

하수오가미방이 고지혈증 SHR 및 항산화에 미치는 영향

김수익, 김남욱, 전상윤, 홍 석
동신대학교 한의과대학 내과학교실

The Effect of *Hasuogamibang* on Hyperlipidemic SHR and Antioxidant Activity

Su-ik Kim, Nam-uk Kim, Sang-yun Jeon, Seok Hong
Dept. of Internal Medicine, College of Oriental Medicine, Dong-Shin University

ABSTRACT

Objectives : This study was designed to evaluate the effect of *Hasuogamibang* (HGB) on hyperlipidemia and antioxidant activity.

Methods : For this study, we divided four groups of rats (normal WKY group, normal SHR group, high cholesterol diet and saline-treated SHR group, high cholesterol diet and HGB-treated SHR group), and observed the change of body weight, weight of liver, cholesterol, triglyceride, glucose, albumin, histologic change of liver and aorta, lipid peroxidation and antioxidant activity of liver tissue, and cholesterol gene revelation control efficiency.

Results : Total-cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides were decreased significantly by HGB. However, HDL-cholesterol increased significantly. The tissue of liver and aorta were controlled defect by HGB on histologic study. Lipid peroxidation and SOD of liver tissue was decreased significantly by HGB. Gene revelation of ACAT and HMG CoA reductase in hepatic tissue was decreased significantly by HGB.

Conclusion : This study suggests that HGB is significantly effective on hyperlipidemia and antioxidant activity.

Key words : *Hasuogamibang*(HGB), hyperlipidemia, antioxidant activity

1. 서론

지단백의 합성과 분해에 이상이 생겨 혈청내 cholesterol, triglyceride가 상승되어 있는 상태를 고지혈증이라 한다^{1,2}. 고칼로리 음식과 동물성 식품 섭취의 증가로 혈중 total cholesterol 수치가 증가되고 있으며, 또한 연령 및 체질량 지수에 비례하여 증가된다고 보고되고 있다³⁻⁵. 혈중 cholesterol 수치는 심혈관질환의 발생율과 정비례 관계에 있

으며 특히 뇌졸중이나 관상동맥 질환의 위험인자가 된다^{6,7}.

한의학에서 고지혈증은 濕痰의 重濁한 穢濁之氣가 체내에 정체된 것으로 痰濁, 濕熱, 瘀血 등의 범주에 속하는 것으로 보고 있다⁸. 그 病因은 대부분 飲食不節, 運動不足, 七情內傷, 先天不足 및 臟腑機能失常 등이다⁹.

고지혈증에 대한 한의학적 연구로는 정¹⁰의 加味 溫膽湯, 황¹¹의 茵陳胃苓湯, 차¹²의 降脂通脈飲, 유¹³의 夏枯草散 등 임상에서 고지혈증 치료 효과가 있는 처방을 실험적으로 증명하고, 기전을 연구하려는 노력이 이루어지고 있다.

何首烏加味方은 補肝益腎, 養血祛風하는 何首烏,

· 교신저자: 홍 석 전남 순천시 조례동 1722-9
동신대학교 순천한방병원 2내과 2진료실
TEL: 061-729-7155
E-mail: 17under@hanmail.net

固精縮尿, 澁腸止瀉하는 金櫻子, 淸肝明目, 平肝潛陽하는 草決明, 健脾滲濕하는 薏苡仁, 淸熱除濕하는 茵陳, 淸濕熱, 利小便하는 澤瀉, 行氣消食, 健脾開胃하는 山楂肉, 淸熱解毒, 升舉陽氣하는 柴胡, 行氣破瘀, 淸心解鬱하는 鬱金, 除煩渴, 消食化痰하는 茶葉¹⁴ 으로 구성된 처방으로 한의학적으로 혈중 지질의 수치를 감소시킬 것으로 생각되는 처방이다.

이에 저자는 何首烏加味方 추출물을 고 cholesterol 식이로 유발된 고지혈증 SHR(spontaneously hypertensive rat)에 경구 투여하여 체중 및 간 중량의 변화, 혈중 cholesterol, triglyceride 측정, 간과 대동맥의 조직학적 검사, 간 조직에 대한 항산화활성 및 간 조직의 cholesterol 인자 발현에 미치는 영향 등을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험

1. 재 료

1) 동물 및 사육조건

본 실험에 사용된 실험용 쥐는 체중 180~220 g 의 웅성 WKY(Wister Kyoto rat) 과 SHR (spontaneously hypertensive rat)이며, 실험 당일까지 고형사료와 고 cholesterol 식이사료(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 고 cholesterol 식이 사료의 조성 내용과 분량은 다음과 같다(Table 1, Table 2).

Table 1. Composition of Basal Diet

Composition	Content
Crude protein	above 22.1%
Crude fat	above 8.0%
Crude fiber	below 5.0%
Crude ash	below 8.0%
Calcium	above 0.6%
Phosphorus	above 0.4%

Table 2. Composition of High Cholesterol Diet

Diets ingredient	Concentration(g/kg)
Purina mouse cow	750.00
Casein	75.00
Cocoa butter	75.00
Dextrose	25.00
Dextrin	16.25
Cholesterol	12.50
Cellulose	12.50
Sucrose	16.25
Mineral mix #200000	8.75
Sodium cholate	5.00
Vitamin mix #310035	2.50
Choline chloride	1.25
Total	1000.00

2) 약 재

본 실험에 사용한 하수오가미방(*Hasuogamibang* : 이하 HGB로 표기함)의 구성 약물은 2첩분량이며, 동신대학교 부속한방병원에서 구입하여 정선한 후 사용하였다.

Table 3. The Compositions of *Hasuogamibang* (HGB)

Herbal name	Scientific name	Volume(g)
何首烏	<i>Polygoni Multiflori Radix</i>	30
金櫻子	<i>Rosae Leavigatae Fructus</i>	30
草決明	<i>Cassiae Semen</i>	30
薏苡仁	<i>Coicis Semen</i>	30
茵陳	<i>Artemisiae Capillaris Herba</i>	24
澤瀉	<i>Alismatis Rhizoma</i>	24
山楂肉	<i>Crataegi Fructus</i>	18
柴胡	<i>Bupleuri Radix</i>	12
鬱金	<i>Curcumae Radix</i>	12
綠茶	<i>Camellia sinensis</i>	6
Total amount		216

2. 방법

1) *In vitro*

(1) 항산화 활성 측정

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

150 nm DPPH/EtOH 100 μl에 HGB를 1000, 500, 250, 125, 62.5 μg/ml 농도로 희석하여 50 μl씩 첨가한 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. 이를 흡광도 517 nm에서 측정하여 아래의 방법으로 계산하였다.

$$\text{DPPH 소거능(\%)} =$$

$$\left(\frac{\text{대조군의 흡광도} - \text{HGB 투여군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \right) \times 100$$

② Superoxide dismutase(SOD) 유사활성 측정

HGB 0.2 ml에 tris-HCl buffer(pH 8.5) 2.6 ml과 7.2 mM pyrogallol 0.2 ml를 가하여 25°C에서 10분 반응 후 1 N HCl 0.1 ml로 반응 정지시켰다. 반응액을 420 nm에서 흡광도를 측정하고 buffer를 첨가한 것을 대조군으로 하여 아래와 같이 저해율을 측정하였다.

$$\text{SOD 유사활성(\%)} =$$

$$100 - \left\{ \left(\frac{\text{HGB 투여군의 흡광도}}{\text{buffer 첨가군의 흡광도}} \right) \times 100 \right\}$$

2) *In vivo*

(1) 고 cholesterol 사료에 의한 고지혈증 유발과 약물투여

WKY와 SHR에는 Table 1의 일반 식이와 식수를 충분히 공급하였고, 대조군은 SHR에 Table 2 조성으로 만들어진 고 cholesterol 식이와 식수를 충분히 공급하였다. 그리고 HGB투여군은 고 cholesterol 식이 투여와 함께 4주간 HGB를 몸무게 60 kg의 성인이 하루 2침을 음용한 경우의 기준으로 441.7 mg/kg/0.5ml의 양으로 매일 정해진 시간에 경구 투여하였다.

(2) 체중 및 간 중량 측정

① 체중 변화 측정

체중 증가량은 고 cholesterol 식이 투여를 시작한 주부터 4주간 매주 화요일 오후 4시에 측정하여 평균값을 산출하였다.

② 간 중량 측정

6주간의 실험 종료 후 몸의 혈액을 제거한 후 간을 적출하여 중량을 측정하였다.

(3) 체혈 및 혈장 분리

HGB의 투여 종료 후 12시간 절식 후 ether로 마취시킨 다음 심장에서 12 ml이상의 혈액을 취하여 5 ml를 15 ml conical tube에 넣어 6,500 rpm에 15분간 원심 분리시켜 혈청을 분리하였다. 나머지 6 ml의 혈액을 EDTA가 첨가된 튜브에 넣어 혈장을 분리하였다.

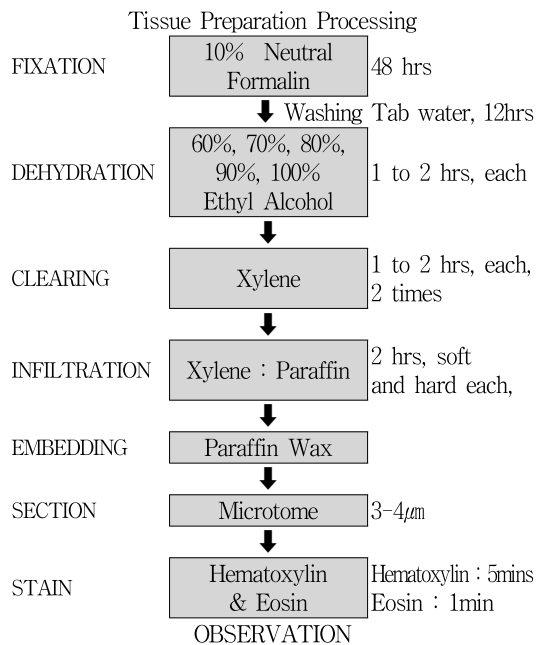
(4) 혈청 및 혈장 성분 측정

분리한 혈청은 생화학기기를 이용하여 total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, triglyceride, 을 측정하였다.

(5) Hematoxyline & eosin 염색

각 실험군에서 적출한 간 및 대동맥 조직을 10% 중성 포르말린에 48시간 고정하여 후 흐르는 수돗물에서 12시간 수세하여 조직 내 고정액을 완전 제거하였다. 조직의 탈수를 위해 60%에서부터 100% 알코올에 이르기까지 농도 상승 순으로 통상의 방법에 따라 탈수하고, xylene에 투명과정을 거

친 다음 파라핀 블록을 제작하였다. 제작된 블록은 박절기(microtome)를 이용하여 3~4 μm 두께로 절편을 만들어 탈 파라핀 및 염색 과정을 거친 다음 hematoxyline과 eosin(H&E) 일반 염색을 실시하여 100을 광학현미경상에서 관찰하였다.



Scheme 1. Tissue preparation processing

(6) 간 조직의 효소활성 측정

① 효소원 제조

적출한 간은 PBS로 세척하여 수분을 제거하고 1 g의 간 조직에 10 ml의 0.25 M sucrose / 0.5 mM EDTA / 5 mM N-2-hydroxyethyl-piperazine-N-2-ethane sulfonic acid(HEPES) 용액을 가하여 ultra homogenizer를 이용하여 빙냉 하에서 마쇄하였다. 마쇄한 용액을 4°C, 600 xg로 15분간 원심 분리하여 핵 및 미마쇄 부분을 제거한 후 4°C, 8000 xg로 30분간 원심 분리하여 1 ml의 상등액을 TBARS 함량측정에 사용하였다. 나머지는 4°C, 10000 xg에서 30분간 원심 분리하여 상등액 중 일부를 취하여 0.4배 양의 ethanol : chloroform(5 : 3) 냉혼합액을

가하여 2분간 전탕한 다음 다시 4°C, 10000 xg에서 30분간 원심 분리하여 얻은 상등액을 superoxide dismutase(SOD) 활성도 측정에 사용하였다. Catalase 활성은 마쇄액을 4°C, 10000 xg로 30분간 원심 분리하여 얻은 침전물에 0.25 M sucrose 용액에 현탁시킨 다음 다시 4°C, 10000 xg에서 20분간 원심 분리하여 얻은 침전물에 0.25 M sucrose 용액을 가해 현탁시켜 측정하였다.

② 과산화지질(TBARS) 함량 측정

간 조직의 과산화지질 정량은 Sato법¹⁵⁾을 이용하여 측정하였다. 제조한 간 조직 효소원 0.5 ml 에 TCA용액 2.5 ml 를 가하여 잘 섞은 다음 실온에서 10분간 방치한 후 1500 xg에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 버리고 침전물은 0.05 M 황산으로 1 회 세척 후 침전물에 0.05 M 황산 2.5 ml와 0.6% TBA 3.0 ml를 가하여 잘 섞은 후 95°C의 항온 수조에서 30분간 가열하였다. 가열 후 n-butanol : pyridine(15 : 1) 혼합액 3.0 ml를 가하여 잘 섞은 후 1500 xg에서 10분간 원심 분리하고 상등액을 취하여 530 nm에서 흡광도를 측정하였다.

③ 항산화 효소(SOD) 활성 측정

Oyanagui의 방법¹⁶⁾에 준하여 Cytochrome C, 2 μM xanthine sodium, 50 mM sodium phosphate buffer의 기질액에 효소액을 넣고 안정화 시킨후 xanthine oxidase 50 μl를 넣고 흡광도를 사용하여 550 nm에서 2분간의 흡광도를 측정하였다. Xanthine / xanthine oxidase 반응으로 생성된 superoxide anion에 의해 cytochrome C가 환원되는 것을 측정하는데, SOD에 의해 superoxide anion의 양이 감소하여 cytochrome C가 변화하는 현상을 이용하여 SOD 활성을 측정하였다. Cytochrome C의 환원을 50% 억제하는 양을 SOD의 1 unit로 정의 하였다.

④ Catalase 활성 측정

Aebi의 방법¹⁷⁾을 이용하여 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0) 2.89 ml에 기질 30 mM H₂O₂ 100 μl를 넣어 25°C에서 5분간 반응 시켰다. 여기에 효소액 10 μl를 가하여 다시 25°C, 240 nm

에서 5분간 흡광도를 측정하였다. H₂O₂ 흡광도 변화와 H₂O₂의 mole흡광계수로 농도를 구하여 효소 활성도를 측정하였다. 효소활성의 단위는 1분당 1 mg protein이 분해하는 hydrogen peroxide의 양을 μ mole로 표시하였다.

(7) 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 15 초간 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-증합효소 연쇄반응

역전사(reverse transcription) 반응은 준비된 total RNA 3 μ g을 DNase I (10 U/ μ l) 2U/tube를 37°C heating block에서 30분간 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 \times 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 불활성화시킨 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 I로 염색체의 DNA를 제거하기 위해 digested 하였다. 75°C에서 20분 동안 DNase 과 5 μ g을 넣어 total RNA는 first strand cDNA synthesis kit를 이용하여 cDNA를 transcription하였다.

기술된 것에 따라 real-time PCR은 applied을 사용하면서 수행되었다. Probes는 6-carboxy-fluorescein 으로 라벨을 붙이고, beta-actin cDNA는 모든 cDNA와 같은 양을 포함한 각 cDNA 표본을 AmpliTaq gold DNA Polymerase을 포함시켜 TaqMan Universal PCR로 증폭시켰다. PCR 조건은 40 cycles를 위한 50°C에서 2 분, 95°C과 10 분, 60°C에서 15 초 수행하였다. 사용된 probe는 다음과 같다.

$$y = x(1+e)^n, \quad x = \text{starting quantity} \quad y = \text{yield}, \\ n = \text{number of cycles}$$

e = efficiency로 계산하여 RQ(relative quantitative)를 측정하였다.

ACAT	Sense	CCTCCCGGTTTCATTCT GATA
	Antisense	ACACCTGGCAAGATGG AGTT
HMG-CoA reductase	Sense	TGCTGCTTTGGCTGTA TGT
	Antisense	TGAGCGTGAACAAGAA CCA

3. 통계 처리

다양한 실험으로부터 얻은 결과는 mean \pm standard error로 기록하였고, 유의성 검증은 Student's *t*-test 분석 방법을 이용하여 결정하였다. 대조군을 정상군과, 실험군을 대조군과 비교하여 p<0.05 일 때 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

III. 실험결과

1. *In vitro*

1) 항산화 활성에 미치는 영향

(1) DPPH 소거활성에 미치는 영향

DPPH의 소거 활성은 62.5, 125, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각 $30.4 \pm 6.8\%$, $47.4 \pm 1.1\%$, $68.2 \pm 4.7\%$, $73.9 \pm 8.5\%$ 의 소거 활성 효과를 나타내었다 (Fig. 1).

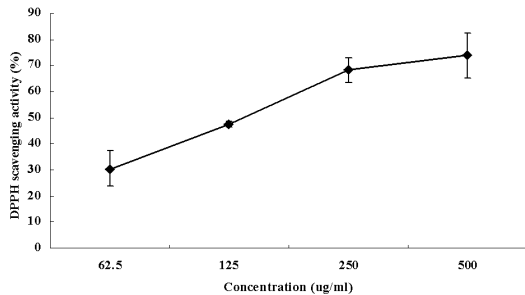


Fig. 1. Scavenging Activity of HGB on DPPH Free Radical.

HGB 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 \pm SD of three independent experiments.

(2) SOD 유사활성에 미치는 영향

SOD나 SOD 유사 물질에 의해서만 항산화 활성을 나타내는 pyrogallol을 이용하여 HGB의 항산화 활성을 측정된 결과 62.5, 125, 250, 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서 각각 $16.3 \pm 4.5\%$, $28.2 \pm 1.5\%$, $36.9 \pm 2.4\%$, $42.8 \pm 1.4\%$ 의 항산화 활성 효과를 나타내었다 (Fig. 2).

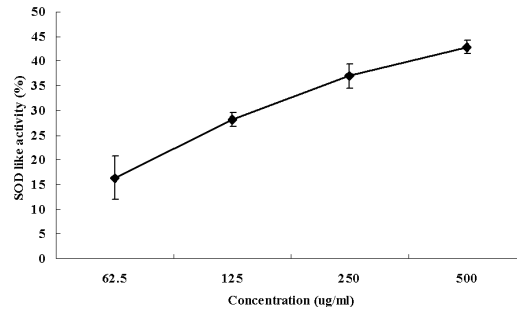


Fig. 2. SOD-like Activity of HGB

SOD-like activity of HGB at final concentration 62.5, 125, 250, 500 ($\mu\text{g/ml}$). The results are the mean \pm SD of three independent experiments.

2. *In vivo*

1) 체중 및 간 중량에 미치는 영향

(1) 체중 변화에 미치는 영향

고 cholesterol 식이를 시작한 주부터 4주간 매주 체중 변화를 측정된 결과, 각 1, 2, 3, 4주의 체중은 아래와 같이 나타났으며 HChol-SHR군의 4주째에서 SHR군에 비하여 유의성 있게 ($p < 0.05$) 증가하였다 (Table 2. Fig. 3).

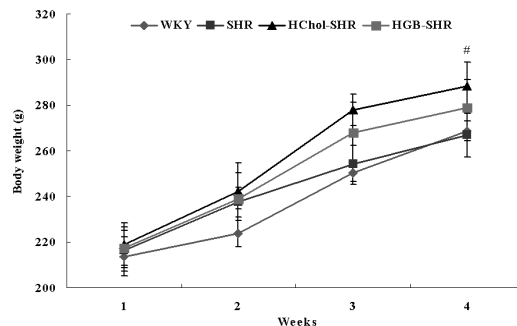


Fig. 3. Effect of HGB on the Body Weight in Rat Fed High Cholesterol Diets.

WKY : Normal WKY rat group.
 SHR : normal SHR rat group.
 HChol-SHR : High cholesterol diet and saline (0.5 ml/day) treated group.
 HGB-SHR : High cholesterol diet and HGB (441.7 mg/0.5 ml/day) treated group.
 Values represent the means \pm SD of 6 rats. Statistically significant value compared with SHR by *t-test* ($p < 0.05$).

Table 2. The Body Weight in Rat Fed High Cholesterol Diets

Week \ Group	WKY	SHR	HChol-SHR	HGB-SHR
1	213.6±8.6	216.2±8.9	219.0±9.3	217.5±8.9
2	223.5±5.8	237.3±6.6	242.3±7.7	238.9±15.8
3	250.2±4.9	254.3±7.9	277.7±6.9	268.0±13.1
4	268.6±4.4	266.8±9.7	288.5±10.4 [#]	278.8±12.7

(2) 간 중량 변화에 미치는 영향

실험 종료 후 간의 중량을 측정한 결과, WKY는 7.1 ± 0.4 g, SHR은 8.3 ± 0.4 g, HChol-SHR은 20.1 ± 1.2 g, HGB-SHR은 16.9 ± 1.2 g으로 나타나 HChol-SHR은 WKY와 SHR에 비하여 유의성 있게(+++ : P < 0.001, ### : P < 0.001) 증가하였고, HGB-SHR군에서는 대조군인 HChol-SHR에 비하여 감소하였다(Fig. 4).

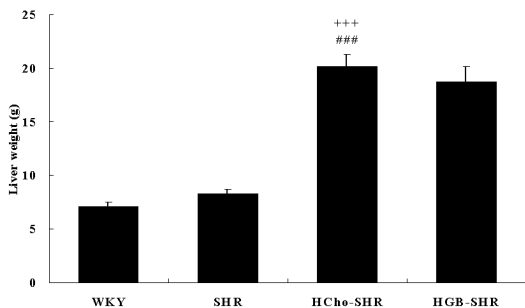


Fig. 4. Effect of HGB on the Liver Weight in Rat Fed High Cholesterol Diets.

Values represent the means ± SD of 6 rats. Statistically significant value compared with WKY by *t-test*(+++p<0.001). Statistically significant value compared with SHR by *t-test*(###p<0.001). Legends are the same as Fig. 3.

2) Cholesterol 변화에 미치는 영향

(1) Total cholesterol의 변화에 미치는 영향

실험 종료 후 혈청 내 total cholesterol의 변화를 분석한 결과, WKY는 99.0 ± 3.6 mg/ml, SHR은 59.0±2.0 mg/ml, HChol-SHR은 114.0 ± 8.9 mg/ml, HGB-SHR은 93.0±5.0 mg/ml로 나타나 HChol-SHR

은 SHR에 비하여 유의성 있게(### : P < 0.001) 증가하였고 HGB-SHR군에서는 대조군인 HChol-SHR에 비하여 유의성 있게(* : P < 0.05) 감소하였다(Fig. 5).

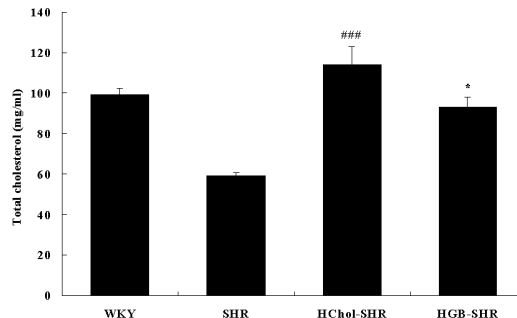


Fig. 5. Effect of HGB on the Total Cholesterol Level in Rat Fed High Cholesterol Diets.

Values represent the means ± SD of 6 rats. Statistically significant value compared with SHR by *t-test*(###p<0.001). Statistically significant value compared with HChol-SHR by *t-test*(*p<0.05). Legends are the same as Fig. 3.

(2) LDL cholesterol의 변화에 미치는 영향

실험 종료 후 혈청 내 LDL cholesterol의 변화를 분석한 결과, WKY는 16.4 ± 0.9 mg/ml, SHR은 8.7±0.6 mg/ml, HChol-SHR은 72.0 ± 16.6 mg/ml, HGB-SHR은 48.7 ± 1.5 mg/ml로 나타나 HChol-SHR은 WKY와 SHR에 비하여 유의성 있게(+++ : P < 0.001, ### : P < 0.001) 증가하였고 HGB-SHR군에서는 대조군인 HChol-SHR에 비하여 유의성 있게(* : P < 0.05) 감소하였다(Fig. 6).

(3) HDL cholesterol의 변화에 미치는 영향

실험 종료 후 혈청 내 HDL cholesterol의 변화를 분석한 결과, WKY는 82.2 ± 4.0 mg/ml, SHR은 47.5 ± 2.7 mg/ml, HChol-SHR은 37.7 ± 2.7 mg/ml, HGB-SHR은 44.3 ± 1.3 mg/ml으로 나타나 HChol-SHR군은 WKY군과 SHR군에 비하여 유의성 있게(+++ : P < 0.001, # : P < 0.05) 감소하였고 HGB-SHR군에서는 대조군인 HChol-SHR군에 비하여

유의성 있게(* : P <0.05) 증가하였다(Fig. 7).

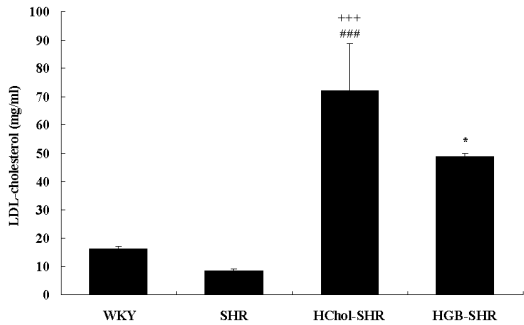


Fig. 6. Effect of HGB on the LDL Cholesterol Level in Rat Fed High Cholesterol Diets.

Values represent the means \pm SD of 6 rats. Statistically significant value compared with WKY by *t-test*(+++p<0.001). Statistically significant value compared with SHR by *t-test*(###p<0.001). Statistically significant value compared with HChol-SHR by *t-test*(*p<0.05). Legends are the same as Fig. 3

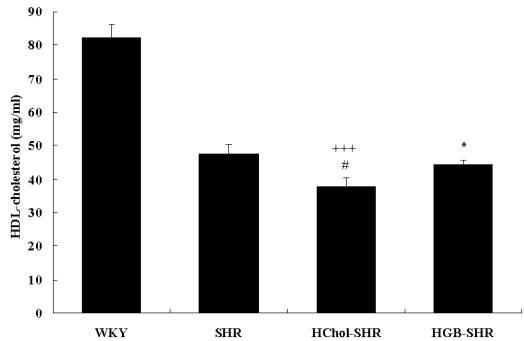


Fig. 7. Effect of HGB on the HDL Cholesterol Level in Rat Fed High Cholesterol Diets.

Values represent the means \pm SD of 6 rats. Statistically significant value compared with WKY by *t-test*(+++p<0.001). Statistically significant value compared with SHR by *t-test*(#p<0.05). Statistically significant value compared with HChol-SHR by *t-test*(*p<0.05). Legends are the same as Fig. 3.

3) Triglyceride 변화에 미치는 영향

실험 종료 후 혈청 내 triglyceride의 변화를 분

석한 결과, WKY는 30.0 ± 4.0 mg/ml, SHR은 28.7 ± 2.1 mg/ml, HChol-SHR은 56.7 ± 2.9 mg/ml, HGB-SHR은 43.7 ± 7.2 mg/ml로 나타나 HChol-SHR은 WKY와 SHR에 비하여 유의성 있게(+++ : P <0.001, ### : P <0.001) 증가 하였고, HGB-SHR군에서는 대조군인 HChol-SHR에 비하여 유의성 있게(* : P <0.05) 감소하였다(Fig. 8).

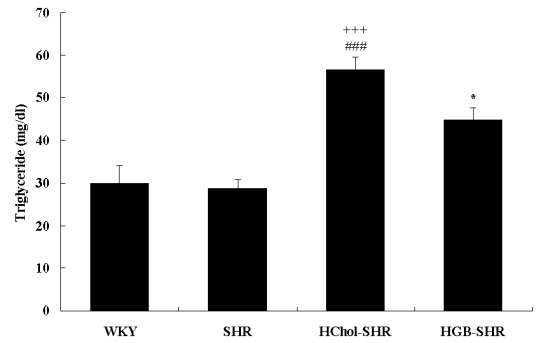


Fig. 8. Effect of HGB on the Triglyceride Level in Rat Fed High Cholesterol Diets.

Values represent the means \pm SD of 6 rats. Statistically significant value compared with WKY by *t-test*(+++p<0.001). Statistically significant value compared with SHR by *t-test*(###p<0.001). Statistically significant value compared with HChol-SHR by *t-test*(*p<0.05). Legends are the same as Fig. 3.

6) 조직 변화에 미치는 영향

(1) 간 조직의 변화에 미치는 영향

실험 종료 후 간을 적출하여 염색한 결과 대조군에서는 간세포에서 지방질 축적에 의한 광범위한 지방공포(화살표) 병변 소견이 나타난 반면, HGB 투여군에서는 상대적으로 간 세포내 지방 공포 병변이 감소되었으며, 간세포의 핵이 정상 조직과 유사한 모양으로 관찰되었다(Fig. 9).

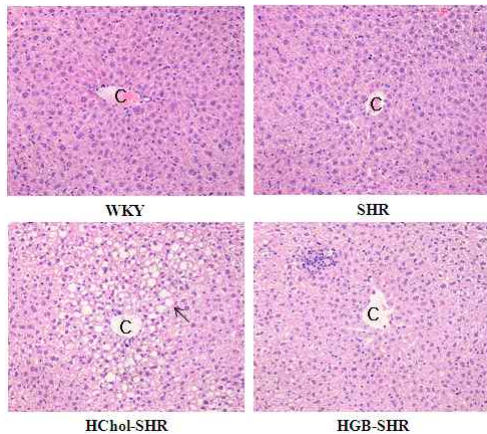


Fig. 9. Representative Microscope Photographs of Liver Stained with Hematoxylin and Eosin.

Legends are the same as Fig. 3.

(2) 대동맥의 변화에 미치는 영향

실험 종료 후 대동맥을 적출하여 H&E 염색한 결과 대조군에서는 혈관 벽의 내피세포가 불규칙적으로 증가한 것이 보이며 세포층의 파괴로 인하여 경계가 불분명(화살표 부분)하게 보인 반면, HGB 투여군에서는 상대적으로 세포가 규칙적이며 혈관 벽의 경계면이 뚜렷하게 보인다(Fig. 10).

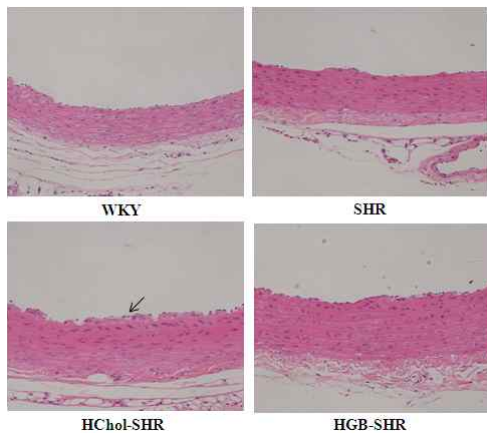


Fig. 10. Representative Microscope Photographs of Aorta Stained with Hematoxylin and Eosin.

Legends are the same as Fig. 3.

7) 간조직의 과산화지질 함량 변화에 미치는 영향
실험 종료 후 간 조직에서 과산화지질의 함량 변화를 측정된 결과, WKY는 6.6 ± 0.9 g, SHR은 9.7 ± 0.8 g, HChol-SHR은 24.3 ± 2.3 g, HGB-SHR은 18.3 ± 1.4 g으로 나타나 HChol-SHR은 WKY와 SHR에 비하여 유의성 있게(+++ : $P < 0.001$, ### : $P < 0.001$) 증가하였고 HGB-SHR 군에서는 대조군인 HChol-SHR에 비하여 유의성 있게(* : $P < 0.01$) 감소하였다(Fig. 11).

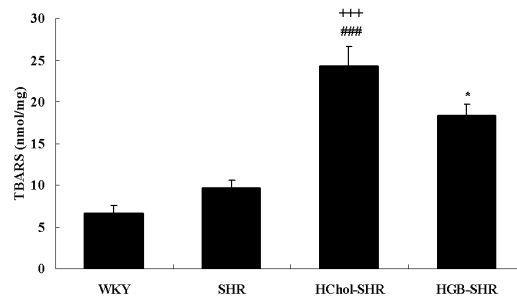


Fig. 11. Effect of HGB on Hepatic Thiobarbituric acid Reactive Substance (TBARS) Value in SHR Fed High Cholesterol Diets.

Values represent the means \pm SD of 6 rats. Statistically significant value compared with WKY by *t-test*(+++ $p < 0.001$). Statistically significant value compared with SHR by *t-test*(### $p < 0.001$). Statistically significant value compared with HChol-SHR by *t-test*(* $p < 0.05$). Legends are the same as Fig. 3.

8) 간 조직의 항산화 효소활성에 미치는 영향

(1) SOD의 활성에 미치는 영향

실험 종료 후 간 조직에서 SOD 활성의 변화를 측정된 결과, WKY는 8.2 ± 0.3 unit/mg protein, SHR은 6.4 ± 0.3 unit/mg protein, HChol-SHR은 5.3 ± 0.2 unit/mg protein, HGB-SHR은 6.1 ± 0.2 unit/mg protein으로 나타나 HChol-SHR은 WKY와 SHR에 비하여 유의성 있게(+++; $P < 0.001$, # : $P < 0.01$) 감소하였고 HGB-SHR군에서는 대조군인 HChol-SHR에 비하여 유의성 있게(** : $P < 0.01$) 증가하였다(Fig. 12).

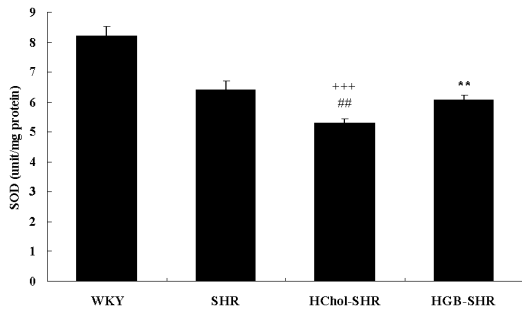


Fig. 12. Effect of HGB on Hepatic SOD Value in Rat Fed High Cholesterol Diets.

Values represent the means \pm SD of 6 rats. Statistically significant value compared with WKY by *t-test*(+++ p <0.001). Statistically significant value compared with SHR by *t-test*(## p <0.01). Statistically significant value compared with HChol-SHR by *t-test*(** p <0.01). Legends are the same as Fig. 3.

(2) Catalase의 활성에 미치는 영향

실험 종료 후 간 조직에서 catalase 활성의 변화를 측정된 결과, WKY는 18.3 ± 2.0 nmol/mg, SHR은 17.3 ± 1.9 nmol/mg, HChol-SHR은 7.2 ± 1.4 nmol/mg, HGB-SHR은 8.6 ± 0.7 nmol/mg으로 나타나 HChol-SHR은 WKY와 SHR에 비하여 유의성 있게(++ : $P < 0.01$, ## : $P < 0.01$) 감소하였고 HGB-SHR군에서는 대조군인 HChol-SHR에 비하여 증가하였다(Fig. 13).

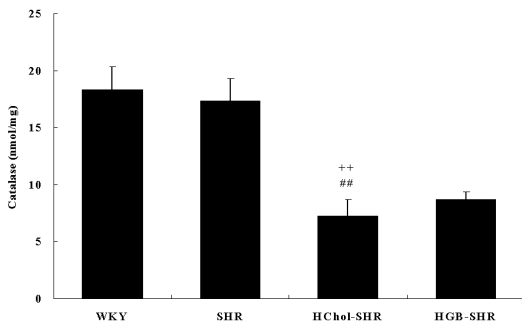


Fig. 13. Effect of HGB on Hepatic Catalase Value in Rat Fed High Cholesterol Diets.

Values represent the means \pm SD of 6 rats.

Statistically significant value compared with WKY by *t-test*(++ p <0.001). Statistically significant value compared with SHR by *t-test*(## p <0.001). Legends are the same as Fig. 3.

9) 간 조직의 cholesterol 인자 발현에 미치는 영향

(1) Hepatic ACAT의 변화에 미치는 영향

간 조직에서의 ACAT의 mRNA 유전자 발현은 대조군인 HChol-SHR의 유전자 발현을 1.01 ± 0.03 RQ로 했을 때 WKY는 0.21 ± 0.03 RQ, SHR은 0.29 ± 0.05 RQ, HGB-SHR은 0.86 ± 0.02 RQ로 나타나 HChol-SHR은 WKY와 SHR에 비하여 유의성 있게(++ : $P < 0.01$, ## : $P < 0.01$) 증가하였고 HGB-SHR군에서는 대조군인 HChol-SHR에 비하여 유의 있게(* : $P < 0.05$) 감소하였다(Fig. 14).

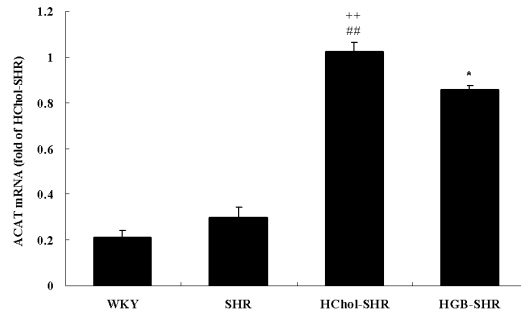


Fig. 14. Effects of HGB on the Expression of ACAT mRNA Level in the Liver of Rat Fed High Cholesterol Diets.

Values represent the means \pm SD of 6 rats. Statistically significant value compared with WKY by *t-test*(++ p <0.001). Statistically significant value compared with SHR by *t-test*(## p <0.001). Statistically significant value compared with HChol-SHR by *t-test*(* p <0.05). Legends are the same as Fig. 3.

(2) Hepatic HMG-CoA reductase의 변화에 미치는 영향

간 조직에서의 HMG-CoA reductase의 mRNA 유전자 발현은 대조군인 HChol-SHR의 유전자 발현을 1.01 ± 0.01 RQ로 했을 때 WKY는 $0.40 \pm$

0.03 RQ, SHR은 0.47 ± 0.03 RQ, HGB-SHR은 0.61 ± 0.02 RQ로 나타나 HChol-SHR은 WKY와 SHR에 비하여 유의성 있게(++ : $P < 0.01$, ## : $P < 0.01$) 증가하였고 HGB-SHR군에서는 대조군인 HChol-SHR에 비하여 유의성 있게(** : $P < 0.01$) 감소하였다(Fig. 15).

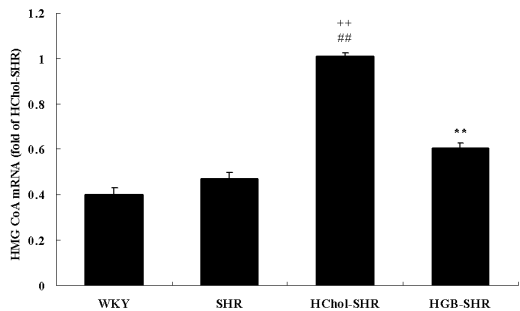


Fig. 15. Effects of HGB on the Expression of HMG-CoA Reductase mRNA Level in the Liver of Rat Fed High Cholesterol Diets.

Values represent the means \pm SD of 6 rats. Statistically significant value compared with WKY by *t-test*(++ $p < 0.001$). Statistically significant value compared with SHR by *t-test*(## $p < 0.001$). Statistically significant value compared with HChol-SHR by *t-test*(** $p < 0.01$). Legends are the same as Fig. 3.

IV. 고찰

고지혈증은 혈액의 점도와 혈소판 응집력을 증가시켜 혈액순환장애를 유발함으로써 고혈압, 동맥경화증, 뇌졸중, 허혈성심질환 등의 주요한 원인이 된다^{1,2,18}. 혈중 지질은 주로 cholesterol, triglyceride, phospholipid, free fatty acid 등으로 구성되어 있다. 혈중 지질 수치는 성별, 연령, 식이, 비만, 스트레스 등 사회적 환경과 지리적 조건 및 운동량에 따라서 차이가 나는데, 우리나라에서 cholesterol 수치가 과거에 비해 급속히 상승하고 있는 것은 동물성 지방의 섭취가 증가하고 있기 때문이다¹⁹.

모든 혈청 지질은 단백질과 결합한 상태로 운반

되는데, 혈청 지단백은 5가지 유형으로 나눌 수 있다. chylomicron, 초저비중 지질단백(Very low-density lipoprotein, VLDL), 중간비중 지질단백(intermediate-density lipoprotein, IDL), 저비중 지질단백(low-density lipoprotein, LDL), 고비중 지질단백(high-density lipoprotein, HDL) 등이다²⁰. chylomicron 및 VLDL은 triglyceride, LDL은 cholesterol, HDL은 cholesterol과 phospholipid을 주로 운반 한다²¹.

고지혈증 치료는 LDL-cholesterol 감소 외에도 HDL-cholesterol의 농도를 높이는 것이 심혈관질환의 위험을 감소에 효과적 이라고 보고되고 있다. HDL-cholesterol과 관상동맥질환의 사망률과 유병률 사이에는 역의 상관관계가 있어 HDL-cholesterol이 40 mg/dl 미만인 사람에서 관상동맥질환의 발생률이 증가하며, HDL-cholesterol이 높은 경우 관상동맥질환의 예방효과가 있다고 보고되었다^{22,23}.

지질대사는 외인성과 내인성으로 구분된다. 외인성 지질대사는 섭취한 음식물 중 triglyceride은 지방세포로, cholesterol은 간으로 운반하는 기능을 의미 한다. 음식물 중에 포함되어 있는 triglyceride과 cholesterol은 chylomicron에 둘러싸여 장림프관에서 흡수되어 림프관을 따라 순환하다가 조직과 간으로 운반 된다^{1,21}.

내인성 지질 대사는 간에서 생산된 지질을 각 조직으로 전달하는 과정이다. 잉여 탄수화물은 간에서 triglyceride로 변하고, acetate가 HMG-CoA reductase 등에 의해 cholesterol로 합성 된다²⁴.

VLDL에서 triglyceride가 빠져나간 잔여입자를 IDL이라 하는데, 혈중 cholesterol의 약 75%는 LDL에 존재한다. LDL은 cholesterol을 필요한 장기로 운반하고, 간에서 포착된 LDL은 담즙합성에 필요한 cholesterol을 제공하게 된다.

HDL의 기능은 말초세포나 지방분해의 부산물로부터 유래되는 잉여 phospholipid나 cholesterol을 전달받아 직접적으로 간으로 운반하거나, cholesterol ester를 VLDL이나 LDL에 전달하여 간접적으로 간으로 cholesterol을 역수송 하는 것이다^{1,20,21}.

인체 내의 cholesterol은 LDL 수용체, HMG CoA reductase, acyl-CoA cholesterol acyltransferase (ACAT)에 의해 조절 된다. HMG-CoA로부터 mevalonate로 전환시키는 효소인 HMG-CoA reductase는 cholesterol을 합성 조절하는 효소이며, HMG-CoA reductase 활성의 저하는 혈청 cholesterol 농도를 감소시킨다. ACAT는 세포내에서 cholesterol ester의 형성을 촉진하는 효소로 간에서는 apoprotein B 포함 지단백질의 생산과 방출, 대식세포와 조직에 있는 cholesterol ester 축적에 관여하고 있다. 따라서 ACAT 형성이 감소하면 cholesterol ester가 축적되는 것을 막아 cholesterol의 체내 축적을 감소시킨다²⁵.

세포질의 고분자는 활성산소에 의해 손상된다. 이것은 유전자, 단백질, 탄수화물 및 지질을 산화시킨다. 특히 과산화지질은 자동 산화반응에 의한 불포화 지방산에 O₂가 부가된 생성물의 총칭으로 신체에 손상을 입히고, 세포기능을 저하시켜 질병을 야기 한다. 그러나 생체에는 SOD, catalase, various peroxidases, vitamin C 와 E 등에 다양한 항산화 시스템이 있어 활성산소를 제거 한다²⁶.

한의학에서 고지혈증은 痰濁, 濕熱, 瘀血 등의 범주에 속하는 것으로 보고 있다⁸. <靈樞·五癰津液別>²⁷에서는 五穀의 津液이 和合되어 膏로 되어 骨空의 내부에 삼투되어 腦髓를 補益하다고 하였는데 膏는 진액의 일종으로 水穀에서 來原 하고 脾의 散精作用과 三焦의 運化作用 등에 의해 혈중에 滲入하여 형성되는 인체의 영양물질로 脂血로 인식할 수 있다. 따라서 高脂血은 인체에 대한 여러 因素作用에 의해 발생하는 혈중의 痰濁이라 할 수 있다. 고지혈증은 嗜食肥甘之味の 外因과 肝脾腎機能失調의 內因에 의해 痰濕, 瘀血이 생성하여 발병되며 그 병리기초는 本虛標實인데 肝脾腎虛가 本虛에 속하고 濕痰, 瘀血은 標實에 속한다. 滋補肝腎, 調理脾胃로 扶正하고 活血化瘀, 利濕化痰으로 祛邪하여 치료 한다⁸.

何首烏加味方은 補肝益腎, 養血祛風 효능이 있

는 何首烏, 固精縮尿, 澁腸止瀉 효능이 있는 金櫻子, 清肝明目, 平肝潛陽 효능이 있는 草決明, 健脾滲濕 효능이 있는 薏苡仁, 清熱除濕 효능이 있는 茵陳, 清濕熱, 利小便 효능이 있는 澤瀉, 行氣消食, 健脾開胃 작용이 있는 山楂肉, 清熱解毒, 升舉陽氣 효능이 있는 柴胡, 行氣破瘀, 清心解鬱 작용이 있는 鬱金, 除煩渴, 消食化痰 작용이 있는 茶葉 으로 구성된 처방으로 항고지혈 효과가 기대 된다¹⁴.

이에 저자는 何首烏加味方이 고지혈증 및 항산화에 미치는 영향을 실험적으로 규명하고자 何首烏加味方의 추출물을 고 cholesterol 식이로 유발된 고지혈증 SHR에 경구 투여하여 항산화능, 체중 및 간 중량, cholesterol 및 triglyceride, glucose, albumin, 간과 대동맥의 조직학적 검사, 간 조직에 대한 항산화 효소 활성, 간 조직의 cholesterol 인자 발현에 미치는 영향 등을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

DPPH는 인체에 해로운 영향을 미치는 free radical의 한 종류로, 항산화 물질을 측정하는데 사용 되며⁵³, SOD는 항산화효소로 활성산소를 제거 한다²⁸. HGB의 항산화 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해 DPPH 소거 활성능과 SOD 유사 활성을 조사하였다. DPPH의 소거 활성은 농도 의존적으로 증가함을 확인하였고, SOD 및 SOD 유사 물질에서 항산화 활성을 나타내는 pyrogallol을 이용하여 HGB의 항산화 활성을 측정된 결과 역시 농도 의존적으로 증가함을 확인하였다.

고 cholesterol 식이로 유발된 고지혈 SHR의 체중 및 간 중량에 미치는 영향을 측정된 결과 체중은 WKY, SHR에 비하여 대조군은 증가하였으며, 실험군에서는 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성이 없었고, 고 cholesterol 식이 시작 4주째 대조군이 WKY, SHR에 비하여 유의성 있는 증가가 나타났다. 간의 중량을 측정된 결과 대조군은 WKY, SHR에 비하여 유의성 있게 증가 하였고 실험군은 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었다.

혈청내 Total cholesterol, LDL cholesterol 및 Triglyceride은 모두 WKY, SHR에 비하여 대조군에서 유의성 있게 증가하였고, 실험군은 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다.

HDL cholesterol 항목에서 WKY, SHR에 비하여 대조군에서 유의성 있게 감소하였고, 실험군은 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다.

조직학적 검사 결과, 대조군의 간세포에서 지방질 축적에 의한 광범위한 지방공포 병변 소견이 나타난 반면, 실험군에서는 상대적으로 간 세포내 지방 공포 병변이 감소되었으며, 간세포의 핵이 정상 조직과 유사한 모양으로 관찰되었다. 대동맥을 적출하여 H&E 염색한 결과 대조군에서는 혈관벽의 내피세포가 불규칙적으로 증가한 것이 보이며, 세포층의 파괴로 인하여 경계가 불분명하게 보인 반면, 실험군에서는 상대적으로 세포가 규칙적이며 혈관 벽의 경계면이 뚜렷한 것이 보인다.

간 조직의 항산화 활성을 관찰하기 위하여 간 조직의 과산화지질 함량, SOD, catalase의 양을 측정하였다. 대조군은 정상군WKY, SHR에 비하여 유의성 있게 증가하였고, 실험군은 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다. SOD의 함량은 대조군은 WKY, SHR에 비하여 유의성 있게 감소하였고, 실험군은 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다.

catalase의 경우 대조군은 WKY, SHR에 비하여 유의성 있게 감소하였고, 실험군에서는 대조군에 비하여 증가 하였으나 유의성은 없었다.

간 조직의 cholesterol 인자 발현에 미치는 영향을 알아보기 위하여 유전자 검사를 통해 ACAT와 HMG-CoA reductase의 변화를 측정하였다. ACAT의 mRNA 유전자 발현은 대조군은 WKY, SHR에 비하여 유의성 있게 증가하였고, 실험군에서는 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다.

간 조직에서의 HMG-CoA reductase의 mRNA 유전자 발현 역시 대조군은 WKY, SHR에 비하여 유의성 있는 증가를 나타냈고 실험군에서는 대조

군에 비하여 유의성 있는 감소를 나타냈다.

이상의 결과들을 종합해 보면, 何首烏加味方은 세포독성 및 간 독성은 없었으며, DPPH소거 활성과 SOD 유사 활성을 농도 의존적으로 증가 시켰다.

체중과 간 조직의 중량은 감소시키는 경향이 있었다. Total cholesterol과 LDL cholesterol 및 triglyceride와 glucose를 감소시키고 HDL cholesterol을 증가시키는 것으로 보아 何首烏加味方이 혈중 지질의 농도를 감소시키는 효과가 있음을 알 수 있었다. 또한 간 조직의 과산화지질은 감소시키고 SOD를 유의성 있게 증가 시키는 것으로 보아 항산화 활성 효과가 있는 것으로 생각된다.

조직검사상 간과 대동맥을 보호하는 효과를 나타내었으며, ACAT와 HMG-CoA reductase를 유의성 있게 감소시키는 것으로 보아 콜레스테롤 합성을 억제 하는 효능을 보여 주었다.

이러한 결과는 何首烏加味方이 임상에서 고지혈증으로 야기되는 동맥경화, 뇌졸중, 허혈성심질환이나 기타 심혈관질환의 예방과 치료에 효과가 있을 것으로 기대되며, 향후 보다 심도 있고 지속적인 연구가 필요하리라 생각된다.

V. 결론

何首烏加味方의 고지혈증에 대한 효과를 알아보기 위하여 何首烏加味方의 추출물을 고 cholesterol 식이로 유발된 고지혈증 SHR에 경구 투여한 후 항산화능, AST, ALT, 체중 및 간 중량, 혈청 내 cholesterol 및 triglyceride, glucose, albumin 함량의 변화, 간과 대동맥의 조직학적 검사, 간 조직에 대한 항산화활성, 간 조직의 cholesterol 인자 발현에 미치는 영향 등을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 何首烏加味方은 DPPH 소거능과 SOD 유사 활성을 농도 의존적으로 증가시켜 항산화 활성

효과를 나타내었다.

2. 何首烏加味方은 혈청 내 total cholesterol, LDL cholesterol 및 triglyceride를 유의성 있게 감소시켰고, HDL cholesterol은 유의성 있게 증가시켰다.
3. 何首烏加味方 투여군의 조직학적 검사 상 간 세포내 공포 병변이 감소되고 세포핵은 정상 조직과 유사한 모양으로 관찰되었고, 대동맥 조직내 세포는 규칙적이며 혈관벽의 경계면이 뚜렷하게 관찰 되었다.
4. 何首烏加味方에 의해 간 조직의 과산화지질이 유의성 있게 감소되었고 SOD 활성은 유의성 있게 증가되었다.
5. 何首烏加味方은 간 조직의 acyl-CoA와 HMG-CoA reductase의 유전자 발현을 억제하였다.

참고문헌

1. HARRISON'S 내과학. 해리슨 내과학 편찬위원회 편. 서울: 정담; 1997, p. 2235-42.
2. 머크 매뉴얼, MARK H. BEERS, M.D., ROBERT BERKOW, M.D. , 서울:한우리; 2003, p. 214.
3. Jin-Q Kim, Jung-Han Song, Young-Bae Park, Hong-Kyu Lee, Young-Seol Kim, Un-Ho Ryoo, Gap-Bum Heo. National cholesterol treatment guidelines in Korean population - setting-up the cutpoints for high blood cholesterol. Journal of Korean Medical Science. 1997;17(1):17-22.
4. 김영호, 김종근, 이상우, 임성택, 차경우, 조영재, 유선희, 이찬우, 김중구. 한국 정상 성인 남자에 서의 혈청 총 cholesterol치 변화에 관한 최근 10 년간 추적조사. 대한내과학회지, 2003;65(6):675-81.
5. 성영호, 한재호, 송준화, 최덕호, 이상도, 전종민, 배진호, 최창필, 김중구. 한국 정상 성인에서의 혈청 총 콜레스테롤 및 중성지방치에 관한 연구. 대한내과학회지. 1993;45(3):307-21.
6. 임상진단학. 전국 의과대학 임상교수편. 서울: 한 미의학; 2002, p. 159.
7. 가정의학. 의학교육연수원 편. 서울: 서울대학교 출판부; 1999, p. 302.
8. 杜鎬京. 동의신계학. 서울: 東洋醫學研究院; 1993, p. 1196.
9. 방혜정, 탁의수, 홍윤희, 강윤희. 고지혈증에 대한 한의학적 고찰. 동서의학. 1995;20(1):25-36.
10. 정수미, 김경수, 전상윤, 안정조, 홍석. 가미온담 탕의 항고지혈 작용에 대한 연구. 대한한방제학회지. 2005;13(1):85-102.
11. 황윤규, 김동희. 茵陳胃苓湯이 高脂血 誘發 白鼠의 血液學的 變化에 미치는 影響. 대전대학교 한 의학연구소 논문집. 2005;14(2):71-85.
12. 차관배, 안정조, 조현경, 유호룡, 김윤식, 설인찬. 降脂通脈飲이 항산화 활성과 高脂血 誘發 白鼠에 미치는 영향. 대한한방내과학회지. 2008;29(3) :703-15.
13. 유현숙, 최학주, 김선빈, 김동희. 하고초산이 고 지혈 유발 SHR 백서에 미치는 영향. 대전대학교 한의학연구소 논문집. 2008;17(2):101-16.
14. 본초학. 전국한외과대학 공동교재편찬위원회 편. 서울: 영림사. 2004, p. 192, 352-3, 372, 455, 553, 639, 692.
15. Sato N, Fujii K, Yuge O. In vivo and in vitro sevoflurane-induced lipid peroxidation in guinea-pig liver microsomes. 1994;75(6):366-70.
16. Oyanagui Y. Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. Anal Biochem. 1984;142(2):290-6.
17. Aebi H. Catalase in vitro. Methods Enzymol. 1984;105:121-6.
18. 李迎雨, 吳秉熙, 金哲鎬. 고혈압. 서울: 고려의학; 2000, p. 247-9.
19. 심계내과학. 전국한외과대학심계내과학교실. 서울: 군자출판사; 2006, p. 171.
20. 병리학. 대한병리학회. 서울: 고문사; 1995, p. 476-7.

21. 내분비학. 최영길. 서울: 의학출판사; 1994, p. 753-9.
22. Cho HK. High density lipoprotein cholesterol comes of ages. Kor Circulation J. 2007;37(5):187-90.
23. Castelli WP. Cholesterol and lipids in the risk of coronary artery disease:the Framingham Heart Study. Can J Cardiol. 1988;4:5A-10A.
24. 민중기, 이미영. 식물추출액으로부터 HMG CoA reductase의 활성억제제 탐색. 순천향자연과학 연구논문집. 2002;8(2):71-5.
25. Roitelman, J., Olender, E.H., Bar-Nun, S., Dunn, W.A., Simoni, R.D.. Immunological Evidence for 8 Spans in the Membrane Domain of 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl Coenzyme A Reductase: Implications for Enzyme Degradation in the Endoplasmic Reticulum. J. Cell Biol. 1992;117(5): 959-73.
26. 임상병리과일. 이귀녕, 권오현. 서울: 의학문화사; 2003, p. 179-80.
27. 黃帝內經 靈樞. 金達鎬 編. 서울: 醫聖堂; 2002, p. 772.
28. Bjelakovic G, et al. Mortality in randomized trials of antioxidant supplements for primary and secondary prevention: systematic review and meta-analysis. JAMA. 2007;297(8):842-57.