五味子 클로로포름 분획물이 이상지질혈증 생쥐의 지질대사 및 간 조직 유전자 변화에 미치는 영향

신윤리 · 김영균 · 김경민

동의대학교 한의과대학 순환신경내과학교실

The Effects of Schizandrae Fructus Chloroform Fraction on Gene Expression in Liver Tissue of Dyslipidemic Mice

Yoon Ri Shin, Young Kyun Kim, Kyoung Min Kim

Department of Cardiovascular and Neurologic Disease, College of Oriental Medicine, Dong-Eui University

Received: October 30, 2015

Revised: November 27, 2015

Accepted: December 1, 2015

Correspondence to: Kyoung Min Kim
Department of Cardiovascular and
Neurologic Disease, College of
Oriental Medicine, Dong-Eui
University, 62 Yangjeong-ro,
Busanjin-gu, Busan 47227, Korea
Tel: +82-51-850-8623
Fax: +82-51-867-5162
E-mail: kyoung@deu.ac.kr

Copyright © 2015 by The Society of Korean
Medicine for Obesity Research

Objectives: Schizandrae fructus (*Schizandra chinensis*) is one of very common herbs, it is known as natural antioxidants, anti-inflammatory agent. Also some reports show that its extract works to regulate of dyslipidemia. This study was designed to investigate the effects of Schizandrae fructus chloroform fraction (SFCF) on serum lipid levels in dyslipidemic mice.

Methods: The levels of total cholesterol, high density lipoprotein-cholesterol, triglyceride, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), fasting blood glucose in serum were measured. Histopathological and gene expression changes in liver tissue were also observed.

Results: Oral administration of SFCF lowered levels of total cholesterol and triglyceride, which were elevated by high-fat diet. But SFCF did not affect on weight changes and serum AST, ALT levels in dyslipidemic mice. After carrying out gene ontological analysis, large numbers of genes in high-fat diet group were up-(347) or down-regulated (235). In SFCF treated mice, some changed expression of the genes was restored to normal levels, with a recovery rate of 17%. And it seems that fatty acid biosynthesis pathway was one of important key pathways to recovery.

Conclusions: SFCF has beneficial effect on dyslipidemia, and could be used to prevent and treat cardiovascular disease.

Key Words: Fructus schizandrae, Fraction, Microarray analysis, Dyslipidemias, Gene ontology

서 론

2013년 국민건강영양조사를 보면, 만 30세 이상 성인 남성 중 13.8%, 여성 중 15.9%가 고콜레스테롤혈증을 가지고 있다고 보고되었으며, 이는 남자 7.2%, 여자 8.4%로 조사된 2005년 결과치보다 거의 2배로 증가한 수치이다¹⁾.

이상지질혈증(dyslipidemia)은 혈장 내에 total cholesterol, low density lipoprotein (LDL)-cholesterol, triglyceride의 농도가 높거나, high density lipoprotein (HDL)-cholesterol의 농도가 낮은 상태를 말한다²⁾.

이상지질혈증이 동맥경화나 심근경색 같은 허혈성 심질환의 위험을 증가시킬 수 있다는 것이 알려지면서 진단과 치료에 있어서 그 중요도가 더욱 높아지고 있다.

이상지질혈증에 관한 단일 약제 연구로는 황기³⁾, 산사⁴⁾, 단삼⁵⁾ 등이 있으며, 한약 연구로는 통심락⁶⁾, 혈부축어탕⁷⁾, 사물활혈탕⁸⁾, 황기계지오물탕⁹⁾ 등이 보고되었다. 각각의 연구들은 혈중지질 대사에 유의한 효과를 보여주었으나 대부분 조 추출물(crude extract)의 형태로 연구가 이루어져 그 작용기전을 파악하기에는 어려웠다.

오미자는 收斂固澁 益氣生津 補腎寧心하는 효능으로

만성기침, 발한과다, 갈증, 기력저하 및 유정(遺精), 활정(滑精) 등의 증상에 生脈散, 醒心散, 清心補血湯 등의 처방을 통해 활용하였음을 확인할 수 있다^{10,11)}.

오미자에 관한 연구를 살펴보면 항산화 및 혈당강하¹²⁾, 항염증 및 간보호 효과¹³⁾ 등의 생리 활성이 보고되었으며, 특히 이상지질혈증과 관련하여 오미자 추출물의 지방세포 분화 억제¹⁴⁾, 오미자의 증류수 추출물이나¹⁵⁾ 약침 제제¹⁶⁾로 이용하여 유의한 효과가 있다고 보고되었다.

그러나 상기 연구 등에서는 오미자의 추출방법으로 저온 물 추출 방식을 사용하였으며, 이러한 경우 생리활성물질의 수율이 비교적 높지 않고 그 활성 또한 약하다는 단점이 있다¹⁷⁾. 때문에 효율적인 추출방식을 통해 오미자의 생리활성을 자세하게 연구할 필요가 있다고 생각된다.

이에 저자는 오미자를 hexane, chloroform, ethyl-acetate, butanol 등을 이용하여 분획물을 얻어 실험한 결과, 고지방식이에 의해 유발된 이상지질혈증에 오미자 chloroform 분획물이 비교적 강한 활성을 나타내어 오미자 chloroform 분획물을 이용하여 고지방식으로 유발된 이상지질혈증 생쥐의 지질 대사 및 간 독성에 미치는 영향을 살펴보고, DNA microarray 기법으로 간 조직 내의 유전자 발현 변화를 분석하여 유의한 결과를 얻었기에 이를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

이상지질혈증 유발을 위하여 6주령 체중 25~30 g의 수컷 C57BL/6를 (주)샘타코 바이오 코리아(Samtako Inc., Osan, Korea)로부터 공급받아 사용하였다. 실험에 사용된 동물의 유지 및 관리에 있어서 사료 및 음용수를 자유롭게 섭취하도록 하였으며, 식품의약품안전처의 실험동물에 관한 법률 및 시행규칙에 따라 사육실의 온도 및 습도 조건을 유지하였고(실내온도 $24 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$), 조명의 주기도 12시간 간격으로 일정하게 수행하였다. 또한 polycarbonate cage를 사용하여 네 마리씩 분리하여 유지 관리하였다.

2) 약재

오미자(Schizandrae Fructus)는 (주)화림제약(Hwalim Natural Drug Co. Ltd., Busan, Korea)에서 규격품을 구입하였으며, 관능 검사를 통해 北五味子 (*Schizandra chinensis*)인 것을 확인한 후 정선하여 사용하였다.

2. 방법

1) 오미자 chloroform 분획물의 획득

구입한 오미자 500 g을 분쇄기로 잘게 부순 다음 실온에서 5일 동안 100% methanol에 담가서 여과액을 얻는 과정을 2회 반복하였고, 이를 동결 건조시켜 109.7 g의 건조 추출물을 얻었으며 수율은 약 21.94%였다. 이 추출물 중 100 g을 증류수에 현탁시킨 후 다시 hexane과 물을 1:1의 비율이 되도록 농도를 재조정하여 hexane층을 분리하였으며 역시 2회 반복하여 용액을 얻었다. 마찬가지로 chloroform, ethyl-acetate, butanol을 사용하여 극성에 따라 순차적으로 용매 분획물을 얻었다(Fig. 1). 본 연구에서는 예비 연구를 바탕으로 박층 크로마토그래피(thin layer chromatography)상 methanol 추출물과 가장 유사한 추출 및 분리 패턴을 보인 chloroform 분획물만을 사용하였으며, 이러한 과정을 거쳐 얻은 최종 추출물은 1.22 g으로 오미자 500 g에 대한 수율은 약 0.268%에 해당하였다.

Fig. 1. Purification procedure for the fractions isolated from Schizandrae fructus.

2) 이상지질혈증 유발 및 실험군 분류

이상지질혈증 유발을 위하여 4주간 30마리에는 고지방 식이를 공급하였으며, 8마리의 정상 식이군(normal, NOR)에는 일반 사료를 공급하였다. 실험 5주차에 고지방 식이군 중에서 체중을 기준으로 하여 대조군(control, CTL) 및 오미자 chloroform 분획물(*Schizandrae fructus* chloroform fraction, SFCF) 투여군을 각각 8마리씩 선별하였으며, 나머지 기준 체중 외의 14마리는 실험에서 탈락시켰다.

실험 5주차부터 NOR군은 일반 식이를, CTL군은 고지방 식이를 공급하면서 1차 증류수를 1일 1회 구강투여하였으며, SFCF군은 고지방 식이를 계속 공급하면서 SFCF를 10 mg/kg body weight/day 농도로 경구 투여하였다. 실험에 사용한 고지방 식이는 (주)두얼바이오텍(DooYeol Biotech, Seoul, Korea)에 주문 제작하여 사용하였으며, 조성은 Table 1과 같다.

3) 체중, 사료 섭취량 및 음수량 측정

4주간의 이상지질혈증 유발 기간이 끝난 뒤, 시료 투여 시작 일에 전자저울을 이용하여 기준 체중을 측정하였으며, 이후 1주 간격으로 체중을 측정하였다. 또한 3주간 시료를 투여하면서 주 1회 사료 섭취량(g) 및 음수량(ml)을 측정하였다. 측정 단위는 24시간으로, 전일 오후 4시에 고형사료와 음용수를 제공하고, 다음날 오후 4시에 남은 사료와 음용수의 양을 측정하여, 그 차이를 일일 사료 섭취량 및 음수

량으로 계산하였다.

4) 간 조직의 적출 및 처리

7주간의 실험이 끝난 후, 생쥐를 희생시키고 간 조직을 적출하였다. 간 조직 대엽의 침부를 절제하여 인산 완충액에 행군 뒤, 4% paraformaldehyde에 24시간 고정하였으며, 이후 paraffin 포매 과정을 거쳐 조직 절편을 완성하였다. 5 µm 두께로 절제한 조직을 슬라이드 글라스 위에 올리고 H&E 기법으로 염색한 후, 광학 현미경(Carl Zeiss Inc., Oberkochen, Germany)을 이용하여 관찰하였다.

5) 혈중 cholesterol 및 triglyceride, AST, ALT, glucose 수치 측정

3주간의 약물 투여가 끝난 후, 생쥐의 복대동맥에서 혈액을 채취하였다. 5,000×g로 20분간 원심 분리하여 상청액을 얻었으며, 이를 이용해 혈중 total cholesterol, HDL-cholesterol 및 triglyceride, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), glucose 수치를 측정하였다. 측정 시에는 각각의 측정용 kit (FUJIFILM Corp., Tokyo, Japan)를 사용하였다.

6) Microarray 실험

(1) RNA 분리, microarray 실험 및 데이터 분석

각 실험동물로부터 간 조직을 적출하여 곧바로 액체 질소에 담가서 얼린 뒤 -70°C에서 보관하였으며, 이로부터 얻은 RNA를 pooling한 후 약 45,000 oligonucleotide probes가 결합된 microarray (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, USA)에 반응시키고, 3DNA array detection system (Genisphere LLC, Hatfield, PA, USA)을 이용하여 형광염색하였다. 간 조직에 포함되어 있는 total RNA의 quality는 Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies Inc.)를 이용하여 측정하였으며, 상기 과정을 2회 이상 반복하여 결과의 재현성을 높이고자 하였다.

Microarray의 이미지 파일은 ScanArray scanner (Perkin-Elmer Inc., Waltham, MA, USA)를 이용하여 측정하였고, IMAGE 4.0 (Bio-discovery Inc., Hawthorne, CA, USA) 프로그램을 이용하여 수치화하였다. 발현의 증가 또는 감소의 기준은 NOR군에 비해 2배 또는 0.5배의 변화를 보

Table 1. The Compositions of High Fat Diet

Ingredient	Weight (g)	Calorie (kcal)
Casein	200	800
Sucrose	68.8	275.2
Cellulose	50	0
Soybean oil	25	225
Lard*	245	2,205
Mineral mix	10	0
Vitamin mix	10	40
L-Cystine	3	12
Choline bitartrate	2	0
Potassium citrate	16.5	0
DiCalcium phosphate	13	0
Calcium carbonate	2	0
Maltodextrin	125	500
Total	770.3	4,057.2

*Typical analysis of cholesterol in lard=0.95 mg/g.

인 유전자만을 대상으로 결정하였다.

(2) Pathway 분석

Pathway 데이터베이스는 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)에서 제공하는 자료를 활용하였다. 개별 pathway의 통계적 유의성은 다중비교 테스트를 이용하여 보정되었다.

3. 통계처리

실험 자료에 대한 통계적 분석은 통계 패키지인 SPSS ver. 12.0 for windows (SPSS Inc., Chicago, IL USA)를 이용하였다. 실험 성적은 평균±표준편차로 나타내었으며, 실험군 간 평균의 차이를 검정할 때에는 one way-ANOVA test를 시행하였고, P값이 0.05 미만일 때 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. 체중 변화에 미치는 영향

4주간의 고지방 식이를 통해 이상지질혈증을 유발시킨 후, 3주간 시료를 투여하면서 체중의 변화를 관찰한 결과, 각 실험군 모두 체중 증가의 경향이 나타났으며, 실험군 사이에 통계적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았다(Fig. 2).

Fig. 2. Effects of SFCF on changes of body weights in dyslipidemic mice. Body weights were measured on the day which SFCF was first administered (week 0) and every weeks. NOR: naive mice (n=8); normal, CTL: dyslipidemic mice (n=8); control, SFCF: Schizandrae fructus chloroform fraction-administered mice (n=8). Values are represented as mean±standard deviation.

2. 사료 섭취량 및 음수량에 미치는 영향

3주 간의 실험 기간 동안 실험동물이 섭취한 사료 및 음용수 양의 변화를 관찰하였으며, 각 실험군 사이에 통계적으로 유의한 차이는 관찰되지 않았다(Table 2).

3. 혈청 중 total cholesterol 수치 변화에 미치는 영향

실험동물의 혈청 중 total cholesterol 수치 변화를 관찰한 결과, CTL군에서 205.25±13.02 mg/dl로 나타나 167.13±13.38 mg/dl를 보인 NOR군에 비해 유의하게 증가하였고, SFCF군에서는 175.32±14.10 mg/dl로 나타나 CTL군에 비하여 유의하게 감소하였다(Fig. 3).

Table 2. Effects of SFCF on Changes of Food and Water Uptake in Dyslipidemic Mice

Group	Food uptake (g)	Water uptake (ml)
NOR	6.46±0.72	15.42±3.43
CTL	6.52±2.97	14.62±3.63
SFCF	6.84±2.51	13.55±4.21

Values are presented as mean±standard deviation.

SFCF: Schizandrae fructus chloroform fraction-administered mice (n=8), NOR: naive mice (n=8); normal, CTL: dyslipidemic mice (n=8); control.

Fig. 3. Effects of SFCF on total cholesterol levels in dyslipidemic mice. Total cholesterol levels in serum were measured using spectrophotometry. NOR: naive mice (n=8); normal, CTL: dyslipidemic mice (n=8); control, SFCF: Schizandrae fructus chloroform fraction-administered mice (n=8). Values are represented as mean±standard deviation. #P<0.05 as compared to NOR group. *P<0.05 as compared to CTL group.

4. 혈청 중 HDL-cholesterol 수치 변화에 미치는 영향

생쥐의 혈액으로부터 HDL-cholesterol 수치 변화를 관찰한 결과, NOR군 81.4 ± 11.6 mg/dl, CTL군 79.5 ± 5.6 mg/dl, SFCF군 76.1 ± 10.8 mg/dl로, 각 실험군 사이에 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다(Fig. 4).

5. 혈청 중 triglyceride 수치 변화에 미치는 영향

3주간 SFCF의 투여가 끝난 후에 생쥐의 혈중 triglyceride 수치 변화를 관찰한 결과, CTL군에서 121.54 ± 17.71 mg/dl로 나타나 80.45 ± 7.59 mg/dl를 보인 NOR군에 비해 유의한 증가를 보였고, SFCF군은 81.32 ± 7.36 mg/dl로 나타나 CTL군에 비하여 유의한 감소를 보였다. SFCF군을 NOR군

과 비교하였을 경우에는 유의한 차이가 나지 않았다(Fig. 5).

6. 간 조직의 지방 분포에 미치는 영향

7주후에 생쥐의 간 조직을 적출하여 관찰한 결과, 각각의 조직 샘플에서 거의 유사한 구조로 간세포가 무수히 열을 지어 분포하고 있음을 확인하였다. 간 세포판의 간격은 NOR군에 비해 CTL군에서 약간 넓었으나 정상 소견에 속하였고, 각 실험군 모두 흰색 방울 모양의 지방축적 현상 및 기타 특이 소견을 보이지 않았다(Fig. 6).

7. 혈청 중 AST 수치 변화에 미치는 영향

실험동물의 혈중 AST 수치 변화를 관찰한 결과, NOR군

Fig. 4. Effects of SFCF on high density lipoprotein (HDL)-cholesterol levels in dyslipidemic mice. HDL-cholesterol levels in serum were measured using spectrophotometry. NOR: naive mice (n=8); normal, CTL: dyslipidemic mice (n=8); control, SFCF: Schizandrae fructus chloroform fraction-administered mice (n=8). Values are represented as mean $\pm$ standard deviation.

Fig. 5. Effects of SFCF on triglyceride levels in dyslipidemic mice. Triglyceride levels in serum were measured using spectrophotometry. NOR: naive mice (n=8); normal, CTL: dyslipidemic mice (n=8); control, SFCF: Schizandrae fructus chloroform fraction-administered mice (n=8). Values are represented as mean $\pm$ standard deviation, #P < 0.05 as compared to NOR group, *P < 0.05 as compared to CTL group.

Fig. 6. Effects of Schizandrae fructus chloroform fraction (SFCF) on lipid accumulation of liver tissue in dyslipidemic mice. Liver tissues were observed using H&E ($\times 100$). (A) Naive mice group, (B) Dyslipidemic mice group, (C) SFCF-administered mice group.

에서 47.2 ± 11.3 U/L, CTL군 56.5 ± 13.1 U/L, SFCF군 48.7 ± 8.0 U/L로, 각 실험군 사이에는 통계적으로 유의한 차이가 보이지 않았다(Fig. 7).

8. 혈중 ALT 수치 변화에 미치는 영향

생쥐의 혈액으로부터 ALT 수치 변화를 관찰한 결과,

Fig. 7. Effects of SFCF on aspartate aminotransferase (AST) levels in dyslipidemic mice. AST levels in serum were measured using spectrophotometry. NOR: naive mice (n=8); normal, CTL: dyslipidemic mice (n=8); control, SFCF: Schizandrae fructus chloroform fraction-administered mice (n=8). Values are represented as mean $\pm$ standard deviation.

Fig. 8. Effects of SFCF on alanine aminotransferase (ALT) levels in dyslipidemic mice. ALT levels in serum were measured using spectrophotometry. NOR: naive mice (n=8); normal, CTL: dyslipidemic mice (n=8); control, SFCF: Schizandrae fructus chloroform fraction-administered mice (n=8). Values are represented as mean $\pm$ standard deviation. #P < 0.05 as compared to NOR group.

NOR군은 23 ± 2.7 U/L, CTL군은 31 ± 4.2 U/L로 나타나 두 군 사이에 유의한 차이를 확인하였다. 반면에 SFCF군에서는 30 ± 6.5 U/L로, CTL군과 SFCF군 간에는 유의한 차이가 없었다(Fig. 8).

9. 혈청 중 glucose 수치 변화에 미치는 영향

실험동물의 혈액으로부터 glucose 함량 변화를 관찰한 결과, CTL군에서 163.37 ± 17.27 mg/dl로 나타나 107.13 ± 17.10 mg/dl를 보인 NOR군에 비해 유의한 증가를 보였고, SFCF군은 122.63 ± 20.44 mg/dl로 나타나 CTL군에 비하여 유의한 감소를 보였다(Fig. 9).

10. 간 조직 유전자 발현 변화에 미치는 영향

적출된 간 조직의 RNA를 분리하여 microarray에 반응시킨 후 형광염색하여 원본 이미지를 얻었다. 형광 표지는 Cy3와 Cy5로 구성된 two colors system을 사용하였기 때문에 적색과 녹색 스팟으로 표현되었고, 의미 있는 변화를 보이지 않은 유전자 스팟은 노란색으로 나타났다(Fig. 10).

유전자 발현 변화를 살펴보기 위해 microarray 원본 이미지를 표준화, 시각화하여 군집 분석을 실시하였다. 붉은 색은 발현이 증가된 유전자를, 녹색은 발현이 감소된 유전자를 나타내었으며, 그 결과 CTL군에서 발현 변화를 보인

Fig. 9. Effects of SFCF on glucose levels in dyslipidemic mice. Glucose levels in serum were measured using spectrophotometry. NOR: naive mice (n=8); normal, CTL: dyslipidemic mice (n=8); control, SFCF: Schizandrae fructus chloroform fraction-administered mice (n=8). Values are represented as mean $\pm$ standard deviation. #P < 0.05 as compared to NOR group, *P < 0.05 as compared to CTL group.

유전자 중 일부가 SFCF군에서는 정상 수준으로 유지됨을 관찰할 수 있었다(Fig. 11).

발현이 변화한 유전자의 수를 확인한 결과, NOR군에 비해 CTL군에서 발현이 감소된 유전자가 235개, 증가된 유전자는 347개였으며, 그 중 SFCF 투여로 정상 유지된 유전

자는 각각 32개 및 84개였다.

11. 변화된 유전자의 ontology 및 pathway 분석

NOR군에 비하여 CTL군에서 변화를 보인 유전자들의 기

Fig. 10. Raw image of microarray. A total sequence set of ~45,000 oligonucleotide probes were printed onto glass microscope slides. The probe preparation and hybridization were performed using 3DNA array detection system with 20 µg of total RNA from cells. Untreated cells were used as reference RNA.

Fig. 11. Expressional profile of microarray. The normalized ratios were hierarchically clustered by using CLUSTER, and then visualized using TREEVIEW program. Red, green, and black color represent up-regulation, down-regulation, and no change of gene expression, respectively. The color intensity correlates with expression level of the gene. CTL: liver tissue from dyslipidemic mice; control, SFCF: liver tissue from Schizandrae fructus chloroform fraction-administered mice.

Table 3. Ontological Analysis of Genes Up-Regulated by Dyslipidemia

GO term	Count	%	P-value	Bonferroni	Benjamini	FDR	Fisher exact
Organelle fission	42	3,2	1,8E-10	4,6E-7	4,6E-7	3,2E-7	4,8E-11
Mitosis	40	3,0	6,1E-10	1,6E-6	7,9E-7	1,1E-6	1,7E-10
Nuclear division	40	3,0	6,1E-10	1,6E-6	7,9E-7	1,1E-6	1,7E-10
M phase of mitotic cell cycle	40	3,0	9,1E-10	2,4E-6	7,8E-7	1,6E-6	2,5E-10
Immune response	66	5,0	1,2E-9	3,2E-6	8,0E-7	2,2E-6	5,0E-10
Cell division	50	3,8	5,1E-9	1,3E-5	2,7E-6	9,1E-6	1,8E-9
Mitotic cell cycle	45	3,4	8,4E-9	2,2E-5	3,6E-6	1,5E-5	2,8E-9
Cell cycle process	59	4,5	1,2E-8	3,2E-5	4,6E-6	2,2E-5	4,9E-9

The most changed genes in expression were listed. Fisher exact test was performed for calculating enrichment P-values, and multiple test was performed for corrections (Bonferroni, Benjamini, and FDR).

GO: gene ontology, Count: number of genes in set with annotation, FDR: false discovery rate, the expected proportion of the observed enrichments due to random chance.

능적 연관성을 알아보기 위하여 gene ontology와 pathway 분석을 수행하였다.

Gene ontology 분석상, 발현이 증가한 유전자들은 cell division, nuclear division 등 cell cycle과 관련이 많았다 (Table 3). 반면에 발현이 감소한 유전자들은 steroid metabolic

process, cholesterol biosynthetic process 등의 지질 대사와 관련이 많은 것으로 나타났다(Table 4).

KEGG database에 기초하여 pathway 분석해본 결과도 gene ontology와 유사하게 cell cycle 및 지질대사와 연관된 pathway가 각각 상위에 랭크됨을 확인할 수 있었다(Table 5, 6).

Table 4. Ontological Analysis of Genes Down-Regulated by Dyslipidemia

GO term	Count	%	P-value	Bonferroni	Benjamini	FDR	Fisher exact
Sterol bio-synthetic process	11	4.1	2.2E-11	2.8E-8	2.8E-8	3.6E-8	6.5E-13
Cholesterol bio-synthetic process	10	3.7	8.8E-11	1.1E-7	5.6E-8	1.4E-7	2.2E-12
Steroid bio-synthetic process	13	4.8	4.1E-10	5.2E-7	1.7E-7	6.7E-7	2.7E-11
Sterol metabolic process	12	4.4	3.3E-8	4.1E-5	1.0E-5	5.3E-5	2.9E-9
Cholesterol metabolic process	11	4.1	1.5E-7	1.9E-4	3.8E-5	2.4E-4	1.3E-8
Lipid biosynthetic process	19	7.0	1.7E-7	2.2E-4	3.7E-5	2.8E-4	3.6E-8
Humoral immune response	9	3.3	8.2E-7	1.0E-3	1.5E-4	1.3E-3	5.9E-8
Steroid metabolic process	13	4.8	5.0E-6	6.4E-3	8.0E-4	8.2E-3	8.6E-7

The most changed genes in expression were listed. Fisher exact test was performed for calculating enrichment P-values, and multiple test was performed for corrections (Bonferroni, Benjamini, and FDR).

GO: gene ontology, Count: number of genes in set with annotation, FDR: false discovery rate, the expected proportion of the observed enrichments due to random chance.

Table 5. Pathway Analysis of Genes Up-Regulated by Dyslipidemia

Term	Count	%	P-value	Bonferroni	Benjamini	FDR	Fisher exact
Cell cycle	29	2.2	3.5E-7	6.0E-5	6.0E-5	4.3E-4	9.8E-8
ECM-receptor interaction	18	1.4	3.4E-5	5.9E-3	3.0E-3	4.2E-2	8.7E-6
Glycolysis/gluconeogenesis	16	1.2	2.5E-4	4.3E-2	1.4E-2	3.1E-1	7.0E-5
Cytokine-cytokine receptor interaction	28	2.1	4.1E-3	5.1E-1	1.6E-1	4.9E-0	2.1E-3
Allograft rejection	10	0.8	6.0E-3	6.5E-1	1.9E-1	7.1E-0	1.7E-3
Pyruvate metabolism	10	0.8	7.2E-3	7.2E-1	1.9E-1	8.5E-0	2.1E-3
p53 signaling pathway	13	1.0	7.6E-3	7.3E-1	1.7E-1	8.9E-0	2.7E-3
Intestinal immune network for IgA production	10	0.8	8.6E-3	7.8E-1	1.7E-1	1.0E-1	2.6E-3
Focal adhesion	26	2.0	9.5E-3	8.1E-1	1.7E-1	1.1E-1	5.1E-3
Biosynthesis of unsaturated fatty acids	8	0.6	1.0E-2	8.4E-1	1.7E-1	1.2E-1	2.6E-3

The pathways were presented from KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), and the most changed pathways in expression were listed. Fisher exact test was performed for calculating enrichment P-values, and multiple test was performed for corrections (Bonferroni, Benjamini, and FDR). Count: number of genes in set with annotation, FDR: false discovery rate, the expected proportion of the observed enrichments due to random chance, ECM: extracellular matrix, IgA: immunoglobulin A.

Table 6. Pathway Analysis of Genes Down-Regulated by Dyslipidemia

Term	Count	%	P-value	Bonferroni	Benjamini	FDR	Fisher exact
Retinol metabolism	11	4.1	4.4E-7	4.7E-5	4.7E-5	4.9E-4	4.4E-8
Steroid biosynthesis	6	2.2	1.7E-5	1.8E-3	9.1E-4	1.9E-2	7.1E-7
Terpenoid backbone biosynthesis	5	1.9	1.9E-4	2.0E-2	6.7E-3	2.1E-1	8.6E-6
Steroid hormone biosynthesis	6	2.2	1.0E-3	1.1E-1	2.7E-2	1.2E-0	1.2E-4
Prion diseases	5	1.9	5.6E-3	4.5E-1	1.1E-1	6.1E-0	7.3E-4
Linoleic acid metabolism	5	1.9	7.7E-3	5.6E-1	1.3E-1	8.3E-0	1.1E-3

The pathways were presented from KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), and the most changed pathways in expression were listed. Fisher Exact test was performed for calculating enrichment P-values, and multiple test was performed for corrections (Bonferroni, Benjamini, and FDR).

Count: number of genes in set with annotation, FDR: false discovery rate, the expected proportion of the observed enrichments due to random chance.

또한 각 pathway에 포함된 유전자들의 발현도를 고려하여 분석한 결과, CTL군에서 많은 pathway가 붉은색으로 표현되었다. 이는 유전자 활성이 증가하였다는 것을 의미하는 것으로, Fig. 10에서의 유전자 발현 프로파일과 패턴이 상당히 유사하다. SFCF 투여 후에 CTL군에서 증가된 활성이 정상 수준으로 유지되는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 fatty acid biosynthesis, glycerolipid metabolism, glycerophospholipid

metabolism 등 지질대사와 관련된 pathway가 다수 선별되었다(Fig. 12).

고 찰

이상지질혈증(dyslipidemia)은 혈액 내에 total cholesterol, triglyceride, LDL-cholesterol의 농도가 높거나 HDL-cholesterol의 농도가 낮은 상태를 말하는 것으로²⁾, 1948년 Framingham Heart Study에서 심혈관질환의 위험인자로 인식되면서¹⁸⁾, 임상적으로 매우 중요하게 다루어져 왔다.

이상지질혈증의 치료 지침은 2004년 개정된 NCEP (National Cholesterol Education Program) ATP III (Adult Treatment Panel III)¹⁹⁾에 기초하여 상당 기간 사용되었다. 이후 여러 임상연구들의 결과를 토대로 2013년 후반 미국심장학회(American College of Cardiology, ACC)와 미국심장협회(American Heart Association, AHA)에서 새로운 가이드라인을 발표하였고²⁰⁾, 앞으로 이상지질혈증 치료 지침에 적극 반영될 것으로 보인다.

ACC/AHA 가이드라인을 살펴보면 ATP III와는 달리 atherosclerotic cardiovascular disease (ASCVD)의 빈도가 감소될 수 있는 특정 환자들을 4개 군으로 분류하여 이에 해당하는 환자에게만 고강도 혹은 중강도의 스타틴 요법을 권고하고 있다. 반면에 위 항목에 해당되지 않는 환자에서는 스타틴 요법의 ASCVD 예방효과는 명확하지 않으며, 또한 아시아인의 경우에는 고강도 스타틴 약물요법을 조정할 수 있다고 하였으나 그 산출방법은 소개되지 않은 상태이다.

이와 같이 제한적인 스타틴 요법이 제시된 것은 그 부작용과도 관련이 깊다고 생각된다. 스타틴계열 약물의 부작용에 대해서는 다양하게 보고되고 있으며, 그 중 가장 흔한 것이 간 장애와 근육 장애이다²¹⁾. 일부 환자에서 스타틴 요법으로 인하여 간 효소 수치가 정상의 3배 이상으로 증가하였으며, 이러한 경우에는 스타틴 요법을 지속할 수 없다. 또한 관찰 연구에 따르면 스타틴 치료를 받은 사람 중 약 10%~15%에서 근육 문제가 발생하였으며, 대부분의 경우에는 근육통으로 그치지만²²⁾, 심각한 경우에는 횡문근융해증을 유발하여 생명에 위협을 초래하였다²³⁾. 따라서 스타틴 요법 외의 이상지질혈증의 안전한 치료법이 요구된다.

Fig. 12. Pathway activity profile of microarray. Red, green, and black color represent up-regulation, down-regulation, and no change of gene expression, respectively. The color intensity correlates with expression level of the genes. CTL: liver tissue from dyslipidemic mice; control, SFCF: liver tissue from Schizandrae fructus chloroform fraction-administered mice.

현재 우리나라에서도 이상지질혈증의 치료에 있어 LDL-cholesterol의 조절을 우선하고 있다. 그러나 2012년 한국보건의료연구원에서는 혈중 지질 항목 중 한국 남성은 total cholesterol, LDL-cholesterol, triglyceride 및 non-HDL (total cholesterol-HDL-cholesterol)이, 여성은 triglyceride가 특히 심뇌혈관질환의 위험요인으로 작용한다고 보고하였다²⁴⁾. 따라서 한국인의 특성에 맞는 이상지질혈증의 치료지침 및 안전한 치료물질의 개발에 대한 연구가 필요하다고 생각된다.

오미자는 목련과(木蘭科, Magnoliaceae)에 속한 落葉 木 質藤本인 五味子(北五味子) *S. chinensis* (Turcz.) Baill. 또는 華中五味子(南五味子) *S. sphenanathera* Rehd. et Wils.의 성숙한 과실을 건조한 것으로,五味를 가지고 있으나 酸味が主이고, 그 性이 溫하되 燥하지 않아 肺·心·腎 三經에 들어가 上으로는 肺氣를 斂하고 下로는 腎陰을 滋한다고 하였다¹⁰⁾. 지속적인 연구를 통해五味자의 다양한 생리적 활성이 보고되고 있으며, 특히 혈중 지질을 조절하는 데도 유의한 효과를 보여주었으나^{15,16)}, 그 기전에 대하여서는 연구가 부족하였다.

저자는 예비 실험을 통하여 고지방 식이에 의한 생쥐의 이상지질혈증에五味子 분획물들을 투여하여 그 활성을 확인하였으며, 이 중에도 활성도가 높았던 chloroform 분획물(SFCF)이 지질대사에 어떠한 과정을 거쳐 작용하는가를 알아보기 위하여 본 연구를 수행하였다.

7주간의 고지방 식이 후, CTL군에서 정상 식이의 NOR군에 비하여 total cholesterol 및 triglyceride 수치가 유의하게 상승하였으나, SFCF군은 CTL군에 비하여 해당 항목이 유의하게 감소하여 이상지질혈증에 SFCF의 투여가 유의한 효과가 있음을 보여주었다(Fig. 3, 5).

공복 시 혈당 또한 CTL군에서는 NOR군에 비하여 유의하게 증가하였으며, SFCF의 투여로 유의하게 감소되는 결과를 보였다(Fig. 9).

다만 HDL-cholesterol 수치가 NOR군에 비하여 통계학적 유의성은 없으나 CTL군 및 SFCF군에서 낮았으며, 이는 고지방식으로 인한 결과로 추정된다. 또한 CTL군에 비해 SFCF군이 HDL-cholesterol 수치가 오히려 더 감소하는 결과를 보였는데(Fig. 4), 이는 향후 추가적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

약물 투여가 진행되었던 3주의 실험기간 동안 각 실험군

의 체중변화에는 유의한 차이가 없었으며(Fig. 2), 사료 섭취량과 음수량에 있어도 특별한 차이를 발견할 수 없었다(Table 2). 이는 실험을 통해 유발된 이상지질혈증에 SFCF이 식욕 억제 등의 방법으로 혈중 지질을 조절하지 않았음을 나타내는 것으로, 식사량의 감소나 식습관의 변경 없이도 이상지질혈증을 개선하는 효과가 있음을 확인할 수 있다.

7주간의 실험 후에 NOR군, CTL군 및 SFCF군의 간 조직의 지방 분포에는 뚜렷한 차이를 발견할 수 없었으며(Fig. 6), 혈중 AST 수치도 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 7). 반면에 혈중 ALT를 측정된 결과, NOR군에 비해 CTL군의 경우 경도의 증가를 보였고, 그에 비해 SFCF군은 CTL군과 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 8).

ALT는 간세포 손상에 특이적으로 상승하는 aminotransferase로²⁵⁾, 고지방식으로 인하여 이상지질혈증이 발생하면서 간 조직 내 지방 축적은 되지 않았으나 경도의 간세포가 손상된 것으로 보인다. SFCF의 투여 후에 간 손상이 심해지지는 않았으나 간세포를 손상으로부터 보호하지는 못하였다. 이는五味자의 간 보호 효과를 보여주었던 타 연구 결과²⁶⁾와는 상이한 점으로, SFCF 외의五味子 분획물을 이용한 추가적인 연구가 필요하리라 생각된다.

Microarray 기법을 응용한 유전자 발현 변화 연구의 발전으로, 다양한 분야에서 활발한 연구가 진행되고 있다. 인간 유전학 분야에서는 인간의 질병에 관련된 유전자 발견을 주도하고 있으며²⁷⁾, 약물학 분야에서는 약물에 대한 유전자 변화의 반응이나 약물에 의한 유해 반응을 관찰하기가 용이해졌다²⁸⁾. 최근 관심이 집중되고 있는 시스템 생물학 분야에서도 microarray를 활용한 연구방법을 통해 정보를 추출하고 있으며, 이러한 결과를 이용하여 gene ontology와 같은 지식베이스를 확장함으로써 다양한 결과를 통합할 수 있게 되었다²⁹⁾.

본 연구에서도 유전자 발현 변화를 살펴보고 그 기전을 확인하기 위하여 적출한 간조직의 microarray를 실시 분석하였으며, 그 결과 NOR군에 비해 CTL군에서 347개의 유전자의 발현이 증가되고, 235개의 유전자의 발현이 감소되었음을 확인하였다. 반면에 SFCF를 투여하여 그 변화된 유전자 중 각각 84개 및 32개가 정상 수준으로 발현이 유지되었다. 전체적으로 고지방 식이로 인하여 발현 변화를 보인 총 582개의 유전자 중 116개의 유전자가 SFCF의 투여로

정상 수준으로 유지하였으며, 백분율로는 약 19.9%에 해당하였다.

CTL군에서 발현이 증가된 유전자는 cell cycle과, 감소된 유전자는 steroid 등의 지질 대사와 각각 연관되어 있었으며, KEGG pathway 분석 또한 유전자 프로파일과 유사한 패턴을 보여주었다(Table 3~6). PAPI (pathway activity profiling) 결과, CTL군에서 up-regulate된 fatty acid biosynthesis pathway가 SFCF군에서는 down-regulate되어 뚜렷한 차이를 보였으며, 그 외에 glycerolipid 및 glycerophospholipid metabolism pathway도 대조군에 비하여 up-regulate되는 정도가 감소하였다(Fig. 12).

이상의 연구결과를 종합할 때, SFCF는 식욕 억제 및 체중 감소를 일으키지 않으면서 혈중 지질 중 total cholesterol과 triglyceride를 조절하여 이상지질혈증을 개선하는 효과가 있었으며, 여기에는 fatty acid biosynthesis 등 지질대사와 관련된 pathway를 통하여 유전자 발현을 조절하는 기전이 있음을 확인할 수 있었다.

따라서 본 결과를 토대로 하여 연구를 발전시켜 나간다면, 이상지질혈증을 개선하고 심혈관계 질환을 예방하며 치료하는 데에 오미자 chloroform 분획물을 활용할 수 있으리라 생각된다.

결론

오미자 chloroform 분획물(SFCF)이 이상지질혈증 생쥐에 미치는 영향을 확인하기 위하여 4주간 고지방식이를 통해 이상지질혈증을 유발하고, 3주간 SFCF를 투여한 다음 혈중 total cholesterol, HDL-cholesterol, triglyceride 함량 변화 및 공복 시 혈당 변화를 관찰하고, AST, ALT 검사 및 간을 적출하여 조직병리학적 이상 변화를 확인하였으며, 유전자 microarray 분석을 시행한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. SFCF의 투여는 생쥐의 체중 증감에 영향을 끼치지 않았다.
2. SFCF는 이상지질혈증의 유발로 상승된 혈청 지질 항목 중 triglyceride와 total cholesterol 함량을 유의하게 감소시켰다.
3. SFCF 투여는 혈중 AST, ALT 수치 및 간 조직의 지방

분포에 영향을 끼치지 않았다.

4. SFCF 투여는 이상지질혈증 유발에 의하여 발현이 변화된 간 조직 유전자 중 약 19.9%의 발현 변화를 조절하였다.

5. SFCF 투여로 인한 유전자 발현 변화의 조절에는 fatty acid biosynthesis 등 지질대사와 관련된 pathway를 통한 기전이 있었다.

감사의 글

This work was supported by Dong-Eui University Grant (2015AA036).

References

1. Korea National Health & Nutrition Examination Survey [Internet]. Cheongju: Ministry of Health Welfare; [cited 2015 May 8]. Available from: <https://knhanes.cdc.go.kr/knhanes/index.do> = About KNHANES - Major Results - Chronic Disease - Dyslipidemia.
2. Department of Internal Medicine Asan Medical Center. Asan Medical Center Internal Medicine Manual 3rd edition. Seoul : Koonja Publishing Inc. 2009 : 380-7.
3. Roh SW, Kim JB. Effects of Astragali radix on the diet-induced hyperlipidemia in rats. Korean J Orient Physiol Pathol. 2008 ; 22(3) : 575-9.
4. Niu C, Chen C, Chen L, Cheng K, Yeh C, Cheng J. 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. Horm Metab Res. 2011 ; 43(9) : 625-30.
5. Kim HC, Kim HW, Kim YS, Lee JS, Kwon JN, Kim YG, et al. Effects of Salviae miltiorrhizae radix (SMR) on serum lipid level in hyperlipidemic rats. Kor J Herbol. 2007 ; 22(4) : 239-45.
6. Ha TH, Kim HY, Kim HW, Cho SI, Kim YG. Effects of Tong Xin Lou on levels of serum lipid in high fat diet-induced dyslipidemia in mice. Kor J Herbol. 2012 ; 27(3) : 107-12.
7. Beak G, Kim KC, Lee YT. The effect of HyulbuChukohtang on the hyperlipidemia rats. J Orient Physiol. 1998 ; 13(1) : 102-9.
8. Kang SS, Shin YJ, Jo JJ, JeonSY. Study of the effects of Samulhwallyeol-tang in hyperlipidemic animal model induced with a high-fat diet. J Int Korean Med. 2014 ; 35(2) : 119-32.
9. Kim KM, Jeong GS, Kim YG, Kwon JN. Effects of Whanggiyejiomul-tang on the hyperlipidemia in rats induced by triton WR-1339. Korean J Orient Med Physiol Pathol. 2001 ; 15(4) : 531-6.
10. Testbook National Institute of Oriental Medicine. Phytology. Seoul : Younglimsa. 2007 : 685-6.

11. Heo J. Donguibogam. Seoul : Bubin publishers. 2002 : 312-3.
12. Kim SI, Sim KH, Ju SY, Han YS. A study on antioxidative and hypoglycemic activities of Omija (*Schizandra chinensis* Baillon) extract under variable extract conditions. *Korean J Food Nutr.* 2009 ; 22(1) : 41-7.
13. Choo B, Chung KH, Seo YB, Roh SS. Antioxidant, antiinflammation and hepatoprotective activity of *Schizandrae fructus* processed with differentiated steaming number. *Kor J Herbol.* 2013 ; 28(2) : 83-92.
14. Park SY, Hwang HY, Seo EA, Kwon KB, Ryu DG. Inhibition effects of *Galla chinensis* extract on adipocyte differentiation in OP9 cells. *Korean J Orient Physiol Pathol.* 2012 ; 26(4) : 455-61.
15. Ock ES. Effect of *Schizandra chinensis* extract in hyperlipidemic rats. *J Koran Soc Food Nutr.* 1995 ; 24(5) : 658-62.
16. Lee S, Lee H. A study on the effect of herbal-acupuncture with *Schizandrae fructus* solution on hyperlipidemia in rats induced by high fat diet. *J Korean Acupunct Moxib Med Soc.* 2011 ; 28(2) : 143-53.
17. Kim HK, Na GM, Ye SH, Han HS. Extraction characteristics and antioxidative activity of *Schizandra chinensis* extracts. *J Korean Soc Diet C.* 2004 ; 19(5) : 484-90.
18. Dawber TR, Meadors GF, Moore FE Jr. Epidemiological approaches to heart disease: the Framingham Study. *Am J Public Health Nations Health.* 1951 ; 41(3) : 279-81.
19. National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation.* 2002 ; 106 : 3143-421.
20. Stone NJ, Robinson J, Lichtenstein AH, Merz NB, Blum CB, Eckel RH, et al. 2013 ACC/ AHA guideline on the treatment of blood cholesterol to reduce atherosclerotic cardiovascular risk in adults: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on practice guidelines. *Circulation.* 2014 ; 129(25 Suppl 2) : S1-45.
21. Bellosa S, Corsini A. Statin drug interactions and related adverse reactions. *Expert Opin Drug Saf.* 2012 ; 11(6) : 933-46.
22. Abd TT, Jacobson TA. Statin-induced myopathy: a review and update. *Expert Opin Drug Saf.* 2011 ; 10(3) : 373-87.
23. Mancini GB, Baker S, Bergeron J, Fitchett D, Frohlich J, Genest J, et al. Diagnosis, prevention, and management of statin adverse effects and intolerance: proceedings of a Canadian Working Group Consensus Conference. *Can J Cardiol.* 2011 ; 27(5) : 635-62.
24. National Evidence-based Healthcare Collaborating Agency. A study on Koreans all its cerebral vascular disease high risk dyslipidemia. Seoul : National Evidence-based Healthcare Collaborating Agency. 2012 : 1-129.
25. Textbook Compilation Committee of Internal Korean Medicine of Liver. Pathology of liver. Seoul : Oriental Medicine Institute Press. 2001 : 237.
26. Lee YK. Effect of Omija (*Schizandra chinensis* Baillon) methanol extract on Benzo(a)Pyrene induced hepatotoxicity in rats. *J East Asian Soc Diet Life.* 1995 ; 5(1) : 21-7.
27. Flint J, Eskin E. Genome-wide association studies in mice. *Nature Reviews Genetics* 2012 ; 13(November) : 807-17.
28. Daly AK. Genome-wide association studies in pharmacogenomics. *Nature Rev Genet.* 2010 ; 11(April) : 241-6.
29. Klipp E, Herwig R, Kowald A, Wierling C, Lehrach H. Systems biology in practice: concepts, implementation and application. US : John Wiley & Sons. 2008 : 442-7.