

## 蘇合香元이 혈액내 Free Cholesterol에 의한 혈관내피세포 손상에 미치는 영향

이상현, 이소연, 윤현덕, 신오철, 박창국, 박치상  
대구한의대학교 한의학과 내과학교실

### The Effect of Sohaphyangwon water extract on Endothelial cells by Free cholesterol in blood

Sang-heon Lee, So-Yeon Lee, Hyeon-Deok Yoon, Oh-Chul Shin, Chang-Gook Park, Chi-Sang Park  
Department of Oriental Medicine Graduate school of Daegu Haany University Gyeongbuk, Korea

FC(free cholesterol) plays an important role in normal and pathophysiological cells including that of messenger molecule or dilator of blood vessels in such illnesses as arteriosclerosis, hypertension and myocardial infarction.

Smooth muscle and endothelial cell functions in the arteria wall are unified by complex intercellular signalling processes. In arteria comprised of one layer of smooth muscle cells surrounding the endothelium, the close apposition of the two cell types enables a signal derived from one cell to rapidly diffuse to neighboring cells. Experimentation was conducted to investigate the potential contribution of Sohaphyangwon(SHHW) on levels of FC generated by foamed microphages, and mechanisms of protection against ACAT inhibitor. It was found that J774 macrophages, which normally do not express FC, were expressed by oxLDL and ACAT inhibitor. SHHW protected cells were found to be resistant to oxLDL and delayed death following the FC. Inhibition of FC formation abolished the protective effect against ACAT inhibitor exposure.

Cardiovascular diseases include abnormalities of blood vessels dysfunction of the renin-angiotension system. What relation herbal medicine may have with vessel endothelium necrosis was here studied. In Oriental Medicine, SHHW water extract used for diseases in relation to cardiovascular systems. The resistance to cardiovascular disease of ACAT inhibitor induced J774 macrophage cells were studied through analysis of cell morphological patterns and immunochemistry of SHHW.

The results of this study suggest that SHHW has protective effects on the cardiovascular system, and that it is effective in both prevention and treatment of diseases of the cardiovascular system, particularly against necrosis of blood.

**Key Words:** Free cholesterol, Arteriosclerosis, ACAT, SHHW

### 1. 緒 論

동맥경화증은 동맥 내벽에 지질과 혈소판이 침착되어 국소적 비후, 섬유화, 과사가 일어나는 병리적 과정을 통하여 죽종이 형성되고 혈관내 혈류의 흐름을 방해하게 되며 이로 인해 혈관내 혈전을 발생

하게 하는 것으로 허혈성 심장질환 및 뇌질환 등의 중요한 원인이 되고 있다<sup>1</sup>. 동맥경화증의 발생은 고혈압, 고혈당, 저산소증, 산소라디칼, 콜레스테롤 등의 유발인자에 의해 혈관내피세포가 손상을 받아 기능이 변화되면서 시작된다<sup>2</sup>.

현재까지 동맥경화증을 비롯한 심혈관계 질환에 관한 실험적 연구동향으로는 人蔘의 혈압강하 효과 및 심박수 증가<sup>3</sup>, 혈관내피세포의 자극을 통한 NO 합성효소의 활성화<sup>4</sup>, 高麗人蔘 추출물의 혈관평활근 이완<sup>5</sup>,

· 접수: 2005. 6. 24. · 채택: 2005. 7. 20.  
· 교신저자: 박치상, 대구광역시 수성구 상동  
대구한의대학교 심계내과학교실  
(Tel. 053-770-2179, E-mail : stephano@dhu.ac.kr)

심근세포에서 失笑散의 LDH 활성도 방어<sup>6</sup>, 生脈散의 대동맥 평활근에서의 NO 생성<sup>7</sup> 등이 보고 되었다.

蘇合香元은 『太平惠民和劑局方』<sup>8</sup>에 처음으로 명명된 처방으로, 開竅, 溫裏祛寒, 理氣止痛하는 효능이 있어 傳屍骨蒸, 疰忤鬼氣, 卒心痛, 霍亂吐利, 時氣鬼魅瘴癘, 瘀血月閉, 驚癇鬼忤, 中人小兒吐利, 大人孤狸 등의 치료에 사용되는데, 一切의 氣痰과 中氣, 上氣, 氣逆, 氣鬱, 氣痛 등의 증상을 다스린다<sup>9</sup>.

근래 蘇合香元에 대한 실험적 연구로는 安 등<sup>10</sup>의 鎮痛·抗痙攣·抗瀉下 효과, 李 등<sup>11</sup>의 심근 허혈 상태 회복 효과, 南 등<sup>12</sup>의 저산소성 뇌장해에 대한 보호효과 및 崔 등<sup>13</sup>의 rat에 유발된 뇌경색 면적 감소 효과 등의 보고는 있었으나, 심혈관계 질환에 밀접한 관계가 있는 Free Cholesterol(이하 FC) 생성 및 macrophage의 혈관내피세포의 괴사유도에 관한 연구는 아직 보고된 바가 없었다.

이에 저자는 疏散寒邪, 行氣化痰, 開竅醒神<sup>14</sup>의 효능이 있는 蘇合香元이 심혈관 질환에도 효과가 있을 것으로 생각되어 이를 규명하기 위해 ACAT 저해제와 acetyl-LDL을 통해 FC를 유도하여 혈청학적 인자 및 혈관내피세포를 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 實 驗

### 1. 材料

#### 1) 動物

본 실험에서 사용한 동물모델은 (주)중앙실험동물에서 분양 받은 체중 200~250g의 Sprague-Dawley계 흰쥐 암컷을 대상으로 하였고, 항온 항습(20±1℃, 55±3%)의 조건하에서 사육하였으며, 물과 사료는 제한하지 않았다.

#### 2) 試料의 調製

본 실험에 사용한 蘇合香元(Sohaphyangwon)은 대구한의대학교 부속 대구한방병원 약제과에서 구입하여 1Kg을 細末한 다음 적당량의 3차 증류수를 첨가하여 85℃에서 6시간 熱湯을 가한 후 식혀 蘇合香元 수 추출물을 조제하였다. 그리고 이를 gauze로 1차 여과 후 -70℃(Deep Freezer)에서 12시간 동결시키고, 다시 Freeze Dryer로 동결 건조하여 240g을 얻어 사용 전 -80℃에 보관하다가 3차 증류수로 적당한 농도로 희석한 후 실험에 사용하였다. 방향성 약재는 熱湯하면 안되지만, 실험적으로 불가능하여 경구투여를 하기 위해 처리하였다. 처방은 『東醫寶鑑·氣門』<sup>9</sup>을 기준으로 하였으며 1첩의 내용과 용량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Prescription of Sohaphyangwon

Herbs	Pharmacological Name	Dose(g)
白 朮	Atractylodis Macrocephalae Rhizoma	7.5
木 香	Aucklandiae Radix	7.5
沈 香	Aquilariae Resinatum Lignum	7.5
麝 香	Moschus	7.5
丁 香	Caryophylli Flos	7.5
安息香	Benzoinum	7.5
白檀香	Santali Albae Lignum	7.5
朱 砂	Cinnabaris	7.5
犀 角	Rhinoceri Cornu	7.5
訶子皮	Terminaliae Fructus	7.5
香附子	Cyper Rhizoma	7.5
畢 撥	Piperis Longi Fructus	7.5
蘇合油	Styrax	3.75
乳 香	Olibanum	3.75
龍 腦	Borneolum Syntheticum	3.75
蜂 蜜	Mel	15.0
Total amount		116.25

3) 試藥 및 機器

실험에 필요한 Duplecco's modified Eagle's medium(DMEM), 항생제, trypsin 및 fetal bovine serum(FBS)은 Gibco Brl. Co.에서 구입하였으며, ACAT inhibitor 58035, acLDL, FC, phospholipid, sodium citrate, glucose는 Sigma Co.에서, 배양용기인 96 well plate, 10cm dish는 Falcon Co.에서 구입하여 사용하였다. J774 macrophages는 ATCC Co.에서, DMEM penicillin, streptomycin, HEPES buffer는 Gibco Co.에서, dish cover glass, 6-well plate는 Nunc Co.에서 rhodamine 123는 Molecular Probe Co.에서 구입하였다.

2. 方法

1) 혈액의 응집분석

흰쥐 6마리를 ketamin으로 마취하고 심장에서 0.38% S. citrate가 들어 있는 플라스틱 튜브에 혈액 100 $\mu$ l만을 채취한 군을 정상군(NOR), 정상군에 ACAT inhibitor 58035(5 $\mu$ g/ml)와 acLDL, FC/phospholipid를 첨가한 대조군(CON) 그리고 대조군에 蘇合香元 20 $\mu$ g/ml을 첨가한 실험군(SHHW)으로 하여 구분하였다. 그리고 거품세포인 macrophage에서 배출하는 FC에 의해 적혈구 주변의 응집 억제유무를 파악하기 위해 현미경하( $\times 50$ )에서 관찰하였다.

2) 적혈구 막구조 변형분석

심장에서 0.38% S. citrate가 들어 있는 플라스틱 튜브에 혈액 100  $\mu$ l만을 채취한 군을 정상군, 정상군에 FC가 Cholesteryl Ester(CE)로 전환되는 것을 차단하기 위해 ACAT inhibitor 58035(5 $\mu$ g/ml)와 acLDL, FC/phospholipid를 첨가한 대조군 그리고 대조군에 蘇合香元 20 $\mu$ g/ml을 첨가한 실험군으로 나누어 거품세포인 macrophage에서 배출하는 FC에 의해 과산화지질을 유도하여 적혈구 막구조 변형 여부를 파악하기 위해 현미경하( $\times 400$ )에서 관찰하였다.

3) 혈액내 FC 결정화 유도 및 형태 분석

항응고를 위해 0.38% sodium citrate와 1% glucose를 가한 후  $\times 1,500$  rpm에서 원심분리하여 macro-

phage만을 분리하여 얻은 후 10mM HEPES buffer (pH7.4: 140 mM NaCl, 5mM NaHCO<sub>3</sub>, 0,5mM MgCl<sub>2</sub>, 3mM KCl, 140 mM glucose)가 들어 있는 tube에 넣고 FC가 CE로 전환되는 것을 차단하기 위해 ACAT inhibitor 58035(5 $\mu$ g/ml)와 acLDL, FC/phospholipid를 첨가하여 대조군으로 하였으며, 여기에 蘇合香元 20 $\mu$ g/ml을 첨가한 실험군으로 구분하였다. 그런 다음 10~110시간까지 시간대별로 FC 구조를 분석하기 위해 유리 슬라이드에 도말표본을 만들어 완전히 건조시킨 다음 wright염색을 한 후 물로 씻어주고 오븐에서 충분히 말린 다음  $\times 200$  배율에서 관찰하여 FC의 형태적인 구조를 판정하였다.

4) J774 macrophages 세포주의 FC 결정화

세포주인 J774 macrophages를 통해 계대배양시켜 5% FBS가 함유한 DMEM 배지에 penicillin/streptomycin을 첨가하여 cell culture용 dish에 배양하면서 103 세포를 cover glass가 들어 있는 6-well plate에 분주하였다. 37 $^{\circ}$ C에서 하루동안 50%정도 조밀하게 배양한 다음 serum free medium으로 2번 세척한 후 1ml SFM을 첨가하고 100 $\mu$ g/ml acetyl-LDL, ACAT inhibitor 58035(5 $\mu$ g/ml)으로 반응시켜 대조군(ACAT)으로 하였으며, 여기에 蘇合香元 20  $\mu$ g/ml을 첨가한 실험군(ACAT+SHHW)으로 구분한 후 FC의 결정화를 현미경하( $\times 200$ )에서 관찰하였다.

5) 세포내 ROS 생성 분석

FC의 결정화를 유도한 대조군(FC)과 실험군(FC+SHHW)을 9시간 후 4% para-formaldehyde로 고정된 후 PBS로 세척하였고, ACAT inhibitor 58035 (5 $\mu$ g/ml)에 의해 세포내 ROS의 생성정도를 분석하기 위해 rhodamine 123으로 1시간 염색한 후 냉장고에 보관하였고, ROS의 정량을 위해 Confocal 현미경하에서 관찰하였다.

6) 통계처리

모든 실험은 3회 이상 수행하였으며, 실험결과는 대조군에 대한 백분율 및 mean $\pm$ S.D로 표시하였으며, 통계학적 유의성은 Student's t-test에 의한 p<0.05의 유의성으로 나타내었다.

### III. 成績

#### 1. 혈액의 응집에 미치는 영향

혈액에 ACAT inhibitor 58035(5 $\mu$ g/ml)와 acLDL, FC/phospholipid를 첨가하여 FC로 존재하게 하는 상태로 유도하여 관찰한 결과, 대조군에서는 정상군보다 다르게 응집입자가 뭉쳐있는 양상과 혈액세포들의 표면구조가 수축된 상태로 나타났고, 이에 비해 실험군에서는 적혈구 주변의 응집이 억제되는 양상이 관찰되었다(Fig. 1).

#### 2. 적혈구 세포막 구조에 미치는 영향

FC에 의해 적혈구 막구조의 변형을 확인하기 위해  $\times 400$  배율의 현미경으로 관찰한 결과, 정상군은 적혈구 세포막 구조가 균일하게 존재하였고, 대조군에서는 세포막의 plaque rupture가 일어나 구멍이 난 상태였으나, 실험군에서는 대조군에 비해 구멍의 공극이 크게 감소하였다(Fig. 2).

#### 3. FC 구조에 미치는 영향

FC의 형태적인 구조를 관찰한 결과, 보통 plate, rod, helix 구조로 나타났다. 특히 과산화지질화를 많이 유도하는 형태는 주로 plate구조에 의해 일어

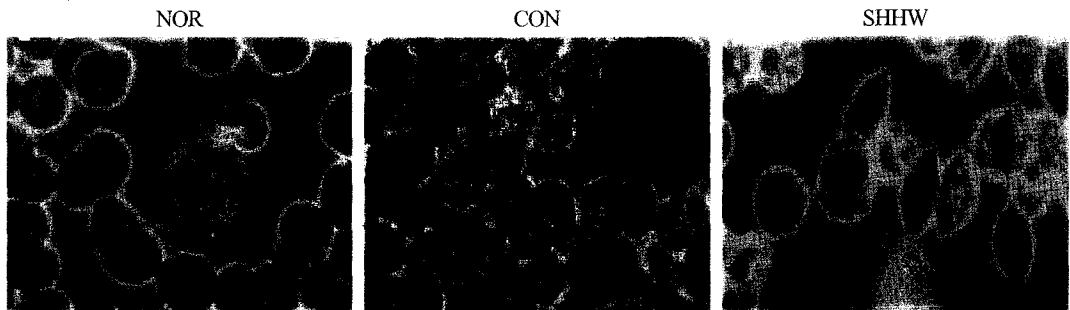


Fig. 1. Light photomicrograph showing the various shapes or aggregation of RBC appearing in model FC loaded foam cells.

Normal(left), aggregation(middle), and SHHW(right). RBCs were loaded with cholesterol by using acLDL and FC/phospholipid dispersions as described in Methods and then treated for 90 hours with the ACAT inhibitor 58035(5 $\mu$ g/ml).  $\times 50$

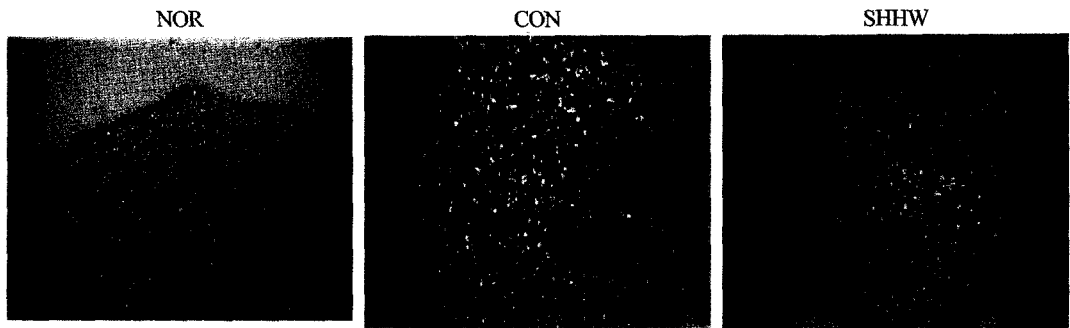


Fig. 2. Light photomicrograph showing in the membrane surface of RBC appearing in model FC loaded foam cells.

Normal(left), plaque rupture(middle), and SHHW(right). RBCs were loaded with cholesterol by using acLDL and FC/phospholipid dispersions as described in Methods and then treated for 90 hours with the ACAT inhibitor 58035(5 $\mu$ g/ml).

났다(Fig. 3.)

4. M $\phi$ 세포내의 Plate구조 결정화에 미치는 영향

Plate구조를 가진 대조군과 실험군에서 10시간부터 110시간까지 시간대별로 관찰한 결과, 대조군은 25 $\pm$ 1, 44 $\pm$ 1, 66 $\pm$ 2, 79 $\pm$ 2, 81 $\pm$ 1, 80 $\pm$ 1개로 plate의 수가 상대적으로 증가한 반면, 실험군에서는 12 $\pm$ 1,

11 $\pm$ 1, 12 $\pm$ 1, 14 $\pm$ 1, 11 $\pm$ 1, 12 $\pm$ 1로 나타나 대조군에 비하여 약 2배에서 8배정도 감소되어, 실험군에서 유의성(p<0.05) 있게 억제되는 경향을 보였다(Fig. 4).

5. M $\phi$ 세포내의 ROS생성에 미치는 영향

蘇合香元의 처리에 의해 ROS의 생성이 억제되는 지 관찰한 결과, 정상군, 대조군, 정상군에 蘇合香元

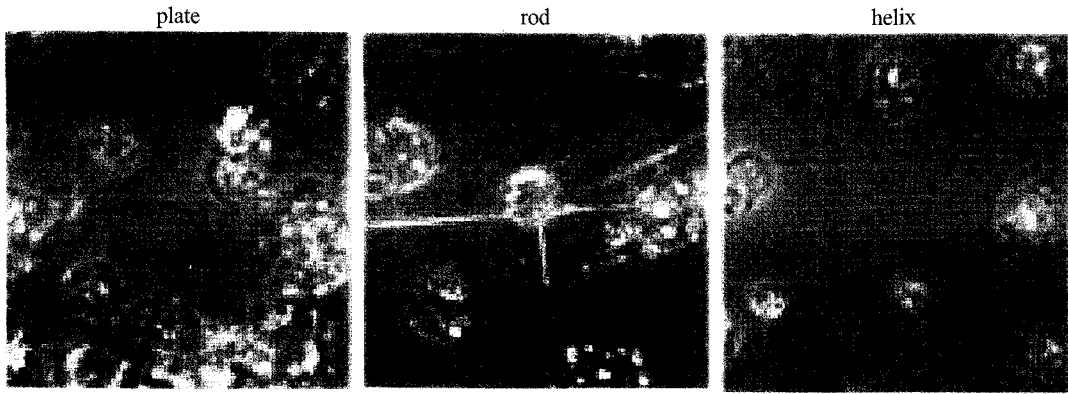


Fig. 3. Light photomicrograph showing the various shapes of FC crystals appearing in model Macrophage foam cell incubations.

plate(left), rod(middle), and helix(right). Macrophages were loaded with cholesterol by using acLDL and FC/phospholipid dispersions as described in Methods and then treated for 90 hours with the ACAT inhibitor(5 $\mu$ g/ml).

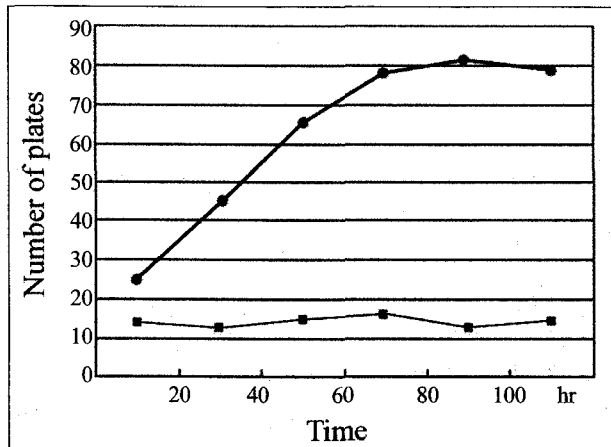


Fig. 4. Effect of the SHHW on the number of cholesterol plates seen in each treatment times.

Macrophages were treated as described in the legend to Fig. 3. In the presence of the ACAT inhibitor( -○- ) without the SHHW , the number of plates increased, reaching a peak at 90 hours. In contrast, in the presence of the ACAT inhibitor(5 $\mu$ g/ml)( -□- ) with the SHHW, the number of plates remained low and relatively constant.

처리군, 대조군에 蘇合香元을 처리한 실험군에서 각각  $6\pm 1$ ,  $21\pm 1$ ,  $5\pm 1$ ,  $11\pm 1$ 로 나타나 蘇合香元을 처리한 군에서 유의성( $p<0.05$ ) 있게 생성이 억제되는 경향을 보였다(Fig. 5).

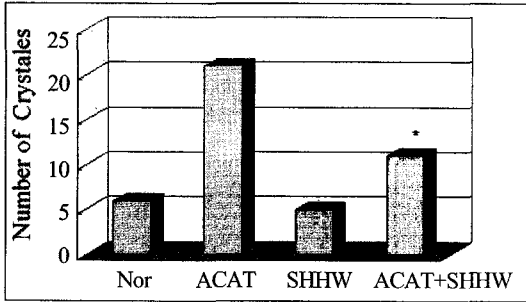


Fig. 5. Inhibition of FC crystallization by addition of SHHW to the extracellular medium.

J774 macrophages were cholesterol enriched as described in Methods. After an equilibration period, the monolayers were treated for 90 hrs without acetyl-LDL and ACAT inhibitor(left), with  $100\mu\text{g/ml}$  acetyl-LDL and ACAT inhibitor( $5\mu\text{g/ml}$ )(middle), with  $100\mu\text{g/ml}$  acetyl-LDL and ACAT inhibitor( $5\mu\text{g/ml}$ ) plus SHHW( $20\mu\text{g/ml}$ ). The monolayers were examined by light microscopy by two independent researchers. Crystals were counted in 10 random fields at  $\times 100$  magnification and are reported as means. The average error in reading the slides between investigators was 10%(\* $p<0.05$ ).

#### 6. M세포내의 ROS 정량적 분석

蘇合香元의 처리에 의해 ROS의 양적 변화를 측정 한 결과, 거품세포인 J774 macrophages의 정상

군은 녹색형광의 rhodamine 123이 강하게 나타난 반면, 대조군은 무색의 형광이 나타났고, 실험군에서는 정상군처럼 회복되어 녹색형광이 강하게 나타났다(Fig. 6).

정량적으로 분석한 값에서는 정상군, 정상군에 蘇合香元을 처리한 군, 대조군, 그리고 대조군에 蘇合香元을 처리한 군으로 구분하여 분석한 결과, 각각  $0.35\pm 0.01$ ,  $0.36\pm 0.01$ ,  $2.5\pm 0.01$ ,  $0.65\pm 0.01$ 로 나타나 대조군에 蘇合香元을 처리한 군에서 유의성( $p<0.05$ ) 있게 감소하는 경향을 보였다(Table 2, Fig. 7).

Table 2. Quantification of the Data in the Using Fluorescence Intensity Measurements of Individual Cells

	Fluorescence of intensity (arbitrary unnts)
N	$0.35\pm 0.01$
N+SHHW	$0.36\pm 0.01$
FC	$2.5\pm 0.01$
FC+SHHW	$0.65\pm 0.01^*$

Quantitative data of Rhodamine 123 staining of normal and FC-loaded macrophages. Macrophages were incubated in DMEM and 1% FBS alone(Normal) or containing  $100\mu\text{g/ml}$  acetyl-LDL and 1% FBS plus  $5\mu\text{g/ml}$  compound ACAT inhibitor 58035(FC) for 9h, FC with SHHW. The live cells were then stained with rhodamine 123 and viewed by confocal microscopy. Shown in the fluorescence intensity are quantitative data from five fields of cell (100cells total) for each condition(\* $p<0.05$ ).

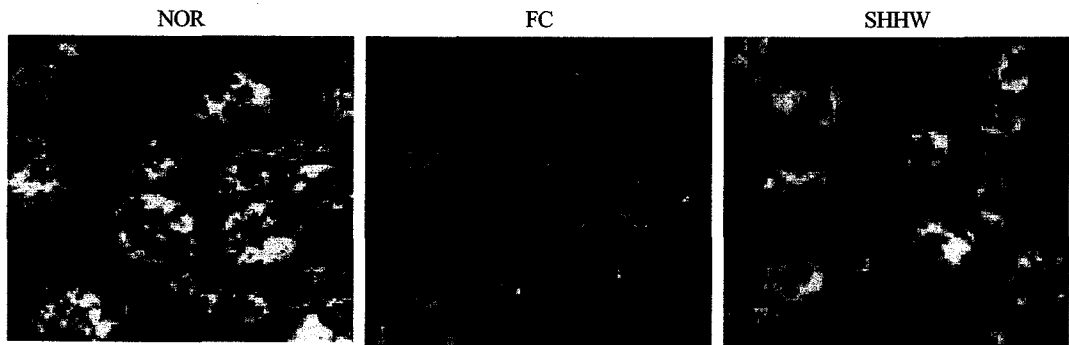


Fig. 6. Rhodamine123 staining of normal and FC-loaded macrophages.

Macrophages were incubated in DMEM and 1% FBS alone normal(left: NOR); or containing  $100\mu\text{g/ml}$  acetyl-LDL and ACAT inhibitor 58035( $5\mu\text{g/ml}$ )(middle: FC) plus  $20\mu\text{g/ml}$  SHHW extract(right: FC+ SHHW) for 9h. The live cells were then stained with rhodamine 123 and viewed by confocal microscopy.

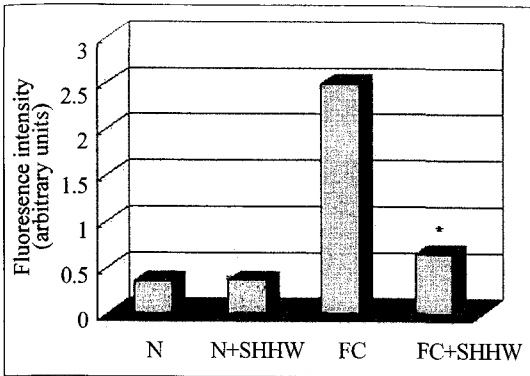


Fig. 7. Quantification of the data in the using fluorescence intensity measurements of individual cells. Quantitative data of Rhodamine 123 staining of normal and FC-loaded macrophages.

Macrophages were incubated in DMEM and 1% FBS alone (Normal) or containing 100µg/ml acetyl-LDL plus 5µg/ml compound ACAT inhibitor 58035(FC) for 9h, FC with SHHW. The live cells were then stained with rhodamine 123 and viewed by confocal microscopy. Shown in the fluorescence intensity are quantitative data from five fields of cell(100cells total) for each condition(\*p<0.05).

## VI. 考 察

심장을 포함하여 동맥에서 모세혈관에 이르기 까지 우리 몸의 각 부분에 혈액을 순환시키는 모든 기관을 합쳐 심혈관계라고 하며 심장 및 혈관에 생기는 질병을 심혈관질환이라 한다<sup>15</sup>. 근래 성인병으로 가장 문제시되고 있는 것은 동맥경화증을 비롯한 심장순환계통의 질환이다<sup>16</sup>. 이는 현대사회로 오면서 경제의 발전과 더불어 급격한 사회적 여건의 변화, 식생활의 변화, 인구구조의 노령화 등으로 인해 질병양상에 많은 변화를 초래함과 동시에 과도한 스트레스, 유전적인 원인 그리고 환경적 요인 등이 심혈관에 손상을 초래하여 여러 가지 심혈관계의 병태 양상을 야기하고 있다<sup>17</sup>.

통계청 조사에 따르면 90년대 관상동맥 질환자수는 70년대와 비교할 때 10배정도, 80년대 초와 비교할 때는 7배 가량 급증하였으며, 90년대 초부터 우리나라 사망원인 가운데 첫째가 순환기계 질환으로 암질환을 능가하였다<sup>17</sup>. 1993년부터 2003년

까지 인구 10만명당 사망률을 살펴보면 1995년부터 전체적인 순환기계 질환으로 인한 사망자수는 감소 추세로 2000년부터는 암질환으로 인한 사망률에 뒤지고 있으나 허혈성 심장질환으로 인한 사망자수는 급속히 증가하는 추세이다<sup>17</sup>.

심혈관계 질환은 韓醫學에서는 胸痺, 驚悸, 健忘, 中風, 昏迷, 癡呆, 百合病 등의 범주에서 다루고<sup>15,18</sup>, 서양의학에서는 심근경색, 협심증, 고혈압, 저혈압, 심근염, 심내막염, 부정맥, 동맥경화증, 고혈압성 심장병, 폐원성심장병, 뇌혈관질환, 혈관주위질환 등의 많은 질병들이 포함된다<sup>19</sup>. 그 중에서도 특히 동맥경화증은 뇌경색과 협심증, 심근경색증 등의 허혈성 심질환 및 말초혈관 폐쇄를 유발하는 원인질환이 된다<sup>2</sup>.

현재 알려진 동맥경화의 주요 발생 과정을 살펴 보면 혈중콜레스테롤의 주요 전달체인 low density lipoproteine(LDL)이 동맥벽에 혈중농도 의존적으로 전달되며, 동맥벽의 내피하에서 지방성분의 산화가 시작되고(minimally modified LDL, mm-LDL), 이들이 순환중의 monocyte를 동맥벽으로 유도하게 됨으로써 시작이 된다. 동맥벽에 침윤한 monocytes는 산화된 LDL에 자극 받은 혈관내피세포가 생산한 monocyte-colony stimulating factor(M-CSF)에 의해 macrophage로 분화하고, 이들 세포의 강력한 산화능에 의해 LDL은 완전한 산화 상태(ox-LDL)가 되어 macrophage의 표면수용체인 LDL receptor에 결합하는 능력을 상실하고 대신 scavenger receptor (SR)를 통하여 macrophage에 수용됨으로써, 이들 세포 내의 cholesterol 농도를 조절하는 feed-back 조절 메커니즘을 벗어나게 된다. 결과적으로 macrophage에 고농도로 축적된 cholesterol은 소위 foam cell이 되어 동맥경화의 초기 병변인 fatty streak를 형성한다<sup>20</sup>. 이러한 초기병변인 fatty streak 단계에서 병변의 진행은 동맥벽 중간층에 있는 평활근 세포가 elastic lamina를 지나 혈관벽 내층과 혈관내피 세포 하부에까지 이동하면서 진행된다<sup>21</sup>. 이러한 과정들에서 ACAT(acyl-coenzyme A:cholesterol acyl-transferase)는 cholesterol과 acyl CoA의 에스테르화에

관여하여 소장에서 cholesterol의 흡수, 간장에서 very low density lipoprotein(VLDL)의 합성, 지방 세포와 혈관내벽에 CE의 축적에 관여하는 등의 역할을 한다<sup>22</sup>. 결론적으로 동맥경화의 시작 단계에는

지질의 농도가 높은 것이 주요한 위험인자이며, 병변의 진행단계에서는 macrophage의 작용으로 이루어지는 광범위한 만성 염증성 반응이 병변 진행의 자극인자라고 할 수 있다<sup>23</sup>(Fig. 8, 9).

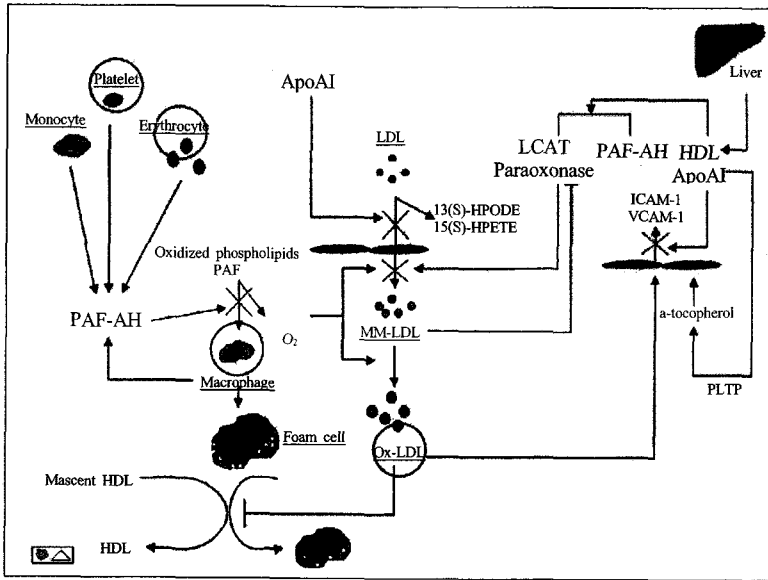


Fig. 8. Pathogenesis of atherosclerosis: Relation between endothelial cell, macrophage and ox-LDL.

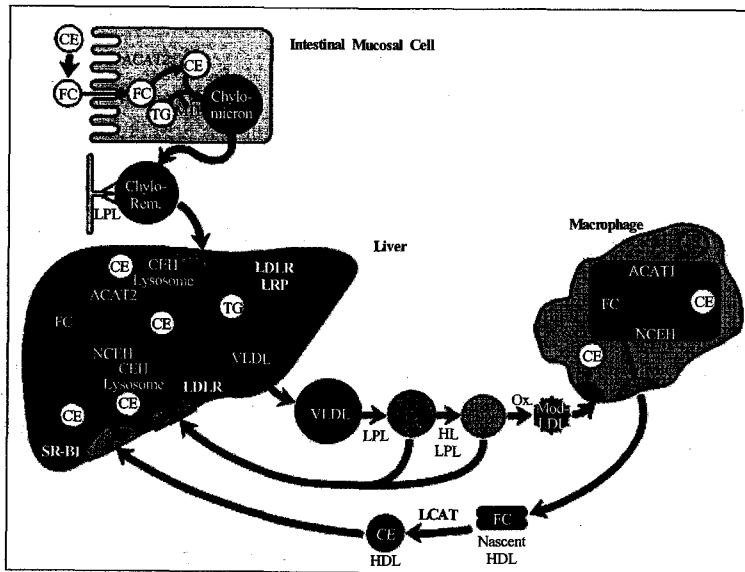


Fig. 9. The association of atherosclerotic factors; FC, VLDL and ACAT.



심혈관계 질환의 연구동향으로는 남 등<sup>3</sup>이 인삼의 혈압강하와 심박수의 증가에 대해 보고하였고 유 등<sup>5</sup>이 고려인삼 추출물의 혈관평활근 이완작용에 대해 보고하였다. 그리고 한 등<sup>6</sup>이 심근세포에서 失笑散이 LDH 활성도에 대한 효과를, 허 등<sup>7</sup>이 生脈散에서 대동맥 평활근에서의 NO생성을, 권 등<sup>24</sup>이 沒藥煎湯液의 배양 심근세포에 대한 작용을, 한 등<sup>25</sup>이 失笑散 전탕액이 XO/HX에 미치는 효과를, 손 등<sup>26</sup>이 丹蔘飲 전탕액이 산소유리기에 의해 손상된 심근세포의 LDH 활성도에 미치는 영향을, 안 등<sup>27</sup>이 括蕪薤白半夏湯 추출물이 배양 심근세포의 박동수와 LDH 활성도에 대한 효과를, 노 등<sup>28</sup>이 加味清心湯이 심혈관계 및 뇌손상에 대한 작용을 보고하는 등 많은 연구가 있었다.

한편 본 실험에 사용된 蘇合香元은 王의 『外臺秘要』에 吃力伽丸으로 처음 기재되어 傳屍骨蒸, 疰忤鬼氣, 卒心痛, 時氣鬼魅瘴癘, 驚癇鬼忤, 中人小兒吐利, 大人狐狸 등을 治한다 하였는데, 그 후 陳<sup>8</sup>의 『太平惠民和劑局方』에서 麝香蘇合元으로 개명한 이래로 許 등<sup>9</sup>은 中氣, 上氣, 氣逆, 氣鬱 등에, 龔 등은 中風, 中氣, 痰厥, 中惡, 胸痛, 胸痺, 腹痛, 小兒急慢驚風, 婦人產後中風 등을 치료한다고 하였다.

본 실험에 사용된 방의 약물구성 및 효능을 살펴보면 辛香한 蘇合香, 麝香, 安息香, 龍腦 등은 開竅辟穢하는 효능이 있어 君藥이 되고, 木香, 白檀香, 丁香, 沈香, 乳香, 香附子 등의 辛溫은 君藥의 효능을 도와 行氣解鬱하고 散寒化濁하는 동시에 臟腑氣血의 鬱滯를 제거하여 臣藥이 된다. 華撥은 散寒止痛하고 開鬱의 효능을 강화하고, 犀角은 辟穢解毒하며, 朱砂는 鎮心安神에 작용하고, 白朮은 補氣健脾하여 祛濕하며, 訶子是 溫澁斂氣하는 효능이 있어 他藥의 辛香太過에 의한 正氣耗散을 방지하므로 佐·使藥으로 한다<sup>14</sup>. 이와 같이 蘇合香元은 동물, 식물 및 광물성 약재의 약효가 고루 나타내는 작용으로 寒邪痰濁之閉之證을 치료하는 溫開의 대표적인 처방으로 中風, 中暈, 痰厥, 氣厥 등의 諸氣證에 쓸 수 있는 방제라 할 수 있다.

蘇合香元을 현대적으로는 중풍 초기나 스트레스

성으로 인한 제증상에 다용하고 있으며, 본 방에 대한 연구보고로는 蘇合香元의 항심리적 스트레스 효과에 관한 실험적 연구, 交感丹과 蘇合香元 투여 후 항stress 관련 hormone 함량 변화에 관한 실험적 고찰, 蘇合香元이 저산소증 유발 배양 대뇌신경세포에 미치는 영향, 蘇合香元이 실험적 뇌경색 흰쥐의 국소뇌혈류량 및 경색 면적에 미치는 영향<sup>13</sup> 등이 있었으나, 아직까지 심혈관계 질환에 대한 혈청학적 인자 및 혈관내피세포의 손상 유도에 관한 연구보고는 전무하였다.

이에 저자는 疏散寒邪, 行氣化痰, 開竅醒神하는 蘇合香元의 심혈관계 질환에 대한 효과를 규명하기 위해 동맥경화증에 밀접한 관계가 있는 FC에 대하여 ACAT inhibitor와 acetyl-LDL을 사용하여 FC를 유도한 세포주에서 蘇合香元이 혈액의 응집에 미치는 영향, 적혈구 세포막 구조에 미치는 영향, FC구조에 미치는 영향, MΦ세포내의 plate구조 결정화에 미치는 영향 및 ROS 생성에 미치는 영향, 그리고 MΦ세포내의 ROS 정량적 분석 등을 관찰하였다.

먼저 蘇合香元이 혈액의 응집에 미치는 영향을 알아보기 위하여 FC가 CE로 전환되는 것을 차단하기 위해 ACAT inhibitor, acLDL, FC/phospholipid를 첨가하여 FC로 존재하게 하는 상태로 유도한 뒤 蘇合香元 수추출액을 투여한 결과 Fig. 1에서처럼 대조군에서는 응집입자가 뭉쳐있는 양상이거나 혈액세포들의 표면구조가 수축된 상태로 존재하였으나 실험군에서는 적혈구 주변의 응집이 억제되었다. Fig. 2에서처럼 ×400 배율의 현미경하에서 적혈구 막구조 변형을 관찰하여 본 결과에서도 대조군의 경우 과산화기질화로 인한 세포막의 plaque rupture가 일어나 구멍이 난 상태를 나타내었으나 실험군에서는 거품세포인 macrophage에서 배출하는 FC생성을 차단하므로 과산화기질을 억제한 관계로 대조군에 비해 구멍의 공극이 크게 감소한 결과를 보였다. 그리고 FC가 혈액내의 적혈구뿐만 아니라 심장의 동맥조직이나 혈관내피세포의 세포표면의 파열을 과산화기질에 의해 유도된다면 막구조를 결정하는 인자인 거품세포의 FC의 결정을 관찰할 필요가

있으므로  $\times 200$  배율의 현미경하에서 관찰하여 FC의 형태적인 구조를 판정하였는데 Fig. 3에서처럼 보통 plate, rod, helix 구조로 관찰되었고 특히 과산화지질을 많이 유도하는 형태는 주로 plate구조에 의해 일어났다. 한편 plate구조를 가진 대조군과 실험군에서 10시간부터 110시간까지 시간대별로 관찰하여 볼 때 Fig. 4에서처럼 대조군은 각각  $25 \pm 1$ ,  $44 \pm 1$ ,  $66 \pm 2$ ,  $79 \pm 2$ ,  $81 \pm 1$ ,  $80 \pm 1$ 개로 판의 수가 상대적으로 증가한 반면 실험군에서는  $12 \pm 1$ ,  $11 \pm 1$ ,  $12 \pm 1$ ,  $14 \pm 1$ ,  $11 \pm 1$ ,  $12 \pm 1$ 로 나타나어 대조군에 비해 유의성( $p < 0.05$ ) 있게 감소하는 경향을 보였다.

상기의 실험 결과로 蘇合香元은 거품세포인 macrophage에서 배출하는 FC에 의해 산화성 물질의 작용을 차단하고 과산화지질화를 억제하는 항산화효과가 있는 것으로 생각되며, 특히 CE에서 FC로 전환하는 효소인 neutral cholesteryl esterase(NCEH)의 활성화를 차단하거나 FC에서 CE로 전환하는 효소인 ACAT를 활성화 시킨다고 짐작할 수 있다.

다음으로, 蘇合香元이 macrophage 세포주에 미치는 영향을 알아보기 위하여 蘇合香元 처리에 의해 ROS의 결정화에 미치는 영향과 ROS의 양적 변화에 대하여 알아보고자 하였다. 거품세포인 J774 macrophage는 산화적 LDL로 인해 세포내의 ROS의 형성을 촉진하게 되어 FC의 결정화가 초래된다. 이는 혈액응고를 유도하여 혈전을 일으켜 혈관내피세포, 심근세포나 동맥세포의 혈전이 침착되는 상태를 나타내게 된다<sup>29-30</sup>. 먼저 蘇合香元 투여에 의해 ROS의 생성이 억제되는지 관찰한 결과 Fig. 5에서처럼 J774 macrophages세포에 무처리한 정상군, 정상군에 산화적 LDL로 인한 세포내의 ROS의 형성을 촉진시킨 대조군, 정상군에 蘇合香元을 처리한 군, 대조군에 蘇合香元을 처리한 실험군으로 나누어 조사하여 각각  $6 \pm 1$ ,  $21 \pm 1$ ,  $5 \pm 1$ ,  $11 \pm 1$ 을 나타내었다. 특히 蘇合香元을 처리한 실험군에서 유의성( $p < 0.05$ ) 있게 결정화를 억제함을 알 수 있었다. 그리고 세포내 ROS의 생성 정도를 분석하기 위해 ROS의 생성이 증가시 무색형광이 염색되는 rhodamine 123을 1시간 염색한 후 confocal 현미경하에서 관찰하였다.

그 결과 Fig. 6에서처럼 거품세포인 J774 macrophages의 정상군은 녹색형광의 rhodamine 123이 강하게 나타난 반면, 대조군은 막의 구조가 ROS의 생성으로 인해 무색의 형광을 나타내었고, 蘇合香元을 처리한 실험군에서는 정상군처럼 회복되어 녹색형광이 강하게 나타났다. 특히 정량적으로 분석한 값에서는 Fig. 7과 Table 2에서처럼 정상군, 정상군에 蘇合香元을 처리한 군, 그리고 대조군, 대조군에 蘇合香元을 처리한 군으로 구분하여 분석한 결과, 각각  $0.35 \pm 0.01$ ,  $0.36 \pm 0.01$ ,  $2.5 \pm 0.01$ ,  $0.65 \pm 0.01$ 을 나타내어 蘇合香元을 처리한 군에서 유의성( $p < 0.05$ ) 있게 감소함을 알 수 있었다. 따라서 동맥벽에 침윤된 monocytes는 산화된 LDL에 의해 macrophage로 분화되고, 이는 다시 강력한 산화적 LDL에 의해 거품세포의 macrophage로 되고, 여기서 배출되는 FC는 과산화지질을 유도시켜 혈관내피세포의 손상이 진행되면서 심혈관 질환이 유발되는데, 소합항원이 이러한 기전을 치료하는데 중요한 역할을 할 것이라 생각된다.

상기 실험 결과를 종합하여 볼 때, 蘇合香元은 FC 유도에 의한 혈액응집과 과산화지질화에 관여하는 FC 형성을 억제시키고, 혈관내피세포의 손상을 유발시키는 거품세포의 macrophages, 세포내의 FC 결정화를 억제시켜 심혈관계의 손상을 회복시키는 효능이 있는 것으로 추정되며, 앞으로 동물 및 임상 실험 연구가 병행되어야 할 것으로 생각된다.

## V. 結 論

蘇合香元 수추출액의 FC에 의한 혈관내피세포의 손상에 대한 보호 및 회복효과를 규명하기 위해 acetyl-LDL과 ACAT inhibitor를 이용하여 FC를 유도한 실험에서 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 蘇合香元은 FC를 유도한 상태에서 적혈구 주변의 응집을 억제하였다.
2. 蘇合香元은 FC를 유도한 상태에서 적혈구 막구조의 변형을 감소시켰다.

3. FC의 형태적인 구조는 보통 plate, rod, helix 구조로 관찰되어졌으며, 특히 과산화지질을 많이 유도하는 형태는 주로 plate 구조에 의해 일어났다.
4. 蘇合香元은 plate 구조의 형성을 유의성 있게 억제시켰다.
5. 蘇合香元은 FC를 유도한 상태에서 macrophage 세포내 ROS의 생성을 유의성 있게 억제시켰다.

이상의 실험결과를 종합하여 보면 蘇合香元이 혈액 응집과 세포의 과산화지질화에 관계되는 FC 형성을 억제시키고, 혈관내피세포의 손상에 대한 보호 및 회복효과가 있음이 관찰되어, 소합항원의 동맥경화증, 허혈성 심질환과 뇌혈관질환 치료 효능이 본 실험을 통해 일부 입증되었다.

### 參考文獻

1. 이문호. 내과학(下). 서울: 학문사; 1986, p.1450-71.
2. 김권삼. 동맥경화증에서 Nitric Oxide와 Cytokines. 한국지질학회지. 1995;1(5):1-10.
3. 남기열, 고성룡, 최강주. 人蔘의 품질과 약리활성 물질과의 상관성. J. Ginseng Res. 1998;22(4): 274.
4. H. S. W., Kim, H.: Int. AJ. Biochem. Cell. Biol. 1996;28(5):573.
5. 유연희, 강두희. 연세의대 논문. 1981;14(1): 148.
6. 한동훈, 권강범, 김우경, 오광수, 김인규, 류도곤. 失笑散 전탕액과 구성약물이 배양 심근세포의 LDH활성도에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2001;15(5):770-4.
7. 허윤, 나영훈, 한상혁, 장호연, 임준모, 이인 등. 生脈散이 대동맥 평활근 세포에서 NO생성에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2001;15(5): 775-82.
8. 陳師文. 太平惠民和劑局方. 臺北: 旋風出版社; 1976, p.214.
9. 許浚. 東醫寶鑑. 서울: 南山堂; 2001, p.93.
10. 안영기, 최용태. 四關穴 鍼刺와 麝香蘇合香元이 鎮痛, 抗痙攣, 抗瀉下, 혈청성분변화 및 胃기능에 미치는 영향. 경희대논문집. 1981;4:1-12.
11. 이영빈, 문상관, 고창남, 조기호, 김영석, 배형섭 등. 麝香蘇合元이 재관류 장치하의 흰쥐 심장에 미치는 영향. 대한성인병학회; 1997;3(1):164-81.
12. 南相環, 李京燮. 牛黃清心元과 蘇合香元의 효능에 관한 연구. 경희의학. 1990;6(2):220-37.
13. 최은정, 신길조, 이원철. 蘇合香元이 실험적 뇌경색 흰쥐의 국소 뇌혈류량 및 경색 면적에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1997;18(1):456-69.
14. 方劑學教授 共編著. 方劑學. 서울: 永林社; 1999, p.348-9.
15. 屈松栢, 李家康. 實用中醫心腦病學. 제2판. 北京: 科學技術文獻出版社; 2000, p.3.
16. 金榮中. 동맥경화증의 지방축적 Mechanism. 생약학회지. 1978;9(4):157-67.
17. 통계청. 사망원인통계연보; 1983-2003.
18. 蕉增綿, 干全俊. 中西醫臨床心血管病學. 北京: 中國中醫藥出版社; 2000, p.2-4.
19. Chung YT, Choi MK, Kim JJ, Kim JM, Park ST. A study on the cytotoxicity of adriamycin on cultured rat myocardial and endothelial cells. J Chonnam Med. Sci. 1998;1:221-9.
20. Thompson J., Biggers T.D.. Effects of inhibitors of protein synthesis on the development of preimplantation mouse embryos. Exp. Cell. Res. 1966;41:411-27.
21. Qiao J. H., Tripathi J., Mishra N.K., Cai Y., Tripathi S., Wang X.P., Imes S., Fishbein M.C., Clinton S.K., Libby P., Luis A.J., Rajavashisth T.B.. Role of macrophage colony-stimulating factor in atherosclerosis studies of osteoporotic mice. Am. J. Path. 1997;150:1687-99.
22. Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux D, Tian J, Miyata M. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-

- stimulating factor(op) and apolipoproteine E. Proc Natl Acad Sci USA. 1995;92:8264-8.
23. 오구택. 형질전환모델동물을 이용한 동맥경화증의 연구 및 치료제 개발. 생화학분자생물학뉴스. 2002;22(1):12-21.
  24. 권강범, 조현익, 김구환. 沒藥 煎湯液이 培養 心筋細胞에 미치는 影響. 대한 한의학회지. 2000; 21(2):79-86.
  25. 한동훈, 권강범, 황인진. 失笑散 전탕액이 XO/HX에 의해 손상된 배양 심근세포 박동수에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2001;15(4): 566-70.
  26. 손창식, 권강범, 정종선. 丹蔘飲 전탕액이 산소 유리기에 의해 손상된 심근세포의 LDH활성도에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2001;15 (4):621-5.
  27. 안효창, 권강범, 박은영, 장승호, 류도곤. 括蕪菴 白半夏湯 추출물이 배양 심근세포의 박동수와 LDH활성도에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2002;16(2):289-95.
  28. 盧鉉泰, 金瑩均. 加味清心湯이 심혈관계 및 뇌 손상에 미치는 영향. 한방성인병학회지. 1998;4 (1):176-202.
  29. Lai KN, Leung JC, Metz CN, Lai FM, Bucala R, Lan HY. Role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome. J Pathol. Apr. 2003;199(4):496-508.
  30. Palmer R. M., Ferrige A. G., Moncada S.. Nitric oxide relaease accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature. 1987;327-524.