

원 저

## 丹蔘通脈湯과 丹蔘生脈散이 고지혈증 및 Hypoxia로 유발된 뇌손상과 세포손상에 미치는 영향

김용진, 유병남, 김윤식, 설인찬  
대전대학교 한의과대학 심계내과학교실

### The Effect of *Dansamtongmek-tang* and *Dansamsengmek-san* on Hyperlipidemia and Brain & Cell Damage by Hypoxia

Yong-jin Kim, Byeong-chan Yu, Yoon-sik Kim, In-chan Seol

Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine,  
Daejeon University, Taejeon, Korea.

**Background and Aims:** *Dansamtongmek-tang* (DSTMT) and *Dansamsengmek-san* (DSSMS) have been used for many years as therapeutic agents for the acute stage of cerebrovascular disease, hypertension and hyperlipidemia in Oriental medicine, but the effects of DSTMT and DSSMS on hyperlipidemia and safety for cell damage are not yet well-known. This study was done to investigate the effects of DSTMT and DSSMS on hyperlipidemia.

**Methods:** In vivo test: after administering DSTMT and DSSMS to SHR and ICR occurred hyperlipidemia for 3 weeks, we analyzed body weight, cholesterol levels, TG, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, LDH in plasma, brain, liver and kidney tissue, and DNA by RT-PCR.

**In vitro test:** after administering DSTMT and DSSMS to human hepatocellular carcinoma in hypoxia, we observed cell cohesion by light microscope, analyzed the inflow of Ca<sup>2+</sup> by confocal laser scanning microscope and DNA by RT-PCR.

**Results:** DSTMT significantly decreased the levels of triglyceride and increased the levels of HDL-cholesterol in SHR, and significantly decreased the levels of LDL-cholesterol and body weight and increased the levels of HDL-cholesterol in ICR. DSSMS significantly decreased body weight, total cholesterol levels, LDL-cholesterol, LDH and cardiac risk factor (CRF) in SHR and significantly decreased the levels of total cholesterol, triglyceride, LDL-cholesterol, LDH and CRF in ICR. DSTMT had an effect on protecting cells from damage by inhibiting production of p53 mRNA, and in DSSMS, by inhibiting production of p53 mRNA and p21 mRNA after hypoxia. DSTMT effectively blocked off Ca<sup>2+</sup> at low density, but DSSMS effectively blocked off Ca<sup>2+</sup> at high density. Both DSTMT and DSSMS had an effect on inhibiting lipid metabolism by blocking off production of apo B mRNA.

**Conclusions:** These results suggest that DSTMT and DSSMS might be usefully applied for treatment of hyperlipidemia and suppression of brain damage.

**Key Words:** *Dansamtongmek-tang*, *Dansamsengmek-san*, hyperlipidemia, brain damage, cell damage, hypoxia, Ca<sup>2+</sup>, confocal laser scanning microscope (CLSM)

· 접수 : 2006년 8월 20일 · 논문심사 : 2006년 8월 21일  
· 채택 : 2006년 9월 1일  
· 교신저자 : 설인찬, 대전광역시 중구 대흥동 22-5번지  
대전대학교부속한방병원 뇌신경내과  
(Tel: 042-229-6805, Fax: 042-254-3403,  
E-mail: seolinch@dju.ac.kr)

서 론

최근 생활습관의 변화, 특히 서구화된 식생활로  
의 변화 등으로 인해 고칼로리식, 지방분의 과다

섭취 및 운동 부족 등의 현상이 날로 늘어나는 추세에서 고혈압, 고지혈증, 당뇨, 비만 등의 성인병 또한 증가하고 있는 실정이다<sup>1,2)</sup>. 이 중 고지혈증은 동맥경화 및 허혈성 심혈관질환이나 뇌혈관질환의 발생과 밀접한 관련이 있는 것으로 밝혀져 있으며, 최근에는 인간 삶의 질을 측정하는 데 있어 중요한 척도로 인식되는 성인병 유발 위험 요인 중 큰 축을 이루는 지표가 된다<sup>2,3)</sup>.

고지혈증을 유발하는 지질 성분 중, 특히 Low Density Lipoprotein(LDL)-cholesterol은 심혈관계 및 뇌혈관계 질환 발병의 중요한 위험 인자 중의 하나로 보고되고 있으며, 이에 따라 식이요법 및 약물요법을 통하여 LDL-cholesterol을 낮출 수 있는 항고지혈 치료약물의 개발을 위한 많은 연구가 진행되고 있다<sup>4)</sup>.

한의학적으로도 고지혈증 및 뇌손상에 대한 실험 연구로 배<sup>5)</sup>의 척담탕, 남<sup>6)</sup>의 양격산화탕, 강<sup>7)</sup>의 대승기탕, 임<sup>8)</sup>의 삼습탕, 박<sup>9)</sup>의 사향우황삼칠근복합방, 정<sup>10)</sup>의 가미과루해백황금탕, 김<sup>11)</sup>의 대황황련해독탕, 한<sup>12)</sup>의 대시호탕가미방, 박<sup>13)</sup>의 소풍척담탕 등 다양한 보고가 있었지만, 아직까지 丹蔘通脈湯과 丹蔘生脈散의 항고지혈 효과 및 세포 보호 효과에 대한 보고는 접하지 못하였다.

이에 저자는 丹蔘通脈湯과 丹蔘生脈散 두 약물을 이용하여 항고지혈 효과 및 고지방식이에 의해 유발된 조직 변성에 대한 보호 효과, 그리고 저산소 스트레스에 의해 유발된 뇌손상 및 세포손상에 대한 보호 효과 등을 검증하고자 먼저 이들 방제의 *in vivo test*에서 체중 변화 및 혈장 지질 농도를 분석한 후 각 장기에 대한 조직 검사를 실시하였고, 산소 스트레스를 유발하여 이에 대한 세포손상을 간접적으로 의미하는 특정 mRNA를 RT-PCR을 통해 분석하였으며, *in vitro test*에서는 산소 스트레스 유발 후 동물세포의 성장 패턴을 먼저 분석한 뒤, 형광 촬영을 통해 세포손상을 가늠할 수 있는 세포내 calcium ion의 유입 정도를 비교 분석하였고, 고지혈증의 중간 매개로 알려진

apo B lipoprotein 발현에 대한 유전자 분석을 실시하였던 바 유의할 만한 실험 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 실 험

### 1. 재료

#### 1) 동물

##### (1) 종류

본 실험에 사용된 실험용 쥐는 (주)샘타코바이오코리아에서 구입한 평균 체중 120g 정도의 생후 5주된 웅성 SHR {Spontaneous Hypertensive Rat; 자발성고혈압백서, Sam:TacN(SHR)}과, 평균 체중 30g 정도의 생후 5주된 웅성 ICR {Institute of Cancer Research, Sam:TacHa(ICR)}이다.

##### (2) 사료

본 실험동물의 먹이로 일반사료와 고지방사료 두 가지를 사용하였다.

일반사료는 NIH#31M(Taconic Co., U.S.A.)으로서 그 조성 성분이 단백질 18.0% 이상, 조지방 5.0%, 조섬유 4.5%, 회분 8.0%이고, 고지방사료는 Dyets#101556(Dyets Co., U.S.A.)로서 단백질 17.7%, 지방 40.0%, 조섬유 5.0%, 회분 4.0%, 수분 3.3%, 탄수화물 31.4%로 조성된 사료다.

##### (3) 사육조건

본 실험동물을 한국과학기술원(KAIST) 의과학 연구센터 실험동물실에서 3주간 사육하며 실험을 진행하였으며, 사육실의 조건은 실온 21~23℃, 상대습도 55~65%, 기압 3mmAq, 조명시간 12시간(07:00~19:00), 조도 150~300Lux로 설정하였다.

사료는 최초 1주 동안은 충분한 양의 일반사료 NIH#31M을 멸균 후에 멸균증류수와 함께 공급하였고, 다음 2주 동안은 SHR의 경우 하루 20g, ICR의 경우 하루 3g의 고지방사료 Dyets#101556 일정량을 냉장보관하면서 멸균증류수와 함께 공급하여 사육하였다.

#### 2) 동물세포

**Table 1.** Compositions of *Dansamtongmek-tang* (DSTMT; A) & *Dansamsengmek-san* (DSSMS; B)

種類	韓藥名	學名	用量(g)
丹蔘通脈湯 (DSTMT; A)	丹 蔘	<i>Salviae Radix</i>	300.0
	鷄 血 藤	<i>Millettiae Lignum</i>	300.0
	玄 蔘	<i>Scrophulariae Radix</i>	300.0
	甘 草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	300.0
	當 歸	<i>Angelicae Sinensis Radix</i>	180.0
	Total amount		1380.0
丹蔘生脈散 (DSSMS; B)	丹 蔘	<i>Salviae Radix</i>	150.0
	人 蔘	<i>Ginseng Radix</i>	180.0
	麥 門 冬	<i>Liriopis Tuber</i>	180.0
	生 地 黃	<i>Rehmanniae Radix</i>	180.0
	山 茱 萸	<i>Corni Fructus</i>	120.0
	五 味 子	<i>Schizandrae Fructus</i>	60.0
	Total amount		870.0

동물세포는 한국세포주은행에서 Human Hepato-cellular Carcinoma(SNU-475)를 분양받아 통상의 방법에 따라 100×100×20mm 크기의 cell culture dish 내에서 Gibco BRL Co.(U.S.A.)의 배지를 이용하여 배양하였다.

### 3) 약물

본 실험에 사용한 丹蔘通脈湯(DSTMT; A)과 丹蔘生脈散(DSSMS; B)은 대전대학교부속한방병원에서 구입하였고, 그 내용과 용량은 다음과 같다 (Table 1).

### 4) 시약 및 기기

본 실험에 사용한 시약은 Sigma Co.(U.S.A.)의 formaldehyde, hematoxylin, aluminium sulphate, citric acid, sodium iodate, eosin yellowish, sodium bicarbonate, magnesium sulphate, gelatin, ethidium bromide, agarose, EDTA, xylene, DTT와 중외제약(Korea)의 ether, paraffin, normal saline, Bayer Co.(Germany)의 ketamine, rompun, Fisher(U.S.A.)의 ethanol, hydrochloric acid, Invitrogen Co.(U.S.A.)의 super script II RT kit, taq DNA polymerase, dNTP mixture, RNaseOUT, Genotech Co.(Korea)의

primers, oligo(dT)15, Intronbio Co.(Korea)의 total RNA extraction kit, easy-Blue liquid, Merk Co. (Germany)의 chloroform, isopropanol 그리고 ethylene glycol(Duchefa Biochemie, Netherlands), fluo-4 (Molecular Probes Co., U.S.A.), liquid nitrogen (중앙산업가스, Korea) 등이다.

기기는 Vision Co.(Korea)의 autoclave, vortex mixer, incubator, clean bench와 Hanil(Korea)의 high-speed centrifuge supra 25K, centrifuge MF80, microcentrifuge Micro12, Olympus(Japan)의 optical microscope, digital camera, Nuair Co.(U.S.A.)의 Nuair direct heat DH auto flow, CO<sub>2</sub> automatic air-jacketed incubator, 그리고 freeze dryer(II Shin Engineering Co., Korea), confocal laser scanning microscope TCS SP2 AOBs(Leica, Germany), deep freezer(Samwon Engineering Co., Korea), micro slide(Surgipath Co., U.S.A.), filter paper(3M, U.S.A.), Hitachi 7600-010(Hitachi Co., Japan), thermal cycler(Bio-Rad, U.S.A.), UV transilluminator BTS-20M(Uvitec, U.K.), nuclease-free microcentrifuge tube(Sarstedt Co., U.S.A.) 등을 사용하였다.

## 2. 방법

### 1) 검액의 제조

각각의 약물을 깨끗이 씻어 먼저 10 l 용기에 넣고 3차 증류수(Arium® 611 초순수 제조시스템, Sartorius Co., Germany) 3 l와 함께 121°C에서 2시간 동안 가압하면서 가열하여 추출액을 얻었다. 이 추출액을 4°C에서 10,000rpm으로 30분간 원심분리하여 고형성분을 제거하였으며, 이것을 다시 3M filter paper로 여과하여 얻은 여과액을 -70°C deep freezer에서 4시간 동안 방치하고, 24시간 동안 freeze dryer로 동결 건조하여 분말을 얻었다. 이를 통해 얻어진 각 분말의 중량을 측정하여 최종농도가 100mg/ml의 용액이 되도록 생리식염수에 희석하여 -50°C 냉동고에 분주하여 냉동 보관하였다.

### 2) In vivo test

#### (1) 약물의 투여

실험 첫날부터 SHR은 3마리씩 세 집단, ICR은 5마리씩 세 집단으로 나누어 각각 control군, 丹蔘通脈湯투여군(A group), 丹蔘生脈散투여군(B group)으로 설정하고, 각각의 검액을 각 실험군대로 1일 1회 0.267mg/g씩 경구 투여하였으며, control군은 생리식염수를 1일 1회 같은 량, 즉 SHR은 320 $\mu$ l, ICR은 80 $\mu$ l씩 경구 투여하였다.

3주 동안 매일 오전 10시경 이와 같은 방법으로 약물 투여를 실시하였으며, 첫 1주간은 일반사료와 멸균증류수를 충분히 공급하고, 다음 2주간은 일정량의 고지방사료를 공급하면서 멸균증류수는 자유로이 섭취할 수 있도록 하였다.

위의 과정대로 3주간의 약물 투여 후 SHR과 ICR을 각각의 투여군별로 체중의 변화를 측정하고, 조직 및 혈액을 채취하여 이후의 실험을 진행하였다.

#### (2) 체중 측정

각 실험군별로 실험 개시일의 체중과 실험 최종일의 체중을 각각 측정하여 평균을 내고 실험군별 체중 증가의 정도를 비교 분석하였다.

### (3) 채혈 및 혈장 분리

최종일까지 시료를 투여한 SHR과 ICR을 cage에서 2시간 동안 안정시킨 다음 37.5°C의 예비 보온기에 10분 동안 넣어 두었다가 ether로 마취시킨 후, 통상적인 방법에 따라 대정맥에서 syringe를 이용하여 채혈하였다. 채혈량은 ICR의 경우 마리당 800 $\mu$ l, SHR의 경우 2ml씩 채혈하였으며, 각 실험군별로 채혈한 혈액을 3mg/ml EDTA 용액을 0.5ml로 채운 용기에 넣어 30분간 방치한 다음 4°C에서 3,000rpm으로 10분간 원심분리시킨 후 상층액으로 분리된 혈장을 이후의 분석을 위해 -80°C에 보관하였다.

### (4) 혈장 성분의 측정

각 실험군에서 채취한 혈장에서 각각 total cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, LDH의 함량 및 Cardiac Risk Factor (CRF)를 Hitachi 7600-010(Hitachi Co., Japan)을 사용하여 측정하였다.

### (5) 조직학적 검사

#### ① 조직의 분리

광학현미경을 통한 조직학적 관찰을 위해 실험 동물을 처사 12시간 전에 식이를 중단시키고 공복 상태에서 ether를 흡입시켜 마취시킨 다음, 두 개골과 흉곽, 복부를 절개한 뒤 SHR과 ICR 모두 brain, heart, liver의 순으로 적출하였다. 적출한 각 조직들을 10% formaldehyde 용액에 30분간 담가두었다가 다시 꺼내어 새로운 10% formaldehyde 용액에 침윤시켜 상온에서 48시간 동안 고정하였다.

#### ② 조직 슬라이드의 제작 및 관찰

고정된 각 장기의 조직내 고정액 제거를 위해 증류수에 침윤시켰다가 tap water로 수세하고, 60% alcohol로 농도를 상승시키면서 탈수하였다. 탈수된 조직들은 xylene 용액으로 투명 과정을 거쳐 용해된 paraffin에 침투 및 포매 과정을 통해 블럭으로 제작하였다. 제작된 paraffin 블럭을 4 $\mu$ m 두께의 절편으로 잘라 micro slide에 부착하고 탈paraffin 및 합수 과정을 거친 다음, hematoxylin

**Table 2.** Compositions of Reagent for H&E Dyeing

Item	Element	Menstruum
Gill's hematoxylin	hematoxylin 6.0g	ethylene glycol 269ml distilled water 680ml
	aluminum sulphate 4.2g	
	citric acid 1.4g	
	sodium iodate 0.6g	
Eosin	eosin yellowish 1.0g	distilled water 100ml
1% acid alcohol	conc. hydrochloric acid 1ml	70% alcohol 99ml
Scott's tap water	sodium bicarbonate 20g magnesium sulphate 3.5g	saline 1l

용액에 5분간 반응시킨 후 tap water로 수세하고, 다시 1% acid alcohol에 2분간 담가두었다가 tap water로 수세한 후, eosin 용액에 5분간 반응시키고 이를 다시 tap water로 수세하는 과정을 거쳐 H&E 염색을 실시한 후 슬라이드로 제작하고, 광학현미경하에서 관찰 및 사진 촬영을 하였다.

H&E 염색에 사용된 시약은 다음과 같다(Table 2).

(6) 산소 스트레스 후 조직내 mRNA 분석

① 뇌허혈 유발

각 실험군별로 SHR과 ICR을 1마리씩 선별한 후, ketamine과 rompun을 각각 100mg/kg, 16mg/kg 씩 동시에 주사하여 마취한 다음, 소형클립을 이용하여 경동맥을 차단한 뒤 5분 동안 유지하면서 뇌허혈을 유발시켰다.

뇌허혈 유발 24시간 후에 공복 상태에서 ether를 흡입시켜 마취시킨 다음, 두개골을 절개한 뒤 brain을 적출하여 즉시 liquid nitrogen으로 급속 동결시킨 후 이후의 total RNA 추출 실험에 이용하기 위해 -80℃에 보관하였다.

② RNA 추출

Total RNA의 추출은 easy-Blue™ total RNA extraction kit(Intronbio Co., Korea)와 그에 준하는 protocol을 이용하여 추출하였다.

급속 동결시켜 보관한 각 실험군의 brain 조직 샘플 50mg씩을 취하여 1ml의 easy-Blue 용액을 가한 후 잘 분쇄한 뒤, 10초간 진탕한 후 200µl의 chloroform을 넣고 다시 진탕하였다. 이 조직액을

4℃에서 13,000rpm으로 10분간 원심분리한 뒤 400µl의 상층액을 새 tube로 옮긴 다음, 여기에 같은 양의 isopropanol을 넣고 3회 정도 tube를 뒤집으면서 섞어준 후 실온에 10분간 방치하였다. 이를 다시 13,000rpm에서 5분간 원심분리하여 RNA 침전물을 얻은 후 70%의 ethanol로 수세하여 건조시키고, 여기에 RNA가 안정화될 수 있도록 50µl의 DEPC(Inhibitor of RNase) 처리된 멸균증류수를 가하여 RNA 용액을 만든 뒤, 이후의 RT-PCR(Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction)을 이용한 mRNA 정량을 위해 -70℃에 보관하였다.

③ RT-PCR을 통한 mRNA의 정량

각 실험군별 brain 조직샘플로부터 얻은 total RNA 추출물을 가지고 Reverse Transcriptase(RT)를 이용한 RT-PCR을 통하여 각 조직내 특정 mRNA의 정량을 진행하였다.

먼저 cDNA의 합성을 진행하였는데 super script II RT kit(Invitrogen Co., U.S.A.)를 이용하였으며, 그 과정은 다음과 같다.

Nuclease-free microcentrifuge tube에 oligo(dT) 15(500µg/ml) 1µl와 5µg의 total RNA 추출물, 10mM dNTP mixture 1µl를 함께 넣고, 멸균 증류수를 가하여 최종부피를 12µl로 되게 하여 65℃에서 5분간 반응시킨 후, 얼음으로 냉각시켰다. 여기에 5× first-strand buffer 4µl와 0.1M DTT 2µl, RNaseOUT(40units/µl) 1µl를 넣고 42℃에서

**Table 3.** The Genomic Sequence of Oligonucleotide for RT-PCR in Vivo Test

Animal	mRNA	Primer	Genomic Sequence
SHR	c-jun	upper	5'-CTAAGATTCTGAAGCAGAGC-3'
		lower	5'-CTATGCAGTTCAGCTAGG-3'
	p21	upper	5'-CTACGATAGAGGACTCC-3'
		lower	5'-CAGTTCTCATGTACTGGTC-3'
	p53	upper	5'-CTTACCAAGGCAACTATGGC-3'
		lower	5'-CAGGCCGTCACCATCAGAG-3'
ICR	c-jun	upper	5'-CTGATCATCCAGTCCAGC-3'
		lower	5'-GCGTAGACCGGAGGCTCA-3'
	p21	upper	5'-CTGTCGGAACAGGAGAC-3'
		lower	5'-CGTGGACAGTGGCATC-3'
	p53	upper	5'-GCCATCTACAAGAAGTC-3'
		lower	5'-CTGTTACACATGTACTTGTAG-3'

2분간 반응시킨 후 200units의 super script II RT 를 가하여 잘 섞어준 뒤 다시 42℃에서 50분간 반응시켰다. 이 반응액을 70℃로 15분간 가열하여 반응을 종결시키고 약 5 $\mu$ l의 cDNA를 얻었다.

그 다음으로 RT-PCR 반응을 진행하였는데 다음과 같은 방법으로 수행하였다.

역시 nuclease-free microcentrifuge tube에 cDNA 2 $\mu$ l와 10 $\times$  PCR buffer 2 $\mu$ l, 2.5mM dNTP mixture 1.6 $\mu$ l, sense primer(10pmol/ $\mu$ l) 0.4 $\mu$ l, antisense primer(10pmol/ $\mu$ l) 0.4 $\mu$ l를 함께 넣고, 멸균 증류수를 가하여 최종부피를 19.5 $\mu$ l로 되게 하여 여기에 taq DNA polymerase(2U/ $\mu$ l) 0.5 $\mu$ l를 가하여 반응액을 제조하였다. 이 반응액을 94℃에서 10분 동안 preincubation한 뒤, 94℃에서 20초, 50~55℃에서 20초, 72℃에서 20초간 각각 30cycle로 반응시킨 후, 다시 72℃에서 10분간 종결반응을 진행하였다. 이와 같은 과정을 통해 얻은 결과물을 ethidium bromide로 염색한 후, 1.2% agarose gel 상에서 전기영동을 시행하여 각각의 특정 mRNA의 정량을 분석하였다.

각 실험군별 brain 조직으로부터 추출한 RNA의 RT-PCR에 이용한 primer의 염기서열은 다음과 같다(Table 3).

### 3) In vitro test

#### (1) 동물세포의 배양

직경 18mm, 두께 0.16mm인 laboratory glassware (Marienfield Co., Germany)를 10% gelatin 용액에 침윤시킨 뒤 4℃에서 1시간 동안 반응시켜 cell이 잘 부착되도록 커버글라스를 코팅한 후, 이를 6 well cell culture plate에 넣고 배양액을 2ml씩 첨가한 뒤, 분양받은 Human Hepatocellular Carcinoma (SNU-475)를 plate의 각 well에 넣고 37℃에서 배양하였다. 이때 배양액은 Gibco BRL Co.(U.S.A.)의 배지를 이용하였으며 통상의 방법에 따라 배양하였다.

#### (2) 약물의 투여

시험적으로 배양액 1ml당 검액을 1mg, 2mg, 3mg, 4mg, 5mg 순으로량을 증가시키면서 단계적으로 투여하여 보았는데, 투여된 용량이 3mg에 도달된 시점부터 세포가 안정적으로 안착되지 못하였다. 그러므로 배양액 10ml당 검액을 5mg, 10mg, 20mg의 농도로 맞추기로 하고, 각 well당 2ml씩의 배양액이 가해진 plate를 control군, 丹蔘通脈湯투여군(A group), 丹蔘生脈散투여군(B group)으로 구분하여 각각의 검액을 각 실험군대로 1mg, 2mg, 4mg씩 투여하였다. 이 때 각 실험군마다 투여될 검액을 생리식염수로 희석하여 모두 40 $\mu$ l의 부피로 맞추어 투여하였으므로, control군에도 같은 용량

의 생리식염수를 투여하였다.

약물을 투여한 시점은 gelatin이 코팅된 슬라이드에 동물세포가 부착하여 안정화되는 시간인 약 24시간 뒤에 시행하였고, 다시 24시간 동안 더 배양한 다음 이후의 실험을 진행하였다.

(3) 산소 스트레스 유발

약물 투여 후 24시간 동안 더 배양한 뒤에 각 plate를 배양기에서 꺼내어 산소 공급을 차단하고 25°C의 암소에 1시간 30분 동안 방치하였다.

(4) 현미경적 관찰

각 plate를 암소에 방치하여 1시간 30분 동안 산소를 차단함으로써 산소 스트레스를 준 직후 각 실험군들을 광학현미경으로 관찰하여 각 투여군 별로 cell의 성장패턴을 비교분석하였다.

(5) Cytotoxic calcium ion의 분석

저산소 처리를 한 각 plate에 Molecular Probes Co.(U.S.A.)의 calcium indicator인 fluo-4(AM)를 각 well당 50µl씩 처리하여 배양기에서 1시간 동안 반응시켰다. 그리고 충북대학교 공동실습관에 설치된 confocal laser scanning microscope(Leica Co., Germany)를 이용하여 세포내 Ca<sup>2+</sup>의 유입 정도를 측정하였다. Slide glass의 사진 촬영은 서로 다른 세 부분을 연속적으로 선택하여 촬영하였고, 다시 같은 부분에 대해 다른 각도의 단면을 촬영하여 각 실험군별 염색 정도를 비교하였다.

Confocal laser scanning microscope TCS SP2 AOBS에 사용된 광원은 다음과 같다(Table 4).

Calcium indicator로 사용된 fluo-4(AM)는 세포내의 Ca<sup>2+</sup>과 결합하여 argon-laser source에 대해 488nm의 파장범위에서 형광을 나타내는 물질로서

분자식은 C<sub>51</sub>H<sub>50</sub>F<sub>2</sub>N<sub>2</sub>O<sub>23</sub>이며 구조는 다음과 같다 (Fig. 1).

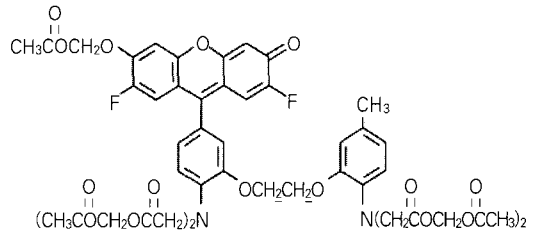


Fig. 1. The molecular structure of fluo-4 (AM).

(6) 동물세포내 mRNA 분석

① RNA 추출

암소에 방치하여 저산소 처리를 한 각 대조군과 실험군의 plate를 수거하여 Fetal Bovine Serum(FBS)으로 세척한 후 RNA 추출에 이용하였다.

배양세포의 total RNA의 추출도 앞서 기술한 brain의 조직내 RNA 추출시 사용했던 easy-Blue™ total RNA extraction kit(Intronbio Co., Korea)와 그에 준하는 protocol을 이용하여 같은 방법으로 추출하였다.

먼저 1×10<sup>6</sup>개의 cell을 1.5ml의 tube에서 원심분리를 통해 수거한 뒤 culture media를 완전히 제거하고 1ml의 easy-Blue 용액을 가하여 10초간 진탕한 후 200µl의 chloroform을 넣고 다시 진탕하였다. 이후의 과정은 앞서 기술한 brain의 조직내 RNA 추출 과정과 같다.

② RT-PCR을 통한 mRNA의 정량

각각의 약물투여 동물세포군들로부터 얻은

Table 4. Source of Light for Confocal Laser Scanning Microscope

Visible		UV
Red	He-Ne 633nm	Diode 405nm
Green	He-Ne 543nm	
Blue	Ar 458nm Ar 476nm Ar 488nm Ar 514nm	

total RNA 추출물을 가지고 RT-PCR을 이용하여 human apolipoprotein B 유전자의 정량을 진행하였다.

cDNA의 합성과 RT-PCR의 반응 또한 앞서 기술한 brain 조직의 mRNA 정량 방법과 같다. 이와 같은 과정을 통해 얻은 결과물을 ethidium bromide로 염색한 후, 1.2% agarose gel 상에서 전기영동을 시행하여 각 실험군별 human apolipoprotein B mRNA의 정량을 분석하였다.

각 실험군별 배양세포로부터 추출한 RNA의 RT-PCR에 이용한 primer의 염기서열은 다음과 같다(Table 5).

4) 통계 처리 및 비교 분석

각 실험군의 결과값은 unpaired student's T-test 및 Sigma Plot 2000 통계프로그램을 사용하여 통계 처리하였고,  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  및  $p < 0.001$  수준에서 유의성 검정을 실시하였으며, 각 실험별로 촬영한 사진은 육안적으로 단순 비교 분석하였다.

성 적

1. In vivo test

1) 체중의 변화

각 실험군별 체중의 변화는 SHR과 ICR 모두 대조군보다 적게 증가한 것으로 나타났으나, SHR의 경우 B실험군에서의 체중 증가가 적게 나타난 반면, ICR의 경우 A실험군에서의 체중 증가가 보다 적게 나타나 서로 다른 양상을 보여주고 있다 (Table 6).

2) 혈장 성분의 변화(Table 7)

(1) Total cholesterol의 함량

각 실험군별 total cholesterol 량의 측정 결과, SHR과 ICR 모두 B실험군에서 유의성 있는 감소 효과가 나타났다.

(2) Triglyceride의 함량

각 실험군별 triglyceride 량의 측정 결과, SHR과 ICR이 서로 다른 양상을 보였다. SHR의 경우 triglyceride의 량이 A실험군에서는 유의성 있게

Table 5. Genomic Sequence of Oligonucleotide for RT-PCR *in Vitro Test*

Creatures	mRNA	Primer	Genomic Sequence
Human	apo B	upper lower	5'-ACCCGTTTGCAAGCAG-3' 5'-CATAATGCCATGCCACCCTC-3'

Table 6. Changes of Body Weight in SHR & ICR

Model	Group	Wt(g)/Final	Wt(g)/Start	Wt(g)/Final-Start
SHR	C	189.7		68.7
	A	185.0	121.0	64.0
	B	178.7		57.7***
ICR	C	44.8		15.8
	A	41.6	29.0	12.6**
	B	43.2		14.2

C (Control): normal saline (SHR 320 $\mu$ l, ICR 80 $\mu$ l) treated group.

A: DSTMT (0.267mg/g) treated group.

B: DSSMS (0.267mg/g) treated group.

Statistically significant value compared with control data by T-test (\*\*:  $p < 0.001$ , \*:  $p < 0.01$ ).

† Numbers rounded to two decimal places.



**Table 7.** Levels in Plasma

Levels	Model	C	A	B
Total cholesterol levels in plasma (mg/dℓ)	SHR	84	85	75**
	ICR	196	194	170**
Triglyceride levels in plasma (mg/dℓ)	SHR	130	83*	162
	ICR	130	126	93*
HDL-cholesterol levels in plasma (mg/dℓ)	SHR	33.3	34.8**	32.3
	ICR	104.4	106.3***	96.6
LDL-cholesterol levels in plasma (mg/dℓ)	SHR	18	23	13*
	ICR	19	14*	11*
LDH levels in plasma (IU/L)	SHR	25	34	10**
	ICR	66	63	55**
Comparison of cardiac risk factor (CRF)	SHR	5	3	2
	ICR	4	3	1

C (Control): normal saline (SHR 320μℓ, ICR 80μℓ) treated group.  
 A: DSTMT (0.267mg/g) treated group.  
 B: DSSMS (0.267mg/g) treated group.  
 Statistically significant value compared with control data by T-test  
 (\*\*: p<0.001, \*: p<0.01, †: p<0.05).  
 † Numbers rounded to one decimal place.

감소한 반면 B실험군에서는 도리어 대조군보다 증가되는 것으로 나타났고, ICR의 경우 반대로 B 실험군에서만 유의성 있는 감소 효과가 나타났다.

**(3) HDL-cholesterol의 함량**

각 실험군별 HDL-cholesterol 량의 측정 결과, SHR과 ICR 모두 A실험군에서 유의성 있게 증가하는 것으로 나타났다.

**(4) LDL-cholesterol의 함량**

각 실험군별 LDL-cholesterol 량의 측정 결과, SHR과 ICR이 서로 다른 양상을 보였다. SHR의 경우 LDL-cholesterol 량이 A실험군에서는 도리어 증가한 반면 B실험군에서는 대조군보다 유의성 있게 감소하였고, ICR의 경우 A실험군과 B실험군 모두에서 단계적으로 유의성 있게 감소하였다. 즉 SHR과 ICR 모두 B실험군에서 유의성 있는 감소 효과가 나타났다.

**(5) LDH의 함량**

각 실험군별 LDH 량의 측정 결과, SHR과 ICR

이 서로 다른 양상을 보였다. SHR의 경우 LDH 량이 A실험군에서는 도리어 증가한 반면 B실험군에서는 대조군보다 유의성 있게 감소하였고, ICR의 경우 A실험군과 B실험군 모두에서 단계적으로 감소하였다. 즉 SHR과 ICR 모두 B실험군에서 유의성 있는 감소 효과가 나타났다.

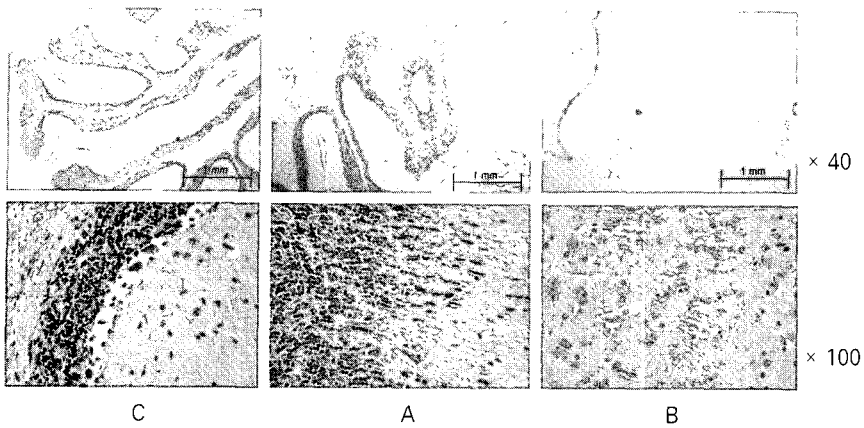
**(6) Cardiac Risk Factor(CRF)의 비교**

각 실험군별 CRF 분석 결과, SHR의 경우 A실험군과 B실험군 모두 유의성 있게 감소하였고, ICR의 경우도 두 실험군 모두 대조군보다 단계적으로 감소하였으나, SHR과 ICR 모두 A실험군보다 B실험군에서의 감소 효과가 두드러졌다.

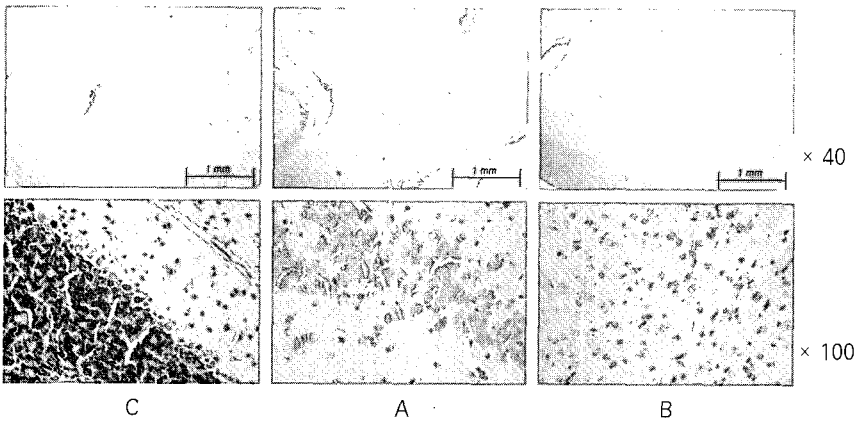
**3) 조직학적 소견**

**(1) Brain**

약물투여 후 일반적인 조직변화를 관찰하기 위해 각 실험군의 brain 조직을 광학현미경으로 검경한 결과, 생리식염수만을 투여한 대조군에서는 SHR과 ICR 모두 hematoxylin으로 강하게 염색된



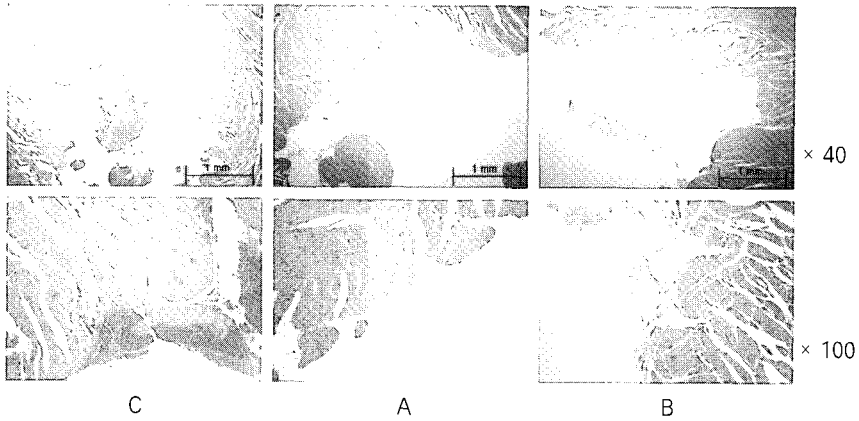
**Fig. 2.** Light micrographic appearance of brain in SHR (H&E stain).  
 C (Control): normal saline ( $320\mu\ell$ ) treated group.  
 A: DSTMT ( $0.267\text{mg/g}$ ) treated group.  
 B: DSSMS ( $0.267\text{mg/g}$ ) treated group.



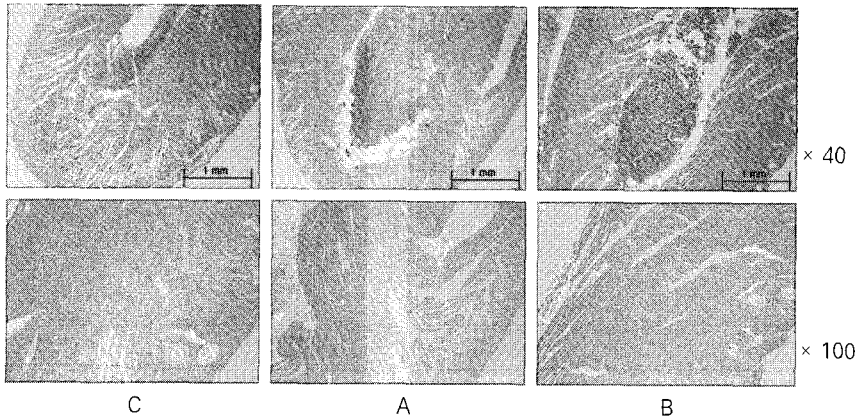
**Fig. 3.** Light micrographic appearance of brain in ICR (H&E stain).  
 C (Control): normal saline ( $80\mu\ell$ ) treated group.  
 A: DSTMT ( $0.267\text{mg/g}$ ) treated group.  
 B: DSSMS ( $0.267\text{mg/g}$ ) treated group.

핵들이 granule cell layer에서 무리를 이루면서 밀집된 상태로 monolayer와 경계를 명확히 하고 있었으나, A실험군과 B실험군에서는 핵들이 밀집되지 않고 분산되어 있는 형태를 띠며 hematoxylin에 대해 약한 염색 반응을 나타내고 있는 것으로 관찰되었다. 특히 SHR의 경우 B실험군에서의 핵

염색 정도가 A실험군보다 더 약하게 관찰되었다. 또 대조군의 경우 핵이 작고 다소 불규칙하면서 세포질 대부분에 지방질과 유사한 작은 과립들이 많이 분포하고 있는 반면, A실험군과 B실험군에서는 핵이 축소되지 않고 비교적 고른 크기를 가지면서 세포질 내에 지방질성의 작은 과립의 수



**Fig. 4.** Light micrographic appearance of heart in SHR (H&E stain).  
 C (Control): normal saline (320 $\mu$ l) treated group.  
 A: DSTMT (0.267mg/g) treated group.  
 B: DSSMS (0.267mg/g) treated group.



**Fig. 5.** Light micrographic appearance of heart in ICR (H&E stain).  
 C (Control): normal saline (80 $\mu$ l) treated group.  
 A: DSTMT (0.267mg/g) treated group.  
 B: DSSMS (0.267mg/g) treated group.

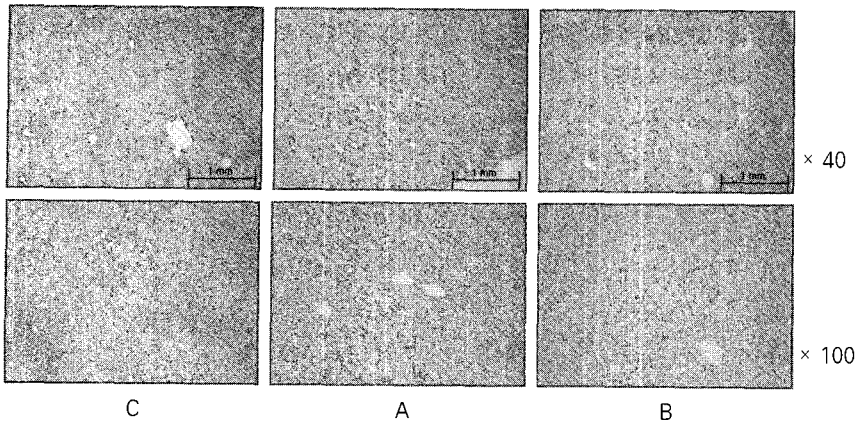
가 대조군보다 적게 관찰되었다(Fig. 2-3).

## (2) Heart

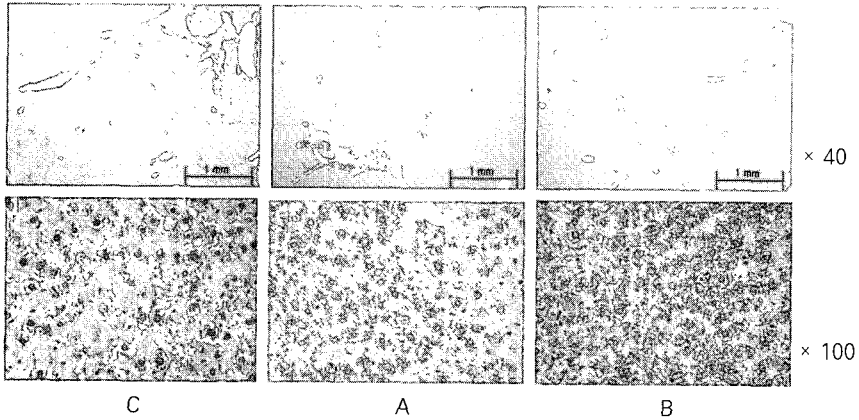
약물투여 후 일반적인 심근조직의 변화를 관찰하기 위해 각 실험군의 heart 조직을 광학현미경으로 검정한 결과, SHR과 ICR 모두 생리식염수만을 투여한 대조군보다 A실험군 및 B실험군에

서 심근 섬유 사이의 내실이 더 확장된 소견을 보였다. 특히 SHR의 경우 A실험군보다 B실험군에서의 확장이 두드러진 반면, ICR의 경우 B실험군보다 A실험군에서 내실의 확장이 더 두드러지게 나타났다(Fig. 4-5).

## (3) Liver



**Fig. 6.** Light micrographic appearance of liver in SHR (H&E stain).  
C (Control): normal saline (320 $\mu$ l) treated group.  
A: DSTMT (0.267mg/g) treated group.  
B: DSSMS (0.267mg/g) treated group.



**Fig. 7.** Light micrographic appearance of liver in ICR (H&E stain).  
C (Control): normal saline (80 $\mu$ l) treated group.  
A: DSTMT (0.267mg/g) treated group.  
B: DSSMS (0.267mg/g) treated group.

약물투여 후 일반적인 조직의 변화를 관찰하기 위해 각 실험군의 liver 조직을 광학현미경으로 검경한 결과, SHR과 ICR 모두 대조군보다 각 실험군에서 지방세포의 감소와 함께 확장된 portal vein이 관찰되었다.

SHR의 경우 대조군에서는 노란색의 무수히 많은 지방질성 과립이 산재되어 있는 상태로 관찰된

반면, A실험군과 B실험군에서는 그 수가 감소되어 있었고, 특히 B실험군에서 과립의 감소가 두드러지게 나타났다.

ICR의 경우도 대조군에서는 세포질 내에 노란색의 지방질층이 두껍고 넓게 분포된 반면, A실험군과 B실험군에서는 그 크기와 정도가 대조군보다 적게 나타났다. 특히 대조군에서는 hematoxylin

으로 강하게 염색된 핵들이 관찰되었으나, A실험군과 B실험군에서는 대조군보다 약하게 염색되어 핵 안의 핵소체들도 잘 관찰되는 편이었고, B실험군보다 A실험군에서의 염색 약화가 두드러지게 나타났다

그리고 SHR과 ICR 모두 대조군보다 각 실험군에서 확장된 portal vein이 많이 관찰되었고, 특히 B실험군에서의 확장이 두드러지게 나타났다(Fig. 6-7).

4) 산소 스트레스 후 brain 조직내 mRNA 분석 (Fig. 8)

(1) c-jun mRNA

산소 공급을 차단하여 뇌허혈을 유발한 후 brain 조직내 c-jun mRNA의 발현 정도를 비교 분석한 결과, SHR과 ICR 모두 대조군과 각 실험군 사이에 특별한 차이가 없었다.

(2) p53 mRNA

산소 공급을 차단하여 뇌허혈을 유발한 후 brain 조직내 p53 mRNA의 발현 정도를 비교 분

석한 결과, SHR과 ICR 모두 각 실험군에서 p53 mRNA의 발현이 대조군보다 상대적으로 감소된 것으로 나타났다.

SHR의 경우 A실험군과 B실험군 모두 대조군보다 p53 mRNA의 생성이 두드러지게 감소한 것으로 나타났고, ICR의 경우 A실험군보다 B실험군에서 p53 mRNA의 생성이 더 감소한 것으로 나타났다.

(3) p21 mRNA

산소 공급을 차단하여 뇌허혈을 유발한 후 brain 조직내 p21 mRNA의 발현 정도를 비교 분석한 결과, SHR과 ICR 모두 B실험군에서 p21 mRNA의 발현이 대조군보다 상대적으로 감소된 것으로 나타났다.

ICR의 경우 A실험군에서는 p21 mRNA의 발현이 오히려 더 증가한 것으로 보이나, SHR과 ICR 모두 B실험군에서는 p21 mRNA의 생성이 감소한 것으로 나타났다.

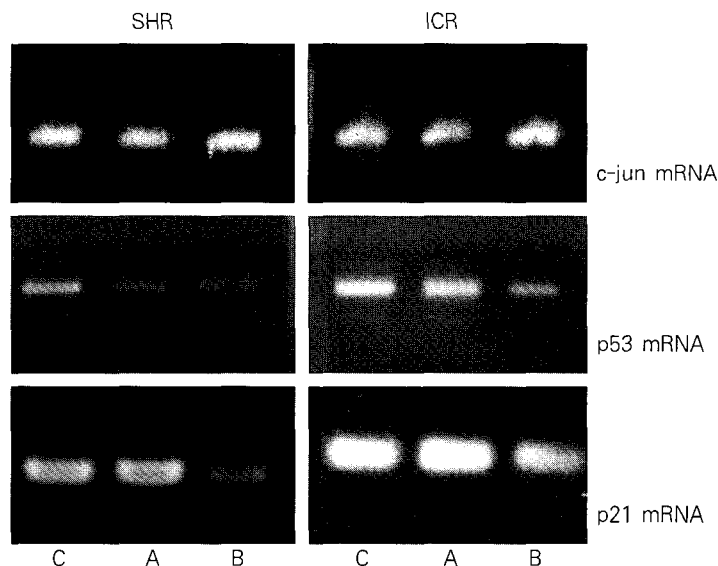
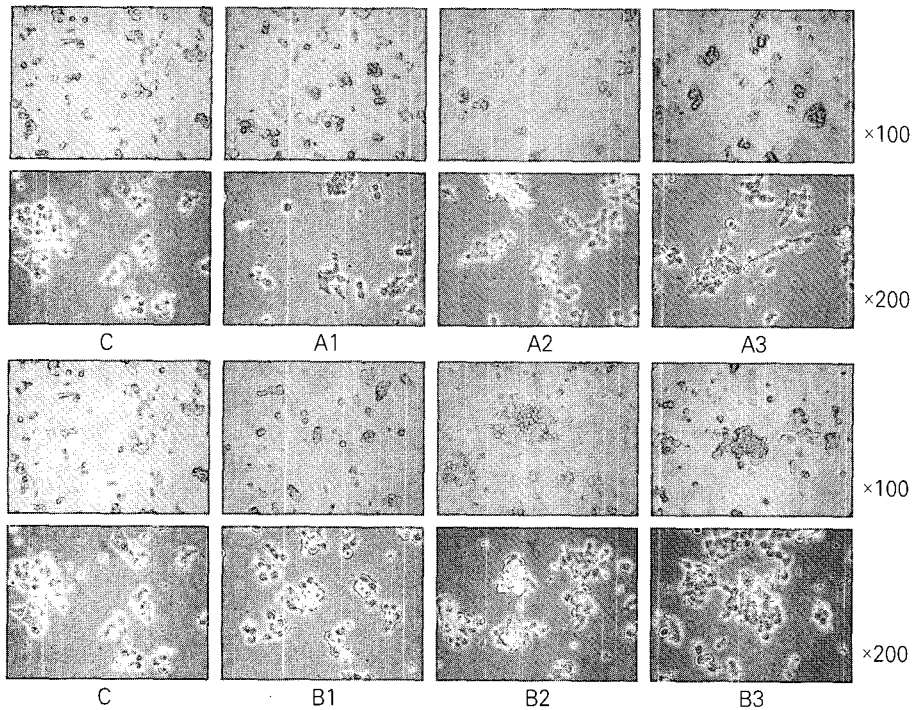


Fig. 8. Agarose gel electrophoresis pictures of c-jun mRNA, p53 mRNA, and p21 mRNA by RT-PCR (in brain tissue, after hypoxia).

C (Control): normal saline (SHR 320 $\mu$ l, ICR 80 $\mu$ l) treated group.

A: DSTMT (0.267mg/g) treated group.

B: DSSMS (0.267mg/g) treated group.



**Fig. 9.** Light micrographic appearance of hepatocellular carcinoma.  
 C (Control): normal saline (40 $\mu$ l) treated group.  
 A: DSTMT treated group.  
 B: DSSMS treated group.  
 1~3: 1mg, 2mg, 4mg (5mg/10ml, 10mg/10ml, 20mg/10ml) treated.

## 2. In vitro test

### 1) 광학현미경적 관찰

동물세포의 각 실험군에 약물을 투여하고 저산소 처리를 한 후 광학현미경으로 각 실험군들의 cell 성장패턴을 비교 분석한 결과, A실험군에서는 투여 용량의 증감에 관계없이 대조군과 뚜렷한 차이를 보이지 않은 반면, B실험군에서는 2mg의 용량을 투여했을 때부터 세포의 응집이 관찰되기 시작하여 4mg의 용량을 투여했을 때에는 더 뚜렷한 세포의 응집이 관찰되었다(Fig. 9).

### 2) Cytotoxic calcium ion의 세포내 유입 정도 분석

Confocal laser scanning microscope로 촬영한 각각의 사진은 각 실험군마다 첨가된 calcium indicator인 fluo-4(AM)가 산소 스트레스를 받은

세포내로 유입된  $Ca^{2+}$ 과 결합하여 그 농도에 비례적으로 형광을 나타내는 것을 보여준다.

대조군에서는 산소 스트레스에 의한  $Ca^{2+}$ 의 유입이 뚜렷하여 핵을 제외한 세포질 대부분이 짙은 형광을 나타내고 있는 반면, A실험군과 B실험군에서는 산소 스트레스에 의한  $Ca^{2+}$ 의 유입에 방어력을 보이면서 전체적으로 옅은 형광을 띠고 있었다. 특히 A실험군에서는 낮은 농도의 투여군에서  $Ca^{2+}$  유입에 대한 방어력이 탁월하여 1mg 투여시 가장 옅은 형광의 정도를 나타내고 있었으나, B실험군에서는 투여 약물의 농도가 높을수록  $Ca^{2+}$  유입에 대한 방어력이 증가하여 낮은 농도보다 높은 농도의 투여군에서 더 옅은 형광을 띠고 있었다(Fig. 10).

### 3) 동물세포내 apo B mRNA 분석

저산소 처리를 한 동물세포내 apo B mRNA의 발현 정도를 분석한 결과, 대조군에서는 apo B mRNA의 발현이 뚜렷한 반면, A실험군과 B실험군에서는 모두 apo B mRNA의 발현이 눈에 띄게 감소하는 양상을 관찰할 수 있었다. 특히 각 약물의 용량이 증가할수록 유전자의 발현이 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 11).

### 고 찰

고지혈증이란 일반적으로 혈청이나 혈장 중

total cholesterol 또는 triglyceride 함량이 기준 범위를 넘어 높게 증가된 상태를 말하는 것으로서 저HDL-cholesterol혈증이나 고LDL-cholesterol혈증도 이에 포함된다<sup>14)</sup>. 이러한 고지혈증은 죽상동맥경화와 같은 뇌·심혈관계 질환의 발병과 밀접한 관계가 있고, 여러 대규모 임상 보고에서 성인병으로 인한 사망률과 Coronary Heart Disease(CHD)에 의한 사망률에 직접적인 영향을 미친다고 밝혀지고 있다<sup>4)</sup>. 특히 고지혈증 환자에서는 일반적으로 통증과 같은 뚜렷한 자각 증상이 나타나지 않

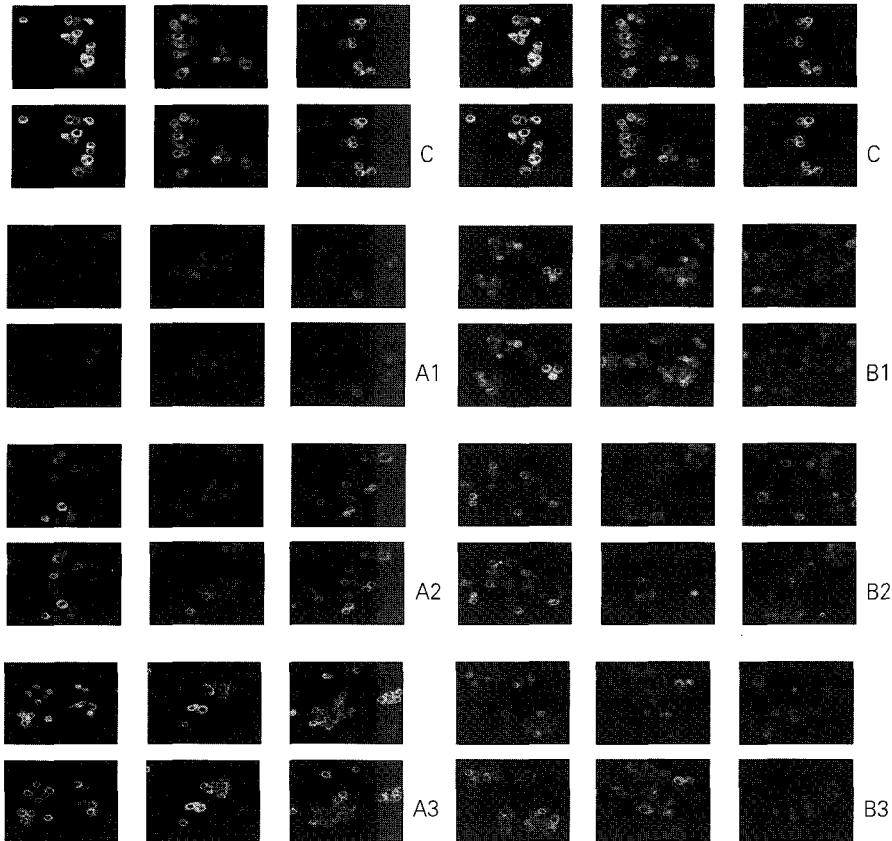


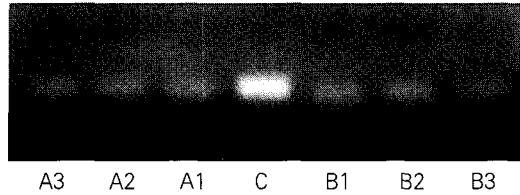
Fig. 10. Confocal laser scanning microscopic appearance of hepatocellular carcinoma. Each group reacted with fluo-4, that is calcium indicator, for an hour (90 minutes after hypoxia). Each figure shows different phases of the sample.

C (Control): normal saline (40 $\mu$ l) treated group.

A: DSTMT treated group.

B: DSSMS treated group.

1~3: 1mg, 2mg, 4mg (5mg/10ml, 10mg/10ml, 20mg/10ml) treated.



**Fig. 11.** Agarose gel electrophoresis pictures of apo B mRNA by RT-PCR (in human hepatocellular carcinoma, after hypoxia).  
C (Control): normal saline (40 $\mu$ l) treated group.  
A: DSTMT treated group.  
B: DSSMS treated group.  
1~3: 1mg, 2mg, 4mg (5mg/10ml, 10mg/10ml, 20mg/10ml) treated.

기 때문에 고혈압, 흡연과 함께 순환기 질환의 3대 위험 인자임에도 불구하고 관리 및 치료가 소홀한 것이 사실이다<sup>1,15)</sup>.

1998년에 실시된 우리나라 국민건강영양조사를 근거로 2000년 말경에 발표된 ‘한국지질·동맥경화학회’의 ‘고지혈증 치료지침제정위원회’에서 고지혈증 범위에 따르면 고cholesterol혈증 및 경계치의 수치는 각각 240/200mg/dl 이상, 고LDL-cholesterol혈증의 경우는 160/130mg/dl 이상, 저HDL-cholesterol혈증의 경우는 40mg/dl 미만, 고triglyceride혈증의 경우는 200/150mg/dl 이상으로 제시되었다<sup>16)</sup>. 혈청 및 혈장 지질의 함량이 영양 상태나 생활조건에 따라 크게 좌우된다는 점에서 이와 같이 우리나라 실정에 맞게 자체적인 역학 조사를 통하여 그 함량의 범위를 정한 것은 실로 다행한 일이다.

혈청 및 혈장 지질은 그 상태 그대로 물에 용해되지 않기 때문에 보다 소수성인 cholesterol ester와 triglyceride를 핵으로 하고, 극성을 지닌 phospholipid와 free cholesterol이 표면을 둘러싼 상태에 apoprotein이 결합된 apolipoprotein의 형태로 혈액 내를 순환한다. 고지혈증은 이러한 lipoprotein의 대사이상, 즉 생합성의 증가나 분해의 감소 등에 의하여 발생되는 것으로 알려져 있다<sup>17)</sup>.

Lipoprotein의 대사 경로로는 외인성 경로와 내인성 경로가 있다. 외인성 경로는 섭취된 지방이

소장에서 흡수되어 림프관 및 흉관에서 정맥 및 동맥계를 경유하여 간에 이르는 경로를 말한다. 그리고 내인성 경로는 간에서 합성, 분리된 Very Low Density Lipoprotein(VLDL)이 혈중에서 Low Density Lipoprotein(LDL)으로 전환되고 최종적으로 간 또는 말초 조직의 LDL 수용체에 이르는 경로를 말한다. 이러한 대사 과정에 문제가 생기면 혈중 지질 함량이 높아지면서 동맥 혈관 내벽을 따라 지질이 두껍게 쌓이게 되는 동맥경화증을 초래하게 되며, 더 나아가 심근경색, 뇌졸중 등과 같은 각종 혈관 질환을 유발하게 된다<sup>17-19)</sup>.

고지혈증에 있어 이와 같은 혈중 lipoprotein 중 HDL-cholesterol 및 LDL-cholesterol의 함량은 매우 중요한 의의를 가지고 있는데, HDL-cholesterol의 함량은 관상동맥질환을 비롯한 동맥경화성 질환의 이환률과 역상관 관계를 나타내며, 이는 항동맥경화 작용을 지닌 lipoprotein인 HDL이 말초 조직에 축적되어 있는 과잉된 cholesterol을 끌어내어 결합한 뒤 간으로 운반 처리하는 동맥경화 방어기전의 경로에 관여하기 때문이다. 이와 반대로 혈중 LDL-cholesterol의 수치와 심혈관 질환에 의한 사망률 사이에는 정비례 관계가 성립되는데, 이를 이용하여 혈중 LDL-cholesterol의 수치를 낮추면 동맥경화가 예방되거나 기존의 동맥경화의 진행을 지연시킬 수 있다는 사실이 밝혀지면서 최근에는 관상동맥질환의 1차 또는 2차 예방으로서



LDL-cholesterol의 수치를 낮추는 고지혈증 치료가 중요시되고 있다<sup>20)</sup>.

최근 고지혈증의 원인을 유전적 요인으로 설명하는 연구가 분자생물학의 발전으로 활발하게 진행되고 있으며, 특히 특정 유전자의 발현 또는 변이가 고지혈증 발병 위험도의 증가와 관련되어 있는 것으로 보고되고 있다<sup>21)</sup>. Lipoprotein의 내인성 경로에서 중요한 역할을 차지하는 apolipoprotein 중 low density apolipoprotein인 apo B48과 apo B100은 각각의 apo B 수용체와의 결합을 통해 혈중 cholesterol의 농도를 증가시키는 원초적 lipoprotein으로 알려져 있다. 이들의 생성과 합성에 중요한 역할을 담당하는 유전자가 바로 apo B mRNA이다. 즉 이 apo B mRNA의 발현 정도를 분석함으로써 향후 고지혈증의 유발 가능성에 대해 추론이 가능하다<sup>22-24)</sup>.

이러한 유전자를 분석하는 기술이 바로 RT-PCR (Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction)인데, 이는 미세한 유전자의 발현을 감지하는 가장 최근의 분석 방법으로서 이전의 Western Blot 분석이나 ELISA, 연속절편검사, 면역화학염색법 등과 달리 적은 수의 유전자 발현도 민감하게 알아낼 수 있다는 장점이 있다. 이 방법은 100만개의 정상 유전자 중 1개의 비정상적인 유전자만 있어도 이를 발견할 수 있는 매우 민감한 유전자 검사 방법으로 각 유전자의 primer 염기 서열에 따라 각각의 유전자 발현을 시각적으로 분석할 수 있다<sup>25,26)</sup>.

높은 농도의 혈중 지질이 각 장기 및 조직에 오랫동안 침착되면 정상적인 조직 대사가 장애를 받으면서 외부환경에 대한 세포의 대응력도 저하될 수 있다. 특히 Lactate Dehydrogenase(LDH)는 간, 심장, 뇌, 근육, 골격, 신장, 적혈구 등에 많이 분포하면서 당분해 과정에 마지막으로 작용하는 중요한 효소 중 하나로서 각 장기에 염증이 나타나거나 기능 장애가 발생시 그 수치가 증가하는 특징을 나타낸다. 그러므로 LDH 수치는 고지혈증 검사시 혈중 지질이 심장, 간, 뇌 등의 장기에 미치

는 영향을 평가하는 도구로서 널리 이용되고 있다<sup>27)</sup>.

장시간 높은 농도의 혈중 지질에 노출될 경우 비만의 유발과 함께 외부 환경의 특정 스트레스에 의한 조직과 세포 손상에도 영향을 미칠 수 있다. 흔히 세포 손상을 유발하는 외부 요인으로 산소 스트레스를 들 수 있는데 이 외에도 온도, 물리적 스트레스 등 다양한 외부 요인에 의해 세포 손상 정도가 서로 다르게 나타날 수 있다. 그 중 산소 스트레스는 세포의 성장과 사멸에 심각하고도 직접적인 영향을 미치며, 산소 스트레스를 받은 정상적인 세포는 서로 응집하면서 외부 환경에 대해 방어력을 구사하려고 하나 고지질에 장시간 노출된 세포의 경우 이와 같은 능력이 저하 또는 상실되는 것으로 보고되고 있다<sup>28)</sup>.

특히 세포의 성장과 사멸에 관여하는 여러 유전자의 작용 기전을 살펴보면, 특정 스트레스에 의한 세포 손상시 각 세포의 성장 주기마다 작용하는 특정 유전자의 발현에 의해 DNA의 합성이 중단되거나, DNA 손상시 특정 유전자의 발현이 증가하게 된다. 그 중 p53 유전자는 tumor suppressor protein으로서 DNA가 손상을 받을 때 세포의 성장을 억제하거나 자연스러운 세포사를 유도하는 역할을 담당하며, 저산소 환경에서도 활성화되어 apoptosis를 일으키는 매개가 되는 유전자로 알려져 있다. 이 p53 유전자의 발현은 c-jun mRNA에 의해 조절되는 것으로 알려져 있으며, 이 p53 mRNA에 의해 p21 유전자도 발현이 촉진되어 세포의 성장을 억제하고 자연스러운 세포사멸을 유도하는 것으로 알려져 있다<sup>29,30)</sup>.

p53은 DNA 손상 후 세포의 G1기의 check point에 주로 작용하여 세포 성장의 정지를 유도하는 신호 전달계에서 중심적 역할을 하며, 세포 주기에 참여하는 다양한 세포내 유전자의 발현을 유도하게 된다. p21은 wild type p53에 의해 활성화되거나 독자적으로 활성화되는 유전자 산물로서 cyclin-dependent kinase와 결합하여 Rb 단백질의 인산화를 억제함으로써 세포가 G1기에서 S기로

성장하지 못하게 억제하는 강력한 tumor suppressor protein이다<sup>31)</sup>. 즉 RT-PCR을 통해 세포내에서 p21, p53, c-jun 유전자가 많이 검출되는 것을 확인한다면 이는 외부 스트레스에 의한 자연스러운 세포 피사가 많이 이루어졌다는 것을 시사한다고 할 수 있다.

이외에도 세포 손상시 과량의  $\text{Na}^+$ 과  $\text{Ca}^{2+}$ 이 세포내로 유입되어 세포가 팽창되고 세포내 각종 효소가 활성화되어 결과적으로 흥분성 세포독성이 발생하게 되는데, 이 중 세포내로 유입된  $\text{Ca}^{2+}$ 은 다양한 종류의 protein kinase를 활성화시킴으로써 세포독성을 유발하는 중요한 신호전달물질로 알려져 있다<sup>32)</sup>. 특히 허혈성 뇌손상에서 신경세포 손상의 초기 시작은 세포내로 유입된 과량의 cytotoxic  $\text{Ca}^{2+}$ 이 nitric oxide synthase를 활성화시키고 NO의 발생을 유발하여 생체내 Reactive Nitrogen Species(RNS)를 유도하는데서 비롯된다. 이 과정 중 mitochondria에서 증가된  $\text{Ca}^{2+}$ 은 에너지 대사 과정의 oxidative phosphorylation을 uncoupling시킴으로써 에너지 공급을 감소시켜 free radical의 생성을 증가시킴으로 인해 결국 DNA 및 세포막의 손상을 유발하게 된다. 즉  $\text{Ca}^{2+}$ 은 뇌허혈 주변에서 관찰되는 지연성 세포사를 유도하는데 매우 중요한 역할을 담당하고 있어 세포내로 유입된  $\text{Ca}^{2+}$ 의 농도를 측정한다면 얼마나 더 진행된 세포사가 이루어졌는지 가능할 수 있다<sup>33-35)</sup>.

최근 이러한  $\text{Ca}^{2+}$ 의 농도를 측정하던 이전의 ion capture cytochemistry나 PIXE 방법과 달리 Confocal Laser Scanning Microscope(CLSM)를 이용하여 비교적 간단하면서도 경제적으로 세포내 calcium ion의 변화를 시작적으로 분석할 수 있는 방법이 개발되었다. CLSM은 confocal의 원리를 현미경에 도입하여 세포의 미세구조 관찰을 가능하게 하였으며, 일반현미경이나 전자현미경에서 관찰할 때 발생하는 image의 변화 없이 삼차원 영상과 실시간 분석이 가능하다는 장점이 있다. 그리고 형광물질을 이용하여 생체 내에서 특

정 물질의 분포를 관찰하거나, 살아있는 세포 내에서의 물질 이동을 실시간으로 관찰할 때 매우 유용한 기술이다<sup>36,37)</sup>.

CLSM의 원리는 optical axis에 pinhole을 설치하여 point source로부터 나오는 광원이 시료를 통과하거나, 시료에서 반사되는 광선 중 초점 영역에서 일치되는 광선만이 pinhole을 통과할 수 있게 함으로써 해상력을 극대화시키는 기술로, 형광 염색을 통해 표지된 분자 및 구조물을 컴퓨터로 조절되는 초점위치에 따라 광학적인 절편영상으로 나타내어 물리적인 절편제작과정에서 발생하는 간섭현상을 제거할 수 있으며, 여러 장의 2차원 image로부터 3차원 image까지 재구성이 가능하다는 장점을 가지고 있다. 그러나 pinhole을 통과하여 상을 형성하는 과정에서 대부분의 광원이 소모되기 때문에 시료 자체가 상당한 형광을 발해야 한다는 단점이 있다. 그러므로 이러한 어려움을 해결하기 위해 laser를 사용하게 되었고 시료 전체를 scanning하는 시간을 단축시키기 위해 FITC나 rhodamine, fluo-3, fluo-4와 같은 다양한 형태의 형광염색물질이 개발되어 세포내 calcium ion의 농도나  $\text{H}_2\text{O}_2$ , pH의 변화 등을 살아있는 세포에서 직접 측정할 수 있게 되었다<sup>36,37)</sup>.

한의학에서 고지혈증을 언급한 문헌을 찾아보면, 〈素問·通評虛實論〉<sup>38)</sup>에 ‘風治消癰 仆擊 偏枯痰厥 氣滿發逆 肥貴人則 膏粱之疾’이라 하여 기름진 음식으로 인한 비만을 말하였고, 朱<sup>39)</sup>는 ‘肥人氣虛生痰 寒生濕 濕生痰 故肥多寒濕’이라 하고, 李<sup>40)</sup>는 ‘人肥必氣結而肺鬱 肺金克肝木 故痰盛’이라 하여痰과 비만과의 관계를 말하였다. 〈東醫寶鑑〉<sup>41)</sup>에서도 ‘肥則腠理緻密而 多鬱滯氣血 難而通利 故多卒中也’라 하여 기름진 음식과 비만, 濕痰 등이 현대의 고지혈증과 깊은 관련이 있는 것으로 보고 있다. 또 〈素問·奇病論〉<sup>38)</sup>에서는 ‘人必數食甘味而多肥也 肥者令人多熱’이라 하였고 〈素問·異法方宜論〉<sup>38)</sup>에서는 ‘其民華食而脂肥’라 하였는데, 이를 종합해보면 고지혈증을痰濁이

나 痰熱, 더 나아가 瘀血로 辨證할 수 있다.

病因으로서의 痰은 인체의 수액이 체내에서의 運化輸送 기능이 실조되어 인체 여러 부위에 저류되어 나타나는 일종의 병리 산물로서 瘀血과 더불어 허혈성 혈관질환의 중요한 인자로 작용하고 있다. 그러므로 한의학적으로 고지혈증을 치료하는데 있어 먼저 利濕化痰, 活血化瘀시키는 데 목적을 두고, 개개인의 체내 상태에 따라 적절히 滋補肝腎, 調理脾胃하는 扶正祛邪의 治法이 바람직하다고 사료된다.

본 연구에 사용된 丹蔘通脈湯과 丹蔘生脈散은 모두 活血祛瘀의 효과가 있는 丹蔘을 君藥으로 하여 구성된 처방으로서 丹蔘通脈湯은 鷄血藤, 玄蔘, 甘草, 當歸와 함께 活血通絡시키는 데에 주안점을 두었고, 丹蔘生脈散은 人蔘, 麥門冬, 五味子로 구성된 生脈散에 生地黃, 山茱萸를 가하여 보다 益氣生津시키는 데에 주안점을 둔 처방이다. 이와 같이 活血通絡의 효과가 강한 丹蔘通脈湯과 活血化瘀하면서 益氣生津의 효과가 加味된 丹蔘生脈散을 시료로 이용하여 고지혈증과 뇌손상 및 세포손상과 관련된 이후의 실험을 진행하면서 두 약물을 서로 비교 분석하여 보다 더 유의성 있고 안전한 형태의 항고지혈 및 뇌보호 약물을 개발하고자 하였다.

먼저 *in vivo test*에서는 고혈압이 유발된 SHR과 정상 ICR을 대상으로 고지방사료를 일정 기간 동안 먹여 고지혈증을 유발시키고 동시에 위의 약물을 추출하여 조제한 일정량의 검액을 丹蔘通脈湯투여군(이하 A실험군)과 丹蔘生脈散투여군(이하 B실험군)으로 각각 나누어 3주간 투여한 후 각 투여군별로 혈장, 조직, 유전자 분석 등을 실시하였다. 실험 대상으로 SHR과 ICR을 동시에 선택한 이유는 고혈압이 직간접적으로 고지혈증에 영향을 미칠 수 있다는 개연성을 바탕으로 고려한 것이다.

3주간의 약물 투여 후 먼저, 실험 개시일과 종료일의 체중을 측정하여 체중 증가 정도를 비교

분석하였고, 혈장내 total cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, LDH 등을 측정하여 대조군과 비교함으로써 어느 투여군이 고지혈증의 유발 억제에 더 유의한 효과를 보이는지 분석하였다. 그리고 brain, heart, liver를 적출하여 각 조직을 현미경으로 관찰함으로써 각 투여군이 대조군에 비해 고지혈증으로 인한 조직의 변성을 얼마나 억제하였는지 육안적으로 확인하였다. 그리고 실험동물을 처사 전에 경동맥을 결찰하는 방법으로 뇌허혈을 유발하여 산소 스트레스에 의한 뇌조직의 손상 정도를 RT-PCR 방법을 통해 c-jun mRNA, p53 mRNA, p21 mRNA의 발현 정도를 분석함으로써 어느 투여군이 보다 효과적으로 뇌조직을 보호하는지에 대한 실험도 진행하였다<sup>42)</sup>.

다음으로 *in vitro test*에서는 Human Hepatocellular Carcinoma를 배양하여 각 실험군별로 위의 검액을 1mg, 2mg, 4mg씩 투여하고 저산소 처리를 한 후 현미경적 관찰, Ca<sup>2+</sup> 유입 정도 측정, 유전자 분석 등을 실시하였다. 실험 대상으로 Human Hepatocellular Carcinoma를 선택한 이유는 이 동물세포가 인체의 장기 중 간에서 유래한 세포이면서 생장 속도가 빨라 각종 지방대사 및 hormone대사를 주관하는 인체의 간세포와 가장 유사하여 본 실험에 유용할 것으로 판단되었기 때문이다<sup>43)</sup>.

배양 세포에 약물을 투여하고 24시간 뒤에 약 1시간 30분 동안 암소에 방치함으로써 저산소 처리를 한 후, 광학 현미경으로 각 투여군별 세포의 응집 정도를 비교함으로써 어느 투여군이 산소 스트레스에 대해 더 많은 내항력을 가지는지 비교 분석하였다. 그리고 calcium indicator인 fluo-4(AM)를 처리한 후 confocal laser scanning microscope로 관찰하여 Ca<sup>2+</sup>의 유입 정도를 분석함으로써 세포 손상에 대해 보다 효과적인 억제력을 보인 실험군을 시각적으로 확인하였다. 그리고 각 투여군별로 RT-PCR을 통한 apo B mRNA의 발현 정도를 분석함으로써 어느 실험군이 보다 효과적으로 지방대사를 억제하는지에 대한 실험까지 실시하

였다<sup>44)</sup>.

먼저 *in vivo test*에서 3주간의 체중 변화를 살펴보면, SHR의 경우 대조군은 68.7g 증가한데 비하여 A실험군은 64.0g, B실험군은 57.7g 증가하였으며, ICR의 경우 대조군은 15.8g 증가한데 비하여 A실험군은 12.6g, B실험군은 14.2g 증가한 것으로 나타나 각 실험군별 체중변화가 모두 대조군보다 적게 증가한 것으로 나타났으나, SHR의 경우 B실험군에서 체중 증가가 적게 나타난 반면, ICR의 경우 A실험군에서 체중 증가가 보다 적게 나타나 서로 다른 양상을 보였다. 이와 같은 결과로 미루어 보아 고혈압이 먼저 유발된 실험군에서는 丹蔘生脈散이 체중 증가 억제에 보다 효과적이었고, 고혈압이 유발되지 않았던 실험군에서는 丹蔘通脈湯이 보다 효과적인 체중 증가 억제력을 가지고 있는 것으로 사료된다.

혈장 성분 중 먼저 total cholesterol의 함량을 살펴보면, SHR의 경우 대조군은 84mg/dl, A실험군은 85mg/dl인데 비하여 B실험군은 75mg/dl로 감소하였고, ICR의 경우 대조군은 196mg/dl, A실험군은 194mg/dl인데 비하여 B실험군은 170mg/dl로 감소한 것으로 나타나 SHR과 ICR의 경우 모두 B실험군에서 total cholesterol의 농도가 유의성 있게 감소한 것으로 나타났다. 이는 丹蔘生脈散이 丹蔘通脈湯보다 고혈압이 유발된 실험군과 그렇지 않은 실험군 모두의 경우에서 total cholesterol의 수치를 낮추는 데 보다 더 뛰어난 효과를 가지고 있는 것으로 사료된다.

Triglyceride의 함량 측정 결과 좀 더 복잡한 양상의 결과가 도출되었는데, SHR의 경우 대조군은 130mg/dl인데 비하여 A실험군은 83mg/dl로 감소하였으나 B실험군은 도리어 162mg/dl로 증가한 것으로 나타났고, ICR의 경우 대조군은 130mg/dl, A실험군은 126mg/dl인데 비하여 B실험군은 93mg/dl로 나타나 SHR의 경우 A실험군에서 triglyceride의 농도가 유의성 있게 감소한 것으로 나타난 반면, ICR의 경우 B실험군에서 보다 더 유의성 있

는 감소 효과가 나타나 서로 다른 양상을 보였다. 이와 같은 결과로 미루어 보아 고혈압이 유발된 실험군에서는 丹蔘通脈湯이 triglyceride의 감소에 보다 효과적인 반면, 고혈압이 유발되지 않은 실험군에서는 丹蔘生脈散이 보다 효과적으로 triglyceride를 감소시키는 것으로 사료된다.

다음으로 HDL-cholesterol의 함량을 살펴보면, SHR의 경우 대조군은 33.3mg/dl, B실험군은 32.3mg/dl인데 비하여 A실험군은 34.8mg/dl로 증가한 것으로 나타났으며, ICR의 경우 대조군은 104.4mg/dl, B실험군은 96.6mg/dl인데 비하여 A실험군은 106.3mg/dl로 나타나 SHR과 ICR의 경우 모두 A실험군에서 HDL-cholesterol의 농도가 유의성 있게 증가한 것으로 나타났다. 이는 丹蔘通脈湯이 丹蔘生脈散보다 고혈압을 유발한 실험군과 그렇지 않은 실험군 모두의 경우에서 HDL-cholesterol의 수치를 높이는 데 보다 긍정적인 효과가 있는 것으로 사료된다.

LDL-cholesterol의 함량을 측정한 결과, SHR의 경우 대조군은 18mg/dl인데 비하여 B실험군은 13mg/dl로 감소하였으나 A실험군은 23mg/dl로 증가한 것으로 나타났고, ICR의 경우 대조군은 19mg/dl인데 비하여 A실험군은 14mg/dl, B실험군은 11mg/dl로 두 실험군 모두 감소한 것으로 나타나 SHR과 ICR의 경우 모두 B실험군에서 LDL-cholesterol의 농도가 유의성 있게 감소한 것으로 나타났다. 이는 丹蔘生脈散이 丹蔘通脈湯보다 고혈압이 유발된 실험군과 그렇지 않은 실험군 모두의 경우에서 LDL-cholesterol의 수치를 낮추는 데 보다 더 뛰어난 효과가 있다는 것을 의미한다고 사료된다.

다음으로 혈중 LDH의 함량을 측정한 결과, SHR의 경우 대조군은 25IU/L인데 비하여 B실험군은 10IU/L로 감소하였으나 A실험군은 도리어 34IU/L로 증가한 것으로 나타났고, ICR의 경우 대조군은 66IU/L인데 비하여 A실험군은 63IU/L, B실험군은 55IU/L로 두 실험군 모두 감소한 것으로 나타나 SHR과 ICR의 경우 모두 B실험군에서

LDH의 농도가 유의성 있게 감소한 것으로 나타났다. 이와 같이 B실험군의 LDH 수치가 낮게 측정되었다는 것은 丹蔘生脈散이 丹蔘通脈湯보다 고혈압이 유발된 실험군과 그렇지 않은 실험군 모두의 경우에서 조직 손상에 대한 보호 효과가 크다는 것을 의미한다고 사료된다.

이와 같은 결과를 바탕으로 Hitachi 7600-010이 산정한 Cardiac Risk Factor(CRF)의 위험 요인 개수를 분석한 바, SHR의 경우 대조군이 5개인데 비하여 A실험군은 3개, B실험군은 2개로 나타났고, ICR의 경우 대조군이 4개인데 비하여 A실험군은 3개, B실험군은 1개로 나타나 SHR과 ICR에서 두 실험군 모두 대조군에 비해 상대적으로 CRF의 개수가 적게 나타났으며, 특히 B실험군의 위험 요인이 A실험군보다 훨씬 적은 것으로 나타났다. 이 CRF 수치가 5를 넘어서게 되면 심혈관 질환의 발생 가능성이 아주 높은 것을 의미하는데, 이와 같은 결과로 미루어 보아 丹蔘生脈散이 丹蔘通脈湯보다 심혈관질환의 발생 가능성을 낮추는데 보다 효과적이라고 사료된다.

이를 종합해보건대 고지혈증에 대한 효과면에 있어 丹蔘生脈散투여군이 HDL-cholesterol을 제외한 모든 항목에서 丹蔘通脈湯투여군보다 우위를 나타냈으며, 특히 뇌혈관질환 및 심혈관질환의 중요한 위험 인자인 total cholesterol과 LDL-cholesterol 및 LDH의 함량을 유의성 있게 감소시킴으로써 항고지혈 약물로서의 가능성을 충분히 보여주었다고 사료된다.

계속해서 3주간의 약물 투여 후의 조직 변화를 현미경을 통해 관찰함으로써 고지방식이로 유발된 각 조직의 변성 정도를 비교 분석하였다. 이 관찰 실험에는 각 실험동물의 brain, heart, liver 조직을 선택하였는데, 이는 고지혈증이 뇌혈관질환 및 심혈관질환과 밀접한 관련이 있기 때문이며, 또한 간에 미치는 영향을 육안적으로 살펴보아 각 약물의 안정성에 대한 검증도 아울러 검토해보기 위해서다.

먼저 각 실험군별로 brain 조직을 광학 현미경으로 관찰한 결과, SHR과 ICR 모두 대조군은 강하게 염색된 핵들이 작고 불규칙한 형태로 광범위하게 무리를 이루면서 밀집되어 있고 세포질 내부에는 지방질성의 작은 과립이 많이 분포하고 있는 반면, A실험군과 B실험군에서는 대조군보다 약하게 염색된 핵들이 크고 고른 형태를 유지하면서 밀집되지 않고 널리 분포하면서 지방질성의 작은 과립도 적게 관찰되었다. 특히 SHR의 경우 B실험군이 A실험군보다 염색 정도가 훨씬 약하였고, 핵의 크기도 보다 크고 고른 형태였다. 이는 지방변성으로 인한 조직의 변성이 대조군에서는 훨씬 더 진행되어 세포가 많이 노화되어 있는 반면, 각 실험군들은 조직 변성이 덜하고 세포가 젊다는 것을 의미한다. 특히 B실험군의 조직 세포가 젊다는 것은 그만큼 丹蔘生脈散이 고지방식에 대해서 뇌세포 손상에 대한 보호 효과가 크다는 것을 의미한다고 볼 수 있다.

Heart에 대한 조직 검사 결과, SHR과 ICR 모두 대조군의 심근 조직은 수축된 형태로 긴장을 유지하고 있는 반면, A실험군과 B실험군은 심근 조직이 완화된 상태로 내실의 확장이 두드러지게 관찰되었다. 이는 丹蔘通脈湯과 丹蔘生脈散이 심근을 이완시키고 동시에 심혈관도 이완시켜 심혈관질환에 의한 심근 손상을 미연에 방지하는 작용이 있다는 것을 시사해주는 소견이라 생각된다.

마지막으로 liver에 대한 조직 검사를 시행한 결과, SHR과 ICR 모두 대조군의 경우 무수히 많은 노란색의 지방질성 과립이 산재되거나 두껍게 분포되면서 핵이 진하게 염색된 반면, A실험군과 B실험군의 경우 지방질성 과립의 수가 많이 감소하고 핵의 염색 정도도 약하게 관찰되었다. 특히 B실험군에서 A실험군보다 과립의 감소와 핵의 염색 약화가 두드러지게 관찰되었다. 이를 통해 고지방식으로 인해 간조직에 지방이 침착되는 것을 丹蔘通脈湯과 丹蔘生脈散이 효과적으로 억제한다고 볼 수 있으며, 간세포의 노화 억제 및 세

포 손상에 대한 보호 효과도 긍정적으로 보여줌에 따라 간에 미치는 약물의 영향이 안전하다는 것을 시사해 주는 소견이라 사료된다.

지금까지 각 약물의 투여군별 조직 검사를 종합해 본 결과, 丹蔘通脈湯과 丹蔘生脈散 모두 각 조직 세포의 노화 방지 및 지방 변성 억제에 일정한 효과가 있는 것으로 관찰되었고, 특히 丹蔘生脈散이 丹蔘通脈湯보다 세포 손상에 대한 보호 효과가 뛰어나다는 사실이 확인되었다.

In vivo test의 마지막 실험으로 뇌허혈을 유발한 실험동물의 brain 조직에서 세포괴사와 관련된 c-jun, p53, p21 유전자를 순서대로 RT-PCR을 통해 검출해 보았다. 이 유전자를 선택한 이유는 앞서 언급했듯이 세포사를 유도하는 p53 유전자와 이의 발현을 유도하는 c-jun 유전자, 그리고 p53 유전자에 의해 발현되어 역시 세포사를 유도하는 p21 유전자의 생성 정도를 각 약물 투여군끼리 비교해봄으로써 어느 약물이 더 효과적으로 세포사를 억제하는지에 대해 검토해 보기 위해서다.

먼저 c-jun mRNA의 경우 SHR과 ICR 모두 대조군과 각 실험군 사이에 특별한 차이 없이 c-jun 유전자의 발현이 강하게 나타났다. 다음으로 p53 mRNA의 경우 SHR과 ICR 모두 각 실험군에서 p53 유전자의 발현이 대조군보다 상대적으로 감소한 것으로 나타났으며, 특히 SHR의 경우 A실험군과 B실험군 모두에서 대조군보다 p53 유전자의 생성이 두드러지게 감소한 것으로 나타난 반면, ICR의 경우 A실험군보다 B실험군에서 p53 유전자의 생성이 더 눈에 띄게 감소한 것으로 나타났다. 마지막으로 p21 mRNA의 경우 SHR과 ICR 모두 B실험군에서만 p21 유전자의 발현이 대조군보다 상대적으로 적게 나타났다. 이와 같은 유전자 검출 결과를 종합해보건대 丹蔘通脈湯과 丹蔘生脈散 모두 c-jun mRNA의 생성 억제보다는 p53 mRNA의 생성을 억제함으로써 뇌조직의 허혈성 세포 괴사를 방지하는 것으로 보여지며, 특히 丹蔘生脈散은 p21 mRNA의 억제에도 관여하

여 丹蔘通脈湯보다 더 효과적인 뇌세포 손상 억제 효과를 발휘하는 것으로 생각된다.

다음으로 *in vitro test*에서 약물을 투여하고 산소 스트레스를 유발한 후 각 투여군별로 광학현미경을 통해 cell을 관찰한 결과, A실험군에서는 투여 용량과 관계없이 대조군과 뚜렷한 차이를 보이지 않은 반면, B실험군에서는 2mg의 용량을 투여했을 때부터 세포의 응집이 관찰되기 시작하여 4mg의 용량을 투여했을 때에는 더 뚜렷한 세포 응집 현상이 관찰되었다. 세포의 응집은 왕성한 cell의 분열 및 생장이 반영된 상태로 이는 B실험군의 투여 용량이 증가할수록 저산소에 대한 세포의 방어력이 대조군이나 A실험군에 비해 상대적으로 증가하는 것을 의미하는 것으로서 丹蔘生脈散이 저산소 처리에 의한 세포손상 유발 실험에서 유의성 있는 보호 효과를 나타낸 것으로 사료된다.

산소 스트레스로 세포손상을 유도한 후 각 투여군별 cell의 손상 정도를 파악하기 위해  $Ca^{2+}$ 의 유입 정도를 confocal laser scanning microscope로 형광 관찰한 결과, 대조군에서는  $Ca^{2+}$ 의 유입이 뚜렷하여 짙은 형광을 나타내고 있는 반면, A실험군에서는 낮은 농도의 투여군에서  $Ca^{2+}$ 의 유입 차단 효과를 뚜렷하게 나타내 형광의 염색 정도가 두드러지게 약화되어 나타났고, B실험군에서는 높은 농도의 투여군에서  $Ca^{2+}$ 의 유입 차단이 보다 효과적으로 나타나 형광이 열게 나타나는 양상을 보였다. 이는 丹蔘通脈湯의 경우 저농도에서 세포 손상 억제가 보다 효과적으로 나타나며, 丹蔘生脈散의 경우 고농도에서 세포 손상에 대한 보다 효과적인 보호 작용이 발휘된다는 것을 시사해 주는 실험 결과라 할 수 있다.

마지막으로 역시 저산소 처리를 한 동물세포내 apo B mRNA의 발현 정도를 분석한 결과, 대조군에서는 apo B mRNA의 발현이 뚜렷하게 나타난 반면, A실험군과 B실험군 모두에서 apo B mRNA의 발현이 눈에 띄게 감소하는 양상을 관찰할 수 있었다. 특히 각 약물의 용량이 증가할수

록 유전자의 발현이 감소하는 것으로 나타났는데, 이는 丹蔘通脈湯과 丹蔘生脈散 모두 지질대사 중 cholesterol의 생성에 관여하는 key regulator인 apo B mRNA의 생성 과정을 효과적으로 차단함으로써 항고지혈 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

이상의 실험 결과 丹蔘通脈湯과 丹蔘生脈散은 고지혈증을 개선시키는 데에 뚜렷한 효과가 있으며, 더 나아가 뇌손상 및 세포 손상에 대한 보호력도 뛰어나다는 사실이 입증되었다. 특히 丹蔘生脈散은 혈중 total cholesterol 및 LDL-cholesterol, LDH의 수치를 효과적으로 저하시키면서, 무엇보다도 고지방식이에 의한 지방변성 억제 및 저산소에 의한 세포 손상 억제에 모두 뛰어난 효과와 안정성을 보임에 따라 항고지혈 및 뇌보호 약물로서 활용 가치가 높을 것으로 생각되며, 향후 이에 대한 지속적인 보충 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 결 론

In vivo test에서 체중의 변화, 혈장 성분 함량의 측정, 일반조직검사 및 RT-PCR을 이용한 유전자 분석 등을 시행하고, in vitro test에서 현미경적 세포검사, 형광 염색을 통한 Ca<sup>2+</sup> 유입량 분석 및 유전자 검출 등을 시행하여 丹蔘通脈湯과 丹蔘生脈散의 항고지혈 효과 및 hypoxia로 유발된 뇌손상 및 세포손상에 대한 보호 효과를 살펴본 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 丹蔘通脈湯은 SHR에서 triglyceride의 함량을 유의성 있게 감소시키고, HDL-cholesterol의 함량을 유의성 있게 증가시킴과 동시에, ICR에서 체중의 증가를 억제하면서 LDL-cholesterol의 함량을 유의성 있게 감소시키고 HDL-cholesterol의 함량을 유의성 있게 증가시켰다.

2. 丹蔘生脈散은 SHR에서 체중의 변화 및 total cholesterol, LDL-cholesterol, LDH, Cardiac Risk Factor(CRF) 등을 유의성 있게 감소시킴과 동시에, ICR에서도 total cholesterol, triglyceride, LDL-

cholesterol, LDH, CRF 등을 유의성 있게 감소시켰다.

3. 丹蔘通脈湯과 丹蔘生脈散 모두 각 조직의 세포 손상 및 지방변성에 대해 일정한 억제 효과를 나타냈다.

4. 丹蔘通脈湯은 뇌허혈시 p53 mRNA의 발현만을 억제한 반면, 丹蔘生脈散은 p53 mRNA와 p21 mRNA의 발현을 동시에 억제하였다.

5. 丹蔘生脈散은 hypoxia 유발시 고농도에서 더 강한 세포 응집력을 나타냈다.

6. 丹蔘通脈湯은 저농도에서 Ca<sup>2+</sup>의 유입을 차단한 반면, 丹蔘生脈散은 고농도에서 Ca<sup>2+</sup>의 유입을 차단하였다.

7. 丹蔘通脈湯과 丹蔘生脈散 모두 apo B mRNA의 생성을 억제하였다.

이상의 결과로 미루어 보아 丹蔘通脈湯과 丹蔘生脈散 모두 고지혈증의 치료와 뇌손상 억제 및 세포 보호 작용에 우수한 활용 가치가 있을 것으로 생각되며, 그 작용 기전에 대해 보다 더 많은 보충 연구가 지속적으로 필요하리라 사료된다.

## 참고문헌

1. 서울대학교 의과대학 내과학교실. 내과학. 서울:군자출판사. 1996:176-193.
2. Funatsu T., Kakuta H., Arai Y., Suzuki K. and Miyata K. Atorvastatin(Lipitor); A review of its pharmacological and clinical profile. Folia Pharmacol. 2001;117:65-76.
3. Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised atrial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease. Lancet. 1994;344:1383-1389.
4. La Rosa J.C., Hunninghake D., Bush D., Criqui M.H., Getz G.S. and Gotto A. The task force on cholesterol issue. American Heart Association. Circulation. 1990;81:1721-1733.

5. 배경일. 척당당이 고혈압 및 고지혈증에 미치는 영향. 대전대학교 대학원. 1996.
6. 남창규. 양격산화당이 고혈압 및 고지혈증에 미치는 영향. 대전대학교 대학원. 1995.
7. 강화정. 대승기당이 고혈압 및 고지혈증에 미치는 영향. 대전대학교 대학원. 1995.
8. 임준식. 삼습당이 고혈압 및 고지혈증에 미치는 영향. 대전대학교 대학원. 1996.
9. 박중양. 사향우황삼칠근복합방이 고지혈증 및 뇌손상에 미치는 영향. 대전대학교 대학원. 1998.
10. 정은아. 가미과루해백황금당의 항고지혈증 효과. 대한응용약물학회지. 2001;9:104-111.
11. 김영석. 대황황련해독당의 항고지혈증 작용. 대한생약학회지. 2001;32(2):145-152.
12. 한승동. 대시호탕가미방이 고혈압 및 고지혈증에 미치는 영향. 경산대학교 한의과대학 부설 제한동의학술원 논문집. 1998;3:73-99.
13. 박치상. 소풍척당당이 고혈압 및 고지혈증에 미치는 영향. 경산대학교 한의과대학 부설 제한동의학술원 논문집. 1997;2:144-155.
14. 山本章. 日本人における高脂血症の疫學. 東京. 内科. 1998;81(2):237-242.
15. 의학교육연수원 편. 가정의학. 서울:서울대학교 출판부. 1993:302-304.
16. 신현호. 고지혈증의 진단. 메디칼업저버. 2003 ;198:25.
17. 酒井尙彦, 山下靜也, 松澤佑次. 脂質代謝の調節. 東京. 内科. 1998;81(2):213-225.
18. Falk E., Shah P.K. and Fuster V. Coronary plaque disruption. American Heart Association. Circulation. 1995;92:657-671.
19. Ginsberg H.N. Lipoprotein metabolism and its relationship to atherosclerosis. Med. Clin. North Am. 1994;78:1-20.
20. P.S. Roheim, B.A. Lefevre and R. Tulley. Differential response to low-fat diet between low and normal HDL-cholesterol subjects. J. Lipid. Res. 2000;41(3):321-328.
21. 전숙. 고지혈증 환자에서의 아포지단백 C-III 유전자 촉진자의 다형성. 대한내과학회지. 2003 ;64(3):293-302.
22. Stephen G. Young. Apo B gene defects affecting plasma cholesterol levels. California Med. 2002;74-75.
23. C. Ehnholm, R.W. Mahley. Role of apolipoprotein E in the lipolytic conversion of b-very low density lipoproteins to low density lipoproteins in type III hyperlipoproteinemia. Proc. Natl. Acad. Sci. 1984;81:5566-5570.
24. W.A. Boisver, J. Spangenberg and L.K. Curtiss. Treatment of severe hypercholesterolemia in apolipoprotein E-deficient mice by bone marrow transplantation. J. Clin. Invest. 1995;96:1118-1124.
25. Raj G.V., Moreno J.G. and Gomella L.G. Utilization of polymerase chain reaction technology in the detection of solid tumors. Cancer. 1998;82:1419-1442.
26. Vannuchi A.M., Bosi A., Glinz S., Pacini P., Linari S. and Sarccardi R. Evaluation of breast tumor cell contamination in the bone marrow and leukapheresis collection by RT-PCR for cytokeratin 19 mRNA. Br. J. Haem. 1998;103:610-617.
27. Ames B.N., Shigenaga M.K. and Hagen T.M.. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. Proc. Natl. Acad. Sci. 1993 ;90:7915-7922.
28. Oliver C.N., Stark-Reed P., Stadtman E.R., Liu G.L., Carney J.M. and Floyd R.A. Ischemia; Reperfusion induced oxidative damages to proteins in Grebil brain. Proc. Natl. Acad. Sci. 1990;56:781-792.



29. Crumrine R.C., A.L. Thomas and P.F. Morgan. Attenuation of p53 expression protects against focal ischemic damage in transgenic mice. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 1994;14:887-891.
30. Herschman H.R. Primary response genes induced by growth factors and tumor promoters. *Annu. Rev. Biochem.* 1991;60:281-319.
31. Harper J.W., Adami G.R. and Wei K. The p21 Cip1 interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin dependent kinase. *Cell.* 1993;75:805-816.
32. Choi D.W. Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neurosci Lett.* 1987;58:293-297.
33. Cao W., Carney J.M., Duchon A., Floyd R.A. and Chevion M. Oxygen free radical involvement in ischemia and reperfusion injury to brain. *Neurosci. Lett.* 1988;88:233-238.
34. Good P.F., Werner P., Hsu A., Olanow C.W. and Perl D.P. Evidence for neuronal oxidative damage in Alzheimer's disease. *Amer. J. Pathology.* 1996;149:21-28.
35. Yamada K., Goto S., Oyama T., Yoshikawa M., Nagahiro S. and Ushino Y. Striatal cells containing the Ca<sup>2+</sup>-binding protein cactinin (protein 10) in ischemia induced neuronal injury. *Acta Neuropathology.* 1995;89:172-177.
36. Shotton D.M. Confocal scanning optical microscopy and its application for biological specimens. *J. Cell Sci.* 1989;94:175-206.
37. Ha K.S., Lee Z.W. Confocal laser scanning microscopy *Ajou Med. J.* 1997;2:91-95.
38. 王琦 외 편저. 素問今釋. 北京:人民衛生出版社. 1981:32-33.
39. 朱震亨. 丹溪心法. 臺北:오주출판사. 1969:65-105.
40. 李杲. 東垣十種醫書. 서울:대성문화사. 1983 :635-636.
41. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:남산당. 1984:197-199.
42. J.D. Keyser, G. Sulter and P.G. Luiten. Clinical trials with neuroprotective drugs in acute ischemia stroke; Are we doing the right thing? *Trends Neurosci.* 1999;22:535-540.
43. MacKay K.B., Patel T.R., Galbraith S.L., Woodruff G.N. and McCulloch J. The relationship between glutamate release and cerebral blood flow after focal cerebral ischemia in the cat; Effect of pretreatment with enadoline (a kappa receptor agonist). *Brain Res.* 1996 ;712:329-334.
44. Richter C. Do mitochondrial DNA fragments promote cancer and aging? *FEBS Lett.* 1988 ;241:1-5.