

黃連阿膠湯이 Free Cholesterol에 의한 혈관내피세포 손상에 미치는 영향

이소연, 윤현덕, 신오철, 신유정, 박치상
대구한의대학교 한의과대학 심계내과학교실

Effect of *Hwangryunagyotang* Water Extract on Endothelial Cells by Free Cholesterol.

So-Yeon Lee, Hyun-Duk Yoon, Oh-Chul Shin, Yoo-jung Shin, Chi-Sang Park
Department of Internal Medicine,
College of Oriental medicine, Daegu Haany University

ABSTRACT

Hwangryunagyotang is supposed to have significant effects on some sorts of cardiovascular diseases like atherosclerosis. For this study, ACAT inhibitor was put in LDLR $-/-$ mice to derive free cholesterol from it. This was to examine the effectiveness of *Hwangryunagyotang* on its protecting and recovering function with endothelial cells damaged by free cholesterol through experimental. The results are reported below.

Hwangryunagyotang suppressed the crystallization of reactive oxygen species in macrophages and the numbers of free cholesterol crystal plate structured and reduced fragmentation of nucleus in ECV 304 cell strain by ACAT inhibitor significantly. *Hwangryunagyotang* also suppressed the necrosis of tissue in LDLR $-/-$ mice (treated with ACAT inhibitor) inflammatory portion which is adjacent to aortic root, proximal aorta and carotid artery by immunohistochemistry and fluorescence microscopy.

On the whole, *Hwangryunagyotang* suppressed the necrosis of endothelial cells and especially its effect for the necrosis of para-myocardial tissues by free cholesterol. With this result, I suggest *Hwangryunagyotang* might have protective and recovery effects on atherosclerosis, so we need to carry on this study henceforth clinically and experimentally as well.

Key words: *Hwangryunagyotang*, atherosclerosis, free cholesterol

1. 서론

동맥경화증은 동맥 내벽에 지질과 혈소판이 침착되어 국소적 비후, 섬유화, 괴사가 일어나는 병

리적 과정을 통하여 죽종이 형성되고 혈관내 혈류의 흐름을 방해하게 되며 이로 인해 혈관내 혈전을 발생하게 하는 것으로 허혈성 심장질환 및 뇌질환 등의 중요한 원인이 되고 있다¹⁾.

동맥경화를 일으키는 원인으로는 스트레스, 고혈압, 고지혈증, 당뇨병, 흡연, 음주, 운동부족 등 복잡한 위험인자가 장기간 지속적으로 작용했을

· 교신저자: 윤현덕 대구 수성구 상동 165
대구한방병원 심계내과학교실
Tel. 053-770-2178
E-mail : wkfgoeh2@hanmail.net

때 발생된다². 최근 우리나라도 급격한 경제의 발전, 사회적 여건의 변화, 식생활의 변화, 인구구조의 노령화 등으로 인해 이러한 원인인자에 대한 노출이 많아짐으로써 동맥경화증의 위험이 증가하고 있다³.

동맥경화의 시작 단계에는 지질의 농도가 높은 것이 주요한 위험인자이며, 병변의 진행단계에서는 macrophage와 T cell의 상호작용으로 이루어지는 광범위한 만성 염증성 반응이 병변 진행의 자극인자라고 할 수 있다⁴. 즉 동맥벽의 macrophage에 있는 청소 수용체를 통하여 산화된 low density lipoprotein(이하 LDL)의 섭취로 인해 콜레스테롤이 축적되고 거품세포를 형성하여 동맥경화증의 초기 병변인 지방반(fatty streak)이 생성된다. 이러한 병변은 점차 진행되면서 내피세포, 평활근세포, 대식세포, 혈소판 등에서 분비된 성장인자와 cytokine에 의해 활성화되며 동맥경화증으로 진행된다⁵.

지금까지 동맥경화증에 관한 국내 실험적 연구 동향으로는 최 등⁶의 “麝香祛瘀丸이 동맥경화증에 미치는 영향”, 이 등⁷의 “鷄鳴散이 혈장지질 함량 및 심혈관계에 미치는 영향”, 남 등⁸의 “四物湯이 혈관내피세포에 미치는 영향”, 허 등⁹의 “生脈散이 대동맥 평활근 세포에서 NO생성에 미치는 영향” 등이 보고되었으나, 黃連阿膠湯이 심혈관계에 미치는 영향에 대한 연구보고는 아직 없었다.

본 연구에 사용된 黃連阿膠湯은 《傷寒論》¹⁰에 처음 수록된 처방으로 不安, 胸痞, 不眠, 초조감 등 心火旺의 증후에 口渴, 咽乾, 頭暈, 身體瘦瘠, 腰脚無力 등 陰虛의 증후를 겸한 증상을 치료하는데 사용된다¹¹.

이에 저자는 養陰瀉火하고 益腎寧心¹²하는 黃連阿膠湯이 동맥경화증에 효능이 있을 것으로 사료되어 이를 규명하기 위하여 Acyl-Coenzyme A:cholesterol acyltransferase(이하 ACAT) 저해제와 acetyl-LDL을 통해 free cholesterol(이하 FC)을 유도하여 혈청학적 인자 및 혈관내피세포를 관찰

하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재 료

1) 試料의 調製

실험에 사용한 黃連阿膠湯은 대구한의과대학 부속 대구한방병원 약제과에서 구입하여 1000g을 細末한 다음 적당량의 3차 증류수를 첨가하여 85℃에서 6시간 熱湯을 가한 후, 식혀 黃連阿膠湯 수추출물을 얻었다. Gauze로 1차 여과 후 -70℃에서 12시간 동결시키고, freeze dryer로 동결 건조하여 310g을 회수하였다. 사용 전 -80℃에 보관하다가 3차 증류수로 적당한 농도로 희석한 후 실험에 사용하였다. 黃連阿膠湯의 처방은 《傷寒論》¹⁷에 수록된 처방으로, 내용과 용량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Prescription of Hwangryunagyotang

Herbs	Pharmacological Name	Dose(g)
黃 連	<i>Coptidis Rhizoma</i>	150
黃 芩	<i>Scutellariae Radix</i>	37.5
白芍藥	<i>Paeoniae Radix Alba</i>	75
鷄子黃	<i>Gallus Domesticus Brisson</i>	40
阿 膠	<i>Asini Gelatinum</i>	112.5
Total amount		415

2) 動 物

본 연구는 체중 25g내외의 LDLR^{-/-} mice (Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine, USA) 암컷을 대상으로 실험을 실시하였으며, 항온 항습(20±1℃, 55±3%)의 조건하에서 사육하였으며, 물과 사료는 제한하지 않았다.

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 구입하였고, ACAT inhibitor 58035, acetyl-LDL, FC, phospholipid, sodium citrate, glucose는 Sigma Co.에서 구입하였으며, 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) 혈액내 FC 결정화 유도 및 형태 분석
혈액으로부터 항응고를 위해 0.38% sodium citrate와 1% glucose를 사용하여 $\times 1500$ rpm에서 원심 분리하여 macrophage만을 분리하여 조제하였다. 10mM HEPES buffer(pH7.4 : 140mM NaCl, 5mM NaHCO_3 , 0.5mM MgCl_2 , 3mM KCl, 140mM glucose)가 들어 있는 tube에 넣고 90분간 FC가 cholesteryl ester(이하 CE)로 전환되는 것을 차단하기 위해 ACAT inhibitor 58035 ($5\mu\text{g}/\text{ml}$)와 acetyl-LDL, FC/phospholipid를 첨가한 대조군 그리고 대조군에 黃連阿膠湯 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 첨가한 실험군에서 FC 구조를 분석하였다. 거품세포인 macrophage에서 배출하는 FC에 의해 과산화지질을 유도하여 macrophage에서 분비되는 FC의 형태적인 구조를 판정하기 위하여 상기와 같은 방법으로 세포배양을 마친 후 유리 슬라이드에 도말표본을 만들어 완전히 건조시킨 다음 wright염색을 한 후 물로 씻어주고 오븐에서 충분히 말린 다음 현미경하($\times 200$)에서 관찰하였다.

2) J774 macrophages 세포주의 FC 결정화 유도

세포주인 J774 macrophages를 통해 계대배양시켜 5% FBS가 함유한 DMEM 배지에 penicillin/streptomycin을 첨가하여 flask내지 cell culture용 dish에 배양하면서 10^3 세포를 cover glass

가 들어 있는 6-well plate에 분주하고 37°C 에서 12시간 배양하였다. Serum free medium(이하 SFM)으로 2번 세척한 후 1ml SFM을 첨가하고 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ acetyl-LDL, ACAT inhibitor 58035($5\mu\text{g}/\text{ml}$)으로 반응시킨 대조군과 대조군에 黃連阿膠湯 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 첨가한 실험군에서 FC의 결정화를 현미경하($\times 200$)에서 관찰하였다.

3) Reactive Oxygen Species의 정량 분석

실험에 사용된 세포주인 J774 macrophages는 계대배양시켜 5% FBS가 함유한 DMEM 배지에 penicillin/streptomycin을 첨가하여 flask내지 cell culture용 dish에 배양하면서 10^3 세포를 cover glass가 들어 있는 6-well plate에 분주하였다. 37°C 에서 12시간 배양한 다음 SFM으로 2번 세척한 후, 1ml SFM을 첨가하고 $100\mu\text{g}/\text{ml}$ acetyl-LDL으로 반응시켰다. FC 상태를 유도한 대조군, 대조군에 黃連阿膠湯 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 을 첨가한 실험군에 9시간 후 4% para-formaldehyde로 고정 후 PBS로 세척하였다. ACAT inhibitor 58035($5\mu\text{g}/\text{ml}$)에 의해 세포내 Reactive Oxygen Species(이하 ROS)의 생성정도를 분석하기 위해 ROS의 생성이 전무시 형광으로 염색되고 증가시에는 무색형광이 염색되는 rhodamine 123을 이용하였다. Rhodamine 123을 1시간 염색한 후 ROS의 정량을 위해 confocal 현미경하에서 관찰하였다.

4) ECV 세포주의 배양

실험에 사용된 인간 제대혈관 유래 내피세포인 ECV304 세포주는 충북대학교 의과대학 정규보 교수로부터 분양받아 계대배양시켜 5% FBS를 함유한 DMEM 배지에 penicillin/streptomycin을 첨가하여 flask내지 cell culture용 dish에 배양하면서 10^3 세포를 6-well plate에 분주하였다. 37°C 에서 12시간 배양한 다음 SFM으로 2번 세척한 후, 1ml SFM을 첨가하여 실험에 사용하였다.

5) Tunel assay를 통한 세포사 관찰

ECV304 세포주를 통해 黃連阿膠湯의 FC에 의해 손상된 혈관내피세포에 대한 세포사 억제효과

를 조사하기 위해 정상군과 100 μ g/ml acetyl-LDL, ACAT inhibitor 58035(5 μ g/ml)으로 반응시킨 대조군과 대조군에 黃連阿膠湯 20 μ g/ml을 첨가한 실험군으로 구분하였다. 37 $^{\circ}$ C에 12시간 배양한 다음 cover glass에 분주하고 12시간 배양한 후 黃連阿膠湯 20 μ g/ml를 가한 후 6시간 후에 세포사를 억제하는지 조사하기 위해 TUNEL assay 방법을 수행하였다.

TUNEL assay를 수행한 순서는 먼저 배지를 제거하고 PBS로 세척한 다음 세포를 4% para-formaldehyde로 12시간 동안 4 $^{\circ}$ C에서 고정시킨 다음 0.5% Tween 20, 0.2% BSA(bovine serum albumin)을 첨가하여 실온에서 15분간 침투과정을 실시하였다. 그런 다음 PBS로 3회 세척 후 세포내 염색체 DNA nick 말단을 표지하기 위해 terminal deoxynucleotidyl transferase(TdT)용액(TdT 완충액, biotin-dUTP, TdT=18:1:1) 5 μ l를 떨어 뜨려서 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 유지시킨 다음 증류수로 3회 세척하였다. 증류수 세척 후 blocking 용액인 0.5% BSA를 50 μ l 정도 첨가하여 실온에서 10분간 정지한 후 streptavidine-FITC용액 50 μ l를 첨가하여 30분간 실온에서 유지하였다. 다시 PBS로 3회 세척한 후 slide glass 위에 mounting 용액을 약간 떨어뜨리고 얹어놓고 confocal 현미경하에서 관찰하였으며, 녹색의 형광염색 유무를 판정하여 세포사를 확인하였다.

6) 면역조직 화학분석법

LDLR $^{-/-}$ mice 심장 주변부인 동맥내피세포의 조직괴사가 약물에 의해 보호를 받았거나 괴사가 일어났는지를 확인하기 위해 정상군, ACAT inhibitor 58035(5 μ g/ml)로 8주간 정맥주사한 대조군, 그리고 대조군에 黃連阿膠湯을 경구투여한 실험군으로 구분하였다. Mice를 ketamin으로 마취한 다음 절개한 후, 심장동맥을 중심으로 주변부를 paraffin 포매를 실시하여 면역조직화학 염색을 수행하였다. 2주간 약물을 경구투여를 실시한 후 교살하여 심장 조직부위를 formalin으로 고정한 후 5 μ m 두께로 microtome으로 절단하고 연속절편을

4 $^{\circ}$ C에서 2N HCl 용액에서 20분간 반응시켜 DNA-denaturation을 수행하였다. 그리고 0.1M borate 완충액을 처리하여 안정시킨 후, 비특이적인 면역반응을 억제하기 위해 0.01%의 proteinase K가 포함된 0.5% bovine serum albumin을 1시간 동안 반응시켰다. 그 후 1차 항체인 VCAM-1, ICAM-1, MOMA-2는 4 $^{\circ}$ C 냉장실에서 12시간 동안 반응시키고, 다시 Horseradish peroxidase-antibody가 표지된 avidin biotin complex에 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 그런 다음 0.05% 3,3-diaminobenzidine과 0.01% HCl이 포함된 0.05M Tris-HCl 완충액(pH 7.4)에서 발색시킨 후 광학현미경(\times 100)하에서 H/E염색을 관찰하였다.

형광현미경하에서 1차 항체인 백혈구가 내피세포에 침윤하여 확산해 가는지를 파악하기 위하여 1차 항체 marker인 anti-Mac3 antibody와 CD45.1을 확인하기 위하여 형광염색을 수행하였으며, 세포사를 확인하기 위해 Hoechst 33258을 염색하여 측정하였다. 면역조직 화학분석법과 같은 방법을 시행한 후, 1차항체인 anti-Mac3 antibody, CD45.1를 표지하고 2차항체인 anti-conjugated FITC antibody를 처리하여 U.V하에서 형광현미경(\times 100)으로 형광색상을 관찰하였다.

8) 통계처리

모든 실험은 3회 이상 수행하였고 대조군은 백분율(% Control)로 표시하였으며, 통계학적 유의성은 Student's t-test에 의한 $P<0.05$ 의 유의성으로 나타내었다.

III. 성적

1. FC 구조에 미치는 영향

광학현미경(\times 200)에서 FC의 형태적인 구조를 관찰한 결과, plate, rod, helix 구조로 나타났다. 특히 과산화지질화를 많이 유도하는 형태로는 주로 plate 구조에 의해 일어났다(Fig. 1).

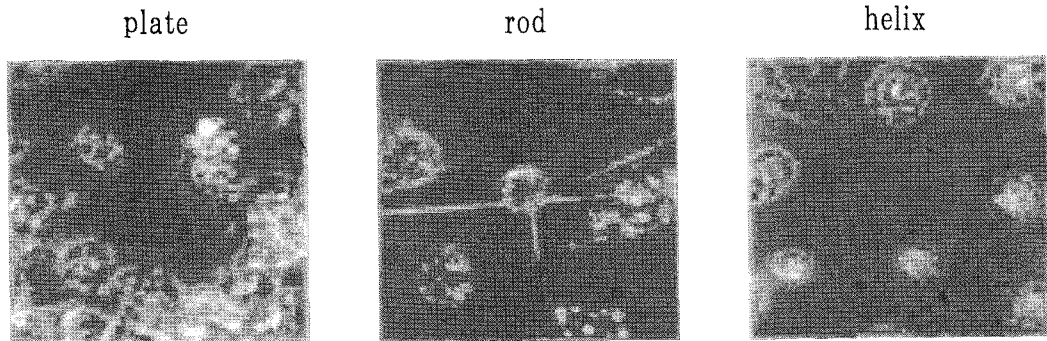


Fig 1. Light photomicrograph showing the various shapes of FC crystals appearing in model Macrophage foam cell incubations.

Plate (left), rod (middle), and helix (right). Macrophages were loaded with cholesterol by using acetyl-LDL and FC/phospholipid dispersions as described in methods and then treated for 90 minutes with the ACAT inhibitor ($5\mu\text{g}/\text{mL}$).

2. M ϕ 세포내의 plate 구조 결정화에 미치는 영향

Plate 구조를 가진 FC에서 정상군(NOR), 정상군에 黃連阿膠湯 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 첨가한 군(NOR+HRAG), 대조군(ACAT), 대조군에 黃連阿膠湯 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 첨가한 군(ACAT+HRAG)으로 구분하여 결정체의 수를 관찰하였을 때 각각 3 ± 1 , 7 ± 1 , 23 ± 1 , 12 ± 1 개로 나타나 대조군에 비해 黃連阿膠湯 처리군(ACAT+HRAG)에서 유의성($p<0.05$) 있게 억제되는 경향을 보였다(Fig. 2).

3. M ϕ 세포내의 ROS 생성에 미치는 영향

黃連阿膠湯의 처리에 의해 ROS의 결정화가 억제되는지 관찰하였다. J774 macrophages 세포에 무처리한 정상군(NOR), 정상군에 黃連阿膠湯 처리군(NOR+HRAG), 거품세포인 J774 macrophages에 산화적 LDL로 인한 세포내의 ROS의 형성을 촉진시킨 대조군(FC), 대조군에 黃連阿膠湯을 처리한 실험군(FC+HRAG)으로 나누어 조사한 결과, 0.26 ± 0.01 , 0.27 ± 0.01 , 2.35 ± 0.02 , 0.33 ± 0.01 로 나타나 대조군에 비해 黃連阿膠湯을 처리한 군

(FC+HRAG)에서 유의성($p<0.05$) 있게 결정화를 억제하는 경향을 보였다(Fig. 3).

4. ECV304 세포주의 세포사에 미치는 영향

Tunel assay를 시행하여 ECV304 세포주의 세포핵의 절단 유무를 조사한 결과, 정상군(NOR)은 미미하게 반응을 보인 반면 대조군(CON)은 강한 녹색 형광을 보임으로써 세포핵의 절단이 유도되었음을 나타내었고, 실험군(HRAG)은 약한 녹색 형광 신호를 보였다(Fig. 4).

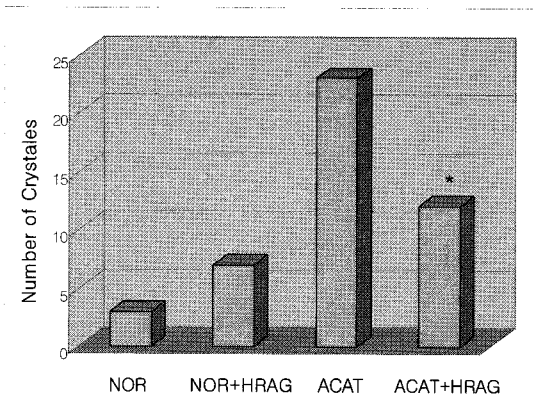


Fig 2. Inhibition of FC crystallization by addition of HRAG to the extracellular medium.

J774 macrophages were cholesterol enriched as described in methods. After an equilibration period, the monolayers were treated for 90 minutes without ACAT inhibitor, with ACAT inhibitor (5µg/mL), with ACAT inhibitor(5µg/mL) plus HRAG (20µg/mL). The monolayers were examined by light microscopy by 2 independent researchers. Crystals were counted in 10 random fields at x100 magnification and are reported as means. The average error in reading the slides between investigators was 10%.

*p<0.05, These experiments have been replicated three times with similar results.

NOR : normal group

NOR+HRAG : normal+*Hwangryunagyotang* treated group

ACAT : normal+ACAT inhibitor treated group

HRAG : ACAT inhibitor+*Hwangryunagyotang* treated group

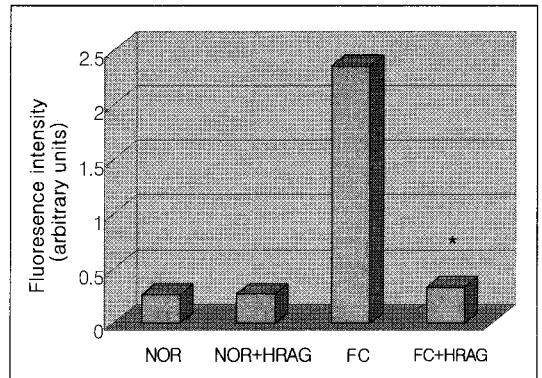


Fig 3. Quantification of the data in the using fluorescence intensity measurements of individual cells.

Quantitative data of Rhodamine 123 staining of normal and FC-loaded macrophages. Macrophages were incubated in DMEM and 1% FBS alone (Normal) or containing 100 µg/ml acetyl-LDL plus 5 µg/mL compound 58035 (FC) for 9 hours, FC with HRAG. 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 (100 cells total) for each condition.

*p<0.05, These experiments have been replicated three times with similar results.

NOR : normal group

NOR+HRAG : normal+*Hwangryunagyotang* treated group

FC : normal+ACAT inhibitor treated group

FC+HRAG : ACAT inhibitor+*Hwangryunagyotang* treated group

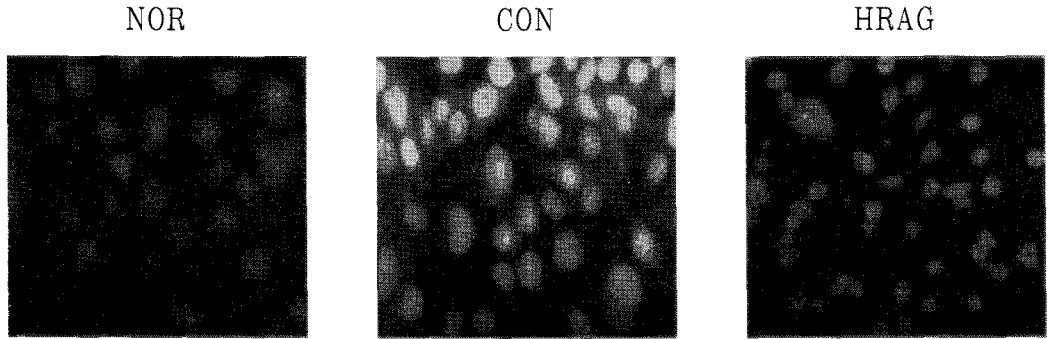


Fig 4. Effect of the HRAG on ECV304 exposed to acetyl-LDL plus compound 58035 by TUNEL assay.

Left: ECV304 cells were incubated for 9 hours in DMEM and 1% FBS alone (normal). middle: or containing compound 58035 (5 μ g/mL) plus 100 μ g/mL acetyl-LDL(control). right: or compound 58035 plus acetyl-LDL and *Hwangryunagyotang*(HRAG). The death cells were then observed with TUNEL assay and viewed by confocal microscopy. Shown in fluorescence intensity are quantitative data from six fields of cells (300 cells total), respectively.

5. LDLR^{-/-} mice의 조직염증에 미치는 영향

LDLR^{-/-} mice의 심장 주변 동맥 내피세포의 조직괴사가 黃連阿膠湯에 의해 보호를 받았는지를 확인하기 위해 mice의 심장 동맥을 중심으로 주변부를 paraffin 포매를 실시하여 H/E 염색을 수행하였다. 그 결과, 정상군(NOR)은 동맥부가 잘

발달되어 있으나 대조군(CON)은 괴사가 진행되어 동맥부가 소실되거나 파괴된 양상을 보였는데 특히 주변 혈관 내피세포의 두께가 감소한 양상을 보였다. 반면 실험군(HRAG)은 내피세포의 증식이 유도되거나 파괴가 억제되어 심장 내피세포의 두께가 정상군과 유사하게 나타났다(Fig. 5).

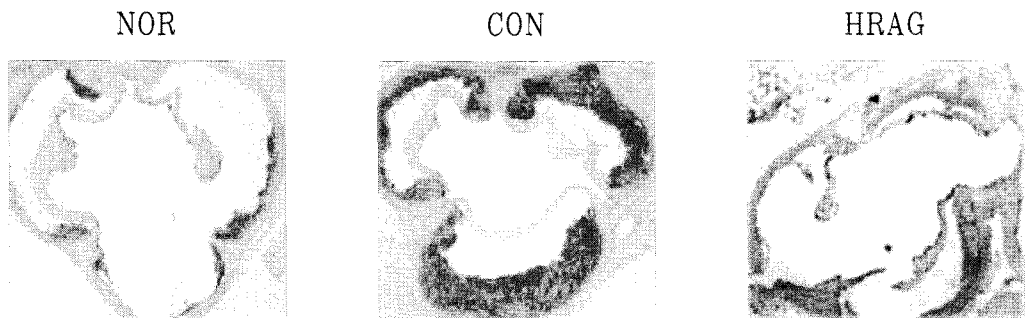


Fig 5. Histological sections of aortic root. Mice were 8 weeks of age and had been fed a high-fat diet.

Cross section (5 μ m) of the proximal aorta from a control male LDLR^{-/-} mouse with a mean lesion area of 38-600 μ m². left: LDLR^{-/-}, middle: LDLR^{-/-} plus ACAT inhibitor (5mg/mL). right: LDLR^{-/-} plus ACAT inhibitor (5mg/mL) with *Hwangryunagyotang*. Dark-staining material represents H/E-positive, lipid-laden macrophages as well as extracellular lipid within the aortic wall and valve leaflets; magnification x100.

6. LDLR^{-/-} mice의 VCAM-1, ICAM-1 및 MOMA-2 발현에 미치는 영향

LDLR^{-/-} mice의 심장 동맥 내피세포의 조직괴사가 黃連阿膠湯에 의해 보호를 받았는지 판

찰하기 위하여 VCAM-1와 ICAM-1의 세포표면 부착인자들로 유도 확인한 결과, 정상군(NOR)보다 대조군(CON)에서 강하게 적색염색이 보였으나 실험군(HRAG)은 약하게 보였다(Fig. 6).

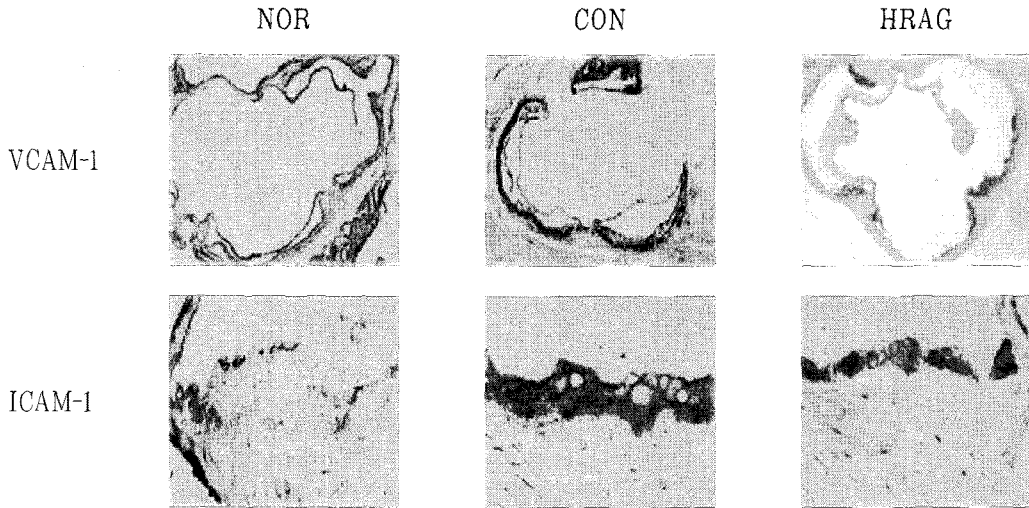


Fig 6. Histological sections of aortic root. Mice were 8 weeks of age and had been fed a high-fat diet.

Cross section (5 μ m) of the proximal aorta from a control male LDLR^{-/-} mouse with a mean lesion area of 38-600 μ m². left: LDLR^{-/-}, middle: LDLR^{-/-} plus ACAT inhibitor (5mg/mL), right: LDLR^{-/-} plus ACAT inhibitor (5mg/mL) with *Hwangryunagyotang*. Dark-staining material represents VCAM-1-positive, ICAM-1 macrophages as well as extracellular lipid within the aortic wall and valve leaflets; magnification x100.

대조군(CON)에서는 염증세포 마크로파지의 대표적인 단백질 marker인 MOMA-2가 강한 형광을

나타난 것에 비해 정상군(NOR)이나 실험군(HRAG)은 약하게 보였다(Fig. 7).

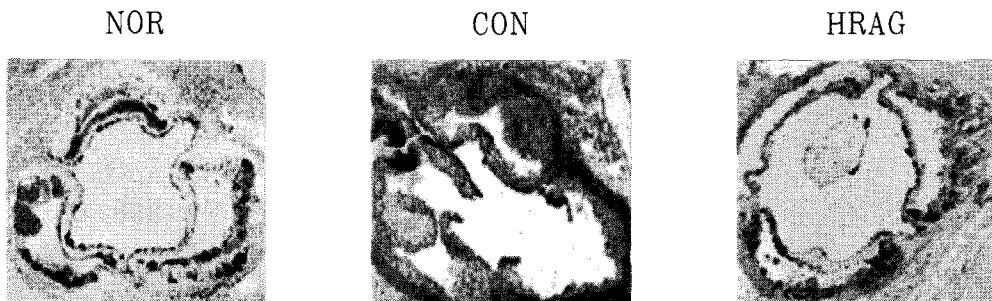


Fig 7. Immunocytochemical analyses of the proximal aorta in LDLR^{-/-} mice (left) after treatment of ACAT inhibitor (middle) and ACAT inhibitor (5mg/mL) plus *Hwangryunagyotang* (right).

7. LDLR^{-/-} mice의 anti-Mac3, CD45.1에 미치는 영향

Carotid artery의 조직부근의 단세포와 매크로파아지의 침범으로 염증에 관여하는 염증세포들이 심근 내피세포의 침윤으로 유도되는지 확인한 결

과, 정상군(NOR)은 녹색형광으로 인한 백혈구의 존재를 나타내는 Mac3의 발현이 약하게 보인 반면 대조군(CON)에서는 녹색형광이 강하게 보였으며, 실험군(HRAG)은 감소되는 경향이 관찰되었다(Fig. 8).

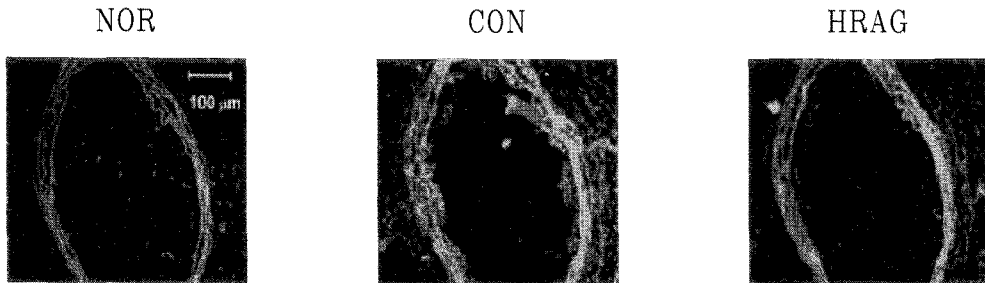


Fig 8. Inflammatory cells predominate on carotid artery in LDLR^{-/-} mice (left) after treatment of ACAT inhibitor (middle) and ACAT inhibitor (5mg/mL) plus *Hwangryunagyotang* (right).

Serial frozen sections were stained with primary antibody to anti-Mac3. Sections were counterstained with Hoechst dye (blue) to visualize cell nuclei and anti-Mac3 for monocytes/macrophages (green) were evident on the neointima in carotid artery with LDLR^{-/-} mice at 14 days. Scale bar, 100 μm.

이식 쥐에서 볼 수 있는 CD45.1의 발현이 정상군(NOR)에서는 강하게 형광이 나타났지만, 대조군(CON)에서는 거의 소멸되는 반면 세포사로 인

한 Hoechst 33258의 청색형광이 강하게 보였고, 실험군(HRAG)에서는 다소 세포사는 일어났지만 대조군보다 감소되는 경향이 관찰되었다(Fig. 9).

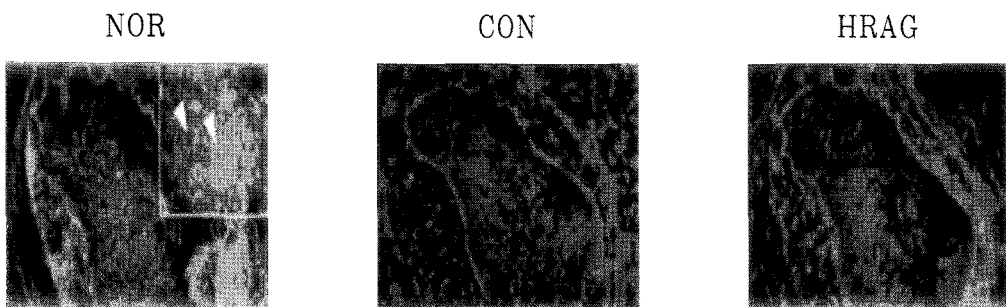


Fig 9. Inflammatory cells predominate on carotid artery in LDLR^{-/-} mice (left) after treatment of ACAT inhibitor (middle) and ACAT inhibitor (5mg/mL) plus *Hwangryunagyotang* (right).

Serial frozen sections were stained with primary antibody to CD45.1. Sections were counterstained with Hoechst dye (blue) to visualize cell nuclei. Left: Numerous (CD45.1) WBCs were evident on the neointima in carotid artery with LDLR^{-/-} mice at 14 days. Cells expressing CD45.1 surface antigen have distinct green borders (inset, arrowheads). Middle: In contrast, (CD45.1-positive) WBCs were undetected in carotid artery with LDLR^{-/-} mice plus ACAT inhibitor at 14 days. Right: in the LDLR^{-/-} mice plus ACAT inhibitor with *Hwangryunagyotang*, fluorescence appears in partly green.

IV. 고 찰

동맥경화는 대부분의 퇴행성 동맥 질환의 원인으로 알려져 있으며, 동맥혈관 내막층의 세포간질 부위에 콜레스테롤 침착과 더불어 동맥중막 부위의 평활근 세포가 내막층으로 이동해 와서 증식이 일어나는 소견을 나타낸다¹³. 이러한 동맥경화는 신체의 어느 부분에서도 가능하지만 주로 대동맥, 뇌동맥, 관상동맥 부위에서 발생빈도가 높으며, 심장에서 동맥경화가 일어나면 협심증이나 심근경색, 뇌에서 동맥경화가 일어나면 뇌경색으로 인한 뇌졸중이 그리고 신장에서 동맥경화가 일어나면 신부전증 등이 나타나는 등 중대한 질환을 초래하게 된다².

지금까지 알려진 동맥경화의 주요 발생과정은 동맥내막 내피세포의 손상으로 내피세포의 기능이상이 초래되어 내피세포에 혈중 단핵구와 혈소판의 부착이 증가하는 것으로 시작된다¹⁴. 이러한 과정에는 손상된 내피세포에서 발견되는 adhesion molecule, 즉 intercellular adhesion molecule(ICAM), vascular cell adhesion molecule(VCAM) 및 E, P-selectin등이 단핵구의 표면에 있는 L-selectin, integrin에 대한 수용체로 작용하게 되며¹⁵, 이후 부착된 단핵구는 내피세포 사이를 통과하여 혈관 내막하로 이동하게 된다¹⁶. 혈관 내막하로 이동한 단핵구는 대식세포로 분화하는데 이 과정에 내피세포와 대식세포에서 분비되는 macrophage colony stimulating factor(MCSF)가 관련하며, 분화한 대식세포는 cytokine, 성장인자 및 단백질해소소 등을 분비하는 능력을 지니며 병변의 진행에 중요한 역할을 한다¹⁵⁻⁶.

단핵구에서 분화된 대식세포는 지질을 섭취, 축적하여 거품세포(foam cell)로 변화되며, 이 과정에서 주로 섭취되는 ox-LDL은 정상적인 LDL수용체가 아닌 청소수용체를 통하여 섭취된다. 청소수용

체는 정상적인 LDL 수용체가 세포내에 일정량의 콜레스테롤 축적시 하향 조절되는 것에 반해, 세포내 콜레스테롤 양에 의해 하향 조절이 되지 않아 세포내에 콜레스테롤이 과다하게 축적될 수 있게 한다. 이상의 단계를 거쳐 단핵세포, 대식세포, T-림프구 등으로 구성된 지방반(fatty streak)이 형성된다¹⁷.

동맥경화증이 계속 진행되는 경우에는 그 다음 단계로 평활근 세포의 증식을 특징으로 하는 섬유반(fibrous cap) 형성과정으로 이행하게 되고, 그 후 혈관내막에 평활근세포, 대식세포, 결합조직기질 및 지질 침착이 점차 증가하게 되어 섬유반병소(fibrous plaque)를 형성하게 된다¹⁷⁻⁸.

이러한 과정들에서 ACAT는 콜레스테롤과 acyl CoA의 에스테르화에 관여하여 소장에서 콜레스테롤의 흡수, 간장에서 very low density lipoproteine(VLDL)의 합성, 지방세포와 혈관내벽에 cholesterol ester의 축적에 관여하는 등의 역할을 한다¹⁹⁻²⁰.

한의학에서는 동맥경화증의 주요 증상, 병리기전 및 합병증 등을 분석하여 불 때 뇌동맥경화로 오는 中風, 健忘, 頭痛, 眩暈 등과 관상동맥의 죽상경화로 인한 心痛, 胸痛, 胸痺, 胸悶 등의 제증상이 이와 유관하며, 이와 같은 병증을 일으키는 원인으로 痰, 瘀血, 氣滯, 火(肝火) 등이 있다²¹⁻².

동맥경화증에 관한 치료제 개발영역에서 국내 실험적 연구동향으로는 유 등²³이 “고려인삼추출물이 혈관 평활근에 대한 이완작용”을, 정 등²⁴이 “굴피의 flavonoid 성분이 고지혈증 및 동맥경화에 대한 치료효과”를, 그리고 김 등²⁵이 “산마늘 추출물의 항동맥경화 효과”등의 많은 연구보고가 있었다. 한의학적인 측면에서도 최 등⁶의 “麝香祛瘀丸이 동맥경화증에 미치는 영향”, 이 등⁷의 “鷄鳴散이 혈장지질 함량 및 심혈관계에 미치는 영향”, 남 등⁸의 “四物湯이 혈관내피세포에 미치는 영향”, 허 등⁹의 “生脈散이 대동맥 평활근 세포에서 NO생성에 미치는 영향” 등의 많은 연구가 있었으나, 아직까

지 黃連阿膠湯을 사용하여 free cholesterol에 의한 혈관내피세포 손상에 대한 연구는 없었다.

본 연구에 사용된 黃連阿膠湯은 《傷寒論》에 처음 기재된 처방으로 '少陰病 得之 二三日以上 心中煩 不得臥者 黃連阿膠湯 主之'라 하여, 不安, 胸悶, 胸痛, 不眠 등의 心火旺의 증후에 口渴, 咽乾, 頭暈, 腰脚無力 등 陰虛의 증후를 겸한 증상을 치료하는데 사용된다.^{11-12,26.}

본 방의 약물구성 및 효능을 살펴보면 黃連은 淸熱燥濕·淸心除煩하는 효능으로 心火를 瀉하고, 阿膠는 補血滋陰·潤燥止血하는 효능으로 腎陰을 補益하여 君藥을 이루고, 黃芩은 黃連을 보좌하여 瀉火力을 돕고, 芍藥은 阿膠를 보좌하여 滋陰補血力을 도와 臣藥이 된다. 또한 鷄子黃은 腎陰을 자양하고 心血을 길러 心腎이 안정되도록 하는 佐使藥이 된다.^{12,27-8.}

이에 저자는 養陰瀉火하고 益腎寧心¹²하는 黃連阿膠湯이 동맥경화증에 효능이 있을 것으로 사료되어 이를 실험적으로 규명하고자 본 연구를 실시하게 되었다. 실험은 크게 2가지 방향으로 시행하였는데, 첫째는 거품세포인 J774 macrophage에 ACAT inhibitor를 첨가하여 FC를 유도한 뒤 黃連阿膠湯 수추출액을 투여하여 FC 결정화와 ROS 정량분석을 수행함으로써 黃連阿膠湯이 macrophage 세포주에 미치는 영향을 알아보고자 하였고, 둘째는 인간유래 혈관내피세포인 ECV304 세포주에 ACAT inhibitor를 투여하여 FC를 유도한 뒤 黃連阿膠湯 수추출액을 투여하여 Tunel assay를 통한 세포사 관찰과 ACAT inhibitor를 처리한 LDLR^{-/-} mice 심장 주변부인 동맥내피세포에 대한 형광현미경 분석법과 면역조직화학 분석법을 수행함으로써 黃連阿膠湯이 심근조직 주변 세포에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

먼저 막구조를 결정하는 인자인 FC의 결정을 알아보기 위하여 현미경하($\times 200$)에서 관찰하여 FC의 형태적인 구조를 판정한 결과, plate, rod, helix 구조로 관찰되었고, 특히 과산화지질화를 많

이 유도하는 형태로는 주로 plate 구조에 의해 일어났다. 한편 plate 구조의 FC에서 정상군, 정상군에 黃連阿膠湯 투여군, 정상군에 ACAT inhibitor를 첨가한 대조군, 대조군에 黃連阿膠湯을 투여한 실험군으로 나누어 관찰한 결과, 각각 3 ± 1 , 7 ± 1 , 23 ± 1 , 12 ± 1 로 결정체의 수가 나타나 대조군에 黃連阿膠湯을 투여한 실험군에서 50%정도 감소하는 경향을 보여 대조군에 비해 실험군이 FC 결정화를 유의성($p<0.05$) 있게 억제하는 효과가 관찰되었다. 그리고 거품세포인 J774 macrophages가 산화적 LDL에 의해 세포내의 ROS의 형성을 촉진하게 되어 FC의 결정화가 초래되는데 이는 혈액응고를 유도하여 혈전을 일으켜 혈관내피세포, 심근세포나 동맥세포의 혈전이 침착되는 상태를 나타내게 된다. 이에 黃連阿膠湯 처리에 의해 ROS의 결정화가 억제되는지 관찰하기 위하여 J774 macrophages 세포에 무처리한 정상군, 정상군에 黃連阿膠湯 처리군, 정상군에 산화적 LDL로 인한 세포내의 ROS의 형성을 촉진시킨 대조군, 대조군에 黃連阿膠湯을 처리한 실험군으로 나누어 조사한 결과, 각각 0.26 ± 0.01 , 0.27 ± 0.01 , 2.35 ± 0.02 , 0.33 ± 0.01 로 나타나 대조군에 黃連阿膠湯을 처리한 실험군에서 대조군에 비해 유의성($p<0.05$) 있게 ROS 결정화를 억제하는 경향을 보였다. 이상의 실험 결과로 黃連阿膠湯은 거품세포인 macrophage에서 배출하는 FC에 의해 산화성 물질의 작용을 차단하고, 과산화지질화를 억제하는 항산화효과가 있는 것으로 생각된다.

둘째, 黃連阿膠湯이 심근조직 주변 세포에 미치는 영향을 알아보기 위해 인간 체대혈관 유래 혈관내피세포인 ECV304 세포주에 미치는 영향을 알아보고자 하였다. 혈관 내피세포의 생존율은 세포 증식에도 영향을 주므로 세포핵의 절단유무를 통해 핵 분절을 억제하는지 여부를 관찰하였다. 정상군, ACAT inhibitor로 반응시켜 FC생성을 촉진하여 세포괴사를 유도한 대조군, 대조군에 黃連阿膠湯을 투여한 실험군으로 나누어 세포핵을 조사

한 결과, 실험군에서는 정상군과 유사하게 Tunel assay의 반응을 보인 반면 대조군은 강한 녹색형광이 관찰되어, 세포핵의 절단이 黃連阿膠湯에 의해 차단되는 것을 유추해 볼 수 있었다. 그리고 LDLR-/- mice의 심장에 ACAT inhibitor의 영향을 보기 위해 aortic root의 조직 부근에 염증시 macrophage의 침범이 유도되는지 확인한 결과, 정상군보다 대조군에서 강하게 H/E염색이 보였으나 실험군은 약하게 보였다.

그리고 proximal aorta의 조직부근의 염증시 macrophage의 침범으로 염증에 관여하는 세포들의 세포표면 부착인자인 VCAM-1와 ICAM-1이 유도되었는지 확인한 결과, 정상군보다 대조군에서 강하게 적색염색이 보였으나 실험군은 약하게 보였으며, 대조군에서는 염증세포 macrophage의 대표적인 단백질 marker인 MOMA-2가 강한 형광을 나타낸 것에 비해 정상군이나 실험군에서는 약하게 나타났다.

또한 carotid artery의 조직부근의 단세포와 macrophage의 침범으로 염증에 관여하는 염증세포들의 세포가 심근 내피세포의 침윤으로 유도되는지 확인한 결과, 정상군은 녹색형광으로 인한 백혈구의 존재를 나타내는 Mac3의 발현이 약하게 보인 반면, 대조군에서는 녹색형광이 강하게 보였으며, 실험군은 감소되는 경향이 관찰되었다. 이식 쥐에서 볼 수 있는 CD45.1의 발현이 정상군에서는 강하게 형광이 나타냈지만, 대조군에서는 거의 소멸되는 반면 세포사로 인한 Hoechst 33258의 청색형광이 강하게 보였고, 실험군에서는 다소의 세포사는 일어났지만 대조군보다 감소되는 경향이 관찰되었다.

이상의 실험 결과로 黃連阿膠湯은 FC에 의한 세포의 산화적 손상을 방지하여 혈관내피세포의 괴사를 억제하는데 작용하여 동맥경화증에 대한 보호 효과가 있을 것으로 추정되며, 향후 黃連阿膠湯을 이용한 다각적인 임상 및 실험적 연구가 병행되어야 할 것으로 생각된다.

V. 결론

黃連阿膠湯의 FC에 의한 혈관내피세포의 손상에 대한 보호 및 회복효과를 규명하기 위해 acetyl-LDL과 ACAT inhibitor를 이용하여 FC를 유도한 실험에서 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 黃連阿膠湯은 과산화지질화를 많이 유도하는 형태인 plate구조의 FC 결정체 수를 유의하게 억제시켰다.
 2. 黃連阿膠湯은 마크로파지 세포내의 ROS 결정화를 유의하게 억제시켰다.
 3. 黃連阿膠湯은 ECV304 세포주에서 ACAT inhibitor에 의한 세포핵의 분절을 감소시켰다.
 4. 黃連阿膠湯은 LDLR-/- mice의 aortic root의 조직부근 괴사를 억제시켰다.
 5. 黃連阿膠湯은 LDLR-/- mice의 proximal aorta의 조직부근 괴사를 억제시켰다.
 6. 黃連阿膠湯은 LDLR-/- mice의 carotid artery의 조직부근 괴사를 억제시켰다.
- 이상의 실험 결과를 종합하여 보면 黃連阿膠湯이 FC를 유도한 세포주에서 FC에 의한 조직괴사와 심근조직 주변의 혈관내피세포의 괴사에 대한 보호 및 회복효과가 있음이 관찰되어 동맥경화증에 대한 보호 작용이 있는 것이 본 실험을 통해 일부 입증되었다

參考文獻

1. 이문호, 내과학(下), 서울:학문사, 1986:1450-71.
2. D. Steinberg. Atherogenesis in perspective: Hypercholesterolemia and inflammation as partners in crime. Nature Medicine. 2002;8(11):1211-7.
3. 장진택, 김정범, 심혈관질환의 현황과 전망. 동의생리병리학회지, 2001;15(5):659-63.

4. 오구택. 형질전환모델동물을 이용한 동맥경화증의 연구 및 치료제 개발. 생화학분자생물학 뉴스. 2002;22(1):12-21.
5. 김권삼. 동맥경화증에서 Nitric Oxide와 Cytokines. 한국지질학회지. 1995;1(5):1-10.
6. 최영식, 이장훈, 우홍정. 麝香祛瘀丸이 동맥경화증에 미치는 영향. 동서의학연구소 논문집. 1996;1:171-88.
7. 이승무, 전병훈, 문병순. 鷄鳴散이 혈관지질 함량 및 심혈관계에 미치는 영향. 동의병리학회. 1997;11(1):126-35.
8. 남창규, 김영균, 문병순. 四物湯이 혈관내피세포에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 1999;20(1):83-98.
9. 허윤, 나영훈, 한상혁, 장호연, 임준모, 이인, 전희준, 류지용, 문병순. 生脈散이 대동맥 평활근 세포에서 NO생성에 미치는 영향. 동의생리병리학회지. 2001;15(5):775-82.
10. 張仲景. 傷寒論. 臺北:臺聯國風出版社. 1974:252-3.
11. 李常仁. 天真處方解說. 서울:成輔社. 1987:410.
12. 裴秉哲. 標準臨床方劑學. 서울:成輔社. 1995:142-3.
13. 전국의과대학교수 譯. 오늘의 진단과 치료. 서울:도서출판 한우리. 2000:502.
14. V.J. Dzau, P.C. Braun-Pullaeus and D.G. Sedding. Vascular proliferation and atherosclerosis: New perspectives and therapeutic strategies. Nature Medicine. 2002;8(11):1249-56.
15. Ross R. Atherosclerosis an inflammatory disease. N Engl J Med. 1999;340:115-26.
16. Giachelli CM, Lombardi D, Johnson RJ, Murry CE, Almeida M. Evidence for a role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimuli in vivo. Am J Pathol. 1998;152:353-8.
17. Rajavashisth TB, Andalibi A, Territo MC, et al. Induction of endothelial cell expression of granulocyte and macrophage colony-stimulating factors by modified low-density lipoproteins. Nature. 1990;344: 254-7.
18. A.C. Li, C.K. Glass. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention. Nature Medicine. 2002;8(11):1235-42.
19. Oneil Lee, Catherine CYChang, William Lee. Immunodepletion experiments suggest that acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase-1 (ACAT-1) proteine plays a major catalytic role in adult human liver, adrenal gland, macrophages, and kidney, but not in intestines. Journal of lipid research. 1998; 39(8):1722-7.
20. JohnRBurnett, LisaJWilcox, DawnETelford. Inhibition of ACAT by avasimibe decreases both VLDL and LDL apolipoproteine B production on miniature pigs. Journal of lipid research. 1999;40(7):1317-27.
21. 屈松栢, 李家康. 實用中醫心血管病學. 제2판. 北京:科學技術文獻出. 2000:3.
22. 이원철. 赤何首烏가 고콜레스테롤 식이에 의하여 유발된 家兔 관상동맥의 죽상경화에 미치는 영향. 대한한의학회지. 1995;16(1):425-34.
23. 유연희, 강두희. 고려인삼추출물이 혈관 평활근에 대한 작용. 연세의대 논문집. 1981;14(1): 148.
24. 정태숙, 최명숙, 박영배, 복성해. 글피 Bioflavonoids의 고지혈증 및 동맥경화 예방 치료효과와 기작 연구. 식품산업과 영양. 2000; 5(2):21-8.
25. 김태균, 김승희, 강석연, 정기영, 최돈하, 박용복, 류중훈, 한형미. 동맥경화 유발 토끼와 형질전환 마우스에서 산마늘 추출물의 항동맥경화 효과. 생약학회지. 2000;31(2):149-56.

黃連阿膠湯이 Free Cholesterol에 의한 혈관내피세포 손상에 미치는 영향

26. 蔡仁植. 傷寒論譯詮. 서울:高文社. 1995:213.

27. 전국한의과대학 본초학교실. 본초학. 서울:永林社. 1995:178-81, 581-2, 584-5.

28. 서부일, 김상찬 감수. 本草集成. 서울: 목과토. 2000:108-14, 826-8, 832-4.