

製何首烏加味方이 고지혈증 및 산화적 손상에 미치는 영향

윤현덕, 조현경, 유호룡, 설인찬, 김윤식
대전대학교 한의과대학 심계내과학교실

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

Hyeon-deok Youn, Hyun-kyung Jo, Ho-ryong Yoo, In-chan Seol, Yoon-sik Kim
Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dae-jeon University

ABSTRACT

Objectives: This experiments were performed to determine the effects of the *Jehasuogamibang* (製何首烏加味方: JHGB) on antioxidationactivity and hyperlipidemia induced by a hypercholesterolemic diet in mice.

Methods: After treatment with JHGB expert safety in cytotoxicity and toxicity of Human fibroblast cells and liver and kidney, effect on Reactive Oxygen Species, serum total cholesterol, LDL-cholesterol, triglyceride, glucose, HDL-cholesterol, lipid peroxid of liver tissue, significantly increased SOD and catalase.

Results:

1. JHGB showed safety in cytotoxicity and toxicity of human fibroblast cells and liver and kidney.
2. JHGB showed significant inhibitory effect on reactive oxygen species.
3. JHGB significantly decreased serum total cholesterol, LDL-cholesterol, triglyceride, and glucose, and significantly increased serum HDL-cholesterol.
4. JHGB significantly decreased lipid peroxide of liver tissue and significantly increased SOD and catalase.

Conclusions: These results suggest that *Jehasuogamibang* is effective in antioxidationactivity and dietary hyperlipidemia-induced mice.

Key words: Hyperlipidemia, Antioxidation Activity, *Jehasuogamibang*

1. 緒 論

뇌졸중과 관상동맥질환을 포함한 심혈관계질환은 암과 함께 우리나라의 주요 사망원인이며¹, 동맥벽이 비후하고 굳어지는 동맥경화성 질환이 가장 큰 비중을 차지하고 있다².

고지혈증은 혈청 중 triglyceride, cholesterol,

phospholipid, free fatty acid 등의 지질이 혈액내에 과도하게 증가되어있는 상태를 말하는 것으로³⁻⁵, 고혈압, 흡연, 당뇨, 고요산혈증, 비만, 운동 부족과 함께 동맥경화증의 주요 위험인자이며², 유병률이 점차 많아지고, 그 정도가 심해지고 있다⁶.

고지혈증 치료에 사용되는 주요 약물로는 HMG CoA reductase inhibitors(Statins), micronized fenofibrate (Lipidil), bile acid sequestrants(Resins), Nicotinic acid, probucol, 어유 또는 오메가-3 지방산 등이 있다^{7,8}. 그러나 소화불량, 간독성, 근육통, 횡문근변성, 광과민성 등 부작용이 유발될수 있어 장기간

· 교신저자: 김윤식 대전시 동구 대학로 62
대전대학교 한의과대학 심계내과학교실
TEL: 053-759-8875
E-mail: manchonhani@naver.com

복용은 문제점이 있는 것으로 알려져 있다⁹⁻¹¹.

한의학에서 고지혈증이란 병명은 없으나 《靈樞·衛氣失常論》¹²에서 “肥人多, 有膏, 有肉”라고 하여 지질에 대해 오래전부터 인식하고 있었다. 대개 痰飲, 瘀血 등의 범주에 속하며, 嗜食肥甘厚味の 外的要因과 肝脾腎機能失調의 內的要因에 의해 發病되는 本虛標實의 병리적 특성이 있다¹³.

製何首烏加味方(JHSB)은 《心血管科專病中醫臨床診治》¹⁴에 기록된 처방으로, 製何首烏, 枸杞子, 決明子, 茵陳, 山查肉, 蘿菔子, 免絲子, 白茯苓, 黃芩, 淫羊藿 등으로 구성되었으며, 滋補肝腎, 利濕化痰하는 효능이 있어 대전대학교 한방병원에서 고지혈증과 관련된 질환에 다용되고 있다.

본 연구는 製何首烏加味方이 고지혈증과 산화적 손상에 미치는 영향을 과학적으로 증명하고자 세포의 생존율 및 간·신의 기능평가를 통해 안전성을 확인한 후, human umbilical vein endothelial cell(이하 HUVEC)에서 항산화활성, apoptosis를, rat에서 몸무게 및 간 무게, 콜레스테롤, triglyceride, glucose, albumin, globulin, albumin/globulin ratio 변화, 간조직의 과산화지질 함량, 항산화 활성 등에 미치는 영향 등을 관찰하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 實驗

1. 재료

1) 동물 및 사육 조건

본 실험에 사용된 실험용 쥐는 체중 300-350 g의 웅성 Sprague-Dawley(SD) rat은 실험 당일까지 고형사료와 고콜레스테롤 식이사료(Bio-serv, USA)를 자유 식이하면서 물을 충분히 공급하였다. 실온 22± 2°C, 상대습도 50±10%, 조명시간 12시간(07:00~19:00), 조도 150~300 Lux로 설정하여 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 체중 변화가 일정하고 건강한 쥐만을 선별하여 실험에 사용하였다. 일반 사료와 고콜레스테롤 식이 사료의 조

성 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. Composition of Basal Diet, Prescription of Hyperlipidemic Diet

| Composition | Content (%) |
|---------------------|----------------------|
| Crude protein | above 22.1 |
| Crude fat | above 8.0 |
| Crude fiber | below 5.0 |
| Crude ash | below 8.0 |
| Calcium | above 0.6 |
| Phosphorus | above 0.4 |
| Diets ingredient | Concentration (g/kg) |
| Purina mouse cow | 750.0 |
| Casein | 75.0 |
| Cocoa butter | 75.0 |
| Dextrose | 25.0 |
| Dextrin | 16.25 |
| Cholesterol | 12.5 |
| Cellulose | 12.5 |
| Sucrose | 16.25 |
| Mineral mix #200000 | 8.75 |
| Sodium cholate | 5.0 |
| Vitamin mix #310035 | 2.5 |
| Choline chloride | 1.25 |

2) 약재

본 실험에 사용한 製何首烏加味方(*Jehasuogamibang*, JHSB)의 구성 약물은 대전대학교 둔산한방병원에서 구입하여 정선한 후 사용하였다(Table 2).

Table 2. The Compositions of *Jehasuogamibang* (JHSB)

| Herb name | Scientific name | Amount (g) |
|-----------|---------------------------------------|------------|
| 製何首烏 | <i>Polygonum multiflorum</i> Thunb | 20 |
| 枸杞子 | <i>Lycium chinense</i> Miller | 15 |
| 免絲子 | <i>Cuscuta japonica</i> Choisi | 12 |
| 決明子 | <i>Cassia obtusifolia</i> | 15 |
| 白茯苓 | <i>Poria cocos</i> Wolf | 10 |
| 山查肉 | <i>Crataegus pinnatifida</i> | 15 |
| 黃芩 | <i>Scutellaria baicalensis</i> GEORGE | 10 |
| 茵陳 | <i>Artemisia capillaris</i> Thunb | 15 |
| 蘿菔子 | <i>Raphanus sativus</i> L | 15 |
| 淫羊藿 | <i>Epimedium koreanum</i> Nakai | 9 |
| 總量 | | 136 |

3) 시약 및 기기

(1) 시약

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), Heparin, ECGS, Sodium citrate, LPS, N-2-hydroxyethyl-piperazine-N-2-ethane sulfonic acid (HEPES)는 sigma 사(USA) 제품을, Dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Sowa chemical사(Japan) 제품을, Ethylactate는 Junsei사(Japan) 제품을, Potassium Phosphate Monobasic(KH₂PO₄)는 Yakuri사(Japan) 제품을, ACAT, HMG-CoA reductase는 바이오니아사(Korea) 제품을, 이 밖에 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

(2) 기기

본 연구에 사용된 기기는 Ice-maker(Vision, Korea), Centrifuge(Hanil Co., Korea), Rotary vacuum evaporator (Büchi 461, Switzerland), Deep freezer(Sanyo Co., Japan), Autoclave(Sanyo, Japan), Ultrasonic cleaner (Branson Ultrasonics Co., USA), ELISA reader (Molecular Device., USA), Roller Mixer(Gowon scientific technology Co., Korea), 한약유출기(DWP-1800T, 웅진, Korea), HPLC(CMB-20A, Shimadzu, Japan), Spectrophotometer(UV-2450, Shimadzu, Japan), cell cytometry(FACS, Beckman Co., USA), Balance(Cass, Korea), 생화학기(AU400, Olympus, USA), 감마카운터기(WIZARD 1470, Finland) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 약물 추출

JHSB 2침을 한약 약탕기에 넣고, 증류수 1500 ml와 같이 혼합하여 3시간 열탕하여 추출한 후 흡입 여과하였다. 이를 rotary vacuum evaporator 에서 감압 농축하여 분말 13.75 g을 얻었으며, 얻어진 분말은 초저온냉동고(-80 °C)에서 보관하면서, 실험에 따라 필요한 농도로 증류수에 희석하여 사용하였다.

2) 안전성 검사

(1) 세포독성 측정

세포독성 측정은 인간 제대혈관내피세포(Human umbilical vein endothelial cell, HUVEC) 및 인간 단핵구 세포주(THP-1 cell)를 사용하였다.

96 well plate에 5×10³ cell/100 μl의 농도로 HUVEC 또는 THP-1 세포를 분주한 다음 각각 48시간과 24시간 동안 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 배양(HUVEC의 monolayer 형성)한 후 새 배지로 교환한 다음에 JHSB를 culture media에 녹여 각각 10, 20, 50 (μg/ml)의 농도로 처리한 후 48시간 배양하였다. MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 용액을 10 μl 첨가하여 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 4시간을 배양한 다음, 100 μl의 solubilization 용액을 추가로 첨가하였다. 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양한 다음 ELISA reader를 이용하여 550-600 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) 간 기능 측정

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

(3) 신 기능 측정

실험 종료 후 혈액을 채취해 혈청을 분리하여 creatinine, uric acid 검사를 실시하였다.

3. *In vitro* 실험

1) 항산화 활성 측정

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

150 mM DPPH/EtOH 150 μl에 JHSB를 200, 100, 50, 25 μg/ml 농도로 희석하여 100 μl씩 첨가한 후 37 °C에서 30분간 반응시켰다. 이를 흡광도 517 nm에서 측정하여 아래의 방법으로 계산하였다.

DPPH 소거능 (%) =

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

(2) Superoxide dismutase(SOD) 유사 활성 측정
JHSB 0.2 ml에 tris-HCl buffer(pH 8.5) 2.6 ml

과 7.2 mM pyrogallol 0.2 ml를 가하여 25 °C에서 10분간 반응 후 1 N HCl 0.1 ml로 반응을 정지시켰다. 반응액을 420 nm에서 흡광도를 측정하고, buffer를 첨가한 것을 대조군으로 하여 아래와 같이 활성도를 측정하였다.

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

(3) 세포내 reactive oxygen species(ROS) 활성 측정

96 well plate에 5×10^3 cell/100 μ l의 농도로 HUVEC을 분주한 다음 24시간 동안 37 °C, 5% CO₂ 배양기에서 배양한 후 새 배지로 교환한 다음에 JHSB를 culture media에 녹여 50 (μ g/ml)의 농도로 처리하였다. 1시간 배양 후 TNF- α 10 (ng/ml) 처리하여 1시간 배양한 다음에 Trypsin-EDTA를 이용하여 세포를 모아 10 μ M의 2,7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFDA)를 첨가하여 실온에서 5~30분 배양하고 FACS를 이용하여 형광 측정하고 분석하였다.

2) 세포고사 측정(apoptosis assay)

24 well plate에 4×10^4 cell/500 μ l의 농도로 HUVEC을 분주한 다음 24시간 동안 37 °C, CO₂ 배양기에서 배양한 후 새 배지로 교환한 후 JHSB를 50 (μ g/ml) 농도로 처리하였다. 1시간 배양 후 LPS 10 (μ g/ml) 처리하여 24시간 배양하였고, Trypsin-EDTA를 이용하여 세포를 모아 PBS로 세척하여 1x binding buffer로 4×10^4 cells/100 μ l이 되게 희석하여 Annexin V-FITC와 propidium(PI)을 각각 2.5 μ l씩 첨가하여 실온에서 15분간 방치한 후 FACS를 이용하여 형광 측정하고 분석하였다.

4. In vivo 실험

1) 고콜레스테롤 사료에 의한 고지혈증 유발과 약물 투여

각 실험군은 정상군, 대조군 그리고 JHSB 투여군으로 나누어 정상군은 일반 사료와 식수를 충분

히 공급하였다 대조군과 JHSB 투여군은 Table 2의 조성으로 만들어진 고콜레스테롤 사료와 식수를 충분히 공급하였으며 JHSB 투여군은 고콜레스테롤 투여 2주 후부터 209 mg/kg/0.5 ml의 양으로 정해진 시간에 매일 투여하였다.

2) 체중 증가량 및 간장 무게 측정

체중 증가량은 고콜레스테롤 식이 투여를 시작한 주부터 매주 같은 시간에 측정하여 평균값을 산출하였고 실험 종료 후 몸의 혈액을 제거한 후 간장을 적출하여 무게를 측정하였다.

3) 체혈 및 혈청 성분 측정

JHSB의 투여 종료 후 12시간 절식 후 ether로 마취시킨 다음 심장에서 12 ml이상의 혈액을 취하여 5 ml을 15 ml conical tube에 넣어 6,500 rpm에 15분간 원심 분리시켜 혈청을 분리하였다. 분리한 혈청은 생화학기기(AU400, Olimpus, USA)를 이용하여 Total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, Triglyceride, Glucose 그리고 Albumin 등을 측정하였다.

4) 간조직의 효소활성 측정

(1) 효소원 제조

적출한 간은 PBS로 세척하여 수분을 제거하고, 1 g의 간 조직에 10 ml의 0.25 M sucrose/0.5 mM ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA)/5 mM N-2-hydro-xylethyl-piperazine-N-2-ethane sulfonic acid(HEPES) 용액을 가하여 ultraturax homogenizer를 이용하여 빙냉 하에서 마쇄하였다. 마쇄한 용액을 마쇄한 용액을 4 °C, 600 xg로 15분간 원심 분리하여 핵 및 미마쇄 부분을 제거한 후 4 °C, 8000 xg로 30분간 원심 분리하여 1 ml의 상등액을 TBARS 함량 측정에 사용하였다. 나머지는 4 °C, 10000 xg에서 30분간 원심 분리하여 상등액 중 일부를 취하여 0.4배양의 ethanol:chloroform(5:3) 냉혼합액을 가하여 2분간 진탕한 다음 다시 4 °C, 10000 xg에서 30분간 원심 분리하여 얻은 상등액을 superoxide dismutase(SOD) 활성도 측정에 사용하였다. Catalase 활성은 마쇄액을 4 °C, 10000 xg로 30분간 원심 분

리하여 얻은 침전물을 0.25 M sucrose 용액에 현탁 시키는 과정을 2회 반복 후 아래의 방법으로 측정하였다.

(2) 지질과산화도 측정

간조직의 과산화지질 정량은 Sato법을 이용하여 측정하였다. 제조한 간조직 효소원 0.5 ml에 TCA용액 2.5 ml를 가하여 잘 섞은 다음, 실온에서 10분간 방치한 후 1500 xg에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 버렸다. 남은 침전물은 0.05 M 황산으로 1회 세척 후 침전물에 0.05 M 황산 2.5 ml와 0.6% TBA 3.0 ml를 가하여 잘 섞은 후 95 °C의 항온 수조에서 30 분간 방치하였다. 여기에 n-butanol :pyridine(15:1) 혼합액 3.0 ml를 가하여 잘 섞은 후 1500 xg에서 10분간 원심 분리하고, 상등액을 취하여 530 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(3) 항산화 효소(SOD) 활성 측정

Oyanagui의 방법에 준하여 Cytochrome c, 2 μM xanthine sodium, 50 mM sodium phosphate buffer의 기질액에 효소액을 넣고 안정화 시킨 후 xanthine oxidase 0.2 unit/ml를 넣고 흡광도를 사용하여 550 nm에서 2분간의 흡광도를 측정하였다. Xanthine/xanthine oxidase 반응으로 생성된 superoxide anion에 의해 cytochrome c가 환원되는 것을 측정하는데, SOD에 의해 superoxide anion의 양이 감소하여 cytochrome c가 변화는 현상을 이용하여 SOD 활성을 측정하였다. Cytochrome C의 환원을 50% 억제하는 양을 SOD의 1 unit로 정의 하였다.

(4) Catalase 활성 측정

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

5. 통계 처리

본 실험에서 얻은 결과를 Student's t-test로 분석하여 p값을 구하였다. 각 대조군을 정상군과, 실험군을 대조군과 비교하여 p<0.05 일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

III. 實驗結果

1. 안전성 검사

1) 세포독성에 미치는 영향

(1) HUVEC에서의 세포 독성에 미치는 영향

HUVEC에 대한 세포독성에서는 대조군의 세포 생존율을 100±1.4(%)로 하였을 때, JHSB 10, 20, 50 (μg/ml) 농도 처리군에서는 생존율이 각각 99.3 ±6.2, 94.7±3.7, 107.9±6.8(%)로 나타났다(Fig. 1).

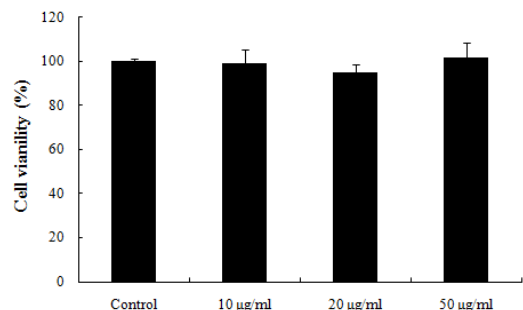


Fig. 1. Effects of JHSB on the viability of HUVEC.

HUVEC were cultured with various concentration of JHSB extract for 48 hr and the cell viability was measured by cytotoxicity assay. The results were presented by the mean ± S.D.

(2) THP-1 세포에서의 세포 독성에 미치는 영향

THP-1 세포에 대한 세포독성에서는 대조군의 세포 생존율을 100±0.0(%)로 하였을 때, JHSB 5, 10, 20, 50 (μg/ml) 농도 처리군에서는 생존율이 각각 89.8±4.4, 92.8±3.8, 87.8±4.2, 91.2±5.6(%)로 나타났다(Fig. 2).

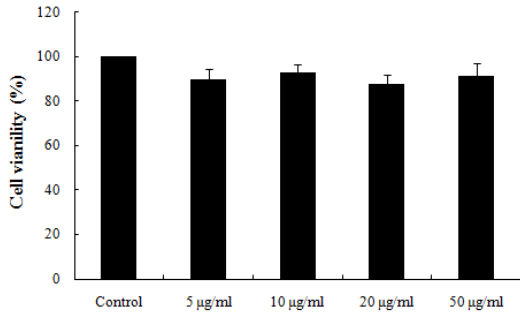


Fig. 2. Effects of JHSB on the viability of THP-1 cells.

HUVEC were cultured with various concentration of JHSB extract for 24 hr and the cell viability was measured by cytotoxicity assay. The results were presented by the mean ± S.D.

2) 간 기능에 미치는 영향

(1) AST 수치에 미치는 영향

AST는 정상군이 136.7±20.1 (IU/L) 대조군이 333.0±25.12 (IU/L)로 나타나 정상군에 비하여 대조군에서 유의성 있는(++p<0.01) 증가를 나타냈다. JHSB 투여군에서는 207.7±33.3 (IU/L)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게(**p<0.01) 감소하였다(Fig. 3).

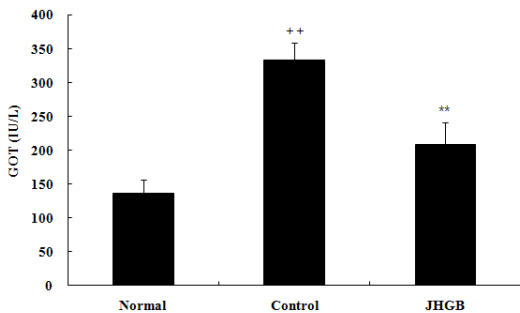


Fig. 3. Effect of JHSB on the AST in hyperlipidemia rat.

Normal : normal SD rat group
 Control : Hyperlipidemic diet and normal saline (0.5 ml/day) treated group
 JHSB : Hyperlipidemic diet and JHSB (209 mg /0.5 ml/day) treated group
 The results were presented by the mean ± S.D.

Statistically significant value was calculated by compared with normal group by Student's *t*-test (++p<0.01). Statistically significant value was calculated by compared with control group by Student's *t*-test (**p<0.01).

(2) ALT 수치에 미치는 영향

ALT는 정상군이 37.3±1.2 (IU/L), 대조군이 230.0±25.51 (IU/L)로 나타나 정상군에 비하여 대조군에서 유의성 있는(++p<0.01) 증가를 나타냈다. JHSB 투여군에서는 67.7±35.0 (IU/L)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게(**p<0.01) 감소하였다(Fig. 4).

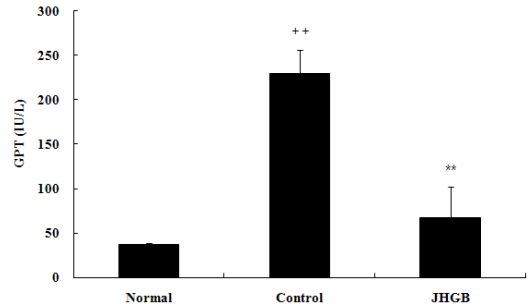


Fig. 4. Effect of JHSB on the ALT in hyperlipidemia rat.

Normal : normal SD rat group
 Control : Hyperlipidemic diet and normal saline (0.5 ml/day) treated group
 JHSB : Hyperlipidemic diet and JHSB (209 mg /0.5 ml/day) treated group
 The results were presented by the mean ± S.D. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by Student's *t*-test (++p<0.01). Statistically significant value was calculated by compared with control group by Student's *t*-test (**p<0.01)

(3) Alkaline phosphatase(ALP) 수치에 미치는 영향

ALP는 정상군이 127.3±24.5 (IU/L), 대조군이 221.7±9.1 (IU/L)로 나타나 정상군에 비하여 대조군에서 유의성 있는(++p<0.01) 증가를 나타냈다. JHSB 투여군에서는 155.0±19.1 (IU/L)로 나타나

대조군에 비하여 유의성 있게 (** $p < 0.01$) 감소하였다(Fig. 5).

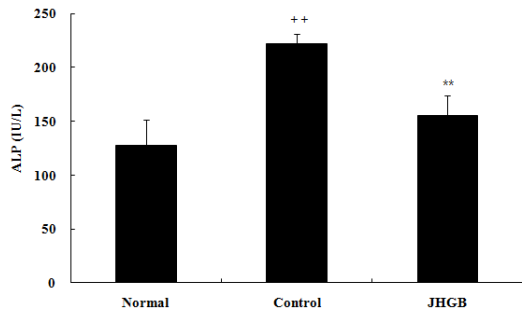


Fig. 5. Effect of JHSB on the ALP in hyperlipidemia rat.

Normal : normal SD rat group
 Control : Hyperlipidemic diet and normal saline (0.5 ml/day) treated group
 JHSB : Hyperlipidemic diet and JHSB (209 mg /0.5 ml/day) treated group
 The results were presented by the mean \pm S.D. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by Student's *t*-test ($++p < 0.01$). Statistically significant value was calculated by compared with control group by Student's *t*-test ($**p < 0.01$).

2) 신장 기능에 미치는 영향

(1) Creatinine 수치에 미치는 영향

Creatinine은 정상군이 0.49 ± 0.02 (mg/dl), 대조군이 0.50 ± 0.07 (mg/dl)로 나타나 정상군에 비하여 대조군에서 증가를 나타냈다. JHSB 투여군에서는 0.50 ± 0.03 (mg/dl)로 감소하였다(Fig. 6).

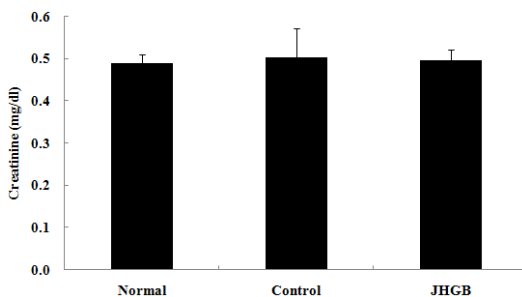


Fig. 6. Effect of JHSB on the creatinine in hyperlipidemia rat.

Normal : normal SD rat group

Control : Hyperlipidemic diet and normal saline (0.5 ml/day) treated group

JHSB : Hyperlipidemic diet and JHSB (209 mg /0.5 ml/day) treated group. The results were presented by the mean \pm S.D.

(2) Uric acid 수치에 미치는 영향

Uric acid는 정상군이 2.10 ± 0.11 (mg/dl), 대조군이 2.36 ± 0.01 (mg/dl)로 나타나 정상군에 비하여 대조군에서 유의성 있는 ($+p < 0.05$) 증가를 나타냈다. JHSB 투여군에서는 1.78 ± 0.16 (mg/dl)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 (** $p < 0.01$) 감소하였다(Fig. 7).

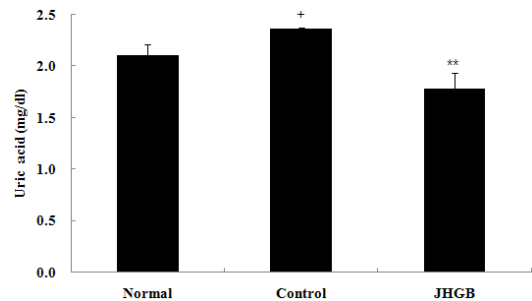


Fig. 7. Effect of JHSB on the Uric acid in hyperlipidemia rat.

Normal : normal SD rat group

Control : Hyperlipidemic diet and normal saline (0.5 ml/day) treated group

JHSB : Hyperlipidemic diet and JHSB (209 mg /0.5 ml/day) treated group

The results were presented by the mean \pm S.D. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by Student's *t*-test ($+p < 0.05$). Statistically significant value was calculated by compared with control group by Student's *t*-test ($**p < 0.01$).

2. 항산화 활성에 미치는 영향

1) DPPH 소거능에 미치는 영향

DPPH의 소거 활성은 200, 100, 50, 25 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 각각 55.0 ± 3.5 , 38.2 ± 1.1 , 19.9 ± 3.5 , 8.3 ± 1.2 (%)로 농도 의존적으로 증가하였다(Fig. 8).

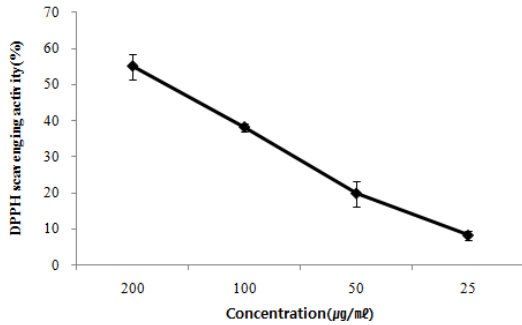


Fig. 8. Scavenging activity of JHGB.

JHGB 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 ± S.D.

2) SOD 유사 활성에 미치는 영향

SOD나 SOD 유사 물질에 의해서만 항산화 활성을 나타내는 pyrogallol을 이용하여 JHGB의 항산화 활성을 측정된 결과 200, 100, 50, 25 (µg/ml) 농도에서 각각 29.4±3.0, 21.4±2.4, 14.4±2.2, 12.2±2.4 (%)의 항산화 활성 효과를 나타내었다(Fig. 9).

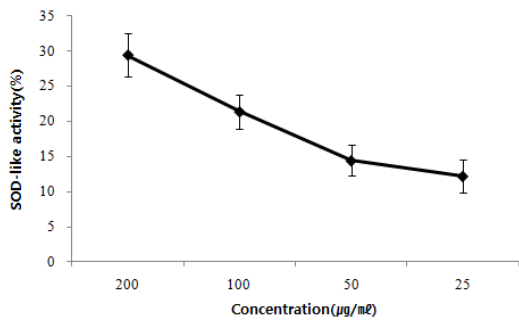


Fig. 9. Effects of JHGB on superoxide dismutase like activity.

JHGB were reacted with tris-HCl buffer (pH 8.5) 2.6 ml and 7.2 mM pyrogallol 0.2 ml for 10

mins at 25 °C and determined at 420 nm after stopping the reaction by adding 0.1 ml of 1 N HCl. The results were presented by the mean ± S.D.

3) HUVEC에서 ROS 생성에 미치는 영향

대조군의 ROS 생성율이 1.00±0.00일 때, TNF-α 처리군은 2.43±0.23으로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는(++p<0.01) 증가를 나타내었고, JHGB 50 (µg/ml) 농도에서 1.47±0.30으로 TNF-α 처리군에 비하여 유의성 있게(*p<0.05) 감소하였다(Fig. 10).

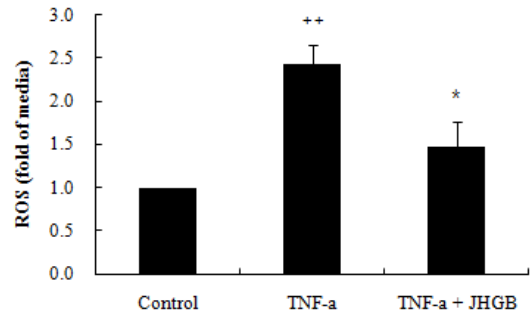


Fig. 10. Effects of JHGB on ROS production of HUVEC induced by TNF-α

The results represent the mean ± S.D. Statistically significant value was calculated by compared with control group by Student's t-test (++p<0.01). Statistically significant value was calculated by compared with TNF-α group by Student's t-test (*p<0.05).

3. HUVEC에서 apoptosis에 미치는 영향

대조군이 15.43±2.93(%) 일 때, LPS 처리군은 58.47±2.74(%)로 대조군에 비하여 유의성 있는(++p<0.01) 증가를 나타내었고, JHGB 50 (µg/ml) 농도에서 45.65±2.98(%)로 나타나 대조군에 비해 유의성 있는(**p<0.01) 감소를 나타내었다(Fig. 11).

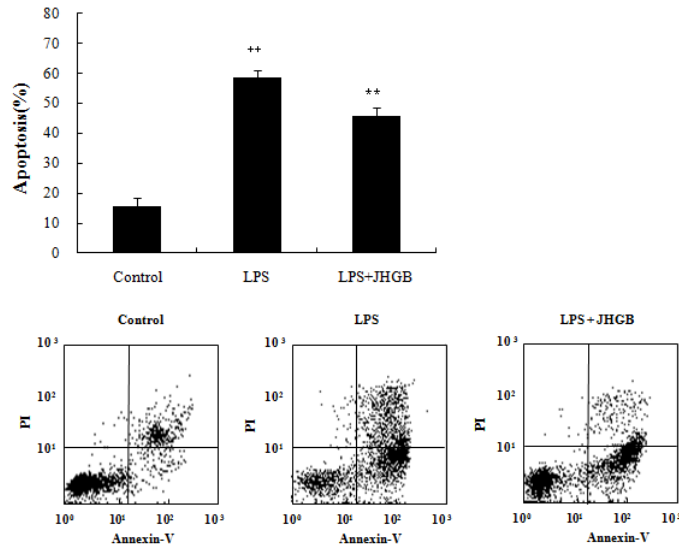


Fig. 11. Effects of JHSB on apoptosis of HUVEC induced by LPS.

The results represent the mean \pm S.D. Statistically significant value was calculated by compared with control group by Student's *t*-test ($+p < 0.01$). Statistically significant value was calculated by compared with LPS group by Student's *t*-test ($**p < 0.01$).

4. 콜레스테롤 변화에 미치는 영향

1) Total cholesterol의 변화에 미치는 영향

혈청 내 total Cholesterol의 변화는, 정상군은 77.7 ± 7.1 (mg/dl), 대조군은 179.7 ± 13.4 (mg/dl)으로 나타나 정상군에 비해 유의성 있는($+p < 0.01$) 증가를 나타냈으며, JHSB 투여군에서는 131.0 ± 15.5 (mg/dl)로 나타나 대조군에 비해 유의성 있게($**p < 0.05$) 감소하였다(Fig. 12).

Normal : normal SD rat group

Control : Hyperlipidemic diet and normal saline (0.5 ml/day) treated group

JHSB : Hyperlipidemic diet and JHSB (209 mg /0.5 ml/day) treated group

The results represent the mean \pm S.D. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by Student's *t*-test ($+p < 0.01$). Statistically significant value was calculated by compared with control group by Student's *t*-test ($**p < 0.01$).

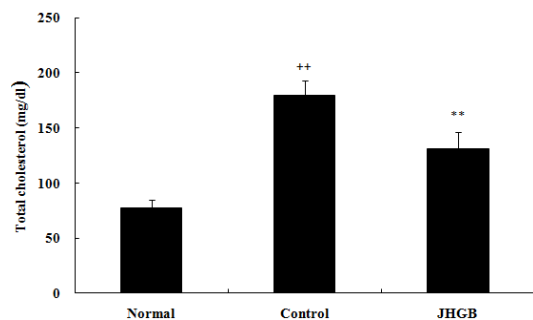


Fig. 12. Effect of JHSB on the total-Chol. level in hyperlipidemia rat.

2) LDL cholesterol의 변화에 미치는 영향

혈청 내 LDL Cholesterol의 변화는, 정상군은 12.7 ± 1.5 (mg/dl), 대조군에서 127.3 ± 15.0 (mg/dl)으로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는($+p < 0.01$) 증가를 나타냈으며, JHSB 투여군에서는 83.3 ± 7.2 (mg/dl)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게($**p < 0.01$) 감소하였다(Fig. 13).

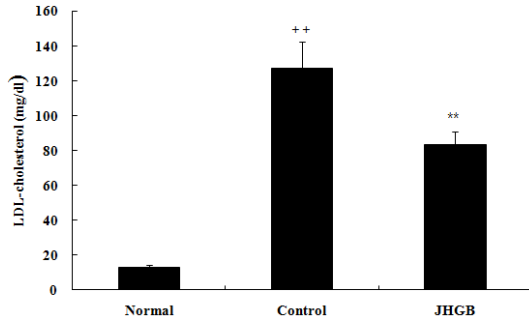


Fig. 13. Effect of JHSB on the LDL-Cholesterol level in hyperlipidemia rat.

Normal : normal SD rat group
 Control : Hyperlipidemic diet and normal saline (0.5 ml/day) treated group
 JHSB : Hyperlipidemic diet and JHSB (209 mg /0.5 ml/day) treated group
 The results represent the mean \pm S.D. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by Student's *t*-test ($++p<0.01$). Statistically significant value was calculated by compared with control group by Student's *t*-test ($**p<0.01$).

3) HDL cholesterol에 미치는 영향

혈청 내 HDL Cholesterol의 변화는, 정상군은 42.8 ± 1.6 (mg/dl), 대조군은 32.0 ± 2.3 (mg/dl)로 나타나 정상군에 비해 유의성 있는($++p<0.01$) 감소를 나타냈으며, JHSB 투여군에서는 42.7 ± 4.3 (mg/dl)로 나타나 대조군에 비해 유의성 있게($**p<0.05$) 증가하였다(Fig. 14).

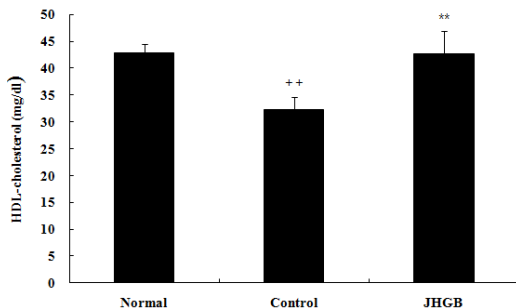


Fig. 14. Effect of JHSB on the HDL-Chol. level in hyperlipidemia rat.

Normal : normal SD rat group
 Control : Hyperlipidemic diet and normal saline

(0.5 ml/day) treated group
 JHSB : Hyperlipidemic diet and JHSB (209 mg /0.5 ml/day) treated group
 The results represent the mean \pm S.D. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by Student's *t*-test ($++p<0.01$). Statistically significant value was calculated by compared with control group by Student's *t*-test ($**p<0.01$).

5. Triglyceride 변화에 미치는 영향

Triglyceride의 변화는, 정상군은 33.8 ± 6.2 (mg/dl), 대조군은 320.4 ± 43.7 (mg/dl)로 나타나 정상군에 비해 유의성 있는($++p<0.01$) 증가를 나타냈으며, JHSB 투여군에서는 34.0 ± 10.6 (mg/dl)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게($**p<0.01$) 감소하였다(Fig. 15).

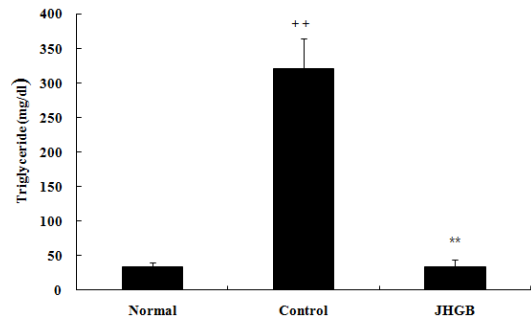


Fig. 15. Effect of JHSB on the triglyceride level in hyperlipidemia rat.

Normal : normal SD rat group
 Control : Hyperlipidemic diet and normal saline (0.5 ml/day) treated group
 JHSB : Hyperlipidemic diet and JHSB (209 mg /0.5 ml/day) treated group
 The results represent the mean \pm S.D. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by Student's *t*-test ($++p<0.01$). Statistically significant value was calculated by compared with control group by Student's *t*-test ($**p<0.01$).

12. Glucose 변화에 미치는 영향

Glucose의 변화는, 정상군의 138.7 ± 12.5 (mg/dl), 대조군은 183.3 ± 9.5 (mg/dl)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는($++p<0.01$) 증가를 나타냈으며, JHSB 투여군에서는 157.0 ± 2.6 (mg/dl)로 나타나 대조군

에 비하여 유의성 있게(*p<0.05) 감소하였다(Fig. 16).

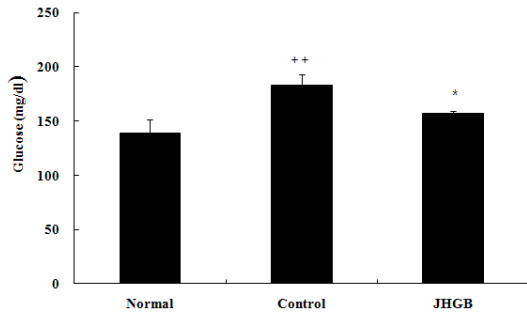


Fig. 16. Effect of JHSB on the glucose level in hyperlipidemia rat.

Normal : normal SD rat group
 Control : Hyperlipidemic diet and normal saline (0.5 ml/day) treated group
 JHSB : Hyperlipidemic diet and JHSB (209 mg / 0.5 ml/day) treated group
 The results represent the mean \pm S.D. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by Student's *t*-test ($++p<0.01$). Statistically significant value was calculated by compared with control group by Student's *t*-test ($*p<0.05$).

7. 간조직의 과산화지질 함량에 미치는 영향

간 조직 내 과산화지질의 함량은 정상군은 5.6 ± 0.7 (nmol/mg), 대조군은 31.1 ± 2.9 (nmol/mg)으로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있게($++p<0.01$) 증가하였으며, JHSB 투여군에서는 15.4 ± 1.0 (nmol/mg)으로 대조군에 비하여 유의성 있게($**p<0.01$) 감소하였다(Fig. 17).

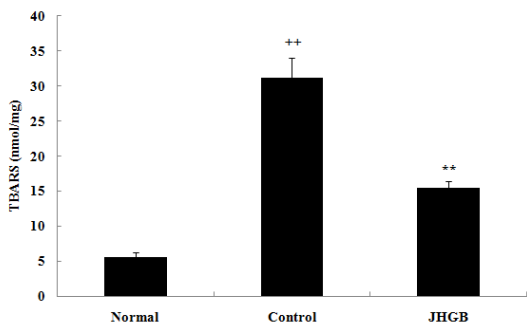


Fig. 17. Effect of JHSB on hepatic thiobarbituric acid

reactive substance (TBARS) value in hyperlipidemia rat.

Normal : normal SD rat group
 Control : Hyperlipidemic diet and normal saline (0.5 ml/day) treated group
 JHSB : Hyperlipidemic diet and JHSB (209 mg / 0.5 ml/day) treated group
 The results represent the mean \pm S.D. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by Student's *t*-test ($++p<0.01$). Statistically significant value was calculated by compared with control group by Student's *t*-test ($**p<0.01$).

8. 간조직의 항산화 활성에 미치는 영향

1) SOD의 변화에 미치는 영향

간 조직 내 SOD의 함량은 정상군은 9.9 ± 0.4 (unit/mg protein), 대조군은 5.1 ± 0.7 (unit/mg protein)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있게($++p<0.01$) 감소하였으며, JHSB 투여군에서는 7.3 ± 0.8 (unit/mg protein)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게($*p<0.05$) 증가하였다(Fig. 18).

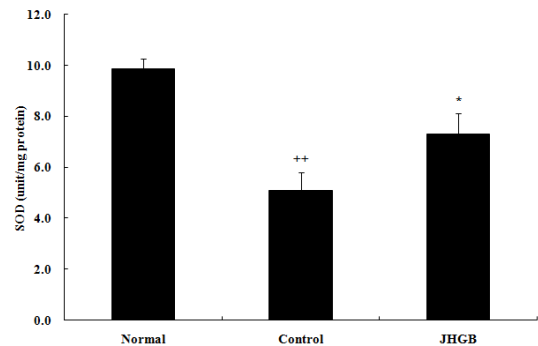


Fig. 18. Effect of JHSB on hepatic SOD level in hyperlipidemia rat.

Normal : normal SD rat group
 Control : Hyperlipidemic diet and normal saline (0.5 ml/day) treated group
 JHSB : Hyperlipidemic diet and JHSB (209 mg / 0.5 ml/day) treated group
 The results represent the mean \pm S.D. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by Student's *t*-test ($++p<0.01$). Statistically significant value was calculated by compared with control group by Student's *t*-test ($*p<0.05$).

2) Catalase의 변화에 미치는 영향

간 조직 내 Catalase의 함량은 정상군은 14.0±0.4 (nmol/mg protein), 대조군은 7.9±0.7 (nmol/mg protein)로 나타나 정상군에 비해 유의성 있게(+p<0.01) 감소하였으며, JHSB 투여군에서는 11.1±1.0 (nmol/mg protein)로 대조군에 비하여 유의성 있게(**p<0.01) 증가하였다(Fig. 19).

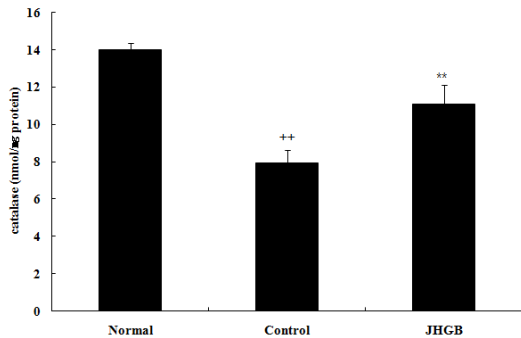


Fig. 19. Effect of JHSB on hepatic catalase level in hyperlipidemia rat.

Normal : normal SD rat group
 Control : Hyperlipidemic diet and normal saline (0.5 ml/day) treated group
 JHSB : Hyperlipidemic diet and JHSB (209 mg /0.5 ml/day) treated group
 The results represent the mean ± S.D. Statistically significant value was calculated by compared with normal group by Student's *t*-test (++p<0.01). Statistically significant value was calculated by compared with control group by Student's *t*-test (**p<0.01).

V. 考 察

우리나라에서 뇌졸중과 관상동맥질환을 포함한 심혈관계질환은 암과 함께 주요 사망원인이며, 일반적으로 흡연, 고혈압, 고지혈증이 관상동맥질환의 3대 위험요인이므로, 고지혈증을 조기에 치료하는 것은 동맥경화증, 나아가서 관상동맥질환의 발병을 예방하게 된다^{15,16}.

고지혈증이란 혈중 total cholesterol이나 LDL-

cholesterol, TG 농도의 증가를 의미하지만, HDL-cholesterol의 경우 농도가 감소하는 것으로 관상동맥질환의 발생을 증가시키는 이상지질혈증을 의미하며 이를 조절하여 죽상경화증에 의한 관상동맥질환의 발생을 예방하는 것이 치료의 목표가 된다¹⁷.

지질은 인체 에너지의 주요 공급원이며, 또 몸의 중요한 구성성분이기도 하다. 지질의 대사는 여러 대사 과정 및 호르몬 분비에 의하여 조절되고 있으며, 중추신경계·간·지방조직 뿐만 아니라 근육 등 거의 모든 장기의 상황에 따라 직·간접적 영향을 받는다. 장관에서 흡수된 지질은 그대로는 체내 순환이 불가능하므로 지단백질과 결합하여 킬로미크론(chylomicron)을 형성하여 혈중으로 들어오게 된다. 이렇게 흡수된 지질은 직접 에너지원으로 쓰이거나 세포막이나 호르몬의 재료로 쓰이며, 남는 경우는 지방조직 내에 중성지방의 형태로 저장하였다가 필요한 때에 다시 쓰이기도 한다. 이러한 지질대사가 장애를 받으면 혈청중의 콜레스테롤과 중성지방이 증가하게 되어 관상동맥과 뇌혈관의 죽상경화를 유발한다^{2,19}.

고지혈증은 원발성과 속발성으로 분류되며 원발성은 선천적으로 지질대사에 관여하는 유전인자의 결함에 의해 발생한 것이고, 속발성은 당뇨, 만성신부전, 과음, 비만, 약물과용, 갑상선기능저하증, 신증후군, 부신피질호르몬과다, 부적절한 음식 섭취 등으로 인하여 지질성분이 이차적으로 증가하여 발생한 것이다¹⁹.

고지혈증의 치료는 우선적으로 식이요법을 실시하는 것이 기본이며 중증인 경우나 합병증의 위험이 현저할 때는 약물치료 등을 병행하여 상승된 혈중지방을 정상범위로 내려서 동맥경화성 심장질환의 위험 및 진행을 감소시킨다. 심혈관 질환의 다른 위험 인자가 없는 35세 미만의 남자나 폐경 이전의 여자인 경우 LDL-cholesterol의 농도가 190 mg/dl을 넘어 220 mg/dl까지 되더라도 약물요법은 가급적 연기하고 식이요법이나 운동 등의 비약물요법을 최대한 권장하도록 한다. 3-6개월 간의

식이요법 및 운동, 금연 등의 비약물 요법에도 불구하고 LDL-cholesterol의 농도가 190 mg/dl 이상이거나, 심혈관질환의 위험인자를 2가지 이상 가지고 있으면서 LDL-cholesterol의 농도가 160 mg/dl 이상인 경우는 약물요법이 고려되어야 한다. 약물요법의 목표는 일반 환자인 경우 LDL-cholesterol의 농도를 160 mg/dl 미만, 2가지 이상의 위험인자를 가지고 있는 환자인 경우는 130 mg/dl 미만으로 유지하도록 하여야 한다. 관상동맥질환을 가지고 있는 환자인 경우는 LDL-cholesterol의 농도가 130 mg/dl 이상인 경우 약물요법의 대상이 되며, 100 mg/dl 이하로 유지시키는 것이 치료의 목표가 된다²⁰.

고지혈증 치료에 사용되는 주요 약물로는 HMG CoA reductase inhibitors(Statins), micronized fenofibrate (Lipidil), bile acid sequestrants(Resins), Nicotinic acid, probucol, 어유 또는 오메가-3 지방산 등이 있다^{7,8}.

1950년대부터 식이나 운동요법과 같은 비약물요법이나 niacin, fibrates, resin 등의 약제를 사용하여 혈중 콜레스테롤농도를 낮춰서 관상동맥질환을 예방하고자하는 연구들이 시작되었고 최근에 HMG-CoA reductase억제제(Statins)가 콜레스테롤 농도를 20-30% 감소시킬수 있게 되어 관상동맥질환의 발생을 30% 정도 감소시켰다⁹⁻¹¹.

이중 가장 효과적인 HMG-CoA reductase는 cholesterol 합성의 반응속도를 조절하는 효소이며, 이 효소의 억제제는 cholesterol 합성을 저하시킨다. HMG-CoA reductase inhibitor(statin)는 cholesterol 합성을 억제하여 간의 LDL 수용체 활성을 증가시켜 순환 LDL 대사를 촉진하여 LDL-cholesterol을 저하시키고, 혈장 TG도 저하시키며, HDL-cholesterol을 증가시킨다²¹. 최근에는 천연 항산화제로 각광받는 비타민류(비타민A, C, E), EGCG(epigallocatechin-3-gallate), 이소플라본(genistein, daidzein, glycitein) 등이 심혈관계 질환의 저감인자로 검토되고 있다²².

한의학에서 고지혈증이라는 용어는 찾아볼 수

없으나 이로 인하여 나타나는 증상들에 준하여 痰證,心悸,眩暈,頭痛,胸痞,真心痛,中風 등의 범주에 해당된다 볼 수 있으며, 고지혈증으로 인한 동맥경화증은 주로 水濕,痰濁,瘀血이 체내에 발생하여 脾虛痰阻,濕熱鬱結,胃熱腑實,氣滯血瘀 등의 병리기전을 수발함으로써 발생하는 것으로 인식하였다^{23,24}. 고지혈증은 本虛標實證으로 볼 수 있는데 肝脾腎虛는 本虛에, 痰濕,瘀血은 標實에 속한다. 治法에 있어서 滋補肝腎,調理脾胃로 扶正하고,活血化瘀,利濕化痰으로 祛邪하여 標本同治,補瀉兼施하므로 高脂血症의 治方은 補益藥,利濕化痰藥,活血化瘀藥 등이 相互組合되어 構成되어 있는 것이 많다¹³.

본 실험에 사용된 製何首烏加味方(JHSB)은 《心血管科專病中醫臨床診治》¹⁴에 기록된 처방으로 대 전대학교 한방병원에서 순환기계 질환에 사용되는 처방이다. 구성은 製何首烏 20 g, 枸杞子 15 g, 免絲子 12 g, 決明子 15 g, 白茯苓 10 g, 山查肉 15 g, 黃芩 10 g, 茵陳 15 g, 蘿菴子 15 g, 淫羊藿 8 g으로, 滋補肝腎,利濕化痰의 효능이 있어 본 연구를 통하여 고지혈증 치료제로서의 과학적 근거를 마련하고자 하였다.

이에 저자는 JHSB에 대해 HPLC 패턴 분석, 독성평가를 시행한 후 고cholesterol 식이로 유발된 고지혈증 백서모델을 이용하여 실험을 진행하였다. *in vitro*에서 항산화 활성, HUVEC에서 apoptosis, THP-1 세포의 transmigration, LPS로 유도된 부착분자의 발현, NF-kB 활성,케모카인 및 염증성 사이토카인 생성량, THP-1 세포에서의 MCP-1에 의한 세포 유주운동을, *in vivo*에서 몸무게 및 간 무게, 콜레스테롤 변화, Triglyceride 변화, Glucose 변화, Albumin 변화, Globulin 변화, Albumin/Globulin ratio 변화, 간조직의 과산화지질 함량, 간조직의 항산화 활성, 간 조직의 콜레스테롤 인자 발현, 조직 변화 등에 미치는 영향 등을 측정하였다.

세포독성 평가 결과, 대조군의 HUVEC 세포

생존율을 $100 \pm 1.4(\%)$ 로 하였을 때, JHSB 10, 20, 50 ($\mu\text{g/ml}$) 농도 처리군에서는 생존율이 각각 99.3 ± 6.2 , 94.7 ± 3.7 , $107.9 \pm 6.8(\%)$ 로 나타났다. THP-1 세포에 대한 세포독성에서는 대조군의 세포 생존율을 $100 \pm 0.0(\%)$ 로 하였을 때, JHSB 5, 10, 20, 50 ($\mu\text{g/ml}$) 농도 처리군에서는 생존율이 각각 89.8 ± 4.4 , 92.8 ± 3.8 , 87.8 ± 4.2 , $91.2 \pm 5.6(\%)$ 로 나타나 세포에 독성영향을 주지 않는 것으로 평가할 수 있다.

약물이 간과 신장의 독성에 미치는 영향을 확인하기 위해, 간 기능의 변화를 확인한 결과, AST는 JHSB 투여군에서는 207.7 ± 33.3 (IU/L)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 (** $p < 0.01$) 감소하였다. ALT는 JHSB 투여군에서는 67.7 ± 35.0 (IU/L)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 (** $p < 0.01$) 감소하였다. ALP는 JHSB 투여군에서는 155.0 ± 19.1 (IU/L)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 (** $p < 0.01$) 감소하였다. 신장 기능의 변화를 알아본 결과 creatinine은 JHSB 투여군에서는 0.50 ± 0.03 (mg/dl)로 감소하였다. Uric acid는 JHSB 투여군에서는 1.78 ± 0.16 (mg/dl)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게 (** $p < 0.01$) 감소하였다.

JHSB를 투여한 군에서 HUVEC 및 THP-1 세포의 생존율 변화에 영향은 없었고, AST, ALT, creatinine, uric acid를 모두 감소시켜, JHSB에 의해 유발된 세포독성, 간독성 신독성은 없는 것으로 평가할 수 있으며, 본 처방이 고지혈증 치료제가 갖는 간독성이나 신장독성에 대해 보다 더 안전하게 사용될 가능성이 있다고 사료된다.

과다한 유리기(free radical)는 조직 손상을 유발하여 허혈-재관류 손상 뿐만 아니라 각종 성인병, 발암 및 노화에 이르기까지 다양한 질병을 유발하며, 과다하게 생성된 유리기에 의한 산화성 스트레스에 기인한다고 생각 된다²⁵. 특히 지질과산화(lipid peroxidation)는 산화성 스트레스의 주요 원인으로²⁶, 지질과산화에 의해 생성된 활성 알데히드는 교원질 유전자의 발현을 증가시키고 섬유화성 사이토카인(profibrogenic cytokine)의 분비

를 촉진시키는 것으로 보고되고 있다²⁷⁻²⁹.

Superoxide dismutase(SOD)와 catalase는 호소계 항산화계에 해당되며, SOD는 헤로운 환원 산소종을 과산화수소로 변환시키는 반응을 촉매하는 효소이며, CuZn-SOD와 Mn-SOD 두 종류가 있고³⁰, SOD에 의하여 생성된 과산화수소는 peroxidase나 catalase에 의하여 무해한 물분자와 산소분자로 전환되어 산소상해로부터 생체를 보호하는 것으로 알려져 있다. SOD 유사활성물질은 SOD와 유사한 활성을 가지면서, SOD의 단점을 보완할 수 있으며 산화방지는 물론 노화방지와도 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다³¹. 세포질내에 존재하는 catalase는 세포소기관인 peroxisome 내에서 과산화수소를 물과 산소로 분해하는 효소로 과산화수소에 의한 산화적 손상으로부터 세포를 보호해 주는 중요한 역할을 한다³².

산화적 손상은 고지혈증이 진행에 있어 초기에 나타나는 현상이며, 항산화제의 복용은 고지혈증으로 유발되는 질병들의 여러 과정에 작용하여 질병을 예방하는 효과를 나타내는 것으로 알려져 있다³³⁻³⁵. 따라서 약리학적으로 항고지혈 효과를 나타내며, 동시에 항산화 효과를 나타내는 약물을 개발하기 위한 연구가 지속되고 있다³⁶.

본 실험에 사용된 DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 방법은 항산화성 물질과 반응시 받아들이는 전자로 인해 그 자체의 정체성을 상실하는 정도를 측정함으로써 간접적인 항산화 효과를 확인할 수 있다. DPPH를 환원시키거나 상쇄시키는 능력이 크면 높은 항산화 활성 및 활성산소를 비롯한 다른 radical에 대한 소거작용을 기대할 수 있다³⁷.

항산화 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해 DPPH 소거능, SOD 유사 활성, HUVEC에서 ROS 생성에 미치는 영향을 측정하였다.

DPPH의 소거 활성은 200, 100, 50, 25 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 각각 55.0 ± 3.5 , 38.2 ± 1.1 , 19.9 ± 3.5 , $8.3 \pm 1.2(\%)$ 로 농도 의존적으로 증가하였다. SOD나 SOD 유사 물질에 의해서만 항산화 활성을 나타내는

pyrogallol을 이용하여 JHGB의 항산화 활성을 측정된 결과 200, 100, 50, 25 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 각각 29.4 ± 3.0 , 21.4 ± 2.4 , 14.4 ± 2.2 , 12.2 ± 2.4 (%)의 항산화 활성 효과를 나타내었다. HUVEC에서 ROS 생성에 미치는 영향은 대조군의 ROS 생성률이 1.00 ± 0.00 일 때, TNF- α 처리군은 2.43 ± 0.23 으로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는($++p<0.01$) 증가를 나타내었고, JHSB 50 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 1.47 ± 0.30 으로 TNF- α 처리군에 비하여 유의성 있게($*p<0.05$) 감소하였다. 이로 미루어 볼때 JHSB는 세포내 항산화 활성을 증가시킨다고 보인다.

Apoptosis는 세포사멸에 관계하는 신호전달체계를 통하여 우연히 일어나는 necrosis와 달리 target에서 생성되는 trophic(survial) factor의 부족에 의해 일어나는 세포사이며 gene-directed cellular self-destruction 또는 programmed cell death로도 불리운다^{38,39}.

원래 성숙한 세포가 특정한 cell death gene의 발현에 의해 오랜 기간에 걸쳐 사멸하는 현상으로 세포예정사(programmed cell death)에 있어 필수적인 과정이다. 이는 세포가 능동적으로 죽음에 참여하는 과정으로 유도가 가능하고 질서정연하며, 조혈계를 포함한 많은 종류의 세포 집단의 항상성 조절에 중요한 인자이다⁴⁰.

HUVEC에서 apoptosis에 미치는 영향을 알아본 결과 대조군이 15.43 ± 2.93 (%) 일 때, LPS 처리군은 58.47 ± 2.74 (%)로 대조군에 비하여 유의성 있는($++p<0.01$) 증가를 나타내었고, JHSB 50 ($\mu\text{g/ml}$) 농도에서 45.65 ± 2.98 (%)로 나타나 대조군에 비해 유의성 있는($**p<0.01$) 감소를 나타내었다.

혈중의 total cholesterol 농도는 주로 간, 장관에서의 total cholesterol 생성과 흡수 및 이상에 관여하는 여러 인자에 좌우되고, 체내 지질 대사 이상의 지표로서 중요하며, 혈액 내에 필요이상 많이 존재하게 되면 고지혈증이 유발되고 죽상동맥경화증의 주요 원인이 된다⁴¹.

고Cholesterol 식이에 의한 고지혈 유발 쥐의 간장의 무게를 측정된 결과, 정상군은 2.3 ± 0.2 (g)로,

대조군은 5.0 ± 0.4 (g)으로 나타나 정상군에 비해 유의성 있는($++p<0.01$) 증가를 나타냈고, JHSB 투여군에서는 3.4 ± 0.7 (g)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있게($**p<0.05$)감소하는 것으로 나타났다. 지속적인 고Cholesterol식은 간에 지방을 축적시키는데 JHSB가 간의 지방축적에 대한 억제작용이 있을 것으로 판단된다.

고지혈증이란 혈중 total cholesterol, LDL-cholesterol, TG 농도가 증가하거나 HDL-cholesterol이 감소하는 것²⁶이므로, 본 연구에서 혈청내 직접적인 함량 분석을 시행하였다. 혈청 내 total Cholesterol의 변화는, 정상군은 77.7 ± 7.1 (mg/dl), 대조군은 179.7 ± 13.4 (mg/dl)으로 나타나 정상군에 비해 유의성 있는($++p<0.01$) 증가를 나타냈으며, JHSB 투여군에서는 131.0 ± 15.5 (mg/dl)로 나타나 대조군에 비해 유의성 있는($**p<0.05$) 감소 효과를 나타내었다. LDL Cholesterol의 변화는, 정상군은 12.7 ± 1.5 (mg/dl), 대조군에서 127.3 ± 15.0 (mg/dl)으로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는($++p<0.01$) 증가를 나타냈으며, JHSB 투여군에서는 83.3 ± 7.2 (mg/dl)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는($**p<0.01$) 감소를 나타내었다. 혈청 내 HDL Cholesterol의 변화는, 정상군은 42.8 ± 1.6 (mg/dl), 대조군은 32.0 ± 2.3 (mg/dl)로 나타나 정상군에 비해 유의성 있는($++p<0.01$) 감소를 나타냈으며, JHSB 투여군에서는 42.7 ± 4.3 (mg/dl)로 나타나 대조군에 비해 유의성 있는($**p<0.05$) 증가를 나타내었다. Triglyceride의 변화는, 정상군은 33.8 ± 6.2 (mg/dl), 대조군은 320.4 ± 43.7 (mg/dl)로 나타나 정상군에 비해 유의성 있는($++p<0.01$) 증가를 나타냈으며, JHSB 투여군에서는 34.0 ± 10.6 (mg/dl)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는($**p<0.01$) 감소를 나타냈다. 이와 같은 결과로 미루어 볼때 혈청내 total Cholesterol, LDL Cholesterol, Triglyceride는 감소시키고 HDL Cholesterol은 증가시키는 JHSB의 혈청내의 지질에 대한 유의성 있는 조절효과를 확인하였다.

Glucose의 변화는, 정상군의 138.7 ± 12.5 (mg/dl),

대조군은 183.3±9.5 (mg/dl)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있는(++p<0.01) 증가를 나타냈으며, JHSB 투여군에서는 157.0±2.6 (mg/dl)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는(*p<0.05) 감소를 나타내었다. 이로 미루어 볼 때 JHSB가 혈중 Glucose를 조절하여 순환계 질환 및 대사증후군에 이용할 수 있을 것으로 보인다.

간조직의 항산화 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해 SOD의 변화에 미치는 영향을 알아본 결과 간 조직 내 SOD의 함량은 정상군은 9.9±0.4 (unit/mg protein), 대조군은 5.1±0.7 (unit/mg protein)로 나타나 정상군에 비하여 유의성 있게(++p<0.01) 감소하였으며, JHSB 투여군에서는 7.3±0.8 (unit/mg protein)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는(*p<0.05) 증가를 나타냈다. 간 조직 내 Catalase의 함량은 정상군은 14.0±0.4 (nmol/mg protein), 대조군은 7.9±0.7 (nmol/mg protein)로 나타나 정상군에 비해 유의성 있게(++p<0.01) 감소하였으며, JHSB 투여군에서는 11.1±1.0 (nmol/mg protein)로 대조군에 비하여 유의성 있는(**p<0.01) 증가를 나타내었다. 이는 JHSB 투여가 지질 과산화도를 억제하고 항산화 활성을 증가시키는 효과를 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

이상의 실험 내용을 종합해 보면 JHSB는 *in vitro*에서 항산화 활성을 증가시키고, HUVEC에서 apoptosis를 저하시켰다. 또한 고cholesterol 식이로 유발된 고지혈증 백서에 투여한 결과 total cholesterol, LDL-cholesterol, triglyceride, glucose를 감소시키고, HDL-cholesterol을 증가시켰다. 이러한 변화를 근거로 고지혈증으로 인하여 발생할 수 있는 다양한 질환을 예방할 수 있을 것으로 사료된다. 또한 SOD와 catalase의 조직 내 수치 증가로 미루어 보아 항산화 활성을 증가시키는데 유효한 효과를 가지고 있었다.

이로 미루어 보아 JHSB는 혈관 내 손상과 노화 현상을 막아 순환기계 질환에 유효한 효과가 있을 것으로 기대되며, 고지혈증으로 야기할 수 있는

죽상동맥경화증, 허혈성 심질환, 뇌경색, 고혈압, 비만, 당뇨병, 지방간, 간경변 등의 예방에도 응용할 수 있을 것이라 사료된다. 향후 이 연구결과를 바탕으로 하여 고지혈증에 대한 처방에 대한 추가적인 한의학적 실험 연구가 이어지길 바란다.

V. 結 論

製何首烏加味方(JHSB)이 고지혈증에 미치는 영향을 알아보기 위하여 세포와 간·신의 독성을 평가한 후, *in vitro*에서 항산화 활성, HUVEC에서 apoptosis, *in vivo*에서 콜레스테롤 변화, Triglyceride 변화, 간조직의 과산화지질 함량, 간조직의 항산화 활성 등에 미치는 영향 등을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 製何首烏加味方は 세포독성 및 간독성, 신독성이 없었다.
2. 製何首烏加味方は ROS 생성을 유의성 있게 억제하였다.
3. 製何首烏加味方は 혈청 내의 total cholesterol, LDL-cholesterol, triglyceride, glucose를 유의성 있게 감소시켰으며, HDL-cholesterol을 유의성 있게 증가시켰다.
4. 製何首烏加味方は 간 조직의 과산화지질을 유의성 있게 감소시켰으며, SOD와 catalase를 유의성 있게 증가시켰다.

이상으로 製何首烏加味方は 항산화능 및 항고지혈증 효과가 있는 것으로 생각되며 고지혈증에 대한 예방 및 치료에 응용될 수 있을 것으로 사료된다.

參 考 文 獻

1. http://kosis.kr/metadata/main.jsp?surv_id=19&curYear=2008, 통계청. 사망원인통계. 2008.
2. 전국한의과대학 심계내과학교실. 한방순환신경

- 내과학. 서울: 군자출판사; 2010, p. 184-9.
3. Mark H Beets, Robert Berkow. 머크 매뉴얼 17th. 서울: 한우리; 2003, p. 214-7.
 4. Jain KS, Kathiravan MK, Somani RS, Shishoo CJ. The biology and chemistry of hyperlipidemia. *Bioorg Med Chem* 2007;15(14):4674-99.
 5. 신규성. Power internal medicine. 서울: 군자출판사; 2000, p. 300-17.
 6. 김광원, 서정돈, 이홍규, 박의현, 박정의, 박영배, 외. 고지혈증과 동맥경화. 서울: 현의학; 2003, p. 3-8.
 7. Walsh JM, Pignone M. Drug treatment of hyperlipidemia in women. *JAMA* 2004;291(18):2243-52.
 8. Farnier M, Davignon J. Current and future treatment of hyperlipidemia: the role of statins. *Am J Cardiol* 1998;82(4B):3J-10J.
 9. Law MR, Wald NJ, Thompson SG. By how much and how quickly does reduction in serum cholesterol concentration lower risk of ischemic heart disease?. *BMJ* 1994;308:367-72.
 10. Jeon KJ, Chung NS, Ahan SG, Ha JW, Lim SJ, Jang YS, Shim WH, Cho SY, Kim SS, Lee SH, Shin MJ. Studies on the efficacy and safety of Atovastatin in hypercholesterolemic (LDL-cholesterol) patients. *Korean Circulation K* 1999;29:1309-16.
 11. Scandinavian Sinvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease. the Scandinavian Sinvastatin Survival Study(4S). *Lancet* 1994;344:1383-9.
 12. 楊維傑. 黃帝內經靈樞譯釋. 서울: 일증사; 1991, p. 296, 397, 416, 611-2.
 13. 방혜정. 고지혈증에 대한 한의학적 고찰. *동서의학* 1995;20:25-36.
 14. 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. 124.
 15. 박정의. 관상동맥경화증 위험인자의 역학연구. *한국지질학회지 제14차 추계학술대회* 1997:101-8.
 16. 김치정. 고지혈증. *대한내과학회지* 2002;62:44-57.
 17. Daniel J. Rader, Helen H. Hobbs. Harrison's Principles of Internal medicine. Section 3 Disorders of Intermediary Metabolism. 16th edition. Seoul: MIP; 2006, p. 2038-40, 2058, 2500-12.
 18. 이귀녕. 임상병리과일. 서울: 의학문화사; 2000, p. 107-9, 124-9, 635-7, 919-22, 931-4.
 19. 서울대학교의과대학. 내분비학. 서울: 서울대학교출판사; 2005, p. 261.
 20. 신현호. 고지혈증의 약물요법. *한국지질학회 제1차 동맥경화와 고지혈증 Workshop* 1994:41-9.
 21. Paaladinesh Thavendiranathan P, Bagai A, Brookhart AM, Choudhry MK. Primary prevention of cardiovascular diseases with statin therapy. A meta-analysis of randomized controlled trials. *Arch Intern Med* 2006;166:2307-13.
 22. Giugliano D. Dietary antioxidants for cardiovascular prevention. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2000; 10(1):38-44.
 23. 黃文東. 實用中醫內科學. 上海: 人民衛生出版社; 1986, p. 414-22.
 24. 趙永康. 高脂血症治法審析. *中醫雜誌* 1988;29(7):66.
 25. Halliwell B, Gutteridge JMC, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease : Where are we now? *J Lab Clin Med* 1992;119:598-620.
 26. Enterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malondialdehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 1991;11:81-128.
 27. Bedosa P, Houghlum K, Trautwein C, Holstege A, Chojkier M. Stimulation of collagen α_1 gene expression is associated with lipid peroxidation in hepatocellular injury : A link to tissue

- fibrosis? *Hepatology* 1994;19:1262-71.
28. Lee KS, Buck M, Houghlum K, Chojkier M. Activation of hepatic stellate cells by TGF- α and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myc expression. *J Clin Invest* 1995;96:2461-8.
 29. Kamimura S, Tsukamoto H. Cytokine gene expression by Kupffer cells in experimental alcoholic liver disease. *Hepatology* 1995;21:1304-9.
 30. Stocker R, Frei B. Endogenous antioxidant defences in human blood plasma (in *Oxidative Stress and Antioxidants*). Orlando, FL: Academic Press Ltd; 1991, p. 213-42.
 31. 이소연, 신유정, 박종혁, 김승모, 박치상. 경옥 고의 성분 분석 및 추출물별 항산화효능비교. *대한분초학회지* 2008;23(2):123-36.
 32. Deisseroth A, Dounce AL. Catalase physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiological reviews* 1970;50:319-75.
 33. Araujo FB, Barbosa DS, Hsin CY, Maranhao RC, Abdalla DS. Evaluation of oxidative stress in patients with hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 1995;117(1):61-71.
 34. Yang RL, Shi YH, Hao G, Li W, Le GW. Increasing Oxidative Stress with Progressive Hyperlipidemia in Human: Relation between Malondialdehyde and Atherogenic Index. *J Clin Biochem Nutr* 2008;43(3):154-8.
 35. Arca M, Natoli S, Micheletta F, Riggi S, Di Angelantonio E, Montali A, Antonini TM, Antonini R, Diczfalusy U, Iuliano L. Increased plasma levels of oxysterols, in vivo markers of oxidative stress, in patients with familial combined hyperlipidemia: reduction during atorvastatin and fenofibrate therapy. *Free Radic Biol Med* 2007;42(5):698-705.
 36. Racek J, Rusnakova H, Trefil L, Siala KK. The influence of folate and antioxidants on homocysteine levels and oxidative stress in patients with hyperlipidemia and hyperhomocysteinemia. *Physiol Res* 2005;54(1):87-95.
 37. 이경민, 서정철, 한상원. 황기약침액의 NO, DPPH 소거 및 IL-4 억제효과. *대한침구학회지* 2003; 20(2):184-94.
 38. 대한병리학회. 병리학. 서울: 고문사; 1994, p. 112-22, 125-9, 591-3, 1218-20.
 39. 전미혜. 오적산이 자궁근종세포의 사멸과 cell apoptosis에 미치는 영향. *대구한의대학교대학원* 2003.
 40. 강호영, 권병석, 김강주, 김덕룡, 김영호, 박주홍, 외. KUBY 면역학. 서울: 월드사이언스; 2006, p. 31.
 41. Martin MJ. Serum cholesterol, blood pressure, and mortality : implications from a cohort of 361662 men. *Lancet* 1986;2:933-9.