

## 대식세포의 oxLDL생성에 미치는 강활속단탕의 영향

선승호, 고성규, 정용수

상지대학교 부속 한방병원 순환기내과학교실

### Effects of KanghwalSokdintang(KS) on LDL Oxidation in Macrophage Cell

Seung-Ho Sun, Seong-Gyu Ko, Yong-Su Jeong

Department of Circulatory Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Sangji University, Wonju-Si, Korea

**Objective :** As a link in chain of research to confirm the oriental medical prescription which has the anti-atherosclerosis effects, this research evaluated the effects on the macrophage-related factors by using KanghwalSokdintang(KS).

**Methods :** In order to perform this research, we have evaluated the effects on the oxLDL formation from the macrophages, the nitric oxide formation, and the oxidation of macrophages. Thus, with this evaluation, we have investigated the applicability on the atherosclerosis.

**Results :** KanghwalSokdintang has showed a noticeable reduction of protein oxidation in the process of oxLDL formation, has remarkably restrained phospholipid peroxidation, an index to estimated the phospholipid oxidation and reduction that are formed in the process of macrophage's oxLDL formation, and has increased the nitrite concentration noticeably in the LDL-dealing macrophages. By increasing the survival rate of macrophages, KanghwalSokdintang has restrained the cellular damages. KanghwalSokdintang is ineffective on the LDH outflow from damaged cells. 1  $\mu\text{g/ml}$  KanghwalSokdintang sample has increased acid phosphatase activity remarkably.

**Conclusion :** KanghwalSokdintang has the possibility to be used in the prevention and treatment of atherosclerosis, which is formed by the oxLDL formation of macrophages.

**Key Words:** oxLDL, macrophage, atherosclerosis, KanghwalSokdintang

### 1. 緒 論

허혈성 뇌질환과 허혈성 심질환은 우리나라에서 신생물 다음으로 성인사망률 2, 3위를 차지하는 뇌졸중과 심장 질환의 대부분을 차지하는 질환으로, 지금까지 밝혀진 위험 인자 중에 죽상동맥경화(Atherosclerosis)가 주요한 위험 인자로 작용하고 있다. 죽상동맥경화의 위험인자로는 고지혈증, 고혈압,

흡연, 그리고 당뇨병 등이 알려져 있는데, 특히 고지혈증 중 LDL(low density lipoprotein)은 관상동맥질환 및 죽상동맥경화증의 발생과 연관성이 매우 깊다<sup>2,3</sup>.

혈장 내의 콜레스테롤 운반 지단백인 LDL은 죽상동맥경화증 발생에 관여하는데, 많은 연구결과 LDL의 산화로 인해 형성된 oxidized LDL(oxLDL)이 병변 발생에 중요한 역할을 한다는 것이 밝혀졌다<sup>4,5</sup>. 또한, LDL은 동맥벽의 대식세포에서도 중요한 역할을 하는데, LDL 수용체 이외에 청소수용체(scavenger receptor)가 존재하여, 청소수용체를 통한 변형된 LDL의 섭취로 인해 콜레스테롤 축적, 포말세포 형성 및 여러 가지 생물학적 중요성을 갖는 여러 가지 물

· 접수 : 2003년 2월 5일 · 채택 : 2003년 5월 3일  
· 교신저자 : 선승호, 강원도 원주시 우산동 283번지 상지대학교 부속 한방병원 2내과  
(Tel: 033-741-9381 Fax: 033-732-2124, E-mail: sunguy2001@hanmail.net)

질들을 분비하게 된다<sup>6</sup>. 죽상동맥경화증은 혈장 LDL의 상승으로 동맥 내피세포에 단핵구가 부착되고, 내막에 침입하여 조직의 대식세포, Lipoxygenase, 청소수용체와 반응하여 oxLDL을 형성하거나, 포말세포(foam cells)를 형성한다. 또는 혈장 LDL의 상승으로, 내막 LDL이 상승되고, LDL은 다시 내피세포, 대식세포, 혈관 평활근 세포(Smooth muscle cell; SMC)와 반응하여 oxLDL을 생성하여 곧바로 포말세포를 생성하거나, 조직의 대식세포, Lipoxygenase, 청소수용체에 다시 자극을 준다. 이렇게 생긴 포말세포는 지방 선조(Fatty streak)를 만들면서, 병소 부위가 진행된다<sup>17</sup>.

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<sup>17</sup>. 본 저자는 이러한 점에 착안하여, 한약재로부터 항동맥경화효과를 가지는 한방처방을 확인하는 연구의 일환으로 대식세포 관련인자들에 대한 영향을 평가하기로 하였다. 김 등<sup>8</sup>과 Hsieh 등<sup>9</sup>의 杜 연구, 김<sup>10</sup>의 獨活寄生湯 연구, 그리고 이<sup>11</sup>의 何首烏 연구에서 補肝腎 약물이 고지혈증에 유의한 효과가 있음을 보고하였다. 이것을 근거로, 補肝腎하는

효능을 가진 羌活續斷湯(Kanghwalsokdintang; KS)이 항동맥경화 효과에 가능성이 있을 것으로 유추하여, 羌活續斷湯이 대식세포에서 oxLDL 생성에 미치는 영향, nitric oxide 생성에 미치는 영향, 대식세포의 활성화에 미치는 영향 등을 평가하여 동맥경화증에 응용가능성을 검토하였다.

## II. 實驗方法

### 1. 실험재료

#### 1) 한약재의 구성

강활속단탕은 상지대학교 부속한방병원에서 기증받아 사용하였으며, 한 침의 처방구성은 다음과 같다.(Table 1)

#### 2) 한약재 추출 및 시료제조

실험용 처방에 증류수 2000ml를 넣고 4시간 이상 추출한 후 여과지를 이용하여 여과하였다. 여과액을 감압증류기를 이용하여 농축한 다음 냉동건조기를 이용하여 건조하고 사용 시까지 냉동보관 하였다. 경구 투여 시에는 생리식염수에 녹여 사용하였으며, 조직 배양 시에는 배지에 녹인 후 멸균 여과하여 사용하였다.

Table 1. Prescription of Kanghwalsokdintang(KS)

Herbs	Scientific Name	Dose
羌活(Notopterygii Rhizoma)	<i>Notopterygium incisum</i> TING	2g
防風(Saposhnikovia Radix)	<i>Saposhnikovia divaricata</i> SCHISCK	2g
白芷(Angelicae Dahuricae Radix)	<i>Angelica dahurica</i> (FISCH.) BENTH. et HOOKER F.	2g
細辛(Asari Radix)	<i>Asarum sieboldii</i> MIQ.	2g
杜冲(Eucommiae Cortex)	<i>Eucommiae ulmoides</i> OLIV.	2g
牛膝(Achyranthis Radix)	<i>Achyranthes fauriei</i> LEV.et VNT.	2g
秦艽(Gentiana Macrophyllae Radix)	<i>Gentiana macrophylla</i> PALL.	2g
續斷(Dipsaci Radix)	<i>Dipsacus japonicus</i> MIQ.	2g
熟地黃(Rehmanniae Radix Preparata)	<i>Rehmannia glutinosa</i> LIBOSCHITZ var. <i>puppurea</i> MAKINO	2g
當歸(Angelicae Gigantis Radix)	<i>Angelica gigas</i> NAKAL	2g
人蔘(Ginseng Radix)	<i>Panax ginseng</i> C. A. MEYER ( <i>P. schinseng</i> NEES)	2g
白芍藥(Paeoniae Radix)	<i>Paeonia lactiflora</i> PALLAS	2g
赤茯苓(Poria)	<i>Poria cocos</i> WOLF	2g
肉桂(Cinnamomi Cortex)	<i>Cinnamomum cassia</i> PRESL	2g
川芎(Cnidii Rhizoma)	<i>Cnidium officinale</i> MAKINO	2g
生薑(Zingiberis Rhizoma Recens)	<i>Zingiber officinale</i> ROSCOE	6g

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, 100µg/ml streptomycin을 첨가한 배지를 0.22µm membrane filter로 여과한 다음 사용하였으며, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 매주 2-3 회씩 배지를 교환해 주었으며, 계대 배양시는 배지를 제거한 후 trypsin-EDTA(×10)를 가하고, 37°C에서 10분간 방치하여 부착된 세포를 분리하였다. 실험시 사용할 세포는 5×10<sup>6</sup>cells/ml를 24well에 seeding하였고, 세포가 바닥에 잘 부착하도록 배양했다.

(2) 대식세포의 LDL 단백질산화에 미치는 영향 측정

대식세포에서 oxLDL 생성시 나타나는 단백질분해의 정도를 측정하였다. 위에 기술한 방법과 동일한 방법으로 24well에 배양한 세포를 PBS로 2회 세척한 후, 1µg/ml, 10µg/ml 농도의 KS를 배지에 가한 후, 37°C, CO<sub>2</sub> incubator에서 8시간동안 배양하였다. 여기에 200µg/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 지질분해의 정도를 측정하였다. (2)에서 기술한 바와 같이 배양한 각 실험군을 plate로부터 취하여 초음파로 세포를 분쇄한 후, 분쇄액 200µl에 동량의 20% TCA(in 0.6M HCl) 용액과 0.1M TBA(in 0.26M Tris buffer) 용액 400µl를 넣어 95°C에서 20분간 반응시켰다. 반응 종결후 2000g에서 5분간 원심분리하고 상층액을 취해 550nm에서 흡광도를 측정하였다.

(4) 대식세포의 Nitric Oxide 생성능에 미치는 영향 측정

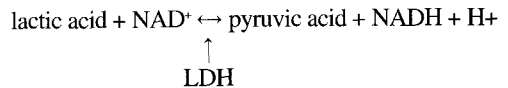
위에 기술한 것과 동일한 방법으로 LDL은 투여한 후 90시간 배양하고 실험군에서 배지 상층액을 취하였다. NaNO<sub>2</sub> 용액의 연속적인 희석액을 만들어 최종 농도가 0.05µM이 되도록 조절하였다. 먼저 얻은 세포 배양액과 NaNO<sub>2</sub> 희석액에 동량의 Greiss reagent solution을 넣고, 15분간 상온에 방치한 다음 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

(5) 대식세포 생존능에 미치는 영향 측정

RAW 264.7 세포를 24 well에 분주하고 5시간 동안 배양하여 부착시킨 후, 1µg/ml, 10µg/ml 농도의 KS를 첨가하였다. 7시간 배양한 다음 5µM CuSO<sub>4</sub>에 20시간 노출시켰다. PBS로 희석한 MTT용액 50µl를 첨가하고 다시 4시간 배양하였다. 상층액을 제거하고 50µl DMSO를 첨가한 다음 650nm에서 흡광도를 측정하였다.

(6) LDH 유리에 미치는 영향 측정

LDL을 첨가한 대식세포를 5µM CuSO<sub>4</sub>에 20시간 노출시킨 다음, 먼저 상층액을 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 500µl 넣고 초음파를 사용하여 세포막을 용해시킨 다음, LDH kit를 사용하여 측정하였다. LDH kit의 반응 원리는 다음과 같다.



대식세포로부터 유리된 LDH의 백분율은 다음의 공식을 사용하여 결정하였다.

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

(7) 대식세포 활성화에 미치는 영향 측정

대식세포의 활성화여부를 알아보기 위하여 Suzuki 등<sup>12)</sup>의 방법에 따라 활성화된 대식세포로부터 분비되는 acid phosphatase의 활성을 측정하였다. 시약 및 재료는 PBS 용액 (pH 7.2), 0.02M p-nitrophenyl

phosphate/ 0.1 M citrate buffer(pH 5.0)는 0.1M citrate acid와 0.1M sodium citrate를 약 1:1.5(v/v)로 혼합하여 pH 5.0으로 조정 한 후 p-nitrophenyl phosphate (Sigma Chemical Co., U.S.A)를 0.02M 되도록 가하였으며, 0.2M borate buffer (pH 9.8)는 0.2 M sodium borate에 0.2M NaOH를 가해 pH 9.8로 조정하였다. (6)번과 동일한 방법으로 5 $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>에 20시간 노출 시킨 다음, 상등액을 취하여 실시하였다. 0.1% Triton X-100을 100 $\mu$ l를 가한 다음 0.02M p-nitrophenyl phosphatase/ 0.1M citrate buffer (pH 5.0)를 0.5 ml 가해 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 1시간 반응시킨 후 1500rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 상등액에 cold 0.2M borate buffer (pH 9.8) 1ml씩을 가하여 반응을 종결시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며 대 식 세포의 활성은 다음 식에 따라 계산하였다.

Acid phosphatase activity (p-nitrophenyl phosphatase  $\mu$  mol/10<sup>6</sup> macrophage/60 mins) = 1.15  $\times$  O.D. at 405 nm

### 3. 통계처리

모든 수치는 mean  $\pm$  S.D로 나타내었으며, 유의성 검정은 각 군에 대하여 student's t-test로 하였다.

## III. 實驗結果

### 1. 대식세포 LDL 단백질화에 미치는 영향

대식세포에서 oxLDL 생성시 나타나는 단백질분해 의 정도를 측정하기 위하여, 1 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml 농도의 KS 시료를 미리 투여한 다음, 90시간 동안 LDL과 함께 배양하여 활성화된 대식세포에 의해 nLDL로부터 oxLDL로 형성되는 과정에서 나오는 단백질 분해 정 도를 측정하였으며, 결과는 482 nm에서 측정된 실험 치를 기준으로 남아있는 단백질량으로 표시하였다. RAW264.7에 KS 시약을 가하지 않고 LDL만 첨가하 여 배양한 대조군에서는 oxLDL 형성이 유발되었다. 실험약물을 첨가한 실험군의 경우, 10 $\mu$ g/ml 농도에서 oxLDL 형성을 억제하였다.(Fig. 1)

### 2. 대식세포 LDL 지질산화에 미치는 영향

대식세포에서 oxLDL 생성시 나타나는 LDL의 지 질과산화 정도를 알기위하여, 1 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml 농도의 KS 시료를 미리 투여한 다음, 90시간 동안 LDL과 함 께 배양하여 활성화된 대식세포에 의해 nLDL로부터 oxLDL로 형성되는 과정에서 나타나는 LDL의 지질 과산화 정도를 알기위하여 MDA를 측정하였다 RAW264.7에 KS 시약을 가하지 않고 LDL만 첨가하 여 배양한 대조군에서는 oxLDL 형성이 유발되었다. 1 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml 농도의 KS 시료군은 대조군에 비해 MDA 수치를 감소시켜 oxLDL 형성을 억제하였 다.(Fig. 2)

### 3. 대식세포 Nitric Oxide 생성능에 미치는 영향

LDL과 함께 투여한 후, KS 시료가 대식세포의 nitric oxide 분비에 어떠한 영향을 미치는지 알아 본 결과, KS 1 $\mu$ g/ml를 미리 투여한 시료투여군의 경우, 대 조군에 비해 nitric oxide의 생성이 증가하였다.(Fig. 3)

### 4. 대식세포 생존능에 미치는 영향

RAW 264.7 세포에 1 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml 농도의 KS를 첨가한 후 CuSO<sub>4</sub>로 20시간 세포상해를 유발하였으 며, 세포생존율은 MTT assay로 평가하였다. 실험결 과, 1 $\mu$ g/ml, 10 $\mu$ g/ml 농도의 KS시료 투여군 모두 대식

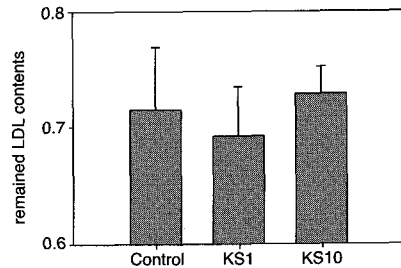


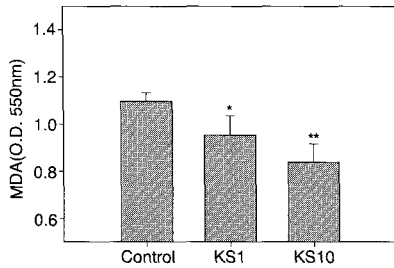
Fig. 1. Effect of KS on oxidized LDL formation in macrophage cells.

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

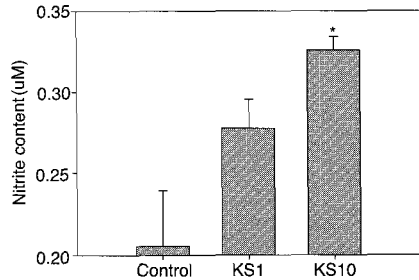
Control: Vehicle

KS1: 1 $\mu$ g/ml of KS treated group

KS10: 10 $\mu$ g/ml of KS treated group



**Fig. 2.** Effects of KS on oxLDL formation in macrophage cells.  
MDA was measured in RAW 264.7 cells incubated with native LDL for 90hrs.  
Control: Vehicle  
KS1: 1  $\mu\text{g/ml}$  of KS treated group  
KS10: 10  $\mu\text{g/ml}$  of KS treated group  
\* p< 0.05 vs Control  
\*\* p< 0.01 vs Control

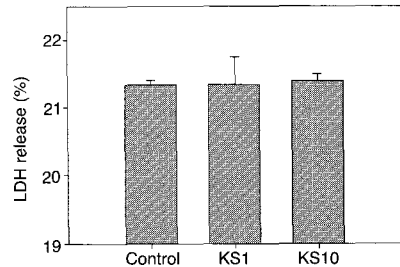


**Fig. 3.** Effects of KS on nitric oxide synthesis in macrophage cells.  
RAW 264.7 cells were incubated with native LDL for 90hrs.  
Control: Vehicle  
KS1: 1  $\mu\text{g/ml}$  of KS treated group  
KS10: 10  $\mu\text{g/ml}$  of KS treated group  
\* p< 0.01 vs Control

**Table 2.** The survival rate of RAW 264 cell from different groups incubated with CuSO<sub>4</sub> for 20hrs

Treatment	O.D value (650nm)	Survival rate (%)
control	1.00 ± 0.08	100.0
KS 1 $\mu\text{g/ml}$	1.62 ± 0.11	161.7 ± 9.02*
KS 10 $\mu\text{g/ml}$	1.32 ± 0.32	132.0 ± 16.5*

The value are expressed as mean ± S.D (n=8)  
Control: Vehicle  
KS1: 1  $\mu\text{g/ml}$  of KS treated group  
KS10: 10  $\mu\text{g/ml}$  of KS treated group  
\* p< 0.01 vs Control



**Fig. 4.** Effects of KS on CuSO<sub>4</sub>-induced LDH release from macrophage cells  
Murine macrophage-like RAW 264.7 cells were incubated with 1  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$  of KS in the presence of 5  $\mu\text{M}$  CuSO<sub>4</sub>.  
Control: 5  $\mu\text{M}$  CuSO<sub>4</sub> + Vehicle  
KS1: 5  $\mu\text{M}$  CuSO<sub>4</sub> + 1  $\mu\text{g/ml}$  of KS  
KS10: 5  $\mu\text{M}$  CuSO<sub>4</sub> + 10  $\mu\text{g/ml}$  of KS  
\* p< 0.01 vs Control

세포 생존율을 증가시켜 세포손상을 억제함을 보였다.(Table 2)

5. oxLDL로 처리한 대식세포에서 LDH유리에 미치는 영향

LDL을 첨가한 대식세포를 CuSO<sub>4</sub>에 20시간 노출시켜 배양하고, 상등액을 취하여 손상된 세포로부터 배지로 누출된 LDH를 측정하였다. 실험결과, 1  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$  농도의 KS시료는 모두 손상된 세포로부터 LDH 유출에 영향을 주지 못하였다.(Fig. 4)

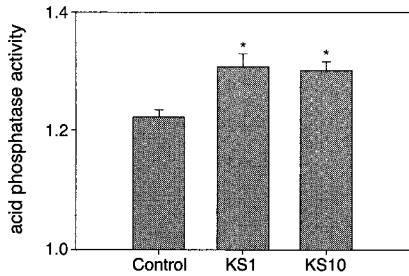
6. 대식세포 활성화에 미치는 영향 측정

대식세포의 활성화여부를 알아보기 위하여 Suzuki 등12의 방법에 따라 활성화된 대식세포로부터 분리되는 acid phosphatase의 활성을 측정하였다. CuSO<sub>4</sub>

를 가하여 RAW 264.7 cell에 손상을 가한 경우에 세포의 활성은 현저히 억제되었으나, 대조군과 비교하여 1  $\mu\text{g/ml}$  KS 시료는 acid phosphatase 활성을 현저히 증가시켰다. 이것은 KS 시료가 1  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 과산화 기질로 손상된 세포의 활성을 회복시킨다는 것을 의미한다.(Fig. 5)

IV. 考 察

죽상동맥경화는 혈관내막에 지질이 침착되어 콜레스테롤 결정이 함유된 지질의 핵과 이를 덮고 있는



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

Murine macrophage-like RAW 264.7 cells were incubated with 1  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$  of KS in the presence of 5  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ .  
 Control: 5  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  + Vehicle  
 KS1: 5  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  + 1  $\mu\text{g/ml}$  of KS  
 KS10: 5  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$  + 10  $\mu\text{g/ml}$  of KS  
 \*  $p < 0.01$  vs Control

섬유성 피막으로 구성된 죽종이나 섬유지방성 판으로 구성되어, 혈관벽에 결합조직이 증가되고 석회침착이 일어나 경화되는 질환으로, 허혈성 뇌질환과 관상동맥질환(coronary heart disease; CHD)을 비롯한 허혈성 심질환을 발생시키는 중요한 원인 중 하나이다. 죽상동맥경화의 위험인자로 고지혈증이 많은 작용을 하는 것으로 알려졌으며, 특히 고지혈증 중 LDL(low density lipoprotein)은 관상동맥질환 및 죽상동맥경화증의 발생과 연관성이 매우 깊다<sup>23</sup>.

따라서, 죽상동맥경화증을 예방하거나 치료하기 위해서 죽상동맥경화와 LDL에 관한 최근 많은 연구가 수행되었고, LDL의 산화, 혈관내피세포 및 대식세포의 기능이상 등이 결정적인 역할을 한다는 것이 규명되었다<sup>2,13</sup>.

OxLDL(oxidized LDL)은 생체 내에서 동맥벽의 세포 (내피세포, 평활근 세포, 단핵구, 대식세포), 혈구세포, 혈장성분(면역복합체) 및 동맥벽 기질 등과 지단백의 상호작용에 의해 일어나는데, 가장 생물학적으로 관련 있는 변형은 LDL의 산화로 주로 동맥 내막에서 일어난다<sup>4,14</sup>.

생체내에서 LDL이 산화할 때, 여러 가지 효소 및 비효소적 기전이 관여하는데, lipoxygenase<sup>15</sup>, ceuloplasmin<sup>16</sup>, myeloperoxidase<sup>17</sup>, superoxide anion<sup>18</sup>, 그

리고, peroxynitrite(ONOO)<sup>19</sup> 등이 여기에 반응한다.

이 외에도 oxLDL은 응고경로(coagulation pathways)를 반대로 변경시킬 수 있다<sup>4</sup>. 즉, 혈소판과 트롬빈(thrombin) 같은 혈전인자들도 동맥평활근(arterial smooth muscle)에 노출되었을 때 LDL로 산화된다. 혈전, 내막 손상 또는 동맥 경화성 플라크(arterosclerotic plaque) 형성과 혈소판은 LDL의 산화적 변형에 상호작용을 한다<sup>20</sup>.

OxLDL은 macrophage의 섭취를 증강시키고, macrophage는 cholesteryl ester의 축적을 야기한다. 또한, 순환 단핵구(monocytes)와 T 세포(T cell)의 화학적 주성이 있어서<sup>7</sup>, 경미한 oxLDL이 동맥의 국소내막 하 부위에 축적되면, 단핵구와 단핵구에서 분화된 대식세포가 똑같은 부위에 더 많이 축적된다. 이것이 순환에 나쁜 영향을 미쳐서, oxLDL과 macrophage를 더 많이 발생시키고, macrophage는 LDL 산화와 섭취가 더 증가하게 된다<sup>4</sup>.

OxLDL은 대식세포의 운동성을 저하시켜서, 동맥 내막에 고착하게 한다. 그리고, 세포독성이 있어서, 동맥벽에 oxLDL의 국소적 축적은 다양한 세포 과정을 붕괴시키는데 큰 역할을 한다<sup>21</sup>.

여러 동물모델 및 인간에서의 여러 연구 결과를 토대로 죽상동맥경화증이 생기는 병태생리를 살펴보면 다음과 같다.

먼저 혈장 LDL의 증가로 순환 단핵구가 동맥 내피세포의 부착이 증가되고, 동시에 동맥내막으로 LDL의 유입이 증가한다. 동맥내막에서의 증가된 LDL은 내피세포, 평활근 세포(SMC) 및 대식세포 등에 의해 축적되어 산화 변형을 일으키게 되는데, 산화 초기에 경미한 oxLDL은 소위 minimally modified LDL(MM-LDL)을 형성하고, 일단 형성된 MM-LDL은 내피세포에서의 단핵구를 접착하는 내피세포접착 분자로서 VCAM-1(vascular cell adhesion molecule-1)의 표현을 증가시키며<sup>22</sup>, MCP-1(monocyte chemoattractant protein-1), M-CSF(macrophage-colony stimulating factor), GM-CSF(granulocyte/macrophage-colony stimulating factor), 그리고 G-CSF(granulocyte-macrophage stimulating factor) 등을 분비시킨다<sup>23,24</sup>. 그

결과 내피세포에 단핵구의 접착이 일어나고 MCP-1의 매개로 내피하부로 단핵구의 이주가 일어나며, M-CSF에 의해 MM-LDL은 단핵구의 대식세포로의 분화를 촉진한다. 이어 성숙된 대식세포는 MM-LDL을 더욱더 산화된 형태로 변형시키며, 이렇게 해서 생성된 oxLDL은 청소수용체(scavenger receptor)에 의해 포식되어 cholesteryl ester의 축적을 일으키고, 포말세포(foam cell)를 형성한다<sup>4,7,14,23</sup>.

동맥 대식세포와 동맥 평활근에서 유발된 포말세포는 지방 선조(fatty streak lesion)를 형성한다. 포말세포는 IL-8<sup>25</sup>과 같은 growth factor와 cytokine 등의 작용에 의해서 평활근 세포를 증식시키고, 섬유성 플라크를 생성한다. 그리고, 대식세포의 청소수용체의 기능이 정상이면 자기살해세포(apoptotic cells)가 식균작용에 의해 제거되어, 섬유성 병소로 발전하고, 대식세포의 청소수용체의 기능이 손상을 받아 기능을 상실하면, 포말세포가 괴사되어도 주위의 대식세포가 제거하지 못해서 세포의 공간에 지질이 축적되고, 그 병소는 불안정하여 괴사성 병소가 된다<sup>7</sup>.

본 연구에서 대식세포를 배양하면서 LDL을 첨가하여 oxLDL양을 측정하기 위한 방법으로 산화하여 분해되고 남은 단백질량을 측정하였다. 실험결과, KS는 대식세포 oxLDL 생성과정에서 일어나는 단백질 산화를 현저히 억제하는 결과를 나타내었다(Fig. 1). 한편, 대식세포의 oxLDL 생성능 측정의 또다른 방법으로 LDL내의 인지질의 산화 및 분해를 측정하였으며, 지표로서 지질과산화 결과 생성되는 MDA를 측정하였다. 실험결과, KS는 LDL을 첨가한 대식세포로부터 생성되는 oxLDL의 지표인 지질과산화를 저하시켰다(Fig. 2). 따라서, KS는 대식세포의 oxLDL 생성능을 억제하여 혈관벽에 지질 침착 및 혈관 비후화, 면역 복합체 형성으로 나타나는 염증반응 결과 유발되는 혈관과열 등을 억제할 수 있을 것으로 사료되었다.

Nitric oxide(NO)는 L-arginin과 분자 산소로부터 constitutive NO synthase(cNOS) 또는 inducible NO synthase(iNOS)라는 효소에 의해 생성된다. 활동성 대식세포는 endotoxin, LPS, 특정 cytokine의 자극에

의해 유도된 NO를 유리시킨다<sup>26</sup>.

이 NO는 비교적 안정적인 자유기로 정상적인 pH에서는 LDL을 산화시킬 수 없다. 비정상적인 기능을 하는 eNOS(endothelial NO synthase), homocystein, 고인슐린혈증, 그리고, 고혈당은 superoxide와 hydrogen peroxide 형성을 증가시키게 유도하고, 이런 산화물은 NO와 결합하고, NO를 파괴하여, peroxy-nitrate anion, peroxy-nitrous acid, hydroxyl radical 등으로 이어지는 일련의 산화물을 생성한다. 이런 산화물 모두는 단백질 변형, 세포막 손상, 지질 산화, oxLDL 등을 발생시킨다<sup>27</sup>. 대식세포의 청소수용체에 의해 oxLDL이 인지되고 흡수되게 된다. 이러한 일련의 과정을 통해 흡수된 콜레스테롤은 대식세포에 의해 축적되며, prostaglandin 생성을 포함한 염증반응, 세포사멸과 함께 atherosclerosis의 진행을 촉진하는데 관여한다<sup>7</sup>. 이와는 달리 혈관내피세포에서 생성되는 NO는 vascular smooth muscle의 이완과 혈소판 응집능 억제, 혈관내피세포에서의 투과성 억제 및 면역세포 등의 혈관 점착능 억제기능을 나타낼 수 있다<sup>27,28</sup>.

또한, NOS 또는 NO activity의 감소는 죽상동맥경화의 초기단계와 악화단계에 큰 작용을 하며, 죽상동맥경화는 내피 의존성 관상동맥 혈관확장을 손상하여, 관상동맥의 혈관수축을 더 쉽게 한다. 고콜레스테롤혈증의 상태에서 NO의 생리적 역할이 감소된다. 비정상인 NO는 NO를 발생할 수 있는 물리적 자극 또는 작용인자와 상호영향을 주는 동맥벽의 막수용체를 손상시키고, L-arginine의 농도를 감소시키고, 이용하는 기전을 손상하고, inducible NO synthase(iNOS)와 endothelial NO synthase(eNOS) 모두의 농도와 활성을 감소시키고, 동맥경화된 손상된 내피로부터 NO의 방출을 손상시키고, 내피에서 vascular smooth muscle cells로의 NO 확산이 손상을 받아 혈관확장작용의 민감도가 감소하고, NO의 퇴화가 국소적인 부위에서 증강시키는데 작용을 한다<sup>29</sup>. 따라서, 혈관내피세포에서 유래한 NO는 atherosclerosis의 진행을 억제하는 것으로 알려져 있다. Nitrite 및 nitrate는 NO의 대사산물로 내피세포 또는 대식세포로부터 생성되는 NO의 생성 parameter로서 측정된

다. 실험결과, KS는 LDL을 처리한 대식세포에서 nitrite의 농도를 현저히 증가시키는 것으로 나타났다 (Fig. 3). 이는 KS가 LDL을 섭취한 대식세포에 의해 생성되는 oxLDL에 의해 반응이 자극되는 NOS의 활성을 증가시킨 결과로 보인다. 이러한 결과는 KS내에 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 측정한 결과, KS는 CuSO<sub>4</sub>로 유도한 oxLDL에 의한 대식세포의 LDH 유리에 영향을 주지 못하였다(Fig. 4). 이상의 결과들은 KS 자체가 대식세포의 기능을 억제하여 oxLDL의 생성을 저해하는 것이 아님을 시사해 준다. 또한, 대식세포의 생존과 활성을 억제하여 oxLDL을 저해하는지 알아보기 위해, 대식세포의 기능활성화에 미치는 영향과 CuSO<sub>4</sub>에 의한 대식세포의 생존율을 측정하였다. 실험결과, KS는 대식세포 생존율을 증가시켜 대식세포 손상을 억제함을 보였고, 대식세포의 기능 측정지표인 acid phosphatase의 활성도 증가시켰다(Fig. 5). 따라서, KS의 oxLDL 생성 억제작용은 대식세포의 세포기능억제를 통한 작용은 아닌 것으로 판단되었다.

羌活續斷湯(KS)은宋代 陳自明이 쓴 世醫得效方に 나오는 처방으로, 肝腎虛弱하여 筋骨이 攣痛하는證을 補肝腎, 強筋骨의 治法으로 치료하는데 사용된다. 獨活寄生湯의 變用方이며, 桑寄生의 眞品을 구하기 어려우므로, 他寄生으로 代用하는데 그 害가 不少하므로, 桑寄生을 빼고, 續斷으로 대용하고, 獨活을 羌活로 대용하여 만든 처방이다<sup>30,31</sup>.

현재 羌活續斷湯(KS)의 동맥경화증, 고지혈증 및 항산화 작용 등에 관한 연구는 나와있지 않다. 그러나, 補肝腎, 強筋骨의 효능이 있는 杜仲에 관해서 김 등<sup>8</sup>은 고지질혈증을 억제하고, 혈압 또한 강하하는 효과가 있다고 보고하였고, Hsieh 등<sup>9</sup>은 유생분자(biomolecules)에서 산화적 손상을 막는 항산화 효과

가 있다고 보고하였다. 또한, 羌活續斷湯의 原方인 獨活寄生湯에서도 김<sup>10</sup>은 白鼠의 血液에 미치는 영향에 관한 연구 중 혈중 콜레스테롤의 유의한 감소를 보고하여 항콜레스테롤 작용의 가능성을 시사하였다. 이<sup>11</sup>는 補肝腎, 強筋骨, 益精髓, 和氣血하는 효능을 가진 赤何首烏가 관상동맥의 죽상동맥경화를 경감시키는 효과가 있다고 보고하였다.

이상과 같이 補肝腎, 強筋骨의 효능을 중심으로 하고 있는 杜仲, 獨活寄生湯, 赤何首烏가 고지혈증에 효과가 있는 것으로 보면, 補肝腎, 強筋骨의 효능이 있는 羌活續斷湯도 역시 효과가 있을 것으로 생각될 수 있고, 본 저자의 연구에서도 유의한 효과가 있음을 입증하였다. 이것은 肝藏血과 肝主疏泄의 작용에 의해 血液을 저장하고 조절하는 기능을 하고, 腎藏精과 腎主骨髓의 작용에 의해 血液의 근원을 제공하여, 肝腎同源의 의미로 血을 통합조절하는 것으로 사료되므로, 補肝腎의 효능이 있는 다른 약제나 처방에 관해서도 지속적인 연구를 진행해야 하겠다.

본 실험은 in vitro의 실험이므로, 아직 in vivo에서의 작용을 확인되지 않았다. 그러므로, in vivo에서의 연구가 계속되어야 하겠다.

이상의 연구 결과, 羌活續斷湯(KS)은 대식세포의 oxLDL 형성을 통한 동맥경화증 발현의 예방 및 치료에 이용될 가능성이 있다고 사료되었다.

## V. 結 論

본 연구에서는 한약재로부터 항죽상동맥경화 효과를 가지는 한방처방을 확인하는 연구의 일환으로 羌活續斷湯(KS)을 이용하여 대식세포 관련인자들에 대한 영향을 평가하였다. 이를 위하여 대식세포에서 oxLDL 생성에 미치는 영향, nitric oxide 생성에 미치는 영향, 대식세포의 활성화에 미치는 영향 등을 평가하여 죽상동맥경화증에 대한 응용가능성을 검토하였고, 실험결과를 다음과 같았다.

1. 羌活續斷湯은 대식세포의 oxLDL 생성과정에서 일어나는 단백질 산화를 현저히 억제하는 결과를 나타내었다.



2. 羌活續斷湯은 대식세포의 oxLDL 생성과정에서 생성되는 인지질의 산화 및 분해를 측정하는 지표인 지질과산화를 현저히 억제하였다.
  3. 羌活續斷湯은 LDL을 처리한 대식세포에서 nitrite의 농도를 현저히 증가시키는 것으로 나타났다
  4. 羌活續斷湯은 대식세포 생존율을 증가시켜 세포 손상을 억제함을 보였다.
  5. 羌活續斷湯은 손상된 세포로부터 LDH 유출에 영향을 주지 못하였다.
  6. 1 $\mu$ g/ml 羌活續斷湯 시료는 acid phosphatase 활성을 현저히 증가시켰다.
- 이상의 연구결과, 羌活續斷湯(KS)은 대식세포의 oxLDL 형성을 통한 죽상동맥경화증 발현의 예방 및 치료에 이용될 가능성이 있다고 사료되었다.

### 參考文獻

1. 통계청 사망원인통계 2001
2. Daniel Steinberg, Joseph L. Witztum. Lipoprotein and atherogenesis. current concepts. *JAMA* 1990 ; 264(23) : 3047-52
3. 대한병리학회 대구, 경북지부학회. 간추린 병리학 서술 : 정문각 ; 1998, p.209
4. Joseph L. Witztum, Daniel Steinberg. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J Clin Invest.* 1991 ; 88 : 1785-92
5. Daniel Steinberg. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Bio Chem.* 1997 ; 272(34) : 20963-6
6. Carl F. Nathan. Secretory products of macrophage. *J Clin Invest.* 1987 ; 79 : 319-326
7. Daniel Steinberg. Lewis A. Conner memorial lecture. oxidative modification of LDL and atherogenesis. *Circulation* 1997 ; 95 : 1062-71
8. 김승진, 구국희, 김종만. 두충이 동맥경화증에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. 한양의대학술지 1988 ; 8(2) : 639-58
9. Chiu-Luan Hsieh, Gow-Chin Yen. Antioxidant actions of Du-Zhong(*Eucommia ulmoides* OLIV.) toward oxidative damage in biomolecules. *Life science* 2000 ; 66(15) : 1387-400
10. 김희철. 獨活寄生湯이 白鼠의 血液에 미치는 影響. 大韓韓方內科學會誌 1995 ; 16(2) : 51-60
11. 이원철. 赤何首烏가 高Cholesterol食餌에 의하여 誘發된 家兔 冠狀動脈의 粥狀硬化에 미치는 影響. 大韓韓醫學會誌 1995 ; 16(1) : 425-36
12. Suzuki I., Hashimoto K., Oikawa S., Sato K., Osawa M. and Yadomae T. Antitumor and immunodulating activities of a  $\beta$ -Glucan obtained from liquid-cultured *Grifola frondosa*. *Chem Pharm Bull.* 1989 ; 37(2) : 410-13
13. Daniel Steinberg, Antonio M. Gotto Jr. Preventing coronary artery disease by lowering cholesterol levels. *JAMA* 1999 ; 282(21) : 2043-3052
14. 배학연. 죽상동맥경화증에서 산화 저밀도지단백의 역할. 당뇨병 1999 ; 23(1) : 7-11
15. Parthasarathy S, Wieland E, Steinberg D. A role for endothelial cell lipoxigenase in the oxidative modification of LDL. *Proc Natl Acad Sci(USA).* 1989 ; 86 : 1046-50
16. Eduardo Ehrenwald, Guy M. Chisolm, Paul L.Fox. Intact human ceruloplasmin Oxidatively modifies low density lipoprotein. *J Clin Invest.* 1994 ; 93 : 1493-1501
17. Alan Daugherty, Julie L. Dunn, Bebra L. Rateri, Jay W. Heinecke. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein Oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. *J Clin Invest.* 1994 ; 94 : 437-44
18. Jay W. Heinecke, Linda Baker, Henry Rosen, Alan Chait. Superoxide-mediated modification of low density lipoprotein by arterial smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1986 ; 77 : 757-61
19. Andrew J. Maxwell. Mechanisms of dysfunction of the nitric oxide pathway in vascular diseases. *Biology and Chemistry* 2002 ; 6(2) : 101-24
20. J. Jeffrey Alexander, Isabel Lewix. The Influence of Platelet-Smooth Muscle Cell interaction on the Oxidative Modification of Low-Density Lipoprotein. *Journal of Surgical Research* 2002 ; 103 : 41-6
21. Morel, D.W., P.E. DiCorleto, G.M. Chisolm. Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Arteriosclerosis* 1984 ; 4 : 357-64
22. Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr. Endothelial

- expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science* 1991 ; 251 : 788-91
23. Ben D.M. Chen, Carl R. Clark, Ta-hsu Chou. Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor stimulates monocyte and tissue macrophage proliferation and enhances their responsiveness to macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1988 ; 71(4) : 997-1002
24. T.B. Rajavashisth, A. Andalibi, M.C. Territo, J.A. Berliner, M. Navab, A.M. Fogelman et al. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low density lipoprotein. *Nature* 1990 ; 344 : 254-7
25. Nan Wang, Ira Tabas, Robert Winchester, Stefano Ravalli, LeRoy E. Rabbani, Alan Tall. Interleukin-8 is induced by cholesterol loading of macrophage and expressed by macrophage foam cells in Human atheroma. *J Biol Chem.* 1996 ; 271(15) : 8837-42
26. Ryoza Matsuno, Yukihiko Aramaki, Hidetoshi Arima, Seishi Tsuchiya. Scavenger receptors may regulate nitric oxide production from macrophages stimulated by LPS. *Biochemical and biophysical research communications* 1997 ; 237 : 601-5
27. Alheid U., Frolich J.C., Forstermann U. Endothelium derived relaxing factor from cultured human endothelial cell inhibits aggregation of human platelets. *Throm Res.* 1994 ; 47 : 561-71
28. Denham S. and Rowland I.J. Inhibition of the reactive proliferation of lymphocytes by activated macrophage: the role of nitric oxide. *Clin Exp Immunol.* 1992 ; 87 : 157-62
29. Claudio Napoli, Louis J. Ignarro. Minireview: nitric oxide and atherosclerosis. *Biology and chemistry* 2001 ; 5(2) : 88-97
30. 金定濟. 診療要鑑(下). 서울 : 동양의학연구원 ; p.305
31. 東醫科學院. 東醫處方大全(2). 서울 : 麗江出版社 ; 1993, p.767-8
32. 김경식. 진단학. 서울:민중서관;1962,p.58,631.