東 醫 生 理 學 會 誌
J. of Oriental Physiology
Vol.14(2), 통권 제20호, 1999

혈부축어탕이 Triton WR-1339에 의한 고지혈증 유발 생쥐 간조직내 지질 축적 억제에 미치는 영향

Suppression of Lipid Accumulation of *Hyulboochucketang* in the Hepatic Tissue of Hyperlipidemic Mice by Triton WR-1339

김호현* · 방혜정** · 강윤호** · 박인식*** · 안상현*** · 김진택*** · 이해풍****

I. 서론

고지혈증은 한의학적으로 痰濁, 血瘀 등의 범주에 속하며, 지질단백 대사 이상으로 인해 생기는 것으로, 현재 지질함량 식이의 과다 섭취로 인해 발병이 급증하고 있는 실정이다. 이러한 고지혈증은 질병자체의 위협보다는 동맥경화(atherosclerosis)유발의 가장 뚜렷한 위험인자로 인지되고 있는 것으로 Keith(1991)는 보고하였다.

저밀도 지질단백(low-density lipoprotein: LDL)의 혈중농도 상승은 고지혈증의 주된 병변으로, 이는 간조직내 LDL receptor의 결핍(Karen 들(1994), Noriaki 들(1989)), apolipoprotein(Apo) 과잉생성(Hornick 들(1983)), 그리고 식이로 유발된 triglyceride가 풍부한 chylomicron과 초저밀도 지질단백(very low-density lipoprotein: VLDL)의 증가(Raul 들(1990)과 Takeshi 들(1988))에 의해 기인되는 것으로 보고되었다. 이러한 지방대사 장애로 나타나는 형태학적 변화로 우선 간조직에서는 지방 및 콜레스테롤 입자의 세포질내 축적 증가, 그로 인한 그물구조의 세포질을 가진 간세포 출현 증가 그리고 간세포판(hepatic plate)의 소멸 등이 관찰된다고 김 들(1997)은 보고하였다. 또한 신장조직에서는 보우만주머니 외벽세포의 비후, 요세관 공간의 확장 그리고 콜레스테롤을 비롯한 지방의 과다 분포 등의 형태학적 변화가 나타난다고 박 들(1998)과 김 들(1998)은 보고하였다.

血府逐瘀湯은 陣과 路(1990)에 의해 一切의 血瘀氣滯症을 通治하며, 活血祛瘀, 理氣止痛의 효능이 있는 것으로 보고되었다. 이런 연유로 임상에서 血瘀로 발병되는 두통, 심장병, 뇌혈관질환 등에 활용되는 것으로 方(1993)은 보고하였다. 이러한 血府逐瘀湯은 endotoxin으로 유발된 실험적 血栓證과 자체혈액으로 유발된 실험적 皮下血腫에 유의한 치료효과가 있으며(최와 강(1987)), 흰쥐 간세포의 괴사를 현저하게 억제하는 작용을 하는 것(우(1996))으로 알려졌다. 그리고 處方中에 理氣藥과 活血藥이 지질대사의 조절에 협동작용을 한다고 沃(1988)이 보고하였다. 한편 血府逐瘀湯의 항고지혈증효과에 관한 형태학적 실험은 김 들(1998)에 이루어졌는데, 血府逐瘀湯이 지방과 콜레스테롤의 혈액내 수치를 감소시킨 결과

* : 세명대학교 한의과대학 생리학교실
** : 동국대학교 한의과대학 내과학교실
*** : 동국대학교 한의과대학 해부학교실
**** : 동국대학교 생명자원과학대학 응용생물학과.

신장에서의 지방과 콜레스테롤의 축적감소를 유도하는 것으로 관찰되었다.

이러한 이전의 보고를 통해 손상된 지질대사에 대한 조절능력이 있을 것으로 추정되는 血府逐瘀湯이 고지혈증 유발시 총콜레스테롤의 혈중농도와 간조직내 지방 축적의 감소에 미치는 영향에 대해 조사하기 위해 본 실험은 실시되었다. 본 실험에서 인위적인 고지혈증을 유발하기 위해 세포외 lipase활성을 억제하여 혈액 내 triglyceride와 LDL을 증가(Hayashi 들(1982), Lottenberg 들(1992) 그리고 Zeniya와 Reuben(1988))시키고 세포내 lipase활성 억제에 관여하여 triglyceride의 축적을 증가(Dominique 들(1991))시키는 것으로 보고된 Triton WR-1339(TX)를 처리하였다. TX 처리후 생쥐에 血府逐瘀湯 추출물을 복강주사한 다음 혈중의 총콜레스테롤 수치 증감과 간조직에서의 지방과 콜레스테롤 축적 감소에 의한 형태적 변화를 조사하였다. 간조직내의 지방 분포변화는 Sudan black B 염색을, 콜레스테롤 분포변화는 Perchloric acid-napthoquinone 염색 후 관찰하였다. 저자들은 본 실험을 통해 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물

생명공학연구소에서 분양받은 태령 4주된 ICR계 생쥐 수컷을 무균사육장치내에서 2주일동안 적응시킨 후 체중 30g된 생쥐를 선별하여 사용하였다. 생리식염수를 복강 주사한 대조군, TX 주사군, TX 주사 후 혈부축어탕 추출물 주사군(HCE 처리군)으로 나눈 후 시간의 경과에 따라 24, 48, 그리고 72시간으로 세분시켰으며 각각에 10마리씩 배정하였다.

2. TX의 제조와 주사

TX 주사군과 HCE 처리군에 생리식염수에 희석된 10% Triton WR-1339 (Fluka. Germany)용액을 각각 600mg/kg씩 복강주사하였으며, 대조군에는 동량의 생리식염수를 주사하였다.

3. 혈부축어탕 추출물의 제조 및 주사

본 실험에서 사용된 혈부축어탕은 동국대학교 한방병원에서 조제된 것으로, 1첩 분량을 증류수 1000ml에 넣고 2시간동안 전탕하고 원심분리시킨 후 여과하였다. 그 여액을 rotary evaporator로 100ml로 농축한 후 HCE 처리군에 매일 3.3ml/kg씩 복강주사하였다.

4. 총콜레스테롤의 측정

TX를 주사 후 24, 48 그리고 72시간이 되었을 때 생쥐를 경추탈구로 희생시킨 후 심장천침으로 채혈하였다. 채혈된 혈액을 2000rpm으로 20분간 원심분리하여 혈장을 얻었다. 혈장 4μl와 제조된 총콜레스테롤 측정용시액(AM202-K. Asan.) 600 μl를 섞어 37℃에서 5분간 가온 후 500nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 그런 다음 측정된 흡광도 값으로 총콜레스테롤량을 환산하였다.

5. 간조직의 냉동절편제작

TX를 주사한 후 24, 48 그리고 72시간이 되었을 때 생쥐를 경추탈구로 희생시키고 생리식염수와 인산완충용액으로 심장관류고정(cardiac perfusion)을 한 후 간을 적출하였다. 적출된 간조직은 실온에서 10% 중성포르말린(neutral buffered formalin : NBF)용액에 24시간동안 고정한 후, 동결파괴를 방지(cryoprotection)하기 위해 30% sucrose 용액에 24시간동안 침적시켰다. 침적된 조직을 냉동절편기(cryostat)를 이용하여 5 μm 두께의 냉동절편으로 제작하였다.

6. 간조직의 일반적인 형태변화

10% 중성포르말린 용액에 24시간동안 고정된 간조직을 통상적인 방법으로 paraffin에 포매한 후 5 μm 두께의 절편으로 제작하였다. 만들어진 절편은 hematoxylin과 eosin으로 염색한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

7. 간조직내 지방의 염색

Sudan black B 염색법을 통해 간조직내 지방의 분포변화를 조사하였는데, 우선 냉동절편을 absolute propylene glycol로 10분간 탈수한 후 Sudan black B 용액에 10분간 염색하였다. 85% propylene glycol로 3분간 탈색한 후 증류수에 수세하고 nuclear fast red로 1분간 대조 염색하였다. 대조 염색 후 증류수로 3회 수세한 다음 glycerin jelly로 봉입한 후 광학현미경으로 관찰하였다.

8. 간조직내 콜레스테롤의 염색

간조직의 콜레스테롤 분포변화에 관한 조사는 Perchloric acid-napthoquinone(PAN) 염색법을 통해 이루어졌다. 우선 냉동절편위에 PAN 시약을 도포한 후 60℃ incubator에서 용액의 색깔이 적색에서 청색으로 변화될 때까지 반응시킨다. 반응이 완료되면 60% perchloric acid을 적하한 후 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

9. 통계처리

본 실험에서 얻어진 결과의 통계와 유의성 검정은 Sigma Plot program 4.0(Sigma. USA)으로 처리하였다.

Table. 1. The amount and composition of *Hyolboochucketang*.

韓藥名	生藥名	重量(g)
當歸	*Angelicae Gigantis Radix*	11.25
生地黃	*Gehmannial Rhizoma*	11.25
桃仁	*Persicae Semen*	15
紅花	*Carthami Flos*	11.25
枳殼	*Aurantii Fructus*	7.5
赤芍藥	*Paeoniae Radix Rubra*	7.5
柴胡	*Bupleuri Radix*	3.75
甘草	*Glycyrrhizae Radix*	3.75
桔梗	*Platycodi Radix*	5.625
川芎	*Cnidii Rhizoma*	3.75
牛膝	*Achyranthis Bidentatae Radix*	11.25
計		91.875

III. 결과

1. 총콜레스테롤의 변화 관찰

생리식염수를 복강주사한 대조군에서는 실험기간동안 총콜레스테롤량의 변화가 나타나지 않았지만, TX 주사군과 HCE 처리군에서는 TX 접종 후 각각 24시간과 48시간에서 유의성 있는 증가를 관찰할 수 있었다. 이러한 유의성 있는 증가는 24시간에서 나타났는데, 대조군의 총콜레스테롤량이 52.48±3.97mg/dl인 것에 반해 TX 주사군과 HCE 처리군에서는 각각 239.02±21.20mg/dl와 154.41±14.78mg/dl로 증가되어 나타났다. 그리고 48시간에서는 각각 205.07±14.83mg/dl와 150.00±10.87mg/dl로 나타나 51.55±4.53mg/dl인 대조군에 비해 유의성 있는 증가를 보였다. 그러나 TX 주사군과 HCE 처리군에서 관찰된 48시간의 총콜레스테롤량은 24시간에 비해서는 감소한 것으로 관찰되었다. 그리고 TX 주사군과 HCE 처리군에서 24시간 이후 시간이 경과할수록 감소하던 경향의 총콜레스테롤량은 72시간대에 이르러 대조군과 같은 수준으로 나타났다. 한편 24시간대와 48시간대에서 TX 주사군에 비해 HCE 처리군에서 총콜레스테롤량이 낮게 나타난 것으로 관찰되었으며, 이러한 경향은 그 유의성이 있는 감소로 인정되었다.

Table 2. Effect of *hyulboochoogetang* extracts(HCE) on the change of total cholesterol value in mouse injected TX. After TX injection, the total cholesterol value began to increase and reached a peak at hour-24. The increase of total cholesterol value in mouse with *hyulboochoogetang*

extract treatment noticeably mitigated at hour-24 and 48 and these increase extract had probability in P(0.05 of student T test. (unit : mg / dl)

GROUP	TIME (hours)			
	INITIATION	24	48	72
CONTROL	51.20 ±4.16	52.48 ±3.97	51.55 ±4.53	51.45 ±3.93
TRITON	51.09 ±4.04	239.02 ±21.20	205.07 ±14.83	75.81 ±8.67
TREATMENT HCE	51.32 ±4.18	154.41 ±14.78*	150.00 ±10.87*	56.08 ±9.05

Abbreviation) M ± S.D : Mean ± standard Deviation, CONTROL : Saline intraperitoneally injected group., TRITON : Triton WR-1339 intraperitoneally injected group, TREATMENT HCE : *Hyulboochoogetang* extracts intragastric injected group after Triton WR-1339 intraperitoneal injection., * : P < 0.05 compared with Triton WR-1339.

2. 간조직의 일반적인 형태 변화

생리식염수를 복강주사한 대조군은 전 실험기간동안 정상적인 형태의 간세포에 의해 형성된 간세포판(hepatic plate)의 배열을 볼 수 있었다. 간세포내 공포화(vacuolation)에 의해 생성된 그물구조의 세포질을 가진 간세포, 간세포의 괴사(necrosis), 괴사된 간세포 주변의 림프구나 섬유아세포의 침적(infiltration) 등의 염증현상, 응혈(blood coagulation) 등의 형태적 변화는 나타나지 않았다(Fig. 1.).

그러나 TX 주사군에서는 TX 주사 후 대조군과 다른 양상으로 관찰되었으며, 시간의 경과에 따라 각기 다르게 변화된 조직의 형태를 보였다. 우선 TX 주사 후 24시간에 일부 간소엽의 중심정맥(central vein)주변부에서 그물구조의 세포질을 가진 간세포가 나타났으나 정상적인 간세포판의 배열을 보였다. TX 주사 후 48시간이 되었을 때 그물구조의 세포질을 가진 간세포의 분포가 확장되어 중심정맥주변부에서부터 문맥공간(portal space)주변까지 나타났다(Fig. 2.). 특히 문맥공간주변부에서 액포화가 증가된 일부 간세포의 괴사가 심해져 간세포들의 경계 구분이 어려워졌고 전체적으로 간세포판의 배열이 사라졌다(Fig. 3.). 그러나 TX 주사 후 72시간에서는 일부 간소엽의 문맥공간주변부에서만 그물구조의 세포질을 가진 간세포를 관찰할 수 있었고, 간세포판은 일부 간소엽을 제외한 대부분의 지역에서 대조군과 별 차이가 없는 정상적인 상태의 배열로 나타났다.

한편 HCE 처리군에서 관찰된 간조직의 형태는 TX 주사군에서 나타난 것과는 달리 대조군과 유사한 것으로 관찰되었다. 그러나 실험기간동안 일부 간소엽에서만 그물구조의 세포질을 가진 간세포가 관찰되었다. 그러나 이러한 간세포의 분포는 TX 주사군에 비해 월등히 적게 나타났으며, 또한 TX 주사군에서 파괴되어 사라진 간세포판을 HCE 처리군에서는 관찰할 수 있었다(Fig. 4.).

3. 간조직내의 지방 분포 변화

대조군에서는 Sudan Black B에 흑청색으로 염색된 적은 수의 지방입자를 가지고 있는 간세포가 간소엽 전체에 골고루 분포하는 양상이었다. 이러한 대조군의 지방분포 양상은 전 실험기간동안 동일하게 나타났다(Fig. 5.)

TX 주사군에서 관찰된 지방분포는 TX 주사 후 시간의 경과에 따라 대조군에 비해 그 수와 입자의 크기가 증가된 양상으로 나타났다. TX 주사 후 24시간에서는 중심정맥주변부의 일부 간세포에서 대조군보다 많은 수의 지방입자가 침착된 것이 확인되었으나, 지방입자의 크기는 대조군과 동일하였다(Fig. 6.). TX 주사 후 48시간이 되었을 때, 지방입자 증가는 중심정맥주변부의 간세포 뿐만 아니라 문맥공간주변부까지 확장되어 간소엽 전체에서 일어난 것으로 관찰되었다(Fig. 7.). 또한 이때 간세포에 존재하는 지방입자의 크기도 대조군에 비해 커진 것으로 나타났다. TX 주사 후 72시간이 되었을 때 지방입자의 분포는 문맥공간주변부의 일부 간세포에서 대조군보다 많은 수의 지방입자의 축적을 관찰할 수 있었다. 그러나 지방입자의 크기는 대조군에 비해 약간 큰 것으로 나타났다(Fig. 8.). 한편 TX 주사 후 HCE 처리군의 지방입자 분포는 대조군과 비

슷한 양상으로 관찰되었다. 그러나 일부 간소엽의 문맥주변부에 존재하는 간세포에서는 지방입자의 축적이 대조군보다는 많은 것으로 나타났으나, TX 주사군에 비해서는 적은 것으로 관찰되었다. 또한 지방입자의 크기도 대조군에 비해 조금 큰 것으로 관찰되었지만, TX 주사군에 비해서는 작은 것으로 나타났다(Fig. 9., 10., 11.). 이러한 지방분포의 차이는 48시간과 72시간에서 명확하게 관찰되었다.

4. 콜레스테롤 분포 변화

PAN에 짙은 흑녹색으로 염색된 콜레스테롤은 그 입자의 형태가 눈입자와 유사하며 대조군에서는 간소엽 전체에 골고루 분포하는 양상으로 관찰되었다(Fig. 12.).

TX 주사군에서 관찰된 콜레스테롤 입자의 분포양상은 대조군과 같이 전체에 골고루 분포하지만, 대조군보다 많은 수의 콜레스테롤이 침착된 것이 확인되었다(Fig. 13, 14., 15.). 그리고 콜레스테롤 입자의 크기도 대조군보다는 커진 것으로 나타났다. 이러한 콜레스테롤 입자의 분포증가는 TX 주사후 48시간에서에서 명확하게 관찰되었다(Fig. 14.).

TX 주사 후 HCE 처리군의 콜레스테롤 염색결과는 그 분포는 대조군과 비슷한 양상으로 관찰되었다(Fig. 16., 17., 18.). 그러나 일부 문맥공간 주변부의 간세포에서 대조군보다 많은 양의 콜레스테롤 침착이 나타났다. 그러나 TX 주사 후 HCE 처리군의 변화는 TX 주사 군에 비해서는 그 침착되는 양이 적은 것으로 관찰되었다. 특히 HCE 처리군 중 48시간에 콜레스테롤 침착 정도의 차이가 가장 큰 것으로 관찰되었다.

Ⅳ. 고찰

근래에 들어 식이성향의 서구화와 지방섭취률의 변화로 인해 그 발병이 증가추세에 있는 고지혈증은 혈관내막에 콜레스테롤 과다 침적을 야기시킴으로써 동맥경화의 발병 증가를 주도하기 때문에 고지혈증 치료제의 개발에 많은 관심을 보이고 있는 것으로 최(1992)와 최와 양(1993)은 보고하였다. 고지혈증 발병시 실질조직내에서는 지방의 비정상적 축적으로 인한 지방변성(fatty change)을 유도한다고 Catlos와 Goetz(1984), Hayashi 들(1982) 그리고 Venkatesan 들(1988)이 보고하였고, 혈중내 콜레스테롤, 콜레스테롤에스터 및 triglyceride와 같은 지질의 농도가 상승한다고Robibins 들(1989)은 보고하였다. 고지혈증을 일으키는 원발성 병인으로는 triglyceride의 hydrolysis의 저해(Dalin 들(1994), Dominique 들(1991), Gerber 들(1981) 그리고 Raul 들(1990)), LDL receptor 결핍의 결과인 LDL의 대사이상(Karen 들(1994)와 Noriaki 들(1989), 그리고 Apo B의 transport율의 증가(Vushkin과 Dolgov(1986))와 같은 지질과 지질단백의 대사이상이 있고, 속발성 원인으로는 당뇨병, 갑상선 기능감퇴, 알콜성 간질환 등이 있다고 Robbins 들(1989)이 보고하였다.

이러한 고지혈증은 한의학적으로 痰濁, 血瘀 등의 범주에 속하고, 頭暈, 頭痛, 氣短, 胸悶, 腰膝酸軟 등의 증상이 나타난다. 발병의 외적요인으로는 肥甘厚味의 과다한 섭취로 발생하고, 내적요인으로는 肝脾腎의 기능저하로 인한 지질대사의 失調에 의한 瘀濕, 瘀血이 生하여 발생하게 된다. 그 病理基礎는 本虛標實인데, 肝脾腎虛는 本虛에 속하고, 瘀濕, 血瘀는 標實에 속하므로 治法에 있어서 滋補肝腎, 調理脾胃로 扶正하고, 活血化痰, 利濕化瘀으로 祛邪하여 標本同治, 補瀉兼施하는데, 標本緩急을 고려하여 辨證施治하여야 한다고 방과 강(1996)은 보고하였다.

고지혈증의 病機에 대해 鄭(1985)은 痰濁이 위주인데 痰濁內阻는 氣滯血瘀를 유발하므로 瘀血을 兼有하는 경우가 많다고 하였고, 劉 들(1993)은 痰濕이 內滯되어 脈管에 침입하여 血行이 阻碍되어 血瘀를 일으켜 발병한다고 하였다. 또한 寧 들(1990)과 洪 들(1988)은 痰濁이 脈絡에 壅滯되어 오래되면 血瘀를 이루어 발병한다고 하였

고, 屈과 李(1993)은 痰濁은 血脈에 존재하여 脈絡을 壅滯不暢하게 하므로 痰濁으로 인해 血瘀가 초래되고 痰瘀互結하여 脈道를 膠着하므로써 발병한다고 하였다.

혈액의 운행은 반드시 氣의 推動作用에 의해 이루어지기 때문에 氣行則血行하고 氣滯則血滯하므로 氣滯는 血瘀를 형성하는 원인의 하나에 해당하며 祛瘀하려면 먼저 理氣하여야 하고, 行血하려면 먼저 行氣하여야 한다. 한편 血府逐瘀湯은 活血祛瘀의 효능이 있는 桃紅四物湯과 疏肝理氣의 효능이 있는 四逆散에 胸膈의 結氣를 開하는 桔梗과 瘀血을 下行시키는 牛膝을 加하여 구성된 처방으로 活血祛瘀, 理氣止痛의 功效가 있어 一切의 血瘀氣滯症을 通治하고, 瘀血停滯로 인한 胸脇疼痛, 惑頑固性頭痛, 內熱煩悶, 失眠多夢, 心悸怔忡, 急躁善怒, 심장병, 뇌혈관 질환 등에 응용된다고 方(1993)은 기술하였다.

血府逐瘀湯 구성약물의 효능과 약리기전을 살펴보면 桃仁, 紅花, 川芎, 牛膝, 赤芍藥은 活血祛瘀하고, 當歸는 補血活血하며, 生地黃은 淸熱凉血하고, 枳殼은 行氣하며, 柴胡는 疏肝解鬱하고, 甘草는 補脾益氣하며, 桔梗은 宣肺祛痰하고, 當歸, 紅花, 川芎, 赤芍藥은 血小板聚集을 억제하며, 當歸, 川芎, 紅花는 抗血栓작용이 있고, 當歸, 甘草, 柴胡, 桔梗은 降血脂작용이 있으며, 柴胡, 甘草는 抗脂肪肝작용을 한다고 顔(1991)과 周(1994)가 보고하였다.

이전에 행해진 실험을 통해 血府逐瘀湯이 氣滯血瘀證患者의 고지혈증에 대해 일정한 降血脂작용이 있고, 處方中의 理氣藥은 고지혈증 유발 생쥐 혈청의 total cholesterol, triglyceride, LDL을 감소시키고, 活血藥은 간조직내의 total cholesterol, triglyceride, 肝指數를 감소시킨다고 하여 理氣藥과 活血藥이 지질대사조절에 협동작용을 한다고 沃(1988)이 보고하였다. 따라서 血瘀는 由痰生瘀, 由痰挾瘀의 병리기전을 통하여 痰濁과 함께 고지혈증을 유발하는 주요원인이므로 活血祛瘀, 理氣止通의 효능이 있는 血府逐瘀湯이 고지혈증에 일정한 효과가 있을 것으로 사료된다.

본 연구는 혈부축어탕 추출물의 항고지혈증 효과 중 실제 간조직내에서 지방의 축적 감소작용을 조사하기 위해서 행해진 것으로, TX로 생쥐에서 인위적인 고지혈증을 유발시킨후 혈부축어탕을 복강주사한 다음 생쥐의 혈중 총콜레스테롤량과 간세포내 콜레스테롤를 비롯한 지방분포에 따른 형태적 변화를 조사하였다.

혈중 콜레스테롤량은 이미 沃(1988)의 보고와 같은 결과로 나타났는데, TX 주사군에서 나타난 증가양상과는 달리 혈부축어탕 추출물 처리군에서 감소된 경향을 보였다. 이러한 결과는 혈부축어탕 추출물이 지질대사장애의 회복을 통한 혈중 콜레스테롤량의 정상화에 기여하는 것으로 사료된다.

TX 주사 후 인위적인 고지혈증이 유발된 간조직에서 나타나는 일반적인 형태변화는 간세포에 축적된 지방이 염색과정에서 유실되어 나타나는 그물구조의 세포질을 가진 간세포가 시간이 경과할수록 중심정맥주변부에서 문맥공간주변부까지 확장되는 간다는 것이다. 이러한 경향은 간세포내 지방 축적의 진행방향을 나타내는 것으로, 이는 TX에 의한 고지혈증 변병유발시 지방은 간문맥(hepatic vein)에서 중심정맥까지 혈류의 흐름에 따라 이동되므로 지방 축적은 중심정맥주변부에서부터 시작되어 심화되면 문맥공간까지 확장되는 것으로 사료된다. 이것은 혈류의 흐름에 역행하는 담즙의 과잉 증가시 생기는 담즙정체가 간문맥주변부에서부터 시작하여 중심정맥주변부까지 확대되어 일어난다는 Robbins 들(1989)의 보고와 관련성을 가진다. 한편 간 조직내의 일반적인 형태변화는 지방분포 변화와 관련하여 생각할 수 있는데 TX 주사군에서는 TX 주사 후 간소엽 전체 간세포에서 지방입자의 축적이 증가하였으며, 그 지방방울의 크기도 대조군에 비해 증가된 것으로 나타났다. 이러한 TX 주사군에서 나타나는 지방축적은 고지혈증에서 나타나는 병변으로 간세포에서 일시적인 지방대사장애 즉, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG CoA)

reductase에 의한 간세포내에서 cholesterol 합성 증가로 야기된 plasma lipoprotein의 증가와 같은 기전에 의한 지방축적이 나타난다는 Baran 들(1985), Goldfarb(1978), Kasim 들(1991)의 보고와 TX가 세포내 lipase의 활성을 저해하여 triglyceride의 축적이 증가한다고 한 Dominique 들(1991)의 보고와도 견해가 일치한다. 또한 이러한 간세포에서의 축적 지방입자 증가는 주로 콜레스테롤의 증가에 의해 주도되는 것이라고 김 들(1997)은 보고하였고, 본 실험 결과 콜레스테롤 입자의 축적과 크기 증가도 확인되었다.

이러한 TX 주사군에서 일어나는 간조직의 변화와는 달리 혈부축어탕 추출물 처리군에서는 일부 문맥공간 주변부을 제외하고는 TX 주사군에 비해서는 이러한 그물구조가 적게 나타나는 일반적인 형태변화가 관찰되었다. 또한 지방분포과 콜레스테롤도 일부 문맥공간 주변부를 제외하고는 그 분포가 크게 감소되어 대조군과 유사하였으며, 지방방울과 콜레스테롤입자의 크기도 작아졌다. 이러한 혈부축어탕 추출물 처리군에서 나타난 결과는 TX 주사로 야기된 지방대사 장애를 혈부축어탕 추출물이 회복시키는 역할을 수행함으로써 혈액내 총콜레스테롤량과 간세포내에서 지방축적이 TX 주사군에 비해 저하된 것으로 생각할 수 있다. 이상의 결과로 미루어 보아 혈부축어탕 추출물은 항고지혈증에 유의한 작용을 할 것으로 사료되며, 아울러 동맥경화의 예방인자로서의 역할도 기대되는 바 앞으로 이 부분의 연구도 진행되어야 할 것이다.

결론

본 실험은 혈부축어탕이 고지혈증 유발시 발생되는 간조직내 과도한 지방 축적 감소에 미치는 영향을 조사하기 위해 ICR 생쥐에 Triton WR-1339(TX; 600mg/kg) 복강주사로 인위적인 고지혈증을 유발시킨 후 혈부축어탕 추출물(3.3ml/kg/day)을 복강주사하여 시간의 경과에 따른 간조직에서의 콜레스테롤을 비롯한 지방 축적에 따른 형태 변화를 관찰하였다. Triton WR-1339 주사 후 간조직에서 나타난 일반적인 형태변화는 그물구조의 세포질를 가진 간세포가 간엽 전체에서 관찰되었고, 간세포 손상으로 인한 간세포판은 사라졌다. 간조직내의 지방분포 변화는 전체 간엽에 지방입자의 과출현을 확인할 수 있었으며, 지방입자의 크기도 대조군에 비해 큰 것으로 나타났다. 간조직내의 콜레스테롤 입자의 분포 변화는 콜레스테롤입자가 간엽전체에서 과출현하는 것이 관찰되었다. 그러나 혈부축어탕 추출물 처리군에서는 그물구조의 세포질을 가진 간세포가 줄었으며 간세포내에 침척되고 있는 지방입자와 콜레스테롤 입자의 수와 크기도 줄었다. 이상의 결과로 볼 때 혈부축어탕 추출물은 지방대사 장애로 유발된 생쥐 간장에서의 과도한 지방축적을 감소시키는 항고지혈증 효과를 보이는 것으로 사료된다.

= Abstract =

Suppression of Lipid Accumulation of *Hyulboochucketang* in the Hepatic Tissue of Hyperlipidemic Mice by Triton WR-1339

Ho-Hyun Kim*, Hyui-Jeng Bang, Yun-Ho Gang**, In-Sick Park***, Sang-Hyun Ahn***, Jin-Tack Kim***, Hai-Poong Lee******

**Dept. of Physiology, Oriental Medical College, Se-Myung University, Jechon, Korea*
***Dept. of Internal Medicine,*
****Dept. of Anatomy, Oriental Medical College,*
*****Dept. of Applied Biology, College of Life Resource, Dong-Guk University, Kyungju, Korea*

After Triton WR-1339 (TX; 600mg/kg) intraperitoneal injection, hepatic tissues of ICR mice were intragastric injected with *Hyulboochucketang* extract(HCE; 3.3ml/kg/day) were observed to

investigate the suppressive effect of lipid accumulation that evoke by the antihyperlipidemic effect of HCE. These hepatic tissues were fixed in fromol-calcium solution and were cryocut. These tissues stained by H&E for general morphology, sudan black B for lipid and perchloric acid-naphthoquinone(PAN) method for cholesterol. After TX treatment, the increase of hepatocyte having meshlike cytoplasm(HHMC) were shown in all hepatic lobules and the hepatic plates were disappeared in the aggregative region of HHMC. The number of blue black colored lipid drop and dark green colored asterisk shaped cholesterol particle in hepatic cytoplasm were increased and the size of lipid drop and cholesterol particle were enlarged. But, in HCE-treated mice, the HHCM were disappeared and hapatic plate were rearranged. The number of lipid drop and cholesterol particle were decreased than TX-treated mice and the size of lipid drop and cholesterol particle were diminished. As results indicated that the HCE work on the suppression of lipid accumulation in hepatic tissue of hyperlipidemic mice caused by disturbance of lipid metabolism.

Key Word : *Hyulboochuchetang*, Triton WR-1339, Liver, Lipid, Cholesterol, Hyperlipidemia. Antihyperlipidemic effect

參考文獻

김진택, 김동환, 안상현 : 장기간 알콜투여에 의한 간 및 신장, 위장 조직손상에 미치는 영향. 동국대학교 한의학연구소 논문집. 3: 163-9, 1994.

김진택, 박인식, 안상현 : Triton WR-1339 주사에 의한 고지혈증 유발시 간세포내 지방축적에 관한 형태학적 연구. 동국대학교 한의학연구소 논문집. 6: 107-15, 1997.

김호현, 강윤호, 방혜정, 김진택, 박인식, 안상현, 이해풍 : 혈부축어탕이 고지혈증 유발 생쥐 신장내 지방축적 감소 효과. 세명대학교 한의학연구소 논문집. 1(1) : 71-82. 1998.

박인식, 김진택, 안상현 : Triton WR-1339 주사에 의한 고지혈증 유발 생쥐 신장에 미치는 참홑파래 추출물의 지방축적 억제영향. 동국대학교 한의학연구소 논문집. 6(2): 87-98, 1998.

방혜정, 강윤호 : 고지혈증의 治方에 관한 문헌적 고찰. 동서의학. 21(2): 70-81, 1996.

우대윤, 이태균, 문진영, 임종국, 박원환, 남경수 : 인공막과 Rat의 간세포를 이용한 혈부축어탕의 항산화 작용에 관한 연구. 대한한의학회지. 17(1): 465-477, 1996.

최승규, 김광호 : 혈부축어탕이 혈전증과 피하혈종에 미치는 영향. 경희한의대논문집. 10: 605-625, 1987.

최재수 : 고지질혈증과 그 치료약. 생명과학. 2(2): 134-7, 1992.

최재수, 양한석 : 천연에 존재하는 고지혈증 개선 활성성분의 탐색. 생명과학. 3(2): 79-90, 1993.

屈松柏, 李家庚 : 實用中醫心血管病學, 北京, 科學技術文獻出版社. 1993.

寧選 외 : 山查降脂藥對中老年人高脂血症的臨床觀察, 河南中醫, 1990.

劉進 외 : 降脂口服液治療原發性高脂血症療效觀察. 中國中西醫結合雜誌. 13(11): 658-660, 1993.

方文賢 : 中國名方臨證秘用. 北京. 中國中醫藥出版社. pp 336-338. 1993.

顔正華 : 中藥學. 北京, 人民衛生出版社. 1991.

王勳臣 : 醫林改錯. 서울. 일중사. pp 61-65. 1992.

沃興德 : 血府逐瘀湯對氣帶血瘀型高脂血證降脂作用的臨床觀察與實驗研究. 中西醫結合雜誌. 8(10) : 601-603, 1988.

周安方 : 中藥分册, 北京, 中國科學技術出版社. 1994.

陳偉, 路一平 : 方劑學, 上海, 上海中醫學院出版社. 1990.

洪允祥 : 沒藥治療高脂血症臨床觀察. 中醫雜誌. 29(6): 36-37, 1988.

Baran, J. S., Laos, I., Langford, D. D., Miller, J. E., Jett, C., Taite, B., and Rohrbacher, E. : 3-Alkyl-3-hydroxyglutaric acid ; a new class

of hypocholesterolemic HMG CoA reductase inhibitors.. J. Med. Chem. 28(5): 597-601, 1985.

Catlos, T. and Goetz, W. R. : Sandritter's color atlas & textbook of Histopathology. 7th edition. Year Book Med. Co. pp153-5, 1984.

Dalin, R., Hiroyuki, N., Hideomi, A., and Takahiro, N. : Study on Antihypertensive and Antihyperlipidemic effects of marine algae. Fisheries Science. 60(1): 83-8, 1994.

Dominique, H., Paul, H., and David, N. B. : Effect of lipase inhibitor, triton WR-1339 and tetrahydrolipstatin, on the synthesis and secrtion of lipids by rat hepatocytes. FEBS. 286(1,2): 186-8, 1991.

Gerber, L. E. and Erdman, J. W. : Hyperlipidemia in rat fed retinoic acid. Lipid. 16(7): 496-501, 1981.

Goldfarb, S.: Rapid increase in hepatic HMG CoA reductase activity and in vivo cholesterol synthesis after triton WR-1339 injection. J. Lipid. Res. 19(4): 489-94, 1978.

Hayashi, H., Ninobi, S., Matsumoto, Y., and Suga, T. : Effect of triton WR-1339 on lipoprotein lipolytic activity and lipid content of rat liver lysosome. J. Biochem(Tokyo). 89(2): 573-9, 1981.

Hayashi, H., Shitara, M., and Yamasaki, F. : The origin of lipid accumulated in the liver lysosomes after administration of triton WR-1339. J. Biochem. 92(5): 1585-90, 1982.

Hornick, C.A., Kita, T., Hamilton, R. L., Kane, J, P., and Havel, R. J. : Secretion of lipoproteins from the liver of normal and WHHR. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80(19): 6096-100, 1983.

Karen, F. K., Dawn, R. M., Linda, L. A., Steven, E. R., Leslie, D. S., and James, M. W. : In vivo Corresction of LDL receptor deficiency in the WHHR with recombinant adenoviruses. J. Bio. Chem. 269(18): 13695-702, 1994.

Kasim, S. E., Leboeuf, R. C., Khilnani, S., Tallapaka, L., Dayananda, D., and Jen, K. L. : Mechanisms of triglyceride-lowering effect of an HMG-CoA reductase inhibitor in a hypertriglyceridemic animal model, the Zucker obese rat. J. Lipid. Res. 33(1): 1-7, 1992.

Keith, E. S. : Atherosclerosis. Encyclo. Human Bio. 1: 447-55, 1991.

Larusso, N. F., Kost, L. J., Carter, J. A., and Barham, S. S.: Triton WR-1339, a lysosomotropic compound, is excreted into bile and alters the biliary excretion of lysosomal enzymes and lipids. Hepatology. 2(2): 209-15, 1982.

Lottenberg, A. M., Oliveira, H. C., NAkandakare, E. R., and Quintao, E. C. : Effect of dietary fish oil on the rate of very LDL, triacyglycerol formation and on the metabolism of chylomicrons. Lipid. 27(5): 326-30, 1992.

Noriaki, K., Toru, K., Atsushi, M., Masayuki, Y., Kenji, I., Yutaka, N., and Chuichi, K. : Induction of mRNA for LDL receptors in heterozygous Watanabe Heritable Hyperlipidemic Rabbit treated with CS-514(Pravastatin) and Cholestyramine. Circulation. 79(5): 1084-90, 1989.

Raul, G. M., Ivete, A. R., and Mario, H. H. : Effects of triton WR-1339 and heparin on the transfer of surface lipids from triglycerideirich emulsions to HDL in rats. Lipid. 25(11): 701-5, 1990.

Robbins, S. L., Cotran, R., and Kumar, V. : Robbins pathologic basis of disease. W. B. Saunders. 4th edition. pp556-61. 1989.

Sharma, R. D. : Effect of various isoflavones on lipid levels in triton-treated rats. Atherosclerosis. 33: 371-5, 1979.

Takeshi, C., Hisashi, M., Yasushi, K., Michihiko, M., Johji, Y., and Hajime, F. : The effect of crude on experimental hypercholesteremia; Mode of action of Epigallocatechin Gallate in

tea leaves. Chem. Pharm. Bull. 36(1): 227-233, 1988.

Venkatesan, S., Ward, R. J., and Peter, T. J. : Effect of chronic ethanol feeding on the hepatic secretion of VLDL. Biochim Biophys Acta. 960(1): 61-6, 1988.

Vushkin, M. L. and Dolgov, A. V. : Activity of cholesterol metabolism enzymes and lipid levels in the rat liver, aorta, adrenals and serum after exposure to triton WR-1339. Vopr. Med. Khim. 32(3): 98-101, 1986.

Zeniya, M. and Reuben, A. : Triton WR-1339-induced changes in serum lipids and biliary lipid secretion. Am. J. Physiol. 254(3pt1): 346-54, 1988.

Legends for figure

Fig. 1. The structure of liver in mouse at hour-48 after saline intraperitoneally injection. These hepatocytes and hepatic plate were appered as normal structure. C: central vein. H & E. x200

Fig. 2. The liver in mouse at hour-48 after triton WR-1339(TX) intraperitoneal injection. These hepatocyte having meshlike cytoplasm were shown in the hepatic lobule and the hepatic plate were disappeared in the region of lipid accumulation. arrow: meshlike cytoplasm. H & E. x200

Fig. 3. The magnification of hepatocyte(arrow) having meshlike. H & E. x400

Fig. 4. The liver in mouse at hour 48 after TX intraperitoneal injection with daily Hyulboochoogetang extract(HCE) treatment. The hepatic meshlike cytoplasm were disappeared in hepatic lobule. The structure of hepatocyte were shown as like as normal hepatic morphology and the hepatic plate were rearranged. H & E. x200

Fig. 5. The central vein area of murine liver at hour 48 after saline injection. The lipid drop of hepatocyte were demonstrated as dark blue colored spot. arrow: lipid blot. Sudan black B stain. x400

Fig. 6. The distribution of lipid blot of murine liver at hour 24 after TX injection. The lipid blot of hepatocyte were increased in the all hepatic area than control group. Sudan black B stain. x400

Fig. 7. The distribution of lipid blot of murine liver at hour 48 after TX injection. The lipid blot of hepatocyte were remarkably increased in the all hepatic area than control group. Sudan black B stain. x400

Fig. 8. The distribution of lipid blot of murine liver at hour 72 after TX injection. The lipid blot of hepatocyte were increased in the all hepatic area than control group. Sudan black B stain. x400

Fig. 9. The distribution of lipid blot of murine liver at hour 24 after TX injection with dairy HCE treatment. The lipid blot of hepatocyte were decreased in the all hepatic area than TX injection group. Sudan black B stain. x400

Fig. 10. The distribution of lipid blot of murine liver at hour 48 after TX injection with dairy HCE treatment. The lipid blot of hepatocyte were conspicuously decreased in the all hepatic area than TX injection group. Sudan black B stain. x400

Fig. 11. The distribution of lipid blot of murine liver at hour 72 after TX injection with dairy HCE treatment. The lipid blot of hepatocyte were decreased in the all hepatic area than TX injection group. Sudan black B stain. x400

Fig. 12. The distribution of cholesterol particle of murine liver at hour 48 after saline injection. The cholesterol particle of hepatocyte were demonstrated as dark green asterisk by Prechloric acid-naphthoquinone(PAN) method. arrow: cholesterol particle. PAN method. x400

Fig. 13. The distribution of cholesterol particle of murine liver at hour 24 after TX injection. The cholesterol particle of hepatocyte were increased in the all hepatic area than control group. PAN method. x400

Fig. 14. The distribution of cholesterol particle of murine liver at hour 48 after TX injection. The cholesterol particle of hepatocyte were remarkably increased in the all hepatic area than control group. PAN method. x400

Fig. 15. The distribution of cholesterol particle of murine liver at hour 72 after TX injection. The cholesterol particle of hepatocyte were increased in the all hepatic area than control group. PAN method. x400

Fig. 16. The distribution of cholesterol particle of murine liver at hour 24 after TX injection with dairy HCE treatment. The cholesterol particle of hepatocyte were decreased in the all hepatic area than TX injection group. PAN method. x400

Fig. 17. The distribution of cholesterol particle of murine liver at hour 48 after TX injection with dairy HCE treatment. The cholesterol particle of hepatocyte were conspicuously decreased in the all hepatic area than TX injection group. PAN method. x400
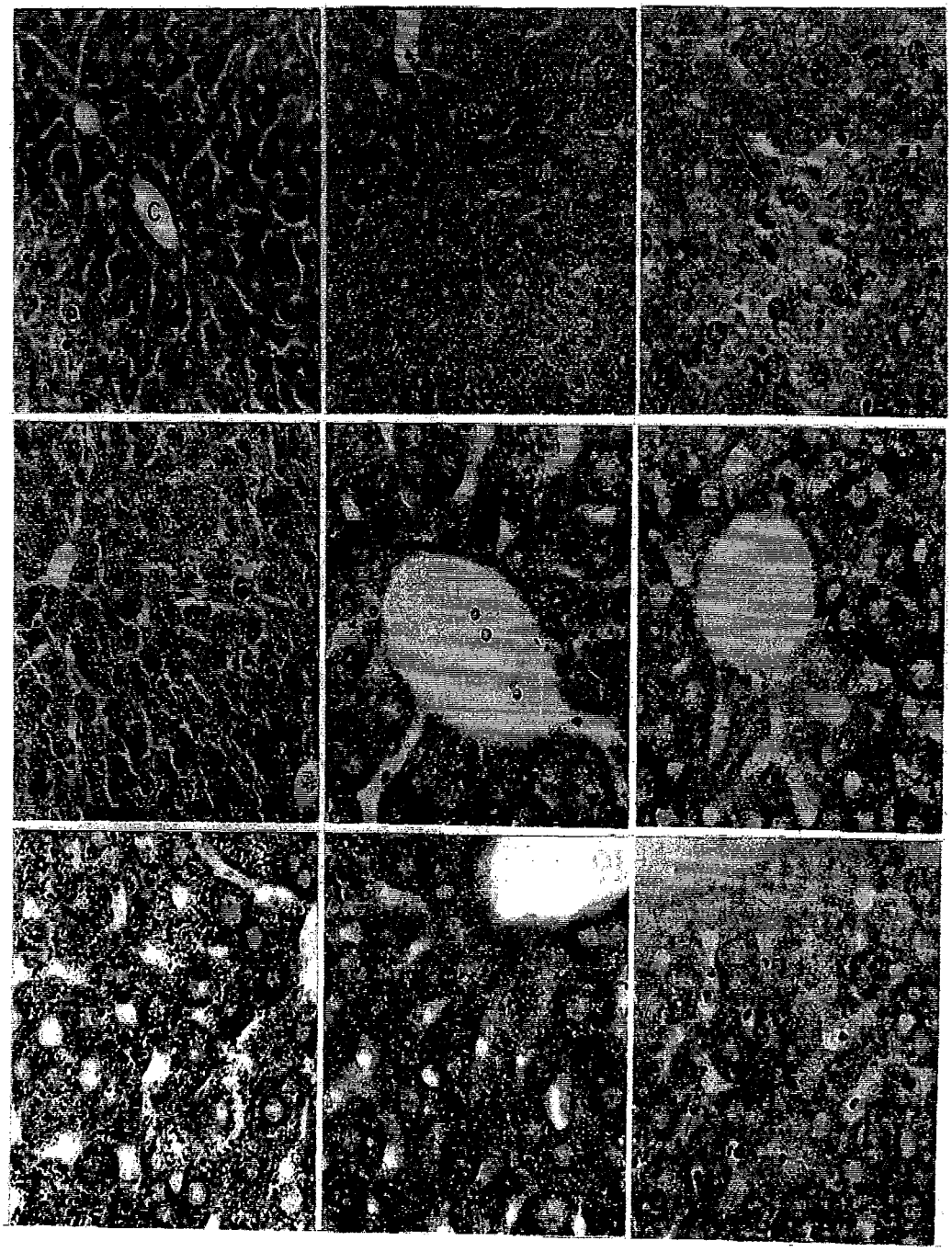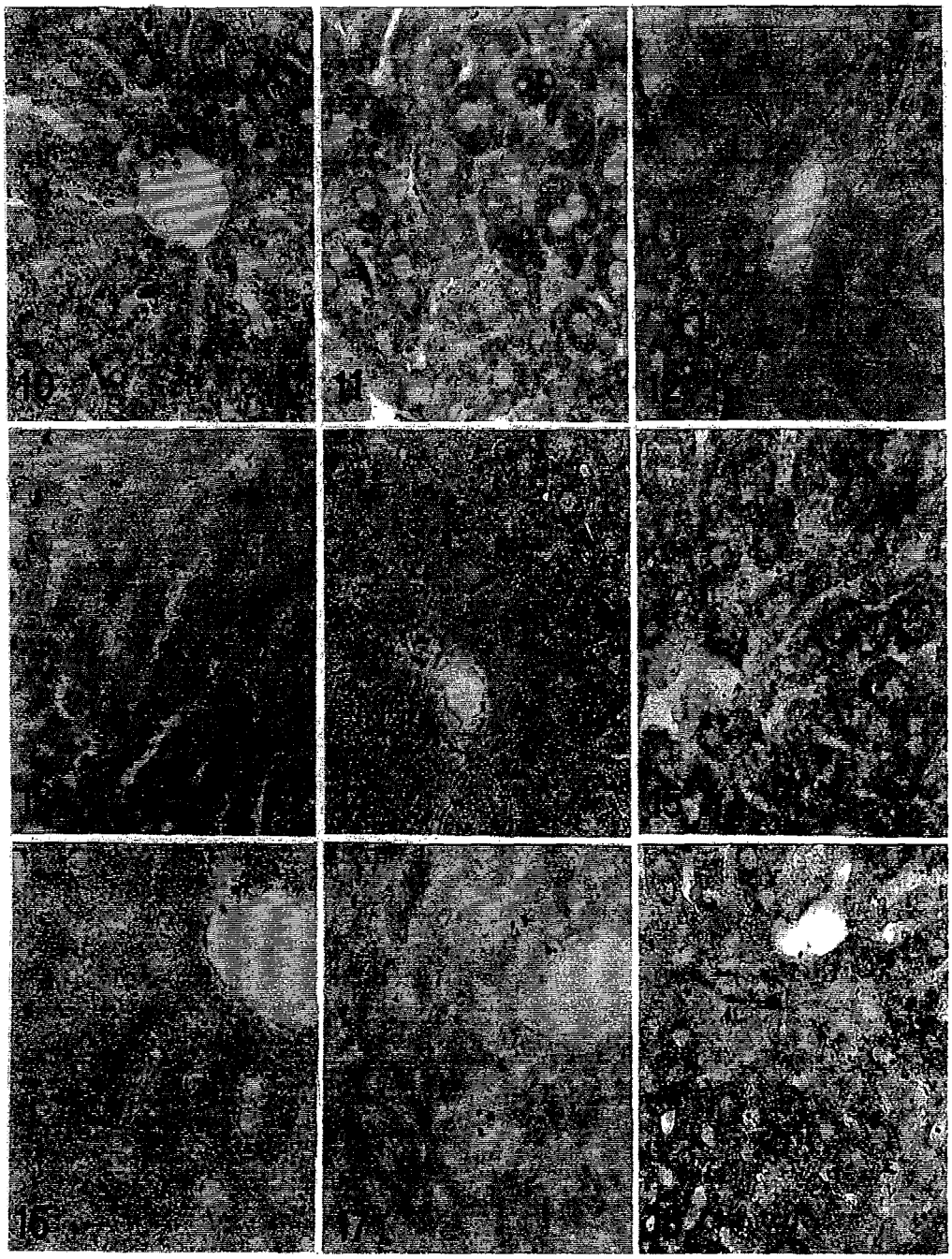
Fig. 18. The distribution of cholesterol particle of murine liver at hour 72 after TX injection with dairy HCE treatment. The cholesterol particle of hepatocyte were decreased in the all hepatic area than TX injection group. PAN method. x400