

고지혈증 동물모델 설정을 위한 식이처방의 실험적 연구

노환성[†] · 김운자* · 박건구* · 조영환** · 박형섭

울산대학교 의과대학,

*아산생명과학 연구소 민간요법연구실, **아산재단 서울중앙병원 약제과

(1994년 10월 25일 접수)

Studies on Diet Regimens for the Development of Hyperlipidemic Animal Model

Hwan Seong Ro,[†] Oon Ja Kim,* Kun-Ku Park,* Young Hwan Cho** and Hyung Sup Park

College of Medicine, University of Ulsan, Seoul 138-040, Korea

*Asan Institute for Life Science Seoul 138-040, Korea

**Dept. of Pharmacy, Asan Medical Center Seoul 138-040, Korea

(Received October 25, 1994)

Development of hyperlipidemic animal model is prerequisite for the screening of drugs lowering the blood lipoprotein level. In this study, two kinds of diet regimens were tried for the hyperlipidemic effect. The model will be used for the screening of current prescriptions to a variety of diseases related to hyperlipidemia by practitioner of traditional herbal medicine. Fifteen male Wister rats of 200 g were divided into three groups, and given normal, or either one of the two high cholesterol diets for up to 2 weeks. Regimen HC-1 and regimen HC-2 contained 1% and 2% cholesterol in diet, respectively. Total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high density lipoprotein cholesterol (HDL) and lower density lipoprotein cholesterol (LDL) levels in the serum were measured before the start of the diet, at 1 week after the start, and at 2 week point. Both regimens resulted in hyperlipidemia with the typical characteristics of increase in TC and LDL, and reduction in HDL, and showed no observable side effects such as diarrhea. In conclusion, both of HC-1 and HC-2 regimens appeared appropriate as diet regimens for the hyperlipidemic rat model.

Keywords - Hyperlipidemic animal model, Diet regimen, Total cholesterol, Lipoprotein, Triglyceride

고지혈증이 원인이 되어 나타나는 질환에 투여되고있는 한약처방의 항고지혈 효과를 과학적으로 *in vivo* 에서 검증하고자 하는 실험에서는 이미 고지혈상태인 동물이 반드시 필요하다. 이러한 고지혈증인 병태 동물모델을 만들기위한 방법을 확립하기위하여 고지혈증 유발용 식이처방을 만들고 이들 처방에 의해 조제된 사료를 먹인 랫트에서 나타나는 고지혈증 유발효과를 검토하였다.

현재까지 고지혈증 병태동물 모델을 만드는 방법은 토끼, 원숭이, 랫트, 마우스 등 대상 동물의 중

류¹⁻³⁾와 lard, cholesterol, vitamin D 등 식이처방에 첨가시키는 약물의 종류 및 그 함량에 따라 여러가지 사료조성^{4,5)}이 보고 되었다.

특히 쥐를 사용하여 고지혈증 동물모델을 만들 고자 할때에는 토끼에 비하여 cholesterol에 대한 흡수성이 나쁘고 대사 능력이 크기때문에 cholesterol 만으로는 고지혈증 상태를 만들기가 어려워⁶⁾ 연구자마다 여러 종류의 성분을 추가하여 만든 식이 처방을 사용하는 실정이다. Mitsuma 등은 cholesterol과 cholic acid 를 각각 다른 농도로 첨가한

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

식이를 사용하여 혈액중의 lipoprotein 농도를 측정하여 보고한 바 있으며,⁷⁾ Umeda 등은 cholesterol, sodium cholate, olive oil이 첨가된 시판중인 고지혈유발용 사료를 사용하여 고지혈증 랫트를 만들었다.⁸⁾

저자 등은 정상 동물사료에 cholesterol, cholic acid, olive oil을 각각 다른 농도로 첨가시켜 조절한 고지혈증 유발용 사료를 랫트에 먹인후 혈청중의 total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high density lipoprotein cholesterol (HDL), lower density lipoprotein cholesterol (LDL) 값을 측정하여 고지혈증 유발 효과를 검토하였다.

실험방법

시약 및 기기

고지혈증 유발용 사료를 조제하는데 사용된 시약은 cholesterol (Shinyo Co., Japan), cholic acid (Biochemika, Germany), olive oil (K.P., 국전원료상사) 등이었으며 정상 식이용 사료는 실험동물용 사료 (삼양사료)를 사용했으며, 고지혈증 유발용 조제사료의 원료는 위의 정상 식이용 사료를 분쇄한 후 분말로 만들어 사용하였다.

TC, TG, HDL의 측정은 auto analyzer (Hitachi 736-40, Japan)을 사용하였으며 채혈된 혈액에서의 혈청 분리는 원심분리기 (Sorvall RT 6000B, Dupont, U.S.A.)를, 고지혈증 유발용 조제사료의 조제는 아산재단 서울중앙병원 약제과의 제제시설과 아산생명과학연구소의 동물사료 성형기 및 건조기를 사용하였다.

실험동물

아산생명과학연구소 SPF 동물 사육실로부터 분양받은 Wister계 웅성 랫트 (체중 210-220 g), 15마리를 5마리씩 3군으로 나누어 실험에 사용하였으며 이 실험에 사용된 랫트는 온도, 습도, 광도가 자동으로 조절되는 위의 연구소에 부설된 소동물 사육실에서 사육했으며 물은 자유로이 섭취케 하였다.

고지혈증 유발용 사료의 조제

정상 식이용 동물사료를 분쇄한 후 4호체로 친 다음 cholesterol, cholic acid, olive oil 등 Table I과 같은 처방의 원료약품을 평량하여, 함께 혼합한 후

Table I—Composition of High Cholesterol Diet Regimens, HC-1 and HC-2 Which was Used on Experimental Hyperlipidemia in Rats

Ingredients	Quantity (g)	
	HC-1	HC-2
Cholesterol	10.0	20.0
Cholic acid	2.5	5.0
Olive oil	25.0	25.0
Normal diet	962.5	850.0
Total	1000.0	1000.0

Table II—Effect of Feeding High Cholesterol Diets Regimens for 2 Weeks on the Body Weight Changes in Rats

Treatment	Body Weight (g)			
	Initial	7th day	14th day	Weight gain*
Normal diet	212.4 ± 2.2	231.8 ± 3.0	248.0 ± 2.7	35.6 ± 1.3
HC-1	220.6 ± 1.0	251.4 ± 2.5**	272.4 ± 4.1**	51.8 ± 3.1**
HC-2	214.4 ± 4.6	241.6 ± 2.5*	261.8 ± 4.5*	46.8 ± 1.7**

Values are means ± S.E. of five rats.

* Weight gain means average weight gain during 2 weeks experiment.

** Significantly different from the control value (P < 0.05).

** Significantly different from the control value (P < 0.01).

증류수를 사용하여 연합하였다. 사료 성형기를 사용하여 랫트용 사료로 성형시킨 후 건조기에서 65°C로 20시간 건조한 후 각각 고지혈증 유발 사료인 HC-1과 HC-2로 사용하였다.

혈액의 채취

랫트를 정상사료로 사육하여 평균 체중이 210-220 g이 되게 한 후 검사 당일에는 절식한 지 4시간 후에 각각 랫트의 꼬리 정맥에서 2.5 ml 씩의 혈액을 채취하였다. 1군은 정상 사료를, 2군은 HC-1 사료를, 3군은 HC-2 사료를 각각 7일, 14일간 투여한 후 위와 같은 방법으로 혈액을 채취하였다. 채취된 혈액을 30분간 방치시킨 후 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 얻은 후 TC 및 TG 측정용과 HDL 측정용으로 각각 0.5 ml 씩 나누어 서울중앙병원 임상병리과에서 측정하였다.

혈청중 지질농도의 측정

TC는 CHOD-PAP enzymatic colorimetric method를 이용한 auto analyzer (Hitachi 736-40)를 사용하여 측정하였으며 TG는 enzymatic method를 이용한 auto analyzer를 사용하여 측정하였다.

Table III—Effect of Feeding High Cholesterol Diets for 1 Week on Serum Lipid Levels in Rats

Treatment	Serum Cholesterol (mg/100 ml) ^a			Triglyceride (mg/dl)	Atherogenic Index ^b
	TC	HDL	LDL		
Normal diet	62.8 ± 7.8	20.2 ± 0.4	42.6 ± 7.8	309.0 ± 12.4	2.1 ± 0.4
HC-1	215.6 ± 12.5*	11.8 ± 0.4*	203.8 ± 12.6*	247.4 ± 29.0	17.4 ± 1.3*
HC-2	368.4 ± 20.0*	9.6 ± 0.5*	358.8 ± 20.1*	177.8 ± 16.5*	37.9 ± 3.6*

Values are means ± S.E. of five rats.

^aTC; total cholesterol, HDL; high density lipoprotein cholesterol, LDL; lower density lipoprotein cholesterol.

^bAtherogenic index; ratio of LDL to HDL.

*Significantly different from the control value (P<0.001).

Table IV—Effect of Feeding High Cholesterol Diet for 2 Weeks on Serum Lipid Levels in Rats

Treatment	Serum Cholesterol (mg/100 ml) ^a			Triglyceride (mg/dl)	Atherogenic Index ^b
	TC	HDL	LDL		
Normal diet	66.6 ± 1.4	34.0 ± 1.1	32.6 ± 1.3	172.0 ± 17.2	1.0 ± 0.1
HC-1	178.2 ± 8.8**	18.8 ± 0.8**	159.4 ± 9.2**	178.8 ± 23.1	8.6 ± 0.7**
HC-2	291.8 ± 12.0**	14.0 ± 0.6**	277.8 ± 12.4**	130.4 ± 4.7*	20.1 ± 1.8*

Values are mean ± S.E. of five rats.

^aTC; total cholesterol, HDL; high density lipoprotein cholesterol, LDL; lower density lipoprotein cholesterol.

^bAtherogenic index; ratio of LDL to HDL.

*Significantly different from the control value (P<0.05).

**Significantly different from the control value (P<0.001).

HDL은 dextran sulfate-MgCl₂ 침전법을 사용하여 Apo-B를 함유하는 LDL 등을 침전시킨 후 위의 auto analyzer를 사용하여 측정하였다. LDL의 계산은 hypertriglycemia 인 경우 Friedewald의 계산식이 적합하지 않아서^{9,10} Seki 등¹¹이 사용한 계산식을 적용하여 계산하였다.

결과 및 고찰

랫트의 체중 증가

정상사료와 고지혈증 유발용 사료인 HC-1과 HC-2로 사육한 3군의 랫트들의 체중을 조사한 결과는 Table II 와 같이 정상사료 섭취군에 비하여 실험에 사용된 두 종류의 고지혈증 유발용 조제사료 섭취군에서 높은 체중 증가를 보였으며 HC-1 섭취군에서 더 높은 체중 증가를 나타내었다.

랫트에 대한 고지혈증 유발효과

HC-1을 7일간 투여한 군의 혈청중 TC 농도는 Table III에서 볼 수 있는 바와 같이 정상사료를 투여한 대조군에 비하여 340%, HC-2를 투여한 군

에서는 586%가 증가하여 Mitsuma 등⁷이 보고한 것보다 더 높은 TC 농도증가를 나타내었다. TG와 HDL은 HC-1과 HC-2 섭취군이 대조군에 비하여 유의성있게 감소되었으며 LDL은 두 군에서 모두 대조군에 비하여 각각 489%와 852%씩 증가하였다. HC-1과 HC-2 식이처방을 2주일간 섭취시켰을 때의 혈청중 지질농도는 Table IV에서와 같이 1주일동안 투여한 경우보다 약간 낮게 나타났으나, 여전히 현저한 고지혈 상태가 유지됨으로써 HC-1과 HC-2 식이처방이 랫트에서 고지혈증을 유발시키기 위한 식이조성으로써 적합한 것으로 사료된다. 랫트에서 2주일간 고지혈식을 섭취시켰을 때의 혈청중 지질농도가 1주일간 먹인 후의 농도보다 낮아지는 현상은 항상성을 유지하기 위해 간에서 cholesterol의 합성을 억제 하였거나 cholesterol의 배설을 촉진하는 등의 조절 기전에 의한 것으로 사료된다.

따라서 고지혈증 병태 동물모델 만드는데 있어서 Seki 등¹¹은 cholesterol 등이 첨가된 고지혈증 유발용 사료를 10일간 섭취시킨 바 있으나 저자 등의 실험에서는 7일동안 HC-1이나 HC-2를 섭취시키는

것이 고지혈증 병태 모델에 더 적합한 것으로 분석되었다. 고지혈증 유발용 사료에 첨가되는 약품의 종류도 cholesterol 외에 methionin, caffen 등의 성분을 추가시킨 Sugiyama 등¹²⁾에 비하여 저자들이 고안한 HC-1과 HC-2 등의 식이처방은 비교적 그 조성이 간단하며 특히, cholesterol을 사용시에 최⁹⁾등⁹⁾이 보고한 바와 같은 설사등의 부작용이 나타나지 않아서 비교적 건강한 상태의 고지혈증 동물모델을 만들 수 있었다.

결 론

고지혈증 유발용 식이처방인 HC-1과 HC-2의 조성으로 조제된 사료를 Wister 계 웅성 랫트에 섭취시킨 후 7일과 14일 후에 혈액을 채취하여 혈청중의 TC, TG, HDL 및 LDL 등을 측정한 결과 두 종류의 식이처방 모두가 고지혈증 유발효과가 우수한 것으로 나타났으며 TG는 HC-2 섭취군에서 현저하게 저하된 것을 볼 수 있었다. 따라서 HC-1과 HC-2의 처방으로 조제된 고지혈증 유발용 사료는 비교적 조성이 간단하면서 설사 등의 부작용이 나타나지 않아 랫트의 고지혈증 유발용 사료로 사용될 수 있음을 알 수 있었다.

감사의 말씀

이 논문은 1994년도 아산생명과학연구소의 연구비에 의하여 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

문 헌

- 1) J.H. Moore and D.L. Williams, The effect of an atherogenic diet on plasma lipid composition and aortic atherosclerosis in two strain of New Zealand white rabbit, *Brit. J. Nutr.*, **20**, 571-580 (1966).
- 2) D.A. Eggen, Cholesterol metabolism in groups of rhesus monkeys with high or low response of serum cholesterol to an atherogenic diet, *J. Lip. Res.*, **17**, 663-673 (1976).
- 3) A.C. Beynen, M.B. Katan and L.F.M. Van Zutphen, Hypo- and hyperresponders; individual differences in the response of serum cholesterol concentration to change in diet, *Adv. Lip. Res.*, **22**, 115-171 (1987).
- 4) A.E. Harper, Aminoacid balance and imbalance, *J. Nutr.*, **68**, 405-424 (1959).
- 5) American Institute of Nutrition, Report of the American Institute of Nutrition Ad. Hoc Committee on standards for nutritional studies, *J. Nutr.*, **107**, 1340-1348 (1977).
- 6) J.S. Choi and H.S. Young, Search for naturally occurring hypolipidemic principles, *Life Science*, **3(2)**, 79-90 (1993).
- 7) T. Mitsuma, K. Izawa, T. Yokizawa, H. Oura, M. Yamamoto and Y. Kawashima, *J. Medical and Pharmaceutical Society for Wakan-Yaku*, **1**, 15-21 (1984).
- 8) M. Umeda, S. Amagaya and Y. Ogihara, Effect of Shosaikoto, Daisaikoto and Sanoshashinto (traditional Japanese and Chinese medicine) on experimental hyperlipidemia in rat, *J. Ethnopharmacology*, **26**, 255-269 (1989).
- 9) W.T. Friedewald, R.I. Levy and D.S. Fredrickson, Estimation of the concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge, *Clin. Chem.*, **18**, 499-505 (1972).
- 10) W.K. Kim, J.L. Jeong, K.O. Lee, D.K. Seo and K.B. Lee, A study for actually determined value and calculated value of low density lipoprotein, *Korean J. of Medical Technologists*, **25(1)**, 144-151 (1993).
- 11) K. Seki, M. Fukuda and M. Ohki, Studies on hypolipidemic agent. IV. Influence of a new hypolipidemic agent, 5-tridecylpyrazole-3-carboxylic acid, on cholesterol metabolism in rat, *Chem. Pharm. Bull.*, **33(11)**, 5036-5041 (1985).
- 12) Y. Sugiyama, A. Ohishi and K. Muramatsu, Comparison between the plasma cholesterol elevating effects of caffen and methionin in rats on a high cholesterol diet, *Agric. Biol. Chem.*, **53** (11), 3101-3103 (1989).