

五味子 hexan 분획 추출물이 고지방 식이에 의한 고지혈증 생쥐의 지질대사 및 간 조직 유전자 발현에 미치는 영향

Effects of Schisandra Fructus hexane fraction on high fat diet induced hyperlipidemic mice

김현영, 박선미, 김영균*
동의대학교 한의과대학

Hyun-Young Kim, Sun-Mi Park, Young-Kyun Kim*
College of Korean Medicine, Dong-Eui University

- **Objectives** The berries of Schisandra chinensis (Schisandra Fructus) are given the name Omiza in Korean (五味子), and have been used as remedies for many ailments: to resist infections, increase skin health, and combat insomnia, coughing, and thirst. This study was designed to investigate the effects of Schisandra Fructus hexane fraction (SFH) on serum lipid levels in Hyperlipidemic mice.
- **Methods** In this experiment, effects on total cholesterol, HDL-cholesterol, triglyceride, AST, ALT, fasting blood glucose in serum were measured. And in addition, histopathological and gene expression changes in liver tissue was also observed.
- **Results** SFH did not affect weight gain, serum AST and ALT in hyperlipidemic mice. Oral administration of SFH lowered levels of total cholesterol and triglyceride, which were elevated by induction of hyperlipidemia. Finally, administration of SFH lowered fasting blood glucose significantly. And SFH also ameliorates anti-oxidative stress systems in internal organs which play key role in disease prevention.
- **Conclusion** Results in our study suggest that SFH can prevent obese through regulation of dyslipidemia and hyperglycaemia.
- **Key words** Schisandra Fructus, hexane fraction, hyperlipidemia.

* 교신저자: 김영균
부산시 부산진구 양정동 동의대학교 한의과대학
전화: 051 867 5105, FAX: 051 853 4036
E-mail: lab3402@hanmail.net

■ 서론

심혈관 질환은 과체중 및 비만 등과 함께 대사성 질환을 가지고 있을 경우에 발병이 현저히 증가하는 경향이 있으며 이러한 배경에는 급격한 환경의 변화, 과도한 영양 섭취, 각종 스트레스 등이 있는 것으로 알려져 있다¹⁾. 특히 사회 활동의 증가와 음식 섭취환경의 변화로 축적되는 칼로리의 양은 점차 늘어나는데 비해 활동량은 전반적으로 감소하는 경향을 보이게 됨에 따라 비만과 관련된 대사성 질환의 유병률은 점차 증가하는 추세이다²⁾. 혈중 지질 농도의 상승이 심혈관계 질환의 발생에 주요한 작용을 한다는 것은 잘 알려진 사실이며, 체내 지질의 함량이 증가되면 혈중 콜레스테롤의 상승, 지방의 축적, 인슐린 저항성의 증가 등과 같은 대사 이상이 나타나며, 이로 인해 당뇨병, 고혈압, 심혈관질환, 뇌졸중, 암 등과 같은 다양한 질병을 유발함으로써 인간의 건강을 위협하고 있으며, 사회적인 문제로 대두되고 있어^{3, 4)} 향후 적극적인 치료 대책의 마련이 절실하다 할 수 있다.

한약을 재료로 한 연구 중 고지방 식이에 의하여 유발된 고지혈증과 같은 지질의 대사 이상에 총백⁵⁾, 현초⁶⁾, 산사⁷⁾, 인진⁸⁾, 조협⁹⁾ 등의 약물이 유의한 효과가 있는 것으로 최근에 보고되었으나 대개의 경우 조추출물(粗抽出物)의 형태가 주된 연구 재료로 활용되어져 왔다.

최근 한의학계에서는 신약 개발을 통한 한의약 산업의 부가가치 상승, 연구 개발 과정을 통한 고급 연구 인력의 양성에 대한 관심 또한 커지고 있다. 따라서 본 연구에서는 한약재 추출물의 활성을 1차 용매 분획물의 단계에서 확인하고자 하였으며, 그 재료를五味자로 선정하였다.

五味자는 오미자과(Schisandraceae)에 속한 落葉 木質藤本인 오미자(北五味子) *Schisandrae chinensis* Baill. 또는 華中五味子(南五味子) *S. sphenanthera* Rehd. et Wils.의 완숙한 과실을 건조한 것으로¹⁰⁾, 독성이 매우 낮아서 LD50은 5.1g/kg으로¹¹⁾ 알려져 있고 收斂固澁, 益氣生津, 補腎寧心 등의 효능이 있다¹⁰⁾.

五味자에 관한 기존 연구자들의 결과는 매우 다양한데 본 연구와 연관성있는 최근의 보고로는 항산화 및 혈당 강하 작용¹²⁻¹⁴⁾, 약침을 이용한 항 고지혈 작용¹⁵⁾, 기타 다양한 생리활성 등¹⁶⁾이 있었는데,五味자는 식품과 의약품 모두로 사용할 수 있는 식물로 현재 다양한 형태의 가공식품 및 한의학 임상에서의 활용도 또한 상당히 높아 앞으로 개발가치가 매우 높은 약재 중 하나로 인식되고 있다.

이에 저자는 예비 연구를 통해 고지방식으로 유발된 고지혈증 생쥐의 혈중 지질함량을 관찰하여五味자의 핵산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올, 물 분획물 중 핵산 분획물에서 가장 높은 활성도를 관찰하였으며, 본 연구에서는五味자 핵산 분획물을 재료로 지질 대사에 미치는 영향을 살펴보았다. 우선五味자 핵산 분획 추출물을 투여하여 체중변화, 지질 대사에 관련된 생화학적 지표, 간 독성 지표, 항산화능에 관련된 지표들을 측정하였으며, 간 조직을 적출하여 지방 분포를 관찰하고, microarray 분석을 수행한 결과 고지혈증으로 인해 변화된 유전자들이五味자 핵산 분획 추출물의 투여로 인해 유의성 있게 조절됨을 확인하였으므로 그 결과를 보고하는 바이다.

■ 재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

고지혈증 유발을 위하여 6주령 체중 20-25 g의 수컷 ICR mice(샘타코, 한국)를 사용하였다. 실험에 사용된 동물은 항온 및 항습 장치가 부착된 사육장에서 고형사료와 물을 충분히 공급하면서 실험실 환경(실내온도 24±2°C, 습도 55±5%, 12시간 dark/light)에 1주일 이상 적응시킨 후 사용하였다.

2) 약재

본 연구에 사용된 약재 오미자(*Schisandrae Fructus*)는 화림제약(부산, 한국)에서 구입하였으며, 관능검사를 통해五味자(북오미자)인 것을 확인한 후 정선하여 사용하였다.

2. 방법

1)五味子 핵산 분획물의 획득

구입된 약재 五味子 500g을 분쇄기로 잘게 부순 다음 실온에서 5일 동안 메탄올에 담가 여과액을 얻는 과정을 2회 반복한 후 동결 건조시켜 109.7g의 건조 추출물을 얻었으며 수율은 약 21.94% 였다. 이 중 100g의 메탄올 추출물을 증류수에 현탁시킨 후 다시 핵산과 물을 1:1의 비율이 되도록 농도를 재조정 한 후 핵산 층을 분리하였으며 역시 2회 반복한 용액을 얻었다. 이후 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올, 증류수의 순서로 극성에 따라 순차적으로 용매 분획물을 얻어 실험에 사용하였다(Fig. 1). 본 연구에서는 예비 실험을 통해 가장 강한 활성을 보인 핵산 분획물(SFH)만을 사용하였으며, 이러한 분획물 획득 과정을 거쳐 얻은五味子 핵산 분획물의 최종 추출물은 8.16g으로五味子 500g에 대한 수율은 1.6%에 해당하였다.

2) 고지혈증 유발 및 실험군 분류

고지혈증 유발을 위하여 4주간 30마리의 고지방 식이군(CTL군, SFH군)에는 고지방 식이를 공급하였으며, 8마리의 정상 식이군(이하 NOR군)에는 일반 사료를 공급하였다. 실험 5주째에서의 체중을 기준으로 대조군(이하 CTL군) 및 실험군(이하 SFH

군)을 각각 8마리씩 선별하여 실험에 사용하였다.

실험 5주째부터 NOR군은 계속 일반 식이를 공급하면서 D/W를 1일 1회 경구 투여 하였고, CTL군은 고지방 식이를 사료로 공급하면서 D/W를 1일 1회 경구 투여하였다. SFH군은 고지방 식이를 공급하면서 SFH를 30mg/kg body weight/day 농도로 1일 1회 경구 투여 하였다. 실험 식이는 두열바이오텍(대전, 한국)에 주문 제작하여 사용하였으며, 조성은 Table 1과 같다.

3) 체중, 식이량 및 음수량 측정

4주간의 고지혈증 유발 기간이 끝나고, 시료의 투여가 시작되는 날 전자저울을 이용하여 기준 체중을 측정하였으며, 이후 7일 간격으로 체중을 측정하였다. 2주간의 시료 투여기간 동안 주 1회 식이량(g) 및 음수량(ml)을 측정하였다. 측정 단위는 24시간으로 전일 오후 4시에 고형사료와 음용수를 공급한 후, 다음 날 오후 4시에 남은 사료와 음용수의 양을 측정하여 그 차이를 하루 동안의 식이량 및 음수량으로 계산하였다.

4) 혈중 cholesterol 및 triglyceride, glucose, AST, ALT 함량 측정

2주간의 약물 투여가 끝난 후, 생쥐의 복대동맥에서 혈액을 채취하였다. 얻어진 혈액을 5,000×g로 20분간 원심 분리하여 상청액을 얻어 혈중 콜레스테롤 및 triglyceride 함량을 측정하였다. 혈청 중 total cholesterol, HDL-cholesterol 및 triglyceride, glucose, AST, ALT의 함량은 각각의 측정용 키트(FUJIFILM, 일본)을 사용하였다.

5) 조직 적출 및 처리

6주간의 실험이 끝나고 생쥐를 희생시킨 후 간 조직을 적출하였는데, 간조직 대엽의 첨부를 절제하여 인산 완충액에 행군 후, 4% paraformaldehyde에 1일간 고정 하였다. 고정된 조직은 Paraffin 포매 과정을 거쳐서 조직 절편을 완성하였다. 5μm 두께로 절제된 조직을 슬라이드 글라스 위에 올리고 haematoxylin and eosin 기법으로 염색하고, 광학 현미경(Zeiss, Germany)을 이용하여 관찰하였다.

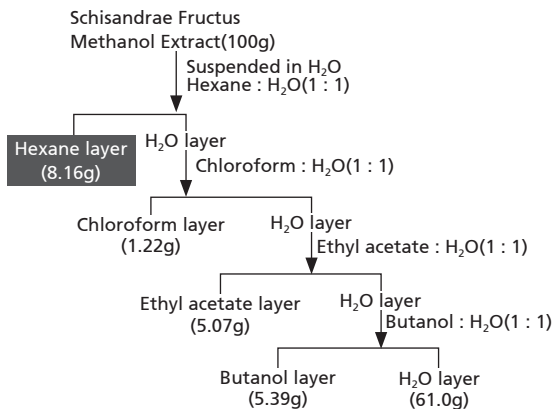


Fig. 1. Purification procedure for the fractions isolated from Schisandrae Fructus. Hexane, chloroform, ethyl acetate, 1-butanol and water were used for solvent.

Table 1. Compositions of high fat diet

Ingredients	gm	kcal
Casein	200	800
Sucrose	68.8	275.2
Cellulose	50	0
Soybean Oil	25	225
Lard ^{a)}	245	2,205
Mineral mix	10	0
Vitamin mix	10	40
L-Cystine	3	12
Choline Bitartrate	2	0
Potassium Citrate	16.5	0
Dicalcium Phosphate	13	0
Calcium Carbonate	2	0
Maltodextrin	125	500
Total	773.85	4,057

a) Typical analysis of cholesterol in lard = 0.95mg/gram

6) 간 조직 내 지질과산화물 함량 측정

실험동물을 희생시킨 후, 간 조직을 적출하여 130mM NaCl, 5mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH 7.4)로 된 냉장 보관 세척액을 이용하여 혈액을 제거하고, Stadie-Riggs microtome(Tomas Co. USA)을 사용하여, 가로 및 세로의 길이는 각각 1cm으로 하여 약 1cm² 넓이와 약 0.3-0.5mm 두께의 간 조직 절편을 제작하였으며, 이를 1% phosphoric acid 3ml과 0.6% thiobarbituric acid 용액 1ml을 첨가하여 끓는 물에서 60분간 중탕한 후, 1-butanol을 4ml 첨가하여 고루 섞은 후 800×g에서 25 분간 원심분리하여 상층액의 흡광도를 534nm와 510nm에서 측정하는 것으로 평가하였다.

7) 간 조직 내 항산화 효소 활성 측정

간 조직 내 항산화 효소는 환원성 항산화 효소인 GSH, superoxide dismutase(SOD) 및 catalase 함량을 측정하였다. 효소 활성 측정을 위해 적출된 간을 잘게 다진 후 균질을 위한 완충액(154 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.4)에 넣은 후 4°C 1,000×g에서 10분 동안 원심 분리하여 상층액을 얻은 다음 다시 4°C 10,000×g에서 20분간 원심

분리한 후 상층액을 4°C 100,000×g에서 60분간 다시 원심분리하여 얻은 상층액을 기질로 사용하였다.

GSH 함량은 다음의 방법으로 측정하였는데, 0.248mg/ml NADPH 용액 700μl, 6 mM 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid(DTNB) 용액 100μl와 증류수 198μl를 cuvette에 넣어 30°C에서 15분간 데운 후 시료 2μl를 넣고 섞은 다음 266 U/ml GSSG reductase 10μl를 첨가하여 412nm에서 흡광도의 변화를 관찰하였고 단위는 μg/mg protein으로 나타내었다.

간 조직 내 SOD 및 catalase는 측정 키트(BIOXY-TECH, SOD-525 및 CATALASE-520 assay kit)을 구입하여 사용하였으며, 구체적인 방법은 사용자 매뉴얼을 따라 spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정하여 효소 활성을 정량하였다.

8) Microarray 실험

(1) RNA 분리, microarray 실험 및 데이터 분석
 각 실험동물로부터 간 조직을 적출하여 곧바로 액체 질소에 담귀 얼린 뒤 -70°C에서 보관하였으며, 이로부터 얻은 RNA를 pooling한 후 약 45,000 oligo-chip이 결합된 microarray(Agilent Tech-

nologies)에 반응시켰으며, 3DNA array detection system(Genisphere, PA)을 이용하여 형광염색을 하였다. microarray의 이미지 파일은 ScanArray scanner(Perkin-Elmer, Boston, MA)을 이용하여 측정하였다. microarray 이미지 파일은 IMAGE 4.0(Bio-discovery, Marina del Rey, CA) 프로그램을 이용하여 수치화 하였으며, 발현의 증가 또는 감소의 기준은 NOR군에 비해 2배 이상 증가되거나 0.5 배 이상 감소되는 유전자만을 대상으로 결정하였다.

(2) Pathway 분석

Pathway 데이터베이스는 Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG)에서 제공하는 자료를 활용하였다. 개별 pathway의 통계적 유의성은 다중 비교 테스트를 이용하여 보정되었다.

3. 통계 처리

실험 자료에 대한 통계적 분석은 통계 패키지인 SPSS 12.0 ver. for windows를 이용하였다. 실험 성적은 mean±SD로 나타내었으며, 실험군 간 평균의 차이를 검정할 때에는 one way-ANOVA test를 시행하였고 p-값이 0.05 미만일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

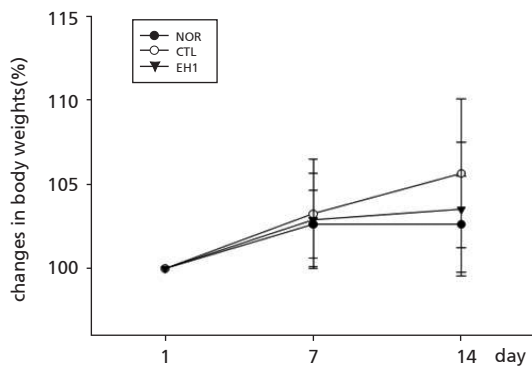


Fig. 2. Effects of SFH on changes in body weights in hyperlipidemic mice. Body weights were measured on day which SFH group was firstly administered (day 1) and every 7 days. NOR group, naive mice (n=8); CTL group, hyperlipidemic mice (n=8); SFH group, SFH administered mice (n=8). Values are represented as mean±SD.

■ 성적

1. 체중 변화에 미치는 영향

4주간의 고지방 식이를 통한 고지혈증 유발 기간이 끝난 후, 2주간 시료를 투여하면서 체중의 변화를 관찰한 결과, 다른 군에 비해 CTL군에서 경미한 체중 증가의 경향이 관찰되기는 하였으나 각 군 간의 통계적 유의성은 보이지 않았다(Fig. 2).

2. 식이량 및 음수량에 미치는 영향

2주간의 실험 기간 동안 실험동물이 섭취한 사료 및 음용수 양의 변화를 관찰한 결과 각 군 사이에 통계적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았다(Table 2).

3. 혈청 중 total cholesterol 함량 변화에 미치는 영향

실험동물의 혈액으로부터 얻은 혈청 중 total cholesterol 함량 변화를 관찰한 결과 CTL군에서 175.25±16.02mg/dl로 나타나 136.13±15.38mg/dl를 보인 NOR군에 비해 유의한 증가를 보였고, SFH 군에서는 152.00±15.10mg/dl로 나타나 CTL군에 비하여 유의한 감소를 보였다(Fig. 3). SFH군을

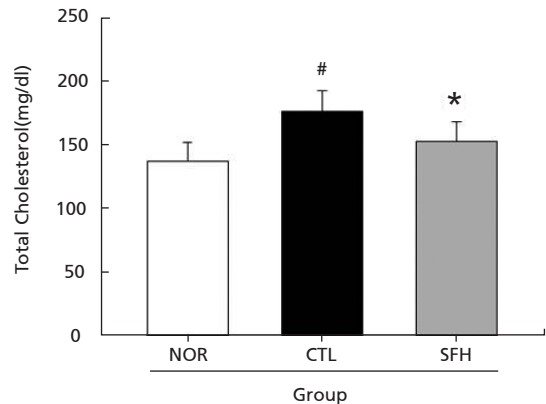


Fig. 3. Effects of SFH on total cholesterol levels in hyperlipidemic mice. Total cholesterol levels in serum were measured using spectrophotometry. NOR group, naive mice (n=8); CTL group, hyperlipidemic mice (n=8); SFH group, SFH administered mice (n=8). Values are represented as mean±SD. #P < 0.05 vs. NOR group, *P < 0.05 as compared to CTL group.

Table 2. Effects of SFH on Changes of Food and Water uptake in Hyperlipidemic Mice

Group	Food Uptake (g)	Water Uptake (ml)
NOR ^{a)} group	6.04±0.45 ^{b)}	13.85±2.63
CTL group	6.05±1.37	12.26±1.74
SFH group	5.84±1.51	12.58±2.21

a) NOR group, naive mice (n=8); CTL group, hyperlipidemic mice (n=8); SFH group, SFH administered mice(n=8)

b) Values are represented as mean±SD.

NOR군과 비교하였을 경우에는 유의하게 높은 수치로 관찰되었다.

4. 혈청 중 HDL-cholesterol 함량 변화에 미치는 영향

생쥐의 혈액으로부터 HDL-cholesterol 함량을 관찰한 결과 NOR군, CTL군 및 SFH군에서 각각 71±7.73, 75.63±5.21 및 69.25±8.66mg/dl로 나타나 각 군 사이에 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다(Fig. 4).

5. 혈청 중 triglyceride 함량 변화에 미치는 영향

2주간 SFH의 투여가 끝난 후, 생쥐의 혈액으로

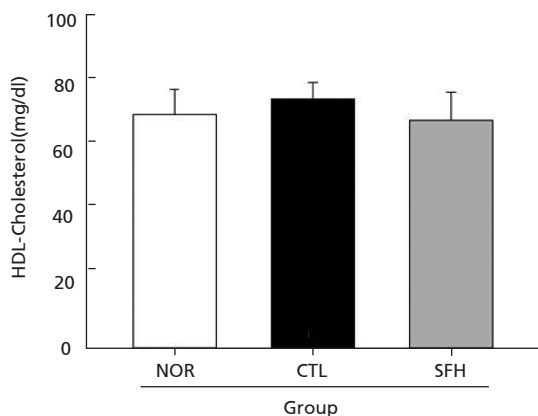


Fig. 4. Effects of SFH on HDL-Cholesterol levels in hyperlipidemic mice. HDL cholesterol levels in serum were measured using spectrophotometry. NOR group, naive mice (n=8); CTL group, hyperlipidemic mice (n=8); SFH group, SFH administered mice (n=8). Values are represented as mean±SD.

부터 분리된 혈청 중 triglyceride 함량 변화를 관찰한 결과 CTL군에서 107.75±23.71mg/dl로 나타나 60.25±9.59mg/dl를 보인 NOR군에 비해 유의한 증가를 보였고, SFH군은 69.25±11.36mg/dl로 나타나 CTL군에 비하여 유의한 감소를 보였다(Fig. 5). SFH군을 NOR군과 비교하였을 경우에는 유의하게 높은 수치로 관찰되었다.

6. 혈청 중 glucose 함량 변화에 미치는 영향

2주간 SFH의 투여가 끝난 후, 실험동물의 혈액으로부터 glucose 함량을 관찰한 결과 CTL군에서 140.37±21.27mg/dl로 나타나 84.13±15.10mg/

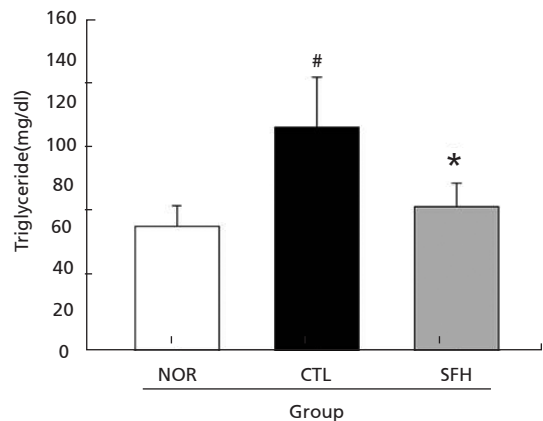


Fig. 5. Effects of SFH on triglyceride levels in hyperlipidemic mice. Triglyceride levels in serum were measured using spectrophotometry. NOR group, naive mice (n=8); CTL group, hyperlipidemic mice (n=8); SFH group, SFH administered mice (n=8). Values are represented as mean±SD. #P < 0.05 vs. NOR group, *P < 0.05 as compared to CTL group.

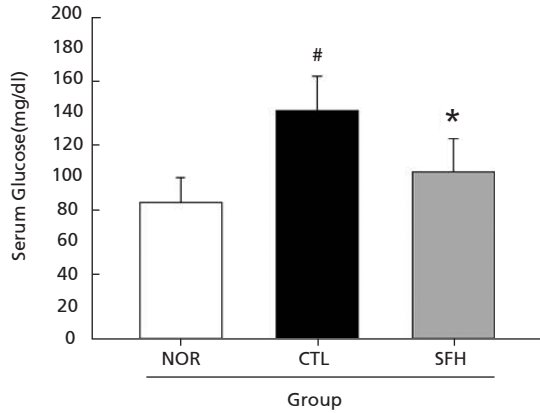


Fig. 6. Effects of SFH on glucose levels in hyperlipidemic mice. Glucose levels in serum were measured using spectrophotometry. NOR group, naive mice (n=8); CTL group, hyperlipidemic mice (n=8); SFH group, SFH administered mice (n=8). Values are represented as mean±SD. [#]P < 0.05 vs. NOR group, ^{*}P < 0.05 as compared to CTL group.

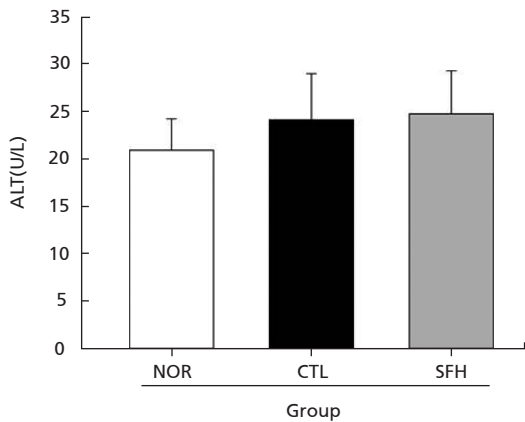


Fig. 8. Effects of SFH on ALT levels in hyperlipidemic mice. ALT levels in serum were measured using spectrophotometry. NOR group, naive mice (n=8); CTL group, hyperlipidemic mice (n=8); SFH group, SFH administered mice (n=8). Values are represented as mean±SD.

dl를 보인 NOR군에 비해 유의한 증가를 보였고, SFH군은 102.63±20.44mg/dl로 나타나 CTL군에 비하여 유의한 감소를 보였다(Fig. 6). SFH군을 NOR군과 비교하였을 경우에는 유의하게 높은 수치를 관찰되었다.

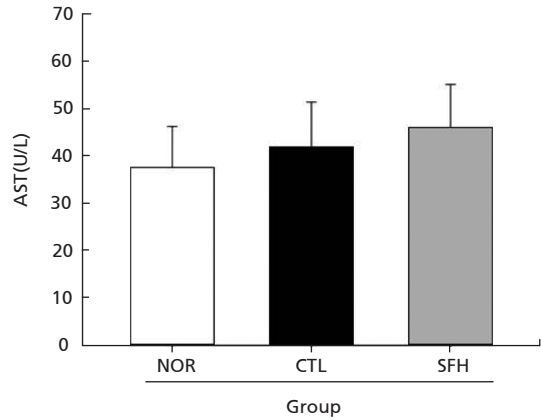


Fig. 7. Effects of SFH on AST levels in hyperlipidemic mice. AST levels in serum were measured using spectrophotometry. NOR group, naive mice (n=8); CTL group, hyperlipidemic mice (n=8); SFH group, SFH administered mice (n=8). Values are represented as mean±SD.

7. 혈청 중 AST 함량 변화에 미치는 영향

실험동물의 혈액으로부터 분리된 혈청 중 AST 함량 변화를 관찰한 결과 NOR군, CTL군 및 SFH군에서 각각 37.38±8.70, 41.63±9.47 및 45.88±8.94 U/L으로 나타나 각 군 사이에 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 7).

8. 혈중 ALT 함량 변화에 미치는 영향

실험동물의 혈액으로부터 ALT 함량 변화를 관찰한 결과 NOR군, CTL군 및 SFH군에서 각각 20.88±3.31, 24±4.87 및 24.63±4.53 U/L으로 나타나 각 군 사이에 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 8).

9. 간 조직의 지방 분포에 미치는 영향

6주간의 실험이 끝난 후, 간 조직을 적출하여 지방 분포를 관찰한 결과 NOR군(A), CTL군(B), SFH군(C)에서 모두 흰색 방울 모양의 지방 축적 현상인 간지방증이 관찰되지 않았으며, 각 군 간에 지방 분포의 차이가 없었다(Fig. 9).

10. 간 조직 내 지질과산화물 함량 변화

실험동물로부터 적출한 간 조직으로부터 지질과

산화물인 MDA 함량을 측정한 결과 CTL군에서 187.38 ± 21.97 pmole MDA/mg protein으로 나타나 111.25 ± 25.60 pmole MDA/mg protein을 보인 NOR군에 비해 유의한 증가를 보였고, SFH군은 186.25 ± 20.94 pmole MDA/mg protein으로 CTL

군과 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다 (Fig. 10). SFH군을 NOR군과 비교하였을 경우에는 유의하게 높은 수치로 관찰되었다.

11. 간 조직 내 항산화 효소 활성의 변화

2주간 SFH의 투여가 끝난 후, 실험동물의 간 조

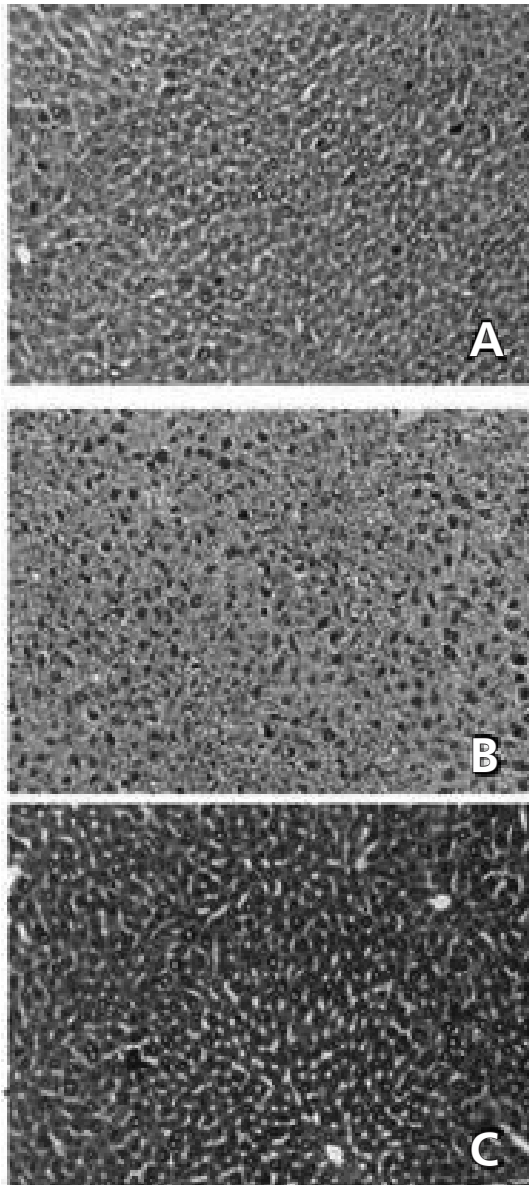


Fig. 9. Effects of SFH on lipid accumulation of liver tissue in hyperlipidemic mice. Liver tissues were observed using haematoxylin and eosin stain. A, NOR group; B, CTL group; C, SFH group (x100).

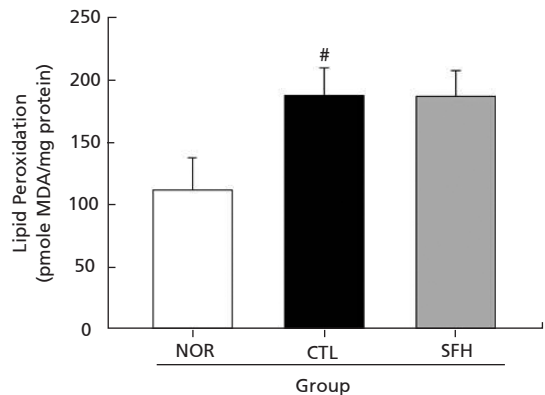


Fig. 10. Effects of SFH on lipid peroxidation levels in hyperlipidemic mice. Lipid peroxidation in liver tissues were measured using spectrophotometry. NOR group, naive mice (n=8); CTL group, hyperlipidemic mice (n=8); SFH group, SFH administered mice (n=8). Values are represented as mean \pm SD. #P < 0.05 as compared to NOR group.

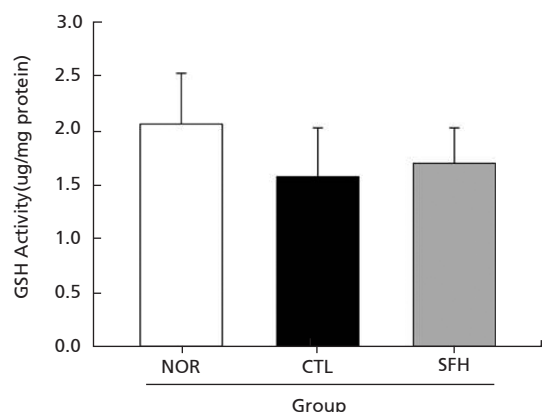


Fig. 11. Effects of SFH on GSH activities of liver tissues in hyperlipidemic mice. GSH activities in liver tissues were measured using spectrophotometry. NOR group, naive mice (n=8); CTL group, hyperlipidemic mice (n=8); SFH group, SFH administered mice (n=8). Values are represented as mean \pm SD.

직으로부터 GSH 활성을 확인한 결과 NOR군, CTL군 및 SFH군에서 각각 2.05 ± 0.47 , 1.56 ± 0.46 및 $1.69 \pm 0.33 \mu\text{g}/\text{mg protein}$ 으로 나타나 각 군 사이의 평균에 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다 (Fig. 11).

이에 비해 SOD의 경우 NOR군, CTL군 및 SFH군에서 각각 15.78 ± 4.88 , 9.21 ± 4.14 및 $14.65 \pm 4.49 \text{ U}/\text{mg protein}$ 로 나타나 NOR군에 비해 CTL군에서의 SOD 활성이 낮게 나타났으며, SFH군은 CTL군에 비하여 유의한 감소를 보여 NOR군과 통계적 유의성이 없을 정도로 SOD의 활성이 높게 나타났다 (Fig. 12).

간 조직 내 catalase 활성의 경우 NOR군, CTL군 및 SFH군에서 각각 13.75 ± 4.13 , 6.63 ± 1.69 및 $8.88 \pm 2.59 \text{ k/g protein}$ 으로 나타나 NOR군에 비해 CTL군과 SFH군에서 catalase 함량이 감소하였으며, CTL군과 SFH군 사이에는 통계적으로 유의한 차이가 나타나지 않았다 (Fig. 13).

12. 간 조직 유전자 발현 변화

적출된 간 조직으로부터 cDNA microarray를 시행하여 각각의 유전자 발현을 형광염색의 발현 농도

로 측정하였다. 발현이 증가된 유전자는 빨간색, 감소된 유전자는 녹색, 발현에 변화가 없는 유전자는 검은색으로 표현되었다. 유전자 발현의 변화를 살펴본 결과, 고지혈증이 유발 되었을 경우 증가 또는 감소하였던 유전자 중 일부에서 SFH를 투여하였을 때 정상 수준(검은색)으로 회복되는 결과를 관찰 할 수 있었다 (Fig. 14).

발현에 차이를 보이는 유전자 중 2배 이상 증가되거나 0.5배 이상 감소되는 유전자에 의미를 두었다. 시행한 cDNA microarray 결과에서 발현이 변화한 유전자의 개수를 확인해보면 고지혈증 유발에 의해 발현에 변화가 생긴 유전자의 총 개수는 680개였다. 이 중 발현이 감소된 유전자가 153개, 증가된 유전자가 527개였으며, 이 유전자들 중 SFH 투여에 의해 정상으로 유지된 유전자는 각각 56개 및 310개로 확인되었다 (Table 3).

고지혈증 유발에 의해 발현이 변화한 유전자들이 관여하는 생물학적 과정을 분석한 결과, sterol metabolic process, cholesterol metabolic process 등과 같이 주로 지질 대사과정이 관련 많음을 확인할 수 있었다 (Table 4).

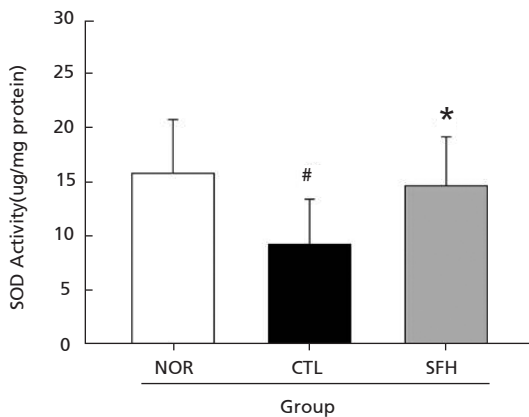


Fig. 12. Effects of SFH on SOD activities of liver tissues in hyperlipidemic mice. SOD activities in liver tissues were measured using spectrophotometry. NOR group, naive mice (n=8); CTL group, hyperlipidemic mice (n=8); SFH group, SFH administered mice (n=8). Values are represented as mean ± SD. #P < 0.05 vs. NOR group, *P < 0.05 as compared to CTL group.

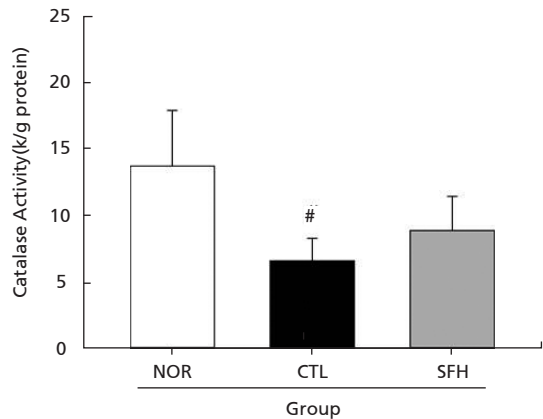


Fig. 13. Effects of SFH on catalase activities of liver tissues in hyperlipidemic mice. Catalase activities in liver tissues were measured using spectrophotometry. NOR group, naive mice (n=8); CTL group, hyperlipidemic mice (n=8); SFH group, SFH administered mice (n=8). Values are represented as mean ± SD. #P < 0.05 as compared to NOR group

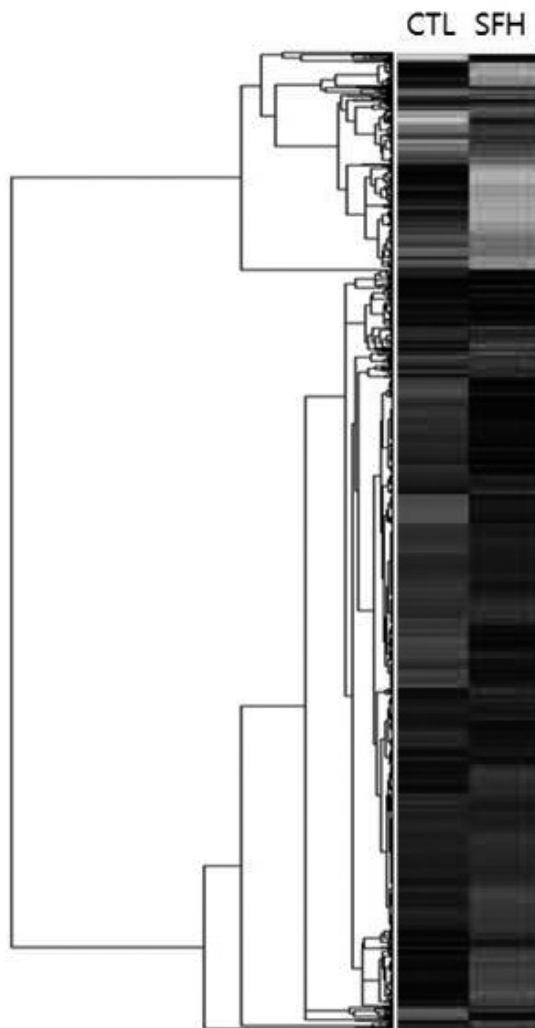


Fig. 14. Expressional profile of microarray. The normalized ratios were hierarchically clustered by using CLUSTER and then visualized using TREEVIEW program. Red, green, and black color represents up-regulation, down-regulation, and no change of gene expression, respectively. The color intensity correlates with expression level of the gene. CTL group, liver tissues from hyperlipidemic mice; SFH group, liver tissues from SFH administered mice.

반면 SFH 투여로 발현이 조절되는 유전자의 생물학적 기능은 DNA 복제, 전사 등에 주로 관여하는 것으로 나타났다(Table 5).

■ 고찰

五味子は 오미자과(Schisandraceae)에 속한 落葉 木質藤本인 오미자(北五味子) *Schisandrae chinensis* Baill. 또는 華中五味子(南五味子) *S. sphenanthera* Rehd. et Wils.의 완숙한 과실을 건조한 것으로, 性溫 味酸甘하고 收斂固澀, 益氣生津, 補腎寧心 등의 효능이 있어, 肺虛喘咳, 口乾作渴, 自汗, 盜汗, 勞傷羸瘦, 夢遺, 滑精, 久瀉久痢 등과 같은 병증을 치료하는데 주로 활용하여 왔다¹⁰⁾.五味子の 주요 약리 작용으로는 중추신경계 흥분 및 진정, 간 기능 보호, 면역 기능 촉진, 항균, 항노화 등이 있으며 심혈관계에도 작용하여 관상동맥에서의 혈류량을 향상시키기도 하는 것으로 알려져 비교적 다양한 활성을 가진 것으로 보고되고 있다¹¹⁾.

神農本草經에 따르면 “五味子は 기(氣)가 따뜻하여 하늘에서 봄에 상승하는 목기(木氣)를 내려 받아 족소양담경으로 들어가고, 맛이 시고 독이 없어 땅에서 동방의 목미(木味)를 얻어 족궤음간경으로 들어간다. 담(膽)은 생기(生氣)의 근원이며, 간(肝)은 혈기(血氣)를 생성하는 장(臟)이다”고 하여¹⁷⁾五味子が 肝과 膽으로 귀경하므로 혈액 및 간지질 대사에 영향을 줄 것이라 사료되어五味子를 재료로 선정하였다.

五味子에 함유되어 있는 대표적 구성 성분들은 schisandrin, gomisins A, gomisins N 등 주로 리그난 화합물인 것으로 알려져 있으며, 이 중 schisandrin의 경우 혈당 저하, 항궤양, 만성 간염 치료 등의 효능이 있는 것으로 보고되어 있다¹⁸⁾. 이러한 효능 외에도 다양한 맛을 한꺼번에 가진 특성으로 인해

Table 3. Number of down- or up-regulated genes. The number of down-regulated genes(below 0.5 fold ratio) or up-regulated genes(over 2 fold ratio) were measured in each experimental condition.

CTL group		SFH group	
Down-regulated genes	153	No-change	56
Up-regulated genes	527		310

차, 술, 화채 등과 같은 음식의 재료로도 널리 활용되고 있는 약재로 임상에서의 활용도가 비교적 높은 약재이다. 치료를 목적으로 사용하는 약재의 경우 안전성의

Table 4. Ontological analysis of pathways regulated by hyperlipidemia. Top 10 processes were selected and the scheme of metabolism were designed using related processes.

Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamin
sterol metabolic process	RT	█	15	2.6	1.4E-8	2.6E-5
cholesterol metabolic process	RT	█	14	2.4	3.6E-8	3.3E-5
sterol biosynthetic process	RT	█	9	1.5	8.8E-7	5.3E-4
cholesterol biosynthetic process	RT	█	8	1.4	1.6E-6	7.3E-4
steroid biosynthetic process	RT	█	12	2.1	2.7E-6	9.9E-4
transcription	RT	█	80	13.7	2.8E-6	8.4E-4
steroid metabolic process	RT	█	17	2.9	6.9E-6	1.8E-3
regulation of cell cycle	RT	█	17	2.9	2.2E-4	4.9E-2
lipid biosynthetic process	RT	█	20	3.4	2.6E-4	5.0E-2
regulation of transcription	RT	█	86	14.7	3.5E-4	6.1E-2

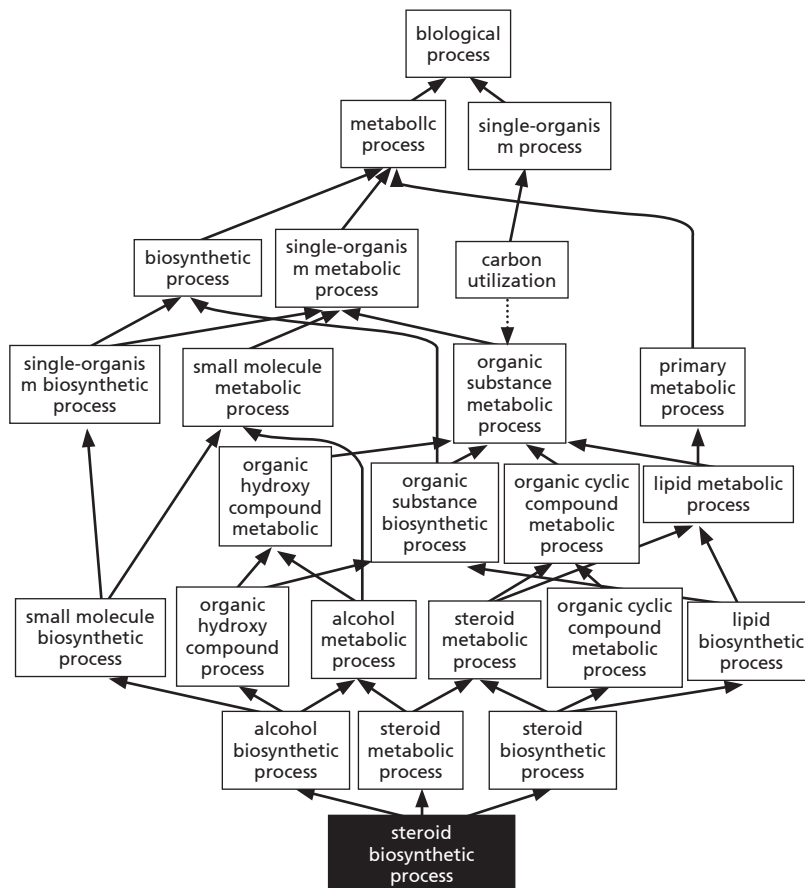
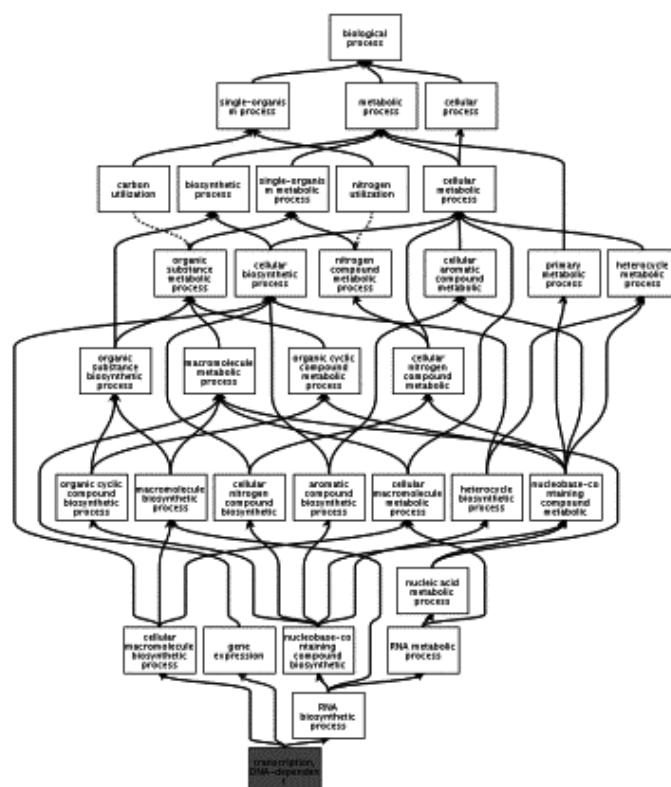


Table 5. Ontological analysis of pathways regulated by SFH administration. Top 15 processes were selected and the scheme of metabolism were designed using related processes.

Term	RT	Genes	Count	%	P-Value	Benjamin
transcription	RT	█	131	13.6	1.0E-5	1.8E-2
regulation of transcription	RT	█	142	14.7	6.5E-5	5.9E-2
rhythmic process	RT	█	12	1.2	7.0E-5	4.3E-2
DNA metabolic process	RT	█	48	5.0	2.9E-4	1.3E-1
DNA recombination	RT	█	14	1.5	8.1E-4	2.6E-1
regulation of RNA metabolic process	RT	█	84	8.7	2.2E-3	5.0E-1
DNA repair	RT	█	30	3.1	2.5E-3	4.9E-1
regulation of transcription, DNA-dependant	RT	█	82	8.5	3.1E-3	5.2E-1
cellular response to stress	RT	█	41	4.3	6.2E-3	7.3E-1
regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	RT	█	38	3.9	8.7E-3	8.0E-1
response to DNA damage stimulus	RT	█	34	3.5	8.9E-3	7.8E-1
chromosome organization	RT	█	34	3.5	1.3E-2	8.7E-1
circadian rhythm	RT	█	5	0.5	1.4E-2	8.7E-1
negative regulation of macromolecule biosynthetic process	RT	█	28	2.9	1.9E-2	9.2E-1
DNA replication	RT	█	19	2.0	1.9E-2	9.1E-1



확보가 가장 중요한 선결 과제이며 이러한 특성으로 인해 식품 및 의약품으로 함께 사용할 수 있는 재료로부터 치료 물질을 개발하는 과정은 앞으로 더욱 유리한 연구 개발 방법이 될 것으로 기대된다. 지금까지 한의학계는 전통적인 제제 이외에는 별 관심을 가져오지 않았지만, 새로운 제제 및 제형의 개발과 함께 부작용이 없으면서도 강한 활성을 가지는 한약 성분 추출방법이 필수적이며, 객관적으로 활성이 검증된 제제의 개발과 활용이 멀지 않은 미래에 한의학 임상에서 아주 중요한 위치를 차지하게 될 것이다. 따라서 본 연구에서는 오랜 기간 동안 식품 및 의약품으로 다양하게 활용되어 온五味子を 재료로 하여 예비 연구를 수행하였으며 고지혈증을 개선할 수 있는五味子 활성 분획을 탐색하고자 하였다.

본 연구에 나타내지는 않았지만 선행 연구를 통해 실험동물인 생쥐에 고지방식을 적용함으로써 유발된 고지혈증에五味子 용매 분획물들을 투여하여 혈청 중 콜레스테롤 함량 변화에 핵산 분획물이 가장 강한 활성을 나타낸다는 것을 확인하였으며, 본 연구에서는 핵산 분획 추출물(SFH)만을 연구 재료로 사용하였다.

본 연구의 결과에서 6주간의 고지방식의 공급을 통해 혈중 total cholesterol과 triglyceride가 정상식이 군에 비해 유의한 증가를 보이는 고지혈증이 유발되었으며, 공복 시 혈당 또한 유의한 수준으로 증가하였다.

약물 투여가 진행되었던 마지막 2주간의 체중 변화율은 각 군 사이에 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았는데(Fig. 2), 고지방 식이에 의한 실험군 간의 체중 변화율의 유의한 차이가 나타나지 않아도 혈중 total cholesterol과 triglyceride가 증가하여 고지혈증이 유도되고, 혈중 glucose 함량 또한 증가하는 흥미로운 결과가 관찰되었다(Fig. 2, 3, 5, 6). 현재까지의 연구 결과만으로는 이러한 결과에 대한 명확한 해석이 불가능 하지만 추후 후속 연구를 통해 고지방 식이에 의한 피하지방 및 복부지방 등의 변화를 관찰한다면 이러한 관찰 결과를 합리적으로 설명할 수 있을 것으로 생각된다. 2주 동안의 SFH 투여에 의해 혈청 중 total cholesterol과 triglyceride

가 SFH군의 경우 CTL군에 비해 유의하게 감소되는 등의 변화가 나타났는데, 향후 고지방 식이 섭취 기간을 연장하여 이에 대한 약물 투여의 결과를 살펴본다면 CTL군과 SFH군에서 유의한 체중의 변화가 관찰될 수도 있을 것으로 추정된다.

실험을 진행하는 동안 실험동물이 섭취한 사료와 음용수의 양이 연구 결과에 영향을 미칠 수 있으며, 인간의 경우에도 식습관의 변화가 비만, 당뇨 고지혈증의 호전과 악화에 직접적으로 영향을 미칠 수 있으므로¹⁹⁾, 본 연구에서는 2주간의 약물 투여 기간 동안 식이량과 음수량 변화를 살펴보았으며, 그 결과 모든 군에서 특별한 차이를 발견할 수 없었다(Table 2). 이는 고지방 식이를 통해 유발된 고지혈증의 임상 지표 개선에 오미자 핵산 분획물인 SFH가 식욕 억제 등의 방법으로 고지혈증을 조절하지 않았음을 나타낸다. 이러한 결과는 한약을 복용할 경우 식사량을 조절하는 과정을 통해 비만, 고지혈증 등이 개선될 것이라는 임상에서의 막연한 추측과는 상이한 결과로 해석된다.

고혈당과 심혈관 질환 사이의 연관성에 관해서는 아직 그 기전이 명확하게 밝혀지지는 않았지만 고혈당이 대사성 질환과 아주 밀접한 관련이 있다는 것은 이미 보고된 바 있으며, 관상동맥질환과 같은 심혈관 질환과의 상관성은 매우 밀접한 것으로 보고되고 있다^{20, 21)}. 본 연구의 결과에서 6주간의 고지방식이 섭취는 공복 시 혈당을 통계적으로 유의한 수준으로 상승시켰으며, SFH의 투여는 고지방식에 의한 공복 시 혈당상승을 유의하게 감소시켰다(Fig. 6). 이러한 결과는 김 등¹³⁾이五味子を 물과 에탄올로 추출하여 혈당 강하의 작용이 있음을 보고한 연구 결과와도 유사하였다.

AST(Aspartate aminotransferase) ALT(Alanine aminotransferase)는 간 세포에 존재하는 aminotransferase의 일종으로 세포가 손상되었을 때 혈중으로 분비되므로 간세포 손상의 표지로 활용되는 지표 물질로 간 기능 검사에 있어서 주요한 측정 항목이다^{22, 23)}. 본 연구에서는 실험동물의 혈청 중 AST 및 ALT 함량을 분석하여 CTL군 및 SFH군에서의 간 조직 손상 여부를 확인하여 보았는데, 건강

한 간 기능을 가진 NOR군과 차이가 나타나지 않았으므로 고지방식이 및 SFH의 투여가 간의 기능을 저하시키거나 약물인성 간 손상을 나타내지 않음을 관찰할 수 있었다(Fig. 7, 8). 이러한 결과는 본 연구에 사용된 동물 모델은 경미한 고지혈증 모델로 간 기능의 이상까지는 초래하지 않았다는 것을 의미하며, 또한 본 연구에서 사용된 기간과 농도 내에서 SFH의 투여가 간 기능 손상을 초래하지 않는다는 것을 의미하기도 한다. 이는 제한적이지만五味子 핵산 분획물의 안전성 입증에 위한 보조 자료로 활용될 수 있다고 생각한다.

간 조직 내 지방의 축적은 비만, 고지혈증 등에서 일어날 수 있으며, 신장과 심장 및 근육에도 나타날 수 있지만 특히 간에 지방의 축적의 정도가 심한 상태를 간지방증(Hepatic steatosis)라 하는데, 간 조직 내의 지방 축적은 일반적으로 음주, 부적합한 식습관 등과 당뇨병, 고혈압과 같은 대사이상 질환이 다양하게 복합되어 일어나며^{22, 24)}, 간지방증에서의 지방 변화는 주로 triglyceride의 세포내 축적에 기인하는 것으로 알려져 있다²⁵⁾. 간 지방증의 대표적 조직학적 특징 중 하나로 steatosis가 있는데, 이는 일반적으로 간 실질 세포의 liposome 내에 지방이 축적되는 것을 의미 한다²⁶⁾.

본 연구의 결과에서 6주간의 고지방식이 투여는 실험동물의 간 조직에 지방 조직의 축적을 나타내지 않았는데, 이는 고지방식이의 기간이 비교적 짧은데 영향을 받은 것으로 추정되며, 6주간의 고지방식은 간 기능에는 별다른 영향을 주지 않으면서 고지혈증을 유발하는 것으로 해석 된다(Fig. 9).

또한 조직학적으로 간 조직 내 지방 축적이 관찰되지 않았다 하더라도 인체 각 부위는 지질의 산화로 인해 2차적인 손상을 받을 수 있기 때문에 본 연구에서는 경증의 간 손상 및 이의 회복 여부를 확인하기 위하여 지질과산화물 중 하나인 MDA (malondialdehyde) 함량을 측정하였는데, 고지방식에 의해 관련 수치가 증가하였다. 이는 고지혈증으로 인해 간 조직 내 지질의 산화가 유도되고 심할 경우 간세포 손상의 가능성이 있음을 보여 주며 (Fig. 10), SFH 투여는 고지방식에 의한 지질과산

화물의 증가를 억제하지 못하였다.

김 등¹²⁾이 최근五味子 물 및 에탄올 추출물의 시험관 내에서의 항산화 활성을 보고한 바 있으므로, 본 연구에서는 SFH 투여가 생체 내 항산화 체계에 영향을 미치는지 확인하기 위하여 간 조직 내에서의 GSH 등 항산화 효소 활성을 함께 측정하여 보았다. 그 결과 고지혈증 유발로 인해 간 조직 내 SOD 및 catalase 활성이 낮아졌으며, 이 중 SOD의 경우 SFH 투여로 인해 활성이 회복되는 결과가 관찰되었다(Fig. 12).

적출된 간 조직으로부터 유전자 발현의 변화를 살펴본 결과, 고지혈증이 유발 되었을 경우 발현이 증가 또는 감소하였던 유전자 중 일부에서 SFH를 투여하였을 때 정상 수준으로 유지되는 결과를 관찰할 수 있었는데, Fig. 14에서 CTL 부위에서는 붉은 색 또는 초록색을 띠는데 비해 그 오른쪽인 SFH 부위에서는 검은색으로 나타나 정상으로 회복되었음을 알 수 있다.

발현이 변화한 유전자의 개수를 확인해보면 고지혈증 유발에 의해 발현이 감소된 유전자가 153개, 증가된 유전자가 527개였으며, 이 유전자들 중 SFH 투여에 의해 정상으로 유지된 유전자는 각각 56개 및 310개로 확인되었다(Table 3). 따라서 전체적으로 약 54% 정도의 유전자 발현이 억제되었음을 알 수 있다.

한편 고지혈증 유발에 의해 발현이 변화한 유전자들이 직접적으로 관여하는 생물학적 과정을 분석한 결과, 주로 sterol 등과 같은 지질 대사와 관련됨을 확인할 수 있었다(Table 4). 반면 SFH 투여로 발현이 조절되는 유전자의 생물학적 기능은 DNA 복제, 전사 등에 주로 관여하는 것으로 나타났다(Table 5).

이러한 결과를 명확하게 해석할 수는 없으나 SFH 투여가 직접적으로 고지혈증의 발생에 관여하는 유전자를 조절하는 것이 아니라 조금 더 기본적인 기능을 하는 유전자를 조절함으로써 결과적으로 고지혈증 유발에 관여하는 유전자에 간접적으로 영향을 미치는 것으로 추측된다.

위에서의 연구 결과들을 종합하여보면,五味子의 핵산 분획물인 SFH는 고지혈증 및 공복 시 혈당 상

승을 조절함으로써 고지혈증의 임상 지표들을 개선하였으며, 간 조직 내 항산화 효소인 SOD의 활성도 회복시켜 여러 질환으로 인한 간 조직의 손상을 억제할 수 있는 가능성을 보여주었다. 이러한 결과들은 심혈관 질환의 주요한 인자인 혈중 지질과 혈당을 동시에 조절함으로써 심혈관 질환의 예방 및 치료 효과를 기대할 수 있으며, 제한적이거나 五味子 핵산 분획물의 안전성을 확인하였으므로 추후 세부 분획물 획득으로 인한 강력한 고지혈증 개선 물질의 개발이 가능할 것으로 생각된다.

■ 결론

五味子 핵산 분획 추출물(SFH)이 고지혈증 생쥐에 미치는 영향을 확인하기 위하여 고지방식을 통해 고지혈증을 유발하고, 2주간 SFH를 투여한 다음 혈중 total cholesterol, HDL-cholesterol, triglyceride 함량 변화 및 공복 시 혈당 변화를 관찰하고, 간 세포 손상 여부 확인을 위한 AST 및 ALT 검사를 시행하였으며, 간을 적출하여 조직병리학적 이상 변화를 확인한 다음, 간 조직 내 유전자의 변화와 어떠한 관련이 있는지 확인하기 위해 RNA를 분리하여 microarray 분석을 수행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 고지혈증과 SFH 투여는 생쥐의 체중 증가량에 영향을 미치지 못하였다.
2. SFH는 고지혈증 유발에 의하여 상승된 혈청 중 total cholesterol과 triglyceride 함량을 유의하게 감소시켰다.
3. 고지혈증에 의해 상승된 공복 시 혈당이 SFH 투여에 의해 유의하게 감소되었다.
4. 고지혈증 및 SFH 투여는 혈중 AST 및 ALT에는 영향을 미치지 않았다.
5. 고지혈증에 의해 감소된 간 조직 내 SOD 활성이 SFH 투여에 의해 증가되었다.
6. SFH 투여는 고지혈증 유발에 의해 발현이 변화한 유전자들의 약 54% 정도를 정상수준으로 유지시켰다.

이러한 결과들을 통하여 五味子 핵산 분획물인 SFH는 고지혈증 개선과 공복 시 혈당 조절, 간 조직 내 항산화 효소 활성의 회복 등과 같은 작용을 가지고 있으므로, 향후 심혈관계 질환 치료제 개발에 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

참고 문헌

1. Fan J, Song Y, Chen Y, Hui R, Zhang W. Combined effect of obesity and cardio-metabolic abnormality on the risk of cardiovascular disease: A meta-analysis of prospective cohort studies. *International Journal of Cardiology*. 2013;168(5):4761-8.
2. 배남규, 권인선, 조영채. 한국인의 10년간 비만 수준의 변화 양상 : 1997-2007. *대한비만학회지*. 2009;18(1):24-30.
3. Nelson RH. Hyperlipidemia as a Risk Factor for Cardiovascular Disease Review. *Primary Care: Clinics in Office Practice*. 2013;40(1):195-211.
4. Rubenfire M, Brook RD, Rosenson RS. Treating Mixed Hyperlipidemia and the Atherogenic Lipid Phenotype for Prevention of Cardiovascular Events. *The American Journal of Medicine*. 2010;123(10):892-8.
5. Sung YY, Yoon T, Kim SJ, Yang WK, Kim HK. Anti-obesity activity of *Allium fistulosum* L. extract by down-regulation of the expression of lipogenic genes in high-fat diet-induced obese mice. *Mol Med Report*. 2011(a);4(3):431-5.
6. Sung YY, Yoon T, Yang WK, Kim SJ, Kim HK. Anti-obesity effects of *Geranium thunbergii* extract via improvement of lipid metabolism in high-fat diet-induced obese mice. *Mol Med Report*. 2011(b);4(6):1107-13.
7. Niu C, Chen C, Chen L, Cheng K, Yeh C, Cheng J. Decrease of blood lipids induced by Shan-Zha (fruit of *Crataegus pinnatifida*) is mainly related to an increase of PPAR α in liver of mice fed high-fat diet. *Horm Metab Res*. 2011;43(9):625-30.
8. Yamamoto N, Kanemoto Y, Ueda M, Kawasaki K, Fukuda I, Ashida H. Anti-obesity and anti-diabetic effects of ethanol extract of *Artemisia princeps* in C57BL/6 mice fed a high-fat diet.

- Food Funct. 2011;2(1):45-52.
9. Lai P, Du JR, Zhang MX, Kuang X, Li YJ, Chen YS, He Y. Aqueous extract of *Gleditsia sinensis* Lam. fruits improves serum and liver lipid profiles and attenuates atherosclerosis in rabbits fed a high-fat diet. *J Ethnopharmacol.* 2011;137(3):1061-6.
 10. 전국한의과대학 공동교재편찬위원회. 본초학. 영림사; 2011, p. 683-84.
 11. 김호철. 한약약리학. 집문당; 2008, p. 488-90.
 12. 김현구, 나경민, 예수향, 한호석. 오미자 추출물의 추출특성 및 항산화 효과. *한국식생활문화학회지.* 2004;19(5):484-90
 13. 김순임, 심기현, 주신윤, 한영식. 추출 조건에 따른 오미자 추출물의 항산화 및 혈당 강하에 관한 연구. *한국식품영양학회지.* 2009;22(1):41-7.
 14. 고병섭, 박성규, 최수봉, 전동화, 최미경, 박선민. 오미자 추출물의 혈당 강하 효과에 관한 연구. *한국응용생명화학학회지.* 2004;47(2):258-64
 15. 이성환, 이현. 양릉천 오미자 약침이 고지방식으로 유발된 고지혈증 흰쥐에 미치는 영향. *대한침구학회지.* 2011;28(2):143-53.
 16. 권후자, 박찬성. 오미자 추출물의 생리활성. *한국식품저장유통학회지.* 2008;15(4):587-92.
 17. 의성당편집부. 한글 신농본초경. 의성당; 2012, p. 160-1.
 18. 최은오, 이봉수, 박용수, 서은옥, 정봉우. Schizandrin 함량이 높은 음료 개발을 위한 오미자 (*Schizandra chinensis* Baillon)의 추출 조건. *한국 생물공학학회지.* 2008;23(3):271-5.
 19. 박정아, 윤진숙. 비만 또는 고혈당 증상 보유에 따른 대사성증후군의 식습관 및 영양상태 비교. *한국영양학회지.* 2005;38(8):672-81.
 20. 윤지성. 식후 고혈당과 심혈관질환. *임상당뇨병.* 2012;13(1):18-22.
 21. Sheu WH, Rosman A, Mithal A, Chung N, Lim YT, Deerochanawong C et al. Addressing the burden of type 2 diabetes and cardiovascular disease through the management of postprandial hyperglycaemia: an Asian-Pacific perspective and expert recommendations. *Diabetes Res Clin Pract.* 2011;92:312-21.
 22. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N. Engl. J. Med.* 2002;346(16):1221-31.
 23. 김재택. 당뇨병과 간기능 이상 ; 당뇨병환자에서 간효소치 상승의 기전. *임상당뇨병.* 2006;7(2):120-3.
 24. Bayard M, Holt J, Boroughs E. Nonalcoholic fatty liver disease. *American family physician.* 2006;73(11):1961-8.
 25. Reddy JK, Rao MS. Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2006;290(5):852-8.
 26. Cotran, Kumar, Collins, Robbins Pathologic Basis of Disease. Philadelphia: W.B Saunders Company. 1998.