

加味逍遙散이 脂蛋白酸化에 따른 RAW 264.7 活性에 미치는 影響

황 귀 서
경원대학교 한의과대학

Effects of Gamisoyosan(GS) on LDL Oxidation in RAW 264.7 Cell.

Gwi-Seo Hwang

College of Oriental Medicine, Kyungwon University, 461-701, Korea.

The oxidative modification of low density lipoprotein(LDL) has been implicated in the development of atherosclerosis. Oxidized LDL are found in macrophage foam cell, and it can induce an macrophage proliferation in atherosclerotic plaque. In this study, we investigated the hypothesis that gamisoyosan(GS) may reduce atherosclerosis by lowering the oxidizability of LDL. To achive this goal, we examined the effect of GS on LDL oxidation, nitric oxide production in mouse macrophage cell line, RAW264.7, and the effect of GS on cupuric sulfate-induced cytotoxicity, LDH release, and macrophage activity. GS inhibited the generation 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, GS activated RAW264.7 cell, and prolonged the survival time, and increased nitric oxide production in Raw 264.7 cells.

Key words: lipoprotein(LDL), RAW264.7 cell, gamisoyosan(GS)

서 론

동맥경화증은 혈관벽에 지방성분이 침착되고, 혈관벽이 비후해져 탄력성을 상실한 상태로 뇌졸중, 심근경색, 신부전등의 합병증을 유발할 수 있다. 사회가 현대화되면서 식생활의 변화는 심혈관계 질환의 발생을 현저히 증가시켰으며, 특히 고지혈증 및 고콜레스테롤혈증, 고혈압, 흡연 등은 동맥경화를 유발하는 3대 위험인자로 잘 알려져 있다. 고지방식 섭취로 인한 고지혈증 중에서 LDL(low density lipoprotein)이 HDL(high density lipoprotein)에 비하여 상대적

으로 우세한 과지질단백질혈증(hyperlipoproteinemia)에서는 관상동맥질환 및 죽상동맥경화(atherosclerosis) 이환율이 매우 높은 것으로 알려져 있다^(1,2). 대부분의 연구자들은 동맥경화를 예방하거나 치료하기 위하여 혈중 콜레스테롤을 억제하고 비수용성인 LDL치를 낮추기 위한 시도를 다양한 방법으로 수행하였다.

최근 연구에 의해, 동맥경화 유발의 가장 중요한 인자로 알려진 LDL은 혈관내피세포와 대식세포에 의해 산화되어 oxLDL로 바뀌어 작용을 시작하는 것으로 보고되었다⁽⁸⁾. 즉, 대식세포나 혈관내피세포에 의해 생성된 oxLDL은 대식

세포의 세포질내 칼슘농도를 높이고 PKC(protein kinase C)의 활성을 증가시킴으로써 GM-CSF(granulocyte macrophage colony stimulating factor)를 유리시킨다. 대식세포로부터 유리된 GM-CSF는 대식세포를 증식시켜 더 많은 oxLDL을 생성하여 혈관벽 침착을 촉진한다^(9,10). 또한, GM-CSF는 혈관내피세포 및 혈관 평활근 세포의 증식을 자극하여 oxLDL의 혈관벽 침착과 함께 혈관벽 비후화를 유발하여 동맥경화를 유발하게 된다. 따라서, LDL의 혈관침착과 혈관세포의 비후화로 인한 동맥경화증을 치료하기 위해서는 대식세포에서 oxLDL의 생성을 억제하는 것이 매우 중요하다고 판단된다. 그러나, 고콜레스테롤혈증과 같이 기존의 알려진 동맥경화 위험인자가 없는 경우에도 동맥경화가 발생할 수 있다고 보고되고 있으며, 동맥경화 위험성을 높일 수 있는 또다른 인자로는 호모시스테인 등이 알려졌다⁽³⁾. 그러나, 동맥경화의 주요 병리현상인 혈관벽 비후에는 혈관내피세포, 혈관 평활근세포와 대식세포, 호중구 세포등의 분열증식 및 상해현상이 관련되어 있으며(4,5), beta-FGF(fibroblast growth factor), TGF-alpha, IL-8과 같은 growth factor와 cytokine등 이들 세포상호간의 활성을 조절한다^(6,7). 이 과정에서 LDL의 산화형이 결정적으로 중요한 역할을 하여 죽상동맥경화의 진행이 촉진된다.

加味逍遙散(GS)은 逍遙散의 疎肝解鬱작용을 강화한 처방으로 한의학적으로는 逍遙散證 實證의 瀉火작용을 통하여 怒氣傷肝, 血少目暗, 肝氣鬱結, 月經不順, 顔面赤熱, 更年期障礙등에 적용할 수 있는 처방으로 알려져 있다⁽¹¹⁾. 실험적으로 확인된 약리작용으로 혈액순환촉진, 스트레스로 인한 뇌 카테콜아민류의 억제작용등이 보고되었다⁽¹²⁾.

본 연구에서는 GS가 동맥경화증에 응용할 수 있는지를 검토하기 위하여 macrophge cell line 인 RAW264.7 cell을 이용하여 oxLDL의 생성에 미치는 영향, nitric acid 생성에 미치는 영향을

평가하였다.

실험방법

1. 실험재료

1) 한약제의 구성

가미소요산(GS) (당귀 6g, 시호 백작약 백출 백복령 각 5g, 목단피 치자 감초 각 3g, 박하 생강 각 2g)은 경원대학교 한방병원에서 기증받아 사용하였으며, 처방구성은 다음과 같다.

2) 한약제 추출 및 시료제조

실험용 처방에 증류수를 넣고 4시간 이상 추출한 후 여과지를 이용하여 여과하였다. 여과액을 감압증류기를 이용하여 농축한 다음 냉동건조기를 이용하여 건조하였다. 경구투여시에는 생리식염수에 녹여 사용하였으며, 조직 배양시에는 배지에 녹인후 멸균 여과하여 사용하였다.

3) 실험동물의 선택 및 사육조건

본 실험에서 사용하는 Spraque-Dawley 랫드(이하 랫드)는 대한바이오링크에서 분양받아 2주이상 실험 사육장 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 사육장은 인공조명설비에 의하여 조명시간을 오전 7:00 부터 오후 7:00 까지 12 시간으로 조절하며, 실내온도는 22℃ 내외, 습도는 60 % 내외로 유지하였다. 공급된 사료는 고품사료를 사용하였으며, 그 조성은 조단백 21 %, 조지방 3.5 %, 조 셀룰로오즈 5.0 %, 무기질 8.0 % 등이다. 급수는 일반 상수도를 사용하였고 사료와 급수는 제한하지 않았다.

2. 실험 방법

1) 혈액의 유리세관 통과능에 미치는 영향 측정

가미소요산 추출시료(이하 GS)를 500mg/kg, 100mg/kg의 용량으로 랫드에 10일간 경구 투여한 다음, heparin 처리한 syringe를 이용하여 채혈하였다. 혈액을 ACD 용액으로 5배 희석한 다

음, 일정한 크기의 유리관을 통과하게 하여 혈류 속도에 미치는 영향을 측정하였다. 기준은 5ml의 희석 혈액이 직경 2mm의 크기를 가진 유리관을 통과하는 데 걸리는 시간을 측정하여 결정하였다.

2) 대식세포의 oxLDL 생성 및 기능에 미치는 영향 측정

(1) 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, 100U/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin을 첨가한 배지를 0.22µm membrane filter로 여과한 다음 사용하였으며, 37°C, 5% CO2 incubator에서 배양하였다. 매주 2-3 회씩 배지를 교환해 주었으며, 계대 배양시는 배지를 제거한 후 trypsin-EDTA(×10)를 가하고, 37°C에서 10분간 방치하여 부착된 세포를 분리하였다. 실험시 사용할 세포는 5×10^5 cells/ml를 24well에 seeding하였고, 세포가 바닥에 잘 부착하도록 배양했다.

(2) 대식세포 LDL 단백질산화에 미치는 영향 측정

대식세포에서 oxLDL 생성시 나타나는 단백질 분해의 정도를 측정하였다. 위에 기술한 방법과 동일한 방법으로 24well에 배양한 세포를 PBS로 2회 세척한 후, 1µg/ml, 10µg/ml 농도의 GS를 배지에 가한 후, 37°C, CO2 incubator에서 8시간동안 배양하였다. 여기에 200µg/ml 농도의 LDL(Sigma Chemical Co.)을 가한 후 90시간 동안 다시 배양하였다. 각 군의 세포를 plate로부터 취하고 초음파로 세포막을 용해시킨 후, 482nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) 대식세포 LDL 지질산화에 미치는 영향 측정

대식세포에 의한 oxLDL 생성시 나타나는 지

질분해의 정도를 측정하였다. (2)에서 기술한 바와 같이 배양한 각 실험군을 plate로부터 취하여 초음파로 세포를 분쇄한 후, 분쇄액 200µl에 동량의 20% TCA(in 0.6M HCl) 용액과 0.1M TBA(in 0.26M Tris buffer) 용액 400µl를 넣어 95°C에서 20분간 반응시켰다. 반응 종결후 2000g에서 5분간 원심분리하고 상층액을 취해 550nm에서 흡광도를 측정하였다.

(4) 대식세포 Nitric Oxide 생성능 측정

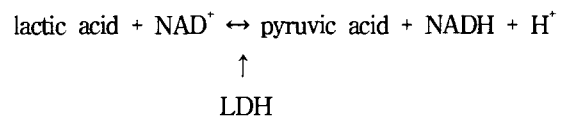
위에 기술한 것과 동일한 방법으로 LDL를 투여한 후 90시간 배양하고 실험군에서 배지 상층액을 취하였다. NaNO2 용액의 연속적인 희석액을 만들어 최종농도가 0.05µM가 되도록 조절하였다. 먼저 얻은 세포 배양액과 NaNO2 희석액에 동량의 Greiss reagent solution을 넣고, 15분간 상온에 방치한 다음 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

(5) 대식세포 생존능에 미치는 영향 측정

RAW 264.7 세포를 24 well에 분주하고 5시간 동안 배양하여 부착시킨 후, 1ug/ml, 10ug/ml 농도의 GS를 첨가하였다. 7시간 배양한 다음 5µM CuSO4에 20시간 노출시켰다. PBS로 희석한 MTT용액 50µl를 첨가하고 다시 4시간 배양하였다. 상층액을 제거하고 50 µl DMSO를 첨가한 다음 650nm에서 흡광도를 측정하였다.

(6) LDH 유리에 미치는 영향 측정

LDL을 첨가한 대식세포를 5µM CuSO4에 20시간 노출시킨 다음, 먼저 상등액을 취하여 배지로 누출된 LDH 양을 LDH kit (LDH/LD , Sigma No .500)로 측정하였다. 세포내에 존재하는 LDH 양은 lysis buffer(50mM Tris/5mM EDTA)를 500µl 넣고 초음파를 사용하여 세포막을 용해시킨 다음, LDH kit를 사용하여 측정하였다. LDH kit의 반응 원리는 다음과 같다.



대식세포로부터 유리된 LDH의 백분율은 다음의

공식을 사용하여 결정하였다.

$$\text{Release (\%)} = \frac{\text{LDH activity in medium X 100}}{\text{LDH activity in medium + LDH activity in cell lysate}}$$

(7) 대식세포 활성화에 미치는 영향 측정

대식세포의 활성화여부를 알아보기 위하여 Suzuki 등 (1989)의 방법에 따라 활성화된 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 조정 한 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. 6번과 동일한 방법으로 5 μM CuSO4에 20시간 노출시킨 다음, 상등액을 취하여 실시하였다. 0.1% Triton X-100을 100 μl를 가한 다음 0.02 M p-nitrophenyl phosphatase/ 0.1 M citrate buffer (pH 5.0)를 0.5 ml 가해 37°C , 5% CO2 배양기에서 1시간 반응시킨 후 1500 rpm에서 5분간 원심분리 후 얻은 상등액에 4°C상에서 0.2 M borate buffer (pH 9.8) 1ml씩을 가하여 반응을 종결시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였으며 대식 세포의 활성은 다음 식에 따라 계산하였다. Acid phosphatase activity (p-nitrophenyl phosphatase μmol/ 10⁶ macrophage/60 mins) = 1.15 × O . D. at 405 nm

실험 결과

1. 혈액의 유리세관 통과속도에 미치는 영향

정맥혈전의 혈류속도가 저하되어 혈액이 혈관과 부착되는 능력에 따라 혈전이 유발될 수 있

다. 이는 혈액성분의 변화에 따른 점조도의 크기에 따라 증가될 수 있으며, 혈구세포의 상호작용에 따라 변화할 수 있다. Fig.1은 filtration rate에 대한 in vitro 실험의 결과를 나타낸 그림이다. Fig.1는 in vivo 실험 결과이다. GSE를 500mg/kg의 용량으로 투여한 경우, 89.02 ± 4.18 ml/min 로서 약물을 투여하지 않은 랫드에서 얻은 혈액의 78.63 ± 4.52 ml/min에 비해 유의적인 증가를 보였다. 100mg/kg을 투여한 경우는 83.09 ± 5.74 ml/min으로서 약물을 투여하지 않은 혈액에 증가하는 경향을 나타내었다.

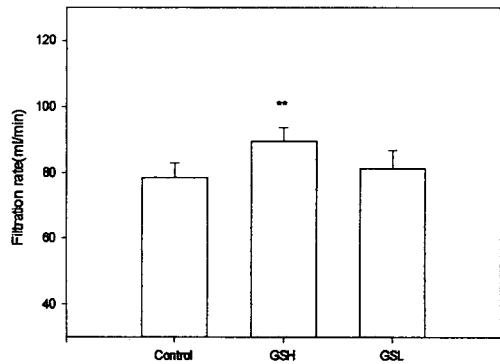


Fig. 1. Effects of GS on the filtration rate of whole blood in vivo.

Filtration rate was measured with 20% whole blood suspension in Tris-NaCl buffer. Each was incubated at 37C for 5 min.

Control: non treated group

GSH: GS treated group (500mg/kg, P.O.)

GSL: GS treated group (100mg/kg, P.O.)

** : p<0.01 vs

2. 대식세포 LDL 지질산화에 미치는 영향

native LDL을 산화시키는 유도제인 murine macrophage -like RAW 264.7 cell의 활성을 대식작용의 결과, 분해되어 유리되는 MDA 양으로 간접적으로 측정하였다. 대조군에 비해 10 μg/ml 농도의 GS시료군에서 MDA 수치가 감소하여 지질단백의 산화반응이 억제되는 것을 나타내었다.

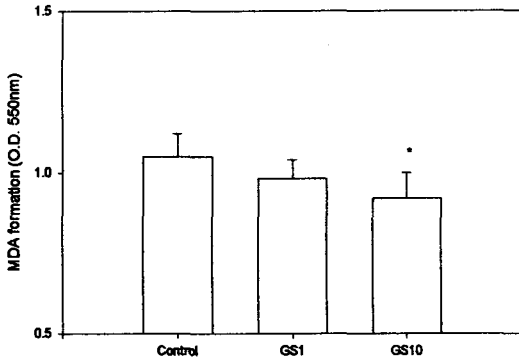


Fig. 2. Effect of GS on oxidized LDL formation in murine macrophage-like RAW 264.7 cells..

MDA was measured in RAW 264.7 cells incubated with native LDL for 90hrs.

Control: vehicle
 GS1: 1 μ g/ml of GS
 GS10: 10 μ g/ml of GS
 *: p<0.05 vs control

3. 대식세포 LDL중의 단백질 산화에 미치는 영향

1 μ g/ml, 10 μ g/ml 농도의 GS시료를 미리 투여한 다음, 90시간 동안 LDL과 함께 배양하여 산화되지 않고 남아있는 단백질의 양을 482nm 흡광도를 이용하여 측정하였다. 10 μ g/ml 농도의 GS시료를 미리 투여한 실험군의 경우, 시약을 처리하지 않고 LDL에 노출시킨 대조군의 결과와 비교해 볼 때, 남아 있는 LDL 양이 유의적으로 증가하였다. 따라서, GS시료는 10 μ g/ml 농도에서 LDL을 취하여 nLDL을 oxLDL로 변화시키는 대식세포의 활성을 억제하였다.

4. 대식세포 Nitric Oxide 생성능에 미치는 영향

혈관을 확장하는 stimulator이며, 혈소판 응집 저해제인 NO(Nitric oxide)의 양을 nitrite의 양으로 간접적으로 측정하였다. LDL과 함께 투여

한 후, 시료가 대식세포의 nitrite 분비에 어떠한 영향을 미치는지 알아 본 결과, 대조군에 비해 GS 1 μ g/ml를 미리 투여한 시료투여군의 경우, 유의적으로 nitrite의 양이 증가하였다.

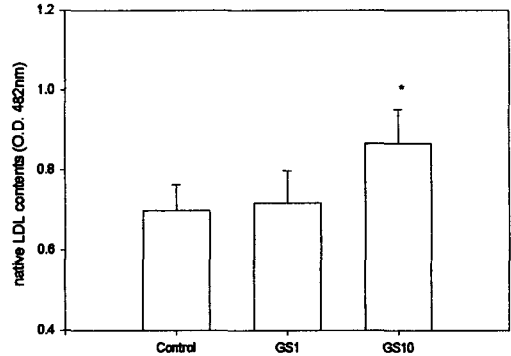


Fig. 3. Effect of GS on oxidized LDL formation in RAW264.7 cells.

Remained native protein was measured in RAW 264.7 cells incubated with native LDL for 90hrs.

Control: vehicle
 GS1: 1 μ g/ml of GS
 GS10: 10 μ g/ml of GS
 *: p<0.05 vs control

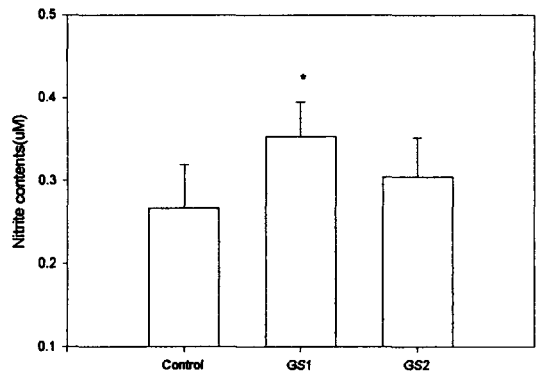


Fig.4. Effect of GS on nitric oxide formation in RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells incubated with native LDL for 90hrs.

Control: vehicle GS1: 1 μ g/ml of GS
 GS10: 10 μ g/ml of GS
 *: p<0.05 vs control

5. 대식세포 생존능에 미치는 영향

5μM CuSO4로 세포에 손상을 가하여 일어난 세포손해를 MTT assay로 측정하였다. 실험 결과, 1μg/ml, 10μg/ml 농도의 시료투여군에서 모두 cell survival rate을 증가시켜 세포손상이 억제됨이 확인되었다.

Table 1. The survival rate of RAW264.7 cell from different groups incubated with CuSO for 20 hrs.

| | O.D value (650nm) | Survival rate (%) |
|------------|-------------------|-------------------|
| Control | 1.00±0.08 | 100.0 |
| GS 1ug/ml | 1.22±0.01 | 122.0±1.99* |
| GS 10ug/ml | 1.44±0.18 | 143.6±10.5* |

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

6. LDH 유리에 미치는 영향

LDL을 첨가한 RAW264.7 cell을 5μM CuSO4에 20시간 노출시켜 손상을 유도한 후, 손상된 세포로부터 배지에 유출되는 LDH 활성을 측정하였다. 실험 결과, GS시료는 실험에 사용한 모든 농도에서 유의적 (p<0.01)으로 LDH 누출을 억제하였다.

7. 대식세포 활성화에 미치는 영향

5μM CuSO4에 노출시켜 산화형 지단백으로 손상시킨 RAW 264.7 cell에 대한 시료의 효과를 살펴보았다. 대조군과 비교하여 10μg/ml 농도의 GS시료군의 acid phosphatase activity가 증가하여 GS시료가 10μg/ml 농도에서 과산화 기질로 손상된 세포의 활성을 회복시켰다.

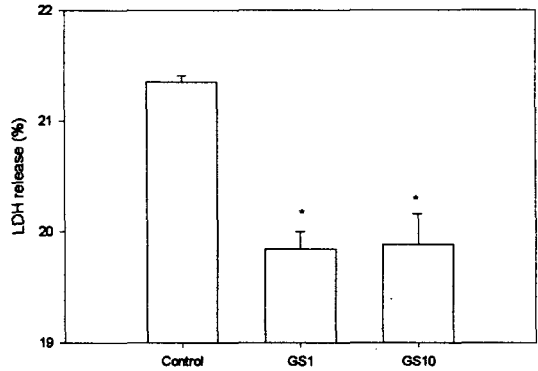


Fig. 6. Effect of GS on CuSO4-induced LDH release from murine macrophage-like RAW 264.7 cells.

RAW 264 cells were incubated with 1, 10 μg/ml GS in the presence of 5μM CuSO4.

Control: CuSO4 only

GS1: 1ug/ml of GS + CuSO4

GS10: 10ug/ml of GS + CuSO4

* p< 0.01 vs control

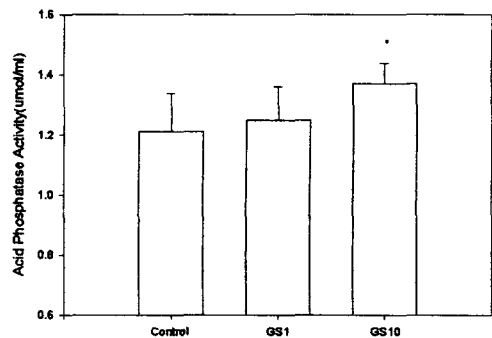


Fig. 7. Effect of GS on acid phosphatase activity in RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were incubated with 1, 10ug/ml of GS in presence of CuSO4.

Control: CuSO4 only

GS1: 1ug/ml of GS + CuSO4

GS10: 10ug/ml of GS + CuSO4

* p< 0.01 vs control

고 찰

혈관벽에 지방성분이 침착되고, 동맥혈관벽이 비후해져 탄력성이 상실된 疾患인 동맥경화증은 뇌졸중, 심근경색, 신부전등의 심각한 심혈관계 질환을 유발할 수 있다. 동맥경화의 원인으로는 고지혈증중 LDL(low density lipoprotein)이 HDL(high density lipoprotein)에 비하여 상대적으로 우세한 과지질단백질혈증(hyperlipoproteinemia)에서는 관상동맥질환 및 죽상동맥경화(atherosclerosis) 이환율이 매우 높은 것으로 알려져 있다(1,2) 죽상동맥경화증은 지방선조(fatty streak)의 초기단계인 거품세포(foam cell)의 형성으로부터 시작된다고 알려져 있다. 이러한 거품세포는 혈중 단핵세포(monocyte)의 콜레스테롤 침착부위에서의 혈관벽 침투와 대식세포로의 분화 및 인지질의 흡수를 통하여 형성되기 시작한다. 이 과정에는 LDL의 흡수와 산화과정도 포함되어 있는데, 산화과정을 통해 형성된 oxLDL에 의하여 대식세포가 혈관벽에 고착하게 된다.

LDL은 대식세포 뿐만아니라 혈관내피세포, 혈관평활근세포, 임파구등에 의해서도 oxLDL로 바뀔 수 있다. 이 과정에는 여러가지 효소적 또는 비효소적 작용이 관여하는데, ceruloplasmin-bound copper, superoxide, NOx, lipoxigenase, myeloperoxidase 등이 중요한 인자로 작용하게 된다. 대식세포나 혈관내피세포에 의해 생성된 oxLDL은 대식세포의 세포질내 칼슘농도를 높이고 PKC(protein kinase C)의 활성을 증가시킴으로서 GM-CSF(granulocyte macrophage colony stimulating factor)를 유리시킨다. 대식세포로부터 유리된 GM-CSF는 대식세포를 증식시켜 더 많은 oxLDL을 생성하여 혈관벽 침착을 촉진한다(9,10). 또한, GM-CSF는 혈관내피세포 및 혈관평활근 세포의 증식을 자극하여 oxLDL의 혈관벽 침착과 함께 혈관벽 비후화를 유발하게 된다. 이와함께 혈관벽 침착세포내에서 형성된

oxLDL의 자가항체가 형성되어 침착된 면역복합체는 염증반응을 유발하여 혈관벽이 파열될 수도 있으며, 이러한 경우 심각한 병증으로 악화된다.

LDL이 copper ion에 노출되면 LDL중의 apoprotein의 산화 및 분해, 인지질과 스테롤계 화합물의 산화 및 분해가 각각 일어난다. 이러한 변화는 LDL이 혈관내피세포나 대식세포에서와 비슷한 양태로 산화된다. LDL의 산화에는 Apolipoprotein B의 fragmentation, cross-linking, 아미노산 산화와 유도체 형성등의 단백질의 산화 및 분해가 포함되는데, 산화 및 분해정도는 tyrosine, nitrotyrosine, chlorotyrosine, hydroxyleucine과 그들의 이성질체등을 측정하여 평가할 수 있다(17, 18).

본 연구에서는 대식세포의 cell line인 RAW264.7 cell을 배양하면서 LDL을 첨가하여 생성되는 oxLDL양을 측정하기 위한 방법으로 산화하여 분해되고 남은 단백질량을 측정하였다. 실험결과, GS는 RAW264.7 cell oxLDL 생성과정에서 일어나는 단백질 산화를 현저히 억제하는 결과를 나타내었다. 한편, RAW264.7 cell의 oxLDL 생성능 측정의 또다른 방법으로 LDL내의 인지질의 산화 및 분해를 측정하였으며, 지표로서 지질과산화 결과 생성되는 MDA를 측정하였다. 실험결과, GS는 LDL을 첨가한 RAW264.7 cell로부터 생성되는 oxLDL의 지표인 지질과산화를 현저히 억제하였다. 따라서, GS는 RAW264.7 cell의 oxLDL 생성능을 억제하여 혈관벽에 지질침착 및 혈관 비후화, 면역복합체 형성으로 나타나는 염증반응 결과 유발되는 혈관 파열등을 억제할 수 있을 것으로 추측되었다.

Nitrite 및 nitrate는 nitric oxide(NO)의 대사산물로 endothelial cell이나 macrophage cell로부터 생성된다. NO는 비교적 안정적인 자유기로 정상적인 PH에서는 LDL을 산화시킬 수 없다. 그러나, RAW264.7 cell나 혈관내피세포에서 생성된 superoxide와 반응하여 peroxynitrite를 생성

할 수 있으며, 이 반응성이 높은 질소화합물이 LDL로부터 oxLDL 생성을 촉진하여 RAW264.7 cell의 scavenger receptor에 의해 oxLDL이 인지되고 흡수되게 한다(19, 20). 이러한 일련의 과정을 통해 흡수된 cholesterol은 RAW264.7 cell에 의해 축적되며 세포의 사멸과 함께 atherosclerosis의 진행을 촉진한다고 보고되고 있다. 이와다른 NO의 작용으로는 vascular smooth muscle의 이완과 혈소판 응집능 억제, 혈관내피세포에서의 혈관 투과성 억제 및 면역세포등의 혈관점착능 억제가 있으며(13, 14), cGMP 분해효소인 phosphodiesterase의 억제를 통한 fibroblast, lymphocyte 및 smooth muscle cell 증식 억제가 보고되었다(15, 16). Atherosclerosis 진행과정은 혈관에 cholesterol등의 지질이 침착되고 혈관세포의 증식으로 혈관벽 비후가 일어나는 과정을 포함한다. 따라서, 이상의 작용들은 NO가 atherosclerosis의 진행을 억제할 수 있다는 증거로 제시되고 있다. Nitrite 및 nitrate는 nitric oxide(NO)의 대사산물로 endothelial cell이나 macrophage cell로부터 생성되는 nitric oxide의 생성 parameter로서 측정된다(17). 실험결과 GS는 LDL을 처리한 RAW264.7 cell에서 nitrite의 농도를 현저히 증가시키는 것으로 나타났다. 이는 GS가 LDL을 섭취한 RAW264.7 cell에 의해 생성되는 oxLDL에 의해 반응이 자극되는 NOS(nitric oxide synthetase)의 활성을 증가시킨 결과로 보인다. 이러한 결과는 GS가 RAW264.7 cell로부터 oxLDL 생성을 억제하는 결과와 상관성이 있다. 따라서, 본 연구자들은 NO가 atherosclerosis의 진행을 억제하는 작용을 나타낼 것으로 추측하였다.

LDH는 세포손상시 투과성이 증가된 세포막을 통하여 세포로부터 누출되는 세포내의 효소로, LDH의 측정은 세포손상의 정도를 판정하는 기준이 된다. RAW264.7 cell에 대한 oxLDL의 상해작용의 지표로 LDH 유리량을 이용하여 측정

한 결과, GS는 CuSO₄ 로 유도한 oxLDL에 의한 RAW264.7 cell의 LDH 유리를 억제하는 효과를 나타내었다(Fig.6).

이상의 결과들은 GS 자체가 RAW264.7 cell의 기능을 억제할 가능성과 항산화작용을 나타낼 가능성을 시사해 준다. 이러한 가능성을 확인하기 위하여 RAW264.7 cell의 기능활성화에 미치는 영향과 CuSO₄에 의한 RAW264.7 cell의 생존율을 측정하였다. 실험결과, GS는 RAW264.7 cell의 생존율에는 직접적인 영향을 주지 못하였으며, 오히려 RAW264.7 cell의 기능 측정지표인 acid phosphatase의 활성은 증가시켰다. 따라서, GS의 oxLDL 생성 억제작용은 RAW264.7 cell의 세포기능억제를 통한 작용은 아닌 것으로 판단되었다. (Fig.7).

이상의 연구결과, GS는 지질대사 이상으로 인한 동맥경화증의 예방 및 치료에 이용될 가능성이 있다고 사료되었다.

결론

가미소요산(GS)이 macrophage cell line인 RAW264.7 세포의 지단백 산화에 關聯된 인자들에 대한 영향을 평가하였다. 이를 위하여 대식세포에서 oxLDL 생성에 미치는 영향, nitric oxide 생성에 미치는 영향, 대식세포의 활성화에 미치는 영향등을 평가하여 지단백 산화 억제를 통하여 동맥경화증에 응용할 수 있는지 여부를 검토하였다. 실험결과, 가미소요산(GS)은 RAW264.7 cell oxLDL 생성과정에서 일어나는 단백질 산화를 현저히 억제하는 결과를 나타내었다. 또한, RAW264.7 cell의 oxLDL 생성과정에서 생성되는 인지질의 산화 및 분해를 측정하는 지표인 지질 과산화물을 현저히 억제하였다. 따라서, GS는 RAW264.7 cell의 oxLDL 생성능을 억제하여 혈관벽에 지질이 침착하고 혈관의 비후화, 면역복합체 형성등으로 나타나는 염증반응으로 인한 혈관과열등을 억제할 수 있을 것으로 추측되었

다. 이상의 결과가 GS 자체의 RAW264.7 cell 기능억제 효과인지 또는 항산화작용을 통한 효과인지 확인하기 위한 실험결과, GS는 손상된 RAW264.7 cell의 생존율에는 직접적인 영향을 주지 못하였으며, 오히려 RAW264.7 cell의 기능 측정지표인 acid phosphatase의 활성은 증가시켰다.

따라서, 가미소요산(GS)은 대식세포의 oxLDL 형성을 통한 동맥경화증 발현의 예방 및 치료에 이용될 가능성이 있다고 사료되었다.

감사의 말씀

본 연구는 경원대학교 학술연구지원금으로 수행되었기에 감사드립니다.

참고문헌

1. Steinberg D and Witztum J.L.: Lipoproteins and atherosclerosis. Current concepts. JAMA 264, 3047-3052, 1990
2. Kullo K.J., Gau G.T. and Tajik J.: Novel risk factors for atherosclerosis. Mayo Clin Proc 75, 369-380, 2000
3. Tsai W.C., Li Y.H., Tsai L.M., Chao T.H., Lin L.J., Chen T.Y. and Chen J.H.: Correlation of homocysteine levels with the extent of coronary atherosclerosis in patients with low cardiovascular risk profiles. Am J Cardiol 85, 49-52, 2000
4. Sakai M., Kobori S., Miyazaki A. and Horiuchi S.: Macrophage proliferation in atherosclerosis. Curr Opin Lipidol 11, 503-509, 2000
5. Rosenfeld M.E. and Ross R.: Macrophage and smooth muscle proliferation in atherosclerotic lesions of WHHL and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. Atherosclerosis 10, 680-687, 1990
6. Wang N., Tabas I., Wichester R., Ravalli S., Rabbani L.E. and Tall A.: Interleukin-8 is

- induced by cholesterol loading of macrophage and expressed by macrophage foam cells in human atheropma. J Biol Chem, 271, 8837-42, 1996
7. Wang C.Y., Bassul A.G., Boise L.H.: Activation of granulocyte-macrophage colony stimulating factor promotor in T cells requires cooperative binding of Elf-1 and AP-1 transcription factors. Mol Cell Biol 10, 1281-1286, 1990
8. Witztum J.L. and Steinberg D.: Role of oxidized low density lipoprotein in atherosclerosis. J Clin Invest 88, 1785-1792, 1991
9. Chen B.M., Clark C.R. and Chou D.L.: Granulocyte/macrophage colony stimulating factor stimulates monocyte and tissue macrophage proliferation and enhances their responsiveness to macrophage colony stimulating factor. Blood 71, 997-1002, 1988
10. Claus R., Fymys B., Deigner H.P. and Wolf G.: Oxidized low density lipoprotein stimulates protein kinase C (PKC) and induces expression of PKC isotypes via prostaglandin H synthetase in P388D1 macrophage-like cells. Biochemistry 35, 4911-4922, 1996
11. 尹甲用, 東醫方劑斗處方解說, 醫聖堂, p411, 1998
12. G.S. Hwang, K.S. Lee, J.H.Park, Effect of Danchisoyosan on catecholamine level in rat brain applied to immobilization stress. Kor. J. Environ. Toxicol. 13, 143-149, 1998
13. Alheid U., Frolich J.C. and Forstermann U.: Endothelium derived relaxing factor from cultured human endothelial cell inhibits aggregation of human platelets. Throm Res 47, 561-71, 1994
14. Denham S. and Rowland I.J.: Inhibition of the reactive proliferation of lymphocytes by activated macrophages: the role of nitric oxide. Clin Exp Immunol 87, 157-62, 1992
15. Heller R., Bussolino F., Ghigo D., Pescarmona

- G.P., Calvino R., Gasco A., Till U. and Bosia A.: Activation of endothelial guanylate cyclase inhibits cellular reactivity. *Agents Actions* 45, 177-81, 1994
16. Garg U.C. and Hassid A.: Nitric oxide decreases cytosolic free calcium in Balb/c 3T3 fibroblasts by cyclic GMP-dependent mechanism. *Biochem Biophys Res Commun* 171, 474-9, 1990
17. 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
18. 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* 272, 3520, 1997
19. Hazen S.L., Hsu F.F., Duffin K. and Heinecke J.W.: Molecular chlorine generated by the myeloperoxidase-hydrogen peroxide-chlorine system of phagocytes converts low density lipoprotein cholesterol into a family of chlorinated sterols. *J Biol Chem* 271, 23080, 1994