

금궐요략(金匱要略) 심통 처방 중 과루해백반하탕과 과루해백백주탕이 대식세포 극성화에 미치는 영향

손창현¹·이상민¹, 유가람^{2,3}, 이승준³, 임동우⁴, 김혁^{2,3}, 박원환³, 김재은^{4*}

¹동국대학교 한의과대학, ²동국대학교 한의학연구소, ³동국대학교 한의과대학 진단학교실, ⁴동국대학교 한의과대학 병리학교실

Effects of 『Geum-Gwe-Yo-Ryak(金匱要略)』 Prescription for Chest Pain Including Kwaruhaebaekbanha-tang and Kwaruhaebaekpaekju-tang on Macrophage Polarization

Chang-Hyeon Son¹·Sang-Min Lee¹, Ga-Ram Yu^{2,3}, Seung-Jun Lee³, Dong-Woo Lim⁴,
Hyuck Kim^{2,3}, Won-Hwan Park³, Jai-Eun Kim^{4*}

¹College of Korean Medicine, Dongguk University, Goyang

²Institute of Korean Medicine, Dongguk University, Goyang

³Department of Diagnostics, College of Korean Medicine, Dongguk University, Goyang

⁴Department of Pathology, College of Korean Medicine, Dongguk University, Goyang

Objectives: This study was designed to evaluate the macrophages polarization of traditional Korean medicine on cardiac pain about Geum-Gwe-Yo-Ryak's two prescriptions including Kwaruhaebaekbanha-tang (KHB) and Kwaruhaebaekpaekju-tang (KHP).

Materials and methods: Flow cytometry analysis was used to measure the changes in the ratio of M1 type and M2 type macrophages. Protein expression of nuclear factor-like 2 (Nrf2), heme oxygenase-1 (HO-1), inducible nitric oxide synthase (iNOS), and cyclooxygenase-2 (COX-2) were measured by Western Blot, and ABCA1 and SR-B1 were detected by real time PCR (RT-PCR). Intracellular lipid accumulation was measured by Oil Red O staining (ORO staining).

Results: KHB and KHP increase anti-oxidative activity related protein levels including Nrf2 and HO-1. Furthermore, KHB and KHP inhibit lipid accumulation on intracellular levels through induction of ATP binding receptor cassette subfamily A member 1 (ABCA1) and scavenging receptor class B member 1 (SR-B1), respectively. Finally, KHB and KHP also blocked pro-inflammatory mediators including tumor necrosis factor-alpha (TNF α) and interleukin-6 (IL-6), iNOS and COX-2 expression.

Conclusion: This study suggests that KHB and KHP potently regulate the M1/M2 macrophage polarization.

Key Words : Geum-Gwe-Yo-Ryak, Kwaruhaebaekbanha-tang, Kwaruhaebaekpaekju-tang, Macrophage polarization

• Received : 13 May 2019 • Revised : 23 May 2019 • Accepted : 27 May 2019

• Correspondence to : 김재은(Jai-Eun Kim)

경기도 고양시 일산동구 동국로32 동국대학교 한의과대학 병리학교실

Tel : +82-31-961-5829, Fax : +82-31-961-5835, E-mail : herbqueen@dongguk.ac.kr

서론

혈관노화(vascular aging)로 인한 순환기의 장애는 허혈성심장질환(ischemic heart disease) 및 뇌혈관질환(cerebrovascular disease)과 같은 질병을 일으키는 요인으로, 인간의 주요한 사망원인이며 전 세계적인 발병률의 증가 추세를 보이고 있다^{1,2)}. 혈관 노화의 원인으로는 흡연, 고혈압, 고지혈증, 당뇨병, 스트레스, 비정상적 식이 및 과음, 복부비만 등이 알려져 있으나, 이들의 복합적 상호 작용에 의해 오랜 기간에 걸쳐 궁극적으로 죽상동맥경화증(atherosclerosis) 등과 같은 병변으로 진행된다³⁾. 죽상동맥경화증은 혈관의 가장 안쪽 막에 콜레스테롤의 침착으로 인한 특이적 혈관내피세포(vascular endothelial cells)의 이상 증식이 일어나 혈관이 좁아지거나 막히게 되는 현상으로, 죽상판(atheromatous plaque)을 형성하게 되며, 초기 단계에서 혈관 내의 대식세포(macrophages)에 의한 산화형 저밀도 지질단백질(oxidative low-density lipoprotein, ox-LDL) 인식 및 내피 체계로의 전달은 혈관내피세포의 다양한 반응을 촉진하여 혈류에 cytokines 및 chemokines 등을 공급한다⁴⁾. 이러한 신호전달분자 들은 단핵구 세포(monocyte)를 모집하게 되고, 최종적으로 거품세포(foam cells)를 만들어 죽상동맥경화의 병변을 지속적으로 악화 시키는 것으로 알려져 있다⁵⁾. 또한 대식세포는 혈관평활근세포(vascular smooth muscle cells)의 이주(migration)와 증식(proliferation)에도 증대한 영향을 미치는 것으로 보고 되었다⁶⁾.

대식세포는 다양한 외부 자극원에 대응하여 분극화(polarization)될 수 있으며, 분극형 대식세포는 전염증성 M1 형(pro-inflammatory M1 type)과 항염증성 M2 형(anti-inflammatory M2 type)으로 구분할 수 있다⁷⁾. 전염증성 M1 형의 경우 지질다당체(lipopolysaccharide, LPS) 혹은 interleukin-6 (IL-6) 등에 의해 분극화가 유도되며, 인접한 세포에 전염증성 신호를 전달하여 염증반응을 개시하는 역할을 한

다. 반면, M2 형의 항염증성 대식세포는 IL-4 또는 IL-10 등에 의해 극성화가 유도되어 염증을 차단시키는 신호전달물질 등을 분비하여 손상된 조직의 복구에 기여하는 것으로 알려져 있다⁸⁾. 따라서 혈관의 노화를 원인으로 발생하는 죽상동맥경화와 같은 질병을 조기에 차단하거나 예방하기 위한 목적으로 전염증성 M1 형과 항염증성 M2 형의 대식세포 분극화 비율을 조절(M1:M2 ratio)하는 것은 죽상동맥경화증의 예방과 치료에 필수적 전략이다⁹⁾.

한의학에서는 혈관노화의 원인으로 어혈(瘀血), 담(痰), 습탁(濕濁) 등을 주요하게 다루고 있으며, 이로 인한 심통에 관해서는 ‘장중경(張仲景)’의 의서 [금궤요략(金匱要略)] 제 9편 ‘흉비심통단기병맥증치(胸痹心痛短氣病脈證治)’에 수록되어 있고, 심통을 치료하는 대표적 처방으로 ‘과루해백백주탕(瓜蒌薤白白酒湯)’과 ‘과루해백반하탕(瓜蒌薤白半夏湯)’ 등을 제시하였다¹⁰⁾. [금궤요략]에서는 가슴이 답답한 병으로 숨이 차고, 기침이 나거나 침을 뱉고, 가슴과 등이 동시에 아픈 경우 및 기가 짧아 숨이 이어지지 않는 경우를 심통으로 기록하고 있다. 반하(半夏, *Pinellia ternate* Thunb.)를 가미한 ‘과루해백반하탕’의 경우 증상이 더욱 심화되어 가슴이 답답해 누울 수조차 없는 심통이 발병한 경우 처방토록 구분 하였다¹¹⁾. 두 처방에 공통적으로 사용된 본초는 과루인(瓜蒌仁, *Trichosanthes kirilowii* Maxim.)과 해백(薤白, *Allium macrostemon* Bunge.)으로, 과루인은 청화열담약(淸火熱痰藥)에 속하며, 해백은 이기약(理氣藥)에 포함되는 방제 구성으로, 중국에서 최근 데이터 마이닝 기법으로 이루어진 관상동맥질환의 증의학적 치료 기록 연구에서 두 가지 한약이 상위 10종으로 확인 되었다¹²⁾. 그러나 ‘과루해백백주탕’ 및 ‘과루해백반하탕’의 죽상동맥경화 예방차원에서 단핵구 및 대식세포의 극성화에 미치는 영향에 대한 세포 수준에서의 실험 및 분자적 증명은 부족하다.

따라서, 본 연구에서는 사람의 단핵구 세포주인 THP-1을 대상으로 관상동맥질환 모델에서 표현되는

혈관노화의 예방 및 치료에 관한 환원적 접근법으로 [금궤요략] 제 9편 처방을 세포 수준에서 작용점 분석을 시도 하였으며, 세포의 생존율평가(cell viability), 유세포 분석(fluorescence -activated cell sorting, FACS), 항산화능(antioxidant property), 지질의 세포 내 축적(lipid accumulation), 콜레스테롤 역수송(reverse cholesterol transport, RCT) 관련유전자와 항염증 마커 등을 실험하여 ‘과루해백백주탕’ 및 ‘과루해백반하탕’이 단핵구 세포의 대식세포 극성화에 미치는 긍정적 평가 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 시약

Ascorbic acid, 2,2-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS), 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), lipopolysaccharide (LPS), phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 및 Oil Red O staining 시약은 모두 SigmaAldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 세포 배양을 위한 RPMI 1640 및 Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), antibiotics (penicillin-streptomycin)은 Hyclone 사(Logan, UT, USA) 제품을 사용하였고, 1 차 항체로서 cyclooxygenase-2 (COX-2), inducible nitric oxide synthase (iNOS), heme oxygenase-1 (HO-1), nuclear factor(erythroid-derived 2)-like 2(Nrf2), Lamin B 및 β -actin은 Santa Cruz (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였다. Interleukin (IL)-6 및 tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)의 항체는 Cell Signaling Technology(Danvers, MA, USA)의 제품을 사용하였다. Human recombinant low-density lipoprotein과 유기용매는 Merck사(Darmstadt, Germany)로부터 구입하였으며, interferon-gamma (IFN- γ), IL-4 recombinant는 GenScript (Piscataway,

NJ, USA)로부터, 그 밖에 실험에 사용된 시약은 모두 시험용 특급 제품을 사용하였다.

2. 추출물의 제조

과루해백반하탕(Kwaruhaebackbanha-tang, KHB)은 과루인(*Trichosanthes kirilowii* Maxim.) 72g, 해백(*Allium macrostemon* Bunge.) 54g 및 반하(*Pinellia ternate* Thunb.) 72g으로 구성하였으며, 과루해백백주탕(Kwaruhaebackpackju-tang, KHP)은 과루인(*T. kirilowii*) 108g과 해백(*Allium macrostemon*Bge.) 81g으로 휴먼허브(HumanHerb, Gyeongsangbuk-do, Korea)에서 구입하였다. 구성된 처방에 70% 에탄올 1 L를 첨가하여 상온에서 3일 동안 교반하여 상등액을 취하였으며, rotary evaporator에서 감압 농축을 실시하였다. KHB 및 KHP 시료를 다시 증류수 50ml에 녹여 동결하였으며, 동결 건조기에서 최종 분말 형태의 시료를 얻었다. 세포에 처리하기 위한 조건으로 0.45 μ m와 0.22 μ m의 syringe filter를 차례로 통과시켜 사용하였다.

3. 세포 배양 및 세포의 생존율 측정

사람의 단핵구 세포인 THP-1 세포는 한국세포주은행(Korean Cell Line Bank, KCLB)에서 구입하였으며, 10% fetal bovine serum (FBS, Thermo Fisher Scientific, USA)과 1% penicillin-streptomycin (Hyclone, USA), 0.05 mM의 2-mercaptoethanol이 포함된 RPMI-1640 media (Hyclone)에서 배양하였다. 세포가 배양접시에 80% 이상 밀도가 되었을 때 계대배양을 실시하였으며, 37 $^{\circ}$ C의 온도와 5%의 이산화탄소가 공급되도록 유지하였다.

시료에 의한 세포의 생존율 영향 평가는 EZ-Cytox 세포 생존율 kit (Daeil Lab. Service, Korea)를 이용하여 실시하였다. 먼저 세포 배양용 96 well plate에 5 \times 10⁵ cells/well 조건으로 THP-1 cell을 접종하고 24시간 동안 완전 배지에서 세포 증식을 유도하였다. 세포의 분화를 위하여 최종 농도 50ng/ml이 되

도록 PMA를 처리하였으며, 48시간 후 FBS가 첨가되지 않은 starvation 배지로 교환한 후 KHB 및 KHP의 최고 처리 농도 200 μ g/ml가 되도록 시료를 처리하여 24시간이 지난 다음 EZ-Cytox kit에서 제공된 시약 및 방법에 따라 남은 과정을 진행하였다. 반응을 마친 상등액은 새로운 96 well plate에 옮겨 multi plate reader (Molecular Devices, USA)에서 흡광도 450nm으로 생존율을 측정하였다.

4. 유세포분석(Fluorescence activated cell sorting, FACS)

사람의 단핵구 세포인 THP-1을 세포 배양용 6 well plate에 1.5 \times 10⁶ cells/well 접종 시킨 후 KHB 및 KHP가 최종적으로 100 μ g/ml이 되도록 처리하였다. 본 실험에는 양성대조군(positive control)으로 interleukin-4 (IL-4)를 사용하였으며, fluorescein-isothiocyanate (FITC)-conjugated F4/80 항체 (eBioscience, Thermo)를 사용하여 대식세포 (macrophages)의 형광 염색을 개시하였다. M1 stage의 대식세포 극성화를 표지 하는 생물학적 지표 (biomarker)로 CD86 (eBioscience, Thermo) 항체를 사용하였고, M1 population을 phycoerythrin (PE)-A 형광염색법을 통하여 정량적으로 측정하였다. 한편, 대식세포의 극성화를 위하여 THP-1 세포에 PMA를 처리하고, 100ng/ml의 지질다당체(lipopolysaccharides, LPS) 및 20ng/ml의 interferon-gamma (IFN- γ)에 48시간 동안 노출시켜 M1 polarization을 유도하였다. 유세포분석 장치는 CytoFLEX (Beckman Coulter, China)를 사용하였고, 제공된 소프트웨어를 이용한 결과 분석을 실시하였다.

5. 단백질의 분리 및 Western blotting

핵 및 세포질의 단백질은 Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents Kit (Thermo, USA)를 사용하여 제공된 설명에 따라 분리를 위한 과정을 수행하였다. 한편, Western blot 분석을 위한 총 단백질의

분리 과정은 다음과 같다. 먼저 차가운 1X 농도의 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)으로 세 번 세척을 한 뒤 protease inhibitor와 phosphatase inhibitor (Roche Diagnostics, USA)가 첨가된 단백질 분리용 radioimmunoprecipitation assay (RIPA) buffer (Invitrogen, USA)를 골고루 뿌려주고, cell scraper로 긁어 e-tube에 옮겨 주었다. 원심분리는 4 $^{\circ}$ C 조건으로 1,500rpm에서 2분 동안의 과정으로 진행하였고, 상등액을 수거하여 다음 실험을 수행하기 까지 -80 $^{\circ}$ C 조건의 초저온 냉동고에 보관하였다. 단백질 정량은 bovine serum albumin (BSA)을 표준품으로 하는 BCA kit (Thermo, USA)를 사용하였으며, 25 μ g protein /lane이 되도록 조절하여 95 $^{\circ}$ C의 heat block에서 5분 간 정치시킨 후 10%의 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 상에서 전기 영동을 실시하였다. 이후 polyvinylidene difluoride (PVDF) 막으로 단백질을 이동시키고, 5% BSA가 함유된 Tris buffered saline-Tween 20 (TBS-T, pH 7.4)로 비특이적 항체의 결합을 방지하는 blocking 과정을 진행하였다. 한 시간 후 TBS-T를 이용하여 5분 간의 세척 과정을 세 차례 실시하였고, 산화적 스트레스에 대응하는 항체로서 nuclear factor-like 2 (Nrf2) 및 heme oxygenase-1 (HO-1)을 사용하였다. 또한 전염증성 매개체로서 inducible nitric oxide synthase (iNOS) 및 cyclooxygenase-2 (COX-2)를 사용하였다. 항체는 모두 1:2,000의 3%의 BSA가 포함된 TBS-T에 비울로 희석하여 4 $^{\circ}$ C에서 overnight 동안 결합 반응을 유도시켰다. 세척 과정을 마친 후 2차 항체는 실온에서 1:5,000의 비율로 1%의 BSA가 함유된 TBS-T에서 두 시간 동안 반응시켰으며, enhanced chemiluminescence (ECL, Thermo, USA)를 이용하여 Fusion solo imaging system (Fusion solo, France) 상에서 분석 결과를 획득하였다.

6. 실시간 중합효소 연쇄반응(Real time-

Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)

PMA로 분화시킨 THP-1에서 total RNA를 얻기 위한 과정으로 Trizol reagent (Thermo, USA)를 처리하였으며, Nanodrop Lite (Thermo, USA)를 이용하여 정량 하였다. 0.5g의 RNA 1에 18mer의 oligo dt (Invitrogen, USA) 및 48 μ l의 DNase-RNase free ultrapure water를 섞어 최종 부피가 50 μ l가 되도록 조절한 뒤 8 strip PCR tube에서 70 $^{\circ}$ C 조건으로 안정화를 유도하였다. 역전사 과정은 AccuPower RT PreMix kit (Bioneer, Korea)에 제공된 방법을 따라 42 $^{\circ}$ C에서 60분, 94 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 실시하였고, 합성된 cDNA를 이용하여 SYBR Green Master Mix (Bioneer, Korea)를 첨가하여 LightCycler 480 PCR System (Roche, Switzerland)에서 남은 증폭 과정을 진행하였다. Housekeeping gene으로는 GAPDH를 사용하였으며, 증폭에 사용된 primer의 서열은 다음과 같다(Table 1).

7. 세포 내 지질의 축적 염색(Oil Red O staining)

세포 내 지질의 축적을 평가하기 위하여 PBS를 이용한 세척을 진행하였고, 실온에서 5분 동안 10%의 formalin 용액으로 고정을 시켰다. 이후 세포를 다시 60%의 isopropanol으로 세척한 후 60%의 isopropanol에 녹아있는 Oil Red O시약으로 15분 동안 염색을 하였다. 정성적인 결과 사진은 현미경 (Olympus, CKX41, Japan)에서 관찰하였으며, 염색된 시료를 녹여 520nm에서 흡광도를 측정하여 정량적 결과를 추출하였다.

8. 통계처리

실험결과에의 통계처리는 평균값 \pm 표준편차(means \pm standard deviation)로 나타내었고, 유의성 검증을 위한 프로그램으로 GraphPad Prism 5를 이용한 One-Way Anova 방법에서 Tukey's Multiple Comparison Test의 *p* 값이 0.05 이하인 경우에만 유의한 것으로 인정하였다.

결과 및 고찰

혈관의 노화(vascular aging)로 인하여 발생할 수 있는 순환기계 장애는 전세계적으로 증가 추세이며, 심혈관계 질환의 현대 의학적 약물 치료법으로 hydroxyl-methylglutaryl-coenzyme A (HMG-CoA) 환원효소 억제제인 스타틴(statins)이 대표적이다¹³⁾. 콜레스테롤의 합성을 감소시키는 효능으로 알려져 있는 스타틴 계열의 합성 신약은 low-density lipoprotein (LDL)의 혈장 내 수치를 최대 50%까지 감소시킨다는 보고가 있으나, 신생 당뇨병의 발병 위험 요소로 작용하며 간 기능 저하 등 다양한 부작용 역시 문제로 제기되어 왔다^{14,15)}. 그러므로, 스타틴 계열의 약물 투여는 부작용 제어가 어렵다는 단점과 장기간 복용에 따른 내성 문제를 극복하기 어렵다는 명백한 한계가 있다고 할 수 있다. 따라서, 스타틴 계열 약물의 즉각적인 콜레스테롤 저하 효능을 유지 하면서 각종 부작용을 감소시키고, 내성에 대한 한계를 극복할 수 있는 심혈관질환의 예방 및 치료 차원의 궁극적 대안이 필요하며, 최근 근거 중심의 한약

Table 1. The primer sequences of reverse cholesterol transport-related genes for quantitative polymerase chain reaction.

Primer	Sequence
ABCA1	Forward 5'-ACCAGTTTGTGGCCCTTTG-3'
	Reverse 5'-AGTTCCAGGCTGGGGTACTT-3'
SR-BI	Forward 5'-CTGTGGGTGAGATCATGTGG-3'
	Reverse 5'-GCCAGAAGTCAACCTTGCTC-3'
GAPDH	Forward 5'-GGCCTCCAAGGAGTAAGACC-3'
	Reverse 5'-AGGGGTCTACATGGCAACTG-3'

을 바탕으로 하는 혈관의 노화 예방 및 치료약물 발굴이 각광받고 있다¹⁶⁾.

본 연구 논문에서는 금궤요략(金匱要略)의 흉비심통단기병맥증치(胸痺心痛短氣病脈證治)편에 수록되어 있고, 병변의 진행 단계에 따른 상이한 처방을 구성하는 과루해백반하탕(KHB)과 과루해백백주탕(KHP)이 죽상동맥경화를 예방하거나 치료할 수 있다는 것을 발견하고 분자 수준에서 환원적 기법으로 작용점 분석을 시도하였다. 귀납적 사고(deductive reasoning)를 증명하기 위한 수단으로 먼저 사람의 단핵구 세포주인 THP-1을 대상으로 세포 생존에 미치는 영향을 평가한 결과 KHP는 세포에 최고 처리 농도 200 µg/ml까지 생존율에 별다른 영향이 나타나지 않았으나, KHB에서는 약 5%의 감소가 관찰되었다(Fig. 1. A and B). 따라서 두 처방이 관련 질병의 예방이나 치료에 미치는 결과 측정에 변수의 작용을 배제하기 위하여 KHB 및 KHP를 처리할 수 있는 단일 농도의 한계를 100µg/ml 설정하였다. 한편, 금궤요략에 수록된 두 처방의 공통된 본초 구성 약물로는 청화열담약(淸火熱痰藥)인 과루인(瓜蒌仁)과 이기약(理氣藥)인 해백(薤白)이 있다. 과루인의 주치는 토혈(吐血), 대변비결(大便祕結), 적백열리(赤白熱痢), 흉비(胸痺), 결흉(結胸) 등이며, 평활근 증식 억제를 통하여 심혈관계 및 뇌혈관계에 긍정적 효능이 있을 것으로 실험 연구 논문에서 보고 되었다¹⁷⁾. 해백 또한 혈중 지질의 감소 및 항죽상동맥경화에 대한 효능이 보고되었으며, 한의(약)학에서의 주치병은 담음해천(痰飲咳喘), 흉비동통(胸痺疼痛), 설리후중(泄痢後重) 등으로 알려져 있다^{18,19)}.

다음으로 사람의 단핵구 세포에 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)를 처리하여 대식세포로 분화시킨 후 lipopolysaccharide (LPS) 및 interferon gamma (IFNγ)에 노출시켜 M1 상태로의 극성화를 유도하였다. M1 극성화를 전환시키는 지표물질로는 interleukin-4 (IL-4)를 사용하였으며, KHB와 KHP는 통계적으로 유의하게 M1으로 극성화된 대식세포

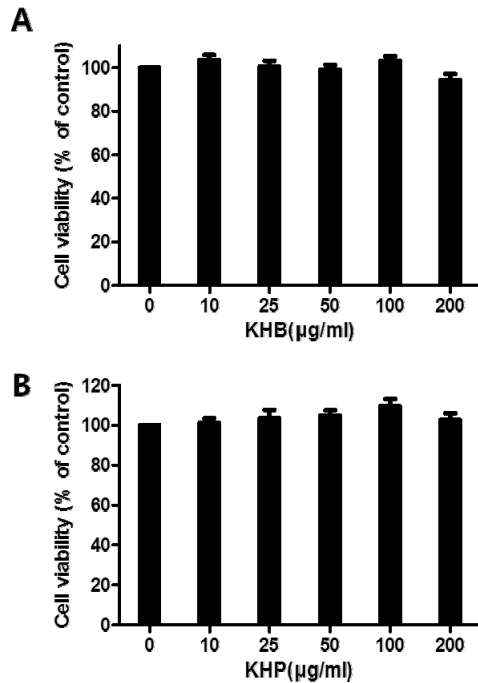


Fig. 1. The effect of KHB (A) and KHP (B) on cell viability in human monocytic THP-1 cell line. Cell viability was determined using the cell viability assay kits (Ez-CyTox). All data represent the means±SD of three different experiments.

에서 대표적으로 발현되는 CD86의 population이 감소하는 것이 유세포 분석을 통하여 확인되었다 (Fig. 2, A and B). 특히 반하가 포함된 KHB의 경우에는 M1/M2의 M1 세포의 CD86 지표 인자가 대조군 대비 1.5배 감소하는 경향이 관찰되었으며, 이는 반하의 온화한담(溫化寒痰)한 성질이 대식세포의 전염증성 극성화를 적극적으로 차단하는 작용을 하는 것으로 보여진다. 반하 추출물의 알려진 효능으로 진정효과, 항경련효과, 그리고 항염증 등에 탁월하다는 보고가 있다²⁰⁾.

이상의 결과에서 KHB 및 KHP가 전염증성 M1 대식세포로의 분화를 억제한다는 관찰을 바탕으로 처방의 하위 작용점을 분석하기 위하여 산화적 스트레스에 대응하는 세포의 방어 능력을 단백질 수준에

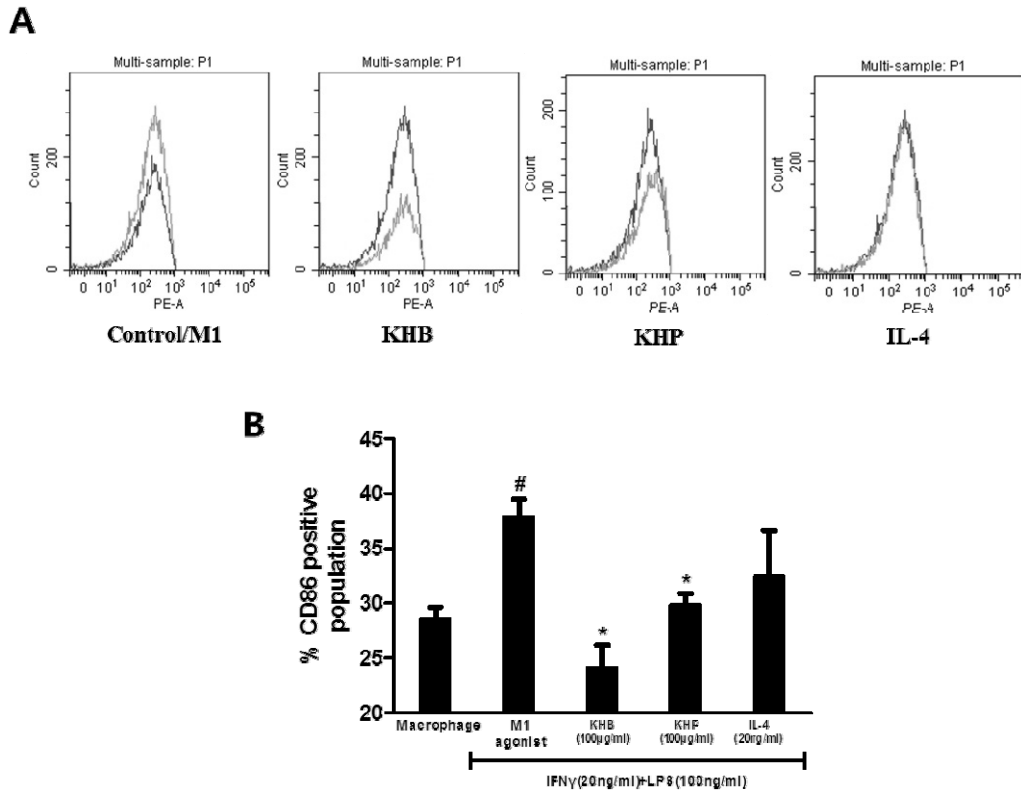


Fig. 2. The effect of KHB and KHP on expression of CD86 levels in M1 polarized THP-1 cells. Flow cytometry analysis (A) and CD86 population levels (B) on IFN γ (20ng/ml) and LPS (100ng/ml)-stimulated THP-1 cells. All data represent the means \pm SD of three different experiments. # P < 0.05 compared to untreated cells, and asterisk indicates statistically significant difference between polarized group (* < 0.05).

서 검증해 보았다. 분자 마커로는 nuclear factor-like 2 (Nrf2) 및 heme oxygenase-1 (HO-1)을 사용하였고, Nrf2는 세포질에서 불활성 상태로 존재하다가 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 등의 자극으로부터 활성화 되어 핵질로 이동하게 된다²¹⁾. 세포질에서 핵질로 이동한 Nrf2는 유전자 전사 인자로 작용하여 최종 HO-1과 같은 방어 기구의 단백질을 생산하게 되는데, KHP는 Nrf2의 translocation을 1.4배 증가시켰으며, HO-1의 발현을 2.4배 유도하였다(Fig.3, A and B). 관찰된 결과는 KHP에서 모두 유의적이었으므로, 혈관의 노화를 예방하는 차원에서 산화적 스트레스의 제어에 효능이 있는 처방은

과루해백백주탕으로 판명되었다.

한편, 콜레스테롤과 같은 지질 성분의 혈관 내 비정상 수준으로의 상승은 산화형 저밀도 지질단백질(oxidized-low density lipoprotein, oxi-LDL)의 생성을 촉발하고, 죽상동맥경화와 같은 혈관 노화성 혈관 질환을 장기간에 걸쳐 만들게 된다²²⁾. 본 실험에서는 oxi-LDL로 자극한 THP-1 유래 분화형 대식세포에 KHB와 KHP, 그리고 혈중 콜레스테롤의 조절에 효능이 우수하다고 알려진 prava statin을 대조군으로 사용하여 지질의 축적 억제 정도를 정성법과 정량법을 이용하여 분석하였다. Oxi-LDL은 정상 대조군에 비하여 약 1.7배까지 지방의 세포 내 축적을 유도하

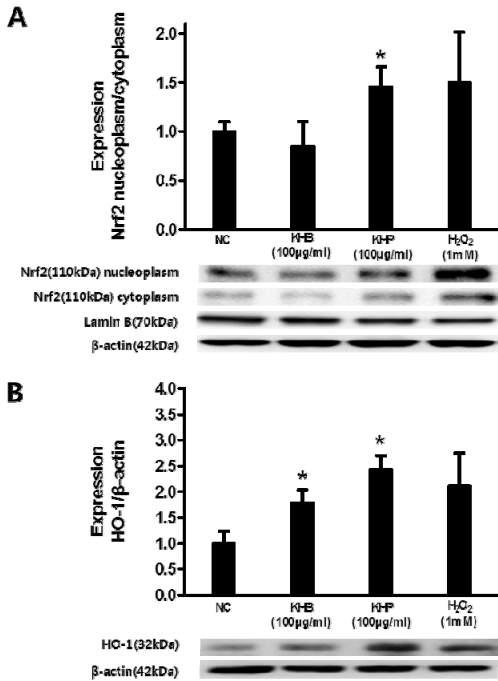


Fig. 3. The effect of KHB and KHP on antioxidant-related protein expressions including Nrf2 (A) and HO-1 (B). All data represent the means±SD of three different experiments. Asterisk indicates statistically significant difference between untreated group (* < 0.05).

였으나, KHB 및 KHP 그리고 prava statin은 정상 수준에 가깝게 지질의 축적을 억제하였다(Fig. 4. A). Oil Red O 측정의 정량적 분석에서는 KHB가 KHP보다 우수한 결과를 나타내었고, prava statin에 근접한 효능을 나타내는 유의적 결과를 얻었다. 오차 범위를 고려하였을 때 상호 우열을 구분하기는 어려우나 양성대조군으로 사용된 스타틴 계열의 약물과 KHB가 유사한 효능을 나타내는 것을 알 수 있었다. 세포 내 지질 축적 억제에 작용하는 KHB 및 KHP의 작용점을 분석하기 위한 유전자 발현 수준을 검토한 결과 콜레스테롤의 세포 외부 유출과 인지질의 항상성 유지에 관련된 ATP-binding cassette transporter ABCA1은 KHP가 월등히 높은 발현 유

도를 나타내었으나(Fig. 4. C), 콜레스테롤의 역수송을 조절하는 scavenger receptor class B type 1 (SR-B1)의 경우 KHB가 정상대조군에 비하여 약 4.2배 증가하는 것이 관찰되었다(Fig. 4. D). 콜레스테롤의 역수송은 심장 질환 및 뇌졸중, 특히 죽상동맥경화증에 대한 주요한 보고 메커니즘으로 알려져 있다²³. 유전자 발현 수준을 검증한 결과에서 유추할 수 있는 KHB와 KHP의 작용점으로 KHP는 혈관의 노화를 방지하는 세포 인지질의 항상성 유지에 보다 효능이 있는 것임을 알 수 있었다. 반하를 처방에 구성하고 있는 KHB는 보다 직접적으로 혈관의 병변에 작용하는 치료 효능을 기대할 수 있을 것으로 판명 되었다. 이는 금계요약 홍비심통단기병맥증치 편에 수록된 처방 구성이 오늘날 죽상동맥경화와 같은 병변 진행의 단계별 작용점에 관한 현대적 해석을 가미한 것일 뿐, 본 논문의 실험적 접근을 통하여 두 처방을 예방과 치료에 방점이 있는 것으로 단정짓기에 한계는 있다.

끝으로 두 처방이 사이토카인의 분비와 LPS의 자극으로 인한 염증성 단백질 마커의 합성을 저해하는 효능을 평가하기 위하여 유전자 실시간중합효소 반응과 western blot을 실시하였다. Tumor necrosis-alpha (TNF- α)와 IL-6는 전염증성 사이토카인(proinflammatory cytokines)의 대표적 분자 표지로 INF γ 및 LPS에 의하여 자극 받은 대식세포가 혈중으로 분비하는 신호전달 물질이다. 혈관에 분비된 TNF- α 와 IL-6는 인접한 내피세포 및 혈관평활근세포에 증식과 관련한 신호를 전달하여 plaque를 형성하는데 기여하는 것으로 알려져 있다²⁴. KHB 및 KHP는 유전자 발현 수준에서 TNF- α 및 IL-6 mRNA의 형성을 정상수준 또는 그 이하로 낮추는 결과를 얻을 수 있었다. 염증 반응을 전개하는 사이토카인의 분비를 저해하는 효능은 KHP에 비하여 반하를 처방 구성으로 포함시키는 KHB가 우수하였다(Fig. 5. A and B). 반면 대식세포 내부에서 일어나는 염증성 반응 가운데 혈관을 확장시키는 데 필요한 산화질소(nitric oxide,

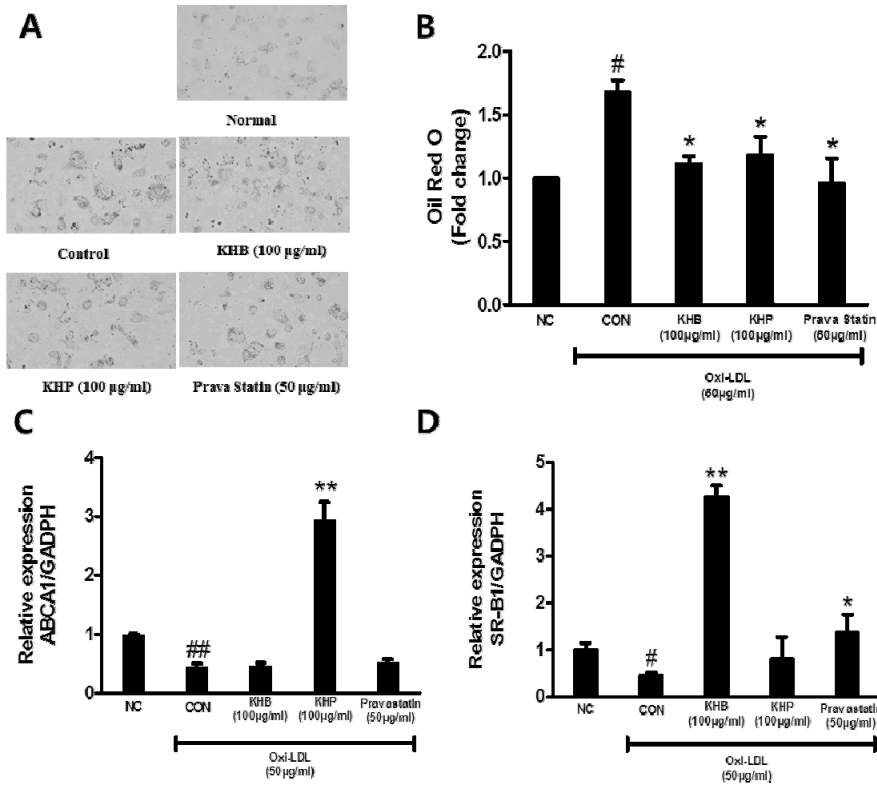


Fig. 4. The effect of KHB and KHP on oxi-LDL-stimulated lipid accumulation. Microscopic images (A) and resultant solution were measured at 520 nm under microplate reader (B). Reverse cholesterol-related genes expression were detected by quantitative real-time PCR including ABCA1 (C) and SR-B1 (D). All data represent the means \pm SD of three different experiments. # P < 0.05, ## P < 0.01 compared to oxi-LDL untreated cells. Asterisk indicates statistically significant difference between ox-LDL-stimulated group (* < 0.05, ** < 0.01).

NO)를 합성시키는 inducible nitric oxide synthase (iNOS)와 LPS 와 같은 자극원에 의해 유도형으로 생성되는 염증성 cyclooxygenase-2 (COX-2)는 KHP 가 통계적으로 유의한 발현 감소 효과를 나타내었다 (Fig. 5. C and D). 이러한 결과 역시 죽상동맥경화와 같은 만성 염증성 질환의 병변 진행 단계에 있어 반하를 포함시키는 금궤요약의 처방이 보다 후기의 단계를 조절하고, 과루해백백주탕은 혈관의 노화를 예방하는 효능에 주목할 필요가 있을 것이다.

결론

본 연구는 장중경의 저서인 금궤요약 비심통병맥 증치편에 수록된 과루해백반하탕(KHB)과 과루해백백주탕(KHP)의 혈관노화 치료 및 예방 효능을 탐색 하기 위해 사람의 단핵구 세포인 THP-1 cell에 KHB 및 KHP을 처리하여 세포의 생존을 검사, 단 핵구 세포의 분화를 통한 M2 극성화에 미치는 영향, 지질의 세포 내 축적과 콜레스테롤을 역수송 관련 유전자와 단백질 발현, 염증의 차단에 관련된 사이토카인 및 단백질 발현 양상을 확인한 결과 다음과 같은

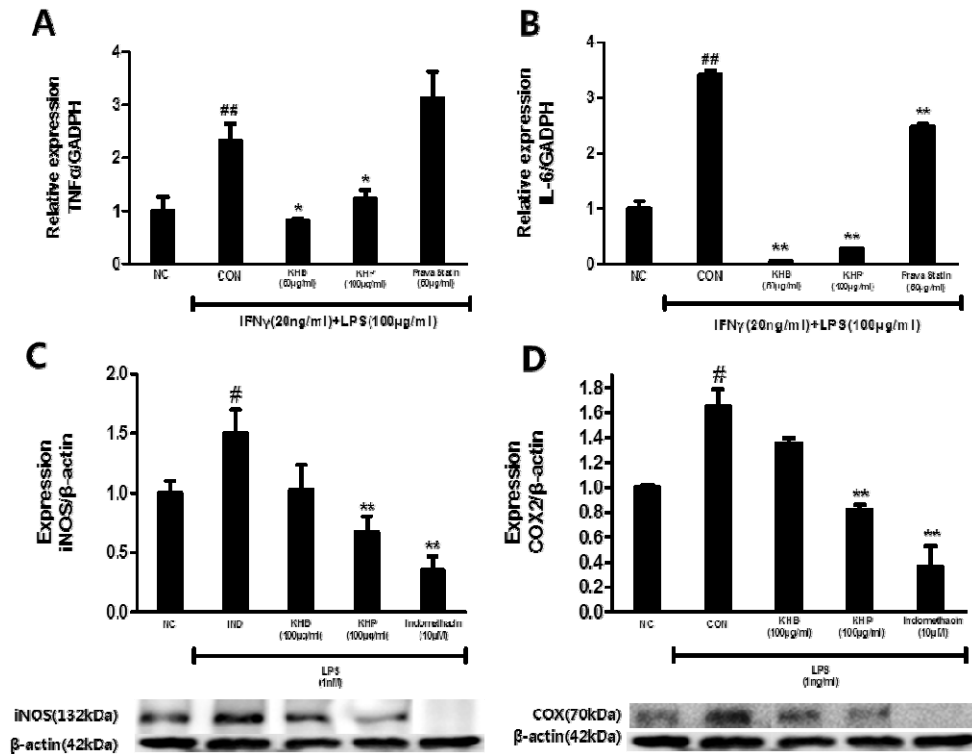


Fig. 5. The effect of KHB and KHP on anti-inflammation-related mediator expressions including TNF- α (A), IL-6 (B), iNOS (C) and COX-2 (D). # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ compared to ox-LDL untreated cells. Asterisk indicates statistically significant difference between ox-LDL-stimulated group (* < 0.05 , ** < 0.01).

결론을 얻었다.

1. KHB, KHP는 최종 100 μg/ml 농도에서 THP-1 cell의 생존율에 아무런 영향을 미치지 않는다는 것이 확인되었다.
2. KHB와 KHP는 유세포분석을 통하여 확인된 결과 M1 극성화에 관한 지표인자인 CD86의 발현량을 감소시켜 전염증성 M1 대식세포의 분화를 억제하였다.
3. KHP는 항산화 전사인자인 Nrf2와 HO-1 효소의 발현을 증가시켜 항산화 방어체계의 활성화를 통한 산화적 스트레스 제어효과를 나타냈다.
4. KHB와 KHP는 모두 지질 축적을 억제하여 대조군과 함께 정상 수준에 가까운 효능을 보였으며,

정량 분석에서 KHB가 KHP보다 우수한 효능을 나타냈다.

5. KHP는 유전자 수준에서 ABCA1의 높은 발현이 나타났고, KHB는 SR-B1의 높은 발현이 각각 나타났다.
6. KHP와 KHB는 전염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IL-6의 발현을 저해하여 정상수준 또는 그 이하로 낮추었으며, KHB의 효능이 더 우수한 것으로 보여졌다. 한편, KHP는 iNOS, COX-2의 발현량을 감소시키는 결과를 보였다.

이상의 연구 결과를 통해 KHB와 KHP이 세포 수준에서 M1/M2 대식세포 균형 조절, 항산화 효능, 지질축적억제 효과, 콜레스테롤 역수송 관련 유전자

및 단백질 발현 증대 효과, 항염증 효과가 있었으며, 향후 추가적 동물 실험 등을 통해 혈관노화 치료 및 예방약물로서 가치를 죽상동맥경화를 포함하는 심혈관계질환에 병변의 진행 단계별로 평가할 필요가 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문(저서)은 2018년도 정부(교육부)의 재원으로 한국과학창의재단(2018년도 학부생 연구프로그램)의 지원을 받아 수행된 연구임.

참고문헌

1. Tong X, Yang Q, Ritchey MD, George MG, Jackson SL, Gillespie C, et al. The burden of cerebrovascular disease in the United States. *Prev Chronic Dis.* 2019;16(52):180411.
2. Terentes-Printzios D, Vlachopoulos C, Xplanteris P, Ioakeimidis N, Aznaouridis K, et al. Cardiovascular risk factors accelerate progression of vascular aging in the general population: Results from CRAVE study (Cardiovascular Risk Factors Affecting Vascular Age). *Hypertension.* 2017;70(5):1057-64.
3. John Hall. *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology.* 12th ed. Korea: Bupmoon Education. 2017.
4. Poupel L, Combadiere C. Atherosclerosis: on the trail of chemokines. *Biol Aujourdhui.* 2010;204(4):285-93.
5. Munteanu AI, Raica M, Zota EG. Immunohistochemical study of the role of mast cells and macrophages in the process of angiogenesis in the atherosclerotic plaques in patients with metabolic syndrome. *Arkh Patol.* 2016;78(2):19-28.
6. Chati A, Eckel RH. Lipids, lipoproteins, and cardiovascular disease: Clinical pharmacology now and in the future. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016;101(3):804-14.
7. Pigarevsky PV, Snegova VA, Nazarov PG. Macrophages and their role in destabilization of an atherosclerotic plaque. *Kardiologiya.* 2019;59(4):88-91.
8. Saqib U, Sarkar S, Suk K, Mohammad O, Baig MS, Savai R. Phytochemicals as modulators of M1-M2 macrophages in inflammation. *Oncotarget.* 2018;9(25):17937-50.
9. Liu Y, Wang X, Pang J, Zhang H, Luo J, Qian X, et al. Protocatechuic acid attenuates atherosclerosis by inhibiting M1 and promoting M2 macrophage polarization. *J Agric Food Chem.* 2019;67(3):807-18.
10. 전국한의학대학교 심계내과학교실. *東醫心系內科學.* 서울: 서원당. 2001.
11. 이학로. *금궤요략의 순환구조.* 대전:주민출판사. 2000.
12. Ren Y, Chen ZQ, Zhang MZ, Guo LH, He DY. Cluster analysis of medication laws for treating coronary heart disease by distinguished veteran doctors of traditional Chinese medicine. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi.* 2016;36(4):411-4.
13. Bertrand MJ, Tardif JC. Inflammation and beyond: New directions and emerging drugs for treating atherosclerosis. *Exper Opin Emerg Drug.* 2017;22(1):1-26.
14. Paseban M, Butler AE, Sahebkar A. Mechanisms of statin-induced new-onset diabetes. *J Cell Physiol.* 2019;234(8):12441-61.
15. Richard A. Harvey. *Lippincott's Illustrated*

- Reviews: Pharmacology. 6th ed. Seoul: Shinil Books. 2015.
16. Yuan H, Ma Q, Ye L, Piao G. The traditional medicine and modern medicine form natural products. *Molecules*. 2016;29(5):559.
 17. Yu X, Tang L, Wu H, Zhang X, Luo H, Guo R. et al. *Trichosanthis Fructus*: botany, traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J Ethnopharmacol*. 2018;224:177-94.
 18. Yao ZH, Qin ZF, Dai Y, Yao XS. Phytochemistry and pharmacology of *Allii Macrostemonis Bulbus*, a traditional Chinese medicine. *Chin J Nat Med*. 2016;14(7):481-98.
 19. 전국한의과대학 공동교재편찬위원회. *本草學*. 서울:영림사. 2007.
 20. Mao S, Chenf L, Wu L. Study on anticonvulsive effect of *Rhizoma pinelliae*. *Zhong Yao Cai*. 2001;24(11):813-4.
 21. Mimura J, Itoh K. Role of Nrf2 in the pathogenesis of atherosclerosis. *Free Radic Biol Med*. 2015;88:221-32.
 22. Ahotupa M. Oxidized lipoprotein lipids and atherosclerosis. *Free Radic Res*. 2017;51(4): 439-47.
 23. Favari E, Chroni A, Tietge UJ, Zantti I, Escola-Gil JC, Bernini F. Cholesterol efflux and reverse cholesterol transport. *Handb Exp Pharmacol*. 2015;224:181-206.
 24. Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Inflammation in Atherosclerosis: from pathophysiology to practice. *J Am Coll Cardiol*. 2009;54(23): 2129-38.

ORCID

- 손창현 <https://orcid.org/0000-0002-3393-5684>
이상민 <https://orcid.org/0000-0001-7482-377X>
유가람 <https://orcid.org/0000-0003-1559-4326>
이승준 <https://orcid.org/0000-0002-2640-3401>
임동우 <https://orcid.org/0000-0002-3179-9439>
김혁 <https://orcid.org/0000-0002-7017-1521>
박원환 <https://orcid.org/0000-0002-2464-8317>
김재은 <https://orcid.org/0000-0002-1368-6684>