

백출과 양춘사 추출 혼합물의 항콜레스테롤 효과 및 기전 연구

김하림 · 김예슬 · 권강범 · 정현중^{1*}

원광대학교 한의과대학 생리학교실 및 ㈜일원바이오, 1: 원광대학교 한의과대학 진단학교실

Anti-cholesterol Effects and Molecular Mechanism Study of Mixture of *Atractylodes Macrocephala* and *Amomum Villosum* ExtractsHa Rim Kim, Ye Seul Kim, Kang Beom Kwon, Hyun Jong Jung^{1*}

Department of Physiology, School of Korean Medicine, Wonkwang University & Ilwonbio Co.,

1: Department of Diagnostics, School of Korean Medicine, Wonkwang University

Atractylodes macrocephala (AM) and *Amomum villosum* (AV) are the most common herbs in Korean Medicine to treat digestive diseases. In this study, we investigated the cholesterol lowering effects of mixtures of AM and AV extracts on high cholesterol diet (HCD) induced dyslipidemia mouse model. We classified animals into six different groups: Group 1: Normal diet, Group 2: HCD, Group 3: AV extracts : AM extracts (1:1) (200 mg/kg) + HCD, Group 4: AV extracts : AM extracts (1:2) (200 mg/kg) + HCD, Group 5: AV extracts : AM extracts (1:3) (200 mg/kg) + HCD, Group 6: Simvastatin 40 mg/kg + HCD. After 4 weeks of oral administration of respective drugs, we checked body, liver and epididymal fatweights along with liver and serum triacylglyceride (TG) concentration, total and low density lipoprotein (LDL) cholesterol in serum. Moreover, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase (HMGCR), LDL receptor (LDLR), and sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP2) were detected by RT PCR or western blot analysis. The overall results showed that mixtures of AM and AV extracts inhibited HCD-induced increases of total cholesterol and LDL cholesterol in serum. Those effects seem to be caused by AM and AV extracts through inhibition of HMGCR expression. And thus blood cholesterol is induced into the liver by increasing LDLR expression, which is regulated by SREBP2 transcription factor. The cholesterol lowering effects and mechanism of mixtures of AM and AV extracts was similar to the statin. We have identified the potential mixtures of AM and AV extracts as a new treatment for dyslipidemia.

keywords : *Atractylodes macrocephala*, *Amomum villosum*, high cholesterol diet, low density lipoprotein receptor, HMG-CoA reductase, sterol regulatory element-binding protein 2

서 론

고지혈증(Hyperlipidemia)은 혈액 내에 지질 성분이 증가하여 혈관 벽에 축적되어 염증을 일으키고, 이로 인해 심혈관계 질환의 유병률을 높이는 질환으로¹⁾ 이상지질혈증(dyslipidemia)의 한 범주이다. 이상지질혈증은 혈액 내 총콜레스테롤 및 LDL 콜레스테롤, 중성지방이 증가하거나 HDL 콜레스테롤이 감소된 상태로 정의하며 유전적 요인으로 특정 지질이 혈액 내 증가하기도 하며, 식생활이나 생활습관, 약물복용 등의 다양한 환경적 요인에 의해 발생하기도 한다²⁾.

한의학에서 이상지질혈증은 고량후미(膏梁厚味)의 섭취로 인한 비만, 기허(氣虛)로 인한 습담(濕痰)의 형성, 어혈(瘀血), 혈열(血熱) 등에 의하여 발생한다고 하였으며, 거담제습(祛痰除濕), 활혈화어(活血化瘀), 보중익기(補中益氣), 청열사화(淸熱瀉火)의 방법으로 치료하였다³⁾. 특히 체내의 수액이 제대로 순환되지 못하여 발생하는 담음(痰飲)의 개념과 혈액의 성분이 바뀌어 생리 기능에 문제가 생긴 혈액, 혈관 이상으로 생긴 혈전은 이상지질혈증의 개념과 유사한 것으로 보는 연구⁴⁾도 보고 되어있다.

최근 연구에 의하면 백출과 양춘사 추출 혼합물은 고지방식이 유도 비만 마우스 모델에서 체중 및 간과 지방 무게의 증가를 유의하게 억제함이 보고되었으며⁵⁾, 특히 백출과 양춘사 추출물을 3:1의 비율로 혼합하였을 때 *in vivo*⁵⁾, *in vitro*⁶⁾ 항비만 효과가 있다고 보고되었다. 또한 백출과 양춘사 추출물을 3:1로 혼합하여 100, 200, 500 mg/kg의 농도로 투여한 결과 고지방 사료로 인한 간과 혈중의 중성지방 증가가 유의하게 억제되었으며, 총콜레스테롤과 LDL 콜레스테롤의 증가가 유의하게 억제되었으나⁷⁾ 항콜레스테롤의 효과 및 기전에 대한 보고는 없었다.

이에 저자는 백출과 양춘사 추출 혼합물의 고지방식이 유도 비만 모델에서의 항비만 및 항콜레스테롤 효과⁵⁻⁷⁾를 토대로 고콜레

스테롤 식이 유도 비만 모델에서 항콜레스테롤 효과 및 기전을 조사하여 유의한 결과를 얻었다.

재료 및 방법

1. 백출과 양춘사 추출물 제조

백출(*Atractylodes macrocephala* Koidz.)과 양춘사(*Amomum villosum* Lour.)는 (주)광명당 제약(Ulsan, Korea)에서 구입하여 사용하였으며 원광대학교 한의과대학 본초학 교실에서 진품을 확인하였다. 백출과 양춘사 100g을 각각 3차 증류수 900ml에 4시간 가열하여 환류 추출 후 여과하고 남은 용액을 감압시켜 농축, 건조하여 양춘사 9.25g, 백출 39.8g의 추출물을 얻어 냉장 보관하였다. 백출과 양춘사를 1:1, 2:1, 3:1의 비율로 혼합하여 200 mg/kg의 용량으로 사용하였으며 대조군 약으로 Simvastatin은 TCI (Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다.

2. 실험동물의 사육 및 식이

실험동물은 8주령 된 C57BL/6J 수컷 마우스를 구입(Orientbio, Seongnam, Korea)하여 1주일 동안 사육실 환경에 적응시켰다. 마우스는 평균 체중이 약 20~22g 정도 되었으며 정상식이 대조군(Normal diet, ND)(Group 1), 고콜레스테롤식이 투여군(High cholesterol diet, HCD, Table 1)(Group 2), 고콜레스테롤 식이와 다양한 비율의 양춘사와 백출 혼합물을 투여한 실험군(Group 3-5), 고콜레스테롤 식이와 Simvastatin을 투여한 양성 대조군(Group 6)으로 나누어 4주 동안 경구 투여하였다(Table 2). 사육실은 상대습도 50~60%, 온도 18~24°C로 유지하였으며 명암을 12시간 주기(8:00~20:00)로 조절하였다. 본 실험에 사용한 고콜레스테롤 사료는 총 열량의 약 17%의 단백질, 43%의 탄수화물, 41%의 지방으로 구성되었으며 일주일에 한 번씩 체중을 측정하였

Hyun Jong Jung, Department of Diagnostics, School of Korean Medicine, Wonkwang University, 460 Iksandae-ro, Iksan, Jeonbuk, South Korea

E-mail : kendu@wku.ac.kr Tel : +82-63-850-6978

Received : 2022/09/16 Revised : 2022/10/21 Accepted : 2022/10/25

© 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.2022.10.36.5.181>

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

다. Wonkwang University Animal Experiment Ethics Committee에서 동물실험 승인(WKU20-02)을 받았으며, institutional guideline을 준수하여 실험실 동물을 관리하였다.

Table 1. High cholesterol diet

Nutrients	gm%	kcal%
Protein	20	17
Carbohydrate	50	43
Fat	20	41
Total		100
Ingredient	gm	kcal
Casein, 80 Mesh	195	780
DL-Methionine	3	12
Corn Starch	50	200
Maltodextrin 10	100	400
Sucrose	341	1364
Cellulose	50	0
Milk Fat, Anhydrous*	200	1800
Corn Oil	10	90
Mineral Mix S10001	35	0
Calcium Carbonate	4	0
Vitamin Mix V10001	10	40
Choline Bitartrate	2	0
Cholesterol, USP	1.5	0
Ethoxyquin	0.04	0
Total	1001.54	4686

*Anhydrous milk fat typically contains approximately 0.3% cholesterol, and consequently High cholesterol diet contains approximately 0.21% cholesterol.

Table 2. Classification of Experimental Groups

Group: abbreviation	Treatment
Group 1: Control	Normal diet + saline
Group 2: CD	Cholesterol diet (CD) + saline
Group 3: Ex. 1:1	Cholesterol diet (CD) + <i>Amomum villosum</i> extract (AVE)(1) : <i>Atractylodes macrocephala</i> extract (AME)(1) (200 mg/kg)
Group 4: Ex. 1:2	Cholesterol diet (CD) + <i>Amomum villosum</i> extract (AVE)(1) : <i>Atractylodes macrocephala</i> extract (AME)(2) (200 mg/kg)
Group 5: Ex. 1:3	Cholesterol diet (CD) + <i>Amomum villosum</i> extract (AVE)(1) : <i>Atractylodes macrocephala</i> extract (AME)(3) (200 mg/kg)
Group 6: Simvastatin	Cholesterol diet (CD) + Simvastatin(40 mg/kg)

3. 바이오마커 분석 및 부검

체중은 실험 시작 후 매주 측정하였으며 부검은 ether로 마취 후 복대 정맥에서 채혈하여 혈액 내 중성지방(triglyceride; TG), 총콜레스테롤(total cholesterol; TC), 저밀도 지단백질 콜레스테롤(low density lipoprotein cholesterol ; LDL-C)의 양을 TC 측정 kit, TG 측정 kit (Asan Phamaceutical, Seoul, Korea)와 LDL 콜레스테롤 측정 kit (Dogenbio, Seoul, Korea)를 이용하여 분석에 사용하였으며 간과 부고환 주위의 지방 조직을 적출하여 무게를 측정하였다.

4. 간 중성지방(Liver triglyceride) 분석

간 중성지방 함량의 측정을 위해 간 조직을 chloroform-methanol solution(2:1, v/v)에서 균질화하여 1시간 동안 상온에서 반응시킨 후 원심분리 후 유기용매 층을 24시간 동안 건조하였다. Ethanol에서 용해한 후 간의 중성지방 함량은 TG kit(Asan Pharmaceutical, Seoul, Korea)를 이용하여 조사하였고 단백질 농도로 표준화시켰다.

5. Total RNA 분리 및 실시간 역전사 효소 중합반응(Real Time PCR)

실험이 끝난 후 적출된 간으로부터 total RNA의 분리는 TRIzol reagent (Invitrogen, CA, USA)를 이용하여 제조사가 제공하는 방법에 따라 수행하였다. 각각의 조직을 잘게 자른 후 1000 μ l RNAzol B로 용해시킨 후 200 μ l chloroform을 첨가하여 얼음 속에서 5분 반응시켰다. 반응이 끝난 후 4 $^{\circ}$ C에서 13,000rpm으로 10분 원심분리하여 상층액 500 μ l을 새로운 tube에 옮겼다. 위 상층액에 동량의 isopropanol을 첨가하여 섞은 후 4 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 4 $^{\circ}$ C에서 13,000rpm으로 10분 원심분리하고 침전물을 75% EtOH로 2번 세척하였다. 세척된

RNA를 건조시킨 후 DEPC water 20 μ l로 녹이고 분광광도계에서 흡광도를 측정하여 정량하였다. 역전사 반응 (reverse transcription reaction)은 2 μ g total RNA와 Prime Script TM reagent kit (perfect realtime) (TaKaRa, Tokyo, Japan)를 이용하여 제조사에서 제공하는 방법에 따라 수행하였다. 역전사 반응은 total RNA (2 μ g), oligo d(T)primer (25pmol), PrimeScript RT enzyme Mix I, 5X primeScript Buffer가 함유된 반응액으로 37 $^{\circ}$ C에서 15분, 85 $^{\circ}$ C에서 5초 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 실시간 역전사 효소 중합 반응은 10배 희석한 cDNA에 Power SYBR Green PCR Master Mix를 이용하여 수행하였다. 발현된 각각 유전자의 mRNA 양은 LightCycler System software (Roche)를 이용하여 GAPDH에 대한 상대적인 양으로써 계산하였다. 사용된 primer의 sequence는 Table 3에 기록하였다.

Table 3. Sequences and Accession Numbers

Gene	Sequence for Primers	Accession no.
GAPDH	Forward: CGTCCCGTAGACAAAATGGT Reverse: TTGATGGCAACAATCTCCAC	NM_008084
HMGCR	Forward: TGCTGCTTTGGCTGTATGTC Reverse: TGAGCGTGAACAAGAACCAG	NM_001360165.1
LDLR	Forward: ACCGCAACATCTACTGGACA Reverse: GTCCACACCATTCAAACCCC	NM_001252659.1
SREBP-2	Forward: TGGGCAGCAACGGGACCATT Reverse: GGAGGACCGGTAGCGCTTTCA	NM_033218.1

6. Western blotting

간 조직 내 단백질은 M-PER (Mammalian Protein Extraction Reagent) (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)를 사용하여 분리하였다. 샘플(20 μ g)은 10% acrylamide와 함께 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)를 사용하여 분리하였고, Hybond™-polyvinylidene fluoride membranes (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK) 을 사용하여 이동하였다. 각각의 membrane은 2% bovine serum albumin 또는 5% skim milk를 사용하여 2시간 동안 블로킹하였고, β -actin에 대한 일차 항체(Santa Cruz Technology, CA, USA)와 HMGCR에 대한 일차 항체(Cell Signaling, MA, USA)는 1 μ g/ml of a 1:2000 dilution 하여 4 $^{\circ}$ C 냉장고에서 overnight 처리하였다. 이차 항체는 HRP-conjugated IgG (Abcam, Cambridge, UK)는 1:2000 dilution 하여 반응시켰다. 단백질 발현량은 image analyzer (EZ-Capture ST, Tokyo, Japan)를 사용하여 확인하였다.

7. 통계분석

모든 실험 결과는 평균 \pm 표준편차(Mean \pm S.D.)로 계산하였다. 각 군 간의 통계적 유의성 검정에 따른 통계분석은 ANOVA (one-way analysis of variance test) Duncan 사후검정 비교하여 p<0.05일 때 유의한 것으로 판정하였다(SPSS V12., SPSS Inc, IL, USA).

결 과

1. 백출과 양춘사 추출 혼합물의 체중 증가 억제 효과

고콜레스테롤 식이를 4주간 투여한 군의 체중은 정상 식이를 4주간 투여한 군의 체중과 비교하여 유의하게 증가하였다. 고콜레스테롤 식이와 simvastatin 40 mg/kg 병용 투여군에서 체중 증가는 유의하게 억제되었으며, 백출과 양춘사 추출 혼합물을 병용 투여한 군에서도 고콜레스테롤 식이에 의한 체중 증가가 유의하게 억제되었으나, 백출 추출물의 농도와와의 상관관계는 나타나지 않았다 (Fig. 1).

2. 백출과 양춘사 추출 혼합물의 간과 부고환 주위 지방 증가 억제 효과

고콜레스테롤 식이를 4주간 투여한 군의 간과 부고환 주위 지방의 무게는 정상 식이를 4주간 투여한 군과 비교하여 유의하게 증가하였다. 백출과 양춘사 추출 혼합물을 고콜레스테롤 식이와 병용 투여한 군에서는 백출 농도 의존적으로 간과 부고환 주위 지방 증가의 억제 효과가 나타났다(Table 4).

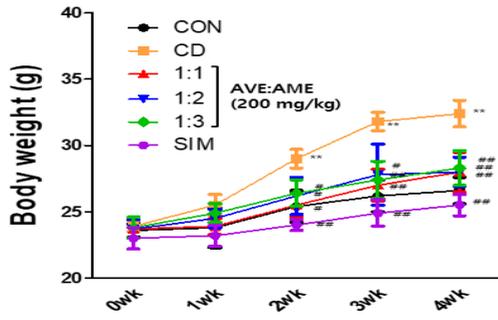


Fig. 1. Effects of mixtures of *Atractylodes macrocephala* extracts (AME) and *Amomum villosum* extracts (AVE) on body weight of high cholesterol diet-induced mice. CON:control; CD:cholesterol diet; SIM:simvastatin 40 mg/kg. All data present mean±S.D. **p<0.01 vs. control; #p<0.05, ##p<0.01 vs. cholesterol diet. n=10

Table 4. Effects of mixtures of *Amomum villosum* extracts (AVE) and *Atractylodes macrocephala* extracts (AME) on liver and epididymal fat of high cholesterol diet-induced mice.

Gorup	Week	Liver	Epididymal fat
Control		1.11±0.04	0.29±0.03
Cholesterol diet		1.23±0.08**	1.27±0.22**
AVE(1):AME(1) Extracts Mixtures (200 mg/kg)		1.14±0.11	0.85±0.10**
AVE(1):AME(2) Extracts Mixtures (200 mg/kg)		1.08±0.18*	0.78±0.15**
AVE(1):AME(3) Extracts Mixtures (200 mg/kg)		0.99±0.07*	0.62±0.19**
Simvastatin (40 mg/kg)		1.01±0.12*	0.63±0.09*

All data present mean±S.D. **p<0.01 vs. control; *p<0.05, ##p<0.01 vs. cholesterol diet. n=10

3. 백출과 양춘사 추출 혼합물의 간과 혈액의 중성지방 증가 억제 효과

고콜레스테롤 식이를 4주간 투여한 군의 간과 혈액 내 중성지방(triglyceride, TG)의 양은 정상 식이를 4주간 투여한 군과 비교하여 유의하게 증가하였다. 그러나 백출과 양춘사 추출 혼합물을 고콜레스테롤 식이와 병용 투여한 군의 혈액 내 중성지방의 양은 고콜레스테롤 식이군과 비교하여 백출 농도 의존적으로 유의하게 감소하였다(Fig. 2). 간 조직의 중성지방의 양은 백출과 양춘사 추출 혼합물을 투여한 군에서 감소하는 경향을 나타냈으나 통계적으로 유의하지 않았다. 또한, 백출과 양춘사 추출물을 3:1로 혼합하여 투여한 군의 혈액 내 중성지방의 양은 양성 대조군으로 투여한 simvastatin군과 유사한 감소 효과를 나타냈다.

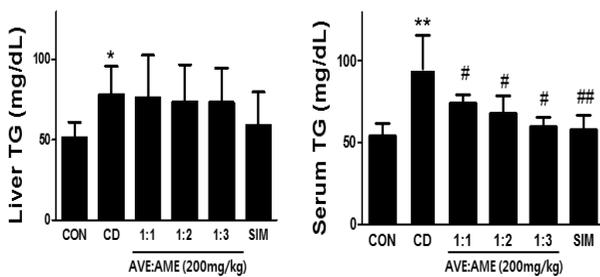


Fig. 2. Effects of mixtures of *Amomum villosum* extracts (AVE) and *Atractylodes macrocephala* extracts (AME) on liver and serum TG concentration. CON:control; CD:cholesterol diet; SIM:simvastatin 40 mg/kg. All data present mean±S.D. *p<0.05; **p<0.01 vs. control; #p<0.05, ##p<0.01 vs. cholesterol diet. n=10

4. 백출과 양춘사 추출 혼합물의 혈액 총콜레스테롤과 LDL 콜레스테롤 증가 억제 효과

고콜레스테롤 식이를 4주간 투여한 군의 혈액 내 총콜레스테롤 양은 정상 식이를 4주간 투여한 군과 비교하여 유의하게 증가하였다. 백출과 양춘사 추출 혼합물을 고콜레스테롤 식이와 병용 투여한 군의 총콜레스테롤 양은 고콜레스테롤 식이군과 비교하여 백출 농도 의존적으로 유의하게 감소하였다. 특히 양춘사와 백출 추출물을 1:3의 비율로 투여한 군에서는 simvastatin 투여군에 비하여 총콜레스테롤의 감소량이 많았다(Fig. 3). LDL 콜레스테롤 양은 고콜레스테롤 식이를 4주간 투여한 군에서 정상 식이를 4주간 투

여한 군에 비해 유의하게 증가하였다. 백출과 양춘사 추출 혼합물을 고콜레스테롤 식이와 병용 투여한 군의 LDL 콜레스테롤 양은 감소하였으며, 특히 백출과 양춘사 추출물을 3:1로 혼합하여 투여한 군은 고콜레스테롤 식이군과 비교하여 30.6% 감소하여 유의성을 나타냈다(Fig. 2).

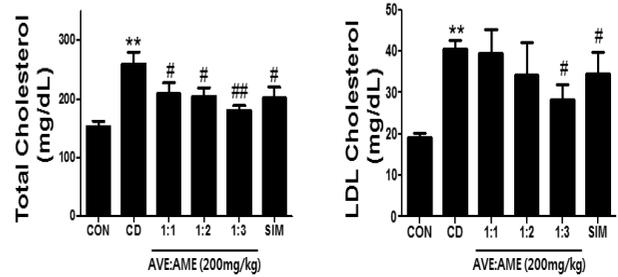


Fig. 3. Effects of mixtures of *Amomum villosum* extracts (AVE) and *Atractylodes macrocephala* extracts (AME) on total and LDL cholesterol in serum. CON:control; CD:cholesterol diet; SIM:simvastatin 40 mg/kg. All data present mean±S.D. **p<0.01 vs. control; #p<0.05, ##p<0.01 vs. cholesterol diet. n=10

5. 백출과 양춘사 추출 혼합물의 간 HMG CoA Reductase (HMGCR) 감소에 대한 억제 효과

고콜레스테롤 식이를 4주간 투여한 군의 간의 HMGCR 단백질과 mRNA 발현은 정상 식이를 4주간 투여한 군과 비교하여 유의하게 감소하였다. 그러나 백출과 양춘사 추출 혼합물을 고콜레스테롤 식이와 병용 투여한 군의 HMGCR 단백질과 mRNA 발현량은 고콜레스테롤 식이군과 비교하여 백출 농도 의존적으로 유의하게 증가하였다. 특히, 백출과 양춘사 추출물을 3:1로 혼합하여 투여한 군의 HMGCR mRNA 발현량은 고콜레스테롤 식이 투여군에 비해 94.3% 증가하여 유의성을 나타냈다(Fig. 4).

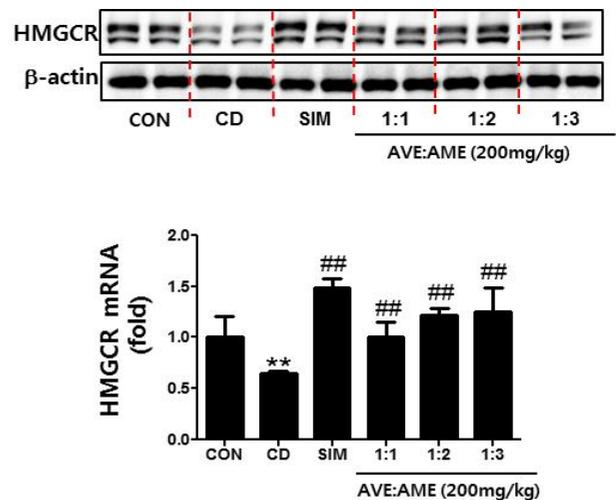


Fig. 4. Effects of mixtures of *Amomum villosum* extracts (AVE) and *Atractylodes macrocephala* extracts (AME) on HMG CoA Reductase (HMGCR) expressions in liver. All data present mean±S.D. CON:control; CD:cholesterol diet; SIM:simvastatin 40 mg/kg. **p<0.01 vs. control; ##p<0.01 vs. cholesterol diet. n=10

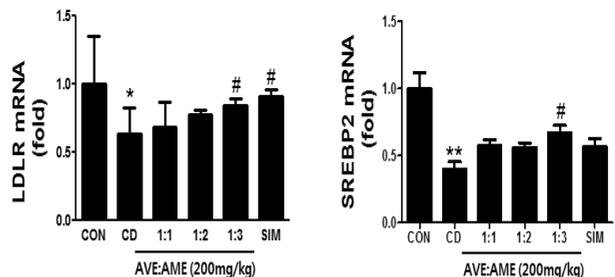


Fig. 5. Effects of mixtures of *Amomum villosum* extracts (AVE) and *Atractylodes macrocephala* extracts (AME) on cholesterol homeostasis-related genes in liver. CON:control; CD:cholesterol diet; SIM:simvastatin 40 mg/kg. All data present mean±S.D. *p<0.05; **p<0.01 vs. control; #p<0.05 vs. cholesterol diet. n=10

6. 백출과 양춘사 추출 혼합물의 콜레스테롤 관련 유전자 발현 감소에 대한 억제 효과

고콜레스테롤 식이를 4주간 투여한 군의 간의 low density lipoprotein receptor (LDLR) mRNA의 발현량은 정상 식이를 4주간 투여한 군과 비교하여 유의하게 감소하였다. 그러나 고콜레스테롤 식이와 백출과 양촌사 추출물을 3:1로 혼합하여 투여한 군에서 LDLR mRNA는 유의하게 증가하였다(Fig. 4). 또한 LDLR의 발현을 주관하는 전사인자로 알려진 sterol regulatory element-binding protein 2 (SREBP2) mRNA 발현량을 조사한 결과, 백출과 양촌사 추출물을 3:1로 혼합하여 투여한 군에서 고콜레스테롤 식이에 의한 SREBP2 mRNA 감소를 유의하게 억제하였다(Fig. 5).

고찰

비만은 고콜레스테롤혈증, 고중성지방혈증 등 이상지질혈증을 유발하여 동맥경화, 심뇌혈관질환 등 다양한 혈관 질환을 유발하는 것으로 알려져 있다. 이상지질혈증의 진단을 위해서는 저밀도 지단백질 콜레스테롤(LDL-C)과 고밀도지단백질 콜레스테롤(high density lipoprotein cholesterol: HDL-C)의 수치를 확인하여야 한다. LDL-C는 간의 콜레스테롤을 말초로 운반하는 역할을 하며 산화되어 대식세포의 scavenger receptor에 의하여 흡수되고 foam cell을 형성하며 동맥경화성 플라크의 생성에 기여함으로써 심혈관질환의 위험도를 증가시킨다⁸⁾. 우리 몸의 콜레스테롤 항상성을 유지하는데 간(liver)은 중요한 역할을 한다. 음식을 통해 흡수한 콜레스테롤, 간 이외의 조직에서 합성된 콜레스테롤, 간 내부에서 합성된 콜레스테롤 모두 간의 콜레스테롤 pool로 들어가게 되고 쓸개를 통해 unmodified cholesterol의 형태로 제거되거나 담즙산염의 형태로 소장으로 분비되거나 말초조직에 보내져 혈장 지단백의 구성 성분으로 사용함으로써 콜레스테롤의 유입과 배출을 조절한다⁹⁾.

이상지질혈증의 치료에 사용되는 약물에는 스타틴(statins), 에제티미브(ezetimibe), proprotein convertase subtilisin-kexin type 9(PCSK9) 억제제인 알리로쿠맙(alirocumab), 에볼로쿠맙(evolocumab) 등이 있으며 이상지질혈증에는 일차적으로 스타틴 투여가 권고된다¹⁰⁾. 스타틴은 HMG-CoA 환원효소(HMG-CoA reductase; HMGCR) 억제제로 알려져 있다. HMGCR은 간에서 HMG-CoA를 mevalonic acid로 변환하게 하여 콜레스테롤의 합성에 관여하는데 스타틴은 이러한 HMGCR을 경쟁적으로 억제하여 콜레스테롤 생합성을 감소시킨다¹¹⁾. 그러나 임상적으로 스타틴 약물에 대한 다양한 이상 반응이 보고되고 있으며 여러 RCT(randomized controlled trials) 연구를 통하여 스타틴의 다양한 이상 반응이 확인되었다¹²⁾. 스타틴 복용 환자의 10-15%가 근육통 등 부작용을 야기하며^{13,14)} 근육통과 위장관 증상과 같이 흔한 부작용 외에도 발진, 근육병증, 불면과 같은 증상이 드물게 나타나며 심각한 경우 횡문근 용해증과 같은 근육 독성을 나타낼 수 있다¹⁵⁾. 따라서 이러한 스타틴의 부작용을 완화하면서 항콜레스테롤 효과가 있는 새로운 한약재들에 대한 연구들이 많이 진행되고 있다¹⁶⁻¹⁸⁾.

사인(砂仁, *Amomi Fructus*)은 생강과(Zingiberaceae)에 속한 녹각사(*Amomum villosum* Loureiro var. *xanthioides* T.L.Wu et Senjen) 또는 양촌사(*Amomum villosum* Loureiro)의 잘 익은 열매 또는 씨의 덩어리이다¹⁹⁾. 실험적으로 양촌사는 지방 합성과 관련된 fatty acid synthase (FAS), sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP1) 유전자와 지방세포 분화와 관련된 peroxisome proliferator-activated γ (PPAR γ), CCAAT-enhancer binding protein α (C/EBP α) 유전자 및 tumor necrosis factor- α (TNF- α)의 발현을 유의하게 억제하였으며 adiponectin의 발현을 유의하게 증가시켜 항비만 효과가 있다고 보고되었다²⁰⁾. 백출(白朮, *tractylodes Rhizoma Alba*)은 국화과(Compositae)에 속한 삼주(*Atractylodes japonica* Koidzumi) 또는 백출(*Atractylodes macrocephala* Koidzumi)의 뿌리 줄기이다¹⁹⁾. 실험에서 백출은 대사와 관련된 다양한 단백질들의 발현을 조절하여 당과 지방산의 대사를 조절하며 특히 백출의 항비만 효과는 인슐린 감수성의 증가와 연관되어 있으며²¹⁾ 당의 불내성을 개선시킨다고 하였다²²⁾. 또한, 백출과 양촌사 추출물은 실험적으로 혼합하여 사용될 때 항비만 효과가 있는 것으로 보고되었다. 김 등의

보고⁵⁾에 의하면 고지방 사료로 유도된 비만 모델에서 사인과 백출을 1:1, 2:1, 3:1의 비율로 섞은 혼합물을 경구 투여한 결과 백출 농도 의존적으로 항비만 효과가 증가하였으며 간에서 지방 합성에 관여하는 ACC와 FAS 유전자의 발현을 조절하는 것으로 밝혀졌다. 또한 백출과 양촌사 추출 혼합물을 지방전구세포(OP9 cell)에 처리한 결과 지방세포 분화를 조절하는 전사인자인 PPAR γ 와 C/EBP α 의 발현을 억제하며 PPAR γ 에 의해 발현이 조절되는 지방세포 특이 유전자인 lipoprotein lipase (LPL)과 adipocyte protein 2 (aP2) 발현을 억제하고 지방세포 분화 초기의 세포 증식에 관여하는 인자인 extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK)와 protein kinase B (AKT)의 발현을 억제한다고 하였다⁶⁾. 고지방 식이에 양촌사와 백출 추출 혼합물을 1:3의 비율로 혼합하여 100, 200, 500 mg/kg의 농도로 투여한 경우 혼합물의 농도에 비례하여 간과 혈액 내 중성지방 및 총콜레스테롤과 LDL 콜레스테롤의 증가를 유의하게 억제하였으며 혈중 인슐린 증가 및 adiponectin의 감소를 유의하게 억제하였다⁷⁾. 이러한 결과는 백출과 양촌사 추출물을 효과적으로 혼합하여 사용함으로써 비만과 관련 있는 고콜레스테롤 혈증에 대한 억제 효과가 있으며 그 기전에 대하여 추가로 연구할 필요성이 있음을 시사한다.

고콜레스테롤 식이에 의한 고콜레스테롤 혈증 유도 모델은 실험적으로 다양한 물질의 항콜레스테롤 효과를 탐색하는 주요한 수단으로 활용되고 있다^{23,24)}. 본 실험에서 사용한 재료는 김 등이 보고한 논문⁵⁻⁷⁾을 근거로 200 mg/kg의 백출과 양촌사 추출물을 1:1, 2:1, 3:1의 비율로 혼합하여 사용하였다.

Table 4와 Table 5에서 보여주듯이 고콜레스테롤 식이 투여군에서 체중과 간과 부고환 주위 지방의 무게가 정상 식이를 투여한 군과 비교하여 유의하게 증가하였다. 그러나 200 mg/kg의 양촌사와 백출 추출 혼합물을 투여한 군은 고콜레스테롤 식이에 의한 체중, 간과 부고환주위 지방 무게의 증가를 유의하게 억제하였다. 이와 같은 결과는 김 등이 보고^{11,13)}한 고지방 식이에 의한 체중 증가 억제 효과와 더불어 양촌사와 백출 추출 혼합물이 항비만 제제 개발의 후보가 될 수 있음을 시사한다.

Fig. 2에서 양촌사와 백출 추출 혼합물은 고콜레스테롤 식이에 의한 혈중 총콜레스테롤과 LDL 콜레스테롤의 증가를 유의하게 억제하여 김 등이 보고^{5,7)}한 고지방 사료에 의한 콜레스테롤 증가 억제 효과와 유사하였다. 특히 양촌사와 백출 추출물을 1:3으로 혼합하여 처리한 군에서 양성 대조군으로 사용한 simvastatin 투여군과 효과가 거의 비슷하였으며 총콜레스테롤 증가의 억제 측면에서는 simvastatin 투여군에 비하여 효과가 더 높았다. 이러한 결과는 실험적으로 양촌사와 백출 추출 혼합물이 고지방 혹은 고콜레스테롤 식이로 인한 혈중 콜레스테롤 농도를 유의하게 감소시킴을 시사한다.

Fig. 3에 나타난 바와 같이 고콜레스테롤 식이를 투여한 군에서 혈액 내 콜레스테롤이 증가하면 간은 콜레스테롤의 항상성 유지를 위하여 HMGCR 단백질과 mRNA를 억제함으로써 콜레스테롤의 합성을 감소시킨다⁹⁾. 반면 simvastatin 투여군과 양촌사와 백출 추출 혼합물 투여군에서는 HMGCR 단백질 및 mRNA의 발현 감소를 유의하게 억제하였는데(Fig. 3), 이는 콜레스테롤의 항상성에 관여하는 간에서의 콜레스테롤 생합성이 감소했기 때문이라고 사료된다.

스타틴은 간에 작용하여 HMGCR을 억제함으로써 콜레스테롤 합성을 감소시키는데 반해 스타틴을 세포 혹은 마우스에 투여했을 때 HMGCR 발현의 증가는 다양하게 보고되고 있다^{11,25)}. 즉 스타틴은 HMGCR의 작용을 억제함과 동시에 HMGCR의 발현을 증가시키는 역할을 한다.

간에서 콜레스테롤이 감소하게 되면 SREBP2 전사 인자를 활성화시켜 HMGCR과 같은 콜레스테롤 합성과 관련된 유전자 단백질이 활성화되면서 HMGCR의 수가 증가하게 된다. 그러나 스타틴에 의하여 HMGCR의 작용이 억제되고 있으므로 간에서의 콜레스테롤 합성이 증가하지는 않는다. SREBP2는 또한 LDL receptor (LDLR)의 발현을 증가시키고 간세포 표면의 LDLR은 혈액 내 콜레스테롤을 간으로 흡수함으로써 혈중 콜레스테롤을 감소시키게 된다²⁶⁾.

Fig. 4에서 고콜레스테롤 식이 투여군에 비하여 양촌사와 백출을 1:3의 비율로 혼합하여 투여한 군과 simvastatin 투여군에서는 LDLR mRNA의 감소가 유의하게 억제되었다. 또한 양촌사와 백출

추출물을 1:3의 비율로 혼합하여 투여한 군에서는 고콜레스테롤 식이로 인한 SREBP2 mRNA 발현의 감소가 유의하게 억제되었다. sterol regulatory element-binding 단백질들은 (SREBPs, SREBP1a, SREBP1c, and SREBP2를 포함.) 콜레스테롤과 지방산을 합성하고 세포에서의 흡수를 조절하는 전사 인자이며²⁷⁾ 그 중 SREBP2만이 선택적으로 콜레스테롤 합성과 관련한 인자들을 조절한다. 콜레스테롤 농도가 낮으면 SREBP2는 HMGCR 유전자의 발현을 활성화함으로써 콜레스테롤의 합성을 촉진하고, LDLR의 발현을 활성화함으로써 간과 소장 등의 간 이외의 조직에서 LDL 콜레스테롤의 흡수를 촉진시킨다. 반대로 콜레스테롤이 높을 때에는 HMGCR 유전자의 발현을 억제함으로써 콜레스테롤의 합성을 저해하고 LDLR를 억제함으로써 콜레스테롤의 재흡수를 막게 된다^{9,28)}. 결국 양춘사와 백출 추출물의 HMGCR 작용의 억제는 콜레스테롤의 항상성에 중요 역할을 하는 간에서의 콜레스테롤 생합성의 감소를 의미하며 이는 SREBP2에 의한 LDLR의 발현 증가를 유도하여 혈중 콜레스테롤이 LDLR를 통해 간으로 유입되게 함으로써 결국 혈중 콜레스테롤이 감소한다고 이해할 수 있으며 이것은 스타틴의 혈중 콜레스테롤 감소 기전과 유사하였다.

다만 본 연구는 몇 가지 제한점이 있는데 첫 번째는 양춘사와 백출 추출물 투여 기간이 4주로 한정적이라는 점이다. 이상지질혈증은 장기간에 걸쳐 혈관에 지질이 쌓이면서 심뇌혈관질환을 유발하는 만성질환으로 양춘사와 백출 추출물을 장기간 투여했을 때 콜레스테롤의 수치 개선 및 HMGCR, LDLR, SREBP2의 수치 변화에 관하여 연구해 볼 필요가 있다.

또한 김⁷⁾ 등의 논문에 의하면 양춘사 백출 추출 혼합물은 고지방 식이에 의한 간의 중성지방 증가를 유의하게 억제하였으나 본 연구에서 고콜레스테롤 식이에 의한 중성지방의 증가는 억제되는 경향을 나타냈으나 통계적으로 유의하지 않았다. 양춘사와 백출 추출 혼합물의 고콜레스테롤 식이에 의한 간의 중성지방 증가의 억제 효과는 추가 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결과를 종합하면, 고콜레스테롤 식이를 투여한 마우스 모델에서 양춘사와 백출 추출 혼합물은 혈중 콜레스테롤 감소 효과를 나타냈다. 그 기전은 양춘사와 백출 추출 혼합물이 간에서의 콜레스테롤을 감소시킴으로써 HMGCR의 발현이 증가하고, 전사인자 SREBP2를 활성화함으로써 LDLR 발현을 증가, 혈중 콜레스테롤을 간으로 유입시켜 결과적으로 혈중 콜레스테롤 농도를 감소시키는 것으로 유추할 수 있다. 특히 전 세계적으로 이상지질혈증에 가장 많이 사용하고 있는 스타틴 계열의 simvastatin과 유사한 콜레스테롤 감소 효과를 나타냈다는 점과 스타틴의 부작용을 감안할 때 양춘사와 백출 추출 혼합물은 부작용 없는 이상지질혈증 치료제 개발의 후보가 될 수 있음을 시사한다.

결 론

본 연구는 고콜레스테롤 식이로 유발된 마우스 병태 모델에서 백출과 양춘사 추출 혼합물의 항콜레스테롤 효과 및 기전을 연구하여 아래와 같은 결과를 얻었다.

백출과 양춘사 추출 혼합물은 고콜레스테롤 식이로 인한 체중, 간, 부고환 주위 지방 무게의 증가를 유의하게 억제하였다.

백출과 양춘사 추출 혼합물은 고콜레스테롤 식이로 인한 혈중 중성지방의 증가를 유의하게 억제하였다.

백출과 양춘사 추출 혼합물은 고콜레스테롤 식이로 인한 혈중 콜레스테롤의 증가를 유의하게 억제하였다.

백출과 양춘사 추출 혼합물은 고콜레스테롤 식이로 인한 HMGCR 단백질 및 mRNA 발현의 감소를 유의하게 억제하였다.

백출과 양춘사 추출 혼합물은 고콜레스테롤 식이로 인한 SREBP2 및 LDLR 발현의 감소를 유의하게 억제하였다.

이상의 결과는 백출과 양춘사 추출 혼합물이 혈중 콜레스테롤을 감소시키는 효과가 있으며 향후 이상지질혈증 예방제 및 치료제 개발의 후보물질이 될 수 있음을 시사한다.

감사의 글

본 연구는 2020년도 중소벤처기업부의 중소기업기술개발사업

지원에 의한 연구임 (Project No. S2853447).

References

- Hill MF, Bordoni B. Hyperlipidemia. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021. [Internet].[Cited 2021 June 2] Available from: <https://www.statpearls.com/ArticleLibrary/viewarticle/23187>
- Jameson JL, Fauci, AS, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL, Loscalzo J. Harrison's Principles of Internal Medicine, 20th edition. New York:McGraw-Hill Education:2018:2889-92.
- Hong YK, Kim SS, Shin MK, Kim JJ. Review of Korean Medical Treatment in Hyperlipidemia - Focusing on Treatment of Korean Herbal Medicine. Korean J. Oriental Physiology & Pathology. 2010;24(1):9-14.
- Kim HT, Kim YS, Seol IC, Yoo HR. The Effects of an Extract of Artemisiae Capillaris, Curcumae Longae, and Crataegi Fructus (IUS) on Anti-hyperlipidemia and Anti-oxidation in db/db Mouse Model. J. Int. Korean Med. 2016;37(3):467-83.
- Kim HR, Choi BK, Jung HJ. Anti-Obesity Effects of Mixture of tractylodes macrocephala and Amomum villosum Extracts. J Physiol & Pathol Korean Med. 2019;33(5):282-87.
- Kim HR, Kwon YK, Choi BK, Baek DG. Inhibitory Effects of Mixture of Atractylodes Macrocephala and Amomum Villosum Extracts on Adipocyte Differentiation in OP9 Cells. J Physiol & Pathol Korean Med. 2020;34(1):24-9.
- Kim HR, Kwon YK, Choi BK, Jung HJ, Baek DG. Effect of Mixture of Atractylodes macrocephala and Amomum villosum Extracts on Body Weight and Lipid Metabolism in High Fat Diet-Induced Obesity Model. J Physiol & Pathol Korean Med. 2020;34(2):75-80.
- Stewart J, McCallin T, Martinez J, Chacko S, Yusuf S. Hyperlipidemia. Pediatr Rev. 2020;41(8):393-402.
- Champe PC, Harvey RA, Ferrier DR. Lippincott's Illustrated Reviews: Biochemistry, 3th edition. 2005:217-39.
- Lee SH. Update on the Pharmacologic Agents for Dyslipidemia. J Korean Diabetes. 2015;16(4):269-75.
- Jiang SY, Li H, Tang JJ, Wang J, Luo J, Liu B, Wang JK, Shi XJ, Cui HW, Tang J, Yang F, Qi W, Qiu WW, Song BL. Discovery of a potent HMG-CoA reductase degrader that eliminates statin-induced reductase accumulation and lowers cholesterol. Nat Commun. 2018;9(1):5138.
- Golomb BA, Evans MA. Statin adverse effects : a review of the literature and evidence for a mitochondrial mechanism. Am J Cardiovasc Drugs. 2008;8(6):373-418.
- Rosenson RS, Baker S, Banach M, Borow KM, Braun LT, Bruckert E, Brunham LR, Catapano AL, Elam MB, Mancini GBJ, Moriarty PM, Morris PB, Muntner P, Ray KK, Stroes ES, Taylor BA, Taylor VH, Watts GF, Thompson PD. Optimizing Cholesterol Treatment in Patients With Muscle Complaints. J Am Coll Cardiol. 2017;70(10):1290-301.
- Banach M, Rizzo M, Toth PP, Farnier M, Davidson MH, Al-Rasadi K, Aronow WS, Athyros V, Djuric DM, Ezhov MV, Greenfield RS, Hovingh GK, Kostner K, Serban C, Lighezan D, Fras Z, Moriarty PM, Muntner P, Goudev A, Ceska R, Nicholls SJ, Broncel M, Nikolic D, Pella D, Puri R, Rysz J, Wong ND, Bajnok L, Jones SR, Ray KK, Mikhailidis DP. Statin intolerance - an attempt at a unified definition. Position paper from an International

- Lipid Expert Panel. Arch Med Sci. 2015;11(1):1-23.
15. Choi HJ, Park JN. Management of Risk of Statin Therapy. J Korean Acad Fam Med. 2004;25(10):713-20.
 16. Ku GR, Lee HI, Kim SJ, Shin MR, Park HJ, Roh SS, Seo YB. Effects of Steaming Process on Liriopsis Tuber to Antioxidant Activities and Hyperlipidemia Induced Rats. Kor. J. of Herbol. 2018;33(5):89-103.
 17. Kim JS, Park MJ, Kim SJ, Shin MR, Lee AR, Park HJ, Roh SS, Seo YB. Studies on Antioxidant and Anti-hyperlipidemic Effects in Induced Hypercholesterolemic Rats of Steamed *Achyranthis Bidentatae Radix*. Kor. J. of Herbol. 2018;33(6):43-60.
 18. Feng Xiu Jin, Roh SS, Oh DS, Seo YB. Lipid Improvement Effect of Fermented *Cynanchi wilfordii Radix* in Hyperlipidemia Rats. Kor. J. of Herbol. 2015;30(6):83-91.
 19. Ministry of Food and Drug Safety(MFDS). The Korean Pharmacopoeia. [Internet].[Cited 2021 June 2] Available from: <https://nedrug.mfds.go.kr/ekphome>
 20. Kim HR, Antonisamy P, Kim YS, Kwon YK, Ryu DG, Lee YR, Lee G, Ham HD, Kwon KB. Amomum villosum Lour. fruit extract ameliorates high-fat diet-induced body mass gain and adipogenic pathways in C57BL/6 mice. Journal of King Saud University - Science. 2021;33:101473
 21. Song MY, Kang SY, Oh TW, Kumar RV, Jung HW, Park YK. The Roots of *Atractylodes macrocephala* Koidzumi Enhanced Glucose and Lipid Metabolism in C2C12 Myotubes via Mitochondrial Regulation. Evid Based Complement Alternat Med. 2015;2015:643654.
 22. Song MY, Lim SK, Wang JH, Kim H. The Root of *Atractylodes macrocephala* Koidzumi Prevents Obesity and Glucose Intolerance and Increases Energy Metabolism in Mice. Int. J. Mol. Sci. 2018;17:19(1):E278.
 23. Gutman R, Rauch M, Neuman A, Khamaisi H, Jonas-Levi A, Konovalova Y, Rytwo G. Sepiolite Clay Attenuates the Development of Hypercholesterolemia and Obesity in Mice Fed a High-Fat High-Cholesterol Diet. J Med Food. 2020;23(3):289-96.
 24. Al-Muzafar HM, Amin KA. Efficacy of functional foods mixture in improving hypercholesterolemia, inflammatory and endothelial dysfunction biomarkers-induced by high cholesterol diet. Lipids Health Dis. 2017;16(1):194.
 25. Brown, M. S. & Goldstein, J. L. Multivalent feedback regulation of HMG CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. J. Lipid Res. 1980;21(5):505-17.
 26. Goldstein JL, Brown MS. The LDL receptor. Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2009;29(4):431-8.
 27. Madison BB. Srebp2: A master regulator of sterol and fatty acid synthesis. J Lipid Res. 2016;57(3):333-5.
 28. Luo J, Yang H, Song BL. Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis. Nat Rev Mol Cell Biol. 2020;21(4):225-45.