

소지환가미방이 고지혈 병리인자 및 동물 병태 모델에 미치는 영향

우무룬 · 김동희*

대전대학교 한의과대학 병리학교실

Effects of Sojihwangamibang on Hyperlipidemia in Rats Induced by High Cholesterol Diet

Mao Lun Yu, Dong Hee Kim*

Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Daejeon University

This experimental study was designed to investigate the inhibitory effects of Sojihwangamibang on hyperlipidemia in rats induced by high cholesterol diet. Sprague-Dawley rats were divided into normal group, control group, SJB treated group. Obese rats were induced by high cholesterol diet treatment for 6 weeks including an oral administration of SJB for 4 weeks. In SJB group, serum total cholesterol, LDL cholesterol, triglyceride and glucose were significantly decreased, and HDL cholesterol was significantly increased compared with untreated control group. In SJB group, HMG-CoA and ACAT concentration of hepatic homogenate were significantly decreased compared with untreated control group. These results provide experimental evidence that SJB, applied currently in the clinical practice, appears to be effective for down-regulating risk factors of hyperlipidemia, and thus may be used as an objective information for the development of therapeutic agents.

Key words : Sojihwangamibang(SJB), LDL cholesterol, HDL cholesterol, hyperlipidemia

서 론

최근 건강검진을 받는 사람들 중에 혈액검사 등을 통해 고지혈증의 진단을 받는 사람들의 숫자가 증가하고 있다. 한국인의 사망원인¹⁾의 2, 3위를 차지하고 있는 뇌출혈, 뇌경색 등의 뇌혈관 질환과 협심증, 심근경색 등의 심장병은 동맥경화가 원인이 되어 일어나는 혈관질환이다.

동맥경화의 중요한 인자 중의 하나인 고지혈증은 동맥혈관벽에 콜레스테롤 등의 지질이 침착하여 혈관을 협착 시키거나 경화시켜 혈액의 흐름을 악화시키는 것으로 순환기 질환의 공통병인으로 인식되고 있다. 특히 암과 함께 순환기 질환이 사망률의 수위를 차지하고 있어 고지혈증에 대한 근본적이고 효율적인 대책이 요구되고 있다^{2,3)}.

고지혈증은 혈액중의 지질, 특히 중성지질과 총콜레스테롤,

LDL 콜레스테롤이 과도하게 증가한 상태를 말한다. 미국의 National Cholesterol Education Program (NCEP)은 위험 인자 분석 및 혈중 지질 측정의 기준으로 관상동맥심질환 위험군을 분류하였고, 그에 대한 종합적인 치료 지침을 수립하여 3차에 걸쳐 보고한 바가 있다. 더불어 Adult Treatment Panel (ATP) III는 LDL 콜레스테롤의 수치를 160 mg/dL 이하로 낮출 것을 권고하였던 ATP I (1988) 및 ATP II (1993)의 보고와 달리 LDL 콜레스테롤의 치료 목표치를 100 mg/dL 이하로 낮추었다. 또한 HDL 콜레스테롤의 수치를 기존의 40 mg/dL 이상에서 60 mg/dL 이상으로 높여 관상동맥심질환자를 비롯한 관련 질환자의 범위를 확대시켜 이에 대한 예방 및 치료를 한층 강화하였다^{4,6)}. 이 같이 증가 추세에 있는 관상동맥 질환 해결책을 위한 다각적 노력이 세계적으로 이루어지고 있으며, 제약 분야에서도 끊임없는 R&D 투자가 이루어지고 있다.

고지혈증 치료제로는 콜레스테롤의 합성을 억제하는 HMG-CoA 환원효소 저해제, ACAT 저해제 등과 콜레스테롤의 대사와 배설을 촉진하는 음이온 교환수지, LPL 활성화제 등으로

* 교신저자 : 김동희, 대전시 동구 용운동 96-3, 대전대학교 한의과대학

· E-mail : dhkim@dju.ac.kr, · Tel : 042-280-2623

· 접수 : 2009/11/15 · 수정 : 2009/11/25 · 채택 : 2009/12/11

분류되어 사용되어 왔으며^{7,9)}, 발병 기전의 최신지견에 따라 고지혈증의 치료제도 다양하게 개발되어 왔다. 그러나 치료 효과와 더불어 여전히 상존하는 소화기 장애, 간 장애, 두통 등의 부작용¹⁰⁾으로 인하여 지속적인 보완이 요구되고 있으며, 특히 천연물에서의 연구는 이러한 단점을 보완할 수 있다는 점에서 유망한 분야로 떠오르고 있다.

이에 본 연구에서는 임상에서 사용되고 있는 消脂丸加味方의 효과를 객관적으로 증명함과 동시에 R&D를 위한 기초적 자료를 제공하기 위하여 고콜레스테롤 식이 백서에 미치는 영향을 평가하였다. 실험은 기본적인 혈액검사 및 조직 검사를 통하여 관여인자에 대한 직접적인 효능 평가와 더불어 혈중 콜레스테롤, 특히 LDL-콜레스테롤을 산화시켜 동맥경화 유발의 원인이 되는 산화적 손상에 대한 항산화 효능을 평가하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물 및 사육조건

본 실험에 사용된 실험용 쥐는 체중 180~220 g의 웅성 SD (Sprague-Dawley) rat 은 실험 당일까지 고형사료(Table 1)와 고콜레스테롤 식이사료(Table 2, Bio-serv, USA)를 자유 식이하면서 물을 충분히 공급하였다. 실온 22 ± 2°C, 상대습도 50 ± 10%, 조명시간 12시간 (07:00~19:00), 조도 150~300 Lux로 설정하여 2주일간 실험실 환경에 적응시킨 후 체중 변화가 일정하고 건강한 쥐만을 선별하여 실험에 사용하였다. 일반 사료와 고콜레스테롤 식이 사료의 조성 내용과 분량은 다음과 같다.

Table 1. Composition of Basal Diet

조단백질	22.1%
조지방	8.0%
조섬유	5.0%
조회분	8.0%
칼슘	0.6%
인	0.4%

Table 2. Composition of high cholesterol Diet

Dyets ingredient	Concentration (g/kg)
Purina mouse cow	750.0
Casein	75.0
Cocoa butter	75.0
Dextrose	25.0
Dextrin	16.25
Cholesterol	12.5
Cellulose	12.5
Sucrose	16.25
Mineral mix #200000	8.75
Sodium cholate	5.0
Vitamin mix #310035	2.5
Choline chloride	1.25

2) 약재

본 실험에 사용한 소지환가미방 (Sojiwhangamibang 이하 SJB로 지칭함)의 구성 약물은 대전대학교 부속한방병원에서 구

입하여 정선한 후 사용하였다.

Table 3. The Compositions of Sojiwhangamibang(SJB)

韓藥名	生藥名	用量(g)
蒼朮(炒)	<i>Atractylodis Rhizoma</i>	3
枳殼(炒)	<i>Aurantii Fructus</i>	3
何首烏	<i>Cynanchi Wilfordii Radix</i>	3
紅花	<i>Cartami Flos</i>	3
丹蔘	<i>Salviae Radix</i>	3
車前子	<i>Plantaginis Semen</i>	3
肉從蓉	<i>Cistanchis Herba</i>	3
白疾藜	<i>Tribuli Semen</i>	3
菊花	<i>Chrysanthemi Flos</i>	3
鬱金	<i>Curcumae longae Rhizoma</i>	3
遠志	<i>Polygalae Radix</i>	3
決明子	<i>Cassiae Semen</i>	9
山楂(炒)	<i>Crataegi Fructus</i>	9
澤瀉	<i>Allismatis Rhizoma</i>	6
白茯苓	<i>Smilacis Rhizoma</i>	4.5
陳皮	<i>Aurantii Nobilis Pericarpium</i>	2
石菖蒲	<i>Acori Graminei Rhizoma</i>	2
Total		65.5

3) 시약 및 기기

(1) 시약

Dulbecco's phosphate buffered saline (DPBS-A; Sigma Co., U.S.A.), RPMI 1640 (Sigma Co., U.S.A), DNase type I (Sigma Co., U.S.A.), Penicillin (Sigma Co., U.S.A.), Streptomycin (Sigma Co., U.S.A.), Trypsin (invitrogen., U.S.A), Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA; Sigma., U.S.A), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma., U.S.A), Dimethyl sulfoxide (DMSO; Sowa chemical., Japan), 3.8% Sodium citrate (Sigma Co., U.S.A), Hippuryl-his-leu acetate (Sigma Co., U.S.A), Ethylactate (Junsei., Japan), Potassium Phosphate Monobasic (KH₂PO₄; Yakuri., Japan), 등을 사용하였고, 이 밖에 일반 시약은 특급 시약을 사용하였다.

(2) 기기

본 연구에 사용된 기기는 Accoutered GC (Roche, Germany), Ice-maker (Vision, Korea), Serum separator (녹십자, Korea), Minos-ST (Cobas Co., France), Centrifuge (Beckman Co., U.S.A.), Rotary vaccum evaporator (Büchi 461, Switzerland), Deep freezer (Sanyo Co., Japan), Freeze dryer (Eyela Co., Japan), Autoclave (Hirayama, Japan), Ultrasonic cleaner (Branson Ultrasonics Co., U.S.A.), ELISA reader (Molecular Dvice., U.S.A), Roller Mixer (Gowon scientific technology Co., Korea), 한약유출기 (DWP-1800T, 웅진, Korea), Spectrophotometer (UV-2450, Shimazu, Japan), Balance (Cass, Korea), 생화학기기 (AU400, Olympus, U.S.A) 등을 사용하였다.

2. 방법

1) 약물 추출

SJB 2첩을 한약 약탕기 (DWP-1800T, 대웅)에 넣고, 증류수

1500 ml와 같이 혼합하여 3시간 열탕하여 추출한 후 흡입 여과하였다. 이를 rotary vacuum evaporator (Büchi 461, EYELA)에서 감압 농축하여 SJB를 분리한 후, 다시 동결건조기 (EYELA, FDU-540, Japan)에서 24시간 동결 건조하여 분말 19.5 g을 얻었으며, 얻어진 분말은 초저온냉동고 (-80℃)에서 보관하면서, 실험에 따라 필요한 농도로 증류수에 희석하여 사용하였다.

2) In vitro

(1) 독성 검사

① Human fibroblast cells (hFCs) 배양

피부 조직을 cool D-PBS로 3회 세척한 후 작은 조각으로 절단한 다음, conical tube (15 ml)에 넣어 1,400 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 이 tube에 RPMI 1640 {containing collagenase A (5 mg/ml, BM, Indianapolis, IN, USA)와 DNase type I (0.15 mg/ml, Sigma. Co., U.S.A.), antibiotics (penicillin 10⁴ U/ml, streptomycin 10 mg/ml, amphotericin B 25 µg/ml)}를 넣고 37℃ CO₂ 배양기에서 hFCs를 2 시간 동안 배양하였다. 여기에 0.5 % trypsin-0.2 % EDTA를 첨가하여 30 분간 배양하고, 인산완충생리식염수 (PBS)로 약 2회 1,500 rpm에서 원심분리한 후 RPMI1640-10 % FBS로 1주일 동안 배양하였다. 이를 다시 0.5 % trypsin-0.2 % EDTA로 분리하여 연속으로 1주일씩 3회 반복하여 살아있는 부착세포를 RPMI1640-10 % FBS 배양액에서 배양하였다.

② 세포독성 측정

세포독성 측정은 MTT assay로 하였다. 배양한 Human fibroblast cells를 96 well plate에 2×10⁴ cell 씩 분주한 후 배양하고, 24시간 후 SJB를 500, 250, 100, 50, 25 (µg/ml)의 농도를 투여하였다. 다시 48시간 배양 후 부유액을 제거하고, 각 well에 MTT solution 100 µl 씩 첨가하여 4시간 동안 배양하였다. 배양 후 부유액을 제거하고 각 well에 100 µl의 DMSO를 첨가하여 37℃ CO₂ 배양기에서 30분 동안 반응 시킨 후 ELISA reader를 사용하여 wave length 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

③ 간 독성 측정

실험 종료 후 혈액을 채취 해 혈청을 분리하여 생화학분석기기를 이용하여 GOT, GPT검사를 실시하였다.

(2) 항산화 활성 측정

① 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 소거능 측정

150 mM DPPH/EtOH 450 에 SJB를 1000, 500, 250, 125, 62.5 µg/ml 농도로 희석하여 50 µl씩 첨가한 후 37℃에서 30분간 반응시켰다. 이를 흡광도 517 nm에서 측정하여 아래의 방법으로 계산하였다.

$$\text{DPPH 소거능(\%)} = \left(\frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{SJB 투여군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

② Superoxide dismutase (SOD) 유사활성 측정

SJB 0.5 ml에 tris-HCl buffer(pH 8.5) 2.6 mL과 7.2 mM pyrogallol 0.5 ml를 가하여 25℃에서 10분 반응 후 1 N HCl 0.1 mL로 반응 정지시켰다. 반응액을 420 nm에서 흡광도를 측정하

고 buffer를 첨가한 것을 대조군으로 하여 아래와 같이 저해율을 측정하였다.

$$\text{SOD 유사활성 (\%)} = 100 - \left(\frac{\text{SJB 투여군의 흡광도}}{\text{buffer 첨가군의 흡광도}} \right) \times 100$$

3) In vivo

(1) 고콜레스테롤 사료에 의한 고지혈증 유발과 약물 투여

각 실험군은 정상군, 대조군 그리고 SJB 투여군으로 나누어 정상군은 일반 사료와 식수를 충분히 공급하였다 대조군과 SJB 투여군은 표2의 조성으로 만들어진 고콜레스테롤 사료와 식수를 충분히 공급하였으며, SJB투여군은 고콜레스테롤 투여 2주 후부터 78.8 mg/kg/0.5 ml의 양으로 정해진 시간에 매일 투여하였다.

(2) 채혈 및 혈청 분리

SJB의 투여 종료 후 12시간 절식 후 ether로 마취시킨 다음 심장에서 12 ml이상의 혈액을 취하여 5 ml을 15 ml conical tube에 넣어 6,500 rpm에 15분간 원심 분리시켜 혈청을 분리하였다.

(3) 혈청 및 혈장 성분 측정

분리한 혈청은 생화학기기 (AU400, Olympus, U.S.A)를 이용하여 total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol 그리고 triglyceride 양을 측정하였다.

(4) 간조직의 효소 활성 측정

① 효소원 제조

적출한 간은 PBS로 세척하여 수분을 제거하고 1 g의 간 조직에 10 ml의 0.25 M sucrose/0.5 mM ethyldiamine tetraacetic acid (EDTA) / 5 mM N-2-hydroxy-ethyl-piperazine-N-2-ethane sulfonic acid (HEPES) 용액을 가하여 ultraturax homogenizer를 이용하여 빙냉 하에서 마쇄하였다. 마쇄한 용액을 마쇄한 용액을 4℃, 600 x g로 15분간 원심 분리하여 핵 및 미마쇄 부분을 제거한 후 4℃, 8000 x g로 30분간 원심 분리하여 1 ml의 상등액을 TBARS 함량 측정에 사용하였다. 나머지는 4℃, 10000 x g에서 30분간 원심 분리하여 상등액 중 일부를 취하여 0.4배양의 ethanol : chloroform (5:3) 냉혼합액을 가하여 2분간 진탕한 다음 다시 4℃, 10000 x g에서 30분간 원심 분리하여 얻은 상등액을 superoxide dismutase (SOD) 활성도 측정에 사용하였다. Catalase 활성은 마쇄액을 4℃, 10000 x g로 30분간 원심 분리하여 얻은 침전물에 0.25M sucrose 용액에 현탁시킨 다음 다시 4℃, 10000 x g에서 20분간 원심 분리하여 얻은 침전물에 0.25 M sucrose 용액을 가해 현탁 시켜 측정하였다.

② 과산화지질 (TBARS) 함량 측정

간조직의 과산화지질 정량은 Sato법¹¹⁾을 이용하여 측정하였다. 제조한 간조직 효소원 0.5 ml 에 TCA용액 2.5 ml 를 가하여 잘 섞은 다음 실온에서 10분간 방치한 후 1500 x g에서 10분간 원심분리하여 상등액을 버리고 침전물은 0.05M 황산으로 1회 세척 후 침전물에 0.05M 황산 2.5 ml와 0.6% TBA 3.0 ml를 가하여 잘 섞은 후 95℃의 항온 수조에서 30분간 가열하였다. 가열 후 n-butanol:pyridine (15:1) 혼합액 3.0 ml를 가하여 잘 섞은 후 1500 x g에서 10분간 원심 분리하고 상등액을 취하여 530 nm에서

흡광도를 측정하였다.

(5) Real Time Quantitative RT-PCR

① RNA 추출

미량의 간 조직에 RNAzolB 500 μ l를 넣고 homogenizer로 마쇄한 후 chloroform (CHCl₃) 50 μ l를 첨가한 후 15초간 다시 혼합하였다. 이를 얼음에 15 분간 방치한 후 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 약 200 μ l의 상층액을 회수하여 2-propanol 200 μ l와 동량 혼합 후 천천히 흔들고 얼음에서 15 분간 방치하였다. 이를 다시 13,000 rpm에서 원심 분리한 후 80% EtOH로 수세하고 3분간 vacuum pump에서 건조하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 diethyl pyrocarbonate (DEPC)를 처리한 20 μ l의 증류수에 녹여 heating block 75°C에서 불활성화 시킨 후 first strand cDNA 합성에 사용하였다.

② 역전사-중합효소 연쇄반응

역전사 (reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 μ g을 DNase I (10 U/ μ l) 2U/tube를 37°C heating block에서 30 분간 반응한 후 75°C에서 10분 동안 변성시키고, 여기에 2.5 μ l 10 mM dNTPs mix, 1 μ l random sequence hexanucleotides (25 pmole/ 25 μ l), RNA inhibitor로서 1 μ l RNase inhibitor (20 U/ μ l), 1 μ l 100 mM DTT, 4.5 μ l 5×RT buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂)를 가한 후, 1 μ l의 M-MLV RT (200 U/ μ l)를 다시 가하고 DEPC 처리된 증류수로서 최종 부피가 20 μ l가 되도록 하였다. 이 20 μ l의 반응 혼합액을 잘 섞은 뒤 2,000 rpm에서 5초간 원심 침강하여 37°C heating block에서 60분 동안 반응시켜 first-strand cDNA를 합성하였다. 이를 다시 95°C에서 5분 동안 방치하여 M-MLV RT를 불활성화 시킨 후 합성이 완료된 cDNA를 polymerase chain reaction (PCR)에 사용하였다.

③ Real Time Quantitative RT-PCR

간 조직으로 부터의 총 RNA는 TRI 시약으로 분리하고, DNase I (Life Technologies, Grand Island, NY)로 염색체의 DNA를 제거하기 위해 digested 하였다. 75°C에서 20분 동안 DNase과 5 ug을 넣어 total RAN은 First Strand cDNA Synthesis kit (Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ)로 cDNA 으로 transcription하였다. 기술 방식에 따라 Real-Time PCR은 Applied (Applied Biosystems, U.S.A)을 사용하여 수행되었다. Probe들은 6-carboxy-fluorescein으로 라벨을 붙이고, beta-actin cDNA는 모든 cDNA에 같은 양의 각 cDNA 표본을 AmpliTaq Gold DNA Polymerase을 포함시켜 TaqMan Universal PCR로 증폭시켰다. PCR 조건은 40 cycles를 위한 50°C에서 2분, 95°C과 10 분, 60°C에서 15초 수행하였다. 사용된 probe는 아래와 같다.

ACAT	Sense	CCTCCCGGTTTCATTCTGATA
	Antisense	ACACCTGGCAAGATGGAGTT
HMG-CoA reductase	Sense	TGCTGCTTTGGCTGTATGT
	Antisense	TGAGCGTGAACAAGAACCA

$y = x(1+e)^n$, x = starting quantity, y = yield, n = number of cycles, e = efficiency로 계산하여 RQ(relative quantitative)를

측정하였다.

4) 통계 처리

본 실험에서 얻은 결과는 ANOVA multi t-test (JAVA, Bonferroni Ver 1.1)로 분석하여 p값을 구하였다. 각 대조군을 정상군과, 실험군을 대조군과 비교하여 p<0.05 일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 세포독성에 미치는 영향

hFCs에 대한 세포독성에서는 대조군의 세포생존율이 100.3±0.4(%)인 반면, SJB의 200, 100, 50, 25(μ g/ml) 농도에서는 각각 87.4±3.5, 90.2±1.2, 94.3±3.5, 100.3±1.6(%)로 나타났다(Fig. 1).

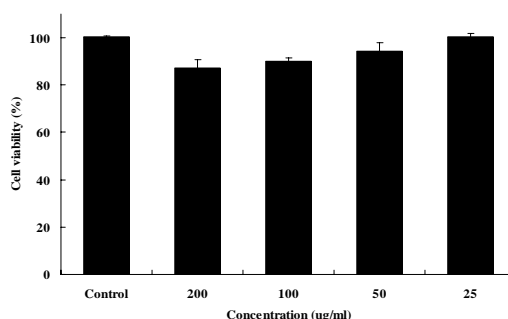


Fig. 1. Cytotoxicity of SJB on Human Fibroblast Cells(hFCs). Human fibroblast cells (hFCs) were treated with various concentration (200, 100, 50, 25 μ g/ml) of the SJB extract.

2. 간 기능에 미치는 영향

1) GOT에 미치는 영향

간 기능 측정의 지표 성분인 GOT는 대조군이 224.0±15.6 (I.U/L), 정상군이 118.0±7.0 (I.U/L)로 나타나 정상군에 비하여 대조군에서 유의성 있는 (++) : P <0.01) 증가를 나타냈다. SJB 투여군에서는 143.57±24.7 (I.U/L)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (* : P<0.05) 감소를 나타내었다(Fig. 2).

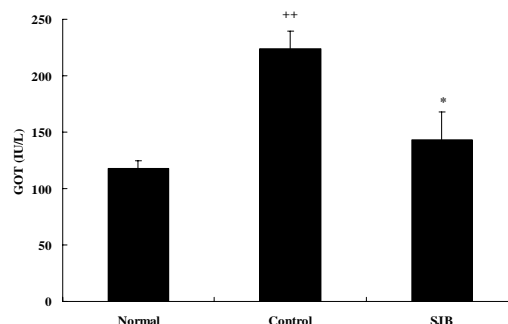


Fig. 2. Effect of SJB on the GOT in rat fed high cholesterol diets. Normal : Normal SD rat group. Control : high cholesterol diet and normal saline (0.5 ml/day) treated group. SJB : high cholesterol diet and SJB (78.8 mg/0.5 ml/day) treated group. The results are represent the mean ± S.E. Statistically significant value compared with normal group (++)p<0.01). Statistically significant value compared with control group (*p<0.05). Statistically significant value compared with control group (*p<0.05).

2) GPT에 미치는 영향

GPT는 대조군이 59.0±9.9 (I.U/L), 정상군이 39.7±5.5 (I.U/L)로 나타나 정상군에 비하여 대조군에서 유의성 있는 (+ : P <0.05) 증가를 나타냈다. SJB 투여군에서는 41.0±2.3 (I.U/L)로 나타나 대조군에 비하여 감소를 나타내었다(Fig. 3).

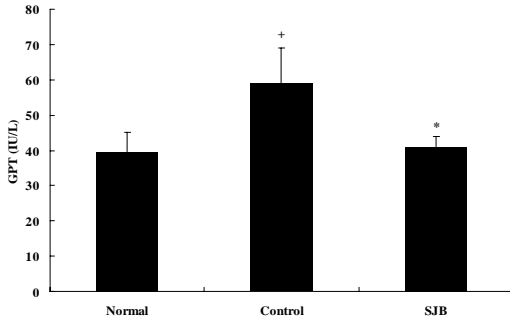


Fig. 3. Effect of SJB on the GPT in rat fed high cholesterol diets. Statistically significant value compared with normal group (+p<0.05). Statistically significant value compared with control group (*p<0.05).

3. 항산화 활성

1) DPPH 소거활성에 미치는 영향

DPPH의 소거 활성은 500, 250, 125, 62.25 (µg/ml) 농도에서 각각 63.7±2.4, 49.2±3.2, 43.9±2.8, 21.8±1.6(%)의 소거 활성 효과를 나타내었다(Fig. 4).

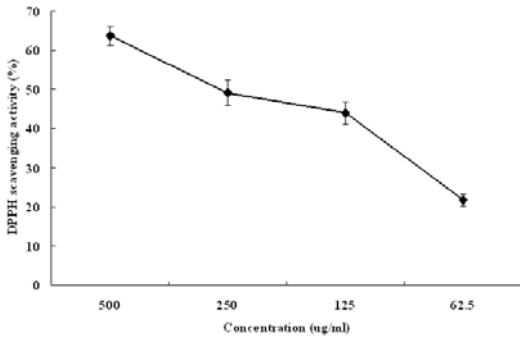


Fig. 4. Scavenging activity of SJB on DPPH free radical. SJB were reacted with DPPH for 30 minutes at 37°C, and the absorbance at 517 nm due to DPPH radical was determined. The results are the mean ± SD.

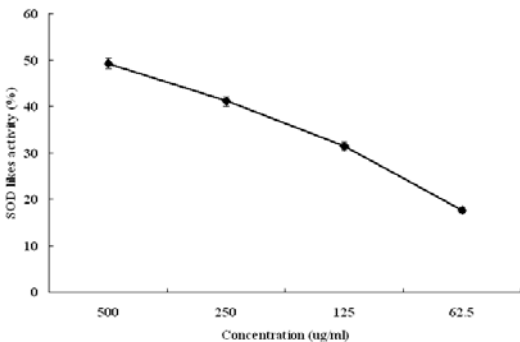


Fig. 5. SOD-like activity of SJB at final concentration 500, 250, 125, 62.25(µg/ml). The results are the mean ± SD.

2) SOD 유사활성에 미치는 영향

SOD나 SOD 유사 물질에 의해서만 항산화 활성을 나타내는 pyrogallol을 이용하여 항산화 활성을 측정한 결과 500, 250, 125, 62.25 (µg/ml)의 농도에서 각각 49.3±1.2, 41.1±1.0, 31.5±0.9, 17.7±0.6 (%)의 항산화 활성 효과를 나타내었다(Fig. 5).

4. Total cholesterol 변화에 미치는 영향

실험 종료 후 rat의 혈청 내 total cholesterol의 변화를 분석한 결과, 대조군에서는 271.0±28.0 (mg/dl)로, 정상군의 55.0±4.4 (mg/dl)에 비하여 유의성 있는 (+++ : P <0.001) 증가를 나타냈으며, SJB 투여군에서는 154.0 ± 19.7 (mg/dl)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (** : P <0.01) 감소를 나타내었다(Fig. 6).

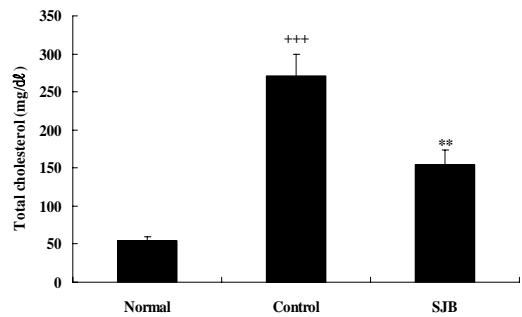


Fig. 6. Effect of SJB on the T. Chol. level in rat fed high cholesterol diets. Statistically significant value compared with normal group (+++p<0.001). Statistically significant value compared with control group (**p<0.01).

5. LDL cholesterol 변화에 미치는 영향

실험 종료 후 rat의 혈청 내 LDL cholesterol의 변화를 분석한 결과, 대조군에서는 43.0±7.5 (mg/dl)로, 정상군의 6.7±1.5 (mg/dl)에 비하여 유의성 있는 (++ : P <0.01) 증가를 나타냈으며, SJB 투여군에서는 21.3 ± 1.5 (mg/dl)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 (** : P <0.01) 감소 효과를 나타내었다(Fig. 7).

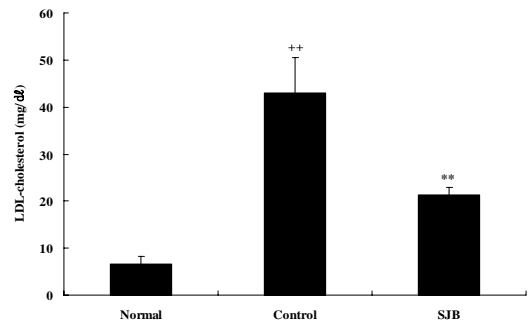


Fig. 7. Effect of SJB on the LDL Cholesterol level in rat fed high cholesterol diets. Statistically significant value compared with normal group (++p<0.01). Statistically significant value compared with control group (**p<0.01).

6. HDL cholesterol 변화에 미치는 영향

실험 종료 후 rat의 혈청 내 HDL cholesterol의 변화를 분석한 결과, 대조군에서는 5.7±1.5 (mg/dl)로, 정상군의 16.3±1.2

(mg/dl)에 비하여 유의성 있는 ($++ : P < 0.01$) 증가를 나타냈으며, SJB 투여군에서는 10.3 ± 2.3 (mg/dl)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 ($* : P < 0.05$) 감소 효과를 나타내었다(Fig. 8).

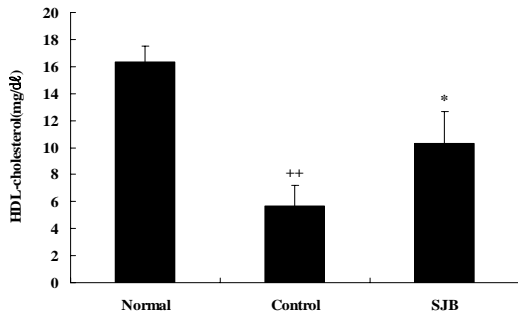


Fig. 8. Effect of SJB on the HDL Cholesterol level in rat fed high cholesterol diets. Statistically significant value compared with normal group ($++p < 0.01$). Statistically significant value compared with control group ($*p < 0.05$).

7. Triglyceride 변화에 미치는 영향

실험 종료 후 rat의 혈청 내 triglyceride의 변화를 분석한 결과, 대조군에서는 137.0 ± 25.2 (mg/dl)로, 정상군의 50.7 ± 11.5 (mg/dl)에 비하여 유의성 있는 ($++ : P < 0.01$) 증가를 나타냈으며, SJB 투여군에서는 79.0 ± 23.4 (mg/dl)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 ($+ : P < 0.05$) 감소를 나타내었다(Fig. 9).

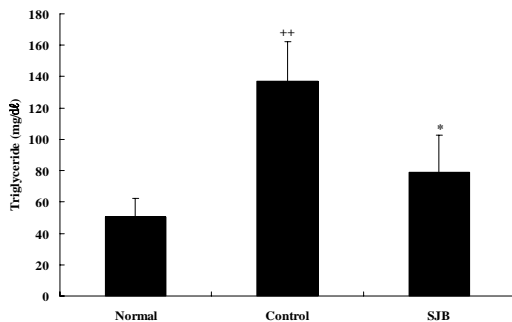


Fig. 9. Effect of SJB on the triglyceride level in rat fed high cholesterol diets. Statistically significant value compared with normal group ($++p < 0.01$). Statistically significant value compared with control group ($*p < 0.05$).

8. 간조직의 과산화지질 함량에 미치는 영향

실험 종료 후 간 조직에서 과산화지질의 함량을 관찰한 결과, 대조군에서 19.8 ± 1.4 (nmol/mg)로, 정상군의 3.4 ± 0.6 (nmol/mg)에 비하여 유의성 있게 ($+++ : P < 0.001$) 증가하였으며 SJB 투여군에서는 8.3 ± 2.3 (nmol/mg)으로 대조군에 비하여 유의성 있는 ($* : P < 0.05$) 감소를 나타냈다(Fig. 10).

9. 간 조직내 콜레스테롤 인자 발현에 미치는 영향

1) ACAT mRNA 유전자 발현에 미치는 영향

간 조직에서의 ACAT의 mRNA 유전자 발현은 대조군의 유전자 발현을 1 (RQ)로 하였을 때 정상군은 0.18 ± 0.06 (RQ)로 나타나 정상군에 비하여 대조군에서 유의성 있는 ($+++p < 0.001$) 증

가를 나타냈으며, SJB 투여군에서는 0.57 ± 0.05 (RQ)로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 ($**p < 0.01$) 감소를 나타냈다(Fig. 11).

2) HMG-CoA reductase mRNA 유전자 발현에 미치는 영향

대조군의 유전자 발현을 1 (RQ)로 했을 때 정상군은 0.36 ± 0.03 (RQ)로 나타나 정상군에 비하여 대조군에서 유의성 있는 ($+++p < 0.001$) 증가를 나타냈으며, SJB 투여군에서는 0.56 ± 0.09 (RQ)으로 나타나 대조군에 비하여 유의성 있는 ($**p < 0.01$) 감소를 나타냈다(Fig. 12).

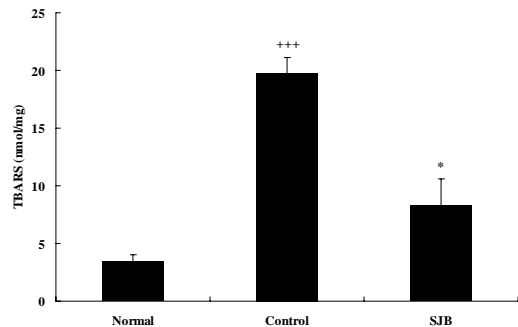


Fig. 10. Effect of SJB on hepatic thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) value in rat fed high cholesterol diets. Statistically significant value compared with normal group ($+++p < 0.001$). Statistically significant value compared with control group ($*p < 0.05$).

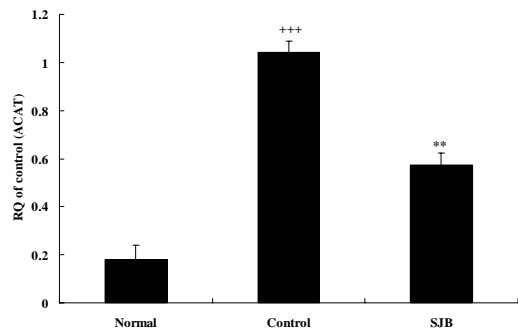


Fig. 11. Effects of SJB on the expression of ACAT mRNA level in the liver of rat fed high cholesterol diets. Statistically significant value compared with normal group ($+++p < 0.001$). Statistically significant value compared with control group ($**p < 0.01$).

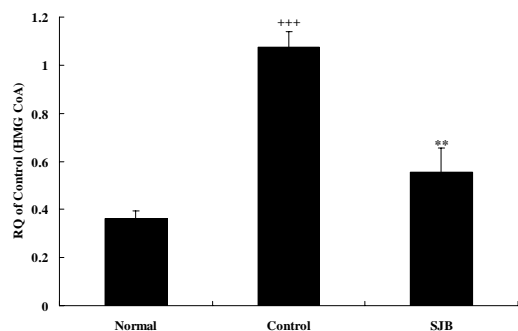


Fig. 12. Effects of SJB on the expression of HMG-CoA reductase mRNA level in the liver of rat fed high cholesterol diets. Statistically significant value compared with normal group ($+++p < 0.001$). Statistically significant value compared with control group ($**p < 0.01$).

고찰

한국인의 사망 원인 2,3위를 차지하는 것은 협심증, 심근경색 등을 포함한 심장질환과 뇌출혈, 뇌경색 등의 뇌혈관 질환은 동맥경화가 원인이 되어 일어나는 혈관질환이다¹²⁾.

동맥경화의 중요한 인자 중 하나인 고지혈증은 혈액중의 지질, 특히 중성지질과 콜레스테롤 중의 총콜레스테롤, LDL 콜레스테롤이 과도하게 증가한 상태를 말한다. Kannel 등¹³⁾은 심근경색에서 고콜레스테롤혈증, 고혈압, 흡연 등이 크나큰 위험 인자로 작용하는 것을 보고하였으며, Shipley 등¹⁴⁾은 혈액 중에 콜레스테롤 수치의 상승과 더불어 관상동맥질환에 의한 사망률이 증가하는 것으로 보고한 바가 있다.

혈액 중에는 산소와 영양분 등이 포함되어 있는데, 그 중 하나가 지질이며 주로 콜레스테롤과 중성지방이다^{15,16)}. 그러나 지질이 다양한 원인에 의해서 혈중에 과도하게 축적되게 되면 고지혈증을 일으키게 된다.

현재 고지혈증 치료제로는 혈청지질의 과잉 생산에 대한 콜레스테롤의 흡수억제와 합성 억제 약물 그리고 부적절한 제거에 대한 대사와 배설을 촉하는 약물 등이 개발되어 왔다(Fig. 13). 이렇듯 다양한 신규 치료제 덕분에 과거에 비하여 치료율이 상승되었음에도 불구하고 소화기 장애, 간 장애 등의 부작용은 여전히 존재하고 있다. 타 치료제처럼 세계적으로 이에 대한 보완적 연구가 꾸준히 진행되고 있으며, 천연물에서의 치료제 연구는 이러한 단점을 보완할 수 있다는 점에서 관심 분야로 대두되고 있다.

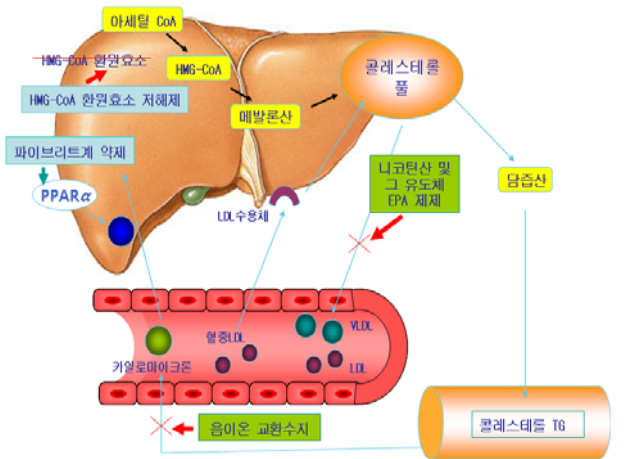


Fig. 13. Cholesterol production and the mechanism of cholesterol drug.

본 시료인 消脂丸加味方은 良의 《秘方大全》¹⁷⁾에 收載된 처방으로 理氣燥濕化痰, 活血祛瘀, 平肝潛陽, 消風清熱, 補肝益腎 약물로 구성되어 고지혈증에 활용되고 있다.

이에 본 실험에서는 임상 활용방인 消脂丸加味方의 항고지혈증 효능을 실험적으로 규명하여 한의학의 EBM 구축에 일조함과 동시에 항 후 다양한 치료 처방 개발에 대한 효능 검색에 기초적 자료를 제공하고자 하였다.

먼저 안전성 평가를 위해 in vitro에서 정상세포에 대한 세

포독성을 평가하고, 약물 투여 후 GOT, GPT 의 혈중 농도 변화를 살펴본 결과, 세포독성에서는 200 ug/ml 의 농도에서 87 % 이상의 세포생존율을 나타냈으며, 대조군에서 증가된 GOT, GPT, 는 SJB 투여군에서 정상군과 비슷한 수준으로 감소하는 것으로 나타났다(Fig. 1-3).

인체의 에너지 대사산물인 활성산소는 혈액 속을 유리하다 혈관 내피세포의 손상을 유발하고 혈중의 콜레스테롤, 특히 LDL-콜레스테롤을 산화시켜 동맥경화의 중요한 단서를 제공한다. 혈중 단구세포가 내피세포의 손상 부위에 결합하여 내측으로 이동하게 되면 활성산소 중에 의해 산화된 LDL-콜레스테롤은 단구의 매크로파지로서의 분화를 촉진시키고 매크로파지의 포말 세포에 중대한 영향을 미치게 된다. 결국 포말세포는 혈관 벽을 경화시켜서 동맥경화를 일으켜 혈관 내피 기능장애를 가져온다¹⁸⁻²¹⁾. 橫山 등²²⁾은 질환 모델 동물과 관상동맥질환자의 동맥경화 혈관에서 산화적 스트레스가 증가하며 활성산소종이 혈관내피의 손상과 염증에 관여하고 있음을 보고한 바가 있다. 따라서 항산화 작용은 콜레스테롤의 산화를 방지하고 나아가 동맥경화를 예방 치료하는데 중요한 역할을 담당함으로써 산화적 손상에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다. 본 시료의 항산화 활성 측정 결과에서는 DPPH 소거능과 SOD 유사활성에서 농도 의존적으로 소거능과 활성도를 동시에 증가시킴으로써 (Fig. 4, 5), 본 시료가 고지혈증으로 인한 혈관 내피세포 손상 및 LDL-콜레스테롤을 산화를 억제함으로써 동맥경화의 병리 변화를 개선시킬 수 있음을 시사하였다.

콜레스테롤은 간에서 생성하여 생체막을 구성하고, 담즙산 성호르몬, 부신피질호르몬, 스테로이드호르몬 등의 호르몬을 형성하며 그리고 비타민 D 전구체 등의 재료가 되어 건강한 몸을 유지하는데 필수적인 요소이다. 또한 혈관 내측에 부착하여 혈류의 흐름을 유연하게 하고 혈관을 보호하는 기능을 가지고 있다. 혈중 지질은 콜레스테롤 중성지방 지방산 등으로 구성되어 있으며 콜레스테롤은 물에 녹지 않기 때문에 아포단백이나 인지질로 주위를 덮어 리포단백(lipo protein)으로서 혈중에 순환하고 있다. 이는 리포단백의 밀도에 따라 초저밀도 리포단백 (VLDL) 콜레스테롤과 저밀도 리포단백 (LDL) 콜레스테롤 그리고 고밀도 리포단백 (HDL) 콜레스테롤이 있다. 그 중 VLDL, LDL 콜레스테롤은 간으로부터 생성되어 혈액을 통하여 전신에 순환하며, LDL 콜레스테롤은 활성산소, 혈관손상, 혈관협착 등과 같은 여러 가지 요인에 의해 혈관 벽에 침착시켜 동맥경화 등을 유발시킴으로써²³⁻²⁵⁾, 총콜레스테롤과 LDL콜레스테롤의 혈중 농도는 고지혈증의 판단에 중요한 단서가 된다. 반면 고밀도 리포단백으로 형성되어 있는 HDL 콜레스테롤은 조직과 혈액속의 콜레스테롤 에스테르를 간으로 운반하여 대사시킴으로써 콜레스테롤을 체외로 배설하는 역할을 하여 고지혈증을 억제 시키는 기능을 담당한다 (Fig. 13). 따라서 최근의 고지혈증 치료제 개발의 경향을 보면 LDL 콜레스테롤 수치 강하작용 뿐만 아니라 HDL 콜레스테롤 수치의 상승작용에도 중점을 두고 있다²⁶⁻²⁹⁾. Paoletti 등³⁰⁾이 개발 중인 치료제의 임상실험 뿐만 아니라 LDL 콜레스테롤 수치를 떨어뜨리는 작용뿐만 아니라 HDL 콜레스테롤을 상승시키는 작용이

고지혈증에서 치료효과를 증가시키는 것으로 보고하고 있다. 본 실험에서는 SJB의 투여를 통해 고콜레스테롤 식이에 의해 증가된 혈청 중의 총콜레스테롤의 농도와 LDL 콜레스테롤의 농도를 대조군에 비하여 감소시킨 반면, HDL 콜레스테롤의 농도는 증가시켰으므로 (Fig. 6-8), 본 SJB가 콜레스테롤의 병리적 대사 기전에 유의적으로 작용하고 있음을 입증해 주고 있다.

Triglyceride는 콜레스테롤의 전구체로서 지방산이 글리세롤과 에스테르 결합한 것으로 에너지원으로 사용되고 간에서 합성된 triglyceride는 단백질과 결합하여 초저밀도지질단백질 (very low density lipoprotein, VLDL)로써 혈중에 방출되어 지질의 운반을 담당한다. 또한 대부분 중성지방과 콜레스테롤로 이루어진 VLDL은 LDL로 변환되어 혈중에 유리하며 동맥경화 등을 일으키는 요인으로 작용하는데^{31,32}, 본 연구에서는 혈청 중의 triglyceride 수치가 대조군에 비하여 유의성 있게 감소함으로써 SJB가 triglyceride의 생성을 저해함과 동시에 콜레스테롤의 합성을 감소시킬 수 있다(Fig. 9).

지질과산화 반응은 세포 내 산화적 자극의 증가에 의해 활성산소의 증가나 방어 체계 능력의 감소가 일어났을 때에 심각한 독성을 나타내게 된다. Lipid peroxide의 생성은 병태 생리 현상이나 조직의 손상 정도를 나타내는 지표로, 활성산소에 의해 과산화 반응이 시작되며 연쇄적으로 진행되는데³³⁻³⁵, 본 연구에서 간조직의 지질과산화도는 대조군에 비하여 유의성 있게 감소시키는 것으로 나타났다(Fig. 10).

콜레스테롤은 체 내에서 만들어지게 되는데, 첫째는 식이적으로 흡수된 콜레스테롤이 소장에서 흡수되고 유리형 콜레스테롤은 ACAT에 의해 세포내에서 에스테르화된 콜레스테롤로 저장된다. 에스테르화된 콜레스테롤은 아포단백질과 다른 지질들이 결합되어 지방 조직이나 근육에 지질을 공급한 다음 나머지는 수용체를 통하여 간으로 유입된다³⁶⁻³⁸. 두 번째는 간에서 합성되는데, LDL 수용체에 의해 유입된 콜레스테롤은 두 분자의 acetyl-CoA가 간에 존재하는 HMG-CoA 환원 효소 및 여러 효소에 의해 매개되어 여러 단계의 과정을 거쳐 유리형 콜레스테롤로 생합성되며, 이렇게 생합성된 유리형 콜레스테롤은 세포막, 스테로이드 호르몬, 담즙산 등을 생산하는데 쓰이게 된다³⁹⁻⁴⁰. 한편 체 내의 콜레스테롤의 합성이 조절되어지는데 기본적으로 유리형 콜레스테롤의 합성은 식이로 흡수된 콜레스테롤의 양에 의해 조절되지만, 과잉으로 공급되어지면 간에서 HMG-CoA 환원 효소의 합성을 저해하는 방법을 통해서 콜레스테롤의 생합성을 차단하며, 간의 LDL 수용체의 생산을 저해시켜 간의 내외부로부터의 유리형 콜레스테롤의 공급을 차단한다. 또한 ACAT 효소를 활성화시켜 유리형 콜레스테롤을 에스테르화된 콜레스테롤로 전환시켜 조절하게 된다. 이렇게 효소들의 상호 조절 작용에 의해 콜레스테롤의 수치가 정상으로 유지하게 된다. 하지만 콜레스테롤이 체내에 과잉으로 공급되게 되면 세포내 콜레스테롤의 축적과 합성으로 인해 콜레스테롤이 생체 내에서 필요 이상 존재하게 되어 고지혈증 등을 유발하게 된다⁴¹⁻⁴². 따라서 콜레스테롤을 세포내에 저장하는 효소인 ACAT의 저해와 콜레스테롤 합성 효소인 HMG-CoA 저해에 의한 고지혈증 억제제 개발은 가장 널리

알려진 방법이다. 따라서 본 연구에서는 간 조직에서 ACAT와 HMG-CoA 효소의 유전적 발현을 측정하였는데, 두 가지 모두에서 유의성 있는 감소를 나타냄으로써(Fig. 11, 12) 본 시료가 고지혈증의 개선에 매우 효과적임을 실험적으로 증명하였다.

이상의 결과들을 통해 SJB가 total cholesterol과 LDL cholesterol 등의 고지혈증 유발 인자 수치를 감소시키고, 간조직의 지질과산화 억제와 세포내 콜레스테롤의 축적과 생합성을 감소시킴으로써 고지혈증에 유의적임을 실험적으로 확인할 수 있었다.

결론

消脂丸加味方이 高脂血症에 미치는 效能을 實驗的으로 糾明하고자 기본적인 혈액, 관련인자 및 산화적 손상에 대한 항산화 효능을 평가하여 다음과 같은 結論을 얻었다.

消脂丸加味方은 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の 濃度에서 human fibroblast cell에 대하여 87% 이상의 生存率을 나타내었다. 消脂丸加味方은 간기능 검사에서 GOT, GPT, ALT의 血中 數値를 對照群에 비하여 有意性있게 減少시켰다. 消脂丸加味方은 DPPH 소거능과 SOD 유사활성을 농도 의존적으로 증가시켰다. 消脂丸加味方은 高脂血症 誘發에 따른 體重을 減少시키고, 肝의 무게를 有意性 있게 減少시켰다. 消脂丸加味方은 高脂血症 誘發에 따른 total cholesterol과 LDL cholesterol 血中 數値를 對照群에 비하여 有意性있게 減少시킨 반면, HDL cholesterol 數値는 有意性 있게 增加시켰다. 消脂丸加味方은 高脂血症 誘發에 따른 triglyceride 血中 數値를 對照群에 비하여 有意性있게 減少시켰다. 消脂丸加味方은 高脂血症 誘發에 따른 脂質過酸化度를 對照群에 비하여 有意性있게 減少시켰다. 消脂丸加味方은 高脂血症 誘發에 따른 ACAT와 HMG-CoA 유전자 발현을 對照群에 비하여 有意性 있게 減少시켰다.

以上の 結果로 보아 現在 臨床에서 活用되는 消脂丸加味方의 抗高脂血 作用이 實驗的으로 檢證되어, EBM 구축과 더불어 臨床에서의 활용도를 제고할 수 있을 것으로 기대된다. 아울러 향 후 개별 약물에 대한 검색을 통하여 약물간의 상승 작용 및 개별 약물내 유효 물질에 대한 심도있는 논의가 필요할 것으로 사료된다.

참고문헌

- 통계청. 2008 한국의 사회지표. 2009년 2월.
- Chun, S., Min, W., Park, H., Song, J., Kim, J., Min, Y., Kim, J., Lee, S. The risk groups for coronary heart disease in Koreans. Assessment by distribution of serum lipid concentrations. Clin Chem Lab Med 37: 969-974, 1999.
- Kim, J.Q., Song, J., Park, Y.B., Lee, H.K., Kim, Y.S., Ryoo, U.H., Heo, G.B. National cholesterol treatment guidelines in Korean population - setting-up the cutpoints for high blood cholesterol. J Korean Med Sci. 12: 17-22, 1997.

4. National Cholesterol Education Program National Heart, Lung, and Blood Institute National Institutes of Health. Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III), Executive Summary. NIH Publication No. 01-3670, 2001.
5. Grundy, S.M. Approach to lipoprotein management in 2001 national cholesterol guidelines. *Am J Cardiol* 90 (suppl):11i-21i, 2002.
6. Fedder, D.O., Koro, C.E., L, G.J. New national cholesterol education program III guidelines for primary prevention lipid-lowering drug therapy. *Circulation* 105: 152-156, 2002.
7. Chuang, P., Langone, A.J. Ezetimibe reduces low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) in renal transplant patients resistant to HMG-CoA reductase inhibitors. *Am J Ther.* 14(5):438-441, 2007.
8. Adameová, A., Kuzelová, M., Faberová, V., Svec, P. The hypolipidemic effect of a new ACAT inhibitor, VULM 1457, in diabetic-hypercholesterolaemic rats. *Pharmazie.* 60(9):714-715, 2005.
9. Westerterp, M., de Haan, W., Berbée, J.F., Havekes, L.M. Rensen PC. Endogenous apoC-I increases hyperlipidemia in apoE-knockout mice by stimulating VLDL production and inhibiting LPL. *J Lipid Res.* 247(6):1203-1211, 2006.
10. Uchida, K., Masayuki, O., Ohno, K., Hashiguchi, M., Echizen, H., Rikihisa, T., Ogata hiroyasu. Drug Use Evaluation of Antidyslipidemic Agents at a Community Hospital in Japan. *PSJ* 122(7):499-506, 2002.
11. Sato, N., Fujii, K., Yuge, O. In vivo and in vitro sevoflurane-induced lipid peroxidation in guinea-pig liver microsomes. *75(6):366-370*, 1994.
12. Yang, C.C., Kao, C.C. Cardiovascular diseases and the risk of venous thromboembolism: a hospital-based case-control study. *J Chin Med Assoc.* 70(3):103-109, 2007.
13. Kannel, W.B. High-density lipoproteins: epidemiologic profile and risks of coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 52(4):9B-12B, 1983.
14. Shipley, M.J., Pocock, S.J., Marmot, M.G. Does plasma cholesterol concentration predict mortality from coronary heart disease in elderly people? 18 year follow up in Whitehall study. *BMJ.* 303(6794):89-92, 1991.
15. Miura, S., Saku, K. Therapies for raising high-density lipoprotein cholesterol. *Intern Med.* 46(7):339-340, 2007.
16. Schoenhagen, P., Tuzcu, E.M., Apperson-Hansen, C., Wang, C., Wolski, K., Lin, S., Sipahi, I., Nicholls, S.J., Magyar, W.A., Loyd, A., Churchill, T., Crowe, T., Nissen, S.E. Determinants of arterial wall remodeling during lipid-lowering therapy: serial intravascular ultrasound observations from the Reversal of Atherosclerosis with Aggressive Lipid Lowering Therapy (REVERSAL) trial. *Circulation.* 113(24):2826-2834, 2006.
17. 良石主編. 秘方大全(名醫珍藏). 北京科學技術出版社, 2006.
18. Slowing, K., Ganado, P., Sanz, M., Ruiz, E., Tejerina, T. Study of garlic extracts and fractions on cholesterol plasma levels and vascular reactivity in cholesterol-fed rats. *J Nutr.* 131(3s):994S-999S, 2001.
19. Siegel-Axel, D., Daub, K., Seizer, P., Lindemann, S., Gawaz, M. Cardiovasc Res. Platelet lipoprotein interplay: trigger of foam cell formation and driver of atherosclerosis. *78(1):8-17*, 2008.
20. Igarashi, K., Tsuji, M., Nishimura, M., Horimoto, M. Improvement of endothelium-dependent coronary vasodilation after a single LDL apheresis in patients with hypercholesterolemia. *J Clin Apher.* 19(1):11-16, 2004.
21. Tang, F.T., Qian, Z.Y., Liu, P.Q., Zheng, S.G., He, S.Y., Bao, L.P., Huang, H.Q. Crocetin improves endothelium-dependent relaxation of thoracic aorta in hypercholesterolemic rabbit by increasing eNOS activity. *Biochem Pharmacol.* 72(5):558-565, 2006.
22. 横山. 冠動脈疾患과 酸化스트레스. 炎症, pp 131-138, 2003.
23. 小崎丈太郎. 小山千穂:特集 高脂血症治療の曲がり角 *Nikkei Medical* 6月号, pp 60-69, 1997.
24. Fruchart, J.C., Duriez, P. Mode of action of fibrates in the regulation of triglyceride and HDL-cholesterol metabolism. *Drugs Today (Barc).* 42(1):39-64, 2006.
25. Shrestha, S., Volek, J.S., Udani, J., Wood, R.J., Greene, C.M., Aggarwal, D., Contois, J.H., Kavoussi, B., Fernandez, M.L. A combination therapy including psyllium and plant sterols lowers LDL cholesterol by modifying lipoprotein metabolism in hypercholesterolemic individuals. *J Nutr.* 136(10):2492-2497, 2006.
26. Frick, M.H., Elo, O., Haapa, K., Heinonen, O.P., Heinssalmi, P., Helo, P., Huttunen, J.K., Kaitaniemi, P., Koskinen, P., Manninen, V., et al. Helsinki Heart Study: primary-prevention trial with gemfibrozil in middle-aged men with dyslipidemia. Safety of treatment, changes in risk factors, and incidence of coronary heart disease. *N Engl J Med.* 317(20):1237-1245, 1987.
27. Tsutsumi, K., Inoue, Y., Murase, T. Effects of NO-1886, a lipoprotein lipase promoting agent, on homozygous and heterozygous Watanabe heritable hyperlipidaemic rabbits. *Arzneimittelforschung.* 50(2):118-121, 2000.
28. Jukema, J.W., Bruschke, A.V., van Boven, A.J., Reiber, J.H., Bal, E.T., Zwinderman, A.H., Jansen, H., Boerma, G.J., van Rappard, F.M., Lie, K.I., et al. Effects of lipid lowering by pravastatin on progression and regression of coronary artery disease in symptomatic men with normal to

- moderately elevated serum cholesterol levels. The Regression Growth Evaluation Statin Study (REGRESS). *Circulation*. 91(10):2528-2540, 1995.
29. Sacks, F.M., Pfeffer, M.A., Moye, L.A., Rouleau, J.L., Rutherford, J.D., Cole, T.G., Brown, L., Warnica, J.W., Arnold, J.M., Wun, C.C., Davis, B.R., Braunwald, E. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. *N Engl J Med*. 335(14):1001-1009, 1996.
 30. Paoletti, R., Fahmy, M., Mahla, G., Mizan, J. and Southworth, H. Rosuvastatin is superior to pravastatin and simvastatin in reducing low-density lipoprotein cholesterol, enabling more hypercholesterolemic patients to achieve low-density lipoprotein cholesterol targets. *Am Coll Cardiol Annual Scientific Session*, 2001.
 31. 정은아, 김윤경, 김남재, 김동현, 이상인. 가미과루해백황금탕의 항고지혈증 효과. *응용약물학회지* 9: 104-111, 2001.
 32. Kjorholt, C., Akerfeldt, M.C., Biden, T.J., Laybutt, D.R. Chronic hyperglycemia, independent of plasma lipid levels, is sufficient for the loss of beta-cell differentiation and secretory function in the db/db mouse model of diabetes. *Diabetes*. 54(9):2755-2763, 2005.
 33. Halliwell, B. Biochemical mechanism accounting for the toxic action of oxygen on living organisms. the key role of superoxide dismutase. *Cell. Biol. Int. Rep.* 2: 11, 1978.
 34. Susan, M.D. and Darry, L.F. Normobaric oxygen toxicity of the lung. *New. Engl. J. Med.* 303: 76, 1980.
 35. Freman, B.A. and Crapo, J.D. *Biology of disease* : Free radicals and tissue injury. *Lab. Invest.* 47: 412, 1982.
 36. Vaziri, N.D., Liang, K. Up-regulation of acyl-coenzyme A:cholesterol acyltransferase (ACAT) in nephrotic syndrome. *Kidney Int.* 61(5):1769-1775, 2002.
 37. Vaziri, N.D., Liang, K. ACAT inhibition reverses LCAT deficiency and improves plasma HDL in chronic renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol.* 287(5):F1038-1043, 2004.
 38. Zoltowska, M., Delvin, E.E., Paradis, K., Seidman, E., Levy, E. Bile duct cells: a novel in vitro model for the study of lipid metabolism and bile acid production. *Am J Physiol.* 276(2 Pt 1):G407-414, 1999.
 39. Liang, K., Kim, C.H., Vaziri, N.D. HMG-CoA reductase inhibition reverses LCAT and LDL receptor deficiencies and improves HDL in rats with chronic renal failure. *Am J Physiol Renal Physiol.* 288(3):F539-544, 2005.
 40. Roberts, C.K., Liang, K., Barnard, R.J., Kim, C.H., Vaziri, N.D. HMG-CoA reductase, cholesterol 7 α -hydroxylase, LDL receptor, SR-B1, and ACAT in diet-induced syndrome X. *Kidney Int.* 66(4):1503-1511, 2004.
 41. Bocan, T.M., Krause, B.R., Rosebury, W.S., Lu, X., Dagle, C., Bak Mueller, S., Auerbach, B., Sliskovic, D.R. The combined effect of inhibiting both ACAT and HMG-CoA reductase may directly induce atherosclerotic lesion regression. *Atherosclerosis.* 157(1):97-105, 2001.
 42. Lee, M.K., Moon, S.S., Lee, S.E., Bok, S.H., Jeong, T.S., Park, Y.B., Choi, M.S. Naringenin 7-O-cetyl ether as inhibitor of HMG-CoA reductase and modulator of plasma and hepatic lipids in high cholesterol-fed rats. *Bioorg Med Chem.* 11(3):393-398, 2003.