

左金丸과 茺藺丸이 高脂血症에 미치는 영향

金利眩[#], 成洛戌¹, 李暎鍾^{*}

暎園大學校 韓醫科大學 本草學教室, 1: 농촌진흥청 작물과학원

The Effects of Jwa Kum-Whan and Soo Ryeon-Whan on the Hyperlipidemia in Rats

Kim, Yi-Heon[#], Seong, Nak-Sul¹, Lee, Young-Jong^{}*

Dept. of Herbology, College of Oriental Medicine, Kyungwon University
Seongnam 461-701, Korea
1: National Crop Experiment Station, RDA, Suwon 441-100, Korea

ABSTRACT

Objectives : By examining the effects of Jwa Kum-Whan composed of Coptidis Rhizoma and Evodiae Fructus by the ratio of 6:1 the effects of Soo Ryeon-Whan and composed of Coptidis Rhizoma and Evodiae Fructus by the ratio of 1:1 on hyperlipidemia, the present study attempted to reveal the change of effects based on the ratio of combination.

Methods : Jwa Kum-Whan and Soo Ryeon-Whan were injected to rats suffered from induced hyperlipidemia, and then its influence on lipid. During the cultivation of hepatocytes, Jwa Kum-Whan and Soo Ryeon-Whan were added to culture media, and the expression of the enzymes relevant to fat metabolism of hepatocytes was examined.

Results :

1. Jwa Kum-Whan significantly decreased total cholesterol(Tc), triglyceride(TG), and LDL-cholesterol(LDLc) of rats suffering from hyperlipidemia induced by high cholesterol diet. Soo Ryeon-Whan decreased LDLc, but had no significant on Tc and TG.

2. Jwa Kum-Whan increased the expression of cholesterol esterase, LDL-receptor, diacylglycerol acyltransferase (DGAT), acylCoA-cholesterol-acyltransferase (ACAT), peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR γ), peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR α) of cultivated hepatocytes. In addition, Soo Ryeon-Whan increased the expression of cholesterol esterase, LDL-Receptor, DGAT, PPAR γ , PPAR α of cultivated hepatocytes, but had no significant effects on the expression of ACAT.

Conclusion : Both Jwa Kum-Whan and Soo Ryeon-Whan were composed of Coptidis Rhizoma and Evodiae Fructus, but the former is more effective in hyperlipidemia.

Key words : Jwa Kum-Whan, Soo Ryeon-Whan, Coptidis Rhizoma, Evodiae Fructus, hyperlipidemia.

*교신저자: 이영중. 경원대학교 한의과대학 본초학교실 E-mail: garak@kyungwon.ac.kr Tel: 031-750-5415

[#]제1저자: 김이현. 경원대학교 한의과대학 본초학교실

· 접수 : 2005년 4월 9일 · 수정 : 2005년 6월 16일 · 채택 : 2005년 6월 20일

緒 論

左金丸은 《丹溪心法》¹⁾에 “黃連 六兩 吳茱萸 一兩(或 半兩) 上爲末 爲丸 治肝火”라고 처음 수록된 처방으로 淸肝瀉火 降逆止嘔의 효능이 있어 肝火犯胃證과 관련된 脇肋脹痛, 嘈噯吞酸, 嘔吐口苦 脘痞噯氣 등의 症狀을 치료하고, 근래에는 急慢性胃炎, 胃十二指腸潰瘍, 口腔潰瘍 등의 病症에 사용되기도 한다.²⁻⁶⁾

左金丸과 같이 黃連과 吳茱萸로 구성되어 있으면서도 黃連 2兩과 吳茱萸 2兩의 같은 量으로 배합된 茱連丸은 赤白痢疾을 주 증상으로 하고 있으며,⁷⁾ 赤白痢疾 외에 腸風下血에 사용된다.⁸⁾

黃連은 苦寒한 性味로 心, 肝, 胃, 大腸經에 들어가 淸熱燥濕, 解毒燥濕의 효능이 있어 熱病이 心經에 들어가 생긴 高熱, 煩躁, 譫妄과 熱邪로 血熱妄行한 吐衄, 그리고 濕熱로 인한 胸痞, 泄瀉, 痢疾, 心火亢盛으로 인한 心煩失眠, 胃熱로 인한 嘔吐, 肝火로 인한 目赤腫痛을 다스린다. 吳茱萸는 辛苦 熱한 性味로 肝, 脾, 胃經에 들어가 散寒止痛, 疏肝下氣, 溫中燥濕의 효능이 있어 脘腹冷痛, 厥陰頭痛, 疝痛, 痛經, 嘔吐吞酸과 寒濕泄瀉를 치료한다.⁹⁾

黃連과 吳茱萸의 藥對는 一寒一熱과 辛開苦降의 相反되는 性질을 이용하여 黃連의 苦寒한 性味는 肝經의 橫逆之火를 瀉하고 和胃降逆하며, 吳茱萸의 辛熱한 性味는 疏肝解鬱 降逆止嘔하는 한편 黃連의 寒涼한 性을 制하므로, 淸瀉肝火 降逆和胃 開鬱散結의 效能을 갖게 되어 肝鬱化火橫逆犯胃로 인한 脇肋脹痛 嘔吐吞酸을 치료할 수 있다. 이외에도 黃連의 淸腸止痢와 吳茱萸의 溫中行氣를 배합하여 淸熱燥濕止痛의 效能을 갖게 되어 大便血과 痔瘡腫痛 등症을 치료할 수 있다.¹⁰⁾

黃連의 藥理효능에 대해서는 항산화,¹¹⁾ 고지혈증 강하,¹²⁾ 항균,^{13,14)} 항암,¹⁵⁾ 등이 보고되었고, 吳茱萸의 藥理효능에 대해서는 항암,^{16,17)} 진경 및 항염,¹⁸⁾ 과민성 및 설사에 대한 효과¹⁹⁾ 등과 함께, 혈액순환을 개선시킨다고 보고된 바 있다.²⁰⁾

左金丸에 대해 Luo 등²¹⁾이 성분분석을 보고하였고, 효능에 대해서는 최²²⁾가 家兔의 腸運動과 白鼠의 胃液分泌 및 胃酸도에 관한 실험에서 左金丸을 投與시 장운동이 증가하였으며 위액분비도 증가하였다고 보고하였으나 左金丸의 구성약물인 黃連의 효능으로 알려진 고지혈증에 관한 보고는 없다.

본 연구에서는 黃連과 吳茱萸 藥對가 상호 밀접한 연관이 있는 고지혈증에 미치는 효능을 구명하

기 위해, 고콜레스테롤 사료의 식이로 유발된 고지혈증에서 지질 함량, 지질대사 유전자의 발현 등을 검사하여, 黃連-吳茱萸 藥對의 효능에 대한 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

材料 및 方法

1. 材 料

1) 動物

실험동물은 생후 약 6 주령의 체중 200~220 g의 Sprague-Dawley계 흰쥐를 대한바이오링크(충북 음성)에서 공급받아 14 일 이상 실험 사육장 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 사육장은 인공조명설비에 의하여 조명시간을 오전 7:00부터 오후 7:00까지 12 시간으로 조절하였으며, 실내온도는 22℃ 내외, 습도는 60% 내외로 유지하였다. 사료는 정상군의 경우 고형사료(삼양사)를 사용하였고, 그 조성은 조단백 21%, 조지방 3.5%, 조셀룰로오스 5.0%, 무기질 8.0% 등이다. 고지혈증 대조군 및 실험군의 경우에는 일반 사료에 cholesterol과 cholic acid를 첨가한 고콜레스테롤 사료를 공급하였다. 급수는 일반 상수를 사용하였고, 사료와 급수는 제한하지 않았다.

2) 藥材

실험에 사용된 黃連(Coptidis Rhizoma; CR)과 吳茱萸(Evodiae Fructus; EF)는 중국산 수입품을 구입하여 사용하였다.

3) 시약 및 기기

Fetal bovine serum, Hank's Balanced Salt Solution은 Gibco(USA) 제품을, Cy3, Cy5, Cell-lysis buffer, Olio dT, Cyscript buffer, Cyscript reverse transcriptase, dUTP 등 유전자발현에 소요되는 시약은 Amersham Biosciences(USA) 제품을, 그리고 기타 시약은 Sigma 제품을 사용하였다.

원심분리기는 Vision Com.(Korea), CO₂ incubator 와 deep freezer는 Forma Company(USA), microcentrifuge는 Boeringer

(Germany), ELISA reader는 BMS(USA), ultrasonicator는 Gibco(USA), laminar flow와 멸균기(autoclave)는 Sony Electronics(Japan), inverted microscope는 Hund(Germany), microdispensor는 Gilman(USA), microarray scanner는 Applied Precision Inc(USA), water bath는 Jeiotech(Korea) 제품을 사용하였다.

2. 方法

1) 시료의 製造

黃連과 吳茱萸 각각 100 g을 환류장치가 달린 플라스크에 넣고 물 1,000 mL을 첨가하여 4시간 이상 가열 추출한 다음 깔때기에 거즈와 여과지를 깔고 삼각플라스크에 받았다. 여과된 추출물을 동결건조기를 이용하여 黃連은 24 g, 吳茱萸는 15 g의 건조분말을 얻어 냉동 보관하여 실험에 사용하였다.

左金丸은 黃連과 吳茱萸를 6 : 1 비율인 黃連 추출 건조분말 43.2 mg : 吳茱萸 추출 건조분말 4.5 mg이 되도록 하였고(CR-EF 1), 茱萸丸은 黃連과 吳茱萸를 1 : 1 비율인 黃連 추출 건조분말 25.2 mg : 吳茱萸 추출 건조분말 15.75 mg이 되도록 하였다(CR-EF 2).

2) 고지혈증에 대한 영향

(1) 高脂血症 흰쥐에 대한 영향

① 高콜레스테롤사료 제조

高콜레스테롤사료로는 노 등²³⁾의 방법에 따라 HC-2(High cholesterol 2) 사료를 사용하였다. HC-2 사료는 cholesterol, cholic acid, olive oil, 분쇄한 정상사료를 20 : 5 : 25 : 950의 무게비율로 혼합한 후 적당량의 물을 첨가하여 반죽해서 60℃로 조정된 건조기에서 24 시간 이상 건조시켜서 제조하였으며 사료 제작한 후 3 일 이내에 食餌하였고 3 일 이상 경과된 高콜레스테롤사료는 사용하지 않았다.

② 실험군 및 약물투여

고지혈증은 고콜레스테롤 사료(HC-2)를 10 일 동안 계속하여 투여함으로써 유발시켰다. 약물투여

군은 左金丸(CR-EF 1)과 茱萸丸(CR-EF 2) 투여군으로 나누고, 흰쥐에 고콜레스테롤 사료를 10 일 동안 계속하여 투여하여 고지혈증을 유발 시킨다음 CR-EF 1과 CR-EF 2 를 체중 1 kg 당 210 mg에 해당하는 양을 물에 용해하여 투여하였다. 약물은 하루에 1번씩 4 주간 경구투여 하였다. 이 때 정상군은 일반사료를 食餌하면서 전당액 대신에 생리식염수(0.85% NaCl)를 투여하였고 대조군은 高콜레스테롤사료를 식이하면서 전당액 대신에 생리식염수(0.85% NaCl)를 투여하였다.

③ 채혈 및 혈청 분리

마지막 약물을 투여한 다음날 흰쥐를 ethylether 마취시킨 후, 심장 천자를 하여 채혈하였다. 채혈한 혈액을 암소에 실은 방치하여 응고시킨 다음, 3,000 rpm에서 15 분간 원심분리하여 상층액을 취하여 혈청으로 하였다.

④ Serum parameter 측정

總콜레스테롤(total cholesterol; Tc)含量, 고밀도콜레스테롤(HDL-cholesterol; HDLc)含量, 중성지방(triglyceride; TG)含量 등은 아산제약의 측정용 kit를 각각 사용하여 측정하였으며, LDL-cholesterol(LDLc)은 측정되어진 Tc, HDLc 및 TG 값을 이용하여 다음과 같은 공식에 의해 계산하였다.

$$LDLc = Tc - HDLc - (1/5)TG$$

(2) 肝 세포의 지질대사 유전자 발현에 미치는 영향

肝세포(hepatocyte)를 배양하는 배지에 CR-EF 1과, CR-EF 2 를 첨가하여 배양한 다음, RNA분리와 cDNA제조 및 정제 그리고 hybridization을 실시하여 cholesterol esterase, LDL-receptor, lipoprotein lipase, DGAT(diacylglycerol acyltransferase), ACAT, PPAR 등의 gene 발현에 미치는 영향을 조사하였다. 유전자발현에 대한 검사는 Schena 등²⁴⁾ 및 Huang 등²⁵⁾의 방법에 준하여 행하였으며, 구체적인 방법은 다음과 같았다.

① 肝세포의 배양

간에서 얻은 세포주인 HepG2(ATCC, USA)를 급

속히 해동시킨 후, 10% fetal bovine serum(FBS)가 포함된 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지(SM-PC, fungizone 포함)에 배양하였다. 7 일간 배양한 후 세포를 수거하여 세포수 6×10^6 cell/ml 이 되도록 현탁시켜 4 시간 배양하였다. 시료 CR-EF 1, CR-EF 2를 배지에 녹인 후 membrane filter(pore size 0.45 μ m)에 통과시킨 檢液을 배양된 세포에 50 μ g/ml의 농도가 되도록 첨가하여 15 시간 배양하였다. 각 시험군은 동일한 실험을 4 회 실시하여 약제의 효능을 평가하였다.

② Total RNA 分離

대조군에는 fluorochrome 인 Cy3를, 실험군에는 Cy5를 50 μ g/ml이 되도록 처리한 다음 10 시간을 추가 배양하였다. RNA를 분리하기 위하여 배양세포의 배지를 제거한 다음, 냉각(4°C)된 PBS로 3 회 washing 하였다. Pestle로 긁어 세포를 모은 다음, 750 \times g에서 10 분간 원심분리하고 ice cold PBS로 2 회 씻었다. 침전된 세포에 lysis buffer를 가하여 용해시킨 다음, 12,000 \times g에서 10분간 원심분리하여 上層을 취하였다. 다시 1 M sucrose가 함유된 tris buffer 위에 loading한 다음, 36,000 rpm에서 160 분간 원심분리 하였다. Polysome pellet을 취하여 1 ml Sodium dodecyl sulfate(SDS) buffer에 녹인 후, 37°C에서 30분간 incubation 시켰다. Sodium acetate buffer를 가한 다음, phenol/CHCl₃ 용액으로 추출하였다. NaCl을 0.2 M이 되도록 하고 3 배의 ethanol 을 가하고 -20°C에서 12 시간 보관 하였다. 침전물을 75% ethanol로 2 회 washing 하여 건조시켰다. 유전자 발현에 필요한 RNA양을 대조군과 시험군에서 mRNA양이 같도록 조정한다. 다음, 전기영동으로 확인하여 사용하였다.

③ Fluorescence labelled cDNA 製造

대조군 및 시험군에서 각각 분리한 total RNA액 10 μ l(13 μ g RNA 함유)에 oligo dT 1 μ l를 넣은 후 조심스럽게 혼합한 다음, 70°C에서 5 분간 incubation하였다. primer(oligo-dT)가 annealing하도록 室溫에서 약 10 분간 방치한 다음, Cy script buffer 4 μ l, 0.1 M DTT 2 μ l, dUTP nucleotide 1 μ l, dUTP Cy dye-labelled nucleotide 1 μ l, Cy script reverse transcriptase 1 μ l를 첨가한 후, 아주 조심스럽게 혼합하였다. 이후 42°C에

서 90 분간 incubation 한 후, 얼음상에 방치하였다. 여기에 2.5 M NaOH 2 μ l를 가한 후 37°C에서 15 분간 incubation하여 mRNA를 degradation하였으며, 2 M HEPES buffer 10 μ l를 가하여 중화시켰다.

④ Labelled cDNA의 精製

제조된 cDNA 액을 GFXTM column(Amersham Co. USA)상에 loading한 다음, capture buffer와 washing solution을 사용하여 elution시켰다. Cy3-, Cy5- labelled cDNA 양을 각각 60 μ l만큼 elution 하였다.

⑤ 유전자 確認 및 定量

각각의 Cy3-, Cy5- labelled cDNA를 냉동건조기(speed vac)를 이용하여 3 시간 동안 건조한 다음, 7.5 μ l의 nuclease free water에 녹였다. 95°C에서 2 분간 가열한 다음, 곧바로 얼음상에 30 초 이상 방치하였다. 여기에 7.5 μ l의 hybridization buffer와 15 μ l의 100% formamide를 가한 후 조심스럽게 섞었다. 혼합된 액을 microarray slide(Amersham Biosciences, USA)와 cover slip 사이에 30 μ l loading하였다. cDNA가 loading된 slide를 hybridization chamber에 넣고 42°C에서 18 시간동안 incubation하였다. 다시 slide를 0.2% SDS가 함유된 55°C로 가온된 SSC(saline, SDS, citrate)buffer에 넣어 55°C에서 10 분간 2 회 세척하였다. 다시 0.06 배로 희석한 SSC buffer로 상온에서 10 분간 세척한 다음, 1,000 rpm에서 2 분간 원심분리하였다. 테시케이터에 1 시간 방치하여 건조하고 발현된 유전자 양을 측정하였다. Cy3 및 Cy5 형광도(fluorescence intensity)는 GenePix Pro 3.0 software (Axon Instrument Inc.)를 사용하여 측정하였으며, 유전자 발현 정도는 슬라이드 상의 Cy3/Cy5 비율을 Log(log₂ logarithms)로 환산하였다.

3) 통계처리

실험으로부터 얻은 결과들의 실험군별 상호비교를 위한 평균치는 평균 \pm 표준오차(Mean \pm S.E.)로써 산출하였다. 실험군들간의 통계적 유의성 검증은 Student's t-test 분석방법이 사용되었으며, p-value가 0.05 미만인 경우에 그 유의성을 인정하였다.

結 果

1. 고지혈증 흰쥐에 대한 영향

1) 혈청 중 total-cholesterol에 미치는 영향

혈청 중 Tc(total cholesterol)의 변화를 관찰한 결과, 고콜레스테롤 사료를 식이한 대조군의 혈청 중 Tc는 125.42 ± 4.12 mg/dL 로 정상사료를 식이한 정상군의 평균 67.68 ± 3.06 mg/dL 보다 현저하게 증가하였다($p < 0.01$). CR-EF 1 투여군의 Tc는 108.02 ± 4.85 mg/dL 로 대조군에 비하여 유의성있게 감소되었고($p < 0.05$), 이에 비하여 CR-EF 2 투여군의 Tc는 118.86 ± 5.14 mg/dL 로 다소 감소하는 경향성은 보였으나 유의성이 없었다(Fig. 1).

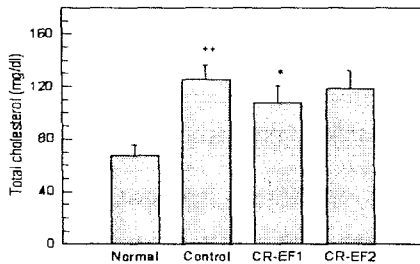


Fig. 1. Effects of Coptidis Rhizoma and Evodiae Fructus on serum total cholesterol in hyperlipidemic rats.

The normal and control group were administrated with saline.

CR-EF was administered for 4 weeks.

CR-EF 1: 200mg/kg(Coptidis Rhizoma: Evodiae Fructus=6:1), *p.o.*

CR-EF 2: 200mg/kg(Coptidis Rhizoma: Evodiae Fructus=1:1), *p.o.*

++: Statistically significant compared with normal group($p < 0.01$).

* : Statistically significant compared with control group($p < 0.05$).

2) 혈청 중 HDL-cholesterol에 미치는 영향

혈청 중 HDLc(HDL-cholesterol)의 변화를 관찰

한 결과, 대조군의 혈청 중 HDLc는 25.01 ± 1.94 mg/dL 로 정상사료를 식이한 정상군의 평균 34.70 ± 1.73 mg/dL 보다 현저하게 증가하였다($p < 0.01$). CR-EF 1 투여군의 HDLc는 27.81 ± 2.02 mg/dL, CR-EF 2 투여군은 29.62 ± 2.28 mg/dL 로 두 경우 모두 대조군에 비해서는 혈청 중 HDLc 수준이 다소 증가하는 경향성은 보였으나, 유의성은 없었다(Fig. 2).

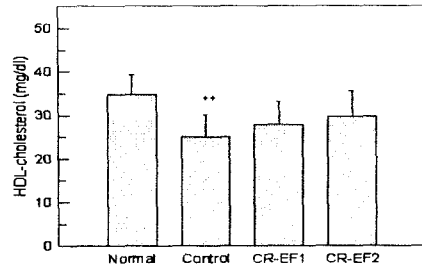


Fig. 2. Effects of Coptidis Rhizoma and Evodiae Fructus on serum HDL-cholesterol in hyperlipidemic rats.

The normal group(Normal) was fed on the normal diet, and the others were fed on the HC-2 diet.

The normal and control groups(Control) were administrated with saline.

CR-EF was administered for 4 weeks.

CR-EF1: 200mg/kg(Coptidis Rhizoma: Evodiae Fructus=6:1), *p.o.*

CR-EF2: 200mg/kg(Coptidis Rhizoma: Evodiae Fructus=1:1), *p.o.*

++: Statistically significant compared with normal group($p < 0.01$).

3) 혈청 중 triglyceride에 미치는 영향

혈청 중 TG(triglyceride)의 변화를 관찰한 결과, 대조군의 혈청 중 TG는 101.07 ± 4.14 mg/dL 로 정상사료를 식이한 정상군의 평균 66.80 ± 3.46 mg/dL 보다 현저하게 증가하였다($p < 0.01$). CR-EF 1 투여군의 TG는 87.71 ± 3.32 mg/dL 로 대조군에 비하여 유의성있게 감소하였으나($p < 0.05$), CR-EF 2 투여군의 TG 수준은 92.17 ± 4.05 mg/dL 로 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 3).

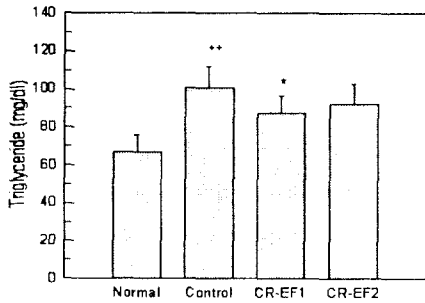


Fig. 3. Effects of Coptidis Rhizoma and Evodiae Fructus on serum triglyceride(TG) in hyperlipidemic rats.

The normal group(Normal) was fed on the normal diet, and the others were fed on the HC-2 diet.

The normal and control groups(Control) were administrated with saline.

CR-EF was administered for 4 weeks.

CR-EF 1: 200mg/kg(Coptidis Rhizoma: Evodiae Fructus=6:1), *p.o.*

CR-EF 2: 200mg/kg(Coptidis Rhizoma: Evodiae Fructus=1:1), *p.o.*

++: Statistically significant compared with normal group($p < 0.01$).

* : Statistically significant compared with control group($p < 0.05$).

4) 혈청 중 LDL-cholesterol에 미치는 영향

Tc, TG, HDLc 등을 근거로 산출한 혈청 중 LDLc (LDL-cholesterol) 의 변화를 관찰한 결과, 고콜레스테롤 사료를 식이한 대조군의 혈청 중 LDLc는 80.44 ± 2.00 mg/dL 로 정상사료를 식이한 정상군의 평균 25.07 ± 1.62 mg/dL 보다 3 배 이상 증가하였다($p < 0.01$). CR-EF 1 투여군의 LDLc 는 72.41 ± 2.71 mg/dL, CR-EF 2 투여군의 LDLc 는 71.65 ± 2.20 mg/dL로 대조군에 비하여 유의성 있게 감소되었다($p < 0.05$)(Fig. 4).

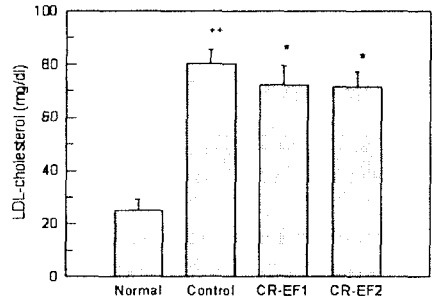


Fig. 4. Effects of Coptidis Rhizoma and Evodiae Fructus on serum LDL-cholesterol(LDLc) in hyperlipidemic rats.

The normal group(Normal) was fed on the normal diet, and the others were fed on the HC-2 diet.

The normal and control groups(Control) were administrated with saline.

CR-EF was administered for 4 weeks.

CR-EF 1: 200mg/kg(Coptidis Rhizoma: Evodiae Fructus=6:1), *p.o.*

CR-EF 2: 200mg/kg(Coptidis Rhizoma: Evodiae Fructus=1:1), *p.o.*

++: Statistically significant compared with normal group($p < 0.01$).

* : Statistically significant compared with control group($p < 0.05$).

2. 肝 세포의 지질대사 유전자 발현에 미치는 영향

1) Cholesterol esterase gene에 대한 영향

肝세포(hepatocyte)를 배양하면서 배지에 CR-EF 1과 CR-EF 2를 첨가하여 배양한 다음, RNA분리와 cDNA제조 및 정제 그리고 hybridization을 실시하여 gene의 발현에 미치는 영향을 관찰한 결과, 정상대조군의 $\log_2(Cy3/Cy5)$ 비율이 0.152 ± 0.011 인데 비하여, CR-EF 1 투여군은 비율이 0.301 ± 0.026 로 유의성이 있었고($p < 0.01$), CR-EF 2 투여군도 0.226 ± 0.018 로 유의하게 증가하였다($p < 0.05$). CR-EF 1 및 CR-EF 2 투여군 모두 정상군에 비해서 cholesterol esterase 발현이 2 배 가까이 현저하게 높은 수준이었다(Fig. 5).

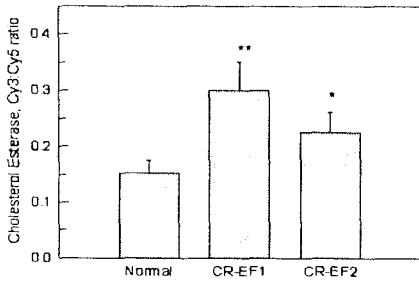


Fig. 5. Effects of Coptidis Rhizoma and Evodiae Fructus on expression of cholesterol esterase gene in hepatocytes.

CR-EF 1: 50ug/mL(Coptidis Rhizoma: Evodiae Fructus=6:1)

CR-EF 2: 50ug/mL(Coptidis Rhizoma: Evodiae Fructus=1:1)

p-value: Statistically significant compared with normal group.

(*: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$)

2) LDL-receptor gene의 발현에 대한 영향

LDL-receptor gene의 발현에 대한 영향을 관찰한 결과, 정상군의 $\log_2(\text{Cy3}/\text{Cy5})$ 비율은 0.300 ± 0.009 였으며, CR-EF 1 투여군은 비율이 0.374 ± 0.012 로 정상군에 비하여 유의성있게 증가하였고 ($p < 0.01$), CR-EF 2 투여군도 0.343 ± 0.014 로 유의성있게 증가하였다($p < 0.05$)(Fig. 6).

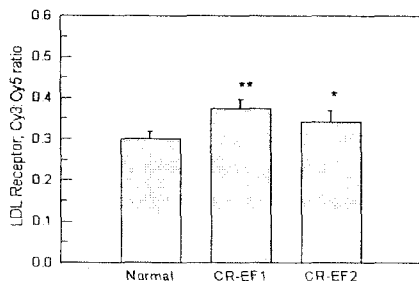


Fig. 6. Effects of Coptidis Rhizoma and Evodiae Fructus on expression of LDL-receptor gene in hepatocytes.

CR-EF 1: 50ug/mL(Coptidis Rhizoma: Evodiae Fructus=6:1)

CR-EF 2: 50ug/mL(Coptidis Rhizoma: Evodiae Fructus=1:1)

p-value: Statistically significant compared with normal group.

(*: $p < 0.05$ **: $p < 0.01$)

3) Lipoprotein lipase gene의 발현에 대한 영향

간세포(hepatocytes)에서의 lipoprotein lipase gene 발현에 대한 영향을 관찰한 결과, 정상군의 $\log_2(\text{Cy3}/\text{Cy5})$ 비율은 0.124 ± 0.006 였으며, CR-EF 1 투여군은 비율이 0.129 ± 0.008 , CR-EF 2 투여군은 0.126 ± 0.006 로 모두 유의성이 없었다 (Fig. 7).

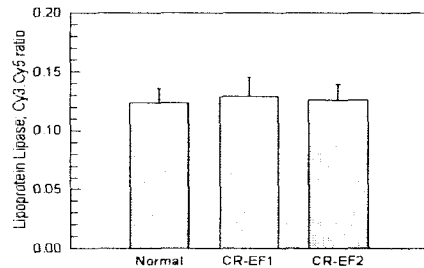


Fig. 7. Effects of Coptidis Rhizoma and Evodiae Fructus on expression of cholesterol esterase gene in hepatocytes.

CR-EF 1: 50ug/mL(Coptidis Rhizoma: Evodiae Fructus=6:1)

CR-EF 2: 50ug/mL(Coptidis Rhizoma: Evodiae Fructus=1:1)

4) Diacylglycerol acyltransferase gene에 대한 영향

간세포(hepatocyte)에서 diacylglycerol acyltransferase (DGAT) gene의 발현에 대한 영향을 관찰한 결과, 정상군의 $\log_2(\text{Cy3}/\text{Cy5})$ 비율이 0.748 ± 0.023 인데 비하여, CR-EF 1과 CR-EF 2 투여군 모두 유의성 있게 증가하였다($p < 0.01$). 즉, CR-EF 1 투여군은 비율이 1.695 ± 0.159 로 정상군에 비하여 2배 이상 증가하였고, CR-EF 2 투여군은 1.210 ± 0.075 였다 (Fig. 8).

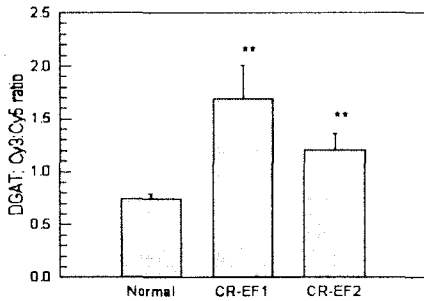


Fig. 8. Effects of Coptidis Rhizoma and Evodiae Fructus on expression of DGAT gene in hepatocytes.

CR-EF 1: 50ug/mL(Coptidis Rhizoma: Evodiae Fructus=6:1)

CR-EF 2: 50ug/mL(Coptidis Rhizoma: Evodiae Fructus=1:1)

p-value: Statistically significant compared with normal group

(** : $p < 0.01$)

5) AcylCoA-cholesterol-acyltransferase gene에 대한 영향

肝세포(hepatocyte)에서 AcylCoA-cholesterol-acyltransferase (ACAT) gene의 발현에 대한 영향을 관찰한 결과, ACAT gene 발현과정에서 정상군의 $\log_2(\text{Cy}3/\text{Cy}5)$ 비율은 0.180 ± 0.008 이었으며, CR-EF 1 투여군은 0.212 ± 0.006 으로 유의성 있게 상승하였고($p < 0.05$), CR-EF 2 투여군은 0.193 ± 0.009 로 정상군과 비교하였을 때 다소 상승하였으나 유의성은 없었다(Fig. 9).

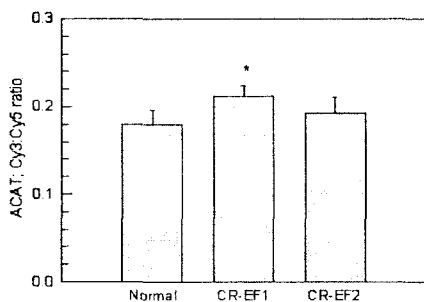


Fig. 9. Effects of Coptidis Rhizoma and Evodiae Fructus on expression of ACAT gene in hepatocytes.

CR-EF 1: 50ug/mL(Coptidis Rhizoma: Evodiae Fructus=6:1)

CR-EF 2: 50ug/mL(Coptidis Rhizoma: Evodiae Fructus=1:1)

p-value: Statistically significant compared with normal group.

(* : $p < 0.05$)

6) Peroxisome proliferator activated receptor gamma gene의 발현에 대한 영향

肝세포(hepatocyte)에서 peroxisome proliferator activated receptor gamma(PPAR γ) gene의 발현에 대한 영향을 관찰한 결과, 정상군의 $\log_2(\text{Cy}3/\text{Cy}5)$ 비율은 0.242 ± 0.026 이었으며, CR-EF 1 투여군은 0.334 ± 0.008 로 정상군과 비교하여 유의성 있게 상승하였으며($p < 0.01$), CR-EF 2 투여군도 0.316 ± 0.014 로 PPAR γ gene의 발현이 유의성 있게 상승하였다($p < 0.05$)(Fig. 10).

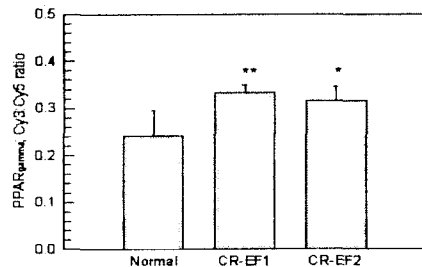


Fig. 10. Effects of Coptidis Rhizoma and Evodiae Fructus on expression of PPAR(peroxisome proliferator activated receptor) gamma gene in hepatocytes.

CR-EF 1: 50ug/mL(Coptidis Rhizoma: Evodiae Fructus=6:1)

CR-EF 2: 50ug/mL(Coptidis Rhizoma: Evodiae Fructus=1:1)

p-value: Statistically significant compared with normal group.

(* : $p < 0.05$ ** : $p < 0.01$)

7) PPAR alpha gene의 발현에 대한 영향

肝세포(hepatocyte)에서 peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPARα) gene의 발현에 대한 영향을 관찰한 결과, 정상군의 log₂(Cy3/Cy5) 비율은 0.196 ± 0.009 였으며, CR-EF 1 투여군은 0.353 ± 0.013, CR-EF 2 투여군은 0.243 ± 0.006 으로 정상군과 비교하였을 때 두 경우 모두 PPARα gene의 발현이 유의성있게 상승하였다(p<0.01)(Fig. 11).

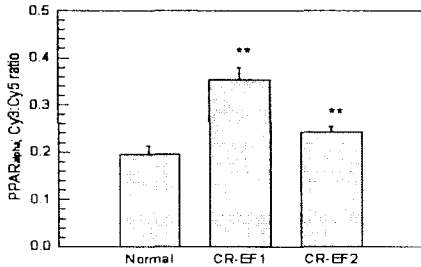


Fig. 11. Effects of Coptidis Rhizoma and Evodiae Fructus on expression of PPARα gene in hepatocytes.

CR-EF 1: 50ug/mL(Coptidis Rhizoma: Evodiae Fructus=6:1).

CR-EF 2: 50ug/mL(Coptidis Rhizoma: Evodiae Fructus=1:1).

p-value: Statistically significant compared with normal group.

(**): p<0.01).

考 察

左金丸은 《丹溪心法》¹⁾ 火門에 “黃連 六兩 吳茺萸 一兩 或 半兩 上爲末 爲丸 治肝火”로 처음 수록된 이래, 《醫方集解》²⁶⁾에서는 瀉下之劑에, 《中醫方劑通釋》²⁾에서는 清熱劑에, 《實用處方綱目》⁵⁾에서는 清臟腑熱劑에 收載되어 있는 등, 주로 熱, 火와 관계된 病證에 사용되었다. 左金의 名稱에 대하여 《醫方集解》²⁶⁾에서는 “肝居於左, 肺處於右. 左金者: 謂使金令得行於左而平肝也.”라 하였으며, 《醫方考》²⁷⁾에서는 “左金也. 左金者 謂金令行左而平肝也,”라 하였고, 胡天錫은 《醫宗金鑑》²⁸⁾의 刪補

名醫方論에서 “左金者 木從左而制從金也”라 하였고, 《實用處方綱目》⁵⁾에서는 “木從左而制從金’ 能剋制肝木之氣者唯獨肺金 但心火旺又可刑金 金受其刑則不能制木 是以又當瀉其心火 使心火不致刑金 肺金得以制木.”이라고 하였으며, 《中醫方劑通釋》²⁾에서는 “瀉心火而補肺金 金旺則能制木以平肝 故名左金丸”이라 하였다. 이상에서와 같이 左金의 명칭은 肺金으로 하여금 左肝을 克制하여 平肝하여 붙여진 이름이다. 異名으로는 回令丸, 茺藺丸 등이 있다.^{2,26)}

左金丸은 黃連과 吳茺萸의 藥對로 구성된 방제이며, 用量으로는 《丹溪心法》¹⁾에 黃連 六兩에 吳茺萸 一兩 혹은 半兩을 사용하였고, 이후의 醫書에서는 黃連 六兩에 吳茺萸 一兩을 사용하여 黃連과 吳茺萸의 比率을 6 : 1로 유지하였다.^{2,6,26)}

左金丸의 治療症狀으로 《丹溪心法》¹⁾에서는 “治肝火”라 하였고, 《中醫方劑通釋》²⁾에서는 “肝火犯胃 症見脇肋脹痛, 嘈噯吞酸, 嘔吐口苦, 脘痞噯氣, 舌紅苔黃, 脈弦數者”라 한 바와 같이 左金丸의 病因病機는 肝鬱化火하여 橫逆犯胃한 肝胃不和證이며, 그에 따른 主治症은 脇肋脹痛, 嘈噯吞酸, 嘔吐口苦, 脘痞噯氣, 舌紅苔黃, 脈弦數 등이다.

《醫方考》²⁷⁾에서는 左金丸의 구성약물인 黃連의 효능으로 “黃連乃瀉心之物 瀉去心火 不得乘其肺金 則清肅之令左行 而肝有所制矣”이라 하였고, 吳茺萸의 효능으로 “吳茺萸味辛熱而氣臊 臊則入肝 辛熱則疏利 乃用之以爲反佐. 經曰: 佐以所利 和以所宜. 此之謂也”라 하였는데, 吳茺萸는 辛苦熱한 性味が 肝脾 胃經에 歸經하므로 辛熱한 性味는 肝에 入하여 肝氣로 하여금 條達하게 하여 鬱結이 풀어져 疏肝理氣하여 宣散解鬱의 효능이 있고, 辛苦한 味는 胃에 入하여 辛開苦降의 작용으로 和胃降逆의 효능이 있어, 肝鬱化火로 肝火犯胃하여 胃失和降한 嘔吐吞酸에 黃連과 함께 配伍하여 肝鬱化火犯胃證을 치료할 수 있다.

藥對는 보통 두가지 약물이 한쌍을 이루지만, 때로는 세가지 이상의 약물로 구성되어 임상에서 자주 쓰이는 고정된 配伍형식이며, 약물 配伍에서 가장 작은 單位로 비록 그 조성은 간단하나 약물 配伍의 기본적 특징을 갖추고 있다. 藥對의 효능은 구성하고 있는 單味藥의 효능과 밀접한 관계를 가지고 있으나, 대체로 單味藥의 효능을 합친 것보다 더 강하고 그 작용이 더 전면적이며 또 독성이나 부작용이 감소되거나 제거된다.^{29,30)}

藥對는 배합하는 약물의 용량에 따라 효능이 달라지기도 하는데 左金丸과 같이 黃連과 吳茺萸로

구성되어 있으면서 黃連 2량과 吳茱萸 2량의 같은 양으로 배합된 茱連丸은 赤白痢疾을 주 증상으로 하고 있으며,⁷⁾ 茱連丸은 일명 變通丸이라고 하며 赤白痢疾 외에 腸風下血에 사용된다.⁸⁾

上記한 바와 같은 左金丸, 茱連丸 및 이의 구성 약물인 黃連과 吳茱萸의 효능을 고려하여, 본 연구에서는 左金丸 및 茱連丸이 고지혈증 및 혈액순환 관련인자 등에 대한 효능을 검사함으로써 黃連-吳茱萸 藥對의 특성을 살펴보고자 하였다.

고지혈증에 대한 左金丸(CR-EF 1) 및 茱連丸(CR-EF 2)의 효능을 검사한 결과, 左金丸을 200 mg/kg 용량으로 4 주일간 투여한 경우, 고콜레스테롤을 食餌로 유발된 고지혈증 흰쥐의 total cholesterol(Tc), triglyceride(TG) 및 LDL-cholesterol (LDLc) 등의 주요 고지혈증 지표가 유의하게 저하되었다. 이에 비하여 茱連丸 투여군은 LDLc 수준은 저하시켰으나, Tc, TG 수준에는 유의한 영향이 없었으며, 이들 두 처방은 모두 혈청 중 HDLc 함량에는 유의한 영향이 없었다. 이와 같은 결과는 고콜레스테롤을 食餌로 비롯된 고 Tc성 고지혈증의 개선에 左金丸은 좋은 효과가 기대되나 茱連丸은 유의한 효과를 보이기 어려움을 시사하며, 이는 黃連-吳茱萸 藥對에서 그 배합분량에 따른 효능의 차이가 있음을 알 수 있다.

또한 上記한 바와 같이, 黃連-吳茱萸 藥對는 고콜레스테롤을 食餌 고지혈증 흰쥐의 TG 및 LDLc 등 심혈관계 질환과 밀접한 연관이 있는 주요 지표를 유의하게 저하시켰으며, 이는 黃連-吳茱萸 藥對가 지질대사에 영향을 주어 지질침착으로 인해 발생하는 심혈관계 질환을 억제할 가능성을 시사하였다.

이러한 黃連-吳茱萸 藥對의 구체적인 작용을 알아보기 위하여 간세포(hepatocytes)를 배양하면서 배지에 약제를 첨가하여 지질대사와 연관된 성분들의 발현에 대한 영향을 조사하였다. 성적에서 기술한 바와 같이, LDLc 및 HDLc의 대사를 담당하는 간세포 내의 효소의 유전자 발현에 미치는 영향을 평가한 결과, 左金丸(CR-EF 1) 첨가로 cholesterol esterase, LDL-receptor, diacylglycerol acyltransferase (DGAT), acylCoA-cholesterol-acyltransferase(ACAT), peroxisome proliferator activated receptor gamma (PPAR γ), peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR α) 등의 발현이 증가되었으며, lipoprotein lipase의 발현에는 유의한 영향이 없었다. ACAT(EC2.3.1.26)는 콜레스테롤과 지방산으로부터 cholesteryl esters를 생

성하는 효소로, ACAT 발현 및 조절은 혈청 중 콜레스테롤을 적정하게 유지하므로(cholesterol homeostasis)에 초기 동맥경화에서도 ACAT 발현의 조절한다.^{31,32)} 또한, PPAR γ 및 PPAR α 는 지방산 대사, 콜레스테롤 신생합성과 밀접하게 연계되어 있기 때문에 당뇨나 비만치유에서도 중요한 요소이다.^{33, 35)} 그러므로, 左金丸은 고지혈증과 연관된 비만, 당뇨, 동맥경화 등에 유용하게 활용될 수 있는 처방이라고 사료된다.

한편, 간세포(hepatocytes)를 배양시에 茱連丸(CR-EF 2)을 첨가한 경우에는 cholesterol esterase, LDL-receptor, DGAT, PPAR γ , PPAR α 등의 발현이 증가되었으며, lipoprotein lipase의 발현에는 유의한 영향이 없는 등 左金丸 첨가시와 거의 유사한 영향을 보였으나, 左金丸의 경우와는 달리 ACAT의 발현에는 유의한 영향이 없었다. 이와 같은 결과는 ACAT가 콜레스테롤 대사에서 중요한 역할을 하는 효소임을 감안할 때, 茱連丸 또한 고지혈증과 연관된 비만, 당뇨, 동맥경화 등에 유용하게 활용될 수 있지만 左金丸이 더욱 우수한 것으로 사료된다.

이처럼 左金丸과 茱連丸은 모두 黃連과 吳茱萸로 구성되어 있으나, 배합 비율에 따라 그 효능이 차이가 있음을 알 수 있는데, 고지혈증에는 左金丸이 茱連丸보다 효과적이라 생각되므로 이에 대한 임상적 검토가 필요하다고 사료된다.

結 論

고지혈증을 유발한 흰쥐에 左金丸 및 茱連丸을 투여하여 지질에 대한 영향을 조사하였으며, 肝세포(hepatocytes)의 배양과정에서 배지에 左金丸과 茱連丸을 첨가하여 肝세포의 지질대사 관련 효소의 발현에 대하여 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 左金丸은 高콜레스테롤을 食餌로 유발된 고지혈증 흰쥐의 total cholesterol(Tc), triglyceride(TG) 및 LDL-cholesterol(LDLc) 등을 유의성 있게 저하시켰으며, 茱連丸은 LDLc은 저하시켰으나, Tc 및 TG 에는 유의성이 없었다.
2. 左金丸은 배양된 肝세포의 cholesterol esterase, LDL-receptor, diacylglycerol acyltransferase (DGAT), acylCoA-cholesterol-acyltransferase (ACAT), peroxisome proliferator activated

receptor gamma (PPAR γ), peroxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR α) 등의 발현을 증가시켰다. 또한 茺藺丸은 배양된 肝세포의 cholesterol esterase, LDL-receptor, DGAT, PPAR γ , PPAR α 등의 발현을 증가시켰으나, ACAT의 발현에는 유의성이 없었다.

이상의 실험결과를 종합하면, 左金丸과 茺藺丸은 모두 黃連과 吳茺萸로 구성되어 있으나, 고지혈증에는 左金丸이 茺藺丸보다 효과적일 것으로 생각된다.

參考文獻

1. 朱震亨. 丹溪心法附餘. 서울:大星文化社. 1993:369.
2. 宗全和 主編. 中醫方劑通釋 卷二. 河北:河北科學技術出版社. 1995:41-2.
3. 許濟群 王綿之 主編. 方劑學. 北京:人民衛生出版社. 1995:158-60.
4. 姜衛周, 周樂年 主編. 成方新用治驗大全. 北京:中國中醫藥出版社. 1994:45-6.
5. 何倫 主編. 實用處方綱目. 陝西:陝西科學技術出版社. 1991:156-9.
6. 襄秉哲. 標準臨床方劑學. 서울:成輔社. 1995:152-3.
7. 許浚. 東醫寶鑑. 서울:南山堂 影印. 1986:187.
8. 趙學敏. 串雅全書. 北京:中國中醫藥出版社. 1998:116.
9. 國家中醫藥管理局 中華本草 編委會. 中華本草 精選本. 上海:上海科學技術出版社. 1996:525-38, 1026-34.
10. 김이현, 이영중. 左金丸에 대한 文獻的 考察. 경원대학교 한의학연구소 논문집. 2003;6:71-80.
11. Yokozawa T, Ishida A, Kashiwada Y, Cho EJ, Kim HY, Ikeshiro Y. Coptidis Rhizoma: protective effects against peroxynitrite-induced oxidative damage and elucidation of its active components. J Pharm Pharmacol. 2004;56(4):547-56.
12. Yokozawa T, Ishida A, Cho EJ, Nakagawa T. The effects of Coptidis Rhizoma extract on a hypercholesterolemic animal model. Phytomedicine. 2003;10(1):17-22.
13. Hu JP, Takahashi N, Yamada T. Coptidis Rhizoma inhibits growth and proteases of oral bacteria. Oral Dis. 2000;6(5):297-302.
14. Higaki S, Hasegawa Y, Morohashi M, Sakamoto K, Yamagishi T. The influence of coptidis rhizoma to lipase activity of Propionibacterium acnes Nippon Hifuka Gakkai Zasshi. 1990;100(8):883-6.
15. Iizuka N, Miyamoto K, Hazama S, Yoshino S, Yoshimura K, Okita K, Fukumoto T, Yamamoto S, Tangoku A, Oka M. Anticachectic effects of Coptidis rhizoma, an anti-inflammatory herb, on esophageal cancer cells that produce interleukin 6. Cancer Lett. 2000;158(1):35-41.
16. Zhang Y, Zhang QH, Wu LJ, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. Atypical apoptosis in L929 cells induced by evodiamine isolated from Evodia rutaecarpa. J Asian Nat Prod Res. 2004;6(1):19-27.
17. Zhang Y, Wu LJ, Tashiro S, Onodera S, Ikejima T. Evodiamine induces A375-S2 cell death through two different pathways. Yao Xue Xue Bao. 2003;38(9):650-3.
18. Matsuda H, Yoshikawa M, Iinuma M, Kubo M. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of limonin isolated from the fruits of Evodia rutaecarpa var. bodinieri. Planta Med. 1998;64(4):339-42.
19. Matsuda H, Wu JX, Tanaka T, Iinuma M, Kubo M. Antinociceptive activities of 70% methanol extract of evodiae fructus (fruit of Evodia rutaecarpa var. bodinieri) and its alkaloidal components. Biol Pharm Bull. 1997;20(3):243-8.
20. Ko JS, Rho MC, Chung MY, Song HY, Kang JS, Kim K, Lee HS, Kim YK. Quinolone alkaloids, diacylglycerol acyltransferase inhibitors from the fruits of Evodia rutaecarpa. Planta Med. 2002;68(12):1131-3.
21. Luo J, Ma H, Xu M, Cheng X. HPLC quantitative analysis of berberine absorbed with macroporous resin in Rhizoma Coptidis and its preparation zuo jin wan. Zhong Yao Cai. 2000;23(7):413-5.
22. 최두호. 좌금환이 장운동 및 위액분비에 미치는 영향. 원광대학교 한의학연구소. 1993;3(1):133-47.
23. 노환성, 김운자, 박건구, 조영환, 박형섭. 고지혈

- 중 동물모델 설정을 위한 식이처방의 실험적 연구. 약제학회지. 1994;24(4):297-300.
24. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*. 1995;270:467-70.
25. Huang Q, Dunn RT, Jayadev S, DiSorbo O, Pack FD, Farr SB, Stoll RE, Blanchard KT. Assessment of Cisplatin-Induced Nephrotoxicity by Microarray Technology. *Toxicological Sciences*. 2001;63:196-207.
26. 汪昂. 醫方集解. 서울:大星出版社. 1984:459-61.
27. 吳昆. 醫方考. 江蘇:江蘇科學技術出版社. 1985:79.
28. 吳謙. 醫宗金鑑. 서울:大星文化社. 1983:83.
29. 高曉山 主編. 中藥藥性論. 北京:人民衛生出版社. 1992:261-4.
30. 陳維華 著, 盧煥濤 譯. 藥對論. 서울:一中社. 1998:5.
31. Suckling KE, Strange EF. Role of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase in cellular cholesterol metabolism. *J Lipid Res*. 1985;26:647-71.
32. Chang TY, Chang CCY, Cheng D. Acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase. *Annu Rev Biochem*. 1997;66:613-38.
33. Kliewer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, Devchand P, Wahli W, Willson TM, Lenhard JM, Lehmann JM. Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1997;94:4318-23.
34. Wang M, Wise SC, Leff T, Su TZ. Troglitazone, an antidiabetic agent, inhibits cholesterol biosynthesis through a mechanism independent of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Diabetes*. 1999;48:254-60.
35. Antonio VP, Mercedes JL, Bradford BL. Regulation of PPAR gene expression by nutrition and obesity in Rodents. *J Clin Invest*. 1996;97:2553-61.