

동맥경화증이 유발된 ApoE^(-/-) mouse에서 血府逐瘀湯과 Aspirin의 병용투여 효과에 대한 연구

이범준^{1*}, 윤승연^{*}, 박현우, 박지혁, 조인영, 이정숙, 류재환²

¹경희강남한방병원 한방내과

²경희대학교 동서의학대학원 동서외학과

Effects of Concurrent Administration of Hyeolbuchukeo-tang and Aspirin on Atherosclerosis in the ApoE^(-/-) Mouse

Beom-joon Lee^{1*}, Seung-yeon Yun^{*}, Hyun Woo Park, Ji-hyuk Park, In-young Jo, Jeong-sook Lee,
Jae-hwan Lew²

¹Dept. of Oriental Internal Medicine, Kangnam Korean Hospital, Kyunghee university, Seoul, Korea

²East-west Medicine, The graduate School of East-West Medical Science,
Kyunghee university, Suwon, Korea

Objective: The antiplatelet agent aspirin has been widely used for treating atherosclerosis in western medicine, and its efficacy has been proven in cardiac and extracardiac vascular diseases. On the other hand, Hyeolbuchukeo-tang has been widely used for treating blood stasis syndrome in traditional medicine. Therefore we investigated whether Hyeolbuchukeo-tang could have a synergic effect along with aspirin.

Methods & Materials: Male ApoE^(-/-) mice were randomly divided into three different experimental groups: a non-treated group(Control group), an aspirin-treated group(AP group), and an aspirin with Hyeolbuchukeo-tang-treated group(APH group). The control group was fed only an atherogenic diet, the AP group an atherogenic diet plus Aspirin 5 mg/kg, and the APH group an atherogenic diet plus Aspirin 5 mg/kg with Hyeolbuchukeo-tang 100 mg/kg. We investigated plasma lipid with liver function test, and performed the histological investigation of liver and abdominal aorta.

Results:

1. We investigated photomicrographic changes of liver and abdominal aorta tissue. They showed that histological injury of aorta and lipid accumulations of the liver were lower in the AP and APH groups than in the control group.
2. In the APH group, plasma triglyceride levels were significantly lower than those in the control and AP groups.
3. There were no differences in aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase levels among the control, AP and APH groups.

Conclusion: The above results show that a combined treatment of Hyeolbuchukeo-tang and aspirin has a somewhat synergic effect in terms of inhibiting vessel injury and decreasing lipid deposits on liver cells without liver toxicity.

Key Words : Aspirin, atherosclerosis, hypertriglyceridemia, Hyeolbuchukeo-tang(血府逐瘀湯), ApoE^(-/-) mouse

* 본 저자는 연구에 동일한 기여를 함.

서론

2007년 통계청 사망원인 분석에 의하면 우리나라 전체 사망자 중 뇌혈관질환(12.0%) 및 심장질환(8.8%)으로 사망한 사람은 전체 사망률의 20.8%로 27.6%를 차지한 암에 이어 두 번째 및 세 번째 사망 원인으로 나타났고¹⁾, 전 세계적으로도 동맥경화증과 관련된 질환인 허혈성 심질환과 뇌혈관 질환에 의한 사망률이 큰 폭으로 증가하고 있다²⁾. 이러한 순환기계통질환에 의한 사망률을 줄이기 위해서는 그 원인이 되는 동맥경화증과 이를 유발시키는 고지혈증에 대한 치료와 관리가 매우 중요하다³⁾. 한편 혈중 지질 농도가 올라간 고지혈증과 혈관의 내벽에 죽종이 형성되고 혈관에 혈전이 형성되어 혈액의 흐름에 장애를 일으키는 동맥경화증은 한의학적으로 血脈의 흐름을 방해하는 瘀血의 개념과 관련이 깊다. 따라서, 한의학적으로는 瘀血證을 치료하는 것이 그 치료목표가 된다⁴⁾.

혈부축어탕은 清代 王清任의 醫林改錯에 처음 기록되어 活血祛瘀, 行氣止痛의 효능을 발휘하여 瘀血證을 치료하는 대표적인 처방으로서 임상에서 어혈과 관련된 제반 증상에 광범위하게 활용되고 있다⁵⁾.

고지혈증에 대한 혈부축어탕의 효과를 살펴보면 혈부축어탕이 고지질혈증을 개선시켰다는 보고⁶⁻⁷⁾가 있으며, 특히 지질의 과산화를 억제시키는 효과⁸⁾와 HMG-CoA reductase의 저해를 활성화시키는 효과⁹⁾를 나타내었다.

또한, 순환기계 영역에서 임상적으로는 순환기계통의 각종 질환에 활용¹⁰⁾되고 있으며, 심부정맥혈전증에도 효과¹¹⁻¹²⁾가 있었고, 중풍 후 발생한 불면증을 개선시키는 효과¹³⁾도 보고되었다. 또한, 실험적으로는 대뇌동맥 폐쇄로 인한 뇌허혈의 면적을 감소¹⁴⁾시켰으며, 신경세포의 자연사를 억제하는 효과로 신경세포손상을 억제한다고 보고¹⁵⁾되었다. 그 작용기전에 대해서는 활성화된 혈소판에서 분비되는 과립성분들과 prostaglandin의 합성을 억제하는 기전을 통해 혈소판의 응집을 억제¹⁶⁾하였고, 대식세포에서 oxidized low density lipoprotein(ox-LDL)의 축적을

감소¹⁷⁾시키고, 혈관의 확장을 유도시키는 nitric oxide(NO)의 생성을 증가¹⁸⁾시켰다고 보고되었다.

현재 서양의학에서는 항혈소판응집억제제를 사용하여 혈액의 응집을 예방하고, 뇌졸중 및 심장질환의 위험성을 줄이며 혈관성 질환의 사망률을 줄이고 있다. 그러나 기존의 항혈소판응집억제제는 저항성¹⁹⁾이 생기기도하고 위장관 증상과 출혈²⁰⁾이 나타나는 등의 문제로 인하여 좀 더 안전하고 효과적인 약물 개발의 필요성이 절실한 상태이다.

이에 본 실험에서는 동맥경화 동물모델인 ApoE^(-/-) mouse에 기존의 항혈소판제제인 Aspirin과 혈부축어탕을 병용투여 하였다. 이를 통하여 Aspirin의 동맥경화의 예방효과를 혈부축어탕이 증강시키는 것을 살펴보기 위해 대동맥의 조직학적 분석을 통해 그 영향을 확인해 보았으며, 혈청 지질 검사와 간의 조직학적 분석을 통해 동맥경화를 유발 및 악화시키는 유발인자인 고지혈증을 감소시키는 효과도 증강되는지 살펴보았다.

실험재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

실험동물은 ApoE^(-/-) mouse(4주령, 수컷, 체중 20g 내외) 15마리를 (주)중앙실험동물(서울, 한국)에서 구입하여 1주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 다음 온도 22 ± 2°C, 습도 50 ± 5%, 명암주기 12시간(명주기: 07:00~19:00)이 자동 설정된 동물사육실에서 4주간 사육하며 실험을 진행하였으며, 사료와 식수는 자유롭게 섭취하도록 하였다. 본 실험은 2008년 도입된 동물보호법 제13조에 따른 3Rs 원칙(replacement, reduction, refinement)을 따르며, 윤리적인 실험을 수행하기 위하여 동물을 사용하기 전 실험계획과 수행요령 및 주의사항을 사전에 교육 받았고, 경희의료원 윤리위원회의 승인을 거쳐 진행되었다.

2) 약물

실험에 사용한 혈부축어탕은 『慶熙韓方處方集』에

Table 1. Composition of Hyeolbuchukeo-tang(血府逐瘀湯)

Herbal Name	Pharmacognostic Name	Amount(g)
桃仁	<i>Prunus persica</i> (L) Batsch.	16g
當歸	<i>Angelica gigas</i> Nakai.	12g
生地黃	<i>Rehmannia glutinosa</i> var.	12g
紅花	<i>Carthamus tinctorius</i> L.	12g
牛膝	<i>Achyranthes bidentata</i> Bl.	12g
枳殼	<i>Citrus aurantium</i> L.	8g
赤芍藥	<i>Paeonia lactiflora</i> Pall.	8g
桔梗	<i>Platycodon grandiflorum</i> (Jacq.) A. DC.	6g
川芎	<i>Ligusticum chuanxiong</i> Hort.	6g
柴胡	<i>Bupleurum falcatum</i> Linne.	4g
甘草	<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.	4g
Total Amount		100g

기재된 것으로 경희의료원 한방병원 제약실에서 제제화한 농축액 추출물 제제를 사용하였다. 1첩의 구성내용은 Table 1과 같으며, 수율은 25.3%이며 1포의 분량은 6g이다. 양성대조약물은 Aspirin(상품명: Astrix 100mg캡슐, (주)보령제약, 서울)을 사용하였다.

3) 방법

① 실험군 분류 및 처치

실험실 환경에서 1주간 적응시킨 ApoE^(-/-) mouse를 대조군(Control군, n=5), Aspirin 투여군(AP군, n=5), Aspirin과 혈부축어탕 투여군(APH군, n=5)의 3군으로 나누었으며, 적응기간이 지난 직후의 시점에서 체중은 Control군이 19.8 ± 1.5 g, AP군이 17.6 ± 4.7 g, APH군이 20.3 ± 1.3 g 으로 각 군 간의 체중의 차이는 없었다. 이후 2주간 동맥경화유발식이(atherogenic diet, AD)를 Table 2와 같이 제조하여 매일 일정한 시간에 물과 함께 공급하였다. 다시 2주간 동맥경화유발식을 공급하면서, Control군은 생리식염수를, Aspirin 단독투여군인 AP군은 Aspirin 5 mg/kg을, Aspirin과 혈부축어탕 병용투여군인 APH군은 Aspirin 5 mg/kg과 혈부축어탕 100 mg/kg을 투

여하였으며, 각 시료는 멸균 생리식염수에 녹여 매일 1회 경구 투여하였다.

② 혈액 및 조직의 채취

실험 최종일에 12시간 금식시킨 다음 ethyl ether로 가볍게 마취시킨 뒤에 70% 에탄올로 복부를 소독한 후 해부하였다. 개복 후 10 ml 주사기로 복부 대동맥에서 채혈한 후, 채취한 혈액은 실온에서 30분간 보관한 뒤 원심분리기(VS-15000CFN, Vision, 한국)로 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 하여 혈청을 분리하였고, 이를 생화학적 분석에 제공하였다. 채혈 후 즉시 각 조직을 분리 적출하였으며, 0.9% 생리식염수로 적출조직을 여러 차례 세척하여 혈액과 이물질을 제거하였고, 이를 조직학적 분석에 제공하였다. 혈중 total cholesterol TC), triglyceride TG), low density lipoprotein cholesterol LDL-C), high density lipoprotein cholesterol(HDL-C) 농도와 혈중 aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase(ALT) 농도는 의료전문수탁검사기관인 삼광의료재단(서울, 한국)에 의뢰하여 분석하였으며, 대동맥, 간의 조직검사는 경희의료원 조직병리학 교

Table 2. Composition of the Atherogenic Diet^a

Ingredients	percentage (%)
Casein	20
Sucrose	44
Cholesterol	1
Lard	10
Cellulose	5
DL-Methionine	0.3
Mineral Mixture ^{**}	3.5
Vitamin Mixture [†]	1
Choline Bibatrate	0.2
Corn starch	15

^a Atherogenic diet was prepared according to the guideline of AIN-76A to which 1% cholesterol and 10% lard were added.

^{**} AIN-76A mineral mix (#200000 Dyets Inc., USA)

[†] AIN-76A vitamin mix (#300050, Dyets Inc., USA)

실(서울, 한국)에 의뢰하여 분석하였다.

③ 혈청 지질농도 및 임상생화학적 지표 분석

혈청 TC는 HDAOS법으로 검사하였으며 Pureauto S CHO-N 시약(Daiichi, Japan)을 사용하였고, 혈청 TG는 HDAOS법으로 검사하였으며 Pureauto S TG-N 시약(Daiichi, Japan)을 사용하였으며, 혈청 LDL-C는 효소법(직접법)으로 Cholestest N-LDL 시약(Daiichi, Japan)을 사용하였고, 혈청 HDL-C는 선택저해법(직접법)으로 Cholestest N-HDL 시약(Daiichi, Japan)을 사용하였다. 혈청 AST는 효소활성측정법으로 Pureauto S AST 시약(Daiichi, Japan)을 사용하였고, 혈청 ALT는 효소활성측정법으로 Pureauto S ALT 시약(Daiichi, Japan)을 사용하였다. 이러한 혈청 분석에는 모두 분광광도계(Hitachi 7600-110, Hitachi, Japan)를 사용하여 분석하였다.

④ 대동맥의 조직학적 검사

대동맥을 절취하여 10% formalin에 24시간 고정하였다. Gum sucrose 용액에 24시간 동안 4℃에서 조직을 침수하여 결빙에 의한 손상을 방지하였고 액체질소로 급속 동결한 후 microtome으로 10 μ m의 두께

로 박절하여 슬라이드에 부착시켰다. 100% propylene glycol 용액에서 완전탈수하고 60℃ oven에 있는 oil red O(Sigma Co., USA)에서 10분간 염색 후 85% propylene glycol 용액에서 탈색 후 감별하였다. 증류수로 여러 차례 세척한 후 1% 희석 Harris' hematoxylin 용액으로 감별 염색을 한 다음 다시 증류수로 여러 차례 세척하고 Canada balsam으로 봉입하였다. 그 후 광학현미경(ECLIPSE E600, Nikon, Japan)으로 관찰한 후, 카메라(DXM 1200F, Nikon, Japan)를 이용하여 사진촬영 하였다.

⑤ 간의 조직학적 검사

간을 절취하여 10% formalin에 24시간 고정하였다. Gum sucrose 용액에 24시간 동안 4℃에서 조직을 침수하여 결빙에 의한 손상을 방지하였고 액체질소로 급속 동결한 후 microtome으로 10 μ m의 두께로 박절하여 슬라이드에 부착시켰다. 100% propylene glycol 용액에서 완전탈수하고 60℃ oven에 있는 Sudan black B(Sigma Co., USA)에서 10분간 염색 후 85% propylene glycol 용액에서 탈색 후 감별하였다. 증류수로 여러 차례 세척한 후 Nuclear fast red 용액으로 감별 염색을 한 다음 다시 증류수로 여러 차례 세척하고 Canada balsam으로

봉입하였다. 그 후 광학현미경(ECLIPSE E600, Nikon, Japan)으로 관찰한 후, 카메라(DXM 1200F, Nikon, Japan)를 이용하여 사진촬영 하였다.

4) 통계처리

모든 자료의 통계분석은 SPSS 17.0(SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA)을 이용하여 일원 배치 분산 분석(one-way ANOVA)으로 검정하여 평균 ± 표준편차로 나타내었으며, 사후 검정은 Tukey's multiple comparison test에 따라 신뢰도 95%(p<0.05) 수준에서 검정하였다.

결 과

1. 조직학적 분석

1) 대동맥조직 변화

대동맥 조직의 변화를 살펴보면 Control군에서는 거품세포(foam cell)의 형성 및 침윤, 대동맥벽의 비후 및 동맥관층 변화, 동맥경화성 콜레스테롤 틈새(cholesterol cleft) 형성 및 거대한 지방핵의 형성, 심한 동맥류 형성, 동맥경화반 내 출혈 및 혈관파열 소견을 보여 동맥경화가 유발된 것으로 나타났다(Fig. 1-A). AP군에서는 동맥벽은 잘 유지되고 있고 일부에서 거품세포가 나타나고 조직구(histocyte)가 보이지만 죽상동맥경화증 초기단계에 해당하는 것

으로 Control군에 비해서는 양호한 상태를 보이고 있다(Fig 1-B). APH군에서도 aneurysm이 형성되었으나 AP군과 유사한 단계로 정상에 가까운 것으로 나타났다(Fig. 1-C).

2) 간조직 변화

간조직의 변화를 살펴보면 Control군에서는 grade I~II 정도의 지방간 소견을 보였고, 간담관 및 그 주위의 세포증식이 보였으며, 중심정맥에서 염증세포의 침윤이 확인되었다. 또한 간세포 세포질의 대공포화(balloning degeneration)가 문맥주위에서 발견되었다(Fig. 2-A). AP군에서는 일부 중심정맥의 확장소견과 거품조직구(foamy histiocyte)의 출현이 있으나 Control군에 비해 조직학적으로 거의 정상소견을 보였고(Fig. 2-B), APH군에서는 간조직이 정상소견을 보였다(Fig. 2-C).

2. 혈청 분석

1) 혈청 지질수치의 변화

실험동물의 혈청에서 TC를 측정된 결과, Control군이 2853.0 ± 612.8 mg/dl, AP군이 2664.0 ± 1077.0 mg/dl, APH군이 2913.0 ± 978.9 mg/dl로 실험군간 TC농도에는 유의한 차이가 없었다. TG를 측정된 결과, Control군이 27.7 ± 4.1 mg/dl, AP군이 22.5 ±

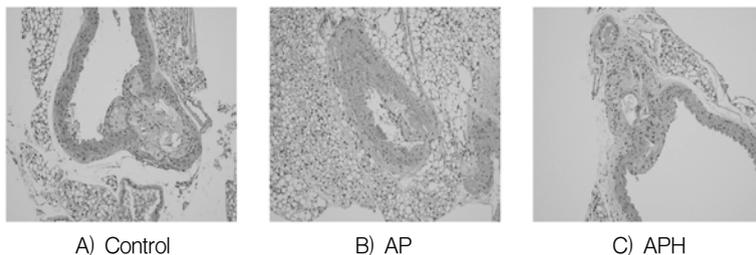


Fig. 1. Histological Analysis of Aortic Tissue in ApoE^(-/-) Mouse Fed with Atherogenic Diet(×200).

The male ApoE^(-/-) mice were fed with atherogenic diet for 4 weeks. AP and APH groups were given Aspirin and Aspirin with *Hyeolbuchukeo-tang* for last 2 weeks respectively. After mice were sacrificed, the aorta was removed and sliced into 10 μ m sections. The sections were stained with oil red O and analyzed by optical microscopic study. Histological findings of control group were the form cell infiltration, moderate atheroma, severe aneurysm and atherosclerotic cholesterol cleft formation. On the contrary, those of APH group were small aneurysm and nearly normal finding. Control: atherogenic diet only, AP: atherogenic diet + Aspirin 5mg/kg, APH: atherogenic diet + Aspirin 5mg/kg + *Hyeolbuchukeo-tang* 100mg/kg.

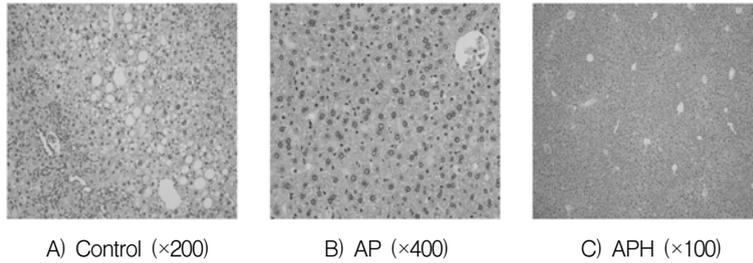


Fig. 2. Histological Analysis of Liver Tissue in ApoE^(-/-) Mouse Fed with Atherogenic Diet(with various magnification).

The male ApoE^(-/-) mice were fed with atherogenic diet for 4 weeks. AP and APH groups were given Aspirin and Aspirin with *Hyeolbuchukeo-tang* for last 2 weeks respectively. After mice were sacrificed, the liver was removed and sliced into 10 μ m sections. The sections were stained with sudan black B and analyzed by optical microscopic study. Histological findings of control group were moderate fatty liver, inflammatory infiltration and ballooning degeneration around central vein. Those of AP group were mild inflammatory infiltration around central vein and foamy histiocyte. On the contrary, those of APH group were nearly normal. Control: atherogenic diet only, AP: atherogenic diet + Aspirin 5mg/kg, APH: atherogenic diet + Aspirin 5mg/kg + *Hyeolbuchukeo-tang* 100mg/kg.

5.0 mg/dl, APH군이 12.8 \pm 2.4 mg/dl로 Control군에 비해서 APH군이 유의한 감소를 보였다(p<0.05). HDL-C를 측정된 결과 Control군이 10.7 \pm 7.8 mg/dl, AP군이 7.2 \pm 0.7 mg/dl, APH군이 6.1 \pm 1.6 mg/dl로 군 간의 유의한 차이가 없었다. LDL-C를 측정된 결과, Control군이 1043.0 \pm 478.6 mg/dl, AP군이 886.0 \pm 261.8 mg/dl, APH군이 824.0 \pm 267.8 mg/dl로 Control군에 비하여 AP군과 APH군에서 통계적 유의성은 없었으나 점차로 감소하는 경향을 보였다 (Table 3).

2) AST와 ALT의 변화

실험동물의 혈청에서 AST를 측정된 결과, Control군이 158.7 \pm 31.7 IU/L, AP군이 166.0 \pm 26.4 IU/L,

APH군이 162.3 \pm 12.1 IU/L로 실험군 사이에 차이를 보이지 않았고, ALT를 측정된 결과, Control군이 49.0 \pm 9.5 IU/L, AP군이 42.3 \pm 4.9 IU/L, APH군이 39.7 \pm 3.2 IU/L로 ALT와 AST는 AP군과 APH군에서 점차로 감소하는 경향을 보였으나 유의한 변화는 없었다(Table 3).

고 찰

죽상동맥경화증(atherosclerosis)이란 희랍어의 어원으로 athero란 粥狀(gruel, 먹는 죽과 같은), sclerosis는 硬化(단단하게 됨)를 뜻한다. 이것이 임상적으로 큰 의미를 갖는 이유는 이 질환에 의한 합병증으로 대개 관상동맥이나 뇌혈관이 폐색되어 경색이라고

Table 3. Effect of *Hyeolbuchukeo-tang* Extracts on the Level of Serum Lipid and AST, ALT Level in ApoE^(-/-) Mouse Fed with Atherogenic Diet.

	TC (mg/dl)		TG (mg/dl)		HDL-C (mg/dl)		LDL-C (mg/dl)		AST (IU/L)		ALT (IU/L)	
Control	2853.0	\pm 612.8	27.7	\pm 4.1	10.7	\pm 7.8	1043.0	\pm 478.6	158.7	\pm 31.7	49.0	\pm 9.5
AP	2664.0	\pm 1077.0	22.5	\pm 5.0	7.2	\pm 0.7	886.0	\pm 261.8	166.0	\pm 26.4	42.3	\pm 4.9
APH	2913.0	\pm 978.9	12.8	\pm 2.4*	6.1	\pm 1.6	824.0	\pm 267.8	162.3	\pm 12.1	39.7	\pm 3.2

Control: atherogenic diet only, AP: atherogenic diet + Aspirin 5mg/kg, APH: atherogenic diet + Aspirin 5mg/kg + *Hyeolbuchukeo-tang* 100mg/kg. Statistical significance was considered as p<0.05 compared with control group. *: p<0.05 determined by one-way ANOVA followed by Tukey's test. TC: total cholesterol, TG: triglyceride, HDL-C: high density lipoprotein cholesterol, LDL-C: low density lipoprotein cholesterol, AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase

하는 치명적인 결과를 보이기 때문이다. 이런 죽상 동맥경화증의 발생기전 중 가장 많은 지지를 받는 것은 ‘손상반응설’²²⁾인데, 초기에 동맥에 손상이 일어나면서 시작된다고 설명되어져 왔다.

즉, 고지혈증과 같은 위험인자에 의해서 혈관 내피세포(endothelial cell)에 손상이 발생하여 혈소판의 접착과 활성화가 유도되고, 단핵구(monocyte)와 T-림프구가 혈관내벽 안으로 진입하여 대식세포(macrophage)로 분화한 후, 저밀도 지방단백(low density lipoprotein, LDL)이 동맥벽에 쉽게 침투해 들어와, 동맥벽의 내피하에서 산화되어 산화 LDL(oxidized LDL, ox-LDL)이 된다. 이와 같은 ox-LDL은 내피세포를 손상시키는 한편, 대식세포가 이를 포식하여 거품세포(foam cell)로 변환되어 동맥경화의 초기 병변인 지방줄무늬(fatty streak)를 형성한다²¹⁾. 이들 세포들은 세포성장물질들이나 염증성 사이토카인들을 분비하여 혈관 중간층(media)의 평활근세포들이 증식하고, 혈관 내층(intima)쪽으로 이동하여 두터워지고, 대식세포나 거품세포들이 세포사를 일으키게 된다. 이러한 세포가 죽은 내용물이나 지질 등이 모여서 동맥경화반의 핵(core)을 이루게 되고, 모자(cap)를 쓰고 있는 형태인 섬유성 뚜껑(fibrous cap)이 되는데, 이러한 섬유성 뚜껑을 이루는 혈관 평활근세포가 괴사에 빠지고 세포외기질이 염증세포들에서 분비되는 효소에 의해서 녹으면, 섬유성 뚜껑이 약화되어 쉽게 파열될 수 있어, 순식간에 혈전이 생겨서 혈관내경이 급격히 좁아지고 혈행장애가 초래된다²²⁾. 결과적으로 보면, 동맥경화라는 것은 시작 단계에서는 고지혈증과 혈소판응집 및 혈전의 형성이 주요한 위험인자이며, 병변의 진행단계에서는 대식세포와 T-림프구의 상호작용으로 이루어지는 광범위한 만성 염증성반응이 병변 진행의 자극인자라고 할 수 있다²³⁾.

고지혈증과 동맥경화의 관계를 더 자세히 살펴보면, 고지혈증에 있어서는 LDL의 입자가 쉽게 동맥 내강을 빠져나와 혈관 내피하조직에 체류하여 염증을 일으키고 지방을 누적시키면서 혈관의 협착을 일으키게 되기 때문에 동맥경화가 쉽게 나타나게 된다²⁴⁾.

특히, LDL에 있어서 비중이 높고 크기가 작은 것을 small dense LDL이라 하는데, 작은 크기로 인해 혈관 내피하 조직으로 쉽게 진입할 수 있으며, 산화에 약해서 쉽게 ox-LDL로 변화할 수 있어 혈관 내피하 조직에서 쉽게 염증반응을 일으켜 거품세포를 생성하기 때문에 동맥경화를 더욱 잘 유발하게 된다²⁵⁾. 한편, 이러한 small dense LDL은 고중성지방혈증에서 잘 나타나게 되는데, 중성지방이 혈중에 많게 되면 그로 인해 초저밀도 지방단백질(very low density lipoprotein, VLDL)이 많아지고 cholesterol ester transfer protein(CETP)라는 단백질에 의해서 과도한 중성지방이 LDL로 전달되어 small dense LDL이 많이 생성되기 때문이다²⁶⁾. 특히, 우리나라 사람은 고탄수화물 식사에 의해 유럽인들 보다 고중성지방혈증이 잘 나타나 이러한 small dense LDL이 많은 것으로 보고되어 있다^{27,28)}.

본 연구에서 사용된 동맥경화 동물모델의 하나인 ApoE^(-/-) mouse는 1992년 Breslow와 Maeda 그룹에서 각각 apolipoprotein E 유전자를 homologous recombination 방법으로 knock out시킨 것으로, 정상식이에서도 혈장 콜레스테롤치가 거의 400~500mg/dl에 도달하며, 10주령 마우스에서 자연적으로 동맥경화가 발생하는 특징을 가지고 있다^{29,30)}. 특히, 0.15% 콜레스테롤과 19.5%의 casein 이 포함된 western-type diet 하에서 6주령에서 단핵구의 침착이 관찰되었고, 8주령에서 거품세포의 침착이 관찰되었다³⁰⁾. 이 모델의 장점은 동맥경화가 시작되는 지방줄무늬의 형성에서 necrotic core와 cholesterol cleft, 석회화를 보이면서 두터운 섬유성뚜껑을 갖는 섬유증식성 병변을 형성하는 중기까지 병변이 진행되어 사람과 유사한 발병과정을 보인다는 것과 병변 발생부위가 사람에서 발생하는 것과 마찬가지로 arterial tree에서 모두 발생하며, 병변의 주요 구성 요소인 대식세포와 평활근, T-세포 등의 세포에서도 인체의 병변에서와 같은 양상의 발병과정을 보여준다는 것이다^{31,32)}. 특히 Apo E의 구조에 문제가 있어 정상적인 기능을 하지 못하는 Apo E^(-/-) 모델에서는 중성지방의 농도가 증가하고 small dense LDL의 생성이 많아진다고

보고되었다³³⁾.

실험에 사용된 Aspirin은 thromboxane A₂를 억제하여 혈소판 응집을 감소시키는 작용을 한다. 그러나 Aspirin의 혈소판 억제작용이 떨어지는 Aspirin 저항성이 일부 환자들에게서 나타나기도 하는데, 특히 중성지방의 농도가 높은 경우 혈소판의 응집이 더 항진되는 것으로 나타났고³⁴⁾, Aspirin 저항성이 나타나는 것으로 보고되었다³⁵⁾. 이에 Aspirin 저항성이 나타난 경우 Aspirin의 용량을 증량시키거나, 기전이 다른 두 세가지 항혈소판 제제의 병합이 시도되고 있다³⁶⁾. 그러나, 이러한 부작용 중에서 위장관 장애, 위장관출혈, 간독성 등은 Aspirin보다 경미하지만 피부발진, 설사 등은 더 흔하게 나타났다¹⁷⁾. 이러한 문제로 인하여 좀 더 안전하고 효과적인 약물 개발의 필요성이 절실한 상태이다.

한의학에 고지혈증이란 병명은 없으나 內經에서는 우리가 섭취하는 음식물에서 膏가 만들어진다고 보았고, 張景岳은 痰濁이 血脈에 壅滯不暢하여 瘀血에 이르게 되어 痰과 瘀가 互結하여 膠着脈道되어 순환기 질환이 나타난다고 하였다. 따라서, 痰濁, 瘀血 등으로 유발된 질병과 기전을 살펴보면 고지혈증 및 동맥경화와 연관하다고 할 수 있다³⁷⁾.

清代 王清任의 醫林改錯의 혈부축어탕은 瘀血證을 치료하는 대표적인 처방으로서 구성은 活血祛瘀作用을 나타내는 桃紅四物湯과 活血祛瘀, 行氣止痛의 효능을 나타내는 四逆散의 合方한 형태이다. 고지혈증에 대한 혈부축어탕의 효과를 살펴보면 혈부축어탕이 실험적인 쥐의 고지질혈증을 개선시켰고⁶⁾ 氣滯血瘀 환자의 고지혈증에 대해 지질을 감소시키는 효과가 보고되었으며⁷⁾, 당뇨병 상태를 유발시킨 백서에 있어 TG와 LDL-C을 감소시키고 HDL-C을 증가시켰으며, 혈청지질과 간지질의 과산화를 억제시켰다고 보고되었다⁸⁾. 또한 고지방식으로 유발시킨 고지혈증 모델에 있어 콜레스테롤 합성을 조절하는 HMG-CoA reductase의 저해를 활성화 시키는 효과와 발효추출물에서 혈청 TG수치를 감소시켰으며 간에서의 지방축적을 감소시켰다⁹⁾. 또한, 순환기계에 미치는 영향으로는 임상적으로는 고지혈증, 혈전증,

심근경색, 협심증, 뇌진탕 후 후유증의 두통, 현훈 등 여러 질환에 활용되고 있으며 치료면에서도 양호한 효과를 얻고 있는 것으로 보고되었으며¹⁰⁾, 방광 수술 후 발생한 심부정맥혈전증에도 효과가 있었으며¹¹⁾, 뇌출혈로 항응고제를 사용하기 힘든 상황에서 심부정맥혈전증에 투여하여 효과가 있었다는 보고가 있었고¹²⁾, 중풍 후 발생한 불면증을 개선시키는 효과도 보고되었다¹³⁾. 실험적으로 중뇌동맥 폐쇄를 유도한 흰쥐의 국소부 뇌손상에 있어 뇌허혈의 면적을 감소시켰으며¹⁴⁾, 전뇌허혈을 유도한 쥐에서 신경세포의 자연사를 억제하는 효과를 보여 신경세포손상을 억제한다고 보고되었다¹⁵⁾. 그 기전에 대한 연구로 혈부축어탕이 활성화된 혈소판에서 분비되는 과립성분들과 prostaglandin의 합성을 억제하는 기전을 통해 혈소판응집을 억제하였고¹⁶⁾, 대식세포에서 ox-LDL의 축적을 감소시켰으며¹⁷⁾, 혈관의 확장을 유도시키는 nitric oxide(NO)의 생성을 증가시켰다고 보고되었다¹⁸⁾. 이와 같이 혈부축어탕이 동맥경화를 예방하는 실험적인 보고와 그 기전 및 임상적인 보고가 되어 왔다.

따라서 본 실험에서는 고지혈증이 유발된 ApoE^(-/-) mouse에 고지혈증과 동맥경화와 밀접하게 관련된 어혈질환에 사용되는 혈부축어탕을 동맥경화를 개선시키는 효과가 있는 항혈소판 응집억제제인 Aspirin과 병용투여한 후에, 실험동물의 체중변화와 대동맥, 간의 조직학적 변화, 혈중 지질성분에 대한 분석을 시행함으로써 병용투여를 통해 혈관질환의 예방 및 치료에 대한 효과가 상승작용을 나타내는지 알아보고자 하였다.

본 실험에서 TC는 군 사이에 유의한 차이가 없었으나, 혈중 TG는 AP군, APH군에서 Control군보다 감소했으며, 특히 APH군에서 유의하게 감소하였다. 한편, LDL의 농도에서는 통계적으로 의미있는 변화를 보이지는 않았지만, AP군, APH군에서 Control군보다 감소하는 경향을 보였다. 이는 혈부축어탕의 투여를 통해 고중성지방혈증을 감소시키는 효과가 있고, 또한 LDL의 개선을 통해 동맥경화를 더욱 개선시키는 효과가 나타날 것으로 사료된다. 특히,

Aspirin은 TG가 높을 때 Aspirin 저항성이 나타나는 것으로 보고되었는데³⁵⁾ 혈부축어탕의 병용투여로 TG가 낮아지면서 저항성이 낮아지고 효과가 상승할 것으로 기대되었다.

이에 이어진 실험에서 실험동물의 대동맥을 관찰한 결과 Control군에서 동맥경화가 상당히 진행된 것에 비하여 AP군에서는 동맥벽은 잘 유지되고 있고 일부에서 거품세포가 나타나고 단핵구가 혈류에서 빠져나와서 조직에 존재하는 histiocyte가 보이는 동맥경화 초기 단계에 해당하는 소견을 보여 control군 보다 양호한 상태를 보였다. 특히, APH군에서는 aneurysm이 나타났으나 AP군과 유사한 단계에 해당되나 더욱 정상에 가까운 것으로 나타났다. 이러한 결과로 보아 대동맥 조직검사상 혈부축어탕은 Aspirin의 효과를 상승시킬 수 있을 것으로 나타났는데, 본 실험의 투여기간이 짧아 조직검사상 뚜렷한 차이가 나타나지는 않았으나 향후 더욱 장기간 투여한 후 조직검사를 시행하면 그 차이를 더욱 잘 규명할 수 있을 것으로 사료된다. 또한, 동맥경화는 고지혈증에 의해 생기는 반응일 뿐만 아니라 혈관벽의 염증 반응²²⁾이므로, 높은 C-reactive protein 및 TNF- α 등의 관련이 있어 항염증 효과를 나타내는 치료가 고지혈증을 개선시킨다고 하는 연구가 보고되고 있다³⁸⁾. 따라서 이번 실험의 결과를 바탕으로 향후 염증 반응을 확인할 수 있는 인자인 IL-1 β , TNF- α 와 COX-2등의 변화를 추적하면 혈부축어탕의 병행요법의 유용성을 분자생물학적인 기전을 통해 명확히 밝힐 수 있을 것이라 사료된다.

한편, 실험동물의 간조직에서는 고지방식이만 투여한 Control군의 간조직 검사상 grade I~II 정도의 지방간 소견을 보였으며 세포질 및 대공포 지방변성이 관찰되었다. 반면 AP군에서는 일부 중심정맥의 확장소견과 foamy histiocyte의 출현이 있으나 조직학적으로 거의 정상소견을 보였고 APH군에서는 모두 간조직이 정상소견을 보였다. 이러한 결과로 보아 Aspirin 단독 투여는 동맥경화를 예방하는 효과가 있었지만 혈부축어탕과 병용투여시 지방대사에 영향을 미쳐 지방간을 일으키지 않도록 되었다.

또한 혈중 AST, ALT 측정은 약물의 독성검사에서 필수적인 항목이므로 간 손상의 유무를 측정하는 기본적인 기준이 되는데, 본 실험에서 Aspirin과 혈부축어탕을 병용투여한 경우 특별한 간독성은 나타나지는 않았다.

다만 이번 실험에서는 혈액검사에 있어 LDL-C과 같은 일부지표에서 약물투여시 감소경향은 보였으나 통계적으로 유의하지 않았다고 나타났고 대동맥 조직에 있어 상승효과가 기대되었으나 뚜렷이 나타나지 않았는데, 이는 병태 유발기간과 처치기간이 각각 2주로 정확한 변화를 살피기에는 충분하지 못했던 것 때문으로 사료된다. 따라서 향후 충분한 실험기간을 가지고 반복실험을 실시하면 좀 더 명확한 결과를 얻을 수 있으리라 기대된다.

결론

혈부축어탕이 동맥경화 유발식이를 섭취한 ApoE^(-/-) mouse의 고지혈증 및 동맥경화증에 대하여 Aspirin과 병행투여 되었을 때 미치는 영향을 알아보기 위하여, 체중 분석과 장기의 조직학적 분석 및 혈청을 분석 비교해 본 연구의 결과는 다음과 같다.

1. 혈청검사에 있어서 TG는 Control군에 비해 APH군이 유의하게 감소하였고, LDL-C은 Control군에 비해 감소하는 경향을 보였다. 또한 AST와 ALT는 각 군 간의 차이가 없었다.
2. 조직검사에 있어서 대동맥조직은 Control군에서는 동맥경화반 내 출혈 및 혈관과열소견을 보였으나 AP군은 초기 atherosclerosis에 해당하는 변화가 나타났고, APH군은 AP군과 비슷한 초기 atherosclerosis의 소견을 보이긴 하였으나 AP군보다 정상에 가까운 소견을 보였다.
3. 조직검사에 있어서 간조직은 Control군에서 지방간 소견을 보였으나 AP군에서는 일부 지방침착의 흔적이 보였으나 Control군에 비해 조직학적으로 거의 정상소견을 보였고, APH군에서는 간조직이 정상소견을 보였다.

이상으로 살펴보면 동맥경화증에 대표적으로 사

용되는 항혈소판응집억제제인 Aspirin과 어혈을 없애는 효과로 순환기장애에 빈용되는 혈부축어탕을 병용하여 투여한 경우의 유효성을 살펴본 결과 동맥경화를 방지하는 효과가 상승되는 뚜렷한 경향성을 나타냈다. 특히, 고중성지방혈증을 개선시키는 것으로 나타나 중성지방으로 인한 동맥경화의 유발 및 악화요인을 개선시키는 효과가 기대되었고, 기존의 Aspirin의 저항성을 감소시킬 것으로 기대되었다. 또한, 간과 같은 조직에 지방이 축적되는 것을 개선시키는 효과가 나타나 동맥경화로 인한 합병증을 개선시키는 것으로 나타났다.

참고문헌

1. 통계청. 2007년 사망원인 통계연보. 서울. 2008.
2. 천병렬. 한국인의 고지혈증 및 동맥경화증 질환의 시대적 변천. 한국지질동맥경화학회지. 2001;11(1): 29-38
3. 채인호. 고지혈증 있는 환자에서 뇌졸중 및 관상동맥질환의 일차예방. 한국지질동맥경화학회지. 2001;11(3):362-365
4. Choi SH, Ahn KS, Moon JJ, Park JA. A Study on the Effect of Samchilgeun on Thrombosis and elevated Blood Viscosity. J of Oriental Medical Pathology. 1992;7(1):163-170
5. 上海中醫學院. 方劑學. 香港:商務印書館 1977:177
6. Baek KH, Kum KC, Lee YT. The effect of Hyulbuchuckotang on hyperlipidemia rats. J of Oriental Physiology. 1998;13(1):102-109
7. 添興德. 血府逐瘀湯對氣滯血瘀型高脂血症降脂作用的臨床觀察與實驗研究. 中西醫結合雜誌. 1988; 8(10):601-603
8. Choi SJ. Effect of Hyeolbuchugeo-tang on hyperlipidemia in streptozotocin-induced diabetic rats. Dept of Oriental Medicine, Graduate School of Kyungwon University, 2005.
9. Pi CM, Chong MS, Kim HJ, Cho HY, Choi YH, Lee KN. Effects of Hyolbuchukeo-tang extracts on blood and liver of hyperlipidemia rats induced by high fat diet. Kor J Oriental Preventive Medical Society. 2009;13(1):41-58
10. Choi SH. Effects of Hyeolbusueotang on thrombosis and ecchymoma. J Korean Oriental Medicine. 1984;8(2):84-85
11. Min BK, Kim SJ, Kang JH, Park JW, Yun IJ, Oh MS. Clinical Investigation about Deep Vein Thrombosis after cystostomy; case report. The Journal of the Korea Institute of Oriental Medical Informatics. 2005;11(2):14-22
12. Kang JS, Park SH, Song MK, An YM, An SY, Lee BC. The effect of Hyulbuchuko-tang on a case with Deep Vein Thrombosis(DVT) and Intracranial Hemorrhage(ICH). Korean J Orient Int Med. 2009;30(2):438-449
13. Jung KH, Kim YS, Kang KS. Two Cases of Insomnia in Stroke Patients, Treated with Enhanced Blood Circulation. Korean J Orient Int Med. 2002;23(2):313-320
14. Cho EH, Kwon JN, Kim YG. Neuroprotective effect of Hyulbuchookau-tang on focal cerebral ischemia of the rats. J Korean Oriental Med. 2006;27(2):70-85
15. Cho EH, Kwon JN, Kim YG. Neuroprotective effects of Hyulbuchookau-tang on Global Cerebral Ischemia of the rats. J Korean Oriental Med. 2007;28(2):44-53
16. Park JH, Han YH, Jeon CY, Kim DW, Park SK, Lee CJH et al. The effects of Hyulbuchukotang (HCE) on the thrombosis related factors. Korean J Orient Int Med. 2000;21(5):819-827
17. Choi YK, Go JC, Baek EK, Hong ES, Han JW, Park SK et al. Effects of Hyeolbuchukeo-tang on LDL oxidation in macrophage cell. Korean J Orient Int Med. 2002;23(3):406-414
18. Han JM, Ko CB, Park CM, Jeoung MS, Park LK, Lee KN. Effects of Hyeolbuchukeo-tang (Xiefuzhuyu-tang) on NO production in aortic vascular smooth muscle cells. J Korean Oriental Med. 2002;23(2):19-27

19. Hankey GJ, Eikelboom JW. Aspirin resistance. *Lancet*. 2006;367(9510):606-617
20. Rondondi N, Bauer DC. Assessing the risk/benefit profile before recommending aspirin for the primary prevention of cardiovascular events. *Am J Med*. 2004;117(7):528-530
21. Cybulsky MI, Gimbrone MA. Endothelial expression of a mononuclear leukocyte adhesion molecule during atherogenesis. *Science*. 1991;251(4995):788-791
22. Weissberg PL, Bennett MR. Atherosclerosis - an inflammatory disease. *New Engl J Med*. 1999;340(2):115-126
23. 오구택. 형질전환모델동물을 이용한 동맥경화증의 연구 및 치료제 개발. *생화학분자생물학뉴스* 2002;22(1):12-21
24. 조흥근, 장양수. Small dense LDL과 동맥경화증. *한국지질동맥경화학회지*. 2003;13(2):333-339
25. Anber V, Griffin BA, McConnell M, Packard CJ, Shepherd J. Influence of plasma lipid and LDL-subfraction profile on the interaction between low density lipoprotein with human arterial wall proteoglycans. *Atherosclerosis*. 1996;124(2):261-271
26. Packard CJ. Triacylglycerol-rich lipoproteins and the generation of small, dense low-density lipoprotein. *Biochem Soc Trans*. 2003;31(5): 1066-1069
27. Anuurad E, Shiwaku K, Enkhmaa B, Nogi A, Kitajima K, Yamasaki M, Yamane Y. Ethnic differences in the formation of small LDL particles in Asians: a comparison of Koreans, Japanese and Mongolians. *Eur J Clin Invest*. 2004;34(11):738-746
28. Cho HK, Shin G, Ryu SK, Jang Y, Day SP, Stewart G, et al. Regulation of small dense LDL concentration in Korean and Scottish men and women. *Atherosclerosis*. 2002;164(1):187-193
29. Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous hypercholesterolemia and arterial lesions in mice lacking apolipoprotein E. *Science*. 1992;258(5081):468-471
30. Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstyuyt JG, et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell*. 1992;71(2): 343-353
31. Zhou X, Stemme S, Hansson GK. Evidence for a local immune response in atherosclerosis. CD4+ T cells infiltrate lesions of apolipoprotein E -deficient mice. *Am J Pathol*. 1996;149(2): 359-366
32. Roselaar SE, Kakkanathu PX, Daugherty A. Lymphocyte populations in atherosclerotic lesion of ApoE^{-/-} and LDL receptor^{-/-} mice. Decreasing density with disease progression. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1996;16(8): 1013-1018
33. Skoglund-Anderson C. Influence of common variants in the CETP, LPL, HL and APO E genes on LDL heterogeneity in healthy, middle-aged men. *Atherosclerosis*. 2003;167(2):311-317
34. Friend M, Vucenik I, Miller M. Platelet responsiveness to aspirin in patients with hyperlipidaemia. *BMJ*. 2003;326(7380):82-83
35. Karepov V, Tolpina G, Kuliczowski W, Serebruany V. Plasma triglycerides as predictors of platelet responsiveness to aspirin in patients after first ischemic stroke. *Cerebrovasc Dis*. 2008;26(3):272-276
36. Comerota AJ. Effect on platelet function of cilostazol, clopidogrel, and aspirin, each alone or in combination. *Atheroscler Suppl*. 2005;6(4):13-19
37. An YS, An TW, Kang HJ, Lee YH, Lim YK. The effect of herbal-acupuncture with Moutan Cortex Radicis extract. *Journal of Meridian & Acupoint*. 2009;26(1):85-109
38. Ridker PM, Silvertown JD. Inflammation, C-reactive protein and atherothrombosis. *J Periodontol*. 2008;79(8 suppl):1544-1551