

고지방 식이로 유도된 당뇨병성 죽상경화 마우스 모델에서 밀몽화의 효능 연구

황선미¹, 이윤정¹, 김은주¹, 김혜읍¹, 리향¹, 최용준², 조남근², 이호섭¹, 강대길^{1*}

1: 원광대학교 한의학전문대학원 2: 원광대학교 한의과대학 침구학교실

Effect of *Buddleja officinalis* in Diabetic Atherosclerotic Mouse Model Using High Fat Diet

Sun Mi Hwang¹, Yun Jung Lee¹, Eun Ju Kim¹, Hye Yoom Kim¹, Xiang Li¹,
Yong Jun Choi², Nam Geun Cho², Ho Sub Lee¹, Dae Gill Kang^{1*}

1: Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University

2: Department of Acupuncture & Moxibustion, College of Oriental Medicine, Wonkwang University

ABSTRACT

Objectives : This study was designed to investigate the effects of an aqueous extract from *Buddleja officinalis* Maxim (ABO) on vascular dysfunction in low-density lipoprotein receptor deficient (LDLr KO) mice.

Methods : Present study showed that LDLr KO mice were fed a high fat diet consisting of 60 kcal% fat, with or without 200 mg/day/kg ABO of diet, for 14 weeks.

Results : High fat diet-LDLr KO mice were treated with ABO were completely normalized by lowering glucose. ABO reduced intima/media thickness in a high fat diet-LDLr KO mice without affecting plasma cholesterol and triglyceride levels. ABO caused endothelium-dependent relaxation in the acetylcholine-precontracted aorta of high fat diet-LDLr KO mice. ABO increased eNOS expression, while decreased cell adhesion molecules expression in high fat diet-LDLr KO mice.

Conclusions : In conclusion, chronic treatment with ABO improved hyperglycemia and endothelium-dependent vascular relaxation as well as exhibited anti-inflammatory effect in diabetic atherosclerotic mouse model, independent of effects on plasma lipids.

Key words : *Buddleja officinalis*; Atherosclerosis; LDLr KO; eNOS; CAMs

서 론

현대 사회에서 심각한 사회 문제로 대두되고 있는 비만, 고혈압 환자에서 협심증, 심근경색증, 뇌경색 및 말초혈관 질환 등의 죽상경화성 질환이 흔히 동반되는 것은 잘 알려진 사실이며, 이러한 질환에 흔히 동반되는 공복 및 식후 고 인슐린 혈증이 죽상경화성 심혈관 질환의 독립적인 위험 인자가 될 수 있다는 연구 결과가 많이 보

고되고 있다¹⁾. 그러므로 죽상경화증과 같은 대혈관 합병증은 각종 뇌혈관 및 심혈관 질환의 직접적인 원인이 되어 당뇨병 환자의 사망률의 원인이 되고 있다. 고혈당은 혈관 손상 발달을 조절하는 데 있어 중요한 역할을 하고 있으며, 고혈당에 의한 내피 세포의 기능 장애는 과응고 상태와 함께 죽종성 혈전증 등의 합병증을 유발하는 것으로 알려져 있다²⁾. 혈관 손상으로 대표되는 내피 세포의 기능 장애는 세포 유착 분자 및 사이토카인의 과발현

* 교신저자 : 강대길, 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의학전문대학원

· Tel : 063-850-6933 · E-mail : dgkang@wku.ac.kr

· 접수 : 2009년 11월 17일 · 수정 : 2009년 12월 10일 · 채택 : 2009년 12월 21일

을 통하여 나타나며, 특히 죽상경화에 의한 손상에 있어 내피세포는 intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), 그리고 E-selectin과 같은 세포유착 분자(cell adhesion molecules) 발현 증가를 유도한다³⁾. 이러한 상황에서 수많은 백혈구가 혈관 내벽에 붙게 되며, 혈관 내벽을 통과하여 내피 세포 기능 저하 및 조직 손상을 유발하게 된다. 이전의 연구에서 고혈당 상태에서 내피 세포와 단핵구를 배양하면 유착률이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 ICAM-1, VCAM-1 및 E-selectin과 같은 세포 유착 분자의 과발현에 의한 백혈구와의 결합이 고포도당 상태에서 증가함을 보여주고 있다⁴⁾. 그러나, 고혈당에 의한 혈관 합병증에 관한 정확한 메커니즘에 대해서는 그 기전이 아직 밝혀져 있지 않다. 그러므로 당뇨병성 죽상경화증을 억제하는 효능 연구를 수행하고자 할 때 필요한 병태동물 모델의 구축이 매우 중요하다. 최근에 가장 이상적인 당뇨병성 죽상경화증 동물 모델은 LDL (low-density lipoprotein) 수용체가 결핍된 마우스에 고지방 식이(high fat diet)를 실시한 모델이다. 이러한 LDLr KO 마우스에서는 고혈당 및 고 인슐린 혈증이 나타나며 비 당뇨병 마우스에 비해 죽상경화 병변이 확연히 증가하는 것을 볼 수 있었다⁵⁾. 혈관 내피 세포 손상은 혈관 이완 반응성으로 대표되며 고지방 식이에 의해 유발된 당뇨 쥐에서는 acetylcholine (ACh)에 대한 혈관 이완이 감소된다고 보고되어 있다⁶⁾. 혈관 평활근(vascular smooth muscle)의 수축과 이완을 조절하는 기전은 매우 다양하다. 이러한 기전 중에서 가장 중요한 하나는 혈관 내피 세포유래 이완인자인 산화질소(NO)이며⁷⁾, 혈관 내피 세포에서 NO의 생성을 증가시켜 혈관을 이완시키는 한약이나 생약은 최근에 많이 보고되고 있다^{8,9)}. 그러나 당뇨병성 동물모델에서 밀몽화 추출물에 의한 혈관 이완 효과 및 혈관 염증 등 혈관 기능에 관련된 메커니즘에 대한 연구는 아직 많이 보고되어져 있지 않다.

밀몽화(*Buddlejase Flos*)는 마전과(Loganiaceae)에 속한 낙엽관목인 밀몽화(*Buddlejase officinalis* Maxim)의 말린 꽃이나 꽃봉오리로味甘, 平, 微寒, 無毒하고祛風散熱, 明目退翳하는 효능이 있어多淚明, 眼生翳膜, 視物昏花 등에 사용되어 왔다. 주로 술(酒)에 하룻밤 담궈서 건조시켜 꿀(蜜)과 뒤섞어 오전 6시에서 오후 6시까지 증한 후 햇볕에 말려서 사용한다¹⁰⁾. 또한 밀몽화에 대한 실험적 연구로는 항균작용¹¹⁾, 항산화작용¹²⁾, 신경세포 보호 효과¹³⁾, aldose reductase 활성 억제¹⁴⁾ 등에 관한 보고가 있으며, 항염증 효과¹⁵⁾에 관한 연구 결과도 있었으나, 당뇨병성 혈관 합병증에 관한 연구는 아직 미진한 상태이다. 최근에는 고혈당 상태의 혈관 내피 세포에서 밀몽화 추출물에 의한 혈관 보호 효과가 보고되었으나 동물 모델을 통한 효능 연구는 아직 이루어지지 않았다^{16,17)}. 그러므로 본 연구는 당뇨병성 죽상경화 마우스 모델에 밀몽화 열수 추출물을 장기간 투여하여 혈관 기능 개선 효과 및 관련 메커니즘에 대해 알아보려 한다.

재료 및 방법

1. 시료의 제조

밀몽화는 원광대학교 한방병원(익산, 전북)에서 구입한 후 정선하여 사용하였고, 1 kg (Voucher specimen DH-12)을 건조시킨 후 분쇄기를 이용하여 분말로 하였으며, 삼각 플라스크에 밀몽화 300 g과 증류수 1.5 L를 넣고 냉각기를 설치한 후 120분간 가열하였다. 추출된 전탕액을 3,000 rpm으로 30분간 원심 분리 후 여과지(Whatmann No. 3)를 이용하여 여과하였다. 여과된 밀몽화 전탕액을 냉동건조기를 이용하여 동결 건조시킨 후 사용 전까지 -20°C에 보관하였다. 수율은 약 9%였다.

2. 실험동물 및 식이

6 주령 수컷 LDL receptor knockout (LDLr KO) 마우스 및 wild type 마우스 (C57BL/6J)를 Jackson laboratory (Bar Harbor, ME, USA)에서 구입하여 실험에 사용하였다. LDL receptor knockout 및 wild type 마우스는 온도 22 ± 2°C, 습도 50~60%의 항온항습 장치에서 12시간씩 암기와 명기를 조절하면서 1주간 적응기를 거쳤다. 적응기를 거친 후 아래와 같이 8마리씩 5개 그룹으로 무작위로 구분하였다. 1) Wild type mice + normal diet group, 2) Wild type mice + high fat diet group, 3) LDLr KO mice + high fat diet group, 4) LDLr KO mice + 200 mg/kg/day 밀몽화, 5) LDLr KO mice + 3 mg/kg/day of fluvastatin. High fat diet는 Research Diet (D12492; New Brunswick, NJ, USA)에서 구입하였으며 60% kcal% fat으로 구성되어 있다. 그룹별로 분리한 후 5주간 각각의 그룹에 normal diet 및 high fat diet를 투여하였으며 6주가 되는 시점에서 총 14주 동안 밀몽화, fluvastatin을 high fat diet와 함께 각각 fluvastatin 3 mg/kg/day, 밀몽화 200 mg/kg/day를 투여하였다.

3. 혈액 생화학적 분석

혈당은 마우스의 꼬리 정맥의 전혈에서 Onetouch[®] Ultra[™] Blood glucose Meter 및 Test Strip (Life Scan Inc, CA, USA)을 이용하여 측정하였다. 측정값은 Onetouch[®] Ultra[™] Blood glucose Meter의 수치를 mg/dL로 나타내었다. GOT, total protein, total bilirubin, HDL, LDL, TG level 등은 commercial kits (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)를 이용하여 측정하였다.

4. 흉부대동맥의 분리 및 혈관장력 측정

실험동물을 단두한 후 흉부 대동맥을 분리하였다. 분리된 흉부 대동맥을 118 mM NaCl, 4.7 mM KCl, 1.1 mM MgSO₄, KH₂PO₄, 1.5 mM CaCl₂, 25 mM NaHCO₃,

10 mM glucose가 들어있는 차가운 Krebs 용액(pH 7.4)에 넣고 연결 조직과 지방을 제거한 후 약 3 mm의 길이의 절편으로 만들었다. 흉부 대동맥 절편에 95% O₂-5% CO₂ 기체로 포화시킨 37°C의 Krebs 용액으로 고정시킨 후 force-displacement transducer (Grass FT 03, GRASS Instrument, MA, USA)가 장착된 생리 기록계(Grass Model 7E, Grass Instrument, MA, USA)를 이용하여 isometric tension을 측정하였다. 실험에 사용된 혈관은 내피 세포가 손상되지 않도록 주의하여 분리하였으며, Krebs 용액에서 1 g 휴지기 장력을 유지하면서 1 시간 동안 안정화시켰다. 혈관이 안정화된 후 phenylephrine으로 수축시켰고 이어서 SNP 및 ACh에 대한 혈관이완 반응을 측정하였다.

5. 조직절편 제작과 hematoxylin-eosin 염색

적출된 흉부대동맥 조직을 10% 포르말린(pH 7.4)에 3일간 고정시킨 후, 수세로써 조직 내에 남아있는 포르말린을 제거하였다. 알코올(50~100%) 농도 상승 순으로 탈수하고 xylene으로 치환하였다. 파라핀 침투과정을 거친 후 포매하여 블록을 제작하였다. 준비된 파라핀 블록을 회전형 박질기(microtome; Thermo Electron Corporation, Pittsburg, PA, USA)를 사용하여 6~7 µm 두께로 자른 뒤 슬라이드 위에 부착시켜 실온에서 3일 동안 건조시킨다. 절편된 조직이 붙어있는 슬라이드의 파라핀을 제거하고, 탈 xylene 흡수 과정을 거쳐 수돗물에 세척하였다. 핵 염색을 위해 Harris hematoxylin solution (Sigma, USA)에 슬라이드를 침적시킨 후 세척하였다. 감별탈색을 위해 1% HCl-EtOH에 5초씩 2번 침적시키고 세척하였다. 0.5% ammonium water로 중화 현색한 뒤 다시 세척하고, 1% eosin Y solution (Muto, Japan)에 2분 동안 침적시켜 세포질 염색을 한 후 탈수과정을 거쳤다. xylene 용액에서 투명 과정을 거쳐 봉입제로 봉합한 후 광학현미경으로 400배 시야에서 관찰한 후 사진을 촬영하였다(BX41, Olympus, Japan).

6. 혈관 조직의 eNOS 발현 측정

적출된 흉부대동맥 조직을 4% paraformaldehyde 용액으로 고정하고, 30% sucrose 용액에 조직을 침적시켰다. 조직을 동결한 후 cryotome SME (Thermo Electron Corporation, Pittsburg, PA, USA)를 이용하여 4 µm의 두께로 평행하게 횡단절편을 만든 후 슬라이드글라스 위에 부착시켰다. 실온에서 하룻밤 충분히 건조시킨 다음 내인성 과산화효소(endogenous peroxidase)의 활성을 방지하기 위해 3% hydrogen peroxide 용액에 넣어 1분간 실온에 방치하였다. 이후 조직을 PBS로 3번 세척한 다음 10% non-immune goat serum을 사용하여 20분 동안 반응시켜 항체의 비특이적 결합을 방지하였다. 그 다음 anti-eNOS (1 : 200, Santa Cruz Biotechnology, Inc, USA)를 붙여 습윤

상자에 넣고 4°C에서 하룻밤 동안 방치하였다. 슬라이드를 세척한 다음 이차항체를 실온에서 반응시킨 뒤 Horseradish peroxidase-conjugated streptavidin에 30분 동안 반응시킨 후 PBS로 3번 세척하였다. 일정시간 동안 발색시킨 다음 흐르는 물에 씻어 반응을 중지시킨 후 봉입제로 봉입하였다. eNOS의 발현 정도는 광학현미경으로 1,000배 시야에서 관찰한 후 사진을 촬영하였다(BX41, Olympus, Japan).

7. 단백질 분리와 western blot 분석

조직 및 세포를 수집하여 Homogenase buffer [20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1 mM EDTA, 140 mM NaCl, 1% Triton X-100, 2.5 mM sodium pyro-phosphate, 1 mM β-glycerolphosphate, 1 mM sodium vanadate, 1 µg/ml leupeptin, 1 mM PMSF]로 용해시켜 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질은 Bradford (Bio-Bad, USA)법으로 정량하여 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE)로 전기 영동하여 분리하였다. 전기영동 후 gel 내 단백질을 nitrocellulose membrane에 전이시켰다. Membrane을 5% (w/v) non-fat dry milk가 포함된 Tris-buffered saline [TBS: 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl] with 0.1% Tween-20 (TBS-T)용액에 1시간 동안 담궈 비특이적인 결합을 방지하기 위하여 blocking을 시행하였다. Blocking된 membrane에 1차 항체를 1 : 1,000 비율로 희석한 후 4°C에서 반응시켰다. 그 후 TBS-T에 1 : 2,000 비율로 희석한 horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse 혹은 goat IgG 항체와 상온에서 반응시키고, TBS-T로 충분히 세척한 다음, enhanced chemiluminescence system을 이용하여 발현 측정 후 정량하였다.

8. 통계처리

실험군간의 유의성은 또한 모든 실험결과들의 통계처리는 Sigma plot program (SPSS Inc., Chicago, USA)에 의한 student's *t*-test를 이용하여 *p*값이 0.05 이하인 경우 유의한 차이로 판정하였고, 실험 결과의 표현은 mean ± S.E.로 하였다.

결 과

1. 당뇨병성 죽상경화 마우스 모델에서 밀몽화 추출물 투여에 대한 혈액 생화학적 분석

당뇨병성 죽상경화 동물모델은 현재까지도 증상과 일치하는 정확한 모델을 구축하지 못한 상태이다. LDLr KO 마우스에 고지방 식이를 투여한 것은 최근에 가장 많이 알려진 당뇨병성 죽상경화 동물모델이다⁴⁾. 그러므로

본 연구에서 밀몽화에 의한 당뇨병성 죽상경화 억제 효능을 알아보기 위하여 LDLr KO 마우스에 먼저 5주간 고지방 식이를 일제히 실시한 후 밀몽화 200 mg/kg/day 및 콜레스테롤 강하제인 fluvastatin 3 mg/kg/day를 각각 14주간 투여하면서 혈당 변화를 측정하였다. LDLr KO 마우스에 고지방 식이를 실시한 군은 혈당을 측정하는 기간 동안 220 mg/dl 이상을 유지하였다. 그러나 밀몽화 추출물 및 fluvastatin을 각각 투여한 군에서는 유의성 있는 혈당 감소 효과를 보였다. 신기능을 측정하는 검사에서 BUN 및 혈청 creatinine 수치는 LDLr KO 마우스에 고지방 식이를 실시한 군과 밀몽화 투여군, 그리고 fluvastatin 투여군에서 모두 정상범위에 속하였다. 간 기능의 상태를 조사하기 위한 혈청 내 효소치를 측정하는 검사에서도 total protein, GOT, total-bilirubin 수치 모두 정상 범위에서 나타났다. 고지혈증을 나타내어 주는 콜레스테롤 수치 검사에서 total-cholesterol은 LDLr KO 마우스에 고지방 식이를 실시한 군과 밀몽화 투여군, 그리고 fluvastatin 투여군에서 특이할 만한 변화는 보이지 않았다. 중성지방 및 LDL 콜레스테롤, HDL 콜레스테롤 수치 역시 유의성 있는 변화는 보여주지 않았다(Table. 1).

Table 1. Effect of ABO on Biochemical Analysis of Plasma in LDLr^{-/-} mice Fed a High Fat Diet

	LDLr ^{-/-} +H	LDLr ^{-/-} +H +ABO	LDLr ^{-/-} +H +FLUvastatin
Body weight (g)	40.3±1.5	41.3±0.9	45.2±2.1
BUN (mg/dl)	25.3±1.7	22±0.6	19.6±0.6
Creatinine (mg/dl)	0.02	0.017	0.01
T-pro (g/dl)	5.2±0.1	5.23±0.1	5.1±0.1
GOT (IU/L)	63.3±6.2	72±6.5	83±7.8
T-bilirubine (mg/dl)	0.6±0.1	0.76±0.1	0.5±0.1
T-chol (mg/dl)	252.1±2.5	275.5±11.4	281.4±1.8
TG (mg/dl)	119.6±2.7	116.2±3.1	189.8±2.7
LDL (mg/dl)	98.8±1.4	119.9±2.1	122.6±3.0
HDL (mg/dl)	129.5±1.8	132.8±1.4	120.8±2.4
Glucose (mg/dl)	228.13±9.1	153.57±8.4*	175.75±9.3*

BUN : Blood Urea Nitrogen. T-pro : Total Protein.

GOT : Glutamic Oxaloacetic Transaminase.

T-bilirubin : Total Bilirubin.

T-chol : Total Cholesterol, TG : Triglyceride.

LDL : Low Density Lipoproteins. HDL : High Density Lipoproteins.

Values are expressed as mean ± S.E. (n=10).

* : $p < 0.05$ vs. LDLr^{-/-} + H.

2. 당뇨병성 죽상경화 마우스 모델에서

밀몽화 추출물 투여에 의한 혈관 장력의 변화

밀몽화에 의한 혈관 기능 개선 여부를 확인하기 위하여 경동맥을 적출한 후, 혈관 이완 실험을 수행하였다. LDLr KO 마우스에 고지방 식이를 실시한 군 및 밀몽화, fluvastatin 투여군의 경동맥을 이용하여 ACh 및 SNP에 대한 혈관 이완 반응을 조사하였다. LDLr KO 마

우스에 고지방 식이를 실시한 군의 경동맥에서 내피 세포 의존성 혈관 이완 인자인 ACh에 대한 혈관 이완 반응은 일반 식이를 투여한 군에 비해 현저히 감소하였다. 3 mg/kg fluvastatin을 투여한 군은 고지방 식이에 의해 감소된 ACh에 대한 혈관 이완 반응을 현저히 개선시켰고, 200 mg/kg 밀몽화 추출물과 함께 투여한 군은 감소된 ACh에 대한 혈관이완 반응을 유의성있게 개선시켰다. NO donor인 SNP에 대한 혈관 이완 반응은 LDLr KO 마우스에 고지방 식이를 실시한 군과 fluvastatin 및 밀몽화 투여군 사이에 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았다. 그러므로 당뇨병성 죽상경화 마우스 모델에서 밀몽화 추출물에 의한 혈관 이완 개선 효과를 확인하였으며, 이는 혈관 내피 세포 의존적인 것으로 나타났다(Fig. 1).

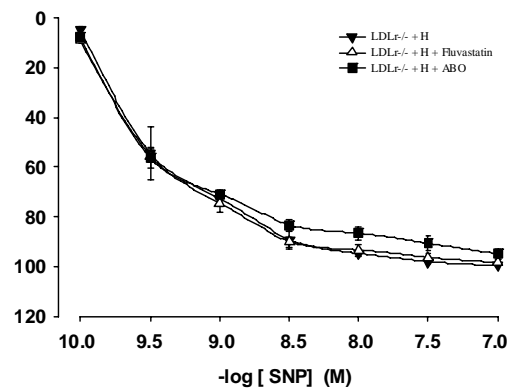
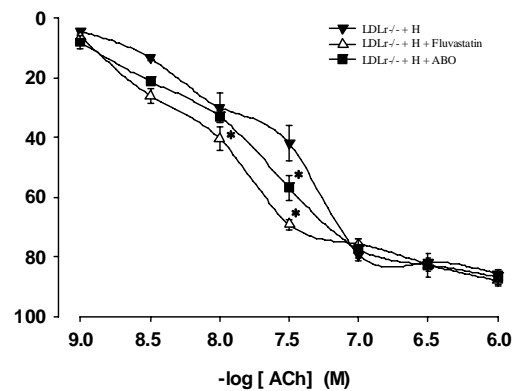


Fig. 1. Effect of ABO on dose-dependent acetylcholine (ACh) or sodium nitropursside (SNP)-induced contraction in thoracic aortic rings from LDLr^{-/-} mice fed a high fat diet

Values are expressed as mean ± S.E. (n=10).

* : $p < 0.05$ vs. LDLr^{-/-} + H.

3. 당뇨병성 죽상경화 마우스 모델에서

밀몽화 투여에 의한 혈관 병변 억제 효과 분석

당뇨병성 죽상경화 마우스 모델에서 밀몽화 투여에 의한 혈관 병변 억제 효과를 분석하기 위하여 흉부 대동맥을 적출한 후, H&E staining을 실시하였다. Wild type 마우스에 normal diet를 실시한 군에서는 정상적인 혈관 형태를

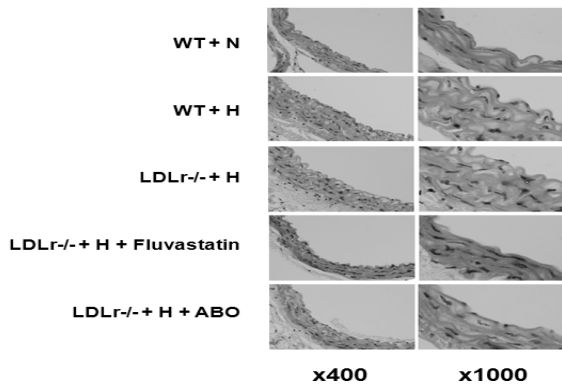


Fig. 2. Protective effect of ABO on intima and media thickness in LDLr^{-/-} mice fed a high fat diet. H&E staining of thoracic artery

Each figure indicated WT + N, WT + H, LDLr^{-/-} + H, LDLr^{-/-} + H + 3 mg/kg/day fluvastatin, LDLr^{-/-} + H + 200 mg/kg/day ABO, respectively. Objective magnification ×400 (left), ×1000 (right).

보이고 있으나 wild type에 고지방 식이를 실시한 군에서는 혈관 내막의 비후도가 증가하는 경향을 보이고 있다. LDL receptor knockout 마우스에 고지방 식이를 실시한 군에서는 혈관 내막 및 중막의 비후도가 wild type에 고지방 식이를 실시한 군과 비교하였을 때 확연한 증가현상을 보이고 있으며 fluvastatin을 투여한 군에서는 그 효과가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 밀몽화 추출물을 투여한 군에서는 혈관 내막 및 중막의 비후도가 다소 감소하는 경향을 보이고 있으며, 내피층 표면의 손상 정도 역시 LDL receptor knockout 마우스에 고지방 식이를 실시한 군에 비해 그 정도가 감소함을 보여주고 있다(Fig. 2).

4. 당뇨병성 죽상경화 마우스 모델에서 밀몽화 투여에 의한 혈관 염증 억제 효과 분석

당뇨병성 죽상경화 마우스 모델에서 밀몽화 투여에 의한 항 염증 효과를 알아보기 위하여 각 군에서 흉부 대동맥을 적출하여 단백질을 분리한 후 혈관 유착 분자인 VCAM-1, ICAM-1 및 E-selectin의 발현을 확인하였다. Western blotting 결과, wild type에 고지방 식이를 실시한 군은 normal diet를 실시한 군에 비해 혈관 유착 분자의 단백질 발현이 증가하였으며, 이러한 증가 효과는 LDL receptor knockout 마우스에 고지방 식이를 실시한 군에서 확연히 증가하는 것을 확인하였다. 그러나, 밀몽화 200 mg/kg 투여군에 의해 혈관 유착 분자의 증가 효과는 확연히 감소하였다 (Fig. 3).

5. 당뇨병성 죽상경화 마우스 모델에서 밀몽화 투여에 의한 eNOS의 발현 분석

밀몽화는 LDL receptor knockout 마우스에 고지방 식이를 실시한 군에서 내피 세포 의존성 혈관 이완 효과를

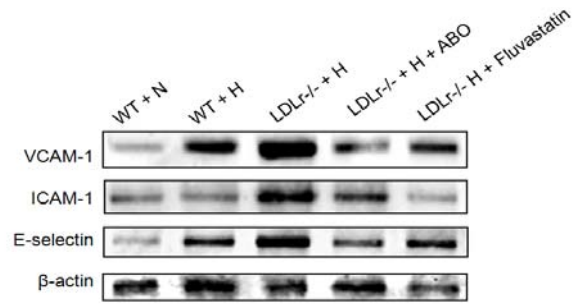


Fig. 3. Effect of ABO on cell adhesion molecules expression in LDLr^{-/-} mice fed a high fat diet

Western blot analysis of thoracic artery from high fat diet rats was performed with monoclonal antibodies raised against E-selectin, VCAM-1, ICAM-1, and with polyclonal antibody actin (internal control). Each band indicated WT + N, WT + H, LDLr^{-/-} + H, LDLr^{-/-} + H + 3 mg/kg/day fluvastatin, LDLr^{-/-} + H + 200 mg/kg/day ABO, respectively.

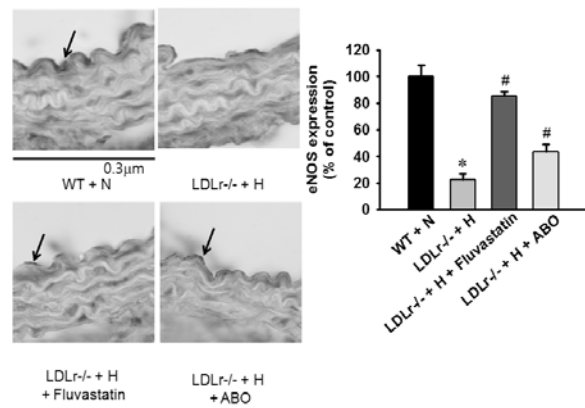


Fig. 4. Effect of ABO on eNOS immunoreactivity in LDLr^{-/-} mice fed a high fat diet

Each figure indicated WT + N, LDLr^{-/-} + H, LDLr^{-/-} + H + 3 mg/kg/day fluvastatin, LDLr^{-/-} + H + 200 mg/kg/day ABO, respectively. Objective magnification, ×1000. Right panel indicates the percentage of activated endothelial cells for eNOS in thoracic aorta. Values are expressed as mean ± S.E. (n=10). * *p* < 0.05 vs. WT + N, # *p* < 0.05 vs. LDLr^{-/-} + H.

나타냈으므로 NO와의 관련성을 알아보기 위하여 흉부 대동맥에서 immunohistochemistry를 이용하여 NO 합성 효소인 eNOS 발현을 관찰하였다. Wild type에 normal diet를 실시한 군에 비하여 LDL receptor knockout 마우스에 고지방 식이를 실시한 군은 eNOS의 발현을 거의 볼 수 없었고, fluvastatin 투여군에서는 eNOS 발현이 확연히 회복되는 것을 볼 수 있었다. 또한 밀몽화 200 mg/kg/day 투여군에서도 유의성 있는 eNOS의 증가를 확인하였다 (Fig. 4).

고찰

본 연구는 고지방 식이를 실시한 LDL receptor knockout 마우스 모델에서 밀몽화 추출물에 의한 혈관 기능 보호

효과를 조사하기 위해 진행되었다. 당뇨병성 죽상경화증 모델로 가장 이상적인 것은 LDLr KO mice에 고지방 식이(high fat diet)를 실시한 모델이다. 본 연구에서 LDLr KO mice에 60% kcal% fat를 포함한 고지방 식이를 14주간 장기간 투여한 결과, 현저한 혈당의 증가를 초래하였다. 흥미롭게도 밀몽화 추출물의 장기 투여는 고지방 식이에 의한 혈당 증가를 유의성 있게 감소시키는 것으로 나타났다. 그러나 밀몽화 추출물에 의한 지질대사 개선 효과는 HDL 및 중성지방, LDL 콜레스테롤을 개선시키지는 않았으므로 밀몽화에 의한 혈당 감소 효과와 지질 대사 개선 효과는 독립적으로 이루어진다는 것을 확인할 수 있었다.

실제로 어떠한 동물 실험이나 임상에서도 당뇨에 의한 직접적인 죽상경화 병변이 나타난다는 보고는 거의 없으나, 당뇨가 괴사성 지방핵(necrotic lipid core) 형성에 기여하는 것은 사실로 보인다. 이는 제1형 당뇨병환자에서 fatty streak나 intima/media thickness와 같은 lesion initiation이 dyslipidemia와는 상관없이 활발히 나타난다는 사실에 기인한다^{18,19}. 괴사성 지방핵은 염증 반응의 지속으로 인해 거품 세포의 숫자가 증가하면서 일부가 괴사하게 되고 죽은 세포들이 머금고 있던 지질이 배출되면서 형성된다. 이러한 괴사성 지방핵은 평활근 세포의 증식으로 생겨나는 fibrous cap과 함께 죽상경화반(atherosclerotic plaque)을 형성하게 된다^{20,21}. 그러므로 당뇨병에 기인한 죽상경화 병변은 장기간 당뇨에 의한 혈관 기능 장애가 지속되어 죽상경화반 형성에 영향을 줄 것이라 추측하고 있다. 본 실험에서도 장기적인 고혈당으로 인하여 초기 죽상경화증으로 대표될 수 있는 혈관 기능 장애가 나타났으나 중증 죽상경화증을 나타내지는 못하였으며 이는 혈관 장력의 감소와 ICAM-1, VCAM-1, E-selectin과 같은 혈관 내피 세포 내 세포 유착 분자의 발현 증가 등으로 설명할 수 있다. 죽상경화의 초기 단계에서 내피 세포에서의 ICAM-1, VCAM-1, E-selectin과 같은 세포 유착 분자의 발현이 증가한다. 그 결과로 단핵구 및 백혈구의 염증 부위로의 침투가 증가하고 이들에 의한 염증 사이토카인의 분비는 혈관 염증을 더욱 진행시킨다^{22,23}. 그러므로 이러한 세포 유착 인자의 발현 억제는 죽상경화를 예방 및 치료할 수 있는 좋은 치료 목표가 될 수 있으며, 특히 장기간 투여로 인한 부작용 면에서 안전한 천연물을 이용해 이들 분자들의 선택적인 억제로 죽상경화를 억제시켰다는 연구가 최근 많이 보고되고 있다. 본 연구결과에서 밀몽화 추출물은 고지방 식이를 실시한 LDL receptor knockout 마우스 모델에서 증가한 세포 유착 분자인 ICAM-1, VCAM-1 및 E-selectin의 발현을 현저하게 감소시켰다. 그러므로 밀몽화 투여가 TG나 LDL 콜레스테롤의 개선 없이 혈당 강하 효과를 나타내고 더 나아가 혈관 이완 및 항염증 효과를 나타내는 것으로 보아 초기 죽상경화에 효과를 준다고 사료된다.

NO는 평활근 세포내로 확산되어 평활근 세포내의 sGC를 활성화시켜 cGMP를 생성하는데 이차 전령인 cGMP의

역할로 인해 칼슘 통로가 닫힘으로써 혈관 평활근이 이완된다. 내피 세포의 손상으로 인한 내피 세포 내의 NO 농도 감소는 혈관 장력 조절의 실패로 이어지고 이로 인한 혈관 긴장도 증가는 고혈압, 혈관염증, 죽상경화 등을 유발시킨다고 여러 연구에서 보고된 바가 있다. 최근 연구에서는 비만 쥐에서 내피 세포 손상에 의해 ACh에 대한 혈관 이완 반응성이 현저히 손상됨을 보고하였다²⁴. 또한 고지방 식이는 흰쥐에서 인슐린 저항성과 체중 증가를 유도하고 이로 인해 혈관 내피 세포가 손상된다는 보고가 있다²⁵. 그러므로 본 연구자는 고지방 식이를 실시한 LDL receptor knockout 마우스 모델에서 밀몽화 추출물의 장기투여에 의한 혈관 이완 반응성 변화를 검증하였다. 실험 결과에서 고지방 식이를 실시한 LDL receptor knockout 마우스는 흥부 대동맥에서 ACh에 대한 혈관 이완 반응이 현저히 감소하였다. 흥미롭게도 밀몽화 추출물의 장기 투여는 고지방 식이를 실시한 LDL receptor knockout 마우스의 손상된 혈관 이완 반응을 현저히 개선시켰다. ACh의 혈관 이완 반응은 G protein-coupled receptor인 muscarinic receptors를 경유하여 나타난다. ACh의 수용체 결합에 의한 결과로 내피 세포 내의 칼슘 농도가 증가되고, 이는 내피 세포 내의 NO생성 효소인 eNOS의 활성을 돕는다. 이러한 결과로 내피 세포 내의 NO의 증가는 혈관 평활근을 이완시켜 혈압을 낮추는 역할을 한다^{26,27}. 본 연구에서 immunohistochemistry를 통해 혈관 내막의 eNOS의 발현이 밀몽화 추출물을 투여한 군에서 현저히 증가하는 것을 확인하였으며, 이는 NO의 증가로 인한 혈관 기능 장애 개선 효과를 지지해주고 있다. 또한 실험 결과에서 밀몽화 추출물은 고지방 식이를 실시한 LDL receptor knockout 마우스 모델에서 흥부 대동맥의 내피층 표면이 거칠어지고, 중막 평활근이 비후되는 것을 개선시켰다. 따라서 밀몽화 추출물은 고지방 식이를 실시한 LDL receptor knockout 마우스 모델에서 혈관 내피 세포의 기능적인 향상이나 NO의 생물학적인 활성도를 증가시켜 ACh에 대한 혈관 이완 반응성을 증가시키는 것으로 사료되며, 더 나아가 혈관기능 장애를 개선시키는 것으로 보여진다. 이는 밀몽화 추출물이 당뇨병성 죽상경화에서 혈관 장력의 조절에 아주 중요한 역할을 하고 있는 것으로 사료되며, 밀몽화 추출물에 의한 혈압 강하 메커니즘 연구가 필요할 것으로 보인다.

결 론

본 연구는 밀몽화 추출물이 당뇨병성 혈관 합병증에 대한 억제 효과를 관찰하고자 수행하였으며, 다음과 같은 결론을 얻었다.

LDL receptor knockout 마우스에 고지방 식이를 14주 동안 실시하여 혈당의 유의성 있는 증가를 보였으며, 밀몽화 200 mg/kg을 투여한 군에서 유의성 있는 혈당 감소 효과를 보였다. 고지방 식이를 실시한 LDL receptor

knockout 마우스 모델에서 밀몽화 추출물과 함께 투여한 군은 감소된 ACh에 대한 혈관 이완 반응을 현저히 개선시켰다. LDL receptor knockout 마우스에 고지방 식이를 실시한 군에서는 intima 손상 및 intima/media의 비대 효과를 볼 수 있었고, 밀몽화 투여에 의해 확인한 감소 효과를 볼 수 있었다. LDL receptor knockout 마우스에 고지방 식이를 실시한 군에서는 ICAM-1, VCAM-1, E-selectin의 확인한 증가를 볼 수 있었으며, 밀몽화 200 mg/kg 투여군에 의해 그 증가 효과가 확연히 감소하였다. Wild type에 normal diet를 실시한 군에 비하여 LDL receptor knockout 마우스에 고지방 식이를 실시한 군은 eNOS의 발현을 거의 볼 수 없었고, 밀몽화 투여군에서 유의성 있는 eNOS의 증가를 확인하였다.

그러므로 밀몽화 추출물은 고지방 식이를 실시한 LDL receptor knockout 마우스 모델에서 혈당을 감소시키고 eNOS 발현을 증가시켜 NO 발생으로 인한 내피 세포 의존적인 혈관이완을 통하여 세포 유착 분자의 발현 감소 및 혈관 내피 세포의 기능적 개선을 통해 초기 죽상경화 증으로 보이는 혈관 염증을 개선시키는 것으로 사료된다. 이는 당뇨병성 혈관 합병증과 같은 혈관 질환에 대한 새로운 치료 방향을 제시하는데 유용할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 원광대학교 연구비지원(2009)에 의해 수행되었음

참고문헌

1. Reaven GM, Las A. Insulin resistance, compensatory hyperinsulinemia, and coronary heart disease. *Diabetologia*. 1994 ; 37 : 948-52.
2. Lopes-Virella MF, Virella G. Immune mechanism of atherosclerosis in diabetes mellitus. *Diabetes*. 1992 ; 41 : 86-91.
3. Quagliaro L, Piconi L, Assaloni R, Da Ros R, Maier A, Zuodar G, Schreyer SA, Vick C, Lystig TC, Mystkowski P, LeBoeuf RC. LDL receptor but not apolipoprotein E deficiency increases diet-induced obesity and diabetes in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002 ; 282 : 207-14.
4. Lee YJ, Kang DG, Kim JS, Lee HS. Lycopodium lucidum inhibits high glucose-induced vascular inflammation in human umbilical vein endothelial cells. *Vascul Pharmacol*. 2008 ; 48 : 38-46.
5. Schreyer SA, Vick C, Lystig TC, Mystkowski P, LeBoeuf RC. LDL receptor but not apolipoprotein E deficiency increases diet-induced obesity and diabetes in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002 ; 282 : 207-14.
6. Wang C, Li J, Lv X, Zhang M, Song Y, Chen L, Liu Y. Ameliorative effect of berberine on endothelial dysfunction in diabetic rats induced by high-fat diet and streptozotocin. *Eur J Pharmacol*. 2009 ; 620 : 131-7.
7. MacNaul KL, Hutchinson NI. Differential of iNOS and cNOS mRNA in human vascular smooth muscle cells and endothelial cells under normal and inflammatory conditions. *Biochem Biophys Res Commun*. 1993 ; 196 : 1330-4.
8. Kuramochi T, Chu J, Suga T. Gou-Teng (From *Uncaria rhynchophylla* Miquel)-induced endothelium-dependent and independent relaxations in the isolated rat aorta. *Life Sci*. 1994 ; 54 : 2061-9.
9. Goto H, Shimada Y, Tanigawa K, Sekiya N, Shitani T, Terasawa K. Effect of *Uncaria ramulus et Uncus* on endothelium in spontaneously hypertensive rats. *Am J Chin Med*. 1999 ; 27 : 339-45.
10. 정보섭, 신민교. 圖解鄉藥(生藥)大事典. 영림사. 1990 ; 850-1.
11. Blondelle SE, Houghten RA. Design of model amphipathic peptides having potent antimicrobial activities. *Biochem*. 1992 ; 31 : 12688-94.
12. Piao MS, Kim MR, Lee DG, Park Y, Hahm KS, Moon YH, Woo ER. Antioxidative constituents from *Buddleia officinalis*. *Arch Pharm Res*. 2003 ; 26 : 453-7.
13. Lee DH, Ha N, Bu YM, Choi HI, Park YG, Kim YB, Kim MY, Kim H. Neuroprotective effect of *Buddleja officinalis* extract on transient middle cerebral artery occlusion in rats. *Biol Pharm Bull*. 2006 ; 29 : 1608-12.
14. Matsuda H, Cai H, Kudo M, Tosa H, Iinuma M. Study on anti-cataract drugs from natural sources. II. Effects on *buddlejae flos* on in vitro aldose reductase activity. *Biol Pharm Bull*. 1995 ; 18 : 463-6.
15. Liao YH, Houghton PJ. Novel and known constituents from *Buddleja* species and their activity against leukocyte eicosanoid generation. *J Nat Prod*. 1999 ; 62 : 1241-5.
16. Lee YJ, Kang DG, Kim JS, Lee HS. Effect of *Buddleja officinalis* on high-glucose-induced vascular inflammation in human umbilical vein endothelial cells. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2008 ; 233 : 694-700.
17. Lee YJ, Kang DG, Kim JS, Lee HS. *Buddleja officinalis* inhibits high glucose-induced matrix

- metalloproteinase activity in human umbilical vein endothelial cells. *Phytother Res.* 2008 ; 22 : 1655-59.
18. Järvisalo MJ, Putto-Laurila A, Jartti L, Lehtimäki T, Solakivi T, Rönnemaa T, Raitakari OT. Carotid artery intima-media thickness in children with type 1 diabetes. *Diabetes.* 2002 ; 51 : 493-8.
 19. McGill HC Jr, McMahan CA, Zieske AW, Malcom GT, Tracy RE, Strong JP. Effects of nonlipid risk factors on atherosclerosis in youth with a favorable lipoprotein profile. *Circulation.* 2001 ; 103 : 1546-50.
 20. Johnson JL. Matrix metalloproteinases: influence on smooth muscle cells and atherosclerotic plaque stability. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2007 ; 5 : 265-82.
 21. Li G, Sanders JM, Phan ET, Ley K, Sarembock IJ. Arterial macrophages and regenerating endothelial cells express P-selectin in atherosclerosis-prone apolipoprotein E-deficient mice. *Am J Pathol.* 2005 ; 167 : 1511-18.
 22. Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *N Engl J Med.* 1999 ; 340 : 115-26.
 23. Shimizu Y, Newman W, Tanaka Y, Shaw S. Lymphocyte interactions with endothelial cells. *Immunol Today.* 1992 ; 13 : 106-12.
 24. Nishimatsu H, Suzuki E, Satonaka H, Takeda R, Omata M, Fujita T, Nagai R, Kitamura T, Hirata Y. Endothelial dysfunction and hypercontractility of vascular myocytes are ameliorated by fluvastatin in obese Zucker rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005 ; 288 : 1770-6.
 25. Knight SF, Quigley JE, Yuan J, Roy SS, Elmarakby A, Imig JD. Endothelial dysfunction and the development of renal injury in spontaneously hypertensive rats fed a high-fat diet. *Hypertension.* 2008 ; 51 : 352-9.
 26. Nishida S, Satoh H. Mechanism for the vasodilations induced by Ginkgo biloba extract and its main constituent, bilobalide, in rat aorta. *Life Sci.* 2003 ; 72 : 2659-67.
 27. Rodriguez-Cruz ME, Perez-Ordaz L, Serrato-Barajas BE, Juarez-Oropeza MA, Mascher D, Paredes-Carbajal MC. Endothelium-dependent effects of the ethanolic extract of the mistletoe *Psittacanthus calyculatus* on the vasomotor responses of rat aortic rings. *J Ethnopharmacol.* 2002 ; 39 : 281-6.