

TNF- α 로 유도된 혈관내피세포의 혈관염증에 미치는 五積散의 억제 효과

한병혁^{1,2,3}, 윤정주^{1,2,3}, 김혜음^{1,2,3}, 안유미^{1,2,3}, 홍미현^{1,3}, 손찬옥^{1,2,3}, 나세원^{1,2,3},
이윤정^{1,2,3}, 강대길^{1,2,3}, 이호섭^{1,2,3*}

1 : 원광대학교 한의과대학 생리학교실, 2 : 한의학전문대학원 천연물개발학, 3 : 원광대학교 한방심신증후군센터

Inhibitory Effects of Ojeoksan on TNF- α -induced Vascular Inflammation in Human Umbilical Vein Endothelial Cells

Byung Hyuk Han^{1,2,3}, Jung Joo Yoon^{1,2,3}, Hye Yoom Kim^{1,2,3}, You Mee Ahn^{1,2,3},
Mi Hyeon Hong^{1,3}, Chan Ok Son^{1,2,3}, Se Won Na^{1,2,3}, Yun Jung Lee^{1,2,3}, Ho Sub Lee^{1,2,3*}

1 : Department of Physiology, College of Korean Medicine

2 : Department of herbal Resources, Professional Graduate School of Korean Medicine

3 : Hanbang Cardio-Renal Syndrome Research Center

ABSTRACT

Objectives : Ojeoksan, originally recorded in an ancient Korean medicinal book named "Donguibogam" and has been used for the treatment of circulation disorder of blood which was called blood accumulation (血積) in Korean medicine. Therefore, this study was carried out to investigate the beneficial effect of OJS on vascular inflammation in HUVECs.

Methods : We evaluated the effect of OJS on the expression of cell adhesion molecules and protective role in HUVEC stimulated by TNF- α by using Western blot.

Results : Pretreatment with OJS decreased the adhesion of HL-60 cells to TNF- α -induced HUVEC. OJS suppressed TNF- α -induced expression level of cell adhesion molecules such as intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), and endothelial cell selectin (E-selectin). Moreover, OJS significantly decreased TNF- α -induced production of intracellular reactive oxygen species (ROS); and inhibited the phosphorylation of κ B- α in the cytoplasm compared to the experimental group. Pretreatment with OJS inhibited the trans-location of NF- κ B p65 to the nucleus, OJS also inhibited phosphorylation of MAPKs compared to the experimental group. OJS significantly increased the protein expression of Nrf2 and HO-1.

Conclusions : Ojeoksan has a protective effect on vascular inflammation, and might be a potential therapeutic agent for early atherosclerosis.

Key words : Ojeoksan, HUVEC, TNF- α , adhesion molecules, NF- κ B, reactive oxygen species, HO-1

I. 서 론

현대 사회의 잘못된 식습관과 생활습관 등 다양한 원인으로 인한 혈관 질환의 발병률이 매우 높아지고 있다. 이에 따라서 혈관 염증 및 혈관 관련 질환에 대한 관심은 매우 높다. 혈관 염증은 혈관 내벽에 염증이 발생하는 것을 말하며, 혈관 내벽에

염증이 발생함으로 인하여 혈관의 내경이 좁아져 혈액 순환에 장애가 생기게 되며, 이로 인한 조직의 괴사 및 허혈(虛血)을 야기한다. 이러한 혈관 염증은 신체의 다양한 혈관에 해당하며, 죽상 동맥 경화증, 고혈압 등 다양한 증상으로 이어진다고 보고되어 있다^{1, 2)}. 사이토카인의 생성 역시 죽상동맥경화증의 원인이 될 수 있으며³⁾, 혈관부착인자의 발현을 촉진함으로써

*Corresponding author : 이호섭, 원광대학교 한의과대학 생리학교실.

· Tel : +82-63-850-6447 · Fax : +82-63-850-7260 · E-mail : host@wku.ac.kr

· Received : 04 June 2018 · Revised : 19 July 2018 · Accepted : 25 July 2018

죽상동맥경화증의 병변 부위에서 존재하는 대식세포의 활성을 자극하게 된다⁴⁾. Tumor necrosis factor alpha (TNF- α)는 매우 중요한 염증 사이토카인이며 vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), 그리고 endothelial-selectin (E-selectin)와 같은 혈관 부착 인자들의 발현을 증가시킨다⁵⁾.

Nuclear factor-kappa B(NF- κ B)는 전형적으로 inhibitory kappa B (I κ B)에 의하여 억제되는 다양한 종류의 염증반응 조절 인자들의 발현을 증가시킴으로써 염증 반응에서 매우 중요한 역할을 수행한다⁶⁾. I κ B의 인산화는 p38 MAPK, extracellular signal-regulated kinases 1/2 (ERK 1/2), c-jun N-terminal kinase (JNK)과 같은 MAPKs의 활성을 통하여 NF- κ B의 핵 내로의 이동을 활성화 시킨다⁷⁾. NF- κ B의 활성은 염증 전 단계의 사이토카인에 의하여 조절되는 세포 내 활성산소(Reactive oxygen species, ROS)의 발현에 의하여 증가된다. 따라서 ROS/NF- κ B 기전 경로의 주요 조절 인자들은 죽상동맥경화증과 같은 혈관 질환의 치료의 접근에 있어서 매우 중요하다⁸⁾.

Nuclear factor erythroid 2 - related factor 2(Nrf2)는 산화-환원 반응 전사 인자로서, 내피세포 내에서 방어역할을 수행한다. Nrf2는 주로 타겟 유전자로부터 Nrf2를 보호하는 세포질의 억제자 단백질인 Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)의 억제를 조절한다. 하지만 혈관의 손상에 노출되게 되면 Keap1의 발현은 감소하게 되고 이는 Nrf2의 안정적인 상태로 이어지게 된다. 그 이후에 Nrf2의 핵 내 이동이 이루어지게 된다. 세포의 핵 내에서, Nrf2는 작은 단위의 MAF 단백질과 이종이량체를 형성하고 항산화/친전자체 반응 요소(ARE/EpRE)에 결합하게 된다⁹⁾. Heme oxygenase 1 (HO-1)와 같은 ARE/EpRE 매개 유전자의 상향 조절은 HO-1의 저해와 활성의 과정을 통하여 간접적인 항산화 효과를 수여하게 된다^{10, 11)}.

전통 한의학에서는 매우 다양한 종류의 천연 약재가 다양한 병증에 대한 치료 목적으로 사용되어 왔다. 五積散(OJS, Wuji-san in Chinese, Goshaku-san in Japanese)은 총 17개의 약재로 구성된 있는 처방이다(蒼朮, 麻黃, 陳皮, 厚朴, 桔梗, 枳殼, 當歸, 乾薑, 白芍藥, 白茯苓, 白芷, 川芎, 半夏, 桂皮, 甘草, 生薑, 葱白). 오적산에 대한 처방과 기록은 전통 한의학 서적인 『東醫寶鑑』에 기술되어있으며, 오적산의 최초 기록은 중국 전통 의학 서적인 『太平惠民和劑局方』에서 그 내용을 확인할 수 있다^{12, 13)}. 한국에서는 오적산은 한방 건강 치료 중 처방 일수와 의료 비용 면에서 56가지의 처방 중 가장 높은 순위에 있다¹⁴⁾. 또한 오적산은 다섯번째로 빈번하게 처방되는 한약이며¹⁵⁾, 한의학 치료에 있어서 제공되는 주 치료 처방 중 하나이다¹⁶⁾. 이러한 내용은 많은 한의학 기관에서 병증을 다스릴 때에 오적산이 사용된다는 것을 의미한다. 그러나 오적산에 대하여 혈관내피세포(Human umbilical vein endothelial cells, HUVEC)에서의 염증 진행 과정에서 혈관 보호 효과에 대한 기록 효능 연구는 미비한 단계에 있다. 따라서 본 연구에서는 오적산이 혈관 내피 세포에서 혈관 염증 과정에 대한 억제 효과를 지니는지에 대한 효능을 입증하고자 연구를 수행하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시료의 제조

오적산의 동결건조된 시료는 한국한의학연구원에서 분양받아 실험에 사용하였으며, 오적산 시료 제조 방법은 다음과 같다. 오적산을 구성하는 17 종류의 약재는 2008년 HMAX (Jecheon, Korea)와 Omniherb(Yeongcheon, Korea)에서 구입하였으며 이를 100℃의 증류수로 2시간동안 전기 추출기(COSMOS-660; Kyungseo Machine Co., Incheon, Korea)를 이용하여 추출하였다. 그런 다음 standard sieve (NO.270, 53 μ m; Chung Gye Sang Gong Sa, Seoul, Korea)를 이용하여 여과하였다. 40℃ 미만의 온도에서 vacuum (Eyela N-11, Tokyo, Japan)을 이용하여 건조시키기 위하여 증발을 시켰으며, 동결건조하였다(PVTFD10RS, IlShinBioBase, Yangju, Korea). 물 추출물의 총 양은 4.2 kg이며 21.0% 수율로 획득하였다. 동결건조된 오적산 샘플 200 mg을 20 mL의 증류수에 용해하였으며, ultrasonicator를 이용하여 30분 동안 용해시켰다.

2. 세포 배양

인간 혈관내피세포 (HUVEC)는 American Type Culture Collection (ATCC) (CRL-2873; Manassas, VA, USA)에서 구입 하였으며, Human monocytic leukemia cell line (HL-60) 역시 ATCC (CCL-240)를 통하여 구입 하여, 10%의 FBS가 포함되어 있는 RPMI 1640 (Gibco, USA)에서 37℃, 5% CO₂의 농도 조건으로 배양하였다.

3. 세포 부착률 측정

혈관 내피세포를 6-well culture plate에 분주한 후, 세포가 약 70% 정도 자라면 serum free 배지로 교체하여 준 다음 오적산을 각 농도별로 30분간 전처리 후 TNF- α 를 최종 농도 50 ng/mL이 되도록 가하여 6시간 배양하였다. HL-60 세포는 culture dish에서 10% FBS가 함유된 RPMI 1640 배지로 배양한 후 10 μ M 2,7-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein acetoxymethylester (BCECF-AM, Sigma, USA)으로 1시간 동안 염색하였다. 혈관 내피 세포에 부착된 HL-60 세포는 fluorescence microscopy (Nikon Eclipse Ti, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. 또한 측정한 후 0.1% SDS가 포함되어 있는 50 mM Tris-HCl (pH 8.0)를 이용하여 세포를 용해시켜 spectrofluorometer (F-2500, Hitachi, Tokyo, Japan)를 사용하여 485 nm과 535 nm의 파장으로 부착률을 측정하였다.

4. 효소면역측정법

혈관 내피 세포를 96 well plate에 2 × 10⁴ cells/well로 분주한 후 세포가 70% 정도 자라면 오적산을 30분 동안 전처리 하고, TNF- α 를 최종 농도 50 ng/mL이 되도록 가하여 6시간 더 배양하였다. 배양 후, 1% paraformaldehyde로 1시간 고정하고 1% BSA가 함유된 PBS를 well에 넣고 1시간 동안 상온에서 blocking 하였다. 각 well을 세척한 후 ICAM-1,

VCAM-1, E-selectin 1차 항체를 1% BSA가 함유된 PBS에 1:1000으로 희석하여 분주한 다음 4°C 온도에서 overnight 하였다. 반응시킨 후 2차 항체를 상온에서 1시간 동안 처리하였다. 세포 배양 배지에 100 μ l의 TMB single solution (Life technology, Carlsbad, CA, USA)을 각 well에 추가한 다음 배지의 색이 파란색으로 변하면 100 μ l의 1 N HCL를 넣어 반응을 중단한다. 색이 노란색으로 변하게 되면 형광의 강도를 spectrofluorometer (Infinite F200 pro, Tecan, Switzerland)를 이용하여 495 nm 파장에서 측정하였다.

5. 단백질 분리와 western blot 분석

오직산과 TNF- α 를 처리한 혈관 내피 세포를 PBS로 2회 세척하고, RIPA buffer로 세포를 용해하여 단백질을 추출하였다. 단백질 정량은 Bradford법을 이용하여 단백질의 농도를 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 전기 영동하여 분리한 후 nitrocellulose membrane으로 transfer 하였다. 비특이적 항체 결합을 방지하기 위하여 BSA가 함유된 용액에 상온에서 1시간 동안 blocking 하였다. Blocking된 membrane을 1:1000으로 희석한 각 타겟 단백질의 1차 항체를 처리한 다음 1:2000으로 희석한 2차 항체를 상온에서 1시간 반응시키고 ECL solution을 반응시켜 발현 정도를 chemiluminescence (Amersham, Buckinghamshire, UK)을 사용하여 측정 후 정량 하였다.

6. 실시간 역전사 중합 효소 연쇄 반응

혈관 내피 세포로부터 Total cellular RNA는 Trizol reagent를 이용하여 분리하였다. cDNA 합성을 위하여 500 ng mRNA과 20 μ l의 reverse transcription reaction incubated in the SimpliAmp Thermal Cycler (Life technology, Carlsbad, CA, USA)를 섞은 후 42°C 에서 60 분, 94°C 에서 5분 배양하여 합성된 cDNA 실험에 사용할 때까지 -20°C에서 보관하였다. 합성된 cDNA를 이용하여 real-time qRT PCR을 실시하였다. 사용된 primer의 염기 서열은 다음과 같다. VCAM-1 (forward: 5'-ATGCCCTGGGAAGATGGTCGTGA-3', reverse: 5'-TGGAGCTGGTAGACCCCTCGCTG-3'), ICAM-1 (forward: 5'-CTCACCCGTGTACTGGACTC-3', reverse: 5'-CGCCGGAAGCTGTAGATGG-3'), E-selectin (forward: 5'-ATCATCCTGCAACTTCACC-3', reverse: 5'-ACACCTCACCAAACCCCTTC-3'), MMP-2 (forward: 5'-AAGACTGAAGATGTTACTCCAATGGAAG-3', reverse: 5'-AACGTTTGTG CTTGTTCTTGTAGTGG-3'). 1 μ l cDNA sample, 1 μ l primer pairs, 8 μ l ultra-pure distilled water, 그리고 10 μ l SYBR Green PCR Master Mix를 섞어준 다음 Step-One™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 95°C 에서 10 분 동안 denaturation step 을 거쳤다. 그 후 95°C 에서 15 초 동안 총 40번을 반복하였으며, 60°C 에서 60 초 진행하였다. 각각의 RNA sample 은 세 번 반복 실험 을 하였다. mRNA 측정 결과는 GAPDH mRNA 측정 결과에

의하여 표준화하였다.

7. 면역형광염색법

NF- κ B p65의 핵 내로의 이동을 확인하기 위하여 혈관 내피 세포를 Lab-Tek II chamber slide에 배양하였다. 오직산을 30분 동안 전처리한 다음, TNF- α (50 ng/ml)를 추가하여 한시간 동안 추가로 배양하였다. 세포를 4% paraformaldehyd 를 이용하여 고정시켜준 다음 0.1% Triton X-100을 처리하였다. NF- κ B p65 항체를 처리한 다음 형광 라벨이 되어 있는 2차 항체 (fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled secondary antibody (Santa Cruz, Dallas, TX, USA))를 처리하였다. 세포의 핵을 시각화하기 위하여 1 μ g/ml의 DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)를 30분 동안 처리하였다. PBS를 사용하여 세포를 세척한 후, fluorescence microscope (Nikon Eclipse Ti, Tokyo, Japan)를 사용하여 NF- κ B p65 의 핵 내로의 이동 정도를 관찰하였다.

8. Luciferase assay

혈관 내피 세포가 60-70% 정도 culture plate에 자라게 되면 lipofectamine LTX (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용하여 제조사에서 제공한 실험 방법에 의거하여 plasmid를 세포에 transfection 시켜준다. 5 μ g of pGL3-NF- κ B-Luc 또는 Renilla를 세포 배양 배지 5 μ l와 혼합하여 lipofectamine LTX reagent에 잘 섞어준 다음 세포에 처리하여 준다. 72시간이 지난 후 세포에 오직산을 30분 동안 전처리 하여 주고, TNF- α 자극을 1시간 동안 넣어준 다음 용해시켜준다.

Luciferase 활성도는 Renilla-Firefly luciferase dual assay kit (Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)를 이용하여 측정한다.

9. 활성산소 측정

형광 염색 탐침자인 CM-H₂DCFDA를 사용하여 ROS의 생성 정도를 측정하였다. 60mm² dish culture plates에 혈관 내피 세포를 배양하여 주고, 세포가 70% 정도 자라게 되면 오직산을 30분 동안 전 처리 한다. 세포 배양액을 제거한 다음 TNF- α 와 함께 20 μ M CM-H₂DCFDA를 넣은 다음 1시간 동안 세포를 배양한다. 세포에서 생성된 활성산소는 fluorescence microscopy (Nikon Eclipse Ti, Tokyo, Japan)를 사용하여 시각화하였으며, 형광의 강도에 대한 수치는 spectrofluorometer (F-2500, Hitachi, Tokyo, Japan)를 사용하여 485 nm과 535 nm의 파장으로 활성산소의 생성 정도를 측정하였다.

10. 통계분석

실험 성적의 분석은 각 실험군 간의 평균치와 표준편차로 표시하였으며, 실험 결과의 통계처리는 Systat의 SigmaPlot version 10.0을 사용하여 Student's t-test를 통하여 *p* 값이 0.05 이하인 경우 유의한 차이로 판정하였다.

Ⅲ. 결 과

1. TNF- α 에 의해 자극을 받은 HUVEC 세포에서 단핵백혈구로의 세포의 부착에 대한 오적산의 효과

오적산을 세포에 30분 동안 처리해 준 다음 TNF- α 자극을 6시간 준 다음 BCECF-AM을 이용하여 HL-60세포를 HUVEC에 2.5×10^5 cells/ml 분주하여 배양하였다. Figure 1에서 확인할 수 있듯이 TNF- α 에 의하여 증가된 단핵백혈구의 세포 부착 정도가 오적산 전처리 시 농도 의존적으로 TNF- α 단독 처리 군에 비하여 감소하는 결과를 얻을 수 있었다.

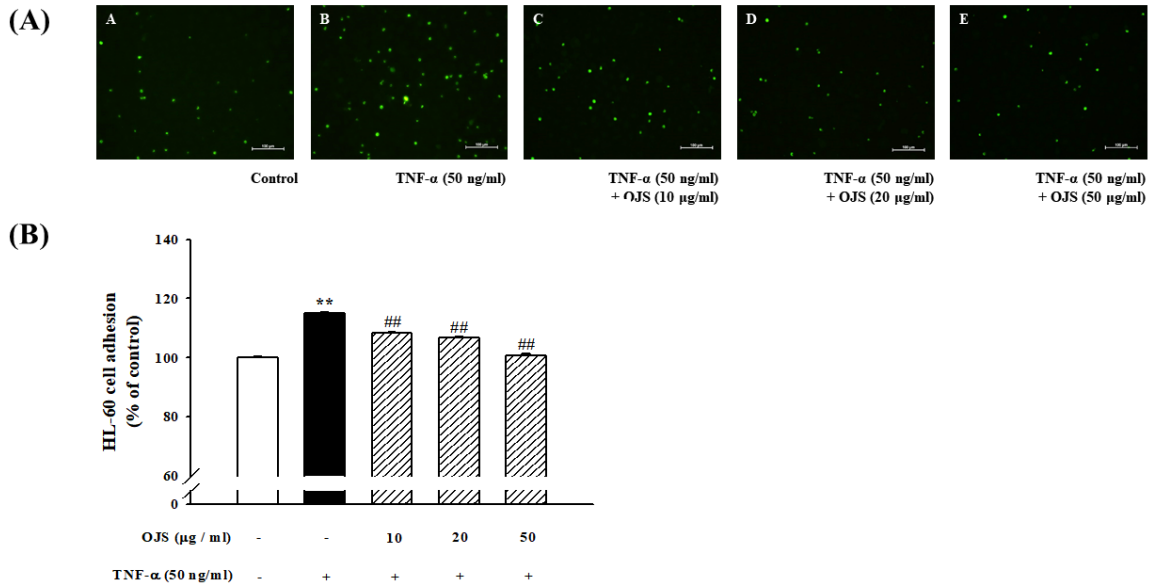


Figure 1. Effect of OJS on TNF- α -induced adhesion of HL-60 cells to HUVECs. Adherent HL-60 cells visualized using fluorescence microscopy (A). The intensity of fluorescence was measured using a spectrofluorometer (B). Data are presented as mean \pm S.E. of five independent experiments with triplicate dishes. ** $P < 0.01$ vs. control, ## $P < 0.01$ vs. TNF- α alone.

2. HUVEC에서 오적산이 TNF- α 에 의해 유도된 VCAM-1, ICAM-1, E-selectin 발현의 억제에 미치는 영향

ELISA 기법을 이용하여 오적산이 adhesion molecule의 발현을 억제시키는 지의 여부를 확인하였다. ICAM-1, VCAM-1, E-selectin의 발현 증가는 오적산을 20 μ g/ml 이상의 농도로 처리하였을 때 농도 의존적으로 TNF- α 단독 처리 군에 비하여 감소하는 결과를 확인하였다(Figure 2A). 이 결과를 바탕으로 세포 부착 인자들의 mRNA 발현 정도를 real-time qRT-PCR을 이용하여 측정하였다. 그 결과 TNF- α 에 의하여 증가된 세포 부착 인자들의 발현이 오적산에 의하여 감소됨을 나타내었다(Figure 2B).

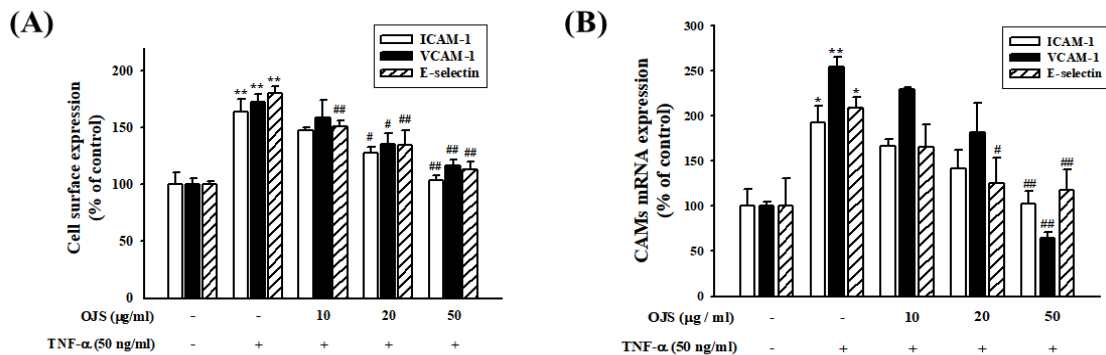


Figure 2. Effects of OJS on TNF- α -induced ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin expressions. HUVECs were pretreated with different concentrations (10–50 μ g/ml) of OJS for 30 min and then stimulated with TNF- α for 6 h. ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin production were then analyzed via ELISA (A). Real-time RT-qPCR analysis of ICAM-1, VCAM-1, and E-selectin mRNA expression (B). Data are presented as means \pm S.E. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs. TNF- α alone

3. 오적산의 NF- κ B 활성 억제 효과

오적산이 세포 부착 인자들의 발현을 억제시키는 데 있어 밀접한 관련이 있는 전사인자 중 하나인 NF- κ B 억제 효과를 확인하기 위하여 오적산을 전처리 한 세포에서 각각 세포질과 핵을 분리하여 단백질 발현을 확인하였다. 그 결과 TNF- α 단독 처리 시, 세포질에서의 I κ B의 인산화가 증가하지만 이를 오적산이 감소시키는 것을 확인하였다. 또한 핵 내에서의 NF- κ B의 발현 역시 오적산에 의하여 감소하는 것을 확인할 수 있었다(Figure 3A). 이를 형광현미경을 통하여 시각화한 결과에서도 오적산은 핵에서의 NF- κ B p65를 감소시키는 역할을 하는 것으로 확인하였다(Figure 3B). 추가적으로 NF- κ B p65 유전자의 발현을 확인하고자 luciferase assay를 이용하여 실험을 진행하였다. 그 결과 NF- κ B p65의 유전자 발현 역시 오적산을 처리하였을 때 농도 의존적으로 TNF- α 단독 처리 군에 비하여 감소하는 것을 실험을 통하여 확인할 수 있었다(Figure 3C).

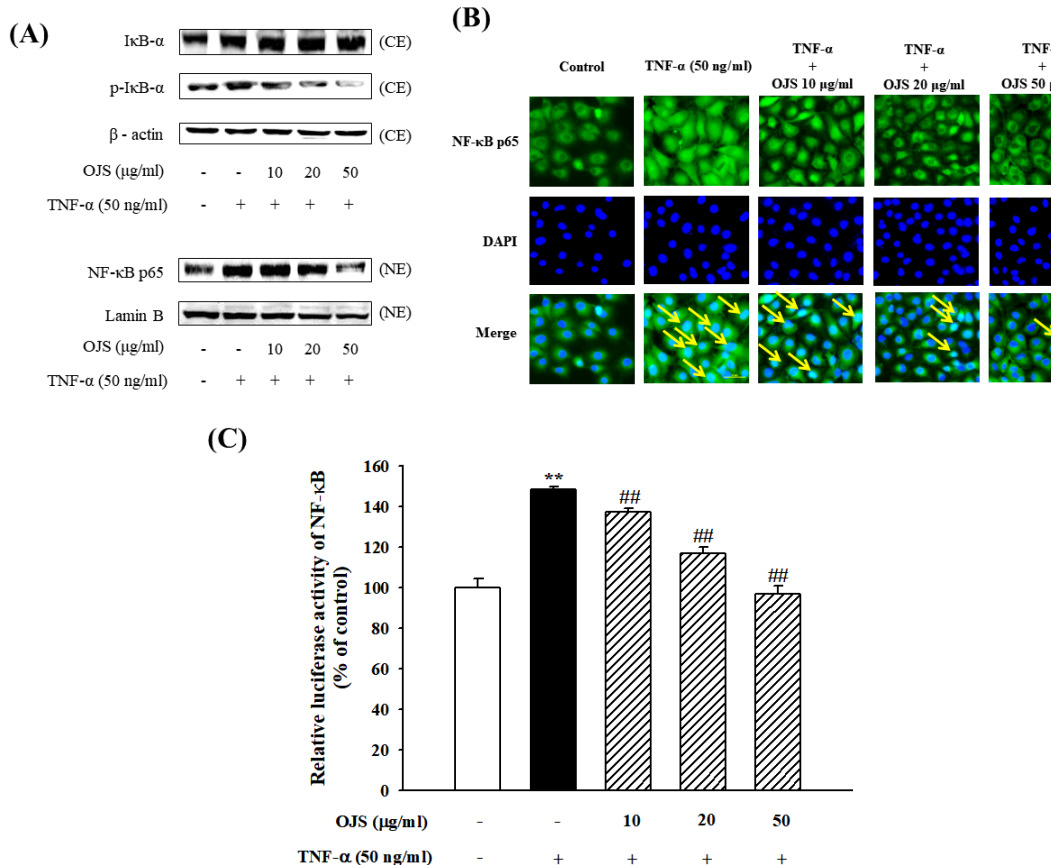


Figure 3. Effects of OJS on TNF- α -induced NF- κ B p65 expression and DNA activation. The nuclear and cytoplasmic protein extracts were blotted with the antibodies specific for I κ B- α , p-I κ B- α , and NF- κ B p65 (A). Immunostaining of NF- κ B p65 by using a monoclonal antibody (green), nuclei stained with DAPI (blue), and composite images generated by superimposing photographs (original magnification \times 400) (B). The luciferase activities are expressed as a percentage of the fluorescence intensity mean \pm S.E. of three individual experiments ** P < 0.01 vs. control, ## P < 0.01 vs. TNF- α alone (C).

4. TLR2, TLR4, MyD88 발현에 대한 오적산의 효과

NF- κ B 활성에 영향을 미치는 TLR-2/-4의 단백질 발현과 이 기전에서 TLR와 결합하여 NF- κ B의 활성을 일으키게 하는 MyD88에 대한 단백질 발현 역시 western blot을 이용하여 실험을 진행하였다. 그 결과 Figure 4에서 보는 바와 같이, 오적산은 증가된 각 인자들의 발현을 감소시키는 역할을 수행하는 결과를 얻었으며 이는 오적산이 TLR-2/-4와 MyD88 기전에서 순기능을 가진다는 것을 나타낸다.

5. 오적산이 HUVEC에서 MAPK 인산화에 미치는 영향

TNF- α 자극을 통하여 증가된 MAPK의 인산화 정도의 발현이 오적산에 의하여 얼마나 감소하는지를 확인함으로써 오적산의 항염증 효능을 확인 하였다. Figure 5에서 확인되는 바와 같이 TNF- α 에 의해 MAPK의 인산화 발현이 증가됨을 볼 수 있다. 하지만 TNF- α 의 자극에 의해 증가된 발현이 오적산을 처리하였을 때 감소함을 확인하였고, 특히 ERK와 p38의 경우 실험군에 비하여 ERK와 p38의 인산화가 농도 유의성 있게 현저하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

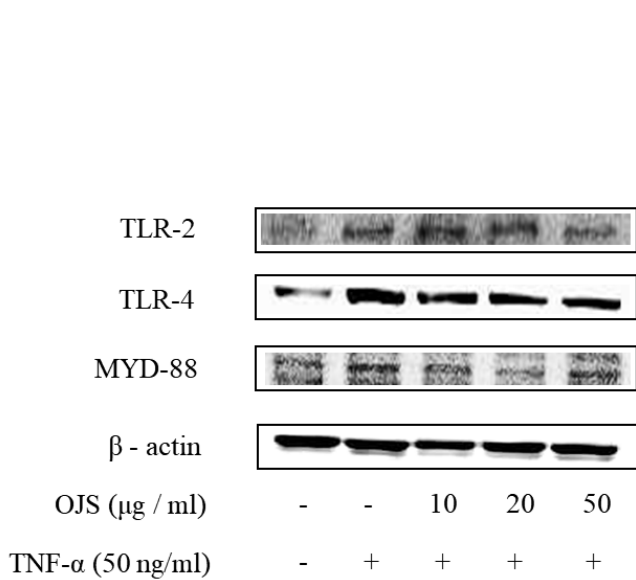


Figure 4. Effects of OJS on the expressions of TLR2, TLR4, and MyD88. HUVECs were pretreated with different concentrations (10 – 50 µg/ml) of OJS for 30 min and then stimulated with TNF-α for 6 h. Western blot analysis of TLR2, TLR4, and MyD88 protein expression.

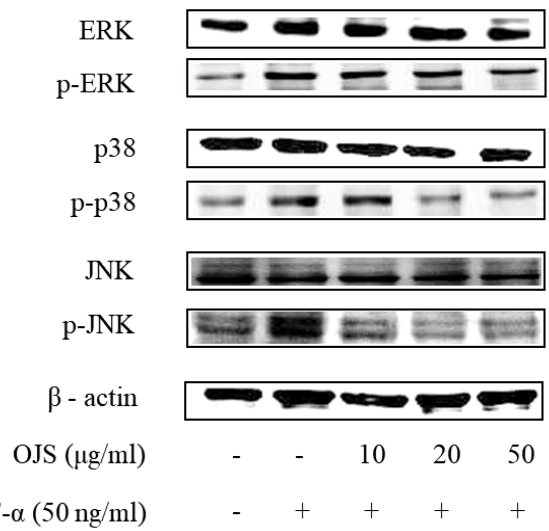


Figure 5. Effect of OJS on phosphorylation of MAPKs. HUVECs were pretreated with OJS (0 – 50 µg/ml) for 30 min and then stimulated with TNF-α (50 ng/ml) for 1 h. MAPKs were detected by specific antibodies and compared to the corresponding signals from phosphorylated MAPKs. Whole-cell extracts were assayed for phosphorylated MAPKs via western blot analysis.

6. 오적산의 TNF-α에 의해 유도된 활성산소(ROS)에 대한 anti-oxidant 효과

TNF-α에 의해 유도된 산화적 스트레스에 대한 오적산의 억제 효과를 확인하기 위한 실험을 진행하였다. 형광현미경을 이용하여 촬영함으로써 시각화한 결과 오적산에 의해 ROS가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 특히 오적산을 50 µg/ml의 농도로 처리하였을 때는 positive control로 처리한 NAC (10 mM) 수준까지 감소하는 경향을 확인하였다. 실험 결과 TNF-α에 의해 control group에 비해 증가된 ROS가 TNF-α 단독 처리 군에 비하여 오적산의 처리 농도 별로 감소 경향을 나타내었다. 따라서 오적산이 TNF-α에 의해 유도된 ROS product에 대해 anti-oxidant 효과를 확인할 수 있었다(Figure 6).

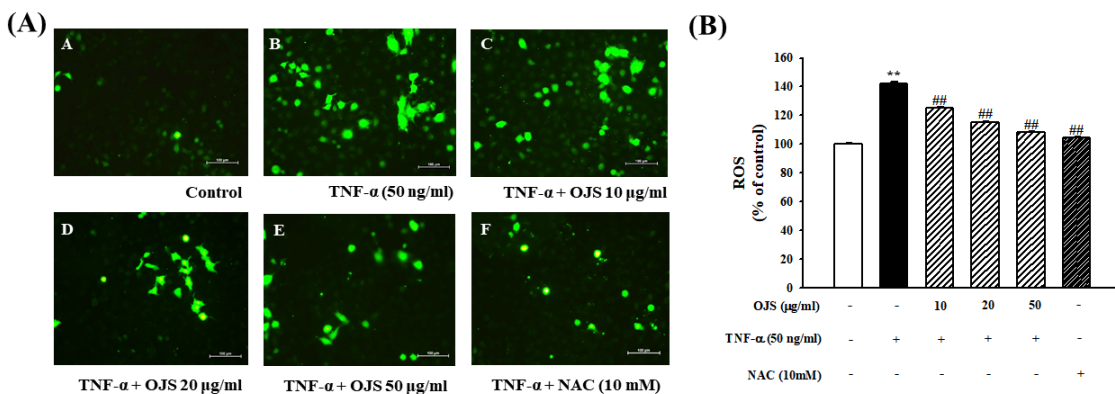


Figure 6. Inhibitory effect of OJS on TNF-α-induced ROS production, ROS production was examined via fluorescence microscopy (original magnification ×100) (A). ROS production was expressed as mean **P < 0.01 vs. control, ##P < 0.01 vs. TNF-α alone (B)

7. 오적산이 HO-1/Nrf2 단백질 발현에 미치는 영향

내피세포에서 보호효과에 있어 중요한 역할을 한다고 알려진 전사인자 Nrf2와 이를 억제하며 조절하는 Keap1, 그리고 항산화와 연관 있는 HO-1의 단백질 발현을 western blot을 통하여 확인하였다. 그 결과 오적산에 의하여 Nrf2의 핵 내에서의 발현이 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, 반대로 세포질 내에서의 keap1의 발현은 오적산에 의하여 억제되는 것을 확인하였다(Figure 7A). 오적산은 HO-1의 발현 역시 증가시키는 것을 확인하였다. 특히 3시간 동안 오적산 처리하였을 때 가장 많은 증가를 보였다(Figure 7B). 추가적으로 오적산을 농도별로 처리하였을 때 오적산 농도 유익성 있게 HO-1의 발현을 증가시키는 것을 확인할 수 있었다. 또한 HO-1 activator, inhibitor로 알려진 CoPP와 SnPP를 각각 처리하여 그 변화를 확인하였다(Figure 7C).

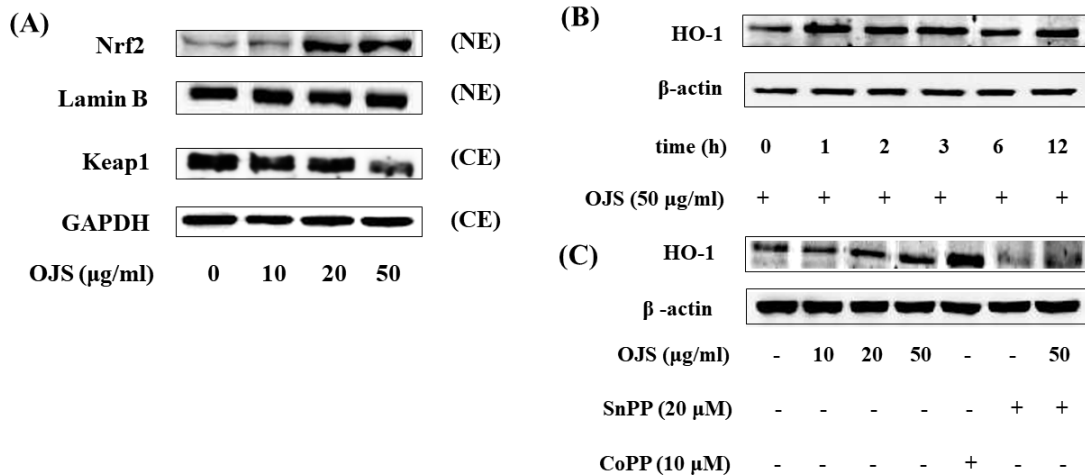


Figure 7. Effects of OJS on HO-1/Nrf2 protein expression. The nuclear (NE) and cytoplasm (CE) extracts were blotted with Nrf2, Lamin B, Keap 1, and GAPDH, respectively. Nuclear Nrf2 levels were normalized to Lamin B levels (A). The total protein extracts were blotted with the antibodies specific for HO-1 (B). Cells were incubated for 3 h with indicated concentrations of OJS (0 – 50 $\mu\text{g/ml}$) (C).

IV. 고 찰

본 연구에서는 한의학 전통 처방인 오적산의 혈적(血積)에 대한 효능에 착안하여, 혈관 내피세포에서 오적산을 전처리한 후 TNF- α 로 염증을 유발하고 이를 비교함으로써 오적산의 혈관염증에 대한 보호 효과를 알아보았다. TNF- α , IL-1 β , IL-6, 세포 부착 인자들과 같은 사이토카인들은 혈관염증에 대한 병리학적인 중요한 요인이자 염증 표시자로 잘 알려져 있다^{17, 18}. 혈관 염증의 초기 단계는 단핵구의 내피세포로의 부착으로 인한 상호작용으로부터 시작되며 이것은 특히 혈관이 많은 내피의 혈관 손상에서 발견된다^{19, 20}. 따라서 본 실험에서는 사람의 혈관 내피 세포인 HUVEC에서 TNF- α 에 의해 유도된 단핵구의 세포 부착이 오적산에 의하여 감소하는 것을 확인하였다. 또한 대표적인 pro-inflammation인 TNF- α 에 의하여 유도된 세포 부착인자들의 발현에 대한 오적산의 영향을 확인하였다. TNF- α 처리에 의하여 증가된 ICAM-1, VCAM-1, E-selectin의 발현이 오적산 전처리에 의하여 농도 의존적으로 감소되는 것을 확인하였으며, 세포 수준에서의 mRNA의 양을 측정하기 위하여 real-time qRT-PCR을 시행한 결과, TNF- α 를 단독 처리한 군에 비하여 오적산을 전처리한 군에서 발현이 유의성 있게 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이 결과들로 보아서 오적산은 세포 부착인자들의 발현을 조절함으로써 죽상동맥경화증을 유발하는 혈관 염증의 초기단계에서 억제자로서의 기능을 수행하는 것을 확인하였다.

NF- κ B는 염증반응, 면역반응, 세포 분화 등에 있어서 매우 중요한 역할을 수행하는 전사인자이다^{21, 22}. NF- κ B는 정상적인 상태에서는 세포질에 p50, p65의 heterodimer와 저해제인 I κ B- α 와 함께 비활성 상태로 존재하지만 염증성 자극을 받게 되면, I κ B- α 를 인산화 시키며 핵 내로 이동한 다음 전사인자로서의 역할을 수행한다²³. 본 연구에서는 오적산이 염증 조절 인자인 NF- κ B의 활성화에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 실험을 진행하였다. 그 결과, TNF- α 자극은 세포질에서의 I κ B- α 인산화와, 핵 내부에서의 NF- κ B 발현을 증가시켰지만 오적산이 이를 억제하는 것으로 나타났다. 또한 핵 내

로의 NF- κ B의 이동 역시 오적산이 감소시키는 것을 확인하였다. 추가적으로 DNA 단계에서의 활성화를 luciferase assay를 통하여 확인하였다. 그 결과 오적산은 TNF- α 에 의하여 유도된 NF- κ B-DNA 결합 활성을 억제하였다. 이 결과들을 종합하면, 오적산은 I κ B- α 의 인산화 억제를 통하여 NF- κ B 활성을 조절하는 것으로 생각되며, NF- κ B의 활성을 통해 발생하는 다양한 염증 단백질의 발현을 억제하여 염증 과정을 조절하는 것으로 생각된다. 추가적으로 TLR은 선천성 면역 체계에서 염증 반응을 조절하는 중요한 역할을 수행한다²⁴. 기존의 연구에서 TLR4와 TLR 2의 발현은 pro-inflammatory 조절자에 의하여 발현이 유도되는 것으로 입증되었다²⁵. 이 과정에서 MyD88은 매우 중요한 신호 변환 역할을 수행하며, 이는 NF- κ B와 활성산소의 발생에 있어서 하위 단계의 전사인자를 조절하는 것으로 알려져 있다²⁶. 따라서 TLR-2/-4와 MyD88의 단백질 발현을 western blot을 통하여 확인하였으며 그 결과 오적산이 이 단백질들의 발현을 억제하였다.

MAPK 역시 세포의 성장과 분화에 있어서 매우 중요한 조절자 역할을 수행한다. MAPK는 사이토카인과 세포의 stress에 반응하며 이는 염증과 면역 체계와 밀접한 관련이 있으며, 추가로 MAPK는 NF- κ B의 기전 경로를 조절하는 중요한 역할 또한 수행한다고 알려져 있다²⁷. 따라서 TNF- α 에 의하여 염증이 유도된 혈관 내피 세포에서 MAPKs/NF- κ B의 경로에 대한 오적산의 효과를 알아보기 위하여 ERK1/2, p38, 그리고 JNK와 같은 MAPK의 인산화 정도를 western blot을 통하여 확인하였다. 본 실험의 결과는 오적산이 MAPK의 인산화를 억제하며 이를 통하여 NF- κ B의 경로 또한 억제함으로써, 혈관염증에 대한 억제자로서 탁월한 효능이 있음을 나타낸다.

산화적 스트레스는 초기단계의 죽상동맥경화증에서 발생하며, 이는 혈관염증으로 이어지는 데에 있어서 매우 중요한 역할을 한다²⁸. ROS/NF- κ B 기전 경로는 혈관 질환에 대한 염증 반응에 있어서 매우 중요한 조절 인자라고 알려져 있다. 따라서 혈관 내피세포에서의 활성산소 생성을 CM-H₂DCFDA 염색을 통하여 측정하였으며 면역형광 염색을 통하여 시각화하여 관찰하였다. 그 결과 TNF- α 에 의하여 유도된 활성산소의 생성은

현저하게 증가하였으며 이를 오적산이 완화시켜주는 것을 확인할 수 있었다.

HO-1의 발생 유도는 HO-1이 CO, bilirubin, biliverdin을 생성하는 과정을 통하여 염증을 조절하는 역할을 한다¹⁰⁾. 따라서 혈관 염증에서 HO-1의 역할을 이해하는 것은 염증에 대한 조절에 있어서 매우 중요한 연구 가치가 있다. 죽상 동맥경화증에서 HO-1은 매우 밀접한 관련이 있으며 HO-1은 혈관 세포에서 잘 확립된 심혈관 위험 인자에 의하여 유도된다. HO-1 반응은 다양한 기전 경로를 통하여 죽상 동맥 경화증에 대하여 혈관 벽을 보호하는 반응을 보인다²⁹⁾. HO-1의 보호 효과는 발현에 있어서 특정한 위치와 발현량에 의존한다. 그 결과 내피 세포에서의 HO-1의 발현은 죽상 동맥경화증을 약화시킨다. 본 실험 결과에 의하면 혈관 내피세포에서 오적산은 HO-1의 발현을 증가시켰다. 추가적으로 오적산은 HO-1의 발현과 관련이 있는 Nrf2의 발현 역시 증가시켰다.

V. 결 론

오적산은 혈관내피세포에서 ROS/NF- κ B 신호전달 체계를 억제하고, Nrf2/HO-1 발현을 유도함으로써 혈관부착인자의 발현의 감소를 유도하였다. 그러므로 혈관 염증 과정에 대한 보호 효과를 나타냄으로써, 이러한 결과는 한약재를 이용한 만성 심혈관질환 치료에 중요한 기초자료를 제공하는데 기여할 수 있다.

감사의 글

본 논문의 연구는 원광대학교 (2018)의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. Tay SS, Mc Cormack A, Rose ML. Effect of cognate human CD4+ Tcell and endothelial cell interactions upon chemokine production. *Transplantation*. 2004; 78(7): 987-94.
2. Uzel G, Pachman LM. Cytokines in juvenile dermatomyositis pathophysiology: potential and challenge. *Curr Opin Rheumatol*. 2003; 15(6): 691-7.
3. Liu X, Pan L, Wang X, Gong Q, Zhu YZ. Leonurine protects against tumor necrosis factor- α -mediated inflammation in human umbilical vein endothelial cells. *Atherosclerosis*. 2012; 222: 34-42.
4. Rao RM, Yang L, Garcia-Cardena G, Liscinskas FW. Endothelial-dependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall. *Circ Res*. 2007; 101: 234-47.
5. Sana TR, Janatpour MJ, Sathe M, McEvoy LM, McClanahan TK. Microarray analysis of primary endothelial cells challenged with different inflammatory and immune cytokines. *Cytokine*. 2005; 29: 256-69.
6. Gloire G, Legrand-Poels S, Piette J. NF-kappaB activation by reactive oxygen species: fifteen years later. *Biochem Pharmacol*. 2006; 72(11): 1493-505.
7. Guha M, Mackman N. LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal*. 2001; 13(2): 85-94.
8. Kumar S, Sharma A, Madan B, Singhal V, Ghosh B. Isoliquiritigenin inhibits IKappaB kinase activity and ROS generation to block TNF-alpha induced expression of cell adhesion molecules on human endothelial cells. *Biochem Pharmacol*. 2007; 73: 1602-12.
9. Li L, Kobayashi M, Kaneko H, Nakajima-Takagi Y, Nakayama Y, Yamamoto M. Molecular evolution of Keap1. Two Keap1 molecules with distinctive intervening region structures are conserved among fish. *J Biol Chem*. 2008; 283: 3248-55.
10. Liu XM, Peyton KJ, Ensenat D, Wang H, Hannink M, Alam J, Durante W. Nitric oxide stimulates heme oxygenase-1 gene transcription via the Nrf2/ARE complex to promote vascular smooth muscle cell survival. *Cardiovasc Res*. 2007; 75: 381-89.
11. Alam J, Cook JL. Transcriptional regulation of the heme oxygenase-1 gene via the stress response element pathway. *Curr Pharm Des*. 2003; 9(30): 2499-511.
12. The Korean Journal of Oriental Medical Prescription, Herbal Formula Science. A Prescripional Study of Ojeoksan on Clinical Application. 2012; 20(2): 153-64.
13. Lee SI. CheonJinChubangHaesul. Seoul : Seongbosa. 1987 : 118
14. National Health Insurance Corporation, Health Insurance Review & Assessment Service. National Health Insurance statistical yearbook, National Health Insurance Corporation and Health Insurance Review and Assessment Service. 2010: 300-1.
15. Lee JT. Research on intake of Chinese medicine by Korean. Korea Food and Drug Administration. 2006: 94.
16. Bak YH, Huang DS, Shin HK. The analysis of herbal medicine preparations equipped in traditional Korean medical clinics. *The Korean J of Oriental Med Prescrip*. 2010; 18(1): 43-56.
17. Tuttolomondo A, Pecoraro R, Pinto A. Studies of selective TNF inhibitors in the treatment of brain injury from stroke and trauma: a review of the evidence to date. *Drugs Des Devel Ther*. 2014; 7(8): 2221-38.
18. Dustin ML, Rothlein R, Bhan AK, Dinarello CA, Springer TA. Induction by IL-1 and interferon-

- gamma: tissue distribution, biochemistry, function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol*. 1986; 137(1): 245-54.
19. Cleman JE, Huentelman MJ, Kasparov S, Metcalfe BL, Paton JF, Katovich MJ, Semple-Rowland SL, Raizada MK. Efficient large-scale production and concentration of HIV-1-based lentiviral vectors for use in vivo. *Physiol*. 2003; 12: 221-8.
 20. Luo SF, Wang CC, Chen CS, Helenius LD, Yang CM. Induction of cyclooxygenase-2 by lipopolysaccharide in canine tracheal smooth muscle cells : involvement of p 42, 44 and p 38 mitogen-activated protein kinases and nuclear factor-kappa B pathways. *Cell Signal*. 2003; 15: 497-509.
 21. Korhonen P, Helenius M, Salminen A. Age-related changes in the regulation of transcription factor NF-kappaB in rat brain. *Neurosci Lett*. 1997; 255: 61-4.
 22. Lawrence T, Gilroy DW. Possible new role for NF- κ B in the resolution of inflammation. *Nat Med*. 2001; 7: 1291-7.
 23. Brasier AR. The nuclear factor-kappaB-interleukin-6 signaling pathway mediating vascular inflammation. *Cardiovasc Res*. 2010; 86: 211-8
 24. A Banerjee, S Gerondakis. Coordinating TLR-activated signaling pathways in cells of the immune system *Immunol. Cell Biol*. 2007; 85: 420-4.
 25. Frantz S, Kobzik L, Kim YD, Fukazawa R, Medzhitov R, Lee RT. Toll4 (TLR4) expression in cardiac myocytes in normal and failing myocardium. *J Clin Invest*. 1999; 104(3): 271-80.
 26. Y Liu, H Yin, M Zhao, Q. LuTLR2 and TLR4 in autoimmune diseases: a comprehensive review *Clin. Rev Allergy Immunol*. 2014; 47: 136-47.
 27. Surh YJ, Chun KS, Cha HH, Han SS, Keum YS, Park KK, Lee SS. Molecular mechanisms underlying chemopreventive activities of anti-inflammatory phytochemicals: down-regulation of COX-2 and iNOS through suppression of NF- kappa B activation. *Mutat Res*. 2001; 480-481: 243-268
 28. Chen JW, Chen YH, Lin FY, Chen YL, Lin SJ. Ginkgo biloba extract inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced reactive oxygen species generation, transcription factor activation, and cell adhesion molecule expression in human aortic endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2003; 23: 1559-66.
 29. Kato H, Amersi F, Buelow R, Melinek J, Coito AJ, Ke B, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski J. Heme oxygenase-1 overexpression protects rat livers from ische