

청혈플러스가 혈관내피세포에서 염증 지표인자에 미치는 영향

서동효¹ · 주인환¹ · 김동희^{1*}

대전대학교 한의과대학 병리학교실¹

Effect of ChungHyul-Plus on inflammatory factors in Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs)

Dong-hyo Seo¹ · In-Hwan Joo¹ · Dong-Hee Kim^{1*}

Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University¹

Objectives : Coronary and cerebrovascular disease with high mortality is a major factor in arteriosclerosis. Pro-inflammatory cytokines damage vascular endothelial cells, leading to vascular inflammation. These vascular inflammation can build up cholesterol and thrombus to cause atherosclerosis. **Methods** : In this study, we researched the effect of ChungHyul-Plus for vascular inflammation in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) stimulated with tumor necrosis factor- α (TNF- α). Change in mRNA expression of inflammatory cytokines (CCL5, CXCL8, CX3CL1, and MCP-1), cell adhesion molecules (VCAM-1 and ICAM-1), and anti-inflammation modulators (KLF2 and eNOS) were quantified by qRT-PCR. **Results** : ChungHyul-Plus decreased expression of inflammatory cytokines and cell adhesion molecules and increased anti-inflammation modulators expression in TNF- α stimulated HUVECs. **Conclusions** : These results suggest that ChungHyul-Plus can be used in the treatment and prevention of vascular inflammation and arteriosclerosis.

Key words: Atherosclerosis, ChungHyul-Plus, Cytokines, HUVECs, Vasculitis

서론

죽상동맥경화 (atherosclerosis)는 중성지방이나 콜레스테롤 등의 지방성 물질이 혈관에 침착하여 혈관이 좁아지고 혈액의 순환에 장애가 발생하는 질환이다. 관상동맥이 좁아져 생기는 관상동맥 질환 (협심증, 심근경색증 등)과 뇌로 가는 혈관이 좁아져 생기는 뇌경색증 및 사지로 가는 혈관이 좁아지는 말초혈관 질환 등이 여기에 해당된다. 죽상동맥경화는 정확한 원인이 아닌 나이, 성별, 식습관, 질병 등 다양한 요인들에 의해 발생한다고 알려져 있으나, 최근에는 발생 과정에서 염증 반응이 중요한 병리적 반응으로 인식되어 이에 대한 다양한 연구가 진행되고 있다¹⁾. 일단 죽상경화성 질환이 발생하면 재발의 가능성이 높고 조절이 어렵기 때문에 질환으로 발전하기 전에 위험 인자를 개선하여 예방하는 것이 가장 효과적인 치료 대책이다^{2,3)}.

한의학에서 죽상동맥경화라는 병명의 표기가 없으나 주로 심장과 간의 기능 실조로 인한 心悸, 中風, 眩, 心忪 및 肝陽上亢 등의 범주^{4,5)}에서 다루어지고 있으며, 주된 요인을 痰飲, 瘀血 및 火熱 등으로 인식하고 있다.

죽상동맥경화의 요인들 중 하나인 콜레스테롤 및 중성지방 등의 지질대사에 대한 연구로는 白何首烏⁶⁾, 枸杞子⁷⁾ 등의 단일 약재 연구와 茵陳 복합추출물⁸⁾, 清心蓮子湯⁹⁾ 및 四物活血湯¹⁰⁾ 등의 처방 연구가 지속적으로 이루어져 왔고, 혈관내피세포에서 혈관 염증에 대한 연구로 쑥 가수분해물¹¹⁾, 콩잎 추출물¹²⁾, 土茯苓¹³⁾ 등의 한약재에 대한 연구는 꾸준히 진행되어 왔으나 처방에 대한 연구는 소수에 불과하다.

본 시료인 청혈플러스는 茵陳, 鬱金, 山楂, 丹蔘으로 구성되어 현재 임상에서 지질대사 이상으로 인한 다양한 증상에 예방 혹은 치료제로 활용되고 있다. 이

에 대한 연구로 茵陳¹⁴⁾, 鬱金¹⁵⁻¹⁷⁾, 山楂¹⁸⁾의 항염증 효능이 규명되어 있고, 이상지질혈증에 대한 茵陳^{19,20)}, 鬱金^{21,22)}, 山楂^{23,24)}, 丹蔘^{25,26)}의 다양한 연구가 진행되었다.

이에 본 실험에서는 청혈플러스가 지질대사에 효능을 나타낸 연구 결과들^{27,28)}에 착안하여 최근 죽상동맥경화의 주된 요인으로 대두되고 있는 혈관 염증에 대한 효능을 확인하고자 인간 혈관내피세포인 Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs)에서 혈관 염증을 유도하는 세포부작인자, 혈관 염증을 진행시키는 염증성 사이토카인 및 염증 억제 조절인자 등에 대한 실험을 통하여 객관적인 효능을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 약재

본 실험에 사용한 청혈플러스 (ChungHuy1-Plus 이하, CHP)의 구성약재들은 [Table 1]과 같으며 (주)옴니허브에서 구입하여 대전대학교 TBRC-RIC에서 정선 후 사용하였다.

Table 1. The Prescription of CHP

Herbal medicine name	Pharmacognostic name	Weight (g)
茵 陳	Artemisia iwayomogi Kitamura	30
鬱 金	Curcuma longa Linne	30
山 楂	Crataegus pinnatifida Bunge	30
丹 蔘	Salvia miltiorrhiza Bunge	30
Total amount		120

2. 시약

사용된 시약은 6,8-dimethyl esculetin (254886; Sigma, U.S.A.), salvianolic acid B (49724; ; Sigma, U.S.A.), quercetin (1592409; Sigma, U.S.A.), EGMTM-2 Medium (Lonza, Switzerland), EGMTM-2 SingleQuotsTM Kit (Lonza, Switzerland), trypan blue (Sigma, U.S.A.), EZ-Cytox (Daeilab, Korea), dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS : Welgene, Korea), Total RNA prep kit (Intronbio, Korea), AccuPower CycleScript RT PreMix (Bioneer, Korea), SYBR Green (Qiagen,

Germany), DEPC-DW (Bioneer Co., Korea)등을 사용하였다.

3. 기기

사용된 기기는 rotary vacuum evaporator (Büchi B-480, Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540, Japan), HPLC (Shimadzu, Co., Japan), CO2 incubator (Forma scientific Co., U.S.A.), clean bench (Vision scientific, Korea), autoclave (Sanyo, Japan), vortex mixer (Vision scientific, Korea), centrifuge (Hanil, Korea), deep-freezer (Sanyo, Japan), ice-maker (Vision scientific, Korea), plate shaker (Lab-Line, U.S.A.), microplate reader (Molecular Devices Co., U.S.A.), (Nanodrop (Thermofisher, U.S.A.), Alpha Cycler 1 PCRmax (PCRmax, U.K.) real time PCR (Qiagen, Germany)등을 사용하였다.

4. 시료 추출

CHP 120 g에 증류수 2,000 ml를 넣어 3시간 동안 환류추출을 한 후 rotary vacuum evaporator로 감압 농축하였으며, 농축된 용액을 freeze dryer로 동결 건조하여 얻어낸 분말 33.54 g (수율 27.95%)을 초저온 냉동고 (-80℃)에서 보관하며 실험에 필요한 농도로 증류수에 희석해 사용하였다.

5. HPLC 분석

HPLC의 이동상을 0.1% phosphoric acid in water (A)와 0.1% phosphoric acid in acetonitrile (B)로 gradient elution system을 적용시켜 0~20분 (A; 80%, B; 20%), 20~30분 (A; 60%, B; 40%), 30~35분(100% B), 35~40분 (A; 80%, B; 20%), 55~70분(5% B)로 설정하였으며. 유속은 1 ml/min, column 온도는 40℃로 유지하였다. 이 후 20 mg/ml 농도로 준비된 CHP를 주입하여 UV wavelength 280 nm에서 6,8-dimethyl esculetin, salvianolic acid B, quercetin 함량을 분석하였고 430 nm에서 curcumin 함량을 분석하였다.

6. 세포 배양

HUVECs는 EGMTM-2 Medium과 EGMTM-2 SingleQuotsTM Kit으로 혼합된 배지를 사용하여 37℃, 5% CO2 조건이 유지되는 세포배양기에서 배양하였으며, 2-3일 주기로 계대 배양하여 실험을 진행

하였다.

7. 세포 생존율 측정

96 well plate에 HUVECs를 1.5×10^5 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양 하였다 실험을 하기 전에 새로운 배양액으로 교체하였고, CHP를 각각 1, 10, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 10 μl 의 EZ-Cytox 용액을 첨가하여 세포배양기에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시 하였다.

8. 세포 내 유전자 발현량 측정

1) RNA 추출

6 well plate에 HUVECs를 106 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였으며, CHP를 각각 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 2시간 동안 전처리 후 10 ng/ml의 TNF- α 를 처리하여 다시 22시간 동안 배양하였다. HUVECs를 PBS로 2회 씻어준 뒤 easy blue 1 ml와 chloroform 200 μl 를 넣고 vortexing 해준 후 13,000 rpm, 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분 동안 원심분리 하였다. 상층액 400 μl 와 binding buffer 400 μl 를 실온에서 1분 동안 반응시킨 뒤 반응액 700 μl 를 column에 주입하여 13,000 rpm에서 30초 동안 원심분리 하였다. Column에 washing buffer A를 700 μl 넣고 13,000 rpm에서 30초 동안 원심분리 후 washing buffer B를 700 μl 넣고 동일하게 원심분리 하였다. Column 하단을 1.5 ml tube로 교체한 후 column에 elution buffer를 50 μl 넣고 1분 동안 반응시킨 뒤 13,000 rpm에서 1분 동안 원심분리하여 추출된 total RNA를 모았다.

2) cDNA 합성

역전사 (reverse transcription) 반응은 RT premix kit의 mixture (reaction buffer, dNTPs mixture, RNase inhibitor, stabilizer, oligo dT15 primer)를 사용하여 total RNA 1 μg 이 되도록 diethyl pyrocarbonate (DEPC) 처리된 증류수에 최종 부피가 20 μl 가 되도록 하여 첨가하였다. 이 20 μl 의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 45 $^{\circ}\text{C}$ 에서 60분 반응시켜 first-strand cDNA를 합성한 후 95 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성을 완료하였다.

3) 유전자 발현량 측정

합성이 완료된 cDNA를 증폭시키기 위하여 qRT-PCR을 진행하였으며, qRT-PCR 전용 tube에 cDNA 1 μl , 각 primer 2 μl , SYBR Green 10 μl , DEPC-DW 5 μl 씩 넣어 다음과 같이 진행하였다. 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분 동안 반응한 다음 94 $^{\circ}\text{C}$ 에서 15초, 60 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초, 72 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30초를 40회 반복하여 진행하였고 이 후 유전자 발현량은 대조군에 비하여 계산하였으며, 사용된 primer의 sequence는 [Table 2]와 같다.

Table 2. The Sequences of Primers in This Study

Primer	F/R*	Sequences
CCL5	F	CGGGAGTACATCAACTCTTTGGA
	R	CAAGCTAGGACAAGAGCAAGCA
CXCL8	F	TCTTGGCAGCCTTCCTGATT
	R	TTTCTGTGTTGGCGCAGTGT
CX3CL1	F	TCACGTGCAGCAAGATGACA
	R	TCCTTGACCCATTGCTCCTT
MCP-1	F	GCTCAGCCAGATGCAATCAA
	R	CTTGCCACAATGGTCTTGA
VCAM-1	F	CCCTACCATTGAAGATACTGG
	R	ATCTCTGGGGGCAACATTGAC
ICAM-1	F	TCTTCCTCGGCCTTCCCATA
	R	AGGTACCATGGCCCCAAATG
KLF2	F	CCTCCTTGACGAGTTTTGTTTTTC
	R	AAGGCATCACAAAGCCTCGAT
eNOS	F	CTCATGGGCACGGTGTATG
	R	ACCACGTCATACTCATCCATACAC
GAPDH	F	GGCAAATTCATGGCACCG
	R	TCGCCCACTTGATTTTGGGA

* F : forward, R : reverse

9. 통계처리

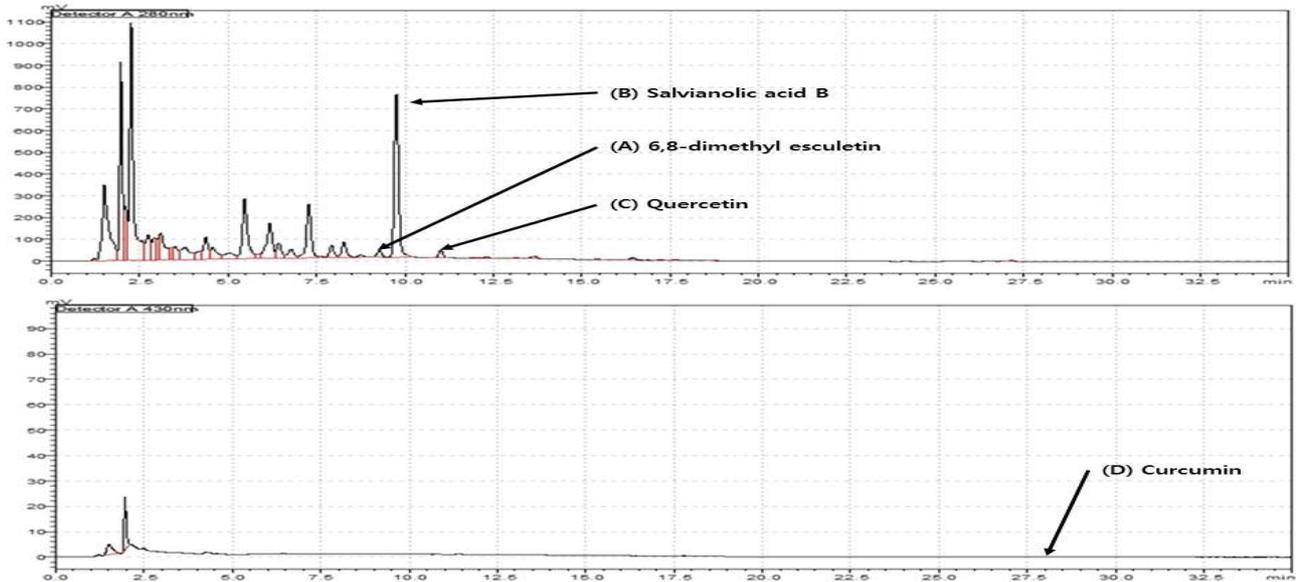
실험 결과는 SPSS 21.0를 이용하여 mean \pm standard error of mean으로 나타내었으며, ANOVA를 사용하여 다중 비교하였고 Duncan test를 통해 $p < 0.05$, $p < 0.01$ 및 $p < 0.001$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

실험 결과

1. HPLC 분석

CHP는茵陳의 지표 성분인 6,8-dimethyl esculetin 이 17.5 mg/L, 丹蔘의 지표 성분인 salvianolic acid B가 693.8 mg/L, 山楂의 지표 성분인 quercetin이 6.1 mg/L 함량으로 검출되었으며, 鬱金の 지표 성분인 curcumin은 검출되지 않았다.[Fig. 1]

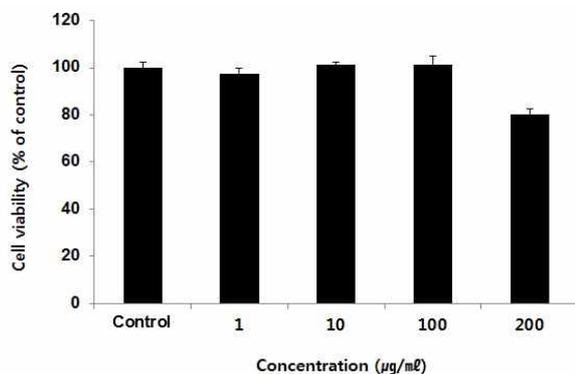
[Fig.1]. Indicator components analysis of CRP. Indicator components of CRP were analysis with HPLC chromatogram. 280 nm : (A); 6,8-dimethyl esculetin, (B) salvianolic acid B, (C) quercetin, 430 nm : (D) curcumin



2. 세포 생존율 측정

HUVECs에서 세포 생존율을 측정한 결과, 대조군이 100.00 ± 2.21 로 나타났을 때, CHP 1, 10, 100, 200 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 $97.32 \pm 2.62\%$, $101.33 \pm 1.14\%$, $101.24 \pm 3.98\%$, $80.47 \pm 2.15\%$ 로 나타났다.[Fig. 2]

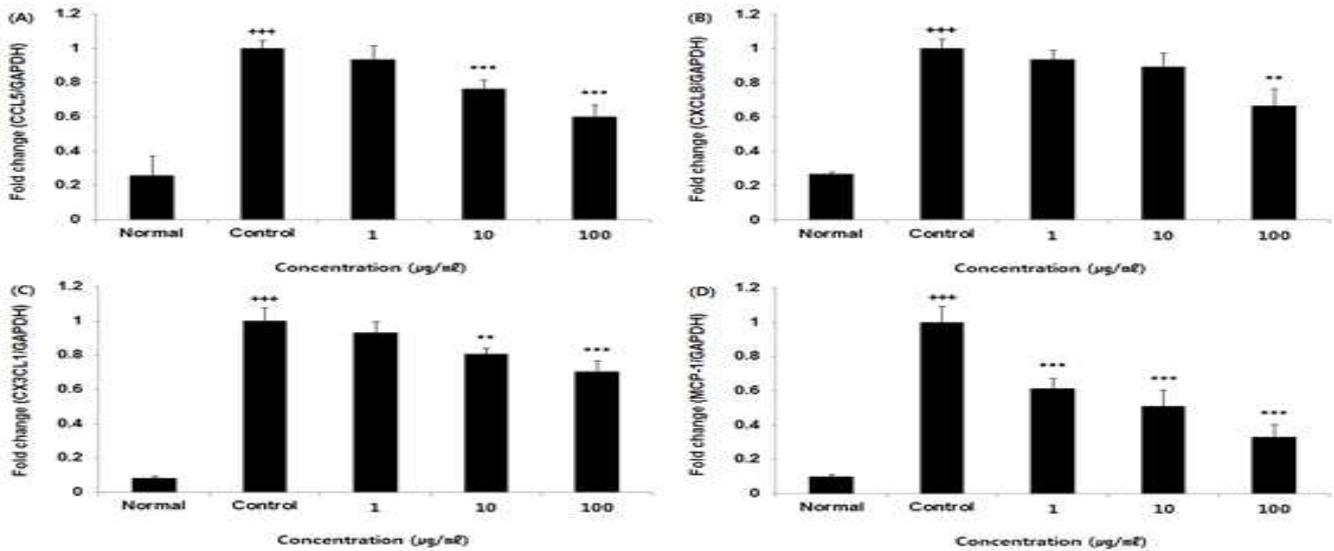
[Fig. 2] Cell viability of CHP in HUVECs. HUVECs were treated with CHP at concentration of 1, 10, 100, and 200 $\mu\text{g/ml}$ for 24 h. Treated cells were exposed by EZ-Cytox for 30 min and then absorbance was measured at 450 nm using microplate reader. Cell viability was calculated as percentage versus control.



3. 염증성 사이토카인 유전자 발현량

CCL5 유전자 발현량을 측정한 결과, 정상군은 0.26 ± 0.11 , 대조군은 1.00 ± 0.04 로 나타났을 때, CHP 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도 투여군에서 각각 0.94 ± 0.08 , 0.77 ± 0.05 , 0.60 ± 0.07 로 나타나, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 (***) : $p < 0.001$) 감소가 나타났다[Fig.3A]. CXCL8 유전자 발현량은 정상군이 0.27 ± 0.01 , 대조군이 1.00 ± 0.06 로 나타났을 때, CHP 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도 투여군에서 각각 0.93 ± 0.06 , 0.89 ± 0.08 , 0.67 ± 0.10 으로 나타나, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 (** : $p < 0.01$) 감소가 나타났다[Fig.3B]. CX3CL1 유전자 발현량은 정상군이 0.08 ± 0.01 , 대조군이 1.00 ± 0.08 로 나타났을 때, CHP 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도 투여군에서 각각 0.93 ± 0.06 , 0.81 ± 0.03 , 0.70 ± 0.06 으로 나타나, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 (** : $p < 0.01$, ***) : $p < 0.001$) 감소가 나타났다[Fig. 3C]. MCP-1 유전자 발현량은 정상군은 0.10 ± 0.01 , 대조군이 1.00 ± 0.09 로 나타났을 때, CHP 1, 10, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도 투여군에서 각각 0.62 ± 0.06 , 0.51 ± 0.09 , 0.33 ± 0.07 로 나타나, 모든 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 (***) : $p < 0.001$) 감소가 나타났다.[Fig. 3D]

[Fig. 3] Effect of CHP on fold change of inflammatory cytokines expression in HUVECs stimulated with TNF- α . HUVECs were pretreated with CHP at concentration of 1, 10, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 2 h, and then stimulated with 10 ng/mL TNF- α for 22 h. Fold change of inflammatory cytokines expression was quantified by qRT-PCR. +++ : $p < 0.001$ vs normal group. ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ vs control group. (A); CCL5, (B); CXCL8, (C) CX3CL1, (D) MCP-1.

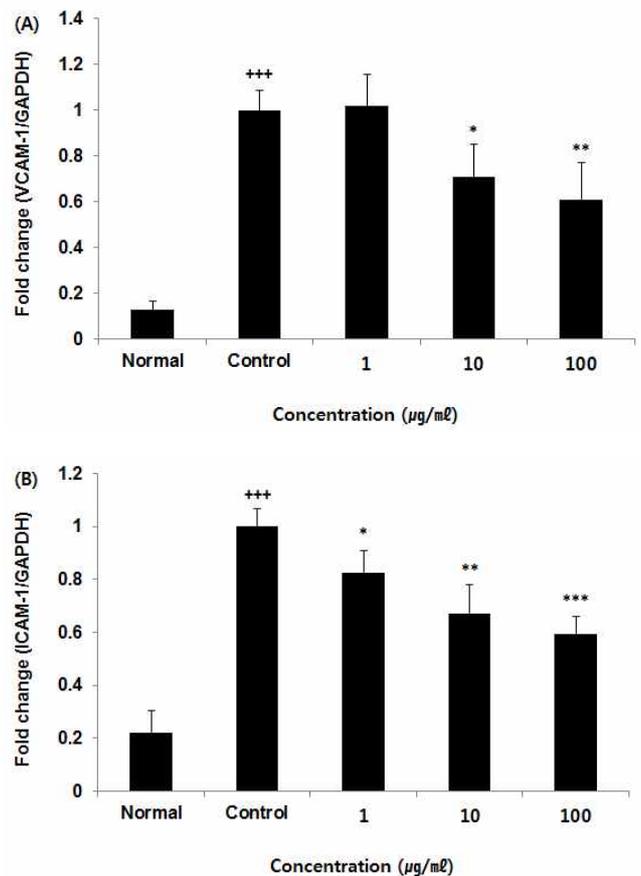


4. 세포부착인자 유전자 발현량

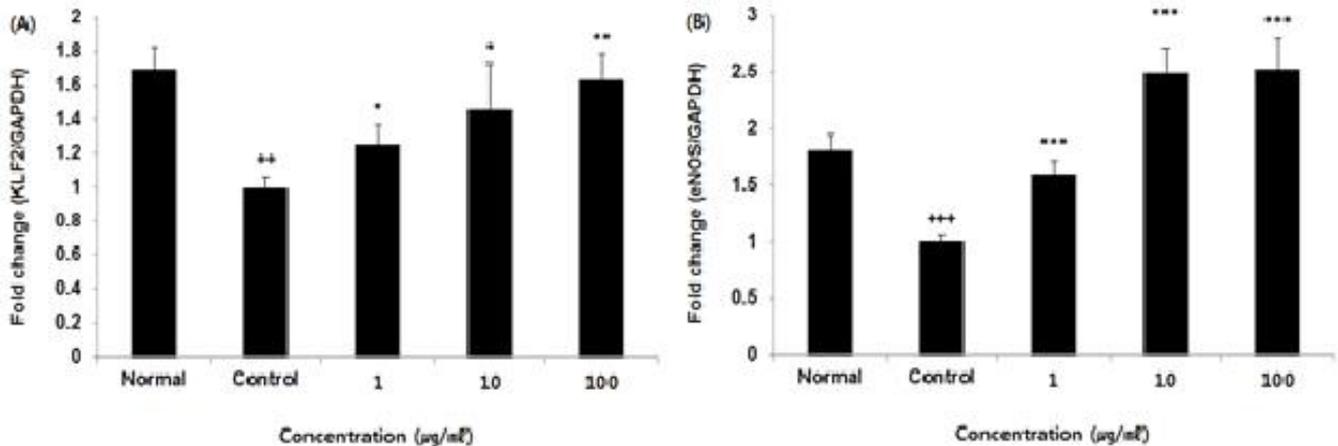
VCAM-1 유전자 발현량을 측정된 결과, 정상군은 0.13 ± 0.04 , 대조군은 1.00 ± 0.09 로 나타났을 때, CHP 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도 투여군에서 각각 1.02 ± 0.14 , 0.71 ± 0.14 , 0.61 ± 0.16 으로 나타나, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$) 감소가 나타났다[Fig. 4A]. ICAM-1 유전자 발현량은 정상군은 0.22 ± 0.08 , 대조군은 1.00 ± 0.07 로 나타났을 때, CHP 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도 투여군에서 각각 0.83 ± 0.08 , 0.67 ± 0.11 , 0.60 ± 0.06 으로 나타나, 모든 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$) 감소가 나타났다.[Fig. 4B]

[Fig. 4] Effect of CHP on fold change of cell adhesion molecules expression in HUVECs stimulated with TNF- α . HUVECs were pretreated with CHP at concentration of 1, 10, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 2 h, and then stimulated with 10 ng/mL TNF- α for 22 h. Fold change of cell adhesion molecules expression was quantified by qRT-PCR. +++ : $p < 0.001$ vs normal group. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ vs control group. (A); VCAM-1, (B); ICAM-1.

[Fig. 4]



[Fig. 5] Effect of CHP on fold change of anti-inflammation modulators expression in HUVECs stimulated with TNF- α . HUVECs were pretreated with CHP at concentration of 1, 10, and 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 2 h, and then stimulated with 10 ng/mL TNF- α for 22 h. Fold change of anti-inflammation modulators expression was quantified by qRT-PCR. ++ : $p < 0.01$, +++ : $p < 0.001$ vs normal group. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, *** : $p < 0.001$ vs control group. (A); KLF2, (B); eNOS.



5. 염증억제 조절인자 유전자 발현량

KLF2 유전자 발현량을 측정한 결과, 정상군은 1.69 ± 0.14 , 대조군은 1.00 ± 0.07 로 나타났을 때, CHP 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도 투여군에서 각각 1.25 ± 0.12 , 1.46 ± 0.27 , 1.64 ± 0.15 로 나타나, 모든 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 (* : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$) 증가가 나타났다[Fig. 5A]. eNOS 유전자 발현량은 정상군이 $1.8 \pm 0.1\%$, 대조군이 $1.0 \pm 0.1\%$ 로 나타났을 때, CHP 1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도 투여군에서 각각 $1.6 \pm 0.1\%$, $2.3 \pm 0.4\%$, $2.5 \pm 0.2\%$ 로 나타나, 모든 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 (***) : $p < 0.001$) 증가가 나타났다.[Fig. 5B]

고찰

죽상동맥경화는 동맥의 가장 내측에 존재하는 내막이 두꺼워지고 콜레스테롤 및 중성지방 등의 지질성 물질이 침착하여 혈관이 굳어진다. 혈관 중막의 근육세포는 파괴되어 얇아지고 외막은 염증세포의 침윤으로 인해 부풀어 혈관이 좁아지거나 막히게 된다. 또한 축적된 콜레스테롤에 의해 혈관 내피세포의 손상이 발생하여 염증이 발생하고 죽상종이 파열되거나 침식되어 혈관 내에 혈전이 생겨 혈관이 좁아지게 된다^{1,2)}. 축적된 콜레스테롤은 조직 내 산화물질에 의해 산화되고 이는 내피세포에 작용하여 세포부

착인자 (VCAM-1, ICAM-1)의 발현을 증가시켜 단핵구를 내피 하조직으로 유입시키고 여러 가지 염증성 사이토카인 (CCL5, CXCL8, CX3CL1)을 분비시킨다²⁹⁻³²⁾.

혈관 염증 반응은 염증세포, 내피세포, 혈관 평활근 세포 및 세포 외 기질 간의 복잡한 상호작용을 나타내며, 혈관손상은 증가된 세포부착인자가 내피세포에 작용하여 염증세포를 유입시키고 염증성 사이토카인을 증가시킨다. 이러한 염증성 사이토카인의 지속적인 증가는 죽상동맥경화증 및 고혈압과 같은 혈관 기능 장애 및 혈관 질환과 관련이 있다. 혈관 내 염증이 발생하는 질환들 중 죽상동맥경화는 세포부착인자인 VCAM-1 및 ICAM-1이 작용하여 혈액 내 콜레스테롤을 이동시키는 지질단백질과 염증 반응을 야기하는 백혈구들이 혈관 내피세포에 침착되어 발생한다²⁹⁻³²⁾. 그리고 CCL5는 호산구와 호염기구, CXCL8은 호중구, CX3CL1은 T 세포와 단핵구, MCP-1은 단핵구의 화학주성인자로 작용하여 각각의 염증세포를 이동시켜 혈관 내 염증반응을 유도하여 죽상동맥경화의 진행에 중요한 역할을 한다³¹⁾. 정상적인 혈관상태를 유지하기 위해 혈관 내 염증을 억제시키는 KLF2는 염증성 사이토카인에 의해 발현이 억제되어 세포 부착인자의 발현이 유도되고 항혈전 및 염증에 대한 효능을 나타내는 효소인 eNOS의 발현을 증가시켜 혈관 염증을 조절하는 스위치 역할을 한다^{33,34)}.

한의학에서 죽상동맥경화는 병리적 양상과 병증에

준하여 볼 때 氣血의 병리적 산물인 痰濁이 血脈에 壅滯不暢하여 血瘀에 이르게 되고, 痰과 瘀가 互結하여 膠着脈道되어 마침내 脈痺가 되면서 발생하는 것으로 정의할 수 있다^{4,35}).

본 실험에 사용한 청혈플러스는 茵陳, 鬱金, 山楂, 丹蔘이 동량으로 구성된 처방으로, 茵陳은 利水滲濕藥으로 清熱利濕하는 효능이 있으며³⁶, 항염증¹⁴ 및 이상지질혈증^{19,20}에 대한 효능이 실험적으로 규명된 바가 있다. 鬱金은 活血祛瘀藥으로 行氣解鬱하며 血分에 들어가 涼血消瘀하여 血中の 氣藥³⁶으로 불리우며, 유효 성분인 curcumin의 항염증¹⁵⁻¹⁷ 및 항고지혈^{21,22} 효능이 보고되어 있으며 혈관내피세포 보호³⁷에 대한 효능 역시 보고된 바가 있다.

山楂는 消食健胃의 효능으로 소화기계 질환에 사용되는 약재이며, 血分에서 化痰散結하는 작용을 한다³⁶. 이 역시 항염증¹⁸ 및 항이상지질혈증^{23,24} 효능이 검증된 바가 있으며, 혈압강하, 관상동맥 확장 작용이 있어 임상에서 죽상동맥경화증에 응용하고 있다³⁸.

丹蔘은 涼血消腫, 活血去瘀 효능으로 瘀血性 증상에 사용하거나 心煩, 失眠, 心腹疼痛 등의 증상에 사용된다³⁶. 동맥경화로 인한 심장병이나 혈전폐색에도 효과적이라고 알려져 있으며³⁹, 이상지질혈증 효능에 대한 국내외 다양한 연구 역시^{25,26} 보고된 바가 있다.

따라서 본 연구에서는 이러한 문헌적 근거와 이상지질혈증에 대한 효능이 검증된 연구 결과들에 착안하여 청혈플러스가 이상지질혈증이 아닌 죽상동맥경화의 또 다른 요인인 혈관 염증에 대한 효능을 검증하기 위하여 혈관내피세포에서 세포부착인자, 염증성 사이토카인 및 염증 조절인자의 유전자 발현량을 측정하였다.

인간 혈관내피세포인 HUVECs에 염증매개물질인 TNF- α 를 처리한 다음 혈관 내피에 지질단백질 및 염증세포들을 부착시켜 죽상동맥경화를 발병시키는 세포부착인자 VCAM-1과 ICAM-1 유전자 발현량을 확인한 결과, TNF- α 를 처리한 대조군은 TNF- α 를 처리하지 않은 정상군에 비해 5배 이상의 발현 증가를 나타내었고, TNF- α 와 청혈플러스를 처리한 실험군은 대조군에 비해 농도 의존적인 감소를 나타내었으며, 청혈플러스 100 μ g/ml 농도에서는 VCAM-1과 ICAM-1 유전자 발현량을 각각 39%와

40% 감소시켰다[Fig.4]. VCAM-1과 ICAM-1의 발현을 비교해보면, 쪽 가수 분해물은 >10 kDa 분획물 1 mg/ml 농도에서 각각 80%와 40% 이상의 발현 억제 효과를 나타내었고¹¹, 土茯苓은 50 μ g/ml 농도에서 각각 80%와 94%의 발현 억제 효능을 나타내었다¹³. 쪽 가수분해물의 경우 청혈플러스보다 많은 1 mg/ml 농도에서 동일한 ICAM-1의 발현 억제능을 나타낸 것은 청혈플러스가 낮은 농도에서 세포부착인자 억제 효능이 있을 것이라 사료된다. 단일 약재인 土茯苓에서 복합물인 본 시료보다 효과적인 결과가 도출되어 향후 본 시료의 개별 약제에 대한 검토를 통하여 이에 대한 결과를 확인한 후 이에 대한 해석이 필요할 것으로 보인다.

염증세포를 이동시켜 혈관 내 염증반응을 야기하는 염증성 사이토카인 CCL5, CXCL8, CX3CL1 및 MCP-1의 유전자 발현량에서는 TNF- α 를 처리한 대조군은 TNF- α 를 처리하지 않은 정상군에 비해 4배 이상의 발현 증가를 나타내었고 TNF- α 와 청혈플러스를 처리한 실험군은 대조군에 비해 농도 의존적인 감소를 나타내었으며, 청혈플러스 100 μ g/ml 농도에서는 CCL5, CXCL8, CX3CL1 및 MCP-1 유전자 발현량을 각각 40%, 33%, 30%, 67% 감소시켰는데[Fig.3], 이는 1 mg/ml 농도에서 CXCL8와 MCP-1 발현량을 30% 감소시킨 쪽 가수분해물 >10 kDa 분획물보다 비교 우위적 억제능을 나타내었다.

마지막으로 염증을 억제하는 조절인자 KLF2와 eNOS 유전자 발현량을 확인한 결과, TNF- α 를 처리한 대조군은 TNF- α 를 처리하지 않은 정상군에 비해 2배의 발현 감소를 나타내었고 TNF- α 와 청혈플러스를 처리한 실험군은 대조군에 비해 농도의존적인 증가를 나타내었으며, 청혈플러스 100 μ g/ml 농도에서는 KLF2와 eNOS 유전자 발현량을 각각 64%와 150% 증가시켰는데[Fig.5], 이는 100 μ g/ml 농도에서 KLF2와 eNOS 유전자 발현량 각각 60%, 40%를 증가시킨 콩잎 추출물보다 효과적인 결과 수치이다.

이상의 결과로 청혈플러스는 세포부착인자와 염증성 사이토카인의 유전자 발현량의 유의적 감소와 더불어 염증을 억제하는 조절인자의 유전자 발현량을 유의적으로 증가시킴으로써 혈관 염증에 대한 객관적 효능이 규명되었다. 따라서 현재 임상에서 활용되고 있는 처방에 대한 객관적 효능 규명을 통해 향후

이상지질혈증과 죽상동맥경화증의 다양한 처방 및 유효 물질 개발에 기초적 자료를 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

결론

혈관염증에 대한 청혈플러스의 효능을 알아보기 위해 인간 혈관내피세포인 Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs)에 염증 유도물질인 tumor necrosis factor- α (TNF- α)를 처리하여 염증과 관련된 유전자들의 발현량을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 청혈플러스는 세포부착인자인 VCAM-1과 ICAM-1 발현을 농도 의존적이고 유의적으로 감소시켰다.
2. 청혈플러스는 염증성 사이토카인인 CCL5, CXCL8, CX3CL1 및 MCP-1 발현을 농도 의존적이고 유의적으로 감소시켰다.
3. 청혈플러스는 염증억제 조절인자인 KLF2와 eNOS 발현을 농도 의존적이고 유의적으로 증가시켰다.

감사의 글

본 연구는 산업통상자원부 지정 대전대학교 난치성 면역질환의 동서생명의학연구 지혁혁신센터의 지원에 의한 것입니다.

Reference

1. Ross R. Atherosclerosis—an inflammatory disease. *New England journal of medicine*. 1999 Jan 14 ; 340(2) : 115-26.
2. Young JL, Libby P, Schönbeck U. Cytokines in the pathogenesis of atherosclerosis. *Thrombosis and haemostasis*. 2002 ; 88(04) :

554-67.

3. Bergheanu SC, Bodde MC, Jukema JW. Pathophysiology and treatment of atherosclerosis. *Netherlands Heart Journal*. 2017 ; 25(4) : 231-42.
4. College of Oriental Medicine, College of Medicine, Dept of Internal Medicine. Eastern Medicine Department of Internal Medicine. *Shuyuantang*. 2001 : 209-14
5. Professor, Department of Internal Medicine, National Oriental Medicine College. *Trigeminal Internal Medicine*. Department of Oriental Medicine. 1995 : 214-5.
6. Choi HY, Ham IH, Lee JY, Yoon YJ, Yang GS, Tae J, et, al. Effects of *Cynanchum Spp.* on the hyperlipidemia in rats induced by triton WR-1339. *The Korea Journal of Herbology*. 2007 ; 22(4) : 279-86.
7. Cho JH, Shin JS, Bae HJ, Kim YB, Kang JK, Hwan SY. Changes of Serum Lipid after Treatment of *Lycii fructus Extract* in Hyperlipemia Rats. *Korean Journal of Clinical Laboratory Science*. 2004 ; 36(1) : 49-54.
8. Kim TY, Oh JM, Kim YS, Jo HK, Yoo HR, Seol IC. Anti-dyslipidemic effect of ACLL extract(*artemisia capillaris thunb, curcuma longa L, lycium chinense, ligustrum lucidum aiton complex extract*) on high cholesterol diet-induced dyslipidemia in mice. *Journal of Haehwa Medicine*. 2016 ; 25(1) : 133-44.
9. Yoon YS, Keum SO, Lee SW, Kim IH, Lee HI, Song YS. Effects of *Cheongshimyeonja-tang* on body weight and serum lipid levels in high fat diet induced obese mice. *Herbal Formula Science*. 2014 ; 22(1) : 123-39.
10. Kang SS, Shin YJ, Jo JJ, Jeon SY. Study of the effects of *Samulhwahyeol-tang* in hyperlipidemic animal model induced with a high-fat diet. *The journal of internal Korean medicine*. 2014 ; 35(2) : 119-32.
11. Kim SY, Yang JE, Song JH, Maeng SH, Lee JH, Yoon NY. Inhibition Effect of Enzymatic Hydrolysate from Japanese Mud Shrimp (*Upogebia major*) on TNF- α -induced

- Vascular Inflammation in HUVEC cells. he Korean Society of Fisheries and Aquatic Science. 2018 ; 51(2) : 127–34.
12. Han JM, Li H, Cho MH, Baek SH, Lee CH, Park HY, Jeong TS. Soy-leaf extract exerts atheroprotective effects via modulation of Krüppel-like factor 2 and adhesion molecules. International journal of molecular sciences. 2017 ; 18(2) : 373.
 13. Yi EY, Kim YJ. Extract of Balloon-flower Inhibited In Vitro Angiogenesis in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. Journal of Life Science. 2017 ; 27(9) : 1059–63.
 14. Noh DJ, Choi JG, Hong SS, Oh MS. Comparison of Anti-inflammatory effects between *Artemisia capillaris* and *Artemisia iwayomogi* by extraction solvents. The Korea Journal of Herbology. 2018 ; 33(3) : 55–62.
 15. Lee JY, Lee EJ, Lee YS, Yoo WK. Effects of curcumin on UVB-irradiated inflammation in HaCaT keratinocyte cells. Journal of Physiology & Pathology in Korean Medicine. 2011 ; 25(6) : 1014–9.
 16. Kim EJ, Song BN, Jeong DS, Kim SY, Cho YS, Park SY. Anti-oxidative and Anti-inflammatory Activities of Fermented Turmeric (*Curcuma longa* L.) by *Rhizopus oryzae*. Journal of Life Science. 2017 ; 27(11) : 1315–23.
 17. Lee JY. The Anti-inflammatory and Cytotoxic Effects of Curcumin Extract of *curcuma longa* on HaCaT keratinocyte cell lines. Daegu Haany University Graduate School Doctoral Thesis. 2011.
 18. Li C, Wang MH. Anti-inflammatory effect of the water fraction from hawthorn fruit on LPS-stimulated RAW 264.7 cells. Nutrition research and practice. 2011 ; 5(2) : 101–6.
 19. Lee JT, Lee BR, Yang GY, Lee H, Yim YK. A Study on the Effect of Herbal-acupuncture with *Artemisiae Capillaris Herba* at GB34 on Hyperlipidemia in Rat. Korean Journal of Acupuncture. 2010 ; 27(1) : 107–23.
 20. Kim YC, Kim SM, Park JH, Seo BI, Choi HS. Preventive effects of Injinho-tang and Haninjinho-tang on hyperlipidemia and liver damage induced by alcohol. The Korea journal of herbology. 2006 ; 21(3) : 47–54.
 21. Arafa HM. Curcumin attenuates diet-induced hypercholesterolemia in rats. Medical Science Monitor. 2005 ; 11(7) : 228–34.
 22. Han JM, Lee JS, Kim HG, Seol IC, Im HJ, Cho JH, Son CG. Synergistic effects of *Artemisia iwayomogi* and *Curcuma longa radix* on high-fat diet-induced hyperlipidemia in a mouse model. Journal of Ethnopharmacology. 2015 ; 173 : 217–24.
 23. Lee SK, Lee SS, Baek JW, Lee SJ, Kim KH. Effect of *Crategii fructus* on serum lipid in high cholesterol diet induced hyperlipidemic rats. Korean Journal Oriental Preventive Medical Society. 2003 ; 7(2) : 13–22.
 24. Seo BI. Preventive effects of water extracts from *Crataegi fructus* on hyperlipiderma and liver damage induced by alcohol. Kor J Herbology. 2005 ; 20 : 35–43.
 25. Ji W, Gong BQ. Hypolipidemic activity and mechanism of purified herbal extract of *Salvia miltiorrhiza* in hyperlipidemic rats. Journal of ethnopharmacology. 2008 ; 119(2) : 291–8.
 26. WANG XR, ZHAO S. The effects of tanshinone II A sulfonate on hemorheology and blood lipid in patients with pulmonary heart disease. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics. 2011 ; 32(3) : 237–8.
 27. Choi KE. The effect of Chunghyl-plus on oxidative damage and hyperlipidemia in db/db mouse. Daejeon University Graduate School Master's Thesis. 2015.
 28. Kim HT. Anti-oxidative and Anti-dyslipidemic Effects of the Chunghyul Plus(CHP) in HepG2 cells and Rats Induced Dyslipidemia by High Cholesterol diet. Daejeon University Graduate School Doctoral Thesis. 2018.
 29. Koo HJ, Park HJ, Byeon HE, Kwak JH, Um SH, Kwon ST, Rhee DK, Pyo S. Chinese Yam Extracts Containing β -Sitosterol and Ethyl

- Linoleate Protect against Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice and Inhibit Muscular Expression of VCAM-1 In Vitro. *Journal of food science*. 2014 ; 79(4) : 719-29.
30. Bae JH, Park JS, Hong GR, Shin DG, Kim YJ, Shim BS. Correlation between inflammatory markers and the progression of atherosclerosis in patients with coronary artery disease. *Korean Journal of Medicine*. 2008 ; 74(1) : 51-8.
31. Sprague AH, Khalil RA. Inflammatory cytokines in vascular dysfunction and vascular disease. *Biochemical pharmacology*. 2009 ; 78(6) : 539-52.
32. Kim JH. Effects of mix-1 on anti-CD40 antibody and recombinant IL-4- induced cytokine production and immunoglobulin E in highly purified mouse B cells. Daejeon University Graduate School Doctoral Thesis. 2004.
33. SenBanerjee S, Lin Z, Atkins GB, Greif DM, Rao RM, Kumar A, Feinberg MW, Chen Z, Simon DI, Luscinskas FW, Michel TM. KLF2 Is a novel transcriptional regulator of endothelial proinflammatory activation. *Journal of Experimental Medicine*. 2004 ; 199(10) : 1305-15.
34. Atkins GB, Jain MK. Role of Kruppel-like transcription factors in endothelial biology. *Circulation research*. 2007 ; 100(12) : 1686-95.
35. Chae WS. Introduction to Oriental Medicine. Daeseongmunhwasa. 1997 : 219.
36. The national college of Korean Medicine Department of Herbology. Department of Herbology. Herbology. Seoul: Younglim Inc. 2007. p.369-370, 411-412, 452-453, 458-459.
37. Seo EA, Chung HT, Ko KH, Kwon KB. Cytoprotective Effects of Radix Curcumae Aromaticae in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Journal of physiology & pathology in Korean Medicine*. 2004 ; 18(6) : 1805-9.
38. National Oriental Medical Department of Heart Internal Medicine. Circulation of Internal Medicine nerve. Seoul, Gunja publishing company. 2010. p.169-173, p.184-189.
39. Bang HJ, Tak US, Hong Y, Kang YH. Korean medicine approach to hyperlipidemia. *J of East-west Medicines*. 1995 ; 20(1) : 25-36.