

# 해백청혈플러스(AMCP)의 항산화 및 항염증 작용을 통한 죽상동맥경화 억제 효과

채인철 · 유주영 · 유호룡 · 김윤식 · 설인찬\*

대전대학교 한의과대학 심계내과학교실

## Effects of Antioxidant and Anti-inflammatory Activity of Allii Macrostemonis Bulbus Cheonghyeol Plus on the Inhibition of Atherosclerosis

Incheol Chae, Juyeong Ryu, Horyong Yoo, Yoonsik Kim, Inchan Seol\*

Department of Cardiology and Neurology of Korean Medicine, College of Korean Medicine, Daejeon University

The purpose of this study was to investigate the antioxidant, anti-inflammatory and anti-cellular adhesion molecules effects of Allii Macrostemonis Bulbus, Artemisiae Capillaris Herba, Curcumae Radix, Crataegi Fructus, Salviae Miltiorrhizae Radix complex extract(AMCP) on the inhibition of atherosclerosis in HUVEC. We measured DPPH radical scavenging activity and ABTS radical scavenging activity of AMCP to evaluate its antioxidant effect. And we also measured the expression level of NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ , ERK, JNK, p38 proteins to evaluate its anti-inflammatory effect. Lastly, we measured the expression level of MCP-1, ICAM-1, VCAM-1 mRNA and their level to evaluate its anti-cellular adhesion molecules. AMCP did not show any cytotoxicity in HUVEC within the concentraion tested except for a concentration of 400  $\mu$ g/ml. AMCP increased the DPPH radical scavenging activity and ABTS radical scavenging activity in HUVEC as the concentration of AMCP rises. AMCP significantly reduced NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ , JNK, ERK and p38 protein expression in HUVEC compared to control group. AMCP significantly reduced MCP-1, ICAM-1, VCAM-1 gene expression in HUVEC compared to control group. AMCP significantly decreased the levels of MCP-1, ICAM-1, VCAM-1 in HUVEC compared to control group. These results suggest that AMCP has effects on antioxidation, anti-inflammation and anti-cellular adhesion molecule, which helps the treatment and prevention of dyslipidemia and atherosclerosis.

keywords : Allii Macrostemonis Bulbus, CheongHyeol Plus, Dyslipidemia, Atherosclerosis

### 서 론

2018년 사망원인통계 자료에 따르면 심장 질환과 뇌혈관 질환은 각각 사망원인 2위와 4위에 해당하고, 이 둘을 합친 심·뇌혈관계질환은 전체 사망원인의 18.4%를 차지할 정도로 큰 비중을 차지하고 있다. 우리나라의 고혈압 유병률은 큰 변화가 없고 흡연율의 감소도 정체되고 있는 것과는 반대로 당뇨병과 고콜레스테롤혈증(Hypercholesterolemia)의 유병률은 점차 증가하는 추세이다. 이상지질혈증(Dyslipidemia)은 고혈압, 당뇨병, 흡연과 같이 심·뇌혈관계질환에 가장 많은 영향을 끼치는 위험 요인 중 하나로, 혈관 내피세포의 손상에 의해서 심·뇌혈관계질환의 주요 원인이 되는 만성 염증성 질환인 죽상동맥경화증을 유발하는 가장 중요한 인자이다<sup>1)</sup>.

이상지질혈증 중 고콜레스테롤혈증 치료의 일차 선택약제로 HMG-CoA 환원효소 억제제인 statin이 사용되고 있지만, 부작용으로 소화장애, 속쓰림, 복통, 간독성, 근육 독성 등이 나타날 수 있다. 이외에 에제티미브도 이상지질혈증 치료제로 사용되고 있지만 복통, 설사, 및 소화장애 등 다양한 부작용이 있고, 고중성지방혈증(Hypertriglycemia)의 치료에는 피브린산 유도체(fibrin acid)나 오메가 3 지방산을 먼저 사용하지만, 이들의 사용 역시 다양한 부작용이 나타날 수 있다. 저HDL 콜레스테롤혈증 환자에게 효과적인 약제인 니코틴산도 마찬가지로 피부 홍조, 소화장애, 간독성, 통풍, 혈당 상승 등의 부작용이 보고되었다<sup>2)</sup>.

이런 다양한 부작용을 갖고 있는 항이상지질혈증 치료약들의 새로운 대안으로 기대되는 청혈플러스(Cheonghyeol Plus, CHP)는茵陳蒿, 鬱金, 山楂, 丹蔘으로 구성된 한약재 복합추출물로, 세포

\* Corresponding author

Inchan Seol, Daejeon Korean Medicine Hospital of Daejeon University, 75, Daedeok-daero 176beon-gil, Seo-gu, Daejeon, 35235 Republic of Korea

E-mail : seolinch@dju.kr Tel : +82-42-470-9130

Received : 2020/03/04 Revised : 2020/04/16 Accepted : 2020/04/24

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2020.06.34.3.126

Available online at https://kmpath.jams.or.kr

및 동물을 대상으로 한 실험 연구들<sup>3,4)</sup>과 임상증례보고<sup>5)</sup>에서 항이상지질혈증의 효과가 알려져 있다. 최근에는 청혈플러스의 구성 약을 발효시켜 추출한 내용물로 항이상지질혈증의 효과가 입증되기도 했다<sup>6)</sup>. 이와 함께 薤白은 여러 실험<sup>7-9)</sup>을 통해 항산화 및 항염증효과, 항이상지질혈증 효과가 있어 죽상동맥경화 관리에 효과가 있음이 알려져 있다. 이에 저자는 기존의 청혈플러스에 薤白을 가미한 해백청혈플러스의 항산화 및 항염증 작용을 통한 죽상동맥경화 억제 효과를 확인하기 위해 이번 연구를 진행하게 되었다.

본 연구에서는 해백청혈플러스(AMCP)의 항산화 및 항염증 작용을 통한 죽상동맥경화 억제 효과를 알아보고자 AMCP를 human umbilical vein endothelial cell(HUVEC)에 처리하여 세포생존율을 확인하였고, 항산화 효과를 확인하기 위해 DPPH 및 ABTS radical 소거능을 측정하였다. 그리고 AMCP의 항염증 효과를 확인하기 위해 NF- $\kappa$ B 및 I $\kappa$ B $\alpha$ 의 단백질 발현량과 MAPKs 신호전달 체계의 ERK, JNK, p38 단백질 발현량을 측정하였다. 마지막으로 AMCP의 세포부착분자 억제 효과를 확인하기 위해 MCP-1, ICAM-1, VCAM-1의 유전자 발현량과 생성량을 측정하였고 이에 유의미한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 시료

본 실험에 사용된 해백청혈플러스(Allii Macrostemonis Bulbus Cheonghyeol Plus, AMCP)의 구성 약재들은 대한한약국에서 구입하여 사용하였으며, 한 첩의 내용과 분량은 다음과 같다 (Table 1).

Table 1. The Prescription of AMCP

Herbal medicine name	Pharmacognostic name	Weight(g)
薤 白	<i>Allii Macrostemonis Bulbus</i>	10
茵 陈 蒿	<i>Artemisiae Capillaris Herba</i>	10
鬱 金	<i>Curcumae Radix</i>	10
山 楂	<i>Crataegi Fructus</i>	10
丹 蔘	<i>Salviae Miltiorrhizae Radix</i>	10
Total amount		50

#### 2) 시약

사용된 시약은 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH : Sigma-Aldrich, U.S.A.), 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS : Sigma-Aldrich, U.S.A.), gallic acid(Sigma-Aldrich, U.S.A.), EGM<sup>TM</sup>-2 endothelial cell growth medium-2 bullekit<sup>TM</sup> Lonza, U.S.A.), gelatin solution(Sigma-Aldrich, U.S.A.), tumor necrosis factor- $\alpha$  human(TNF- $\alpha$  : Sigma-Aldrich, U.S.A.), trypan blue(Sigma-Aldrich, U.S.A.), trypsin-EDTA solution(Welgene, Korea), dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS : Welgene, Korea), EZ-cytox(Daeilab, Korea), human MCP-1 ELISA kit(Komabiotech, Korea), human ICAM-1 ELISA kit(Komabiotech, Korea), human VCAM-1

ELISA kit(Komabiotech, Korea), SYBR Green(Qiagen, Germany), total RNA prep kit(Intronbio, Korea), accupower cyclescript RT premix(Bioneer, Korea), DEPC-DW(Bioneer, Korea), pierce<sup>TM</sup> BCA protein assay Kit(Thermo Fisher, U.S.A.), RIPA lysis and extraction buffer(Thermo Fisher, U.S.A.), protease inhibitor cocktail(Sigma-Aldrich, U.S.A.), phosphatase inhibitor cocktail 2(Sigma-Aldrich, U.S.A.), phosphatase inhibitor cocktail 3(Sigma-Aldrich, U.S.A.), bovine serum albumin(BSA : Gendepot, U.S.A.), miracle-star<sup>TM</sup> western blot detection system(Intron Biotechnology, Korea), primary antibody(Cell Signaling, U.S.A.), secondary antibody(Jackson immunoresearch, U.S.A.)등을 사용하였다.

### 2. 방법

#### 1) 시료 추출

AMCP 1첩 분량(50 g)에 500 mL의 증류수를 넣어 100°C에서 3시간동안 추출하였으며, 추출물을 여과지로 여과한 후, rotary vacuum evaporator를 통해 감압농축하고 freeze dryer를 사용하여 동결건조를 진행하여 7.68 g(수득률 : 15.35%)의 분말을 얻었으며, -20°C에 보관하면서 사용하였다.

#### 2) 세포 배양

HUVEC은 0.2% gelatin solution으로 코팅된 plate에 EGM<sup>TM</sup>-2 medium과 EGM<sup>TM</sup>-2 singlequots<sup>TM</sup> kit로 혼합된 배지를 사용해 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건이 유지되는 세포배양기에서 배양했고, 2-3일 주기로 계대 배양해 실험을 진행하였다.

#### 3) 세포생존율 측정

HUVEC을 48 well plate에 1 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양 하였다. 24시간 후, AMCP를 50, 100, 200, 400  $\mu$ g/mL의 농도로 처리 후 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 배양액 100  $\mu$ L당 10  $\mu$ L의 EZ-Cytox 용액을 첨가해 세포배양기에서 30분 동안 반응시켰다. 반응 후에 450 nm 에서 흡광도 변화를 측정 한 뒤 대조군에 대한 세포생존율을 백분율로 표시하였다.

#### 4) DPPH radical 소거능 측정

AMCP의 최종 농도가 1, 10, 100, 1000  $\mu$ g/mL의 농도가 되도록 희석시켰고, 에탄올에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 150  $\mu$ L와 시료를 100  $\mu$ L씩 혼합해 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. 반응 이후 517 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 대조군은 증류수를 넣었으며, DPPH radical 소거능은 아래의 식에 따라서 계산하였다.

$$\text{소거능 (\%)} = \left( \frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

#### 5) ABTS radical 소거능 측정

AMCP의 최종 농도가 1, 10, 100, 1000  $\mu$ g/mL의 농도가 되도록 희석시켰고, ABTS 용액은 7.4 mM ABTS (2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))와 2.6 mM의 potassium persulphate를 제조한 후에 암소에 하루 간 방치하여

양이온(ABTS+)을 형성시킨 이후에 732 nm에서 흡광도를 측정해 흡광도 값이 1.5 이하가 나오도록 희석시켰다. 희석된 ABTS+ 용액 95  $\mu$ l와 시료를 5  $\mu$ l씩 혼합하여 실온에 10분 동안 반응시킨 후, 732 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 대조군은 증류수를 넣었으며, ABTS radical 소거능은 아래의 식에 따라서 계산하였다.

$$\text{소거능 (\%)} = \left( \frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

#### 6) 단백질 발현량 측정

6 well plate에 HUVEC을  $1 \times 10^6$  cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 AMCP를 50, 100, 200  $\mu$ g/ml의 농도로 처리하고 1시간 뒤, 10 ng/ml의 TNF- $\alpha$ 를 추가하여 12시간 동안 배양하였다. 이 후에, 1200 rpm에서 5분 동안 원심분리 한 뒤에 얻은 세포를 D-PBS로 2회 세척하고 세포 pellet에 protease inhibitor cocktail I, phosphatase inhibitor II, III가 포함된 RIPA buffer를 넣어 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질은 BCA proein assay kit를 이용하여 정량하였으며, sample loading buffer와 섞어 95°C에서 5분간 반응시켜 준비하였다. 준비된 단백질은 10% acrylamide gel을 통해 SDS-PAGE하여 크기별로 분리하였으며, PVDF membrane에 이동시켰다. 단백질이 옮겨진 membrane을 3% BSA에 담가 상온에서 2시간동안 반응시켰다. TBS-T buffer를 이용하여 세척하고 primary antibody를 넣어 4°C에서 16시간동안 반응시켰다. 다시 3회 세척하고 secondary antibody를 넣어 상온에서 1시간동안 반응시켰으며, 다시 세척하고 ECL solution을 통해 단백질을 발색시켰다. 이후, chemidoc fusion FX를 통해 단백질 발현량을 분석하였다.

#### 7) 유전자 발현량 측정

##### (1) RNA 추출

6 well plate에 HUVEC을  $1 \times 10^6$  cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 AMCP를 50, 100, 200  $\mu$ g/ml의 농도로 처리하고 1시간 뒤, 10 ng/ml의 TNF- $\alpha$ 를 추가하여 12시간 동안 배양하였다. 이 후, 1200 rpm에서 5분 동안 원심분리 한 뒤에 얻은 세포에 easy blue 1 ml와 chloroform 200  $\mu$ l를 넣고 vortexing 해준 뒤, 13000 rpm, 4°C에서 10분 동안 원심분리 하였다. 상층액 400  $\mu$ l와 binding buffer 400  $\mu$ l를 실온에서 1분 동안 반응시킨 후, 반응액 700  $\mu$ l를 column에 주입하여 13000 rpm에서 30초 동안 원심분리 하였다. Column에 washing buffer A를 700  $\mu$ l 넣고 13000 rpm에서 30초 동안 원심분리 한 뒤, washing buffer B를 700  $\mu$ l 넣고 동일하게 원심분리 하였다. Column 하단을 1.5 ml tube로 교체한 뒤, column에 elution buffer를 30  $\mu$ l 넣고 1분 동안 반응시킨 후 13000 rpm에서 1분 동안 원심분리 하여 total RNA를 추출하였다.

##### (2) cDNA 합성

역전사(reverse transcription) 반응은 RT premix kit의 mixture (reaction buffer, RNase inhibitor, dNTPs mixture, stabilizer, oligo dT15 primer) total RNA를 1  $\mu$ g 넣고

DEPC-DW을 최종 부피가 20  $\mu$ l가 되도록 첨가하였다. 이 혼합액을 잘 섞은 후, 45°C에서 60분 동안 반응시킨 뒤 first-strand cDNA를 합성하고, 95°C에서 5분 동안 방치해 M-MLV RT를 불활성화 시켜 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다.

##### (3) 유전자 증폭

합성이 완료된 cDNA를 증폭시키기 위해 real-time PCR을 진행하였고, real-time 전용 tube에 cDNA 1  $\mu$ l, 각 primer 2  $\mu$ l, DEPC-DW 5  $\mu$ l, SYBR Green 10  $\mu$ l씩 넣어 95°C에서 2분 동안 반응시킨 뒤 다음 95°C에서 5초, 62.5°C에서 30초를 40회 반복하여 유전자를 증폭시켰다. 유전자 발현량은 대조군에 비교하여 계산하였으며, 사용된 primer의 sequence는 Table 2와 같다.

Table 2. The Sequences of Primers

Primer	F/R*	Sequences
MCP-1	F	GCTCAGCCAGATGCAATCAA
	R	CTTGGCCACAATGGTCTTGA
ICAM-1	F	TCTTCCTCGGCCTTCCATA
	R	AGGTACCATGGCCCCAAATG
VCAM-1	F	CCCTACCATTGAAGATACTGG
	R	ATCTCTGGGGGCAACATTGAC
$\beta$ -actin	F	ATCGTGGGGCGCCCAGGCACCA
	R	GGGGTACTTCAGGGTGAGGA

\* F : forward, R : reverse

#### 8) 바이오마커 생성량 측정

6 well plate에 HUVEC을  $1 \times 10^6$  cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 AMCP를 50, 100, 200  $\mu$ g/ml의 농도로 처리하고 1시간 뒤, 10 ng/ml의 TNF- $\alpha$ 를 추가하여 12시간 동안 배양하였다. 배양액을 1200 rpm에서 5분 동안 원심분리 하여 얻은 상등액과 standard를 96 well plate에 100  $\mu$ l씩 넣고 37°C에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응 후, washing buffer를 이용하여 4회 세척 작업을 진행한 후, 100  $\mu$ l의 detection antibody를 넣어 다시 37°C에서 2시간 동안 반응시키고 세척하였다. 세척 후, HRP conjugate를 100  $\mu$ l씩 넣어 37°C에서 30분 동안 반응시키고 세척한 뒤 substrate reagent를 100  $\mu$ l씩 넣어 37°C에서 15분 동안 반응시키고 100  $\mu$ l의 stop solution을 추가하여 micro reader를 통해 450 nm에서 흡광도를 측정하였고, standard curve를 기준으로 절댓값으로 표시하였다.

#### 3. 통계처리

실험 결과는 SPSS 21.0를 이용해 mean $\pm$ standard error of mean으로 나타내었으며, ANOVA를 사용하여 다중 비교하였고 Tukey's HSD test를 통해 p < 0.05, p < 0.01과 p < 0.001 수준에서 유의성을 검정하였다.

## 결 과

#### 1. 세포생존율

HUVEC에 AMCP 처리를 한 뒤에 세포생존율을 측정한 결과, 정상군이 100.00 $\pm$ 2.92%로 나타났을 때, AMCP 50, 100, 200,

400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 각각  $100.97 \pm 3.56\%$ ,  $99.97 \pm 1.56\%$ ,  $100.57 \pm 3.71\%$ ,  $80.23 \pm 3.83\%$ 로 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  이상의 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는(\*\* ;  $p < 0.01$ ) 감소가 나타났다(Fig. 1).

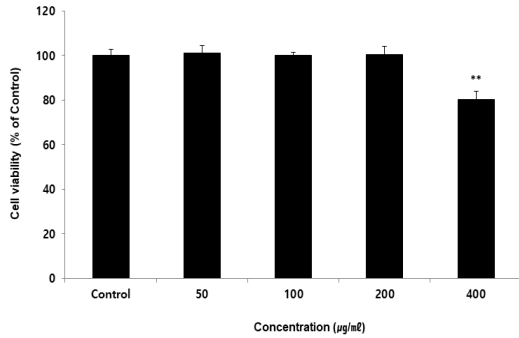


Fig. 1. Cell viability of AMCP in HUVEC. HUVEC were treated by 50, 100, 200, and 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of AMCP for 24 h. Treated cells were reacted by EZ-Cytox for 30 mins and then absorbance were measured at 450 nm using micro plate reader. Cell viability were calculated as percentage relative to the control. The result were presented by the mean  $\pm$  S.D from three independent experiments (Significance of results, \*\* ;  $p < 0.01$  compared to control).

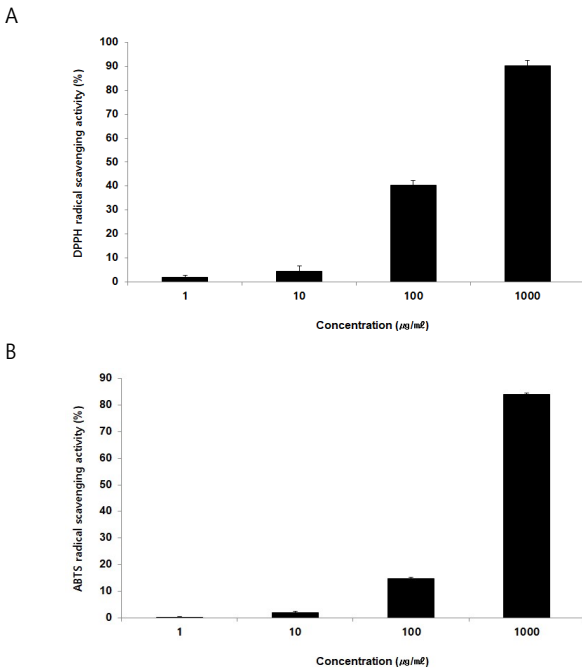


Fig. 2. DPPH radical scavenging activity(A) and ABTS radical scavenging activity(B) of AMCP. AMCP was incubated at 1, 10, 100, and 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  with DPPH solution and ABTS solution for 30 mins. DPPH radical scavenging activities were determined by measurement of absorbance at 517 nm and ABTS radical scavenging activities were determined by measurement of absorbance at 732 nm. The results were expressed as mean  $\pm$  S.D from three independent experiments.

2. DPPH radical 소거능

DPPH radical 소거능을 측정한 결과, AMCP 1, 10, 100, 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 각각  $1.78 \pm 1.01\%$ ,  $4.36 \pm 2.23\%$ ,  $40.46 \pm 1.99\%$ ,  $90.33 \pm 2.14\%$ 로 DPPH radical 소거능의 농도 의존적인 증가가 나타났다(Fig. 2A).

3. ABTS radical 소거능

ABTS radical 소거능을 측정한 결과, AMCP 1, 10, 100, 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 각각  $0.24 \pm 0.09\%$ ,  $1.97 \pm 0.37\%$ ,  $14.86 \pm 0.30\%$ ,  $84.12 \pm 0.46\%$ 로 ABTS radical 소거능의 농도 의존적인 증가가 나타났다(Fig. 2B).

4. 단백질 발현량

1) NF- $\kappa$ B

NF- $\kappa$ B 단백질 발현량을 측정한 결과, 정상군에서  $0.44 \pm 0.10$ , 대조군에서  $1.00 \pm 0.05$ , AMCP 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 각각  $0.99 \pm 0.03$ ,  $0.83 \pm 0.06$ ,  $0.59 \pm 0.07$ 로 나타나 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 대조군에 비해 유의성 있는(\*\* ;  $p < 0.01$ , \*\*\* ;  $p < 0.001$ ) 감소가 나타났다(Fig. 3A).

2) I $\kappa$ B $\alpha$

I $\kappa$ B $\alpha$  단백질 발현량을 측정한 결과, 정상군에서  $0.28 \pm 0.06$ , 대조군에서  $1.00 \pm 0.08$ , AMCP 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 각각  $0.98 \pm 0.01$ ,  $0.80 \pm 0.03$ ,  $0.65 \pm 0.04$ 로 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 대조군에 비해 유의성 있는(\* ;  $p < 0.05$ , \*\* ;  $p < 0.01$ ) 감소가 나타났다(Fig. 3B).

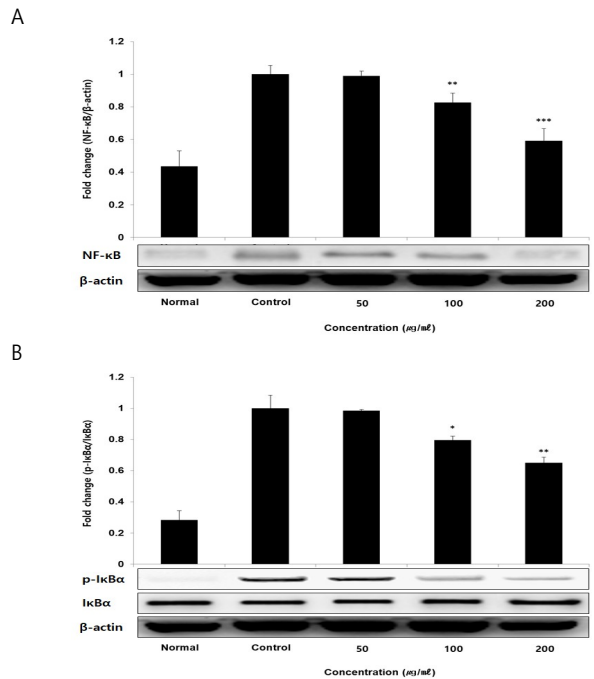


Fig. 3. Effect of AMCP on NF- $\kappa$ B(A) and I $\kappa$ B $\alpha$ (B) protein expression level in HUVEC. HUVEC were treated 50, 100, and 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of AMCP with 10 ng/mL TNF- $\alpha$  for 12 h. The total cell extracts were subjected to 10% SDS-PAGE and western blot analysis with the respective primary and secondary antibodies. The result were presented by the mean  $\pm$  S.D from three independent experiments (Significance of results, \* ;  $p < 0.05$ , \*\* ;  $p < 0.01$ , \*\*\* ;  $p < 0.001$  compared to control).

3) ERK

ERK 단백질 발현량을 측정한 결과, 정상군에서  $0.09 \pm 0.02$ , 대조군에서  $1.00 \pm 0.01$ , AMCP 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 각각  $0.91 \pm 0.03$ ,  $0.59 \pm 0.03$ ,  $0.36 \pm 0.04$ 로 모든 농도에서 대조군에 비

해 유의성 있는(\* ;  $p < 0.05$ , \*\*\* ;  $p < 0.001$ ) 감소가 나타났다 (Fig. 4A).

#### 4) JNK

JNK 단백질 발현량을 측정한 결과, 정상군에서  $0.34 \pm 0.02$ , 대조군에서  $1.00 \pm 0.03$ , AMCP 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 각각  $1.00 \pm 0.05$ ,  $0.83 \pm 0.02$ ,  $0.68 \pm 0.02$ 로 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 대조군에 비해 유의성 있는(\*\* ;  $p < 0.01$ , \*\*\* ;  $p < 0.001$ ) 감소가 나타났다(Fig. 4B).

#### 5) p38

p38 단백질 발현량을 측정한 결과, 정상군에서  $0.25 \pm 0.02$ , 대조군에서  $1.00 \pm 0.06$ , AMCP 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 각각  $1.03 \pm 0.04$ ,  $0.90 \pm 0.02$ ,  $0.59 \pm 0.05$ 로 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 대조군에 비해 유의성 있는(\* ;  $p < 0.05$ , \*\*\* ;  $p < 0.001$ ) 감소가 나타났다(Fig. 4C).

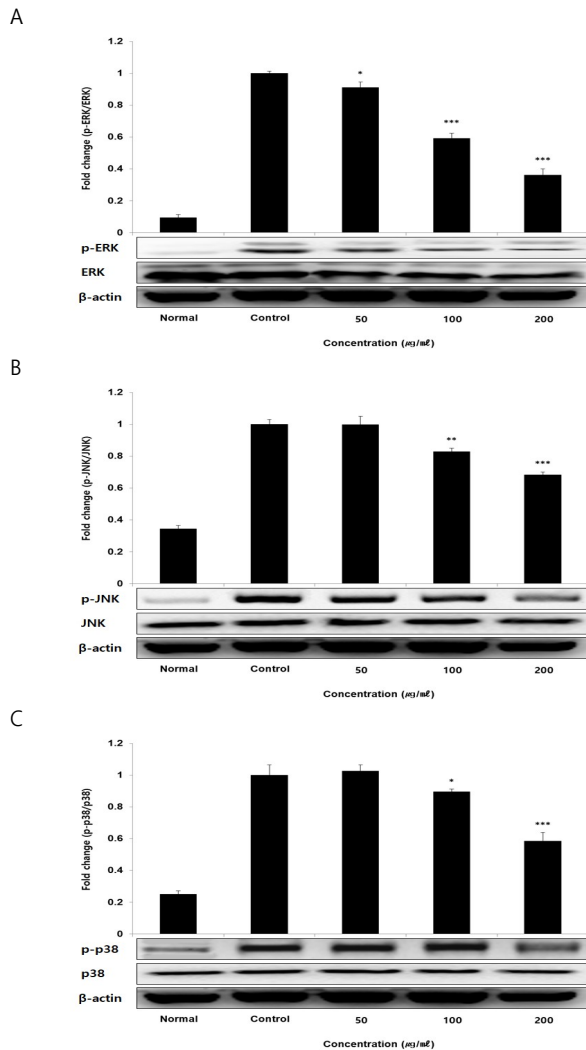


Fig. 4. Effect of AMCP on ERK(A), JNK(B) and p38(C) protein expression level in HUVEC. HUVEC were treated 50, 100, and 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of AMCP with 10  $\text{ng}/\text{mL}$  TNF- $\alpha$  for 12 h. The total cell extracts were subjected to 10% SDS-PAGE and western blot analysis with the respective primary and secondary antibodies. The result were presented by the mean  $\pm$  S.D from three independent experiments (Significance of results, \* ;  $p < 0.05$ , \*\* ;  $p < 0.01$ , \*\*\* ;  $p < 0.001$  compared to control).

## 5. 유전자 발현량

### 1) MCP-1

MCP-1 유전자 발현량을 측정한 결과, 정상군에서  $0.12 \pm 0.05$ , 대조군에서  $1.00 \pm 0.05$ , AMCP 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 각각  $0.99 \pm 0.02$ ,  $0.93 \pm 0.04$ ,  $0.75 \pm 0.03$ 로 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 대조군에 비해 유의성 있는(\*\*\* ;  $p < 0.001$ ) 감소가 나타났다(Fig. 5A).

### 2) ICAM-1

ICAM-1 유전자 발현량을 측정한 결과, 정상군에서  $0.11 \pm 0.03$ , 대조군에서  $1.00 \pm 0.05$ , AMCP 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 각각  $0.96 \pm 0.03$ ,  $0.76 \pm 0.03$ ,  $0.54 \pm 0.03$ 로 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 대조군에 비해 유의성 있는(\*\*\* ;  $p < 0.001$ ) 감소가 나타났다(Fig. 5B).

### 3) VCAM-1

VCAM-1 유전자 발현량을 측정한 결과, 정상군에서  $0.07 \pm 0.08$ , 대조군에서  $1.00 \pm 0.04$ , AMCP 50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 각각  $0.94 \pm 0.03$ ,  $0.84 \pm 0.04$ ,  $0.58 \pm 0.03$ 로 100, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 대조군에 비해 유의성 있는(\*\* ;  $p < 0.01$ , \*\*\* ;  $p < 0.001$ ) 감소가 나타났다(Fig. 5C).

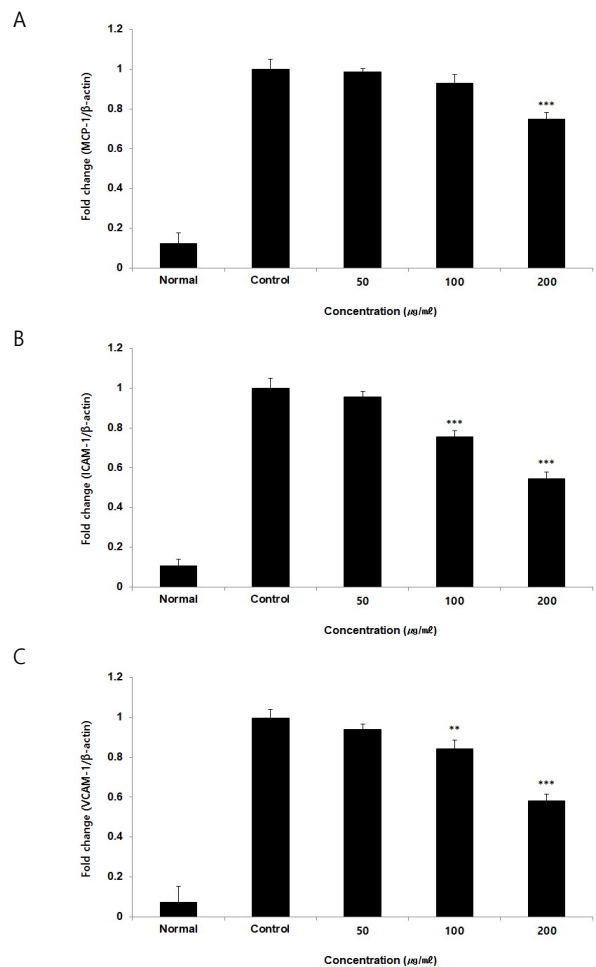


Fig. 5. Effect of AMCP on MCP-1(A), ICAM-1(B), VCAM-1(C) mRNA expression level in HUVEC. HUVEC were treated 50, 100, and 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of AMCP with 10  $\text{ng}/\text{mL}$  TNF- $\alpha$  for 12 h. The mRNA expression level were measured using a quantitative real-time PCR (qRT-PCR). The result were presented by the mean  $\pm$  S.D from three independent experiments (Significance of results, \*\* ;  $p < 0.01$ , \*\*\* ;  $p < 0.001$  compared to control).

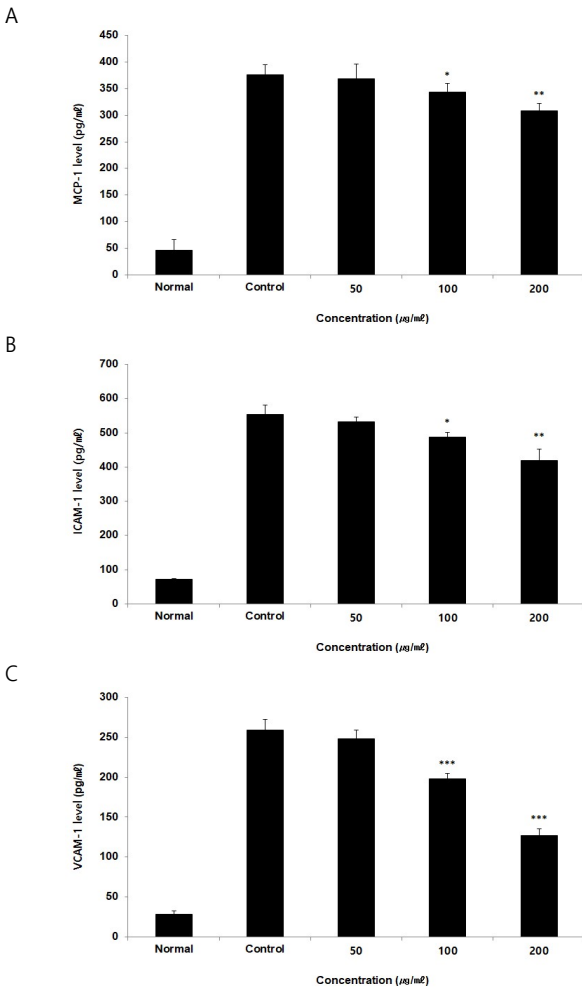


Fig. 6. Effect of AMCP on MCP-1(A), ICAM-1(B), VCAM-1(C) level in HUVEC. HUVEC were treated 50, 100, and 200 µg/ml of AMCP with 10 ng/ml TNF-α for 12 h. MCP-1 level was measured using a ELISA kit. The result were presented by the mean ± S.D from three independent experiments (Significance of results, \* ; p < 0.05, \*\* ; p < 0.01 compared to control, \*\*\* ; p < 0.001 compared to control).

6. 바이오마커 생성량

1) MCP-1

MCP-1 생성량을 측정한 결과, 정상군에서 46.17±19.95 pg/ml, 대조군에서 376.20±19.26 pg/ml, AMCP 50, 100, 200 µg/ml 농도에서 각각 368.50±27.69 pg/ml, 343.74±16.68 pg/ml, 308.95±13.09 pg/ml로 100, 200 µg/ml 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는(\* ; p < 0.05, \*\* ; p < 0.01) 감소가 나타났다(Fig. 6A).

2) ICAM-1

ICAM-1 생성량을 측정한 결과, 정상군에서 71.95±2.45 pg/ml, 대조군에서 553.19±28.08 pg/ml, AMCP 50, 100, 200 µg/ml 농도에서 각각 532.62±13.81 pg/ml, 486.51±13.71 pg/ml, 418.27±33.92 pg/ml로 100, 200 µg/ml 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는(\* ; p < 0.05, \*\* ; p < 0.01) 감소가 나타났다(Fig. 6B).

3) VCAM-1

VCAM-1 생성량을 측정한 결과, 정상군에서 28.04±4.29 pg/ml, 대조군에서 259.22±13.57 pg/ml, AMCP 50, 100, 200 µg/ml

농도에서 각각 248.26±10.60 pg/ml, 198.00±6.50 pg/ml, 126.86±8.83 pg/ml로 100, 200 µg/ml 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는(\*\*\* ; p < 0.001) 감소가 나타났다(Fig. 6C).

고찰

한국에서는 이상지질혈증에 대한 정의를 National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III (NCEP-ATP III)의 권고와 같이 죽상경화성 이상지질혈증 (atherogenic dyslipidemia)으로 알려져 있는 고LDL 콜레스테롤 혈증(LDL 160mg/dL 이상), 고중성지방혈증(Triglyceride 200mg/dL 이상), 저HDL 콜레스테롤혈증(HDL 40mg/dL 미만) 중 하나 이상에 해당하거나 과거에 의사의 진단이 있거나 지질강화제를 복용하는 경우로 정의한다<sup>1)</sup>. 2014년부터 2016년까지 질병관리본부 국민건강영양조사를 바탕으로 정리된 자료에 의하면 30대 이상의 한국인들은 10명 중 4명이 이상지질혈증에 해당되고 1년에 290일 이상 이상지질혈증과 관련된 약을 복용하는 사람 수가 2002년 기준 76,145명에서 2016년 기준 3,634,907명으로 2002년 대비 2016년에 47.7배 증가하였다<sup>10)</sup>.

죽상동맥경화증(Atherosclerosis)은 혈관 내피세포에 일어나는 대표적인 염증성 질환으로 동맥의 가장 내측에 존재하는 내막이 두꺼워지고 콜레스테롤 및 중성지방 등 지질성 물질이 침착되어 혈관이 굳어지는 질환이다. 죽상동맥경화증은 혈관 혹은 혈관벽 내의 염증이 생성되어 염증성 cytokine의 자극에 의해 혈류 중에 떠도는 monocyte가 혈관의 내피세포에 부착되어 macrophage로 분화하면서 염증반응을 유도하는 것이 주요한 발병기전이다<sup>11)</sup>. 죽상동맥경화증 발생의 초기 단계에서 LDL이 혈관 내막에 들어와 산화작용을 통해 산화 LDL로 변형이 일어나고, macrophage는 산화 LDL을 흡수해 foam cell을 형성하고, foam cell은 혈관벽에 침착되어 국소적인 염증 반응을 일으키는데, 이러한 염증 과정에서 NF-κB가 proatherogenic한 주요 조절 인자로 알려진 바가 있다. 산화 LDL은 내피세포에서 NF-κB를 활성화하여 MCP-1 분비를 증가시키고 병변으로 monocyte의 침투를 유도하며 ICAM-1, VCAM-1 같은 부착분자(adhesion molecule)를 조절한다<sup>12)</sup>.

한의학의 관점에서 이상지질혈증은 『靈樞·衛氣失常論』에 ‘肥人多, 有膏, 有肉’이라는 내용을 참고하여 膏를 이상지질에 관한 언급으로 생각할 수 있다<sup>5)</sup>. 또한 한의학에서는 이상지질혈증을 膏粱厚味の 과잉섭취의 外因과 脾의 運化失調와 肝의 疏泄機能失調의 內因으로 濕濁한 穢濁之氣가 인체 내에 정체되어 瘀血, 濕濁이 血脈에 발생한 것으로 설명하고<sup>13)</sup>, 이상지질혈증이 유발하는 동맥경화증에 대해서는 痰飲, 瘀血, 氣滯, 寒凝 虛勞 등의 범주에 해당한다고 설명한다<sup>6)</sup>.

청혈플러스의 처방 구성은 茵陳蒿, 鬱金, 山楂, 丹蔘으로 구성되어 있다. 현재까지 세포 단위에서 동물실험까지 여러 연구들과 임상 사례에 대해 발표되었고, 청혈플러스의 항염증 및 항이상지질혈증의 효과를 밝힌 바가 있다<sup>3-6)</sup>.

茵陳蒿는 Artemisia capillaris Thunberg의 全草로 利水滲濕藥에 해당한다<sup>14)</sup>. 茵陳蒿 추출물은 고지방식이로 유도된 Mouse 모

델에서 지방에 대한 대사를 증진시켜 Adipocyte에서의 지질 축적을 억제하고 항비만 효과를 나타냄이 보고된 바 있다<sup>15)</sup>. 또한 茵蔯蒿 추출물의 복용이 poloxamer-407로 유도된 rat 모델에서 혈청 내 total cholesterol, triglyceride, LDL-cholesterol의 감소와 TAC, SOD, activities 및 GSH, GSH-reductase level의 감소를 통해 항 이상지질혈증 및 항산화 효과가 있다는 연구 결과가 있다<sup>16)</sup>.

鬱金은 Curcuma aromatica Salisb.의 塊根을 건조시킨 것으로 活血祛瘀藥에 해당한다. 鬱金은 血中の 氣藥이 되어 氣血이 鬱滯된 모든 病에 사용된다<sup>14)</sup>. 鬱金 추출물의 DPPH radical 소거능 및 ABTS radical 소거능이 농도 의존적이고, 鬱金 추출물이 BV2 세포에서 LPS로 유도된 NO와 iNOS 생성을 억제해 항산화 및 항염증 효과를 가진다는 것이 보고되었다<sup>17)</sup>. 韓茵蔯과 鬱金を 이용한 복합 추출물의 항이상지질혈증 효과를 확인하기 위해 고지방식으로 유도된 고지혈증 mouse 모델에서 실험<sup>18)</sup>이 진행되었는데, 혈청 내 total cholesterol과 triglyceride의 감소, 몸과 간, 복막의 지방조직 무게의 감소, 그리고 간에서의 지질 축적 저하와 항산화능이 있다는 결과가 확인되었다.

山楂는 Crataegus pinnatifida Bunge var. typica Schneider 및 동속 근연식물의 果實로 消食藥에 해당한다. 血分에 들어가서 化痰散結하여 고지혈증, 죽상동맥경화증 등에 응용된다<sup>14)</sup>. 山楂는 동물 실험<sup>19,20)</sup>과 항산화 활성 측정 관련 실험<sup>21)</sup>에서 혈청 지질농도개선과항산화효과를확인되었고 山楂를 발효한 추출물<sup>22,23)</sup>에 대한 항이상지질혈증의 효과가 확인되었다.

丹蔘은 Salvia miltiorrhiza Bge.의 根과 根莖을 건조한 것으로 活血祛瘀藥에 해당한다<sup>14)</sup>. 丹蔘은 동물 실험<sup>24,25)</sup>에서 혈중 지질 수치를 낮춰 이상지질혈증과 죽상동맥경화에 대한 효과가 알려져 있고, 환자 대상의 丹蔘 복합추출물 투여 또한 혈소판 응집 반응 억제 및 adhesion molecule과 pro-inflammatory cytokine 억제를 통해 내피세포와 혈관기능 개선으로 죽상동맥혈전증을 개선시키고 고지혈증환자의 혈청 triglyceride, total cholesterol의 개선에 유효함이 확인되었다<sup>24,26)</sup>.

薤白은 Allium macrostemon Bge.의 鱗莖을 건조한 것으로 理氣藥에 해당한다. 苦溫하여 痰濕을 燥하게 하여 痰濁이 胸中에 停留함에 사용되기도 한다<sup>14)</sup>. 薤白은 산소자유기에 의한 PKC 활성도의 증가에 대해 유의한 억제 효과를 나타내 혈관내피세포 생존율을 증가시키고 薤白 복합추출물로는 전염증성 M1 대식세포의 분화를 억제하고 항염증, 지질축적억제를 통해 혈관 노화와 죽상동맥경화에 도움을 주고<sup>7)</sup>, DPPH free radical 소거활성이 나타나 항산화 작용을 하며<sup>8)</sup>, 혈중 total cholesterol, LDL-cholesterol, Triglyceride를 감소시키고 HDL-cholesterol을 증가시키는 역할을 한다고 알려져 있다<sup>9)</sup>.

CHP의 한약재 구성을 보면 山楂는 消食藥으로 이상지질혈증의 外因인 膏粱厚味の 과잉섭취로 발생한 문제를 해결하고 鬱金과 丹蔘은 活血祛瘀藥으로 血脈의 瘀血을 해결하도록 조합되어 있다. CHP에서 血脈의 濕濁 해소하는 작용은 茵蔯蒿만으로 담당하기에 부족하다 판단되어 理氣藥인 薤白을 추가해 항이상지질혈증과 죽상동맥경화 관리 효과를 높이고자 하였다.

HUVEC은 인간 땃줄 정맥 내피 세포로, 죽상동맥경화증의

plaque 형성과 혈관신생에서 내피세포의 병리적 작용과 반응에 대한 세포 실험 연구에서 많이 활용되고 있다<sup>27)</sup>. 한약재를 활용한 단일 성분 혹은 복합 추출물 등의 항산화, 항염증, 세포부착분자 저하를 통한 항이상지질혈증 효과를 확인하기 위해 NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ , MAPKs, MCP-1, ICAM-1, VCAM-1의 변화를 확인하는 실험에 TNF- $\alpha$ 를 처리한 HUVEC이 활용되고 있다<sup>28-30)</sup>.

HUVEC에 AMCP를 처리한 후에 세포 생존율을 측정할 결과 AMCP 50, 100, 200, 400  $\mu$ g/ml 농도에서 각각 100.97 $\pm$ 3.56%, 99.97 $\pm$ 1.56%, 100.57 $\pm$ 3.71%, 80.23 $\pm$ 3.83%의 생존율을 보여 400 $\mu$ g/ml의 농도 이상에서 대조군에 비해 유의미한 생존율 감소를 보여 400 $\mu$ g/ml의 농도 이상에서는 세포 독성을 보인다고 판단하여 400 $\mu$ g/ml 이상 농도의 AMCP는 실험에서 제외하기로 하였다.

고지혈증과 고혈당 상태에서는 세포내 해당계가 항진되어 있어 혈관 내피에 대해 조직 장애성을 갖고 있는 활성산소의 생산을 촉진시키는 등의 내피기능 장애가 일어난다. 이러한 내막의 손상을 통해 LDL은 혈액 속에서 혈관벽 안의 세포의 기질과 쉽게 결합하여 동맥벽으로 침투한다. 혈관벽 안에 자리 잡은 LDL은 대식세포에 의해 산화 LDL로 변화하고, 이러한 산화 스트레스는 혈관내피 세포를 자극시켜 손상을 입은 내피로 혈액 속 백혈구를 유도하며 TNF- $\alpha$ , IL-6 등의 cytokine을 생성해 죽상동맥경화증과 같은 심혈관질환의 초기 발생과 진행에 영향을 끼친다<sup>31)</sup>.

DPPH assay는 식물 혹은 단일 화합물의 항산화능을 측정하는데 널리 사용되는 측정법으로 간단하고 빠르게 이용할 수 있는 방법이다. DPPH는 짙은 보라색을 갖는데 항산화 활성이 있는 물질과 만나면 광학적으로 빠른 속도로 hydrogen radical의 전자를 받아들여 환원되어 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine으로 안정한 화합물로의 비가역적인 전환이 이루어지고 짙은 보라색이 없어지는 특징을 가지는데, 색깔이 없어지는 정도는 추출물 혹은 화합물의 DPPH radical 소거능이 크다는 것을 뜻한다<sup>32)</sup>.

ABTS assay는 2,2-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphate) 양이온(ABTS.<sup>+</sup>)에 대한 항산화 물질의 소거능 측정법으로 실험의 방법이 간단하여 항산화능을 측정하는데 널리 사용된다. ABTS assay에서 ABTS는 potassium persulfate와 반응해 녹색의 ABTS radical을 형성하게 되고, 생성된 ABTS radical은 항산화 활성 물질에서 전자를 받아서 무색의 물질로 환원된다. 시료의 항산화능은 일정 시간 동안 ABTS radical과 시료의 반응에서 ABTS radical과 potassium persulfate의 반응에 의해 만들어진 녹색이 없어지는 정도를 흡광도를 측정하여 얻을 수 있다<sup>32)</sup>.

AMCP 1, 10, 100, 1000  $\mu$ g/ml 농도에서 DPPH와 ABTS radical 소거능을 측정할 결과, 농도 의존적으로 DPPH와 ABTS radical 소거능이 증가하였다. 따라서 AMCP는 free radical을 환원시켜 산화적 손상을 줄이는 작용을 하고 농도가 증가할수록 AMCP의 항산화능이 커지는 것으로 사료된다.

NF- $\kappa$ B는 일반적인 면역과 염증, 세포 성장 조절 등의 다양한 단계에 참여하는 전사 인자로 평소 휴지기인 세포에서 p50과 p65가 결합한 heterodimer로 DNA와의 결합에 필요한 N-말단부위에 억제 단백질 I $\kappa$ B와 결합한 불활성 상태로 세포질 내에 존재한다<sup>33)</sup>. 하지만 TNF나 IL-1과 같은 cytokine 및 LPS와 같은

pro-inflammatory stimuli에 노출이 되면 I- $\kappa$ B kinase(IKK, inhibitory- $\kappa$ B kinase) complex가 자극이 되어 활성화되고 IKK가 NF- $\kappa$ B와 결합되어 있는 I- $\kappa$ B $\alpha$ 를 인산화(phosphorylation)시키면서 분리된 NF- $\kappa$ B는 핵 안으로 이동하여 COX-2, 염증 유도성 cytokine(IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ ) 등의 염증 반응에 관여하는 특정 유전자 내 DNA 서열과 결합하여 전사를 시작하여 해당 유전자의 발현을 증가시켜 염증 반응을 가속화시키는 전사조절인자로 작용한다<sup>34</sup>). 이러한 NF- $\kappa$ B는 죽상동맥경화증의 진행 과정에서도 중요한 역할을 담당한다. 혈관의 허혈성 변화 및 죽상경화성 반응을 유발하는 고지혈증, 산화 LDL, 산화 스트레스, 고혈압, 당뇨, 활성화된 혈소판 등이 NF- $\kappa$ B 활성화를 유도하여 NF- $\kappa$ B가 발현하게 되면 혈관 내피세포와 macrophage에서 여러 cytokines, MCP-1을 포함한 chemokines 및 ICAM-1, VCAM-1을 포함한 adhesion molecules의 발현을 증가시켜 염증 세포들이 혈관 내로 침투하는 것을 쉽도록 만들고, 혈관 내피세포나 macrophage 자체의 NF- $\kappa$ B가 대식세포집락자극인자(macrophage colony-stimulating factor)를 조절해 monocyte를 macrophage로 분화시키는 과정을 촉진하는 작용과 함께 죽상동맥경화증의 시작과 진행, 증상 유발을 촉진하는 작용을 한다<sup>35</sup>).

MAPKs 경로란 진핵세포의 신호전달에서 중심적 역할을 하는 일련의 단백질 인산화 효소가 연속되는 경로이다. MAPK는 세포의 성장과 분열, 스트레스 혹은 cytokine에 의한 세포반응 조절 등에 중요한 역할을 한다. MAPK의 종류는 ERK(extracellular signal regulated kinase), JNK(stress-activated c-Jun N-terminal kinase), p38 kinase가 존재한다<sup>36</sup>. 염증 신호는 세포 내에 다양한 신호전달 분자들을 활성화시키는데, 이 중 MAPK는 인산화를 통해 NF- $\kappa$ B를 포함한 다양한 전사인자들을 활성화시키는 핵심 신호전달 분자이다. ERK1/2는 주로 표피성장인자에 의해서 활성화되는데 염증 반응과 관련해서는 NF- $\kappa$ B를 활성화시키고, JNK는 IKK를 활성화시켜 I- $\kappa$ B를 인산화 하여 NF- $\kappa$ B를 활성화시키고, p38 kinase는 mRNA 수준에서 TNF- $\alpha$ 의 translation과 stability를 조절한다. MAPKs는 IKK를 활성화시켜 NF- $\kappa$ B의 활성화를 조절하고 핵으로 직접 들어가 전사인자로서 작용하기 때문에 MAPKs와 NF- $\kappa$ B의 활성화가 감소하는 것은 항염증효과를 의미한다고 볼 수 있다<sup>37</sup>).

HUVEC 내 NF- $\kappa$ B 단백질 발현량을 측정한 결과, AMCP 100, 200  $\mu$ g/ml 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 보였고, I $\kappa$ B $\alpha$  단백질 발현량은 100, 200  $\mu$ g/ml 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 보였다. ERK 단백질 발현량의 경우, 모든 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 보였고, JNK 단백질 발현량은 100, 200  $\mu$ g/ml 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 보였고, p38 단백질 발현량은 100, 200  $\mu$ g/ml 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 보였다. 따라서 AMCP는 MAPK의 인산화 과정을 막고 I- $\kappa$ B $\alpha$ 의 인산화 작용을 방해하여 염증을 유발하는 NF- $\kappa$ B의 활성화를 억제해 항염증 작용을 나타내는 것으로 사료된다.

MCP-1는 조직내 면역 및 염증반응이 일어나면 pro-inflammatory cytokine인 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , LPS, 고혈당 등의 자극에 반응해 monocyte 등의 면역 세포들을 병소 부위로 모이게

하는 chemokine의 일종으로, 혈관 내로 염증세포를 유도하여 죽상동맥경화증의 개시와 진행에 있어서 중요한 역할을 한다<sup>38,39</sup>).

ICAM-1, VCAM-1은 세포부착분자로 죽상동맥경화의 초기 과정에서 혈액 내 cholesterol을 이동시키는 지질단백질과 염증 반응을 일으키는 백혈구를 혈관 내피세포에 부착시켜 염증 반응을 일으킨다. 축적된 cholesterol은 조직 내부의 산화물질에 의해 산화되고, 산화 LDL-cholesterol이 혈관 내피세포에 작용해 VCAM-1과 ICAM-1의 발현을 유도한 뒤 monocyte를 내피 조직으로 유입시키고 여러 염증성 cytokine을 분비시켜 죽상동맥경화증의 초기 진행을 돕는다<sup>40</sup>).

HUVEC 내 MCP-1 유전자 발현량을 측정한 결과, AMCP 200  $\mu$ g/ml 농도에서 유의성 있는 감소를 보였다. ICAM-1 유전자 발현량은 100, 200  $\mu$ g/ml 농도에서 유의성 있는 감소를 보였고, VCAM-1 유전자 발현량은 100, 200  $\mu$ g/ml 농도에서 유의성 있는 감소를 보였다. HUVEC 내 MCP-1 생성량을 측정한 결과, AMCP 100, 200  $\mu$ g/ml 농도에서 유의성 있는 감소를 보였다. ICAM-1 생성량은 100, 200  $\mu$ g/ml 농도에서 유의성 있는 감소를 보였고, VCAM-1 생성량은 100, 200  $\mu$ g/ml 농도에서 유의성 있는 감소를 보였다. 따라서 AMCP는 염증 관련 chemokine의 발현을 낮춰 염증세포 응집을 억제하고 세포부착분자의 활성화를 방해하여 혈관 내피세포에서 발생하는 염증 반응을 억제하여 항죽상동맥경화 작용을 가진 것으로 사료된다.

이상의 결과들을 종합해 볼 때, AMCP는 항산화 작용을 통해 LDL-cholesterol의 산화와 혈관 내피세포의 손상을 억제하고 염증을 유발하는 전사인자의 활성화를 억제하여 혈관내피세포에서의 면역 세포 응집과 염증 반응을 낮춰 죽상동맥경화 발생을 예방 및 치료할 수 있을 것으로 사료된다. 다만, 본 연구는 AMCP의 total flavonoid와 같은 항산화물질의 함량을 포함하지 못한 점과 AMCP의 항산화, 항염증, 세포부착분자 억제 효과를 객관적으로 비교할 수 있는 양성 대조군이 포함되지 못한 점, 세포 수준에서 진행된 실험으로 동물 모델에서 혈중 지질수치 평가를 통한 AMCP의 이상 지질혈증 개선 여부에 대해서는 명확히 판단할 수 없다는 점에서 한계가 있다. 따라서 향후 실험에서 AMCP의 항산화물질 함량 측정 및 AMCP의 양성 대조군 설정과 동물 모델의 실험을 통한 혈중 지질수치 평가를 통한 이상지질혈증 및 죽상동맥경화에 대한 예방 및 치료 효능에 대해 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

## 결 론

해백청혈플라스(AMCP)의 항산화 및 항염증 작용을 통한 죽상동맥경화 억제 효과를 확인하기 위해 인간 태줄 정맥 내피 세포인 HUVEC을 통해 DPPH 및 ABTS radical 소거능, NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ , JNK, p38의 단백질 발현량, MCP-1, ICAM-1, VCAM-1의 유전자 발현량과 생성량을 확인한 결과, 다음과 같은 결과를 얻었다.

AMCP는 400 $\mu$ g/ml를 제외하고는 실험이 진행된 농도 내에서 세포독성을 보이지 않았다.

AMCP는 DPPH 및 ABTS radical 소거능을 농도의존적으로 증가시켰다.



AMCP는 NF- $\kappa$ B, I $\kappa$ B $\alpha$ , JNK, p38 단백질 발현량을 100, 200  $\mu$ g/ml 농도에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소시켰고, ERK 단백질 발현량을 모든 농도에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소시켰다.

AMCP는 MCP-1 유전자 발현량을 200  $\mu$ g/ml 농도에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소시켰고, ICAM-1, VCAM-1 유전자 발현량을 100, 200  $\mu$ g/ml 농도에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소시켰다.

AMCP는 MCP-1, ICAM-1, VCAM-1 생성량을 100, 200  $\mu$ g/ml 농도에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소시켰다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, AMCP의 항산화 및 항염증 작용을 통한 죽상동맥경화 억제 효과가 실험적으로 확인되었고, 추후 항산화물질 함량 측정 및 양성 대조군과의 비교, 동물 모델 실험을 통한 혈중 지질수치 감소 효과 확인 등의 내용이 포함된 이상지질혈증 및 죽상동맥경화 억제 효능에 대한 추가적인 연구가 필요하리라 사료된다.

## References

1. Statistics Korea. Annual report on the causes of death statistics in 2018. Daejeon: Statistics Korea; 2019.
2. Kim SH. Drug treatment of dyslipidemia. J Korean Med Assoc. 2016;59(5):366-73.
3. Choi KE, Seol IC, Kim YS, Yoo HR. Hypolipidemic and Anti-oxidant Effects of Chunghyl Plus in Type II Diabetic Mice Model. J Physiol & Pathol Korean Med. 2016;30(3):164-76.
4. Kim HT. Anti-oxidative and Anti-dyslipidemic Effects of the Chunghyl Plus(CHP) in HepG2 cells and Rats Induced Dyslipidemia by High Cholesterol diet. [Doctorate]. [Daejeon]: Daejeon University College of Korean Medicine; 2018 Feb. 64 p.
5. Jung ES, Kim HT, Choi KE, Oh JM, Cho HK, Yoo HR, et al. A Case Report of the Beneficial Effects of Chunghyl-Plus in Dyslipidemia Patients. The Journal of the Society of Storke on Korean Medicine. 2016;17(1):55-66.
6. Lee KW, Cho HK, Yoo HR, Seol IC, Kim YS. The Effects of an Extract of Fermented Artemisiae Iwayomogii Herba, Curcumae Longae, Crataegi Fructus and Salviae Miltiorrhizae Radix on Anti-inflammation Associated with Dyslipidemia and Anti-oxidation in RAW264.7 and HUVEC Cells. J Int Korean Med. 2018;39(4):480-94.
7. Son CH, Lee SM, Yu GR, Lee SJ, Lim DW, Kim H, et al. Effects of Geum-Gwe-Yo-Ryak Prescription for Chest Pain Including Kwaruhaebaekbanha-tang and Kwaruhaebaekpaekju-tang on Macrophage Polarization. J Korean Med. 2019;40(2):51-62.
8. Park JH. A Study on the Effects of Gamigwaruhaebaekbaekju-tang on the Cardiovascular System and Dosage Form Change. [Doctorate]. [Seoul]: Kyunghee University College of Korean Medicine; 2000 Feb. 103p.
9. Lee KH, Park HS, Yun YH, Shin YB, Baik YC, Kooh DH, et al. Antihyperlipidemic Effect of Complex of Medicinal Plant Products on Hyperlipidemic Rats Induced by High Cholesterol Diet. Korean J Medicinal Crop Sci. 2015;23(2):109-16.
10. The Korean Society of Lipid and Atherosclerosis (KSoLA). Dyslipidemia Fact Sheets in Korea. Seoul: Korean Society of Lipid and Atherosclerosis; 2018.
11. Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. N Engl J Med. 1999;340(2):115-26.
12. Lee MS and Kim KA. NF- $\kappa$ B Pathway in Metabolic/endocrine Diseases. Endocrinol Metab. 2006;21(5):352-63.
13. Cha JY, Yoo HR, Kim YS, Seol IC, Jo HK. Inhibition of gene associated with Dyslipidemia and Antioxidative Effect of Artemisia iwayomogi, Curcumae Radix and Raphani Semen(ACR) on HepG2 cell model. J Korean Med. 2017;38(3):43-58.
14. The national college of Korean Medicine Department of Herbology. Department of Herbolgy. Seoul: Younglim Inc; 2007.
15. Hong JH, Hwang EY, Kim HJ, Jeong YJ, Lee IS. Artemisia capillaris Inhibits Lipid Accumulation in 3T3-L1 Adipocytes and Obesity in C57BL=6J Mice Fed a High Fat Diet. J Med Food. 2009;12(4):736-45.
16. Jang WS, Kim YS, Seol IC. Antioxidant and Lipid-lowering Effects of Artemisia capillaris on a Rat Model of Hyperlipidemia. The Journal of Korean Oriental Medicine. 2012;33(2):11-24.
17. Oh HI, Park HB, Ju MS, Jung SY, Oh MS. Comparative Study of Anti-oxidant and Anti-inflammatory Activities between curcumae longae Radix and Curcumae longae Rhizoma. Kor J Herbology. 2010;25(1):83-91.
18. Han JM, Lee JS, Kim HG, Seol IC, Im HJ, Cho JH, et al. Synergistic effects of Artemisia iwayomogi and Curcumalonga radix on high-fat diet-induced hyperlipidemia in a mouse model. Journal of Ethnopharmacology. 2015;173:217-24.
19. Kim HS, Kim MA, Jang SH, Lee WK, Ryu JY. Effects of Haw(Crataegus pinnatifida Bunge) on Relaxation in the Lipid Components and Blood Glucose of Lipid Metabolism Syndrome. Journal of Environmental Science International. 2014;23(6):1021-7.
20. Kwon SH and Kim JB. Effects of Crataegii Fructus on the Diet-induced Hyperlipidemia in Rats. Korean J

- Oriental Physiology & Pathology. 2010;24(1):67-73.
21. Duan YS, Kim MA, Seong JH, Chung HS, Kim HS. Antioxidative activities of various solvent extracts from haw(Crataegus pinnatifida Bunge). Korean J Food Preserv. 2014;21(2):246-53.
  22. Chon JW, Park JK, Lee MA, Jeong MR, Han JH, Park YK. Fermented Crataegi fructus Vinegar Improves Lipid Metabolism in Rats Fed High Fat Diet. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2009;38(8):1024-31.
  23. Kim YH, Chon JW, Song YJ, Han JH, Park SH. Study of Crataegi Fructus for Medicinal Foods Applications - Functional Evaluation of Fermented Liquid on the Lipid Profile Improvement High Fat Diet -. Korean J Oriental Physiology & Pathology. 2005;19(5):1272-80.
  24. Lim YN, Lee SN, Kim JY, Shin JH, Kwon OR. A Phellinus baumii-based supplement containing Salvia miltiorrhiza Bunge improves atherothrombotic profiles through endothelial nitric oxide synthase and cyclooxygenase pathways in vitro and in vivo. Journal of Functional Foods. 2016;24:231-43.
  25. Kim HC and Kim YK. Genome-wide analysis on the effects of Salviae miltiorrhizae Radix in hyperlipidemic mice. Journal of Haehwa Medicine. 2013;21(2):73-84.
  26. Choi JS. Effects of CPs(combined preparation of Salvia miltiorrhiza bunge, Panax notoginseng and Borneolum) on Hyperlipidemia. [Master]. [Iksan]: Wonkwang University College of Korean Medicine; 2004 Oct. 23-24p.
  27. Park HJ, Zhang Y, Georgescu SP, Johnson KL, Kong D, Galper JB. Human Umbilical Vein Endothelial Cells and Human Dermal Microvascular Endothelial Cells Offer New Insights Into the Relationship Between Lipid Metabolism and Angiogenesis. Stem Cell Rev. 2006;2(2):93-102.
  28. Lim HC and Jeon SY. The Effect of Gamidohongsamul-tang (GDT) on the Gene Expression Levels of eNOS, KLF2, ICAM-1 and VCAM-1 in HUVEC Cells. J Int Korean Med. 2018;39(1):1-8.
  29. Kim KS, Na C, Shin BC, Kwon YD, Song YS. Curcumin's Effect on ICAM-1, VCAM-1 Expression in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. J Oriental Rehab Med. 2008;18(1):1-13.
  30. Kim SY, Yang JE, Song JH, Maeng SH, Lee JH, Yoon NY. Inhibition Effect of Enzymatic Hydrolysate from Japanese Mud Shrimp Upogebia major on TNF- $\alpha$ -induced Vascular Inflammation in Human Umbilical Vein Endothelial Cells(HUVECs). Korean J Fish Aquat Sci. 2018;51(2):127-34.
  31. Madamanchi NR, Vendrov A, Runge MS. Oxidative stress and vascular disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005;25(1):29-38.
  32. Kim MJ and Park EJ. Feature Analysis of Different In Vitro Antioxidant Capacity Assays and Their Application to Fruit and Vegetable Samples. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2011;40(7):1053-62.
  33. Barnes PJ and Karin M. Nuclear Factor- $\kappa$ B: a Pivotal Transcription factor in chronic inflammatory disease. N Engl J Med. 1997;336(15):1066-71.
  34. Baldwin AS Jr. The NF- $\kappa$ B and I  $\kappa$ B proteins: new discoveries and insights. Annu Rev Immunol. 1996;14:649-83.
  35. Collins T and Cybulsky MI. NF- $\kappa$ B: pivotal mediator or innocent bystander in atherogenesis. J Clin Invest. 2001;107(3):255-64.
  36. Johnson GL and Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. Science. 2002;298(5600):1911-2.
  37. Park JH and Kim KJ. The Effect of Moutan Cortex on Pro-inflammatory Cytokines through NF- $\kappa$ B & MAPKs pathway in HMC-1. The Journal of Korean Oriental Medical Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology. 2009;22(2):1-18.
  38. Kim SY, Yang JE, Song JH, Maeng SH, Lee JH, Yoon NY. Inhibition Effect of Enzymatic Hydrolysate from Japanese Mud Shrimp Upogebia major on TNF- $\alpha$ -induced Vascular Inflammation in Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs). Korean J Fish Aquat Sci. 2018;51(2):127-34.
  39. Kim HL, Yang SH, Oh YK, Lee JE, Oh JE, Yoon HJ, et al. The Effects of Polymorphism in the MCP-1 Gene Regulatory Region on MCP-1 Expression and the Manifestation of Lupus Nephritis. Korean J Nephrol. 2002;21(1):137-44.
  40. Seo DH, Joo IH, Kim DH. Effect of ChungHuyl-Plus on inflammatory factors in Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVECs). Journal of Haehwa Medicine. 2018;27(2):11-20.