

Original Article

## 상황청혈플러스(PLCP)가 HUVEC에서 이상지질혈증 관련 항산화 작용 및 염증인자 발현 억제에 미치는 영향

원서영, 유호룡, 설인찬, 김윤식\*  
대전대학교 한의과대학 심계내과학교실

### The Effect of Phellinus Linteus Cheonghyeol Plus(PLCP) on Antioxidant Activity and Inhibition of Inflammatory Factor Expression Associated with Dyslipidemia in HUVEC

Seo-young Won, Ho-ryong Yoo, In-chan Seol, Yoon-sik Kim\*  
Dept. of Internal Medicine, College of Korean Medicine, Daejeon University

**Objectives:** The purpose of this study was to investigate the effect of Phellinus linteus cheonghyeol plus (PLCP) on antioxidant and inhibition of inflammatory factor expression associated with dyslipidemia in HUVEC.

**Methods:** The scavenging activity of DPPH and ABTS radical of PLCP was measured in HUVEC. The expression levels of NF- $\kappa$ B, p-I $\kappa$ B $\alpha$ , ERK, JNK, and p38 proteins were measured after treating with TNF- $\alpha$  in HUVEC. The expression levels of MCP-1, ICAM-1, and VCAM-1 mRNA and biomarkers were measured after treatment with TNF- $\alpha$  in HUVEC.

**Results:**

1. PLCP increases DPPH and ABTS radical scavenging activity in a concentration dependent manner.
2. PLCP significantly decreased the concentration of NF- $\kappa$ B, p-I $\kappa$ B $\alpha$ , ERK, JNK protein compared to the control at concentrations of 100  $\mu$ g/ml or more, and significantly decreased concentration of p38 protein at all concentrations.
3. PLCP significantly decreased MCP-1 mRNA expression levels at 100 $\mu$ g/ml or more compared to the control. ICAM-1 and VCAM-1 mRNA expression levels were significantly reduced at all concentrations compared to the control. MCP-1, ICAM-1 protein expression levels were significantly reduced compared to the control at concentrations of 100  $\mu$ g/ml or more, and VCAM-1 protein expression levels were reduced at all concentrations.

**Conclusions:** These results suggest that PLCP has an antioxidant effect, and it has been experimentally confirmed that it can prevent or inhibit inflammatory diseases caused by dyslipidemia due to its inhibitory effect on inflammation-related factors in HUVEC.

**Key Words** : *Phellinus linteus, Cheonghyeol plus, Dyslipidemia, Antioxidant activity, Anti-inflammatory effect, Atherosclerosis.*

### 서론

심뇌혈관계질환으로 인한 사망원인 중 동맥경화가

가장 많은 부분을 차지하고 있으며, 이상지질혈증은 임상적으로 중요한 원인질환이 된다. 이상지질혈증은 혈관내막에 cholesterol을 침착시키고 세포증식을 일

• Received : 24 April 2020      • Revised : 22 May 2020      • Accepted : 25 May 2020

• Correspondence to : 김윤식

충남 천안시 서북구 노태산로 4길 대전대학교 대전대부속천안한방병원 한방내과

Tel : +82-41-521-7536, Fax : +82-41-521-7007, E-mail : yoonsik@dju.kr

으며 혈관 내경을 좁아지게 한다. 이는 말초 혈액순환을 방해하여 허혈성 심질환, 뇌경색을 유발할 수 있으며, 특히 동맥경화의 위험을 증가시킨다.<sup>1)</sup>

이상지질혈증은 혈청 cholesterol, low density lipoprotein (LDL)-cholesterol, triglyceride이 높거나 high density lipoprotein (HDL)-cholesterol이 낮은 상태로 정의된다. 최근 뇌혈관질환으로 인한 사망률은 감소하는 추세이나, 심혈관질환으로 인한 사망률은 증가하고 있다.<sup>2)</sup> 심뇌혈관계질환 유발의 위험요인으로는 고혈압, 흡연, 이상지질혈증, 당뇨병 등이 있다. 고혈압 유병률 및 흡연율은 과거와 비교하여 큰 차이가 없으나 이상지질혈증과 당뇨병은 증가하는 추세에 있어 심혈관질환과의 연관성이 주목받고 있다.<sup>3)</sup>

이상지질혈증이 죽상동맥경화증을 유발하는 과정에는 산화적 스트레스와 염증반응이 동반된다. 이상지질혈증에서 축적된 cholesterol은 조직 내 산화물질에 의해 산화되고 산화된 LDL-cholesterol은 단핵구를 부착시키는데 필요한 intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1, endothelial-selectin (E-selectin) 등 혈관 부착인자의 발현을 증가시켜 단핵구를 유입하며 cytokine을 분비시킨다. 단핵구는 대식세포로 분화되어 monocyte chemoattractment protein (MCP)-1을 분비하여 단핵구의 유입을 촉진하고 interleukin (IL)-6, IL-1 $\beta$ , tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ 의 cytokine을 분비하며, 산화물질을 내보내 cholesterol을 더욱 산화시킨다. 대식세포는 산화 LDL을 비롯한 지질을 흡수하여 포말세포가 되며, 포말세포는 혈관벽에 침착되고, 여러 종류의 cytokine 및 chemokine을 분비하여 plaque형성에 관여한다.<sup>4)</sup>

이상지질혈증과 관련된 한의학적 연구는 다양하다. 그 중 대전대학교 심계내과과 교실에서 처방하는 청혈플러스는 茵陳蒿, 山楂, 鬱金, 丹蔘으로 구성되어 있으며 기존연구에서 항산화 및 항고지혈 효능<sup>5)</sup>과 임상적으로 이상지질혈증의 개선<sup>6)</sup>이 확인되었다. 상

황버섯 추출물은 항염증 작용<sup>7)</sup>, interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )분비를 통한 항종양 효과<sup>8)</sup>, 항산화 효능<sup>9)</sup>이 발표된 바 있다. 앞선 연구에서 유의미한 효과가 밝혀진 청혈플러스에 항산화, 항염증 효능을 가진 桑黃을 가미하여 이상지질혈증 개선 효과를 확인하고자 본 연구를 진행하였다.

땃줄 내피세포의 혈관 유래 세포인 Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC)에 상황청혈플러스 (Phellinus linteus Cheonghyeol plus, PLCP)를 처리하고 DPPH radical 소거능과 ABTS radical 소거능을 측정하여 항산화 효능을 평가하였다. 또한 TNF- $\alpha$ 를 처리한 후 NF- $\kappa$ B, extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38, ICAM-1, VCAM-1 등을 측정하여 염증 관련 인자의 발현을 억제하는데 미치는 영향을 조사하였으며, 이와 관련하여 유의미한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

상황청혈플러스 (Phellinus linteus Cheonghyeol plus, PLCP) 한 침의 구성 약재들은 桑黃(*Phellinus linteus*), 茵陳蒿(*Artemisia capillaris*), 山楂(*Crataegus pinnatifida*), 鬱金(*Curcuma longa*), 丹蔘(*Salvia miltiorrhiza*)으로 각 10 g씩 구성되며 대전한약국을 통해 구입하였다.

#### 2) 시료 추출

PLCP 한 침에 증류수 500 ml를 넣고 100 °C에서 3시간 동안 추출한 후 여과지를 통해 여과시켰다. 이후 여과된 것을 rotary vacuum evaporator로 감압농축하고 농축된 용액은 freeze dryer로 동결건조시켰다. 이 과정을 통해 얻은 분말 5.65 g(수득률 : 11.30 %)은 -20 °C에 보관하였고 희석시켜 사용하였다.

### 3) 세포 배양

Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC)은 0.2 % gelatin solution으로 코팅된 plate에 EGM<sup>TM</sup>-2 medium과 EGM<sup>TM</sup>-2 singlequots<sup>TM</sup> kit로 혼합된 배지를 사용하여 세포배양기에서 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 조건을 유지시켰고, 2-3일 주기로 계대 배양하였다.

## 2. 세포 생존율 측정

HUVEC을 48 well plate에 1×10<sup>5</sup> cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였고 이후 24시간 동안 PLCP를 50, 100, 200, 400 µg/ml의 농도로 처리하여 배양하였다. EZ-Cytox를 배양액 100 µl당 10 µl씩 첨가하였고, 30분 동안 세포배양기에 넣은 후, 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 세포생존율을 표시하였다.

## 3. DPPH radical 소거능 측정

PLCP를 희석시켜 1, 10, 100, 1000 µg/ml의 농도로 만들었고, 에탄올에 용해시킨 0.2 mM의 DPPH 용액 150 µl와 시료를 100 µl씩 혼합하였다. 혼합한 용액은 37 °C에서 30분간 반응시킨 후 517 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. DPPH radical 소거능은 다음과 같은 식에 대입하여 계산하였고 대조군으로는 증류수를 사용하였다.

$$\text{소거능 (\%)} = \left( \frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

## 4. ABTS radical 소거능 측정

PLCP를 희석시켜 1, 10, 100, 1000 µg/ml의 농도로 만들었고, 7.4 mM ABTS (2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))와 2.6 mM potassium persulphate를 제조한 후, 24시간 동안 암소에 보관하여 양이온(ABTS+)을 형성시켰다. 흡광도는 732 nm에서 측정하였고 그 값이 1.5이하가 나

오도록 희석시켰으며, 희석된 ABTS+ 용액 95 µl와 시료를 5 µl씩 혼합하였다. 혼합된 용액은 10분 동안 실온에서 반응시킨 후 732 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. ABTS radical 소거능은 다음과 같은 식에 대입하여 계산하였고 대조군으로는 증류수를 사용하였다.

$$\text{소거능 (\%)} = \left( \frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

## 5. 단백질 발현량 측정

HUVEC을 6 well plate에 1×10<sup>6</sup> cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하고 1시간 동안 PLCP를 50, 100, 200 µg/ml의 농도로 처리한 후, 10 ng/ml의 TNF-α를 추가하여 12시간 동안 배양하였다. 배양한 세포는 5분간 1200 rpm에서 원심분리 시키고 이 후 얻은 세포를 D-PBS로 2회 세척하였다. Pellet에 protease inhibitor cocktail I, phosphatase inhibitor II,III가 포함된 RIPA buffer를 넣어 단백질을 추출하였으며, 정량은 BCA protein assay kit를 이용하였다. Sample loading buffer와 섞어 95 °C에서 5분간 반응시켰고 반응시킨 단백질은 10 % acrylamide gel을 통해 SDS-PAGE하여 크기별로 분리하였다. 분리시킨 단백질은 PVDF membrane로 이동시켜 3 % BSA에 담가 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. TBS-T buffer를 이용하여 세척하고 primary antibody를 넣어 4 °C에서 16시간 동안 반응시켰으며, 다시 3회 세척하고 secondary antibody를 넣어 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 다시 세척하고 ECL solution을 통해 단백질을 발색시켰으며 chemidoc fusion FX를 통해 NF-κB, IκBα, ERK, JNK, p38의 단백질 발현량을 분석하였다.

## 6. 유전자 발현량 측정

### 1) RNA 추출

HUVEC을 6 well plate에 1×10<sup>6</sup> cells/well로 분

주하여 24시간 동안 배양하고 1시간 동안 PLCP를 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 후, 10  $\text{ng}/\text{ml}$ 의 TNF- $\alpha$ 를 추가하여 12시간 동안 배양하였다. 배양한 세포는 5분간 1200 rpm에서 원심분리 시키고 이 후 얻은 세포에 easy blue 1 ml와 chloroform 200  $\mu\text{l}$ 를 넣고 vortexing 해준 후, 13000 rpm, 4  $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분 동안 원심분리 하였다. 상층액 400  $\mu\text{l}$ 와 binding buffer 400  $\mu\text{l}$ 를 실온에서 1분간 반응시킨 후, 반응액 중 700  $\mu\text{l}$ 를 column에 주입하여 30초간 13000 rpm에서 원심분리 하였다. Washing buffer A 700  $\mu\text{l}$ 를 Column에 넣고 30초간 13000 rpm에서 원심분리 후, washing buffer B 700  $\mu\text{l}$ 를 넣고 30초간 13000 rpm에서 원심분리 하였다. Column 하단을 1.5 ml tube로 교체한 후, elution buffer 30  $\mu\text{l}$ 를 넣고 실온에서 1분간 반응시킨 후 13000 rpm에서 1분간 원심분리시켜 total RNA를 추출하였다.

2) cDNA 합성

역전사 반응은 RT premix kit의 mixture (reaction buffer, dNTPs mixture, RNase inhibitor, stabilizer, oligo dT15 primer) total RNA를 1  $\mu\text{g}$  넣고 DEPC-DW을 최종 부피가 20  $\mu\text{l}$ 가 되도록 첨가하였다. first-strand cDNA를 합성하기 위해 혼합액을 잘 섞은 후 45  $^{\circ}\text{C}$ 에서 60분 반응시키고 95  $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시켰다. 합성된 cDNA는 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다.

3) 유전자 증폭

Real-time PCR을 통해 유전자를 증폭시켰으며, 전용 tube에 cDNA 1  $\mu\text{l}$ , 각 primer 2  $\mu\text{l}$ , SYBR Green 10  $\mu\text{l}$ , DEPC-DW 5  $\mu\text{l}$ 씩 넣어 처음에는 95  $^{\circ}\text{C}$ 에서 2분 동안 다음에는 95  $^{\circ}\text{C}$ 에서 5초 동안, 이후에는 62.5  $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초 동안을 40회 반복하여 유전자를 증폭시켰다. 대조군과 비교하여 유전자 발현량을 계산하였으며, primer의 sequence는 다음 표와 같다

Table 1. The Sequences of Primers

Primer	F/R*	Sequences
MCP-1	F	GCTCAGCCAGATGCAATCAA
	R	CTTGCCACAATGGTCTTGA
ICAM-1	F	TCTTCCTCGGCCTTCCCATATA
	R	AGGTACCATGGCCCCAAATG
VCAM-1	F	CCCTACCATTGAAGATACTGG
	R	ATCTCTGGGGGCAACATTGAC
$\beta$ -actin	F	ATCGTGGGGCGCCCCAGGCACCA
	R	GGGGTACTTCAGGGTGAGGA

\* F : forward, R : reverse

(Table 1).

7. 바이오마커 생성량 측정

HUVEC을 6 well plate에  $1 \times 10^6$  cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하고 1시간 동안 PLCP를 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리한 후, 10  $\text{ng}/\text{ml}$ 의 TNF- $\alpha$ 를 추가하여 12시간 동안 배양하였다. 1200 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 얻은 상등액과 standard를 96 well plate에 100  $\mu\text{l}$ 씩 넣고 2시간 동안 37  $^{\circ}\text{C}$ 에서 반응시킨 후, washing buffer를 이용하여 4회 세척하였다. 100  $\mu\text{l}$ 의 detection antibody를 넣고 37  $^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 반응시키고 세척하였고 HRP conjugate를 100  $\mu\text{l}$ 씩 넣어 37  $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 반응시키고 세척하였다. 이후, substrate reagent를 100  $\mu\text{l}$ 씩 넣어 37  $^{\circ}\text{C}$ 에서 15분간 반응시키고 100  $\mu\text{l}$ 의 stop solution을 추가하여 micro reader를 통해 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, standard curve를 기준으로 절댓값으로 표시하였다.

8. 통계처리

실험을 통해 얻은 결과는 SPSS 21.0를 이용하여 mean $\pm$ standard error of mean으로 나타내었고 ANOVA를 사용하여 다중 비교하였다. 유의성은 Tukey's HSD test를 통해  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  및  $p < 0.001$  수준에서 검정하였다.

## 실험 결과

### 1. 세포생존율

세포생존율을 측정한 결과, 대조군에서 100.00±2.61 %일 때, 50, 100, 200, 400  $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 100.32±3.29 %, 100.70±1.27 %, 99.05±1.28 %, 88.80±2.55 %로 PLCP는 400  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서 90 % 이하의 세포생존율이 나타났다 (Fig. 1).

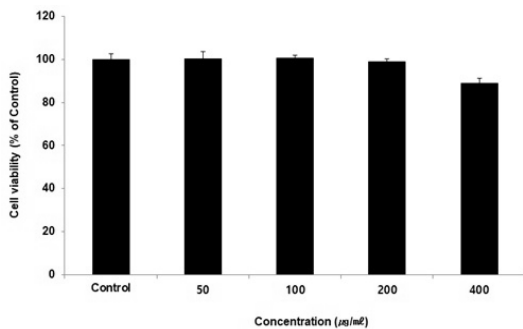
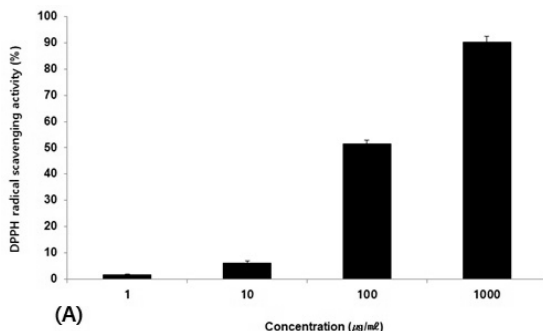


Fig. 1. Cell viability of PLCP in HUVEC. Cell viability was calculated as percentage relative to the control. The results were presented by the mean  $\pm$  S.D from four independent experiments.

### 2. DPPH와 ABTS radical 소거능

DPPH radical 소거능을 측정한 결과 1, 10, 100,



1000  $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 1.55±0.46 %, 6.18±0.69 %, 51.38±1.52 %, 90.35±2.21 %로 PLCP 농도 의존적 증가가 나타났다 (Fig. 2A). ABTS radical 소거능을 측정한 결과 1, 10, 100, 1000  $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 0.69±0.80 %, 2.46±1.06 %, 19.61±0.76 %, 86.46±2.20 %로 PLCP 농도 의존적 증가가 나타났다 (Fig. 2B).

### 3. 단백질 발현량

#### 1) NF- $\kappa$ B

NF- $\kappa$ B 단백질 발현량을 측정한 결과, 정상군에서 0.44±0.10, 대조군에서 1.00±0.05일 때, 50, 100, 200  $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 0.99±0.03, 0.79±0.08, 0.40±0.11로 PLCP는 100  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있는(\*\* ;  $p < 0.01$ , \*\*\* ;  $p < 0.001$ ) 감소가 나타났다 (Fig. 3A).

#### 2) I $\kappa$ B $\alpha$

I $\kappa$ B $\alpha$  단백질 발현량을 측정한 결과, 정상군에서 0.28±0.06, 대조군에서 1.00±0.08일 때, 50, 100, 200  $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 0.91±0.02, 0.69±0.04, 0.61±0.02로 PLCP는 100  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있는(\*\* ;  $p < 0.01$ ) 감소가 나타났다 (Fig. 3B).

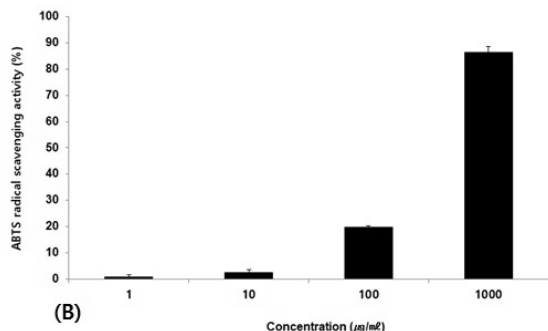


Fig. 2. DPPH(A) and ABTS(B) radical scavenging activity of PLCP. PLCP was incubated at 1, 10, 100, and 1000  $\mu\text{g/ml}$  with DPPH solution for 30 mins and ABTS solution for 10 mins. DPPH radical scavenging activities were determined by measurement of absorbance at 517 nm and ABTS radical scavenging activities were determined by measurement of absorbance at 732 nm. The results were expressed as mean  $\pm$  S.D from three independent experiments.

### 3) ERK

ERK 단백질 발현량을 측정한 결과, 정상군에서  $0.09 \pm 0.02$ , 대조군에서  $1.00 \pm 0.01$ 일 때, 50, 100, 200  $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각  $0.99 \pm 0.01$ ,  $0.65 \pm 0.04$ ,  $0.38 \pm 0.04$ 로 PLCP는 100  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있는(\*\*\*) ;  $p < 0.001$ ) 감소가 나타났다 (Fig. 3C).

### 4) JNK

JNK 단백질 발현량을 측정한 결과, 정상군에서  $0.34 \pm 0.02$ , 대조군에서  $1.00 \pm 0.03$ 일 때, 50, 100, 200  $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각  $1.01 \pm 0.06$ ,  $0.85 \pm 0.02$ ,  $0.62 \pm 0.02$ 로 PLCP는 100  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서 대조군에 하여 유의성 있는(\*\* ;  $p < 0.01$ , \*\*\*) ;  $p < 0.001$ ) 감소가 나타났다 (Fig. 3D).

### 5) p38

p38 단백질 발현량을 측정한 결과, 정상군에서  $0.25 \pm 0.02$ , 대조군에서  $1.00 \pm 0.06$ 일 때, 50, 100, 200  $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각  $0.85 \pm 0.05$ ,  $0.68 \pm 0.03$ ,  $0.64 \pm 0.02$ 로 PLCP는 모든 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있는(\* ;  $p < 0.05$ , \*\*\*) ;  $p < 0.001$ ) 감소가 나타났다 (Fig. 3E).

## 4. 유전자 발현량

### 1) MCP-1

MCP-1 유전자 발현량을 측정한 결과, 정상군에서  $0.12 \pm 0.05$ , 대조군에서  $1.00 \pm 0.05$ 일 때, 50, 100, 200  $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각  $0.90 \pm 0.06$ ,  $0.71 \pm 0.03$ ,  $0.43 \pm 0.02$ 로 PLCP는 100  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있는(\*\*\*) ;  $p < 0.001$ ) 감소가 나타났다 (Fig. 4A).

### 2) ICAM-1

ICAM-1 유전자 발현량을 측정한 결과, 정상군에서  $0.11 \pm 0.03$ , 대조군에서  $1.00 \pm 0.05$ 일 때, 50, 100,

200  $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각  $0.90 \pm 0.02$ ,  $0.52 \pm 0.04$ ,  $0.27 \pm 0.04$ 로 PLCP는 모든 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있는(\* ;  $p < 0.05$ , \*\*\*) ;  $p < 0.001$ ) 감소가 나타났다 (Fig. 4B).

### 3) VCAM-1

VCAM-1 유전자 발현량을 측정한 결과, 정상군에서  $0.07 \pm 0.08$ , 대조군에서  $1.00 \pm 0.04$ 일 때, 50, 100, 200  $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각  $0.76 \pm 0.02$ ,  $0.24 \pm 0.06$ ,  $0.21 \pm 0.05$ 로 PLCP는 모든 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있는(\*\*\*) ;  $p < 0.001$ ) 감소가 나타났다 (Fig. 4C).

## 5. 바이오마커 생성량

### 1) MCP-1

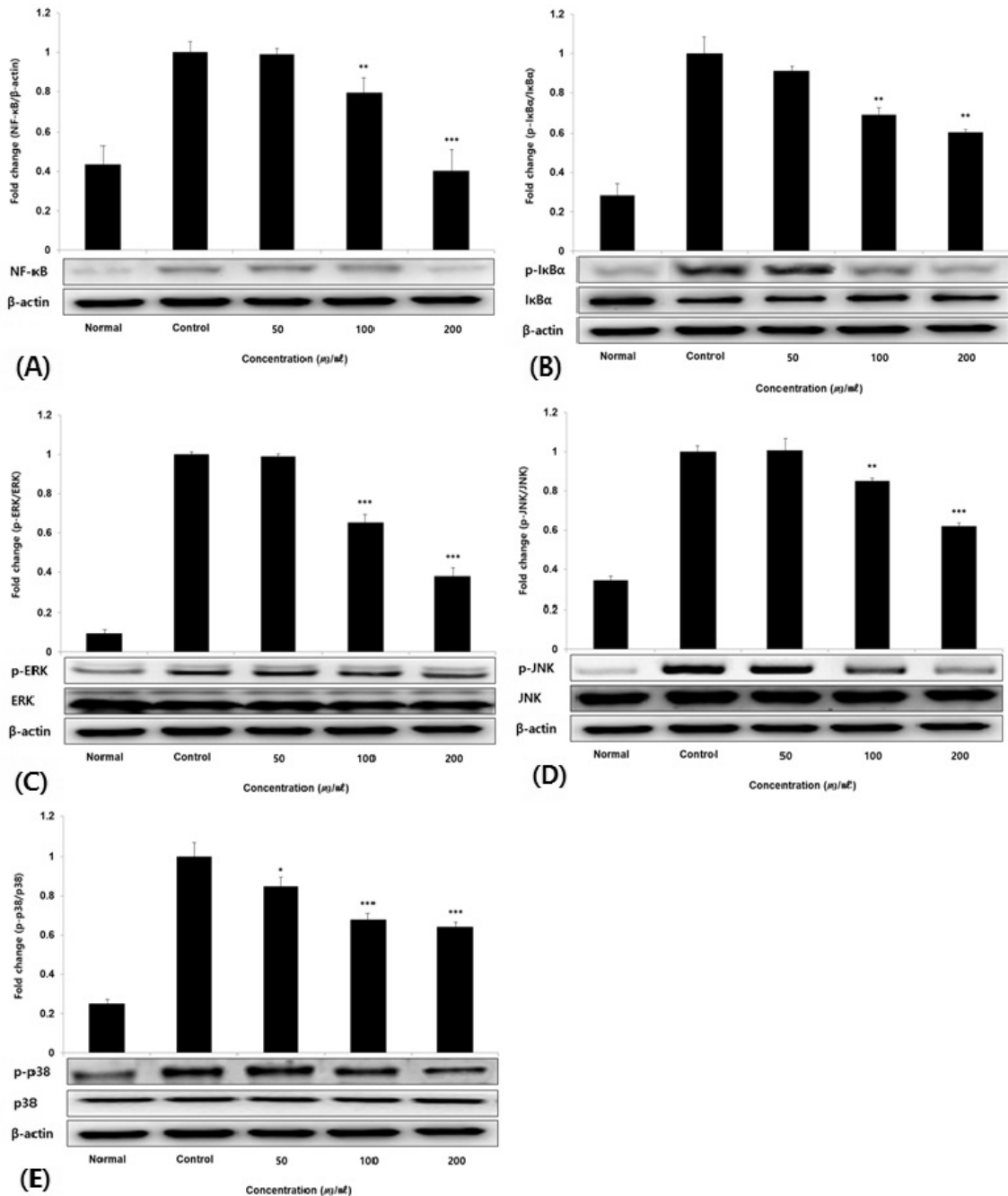
MCP-1 생성량을 측정한 결과, 정상군에서  $46.17 \pm 19.95$  pg/ml, 대조군에서  $376.20 \pm 19.26$  pg/ml일 때, 50, 100, 200  $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각  $376.56 \pm 23.80$  pg/ml,  $340.72 \pm 12.87$  pg/ml,  $310.97 \pm 6.89$  pg/ml로 PLCP는 100  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있는(\* ;  $p < 0.05$ , \*\* ;  $p < 0.01$ ) 감소가 나타났다 (Fig. 5A).

### 2) ICAM-1

ICAM-1 생성량을 측정한 결과, 정상군에서  $71.95 \pm 2.45$  pg/ml, 대조군에서  $553.19 \pm 28.04$  pg/ml일 때, 50, 100, 200  $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각  $550.12 \pm 10.72$  pg/ml,  $510.62 \pm 12.24$  pg/ml,  $448.12 \pm 36.76$  pg/ml로 PLCP는 100  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있는(\* ;  $p < 0.05$ , \*\* ;  $p < 0.01$ ) 감소가 나타났다 (Fig. 5B).

### 3) VCAM-1

VCAM-1 생성량을 측정한 결과, 정상군에서  $28.04 \pm 4.29$  pg/ml, 대조군에서  $259.22 \pm 13.57$  pg/ml일 때, 50, 100, 200  $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각  $225.69 \pm 9.64$  pg/ml,  $180.69 \pm 15.61$  pg/ml,  $120.69 \pm 13.12$  pg/ml로 PLCP는



**Fig. 3.** Effect of PLCP on NF-κB(A), IκBα(B), ERK(C), JNK(D) and p38(E) protein expression level in HUVEC. HUVECs were treated 50, 100, and 200 μg/ml of PLCP with 10 ng/ml TNF-α for 12 h. The total cell extracts were subjected to 10% SDS-PAGE and western blot analysis with the respective primary and secondary antibodies. The results were presented by the mean ± S.D from three independent experiments (Significance of results, \* ; p<0.05, \*\* ; p<0.01, \*\*\* ; p<0.001 compared to control).

모든 농도에서 대조군에 비하여 유의성 있는(\*\* ;  $p < 0.01$ , \*\*\* ;  $p < 0.001$ ) 감소가 나타났다 (Fig. 5C).

## 고찰

국내 뇌혈관 질환으로 인한 사망률은 2008년 10만 명당 56.5명에서 2018년 44.7명으로 감소했다. 그러나 심장질환으로 인한 사망률은 2008년 10만 명당 43.4명에서 2018년 10만 명당 62.4명으로 증가했다. 2018년의 사망원인통계에서는 심장질환과 뇌혈관질환이 사망률 2, 4위로 조사되었다.<sup>2)</sup> 심혈관질환 사망률이 높아지며 심혈관질환의 원인질환 치료법에 대해 관심이 증가하고 있다.

이상지질혈증은 혈청 cholesterol, triglyceride, LDL-cholesterol이 증가하거나 HDL-cholesterol이 감소하는 질환이다. 이상지질혈증은 자각증상이 없으며 방치할 경우 관상동맥질환의 중요한 독립 위험인자가 되므로 조기 발견 및 치료가 중요하다.<sup>10)</sup> 원인에 따라 치료방법이 나뉘는데 LDL-cholesterol이 상승한 경우에는 이차적 원인을 찾아 제거하고, statin, bile acid sequestrants, nicotinic acid, ezetimibe 등을 치료 약제로 사용한다. Triglyceride가 높으며, HDL-cholesterol이 낮은 경우 체중조절, 운동을 우선한다. 만약 LDL-cholesterol이 정상범위인데도 triglyceride가 높은 경우 pyruvic acid derivatives, omega-3 fatty acid, nicotinic acid 등을 치료 약제로 선택한

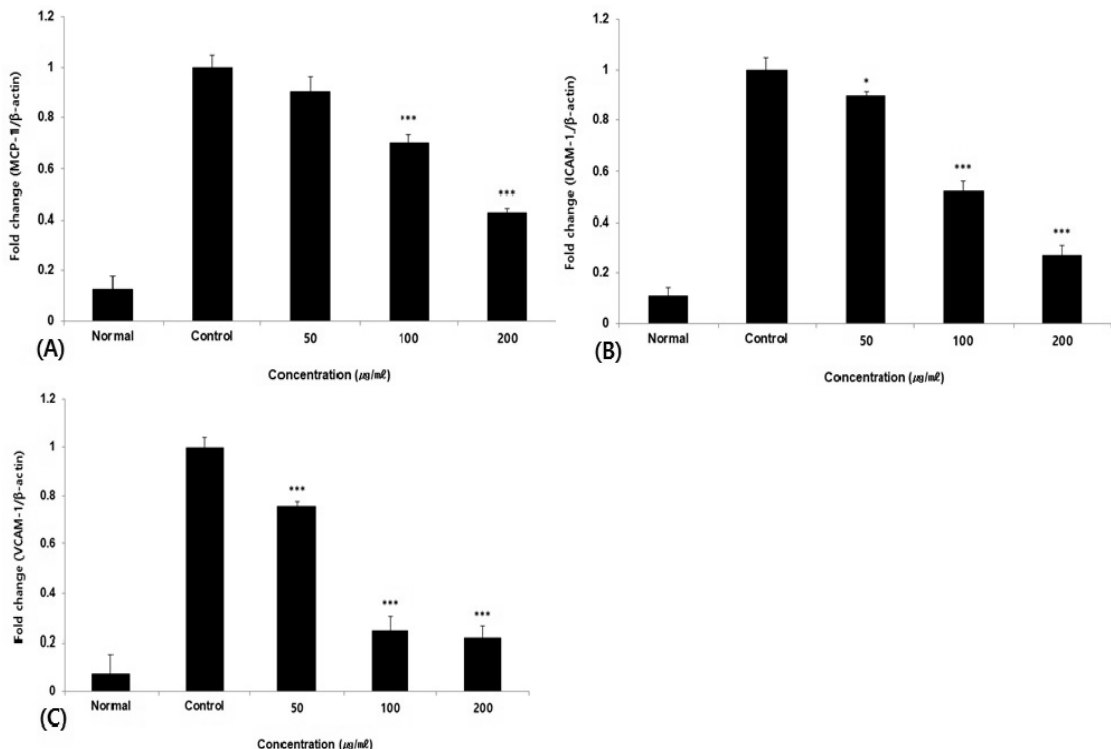


Fig. 4. Effect of PLCP on MCP-1(A), ICAM-1(B) and VCAM-1(C) mRNA expression level in HUVEC. HUVECs were treated 50, 100, and 200 µg/ml of PLCP with 10 ng/ml TNF-α for 12 h. The mRNA expression levels were measured using a quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The results were presented by the mean ± S.D from three independent experiments (Significance of results, \* ;  $p < 0.05$ , \*\* ;  $p < 0.01$ , \*\*\* ;  $p < 0.001$  compared to control).



다.<sup>11)</sup> Statin 계열의 치료제를 가장 많이 사용하는데, 간독성, 근육독성, 약물 상호작용 등의 문제를 동반할 수 있어<sup>12)</sup>, 천연물에 대한 연구도 다양하게 이루어지고 있다.<sup>13)</sup>

동맥경화는 여러 요인으로 인해 혈관벽 안에 지질이나 세포외 기질의 이상 축적이 나타나 혈관의 경화성 변화를 유발한다. 혈관 내부에 plaque가 형성되어 혈관이 좁아지게 되고 혈관 손상으로 박리된 물질이 혈전을 발생시킨다. 이상지질혈증은 죽상동맥경화증의 주요 원인으로 혈중 LDL-cholesterol의 상승은 혈관내피로의 침입을 용이하게 한다.<sup>14)</sup> 죽상경화증은 혈관 내막의 손상에 의한 cytokine 분비의 염증 반응으로 시작되며 VCAM-1, ICAM-1, MCP-1 등

의 혈관부착인자의 발현을 유도하여 죽상동맥경화증의 병변 부위의 대식세포 활성을 자극한다.<sup>15)</sup> 더 나아가 혈관내벽의 염증은 협심증, 심근경색, 심내막염, 부정맥 등의 심혈관질환과 뇌경색, 뇌출혈 등의 뇌혈관질환, 신부전, 기타 허혈성 질환 등의 혈관 합병증을 유발한다.<sup>16)</sup>

한의학의 이상지질혈증은 《靈樞衛氣失常論》에서 “肥人多, 有膏, 有肉”이라고 언급하였다.<sup>17)</sup> 이상지질혈증의 증상인 胸悶, 胸痛, 心悸, 頭暈, 麻木을 心痛, 胸痞, 怔忡, 水腫, 中風으로 판단하여 化痰去瘀하여 痰飲과 瘀血을 치료한다.<sup>18)</sup> 다른 연구에서는 이상지질혈증의 원인으로 內因은 痰濁, 瘀血, 濕熱로 인한 肝脾腎機能失調, 外因은 嗜食肥甘厚味로 보았다. 本虛

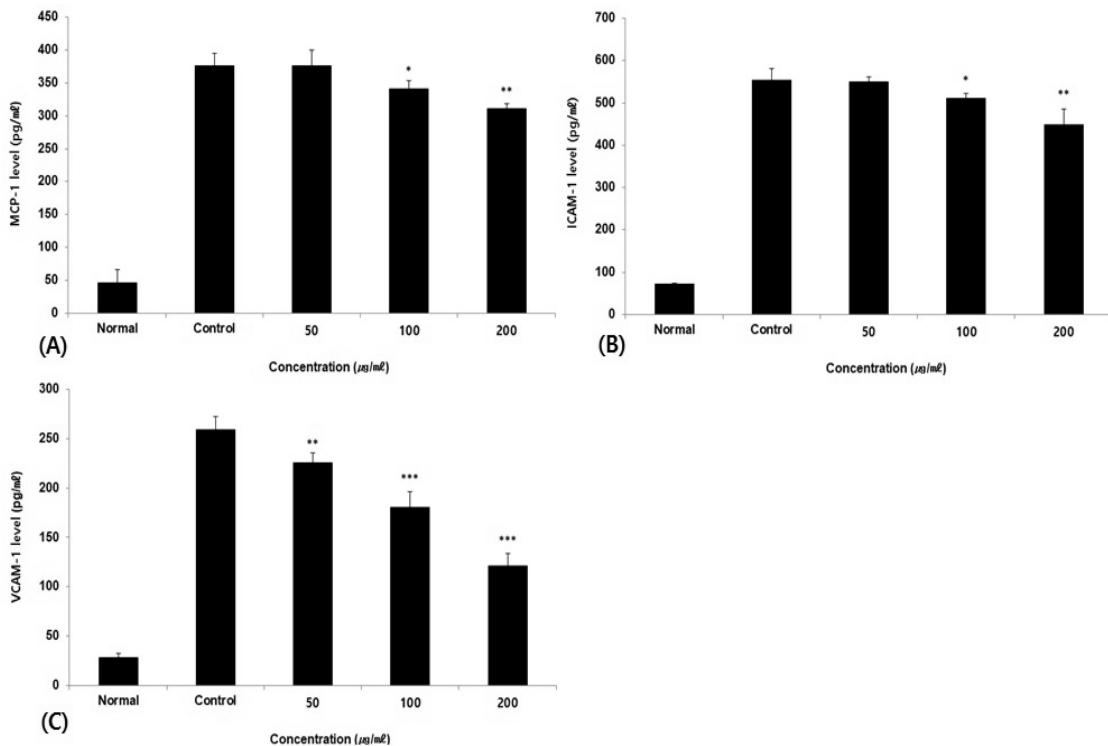


Fig. 5. Effect of PLCP on MCP-1(A), ICAM-1(B) and VCAM-1(C) level in HUVEC. HUVECs were treated 50, 100, and 200 µg/ml of PLCP with 10 ng/ml TNF-α for 12 h. MCP-1(A), ICAM-1(B) and VCAM-1(C) levels were measured using a ELISA kit. The results were presented by the mean ± S.D from three independent experiments (Significance of results, \* ; p<0.05, \*\* ; p<0.01, \*\*\* ; p<0.001 compared to control).

인 肝脾腎虛와 標實인 痰濕, 瘀血이 겸한 本虛標實證으로 滋補肝腎, 調理脾胃와 利濕化痰, 活血化瘀의 치료 방법으로 補瀉兼施하여 치료한다고 언급하였다. 치료약으로는 補益藥과 活血化瘀藥, 利濕化痰藥 등이 주로 사용된다.<sup>19)</sup>

PLCP는 茵陳蒿, 山楂, 鬱金, 丹蔘으로 이루어진 청혈플러스에 桑黃을 가미하여 구성된 약물이다. 청혈플러스는 대전대학교 한방병원에서 이상지질혈증 개선을 위해 주로 처방되며 임상적 개선 효과<sup>6)</sup>가 밝혀져 있다. 桑黃은 lipopolysaccharide(LPS)에 의해 유발된 염증 반응을 감소시키는 항염증 효과에 대한 연구<sup>7)</sup>, 면역활성을 통한 항종양 작용에 대한 연구<sup>8)</sup>, 항산화 효과<sup>9)</sup>에 대한 연구가 이루어져 있다. 본 연구에서는 이상지질혈증의 산화적 손상을 예방하고 염증반응을 억제하기 위해 청혈플러스에 항산화효과 및 항염증 효과가 있는 桑黃을 가감하여 진행하였다.

利水滲濕藥인 茵陳蒿는 性은 微寒, 味는 苦辛하며 清濕熱한다. 消食藥인 山楂는 性은 微溫, 味는 酸甘하며 行氣消食散瘀한다. 活血祛瘀藥인 鬱金은 性은 寒, 味는 辛苦하며 活血消瘀, 解鬱祛痰한다. 活血祛瘀藥인 丹蔘은 性은 微寒, 味는 苦하며 活血祛瘀한다.<sup>20)</sup> 구성 본초에 관한 현대적 연구를 살펴보면 茵陳蒿는 고지혈증의 병태모델에서 항고지혈 및 항산화 효과가 확인되었다.<sup>21)</sup> 鬱金의 Curcumin은 고지혈증 모델에서 담즙분비를 촉진시켜 혈중 cholesterol을 낮추며,<sup>22)</sup> 항고지혈증 및 항산화 효과를 나타냈다.<sup>23)</sup> 山楂는 강심, 혈압강하, 관상동맥 확장작용으로 고지혈증, 죽상동맥경화증에 응용된다.<sup>20)</sup> 또한 triglyceride, glucose의 장내흡수 억제작용이 있으며, 인슐린 저항성을 낮추고, triglyceride의 합성을 감소시켜 고지혈증과 당뇨병에 효과적이다.<sup>24)</sup> 丹蔘은 고혈압 및 혈전폐색성 맥관염, 肝脾腫大와 관상동맥 경화성 심장병의 치료 효과가 보고되었으며,<sup>20)</sup> 항암, 항염증작용과 심혈관계 질환에 관한 동물실험에서 총 cholesterol을 감소시켜 이상지질혈증을 개선하였다.<sup>25)</sup>

본 연구에서는 PLCP를 이용하여 HUVEC에서 항

산화 및 염증인자 발현 억제에 미치는 영향을 조사하였다. 항산화 효과를 확인하기 위해 DPPH radical 소거능, ABTS radical 소거능을 측정하였고 항염증 효과를 확인하기 위해 TNF- $\alpha$ 를 처리한 후 NF- $\kappa$ B, p-I $\kappa$ B $\alpha$ , ERK, JNK, p38의 단백질 발현량과 MCP-1, ICAM-1, VCAM-1의 유전자 발현량 및 바이오마커 생성량을 측정하였다.

HUVEC는 태줄 내피 세포의 혈관에서 유래된 세포로 분자전달, 혈액 응고, 혈관 신생, 섬유소 용해 등의 생리학, 약리학 연구에서 주로 사용되며, 정상 및 병리상태에서의 내피의 상태, 종양관련 혈관의 신생, 산화스트레스, 저산소, 염증 등의 내피기능 및 질병을 연구하는데 고전적 모델 시스템이 된다.<sup>26)</sup>

EZ-Cytox assay를 이용하여 HUVEC에서 PLCP의 세포생존율을 확인하였다. EZ-Cytox assay는 tetrazolium salt가 mitochondria의 호흡사슬에 존재하는 탈수소 효소인 succinate-tetrazolium reductase에 의해 환원되어 발색물질인 formazan을 형성하는 원리로 수행된다. Succinate-tetrazolium reductase는 호흡사슬에 존재하여 살아있는 세포에서만 활성을 갖기 때문에 시료 중 생존세포수가 증가하면 mitochondria의 succinate-tetrazolium reductase 활성도 증가하여 흡광도가 증가한다. 그렇기 때문에 흡광도와 살아있는 세포 수는 직선 상관관계를 갖는다.<sup>27)</sup>

PLCP를 50, 100, 200, 400( $\mu$ g/ml)의 농도로 나누어 EZ-Cytox assay를 수행한 결과 각각 100.32 $\pm$ 3.29 %, 100.70 $\pm$ 1.27 %, 99.05 $\pm$ 1.28 %, 88.80 $\pm$ 2.55 %로 400  $\mu$ g/ml 이상의 농도에서 90 % 이하의 세포 생존율을 나타냈다 (Fig. 1). 실험농도 200  $\mu$ g/ml 이하에서 세포독성이 안전한 것으로 판단되어 200  $\mu$ g/ml 이하의 농도에서 실험을 진행하였다.

죽상동맥경화증은 혈관 내피세포에서 발생하는 대표적인 염증성 질환이다. 혈관염증반응에서 산화적 스트레스는 주요 원인으로, 죽상동맥경화증이 진행하는데 핵심 역할을 한다.<sup>28)</sup> 산화 스트레스는 항상성을 이루고 있는 prooxidant와 antioxidant의 균형에 작용

하여 세포에 손상을 일으킨다. 산화 스트레스는 노화, DNA 손상, 지질의 과산화, 단백질과 지질의 산화로 인한 세포막의 손상 등을 일으키며 동맥경화, 암, 류마티스 관절염, 노인성 치매, 파킨슨병 등의 원인이 된다.<sup>29)</sup>

본 실험에서는 항산화 효능을 확인하기 위해 DPPH radical, ABTS radical의 소거능을 측정하였다. DPPH assay는 빠르고 간단하게 항산화능을 측정하기 위한 방법으로 짙은 보라색을 보이는 활성산소물질인 DPPH에 항산화 활성을 일으키면 hydrogen radical을 만나 환원되어 보라색이 없어진다. 변색의 정도로서 DPPH radical의 소거능을 측정할 수 있다.<sup>30)</sup> ABTS assay는 화학반응을 일으켜 free radical이 유발된 용액에 항산화능을 측정하는 방법으로 DPPH assay와 차이가 있지만 소수성, 친수성 물질 모두에 적용할 수 있다는 특징이 있다<sup>31)</sup>.

PLCP의 농도를 1, 10, 100, 1000( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )으로 희석하여 DPPH assay, ABTS assay를 시행한 결과 PLCP는 농도 의존적인 radical 소거능의 증가를 보였다 (Fig.2A, Fig.2B). 이는 PLCP가 농도 의존적으로 reactive oxygen species (ROS) 등의 산화작용을 억제하는 작용이 있음을 나타낸다.

NF- $\kappa$ B는 유전자 발현을 조절하며 세포 내에서 신호 전달의 중요한 역할을 맡고 있는 단백질 복합체로써, 염증반응, 면역, 세포자멸, 세포증식 및 분화에 관여한다. Inhibitor  $\kappa$ B ( $I\kappa$ B)는 NF- $\kappa$ B의 활성을 억제하며, NF- $\kappa$ B는 세포질 내에서  $I\kappa$ B와 결합하여 비활성 상태로 존재한다. 외부에서 Pathogen, TNF receptor, Toll-like receptor (TLR), IL-1 receptor를 통해 자극이 주어지면 IKK복합체가 NF- $\kappa$ B와  $I\kappa$ B 결합체에 붙어  $I\kappa$ B를 인산화 및 polyubiquitination하여 분해함으로써, NF- $\kappa$ B를 활성화시킨다.<sup>32)</sup> NF- $\kappa$ B가 활성화되면 cytokine, chemokine, adhesion molecules, COX-2, iNOS의 유전자 전사를 조절하므로<sup>33)</sup> 이 과정을 막으면 혈관 염증을 억제할 수 있으며, 염증반응의 일종인 죽상동맥 경화증에서

도 중요한 역할을 담당하게 된다.

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs)는 세포 표면에서 핵의 DNA로 신호를 전달하는 일련의 단백질을 의미한다. LPS는 대식세포에서 TLR4와 결합, 활성화되어 염증반응을 개시한다. 염증반응이 일어나면 MAPKs는 세포핵으로 이동하여 신호전달에 의한 인산화에 관여하며, p38, ERK, JNK 등이 이러한 과정에서 전사인자로 작용한다.<sup>34)</sup> MAPKs는 처음에 ERK로 불렸으며, 근처 GTPase를 사용하는 G-protein 그룹의 Ras, CDC42 등의 단백질의 인산화로 인해 신호를 받아 핵 내의 DNA에서 단백질 합성, 세포분열 등을 유발한다.<sup>35)</sup> JNK 신호경로는 죽음의 신호경로로 세포자멸사, 염증반응, cytokine 생성, 대사과정에서 중요한 역할을 한다. JNK 신호경로는 cytokine을 분비, DNA 손상을 유발하고, DNA가 복구되지 못하면 세포자멸사를 유발하여 조직의 손상을 초래한다.<sup>36)</sup> p38은 MAPKs의 구성 단백질로 cytokine, 자외선, 열, 삼투성 쇼크에 영향을 받아 세포분화와 세포자멸, 자가탐식 등을 일으킨다.<sup>37)</sup>

HUVEC에 TNF- $\alpha$ 를 처리하여 염증반응을 유발한 후 PLCP를 50, 100, 200( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )으로 처리하여 단백질 발현량을 분석하였다. NF- $\kappa$ B (Fig. 3A), p- $I\kappa$ B $\alpha$  (Fig. 3B), ERK (Fig. 3C), JNK (Fig. 3D) 단백질 발현량에서 PLCP는 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상의 농도에서 대조군에 비해 유의한 감소를 보였다. p38 단백질 발현량에서 PLCP는 모든 농도에서 대조군에 대해 유의한 감소를 보였다 (Fig. 3E). 본 연구에서 NF- $\kappa$ B, p- $I\kappa$ B $\alpha$ , ERK, JNK 단백질 발현량의 감소는 PLCP가 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  이상의 농도에서 세포 내 NF- $\kappa$ B 및 MAPKs 신호경로를 억제하여 항염증작용이 있음을 시사한다.

MCP-1은 chemokine의 일종으로 백혈구 유주와 염증반응에서 중요한 역할을 하며 혈관신생을 매개로 종양의 성장, 전이에 관여하는 작은 단백질이다.<sup>38)</sup> 지질에 의해 혈관 내피의 산화적 손상과 염증반응이 일어나면, 지질과 혈장성분의 투과성이 증가

하고, 단핵구가 혈관내피에 부착하게 되어 동맥경화가 시작된다.<sup>39)</sup> 단핵구가 혈관 내피에 부착하는 과정에 세포부착인자인 ICAM-1, VCAM-1 등이 작용한다. 부착된 단핵구는 지질을 탐식하여 포말세포가 되고, 활성화된 혈소판, 단핵구에서 분비된 인자는 평활근 세포를 내막으로 이동, 증식시킨다. 평활근 세포는 세포외 기질을 합성하여 교원질, 탄력섬유, 프로테오글리칸을 축적시킨다. 이러한 손상이 반복되면 혈관 투과성이 증가하고 침윤된 단핵구와 혈소판의 작용으로 죽상판도 성장하게 된다.<sup>40)</sup>

HUVEC에 PLCP를 50, 100, 200( $\mu\text{g/ml}$ )으로 처리하고 TNF- $\alpha$ 를 추가한 후 Quantitative real-time polychain reaction (qRT-PCR)을 이용하여 유전자 발현량을 분석하였다. MCP-1 (Fig. 4A) mRNA 발현량은 PLCP 100  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서 대조군에 비해 유의한 감소를 보였다. ICAM-1 (Fig. 4B), VCAM-1 (Fig. 4C) mRNA 발현량은 모든 PLCP 농도에서 대조군에 비해 유의한 감소를 보였다. 또한 바이오마커 생성량에서는 MCP-1 (Fig. 5A), ICAM-1 (Fig. 5B)은 PLCP 100  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서 대조군에 비해 유의한 감소를 보였고, VCAM-1의 생성량은 PLCP 모든 농도에서 대조군에 비해 유의한 감소를 보였다 (Fig. 5C).

PLCP는 100  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서 MCP-1, ICAM-1, VCAM-1의 mRNA 발현 및 바이오마커 생성을 유의하게 저해하였다. 이는 PLCP가 염증으로 인한 혈관손상과 염증세포의 침착을 억제하는 효과가 있음을 시사한다.

본 실험의 결과로 PLCP의 효과를 3가지로 정리할 수 있다. PLCP는 DPPH radical, ABTS radical의 소거능으로 ROS에 의한 산화를 억제하여 유효한 항산화 활성을 갖는다. NF- $\kappa\text{B}$ , MAPKs 신호경로를 직접 억제하여 혈관 내 염증반응을 억제한다. 혈관부착인자 생성을 저해하여 산화 스트레스로 인한 염증세포의 부착 과정을 막아 침착을 억제한다.

이상지질혈증으로 인한 죽상동맥병변이 혈관의 염

증과 합병증에 기인한다는 사실은 PLCP가 이상지질혈증으로 인한 염증성 질환을 예방하거나 억제하는 치료약물이 될 수 있음을 시사한다. 본 연구를 통해 PLCP의 심혈관계 질환에서 보호효과와 치료제 가능성을 확인하였다. 추후 동물실험 등 후속연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 결론

상황청혈플러스 (PLCP)의 이상지질혈증 관련 손상혈관에서의 항산화 및 항염증 효능을 알아보기 위해 인간 태줄 정맥 내피 세포 (HUVEC)를 이용하여 실험을 진행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. PLCP는 DPPH, ABTS radical 소거능을 농도 의존적으로 증가시킨다.
2. PLCP는 NF- $\kappa\text{B}$ , p-I $\kappa\text{B}\alpha$ , ERK, JNK 단백질 발현량을 100  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서 대조군에 비해 유의하게 감소시켰으며, p38 단백질 발현량을 모든 농도에서 대조군에 비해 유의하게 감소시켰다.
3. PLCP는 MCP-1 mRNA 발현량을 100  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서 대조군에 비해 유의하게 감소시켰으며, ICAM-1, VCAM-1 mRNA 발현량을 모든 농도에서 대조군에 비해 유의하게 감소시켰다. MCP-1, ICAM-1 바이오마커 생성량을 100  $\mu\text{g/ml}$  이상의 농도에서 대조군에 비해 유의하게 감소시켰으며, VCAM-1 바이오마커 생성량을 모든 농도에서 유의하게 감소시켰다.

## 참고문헌

1. National Oriental Medical Department of Heart Internal Medicine. Oriental neurocirculatory Internal Medicine. 3rd edition. Seoul: Gunja publishing company. 2011:184-5.
2. Statistics Korea. 2018 Death statistics : Korea. Korea development institute. 2019.

3. Jung HS. Risks and Management of Dyslipidemia. Public health weekly report. 2019;12(37):1416-22.
4. Kim CJ. Atherosclerosis and inflammation. Journal of Lipid and atherosclerosis. 2001;11(4): 413-9.
5. Choi KE, Seol IC, Kim YS, Cho HK, Yoo HR. Hypolipidemic and Anti-oxidant Effects of Chunghyl Plus in TypeII Diabetic Mice Model. J Physiol& Pathol Korean Med. 2016; 30(3):164-76.
6. Jung ES, Kim HT, Choi KE, Oh JM, Cho HK, Yoo HR, et al. A Case Report of the Beneficial Effects of Chunghyul-Plus in Dyslipidemia Patients. The Journal of the Society of Stroke on Korean Medicine. 2016; 17(1):56-66.
7. Lim JH, Kim SH, Park NH, Moon CJ, Kang SS, Kim SH, et al. Acute and Chronic Antiinflammatory Effects of Phellinus linteus Water Extract in Rats. Journal of Biomedical Research. 2010;11(1):27-35.
8. Yoon HY. Effects of Oral Administration of Phellinus linteus on the Productions of the Th1- and Th2-type Cytokines in Mice. J. Life Sic. & Nat. Res. 2004;27(1):63-74.
9. Kim HJ, Jin CB, Lee YS. Studies on the cytotoxicity against tumor cells and antioxidant activities of the fractions of Phellinus linteus. Bull K.H Pharma Sci. 2006;34(1):29-33.
10. Cha BS. Step to Internal Medicine Endocrinology. 4th edition. Seoul: Jungdam publishing company. 2018:389.
11. The Korean Academy of Clinical Geriatrics. Principles of Geriatric Medicine. Seoul: Hankookbook. 2011:232-46.
12. Choi HJ, Park JN. Management of Risk of Statin Therapy. J Korean Acad Fam Med. 2004;25:713-20.
13. Park SA, Jo HK, Yoo HR, Kim YS, Seol IC, An JJ. The Effects of Gamijihwang-tang(GJT) on Hyperlipidemia in Rats. Korean J. Orient. Int. Med. 2009;30(2):338-54.
14. Kim JC. SIM Integral medicine. Part III; Cardiology. Seoul: Jungdam. 2013:205-8.
15. Rao RM, Yang L, Garcia-Cardena G, Luscinskas FW. Endothelial-Dependent Mechanisms of Leukocyte Recruitment to the Vascular Wall. CircRes. 2007;101(3):234-47.
16. Ito T, Ikeda U. Infammatory cytokines and cardiovascular disease. Curr Drug Targets Inflamm Allergy. 2003;2:257-65.
17. Habukuihakwon. Youngchu-kyungkyosuk. Beijing: Inminwishen publisher. 1982:161.
18. Son BD. Hyperlipidemia Treatment 47 Clinical Experiences. Shanghai Journal of Traditional Chinese Medicine. 1990;8:7-8.
19. Bang HJ, Tak ES, Hong Y, Kang YH. A Study on The Oriental-medical Understanding of Hyperlipidemia. The Journal of east-west medicines. 1995;20(1):25-36.
20. Herbalmedicine Compilation Committee of College of Oriental Medicine. Herbal medicine. 2nd edition. Seoul: Younglimsa. 2010:369, 411-2,453,458.
21. Jang WS, Kim YS, Seol IC. Antioxidant and Lipid-lowering Effects of Artemisia capillaris on a Rat Model of Hyperlipidemia. The Journal of Korean Oriental Medicine. 2012; 33(2):11-24
22. Arafá HM. Curcumin attenuates diet-induced hypercholesterolemia in rats. Med Sci Monit. 2005;11(7):228-34.

23. Park SA, Jo HK, Yoo HR, Kim YS, Seol IC, An JJ. Lipid-lowering and Antioxidant Effects of Curcuma Radix in Poloxamer 407-induced Hyperlipidemia Model in Rat Models. Korean J. Orient. Int. Med. 2011;32(2):243-58.
24. Li HB, Fang KY, Lu CT, Li XE. Study on lipid-regulating function for the extracts and their prescriptions from Semen Cassiae and fructus crataegi. Zhong yao cai. 2007;30(5): 573-5.
25. Kim MS, Seo IB, Kim JB. Effects of Salviae Miltiorrhizae Radix on the Diet-induced Hyperlipidemia in Rats, Korean J. Oriental Physiology & Pathology. 2004;18(2):431-5.
26. Manconi F, Markham R, Fraser IS. Culturing endothelial cells of microvascular origin. Methods in Cell Science. 2000;22:89-99.
27. Kwon HK, Hwang JS, So JS, Lee CG, Sahoo A, Ryu JH, et al. Cinnamon extract induces tumor cell death through inhibition of NFkappaB and AP1. BMC Cancer. 2010;10: 392.
28. Tsai KL, Kao CL, Hung CH, Cheng YH, Lin HC, Chu PM. Chicoric acid is a potent anti-atherosclerotic ingredient by antioxidant action and anti-inflammation capacity. Oncotarget. 2017;8(18):29600-12.
29. Chung IM, Kim KH, Ahn JK. Screening of Korean medicinal and food plants with antioxidant activity. Kor J Med Sci. 1998; 6:311-22.
30. Kim MJ, Park EJ. Feature Analysis of Different In Vitro Antioxidant Capacity Assays and Their Application to Fruit and Vegetable Samples. Journal of the Korean society of food science and nutrition. 2011;40(7):1053-62.
31. Lee SO, Lee HJ, Yu MH, Im HG, Lee IS. Total Polyphenol Contents and Antioxidant Activities of Methanol Extracts from Vegetables produced in Ullung Island. Korean J. Food Sci Technol. 2005; 37(2): 233-40
32. Chae SW. Function and Activation of NF- $\kappa$ B in Immune System. Korean J Otolaryngol. 2005; 48: 284-8.
33. Kim DH, Chung JH, Yoon JS, Ha YM, Bae SJ, Lee EK, et al. Ginseno- side Rd inhibits the expressions of iNOS and COX-2 by suppressing NF- $\kappa$ B in LPS-stimulated RAW264.7 cells and mouse liver. J Ginseng Res. 2013; 37: 54-63.
34. Cobb MH, Goldsmith EJ. Dimerization in MAPkinase signaling. Trends Biochem Sci. 2000; 25(1): 7-9.
35. Orton RJ, Sturm OE, Vyshemirsky V, Calder M, Gilbert DR, Kolch W. Computational modelling of the receptor-tyrosine-kinase-activated MAPK pathway. The Biochemical Journal. 2005; 392(2): 249-61.
36. Dhanasekaran DN, Reddy EP. JNK signaling in apoptosis. Oncogene. 2008;27(48):6245-51.
37. Segales J, Perdiguero E, Munoz-Canoves P. Regulation of Muscle Stem Cell Functions: A Focus on the p38 MAPK Signaling Pathway. Frontiers in Cell and Developmental Biology. 2016; 4: 91.
38. Christopherson K, Hromas R. Chemokine Regulation of Normal and Pathologic Immune Responses. Stem Cells. 2001; 19(5): 388-96.
39. Rong Y, Geng Z, Lau BH. Ginko biloba attenuates oxidative stress in macrophages and endothelial cells. Free Radic Biol Med. 1996; 20: 121-7.

40. Han KH. Dyslipidemia, Inflammation and Atherosclerosis. Cardiovascular Update. 2004; 6(3): 6-13.

**ORCID**

원서영 <https://orcid.org/0000-0002-9274-5426>

유호룡 <https://orcid.org/0000-0001-6152-7488>

설인찬 <https://orcid.org/0000-0001-7142-7042>

김윤식 <https://orcid.org/0000-0003-4999-3288>