제2형 당뇨 마우스 모델에서 청혈플러스의 항고지혈 및 항산화효과

최고은 · 설인찬 · 김윤식 · 조현경 · 유호룡*

대전대학교 한의과대학 심계내과학교실

Hypolipidemic and Anti-oxidant Effects of Chunghyl Plus in Type II Diabetic Mice Model

Koh Eun Choi, In Chan Seol, Yoon Sik Kim, Hyun Kyoung Cho, Ho Ryong Yoo*

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

This study was perfomed to investigate the effects of Chunghyul-plus(CHP) on oxidative damage and hyperlipidemia in db/db mouse. After treatment with CHP, safety in cytotoxicity, heavy metal toxicity, production of reactive oxygen species(ROS), nitric oxide (N0) and proinflammatory cytokine IL-Ib, TNF-a, IL-6 in RAW 264.7 cells. Serum total cholesterol, LDL cholesterol, HDL cholesterol, triglyceride, insulin, GLP-1, glucose, food intake, body weight, organ weight, AST, ALT, ALP, BUN, creatine and histologic change of liver and aorta were measured in db/db mouse after oral administration of CHP. CHP showed safety in cytotoxicity and toxicity of liver and kidney for logn time administration. CHP increased the DPPH and ABTS radical scavenging activity. CHP showed significant inhibitory effect on reactive oxygen species (ROS), and showed inhibitory effect on nitiric oxide(NO) compared to control group. CHP decreased cytokine IL-6 production significantly, and decreased IL-1β and TNF-α compared to control group. CHP decreased body and organ weitht, intake food, and glucose levels compared to control group. CHP decreased total cholesterol and triglyceride significantly, and decreased LDL-cholesterol levels and increased HDL-cholesterol levels compared to control group. CHP decreased atherogenic index and cardiac risk factor significantly. CHP increased serum insulin and GLP-1 compared to control group. In histologic examination, lipophagy in the liver and aorta decreased in CHP treated mice and the cell was regular and boundary of vessel wall was clear compared to control group. These results suggest that CHP is effective in antioxidation activity and treatment and prevention of hyperlipidemia, atherosclerosis, diabetes, ischemic heart disease, stroke and other cardiocerebrovascular disease.

keywords : Chunghual-plus(Cheonghyeol-plus), Antioxidation activity, Hyperlipidemia, Atherosclerosis

서 론

2014년 통계청의 사망원인 발표에 따르면 뇌졸중이나 심근경색 등의 심뇌혈관질환은 암에 이은 주요 사망원인으로 특히 심근경색과 같은 허혈성 심장질환으로 인한 사망은 계속 증가하고 있다[1]. 또한 심뇌혈관질환의 선행질환인 비만, 고혈압, 당뇨병 및 고콜레스테롤혈증은 우리나라 성인의 54%가 겪고 있으며 적절히 관리하면 심근경색, 뇌졸중 등의 심각한 질환을 예방할 수 있기 때문에 관리의 필요성이 크다[2]. 이들 중 고지혈증은 혈액 내의 지질 또는 지단백이 정상보다 증가된 상태로 동맥경화증의 중요한 위험인자로 허혈성 심뇌혈관 질환의 원인이 되며[3], 이를 조절하여 죽상경화증에 의한 순환기 질환을 예방하는 것이 중요하다[4].

한의학에서 고지혈증과 일치하는 개념은 없으나《靈樞.衛氣失常論》[5]에서 "肥人多, 有膏, 有肉"이라 하여 지질에 대한 인식이 오래됨을 알 수 있다. 또한 胸悶 胸痛 心悸 頭暈 痲木 등의 증상으로 보아 心痛 胸痞 怔忡 水腫 中風 등의 범주에 속한다고 볼 수 있으며 그 원인은 痰飮과 瘀血로 보아 化痰去瘀의 治法을 多用하고 있다[6]. 최근 이러한 치법을 토대로 循環器加味方, 製何首烏加味方 등의 처방[7,8]에 관한 실험적 연구를 통해 고지혈증에 대한 유효성이 밝혀지고 있으며 임상적으로 항고지혈 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 또한 이[9] 등은 한인진 및 울금의 복합추출물이 항비만과 항고지혈증 및 항산화 효능이 있으며 대사증후군을 감소시키는 효과가 있음을 보고한 바 있어, 안전하고 효능이 우수한 천연약물로 구성된 복합 추출물을 이용하여 과학적인 실험을 통한 치료제의 개발이 기대되고 있다.

이에 저자는 고지혈증을 痰飮과 瘀血의 개념으로 인식하고 活血 利濕하는 약재들 중 기존 논문에서 실험적 연구를 통해 고지혈증의 개선에 효과가 있다고 밝혀진 丹蔘[10], 茵蔯[11], 鬱金[12], 山査[13]

* Corresponding author

Ho Ryong Yoo, Korean Medicine Hospital of Daejeon University, 75, Daedeok-daero 176beon-gil, Seo-gu, Daejeon, Korea

·E-mail : hryoo@dju.kr ·Tel : +82-42-470-9131

·Received : 2016/03/18 ·Revised : 2016/04/21 ·Accepted : 2016/05/10

ⓒ 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.2016.06.30.3.164

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

로 구성된 청혈플러스를 이용하여 당뇨 발생 모델인 db/db 생쥐에 대한 항고지혈증 효과를 실험적으로 규명하고자 연구하게 되었다.

본 연구는 청혈플러스(이하 CHP)가 산화적 손상 및 고지혈증에 미치는 영향을 과학적으로 증명하고자 진행되었으며, CHP 추출물을 RAW246.8 세포를 이용하여 세포독성과 중금속검사를 통해 안전성을 확인한 후, 항산화 및 항염증 효과를 알아보기 위해 총 페놀 및 플라보노이드 함량, DPPH와 ABTS radical 소거능, 세포내 ROS, NO, 사이토카인 생성량을 측정하였고, 당뇨 동물 모델인 8주령의 수컷 db/db 생쥐를 이용하여 혈청 내 cholesterol, triglyceride, insulin, GLP-1, glucose, 식이섭취량, 체중, 장기무게, 간과 신기능 수치를 측정하고 간과 대동맥의 조직에 미치는 영향 등을 관찰하였으며 이에 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 세포

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

2) 약재

본 실험에 사용한 청혈플러스(ChungHuyl-Plus 이하 CHP로 표기)는 KB원외탕전에서 조제된 것으로 1캡슐의 분량은 500 mg이고, 이는 총 약재 1.5 g에서 추출한 것이다. CHP는 총 약재 분량의 5배 용량의 정제수로 100도씨에서 10시간 열탕 추출 후 80도씨에서 65 브릭스로 감압 농축하여 얻은 농축액과 농축 전 약재의 1/2에 해당하는 양의 약재를 미분하여 농축액과 혼합 후 다시 건조하여 캡슐에 넣어 사용한 것으로 CHP(1첩)의 구성과 용량은 다음과 같다(Table 1).

Table 1. The Prescription of CHP

Herbal medicine name	Pharmacognostic name	Weight(g)
茵蔯蒿	Artemisiae Capillaris Herba	0.375
鬱 金	Curcumae longae Radix	0.375
山 査	Crataegi Fructus	0.375
丹 蔘	Salvia miltiorrhiza BUNGE	0.375
Total amount		1.5

3) 동물 및 사료

본 실험을 위하여 사용된 db/db mouse (5주령, 수컷, 20~27 g)는 라온바이오 (Korea)에서 구입하여 사용하였다. 실험동물은 2주간 안정기를 거치면서 순화시켰으며, 안정기 및 실험기간에 모든 실험군에는 일반 사료(Altromin CO., Germany)를 자유식이하며 물을 충분히 공급하였다. 2주간의 유발기간 이후 8주령부터 동물 실험을 진행하였다. 실험 동물은 대조군과 실험군의 혈당체크 후 그룹을 배분하였으며, 실험 시작 시 정상군의 혈당은 145.3±17.4 ㎎/㎗, 대조군은 264.4±133.6 ㎎/㎗, CHP 투여군은 269.7±71.3 ㎎/㎗이였다. 동물 사육실은 다음과 같은 조건으로 이루어졌는데, Conventional system으로 22±2℃, 1일 24시간 중 12시간은 200-300 Lux로 조명하였고, 12시간은 빛에서 완전히 차단하였다. 본 실험은 대전대학교 동물실험 윤리위원회의 승인 (승인번호 DJUARB2015-031)을 받아 동물윤리준칙에 의거하여 실험하였다.

4) 시약

본 실험을 위해 Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (D-PBS : Welgene Co.,, Korea), Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM : Gibco BRL Co., UK), 우태아혈청 (fetal bovine serum: FBS, Invitrogen Co., U.S.A.), lipopolysaccharide (LPS : Sigma Co., U.S.A.), cell viability assay kit (Daeillab sevice, Korea), nitric oxide detection kit (Intron Biotechnology, Korea), penicillin (Hyclone, Co., U.S.A.), streptomycin (Hyclone Co., U.S.A.), (2,7)-dichlorodihydrofluorescin diacettate (DCFH-DA : Sigma Co., U.S.A.), 2,2'-azinobis-(3- ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS : Sigma Co., U.S.A.), 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH : Sigma Co., U.S.A.), trypan blue (Sigma Co., U.S.A.), ethanol (Merck Co., Germany), Mouse magnetic luminex screening assay (R&D system, U.S.A.), Rat/Mouse insulin ELISA kit (Biovender., CZECH), GLP-1 ELISA kit (shibayaki Co., Japan), Dimethyl sulfoxide (DMSO : Sigma Co., U.S.A.), Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Merck Co., Germany), Gallic acid (Sigma Co., U.S.A.), Quercertin (Sigma Co., U.S.A.), Sodium carbonate (Sigma Co., U.S.A.), Aluminum nitrate nonahydrate (Sigma Co., U.S.A.), Potassium acetate solution (Sigma Co., U.S.A.), As, Pb, Hg, Cd standard solution (SCP Science, Canada), water (Duksan, Korea), acetonitrile (Duksan, Korea) 등을 사용하였다.

5) 기기

기기는 rotary vacuum evaporator (Büchi B-480 Co., Switzerland), freeze dryer (EYELA FDU-540 Co., Japan), CO2 incubator (Forma scientific Co., U.S.A.), clean bench (Vision scientific Co., Korea), autoclave (Sanyo Co., Japan), vortex mixer (Vision scientific Co., Korea), centrifuge (Sigma Co., U.S.A.), deep-freezer (Sanyo Co., Japan), ice-maker (Vision scientific Co., Korea), plate shaker (Lab-Line Co., U.S.A.), ELISA reader (Molecular Devices Co., U.S.A.), ICP (Shimadzu, Co., Japan), 수은분석기 (TELEDYNE Leeman Labs, U.S.A.), HPLC (Shimadzu, Co., Japan), 환류 추출기 (Mtops, Korea), 동결 건조기 (IlShinBioBase, Korea), Light Microscope (Carl Zeiss, Co., Germany), flow cytometry system (BD biosciences, U.S.A.), Luminex (Millipore Co., U.S.A.)등을 사용하였다.

2. 방법

1) 시료의 조제

캡슐 형태의 CHP 시료에 대한 내용물을 수거하여 얻어진 분말을 냉동고에서 보관하였고, 필요한 농도에 따라 3차 증류수로 희

석하여 사용하였다.

2) 중금속 검사

비소, 납, 카드뮴 분석의 경우, CHP 추출물 0.5 g을 극초단파 시료전처리장치 전용용기에 넣어 질산 10 ㎖을 첨가하고, 후드 안에 용기를 정치시켜 발생 가스를 제거하였으며 극초단파 시료전처리장치를 사용하여 분해하였다. 분해가 끝난 후 분해액을 여과지로 여과하여 용량플라스크에 넣고 물로 적절히 표준액의 농도범위로 희석하여 검액으로 하였다. 별도로 극초단파 시료전처리장치 전용용기에 질산 10 ㎖를 넣고 검액 조제와 동일한 방법으로 조작하여 공시험액으로 사용하였다. 준비된 검액과 표준액 및 공시험액으로 유도결합플라즈마분광계(ICP)를 이용하여 검량선을 작성하였고, 공시험액으로 보정하여 검액을 측정하였다. 수은 분석의 경우 CHP 추출물 50 ㎎을 정확하게 측정하여 특별한 전처리 과정을 거치지 않고 수은분석기를 이용하여 측정하였다.

3) 세포독성 측정

RAW 264.7 세포는 96 well plate에 1.5×10^5 cells/well로 분주하였다. 실험을 시행하기 전에 새로운 배양액으로 교체하였고, CHP를 각각 1, 10, 100 (㎍/㎖)의 농도로 처리한 후에 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 10 ㎕의 WST solution을 넣어 30분간 배양기 (37℃, 5% CO_2)에서 반응시켰다. 반응이 끝난 후 450 nm에서 흡광도 변화를 측정하여 백분율로 대조군에 대한 세포의 생존율을 표시하였다.

4) RAW 264.7 세포 배양

동결된 RAW 264.7 세포를 50 ㎖의 튜브에 옮긴 다음 PBS 9 ㎖을 넣어 세포를 부유시킨 후 1,200 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 세포가 있는 튜브에 1% penicillin과 10% fetal bovine serum (FBS)로 조성된 DMEM배지 1 ㎖을 넣어 부유시켰다. 100 ㎜ dish에 9 ㎖ 배지를 넣어 세포를 부유시킨 후, 세포배양기 (37℃, 5% CO_2)에서 배양하였다. 계대배양의 횟수는 5회 이상으로 시행하였고, 시료들의 처리 전에 24시간 적응시켰다.

5) 항산화 효능 측정

(1) 총 폴리페놀 함량 측정

CHP의 phenol 함량은 Gutfinger의 방법을 응용하여 측정하였다. 추출 시료용액 1 ㎖에 Foiln-Ciocalteu's phenol reagent 50% 0.5 ㎖를 가하여 실온에서 3분동안 반응시켰다. 반응용액에 Na_2CO_3 포화용액 1 ㎖ 및 증류수 7.5 ㎖를 차례로 혼합하여 30분간 정치시킨 후, 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 상청액을 얻어 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 phenol 함량은 gallic acid를 표준물질로 하여 작성한 검량선에 따라 함량을 측정하였으며, GAE (Gallic acid equivalent)/g을 측정단위로 사용하였다.

(2) 총 플라보노이드 함량 측정

CHP의 flavonoid 함량은 Nieva Moreno 등의 방법을 응용하여 측정하였다. CHP 및 스텐다드 각 0.1 ㎖와 80% 에탄올 0.9 ㎖를 혼합한 혼합물 0.5 ㎖에 1M potassium acetate와 10% aluminium niatate 0.1 ㎖ 80% 에탄올 4.3 ㎖을 더하여 실온에 40분 동안 방치한 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였고, quercetin을 이용하여 작성한 표준곡선을 이용하여 함량을 구하였다.

(3) DPPH radical 소거능 측정

Free radical 소거 활성 시험은 안정한 Free radical DPPH를 사용하는 방법이다. CHP 추출물의 최종 농도를 1, 10, 100, 1,000 (㎍/㎖)로 나올 수 있게 추출물을 희석시키고, CHP 추출물 각 100 ㎕와 에탄올에 용해시킨 0.2 mM의 DPPH 용액 150 ㎕를 혼합하여 37℃에서 30분 동안 반응 시킨 후 517 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. 시료액의 대조군은 증류수를 사용했으며, DPPH 용액의 대조군으로는 에탄올을 넣어 보정값을 얻었다. DPPH 자유라디칼 소거율은 아래의 식과 같이 계산하였다.

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

(4) ABTS radical 소거능 측정

ABTS assay는 기존에 보고된 방법을 96 well plate에 맞게 수정하여 실시하였다. CHP 추출물의 최종 농도를 1, 10, 100, 1,000 (㎍/㎖)로 나올 수 있게 추출물을 희석시켰으며, ABTS 용액은 7.4 mM ABTS (2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline -6-sulfonic acid))와 2.6 mM potassium persulphate를 제조한 다음, 암소에 24시간 방치하여 양이온 (ABTS·+)을 형성시킨 후 734 ㎚에서 흡광도를 측정하여 그 값이 1.5 이하로 나오도록 희석하였고, 희석된 ABTS·+ 용액 150 ㎕와 CHP를 각각 5 ㎕ 혼합하여, 실온에서 10분간 반응시킨 뒤에 734 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. 항산화능은 증류수를 대조군으로 하고 대조군에 대하여 ABTS radical 소거능을 백분율로 계산하였다.

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

(5) 세포내 ROS 생성 측정

RAW 264.7 세포에서 reactive oxygen species (ROS)를 측정하기 위하여 2′,7′-dichlorofluorescin diacetate (DCF-DA)를 이용하였다. 12 well plate에 RAW 264.7 세포를 2×10^5 cells/well이 되게 분주하여 24시간 동안 배양 하였다. 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였으며, CHP 추출물을 1, 10, 100 (㎍/㎖)의 농도로 처리하고, LPS 1 ㎍/㎖의 농도로 처리한 후, 다시 24시간 동안 37℃, 5% CO_2 배양기에서 배양하였다. 배양 후, 1,200 rpm에서 5분동안 원심분리 하여 모은 세포를 차가운 PBS로 두차례 세척하였고, DCF-DA은 10 μM이 되도록 첨가한 다음 15분 동안 상온의 암소에 두었다. 염색 후 차가운 PBS를 넣어 1,200 rpm에서 5분동안 원심분리 한 뒤, 상청액을 제거한 다음 다시 PBS 400 ㎕를 부유시켜 유세포 분석로 형광강도의 세기에 따른 변화를 분석하였다.

6) 항염증 효능 측정

(1) Nitric oxide(NO) 생성량 측정

NO의 농도는 griess reagent system을 이용해 배양액 내의 nitric oxide 농도를 측정하였다. RAW 264.7 세포는 96 well plate에 2×10^4 cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양 하였다. 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였고 CHP 추출물을 각각 1, 10, 100 (㎍/㎖)의 농도와 LPS 1 ㎍/㎖의 농도로 처리하여 다시 24시

간 동안 배양하였다. N1 buffer 50 ㎕를 각 well에 처리하고 상온에서 10분간 반응 시킨 다음, N2 buffer 50 ㎕를 각 well에 처리하여 10분간 반응시킨 후 540 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite standard의 농도별 표준곡선을 이용하여 배양액의 NO 농도를 결정하였다.

(2) 사이토카인 생성량 측정

세포 내에서 염증성 사이토카인을 12 well plate에 RAW 264.7 세포를 2×10^5 cells/well이 되게 분주하여 24시간 동안 배양한 후 새로운 배양액으로 교체하였고, CHP 추출물을 1, 10, 100 (㎍/㎖)의 농도, LPS 1 ㎍/㎖의 농도로 처리하여 다시 세포배양기 (37℃, 5% CO_2)에서 24시간 동안 배양하였다. 원심분리한 다음 상청액으로 IL-1β, IL-6, TNF-α를 Luminex 기기로 측정하였다.

7) 혈당 및 식이섭취량, 체중, 장기 무게 측정

db/db mouse의 기원으로 알려진 C57BL/6 마우스를 정상군으로 분류하였으며, 당뇨 발생 모델로 알려진 db/db mouse를 대조군과 실험군으로 나누었다. 대조군과 실험군은 8주령 마우스의 혈당을 체크하고 평균을 구하여 그룹 당 각 8마리씩 나누어 진행하였다. 이때 대조군은 264.40±133.60 이였으며, 실험군은 279.63±59.40으로 실험을 시작하였으며, 혈당의 수치가 낮거나 높은 모델은 에테르를 이용하여 폐사하였다. 실험 시작 8주령부터 실험 종료인 11주령까지 정상군과 대조군에는 증류수를 경구투여 하였으며, 실험군에는 CHP 추출물을 매일 하루 1회, 오전 10시에 200㎕ (400 ㎎/kg) 씩 투여하였다. CHP 추출물 투여량은 성인 체중 60 kg을 기준으로 한 후 마우스 체중 30 g을 기준으로 하여 산출하였다.

혈당 측정은 실험 시작일로부터 실험이 종료되는 주까지 매주 월요일에 측정을 실시하였다. 혈당 측정 3시간 전부터 절식시킨 후 꼬리 끝을 절단한 뒤 혈당체크기를 이용하여 혈당을 측정하였으며 식이섭취량 및 체중은 매주 월요일에 측정을 실시하였다. 장기무게는 실험 종료 후 간 조직과 부고환 주위 지방조직 및 신장을 절취하여 g 단위로 측정하였다.

8) 혈청 내 콜레스테롤 및 triglycerides (TG) 측정

혈청 내 콜레스테롤 및 triglycerides (TG)의 함량을 측정하기 위해 심장 천자법을 이용하여 실험 종료 후 혈액을 채취하였으며, 혈액을 30분동안 상온에서 굳힌 다음 3,000 rpm에서 15분 동안 원심분리 후 혈청을 분리하여 대전대학교 한방BIO FabLab에 분석 의뢰 하였다. Total cholesterol과 triglyceride (TG) 함량은 Enzymatic assay, high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) 함량은 Selective inhibition, low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) 함량은 Enzymetric method의 원리를 이용하여 생화학 자동분석기로 측정하였다.

9) 동맥경화지수(AI) 및 심혈관위험지수(CRF)

동맥경화 지수(Atherogenic Index, AI)는 Fiordaliso의 계산법인 AI=([Total-C] -[HDL-C])/[HDL-C] 식을 사용하여 구하였다. 또한, 심혈관위험지수인 CRF (Cardiac Risk Factor)는 Rosenfeld의 계산법에 따라 총 콜레스테롤의 양을 HDL 콜레스테롤의 양으로 나누어 구하였다.

10) 간 기능

혈청 내에서 AST, ALT, ALP 활성도를 측정하기 위해 심장 천자법을 이용하여 실험 종료 후 혈액을 채취하였다. 혈액을 30분간 상온에서 굳힌 다음 3,000 rpm에서 15분동안 원심분리 후 혈청을 분리하여, 대전대학교 한방BIO FabLab에 분석 의뢰 하였다. AST, ALT, ALP 활성도는 JSCC UV method 원리를 이용하여 생화학 자동분석기로 측정하였다.

11) 신 기능

혈청 내에서 creatinine, BUN 활성도를 측정하기 위해 심장 천자법을 이용하여 실험 종료 후 혈액을 채취하였다. 혈액을 30분간 상온에서 굳힌 다음 3,000 rpm에서 15분동안 원심분리 후 혈청을 분리하여, 대전대학교 한방BIO FabLab에 분석 의뢰 하였다. Creatinine의 함량은 Creatinine Jaffe Method 원리를 이용하였고, BUN의 함량은 Kinetic UV assay for urea/urea nitrogen원리를 이용하여 생화학 자동분석기로 측정하였다.

12) 혈청 내 인슐린 측정

실험 종료 후 ethyl ether로 마취한 상태에서 심장 천자법으로 채혈한 다음 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 분리한 후, Rat/Mouse Insulin ELISA kit을 이용하여 다음과 같이 측정하였다. 코팅 된 Insulin plate에 washing 완충 용액을 이용하여 세척하고 100 ㎕의 biotin conjugate와 10 ㎕의 standard, 혈청을 넣은 뒤 2시간 동안 반응시켰다. 반응 후 다시 washing 완충 용액을 이용하여 세척하고 100 ㎕의 HRP conjugate를 넣은 뒤 30분 동안 반응시키고 세척작업 후 100 ㎕의 substrate chromogen reagent를 넣은 후 30분 동안 반응시켰다. 측정 전 reaction stopper를 100 ㎕를 취한 뒤 ELISA reader 450 ㎚에서 흡광도를 측정하였다.

13) 혈청 내 GLP-1 측정

실험 종료 후 ethyl ether로 마취한 상태에서 심장 천자법을 통하여 채혈한 다음 3,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 혈청을 분리한 후, GLP-1 ELISA Kit를 이용하여 측정하였다. anti-GLP-1 coated 96 well plate에 혈청 10 ㎕와 buffer solution 40 ㎕를 혼합하여 각각의 well에 50 ㎕씩 분주하고 20~25℃에서 2시간 동안 방치한 다음 washing buffer로 3회 세척하였다. 다시 biotin-labeled anti-GLP-1 solution 50 ㎕를 넣고 20~25℃에서 2시간을 배양한 후 다시 3회 세척하였다. 그리고 HRP-conjugated avidin solution 50 ㎕를 넣고 20~25℃에서 30분 동안 배양한 후에 다시 세척하였다. 마지막으로 chromogenic substrate reagent 50 ㎕를 넣고 20~25℃에서 30분 동안 배양한 후, 50 ㎕의 reaction stopper를 첨가하였고 multi microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

14) 조직 검사

Ether로 마취하여 심장 천자법를 이용하여 혈액을 채혈하고 흉부와 복강을 절개하여 간과 대동맥을 적출하였다. 각 실험군별로 적출한 조직은 48시간동안 10% 중성 포르말린에 고정하였고, 고정이 완료된 조직들을 12시간 동안 흐르는 수돗물에서 수세한 다음 조직내 고정액을 완전히 제거하였다. 조직의 탈수를 위해 60%에서 100%의 알코올에 이르기까지 농도 상승 순에 따라 탈수한 뒤, xylene에 투명과정을 거친 후에 파라핀 블럭을 제작하였다. 제작된

블럭은 박절기(microtome)를 이용하여 3~4 ㎛ 두께의 절편으로 만들어 탈 파라핀 과정 및 함수과정을 거친 후, hematoxyline & eosin (H&E) 일반 염색을 시행하였으며 광학현미경으로 관찰 및 사진 촬영하였다.

3. 통계처리

실험 결과의 통계처리는 SPSS 11.0 unpaired student's T-test 및 ANOVA를 사용하였으며 $p<0.05$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

결 과

1. 중금속 함량

CHP 추출물의 중금속 함량을 측정한 결과, 납, 카드뮴, 수은의 경우 기준치 이하로 검출되었고 비소는 검출되지 않았다(Table 2).

Table 2. Content of Pb, As, Cd and Hg in Extract of CHP

	Pb	As	Cd	Hg
permissive density (mg/kg)	5	3	0.3	0.2
CHP	0.108	N.D[1)]	0.083	0.004

1) N.D. : Not detected.

2. 세포독성

1) RAW 264.7

RAW 264.7 세포독성은 대조군을 100.0±9.1%로 나타냈을 때 CHP 추출물은 1, 10, 100 (㎍/㎖) 농도에서 99.3±4.5%, 104.8±3.6%, 102.3±10.5%의 세포 생존율을 나타내어 안전한 것으로 확인되었다.

3. 항산화 효능에 미치는 영향

1) 총 폴리페놀 함량

CHP 추출물에 존재하는 총 phenol 함량을 gallic acid를 표준물질로 설정하여 측정한 결과, Table 3과 같이 phenol 함량은 291.3±3.3 ㎎/g이었다(Table 3).

Table 3. Total Phenol Contents of CHP

Sample	Total phenolics (㎎/g ext.)
CHP	291.3±3.3

2) 총 플라보노이드 함량

CHP 추출물에 존재하는 총 flavonoid 함량을 quercetin을 표준물질로 설정하여 측정한 결과, Table 4와 같이 flavonoid 함량은 114.9±2.7 ㎎/g이었다(Table 4).

Table 4. Total Flavonoid Contents of CHP

Sample	Total flavonoid (㎎/g ext.)
CHP	114.9±2.7

3) DPPH radical 소거능에 미치는 영향

CHP 추출물의 DPPH radical 소거능은 1 ㎍/㎖ 농도에서 0.6±1.8%, 10 ㎍/㎖ 농도에서 5.1±1.5%, 100 ㎍/㎖ 농도에서 33.2±1.7%, 1,000 ㎍/㎖ 농도에서 87.9±2.0%로 농도 의존적으로 증가하였다.

4) ABTS radical 소거능에 미치는 영향

CHP 추출물의 ABTS radical 소거능은 1 ㎍/㎖ 농도에서 0.1±0.3%, 10 ㎍/㎖ 농도에서 2.6±0.5%, 100 ㎍/㎖ 농도에서 24.4±8.6%, 1,000 ㎍/㎖ 농도에서 85.9±0.9%로 농도 의존적으로 증가하였다.

5) ROS 생성량에 미치는 영향

RAW 264.7 세포주에서 ROS 생성량은 대조군을 100.0±8.9%로 나타냈을 때 정상군은 40.8±3.6%, CHP 추출물은 1 ㎍/㎖ 농도에서 92.9±6.7%, 10 ㎍/㎖ 농도에서 76.5±5.7%, 100 ㎍/㎖ 농도에서 96.4±5.6%로, 대조군에 비하여 10 ㎍/㎖ 농도에서 유의성 있게(* : $p<0.05$) 감소하였다(Fig. 1).

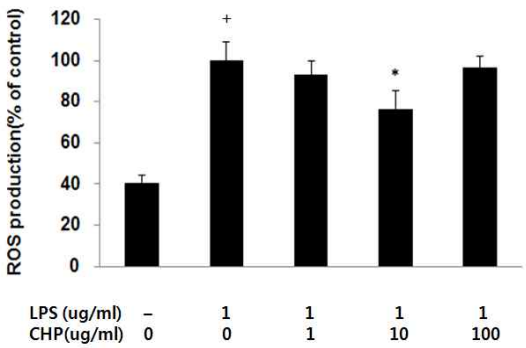

Fig. 1. Effect of CHP extract on ROS production in RAW 264.7 cells. Each cell was treated with 1, 10 and 100 (㎍/㎖) of CHP extract and LPS (1 ㎍/㎖) for 24hr. The ROS production was analyzed by flow cytometry. The results were expressed as mean ± S.D. from three independent experiments. (* : $p<0.05$. compared to control)

4. 항염증 효능에 미치는 영향

1) NO 생성량에 미치는 영향

RAW 264.7 세포주에서 NO 생성량은 대조군을 16.1±1.5 uM로 나타냈을 때 정상군은 3.2±1.0 uM, CHP 추출물은 1 ㎍/㎖ 농도에서 16.4±1.7 uM, 10 ㎍/㎖ 농도에서 17.0±1.1 uM, 100 ㎍/㎖ 농도에서 17.2±3.4 uM로 측정되었다.

2) 사이토카인 생성량에 미치는 영향

(1) IL-1β

RAW 264.7 세포주에서 IL-1β 생성량은 대조군이 48.0±6.2 pg/㎖인 반면, 정상군은 12.6±1.0 pg/㎖, CHP 추출물은 1 ㎍/㎖ 농도에서 40.8±6.4 pg/㎖, 10 ㎍/㎖ 농도에서 43.3±2.8 pg/㎖, 100 ㎍/㎖ 농도에서 39.0±6.6 pg/㎖로, 대조군에 비하여 모든 농도에서 감소하였다.

(2) IL-6

RAW 264.7 세포주에서 IL-6 생성량은 대조군이 1021.8±140.9 pg/㎖인 반면, 정상군은 17.1±1.0 pg/㎖, CHP 추출물은 1 ㎍/㎖ 농도에서 938.4±82.2 pg/㎖, 10 ㎍/㎖ 농도에서 796.8±82.9 pg/㎖, 100 ㎍/㎖ 농도에서 891.7±98.6 pg/㎖로, 대조군에 비하여 모든 농도에서 감소하였으며 10 ㎍/㎖ 농도에서 유의성 있게 (* : $p<0.05$) 감소하였다(Fig. 2).

(3) TNF-α

RAW 264.7 세포주에서 TNF-α 생성량은 대조군이 5905.3±237.2 pg/㎖인 반면, 정상군은 573.0±52.3 pg/㎖, CHP 추출물은 1 ㎍/㎖ 농도에서 5658.3±332.7 pg/㎖, 10 ㎍/㎖ 농도에서 5413.8±199.2 pg/㎖, 100 ㎍/㎖ 농도에서 5875.3±199.1 pg/㎖로, 대조군에 비하여 모든 농도에서 감소하였다.

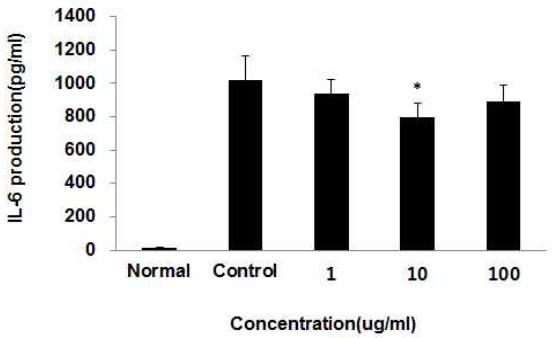

Fig. 2. Effect of CHP extract on LPS-induced IL-6 production in RAW 264.7 cells. Raw 264.7 cells were treated with 1, 10 and 100 (㎍/㎖) of CHP extract in the presence of LPS (1 ㎍/㎖) for 24hr. The results were expressed as mean ± S.D. from three independent experiments (Significance of results: ** : p<0.05).

5. 체중에 미치는 영향

체중의 증가에 미치는 영향을 측정한 결과, 정상군은 실험 시작 시 22.70±0.45 g에서 종료 후 25.51±0.69 g, 대조군은 실험 시작 시 49.19±1.18 g에서 종료 후 54.57±0.83 g인 반면, CHP 투여군은 실험 시작 시 49.78±1.88 g에서 종료 후 51.70±1.53 g로, CHP 투여군은 대조군에 비하여 체중 증가량이 적었다.

Table 5. Effect of CHP Extract on Body Weight Gain in db/db Mice

	Normal	Control	CHP 400㎎/㎏
Initial body weght (g)	22.70±0.45	49.19±1.18	49.78±1.88
Final body weight (g)	25.51±0.69	54.57±0.83	51.70±1.53
Weight gain (g)	+2.81	+5.38	+1.92

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

6. 식이 섭취량에 미치는 영향

식이 섭취량에 미치는 영향을 측정한 결과, 대조군은 실험 시작 8주령에서 280 g, 9주령에서 302 g, 10주령에서 304 g, 실험 종료 11주령에서는 297 g인 반면, 정상군은 실험 시작 8주령에서 157 g, 9주령에서 158 g, 10주령에서 167 g, 실험 종료 11주령에서는 177 g로, CHP 400 ㎎/㎏ 투여군은 실험 시작 8주령에서 235 g, 9주령에서 174 g, 10주령에서 180 g, 실험 종료 11주령에서는 209 g로 대조군에 비하여 식이 섭취량이 감소하였다.

7. 혈당 변화에 미치는 영향

혈당 변화에 미치는 영향을 측정한 결과, 대조군은 실험 시작 8주령에서 264.4±133.6 ㎎/㎗, 9주령에서 389.6±62.6 ㎎/㎗, 10주령에서 509.9±74.2 ㎎/㎗, 실험 종료 11주령에서는 598.4±4.6 ㎎/㎗인 반면, 정상군은 실험 시작 8주령에서 145.3±17.4 ㎎/㎗, 9주령에서 152.7±12.5 ㎎/㎗, 10주령에서 145.4±7.3 ㎎/㎗, 실험 종료 11주령에서는 146.1±9.4 ㎎/㎗로 나타났으며, CHP 400 ㎎/㎏ 투여군은 실험 시작 8주령에서 269.7±71.3 ㎎/㎗, 9주령에서 295.0±63.2 ㎎/㎗, 10주령에서 398.7±56.5 ㎎/㎗, 실험 종료 11주령에서는 372.5±112.1 ㎎/㎗로 대조군에 비하여 감소하였다. 또한, 실험 시작과 종료 주의 혈당 수치 변화를 확인한 결과 대조군은 334.0 ㎎/㎗의 수치가 증가한 반면, 정상군은 0.9 ㎎/㎗, CHP 400 ㎎/㎏ 투여군은 102.8 ㎎/㎗의 혈당 변화로 대조군에 비하여 감소하였다(Table 6).

Table 6. Effect of CHP on Chage of Blood Sugar in db/db Mice

	Normal	Control	CHP
Initial Blood Sugar (㎎/㎗)	145.3±17.4	264.4±133.6	269.7±71.3
Final blood sugar (㎎/㎗)	146.1±9.4	598.4±4.6	372.5±112.1
Change of blood sugar (㎎/㎗)	+0.9	+334.0	+102.8

8. 장기 무게 변화

장기 무게 변화에 미치는 영향을 측정한 결과, 대조군의 실험 종료 후 간의 무게는 2.68±0.29 g, 지방의 무게는 2.24±0.25 g, 신장의 무게는 0.50±0.07 g인 반면, 정상군의 실험 종료 후 간의 무게는 1.33±0.20 g, 지방의 무게는 0.38±0.08 g, 신장의 무게는 0.31±0.01 g이고, CHP 400 ㎎/㎏ 투여군의 실험 종료 후 간의 무게는 1.87±0.22 g, 지방의 무게는 1.12±0.58 g, 신장의 무게는 0.31±0.07 g이였다.

9. 혈중 콜레스테롤에 미치는 영향

1) 총 콜레스테롤 함량

혈청 내 총 콜레스테롤 함량을 측정한 결과, 대조군은 197.50±28.10 ㎎/㎗인 반면, 정상군은 97.14±12.54 ㎎/㎗, CHP 400 ㎎/㎏ 투여군은 120.00±30.33 ㎎/㎗로, 대조군에 비하여 유의성 있게 (** : p<0.01) 감소하였다(Fig. 3).

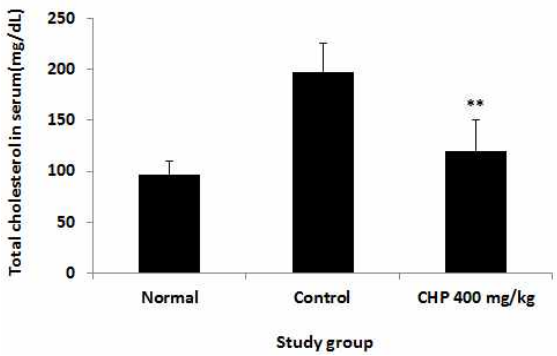

Fig. 3. Effect of CHP extract on the serum total cholesterol level in db/db mice. The results were expressed as mean ± S.D(Significance of results, ** : p <0.01) (n = 8). Normal : non-diabetic mice. Control : db/db mice were treated orally with DW. CHP 400 ㎎/㎏ : db/db mice were treated orally with 400 ㎎/㎏/day at CHP.

2) HDL-C 함량

혈청 내 HDL-C 함량을 측정한 결과, 대조군은 25.00±5.77 ㎎/㎗인 반면, 정상군은 20.00±5.77 ㎎/㎗, CHP 400 ㎎/㎏ 투여군은 35.00±4.50 ㎎/㎗로, 대조군에 비하여 증가하였다(Fig. 4).

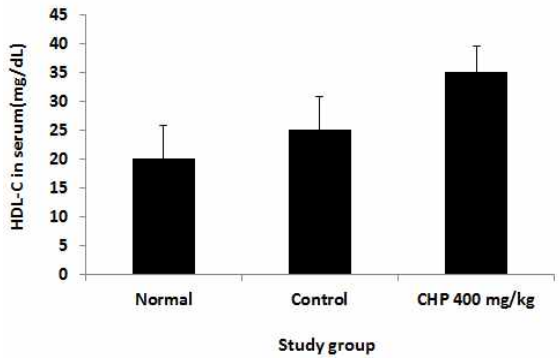

Fig. 4. Effect of CHP on the level of HDL-cholesterol in the serum of db/db mice. The results were expressed as mean ± S.D. (n = 8). Normal : non-diabetic mice. Control : db/db mice were treated orally with DW. CHP 400 ㎎/㎏ : db/db mice were treated orally with 400 ㎎/㎏/day at CHP.

3) LDL 콜레스테롤 함량

혈청 내 LDL-C 함량을 측정한 결과, 대조군은 163.2±30.85 ㎎/㎗인 반면, 정상군은 136.71±10.19 ㎎/㎗, CHP 400 ㎎/㎏ 투여군은 127.6±23.18 ㎎/㎗로 , 대조군에 비하여 감소하였다(Fig. 5).

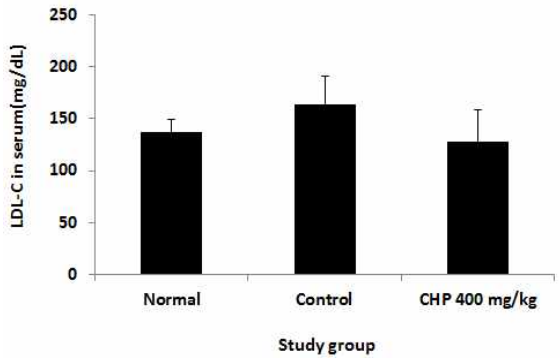

Fig. 5. Effect of CHP on the level of LDL-cholesterol in the serum of db/db mice. The results were expressed as mean ± S.D. (n = 8). Normal : non-diabetic mice. Control : db/db mice were treated orally with DW. CHP 400 ㎎/㎏ : db/db mice were treated orally with 400 ㎎/㎏/day at CHP.

4) Triglyceride(TG) 함량

혈청 내 triglyceride 함량을 측정한 결과, 대조군은 대조군은 256.00±82.66 ㎎/㎗인 반면, 정상군은 140.00±51.38 ㎎/㎗, CHP 400 ㎎/㎏ 투여군은 133.33±29.44 ㎎/㎗로, 대조군에 비하여 유의성 있게 (** : p<0.01) 감소하였다(Fig. 6).

10. 동맥경화지수 및 심혈관 위험지수에 미치는 영향

동맥경화지수를 측정한 결과, 대조군은 6.90±0.08 ㎎/㎗인 반면, 정상군은 3.86±0.04 ㎎/㎗, CHP 400 ㎎/㎏ 투여군은 2.83±0.04 ㎎/㎗로, 대조군에 비하여 유의성 있게 (*** : p<0.001) 감소하였다(Table 7). 또한, 심혈관 위험지수를 측정한 결과, 대조군은 7.90±0.12 ㎎/㎗인 반면, 정상군은 4.86±0.13 ㎎/㎗, CHP 400 ㎎/㎏ 투여군은 3.43±0.10 ㎎/㎗로, 대조군에 비하여 유의성 있게 (*** : p<0.001) 감소하였다(Table 7).

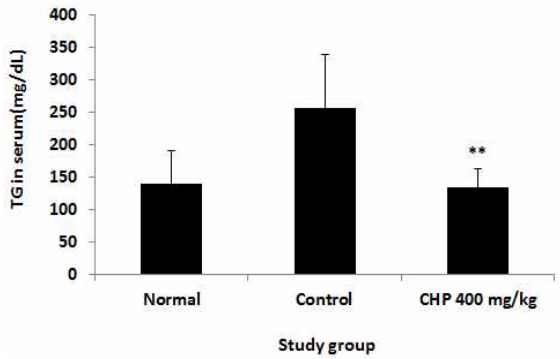

Fig. 6. Effect of CHP on the level of triglyceride in the serum of db/db mice. The results were expressed as mean ± S.D(Significance of results, ** : p<0.01) (n = 8). Normal : non-diabetic mice. Control : db/db mice were treated orally with DW. CHP 400 ㎎/㎏ : db/db mice were treated orally with 400 ㎎/㎏/day at CHP.

Table 7. AI and CRF of Serum in db/db Mice Containing CHP for 4 weeks

	Normal	Control	CHP
AI	3.86±0.04	6.90±0.08	2.83±0.04 ***
CRF	4.86±0.13	7.90±0.12	3.43±0.10 ***

Values are mean±SD of 8 mice per group. (Significance of results, *** : p<0.001) (n = 8) AI ; atherogenic index, CRF ; cardiac risk factor. Normal : non-diabetic mice. Control : db/db mice were treated orally with DW. CHP 400 ㎎/㎏ : db/db mice were treated orally with 400 ㎎/㎏/day at CHP

11. 간 기능에 미치는 영향

1) Aspartate aminotransferase (AST) 함량

간 기능 측정의 지표 성분인 AST를 측정한 결과, 대조군은 220.00±42.43 IU/L인 반면, 정상군은 136.67±79.70 IU/L, CHP 400 ㎎/㎏투여군은 192.00±31.80 IU/L로 대조군에 비하여 감소하였다.

2) Alanine aminotransferase (ALT) 함량

간 기능 측정의 지표 성분인 ALT를 측정한 결과, 대조군은 87.50±5.00 IU/L인 반면, 정상군은 87.14±7.56 IU/L, CHP 400 ㎎/㎏투여군은 86.40±3.40 IU/L로, 그룹간의 차이가 없었다.

3) Alkaline Phosphatase (ALP) 함량

간 기능 측정의 지표 성분인 ALP를 측정한 결과, 대조군은 230.78±6.61 IU/L인 반면, 정상군은 99.48±5.2 IU/L, CHP 400 ㎎/㎏투여군은 124.16±8.69 IU/L로, 대조군에 비하여 유의성 있게 (** : p<0.01) 감소하였다.

12. 신 기능에 미치는 영향

1) Creatinine (Cr) 함량

신 기능 측정의 지표 성분인 creatinine을 측정한 결과, 대조군은 1.40±0.04 ㎎/㎗인 반면, 정상군은 0.97±0.05 ㎎/㎗, CHP 400 ㎎/㎏투여군은 1.10±0.04 ㎎/㎗로 대조군에 비하여 감소하였다.

2) Blood urea nitrogen (BUN) 함량

신 기능 측정의 지표 성분인 BUN을 측정한 결과, 대조군은 20.38±5.45 ㎎/㎗인 반면, 정상군은 24.44±3.15 ㎎/㎗, CHP 400 ㎎/㎏투여군은 23.50±2.35 ㎎/㎗로 그룹간의 차이가 없었다.

13. 혈청 내 인슐린 생성량에 미치는 영향

혈청 내 인슐린 생성량을 측정한 결과, 대조군은 118.51±19.27

μU/㎖인 반면, 정상군은 80.76±6.92 μU/㎖, CHP 400 ㎎/㎏ 투여군은 154.65±21.30 μU/㎖로, 대조군에 비하여 증가하였다.

14. 혈청 내 GLP-1 생성량에 미치는 영향

혈청 내 GLP-1 생성량을 측정한 결과, 대조군은 7.94±0.75 pg/㎖인 반면, 정상군은 12.67±0.98 pg/㎖, CHP 400 ㎎/㎏ 투여군은 11.86±1.62 pg/㎖로, 대조군에 비하여 증가하였다.

15. 조직 염색 관찰

1) 간

실험 종료 후 간 조직에 H & E 염색 후 관찰한 결과, 대조군은 간 세포에서 지방공포가 관찰되며, 이로 인해 세포의 핵이 세포질 내에서 가장자리로 밀려난 것을 확인할 수 있고, 정상군에 비해 쿠퍼세포의 수도 현저한 감소를 보였다. 이에 반해 CHP 400 ㎎/㎏ 투여군은 간 세포내의 지방공포로 인해 세포의 크기는 커져있긴 하지만, 대조군에 비하여 지방공포가 적어졌으며, 세포핵도 중앙에 위치해 있는 것을 확인하였다(Fig. 7).

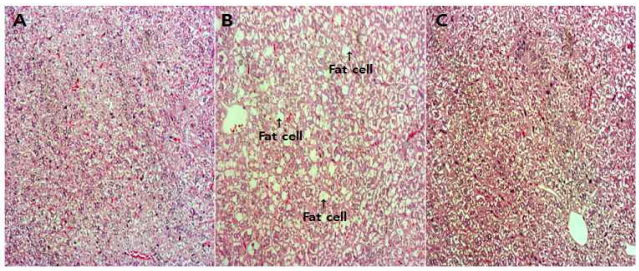

Fig. 7. Standard Hematoxylin-Eosin staining of liver from db/db mice. original magnification (Zeiss, ×2.5). (A) ; Normal ; Normal C57BL/6J mice group (B) ; Control ; db/db mice group treated with DW (C) ; CHP ; db/db mice group treated with CHP 400 ㎎/㎏

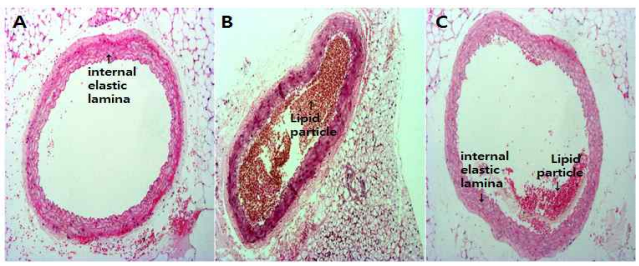

Fig. 8. Standard Hematoxylin-Eosin staining of aortas from db/db mice. original magnification (Zeiss, ×10). (A) ; Normal ; Normal C57BL/6J mice group (B) ; Control ; db/db mice group treated with DW (C) ; CHP ; db/db mice group treated with CHP 400 ㎎/㎏

2) 대동맥

실험 종료 후 대동맥 조직을 H & E 염색하여 관찰한 결과, 대조군은 대부분이 내막하 공간 (subintimal space)에서 지질 입자 (lipid particle)가 모인 지질 핵심 (lipid core)이 보이며, 그 위를 덮고 있는 내막 세포의 변형과 배열이 구분되지 않았고 내막이 상대적으로 두꺼워져 있는 것을 확인하였다. 이에 반해, CHP 400 ㎎/㎏ 투여군에서는 내막이 비교적 얇고 두께가 고르며 고배율에서 내막과 내부 탄력층 (internal elastic lamina), 중막 등의 각층이 명확히 구분되어 있었으며, 지질 입자가 대조군에 비하여 적게 나타났음을 확인하였다(Fig. 8).

고 찰

전 세계적으로 연간 1,700만명에 해당하는 인구가 심혈관계 질환으로 사망하며, 이는 전체사망원인의 30%를 차지할 정도로 질병부담이 크다. 선진국에서는 지난 수십 년 동안 이에 의한 사망이 감소하고 있지만, 우리나라 30세 이상 성인인구의 관상동맥질환 유병률은 1998년에는 1%미만에서 10여년이 지난 2010년에는 2.5% 정도로 국내에서는 오히려 빠르게 증가하고 있다[14,15]. 또한 심뇌혈관계질환에 가장 많은 영향을 미치는 위험인자는 고혈압, 고지혈증, 흡연, 당뇨병으로 확인되었다[16].

고지혈증이란 혈중 total cholesterol 또는 LDL-cholesterol, TG 농도의 증가와 HDL-cholesterol의 농도의 감소를 의미하는 것으로 관상동맥질환의 발생을 증가시키는 이상지질혈증을 말하며 이를 조절하며 죽상경화증에 의한 관상동맥 질환을 예방하는 것이 치료의 목표가 된다[4]. 최근 statin 치료 등 많은 중재적 연구 결과들을 보면, LDL-cholesterol의 감소에 따라 약 25-30%의 심혈관질환이 감소하며, 혈중 LDL-cholesterol이 가장 중요한 치료목표로서 1mg/dL 감소에 따라 심혈관질환 위험도가 0.5-2% 감소함을 알 수 있다. 그러나 LDL-cholesterol 수치가 높지 않더라도 중성지방이 높고 HDL-cholesterol이 낮은 죽상경화 호발성 이상지질혈증의 경우, LDL-cholesterol이 증가하고 죽상경화가 발생, 진행되는 위험이 높아지므로 관상동맥 심장질환의 위험도를 감소시키기 위해서는 혈중 중성지방과 HDL-cholesterol의 관리 및 조절이 필요하다[17].

체내 과도한 지방의 축적과 혈중 지질농도의 증가는 당뇨병, 고혈압 및 심혈관질환을 포함한 만성질병을 유발하는 원인으로 알려져 있으며, 당뇨병과 고지혈증은 동맥경화의 위험인자가 된다. 고지혈증과 고혈당 상태는 세포내 해당계의 항진으로 혈관 내피에 대해 조직장애성을 갖는 활성산소의 생산을 촉진하는 등 내피기능의 장애를 일으킨다. 이러한 내막 손상을 계기로 혈액 속에서 지질의 수송을 담당하는 리포단백의 하나인 저비중 지질단백 LDL은 혈관벽 안의 세포외 기질과 쉽게 결합하여 동맥벽으로 침입한다. 혈관벽 안에 자리잡은 LDL은 대식세포로 인해 산화LDL로 변화하고, 이러한 산화스트레스는 혈관내피세포를 자극하여 손상을 입은 내피로 혈액 속에서 백혈구를 유도하며 사이토카인을 생성한다. 따라서 고지혈증과 당뇨병의 개선은 동맥경화를 억제하며 관상동맥질환의 발병률을 낮추는 것으로 밝혀져 있다[18].

고지혈증의 양방적 치료는 LDL-cholesterol이 높은 경우에는 이차적 원인을 제거하고 스타틴, 니코틴산, 에제티미브, 담즙산 수지 등을 사용한다. 중성지방이 높고 HDL-cholesterol이 낮은 경우 체중감소, 운동 등을 적극 권하고 LDL-cholesterol이 정상화 된 후에도 중성지방의 농도가 계속 높은 경우에는 피브르산 유도체나 니코틴산, 오메가-3 지방산을 사용한다. 그러나 소화장애, 속쓰림, 간독성, 근육병증 및 콜레스테롤 담석 발생 등의 부작용이 유발될 수 있어 주의가 필요하다[17].

고지혈증은 한의학적으로 痰濁, 瘀血, 濕熱의 범주에 속하고 肝脾腎機能失調의 內因과 嗜食肥甘厚味의 外因에 의해 發病한다고 보았으며 肝脾腎虛는 本虛에, 痰濕 瘀血은 標實에 속하는 本虛標實證으로 볼수 있다. 따라서 治法 으로는 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 원리를 응용할 수 있으며 治方은 補益藥, 活血化瘀藥, 利濕化瘀藥 등이 相伍相合되어 구성되어 있는 것이 많다[19].

고지혈증과 관련된 한의학적 연구로는 茵蔯蒿[20], 枳實[21] 등의 단미제와 加味防風通聖散[22], 加味除濕順氣湯[23] 등의 처방에 관한 실험적 연구가 있다. 하지만 현재 이들 처방은 고지혈증의 치료에 적극적으로 활용되지 못하는 실정으로 대부분 양방제제에 의존하고 있으나, 최근 연구에서는 양방제제 또한 장기적으로 투여했을 때 간손상 등의 안전성 문제가 제기되고 있다[24]. 따라서 저자는 비교적 안전성이 높은 천연물로서 실험적 연구를 통해 고지혈증에 대한 효능이 있다고 밝혀진 한약제재로 구성된 복합추출물이 고지혈증에 미치는 영향을 알아보고자 연구를 진행하게 되었다.

丹蔘은 活血去瘀, 凉血消腫의 효능이 있어 月經不調, 經閉 등의 부인과 질환과 心腹疼痛, 癥瘕積聚, 心煩失眠 등에 사용하고 있으며 최근에 와서는 肝脾腫大와 관상동맥 경화성 심장병, 고혈압 및 혈전폐색성 맥관염에 좋은 효과가 있다고 알려져 있다[25]. 丹蔘에 관한 연구로는 항암, 항염증작용과 심혈관계 질환에 대한 연구가 있으며 동물실험에서 총 콜레스테롤을 감소시켜 고지혈증을 개선시키는 효능이 보고되어 있다[10]. 茵蔯은 淸熱利濕하는 효능이 있어 黃疸, 痰結石, 濕瘡등에 사용되어 왔으며[25] 장[11]은 고지혈증 병태모델에서 인진의 항고지혈증 및 항산화 효과를 밝힌 바 있다. 鬱金은 活血止痛, 行氣解鬱하는 효능이 있어 胸腹脇痛, 通經, 癥瘕積聚 등의 증상에 다용되어왔다[25]. 鬱金의 대표적인 성분인 커큐민(curcumin)은 고지혈 모델에서 담즙분비 촉진을 통하여 혈중 콜레스테롤 농도를 감소시키는 것으로 보고되어 있으며[26], 이는 박[12]등의 연구에서도 항산화 효과와 함께 항고지혈증 효과가 있음이 확인되었다. 또한 이[27]의 연구를 통해 한인진과 울금의 복합추출물이 고지방식이로 유발된 백서에서 항고지혈증과 항비만효과가 있으며, 신[28]은 서양식이로 유발된 아포지단백질 E-결손 마우스의 동맥경화 모델에서 한인진과 울금의 복합추출물의 지질저하, 항산화, 항염증 작용을 통해 항동맥경화가 있음을 보고한바 있다. 山査는 消食健脾, 行氣散瘀하는 효능이 있어 肉食積滯, 胃脘脹滿 등의 소화기 증상에 多用되어 왔으며 强心, 혈압강하, 관상동맥확장작용이 있어 고지혈증, 죽상동맥경화증에 응용해왔다[25]. 山査는 중성지방과 glucose의 장내 흡수를 억제하고, 인슐린 저항성과 중성지방의 합성을 감소시켜 고지혈증 및 당뇨를 개선시키는 작용이 있음이 동물 실험을 통해 확인된 바 있다[29]. 박[13]의 연구에서도 고지방식이 유도 동물모델에서 총콜레스테롤, 중성지질, LDL-cholesterol의 증가를 억제하고 HDL-cholesterol은 상승시켜 체내 지질 대사의 개선에 유효한 것으로 밝혀졌다.

활성산소는 인체대사에 유익한 작용을 가지고 있지만 환경오염과 자외선, 화학물질, 스트레스, 혈액순환장애 등으로 과다할 경우에는 동맥경화, 암, 파킨슨병, 류마티스 관절염, 백내장 및 노인성 치매와 같은 질환 등을 유발시킨다. 활성산소의 과다한 생성은 체내 DNA 손상과 지질의 과산화로 인한 세포막의 손상, 단백질의 산화 등을 가져오며 지질의 과산화, 특히 LDL-cholesterol의 산화적 변형을 일으킴으로써 동맥경화 등 심혈관질환의 초기 발생과 진행에 핵심적인 역할을 하게 된다[30]. 또한 산화적 스트레스는 NO 및 IL-1β, TNF -α, IL-6등의 사이토카인과 같은 염증관련인자들의 발현과 생성을 유발 및 증가시킨다[31].

이상의 논의를 바탕으로 저자는 고지혈증을 瘀血과 痰濕의 개념으로 인식하고 活血去瘀, 利濕化痰의 효능을 가지고 다수의 선행연구를 통해 고지혈증에 대한 유효성이 확인된 약재로 구성된 복합추출물 CHP를 이용하여 항산화 및 항고지혈증 효과를 실험적으로 규명하고자 실험을 진행하였다. In vitro에서 CHP추출물을 RAW 264.7 세포를 이용하여 세포독성과 항산화활성 및 염증성 사이토카인 생성량을, in vivo에서 당뇨 모델 동물인 8주령의 수컷 db/db 생쥐를 이용하여 혈청 holesterol, triglyceride, insulin, GLP-1, glucose, 식이섭취량, 체중, 장기무게, AST, ALT, ALP, BUN, creatine, 간과 대동맥의 조직 등을 관찰하였다.

CHP의 안전성 검증을 위하여 중금속 함량과 RAW264.7 세포에 대한 세포독성을 관찰한 결과 납, 카드뮴, 수은의 경우 기준치 이하로 검출되었고 비소는 검출되지 않았으며 세포독성은 모두 99% 이상의 세포생존율을 보여 안전한 것으로 평가되었다(Table 2).

CHP가 산화적 손상에 미치는 영향을 알아보기 위해 총 페놀 및 플라보노이드 함량, DPPH radical과 ABTS radical 소거능 및 ROS 생성량을 측정하였고, NO와 염증성 사이토카인 생성량을 측정하여 항염증 효능을 평가하였다.

페놀성 화합물은 식물계에 흔히 존재하는 2차 대사물의 하나로 폴리페놀은 reactive free radical에 수소원자를 제공하여 안정한 non-radical을 만들어 항산화작용, 항암 및 콜레스테롤 저하효과 등 다양한 생리활성을 나타낸다. 플라보노이드는 항균, 항암 및 항염증 활성 등이 있으며, 종류나 함량에 따라 서 항산화 활성에 미치는 영향이 크다고 알려져 있다[32]. DPPH assay는 빠르고 간단하여 항산화능을 측정하기 위해 널리 사용되는 방법이다. DPPH는 짙은 보라색을 나타내는 활성산소의 하나로 항산화 활성이 있는 물질과 만나면 hydrogen radical의 전자를 받아들이면서 환원되어 짙은 보라색이 엷어지는데, 색깔이 엷어지는 정도는 DPPH radical 소거능이 큰 것을 의미한다[33]. ABTS assay는 DPPH와 같이 radical 소거법에 의한 항산화능 측정법이라는 점은 같지만, 화학반응을 통하여 free radical이 유발된 용액에 시료를 첨가하여 항산화능을 측정한다는 점에서 다르며, 단시간에 측정할 수 있고,[34] 소수성과 친수성 모두에 적용 가능하다[35].

CHP추출물에 존재하는 총 페놀 함량은 291.3±3.3 ㎎/g, 플라보노이드 함량은 114.9±2.7㎎/g 로 측정되었고, CHP 추출물을 1, 10, 100, 1,000 (㎍/㎖)의 농도로 희석한 후 DPPH radical 소거능 및 ABTS radical 소거능을 측정한 결과, 모든 농도에서 농도의존적으로 증가하였다. 따라서 CHP는 항산화 효능을 가진다고 생각할 수 있다(Table 3 & Table 4).

ROS는 세포 내에 존재하는 효소에 의해 생성되는 O_2 등을 말하며 이는 산화적 손상을 일으키는 주된 원인이다. ROS중 superoxide radical은 생체 내에서 산소를 이용하는 정상적인 대

사과정에서 생성될 뿐 아니라, organic compound 들의 자동산화나 외부로부터 들어온 이물질에 대한 대식세포의 탐식작용과 효소반응에 의해서도 생성될 수 있다.[36] NO는 내피세포, 호중구 등에서 nitric oxide synthase(NOS) 효소의 촉매작용을 통해 L-arginine에서 생성되는 free radical로 반응성이 강하며 대부분의 기관에서 intercelluar messenger로서 작용한다. 또한 혈관의 항상성이나 혈관 내피세포에 백혈구나 혈소판의 부착을 억제하거나 혈소판 응집을 억제하는 등 생리적인 현상에 관여하고 신경전달 매개체로 작용한다. 면역계에서는 대식세포와 미생물의 방어에 관여하며 면역반응에 중추적인 역할을 하고 있다. 그러나 최근에 과량의 NO 생성이 염증반응과 조직의 파괴, 면역체계의 이상을 일으키며, superixide 음이온(O_2-)과 쉽게 반응하여 반응성이 매우 높고 독성이 강한 산화제인 peroxynitrite (ONOO-)를 생성하는데, Peroxynitrite는 단백질 및 지질의 과산화를 유도하고, 세포독성을 일으킨다고 보고되고 있다[37,38]. CHP의 항산화 및 항염증 효능을 알아보고자 ROS와 NO 및 전염증성 매개물질인 TNF-α, IL-6 등과 같은 사이토카인을 Raw 264.7 세포를 사용하여 측정하였다. Raw 264.7 세포는 마우스유래 대식세포주로, 병원균의 내독소로 알려진 LPS에 의해 활성화되며 다양한 산화적 매개체뿐 아니라 염증관련 인자를 방출하는 것으로 알려져 있다[39].

사이토카인은 많은 세포에서 생산하는 폴리펩티드로 염증과 면역반응에서 매개체의 기능을 하며 IL-6, IL-1β, TNF-α는 대식세포에서 생산되는 대표적인 염증성 사이토카인으로 염증반응은 죽상경화의 발생과 진행, 경화반의 미란과 파열에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 죽상경화가 진행되면 경화반내 활성화된 T임파구에서 IL-2, IL-γ, TNF-α 등이 분비되고 대식세포와 내피세포에서는 IL-1과 같은 사이토카인이 분비된다. 이중 TNF-α와 IL-1은 염증성 사이토카인이라고 하는데, 이는 혈관내벽에 백혈구의 접착 및 염증세포의 침윤을 증가시키는 염증반응을 촉진하는 역할을 하기 때문이며, 내피세포의 접착분자에 의해 경화반 생성이 시작되는 단계에서도 중요한 역할을 한다[40]. 또한 이러한 염증성 사이토카인들은 최근 비만에 대한 연구를 통해 비만으로 인해 과잉 축적된 지방조직에서도 분비되며, 생체 면역계, 대사증후군 및 인슐린 저항성과 깊은 관련이 있는 것으로 알려져 있다[41].

RAW 264.7 세포에서 ROS와 NO의 생성량을 측정한 결과 ROS의 생성량은 대조군에 비해 10μg/ml 농도에서 유의성 있게 ($p<0.05$) 감소하였고(Fig. 1), NO의 생성량은 대조군에 비해 감소하긴 했으나 유의성은 없었다. 이로 미루어 볼 때 CHP는 세포내 항산화 활성을 증가시키는 것으로 보인다. 또한 RAW 264.7 세포에서 산화적 스트레스로 인해 발현된 염증성 사이토카인 IL-1β, TNF-α, IL-6의 생성량에 미치는 영향을 알아본 결과 IL-1β와 TNF-α 생성량은 대조군에 비하여 모든 농도에서 감소하였으나 유의성은 없었고, IL-6 생성량은 모든 농도에서 감소하였으며 10 μg/ml 농도에서 유의성 있게 ($p<0.05$) 감소하였다(Fig. 2). 따라서 CHP가 염증성 사이토카인의 생성을 억제하는 것으로 보아 산화적 스트레스로 인한 염증 질환에도 유의하게 작용함을 객관적으로 확인할 수 있었다.

비만, 특히 중심성 비만은 인슐린 저항성을 유발하는 가장 큰 원인으로 주목받고 있으며, 최근 많은 연구를 통하여 비만과 인슐린 저항성 그리고 만성 염증상태는 서로 깊은 관련이 있다는 것이 밝혀졌다. GLP-1은 위장관 호르몬(incretin)중 하나로 장관 내 영양분의 자극에 의해 분비되며, 췌도세포의 인슐린 분비를 촉진하고 위장관 운동을 저하시켜 식욕을 억제하는 기능이 있다. 이러한 작용은 체중의 감소로 이어져 제 2형 당뇨환자에게 투여시 혈당강하와 체중감소의 효과가 함께 나타나며, 그 중에서도 체간의 지방량 감소가 뚜렷하다고 밝혀져 있다[42].

Db/db 마우스는 시상하부에 위치한 비만 호르몬 leptin의 수용체인 Ob-Ra에 돌연변이를 일으켜 시상하부에서 leptin의 신호전달과정에 결함이 생겨 과도한 먹이 섭취, 지방 축적이 일어나 제2형 당뇨와 유사한 형태의 비만증, 고인슐린혈증, 고혈당 등을 특징으로 하는 동물이다. CHP가 비만 및 당대사에 미치는 영향을 알아보기 위하여 쥐의 체중 변화와 장기무게, 식이섭취량 및 혈당을 측정한 결과 CHP 투여군의 식이섭취량은 대조군보다 적었고 그에 따라 체중증가량도 낮았으며, 간과 신장, 지방의 무게도 대조군보다 모두 낮게 측정되었다(Table 5). 또한 혈당수치의 변화를 확인한 결과 CHP 투여군은 대조군에 비하여 혈당 상승 정도가 낮았으며 (Table 6), 실험 종료 후 혈청 내 인슐린과 GLP-1 생성량을 측정한 결과 인슐린과 GLP-1생성량 모두 대조군에 비하여 증가하였다.

이를 통해 CHP는 비만 및 당대사의 개선에도 효과가 있다고 생각되며 CHP 투여군에서 보여진 혈중 인슐린농도와 GLP-1의 상승은 공복혈당을 감소시키고 혈중 중성지방농도를 감소시킬 수 있는 것으로 보아 췌장기능을 부분적으로 회복시켜 인슐린 분비능이 증가하고, 이러한 인슐린 분비 촉진이 혈중 유리지방산의 농도와 체내 지방 산화를 감소시킴으로써 말초조직에서 인슐린 감수성을 호전시켰을 것으로 생각해볼 수 있으나 기전에 대한 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

CHP의 고지혈증에 대한 효과를 알아보기 위하여 혈청 cholesterol과 triglyceride를 측정하였고 간과 신장에 미치는 영향을 알아보기 위해 AST, ALT, ALP와 BUN, Creatinine을 측정하고, 간과 대동맥의 조직검사를 시행하였다.

콜레스테롤은 세포막의 구성요소이며, steroid hormone과 vitamin D의 전구물질로서 생체 내에서 필요불가결한 성분이지만, 고지혈증, 동맥경화증, 심장질환과 담석증 등 각종 심장 순환기계 질환의 원인이 된다[43]. 또한 혈청 중성지방의 농도 저하는 모세혈관 벽에 존재하는 lipoprotein lipase가 chylomicron과 VLDL의 분해를 촉매하게 한다[44]. HDL-cholesterol은 말초조직 및 혈관 벽에 축적된 콜레스테롤을 이화, 제거하여 콜레스테롤 에스테르로 만들어 간장으로 운반하여 담즙산으로 배설시킴으로써 혈중 콜레스테롤 농도를 저하시킨다[45]. 또한 개개인의 지단백 농도보다 총 콜레스테롤에 대한 HDL-cholesterol의 비율이 심장 질환의 위험도 정도를 더 확연하게 나타내 준다는 보고가 있다[46,47]. 따라서 HDL-cholesterol의 상승은 고지혈증이 개선되었음을 표현하는 지표가 된다[43].

CHP가 콜레스테롤 변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험 종료 후 혈청 내의 화학적 성분을 측정한 결과 total cholesterol과 triglyceride는 CHP 투여군에서 대조군에 비해 유

의성 있게 ($p<0.01$) 감소하였다(Fig 3. Fig 6). 또한 HDL-cholesterol은 CHP 투여군에서 대조군에 비하여 증가하였으나 유의성은 없었고(Fig. 4), LDL-cholesterol는 대조군에 비하여 감소하였으나 유의성은 없었으나(Fig. 5), 총 콜레스테롤과 중성지방이 유의하게 감소한 것으로 보아 CHP가 혈청 내 지질에 대한 유의성 있는 조절 효과가 있음을 알 수 있었다. 심혈관계 질환의 위험도 판정에 이용되는 동맥경화지수(AI)와 심혈관위험지수(CRF) 또한 CHP의 투여로 유의하게($p<0.001$) 감소하였으며(Table 7) 따라서 CHP는 혈청내 지질대사를 개선하며 이를 통해 심혈관계 질환의 위험을 감소시키는 효과가 있는 것으로 생각된다.

간 기능과 신 기능에 CHP가 미치는 영향을 관찰한 결과 대조군에 비하여 CHP 투여군에서 AST는 감소하였으나 유의성은 없었고, ALT는 그룹 간에 차이가 없었으며, ALP는 유의성 있게 ($p<0.01$) 감소하였다. 또한 BUN은 감소하였으나 유의성은 없었으며, Creatinine의 경우 그룹 간에 차이가 없었다. 따라서 CHP는 간독성과 신독성이 없어 장기간의 복용이 가능 할 것으로 생각되며 ALP의 감소에 유의한 효과를 보인 것으로 보아 간, 담도 및 뼈 등 조직 손상의 억제에도 도움이 될 것으로 생각된다.

CHP가 간과 대동맥의 조직에 미치는 영향을 알아보기 위하여 실험 종료 후 간조직과 대동맥의 조직에 H&E 염색 후 관찰하였다. 그 결과 대조군의 간세포에서 지방조직의 축적에 의한 지방공포 병변 소견이 보이고 세포핵이 가장자리로 밀려난 반면, CHP 투여군에서는 대조군에 비하여 간 세포내 지방공포 병변이 감소하였으며, 간 세포핵이 중앙에 위치한 것이 관찰되었다. 또한 대조군에서는 정상군에 비해 쿠퍼세포의 수도 현저히 감소하였다. 대동맥 조직은 대조군에서는 대부분 내막하 공간에 지질 핵심이 관찰되고 내막 세포의 변형과 배열이 불규칙적이며 내막이 상대적으로 두꺼워져 있는 반면, CHP 투여군에서는 내막이 얇고 두께가 고르며 각 층이 명확히 구분되어있으며 지질 입자가 대조군에 비해 적게 나타났음을 관찰하였다. 따라서 CHP는 조직검사상 간과 대동맥을 보호하는 효과가 있음을 알 수 있다(Fig. 7. Fig. 8).

이상의 결과들을 종합해 보면, CHP는 세포독성이 없고 중금속 검사 결과 안전성이 확인되었으며, DPPH radical과 ABTS radical 소거능을 농도 의존적으로 증가시키고 ROS 생성량을 유의성 있게 감소시킨 것으로 보건대 항산화 활성의 증가에 유효한 효과를 가지며, NO 및 염증성 사이토카인을 감소시키는 것으로 보아 항염증 효과가 있는 것으로 생각된다. 당뇨모델인 db/db 생쥐에게 투여한 결과 체중과 장기무게, 혈당을 감소시키고 혈청 내 인슐린 및 GLP-1의 생성량을 증가시킨 것으로 보아 비만과 당대사에도 유효한 개선 효과가 있으며, Total cholesterol과 triglyceride를 유의성 있게 감소시키고 심혈관지수와 동맥경화지수 또한 유의하게 감소시킨 것으로 보아 CHP가 혈중 지질의 농도를 감소시켜 지질 대사를 개선하는 효과가 있음을 알 수 있었다. 간기능 및 신기능 검사 결과 간독성과 신독성이 없어 안전하다고 볼 수 있으며, 따라서 장기간 복용이 가능할 것으로 보인다. 또한 CHP는 간과 대동맥의 조직 검사 결과 고지혈증에 의한 지방의 축적을 억제하는 등 간과 대동맥을 보호하는 효과를 나타냈다.

따라서 CHP는 산화적 손상과 고지혈증을 억제하는데 유효하다고 볼 수 있으며, 지질 및 당 대사를 개선하여 고지혈증으로 인해 나타날 수 있는 죽상동맥경화증, 허혈성 심질환, 뇌졸중, 비만, 당뇨병 등의 예방과 치료에 응용할 수 있을 것으로 보인다. 향후 고지혈증을 비롯한 심혈관계 질환의 한의학적 치료를 위해 보다 심도 있고 지속적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결 론

청혈플러스가 고지혈증에 미치는 영향을 알아보기 위하여 당뇨 동물 모델인 8주령의 수컷 db/db 생쥐를 이용하여 in vitro에서 세포독성과 항산화활성, 염증성 사이토카인 생성량, in vivo에서 혈청 내 cholesterol과 triglyceride 수치 및 인슐린 농도와 GLP-1생성량, 혈당, 식이섭취량, 체중, 장기무게, 간과 신기능 수치, 간과 대동맥의 조직 등을 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

CHP는 세포독성이 없으며, 당뇨 모델 백서에서 장기간 투여에도 간독성 및 신독성이 없었다.

CHP는 DPPH radical 과 ABTS radical 의 소거 활성을 농도 의존적으로 증가시켰다.

CHP는 대조군에 비해 ROS 생성량을 유의성 있게 감소시켰으며 NO 생성량을 감소시켰다.

CHP는 대조군에 비해 사이토카인 IL-6 생성량을 유의성 있게 감소시켰으며 IL-1β와 TNF-α 생성량을 감소시켰다.

CHP는 당뇨 모델 백서의 체중 증가 및 식이섭취량을 억제시켰으며 간, 신장, 지방의 무게와 혈당을 감소시켰다.

CHP는 혈청 내 Total cholesterol, triglyceride를 유의성 있게 감소시켰으며 LDL-cholesterol을 감소시켰고, HDL-cholesterol을 증가시켰다.

CHP는 동맥경화지수와 심혈관위험지수를 유의성 있게 감소시켰다.

CHP는 혈청 내 인슐린과 GLP-1의 생성량을 증가시켰다.

CHP는 간의 조직학적 검사 결과 대조군에 비해 지방공포가 적어지고 세포핵을 중앙에 위치하는 호전현상을 보였다.

CHP는 대동맥의 조직학적 검사 결과 대조군에 비해 내막하 공간의 지질축적과 내막 손상을 억제하는 현상을 보였다.

이상의 결과로 미루어 보아 청혈플러스는 항산화 효능 및 항고지혈 효과가 있다고 사료되며 향후 동맥경화, 당뇨병, 허혈성 심장질환, 뇌졸중 및 기타 심뇌혈관계질환에 활용할 수 있는 치료제로 사용될 수 있도록 추가적인 연구가 필요하리라 사료된다.

References

1. Statics Korea. 2014 Report on the cause of death statistics. Available from: URL: http://kostat.go.kr/portal/korea/kor_nw/2/6/2/index.board?bmode=read&aSeq=348539
2. Ministry of Health & Welfare. 2014 National Health and Nutrition Examination Survey.Available from: URL http://www.mohw.go.kr/front_new/al/sal0301vw.jsp?PAR_

MENU_ID=04&MENU_ID=0403&page=16&CONT_SEQ=326126
3. Department of Internal Medicine. Seoul National University college of medicine. 2nd Edition SNUH Manual. Seoul: Korea Medical. p 507, 2014.
4. The Korean Association of Internal Medicine. Harrison's Principles of Internal Medicine 16th ed. Seoul: Publication MIP. pp 1559-1564, 2038-2040, 2058, 2500-2512, 2006.
5. Yang, Y.G. Hwangjenaegyeong Somunyeogseog. Seoul : IlJung Inc. pp 296, 397, 416, 611-612, 1991.
6. Son, B.D. Hyperlipidemia Treatment 47 Clinical Experiences. Shanghai Journal of Traditional Chinese Medicine. 8: 7-8, 1990.
7. Kim, D.H., Lim, S.M., Ahn, J.J., Jo, H.K., Yoo, H.R., Kim, Y.S., Seol, I.C. Effect of Sunhwangigagambang(SHG) on Hyperlipidemia in SD Rats Induced by High Cholesterol Diet. Korean J. Orient.Int. Med. 31(3):526-538, 2010.
8. Youn, H.D., Jo, H.K., Yoo, H.R., Seol, I.C.H., Kim, Y.S. The Effects of Jehasuogamibang on Antioxidation Activity and Dietary Hyperlipidemia-induced Mice. J. Int. Korean Med. 35(3):244-261, 2014.
9. Lee, S.J., Han, J.M., Lee, J.S., Son, C.G., Im, H.J., Jo, H.K., Yoo, H.R., Kim, Y.S., Seol, I.C. ACE Reduces Metabolic Abnormalities in a High-Fat Diet Mouse Model. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Article ID 352647. p 8 , 2015.
10. Kim, M.S., Seo, I.B., Kim, J.B. Effects of Salviae Miltiorrhizae Radix on the Diet-induced Hyperlipidemia in Rats, Korean J. Oriental Physiology & Pathology. 18(2):431-435, 2004.
11. Jang, W.S. Lipid-lowering and Antioxidant Effect of Artemisia capillaris in Poloxamer-407 induced Hyperlipidemia Model in Rat. The Graduate School Daejeon University, 2011.
12. Park, S.A. Lipid-lowering and Antioxidant Effect of Curcuma Radix in Poloxamer 407-induced Hyperlipidemia Model in Rat. The Graduate School Daejeon University, 2011.
13. Park, S.H., Kim, Y.H., Chon, J.W., Song, Y.J., Han, J.H. Study of Crataegi Fructus for Medicinal Foods Applications-Functional Evaluation of Fermented Liquid on the Lipid Profile Improvement High Fat Diet-. Korean J. Oriental Physiology & Pathology 19(5):1272-1280, 2005.
14. Committee for Guidelines for Management of Dyslipidemia. Korean Guidelines for Management of Dyslipidemia. pp 3-5, 2015.
15. Kim, R.B., Kim, B.G., Kim, Y.M., Seo, J.W., Lim, Y.S., Kim, H.S., Lee, H.J., Moon, J.Y., Kim, K.Y., Shin, J.Y., Park, H.K., Song, J.K., Park, K.S., Jeong, B.G., Park, C.G., Shin, H.Y., Kang, J.W., Oh, G.J., Lee, Y.H., Seong, I.W., Yoo, W.S., Hong, Y.S. Trends in the incidence of hospitalized acute myocardial infarction and stroke in Korea, 2006-2010. J Korean Med Sci. 28(1):16-24, 2013.
16. Kim, H.C., Oh, S.M. Noncommunicable diseases: current status of major modifiable risk factors in Korea. J Prev Med Public Health. 46: 165-172, 2013.
17. The Korean Academy of Clinical Geriatrics. Principles of Geriatric Medicine. Seoul: Hankookbook. pp 232-246, 2011.
18. Yensei University College of Medicine, Jung NS. New Steps to Internal Medicine Cardiovascular disease. Seoul: Jeongdam Publishing Company. pp 171-177, 2008.
19. Bang, H.J., Tak, E.S., Hong, Y., Kang, Y.H. A Study on The Oriental-medical Understandling of Hyperlipidemia. The Journal of east-west medicines. 20(1):25-36, 1995.
20. Ham, I.H., Jung, S.W., Lee, K.J., Park, K.H., Choi, H.Y. Effect of the aerial part of Artemisia capillaris, and A. iwayomogi on the Hyperlipidemia of Rats induced by Triton WR-1339. The Korea journal of herbology. 20(1):45-52, 2005.
21. Ham, I.H., Lee, U.C., Lee, B.H. Choi, H.Y. Lipid lowering activity of Ponciri Fructus and Aurantii Fructus Immaturus on hyperlipemia rats induced by Triton WR-1339. The Korea journal of herbology. 22(3):109-116, 2007.
22. Lee, J.C. Effects of Gamibangpungtongseungsan on lipid composition and antioxidant in rat fed high fat. The Korea journal of herbology. 20(2):69-75, 2005.
23. Park, J.K., Choi, H.J., Kim, D.H. A study on the Effect of Kamijesubsungitang on Hyperlipidemia. Daejeon University. 15(1):119-131, 2006.
24. Hwang, E.G. Effect of HMG-CoA reductase inhibitors on the liver in induced hypercholesterolemic rats. The Graduate School Kyung Hee University, 2000.
25. The national college of Korean Medicine Department of Herbology. Department of Herbolgy. Herbology. Seoul: Younglim Inc. pp 369-370, 411-412, 452-453, 458-459: 2007.
26. Arafa, H.M. Curcumin attenuates diet-induced hypercholesterolemia in rats. Med Sci Monit. 11(7):BR228-234, 2005.
27. Lee, S.J. Protective effect of a extract of Artemisia iwayomogi Kitamura. plus Curcuma longa Linne. against Hyperlipidemia and Obesity in High Fat-Diet Mice Model. The Graduate School Daejeon University, 2012.

28. Shin, H.S. A Study on the Atheroprotective Effect of the Water Extract of Artemisia iwayomogi Kitamura plus Curcuma longa Linne in Apolipoprotein E-deficient Mice. The Graduate School Daejeon University, 2013.
29. Li, H.B., Fang, K.Y., Lu, C.T., Li, X.E. Study on lipid-regulating function for the extracts and their prescriptions from Semen Cassiae and fructus crataegi. Zhong yao cai. 30(5):573-575, 2007.
30. Madamanchi, N.R., Vendrov, A., Runge, M.S. Oxidative stress and vascular disease. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 25(1):29-38, 2005.
31. Lee, H.J., Sim, B.Y., Bak, J.W., Kim, D.H. Effect of Gami-sopungsan on Inflammation and DNCB-induced Dermatitis in NC/Nga in Mic. Korean J. Oriental Physiology & Pathology. 28(2):146-153, 2014.
32. Kim, H.W., Kim, B.J., Lim, S.H., Kim, H.Y., Lee, S.Y., Cho, S.I., Kim, Y.K. Anti-oxidative Effects of Taraxaci Herba and Protective Effects on Human HaCaT Keratinocyte. The Korea journal of herbology. 24(3):103-108, 2009.
33. Kim, M.J., Park, E.J. Feature Analysis of Different In Vitro Antioxidant Capacity Assays and Their Application to Fruit and Vegetable Samples. Journal of the Korean society of food science and nutrition. 40(7):1053-1062, 2011.
34. Ku, K.M., Kim, H.S., Kim, B.S., Kang, Y.H. Antioxidant Activities and Antioxidant Constituents of Pepper Leaves from Various Cultivars and Correlation between Antioxidant Activities and Antioxidant Constituents. Journal of applied biological chemistry. 52(2):70-76, 2009.
35. Lee, S.O., Lee, H.J., Yu, M.H., Im, H.G., Lee, I.S. Total Polyphenol Contents and Antioxidant Activities of Methanol Extracts from Vegetables produced in Ullung Island. Korean J. Food Sci Technol. 37(2):233-240, 2005.
36. Kujala, T.S., Loponen, J.M., Klika, K.D., 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. 48(11):5338-5342, 2000.
37. Kim, S.I. Antioxidant activities and death effect of cancer cells of the Lotus(Nelumbo nucifera) leaf extracts. The Graduate School Dankook University, 2011.
38. Channon, K.M., Qian, H., George, S.E. Nitric oxide synthase in atherosclerosis and vascular injury: insights from experimental gene therapy. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 20: 1873-1881, 2000.
39. Yun, K.J., Kim, J.Y., Kim, J.B., Lee, K.W., Jeong, S.Y., Park, H.J., Jung, H.J., Cho, Y.W., Yun, K.J., Lee, K.T. Inhibition of LPS-induced NO and PGE2 production by asiatic acid via NF-κB inactivation in Raw 264.7 macrophages: Possible involvement of the IKK and MAPK pathways. Int Immunophar. 8: 431-441, 2008.
40. Frostegard, J., Ulfgren, A., Nyberg, P., Heiden, U., Swedenborg, J., Andersson, U., Hansson, G. Cytokine expression in advanced human atherosclerotic plaques: dominance of pro-inflammatory(Th1) and macrophage stimulating cytokines. Atherosclerosis. 145: 33-43, 1999.
41. Dandona, P., Aljada, A., Chaudhuri, A., Mohanty, P., Garg, R. Metabolic syndrome: a comprehensive perspective based on interactions between obesity, diabetes, and inflammation. Circulation. 111(11):1448-1454, 2005.
42. Bunck, M.C., Diamant, M., Eliasson, B., Cornér, A., Shaginian, R.M., Heine, R.J. Exenatide Affects Circulating Cardiovascular Risk Biomarkers Independently of Changes in Body Composition. Diabetes Care. 33(8):1734-1737, 2010.
43. Kim, Y.C., Kim, S.M., Park, J.H., Seo, B.I., Choi, H.S. Preventive effects of Injinho-tang and Haninjinho-tang on hyperlipidemia and liver damage induced by alcohol. The Korea journal of herbology. 21(3):47-54, 2006.
44. Kinnunen, P.K., Virtanen, J.A., Vainio, P. Lipoprotein lipase and hepatic endothelial lipase: their roles in plasma lipoprotein metabolism. Atheroscler Rev. 11: 65-105, 1983.
45. Castelli, W.P., Garrison, R.J., Wilson, P.W., Abbott, R.D., Kalousdian, S., Kannel, W.B. ncidence of coronary heart disease and lipoprotein cholesterol levels. JAMA. 256(20):2835-2838,1986.
46. Kinosian, B., Glick, H., Preiss, L., Puder, K.L. Cholesterol and coronary heart disease: predicting risks in men by changes in levels and ratios. J Investig Med. 43(5):443-450, 1995.
47. Prasad, K. Reduction of serum cholesterol and hypercholesterolemic atherosclerosis in rabbits by secoisolariciresinol diglucoside isolated from flaxseed. Circulation. 99(10):1355-1362, 1999.