

원 저

丹蔘散의 거품세포 형성 및 혈관평활근세포 증식 억제를 통한 항동맥경화 효과

유도균, 최동준, 한창호, 정승현, 신길조, 이원철, 강윤호

동국대학교 한의과대학 내과학교실

Dansam-san (丹蔘散) Inhibits Atherosclerosis through Regulation of Foam Cell Formation and Vascular Smooth Muscle Proliferation

Do-kyun Ryu, Dong-jun Choi, Chang-ho Han, Seung-hyun Jung,
Gil-cho Shin, Won-chul Lee, Yoon-ho Kang

Dept. of Oriental Medicine, Graduate School, Dongguk University

Objectives : This study was carried out to investigate the inhibitive effect of a combined-herb prescription of *Dansam-san* (DSS) on formation of foam cells and cytokine.

Methods : Experimental formation of foam cells was induced on macrophage RAW 264.7 with ox-LDL. The effect of DSS extract was observed by measuring the changes of CD36, PPAR- α , MMP-9, iNOS expression and changes of formation level of foam cells after treating experimentally induced foam cells with DSS extract. Then the antioxidative effect of DSS extract was compared with butylated hydroxyanisole (BHA).

Results and Conclusions : Results obtained are as follows:

1. DSS extract showed significant antioxidative effect at 8 mg/ml or more.
2. DSS extract inhibited the formation of foam cells.
3. DSS extract inhibited the creation and revelation of conversion-related material about foam cells.
4. DSS extract prohibited the increase of smooth muscle of vessels.

Key Words : *Dansam-san*, foam cells, atherosclerosis

서 론

2004 통계청 사망원인 분석에 의하면 동맥경화로 인한 심근경색, 뇌졸중을 포함하는 순환기계 질환에 의한 사망자는 전체의 23.7%로 호흡기계

(5.8%), 소화기계(4.9%) 질환에 비해 4배 이상 높은 것으로 나타났다¹⁾. 이러한 순환기계 질환의 주요 병인인 동맥경화의 발병기전으로 ‘손상반응설(response-to-injury hypothesis)’²⁾ 외에 최근 동맥경화의 위험인자들이 세포내 산화스트레스를 증가시키고, 혈관 염증반응을 조절하는 유전자발현을 변화시켜 동맥경화를 발병시킨다는 ‘산화 변이 가설(oxidative modification hypothesis)’^{3,4)}이 제시되면서 산화스트레스가 동맥경화 발병에 관여할 것이라는 많은 연구 결과들이 보고되고 있다.

丹蔘散은 東醫治療經驗集成⁵⁾에 기재된 처방으로

· 접수 : 2007년 5월 17일 · 논문심사 : 2007년 5월 18일
· 채택 : 2007년 6월 4일
· 교신저자 : 신길조, 경기도 성남시 분당구 수내동 87-2
동국대학교 분당한방병원 1내과
(Tel : 031-710-3710, Fax : 031-710-3780,
E-mail : shingcho@naver.com)

당뇨병이 있는 환자의 渴症, 虛飢症, 無力感, 皮膚乾燥 및 手掌紅斑 등을 치료하고, 혈당을 강하시키는 효과가 있다고 하였다. 丹蔘에 대한 실험적 연구로는 PGE2의 생성을 억제할 통한 항염증 작용⁶⁾, hypoxia/reoxygenation으로 유도된 혈관내피세포 손상 완화 효과⁷⁾ 등이 보고되었다. 그 동안 丹蔘을 君藥으로 사용한 복합처방에 대한 연구가 거의 없었다. 이에 저자는 丹蔘의 실험적 연구를 바탕으로 적용분야를 예측하여 丹蔘散의 항동맥경화 효능을 검증하고자 하였다.

생쥐 대식세포인 Raw264.7 cell에 ox-LDL로 거품세포 형성을 유도한 다음 丹蔘散 추출물을 처리하여 거품세포의 형성 정도를 관찰하였고, CD36, PPAR- γ , MMP-9, iNOS의 발현 변화를 측정하였다. 또한 丹蔘散 추출물이 PDGF로 유도된 혈관평활근세포의 증식 억제에 대한 변화를 관찰하였다.

이상의 실험 결과 丹蔘散 추출물이 거품세포 형

성과 생성 cytokine을 억제하는 효능을 보여 이에 보고하는 바이다.

실 험

1. 丹蔘散 추출물의 제조

본 실험에 사용한 丹蔘散(DSS)은 동국대학교 한방병원에서 제조된 것을 사용하였다(Table. 1). 약물의 조제는 일반적인 물추출물 제조방법에 의하여 丹蔘散 2貼을 증류수 500ml에 넣고 3시간동안 진탕한 후 여과하였다. 그 여액을 rotary evaporator를 이용하여 50ml로 감압·농축한 후 동결 건조하여 사용하였다(수득률 15%).

2. 세포주와 세포배양

실험에 사용한 마우스의 대식세포(macrophage)인

Table 1. The Amount and Composition of Dansam-san(DSS) Extract

Species	Part used	Latin name		weight(g)
<i>Salvia miltiorrhiza</i> BGE.	Roots	<i>Salviae Miltiorrhizae Radix</i>	(丹 蔘)	10
<i>Pueraria thunbergiana</i> BENTH.	Roots	<i>Puerariae Radix</i>	(葛 根)	10
<i>Anemarrhena asphodeloides</i> BGE.	Rhizomes	<i>Anemarrhena asphodeloides</i>	(知 母)	10
<i>Dioscorea batatas</i> DECNE.	Rhizomes	<i>Dioscorea opposita</i>	(山 藥)	8
Gypsum	CaSO ₄ · 2H ₂ O	<i>Gypsum fibrosum</i>	(石 膏)	8
<i>Scrophularia buergeriana</i> MIQUEL	Roots	<i>Scrophularia ningpoensis</i>	(玄 蔘)	8
<i>Ophiopogon japonicus</i> KER-GAWL.	Tuberous roots	<i>Liriopsis Tuber</i>	(麥門冬)	8
<i>Scutellaria baicalensis</i> GEORGI	Roots	<i>Scutellaria Radix</i>	(黃 芩)	4
<i>Coptis chinensis</i> FRANCH.	Rhizomes	<i>Coptidis Rhizoma</i>	(黃 連)	4
<i>Lonicerae japonica</i> THUNB.	Lignum	<i>Lonicera japonica</i>	(忍冬藤)	4
<i>Prunus meme</i> SIEB. et ZUCC.	Fruits	<i>Mume Fructus</i>	(烏 梅)	4
<i>Zizyphi jujuba</i> MILL. var. <i>inermis</i> REHDER	Fruits	<i>Jujubae Fructus</i>	(大 棗)	4
T O T A L				82

RAW264.7 cell은 Korean Cell Line Bank(KCLB, Korea)에서 구입하였다. 세포는 37°C, 5% CO2 incubator에서 10% Fetal Bovine Serum(FBS; Sigma, USA)가 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, USA)를 사용하여 배양하였다. 오염방지를 위해 항생제로 100unit/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin (Gibco/BRL, USA)을 첨가하였다. 세포는 플라스크의 80% 정도 자랐을 때 PBS로 씻어 주고, Trypsin-EDTA(Gibco/BRL)를 처리하여 계대 배양하였다. 배지는 2일마다 교환하였다. 한편 혈관 평활근세포는 200-250mg 슛트 Sprague Dawley계 흰 쥐의 가슴대동맥을 적출한 후 0.1% collagenase를 이용하여 평활근세포를 분리·배양하였다. 혈관평활근 세포는 7-12회 계대배양 후 본 실험에 사용하였다.

3. 첨가량 조절을 위한 MTT assay

실험에서 약물의 첨가농도는 MTT assay를 통해 결정되었다. MTT assay는 우선 96well plate에 RAW264.7 cell(5×10³cells/well)을 12시간 배양한 후 FBS를 첨가하지 않은 serum free medium (Sigma)으로 교환하여 4시간동안 안정화시키고, 1, 5, 10, 20mg/ml 농도로 丹蔘散 추출물을 첨가하여 24시간 배양하였다. 그리고 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT; Sigma co.) 2mg/ml를 넣고, incubator에서 4시간 배양한 후 dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma)로 용해 시켜 595nm의 파장에서 microplate reader(Molecular devices, USA)로 흡광도를 측정하여 세포생존률을 계산하였다. 丹蔘散 20mg/ml까지는 세포생존률의 변화가 일어나지 않아 1, 2mg/ml를 첨가량으로 결정하였다.

4. 항산화효과 조사

항산화능력을 측정하기 위해 riboflavin를 이용한 활성산소 소거실험을 실시하였다. 우선 photocell에

40mM buffer 2.6ml, nitroblue tetrazolium 100µl, EDTA/cyanide 200µl, riboflavin 100µl, 항산화 측정할 농도별 丹蔘散 추출물 100µl을 넣고 3번 섞어주었다. 흡광도(absorbance) 560nm에서 autozero를 잡고 light box에서 1분 동안 조사한 후 흡광도를 측정하였다. 이 작업을 7번 반복하여 평균값을 계산하였다.

5. ox-LDL에 의한 대식세포의 거품세포 전환 억제 관찰

RAW264.7 cell-5×10⁵cells/well을 coating slide에 균일하게 plating한 다음 50µg/ml의 ox-LDL에서 2시간 처리하였다. 丹蔘散 추출물을 농도별로 처리한 후 37°C에서 12시간 배양하였다. 배지를 제거한 후 10% NBF에 10분간 고정한 후 Oil red O 염색을 실시하였다. Oil red O 용액에 10분간 처리하고 85% propylen glycol에서 분별한 후 Harris Hematoxylin 로 대조염색하였다.

6. 거품세포전환 관련 물질의 mRNA 발현 억제 조사

CD36, peroxisome proliferator activated receptor (PPAR)-γ, matrix metalloproteinase(MMP) -9, inducible nitric oxide synthase(iNOS) mRNA 발현 억제를 조사하기위해 RAW264.7 cell - 5×10⁵cells/well을 6well 에 plating 한 다음 50µg/ml의 ox-LDL 2시간 처리하고, 丹蔘散 추출물을 농도별(1, 2mg/ml)로 처리한 후 37°C에서 12시간 배양하였다. 배양한 RAW264.7 cell의 RNA를 trizol reagent(Sigma)를 사용하여 추출한 다음 UV- spectrophotometer (Shimadzu, Japan)로 순도와 농도를 측정하였다. RT-PCR kit(Premega, USA)를 이용하여 cDNA를 합성한 후, CD36 primer를 PCR machine으로 온도 조건에 따라 반응시켰다(Table 2). PCR 산물은 1-2% agarose gel 상에서 전기영동 하여 relative intensity로 측정하였다. 한편 RT-PCR의 정확성을

Table 2. The primer of CD36, PPAR- γ , MMP-9, iNOS and β -actin mRNA

Primer		Primer sequences	No. of cycles
CD36	sense	5'-GAG CCC ACA GTT CCG ATC A-3'	35
	antisense	5'-CTG GGA GTT GGC GAG AAA AC-3'	
PPAR- γ	sense	5'-CGA AGA TGC CAT TCT GGC-3'	40
	antisense	5'-GTC TTT CCT GTC AAG ATC G-3'	
MMP-9	sense	5'-AGG CCT CTA CAG AGT CTT TG-3'	30
	antisense	5'-CAG TCC AAC AAG AAA GGA CG-3'	
iNOS	sense	5'-AGA CTG GAT TTG GCT GGT CCC TCC-3'	30
	antisense	5'-AGA ACT GAG GGT ACA TGC TGG AGC C-3'	
β -actin	sense	5'-GGA GAA GAT CTG GCA CCA CAC C-3'	35
	antisense	5'-CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT GCT GG-3'	

Abbreviation : PPAR- γ , peroxisome proliferator activated receptor- γ ; MMP-9, matrix metalloproteinase-9; iNOS, inducible nitric oxide synthase

평가하기 위하여 internal standard인 beta-actin의 증폭을 동시에 실시하였다.

7. 거품세포전환 관련 물질 생성 억제 조사를 위한 면역조직화학적 염색

거품세포내 CD36, PPAR- γ , MMP-9 및 iNOS의 생성 억제를 조사하기 위해 RAW264.7 cell - 5×10^5 cells/well을 coating slide에 plating 하고 위에서 기술된 ox-LDL을 이용한 방법으로 배양하였다. 배지를 제거한 후 10% NBF에 10분간 고정 한 후 항 CD36 항체를 이용한 면역조직화학적 염색을 실시하였다. 우선 절편을 blocking serum인 10% normal goat serum(1:20, DAKO, Denmark)에서 12시간 동안 반응시켜 비특이적 면역반응을 억제하였다. 1차 항체인 mouse anti-mouse CD36(1:100, Santa Santa Cruz Biotec, USA), mouse anti mouse PPAR- γ (1:100, Santa Cruz Biotec), mouse anti mouse MMP-9(1:100, Santa Cruz Biotec), mouse anti mouse iNOS(1:100, Santa Cruz Biotec)에 4°C humidified chamber에서 72시간 동안 반응시켰으며, biotinylated goat

anti-mouse IgG(DAKO)에 4°C humidified chamber에서 24시간 link 하였다. Avidin biotin complex (DAKO)에 1시간동안 실온에서 반응시킨 후 0.05% 3,3'-diaminobenzidine(DAB)과 0.01% HCl이 포함된 0.05 M tris-HCl 완충용액(pH 7.4)에서 발색시킨 후, hematoxylin으로 대조염색하여 광학 현미경으로 관찰하였다.

8. PDGF에 의한 혈관평활근세포 증식 억제 관찰

혈관평활근세포(Vascular smooth muscle cell, VSMC) - 5×10^5 cells/well을 coating slide에 균일하게 plating한 다음 1mg/ml의 platelet-derived growth factor(PDGF, Sigma)에 2시간 처리하였다. 丹蔘散 추출물 2mg/ml 처리한 후 37°C에서 24시간 배양하였다. 배지 제거 4시간 전에 5-bromo-2'- deoxyuridine (BrdU, Sigma) 10 μ M/ml 처리한 후 배지를 제거하고 10% NBF에 10분간 고정하였다. 4°C와 37°C의 2M HCl용액에서 각각 20분씩 반응시켜 DNA-denaturation을 일으켰다. 0.1M borate 완충용액 처리로 안정시킨 후 비특이적 면역반응을 억제하기 위해 0.01%의 proteinase K(DAKO)가 포함된 normal goat serum에

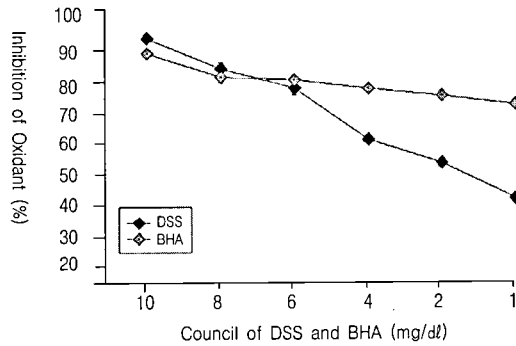


Fig. 1. The anti-oxidant effects of *Dansamsan*(DSS). The SOD ability of DSS were dose dependantly increased. Abbreviation. BHA. Buthylated hydroxyanisole.

1시간동안 반응시켰다. 그런 다음 1차 항체인 mouse anti-mouse BrdU(1:50, Amersham, UK)에 4°C incubation chamber내에서 72시간 반응시켰고 이후의 과정은 동일한 방법으로 면역조직화학적 염색을 실시하였다.

USA)를 이용한 영상분석(image analysis)을 실시하였고, Sigma plot 2000(Sigma)을 통해 Student t-test로 유의성을 검증하였다.

9. 영상분석과 통계처리

유전자 발현의 relative intensity와 면역조직화학의 결과의 수치화를 위해 Optimas 5.2(Optima,

결 과

1. 항산화효과

丹蔘散 추출물의 항산화 효율은 1mg/ml에서 42±0.98%, 2mg/ml에서 54±1.36%, 4mg/ml에서

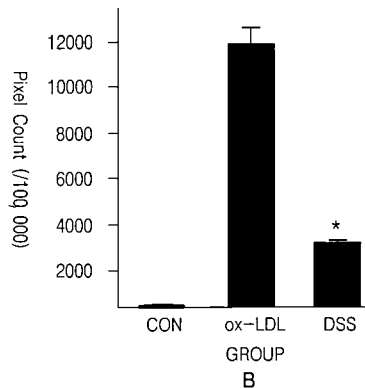
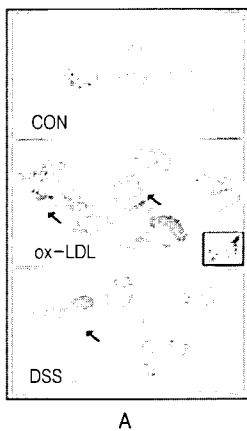


Fig. 2. Inhibition of ox-LDL induced foam cell formation by *Dansamsan*(DSS) extracts. A. morphological changes(Oil red O, x1000). CON, No-treated RAW264.7 cells; ox-LDL, ox-LDL only treated RAW264.7 cells(square, enlargement of foam cell, x2000); DSS treated RAW264.7 cells after ox-LDL treatment; arrow showed foam cell. B. Image Analysis for distribution of lipid particle. Abbreviation. ox-LDL. oxidation low density lipoprotein. (*; P < 0.05 compared with ox-LDL)

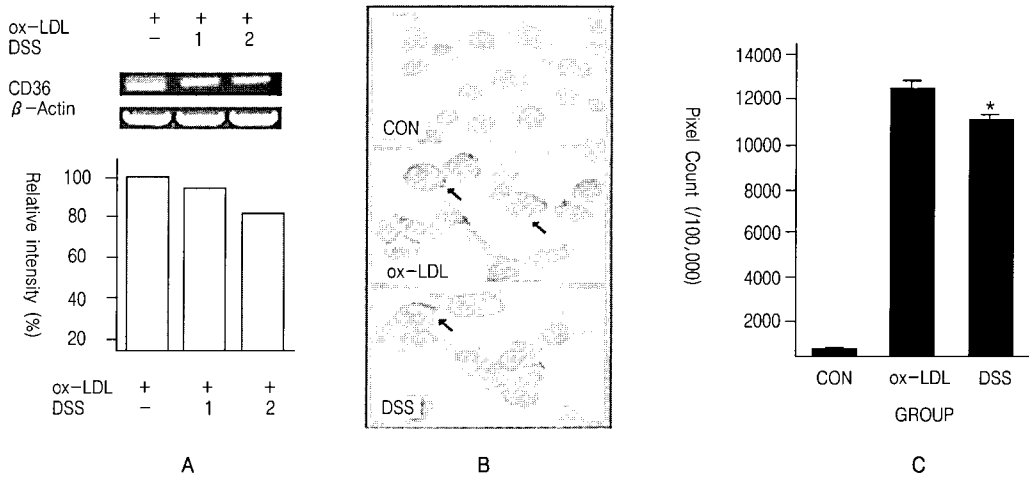


Fig. 3. Inhibition of ox-LDL induced CD36 mRNA expression and CD36 production by Dansamsan(DSS) extracts. A. CD36 mRNA expression. The RAW264.7 cells were treated with ox-LDL for 2hours prior to the addition of indicated concentrations(1 - 2mg/ml) of DSS, and the cells were further incubated for 12hours. The ox-LDL induced CD36 mRNA expression were dose dependantly decreased in DSS treated RAW264.7 cells. B. Morphological changes(arrow, immune reaction for CD36, x1000). C. Image Analysis for distribution of CD36 positive reaction. Abbreviation. ox-LDL, oxidation low density lipoprotein. (*; P < 0.05 compared with ox-LDL)

61±1.02%, 6mg/ml에서 78±2.14%, 8mg/ml에서 84±1.90%, 10mg/ml에서 94±1.00%로 농도 의존적으로 증가하였다. 8mg/ml 이상 丹蔘散 농도에서는 buthylated hydroxyanisole(BHA)보다 우수한 항산화 효능을 보였다(Fig. 1).

2. 대식세포의 거품세포 형성 억제 효과

대조군(580±41/100,000pixel)에서는 Oil red O 염색에 대한 양성반응이 거의 관찰되지 않았다. ox-LDL 처리군에서는 Oil red O 염색에 대한 영상분석 결과 1,953% 증가한 11,909±710/100,000 pixel로 측정되었다. Oil red O 염색에 대한 양성반응은 주로 거품세포 형태의 확장된 세포질의 지방입자에서 강하게 나타났다. ox-LDL 처리군에 비해 丹蔘散 처리군에서는 Oil red O 염색에 대한 영상분석 결과 73% 감소한 3,280±111/100,000 pixel로 측정되었다(Fig. 2).

3. 거품세포 전환 관련 물질 mRNA 발현과 생성 억제

1) CD36 mRNA 발현과 생성 억제 효과

ox-LDL 자극에 의해 RAW264.7 cell에서의 CD36 mRNA 발현은 증가되었는데, 丹蔘散 추출물 처리 후 농도 의존적으로 발현이 감소되었다. 즉, ox-LDL 자극시 발현되는 CD36 mRNA 발현량에 비해 丹蔘散 1mg/ml에서 5.4%, 2mg/ml에서 17.3%가 감소되었다(Fig. 3-A).

대조군(868±11/100,000pixel)에서는 CD36에 대한 양성반응이 거의 관찰되지 않았다. ox-LDL 처리군에서는 CD36에 대한 영상분석 결과 1,334% 증가한 12,448±396/100,000pixel로 측정되었다. CD36에 대한 양성반응은 주로 거품세포 형태의 확장된 세포질에서 강하게 나타났다. ox-LDL 처리군에 비해 丹蔘散 처리군에서는 CD36에 대한 영상분석 결과 9% 감소한 11,034±167/100,000 pixel로 측정되었다(Fig. 3-B, C).

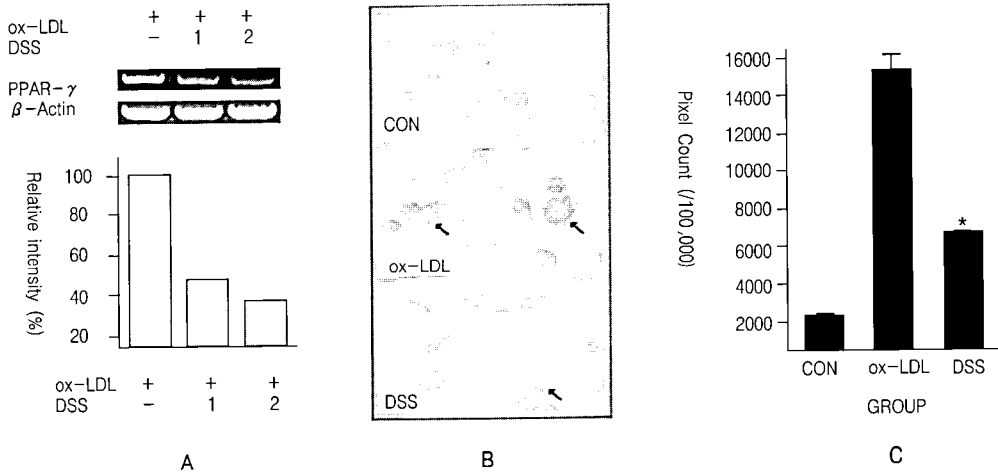


Fig. 4. Inhibition of ox-LDL induced peroxisome proliferator activated receptor(PPAR)- γ mRNA expression and PPAR- γ production by Dansamsan(DSS) extracts. A. PPAR- γ mRNA expression. The RAW264.7 cells were treated with ox-LDL for 2hours prior to the addition of indicated concentrations(1 - 2mg/ml) of DSS, and the cells were further incubated for 12hours. The ox-LDL induced PPAR- γ mRNA expression were dose dependantly decreased in DSS treated RAW264.7 cells. B. Morphological changes(arrow, immune reaction for PPAR- γ , x1000). C. Image Analysis for distribution of PPAR- γ positive reaction. Abbreviation. ox-LDL, oxidation low density lipoprotein. (*; P < 0.05 compared with ox-LDL)

2) PPAR- γ mRNA 발현과 생성 억제 효과

ox-LDL 자극에 의해 RAW264.7 cell에서의 PPAR- γ mRNA 발현이 증가되었는데, 丹蔘散 추출물 처리 후 농도 의존적으로 발현이 감소되었다. 즉, ox-LDL 자극시 발현되는 PPAR- γ mRNA 발현량에 비해 丹蔘散 1mg/ml에서 52.1%, 2mg/ml에서 62.8%가 감소되었다(Fig. 4-A).

대조군(2,324 \pm 75/100,000pixel)에서는 PPAR- γ 에 대한 양성반응이 거의 관찰되지 않았다. ox-LDL 처리군에서는 PPAR- γ 에 대한 영상분석 결과 561% 증가한 15,370 \pm 800/100,000pixel로 측정되었다. PPAR- γ 에 대한 양성반응은 주로 거품세포 형태의 확장된 세포질에서 강하게 나타났다. ox-LDL 처리군에 비해 丹蔘散 처리군에서는 PPAR- γ 에 대한 영상분석 결과 56% 감소한 6,736 \pm 63/100,000pixel로 측정되었다(Fig. 4-B, C).

3) MMP-9 mRNA 발현과 생성 억제 효과

ox-LDL 자극에 의해 RAW264.7 cell에서의

MMP-9 mRNA 발현은 증가되었는데, 丹蔘散 추출물 처리 후 농도 의존적으로 발현이 감소되었다. 즉, ox-LDL 자극시 발현되는 MMP-9 mRNA 발현량에 비해 丹蔘散 1mg/ml에서 33.8%, 2mg/ml에서 44.4%가 감소되었다(Fig. 5-A).

대조군(1,374 \pm 77/100,000pixel)에서는 MMP-9에 대한 양성반응이 거의 관찰되지 않았다. ox-LDL 처리군에서는 MMP-9에 대한 영상분석 결과 1,162% 증가한 17,340 \pm 682/100,000pixel로 측정되었다. MMP-9에 대한 양성반응은 주로 거품세포 형태의 확장된 세포질에서 강하게 나타났다. ox-LDL 처리군에 비해 DSS 처리군에서는 MMP-9에 대한 영상분석 결과 77% 감소한 3,937 \pm 145/100,000 pixel로 측정되었다(Fig. 5-B, C).

4) iNOS mRNA 발현과 생성 억제

ox-LDL 자극에 의해 RAW264.7 cell에서의 iNOS mRNA 발현은 58.3%가 증가되었는데, 丹蔘散 추출물 처리 후 농도 의존적으로 발현이 감소되

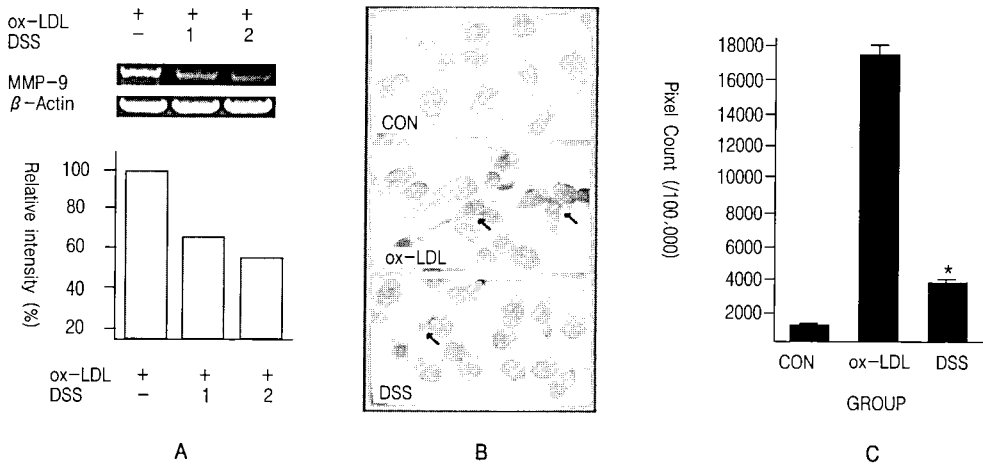


Fig. 5. Inhibition of ox-LDL induced matrix metalloproteinase(MMP)-9 mRNA expression and MMP-9 production by Dansamsan(DSS) extracts. A. MMP-9 mRNA expression. The RAW264.7 cells were treated with ox-LDL for 2hours prior to the addition of indicated concentrations(1 - 2mg/ml) of DSS, and the cells were further incubated for 12hours. The ox-LDL induced MMP-9 mRNA expression were dose dependantly decreased in DSS treated RAW264.7 cells. B. Morphological changes (arrow, immune reaction for MMP-9, x1000). C. Image Analysis for distribution of MMP-9 positive reaction. Abbreviation. ox-LDL, oxidation low density lipoprotein. (*; P < 0.05 compared with ox-LDL)

었다. 즉, ox-LDL 자극시 발현되는 iNOS mRNA 발현량에 비해 丹蔘散 1mg/ml에서 49.0%, 2mg/ml에서 59.0%가 감소되었다(Fig. 6-A).

대조군(1,699±93/100,000pixel)에서는 iNOS에 대한 양성반응이 거의 관찰되지 않았다. ox-LDL 처리군에서는 iNOS에 대한 영상분석 결과 353% 증가한 7,707±107/100,000pixel로 측정되었다. ox-LDL 처리군에 비해 DSS 처리군에서는 iNOS에 대한 영상분석 결과 63% 감소한 2,827±96/ 100,000pixel로 측정되었다(Fig. 6-B, C).

4. PDGF에 의한 혈관평활근세포 증식 억제 효과

대조군(940.7±10.9/100,000pixel)에서는 BrdU에 대한 양성반응이 거의 관찰되지 않았다. PDGF 처리군에서는 BrdU에 대한 영상분석 결과 345.4% 증가한 3,249.3±54.8/100,000pixel로 측정되었다. PDGF 처리군에 비해 DSS 처리군에서는 BrdU에 대한 영상분석 결과 74.8% 감소한 2,430.2±106.7/

100,000pixel로 측정되었다(Fig. 7).

고 찰

한국인의 사망원인 통계에 의하면 심장순환계 질환으로 인한 사망률이 약 24%로 신생물에 의한 사망률에 이어 2위를 차지하고 있다. 특히 동맥경화는 뇌경색, 협심증, 심근경색 등 허혈성 심질환과 말초혈관 폐쇄를 유발하는 원인질환으로 알려져 있으며, 동맥경화의 위험인자로는 고콜레스테롤증, 고혈압, 당뇨병, 흡연 등이 지적되고 있다. 그 경과에는 대개 수년 내지 수십년을 걸쳐 진행되지만, 특수한 상황에서는 수개월내지 1-2년의 급속한 경과를 나타내는 ‘가속된 죽상동맥경화증 (accelerated atherosclerosis)’이 관상동맥성형술 후 재협착이나 이식 혈관(graft vessel)의 협착 등에서 일어난다¹⁾.

예전에는 동맥경화가 시작되는 기전으로 ‘손상반

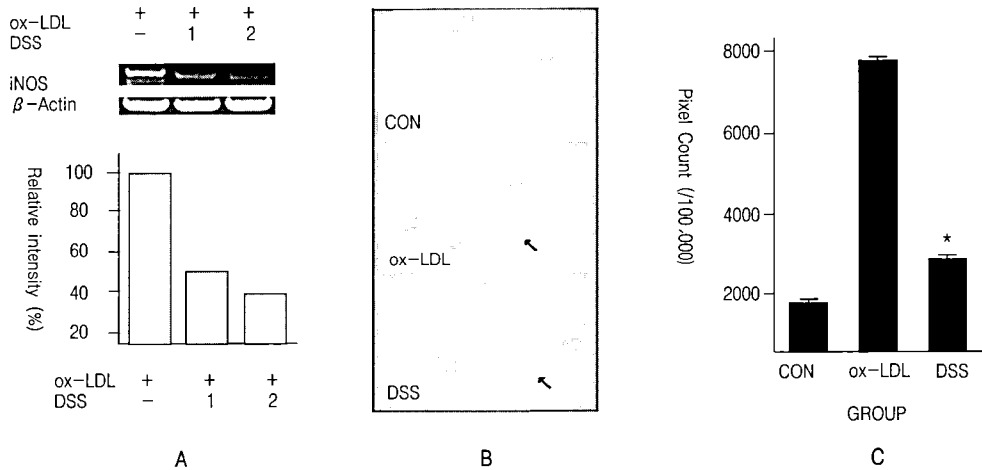


Fig. 6. Inhibition of ox-LDL induced inducible nitric oxide synthase(iNOS) mRNA expression and iNOS production by Dansamsan(DSS) extracts. A. iNOS mRNA expression. The RAW264.7 cells were treated with ox-LDL for 2hours prior to the addition of indicated concentrations(1 - 2mg/ml) of DSS, and the cells were further incubated for 12hours. The ox-LDL induced iNOS mRNA expression were dose dependantly decreased in DSS treated RAW264.7 cells. B. Morphological changes(arrow, immune reaction for iNOS, x1000). C. Image Analysis for distribution of iNOS positive reaction. Abbreviation. ox-LDL. oxidation low density lipoprotein. (*; P < 0.05 compared with ox-LDL)

응설'이 유력하였다²⁾. 하지만 최근에는 죽상동맥 경화를 촉진하는 지단백이 여러 위험인자와 합동으로 내피하 조직(subendothelial tissue)의 세포외기질에 역시 이상으로 축적되고 산화되는 과정을 통하여 발생한다는 '산화 변이 가설(oxidative modification hypothesis)'이 더 유력시되고 있다^{3,4)}. 축적된 지단백의 변형(mm LDL)은 동맥벽의 세포(내피세포, 평활근세포, 단핵구/대식세포), 혈구세포, 혈장성분 및 동맥벽 기질 등과 지단백의 상호작용에 의해 동맥 내막에서 일어나는데, 그 과정은 mm-LDL이 내피세포에 작용하여 ICAM-1, VACM-1, E-selectin 등의 세포부착인자(cell adhesion molecule) 발현을 통한 단핵구 유입을 증가시킨다^{2,8,9)}. 한편 유입된 단핵구는 M-CSF에 의해 대식세포(macrophage)로의 분화가 촉진되며, 성숙한 대식세포는 산화지질 자극에 의해 단핵구 유입촉진물질(MCP-1)¹⁰⁾, 세포증식물질(M-CSF, GM-CSF, PDGF)¹¹⁻¹³⁾ 전염증성 cytokine(IL-1 β , TNF- α)^{14,15)}, 응고를 촉진하는 tissue

factor¹⁶⁾ 등을 분비한다. 그리고 산화 물질을 다량 분비하여 지질을 더욱 산화시키며, 생성된 ox-LDL의 lysophosphatidylcholine은 내피세포, 염증세포, 평활근세포의 protein kinase C를 활성화시켜 superoxide anion(O₂⁻) 발생을 유발하고 또한 LDL의 산화를 촉진시켜 악순환이 나타난다¹⁷⁾. 성숙한 대식세포는 스스로 ox-LDL를 청소수용체를 통하여 다량 포식함으로써 cholestery ester 축적¹⁸⁾을 일으켜 거품세포(foam cell)로 변환된다. 또한 ox-LDL을 비롯한 지방산 산화물질 등은 activator (AP)-1, NF- κ B 및 PPAR- γ 전사인자를 활성화시켜 동맥경화의 병변 진행을 유도한다¹⁹⁾.

丹蔘散은 東醫治療經驗集成⁵⁾에 기재된 처방으로 除煩作用이 있는 丹蔘·葛根·麥門冬·烏梅, 滋陰하는 知母·玄蔘, 淸熱하는 石膏·黃芩·黃連·忍冬藤, 益氣生津하는 大棗 및 健脾益精하는 山藥으로 구성되었는데²⁰⁾, 당뇨병 치료에 응용된 경우를 제외하고 임상 및 실험연구에 사용된 예가

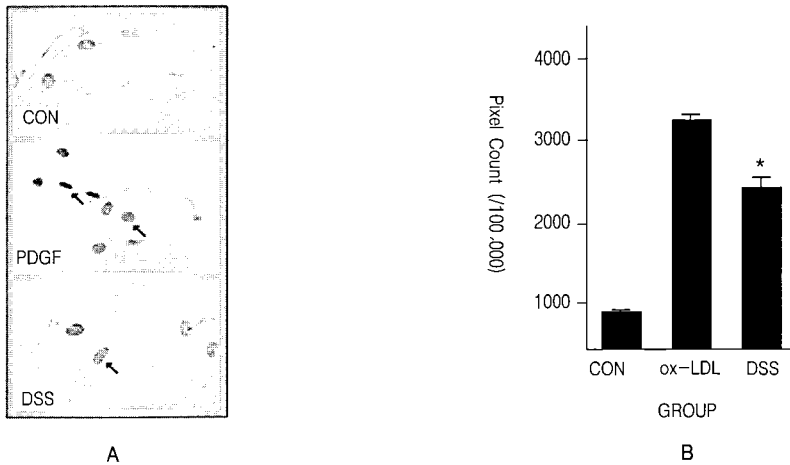


Fig. 7. Inhibition of platelet-derived growth factor(PDGF) induced proliferation of Vascular smooth muscle cell(VSMC) by Dansamsan(DSS) extracts. A. morphological changes(immune reaction for BrdU, $\times 1000$). CON, No-treated VSMC; PDGF, PDGF only treated VSMC; DSS, DSS treated VSMC after PDGF treatment; arrow, BrdU positive VSMC. B. Image Analysis for distribution of lipid particle. Abbreviation. ox-LDL, oxidation low density lipoprotein. (*; $P < 0.05$ compared with PDGF)

거의 없다.

丹蔘散의 주요 구성약물인 丹蔘에 대한 실험 연구로는 심근허혈, 심장 관상동맥 질환에 대한 효능 및 뇌신경세포 보호 효과가 다수 발표되었다^{21,22}. 그 외 고농도 포도당 처리된 cell에서 ROS 생성 억제²³, peroxynitrite scavenging activity를 통한 anti-nitration 효과²⁴, 丹蔘 추출물이 in vitro에서 angiotensin II에 의한 심근세포의 비대 억제²⁵에 대한 보고가 있었다. 葛根은 심혈관질환, 뇌혈류량, 혈당강하에 대한 연구²⁶가 있었으며, 葛²⁷ 등은 葛根의 위점막 보호효과에 대한 연구보고에서 葛根이 free radical을 제거하고 항산화 효소의 활성을 조절하는 효과가 있음을 밝혔다. 知母에 대한 실험 연구로는 항당뇨효과²⁸, 혈소판 응집억제 효과가 보고되었다²⁹. 黃芩은 실험적으로 혈압강하, 고지혈증 개선작용, 장관운동억제, 해열, 진경, 항암작용³⁰ 및 저산소증 상태에서 뇌세포 보호효과에 대한 보고가 있었다^{31,32}. 黃連에 대한 실험 연구로는 활성산소(ROS)를 억제하고, 미토콘드리아

막전위(MMP)소실을 막음으로써 DNA 손상을 막아 신경세포를 보호하고, 저산소증에서 신경세포사를 억제하여 항산화 효과가 있음이 보고되었다^{33,34}. 본 실험에서는 실험보고가 없는 丹蔘散을 항동맥경화 효과가 있을 것으로 추정하고 예비 실험을 한 결과 탁월한 효능을 보여 이에 실험을 진행하였다.

지질과 당대사에 중요한 역할을 하는 nuclear hormone receptor인 PPAR family중 PPAR- γ ³⁵는 동맥경화시 ox-LDL에 의해 거품세포에서 높은 발현되는 전사인자로³⁶, pro-inflammatory cytokine receptor(CD14와 CD11b/CD18) 발현 자극, ox-LDL scavenger receptor B(CD36와 SR-B1) 발현 증가 및 거품세포 형성에 관여한다^{19,35,37}. 본 실험에선 RAW264.7 cell에 ox-LDL를 처리한 후 丹蔘散 추출물을 처리한 다음 RT-PCR를 통한 PPAR- γ 와 CD36의 유전자 발현 변화 및 면역조직화학을 통한 PPAR- γ 와 CD36의 생성 변화를 조사하였다. PPAR- γ mRNA 발현과 생성은 ox-LDL 자극에

의해 증가되었지만, 丹蔘散 추출물 처리군에서는 농도 의존적으로 감소되었다. CD36 mRNA 발현과 생성도 ox-LDL 자극에 의해 증가되었지만, 丹蔘散 추출물 처리군에서는 농도 의존적으로 감소되었다. 이는 丹蔘散 추출물의 항산화작용으로 ox-LDL에 의한 CD36의 전사인자인 PPAR- γ 활성이 억제되어 scavenger receptor B의 생성이 일어나지 않고, 그 결과 대식세포는 세포내 cholesteryl ester 축적으로 인한 거품세포 형성이 억제된 것으로 생각된다. 이러한 거품세포내 지방 축적은 Oil Red O로 염색을 통해 확인되었는데, 거품세포의 수와 지방 양성반응 결과도 PPAR- γ 와 CD36의 결과가 일치하였다. 영상분석 결과 ox-LDL 처리 후 Oil red O 염색에 대한 양성반응이 증가한 반면, 丹蔘散에서는 감소되었다.

동맥경화 병변부의 대식세포와 T 림프구에서 생성된 전염증성 cytokine과 내피세포와 대식세포에서 생성된 MCP-1이나 M-CSF 등의 autocrine 작용에 의해 세포외기질을 제거하는 matrix metalloproteinase(MMP)의 분비가 촉진되어³⁸⁾, collagen type IV 등의 세포외기질의 분해가 일어난다. 이는 이미 분비된 여러 성장인자와 cytokine 등과 같이 혈관 중막에 존재하는 수축형 평활근세포(hill and valley shape)의 내막 이동³⁹⁾과 합성형형질로 변환 및 증식을 유발하여 죽종(atheroma)을 형성한다. 본 실험에서는 type IV collagenase인 MMP-9의 유전자 발현과 생성을 조사하였는데, MMP-9 mRNA 발현과 생성은 ox-LDL 자극에 의해 증가되었지만, 丹蔘散 추출물 처리군에서는 농도 의존적으로 감소되었다. 이는 산화스트레스로 기인된 ox-LDL에 의한 전사인자 NF- κ B와 AP-1의 활성을 丹蔘散이 차단한 결과이며, 丹蔘 추출물이 TNF- α 로 유도된 VSMC의 MMP-9 활성과 이주 억제효과가 있다는 이전 보고⁴⁰⁾와 연관성을 가진다. 丹蔘散의 MMP-9 mRNA 발현과 생성 억제 효과는 차후의 합성형 평활근세포 이주와

collagen, elastin, glycosaminoglycan 등의 세포외기질에 의해 섬유화를 사전에 차단하여 동맥경화의 athermatous plaque 형성을 억제할 것으로 생각된다.

동맥경화 초기 내피세포의 대사장애와 기능손상에 의해 혈관내피의존성 확장 기능의 장애가 생기는데, 이는 내피의존성 확장물질(endothelial derived relaxing factor, EDRF)인 nitric oxide (NO)의 생성 감소와 혈관수축성 물질 분비가 일어난다⁴¹⁾. NO는 생물학적 혈관확장성을 유지하고 혈소판 응집을 억제하여 내피세포 기능을 유지하며 평활근세포의 증식을 막아 동맥경화의 진행을 방지한다⁴²⁾. 최근에는 NO가 대사되면서 세포독성의 radical로 전환되어 조직손상을 유발하거나 동맥경화를 진행시킬 수 있다고 보고되었다. 혈관내막에서 생성된 NO는 O₂-의 반응으로 peroxynitrite (ONOO-)을 생성하여⁴³⁾ LDL과 VLDL을 oxidation시켜 세포막지질을 peroxidation 시키며⁴⁴⁾, thiol기, SH기를 oxidation시켜 세포독성을 유발한다⁴⁵⁾. NO의 생성에 관여하는 eNOS와 iNOS은 초기 동맥경화 병변에서 모두 mRNA의 발현이 있으며, 대식세포 침적지역에서는 iNOS mRNA의 발현이 높아 iNOS가 atherogenesis에 관여할 것으로 생각된다. 이 실험에서는 iNOS의 유전자 발현과 생성을 조사하였는데, iNOD mRNA 발현과 생성은 ox-LDL 자극에 의해 증가되었지만, 丹蔘散 추출물 처리군에서는 농도 의존적으로 감소되었다. 이는 산화스트레스로 기인된 염증관련 전사인자 NF- κ B의 활성을 丹蔘散이 차단한 결과이며, 丹蔘에서 추출된 Lithospermate B가 ONCC- scavenging 함으로써 anti-nitration 효과를 보인다는 이전 보고²⁴⁾와 일치된 결과이다.

동맥경화 유발 시 증가하는 PDGF는 혈관평활근세포의 증식 및 이주를 유도하는데⁴⁶⁾, 丹蔘散 추출물 처리시 혈관평활근세포의 증식이 감소되었다. 이는 丹蔘散이 평활근세포의 증식·이주에

의한 fibrous plaque 형성을 억제할 수 있는 가능성을 시사하는 결과로 생각된다.

이상의 결과로 볼 때 丹蔘散은 동맥경화 초기의 산화 스트레스를 조절함으로써 ox-LDL에 의한 거품세포 형성 억제, MMP-9의 생성억제를 통한 평활근세포의 이주 억제를 통한 섬유화 억제 가능성, iNOS 생성 억제를 통한 NO로 기인된 조직손상 억제, 혈관평활근세포의 증식억제 등을 통한 동맥경화 예방 및 치료 효과가 있는 것으로 생각된다.

결 론

丹蔘(Salvia miltiorrhiza) 복합처방중 丹蔘散의 초기 동맥경화 억제 효과를 조사하기 위하여 대식세포와 혈관평활근세포에 丹蔘散 추출물을 처리하여 거품세포 형성, cytokine 억제 및 혈관평활근세포 증식 억제 정도를 살펴 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 丹蔘散 추출물은 8 mg/ml 이상 농도에서 butylated hydroxyanisole보다 유의한 항산화 효능을 보였다.

2. 丹蔘散 추출물은 대식세포의 거품세포 형성 과정을 유의하게 억제하였다.

3. 丹蔘散 추출물은 거품세포 전환관련물질의 발현과 생성을 유의하게 억제하였다.

4. 丹蔘散 추출물은 혈관평활근세포 증식을 억제하였다.

이상에서 丹蔘散은 동맥경화 초기의 산화 스트레스를 조절함으로써 동맥경화 예방 및 치료에 효과가 있는 것으로 생각된다.

참고문헌

1. 통계청. 사망원인통계연보. 2004.
2. Ross R. atherosclerosis-an inflammatory disease. N Engl J. med. 1999;340: 115-26.

3. Stary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwart CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis. A report from the committee on vascular lesions of the council on atherosclerosis. Am heart Association circulation. 1994;89:2462-78.
4. Steinberg D, Witztum JL. Lipoproteins and atherosclerosis: current concepts. JAMA. 1990; 264:3047.
5. 東醫治療經驗集成 編纂委員會. 東醫治療經驗集成 第9卷 血液內分泌物質代謝疾病. 서울:海東醫學社. 1997:1145-9.
6. Kim SY, Moon TC, Chang HW, Son KH, Kang SS, Kim HP. Effects of tanshinone I isolated from Salvia miltiorrhiza bunge on arachidonic acid metabolism and in vivo inflammatory responses. Phytother Res. 2002; 16:616-20.
7. Luo WB, Dong L, Wang YP. Effect of magnesium lithospermate B on calcium and nitric oxide in endothelial cells upon hypoxia/reoxygenation. Acta Pharmacol Sin. 2002;23 (10):930-6.
8. Cushing SD, Berliner JA, Valente AJ, Territo MC, Navab M, Parhami F, Gerrity R, Schewartz CJ, Fogelman AM. Minimally modification low density lipoprotein induces monocyte chemotactic protein 1 in human endothelial cells and smooth muscle cells. Proc Natl Acad Sci USA. 1990;87:5134-8.
9. Cybulsky MI, Gimbrone MA. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. Science. 1991; 251:788-91.
10. Nelken NA, Coughlin SR, Gordon D, Wilcox

- JN. Monocyte chemoattractant protein-1 in human atheromatous plaques. *J. Clin Invest.* 1991;88:1121-7.
11. Rosenfeld ME, Yla-Herttuala S, Lipton BA, Ord VA, Witztum JL, Steinberg D. Macrophage colony-stimulating factor mRNA and protein in atherosclerotic lesions of rabbits and humans. *AM J. Pathol.* 1992;140:291-300.
 12. Giachelli CM, Lombardi D, Johnson RJ, Murry CE, Almeida M. Evidence for a role of osteopontin in macrophage infiltration in response to pathological stimuli in vivo. *AM J. Pathol.* 1998;152(2):353-8.
 13. Ross R, Masuda J, Raines EW, Gown AM, Katsuda S, Sasahara M, Malden LT, Masuko H, Sato H. Localization of PDGF-B protein in macrophages in all phases of atherogenesis. *Science.* 1990;248:1009-12.
 14. Barath P, Fishbein MC, Cao J, Berenson J, Helfant RH, Forrester JS. Detection and localization of tumor necrosis factor in human atheroma. *AM J. Cardiol.* 1990;65:297-302.
 15. Clinton SK, Fleet JC, Loppenow H, Salomon RN, Clark BD, Cannon JG, Shaw AR, Dinarello CA, Libby P. Interleukin-1 gene expression in rabbit vascular tissue in vivo. *Am J. Pathol.* 1991;138:1005-14.
 16. Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM, Gordon D. Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1989;86:2839-43.
 17. Ohara Y, Peterson TE, Zheng B, Kuo JF, Harrison DG. Lysophosphatidylcholine increases vascular superoxide anion production via protein kinase C activation. *Arterioscler Thromb.* 1994;14(6):1007-13.
 18. Witztum JL, Steinberg D. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J. Clin Invest.* 1991;88(6):1785-92.
 19. Nagy L, Tontonoz P, Alvarez JG, Chen H, Evans RM. Oxidized LDL regulates macrophage gene expression through ligand activation of PPARgamma. *Cell.* 1998;93(2): 229-40.
 20. 전국한의과대학 공동교재편찬위원회. *本草學*. 서울:永林社. 2004:419 - 20.
 21. 이원철, 정혁상, 손낙원. 뇌해마의 장기양 조직 배양을 이용한 한약물의 뇌신경세포손상 보호 효능 연구. *대한한방내과학회지.* 2004;25(3): 461-72.
 22. Zhou W, Ruigrok TJ. Protective effect of danshen during myocardial ischemia and reperfusion: an isolated rat heart study. *Am J. Chin Med.,* 1990;18(1-2):19-24.
 23. Lee GT, Ha H, Jung M, Li H, Hong SW, Cha BS, Lee HC, Cho YD. Delayed treatment with lithospermate B attenuates experimental diabetic renal injury. *J. Am Soc Nephrol.* 2003;14(3): 709-20.
 24. Sung do Y, Rhee SH, Kim JS, Lee JY, Yang HS, Choi JS, Yokozawa T, Han YN, Chung HY. Peroxynitrite scavenging activity of lithospermate B from *Salvia miltiorrhiza*. *J. Pharm Pharmacol.* 2003;55(10):1427-32.
 25. Ouyang X, Takahashi K, Komatsu K, Nakamura N, Hattori M, Baba A, Azuma J. Protective effect of *Salvia miltiorrhiza* on angiotensin II-induced hypertrophic responses in neonatal rat cardiac cells. *Jpn J. Pharmacol.* 2001;87:289-96.
 26. 陳可冀 主編. *抗衰老中藥學*. 北京:中醫古籍出版社. 1989:186-7.
 27. 최호정, 신흥묵. 葛根의 항산화작용에 의한 위 점막 보호효과와 내인성 Sulfhydryl 화합물의 영향. *동의생리학회지.* 1999;14(2):1-9.
 28. Miura T, Ichiki H, Iwamoto N, Kato M, Kubo M, Sasaki H, Okada M, Ishida T, Seino T,

- Tanigawa K. Antidiabetic activity of the rhizoma of *Anemarrhena asphodeloides* and active components, mangiferin and its glucoside. *Biol Pharm Bull.* 2001 Sep;24(9):1009-11.
29. Zhang J, Meng Z, Zhang M, Ma D, Xu S, Kodama H. Effect of six steroidal saponins isolated from *anemarrhenae* rhizoma on platelet aggregation and hemolysis in human blood. *Clin Chim Acta.* 1999 Nov;289(1-2):79-88.
30. 國家中醫藥管理局. 中華本草. 上海:上海科學技術出版社. 1998:1682-94.
31. 이병철, 임강현, 김영옥, 김선려, 안억균, 박호균, 김호철. 黃芩의 4-VO로 유발한 흰쥐 뇌허혈에 대한 신경 방어효과. *大韓本草學會誌.* 1999;14(2):89-96.
32. 김경훈, 정수현, 김재우, 엄형섭, 정승현, 신길조, 이원철, 문일수. 黃芩이 저산소증으로 유발된 대뇌신경세포의 세포사에 미치는 영향. *대한한방내과학회지.* 2002;23(3):396-405.
33. 최주리, 정승현. 흰쥐 대뇌세포의 저산소증 모델에서 黃連의 활성산소 억제 및 미토콘드리아 막전위 유지 효능. *동국대학교 석사학위논문.* 2005
34. 황주원, 신길조. 배양한 흰쥐 대뇌세포의 저산소증 모델에서 黃連이 유전자 표현에 미치는 영향. 2005
35. Tontonoz P, Nagy L, Alvarez JG, Thomazy VA, Evans RM. PPAR γ promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell.* 1998;93(2):241-52.
36. Moore KJ, Rosen ED, Fitzgerald ML, Randow F, Andersson LP, Altshuler D, Milstone DS, Mortensen RM, Spiegelman BM, Freeman MW. The role of PPAR- γ in macrophage differentiation and cholesterol uptake. *Nat Med.* 2001;7(1):41-7.
37. Chinetti G, Gbaguidi FG, Griglio S, Mallat Z, Antonucci M, Poulain P, Chapman J, Fruchart JC, Tedgui A, Najib-Fruchart J, Staels B. CLA-1/SR-BI is expressed in atherosclerotic lesion macrophages and regulated by activators of peroxisome proliferator-activated receptors. *Circulation.* 2000;101(20):2411-7.
38. Galis ZS, Sukhova GK, Lark MW, Libby P. Increased expression of matrix metalloproteinases and matrix degrading activity in vulnerable regions of human atherosclerotic plaques. *J. Clin Invest.* 1994;94:2493-503.
39. Galis ZS, Johnson C, Godin D, Magid R, Shipley JM, Senior RM, Ivan E. Targeted disruption of the matrix metalloproteinase-9 gene impairs smooth muscle cell migration and geometrical arterial remodeling. *Circ Res.* 2002;91(9):852-9.
40. Jin UH, Kang SK, Suh SJ, Hong SY, Park SD, Kim DW, Chang HW, Son JK, Lee SH, Son KH, Kim CH. Inhibitory effect of *Salvia miltiorrhiza* BGE on matrix metalloproteinase-9 activity and migration of TNF- α -induced human aortic smooth muscle cells. *Vascul Pharmacol.* 2006;44(5):345-53.
41. Adams DH, Shaw S. Leucocyte-endothelial interactions and regulation of leucocyte migration. *Lancet.* 1994;343(8901):831-6.
42. Griendling KK, Minieri CA, Ollerenshaw JD, Alexander RW. Angiotensin II stimulates NADH and NADPH oxidase activity in cultured vascular smooth muscle cells. *Circ Res.* 1994;74(6):1141-8.
43. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and

- superoxide. Proc Natl Acad Sci USA. 1990; 87(4):1620-4.
44. Daugherty A, Dunn JL, Rateri DL, Heinecke JW. Myeloperoxidase, a catalyst for lipoprotein oxidation, is expressed in human atherosclerotic lesions. J. Clin Invest. 1993;94(1):437-44.
45. Radi R, Beckman JS, Bush KM, Freeman BA. Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. J. Biol Chem. 1991b;266(7):4244-50.
46. 김명수, 김유선, 하헌주, 박제현, 김혜진, 박기일. Carvedilol 단독 또는 cyclosporine과의 혼합투여가 백서 대동맥 평활근세포배양세포의 증식에 미치는 영향. 대한이식학회지. 2000;14:1-8.