

脂蛋白質酸化에 따른 大食細胞 活性에 미치는 三氣飲의 影響

이희조 · 황귀서* · 김경준
경원대학교 한의과대학 안이비인후피부과학교실
* 경원대학교 한의과대학 예방의학교실

Effects of Samkieum on LDL Oxidation in Macrophage Cell.

Hee-jo Lee · Gwi-seo Hwang · Kyung-jun Kim

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 Samkieum may reduce atherosclerosis by lowering the oxidizability of LDL,

To achieve this goal, we examined the effect of Samkieum on LDL oxidation, nitric oxide production in mouse macrophage cell line, RAW264.7, and the effect of Samkieum on cupric sulfate-induced cytotoxicity, LDH release, and macrophage activity.

Samkieum 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, Samkieum activated RAW264.7 cell, and prolonged the survival time, and increased nitric oxide production in Raw 264.7 cells.

Key words : Samkieum, LDL Oxidation, Macrophage Cell

1. 서 론

동맥경화증은 혈관벽에 지방성분이 침착되고, 혈

관벽이 비후해져 탄력성을 상실한 상태로 뇌졸중, 심근경색, 신부전 등의 합병증을 유발할 수 있다. 고지방식 섭취로 인한 고지혈증 중에서 LDL(low density lipoprotein)이 HDL(high density lipoprotein)에 비하여 상대적으로 우세한 과지질단 백질혈증(hyperlipoproteinemia)에서는 관상동맥질

교신저자 : 김경준, 서울시 송파구 송파동 20-8 경원대학교 부속서울
한방병원 안이비인후피부과
(Tel: 02-425-3456, E-mail: kkjo215@hanmail.net)
• 접수 2006/06/23 • 수정 2006/07/20 • 채택 2006/08/08

환 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^{13,14)}.

LDL은 혈관내피세포와 대식세포에 의해 산화되어 oxLDL로 바뀌어 작용을 시작하는 것으로 보고되었다⁸⁾. 즉, 대식세포나 혈관내피세포에 의해 생성된 oxLDL은 대식세포의 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 혈관평활근 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. 동맥경화 위험성을 높일 수 있는 또다른 인자로는 호모시스테인 등이 알려져 있으며³⁾, 혈관벽 비후에는 혈관내피세포, 혈관 평활근세포와 대식세포, 호중구 세포등의 분열증식 및 상해 현상이 관련되어 있으며^{4,5)}, beta-FGF (fibroblast growth factor), TGF-alpha, IL-8과 같은 growth factor와 cytokine 등이 이들 세포상호간의 활성을 조절한다^{6,7)}. 이 과정에서 LDL의 산화형이 결정적으로 중요한 역할을 하여 죽상동맥경화의 진행이 촉진된다.

三氣飲(Samkieum)은 景岳全書에 新方의 熱陳에 수록된 처방으로 氣血이 虧損한데 風寒濕 三氣가 虛를 타고 침입하여 筋骨歷節痺痛이 심한것과 痢를 한 후에 鶴膝風痛 등의 증상이 있는것을 치료한다¹¹⁾.

본 연구에서는 삼기음이 동맥경화에 미치는 영향

을 관찰하기 위하여 macrophge cell line인 RAW264.7 cell을 이용하여 oxLDL의 생성에 미치는 영향, nitric acid 생성에 미치는 영향을 평가하여 보고하는 바이다.

II. 조사대상 및 방법

1. 재료 및 동물

1) 한약재의 구성

三氣飲은 경원대학교 한방병원에서 제공받아 사용하였으며, 처방의 내용과 용량은 다음과 같다 (Table 1).

Table 1. Contents of Samkieum.

藥物名	생약명	용량(g)
熟地黃	Rehmannia glutinosa	120
杜仲	Eucommia ulmoides	40
牛膝	Achyranthesjaponica	40
當歸	Angelica sinensis	40
枸杞子	Lyciumchinense	40
白茯苓	Angelicae	40
白芍藥	Paeoniae Radix Rubra	40
肉桂	Cinnamomum louern	40
細辛	Asarum heterotropoides	40
白芷	Angelicae Dahuricae Radix	40
炮附子	Aconitum carmichaeli	40
炙甘草	Glyctrrhizae Radix	40
生薑	Zingiber officinale	40
計		600

2) 한약재 추출 및 시료제조

실험용 처방에 증류수를 넣고 4시간 이상 추출한 후 여과지를 이용하여 여과하였다. 여과액을 감압증류기를 이용하여 농축한 다음 냉동건조기를 이

용하여 건조하였다. 경구투여시에는 생리식염수에 녹여 사용하였으며, 조직 배양시에는 배지에 녹인 후 멸균 여과하여 사용하였다.

3) 실험동물의 선택 및 사육조건

본 실험에서 사용하는 Spraque-Dawley 랫드(이하 랫드)는 대한바이오링크에서 분양받아 2 주 이상 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 고택사료를 사용하였으며, 그 조성은 조단백 21 %, 조지방 3.5 %, 조 셀룰로오스 5.0 %, 무기질 8.0 % 등이다. 급수는 일반 상수도를 사용하였고 사료와 급수는 제한하지 않았다.

2. 방법

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℃, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다. 매주 2-3 회씩 배지를 교환해 주었으며, 계대 배양 시는 배지를 제거한 후 trypsin-EDTA(×10)를 가하고, 37℃에서 10분간 방치하여 부착된 세포를 분리하였다. 실험시 사용할 세포는 5 × 10⁵cells/ml를 24well에 seeding하였고, 세포가 바닥에 잘 부착하도록 배양했다.

2) 대식세포 LDL 단백질산화에 미치는 영향 측정

대식세포에서 oxLDL 생성시 나타나는 단백질분해의 정도를 측정하였다. 위에 기술한 방법과 동일한 방법으로 24well에 배양한 세포를 PBS로 2회 세척한 후, 1µg/ml, 10µg/ml 농도의 Samkieum를 배지에 가한 후, 37℃, CO₂ incubator에서 8시간 동안 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 지질분해의 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℃에서 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.

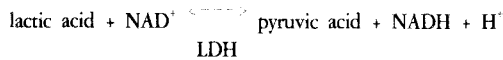
5) 대식세포 생존능에 미치는 영향 측정

RAW 264.7 세포를 24 well에 분주하고 5시간 동안 배양하여 부착시킨 후, 1µg/ml, 10µg/ml 농도의 Samkieum을 첨가하였다. 7시간 배양한 다음 5 µM CuSO₄에 20시간 노출시켰다. PBS로 희석한

MTT용액 50 μ l를 첨가하고 다시 4시간 배양하였다. 상층액을 제거하고 50 μ l DMSO를 첨가한 다음 650nm에서 흡광도를 측정하였다.

6) LDH 유리에 미치는 영향 측정

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



대식세포로부터 유리된 LDH의 백분율은 다음의 공식을 사용하여 결정하였다.

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

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 조정후 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. 6)번과 동일한 방법으로 5 μ M CuSO₄에 20시간 노출시킨 다음, 상층액을 취하여

실시하였다. 0.1% Triton X-100을 100 μ l를 가한 다음 0.02 M p-nitrophenyl phosphatase/ 0.1 M citrate buffer (pH 5.0)를 0.5 ml 가해 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 1시간 반응시킨 후 1500 rpm에서 5분간 원심분리 후 얻은 상층액에 4 $^{\circ}$ 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.

$$\text{Acid phosphatase activity} \\ (\text{p-nitrophenyl phosphatase } \mu\text{mol/ } 10^6 \text{ macrophage/60 mins}) = 1.15 \times \text{O.D. at } 405 \text{ nm}$$

3. 통계처리

통계분석은 student's T-test를 사용하였으며 유의 수준은 0.05로 하였다.

III. 결 과

1. 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 μ g/ml 농도의 Samkieum시료군에서 MDA 수치가 감소하여 지질단백의 산화반응이 억제되는 것을 나타내었다(Fig. 1).

2. 대식세포 LDL중의 단백질 산화에 미치는 영향

1 μ g/ml, 10 μ g/ml 농도의 Samkieum시료를 미리 투여한 다음, 90시간 동안 LDL과 함께 배양하여 산화되지 않고 남아있는 단백질의 양을 482nm 흡광도를 이용하여 측정하였다. 10 μ g/ml 농도의

Samkieum시료를 미리 투여한 실험군의 경우, 시약을 처리하지 않고 LDL에 노출시킨 대조군의 결과와 비교해 볼 때, 남아 있는 LDL 양이 유의적으로 증가하였다. 따라서, Samkieum시료는 10

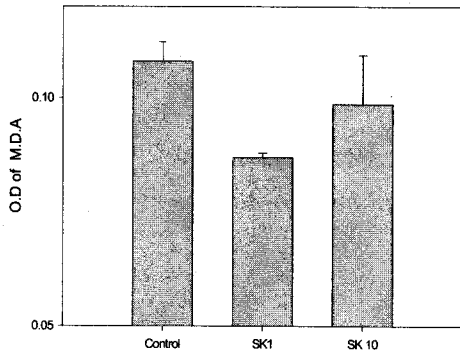


Fig. 1. Effect of Samkieum on oxidized LDL formation in RAW 264.7 cells.

MDA was measured in RAW 264.7 cells incubated with native LDL for 90hrs.
Control; vehicle
SK1; 1 μ g/ml of Samkieum
SK10; 10 μ g/ml of Samkieum
*; p<0.05 vs control

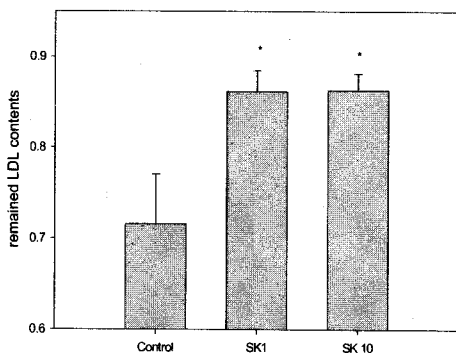


Fig. 2. Effect of Samkieum on Oxidized LDL Formation in RAW264.7 Cells.

Remained native protein was measured in RAW 264.7 cells incubated with native LDL for 90hrs.
Control; vehicle
SK1; 1 μ g/ml of Samkieum
SK10; 10 μ g/ml of Samkieum
*; p<0.05 vs control

μ g/ml 농도에서 LDL을 취하여 nLDL을 oxLDL로 변화시키는 대식세포의 활성을 억제하였다(Fig. 2).

3. 대식세포 Nitric Oxide 생성능에 미치는 영향

혈관을 확장하는 stimulator이며, 혈소판 응집 저해제인 NO(Nitric oxide)의 양을 nitrite의 양으로 간접적으로 측정하였다. LDL과 함께 투여한 후, 시료가 대식세포의 nitrite 분비에 어떠한 영향을 미치는지 알아 본 결과, 대조군에 비해 Samkieum 1 μ g/ml를 미리 투여한 시료투여군의 경우, 유의적으로 nitrite의 양이 증가하였다(Fig. 3).

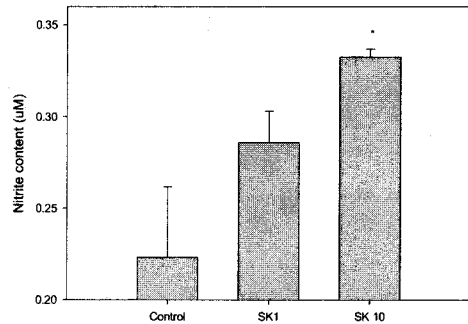


Fig. 3. Effect of Samkieum on Nitric Oxide Formation in RAW 264.7 Cells.

RAW 264.7 cells incubated with native LDL for 90hrs.
Control; vehicle
SK1; 1 μ g/ml of Samkieum
SK10; 10 μ g/ml of Samkieum
*; p<0.05 vs control

4. 대식세포 생존능에 미치는 영향

5 μ M CuSO₄로 세포에 손상을 추가하여 일어난 세포상해를 MTT assay로 측정하였다. 실험 결과, 1 μ g/ml, 10 μ g/ml 농도의 시료투여군에서 모두 cell survival rate을 증가시켜 세포손상이 억제됨이 확인되었다(Table 2).

Table 2. The survival rate of RAW264.7 cell from different groups incubated with CuSO₄ for 20 hrs.

treatment	O.D value (650nm)	Survival rate (%)
control	1.00±0.08	100.0
Samkieum 1µg/ml	1.13±0.04	113.0±5.02*
Samkieum 10µg/ml	1.18±0.06	117.6±6.84*

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

5. 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, Samkieum시료는 실험에 사용한 모든 농도에서 유의적 (p<0.01)으로 LDH 누출을 억제하였다(Fig. 4).

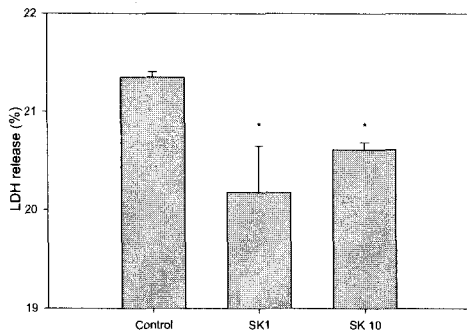


Fig. 4. Effect of Samkieum on CuSO₄-induced LDH Release from Murine

Macrophage-like RAW 264.7 Cells.

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

Control; CuSO₄ only

SK1; 1µg/ml of Samkieum + CuSO₄

SK10; 10µg/ml of Samkieum + CuSO₄

* p< 0,01 vs control

6. 대식세포 활성화에 미치는 영향

5µM CuSO₄에 노출시켜 산화형 지단백으로 손상시킨 RAW 264.7 cell에 대한 시료의 효과를 살펴보았다. 대조군과 비교하여 10µg/ml 농도의

Samkieum시료군의 acid phosphatase activity가 증가되어, 손상된 대식세포의 활성을 회복시켰다 (Fig. 5).

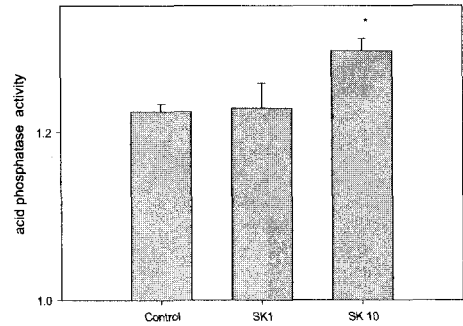


Fig. 5. Effect of Samkieum on Acid Phosphatase Activity in RAW 264.7 Cells.

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

Control; CuSO₄ only

SK1; 1µg/ml of Samkieum + CuSO₄

SK10; 10µg/ml of Samkieum + CuSO₄

* p< 0,01 vs control

IV. 고 찰

혈관벽에 지방성분이 침착되고, 동맥혈관벽이 비후해져 탄력성이 상실된 질환인 동맥경화증은 뇌졸중, 심근경색, 신부전등의 심각한 심혈관계 질환을 유발할 수 있다. 동맥경화의 원인으로는 고지혈증 중 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 뿐만 아니라 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)}.

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 생성할 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 억제등이 보고되었다^{15,16)}. Atherosclerosis 진행 과정은 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 측정된다¹⁷⁾.

LDH는 세포손상시 투과성이 증가된 세포막을 통하여 세포로부터 누출되는 세포내의 효소로, LDH의 측정은 세포손상의 정도를 판정하는 기준

이 된다.

三氣飲(Samkieum)은 景岳全書에 新方의 熱陳에 수록된 처방으로 氣血이 虧損한데 風寒濕 三氣가 虛를 타고 침입하여 筋骨歷節痺痛이 심한것과 痢를 한 후에 鶴膝風痛 등의 증상이 있는것을 치료한다¹¹⁾. 방중의 熟地黃 當歸 白芍藥은 四物湯의 의가 있으며 補血을 목표로 한다.

白芷 杜沖 牛膝 細辛은 風寒濕 三氣를 去하여 腰膝腫痛을 除하며, 茯苓은 利濕하고, 枸杞子는 補腎하고 周痺를 다스리며, 附子 肉桂는 제경 혈맥을 통하며 散寒하고, 甘草는 완화하며 諸藥을 조화시킨다고 한다²⁰⁾.

현대적인 약리실험에 의하면, 地黃은 농도에 따라 혈관을 수축하거나 확장하기도하며, 杜沖은 지구성이 있는 강압작용이 있으며, 白芍藥도 강압작용이 있고, 附子和 肉桂는 함께쓰여 부신피질성 고혈압에 대한 강압작용이 있다고 한다. 牛膝은 강압작용 및 말초혈관에 대한 확장작용이 있고, 枸杞子는 강압작용 이외에 망상내피계통의 탐식기능을 증강한다고 보고되어 있다²¹⁾.

또한 芍藥의 말초혈관확장작용과 탐식능 항진작용이 보고되어 있고, 肉桂의 혈소판 응집억제작용 및 혈관확장작용이 보고되어 있다²²⁾.

본 연구에서는 대식세포의 cell line인 RAW264.7 cell을 배양하면서 LDL을 첨가하여 생성되는 oxLDL양을 측정하기 위한 방법으로 산화하여 분해되고 남은 단백질량을 측정하였다. 실험결과, Samkieum는 RAW264.7 cell oxLDL 생성 과정에서 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, Samkieum는 LDL을 첨가한 RAW264.7 cell로부터 생성되는 oxLDL의 지표인

지질과산화를 현저히 억제하였다. 따라서, Samkieum는 RAW264.7 cell의 oxLDL 생성능을 억제하여 혈관벽에 지질침착 및 혈관 비후화, 면역복합체 형성으로 나타나는 염증반응 결과 유발되는 혈관과열등을 억제할 수 있을 것으로 추측되었다.

실험결과 Samkieum는 LDL을 처리한 RAW264.7 cell에서 nitrite의 농도를 현저히 증가시키는 것으로 나타났다.

이는 Samkieum가 LDL을 섭취한 RAW264.7 cell에 의해 생성되는 oxLDL에 의해 반응이 자극되는 NOS(nitric oxide synthetase)의 활성을 증가시킨 결과로 보인다. 이러한 결과는 Samkieum가 RAW264.7 cell로부터 oxLDL 생성을 억제하는 결과와 상관성이 있는 것으로 나타나 NO가 atherosclerosis의 진행을 억제하는 효과가 있는 것으로 생각된다.

RAW264.7 cell에 대한 oxLDL의 상해작용의 지표로 LDH 유리량을 이용하여 측정한 결과, Samkieum는 CuSO₄ 로 유도한 oxLD에 의한 RAW264.7 cell의 LDH 유리를 억제하는 효과를 나타내었다.

이상의 결과들은 Samkieum 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, Samkieum는 RAW264.7 cell의 생존율에는 직접적인 영향을 주지 못하였으며, 오히려 RAW264.7 cell의 기능 측정지표인 acid phosphatase의 활성은 증가시켰다. 따라서, Samkieum의 oxLDL 생성 억제작용은 RAW264.7 cell의 세포기능억제를 통한 작용은 아닌 것으로 판단되었다.

이상의 연구결과, Samkieum는 지질대사 이상으로 인한 동맥경화증의 예방 및 치료에 응용할 수 있을 것으로 사료된다.

V. 결 론

三氣飲(Samkieum)이 macrophage cell line인 RAW264,7 cell의 지단백 산화에 關聯된 인자들에 대한 영향을 평가하였다. 이를 위하여 대식세포에서 oxLDL 생성에 미치는 영향, nitric oxide 생성에 미치는 영향, 대식세포의 활성화에 미치는 영향 등을 평가하여 지단백 산화 억제를 통하여 동맥경화증에 응용할 수 있는지 여부를 검토하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 三氣飲(Samkieum)은 RAW264,7 cell oxLDL 생성과정에서 일어나는 단백질 산화를 현저히 억제하는 결과를 나타내었다.
2. Samkieum은 RAW264,7 cell의 oxLDL 생성과정에서 생성되는 인지질의 산화 및 분해를 측정하는 지표인 지질과산화물을 억제하였다.
3. Samkieum은 손상된 RAW264,7 cell의 생존에는 직접적인 영향을 미치지 않았다.
4. Samkieum은 RAW264,7 cell의 기능 측정지표인 acid phosphatase의 활성을 증가시켰다.

이상의 연구결과, Samkieum은 RAW264,7 cell의 oxLDL 생성능을 억제하여 혈관벽에 지질이 침착하고 혈관의 비후화, 면역복합체 형성 등으로 나타나는 염증반응으로 인한 혈관과열 등을 억제할 수 있을 것으로 추측되었다. 따라서, 三氣飲(Samkieum)은 대식세포의 oxLDL 형성을 통한 동맥경화증 발현의 예방 및 치료에 응용할 수 있을 것으로 생각된다.

VI. 참고문헌

1. Steinberg D and Witztum J.L. Lipoproteins and atherosclerosis. Current concepts, JAMA

264. 1990; 3047-52
2. Kullo K.J., Gau G.T. and Tajik J. Novel risk factors for atherosclerosis. Mayo Clin Proc 75. 2000; 369-80
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. 2000; 49-52
4. Sakai M., Kobori S., Miyazaki A. and Horiuchi S. Macrophage proliferation in atherosclerosis. Curr Opin Lipidol 11. 2000; 503-9
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. 1990; 680-7
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 atherosclerosis. J Biol Chem. 1996; 271, 8837-42
7. Wang C.Y., Bassul A.G., Boise L.H. Activation of granulocyte-macrophage colony stimulating factor promoter in T cells requires cooperative binding of Elf-1 and AP-1 transcription factors. Mol Cell Biol 10. 1990; 1281-6
8. Witztum J.L. and Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherosclerosis. J Clin Invest 88. 1991; 1785-92
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, 1988; 997-1002
10. Claus R., Fynys 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, 1996; 4911-22
 11. 張景岳. 國譯 景岳全書. 서울. 一中社. 1998; 제 2책 71-80, 제 6책 83-4
 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, 1998; 143-9
 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, 1994; 561-71
 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, 1992; 157-62
 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, 1994; 177-81.
 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, 1990; 474-9
 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, 1997; 2075
 18. Leuwenburg C., Rasmussrn 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, 1997; 3520
 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, 1994; 230-80
 20. 申載鏞. 方藥合編解說. 서울. 成輔社. 1988; 30
 21. 鄭普燮 辛民教, 圖解鄉藥大事典, 서울. 永林社. 1998; 341,525,606,826,907
 22. 타니 타다또. 한방약의 약능과 약리. 서울. 전파과학사. 1999; 80,81,193,194