

# HepG2 cell에서 한인진, 울금, 차전자 추출물(ACP)의 항산화 및 항이상지질혈증 효과

정은선 · 조현경 · 김윤식 · 유호룡\* · 설인찬\*

대전대학교 한의과대학 심계내과학교실

## Antioxidant and Anti-dyslipidemic Effect of *Artemisiae iwayomogii* Herba, *Curcumae longae* Radix, and *Plantaginis* Semen Complex Extract(ACP) on HepG2 Cells

Eunsun Jung, Hyun Kyoung Cho, Yoon Sik Kim, Ho Ryong Yoo\*, In Chan Seol\*

Department of Circulatory Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Daejeon University

This study was performed to investigate the antioxidant and antidyslipidemic effects of *Artemisiae iwayomogii* Herba, *Curcumae longae* Radix and *Plantaginis* Semen complex extract(ACP) on HepG2 cells. We measured total polyphenols, total flavonoids, radical scavenging activity, and ABTS radical scavenging activity of ACP to evaluate its antioxidant activity. HepG2 cells were treated with ACP. Then, we evaluated ROS production; intracellular GSH content; GPx, GR, SOD, and catalase activities; free fatty acids and MDA levels; and mRNA expression levels of ACAT1 and HMG-CoA reductase. Results: ACP contains polyphenols and flavonoids and increased the DPPH and ABTS radical scavenging activities in HepG2 cells in a dose dependent manner. Also, ACP significantly reduced ROS production in HepG2 cells compared to the control group and significantly increased the GSH content, and elevated the enzyme activities of GPx, GR, and catalase in HepG2 cells compared to the control group. In addition, ACP reduced the mRNA expression of ACAT1 and HMG-CoA reductase in HepG2 cells compared to that in the control group. Conclusion: These results suggest that ACP has an antioxidant effect and may suppress the expression of dyslipidemia - associated genes and thus may be useful for the improvement of dyslipidemia.

keywords : Dyslipidemia, Anti-oxidant, *Artemisiae iwayomogii* Herba, *Curcumae longae* Radix, *Plantaginis* Semen

### 서 론

이상지질혈증이란 혈액 내의 지질이 정상범위를 벗어난 상태를 말하며, 일반적으로 총 콜레스테롤(Total cholesterol), 저밀도 지단백 콜레스테롤(LDL-cholesterol), 중성지방(Triglyceride)의 상승 또는 고밀도 지단백 콜레스테롤(HDL-cholesterol)의 저하로 정의한다<sup>1)</sup>. 이상지질혈증은 흡연, 고혈압, 당뇨와 함께 심혈관질환의 독립적인 주요 위험인자로서 심혈관계 질환의 사망률과 위험성을 증가시킨다고 알려져 있다<sup>1,2)</sup>.

우리나라에서 심혈관계 질환은 중요한 사망원인 중 하나로 통계청에서 발표된 자료에 따르면 2015년 전체 사망자의 21.6%가

심장 질환, 뇌혈관 질환, 고혈압성 질환을 포함하는 전체 심·뇌혈관계 질환에 의해 사망하였으며, 지난 10년간 심혈관계 질환으로 인한 사망률은 약 41.6% 증가하였다<sup>2-4)</sup>. 고혈압과 흡연을 비롯한 심혈관계 질환의 다른 위험인자들은 예전에 비해 감소하거나 비슷한 정도로 조절되고 있어, 이러한 심혈관계 질환으로 인한 사망률의 증가는 식이의 서구화, 운동량 감소 등 생활습관의 악화와 이로 인한 이상지질혈증 유병률 증가가 중요한 역할을 하고 있다<sup>1)</sup>. 따라서 심혈관계 질환의 예방이나 재발 방지를 위해 이상지질혈증에 대한 관리와 치료에 대한 필요성이 대두되고 있다.

현재 쓰이고 있는 이상지질혈증 치료제 중 일차적으로 추천되는 약물은 HMG-CoA reductase의 경쟁적 억제제로 작용하는

\* Corresponding author

In Chan Seol, Dunsan Hospital of Daejeon University, 1136 Dunsan-dong, Seo-gu, Daejeon, 302-122, Republic of Korea

·E-mail : seolinch@dju.kr ·Tel : +82-42-470-9130

Ho Ryong Yoo, Dunsan Hospital of Daejeon University, 1136 Dunsan-dong, Seo-gu, Daejeon, 302-122, Republic of Korea

·E-mail : medicdragon@daum.net ·Tel : +82-42-470-9131

·Received : 2017/09/19 ·Revised : 2017/11/10 ·Accepted : 2017/12/07

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

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 <http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2018.02.32.1.13>

Available online at <https://kmpath.jams.or.kr>

statin계 약물이다. Statin은 LDL-cholesterol을 감소시키고 HDL-cholesterol을 증가시키는 효과가 있어 심혈관계 질환 발생을 감소시키는 효과가 있다. 하지만 약 4% 정도에서 소화장애, 속쓰림, 복통 등의 부작용을 일으키며 약 0.005% 정도에서 치명적일 수 있는 간독성과 근육독성 등이 나타날 수 있다고 보고된다<sup>1,5,6</sup>. 이상지질혈증 치료에 이차적으로 사용되는 피브린산 유도체나 니코틴산, 오메가-3 지방산, 에제티미브 등에서도 여러 가지 부작용들이 보고되고 있어 부작용 없이 장기간 안전하게 복용할 수 있는 천연물기원의 이상지질 혈증 치료제에 대한 관심이 높아지고 있다<sup>5,6</sup>.

이상지질혈증은 한의학적으로 痰飲, 濕痰, 瘀血, 氣虛 등의 범주에 속하고 濕熱鬱結, 脾虛痰盛, 氣滯血瘀, 脾腎兩虛 등으로 변증하며, 치료에는 변증에 따라 利水滲濕藥, 祛風濕藥, 化痰止咳平喘藥, 活血去瘀藥, 補氣藥, 理氣藥 등의 범주에 속하는 단미제나 복합제를 사용한다<sup>7-10</sup>.

최근 한의학계에서는 위와 같은 한의학적 이론과 현대 약리학적 관점에서 한방 약물의 이상지질혈증 개선 효과를 확인한 실험 연구들이 활발하게 진행되었다<sup>11-16</sup>. 특히 韓茵陳과 鬱金 복합물은 고지방식으로 유도된 대사장애 동물 모델에서 항이상지질혈증 효과를 비롯한 대사장애 개선 효과가 있음이 확인되었으며<sup>11</sup>, 이를 바탕으로 韓茵陳과 鬱金 복합물에 山查<sup>12</sup>, 山查와 丹蔘<sup>13</sup>, 女貞子와 枸杞子<sup>14</sup> 등을 배합하여 이상지질혈증 개선 효과를 확인한 연구들이 발표되었다. 또한 車前子는 간기능을 개선시키고 담즙산 배출을 촉진함으로써 지질대사에 영향을 미쳐 이상지질혈증을 개선시키는 효과가 있다고 보고되었다<sup>14-16</sup>. 이러한 선행 연구들에 착안하여 항이상지질혈증 효과가 입증된 韓茵陳, 鬱金 복합물에 대표적인 利水滲濕藥인 車前子를 배합하여 지질대사 개선 효과를 확인하고자 본 연구를 진행하였다.

韓茵陳, 鬱金, 車前子 세 가지 약재의 복합 추출물(ACP)이 이상지질혈증에 미치는 효과를 알아보기 위하여 ACP를 HepG2 cell에 처리하여 중금속 검사와 세포독성에서 안전성을 확인한 후, 항산화 효능 평가와 ACAT1, HMG-CoA reductase의 mRNA 발현량 평가에서 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 1. 재료

본 실험에 사용한 한인진, 울금, 차전자 복합물(Artemisia iwayomogi, Curcuma longae Radix, Plantaginis Semen complex extract 이하, ACP로 표기)의 구성 약재들은 (주)온니허브에서 구입하여 사용하였으며, 내용 및 분량은 아래와 같다 (Table 1).

Table 1. The Prescription of ACP

Herbal medicine name	Pharmacognostic name	Weight(g)
韓茵陳	<i>Artemisiae iwayomogii</i> Herba	10
鬱金	<i>Curcuma longae</i> Radix	10
車前子	<i>Plantaginis</i> Semen	10
Total amount		30
Final yield		5.71%

### 2. 방법

#### 1) 시료 추출

한인진, 울금, 차전자 각 10 g에 80% 주정 500 mL을 넣은 다음 3시간 동안 환류추출을 하였다. 그 후 여과액을 rotary vacuum evaporator로 감압 농축하였으며, 농축된 용액을 freeze dryer로 동결 건조하였다. 얻어낸 분말 1.713 g (수율 5.71%)을 초저온 냉동고 (-80°C)에서 보관하였고 실험에 필요한 농도로 증류수에 희석하여 사용하였다.

#### 2) 중금속 검사

납, 카드뮴, 비소 분석은 ACP 0.5 g을 전처리용 vessel에 담은 후 HNO<sub>3</sub> 10 mL을 넣은 다음 후드 안에 정치시켜 1시간 가량 예비분해를 실시하였다. 예비분해가 끝난 시료는 자동전처리 장치를 이용하여 고온, 고압 상태에서 유기물 분해를 진행한 다음 상온에서 식혔다. 분해액은 여과지로 여과한 다음 용량플라스크에 넣고 증류수를 넣어 50 mL 눈금에 맞춘 후 검액으로 사용하였다. 따로 HNO<sub>3</sub> 10 mL을 넣은 vessel도 검액 조제와 같은 방법으로 조작한 후 공시험액으로 사용하였다. 준비된 검액, 공시험액 및 표준액을 가지고 유도결합플라즈마-원자방출분광계 (ICP-AES)를 사용하여 검량선을 작성하였으며 공시험액으로 보정하여 검액을 측정하였다.

#### 3) HepG2 cell 배양

HepG2 cell은 10% 1% antibiotic-antimycotic와 fetal bovine serum (FBS)으로 조성된 DMEM 배지를 사용하여 5% CO<sub>2</sub>, 37°C 조건이 유지되는 세포배양기에서 2-3일 주기로 계대배양하여 실험을 진행하였다.

#### 4) 세포 생존율 측정

48 well plate에 HepG2 cell을 5×10<sup>5</sup> cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. ACP를 각각 1, 10, 100 µg/mL의 농도로 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 10 µL의 CCK-8 용액을 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건이 유지되는 세포배양기에서 30분간 반응시킨 후 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였으며, 정상군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시 하였다.

#### 5) 항산화 효능평가

##### (1) 항산화물질 함량 측정

총 polyphenol 함량은 Gutfinger의 방법<sup>19</sup>)을 응용하여 측정하였다. ACP 시료용액 1 mL에 50% Foiln-Ciocalteu's phenol reagent 0.5 mL를 가하여 3분간 실온에서 반응시켰다. 반응용액에 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 포화용액 1 mL와 7.5 mL 증류수를 차례로 혼합하여 30분간 정치시킨 뒤, 14,000 g에서 10분간 원심분리한 후 상청액을 취해 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 polyphenol 함량은 gallic acid를 표준물질로 이용하여 작성한 검량선에 따라 함량을 구하였다.

총 flavonoid 함량은 Nieva Moreno 등의 방법<sup>20</sup>)을 응용하여 측정하였다. ACP 시료용액 0.1 mL과 80% 에탄올 0.9 mL을 혼합한 혼합물 0.5 mL에 10% aluminium nitrate와 1M potassium acetate 0.1 mL 그리고 80% 에탄올 4.3 mL을 가하여 실온에 40분 방치한 뒤 415 nm에서 흡광도를 측정하였으며, quercetin을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다.

##### (2) free radical 소거능 측정

###### ① DPPH radical 소거능 측정

DPPH radical 소거능 측정은 ACP의 최종 농도가 1, 10, 100, 1,000 (µg/ml)의 농도로 될 수 있게 희석시켰다. 에탄올에 용해시킨 0.2 mM의 DPPH 용액 150 µl와 ACP 각각 100 µl씩 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 용액의 대조군으로써는 에탄올을 넣어 보정값을 얻었으며, 시료액의 대조군은 증류수를 넣었다. DPPH 자유라디칼 소거율은 아래의 식에 따라 계산하였다.

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

### ② ABTS radical 소거능 측정

ABTS radical 소거능 측정은 ACP의 최종 농도가 1, 10, 100, 1,000 (µg/ml)의 농도로 될 수 있게 희석시켰으며, ABTS 용액은 7.4 mM ABTS (2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))와 2.6 mM potassium persulphate를 제조한 후, 암소에 하루 동안 방치하여 양이온 (ABTS+)을 형성시킨 다음 732 nm에서 흡광도를 측정하여 흡광도 값이 1.5 이하가 나오도록 희석하고, 희석된 ABTS+ 용액 150 µl와 ACP를 각각 5 µl 혼합하고, 실온에서 10분간 반응시킨 후, 732 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항산화능은 증류수를 대조군으로 하였으며, 대조군에 대한 ABTS radical 소거능을 백분율로 나타내었다.

$$\text{소거율 (\%)} = \left( 1 - \frac{\text{시료 첨가군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

### (3) 항산화 효소 활성 측정

#### ① 세포 내 reactive oxygen species (ROS) 생성 측정

세포 내 ROS를 측정하기 위하여 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)를 이용하였다.  $5 \times 10^5$  cells/well이 되게 HepG2 cell을 6 well plate에 분주하여 24시간 동안 배양 하였다. 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였으며, ACP 1, 10, 100 (µg/ml)의 농도와 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>을 함께 처리하였다. 다시 24시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건이 유지되는 세포배양기에서 배양한 후, 5분간 300 g에서 원심 분리한 세포를 차가운 PBS로 2회 세척하였다. DCF-DA은 10 µM이 되도록 첨가한 다음 15분 동안 암소, 상온에 두었다. 염색 후 차가운 PBS를 넣어 5분간 300 g에서 원심분리 한 후 상청액을 제거하고 PBS 400 µl를 부유시켜 유세포 분석기를 이용하여 형광강도의 세기에 따른 변화를 분석하였다.

#### ② 세포 내 glutathione (GSH) 함량 측정

HepG2 cell을 6 well plate에  $10^6$  cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양한 후 새로운 배양액으로 교체하였고 ACP를 각각 1, 10, 100 (µg/ml)의 농도로 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 함께 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 시료를 처리한 HepG2 cell을 PBS로 1회 세척한 다음 5% 5-sulfosalicylic acid (SSA)를 60 µl씩 넣어준 후 3분 동안 sonication 방법으로 lysis하였다. 용해시킨 시료를 10분 동안 10,000 g에서 원심 분리하여 얻어낸 상청액을 단백질 정량 후 실험에 사용하였다. 96 well plate에 working mix solution 150 µl와 상청액 10 µl를 넣어주었다. 5분 동안 실온에

서 반응시킨 다음 NADPH (0.16 mg/ml)를 50 µl씩 넣어주고 5분 동안 1분 간격으로 412 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. GSH 농도를 표준용액의 정량곡선을 기준으로 계산하였다.

#### ③ 세포 내 GSH peroxidase (GPx) 활성 측정

HepG2 cell을 6 well plate에  $10^6$  cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양한 후 새로운 배양액으로 교체하였고 ACP를 각각 1, 10, 100 (µg/ml)의 농도로 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 함께 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 시료를 처리한 HepG2 cell을 PBS로 1회 세척한 다음 assay buffer 150 µl를 넣고 3분 동안 sonication 방법으로 균질화 시킨 후 4°C, 10,000 g에서 15분 동안 원심 분리하여 얻어낸 상등액을 단백질 정량하여 실험에 사용하였다. Assay buffer를 96 well plate에 40 µl씩 분주한 다음 reaction mix (Assay buffer 33 µl, 40 mM NADPH solution 3 µl, GSH solution 2 µl/well, GR solution 2 µl) 40 µl씩과 시료 10 µl를 넣고 15분 동안 실온에서 반응시킨 다음 340 nm 파장에서 흡광도를 1차 측정한다. Cumene hydroperoxide solution을 10 µl씩 넣은 다음 5분 동안 실온에서 반응시킨 후 340 nm 파장에서 흡광도를 2차 측정한다. GPx 활성은 ΔOD 값(2차 측정-1차 측정)으로 kit 상의 NADPH standard 검량선에 따라 계산하였다.

$$\text{GPx Activity (mU/ml)} = \left( \frac{B}{\Delta T(T_2 - T_1) \times V} \right) \times \text{Sample dilution factor}$$

\* B is the NADH amount that was decreased between T1 and T2; ΔT is time of reaction; V is Sample volume added into the reaction well

#### ④ 세포 내 GSH reductase (GR) 활성 측정

HepG2 cell을 6 well plate에  $10^6$  cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양한 후 새로운 배양액으로 교체하였고 ACP를 각각 1, 10, 100 (µg/ml)의 농도로 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 함께 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 시료를 처리한 HepG2 cell을 PBS로 1회 세척한 다음 assay buffer 150 µl를 넣고 3분 동안 sonication 방법으로 균질화 시켰다. 그 후 10,000 g, 15분 동안 4°C에서 원심 분리하여 얻은 상등액을 단백질 정량하여 실험에 사용하였다. 시료 100 µl에 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 5 µl 넣은 다음 5분 동안 실온에서 반응시킨 후 catalase를 5 µl 넣고 5분 동안 실온에서 반응시킨다. 96well plate에 assay buffer 30 µl를 분주한 ekdma 반응액 20 µl와 reaction mix (DTNB solution 2 µl, GSSG solution 6 µl/well, GR assay buffer 40 µl, NADPH-GNERATTM solution 2 µl) 50 µl를 넣고 405 nm 파장에서 흡광도를 1차 측정한 후 10분 후에 2차 측정하였다. GR의 활성 측정은 ΔOD 값(2차 측정-1차 측정)으로 kit 의 TNB standard 검량선에 따라 계산하였다.

$$\text{GR Activity (mU/ml)} = \left( \frac{B}{\Delta T(T_2 - T_1) \times 0.9 \times V} \right) \times \text{Sample dilution factor}$$

\* B is the TNB amount from TNB standard Curve; ΔT is time of reaction; V is Sample volume added into the reaction well

#### ⑤ 세포 내 superoxide dismutase (SOD) 활성 측정

HepG2 cell을 6 well plate에  $10^6$  cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양한 후 새로운 배양액으로 교체하였고 ACP를 각각 1, 10, 100 (µg/ml)의 농도로 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 함께 처리하여 다시 24

시간 동안 배양하였다. 시료가 처리된 HepG2 세포를 PBS로 1회 세척한 뒤 차가운 HEPES beffer (pH 7.2, containing 1 mM EGTA, 210 mM mannitol, and 70 mM sucrose) 5 ml에 넣은 후 sonication 방법으로 3분 동안 균질화하였다. 균질화 된 시료를 1,500 g에서 5분 간 원심 분리하고 상등액을 제거한 하였다. 그 후 남은 pellet을 sample buffer 200  $\mu$ l씩 넣고 녹여 단백질 정량 후 실험에 사용하였다. 96 well plate에 radical detector를 200  $\mu$ l씩 분주한 다음 xanthine oxidase 20  $\mu$ l와 시료 10  $\mu$ l를 넣었다. 그 후 30분 동안 실온에서 shaking하여 반응시킨 다음 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. SOD 활성은 superoxide radical을 50% dismutation 시키는데 필요한 SOD량을 1 unit으로 하여 분당 활성정도 (U/min/ml)로 나타내었다.

#### ㉔ 세포 내 catalase 활성 측정

HepG2 cell을 6 well plate에  $10^6$  cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양한 후 새로운 배양액으로 교체하였고 ACP를 각각 1, 10, 100 ( $\mu$ g/ml)의 농도로 1 mM  $H_2O_2$ 와 함께 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 시료를 처리한 HepG2 cell을 PBS로 1회 세척하고 assay buffer 150  $\mu$ l를 넣은 다음 sonication 방법으로 균질화 시켰다. 그 후 1분 동안 10,000 g에서 원심 분리하여 얻은 상등액을 단백질 정량한 후 실험에 사용하였다. 96 well plate에 assay buffer를 68  $\mu$ l씩 분주한 후 상등액을 high control 부분을 포함하여 동일하게 10  $\mu$ l씩 넣어주었다. High control 부분에만 stop solution을 10  $\mu$ l씩 넣은 다음  $H_2O_2$  (1 mM)을 상등액과 high control 부분에 모두 12  $\mu$ l씩 넣고 30분 동안 실온에서 반응시킨다. High control 부분을 제외하고 stop solution을 10  $\mu$ l씩 넣어준 다음 develop mix (assay buffer 46  $\mu$ l, HRP 2  $\mu$ l/well, oxired 2  $\mu$ l)를 50  $\mu$ l씩 넣어주었다. 실온에서 10분 동안 반응시킨 다음 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. Catalase 활성은 1 nmol의 formaldehyde를 생성하는데 필요한 catalase의 양을 1 nmol로 하여 분당 활성정도(nmol/min/ml)를 나타내었다.

#### 6) 항이상지질혈증 효능평가

##### (1) 세포 내 Free fatty acid 함량 측정

HepG2 cell을 6 well plate에  $10^6$  cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양한 후 normal을 제외한 모든 well에 0.5 mM FAs (Palmitate:Oleic acid, 6:4)가 포함된 새로운 배양액으로 교체하였고<sup>21)</sup> ACP를 각각 1, 10, 100 ( $\mu$ g/ml)의 농도로 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 시료가 처리된 HepG2 cell을 1% TritonX-100이 포함된 chloroform 200  $\mu$ l를 넣어 균질화 시킨 후 13,000 g에서 10분 동안 원심분리 한 뒤 상등액을 사용하였다. 상등액을 50°C에서 건조하고 chloroform을 완전히 제거한 다음 fatty acid assay buffer 200  $\mu$ l를 넣고 남아 있는 건조된 지방을 완전히 녹여서 시료로 실험에 사용하였다. 시료 50  $\mu$ l에 ACS reagent 2  $\mu$ l를 넣은 다음 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. 반응액에 Master Reaction Mix (Fatty Acid Assay Buffer 44  $\mu$ l, Fatty Acid Probe 2  $\mu$ l, Enzyme Mix 2  $\mu$ l, Enhancer 2  $\mu$ l/well) 50  $\mu$ l를 넣어준 후 37°C에서 30분 동안 반응시켰다. 570 nm 파장에서 반응액의 흡광도를 측정하였다. Kit에 포함된 palmitic acid 표준용액의 정량곡선을 기준으로 Free fatty acid 함량을 계

산하였다.

##### (2) 세포 내 Lipid peroxidation (MDA) 측정

HepG2 cell을 6 well plate에  $10^6$  cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양한 후 새로운 배양액으로 교체하였고 ACP를 각각 1, 10, 100 ( $\mu$ g/ml)의 농도로 1 mM  $H_2O_2$ 와 함께 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 시료를 처리한 HepG2 cell을 PBS로 1회 세척한 다음 butylated hydroxytoluene (BHT) 10  $\mu$ l와 MDA lysis buffer 300  $\mu$ l를 넣고 세포를 모아주고 sonication 방법으로 lysis하였다. 13,000 g에서 15분 동안 lysis된 세포를 원심 분리하여 상등액을 단백질 정량 후 실험에 사용하였다. TBA reagent 600  $\mu$ l와 상등액 200  $\mu$ l를 넣은 후 95°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응액을 ice에서 10분 동안 식힌 후에 96 well plate에 200  $\mu$ l씩 옮긴 다음 532 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준용액의 정량곡선을 기준으로 MDA 농도를 계산하였다.

##### (3) Reverse transcription PCR

Cell 내 ACAT1, HMG-CoA reductase 발현 수준을 다음과 같이 측정하였다. 6 well plate에 HepG2 cell을  $10^6$  cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양한 다음 normal을 제외한 모든 well에 0.5 mM FAs (Palmitate:Oleic acid, 6:4)가 포함된 새로운 배양액으로 교체하였다. ACP를 각각 1, 10, 100 ( $\mu$ g/ml)의 농도로 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 시료가 처리된 HepG2 cell은 Total RNA extraction kit를 이용하여 total RNA를 추출하였으며 Total RNA를 nanodrop을 이용하여 정량한 뒤 Maxime RT PreMix에 total RNA 2  $\mu$ l와 DEPC-DW 18 $\mu$ l를 넣은 후 TD-360를 이용하여 45°C에서 60분 반응시킨 후 95°C에서 5분 반응시켜서 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA 2 $\mu$ l와 primer F 1  $\mu$ l, primer R 1  $\mu$ l, DEPC-DW 16  $\mu$ l를 AccuPower® Hotstart PCR PreMix에 넣고 Table 2와 같은 조건으로 PCR을 수행하였다. 1.5% agarose gel에서 생성된 product를 100V로 30분 동안 전기 영동한 다음 Fusion Quick Guide를 이용하여 UV촬영을 통해 결과를 확인하였다.

Table 2. The Sequences of Primers in This Study

Primer	F/R	Sequences	Cycle	Annealing (°C)
ACAT1	F	5'-AGCAGAGGCCAGGAATTGA-3'	35	60
	R	5'-GCACACCTGGCAAGATGGAG-3'		
HMG-CoA reductase	F	5'-TTCGGTGGCCTCTAGTGAGA-3'	38	60
	R	5'-TGTGAGTTGGAAGTGGGGC-3'		
$\beta$ -actin	F	5'-TGTCACCACTGGGACGATA-3'	35	56
	R	5'-GGGGTGTGAAGGTCTCAA-3'		

#### 3. 통계분석

실험 결과는 SPSS 11.0의 unpaired student's T-test와 ANOVA를 사용하여 통계처리 하였고 p<0.05, p<0.01 및 p<0.001 수준에서 그 유의성을 검정하였다.

## 결 과

#### 1. 중금속 검사

중금속 함량을 측정한 결과, ACP는 납, 카드뮴의 경우 기준치

이하로 검출되었고 비소, 수은의 경우는 검출되지 않았다.

2. 세포생존율 측정

HepG2 cell에서 ACP 처리에 의한 세포생존율을 측정된 결과, 정상군을 100.00±7.26%로 나타냈을 때, ACP 1, 10, 100 (µg/ml) 농도에서 각각 91.94±0.99%, 88.47±3.40%, 99.80±2.63%로 나타났으며, 15 mg/ml 농도에서 51.70±1.59%로 나타났다(Fig. 1).

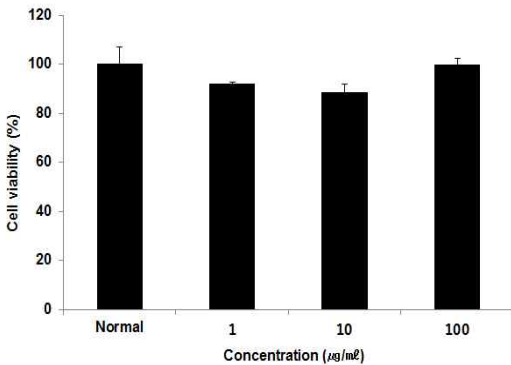


Fig. 1. Cell viability of ACP extract in HepG2 cells. HepG2 cells were treated by 1, 10 and 100 µg/ml of ACP extract for 24 h. Treated cells were exposed by CCK-8 for 30 mins and then absorbance were measured at 450 nm using microplate reader. Cell viability was calculated as percentage versus normal. The results were presented by the mean ± S.D from three independent experiments.

3. 항산화 효능평가

1) 항산화물질 함량 측정

Gallic acid를 표준물질로 하여 ACP에 존재하는 총 polyphenol 함량을 측정된 결과, 322.96±3.70 mg/g으로 나타났다. Quercetin을 표준물질로 하여 ACP에 존재하는 총 flavonoids 함량을 측정된 결과, 33.70±4.10 mg/g으로 나타났다.

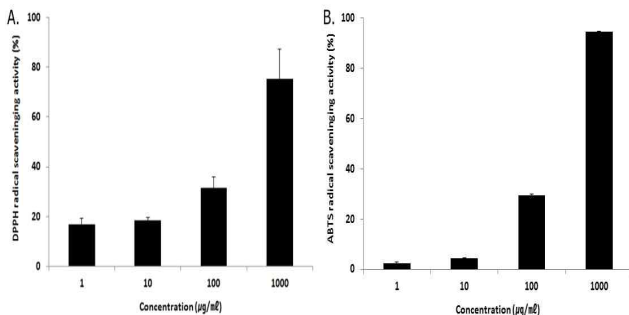


Fig. 2. DPPH radical scavenging activity(A) and ABTS radical scavenging activity(B) of ACP. ACP was incubated at 1, 10, 100, and 1,000 µg/ml with DPPH solution and ABTS solution for 30 mins. DPPH radical scavenging activities were determined by measurement of absorbance at 517 nm and ABTS radical scavenging activities were determined by measurement of absorbance at 732 nm. The results were expressed as mean ± S.D from three independent experiments.

2) 활성산소 소거능 측정

(1) DPPH radical 소거능 측정

ACP의 1, 10, 100, 1,000 (µg/ml) 농도에서 DPPH radical 소

거능을 측정된 결과, 각각 16.90±2.30%, 18.60±1.10%, 31.40±4.50%, 75.40±11.80%로 농도 의존적으로 DPPH radical 소거능의 증가가 나타났다(Fig. 2A).

(2) ABTS radical 소거능 측정

ACP의 1, 10, 100, 1,000 (µg/ml) 농도에서 ABTS radical 소거능을 측정된 결과, 각각 2.40±0.40%, 4.40±0.20%, 29.40±0.50%, 94.40±0.10%로 농도 의존적으로 ABTS radical 소거능의 증가가 나타났다(Fig. 2B).

3) 세포 내 ROS 측정

세포 내 ROS를 측정된 결과, 정상군에서 61.26±2.51%, 대조군에서 100.00±0.14%를 나타낸 반면, ACP 1, 10, 100 (µg/ml) 농도에서 각각 28.82±2.16%, 25.33±1.34%, 20.90±0.99%로 나타나 모든 농도에서 유의성 있는(\*\*\*: p<0.001) 감소가 나타났다(Fig. 3).

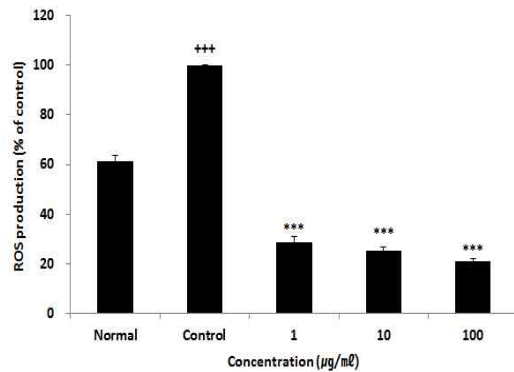


Fig. 3. Effect of ACP on ROS production in HepG2 cells. HepG2 cells were treated by 1, 10 and 100 µg/ml of ACP with 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 24 h. Levels of ROS were calculated as percentage versus control. The result were presented by the mean ± S.D from three independent experiments (Significance of results, \*\*\*: p<0.001 compare to normal, \*\*\*: p<0.001 compare to control). Normal ; non-treated HepG2 cells, Control ; 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-treated HepG2 cells.

4) 항산화 효소활성 측정

(1) 세포 내 GSH 함량 측정

세포 내 GSH 함량을 측정된 결과, 정상군에서 73.89±0.32 nmol/ml, 대조군에서 39.70±0.85 nmol/ml를 나타낸 반면, ACP 1, 10, 100 (µg/ml) 농도에서 각각 51.20±0.70 nmol/ml, 68.38±1.08 nmol/ml, 75.85±0.33 nmol/ml로 나타나 1, 10, 100 (µg/ml) 농도에서 유의성 있는(\*\*\*: p<0.001) 증가를 나타내었다(Fig. 4A).

(2) 세포 내 GPx 활성 측정

세포 내 GPx 활성을 측정된 결과, 정상군에서 337.20±25.91 mU/ml, 대조군에서 235.89±13.26 mU/ml를 나타낸 반면, ACP 1, 10, 100 (µg/ml) 농도에서 각각 378.53±15.56 mU/ml, 435.62±21.04 mU/ml, 431.46±17.87 mU/ml로 나타나 1, 10, 100 (µg/ml) 농도에서 유의성 있는(\*\*\*: p<0.001) 증가가 나타났다(Fig. 4B).

(3) 세포내 GR 활성 측정

세포 내 GR 활성을 측정된 결과, 정상군에서 135.55±3.43 mU/ml, 대조군에서 100.71±3.85 mU/ml를 나타내었으며, ACP 1,

10, 100 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 농도에서 각각  $165.13 \pm 2.70$  mU/mL,  $165.03 \pm 3.38$  mU/mL,  $170.07 \pm 8.40$  mU/mL로 나타나 1, 10, 100 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 농도에서 유의성 있는 (\*\*\*:  $p < 0.001$ ) 증가가 나타났다(Fig. 4C).

#### (4) 세포 내 SOD 활성 측정

세포 내 SOD 활성을 측정한 결과, 정상군에서  $8.32 \pm 0.54$  U/min/mL, 대조군에서  $6.25 \pm 0.57$  U/min/mL를 나타낸 반면, ACP 1, 10, 100 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 농도에서 각각  $8.31 \pm 1.89$  U/min/mL,  $6.67 \pm 0.79$  U/min/mL,  $6.57 \pm 1.75$  U/min/mL로 나타났다(Fig. 4D).

#### (5) 세포내 catalase 활성 측정

세포 내 catalase 활성을 측정한 결과, 정상군에서  $71.13 \pm 6.12$  nmol/min/mL, 대조군에서  $47.19 \pm 4.37$  nmol/min/mL를 나타낸 반면, ACP 1, 10, 100 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 농도에서 각각  $46.18 \pm 1.29$  nmol/min/mL,  $64.27 \pm 3.06$  nmol/min/mL,  $69.76 \pm 2.85$  nmol/min/mL로 나타나 10, 100 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 농도에서 유의성 있는 (\*\*:  $p < 0.01$ ) 증가가 나타났다(Fig. 4E).

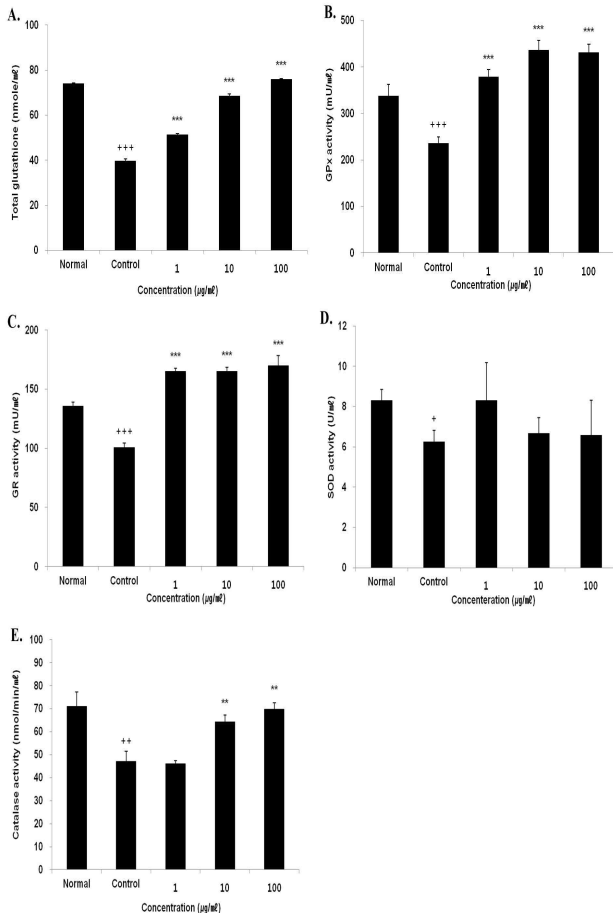


Fig. 4. Effect of ACP on total GSH contents(A), GPx(B), GR(C), SOD(D), catalase(E) in HepG2 cells. HepG2 cells were treated by 1, 10 and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of ACP with 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 24 h. The results were presented by the mean  $\pm$  S.D from three independent experiments (Significance of results, +:  $p < 0.1$ , ++:  $p < 0.01$ , +++:  $p < 0.001$  compare to normal, \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$  compare to control). Normal ; non-treated HepG2 cells, Control ; 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ -treated HepG2 cells.

#### 4. 항이상지질혈증 효능평가

#### 1) 세포 내 free fatty acid 함량 측정

세포 내 free fatty acid 함량을 측정한 결과, 정상군에서  $41.26 \pm 1.32$  nmol/mL, 대조군에서  $70.60 \pm 2.36$  nmol/mL를 나타낸 반면, ACP 1, 10, 100 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 농도에서 각각  $53.97 \pm 1.11$  nmol/mL,  $55.60 \pm 1.36$  nmol/mL,  $60.39 \pm 0.74$  nmol/mL로 나타나 1, 10, 100 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 농도에서 유의성 있는 (\*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$ ) 감소가 나타났다(Fig. 5).

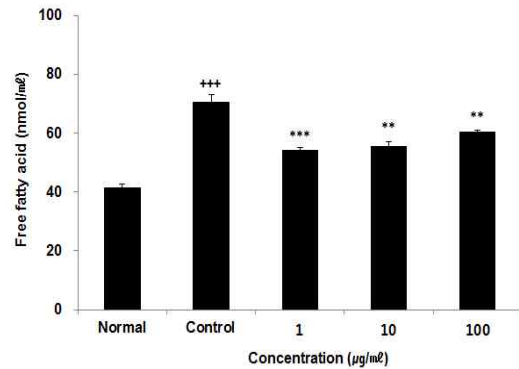


Fig. 5. Effect of ACP on free fatty acid contents in HepG2 cells. HepG2 cells were treated by 1, 10 and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of ACP with 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 24 h. Levels of ROS were calculated as percentage versus control. The result were presented by the mean  $\pm$  S.D from three independent experiments (Significance of results, +++:  $p < 0.001$  compare to normal, \*\*:  $p < 0.01$ , \*\*\*:  $p < 0.001$  compare to control). Normal ; non-treated HepG2 cells, Control ; 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ -treated HepG2 cells.

#### 2) 세포 내 MDA 측정

세포 내 MDA를 측정한 결과, 정상군에서  $3.61 \pm 0.03$  nmol/mg, 대조군에서  $4.35 \pm 0.09$  nmol/mg를 나타낸 반면, ACP 1, 10, 100 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 농도에서 각각  $5.43 \pm 0.11$  nmol/mg,  $3.41 \pm 0.26$  nmol/mg,  $3.41 \pm 0.24$  nmol/mg로 나타나 10, 100 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 농도에서 유의성 있는 (\*\*:  $p < 0.01$ ) 감소가 나타났다(Fig. 6).

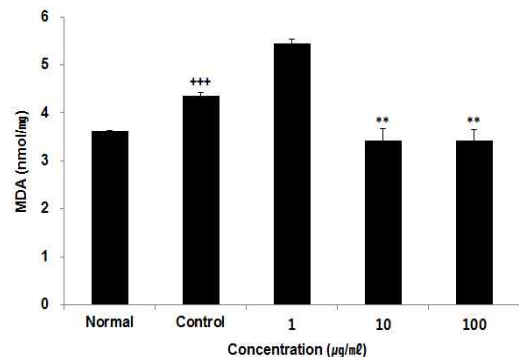


Fig. 6. Effect of ACP on MDA in HepG2 cells. HepG2 cells were treated by 1, 10 and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of ACP with 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  for 24 h. Total GSH contents were calculated using GSH standard curve. The results were presented by the mean  $\pm$  S.D from three independent experiments (Significance of results, +++:  $p < 0.001$  compare to normal, \*\*:  $p < 0.01$  compare to control). Normal ; non-treated HepG2 cells, Control ; 1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ -treated HepG2 cells.

#### 3) 세포 내 mRNA 발현 수준 확인

세포 내 ACAT1과 HMG-CoA reductase mRNA 발현 수준을 확인한 결과, 정상군에 비해 대조군에서 증가가 나타났으며, ACP 추출물 1, 10, 100 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 농도에서 ACAT1 과 HMG-CoA reductase mRNA 발현량의 감소가 나타났다(Fig. 7).

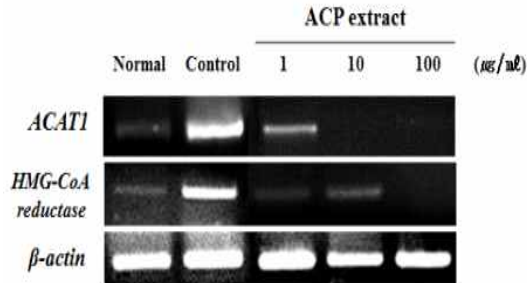


Fig. 7. Effect of ACP on ACAT1 and HMG-CoA reductase mRNA expression in HepG2 cells.

## 고찰

최근 수십 년간 전 세계적으로 감염성 질환에 의한 사망률은 점점 감소한 반면, 비감염성 질환에 의한 사망률은 꾸준히 증가하고 있다. 2008년도에 발표된 세계보건기구(WHO)의 보건 통계 수집국(Global Health Observatory) 조사에 따르면 전체 사망 중 63%가 비감염성 질환에 의해 나타나며, 비감염성 질환 중 심혈관계 질환, 암, 만성 폐질환 등이 가장 많은 사망의 원인으로 보고되었다<sup>1-4</sup>.

그 중에서도 심혈관계 질환은 전 세계적으로 가장 많은 사망원인으로 전체 사망의 30%가 심혈관계 질환으로 인해 발생하고 있으며, 우리나라에서도 과거 30년간 관상동맥질환으로 인한 사망률은 지속적으로 증가해왔다<sup>1-5</sup>. 심혈관계 질환의 주요 위험요인은 흡연, 이상지질혈증, 고혈압, 당뇨병으로 알려져 있으나 고혈압의 유병률과 흡연율은 정체가 되어 있는 반면에 이상지질혈증의 유병률은 점점 증가하고 있어 이상지질혈증의 조기 발견 및 치료를 통해 심혈관계 질환을 예방하려는 노력이 필요하다<sup>1-4,22</sup>.

또한 높은 콜레스테롤 수치는 유방암, 대장암, 전립선암 등의 발생과 관련 있다는 보고가 있었으며,<sup>22-25</sup> 높은 triglyceride 수치와 낮은 HDL-cholesterol 수치는 2형 당뇨병의 높은 유병률과 관련이 있다는 연구가 발표되었다<sup>26</sup>. 이처럼 여러 비감염성 질환들과 이상지질혈증과의 관계들에 대한 연구들이 발표되면서 이상지질혈증의 예방 및 치료에 대한 사회적 관심이 점점 높아지고 있다.

이상지질혈증이란 total cholesterol, LDL-cholesterol, triglyceride가 높은 경우와 HDL-cholesterol이 낮은 경우를 총칭한다<sup>1,5</sup>. 혈중 지질이 증가하면 혈관 평활근 세포에서 ROS의 생성이 증가하게 되고, 증가된 ROS에 의해 내피기능이상 및 LDL-cholesterol의 산화가 일어나게 된다. 산화된 LDL-cholesterol은 산화되지 않은 LDL-cholesterol에 비해 혈관 내피안의 macrophage들에 흡수되기 쉬워지며 지질을 탐식한 macrophage들은 세포질이 lipid drop으로 표현된 foam cell들이 되어 지방줄무늬(fatty streak)를 형성한다. 이 과정이 진행되면 죽상경화반을 형성하게 된다<sup>27,28</sup>.

이상지질혈증 치료의 일차 목표는 LDL-cholesterol을 낮추는 것이며, 두 번째 치료 목표는 non HDL-cholesterol을 낮추는 것이다<sup>1,29</sup>. 많은 역학 연구들에서 높은 LDL-cholesterol 수치와 관상동맥 질환과의 상관관계가 밝혀졌으며, LDL-cholesterol 수치를 1mg/dl 낮추면 심혈관계 질환에 의한 사망이 약 2% 감소하는 것으로 알려져 있다<sup>27</sup>. HDL-cholesterol은 항동맥경화 효과가 있어서 HDL-cholesterol 수치가 1 mg/dl 올라갈 때 마다 심혈관계 질환 발생률을 2-3%씩 낮춘다는 연구가 있다<sup>27,29</sup>. Triglyceride가 죽상동맥경화증 및 허혈성 심질환의 독립적인 위험인자인지에 대해서는 많은 논란이 있어왔으나 최근 연구들에 의하면 triglyceride 수치의 상승이 허혈성 뇌질환 및 허혈성 심질환의 발생과 직접적인 상관관계가 있는 것으로 보고되고 있다<sup>27</sup>.

이상지질혈증에 대한 약물치료는 심혈관계 질환 위험도와 LDL-cholesterol 수치를 종합적으로 판단하여 시행여부를 결정하게 된다<sup>5</sup>. 현재 이상지질혈증 치료제 중 일차적으로 사용되는 statin은 콜레스테롤 전구체인 HMG-CoA reductase를 경쟁적으로 억제하여 간에서의 콜레스테롤 합성을 억제한다. 따라서 LDL-cholesterol을 감소시키고 HDL-cholesterol을 증가시킴으로써 심혈관 질환 발생 감소, 생존율 증가 등의 효과를 가져올 수 있다<sup>5,6,27,29</sup>. 하지만 statin은 약 4% 정도에서 소화 장애, 속 쓰림, 복통, 근육통 등의 부작용을 일으킬 수 있다고 알려져 있으며, 10만 명 중 5명의 빈도로 creatine kinase의 상승을 동반한 근 병증을 일으킬 수 있다는 보고가 있다<sup>5,6</sup>. 이러한 근 병증은 드물지만 치명적일 수 있어 콜레스테롤강하제 근병증(cholesterol-lowering agents myopathy, CLAM)이라 명명되어 임상적 중요성이 제기되기도 했다<sup>6</sup>. Statin 이외에 2차 약물로 피브린산 유도제, 니코틴산, 에제티미브, 오메가-3 지방산 등이 statin계 약물과 병용요법 또는 단독치료로 사용되지만 이 약물들 또한 여러 부작용과 더불어 한계점들이 드러남에 따라 부작용이 적고 혈중 지질 개선 효과가 뚜렷한 약물개발이 필요한 상황이다<sup>1,5,28</sup>.

한의학적으로 이상지질혈증이란 병명은 고전에서 찾아볼 수 없으나 頭暈, 頭痛, 氣短, 胸悶, 腰膝酸軟 등의 증상으로 볼때 痰飲, 濕痰, 瘀血, 氣虛 등의 범주에 속한다<sup>7-10</sup>. 이상지질혈증에 대해 방<sup>8</sup>) 등은 嗜食肥甘厚味の 外因과 肝脾腎機能失調의 內因에 의해 발병한다고 보았으며, 진<sup>7</sup>) 등은 濕熱鬱結, 脾虛痰盛, 胃熱腑實, 肝鬱化火, 脾胃陽虛, 氣滯血瘀의 6가지 변증으로 구분하여 健脾利濕, 清利濕熱, 健脾去痰, 清裏通瀉, 清肝瀉火, 健脾補腎, 活血利氣의 치료법을 제시하였다. 이러한 한의학적 이론을 바탕으로 단미제와 복합제의 본초를 이용한 한방 이상지질혈증 치료제에 대한 연구가 다수 진행되고 있다<sup>10-14</sup>.

韓茵蔯은 清濕熱, 退黃疸하는 효능이 있는 利水滲濕藥으로 더위지기(Artemisia Iwayomogii Herba)의 全草이며 우리나라에서 사철쑥(Artemisia capillaris Thunberg)인 茵陳蒿를 대신해서 사용되고 있다<sup>30</sup>. 韓茵蔯은 동물실험을 통해 total cholesterol, LDL-cholesterol, triglyceride, phospholipid 수치 개선 및 간 손상 개선효과가 있음이 확인되었으며, 韓茵蔯이 茵陳蒿에 비해 유의성 있는 이상지질혈증 및 간 손상 개선효과가 있음이 밝혀졌다<sup>10,31,32</sup>.

鬱金은 活血止痛, 行氣解鬱, 疏肝利膽하는 효능이 있는 活血去瘀藥으로, 鬱金の 대표적인 성분인 curcumin은 고콜레스테롤 식이로 유발된 이상지질혈증 동물모델에서 담즙분비 촉진을 통한 콜레스테롤 농도를 감소시키는 것으로 보고되었다<sup>33</sup>. 또한 鬱金 추출물은 항이상지질혈증 효과 이외에도 항산화 효과가 있음이 여러 연구를 통해 확인되었다<sup>34,35</sup>.

韓茵陳과 鬱金の 복합 추출물은 고지방식으로 유도된 동물연구들을 통해 혈중 지질 감소, 항산화효과, 항동맥경화 효과가 확인되었으며, 각각의 약물을 단독으로 사용하였을 때 보다 복합추출물로 사용하였을 때 효과가 더 좋은 것으로 확인되었다<sup>11,36</sup>. 이러한 연구결과를 바탕으로 韓茵陳, 鬱金の 복합물에 山査<sup>12</sup>, 山査와 丹蔘<sup>13</sup>, 女貞子와 枸杞子<sup>14</sup>등을 배합한 한약 추출물들이 이상지질혈증에 미치는 효과를 알아보기 위한 연구들이 진행되었으며 유의한 항이상지질혈증 효과를 갖는 것으로 보고되었다.

車前子是 清熱利尿, 滲濕通淋하는 효능이 있으며, 車前子 수침액은 백서모델에서 total cholesterol, triglyceride 및 간 조직 중의 지질함량을 대조군에 비해 유의하게 감소시켰다는 연구결과가 있다<sup>15</sup>. 또한 車前子에 포함된 여러 다당체는 담즙산 결합하고 및 cholesterol 미셀(micelle)을 파괴시켜 소장에서의 콜레스테롤 흡수를 감소시키는 작용을 하며<sup>17,18,27</sup>, 그 중 특히 車前子の 대표적인 성분인 acubin은 prostaglandin의 합성 중간체로서 담즙배설 촉진작용 및 간독성에 대한 해독작용 등이 있다고 보고되어 있다<sup>15</sup>. 담즙산은 cholesterol의 대사물로 cholesterol의 분해를 담당하는 7 $\alpha$ -hydroxylase에 의해 합성이 조절되므로 車前子 내의 다당체들이 담즙산과 결합하면 담즙산의 합성이 촉진되어 cholesterol을 저하시키는 효과를 가져올 것으로 사료된다<sup>17,18</sup>.

車前子를 韓茵陳, 鬱金 배합하여 진행한 연구는 아직 보고된 바가 없어, 위의 선행연구들에 착안하여 韓茵陳, 鬱金에 車前子를 배합하여 이상지질혈증 개선에 대한 효능을 확인하고자 본 연구를 진행하였다.

이 연구에서는 HepG2 cell을 이용하여 세포독성, 항산화 효과 및 이상지질혈증 관련 유전자 발현 억제 효과를 평가하였다. 본 실험에 사용한 HepG2 cell은 사람 간세포종 유래의 간세포로서, LDL 수용체, lipoprotein 분비, apoprotein 합성 등의 지질대사에서 사람 간세포에서 이루어지고 있는 것과 동일한 양상을 나타낸다는 여러 보고가 있어서 지질대사를 연구하는 데 다양하게 사용되고 있다<sup>37,38</sup>.

본 연구에서는 ACP의 안전성 확인을 위하여 중금속 검사 중 금속 검사를 시행한 결과 납, 카드뮴은 기준치 이하로 검출되었고, 비소, 수은은 검출되지 않았다. HepG2 cell에 ACP를 처리한 후 세포 생존율을 측정된 결과 ACP 1, 10, 100 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 농도에서 각각 91.94 $\pm$ 0.99%, 88.47 $\pm$ 3.40%, 99.80 $\pm$ 2.63%의 생존율을 보였으며, 세포 활성 및 성장이 50%이상 저해되는 농도인 IC50은 15.38 mg/mL로 나타났다. 따라서 실험이 진행된 농도 범위 내에서 ACP는 HepG2 cell의 생존을 저해할만한 세포독성은 나타나지 않았다.

ACP의 항산화 효과 평가하기 위해 ACP에 존재하는 총 polyphenol, 총 flavonoids, DPPH radical 소거능, ABTS

radical 소거능을 확인하였다. 또한, ACP를 처리한 HepG2 cell에서의 ROS 생성과 세포 내 GSH 함량, GPx, GR, SOD, catalase 활성을 측정하였다.

Polyphenol 화합물은 flavonoids, anthocyanins, tannins, catechins, isoflavones 등을 총칭하며, 식물계에 널리 분포되어 있는 물질이다<sup>39</sup>. 식물체에 함유되어 있는 페놀성 화합물들은 분자 내 phenolic hydroxyl기를 가지고 있기 때문에 ROS의 소거 작용을 통해 하여 산화적 손상을 억제하며<sup>39-41</sup>, flavonoids는 효소적 또는 비효소적으로 지질과산화를 억제한다<sup>39,42</sup>. DPPH assay는 짧은 시간 내에 항산화 효과를 측정할 수 있는 방법으로 천연물로부터 항산화 물질을 탐색하는데 많이 이용되고 있다<sup>43</sup>. 항산화물질은 free radical에 전자나 수소를 공여함으로써 free radical을 환원시켜 항산화 작용을 나타게 되는데, DPPH 용액이 항산화 물질과 만나면 free radical이 소거되면서 DPPH 고유의 청남색이 없어지게 된다. 이 색의 차이를 정량하여 전자 공여능력을 측정함으로써 항산화 효능을 측정할 수 있다<sup>42,43</sup>. ABTS assay는 DPPH assay와 마찬가지로 free radical에 대한 항산화 물질의 소거능을 측정하는 방법으로 실험방법이 간단하며 극성시료 뿐만 아니라 비극성 시료의 항산화능 측정에 모두 사용 가능하여 DPPH assay에 비해 다양한 시료의 항산화능 측정에 사용된다<sup>44,45</sup>. ABTS assay에서 ABTS radical은 녹색을 나타내며 항산화능을 가진 물질로부터 전자를 받아 환원되면 무색으로 변하게 된다<sup>44</sup>.

ROS는 큰 산화력을 갖는 superoxide anion radical(O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hydroxyl radical( $\cdot\text{OH}$ ), hydrogen peroxide(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), single oxygen, (1O<sub>2</sub>), peroxy radical(ROO $\cdot$ ), alkoxy radical(RO $\cdot$ ) 등을 말한다<sup>28</sup>. ROS는 산화적 손상을 야기하여 LDL-cholesterol의 산화, 내피세포의 기능이상, 혈관 평활근세포의 증식과 이주, 혈액 응고기전의 이상을 초래함으로써 죽상동맥경화 등의 혈관질환을 일으키는데 중요한 역할을 한다<sup>28,46</sup>. GSH는 glutathione의 환원형으로 직접적인 ROS의 소거제로 작용하거나 GPx를 촉매로 하여 ROS에 대한 높은 보호효과를 나타낸다<sup>47</sup>. GSH는 free radical에 의해 산화되면 산화형인 GSSG가 되며, GSSG는 산화 된 후 GR에 의해 다시 GSH로 환원된다<sup>47</sup>. 따라서 GSH와 GPx, GR은 세포 내에 어느 정도의 항산화능이 있는지를 판단하는 척도가 된다. SOD는 superoxide를 보다 반응성이 약한 산소와 과산화수소로 바꾸어주는 반응을 촉매하는 효소이며, catalase는 과산화수소를 물로 환원시키는 역할을 하는 효소로서 SOD와 더불어 체내 항산화체계의 근간을 이룬다<sup>44,47</sup>.

ACP에 존재하는 항산화 물질인 polyphenol 함량은 322.96 $\pm$ 3.70 mg/g, flavonoids 함량은 33.70 $\pm$ 4.10 mg/g으로 측정되었다. ACP를 1, 10, 100, 1,000 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 농도에서 DPPH radical 소거능과 ABTS radical 소거능을 측정된 결과, 농도 의존적으로 DPPH radical 소거능과 ABTS radical 소거능의 증가가 나타났다. 또한 모든 농도에서 HepG2 cell 내 ROS의 유의한 (p<0.001) 감소가 나타났으며, GSH함량과 GPx, GR활성은 모든 농도에서 유의하게(GSH : p<0.001, GPx : p<0.001, GR : p<0.001) 증가하였다. 세포 내 SOD 활성은 ACP 처리 이후 대조군에 비해 증가를 보였으며, 세포 내 catalase 활성은 10, 100 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 농도



에서 유의성 있는( $p < 0.01$ ) 증가가 나타났다. 따라서 ACP는 항산화 관련 효소 활성을 촉진하며 free radical을 환원시켜 산화적 손상을 예방할 수 있을 것으로 사료된다.

ACP의 항이상지질혈증 효능을 평가하기 위해 ACP를 처리한 HepG2 cell에서 세포 내 free fatty acid 함량과 지질 과산화 지표인 MDA를 측정하였으며, 세포 내 ACAT1과 HMG-CoA reductase mRNA 발현 수준을 확인하였다.

간세포의 정상적인 생리상태에서 지방조직에서 간으로 유입되었거나 간에서 생성된 free fatty acids는 대부분 산화하여 에너지를 생산하고, 남은 free fatty acids는 세포독성이 없는 triglyceride의 형태로 저장되게 된다. 그러나 간세포에서 과도한 free fatty acids가 생산되게 되면 인슐린 신호전달을 교란하여 저항성을 일으킬 뿐 아니라, 세포독성을 유도하게 되고, 세포 안의 ROS의 증가와 항산화 방어물질의 감소로 이어져 결국 산화 스트레스를 유발하게 된다<sup>48)</sup>.

ACAT(Acetyl-Coenzyme A acetyltransferase)는 콜레스테롤의 ester화 반응을 촉매하는 효소로 이상지질혈증을 비롯한 여러 질환의 치료제들이 이 효소를 target으로 하고 있다<sup>49)</sup>. HMG-CoA reductase는 간 세포의 cholesterol 생합성 단계에서 작용하는 효소로, 이상지질혈증의 1차 치료제인 statin 또한 cholesterol 합성에서 속도 조절단계 효소인 HMG-CoA reductase의 경쟁적 억제제로 작용하여 LDL-cholesterol의 양을 낮춘다<sup>5,50)</sup>.

ACP를 처리한 HepG2 cell 내의 free fatty acid 함량은 모든 농도에서 유의성 있는(10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  :  $p < 0.01$ , 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  :  $p < 0.001$ ) 감소가 나타났으며, 세포 내 MDA도 10, 100 ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 농도에서 유의성 있는 ( $p < 0.01$ ) 감소가 나타났다. HepG2 cell 내 ACAT1과 HMG-CoA reductase mRNA 발현 수준을 확인한 결과, 모든 농도의 ACP를 처리한 군에서 대조군에 비해 ACAT1 과 HMG-CoA reductase mRNA 발현량의 감소가 나타났다. 이를 통해 볼 때, ACP는 지질 대사 관련 효소의 유전자 발현에 영향을 주어 간 조직의 지질대사에 변화를 일으켜 콜레스테롤 생합성을 감소시킬 수 있을 것으로 생각된다.

이상의 결과들을 종합해 볼 때, ACP는 항산화 효능을 통해 LDL-cholesterol의 산화 및 혈관내피세포의 기능 이상을 방지하여 이상지질혈증으로 인한 죽상동맥경화증의 발생을 예방할 수 있을 것으로 기대된다. 또한 ACP는 지질대사 유전자의 발현을 억제함으로써 혈중 지질수치를 개선할 수 있을 것으로 사료된다. 다만 본 연구는 양성대조군을 설정하지 않아 다른 본초들에 비해 항산화 및 항이상지질 효과의 우월성을 확인하기 어렵고, 한인진, 울금, 차전자 단일 추출물과 효과를 비교하지 않아 단일 본초 비해 ACP가 항산화 및 항이상지질 효과에서 우월성을 보이는지 확인하기 어렵다. 또한 세포수준에서 이루어진 실험이라는 한계점이 있어 향후 동물 모델 실험 등을 통한 혈중지질수치 평가 등 이상지질혈증 치료 효과에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 결 론

한인진, 울금, 차전자의 복합추출물(ACP)의 항산화 효과 및 항

이상지질혈증 효과를 알아보기 위해 HepG2 Cell에 ACP를 처리하여 세포독성, 항산화 활성, ACAT1, HMG-CoA reductase의 mRNA 발현량을 확인하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

ACP는 실험이 시행된 농도 내에서 세포독성을 나타내지 않았다.

ACP는 10  $\text{mg}/\text{mL}$ 의 농도에서 항산화 물질인 polyphenol은  $322.96 \pm 3.70$   $\text{mg}/\text{g}$ , flavonoids는  $33.70 \pm 4.10$   $\text{mg}/\text{g}$ 을 함유하였다.

ACP는 HepG2 cell에서 DPPH radical 소거능과 ABTS radical 소거능을 농도 의존적으로 증가시켰다.

ACP는 HepG2 cell에서 ROS 생성을 대조군에 비해 유의성 있게 감소시켰다.

ACP는 HepG2 cell에서 GSH 함량과 GPx, GR 및 catalase 활성을 대조군에 비해 유의성 있게 증가시켰다.

ACP는 HepG2 cell에서 free fatty acid와 MDA를 대조군에 비해 유의성 있게 감소시켰다.

ACP는 HepG2 cell의 ACAT1 과 HMG-CoA reductase mRNA 발현량을 대조군에 비해 감소시켰다.

이상의 결과로 볼 때, ACP는 항산화 및 항이상지질혈증 효과가 있다고 사료되며, 향후 이상지질혈증, 죽상동맥경화증 및 심·뇌혈관 질환에 사용될 수 있도록 추가적인 연구가 필요하리라 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 한의약 임상시험 교육프로그램 개발 및 제품화 지원 시스템 구축 사업(HI15C0006)의 지원을 받아 이루어진 것입니다.

## References

1. Committee for Guidelines for Management of Dyslipidemia. 2015 Korean Guideline for Management of Dyslipidemia. *J Lipid Atheroscler*. 2015;4(1):61-92.
2. Ha KH, Kwon H, Kim DJ. Epidemiologic characteristics of dyslipidemia in Korea. *J Lipid Atheroscler*. 2015;4(2):93-9.
3. Jeong JH, Choi YS, Kim SM, Choi SY, Kim JE, Kim EY et al. Correlation between physical activity status and dyslipidemia in Korean adults: The 2010 Korea national health and nutrition examination survey. *Korean J Clin Geri*. 2014;15(1):35-44.
4. Statistics Korea. Annual report on the vital statistics in Korea[Internet]. Daejeon: Statistics Korea; 2016[cited 2016 Sep 27]. Available from: <http://kostat.go.kr/>.
5. Kim SH. Drug treatment of dyslipidemia. *J Korean Med Assoc*. 2016;59(5):366-73.
6. Mihaylova B, Emberson J, Blackwell L, Keech A, Simes J, Barnes E et al. The effects of lowering LDL cholesterol with statin therapy in people at low risk of vascular disease: Meta-analysis of individual data from 27 randomised trials. *Lancet*. 2012;380(9841):581-90.

7. Chen KT, Yang SS. Practical diagnostic and therapeutics of integrated traditional chinese and western medicine. Beijing, China Medical Science and Technology. 1994. p. 689, 691-2, 694-7.
8. Bang HJ, Tack ES, Hong Y, Gang YH. A Study of Hyperlipidemia by the theory of Traditional Korean Medicine. East-west medicine. 1995;20(1):25-36.
9. Association of Korean Medicine Professors for Cardiovascular and Neurological Medicine. Cardiovascular and Neurological Medicine in Korean Medicine. 5th ed. Seoul:Wooripub. 2016. p. 141-3.
10. Hong YK, Kim SS, Shin MK, Kim JJ. Review of Korean Medical Treatment in Hyperlipidemia - Focusing on Treatment of Korean Herbal Medicine. J Physiol & Pathol Korean Med. 2010;24(1):9-14.
11. Lee SJ, Han JM, Lee JS, Son CG, Im HJ, Jo HK et al. ACE reduces metabolic abnormalities in a high-fat diet mouse model.eCAM. 2015;2015:1-8.
12. Kim HT, Kim YS, Seol IC, Yoo HR. The effects of an extract of artemisiae capillaris, curcumae longae, and crataegi fructus (IUS) on anti-hyperlipidemia and anti-oxidation in db/db mouse model. J Int Korean Med. 2016;37(3):467-83.
13. Choi KE, Seoul IC, Kim YS, Yoo HR. Cho HK, Yoo HR. Hypolipidemic and Anti-oxidant Effects of Chungghyl Plus in Type II Diabetic Mice Model. Korean J Oriental Phys Path. 2016;30(3):164-76.
14. Kim TY, Oh JM, Kim YS, Jo HK, Yoo HR, Seol IC. Anti-dyslipidemic Effect of ACLL extract (Artemisia capillaris Thunb, Curcuma longa L, Lycium chinense, Ligustrum lucidum Aiton complex extract) on High Cholesterol Diet-induced Dyslipidemia in Mice. Journal of Oriental Medicine Research Institute. 2016;25(1):133-44.
15. Cho SY, Kim MJ. The effect of plantaginis semen on serum and hepatic lipid metabolism in fed high and low fat diets. J Korean Soc Food Sci Nutr. 1995.
16. Lee HJ, Chung MJ, Kim DJ, Choe M. Effects of oenanthe javanica, coicis lachryma-jobi L. var., and plantaginis asiatica L. water extracts on activities of key enzymes on lipid metabolism. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2009;38(11):1516-21
17. Hwang JS, Suk JM, Shin I, Hwang SJ, Park JY, Kim SO et al. Effects of plantaginis semen & poria (CJB) water extract on histomorphometrical aspects and histopathological changes in high fat diet-induced obese rats. Kor. J. Herbology. 2013;28(1):91-6.
18. Gong L, Zhang H, Niu Y, Chen L, Liu J, Alaxi S et al. A novel alkali extractable polysaccharide from plantago asiatica L. seeds and its radical-scavenging and bile acid-binding activities. J Agric Food Chem. 2015;63(2):569-77.
19. Gutfinger T. Polyphenols in olive oils. Journal of the American Oil Chemists Society. 1981;58(11):966-8.
20. Nieva M, María I, Antonio R, Marta A, Vattuone. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. Journal of ethnopharmacology. 2000;71(1):109-14.
21. Kim BM, Jung JH, Kim DS, Kim YM, Jeong IH. Inhibitory activity of intracellular lipid accumulation by various marine extracts in HepG2 cells. Korean J Food Sci Technol, 2012;44:362-6.
22. Kim HC, Oh SM. Noncommunicable diseases: Current status of major modifiable risk factors in Korea. Journal of Preventive Medicine and Public Health. 2013;46(4):165-72.
23. Kitahara CM, Berrington de González A, Freedman ND, Huxley R, Mok Y, Jee SH et al. Total cholesterol and cancer risk in a large prospective study in korea. Journal of Clinical Oncology. 2011;29(12):1592-8.
24. Freeman MR, Solomon KR. Cholesterol and prostate cancer. J Cell Biochem. 2004;91(1):54-69.
25. Ha MN, Sung JH, Song YM. Serum total cholesterol and the risk of breast cancer in postmenopausal Korean women. Cancer Causes & Control. 2009;20(7):1055-60.
26. Kannel WB. Lipids, diabetes, and coronary heart disease: Insights from the framingham study. Am Heart J. 1985;110(5):1100-7.
27. Loscalzo J, Longo D, Kasper D, et al. Harrison's Principle of Internal Medicine(18th edition). Seoul:MIP. 2013:1947-62.
28. Vogiatzi G, Tousoulis D, Stefanadis C. The role of oxidative stress in atherosclerosis. Hellenic J Cardiol. 2009;50(5):402-9.
29. Trialists CT. Efficacy of cholesterol-lowering therapy in 18 686 people with diabetes in 14 randomised trials of statins: A meta-analysis. . 2008;371(9607):117-25.
30. National Oriental Medical Department of herbology. Herbology. Seoul: Younglim-sa. 1994. p. 354-5, 369-70, 452-3.
31. Ham IH, Jung SW, Lee KJ, Park KH, Choi HY. Effect of the aerial part of artemisia capillaris and A. iwayomogi on the hyperlipidemia of rats induced by triton WR-1339. Kor. J. Herbology. 2005;20(1):46.
32. Seo BI. Preventive effects of water extracts from artemisiae iwayomogi herba on hyperlipiderma and liver

- damage induced by alcohol. *Kor J Herbology*. 2007;22(1):103-10.
33. Arafa HMM. Curcumin attenuates diet-induced hypercholesterolemia in rats. *Med Sci Monit Int Med J Exp Clin Res*. 2005;11(7):228-34.
  34. Yook JS, Kim MN, Lee SJ, Choi JU, Cha YS. Improvement effect of artificial rice containing curcuma longa L. extract on lipid parameters in C57BL/6J mice. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2015;44(8):1114-20.
  35. Yun SJ, Yeon JY, Kim MH, Kang MH, Kim TH, Son YK et al. The effects of angelica keiskei koidzumi and turmeric extract supplementation on the blood lipids, and antioxidant and inflammatory markers in hypercholesterolemic adults in Korea. *The Korean J Food & Nutr*. 2009;22(4):517-25.
  36. Shin HS, Han JM, Kim HG, Choi MK, Son CG, Yoo HR et al. Anti-atherosclerosis and hyperlipidemia effects of herbal mixture, artemisia iwayomogi kitamura and curcuma longa linne, in apolipoprotein E-deficient mice. *J Ethnopharmacol*. 2014;153(1):142-50.
  37. Cha JY, Kim DJ, Kim SH, Kim YK, Cho YS. Pharmacological effect of hawangyeonhaedoktang on experimental triglyceride accumulated HepG2 cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2003;32(4):586-90.
  38. Chung MJ, Sung N, Park C, Kweon D, Mantovani A, Moon T. Antioxidative and hypocholesterolemic activities of water-soluble puerarin glycosides in HepG2 cells and in C57 BL/6J mice. *Eur J Pharmacol*. 2008;578(2):159-70.
  39. Kim EJ, Choi JY, Yu MR, Kim MY, Lee SH, Lee BH. Total polyphenols, total flavonoid contents, and antioxidant activity of korean natural and medicinal plants. *Korean J. Food Sci. Technol*. 2012;44(3):337-42.
  40. Park YS. Antioxidative activities and contents of polyphenolic compound of medicinal herb extracts. *J East Asian Soc Dietary Life*. 2002;12(1):23-31.
  41. Jeong HJ, Park SB, Kim SA, Kim HK. Total polyphenol content and antioxidative activity of wild grape (*vitis coignetiae*) extracts depending on ethanol concentrations. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2007;36(12):1491-6.
  42. Lee SJ, Chung HY, Lee IK, Yoo ID. Isolation and identification of flavonoids from ethanol extracts of artemisia vulgaris and their antioxidant activity. *Korean J. Food Sci. Technol*. 1999;31(3):815-22.
  43. Que F, Mao L, Zhu C, Xie G. Antioxidant properties of chinese yellow wine, its concentrate and volatiles. *LWT-Food Science and Technology*. 2006;39(2):111-7.
  44. Kim MJ, Park EJ. Feature analysis of different in vitro antioxidant capacity assays and their application to fruit and vegetable samples. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2011;40(7):1053-62.
  45. Awika JM, Rooney LW, Wu X, Prior RL, Cisneros-Zevallos L. Screening methods to measure antioxidant activity of sorghum (*sorghum bicolor*) and sorghum products. *J Agric Food Chem*. 2003;51(23):6657-62.
  46. Kim BH, Son SM. Mechanism of developing diabetic vascular complication by oxidative stress. *Journal of Korean Endocrine Society*. 2006;21(6):448-59.
  47. Kwon RH, Na BJ, Park SJ, Woo WH, Lee MS, Mun YJ. Effect of houttuynia cordata thunb and herbs mixture extract on the antioxidation in the LPS-induced hepatotoxicity. *Korean J Oriental Phys Pathol*. 2007;21(6):1520-24.
  48. Sohn JH, Kim TY. Recent update on pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Korean J Med*. 2010;79(5):461-74.
  49. Jung JH, Ryu YS, Go GW. Improvement of Lipid Homeostasis Through Modulation of Low-density Lipoprotein Receptor Family by Functional Ingredients. *Food Engineering Progress*. 2017;21(1):1-11.
  50. Guyton C, Hall J. *Textbook of medical physiology*. Seoul:Jongdam. 2002. p. 556-88.