

Original Article

## 解毒四物湯이 LPS 유도 ICR mouse의 산화스트레스 및 고지혈증에 미치는 효과

최규호, 정유선, 신현철

대구한의대학교 한의과대학 내과학교실

### The Effects of Haedoksamul-tang on Oxidative Stress and Hyperlipidemia in LPS-induced ICR Mouse

Gyu-ho Choi, Yu-sun Jung, Hyeon-cheol Shin

Department of Internal Medicine of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Dae-gu Haany University

**Objectives:** The present study was conducted to examine whether Haedoksamul-tang (HS), a traditional oriental herbal medicine, have beneficial effects on anti-inflammation and dyslipidemia in lipopolysaccharide (LPS)-induced ICR mouse.

**Methods:** Twenty four 8-week old male ICR mouse were divided into four groups: normal untreated; LPS treatment only; HS 10 mg/kg plus LPS treatment; and HS 30 mg/kg plus LPS treatment. HS was orally administered per day for 2days. Twenty-four hours after LPS injection (10 mg/kg/day, i.p.), all the mice were sacrificed, and serological changes were evaluated. The levels of nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), sterol regulatory element-binding transcription protein 1 (SREBP-1) activity and cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS), tumor necrosis factor a (TNF-a), monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1), acetyl-CoA carboxylase a (ACCa) expression were analyzed in Western blot analysis.

**Results:** HS inhibited oxidative stress in the liver of LPS-induced ICR mice. The LPS-induced ICR mice exhibited the increase of NF- $\kappa$ B activity and COX-2, iNOS, TNF-a, MCP-1 expressions in the liver, while HS treatment significantly inhibited them. Moreover, The administration of HS significantly decreased the elevated serum triglyceride and down-regulated the levels of SREBP-1, ACCa in the liver of LPS-induced ICR mice.

**Conclusions:** In conclusion, HS could have hepato-protective effects against the oxidative stress-related inflammation and abnormal lipid metabolism.

**Key Words** : Haedoksamul-tang, inflammation, dyslipidemia, NF- $\kappa$ B, SREBP-1

### 서론

심혈관질환의 주요 원인이 되는 죽상동맥경화증은 염증성 cytokine을 생산하는 면역세포들에 의한 만성염증 상태로서, 최근의 실험적, 임상적 연구들에 의하면 내독소혈증이 죽상동맥경화증의 발병에

영향을 미치는 것으로 보고되고 있다<sup>1-5)</sup>. 내독소인 lipopolysaccharide (LPS)는 그람음성균의 세포벽에 존재하는 구성물질의 일종으로 대식세포나 단핵구의 활성화로 cytokine의 분비를 촉진하고 시상하부, 부신피질 등의 활성을 유도해 감염이나 염증을 유발한다<sup>6,7)</sup>. 또한 inducible nitric oxide synthase (iNOS)

• Received : 15 February 2016

• Revised : 21 March 2016

• Accepted : 28 March 2016

• Correspondence to : 신현철

대구한의대학교 한의과대학 내과학교실

Tel : +82-54-281-0055, Fax : +82-54-281-7464, E-mail : ungaeshin@naver.com

의 유전자를 활성화시켜 nitric oxide (NO)의 생성을 증가시키고, 산화력이 강한 superoxide (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), hydroxyl radical (OH)과 같은 자유라디칼들도 함께 생성하게 된다. 이러한 라디칼들은 간세포의 지질막을 공격하여 급성 지방변성 및 지방축적을 야기하고, 간독성을 통한 세포의 파괴를 가져오므로 산화적 스트레스 및 지질대사 이상을 야기한다<sup>8)</sup>.

解毒四物湯은 《丹溪心法附餘》에 최초로記載되어 있으며, 淸熱涼血, 補血의 효능으로 消炎, 解熱, 鎮靜鎮痙 등의 효과가 있어 염증상태를 개선하여 죽상동맥경화증의 예방에 활용될 수 있을 것으로 사료된다<sup>9,10)</sup>.

解毒四物湯에 대한 실험적 연구로는 김<sup>11)</sup>의 선천성고혈압 백서 및 고콜레스테롤 식이로 유도된 고지혈증 백서에서 일과성 혈압하강 및 혈중 콜레스테롤 저하 효과, 김<sup>12)</sup>의 LPS로 처리한 RAW 264.7 세포에서 항염효과 및 면역반응, 범<sup>13)</sup>의 Picryl chloride로 유도한 접촉성 피부과민증 모델에서 항알레르기 및 혈액응고에 미치는 영향, 전<sup>14)</sup>의 trimelliticanhydride로 유도한 BALB/c mouse를 대상으로 접촉성 피부과민반응에 미치는 영향, 서<sup>15)</sup>의 사염화탄소로 손상된 백서 간세포에 미치는 영향, 임<sup>16)</sup>의 Behcet 환자의 단구세포에서 cytokine 분비억제 효과에 관한 연구 등이 있다. 이로써 각종 염증반응에 대한 解毒四物湯의 항염증 효능은 실험적으로 증명되었으나 아직까지 세포수준의 연구에 그친 상태이고, 지질대사에 관해서는 혈중 콜레스테롤 수치를 낮추는 효과 외에 관련한 효소 및 전사인자에 대한 구체적인 작용기전에 대한 연구는 부족한 실정이다.

이에 본 연구에서는 LPS로 처리된 ICR mouse의 혈청과 간조직에서 解毒四物湯의 산화적 스트레스 및 염증조절 관련 인자들의 발현 억제효과를 확인하고, 나아가 지질대사 장애를 개선함으로써 고지혈증을 예방하는데 유의한 효과를 관찰한 바 이에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 동물

본 실험은 ○○대학교에서 승인한 “Guidelines for Animal Experimentation”의 지침에 따라 수행되었다. 생후 8주령 된 수컷 ICR mouse 30마리를 샘타코바이오코리아 (오산, 한국)로부터 공급받았다. 1주간 일정한 온도 (23 ± 1°C), 습도 (약 60%)와 밤낮주기 (12시간씩)가 유지되는 환경에 적응시켰으며, NIH#3 (샘타코바이오코리아) 먹이와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였다. 6마리씩 총 4군으로 나누어 정상군과 vehicle 처리군에는 생리식염수를, Haedoksamul-tang (HS) 투여군에는 HS 추출물 10 또는 30 mg/kg body weight을 2일간 매일 경구투여하였다. 투여 종료 후 정상군을 제외한 모든 mouse에 LPS 10 mg/kg body weight을 복강 투여하였고, 24시간 후 마취상태에서 심장천자를 통해 모든 mouse의 혈액을 채취하였으며, 간 또한 빠르게 적출하여 액체 질소에 냉동한 뒤 -80°C에서 보관하였다<sup>17)</sup>.

### 2. 약재 및 추출

본 실험에 사용한 약재는 휴먼허브 (대구, 한국)에서 구입하여 사용하였다. 解毒四物湯 (Table 1.) 1첩 분량 32 g에 물 600 ml를 가하여 3시간 동안 전탕하였다. 전탕액을 여과지 (Whatman NO.2, Maidstone, England)로 여과한 뒤, Evaporator (BUCHI, Switzerland)를 이용하여 감압 농축한 후, 동결 건조하여 얻은 분말을 생리식염수에 희석하여 실험동물에 경구투여 하였다.

### 3. 시약

Polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes는 Millipore Corporation (Bedford, MA, USA)에서 구입하였고, β-actin, histone, sterol regulatory element-binding transcription protein 1 (SREBP-1), acetyl-CoA carboxylase a (ACCa), nuclear factor-κ

B (NF-κB), cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS), tumor necrosis factor α (TNF-α), monocyte chemotactic protein 1 (MCP-1)의 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였으며, Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA)와 dihydrorhodamine (DHR) 123은 Molecular probe, Inc. (Eugene, OR, USA)에서 구입하였다. 모든 혈청 분석에 사용된 kit는 신양화학 (부산, 한국)에서 구입하였고, 이 외에 모든 시약은 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

#### 4. Cytosol extract

간조직 100 mg을 100 mM Tris-HCl (pH 7.4), 20 mM β-glycerophosphate, 20 mM NaF, 2 M Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 1 μM pepstatin, 80 mg/L trypsin inhibitor가 포함된 homogenate buffer 1 ml (10 mM HEPES (pH 7.8), 10 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF)와 함께 얼음으로 차갑게 하여 조직 파쇄기 (Bio Spec Product, USA)로 분쇄하였다. 미토콘드리아 침전물을 얻기 위해 4°C에서 12,000 rpm으로 15분간 원심분리하였다.

#### 5. Nuclear extract

간조직 100 mg을 500 μl hypotonic buffer A (10

mM HEPES (pH 7.8), 10 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM PMSF)에 넣어 차가운 상태에서 조직 파쇄기 (Bio Spec Product, USA)로 분쇄하였다. 10% NP-40 용액 62.5 μl을 첨가하여 12,000 rpm으로 30초간 원심분리하였다. 이렇게 얻어진 핵 분획을 10% NP-40가 더해진 buffer A에 한번 헹구어 12,000 rpm으로 원심분리하고, 100 μl의 buffer B (50 mM HEPES, 50 mM KCl, 0.3 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.1 mM PMSF, 10% glycerol)를 첨가해 재부유시킨 뒤 4°C에서 12,000 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 핵단백질을 포함한 상층액은 수집되어 -80°C에서 냉동보관 되었다.

#### 6. 혈청분석

심장에서 채혈한 혈액을 원심분리하여 혈청을 얻었다. 혈청 triglyceride는 triglyceride assay kit를 사용하여 제작사 (신양화학)의 protocol에 따라 측정하였다. 혈청 샘플 5 μl에 시약 200 μl를 첨가한 후 37°C에서 5분간 incubate 한 뒤 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 7. ROS, TBARS 측정

ROS를 측정하기 위하여 ROS에 의해 2, 7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA)가 산화되어 형광의 2, 7-dichlorofluorescein (DCF)가

Table 1. Composition of Haedoksamul-tang

Herb name	Scientific name	Amounts (g)
黃芩	<i>Scutellaria baicalensis</i> George	4
黃連	<i>Coptis chinensis</i> Franch.	4
黃柏	<i>Phellodendron amurense</i> Ruprecht	4
梔子	<i>Gardenia jasminoides</i> Ellis	4
當歸	<i>Angelica acutiloba</i> (S. et Z.) Kitagawa	4
川芎	<i>Cnidium officinale</i> Makino	4
白芍藥	<i>Paeonia latiflora</i> Pall.	4
生乾地黃	<i>Rehmannia glutinosa</i> (Gaertner) Libosch.	4
Total		32

되는 fluorescence assay법을 사용하였다<sup>19)</sup>. Menadione을 superoxide의 source로 활용하여 stock solution으로부터 희석된 25  $\mu$ M DCFDA의 working solution은 얼음위에 두어 즉시 빛을 차단하였다. DCFDA의 형광강도는 fluorescence plate reader (TECAN, Salzburg, Austria)를 이용하여 방사파장 485, 535 nm에서 각각 30분간 측정되었다.

지질과산화의 최종산물인 malondialdehyde (MDA)를 확인하기 위해 mouse 간세포 분쇄액에서 thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)를 측정하였다. E-tubes에 100  $\mu$ l 조직 샘플을 8.1% SDS 용액 100  $\mu$ l, 20% acetic acid 300  $\mu$ l, 1.2% thiobarbiturate 용액 200  $\mu$ l과 함께 95 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응 시킨 후 상온에서 식힌 뒤 300  $\mu$ l butanol을 추가하여 1,500 rpm으로 10분간 원심분리 하였고, butanol 층의 흡광도를 532 nm에서 측정하였다.

## 8. Western blot analysis

SREBP-1, ACCa, NF- $\kappa$ Bp65, COX-2, iNOS, TNF-a, MCP-1, histone,  $\beta$ -actin을 확인하기 위해 각각의 단백질을 8% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 통해 전기영동 시켰다. 분리된 단백질들을 nitrocellulose membrane에서 90 V로 1시간 30분 동안 전기영동 하였다. 5% 탈지분유가 함유된 TBST (20 mM Tris, 500 mM NaCl, 0.05% Tween 20)로 1시간 동안 blocking한 뒤 TBST로 washing한 후, 1차 항체 (SREBP-1, ACCa, NF- $\kappa$ Bp65, COX-2, iNOS, TNF-a, MCP-1, histone,  $\beta$ -actin)를 5%의 탈지분유가 들어있는 TBST에 희석 (1:1000)하여 membrane을 4 $^{\circ}$ C에서 overnight 동안 반응시켰다. 실온에서 10분씩 3번 TBST로 membrane을 washing한 후, 2차 항체 (horseradish peroxidase-conjugated donkey anti-rabbit antibody; 1:5,000)를 5%의 탈지분유가 들어있는 TBST에 희석 (1:2000)하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. TBST로 washing한 후 enhanced chemiluminescence (Amersham)로 Hyperfilm (Amersham)에 노출시킨 후 단백질의 발현 정도를 분석하였다. Band density는 ATTO Densitograph Software (ATTO Corporation,

Tokyo, Japan)로 측정하여 histone 또는  $\beta$ -actin과의 비율로 정량하였다.

## 9. 통계처리

실험결과를 평균과 표준편차 (mean  $\pm$  SD)로 표기하였으며, SPSS 18.0 for Windows program을 사용하여 one-way analysis of variance (ANOVA) 및 Dunnett's test로 유의수준 p-value < 0.05에서 검정하였다.

## 결 과

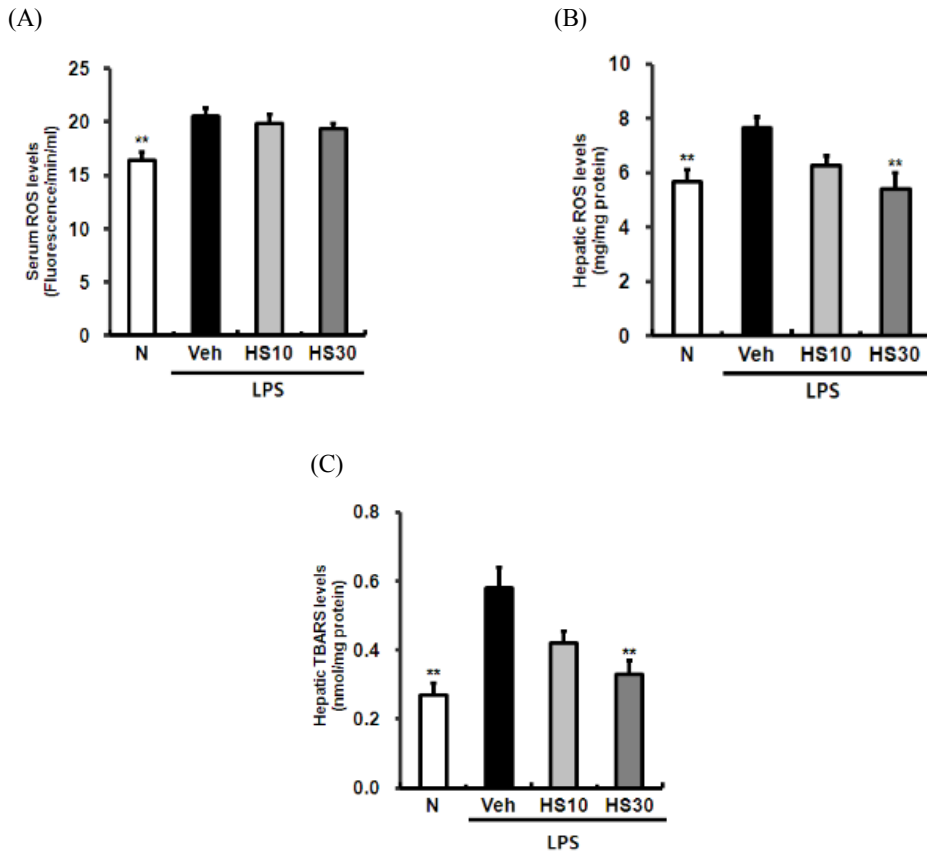
### 1. 혈청 및 간조직에서 HS의 산화적 스트레스 억제 효과

LPS로 유도된 ICR mouse에서 산화적 스트레스 억제 효과를 확인하기 위해 혈청과 간조직에서의 ROS와 간조직에서의 TBARS 수치를 관찰하였다. 혈청 및 간조직의 ROS 모두 LPS 단독 처리군에서 정상군보다 유의한 증가를 보여 LPS로 인해 ROS 발생이 항진되어 있음을 확인하였다. 이에 비해 HS 투여군에서는 LPS 단독 처리군에 비해 간조직의 ROS 발생이 투여농도에 따라 낮아졌으며, 특히 HS 30 mg 투여군의 경우 거의 정상군 수준으로 감소하는 통계적 유의성을 보였으나, 혈청 ROS의 경우에는 HS 투여군에서 유의한 감소효과를 확인하지 못하였다 (Fig. 1A, B).

생체막 지질과산화 결과물인 malondialdehyde (MDA)를 측정된 TBARS 수치의 경우 정상군에 비해 뚜렷이 증가한 LPS 단독 처리군과 비교하여 HS 투여군의 경우 투여 농도가 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였으며, HS 30 mg 투여군에서 통계적으로 유의한 수준을 보였다 (Fig. 1C).

### 2. HS가 간조직에서 NF- $\kappa$ B 활성화에 미치는 영향

산화적 스트레스 상황에서 각종 염증반응 관련 유전자 발현을 조절하는 전사인자인 NF- $\kappa$ B의 활성 정도를 Western blotting을 시행하여 관찰하였다. 그



**Fig. 1.** Inhibition effects of HS on serum and hepatic oxidative stress in LPS-induced ICR mice. Serum ROS (A), hepatic ROS (B), hepatic TBARS (C) levels. N: normal group, Veh: vehicle-treated mice, HS10: HS 10 mg/kg treated mice, HS30: HS 30 mg/kg treated mice. Bars represent means  $\pm$  SD. \*\*  $P < 0.01$  versus vehicle-treated mice values.

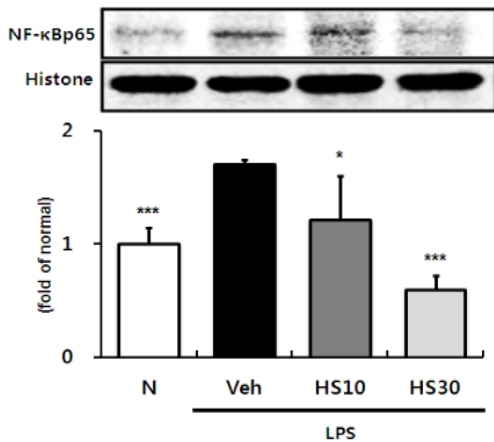
결과 LPS 단독 투여군에서 유의한 수준으로 증가되어 앞서 간조직에서 ROS 및 TBARS가 증가한 결과와 함께 LPS로 인해 산화적 스트레스의 증가가 유발되고 나아가 염증반응이 항진될 것을 예상할 수 있었다. 이에 비해 HS 투여군에서는 NF- $\kappa$ B의 활성이 농도 의존적으로 유의하게 낮아져 HS가 LPS로 유도되는 산화적 스트레스 및 염증반응의 항진을 억제하는 효능이 있음을 확인하였다 (Fig. 2).

### 3. HS가 간조직에서 COX-2, iNOS 단백질 발현에 미치는 영향

결과 2에서 LPS에 의해 NF- $\kappa$ B 활성이 증가되는

것을 확인하 바, NF- $\kappa$ B로 발현이 조절되는 염증반응 관련 효소인 COX-2, iNOS 단백질 발현 정도를 관찰하였다. 그 결과, LPS 단독 투여군에서 정상군보다 COX-2와 iNOS 모두 유의하게 증가하였고, 특히 COX-2의 발현이 확연하게 증가된 것을 확인할 수 있었다. 이로써 LPS로 인한 산화적 스트레스 증가로 염증반응이 촉진됨을 알 수 있었다. 이에 비해 HS 투여군에서는 COX-2, iNOS 모두 투여 농도가 증가함에 따라 유의한 억제효과를 보였다 (Fig. 3A, B).

### 4. HS가 간조직에서 TNF- $\alpha$ , MCP-1 단백질 발현에 미치는 영향



**Fig. 2.** Effects of HS on NF- $\kappa$  Bp65 activity in LPS-induced ICR mice liver, N: normal group, Veh: vehicle-treated mice, HS10: HS 10 mg/kg treated mice, HS30: HS 30 mg/kg treated mice. Histone was used for loading control. Bars represent means  $\pm$  SD, \*  $P < 0,05$ , \*\*\*  $P < 0,001$  versus vehicle-treated mice values.

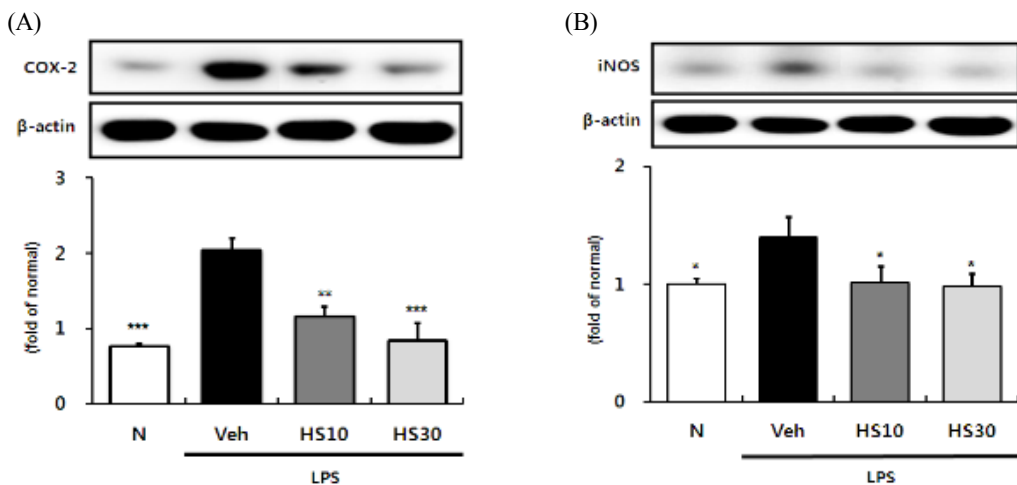
HS의 염증반응 억제 효과를 좀 더 살펴보기 위해 대표적인 염증유발 cytokine인 TNF- $\alpha$ 와 그로 인해 발현이 유도되는 것으로 알려진 chemokine인 MCP-1의 단백질 발현 정도를 확인해 보았다. 그 결과, 정상군과 비교하여 TNF- $\alpha$ , MCP-1의 발현이 유의하게 증가한 LPS 단독 처리군에 비해 HS 투여군

은 모든 투여군에서 TNF- $\alpha$ , MCP-1의 발현이 유의한 수준으로 억제되었다. 특히 MCP-1의 경우 HS가 농도 의존적으로 그 발현정도를 억제함을 확인하였다 (Fig. 4A, B).

### 5. 혈청 및 간조직에서 HS가 triglyceride에 미치는 영향

HS의 지질대사 조절효과를 확인하기 위해 LPS로 유도된 ICR mouse에서 혈청 및 간조직의 triglyceride 수치를 관찰하였다. 그 결과, 혈청에서 LPS 단독 처리군은 정상군 ( $56.78 \pm 5.09$  mg/dl)에 비해  $208.79 \pm 22.18$  mg/dl로 현저하게 증가하였고, HS 투여군의 경우 10 mg 투여군은  $170.97 \pm 21.04$  mg/dl, 30 mg 투여군은  $141.36 \pm 16.09$  mg/dl로 낮아졌으며, 특히 30 mg 투여군에서 유의한 감소효과를 보였다 (Fig. 5A).

간조직의 경우 정상군이  $2.77 \pm 0.48$  mg/mg protein 인데 반해 LPS 단독 처리군은  $5.46 \pm 0.52$  mg/mg protein으로 증가한 것과 비교하여, HS 투여군은 10 mg 투여군은  $5.06 \pm 0.70$  mg/mg protein, 30 mg 투여군은  $4.99 \pm 0.18$  mg/mg protein으로 낮아지는 경향을 보였으나 통계적 유의성은 없었다 (Fig. 5B).



**Fig. 3.** Effects of HS on COX-2 and iNOS expressions in LPS-induced ICR mice liver, COX-2 (A) and iNOS (B) protein expressions in liver, N: normal group, Veh: vehicle-treated mice, HS10: HS 10 mg/kg treated mice, HS30: HS 30 mg/kg treated mice.  $\beta$ -actin was used for loading control. Bars represent means  $\pm$  SD, \*  $P < 0,05$ , \*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  versus vehicle-treated mice values.

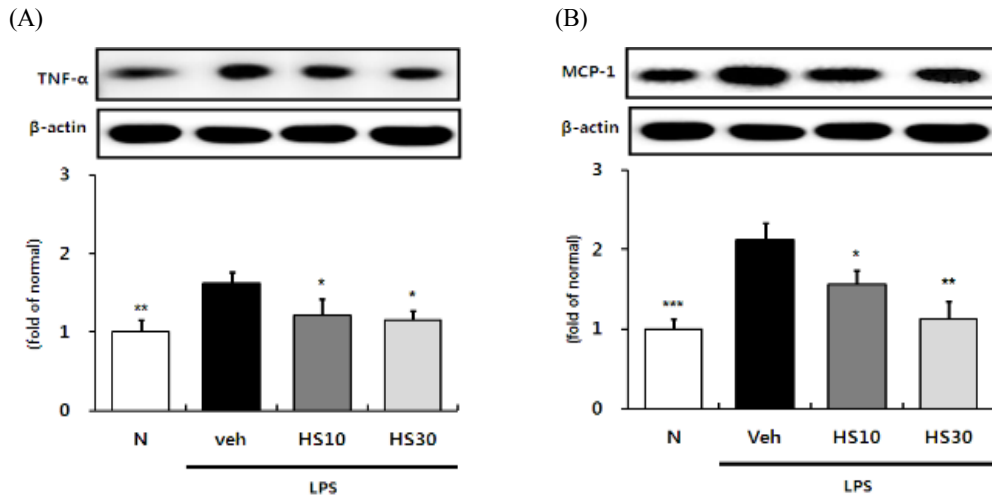


Fig. 4. Effects of HS on TNF- $\alpha$  and MCP-1 expressions in LPS-induced ICR mice liver. TNF- $\alpha$  (A) and MCP-1 (B) protein expressions in liver. N: normal group, Veh: vehicle-treated mice, HS10: HS 10 mg/kg treated mice, HS30: HS 30 mg/kg treated mice,  $\beta$ -actin was used for loading control. Bars represent means  $\pm$  SD. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  versus vehicle-treated mice values.

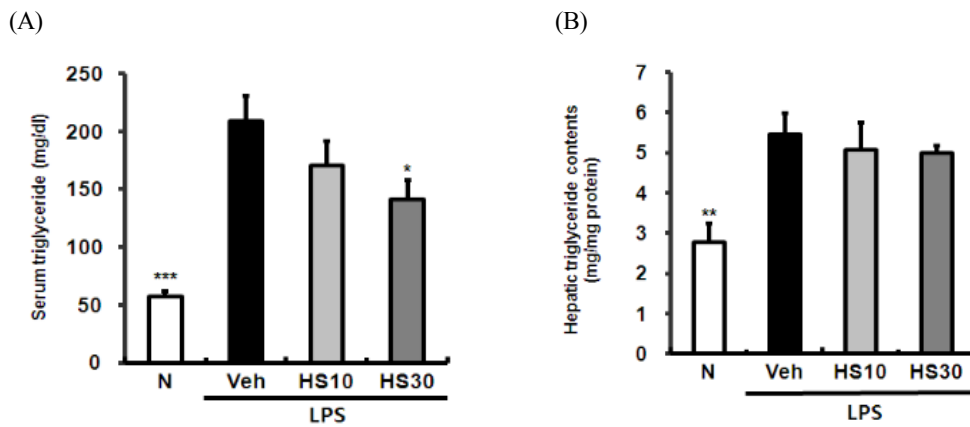
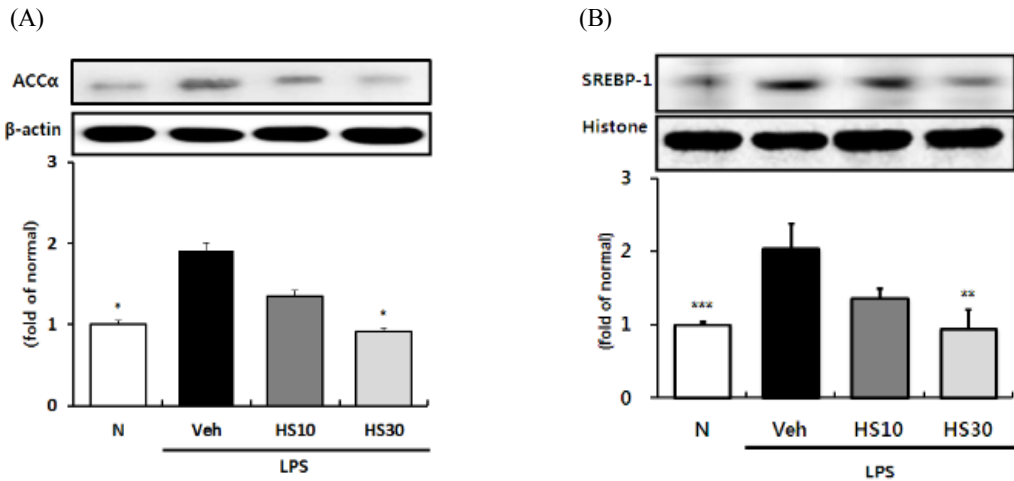


Fig. 5. Effects of HS on serum and hepatic triglyceride levels in LPS-induced ICR mice. Serum triglyceride (A), hepatic triglyceride (B) levels. N: normal group, Veh: vehicle-treated mice, HS10: HS 10 mg/kg treated mice, HS30: HS 30 mg/kg treated mice. Bars represent means  $\pm$  SD. \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$  versus vehicle-treated mice values.

## 6. HS가 간조직에서 SREBP-1 활성과 ACC $\alpha$ 발현에 미치는 영향

결과 5에서 HS가 LPS로 인해 증가되는 혈중 지질수치를 유의한 수준으로 낮추는 효과를 확인한 바, 지질대사 개선의 기전을 확인하기 위해 콜레스테롤과 지방산 합성에 관여하는 유전자들의 발현을 조절하는 전사인자인 SREBP-1의 활성 정도 및 그

하위 표적 효소인 ACC $\alpha$ 의 발현 정도를 관찰하였다. 그 결과, LPS 단독 처리군의 경우 정상군에 비해 SREBP-1의 활성과 ACC $\alpha$ 의 발현이 모두 유의하게 증가하여 지방합성이 활성화되어 있음을 확인할 수 있었다. 이에 비해 HS 투여군의 경우 투여 농도가 증가함에 따라 SREBP-1의 활성과 ACC $\alpha$ 의 발현이 낮아졌으며, 특히 HS 30 mg 투여군에서는 통계적



**Fig. 6.** Effects of HS on SREBP-1 activity and ACCa expression in LPS-induced ICR mice liver, SREBP-1 (A) activity and ACCa (B) protein expression in liver, N: normal group, Veh: vehicle-treated mice, HS10: HS 10 mg/kg treated mice, HS30: HS 30 mg/kg treated mice, Histone or  $\beta$ -actin was used for loading control. Bars represent means  $\pm$  SD. \* P < 0.05, \*\* P < 0.01, \*\*\* P < 0.001 versus vehicle-treated mice values.

으로 유의한 억제효과를 보였다 (Fig. 6A, B).

## 고찰

解毒四物湯은 《丹溪心法附餘》<sup>9)</sup>에 “治婦人經脈不往, 或如豆汁, 五色相雜, 面色痿黃, 臍腹刺痛, 寒熱往來, 崩漏不止.”로 최초記載된 方劑이며, 三焦實火를 치료하는 黃連解毒湯과 血病의 通治方인 四物湯의 合方으로 溫清飲이라고도 한다<sup>18)</sup>. 본방은 血虛의 상태에 血熱의 증상을 兼하는 경우를 치료 대상으로 하여 清熱涼血과 補血의 효능으로 消炎, 解熱, 鎮靜, 抗菌, 循環改善 등의 효과가 있다<sup>11)</sup>. 현재까지 解毒四物湯에 대한 실험적 연구로는 항염효과 및 면역반응에 관련된 보고<sup>12-14, 16)</sup>와 일과성 혈압하강 및 혈중 콜레스테롤 수치 저하를 확인한 김<sup>11)</sup>의 보고 및 서<sup>15)</sup>의 사염화탄소로 손상된 백서 간세포에 미치는 영향 등이 있다. 기존 연구는 주로 항염증에 대한 효과를 밝히는 연구가 대부분이었으며, LPS에 의한 염증반응에 대한 연구로는 세포단계에서 이루어진 김<sup>12)</sup>의 연구 등이 있으나, 간의 급성 지방변성 및 지방축적과 이로 인한 지질대사 이상에 대한 연구는

부족한 실정이다.

이에 저자는 LPS로 유도되는 간세포의 염증반응 및 산화적 스트레스를 억제하여 지질대사를 조절하고, 나아가 죽상동맥경화증을 예방하는데 있어 解毒四物湯의 활용가능성을 검토해 보았다.

LPS는 그람음성균의 세포벽에 존재하며 인체 혈액감염을 야기하는 내독소물질로서, 주로 음식섭취를 통해 지속적으로 노출되어 있으며 특히 서구식 식이는 혈중 내독소 수치를 더욱 증가시키는 것으로 알려져 있고, 만성적인 내독소혈증은 죽상동맥경화증과 대사증후군의 발병요인이 된다<sup>6, 7)</sup>. 간은 내독소혈증과 전신 염증반응의 주요 타겟 장기이며 지질대사를 조절하는데 있어 중추적 역할을 하므로, 간의 염증은 죽상동맥경화증의 발병과 연관되어 있을 것으로 생각된다<sup>20-23)</sup>.

산화적 스트레스는 LPS로 유도되는 간손상의 주요 기전으로, 간에서 LPS는 O<sub>2</sub>를 포함한 활성산소종의 생산을 촉진하고, 간과 혈관세포에서 iNOS의 활성을 자극하여 NO의 생성을 증가시킨다<sup>7)</sup>. 간에서 산화적 스트레스가 유발되면 간세포의 지질막이 손상되고 급성 지방변성 및 지방축적이 야기되며, 간



독성으로 인한 세포 파괴가 초래된다<sup>8)</sup>.

LPS로 처리한 ICR mouse에서 解毒四物湯의 산화적 스트레스 억제 효과를 확인하기 위해 ROS 발생 및 지질과산화 정도를 관찰해 보았다. 그 결과, 혈청 및 간조직 ROS와 간조직 TBARS 수치가 정상군에 비해 뚜렷이 증가한 LPS 단독 처리군에 비해 解毒四物湯 투여군에서는 간조직의 ROS와 TBARS 모두 유의한 수준으로 감소하였다. 반면, 혈청 ROS는 감소 경향을 보이긴 하였으나 통계적 유의성은 없어 ROS 발생 억제효과가 간에서 더욱 뚜렷함을 확인할 수 있었다.

죽상동맥경화증이 진행되는 과정에서 염증반응이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>. 산화적 스트레스에 의해 활성화되는 redox 감수성 전사인자이며, cytokines의 생성, adhesion molecules, immunoreceptors 등과 관련된 염증반응에 있어 중요한 조절자인 NF-κB는 죽상동맥경화증의 진행과정에서도 중요한 역할을 한다. 혈관의 허혈성 변화 및 죽상경화성 반응을 촉진하는 고지혈증, 산화 저밀도지단백 (low density lipoprotein), 전단자극 (shear stress)의 변화, 활성화된 혈소판 등이 NF-κB의 활성화를 유도하며, 이러한 NF-κB의 발현은 혈관 내피세포와 대식세포에서의 cytokines, chemokines 및 adhesion molecules의 발현을 증가시킴으로 염증세포들이 혈관 안으로 침투하는 것을 용이하게 하여 죽상동맥경화증의 시작과 진행 및 증상 유발을 촉진시킨다<sup>24-26)</sup>. 본 실험에서는 LPS 처리로 NF-κB 활성이 유의하게 증가되었으나 解毒四物湯 투여에 의해 농도의존적으로 확인한 억제효과를 보여 산화적 스트레스 및 염증반응 억제효과를 확인하였다.

또한 NF-κB는 COX-2, iNOS와 같은 면역과 염증반응에 관련된 다양한 유전자들의 발현을 촉진시킨다<sup>27)</sup>. COX는 arachidonic acid의 산화를 촉매하는 효소로, COX-1, 2의 두 가지 형태의 isoform으로 존재하며, 이 중 COX-2는 LPS 및 각종 cytokines 등의 염증 촉진성 자극에 빠르게 반응하여 prostaglandins (PG)을 생성한다<sup>28)</sup>. iNOS는 LPS, interferon-γ 및 다양한 염증성 cytokines에 반응하여 유도되는 효소로

NO를 생성하며, COX-2와 iNOS로부터 생성되는 PG와 NO는 급·만성 염증의 발병에 중심적인 역할을 한다<sup>29,30)</sup>. 본 실험에서는 LPS 처리로 COX-2와 iNOS의 발현이 증가된 대조군에 비해 解毒四物湯 투여군의 경우 COX-2와 iNOS 모두 투여농도가 증가함에 따라 유의한 발현억제 효과를 보였다.

죽상동맥경화증의 염증과정에는 cytokines, chemokines, adhesion molecules 등의 여러 염증 매개물질이 관여하는데, 그 중 TNF-α를 비롯한 염증유발성 cytokine (pro-inflammatory cytokine)은 고혈압, 당뇨 및 고지혈증과 같은 혈관질환을 유발할 수 있는 위험인자에 의해 혈관 내에서 국소적으로 발현이 증가된다. 이러한 cytokines의 증가는 혈관내피세포에서 염증세포들의 이동에 중요한 단핵구와 T 세포들의 이동에 관여하는 MCP-1과 같은 chemokine의 발현증가와 관련이 있다<sup>31-33)</sup>. 본 연구에서 염증유발 cytokine인 TNF-α와 그로 인해 발현이 유도되는 chemokine인 MCP-1의 단백질 발현정도를 확인해 본 결과, LPS 단독 처리군에서는 정상군에 비해 확연하게 발현이 증가된 것과 비교해 解毒四物湯 투여군에서는 TNF-α, MCP-1 모두 농도의존적으로 발현이 억제된 것을 확인할 수 있었다.

解毒四物湯의 지질대사 이상에 대한 효과를 관찰해 본 결과에서는 LPS 처리로 혈중 및 간세포내 중성지방 수치가 뚜렷하게 증가하여 LPS로 인해 간에서 지방축적과 지질대사이상이 초래된 것을 확인할 수 있었다. 반면, 解毒四物湯 투여로 혈중 지질수치는 유의하게 감소시켰으나, 간조직의 지방축적은 대조군에 비해 낮은 경향성을 보였을 뿐 통계적 유의성은 없었다. 이로써 解毒四物湯이 LPS로 인해 유발되는 고지혈증을 완화시키는 효과가 있음을 알 수 있었다.

解毒四物湯의 지질대사 조절과 관련한 기전을 좀 더 살펴보기 위해 지질합성 유전자의 발현을 촉진하는 전사인자인 SREBP-1의 활성에 미치는 영향을 관찰해 보았다. 콜레스테롤과 지방산 합성에 관여하는 유전자들의 발현을 조절하는 SREBPs는 helix-loop-helix-leucine zipper family에 속하는 전

사인자로, SREBP-1a, 1c, 2의 세 가지 isoform으로 존재하며, 주로 간과 지방조직에서 발현된다<sup>34,35</sup>. 이 중 지방산 대사와 중성지방의 합성에 주로 관여하는 SREBP-1은 단백질로 발현되어 불활성화상태 (native form)로 소포체에 존재하다가 세포내 sterol이 고갈 되면 골지체로 이동하여 두 단계의 cleavage를 통해 활성화되고, 활성화된 상태 (mature form)의 SREBP-1은 핵 안으로 이동해 acetyl-CoA carboxylase (ACC), fatty acid synthase (FAS), stearyl-AcP desaturase, ATP citrate lyase, malic enzyme과 같은 지방합성에 관련된 효소들의 유전자 발현을 증가시킨다<sup>34,36-39</sup>. 이 중 ACC는 acetyl-CoA의 비가역적 카르복시화 촉진을 통해 malonyl-CoA를 생성하는 지질대사 효소로 미토콘드리아 내에서 지방산 산화를 억제하고 지방산 생합성에 중요한 역할을 하며, 특히 ACCa는 lipogenic tissue에 ACCb는 골격근, 심장과 같은 oxidative tissue에 많이 분포하는 것으로 알려져 있다<sup>40,41</sup>. 본 실험에서는 LPS 단독 처리군에서 SREBP-1의 활성화와 ACCa의 발현이 정상군에 비해 유의하게 증가되어 지질합성이 항진되어 있는 것이 확인되었다. 반면, 解毒四物湯 투여군의 경우 SREBP-1의 활성화와 ACCa의 발현이 뚜렷이 감소하였다. 이로써 解毒四物湯이 SREBP-1의 활성을 억제함으로써 ACCa의 발현을 조절해 LPS로 인한 지질합성 항진을 예방하고 혈중 지질수치를 감소시켜 지질대사를 조절하는 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

이로써 解毒四物湯이 LPS에 의해 유발되는 산화적 스트레스, 염증반응 및 간조직의 손상으로 인한 이상지질혈증에서 NF-κB 활성화와 COX-2, iNOS, TNF-α, MCP-1의 발현을 억제함으로써 산화적 스트레스와 염증반응을 효과적으로 억제하고, SREBP-1 활성화와 ACCa 발현 억제를 통해 고지혈증을 예방 gkdu 죽상동맥경화증에 유용하게 활용될 수 있음을 보여주었다.

### 결론

LPS에 의해 유발되는 산화적 스트레스, 염증반

응, 지질대사이상과 이와 관련한 죽상동맥경화증에 대한 解毒四物湯의 효과 및 대사조절 기전을 알아본 바 다음과 같은 결론을 얻었다.

解毒四物湯은 LPS 처리 ICR mouse에서 ROS 발생과 산화적 스트레스를 억제하였고, NF-κB 활성화와 COX-2, iNOS, TNF-α, MCP-1의 발현을 억제함으로써 산화적 스트레스와 관련한 염증반응에 대해 뚜렷한 방어효과를 나타내었다. 또한 SREBP-1 활성화와 ACCa 발현을 억제하여 지질대사 이상을 개선함으로써 혈중 중성지방의 수치증가를 억제시키는 효과를 보였다.

이로써 解毒四物湯은 LPS에 의한 산화적 스트레스를 방지하고 관련 전사인자 및 염증반응을 효과적으로 억제하며, 지질대사의 효율적인 조절을 통해 고지혈증을 완화시켜 대사성 질환 및 죽상동맥경화증의 치료 및 예방에 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

### 참고문헌

1. Johan F. Immunity, atherosclerosis and cardiovascular disease. BMC med. 2013;11: 117-29.
2. Feng X, Zhang Y, Xu R, Xie X, Tao L, Gao H, et al. Lipopolysaccharide up-regulates the expression of Fcα/μ receptor and promotes the binding of oxidized low-density lipoprotein and its IgM antibody complexes to activated human macrophages. Atherosclerosis. 2010;208: 396-405.
3. Wiesner P, Choi SH, Almazan F, Benner C, Huang W, Diehl CJ, et al. Low doses of lipopolysaccharide and minimally oxidized low-density lipoprotein cooperatively activate macrophages via nuclear factor kappa B and activator protein-1: possible mechanism for acceleration of atherosclerosis by subclinical endotoxemia. Circ Res. 2010;107:56-65.
4. Maitra U, Li L. Molecular mechanisms

- responsible for the reduced expression of cholesterol transporters from macrophages by low-dose endotoxin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013;33:24-33.
5. Vikatmaa P, Lajunen T, Ikonen TS, Pussinen PJ, Leinonen M, Saikku P, et al. Chlamydial lipopolysaccharide (cLPS) is present in atherosclerotic and aneurysmal arterial wall—cLPS levels depend on disease manifestation. *Cardiovasc Pathol.* 2010;19(1):48-54.
  6. Jean L, Bret D, Christophe C. Systemic capsaicin pretreatment fails to block the decrease in food-motivated behavior induced by lipopolysaccharide and interleukin-1 $\beta$ . *Brain Research Bul.* 1997;42:443-9.
  7. Sharifov OF, Nawar G, Ternovov W, Mishra VK, Litovsky SH, Palgunachare MN, et al. Cationic peptide mR18L with lipid lowering properties inhibits LPS-induced systemic and liver inflammation in rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;436(4):705-10.
  8. Kim ID, Kang KS, Kwon RH, Yang JO, Lee JS, Ha BJ. The effect of *Rubus coreanum* Miquel against lipopolysaccharide-induced oxidative stress and lipid metabolism. *J. Fd Hyg. Safety.* 2007; 22(3):213-7.
  9. Ju JH. Dan-gye-sim-beop-bu-yeo. Seoul: Daesung Publishing Co. Ltd. 1982:714.
  10. Lee SI. Cheon-jin-cheo-bang-hea-sheol. Seoul: Sheong-bo-sa. 1995:289-91.
  11. Kim ES. A experimental study of Hwangryeonheadock -Tang and Onchung-Eum on hyperlipidemia & hypertension. *J. of Korean Medicine.* 1999; 20(1):185-96.
  12. Kim YH, Jo HB. Anti-inflammatory effects of Haedoksamul-tang in RAW 264.7 cells. *J. of Oriental Obstetrics & Gynecology.* 2008;21(2): 166-83.
  13. Beom HB. Effects of Onchunggeum and Gamionchunggeum on the anti allergic response and blood coagulation. *J. of Kyung Hee University.* 1990;6(4):490-9.
  14. Jeon YG. Effects of Haedoksamul-tang on Trimellitic anhydride-induced contact hypersensitivity in a mouse model. 2010:1-41.
  15. Seo M, Jeon BH, Woo WH, Jeong WY. Effect of Onchunggeum on the damaged liver cell by carbon tetrachloride in rats. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology.* 1989;11(2):27-36.
  16. Im HJ, Hwang CY, Gang HC, Kim NG, Gwon IH. Inhibitory effects of Onchunggeum on cytokine production from phytohemagglutinin-stimulated peripheral blood mononuclear cells of Behcet's patients. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology.* 2002;16(4):768-73.
  17. Zhu GF, Guo HJ, Huang Y, Wu CT, Zhang XF. Eriodictyol, a plant flavonoid, attenuates LPS-induced acute lung injury through its antioxidative and anti-inflammatory activity. *Exp Ther Med.* 2015;10(6):2259-66.
  18. Heo J. Dong-ui-bo-gam. Seoul: Bubin Publishing Co. Ltd. 2007:416,455.
  19. Rush GF, Gorski JR, Ripple MG, Sowinski J, Bugelski P. Organic hydroperoxide -induced lipid peroxidation and cell death in isolated hepatocytes. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1985; 78:473-83.
  20. Izeboud CA, Hoebe KH, Grootendorst AF, Nijmeijer SM, van Miert AS, Witkamp RF, et al. Endotoxin-induced liver damage in rats is minimized by beta 2-adrenoceptor stimulation. *Inflamm Res.* 2004;53:93-9.
  21. Munford RS. Severe sepsis and septic shock: the role of gram-negative bacteremia. *Annu Rev Pathol.* 2006;1:467-96.
  22. Kleemann R, Verschuren L, van Erk M, Nikolsky

- Y, Verheij ER, Smilde AK, et al. Atherosclerosis and liver inflammation induced by increased dietary cholesterol intake: a combined transcriptomics and metabolomics analysis. *Genome Biol.* 2007;8:R200.
23. Xu X, Hu J, McGrath BC, Cavener DR. GCN2 in the brain programs PPAR $\gamma$ 2 and triglyceride storage in the liver during perinatal development in response to maternal dietary fat. *PLoS One.* 2013;8(10):e75917.
24. Liu RH, Hotchkiss JH. Potential genotoxicity of chronically elevated nitric oxide: a review. *Mutat. Res.* 1996;339:73-89.
25. Collins T, Cybulsky MI. NF-kappaB: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis. *J Clin Invest.* 2001;107:255-64.
26. Thuberg BL, Collins T. The nuclear factor-B/inhibitor of B autoregulatory system and atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol.* 1998;9:387-96.
27. Wang QS, Xiang Y, Cui YL, Lin KM, Zhang XF. Dietary blue pigments derived from Genipin, attenuate inflammation by inhibiting LPS-Induced iNOS and COX-2 expression via the NF-kB inactivation. *PLoS One.* 2012;7(3): 1-11.
28. Kwon HJ, Sung BK, Kim JW, Lee JH, Kim ND, Yoo MA, et al. The effect of lipopolysaccharide on enhanced inflammatory process with age: modulation of NF-kB. *J. Amer. Aging Assoc.* 2001;24:163-72.
29. Napoli C, de Nigris F, Williams-Ignarro S, Pignalosa O, Sica V, Ignarro LJ. Nitric oxide and atherosclerosis: an update. *Nitric Oxide.* 2006;15:265-79.
30. Baldwin AS. Jr The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:649-83.
31. DeGraba TJ. Expression of inflammatory mediators and adhesion molecules in human atherosclerotic plaque. *Neurology.* 1997;49 (Supple 4):S15-9.
32. Fassbender K, Rossol S, Kammer T, Daffertshofer M, Wirth S, Dollman M, et al. Proinflammatory cytokines in serum of patients with acute cerebral ischemia: kinetics of secretion and relation to the extent of brain damage and outcome of disease. *J Neurol Sci.* 1994;122(2):135-9.
33. Adams DH, Lioyd AF. Chemokines: leukocyte recruitment and activation cytokines. *Lancet.* 1997;349:490-5.
34. Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell.* 1997;89:331-40.
35. Weber LW, Boll M, Stampfl A. Maintaining cholesterol homeostasis: sterol regulatory element-binding proteins. *World J Gastroenterol.* 2004;10(21):3081-7.
36. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest.* 2002;109:1125-31.
37. Foufelle F, Ferre P. New perspectives in the regulation of hepatic glycolytic and lipogenic genes by insulin and glucose: a role for the transcription factor sterol regulatory element binding protein-1c. *Biochem J.* 2002;366:377-91.
38. Ferre P, Foretz M, Azzout-Marniche D, Becard D, Foufelle F. Sterol-regulatory-element-binding protein 1c mediates insulin action on hepatic gene expression. *Biochemical Society Transactions.* 2001;29(4):547-52.
39. Horton JD. Sterol regulatory element-binding proteins: transcriptional activators of lipid synthesis. *Biochemical Society Transactions.*

2001;30(6):1091-5.

40. Tong L. Acetyl-coenzyme A carboxylase: crucial metabolic enzyme and attractive target for drug discovery. *Cell Mol Life Sci.* 2005;62(16):
41. Munday MR. Regulation of mammalian acetyl-CoA carboxylase. *Biochem Soc Trans.* 2002;30(6):1059-64.