

益氣化瘀湯加味方이 고지방 식이로 유발된 생쥐의 항고지혈 및 항산화에 미치는 효과

신용진 · 전상윤^{1*}

원광대학교 한의과대학 내과학교실, 1: 동신대학교 한의과대학 내과학교실

Anti-hyperlipidemic and Anti-oxidant effects of Kgihwaetang-gamibang in High Cholesterol Diet-induced Mice Model

Yong Jeon Shin, Sang Yun Jeon^{1*}

Department of Internal Medicine, College of Korean Medicine, Wonkwang University,

1: Department of Internal Medicine, College of Korean Medicine, DongShin University

This study was conducted to investigate the anti-hyperlipidemic and anti-oxidative activities of *Ikgihwaetang-gamibang*(IK). We observed the effect of IK on lipid factor, inflammation factor, body weight and organ weight, and liver after administering IK to hyperlipidemia mice triggered by high fat diet. Additionally, we used Raw 264.7 cells to investigate the changes in anti-oxidative activity and the effects of anti-inflammation. Administration of IK resulted in reduction of total cholesterol, LDL cholesterol, TG, and glucose in blood serum while a clear increase in HDL cholesterol. The production of IL-1 β and IL-6, and ROS and NO also decreased. The results showed that IK has anti-hyperlipidemic and anti-oxidative effects, and suggested its potential use in prevention and treatment of hyperlipidemia and its associated diseases.

keywords : *Ikgihwaetang-gamibang*, Hyperlipidemia, HDL Cholesterol, Anti-oxidation

서론

고지혈증은 혈중에 cholesterol 또는 triglyceride가 비정상적으로 증가된 상태로 유전적인 요인과 서구화된 식사, 스트레스, 운동 부족 등의 환경적인 요인에 의하여 영향을 받는 다 인자 질환이며¹⁾, 순환기계 질환의 직접적인 원인으로 인식되어 이에 대한 치료 방법이 다양하게 연구되고 있다²⁾.

고지혈증 치료 약물로는 HMG-CoA 환원효소 저해제(3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase inhibitor), 담즙산 제거제(bile acid sequestrant), 니코틴산(nicotinic acid) 및 피브린산 유도체(fibrates) 계통의 많은 약물들이 개발되어 사용되고 있으나, 이러한 약물들을 장기간 복용 시 지용성 비타민 결핍증, 소화기계 질환, 간과 신장 기능 저하에 따른 부작용 등이 나타나³⁾ 지속적인 보전이 요구되어, 최근에는 천연물에서의 연구가 이루어지고 있다.

생체의 노화 및 여러 가지 산화적 스트레스의 증가는 체내에서 유리기(free radical)의 과다 생성을 촉진하거나 항산화계의 활성을

감소시켜 세포에 상해를 주며, 혈관을 비롯한 여러 조직의 손상을 일으키는데 이것을 산화적 손상이라고 하며, 여러 가지 만성퇴행성 질환의 원인으로 지적되고 있다⁴⁾.

고지혈증에 대한 한의학적 연구로는五味子 등의 약침을 사용하거나⁵⁾, 麥芽 등의 한약재⁶⁾와 消脂丸加味方, 加味地黃湯, 何首烏加味方, 通心絡, 血府逐瘀湯 등의 처방⁷⁻¹¹⁾을 사용한 실험적 연구가 보고되고 있으며, 항산화에 대한 한의학적 연구로 瓜蒌¹²⁾, 天龍子¹³⁾, 시호사물탕¹⁴⁾등을 이용한 실험적 연구가 보고되고 있다.

益氣化瘀湯加味方은 郭 등¹⁵⁾의《心血管病 妙法良方大全 - 高脂血症編》에 수록된 처방으로 임상에서 고지혈증치료제로 널리 쓰이고 있다. 이에 저자는 고지혈증 치료에 다용되고 있는 益氣化瘀湯加味方の 효능을 객관적으로 증명함과 동시에 기초적 자료를 제공하기 위하여 Raw 264.7 세포를 이용하여 항산화 효과를 측정하고, 고지혈증 질환 모델 동물인 6주령의 수컷 C57BL/6J 생쥐를 이용하여 혈액학적 지질인자, 혈청 내 항염증 효과, 체중 및 장기의 무게 변화, 간 조직의 cholesterol 인자 발현에 미치는 영향 등을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

* Corresponding author

Sang Yun Jeon, DongShin University Oriental Hospital, 141, Wolsan-ro, Nam-gu, Gwangju, Korea

E-mail : damiano70@hanmail.net Tel : +82-62-350-7207

Received : 2015/08/03 Revised : 2015/10/19 Accepted : 2015/10/22

© The Korean Society of Oriental Pathology, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2015.10.29.5.422

Available online at http://www.hantopic.com/kjopp/KJOPP.htm

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

益氣化癆湯加味方(Ikghwaetang-gamibang, 이하 IK)의 구성 약재들은 ㈜옴니허브에서 구입하여 동신대부속광주한방병원에서 정선 후 사용하였으며, 1첩의 구성 약재와 분량은 다음과 같다 (Table 1).

Table 1. The prescription of IK.

Herbal medicine name	Pharmacognostic name	Weight(g)
黃芪	<i>Astragali Radix</i>	30
丹參	<i>Salviae Radix</i>	30
山查	<i>Crataegi Fructus</i>	20
茵陳蒿	<i>Artemisiae Capillaris Herba</i>	20
何首烏	<i>Polygoni Multiflori Radix</i>	20
葛根	<i>Puerariae Radix</i>	15
白芍藥	<i>Paeoniae Radix</i>	15
赤芍藥	<i>Paeoniae Radix Rubra</i>	15
澤瀉	<i>Alimatis Rhizoma</i>	15
黃精	<i>Polygonati Rhizoma</i>	10
決明子	<i>Cassiae Semen</i>	5
甘菊	<i>Chrysanthemi Flos</i>	3
Total amount		198

Table 2. The Components of Normal Diet

Components	Percentage(%)
Crude protein	20.0
Crude fat	4.5
Crude fiber	6.0
Crude calcium oxide	7.0
Calcium	0.5
Phosphorus	1.0
Total	39.0

Table 3. The Components of High Cholesterol Diet

Components	Weight(gm)
Casein, 80 Mesh	200.00
L-Cystine	3.00
Maltodextrin 10	125.00
Sucrose	68.80
Cellulose, BW200	50.00
Soybean Oil	25.00
Lard	245.00
Mineral Mix S10026	10.00
DiCalcium Phosphate	13.00
Calcium Carbonate	5.50
Potassium Citrate, 1 H2O	16.50
Vitamin Mix V10001	10.00
Choline Bitartrate	2.00
FD&C Blue Dye #1	0.05
Total amount	773.85

2) 세포

RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(Korea)에서 구입하여 사용하였다.

3) 동물 및 사료

본 실험은 대전대 동물실험윤리 위원회의 승인(동물사용 윤리

위원회 승인번호 - DJUARB 2013-014)을 받아 동물윤리준칙에 의거하여 실시하였으며, C57BL/6J 생쥐(6주령, 수컷, 18~22 g)는 ㈜중앙실험동물(Korea)에서 구입하여 사용하였다. 생쥐는 2주간의 안정기를 거쳤으며, 안정기 동안 모든 실험군에는 일반 사료(㈜퓨리나, Korea)를 자유식이 하였다. 이후 정상군에는 일반 사료를, 고지혈증을 유도하기 위한 대조군과 IK 투여군에는 고콜레스테롤 사료(㈜중앙실험동물, Korea)를 충분한 물과 함께 2주간 자유 식이 하였다. 사육실은 conventional system으로 22 ± 2°C, 1일 중 12시간은 200-300 Lux로 조명하고, 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 일반 사료, 고콜레스테롤 사료의 kg당 조성의 내용과 분량은 다음과 같다(Table 2, Table 3).

2. 방법

1) 검액 조제

IK 2첩을 80% ethanol 1,000 mL에 넣어 3시간 동안 환류추출 후 얻은 여과액을 Rotary vacuum evaporator에서 감압 농축하였다. 농축된 용액을 1첩 분량으로 Freeze dryer로 동결 건조하여 26.40 g(수득율 : 13.3%)의 분말을 얻었으며, 얻어진 분말은 냉동고(-80°C)에서 보관하고 필요한 농도에 따라 3차 증류수에 희석하여 사용하였다.

2) 세포독성 및 간 독성 검사

(1) 세포독성 측정

Raw 264.7 세포는 96 well plate에 2×10⁴ cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양 후, 실험실시 전 새로운 배양액으로 교체하였고, IK 추출물을 각각 1, 10, 100(µg/mL)의 농도로 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 10 µL의 WST solution을 첨가하여 세포배양기(37°C, 5% CO₂)에서 30분간 반응시키고 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시하였다.

(2) 간 독성 검사

혈청 내 Aspartate aminotransferase (AST), Alanine aminotransferase (ALT), Alkaline phosphatase (ALP)의 활성도 측정을 위해 실험 종료 후 심장 천자법으로 채혈하여, 30분간 상온에서 굳히고 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 후 혈청을 분리하여, 서울의과학연구소에 분석 의뢰하였다. AST, ALT, ALP의 활성도는 JSCC UV method의 원리를 이용하여 생화학 자동분석기로 측정하였다.

4) In vivo

(1) 고지혈 유도 및 약물투여

실험은 정상군, 고지혈증을 유도한 대조군, 대조군에 IK 추출물을 투여한 실험군으로 각 8마리씩 나누어 대조군과 실험군에는 고콜레스테롤 사료를 자유식이 하며 실험을 진행하였다. 정상군과 대조군에는 증류수를, 실험군에는 IK 추출물을 매일 1회, 오전 10시에 200 µL(200 mg/kg) 씩 투여하였으며, IK 추출물 투여량은 1첩을 성인 체중 60 kg에 1회 투여용량으로 하고, 1첩으로부터 얻은 사료를 생쥐의 체중 30 g으로 기준하여 산출하였다.

(2) 체중 및 장기 무게 측정

안정기 2주와 고지혈증 유발기 2주를 거친 후, 고지혈증 유발

생쥐에 IK 추출물을 4주간 투여하였다. 0주부터 실험이 진행되는 8주까지 매주 체중을 측정하고, 실험 종료 후 간 조직을 절취하여 g 단위로 측정하였다.

(3) 혈액화학적검사

혈중 Total cholesterol, High density lipoprotein cholesterol (HDL cholesterol), Low density lipoprotein cholesterol(LDL cholesterol), Triglyceride(TG), Glucose 측정을 위해 실험 종료 후 심장 천자법으로 채혈하여, 30분간 상온에서 굳히고 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 후 혈청을 분리하여 서울의과학연구소에 분석 의뢰하였다.

(4) 혈청 내 염증성 Cytokine 측정

혈청 내 염증성 Cytokine 측정을 위해 Luminex를 사용하였다. Ether로 마취 후 심장 천자법으로 채혈하여, 30분간 상온에서 굳히고 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 후 혈청을 분리하여 IL-1 β , IL-6를 측정하였다.

(5) 조직병리학적검사

Ether로 마취 후 심장 천자법으로 채혈하고 흉부 및 복강을 절개하여 간 조직을 적출하였으며, 적출한 조직은 10% 중성 포르말린에 48시간 고정 후 흐르는 수돗물에서 12시간 수세하며 고정액을 완전 제거하였다. 조직의 탈수를 위해 알코올 농도 60%에서부터 100% 순으로 탈수하고, Xylene에 투명과정을 거친 다음 파라핀 블럭을 제작한 후 박절기(microtome)를 이용해 3~4 μ m 두께로 절편을 만들어 탈 파라핀 및 함유과정을 거쳐 Hematoxyline과 Eosin(H & E) 및 Masson-trichrome staining을 실시하여 광학 현미경상에서 관찰 및 사진 촬영하였다.

(6) 면역조직화학검사(Immunohistochemistry)

Adipocyte different related protein(ADRP)의 발현을 알아보기 위해 라온바이오(Raon Bio Co., Korea)에 의뢰하여, 다음과 같은 방법으로 실험을 진행하였다. 보존 상태가 양호한 간 조직 파라핀 Section을 선택하여, 박절기(Microtome)로 3~4 μ m 두께로 절편하고 슬라이드에 얹어 60°C에서 20-30분 동안 방치한 후 100% Xylene으로 파라핀을 제거하고, 100%, 90%, 80%, 70% 알코올로 처리한 다음 증류수로 함수시켰다. 파라핀 고정으로 조직 내 감추어진 항원을 노출시키기 위해 100 mL Sodium citrate buffer(pH 6.0)용액에 넣고 스티머에서 1시간 동안 중탕한 후 증류수로 수세하여 1차 항체로 4°C에서 overnight 동안 반응시킨 후, 이차항체와 반응을 진행시켰으며, 면역반응의 측정은 Kit을 이용하여 0.05% Diaminobenzidine으로 발색반응을 일으켜 실시하였다.

5) In vitro

(1) 세포 배양

동결된 Raw 264.7 세포를 해동시킨 후 50 mL 튜브에 옮겨, Phosphate buffered saline(PBS) 9 mL를 넣어 세포를 부유시킨 다음 1,200 rpm에서 5분간 원심분리 후 상등액을 제거하였다. 세포가 있는 튜브에 10% Fetal bovine serum(FBS)와 1% Penicillin으로 조성된 Dubellco's minimum essential medium(DMEM) 배지 1 mL를 넣어 부유시켰다. 100 mm Dish에 9 mL의 배지를 넣고, 부유시킨 세포 1 mL를 넣어 세포배양기(37°C, 5% CO₂)에서 배양하였다. 계대배양 횟수는 5회 이상으로 하였고,

시료들을 처리하기 전 24시간 적응시켰다.

(2) 항산화 효능 측정

① ABTS(2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) radical 소거능 측정

ABTS assay는 기존의 방법¹⁶을 96 well plate에 맞게 수정하여 실시하였다. IK 추출물은 최종 농도가 1, 10, 100, 1,000(μ g/mL)가 되도록 희석시키고, ABTS용액은 7.4 mM ABTS와 2.6 mM Potassium persulphate를 제조한 후, 암소에 하루 동안 방치하여 양이온(ABTS+)을 형성시킨 다음 734 nm에서 흡광도를 측정하여 흡광도 값이 1.5 이하가 나올 수 있도록 희석하고, 희석된 ABTS+용액 150 μ L와 IK 추출물을 각각 5 μ L 혼합하여 실온에서 10분간 반응시킨 후, 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화 효능은 증류수를 대조군으로 하여 대조군에 대한 ABTS 라디칼 소거능을 백분율로 나타내었다.

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

② 세포내 ROS(Reactive oxygen species) 생성 측정

Raw 264.7 세포에서 ROS를 측정하기 위하여 DCF-DA(2',7'-dichlorofluorescein diacetate)를 이용하였다. 12 well plate에 Raw 264.7 세포를 2×10^5 cells/well이 되도록 분주하여 24시간 동안 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였으며, IK 추출물을 1, 10, 100(μ g/mL)의 농도로 처리하고, Lipopolysaccharide(LPS) 1 μ g/mL의 농도로 처리한 후, 다시 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배양 후, 1,200 rpm에서 5분간 원심분리하여 모은 세포를 PBS로 2회 세척하고, DCF-DA 10 μ M이 되도록 첨가하여 15분 동안 암소, 상온에 두었다. 염색 후 차가운 PBS를 넣어 1,200 rpm에서 5분간 원심분리 후 상등액을 제거하고 다시 PBS 400 μ L를 부유시켜 유세포 분석기(Flow cytometer, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ USA)로 형광강도의 세기에 따른 변화를 분석하였다.

③ NO(Nitric oxide) 측정

NO의 농도는 griess reagent system을 이용하여 측정하였으며, Raw 264.7 세포는 96 well plate에 2×10^4 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였다. IK 추출물을 1, 10, 100(μ g/mL)의 농도로 처리 후, LPS 1 μ g/mL의 농도로 처리하여 다시 24시간 동안 세포배양기(37°C, 5% CO₂)에서 배양하였으며, N1 buffer 50 μ L를 각 well에 처리하고 10분간 상온에서 반응시킨 후, N2 buffer 50 μ L를 각 well에 처리하여 10분간 반응시켰다. 반응 후 540 nm에서 흡광도를 측정하고, Nitrite standard의 농도별 표준곡선으로 배양액의 NO 농도를 결정하였다.

3. 통계처리

결과는 SPSS 11.0의 Unpaired student's T-test로 통계처리하고, P < 0.05, P < 0.01 및 P < 0.001 수준에서 유의성을 검정하였다.

결 과

1. 세포 독성 및 간 독성 검사

1) 세포독성

Raw 264.7 세포주에서 세포 생존율을 측정 한 결과, 대조군을 100.0 ± 12.2%로 나타냈을 때, IK 추출물은 각각 1, 10, 100(µg/ml) 농도에서 145.7 ± 16.7%, 140.3 ± 13.8%, 139.7 ± 9.6%의 세포 생존율을 나타내었다(Fig. 1).

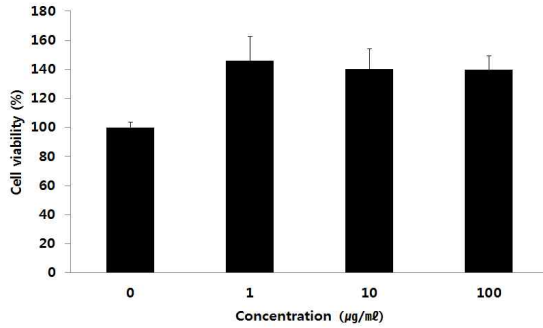


Fig. 1. Cell viability of IK extract in Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cell was treated with 1, 10 and 100(µg/ml) of IK extract for 24hr. Cell viability was measured using an MTT assay. The results were expressed as mean ± S.D. from three independent experiments.

2. 간 독성에 미치는 영향

1) Aspartate aminotransferase(AST)

혈청 중의 AST를 측정한 결과, AST는 정상군이 65.4 ± 4.7 U/L, 대조군이 153.0 ± 8.2 U/L, IK 투여군이 111.8 ± 7.2 U/L로 나타나, 대조군에 비하여 IK 투여군에서 유의성 있게(**:P <0.01) 감소하였다(Fig. 2).

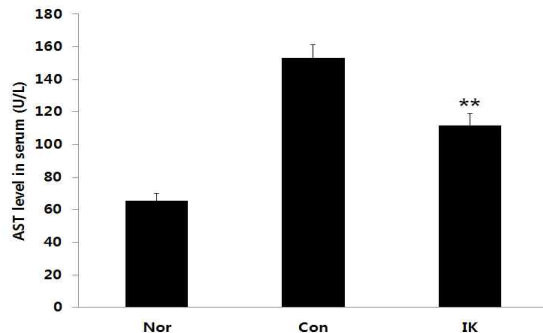


Fig. 2. Effect of IK extract on the AST level in high cholesterol diet induced mice. The results were expressed as mean ± S.D. from three independent experiments. Nor, Normal C57BL/6J mice group; Con, Induced by high cholesterol diet C57BL/6J mice group; IK, Induced by high cholesterol diet C57BL/6J mice group treated with IK extract.(Significance of results, **: P <0.01)

2) Alanine aminotransferase(ALT)

혈청 중의 ALT를 측정한 결과, ALT는 정상군이 31.7 ± 1.7 U/L, 대조군이 47.6 ± 4.7 U/L, IK 투여군이 41.0 ± 3.1 U/L로 나타나, 대조군과 IK 투여군에서 유의한 차이가 나타나지 않았다(Fig. 3).

3) Alkaline phosphatase(ALP)

혈청 중의 ALP를 측정한 결과, ALP는 정상군이 93.8 ± 6.7 U/L, 대조군이 180.4 ± 8.9 U/L, IK 투여군이 132.3 ± 8.5 U/L

로 나타나, 대조군에 비하여 IK 투여군에서 유의성 있게(**:P <0.01) 감소하였다(Fig. 4).

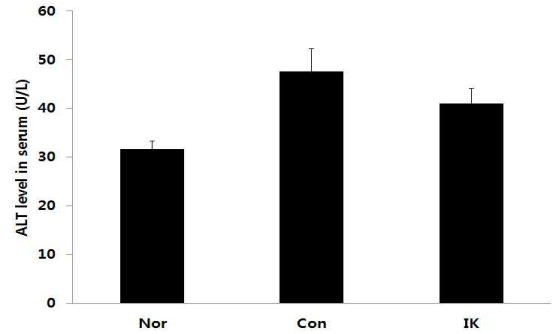


Fig. 3. Effect of IK extract on the ALT level in high cholesterol diet induced mice. The results were expressed as mean ± S.D. from three independent experiments. Nor, Normal C57BL/6J mice group; Con, Induced by high cholesterol diet C57BL/6J mice group; IK, Induced by high cholesterol diet C57BL/6J mice group treated with IK extract.

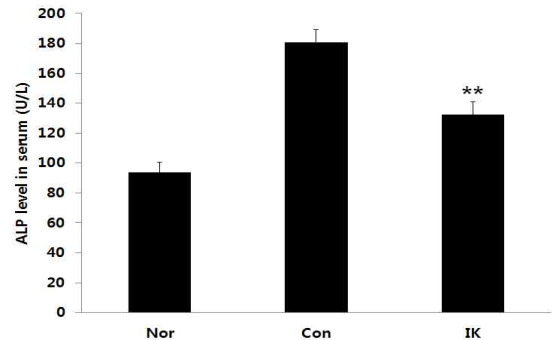


Fig. 4. Effect of IK extract on the ALP level in high cholesterol diet induced mice. The results were expressed as mean ± S.D. from three independent experiments. Nor, Normal C57BL/6J mice group; Con, Induced by high cholesterol diet C57BL/6J mice group; IK, Induced by high cholesterol diet C57BL/6J mice group treated with IK extract.(Significance of results, **: P <0.01)

3. In vivo 분석

1) 혈중 콜레스테롤에 미치는 영향

(1) Total cholesterol에 미치는 영향

혈청 내 total cholesterol을 측정한 결과, 정상군은 85.99 ± 9.54 mg/dL, 대조군은 383.95 ± 35.96 mg/dL, IK 투여군은 204.85 ± 11.03 mg/dL 으로 나타나, 대조군에 비하여 IK 투여군에서 유의성 있게(***: P <0.001) 감소하였다(Fig. 5).

(2) High density lipoprotein(HDL) cholesterol에 미치는 영향

혈청 내 HDL cholesterol을 측정한 결과, 정상군은 40.00 ± 2.83 mg/dL, 대조군은 27.25 ± 2.44 mg/dL, IK 투여군은 34.40 ± 2.62 mg/dL으로 나타나, 대조군에 비하여 IK 투여군에서 유의성 있게(** : P <0.01) 증가하였다(Fig. 6).

(3) Low density lipoprotein(LDL) cholesterol에 미치는 영향

혈청 내 LDL cholesterol을 측정한 결과, 정상군은 32.71 ± 7.70 mg/dL, 대조군은 219.38 ± 16.12 mg/dL, IK 투여군은 135.20 ± 9.08 mg/dL으로 나타나, 대조군에 비하여 IK 투여군에서 유의성 있게(***: P <0.001) 감소하였다(Fig. 7).

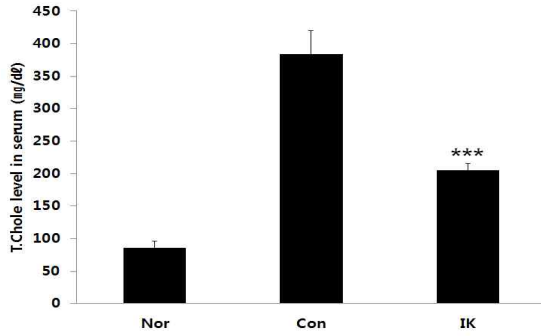


Fig. 5. Effect of IK extract on the serum total cholesterol level in high cholesterol diet induced mice. The results were expressed as mean \pm S.D.(n=8). Nor, Normal C57BL/6J mice group; Con, Induced by high cholesterol diet C57BL/6J mice group; IK, Induced by high cholesterol diet C57BL/6J mice group treated with IK extract.(Significance of results, *** : P <0.001)

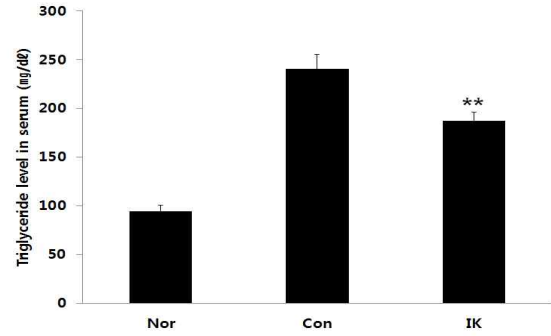


Fig. 8. Effect of IK extract on the serum TG levels in high cholesterol diet induced mice. The results were expressed as mean \pm S.D.(n=8). Nor, Normal C57BL/6J mice group; Con, Induced by high cholesterol diet C57BL/6J mice group; IK, Induced by high cholesterol diet C57BL/6J mice group treated with IK extract.(Significance of results, ** : P <0.01)

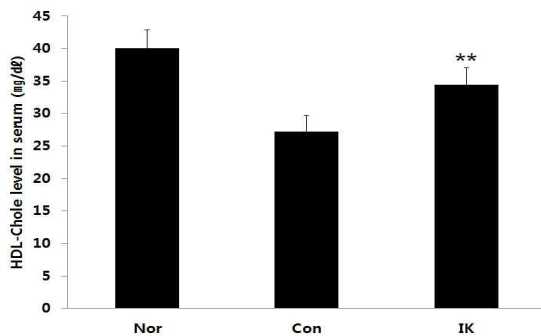


Fig. 6. Effect of IK extract on the serum HDL-cholesterol level in high cholesterol diet induced mice. The results were expressed as mean \pm S.D.(n=8). Nor, Normal C57BL/6J mice group; Con, Induced by high cholesterol diet C57BL/6J mice group; IK, Induced by high cholesterol diet C57BL/6J mice group treated with IK extract.(Significance of results, ** : P <0.01)

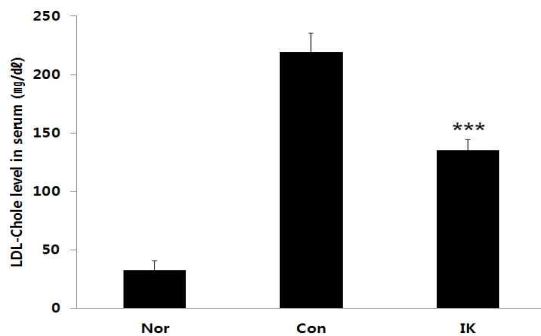


Fig. 7. Effect of IK extract on the serum LDL-cholesterol level in high cholesterol diet induced mice. The results were expressed as mean \pm S.D.(n=8). Nor, Normal C57BL/6J mice group; Con, Induced by high cholesterol diet C57BL/6J mice group; IK, Induced by high cholesterol diet C57BL/6J mice group treated with IK extract.(Significance of results, *** : P <0.001)

2) Triglyceride(TG)에 미치는 영향

혈청 내 TG를 측정된 결과, 정상군은 94.71 ± 6.10 mg/dl, 대조군은 240.95 ± 14.46 mg/dl, IK 투여군은 187.57 ± 8.99 mg/dl 으로 나타나, 대조군에 비하여 IK 투여군에서 유의성 있게(** : P <0.01) 감소하였다(Fig. 8).

3) Glucose에 미치는 영향

혈청 내 glucose를 측정된 결과, 정상군은 64.60 ± 4.22 mg/dl, 대조군은 180.44 ± 13.14 mg/dl, IK 투여군은 124.26 ± 7.17 mg/dl 으로 나타나, 대조군에 비하여 IK 투여군에서 유의성 있게(** : P <0.01) 감소하였다(Fig. 9).

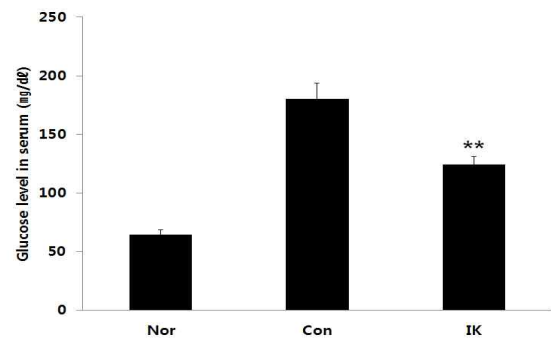


Fig. 9. Effect of IK extract on the serum glucose levels in high cholesterol diet induced mice. The results were expressed as mean \pm S.D.(n=8). Nor, Normal C57BL/6J mice group; Con, Induced by high cholesterol diet C57BL/6J mice group; IK, Induced by high cholesterol diet C57BL/6J mice group treated with IK extract.(Significance of results, ** : P <0.01)

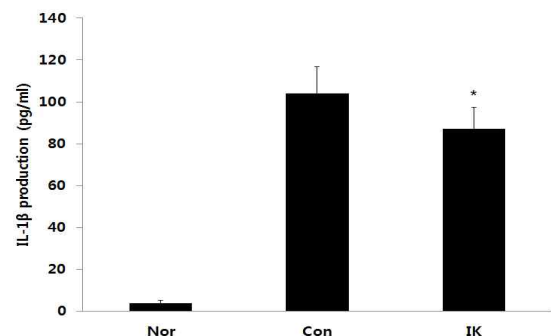


Fig. 10. Effect of IK extract on the serum IL-1 β production in high cholesterol diet induced mice. The results were expressed as mean \pm S.D.(n=8) Nor, Normal C57BL/6J mice group; Con, Induced by high cholesterol diet C57BL/6J mice group; IK, Induced by high cholesterol diet C57BL/6J mice group treated with IK extract.(Significance of results, * : P <0.05)

4) 혈청 내 염증성 cytokine에 미치는 영향

(1) IL-1β의 생성에 미치는 영향

혈청 내 IL-1β 생성량을 측정한 결과 정상군은 4.0 ± 1.3 pg/mL, 대조군은 103.9 ± 12.7 pg/mL, IK 투여군은 87.0 ± 10.5 pg/mL 으로 나타나, 대조군에 비하여 IK 투여군에서 유의성 있게(* : P <0.05) 감소하였다(Fig. 10).

(2) IL-6 생성에 미치는 영향

혈청 내 IL-6 생성량을 측정한 결과 정상군은 3.3 ± 0.7 pg/mL, 대조군은 109.6 ± 13.8 pg/mL, IK 투여군은 84.5 ± 13.9 pg/mL 으로 나타나, 대조군에 비하여 IK 투여군에서 유의성 있게(* : P <0.05) 감소하였다(Fig. 11).

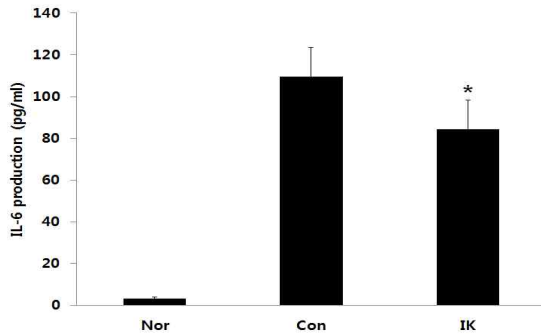


Fig. 11. Effect of IK extract on the serum IL-6 production in high cholesterol diet induced mice. The results were expressed as mean ± S.D.(n=8). Nor, Normal C57BL/6J mice group; Con, Induced by high cholesterol diet C57BL/6J mice group; IK, Induced by high cholesterol diet C57BL/6J mice group treated with IK extract.(Significance of results, * : P <0.05)

5) 체중 변화에 미치는 영향

고지혈증을 유발시킨 생쥐의 체중 증가에 미치는 영향을 측정한 결과, 실험 종료 후 정상군은 24.81 ± 0.37 g, 대조군은 26.48 ± 0.53 g, IK 투여군은 23.81 ± 0.80 g 으로 나타났고, IK 투여군은 대조군에 비하여 6주, 7주, 8주에서 유의성 있게(* : P <0.05, ** : P <0.01, *** : P <0.001) 체중 감소하였다(Fig. 12).

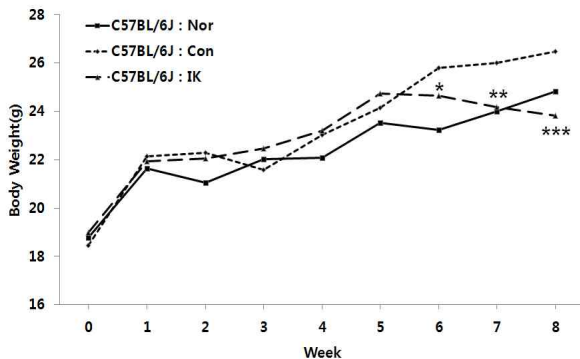


Fig. 12. Effect of IK extract on the increase of body weight in high cholesterol diet induced mice. The results were expressed as mean ± S.D.(n=8). Nor, Normal C57BL/6J mice group; Con, Induced by high cholesterol diet C57BL/6J mice group; IK, Induced by high cholesterol diet C57BL/6J mice group treated with IK extract.(Significance of results, * : P <0.05, ** : P <0.01, *** : P <0.001)

6) 간 조직 무게에 미치는 영향

고지혈증을 유발시킨 생쥐의 간 조직 무게에 미치는 영향을 측정한 결과, 정상군은 1.19 ± 0.07 g, 대조군은 1.57 ± 0.18 g, IK 투여군은 1.38 ± 0.08 g 으로 나타나, 대조군에 비하여 IK 투여군에서 유의성 있게(* : P <0.05) 감소하였다(Fig. 13).

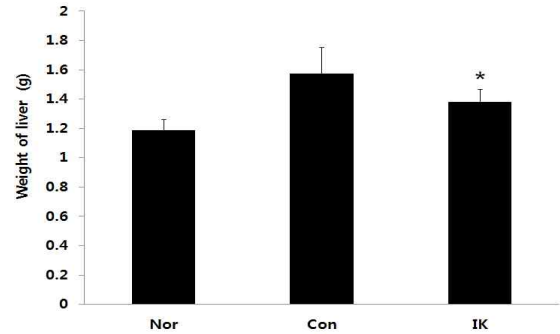


Fig. 13. Effect of IK extract on the liver in high cholesterol diet induced mice. The results were expressed as mean ± S.D.(n=8). Nor, Normal C57BL/6J mice group; Con, Induced by high cholesterol diet C57BL/6J mice group; IK, Induced by high cholesterol diet C57BL/6J mice group treated with IK extract.(Significance of results, * : P <0.05)

7) 간 조직 염색 관찰

(1) 간 조직의 세포형태에 미치는 영향

간 조직을 H & E 염색하여 관찰한 결과, 정상군은 간 세포의 핵이 세포의 중앙에 위치하고, 세포의 크기도 일정하며, 쿠퍼세포는 간 세포 사이에 전체적으로 고르게 분포되어 있으나 대조군은 지방공포가 관찰되고, 세포의 핵이 가장자리로 밀려나있으며, 정상군에 비해 쿠퍼세포의 수도 현저히 감소함을 볼 수 있다. IK 투여군에서는 간 세포내의 지방공포로 인해 세포의 크기는 커져지만, 대조군에 비해 지방공포가 적어졌고, 세포핵도 중앙에 위치하여 있는 호전현상을 나타내었다(Fig. 14).

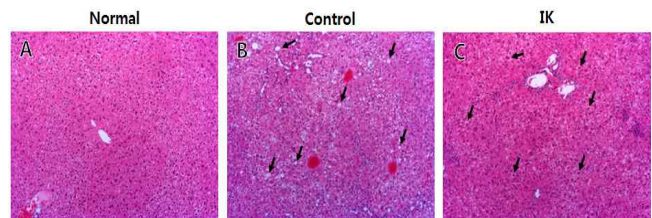


Fig. 14. Histology of liver section on normal and high cholesterol diet induced mice. Paraffin sections were stained with hematoxylin & eosin. The panels were representative photomicrographs of each of these risk at light microscope(Zeiss, ×100). Nor, Normal C57BL/6J mice group; Con, Induced by high cholesterol diet C57BL/6J mice group; IK, Induced by high cholesterol diet C57BL/6J mice group treated with IK extract. The arrows indicate the change of location of the lipid vacuoles and nuclei of the cells.

(2) 간의 섬유화에 미치는 영향

간의 섬유화를 확인하기 위해 Masson's Trichrome 염색을 시행하여 관찰한 결과, 대조군은 정상군에 비해 혈관주변으로 파란색으로 염색되어 섬유화의 정도가 심하게 관찰되었으나, IK 투여군에서는 정상군만큼은 아니지만 회복됨을 볼 수 있었다(Fig. 15).

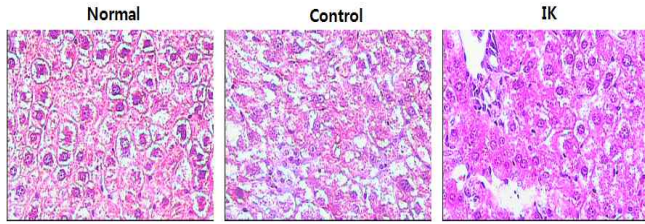


Fig. 15. Microscopic finding of fibrosis on liver tissue. Paraffin sections were stained with Masson's trichrome. The panels were representative photomicrographs of each of these risk at light microscope (Zeiss, $\times 200$). Normal, C57BL/6J mice group; Control, Induced by high cholesterol diet C57BL/6J mice group; IK, Induced by high cholesterol diet C57BL/6J mice group treated with IK extract.

(3) Immunohistochemistry 분석을 통한 ADRP 발현에 미치는 영향

간 조직에서의 ADRP 발현을 보기 위해 조직학적 검사를 한 결과, 대조군에서 ADRP가 30-50% 강하게 발현되었고, IK 투여군에서는 정상군만큼 회복됨을 확인 할 수 있었다 (Fig. 16).

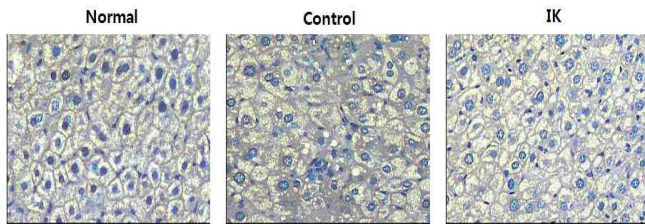


Fig. 16. Immunohistochemical analysis of ADRP expression in liver tissue of normal and high cholesterol diet induced mice. The panels were representative photomicrographs of each of these risk at light microscope (Zeiss, $\times 200$). Normal, C57BL/6J mice group; Control, Induced by high cholesterol diet C57BL/6J mice group; IK, Induced by high cholesterol diet C57BL/6J mice group treated with IK extract.

4. In vitro 분석

(1) ABTS radical 소거능에 미치는 영향

IK 추출물의 ABTS 소거율은 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 $0.7 \pm 3.3\%$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 $3.5 \pm 4.8\%$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 $20.3 \pm 3.4\%$, 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 $91.2 \pm 3.5\%$ 로 나타나 농도 의존적으로 라디칼 소거능이 증가하였다 (Fig. 17).

(2) ROS의 생성에 미치는 영향

IK 추출물의 ROS 생성 저해 활성은 대조군을 $100.1 \pm 0.2\%$ 로 나타냈을 때 정상군은 $58.1 \pm 14.3\%$, IK 추출물군은 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 $79.0 \pm 13.3\%$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 $68.9 \pm 11.4\%$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 $64.5 \pm 10.8\%$ 로 나타나, 대조군에 비하여 농도 의존적으로 유의성 있게 (** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$) 감소하였다 (Fig. 18).

(3) NO의 생성에 미치는 영향

RAW 264.7 세포주에서 IK 추출물의 NO 생성량은 대조군을 $100.0 \pm 16.1\%$ 로 나타냈을 때 정상군은 $39.3 \pm 5.7\%$, IK 추출물군은 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 $103.3 \pm 10.6\%$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 $94.9 \pm 12.6\%$, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 $77.1 \pm 8.9\%$ 로 나타나, 대조군에 비해 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 유의성 있게 (* : $P < 0.05$) 감소하였다

(Fig. 19).

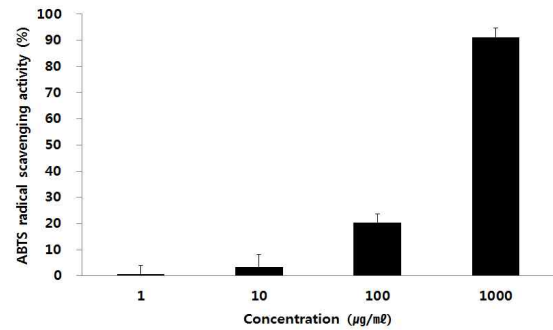


Fig. 17. ABTS free radical scavenging activity of IK extract at various concentration. Extracts were incubated with ABTS solution at RT for 10 mins. Activities were determined by measurement of absorbance at 517 nm. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments.

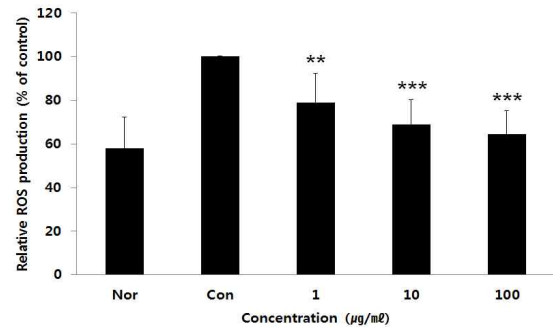


Fig. 18. Effect of IK extract on ROS production in Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) of IK extract and LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24hr. The ROS production was analyzed by flow cytometry. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments. (Significance of results, ** : $P < 0.01$, *** : $P < 0.001$)

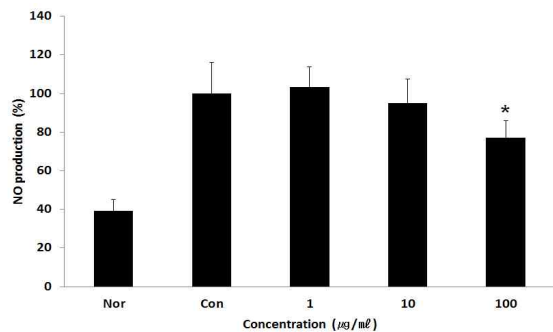


Fig. 19. Effect of IK extract on LPS-induced nitric oxide (NO) production in Raw 264.7 cells. Raw 264.7 cell was treated with 1, 10 and 100 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) of IK extract and LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24hr. The amount of nitric oxide in supernatant was measured using Griess reagent. The results were expressed as mean \pm S.D. from three independent experiments. (Significance of results, * : $P < 0.05$)

고 찰

현대사회는 서구화된 식생활로 지방 섭취가 증가하여, 이로 인

해 유발 되는 고지혈증으로 인한 동맥경화, 심근경색증, 협심증, 뇌졸중 등 심혈관계 질환 또한 증가하고 있는 추세이다¹⁷⁾.

동맥경화의 중요한 인자 중 하나인 고지혈증은 혈액 중의 지질 특히 중성 지방과 콜레스테롤 중의 총콜레스테롤, LDL 콜레스테롤이 과도하게 증가한 상태를 말하는 것으로¹⁸⁾, Kannel 등¹⁹⁾은 심근경색에서 고지혈증, 고혈압, 흡연 등이 큰 위험 인자로 작용하는 것을 보고하였으며, Shipley 등²⁰⁾은 혈액 중에 콜레스테롤수치의 상승과 더불어 관상동맥질환에 의한 사망률이 증가하는 것으로 보고한 바가 있다.

현재 고지혈증 치료제는 혈청지질의 과잉 생산에 대한 콜레스테롤의 흡수 억제와 합성 억제 약물, 부적절한 제거에 대한 대사와 배설을 촉진하는 약물 등이 있으며, 이러한 치료제 덕분에 과거에 비하여 치료율이 상승되었음에도 불구하고 근원적 치료의 한계성과 부작용 때문에 한의학적으로 고지혈증과 고혈당 강하 효과에 대한 연구가 수행되고 있다^{6,7)}.

생체는 정상적인 상태에서 항산화 방어계를 통해 유리의 생성과 제거가 균형을 이루고 있으나 각종 산화적 스트레스의 증가는 체내에서 유리를 과도하게 만들어 여러 조직에서 세포막의 변화, 효소활성의 감소, DNA 손상과 돌연변이 생성에 영향을 주게 되며, 아테롬성경화증, 관절염, 알츠하이머병, 당뇨병 등 만성 퇴행성 질환을 유발하게 된다. 또한 ROS와 NO의 과도한 생성은 지질의 과산화, 특히 LDL cholesterol의 산화적 변형을 유발함으로써 동맥경화와 같은 심혈관계 질환의 초기 발병과 진행에 핵심적인 역할을 하게 된다⁴⁾.

한의학에서 고지혈증에 대한 언급을 찾기는 어려우나, 重濁한 穢濁之氣가 체내에 停留되어 血脈에 濕濁, 瘀血 등이 발생하는 것으로 痰濁, 濕濁, 氣滯, 血瘀의 범주로 보고 있다²¹⁾. <靈樞·五癪津液別>에서는 五穀의 津液이 和合되어 膏가 되고 骨腔의 內部에 삼투되어 腦髓를 補益한다고 하였는데, 膏는 津液의 一種으로 水穀에서 來原하고 脾의 散精作用과 三焦의 運化作用 등에 의해 血中에 滲入하여 형성되는 인체의 영양물질인 脂血로 인식할 수 있고, 高脂血은 인체에 대한 여러 因素作用에 의해 발생하는 血中の 痰濁이라 할 수 있다. 따라서 고지혈증은 嗜食肥甘厚味の 外因과 肝脾腎 기능 실조의 內因에 의해 痰濕, 瘀血이 생성되어 發病되며, 그 병리기전은 本虛標實로 肝脾腎虛가 本虛에 속하고 痰濕, 瘀血은 標實에 속한다. 치료는 滋補肝腎, 調理脾胃로 扶正하고 活血化瘀, 利濕化痰으로 祛邪하며, 시대적으로 隋唐時代에는 祛風을 위주로 한 반면 金元時代 이후로는 補氣, 清熱, 散火, 祛痰 등의 다양한 방법으로 변화, 발전하여왔다²²⁾.

益氣化痰湯加味方은 郭 등¹⁵⁾의《心血管病 妙法良方大全 - 高脂血症編》에 수록된 처방으로 고지혈증을 脾의 運化와 肝의 疏泄 기능 부족으로 濕濁의 重濁한 穢濁之氣가 체내에 정류되어 血脈에 濕濁, 瘀血등이 발생하는 것으로 보고 黃芪, 丹蔘, 山查, 茵陳蒿, 何首烏, 葛根, 白芍藥, 赤芍藥, 澤瀉, 黃精에 決明子, 菊花를 가미한 처방이며 임상적으로 고지혈증 치료제로 널리 쓰이고 있다.

이에 저자는 益氣化痰湯加味方 추출물의 항고지혈 및 항산화 효과를 알아보기 위하여 고지혈증 질환 모델 동물인 6주령의 수컷 C57BL/6J 생쥐를 이용하여 혈액학적 지질인자, 체중 및 장기의 무

게 변화, 혈청 내 항염증 효과, 간 조직에 미치는 영향 등을 관찰하고, Raw 264.7 세포에서 ABST 소거능, ROS 및 No 생성에 미치는 영향을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

간에 대한 독성을 평가하기 위하여 실험 종료 후 혈청 내 AST, ALT, ALP를 측정한 결과 AST는 정상군이 65.4 ± 4.7 U/L, 대조군이 153.0 ± 8.2 U/L, IK 투여군은 111.8 ± 7.2 U/L로 나타났다(Fig. 2), ALT는 정상군이 31.7 ± 1.7 U/L, 대조군이 47.6 ± 4.7 U/L, IK 투여군은 41.0 ± 3.1 U/L로 나타났다(Fig. 3), ALP는 정상군이 93.8 ± 6.7 U/L, 대조군이 180.4 ± 8.9 U/L, IK 투여군은 132.3 ± 8.5 U/L로 나타나(Fig. 4) AST와 ALP에서 IK 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 보였다.

혈중의 total cholesterol 농도는 주로 간, 장관에서의 총 콜레스테롤 생성과 흡수 및 이상에 관여하는 여러 인자에 좌우되고, 체내 지질대사 이상의 지표로서 중요하며, 말초조직에서의 이용이나 산화성 연료 이상의 과량 상태로 혈액 내에 존재하면 고지혈증이 유발되고 이는 죽상 동맥경화증의 주요 원인이 된다²³⁾.

실험 종료 후 혈청 내 total cholesterol의 변화는 정상군이 85.99 ± 9.54 mg/dL, 대조군이 383.95 ± 35.96 mg/dL, IK 투여군은 204.85 ± 11.03 mg/dL로 나타나 IK 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 5).

HDL cholesterol은 조직 내로의 cholesterol 축적을 감소시키고, 항산화 작용으로 혈관 내벽의 손상을 보호하여 혈소판 응집을 억제시키며, 일부는 LDL cholesterol 수용체와 경쟁적으로 작용하여 LDL cholesterol의 재흡수를 감소시킨다. 이와 같이 HDL cholesterol은 관상동맥경화증의 예방인자로 그 혈중 농도는 동맥경화성 질환의 발생과 예후에 유용한 지표가 되고 그 수치의 감소는 고혈압, 당뇨병, 허혈성 심장질환, 심근경색, 뇌졸중의 위험인자로 작용한다²⁴⁻²⁶⁾.

실험 종료 후 혈청 내 HDL cholesterol의 변화는 정상군이 40.00 ± 2.83 mg/dL, 대조군이 27.25 ± 2.44 mg/dL, IK 투여군은 34.40 ± 2.62 mg/dL로 나타나 IK 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 증가를 나타내었다(Fig. 6). 기존의 연구들 중 total cholesterol, LDL cholesterol을 낮추는 것은 많았으나, HDL cholesterol을 높이는 결과를 보인 연구는 적었다. 따라서 IK에 대한 연구는 HDL cholesterol을 높이는 결과를 나타낸 특이한 연구라 할 수 있으며, 이후 더욱 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

LDL cholesterol은 혈중 cholesterol의 주요 구성 성분으로 TG가 정상인 경우에 total cholesterol의 증가는 바로 LDL cholesterol의 증가를 반영하며, LDL cholesterol의 증가는 죽상 동맥경화의 위험 요인으로 간주되고 있고, 관상동맥 질환이나 뇌졸중 환자에서 증가한다고 보고 되고 있다^{27,28)}.

실험 종료 후 혈청 내 LDL cholesterol의 변화는 정상군이 32.71 ± 7.70 mg/dL, 대조군이 219.38 ± 16.12 mg/dL, IK 투여군은 135.20 ± 9.08 mg/dL로 나타나 IK 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 7).

TG는 전신의 각종 지방 조직의 주성분으로서 생체의 에너지 저장에 관여하고 있는데, 대부분 VLDL에 많이 들어있다. VLDL의 분해산물이 LDL cholesterol이며, 다른 한편으로 HDL

cholesterol을 감소시키는 기능을 하기에 TG가 많아지면 LDL cholesterol 증가와 HDL cholesterol 감소가 유발되어 동맥경화가 촉진된다^{29,30}).

실험 종료 후 혈청 내 TG의 변화는 정상군이 94.71 ± 6.10 mg/dL, 대조군이 240.95 ± 14.46 mg/dL, IK 투여군은 187.57 ± 8.99 mg/dL로 나타나 IK 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 8).

혈중 glucose는 여러 호르몬에 의해 조절되는데 glucose의 세포막 투과나 효소계를 촉진하는 insulin은 혈중 glucose의 농도를 저하시키는 역할을 한다. 대사이상 장애로 고지혈증을 비롯한 고지방 섭취와 비만 등에 의해서 발생되기도 하는 당뇨병에 있어서 glucose의 농도가 함께 증가하는 것으로 알려져 있으며, 이 같은 결과를 바탕으로 최근 고지혈증에 대한 약물 치료 중에서 주된 에너지원인 지방과 탄수화물 섭취가 심혈관계 질환에 미치는 영향에 대한 재검토가 이루어지고 있다³¹).

실험 종료 후 혈청 내 glucose의 변화는 정상군이 64.60 ± 4.22 mg/dL, 대조군이 180.44 ± 13.14 mg/dL, IK 투여군은 124.26 ± 7.17 mg/dL로 나타나 IK 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 9).

고지방 식이에 의한 고콜레스테롤혈증은 죽상경화화과 같은 혈관염증성 질환을 유발시킨다³²). 죽상경화화로 진행하는데 중요한 매개가 되는 세포 유착분자(adhesion molecule)는 유전자와 단백질의 유사성에 따라 분류되며, 염증반응 시 백혈구가 혈관내피세포에 결합하는 초기단계에 중요한 selectin family, 백혈구 표면에 발현되어 혈관내피세포 혹은 다른 세포와 상호작용하는 integrin family, 혈관내피세포에 발현되어 백혈구의 integrin과 결합하는 ICAM, VCAM 등이 있다. 죽상경화화의 초기단계에서 내피세포에서의 ICAM-1, VCAM-1, E-selectin과 같은 세포 유착분자의 발현이 증가하면, 단핵구 및 백혈구의 염증부위로 침투가 증가하고 이들에 의한 염증 cytokine의 분비는 혈관염증을 더욱 진행시킨다³³). 최근 연구에 따르면 체내 염증지표는 대사증후군과 제2형 당뇨병 질환의 발병 및 심혈관 질환의 진행 예측 인자로서 보고되었으며³⁴), IL-6과 같은 cytokine은 간의 중성지방 분비를 촉진하고, CRP의 상승을 초래하는 인자로 심혈관계 질환자에서 높게 나타나고 있다³⁵).

실험 종료 후 혈청 내 cytokine 성분인 IL-1 β 의 생성변화는 정상군 4.0 ± 1.3 pg/mL, 대조군 103.9 ± 12.7 pg/mL, IK 투여군 87.0 ± 10.5 pg/mL로 나타났으며 IL-6의 생성 변화는 정상군 3.3 ± 0.7 pg/mL, 대조군 109.6 ± 13.8 pg/mL, IK 투여군 84.5 ± 13.9 pg/mL로 모든 경우에서 IK 투여군이 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 보여(Fig. 10, Fig. 11), IK가 항염증의 효과가 있음을 알 수 있었다.

혈중지질은 신체 비만도와 밀접한 관련이 있어서 미국 스포츠 의학회³⁶)에서는 혈중지질을 개선하기 위한 체중과 비만도를 낮추는데 주력할 것을 강조하고 있다. 특히 체지방은 심혈관 질환과 밀접한 관련이 있는 중성지방과 저밀도 지단백(LDL)의 증가를 야기하기 때문에 혈중지질을 개선하기 위해서는 체지방의 감소가 선행되어야 함을 강조하고 있다³⁷).

IK가 생쥐의 체중증가에 미치는 영향을 알아보기 위해 체중을

측정한 결과 정상군이 24.81 ± 0.37 g, 대조군이 26.48 ± 0.53 g, IK 투여군이 23.81 ± 0.80 g으로 나타나 IK 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 12).

지질대사에 있어 중추적인 역할을 담당하고 있는 간은 섭취한 fatty acid을 필요에 따라 합성 또는 분해하여 지질 항상성을 유지시키는 기능을 가진다. 하지만 과량의 free fatty acid가 흡수되면, 지단백의 생산이 이의 유입정도를 따르지 못해 항산화 활성의 감소 및 중성지방의 축적이 일어나 세포와 조직에 섬유성 변화가 일어나고 간 기능 장애 등을 일으키게 되어 다량의 free radical 발생을 초래하며^{38,39}), 식이로 섭취한 과량의 콜레스테롤은 체외로 정상적으로 배출되지 못하고 간장 내에 축적되어 간장이 비대해진다.

IK의 간에 대한 효과를 관찰하기 위하여 생쥐의 간 조직 무게를 측정한 결과, 정상군이 1.19 ± 0.07 g, 대조군이 1.57 ± 0.18 g, IK 투여군이 1.38 ± 0.08 g으로 나타나 IK 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 13).

간의 조직을 H&E 염색하여 관찰한 결과, 대조군은 간 세포에서 지방공포가 관찰되었으며, 이로 인해 세포의 핵이 세포질 안에서 가장자리로 밀려난 것을 알 수 있었고, 정상군에 비해 쿠퍼세포의 수도 현저히 감소함을 볼 수 있었다. 그러나 IK 투여군에서는 간 세포 내의 지방공포로 인해 세포의 크기는 커져있지만, 대조군에 비해 지방공포가 적었고, 세포핵도 중앙에 위치하여 호전현상을 나타내었다(Fig. 14).

간에서의 섬유화를 확인하기 위해 Masson's Trichrome 염색을 시행하여 관찰한 결과, 대조군은 정상군에 비해 혈관주변에 파란색으로 염색되어 섬유화의 정도가 심한 것이 관찰되었으나, IK 투여군에서는 정상군과 유사한 결과를 볼 수 있었다(Fig. 15).

ADRP는 세포 내에서 중성지방의 저장고 역할을 하는 lipid droplet의 표면에 존재하는 단백질로 설치류 및 사람의 지방간에서 정상간에 비해 ADRP 발현이 증가되어 있음이 알려져 있다^{40,41}).

간 조직에서의 ADRP 발현을 알아보기 위하여 조직학적 검사를 한 결과, 대조군에서 ADRP가 30-50% 강하게 발현되었고, IK 투여군에서는 상대적으로 대조군에 비하여 ADRP 발현이 감소함을 확인할 수 있었다(Fig. 16).

이상의 결과에서 간 조직 무게의 감소, 간 조직의 지방질 분포, 간 조직의 섬유화 정도 및 간 조직에서의 ADRP의 발현의 감소를 나타내는 것으로 보아 IK는 간 조직을 보호하는 효과가 있을 것으로 사료된다.

인체의 에너지 대사 산물인 활성산소는 혈액 속을 유리하다 혈관내피세포의 손상을 유발하고 혈중의 콜레스테롤 특히 LDL cholesterol을 산화시켜 동맥경화의 중요한 단서를 제공한다. 横山 등⁴²)은 질환모델동물과 관상동맥질환자의 동맥경화 혈관에서 산화적 스트레스가 증가하며 활성산소종이 혈관내피의 손상과 염증에 관여하고 있음을 보고한 바 있다. 따라서 항산화 작용은 콜레스테롤의 산화를 방지하고 나아가 동맥경화를 예방 치료하는데 중요한 역할을 담당하기 때문에 산화적 손상에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다.

ABTS assay는 혈장에서 ABTS+의 환광도가 항산화제에 의해 억제되는 것을 기초로 하여 개발된 평가방법으로¹⁷) 항산화제의 활성을 trolox의 값과 비교하여 TEAC(trolox equivalent

antioxidant capacity) assay로 알려져 있다⁴³⁾. ABTS+는 체내에서 과산화수소와 myoglobin의 활성화에 의해 생성되는 ferrylmyoglobin 라디칼 종과 ABTS 반응에 의해 생성되었지만 체내의 복잡한 라디칼 생성 메커니즘 때문에 변형되어 potassium persulfate와 ABTS의 산화에 의해 ABTS+를 단순하게 형성하고 파랑/녹색 형태인 ABTS+는 실온에서 암소에 보관하면서 항산화제에 의해 탈색되는 정도를 분석하여 항산화 활성을 평가한다⁴⁴⁾.

ABTS의 소거 활성은 IK 1, 10, 100, 1000($\mu\text{g}/\text{mL}$) 농도에서 각각 0.7 ± 3.3 , 3.5 ± 4.8 , 20.3 ± 3.4 , $91.2 \pm 3.5(\%)$ 로 나타나 농도 의존적으로 소거활성이 증가하는 것으로 확인되었다(Fig. 17).

Raw 264.7세포에서 ROS의 생성량(%)을 측정한 결과, 대조군을 $100.1 \pm 0.2\%$ 로 나타냈을 때 정상군은 $58.1 \pm 14.3\%$, IK 1, 10, 100($\mu\text{g}/\text{mL}$)농도에서는 각각 $79.0 \pm 13.3\%$, $68.9 \pm 11.4\%$, $64.5 \pm 10.8\%$ 로 나타나 농도 의존적으로 유의성 있는 감소를 나타내었고(Fig. 18), NO의 생성량(%)을 측정한 결과, 대조군을 $100.0 \pm 16.1\%$ 로 나타냈을 때 정상군은 $39.3 \pm 5.7\%$, IK 1, 10, 100($\mu\text{g}/\text{mL}$)농도에서는 각각 $103.3 \pm 10.6\%$, $94.9 \pm 12.6\%$, $77.1 \pm 8.9\%$ 로 나타나 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 유의성 있는 감소를 나타내었다(Fig. 19).

결과를 종합해보면 益氣化癆湯加味方은 임상에서 고지혈증으로 인한 혈관 내피세포 손상 및 LDL cholesterol의 산화를 억제함으로써 동맥경화의 병리변화를 개선시킬 수 있음을 시사하였고, 고지혈증으로 인한 여러 질환의 예방과 치료에 효과가 있을 것으로 추측되거나 향후 보다 지속적이고 심도 있는 연구가 필요하리라 사료된다.

결 론

益氣化癆湯加味方이 항고지혈 및 항산화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 고콜레스테롤 식이로 고지혈증이 유발된 6주령의 수컷 C57BL/6J 생쥐에 益氣化癆湯加味方 추출물을 경구 투여한 후, 혈중 지질인자, 혈중 염증 인자 및 간 조직에 대한 영향, 항산화 활성 변화, 항염증 변화 등을 관찰한 결과 total Cholesterol, LDL cholesterol, TG, glucose의 감소와 HDL cholesterol의 증가를 볼 수 있었으며 염증성 cytokine인 IL-1 β 및 IL-6 의 감소를 볼 수 있었다. 간의 조직학적 검사상 대조군에 비해 정상군에 가까운 현상을 보였으며 ROS 생성량 및 NO 생성량의 감소로 항산화 효과도 있음이 확인되어 임상에서 고지혈증 및 이로 야기되는 동맥경화, 허혈성 심질환, 뇌졸중, 지방간, 비만, 당뇨병 등의 예방과 치료에 효과가 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2013학년도 원광대학교 교내 연구비지원으로 수행되었습니다.

References

1. Grundy, S.M., Denke, M.A. Dietary influence on serum

- lipids and lipoprotein. *J Lipid Research*. 31: 1149-1172, 1990.
2. Sanders, T.A., Oakley, F.R., Miller, G.J., Mitropoulos, K.A. Influence of n-6 versus n-3 polyunsaturated fatty acids in diets low in saturated fatty acids on plasma lipoproteins and hemostatic factors. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 17(12):3449-3460, 1997.
3. Park, C.S. Hyperlipidemia medication : Cholesterol Synthesis Inhibitor. *Food science and industry*. 34(2):61-66, 2001.
4. Sorg, O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality *Comptes Rendus Biologies*. 327(7):649-662, 2004.
5. Lee, S.H., Lee, H. A Study on the Effect of Herbal-acupuncture with Schizandrae Fructus Solution on Hyperlipidemia in Rats Induced by High Fat Diet. *The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society*. 28(2):143-153, 2011.
6. Park, H.S., Yang, K.M., Jung J.W. Effect of Water Extract from Hordeum vulgare L. with Medicinal Herb on Plasma Lipid Status and Glucose in Rats Fed High Fat Diet. *The Korea Journal of Herbology*. 24(1):15-21, 2009.
7. Yu, M.L., Kim, D.H. Effects of Sojihwangamibang on Hyperlipidemia in Rats Induced by High Cholesterol Diet. *Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology*. 23(6):1358-1367, 2009.
8. Park, S.A., Jo, H.K., Yoo, H.R., Kim, Y.S., Seol, I.C., An, J.J. The Effects of Gamijihwang-tang(GJT) on Hyperlipidemia in Rat. *Journal of korean oriental internal medicine*. 30(2):338-354, 2009.
9. Kim, S.I., Kim, N.U., Jeon, S.Y., Hong, S. The Effect of Hasuogamibang on Hyperlipidemic SHR and Antioxidant Activity. *Journal of korean oriental internal medicine*. 30(4):746-760, 2009.
10. Ha, T.H., Kim, H.Y., Kim, H.W., Cho, S.I., Kim, Y.G. Effects of Tong Xin Lou (TXL) on levels of serum lipid in high fat diet-induced dyslipidemia in mice. *The Korea Journal of Herbology*. 27(3):107-112, 2012.
11. Pi, C.M., Chong, M.S., Kim, H.J., Cho, H.E., Choi, Y.H., Lee, K.N. Effects of Hyolbuchukeo-tang Extracts on Blood and Liver of Hyperlipidemia Rats Induced by High Fat Diet. *Society of Preventive Korean Medicine*. 13(1):41-58, 2009.
12. Kim, S.H., Kim, Y.S. Neuroprotective and Anti-Oxidative Effect of Puerariae Radix on Hippocampal Neurons and BV-2 Microglia Cells. *Korean Journal of Oriental Physiology & Pathology*. 19(2):416-425, 2005.

13. Yi, H.S., Heo, S.K., Yun, H.J., Kim, B.W., Park, S.D. Anti-oxidative and Anti-inflammatory Effect of Melia Toosendan in Mouse Macrophage Cells. *The Korea Journal of Herbology*. 23(4):121-134, 2008.
14. Park, S.D., Moon, J.Y. Antioxidative activity of Sihosamultang Methanol Extract. *The Korea Journal of Herbology*. 16(1):29-40, 2001.
15. Xueshen Guo, Yuan He, Chunlian Liao, Cardiovascular Disease Treatment Collection, Wuhan, Huazhong university of science and technology(HUST) press. p 364, 2010
16. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay, *Free Radical. Biology & Medicine*. 26(9-10):1231-1237, 1999.
17. Chung, S.I., Kim, S.E., Kang, M.Y. Characteristics of surimi gel(king oyster mushroom and cuttlefish meat paste) on lipid metabolism and antioxidant status in high-cholesterol-fed rats. *Korean J. Food Sci*. 41(1):191-195, 2009.
18. Jeongdam Publishing Company Editorial Department. SIM Integrated Internal Medicine. Seoul: Jeongdam Publishing Company; pp 335-342, 2013.
19. Kannel, W.B. High-density lipoproteins: epidemiologic profile and risks of coronary artery disease. *Am J Cardiol*. 52(4):9B-12B, 1983.
20. 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.
21. Joung, W.Y., Ahn, K.S. Korean medical Clinical pathology. Seoul: Yeonglimsa; p 545, 1998.
22. National Korean Medicine College Department of Nephro-Endocrine System. Nephro-Endocrine System. Seoul: Koonja Publishing Company; pp 327-329, 2011.
23. Lee, S.Y., Chong, Y.S., Kwon, O.N., Son, K.S., Method of Clinical Laboratory Test. Seoul: Yonsei University Publishing; pp 273-276, 281-283, 303-315. 2000.
24. Moriguchi, E.H., Fusegawa, Y., Tamachi, H., Goto, Y. Effects of smoking on HDL subfractions in myocardial infarction patients. *Clinica Chimica Acta* 195: 139-244, 1990.
25. Kim, B.C., et al. Method of Clinical Tes(29th ed.). Seoul: Komunsa; pp 311-455, 711-713, 1984.
26. Kim, S.Y., et al. HDL Cholesterol Subfraction in Cerebrovascular Disease. *The Korean Journal of Internal Medicine*. 28(8):790-794, 1983.
27. Ryoo, U.H. Hyperlipidemia and Atherosclerosis. Seoul: Korean Society of Lipidology and Atherosclerosis; p 11, 83, 135, 2003.
28. Tell, G.S., Crouse, J.R., Furberg, C.D. Relation between blood lipids, lipoproteins, and cerebrovascular artherosclerosis. A review, *Stroke*. 19: 423, 1988.
29. Yoon, K.H., Son, H.Y. Recent Advances of hyperlipidemia treatment. *J. Korean Acad Fam Med*. 21(5):31-36, 2002.
30. Department of Internal Medicine, Asan Medical center, Ulsan University. 2013 Recent Advances in Internal Medicine XVI. seoul: Shinwonbooks. pp 281-293, 2013.
31. Arafa, H.M. Curcumin attenuates diet-induced hypercholesterolemia in rats. *Med Sci Monit*. 11(7):228-234, 2005.
32. Blankenberg, S., Barboux, S., Tiret, L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis*. 170: 191-203, 2003.
33. Quagliaro, L., Piconi, L., Assaloni, R., Da Ros, R., Maier, A., Zuodar, G., et al. LDL receptor but not apolipoprotein E deficiency increases diet-induced obesity and diabetes in mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 282: 207-214, 2002.
34. Feingold, K.R., Grunfeld, C. Role of cytokines in inducing hyperlipidemia. *Diabetes*. 41: 97-101, 1992.
35. Stenvinkel, P., Heimbürger, O., Jogestrand, T. Elevated interleukin-6 predicts progressive carotid artery atherosclerosis in dialysis patients: Association with Chlamydia pneumoniae seropositivity. *Am J Kidney Dis*. 39: 274-282, 2002.
36. Lippincott Williams & Wilkins. ACSM's Resource Manual for Guidelines for Exercise Testing and Prescription. 4th ed. Philadelphia : American College of Sports Medicine. pp 130-234, 2001.
37. National Institute Health(NIH). Detection, evaluation, and treatment of high blood cholesterol in adults(adult treatment panel III). 02: 5215, 2002.
38. Halliwell, B. Biochemical mechanism accounting for the toxicaction of oxygen on living organism. The key role of superoxide dismutase. *Cell. Biol. Int. Rep*. p 2, 11, 1978.
39. Freman, B.A. and Crapo, J.D. Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab Inves*. 47: 412, 1982.
40. Motomura, W., Inoue, M., Ohtake, T., Takahashi, N., Nagamine, M., Tanno, S., Kohgo, Y., Okumura, T. Up-regulation of ADRP in fatty liver in human and liver steatosis in mice fed with high fat diet. *Biochem Biophys Res Commun*. 340: 1111-1118, 2006.

41. Mak, K.M., Ren, C., Ponomarenko, A., Cao, Q., Lieber, C.S. Adipose differentiation-related protein is a reliable lipid droplet marker in alcoholic fatty liver of rats. *Alcohol Clin Exp Res.* 32: 683-689, 2008.
42. Yokoyama. Roles of Oxidative Stress and Inflammation in Coronary Artery Disease. pp 131-138, 2003.
43. Bozena, T., Soffers, A.M.F., Henryk, S., Sjeif, B., Marelle, G.B., Katarzyna, L., et al. TEAC Antioxidant Activity Of 4-Hydroxybenzoates, *Free Radical Biology & Medicine.* 27(11/12):1427-1436, 1999.
44. Roberta, R., Nicoletta., Anna, P., Min, Y. and Catherine R.E. Antioxidant Activity Applying an Improved ABTS Radical Cation Decolorization Assay. *Free Radical Biology & Medicine.* 26(9/10):1231-1237, 1999.