

약용식물 혼합물의 고지혈증 개선 효과

이광호 · 박현수 · 윤용한 · 신용봉 · 백영찬 · 구대호 · 김성규 · 김명석[†]

(주)하원제약 중앙연구소

Antihyperlipidemic Effect of Complex of Medicinal Plant Products on Hyperlipidemic Rats Induced by High Cholesterol Diet

Kwang Ho Lee, Hyun Soo Park, Yong Han Yun, Young Bong Shin, Young Chan Baik, Dae Ho Kooh, Sung Kew Kim and Myoung Seok Kim[†]

Central Research Institute of Hawon Pharmaceutical, Jangheung 529-851, Korea.

ABSTRACT : The HWND_G02 (*Salvia miltiorrhiza* Bunge, *Crataegus pinnatifida*, *Polygonum multiflorum* Thunberg, *Cnidium officinale* Makino) and HWND_G03 (*Cinnamomum cassia* Blume, *Salvia miltiorrhiza* Bunge, *Crataegus pinnatifida*, *Polygonum multiflorum* Thunberg, *Cnidium officinale* Makino, *Allium macrostemon* Bunge) are new natural mixture composed with several oriental herbs. The aim of the present study was to investigate the effects of HWND extracts on high cholesterol diet (HCD)-induced hyperlipidemic rats. Male Sprague-Dawley rats were divided into five groups: control, HCD, atorvastatin (5 mg/kg, po), ethanolic extracts of HWND_G02 (1,000 mg/kg, po) and HWND_G03 (1,000 mg/kg, po) were administered to the HCD-induced hyperlipidemic rats for 4 weeks to evaluate their anti-hyperlipidemic activities. HWND extracts markedly decreased body and liver weight gain, and recovered serum lipid levels, such as total cholesterol (TC), triglycerides (TG), low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) and high density lipoprotein-cholesterol (HDL-C) in the HCD-induced hyperlipidemic rats. Furthermore, the lipid levels (TC and TG) and the lipid accumulation were significantly lowered in the liver tissue of HWND-administrated rats. After a HCD, each group had a lower atherogenic index (AI) compared to the HCD group. In conclusion, these data suggest that HWND extracts could be the candidate for the material to prevent hyperlipidemia.

Key Words : HWND_G02, HWND_G03, Hyperlipidemia, Triglyceride, High Cholesterol Diet, Natural Product

서 언

최근 국민생활이 향상되면서 식생활의 서구화 및 운동부족 등의 원인으로 인해 비만, 당뇨, 심혈관계 질환 등의 대사성 질환이 증가하고 있다 (Kim *et al.*, 2010). 고지혈증 (hyperlipidemia)은 지질대사의 이상으로 혈액 안에 LDL-콜레스테롤 (low-density lipoprotein cholesterol), 중성지방 (triglyceride) 등 다양한 형태의 지방성분들이 비정상적으로 상승하게 되는 질병이다 (Go *et al.*, 2014). 고지혈증의 분류는 유전적 요인으로 유발되는 일차적 고지혈증과 비정상적인 식습관, 약물 그리고 당뇨, 통풍과 같은 질병 등 여러 다른 요인으로 유발되는 이차적 고지혈증으로 나눌 수 있다 (Boullart

et al., 2012; Chait and Brunzell, 1990). 이러한 혈액 지질의 증가는 결국 비정상적인 혈전, 뇌졸중, 심근경색증을 일으키게 되며 사망률 또한 증가시킨다고 알려져 있다 (Chen *et al.*, 2011; Huang *et al.*, 2013; Oravec *et al.*, 2011). 지나친 영양섭취가 고지혈증의 가장 큰 원인 중 하나이며, 비만 환자에서 혈액의 지질이 집중적으로 상승하고 비대해진 지방덩어리가 늘어나는 것과 관련지어 고지혈증이 비만과 밀접한 관련이 있다는 사실이 계속해서 보고되고 있다 (Maraki *et al.*, 2011). 또한 고지혈증이 진행되면 간 조직의 중량과 지질함량을 급격히 증가 시킨다고 알려져 있다 (Kang *et al.*, 2011).

고지혈증을 치료에는 비만을 치료하는 방법과 같은 식이요법, 운동 등 생활습관을 변화시키는 것이 중요하고 simvastatin,

[†]Corresponding author: (Phone) +882-70-8260-6607 (E-mail) mskim1210@naver.com

Received 2015 January 2 / 1st Revised 2015 January 27 / 2nd Revised 2015 February 11 / 3rd Revised 2015 February 16 / Accepted 2015 February 16

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

atorvastatin 같은 스타틴계열의 약물을 이용하여 혈중 콜레스테롤 수치를 낮출 수 있다고 알려지고 있다 (Kim *et al.*, 2012). 하지만 화합물 소재의 약물의 부작용이 주목되면서 식물소재의 천연 생리활성 물질에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다(Choung *et al.*, 2013; Kwak and Lim, 2013; Seo *et al.*, 2013). 최근 다양한 한약재, 차, 과일과 같은 식물소재 천연물에서 비만 및 고지혈증을 포함한 대사성 질병을 치료하는 효능이 있으며, 부작용은 현저하게 적다는 것이 보고되었다 (Kim *et al.*, 2011; Lee *et al.*, 2008). 하지만 아직까지 고지혈증에 관해서는 뚜렷하게 효능을 보이는 안전성이 높은 천연물 소재의 약물은 개발이 미미한 상태이다.

한방처방은 과거 수백년 이상 임상을 통해 안전성이 증명된 것이기 때문에, 한방처방에 사용되는 한약재 작물은 치료제로 개발할 경우 커다란 장점이 될 수 있다. 본 연구는 전통적으로 사용되는 한약재의 혼합추출물로 산사 (*Crataegi fructus*), 적하수오 (*Polygoni multiflori Radix*), 단삼 (*Salviae miltiorrhizae Radix*), 천궁 (*Cnidii rhizoma*), 해백 (*Bulbus allii Macrostemi*), 계지 (*Cinnamomi ramulus*)로 구성되어 사용하였다. 이들을 구성 성분으로 하는 조성물의 고지혈증 유발 백서에서 효과를 입증한바 있으며, 추가적인 예비시험을 통해 최종적으로 구성물들을 결정하였다 (KooH *et al.*, 2013). HWND_G02 및 G03의 가장 큰 비율을 차지하는 산사, 적하수오, 단삼은 현재 고지혈증의 치료에 효과적이라는 보고가 계속되고 있으며 약리적인 기전도 밝혀지고 있다 (Ji and Gong, 2008; Niu *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2014). 또한 이 약재들은 중국 SFDA (State Food and Drug Administration)에서는 고지혈증을 치료하는 식의약소재로서 높은 빈도의 승인을 받은 상태이기 때문에 그 효과가 어느 정도 입증되었다고 할 수 있다 (Xie *et al.*, 2012). 천궁은 항산화 효능, 혈액순환을 강화시키며 간독성 및 간의 지질을 낮춰주는 효과를 가지고 있다는 것이 알려지고 있다 (Heo and Ha, 2011; Park *et al.*, 2002; Sung and Son, 1994). 또한 해백은 비만과 그에 관련된 질병을 예방할 수 있으며, 혈관내피세포의 손상을 줄여 혈관관련 질병에 도움을 준다고 보고되고 있다 (Kwon *et al.*, 2003; Xie *et al.*, 2008). 마지막으로 계지의 효능으로는 항혈전 작용으로 혈액순환을 용이하게 하여 고지혈증을 비롯한 심혈관계 질환을 예방할 수 있으며, 콜레스테롤을 효과적으로 낮출 수 있다고 알려지고 있다 (Kim *et al.*, 2002; Ryu *et al.*, 2010). 최근 한방처방에서 사용하는 약재 작물과 다른 한약재 작물을 혼합하여 더욱 효과적인 새로운 천연물 의약품 개발하려는 노력이 계속되고 있다. 물론 새로운 약재 혼합물은 현대적 기술을 바탕으로 과학적이고 합리적인 측면에서 그 효능을 증명하여 평가하는 과정이 필수적으로 진행되어야 한다.

본 연구에서는 고지혈증을 치료하기 위해 다양한 혼합약물

의 예비실험을 통해 압축된 후보 약물 중 새롭게 개발한 혼합추출물인 HWND_G02와 G03을 사용하였으며, 고지혈증이 유발된 rat에서 혈액의 생화학적 변화, 간 조직의 지질 변화, 동맥경화지수 등을 분석하여 평가하였다. 이에 우리는 HWND_G02와 G03가 고지혈증 치료에 매우 효과적인 천연물 기반 약물임을 증명함으로써 식의약 소재로 활용하기 위한 기초 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 시료의 조제

약재 구성은 Table 1과 같다. 구성약재는 (주)화평디엔에프를 통하여 절편된 것을 구입하였으며, 이들을 정선하여 사용하였다. 각 처방의 구성약재를 혼합하여 약재 무게의 10배에 해당하는 부피의 30% 에탄올을 첨가하여 100°C에서 4시간 동안 2회 반복 추출하였다. 각각의 추출물은 동결 건조하여 수득률을 확인하였다 (HWND_G02: 26.4%, HWND_G03: 31.4%).

2. 기기 및 분석조건

HPLC는 alliance e2695 system (Waters, Milford, MA)을 이용하여 분석하였다. 각각의 시료 50 mg을 취하여 50% MeOH 10 ml에 용해시키고, 0.2 µm 실린지 필터 (Millipore, Seoul, Korea)를 이용하여 HPLC 분석에 사용하였다. HWND의 주요성분인 chlorogenic acid, tetrahydroxystilbene, salvianolic acid 및 ligustilide에 대하여 함량분석을 Table 2의 조건에 따라 분석하였다. HWND_G02 및 HWND_G03의 주요성분 함량은 Table 3에 나타내었다.

3. 실험동물

실험동물은 6주령의 수컷 SD rat (Sprague-Dawley rat, 체중 180 ~ 220 g)를 대한바이오링크 (Eumseong, Korea)에서 구입하였으며, 1주일간 순화기간을 가졌다. 실험기간 동안 일반 사료 (Rodent NIH031 Open Formula Auto, Zeigler Bros,

Table 1. The compositions of medicinal plant products.

Scientific name	Origin	Amount (g)	
		HWND_G02	HWND_G03
<i>Cinnamomum cassia</i> Blume	Korea	-	10
<i>Salvia miltiorrhiza</i> Bunge	Korea	20	16
<i>Crataegus pinnatifida</i>	Korea	40	28
<i>Polygonum multiflorum</i> Thunberg	Korea	30	16
<i>Cnidium officinale</i> Makino	Korea	10	10
<i>Allium macrostemon</i> Bunge	Korea	-	20
Total amount		100	100

Table 2. HPLC conditions for quantitative analysis.

Item	Conditions
Detection wavelength (nm)	302
Column	Luna C ₁₈ (250 mm × 4.6 mm, 5.0 mm)
Column oven (°C)	30
Flow rate (mL/min)	1.0
Injection volume (μL)	10.0
Mobile phase	A: 0.1% formic acid in water (pH 2.75) B: Acetonitrile 0-8 min, 5% B, 8-50 min, 5-85% B, 50-58 min, 85% B, 58-60 min 85-5% B, 60-70 min 5%

Table 3. The contents of chlorogenic acid, tetrahydroxystilbene, salvianolic acid and ligustilide in HWND extracts (n = 3).

Compounds	HWND_G02 (mg/g)	HWND_G03 (mg/g)
Chlorogenic acid	0.73 ± 0.11	0.69 ± 0.12
Tetrahydroxystilbene	0.72 ± 0.08	0.48 ± 0.08
Salvianolic acid	13.68 ± 1.14	11.35 ± 0.93
Ligustilide	5.42 ± 0.62	4.65 ± 0.31

Pennsylvania, USA)와 고콜레스테롤식이 (D12336 with 1.25% cholesterol, Research diets Inc, New Brunswick, USA)를 자유 급이 하였다. 음수는 자유 공급하였고, 실온 22.0 ± 2.0°C, 상대습도 50.0 ± 10.0%, 조명시간 12시간 (08:00 ~ 20:00), 조도 150 ~ 300 Lux로 설정하였다.

4. 고지혈증 유도 및 시료투여

고지혈증 유도는 8주간 고콜레스테롤 식이를 급이하여 유도하였으며, 체중 및 생화학지표를 기초하여 총 5군으로 각 군당 5수씩 분리하였다. 실험동물은 대조군 (Con)과 고지혈증 유도군 (HCD)으로 구분되며, 고지혈증 유도군은 다시 HCD군, 대조약물 (Lipitrol Tab, Hawonpharm, Seoul, Korea)군 (ATO), HWND_G02, HWND_G03군으로 나누었다. 약물은 0.4% carboxymethyl cellulose (CMC-Na) 용액에 현탁하여 사용하였으며, 총 4주간 약물을 투여하였다. 실험기간 동안 대조군 (Con: 일반식이 및 0.4% CMC solution 경구투여), 유발군 (HCD: 고콜레스테롤 식이 및 0.4% CMC solution 경구투여), 대조약물군 (ATO: 고콜레스테롤 식이 및 Atorvastatin 5 mg/kg 경구투여), 실험군 (HWND_G02: 고콜레스테롤 식이 및 HWND_G02 1,000 mg/kg 경구투여, HWND_G03: 고콜레스테롤 식이 및 HWND_G03 1,000 mg/kg 경구투여)으로 분리하여 진행하였다.

5. 생화학적 분석

1) 혈중지질 및 간 독성 측정

시험 종료일에, 각 군별 12시간 절식 후 희생하였다. 각각의 혈액은 후대정맥에서 채혈하여 약 30분간 실온에 보관한 후에 5,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 혈청을 수집하였다. 분리한 혈청은 kit 시약을 이용하여 총 콜레스테롤 (TC), 중성지방 (TG), high density lipoprotein cholesterol (HDL-c), low density lipoprotein cholesterol (LDL-c), glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), glutamic pyruvic transaminase (GPT) 함량을 분석하였다 (Korea Asan Pharm, Seoul, Korea). 제조사가 제공한 매뉴얼에 따라 수행하였으며, 흡광도는 ELISA reader (Spectrostar-nano, BMG Labtech, Offenburg, Germany)를 사용하여 측정 및 분석하였다. 동맥경화지수 A.I. (atherogenic index)는 각 군에서 시간이 경과함에 따라 [(TC)-(HDL-c)]/(HDL-c)의 공식에 의해 계산하였다.

2) 간 조직의 지질 측정

적출한 1g의 간 조직을 Folch 법 (Folch and Less, 1957)에 의해 chloroform-methanol (3 : 1, v/v)을 첨가 후 균질화하여 추출하였으며, isopropanol 용액으로 용해시킨 후 효소 시약 kit (Korea Asan Pharm, Seoul, Korea)를 이용하여 TC, TG를 분석하였다. 제조사가 제공한 매뉴얼에 따라 수행하였으며, 흡광도는 ELISA reader (Spectrostar-nano, BMG Labtech, Offenburg, Germany)를 사용하여 측정 및 분석하였다.

6. 간조직의 형태학적 평가

적출한 간 조직을 각각 paraffin에 포매 (embedding) 한 후에 조직 절편기를 이용하여 5 μm 두께로 박절 한 다음, slide 위에 조직을 고정하여 oil-red-O (O1391, Sigma, MO, USA)를 이용하여 지질을 염색하였다. 염색 후 60% isopropanol로 세척하였고, 조직의 사진촬영과 분석은 광학현미경 (TS-100, Nikon, Tokyo, Japan)으로 시행하였다.

7. 통계분석

본 연구 결과는 평균치와 표준편차를 사용하여 나타내고, 각 군간 비교는 one-way analysis of variance (ANOVA)와 Student's *t*-test 분석을 실시하였다. 실험군간 유의확률이 $p < 0.05$ 일 때 통계학적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

1. HWND_G02 및 G03의 주요성분 함량 확인

산사에 포함되어 있는 지표성분으로 chlorogenic acid는 지방축적을 감소시킨다고 보고되었다 (Liu *et al.*, 2010; Zheng

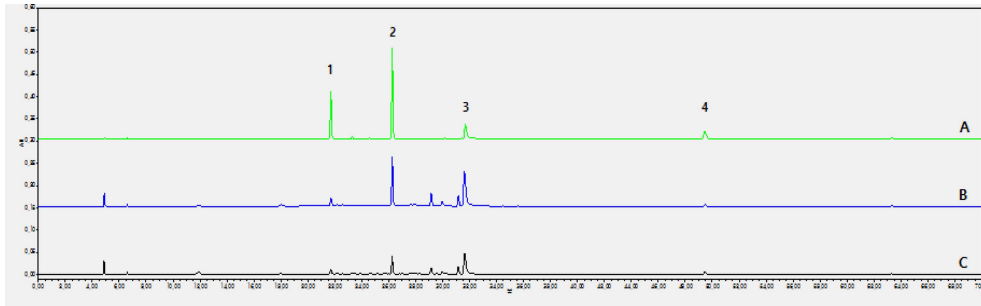


Fig. 1. HPLC chromatograms of (A) the standard mixture, (B) HWND_G02 and (C) HWND_G03. 1; chlorogenic acid (21.704 min), 2; tetrahydroxystilbene (26.258 min), 3; salvanolic acid (31.678 min), 4; ligustilide (49.435 min).

Table 4. The body weights, liver weights and the ratios of liver to body weights in rats.

Group	Liver weight (g)	Body weight (g)	Liver/Body (%)
Con	16.4 ± 2.0	496.5 ± 47.8	3.33 ± 0.54
HCD	26.9 ± 5.5*	582.0 ± 89.7*	4.62 ± 0.56*
ATO	24.5 ± 4.5	571.6 ± 73.9	4.26 ± 0.32**
HWND_G02	23.8 ± 4.1	577.2 ± 60.1	4.35 ± 0.31**
HWND_G03	22.2 ± 2.4**	542.6 ± 43.3**	4.15 ± 0.33**

Values are means ± SD for five experiments. *Significantly different from control group ($p < 0.05$). **Significantly different from HCD group ($p < 0.05$). Con; control, HCD; high-cholesterol diet, ATO; high-cholesterol diet + atorvastatin, HWND_G02; high-cholesterol diet + HWND_G02, HWND_G03; high-cholesterol diet + HWND_G03.

et al., 2014). 적하수오의 지표성분으로 tetrahydroxystilbene은 LDL로 유발된 혈관손상을 보호하는 효능이 있음이 알려졌다 (Han et al., 2013; Yao et al., 2014). Salvanolic acid는 단삼에 포함되어 있는 대표적인 성분이며 최근 혈관세포에서 일어나는 염증을 억제시키는 효능이 밝혀졌다 (Chen et al., 2012; Xu et al., 2015). 또한 천궁의 지표성분인 ligustilide는 알려진 바에 의하면 신경세포에서 항염증 효능을 보이며 동물 모델에서 유도된 고혈압 발생을 감소시킬 수 있는 가능성을 제시하고 있다 (Du et al., 2007; Or et al., 2011). HPLC를 이용하여 HWND_G02 및 G03의 주요 지표성분들을 분석한 결과, chlorogenic acid, tetrahydroxystilbene, salvanolic acid 그리고 ligustilide의 머무름 시간은 21.7분, 26.3분, 31.7분 및 49.4분으로 각각 확인되었다 (Fig 1).

2. 고지혈증이 유발된 동물모델에서 HWND_G02 및 G03의 체중 및 간 중량 변화

HWND_G02 및 G03이 고지혈증 질환에 미치는 영향을 알아보기 위해, 고콜레스테롤 식이로 인해 고지혈증이 유발된 rat에 하루에 1회, 4주 동안 경구 투여하였다. 대조군에 비해 고지혈증이 유발된 군에서 체중과 간 중량이 큰 폭으로 증가하

였으나, HWND_G02와 G03를 투여한 군에서 현저하게 감소함을 보였다 (Table 4). 특히 HWND_G02는 유의성이 인정되지 않은 반면, HWND_G03을 투여한 군은 고지혈증 유발군과 비교하였을 때, 체중에서 39.4 g, 간 중량은 4.7 g이 감소하며 유의성을 나타내었다. 즉, HWND_G03의 투여는 고지혈증으로 인한 체중과 간 중량의 증가를 완화시키는 효능을 보였다.

3. HWND_G02 및 G03에 의해 고지혈증이 유발된 동물모델의 혈액에서 지질함량 지표 및 동맥경화 지수 변화

고지혈증은 지질과 관련된 비만, 당뇨, 동맥경화 등 대사질환과 밀접한 관련이 있으며, 이러한 대사질환에 의해 혈액의 TC, TG, LDL-c 등 지질함량을 높인다는 결과가 오래전부터 알려져 있다 (Park et al., 2014). HWND가 혈액안의 지질과 동맥경화 지수에 미치는 영향을 알아보기 위해 각 실험군의 혈액을 채취하여 TC, TG, HDL-c 및 LDL-c를 측정하였고, 이를 토대로 동맥경화 지수를 구하였다. 대조군과 비교하여 고지혈증 유발군에서 높아진 TC, TG, LDL-c 수치가 HWND_G02군 (TC: 29.4 mg/dl 감소, TG: 100.4 mg/dl 감소, LDL-c: 30.3 mg/dl 감소)과 HWND_G03군 (TC: 38.2 mg/dl 감소, TG: 108.8 mg/dl 감소, LDL-c: 36.8 mg/dl 감소)에서 효과적으로 감소하였다. HDL-c는 대조군과 비교하여 고지혈증 유발군에서 감소하였지만 HWND_G02군에서는 5.8 mg/dl, HWND_G03군은 2.8 mg/dl 회복시켰다. 또한 동맥경화지수는 고지혈증 질병의 악화정도를 파악 할 수 있는 지표이기 때문에 본 연구에서는 재료 및 방법에서 제시된 방법에 의해 점수를 산출하였으며, 결과를 분석해보면 고지혈증 유발군은 3.4 ± 0.6 까지 높은 점수를 보였지만 HWND_G02는 2.1 ± 0.4 , HWND_G03은 2.2 ± 0.5 로 각 각 유의성 있게 감소된 점수를 기록하였다 (Fig. 2). 전체적으로 고지혈증으로 인해 높아진 혈액 속 지질함량과 동맥경화 지수를 HWND_G02 및 G03 투여로 정상치에 근접하게 회복시켜주는 모습을 보였으며, 특히 TG의 수치가 고지혈증 유발군에 비해 대조약물군에서 75.6 mg/dl 를 감소시킨 것에 반해, HWND_G02 및 G03는

고지혈증 유발 백서에서 약용식물 혼합추출물의 영향

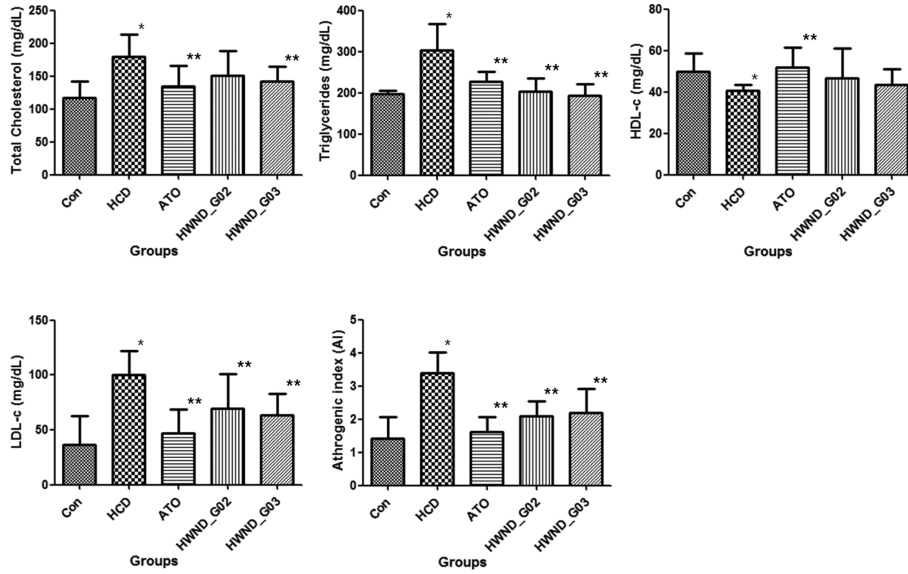


Fig. 2. Effect of HWND extracts on the serum lipid levels and atherogenic index in HCD-induced hyperlipidemic rats. On day 28, the blood sample was collected from postcaval vein and the serum was prepared. The amount of lipid levels and atherogenic index in serum was measured by ELISA. Values are means \pm SD for five experiments. *Significantly different from control group ($p < 0.05$). **Significantly different from HCD group ($p < 0.05$). Con; control, HCD; high-cholesterol diet, ATO; high-cholesterol diet + atorvastatin, HWND_G02; high-cholesterol diet + HWND_G02, HWND_G03; high-cholesterol diet + HWND_G03.

100.4 ~ 108.8 mg/dl 더 효과적으로 감소시키는 결과를 나타냈다. 최근, 고지혈증의 치료에 대한 관심이 많아지면서 다양한 화합물 소재의 치료제가 많이 개발 되었다. 그 중 가장 많이 사용되는 약물은 스타틴계열이다. 스타틴계열의 약물은 HMG-CoA-Reductase 억제제로서 콜레스테롤 수치를 줄이는 기전으로 특히 LDL-c를 낮추어 고지혈증을 치료한다고 알려져 있다 (Babelova *et al.*, 2013). 중성지방은 콜레스테롤과 함께 혈액 속에 존재하는 지방으로, 간에서 70% 이상이 만들어지는 콜레스테롤과 다르게 음식의 영향을 많이 받는다고 알려져 있다. 콜레스테롤과 비슷하게 중성지방이 높아질 경우 동맥이 굳어지는 동맥경화, 심장마비, 중풍, 비만, 고혈압 그리고 고지혈증으로 진행되는 대사증후군의 주요 발병 요인이 된다. 특히, 중성지방은 지방을 보다 적게 섭취하고 전통적으로 쌀을 주식으로 고당질섭취가 많은 한국인이 서양인에 비해 더 높은 수치를 보인다고 보고되고 있다 (Oh *et al.*, 2004; Yagalla *et al.*, 1996). 이로써 한국인에게는 생체내의 높은 콜레스테롤 수치보다 높은 중성지방이 오히려 고지혈증 발병에 큰 영향을 줄 수 있을 것을 예상할 수 있다. 본 연구에서 사용한 대조약물은 atorvastatin으로 현재 고지혈증 치료제로 많이 쓰이는 대표적 스타틴계열의 약물이다. 고지혈증 유발군에서 혈액 내 중성지방의 감소율을 비교해보면 각각 ATO군은 약 24.9%, HWND_G02는 약 33.1%, HWND_G03은 약 35.9%의 결과를 나타내었다. 이를 분석해보면, 고지혈증 질환

에서 콜레스테롤 수치를 감소시키는 방법을 통해 치료하는 스타틴계열과 비교하여 HWND_G02와 G03은 중성지방 수치를 보다 더욱 효과적으로 낮추어 주는 역할을 가지는 것을 확인할 수 있었다.

4. HWND_G02 및 G03에 의해 고지혈증이 유발된 동물모델의 혈액에서 간 독성 지표 변화

HWND_G02 및 G03이 간 독성 지표에 어떠한 영향을 주는지 알아보기 위해, 각 실험군의 혈액에서 GOT와 GPT의 수치를 측정하였다. 대조군과 비교하여 고지혈증 유발군에서 크게 상승한 GOT와 GPT 수치가 HWND_G02군 (GOT: 17.8 IU/L 감소, GPT: 18.4 IU/L 감소)과 HWND_G03군 (GOT: 19 IU/L 감소, GPT: 21 IU/L 감소)에서 유의성 있게 감소되는 결과를 나타냈다 (Fig. 3). 고지혈증 유발군에 비해 대조약물군에서 GOT는 24.2 IU/L, GPT는 22.4 IU/L 이 감소하였고 HWND_G02 및 G03군에서 GOT는 17.819 IU/L, GPT는 18.421 IU/L 감소하여, 비슷한 수준의 간독성을 낮추는 효능을 보였다. 이는 고지혈증 모델에서 높아진 간 독성 지표를 HWND_G02 및 G03의 투여로 인해 감소시킴을 의미한다. 지금까지, 고지혈증과 같은 대사질환은 간에 악영향을 주게 되어 간독성 수치인 GOT, GPT를 높인다는 결과가 보고되고 있다 (Abliz *et al.*, 2014). 분석결과, 고지혈증 유발모델에서 GOT, GPT가 현저히 상승한 것을 볼 수 있었고 HWND_G02

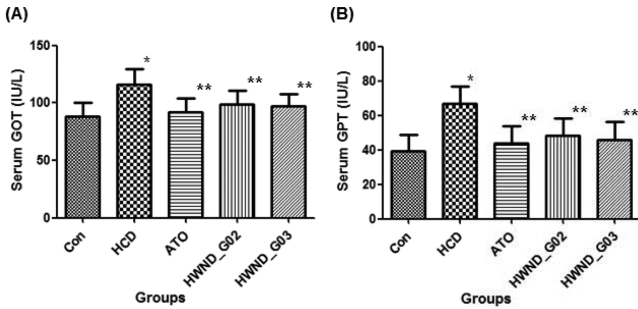


Fig. 3. Effect of HWND extracts on the serum hepatic levels in HCD-induced hyperlipidemic rats. On day 28, the amount of GOT and GPT in the serum was measured by ELISA. Values are means \pm D for five experiments. *Significantly different from control group ($p < 0.05$). **Significantly different from HCD group ($p < 0.05$). Con; control, HCD; high-cholesterol diet, ATO; high-cholesterol diet + atorvastatin, HWND_G02; high-cholesterol diet + HWND_G02, HWND_G03; high-cholesterol diet + HWND_G03.

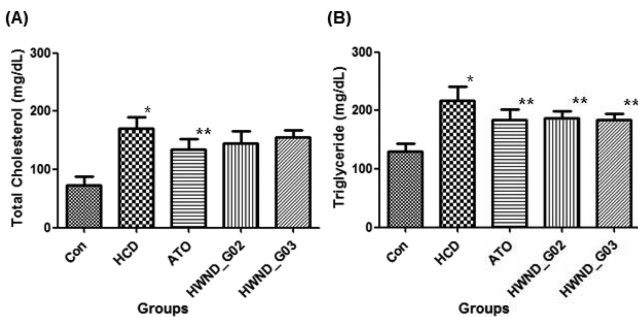


Fig. 4. Effect of HWND extracts on the liver lipid levels in HCD-induced hyperlipidemic rats. On day 28, the amount of TC and TG in liver tissue was measured by ELISA. Values are means \pm SD for five experiments. *Significantly different from control group ($p < 0.05$). **Significantly different from HCD group ($p < 0.05$). Con; control, HCD; high-cholesterol diet, ATO; high-cholesterol diet + atorvastatin, HWND_G02; high-cholesterol diet + HWND_G02, HWND_G03; high-cholesterol diet + HWND_G03.

및 G03의 투여로 인해 약 1530% 까지 감소시킬 수 있음을 확인하였다.

5. HWND_G02 및 G03에 의해 고지혈증이 유발된 동물모델의 간 조직에서 지질함량 지표 변화

HWND_G02 및 G03이 간 조직의 지질함량에 어떠한 영향을 주는지 알아보기 위해, 각 실험군의 간 조직에서 TC와 TG의 함량을 측정하였다. 대조군과 비교하여 고지혈증 유발군의 TC와 TG가 크게 상승하였고, 고지혈증 유발군에 비해 HWND_G02군 (TC: 25.4 mg/dl 감소, TG: 29.9 mg/dl 감소)과 HWND_G03군 (TC: 16.2 mg/dl 감소, TG: 33.1 mg/dl 감소)에서 현저하게 감소하였다 (Fig. 4). 특히 고지혈증 유발

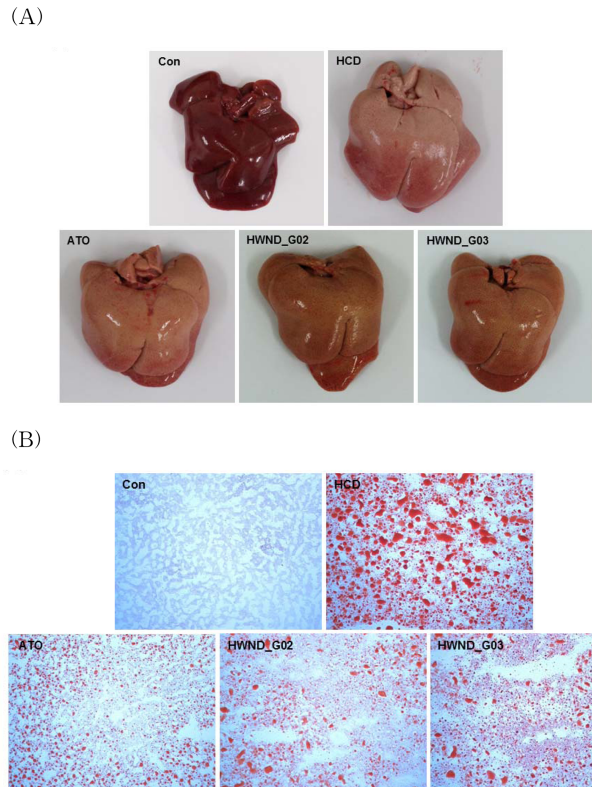


Fig. 5. Effect of HWND extracts on the fatty liver tissue in HCD-induced hyperlipidemic rats. (A) Representative images of the liver isolated from HCD-induced hyperlipidemic rats. (B) Oil-Red O staining of the liver tissue. Con; control, HCD; high-cholesterol diet, ATO; high-cholesterol diet + atorvastatin, HWND_G02; high-cholesterol diet + HWND_G02, HWND_G03; high-cholesterol diet + HWND_G03.

군과 비교하여 대조약물군에서 TC는 36.2 mg/dl, TG는 32.6 mg/dl 감소하였고 HWND_G02 및 G03군에서 TC는 16.2~25.4 mg/dl, TG는 29.9~33.1 mg/dl로 비슷한 수준으로 감소하는 능력을 보였다. 따라서, HWND_G02 및 G03 투여로 인해 간의 지질함량 수치도 낮추는 효과가 있음을 확인하였다.

6. HWND_G02 및 G03에 의해 간 조직의 형태학적 및 지질침착정도 변화

HWND_G02 및 G03의 투여로 인해 간의 TC와 TG를 감소하는 효과를 보였기 때문에 실제 조직에서 어떤 변화를 주는 지 검증하기 위해, 간 조직 절편에 침착된 지질을 oil-red O 염색법을 통해 확인하였다. 간 조직만을 육안으로 비교하였을 때, 대조군에 비해 고지혈증 유발군의 조직이 크게 비대해졌고 색이 변한 모습을 볼 수 있다. 이에 반면에 HWND_G02 및 G03 투여군의 조직은 비대해진 정도와 색이 변한 정도가 더 미미한 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 5A). 간 조직 절편을

염색하여 지질 침착정도를 보면, 대조군에 비해 고지혈증 유발군에 지질의 염색된 부분이 상당히 증가하였지만, 이에 비해 HWND_G02 및 G03군에서 현저하게 감소하였다 (Fig. 5B). 특히 대조약물군과 비슷한 정도로 효과적인 지질감소 역할을 보였다. 이에 HWND_G02 및 G03의 투여는 간 조직의 지질침착 정도를 완화시킴을 확인하였다.

본 연구결과를 요약하면, 고지혈증이 유발되었을 때 천연물 소재 기반의 약물인 HWND_G02와 G03은 혈액과 간 조직에서 총 콜레스테롤, 중성지방, LDL-c을 효과적으로 낮추고 HDL-c는 높여주는 역할을 하였으며, 조직염색을 통해 간에서 지질침착의 정도를 현저하게 감소시키는 사실이 증명되었다. 특히, HWND_G02와 G03는 중성지방을 월등하게 낮춰주는 효능을 나타내어 고당질섭취로 체내 중성지방이 높은 한국인에게 매우 적합하였다. 이는 앞으로 HWND_G02와 G03이 화합물 계열의 부작용이 많은 고지혈증 치료제 시장에서 안전성이 있는 뛰어난 천연물 소재 약물임을 장점으로 하여, 탁월한 효능을 나타내는 고지혈증 치료제로 개발될 수 있을 것으로 기대된다.

REFERENCES

- Abliz A, Aji Q, Abdusalam E, Sun X, Abdurahman A, Zhou W, Moore N and Umar A. (2014). Effect of *Cydonia oblonga* Mill. leaf extract on serum lipids and liver function in a rat model of hyperlipidaemia. *Journal of Ethnopharmacology*. 151:970-974.
- Boullart AC, De Graaf J and Stalenhoef AF. (2012). Serum triglycerides and risk of cardiovascular disease. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1821:867-875.
- Babelova A, Sedding DG and Brandes RP. (2013). Anti-atherosclerotic mechanisms of statin therapy. *Current Opinion in Pharmacology*. 13:260-264.
- Chait A and Brunzell JD. (1990). Acquired hyperlipidemia (secondary dyslipoproteinemias). *Endocrinology Metabolism Clinics North America*. 19:259-278.
- Chen K, Li W, Major J, Rahaman SO, Febbraio M and Silverstein RL. (2011). Vav guanine nucleotide exchange factors link hyperlipidemia and a prothrombotic state. *Blood*. 117:5744-5750.
- Chen X, Deng Y, Xue Y and Liang J. (2012). Screening of bioactive compounds in *Radix Salviae miltiorrhizae* with liposomes and cell membranes using HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 70:194-201.
- Choung MG, Hwang YS, Kim GP, Ahn KG, Shim HS, Hong SB, Choi JH, Yu CY, Chung IM, Kim SH and Lim JD. (2013). Antimelanogenic effect and whitening of anthocyanin rich fraction from seeds of *Liriope platyphylla*. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 21:361-371.
- Du JR, Y Yu, Yao Y, Bai B, Zong X, Lei Y, Wang CY and Qian ZM. (2007). Ligustilide reduces phenylephrine induced-aortic tension in vitro but has no effect on systolic pressure in spontaneously hypertensive rats. *American Journal of Chinese Medicine*. 35:487-496.
- Folch J and Less M. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 226:497-509.
- Go GW, Srivastava R, Hernandez-Ono A, Gang G, Smith SB, Booth CJ, Ginberg HN and Mani A. (2014). The combined hyperlipidemia caused by impaired Wnt-LRP6 signaling is reversed by Wnt3a rescue. *Cell Metabolism*. 4:209-220.
- Han DQ, Zhao J, Xu J, Peng HS, Chen XJ and Li SP. (2013). Quality evaluation of *Polygonum multiflorum* in china based on HPLC analysis of hydrophilic bioactive compounds and chemometrics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 72:223-230.
- Heo YY and Ha BJ. (2011). Effect of *Ligusticum chuanxiong* hort extracts on the bioactivity in high-fat diet-fed obese rats. *Journal of Food Hygiene and Safety*. 26:370-376.
- Huang J, Qian HY, Li ZZ and Zhang JM. (2013). Comparison of clinical features and outcomes of patients with acute myocardial infarction younger than 35 years with those older than 65 years. *American Journal of the Medical Sciences*. 346:52-55.
- Ji W and Gong BQ. (2008). Hypolipidemic activity and mechanism of purified herbal extract of *Salvia miltiorrhiza* in hyperlipidemic rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 119:291-298.
- Kang JS, Lee WK, Yoon WK, Kim N, Park SK, Park HK, Ly SY, Han SB, Yun J, Lee CW, Lee K, Lee KH, Park SK and Kim HM. (2011). A combination of grape extract, green tea extract and L-carnitine improves high-fat diet-induced obesity, hyperlipidemia and non-alcoholic fatty liver disease in mice. *Phytotherapy Research*. 25:1789-1795.
- Kim HS, Choi JW, Huh YM, Ryu SH and Suh PG. (2002). Plasma cholesterol-lowering effects of *Cinnamomi* cortex extract as an inhibitor of pancreatic cholesterol esterase. *Korean Journal of Life Science*. 12:106-112.
- Kim JD, Lee BI, Jeon YH, Bak JP, Jin HL and Lim BO. (2010). Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of green tea mixture and dietary fiber on liver of high fat diet-induced obese rats. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 18:224-230.
- Kim HY, Lim SH, Kwon CJ, Park YH, Lee KJ, Park DS, Kim KH, Kim SM and Park CB. (2011). Effect of *Lythrum salicaria* L. ethanol extract on lipid metabolism and anti-obesity in rat fed high fat diet. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 19:319-324.
- Kim DK, Kim SG, Poudel A, Jeong TS and Jung HJ. (2012). Anti-hyperlipidemic effect of the isolated component, quercetin-3-O-rhamnoside and the fractions from the extract of *Houttuynia cordata* in mice. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 43:101-106.
- Kooh DH, Kim SK, Balk YC, Shin YB, Cho JH and Ham SH. (2013). Composition for prevention or treatment of hyperlipidemia. *Korea Patent*. 10-1483121.
- Kwon KB, Lee HS, Kang GS, Kim IS and Ryu DG. (2003). Effects of *Bulbus allii Macrostemi* extract on PKC activity in pulmonary vascular endothelial cells damaged by XO/HX. *Korean Journal of Oriental Physiology and Pathology*. 17:443-446.

- Kwak HG and Lim HB.** (2013). *Ligustrum lucidum* fruits extract inhibits acute pulmonary inflammation in mice. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 21:323-328.
- Lee JH, Cho CW, Han XF, Hwang JY, Kang MJ, Joo HJ, Kim ME, Seo YJ and Kim JI.** (2008). Amelioration of plasma glucose and cholesterol levels in Db/db mice by a mixture of chinese herbs. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 16:225-230.
- Liu P, Yang B and Kallio H.** (2010). Characterization of phenolic compounds in chinese hawthorn(*Crataegus pinnatifida* bge. var. *major*) fruit by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. Food Chemistry. 121:1188-1197.
- Maraki MI, Aggelopoulou N, Christodoulou N, Anastasiou CA, Toutouza M, Panagiotakos DB, Kavouras SA, Magkos F and Sidossis LS.** (2011). Lifestyle intervention leading to moderate weight loss normalizes postprandial triacylglycerolemia despite persisting obesity. Obesity. 19:968-976.
- Niu C, Chen C, Chen L, Cheng K, Yeh C and Cheng J.** (2011). Decrease of blood lipids induced by Shan-Zha(fruit of *Crataegus pinnatifida*) is mainly related to an increase of PPAR α in liver of mice fed high-fat diet. Hormone and Metabolic Research. 43:625-630.
- Oh KW, Nam CM, Kim CI and Lee YC.** (2004). The effects of dietary carbohydrate on serum triglyceride concentrations in Korea. Journal of Nutrition and Health. 37:448-454.
- Or TC, Yang CL, Law AH, Li JC and Lau AS.** (2011). Isolation and identification of anti-inflammatory constituents from *Ligusticum chuanxiong* and their underlying mechanisms of action on microglia. Neuropharmacology. 60:823-831.
- Oravec S, Krivosikova Z, Krivosik M, Gruber K, Gruber M, Dukt A and Gavornik P.** (2011). Lipoprotein profile in patients who survive a stroke. Neuro Endocrinology Letters. 32:496-501.
- Park M, Yi JW, Kim EM, Yoon IJ, Lee EH, Lee HY, Ji KY, Lee KH, Jang JH, Oh SS, Yun CH, Kim SH, Lee KM, Song MG, Kim DH and Kang HS.** (2014). Triggering receptor expressed on myeloid cell 2(TREM2) promotes adipogenesis and diet-induced obesity. Diabetes. 64:117-127.
- Park YC, Lee SD, Heo Y, Kim HS and Lee IS.** (2002). Effects of *Ligusticum chuanxiang* on blood circulation and oxidative stress. Korean Journal of Oriental Preventive Medical Society. 6:86-94.
- Ryu HY, Ahn SM, Kim JS and Sohn HY.** (2010). Evaluation of in-vitro anticoagulation activity of 33 different medicinal herbs. Journal of Life Science. 20:922-928.
- Seo YC, Kim JS, Kim YO, Kim JC and Lee HY.** (2013). Immune activity of *Lithospermum erythrorhizon* extracted by extreme low temperature extraction process. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 21:105-111.
- Sung TS and Son GM.** (1994). Effect of *Cnidi rhizoma* boiling extract solution on enzyme and hormone of plasma, and liver in the fatted rats induced by high fat dietary. Korean Journal of Food and Nutrition. 7:108-113.
- Wang W, He Y, Lin P, Li Y, Sun R, Gu W, Yu J and Zhao R.** (2014). In vitro effects of active components of *Polygonum multiflorum* Radix on enzymes involved in the lipid metabolism. Journal of Ethnopharmacology. 153:763-770.
- Xie W, Zhang Y, Wang N, Zhou H, Du L, Ma X, Shi X and Cai G.** (2008). Novel effects of macrostemonoside A, a compound from *Allium macrostemon* Bung, on hyperglycemia, hyperlipidemia, and visceral obesity in high-fat diet-fed C57BL/6 mice. European Journal of Pharmacology. 559:159-165.
- Xie W, Zhao Y and Du L.** (2012). Emerging approaches of traditional Chinese medicine formulas for the treatment of hyperlipidemia. Journal of Ethnopharmacology. 140:345-367.
- Xu S, Zhong A, Bu X, Ma H, Li W, Xu X and Zhang J.** (2015). Salvianolic acid B inhibits platelets-mediated inflammatory response in vascular endothelial cells. Thrombosis Research. 135:137-145.
- Yagalla MV, Hoerr SL, Song WO, Enas E and Garg A.** (1996). Relationship of diet, abdominal obesity, and physical activity to plasma lipoprotein levels in Asian Indian physicians residing in the United States. Journal of the American Dietetic Association. 96:257-261.
- Yao W, Huang C, Sun Q, Jing X, Wang H and Zhang W.** (2014). Tetrahydroxystilbene glucoside protects against oxidized LDL-induced endothelial dysfunction via regulating vimentin cytoskeleton and its colocalization with ICAM-1 and VCAM-1. Cellular Physiology and Biochemistry. 34:1442-1454.
- Zheng G, Qiu Y, Zhang QF and Li D.** (2014). Chlorogenic acid and caffeine in combination inhibit fat accumulation by regulating hepatic lipid metabolism-related enzymes in mice. British Journal of Nutrition. 112:1034-1040.