

加味桃紅四物湯이 HUVEC cell 내에 eNOS, KLF2, ICAM-1, VCAM-1의 유전자 발현양에 대해 미치는 영향

임현찬, 전상윤

동신대학교광주한방병원 한방내과

The Effect of *Gamidohongsamul-tang* (GDT) on the Gene Expression Levels of eNOS, KLF2, ICAM-1 and VCAM-1 in HUVEC Cells

Hyun-chan Lim, Sang-yoon Jeon

Dept. of Oriental Internal Medicine, Dong-Shin University Gwangju Oriental Hospital

ABSTRACT

Objectives: This study seeks to investigate the effects of *Gamidohongsamul-tang* (GDT) on the Gene expression levels of eNOS, KLF2, ICAM-1 and VCAM-1 in HUVEC cells.

Methods: HUVEC cells were treated at a concentration of 1, 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) of *Gamidohongsamul-tang* (GDT). To measure the NOS, KLF2, ICAM-1 and VCAM-1 gene expression in HUVEC cells, the synthesized cDNA was subjected to polymerase chain reaction (PCR) and electrophoresis was performed to verify gene expression level.

Results:

1. GDT significantly increased eNOS and KLF2 gene expression.
2. GDT significantly reduced ICAM-1 and VCAM-1 gene expression.

Conclusions: These experiments suggest that *Gamidohongsamul-tang* (GDT) regulates gene expression related with anti-dyslipidemic effects in HUVEC cells. In order to clinically apply this to diseases related to dyslipidemia, such as cardiovascular disease, additional *in vivo* experiments are needed to verify the anti-dyslipidemic effects of GDT.

Key words: *Gamidohongsamul-tang*, anti-dyslipidemic, HUVEC cell

1. 서 론

급격하게 서구화되어가는 생활습관으로 고혈압, 당뇨, 고지혈증, 비만을 포함하는 '생활습관병'이라는 개념이 생겼다. 이런 생활습관병은 심뇌혈관 질환

환을 유발하며 이를 예방하기 위해 순환기계 질환의 주요 위험인자인 고혈압, 당뇨 및 고지혈증을 적절히 관리하는 것이 중요해졌다¹.

이 중 고지혈증은 혈중 콜레스테롤이나 중성지방이 증가된 상태를 의미하며 엄밀하게는 지단백의 대사 이상에 의해 발생하는 이상지질혈증이라 한다². 이상지질혈증은 광범위한 개념으로 일반적으로는 LDL-Cholesterol, Triglyceride(TG), Total Cholesterol이 높으며 HDL-Cholesterol이 낮은 상태를 가리킨다³. 주로 잘못된 식습관으로 인한 비만, 당뇨병, 과다한 음주 등으로 인하여 콜레스테

· 투고일: 2018.02.02, 심사일: 2018.03.25, 게재확정일: 2018.03.28

· 교신저자: 전상윤 광주광역시 남구 월산로 141

동신대학교 광주한방병원 2내과

TEL: 062-350-7206 FAX: 062-350-7141

E-mail: damiano70@hanmail.net

· 이 논문은 2018년도 동신대학교 대학원 한의학 석사학위 논문임.

콜과 중성지방을 운반하는 지단백의 생합성 증가 또는 분해 감소에 의해 여러 형태로 이상지질혈증이 나타난다. 이상지질혈증 환자의 경우 초기 식이요법, 운동요법, 금연 등의 생활습관에 대한 관리를 먼저 시작하며 이후 혈중에 이상지질혈증이 계속 관찰되는 경우 HMG-CoA 환원효소 저해제(HMG-CoA reductase inhibitor), cholestyramine, Fibrates, Niacin 등의 약물을 이용하여 LDL-Cholesterol 수치를 조절하는 것을 기본적인 치료전략으로 한다⁴.

그러나 이상지질혈증을 조절하기 위해 상기 약물을 복용하였을 경우 소화장애, 속쓰림, 복통 등의 가벼운 부작용부터 간 독성 및 근육 독성과 같은 치명적인 부작용이 동반될 수 있다⁵. 이에 부작용이 덜하며 이상지질혈증을 보다 효과적으로 조절할 수 있는 새로운 약물에 대한 필요성이 대두된다.

한의학적으로 이상지질혈증은 濕熱, 痰濁, 瘀血 등의 범주에 포함한다. 이를 근거로 한약 혹은 생약을 통해 이상지질혈증을 안전하며 효과적으로 조절하는 치료약물을 개발하기 위하여 가시오가피, 가미옥녀전 등을 활용한 연구가 있었다^{6,7}. 이들은 total cholesterol, LDL-cholesterol 수치를 감소시켜 이상지질혈증과 관련하여 효능이 있음을 나타내었으나 淸熱祛濕 효능을 이용한 연구 이외 活血祛瘀 작용을 통한 연구는 증례가 다소 부족하였다⁸.

桃紅四物湯은 《醫宗金鑑》에 수록된 처방이다⁹. 養血調經의 효과가 있는 四物湯에 活血化瘀의 효과가 있는 桃仁, 紅花를 加味하여 月經通, 經行不利 產後腹痛, 打撲 등의 질환에 임상적으로 활용되어 왔다. 기존 桃紅四物湯에 관한 연구로는 대한 연구로는 순환기 계통에 관한 연구, 부인과적 질환에 관한 연구, 뇌신경계 질환에 대한 연구가 보고되었으나 이상지질혈증에 대한 연구는 없었다¹⁰⁻¹³. 이에 이상지질혈증에 대한 桃紅四物湯의 효능을 확인하기 위해 실험을 계획하였으며, 活血祛瘀 효능을 높이기 위해 麥門冬, 麻子仁, 桂枝, 人蔘 등을 加味하여 加味桃紅四物湯(GDT)을 사용하였다.

이상지질혈증이 계속되어 콜레스테롤이 혈액 내에 과다하면 혈관벽에 침착하여 죽상경화증을 일으킬 수 있다. 죽상경화증은 심혈관 질환, 뇌혈관 질환을 일으킬 수 있는 위험인자이며 이를 예방하기 위해 적절한 관리가 필요하다.

혈관내피세포의 기능이 이상이면 혈관 수축, 염증반응, 혈전 생성 등을 일으켜 죽상경화증을 유발할 수 있으며 죽상경화증의 초기에 혈액 속의 염증 수치들이 변화한다. 그러므로 혈관내피세포의 활성과 관련된 endothelial nitric oxide synthase (eNOS), Krüppel-like Factor-2(KLF2)와 혈관내피세포에서 염증세포들의 이동에 관여하는 intercellular adhesion molecule-1(ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1)의 수치를 통하여 죽상경화증 및 주요 원인이 되는 이상지질혈증에 대해 간접적으로 평가할 수 있다.

본 실험은 加味桃紅四物湯의 이상지질혈증에 대한 효과를 객관적으로 증명하기 위해 in vitro 실험으로 HUVEC cell을 이용해 加味桃紅四物湯이 eNOS, KLF2, VCAM-1, ICAM-1의 유전자 발현양에 미치는 영향을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 재 료

1) 약 재

본 실험에 사용한 加味桃紅四物湯(Gamidohongsamul-tang, GDT)의 구성 약재들은 (주)옵니허브에서 구입하여 사용하였으며, 그 내용 및 분량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. The Prescription of GDT

Herbal medicine name	Pharmacognostic name	Dose (g)
生地黃	<i>Rehmanniae Radix Crudus</i>	40
大棗	<i>Zizyphi Fructus</i>	10
麥門冬	<i>Liriopsis Tuber</i>	10
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	8
桃仁	<i>Persicae Semen</i>	8
麻子仁	<i>Cannabis Fructus</i>	8
炙甘草	<i>Glycyrrhizae Radix et Rhizoma</i>	8
桂枝	<i>Cinnamomi Ramulus</i>	6
生薑	<i>Zingiberis Rhizoma Crudus</i>	6
阿膠	<i>Asini Cornii Colla</i>	4
人參	<i>Ginseng Radix Alba</i>	4
赤芍藥	<i>Paeoniae Radix Rubra</i>	4
川芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	4
紅花	<i>Carthami Flos</i>	4
Total amount		124

2. 방법

1) 시료 추출

GDT 1침(124 g)에 증류수 1,000 ml를 넣어 3시간 동안 환류추출을 한 후 여과액을 rotary vacuum evaporator로 감압 농축하였다. 농축된 용액을 freeze dryer로 동결 건조하여 얻어낸 분말 29.53 g(수율 23.81%)을 초저온 냉동고 (-80 °C)에서 보관하며 실험에 필요한 농도로 증류수에 희석해 사용하였다.

2) 세포 배양

HUVEC 세포는 EGM™-2 Medium과 EGM™-2 SingleQuots™ Kit으로 혼합된 배지를 사용하여 37 °C, 5% CO₂ 조건이 유지되는 세포배양기에서 배양하였으며, 2-3일 주기로 계대 배양하여 실험을 진행하였다.

3) 항이상지질효능 평가

(1) 세포 내 유전자 발현양 측정

① RNA 추출

6 well plate에 HUVEC 세포를 10⁶ cells/well로

분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였으며, GDT 1, 10, 100(µg/ml)의 농도와 1 µg/ml TNF-α를 함께 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. HUVEC 세포를 PBS로 2회 씻어준 뒤 easy blue 1 ml와 chloroform 200 µl를 넣고 vortexing 해준 후 13,000 rpm, 4 °C에서 10분 동안 원심분리 해준다. 상층액 400 µl와 binding buffer 400 µl를 실온에서 1분 동안 반응시킨 뒤 반응액 700 µl를 column에 주입하여 13,000 rpm에서 30초 동안 원심분리 했다. Column에 washing buffer A를 700 µl 넣고 13,000 rpm에서 30초 동안 원심분리 후 washing buffer B를 700 µl 넣고 동일하게 원심분리 했다. Column 하단을 Ep tube로 교체한 후 column에 elution buffer를 50 µl 넣고 1분 동안 반응시킨 뒤 13,000 rpm에서 1분 동안 원심분리하여 추출된 total RNA를 모았다.

② cDNA 합성

역전사(reverse transcription) 반응은 RT premix kit의 mixture(reaction buffer, dNTPs mixture, RNase inhibitor, stabilizer, oligo dT15 primer)를 사용하여 total RNA 1 µg이 되도록 diethyl pyrocarbonate (DEPC) 처리된 증류수에 최종 부피가 20 µl가 되도록 하여 첨가하였다. 이 20 µl의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 45 °C에서 60분 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 후 95 °C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 다음 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction(PCR)에 사용하였다.

③ 유전자 발현양 측정

합성된 cDNA 2 µl와 primer F 1 µl, primer R 1 µl, DEPC-DW 16 µl 넣고 Table 2와 같은 조건으로 PCR을 수행하였다. 생성된 product를 1.5% agarose gel에서 100 V로 30분 동안 전기영동한 후 Fusion Quick Guide를 이용하여 UV촬영을 통해 결과를 확인하였다.

Table 2. The Sequences of Primers in This Study

Primer	F/R	Sequences	Cycle	Annealing (°C)
eNOS	F	ACTGAAGGCTGGCATCTGGAA	40	59
	R	TCATAGGTGATGCTCCCCAC		
KLF2	F	AGGTGAGAAGCCCTACCACT	40	58
	R	TCTAGTGTAGACCCGGTGGG		
ICAM-1	F	TATAAAGGATCACGCGCCCC	35	60
	R	AACAACCTGGGGCTGGTCACA		
VCAM-1	F	ATGACATGCTTGAGCCAGG	35	60
	R	GTGTCTCCTTCTTTGACACT		
GAPDH	F	ACCACAGTCCATGCCATCAC	35	59
	R	TCTAGACGGCAGGTCAGGTC		

3. 통계처리

실험 결과는 SPSS 18.0의 unpaired student's T-test와 ANOVA를 사용하여 통계처리 하였고 $p < 0.05$, $p < 0.01$ 및 $p < 0.001$ 수준에서 그 유의성을 검증하였다.

III. 실험 결과

1. 세포 내 eNOS 유전자 발현양 측정

세포 내 eNOS 유전자 발현양을 측정한 결과, 정상군을 $144.11 \pm 3.43\%$, 대조군을 $100.00 \pm 2.82\%$ 으로 나타냈을 때, 1, 10, 100($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 각각 $98.44 \pm 5.86\%$, $123.77 \pm 5.15\%$, $127.98 \pm 4.60\%$ 로 나타나 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는(* : $p < 0.05$) 증가가 나타났다(Fig. 1).

2. 세포 내 KLF2 유전자 발현양 측정

세포 내 KLF2 유전자 발현양을 측정한 결과, 정상군을 $173.61 \pm 2.71\%$, 대조군을 $100.00 \pm 1.74\%$ 으로 나타냈을 때, 1, 10, 100($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 각각 $101.66 \pm 1.67\%$, $154.88 \pm 3.42\%$, $166.31 \pm 2.63\%$ 로 나타나 10, 100 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는(** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$) 증가가 나타났다(Fig. 2).

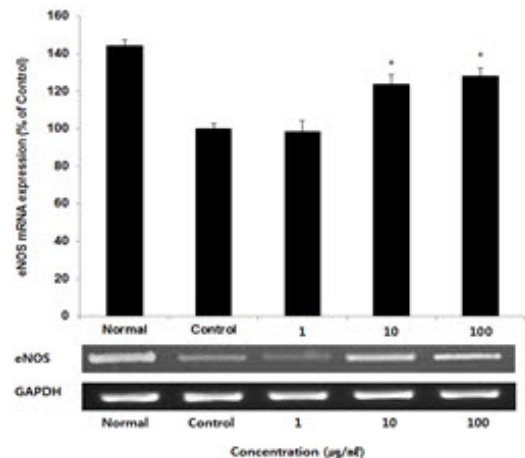


Fig. 1. Effect of GDT on eNOS mRNA expression levels in HUVEC cells.

HUVEC cells were treated by 1, 10, and 100 $\mu\text{g/ml}$ of GDT with TNF- α for 24 h. eNOS mRNA expression levels were measured by polymerase chain reaction. The normal group were not treated by anything, the control group were just seeded by HUVEC cells and not treated by GDT. The result were presented by the mean \pm S.D from three independent experiments (Significance of results, * : $p < 0.05$ compare to control).

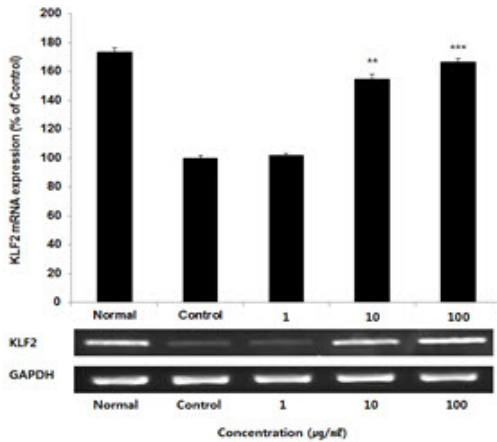


Fig. 2. Effect of GDT on KLF2 mRNA expression levels in HUVEC cells.

HUVEC cells were treated by 1, 10, and 100 µg/ml of GDT with TNF-α for 24 h. KLF2 mRNA expression levels were measured by polymerase chain reaction. The normal group were not treated by anything, the control group were just seeded by HUVEC cells and not treated by GDT. The result were presented by the mean±S.D from three independent experiments (Significance of results, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ compare to control).

3. 세포 내 ICAM-1 유전자 발현양 측정

세포 내 ICAM-1 유전자 발현양을 측정 한 결과, 정상군을 22.32±4.54%, 대조군을 100.00±2.63%으로 나타냈을 때, 1, 10, 100(µg/ml) 농도에서 각각 99.13±1.49%, 85.15±2.70%, 25.73±3.92%로 나타나 10, 100 (µg/ml) 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는(* : $p < 0.05$, *** : $p < 0.001$) 감소가 나타났다(Fig. 3).

4. 세포 내 VCAM-1 유전자 발현양 측정

세포 내 VCAM-1 유전자 발현양을 측정 한 결과, 정상군을 56.12±2.77%, 대조군을 100.00±2.32%으로 나타냈을 때, 1, 10, 100(µg/ml) 농도에서 각각 91.69±5.26%, 56.15±4.55%, 58.13±1.53%로 나타나 10, 100(µg/ml) 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는(*** : $p < 0.001$) 감소가 나타났다(Fig. 4).

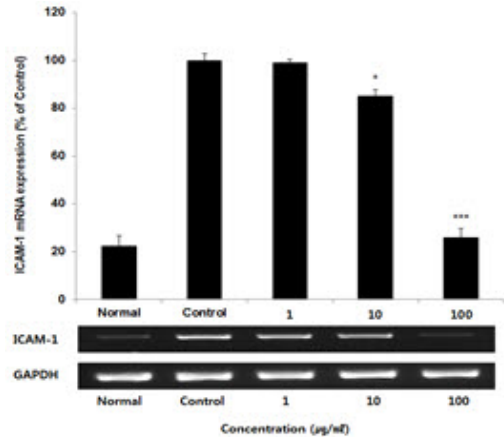


Fig. 3. Effect of GDT on ICAM-1 mRNA expression levels in HUVEC cells.

HUVEC cells were treated by 1, 10, and 100 µg/ml of GDT with TNF-α for 24 h. ICAM-1 mRNA expression levels were measured by polymerase chain reaction. The normal group were not treated by anything, the control group were just seeded by HepG2 cells and not treated by GDT. The result were presented by the mean±S.D from three independent experiments (Significance of results, * : $p < 0.05$, *** : $p < 0.001$ compare to control).

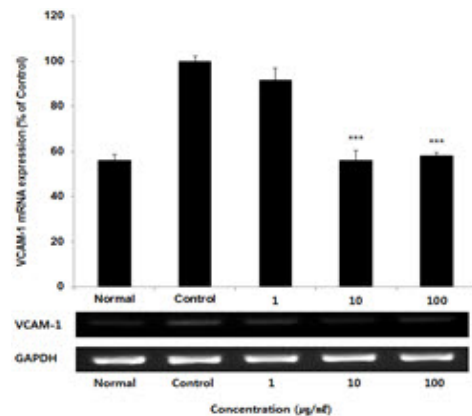


Fig. 4. Effect of GDT on VCAM-1 mRNA expression levels in HUVEC cells.

HUVEC cells were treated by 1, 10, and 100 µg/ml of GDT with TNF-α for 24 h. VCAM-1 mRNA expression levels were measured by polymerase chain reaction. The normal group were not treated by anything, the control group were just seeded by HepG2 cells and not treated by GDT. The result were presented by the mean±S.D from three independent experiments (Significance of results, *** : $p < 0.001$ compare to control).

IV. 고찰

이상지질혈증은 동맥경화 및 죽상경화증의 주원인이며 심근경색, 협심증, 괴저 등 합병증을 유발하는 심혈관계 질환, 뇌혈관계 질환을 포함하는 순환기 질환의 공통적인 병인이다. 이상지질혈증 치료지침 제정위원회가 발간한 2015 이상지질혈증 치료지침에 따르면 임상적으로 TG 150 mm/dL 이상, Total-Cholesterol 200 mg/dL 이상, HDL-Cholesterol 40 mg/dL 이하, LDL-Cholesterol 130 mg/dL 이상을 경계범위로 분류하여 이상지질혈증에 대한 관리방법을 결정한다¹. 위험수치가 아닌 경우에는 약 3개월간의 식사, 운동 등의 생활요법을 시행하며 이후 혈중 지질성분이 제대로 조절되지 않는 경우 약물요법을 시행한다. 각 환자별 고혈압, 당뇨병, 흡연, 연령 등의 위험요인들을 고려하여 LDL-cholesterol에 대한 치료적 목표수치를 세운다².

이상지질혈증에 대한 치료제는 Statins(HMG-CoA reductase inhibitors), Resins(cholestyramine), Fibrates(fibric acid and derivatives), Niacin(nicotinic acid and derivatives) 등이 있다. 이 중 Statins, Niacin, Resins가 1차 선택약제로 사용되고 있으나 Statins의 경우에는 AST, ALT 등의 간수치 상승 및 근육병증(myopathy), Fibrates는 상복부 통증 등 위장관 증상, 간염, 근육병증 등, Resins는 혈중 콜레스테롤 감소, 변비, 소화불량, 콜레스테롤 담석증 등, niacin는 위장관 장애, 간효소 상승, 내당능 장애, 통풍 등의 부작용이 보고되고 있으며 약제들을 병용할 경우 더 흔하게 발생한다¹⁴. 이에 따라 이상지질혈증을 치료하기 위한 보다 안전하며 효과적인 약에 대한 관심이 증가하고 있다.

한의학적으로 이상지질혈증은 濕熱, 痰濁, 瘀血 등의 범주에 포함시킬 수 있다. 이는 내부 노폐물이라는 면을 통해 mast cell과 관련한 염증물질들의 이동상태와 이로 인하여 foam cell이 형성된 이후로 혈관경화증이 되는 기전과 유사한 점이 있다¹⁵. 기존 이상지질혈증에 대한 단일 약제와 복합제에

대한 여러 연구들이 이루어졌으나 清熱祛濕 효능을 이용한 연구와 달리 活血祛瘀 작용을 통한 연구는 적었다^{6,7}. 이에 본 저자는 血脈에 발생하는 濕濁, 瘀血 또한 이상지질혈증의 범주에 속한다 유추하였으며 이를 근거로 活血, 化痰, 補血 효과가 있는 桃紅四物湯이 이상지질혈증을 치료하는데 효과적일 수 있을 것이라 판단하였다.

生地黃은 항염증 및 항산화 효과 등이 실험을 통해 입증되었으며, 한의학적으로 清熱涼血, 生津止渴 등의 효능과 더불어 消瘀通經 효과가 있음에 착안하여 加味桃紅四物湯(GDT)의 군약으로 설계하였다¹⁶.

麻子仁은 潤腸通便, 潤燥殺蟲하는 약물이며 破積血, 復血脈하는 효능을 겸한다. 桂枝는 溫經通脈, 通陽化氣하는 효능이 있으며 當歸, 芍藥, 桃仁 등의 活血祛瘀 약을 배합하여 氣血凝滯로 인한 병증을 치료한다. 단미제로써 이들 약제들이 이상지질혈증에 대해 유효한 효능이 있는 것은 아직 확인되지는 않았으나 한의학적 약리효과를 근거로 桃紅四物湯에 상기 약제들을 포함하여 加味한 GDT을 이용해 실험을 설계하였으며 기초 실험에서 GDT가 桃紅四物湯에 대해 효과적인 결과를 나타내어 실험을 시행하게 되었다.

고혈압, 당뇨병, Reactive oxygen species(ROS), cytokine 등에 의한 Endothelial cell의 기능변화가 원인이 되어 Endothelial cell에 손상이 있게 되며 혈중 monocyte가 Endothelial cell의 손상부위에 결합하여 내측으로 이동하며 monocyte를 Endothelial cell로 부착하는 과정에서 Intercellular adhesionmolecule-1(ICAM-1), Vascular cell adhesion molecule-1(VCAM-1)이 관여한다. 비만세포는 Interleukin-6(IL-6), Tumor necrosis factor- α (TNF- α) 등의 cytokines을 분비하여 ICAM-1, VCAM-1 등에 작용해 혈관내피로 백혈구의 침윤작용을 증가시킨다¹⁷. ICAM-1, VCAM-1은 혈관 투과성을 증가시켜 LDL-cholesterol이 endothelial cell로 쉽게 들어올 수 있게 되며 free radical에 의해 LDL-cholesterol이 산화된 이후 macrophage에

의해 포식되어 혈관벽을 경화시켜 동맥경화를 일으키며 혈관 내피 기능장애를 유발하는 foam cell로 변한다. 혈관중막의 평활근세포는 혈관내막으로 유주하여 plaque을 형성하며 foam cell과 평활근세포가 유주·증식하여 형성된 collagen, elastin에 의하여 혈관내막이 비후되며 경화증을 유발한다. Endothelial cell는 NO를 분비하여 혈관을 확장시키는데 eNOS 등이 억제되면 Endothelial cell의 기능이상을 일으킬 수 있으며 혈관 수축, 염증반응, 혈전생성 등이 나타나며 죽상경화증의 초기 단계에 중요하게 작용한다.

eNOS(endothelial Nitric oxide synthase)는 혈관 내피 NO 합성효소이다. eNOS 유전자 발현양을 통해 NO 생성량을 유추할 수 있다. KLF-2(Krüppel-like Factor-2)는 지방세포분화억제 단백질이다. Statin 계열의 약물이 KLF-2를 조절하여 이상지질혈증에 대한 치료작용을 나타낸다. 이와 더불어 혈관투과성과 관계한 ICAM-1, VCAM-1을 통해 약물이 나타내는 이상지질혈증에 대한 효과를 유추할 수 있으며 이를 확인하는 실험을 설계하여 加味桃紅四物湯(GDT)의 세포내 이상지질혈증에 대한 효과를 확인하였다.

HUVEC cell의 RNA를 추출하여 reverse transcription을 통해 cDNA를 합성하였다. 이후 polymerase chain reaction(PCR)을 통하여 유전자를 증폭시켜 전기영동하여 UV촬영을 통해 각 유전자의 발현양을 확인하였다.

항이상지질혈증 효능을 확인하기 위해 HUVEC cell 내 eNOS 유전자 발현양을 측정하였으며 실험 결과 정상군은 $144.11 \pm 3.43\%$, 대조군은 $100.00 \pm 2.82\%$, 加味桃紅四物湯의 1, 10, 100($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 각 $98.44 \pm 5.86\%$, $123.77 \pm 5.15\%$, $127.98 \pm 4.60\%$ 로 측정되어 加味桃紅四物湯이 10, 100($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 eNOS 유전자 발현양을 유의성 있게 증가시켰다(Fig. 1).

HUVEC cell 내 KLF-2 유전자 발현양을 측정하였으며 실험 결과 정상군은 $173.61 \pm 2.71\%$, 대조군은 $100.00 \pm 1.74\%$, 加味桃紅四物湯의 1, 10, 100($\mu\text{g/ml}$)

농도에서 각 $101.66 \pm 1.67\%$, $154.88 \pm 3.42\%$, $166.31 \pm 2.63\%$ 로 측정되어 加味桃紅四物湯이 10, 100($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 KLF-2 유전자 발현양을 유의성 있게 증가시켰다(Fig. 2).

HUVEC cell 내 ICAM-1 유전자 발현양을 측정하였으며 실험 결과 정상군은 $22.32 \pm 4.54\%$, 대조군은 $100.00 \pm 2.63\%$, 加味桃紅四物湯의 1, 10, 100($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 각 $99.13 \pm 1.49\%$, $85.15 \pm 2.70\%$, $25.73 \pm 3.92\%$ 로 측정되어 加味桃紅四物湯이 10, 100($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 ICAM-1 유전자 발현양을 유의성 있게 감소시켰다(Fig. 3).

HUVEC cell 내 VCAM-1 유전자 발현양을 측정하였으며 실험 결과 정상군은 $56.12 \pm 2.77\%$, 대조군은 $100.00 \pm 2.32\%$, 加味桃紅四物湯의 1, 10, 100($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 각 $91.69 \pm 5.26\%$, $56.15 \pm 4.55\%$, $58.13 \pm 1.53\%$ 로 측정되어 加味桃紅四物湯이 10, 100($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 VCAM-1 유전자 발현양을 유의성 있게 감소시켰다(Fig. 4).

실험을 통하여 加味桃紅四物湯이 HUVEC cell에 대하여 eNOS, KLF-2 유전자 발현양을 증가시켰으며 ICAM-1, VCAM-1 유전자 발현양을 감소시키는 것을 확인하였다. 이를 통해 加味桃紅四物湯이 혈관의 경화를 억제하는 항이상지질혈증 효과가 있으리라 유추된다. 그러나 in vivo 실험이란 한계점이 있으며 in vitro 실험을 통하여 명확한 효능이 입증되어야 할 것으로 사료된다.

V. 결론

加味桃紅四物湯은 eNOS와 KLF2 유전자 발현양을 유의성 있게 증가시켰으며 ICAM-1과 VCAM-1 유전자 발현양을 유의성 있게 감소시켰다. 이를 통해 加味桃紅四物湯은 in vitro 실험에서 항이상지질혈증 효능이 있음을 확인하였으며, 향후 in vivo 실험을 통해 생체 내 효능을 확인하는 실험이 뒷받침되어야 할 것으로 사료된다.

References

1. Committee for Guidelines for Management of Dyslipidemia (2015). Korean Guidelines for Management of Dyslipidemia. 2015, p. 61-86.
2. The Korean academy of family medicine. Family medicine <Clinical trial>. Seoul: Gyechuk Munwhasa: 2003, p. 303-9.
3. Korean Academy of Medical Sciences · Korea Centers for Disease Control and Prevention. Dyslipidemia prevention and management information for me and my family. 2017:5.
4. The Korean Society of Cardiology. Cardiovascular update dyslipidemia. 6(3). Seoul: Medimediakorea co: 2004, p. 6.
5. Bocan TM, Krause BR, Rosebury WS, Lu X, Dagle C, Bak Mueller S, et al. The combined effect of inhibiting both ACAT and HMG-CoA reductase may directly induce atherosclerotic lesion regression. *Atherosclerosis* 2001;157(1):97-105.
6. Kim BB, Hyun CK. Suppression of Fat Accumulation and Improvement of Glucose Tolerance in High-fat Diet-induced Obese Mice Treated with an *Acanthopanaxsenticosus* Extract. *Korean Journal of Pharmacognosy* 2015;9:65-71.
7. Sim BY, Kim DH. Effects of *Gamioknyeo-jeon* on Lipid Metabolism and Blood Glucose Level in db/db Mice. *The Korea Journal of Herbology* 2016;10:39-45.
8. Hur SH. Recent Guidelines on the Management of Blood Cholesterol: 2013 ACC/AHA Guidelines and 2014 NICE Draft Guidelines. *The Korean Journal of Medicine* 2014;87(2):142-50.
9. Wu Qian, etc, The Golden Mirror of Medicine, Seoul: Daesung Publishing Company. 1994, p. 367-8.
10. Cho KI, Kim HY, Ko SJ, Lee SG, Shin SH, Moon BS. Effects of Dohongsamul-Tang on the Gene Expression of Photothrombotic Ischemia Mouse Model. *Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology* 2009;23(3):645-61.
11. Sin DC, Kim YG. The Study on the Effect of Dohongsamultang and Dansameum on Restrain of Thorombus Formation. *The Journal of Internal Korean Medicine* 1995;16(2):136-45.
12. Lim EM, Lee E, Chang SH. Effects of Dohongsamul-tang on Surgically Induced Endometriosis in Rats. *The Journal of Korean Obstetrics & Gynecology* 2006;19(1):125-38.
13. Shin HS, Lee SG, Moon BS. The protective effects of Dohongsamul-tang on 2-deoxy-D-glucose induced Autophagic cell death in C6 glial cells. *Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology* 2009;23(3):581-9.
14. The Korean Society of Lipid and Atherosclerosis. Evidence in statin clinical trials. Seoul: Medical review co.: 2010, p. 182-93.
15. Christy AL, Brown MA. The Multitasking Mast Cell: Positive and Negative Roles in the Progression of Autoimmunity. *The Journal of Immunology* 2007;179(5):2673-9.
16. Oh HL, Kim CR, Kim NY, Jeon HL, Doh ES, Kim MR. Characteristics and Antioxidant Activities of *Rehmanniae radix* Powder. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition* 2013;42(1):62-7.
17. Gustavsson C, Agardh CD, Zetterqvist AV, Nilsson J, Agardh E, Gomez MF. Vascular Cellular Adhesion Molecule-1(VCAM-1) Expression in Mice Retinal Vessels Is Affected by Both Hyperglycemia and Hyperlipidemia. *PLoS ONE* 2010;5(9):1-12.