

大食細胞 oxLDL 生成에 미치는 獨活寄生湯의 影響

*黃貴緒, 宋芝娟

暻園大學校 韓醫科大學 豫防醫學教室

Effects of Tokhwalkisaengtang on LDL Oxidation in Macrophage Cell.

*Gwi Seo Hwang, Ji Yeon Song

College of Oriental Medicine, Kyungwon University, 461-701, Korea.

Abstract

The oxidative modification of low density lipoprotein(LDL) has been implicated in the development of atherosclerosis. Oxidized LDL(oxLDL) are found in macrophage foam cell, and it can induce an macrophage proliferation in atherosclerotic plaque. In this study, we investigated the hypothesis that Tokhwalkisaengtang(TK) may reduce atherosclerosis by lowering the oxidizability of LDL. To achieve this goal, we examined the effect of TK on LDL oxidation, nitric oxide production in murine macrophage cell line, and the effect of TK on cupuric sulfate-induced cytotoxicity, LDH release, and macrophage activity. TK inhibited the generation of oxLDL from native LDL in macrophage cell culture, and decreased the release of LDH from cupric sulfate-stimulated macrophage. In other experiments, TK activated macrophage cell, and increased the survival rate, and enhanced nitric oxide production in macrophage.

Key words: Tokhwalkisaengtang(TK), oxLDL, atherosclerosis, macrophage

I. 서론

심혈관계 질환은 주로 동맥경화, 혈전증, 뇌경색 등으로 현재 국내 질병중 사망률 1위를 기록하고 있다. 이중 동맥경화증은 혈관벽에 지방성분이 침

착되고, 혈관벽이 비후해져 탄력성을 상실한 상태로 뇌졸중, 심근경색, 신부전등의 합병증을 유발할 수 있다. 일반적으로 고지혈증 및 고콜레스테롤혈증, 고혈압, 흡연등은 동맥경화의 3대 위험인자로 잘 알려져 있으며, 특히 고지혈증중 LDL(low

density lipoprotein)이 HDL(high density lipoprotein)에 비하여 상대적으로 우세한 과지질 단백질혈증(hyperlipoproteinemia)에서는 관상동맥질환 및 죽상동맥경화(atherosclerosis) 이환율이 매우 높은 것으로 알려져 있다(1,2). 따라서, 동맥경화를 예방하거나 치료하기 위하여 혈중 콜레스테롤을 억제하고 비수용성인 LDL치를 낮추기 위한 연구가 많이 수행되었다.

최근 연구에 의하면, 고콜레스테롤혈증과 같이 기존의 알려진 동맥경화 위험인자가 없는 경우에도 동맥경화가 발생할 수 있으며, 동맥경화 위험성을 높일 수 있는 또다른 인자로는 호모시스테인 등이 알려졌다(3). 그러나, 동맥경화의 주요 병리현상인 혈관벽 비후에는 혈관내피세포, 혈관 평활근세포와 대식세포, 호중구 세포 등의 분열증식 및 상해현상이 관련되어 있으며(4,5), beta-FGF(fibroblast growth factor), TGF-alpha, IL-8과 같은 growth factor와 cytokine등이 이들 세포상호간의 활성을 조절한다(6,7). 이 과정에는 LDL의 산화형이 중요한 역할을 하여 죽상동맥경화의 진행이 촉진된다.

동맥경화 유발의 가장 중요한 인자로 알려진 LDL은 혈관내피세포와 대식세포에 의해 산화되어 oxLDL로 바뀐다(8). 대식세포나 혈관내피세포에 의해 생성된 oxLDL은 대식세포의 세포질내 칼슘농도를 높이고 PKC(protein kinase C)의 활성을 증가시킴으로서 GM-CSF(granulocyte macrophage colony stimulating factor)를 유리시킨다. 대식세포로부터 유리된 GM-CSF는 대식세포를 증식시켜 더 많은 oxLDL을 생성하여 혈관벽 침착을 촉진한다(9,10). 또한, GM-CSF는 혈관내피세포 및 혈관평활근 세포의 증식을 자극하여 oxLDL의 혈관벽 침착과 함께 혈관벽 비후화를 유발하게 된다.

기존의 동맥경화증 치료에 관한 연구는 주로 혈중 콜레스테롤의 억제에 집중되었으나, 혈관내피세포 및 이 세포와 상호작용을 하는 대식세포의 기능 이상이 동맥경화에 결정적인 역할을 한다는

점이 새롭게 규명되었다. 본 연구진은 이러한 점에 착안하여, 한약재로부터 항동맥경화효과를 가지는 한방처방을 확인하는 연구의 일환으로 대식세포 관련인자들에 대한 영향을 평가하기로 하였다. 이를 위하여 독활기생탕(TK)이 대식세포에서 oxLDL 생성에 미치는 영향, nitric oxide 생성에 미치는 영향, 대식세포의 활성화에 미치는 영향등을 평가하여 동맥경화증에 응용가능성을 검토하였다.

II. 실험방법

1. 실험재료

1) 한약재의 구성

독활기생탕은 경원대학교 한방병원에서 기증받아 사용하였으며, 처방구성은 다음과 같다.

〈독활기생탕(TK)〉

독활 당귀 백작약 삼기생 3g, 숙지황 천궁 인삼 백복령 우슬 두충 진교 세신 방풍 육계 2g, 감초 1.5g, 생강 6g

2) 한약재 추출 및 시료제조

실험용 처방에 증류수를 넣고 4시간 이상 추출한 후 여과지를 이용하여 여과하였다. 여과액을 감압증류기를 이용하여 농축한 다음 냉동건조기를 이용하여 건조하여 사용시까지 냉동보관 하였다. 경구투여시에는 생리식염수에 녹여사용하였으며, 조직 배양시에는 배지에 녹인후 멸균 여과하여 사용하였다.

2. 방법

1) 대식세포의 oxLDL 생성 및 기능에 미치는 영향 측정

(1) 대식세포 배양

실험에 사용한 murine macrophage인 RAW

264.7 Cell은 서울대학교 세포주은행에서 분양받아 사용하였다. 세포배양은 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco)에 0.37% sodium bicarbonate, 10%FBS, 100U/ml penicillin, 100 μ g/ml streptomycin을 첨가한 배지를 0.22 μ m membrane filter로 여과한 다음 사용하였으며, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 매주 2-3 회씩 배지를 교환해 주었으며, 계대 배양시는 배지를 제거한 후 trypsin-EDTA($\times 10$)를 가하고, 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 방치하여 부착된 세포를 분리하였다. 실험시 사용할 세포는 5×10^5 cells/ml를 24well에 seeding하였고, 세포가 바닥에 잘 부착하도록 배양했다.

(2) 대식세포의 LDL 단백질화에 미치는 영향 측정

대식세포에서 oxLDL 생성시 나타나는 단백질 분해의 정도를 측정하였다. 위에 기술한 방법과 동일한 방법으로 24well에 배양한 세포를 PBS로 2회 세척한 후, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml 농도의 TK를 배지에 가한 후, 37 $^{\circ}$ C, CO₂ incubator에서 8시간동안 배양하였다. 여기에 200 μ g/ml 농도의 LDL(Sigma Chemical Co.)을 가한 후 90시간 동안 다시 배양하였다. 각 군의 세포를 plate로부터 취하고 초음파로 세포막을 용해시킨 후, 482nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) 대식세포의 LDL 지질산화에 미치는 영향 측정

대식세포에 의한 oxLDL 생성시 나타나는 지질 분해의 정도를 측정하였다. (2)에서 기술한 바와 같이 배양한 각 실험군을 plate로부터 취하여 초음파로 세포를 분쇄한 후, 분쇄액 200 μ l에 동량의 20% TCA(in 0.6M HCl) 용액과 0.1M TBA(in 0.26M Tris buffer) 용액 400 μ l를 넣어 95 $^{\circ}$ C에서 20분간 반응시켰다. 반응 종결후 2000g에서 5분간 원심분리하고 상층액을 취해 550nm에서 흡광도를 측정하였다.

(4) 대식세포의 Nitric Oxide 생성능에 미치는 영향 측정

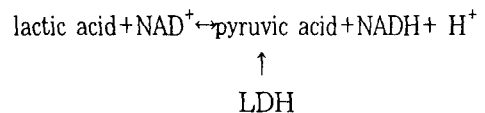
위에 기술한 것과 동일한 방법으로 LDL를 투여한 후 90시간 배양하고 실험군에서 배지 상층액을 취하였다. NaNO₂ 용액의 연속적인 희석액을 만들어 최종농도가 0.05 μ M가 되도록 조절하였다. 먼저 얻은 세포 배양액과 NaNO₂ 희석액에 동량의 Greiss reagent solution을 넣고, 15분간 상온에 방치한 다음 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

(5) 대식세포 생존능에 미치는 영향 측정

RAW 264.7 세포를 24 well에 분주하고 5시간 동안 배양하여 부착시킨 후, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml 농도의 TK를 첨가하였다. 7시간 배양한 다음 5 μ M CuSO₄에 20시간 노출시켰다. PBS로 희석한 MTT용액 50 μ l를 첨가하고 다시 4시간 배양하였다. 상층액을 제거하고 50 μ l DMSO를 첨가한 다음 650nm에서 흡광도를 측정하였다.

(6) LDH 유리에 미치는 영향 측정

LDL을 첨가한 대식세포를 5 μ M CuSO₄에 20시간 노출시킨 다음, 먼저 상등액을 취하여 배지로 누출된 LDH 양을 LDH kit(LDH/LD, Sigma No .500)로 측정하였다. 세포내에 존재하는 LDH 양은 lysis buffer(50mM Tris/5mM EDTA)를 500 μ l 넣고 초음파를 사용하여 세포막을 용해시킨 다음, LDH kit를 사용하여 측정하였다. LDH kit의 반응 원리는 다음과 같다.



대식세포로부터 유리된 LDH의 백분율은 다음의 공식을 사용하여 결정하였다.

$$\text{Release (\%)} = \frac{\text{LDH activity in medium}}{\text{LDH activity in medium} + \text{LDH activity in cell lysate}} \times 100$$

(7) 대식세포 활성화에 미치는 영향 측정

대식세포의 활성화여부를 알아보기 위하여 Suzuki 등 (20)의 방법에 따라 활성화된 대식세포로부터 분비되는 acid phosphatase의 활성을 측정하였다. 시약 및 재료는 PBS 용액 (pH 7.2), 0.02 M p-nitrophenyl phosphate/ 0.1 M citrate buffer (pH 5.0)는 0.1 M citrate acid와 0.1 M sodium citrate를 약 1:1.5 (v/v)로 혼합하여 pH 5.0으로 조정한 후 p-nitrophenyl phosphate (Sigma Chemical Co., U.S.A)를 0.02 M 되도록 가하였으며, 0.2 M borate buffer (pH 9.8)는 0.2 M sodium borate에 0.2 M NaOH를 가해 pH 9.8로 조정하였다. 6번과 동일한 방법으로 5 μM CuSO4에 20시간 노출시킨 다음, 상등액을 취하여 실시하였다. 0.1% Triton X-100을 100 μl를 가한 다음 0.02 M p-nitrophenyl phosphate/ 0.1 M citrate buffer (pH 5.0)를 0.5 ml 가해 37℃, 5% CO2 배양기에서 1시간 반응시킨 후 1500 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 상등액에 cold 0.2 M borate buffer (pH 9.8) 1ml 씩을 가하여 반응을 종결시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며 대식 세포의 활성은 다음 식에 따라 계산하였다.

$$\text{Acid phosphatase activity (p-nitrophenyl phosphatase } \mu\text{mol/ } 10^6\text{ macrophage/60 mins)} = 1.15 \times \text{O.D. at } 405 \text{ nm}$$

3. 통계처리

모든 수치는 mean ± S.D로 나타내었으며, 유의성 검정은 각군에 대하여 student's t-test로 하였다.

III. 실험 결과

1. 대식세포 LDL 지질산화에 미치는 영향

대식세포에서 oxLDL 생성시 나타나는 LDL

의 지질과산화 정도를 알기위하여, 1 μg/ml, 10 μg/ml 농도의 TK 시료를 미리 투여한 다음, 90시간 동안 LDL과 함께 배양하여 활성화된 대식세포에 의해 nLDL로부터 oxLDL로 형성되는 과정에서 나타나는 LDL의 지질과산화 정도를 알기위하여 MDA를 측정하였다 RAW264.7에 TK 시약을 가하지 않고 LDL만 첨가하여 배양한 대조군에서는 oxLDL 형성이 유발되었다. 1 μg/ml, 10 μg/ml 농도의 TK 시료군은 대조군에 비해 MDA 수치를 감소시켜 oxLDL 형성을 억제하였다 (Fig.1).

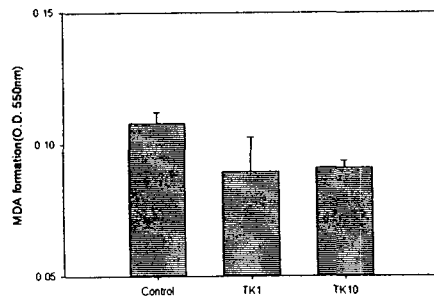


Fig 1. Effects of TK on oxLDL formation in macrophage cells.

MDA was measured in RAW 264.7 cells incubated with native LDL for 90hrs.

Control: Vehicle

TK1: 1ug/ml of TK treated group

TK10: 10ug/ml of TK treated group

* p < 0.01 vs Control

2. 대식세포 LDL 단백질화에 미치는 영향

대식세포에서 oxLDL 생성시 나타나는 단백질 분해의 정도를 측정하기 위하여, 1 μg/ml, 10 μg/ml 농도의 TK 시료를 미리 투여한 다음, 90시간 동안 LDL과 함께 배양하여 활성화된 대식세포에 의해 nLDL로부터 oxLDL로 형성되는 과정

에서 나오는 단백질 분해 정도를 측정하였으며, 결과는 482nm에서 측정된 실험치를 기준으로 남아있는 단백질량으로 표시하였다. RAW264.7에 TK 시약을 가하지 않고 LDL만 첨가하여 배양한 대조군에서는 oxLDL 형성이 유발되었다. 실험약 물을 첨가한 실험군의 경우, 10ug/ml 농도에서 oxLDL 형성을 억제하였다(Fig.2).

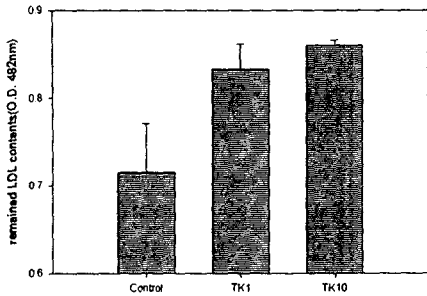


Fig 2. Effect of TK on oxidized LDL formation in macrophage cells.

Remained protein in LDL was measured in RAW 264.7 cells incubated with native LDL for 90hrs.

Control: Vehicle

TK1: 1ug/ml of TK treated group

TK10: 10ug/ml of TK treated group

*p< 0.01 vs Control

3. 대식세포 Nitric Oxide 생성능에 미치는 영향

LDL과 함께 투여한 후, TK 시료가 대식세포의 nitric oxide 분비에 어떠한 영향을 미치는지 알아 본 결과, TK 1ug/ml를 미리 투여한 시료투여군의 경우, 대조군에 비해 nitric oxide의 생성이 증가하였다(Fig.3).

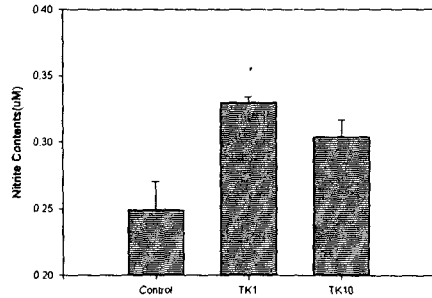


Fig 3. Effects of TK on nitric oxide synthesis in macrophage cells.

RAW 264.7 cells were incubated with native LDL for 90hrs.

Control: Vehicle

TK1: 1ug/ml of TK treated group

TK10: 10ug/ml of TK treated group

* p< 0.01 vs Control

4. 대식세포 생존능에 미치는 영향

RAW 264.7 세포에 1ug/ml, 10ug/ml 농도의 TK를 첨가한 후 CuSO4로 20시간 세포상해를 유발하였으며, 세포생존율은 MTT assay로 평가하였다. 실험결과, 1ug/ml, 10ug/ml 농도의 TK시료 투여군 모두 대식세포 생존율을 증가시켜 세포손상을 억제함을 보였다(Table I).

Table I. The survival rate of RAW 264 cell from different groups incubated with CuSO4 for 20hrs

	O.D value(650nm)	Survival rate(%)
Control	1.00 ± 0.09	100.0
TK 1	1.13 ± 0.01*	113.2 ± 1.72
TK 10	1.16 ± 0.02*	115.8 ± 3.32

The value are expressed as mean ±S.D (n=8)

Control: Vehicle

TK1: 1ug/ml of TK treated group

TK10: 10ug/ml of TK treated group

* p< 0.01 vs Control

5. oxLDL로 처리한 대식세포에서 LDH유리에 미치는 영향

LDL을 첨가한 대식세포를 CuSO₄에 20시간 노출시켜 배양하고, 상등액을 취하여 손상된 세포로부터 배지로 누출된 LDH를 측정하였다. 실험 결과, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml 농도의 TK시료는 모두 손상된 세포로부터 LDH 유출을 억제하였다 (Fig.4).

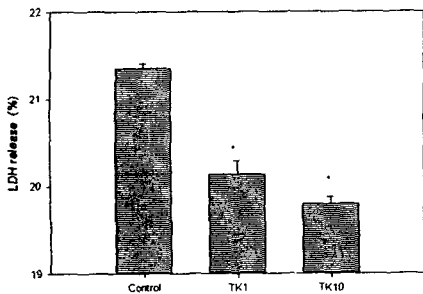


Fig 4. Effects of TK on CuSO₄-induced LDH release from macrophage cells

Murine macrophage-like RAW 264.7 cells were incubated with 1, 10 μ g/ml of TK in the presence of 5 μ M CuSO₄.

Control: 5 μ M CuSO₄ + Vehicle

TK1: 5 μ M CuSO₄ + 1 μ g/ml of TK

TK10: 5 μ M CuSO₄ + 10 μ g/ml of TK

* p < 0.01 vs Control

6. 대식세포 활성화에 미치는 영향 측정

대식세포의 활성화여부를 알아보기 위하여 Suzuki 등(20)의 방법에 따라 활성화된 대식세포로부터 분비되는 acid phosphatase의 활성을 측정하였다. CuSO₄를 가하여 RAW 264.7 cell에 손상을 가한 경우에 세포의 활성은 현저히 억제되었으나, 대조군과 비교하여 1 μ g/ml TK 시료

는 acid phosphatase활성을 현저히 증가시켰다. 이것은 TK 시료가 1 μ g/ml 농도에서 과산화 기질로 손상된 세포의 활성을 회복시킨다는 것을 의미한다(Fig.5).

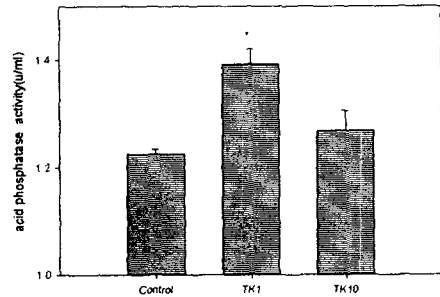


Fig 5. Effects of TK on acid phosphatase activity in macrophage cells.

Murine macrophage-like RAW 264.7 cells were incubated with 1, 10 μ g/ml of TK in the presence of 5 μ M CuSO₄.

Control: 5 μ M CuSO₄ + Vehicle

TK1: 5 μ M CuSO₄ + 1 μ g/ml of TK

TK10: 5 μ M CuSO₄ + 10 μ g/ml of TK

* p < 0.01 vs Control

IV. 고찰

동맥경화증은 동맥혈관벽이 비후해지고 혈관벽에 지방성분이 침착되어 탄력성이 상실된 상태로 뇌졸중, 심근경색, 신부전등의 심각한 심혈관계 질환을 유발할 수 있다. 동맥경화의 원인으로는 고지혈증 및 고콜레스테롤혈증, 고혈압, 당뇨병등이 알려져 있으며, 특히 고지혈증중 LDL(low density lipoprotein)이 HDL(high density lipoprotein)에 비하여 상대적으로 우세한 과지질 단백질혈증(hyperlipoproteinemia)에서는 관상동맥질환 및 죽상동맥경화(atherosclerosis) 이

환율이 매우 높은 것으로 알려져 있다(1,2). 따라서, 동맥경화를 예방하거나 치료하기 위하여 혈중 콜레스테롤을 억제하고 비수용성인 LDL치를 낮추기 위한 연구가 많이 수행되었다.

최근의 연구에 의하면, 죽상동맥경화증은 지방선조(fatty streak)의 초기단계인 거품세포(foam cell)의 형성으로부터 시작된다고 알려져 있다. 이러한, 거품세포는 혈중 단핵세포(monocyte)의 콜레스테롤 침착부위에서의 혈관벽 침투와 대식세포로의 분화 및 인지질의 흡수를 통하여 형성되기 시작한다. 이 과정에는 LDL의 흡수와 산화과정이 포함되어 있는데, 산화과정을 통해 형성된 oxLDL에 의하여 대식세포가 혈관벽에 고착하게 된다.

LDL은 대식세포 뿐만아니라 혈관내피세포, 혈관 평활근세포, 임파구등에 의해서도 oxLDL로 바뀔 수 있다. 이 과정에는 여러가지 효소적 또는 비효소적 작용이 관여하는데, ceruloplasmin-bound copper, superoxide, NOx, lipoxigenase, myeloperoxidase 등이 중요한 인자로 작용하게 된다. 대식세포나 혈관내피세포에 의해 생성된 oxLDL은 대식세포의 세포질내 칼슘농도를 높이고 PKC(protein kinase C)의 활성을 증가시킴으로써 GM-CSF(granulocyte macrophage colony stimulating factor)를 유리시킨다. 대식세포로부터 유리된 GM-CSF는 대식세포를 증식시켜 더 많은 oxLDL을 생성하여 혈관벽 침착을 촉진한다(9,10). 또한, GM-CSF는 혈관내피세포 및 혈관 평활근 세포의 증식을 자극하여 oxLDL의 혈관벽 침착과 함께 혈관벽 비후화를 유발하게 된다. 이와 함께 혈관벽 침착세포내에서 형성된 oxLDL의 자가 항체가 형성되어 침착된 면역복합체는 염증반응을 유발하여 혈관벽이 파열될 수도 있으며, 이러한 경우 심각한 병증으로 악화된다.

LDL이 copper ion에 노출되면 LDL중의 apoprotein의 산화 및 분해, 인지질과 스테롤계 화합물의 산화 및 분해가 각각 일어난다. 이러한 변화는 LDL이 혈관내피세포나 대식세포에서와 비슷한 양태로 산화된다. LDL의 산화에는 Apolipoprotein B의 fragmentation, cross-linking, 아미노산 산화와 유도체 형성 등의 단백질의 산화 및 분해가 포함되는데, 산

화 및 분해정도는 tyrosine, nitrotyrosine, chlorotyrosine, hydroxyleucine과 그들의 이성질체등을 측정하여 평가할 수 있다(17, 18). 본 연구에서는 대식세포를 배양하면서 LDL을 첨가하여 생성되는 oxLDL양을 측정하기 위한 방법으로 산화하여 분해되고 남은 단백질량을 측정하였다. 실험결과, TK는 대식세포 oxLDL 생성과정에서 일어나는 단백질 산화를 현저히 억제하는 결과를 나타내었다(Fig.2).

한편, 대식세포의 oxLDL 생성능 측정의 또다른 방법으로 LDL내의 인지질의 산화 및 분해를 측정하였으며, 지표로서 지질과산화 결과 생성되는 MDA를 측정하였다. 실험결과, TK는 LDL을 첨가한 대식세포로부터 생성되는 oxLDL의 지표인 지질과산화를 저하시켰다(Fig.1).

따라서, TK는 대식세포의 oxLDL 생성능을 억제하여 혈관벽에 지질침착 및 혈관 비후화, 면역복합체 형성으로 나타나는 염증반응 결과 유발되는 혈관과열등을 억제할 수 있을 것으로 사료되었다.

Nitric oxide(NO)는 endothelial cell이나 neuronal cell, macrophage cell에서 nitric oxide synthetase(NOS)에 의해 생성된다. 대식세포는 endotoxin, LPS, 특정 cytokine의 자극에 의해 유도된 NO를 유리시킨다. 이 NO는 비교적 안정적인 자유기로 정상적인 PH에서는 LDL을 산화시킬 수 없다. 그러나, 대식세포나 혈관내피세포에서 생성된 superoxide와 반응하여 peroxynitrite를 생성할 수 있으며, 이 반응성이 높은 질소화합물이 LDL로부터 oxLDL 생성을 촉진하며, 대식세포의 scavenger receptor에 의해 oxLDL이 인지되고 흡수되게 한다(19, 20). 이러한 일련의 과정을 통해 흡수된 cholesterol은 대식세포에 의해 축적되며 prostaglandin 생성을 포함한 염증반응, 세포사멸과 함께 atherosclerosis의 진행을 촉진하는데 관여한다. 이와는 달리 혈관내피세포에서 생성되는 NO는 vascular smooth muscle의 이완과 혈소판 응집능 억제, 혈관내피세포에서의 혈관 투과성 억제 및 면역세포등의 혈관점착능 억제기능을 나타낼 수 있으며(13, 14), cGMP 분해효소인 phosphodiesterase의 억제를 통해 fibroblast,

lymphocyte 및 smooth muscle cell 증식을 억제한다고 보고되었다(15, 16). Atherosclerosis 진행과정은 혈관에 cholesterol 등의 지질이 침착되고 혈관세포의 증식으로 혈관벽 비후가 일어나는 과정을 포함한다. 따라서, 혈관내피세포에서 유래한 NO는 atherosclerosis의 진행을 억제하는 것으로 알려져 있다. Nitrite 및 nitrate는 nitric oxide(NO)의 대사산물로 endothelial cell이나 macrophage cell로부터 생성되는 nitric oxide의 생성 parameter로서 측정된다(17). 실험결과 TK는 LDL을 처리한 대식세포에서 nitrite의 농도를 현저히 증가시키는 것으로 나타났다(Fig. 3)

이는 TK가 LDL을 섭취한 대식세포에 의해 생성되는 oxLDL에 의해 반응이 자극되는 NOS(nitric oxide synthetase)의 활성을 증가시킨 결과로 보인다. 이러한 결과는 TK내에 대식세포를 자극할 수 있는 특정 cytokine이 존재할 가능성을 시사하며, 이 부분에 대한 연구는 더 진행되어야 할 것이다.

LDH는 세포손상시 투과성이 증가된 세포막을 통하여 세포로부터 누출되는 세포내의 효소로, LDH의 측정은 세포손상의 정도를 판정하는 기준이 된다. 대식세포에 대한 oxLDL의 상해작용의 지표로 LDH 유리량을 이용하여 측정된 결과, TK는 CuSO₄로 유도한 oxLDL에 의한 대식세포의 LDH 유리를 억제하는 효과를 나타내었다(Fig.4).

이상의 결과들은 TK 자체가 대식세포의 기능을 억제할 가능성과 항산화작용을 나타낼 가능성을 시사해 준다. 이러한 가능성을 확인하기 위하여 대식세포의 기능활성화에 미치는 영향과 CuSO₄에 의한 대식세포의 생존율을 측정하였다. 실험결과, TK는 대식세포의 생존율에는 직접적인 영향을 주지 못하였으며, 오히려 대식세포의 기능 측정지표인 acid phosphatase의 활성은 증가시켰다(Fig.5).

따라서, TK의 oxLDL 생성 억제작용은 대식세포의 세포기능억제를 통한 작용은 아닌 것으로 판단되었다.

이상의 연구결과, TK는 대식세포의 oxLDL 형

성을 통한 동맥경화증 발현의 예방 및 치료에 이용될 가능성이 있다고 사료되었다.

V. 결 론

본 연구에서는 한약재로부터 항동맥경화효과를 가지는 한방처방을 확인하는 연구의 일환으로 독활기생탕(TK)을 이용하여 대식세포 관련인자들에 대한 영향을 평가하였다. 이를 위하여 대식세포에서 oxLDL 생성에 미치는 영향, nitric oxide 생성에 미치는 영향, 대식세포의 활성화에 미치는 영향등을 평가하여 동맥경화증에 대한 응용가능성을 검토하였다. 실험결과, 독활기생탕(TK)은 대식세포 oxLDL 생성과정에서 일어나는 단백질 산화를 현저히 억제하는 결과를 나타내었다. 또한, 대식세포의 oxLDL 생성과정에서 생성되는 인지질의 산화 및 분해를 측정하는 지표인 지질과산화를 현저히 억제하였다. 따라서, TK는 대식세포의 oxLDL 생성능을 억제하여 혈관벽에 지질이 침착하고 혈관의 비후화, 면역복합체 형성등으로 나타나는 염증반응으로 인한 혈관과열등을 억제할 수 있을 것으로 추측되었다. 이상의 결과가 TK 자체의 대식세포 기능억제 효과인지 또는 항산화작용을 통한 효과인지 확인하기 위한 실험결과, TK는 손상된 대식세포의 생존율에는 직접적인 영향을 주지 못하였으며, 오히려 대식세포의 기능 측정지표인 acid phosphatase의 활성은 증가시켰다.

이상의 연구결과, 독활기생탕(TK)은 대식세포의 oxLDL 형성을 통한 동맥경화증 발현의 예방 및 치료에 이용될 가능성이 있다고 사료되었다.

VI. 참고문헌

1. Steinberg D and Witztum J.L.: Lipoproteins and atherosclerosis. Current concepts. JAMA 264, 3047-3052, 1990
2. Kullo K.J., Gau G.T. and Tajik J.: Novel risk factors for atherosclerosis. Mayo Clin Proc 75, 369-380, 2000
3. Tsai W.C., Li Y.H., Tsai L.M., Chao T.H.,

- Lin L.J., Chen T.Y. and Chen J.H.: Correlation of homocysteine levels with the extent of coronary atherosclerosis in patients with low cardiovascular risk profiles. *Am J Cardiol* 85, 49-52, 2000
4. Sakai M., Kobori S., Miyazaki A. and Horiuchi S.: Macrophage proliferation in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* 11, 503-509, 2000
5. Rosenfeld M.E. and Ross R.: Macrophage and smooth muscle proliferation in atherosclerotic lesions of WHHL and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Atherosclerosis* 10, 680-687, 1990
6. Wang N., Tabas I., Wichester R., Ravalli S., Rabbani L.E. and Tall A.: Interleukin-8 is induced by cholesterol loading of macrophage and expressed by macrophage foam cells in human atherosclerosis. *J Biol Chem*, 271, 8837-42, 1996
7. Wang C.Y., Bassul A.G., Boise L.H.: Activation of granulocyte-macrophage colony stimulating factor promoter in T cells requires cooperative binding of E1f-1 and AP-1 transcription factors. *Mol Cell Biol* 10, 1281-1286, 1990
8. Witztum J.L. and Steinberg D.: Role of oxidized low density lipoprotein in atherosclerosis. *J Clin Invest* 88, 1785-1792, 1991
9. Chen B.M., Clark C.R. and Chou D.L.: Granulocyte/macrophage colony stimulating factor stimulates monocyte and tissue macrophage proliferation and enhances their responsiveness to macrophage colony stimulating factor. *Blood* 71, 997-1002, 1988
10. Claus R., Fyrnys B., Deigner H.P. and Wolf G.: Oxidized low density lipoprotein stimulates protein kinase C (PKC) and induces expression of PKC isotypes via prostaglandin H synthetase in P388D1 macrophage-like cells. *Biochemistry* 35, 4911-4922, 1996
11. 尹甲用, 東醫方劑斗 處方解説, 醫聖堂, p411, 1998
12. 醫療藥日本醫藥品集 24th ed., 日本醫藥情報 Center, P2303-2304, 2000
13. Alheid U., Frolich J.C. and Forstermann U.: Endothelium derived relaxing factor from cultured human endothelial cell inhibits aggregation of human platelets. *Throm Res* 47, 561-71, 1994
14. Denham S. and Rowland I.J.: Inhibition of the reactive proliferation of lymphocytes by activated macrophages: the role of nitric oxide. *Clin Exp Immunol* 87, 157-62, 1992
15. Heller R., Bussolino F., Ghigo D., Pescarmona G.P., Calvino R., Gasco A., Till U. and Bosia A.: Activation of endothelial guanylate cyclase inhibits cellular reactivity. *Agents Actions* 45, 177-81, 1994
16. Garg U.C. and Hassid A.: Nitric oxide decreases cytosolic free calcium in Balb/c 3T3 fibroblasts by cyclic GMP-dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 171, 474-9, 1990
17. Hazen S.L. and Heinecke J.W.: 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalysed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. *J Clin Invest* 99, 2075, 1997
18. Leuwenburg C., Rasmussen J.E. and Hsu F.F.: Mass spectrometric quantitation of marker for protein oxidation by tyrosyl radical in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic plaques. *J Biol Chem* 272, 3520, 1997