

## 시호 추출물의 oxLDL 유도 Foam Cell 형성 억제 작용

이혜진 · 배호성 · 황귀서\*  
가천대학교 한의과대학 예방의학교실

### Inhibitory Effects of Bupleuri Radix on ox-LDL induced Foam Cell Formation

Hye-Jin Lee, Ho-Sung Bae & Gwi-Seo Hwang\*  
Department of Preventive Medicine, College of Oriental Medicine,  
Gachon University, Seongnam 461-701, Korea

#### Abstract

The oxidative modification of low density lipoprotein(LDL) has been implicated in the development of atherosclerosis. Oxidized LDL(oxLDL) is captured into macrophage and stimulates to form macrophage foam cell. And it can induce an inflammation and smooth muscle proliferation in atherosclerotic plaque.

**Objective :** In this study, we aimed to investigate the effect of Bupleuri radix(SH) on the foam cell formation, a critical initiation stage of atherosclerosis.

**Methods :** To achieve the goal, we examined the effect of SH on LDL oxidation, nitric oxide production in RAW264.7, and the effect of SH on cupric sulfate-induced cytotoxicity, LDH release, and macrophage activity.

**Results :** SH inhibited the formation of oxidized LDL from native LDL in RAW264.7 cell culture, and decreased the release of LDH from cupric sulfate-stimulated RAW264.7 cell. In other experiments, SH activated RAW264.7 cell, and prolonged the survival time, and inhibited foam cell formation induced by oxLDL in Raw 264.7 cells.

**Conclusion :** These results showed that SH might prevent atherosclerosis by controlling the early stages of foam cell formation.

---

· 접수: 2012년 7월 24일 · 수정접수: 2012년 8월 20일 · 채택: 2012년 8월 22일  
\* 교신저자: 황귀서, 경기도 성남시 수정구 성남대로 1342 가천대학교 한의과대학 예방의학교실  
전화: 82-31-750-5421, 전자우편: seoul@gachon.ac.kr

**Key words** : atherosclerosis, Bupleuri radix, LDL oxidation, foam cell, macrophage

## I. 서론

육류섭취로 발생이 증가하는 고지혈증과 고콜레스테롤혈증, 동맥경화증은 고혈압 등과 함께 심혈관계 질환의 주요원인으로 알려져 있다. 이중 동맥경화는 혈관벽이 비후해져 탄력성이 떨어지고 혈관이 좁아지는 질병으로, 혈중의 총콜레스테롤 함량이나 LDL, VLDL 같은 저밀도 지단백의 증가가 중요한 역할을 한다. 혈관에 지질이 축적되고 비후해지는 동맥경화로 인해 좁아진 혈관에 혈전이 생기는 경우, 혈관이 쉽게 파열되어 뇌출혈이나 심부전, 심부전 등과 같은 다양한 질병이 병발하게 된다.<sup>1)</sup>

최근, 동맥경화의 직접적인 원인인 혈관내 플라그 형성은 일종의 염증반응으로 밝혀지고 있다. 이러한 혈관의 플라그 형성은 대식세포가 산화된 LDL을 흡수하여 거품세포로 변하는 것으로부터 시작된다.<sup>2)</sup> 대식세포가 거품세포로 변화하는 과정에는 Lyn과 MEKK2들과 교합된 수용체인 CD36이 관여하는데,<sup>3)</sup> CD36은 oxLDL과 결합하여 흡수를 촉진하여 거품세포화로 변환된 대식세포가 혈관내 동맥경화 초기병소에 머무르게 한다.<sup>4)</sup> 이와는 별도로 oxLDL 흡수시 PI3K/Akt pathway, p38와 JNK MAPK 활성화를 통한 신호전달에도 관여한다.<sup>5)</sup> 이런 신호전달과정의 결과는 거품세포가 포획하고 있는 콜레스테롤, 지단백, 지질 등의 유리를 통해 지질의 침착이 나타나며, 거품세포가 분비하는 cathepsins, MMP-1과 같은 protease가 혈관의 collagen이나 elastin을 분해하여 조직 손상을 유발한다.<sup>6)</sup> 이와는 별도로 granulocyte macrophage colony stimulating factor(GM-CSF), IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ 와 같은 세포조절물질의 분비로 단핵구 및 T-

임파구들의 손상부위로의 침투와 염증반응을 자극한다.<sup>7,8)</sup> 이러한 염증발현 물질과 PDGF 등이 혈관 평활근세포를 자극하여 병소부위 이동과 세포증식을 촉진하여 혈관벽이 두꺼워지고 탄력이 없어지는 현상을 가속화시킨다.<sup>9)</sup>

동맥경화 발생을 촉진하는 가장 핵심적인 단계는 거품세포 생성이며, 대식세포는 세포의 효소인 ceruloplasmin,<sup>10)</sup> paraoxonase-1<sup>11)</sup> 및 myeloperoxidase<sup>12)</sup>와 세포내 효소인 12 and 15-lipoxygenase(LOX),<sup>13,14)</sup> NADPH oxidase,<sup>15)</sup> LDL receptor-related protein 1 (LRP1),<sup>16)</sup> and phospholipase A2a (PLA2a)<sup>17)</sup> 등을 통해 LDL 산화작용에 관여한다고 보고되었다.

柴胡(*Bupleurum falcatum*)는 한의학에서 肝氣를 통하게 하고 陽을 상승시키는 효능이 있어 寒熱往來, 胸滿脇痛, 口苦, 耳聾, 頭痛, 目眩, 월경불순, 자궁하수, 탈항 등을 치료하기 위한 목적으로 사용하였다.<sup>18)</sup> 최근 연구결과, 柴胡는 혈소판 응집억제 효과,<sup>19)</sup> 폐암억제 효과<sup>20)</sup> 및 B형 간염 억제 효과가 있다고 보고되었으며,<sup>21)</sup> 특히, 고지방식이 랫드의 체중 및 혈중 지질농도를 감소시키는 것으로 보고되었다.<sup>22)</sup>

본 연구에서는 柴胡가 동맥경화 예방에 효과적인지를 알아보기 위하여, 대식세포에 의한 LDL 산화 억제 및 산화된 LDL에 의한 거품세포 형성 억제 효과를 평가하고자 하였다.

## II. 실험방법

### 1. 재료

#### 1) 한약재의 구성

柴胡(*Bupleurum falcatum*)는 지리산에서 채

취한 다음, 경원대학교 한방병원에서 감정 확인 후 사용하였다.

## 2) 검액 제조

柴胡에 증류수를 넣고 4시간 이상 추출하고 여과지를 이용하여 여과하였다. 여과액을 감압 증류기를 이용하여 농축한 다음 냉동건조기를 이용하여 건조하였으며, 수율은 약 12%이었다. 실험시 PBS와 세포 배양용 배지에 녹인 후 멸균 여과하여 검액(이하 SH)으로 사용하였다.

## 3) 대식세포 배양

실험에 사용한 murine macrophage인 RAW 264.7 Cell은 서울대학교 세포주은행에서 분양받아 사용하였다. 세포배양은 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium, Gibco)에 0.37% sodium bicarbonate, 10% FBS, 100 U/ml penicillin, 100  $\mu\text{g/ml}$  streptomycin을 첨가한 배지를 0.22  $\mu\text{m}$  membrane filter로 여과한 다음 사용하였으며, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다. 매주 2~3회씩 배지를 교환해 주었으며, 계대 배양시는 배지를 제거한 후 trypsin-EDTA( $\times 10$ )를 가하고, 37°C에서 10분간 방치하여 부착된 세포를 분리하였다. 실험에 사용한 세포는  $5 \times 10^5$  cells/ml를 24 well에 seeding하였고, 세포가 바닥에 잘 부착하도록 배양했다.

## 2. 실험방법

### 1) 대식세포 LDL 지질산화에 미치는 영향 측정

대식세포에 의한 LDL 산화과정에 유발되는 지질분해의 정도를 측정하였다. 위에 기술한 바와 같이 배양한 각 실험군을 plate로부터 취하여 초음파로 세포를 분쇄한 후, 분쇄액 200  $\mu\text{l}$ 에

동량의 20% TCA(in 0.6 M HCl) 용액과 0.1 M TBA(in 0.26 M Tris buffer) 용액 400  $\mu\text{l}$ 를 넣어 95°C에서 20분간 반응시켰다. 반응 종결 후 2000 g에서 5분간 원심분리하고 상층액을 취해 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 2) 대식세포 LDL 단백질산화에 미치는 영향 측정

대식세포에서 oxLDL 생성 시 나타나는 단백질분해의 정도를 측정하였다. 위에 기술한 방법과 동일한 방법으로 24 well에 배양한 세포를 PBS로 2회 세척한 후, 1  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$  농도의 SH를 배지에 가한 후, 37°C, CO<sub>2</sub> incubator에서 8시간동안 배양하였다. 여기에 200  $\mu\text{g/ml}$  농도의 LDL(Sigma Chemical Co.)을 가한 후 90시간 동안 다시 배양하였다. 각 군의 세포를 plate로부터 취하고 초음파로 세포막을 용해시킨 후, 482 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 3) 대식세포 Nitric Oxide 생성능 측정

위에 기술한 것과 동일한 방법으로 LDL을 투여한 후 90시간 배양하고 실험군에서 배지 상층액을 취하였다. NaNO<sub>2</sub> 용액의 연속적인 희석액을 만들어 최종농도가 0.05  $\mu\text{M}$ 가 되도록 조절하였다. 먼저 얻은 세포 배양액과 NaNO<sub>2</sub> 희석액에 동량의 Greiss reagent solution을 넣고, 15분간 상온에 방치한 다음 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 4) 대식세포 생존능에 미치는 영향 측정

RAW 264.7 세포를 24 well에 분주하고 5시간 동안 배양하여 부착시킨 후, 1  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$  농도의 SH를 첨가하였다. 7시간 배양한 다음 5  $\mu\text{M}$  CuSO<sub>4</sub>에 20시간 노출시켰다. PBS로 희석한 MTT용액 50  $\mu\text{l}$ 를 첨가하고 다시 4시간 배

양하였다. 상층액을 제거하고 50  $\mu$ l DMSO를 첨가한 다음 650 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 5) LDH 유리에 미치는 영향 측정

LDL을 첨가한 대식세포를 5  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>에 20시간 노출시킨 다음, 먼저 상층액을 취하여 배지로 누출된 LDH 양을 LDH kit(LDH/LD, Sigma No. 500)로 측정하였다. 세포내에 존재하는 LDH 양은 lysis buffer(50 mM Tris/5 mM EDTA)를 500  $\mu$ l 넣고 초음파를 사용하여 세포막을 용해시킨 다음, LDH kit를 사용하여 측정하였다.

#### 6) 대식세포 ACP 유리에 미치는 영향 측정

대식세포의 활성화여부를 알아보기 위하여 대식세포로부터 분비되는 acid phosphatase의 활성을 측정하였다. 시약 및 재료는 PBS 용액(pH 7.2), 0.02 M p-nitrophenyl phosphate/ 0.1 M citrate buffer(pH 5.0)는 0.1 M citrate acid와 0.1 M sodium citrate를 약 1:1.5 (v/v)로 혼합하여 pH 5.0으로 조정된 후 p-nitrophenyl phosphate (Sigma Chemical Co., U.S.A)를 0.02 M 되도록 가하였으며, 0.2 M borate buffer(pH 9.8)는 0.2 M sodium borate에 0.2 M NaOH를 가해 pH 9.8로 조정하였다. 5)와 동일한 방법으로 5  $\mu$ M CuSO<sub>4</sub>에 20시간 노출시킨 다음, 상층액을 취하여 실시하였다. 0.1% Triton X-100을 100  $\mu$ l를 가한 다음 0.02 M p-nitrophenyl phosphatase/ 0.1 M citrate buffer (pH 5.0)를 0.5 ml 가해 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 1시간 반응시킨 후 1500 rpm에서 5분간 원심분리 후 얻은 상정액에 4°C 상에서 0.2 M borate buffer(pH 9.8) 1 ml 씩을 가하여 반응을 종결시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 7) 거품 세포 형성 측정과 Oil Red O 염색

Raw264.7 대식세포 5X10<sup>4</sup> 개를 48-well 플레이트에 분주하여 안정화시켰다. 12시간 후, SH extract를 각각 1  $\mu$ g/ml와 10  $\mu$ g/ml의 농도로 1시간 전처리하였고, ox-LDL를 25  $\mu$ g/ml 농도가 되도록 배지에 첨가하여 48시간 동안 배양하였다. 배양이 끝나면 배지를 제거하고 PBS(pH 7.4)로 세척한 후, 4% formaldehyde/PBS 용액을 가하여 세포를 30분간 고정하였다. 고정된 세포들을 PBS로 세척하고, 0.5% Oil Red O/60% isopropyl alcohol 용액으로 1시간 동안 염색하였다. 염색이 끝나면 염색액을 제거하고, 70% ethanol로 세척 후 4% Nonidet-P40로 반응액을 추출한 다음, 마이크로 플레이트 리더(GENios A5082, TECAN, Maennedorf, Switzerland)를 이용해 490 nm 파장에서 색도를 측정하였다. 또한 400X 배율에서 도립 현미경(Inverted microscope OLYMPUS, IX 51(Olympus Co., Tokyo, JAPAN))을 이용해 관찰하고 그 이미지를 획득하였다.

### 3. 통계처리

각 결과에 대한 유의성 검증은 student's t-test를 이용하였다. p<0.05 인 경우 유의성이 있다고 판정하였다.

## III. 실험결과

### 1. 대식세포 LDL 지질산화에 미치는 영향

대식세포에 의한 native LDL을 산화 정도를 측정하기 위하여 murine macrophage 인 RAW 264.7에 의한 산화작용 결과, 분해되어 유리되는 MDA 양으로 간접적으로 측정하였다. 대조군에

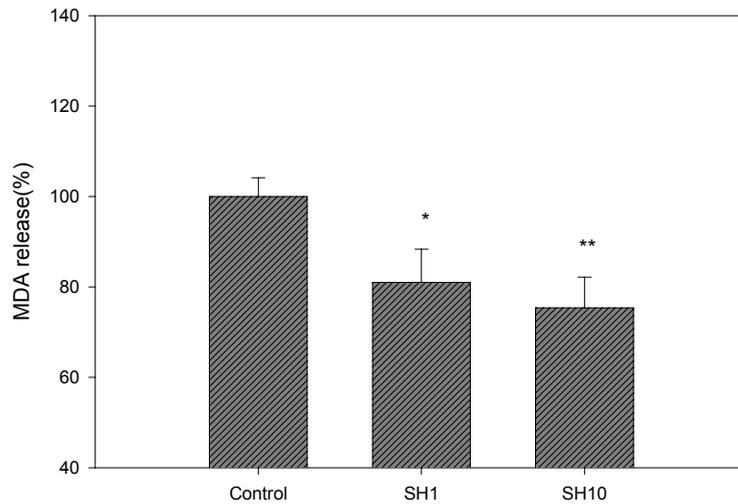


Fig. 1 Effect of SH on oxidized LDL formation in macrophage cells. MDA was measured in RAW 264.7 cells incubated with native LDL for 90hrs.

Control : vehicle

SH1 : 1  $\mu\text{g/ml}$  of SH

SH10 : 10  $\mu\text{g/ml}$  of SH

\* :  $p < 0.05$  vs control \*\* :  $p < 0.01$  vs control

비해 1  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$  농도의 SH 시료군에서 MDA 수치가 감소하여 지질단백의 산화반응이 억제되는 것을 나타내었다(Fig. 1).

## 2. 대식세포 LDL중의 단백질 산화에 미치는 영향

1  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$  농도의 SH시료를 미리 투여한 다음, 90시간 동안 LDL과 함께 배양하여 산화되지 않고 남아있는 단백질의 양을 482 nm 흡광도를 이용하여 측정하였다. 10  $\mu\text{g/ml}$  농도의 SH시료를 미리 투여한 실험군의 경우, 시약을 처리하지 않고 LDL에 노출시킨 대조군의 결과와 비교해 볼 때, 남아있는 LDL 양이 유의적으로 증가하였다. 따라서, SH시료는 10  $\mu\text{g/ml}$  농도에서 LDL을 취하여 nLDL을 oxLDL로 변화시키는 활성을 억제하였다(Fig. 2).

## 3. 대식세포 Nitric Oxide 생성능에 미치는 영향

혈관을 확장하는 stimulator이며, 혈소판 응집 저해제인 NO(Nitric oxide)의 양을 nitrite의 양으로 간접적으로 측정하였다. LDL과 함께 투여한 후, 시료가 대식세포의 nitrite 분비에 어떠한 영향을 미치는지 알아 본 결과, 대조군에 비해 SH 10  $\mu\text{g/ml}$ 를 미리 투여한 시료군의 경우, 유의적으로 nitrite의 양이 증가하였다(Fig. 3).

## 4. 대식세포 생존능에 미치는 영향

배양된 대식세포에 5  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4$ 를 가하여 세포에 손상을 유발하여 일어난 세포상해를 MTT assay로 측정하였다. 실험결과, 1  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$  농도의 SH 군에서 모두 cell survival rate을 증가시켜 세포손상이 억제됨이 확인되었다(Table I).

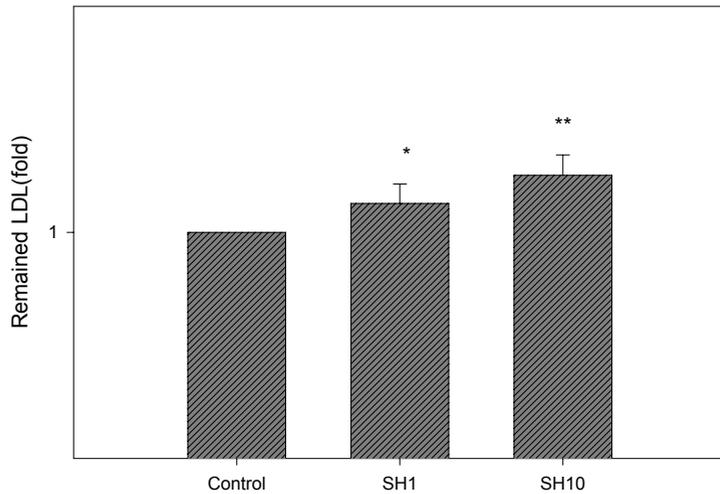


Fig. 2 Effect of SH on oxidized LDL formation in macrophage cells. Remained native protein was measured in RAW 264.7 cells incubated with native LDL for 90hrs.

Control : vehicle

SH1 : 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of SH

SH10 : 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of SH

\* :  $p < 0.05$  vs control \*\* :  $p < 0.01$  vs control

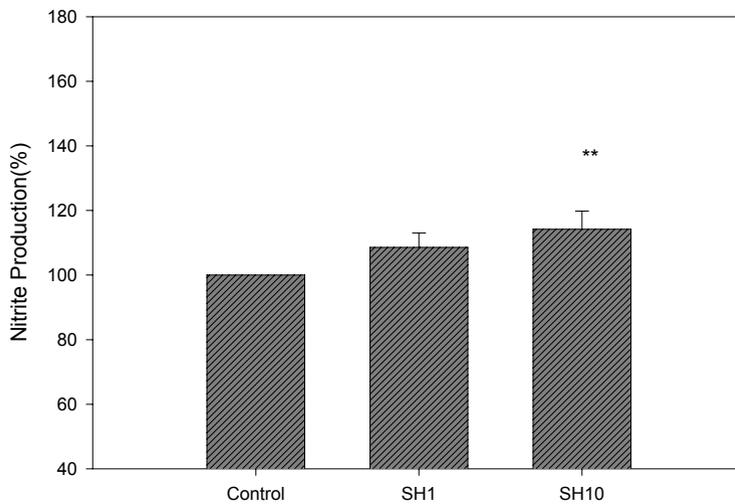


Fig. 3 Effect of SH on nitric oxide formation in macrophage cells. RAW 264.7 cells incubated with native LDL for 90hrs.

Control : vehicle

SH1 : 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of SH

SH10 : 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of SH

\*\* :  $p < 0.01$  vs control

Table I. The survival rate of RAW264.7 cell incubated with CuSO<sub>4</sub> for 20 hrs.

	O.D value (650nm)	Survival rate (%)
control	1.00±0.08	100.0
SH 1μg/ml	1.17±0.03	116.2±3.75*
SH 10μg/ml	1.18±0.01	117.8±1.89*

Survival rates represent the ratio of O.D value between control and SH group. Data are expressed as mean ± S.D. As compared to the control group, \*P < 0.05

### 5. LDH 유리에 미치는 영향

LDL을 첨가한 RAW264.7 cell을 5 μM CuSO<sub>4</sub>에 20시간 노출시켜 손상을 유도한 후, 손상된 세포로부터 배지에 유출되는 LDH 활성을 측정하였다. 실험결과, SH시료는 실험에 사용한 모든 농도에서 유의적(p<0.01)으로 LDH 누출을 억제하였다(Fig. 4).

### 6. 대식세포 ACP 유리에 미치는 영향

5μM CuSO<sub>4</sub>에 노출시켜 산화형 지단백으로 손

상시킨 RAW 264.7 cell에 대한 시료의 효과를 살펴 보았다. 대조군과 비교하여 10 μg/ml 농도의 SH시료군의 acid phosphatase activity가 증가하여 SH시료가 10 μg/ml 농도에서 손상된 세포의 활성을 회복시켰다(Fig. 5).

### 7. 거품생성 세포에 미치는 영향

oxLDL에 의한 거품세포 분화를 억제하는지를 알아보기 위하여 대식세포에 ox-LDL을 첨가하여 거품세포로의 분화를 유도한 후, SH를 처리하여 Oil Red O염색을 통해 거품 세포 내 지질

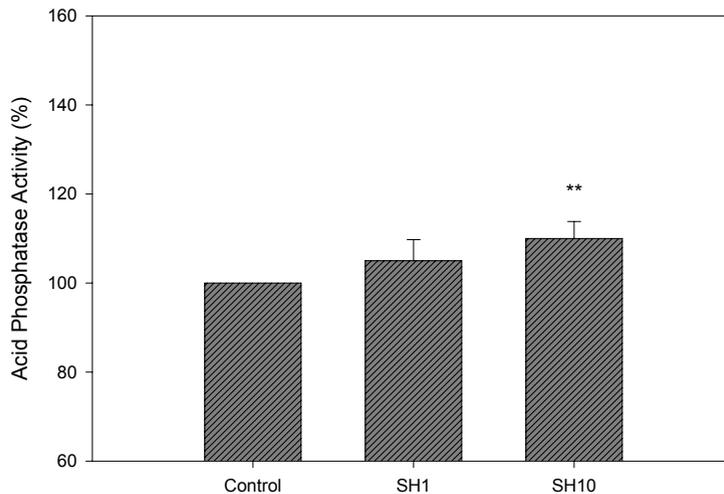


Fig. 4 Effect of SH on acid phosphatase activity in macrophage cells. RAW 264.7 cells were incubated with SH in presence of CuSO<sub>4</sub>.

Control : CuSO<sub>4</sub> only

SH1 : 1 μg/ml of SH + 5 μM CuSO<sub>4</sub>

SH10 : 10 μg/ml of SH + 5 μM CuSO<sub>4</sub>

\*\* p<0.01 vs control

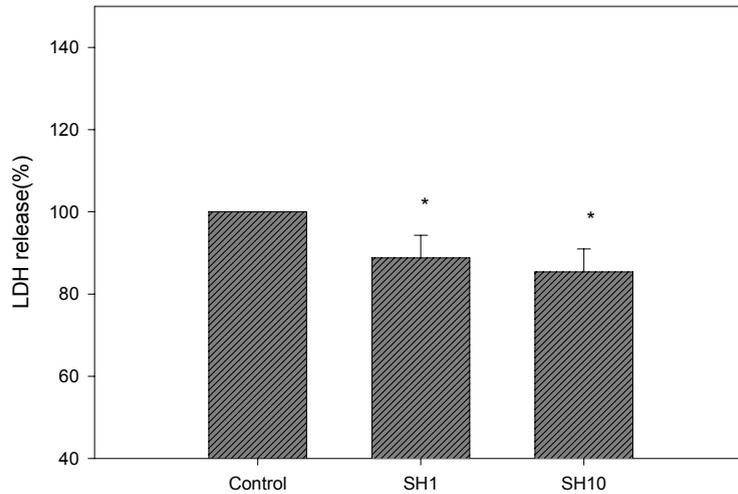


Fig 5. Effect of SH on CuSO<sub>4</sub>-induced LDH release from macrophage cells. RAW 264 cells were incubated with SH in the presence of CuSO<sub>4</sub>.

Control : CuSO<sub>4</sub> only

SH1 : 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of SH + 5  $\mu\text{M}$  CuSO<sub>4</sub>

SH10 : 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of SH + 5  $\mu\text{M}$  CuSO<sub>4</sub>

\* p < 0.05 vs control

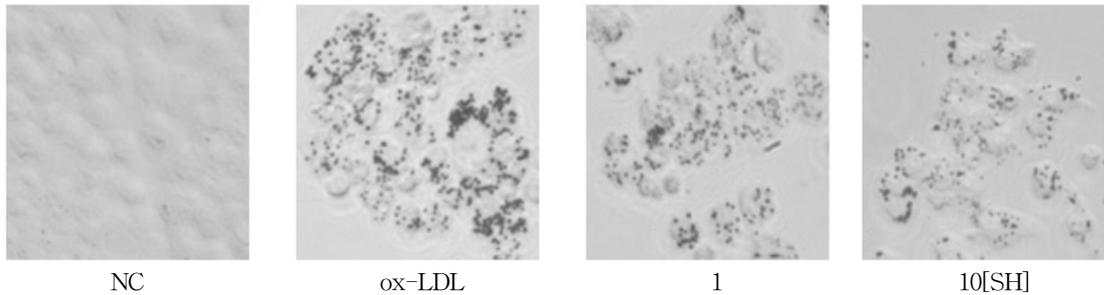


Fig. 6 Inhibitory Effect of SH on the oxLDL-induced foam cell formation.

NC : native LDL

ox-LDL : oxLDL only

SH1 : 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of SH + oxLDL

SH10 : 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of SH + oxLDL

입자의 축적을 현미경으로 관찰하고, 흡광도를 측정하여 수치화하였다. 실험결과, 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  농도의 SH는 oxLDL에 의한 거품세포 생성을 각각 50%, 65% 억제하였다(Fig. 6, Fig. 7).

#### IV. 고찰

죽상동맥경화증 발생은 지방선조(fatty streak)

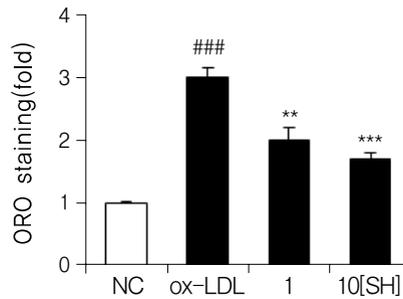


Fig. 7 Effect of SH on lipid accumulation in oxLDL-induced foam cell.

NC: native LDL

ox-LDL: oxLDL only

SH1: 1 $\mu$ g/ml of SH + oxLDL

SH10: 10 $\mu$ g/ml of SH + oxLDL

### p<0.001 vs NC, \*\* p< 0.01 vs ox-LDL, \*\*\* p<0.001 vs ox-LDL

의 초기단계인 거품세포(foam cell)의 형성으로부터 시작한다고 알려져 있다. 거품세포는 대식세포와 단핵세포(monocyte)가 LDL을 흡수하거나, CD36과 LOX-1(lectin-like low-density lipoprotein receptor 1)과 같은 scavenger receptors (SR)를 통해 흡수되는 oxLDL의 흡수 및 침착을 통하여 형성되기 시작한다.<sup>3)</sup> 이 과정에는 흡수된 LDL의 산화과정이 포함되어 있는데, LDL의 산화는 대식세포뿐만 아니라 혈관내피세포, 혈관평활근세포, 임파구 등에 의해서 일어난다. 이 과정에는 ceruloplasmin-bound copper, superoxide, NOx, lipoyxygenase,<sup>13)</sup> myeloperoxidase<sup>12)</sup> 등 여러가지 효소적 또는 비효소적 인자가 관여하게 된다. 또한, 거품세포로부터 유리된 GM-CSF는 면역세포의 이동과 증식을 통해 더 많은 oxLDL을 생성하여 혈관벽 침착을 촉진한다.<sup>6)</sup> 또한, 다양한 염증인자의 생성과 유리를 통해 혈관 내에 염증반응과 혈관 손상을 유발하고, PDGF 등의 작용으로 혈관내피세포 및 평활근세포의 증식을 통한 혈관을 비후화시킨다.<sup>9)</sup>

혈중 LDL은 구리 ion에 노출되면 LDL중의 apoprotein의 산화 및 분해, 인지질과 스테롤계 화합물의 산화 및 분해가 각각 일어난다. 혈관

내피세포나 대식세포도 LDL의 분해를 유발하는 산화과정이 유발되는데, LDL의 산화시에는 지질과산화 물질로 알려진 MDA가 LDL내의 인지질 산화시 분해되어 형성된다. 실험결과, SH는 LDL을 첨가한 RAW264.7 cell로부터 생성되는 oxLDL의 지표인 지질과산화를 현저히 억제하였다(Fig.1) 이와 함께, LDL이 산화되는 과정에서 LDL의 Apolipoprotein B가 조각으로 분해되고, 아미노산이 산화되어 유도체 등이 형성되기도 한다. 따라서, 실험적으로는 LDL의 산화 및 분해정도를 apolipoprotein의 분해결과 나타나는 tyrosine, nitrotyrosine, chlorotyrosine, hydroxyleucine과 그들의 이성질체 등을 측정하여 평가한다.<sup>23, 24)</sup> 본 연구에서는 대식세포의 cell line인 RAW264.7 cell을 배양하면서 LDL을 첨가하여 생성되는 oxLDL양을 측정하기 위한 방법으로 산화하여 분해되고 남은 단백질량을 측정하였다. 실험결과, SH는 RAW264.7 cell oxLDL 생성과정에서 일어나는 단백질 산화를 현저히 억제하는 결과를 나타내었다(Fig. 2). 따라서, SH는 대식세포에 의해 LDL이 산화되어 나타나는 oxLDL 생성능을 억제하여 거품세포로의 분화를 억제할 수 있을 것으로 추측되었다. 대식세포

포에 의한 oxLDL 흡수는 거품세포로 가는 중요한 단계로 알려져 있으며, IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  등과 같은 염증인자 들은 oxLDL 흡수를 증가시키는 scavenger receptor 발현을 증가시켜 거품세포 형성과 동맥경화를 심화시킨다.<sup>25)</sup> 이와 함께 염증반응에 관여하는 Lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2)도 동맥경화에 관여하는 것으로 나타났다.<sup>17)</sup> 반대로 SOD, catalase, glutathione peroxidase와 같은 항산화효소 시스템이나 내피세포의 eNOS 발현 증가는 동맥경화를 억제한다고 보고되었다.<sup>26)</sup> Nitrite는 nitric oxide(NO)의 대사산물로 endothelial cell이나 macrophage cell로부터 생성되며, 대식세포에서 생성된 superoxide와 반응하여 peroxynitrite를 생성하며, 이것에 의해 oxLDL 생성이 촉진되고 scavenger receptor를 통해 oxLDL이 흡수되게 한다. 이러한 일련의 과정을 통해 흡수된 cholesterol은 거품세포로 변한 대식세포에 축적되며 세포의 사멸과 함께 atherosclerosis의 진행을 촉진한다고 보고되고 있다.<sup>3, 4)</sup> 동맥경화 진행과정은 혈관에 cholesterol 등의 지질이 침착되고 혈관세포의 증식으로 혈관벽 비후가 일어나는 과정을 포함한다. 이와는 달리 eNO의 작용으로는 vascular smooth muscle의 이완과 혈소판 응집 억제, 혈관내피세포의 혈관 투과성 억제 및 면역세포의 혈관점착 억제가 있으며,<sup>27)</sup> cGMP-phosphodiesterase의 억제를 통한 fibroblast, lymphocyte 및 smooth muscle cell 증식 억제 등이 보고되었다.<sup>28)</sup> 실험적으로 Nitrite 및 nitrate는 nitric oxide(NO)의 대사산물로 endothelial cell이나 macrophage cell로부터 생성되는 nitric oxide의 생성지표로 측정된다.<sup>23), 24)</sup> 실험 결과, SH는 LDL을 처리한 RAW264.7 cell에서 nitrite의 농도를 증가시키는 것으로 나타났다. 이는 SH가 LDL을 섭취한 RAW264.7 cell에 의해 생성되는 oxLDL에 의해 반응이 자극되는 NOS(nitric oxide synthetase)의 활성을 증가시킨 결과로 보인다. 이는 SH 자체가 항산화작용

을 나타내거나 RAW264.7 cell의 기능을 억제할 가능성을 시사해 준다. 이러한 가능성을 확인하기 위하여 RAW264.7 cell의 기능활성화에 미치는 영향과 CuSO<sub>4</sub>에 의한 RAW264.7 cell의 생존율을 측정하였다. 실험결과, SH는 CuSO<sub>4</sub>로 처리한 RAW264.7 cell의 생존율을 증가시켰다(Table I), 또한, RAW264.7 cell의 기능 측정지표인 acid phosphatase의 활성을 증가시켰다(Fig. 4). 이와 별도로, 세포 손상시 세포막을 통하여 누출되는 세포내 효소인 lactate dehydrogenase(LDH) 활성에 미치는 영향을 측정하였다. RAW264.7 cell에 대한 oxLDL의 상해작용의 지표로 LDH 유리량을 측정한 결과, SH는 CuSO<sub>4</sub> 처리로 생성된 oxLDL에 의한 LDH 유리를 억제하는 효과를 나타내었다(Fig. 5). 따라서, SH의 oxLDL 생성 억제작용은 RAW264.7 cell의 세포기능 억제를 통한 작용은 아닌 것으로 판단되었다. 이러한 결과를 토대로 SH가 거품세포 형성과 거품세포내의 lipid 축적에 미치는 영향을 평가한 결과, SH는 oxLDL로 유발되는 거품세포 형성을 억제하였다(Fig. 6). 또한, 거품세포에 축적되는 lipid 함량을 ORO 염색을 통해 측정한 결과, SH는 억제 효과를 나타내었다(Fig. 7). 이러한 결과는 SH가 대식세포에 의한 LDL 산화를 억제하여 나타난 것으로 판단된다. 본 연구결과를 바탕으로 시호의 동맥경화 환자에 응용하기 위해 실험동물 모델에서의 연구가 진행중이다.

## V. 결론

시호(SH)가 거품세포 생성 및 대식세포에서의 지단백 산화에 미치는 영향에 대하여 평가하였다. 연구결과, SH는 대식세포에서의 oxLDL 생성과정에서 일어나는 단백질 산화를 현저히 억제하는 결과를 나타내었다. 또한, oxLDL 생성 과정에 포함되는 인지질의 산화 및 분해를 측정하기 위한 지표인 지질과산화를 현저히 억제하

였다. 이와 함께, 세포에 대한 CuSO<sub>4</sub>의 세포독성을 억제 하였으며, 대식세포 활성지표인 acid phosphatase의 활성을 증가시켰다. 또한, SH는 oxLDL로 유도된 거품세포 분화 및 거품세포에서 지질축적을 억제하였다.

따라서, SH는 대식세포의 LDL 산화작용 및 거품세포 분화를 억제하여 동맥경화 발생의 초기단계를 억제할 것으로 판단되었다.

## 참고문헌

1. Kullo K.J., Gau G.T. and Tajik J. : Novel risk factors for atherosclerosis. *Mayo Clin Proc* 2000 ; 75 : 369-380.
2. Webb NR, Moore KJ. Macrophage-derived foam cells in atherosclerosis : lessons from murine models and implications for therapy. *Curr Drug Targets*. 2007 ; 8(12) : 1249-63.
3. Rios FJ, Koga MM, Ferracini M, Jancar S. Co-stimulation of PAFR and CD36 is required for oxLDL-induced human macrophages activation. *PLoS One*. 2012 ; 7(5) : e36632.
4. Park YM, Febbraio M, Silverstein RL. CD36 modulates migration of mouse and human macrophages in response to oxidized LDL and may contribute to macrophage trapping in the arterial intima. *J Clin Invest*. 2009 ; 19(1) : 136-45.
5. Rahaman SO, Lennon DJ, Febbraio M, Podrez EA, Hazen SL, Silverstein RL. A CD36-dependent signaling cascade is necessary for macrophage foam cell formation. *Cell Metab*. 2006 ; 4(3) : 211-21.
6. Tojo N, Asakura E, Koyama M, Tanabe T, Nakamura N. Effects of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on protease production from monocyte, macrophage and foam cell in vitro : a possible mechanism for anti-atherosclerotic effect of M-CSF. *Biochim Biophys Acta*. 1999 ; 1452(3) : 275-84.
7. van der Kooij MA, Morand OH, Kempen HJ, van Berkel TJ. Decrease in scavenger receptor expression in human monocyte-derived macrophages treated with granulocyte macrophage colony-stimulating factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996 ; 16(1) : 106-14.
8. James E. McLaren, Daryn R. Michael, Tim G. Ashlin, Dipak P. Ramji. Cytokines, macrophage lipid metabolism and foam cells : Implications for cardiovascular disease therapy. *Progress in Lipid Research* 2011 ; 50 : 331-347.
9. Raines EW. PDGF and cardiovascular disease. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2004 ; 15(4) : 237-54.
10. Ehrenwald, E., and P. L. Fox. Role of endogenous ceruloplasmin in low density lipoprotein oxidation by human U937 monocytic cells. *J. Clin. Invest*. 1996 ; 97 : 884-890.
11. Rozenberg,O., et al. Paraoxonase (PON1) deficiency is associated with increased macrophage oxidative stress : studies in PON1-knockout mice. *Free Radic. Biol. Med*. 2003 ; 34 : 774-784.
12. Carr, A.C., M. R. McCall, and B. Frei. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species : reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2000 ; 20 : 716-1723.
13. Rydberg, E. K., et al. Hypoxia increases

- LDL oxidation and expression of 15-lipoxygenase-2 in human macrophages. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004; 24: 2040-2045.
14. Sakashita, T. et al. Essential involvement of 12-lipoxygenase in regio-specific and-tereospecific oxidation of low density lipoprotein by macrophages. *Eur. J. Biochem.* 1999; 265: 825-831.
  15. Cathcart, M. K. Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/ macrophages: contributions to atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2004; 24: 23-28.
  16. Xu, W., et al. Low density lipoprotein receptor-related protein is required for macrophage-mediated oxidation of low density lipoprotein by 12/15-lipoxygenase. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 36454-36459.
  17. Li, Q., and M. K. Cathcart. Selective inhibition of cytosolic phospholipase A2 in activated human monocytes. Regulation of superoxide anion production and low density lipoprotein oxidation. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 2404-2411.
  18. 完譯中藥大辭典, 정담, p2622-2632, 1999
  19. Kim SY, Yun-Choi HS. Platelet anti-aggregating activities of bupleurumin from the aerial parts of *Bupleurum falcatum*. *Arch Pharm Res.* 2007; 30(5): 561-4.
  20. Chen YL, Lin SZ, Chang JY, Cheng YL, Tsai NM, Chen SP, Chang WL, Harn HJ. In vitro and in vivo studies of a novel potential anticancer agent of isochaihulactone on human lung cancer A549 cells. *Biochem Pharmacol.* 2006; 72(3): 308-19.
  21. Nakahara Y, Okawa M, Kinjo J, Nohara T. Oleanene glycosides of the aerial parts and seeds of *Bupleurum falcatum* and the aerial parts of *Bupleurum rotundifolium*, and their evaluation as anti-hepatitis agents. *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 2011; 59(11): 1329-39.
  22. 이준무, 이은, 최무영. 시호(*Bupleuri Radix*)분말이 고콜레스테롤 급여 흰쥐의 체지방구성 및 TBARS 량에 미치는 영향. *대한분초학회지*, 2000; 15(1): 67-71
  23. Hazen S.L. and Heinecke J.W.: 3-Chlorotyrosine, a specific marker of myeloperoxidase-catalysed oxidation, is markedly elevated in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic intima. *J Clin Invest* 99, 2075, 1997
  24. Leuwenburg C., Rasmussen J.E. and Hsu F.F.: Mass spectrometric quantitation of marker for protein oxidation by tyrosyl radical in low density lipoprotein isolated from human atherosclerotic plaques. *J Biol Chem* 1997; 272: 3520.
  25. Hashizume M, Mihara M. Cytokine. Atherogenic effects of TNF- $\alpha$  and IL-6 via up-regulation of scavenger receptors. 2012; 58 (3): 424-30.
  26. Park JG, Oh GT. The role of peroxidases in the pathogenesis of atherosclerosis. *BMB Rep.* 2011; 44(8): 497-505.
  27. Rudijanto A. The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis. *Acta Med Indones.* 2007; 39(2): 86-93
  28. Rybalkin SD, Yan C, Bornfeldt KE, Beavo JA. Cyclic GMP phosphodiesterases and regulation of smooth muscle function. *Circ Res.* 2003; 93 (4): 280-91.