

한방약물로부터 항고지혈증 치료약물개발(I) -수종 한약재의 항고지혈증 활성검색-

김남재*, 정은아, 김동현¹, 이상인²

경희대학교 동서의학연구소, ¹약학대학, ²한의과대학

Studies on the Development of Antihyperlipidemic Drugs from Oriental Herbal Medicines(I)

-Antihyperlipidemic Activities of Oriental Herbal Medicines-

Nam-Jae Kim*, Eun-Ah Jung, Dong-Hyun Kim¹ and Sang-In Lee²

East-West Medical Research Institute, ¹College of Pharmacy and

²College of Oriental Medicine, Kyung-Hee University, Seoul 130-702, Korea

Abstract – Twenty-four Oriental herbal medicines including Platycodi Radix and Scutellariae Radix, etc., which have been used for the cure of hyperlipidemia, coronary heart disease were evaluated for the 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A(HMG-CoA) reductase inhibition and anti-oxidant effect on a free radical, 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) *in vitro*, and antihyperlipidemic effect on hyperlipidemic rats induced by Triton WR-1339 *in vivo*. 80% MeOH extract of eight herbs including Scutellariae Radix, Coptidis Rhizoma, Paeoniae Radix Rubra, Moutan Cortex Radicis, Angelicae Gigantis Radix, Bambusae Caulis in Taeniam, Cinnamomi Ramulus and Crataegi Fructus inhibited the HMG-CoA reductase activities and exhibited a radical-trapping action on a stable free radical, DPPH. On Triton WR-1339-induced hyperlipidemic rats, four herbs including Scutellariae Radix, Angelicae Gigantis Radix, Bambusae Caulis in Taeniam and Cinnamomi Ramulus showed respectively the significant suppression of serum total cholesterol, triglyceride, phospholipid and LDL-cholesterol levels and serum transaminase(ALT and AST) activities. From these results, it is suggested that each 80% MeOH extract of Scutellariae Radix, Angelicae Gigantis Radix, Bambusae Caulis in Taeniam and Cinnamomi Ramulus have effective antihyperlipidemic action against hyperlipidemia.

Key words – Oriental herbal medicines; antihyperlipidemic action; HMG-CoA reductase; radical-trapping action; 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH); Triton WR-1339-induced hyperlipidemia.

오늘날 인류는 평균수명의 연장에 따른 고령화 인구의 증가와 식생활의 변화, 문화의 발달과 복잡한 산업사회에서 생활함으로써 암, 고혈압, 동맥경화증 및 당뇨병 등 성인병이 그 어느 때보다 많아져 이로 인한 사망률이 수위를 차지하고 있다. 그 중에서도 고지혈증이 중요한 원인으로 되고있는 심혈관계질환인 동맥경화증, 협심증, 심근경색증 등으로 사망에 이르게 되는 경우가 많다. 특히, 동맥경화증, 관상동맥성 질환(Coronary Heart Disease, CHD) 등과 같이 고지혈증과 밀접한 관련이 있는 질환은 인간의 삶의 질

향상을 위하여 중요한 factor가 되고 있다.^{1,2)}

사람의 동맥경화증의 유발인자 및 성립기전에 대하여 여러 가지 학설이 발표되어지고 있지만 현재에 있어서는 불명확한 점이 많다. 유전인자, 연령, 질환, 성 등 숙주 측의 제인자와 식사, 운동, 스트레스 등 환경인자가 직접인자에 영향을 주게 됨에 따라 동맥경화증이 유발되는 것으로 생각할 수 있다. 현재 직접인자로 지질대사이상이 동맥경화증의 성립에 가장 중요한 역할을 하는 것에는 이르지 않다.³⁾ 최근의 여러 역학조사에 의해 혈장 중 cholesterol 특히 LDL-cholesterol이 심혈관질환 발생의 주요 위험인자 중의 하

*교신저자 : Fax-02-966-2801

나라는 것을 밝혔다.^{4,5)} 또한 식이요법이나 약물요법으로 LDL-cholesterol level을 낮춤으로써 심혈관질환으로 이환될 위험도를 낮출 수 있을 뿐만 아니라 이미 존재하는 죽상경화 병변의 퇴행도 가져올 수 있다는 것이 여러 연구를 통하여 입증되고 있다.^{6,9)}

고지혈증은 혈장 중의 지질 즉 cholesterol ester이나 triglyceride가 어느 기준범위를 넘어 높은 상태를 말하지만 혈당의 경우와 달리 기준치 그 자체가 대단히 완만하며 그 이유로는 혈장지질농도는 영양과 그 이외에 생활조건에 의하여 크게 좌우되기 때문이다.¹⁰⁾ 그러한 혈장 중의 지질함량이 상승하면 임상적으로는 허혈성 심장질환, 동맥경화증, 뇌졸중, 당뇨병이나 췌장염, 당뇨병 등을 병발할 위험율이 높다고 알려져 있다. 따라서 혈장 중의 cholesterol이나 triglyceride 함량을 저하시킬 수 있는 치료약물의 개발이 요망된다. 특히 고지혈증 치료의 주요한 목표는 동맥경화성 질환의 예방과 치료이다. 현재 고지혈증을 개선시킬 수 있는 합성의약품은 많이 개발되어 높은 유용성이 인정되고 있으나 새로운 치료약물의 개발이 계속 요구되고 있다.¹¹⁾ 이에 비교적 안전성이 있고 오랜 경험적 축적에 의하여 사용되고 있는 한방약물로부터 고지혈증 치료약물의 개발을 시도하였다.

우선, 한의학적 측면에서 고지혈증은 飮食失節, 運動不足, 七情損傷, 先天不足, 臟腑機能失調 등이 원인되고 있다. 즉, 膏梁厚味の 과식과 과음 등으로 臟腑輸化不及, 臟腑機能 失調, 飮食不歸正化, 脂質輸化障得 등을 일으켜 발병하게 된다. 혹은 先天稟賦不足으로 "陽化氣, 陰成形"이 없어 脂質過多가 滲入血中하여 고지혈증이 발증한다. 그러므로 한의학적으로 고지혈증은 正虛邪實에 속하고 正虛則臟腑氣血虛衰인데, 그 중점은 肝·脾·腎에 있으며 실제로는 痰濁 濕濁과 瘀血이 주가 되는 것이다. 따라서, 고지혈증과 연관된 한의학적 병태는 痰濁阻滯, 濕濁困脾, 氣滯血瘀, 脾腎兩虛, 肝腎陰虛, 肝鬱化火, 胃熱腑實, 痰濁壅塞로 나눌 수 있으며 이러한 병증에 이용되고 있는 한방약물을 조사하여 시료로서 길경, 팔루근, 팔루피 등 24종의 한약재를 우선 선정하였다.^{12,13)}

지질대사장애를 중심으로 하는 일련의 연구 중에서 대표적인 것은 cholesterol대사에 관한 것으로 Anitschkow¹⁴⁾가 가토에 고 cholesterol사료를 투여하여 실험적 고cholesterol혈증 병태모델의 작성에 성공함으로써 동맥경화증의 발증인자로서 cholesterol이 중요시되고 있다. 따라서, 각종 동물에 있어서 cholesterol 투여에 의하여 용이하게 실험적 동맥경화증 병태모델

을 작성할 수 있게 되었다. 또한 고triglyceride혈증은 Albrik 등¹⁵⁾이 혈청 triglyceride치는 cholesterol치에 비하여 허혈성 심질환의 발병률이 높다고 하는 것을 보고하여 주목받았으며, 고 triglyceride혈증을 나타내는 질환에는 이외에 당뇨병, 비만증, 알콜성 지방간 등이 알려져 있다.³⁾

따라서, 한방문헌에 고지혈증에 유효한 것으로 알려진 약물 중에서 길경 등 24종 약물의 고지혈증 개선효과를 screening하기 위하여 *in vitro*에서 cholesterol 생합성에 관여하는 HMG-CoA reductase 저해 활성을 검색하고 한편으로는 고지혈증 발병원인과 밀접한 관련이 있는 free radical의 소거활성을 지표로 하였다. 이 두 종류의 활성검색에서 양호한 실험결과를 보인 한약재를 우선 선정하여 *in vivo*에서 항고지혈증 활성을 평가하였다. *In vivo*에서 항고지혈증 활성평가법으로는 cholesterol 생합성과 관련이 있는 병태모델로 알려진 Triton WR-1339 처치에 의한 고지혈증 병태모델을 이용하였다.¹⁶⁾ 고지혈증 병태모델의 지표로 혈청 중 total cholesterol, triglyceride, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol, phospholipid, transaminase효소활성도(ALT, AST)를 측정하였으며 이들 한약들이 혈청 중 lipid level에 미치는 영향을 검토하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에서 사용한 한약재로는 길경, 팔루근, 팔루피, 죽여, 천축황, 행인, 원지, 지룡, 석창포, 안식향, 인삼, 백출, 황기, 당귀, 황련, 황급, 목단피, 적작약, 후박, 건강, 계지, 복령, 시호, 산사는 서울시 경동시장 소재 동경약업사(주)와 신성약업사(주)에서 구입하여 엄선한 것 중에서 그 기원을 확인하여 사용하였다.

시료의 조제 및 분획 - 한의학에서는 전통적으로 물을 사용하여 열탕 추출한 전제로써 사용하고 있으나 유효성분의 분획과 지표성분의 분리 등을 고려하여 표준엑스와 표준분획 제조법에 따라 실시하였다.¹⁷⁾ 즉, 각각 한약재를 추출에 적합하도록 조말로 분쇄한 것을 1kg씩 취하여 round bottom flask에 옮기고 80% MeOH를 가하고 환류냉각기를 부착하여 수욕상에서 3시간 동안 환류추출하여 여과하였다. 이 조작을 2회 반복 추출하여 여과한 여과액을 합하여 rotary vacuum evaporator를 이용하여 수분이 약 50%가 되도록 농축하고 이를 다시 동결건조기 중에서 건

Table I. Yield of various herbal medicines extracted by 70% methanol

Herbal medicines	Yield (%)	Herbal medicines	Yield (%)
Trichosanthis Fructus	28	Paeoniae Radix Rubra	28
Scutellariae Radix	34	Zingiberis Rhizoma	11
Magnoliae Cortex	6	Moutan Cortex Radicis	24
Atractylodis Rhizoma Alba	13	Angelicae Gigantis Radix	30
Trichosanthis Radix	13	Bambusae Caulis in Taeniam	8
Platycodi Radix	36	Ginseng Radix	19
Acori Graminei Rhizoma	6	Bupleuri Radix	10
Armeniacae Amarum Semen	9	Cinnamomi Ramulus	8
Coptidis Rhizoma	29	Hoelen	3
Astragali Radix	17	Crataegi Fructus	34
Lumbricus	13	Benzoinum	20
Polygali Radix	30	Bambusae Concretio Silicea	7

조하여 건조분말을 시료로 사용하였다. 이들 약물의 수득율은 Table I 에 나타내었다.

시약 및 기구 - 시약으로는 cholestyramine, RS-HMG-CoA, NADPH, dithiothreitol(DTT), EDTA-K, KCl, sucrose는 Sigma사(미국) 제품을, 혈청 중 LDL-Cholesterol함량의 측정에는 bioMerieux 사(프랑스)의 kit시약을, phospholipid 함량 측정용 시약은 야도톤사(일본)의 kit시약을, 그 이외의 혈청 중 지질 함량 측정용 kit시약과 transaminase효소활성 측정용 시약은 아산제약주식회사(한국)의 제품을 사용하였으며 그 외 시약은 일급시약을 사용하였다. 본 실험에 사용한 기계는 deep freezer(Ishin Lab. Co., Model DE 9007, 한국), homogenizer(EYELA Co., MAZELA Z type-1100, 일본), ultra centrifuger(Vision Co., VS-35,000, 한국), 분광광도계(Jasco Co., V-530 UV/vis spectrophotometer, 일본/Shimadzu Co., Model UV-160A, 일본), Roller pump(EYELA Co., RP-1000; rpm 50, 일본), 감압농축기(EYELA Co., Model NE-1, 일본), 동결건조기(EYELA Co., Model FD-1, 일본) 등을 사용하였다.

실험동물 - 실험동물로는 중앙동물로부터 분양받은 Sprague-Dawley계 체중 250 g 전후 웅성 흰쥐를 사용하였으며, 삼양유지사료(주)의 고형사료로 물을 자유롭게 섭취할 수 있도록 하면서 사육하였다. 실험은 특별히 명시하지 않는 한 $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 실시하였다.

In vitro에서 cholesterol 생합성 저해활성의 검색 - HMG-CoA reductase에 대한 저해제의 검색은 Edwards, P. A. 등의 방법을 이용하여 효소활성을 측정하였다.¹⁸⁻²⁰ 즉, 흰쥐를 1마리 씩 각 cage에 넣고 오후 7시에서 오전 7시까지 빛을 비추어 주고 오전 7시에서 오후 7시까지 빛을 차단시켜 3주 이상 사료와 물을 자유롭게 공급하면서 사육하였다. 실험일 3일 전부터 5% cholestyramine을 사료에 섞어 사육하였다. HMG-CoA가 peak에 도달하는 오후 1시에 흰쥐를 방혈치사시킨 후 간을 적출하였다. 간의 습중량을 달아 약 3배 부피의 buffer A(0.1M sucrose, 0.05M KCl, 0.04M potassium phosphate, 0.03M EDTA-K; pH 7.2)를 넣고 homogenization한 후 10,000×g에서 15분 동안 2회 연속 centrifuge (4°C)하고 상등액을 100,000×g에서 1시간 동안 centrifuge (4°C) 한 후 침전을 buffer B (Buffer A+10mM DTT)로 현탁하였다. 상등액을 다시 100,000×g에서 45분 동안 centrifuge (4°C) 한 후 침전을 buffer B로 현탁하고, 이들을 합하여 homogenization하여 microsome을 분리하였다. 6~8°C/min 속도로 3 ml씩 frozen하여 overnight storage 한 후 37°C에서 thaw하여 reductase의 solubilization을 하였다. 여기에 동량의 37°C가 유지된 50% glycerol in buffer B를 가하여 homogenization 한 후 37°C에서 60분 동안 incubation하였다. 37°C가 유지된 buffer B로 3배 희석(final 8.3% glycerol)시킨 후 다시 한번 homogenization하였다. 100,000×g에서 60분 동안 centrifuge (25°C)하여 상등액을 HMG-CoA reductase 효소액으로 하였다. HMG-CoA reductase 효소활성 측정은 37°C 항온과 time scanning이 가능한 UV spectrophotometer를 이용하여 1 ml 석영 cell(cell path length : 1.0 cm)에 screening하고자 하는 시료(inhibitor), 0.2 mM NADPH, buffer C (0.2M KCl, 0.16M potassium phosphate, 0.004M EDTA-K, 0.01M DTT; pH6.8), HMG-CoA reductase 50 μl를 가하여 5분 동안 preincubation한 후 기질인 0.1 mM RS-HMG-CoA를 넣어 총 반응액의 부피가 0.5 ml액이 되도록 하고 340 nm에서 5분간 UV detect하여 분(min.)당 산화되는 NADPH의 양을 측정하였다.

DPPH 항산화 활성검색 - 안정한 free radical인 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)을 이용한 Blois의 방법에 준하였다.²¹ 시료의 MeOH 추출물을 MeOH로 1.0 및 0.1 mg/ml의 농도가 되도록 희석하여 각 농도당 4 ml씩 시험관에 옮기고, 여기에 1×10^{-4} M DPPH의 메탄올 용액 1 ml을 가한 다음 잘 혼합한

후 실온에서 30분간 방치하고 520 nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH를 환원시키는 정도(대조군의 자주색을 탈색시키는 정도)를 산출하여 항산화활성으로 하였다. 항산화 활성이 우수한 활성을 나타내는 시료만을 선별하여 다시 50, 10, 5, 1 µg/ml의 농도가 되게 희석하여 위와 같은 방법으로 측정하여 IC₅₀을 구하여 비교하였다. 대조약물로는 ascorbic acid를 사용하였다.

Triton WR-1339 투여 유발 고지혈증 흰쥐 병태 모델에 미치는 영향 - HMG-CoA reductase 저해 활성과 DPPH 산화 억제 활성이 있는 검체 황금, 적작약, 목단피, 당귀, 죽여, 산사 및 계지의 7종을 선정하여 草間寬 등¹⁶⁾의 방법에 따라 Triton WR-1339 투여로 유발된 고지혈증 흰쥐에서의 항고지혈증 작용을 검토하였다. 즉, 흰쥐 1군을 6마리로 하여 16시간 절식시킨 후 Triton WR-1339 200 mg/kg를 꼬리 정맥에 주사하여 고지혈증을 유발 시켰고, 검액 황금, 적작약, 목단피 및 당귀는 각각 4.0 g/kg/day, 죽여 및 계지는 2.0 g/kg/day로 하루 1회 3일간 경구투여하였으며 최종투여가 Triton WR-1339 투여 1시간 전이 되도록 하였다. 대조군에는 검체 대신 생리식염수만을 경구투여하였으며, 정상군에는 Triton WR-1339 대신 saline을 정맥주사하였다. 양성대조약물로는 lovastatin 100 mg/kg를 사용하여 비교관찰하였다. 체혈한 혈액을 4,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 혈청을 분리한다. 이 혈청을 이용하여 혈청 지질성분 triglyceride(이하 TG), total cholesterol(이하 TC), phospholipid(이하 PL), HDL-cholesterol, LDL-cholesterol 함량 및 transaminase 효소활성(이하 ALT, AST)을 아래의 방법에 따라 측정하였다.

혈청 지질성분의 측정 - 혈청 중 TC 함량 측정은 Allain 등의 효소법²²⁾, 혈청 중 TG 함량 측정은 Saldesai 등의 효소법²³⁾에 준하여 측정하였다. 또한 혈청 중 PL 함량 측정은 효소법²⁴⁾을, ALT와 AST 효소활성도의 측정은 Reitman & Frankel의 방법²⁵⁾에 따라 측정하였다. 그리고, 혈청 중 HDL-cholesterol 함량은 Lopes의 효소법²⁶⁾, LDL-cholesterol 함량은 Mainard 등의 효소법²⁷⁾에 준하여 측정하였다.

통계학적 분석 - 모든 실험결과는 평균±표준편차로 나타내었으며, 자료분석은 Student's t-test를 이용하여 p<0.05 수준에서 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

*In vitro*에서 cholesterol 생합성 저해 효과와

DPPH 항산화 효과 - 한약 중에서 고지혈증 치료의 효과가 있는 약제를 screening하기 위하여 cholesterol 생합성에 관여하는 효소인 HMG-CoA reductase 저해활성과 비교적 안정한 free radical인 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)의 항산화활성을 지표로 하였다. 생체 내 혈청 중 cholesterol 함량에 영향을 주는 HMG-CoA reductase 저해활성만으로 시료의 항고지혈증 활성을 평가하는 데에는 어려움이 많을 것으로 추정된다. 즉, 한 가지 한약 중에도 수많은 성분이 함유되어 있고, 이들 성분의 조합에 의하여 다양한 활성을 보임에 따라 false positive effect 또는 false negative effect를 나타낼 우려가 항상 존재하기 때문이다. 따라서, 이러한 점을 다소 보완하기 위하여 동맥경화증 등 고지혈증의 병변 발생과 밀접히 관련이 있는 free radical의 소거활성을 또 다른 지표로 하여 복합적으로 평가하고자 하였다.

Cholesterol은 세포막 구성성분으로 생체내 각 조직에 존재하고 steroid hormone이나 담즙산의 전구체로 생체의 기능유지에 대단히 중요한 역할을 담당하고 있다. 체내의 cholesterol 대부분은 생체 내에서 생합성되어진 내인성에 기인하고, 食餌에서 섭취된 외인성의 cholesterol이 생체 구성 cholesterol 중에 접하는 비율은 적다. 신체 대부분의 조직은 cholesterol 생합성을 할 수 있으며 그 중에서도 간장에서 주로 일어나며, 그 생합성은 acyl CoA를 기점으로 20여종의 효소반응경로를 통하여 이루어진다.²⁸⁾ 일련의 반응계 중에서 율속단계가 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A(HMG-CoA)를 mevalonic acid으로 환원하는 HMG-CoA reductase의 반응단계이다. HMG-CoA reductase는 세포 내의 microsome에 국재하고 이 효소를 저해하는 약물은 간장에서 HMG-CoA reductase를 길항저해하여 cholesterol 합성을 저하시켜 간세포 내의 cholesterol pool을 감소시켜 결과적으로 LDL receptor의 합성이나 활성이 높아짐으로써 LDL receptor를 매개로 하여 혈류 중의 LDL-cholesterol 유입이 촉진되어 혈청 cholesterol은 저하한다.²⁹⁾ 따라서, HMG-CoA reductase 저해제는 이미 세계 여러 나라에서 개발되어 LDL-cholesterol level을 강하시키기 위한 약물로 가장 많이 사용되고 있으며, 이들 약물을 사용함으로써 관상동맥경화의 진행을 늦출 수 있다는 것이 알려져 있고^{8,30)} 또한 관상동맥질환으로 인한 사망률도 감소시켰다는 보고가 있다.³¹⁾ 뿐만 아니라 HMG-CoA 저해제는 심근경색의 발병률, 심혈관 사망률 및 과거 심근경색의 병력이 없는 중등도의

고cholesterol혈증을 가진 환자에서의 총 사망률도 감소시키는 것으로 알려져 있다.

따라서, 한약의 항고지혈증 활성을 *in vitro*에서 평가하고자 생체의 cholesterol합성에 관여하는 HMG-CoA reductase를 흰쥐 간의 microsome에서 분리하여 그 저해활성을 평가하였다. 대부분의 cholesterol 생합성 효소들은 circadian rhythm을 통해 다양한 효소활성을 갖는다. 지금까지 보고된 여러 연구에서 HMG-CoA reductase는 暗期가 시작된 후 6시간 후에 가장 높은 활성을 나타내고(PM12:00) cholesterol의 합성 속도 변화와도 깊은 positive effect를 가지고 있다고 알려져 있다.¹⁹⁾ 이에 흰쥐를 3주 이상 밤낮을 바꾸어 순응시킨 후 cholestyramine을 3일간 투여하여 HMG-CoA reductase 효소를 유도시켜 暗期가 지난 후 6시간에 간을 적출, 간의 microsome에서 HMG-CoA reductase 효소를 분리하여 그 저해활성을 평가하였다. 80% MeOH로 추출한 한약 추출물을 검체로 하여 *in vitro*에서 NADPH분해 속도를

측정하여 HMG-CoA reductase 저해정도를 검색한 바 황금, 후박, 행인, 황련, 적작약, 목단피, 당귀, 죽여, 계지, 산사 각 공히 0.2 mg/ml의 농도에서 강한 저해활성을 보여 주었다(Table II). 한편, 생명의 영위 과정에서 내적, 외적으로 생성되어진 각종 장해인자의 축적이 문제가 되고 있다. 이 중에서 free radical은 생체막을 공격하여 지질 radical 연쇄반응에 의하여 과산화지질을 축적시켜 각종 질환 즉 순환장애, 염증, 노화, 암, 동맥경화, 소화기질환, 내분비질환 등이 free radical이 존재하는 지질과산화반응과 밀접히 관련이 있는 것으로 알려져 있으며,³²⁾ 한방약물 중에는 이들 free radical에 대한 소거작용이나 생성억제효과가 있음을 보고되었다.³³⁾ 따라서, 시료 한약의 항산화 활성을 검토하기 위하여 비교적 안정한 free radical인 DPPH의 소거활성에 대한 영향을 검토하였다. 본 실험에서는 free radical인 DPPH에 의하여 발색되는 자색을 퇴색시키는 정도를 지표로 하여 측정된 바 황금, 황련, 적작약, 건강, 목단피, 당귀, 죽여, 계지, 산사 각 공히 0.1 mg/ml의 농도에서 강한 free radical 소거활성이 인정되었다(Table II). 따라서, HMG-CoA reductase 저해활성과 DPPH의 산화억제효과를 종합하여 두 종류의 활성평가에서 양호한 결과를 보인 황금, 황련, 적작약, 목단피, 당귀, 죽여, 계지, 산사 등의 농도를 변화시켜 실험한 결과를 Table III에 제시하였다. HMG-CoA reductase 저해활성의 IC₅₀를 계산한 바 당귀 6 µg/ml, 목단피 6 µg/ml, 계지 7 µg/ml, 황련 8 µg/ml에서 높은 저해활성이 인정되었으며 양성비교약물로 사용한 compactin은 3.9 µg/ml이었다.

Table II. Inhibitory effect of various herbal medicines on HMG-CoA reductase and DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) oxidation *in vitro*

Herbal medicines	Inhibition(%)	
	HMG-CoA reductase ^{a)}	DPPH ^{b)}
Trichosanthis Fructus	-	+
Scutellariae Radix	+++	+++
Magnoliae Cortex	+++	++
Atractylodis Rhizoma Alba	+	+
Trichosanthis Radix	-	+
Platycodi Radix	+	+
Acori Graminei Rhizoma	-	+
Armeniacae Amarum Semen	+++	+
Coptidis Rhizoma	+++	+++
Astragali Radix	+	+
Lumbricus	-	+
Polygali Radix	-	++
Paeoniae Radix Rubra	+++	+++
Zingiberis Rhizoma	+	+++
Moutan Cortex Radicis	+++	+++
Angelicae Gigantis Radix	+++	+++
Bambusae Caulis in Taeniam	+++	+++
Ginseng Radix	+	-
Bupleuri Radix	-	+
Cinnamomi Ramulus	+++	+++
Hoelen	-	+
Crataegi Fructus	+++	+++
Benzoinum	-	+
Bambusae Concretio Silicea	+	+

^{a)} : Final concentration of each sample is 200 µg/ml. ^{b)} Final concentration of each sample is 100 µg/ml.
 +++: more then 70% inhibition, ++ : 40~70% inhibition, + : less then 40% inhibition, - : Inhibition not detected in each sample concentration.

Table III. Inhibitory effect of some herbal medicines on HMG-CoA reductase and DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) oxidation dose-dependently *in vitro*

Herbal medicines	Inhibitory effect(IC ₅₀ /µgml)	
	HMG-CoA reductase	DPPH oxidation
Scutellariae Radix	25	19
Coptidis Rhizoma	7	44
Paeoniae Radix Rubra	51	22
Moutan Cortex Radicis	6	3
Angelicae Gigantis Radix	6	30
Bambusae Caulis in Taeniam	8	42
Cinnamomi Ramulus	7	5
Crataegi Fructus	1	50
Positive control	Compactin : Sodium ascorbate :	
	3.9	5

그리고, 죽여, 산사, 황금, 적작약 등의 순서로 저해활성을 보여 주었다. 또한, DPPH에 대한 항산화활성을 보인 시료의 IC₅₀은 목단피 3 µg/ml, 계지 5 µg/ml으로 강한 항산화효과가 인정되었고, 이어서, 황금, 적작약, 당귀, 죽여, 산사 등의 순서로 항산화활성을 보여 주었으며 양성비교약물로 사용한 sodium ascorbate는 5 µg/ml이었다. 이상의 실험결과를 종합하여 보면 HMG-CoA reductase 저해활성 및 DPPH에 대한 항산화효과 모두 강한 활성을 나타낸 산사, 적작약, 당귀, 목단피, 황금, 죽여, 계지의 7종을 *in vivo*에서 고지혈증 병태모델에 대한 항고지혈증효과를 검토하기 위한 시료로 선정하였다.

Triton WR-1339 유발 고지혈증 흰쥐에서 항고지혈 효과 - 실험적 고지혈증 병태 모델 중 내인성 고지혈증의 모델로서 Triton WR-1339 또는 이외의 Tween 80 과 같은 계면활성제를 투여하여 혈중의 cholesterol과 triglyceride를 상승시키며, 이는 cholesterol 합성에 관여하는 효소에 영향을 미치며 triglyceride의 배설을 억제하여 실험적 고지혈증 병태모델이 유발되는 것으로 보고되어 있다.^{16,34,35} Triton WR-1339 처치로 유발된 병태모델 흰쥐에 *in vitro* 실험에서 활성을 보인 황금, 적작약, 목단피, 당귀, 죽여, 산사, 계지 7종 한약의 메탄올 추출물을 각각 경구 투여하여 혈청 중 total cholesterol (TC), high density lipoprotein cholesterol (HDL-cholesterol), low density lipoprotein cholesterol (LDL-cholesterol), triglyceride (TG), phospholipid (PL) 함량 및 transaminase (AST & ALT) 효소활성을 지표로 하였다.

검액의 투여용량 설정은 각 생약의 메탄올 추출물

과 실험동물의 감수성 등을 고려하여 인체 적용량을 기준을 바탕으로 하여 예비실험을 행한 결과 황금, 적작약, 목단피, 당귀, 산사는 메탄올 추출물은 각각 체중 kg 당 4.0 g, 계지 및 죽여는 추출물이 매우 낮아 각각 체중 kg당 2.0 g을 경구 투여하였다. 우선 혈청 중 TC 함량은 흰쥐에 Triton WR-1339 처치 대조군은 259.0±20.3 mg/dl로 비처치 정상군 67.5±7.7 mg/dl에 비하여 유의한 상승을 나타내었다. 검액 처치군 중에서 황금, 죽여, 계지 처치군에서 각각 180.1±31.8 mg/dl, 229.7±16.7 mg/dl 및 170.5±17.1 mg/dl로 대조군에 비하여 각각 p<0.05, p<0.01 및 p<0.001의 유의한 상승억제효과를 나타내었고 그 이외의 검액 처치군에서는 별다른 영향을 주지 못하였다 (Table IV). Lipoprotein의 일종인 LDL-cholesterol 함량은 흰쥐에 Triton WR-1339 처치 대조군은 62.8±11.8 mg/dl로 비처치 정상군 14.9±1.5 mg/dl에 비하여 유의한 상승을 나타내었다. 검액 처치군 중에서 황금 처치군에서 43.4±3.8 mg/dl으로 대조군에 비하여 p<0.01의 유의한 상승억제효과를 나타내었으며 그 이외의 검액 처치군에서는 다소 억제시키는 경향만을 관찰할 수 있었다(Table IV). 그리고, HDL-cholesterol에 대해서는 별다른 변화를 관찰할 수 없었다. 한편 혈청 중 TG 함량에 대해서는 흰쥐에 Triton WR-1339 처치 대조군은 946.4±43.5 mg/dl로 비처치 정상군 81.9±10.9 mg/dl에 비하여 유의한 상승을 나타내었다. 검액 처치군 중에서 황금, 당귀, 죽여 및 계지 처치군에서 각각 670.0±76.7 mg/dl, 640.2±82.9 mg/dl, 623.8±125.5 mg/dl 및 263.7±81.6 mg/dl로 대조군에 비하여 각각 p<0.01, p<0.001, p<

Table IV. Effect of some herbal medicines on serum total cholesterol, HDL-cholesterol and LDL-cholesterol levels in Triton WR-1339 induced hyperlipidemic rats

Group	Dose (g/kg/day, p.o.)	Serum levels(mg/dl)		
		TC	HDL	LDL
Normal	-	67.5 ± 7.7	16.8±2.2	14.9± 1.5
Control	-	259.0 ± 20.3 ^{###}	28.3±3.9	62.8±11.8 ^{###}
Scutellariae Raidix	4.0	180.1 ± 31.8*	27.5±7.5	43.4± 3.8 ^{**}
Paeoniae Radix Rubra	4.0	270.4 ± 18.5	28.5±3.3	57.7±14.2
Moutan Cortex Radicis	4.0	242.2 ± 23.7	28.9±5.7	49.1± 7.7
Angelicae Gigantis Radix	4.0	258.8 ± 21.3	38.2±5.0	50.7±15.3
Bambusae Caulis in Taeniam	2.0	229.7 ± 16.7 ^{**}	26.5±7.2	50.7± 3.1
Crataegi Fructus	4.0	265.3 ± 14.5 ^{###}	29.2±5.8	50.2± 4.5
Cinnamomi Ramulus	2.0	170.51 ± 7.1 ^{###}	43.2±6.5	60.2± 4.9
Lowastatin	0.1	220.0 ± 21.9 ^{**}	35.6±6.4	45.9± 9.1

Values are mean±standard deviation of 6 rats.

TC; Total cholesterol, HDL; High density lipoprotein cholesterol, LDL; Low density lipoprotein cholesterol

*; Significantly different from the normal value(###: p<0.001)

; Significantly different from the control value(: p<0.05, **: p<0.01 and ***: p<0.001)

0.01 및 $p < 0.001$ 의 유의한 상승억제효과를 나타내었고 그 이외의 검액 처치군에서는 별다른 영향을 주지 못하였다(Table V). 그리고, 혈청 중 PL 함량에 대해서는 흰쥐에 Triton WR-1339 처치 대조군은 257.5 ± 20.0 mg/dl로 비치치 정상군 76.1 ± 8.1 mg/dl에 비하여 유의한 상승을 나타내었다. 검액 처치군 중에서 당귀 및 계지 처치군에서 각각 211.6 ± 30.7 mg/dl 및 149.0 ± 31.0 mg/dl로 대조군에 비하여 각각 $p < 0.01$ 및 $p < 0.001$ 의 유의한 상승억제효과를 나타내었고 그 이외의 검액 처치군에서는 별다른 영향을 주지 못하였다(Table V).

혈청 중 ALT 및 AST 효소활성에 대해서는 Triton WR-1339 처치 대조군은 Triton WR-1339 비치치 정상군에 비하여 유의하게 상승됨을 알 수 있었다. ALT 효소활성에 대하여 황금 및 계지 처치군에서 각각 343.4 ± 10.6 Karmen unit와 355.9 ± 24.7 Karmen unit로 Triton WR-1339 처치 대조군 289.0 ± 26.1

Karmen unit에 비하여 각각 $p < 0.01$ 과 $p < 0.05$ 의 유의성이 있는 상승억제효과가 인정되었다(Table VI). 그리고 AST 효소활성에 대하여 황금, 당귀, 산사 각각 처치군에서 745.5 ± 21.1 Karmen unit, 742.3 ± 37.9 Karmen unit 및 790.3 ± 38.7 Karmen unit로 Triton WR-1339 처치 대조군 841.6 ± 56.4 Karmen unit에 비하여 각각 $p < 0.01$ 의 유의한 상승억제효과가 인정되었다(Table VI).

따라서 이상의 실험결과에서 전반적인 혈청 중 TC, TG, LDL-cholesterol 및 PL 함량에 미치는 영향을 종합 평가한 바 Triton WR-1339 유발 실험적 고지혈증 병태모델 흰쥐에서 황금, 당귀, 죽여, 계지 투여군이 양호한 항고지혈증효과가 인정되었다.

결론

한방약물의 고지혈증 치료제 개발을 위한 *in vitro*

Table V. Effect of some herbal medicines on serum triglyceride and phospholipid levels in Triton WR-1339 induced hyperlipidemic rats

Group	Dose (g/kg/day, p.o.)	Triglyceride levels(mg/dl)	Phospholipid levels(mg/dl)
Normal	-	81.9± 10.9	76.1 ± 8.1
Control	-	946.4± 43.5 ^{###}	257.5 ±20.0 ^{###}
Scutellariae Raidix	4.0	670.0± 76.7 ^{**}	220.0 ±23.5
Paeoniae Radix Rubra	4.0	832.1± 45.3	255.6 ±34.8
Moutan Cortex Radicis	4.0	845.3± 29.5	255.6 ±34.8
Angelicae Gigantis Radix	4.0	640.2± 82.9 ^{**}	211.6 ±30.7 ^{**}
Bambusae Caulis in Taeniam	2.0	623.8±125.5 ^{**}	232.4 ±27.8
Crataegi Fructus	4.0	871.7± 61.5	263.6 ±46.3
Cinnamomi Ramulus	2.0	263.7± 81.6 ^{**}	149.01±31.0 ^{**}
Lovastatin	0.1	783.0± 86.6 ^{**}	263.62±43.5

Values are mean±standard deviation of 6 rats.

[#]; Significantly different from the normal value(^{###}: $p < 0.001$)

^{*}; Significantly different from the control value(^{**}: $p < 0.01$ and ^{***}: $p < 0.001$)

Table VI. Effect of some herbal medicines on serum transaminase activities in Triton WR-1339 induced hyperlipidemic rats

Group	Dose (g/kg/day, p.o.)	ALT activities (Karmen unit)	AST activities (Karmen unit)
Normal	-	368.7±43.6	780.4±60.5
Control	-	389.0±26.1 [#]	841.6±56.4 [#]
Scutellariae Raidix	4.0	343.4±10.6 ^{**}	745.5±21.1 ^{**}
Paeoniae Radix Rubra	4.0	435.9±47.2	842.3±51.4
Moutan Cortex Radicis	4.0	416.1±30.9	830.4±54.6 ^{**}
Angelicae Gigantis Radix	4.0	353.8±36.3	742.3±37.9 ^{**}
Bambusae Caulis in Taeniam	2.0	369.3±25.6	750.6±69.1 ^{**}
Crataegi Fructus	4.0	435.0±51.5	790.3±38.7 ^{**}
Cinnamomi Ramulus	2.0	355.9±24.7 [*]	789.1±60.1
Lovastatin	0.1	408.7±49.8	877.7±61.8

Values are mean±standard deviation of 6 rats.

ALT; Alanine aminotransferase activities, AST; Asparate aminotransferase activities

[#]; Significantly different from the normal value([#]: $p < 0.05$)

^{*}; Significantly different from the control value(^{*}: $p < 0.05$ and ^{**}: $p < 0.01$)

screening 방법으로 HMG-CoA reductase 저해효과와 병행하여 free radical DPPH의 항산화활성을 종합 평가하는 screening 방법을 채택하여 한방에서 고지혈증 치료에 이용되고 있는 길경 등 24종 한약의 활성을 검색하였다. 그 결과 황금, 적작약, 목단피, 당귀, 죽여, 산사, 계지의 7종 한약에서 강한 활성이 인정되었다. 이어서, *in vitro*에서 활성을 보인 시료를 *in vivo*에서 항고지혈증 효과를 검토하고자 고지혈증 병태모델로 계면활성제 Triton WR-1339를 사용하여 유발된 실험적 고지혈증 병태모델을 이용하여 검토한 결과 황금, 당귀, 죽여, 계지 처치군에서 유의한 항고지혈증 효과가 인정되었다.

이상과 실험결과를 바탕으로 강한 항고지혈증 활성을 보인 한약으로부터 그 효능이 인정된 특정 엑스분획을 대상으로 유효성분의 분석과 기존처방에 사용되는 한약의 비율에 따른 활성의 변화를 검토하고자 하며, 또한 방제학적 측면에서 한방약물을 조합하여 새로운 제형을 개발하고 한다.

사 사

본 연구는 한국한의학회에서 시행하는 1998년도 한방치료기술 개발연구지원사업의 연구비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

- Goldstein, J. L., Schrott, H. G., Hazzard, W. R., Bierman E. L. and Motuisky, A. G. (1973) Hyperlipidemia in coronary disease. *J. Clin. Invest.* 52: 1544-1568
- Marek, Z., Jaegerman, K. and Ciba, T (1962) Atherosclerosis and level of serum cholesterol in post-mortem investigation. *Am. Heart J.* 63: 768-774
- 小澤 光 (1984) 新藥開發のための藥效スクリーニング法 (I), 83-111. 東京, 丸 善.
- La Rosa, J. C., Hunninghake, D., Buch, D., Criqui, M. H., Getz, G. S. and Gotto, A. M. Jr. (1990) The cholesterol facts. A summary of the evidence relating dietary fats, serum cholesterol, and coronary heart disease. A joint statement by the American Heart Association and the National Heart, Lung and Blood Institute. The Task Force on Cholesterol Issues, American Heart Association. *Circulation* 81: 1721-1733
- Summary of the second report of the National Cholesterol Education Program (NECP) (1993) Expert panel on detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults(Adult Treatment Panel II). *JAMA* 269: 3015-3023
- Blankenhorn, D. H., Azen, S. P., Krams, D. M., Mack, W. J., Cashin-Hemphill, L. and Hodis, H. N. (1993) Coronary angiographic changes with lovastatin therapy. The Monitored Atherosclerosis Regression Study(MARS). *Ann. Intern. Med.* 119: 969-976
- Hodis, H. N., Mack, W. J., LaBree, L. and Selzer R. H. (1996) Reduction in carotid arterial wall thickness using lovastatin and dietary therapy. *Ann. Intern. Med.* 124: 548-556
- Jukema, J. W., Bruschke, A., van Boven, A., Reiber, J., Bal, E. T., Zwiherman, A. H., Jansen, H., Boerma, G., van Rappard, F. M. and Lie, K. I. (1995) Effect of lipid lowering by pravastatin on progression and regression of coronary artery disease in symptomatic men with normal to moderately elevated serum cholesterol levels. *Circulation* 91: 2528-2540
- Furberg, C. D., Adams, H. P., Applegate, W. B. and Byington, R. P. (1994) Effect of lovastatin on early carotid atherosclerosis and cardiovascular events. *Circulation* 90: 1679-1687
- 山本 章 (1998) 日本人における高脂血症の疫學. 内科 81(2): 237-242
- 門脇 孝 (1998) 高脂血症はなぜ治療しなければならぬか -リスクファクターとしての意義. 内科 81(2): 204-211
- 이상인, 박선동 공편저 (1998) 한방임상처방학. 361-384. 도서출판 영림사, 서울
- 전국한의과대학 심계내과학교실 편 (1995) 동의심계내과학. 437-463. 서원당, 서울
- Anitschkow, N. D. (1913) ber die ver nderungen der kaninchenaorta bei experimenteller cholesterinestase. *Beitr. Pathol. Anat.* 56: 379-404
- Albrink, M. J. and Man, E. B. (1959) Serum triglyceride in coronary artery disease archives of internal medicine. *Arch. Intern. Med.* 103: 4-8
- 草 間寛, 西山雅彦, 池田 滋 (1988) 抗高脂血症劑 bezafibrate의藥理學的研究. 日藥理誌 92: 175-180
- 윤혜숙, 장일무 편저 (1993) 전통약물로부터 신약개발 연구법(강삼식, 김영호, 김진웅, 노동석, 정열익, 성충기, 손건호, 정지형, 최재수 : 표준엑스와 표준분획 제조법), 9-15. 서울대학교 천연물과학연구소 발행, 서울
- Edwards, P. A., Lemongello, D. and Fogelman, A. M. (1979) Improved methods for the solubilization

- and assay of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J. Lipid Res.* 20: 40-46
- 19) Edwards, P. A. and Gould, R. G. (1972) Turnover rate of hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase as determined by use of cycloheximide. *The Journal of Biological Chemistry* 247 (5): 1520-1524
 - 20) Edwards, P. A., Lemongello, D and Kane, J. (1980) Properties of purified rat hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and regulation of enzyme activity. *The Journal of Biological Chemistry* 255(8): 3715-3725
 - 21) Blois, M. S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200
 - 22) Allain, C. C., Poon, L. S., Chan, C. S. G., Richmond, W. and Fu, P. C. (1974) Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* 20: 470-475
 - 23) Sardesai, V. M. and Mannig J. A. (1968) The determination of triglycerides in plasma and tissues. *Clin. Chem.* 14: 156-158
 - 24) 金井泉 (1983) 臨床検査法提要 改正 29版. 487-495. 南山堂, 東京
 - 25) Reitman, S. and Frankel, S. (1957) A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic acid and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin. Pathol.* 28: 56-63
 - 26) Lopes-Virella, M. F. (1982) Cholesterol determination in high density lipoproteins separated by three different methods. *Clin. Chem.* 23: 882-884
 - 27) Mainard, F. and Madec, Y. (1986) Cholesterol, phospholipid and apo B composition of LDL; Comparison of precipitation and ultracentrifugation methods. *Ann. Biol. Clin.* 44: 618-623
 - 28) Goldstein, J. L. and Brown, M. S. (1990) Regulation of the mevalonate pathway. *Nature* 343: 425-430
 - 29) 大荷満生, 秦 哉 (1998) HMG-CoA 還元酵素阻害薬. 内科 81(2): 283-287
 - 30) The multicenter anti-atheroma study(MAAS) investigator (1994) Effect of simvastatin on coronary atheroma. *Lancet* 344: 633-638
 - 31) Scandianavian Simvastatin Survival Study Group (1994) Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease. *Lancet* 344: 1383-1389
 - 32) 吉川政己 (1977) 老化と過酸化脂質. 過酸化脂質研究 1: 16-17
 - 33) Egashira, T., Wada, Y., Takayama, F., Kudo, Y., Kono, T., Goto, S. and Yamanaka, Y. (1992) Effects of Gomisshi and Shosaiko-to on lipid peroxidation of rat brain. *Folia Pharmacol. Japan* 100: 345-351
 - 34) Moriura, T., Matsuda, H. and Kubo, M. (1995) Pharmacological study on *Agkistrodon blomhoffii* Blie. IV. Effect of 50% ethanolic extract on experimental hyperlipidemia. *Natural Medicine* 49: 204-207
 - 35) 津田恭介, 野 上壽 (1971) 薬效の評価(1), 483-500. 地人書館, 東京

(1999년 10월 4일 접수)