

Original Article

## HepG2 cell을 이용한 한인진, 울금, 나복자 복합물(ACR)의 이상지질혈증 관련 유전자 발현 억제 및 항산화 효능 평가

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

### Inhibition of gene associated with Dyslipidemia and Antioxidative Effect of *Artemisia iwayomogi*, *Curcumae Radix* and *Raphani Semen*(ACR) on HepG2 cell model

Jiyun Cha, Ho-ryong Yoo, Yoon-sik Kim, In-chan Seol, Hyun-kyung Jo  
Dept. of Internal Medicine, College of Korean Medicine, Daejeon University

**Objectives:** We performed this study to evaluate the antioxidative and hypolipidemic effect of *Artemisia iwayomogi* (韓茵蔯), *Curcuma longa* L. (鬱金) and *Raphanus sativus* L. (蘿菔子) (ACR).

**Method:** We enriched *Artemisiae Capillaris*, *Curcumae Longae* and *Raphani Semen* compound with alcohol. ACR extract is treated to HepG2 cell. Cell groups are divided into 3 groups: normal, control and ACR treated group. We measured polyphenol, flavonoids, DPPH and ABTS radical scavenging activity, ROS, glutathione, GSH peroxidase, GSH reductase, SOD, catalase, free fatty acid, lipid peroxidation and suppression of ACAT1 and HMG-CoA reductase expression on mRNA level.

**Results:**

1. ACR contained polyphenol and flavonoids and increased GSH significantly in HepG2 cell.
2. ACR increased GPx, GR, and catalase activity significantly in HepG2 cell.
3. ACR increased DPPH and ABTS radical scavenging activity significantly in HepG2 cell and decreased ROS.
4. ACR decreased free fatty acid and MDA significantly in HepG2 cell.
5. ACR suppressed ACAT1 and HMG-CoA reductase expression on mRNA level in HepG2 cell.

**Conclusion:** This study suggests that ACR has antioxidative and hypolipidemic effect and might be effective in prevention and treatment of dyslipidemia.

**Key Words** : *Dyslipidemia*, *Hyperlipidemia*, *Antioxidant*, *Artemisia iwayomogi*, *Curcumae Radix*, *Raphani Semen*

### 서론

최근 8년간 우리나라의 사망원인 1순위는 암, 2순위는 뇌혈관질환, 3순위는 심장질환으로, 순환기계 질환인 심뇌혈관질환을 아우르면 사망률은 2015

년 기준 인구 10만명 당 116.9명에 달한다.<sup>1)</sup> 관상동맥질환 및 뇌혈관 질환의 직접적인 원인으로 꼽히는 죽상동맥경화증은 혈관 내벽에 LDL-cholesterol (LDL-C) 등이 침투하여 산화작용을 거쳐 혈관벽의 만성적인 염증상태를 유발하여 혈관 내벽을 좁히고

• Received : 7 August 2017      • Revised : 12 September 2017      • Accepted : 12 September 2017  
• Correspondence to : 조현경(Jo Hyun-kyung)  
Dept. of Internal Medicine, Daejeon Oriental Hospital of Daejeon University  
34929, 176-9 Daeheung-ro, Jung-gu, Daejeon, South Korea  
Tel : +82-42-229-6924, Fax : +82-42-254-3403 , E-mail : brillijo@hanmail.net

plaque를 형성하는 질환으로, 고혈압, 당뇨병, 이상지질혈증 등의 대사증후군으로 유발되는 경우가 많다,<sup>2)</sup> 이 중 고혈압과 당뇨병의 유병률은 2005년 이후 큰 변동을 보이지 않았으나, 식습관의 서구화의 영향으로 이상지질혈증의 유병률(만 30세이상, 표준화)은 2005년 이후 점점 증가하여 2010년 이후 13-14% 수준을 유지하고 있어<sup>3)</sup> 심뇌혈관계질환의 예방을 위한 이상지질혈증의 개선 필요성이 주목받고 있다.

한의학에서는 《靈樞·衛氣失常論》에 “人有肥, 有膏, 有肉”이라 기술하여<sup>4)</sup> 영양과다로 인한 비만에 대해 언급하였으며, 膏粱厚味 섭취의 과다 및 肝의 疏泄기능과 脾의 運化실조로 穢濁之氣가 血脈과 肌肉에 저류되어 痰飲, 瘀血이 쌓여 비만과 여러 합병증이 생긴다고 하였다.<sup>5)</sup> 이상지질혈증 역시 같은 범주로 보아 滲濕, 活血, 消導하는 약물을 치료제로 사용하였으며, 최근에는 다양한 한약 추출물의 이상지질혈증 개선 효과를 전통 한의학 및 현대 약리학적 관점에서 분석한 연구가 진행 중이다.<sup>5-7)</sup>

그 중 한인진(韓茵陳, *Artemisia iwayomogi*)은 淸熱祛濕 하는 한약재로 scopoletin 성분에 의해 항염증<sup>8)</sup>, 항산화<sup>9)</sup> 및 간독성 보호 효과<sup>10, 11)</sup>가 있으며, 울금(鬱金, *Curcuma Radix*)은 活血祛瘀 하여 血行이 정체되어 나타나는 증상에 쓰여온 약물로 비만 환자의 혈중 지질농도 개선<sup>12, 13)</sup> 및 항염증 작용<sup>14)</sup>에 효과가 있다고 알려져 있다. 최근에는 항산화 및 이상지질혈증의 개선에 한인진, 울금 복합물이 갖는 효능에 대한 연구가 활발하게 이뤄지고 있으며, 한인진과 울금 복합물을 이용한 이<sup>6)</sup> 등의 연구와 한인진, 울금에 산사(山査, *Crataegi Fructus*)를 추가한 김<sup>5)</sup> 등의 연구 등이 보고되어 있다.

본 연구에서는 한인진, 울금에 나복자(蘿蔔子, *Raphani Semen*)를 더해 항산화 및 이상지질혈증 개선 가능성을 확인해보고자 하였다. 나복자는 한의학적으로 消導之劑이면서 化痰하는 작용이 뛰어나며 항염증<sup>15)</sup> 및 항산화<sup>16)</sup>, 신경보호작용<sup>17)</sup>이 있는 alkaloid와 항암<sup>18, 19)</sup> 및 항균효과<sup>20)</sup>가 있는 isothiocyanates를 갖고 있다. 최근에는 나복자 추출물의 total

Cholesterol, triglyceride, LDL-C의 감소 및 HDL-C의 증가효과를 보고한 동물모델 연구가 보고되었으나<sup>21-23)</sup> 앞서 보고된 한인진, 울금과 함께 사용한 복합추출물로서의 효과에 대해서는 아직 보고된 바가 없었다. 이에 한인진, 울금, 나복자 복합추출물의 이상지질혈증 개선 효과를 확인하고자 본 연구를 진행하였다.

이를 위해 한인진, 울금, 나복자를 배합한 복합추출물(ACR)을 인간 간암유래세포인 HepG2 cell에 처리하여 항산화 물질의 함량, 항산화 효소의 활성도, 활성산소 소거능과 생성량 등을 측정하여 항산화 효과를 평가하였다. 또한 ACR 처리를 한 HepG2 cell에서 free fatty acid, MDA 및 이상지질혈증 관련 유전자 억제 효능을 평가하였으며, 본 연구에서 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

한인진(*Artemisia iwayomogi*), 울금(*Curcuma Radix*), 나복자(*Raphani Semen*)는 (주)옴니허브에서 구입하여 사용하였다. 세 약재를 1:1:1의 비율로 각각 10g씩 배합하여 한인진, 울금, 나복자 복합물(*Artemisia iwayomogi, Curcuma Radix and Raphani Semen complex extract* 이하, ACR로 표기)을 만들었다.

#### 2) 시료 추출

ACR (30 g)에 80% 주정 500 ml를 넣어 3시간 동안 환류추출을 한 후 여과액을 rotary vacuum evaporator로 감압 농축하였다. 농축된 용액을 freeze dryer로 동결 건조하여 얻어낸 분말 2.128 g (최종수율 7.09%)을 초저온 냉동고 (-80℃)에서 보관하며 실험에 필요한 농도로 증류수에 희석해 사용하였다.

#### 3) HepG2 cell 배양

HepG2 cell은 10% fetal bovine serum (FBS)와 1% antibiotic-antimycotic으로 조성된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건이 유지되는 세포배양기에서 배양하였으며, 2-3일 주기로 계대배양하여 실험을 진행하였다.

## 2. 중금속 검사

ACR 0.5 g을 전처리용 vessel 에 담아, HNO<sub>3</sub> 10 ml을 넣은 뒤, 후드 안에 정치시켜 한 시간 정도 예비분해를 실시한 후, 자동전처리 장치를 이용해 고온 고압 상태에서 유기물 분해를 진행하고 상온에서 식혔다. 분해액은 여과지로 여과하여 용량플라스크에 넣고 증류수를 넣어 50 ml 눈금까지 맞춘 뒤 검액으로 사용하였다. 따로 HNO<sub>3</sub> 10 ml을 넣은 vessel도 검액 조제와 같은 방법으로 조작하여 공시험액으로 사용하였다. 준비된 검액, 표준액 및 공시험액을 가지고 유도결합플라즈마-원자방출분광계(ICP-AES, (Shimadzu, Co., Japan))를 이용하여 검량선을 작성하고 공시험액으로 보정하여 검액을 측정하였다. 수은 분석의 경우 ACR 50 mg을 정확하게 달아 특별한 전처리 과정 없이 자동수은분석기(TELEDYNE Leeman Labs, U.S.A.)를 이용하여 측정하였다.

## 3. 세포 생존율 측정

HepG2 cell은 48 well plate에 5×10<sup>5</sup> cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양 하였다. 실험을 하기 전에 새로운 배양액으로 교체하고, ACR 추출물을 각각 1, 10, 100 (μg/ml)의 농도로 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 10 μl의 CCK-8 용액을 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건이 유지되는 세포배양기에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 정상군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시 하였다. 그리고 위와 동일한 방법으로 ACR 추출물을 다양한 농도별로 처리하여 IC50을 산출하였다.

## 4. 항산화 효능평가

### 1) 항산화 물질 함량 측정

#### (1) 총 polyphenol 및 flavonoids 함량 측정

총 polyphenol 함량은 Gutfinger의 방법<sup>24)</sup>을 응용하여 측정했으며 총 flavonoid 함량은 Nieva Moreno 등의 방법<sup>25)</sup>을 응용하여 측정했다.

#### (2) 세포 내 glutathione (GSH) 함량 측정

Glutathione assay kit(Sigma Co., U.S.A.)를 이용하여 다음과 같이 측정했다. HepG2 cell을 6 well plate에 10<sup>6</sup> cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양 하였다. 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였고 ACR 추출물을 각각 1, 10, 100 (μg/ml)의 농도로 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 함께 처리하여 다시 24시간 동안 배양 하였다. 시료가 처리된 HepG2 cell을 PBS로 1회 세척한 뒤 5% 5-sulfosalicylic acid (SSA)를 60 μl씩 넣어준 후 sonication 방법으로 3분 동안 lysis하였다. 용해시킨 시료를 10,000 g에서 10분 동안 원심 분리하여 얻어낸 상청액을 단백질을 정량 후 실험에 사용하였다. 96 well plate에 상청액 10 μl와 working mix solution 150 μl를 넣어주었다. 실온에서 5분 동안 반응시킨 후 NADPH (0.16 mg/ml)를 50 μl씩 넣어준 뒤 412 nm 파장에서 5분 동안 1분 간격으로 흡광도를 측정하였다. GSH 농도를 표준용액의 정량곡선을 기준으로 계산하였다.

### 2) 항산화 효소 활성 평가

HepG2 cell을 6 well plate에 10<sup>6</sup> cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였고 ACR 추출물을 각각 1, 10, 100 (μg/ml)의 농도로 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 함께 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 이렇게 시료처리 된 HepG2 cell로 다음과 같이 실험을 진행했다.

#### (1) 세포 내 GSH peroxidase (GPx) 활성 측정

Glutathione Peroxidase Activity Colorimetric Assay Kit(BioVision Co., U.S.A.)를 이용했다. 시료가 처리된 HepG2 cell을 PBS로 1회 세척한 뒤 assay

buffer 150  $\mu$ l를 넣은 후 sonication 방법으로 3분 동안 균질화 시킨 후 10,000 g, 4°C에서 15분 동안 원심 분리하여 얻어낸 상등액을 단백질 정량하여 실험에 사용하였다. 96 well plate에 assay buffer를 40  $\mu$ l씩 분주한 후 시료 10  $\mu$ l와 reaction mix (Assay buffer 33  $\mu$ l, 40 mM NADPH solution 3  $\mu$ l, GR solution 2  $\mu$ l, GSH solution 2  $\mu$ l/well) 40  $\mu$ l씩 넣

고 실온에서 15분 동안 반응시킨 뒤 340 nm 파장에서 흡광도를 1차 측정한다. Cumene hydroperoxide solution을 10  $\mu$ l씩 넣은 후 실온에서 5분 동안 반응시킨 뒤 340 nm 파장에서 흡광도를 2차 측정한다. GPx의 활성은  $\Delta$ OD 값(2차 측정-1차 측정)으로 kit 상의 NADPH standard 검량선에 따라 계산되었다.

$$\text{GPx Activity (mU/ml)} = \left( \frac{B}{\Delta T(T_2 - T_1) \times V} \right) \times \text{Sample dilution factor}$$

\* B is the NADPH amount that was decreased between T1 and T2;  $\Delta$ T is time of reaction; V is Sample volume added into the reaction well

(2) 세포 내 GSH reductase (GR) 활성 측정

Glutathione Reductase Activity Colorimetric Assay Kit(BioVision Co., U.S.A.)를 이용했다. 시료가 처리된 HepG2 cell을 PBS로 1회 세척한 뒤 assay buffer 150  $\mu$ l를 넣은 후 sonication 방법으로 3분 동안 균질화 시킨 후 10,000 g, 4°C에서 15분 동안 원심 분리하여 얻어낸 상등액을 단백질 정량하여 실험에 사용하였다. 시료 100  $\mu$ l에 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 5  $\mu$ l 넣은 후 실온에서 5분 동안 반응시킨 다음 catalase를 5  $\mu$ l 넣고 실온에서 5분 동안 반응시킨다. Assay buffer 30  $\mu$ l를 96well plate에 분주한 후 반응액 20  $\mu$ l와 reaction mix (GR assay buffer 40  $\mu$ l, DTNB solution 2  $\mu$ l, NADPH-GENERAT<sup>TM</sup> solution 2  $\mu$ l, GSSG solution 6  $\mu$ l/well) 50  $\mu$ l를 넣고 405 nm 파장에서 흡광도를 1차 측정 후 10분 후에 2차 측정하였다. GR의 활성은  $\Delta$ OD 값(2차 측정-1차 측정)으로 kit 상의 TNB standard 검량선에 따라 계산되었다.

(3) 세포 내 Superoxide dismutase (SOD) 활성 측정

SOD assay kit(Cayman Chemical Company, U.S.A)를 이용했다. 시료가 처리된 HepG2 cell을 PBS로 1회 세척한 뒤 차가운 HEPES beffer (pH 7.2, containing 1 mM EGTA, 210 mM mannitol, and 70 mM sucrose) 5 ml에 넣은 후 sonication 방법으로 3분 동안 균질화하였다. 균질화 된 시료를 1,500 g에서 5분 동안 원심 분리하여 상등액을 제거한 후 남은 pellet을 sample buffer 200  $\mu$ l씩 넣어 녹여 단백질 정량 후 실험에 사용하였다. 96 well plate에 radical detector를 200  $\mu$ l씩 분주한 뒤 시료 10  $\mu$ l와 xanthine oxidase 20  $\mu$ l를 넣은 후 30분 동안 실온에서 shaking하여 반응시킨 후 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. SOD 활성은 superoxide radical을 50% dismutation 하는데 필요한 SOD량을 1 unit으로 하여 분당 활성정도 (U/min/ml)로 나타내었다.

$$\text{GR Activity (mU/ml)} = \left( \frac{B}{\Delta T(T_2 - T_1) \times 0.9 \times V} \right) \times \text{Sample dilution factor}$$

\* B is the TNB amount from TNB standard Curve;  $\Delta$ T is time of reaction; V is Sample volume added into the reaction well

(4) 세포 내 Catalase 활성 측정

Catalase activity colorimetric/fluorometric assay kit(BioVision Co., U.S.A.)를 이용했다. 시료가 처리된 HepG2 cell을 PBS로 1회 세척한 뒤 assay buffer

150  $\mu$ l를 넣은 후 sonication 방법으로 균질화 시킨 후 10,000 g에서 15분 동안 원심 분리하여 얻어낸 상등액을 단백질 정량 후 실험에 사용하였다. 96 well plate에 assay buffer를 68  $\mu$ l씩 분주한 후 상등

액을 high control 부분을 포함하여 동일하게 10  $\mu$ l 씩 넣어주었다. High control 부분만 stop solution을 10  $\mu$ l 씩 넣은 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM)을 상등액과 high control 부분 모두 12  $\mu$ l 씩 넣고 실온에서 30분 동안 반응시킨다. High control 부분을 제외한 곳에 stop solution을 10  $\mu$ l 씩 넣어준 후 develop mix (assay buffer 46  $\mu$ l, oxired 2  $\mu$ l, HRP 2  $\mu$ l/well)를 50  $\mu$ l 씩 넣어주었다. 실온에서 10분 동안 반응시킨 후 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. Catalase 활성은 1 nmol의 formaldehyde를 생성하는데 필요한 catalase의 양을 1 nmol로 하여 분당 활성정도 (nmol/min/ml)를 나타내었다.

### 3) 항산화 시스템 평가

#### (1) DPPH radical 소거능 측정

DPPH radical 소거능 측정은 ACR 추출물의 최종 농도가 1, 10, 100, 1,000 ( $\mu$ g/ml), ascorbic acid의 최종 농도가 1.95, 7.81, 31.25 ( $\mu$ g/ml)의 농도로 될 수 있게 희석시켰으며, 에탄올에 용해시킨 0.2 mM의 DPPH 용액(Sigma Co., U.S.A.) 150  $\mu$ l와 ACR 추출물, ascorbic acid를 각각 100  $\mu$ l 씩 혼합하여 37°C에서 30분간 반응 시켰다. 반응 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료액의 대조군은 증류수를

넣었으며, DPPH 용액의 대조군으로써는 에탄올을 넣어 보정값을 얻었다. DPPH 자유라디칼 소거능은 아래의 식에 따라 계산하였다.

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

#### (2) ABTS radical 소거능 측정

ABTS radical 소거능 측정은 ACR 추출물의 최종 농도가 1, 10, 100, 1,000 ( $\mu$ g/ml), ascorbic acid의 최종 농도가 1.95, 7.81, 31.25 ( $\mu$ g/ml)의 농도로 될 수 있게 희석시켰으며, ABTS 용액(Sigma Co., U.S.A.)은 7.4 mM ABTS (2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))와 2.6 mM potassium persulphate를 제조한 후, 암소에 하루 동안 방치하여 양이온(ABTS<sup>•+</sup>)을 형성시킨 다음 732 nm에서 흡광도를 측정하여 흡광도 값이 1.5 이하가 나오도록 희석하고, 희석된 ABTS<sup>•+</sup> 용액 150  $\mu$ l와 ACR 추출물, ascorbic acid를 각각 5  $\mu$ l 혼합하고, 실온에서 10분간 반응시킨 후, 732 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화능은 증류수를 대조군으로 하여 대조군에 대한 ABTS 라디칼 소거능을 백분율로 나타내었다.

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

#### (3) 세포 내 reactive oxygen species (ROS) 생성 측정

2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA (Sigma Co., U.S.A.))를 이용했다. HepG2 cell을 5×10<sup>5</sup> cells/well이 되게 6 well plate에 분주하여 24시간 동안 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였으며, ACR 추출물 1, 10, 100 ( $\mu$ g/ml)의 농도와 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>을 함께 처리한 후, 다시 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건이 유지되는 세포배양기에서 배양했다. 배양 후, 300 g에서 5분간 원심 분리하여 모은

세포를 차가운 PBS로 2회 세척하고, DCF-DA은 10  $\mu$ M이 되도록 첨가하여 15분 동안 암소, 상온에 두었다. 염색 후 차가운 PBS를 넣어 300 g에서 5분간 원심분리 한 다음 상청액을 제거하고 다시 PBS 400  $\mu$ l를 부유시켜 유세포 분석기를 이용하여 형광강도의 세기에 따른 변화를 분석하였다.

### 5. 이상지질혈증 개선 효과 평가

#### 1) 지질 산화에 미치는 영향 평가

##### (1) 세포 내 free fatty acid 함량 측정

Free Fatty Acid Quantitation Kit(Sigma Co., U.S.A.)를 이용하여 측정했다. HepG2 cell을 6 well plate에  $10^6$  cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 normal을 제외한 모든 well에 0.5 mM FAs (Palmitate:Oleic acid, 6:4)<sup>26)</sup>가 포함된 새로운 배양액으로 교체하였고 ACR 추출물을 각각 1, 10, 100 ( $\mu\text{g/ml}$ )의 농도로 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 시료가 처리된 HepG2 cell은 1% TritonX-100이 포함된 chloroform 200  $\mu\text{l}$ 를 넣어 균질화 시킨 후 13,000 g에서 10분 동안 원심분리 한 뒤 상등액을 사용하였다. 상등액을 50°C에서 건조하여 chloroform을 완전히 제거한 후 fatty acid assay buffer 200  $\mu\text{l}$ 를 넣어 남아 있는 건조된 지방을 완전히 녹여 시료로 실험에 사용하였다. 시료 50  $\mu\text{l}$ 에 ACS reagent 2  $\mu\text{l}$ 를 넣은 후 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. 반응액에 Master Reaction Mix (Fatty Acid Assay Buffer 44  $\mu\text{l}$ , Fatty Acid Probe 2  $\mu\text{l}$ , Enzyme Mix 2  $\mu\text{l}$ , Enhancer 2  $\mu\text{l}/\text{well}$ ) 50  $\mu\text{l}$ 를 넣어준 후 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. 반응액의 흡광도를 570 nm 파장에서 측정하였다. Free fatty acid 함량은 kit에 포함된 palmitic acid 표준용액의 정량곡선을 기준으로 계산하였다.

## (2) 세포 내 lipid peroxidation (Malondialdehyde, MDA) 측정

lipid peroxidation (MDA) kit(BioVision Co., U.S.A.)를 이용했다. HepG2 cell을 6 well plate에  $10^6$  cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였고 ACR 추출물을 각각 1, 10, 100 ( $\mu\text{g/ml}$ )의 농도로 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ 와 함께 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 시료가 처리된 HepG2 cell을 PBS로 1회 세척한 뒤 MDA lysis buffer 300  $\mu\text{l}$ 와 butylated hydroxytoluene (BHT) 10  $\mu\text{l}$ 를 넣고 세포를 모아준 후 sonication 방법으로 lysis하였다. Lysis된 세포를 13,000 g에서 15분 동안 원심 분리하여 상등액을 단백질 정량 후 실험에 사용하였다. 상등액 200  $\mu\text{l}$ 와 TBA reagent 600  $\mu\text{l}$ 를 넣은 후 95°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응

액을 ice에서 10분 동안 식힌 뒤 96 well plate에 200  $\mu\text{l}$ 씩 옮긴 후 532 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. MDA 농도를 표준용액의 정량곡선을 기준으로 계산하였다.

## 2) mRNA 수준의 이상지질혈증 개선 효과 평가

### (1) 세포 내 mRNA 발현 수준 확인

세포 내 ACAT1, HMG-CoA reductase 발현 수준을 다음과 같이 측정하였다. HepG2 cell을 6 well plate에  $10^6$  cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 normal을 제외한 모든 well에 0.5 mM FAs (Palmitate:Oleic acid, 6:4)<sup>26)</sup>가 포함된 새로운 배양액으로 교체하였고 ACR 추출물을 각각 1, 10, 100 ( $\mu\text{g/ml}$ )의 농도로 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다.

### ① RNA 추출

시료가 처리된 HepG2 cell을 Total RNA extraction kit를 이용하여 total RNA를 추출하였다. HepG2 cell을 PBS로 2회 씻어준 뒤 easy blue 1ml와 chloroform 200 $\mu\text{l}$ 를 넣고 vortexing 해준 후 16,000 g, 4°C에서 10분 동안 원심분리 해준다. 상청액 400  $\mu\text{l}$ 와 binding buffer 400  $\mu\text{l}$ 를 실온에서 1분 동안 반응시킨 뒤 반응액 700  $\mu\text{l}$ 를 column에 주입하여 16,000 g에서 30초 동안 원심분리한다. Column에 washing buffer A를 700  $\mu\text{l}$  넣고 16,000 g에서 30초 동안 원심분리 후 washing buffer B를 700  $\mu\text{l}$  넣고 동일하게 원심분리 한다. Column 하단을 Ep tube로 교체한 후 column에 elution buffer를 50  $\mu\text{l}$  넣고 1분 동안 반응시킨 뒤 16,000 g에서 1분 동안 원심분리하여 추출된 total RNA를 모아준다.

### ② cDNA 합성

Total RNA를 nanodrop을 이용하여 정량한 뒤 Maxime RT PreMix에 total RNA 2  $\mu\text{l}$ 와 DEPC-DW 18 $\mu\text{l}$ 를 넣은 후 TD-360(Thermal Dynamic, U.S.A.)를 이용하여 45°C에서 60분 반응시킨 후 95°C에서 5분 반응시켜서 cDNA를 합성하였다.

**Table 1.** The Sequences of Primers in This Study

Primer	F/R	Sequences	Cycle	Annealing (°C)
ACAT1	F	5'-AGCAGAGGCAGAGGAATTGA-3'	35	60
	R	5'-GCACACCTGGCAAGATGGAG-3'		
HMG-CoA reductase	F	5'-TTCGGTGGCCTCTAGTGAGA-3'	38	60
	R	5'-TGTGAGTTGGAAGTGGAGGC-3'		
β-actin	F	5'-TGTCACCAACTGGGACGATA-3'	35	56
	R	5'-GGGGTGTGAAGGTCTCAAA-3'		

③ 유전자 발현 측정

합성된 cDNA 2 μl와 primer F 1 μl, primer R 1 μl, DEPC-DW 16 μl를 AccuPower® Hotstart PCR PreMix에 넣고 Table 1와 같은 조건으로 PCR을 수행하였다. 생성된 product를 1.5% agarose gel에서 100V로 30분 동안 전기영동한 후 Fusion Quick Guide를 이용하여 UV촬영을 통해 결과를 확인하였다.

6. 통계처리

실험 결과는 SPSS 11.0의 unpaired student's T-test와 ANOVA를 사용하여 통계처리 하였고  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  및  $p < 0.001$  수준에서 그 유의성을 검정하였다.

**결 과**

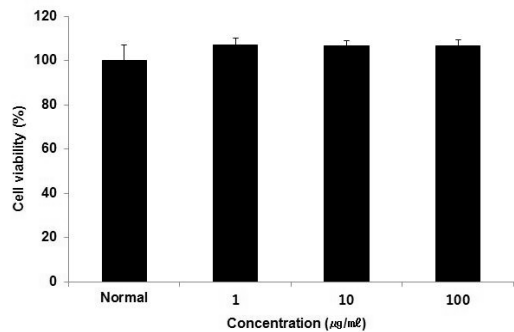
1. 중금속 검사

중금속 함량을 측정한 결과, ACR은 납 0.91mg/kg (permissive density 5mg/kg), 카드뮴 0.06mg/kg (permissive density 0.3mg/kg)이 검출되었으나 기준치 이하로 검출되었다. 비소, 수은의 경우는 검출되지 않았다.

2. 세포생존율 측정

HepG2 cell에서 ACR 추출물 처리에 의한 세포생존율을 측정한 결과, 정상군을 100.00±7.26%로 나타냈을 때, ACR 추출물 1, 10, 100 (μg/ml) 농도에서 각각 107.08±3.20%, 106.57±2.56%, 106.63±2.82%로 나타났으며, 15 mg/ml 농도에서 49.87±1.17%로

나타나 ACR 추출물의 IC50은 14.98 mg/ml로 나타났다 (Fig. 1).



**Fig. 1.** Cell viability of HepG2 cells treated ACR extract. Cell viability was calculated as percentage versus normal. The result were presented by the mean ± S.D from three independent experiments

3. 항산화 효능평가

1) 항산화 물질 함량 측정

Gallic acid를 표준물질로 하여 ACR 추출물에 존재하는 총 polyphenol 함량을 측정한 결과, 314.49 ± 5.20 mg/g으로 나타났다. Quercetin을 표준물질로 하여 ACR 추출물에 존재하는 총 flavonoids 함량을 측정한 결과, 22.69 ± 1.30 mg/g으로 나타났다. 세포 내 GSH 함량을 측정한 결과, ACR 추출물 1, 10, 100 (μg/ml) 농도에서 정상군 대비 유의성 있는 (\*\*\*)  $p < 0.001$  증가가 나타났다(Fig. 2).

2) 항산화 효소 활성 평가

세포 내 GPx 와 GR 활성을 측정한 결과, ACR 추출물 1, 10, 100 (μg/ml) 농도에서 정상군 대비 유의성 있는 (\*\*\*)  $p < 0.001$  증가가 나타났다. 또한 세

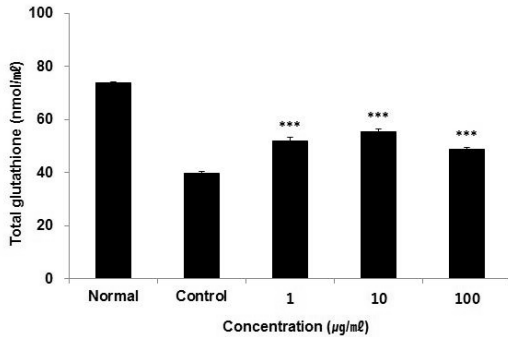


Fig. 2. Effect of ACR extract on total GSH contents in HepG2 cells.

Total GSH contents were calculated using GSH standard curve. The result were presented by the mean ± S.D from three independent experiments (Significance of results, \*\*\*:  $p < 0.001$  compare to control). Normal; non-treated HepG2 cells. Control; 1 mM H2O2-treated HepG2 cells.

포 내 catalase 활성을 측정된 결과, ACR 추출물 10, 100 (µg/ml) 농도에서 정상군보다 유의성 있는 (\*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ) 증가가 나타났다. 그러나 세포 내 SOD 활성 측정 결과는 ACR 추출물 처리를 했을 때 정상군과 대조군에 비해 의미있는 증가를 나타내지 않았다. (Fig. 3).

### 3) 항산화 시스템 평가

ACR 추출물의 1, 10, 100, 1,000 (µg/ml) 농도에서 DPPH radical 소거능 및 ABTS radical 소거능을 측정된 결과, 모두 농도 의존적으로 소거능의 증가가 나타났다. 또한 세포 내 ROS를 측정된 결과, ACR 추출물 1, 10, 100 (µg/ml) 농도에서 정상군 대비 유의성 있는 (\*\*\*:  $p < 0.001$ ) 감소가 나타났다 (Fig. 4).

## 4. 이상지질혈증 개선 효과 평가

### 1) 지질 산화에 미치는 영향 평가

세포 내 free fatty acid 함량을 측정된 결과, ACR 추출물 1, 10 (µg/ml) 농도에서 정상군 대비 유의성 있는 (\*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ) 감소가 나타났다. 세포 내 MDA는 ACR 추출물 1, 10, 100 (µg/ml) 농

도에서 정상군보다 유의성 있는 (\*\*\*:  $p < 0.001$ ) 감소가 나타났다(Fig. 5).

### 2) mRNA 수준의 이상지질혈증 개선 효과 평가

세포 내 ACAT1과 HMG-CoA reductase mRNA 발현 수준을 확인한 결과, 정상군에 비해 대조군에서 증가가 나타났으며, ACR 추출물 1, 10, 100 (µg/ml) 농도에서 ACAT1과 HMG-CoA reductase mRNA 발현량의 감소가 나타났다(Fig. 6).

## 고찰

고혈압, 당뇨병, 이상지질혈증은 심뇌혈관질환의 가장 큰 위험인자이며 이 중 고혈압과 당뇨병의 유병률은 2005년 이후 큰 변동을 보이지 않았다. 그러나 이상지질혈증의 유병률(만 30세이상, 표준화)은 2005년 8.0%에서 2010년 13.5%로 5.5%p 증가한 이후 2014년까지 13-14% 수준을 유지 중이다. 이는 식습관의 서구화로 에너지 섭취량에 대한 지방의 기여율이 1998년 17.9%에서 2014년 21.6%로 크게 상승하였고<sup>3)</sup>, 지방의 공급원으로 육류 등의 동물성 지방질을 주로 섭취하기 때문이라 생각된다.

이상지질혈증은 고지혈증, 고콜레스테롤혈증, 고중성지방혈증을 포괄하는 질환으로 혈청 내 total cholesterol, LDL-cholesterol(LDL-C), triglyceride의 상승 또는 HDL-cholesterol(HDL-C)의 감소를 특징으로 한다. 혈중 농도가 높아진 LDL-C는 혈관내벽에 침투하여 산화되고, 산화된 LDL을 탐식한 대식세포가 활성화되어 cytokine과 활성 산소를 생성하여 혈관벽의 염증을 유발하고 vascular cell adhesion molecule-1, intracellular adhesion molecule-1, monocyte chemoattractant protein-1 등의 세포부착 물질을 발현시킨다. 이 때문에 혈관 내벽은 단핵구가 더 많이 유입되어 지속적으로 cytokine을 분비하는 만성적인 염증상태가 되어, 결과적으로 혈관내막에 평활근 세포가 증식하면서 plaque를 형성해 죽상동맥경화증을 일으킨다.<sup>27,28)</sup> 이상지질혈증으로 인한 동맥경화는 특히 관상동맥에서 일어나기 쉬워 심혈



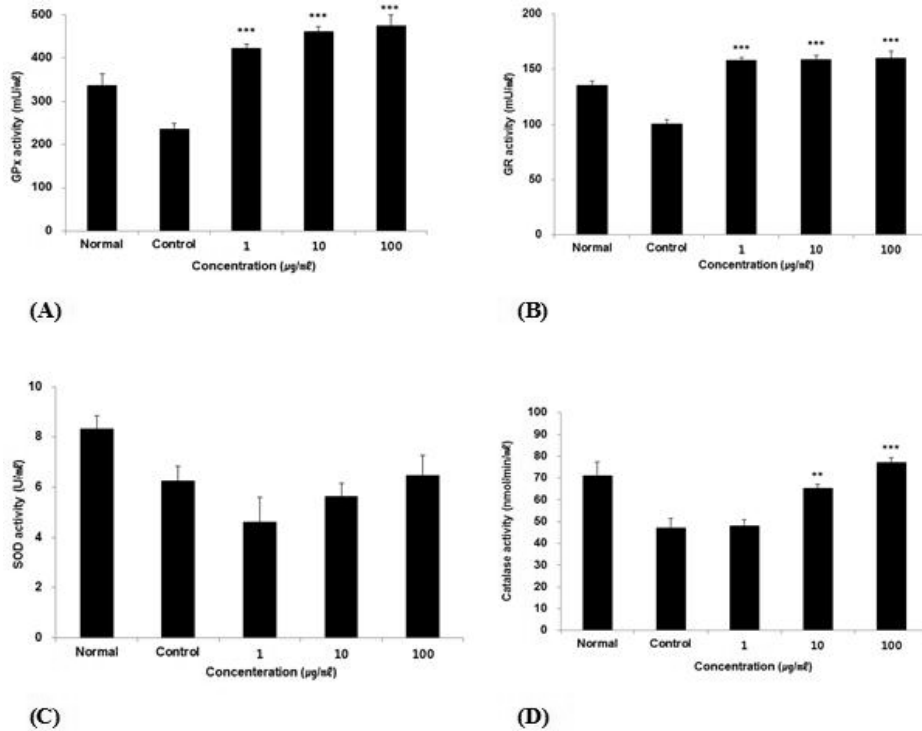


Fig. 3. Effect of ACR extract on GPx, GR, SOD and Catalase activity in HepG2 cells.

(A) GPx activity was calculated using NADPH standard curve.

(B) GR activity was calculated using TNB standard curve.

(C) SOD activity was calculated using SOD standard curve.

(D) Catalase activity was calculated using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> standard curve.

The result were presented by the mean  $\pm$  S.D from three independent experiments (Significance of results, \*\*:  $p < 0.01$ ,

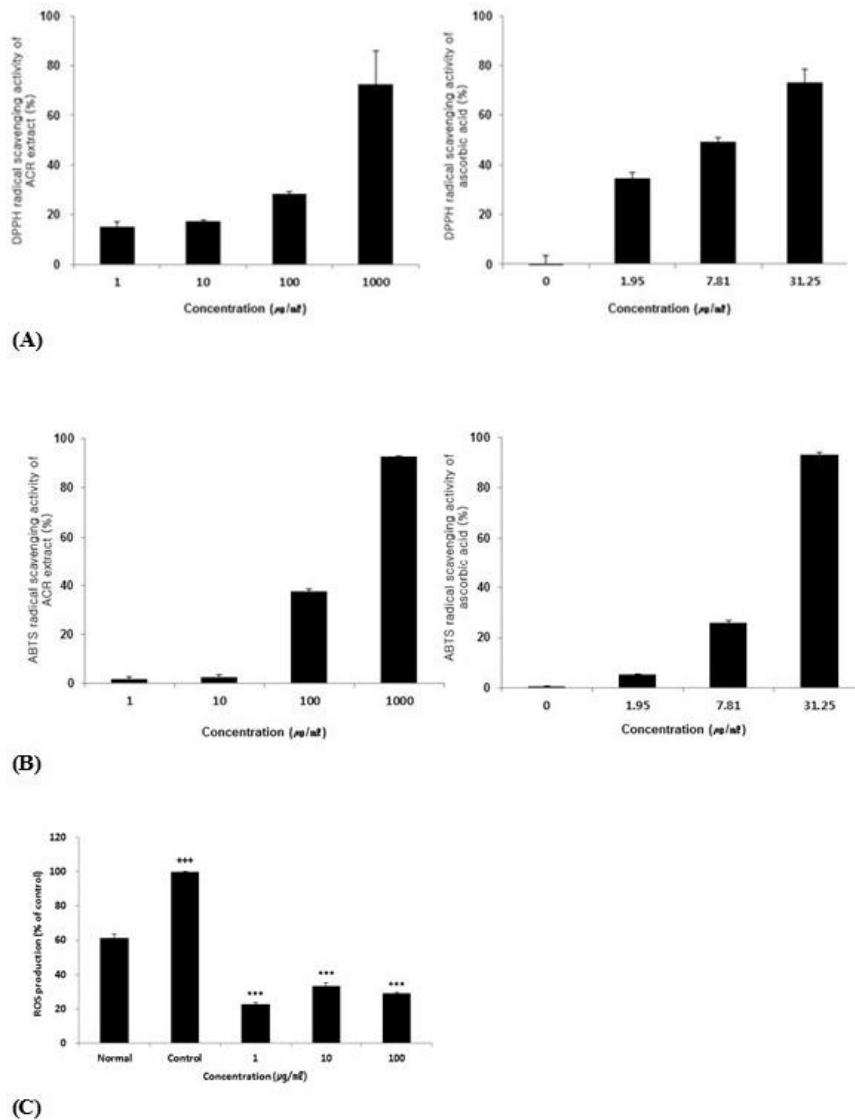
\*\*\*:  $p < 0.001$  compare to control). Normal; non-treated HepG2 cells, Control; 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated HepG2 cells.

관계 질환의 주요 원인이 된다.<sup>2)</sup>

이상지질혈증의 치료에는 식이요법과 운동요법, 금연 등 생활요법이 중요하며 환자의 심혈관질환 위험도와 LDL-C 수치를 종합적으로 판단하여 약물치료 여부를 결정한다. 약물치료는 1차적으로 LDL-C를 감소시키는 것이 원칙이며, 2차적으로는 non LDL-C 감소 약물을 사용한다. 1차 선택약제로 스타틴 계열 약물이 가장 널리 쓰이며, 2차 선택약제로 처방되는 피브린산 유도제, 오메가-3 지방산, 에제티미브, 니코틴산 등은 단독투여로는 스타틴에 필적하는 효과를 나타내지 못하여 동일 효과 대비 스타틴 투여용량을 줄이기 위한 목적으로 보조적 처방을 하는 경우가 많다. 스타틴은 체내 콜레스테롤 생합성

과정에 작용하는 HMG-CoA reductase의 억제제로서 혈청 내 LDL-C를 감소시키는 작용을 한다. 또한 지질 중간 대사물 합성을 억제하고 PPAR $\alpha$ (peroxisome proliferator-activated receptor alpha)의 인산화를 억제하여 HDL-C을 높이는 효과가 있다.<sup>29)</sup> 그러나 스타틴 복용환자의 약 10%는 근육통, 위약감을 약 4%는 소화기 장애를 보이며 드물게 당뇨, 간독성, 근육손상, 급성신부전 등의 심각한 부작용을 일으키기도하여<sup>30)</sup>, 최근에는 기존의 약물치료를 대체 또는 보완할 수 있는 제제의 연구가 활발하게 이뤄지고 있다.

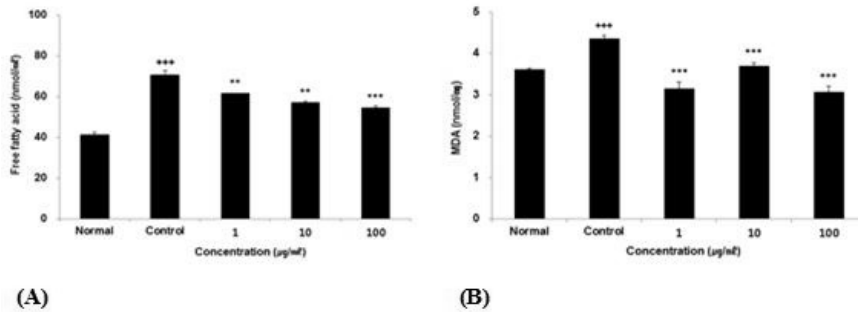
또한 산화적 스트레스, 혈관 내피세포의 활성화, 염증반응 및 내벽에 생성된 plaque의 안정성 역시 동



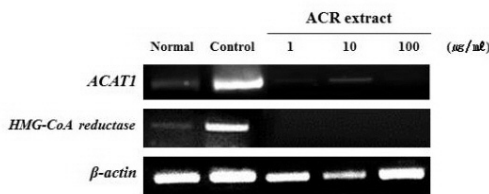
**Fig. 4.** DPPH and ABTS radical scavenging activity of ACR extract and effect of ACR extract on ROS production in HepG2 cells.  
 (A) DPPH radical scavenging activity of ACR extract comparing to ascorbic acid.  
 (B) ABTS radical scavenging activity of ACR extract comparing to ascorbic acid.  
 (C) Effect of ACR extract on ROS production in HepG2 cells. Level of ROS was calculated as percentage versus control. Normal: non-treated HepG2 cells. Control; 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated HepG<sub>2</sub> cells.  
 The result were presented by the mean  $\pm$  S.D from three independent experiments (Significance of results, \*\*\*:  $p < 0.001$  compare to control).

맥경화증의 위험인자이다. 이 때문에 혈관 내벽에서 LDL-C의 산화를 막아 동맥의 죽상경화증의 진행을 방지하는 보조적 용법으로서 항산화제의 사용이 주

목 받고 있으며, 많은 연구에서 이상지질혈증으로 인한 동맥경화증 위험도의 개선 효능평가를 위해서 항산화 효능을 함께 평가하고있다.<sup>31)</sup>



**Fig. 5.** Effect of ACR extract on free fatty acid contents and MDA in HepG2 cells. (A) Free fatty acid contents were calculated using palmitate standard curve, Normal ; non-treated HepG2 cells, Control ; 0.5 mM FAs (palmitate:oleic acid, 6:4)-treated HepG2 cells. (B) Lipid peroxidation (MDA) was calculated using MDA standard curve, Normal ; non-treated HepG2 cells, Control ; 1 mM H2O2-treated HepG2 cells. The result were presented by the mean  $\pm$  S,D from three independent experiments (Significance of results, \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$  compare to control).



**Fig. 6.** Effect of ACR extract on ACAT1 and HMG-CoA reductase mRNA expression in HepG2 cells. ACAT1, HMG-CoA reductase and  $\beta$ -actin mRNA expression were determined using RT-PCR, Normal ; non-treated HepG2 cells, Control ; 0.5 mM FAs (palmitate:oleic acid, 6:4)-treated HepG2 cells.

한의학에서는 이상지질혈증을 痰濁, 氣, 血이 血脈에 저류된 것으로 보아, 膏粱厚味の 과잉섭취와 肝脾腎의 기능실조로 인해 체내에 濕熱과 穢濁之氣가 쌓여 血脈에 痰飲과 瘀血이 정류되고 氣血의 흐름을 막은 것으로 생각한다.<sup>2)</sup> 이에 한의학에서는 이상지질혈증 환자에게 滲濕, 活血, 消導하는 약물을 사용하였으며 다양한 처방 및 약재의 효과에 대해 많은 연구들이 보고되어 있다.<sup>6,9,12,16,23)</sup>

이에 한의학계에서도 복합처방 및 단방으로 이상지질혈증의 개선을 나타내는 약물에 대한 연구가 다양하게 진행 중이다. 한약 처방 중 방풍통성신<sup>32)</sup>, 인진위령탕<sup>33)</sup>, 삼황사심탕<sup>34)</sup> 등과 의이인(薏苡仁, *Coicis*

*Semen*)<sup>35)</sup>, 죽엽(竹葉, *Phyllostachys Folium*)<sup>7)</sup> 등의 단일약재 추출물에 대한 기존 연구들이 한약으로 이상지질혈증의 개선에 유의한 효과를 확인할 수 있음을 밝혔다.

한인진은 肝膽 및 脾胃에 歸經하여 清熱祛濕 利膽退黃하는 약물이다.<sup>36)</sup> 약리학적으로는 scopoletin 성분에 의해 항염증 작용<sup>8)</sup>, 항산화 작용<sup>9)</sup> 및 간독성 보호효과<sup>10,11)</sup>를 갖고 있는 것으로 알려져 있다. 울금은 活血祛瘀 行氣解鬱하는 약물로 肝膽에 歸經하며 특히 血行이 정체되어 나타나는 증상에 쓰여온 약물이다.<sup>36)</sup> 최근에는 비만 환자의 혈중 지질농도 개선<sup>12,13)</sup> 및 항염증 작용<sup>14)</sup>에 효과가 있음이 입증되었다. 한인진, 울금 복합물의 항산화 효능 및 이상지질혈증 개선 효과에 대해 최근 연구가 이뤄지고 있으며, 백서 모델을 사용한 이<sup>6)</sup>의 연구 등 선행 연구에서 유의한 효과를 갖는 것으로 보고되었다.

본 연구에서는 기존 연구에서 이상지질혈증에 효과가 있다고 보고된 한인진, 울금에 대표적인 消導之劑인 나복자를 더하여 실험을 하였다. 나복자는 消導之劑 중에서도 降氣 化痰하는 작용이 뛰어나 食積이 정체된 증과 소화장애 및 喘證에 사용하는 약물이다.<sup>36)</sup> 濕痰과 瘀血, 氣滯 및 脾 기능의 저하는 이상지질혈증과 비만을 유발하므로, 나복자의 化痰,

降氣 작용은 이상지질혈증 개선의 효과가 있다.<sup>22)</sup> 나복자의 약리성분 중 alkaloid는 항염증<sup>15)</sup> 및 항산화<sup>16)</sup>, 신경보호작용<sup>17)</sup>, isothiocyanates는 항암<sup>18,19)</sup> 및 항균효과<sup>20)</sup>가 있는 것으로 알려져 있으며, 비만 동물모델에서 나복자 추출물의 투약이 total Cholesterol, triglyceride, LDL-C의 감소 및 HDL-C의 증가를 유의성 있게 나타내는 것으로 보고<sup>21-23)</sup>되었다. 그러나 선행연구에서 항산화 및 항고지혈 효과가 나타난 한인진, 울금과 병용한 연구는 아직까지 보고되지 않아, 본 저자는 한인진, 울금, 나복자를 동물로 배합하여 항산화 및 이상지질혈증 관련 유전자의 발현 억제효능을 확인해보았다.

HepG2 cell은 15세 백인 남성에게서 분리수립된 인간의 간암유래 세포이다. 간 세포는 정상적 조건에서 내인성 항산화제를 이용해 활성산소종을 소거할 수 있으며<sup>9)</sup> 이 내인성 항산화 시스템이 제대로 작동하지 못할 경우 산화적 스트레스가 간 세포를 손상시키기 때문에 항산화 효능 연구에 HepG2 cell이 다용된다.<sup>37)</sup> 이에 본 연구에서 한인진, 울금, 나복자 복합추출물(ACR)의 항산화 및 항고지혈 효과 평가를 위해 HepG2 cell을 사용해 실험을 진행하였다.

실험에 앞서 ACR 복합물의 안전성을 확인하기 위해 시행한 중금속 검사에서 납과 카드뮴이 기준치 이하로 검출되었으며 비소, 수은은 검출되지 않았다. 또한 ACR을 처리한 HepG2 cell의 세포생존율은 1, 10, 100 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 농도에서 각각  $107.08 \pm 3.20\%$ ,  $106.57 \pm 2.56\%$ ,  $106.63 \pm 2.82\%$ (정상군  $100.00 \pm 7.26\%$ ), 세포생존율이 50% 이상 저해되는 농도인 IC50은  $14.98 \text{ mg}/\text{ml}$ 으로 나타났다. 따라서 실험이 진행된 농도에서 ACR 추출물은 HepG2 cell 모델의 생존을 저해할만한 독성을 갖지 않았다.

항산화 효능 평가를 위해 항산화 물질인 polyphenol, flavonoids 및 glutathione(GSH)의 함량을 측정하고, 항산화 반응을 촉매하는 GSH peroxidase(GPx), GSH reductase(GR), Superoxide dismutase(SOD), catalase의 활성을 평가했다. 그리고 ACR이 HepG2 cell의 항산화 시스템을 얼마나 활성화하는지 확인하기 위해 DPPH radical 및 ABTS radical 소거능,

ROS 생성을 측정하였다.

또한 이상지질혈증의 개선효과를 평가하기 위해 ACR 처리를 한 HepG2 cell의 free fatty acid 함량과 지질의 산화 정도를 평가하기 위한 MDA를 확인하고, 체내 콜레스테롤의 저장과 합성 과정에 작용하는 효소인 ACAT1과 HMG CoA reductase의 mRNA 발현 수준의 영향을 확인하여 이상지질혈증의 개선에 미치는 영향을 살펴보았다.

식물에 다량 함유되어있는 유기화합물인 polyphenol은 농도에 비례하여 광범위한 항산화 효능을 갖는 것으로 알려져 있다.<sup>38,39)</sup> Flavonoids 또한 각종 식물에 존재하는 항산화, 항염증 물질로 호중구의 활성산소 생성 억제 및 직접적인 활성산소 소거능이 있는 것으로 보고되었다.<sup>40)</sup> 본 실험에서 사용한 ACR 추출물은  $10 \text{ mg}/\text{ml}$ 의 농도에서 각각 polyphenol  $314.49 \pm 5.20 \text{ mg}/\text{g}$ , flavonoids  $22.69 \pm 1.30 \text{ mg}/\text{g}$ 를 함유하여, 항산화 효능을 갖는 생약 성분으로 의미가 있음을 확인하였다. GSH는 항산화 물질의 하나로 활성산소와 결합하여 GPx를 촉매로 활성산소를 환원시키는 항산화 반응을 일으킨다. 1, 10, 100 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )의 농도로 희석한 ACR 추출물 처리를 한 HepG2 cell에서는 대조군에 비해 GSH 함량이 유의미하게 ( $p < 0.001$ ) 증가하였다.

GPx, GR, SOD, catalase는 활성산소와의 항산화 반응을 촉매하는 항산화 효소로, 이 중 SOD는 ACR 추출물 처리 이후 대조군에 비해 의미 있게 활성도가 증가하지 않았다. 그러나 ACR 추출물은 GPx, GR의 활성도를 유의성 있게( $p < 0.001$ ) 향상시켰고 catalase 또한 10, 100 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 농도에서 대조군에 비해 활성도가 유의하게(10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ :  $p < 0.01$ , 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ :  $p < 0.001$ ) 증가하였다.

ACR 추출물의 항산화 효능을 평가를 위해 측정 한 DPPH와 ABTS radical 소거능은 모두 1, 10, 100, 1000 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 농도에서 농도의존적으로 증가하였고, 모든 농도에서 ROS 생성량이 대조군에 비해 유의미하게( $p < 0.001$ ) 감소하였다.

실험결과를 종합할 때 HepG2 cell에서 ACR 추출물이 대조군에 비해 실험군의 체내 항산화 물질 함

량과 항산화 효소의 활성도를 증가시켰으므로, 항산화 효능을 증가시키는 것을 확인했다. 또한 한인진, 울금 복합물(ACE)의 항산화 및 항고지혈 효과를 평가한 이<sup>6)</sup> 등의 선행연구에서는 ACE 복합물이 GSH 함량, GR 및 SOD 활성도 증가 및 ROS 농도 감소 효과는 유의성 있게 나타난 반면 GPx와 catalase 활성도에는 유의성 있는 효과를 보이지 않았다는 것을 고려할 때, 나복자의 배합이 한인진, 울금의 항산화 효과를 증강하는 효과가 있을 것으로 사료된다.

Triglyceride의 분해 형태인 free fatty acid는 혈중 농도가 높아질 경우 고지혈증을 유발하고, 혈관 내 지질의 산화량이 늘어나면 죽상동맥경화증으로 진행될 가능성이 증가하며 MDA는 지질 산화량을 시사하는 지표이다. 이상지질혈증에 대한 평가를 위해 ACR 추출물을 1, 10, 100 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )의 농도로 각각 HepG2 cell에 처리해 대조군과 비교했을 때, free fatty acid의 함량과 MDA는 모든 농도에서 유의성 있게( $p < 0.001$ ) 감소하여 ACR 복합추출물이 지질의 절대량 및 산화작용을 감소시키는 효과를 확인했다.

HepG2 cell의 유전자발현수준 검사에서는 ACR 추출물에서 ACAT1 및 HMG-CoA reductase의 mRNA 발현량이 감소한 것이 확인되었다. ACAT1은 음식으로 섭취한 cholesterol을 세포 내로 흡수 및 저장하는 ester화(化) 반응을 촉진하는 효소이며, HMG-CoA reductase는 간 세포의 내인성 cholesterol 합성단계에서 작용하는 효소이다. ACAT1 또는 HMG-CoA reductase의 작용을 저해하거나 발현을 억제하면 지질 농도를 낮춰 이상지질혈증의 치료 방법이 될 수 있으며, 대표적인 고지혈증 치료제인 스타틴 계열 약물 역시 HMG-CoA reductase inhibitor이다.<sup>30)</sup> 본 실험에서 ACR 복합물은 mRNA 발현 단계에서 상기 두 효소의 발현 유전자를 억제함으로써, 체내 cholesterol 흡수와 생합성의 저해를 유도하여 이상지질혈증의 개선효과가 있음을 시사했다.

본 연구는 ACR 추출물이 심혈관계 질환의 주요 원인인 이상지질혈증을 개선하는 효과를 평가하기 위해, 이상지질혈증 관련 유전자 발현 억제 및 항산화 효능을 평가하여 유의성 있는 효과를 확인하

였다. 그러나 본 연구는 세포 수준의 실험으로 지질 대사 효소 활성과 free fatty acid 함량만을 확인했기 때문에, 향후 in vivo 실험 및 동물모델 실험에서 total cholesterol, LDL-C, triglyceride의 감소 및 HDL-C 증가를 확인하여 이상지질혈증의 개선효과를 직접적으로 평가해야 할 것이다. 또한 이상지질혈증 환자의 다수가 고혈압, 당뇨병, 비만 등 다른 대사증후군 인자를 가지고 있다는 점을 고려하여 복합적인 대사증후군 모델에서 추가 연구가 진행된다면, 심혈관계질환의 한의학적 치료 근거 확립에 기여할 것으로 사료된다.

## 결론

본 연구는 한인진, 울금, 나복자 복합물(ACR)의 항산화 작용 및 이상지질혈증을 개선 효과를 알아보기 위해 HepG2 cell에 ACR 복합 추출물을 처리하여 효능평가를 시행하였다. 실험에 앞서 ACR의 안전성 평가를 위해 중금속 검사, 세포생존율 검사 및 IC50 값을 확인하였다. 항산화 효능의 평가를 위해 항산화 물질(polyphenol, flavonoids, GSH) 함량 및 항산화 효소(GPx, GR, SOD, catalase) 활성, DPPH radical 소거능, ABTS radical 소거능, ROS 생성을 측정하였다. 또한 이상지질혈증 개선에 미치는 영향을 확인하기 위해 free fatty acid 함량, MDA를 측정하고 ACAT1과 HMG-CoA reductase의 mRNA 발현 수준을 확인하여 다음의 결과를 얻었다.

1. ACR 추출물은 기준치 이상의 중금속이 검출되지 않았으며, 실험이 시행된 1, 10, 100 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 농도에서 HepG2 cell의 생존을 유의미하게 저해하지 않았다.
2. ACR 추출물은 10mg/ml의 농도에서 항산화 물질인 polyphenol  $314.49 \pm 5.20 \text{mg/g}$ 과 flavonoids  $22.69 \pm 1.30 \text{mg/g}$ 를 함유하였으며, GSH 함량을 대조군에 비해 유의성 있게 증가시켰다.
3. ACR 추출물은 항산화 효소인 GPx, GR, catalase의 활성도를 유의성 있게 증가시켰다. SOD의 경

우 정상군보다 유의한 증가를 보이지 않았다.

4. ACR 추출물은 DPPH radical 소거능, ABTS radical 소거능을 유의성 있게 증가시켰으며 ROS 생성량을 유의성 있게 감소시켰다.
5. ACR 추출물은 free fatty acid 생성량과 MDA를 유의성 있게 감소시켰다.
6. ACR 추출물은 HepG2 cell의 mRNA 수준에서 ACAT1 및 HMG-CoA reductase의 발현을 대조군에 비해 억제했다.

위의 결과로 ACR 추출물은 세포 수준에서 항산화 효능 및 이상지질혈증 관련 유전자의 발현 억제 효과가 있으며, 향후 대사증후군 환자의 예방 및 치료에 응용이 가능할 것이라 사료된다.

#### 참고문헌

1. Statistics Korea. 2015 Cause of death statistics. 2016.
2. Department of circulatory internal medicine, college of oriental medicine. Korean medicine cardiology and neurology. 4th ed. Seoul:Gunja publisher. 2010:184-189..
3. Korea national health and nutrition examination survey. 2014 National health statistics. Seajong: Ministry of Health and Welfare. 2015:36-57.
4. Habukuihakwon. Youngchu-kyungkyosuk. Beijing: Inminwisheng publisher. 1982:161.
5. Kim HT, Kim YS, Seol IC, Yoo HR. The Effects of an Extract of Artemisiae Capillaris, Curcuma Longae, and Crataegi Fructus (IUS) on Anti-hyperlipidemia and Anti-oxidation in db/db Mouse Model. *J. Int. Korean Med.* 2016;37(3):467-83.
6. Lee SJ. Protective effect of a extract of Artemisia iwayomogi Kitamura plus Curcuma longa Linne. against Hyperlipidemia and Obesity in High Fat-Diet Mice Model. Daejeon University. Daejeon, Korea. 2012.
7. Lee JM, Seo BI, Park JH, Roh SS. Effects of water extracts from Phyllostachys Folium on hyperlipidemia and liver damage induced by alcohol. *Kor. J. Herbology.* 2011;26(3):31-6.
8. Moussavi N GV, Receveur O. Could the quality of dietary fat, and not just its quantity, be related to risk of obesity? *Obesity (Silver Spring).* 2008;16:7-15.
9. Shehzad AHT, Subhan F, Lee YS. New mechanisms and the anti-inflammatory role of curcumin in obesity and obesity-related metabolic diseases. *Eur J Nutr.* 2011;50: 151-61.
10. Sekiya MHA, Touyama M, Sakamoto K. Oxidative stress induced lipid accumulation via SREBP1c activation in HepG2 cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;375:602-7.
11. Kurata MSM, Agar NS. Antioxidant systems and erythrocyte life-span in mammals. *Comp Biochem Physiol B.* 1993;106:477-87.
12. 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.
13. 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 J of the Korean Society of Food Science and Nutrition.* 2013;42(4):570-6.
14. Jung SH, Chang CS, Ko KH. Physiological Effects of Curcumin Extracted by Supercritical Fluid from Turmeric(Curcuma longa L.). *Korean J of Food Science and Technology.* 2004;36(2):317-20.
15. Zhang MF, Shen YQ. Antidiarrheal and antiinflammatory effects of sinapine. *Pharmacology*

- and Clinics of Chinese Materia Medica*. 1996;29-31.
16. Matth B. Antioxidant activity of extracts obtained from residues of different oilseeds. *J of Agricultural and Food Chemistry*. 2002; 50(12):3444-52.
  17. Yang CY, He L. Neuroprotective effects of sinapine on PC12 cells apoptosis induced by sodium dithionite. *Chinese J of Natural Medicines*. 2008;6(3):205-9.
  18. Jackson S, Singletary K. Sulforaphane inhibits human MCF-7 mammary cancer cell mitotic progression and tubulin polymerization. *J of Nutrition*. 2004;134(9):2229-36.
  19. Ramirez M, Singletary K. Regulation of estrogen receptor  $\alpha$  expression in human breast cancer cells by sulforaphane. *J of nutritional biochemistry*. 2009;20(3):195-201.
  20. Iv'anovics G, Horv'ath S. Raphanin. An antibacterial principle of the radish (*Raphanus sativus*). *Nature*. 1947;160(4061):297-8.
  21. Kim JY, The Effects of Raphani Semenon Experimental Mouse Model of Obese diabete. Dongshin University. Naju, Korea. 2012.
  22. Daegu Haany University Education-industrial Complex. matirial for treatment and protection of hyperlipidemia or obesity containing *Raphanus sativus* L. extract. 2008.
  23. Castro-Torres IG, Naranjo-Rodríguez EB, Domínguez-Ortíz MÁ, Gallegos-Estudillo J, Saavedra-Vélez MV. Antilithiasic and hypolipidaemic effects of *Raphanus sativus* L. var. *niger* on mice fed with a lithogenic diet. *BioMed Research International*. 2012.
  24. Gutfinger T. Polyphenols in olive oils. *J of the American Oil Chemists Society*. 1981;58(11): 966-8.
  25. Nieva M, Isla M, Sampietro A, Vattuone M. Comparison of the free radical -scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. *J of ethnopharmacology*. 2000; 71(1):109-14.
  26. Kim BM, Jung JH, Kim DS, Kim YM, Jeong IH. Inhibitory activity of intracellular lipis accumulation by various marine extracts in HepG2 cells. *Korean J Food Sci Technol*. 2012;44:362-6.
  27. Ito T, Ikeda U. Infammatory cytokines and cardiovascular disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2003;2:257-65.
  28. Bratus VV, Talaieva TV, Radalovska NV. The Role of a Systemic Inflammatory Process in The Atherogenic Modification of Lipoproteins and the Development of Hypercholesterolemia. *Fiziol Zh*. 1999;45:40-9.
  29. Tobert JA. Lovastatin and beyond: the history of the HMG CoA reductase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2:517-526.
  30. Kim SH. Drug treatment of dyslipidemia. *J of the Korean Medical Association*. 2016;59(5): 366-73.
  31. Cho MK, Noh KH, Kim JJ, Song YS. Anti -atherogenic effect of green tea product through hypolipidemic and anti-oxidative action in ovariectomized rats. *J of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 2007;36(10): 1263-70.
  32. Jung SH, Lee KT, Ann HS, Lee JY, Choi JW, Kim DG. Hypolipidemic and Antioxidative Effects of Bangpoongtongsungsankamibang on Diet-Induced Obesity Rats. *Kor. J. Pharmacogn*. 2006;37(3):190-5.
  33. Hwang WK, Kim DH. Study on the Effect of Injinwieryungtang(IJWRT) on hyperlipidemia. *J of Korean medicine research institute, Daejeon University*. 2005;14(2):71-85.

34. Kim CY. Anti-hyperlipidemic Effect of Samhwangsasim-tanggamibang in High-cholesterol Diet induced Rat Model. Sangji University. Wonju, Korea. 2016.
35. Lee YJ, Son YJ, Lee ES, Park JS, Kim SG. Effects of Coicis Semen on the Hyperlipidemia in Rat. *Kor. J. Herbology*. 2004;19(3):129-36.
36. The Complilation Committee of the Korean Medicine College. *Herbology*. 2nd ed. Seoul: Yeonglim-sa. 2010:369-453.
37. Bartsch H, Nair J. Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: Role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. *Langenbeck Arch. Surg*. 2006;391:499-510.
38. Zheng W, Wang SY. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J Agric Food Chem*. 2001;49:5165-70.
39. Mayer AM, Harel E. Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry*. 1979;18(2):193-215.
40. Winterbourn CC. Comparative reactivities of various biological compounds with myeloperoxidase -hydrogen peroxide-chloride, and similarity of oxidant to hypochlorite. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*. 1985;840(2): 204-10.