

사상 체질 처방의 항동맥경화 효능 비교 연구 -열다한소탕, 양격산화탕, 청심연자탕, 태음조위탕-

김은순, 김예지, 신현규

한국한의학연구원 한약기초연구그룹

Abstract

Anti-atherosclerotic Effects of Herbal Formulas for Sasang Constitutional Medicine

Ohn-Soon Kim, Ye-Ji Kim, Hyeun-Kyoo Shin

Basic Herbal Medicine Research Group, Korea Institute of Oriental Medicine.

Objectives

The purpose of this study was to investigate the anti-atherosclerotic effects of 4 herbal formulas for Sasang constitutional medicine (Yeoldahanso-tang: YDHST, Yanggyeoksanhwa-tang: YGSHT, Cheongsimyeonja-tang: CSYJT and Taeumjowitang: TEJWT).

Methods

The antioxidant activities of herbal formulas were studied by measuring free radical scavenging activities on ABTS and DPPH. The inhibitory effects on LDL oxidation was evaluated by the formation of TBARS, REM and fragmentation of apolipoprotein B-100 (ApoB). Effects of herbal formulas on macrophage lipid accumulation were determined in native LDL and LPS co-incubated macrophages using Oil Red O staining.

Results

The scavenging activities on ABTS and DPPH of herbal formulas were increased in dose-dependent manner (YDHST>YGSHT>CSYJT>TEJWT). Herbal formulas reduced the oxidation properties of LDL induced by CuSO₄. YDHST, YGSHT and CSYJT showed strong suppressive effect on LDL oxidation than TEJWT. In addition, YDHST, YGSHT and CSYJT significantly inhibited foam cell formation in LDL/LPS stimulated RAW 264.7 cells.

Conclusions

These results demonstrate that YDHST, YGSHT and CSYJT have potentials on anti-atherosclerosis by antioxidative effect and suppressive effect on LDL oxidation.

Key Words: Yeoldahanso-tang, Yanggyeoksanhwa-tang, Cheongsimyeonja-tang, Taeumjowitang, Anti-atherosclerotic effect

Received October 8, 2012 Revised November 9, 2012 Accepted November 28, 2012

Corresponding Author Hyeun-Kyoo Shin

Basic Herbal Medicine Research Group, Korea Institute of Oriental Medicine,
Yuseongdae-ro 1672, Yuseong-gu, Daejeon, 305-811, Korea.

Tel: +82-42-868-9464 Fax: +82-42-864-2120 E-mail: hkshin@kiom.re.kr

© The Society of Sasang Constitutional Medicine.
All rights reserved. This is an open access article
distributed under the terms of the Creative
Commons attribution Non-commercial License
(http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/)

I. 緒論

산소를 이용해 생명을 유지하는 모든 생명체들은 세포 내 항산화 방어계와 활성산소종간의 恒常性을 유지하며 생존해 나간다. 이러한 恒常性이 유지되지 못하고 불균형이 초래될 때 산화적 스트레스 (oxidative stress)가 유도되는데 이는 세포 내 다양한 구성 성분에 손상을 초래하여 많은 生理·病理學적 현상에서 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다¹.

동맥경화 (atherosclerosis)는 산화적 스트레스에 기인한 질환 중 하나로, 특히 동맥경화 발병 원인으로 산화 LDL (low density lipoprotein)이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 혈액 내 LDL은 산화적 스트레스에 의해 산화된 LDL (oxidized LDL)로 변화되어 혈관 내막 내로 유입되게 된다. 유입된 산화 LDL은 대식세포의 탐식 작용에 의해 세포 내로 유입되어 거품세포를 형성하게 된다. 거품세포는 대식세포의 염증 반응 및 평활근 세포의 분화·증식 및 혈관내피세포의 변화를 유도하여 플라크를 생성함으로써 동맥경화를 유발하게 된다^{2,3}. 식생활이 서구화되어 가는 우리나라에서도 동맥경화로 인한 순환기계 질환이 날로 증가하고 있는 추세로 효과적인 치료와 예방이 절실히 필요한 실정이다.

四象醫學은 東武 李濟馬의 저서인 『東醫壽世保元』에서 비롯된 體質醫學으로 四象人, 곧 太陽人·太陰人·少陽人·少陰人으로 나누어 生理, 病理, 治療 및 豫防을 달리 접근한다⁴. 四象體質에 따른 각 四象處方들의 生理活性에 대한 몇몇 연구가 진행되어 왔으나, 동맥경화와 관련된 연구는 미흡한 실정이다. 본 연구에서는 少陽人 處方인 涼膈散 火湯과 太陰人 處方 熱多寒少湯, 清心蓮子湯, 太陰調胃湯 4종의 處方을 선정하여 항산화 효과, LDL 산화 억제 효과 및 거품세포 형성 억제 효과를 비교 분석함으로써 산화적 스트레스에 의한 동맥경화와 같은 순환기계 질환의 예방 및 치료의 적용 가능성을 검토하였다.

II. 材料 및 方法

1. 재료

1) 처방 추출

본 실험에 사용된 열다한소탕, 양격산화탕, 청심연자탕, 태음조위탕의 처방 구성 약재들은 (주)옵니허브 (Yeongcheon, Korea)와 (주)HMAX (Jechon, Korea)에서 각각 구입하였다. 각각의 처방에 따라 약재를 배합하고 10배의 물을 가한 후 100°C에서 2시간 동안 무압 환류 추출법 (추출기: 경서메디텍 COSMOS660)을 이용하여 추출하였다. 추출액은 약전표준체를 사용하여 거르고 동결건조기 (일신 동결건조기, PVTFD100R)를 사용하여 처방 추출물 분말을 얻었으며 수득율은 Table 1과 같다.

2. 실험 방법

1) 항산화능 측정

가. ABTS 라디칼 소거능 측정

3-ethyl-benzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) 라디칼을 이용한 항산화능 측정은 ABTS⁺ cation decolorization assay 방법을 96 well plate에 맞게 수정하여 실시하였다⁵. 7 mM ABTS와 2.45 mM potassium persulfate를 최종농도로 혼합하여 실온인 암소에서 24시간 동안 방치하여 ABTS⁺를 형성 시킨 후 743 nm에서 0.7의 흡광도 값을 갖도록 phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4)로 희석하였다. 96 well plate에 ABTS⁺ 용액과 시료를 혼합하여 실온에서 30분간 반응시킨 후, microplate reader (Benchmark Plus, Bio-Rad, USA)를 사용하여 743 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료 추출물의 라디칼 소거활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 RC₅₀값으로 나타내었다. 이때 활성비교를 위하여 Vitamin C를 사용하였다.

Table 1. Combinations of Crude Drugs in Herbal Formulas

		Componented crude drugs (g)			
		YDHST ^{a)}	YGSHT ^{b)}	CSYJI ^{c)}	TEJWI ^{d)}
갈근	Puerariae Radix	15.0			
황금	Scutellariae Radix	7.5		3.75	
고본	Angelicae Tenuissimae Radix	7.5			
나복자	Raphani Semen	3.75		3.75	7.5
길경	Platycodonis Radix	3.75			3.75
승마	Cimicifugae Rhizoma	3.75			
백지	Angelicae Dahuricae Radix	3.75			
생지황	Rehmanniae Radix		7.5		
인동등	Lonicerae Flos		7.5		
연교	Forsythiae Fructus		7.5		
산치자	Gardeniae Fructus		3.75		
박하	Menthae Herba		3.75		
지모	Anemarrhenae Rhizoma		3.75		
석고	Gypsum		3.75		
방풍	Saposhnikoviae Radix		3.75		
형개	Schizonepetae Spica		3.75		
연자육	Nelumbinis Semen			7.5	
산약	Dioscoreae Radix			7.5	
천문동	Asparagi Radix			3.75	
백문동	Liriopsis Tuber			3.75	3.75
원지	Polygalae Radix			3.75	
석창포	Acori Graminei Rhizoma			3.75	3.75
산조인	Zizyphi Spinosi Semen			3.75	
용안육	Longanae Arillus			3.75	
백자인	Thujae Semen			3.75	
감국화	Chrysanthemi Flos			3.75	
의이인	Cocicis Semen				11.25
견을	Castanae Semen				11.25
오미자	Schizandrae Fructus				3.75
마황	Ephedrae Herba				3.75
Total (g)		45	45	52.5	48.75
Yield (%)		29.0	16.2	20.5	19.9

^{a)}Yeoldahanso-tang, ^{b)}Yanggyeoksanhwa-tang, ^{c)}Cheongsimyconja-tang and ^{d)}Taeumjowwi-tang

나. DPPH 라디칼 소거능 측정

1-1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH, Sigma Chemical Co.) 라디칼을 이용한 항산화능 측정은 96 well plate을 이용하여 실시하였다⁶⁾. 96 well plate에 0.15 mM의 DPPH 용액과 시료를 혼합하여 실온에서 30분간 반응시킨 후, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 처방 추출물의 항산화능은 시료를 녹인 용매인 DMSO를 대조군으로 하여 대조군에 대한 라디칼 소거능을 백분율로 나타내었다. 활성비교를 위하여 Vitamin C를 사용하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity} = (1 - A_{\text{sample}}/A_{\text{control}}) \times 100$$

2) LDL 산화 억제 활성 측정

가. Cu²⁺에 의한 LDL의 산화

반응은 LDL (Biomedical Technologies, Stoughton, MA) 100 µg과 시료를 혼합한 후 25 µM CuSO₄를 첨가함으로써 시작하였고, 37°C에서 6시간 동안 반응시켰다. 반응 후 thiobarbituric acid reacting substance (TBARS)의 형성⁷⁾, relative electrophoretic mobility (REM)⁸⁾, apoB-100의 fragmentation⁹⁾을 측정하였다.

나. TBARS 측정

산화 반응이 끝난 LDL 50 μg 을 취하여 TBARS Assay Kit (BioAssay Systems, Hayward, CA)를 이용하여 제조사의 protocol에 따라 측정하였다. 산화된 LDL과의 비교를 통해 상대적인 비율을 계산하였다.

다. REM 측정

산화 반응이 끝난 LDL 10 μg 을 0.8% agarose gel에 loading하여 TAE buffer (40 mM Tris, 40 mM acetic acid, and 1 mM EDTA)에서 100 V로 30분 동안 전기영동한 후, Coomassie brilliant blue R-250로 염색하여 이동 거리를 측정하였다.

라. ApoB-100 분절화 측정

산화 반응이 끝난 LDL 20 μg 을 6% SDS-PAGE에 loading하여 TAE buffer (40 mM Tris, 40 mM acetic acid, and 1 mM EDTA)에서 100 V로 6시간 동안 전기영동한 후, Coomassie brilliant blue R-250로 염색하여 관찰하였다.

3) 거품세포 형성 억제 관찰

가. RAW 264.7 세포주 배양

생쥐 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA)에서 분양 받아 사용하였다. RAW 264.7 세포는 5.5% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin이 첨가된 Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) 배지로 37°C, 5% CO₂에서 배양하였다. 세포 배양에 사용된 모든 시약은 Gibco Laboratories (Grand Island, NY) 제품을 사용하였다.

나. Oil Red O 염색

24 well plate에 분주한 RAW 264.7 세포 (5×10^4 cell/mL)에 LPS (100 ng/mL)와 LDL (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 처리하고 각각의 처방 추출물을 농도별로 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 배양이 끝난 세포는 10% formalin을 이용하여 고정한 후, 0.6% Oil Red O (Sigma Chemical

Co.) 용액으로 3분간 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다. 이미지 분석을 위하여 MetaMorph Software (Molecular Devices)를 이용하였다.

4) 통계처리

실험값은 Mean \pm S.E.M.으로 표시하였다. 실험결과에 대한 통계학적 유의성 검정은 ANOVA검정을 적용하였으며, Dunnett's multiple comparison test를 이용하여 p -value가 0.05 미만일 경우 유의한 것으로 판정하였다.

III. 結果

1. 항산화능 비교

4종 처방의 항산화능을 비교하고자 추출물을 농도별로 조제한 후 ABTS와 DPPH 라디칼 소거활성을 측정하였다. ABTS 라디칼의 소거활성을 비교한 결과 4종 처방의 RC₅₀ 값은 열다한소탕; 23.07 \pm 1.35 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 양격산화탕; 37.74 \pm 0.94 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 청심연자탕; 117.28 \pm 1.48 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 태음조위탕; 204.84 \pm 2.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 양생대조군인 Vitamin C는 3.03 \pm 1.56 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Table 2)으로 측정되었다 (Table 2). DPPH 라디칼의 소거활성을 비교한 결과는 Fig. 1와 같다. 추출물의 농도가 증가함에 따라 점차적으로 DPPH 라디칼의 소거활성이 증가하는 경향을 보였으며, 추출물의 농도 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 열다한소탕; 43.64%, 양격산화탕; 44.13%, 청심연자탕; 34.77%, 태음조위탕; 12.87%의 라디칼 소거활성을 보였다.

2. LDL 산화 억제 활성 비교

4종 처방의 LDL 산화 억제 효과를 검색하고자 Cu²⁺에 의해 LDL 산화를 유도하고, 처방 추출물을 처리하여 LDL 산화정도를 비교 분석하였다. LDL 산화정도는 3가지 방법으로 확인하였다. 먼저 TBARS assay를 수행한 결과 Fig. 2에 나타난 바와 같이 4종 처방 모두 농도

Table 2. Scavenging Effects of Herbal Formulas on ABTS radical.

Herbal formulas	Concentration($\mu\text{g/mL}$)	Scavenging effect(%)	RC ₅₀ ¹⁾ ($\mu\text{g/mL}$)
YDHST ^{a)}	12.5	35.46 \pm 2.45	23.07 \pm 1.35
	25	58.48 \pm 0.78	
	50	91.22 \pm 1.31	
YGSHT ^{b)}	12.5	28.63 \pm 0.66	37.74 \pm 0.94
	50	73.14 \pm 0.37	
	100	97.24 \pm 1.37	
CSYJT ^{c)}	50	30.83 \pm 1.32	117.28 \pm 1.48
	200	74.71 \pm 1.96	
	400	98.38 \pm 0.87	
TEJWT ^{d)}	50	23.31 \pm 0.82	204.84 \pm 2.15
	200	55.75 \pm 1.18	
	400	81.72 \pm 2.54	
Vitamin C	2.5	42.94 \pm 2.32	3.03 \pm 1.56
	10	96.82 \pm 1.05	

¹⁾Concentration required for 50% reduction of ABTS^{•+} at 30 min reaction.

^{a)}Yeoldahanso-tang, ^{b)}Yanggyeoksanhwa-tang, ^{c)}Cheongsimyeonja-tang and ^{d)}Taeumjowji-tang

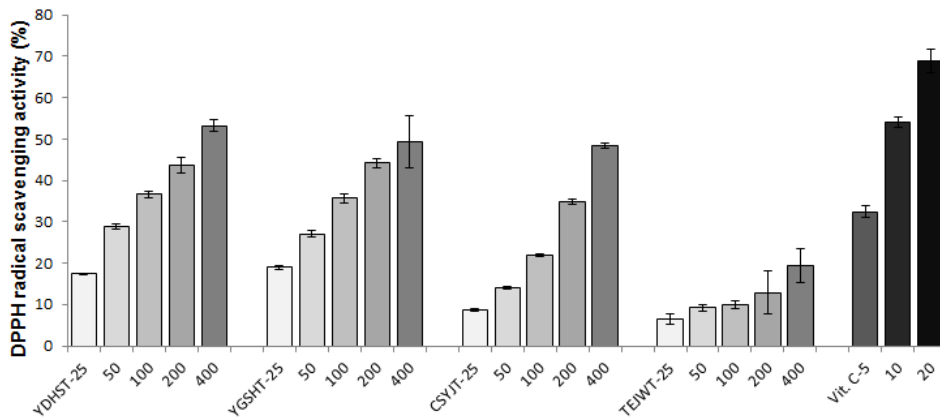


Fig. 1. DPPH radical scavenging activity of herbal formulas. YDHST: Yeoldahanso-tang, YGSHT: Yanggyeoksanhwa-tang, CSYJT: Cheongsimyeonja-tang and TEJWT: Taeumjowji-tang. Each value is the mean \pm S.E.M. of triplicate determinations.

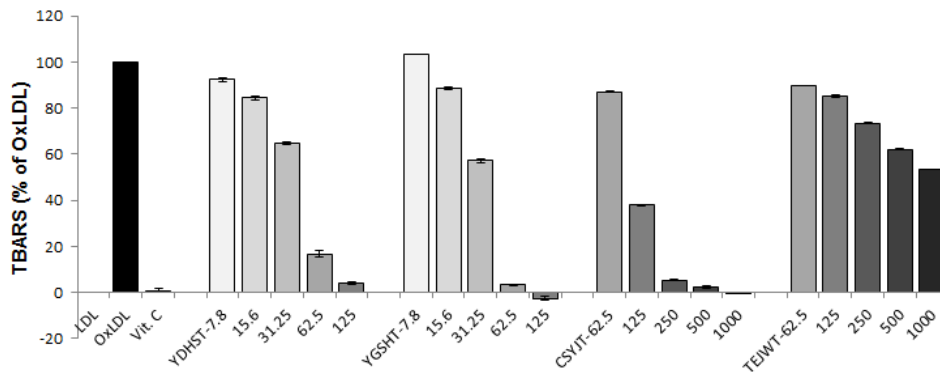


Fig. 2. Effects of herbal formulas on Cu²⁺-induced lipid peroxidation in LDLs. Indicated concentrations of herbal formulas or Vitamin C (50 $\mu\text{g/mL}$) and LDLs were incubated with CuSO₄ for 6 h at 37 °C. The level of LDLs was assessed by TBARS. YDHST: Yeoldahanso-tang, YGSHT: Yanggyeoksanhwa-tang, CSYJT: Cheongsimyeonja-tang and TEJWT: Taeumjowji-tang. Each value is the mean \pm S.E.M. of triplicate determinations.

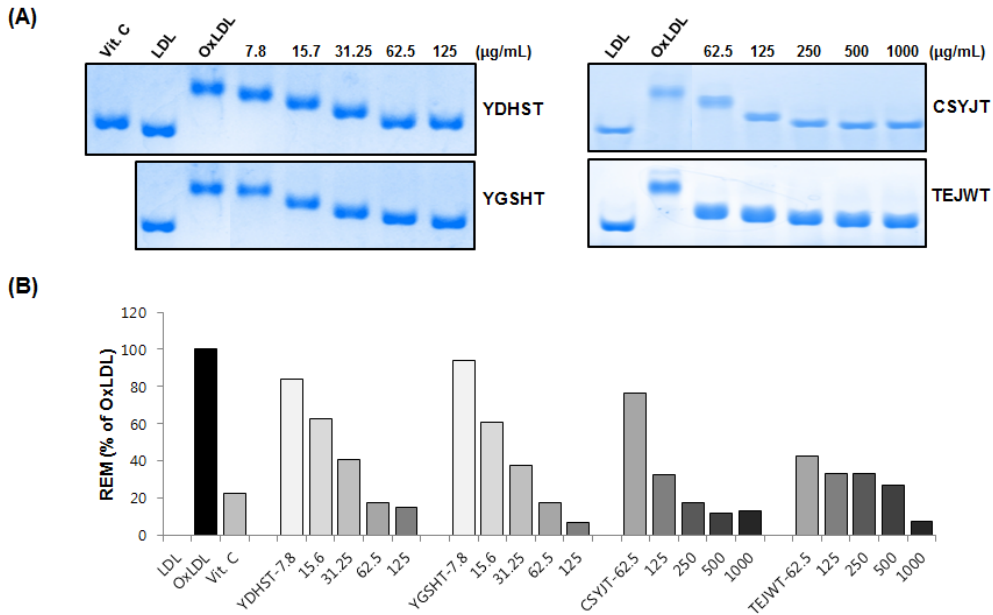


Fig. 3. Effects of herbal formulas on electrophoretic mobility of Cu^{2+} -induced oxidized LDLs. Indicated concentrations of herbal formulas or Vitamin C (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and LDLs were incubated with CuSO_4 for 6 h at 37°C . The electrophoretic mobility of LDLs were detected by agarose gel electrophoresis. (A) The stained gel is representative of two independent experiments. (B) Relative electrophoretic mobility (REM) indicated the distances moved from the origin were calculated and presented. YDHST: Yeoldahanso-tang, YGSHT: Yanggyeoksanhwa-tang, CSYJT: Cheongsimyeonja-tang and TEJWT: Taeumjowji-tang.

의존적으로 저해효과를 나타냈으며, IC_{50} (the half maximal inhibitory concentration) 값은 열다한소탕; 33.54 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 양격산화탕; 31.23 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 청심연자탕; 115.38 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 으로 계산되었다. 하지만 태음조위탕의 경우 실험 최고 농도인 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서도 47%의 저해 효과만을 나타냈다. REM assay 결과 4종 처방 추출물 모두 산화반응에 의한 전기적 이동차를 농도 의존적으로 감소시키는 것을 확인하였다 (Fig. 3). 추출물의 농도 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 열다한소탕; 84.89%, 양격산화탕; 93.02%, 청심연자탕; 67.62%, 태음조위탕; 66.66%의 이동 억제 효과를 나타냈다. LDL 산화 정도를 나타내는 지표인 apoB-100의 분절화를 측정된 결과, Cu^{2+} 에 의해 산화 반응을 유도한 LDL에서는 apoB-100이 거의 분절되어 온전한 단백질 band를 관찰 할 수 없었지만, 처방 추출물과 함께 산화 반응을 유도한 LDL의 apoB-100은 농도 의존적으로 분절화가 회복되는 것을 관찰 할 수 있었다 (Fig. 4).

3. 거품세포 형성 억제 활성 비교

LPS와 LDL을 처리하여 배양한 대식세포는 대조군에서 거의 관찰되지 않는 Oil Red O 염색 양성반응이 다수 관찰되었다. Oil Red O 염색은 주로 거품세포에 존재하는 세포질 내의 지방 입자에서 나타나게 되는데, 4종 처방을 처리한 거품세포에서 이러한 Oil Red O 염색을 비교함으로써 거품 세포 형성 억제 활성을 비교 분석하였다. 태음조위탕을 제외한 열다한소탕, 양격산화탕, 청심연자탕을 처리한 대식세포에서 거품 세포 형성이 억제되는 것을 확인하였다 (Fig. 5).

IV. 考 察

한국인의 사망 원인 통계에 의하면 동맥경화로 인한 심근경색, 뇌졸중을 비롯한 순환기계 질환은 사망 원인의 2위로 악성 종양 다음으로 높은 순위를 차지하

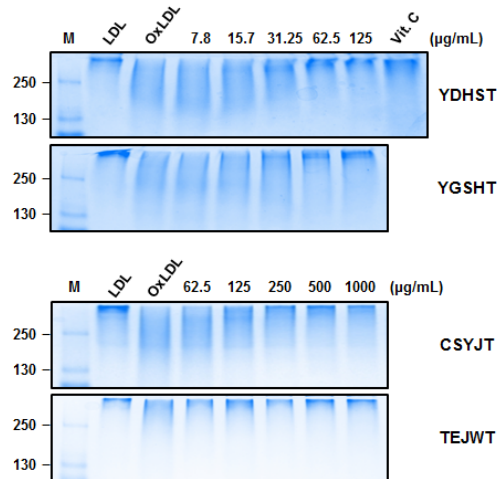


Fig. 4. Effects of herbal formulas on Cu^{2+} -mediated ApoB fragmentation in LDLs. Indicated concentrations of herbal formulas or Vitamin C (50 $\mu\text{g/mL}$) and LDLs were incubated with CuSO_4 for 6 h at 37°C . LDLs were loaded onto 6% SDS-PAGE for electrophoresis. The stained gel is representative of two independent experiments. M, standard molecular weight markers. YDHST: Yeoldahanso-tang, YGSHT: Yanggyeoksanhwa-tang, CSYJT: Cheongsimyeonja-tang and TEJWT: Taeumjowi-tang.

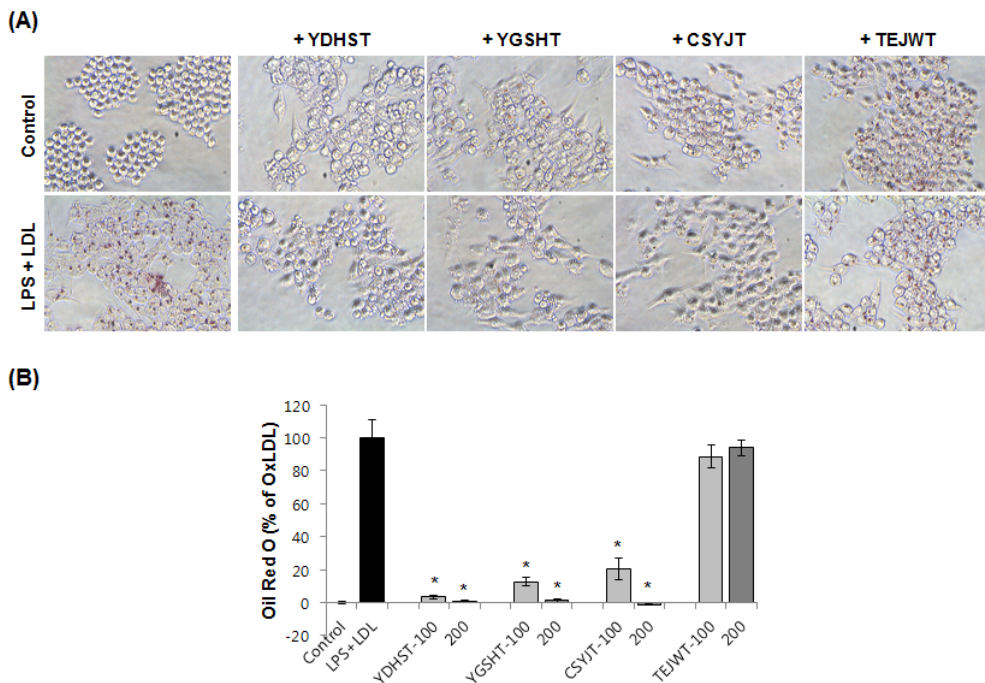


Fig. 5. Inhibitory effects of herbal formulas on the foam cell formation. RAW264.7 cells were co-incubated with LPS (100 ng/mL) and LDL (50 $\mu\text{g/mL}$) for 24 h in the presence or absence of herbal formulas. The lipid laden macrophages (foam cell) were stained for neutral lipids with oil red O. (B) The quantitative data were presented means \pm S.E.M. * $p < 0.01$, as compared to cells cultured with LPS and LDL. YDHST: Yeoldahanso-tang, YGSHT: Yanggyeoksanhwa-tang, CSYJT: Cheongsimyeonja-tang and TEJWT: Taeumjowi-tang. Each value is the mean \pm S.E.M. of triplicate determinations.

고 있다. 동맥경화는 노화와 더불어 산화적 스트레스가 주요 발병 원인인 질환으로 그 기전은 다음과 같다. 혈중 LDL이 산화적 스트레스에 의해 산화 LDL로 변환되면 이 산화된 LDL은 거품세포 형성, 염증 반응, 평활근 세포 및 혈관 내피세포의 분화와 증식 등의 다양한 반응을 촉진하여 혈관 내벽에 플라크를 생성함으로써 동맥경화를 유발하게 된다. 따라서 초기의 산화반응을 조절하는 것이 동맥경화의 예방과 치료에 중요할 것으로 여겨진다. 본 연구에서는 4종 四象處方의 동맥경화에 대한 효능을 알아보고자 하였다.

『東醫壽世保元』에 따르면 涼膈散火湯은 少陽人의 胃受熱裏熱病의 하나인 上消證에 활용되는 처방이며, 熱多寒少湯과 淸心蓮子湯은 太陰人의 肝受熱裏熱病의 하나인 燥熱證에 활용되는 처방이며, 太陰調胃湯은 太陰人 胃完受寒表寒病의 하나인 胃脘寒證에 활용되는 처방이다.⁴ 이러한 4종 處方의 기존의 실험적 연구 결과들을 살펴보면 涼膈散火湯은 주로 허혈에 의한 뇌손상의 보호 효과¹⁰, 당뇨와 비만과 같은 대사 질환 개선 효과^{11,12}, 항염증¹³ 및 면역 활성 효과¹⁴ 등이 보고되었으며, 熱多寒少湯은 주로 뇌질환과 관련하여 보호 효과¹⁵ 및 산화적 손상에 대해 방어 효과¹⁶가 보고되었다. 淸心蓮子湯은 항산화 효과¹⁷와 더불어 항노화 효과¹⁸ 및 항알레르기 효과가 보고되었으며, 太陰調胃湯은 항산화 효능을 통한 간기능 보호 효과²⁰ 및 비만을 억제하며 항고지혈증 효과²¹가 있다고 알려져 있다. 각각의 處方에 대한 단편적인 항산화 효능에 대한 연구는 일부 이루어져 있지만 동맥경화와 관련하여 체계적인 연구는 전무하다시피 하였다.

동맥경화에 대한 효능을 규명하기 위한 일환으로 먼저 처방들의 항산화능을 측정하였다. 측정 결과 ABTS 소거활성과 DPPH 소거활성 모두 열다한소탕, 양격산화탕, 청심연자탕, 태음조위탕의 순서로 관찰되었다. 이는 다양한 항산화물질의 항산화능을 검색한 결과 ABTS 소거활성과 DPPH 소거활성 간의 높은 상관관계가 존재한다는 보고²²와 일관된 결과로 생각된다. ABTS 라디칼 소거 활성법은 *in vitro* 뿐만 아니라

*in vivo*에서도 항산화능을 측정하기 위해 널리 이용되고 있는 방법으로 수소공여항산화제 (hydrogen-donating antioxidant)와 연쇄절단형 항산화제 (chain-breaking antioxidant) 모두를 측정할 수 있고, 수용상 (aqueous phase)과 유기상 (organic phase) 모두에 적용이 가능한 방법이기 때문에 본 연구에서도 소거능이 상대적으로 높게 측정되었다^{23,24}. DPPH 라디칼 소거 활성법은 실제 항산화 활성과 연관성이 높은 방법으로 시료 내 항산화 활성 물질이 활성 라디칼에 전자를 공여하여 탈색을 유도하는 원리를 이용한 방법으로 이러한 전자공여 작용은 지방질 산화를 억제시키는 척도나 동맥경화를 억제하는 척도로 사용되고 있다²⁵. DPPH 소거 활성법을 이용한 태음조위탕의 기존 연구 결과²⁰에서도 우리의 결과 (12.87%, 19.38%)와 유사하게 추출물의 농도 200 µg/mL과 400 µg/mL에서 각각 15.58%, 28.26%의 라디칼 소거활성을 관찰하였다.

LDL은 혈장단백질 (plasma protein) 중 밀도가 1.025에서 1.058에 해당하는 지단백 (lipoprotein)으로 중심부는 소수성인 중성지방 (triglyceride)과 cholesterol ester (CE)로 이루어져 있으며 극성인 인지질과 콜레스테롤에 의해 둘러싸여 있으며, apoB-100 단백질을 포함하고 있다²⁶. ApoB-100 단백질은 LDL-수용체에 결합하는 리간드로 작용하게 되는데, 산화된 LDL은 수용체에 결합하지 못하고 대식세포에 의해 탐식되어 동맥경화의 주요한 발병 원인인 거품세포를 형성하게 된다. 라디칼 소거활성을 통해 항산화 효과를 확인한 처방들이 실제로 LDL의 산화를 억제하는 효능을 나타내는지 Cu²⁺에 의한 LDL 산화 모델을 이용하여 관찰하였다²⁷. LDL 산화 정도는 지질과산화의 증가 (TBARS assay)와 apoB-100의 음성전하의 증가 (REM assay), apoB-100의 분절화 유도를 평가함으로써 측정하였다. 4종 처방 모두 농도의존적으로 LDL의 산화를 억제하는 것을 확인하였다. 태음조위탕 추출물의 경우 LDL을 구성하는 성분 중 apoB-100의 산화를 억제하는 효능은 다른 처방 추출물과 비교하여 크게 차이가 없었으나, 지질과산화를 억제하는 효능은 현저하게 낮은 것으로 관찰되었다. 즉 열다한소탕, 양격산화탕, 청심

연자탕이 대략 100 µg/mL의 농도에서 50% 이상의 지질과산화물의 생성을 억제하는데 비해, 태음조위탕의 경우 1000 µg/mL에서도 50% 미만의 억제 효능을 나타냈다.

마지막으로 생쥐 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 이용한 거품세포 모델을 이용하여 처방의 항동맥경화 효능을 측정하였다²⁸. LPS와 LDL를 동시에 처리한 대식세포는 세포 내 cholesterol ester의 축적을 유도해 거품세포를 형성하게 되는데, 이러한 거품세포 내 지방 축적을 Oil Red O 염색을 통해 확인하였다. 거품세포 형성을 억제하는 효능은 항산화 효능 및 LDL 산화 억제 효능과 밀접하게 연관되는데, 열다한소탕, 양격산화탕, 청심연자탕에서 강하게 관찰되었다. 태음조위탕의 경우 실험 최고 농도인 200 µg/mL 농도까지 유의적인 거품세포 억제 효능을 관찰할 수 없었다. 이는 TBARS assay 결과, 태음조위탕이 다른 처방보다 현저하게 낮은 산화억제 효능을 갖는 것과 상관관계가 있으며, LDL을 구성하고 있는 지질과 단백질 중 지질의 산화를 억제하는 것이 거품세포의 형성을 억제하는데 더 효과적인 일 것으로 여겨진다.

이상의 결과를 종합해보았을 때, 4종의 四象處方이 항산화 효능을 통해 LDL 산화를 억제함으로써 동맥경화 발병의 주요 원인이 거품세포의 형성을 억제하는 것을 확인하였다. 특히 열다한소탕, 양격산화탕, 청심연자탕의 경우 거품세포의 형성을 강력하게 억제하는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구 결과는 四象處方이 기존의 적응증 외에 동맥경화와 같은 산화스트레스에 의한 질환의 예방과 치료에 이용될 수 있는 기초 자료가 될 것으로 기대된다.

V. 結 論

4종의 四象處方인 熱多寒少湯, 涼膈散火湯, 清心蓮子湯, 太陰調胃湯의 항동맥경화 활성을 연구한 결론은 다음과 같다.

1. ABTS 라디칼의 소거활성을 비교한 결과, 추출물의 농도가 증가함에 농도의존적으로 라디칼의 소거활성이 증가하였으며, 4종 처방의 RC_{50} 값은 열다한소탕; 23.07 ± 1.35 µg/mL, 양격산화탕; 37.74 ± 0.94 µg/mL, 청심연자탕; 117.28 ± 1.48 µg/mL, 태음조위탕; 204.84 ± 2.15 µg/mL으로 측정되었다.
2. DPPH 라디칼의 소거활성을 비교한 결과, 추출물의 농도가 증가함에 농도의존적으로 라디칼의 소거활성이 증가하였으며, 추출물의 농도 200 µg/mL에서 열다한소탕; 43.64%, 양격산화탕; 44.13%, 청심연자탕; 34.77%, 태음조위탕; 12.87%의 라디칼 소거활성을 보였다.
3. TBARS assay 결과, 4종 처방 모두 농도 의존적으로 LDL 산화를 억제하였으며, IC_{50} 값은 열다한소탕; 33.54 µg/mL, 양격산화탕; 31.23 µg/mL, 청심연자탕; 115.38 µg/mL으로 관찰되었다. 태음조위탕은 실험 최고 농도인 1000 µg/mL에서 47%의 저해 효과를 나타냈다.
4. REM assay 결과, 4종 처방 모두 농도 의존적으로 LDL 산화를 억제하였으며, 추출물의 농도 125 µg/mL에서 열다한소탕; 84.89%, 양격산화탕; 93.02%, 청심연자탕; 67.62%, 태음조위탕; 66.66%의 억제 효과를 나타냈다.
5. ApoB-100 단백질의 분절화를 통해 LDL 산화를 확인한 결과, 4종 처방 모두 농도 의존적으로 분절화가 회복되는 것을 관찰 할 수 있었다.
6. 열다한소탕, 양격산화탕, 청심연자탕의 거품세포 형성 억제 효과를 Oil Red O 염색을 통해 확인하였다.

이상의 결과로 열다한소탕, 양격산화탕, 청심연자탕은 항동맥경화 활성이 있는 것으로 판단된다.

VI. 感謝의 말씀

본 연구는 한국한의학연구원 표준한방처방 EBM 구축사업(K12030)의 지원으로 진행되었습니다.

VII. 參考文獻

1. Aruoma OI. Free radicals, oxidative stress and anti-oxidants in human health and disease. *J Am Oil Chem Soc.* 1998;75:199-212.
2. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W Jr, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. *Circulation.* 1994;89(5):2462-2478.
3. Steinberg D. The LDL modification hypothesis of atherogenesis: an update. *J Lipid Res.* 2009;50:S376-S381.
4. Lee JM. Dongeuisusebowon. Seoul:Yeogang Publishing Co. 1992:243-271. (Korean)
5. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, and Rice-evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biol Med* 1999;26:1231-1237.
6. Dietz BM, Kang YH, Liu G, Egger AL, Yao P, Chadwick LR, Pauli GF, Farnsworth NR, Mesecar AD, van Breemen RB, and Bolton JL. anthohumul isolated from *Humulus lupulus* inhibits menadione-induced DNA damage through induction of quinone reductase. *Chem Res Toxicol* 2005;18:1296-1305.
7. Wallin B, Rosengren B, Shertzer HG, Camejo G. Lipoprotein oxidation and measurement of thiobarbituric acid reacting substances formation in a single microtiter plate: its use for evaluation of antioxidants. *Anal Biochem.* 1993;208(1):10-11.
8. Sparks DL, Phillips MC. Quantitative measurement of lipoprotein surface charge by agarose gel electrophoresis. *J Lipid Res.* 1992;33(1):123-130.
9. Esterbauer H, Gebicki J, Puhl H, Jürgens G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med.* 1992;13(4):341-390.
10. Lo HS, Lee SM, Bae YC, Park HS, Lee JS, Song SG, et al. The effect of Yangkyuk-Sanhwa-Tang on cytokine production in the patients with cerebral infarction. *J Sasang Constitut Med.* 2004;16(1):120-129. (Korean)
11. Jung SI, Kim JW. Clinical Study about the Diabetes Mellitus Patients Administration of Yangkyuksanwhatang. *Korean J Orient Med Pathol.* 2002;16(6):1308-1313. (Korean)
12. Park J, Jeon B, Kim K. Effects of Ryangkeogsanwhatang on the adipocyte induced by gold thigluose in the rat. *J Korean Oriental Med.* 1996;17(2):145-160. (Korean)
13. Tak M, Tark M, Kang K, Ko W, Yoon H. The Inhibitory Effects of Yang Geouk San Hwa-Tang on LPS-stimulated inflammation in RAW264.7 macrophage cells. *J Korean Oriental Med Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology.* 2010;23(1):118-134. (Korean)
14. Jung DY, Ha H, Lee H, Lee J, Lee N, Lee JK, Huang DS, Shin H. Stimulation of the Immune Response by Yanggyuksanhwa-tang. *J Sasang Constitut Med.* 2010; 22(4):77-84. (Korean)
15. Choi YJ, Han JH, Kim KY, Kang SY. Effects of Yuldahansotang water extract on blood pressure, regional cerebral blood flow and pial arterial diameter. *J Sasang Constitut Med.* 1998;10(1):285-293. (Korean)
16. Lee JH, Park HS, Kim KY. Effects of Yuldahansotang water extract on cultured primary hippocampal cell culture damaged by hydrogen peroxide. *J Sasang Constitut Med.* 2002;14(1):79-89. (Korean)
17. Han B, Bae Y, Song S, Park HS, Lee J, Kim K. Antioxidant effects and its mechanism of Chungsimyeonjatang in Sasang Constitutional Medicine. *J Sasang Constitut Med.* 2004;16(1):130-147. (Korean)
18. Lim JP, Ahn TW. The anti-oxidative and immune-regulatory effect of Chungsimyeonja-tang in aged rat. *J Sasang Constitut Med.* 2007;19(3):227-241. (Korean)
19. Park SC. Effects CheongSimYeonJaTang(CSYJT) on control of immune-function in highly purified mouse

- B cells and Mast cell. *J Sasang Constitut Med.* 2003;15(2):166-179. (Korean)
20. Kim M, Park S. Effects of Taumjowetang on Lipid peroxidation by free radicals and oxidative damage of hepatocytes by tert-butyl hydroperoxide. *J Sasang Constitut Med.* 2001;13(1):51-60. (Korean)
21. Kim KS, Lee DU, Kim YL, Hwang MJ, Kim GW, Koo BS. Anti-obesity and anti-hyperlipidemic effects of Taeyeumjowee-tang and its modified prescription. *J Oriental Neuropsychiatry.* 2007;18(2):57-74. (Korean)
22. Choi YM, Kim MH, Shin JJ, Park JM, and Lee JS. The antioxidant activities of the some commercial teas. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2003;32:723-727. (Korean)
23. Rice-Evans CA and Miller NJ. Total antioxidant status in plasma and body fluids. In *Methods Enzymol.* 1994;234:279-293.
24. Lee SO, Lee HJ, Yu MH, Im HG, and Lee IS. Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extracts from vegetables produced in Ullung Island. *Korean J Food Sci Technol.* 2005;37:233-240. (Korean)
25. Katsube T, Tabata H, Ohta Y, Yamasaki Y, Anuurad E, Shiwaku K, Yamane Y. Screening for antioxidant activity in edible plant products: comparison of low-density lipoprotein oxidation assay, DPPH radical scavenging assay, and Folin-Ciocalteu assay. *J Agric Food Chem.* 2004;52(8):2391-2396.
26. Steinberg D, Witztum JL. Is the oxidative modification hypothesis relevant to human atherosclerosis? Do the antioxidant trials conducted to date refute the hypothesis? *Circulation.* 2002;105(17):2107-2111.
27. Hadjaz F, Besret S, Martin-Nizard F, Yous S, Dilly S, Lebegue N, Chavatte P, Duriez P, Berthelot P, Carato P. Antioxydant activity of β -carboline derivatives in the LDL oxidation model. *Eur J Med Chem.* 2011; 46(6):2575-85.
28. Xie X, Wang S, Xiao L, Zhang J, Wang J, Liu J, Shen X, He D, Zheng X, Zhai Y. DBZ blocks LPS-induced monocyte activation and foam cell formation via inhibiting nuclear factor- κ B. *Cell Physiol Biochem.* 2011;28(4):649-62.