

Original Article

인간 제대정맥 내피세포에서 산수유와 산수유청혈플러스의 항염증효과

김정희, 유호룡, 설인찬, 김윤식*
대전대학교 한의과대학 심계내과학교실

Anti-inflammatory Effect of Cornus Officinalis fruit extract and Cornus Officinalis Fruit Cheonghyeol Plus in Human Umbilical Vein Endothelial Cell

Jeong-hui Kim, 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 anti-inflammatory effect of Cornus Officinalis fruit extract(CE) and Cornus Officinalis Fruit Cheonghyeol Plus(CCP) in Human Umbilical Vein Endothelial Cell.

Methods: We measured cell viability of CE, CCP and treated HUVEC with TNF- α . We measured the mRNA expression levels of KLF2, eNOS, MCP-1, ICAM-1, VCAM-1, the protein expression levels of KLF2, eNOS, MCP-1, ICAM-1, VCAM-1, and the protein phosphorylation level of ERK, JNK, p38 and the biomarker expression levels of MCP-1, ICAM-1, VCAM-1.

Results: 1. CE increased the mRNA, protein expression levels of KLF2, eNOS at concentrations of 100 μ g/ml compared to the control group. CE decreased the mRNA, protein and biomarker expression levels of MCP-1, ICAM-1, VCAM-1 at concentrations of 100 μ g/ml compared to the control group. CE decreased the protein phosphorylation level of p38 at concentrations of 100 μ g/ml compared to the control group. 2. CCP increased the mRNA, protein expression levels of KLF2, eNOS at concentrations of 100 μ g/ml or more compared to the control group. CCP decreased the mRNA, protein and biomarker expression levels of MCP-1, ICAM-1, VCAM-1 at concentrations of 100 μ g/ml or more compared to the control group. CCP decreased the protein phosphorylation level of ERK at concentrations of 100 μ g/ml or more, p38 at concentrations of 200 μ g/ml or more, and JNK at concentrations of 400 μ g/ml compared to the control group.

Conclusions: These results present that CE and CCP has anti-inflammatory effect in HUVEC. So, it could help treat or prevent inflammation in vein caused by dyslipidemia and contribute prevention of cardiovascular and cerebrovascular diseases.

Key Words : *Cornus Officinalis*, anti-inflammatory effect, inflammation, atherosclerosis, dyslipidemia

서론

죽상경화증은 혈관 내벽에 섬유판이 형성되면서

혈관이 딱딱해지고 내강이 좁아지는 질환으로, 심근경색, 동맥류, 뇌경색과 같은 심뇌혈관계 합병증을 초래한다.¹⁾

• Received : 20 July 2022

• Revised : 10 August 2022

• Accepted : 16 August 2022

• Correspondence to : Yoonsik Kim

Oriental Medicine Department of Daejeon University Cheonan Oriental Medicine Hospital, Daejeon University, Notasan-ro 4-gil, Seobuk-gu, Cheonan-si, Chungcheongnam-do

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

이러한 죽상경화증의 주요 원인은 이상지질혈증으로, 이상지질혈증은 당뇨, 고혈압, 흡연과 함께 심뇌혈관계 질환 발생에 영향을 끼치는 주요 원인이 된다. 국내 이상지질혈증 유병률의 지속적인 증가와 동반하여 심뇌혈관계 질환으로 인한 사망률도 계속해서 증가하는 추세에 있다. 이상지질혈증이 심혈관계 질환을 유발하는 과정에는 혈관 내피세포에서의 염증반응이 중요하게 작용한다.^{2,3)} 배 등⁴⁾이 동맥경화증의 진행과 염증 표지자 사이의 상관관계를 확인하였는데 관동맥협착으로 인한 허혈성 심질환으로 관동맥조영술 및 스텐트 삽입술을 받은 150명의 환자를 대상으로 관동맥 시술 전과 시술 6개월 후 협착 정도와 염증지표간의 관계를 분석한 결과, 동맥경화반이 진행된 군에서 CRP(C-reactive protein), VCAM (Vascular Cell Adhesion Molecule)-1 등의 염증지표의 수치가 유의하게 상승해있는 결과가 확인되었다. 이는 내피세포와 단핵구의 활성화에 의한 염증반응이 동맥경화 진행에 중요한 역할을 한다는 것을 시사한다.

LDL-C(Low Density Lipoprotein Cholesterol)는 내피세포를 뚫고 들어가 산화되는데 이때 내피세포가 활성화 되면서 VCAM-1, ICAM(Intercellular Adhesion Molecule)-1와 같은 부착인자의 발현이 증가되어 단핵구가 혈관벽에 부착한다. 단핵구는 분화하여 대식세포가 되고, 대식세포는 주화성 사이토카인인 MCP(Monocyte chemoattractant protein)-1을 분비하여 계속해서 다른 단핵구를 유입시킨다. 대식세포가 산화된 LDL-C를 흡수하여 거품세포를 형성하며 단핵구, 대식세포, T세포 등에서 혈관 내 면역 반응이 계속되면 이에 따라 염증 상태도 지속된다. 혈관 중막에 있던 혈관 평활근세포는 혈관 내막으로 이동해 증식하면서 죽상경화성 섬유판을 형성한다. 대식세포가 MMP(Matrix Metallo Proteinase)를 분비해서 세포외기질을 분해하면 섬유판이 약해지다가 결국 파열되어 혈액 내로 지방이나 조직이 유출되는데, 이는 응고인자를 활성화시키고 혈소판

을 응집시켜 혈전을 생성시킨다. 이러한 기전에 따라 혈관 내 염증이 지속되면 죽상경화가 심해져 혈관이 협착되거나 급성 경색이 생기는 등 심뇌혈관계 질환이 발생할 수 있다.⁵⁻⁷⁾

이상지질혈증 및 혈관내피세포에서의 항염증효과와 관련된 한의학적 연구는 활발히 이루어지고 있다. 그중에서 청혈플러스는 인진호, 단삼, 산사, 울금으로 구성된 복합추출물로 기존 혈관내피세포를 대상으로 항염증효과가 있는 것으로 밝혀졌으며 이상지질혈증 환자에게 투여하여 지질 수치를 개선한 증례가 보고된 약물이다.^{8,9)} 또한 산수유(山茱萸, *Cornus officinalis* Siebold & Zucc.)는 층층나무과(Cornaceae)에 해당하는 산수유나무의 과실로, 씨를 제거한 과육이 약용으로 사용된다.¹⁰⁾ 기존 연구로 규명된 산수유의 효과에는 항염증효과, 항산화효과, 지방형성억제효과, 항당뇨 및 항지질효과, 간보호효과 등이 있다. 특히, 제1형 당뇨병과 이상지질혈증 mouse에 산수유의 주요 성분인 loganin을 투여한 실험에서 항당뇨효과와 항지질효과가 있음이 확인되었으며, LPS (Lipopolysaccharide)에 의해 염증이 유도된 mouse 모델 실험에서 진통효과와 항염증효과가 있는 것으로 밝혀졌다.¹¹⁻¹⁴⁾ 이에 본 실험에서는 항염증효과가 있는 산수유와 청혈플러스에 산수유를 가미한 산수유청혈플러스가 HUVEC(Human Umbilical Vein Endothelial Cell, 인간 제대동맥 내피세포)에 미치는 항염증효과를 확인하고자 하였다. 실험 결과, 유의한 항염증효과를 확인하였으며 이에 이상지질혈증으로 인한 심뇌혈관계 질환의 예방 및 치료약물로서의 가능성을 확인하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재 및 시료추출

산수유청혈플러스(*Cornus officinalis* fruit Cheonghyeol Plus) 1첩(50g)은 山茱萸(*Cornus officinalis*) 10g,

茵陳蒿(*Artemisia capillaris* Thunberg) 10g, 鬱金(*Curcuma phaeocaulis* Val) 10g, 山楂(*Crataegus pinnatifida* Bunge) 10g, 丹參(*Salvia miltiorrhiza* Bunge) 10g으로 구성되어있다. 100 g의 산수유(*Cornus Officinalis* fruit extract, CE)와 100 g(2첩)의 산수유청혈플러스(*Cornus Officinalis* fruit Cheonghyeol Plus, CCP)에 각각 1 L의 증류수를 넣어 3시간 동안 100°C에서 추출하였으며, 여과지를 사용하여 추출물을 여과하였다. 여과된 추출물은 rotary vacuum evaporator를 사용하여 감압농축하고 freeze dryer를 사용하여 동결건조를 진행하였다. 동결건조 완료 후, CE는 27.18 g(수득율 : 27.18%), CCP는 19.63 g(수득율 : 19.63%)의 분말을 얻었으며, -20°C에 보관하면서 실험 당일 소분하고 증류수에 용해시켜 사용하였다. 본 연구에 사용된 모든 약재는 한약재 유통업체인 (주)옵니허브에서 검수된 한약재를 구입하여 사용하였다.

2) 세포 배양

HUVEC은 Lonza(Switzerland)에서 분양받아 사용하였으며, EGM™-2 medium과 EGM™-2 singlequots™ kit으로 혼합된 배지를 사용하여 5% CO₂, 37°C 조건의 세포배양기에서 배양하였다. 세포의 계대 배양은 2-3일 주기로 진행하였으며, 실험에 사용되는 모든 plate는 0.2% gelatin solution으로 30분간 코팅한 후 PBS로 세척하여 사용하였다.

2. 방법

1) 세포 생존율 측정

HUVECs를 48 well plate에 1×10^5 cells/well로 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후, CE는 100 ug/ml로 처리하고 CCP는 100, 200, 400, 600 ug/ml의 농도로 다시 24시간 배양을 시행하였으며, 모든 배양이 종료된 다음 배양액 100 μ l당 10 μ l의 EZ-Cytox 용액을 첨가하여 30분간 세포배양기에서 반응시켰다. 이 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였고

대조군에 대한 세포생존율을 백분율로 표시하였다.

2) 시료 및 약물 처리

HUVECs를 1×10^6 cells/well로 6 well plate에 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후, CE는 100 ug/ml로 처리하고 CCP는 100, 200, 400 ug/ml 농도로 전처리하고 1시간 경과 후 10 ng/ml의 TNF- α (Tumor necrosis factor- α)를 추가하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 모든 배양이 종료된 후 원심분리하여 얻은 세포는 유전자 및 단백질 발현량 측정에 사용하였으며, 상등액은 바이오마커 생성량 측정에 사용하였다.

3) 유전자 발현량 측정

시료 및 약물을 처리한 세포는 total RNA prep kit를 사용하여 RNA를 추출하였으며, 추출한 RNA는 reverse transcription premix와 혼합하고 PCR cyclor를 사용하여 45°C에서 60분, 95°C에서 5분간 반응을 통해 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA로부터 특정 유전자를 증폭시켜 확인하기 위해 real-time PCR을 진행하였으며, cDNA와 특정 유전자에 맞는 primer, SYBR green premix를 혼합하여 95°C에서 2분 동안 반응시키고 5초간 95°C, 30초간 62.5°C를 40회 반복하여 특정 유전자를 증폭시켰다. 유전자 발현량은 대조군의 유전자 발현량을 기준으로 상대정량 하였으며, 사용된 primer들의 정보는 Table 1와 같다.

4) 단백질 발현량 측정

시료 및 약물을 처리한 세포는 phosphatase inhibitor II, III, protease inhibitor cocktail I, 포함된 Radioimmunoprecipitation assay buffer를 넣어 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질은 Bicinchoninic acid protein assay kit를 이용하여 정량하였으며, sample loading buffer와 섞어 95°C에서 5분간 반응시켜 준비하였다. 준비된 단백질은 10% acrylamide

gel을 이용하여 SDS-PAGE(Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)하고 크기에 따라 분리하였으며, PVDF(Polyvinylidenedifluoride) membrane에 이동시켰다. membrane을 3% BSA (Bovine serum albumin)에 담그고 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. TBS-T(Tris buffered saline with tween20) buffer를 통해 세척한 뒤 primary antibody를 넣어 16시간동안 4℃에서 반응시켰다. 이후 3회 세척작업을 시행하고 secondary antibody를 넣어 1시간동안 상온에서 반응시킨 뒤, 다시 세척하고 ECL(Enhanced chemiluminescence) solution으로 단백질을 발색시키고 chemidoc fusion FX를 이용하여 단백질 발현량을 측정하였다. 단백질 발현량은 대조군의 단백질 발현량을 기준으로 상대정량 하였다.

5) 바이오마커 생성량 측정

시료 및 약물을 처리한 세포 상등액과 standard를 96 well plate에 100 μl씩 넣고 2시간동안 37℃에서 반응시켰다. 반응 후, washing buffer를 이용하여 세척 작업을 4회 시행하고 100 μl의 detection antibody를 넣어 다시 2시간 동안 37℃에서 반응시키고 세척하였다. 이후 HRP(Horseradish peroxidase) conjugate를 100 μl씩 넣어 30분간 37℃에서 반응시키고 세척

한 뒤 substrate reagent를 100 μl씩 넣어 15분간 37℃에서 반응시키고 100 μl의 stop solution을 추가하였다. micro plate reader를 이용해 450 nm에서 흡광도를 측정하였고 standard curve를 기준으로 절대 값을 표시하였다.

3. 통계처리

연구 결과는 mean±standard error of mean으로 나타내었으며, SPSS(Statistical package for the social sciences) Statistics Version 21.0을 이용하였으며, 먼저 두 그룹 간의 통계적 비교는 independent sample t-test를 사용하여 수행하였고 여러 그룹 간의 통계적 비교는 ANOVA (analysis of variance)를 사용하여 수행하였다. 이 후 Tukey’s HSD(Honestly significant difference) test를 사용해 유의수준 0.05로 설정하여 유의성을 검정하였고, p<0.05, p<0.01, p<0.001의 3가지 유의수준으로 나누어 표기하였다.

연구 결과

1. 세포생존율

세포생존율을 측정한 결과, 대조군에서 100.00±

Table 1. Real-Time PCR Primer Sequences

Gene name	Size(bp)	F/R	Sequences
KLF2	100	F	CCTCCTTGACGAGTTTTGTTTTTC
		R	AAGGCATCAACAAGCCTCGAT
eNOS	152	F	CTCATGGGCACGGTGATG
		R	ACCACGTCATACTCATCCATACAC
MCP-1	150	F	GCTCAGCCAGATGCAATCAA
		R	CTTGGCCACAATGGTCTTGA
ICAM-1	152	F	TCTTCTCGGCCTTCCCATA
		R	AGGTACCATGGCCCCAAATG
VCAM-1	127	F	CCCTACCATTGAAGATACTGG
		R	ATCTCTGGGGGCAACATTGAC
β-actin	111	F	ATCGTGGGGCGCCCCAGGCACCA
		R	GGGGTACTTCAGGGTGAGGA

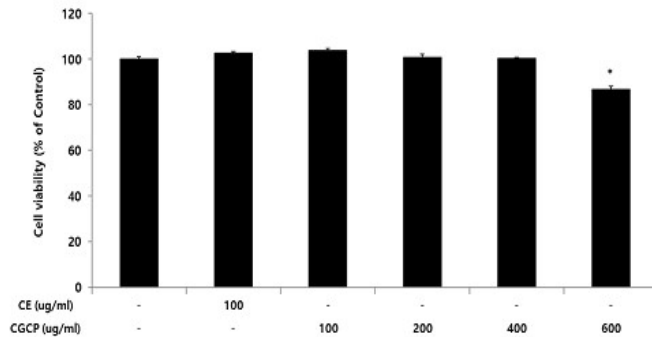


Fig. 1. Cell viability of CE or CCP in HUVEC.

Cell viability were calculated as percentage relative to the control and the result were given by the mean±standard error of mean from three independent experiments(Significance of results, *; $p < 0.05$ compared to control).

0.85%일 때 CE는 100ug/ml 농도에서 $102.46 \pm 0.66\%$ 로 세포 독성이 나타나지 않았으며, CCP는 100, 200, 400, 600ug/ml에서 각각 103.72 ± 0.90 , 100.65 ± 1.40 , 100.27 ± 0.27 , $86.65 \pm 1.30\%$ 의 세포생존율이 나타났다. 600ug/ml이상의 농도에서 90% 이하의 세포생존율이 나타났으며, 이후 연구에서 100ug/ml부터 400ug/ml까지 농도로 설정하여 사용하였다. (Fig. 1)

2. 세포 내 유전자 발현량

1) KLF2(Kruppel-like factor 2)

KLF2의 세포 내 유전자 발현량을 대조군의 유전자 발현량을 기준으로 상대정량한 결과, 대조군에서 1.00 ± 0.05 일 때, 정상군에서 2.14 ± 0.04 배, CE 100 ug/ml에서는 1.46 ± 0.08 배, CCP 100, 200, 400 ug/ml에서 각각 1.18 ± 0.04 , 1.59 ± 0.05 , 1.83 ± 0.10 배로 CE는 100ug/ml에서, CCP는 100ug/ml이상의 농도에서 대조군에 비하여 유의한 증가가 확인되었다. (Fig. 2A)

2) eNOS(Endothelial nitric oxide synthase)

eNOS의 세포 내 유전자 발현량을 대조군의 유전자 발현량을 기준으로 상대정량한 결과, 대조군에서 1.00 ± 0.05 일 때, 정상군에서 1.61 ± 0.12 배, CE 100

ug/ml에서는 1.46 ± 0.06 배, CCP 100, 200, 400 ug/ml에서 각각 1.24 ± 0.05 , 1.54 ± 0.05 , 1.61 ± 0.10 배로 CE는 100ug/ml에서, CCP는 100ug/ml이상의 농도에서 대조군에 비하여 유의한 증가가 확인되었다. (Fig. 2B)

3) MCP-1

MCP-1의 세포 내 유전자 발현량을 대조군의 유전자 발현량을 기준으로 상대정량한 결과, 대조군에서 1.00 ± 0.00 일 때, 정상군에서 0.48 ± 0.01 배, CE 100ug/ml에서는 0.80 ± 0.07 배, CCP 100, 200, 400 ug/ml에서 각각 0.76 ± 0.02 , 0.70 ± 0.05 , 0.52 ± 0.03 배로 CE는 100ug/ml에서, CCP는 100ug/ml이상의 농도에서 대조군에 비하여 유의한 감소가 확인되었다. (Fig. 2C)

4) ICAM-1

ICAM-1의 세포 내 유전자 발현량을 대조군의 유전자 발현량을 기준으로 상대정량한 결과, 대조군에서 1.00 ± 0.00 일 때, 정상군에서 0.48 ± 0.01 배, CE 100ug/ml에서는 0.49 ± 0.05 배, CCP 100, 200, 400 ug/ml에서 각각 0.60 ± 0.05 , 0.54 ± 0.05 , 0.35 ± 0.04 배로 CE는 100ug/ml에서, CCP는 200ug/ml이상의

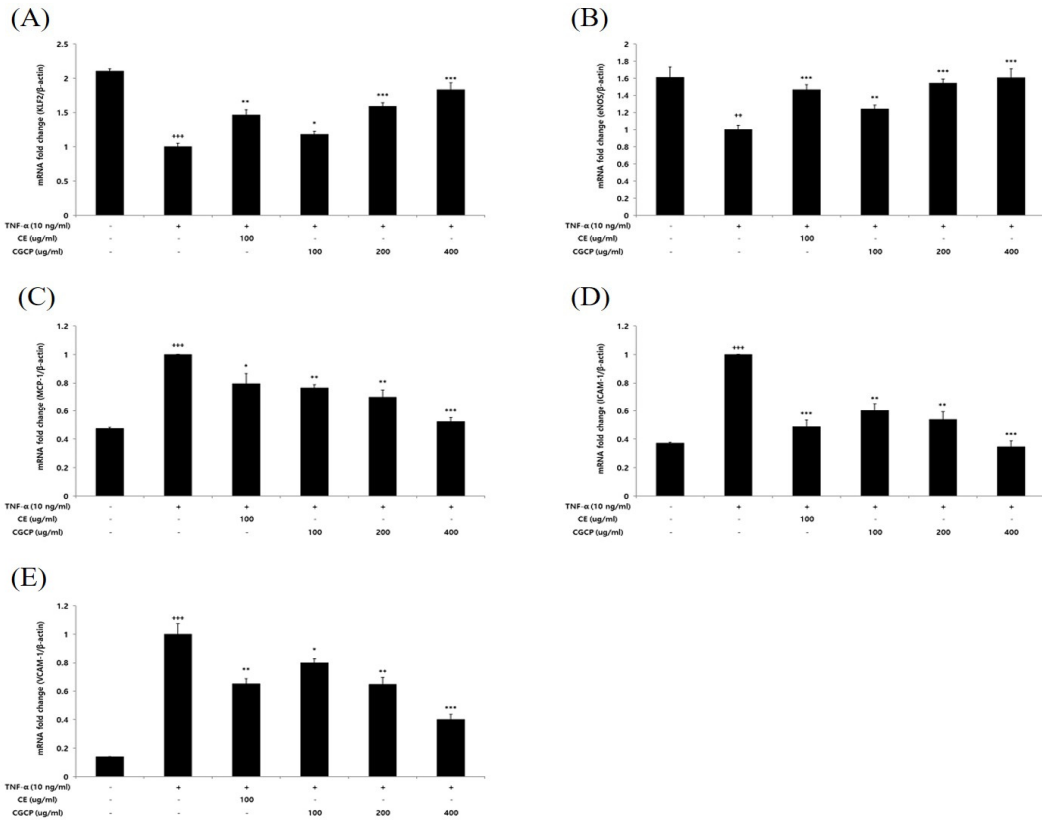


Fig. 2. Effect of CE or CCP on KLF2(A), eNOS(B), MCP-1(C), ICAM-1(D), VCAM-1(E) mRNA expression level in HUVEC. HUVEC were treated CE(100 ug/ml or CCP(100, 200, and 400 ug/ml), with TNF- α 10 ng/ml for 12hour. The mRNA expression level were measured using a real-time PCR(qPCR). The result were given by the mean \pm standard error of mean from three independent experiments(Significance of results, *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$ compared to control, +, $p < 0.001$ compared to normal).

농도에서 대조군에 비하여 유의한 감소가 확인되었다. (Fig. 2D)

5) VCAM-1

VCAM-1의 세포 내 유전자 발현량을 대조군의 유전자 발현량을 기준으로 상대정량한 결과, 대조군에서 1.00 ± 0.01 일 때, 정상군에서 0.14 ± 0.00 배, CE 100ug/ml에서는 0.65 ± 0.04 배, CCP 100, 200, 400 ug/ml에서 각각 0.80 ± 0.03 , 0.65 ± 0.05 , 0.40 ± 0.04 배로 CE는 100ug/ml에서, CCP는 100ug/ml이상의 농도에서 대조군에 비하여 유의한 감소가 확인되었

다. (Fig. 2E)

3. 세포 내 단백질 발현량

1) KLF2

세포 내 KLF2 단백질 발현량을 대조군의 단백질 발현량을 기준으로 상대정량한 결과, 대조군에서 1.00 ± 0.03 일 때, 정상군에서 1.68 ± 0.04 배, CE 100ug/ml에서는 2.13 ± 0.10 배, CCP 100, 200, 400 ug/ml에서 각각 1.45 ± 0.08 , 1.97 ± 0.07 , 2.30 ± 0.08 배로 CE는 100ug/ml에서, CCP는 100ug/ml이상의 농도에서 대조군에 비하여 유의한 증가가 확인되었다.

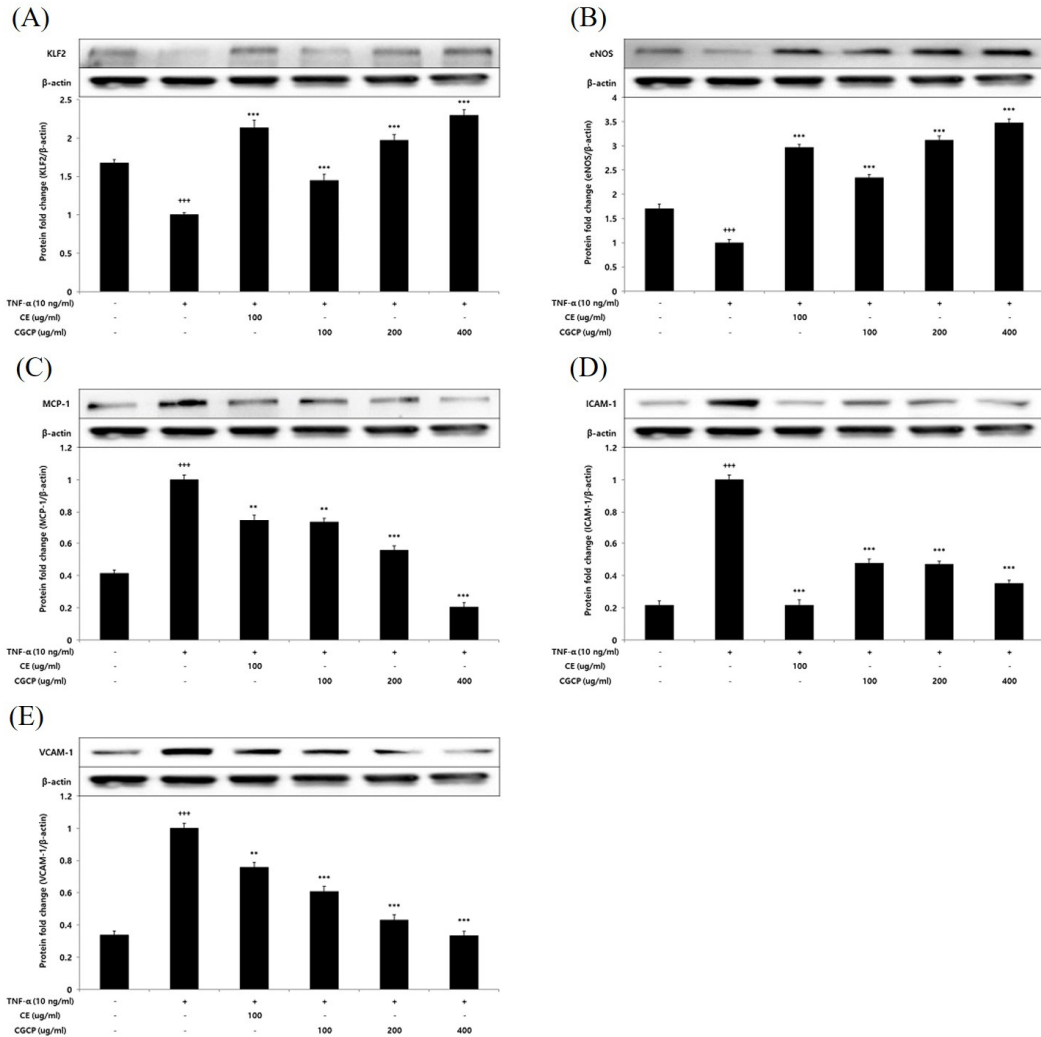


Fig. 3. Effect of CE or CCP on KLF2(A), eNOS(B), MCP-1(C), ICAM-1(D), VCAM-1(E) protein expression level in HUVEC.

HUVEC were treated CE(100ug/ml or CCP(100, 200, and 400ug/ml), with TNF-α 10 ng/12 hour. The protein expression level were measured by a western blot. The result were presented by the mean±standard error of mean from three independent experiments(Significance of results, *; p<0.05, **, p<0.01, ***, p<0.001 compared to control, +, +, +; p<0.001 compared to normal).

(Fig. 3A)

2) eNOS

세포 내 eNOS 단백질 발현량을 대조군의 단백질 발현량을 기준으로 상대정량한 결과, 대조군에서

1.00±0.06일 때, 정상군에서 1.70±0.10 배, CE 100 ug/ml에서는 2.97±0.06 배, CCP 100, 200, 400 ug/ml에서 각각 2.34±0.07, 3.11±0.09, 3.48±0.08 배로 CE는 100ug/ml에서, CCP는 100ug/ml이상의 농도에서 대조군에 비하여 유의한 증가가 확인되었

다. (Fig. 3B)

3) MCP-1

세포 내 MCP-1 단백질 발현량을 대조군의 단백질 발현량을 기준으로 상대정량한 결과, 대조군에서 1.00 ± 0.03 일 때, 정상군에서 0.41 ± 0.02 배, CE 100 ug/ml에서는 0.74 ± 0.04 배, CCP 100, 200, 400ug/ml에서 각각 0.73 ± 0.03 , 0.56 ± 0.03 , 0.20 ± 0.03 배로 CE는 100ug/ml에서, CCP는 100ug/ml이상의 농도에서 대조군에 비하여 유의한 감소가 확인되었다. (Fig. 3C)

4) ICAM-1

세포 내 ICAM-1 단백질 발현량을 대조군의 단백질 발현량을 기준으로 상대정량한 결과, 대조군에서 1.00 ± 0.03 일 때, 정상군에서 0.22 ± 0.03 배, CE 100 ug/ml에서는 0.22 ± 0.03 배, CCP 100, 200, 400 ug/ml에서 각각 0.48 ± 0.02 , 0.47 ± 0.02 , 0.35 ± 0.02 배로 CE는 100ug/ml에서, CCP는 100ug/ml이상의 농도에서 대조군에 비하여 유의한 감소가 확인되었다. (Fig. 3D)

5) VCAM-1

세포 내 VCAM-1 단백질 발현량을 대조군의 단백질 발현량을 기준으로 상대정량한 결과, 대조군에서 1.00 ± 0.03 일 때, 정상군에서 0.34 ± 0.03 배, CE 100ug/ml에서는 0.76 ± 0.03 배, CCP 100, 200, 400 ug/ml에서 각각 0.61 ± 0.03 , 0.43 ± 0.03 , 0.33 ± 0.03 배로 CE는 100ug/ml에서, CCP는 100ug/ml이상의 농도에서 대조군에 비하여 유의한 감소가 확인되었다. (Fig. 3E)

6) ERK

세포 내 ERK 단백질 발현량을 대조군의 단백질 발현량을 기준으로 상대정량한 결과, 대조군에서 1.00 ± 0.03 일 때, 정상군에서 0.71 ± 0.04 배, CE 100ug/

ml에서는 0.92 ± 0.03 배, CCP 100, 200, 400ug/ml에서 각각 0.84 ± 0.03 , 0.69 ± 0.02 , 0.52 ± 0.02 배로 CCP 100, 200, 400ug/ml에서 대조군에 비하여 유의한 감소가 확인되었다. (Fig. 4A)

7) JNK

세포 내 JNK 단백질 발현량을 대조군의 단백질 발현량을 기준으로 상대정량한 결과, 대조군에서 1.00 ± 0.05 일 때, 정상군에서 0.35 ± 0.05 배, CE 100 ug/ml에서는 1.04 ± 0.05 배, CCP 100, 200, 400ug/ml에서 각각 0.99 ± 0.05 , 0.99 ± 0.05 , 0.87 ± 0.05 배로 CCP 400ug/ml에서 대조군에 비하여 유의한 감소가 확인되었다. (Fig. 4B)

8) p38

세포 내 p38 단백질 발현량을 대조군의 단백질 발현량을 기준으로 상대정량한 결과, 대조군에서 1.00 ± 0.03 일 때, 정상군에서 0.33 ± 0.02 배, CE 100ug/ml에서는 0.83 ± 0.03 배, CCP 100, 200, 400ug/ml에서 각각 0.94 ± 0.02 , 0.88 ± 0.02 , 0.39 ± 0.02 배로 CE는 100ug/ml에서, CCP는 200ug/ml 이상의 농도에서 대조군에 비하여 유의한 감소가 확인되었다. (Fig. 4C)

4. 세포 외 바이오마커 생성량

1) MCP-1

세포 외 MCP-1 생성량을 측정된 결과, 정상군에서 216.00 ± 14.85 , 대조군에서 409.50 ± 14.62 일 때, CE 100ug/ml에서는 361.33 ± 16.14 , CCP 100, 200, 400 ug/ml에서 각각 327.83 ± 15.86 , 288.32 ± 14.91 , 214.20 ± 13.18 로 CE는 100ug/ml에서, CCP는 100 ug/ml 이상의 농도에서 대조군에 비하여 유의한 감소가 확인되었다. (Fig. 5A)

2) ICAM-1

세포 외 ICAM-1 생성량을 측정된 결과, 정상군에

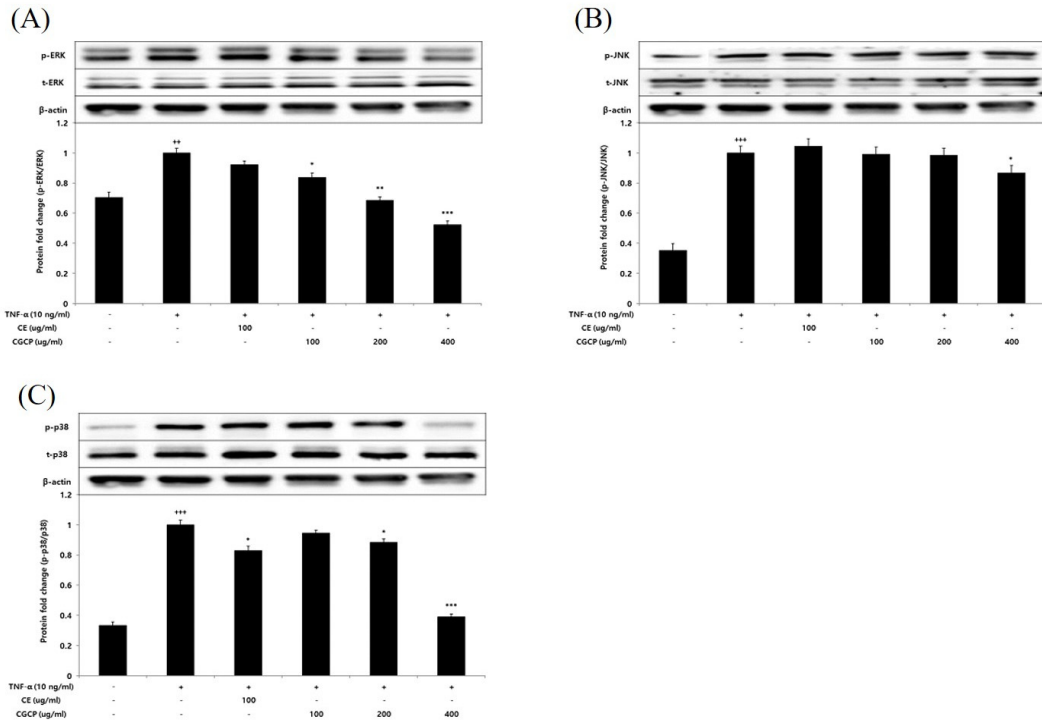


Fig. 4. Effect of CE or CCP on ERK(A), JNK(B), p38(C) protein phosphorylation level in HUVEC. HUVEC were treated CE(100ug/ml or CCP(100, 200, and 400ug/ml), with TNF-α 10 ng/ 12 hour. The protein phosphorylation level were measured by a western blot. The result were presented by the mean±standard error of mean from three independent experiments(Significance of results, *; p<0.05, **; p<0.01, ***; p<0.001 compared to control, +++; p<0.001 compared to normal).

서 136.19±16.64, 대조군에서 416.56±9.14일 때, CE 100ug/ml에서는 172.55±12.18, CCP 100, 200, 400 ug/ml에서 각각 259.45±21.15, 224.25±16.28, 156.81 ±14.79로 CE는 100ug/ml에서, CCP는 100ug/ml 이상의 농도에서 대조군에 비하여 유의한 감소가 확인 되었다. (Fig. 5B)

3) VCAM-1

세포 외 VCAM-1 생성량을 측정할 결과, 정상군에서 52.73±4.29, 대조군에서 308.39±16.12일 때, CE 100ug/ml에서는 249.55±9.90, CCP 100, 200, 400 ug/ml에서 각각 187.55±13.31, 179.61±6.80, 164.89±10.72로 CE는 100ug/ml에서, CCP는 100ug/ml 이

상의 농도에서 대조군에 비하여 유의한 감소가 확인 되었다. (Fig. 5C)

고찰

2021년 발표한 통계청의 사망원인통계에 따르면 2011년부터 2020년까지의 10개년간의 주요 사망원인 중 심뇌혈관질환은 지속적으로 4위 이내 상위권을 차지하고 있으며 특히 2020년 60-79세 연령의 사망원인에서 심장질환과 뇌혈관질환은 각각 2위, 3위에 해당한다. 각 질환군의 수치변동을 보면 뇌혈관 질환으로 인한 사망 인구수는 2010년 10만 명당 53.2명에서 2020년 42.6명으로 줄었고, 심장질환은

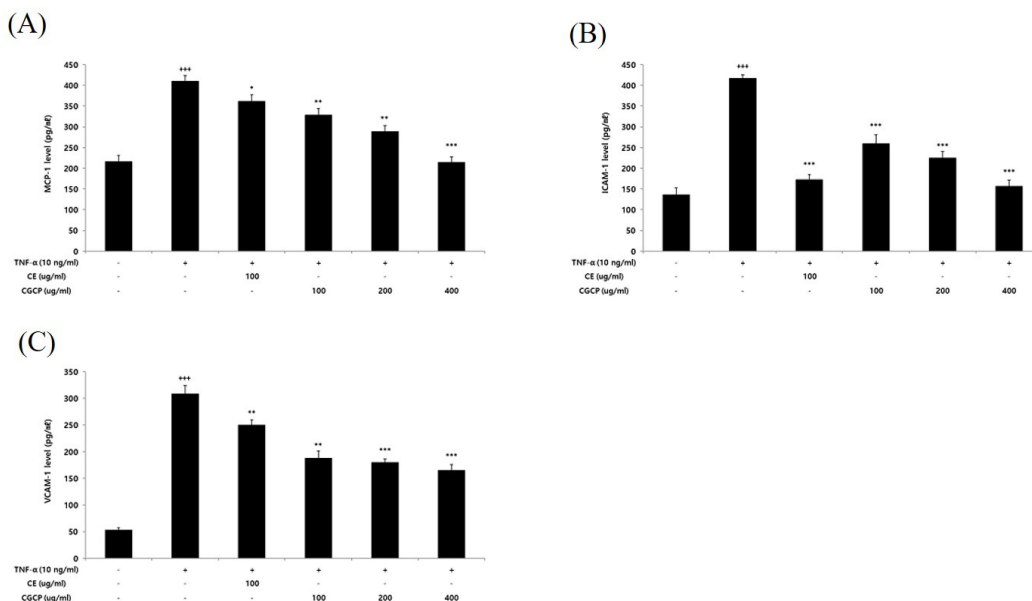


Fig. 5. Effect of CE or CCP on MCP-1(A), ICAM-1(B), VCAM-1(C) level in HUVEC.

HUVEC were treated CE(100ug/ml or CCP(100, 200, and 400ug/ml), with TNF-α 10 ng/ 12hour. MCP-1 level was measured by ELISA kit. The result were presented by the mean±standard error of mean from three independent experiments(Significance of results, *, p<0.05, **, p<0.01, ***, p<0.001 compared to control, +++, p<0.001 compared to normal).

CE : Cornus Officinalis fruit extract
 CCP : Cornus Officinalis Fruit Cheonghyeol Plus
 HUVEC : Human Umbilical Vein Endothelial Cell
 KLF : Kruppel-like factor 2
 eNOS : Endothelial nitric oxide synthase
 MCP-1 : Monocyte chemoattractant protein-1
 ICAM : Intercellular Adhesion Molecule -1
 VCAM : Vascular Cell Adhesion Molecule -1
 TNF : Tumor necrosis factor-α
 ERK : Extracellular signal-regulated kinase
 JNK : Jun N-terminal kinase

2019년 10만 명당 46.8명에서 2020년 63.0명으로 심장질환으로 인한 사망률은 계속해서 증가하고 있다.²⁾

국내 연구에서 심뇌혈관계질환에 가장 많은 영향을 주는 위험요인은 고혈압, 이상지질혈증, 당뇨병, 흡연임을 보고한 바 있으며, 고혈압 유병률과 흡연율은 큰 변화가 없으나 이상지질혈증과 당뇨병의 유병률은 증가추세에 있으므로 국내 전체 순환기계 질환의 유병률은 증가할 것으로 예측되고 있다.¹⁵⁾

이상지질혈증이란 혈액 검사 상 고LDL콜레스테

롤혈증(LDL 콜레스테롤이 160mg/dL 이상인 경우), 고콜레스테롤혈증(총콜레스테롤이 240mg/dL이상인 경우), 고중성지방혈증(중성지방이 200mg/dL이상인 경우), 저HDL콜레스테롤혈증(HDL 콜레스테롤이 40mg/dL미만인 경우) 중 하나 이상에 해당하는 경우로 정의된다.¹⁶⁾ 이상지질혈증에서 특히 LDL-C는 혈관 안에서 응집되어 혈관 내벽에 부착되는데, 이는 혈관 직경의 감소뿐만 아니라 혈관 내의 염증반응을 유도하여 죽상경화증과 급성관동맥증후군을 야기할 수 있다.³⁾

죽상경화증은 과거에는 단순히 혈관 내벽에 지방이 침착되어 발생하는 병으로 인식되었으나, 최근에는 면역세포, 평활근세포, 혈관내피세포 간의 염증작용과 연관되어 있음이 보고되었다.¹⁷⁾ 죽상경화증 예방 및 치료를 위해 이상지질혈증의 관리가 권고되며, 생활습관 개선과 약물복용을 통해 우선적으로 LDL-C 수치를 조절한다.¹⁸⁾ 1차 약물로 사용되는 스타틴(Statin)은 비교적 부작용이 적은 편으로 알려져 있지만 4% 정도에서 소화장애, 속쓰림, 복통 등이 발생하고 드물게 간독성, 근육독성도 나타난다. 또한 에제티미브, PCSK9 억제제(Proprotein convertase subtilisin/Kexin type 9 inhibitors), 니코틴산도 복통, 설사, 피로감, 관절통, 피부홍조 등의 부작용이 발생하며 이에 이상지질혈증 치료를 위한 천연물 제재의 약물연구가 지속적으로 이루어지고 있다.¹⁶⁾

한의학에서는 《靈樞衛氣失常論》에서 “人有肥, 有膏, 有肉”라고 하며 지질과 관련된 내용을 언급한 바 있으며¹⁹⁾, 이상지질혈증, 죽상경화증 및 혈관 내 염증과 관련하여 금은화, 인진호·산사·단삼·울금의 복합추출물인 청혈플러스, 황금·목향·시호의 복합추출물, 오적산까지 단일제재부터 복합추출물, 처방에 이르는 다양한 연구가 이루어지고 있다.^{8,20-22)} 특히, 청혈플러스는 인진호(茵陳蒿, *Artemisia capillaris*), 울금(鬱金, *Curcuma longa* Rarix), 산사(山楂, *Crataegii Fructus*), 단삼(丹蔘, *Salviae miltiorrhizae Radix*)으로 구성된 복합추출물이다. 청혈플러스에 대해서는 이 등²³⁾은 청혈플러스의 구성약재인 한인진, 울금, 산사, 단삼 발효복합추출물이 RAW264.7 mouse 대식세포와 HUVEC 세포에서의 항산화 효과와 항염증효과를 규명하였다. 동물실험으로는 최 등²⁴⁾이 당뇨동물모델인 8주령의 수컷 db/db mouse에 청혈플러스를 투여한 결과, ROS(Reactive oxygen species), NO(nitric oxide)와 TNF- α , IL(Interleukin)-6가 감소하였으며, 총콜레스테롤, LDL 콜레스테롤, 체중, 장기무게가 감소하고 HDL콜레스테롤은 증가하였으며, 혈당이 감소하고 혈청 내 인슐린생성량은

증가하는 결과를 확인했으며 항산화, 항염증, 항당뇨, 항고지혈효과가 있음이 밝혀졌다. 현재 대전대학교 한방병원에서 캡슐제제로 개발되어 임상에서 활발하게 사용되고 있다.⁹⁾ 청혈플러스를 구성하는 약재들의 최근 연구를 살펴보면, 인진호는 RAW274.7 세포에 대하여 항염증, 항산화 효과를 나타냈다.²⁵⁾ 울금은 Streptozotocin으로 유도된 당뇨병 mouse 모델에서 울금을 섭취하게 한 경우 혈청 총콜레스테롤, LDL-C를 비롯한 동맥경화지수, 심장 위험인자가 유의하게 감소하였으며 전해질 불균형을 조절하고 혈당을 낮추는 등 혈당 및 지질대사 기능 개선에 유의한 효과가 있음이 보고되었다.^{26,27)} 산사는 고지방식을 통해 고지혈증이 유발된 mouse 모델에 산사 경구투여했을 때 중성지방과 장기무게는 감소시키고 HDL-C는 증가시키는 항고지혈증 효과가 확인되었다.²⁸⁾ 단삼은 ROS, I-NOS, COX(Cyclo-oxygenase)-2의 발현을 억제하는 항산화 및 항염증효과의 효과가 있는 것으로 확인되었다.²⁹⁾ 또한 Zhang J 등³⁰⁾은 단삼과 산사의 조합이 항염증효과가 있고, 혈중 총콜레스테롤, 중성지방, LDL-C를 감소시키며 HDL-C를 증가시키고 내피를 보호함으로써 죽상경화증을 억제하는 효과가 있음을 보고하였다.

산수유(山茱萸, *Cornus officinalis* Siebold & Zucc.)는 산수유나무의 과실로 10월경 길이 1.5cm~2cm의 핵과가 열리면 이를 수확하여 씨를 제거하고 햇빛에 건조시켜 약용으로 사용한다.¹⁰⁾ 산수유의 항염증 효과와 관련된 최신의 연구에 따르면 mouse 대식세포인 RAW 264.7 세포를 사용하여 산수유 추출물의 항염증효과를 확인한 결과 NO, PGE2 와 염증성 사이토카인의 생성을 유의하게 억제하였고, TNF- α 와 IL-1, IL- β 의 생성 또한 유의하게 억제하여, 뛰어난 항염증효과가 확인되었다.¹³⁾

본 실험에서는 산수유추출물(CE)과 청혈플러스에 산수유를 가미한 산수유청혈플러스(CCP)가 인간 제대정맥 내피세포에 미치는 항염증효과를 확인하고자 실험을 진행하였다. 먼저 HUVEC에 산수유청혈플러

스(CCP)를 농도별로 전처리한 뒤, TNF- α 를 추가하여 염증반응을 유도하였다. 또한 측정인자들의 변화가 산수유에서 기인한 것인지, 산수유청혈플라스에서 기인한 것인지를 확인하기 위해 산수유추출물(CE) 단일농도를 이용하여 동일과정을 진행하였다. 배양 종료 후 원심분리하여 얻은 세포에서 KLF2, eNOS, MCP-1과 VCAM-1, ICAM-1의 유전자 및 단백질 발현량을 측정하였으며, 상등액에서 VCAM-1, ICAM-1 및 MCP-1의 바이오마커 생성량을 측정하였다.

HUVEC은 사람의 제대정맥에서 유래한 혈관내피세포로, 혈관내피는 세포성장, 세포외기질 침착, 혈관조절, 염증반응 조절 등을 통하여 혈관 항상성을 유지하는 역할을 한다. 이에 혈관내피의 변화는 심혈관연구에서 혈관병변의 진행을 지연시키거나 예방하기 위한 연구의 주요 대상으로 활용된다.^{31,32)}

KLF2는 세포성장, 분화, 사멸 등에 관여하는 전사인자로, 이상지질혈증과 심혈관질환의 치료물질로 사용되는 스타틴이 KLF2 기전을 통해 T세포의 병적인 작용과 염증반응을 감소시키며 hemeoxygenase-1을 유도하여 혈관내피세포의 산화적 손상을 방지함이 보고된 바 있다.³³⁾ 내피세포에 존재하는 KLF2은 VCAM-1·ICAM-1·E-selectin 등 혈관부착인자와 eNOS 발현을 조절하는 역할을 하며, 내피 증식·혈관 신생·혈관긴장도에 관여하여 염증반응을 차단한다.³⁴⁾

eNOS는 NO를 만드는 NOS(nitric oxide synthases)의 isotype으로, NOS는 NOS-I (nNOS, neuronal NOS), NOS-II (iNOS, inducible NOS), NOS-III (eNOS, endothelial NOS)라는 3 종류의 isotype이 있는 것으로 알려져 있다. NOS-I (nNOS), NOS-III (eNOS)은 항상 발현되어 있어 constitutive NOS (cNOS)로 통칭한다. eNOS은 혈소판 응집억제기능, 해면체이완기능이 있으며, 혈관긴장유지, 혈관신생, 평활근 증식조절에 관여하여 염증을 억제하는 기능이 있다.^{35,36)} 실험결과, KLF2,eNOS에서 유전자 및

단백질 발현량은 CCP의 모든 농도에서 대조군에 비하여 농도의존적이고 유의성 있는 증가를 보였으며, CE100ug/ml에서도 유의성있는 증가가 나타났다. 이는CE, CCP가 혈관내피세포에서 항염증효과가 있음을 시사한다.

MCP-1(Monocyte chemoattractant protein-1)은 케모카인의 한 종류로, 단핵구를 혈관내피세포로 이동시키며 염증반응을 유도한다. 그 뒤 단핵구는 ICAM-1, VCAM-1 등의 부착인자에 의해 혈관내피에 부착하며 대식세포로 분화한다. 혈관 내에 있던 평활근세포는 전염증성사이토카인과 성장인자의 영향으로 내막으로 이동 및 증식하게 되는데 이러한 과정이 반복되면서 죽상경화성 플라크가 형성된다. 최근 연구로 MCP-1은 신종 코로나 바이러스, 암, 류마티스 관절염, 심혈관 질환 등 다양한 질병의 발병기전에 직간접적으로 관여함이 밝혀졌다.³⁷⁾ 실험결과, MCP-1, ICAM-1, VCAM-1에서 세포 내 유전자, 단백질 발현량과 세포 외 바이오마커 생성량은 CCP의 모든 농도에서 대조군에 비하여 농도의존적이고, 유의성 있는 감소가 나타났으며, CE100ug/ml에서도 유의성있는 감소가 나타났다. 이는 CE와 CCP가 혈관 내 항염증 효과가 있음을 시사한다.

MAPKs(Mitogen activated protein kinases)는 serine/threonine protein kinases로 세포의 증식, 분화, 세포사멸사 뿐만 아니라 염증과 관련된 세포활동을 조절하는 것으로 알려져 있으며 ERK, JNK, p38가 여기에 포함된다. MAPKs는 산화, 삼투압 스트레스 등의 세포스트레스와 TNF- α 및 IL- β 와 같은 전염증성 사이토카인에 의해서 활성화되어 염증 매개물질을 생성한다.^{38,39)} 실험결과, CE 100ug/ml는 p38의 발현량, CCP 100ug/ml는 ERK의 발현량, CCP 200ug/ml p38와 ERK의 발현량, CCP 400 ug/ml은 ERK, JNK, p38의 발현량을 유의하게 감소시키는 것이 확인되었으며, 이는 각각의 농도에서 CE, CCP는 항염증효과가 있음을 입증할 수 있다.

실험 결과에서 주목해야 할 부분으로 먼저 CE

100ug/ml와 CCP 100, 200, 400ug/ml에서의 효능을 비교 해 보면, CCP 400ug/ml의 경우에서만 모든 조건의 실험에서 유의미한 결과를 얻을 수 있었다. 또한 ICAM-1 단백질 발현량의 경우 CE 100ug/ml에서는 78%, CCP 400ug/ml에서 65%가 감소하였는데 이러한 경우를 제외하고, CE 100ug/ml보다 CCP 400ug/ml에서 염증관련지표의 변화 폭이 컸다. 그 다음으로, 동일한 농도에서의 CE와 CCP를 비교해 보면 KLF2, eNOS, ICAM-1의 모든 지표와 VCAM-1 유전자발현량, p38 단백질발현량에서 CE 100ug/ml이 CCP 100ug/ml보다 염증관련지표를 더 효과적으로 변화시켰다. 반면 MCP의 모든 지표와 VCAM-1 단백질 발현량, 바이오마커 생성량에서 CCP 100ug/ml이 CE 100ug/ml보다 염증관련지표를 더 효과적으로 변화시켰다. ERK, JNK의 경우 CE 100ug/ml, CCP 100 ug/ml모두 유의한 결과가 나타나지 않았다. 따라서 추후 CCP 관련 후속연구는 CCP 400ug/ml를 기준으로 진행되는 것이 바람직하며, CE 200,400ug/ml 와의 효능비교 및 약재 구성 비율에 따른 효능비교에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다. 추가적으로 본 연구는 세포 수준에서 진행되었으며, 양성대조군을 설정하지 않아 항염증효과가 있는 청혈플러스를 비롯한 기존의 타 약제와의 비교우위를 확인하지 못하였다. 이에 해당 내용을 보강하며 양성대조군 설정, 동물 대상 실험의 추가적인 연구를 통해 이상지질혈증 및 죽상경화증에 대한 본 약물의 효과를 명확히 밝힐 필요가 있다고 사료된다.

본 실험을 통하여 산수유(CE)와 산수유청혈플러스(CCP)는 KLF2, eNOS 생성을 유의하게 증가시키며 MCP-1, ICAM-1, VCAM-1, JNK, ER K, p38의 발현량을 유의하게 감소시키므로 항염증효과가 있음을 알 수 있다. 또한 이상지질혈증으로 인한 혈관 내 염증이 죽상경화증을 비롯한 심뇌혈관계 질환을 발생시키는 점을 미루어 보아 산수유와 산수유청혈플러스는 이상지질혈증으로 인한 심뇌혈관계 질환의 치료 약물에서 치료 및 예방으로 변경 약물로서

의 가능성이 있다고 사료된다.

결론

인간 제대정맥 내피세포에서 산수유(CE)와 산수유청혈플러스(CCP)의 항염증효과를 확인하고자 실험을 진행한 결과, 아래의 결론을 얻었다.

1. CE 100ug/ml는 KLF2, eNOS의 유전자 및 단백질 발현량을 대조군에 비해 유의하게 증가시켰다. 또한 CE 100ug/ml는 MCP-1 및 ICAM-1, VCAM-1의 유전자, 단백질 발현량과 세포 외 바이오마커 생산량을 대조군에 비해 유의하게 감소시켰으며, p38 단백질 발현량을 대조군에 비해 유의하게 감소시켰다.
2. CCP는 100ug/ml 이상의 농도에서 KLF2, eNOS의 유전자 및 단백질 발현량을 대조군에 비해 유의하게 증가시켰다. 또한 CCP는 100ug/ml 이상의 농도에서 MCP-1 및 ICAM-1, VCAM-1의 유전자, 단백질 발현량과 세포외 바이오마커 생산량을 대조군에 비해 유의하게 감소시켰으며, CCP는 100ug/ml 이상의 농도에서 ERK 단백질 발현량을 대조군에 비해 유의하게 감소시켰으며, 200ug/ml 이상의 농도에서 p38 단백질 발현량을 대조군에 비해 유의하게 감소시켰고, 400ug/ml의 농도에서 JNK 단백질 발현량을 대조군에 비해 유의하게 감소시켰다.

본 연구를 통하여 산수유와 산수유청혈플러스의 인간 제대정맥 내피세포에서의 항염증효과를 확인하였다. 이상지질혈증으로 인한 혈관 내 염증은 죽상경화증을 비롯한 심뇌혈관계 질환을 발생시키는 요인이 되므로, 산수유와 산수유청혈플러스는 심뇌혈관계 질환의 예방 및 치료에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Oh BH. (2003). New Concepts in the pathogenesis and Progression of Atherosclerosis. Medical postgraduates, 31(4), 179-183.
2. Statistics Korea. (2021). 2020 Death statistics : Korea. Korea development institute. Available from: URL: http://kostat.go.kr/portal/korea/kor_nw/1/6/2/index.board?bmode=read&bSeq=&aSeq=403046&pageNo=1&rowNum=10&navCount=10&currPg=&searchInfo=&sTarget=title&sTxt=
3. Jeong HS. (2019). Risks and Management of Dyslipidemia. Public health weekly report. 2019; 12(37): 1416-1211. Available from: URL: https://www.kdca.go.kr/board/board.es?mid=a20602010000&bid=0034&list_no=364839&act=view
4. Bae JH, Park JS, Hond GR, Shin DG, Kim YJ, Shim BS. (2008). Correlation between inflammatory markers and the progression of atherosclerosis in patients with coronary artery disease. The Korean Journal of Medicine, 74(1), 51-58.
5. Stenvinkel P. (2003). Interactions between inflammation, oxidative stress, and endothelial dysfunction in end-stage renal disease. J Ren Nutr, 13(2), 144-148. <https://doi.org/10.1053/jren.2003.50018>.
6. Wolf D, Ley K. (2019). Immunity and Inflammation in Atherosclerosis. Circ Res, 124(2), 315-327. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.118.313591>.
7. Glass CK, Witztum JL. (2001). Atherosclerosis. The road ahead. Cell, 104(4), 503-516. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(01\)00238-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(01)00238-0).
8. Seo DH, Joo IH, Kim DH. (2018). Effect of ChungHuyi-Plus on inflammatory factors in Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs). J Haehwa Medicine, 27(2), 11-20.
9. Oh JM, Cho HK, Yoo HR, Kim YS, Seol IC. (2016). A Case Report of the Beneficial Effects of Chunghyul-Plus in Dyslipidemia Patients. The Journal of the Society of Stroke on Korean Medicine, 17(1), 55-66.
10. Park EB, Kim HS, Shin SY, Ji IA, Kim JH, Kim SG, et al. (2021). Antioxidative Activity of Cornus officinalis Extracts Obtained by Four Different Extraction Techniques. Journal of Life Science, 22(11), 1507-1514. <http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2012.22.11.1507>
11. Kim YJ and Son DY. (2016). Antioxidant activity and suppression of pro-inflammatory mediator of Corni fructus extracts in activated. Korean J Food Preserv, 23(6), 876-882. <https://doi.org/10.11002/kjfp.2016.23.6.876>.
12. Shin JH, Cha GY, Kim HJ, Hwang JH, Han KH, Seo HJ, et al. (2009). Examination of Anti-Obesity Effect of Regional Special Natural Products of Anthrisci radix, Psoraleaesemen, Siegesbeckiae herba and Corni fructus. KSBB Journal, 24(6), 549-555.
13. Yamabe N, Noh JS, Park CH, Kang KS, Shibahara N, Tanaka T, et al. (2010). Evaluation of loganin, iridoid glycoside from Corni Fructus, on hepatic and renal glucolipotoxicity and inflammation in type 2 diabetic db/db mice. European Journal of Pharmacology, 648(13), 179-187. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.08.044>. Epub 2010 Sep 15.
14. Jiang ZQ, Li Y, Jiang LH, Gu H, Wang MY. (2013). Hepatoprotective effects of extracts from processed corni fructus against

- D-galactose-induced liver injury in mice. *Zhong Yao Cai*, 36(1), 85-89.
15. Ross R. (1993). The pathogenesis of atherosclerosis: A perspective for the 1990s. *Nature*. 362(6423), 801-809. <https://doi.org/10.1038/362801a0>.
16. Committee of Clinical Practice Guideline of the Korean Society of Lipid and Atherosclerosis (KSoLA). (2018). Korean Guidelines for the Management of Dyslipidemia 4th ed. Seoul. 31-44.
17. Li JJ, Fang CH. (2004). Atheroscleritis is a more rational term for the pathological entity currently known as atherosclerosis. *Med Hypotheses*, 63(1), 100-102. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2004.01.029>.
19. Bergheanu SC, Bodde MC, Jukema JW. (2017). Pathophysiology and treatment of atherosclerosis. *Neth Heart J*, 25(4), 231-242. <https://doi.org/10.1007/s12471-017-0959-2>.
19. Yang YK. (1991). *Hwangjenegyung-yuckhe*. Seoul: Iljoong-sa.
20. Yang JH, Yoo HR, Kim YS, Seol IC. (2021). The Effect of *Lonicera Japonica* Thunberg on Inflammatory Factor Expression Associated with Atherosclerosis. *Korean J. Orient. Int. Med*, 42(1), 25-39. <https://doi.org/10.22246/jikm.2021.42.1.25>.
21. Do HJ, Kim KH, Oh TW. (2020). Anti-hyperlipidemic Effects of *Scutellariae Radix*, *Aucklandiae Radix* and *Bupleuri Radix* (SAB) extract in FL83B cells. *Kor. J. Herbol*, 35(5): 23-31. <https://doi.org/10.6116/kjh.2020.35.5.23>.
22. Han BH, Yoon JJ, Kim HY, Ahn YM, Hong MH, Son CO, et al. (2018). Inhibitory Effects of Ojeoksan on TNF- α -induced Vascular Inflammation in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Kor. J. Herbol*, 33(4), 59-67. <https://doi.org/10.6116/kjh.2018.33.4.59>.
23. Lee KW, Cho HK, Yoo HR, Seol IC. (2018). The Effects of an Extract of Fermented *Artemisiae Iwayomogii Herba*, *Curcumae Longae*, *Crataegi Fructus* and *Salviae Miltiorrhizae Radix* on Anti-inflammation Associated with Dyslipidemia and Anti-oxidation in RAW264.7 and HUVEC Cells. *J. Int. Korean Med*, 39(4), 480-494. <https://doi.org/10.22246/jikm.2018.39.4.480>.
24. Choi KE, Seol IC, Kim YS, Jo HK, Yoo HR. (2016). Hypolipidemic and Anti-oxidant Effects of *Chunghyl Plus* in Type II Diabetic Mice Model. *J Physiol & Pathol Korean Med*, 30(3), 164-176. <https://doi.org/10.15188/kjopp.2016.06.30.3.164>
25. Lee JH, Jang HJ, Kim KS, Yang HJ, Lee JY, Na YC, et al. (2014). Effects of β -sitosterol derived from *Artemisia capillaris* on the activated human hepatic stellate cells and dimethylnitrosamine-induced mouse liver fibrosis. *BMC Complement Altern Med*, 14(363), 1-10. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-14-363>.
26. Oh DY, Kang DS, Lee YG, Kim HS. (2019). Effects of Turmeric (*Curcuma longa* L.) on Blood Glucose and Lipid Metabolism Functional Improvement in STZ-induced Diabetic rats. *J Environmental Science International*, 28(5), 485-494. <https://doi.org/10.5322/JESI.2019.28.5.485>.
27. Oh DY, Kim HS. (2019). Evaluation of Oxidation Inhibition and Nitrogen Oxide Scavenging Activity from *Curcuma longa* L.

- Extracts. *J Kor. applied science and technology*, 36(1), 13-22. <https://doi.org/10.12925/jkocs.2019.36.1.13>
28. Kwon SH, Kim JB. (2010). Effects of *Crataegii Fructus* on the Diet-induced Hyperlipidemia in Rats. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology*, 24(1), 67-73.
 29. Lee SE, Cho SI. (2015). Anti-inflammatory effects of *Salviae Miltiorrhizae Radix* extract on RAW264.7 cell. via anti-oxidative activities. *Kor. J. Herbol*, 30(4), 89-94. <http://dx.doi.org/10.6116/kjh.2015.30.4.89>.
 30. Zhang J, Liang R, Wang L, Yang B. (2019). Effects and mechanisms of Danshen-Shanzha herb-pair for atherosclerosis treatment using network pharmacology and experimental pharmacology. *J Ethnopharmacol*, 2019, 229(1), 104-114. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.10.004>.
 31. Packard RRS, Libby P. (2008). Inflammation in atherosclerosis: from vascular biology to biomarker discovery and risk prediction. *Clin Chem*, 54(1), 24-38. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2007.097360>.
 32. Onat D, Brillon D, Colombo PC, Colombo PC, Schmidt AM. (2011). Human Vascular Endothelial Cells: A Model System for Studying Vascular Inflammation in Diabetes and Atherosclerosis. *Curr Diab Rep*, 11(3), 193-202. <https://doi.org/10.1007/s11892-011-0182-2>.
 33. Bu D, Tarrío M, Grabie N, Zhang Y, Yamazaki H, Stavrakis G, et al. (2010). Statin-induced Kruppel-like factor 2 expression in human and mouse T cells reduces inflammatory and pathogenic responses. *J Clin Invest*, 120(6), 1961-1970. <https://doi.org/10.1172/JCI41384>. Epub 2010 May 3.
 34. Boon RA, Horrevoets AJ. (2009). Key transcriptional regulators of the vasoprotective effects of shear stress. *Hamostaseologie*, 29(1), 39-43.
 35. Yim CY. (2010). Nitric oxide and cancer. *Korean J Med*, 78(4), 430-436.
 36. Shin JJ, Lee SY, Lee SH, Lee SH, Suh JK, Cho JY, et al. (1996). The Role and Localization of Nitric Oxide Synthase in Neurogenic Inflammation of the Rat Airways. *Tuberculosis and Respiratory disease*, 43(3), 420-432. <https://doi.org/10.4046/trd.1996.43.3.420>.
 37. Ramji DP, Davies TS. (2015). Cytokines in atherosclerosis: Key players in all stages of disease and promising therapeutic targets. *Cytokine Growth Factor Rev*, 26(6), 673-685. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2015.04.003>. Epub 2015 May 12.
 38. Kim EK, Choi EJ. (2015). Compromised MAPK signaling in human diseases: an update. *Arch Toxicol*, 89(6), 867-882. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1472-2>. Epub 2015 Feb 18.
 39. Ryu IH, Cho HB, Kim SB, Seo YJ. (2011). The inhibitory effect of *Picrasmae Lignum* on inflammatory responses. *J Kor. Medicine Obstetrics and Gynecology*, 24(1), 1-14. <https://doi.org/10.15204/jkobgy.2011.24.1.001>.

ORCID

김정희 <https://orcid.org/0000-0001-9283-3357>

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

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

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