

한방약물로부터 항고지혈증 치료약물개발(3)
- *In vitro*에서 가미과루해백황금탕 및 구성약물의 항고지혈증 활성 -

정은아 · 김남재* · 김윤경² · 김동현¹ · 이상인²

경희대학교 동서의학연구소, ¹약학대학, ²한의과대학

Studies on the Development of Antihyperlipidemic Drugs
from Oriental Herbal Medicines (III)
- Antihyperlipidemic Effects of Gamigwaruhaebaekwhanggum-
Tang and Its Constituent Herbal Medicines *in vitro* -

Eun-Ah Jung, Nam-Jae Kim*, Yun-Kyung Kim², Dong-Hyun Kim¹ and Sang-In Lee²

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

²College of Oriental Medicine, Kyung-Hee University, Seoul 130-701, Korea

Abstract - 80% extract of Gamigwaruhaebaekbaekju-Tang (GGHBT), Gagamwaruhaebaekbaekju-Tang (GGGHT) and Gamigwaruhaebaekwhanggum-Tang (GGHWT) remarkably showed inhibitory effects on HMG-CoA reductase, lipid peroxidation of rat liver and LDL oxidation, and DPPH free radical scavenging effect in a dose-dependent manner. Especially, GGHWT which is formulated with *Trichosanthis Fructus*, *Pinelliae Tuber*, *Aurantii Immaturus Fructus*, *Magnoliae Cortex*, *Allii Macrostemii Bulbus*, *Cinnamomi Ramulus* and *Scutellariae Radix* on the basis of Gwaruhaebaekbaekju-Tang listed on the traditional medicinal references showed more effective hypocholesterolemic activities *in vitro* bioassay than the other prescriptions.

Key words - Gamigwaruhaebaekwhanggum-Tang, HMG-CoA reductase, lipid peroxidation, LDL oxidation, antioxidant, hypocholesterolemic effect, DPPH free radical.

Cholesterol은 동맥경화증 등 허혈성 심장질환과 뇌혈관 질환 등을 유발하는 고지혈증의 주요한 인자이며, 그 중에서 LDL-cholesterol이 심혈관 질환 발생의 주요 위험인자 중의 하나라는 것이 밝혀졌다.^{1,2)} 또한, 식이요법이나 약물요법에 의하여 혈중 LDL-cholesterol 함량을 낮추게 함으로써 심혈관질환으로 이환될 위험도를 저하시킬 뿐만 아니라 동맥경화증의 예방이나 치료를 가능하게 할 수 있음을 보고하고 있다.³⁻⁶⁾

이에 한방처방으로부터 새로운 고지혈증 한방치료 약물을 개발하기 위한 연구의 일환으로 김 등^{7,8)}은 한의학적 측면에서 고지혈증과 관련이 있는 질환에 이

용되고 있는 한약재 또는 처방을 구성하고 있는 한약재 등을 선별하여 *in vitro*에서 HMG-CoA reductase 저해활성, DPPH free radical scavenger 효과와 *in vivo*에서 Triton WR-1339 유발 고지혈증 흰쥐, corn oil 처치에 의하여 유발된 고지혈증 흰쥐 및 고cholesterol 식이 처치에 의한 고지혈증 생쥐에 대한 항고지혈증 효과를 보고한 바 있다. 한편, 한의학적으로 고지혈증으로 인한 관상동맥경화와 이로 인해 유발되는 협심증은 흉비(胸痺)에 해당되며 이러한 질환의 치료약물로 금계요략(金匱要略)에 과루해백백주탕, 과루해백반하탕, 지실해백계지탕 등이 수록되어 있어 오랜 동안 임상에 활용되고 있다.⁹⁻¹²⁾

*교신저자 : Fax : 02-966-2801

따라서, 보다 우수한 고지혈증 한방치료약물 개발을 위한 방제를 구성하기 위하여 임상뿐만 아니라 한의학 고전에 기록되어 있는 방제를 기본으로 하여 이를 토대로 수종의 한약을 가미하거나 가감하여 새로운 방제를 구성하고자 한다. 그러기 위해서는 현대적 기술을 접목시켜 보다 과학적이고 합리적이며 보편타당성을 지닌 새로운 방제를 구성하기 위하여 기초 약물학적 측면에서 그 효능을 구명하여야 한다. 우선 *in vitro* 및 *in vivo*에서 양호한 항고지혈증 효과를 지닌 각종 한약이나 방제를 한의학적 이론에 바탕을 두거나 혹은 무작위로 새로운 방제를 구성하고 이를 기초 약물학적으로 평가함으로써 보다 효율적인 새로운 방제를 개발할 수 있을 것으로 생각된다.

이에 저자 등은 과루해백백주탕, 과루해백반하탕 및 지실해백계지탕을 기본방제로 하여 전보^{7,8)}에서 우수한 항고지혈증효과를 지닌 한약재를 가미한 방제를 구성하고 이를 *in vitro*에서 HMG-CoA reductase 저해활성, DPPH free radical scavenger 효과, 지질과산화 형성억제효과 및 LDL 항산화효과 등을 지표로 하여 활성을 평가한 바 유효한 방제로 가미과루해백황금탕을 선정하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에서 사용한 재료 과루실(Trichosanthis Fructus), 반하(Pinelliae Tuber), 지실(Aurantii Immaturus Fructus), 후박(Magnoliae Cortex), 계지(Cinnamomi Ramulus), 해백(Allii Macrostemi Bulbus), 황금(Scutellariae Radix), 산사(Crataegi Fructus), 현호색(Corydalis Tuber), 죽여(Bambusae Caulis in Taeniam)는 전보^{7,8)}와 동일한 것을 사용하였고 voucher specimen은 본 연구소에 보관하고 있다.

시료의 조제 - 시료의 조제는 전보^{7,8)}와 동일한 방법에 따라 80% 에탄올로 추출하여 동결건조한 것을 사용하였으며, 유기용매를 이용한 활성의 분획은 상법에 따라 80% 에탄올 추출물 100 g에 증류수를 20배 이상 가하여 현탁시킨 후 분액여두에 옮기고 상법에 따라 CH₂Cl₂, *n*-BuOH의 순차적으로 분획추출하여 각각의 분획물을 감압농축하여 사용하였으며 추출물을 Table 1에 나타내었다. 그리고, 본 실험에서 사용할 각 처방의 구성 및 조합은 개개 한약재의 80% 에탄올 추출물을 고려하여 조합하였으며, 과루해백백주탕, 과루해백반하탕, 지실해백계지탕은 금궤요략에 기재된

처방내용에 준하였으며¹⁰⁾ 가감 처방구성은 다음과 같다. 우선 과루해백백주탕, 과루해백반하탕 및 지실해백계지탕을 합한 가미과루해백백주탕(이하 STP-I)은 과루실 12 g, 해백 9 g, 반하 12 g, 지실 12 g, 후박 12 g, 계지 6 g, 그리고, 여기에 과루실, 지실 및 계지를 배로 증량한 가감과루해백백주탕(이하 STP-II)는 과루실 24 g, 해백 9 g, 반하 12 g, 지실 24 g, 후박 12 g, 계지 12 g로 구성하도록 하였다. 또한 가감과루해백백주탕(STP-II)에 비교적 HMG-CoA reductase 저해활성이 우수한 황금을 가한 가미과루해백황금탕(이하 STP-III)은 과루실 24 g, 해백 9 g, 반하 12 g, 지실 24 g, 후박 12 g, 계지 12 g, 황금 6 g의 조합으로 구성하였다. 그리고, 가미과루해백백주탕을 비롯한 기본 처방에 산사자, 죽여, 현호색 등을 조합하여 각각 시료로 사용하였다.

시약 및 기구 - 시약으로 LDL cholesterol, TBA (Thiobarbituric acid) 및 PBS(phosphate buffered saline)는 Sigma사(미국) 제품을, Lovastatin(메바코[®]정)는 중외제약(주) 제품을 사용하였으며 그 이외의 시약 및 기구는 전보^{7,8)}와 동일한 것을 사용하였다.

실험동물 - 실험동물로는 중앙동물로부터 분양받은 Sprague-Dawley계 체중 250 g 전후 웅성 흰쥐를 실험실 환경에 1주 이상 순응시킨 후 사용하였다. 사료로는 삼양유지사료(주)의 고형사료를 이용하였으며 물을 자유롭게 섭취할 수 있도록 하였고, 실험은 특별히 명시하지 않는 한 24±2°C에서 실시하였다.

***In vitro* 에서 cholesterol 생합성 저해활성의 검색** - HMG-CoA reductase에 대한 저해제의 검색은 Edwards 등의 방법¹³⁻¹⁵⁾을 이용하여 효소저해활성을 측정하였다.

DPPH 항산화 활성검색 - 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl(DPPH)을 이용한 Blois의 방법¹⁶⁾을 이용하여 항산화활성을 측정하였다.

과산화지질 형성 저해 활성 실험 - 흰쥐를 ether로 마취한 후 복부를 절개하여 간문맥에 polyethylene tube를 삽입하였다. 4°C 0.9% NaCl 용액으로 간을 세척한 후 간을 적출하여 간(습중량)과 1.15% KCl의 비가 1:9의 비율로 세척하고 다시 5배의 0.05 mM EDTA를 함유한 0.05 M phosphate buffer(pH 7.4)를 넣고 homogenation하였다. 항산화효과는 Yokozawa 등의 방법¹⁷⁾을 이용하여 thiobarbituric acid(TBA)-reactive substance법에 따라 실시하였다. 즉 phosphate 완충액(50 mM, pH 7.4) 0.5 ml와 30 mM H₂O₂ 0.3

ml, 3.3 mM F_2SO_4 0.3 ml를 각각 시험관에 옮기고 간 homogenate 0.5 ml를 가하여 잘 혼합하고 각 농도의 검체 0.1 ml씩을 가하여 잘 혼합하였다. 뚜껑을 막고 37°C에서 20분간 incubation시키고 반응정지액으로 Thiobarbituric acid (TBA)/trichloroacetic acid(TCA)/HCl(0.375% TBA, 15% TCA, 0.25 N HCl) 4.0 ml를 가하여 반응을 정지시켰다. 냉수중에서 10분간 병냉시키고 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 535 nm에서 흡광도를 측정하여 항산화효과를 산출하였다.

Low density lipoprotein(LDL) 항산화 작용 – Osamah등 및 Esterbauer등의 방법^{18,19)}에 따라 LDL cholesterol 100 μ g/ml와 가미과루해백황금탕 시료를 0.04 mg/ml 및 0.4 mg/ml 가하여 25°C에서 1시간 동안 preincubation 시킨 후, pro-oxidant로 20 μ mol/L copper sulphate를 가하고 phosphate buffer(pH7.4)를 가하여 1 ml로 한 다음 234 nm에서 10분 간격으로 300분 동안 경시적으로 흡광도를 측정하여 LDL의 항산화효과를 측정하였다. 대조군에는 시료대신 phosphate buffer를 가하고 양성비교약물로서는 시료대신 lovastatin 20 μ M를 가하여 비교관찰하였다. 또한 300분에서 LDL 산화에 의하여 생성된 지질과산화물량을 malondialdehyde의 량으로 하여 Buege등의 방법²⁰⁾에 따라 측정하였다. 즉, 1 ml의 과산화물(LDL oxidation)에 TBA시약(0.375% TBA/15%TCA/0.25 N HCl) 1 ml을 넣고 섞은 후 끓는 물에서 15분 가열하고, 얼음 상에서 식힌 후 1000 g에서 20분간 원심분리하여 pellet를 제거하고 535 nm에서 흡광도를 측정하여 비교관찰하였다.

그리고 LDL이 산화에 대한 resistance를 나타내는 lag phase는 Raal 등의 방법²¹⁾에 따라 pro-pagation phase 동안에 가장 기울기가 심한 부분과 횡축과의 교점으로 하였다.

결과 및 고찰

HMG-CoA reductase 저해효과 – 한약재 및 한약재로 구성되어 있는 방제의 항고지혈증 활성을 *in vitro*에서 측정하기 위하여, 흰쥐간의 microsomes에서 cholesterol 합성에 관여하는 HMG-CoA reductase를 분리하여 그 저해활성을 평가하였다.

우선 한방문헌¹⁰⁻¹²⁾에 홍통 등 순환기계(cardiovascular system) 질환에 이용하여 왔던 대표적 방제인 과루해백백주탕을 비롯한 과루해백반하탕 및 지실해백계지탕 등을 구성하고 있는 과루실, 해백, 반하, 지실, 후박, 계지 등 6종과 전보^{7,8)}의 실험결과에서 양호한 항고지혈증 효과를 보인 현호색, 죽여, 산사, 황금 등 10여종의 한약재를 시료로 하였다.

각 시료의 80% 에탄올 엑스 및 각 시료의 유기용매 분획물의 HMG-CoA reductase 저해활성을 Table 2에 나타내었다. 우선 각 한약재의 80% 에탄올 엑스의 저해활성을 살펴보면 지실과 황금의 IC_{50} 은 1.0 mg/ml 이하에서 관찰되어 가장 양호한 저해활성이 인정되었다. 그 다음으로 과루실, 계지, 현호색, 죽여, 산사의 IC_{50} 은 대략 1.0~5.0 mg/ml이고, 반하는 7.0 mg/ml, 해백 17.0 mg/ml, 후박 28.7 mg/ml 순으로 HMG-CoA reductase 저해활성을 보여 주었다. 각각 시료를 CH_2Cl_2 , *n*-BuOH로 순차적으로 분획하여 얻은 각각의

Table 1. Extract and Solvent Fraction Yields of Various Herbal Medicine

Herbal Medicine	Extract Contents (%)			
	80%EtOH Extract	CH_2Cl_2 fraction	BuOH fraction	H_2O fraction
Trichosanthis Fructus	12.1	19.7	11.3	60.9
Pinelliae Tuber	3.4	24.0	4.4	65.7
Aurantii Immaturus Fructus	29.0	6.7	57.3	27.1
Magnoliae Cortex	35.6	80.7	4.9	12.3
Allii Macrostemi Bulbus	6.0	2.9	12.2	79.6
Cinnamomi Ramulus	3.4	22.4	27.1	40.9
Scutellariae Radix	34.2	11.1	15.3	69.2
Corydalis Tuber	7.8	14.2	8.4	75.0
Bambusae Caulis in Taeniam	5.9	31.8	41.5	22.3
Crataegi Fructus	65.8	4.8	23.5	61.4

Table 2. Inhibitory Effects of Some Herbal Medicines on HMG-CoA Reductase *in vitro*

Herbal Medicine	Inhibitory Effect of HMG-CoA Reductase (IC ₅₀ :mg/ml)			
	80%EtOH Extract	CH ₂ Cl ₂ fraction	BuOH fraction	H ₂ O fraction
Trichosanthis Fructus	3.228	2.226	1.769	7.299
Pinelliae Tuber	7.190	0.820	2.270	50.307
Aurantii Immaturus Fructus	0.614	0.093	0.801	2.422
Magnoliae Cortex	28.692	>10	3.873	0.521
Allii Macrostemii Bulbus	17.500	1.793	6.743	>10
Cinnamomi Ramulus	1.240	3.271	0.968	3.186
Scutellariae Radix	0.117	0.141	0.050	1.414
Corydalis Tuber	2.597	0.340	0.286	19.544
Bambusae Caulis in Taeniam	3.623	2.354	1.661	2.827
Crataegi Fructus	5.030	33.589	1.753	3.488
Compactin		0.004		

Each value represents the mean from 3 experiments

분획물의 HMG-CoA reductase 저해활성은 각 검체에 따라 차이는 있지만 후박을 제외하고는 CH₂Cl₂ 또는 BuOH 분획으로 이행되었다. CH₂Cl₂ 분획으로 이행된 시료는 반하, 지실, 해박이었고, BuOH 분획으로 이행된 시료는 과루실, 계지, 황금, 현호색, 죽여, 산사이었다. 또한, 각 분획물의 HMG-CoA reductase 저해활성을 IC₅₀으로 나타내면 황금의 BuOH 분획물 0.050 mg/ml, 지실 CH₂Cl₂ 분획물 0.093 mg/ml, 현호색 BuOH 분획물 0.286 mg/ml, 후박 불분획물 0.521 mg/ml로 다른 시료에 비하여 양호한 HMG-CoA reductase 저해활성을 보여 주었다.

그리고, 이들 한약재의 조합에 의한 항고지혈증 효과를 평가하기 위하여 전술한 시료의 제조방법에 따라 얻은 80% 에탄올 추출물을 이용하여 과루해박주탕, 과루해박반하탕 및 지실해박계지탕 및 이들 처방의 합방인 가미과루해박주탕의 조합을 만들었다. 가미과루해박주탕(STP-I)에 각 구성 약물을 증량하거나 죽여, 현호색, 산사, 황금 등을 가미한 처방을 작성하여 각 약물의 HMG-CoA reductase 저해활성을 지표로 각 조합 또는 처방의 효과를 검색한 결과를 Table 3에 제시하였다. 그 결과 과루해박주탕, 과루해박반하탕 및 지실해박계지탕 각각의 HMG-CoA reductase 저해효과의 IC₅₀는 각각 3.832 mg/ml, 4.892 mg/ml 및 2.224 mg/ml이었고 이들을 합친 가미과루해박주탕(STP-I)은 2.035 mg/ml로 가장 양호한 저해효과를 관찰할 수 있었다. 이어서 STP-I에 전보^{7,8)}에서 비교적 양호한 HMG-CoA reductase 저해

활성을 보인 지실, 과루실, 계지 등을 가미한 조합의 IC₅₀를 구한 바 지실을 가한 조합에서 가장 양호한 저해활성을 보여 주었다. 또한 지실, 과루실, 계지를 모두 증량한 조합 즉, 가감과루해박주탕(STP-II)에서는 더욱 HMG-CoA reductase 저해활성이 증가되었으며 IC₅₀는 1.305 mg/ml이었다. STP-II에 현호색, 죽여, 산사자 등을 가미하여 얻은 조합에서는 STP-II에 비하여 HMG-CoA reductase 저해활성을 증가시키지 못하였으나, 황금을 가미한 가미과루해박황금탕(STP-III)에서는 IC₅₀이 0.840 mg/ml로 STP-II에 비하여 약 36% 정도 증가된 저해활성을 나타내었다.

DPPH 항산화 효과 - Free radical로서 비교적 안정한 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)을 이용하여 80% 에탄올 엑스 및 에탄올 엑스의 CH₂Cl₂, *n*-BuOH 순차적 분획물의 free radical scavenger 효과를 평가하여 그 결과를 Table 4에 나타내었다. 우선 80% 에탄올 엑스의 항산화효과를 IC₅₀으로 나타내면 후박에서 0.008 mg/ml로 양성비교약물로 사용한 sodium ascorbate 0.005 mg/ml와 유사한 항산화효과가 관찰되었다. 이어서 계지, 황금, 죽여, 산사자는 0.014~0.058 mg/ml 정도이었고 과루실이 가장 높은 0.988 mg/ml의 IC₅₀를 보였다. 그리고, 각 80% 에탄올 엑스의 CH₂Cl₂, *n*-BuOH 순차적 분획에서의 DPPH 항산화활성은 황금에서는 CH₂Cl₂ 분획으로 항산화활성을 나타내는 물질이 이행되며, 나머지 검체에서는 *n*-BuOH 분획으로 이행됨을 알 수 있었다.

한편, HMG-CoA reductase 저해활성이 양호한 조

Table 3. Inhibitory Effects of Various Composition of *Gamigwaruhaebaekwhanggum-Tang* on HMG-CoA Reductase *in vitro*

Group		Composition of herbs	Dose(g)	IC ₅₀ (mg/ml)
GHT		TF+AB	12:9	3.832
GHBT		TF+AB+PT	12:9:12	4.892
JHGT		TF+AB+AF+MC+CR	12:9:12:12:6	2.224
STP-I	GHT+GHBT+JHGT	TF+AB+PT+AF+MC+CR	12:9:12:12:12:6	2.035
	STP-I+AF	TF+AB+PT+AF+MC+CR	12:9:12:24:12:6	1.849
	STP-I+TF	TF+AB+PT+AF+MC+CR	24:9:12:12:12:6	2.139
	STP-I+CR	TF+AB+PT+AF+MC+CR	12:9:12:12:12:12	2.287
STP-II	STP-I+(TF+AF+CR)	TF+AB+PT+AF+MC+CR	24:9:12:24:12:12	1.305
	STP-II+CT	TF+AB+PT+AF+MC+CR+CT	24:9:12:24:12:12:6	1.785
	STP-II+BC	TF+AB+PT+AF+MC+CR+BC	24:9:12:24:12:12:6	2.166
	STP-II+CF	TF+AB+PT+AF+MC+CR+CF	24:9:12:24:12:12:6	2.550
STP-III	STP-II+SR	TF+AB+PT+AF+MC+CR+SR	24:9:12:24:12:12:6	0.840
	STP-III+CT	TF+AB+PT+AF+MC+CR+SR+CT	24:9:12:24:12:12:6:6	1.219
	STP-III+BC	TF+AB+PT+AF+MC+CR+SR +CT+BC	24:9:12:24:12:12:6: 6:6	1.557
	STP-III+CT+BC+CF	TF+AB+PT+AF+MC+CR+SR +CT+BC+CF	24:9:12:24:12:12:6: 6:6:6	1.304
Compactin				0.004

GHT: Gwaruhaebaekbaekju-Tang, GHBT: Gwaruhaebaekbanha-Tang, JHGT: Jisilhaebaekgeji-Tang, STP-I: Gamigwaruhaebaekbaekju-Tang, STP-II: Gagamigwaruhaebaekbaekju-Tang, STP-III: Gamigwaruhaebaekwhanggum-Tang AB; Allii Macrostemii Bulbus, AF; Aurantii Immaturus Fructus, BC; Bambusae Caulis in Taeniam, CF; Crataegi Fructus, CR; Cinnamomi Ramulus, CT; Corydalis Tuber, MC; Magnoliae Cortex, PT; Pinelliae Tuber, SR; Scutellariae Radix, TF; Trichosanthis Fructus, Each value represents the mean from 3 experiments

Table 4. Inhibitory Effects of Some Herbal Medicines on DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) Oxidation *in vitro*

Herbal Medicine	Inhibitory Effect of DPPH Oxidation (IC ₅₀ :mg/ml)			
	80%EtOH Extract	CH ₂ Cl ₂ fraction	BuOH fraction	H ₂ O fraction
Trichosanthis Fructus	0.988	0.162	0.080	2.598
Pinelliae Tuber	0.493	0.076	0.013	0.157
Aurantii Immaturus Fructus	0.063	0.064	0.077	0.054
Magnoliae Cortex	0.008	0.014	0.007	0.011
Allii Macrostemii Bulbus	0.802	0.911	0.419	0.659
Cinnamomi Ramulus	0.014	0.027	0.005	0.015
Scutellariae Radix	0.028	0.003	0.010	0.025
Corydalis Tuber	0.184	0.142	0.013	0.157
Bambusae Caulis in Taeniam	0.054	0.116	0.042	0.053
Crataegi Fructus	0.058	0.083	0.016	0.424
Sodium ascorbate		0.005		

Each value represents the mean from 3 experiments

합인 가미과루해백백주탕(STP-I)과 여기에 지실, 과루
실, 계지의 용량을 증량한 조합 가감과루해백백주탕

(STP-II) 및 STP-II에 황금을 가미한 가미과루해백황
금탕(STP-III)을 검체로 하여 DPPH 항산화활성을 검

Table 5. Inhibitory Effects of Various Composition of *Gamigwaruhaebaekwhanggum-Tang* on DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) Oxidation and Superoxidation Reaction Induced by H₂O₂-FeSO₄ *in vitro*

Groups	Inhibitory Effect (IC ₅₀ :mg/ml)	
	DPPH Oxidation	Superoxidation
STP-I	0.03	189.10
STP-II	0.05	99.78
STP-III	0.03	24.40

STP-I: Gamigwaruhaebaekbaekju-Tang, STP-II: Gagamigwaruhaebaekbaekju-Tang, STP-III: Gamigwaruhaebaekwhanggum-Tang
 Compositions of each prescription are shown in Table 3
 Each value represents the mean from 3 experiments

토하여 결과를 Table 5에 제시하였다. 그 결과 STP-I, STP-II 및 STP-III 각각의 IC₅₀가 0.03 mg/ml, 0.05 mg/ml 및 0.03 mg/ml로 한방약물 조합에 의한 항산화효과의 synergic effect 혹은 antagonistic effect는 인정되지 않았다.

지질과산화 형성억제효과 - 한약 중에서 고지혈증 치료의 효과가 있는 처방이나 약재를 screening하기 위하여 고지혈증 발증과 밀접한 관련이 있는 지질과산화 형성에 대한 억제효과를 검토하여 결과를 Table 6에 나타내었다.

흰쥐 간 homogenate에서 H₂O₂를 산화제로 사용하여 과산화지질을 유발시키고 우선 80% 에탄올 엑스의 지질과산화 형성억제활성을 IC₅₀로 나타낸 바 황금이 8.6 mg/ml로 가장 양호한 지질과산화 형성억제활성이 인정되었으며 지실, 해백, 계지 등이 40~90 mg/

ml 정도의 지질과산화 형성억제활성을 보여 주었다. 그리고, 각 80% 에탄올 엑스의 CH₂Cl₂, *n*-BuOH 순차적 분획에서의 지질과산화 형성억제활성을 살펴보면 황금에서는 CH₂Cl₂ 분획으로, 반하, 지실, 후박, 현호색, 죽여, 산사는 BuOH 분획으로, 과루실, 해백, 계지에서는 물분획으로 이행됨을 알 수 있었다.

한편, HMG-CoA reductase 저해활성이 양호한 가미과루해백백주탕(STP-I)가감과루해백백주탕(STP-II) 및 가미과루해백황금탕(STP-III)을 검체로 하여 지질과산화 형성억제활성을 검토하여 결과를 Table 6에 제시하였다. 그 결과 STP-I, STP-II 및 STP-III 각각 지질과산화 형성억제효과의 IC₅₀은 189.1 mg/ml, 99.8 mg/ml 및 24.4 mg/ml로 나타났다. 따라서, 과루실, 지실 및 계지를 2배로 증량한 조합 STP-II는 STP-I에 비하여 현저한 지질과산화 형성저해효과를 관찰할 수 있었으며 또한 여기에 황금을 가미한 STP-III은 STP-II에 비하여 약 76%의 지질과산화 형성저해효과가 증가됨을 알 수 있었다.

Low density lipoprotein(LDL) 산화 억제효과 - 가미과루해백황금탕(STP-III)의 항고지혈증 효과를 추구하고자 *in vitro*에서 LDL 산화에 대한 STP-III에 대한 영향을 검토하여 그 결과를 Table 7에 제시하였다. STP-III를 가하고 pro-oxidant로 20 μmol/L copper sulphate를 가하여 234 nm에서 10분 간격으로 300분 동안 흡광도를 측정한 결과 시료를 가하지 않은 대조군에 비하여 검액 0.04 mg/ml 및 0.4 mg/ml 처치군에서 각각 현저한 LDL 산화억제효과를 관찰할 수 있었다.

Table 6. Inhibitory Effects of Some Herbal Medicines on Superoxidation Reaction Induced by H₂O₂-FeSO₄ *in vitro*

Herbal Medicine	Inhibitory Effect of Superoxidation(IC ₅₀ :mg/ml)			
	80%EtOH Extract	CH ₂ Cl ₂ fraction	BuOH fraction	H ₂ O fraction
Trichosanthis Fructus	>200	>200	23.8	9.3
Pinelliae Tuber	>200	101.0	68.6	172.7
Aurantii Immaturus Fructus	40.9	77.2	5.3	47.6
Magnoliae Cortex	132.6	>200	36.6	108.0
Allii Macrostemi Bulbus	83.8	395.5	103.5	37.2
Cinnamomi Ramulus	85.6	27.5	78.0	24.5
Scutellariae Radix	8.6	16.0	103.7	58.5
Corydalis Tuber	>200	128.6	84.2	137.6
Bambusae Caulis in Taeniam	>200	29.1	11.6	23.3
Crataegi Fructus	>200	131.4	15.9	177.9

Each value represents the mean from 3 experiments

Table 7. Inhibitory Effects of *Gamigwaruhaebaekwhangum-Tang* on Low Density Lipoprotein (LDL) Oxidation *in vitro*

Groups	Concentration (mg/ml)	Lag time (min)	TBA (Absorbance)
Control	-	34.3±5.5	0.210±0.020
STP-III	0.04	45.6±1.4 (32.9)	0.086±0.008* (59.1)
	0.4	120.4±8.2** (250.3)	0.017±0.003** (91.9)
Lovastatin	0.08	92.2±8.4** (168.8)	0.090±0.005* (57.1)

Values are means ± S.E. of 3 experiments

STP-III : Gamigwaruhaebaekwhangum-Tang

Compositions of STP-III is shown in Table III

The values in parenthesis are % of protection that is calculated as 100 (values of control-values of sample)/(values of control)

The Lag time required for the initiation of LDL oxidation was determined

Lipid oxidation by LDL oxidation was measured by the TBARS assay at the end of incubation (300 minute)

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

LDL의 산화과정은 3단계로 나누어 진행되는데 Lag phase는 propagation 동안 가장 기울기가 심한 부분과 황축과의 교점까지의 범위로 항산화제가 소요되고 LDL의 산화는 일어나지 않아 흡광도의 변화는 없다.¹⁸⁾ 따라서, Lag phase의 증가는 LDL 산화에 대한 resistance로 정의되며 본 실험에서 가미과루해백황금탕(STP-III)의 첨가시 Lag phase를 측정 한 바 검액 0.4 mg/ml의 농도에서 검체를 처치하지 않은 대조군 34.3±5.5분에 비하여 120.4±8.2분으로 p<0.01의 유의한 연장효과를 관찰할 수 있었으며 저농도 0.04 mg/ml의 농도에서도 연장시켰으나 유의차는 없었다(Table 7). 그리고, 300분 동안 LDL의 산화에 의하여 생성된 지질과산화물의 양을 흡광도의 변화로 나타낸 바 대조군 0.210±0.020에 비하여 검액 STP-III 0.04 mg/ml 및 0.4 mg/ml 농도에서 각각 0.086±0.008와 0.017±0.003으로 p<0.05와 p<0.01의 유의성이 있는 지질과산화 형성억제효과를 관찰할 수 있었다. 양성비교약물 lovastatin은 0.08 mg/ml의 농도에서 유의한 지질과산화 형성억제효과를 나타내었다(Table 7).

이상의 실험결과를 종합하면 과루해백주탕 등 한방문헌에 수록된 방제를 기준으로 하여 수종의 한약재를 조합하여 얻은 방제에 대하여 cholesterol 생합성에 관여하는 HMG-CoA reductase에 대한 저해활성을 *in vitro*에서 측정하였으며, DPPH radical의 scavenger 효과, H₂O₂로 유발된 간 지질과산화 형성억제효과 및 LDL 산화에 대한 억제효과를 평가하였다. 그 결과 가미과루해백주탕(STP-I)에서 양호한 활성이 인정되었으며, 보다 우수한 방제를 추구하고자 방제 STP-I에 이 방제를 구성하는 과루실, 지실 및 계지의

량을 배로 증량한 가미과루해백주탕(STP-II)을 선정하여 실험하였다. STP-I에 비하여 HMG-CoA reductase 저해활성 및 지질과산화 형성억제활성이 모두 증가됨이 인정되었다. 또한 전보^{7,8)}에서 현호색, 산사, 죽여, 황금 등이 유의한 항고지혈증 효과가 있음을 밝힌 바 있어 방제 STP-II에 이들 한약재들을 가미한 방제를 구성하여 평가한 바 황금을 가미한 가미과루해백황금탕(STP-III)에서 STP-II에 비하여 HMG-CoA reductase 저해효과 및 지질과산화 형성억제효과가 각각 36%와 76% 증가된 유효한 저해효과가 인정되었다. 또한 LDL 산화에 대한 항산화효과는 구성된 방제 중에서 가미과루해백황금탕(STP-III)을 검체로 하여 평가한 바, 검액의 농도의존적인 항산화효과가 경시적으로 인정되었다. 그리고 LDL 산화에 대한 STP-III의 항산화효과를 Lag phase의 증가와 300분에서의 지질과산화의 생성정도를 측정하여 억제효과를 평가한 바 대조군에 비하여 0.4 mg/ml 처치군에서 Lag phase는 약 250%의 유의한 연장효과를 보였고, 또한 약 91.9%의 유의한 지질과산화 형성억제효과가 인정되었다.

종합하면 *in vitro*에서 항고지혈증 활성을 평가할 수 있는 screening method 중에서 HMG-CoA reductase 저해활성, DPPH free radical scavenger 효과, 지질과산화 형성억제활성 및 LDL 산화 억제활성 등을 지표로 수종의 한약재를 조합하여 평가한 바 과루실, 지실, 해백, 계지, 후박, 반하 및 황금으로 구성된 가미과루해백황금탕(STP-III)이 가장 양호한 항고지혈증 효과가 인정되었다. 앞으로 *in vivo*에서 가미과루해백황금탕의 항고지혈증 효과를 추구하고자 한다.

결 론

동맥경화증이나 심근경색 등의 발병원인이 되는 고지혈증에 유효한 한방치료약물을 추구하고자 하는 연구의 일환으로 과루해백백주당 등을 기본 방제로 하여 수종의 한약재를 조합하여 얻은 새로운 치료약물 가미과루해백황금탕(STP-III)을 비롯한 수종의 방제를 검체로 하여 *in vitro*에서 HMG-CoA reductase 저해 활성, DPPH free radical scavenger 효과, 지질과산화 형성저해효과 및 LDL 항산화효과를 지표로 하여 활성을 검토하였다. 그 결과, 과루해백백주당, 과루해백반하탕, 지실해백계지당을 모두 조합한 가미과루해백백주당(STP-I), STP-I에 과루실, 지실 및 계지를 배로 증량한 가미과루해백백주당(STP-II) 및 STP-II에 황금을 가미한 가미과루해백황금탕(STP-III)에서 양호한 활성이 인정되었다. 특히 가미과루해백황금탕(STP-III) 처치군은 다른 방제에 비하여 우수한 효과를 나타내어 계속하여 *in vivo*에서 항고지혈증 활성을 검토하고 그 작용기전을 밝히고자 한다.

사 사

본 연구는 보건복지부 한방치료기술연구개발사업의 지원에 의하여 이루어진 것(HMP-99-O-11-0009-A)이며 이에 감사드립니다.

인용문헌

- La Rosa, J. C., Hunninghake D., Bush, D., Criqui, M. H., Getz, G. S. and Gotto, Jr., A. M. (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 Issue, 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). The MARS Research Group. *Ann. Intern. Med.* 119: 969-976.
- Jukema, J. W., Bruschke, A., van Boven, A., Reiber, J., Bal, E. T., Zwinderman, 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.
- MASS investigators (1994) Effect of simvastatin on coronary atheroma: the multicenter anti-atheroma study (MASS). *Lancet* 344: 633-638.
- Scandinavian Simvastatin Survival Study Group (1994) Randomised trial of cholesterol lowering in 4444 patients with coronary heart disease: The Scandinavian Simvastatin Survival Study (4S). *Lancet* 344: 1383-1389.
- 김남재, 정은아, 김동현, 이상인 (1999) 한방약물로부터 항고지혈증 치료약물개발(1). *생약학회지* 30(4): 368-376.
- 김남재, 정은아, 김동현, 이상인 (2000) 한방약물로부터 항고지혈증 치료약물개발(2). *생약학회지* 31(2): 190-195.
- 전국한의과대학심계내과학교실 편. 동의심계내과학(상), 서울, 서원당, pp.202-224, 448-455 (1995).
- 의학연구사 譯編: (正統) 금궤요략, 서울, 의학연구사, pp.190-193 (1996).
- 李克光 主編: 금궤요략, 서울, 아울로스 출판사, pp.218-225 (1994).
- 李東建 編著: (國譯) 금궤요략, 서울, 서원당, pp.136-138 (1996).
- 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. *J. Biol. Chem.* 247(5): 1520-1524
- 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.
- 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. *J. Biol. Chem.* 255(8): 3715-3725.
- Blois, M. S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
- Yokozawa, T., Dong, E., Wu, L. Z., Oura, H. and Nishioka, I. (1996) Antioxidation activity of Wen-Pi-Tang *in vitro*. *Natural Medicines* 50(3): 243.
- Hussein, O., Schlezinger, S., Rosenblat, M., Keidar, S. and Aviram, M. (1997) Reduced susceptibility of low

- density lipoprotein(LDL) to lipid peroxidation after fluvastatin therapy is associated with the hypocholesterolemic effect of the drug and its binding to the LDL. *Atherosclerosis* 128: 11-18.
19. Esterbauer, H., Striegl, G., Puhl, H., Rotheneder, M. (1989) Continuous monitoring of *in vitro* oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radic. Res. Commun.* 6: 67-75.
 20. Buege, J. A. and Aust, S. D. (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Enzymol.* 52: 302-310.
 21. Raal, F. J., Areias, A. J., Waisberg, R. and von Arb, M. (1995) Susceptibility of low density lipoprotein to oxidation in familial hypercholesterolaemia. *Atherosclerosis* 115: 9-15.

(2001년 2월 8일 접수)