이것은 고혈압의 원인이 될 수 있다.

(5) 혈관 이완(vasodilation)

(가) 수축/이완 반응(contraction/relaxation response)

혈관이 경직되면 혈압이 올라가게 된다. 동물의 대동맥 및 다른 체조직을 추출하여 수축 및 이완 반응을 측정함으로써 혈관의 경직도를 평가할 수 있다.

(나) 산화 질소(nitric oxide, NO)

혈관 내피 세포에서 생성되는 산화질소(NO)는 내피 유래 혈관이완인자(endothelium-derived relaxing factor)로 알려져 있으며, 혈관 평활근을 이완시키는 작용을 한다.

(다) 내피 산화질소 합성효소(endothelial nitric oxide synthase, eNOS)

NO의 반감기가 짧아 혈중 NO 생성량을 측정하기가 용이하지 않은 경우에 산화질소의 합성을 촉진시키는 효소인 eNOS의 활성이나 단백질발현이나 mRNA 발현을 측정한다.

(라) NADPH oxidase(NOX)

NOX는 혈관에서 ROS를 생산하는데 중요한 역할을 한다. 신장과 혈관에서 NOX에 의한 ROS의 과다 생산은 신장기능 손상과 혈관손상을 일으킨다. 안지오텐신 II가 수용체에 결합을 하면, NOX가 ROS를 생산하고 NO 생산이 감소되고 혈관내피이완이 손상된다. 그러므로 NOX의 활성은 혈압을 상승시키는 역할을 한다.

(6) 심장 기능

(가) 좌심실 비대(left ventricular hypertrophy, LVH)

좌심실 비대는 좌심실 벽이 1.3 cm 이상 두꺼워진 상태를 말한다. 좌심실 비대는 나이가 증가할수록 증가하며 고혈압 또는 기타 심장 문제를 가지고 있는 사람에서 일반적으로 나타난다. 좌심실 비대는 심장, 고혈압, 비만 등의 만성 질환과 관련되어 나타나는 심장 손상 지표 중의 하나이다. 좌심실 비대는 고혈압으로 인한 심혈관계 합병증(뇌졸중, 관상 심장 질환, 심부전)의 강력한 독립적인 위험 요인이다.

(나) BNP와 NT-proBNP

심실 심근이 당겨지면(심실 벽에 스트레스가 가해질 때 등) 펩타이드 proBNP가 분리되어 B형 나트륨 이뇨 펩타이드(B-type natriuretic peptide, BNP)와 비활성 N-terminal proatrial natriuretic peptide(NT-proBNP)로 된다. BNP와 NT-proBNP는 둘 다 cardiac dysfunction의 예민한 지표이다. 이 중 NT-proBNP는 반감기가 길고 그에 따라 혈중 농도가 높아져 보다 예민한 지표로 사용될 수 있다.

급성관동맥증후군(acute coronary syndrome, ACS) 환자와 심부전 환자에서 BNP와 NT-proBNP가 둘 다 증가하는 것이 관찰되었다. BNP와 NT-proBNP의 증가는 심근경색, 심부전, ACS 환자의 사망률과 관계있다.

(다) 기타 심장 기능

① 심박(동)수

심장의 수축과 확장의 반복운동을 심박동이라고 하며, heartrate는 단위시간당 심박동수로 계산된다. 심박동수의 증가는 심혈관계 질환의 위험성과 관련성이 높다고 한다.

② 맥박수

동맥의 주기적인 파동을 말초동맥에서 측정한 것으로, 경동맥, 요골동맥, 슬와동맥, 상완동맥, 후경골동맥 등의 위치에서 측정한다.

③ 심장 무게

동물을 희생시킨 후 심장을 제거하여 무게를 측정한다.

④ 심전도

심장의 수축에 따른 활동전류를 곡선으로 기록한 그래프이다.

⑤ 심장 조직 검사

심장 조직에서 심장 근육의 섬유화와 두께 변화 등을 관찰한다.

⑥ 심장 초음파

심장의 형태와 운동을 영상으로 나타내어 진단하는 검사로, 심방의 크기, 벽의 두께, 벽의 움직임, 판막의 모양과 움직임, 대혈관의 개시부 등을 관찰 할 수 있다.

(7) 신장 기능

(가) 소변 알부민/크레아티닌비(UACR)

정상인에서 매우 소량의 단백질이 소변으로 배설된다. 소변으로 단백질(알부민) 배설이 증가하면 이것은 당뇨와 고혈압 등으로 인해 신장이 손상되었음을 의미하는 지표이다. Microalbuminuria는 30~300 mg 알부민/24시간 뇨 정도로 나타나며, macroalbuminuria는 > 300 mg 알부민/24시간 뇨 정도로 나타난다. Albuminuria는 urinary albumine/creatinine ratio(UACR)로 나타낼 수 있다. Macroalbuminuria와 microalbuminuria 둘 다 심혈관 질환, 당뇨병 신질환, 신부전 위험을 증가시킨다. 레닌 시스템을 억제하는 약제를 사용하여 Albuminuria를 감소시키면 심혈관계질환과 신장질환을 호전시킬 수 있다.

(나) 사구체여과율

사구체여과율(glomerular filtration rate, GFR)은 신장의 사구체에서 여과되는 혈액의 비로서, 직접 측정이 불가능하여 혈중 크레아티닌 또는 이눌린의 농도와 이것들의 소변 배설량으로 간접 측정한다.

GFR은 신장기능의 지표이며, 이것이 감소할 경우 신질환의 발생이나 신부전을 의심할 수 있다. 정상 수치는 $\geq 120 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ 이며 이것이 $< 90 \text{ mL/min/1.73 m}^2$ 로 감소하면 신질환 발생이 3 배 이상 증가하게 된다.

ACE 저해제(ACEIs), β -차단제, 이뇨제, 칼슘통로차단제, 그리고 안지오텐신 II 수용체 차단제는 심혈관계 질환자에서 GFR의 감소를 지연시키는 효과가 있다.

(다) 이뇨 작용

소변량과 소변 내 전해질 함량의 측정을 통해 알 수 있으며, 나트륨의 배설 촉진과 칼륨의 배설 억제는 소변량을 증가시키고 혈액량 감소를 통해 혈압을 낮춘다.

① 소변량

배설되는 소변의 부피를 측정하는 것으로, 소변 배설량 증가와 혈액량 감소는 밀접한 관련이 있다.

② Lipschitz value

요소를 고용량 복용 시 이뇨가 증가하게 된다. 이 같은 원리를 이용하여 요소를 고용량 복용 한 군에 대한 시험물질을 섭취한 군의 수분과 나트륨 배설량의 비율(test compound: urea control)을 측정하는 것으로 1 이상일 경우 positive effect로 본다.

③ Na + Cl

염분 배설 효과(saluretic activity)의 지표로 소변 중 함량 측정한다.

④ Na : K ratio

나트륨 배설 효과(natriuretic activity)의 지표로 소변 중 함량을 측정하여 계산한다.

⑤ Cl : (Na + K) ratio

근위 세뇨관의 강막에 많이 존재하는 탄산무수화효소(carbonic anhydrase)는 중탄산염(NaHCO_3)의 탈수를 촉매하여 중탄산 이온을 재흡수하는 작용을 하며, 이의 억제 정도를 평가하기 위한 지표이다.

2. 주요 바이오마커의 측정 방법

가. 혈압

(1) 이완기/수축기 혈압

혈압은 여러 가지 원인(음식, 음주, 통증, 스트레스, 기분)으로 인해 수시로 달라질 수 있으며 측정 시 자세에 의해서도 혈압이 변하기 때문에 일회측정으로는 판단하기 어렵다 이와 같이 혈압은 측정 장소, 몸의 자세, 정신적인 긴장, 활동 등에 의해 다소 차이가 나며 특히 수축기 혈압은 훨씬 큰 변동성을 보인다.

혈압은 자동 전자 혈압계와 수은 혈압계로 측정할 수 있는데 측정 방법은 동일하나, 다른 점은 수은 혈압계로 측정할 경우에는 감압하면서 청진기에 들리는 소리로 혈압을 판단할 수 있다는 점이다. 대상자를 의자에 앉게 하고 최소한 5분간의 안정 후 상완위를 심장과 같은 높이로 하여 혈압계 커프의 하부가 팔꿈치 안쪽으로 2 cm 상부에 오도록 한 후 커프의 압력을 올린다. 대개 최초 혈압보다 20~30 mmHg 높은 지점까지 압박한 후 2~3 mmHg/sec 속도로 커프의 압력을 낮추어 처음소리가 들리는 지점을 수축기로 간주하고 소리가 완전히 사라지는 지점을 이완기로 간주하여 혈압을 측정한다. 2분 간격을 두고 2회 측정하여 평균을 내고 2회의 평균치가 5mmHg이상 차이가 나면 추가로 측정하여 평균을 구한다.

동물실험의 경우 혈압을 측정할 때 쥐가 움직일 경우 혈압 측정이 불가능하므로 몸체에 꼭 맞는 것을 사용해야한다. 꼬리 동맥이 완전히 확장되게 한 후 꼬리 위쪽에 occlusion 커프를 끼운 후 커프에 physiograph와 연결해놓은 pneumatic pulse sensor 부착한다. 커프의 압력을 올렸다가 감압시키면서 나타나는 맥박을 physiograph로 기록한다. 처음 맥박이 나타날 때가 수축기 혈압이다. 각 동물 당 5회 측정해서 그 평균값을 실험동물의 혈압으로 한다.

(2) 평균 동맥압

평균 동맥압(mean arterial pressure, MAP)은 심장주기(cardiac cycle) 1회 동안의 평균 동맥압을 의미하며 이것은 '이완기 혈압 + 1/3(수축기 혈압 - 이완기 혈압)'로 계산할 수 있다.

(3) 24시간 활동혈압 측정

24시간 활동혈압 측정기를 이용하여 24시간 동안 혈압 변화를 측정한다. 실험 대상자에게 BP cuff를 주로 사용하지 않는 팔에 적용하고 심한 신체 활동을 제외한 일상생활을 하도록 교육한다. 측정기간 동안 대상 환자들에게 일기를 쓰도록 하여 활동시간과 수면시간을 기록하도록 하고, 이를 통하여 활동시간 및 수면시간의 혈압을 추정한다. 주간혈압은 오전 6시부터 오후 10시까지 매 15분 간격으로 측정하고 야간혈압은 오후 10시부터 다음날 오전 6시까지 30분 간격으로 혈압계를 이용하여 측정한다. 모든 측정 값 중 오류가 15% 이상이면 분석에서 제외한다.

(4) 혈압 변동성

혈압 변동성은 24시간 활동 혈압을 측정하면서 24시간, 주간, 야간으로 구분한 혈압의 표준편차 또는 변동계수(Coefficient of variation, CV)를 구하여 관찰한다. 활동 혈압으로 혈압의 변동성을 측정할 목적이라면 주간 혈압의 측정 간격을 최소 15분 이내로 한다.

나. 레닌-안지오텐신계

(1) 레닌

레닌 기질에 혈장을 가한 후 37℃에서 반응시킨다. Angiotensinase 활성을 억제하기 위해 2,3-dimercaptopropano1과 PMSF를 넣어 준다. 반응 후 혈장내 존재하는 면역활성 물질들을 제거하기 위해 생성된 안지오텐신을 acetonitrile/DDw/acetic acid(조성비 =74:24:4)로 이루어진 C18 Sep-Pak을 이용하여 추출한다. 추출물을 건조한 후 안지오텐신 I 방사성원소 표지법에 의해 측정한다.

(2) 안지오텐시노젠/안지오텐신 I

혈장의 경우는 적당량의 레닌과 angiotensinase 활성을 억제하기 위해 2,3-dimercaptopropano1과 PMSF가 함유된 반응액과 혈장을 혼합하여 37℃에서 반응시킨다. 일정한 시간 간격으로 생성된 안지오텐신 I을 추출하여 측정한다. 조직의 경우는 조직을 균질화 시킨 후 시료에 phosphosaline buffer, renin(10^{-5} units/L)을 넣어 37℃에서 4시간 반응시킨 후, NaCl(0.15 mM)에 적당히 희석한다. 희석액을 C18 Sep-Pak을 이용하여 추출, 건조하고 안지오텐신 I 방사성원소 표지법에 의해 측정한다.

(3) 안지오텐신 II

시료에 renin(10^{-5} units)과 angiotensinase 활성을 억제하기 위해 2,3-dimethyl-5-phenylpropanol과 PMSF이 함유된 반응액을 넣어 37 °C에서 3시간 반응시킨다. 시료에 존재하는 안지오텐신 II를 bartitone buffer로 안정화시킨 후, 방사성원소 표지법으로 측정한다.

(4) 안지오텐신 I 전환효소

시료에 hippuryl-histidyl-leucine을 섞고 37°C에서 반응시킨다. 반응이 끝나면 NaOH (0.28M)를 가해서 반응을 종결시킨다. 이 과정에서 생성된 histidyl-leucine을 2% o-phthalaldehyde과 10분간 반응시킨다. 안지오텐신 전환 효소 활성을 형광분석법으로 측정한다(Excitation: 350 nm, Emission: 500 nm).

(5) 알도스테론

시료의 알도스테론 농도는 방사면역측정법 kit를 사용하여 측정할 수 있다. 알도스테론 항체가 들어있는 튜브에 시료(혈액, 조직, 소변)를 넣고 aldosterone- 1^{25} -I를 첨가하여 실온에서 3시간 배양한다. 3회 이상 세척한 후 감마선 계측기에서 1분간 계측한다.

다. 염증

(1) 고민감도 C반응성 단백(hs-CRP)

고민감도 C반응성 단백(hs-CRP)는 효소결합면역흡착검사(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)를 이용한 kit를 사용하여 분석한다. 시료에 CRP 항체를 넣고 실온에서 30분간 반응시킨다. CRP 항체와 결합된 horseradish peroxidase(HRP) 및 기질용액(TMB)을 넣고 실온에서 5-10분간 반응시킨다. 황산으로 반응을 종결한 후 450nm 파장에서 흡광도를 측정한다. 표준액의 흡광도와 비교하여 시료의 CRP 함량을 계산한다.

(2) 인터루킨-6

인터루킨-6(IL-6)는 sandwich enzyme immunoassay 방법을 이용하여 측정한다. IL-6에 대한 항체로 코팅되어 있는 plate에 시료를 넣고 아비딘과 결합된 HRP 및 TMB 용액을 넣어 반응시킨다. 황산 용액을 넣어 HRP 효소와 TMB 기질의 반응을 종결시키고 색상의 변화를 450nm에서 흡광도로 측정한다.

(3) TNF- α

TNF- α 는 sandwich enzyme immunoassay 방법을 이용하여 측정한다. TNF- α 에 대한 항체로 코팅되어 있는 plate에 시료를 넣고 아비딘과 결합된 HRP 및 TMB 용액을 넣어 반응시킨다. 황산 용액을 넣어 HRP 효소와 TMB 기질의 반응을 종결시키고 색상의 변화를 450nm에서 흡광도로 측정한다.

시료의 단백질의 농도를 측정하고, 전기영동하여 단백질을 분리한다. 시료를 transfer하고 5% skim milk or TBST를 이용하여 blocking 한다. TNF- α antibody를 이용하여 단백질 발현정도를 측정한다. mRNA 발현을 위해서는 시료에서 Trizol reagent를 이용하여 RNA를 추출한 후 정량한다. RNA를 이용하여 cDNA를 합성한다. SYBR Green PCR Master Mix, cDNA, primers, RNase-free water를 넣고 PCR을 증폭시킨 후 Sequence Detector software를 사용하여 Amplification data를 분석한다. Relative mRNA expression 수준은 mathematical formulas ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)를 사용하여 분석한다.

(4) NF- κ B

시료의 단백질의 농도를 측정하고, 전기영동 하여 단백질을 분리한다. 시료를 transfer하고 5% skim milk or TBST를 이용하여 blocking 한다. NF- κ B antibody를 이용하여 단백질 발현정도를 측정한다. mRNA 발현을 위해서는 시료에서 Trizol reagent를 이용하여 RNA를 추출한 후 정량한다. RNA를 이용하여 cDNA를 합성한다. SYBR Green PCR Master Mix, cDNA, primers, RNase-free water를 넣고 PCR을 증폭시킨 후 Sequence Detector software를 사용하여 Amplification data를 분석한다. Relative mRNA expression 수준은 mathematical formulas ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)를 사용하여 분석한다.

(5) 호모시스테인

시료(조직, 혈액)에 10mM dithiothreitol을 첨가하여 실온에서 배양한다. 배양액에 EDTA와 HClO₄를 1:1 의 비율로 가해 원심 분리하여 상층액을 얻는다. 상층액에 NaOH를 첨가하여 pH를 맞추고 7-Fluorobenzofurazan-4-sufonic acid ammonium salt를 첨가한 후, 차광된 상태에서 1 시간동안 60 ℃로 가열한다. HPLC를 사용하여 fluorescence detector (Ex. 385 nm, Em. 515 nm)로 측정한다. Homocysteine으로 표준검량선을 작성하여 농도를 구한다.

라. 섬유소 용해

(1) 플라즈미노겐 활성화인자 억제자 1

플라즈미노겐 활성화인자 억제자 1(PAI-1)는 sandwich enzyme immunoassay 방법을 이용하여 측정한다. 시료를 anti-rat PAI-1항체와 반응시킨 후, 다시 아비딘과 결합된 HRP 및 기질용액(TMB)을 넣어 반응시킨다. 황산 용액을 넣어 반응을 종결시키고 색상의 변화를 450nm에서 흡광도로 측정한다.

마. 혈관 이완

(1) 수축/이완 반응

실험동물의 흉부 대동맥 혈관을 적출하여 길이 2~3 mm의 표본을 만들어 Krebs solution 안에 넣어 수조에 매달고 37℃를 유지하면서 혼합가스(95% O₂와 5% CO₂)를 지속적으로 공급한다. 동맥환 표본의 한쪽 끝은 수조 하단에 고정하고 반대쪽은 기저 장력하에서 60분간 장력을 안정화 시킨 다음 혈관의 수축과 이완반응은 force displacement inducer를 사용하여 측정한다. 수축반응은 phenylephrine을 첨가하여 수축력을 측정하고, 최대수축반응의 85%를 보이는 반응을 phenylephrine을 처리하고 이완력을 측정한다.

(2) 산화질소(NO)

NO 농도는 nitrate reductase에 의해 질산염(nitrate)이 아질산염(nitrite)으로 전환되고, 아질산염의 생성은 그리스(Griess) 시약에 의해 azo-dye(아조 염료)로 발색되는 원리를 이용한다. 총 산화질소 농도는 표준 곡선을 사용하여 결정하고 NO 생성량은 1 mol/L로 표시한다.

(3) eNOS

조직에서 단백질을 추출, 정량하고, 정량한 단백질 추출물을 전기영동을 한다. 시료를 transfer하고 5% skim milk or TBST를 이용하여 blocking 한다. p-eNOS와 eNOS antibody를 이용하여 단백질 발현정도를 측정한다.

(4) NADPH oxidase

조직에 완충 용액에 넣고 균질화한 뒤 원심 분리하여 상층액을 분리한다. Lucigenin-enhanced chemiluminescence assay를 사용하여 상층액에서 NADPH oxidase가 매개하는 superoxide radical($O_2^{\cdot-}$) 생성을 측정한다. NADPH oxidase의 활성은 mg 단백질 당 계수로 표현한다. 시료를 채취한 후 단백질 상층액을 얻고, 상층액의 단백질의 농도를 측정한다. 조직을 분해하여 단백질을 추출, 정량하고, 정량한 단백질 추출물을 전기영동을 한다. 시료를 transfer하고 5% skim milk 또는 TBST를 이용하여 blocking 한다. NADPH oxidase antibody를 이용하여 단백질 발현정도를 측정한다. mRNA 발현을 위해서는 시료에서 Trizol reagent를 이용하여 RNA를 추출한 후 정량한다. RNA를 이용하여 cDNA를 합성한다. SYBR Green PCR Master Mix, cDNA, primers, RNase-free water를 넣고 PCR을 증폭시킨 후 Sequence Detector software를 사용하여 Amplification data를 분석한다. Relative mRNA expression 수준은 mathematical formulas ($2^{-\Delta\Delta Ct}$)를 사용하여 분석한다.

바. 심장 기능

(1) 좌심실비대

심전도를 측정하여 좌심실비대는 Sokolow-Lyon 기준과 Cornell 기준을 적용하여 판단한다. Sokolow-Lyon 기준은 전흉부 유도 V1의 S파와 V5 또는 V6의 R파와의 합으로, 남녀 모두 35mm를 초과하는 경우 좌심실비후로 정의하고, Cornell 기준은 전흉부 유도 V3의 S파와 확장 사지유도 aVL의 R파의 합으로, 남자는 28 mm 초과, 여자는 20 mm 초과를 심전도의 좌심실비후로 정의한다.

(2) B형 나트륨이노 펩타이드(BNP)

혈중 BNP농도 측정은 BNP assay kit로 이용하여 측정한다. 측정값이 100 pg/mL을 넘을 때 심인성으로 상승한 것으로 판정한다. 일반적으로 1~3개월에 BNP 수치를 다시 측정하여(early period BNP follow-up) 초기 BNP 감소율을 아래와 같은 방법으로 산출한다.

$$\text{초기 BNP 감소율} = \frac{\text{baseline BNP level} - \text{early follow up BNP level}}{\text{baseline BNP level}} \times 100$$

(3) N-terminal proatrial natriuretic peptide(NT-proBNP)

혈중 NT-proBNP는 proBNP assay kit 이용하여 측정한다. 혈중 NT-proBNP의 측정 범위는 5-35,000 pg/mL이다.

(4) 심박수

가슴에 장착된 심박감지 센서가 무선으로 심박계를 통해 심전도 수치들을 전송한다. 각 호흡 구간별 평균 심박수(mean heart rate, Mean HR), 심박수의 표준편차(standard deviation of heart rate, STD HR)를 구한다. 불규칙적 심박동시에는 심전도에 3초 마다 표시되어 있는 선을 중심으로 6초 동안의 QRS군의 수를 센 후 10을 곱하여 심박수를 계산한다. 동물실험의 경우 마취 후 기도에 cannula를 장치하여 호흡이 용이하도록 한 후 우측 대퇴동맥에 heparin 식염수로 채워진 polyethylene tube를 삽입하여 pressure transducer를 통해 polygraph상에 기록한다.

(5) 맥박수

맥박수는 중지와 검지 두 손가락으로 반대편 손목 밖 부분을 적당히 눌러서 맥박이 뛰는 부분을 확인한다. 이 때 초침이 있는 시계를 이용하여 1분간의 맥박수를 측정한다. 또 다른 방법으로 중지와 검지 두 손가락을 목 중간부분의 약간 바깥쪽을 눌러 보면 이곳의 맥박은 아주 강하게 뛰므로 쉽게 박동을 느낄 수 있고, 이 위치에서 1분간의 맥박수를 측정한다.

(6) 심장무게

실험동물은 희생한 후 심장을 적출하여 무게를 측정한다.

(7) 심전도

심전도 검사는 심장의 박동과 관련되어 나타나는 전기적 활동을 신체 표면에 부착한 전극을 통해 감지하는 것이다. 측정방법은 금속물질을 제거한 후, 바로 누운 자세에서 전극을 손목, 발목위, 흉부에 붙인다. 감도 1(10 mm/mV), 표준기록속도 25 mm/초에서 표준 12 유도 심전도를 기록한다.

(8) 심장 조직 검사

실험동물의 경우 심장을 적출하여 조직을 시료로 사용하여 실험을 할 수 있다.

(9) 심장초음파

심장 초음파는 고혈압성 심장 변화인 좌심실 비대, 심장 기능의 이상을 조기에 발견할 수 있는 검사이다. 대상자를 침대에 왼쪽으로 비스듬히 눕히고 M-mode 심초음파기를 심장을 따라 움직여가며 심장의 구조와 기능을 관찰하고 평가한다.

사. 신장기능

(1) 소변 알부민-크레아티닌 비(UACR)

동물실험에서 24 시간 동안 소변량을 수집한다. 임상의 경우 검체 채취 후 1시간 이내의 신선한 수시 방출뇨에 UACR 선별검사 요시험지봉을 적신 후 요화학분석기를 이용하여 알부민과 크레아티닌을 측정한다.

알부민은 sulfonephthalein dye를 이용한 비색법으로 측정하고 측정범위는 0.1-40.0 mg/dL이다. 크레아티닌은 크레아티닌-금속 복합체의 peroxidase 유사 활성도를 이용한 비색법으로 측정하고 측정범위는 0.1~200 mg/dL이다. 알부민의 값을 크레아티닌의 값으로 나누어 UACR(mg/g)을 계산한다. 알부민이 0.1 mg/dL 미만인 경우는 UACR을 0.1 mg/g 미만으로 정한다. 계산된 UACR이 30 mg/g 미만인 경우는 정상으로 판독하고 30~300 mg/g 구간 및 300 mg/g 초과 구간은 비정상적으로 판독한다.

(2) 사구체여과율

사구체 여과율은 Inulin, Iohexol, ^{51}Cr -EDTA, $^{99\text{m}}\text{Tc}$ -DTPA (Diethylenetriamine pentaacetate), ^{125}I -Iothalamate 등의 외부 표지자의 제거율을 측정하는 방법이 있다. ^{51}Cr -EDTA GFR은 체중에 따라 적정량의 ^{51}Cr -EDTA를 정맥주사 후 2시간 후에 채혈하여 농도를 radioimmunoassay로 측정한 후, GFR을 계산한다.

(3) 소변량

실험동물은 대사케이지(metabolic cage)에서 24 시간 동안 소변량을 수집한다.

(4) Lipschitz value

시험군의 경우에는 시험 물질(50 mg/kg)이 포함된 생리식염수 5.0 mL 경구 투여하고, 요소실험군은 요소(1 g/kg 요소)를 경구 투여하고 추가로 5mL NaCl 용액을 위관 영양법으로

투여한다. 소변 배설량은 시험물질 투여 5 시간 후와 24 시간 후에 각각 기록한다. 소변의 나트륨 함량을 측정한다. Lipschitz-value(ratio T/U)는 시험 화합물의 소변 배설량(T)과 요소 실험군의 소변 배설량(U)의 비로 표현된다. 1.0 이상의 지표는 긍정적 효과로 간주된다. T/U비가 2.0 이상이면 강력한 이뇨제 효과가 있음을 의미한다.

(5) $\text{Na} + \text{Cl}/\text{Na} : \text{K ratio}/\text{Cl} : (\text{Na}+\text{K}) \text{ ratio}$

소변에서 Na^+ , K^+ 및 Cl^- 농도를 분석한다. Na^+ 와 K^+ 의 농도는 원자흡광광도계 (flame photometer)로 분석하고, Cl^- 의 양은 질산은 용액 과 5 % 칼륨 크롬산 용액을 지시약으로 titration하여 측정한다. Na^+ , K^+ 및 Cl^- 농도의 비율을 계산한다.

3. 시험 설계 시 고려사항

가. 동물시험

(1) 실험동물

혈압 감소 효과를 평가하기 위해 비유전적 또는 유전적 고혈압 유도 모델이 사용되고 있다.

비유전적 동물 모델

- 2K1C Model : 개의 한쪽 신동맥을 결찰하여 고혈압을 유도
- 고혈압 유도된 쥐 모델 : 쥐에게 mineralocorticoid, 특히 DOCA(deoxycorticosterone-Acetate), 글루코코르티코이드(glucocorticoid) 안지오텐신 II를 만성적으로 주입하여 내분비적, 대사적, 식이로 유도
- 기타 : Salt-sensitive rat 등 유전적으로 나트륨에 민감한 동물을 이용하여 고혈압을 유발

유전적 동물 모델

- 표현형-유도 된 쥐 실험 모델 : 유전적인 동형접합성 Wistar 중 쥐를 이용한 SHR 모델
- 유전자형으로 유도 된 모델 : 유전자의 조작(과발현 또는 제거) RAS(레닌 안지오텐신 시스템), 아드레날린 발생계 (Adrenergic System), G-단백질 혈관내피세포의 산화질소(nitric oxide) 합성 효소, natriuretic peptides 등과 관련된 유전자

(2) 시험 설계

실험동물을 대상으로 식이에 혼합하여 시험물질을 공급하거나, 강제경구 투여할 수 있다
(※ 정맥 투여, 복강 투여 등의 투여 방법은 적합하지 않다).

(3) 바이오마커

동맥에서의 혈압 및 혈액이나 신장에서의 ACE 농도, renin 농도, angiotensin II 농도 등 다양한 바이오마커를 측정 할 수 있다.

(4) 통계 처리

시험 결과는 대조군과 시험 군을 통계적으로 비교하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 판정한다.

나. 인체적용시험

(1) 시험대상

(가) 시험대상자(예시)

혈압이 정상(수축기 혈압 : 120 mmHg 미만, 이완기 혈압 : 80 mmHg 미만), 주의(수축기 혈압 : 120~129 mmHg, 이완기 혈압 : 80 mmHg 미만), 고혈압 전단계(수축기 혈압 : 130~139 mmHg 또는 이완기 혈압 : 80~89 mmHg)에 속하며 약물을 복용하지 않는 자를 대상으로 한다.

* 고혈압 1기(수축기 혈압 : 140~159 mmHg 또는 이완기 혈압 : 90~99 mmHg)에 속하는 자가 일부(윤리적 으로 허용되는 범위) 포함될 경우 약물을 복용하거나 약물 처방이 필요한 자는 반드시 제외되어야 함

(나) 대상자 제외기준(예시)

- 질병상태
 - 이차 고혈압
 - 기립성 저혈압
 - 악성 고혈압
 - 진찰 전 고혈압(white coat hypertension)
 - 관상동맥질환
 - 심근경색
 - 관상동맥재개통 수술 후
 - 선천성 심장질환
 - 혈관재생
 - 뇌졸중
 - 일과성 뇌허혈발작
 - 말초동맥질환
 - 울혈성심부전
 - 만성신부전(GFR <30 mL/min)
 - 암
 - 선천적 또는 후천적 지혈장애
- 약물 복용
 - 혈압강하제 복용
 - 항정신성 물질 중독
 - 항고혈압제 최대 복용허용량의 3배 이상 복용

안지오텐신 전환효소 억제제와 관련된 부작용
6개월 이내 혈압에 영향을 주는 약복용(호르몬치료, 저혈당제, 체중조절제)
혈압강하제 복용
호르몬피임약(여성) 복용
최근 1년에 피하주사액(헤파린, 인슐린)
면역억제제, 양성자펌프 억제제, 수소 차단제, 비스테로이드성 항염증제

○ 생리적 상태

임신부, 임신을 준비하는 사람

수유부

출산 후 6개월 이내

○ 체중

3개월이내에 5~10% 체중변화/체중 증가/감소가 5 kg 이상

○ 알러지

시험물질에 대한 알러지

○ 기타

최근 3개월내 다른 임상시험 참여

AST 또는 ALT 수치 > 최대 정상수치의 3배

크레아티닌 > 1.5 mg/dL

갑상샘 자극 호르몬 ≥ 10 mIU/L

연구자에 의해 실험에 부적합하다고 판단되는 사람

(2) 시험설계

무작위배정, 위약대조연구(Randomized, controlled trial; RCT)를 기본으로 한다.

(3) 바이오마커

수축기·이완기 혈압 및 기전에 따른 바이오마커를 측정할 수 있다.

(4) 통계 처리

시험결과는 대조군과 시험군을 통계적으로 비교하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 판정한다.

IV

참고문헌

1. 「건강기능식품 기능성 원료 및 기준·규격 인정에 관한 규정」, 식품의약품안전처 고시 제 2016-141호, 2016
2. 건강기능식품 기능성평가 교육프로그램 개발, 식품의약품안전처, 2010
3. 건강기능식품 기능성평가 해설서, 식품의약품안전처, 2008
4. 건강기능식품의 기능성 시험가이드, 한국보건공정서연구회, 2004
5. 국민고혈압사업단, www.htpertension.or.kr
6. 김동민, 임성훈, 이명용. 고혈압 환자에서 혈압변동성 및 심장박동수와 hsCRP와의 관련성. 대한내과학회지 85(1):50-57, 2013
7. 김미경 외, 건강기능식품. (주)교문사, 2010
8. 김소연, 양지은, 송재희, 맹상현, 이지현, 윤나영. 혈관내피세포에서 TNF- α 로 유도되는 혈관염증에 대한 쑥(*Upogebia major*) 효소가수분해물의 억제 효과. 한국수산과학회지 51(2): 127-134, 2018
9. Stuart Ira Fox, 생리학 10판, 라이프사이언스, 2008
10. 대한의학회, 질병관리본부. 일차의료용 근거기반 고혈압 권고 요약본. 2018
11. 대한고혈압학회. 고혈압진료지침. 2018
12. 보건복지부, 질병관리본부. 2016 국민건강 통계 I, 2017
13. 이해영. 고혈압의 새로운 진단기준. 대한의사협회지 61(8):485-492, 2018
14. Borghi C, Cicero AF. Nutraceuticals with a clinically detectable blood pressure-lowering effect: a review of available randomized clinical trials and their meta-analyses. Br J Clin Pharmacol 83(1):163-171, 2017
15. EFSA Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (EFSA NDA Panel), Turck D, Bresson JL, Burlingame B, Dean T, Fairweather-Tait S, Heinonen M, Hirsch-Ernst KI, Mangelsdorf I, McArdle HJ, Naska A, Neuh€auser-Berthold M, Nowicka G, Pentieva K, Sanz Y, Sj€odin A, Stern M, Tome D, van Loveren H, Vinceti M, Willatts P, Martin A, Strain JJ, Heng L, Martinez SV, Siani A. Guidance for the scientific requirements for health claims related to antioxidants, oxidative damage and cardiovascular health (Revision 1). EFSA J 16(1):5136, 2018
16. Lawes CMM, Bennett DA, Lewington S, Rodgers A. Blood Pressure and coronary Heart Disease: A Review of the evidence. Seminar Vascular Medicine 2(4):355-368, 2002

17. Liu T, Zhang L, Joo1 D, Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. Signal Transduction and Targeted Therapy 2:e17023, 2017

건강기능식품 기능성 평가 가이드(민원인 안내서) - ‘혈압조절에 도움을 줄 수 있음’ 편 -

발 행 인 : 이동희

편 집 위 원 장 : 황인균

편 집 위 원 : 이해영, 권용관, 허수정, 서은채, 국주희, 김준영,
이미영, 오재명, 황경미, 방수진, 이요아, 정혜진,
김선후, 송진희

발 행 처 : 식품의약품안전평가원

발 행 일 : 2019년 6월

문 의 처 : 식품위해평가부 영양기능연구팀

(043-719-4416, 4421, 4423, 4428, 4430)

건강기능식품 기능성 평가 가이드

‘혈압조절에 도움을 줄 수 있음’ 편



【부패. 공익신고】 신고자 및 신고내용은 보호됩니다.

- ▶ 식약처 홈페이지 “국민소통 > 국민신문고 > 부패.공익신고” 코너
- ▶ 식약처 홈페이지 “국민소통 > 신고센터 > 부패.공익신고 상담” 코너