

고지방 식이로 유발된 고지혈증 동물 모델에서 枸杞子加味方的 효과 연구

안가영, 조재준, 신민구, 전상윤
동신대학교 한의과대학 내과학교실

Study of the Effects of *Gugijagami-bang* in a Hyperlipidemic Animal Model Induced with a High-Fat Diet

Ga-young An, Jae-joon Joe, Min-koo Shin, Sang-yun Jeon
Dept. of Internal Medicine, College of Korean Medicine, Dong-Shin University

ABSTRACT

Objectives: This study was undertaken to investigate the effects of *Gugijagami-bang* (GGB) in a hyperlipidemic animal model induced by a high-fat diet using diverse biological methods.

Methods: This study was to determine whether fractionated GGB extracts inhibit reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) in RAW 264.7 cells. Hyperlipidemia was induced by a high-fat diet fed for 6 weeks. Total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, triglyceride, liver function and histologic change of liver were measured after oral administration of GGB.

Results:

1. DPPH scavenging bow performance was increased in a concentration-dependent manner by GGB.
2. Compared to the control group, NO production (%) and ROS production (%) were decreased significantly by GGB.
3. Total-cholesterol, LDL-cholesterol, triglyceride were decreased significantly by GGB.
4. HDL cholesterol increased more than the control group, but not significantly.
5. In histopathologic examination, fatty liver (hepatic steatosis) was inhibited, almost no rounds of fat were observed in the liver.

Conclusions: GGB would appear effective in the prevention and treatment of atherosclerosis, ischemic heart disease, other cardiovascular diseases caused by hyperlipidemia.

Key words: *Gugijagami-bang*, hyperlipidemia, RAW 264.7 cell, antioxidant activity

1. 서 론

현대사회는 서구화된 식생활 습관으로 탄수화물, 지방, 단백질의 과다 섭취와 운동이 부족해짐에 따

라 혈액 내 콜레스테롤 및 지방 축적이 증가되고 있다¹. 특히 체내에 과잉 축적된 지방은 생체 내의 에너지 대사에 직접적으로 영향을 주어 열량소비 저하, 지방산화의 억제 및 혈액 내 유리지방산의 과잉², 혈중 지질과산화의 촉진, 중성지방의 증가, 당대사의 이상, 인슐린의 분비와 감수성의 약화 등³, 생체 내 대사산물의 생성과 기능에 이상을 초래하고, 이로 인해 아니라 심장질환, 등의 각종 성인병 및 만성 질환을 유발한다⁴. 특히 고지혈증은 죽상

· 교신저자: 전상윤 광주시 남구 월산로 141번지
동신대학교 광주한방병원 한방내과
TEL: 062-350-7207 FAX: 062-350-7141
E-mail: damiano70@hanmail.net

· 이 논문은 2013년도 동신대학교 일반대학원 한의학 박사학위 논문임.

경화증을 일으키고, 이는 우리나라 주요 사망원인인 심혈관과 뇌혈관 질환의 주요 위험인자가 되고 있다¹.

한의학에서 고지혈증은 痰飲, 瘀血, 氣滯, 寒凝, 虛勞 등의 범주에 속하며⁵, 嗜食肥甘厚味の 外因과 肝脾腎 機能失調의 內因으로 인해 濕濁, 火熱, 脾胃濕熱 등의 원인에 의해 발생하는 것으로 인식하고 있다⁶.

고지혈증에 대한 한의학적 연구로는 정⁷의 加味溫膽湯, 황⁸의 茵陳胃苓湯, 차⁹의 降脂通脈飲, 유¹⁰의 夏枯草散 박¹¹의 加味地黃湯 등 처방과 茵陳蒿¹², 枳實¹³, 白何首烏¹⁴, 丹蔘¹⁵ 등 약재를 이용하여 고지혈증에 대한 효과를 실험적으로 증명하고, 이에 대한 기전을 밝히려는 연구가 이루어지고 있다. 특히 枸杞子는 고지혈증에 대한 실험 연구가 활발히 연구되고 있다¹⁶⁻¹⁸.

枸杞子加味方은 현재 동신대학교 한방병원에서 고지혈증에 활용되고 있는 처방으로 滋補肝腎 益精明目하는 枸杞子를 군약으로 하여 生地黃, 丹蔘, 牧丹皮, 甘菊, 山查肉, 石菖蒲, 麥門冬, 黃連, 梔子, 柴胡, 黃芩, 防風 등으로 구성되어 있다.

임상적으로 혈중 지질이 감소하는 효과를 나타내는 枸杞子加味方에 대하여 실험적으로 규명하고, 기전을 밝히고자 연구하게 되었다.

이에 저자는 枸杞子加味方 추출물을 Raw 264.7 cell을 이용하여 세포독성, DPPH 소거능, NO 생성 억제, ROS 활성효과를 측정하고, 고지혈증 질환 모델동물인 6주령의 수컷 ApoE(k/o) 생쥐를 이용하여 간 및 신 독성, 혈중 인자 등을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재 료

1) 약 재

본 실험에 사용한 枸杞子加味方 (Gugijagami-bang, GGB)의 구성 약물은 대전대학교 부속한방병원에

서 구입하여 정선한 후 사용하였다. 한첩 분량은 아래와 같다(Table 1).

Table 1. The Compositions of Gugijagami-bang (GGB)

Herbal name	Scientific name	Volume (g)
枸杞子	<i>Lycii Fructus</i>	20
生地黃	<i>Rehmanniae Radix</i>	8
丹蔘	<i>Salvia miltiorrhiza Bunge</i>	8
牧丹皮	<i>Moutan Cortex</i>	6
甘菊	<i>Chrysanthemi Flos</i>	6
山查肉	<i>Crataegi Fructus</i>	6
石菖蒲	<i>Acori Graminei Rhizoma</i>	6
麥門冬	<i>Liriois Tuber</i>	6
黃連	<i>Coptidis Rhizoma</i>	4
梔子	<i>Gardeniae Fructus</i>	4
夏枯草	<i>Prunellae Spica</i>	4
柴胡	<i>Bupleuri Radix</i>	4
黃芩	<i>Scutellariae Radix</i>	4
防風	<i>Saposhnikovia Radix</i>	4
Total amount		90

2) 세 포

실험에 사용된 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(Korea)에서 구입하였다.

3) 동물 및 사육조건

실험동물은 고지혈증 질환 모델 동물인 6주령 수컷 ApoE(k/o) 생쥐를 미국 Jackson Lab.으로부터 수입하여 사용하였다. 분양 받은 실험동물은 2주간 일반 고형사료(Table 2. AIN-76A diet Test Diet Co, USA)로 적응시킨 후 체중 변화가 일정하고 건강한 10주령의 생쥐를 선별하여 4마리씩 분리한 후 0.15% cholesterol, 21% fat으로 조성된 western 식이사료(Table 3. Research Diet, USA)와 물을 자유롭게 공급하면서 항온(25±2 °C), 항습(50±5%) 및 12시간 간격의 광주기(light on 07:00-19:00)로 명암이 조절되는 SPF(Specific Pathogen Free) 실험실에서 실험하였다.

Table 2. Composition of AIN-76A Diet

Diets ingredient	Concentration (g/kg)
Casein	200
DL-Methionine	3
Corn Starch	150
Sucrose	500
Cellulose	50
Con Oil	50
AIN-76 Mineral Mix	35
AIN-76A Vitamin Mix	10
Choline Bitartrate	2
Ethoxyquin	0.01

Table 3. Composition of Western Diet

Diets ingredient	Concentration (g/kg)
Casein, 80 Mesh	195
L-Cystine	3
Corn Starch	50
Maltodextrin 10	100
Sucrose	341
Cellulose	50
Milk Fat, Anhydrous	200
Corn Oil	10
Mineral Mix S 10001	35
Calcium Carbonate	4
Vitamin Mix V10001	10
Choline Bitartrate	2
Cholesterol	1.5
Ethoxyquin	0.04

4) 시 약

Dulbecco's phosphate buffered saline, RPMI 1640, Collagenase A, Penicillin, pyrogallol, Ethylenediaminetetraacetic acid (ETDA), 3-(4,5-Dimethyl -2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide(MTT), Sodium citrate, N-2-hydroxyethyl-piperazine-N-2-ethane sulfonic acid(HEPES), lipopolysaccharide(LPS), 2,7-dichloro-dihydro fluorescein diacetate(DCFH-DA), diethyl pyrocarbonate(DEPC), 2,2Diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH)는 sigma사(USA)

제품을, Dimethyl sulfoxide(DMSO)는 Sowa chemical 사(Japan) 제품을, Ethylactate 는 Junsei사(Japan) 제품을, Potassium Phosphate Monobasic(KH₂PO₄)는 Yakuri사(Japan) 제품을, RNazolB M-MLV RT, dNTPs mix, RNase inhibitor Takara사(Japan) 제품을, First Strand cDNA Synthesis kit는 Pharmacia 사(USA) 제품을, DNase I는 Life Technologies사(USA) 등을 사용하였고, 이 밖에 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

5) 기 기

본 연구에 사용된 기기는 High performance liquid chromatography(HPLC, Shimadzu Japan), Ice-maker (Vision, Korea), Centrifuge(Hanil Co., Korea), Rotary vaccum evaporator(Büchi 461, Switzerland), Deep freezer(Sanyo Co., Japan), Autoclave(Sanyo, Japan), Ultrasonic cleaner(Branson Ultrasonics Co., USA), ELISA reader(Molecular Dvice., USA), Roller Mixer (Gowon scientific technology Co., Korea), 한약유출기(DWP-1800T, 대웅, Korea), Spectrophotometer (UV-2450, Shimadzu, Japan), cell cytometry(FACS, Beckman Co., USA), Balance(Cass, Korea), 생화학기(AU400, Olimpus, USA), 감마카운터기(WIZARD 1470, Finland) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 추출

GGB 2침(180 g)에 멸균 증류수 1.5 L를 넣고 전탕 한 후, 여과하여 증류장치로 농축하였다. 농축액을 동결 건조기를 이용하여 완전 건조한 다음 얻어진 분말(수득률 17.8%, 32.1 g)을 냉동 보관(-80 ℃) 하면서 실험 농도로 희석하여 사용하였다.

2) 시료 HPLC 패턴 확인

GGB 추출물 30 mg을 멸균 증류수 1 ml에 녹여 0.45 µm membrane filter로 여과 후 이 중 20 µl를 HPLC 시료로 사용하였다. HPLC는 Shimadzu(Japan)사의 system controller(CBM-20A), pump(LC-20AD), column oven(CTO-20A), UV/VIS detector(SPD-20A)

를 사용하였으며, column은 ACE 5 C18(250×4.6 mm, 5 μm)을 사용하였다. 이동상은 water(A)와 acetonitrile(B)로 gradient elution system을 적용시켜 0%(5분 B), 0-30%(35분 B), 30-100%(10분 B)로 설정하였다. 유속은 1.0 μl/min 이었으며 column 온도는 40 °C를 유지하였다. UV wavelength는 254 nm로 설정하여 분석하였다.

3) In vitro 실험

(1) 세포독성 측정

Raw 264.7 cells은 96well plates에 10⁴ cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양 한 후, GGB를 각각 50, 100, 200 ug/ml의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 10 ul의 WST solution을 첨가한 후 CO₂ 배양기(37 °C, 5% CO₂)에서 30분 반응시킨 후, 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시 하였다.

(2) 항산화 활성 측정

① 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) 소거능 측정
150 mM DPPH/EtOH 150 μl에 GGB를 25, 50, 100, 200 μg/ml 농도로 희석하여 100 μl씩 첨가한 후 37 °C에서 30분간 반응시켰다. 이를 ELISA reader를 이용하여 wave length 517 nm에서 흡광도를 측정 후 아래의 방법으로 계산하였다.

DPPH 소거능 (%) =

$$\left(\frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{GGB처리군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

② Total Nitric oxide 생성 억제 효과 측정

NO의 농도는 배양액 내의 nitrite 농도를 Griess Reagent System을 이용하여 측정하였다. Raw 264.7 cells은 96 well plates에 1×10⁴ cells/100 μl로 분주하여 24시간 동안 배양 한 후, GGB를 각각 50, 100, 200 μg/ml 농도로 처리하고, LPS 1 μg/μl을 처리하여, 다시 24시간 동안 배양하였다. N₁ buffer 50 μl를 각 well에 처리한 후, 10분간 상온에서 암소 반응 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite standard의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액의 NO 농도를 결정하였다.

③ Reactive oxygen species(ROS) 활성 측정

Raw 264.7 cell 내에서 reactive oxygen species(ROS)를 측정하기 위하여 2,7-Dichlorodihydrofluorescein diacetate(DCFH-DA)를 이용하였다. 48 well plate에 Raw 264.7 cell를 2×10⁵/well/400 μl씩 첨가하고 LPS 1 μg/ml 및 GGB 50, 100, 200 μg/ml 농도를 처리한 후 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양하였다. 배양 종료 후 DCFH-DA 10 μM을 처리하여 15분 동안 빛이 차단된 상온에서 배양한 후 차가운 PBS를 넣어 1,200 rpm에서 5분간 원심 분리한 다음 상청액을 제거하고 다시 PBS 400 μl를 부유시켜 유세포 분석기(Flow cytometer)를 이용하여 형광강도의 세기에 따른 ROS를 측정하였다.

4) In vivo 실험

(1) 약물투여

각 실험군은 정상군, 대조군 그리고 GGB 50, 100, 200, 400 투여군으로 나누어 정상군은 일반 사료와 식수를 충분히 공급하였다. 대조군과 GGB 투여군은 Table 3의 조성으로 만들어진 고콜레스테롤 사료와 식수를 충분히 공급하였으며, GGB 투여군은 고콜레스테롤 사료 투여 2주 후부터 400 mg/kg/0.5 ml의 양으로 정해진 시간(오전 11시)에 매일 투여하였다.

(2) 간 및 신 독성 측정

실험 종료 후 혈액을 채취 해 혈청을 분리하여 Alanine aminotransferase(ALT), Alkaline Phosphatase(AST), 요소질소(BUN) 등의 검사를 실시하였다.

(3) 혈중 지질 인자 측정

실험 종료 후, ApoE(k/o) 생쥐에서 심장 천자를 통하여 채혈한 후 Total cholesterol 및 HDL(High-density lipoprotein), LDL(Low-density lipoprotein), triglyceride 함량을 바이오투스텍(오창, Korea)에 측정 의뢰하였다.

(4) Hematoxyline & Eosin 염색

각 실험군 별로 적출한 간 조직 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 순으

로 통상의 방법에 따라 탈수하고, xylene에 투명과정을 거친 다음 파라핀 블록을 제작하였다. 제작된 블록은 박절기(microtome)를 이용하여 3~4 μm 두께로

절편을 만들어 탈 파라핀 및 함수 과정을 거친 다음 hematoxyline & eosin(H&E) 일반 염색을 실시하여 광학현미경상에서 관찰 및 사진 촬영 하였다(Fig. 1).

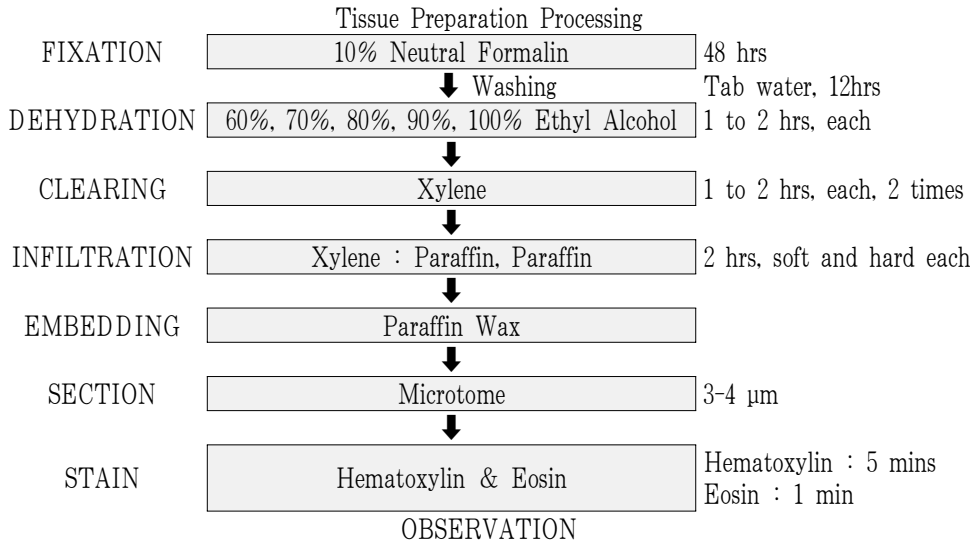


Fig. 1. Hematoxyline & eosin stain processing.

3. 통계처리

본 실험에서 얻은 결과를 ANOVA multi t-test (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. 실험결과

1. HPLC 패턴 확인

GGB 메탄올 추출물을 HPLC로 pattern 분석한 결과 254 nm에서 retention time이 16.7분, 22.7분, 24.1분, 26.4분대에 peak를 확인할 수 있었다(Fig. 2).

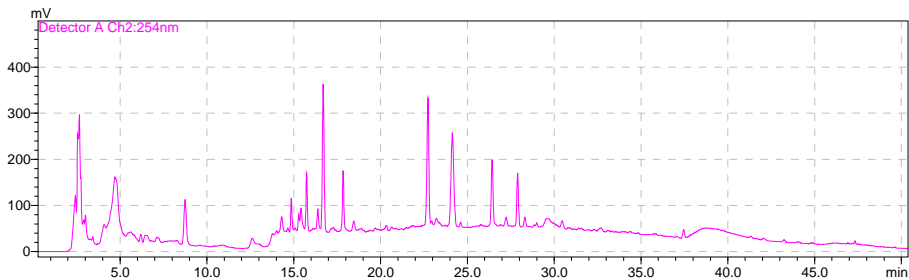


Fig. 2. HPLC chromatogram of water extract of GGB.

Column: ACE 5 C18 (250×4.6 mm, 5 μm), sample injection volume: 5 μl, mobile phase: H2O(A)/ACN(B) gradient elution : 0% (5min B), 0~30% (35min B), 30~100% (20min B), flow rate: 1.0 ml/min, detector: PDA detector

2. In vitro 실험

1) 세포독성에 미치는 영향

정상군의 세포생존율 100±0%로 했을 때, GGB의 50, 100, 200(µg/ml) 농도에서는 각각 132±5, 130±6, 130±6(%)로 나타났다(Fig. 3).

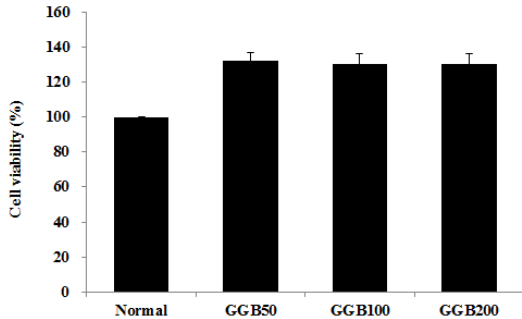


Fig. 3. Effects of GGB on the cell viability of RAW 264.7 cells.

Cells were treated with 50, 100, 200 µg/ml of Caesalpinia sappan Lignum for 24hrs. Cell viability was determined using the WST assay. The results are expressed as mean±SD from three independent experiments.

2) 항산화 활성 측정

(1) DPPH 소거활성 측정

DPPH의 소거 활성은 25, 50, 100, 200(µg/ml) 농도에서 각각 8.2±4.5, 22.5±5.0, 44.3±5.2, 76.5±3.4 (%)로 나타나 농도 의존적으로 소거활성이 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 4).

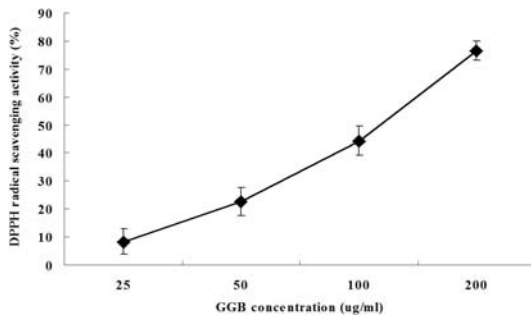


Fig. 4. Scavenging activity of GGB on DPPH free radical.

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

(2) NO 생성억제효과

대조군을 100.0±8.7%로 나타냈을 때, 정상군은 27.7±12.7%, GGB50은 101.8±3.1%, GGB100은 86.8±7.5%, GGB200은 62.5±3.1%로 나타나 GGB100과 GGB200에서 유의성 있는(** p<0.01, *** p<0.001) 감소를 나타내었다(Fig. 5).

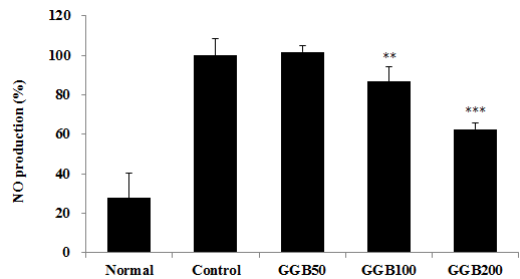


Fig. 5. NO production rate of GGB.

NO production rate of GGB at final concentration 50, 100, 200 (µg/ml). The results are the mean±SD of three independent experiments. Normal : Raw 264.7 cells, Control : Raw 264.7 cells and LPS (2 µg/ml), GGB50 : Raw 264.7 cells and LPS and GGB 50 µg/ml, GGB100: Raw 264.7 cells and LPS and GGB 100 µg/ml, GGB200 : Raw 264.7 cells and LPS and GGB 200 µg/ml. The results are expressed as mean±S.D from three independent experiments. Significant value was calculated by compared with control group by ANOVA multi t-test (** p<0.01, *** p<0.001).

3) ROS 활성 측정

대조군을 100.0±0%로 나타냈을 때, 정상군은 34±18%, GGB50은 90±9%, GGB100은 86±12%, GGB200은 75±8%로 나타나 대조군에 비해 실험군에서 농도 의존적으로 감소하였으며, 특히 GGB200에서 유의성 있는(* p<0.05) 감소를 나타내었다(Fig. 6).

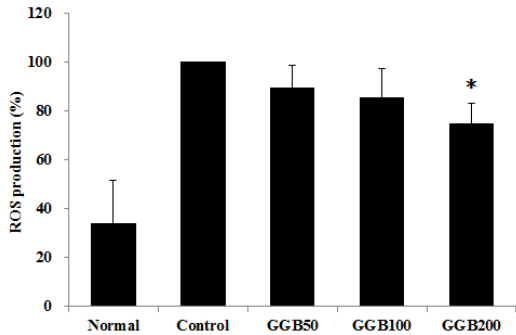


Fig. 6. The inhibitory effect of GGB on reactive oxygen species (ROS).

Raw 264.7 cells were incubated with GGB for 24hr at 37 °C. The cells were stressed with LPS for 30 min and were labeled with DCFH-DA for 15 min. Normal : Raw 264.7 cells, Control : Raw 264.7 cells and LPS (2 µg/ml), GGB50 : Raw 264.7 cells and LPS and GGB 50 µg/ml, GGB100 : Raw 264.7 cells and LPS and GGB 100 µg/ml, GGB200: Raw 264.7 cells and LPS and GGB 200 µg/ml. The results are expressed as mean±S.D from three independent experiments. Significant value was calculated by compared with control group by ANOVA multi t-test (* p<0.05).

3. In vivo 실험

1) 간 독성 평가

AST는 정상군이 80.3±15.0(I.U/L), 대조군이 118.5 ±15.0(I.U/L), GGB400이 104.3±11.4(I.U/L)으로 나타났다으며, ALT는 정상군이 30.2±3.7(I.U/L), 대조군이 40.0±14.1(I.U/L), GGB400이 37.7±14.0(I.U/L)으로 나타났다(Fig. 7).

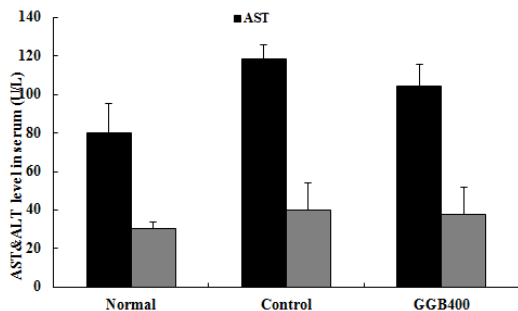


Fig. 7. Effect of GGB on the ALT and AST in ApoE

(k/o) hyperlipidemia mice.

Normal : normal mouse, Control : Hyperlipidemic diet and normal saline (0.2 ml/day) treated group, GGB400 : Hyperlipidemic diet and GGB (400 mg/0.2 ml/day) treated group. Values represent the means±SD of 4 mouse.

2) 신 독성 평가

BUN은 정상군이 25.0±3.3(I.U/L), 대조군이 20.3 ±4.0(I.U/L), GGB400이 19.5±3.0(I.U/L)으로 나타났다(Fig. 8).

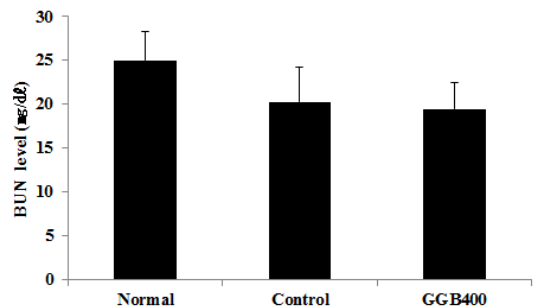


Fig. 8. Effect of GGB on the ALT and AST in ApoE (k/o) hyperlipidemia mice.

Normal : normal mouse, Control : Hyperlipidemic diet and normal saline (0.2 ml/day) treated group, GGB400 : Hyperlipidemic diet and GGB (400 mg/0.2 ml/day) treated group. Values represent the means±SD of 4 mouse.

3) 혈중 지질 인자 측정

(1) 총 콜레스테롤에 미치는 영향

정상군이 116.8±7.6(mg/dl), 대조군이 1929.0±12.9 (mg/dl), GGB400은 1575.5±132.9(mg/dl)으로 나타나 GGB400에서 대조군에 비하여 유의성 있는(** : p<0.01) 감소를 나타내었다(Fig. 9).

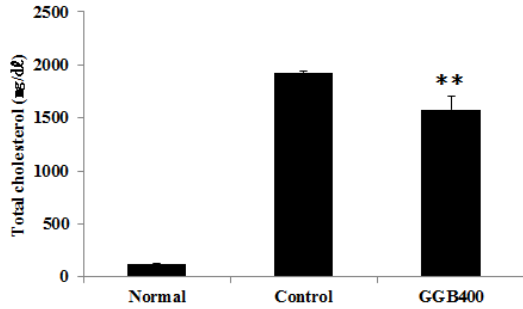


Fig. 9. Effect of GGB on the Total-cholesterol level in ApoE (k/o) hyperlipidemia mice.

Normal : normal mouse. Control : Hyperlipidemic diet and normal saline (0.2 ml/day) treated group. GGB400 : Hyperlipidemic diet and GGB (400 mg/0.2 ml/day) treated group. Values represent the means±SD of 4 mouse. Statistical significance is based on the difference when compared with control (** p<0.01).

(2) LDL cholesterol에 미치는 영향

정상군이 13.3±4.1(mg/dl), 대조군이 1541.7±69.3(mg/dl), GGB400은 1219.3±57.3(mg/dl)으로 나타나 GGB400에서 대조군에 비하여 유의성 있는(*** : p<0.001) 감소를 나타내었다(Fig. 10).

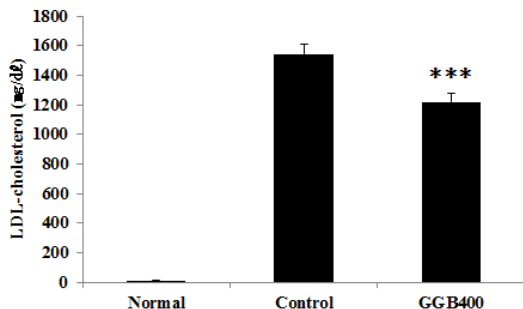


Fig. 10. Effect of GGB on the LDL-cholesterol level in ApoE (k/o) hyperlipidemia mice.

Normal : normal mouse. Control : Hyperlipidemic diet and normal saline (0.2 ml/day) treated group. GGB400 : Hyperlipidemic diet and GGB (400 mg/0.2 ml/day) treated group. Values represent the means±SD of 4 mouse. Statistical significance is based on the difference when compared with control (***) p<0.001).

(3) HDL cholesterol에 미치는 영향

정상군이 99.8±11.3(mg/dl), 대조군이 305.0±84.7

(mg/dl), GGB400은 314.0±72.7(mg/dl)으로 나타나 GGB400에서 대조군에 비하여 증가하였으나 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 11).

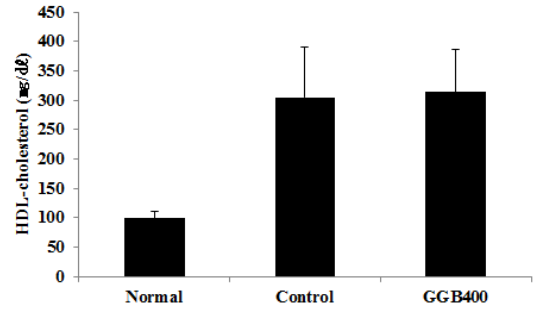


Fig. 11. Effect of GGB on the HDL level in ApoE (-/-) hyperlipidemia mice.

Normal : normal mouse. Control : Hyperlipidemic diet and normal saline (0.2 ml/day) treated group. GGB400 : Hyperlipidemic diet and GGB (400 mg/0.2 ml/day) treated group. Values represent the means±SD of 4 mouse.

(4) Triglyceride에 미치는 영향

정상군이 88.3±44.5(mg/dl), 대조군이 348.0±80.2(mg/dl), GGB400은 228.3±29.5(mg/dl)으로 나타나 GGB400에서 대조군에 비하여 유의성 있는(* : p<0.05) 감소를 나타내었다(Fig. 12).

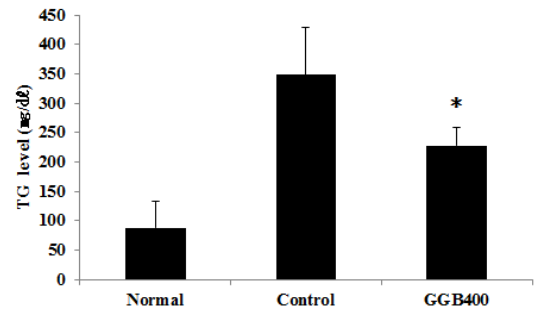


Fig. 12. Effect of GGB on the triglyceride level in ApoE (k/o) hyperlipidemia mice.

Normal : normal mouse. Control : Hyperlipidemic diet and normal saline (0.2 ml/day) treated group. GGB400 : Hyperlipidemic diet and GGB (400 mg/0.2 ml/day) treated group. Values represent the means±SD of 4 mouse. Statistical significance is based on the difference when compared with control (* p<0.05).

4) 조직 변화에 미치는 영향

(1) 간조직에 미치는 영향

실험 종료 후 간을 적출하여 염색한 결과 대조군에서는 간세포에서 지방질 축적에 의한 광범위한 지방공포인 흰색 원형조직이 많이 분포하여 전형적인 지방간 모습(화살표) 병변 소견이 나타나 있으며 세포핵이 줄어든 반면, GGB 400에서는 대조군에 비하여 지방간(hepatic steatosis)이 억제되어 간에 원형의 지방(fat)이 사라진 상태가 관찰되었다(Fig. 13).

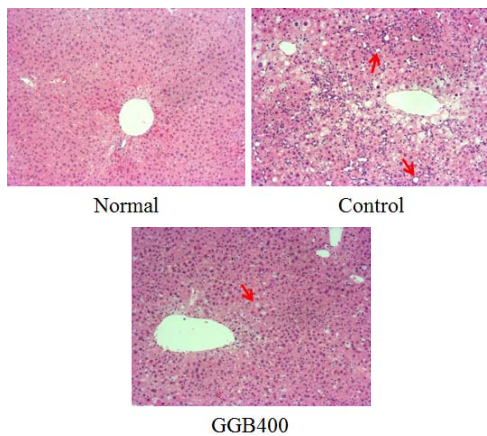


Fig. 13. Representative microscope photographs of liver stained with hematoxylin and eosin.

Normal : normal mouse, Control : Hyperlipidemic diet and normal saline (0.2 ml/day) treated group, GGB400 : Hyperlipidemic diet and GGB (400 mg/0.2 ml/day) treated group

IV. 고찰

인류는 현대의 기술과학문명이 가져다 준 혜택을 고스란히 누리며 그 어느 시대보다 풍요로운 삶을 살아가고 있다. 하지만 이러한 생활환경의 변화 및 식생활의 서구화로 인하여 고칼로리 음식과 동물성 식품의 섭취가 증가함에 따라 고지혈증 발생률이 큰 폭으로 증가하고 있다¹⁹.

고지혈증이란 혈중지질 중의 한 가지 또는 여러

가지의 성분 농도가 정상 수준을 초과한 것을 가리킨다. 혈중지질이란 혈장 또는 혈청 중의 지방류를 통칭하는 말로서, 지용성 물질을 포괄하며, cholesterol, triglyceride, phospholipid, 및 free fatty acid 등을 주요성분으로 한다²⁰.

고지혈증은 단순히 혈청지질의 증가만이 중요한 것이 아니라 지방단백(lipoprotein)의 역할이 중요한데, 이는 지방입자가 물과 섞일 수 없기에 단백질성분과 결합하여 친수성이 있는 입자로 존재해야 하기 때문이다²¹. 이런 지방단백을 자세히 살펴보면, 비수용성인 cholesterol과 중성지방은 내부에 위치하고, 외부에는 수용성인 인지질과 한 개 이상의 아포지질단백(apolipoprotein : Apo B-100, Apo B-48, Apo E, Apo A-I, Apo A-II, Apo C-II, Apo C-III)이 입자의 표면을 둘러싸며 수분과 접촉하면서 수용성 환경의 혈장환경을 통과해 전달할 수 있게 하며, 이런 지방단백은 지질과 단백질이 결합된 고분자량의 수용성 복합체로 내부의 중성지방과 cholesterol을 장 또는 간으로부터 말초조직으로, 반대로 말초조직으로부터 간으로 운반하는데 관여한다^{22,23}.

이런 혈청 지방단백은 5가지 유형으로 나눌 수 있는데, 킬로미크론(chylomicron), 초저비중 지질단백(VLDL), 중간비중 지질단백(IDL), 저비중 지질단백(LDL), 고비중 지질단백(HDL) 등이다²⁴.

킬로미크론(Chylomicron)은 지방식 후 장에서 합성되어 식이로 섭취된 지질의 주요 운반체 역할을 하고 식후 12시간 후에는 혈액 내에는 존재하지 않는다²⁵.

초저비중 지질단백(VLDL) 식이로 섭취된 외인성 중성지방과 체내의 간에서 생성, 합성됨으로써 유리지방산으로 만들어진 중성지방을 말초조직으로 운반하는 역할을 한다²⁶.

저비중 지질단백(LDL)은 간에서 생성, 합성된 콜레스테롤을 간 이외의 세포에 공급하는 역할을 하는데, LDL이 동맥벽의 내피에서 산화되어 순환 중의 monocytes를 동맥벽으로 유도함으로써 동맥경화를 일으킨다²⁷. 자세히 살펴보면 LDL이 혈관

내피 하에서 산화변성을 받아 산화 LDL이 되어 scavenger pathway라고 부르는 경로를 거쳐 세포 내에 축적되어 염증 반응을 악화시키고 내피세포-의존성 혈관확장을 억제하여 동맥경화를 악화시키는 것이다²⁸.

고비중 지질단백(HDL)은 혈관에 부착된 콜레스테롤을 간으로 운반하여 소화시키는, 혈관 내의 콜레스테롤을 제거하는 기능을 가진다²⁹. 역학적 연구결과 고비중 지질단백(HDL)은 동맥경화증의 진행을 방해하는 것으로 밝혀져 있는데³⁰, 고비중 지질단백(HDL)이 1mg/dL 높을 때마다 2-3% 심혈관 질환을 줄일 수 있다는 보고가 있다³¹.

외인성 경로, 즉 식이성으로 들어온 cholesterol은 chylomicron과 결합되는데 모세혈관의 내피의 lipoprotein lipase에 의하여 가수분해 되어 간의 수용체로 흡수된다. 그렇게 흡수된 간장 내의 일부 cholesterol은 free cholesterol 또는 담즙산이 되어 장으로 분비되며, 나머지 cholesterol은 내인성 경로를 통하여 궁극적으로 저비중 지질단백(LDL), 초저비중 지질단백(VLDL)의 농도 상승과 고비중 지질단백(HDL)의 농도를 저하시켜 고지혈증을 유발한다²⁹.

고지혈증의 분류는 대개 원발성과 속발성으로 구분되는데, 유전적인 결함에 의한 것을 원발성(1차성) 고지혈증이라 하고, 환경인자(질병, 약물, 식이)에 의해 유발되는 것을 속발성(2차성) 고지혈증이라 한다. 원발성은 lipid나 lipoprotein 대사에서 유전적 형질의 결손에 의한 이상으로 유발되는 것이고, 속발성은 신증후군, 요독증, 갑상선기능 저하증, 통풍, 담즙 울체, 조절이 잘 안되는 당뇨병, 비만, 알콜 중독, 체장염 등의 질환 외에 임신이나 경구피임약 복용 등으로 인하여 2차적으로 발생되는 것을 말한다³².

고지혈증의 진단 기준은 국제기구나 국가에 따라 달라지는 경향을 보인다⁵. 영국심장학회(British Cardiac Society, 1987)에서는 cholesterol 수치가 250 mg/dl 이상일 때 식이요법, 300 mg/dl 이상일

때 약물요법을 쓰도록 하고, 적절한 치료목표는 200 mg/dl 이하로 유지하도록 하였으며, 유럽학회(European Consensus Conference)에서는 혈중 총 cholesterol 수치가 200-250 mg/dl 일 때 식이요법, 총 cholesterol이 300 mg/dl 이상이거나 총 cholesterol이 200 mg/dl 이상이고 중성지방이 200 mg/dl 이상이면 약물요법의 병용이 필요하다고 하였다. 일본 동맥경화학회에서는 총 cholesterol이 220 mg/dl 이상 및 중성지방 150 mg/dl 이상일 때 고지혈증으로 진단하였다³³.

고지혈증은 임상적으로는 혈청 중 total cholesterol 치가 240 mg/dl 이상이거나 triglyceride 치가 200 mg/dl 이상일 때를 가리키며, 특히 지단백인 저밀도지단백(LDL) 치가 160 mg/dl 이상인 경우와 고밀도지단백(HDL) 치가 35 mg/dl 이하일 경우 동맥경화 및 관상동맥질환의 위험이 높아 치료의 대상으로 하고 있다³⁴.

고지혈증의 예방 및 치료방법이 다양하게 연구되어 왔다. 양방제제는 statin 계열의 약물, 음이온교환수지, 프로브콜, 니코틴산 유도체, 피브린산유도체 등 여러 가지가 사용되고 있으나, 투여를 중지할 경우 혈중 지질치가 다시 상승되므로 지속적인 장기간의 투여를 요하게 되며, 장기간 투여할 경우 약에 따라 피로, 수면장애, 오심, 피부발진, 근육통, 위장장애, 두통, 소양증, 변비 또는 설사 등의 부작용이 있는 것으로 보고되고 있다^{35,36}.

한의학에서는 고지혈증에 대한 직접적인 언급은 없지만, 張景岳은 “痰涎皆本血氣, 若失化失其正, 則臟腑病津液敗, 而氣血則成痰涎”이라 하여 痰濁이 血脈上에 있어 脈絡을 壅塞不通하게 하여 痰濁으로 말미암아 血瘀에 이르게 되어 痰瘀互結로 인해 脈痹가 되고 中風을 일으킬 수 있다고 보았다³⁷. 고지혈증의 원인을 보면 痰濁, 火熱, 氣滯血瘀, 脾胃濕熱 등의 實證과 肝腎陰虛, 脾腎虧虛 등의 虛證으로 인한 것으로 보고 있다³⁸. 치법은 化痰逐瘀, 利濕清熱, 活血化瘀, 健脾益腎, 祛痰化濁, 補腎培本 및 補氣益元 등으로 다양하게 제시되고 있는데, 중국에

서는 活血化癥藥을 고지혈증이나 죽상동맥경화증을 치료하는 단미제로 활용하거나 이들 약을 주로 사용하여 辨證處方이 아닌 專治方을 만들어 활용한 경우가 많이 보고되고 있고, 국내에서의 연구결과도 주로 痰濁과 瘀血을 치료하는 약물들이 고지혈증에 유효함을 보고하고 있다³⁹.

枸杞子加味方은 滋補肝腎 益精明目하는 枸杞子, 清熱生津 涼血止血하는 生地黃, 活血祛瘀 涼血消癥 除煩安神하는 丹蔘, 涼血止血 活血祛瘀하는 牡丹皮, 散風清熱 平肝明目하는 甘菊, 健脾行氣 化痰祛瘀 消食積하는 山查肉, 開竅割痰 醒神益智 化濕開胃하는 石菖蒲, 養陰潤肺 清心除煩 益胃生津하는 麥門冬, 清熱燥濕 清熱除煩 瀉火解毒하는 黃連, 清熱瀉火除煩 瀉熱利濕 養血止血 消腫止痛하는 梔子, 清肝散結하는 夏枯草, 清熱解毒 升舉陽氣하는 柴胡, 清熱燥濕 瀉火解毒 止血하는 黃芩, 祛風解表 祛濕 解癥하는 防風 등⁴⁰으로 구성되어 있는 처방으로 현재 동신대학교 한방병원에서 고지혈증에 활용되고 있다. 이에 임상적으로 혈중 지질이 감소하는 효과를 나타내는 枸杞子加味方에 대하여 실험적으로 규명하고, 기전을 밝히고자 연구하게 되었다.

이에 저자는 枸杞子加味方 추출물을 Raw 264.7 cell을 이용하여 세포독성, DPPH 소거능, NO 생성 억제, ROS 활성효과를 측정하고, 고지혈증 질환 모델동물인 6주령의 수컷 ApoE(k/o) 생쥐를 이용하여 간 및 신 독성, 혈중 인자 등을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

GGB의 안전성 검증을 위하여 Raw 264.7 세포에 대한 세포독성을 관찰한 결과 대조군의 세포생존율 100±0%로 했을 때, GGB의 50, 100, 200(μg/ml) 농도에서는 각각 132±5, 130±6, 130±6(%)의 세포 생존율을 보여 세포 독성이 없는 것으로 생각된다(Fig. 3).

GGB의 항산화 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해 DPPH 소거활성능, NO 생성능, ROS 생성능을 조사하였다. DPPH는 그 자체가 매우 안정한 free radical로서 proton-radical scavenger에 의해

탈색되어 항산화활성을 육안으로도 쉽게 관찰할 수 있는 장점 때문에 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있다⁴¹.

DPPH의 소거 활성은 25, 50, 100, 200(μg/ml) 농도에서 각각 8.2±4.5, 22.5±5.0, 44.3±5.2, 76.5±3.4(%)로 나타나 농도 의존적으로 소거활성이 증가하는 것으로 확인되었고(Fig. 4), Raw 264.7 세포에서 NO의 생성량(%)을 측정한 결과, 대조군을 100.0±8.7%로 나타냈을 때 정상군은 27.7±12.7%, GGB50은 101.8±3.1%, GGB100은 86.8±7.5%, GGB200은 62.5±3.1%로 나타나 GGB100군과 GGB200에서 유의성 있는 감소를 나타내었고(Fig. 5), Raw 264.7 세포에서 ROS의 생성량(%)을 측정한 결과, 대조군을 100.0±0%로 나타냈을 때 정상군은 34±18%, GGB50은 90±9%, GGB100은 86±12%, GGB200은 75±8%로 나타나 GGB200에서 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 6).

간 독성평가 요소인 AST와 ALT를 측정한 결과 AST는 정상군이 80.3±15.0(I.U/L), 대조군이 118.5±15.0(I.U/L), GGB 400투여군이 104.3±11.4(I.U/L)로 나타났으며, ALT는 정상군이 30.2±3.7(I.U/L), 대조군이 140.0±14.1(I.U/L), GGB400 투여군이 37.7±14.0(I.U/L)로 나타나 대조군에서는 증가했으며 GGB 투여군에서는 대조군보다 감소되어 GGB가 AST, ALT 수치를 감소시키는 작용이 있는 것으로 추정되며, 약물에 대한 간독성은 없을 것으로 생각된다(Fig. 7).

신 기능 측정의 지표 성분인 BUN은 정상군이 25.0±3.3(I.U/L), 대조군이 20.3±4.0(I.U/L), GGB 투여군이 19.5±3.0(I.U/L)로 나타나 신독성은 없을 것으로 생각된다(Fig. 8).

Cholesterol 변화에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 혈청 내 Total Cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, Triglyceride를 측정하였다.

실험 종료 후 혈청 내 Total Cholesterol의 변화는 정상군이 116.8±7.6(mg/dl), 대조군이 1929.0±12.9(mg/dl), GGB400 투여군은 1575.5±132.9(mg/dl)으

로 나타나 GGB400 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 9).

LDL cholesterol의 변화는 정상군이 13.3 ± 4.1 (mg/dl), 대조군이 1541.7 ± 69.3 (mg/dl), GGB400 투여군은 1219.3 ± 57.3 (mg/dl)으로 나타나 GGB400 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 10).

HDL cholesterol의 변화는 정상군이 99.8 ± 11.3 (mg/dl), 대조군이 305.0 ± 84.7 (mg/dl), GGB400 투여군은 314.0 ± 72.7 (mg/dl)으로 나타나 GGB400 투여군에서 대조군에 비하여 증가하였으나 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 10). Triglyceride의 변화는, 정상군이 88.3 ± 44.5 (mg/dl), 대조군이 348.0 ± 80.2 (mg/dl), GGB400 투여군은 228.3 ± 29.5 (mg/dl)으로 나타나 GGB400 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 12).

조직학적 검사 결과, 대조군에서는 간세포에서 지방질 축적(hepatic eatosis)에 의한 광범위한 지방공포인 흰색 원형조직이 많이 분포하여 전형적인 지방간 모습의 병변 소견이 나타나 있으며 세포핵이 줄어든 반면, GGB 400 mg/kg 투여군에서는 대조군에 비하여 지방간(hepatic steatosis)이 억제되어 간에 원형의 지방(fat)이 거의 사라진 상태가 관찰되었다(Fig. 13). 따라서 GGB가 간 조직을 보호하는 효과가 있을 것으로 생각된다.

이상의 결과들을 종합해 보면, 枸杞子加味方은 세포독성 및 간, 신 독성은 없었으며, DPPH 소거활성능을 농도 의존적으로 증가시켰고, NO 생성량(%), ROS 생성량(%)은 유의성 있는 감소시키는 효과가 있는 것으로 보아 枸杞子加味方은 항산화 효과가 있음을 알 수 있었고, Total Cholesterol과 LDL cholesterol, TG를 감소시키는 것으로 보아 枸杞子加味方이 혈중 지질의 농도를 감소시키는 효과가 있음을 알 수 있었다. 또한 조직검사 상 간 조직을 보호하는 효과가 있을 것으로 생각된다.

이러한 결과는 枸杞子加味方이 임상에서 고지혈증으로 야기되는 동맥경화, 허혈성 심질환, 기타 심혈관질환의 예방과 치료에 효과가 있을 것으로

사료되며 향후 보다 지속적이고 심도 있는 연구가 필요하리라 사료된다.

V. 결론

枸杞子加味方이 고지혈증에 대한 효과 및 항산화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 고지혈증 질환 모델 동물인 6주령 수컷 ApoE(k/o) 생쥐에 경구 투여한 후, in vitro에서는 세포독성, 항산화 활성 측정, in vivo에서는 간 및 신 독성, 혈중지질 인자, 간 조직의 효소활성을 측정 및 간 조직의 cholesterol 인자 발현에 미치는 영향 등을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 枸杞子加味方은 in vitro에서 세포독성은 없었으며, DPPH 소거활성능을 농도 의존적으로 증가시켰고, 대조군에 비해 NO 생성량(%), ROS 생성량(%)은 유의성 있게 감소시켰다.
2. 枸杞子加味方은 in vivo에서 혈청 내 Total Cholesterol과 LDL cholesterol, TG를 유의성 있게 감소시켰으나, HDL cholesterol을 증가시켰으나 유의성은 없었다.
3. 枸杞子加味方은 조직검사 상 지방간(hepatic steatosis)이 억제되어 간에 원형의 지방(fat)이 거의 사라진 상태가 관찰되었다.

참고문헌

1. 서울대학교 의과대학 내과학교실. 일반의와 의대생이 알아야할 145가지 일차진료에서 흔히 접하는 임상적 문제들. 서울: 군자출판사; 1997, p. 149-54.
2. Nielsen S, Jensen MD. Obesity and Cardiovascular disease is body structure a factor. *Curr Opin Lipidol* 1997;8(4):200-4.
3. Lee KU, Lee HK, Koh CS, Min HK. Artificial

- induction of intravascular lipolysis by lipid-heparin infusion leads to insulin resistance in man. *Diabetologia* 1988;31(5):285-90.
4. 노영무. 대사증후군과 심혈관질환. 한국건강관리 협회지 2004;2(1):71-6.
 5. 전국한의과대학심계내과학교실. 심계내과학. 서울: 군자출판사; 2006, p. 169-73.
 6. 방혜정. 고지혈증에 대한 한의학적 고찰. 동서의학 1995;20:25-36.
 7. 정수미, 김경수, 전상윤, 안정조, 홍석. 가미온담탕의 항고지혈 작용에 대한 연구. 대한한의학제학회지 2005;13(1):85-102.
 8. 황윤규, 김동희. 茵陳胃答湯이 高脂血 誘發 白鼠의 血液學的 變化에 미치는 影響. 대전대학교 한의학연구소 논문집 2005;14(2):71-85.
 9. 차관배, 안정조, 조현경, 유호룡, 김윤식, 설인찬. 降脂通脈飲이 항산화 활성과 高脂血 誘發과 白鼠에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2008;29(3):703-15.
 10. 유현숙, 최학주, 김선빈, 김동희. 하고초산이 고지혈 유발 SHR 백서에 미치는 영향. 대전대학교 한의학연구소 논문집 2008;17(2):101-16.
 11. 박소애, 조현경, 유호룡, 김윤식, 설인찬, 안정조. 加味地黃湯이 高脂血症 關聯 因子에 미치는 영향. 대한한방내과학회지 2009;30(2):338-54.
 12. 함인혜, 정성웅, 이경진, 박규하, 최호영. 인진호와 한인진이 Triton WR-1339로 유도된 고지혈증 흰쥐에 미치는 영향. 대한본초학회지 2005;20(1):45-52.
 13. 함인혜, 이웅철, 이병희, 최호형. 국산과 중국산 지실이 Triton WR-1339 유발 고지혈증 흰쥐에 대한 효능 연구. 대한본초학회지 2007;22(3):109-16.
 14. 함인혜, 이주영, 윤예진, 양갑식, 태진, 부영민, 김호철. 국산 및 중국산 白首烏의 Triton WR-1339 유발 고지혈증 흰쥐에 대한 효능 연구. 대한본초학회지 2007;22(4):279-86.
 15. 김형철, 김형우, 조수인, 김용성, 이장식, 권정남, 김영균. 단삼이 고지혈증 흰쥐의 혈중 지질변화와 간 조직에 미치는 영향. 대한본초학회지 2007;22(4):239-45.
 16. 한성희, 박성혜. 구기자 분말 첨가 식이가 1%가 고콜레스테롤 급여 흰쥐의 지질대사에 미치는 영향. 한국식생활문화학회지 2008;23(4):521-8.
 17. 황은영, 홍정희, 최준혁, 이은정, 이인선. 구기자 추출물의 항비만 및 혈당강화 효과. 한국식품영양과학회지 2009;38(11):1528-34.
 18. 감잎, 메밀잎 및 구기자잎 추출물의 식이보충이 흰쥐의 체지방 함량과 지질대사 조절에 미치는 효과. 한국식품영양과학회지 2011;40(9):1215-26.
 19. Sanders, TA Okaley, FR Miller, GJ. Mitropoulos, KA Influence of n-6 versus n-3 polyunsaturated fatty acids in diets low in saturated fatty acids on plasma lipoproteins and hemostatic factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17(12):3449-60.
 20. 이문호. 내과학. 서울: 학림사; 1986, p. 1495-502.
 21. 김창중. 병태생리학. 서울: 계추문화사; 2010, p. 360-2, 597-9.
 22. Guerin M, Bruckert E, Dolphin PJ, Urpin G, Chapman MJ. Fenofibrate reduces plasma cholesterol ester transfer from HDL to VLDL and normalizes the atherogenic, dense LDL profile in combined hyperlipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:763-72.
 23. Packard CJ, Demant T, Stewart JP, Bedford D, Caslake MJ et al. Apolipoprotein B metabolism and the distribution of VLDL and LDL subfractions. *J lipid Res* 2000;41:305-18.
 24. 병리학. 대한병리학회. 서울: 고문사; 1995, p. 476-7.
 25. 박영배. 고지혈증. *Medical Postgraduates* 2003;31:160-5.
 26. 이귀녕, 권오현. 임상병리과일. 서울: 의학문화사; 2003, p. 148-220.
 27. Christopher KG, Joseph IW. Atherosclerosis:

- The road ahead. *Cell* 2001;104(4):503-16.
28. 고지혈증 치료지침 제정위원회. 고지혈증의 진단과 치료. 서울: 신광출판사; 2000, p. 59, 221-33.
 29. 최영길. 내분비학. 서울: 의학출판사; 1995, p. 476-7.
 30. 안지현. 한눈에 알 수 있는 내과학. 서울: 이퍼블릭; 2010, p. 146-7.
 31. 정우영, 박영배. 새로운 콜레스테롤혈증 치료방침. 서울: 신광출판사; 2001, p. 31, 1093-102.
 32. 김진규. 임상지질학. 서울: 의학출판사; 1995, p. 11-48.
 33. 대한가정의학회. 가정의학 <임상편>. 서울: 계축문화사; 2002, p. 303-9.
 34. 민현기. 임상분비학. 서울: 고려의학사; 1999, p. 489-520.
 35. 고지혈증치료지침제정위원회 編. 고지혈증과 동맥경화증. 서울: 신광출판사; 1998, p. 27-8, 61-7.
 36. 이원로 편저. 임상심장학. 서울: 고려의학사; 1998, p. 751.
 37. 안근형, 이현. 양릉천 천궁약침이 흰쥐의 고지혈증에 미치는 영향. 대한침구학회지 2010;27(4):137-46.
 38. 송왕기, 강재희, 이현. 양릉천 갈근 약침이 흰쥐의 고지혈증에 미치는 영향. 대한침구학회지 2009;26(4):79-90.
 39. 신형섭, 김규열, 김호현, 서일복. 蒲黃이 흰쥐의 식이성 고지혈증 치료에 미치는 영향. 동의생리병리학회지 2003;17(1):225-9.
 40. 전국한의과대학 공동교재편찬위원회. 본초학. 서울: 영림사; 2011, p. 165, 184, 188, 209, 218, 220, 233, 237, 414, 461, 565, 647, 657.
 41. Philip Molyneux. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl(DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J Sci Technol* 2004;26(2):211-9.