

降脂通脈飲이 항산화 활성과 高脂血 誘發 白鼠에 미치는 影響

차관배, 안정조, 조현경, 유호룡, 김윤식, 설인찬
대전대학교 한의과대학 심계내과학교실

The Effects of *Gangzitongmaekeum* on Antioxidation Activity and Dietary Hyperlipidemia-induced Mice

Kwan-bae Cha, Joung-jo An, Hyun-kyung Jo, Ho-rhyong Yoo, Yoon-sik Kim, In-chan Seol
Department of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Daejeon University

ABSTRACT

This experiments was performed to determine the effects of *Gangzitongmaekeum*(降脂通脈飲 : GTE) on antioxidation activity and hyperlipidemia induced by hypercholesterolemic diet in mice.

The results obtained were as follows :

1. GTE showed a safety in cytotoxicity and toxicity of human fibroblast cells and liver.
2. GTE showed DPPH scavenging activity, superoxide dismutase (SOD)-like activity and inhibitory effect on reactive oxygen species (ROS).
3. GTE treated mice showed body and liver weight decrease, compared to the hyperlipidemia-induced control group.
4. GTE decreased total cholesterol and LDL cholesterol levels significantly, but HDL cholesterol levels not significantly.
5. GTE decreased triglyceride levels significantly.
6. Glucose levels in GTE treated mice significantly decreased compared to the hyperlipidemia-induced control group.
7. Albumin levels in GTE treated mice were similar with the hyperlipidemia-induced control group.
8. The lipophagy in liver compared with the control group tended to be decreased in GTE treated mice. In the change of aorta, the cell was regular and boundary of vessel wall was clear, compared to the hyperlipidemia-induced control group.
9. TBARS levels in GTE treated mice significantly decreased compared to the hyperlipidemia-induced control group.
10. The change of SOD and catalase activity significantly increased compared to the hyperlipidemia-induced control group.
11. ACAT mRNA level and HMG-CoA reductase mRNA levels in GTE treated mice significantly decreased compared to the hyperlipidemia-induced control group.

Conclusion : These results suggest that *Gangzitongmaekeum* is effective in antioxidation activity and dietary hyperlipidemia-induced mice.

Key words : *Hyperlipidemia, Antioxidation Activity, Gangzitongmaekeum*

1. 緒 論

생체 내 대사과정에서 부수적으로 생성되는 활

성산소는 free radical의 형태로써 恒常성이 정상적 일 때에는 체내에 유입되는 바이러스나 유독물질 등을 살균하는 방어시스템의 역할을 하지만, 체내의 활성산소 除去能의 장애로 인한 지나친 양의 활성산소는 단백질, DNA, 효소 및 T세포와 같은 면역계통의 인자를 손상시켜 질환을 일으키며 특히 불포화지방산을 공격하여 과산화반응을 일으켜

· 교신저자: 설인찬 대전광역시 중구 대흥동 22-5번지
대전대학교부속한방병원 뇌신경내과
TEL: 042-229-6805 FAX: 042-254-3403
E-mail: seolinch@dju.ac.kr

체내 과산화지질을 축적함으로써 생체기능을 저하시키고 동시에 노화 및 각종 성인병 질환을 유발하는 것으로 알려져 있다¹⁻³.

활성산소의 종류에는 대표적으로 superoxide radical(O_2^-), hydrogen peroxide(H_2O_2), hydroxyl radical(HO^\cdot), singlet oxygen(1O_2) 등 4가지가 있다. 활성산소를 제거하는 항산화 효소로는 O_2^- 를 제거하는 superoxide dismutase(SOD)효소, H_2O_2 를 제거하는 catalase, glutathione peroxidase(GPX)가 있고, 항산화물질로는 효소계의 작용을 받지 않는 HO^\cdot , 1O_2 등을 제거하는 vitamin C, vitamin E, uric acid, bilirubin 등이 있다⁴.

고지혈증은 혈청 중 triglyceride, cholesterol, phospholipid, free fatty acid 등의 지질이 혈액 내에 과도하게 증가되어 있는 상태를 말한다^{5,6}. 일반적으로 고지혈증이란 혈중 cholesterol이 240mg/dl 이상인 고cholesterol혈증이나 중성지방이 많은 고중성지방증을 지칭하며, 지질의 농도가 비정상적으로 상승된 상태를 말한다^{7,8}. 혈청지질의 증가는 혈액의 점도와 혈소판 응집력을 증가시켜 혈액순환 장애를 유발함으로써 고혈압, 동맥경화증, 뇌졸중, 허혈성심질환 등의 주요한 원인이 된다⁹.

한의학에서 고지혈증은 脾의 運化와 肝의 疏泄機能의 부족으로 濕濁의 重濁한 穢濁之氣가 체내에 停留되어 血脈에 濕濁, 瘀血 등이 발생하는 것으로 痰濁 濕濁 氣滯 血瘀 등의 범주에 포함시킬 수 있으며, 그 病因은 대부분 飲食不節, 運動不足, 七情內傷, 先天不足 및 臟腑機能失常 등이다^{10,11}.

최근의 고지혈증에 관한 연구로는 桑枝¹², 地骨皮¹³, 澤瀉¹⁴ 등의 단미제를 이용한 연구와 淸神導痰湯¹⁵, 除濕順氣湯¹⁶, 丹蔘飲¹⁷ 등의 한약복합제제를 이용한 연구들이 있었다.

이에 저자는 항산화활성과 고지혈증에 임상적으로 유효하다고 보고된 降脂通脈飲¹⁸을 선택하여 항산화 활성과 고지혈증에 미치는 효과를 실험적으로 규명하고자 하였다. 이에 독성 검사를 수행한 후, *in vitro*에서 DPPH 소거활성, SOD 유사활성,

ROS 활성에 미치는 영향을 측정하였고, *in vivo*에서 체중 및 간 중량, total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, triglyceride, glucose, albumin, 간조직, 대동맥, 지질과산화도의 변화에 미치는 영향과 간조직의 SOD 활성, catalase의 활성에 미치는 영향, hepatic ACAT, hepatic HMG-CoA의 변화에 미치는 영향을 측정하여 항산화 활성과 고지혈증에 대한 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實 驗

1. 재 료

1) 동물 및 사육조건

본 실험에 사용된 실험용 쥐는 체중 180~220g의 웅성 Sprague-Dawley (SD) rat이며, 실험 당일 까지 고형사료와 고cholesterol 식이사료 (Bio-serv, U.S.A.)를 자유 식이하면서 물을 충분히 공급하였다. 실온 $22 \pm 2^\circ C$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 조명시간 12시간 (07:00~19:00), 조도 150~300Lux로 설정하여 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 체중 변화가 일정하고 건강한 쥐만을 선별하여 실험에 사용하였다.

2) 약 재

본 실험에 사용한 降脂通脈飲 (Gangjitongmeakeum : GTE)의 구성 약물은 대전대학교 부속한방병원에서 구입하여 정선한 후 사용하였다 (Table 1).

3) 시약 및 기기

본 실험의 시약은 Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS-A), DNase type I, amphotericin B, ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), RPMI 1640, penicillin, pyrogallol, streptomycin, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 등을 사용하였고, 이 밖에 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

본 실험의 기기는 accoutered GC (Roche, Germany), ice-maker (Vision, Korea), serum separator (녹십

자, Korea), minos-ST (Cobas Co., France), centrifuge (Beckman Co., U.S.A.), rotary vacuum evaporator (Büchi 461, Switzerland), deep freezer (Sanyo Co., Japan) 등의 기기를 사용하였다.

Table 1. The Compositions of Gangjitungmeakeum (GTE)

Herbs	Scientific name	Amount (g)
하수오	<i>Polygoni Multiflori Radix</i>	15
금앵자	<i>Rosae Laevigatae Fructus</i>	15
결명자	<i>Cassiae Semen</i>	15
의이인	<i>Cocis Semen</i>	15
인진호	<i>Artemisiae Capillaris Hreba</i>	12
택 사	<i>Alismatis Rhizoma</i>	12
산 사	<i>Crataegii Fructus</i>	9
시 호	<i>Bupleuri Radix</i>	6
울 금	<i>Curcuae Radix</i>	6
주제대황	<i>Rhei Radix Et Rhizoma</i>	3
상기생	<i>Visci Herba</i>	6
단 삼	<i>Salviae Miltiorrhizae Radix</i>	6
Total amount		120

2. 방법

1) 약물 추출

시료 추출 방법은 GTE 2첩을 한약 유출기에 넣고, 증류수 1500ml와 같이 혼합하여 3시간 열탕하여 추출한 후 흡입 여과하였다. 이를 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하여 GTE를 분리한 후, 다시 freeze dryer에서 24시간 동결 건조하여 분말 16.3g을 얻었으며, 얻어진 분말은 초저온냉동고 (-80℃)에서 보관하면서, 실험에 따라 필요한 농도로 증류수에 희석하여 사용하였다.

2) 독성 검사

(1) 세포독성 측정

세포독성 측정은 MTT assay로 하였다. 배양한 hFCs를 96 well plate에 2×10^4 cell 씩 분주한 후 배양하고, 24시간 후 GTE를 500, 250, 125, 62.5, 32.15 ($\mu\text{g/ml}$)의 농도를 투여하였다. 다시 48시간 배양

후 부유액을 제거하고, 각 well에 MTT solution 100 μl 씩 첨가하여 4시간 동안 배양하였다. 배양 후 부유액을 제거하고 각 well에 100 μl 의 DMSO를 첨가하여 37℃ CO₂ 배양기에서 30분 동안 반응 시킨 후 ELISA reader를 사용하여 wave length 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) 간 독성 측정

실험 종료 후 혈액을 채취 해 혈청을 분리하여 AST, ALT 검사를 실시하였다.

3) In vitro

(1) 항산화 활성 측정

① 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 소거능 측정

150mM DPPH/EtOH 450 에 GTE를 500, 250, 125, 62.5 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 희석하여 50 μl 씩 첨가한 후 37℃에서 30분간 반응시켰다. 이를 흡광도 517nm에서 측정하여 아래의 방법으로 계산하였다.

$$\text{DPPH 소거능 (\%)} = \left(\frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{GTE 투여군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

② Superoxide dismutase (SOD) 유사활성 측정

GTE 0.2ml에 tris-HCl buffer(pH 8.5) 2.6ml과 7.2mM pyrogallol 0.2ml를 가하여 25℃에서 10분 반응 후 1 N HCl 0.1ml로 반응 정지시켰다. 반응액을 420nm에서 흡광도를 측정하고 buffer를 첨가한 것을 대조군으로 하여 아래와 같이 저해율을 측정하였다.

$$\text{SOD 유사활성 (\%)} = 100 - \left(\frac{\text{GTE 투여군의 흡광도}}{\text{buffer 첨가군의 흡광도}} \right) \times 100$$

4) In vivo

(1) 고cholesterol 사료에 의한 고지혈증 유발과 약물투여

각 실험군은 정상군, 대조군 그리고 GTE투여군으로 나누어 정상군은 일반 사료와 식수를 충분히 공급하였다. 대조군과 GTE투여군은 표2의 조성으로 만들어진 고cholesterol 식이와 식수를 충분히

공급하였으며 GTE투여군은 고cholesterol 식이 투여 2주 후부터 6주간 GTE를 몸무게 60kg의 성인이 하루 2첩을 음용하였을 때를 기준으로 143mg/kg/0.5ml의 양으로 정해진 시간에 매일 투여하였다.

(2) 체중 및 간 중량 측정

① 체중 변화 측정

체중 증가량은 고cholesterol 식이 투여를 시작한 주부터 6주간 매주 같은 시간에 측정하여 평균값을 산출하였고 식이 섭취량은 일정량의 식이를 투여하고 2일에 한 번씩 남은 식이의 중량을 측정하여 계산하였다.

② 간 중량 측정

6주간의 실험 종료 후 몸의 혈액을 제거한 후 간을 적출하여 중량을 측정하였다.

(3) 채혈 및 혈장 분리

GTE의 투여 종료 후 12시간 절식 후 ether로 마취시킨 다음 심장에서 12ml 이상의 혈액을 취하여 5ml를 15ml conical tube에 넣어 6,500rpm에 15분간

원심 분리시켜 혈청을 분리하였다. 나머지 6ml의 혈액을 EDTA가 첨가된 튜브에 넣어 혈장을 분리하였다.

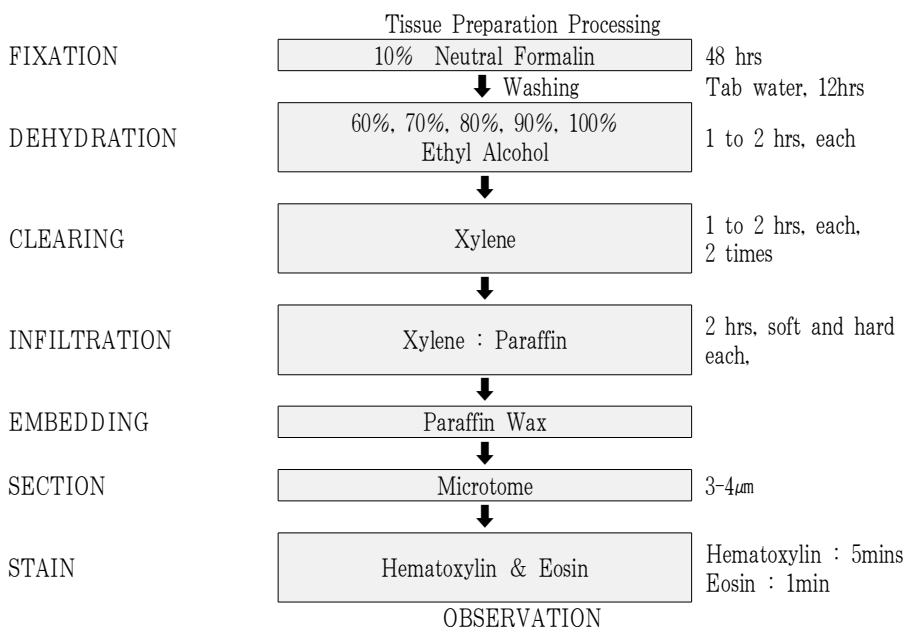
(4) 혈청 및 혈장 성분 측정

분리한 혈청은 생화학기기를 이용하여 total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, triglyceride, glucose 그리고 albumin을 측정하였다.

(5) Hematoxyline & eosin 염색

각 실험군 별로 적출한 간 조직을 10% 중성 포르말린에 48시간 고정하여 고정이 완료된 각 조직들은 흐르는 수돗물에서 12시간 수세하여 조직 내 고정액을 완전 제거하였다. 조직의 탈수를 위해 60%에서부터 100% 알코올에 이르기까지 농도 상승 순으로 통상의 방법에 따라 탈수하고, xylene에 투명과정을 거친 다음 파라핀 블록을 제작하였다. 제작된 블록은 박절기 (microtome)를 이용하여 3~4µm 두께로 절편을 만들어 탈 파라핀 및 함수 과정을 거친 다음 H&E 염색을 실시하여 광학현미경상에서 관찰하였다(Scheme 1).

Scheme 1. Tissue preparation processing



(6) 간조직의 효소활성측정

① 효소원 제조

적출한 간은 PBS로 세척하여 수분을 제거하고 1g의 간 조직에 10ml의 0.25M sucrose / 0.5mM ethyl diamine tetraacetic acid (EDTA) / 5mM N-2-hydroxyethyl-piperazine-N-2-ethane sulfonic acid (HEPES) 용액을 가하여 ultra homogenizer를 이용하여 빙냉 하에서 마쇄하였다. 마쇄한 용액을 4°C, 600xg로 15분간 원심 분리하여 핵 및 미마쇄 부분을 제거한 후 4°C, 8000xg로 30분간 원심 분리하여 1ml의 상등액을 TBARS 함량측정에 사용하였다.

② 과산화지질 (TBARS) 함량 측정

간조직의 과산화지질 정량은 Sato법¹⁹을 이용하여 측정하였다. 제조한 간 조직 효소원 0.5ml 에 TCA용액 2.5ml 를 가하여 잘 섞은 다음 실온에서 10분간 방치한 후 1500xg에서 10분간 원심분리하여 상등액을 버리고 침전물은 0.05M 황산으로 1회 세척 후 침전물에 0.05M 황산 2.5ml와 0.6% TBA 3.0 ml를 가하여 잘 섞은 후 95°C의 항온 수조에서 30분간 가열하였다. 가열 후 n-butanol:pyridine (15:1) 혼합액 3.0ml를 가하여 잘 섞은 후 1500xg에서 10분간 원심 분리하고 상등액을 취하여 530nm에서 흡광도를 측정하였다.

③ SOD 활성 측정

Oyanagui의 방법²⁰에 준하여 cytochrome c, 2 μ M xanthine sodium, 50mM sodium phosphate buffer의 기질액에 효소액을 넣고 안정화 시킨후 xanthine oxidase 50 μ l를 넣고 흡광도를 사용하여 550nm에서 2분간의 흡광도를 측정하였다. Xanthine/xanthine oxidase 반응으로 생성된 superoxide anion에 의해 cytochrome c가 환원되는 것을 측정하는데, SOD에 의해 superoxide anion의 양이 감소하여 cytochrome c가 변화하는 현상을 이용하여 SOD 활성을 측정하였다. Cytochrome c의 환원을 50% 억제하는 양을 SOD의 1unit로 정의 하였다.

④ Catalase 활성 측정

Aebi의 방법²¹을 이용하여 50mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) 2.89ml에 기질 30mM H₂O₂ 100 μ l를 넣어 25°C에서 5분간 반응 시켰다. 여기에 효소액 10 μ l를 가하여 다시 25°C, 240nm에서 5분간 흡광도를 측정하였다. H₂O₂ 흡광도 변화와 H₂O₂의 mole흡광계수로 농도를 구하여 효소활성도를 측정하였다. 효소활성의 단위는 1분당 1mg protein이 분해하는 hydrogen peroxide의 양을 μ mole로 표시하였다.

5) 통계 처리

본 실험에서 얻은 결과를 ANOVA (JAVA, Bonferroni Ver 1.1)로 분석하여 p값을 구하였다. 각 대조군을 정상군과, 실험군을 대조군과 비교하여 p<0.05 일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

III. 實驗結果

1. 독성 검사

1) 세포독성 평가

세포독성을 관찰한 결과 hFCs에서는 대조군의 세포생존율 100.0 \pm 0.6(%)에 대하여, GTE의 500, 250, 125, 62.5, 31.25(μ g/ml) 농도에서 각각 84.5 \pm 0.3, 88.6 \pm 0.4, 91.4 \pm 0.3, 95.8 \pm 0.7, 100.9 \pm 1.0(%)로 나타났다(Fig. 1).

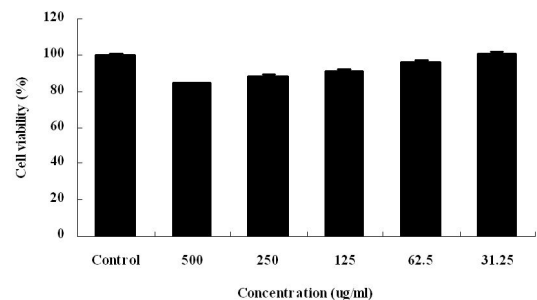


Fig. 1. Cytotoxicity of GTE on hFCs.

hFCs were treated with various concentration (500, 250, 125, 62.5, 31.25 μ g/ml) of the GTE extract.

2) 간 독성 평가

간 기능 측정의 지표 성분인 AST는 대조군이 348.3±58.0(IU/l), 정상군이 140.2±7.2(IU/l)로 나타났다. GTE 투여군에서는 149.3±21.6(IU/l)로 대조군에 비하여 유의성 있는(+: P <0.01) 감소를 나타냈다. ALT 수치에서는 대조군이 107.7±54.3(IU/l), 정상군이 44.0±4.2(IU/l)로 나타났다. GTE 투여군에서 51.5±4.9(IU/l)로 대조군에 비하여 유의성 있는(+ : P <0.05) 감소를 나타냈다. 결과적으로 GTE 투여군은 AST와 ALT의 수치가 정상 범위로 나타나 약물에 의한 간 독성은 발견되지 않았다(Fig. 2).

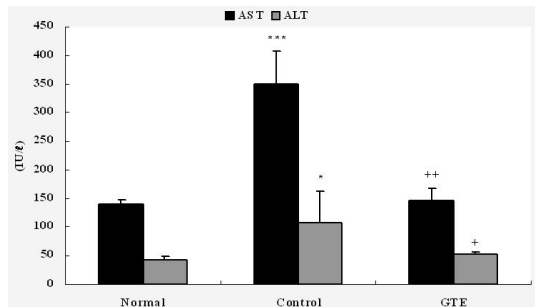


Fig. 2. Effect of GTE on the AST and ALT in rat fed high cholesterol diets.

Normal : Normal SD rat group.
 Control : High cholesterol diet and normal saline (day/0.5ml) treated group
 GTE : High cholesterol diet and GTE (143mg/day/0.5ml) treated group
 Values represent the means ± SD of 6 rats.
 *** : P <0.001, * : P <0.05 compared with normal group. ++ : P <0.01, + : P <0.05 compared with control group.

2. In vitro

1) 항산화 활성에 미치는 영향

(1) DPPH 소거활성에 미치는 영향

DPPH의 소거활성은 62.5, 125, 250, 500(μg/ml) 농도에서 각각 16.9±0.4, 39.5±4.2, 57.7±4.2, 78.5±2.4(%)의 소거 활성 효과를 나타내었다 (Fig. 3).

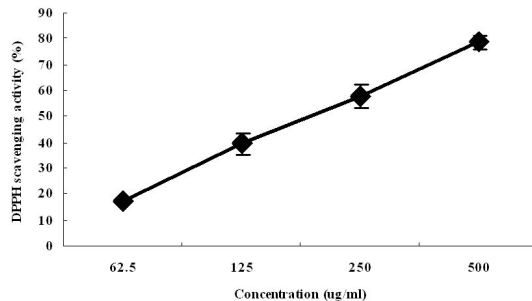


Fig. 3. Scavenging activity of GTE on DPPH free radical.

GTE were reacted with DPPH for 30minutes at 37°C, and the absorbance at 517nm due to DPPH radical was determined. The results are the mean ± SD of three independent experiments.

(2) SOD 유사활성에 미치는 영향

SOD나 SOD 유사 물질에 의해서만 항산화 활성을 나타내는 pyrogallol을 이용하여 GTE의 항산화 활성을 측정된 결과 62.5, 125, 250, 500(μg/ml)의 농도에서 각각 11.5±1.6, 18.7±3.6, 38.9±0.4, 52.8±2.2(%)의 항산화 활성 효과를 나타내었다(Fig. 4)

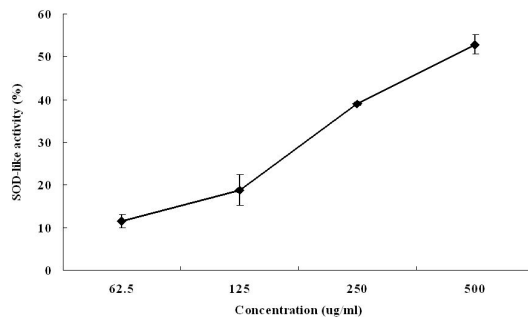


Fig. 4. SOD- like activity of GTE

SOD-like activity of GTE at final concentration 62.5, 125, 250, 500(μg/ml). The results are the mean ± SD of three independent experiments.

3. In vivo

1) 간 중량 변화에 미치는 영향

고cholesterol 식이에 의한 고지혈 유발 쥐의 간의 중량을 측정된 결과, 대조군은 30.1±2.8(g)으로 나타났고, 정상군은 10.3±1.1(g)으로 나타났다. GTE 투

여군에서는 22.4 ± 3.8 (g)로 대조군에 비하여 유의성 있는 (+ : $P < 0.05$) 감소를 나타냈다(Fig. 5).

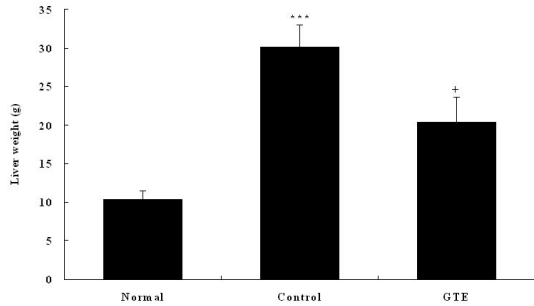


Fig. 5. Effect of GTE on the liver weight in rat fed high cholesterol diets.

Normal : Normal SD rat group.
 Control : High cholesterol diets and normal saline (day/0.5ml) treated group
 GTE : High cholesterol diets and GTE (143 mg/day/0.5ml) treated group
 Values represent the means \pm SD of 6 rats.
 *** : $P < 0.001$ compared with normal group. + : $P < 0.05$ compared with control group.

2) Cholesterol 변화에 미치는 영향

(1) Total cholesterol의 변화에 미치는 영향

실험 종료 후 rat의 혈청 내 total cholesterol의 변화를 분석한 결과, 대조군에서는 295.4 ± 57.5 (mg/dl)로 나타났고, 정상군은 95.5 ± 10.9 (mg/dl)로 나타났다. GTE 투여군에서는 185.5 ± 55.9 (mg/dl)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (++) : $P < 0.01$) 감소 효과를 나타내었다(Fig. 6).

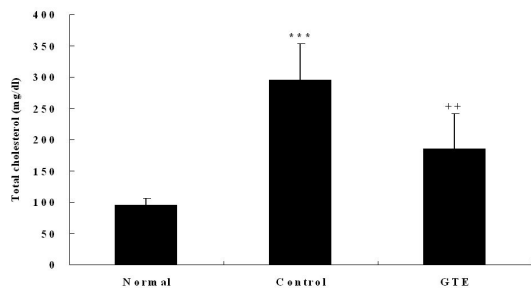


Fig. 6. Effect of GTE on the total cholesterol level in rat fed high cholesterol diets.

Normal : Normal SD rat group.

Control : High cholesterol diets and normal saline (day/0.5ml) treated group

GTE : High cholesterol diets and GTE (143 mg/day/0.5ml) treated group

Values represent the means \pm SD of 6 rats.

*** : $P < 0.001$ compared with normal group.

++ : $P < 0.01$ compared with control group.

(2) LDL cholesterol의 변화에 미치는 영향

실험 종료 후 rat의 혈청 내 LDL cholesterol의 변화를 분석한 결과, 대조군에서는 210.9 ± 38.7 (mg/dl)로 나타났고, 정상군은 23.7 ± 2.6 (mg/dl)로 나타났다. GTE 투여군에서는 121.4 ± 43.1 (mg/dl)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (++) : $P < 0.01$) 감소 효과를 나타내었다(Fig. 7).

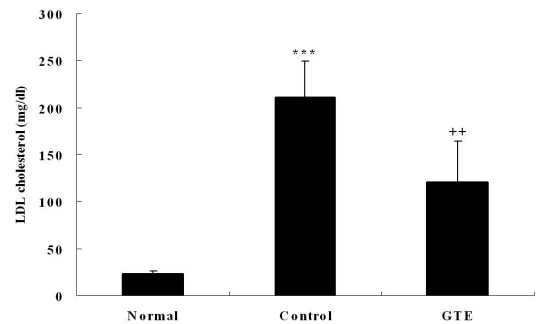


Fig. 7. Effect of GTE on the LDL cholesterol level in rat fed high cholesterol diets.

Normal : Normal SD rat group.

Control : High cholesterol diets and normal saline (day/0.5ml) treated group

GTE : High cholesterol diets and GTE (143 mg/day/0.5ml) treated group

Values represent the means \pm SD of 6 rats.

*** : $P < 0.001$ compared with normal group.

++ : $P < 0.01$ compared with control group.

3) Triglyceride 변화에 미치는 영향

실험 종료 후 rat의 혈청 내 triglyceride의 변화를 분석한 결과, 대조군에서는 94.8 ± 14.9 (mg/dl)로 나타났고, 정상군은 54.4 ± 5.9 (mg/dl)로 나타났다. GTE 투여군에서는 76.5 ± 13.2 (mg/dl)로 나타나 대조군에 비하여 감소하였으며, 유의성 있는 (+ : $P < 0.05$)

감소를 나타내었다 (Fig. 8).

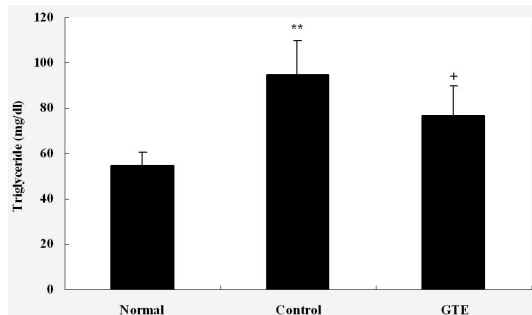


Fig. 8. Effect of GTE on the triglyceride level in rat fed high cholesterol diets.

Normal : Normal SD rat group.
 Control : High cholesterol diets and normal saline (day/0.5ml) treated group
 GTE : High cholesterol diets and GTE (143 mg/day/0.5ml) treated group
 Values represent the means \pm SD of 6 rats.
 + : P <0.05 compared with normal group.

4) Glucose 변화에 미치는 영향

실험 종료 후 rat의 혈청 내 glucose의 변화를 분석한 결과, 대조군에서는 187.6 ± 32.9 (mg/dl)로 나타났고, 정상군은 86.0 ± 5.6 (mg/dl)로 나타났다. GTE 투여군에서는 137.5 ± 9.1 (mg/dl)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (++) : P <0.01) 감소 효과를 나타내었다(Fig. 9).

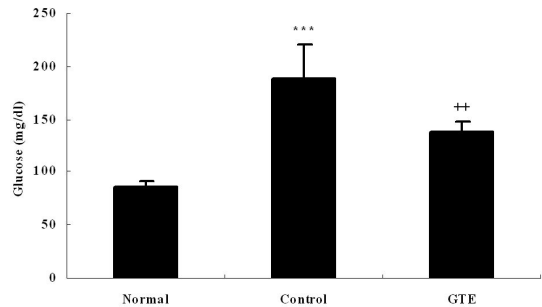


Fig. 9. Effect of GTE on the glucose level in rat fed high cholesterol diets.

Normal : Normal SD rat group.
 Control : High cholesterol diets and normal saline (day/0.5ml) treated group
 GTE : High cholesterol diets and GTE (143 mg/day/0.5ml) treated group
 Values represent the means \pm SD of 6 rats.
 *** : P <0.001 compared with normal group.
 ++ : P <0.01 compared with control group.

5) 간조직 변화에 미치는 영향

실험 종료 후 간을 적출하여 염색한 결과 대조군에서는 간세포에서 지방질 축적에 의한 광범위한 지방공포 (화살표) 병변 소견이 나타난 반면, GTE 투여군에서는 상대적으로 간 세포내 지방공포 병변이 감소되었으며, 간세포의 핵이 정상 조직과 유사한 모양으로 관찰되었다(Fig. 10).

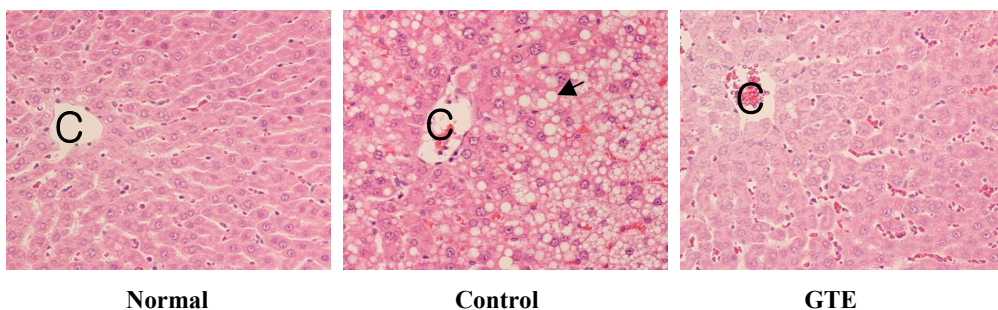


Fig. 10. Representative microscope photographs of liver stained with hematoxylin and eosin.

Normal : Normal SD rat group.
 Control : High cholesterol diets and normal saline (day/0.5ml) treated group
 GTE : High cholesterol diets and GTE (143mg/day/0.5ml) treated group

6) 지질과산화도 변화에 미치는 영향

실험 종료 후 간 조직에서 과산화지질의 함량을 관찰한 결과 대조군에서는 27.9 ± 3.3 (nmol/mg)으로 나타났고, 정상군은 5.9 ± 1.3 (nmol/mg)으로 나타났다. GTE 투여군에서는 17.1 ± 2.4 (nmol/mg)로 대조군에 비하여 유의성 있는 ($++ : P < 0.01$) 감소를 나타냈다(Fig. 11).

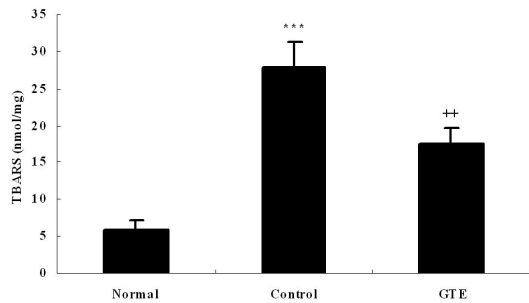


Fig. 11. Effect of GTE on hepatic thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) value in rat fed high cholesterol diets.

Normal : Normal SD rat group.
 Control : High cholesterol diets and normal saline (day/0.5ml) treated group
 GTE : High cholesterol diets and GTE (143 mg/day/0.5ml) treated group
 Values represent the means ± SD.
 *** : P < 0.001 compared with normal group.
 ++ : P < 0.01 compared with control group.

7) 간조직의 항산화 효소활성에 미치는 영향

(1) SOD 활성에 미치는 영향

실험 종료 후 간 조직에서 SOD의 함량을 측정 한 결과 대조군에서는 $4.9 \pm$

0.7 (unit/mg protein)으로 나타났고, 정상군은 12.9 ± 0.3 (unit/mg protein)으로 나타났고, GTE 투여군에서는 11.2 ± 0.2 (unit/mg protein)으로 대조군에 비하여 유의성 있는 ($+ : P < 0.05$) 증가를 나타냈다 (Fig. 12).

(2) Catalase의 활성에 미치는 영향

실험 종료 후 간 조직에서 catalase의 함량을 측정한 결과 대조군에서는 9.1 ± 0.9 (nmol/mg protein)

으로 나타났고, 정상군은 12.9 ± 0.3 (nmol/mg protein)으로 나타났고, GTE 투여군에서는 11.2 ± 0.2 (nmol/mg protein)으로 대조군에 비하여 유의성 있는 ($+ : P < 0.05$) 증가를 나타냈다(Fig. 13).

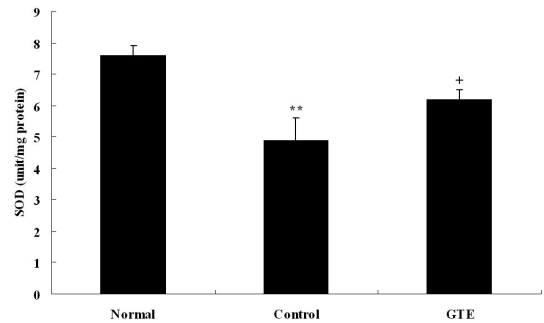


Fig. 12. Effect of GTE on hepatic SOD value in rat fed high cholesterol diets.

Normal : Normal SD rat group.
 Control : High cholesterol diets and normal saline (day/0.5ml) treated group
 GTE : High cholesterol diets and GTE (143 mg/day/0.5ml) treated group
 Values represent the means ± SD.
 ** : P < 0.01 compared with normal group. + : P < 0.05 compared with control group.

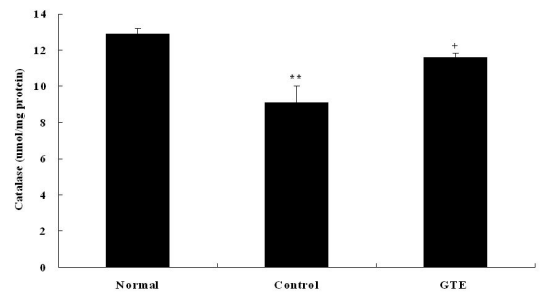


Fig. 13. Effect of GTE on hepatic catalase value in rat fed high cholesterol diets.

Normal : Normal SD rat group.
 Control : High cholesterol diets and normal saline (day/0.5ml) treated group
 GTE : High cholesterol diets and GTE (143 mg/day/0.5ml) treated group
 Values represent the means ± SD. ** : P < 0.01 compared with normal group. + : P < 0.05 compared with control group.

8) 간 조직의 cholesterol 인자 발현에 미치는 영향

(1) Hepatic ACAT의 변화에 미치는 영향

간 조직에서의 ACAT의 mRNA 유전자 발현은 대조군의 유전자 발현을 1.0 ± 0.02 (RQ)로 했을 때 정상군은 0.1 ± 0.01 (RQ)로 나타났다. GTE 투여군에서는 0.6 ± 0.02 (RQ)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (++) : $P < 0.01$ 감소를 나타냈다(Fig. 14).

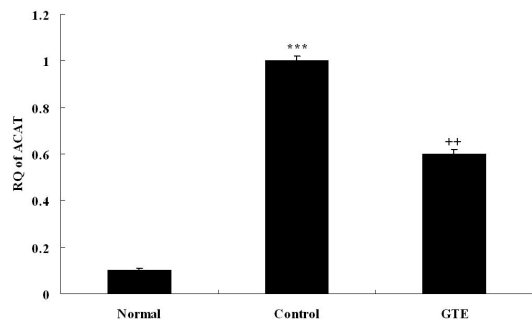


Fig. 14. Effects of GTE on the expression of ACAT mRNA level in the liver of rat fed high cholesterol diets.

Normal : Normal SD rat group.
Control : High cholesterol diets and normal saline (day/0.5ml) treated group
GTE : High cholesterol diets and GTE (143mg/day/0.5ml) treated group
Values represent the means \pm SD. *** : $P < 0.001$ compared with normal group. ++ : $P < 0.01$ compared with control group.

(2) Hepatic HMG-CoA의 변화에 미치는 영향
간 조직에서의 HMG-CoA reductase의 mRNA 유전자 발현은 대조군의 유전자 발현을 1.02 ± 0.03 (RQ)로 했을 때 정상군은 0.35 ± 0.07 (RQ)로 나타났다. GTE 투여군에서는 0.61 ± 0.02 (RQ)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (+++) : $P < 0.001$ 감소를 나타냈다(Fig. 15).

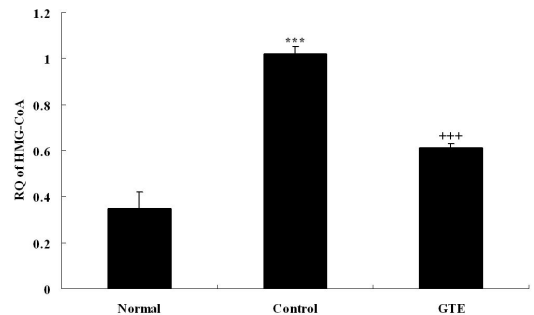


Fig. 15. Effects of GTE on the expression of HMG-CoA reductase mRNA level in the liver of rat fed high cholesterol diets.

Normal : Normal SD rat group.
Control : High cholesterol diets and normal saline (day/0.5ml) treated group
GTE : High cholesterol diets and GTE (143mg/day/0.5ml) treated group
Values represent the means \pm SD. *** : $P < 0.001$ compared with normal group. +++ : $P < 0.001$ compared with control group.

IV. 考 察

본 실험에서는 저자는 降脂通脈飲이 항산화 활성과 고지혈증에 대한 무독성을 검증하기 위하여 세포독성과 간독성에 미치는 영향을 검사하였고, 항산화 활성측정으로는 DPPH 소거활성, SOD 유사활성, ROS 활성에 미치는 영향을 측정하였으며, 체중 및 간 중량의 변화에 미치는 영향을 측정하였고, total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, triglyceride, glucose, albumin을 측정하였으며, 간조직, 대동맥의 조직학적 변화를 관찰하고, 지질과산화도의 변화에 미치는 영향을 측정하였다. 간조직의 SOD 활성, catalase의 활성에 미치는 영향을 측정하고, Hepatic ACAT, Hepatic HMG-CoA의 변화에 미치는 영향을 측정하였다.

降脂通脈飲은 〈心血管科專病中醫臨床診治〉¹⁸에 기재되어 있는 처방으로 何首烏, 金櫻子, 決明子, 薏苡仁, 茵陳蒿, 澤瀉, 山查, 柴胡, 鬱金, 酒製大黃, 桑寄生, 丹蔘으로 구성되고 祛濕痰, 祛瘀, 補陰, 補

血, 淸熱의 효능이 있어, 正虛邪滯高脂血症에 사용한다.

GTE의 500, 250, 125, 62.5, 31.25($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 세포의 생존율을 측정된 결과 GTE 31.25($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 가장 높은 생존율을 보였다(Fig.1).

본 실험에서 간 기능 측정의 지표 성분인 AST는 대조군이 348.3 ± 58.0 (IU/ ℓ), 정상군이 140.2 ± 7.2 (IU/ ℓ)로 나타나 정상군에 비하여 대조군에서 유의성 있는 (***) : $P < 0.001$) 증가를 보였다. GTE 투여군에서는 149.3 ± 21.6 (IU/ ℓ)로 대조군에 비하여 유의성 있는 (** : $P < 0.01$) 감소를 나타냈다. ALT 수치에서는, 대조군이 107.7 ± 54.3 (IU/ ℓ), 정상군이 44.0 ± 4.2 (IU/ ℓ)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는 (+ : $P < 0.05$) 증가를 나타냈다. GTE 투여군에서 51.5 ± 4.9 (IU/ ℓ)로 대조군에 비하여 유의성 있는 (+ : $P < 0.05$) 감소를 나타냈다. 결과적으로 GTE 투여군은 AST와 ALT의 수치가 정상 범위로 나타나 약물에 의한 간 독성은 발견되지 않았다 (Fig. 2). AST ALT 수치가 GTE 투여군에서 유의성 있는 감소를 보였다는 것은, 고지질식을 시킨 쥐에게 있어 지질대사이상으로 인한 간 손상을 억제 하는 효과가 있는 것으로 생각된다.

위의 실험에서 降脂通脈飲은 세포독성 및 간독성을 일으킬 만한 요소가 없는 것으로 판단된다.

DPPH의 소거 활성은 62.5, 125, 250, 500($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 각각 16.9 ± 0.4 , 39.5 ± 4.2 , 57.7 ± 4.2 , 78.5 ± 2.4 (%)의 소거 활성 효과를 나타내어 500($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 가장 높게 나왔다(Fig.3).

Pyrogallol을 이용하여 GTE의 항산화 활성을 측정된 결과 62.5, 125, 250, 500($\mu\text{g}/\text{ml}$)의 농도에서 각각 11.5 ± 1.6 , 18.7 ± 3.6 , 38.9 ± 0.4 , 52.8 ± 2.2 (%)의 항산화 활성 효과를 나타내어 농도 의존적으로 DPPH 소거 활성이 높게 나타났다(Fig. 4).

고cholesterol 식이에 의한 고지혈 유발 쥐의 간의 중량을 측정된 결과, 대조군이 30.1 ± 2.8 (g), 정상군은 10.3 ± 1.1 (g)로 나타나 유의성 있는 (***) : P

< 0.001) 증가를 나타냈고 GTE 투여군에서는 22.4 ± 3.8 (g)로 대조군에 비하여 유의성 있는 (+ : $P < 0.05$) 감소를 나타냈다(Fig. 5).

Rat의 혈청 내 total cholesterol의 변화를 분석한 결과, 대조군에서는 295.4 ± 57.5 (mg/dl)로 정상군의 95.5 ± 10.9 (mg/dl)에 비하여 유의성 있는 (***) : $P < 0.001$) 증가를 나타냈으며, GTE 투여군에서는 185.5 ± 55.9 (mg/dl)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (++) : $P < 0.01$) 감소 효과를 나타내었다 (Fig. 6).

혈청 내 LDL cholesterol의 변화를 분석한 결과, 대조군에서는 210.9 ± 38.7 (mg/dl)로 정상군의 23.7 ± 2.6 (mg/dl)에 비하여 유의성 있는 (***) : $P < 0.001$) 증가를 나타냈으며, GTE 투여군에서는 121.4 ± 43.1 (mg/dl)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (++) : $P < 0.01$) 감소 효과를 나타내었다(Fig. 7). LDL의 유의성 있는 감소는 고지혈증을 감소시키는 효과가 있는 것을 의미한다.

혈청 내 triglyceride의 변화를 분석한 결과, 대조군에서는 94.8 ± 14.9 (mg/dl)로 정상군의 54.4 ± 5.9 (mg/dl)에 비하여 유의성 있는 (** : $P < 0.05$) 증가를 나타냈으며, GTE 투여군에서는 76.5 ± 13.2 (mg/dl)로 나타나 대조군에 비하여 감소하였으며 유의성 있는 (* : $P < 0.05$) 감소를 나타내었다(Fig. 8).

혈청 내 glucose의 변화를 분석한 결과, 대조군에서는 187.6 ± 32.9 (mg/dl)로 정상군의 86.0 ± 5.6 (mg/dl)에 비하여 유의성 있는 (***) : $P < 0.001$) 증가를 나타냈으며, GTE 투여군에서는 137.5 ± 9.1 (mg/dl)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (++) : $P < 0.01$) 감소 효과를 나타내었다(Fig. 9).

간을 적출하여 염색한 결과 대조군에서는 간세포에서 지방질 축적에 의한 광범위한 지방공포 병변 소견이 나타난 반면, GTE 투여군에서는 상대적으로 간 세포내 지방 공포 병변이 감소되었으며, 간세포의 핵이 정상 조직과 유사한 모양으로 관찰되었다(Fig. 10).

간 조직에서 과산화지질의 함량을 관찰한 결과

대조군에서 27.9 ± 3.3 (nmol/mg)으로 정상군의 5.9 ± 1.3 (nmol/mg)에 비하여 유의성 있게 (***) : $P < 0.001$) 증가하였으며 GTE 투여군에서는 17.1 ± 2.4 (nmol/mg)로 대조군에 비하여 유의성 있는 (++) : $P < 0.01$) 감소를 나타냈다(Fig. 11).

간 조직의 SOD의 함량을 측정한 결과 대조군에서 4.9 ± 0.7 (unit/mg protein)로 정상군의 7.6 ± 0.3 (unit/mg protein)에 비하여 유의성 있게 (** : $P < 0.01$) 감소하였으며 GTE 투여군에서는 6.0 ± 0.2 (unit/mg protein)로 대조군에 비하여 유의성 있는 (+ : $P < 0.05$) 증가를 나타냈다(Fig. 12).

간 조직에서 catalase의 함량을 측정한 결과 대조군에서 9.1 ± 0.9 (nmol/mg protein)으로 정상군의 12.9 ± 0.3 (nmol/mg protein)에 비하여 유의성 있게 (** : $P < 0.01$) 감소하였으며 GTE 투여군에서는 11.2 ± 0.2 (nmol/mg protein)로 대조군에 비하여 유의성 있는 (+ : $P < 0.05$) 증가를 나타냈다(Fig. 13).

간 조직에서의 ACAT의 mRNA 유전자 발현은 대조군의 유전자 발현을 1.0 ± 0.02 (RQ)로 했을 때 정상군은 0.1 ± 0.01 (RQ)로 나타나 정상군에 비하여 대조군에서 유의성 있는 (***) : $P < 0.001$) 증가를 나타냈으며, GTE 투여군에서 0.6 ± 0.02 (RQ)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (++) : $P < 0.01$) 감소를 나타냈다(Fig. 14). 간 조직에서의 HMG-CoA reductase의 mRNA 유전자 발현은 대조군의 유전자 발현을 1.02 ± 0.03 (RQ)로 했을 때 정상군은 0.35 ± 0.07 (RQ)로 나타나 정상군에 비하여 대조군에서 유의성 있는 (***) : $P < 0.001$) 증가를 나타냈으며, GTE 투여군에서 0.61 ± 0.02 (RQ)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (+++) : $P < 0.001$) 감소를 나타냈다(Fig. 15).

이상의 결과를 보면 GTE는 세포독성 및 간 독성 검사에서 독성이 발견되지 않았다. DPPH 소거활성, SOD 유사활성의 효과도 있었으며, 대조군에 비하여 ROS의 생성량도 감소하는 효과를 보였다. 체중은 대조군에 비하여 유의성은 없으나 감소하였고, 간 중량은 대조군에 비하여 유의성 있는 감

소를 나타냈다. Total cholesterol, LDL cholesterol은 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타냈으며, HDL cholesterol은 대조군에 비하여 증가하는 효과를 나타내었으나 유의성은 없었다.

Triglyceride, glucose는 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 나타냈으며, albumin은 실험군 간의 차이는 거의 없었다. 간 조직에 있어서는 대조군에 비해 간 세포내 지방 공포 병변이 감소되었으며, 간세포의 핵이 정상 조직과 유사한 모양으로 관찰되었다. 대동맥 혈관 벽의 내피세포가 대조군에 비해 규칙적이며 혈관 벽의 경계면이 뚜렷하게 보였다. 지질과산화도는 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타냈다. 간 조직에서 SOD와 catalase의 함량은 대조군에 비하여 유의성 있는 증가를 나타냈다. 간 조직에서의 ACAT와 HMG-CoA reductase의 mRNA 유전자 발현은 대조군에 비하여 유의성 있는 (++) : $P < 0.01$) 감소를 나타냈다.

그 동안 항산화와 고지혈증에 대한 많은 실험적 연구가 되어왔다. 고지혈증 환자가 하나의 병만을 가지고 있는 것이 아니고 여러 가지 다른 성인병들을 동반하고 있는 경우가 많다. 또한, 개개인의 생활습관과도 밀접한 관련성이 있으므로 앞으로 더욱 지속적으로 많은 연구를 통해 다양한 양상의 고지혈증도 연구해야 한다고 사료된다.

V. 結 論

降脂通脈飲의 항산화 활성과 고지혈증에 미치는 효과에 대해 실험적으로 규명을 위하여, 세포독성, 간 독성, DPPH 소거활성, SOD 유사활성, ROS 활성, 체중 및 간 중량, total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, triglyceride, glucose, albumin, 간조직, 대동맥, 지질과산화도, 간조직의 SOD와 catalase 활성, Hepatic ACAT, Hepatic HMG-CoA를 측정한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 降脂通脈飲은 hFCs에서 세포독성 및 고지혈증 생쥐에서 간 독성이 없는 것으로 나타났다. DPPH 소거활성과 SOD 유사활성을 나타냈다.
2. 降脂通脈飲 투여군은 ROS의 생성량, 간 중량, total cholesterol, LDL cholesterol, triglyceride, glucose, 지질과산화도, Hepatic ACAT와 Hepatic HMG-CoA, 간 세포내 지방 공포 병변을 감소시켰으며 간세포의 핵도 정상 조직과 유사한 모양을 나타내었고, 대동맥 세포가 규칙적이며 혈관 벽의 경계면이 뚜렷하게 보였다.
3. 降脂通脈飲 투여군은 SOD와 catalase의 활성을 유의성 있게 증가시켰다.
이상의 결과 降脂通脈飲이 항산화 작용 및 고지혈증에 유효함을 실험적으로 관찰하여 임상적으로는 세포보호 및 고지혈증에 활용 될 수 있을 것으로 생각된다.

參考文獻

1. Fukuzawa K, Takaishi Y. Antioxidants. J Act Oxyg Free Rad. 1990;1:55-70.
2. Halliwell B. Drug antioxidant effects. Drugs. 1991;42:569-605.
3. Hatano T. Constituents of natural medicines with scavenging effects on active oxygen species-Tannins and related polyphenols-. Natural Medicines. 1995;49:357-63.
4. Blois MS. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. Nature. 1969;4617:1198.
5. 高文社編輯部. 臨床檢査提要. 서울: 高文社; 1991. p. 429-31.
6. 醫學教育研修院. 家庭醫學. 서울: 大學校出版部; 1993. p. 259-62, 302-3.
7. 박영배. 고지혈증. Medical Postgraduates. 2003; 31:160-5.
8. 의료보험관리공단. 성인병 예방과 관리. 서울: 의료보험관리공단; 1993. p. 25.
9. 진귀연, 양사수. 實用中西醫結合診斷治療學. 서울: 一中社; 1992. p. 689-91.
10. 전국한의과대학 심계내과학교실. 心系內科學. 서울: 군자출판사; 2006. p. 169-73.
11. 鄭遇悅, 安圭錫. 韓方臨床病理學. 서울: 永林社; 1998. p. 545.
12. 鄭南燮. 桑枝가 實驗的 高脂血症의 豫防 및 治療效果에 미치는 影響. 慶熙大學校大學院. 1996. p. 90-1
13. 이성두, 박순달, 변준철. 地骨皮가 高脂脂肪食餌로 誘發된 白鼠의 高脂血症에 미치는 影響. 大韓韓方內科學會誌. 1998;19(2):347-66.
14. 최장선, 박순달, 변준철. 澤瀉가 白鼠의 高脂血症에 미치는 影響에 關한 研究. 大韓韓方內科學會誌. 1998;19(2):392-410.
15. 이원구, 김동희. 淸神導痰湯이 食餌性 高脂血症 動物 病態에 미치는 影響. 大田大學校大學院 韓醫學碩士學位論文. 2005.
16. 김정현, 조현경, 유호룡, 설인찬, 김윤식. 除濕順氣湯이 高脂血症 病態 모델에 미치는 影響. 大田大學校大學院 韓醫學碩士學位論文. 2005.
17. 김병철, 이은주, 박치상, 박창국. 丹蔘飲이 高脂血症에 미치는 影響. 大韓韓方內科學會誌. 2000 ;21(1):126-34.
18. 黃春林. 心血管科專病中醫臨床診治. 北京: 人民衛生出版社; 2007. p. 119.
19. Sato N, Fujii K, Yuge O. In vivo and in vitro sevoflurane-induced lipid peroxidation in guinea-pig liver microsomes. Pharmacol Toxicol. 1994 Dec;75(6):366-70.
20. Oyanagui Y. Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. Anal Biochem. 1984 Nov 1;142(2):290-6.
21. Aebi H. Catalase in vitro. Methods Enzymol. 1984;105:121-6.