

## 고지방 식이로 유발된 고지혈증 동물 모델에서 四物活血湯의 효과 연구

강성순, 신용진, 조재준, 전상윤  
동신대학교 한의과대학 내과학교실

### Study of the Effects of *Samulhwallyeol-tang* in Hyperlipidemic Animal Model Induced with a High-Fat Diet

Seong-sun Kang, Yong-jin Shin, Jae-joon Jo, Sang-yun Jeon  
Dept. of Internal Medicine, College of Korean Medicine, Dong-Shin University

#### ABSTRACT

**Objectives :** This study was undertaken to investigate the effects of *Samulhwallyeol-tang* (SM) in a hyperlipidemic animal model induced by a high-fat diet using diverse biological methods.

**Methods :** This study was to determine whether fractionated EtOH extracts of SM inhibit reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) in RAW 264.7 cells. Hyperlipidemia was induced by a high-fat diet fed for 6 weeks. Total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, triglyceride, glucose, liver function, cholesterol gene revelation control efficiency, and histologic change of liver were measured after oral administration of SM.

#### Results :

1. Compared to the control group, ROS production (%) and NO production (%) were decreased significantly by SM.
2. Total cholesterol, LDL cholesterol, triglyceride were decreased significantly by SM.
3. HDL cholesterol was increased significantly by SM.
4. Rats' body weight and glucose were decreased significantly by SM.
5. AST, ALP were decreased significantly by SM.
6. In histopathologic examination, fatty liver and liver fibrosis were inhibited, almost eliminated as round of fat was observed in the liver.

**Conclusions :** SM would appear that effective in the prevention and treatment of atherosclerosis, ischemic heart disease, other cardiovascular diseases, fatty liver and nephrotic syndrome caused by hyperlipidemia.

**Key words :** *Samulhwallyeol-tang*, hyperlipidemia, RAW 264.7 cell, C57BL/6J, antioxidant activity

## 1. 서론

2012년 통계청에서 발표한 사망원인 통계에 따

르면, 국내 3대 사망원인 질환으로 암과 함께 심장 질환과 뇌혈관 질환을 꼽을 수 있어<sup>1</sup>, 순환기계 질환의 중요성이 강조되고 있으며 그 중 심혈관계 질환의 중요한 발병인자로 비만 및 고지혈증이 잘 알려져 있다<sup>2</sup>.

고지혈증은 동맥 경화의 중요한 인자 중의 하나로 동맥 혈관 벽에 콜레스테롤 등의 지질이 침착

· 교신저자: 전상윤 광주시 남구 월산로 141  
동신대부속광주한방병원 2내과  
TEL: 062-350-7207  
E-mail: damiano70@hanmail.net

하여 혈관을 협착 시키거나 경화시켜 혈액의 흐름을 악화시키는 것으로 순환기 질환의 공통 병인으로 인식되고 있다. 특히 암과 함께 순환기 질환이 사망률의 수위를 차지하고 있어 고지혈증에 대한 근본적이고 효율적인 대책이 요구되고 있다<sup>3,4</sup>.

고지혈증은 한의학적으로 痰濁, 濕熱, 瘀血의 범주에 속하고, 嗜食肥甘厚味の 外因과, 肝脾腎機能失調의 內因에 의해 痰濁, 濕熱, 瘀血이 生하여 발병한다고 보았다. 따라서 滋補肝腎, 調理脾胃로 扶正하고, 利濕化痰, 活血化瘀로 祛邪하는 補瀉兼施의 治法을 응용할 수 있다<sup>5</sup>.

최근 고지혈증에 대한 한의학 연구로는 茵陳蒿, 枳實, 白何首烏, 丹蔘 등의 한약재<sup>6-9</sup>와 防風通聖散, 加味除濕順氣湯, 柴苓湯 등의 처방<sup>10-12</sup>에 관한 실험적 연구가 있다.

四物活血湯은 郭 등<sup>13</sup>의 <心血管病 妙法良方大全 - 高脂血症編>에 수록된 임상 처방에 決明子, 何首烏, 菊花를 가미한 처방으로 임상적으로 항고지혈증의 효과가 있는 것으로 알려져 이를 실험적으로 규명하고, 기전을 밝히고자 연구하게 되었다.

이에 저자는 四物活血湯 추출물을 RAW 264.7 세포를 이용하여 항산화 효과를 측정하고, 고지혈증 질환 모델 동물인 6주령의 수컷 C57BL/6J 생쥐를 이용하여 혈액화학적 인자, 체중 변화, 간에 대한 효과, 간 조직의 cholesterol 인자 발현에 미치는 영향 등을 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

#### 1) 약재

본 실험에 사용한 四物活血湯(Samulhwallyeol-tang 이하 SM으로 표기)의 구성 약재들은 (주)유니허브(Korea)에서 구입하였고, 동신대학교부속 순천한방병원에서 정선 후 사용하였다. 그 내용과 분량(1첩)은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. The Prescription of SM.

Herbal medicine name	Pharmacognostic name	Weight (g)
丹蔘	<i>Salviae Miltiorrhizae Radix</i>	30
當歸	<i>Angelicae Gigantis Radix</i>	30
山查	<i>Crataegi Fructus</i>	30
生地黃	<i>Rehmanniae Radix Drudus</i>	30
桔梗	<i>Platycodi Radix</i>	20
桃仁	<i>Persicae Semen</i>	20
白芍藥	<i>Paeoniae Radix Alba</i>	20
牛膝	<i>Achyranthis Bidentatae Radix</i>	20
枳實	<i>Aurantii Immaturus Fructus</i>	20
川芎	<i>Cnidii Rhizoma</i>	20
蒲黃	<i>Typhae Pollen</i>	20
甘草	<i>Glycyrrhizae Radix</i>	12
柴胡	<i>Bupleuri Radix</i>	12
紅花	<i>Carthami Flos</i>	12
決明子	<i>Cassiae semen</i>	5
何首烏	<i>Polygoni Multiflori Radix</i>	5
菊花	<i>Chrysanthemi Flos</i>	3
Total amount		309

#### 2) 세포

실험에 사용된 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(Korea)에서 구입하였다.

#### 3) 동물 및 사료

본 실험을 위하여 사용된 C57BL/6J(6주령, 수컷, 18~22 g)는 (주)중앙실험동물(Korea)에서 구입하여 사용하였다. 실험동물은 2주간의 안정기를 가지면서 순화를 시켰으며, 안정기 동안 모든 실험군에는 일반 사료((주)퓨리나, Korea)를 자유식이 하였다. 안정기를 마친 후 정상군에는 일반 사료를, 고지혈증을 유도하기 위한 대조군과 SM 투여군에는 고지방 사료((주)중앙실험동물, Korea)를 2주간 자유 식이하면서 물을 충분히 공급하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 22±2 °C, 1일 중 12시간은 200-300 Lux로 조명하고, 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 본 실험은 대전대학교 동물실험윤리 위원회의 승인(동물사용 윤리위원회 승

인번호 - DJUARB 2013-014)을 받아 동물윤리준칙에 의거하여 실험하였다. 일반 사료, 고지방 사료

의 kg당 조성의 내용과 분량은 다음과 같다(Table 2, Table 3).

Table 2. The Components of Normal Diet.

Nutrients		
Protein	%	20.00
Arginine	%	1.26
Cystine	%	0.37
Glycine	%	0.87
Histidine	%	0.50
Isoleucine	%	0.82
Leucine	%	1.47
Lysine	%	1.01
Methionine	%	0.33
Phenylalanine	%	0.98
Tyrosine	%	0.63
Threonine	%	0.72
Tryptophane	%	0.25
Valine	%	0.91
Fat (etherextract)	%	4.50
Linoleic Acid	%	1.10
Linolenic Acid	%	0.12
Arachidonic Acid	%	0.02
Omega-3 Fatty acid	%	1.11
Fiber (Crude)	%	3.70
Minerals		
Ash	%	7.25
Calcium	%	1.20
Phosphorus	%	0.62
Phosphorus (non-phytate)	%	0.40
Potassium	%	0.82
Magnesium	%	0.16
Sulfur	%	0.22
Sodium	%	0.34
Chlorine	%	0.47
Fluorine	ppm	21.38
Iron	ppm	112.93
Zinc	ppm	128.85
Manganese	ppm	95.49
Copper	ppm	22.74
Cobalt	ppm	0.78
Iodine	ppm	1.42

Chromium	ppm	0.00
Selenium	ppm	0.32
<b>Vitamins</b>		
Vitamin K	ppm	6.69
Thyamin hydrichloride	ppm	11.02
Riboflavin	ppm	11.57
Niacin	ppm	217.70
Pantothenic acid	ppm	88.72
Choline chloride	ppm	3,447.96
Folic acid	ppm	13.60
Pyridoxine	ppm	11.00
Biotin	ppm	0.12
Vitamin B12	ppm	41.00
Vitamin A	IU/g	28.03
Vitamin D3 (added)	IU/g	4.00
Vitamin E	IU/kg	100.00
<b>Calories provided by :</b>		
Protein	%	24.52
Fat (ether extract)	%	12.41
Carbohydrates	%	63.07

Nutrients expressed as percent of ration except where otherwise indicated. Moisture content is assumed to be 10.0% for the purpose of calculations.

Table 3. The Components of High Cholesterol Diets.

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
<b>Total amount</b>	<b>773.85</b>

## 2. 방법

1) High performance liquid chromatography (HPLC) 분석

SM 에탄올 추출물 30 mg을 80% 주정 1 ml에 녹여 0.45 µm membrane filter로 여과 후 10 µl를 HPLC 시료로 사용하였다. HPLC는 Shimadzu(Japan)사의 system controller(CBM-20A), pump(LC-20AD), column oven(CTO-20A), diode array detector( SPD-M20A)를 사용하였으며, column은 ZORBAX Eclipse Plus C18(250×4.6 mm, 5 µm)을 사용하였다. 이동상은 water(A)와 acetonitrile(B)로 gradient elution system을 적용시켜 0~5분(0% B), 5~40분(30% B), 40~60분(80% B), 60~80분(100% B)로 설정하였다. 유속은 1.0 ml/min이었으며 column 온도는 40 °C를 유지하였고, UV wavelength는 210 nm로 설정하여 분석하였다.

2) *In vitro*

## (1) 세포 배양

동결된 RAW 264.7 세포를 해동시킨 후 50 ml 튜브에 옮기고, PBS 9 ml을 넣어 세포를 부유시킨 뒤 1,200 rpm에서 5분간 원심분리 하여 상등액을 제거하였다. 세포가 있는 튜브에 10% fetal bovine serum(FBS)와 1% penicillin으로 조성된 dulbecco's modified eagle's medium(DMEM) 배지 1 ml을 넣어 부유시켰다. 100 mm dish에 9 ml의 배지를 넣고, 부유시킨 세포 1 ml을 넣어 세포배양기(37 °C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양하였다. 계대배양 횟수는 5회 이상으로 하였고, 시료들을 처리하기 전에 24시간을 적응시켰다.

## (2) 세포독성 측정

RAW 264.7 세포는 96 well plate에  $2 \times 10^4$  cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양 하였다. 실험을 하기 전에 새로운 배양액으로 교체하였고, SM를 각각 1, 10, 100( $\mu\text{g/ml}$ )의 농도로 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 10  $\mu\text{l}$ 의 WST solution을 첨가하여 세포배양기(37 °C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포 생존율을 백분율로 표시 하였다.

## (3) 항산화 효능 측정

① 세포 내 reactive oxygen species(ROS) 생성 측정

RAW 264.7 세포에서 ROS를 측정하기 위하여 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA)를 이용하였다. 12 well plate에 RAW 264.7 세포를  $2 \times 10^5$  cells/well이 되게 분주하여 24시간 동안 배양 하였다. 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였으며, SM 추출물을 1, 10, 100( $\mu\text{g/ml}$ )의 농도로 처리하고, Lipopolysaccharide(LPS) 1  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리한 후, 다시 24시간 동안 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다. 배양 후, 1,200 rpm에서 5분간 원심분리하여 모은 세포를 차가운 PBS로 2회 세척하고, DCF-DA 10  $\mu\text{M}$ 이 되도록 첨가하여 15분 동안

암소, 상온에 두었다. 염색 후 차가운 PBS를 넣어 1,200 rpm에서 5분간 원심분리 한 다음 상등액을 제거하고 다시 PBS 400  $\mu\text{l}$ 를 부유시켜 유세포 분석기(Flow cytometer, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ U.S.A)를 이용하여 형광강도의 세기에 따른 변화를 분석하였다.

## ② Nitric oxide(NO) 측정

NO의 농도는 griess reagent system을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포는 96 well plate에  $2 \times 10^4$  cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였고, SM 추출물을 1, 10, 100( $\mu\text{g/ml}$ )의 농도로 처리하고, LPS 1  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하여 다시 24시간 동안 세포배양기(37 °C, 5% CO<sub>2</sub>)에서 배양하였다. N1 buffer 50  $\mu\text{l}$ 를 각 well에 처리하여 10분간 상온에서 반응 한 후, N2 buffer 50  $\mu\text{l}$ 를 각 well에 처리하고 10분간 반응시켰다. 반응 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite standard의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액의 NO 농도를 결정하였다.

3) *In vivo*

## (1) 고지혈 유발 및 약물 투여

실험군의 구분은 일반 식이를 투여한 정상군, 2주간의 고지방 식이 사료로 고지혈증 유도한 쥐를 대조군과 SM 추출물을 투여한 실험군으로 각 8마리씩 나누어 진행하였고, 실험이 진행되는 동안 자유 식이를 하였다. 정상군과 대조군에는 증류수를 실험군에는 SM 추출물을 매일 1회, 오전 10시에 200  $\mu\text{l}$ (200 mg/kg) 씩 투여하였다. SM 추출물 투여량은 1점을 성인 체중 60 kg에 1회 투여용량으로 하고, 1점으로 부터 얻은 시료를 마우스 체중 30 g으로 기준하여 산출하였다.

## (2) 혈액화학적 검사

혈중 내의 total cholesterol, high density lipoprotein cholesterol(HDL cholesterol), low density lipoprotein cholesterol(LDL cholesterol), triglyceride(TG), glucose의 함량을 측정하기 위해 실험 종료 후 심장 천자법을 이용하여 혈액을 채취하여, 그 혈액을 30분간

상온에서 균한 뒤 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 후 혈청을 분리하여 서울의과학연구소(Korea)에 분석 의뢰 하였다.

(3) 체중 측정

안정기 2주와 고지혈증 유발기 2주를 거친 후, 고지혈증 유발쥐에 SM 추출물을 4주간 투여하였으며, 0주부터 실험이 진행되는 8주까지 매주 체중을 측정하였다.

(4) 간 기능 검사

혈청 내에서 aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase(ALT), alkaline phosphatase(ALP)의 활성도를 측정하기 위해 실험 종료 후 심장 천자법을 이용하여 혈액을 채취하였다. 혈액을 30분간 상온에서 균한 뒤 3,000 rpm에서 15분간 원심분리 후 혈청을 분리하여, 서울의과학연구소(Korea)에 분석 의뢰 하였다. AST, ALT, ALP의 활성도는 JSCC UV method의 원리를 이용하여 생화학 자동분석기로 측정하였다.

(5) 조직병리학적 검사

Ether로 마취하여 심장 천자법을 통해 혈액을 채혈하고 흉부 및 복강을 절개하여 간 조직을 적출하였다. 각 실험군 별로 적출한 조직은 10% 중성 포르말린에 48시간 고정하고, 바이오텍스텍(Korea)에 hematoxyline과 eosin(H&E)을 의뢰하여 관찰 및 사진 촬영 하였다.

3. 통계처리

실험 결과는 SPSS 17.0의 Student T-test를 사용하여 통계처리 하였으며 P<0.05, P<0.01 및 P<0.001 수준에서 유의성을 검정하였다.

III. 실험결과

1. HPLC pattern 분석

SM 주정 추출물을 HPLC를 이용하여 pattern 분석한 결과, 210 nm에서 retention time이 38.76분, 56.48분, 56.74분대에 peak를 확인할 수 있었다(Fig. 1).

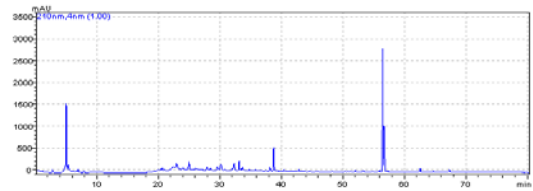


Fig. 1. HPLC chromatogram of 80% ethanol extract of SM.

Column: ZORBAX Eclipse Plus C18(250×4.6 mm, 5 μm), sample injection volume: 10 μl, mobile phase: H<sub>2</sub>O(A)/ACN(B) gradient elution : 0~5min (0% B), 5~40min(30% B), 40~60min(80% B), 60~80min(100% B), flow rate: 1.0 ml/min, detector: PDA detector

2. In vitro

1) 세포독성

RAW 264.7 세포주에서 세포 생존율을 측정 한 결과, 대조군을 100.0±12.6%로 나타냈을 때 SM 추출물은 각각 1, 10, 100(μg/ml) 농도에서 146.1±21.4%, 136.1±18.6%, 125.1±16.8%의 세포 생존율을 나타내었다(Fig. 2).

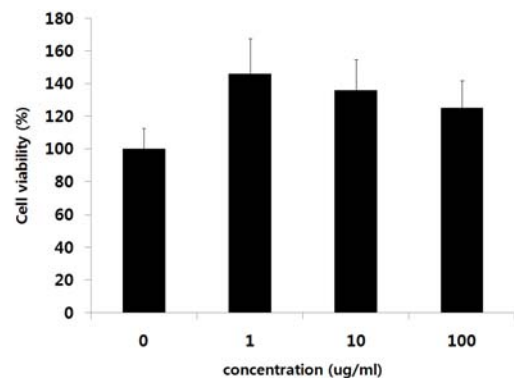


Fig. 2. Cell viability of SM extract in RAW 264.7 cells.

RAW 264.7 cell was treated with 1, 10 and 100 (μg/ml) of SM extract for 24hr. Cell viability was measured using an MTT assay. The results were expressed as mean ± SD from three independent experiments.

2) 항산화 효능에 미치는 영향

(1) ROS의 생성에 미치는 영향

SM 추출물의 ROS 생성 저해 활성은 대조군을 100.2±0.2%로 나타냈을 때 정상군은 51.6±15.8%, SM 투여군은 1 µg/ml 농도에서 93.5±14.9%, 10 µg/ml 농도에서 90.3±5.3%, 100 µg/ml 농도에서 81.8±4.9%로 나타났으며, 100 µg/ml 농도에서 유의성 있게(\* : P<0.05) 감소하였다(Table 4).

(2) NO의 생성에 미치는 영향

RAW 264.7 세포주에서 SM 추출물의 NO 생성량은 대조군을 100.0±3.7%로 나타냈을 때 정상군은 39.7±4.1%, SM 투여군은 1 µg/ml 농도에서 96.7±4.8%, 10 µg/ml 농도에서 94.5±5.9%, 100 µg/ml 농도에서 81.1±7.8%로 나타났으며, 100 µg/ml 농도에서 유의성 있게(\*\*\* : P<0.001) 감소하였다(Table 4).

Table 4. Effect of SM Extract on LPS-induced ROS and NO Production in RAW 264.7 Cells.

	ROS	NO
Normal (%)	51.6±15.8	39.7±4.1
Control (%)	100.2±0.2	100.0±3.7
SM1 (%)	93.5±14.9	96.7±4.8
SM10 (%)	90.3±5.3	94.5±5.9
SM100 (%)	81.8±4.9*	81.1±7.8***

The results were expressed as mean ± SD.

\* : P<0.05 compared with control

\*\*\* : P<0.001 compared with control

4. *In vivo*

1) 혈중 콜레스테롤에 미치는 영향

(1) total cholesterol의 변화에 미치는 영향

혈청 내 total cholesterol 함량을 측정된 결과, 정상군은 85.99±9.54 mg/dl, 대조군은 383.95±35.96 mg/dl, SM 투여군은 231.75±18.54 mg/dl로 나타나, 대조군에 비해 유의성 있게(\*\*\* : P<0.001) 감소하였다(Table 5).

(2) LDL cholesterol 함량

혈청 내 LDL cholesterol 함량을 측정된 결과, 정상군은 32.71±7.70 mg/dl, 대조군은 219.38±16.12 mg/dl, SM 투여군은 142.13±9.55 mg/dl로 나타나, 대조군에 비해 유의성 있게(\*\*\* : P<0.001) 감소하였다(Table 5).

(3) HDL cholesterol 함량

혈청 내 HDL cholesterol 함량을 측정된 결과, 정상군은 40.00±2.83 mg/dl, 대조군은 27.25±2.44 mg/dl, SM 투여군은 36.88±2.32 mg/dl로 나타나, 대조군에 비해 유의성 있게(\* : P<0.05) 증가하였다(Table 5).

(4) TG 변화에 미치는 영향

혈청 내 TG 함량을 측정된 결과, 정상군은 94.71±6.10 mg/dl, 대조군은 240.95±14.46 mg/dl, SM 투여군은 190.41±11.44 mg/dl로, 대조군에 비해 유의성 있게(\* : P<0.05) 감소하였다(Table 5).

Table 5. Effect of SM Extract on the Serum Biomedical Levels in High-fat Diet Induced Hyperlipidemia Mice.

	Nor	Con	SM
total cholesterol (mg/dl)	85.99±9.54	383.95±35.96	231.75±18.54***
LDL cholesterol (mg/dl)	32.71±7.70	219.38±16.12	142.13±9.55***
HDL cholesterol (mg/dl)	40.00±2.83	27.25±2.44	36.88±2.32*
TG (mg/dl)	94.71±6.10	240.95±14.46	190.41±11.44*

The results were expressed as mean ± SD (n=8).

Nor : Normal C57BL/6J mice group

Con : Induced by high fat diet C57BL/6J hyperlipidemia mice group

SM : Induced by high fat diet C57BL/6J hyperlipidemia mice group treated with SM extract

\* : P<0.05 compared with control

\*\*\* : P<0.001 compared with control

2) 체중 변화에 미치는 영향

고지혈증을 유발시킨 쥐의 체중 증가에 미치는 영향을 측정된 결과, 실험 종료 후 정상군은 24.81±0.37 g, 대조군은 26.48±0.53 g, SM 투여군은 24.60±

1.01 g으로 고지혈증을 유발하기 전 체중에 비해 증가함을 나타내었고, SM 투여군은 대조군에 비하여 8주에서는 유의성 있는(\* : P<0.05) 체중 감소를 나타내었다(Table 6).

Table 6. Effect of SM Extract on the Increase of Body Weight in High-fat Diet Induced Hyperlipidemia Mice.

	Nor	Con	SM
Initial body weight (g)	18.78±0.17	18.45±0.26	18.94±0.21
Final body weight (g)	24.81±0.37	26.48±0.53	24.60±1.01*
Weight gain (g)	6.10±0.41	8.03±0.68	5.66±1.10

The results were expressed as mean ± SD (n=8).

\* : P<0.05 compared with control

3) Glucose 변화에 미치는 영향

혈청 내 glucose 함량을 측정된 결과, 정상군은 64.60±4.22 mg/dl, 대조군은 180.44±13.14 mg/dl, SM 투여군은 111.34±11.59 mg/dl으로 대조군에 비해 유의성 있게(\*\* : P<0.01) 감소하였다(Fig. 3).

group: SM . Induced by high fat diet C57BL/6J hyperlipidemia mice group treated with SM extract. (Significance of results, \*\* : P<0.01)

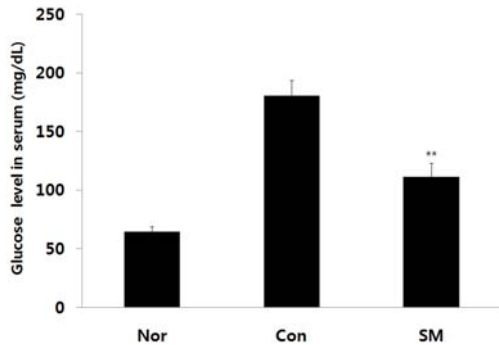


Fig. 3. Effect of SM extract on the serum glucose levels in high-fat diet induced hyperlipidemia mice.

The results were expressed as mean ± SD (n=8). Nor, Normal C57BL/6J mice group; Con, Induced by high fat diet C57BL/6J hyperlipidemia mice

4) 간 기능에 미치는 영향

(1) AST 변화에 미치는 영향

혈청 중의 AST를 측정된 결과, AST는 정상군이 65.4±4.7 U/L, 대조군이 153.0±8.2 U/L, SM 투여군이 114.8±8.5 U/L로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있게(\*\* : P<0.01) 감소하였다(Table 7).

(2) ALT 변화에 미치는 영향

혈청 중의 ALT를 측정된 결과, ALT는 정상군이 31.7±1.7 U/L, 대조군이 47.6±4.7 U/L, SM 투여군이 43.8±4.9 U/L로 나타났으며, 대조군에 비하여 유의한 차이가 나타나지 않았다(Table 7).

(3) ALP 변화에 미치는 영향

혈청 중의 ALP를 측정된 결과, ALP는 정상군이 93.8±6.7 U/L, 대조군이 180.4±8.9 U/L, SM 투여군은 122.7±15.9 U/L로 나타나, 대조군에 비하여 유의성 있게(\* : P<0.05) 감소하였다(Table 7).



Table 7. Effect of SM Extract on the AST, ALT and ALP Levels in High-fat Diet Induced Hyperlipidemia Mice.

	Nor	Con	SM
AST(U/L)	65.4±4.7	153.0±8.2	114.8±8.5**
ALT(U/L)	31.7±1.7	47.6±4.7	43.8±4.9
ALP(U/L)	93.8±6.7	180.4±8.9	122.7±15.9*

The results were expressed as mean ± SD from three independent experiments.

Nor : Normal C57BL/6J mice group

Con : Induced by high fat diet C57BL/6J hyperlipidemia mice group

SM : Induced by high fat diet C57BL/6J hyperlipidemia mice group treated with SM extract

\* : P<0.05 compared with control

\*\* : P<0.01 compared with control

5) 간 조직 염색 관찰

(1) 간 조직의 세포형태 변화에 미치는 영향

간의 조직을 H&E 염색하여 관찰한 결과, 정상군은 간 세포의 핵이 세포의 중앙에 위치하고 있으며, 세포의 크기도 일정하고, 쿠퍼세포는 간 세포 사이에 전체적으로 고르게 분포되어 있었다. 하지만 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. SM 투여군에서는 간 세포내의 지방공포로 인해 세포의 크기는 커져있지만, 대조군에 비해 지방공포가 적어졌으며, 세포핵도 중앙에 위치하여 있는 호전현상을 보였다(Fig. 4).

high-fat diet induced hyperlipidemia mice.

Paraffin sections were stained with hematoxylin & eosin. The panels were representative photomicrographs of each of these risk at light microscope (Zeiss, ×400). Normal, C57BL/6J mice group; Control, Induced by high fat diet C57BL/6J hyperlipidemia mice group; SM, Induced by high fat diet C57BL/6J hyperlipidemia mice group treated with SM extract.

IV. 고찰

고지혈증(hyperlipidemia)이란 혈액 속에 중성지방이나 콜레스테롤이 정상보다 많은 상태를 말하며 그 원인에 따라 유전적 결함에 의한 1차성 고지혈증과 질병, 약물, 식이 등의 환경인자와 관련이 있는 2차성 고지혈증으로 분류되고 있다<sup>14</sup>. 1차성은 lipid나 lipoprotein 대사에서 유전적 형질의 결함에 의한 이상으로 유발되는 것이고, 2차성은 신증후군, 요독증, 갑상선기능 저하증, 통풍, 담즙 울체, 조절이 잘 안되는 당뇨병, 비만, 알코올 중독, 채식염, 폐색성 간장애, 말단비대증, 홍반성낭창 등의 질환 외에 임신이나 경구피임약 복용 등으로 인하여 발생하는 것을 말한다<sup>15</sup>.

고지혈증 자체로는 임상 증상이 없으나 2002년 제정된 한국인의 고지혈증 치료지침에 의하면 total cholesterol의 경우 240 mg/dl 이상, TG의 경우 200 mg/dl 이상, 저밀도 지단백(LDL)의 경우 160 mg/dl

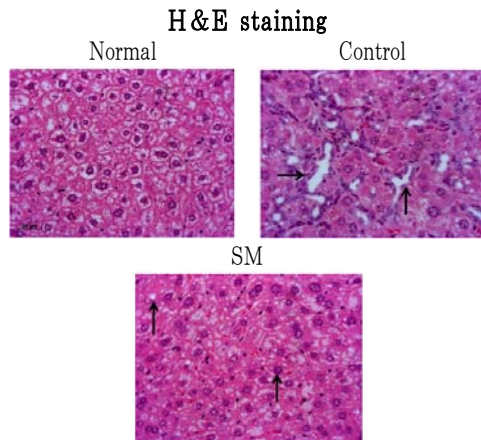


Fig. 4. Histology of liver section on normal and

이상으로 제시하고 있다<sup>16</sup>. 이는 죽종 형성을 촉진하는 지단백의 증가와 죽상경화증의 진행 및 심혈관 질환의 발생은 밀접한 연관성이 있기 때문이다. 죽상경화증은 선진국에서 사망과 장애의 가장 중요한 원인으로 관상동맥에서는 심근경색증과 협심증을 일으키고, 뇌신경계에서는 뇌졸중이나 일과성 허혈발작을 일으킨다. 사지 동맥의 동맥경화는 간혈성 파행과 괴저를 일으키고, 사지의 생활력에 장애를 줄 수 있다<sup>17</sup>.

지질은 식사로 섭취되거나 세포에서 합성되는데, 생체에서 에너지원 및 세포막의 중요한 구성성분이자 호르몬의 전구물질로서 중요한 역할을 담당하고 있다<sup>18</sup>. 체내의 각 기관과 조직에서 사용, 저장되기 위해 혈장을 통하여 이동 및 교환되어야 하는데 일반적으로 지질은 지단백질 안에 존재하여 이동된다<sup>19,20</sup>. 각 지단백의 특성은 구성된 지질 및 고유의 아포지단백에 따라 달라지는데, 아포지단백은 각 지단백질의 대사를 조절하고 조직의 지단백 수용체의 인식 부위로 작용하게 됨으로써 중성지방과 콜레스테롤을 간에서 말초조직으로 운반 또는 말초조직에서 간으로 역수송함으로써 지질을 재분배시킨다<sup>21</sup>.

고지혈증의 양방적 치료에는 리피토나 크레스토 등 스타틴계의 HMG-CoA 환원효소저해제, 담즙산 제거제, 피브린산 유도제, 니코틴산 유도제, 프로브콜(probucol) 등 여러 가지 제제들이 사용되고 있으나, 투여를 중지할 경우 혈중 지질치가 다시 상승되므로 지속적 장기간의 투여를 요한다. 그러나 장기간 투여할 경우 약에 따라 피로, 수면장애, 오심, 피부발진, 근육통, 위장장애, 두통, 소양증, 변비 또는 설사 등의 부작용이 있는 것으로 보고되고 있다. 따라서 혈중 지질을 낮추면서 부작용 없이 장복할 수 있는 치료약이 요구되고 있다<sup>22</sup>.

한의학에서 고지혈증은 痰濁, 濕熱, 瘀血 등의 범주에 속하는 것으로 보고 있다<sup>23</sup>. <靈樞·五癆津液別><sup>24</sup>에서는 五穀의 津液이 和合되어 膏로 되어 骨空의 내부에 삼투되어 腦髓를 補益하다고 하였

는데 膏는 津액의 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 영양 물질로 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, 濕熱, 瘀血이 생성하여 발병되며 그 병리기초는 本虛標實인데 肝脾腎虛가 本虛에 속하고 痰濁, 濕熱, 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 한다<sup>23</sup>.

四物活血湯은 郭 등<sup>13</sup>의 <心血管病 妙法良方大全 - 高脂血症編>에 수록된 임상 처방에 決明子, 何首烏, 菊花를 가미한 처방으로 임상적으로 고지혈증에 대응되는 처방이다. 처방 구성으로 丹蔘, 當歸, 山查, 生地黃, 桔梗, 桃仁, 白芍藥, 牛膝, 枳實, 川芎, 蒲黃, 甘草, 柴胡, 紅花, 決明子, 何首烏, 菊花로 되어 있다.

丹蔘은 活血祛瘀, 調經止痛, 活血安神, 涼血消腫하며, 當歸는 補血和血, 調經止痛, 潤燥滑腸하며, 山查는 消食健胃, 行氣散瘀하며, 生地黃은 清熱涼血, 養陰生津하며, 桔梗은 宣肺利咽, 祛痰排膿하며, 桃仁은 活血祛瘀, 潤腸通便하며, 白芍藥은 活血柔肝, 緩中止痛, 斂陰收汗하며, 牛膝은 補肝腎, 強筋骨하며, 枳實은 破氣消積, 化痰散痞하며, 川芎은 活血行氣, 祛風止痛하며, 蒲黃는 止血, 化瘀, 通淋하며, 甘草은 和中緩急, 潤肺, 解毒, 調和諸藥하며, 柴胡는 和解表裏, 疎肝, 升陽하며, 紅花는 活血通經, 散瘀止痛하며, 決明子는 清肝明目, 平肝潛陽, 潤腸通便하며, 何首烏는 補肝, 益腎, 養血, 祛風하며, 菊花는 散風清熱, 平肝明目的 효능<sup>25</sup>을 가지고 있다.

이에 저자는 四物活血湯 추출물을 RAW 264.7 세포를 이용하여 세포독성, ROS 및 NO 생성 저해 활성 효과를 측정하고, 고지혈증 질환 동물인 6주령의 수컷 C57BL/6J 생쥐를 이용하여 체중 변화, 혈액학적 인자, 간에 대한 효과, 간 조직의 cholesterol 인자 발현에 미치는 영향 등을 관찰하여 다음과

같은 결과를 얻었다.

SM의 안전성 검증을 위하여 RAW 264.7세포에 대한 세포독성을 관찰한 결과 대조군의 세포생존율에 비하여 SM의 1, 10, 100(mg/dl) 농도에서 높은 세포 생존율을 보여 세포 독성이 없는 것으로 생각된다(Fig. 2).

활성 산소는 인체의 생명 유지 과정에서 필연적으로 발생하는 물질로, 사용되는 산소량의 2~3(%)가 활성 산소로 전환되며 이러한 활성 산소는 반응성이 매우 높은 특징을 가지고 있다<sup>26,27</sup>. 이렇게 생성된 활성 산소는 생체 내에서 산화적 손상(oxidative stress)을 유발하기 때문에 적절한 과정을 통하여 제거되어야 하나<sup>28</sup>, 만약 제거하지 못한다면 그 세포 또는 조직은 산화적 스트레스에 의하여 손상을 입게 되고 결국 사멸하게 된다<sup>29</sup>.

산화적 손상은 노화와 관련이 크며, 체내 DNA 손상, 지질의 과산화로 인한 세포막의 손상, 단백질과 지질의 산화 등을 가져와 동맥경화, 암, 류마티스 관절염, 백내장, 노인성 치매 및 파킨슨씨병과 같은 질환 등을 유발시킨다<sup>30</sup>.

SM의 항산화 활성에 미치는 영향을 알아보기 위해 ROS 생성능, NO 생성능을 조사하였다.

ROS는 세포 내에 존재하는 mitochondria, peroxisome, xanthine oxidase(XOD), NADPH oxidase 및 cyclooxygenase(COX) 등의 효소들에 의해 생성되는  $\cdot O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $\cdot OH$  등을 일컫는데, 이는 산화적 손상을 일으키는 주범이 된다. ROS 중 superoxide radical은 산소를 이용하는 생체 내의 정상적인 대사과정에서 생성될 뿐만 아니라, organic compound들의 자동산화, 외부로부터 침입한 이물질에 대한 대식세포의 탐식 작용 및 효소반응에 의하여 생성될 수 있다<sup>31</sup>.

NO는 내피세포, 호중구 등에서 생성되며 L-arginine에서 nitric oxide synthase(NOS)에 의해 citrulline으로 전환 시에도 생성된다. 또한 NO는 대부분의 기관에서 intercellular messenger로서 작용하고 혈관의 항상성, 혈관 내피세포에 백혈구나 혈소판의 부착 억제와 혈소판 응집억제 및 신경전달 물질로서 작

용한다<sup>32</sup>. 아울러 면역계에서는 대식세포 및 미생물 방어에 관여하며 ROS와 쉽게 반응하여 반응성이 매우 높은 산화제인 peroxynitrite( $ONOO^-$ )를 생성하기도 한다<sup>33,34</sup>.

RAW 264.7세포에서 ROS의 생성량(%) 및 NO의 생성량(%)을 측정한 결과, 대조군에 비해 SM100에서 모두 유의성 있게 감소하였다(Table 4).

Cholesterol 변화에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 실험 종료 후 혈청 내 화학적 성분을 측정한 결과 total cholesterol, LDL cholesterol 와 TG의 변화는 SM 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였으며, HDL cholesterol의 변화는 SM 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였다(Table 5).

체내 과도한 지방의 축적 및 혈중 지질농도의 증가는 당뇨병, 고혈압, 심혈관 질환을 포함한 만성질환을 유발하게 되는 원인으로 알려져 있으며, 피하조직 이외의 부위에 축적된 복부비만은 당 및 지질대사에 장애를 초래하는 인슐린 비의존형 당뇨병, 고혈압, 고지혈증 등의 대사성질환과 심혈관 질환의 발병률과 사망률을 증가시킨다고 보고되고 있다<sup>35,36</sup>.

SM의 비만에 대한 효과를 알아보기 위하여 쥐의 체중 변화 및 glucose를 측정한 결과 SM 투여군은 대조군에 비하여 8주에서는 유의성 있게 체중이 감소하였고(Table 6), 혈청 내 glucose의 변화는 SM 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였다(Fig. 3).

비만, 당뇨, 고지혈증 등의 유병률이 증가하면서 만성 간질환의 원인으로 지방간이 차지하는 비중이 점차 높아지고 있다<sup>37</sup>. 지방간은 여러 가지 원인에 의해 간세포에 지방질, 특히 TG가 많이 축적되는 질환이다. 비교적 가벼운 경우에는 단순 지방간(steatosis) 소견만을 나타내기도 하지만, 염증을 동반하는 지방간염(steatohepatitis)으로 나타날 수 있으며, 염증이 장기간에 걸쳐 유지되거나 반복될 경우에는 섬유화(fibrosis) 및 간경변증(cirrhosis)으로

진행될 수도 있다<sup>38</sup>.

SM의 간에 대한 효과를 관찰하기 위하여 AST, ALT, ALP를 측정하고, 간 조직을 염색하여 관찰하였다.

실험 종료 후 혈청 내 AST, ALP의 변화는 SM 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소하였으며, ALT의 변화는 SM 투여군에서 대조군에 비하여 감소하였다(Table 7).

간의 조직을 H&E 염색하여 관찰한 결과, 대조군은 간세포에서 지방공포가 관찰되었으며, 이로 인해 세포의 핵이 세포질 안에서 가장자리로 밀려났으며, 정상군에 비해 쿠퍼세포의 수도 현저히 감소함을 관찰할 수 있었다. SM 투여군에서는 간세포내의 지방공포로 인해 세포의 크기는 커졌지만, 대조군에 비해 지방공포가 적어졌으며, 세포핵도 중앙에 위치하는 호전현상이 관찰 되었다(Fig. 4).

이상의 결과들을 종합해 보면, 四物活血湯은 세포독성이 없으며, ROS의 생성량(%) 및 NO 생성량(%)을 유의성 있게 감소시키는 효과가 있는 것으로 보아 四物活血湯은 항산화 효과가 있음을 알 수 있었고, total cholesterol, LDL-cholesterol, TG를 유의성 있게 감소시키고, HDL-cholesterol 유의성 있게 증가시키는 것으로 보아 四物活血湯이 혈중 지질의 농도를 감소시키는 효과가 있음을 알 수 있었다. 또한 AST, ALT, ALP의 유의성 있게 감소시켰으며, 간 조직의 지방질 분포가 감소된 것으로 보아 간 조직을 보호하는 효과가 있을 것으로 생각되어 진다.

이러한 결과는 四物活血湯이 임상에서 고지혈증으로 야기되는 동맥 경화, 허혈성 심질환, 기타 심혈관계 질환, 지방간 등의 예방과 치료에 효과가 있을 것으로 사료되며, 향후 보다 지속적이고 심도 있는 연구가 필요하리라 생각된다.

## V. 결 론

四物活血湯이 항산화와 항염증에 미치는 영향

및 고지혈증에 대한 효과를 알아보기 위하여 고지혈증 질환 모델 동물인 6주령의 수컷 C57BL/6J 생쥐에 고지방 식이를 경구 투여한 후, in vitro에서는 세포독성 및 항산화 활성 측정을, in vivo에서는 혈중 지질인자, 간에 미치는 효과 및 간 조직에 대한 영향 등을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 四物活血湯은 대조군에 비해 ROS 생성량(%) 및 NO 생성량(%)은 유의성 있게 감소시켰다.
2. 四物活血湯은 in vivo에서 혈청 내 total cholesterol, LDL cholesterol, TG를 유의성 있게 감소시켰다.
3. 四物活血湯은 in vivo에서 혈청 내 HDL cholesterol을 유의성 있게 증가시켰다.
4. 四物活血湯은 in vivo에서 쥐의 체중과 glucose를 유의성 있게 감소시켰다.
5. 四物活血湯은 in vivo에서 AST, ALP를 유의성 있게 감소시켰다.
6. 四物活血湯은 간의 조직학적 검사 상 대조군에 비해 지방공포가 적어지면서 세포핵을 중앙에 위치하는 호전 현상이 나타났다.

이러한 결과에 따라 四物活血湯이 임상에서 고지혈증으로 야기되는 동맥 경화, 허혈성 심질환, 기타 심혈관계 질환, 지방간 등의 예방과 치료에 효과가 있을 것으로 기대된다.

## 참고문헌

1. 통계청. 2012년 사망원인통계. 한국개발연구원. 2013.
2. 김미현, 장소영, 이연숙. 고지방식으로 유도된 고지혈증 모델 흰쥐에서 지방과 제니스테인 섭취가 지질대사 및 항산화능에 미치는 영향. 한국영양학회지 2006;39(2):100-8.
3. Chun SI, Min WK, Park HS, Song JH, Kim JQ, Min YI, et al. The risk groups for coronary

- heart disease in Koreans. Assessment by distribution of serum lipid concentrations. *Clin Chem Lab Med* 1999;37(10):969-74.
4. Kim JQ, Song JH, Park YB, Lee HK, Kim YS, Ryoo UH, et al. National cholesterol treatment guidelines in Korean population-setting-up the cutpoints for high blood cholesterol-. *J Korean Med Sci* 1997;12:17-22.
  5. 方惠貞, 卓宜洙, 洪律喜, 姜允皓. 高脂血症에 對한 韓醫學的考察. *東西醫學* 1995;20(1):25-36.
  6. 함인혜, 정성웅, 이경진, 박규하, 최호영. 茵陳蒿와 韓茵陳이 Triton WR-1339로 유도된 고지혈증 흰쥐에 미치는 영향. *대한본초학회지* 2005;20(1):45-52.
  7. 함인혜, 이웅철, 이병희, 최호영. 국산과 중국산 枳實이 Triton WR-1339 유발 高脂血症 흰쥐에 대한 효능 연구. *대한본초학회지* 2007;22(3):109-16.
  8. 함인혜, 이주영, 윤예진, 양갑식, 태진, 부영민, 등. 국산 및 중국산 白首烏의 Triton WR-1339 유발 高脂血症 흰쥐에 대한 효능 연구. *대한본초학회지* 2007;22(4):279-86.
  9. 김형철, 김형우, 조수인, 김용성, 이장식, 권정남, 등. 丹蔘이 고지혈증 흰쥐의 혈중 지질 변화에 미치는 영향. *대한본초학회지* 2007;22(4):239-45.
  10. 이장천. 加味防風通聖散이 고지방식이 급여 흰쥐의 체지방구성과 항산화능에 미치는 영향. *대한본초학회지* 2005;20(2):69-75.
  11. 박종광, 최학주, 김동희. 加味除濕順氣湯이 高脂血症을 유발시킨 高血壓 白鼠에서의 血液學的 變化에 미치는 影響. *대전대학교 한의학연구소 논문집* 2006;15(1)19-31.
  12. 김정수, 김병탁. 柴苓湯이 고혈압 및 고지혈증에 미치는 영향. *대전대학교 한의학연구소 논문집* 1997;5(2):319-32.
  13. 郭雪申, 柯源, 廖春蓮. 心血管病 妙法良方大全. 華中科技大學出版社; 2010, p. 300.
  14. 김도국, 김세건, 암릿파우렐, 정태숙, 정현주. Poloxamer-407로 유도한 고지혈증 동물모델에서 Quercetin-3-O-rhamnoside 및 어성초 분획물의 항고지혈증 효과. *생약학회지* 2012;43(2):101-6.
  15. 박성우. 속발성 고지혈증. 서울: 임상의학; 1991, p. 11-48.
  16. 한국 지질·동맥경화학회, 유언호, 고지혈증 치료지침 제정위원회. 고지혈증과 동맥경화. 서울: 韓國 脂質·動脈硬化學會, 고지혈증 치료지침 제정위원회; 2003, p. 11, 83, 135.
  17. Daniel J. Rader, Helen H. Hobbs. Harrison's Principles of Internal medicine. Section 3 Disorders of Intermediary Metabolism. 16th edition: MIP; 2006, p. 2038-40, 2500-12, 2058.
  18. 윤건호, 손호영. 고지혈증 치료의 최신지견. *가정의학회지* 2002;21(5):30-6.
  19. 울산의대 서울아산병원내과. 내과학의 최신지견 V. 서울: 도서출판 한국의학; 2002, p. 126-8.
  20. 이귀녕, 권오현. 임상병리과일. 제3판. 서울: 의학문화사; 2000, p. 155-6, 169-71, 179-80, 182, 196-9.
  21. Spady DK, Woollett LA, Dietschy JM. Regulation of plasma LDL-cholesterol level by dietary cholesterol and fatty acids. *Annu Rev nutr* 1993;13:355-81.
  22. 고지혈증 치료지침 제정위원회. 고지혈증의 진단과 치료. 서울: 한의학; 2000, p. 59, 221-33.
  23. 杜鎬京. 동의신계학. 서울: 東洋醫學研究院; 1993, p. 1196.
  24. 黃帝內經靈樞. 金達鎬編. 서울: 醫聖堂; 2002, p. 772.
  25. 전국한의과대학 공동교재편찬위원회. 본초학. 서울: 영림사; 2004, p. 184-5, 188-90, 233-4, 395-6, 414-5, 445-6, 450-1, 461-2, 465-7, 469-70, 499-500, 552-4, 586-8, 632-4, 637-40.
  26. Lee SO, Kim MJ, Kim DG, Choi HJ. Antioxidative activities of temperature-stepwise water extracts

- from *Inonotus obliquus*. *Korean J Food Sci Nutr* 2005;34(2):139-47.
27. 조숙현, 최용조, 노치웅, 최철웅, 김덕송, 조성환. 대나무 수액의 활성 산소 소거활성과 세포독성. *한국식품저장유통학회지* 2008;15(1):105-10.
  28. PaPa S, Skulachev VP. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Mol Cell Biochem* 1997;174:305-19.
  29. Slavić M, Appiah I, Nikolić-Kokić A, Radojčić R, Jones DR, Spasić MB, Milovanović S, Blagojević D. The anti-oxidative defence system in the isolated rat uterus during spontaneous rhythmic activity. *Acta Physiol Hung* 2006;93(4):335-9.
  30. 정일민, 김광호, 안종국. 한국 약용 및 식용식물들의 항산화성 식물탐색. *한국약용작물학회지* 1998;6(4):311-22.
  31. Kujala TS, Loponen JM, Klika KD, Pihlaja K. Phenolics and betacyanins in red beetroot(*Beta vulgaris*) root: distribution and effect of cold storage on the content of total phenolics and three individual compound. *J Agric Food Chem* 2000;48(11):5338-42.
  32. Channon KM, Qian H, George SE. Nitric oxide synthase in atherosclerosis and vascular injury: insights from experimental gene therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000;20:1873-81.
  33. Virag L, Szabo E, Gergely P, Szabo C. Peroxynitrite-induced cytotoxicity: metabolism and opportunities for intervention. *Toxicol. Lett* 2003;140-1:113-24.
  34. Patel RP, McAndrew J, Sellak H, White CR, Jo H, Freeman BA, Darley-Usmar VM. Biological aspects of reactive nitrogen species. *Biochimica et Biophysica Acta(BBA) - bioenergetic* 1999;1411(2-3):385-400.
  35. Björntorp P. The associations between obesity, adipose tissue distribution and disease. *Acta Med Scand Suppl* 1988;723:121-34.
  36. Visscher TL, Seidell JC. The public health impact of obesity. *Annu Rev Public Health* 2001;22:355-75.
  37. 김홍규, 서찬중, 윤효중, 황용하, 이기영, 박혜영, 등. 비알코올성 지방간과 대사성 질환들과의 연관성. *대한내분비학회지* 2002;17(4):526-33.
  38. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002;346(16):1221-31.