

db/db mouse에서 茵陳, 鬱金, 山查 복합추출물의 항고지혈 및 항산화 효과

김현태, 김윤식, 설인찬, 유호룡
대전대학교 한의과대학 심계내과학교실

The Effects of an Extract of *Artemisiae Capillaris*, *Curcumae Longae*, and *Crataegi Fructus* (IUS) on Anti-hyperlipidemia and Anti-oxidation in db/db Mouse Model

Hyun-tae Kim, Yoon-sik Kim, In-chan Seol, Ho-ryong Yoo
Dept. of Circulatory Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dae-Jeon University

ABSTRACT

Objective: This study was performed to investigate the effect of IUS (Inulsan, an extract of *Artemisiae capillaris* (茵陳), *Curcumae longae* (鬱金), and *Crataegi fructus* (山查)) on anti-hyperlipidemia, anti-oxidation, and anti-inflammation.

Method: We administered water extracts of *Artemisiae capillaris*, *Curcumae longae*, and *Crataegi fructus* for three weeks to db/db mice (C57BL/Ks), animal models induced with type 2 diabetes mellitus. Mice were divided into three groups: normal (C57BL/6J mice group), control group (db/db mice without administration of IUS) and IUS group (db/db mice treated with IUS). Then we measured total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, and triglyceride in the serum after the oral administration of IUS.

Results:

1. IUS did not show any cytotoxicity in RAW 264.7 cells.
2. IUS decreased AST, ALP, and creatinine levels and did not show any liver or renal toxicity in the db/db mice.
3. IUS increased DPPH and ABTS radical scavenging activity and decreased ROS production in RAW 264.7 cells.
4. IUS significantly decreased IL-1 β , IL-6, and TNF- α production in RAW 264.7 cells.
5. IUS increased HDL cholesterol and significantly decreased total cholesterol and triglyceride in db/db mice.
6. IUS significantly decreased the atherogenic index and cardiac risk factor.
7. In contrast with the control group, fat infiltration in the liver and aorta decreased in IUS treated mice. The cell nucleus was located in the central area in H&E staining of liver. And endomembranes also were more thinner than the control group in H&E staining of aorta.

Conclusions: These results suggest that IUS might be effective in the prevention and treatment of dyslipidemia.

Key words: *Artemisiae capillaris*, *Curcumae longae*, *Crataegi fructus*, Dyslipidemia, Hyperlipidemia

1. 서 론

2014년 사망통계에 따르면, 뇌혈관 질환과 심장

- 투고일: 2016.04.21, 심사일: 2016.07.07, 게재확정일: 2016.07.07
- 교신저자: 유호룡 대전광역시 서구 둔산2동 1136
대전대학교 둔산한방병원 뇌신경센터
TEL: 042-470-9131 FAX: 042-470-9006
E-mail: medidragon@hanmail.net
- 이 논문은 2016년도 대전대학교 대학원 한의학 석사학위 논문임.

질환은 악성신생물(암)에 이어 2, 3위에 해당하는 주요 사망원인으로 전체 사망자 중 47.4%, 매년 사망자의 절반의 가까운 인원이 3대 사인(死因)으로 목숨을 잃는다¹.

뇌혈관 질환과 심장질환을 포함한 순환계의 질환은 동맥벽이 비후되고 굳어져 발생하는 죽상경화성(atherosclerotic) 요인에 의해 나타나는 경우가 가장 많으며², 특히 주로 관상동맥의 경화로 인한

혈류량 부족으로 나타나는 심근경색은 갑작스럽게 발생하며 발생시 즉각적인 응급치료가 필요로 하는 경우가 많다³. 뇌졸중 역시 대부분 돌연 발생하며, 발병이후 발생할 수 있는 여러 장애를 고려했을 때 위험인자에 대한 일차예방이 매우 중요한 질환이다⁴.

이상지질혈증은 그 자체만으로 질환이라고 할 수는 없으나, 고혈압이나 당뇨병보다도 더 유의적인 순환기계 질환 발병 위험인자(more significant risk factor)이며, 혈청내 과도한 cholesterol, triglyceride 등이 혈관벽에 침착되면서 자각증상 없이 경화가 서서히 진행되다가 죽상동맥경화증을 유발할 수 있다⁵. 그리고 좁아진 혈관으로 인해 혈류가 감소하면 협심증, 심근경색, 허혈성 뇌경색 등의 각종 심혈관계, 뇌혈관계 질환이 발생할 수 있으므로 조기발견 및 예방적 처치가 중요하다^{6,7}.

한의학적 관점에서 이상지질혈증에 해당하는 직접적인 용어는 없으나 《靈樞·衛氣失常論》의 “人有脂, 有膏, 有肉” 표현으로⁸ 문헌적으로 지질이나 비만에 대한 인식이 있음을 확인할 수 있으며, 이상지질혈증의 개념은 濕濁한 穢濁之氣가 脾의 運化失調와 肝의 疏泄機能障礙로 체내에 停留되어 瘀血, 濕濁이 血脈에 발생하는 것⁹과 유사하므로 痰飲, 瘀血, 氣滯 등의 범주에 포함시킬 수 있다². 또한 嗜食肥甘厚味の 外因과 肝脾腎 機能失調의 內因에 의해 發病되는 本虛標實의 병리적 특성을 갖는 개념으로 설명하기도 한다¹⁰.

이상지질혈증에 대한 한의학적 연구는 瓊玉膏¹¹, 四物活血湯¹², 枸杞子加味方¹³, 製何首烏加味方¹⁴ 등의 처방에서부터 單味劑를 이용한 여러 연구로 최근까지도 다양하게 이루어지고 있다. 본 저자는 그 중 茵陳과 鬱金の 복합추출물이 갖는 항고지혈과 항비만 효과에 대한 이 등¹⁵의 선행연구를 토대로, 茵陳¹⁶⁻²⁰, 鬱金^{21,22}의 효능에 더하여 消導之劑이면서 또한 이²³, 서²⁴, 권 등²⁵의 연구에서 밝혀진 山査의 항고지혈 효능을 주목했다.

해당 약제들은 한의학적 원리 및 효능을 토대로

현대의학적인 약리학적 관점에서도 의학적 근거를 갖춘 한약재로 각각의 單味劑 연구에서 그 효능이 입증되었으나 茵陳, 鬱金の 복합추출물 연구 외에 山査를 함께 사용한 복합추출물의 유의성에 대해 아직까지 기존 연구상 명확하게 밝혀지지 않아 이를 실험적으로 규명하고자 연구를 진행하게 되었다.

이에 본 연구에서는 茵陳, 鬱金, 山査 세 가지 약제를 배합한 추출물(인울산, IUS)이 이상지질혈증에 미치는 영향에 대해 살펴보고자 하였다. IUS을 RAW 264.7 세포를 이용한 세포독성과 중금속 검사상 안전성을 확인한 후, 항산화, 항염증 효과 평가와 당뇨와 비만이 유도된 db/db mouse에서의 혈액학적 인자, cholesterol 및 triglyceride 함량, 혈당, 인슐린 생성량, 식이량 및 체중 등의 변화를 확인하여 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고한다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 동물 및 사육조건

본 실험을 위하여 사용된 db/db mouse(5주령, 수컷, 20~27 g)는 당뇨와 비만이 유발된 동물모델로 라온바이오(Korea)에서 구입하여 사용하였다. 실험동물은 2주간의 안정기를 거쳐 순화시켜 8주령부터 실험을 진행하였으며, 안정기 및 실험기간에 모든 실험군에는 일반 사료(Altromin CO., Germany)를 자유식이하며 물을 충분히 공급하였다. 실험동물은 대조군과 실험군의 혈당체크 후 그룹을 배분하였다. 본 실험은 대전대학교 동물실험윤리위원회의 승인(승인번호 DJUAR2015-016)을 받아 동물윤리준칙에 의거하여 실험하였다.

2) 약재

본 실험에 사용한 인울산(Inulsan, 이하 IUS로 표기)의 구성 약제들은 대전대학교 동서생명의학 연구센터(TBRC-RIC)에서 구입해 정선 후 사용하였으며, 약제명과 첨당 용량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. The Prescription of IUS

Herbal medicine name	Pharmacognostic name	Weight (g)
茵陳蒿	<i>Artemisiae Capillaris Herba</i>	10
鬱金	<i>Curcumae longae Radix</i>	10
山查	<i>Crataegi Fructus</i>	10
Total amount		30

3) 시약 및 기기

(1) 시약

본 실험을 위해 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline(D-PBS : Welgene Co., Korea), Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM : Gibco BRL Co., UK), lipopolysaccharide(LPS : Sigma Co., U.S.A.), cell viability assay kit(Daeillab sevice, Korea), penicillin (Hyclone, Co., U.S.A.), nitric oxide detection kit(Intron Biotechnology, Korea), (2,7)-dichlorodihydrofluorescein diacetate(DCF-DA : Sigma Co., U.S.A.), trypan blue(Sigma Co., U.S.A.), Mouse magnetic luminex screening assay(R&D system, U.S.A.), Rat/Mouse insulin ELISA kit(Biovender., CZECH), GLP-1 ELISA kit(shibayaki Co., Japan), Dimethyl sulfoxide (DMSO : Sigma Co., U.S.A.), Quercetin(Sigma Co., U.S.A.), Potassium acetate solution(Sigma Co., U.S.A.), Sodium carbonate(Sigma Co., U.S.A.), Aluminum nitrate nonahydrate(Sigma Co., U.S.A.), Pb, As, Hg, Cd standard solution(SCP Science, Canada), Acetonitrile(Duksan, Korea) 등을 사용하였다.

(2) 기기

본 연구를 위해 CO₂ incubator(Forma scientific Co., U.S.A.), rotary vacuum evaporator(Büchi B-480 Co., Switzerland), clean bench(Vision scientific Co., Korea), freeze dryer(EYELA FDU-540 Co., Japan), autoclave(Sanyo Co., Japan), centrifuge(Sigma Co., U.S.A.), vortex mixer(Vision scientific Co., Korea), ice-maker(Vision scientific Co., Korea), deep-freezer (Sanyo Co., Japan), ELISA reader(Molecular Devices

Co., U.S.A.), plate shaker(Lab-Line Co., U.S.A.), 수은분석기(TELEDYNE Leeman Labs, U.S.A.), ICP(Shimadzu, Co., Japan), 환류 추출기(Mtops, Korea), HPLC(Shimadzu, Co., Japan), Light Microscope (Carl Zeiss, Co., Germany), 동결 건조기(IIShinBioBase, Korea), Luminex(Millipore Co., U.S.A.), Flow cytometry system(BD biosciences, U.S.A.) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 약물 추출

증류수 1,200 ml에 IUS 2첩 분량(60.0 g)을 넣어 3시간 동안 환류추출하고 여과액을 얻은 후 rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하였다. 그리고 농축된 용액을 freeze dryer로 동결 건조하여 6.4 g 분말을 얻었다. 이 분말은 냉동고에서 보관하면서 필요한 농도로 3차 증류수에 희석해 사용하였다.

2) 안전성 검사

(1) 세포독성 측정

96 well plate에 RAW 264.7 세포를 1.5×10^5 cells/well 로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 실험을 하기 전 새로운 배양액으로 교체하였고, IUS를 1, 10, 100(μ g/ml)의 농도로 처리해 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양 이후 10 μ l의 WST solution을 첨가하여 각각 배양기(37 °C, 5% CO₂)에서 30분간 반응시켰다. 반응 후에 450 nm에서의 흡광도의 변화를 측정하였으며 백분율로 대조군에 대한 세포 생존율을 표시하였다.

(2) 중금속 측정

납, 카드뮴, 비소 분석은 IUS 0.5 g을 질산 10 ml 과 함께 극초단파 시료전처리장치 전용용기에 넣고, 발생 가스를 제거하기 위해 후드 안에 용기를 정치시켜 극초단파 시료전처리장치를 사용해 분해하였다. 분해액을 여과지로 여과한 후 용량플라스크에 넣고 물을 섞어 표준액의 농도범위로 희석해 검액으로 삼았다. 또한 별도로 극초단파 시료전처리장치 전용용기에 질산 10 ml를 넣어 검액 조제와 같은 방법으로 공시험액을 준비하였다. 준비된 검액,

표준액 및 공시험액을 유도결합플라즈마분광계(ICP)를 이용해 검량선을 작성, 공시험액으로 보정하여 검액을 측정하였다. 수은 분석의 경우 IUS 50 mg을 기준으로 수은분석기를 이용하여 측정하였다.

(3) 간기능, 신기능 평가

혈청 내 AST, ALT, ALP 및 BUN, creatinine 활성도 평가를 위해 실험종료 이후 혈액을 채취하여 혈청을 분리하고, 대전대학교 한방BIO FabLab에 분석 의뢰하였다.

3. in vitro 실험

1) 항산화 효능 측정

(1) DPPH radical 소거능 측정

2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH)는 항산화 효능을 확인할 수 있는 주요지표로 IUS를 최종 1, 10, 100, 1,000($\mu\text{g/ml}$) 농도가 되도록 희석시켜 에탄올에 용해시킨 0.2 mM DPPH 용액 150 μl 와 IUS를 각각 100 μl 씩 혼합해 30분간 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 반응시켰다. 그리고 반응 이후 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 시료액의 대조군에는 증류수를 넣었고, DPPH 용액의 대조군으로써는 에탄올을 넣어서 보정값을 얻었다. DPPH 자유라디칼 소거율은 아래의 식을 활용하여 계산하였다.

$$\text{DPPH 소거율}(\%) = \frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

(2) ABTS radical 소거능 측정

ABTS 용액은 7.4 mM ABTS(2, 2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))와 2.6 mM potassium persulphate를 제조하여, 암소에 하루 동안 방치해 양이온(ABTS^+)을 형성시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하여 값이 1.5 이하가 나오도록 희석하였고, 희석된 ABTS^+ 용액 150 μl 와 최종농도를 1, 10, 100, 1,000($\mu\text{g/ml}$)가 되도록 희석시킨 IUS를 각각 5 μl 씩 혼합하여, 실온에서 10분간 반응 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다.

ABTS 소거율(%) =

$$\left(1 - \frac{\text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}}\right) \times 100$$

(3) reactive oxygen species(ROS) 활성 측정

Reactive oxygen species(ROS)의 측정은 2', 7'-dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA)를 이용하였다. RAW 264.7 세포를 12 well plate에 2×10^5 cells/well이 되게 분주하고 24시간 동안 배양하였다. 배양 이후 새로운 배양액으로 교체하였으며, IUS을 1, 10, 100($\mu\text{g/ml}$)의 농도로 만들고, LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 뒤 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 배양기에서 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 5분간 1,200 rpm에서 원심분리하여 모은 세포는 차가운 PBS로 2회 세척하고, DCF-DA가 10 μM 이 되도록 첨가하여 암소, 상온에 15분 동안 두었다. 염색 후 차가운 PBS를 넣어 5분간 1,200 rpm에서 원심분리한 후 상청액을 제거하고, PBS 400 μl 를 부유시켜 유세포 분석기를 이용한 형광강도 세기에 따른 변화를 분석하였다.

2) 항염증 효능 측정

(1) 사이토카인 생성량 측정

RAW 264.7 세포를 12 well plate에 2×10^5 cells/well이 되게 분주하여 24시간 동안 배양한 후 새로운 배양액으로 교체하였고, IUS을 1, 10, 100($\mu\text{g/ml}$)의 농도로 처리하고, LPS 1 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리해 다시 24시간 동안 세포배양기(37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2)에서 배양하였다. 원심분리 후 상청액에서 Luminex 기기를 이용하여 IL-1 β , IL-6, TNF- α 를 측정하였다.

4. in vivo 실험

1) 실험군과 대조군 설정 및 약물투여

당뇨와 비만 발생 유발 모델인 db/db mouse를 실험군, db/db mouse의 기원으로 알려진 C57BL/6 마우스를 정상군으로 분류하여 대조군과 실험군을 설정하였다. 대조군과 실험군은 8주령 마우스의 혈당을 체크하고 평균을 구하여 그룹 당 각 8마리씩 나누어 진행하였다. 실험 시작 8주령부터 실험 중

료인 11주령까지 정상군과 대조군에는 증류수를 경구투여 하였으며, 실험군에는 IUS을 매일 1회씩, 오전 10시에 200 μ l(400 mg/kg)씩 투여하였다. IUS 투여량은 성인 체중 60 kg을 기준으로 마우스 체중 30 g에 상응하도록 산출하였다.

2) 채혈 및 혈청 성분 측정

IUS 투여 종료 후 심장 천자법으로 혈액을 채취하여 혈액을 30분간 상온에서 굳힌 뒤에 15분간 3,000 rpm에서 원심분리 후, 혈청을 분리해 Total cholesterol과 Triglyceride(TG), High Density Lipoprotein Cholesterol(HDL-C), Low Density Lipoprotein Cholesterol(LDL-C)의 함량을 측정하였다.

3) 동맥경화지수(AI) 및 심혈관위험지수(CRF) 측정

동맥경화 지수(Atherogenic Index, AI)는 Fiordaliso의 계산법인 $AI = ([Total-C] - [HDL-C]) / [HDL-C]$ 식을 사용하여 구하였다. 또한, 심혈관위험지수인 CRF(Cardiac Risk Factor)는 Rosenfeld의 계산법에 따라 총 콜레스테롤의 양을 HDL 콜레스테롤의 양으로 나누어 구하였다.

4) 조직 검사

Ether로 마취하여 심장 천자법으로 혈액을 채혈하고 흉부와 복강을 절개하여 간과 대동맥을 적출하였다. 각 실험군 별로 적출한 조직은 48시간 동안 10% 중성 포르말린에 고정하였고, 고정이 완료된 조직들은 12시간 동안 흐르는 수돗물에서 수세한 후 조직내 고정액을 완전 제거하였다. 60%에서부터 100% 알코올로 조직의 탈수를 위해 농도 상승 순으로 탈수하였고, xylene에 투명과정을 거친 뒤에 파라핀 블록을 제작하였다. 제작된 블록은 박절기(microtome)를 이용하여 3~4 μ m 두께로 절편을 만들어서 탈 파라핀 및 함수과정을 거친 후, hematoxyline과 eosin(H&E) 염색을 하여 광학현미경상에서 관찰 및 촬영하였다.

5. 통계 처리

실험의 결과들은 SPSS 11.0 unpaired student's T-test와 ANOVA를 사용해 통계처리 하였으며,

$p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

III. 실험결과

1. 안전성 검사

1) 세포독성 평가

RAW 264.7 세포독성 평가에서 대조군을 $100.0 \pm 4.0\%$ 로 나타냈을 때 IUS 1, 10, 100(μ g/ml) 농도에서 $94.0 \pm 6.2\%$, $92.2 \pm 4.7\%$, $91.9 \pm 3.8\%$ 의 세포 생존율을 보여 안전한 것을 확인되었다(Fig. 1).

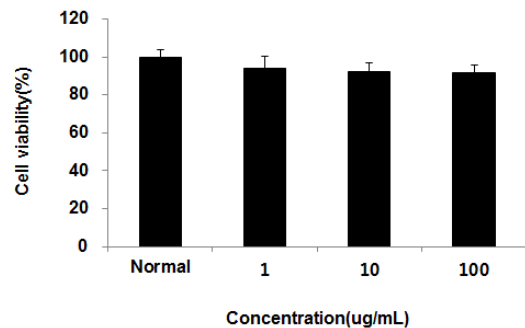


Fig. 1. Cell viability of IUS extract in RAW 264.7 cells.

Each cell was treated with 1, 10 and 100 (μ g/ml) of IUS extract for 24 hr. Cytotoxicity was measured using an MTT assay. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

2) 중금속 함량 평가

IUS의 중금속 함량을 측정된 결과, 납, 카드뮴, 비소, 수은의 경우 기준치 이하로 검출되었다(Table 2).

Table 2. Content of Pb, Cd, As and Hg in Extract of IUS

	Pb	Cd	As	Hg
Permissive density (mg/kg)	5	0.3	3	0.2
IUS	0.201	0.212	0.378	0.006

3) 간 기능에 미치는 영향

(1) AST 수치에 미치는 영향

AST(Aspartate aminotransferase)는 대조군은

220.00±42.43 IU/L로 나타낸 반면, 정상군은 136.67 ±79.70 IU/L, IUS 400 mg/kg투여군은 218.57±66.60 IU/L로 나타나 대조군에 비해 감소하였다(Fig. 2).

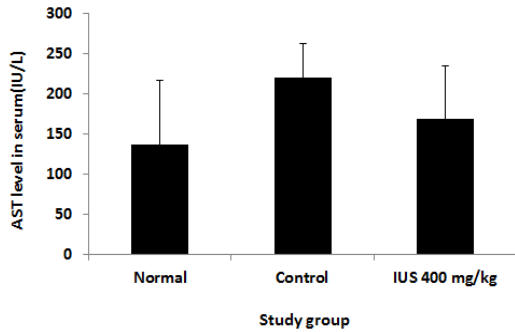


Fig. 2. Effect of IUS extract on the AST level in db/db mice.

The results were expressed as mean±S.D. from three independent experiments (n=8).

Normal : non-diabetic mice

Control : db/db mice were treated orally with DW.

IUS 400 mg/kg : db/db mice were treated orally with 400 mg/kg/day at IUS.

(2) ALT 수치에 미치는 영향

ALT(Alanine aminotransferase)는 측정 결과, 대조군은 87.50±5.00 IU/L로 나타낸 반면, 정상군은 87.14±7.56 IU/L, IUS 400 mg/kg투여군은 85.40±6.90 IU/L로 나타나, 그룹간의 차이가 없었다(Fig. 3).

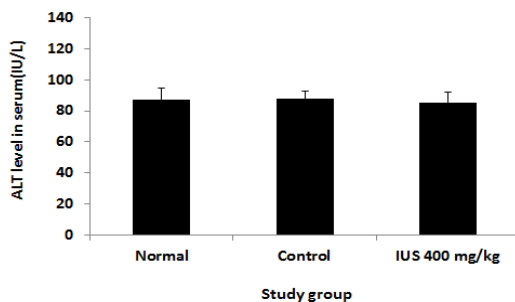


Fig. 3. Effect of IUS extract on the ALT level in db/db mice.

The results were expressed as mean±S.D. from three independent experiments (n=8).

Normal : non-diabetic mice

Control : db/db mice were treated orally with DW.

IUS 400 mg/kg : db/db mice were treated orally with 400 mg/kg/day at IUS.

(3) ALP 수치에 미치는 영향

ALP(Alkaline Phosphatase)를 측정된 결과, 대조군은 230.78±6.61 IU/L로 나타낸 반면, 정상군은 99.48 ±5.2 IU/L, IUS 400 mg/kg투여군은 167.35±7.85 IU/L로 나타나, 대조군에 비해 감소하였다(Fig. 4).

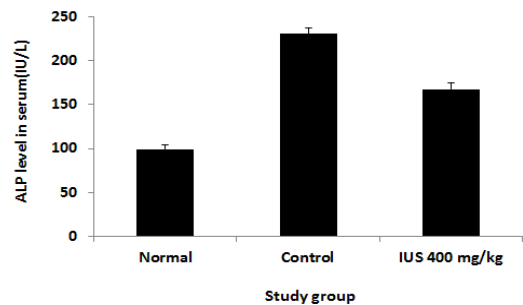


Fig. 4. Effect of IUS extract on the ALP level in db/db mice.

The results were expressed as mean±S.D. from three independent experiments (n=8).

Normal : non-diabetic mice

Control : db/db mice were treated orally with DW.

IUS 400 mg/kg : db/db mice were treated orally with 400 mg/kg/day at IUS.

4) 신장 기능에 미치는 영향

(1) Creatinine 수치에 미치는 영향

creatinine은 측정 결과, 대조군은 1.40±0.04 mg/dl로 나타낸 반면, 정상군은 0.97±0.05 mg/dl, IUS 400 mg/kg투여군은 1.00±0.07 mg/dl로 나타나 대조군에 비해 감소하였다(Fig. 5).

(2) BUN 수치에 미치는 영향

BUN(Blood urea nitrogen)은 측정 결과, 대조군은 20.38±5.45 mg/dl로 나타낸 반면, 정상군은 24.44±3.15 mg/dl, IUS 400 mg/kg투여군은 21.13±2.35 mg/dl로 나타나 그룹간의 차이가 없었다(Fig. 6).

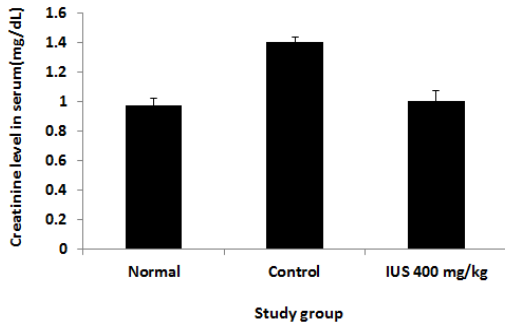


Fig. 5. Effect of IUS extract on the creatinine level in db/db mice.

The results were expressed as mean±S.D. from three independent experiments (n=8).
 Normal : non-diabetic mice
 Control : db/db mice were treated orally with DW.
 IUS 400 mg/kg : db/db mice were treated orally with 400 mg/kg/day at IUS.

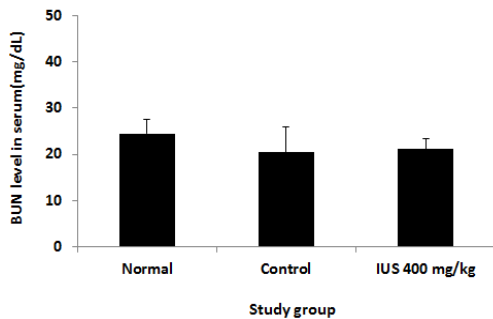


Fig. 6. Effect of IUS extract on the BUN level in db/db mice.

The results were expressed as mean±S.D. from three independent experiments (n=8).
 Normal : non-diabetic mice
 Control : db/db mice were treated orally with DW.
 IUS 400 mg/kg : db/db mice were treated orally with 400 mg/kg/day at IUS.

2. 항산화 활성에 미치는 영향

1) DPPH radical 소거능에 미치는 영향

IUS의 DPPH radical 소거능은 1 µg/ml 농도에 서 2.6±3.9%, 10 µg/ml 농도에서 8.0±5.6%, 100 µg/ml 농도에서 40.2±7.8%, 1,000 µg/ml 농도에서 75.2±8.6% 로 나타나 농도 의존적으로 증가함을 확인하였다 (Fig. 7).

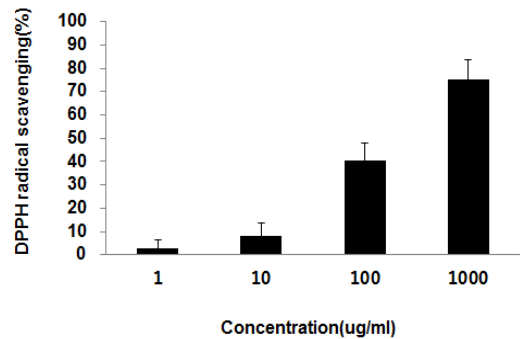


Fig. 7. DPPH free radical scavenging activity of IUS extract at various concentration.

Extracts were incubated with DPPH solution at 37 °C for 30 mins. Activities were determined by measurement of absorbance at 517 nm. The results were expressed as mean±S.D. from three independent experiments.

2) ABTS radical 소거능에 미치는 영향

IUS의 ABTS radical 소거능은 1 µg/ml 농도에 서 1.5±1.6%, 10 µg/ml 농도에서 5.4±1.1%, 100 µg/ml 농도에서 37.5±5.4%, 1,000 µg/ml 농도에서 91.4±0.5%로 농도 의존적으로 증가하였다(Fig. 8).

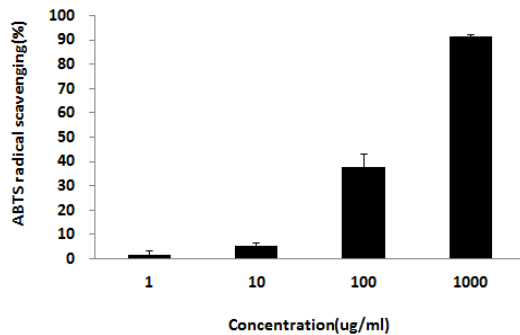


Fig. 8. ABTS radical scavenging activity of IUS extract at various concentration.

Extracts were incubated with DPPH solution at 37 °C for 30 mins. Activities were determined by measurement of absorbance at 517 nm. The results were expressed as mean±S.D. from three independent experiments.

3) ROS 생성량에 미치는 영향

ROS 생성량은 RAW 264.7 세포주에서 대조군을 $100.0 \pm 1.5\%$ 로 나타냈을 때 정상군은 $42.9 \pm 1.6\%$, IUS는 $1 \mu\text{g/ml}$ 농도에서 $108.9 \pm 1.0\%$, $10 \mu\text{g/ml}$ 농도에서 $104.2 \pm 6.7\%$, $100 \mu\text{g/ml}$ 농도에서 $86.1 \pm 5.3\%$ 로 나타나, $100 \mu\text{g/ml}$ 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는(* : $p < 0.05$) 감소를 보였다(Fig. 9).

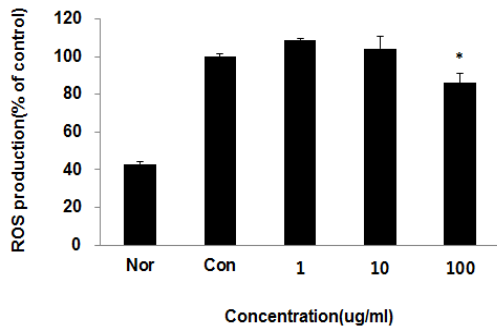


Fig. 9. Effect of IUS extract on ROS production in RAW 264.7 cells.

Each cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g/ml}$) of IUS extract and LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) for 24 hr. The ROS production was analyzed by flow cytometry. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments (* : $p < 0.05$).

3. 항염증 효능에 미치는 영향

1) 사이토카인 생성량에 미치는 영향

(1) IL-1 β

RAW 264.7 세포주에서 IL-1 β 생성량은 대조군이 $741.3 \pm 61.7 \text{ pg/ml}$ 로 나타낸 반면, 정상군은 $1.2 \pm 0.3 \text{ pg/ml}$, IUS는 $1 \mu\text{g/ml}$ 농도에서 $687.9 \pm 15.3 \text{ pg/ml}$, $10 \mu\text{g/ml}$ 농도에서 $687.7 \pm 11.4 \text{ pg/ml}$, $100 \mu\text{g/ml}$ 농도에서 $502.7 \pm 2.4 \text{ pg/ml}$ 로 나타나, 대조군에 비하여 1, 10, $100 \mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의성 있는(** : $p < 0.001$, ** : $p < 0.01$) 감소를 확인하였다(Fig. 10).

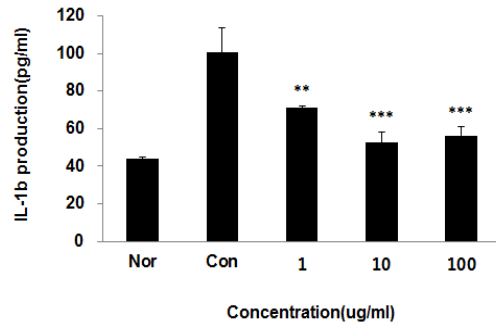


Fig 10. Effect of IUS extract on LPS-induced IL-1 β production in RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells were treated with IUS extract (1, 10 and 100 ($\mu\text{g/ml}$)) for 24 hr in the presence of LPS ($1 \mu\text{g/ml}$). The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments (Significance of results : *** : $p < 0.001$, ** : $p < 0.01$).

(2) IL-6

RAW 264.7 세포주에서 IL-6 생성량은 대조군이 $741.3 \pm 61.7 \text{ pg/ml}$ 로 나타낸 반면, 정상군은 $1.2 \pm 0.3 \text{ pg/ml}$, IUS는 $1 \mu\text{g/ml}$ 농도에서 $687.9 \pm 15.3 \text{ pg/ml}$, $10 \mu\text{g/ml}$ 농도에서 $687.7 \pm 11.4 \text{ pg/ml}$, $100 \mu\text{g/ml}$ 농도에서 $502.7 \pm 2.4 \text{ pg/ml}$ 로 나타나, 대조군에 비하여 $100 \mu\text{g/ml}$ 농도에서 유의성 있는(** : $p < 0.01$) 감소를 나타냈다(Fig. 11).

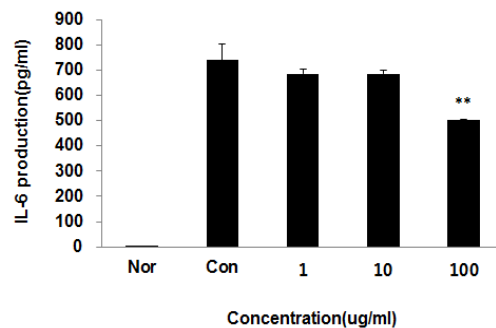


Fig 11. Effect of IUS extract on LPS-induced IL-6 production in RAW 264.7 cells.

Raw 264.7 cells were treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g/ml}$) of IUS extract in the presence of LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) for 24 hr. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments (Significance of results : ** : $p < 0.01$).

(3) TNF- α

RAW 264.7 세포주에서 TNF- α 생성량은 대조군이 2482.2 \pm 108.9 pg/ml로 나타낸 반면, 정상군은 128.7 \pm 3.6 pg/ml, IUS는 1 μ g/ml 농도에서 2195.3 \pm 23.0 pg/ml, 10 μ g/ml 농도에서 1973.8 \pm 55.9 pg/ml, 100 μ g/ml 농도에서 1853.4 \pm 77.7 pg/ml로 나타나, 대조군에 비해 10, 100(μ g/ml) 농도에서 유의성 있는(* : p<0.05) 감소를 나타냈다(Fig. 12).

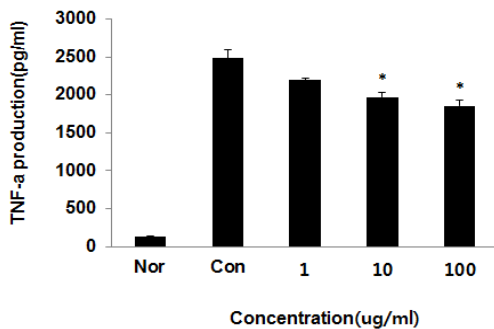


Fig 12. Effect of IUS extract on LPS-induced TNF- α production in RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cells and adipocyte were treated with 1, 10 and 100 (μ g/ml) of IUS extract in the presence of LPS (1 μ g/ml) for 24 hr. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments (Significance of results : * : p<0.05).

4. 혈중 콜레스테롤 변화에 미치는 영향

1) 총 콜레스테롤 함량

혈청 내 총 콜레스테롤 함량 측정 결과, 대조군은 197.50 \pm 28.10 mg/dl로 나타낸 반면, 정상군은 97.14 \pm 12.54 mg/dl, IUS 400 mg/kg 투여군은 106.25 \pm 20.66 mg/dl로 나타나, 대조군에 비해 유의성 있는(** : p<0.01) 감소를 보였다(Fig. 13).

2) HDL-C 함량

혈청 내 HDL cholesterol(HDL-C) 함량을 측정한 결과, 대조군은 25.00 \pm 5.77 mg/dl로 나타낸 반면, 정상군은 20.00 \pm 5.77 mg/dl, IUS 400 mg/kg 투여군은 30.00 \pm 7.07 mg/dl로 나타나, 대조군에 비하여 증가하였다(Fig. 14).

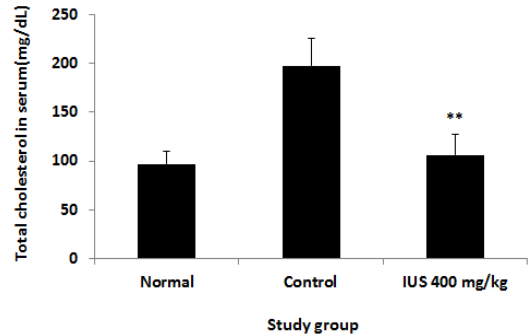


Fig. 13. Effect of IUS extract on the serum total cholesterol level in db/db mice.

The results were expressed as mean \pm S.D (Significance of results, ** : p <0.01) (n=8).
Normal : non-diabetic mice
Control : db/db mice were treated orally with DW.
IUS 400 mg/kg : db/db mice were treated orally with 400 mg/kg/day at IUS.

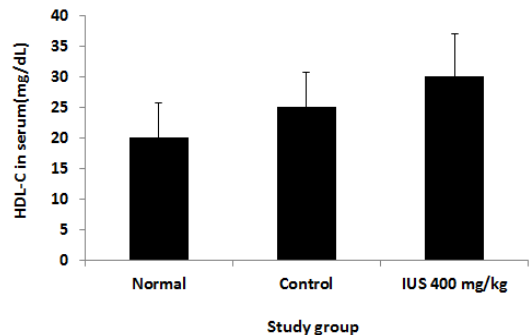


Fig. 14. Effect of IUS on the level of HDL-cholesterol in the serum of db/db mice.

The results were expressed as mean \pm S.D. (n=8).
Normal : non-diabetic mice
Control : db/db mice were treated orally with DW.
IUS 400 mg/kg : db/db mice were treated orally with 400 mg/kg/day at IUS.

3) LDL-C 함량

혈청 내 LDL cholesterol(LDL-C) 함량을 측정한 결과, 대조군은 163.2 \pm 30.85 mg/dl로 나타낸 반면, 정상군은 136.71 \pm 10.19 mg/dl, IUS 400 mg/kg 투여군은 163.2 \pm 13.85 mg/dl로 나타나, 대조군에 비하여 차이를 나타내지 않았다(Fig. 15).

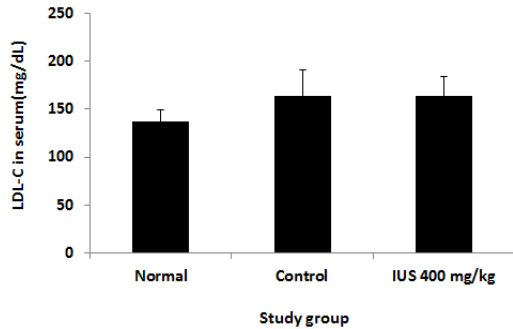


Fig. 15. Effect of IUS on the level of LDL-cholesterol in the serum of db/db mice.

The results were expressed as mean±S.D. (n=8).
 Normal : non-diabetic mice
 Control : db/db mice were treated orally with DW.
 IUS 400 mg/kg : db/db mice were treated orally with 400 mg/kg/day at IUS.

4) Triglyceride(TG) 함량

혈청 내 triglyceride 함량을 측정된 결과, 대조군은 256.00±82.66 mg/dl로 나타난 반면, 정상군은 140.00±51.38 mg/dl, IUS 400 mg/kg 투여군은 112.50±91.77 mg/dl으로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있는(* : p<0.05) 감소를 보였다(Fig. 16).

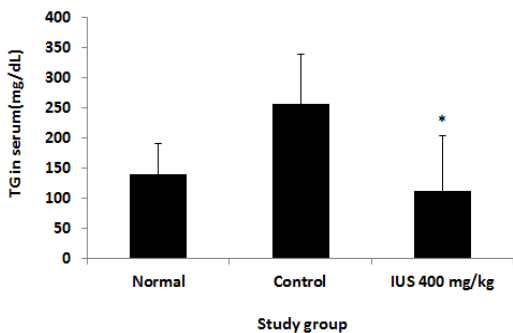


Fig. 16. Effect of IUS on the level of triglyceride in the serum of db/db mice.

The results were expressed as mean±S.D (Significance of results, * : p<0.05)(n=8).
 Normal : non-diabetic mice
 Control : db/db mice were treated orally with DW.

IUS 400 mg/kg : db/db mice were treated orally with 400 mg/kg/day at IUS.

5. 동맥경화지수 및 심혈관 위험지수에 미치는 영향

동맥경화지수를 측정된 결과, 대조군은 6.90±0.08 mg/dl로 나타난 반면, 정상군은 3.86±0.04 mg/dl, IUS 400 mg/kg 투여군은 2.54±0.05 mg/dl로 나타나, 대조군에 비해 유의성 있게(** : p<0.01) 감소하였다(Table 3). 또한, 심혈관 위험지수를 측정된 결과, 대조군은 7.90±0.12 mg/dl로 나타난 반면, 정상군은 4.86±0.13 mg/dl, IUS 400 mg/kg 투여군은 3.54±0.07 mg/dl로 나타나, 대조군에 비해 유의성 있는(***) : p<0.001) 감소를 나타냈다(Table 3).

Table 3. AI and CRF of Serum in db/db Mice Containing IUS for 4 Weeks

	Normal	Control	IUS
AI	3.86±0.04	6.90±0.08	2.54±0.05**
CRF	4.86±0.13	7.90±0.12	3.54±0.07***

Values are mean±SD of 8 mice per group.
 (Significance of results, *** : p<0.001, ** : p<0.01)
 AI : atherogenic index, CRF : cardiac risk factor
 Normal : non-diabetic mice
 Control : db/db mice were treated orally with DW.
 IUS 400 mg/kg : db/db mice were treated orally with 400 mg/kg/day at IUS.

6. 조직 염색 관찰

1) 간

실험 종료 후 간 조직을 H & E 염색, 관찰한 결과 대조군의 간세포에서 지방공포가 관찰되며, 이로 인해 세포핵이 세포질 가장자리로 밀려난 것을 확인할 수 있고, 쿠퍼세포 수도 정상군에 비해 현저한 감소를 보였다. 이에 반해 IUS 400 mg/kg 투여군은 간세포내의 지방공포로 인해 세포의 크기는 커져있으나, 대조군에 비하여 지방공포가 적어졌으며, 세포핵도 중앙에 위치해 있는 것을 확인하였다(Fig. 17).

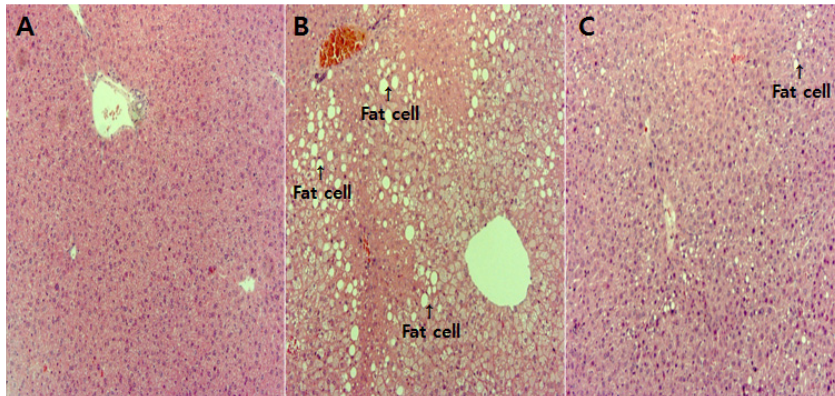


Fig. 17. Standard hematoxylin-eosin staining of liver from db/db mice.

Original magnification (Zeiss, $\times 2.5$)

A : normal, normal C57BL/6J mice group

B : control, db/db mice group treated with DW

C : IUS, db/db mice group treated with IUS 400 mg/kg

2) 대동맥

실험 종료 후 대동맥 조직을 H & E 염색, 관찰한 결과, 대조군은 지질 입자(lipid particle)가 모여 있는 지질 핵심(lipid core)이 내막하 공간(subintimal space)에서 관찰되며 그 위를 덮는 내막 세포의 변형과 배열이 구분되지 않았고 내막이 상대적으로

두꺼워져 있는 것을 확인하였다. 이에 반해, IUS 400 mg/kg 투여군에서는 내막이 얇고 두께가 고르며 고배율에서 내막, 내부 탄력층(internal elastic lamina), 중막 등의 각층이 명확히 구분되어 있었으며, 지질 입자가 대조군에 비하여 적게 나타났음을 확인하였다(Fig. 18).

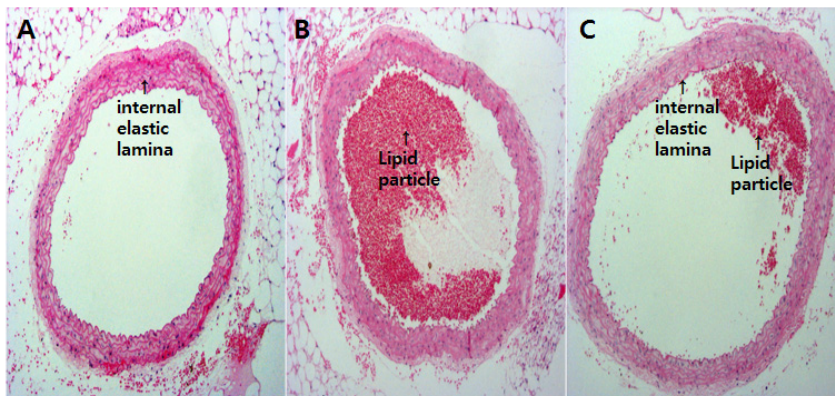


Fig. 18. Standard hematoxylin-eosin staining of aortas from db/db mice.

original magnification (Zeiss, $\times 10$).

A : normal, normal C57BL/6J mice group

B : control, db/db mice group treated with DW

C : IUS, db/db mice group treated with IUS 400 mg/kg

IV. 고찰

우리나라 30세 이상 성인인구의 관상동맥질환 유병률은 1998년 1% 미만이었다는 것에 비해 2010년에는 2.5%로 빠르게 증가하는 추세이며²⁶, 지난 10년간 남녀 430,920명을 대상으로 한 심뇌혈관질환 발생과 위험인자에 대한 추적관찰 연구에서 심뇌혈관계 질환에 가장 큰 영향을 미치는 위험인자로 남자는 고혈압, 흡연, 이상지질혈증, 여자는 고혈압, 이상지질혈증, 당뇨병, 흡연이 각각 언급되었다²⁷. 현재 고혈압 유병률이나 흡연비율은 크게 변하지 않는 추세이나 이상지질혈증은 지속적으로 증가하는 것으로 확인되며, 이로 인해 앞으로 심뇌혈관계 질환에서 이상지질혈증의 예방 및 관리의 중요성이 대두되고 있다²⁸.

이상지질혈증(Dyslipidemia)이란 혈청 내 Triglyceride (TG), Total cholesterol, LDL-C의 상승, 또는 HDL-C의 감소에 해당하는 병태 개념⁶으로 지질대사의 이상으로 혈액 내의 주요 지질(cholesterol, triglyceride, phospholipid, free fatty acid)이 정상보다 증가한 상태를 의미하는 고지혈증³을 포함하는 확장적인 개념으로 최근 들어 점차 활용빈도가 늘어나는 추세이다²⁸.

20세 이상 성인의 경우 이상지질혈증을 진단하기 위한 선별검사로 매 4-6년마다 공복 후 지질 검사(Total cholesterol, TG, HDL-C, LDL-C)를 시행하는 것을 권장하며²⁹, 이상지질혈증의 치료는 식사요법과 운동요법을 포함한 생활요법과 보다 적극적인 치료로 약물요법이 있다. 약물치료는 심혈관질환 위험도 및 지질 검사 수치를 종합적으로 판단하여 시행 여부를 결정하며, 스타틴, 피브린산 유도체, 니코틴산, 에제티미브(ezetimibe), 오메가-3 지방산 등이 있다³⁰. 일차 선택치료제로 주로 사용되는 스타틴은 HMG-CoA 환원효소 억제제로 심혈관질환 위험도에 따라 목표 수치에 도달하도록 용량을 조절하는데, LDL-C를 감소시켜 심혈관질환 감소 효과는 뚜렷하나 소화장애, 속쓰림, 복통

등의 부작용이 4% 정도의 환자에게서 발견되며 드물긴 하나 간 독성이나 근육 독성과 같은 부작용을 보이기도 한다³¹. 피브리산 유도체, 니코틴산, 에제티미브, 오메가-3 지방산 등의 약물은 주로 스타틴 투여에도 뚜렷한 호전을 보이지 않거나 필요에 따라 병용투여를 고려하는 약물들로 각각의 약물에 따른 부작용과 금기는 다양하다³²⁻³⁵.

한의학적 관점에서 이상지질혈증은 濕濁한 穢濁之氣가 체내에 정류되어 瘀血, 濕濁이 血脈에 발생하는 개념⁹이자 嗜食肥甘厚味の 外因과 肝脾腎 기능실조의 內因에 의해 발병되는 本虛標實의 병리적 특성을 갖는 개념으로 설명할 수 있으며, 痰飲, 瘀血, 氣滯 범주에 포함시킬 수 있다². 본 연구에 사용된 茵陳, 鬱金, 山查는 이러한 한의학적 변증의 이상지질혈증을 치료하는데 적합한 약재들로 여러 연구에서 그 효과가 입증되었다¹⁵⁻²⁵.

茵陳은 본초학상으로 利水滲濕藥으로 주로 肝, 膽經으로 歸經하여 清熱利濕 退黃하는 효능이 있고³⁶, 단미(單味)제¹⁶⁻¹⁸ 또는 복합제제¹⁹ 등을 통해서 동물모델에서 이상지질혈증을 개선 효능¹⁶, 항산화 효과²⁰가 있음을 확인할 수 있다. 鬱金은 活血祛瘀藥으로 行氣解鬱하며 血分에 들어가 涼血消瘀하는 血中の 氣藥이다³⁶. 약리학적으로는 항산화 작용 및 항비만^{21,22} 효과를 비롯하여 항암, 항염증 등의 효과^{37,38}가 있음이 밝혀져 있다. 본 저자는 血分에서 化瘀散結하며 지질대사 개선 효능이 있는 山查³⁹를 茵陳, 鬱金과 함께 배합하여 복합 추출물로서 IUS를 실험하여 이상지질혈증에서의 복합추출물 연구를 확장하고자 했다.

또한 임상에서는 환자들이 늘 단독으로 이상지질혈증만을 보이는 것이 아니라 당뇨병이나 비만과 같은 대사성 증상을 수반하는 경우가 많음에도, 현재까지 대부분의 고지혈증 연구에서는 식이를 통해 이상지질혈증을 유발한 동물모델을 활용한 연구에 국한되어 있는 것에 주목하였다. 이에 본 연구에서는 고지혈증 동물모델이 아닌 당뇨와 비만이 유발된 db/db mouse를 model로 연구를 설계

하여 단순 고지질혈증의 개선이 아닌 복합적인 대사 이상이 동반된 이상지질혈증에서 IUS가 갖는 유의성을 확인하고자 하였다.

이상지질혈증에 영향을 줄 수 있는 산화적 스트레스와 항산화 효능을 확인하기 위해 DPPH와 ABTS radical 소거능, 산소의 정상 대사상 자연스럽게 발생하는 부산물이지만 과잉 시 세포 구조의 손상을 일으키는 ROS의 생성량을 측정하였다. 또한 단백질 합성 및 스트레스에 의한 염증성 반응에 관여하는 IL-6과 노령 인구에서 주요 사망예측인자이기도 한 초기 염증반응 매개 단백질인 TNF- α , 심부전, 협심증 등과 관련된 염증유발인자인 IL-1 β 등의 주요 사이토카인^{41,42}을 측정하여 IUS의 항염증 효능에 대해서 확인하고자 했다.

RAW 264.7 세포독성과 증균속 함량 평가에서 납, 카드뮴, 비소, 수은의 기준치 이하 검출로 안전성을 확보하였으며 간 기능과 신기능 평가에서 IUS 투여로 인한 간독성, 신독성에 대한 안전성도 확인하였다.

IUS의 항산화 효능 평가에서 DPPH radical 소거능과 ABTS 소거능은 IUS을 1, 10, 100, 1,000($\mu\text{g}/\text{ml}$)의 농도로 희석한 후 각각을 측정 한 결과, 농도에 의존적으로 증가했고, ROS 생성량은 유의성 있게 (* : $p < 0.05$) 감소하여 IUS가 항산화 효능이 있음을 확인하였다.

항염증 효능 평가를 위한 IL-1 β , IL-6, TNF- α 측정에서는 대조군에 비해 IL-1 β 은 1, 10, 100($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도 모두에서 유의성 있게($p < 0.001$ 또는 $p < 0.01$) 감소하였고, IL-6은 IUS 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도에서 대조군에 비해 유의성 있는($p < 0.01$) 감소를 보였다. TNF- α 은 대조군에 비하여 10, 100($\mu\text{g}/\text{ml}$) 농도에서 유의성 있게($p < 0.05$) 감소하여 이상의 결과에서 IUS가 대조군에 비해 유의적인 염증 억제 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

이상지질혈증의 직접적인 진단기준이 되는 Total cholesterol, HDL-C, LDL-C, TG의 함량 비교에서는 혈청 내 Total cholesterol은 대조군에 비해 유의

성 있는($p < 0.01$) 감소를 보였고, 혈청 내 HDL-C은 대조군에 비해 약간 증가하였다. LDL-C 함량은 대조군에 비하여 유의미한 차이는 없었으며 혈청 내 TG 함량의 경우는 대조군에 비하여 유의성 있는($p < 0.05$) 감소를 보였다. LDL-C의 수치 개선은 확인할 수 없었지만, HDL-C의 상승, TG의 감소와 Total cholesterol의 감소를 보여 IUS가 당뇨가 유발된 동물모델에서 혈청내 지질 함량 조절로 이상지질혈증 개선을 도모할 수 있음을 확인했다. 이는 기존 연구들에서 확인된 茵陳, 鬱金, 山查의 약리학적 항고지혈 효능에서 기인한 것으로 보이며 세 가지 본초를 복합 추출해도 그 결과가 유의성 있게 나타남을 시사한다. 또한 이상지질혈증을 한의학적 개념으로 濕痰과 瘀血이 血脈에 정체된 것으로 정의하고 본초들을 선택하고 배합한 것이 유효했으며, 茵陳의 利濕, 鬱金의 解鬱, 消瘀작용과 山查의 정체된 것을 흘리는 효능(化瘀散結)이 血脈 안에 존재하는 지질환경 개선을 이끌었다고 생각한다.

그리고 본 연구의 지질 개선 결과를 살펴보면 HDL-C의 증가를 확인할 수 있다. 현재 고지혈증 약물치료로 활용되는 약 중에서 HDL-C을 개선할 수 있는 약물은 니코틴산이 유일하며 이 또한 부작용과 주의사항이 다양한 점을 생각하면 연구 결과가 갖는 의미가 더 크다. 다만 동맥경화의 주요 위험인자인 LDL-C의 의미 있는 개선은 확인할 수 없었으므로 이에 대한 추가 한약 배합을 통한 연구가 더 이어져야 할 것으로 보인다.

심혈관계 질환 위험도 판정의 지표가 되는 동맥경화지수(AI) 및 심혈관 위험지수(CRF) 평가에서 동맥경화지수는 대조군에 비하여 유의성 있는($p < 0.01$) 감소를 보일 뿐 아니라 정상군에 비해서도 적은 것을 확인할 수 있었다. 심혈관 위험지수 또한 대조군에 비하여 유의성 있는($p < 0.001$) 감소를 확인하였다. 이는 IUS의 투여가 지질대사를 개선하여 동맥경화 및 심혈관 질환의 위험지수를 의미 있게 낮출 수 있음을 시사한다.

실험종료 후 시행한 조직염색 관찰결과 간 조직에서는 대조군에 비해 지방공포가 적고, 세포핵이 중앙에 위치함을 확인할 수 있었으며, 대동맥 조직에서는 세포 내막이 얇고 두께가 고르며 지질 입자가 대조군에 비해 적었다.

이상의 결과들을 토대로 IUS는 세포독성이 없으며, 간과 신장에 손상을 주지 않으며 혈액내 지질 함량을 조절할 뿐만 아니라 항염증, 항산화능 효능이 있음을 확인하였다. 또한 특별히 당뇨와 비만이 유도된 db/db mouse model에서의 본 연구의 결과는 단순 이상지질혈증 환자뿐 아니라 당뇨나 비만 등의 대사성 증후들이 복합적으로 나타나는 환자들에게서 IUS가 다양하게 활용될 수 있음을 시사한다. IUS는 이상지질혈증의 치료뿐 아니라 당뇨병환자의 비만관리, 죽상동맥경화증, 허혈성 뇌혈관, 심혈관 질환의 예방과 관리에 두루 고려될 수 있을 것으로 생각하며 향후 본 연구결과를 바탕으로 보다 다양한 한의학적 연구가 이어지기를 기대한다.

V. 결론

茵陳, 鬱金, 山查의 추출물(인울산, IUS)의 항고지혈, 항산화 효과를 확인하기 위해 세포독성과 중금속 검출여부를 평가하고 간, 신장에 미치는 영향이 없음을 확인하였다. IUS를 투여하기 전후의 DPPH·ABTS 소거능 활성, ROS·IL-1 β ·IL-6·TNF- α 생성량, Total cholesterol·TG·HDL-C·LDL-C의 함량을 측정하고, 간·대동맥 조직을 염색 관찰한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 인진, 울금, 산사 추출물은 세포독성이 없으며 중금속이 검출되지 않았다.
2. 인진, 울금, 산사 추출물은 AST, ALP, Creatinine은 대조군에 비해 감소를 나타냈고, ALT와 BUN은 그룹간 차이를 보이지 않아 간과 신장 기능에 영향을 미치지 않음을 확인하였다.

3. 인진, 울금, 산사 추출물은 DPPH 소거능과 ABTS 소거능 활성을 보였으며, ROS의 생성량을 대조군에 비해 유의성 있게 감소시켰다.
4. 인진, 울금, 산사 추출물은 IL-1 β , IL-6, TNF- α 생성량은 대조군에 비해 유의성 있게 감소시켰다.
5. 인진, 울금, 산사 추출물은 혈청 내의 HDL-cholesterol을 증가시켰으며, total cholesterol과 triglyceride 함량을 유의성 있게 감소시켰다.
6. 인진, 울금, 산사 추출물은 동맥경화지수 및 심혈관 위험지수는 유의성 있는 감소를 나타냈다.
7. 인진, 울금, 산사 추출물은 조직염색 관찰상 간 조직은 대조군에 비해 지방공포도 적고 세포핵이 보다 중앙에 위치했으며, 대동맥에서는 대조군에 비해 두께가 고르며 내막이 얇고 지질 입자가 적었다.

이상으로 인진, 울금, 산사 추출물은 항산화능 및 항염증, 항고지혈증에 대한 효능이 있는 것으로 생각되며, 이를 복합적인 대사 이상에 동반된 이상지질혈증의 예방 및 치료에 응용할 수 있으리라 사료되는 바이다.

참고문헌

1. Statistics Korea. Death statistics in Korea. Korea: Korea development institute; 2014.
2. National Oriental Medical Department of Heart Internal Medicine. Circulation of Internal Medicine nerve. Seoul: Gunja publishing company; 2010, p. 169-73, 184-9.
3. Department of internal medicine. Seoul national university college of medicine. SNUH manual of medicine. Seoul: Korean medical publisher; 2014, p. 91-9, 507-13.
4. Korean stroke society. Textbook of Stroke. Seoul: E+ public; 2013, p. 47-51.

5. Assmann G, Schulte H. The Prospective Cardiovascular Münster(PROCAM) study: prevalence of hyperlipidemia in persons with hypertension and/or diabetes mellitus and the relationship to coronary heart disease. *American heart journal* 1988;116(6):1713-24.
6. JD editorial department. Step to Internal Medicine Endocrinology. Seoul: Jungdam publisher; 2013, p. 335-44.
7. KIM JJ. The characteristic and Therapy of hyperlipidemia. Seoul: yakupsinmunhak; 1994, p. 50-3.
8. Habukuihakwon. youngchu-kyungkyosuk. Beijing: Inminwisheng publisher; 1982, p. 161.
9. Jung WE, Ahn KS. Korean medicine Pathology. Seoul: younglimsa; 1998, p. 545.
10. Bang HJ, Tak US, Hong Y, Kang YH. Korean medicine approach to hyperlipidemia. *Dongseo-medicine* 1995;20(1):25-36.
11. Kim JB, Song HN. Effects of Kyeongok-go and Its Two Added Precriptions on Hyperlipidemic Rats Induced by High-fat Diet. *Korean Journal of Oriental Physiology and Pathology* 2014; 28(4):371-8.
12. Kang SS, Shin YJ, Jo JJ, Jeon SY. Study of the Effects of Samulwalhyeol-tang in Hyperlipidemic Animal Model Induced with a High-Fat Diet. *The Journal of Korean Oriental Internal Medicine* 2014;35(2):119-32.
13. Ahn GY, Jo JJ, Shin MG, Jeon SY. Study of the effects of gugijagami-bang in a hyperlipidemic animal model induced with a high-fat diet. *The Journal of Korean Oriental Internal Medicine* 2014;35(4):505-18.
14. Youn HD, Jo HK, You HR, Seol IC, Kim YS. The effects of jehasuogamibang on antioxidation activity and dietary hyperlipidemia-induced mice. *The Journal of Korean Oriental Internal Medicine* 2014;35(3):244-61.
15. Lee SJ, Han JM, Lee JS, Son CG, IM HJ, Jo HK, et al. ACE Reduces Metabolic Abnormalities in a High-Fat Diet Mouse Model. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2015;2015:1-8.
16. Jang WS, Kim YS, Seol IC. Antioxidant and Lipid-lowering Effects of Artemisia capillaris on a Rat Model of Hyperlipidemia. *The Journal of Korean Oriental Medicine* 2012;33(2):11-24.
17. Hong JH, Hwang EY, Kim HJ, Jeong YJ, Lee IS. Artemisia capillaris Inhibits Lipid Accumulation in 3T3-L1 Adipocytes and Obesity in C57BL/6J Mice Fed a High Fat Diet. *Journal of Medicinal Food* 2015;12(4):736-45.
18. Lee JT, Lee BR, Yang GY, Lee H, Yim YK. A Study on the Effect of Herbal-acupuncture with Artemisia Capillaris Herba at GB34 on Hyperlipidemia in Rat. *Journal of Meridian & Acupoint* 2010;27(1):107-18.
19. Kim YC, Kim SM, Park JH, Seo BI, Choi HS. Preventive effects of Injinho-tang and Haninjinho-tang on hyperlipidemia and liver damage induced by alcohol. *The Korea Journal of Herbology* 2006;21(3):47-54.
20. Jung MJ. Yin Y, Heo SI, Wang MH. Antioxidant and Anticancer Activities of Extract from Artemisia capillaries. *Korean Journal of Pharmacognosy* 2008;39(3):194-8.
21. Shon MS, Kim GN. Anti-oxidant and anti-obese activities of turmeric(*Curcuma longa* L.) extract in 3T3-L1 cells. *Kor J Aesthet cosmetol* 2014; 12(2):169-75.
22. Kim MS, Chun SS, Choi JH. Effects of Turmeric (*Curcuma longa* L.) on Antioxidative Systems and Oxidative Damage in Rats Fed a High

- Fat and Cholesterol Diet. *The Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition* 2013;42(4):570-6.
23. Lee SK, Lee SS, Baek JW, Lee SJ, Kim KH. Effect of Crategii fructus on serum lipid in high cholesterol diet induced hyperlipidemic rats. *Korean Journal Oroental Preventive Medical Society* 2003;7(2):13-22.
 24. Seo BI. Preventive effects of water extracts from Crataegi Fructus on hyperlipidermia and liver damage induced by alcohol. *Korean J Herbalogy* 2005;20(1):35-43.
 25. Kwon SH, Kim JB, Effects of Crataegii Fructus on the Diet-induced Hyperlipidemia in Rats. *Korean Journal of Oriental Physiology and Pathology* 2010;24(1):67-73.
 26. Kim RB, Kim BG, Kim YM, Seo JW, Lim YS, Kim HS, et al. Trends in the incidence of hospitalized acute myocardial infarction and stroke in Korea, 2006-2010. *Journal of Korean Medical Science* 2013;28(1):16-24.
 27. Jee SH, Jang Y, Oh DJ, Oh BH, Lee SH, Park SW, et al. A coronary heart disease prediction model: the Korean Heart Study. *BMJ Open* 2014;4(5):5-25.
 28. Korean society of lipidology and atherosclerosis. Guidelines for the management of dyslipidemia. Seoul: Korean society of lipidology and atherosclerosis: 2015.
 29. Goff DC, Lloyd-Jones DM, Bennett G, Coady S, D'Agostino RB, Gibbons R, et al. 2013 ACC/AHA guideline on the assessment of cardiovascular risk: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines. *J Am Coll Cardiol* 2014;63(25):2935-59.
 30. Fletcher GF, Ades PA, Kligfield P, Arena R, Balady GJ, Bittner VA, et al. Exercise standards for testing and training: a scientific statement from the American Heart Association. *Circulation* 2013;128(8):873-934.
 31. Mihaylova B, Emberson J, Blackwell L, Keech A, Simes J, Barnes E, et al. The effects of lowering LDL cholesterol with statin therapy in people at low risk of vascular disease: meta-analysis of individual data from 27 randomised trials. *Lancet* 2012;380(9841):581-90.
 32. Berglund L, Brunzell JD, Goldberg AC, Goldberg IJ, Sacks F, Murad MH, et al. Evaluation and treatment of hypertriglyceridemia: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2012;97(9):2969-89.
 33. Cannon CP, Giugliano RP, Blazing MA, Harrington RA, et al. A comparison of ezetimibe/simvastatin versus simvastatin monotherapy on cardiovascular outcomes after acute coronary syndromes. *American Heart Association Scientific Sessions* 2014.
 34. Baigent C, Landray MJ, Reith C, Emberson J, Wheeler DC, Tomson C, et al. The effects of lowering LDL cholesterol with simvastatin plus ezetimibe in patients with chronic kidney disease (Study of Heart and Renal Protection) : a randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 2011;377(9784):2181-92.
 35. Rizos EC, Ntzani EE, Bika E, Kostapanos MS, Elisaf MS. Association between omega-3 fatty acid supplementation and risk of major cardiovascular disease events: a systematic review and meta-analysis. *JAMA* 2012;308(10):1024-33.
 36. Kang BS, Kim IR, Kim HC, Guk YB, Park YG, Seo BI, et al. Bonchohak. Seoul: Yeonglimsa: 2008, p. 369-71, 411-2, 452-6.
 37. Lee KJ, Ma JY, Kim YS. Identification of Curcuminoids from Turmeric(*Curcuma longa*)

- Using Ultrasonic Wave and Dipping Method. *KSBB Journal* 2012;27(1):33-9.
38. Jung SH, Chang KS, Ko KH. Physiological Effects of Curcumin Extracted by Supercritical Fluid from Turmeric(*Curcuma longa* L.), Physiological Effects of Curcumin Extracted by Supercritical Fluid from Turmeric(*Curcuma longa* L.). *Korean Journal of Food Science and Technology* 2004;36(2):317-20.
 39. Araujo FB, Barbosa DS, Hsin CY, Maranhao RC, Abdalla D. Evaluation of oxidative stress in patients with hyperlipidemia. *Atherosclerosis* 1995;117(1):61-71.
 40. Yang RL, Shi YH, Hao G, Li Wu, Le GW. Increasing Oxidative Stress with Progressive Hyperlipidemia in Human: Relation between Malondialdehyde and Atherogenic Index. *Journal of clinical biochemistry and nutrition* 2008; 43(3):154.
 41. Cho JY, Oh SD. The Effects of Blood Lipid and Vascular Inflammation Cytokine on Combined Exercise Intensity in the Post Menopausal Obese Women. *Journal of Sport and Leisure Studies* 2013;52(2):641-52.
 42. The Korean academy of clinical geriatrics. Principles of Geriatric Medicine. Seoul: Korean medicine publisher; 2011, p. 37.