

저밀도 지방단백질의 산화에 대한 곰취 추출물의 항산화 효과

정성원 · 김은정 · 황보현주 · 함승시
강원대학교 식품생명공학부

Effects of *Ligularia fischeri* Extracts on Oxidation of Low Density Lipoprotein

Seong-won Jeong, Eun-jeong Kim, Hyun-ju Hwang bo and Seung-shi Ham
Division of Food and Biotechnology, Kangwon National university

Abstract

The study was carried out to investigate the antioxidant effects of ethanol, methanol, and water extracts or fractions of ethanol extract of *Ligularia fischeri* on low density lipoprotein(LDL) and ethanol extract was further fractionated. The methanol extract and ethyl acetate fraction showed strong antioxidant effect with 71.7% (13.36 nmol/mg) and 95% (1.35 nmol/mg) inhibition in the presence of 15 µg/mL, respectively. In the value of malondialdehyde(MDA) with oxidation time, ethanol, methanol and water extract in the presence of 25 µg/mL inhibited the oxidation up to 4h incubation and ethyl acetate fraction showed strong antioxidant effect up to 8h incubation. Also, the ethanol, methanol and water extract showed antioxidant effects in the agarose gel electrophoresis test. The conjugated diene formation by lipid oxidation with addition of Cu²⁺ in the *Ligularia fischeri* extracts and their fractions was decreased approximately 1.1 to 2.8 times and 2.2 to 3.2 times, respectively compared to control. In the degradation of apo B-100 by oxidation using SDS-PAGE, ethanol, methanol and water extract showed similar degradation band pattern compared to that of native LDL band. Apo B-100 contents using densitometer were 77.8, 92.5% and 82.3% in the ethanol, methanol and water extract, respectively, compared to 100% of native LDL. In the meanwhile, apo B-100 contents in hexane, ethyl acetate and water fraction were 38.8, 94.5 and 65.5% respectively. This results indicated that ethyl acetate fraction showed the strongest antioxidant effect on MDA value or apo B-100 contents of LDL.

Key words: *Ligularia fischeri*, Antioxidant, low density lipoprotein (LDL)

서 론

돌연변이 유발로 발생하는 암에 이어 두 번째로 중요한 사망 원인이되고 있는 것은 동맥경화증으로 인한 심장 혈관계 질환이라 할 수 있다^(1,2). 동맥경화증이 발병하는 초기의 메카니즘으로서 혈관벽 평활근세포의 증식에 의한 내막의 비대화와 혈액의 콜레스테롤 양과 깊은 관계가 있다. 특히 혈청중의 low density lipoprotein (LDL)의 양이 많으면 LDL을 받아들이는 receptor는 주로 내피세포, 섬유아세포 및 동맥 평활근 세포등에 존재하는데 LDL이 이들의 세포에 들어가 분해되지만 수용체가 부족하거나 결핍되면 LDL이 혈중에 축적되어 산화 LDL(oxidized LDL)이 되면서

cholesterol ester등으로 변하고 macrophage 및 동맥의 내피세포에 축적되어 거대 거품세포(foam cell)가 형성되는데 이 과정에서 일부세포는 사멸되고 이 거대 거품세포가 점차 많아지면서 지방층이 동맥부위에 쌓여 동맥경화가 일어나게 된다^(3,4). 이러한 거품세포의 생성원인 중 가장 중요한 인자는 산화LDL 임이 밝혀졌고⁽⁵⁾ 산화LDL은 계속적으로 분비되어 나오는 생리활성물질을 분해하고 내피세포에 염증을 일으켜 결국 동맥경화를 유발하게 된다^(6,8).

이와같은 지질의 과산화 방지와 LDL의 산화를 방지하는 항산화제로는 BHT와 BHA 등이 많이 사용되고 있으나 화학적 합성품으로 생체효소의 활성을 억제하고 암을 유발한다는 보고가 있으며 대부분의 항산화제는 거의 모두 인체에 독성을 나타내어 사용규제를 받고 있다⁽⁹⁾. 반면에 천연 항산화제로 이용되고 있는 비타민인 α-tocopherol 및 vitamin C 등은 그 항

Corresponding author: Seung-Shi Ham, Division of food and Biotechnology, Kangwon National University, Hyoja 2-dong, Chuncheon, Kangwon-do 200-701, Korea

산화 효과가 낮고 가격이 상대적으로 비싼 단점이 있다. 그러므로 항산화능이 우수하고 인체에 무해한 천연항산화제의 연구 개발이 시급하다고 생각된다.

지금까지 보고된 천연 항산화제에 대한 연구로는 일본 약국방에 수록된 24종의 생약에 대하여 항산화활성, avocado 과피 추출물에 대한 산화억제 물질의 분리, 각종 향신료의 정유성분의 항산화효과^(10,11), 은행잎 추출물의 LDL에 대한 항산화효과⁽¹²⁾ 등이 있다. 갈근⁽¹³⁾, 녹차, 우롱차 및 홍차⁽¹⁴⁾, 더덕⁽¹⁵⁾, 불나무⁽¹⁶⁾ 등에서 항산화에 대한 연구보고가 있다. 이와 같이 천연 항산화제의 연구가 활발히 진행되고 있으나 α -tocopherol을 대체할수 있는 천연 항산화제는 개발되지 않고 있다. 곰취에 대한 국내외 연구는 대단히 미비하며 함 등⁽¹⁷⁾이 발표한 여러 산채류 추출물(곰취의 19종)의 항돌연변이성에 관한 보고외에는 알려진 자료가 없는 상태이다.

따라서 본 실험에서는 인간 LDL과 macrophage의 산화에 대한 곰취추출물 및 분획물의 항산화효과를 검토함으로써 동맥경화예방 및 항암, 항돌연변이 효과가 있는 고부가 기능성 식품으로서의 개발에 필요한 기초자료를 얻고자 하였다.

재료 및 방법

재료

곰취(*Ligularia fischeri*)는 경상북도 청송에서 자생한 것을 1997년 4월에 채취하여 깨끗한 물로 세척한 후 동결건조하여 가늘게 세절한 후 -30°C 냉동고에 보관하면서 본 실험에 사용하였으며 ethyl acetate, agarose, 2-thiobarbituric acid (TBA), 3-(4,5-di-methylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), EDTA, sodium azide (NaN₃), trichloro acetic acid (TCA), malondialdehyde (MDA), RPMI 1640 등은 미국 Sigma사(St. Louis, MO, USA)의 제품을 사용하였다.

시료제조

곰취를 깨끗한 물로 씻은 후 동결건조하여 세절 및 분쇄하여 환류냉각기를 부착시킨 플라스크에 시료중량에 각각 10배의 에탄올, 메탄올 그리고 물을 가하여 50°C수욕상에서 12시간씩 3회 반복 추출하였고 또한 낮은 온도에서 추출한 추출물의 영향을 알아보기 위하여 상온에서 에탄올을 넣고 열을 가하지 않은 상태로 얻은 추출물을 상온추출물로 하였다. 불순물을 제거하기 위해 Whatman No. 2 여과지로 여과한 다음 회전 농축기에서 감압 농축하여 동결건조시킨후 각각의

시료로 사용하였다. 활성이 높게 나타난 에탄올 추출물의 활성성분 특성을 검토하기 위하여 곰취 에탄올 추출물을 에탄올, 헥산 및 물을 각각 1:10:9의 비율로 혼합한 혼합용매로 분획하여 헥산층과 물층을 얻었다. 헥산층은 감압농축 후 동결건조하여 헥산 분획물로 하였으며 물층은 ethyl acetate와 물을 각각 동량으로 혼합한 혼합용매로 분획하여 ethyl acetate층을 얻었다. ethyl acetate층은 감압농축하여 동결건조후 ethyl acetate분획물로 하였고 물층은 감압농축 후 동결건조하여 물분획물로 하였다.

LDL의 분리

LDL은 Fig. 1과 같이 분리한 다음 phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4)용액으로 투석한 후 실험에 사용하였다⁽¹⁸⁾. 단백질의 농도는 Lowry method로 측정하였으며 SDS-polyacrylamide gel electrophoresis로써 LDL의 순수도를 검증하였다.

LDL의 산화

LDL (400 µg/mL)과 CuSO₄ (16 µM)에 전체 부피가 1 mL가 되도록 phosphatase buffer (pH 7.4)를 섞어 37°C에서 반응시키고 EDTA (1 mM)를 반응의 마지막 단계에 20 µL를 첨가하여 산화를 중지시켰다⁽¹⁹⁾.

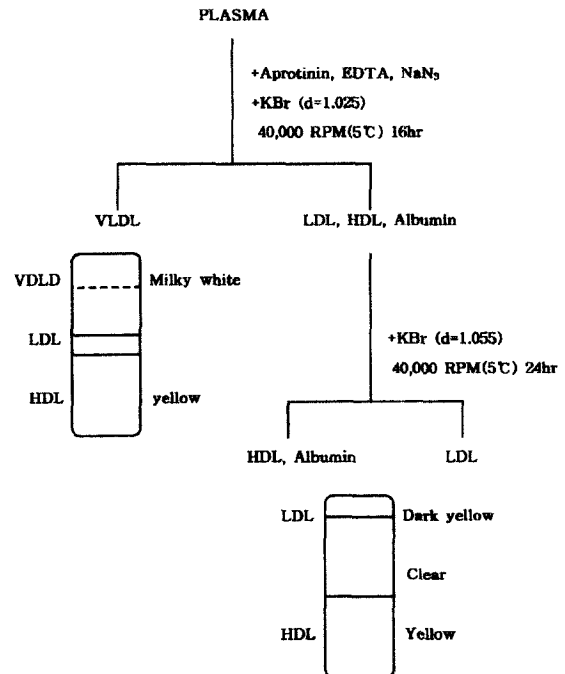


Fig. 1. Preparation of low density lipoprotein (LDL).

Thiobarbituric acid reacting substance (TBARS)의 측정

LDL내의 산화 지질량은 TBARS 방법으로 측정하였다. 곰취 추출물 및 분획물의 농도변화(0~50 µg)에 따른 MDA의 함량 변화를 측정하였고, 곰취 추출물의 일정 농도(30 µg)에서 시간(0~8 hr)에 따른 TBARS의 경시변화를 측정하여 LDL산화에 미치는 효과를 실험하였다. 즉 EDTA첨가로 산화가 중지된 LDL에 25% TCA 1 mL를 넣어 단백질을 침전시키고 원심분리 후 상층액을 분리하여 1% TBA용액 1 mL를 첨가하여 95°C에서 10분간 중탕한 후 얼음으로 냉각시키고 생성된 MDA의 양을 532 nm에서 분광광도계를 이용하여 측정하였다⁽²⁰⁾.

Agarose gel electrophoresis

곰취 추출물 및 분획물이 LDL산화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 agarose gel electrophoresis를 실시하였다. 0.7% agarose gel을 사용하여 이동도를 관찰하였다. 시료용액과 LDL 산화용액을 동량 섞어서 2~3시간 농축시킨 후 10 µL를 주입하였고 30~35 mA의 전력으로 pH 8.6, 0.05 M barbital buffer를 사용하여 전개시켰다⁽²¹⁾.

Conjugated Diene 함량

지방질 과산화물의 측정을 위해 지질 산화도를 conjugated dienes 방법을 이용하였다. 클로로포름:메탄올(2:1) 혼합용액과 LDL 산화용액을 섞은 후 vortex하고 1000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 이후 상층액을 버리고 아래층을 질소가스를 이용하여 건조시킨 시료를 cyclohexane 1.5 mL에 녹여 분광광도계를 이용하여 234 nm에서 conjugated diene의 함량을 측정하였다⁽²²⁾.

SDS-PAGE를 이용한 apo B-100의 분석

LDL 산화에 따른 단백질의 분해를 비교하기 위해 LDL 산화용액을 3% SDS-PAGE에 전개시킨 후 gel상에서 apo B-100부분의 분해정도를 관찰하였다⁽²³⁾.

Macrophage를 이용한 MTT assay

체혈한지 24시간내에 혈액을 구입하여 Fogelman 등의 방법인⁽²⁴⁾ Ficoll/Hypaque gradient centrifugation을 이용하여 분리하였다. 먼저 동량의 혈액을 Ficoll/Hypaque위에 pasteur pipet으로 섞이지 않게 조심스럽게 올려 놓고 2500 rpm에서 20분간 원심분리한다. 이렇게 하면 네 개의 층으로 분리되는데 lymphocyte

층만 떠났다. Hauks' balanced salt solution (HBSS)으로 씻어준 후 다시 순차적으로 2100, 1800, 1500 및 1100 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 이것을 다시 적정량의 HBSS로 희석한 후 소량을 취해 trypan blue로 염색해서 hemacytometer로 세포수를 결정한 후 plating하였다. 본 실험에 사용된 세포수는 2×10^6 /well 이다.

세포배양: 적정량의 세포를 plating한 후 약 3시간 가량 serum이 없는 RPMI 1640을 이용하여 preincubation 한 후 상층액을 제거하고 10% FBS를 포함한 RPMI 1640 medium 100 µL로 3회 세척한 후 5% CO₂ incubator에서 30시간 배양하여 실험의 결과를 얻었다.

MTT assay: Monocyte의 분화와 생존력을 측정하는 방법으로 각 농도의 시료와 30시간 배양한 monocyte에 MTT시약을 넣고 다시 4시간 배양한 후 여기서 생긴 blue formazan crystal을 용해하기 위해 10% SDS 0.01 N HCl로 반응을 중지 시켰다. 다시 16시간 배양 후 분광광도계를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다⁽²⁵⁾.

결과 및 고찰

LDL에 대한 곰취 추출물의 항산화 효과

인간 혈장에서 분리한 저밀도 지방단백질에 대한 곰취 추출물들의 항산화 효과를 TBARS값, agarose gel electrophoresis, conjugated diene, 그리고 SDS-PAGE를 이용한 apo B-100 분석등 네가지 측면에서 검색하였다.

TBARS 측정: 곰취 추출물들의 농도에 따른 지질 산화의 지표인 MDA값을 Fig. 2에 나타내었는데 곰취 추출물들을 5, 15, 30, 40 및 50 µg/mL의 농도로 첨가하였을때 에탄올 추출물의 경우 30.84, 28.48, 1.855, 0.66 및 0.34 nmol/mg의 MDA값을 나타내었다. 산화 억제율로 살펴보면 34%, 39.9%, 96%, 98% 및 99%의 억제율을 보였고 농도가 증가함에 따라 다른 시료들에 효과도 증가하는 추세로 나타났다. 15 µg/mL의 농도로 첨가시 메탄올 추출물의 경우 13.36 nmol/mg (71.8%), 물추출물의 경우 29.3 nmol/mg (38.2%) 그리고 상온추출물의 경우 29.99 nmol/mg (36.7%)의 MDA값과 억제율을 보였다. 메탄올 추출물이 적은 농도에서 가장 좋은 효과를 보였고 이후의 실험에서 시료투여 농도는 30 µg/mL 농도 이상에서 억제율이 유사하기 때문에 15~30 µg/mL사이인 25 µg/mL의 농도로 결정하였다.

시간에 따른 TBARS값의 측정: 산화 시간에 따른 MDA의 변화량은 25 µg/mL의 농도 첨가시 에탄올과

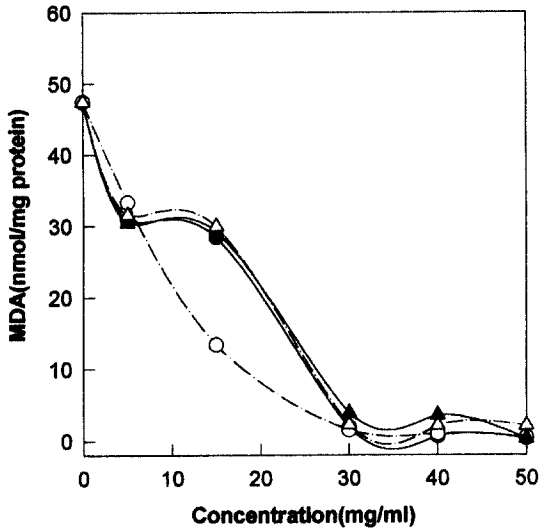


Fig. 2. Inhibitory effects of MDA formation on LDL by increasing concentration of *Ligularia fischeri* extracts. ●—●: Ethanol, ○—○: Methanol, ▲—▲: Water, △—△: Non-heating.

메탄올 그리고 물추출물의 경우 4시간까지 산화를 억제하는 것으로 나타났고 6시간때부터 억제율이 떨어지기 시작했으며 물추출물의 경우에는 급격한 감소를 보였다. 반면 상온추출물의 경우 2시간 까지밖에 억제하지 못하므로서 오랜시간 동안 산화를 억제할수 있

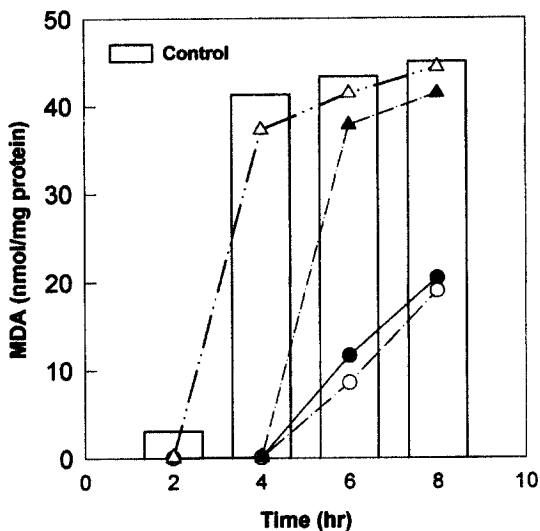


Fig. 3. Inhibitory effects of *Ligularia fischeri* extracts (25 $\mu\text{g/mL}$) according to LDL oxidation time. ●—●: Ethanol, ○—○: Methanol, ▲—▲: Water, △—△: Non-heating.

Fig. 4. The electrophoretic mobility of LDL according to the addition of *Ligularia fischeri* extracts (25 $\mu\text{g/mL}$) on 0.7% agarose gel electrophoresis. [A: native LDL, B: ethanol, C: methanol, D: water, E: non-heating, F: LDL+Cu²⁺]

는 항산화력이 없는 것을 알수 있었다(Fig. 3).

Agarose gel electrophoresis: 산화에 따른 LDL표면의 charge변화를 의미하는 agarose gel electrophoresis는 25 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도 첨가시 에탄올, 메탄올 그리고 물추출물 모두 control에 비하여 positive쪽으로의 이동을 일정하게 억제하였고 상온추출물의 경우에는 다른 추출물의 경우보다 positive charge쪽으로의 이동을 억제하지 못하였다. 따라서 상온추출물 이외의 시료들이 LDL표면의 lysine, arginine들의 positive charge가 산화됨을 억제함으로써 negative charge로의 변화를 막아 주는 항산화력이 있는 것을 알수 있었다(Fig. 4).

Conjugated diene 함량: 지질 산화에 따른 conjugated diene형성 측정은 25 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도를 첨가하였을때 234 nm에서의 흡광도 측정시 control 0.369에 비하여 에탄올 추출물의 경우 0.133, 메탄올 추출물의 경우 0.137, 물 추출물의 경우 0.153 그리고 상온추출물의 경우 0.345로 약 2.8배, 2.6배, 2.4배 및 1.06배의 감소량을 나타내었다. 이 경우 역시 에탄올과 메탄올 추출물이 가장 좋은 항산화효과를 나타내었다(Fig. 5).

SDS-PAGE를 이용한 apo B-100의 분석: Apo B-100부분의 분해정도를 측정한 것으로서 Fig. 6에서 보는 바와 같이 시료 25 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도첨가시 에탄올, 메탄올 및 물추출물의 경우 정상 LDL이 나타내는 band와 비교하였을 때 band 아래부분으로 작은 단편들이 보이지만 거의 유사한 band를 나타내고 있다. 반면 상온추출물의 경우와 LDL을 Cu²⁺로서 산화시킨 control band의 경우에는 apo B-100부분이 심하게 분

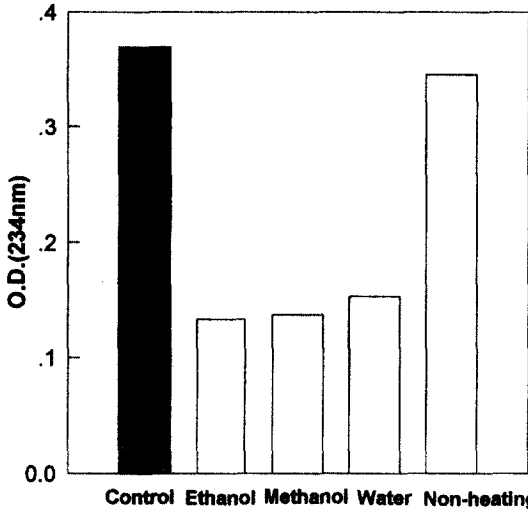


Fig. 5. Inhibitory effects of *Ligularia fischeri* extracts (25 µg/mL) on conjugated diene formation.

Fig. 6. Inhibitory effects of *Ligularia fischeri* extracts (25 µg/mL) on degradation of Apo B-100 using 3% SDS-PAGE. [A: standard, B: native-LDL, C: ethanol, D: methanol, E: water, F: non-heating, G: LDL+Cu²⁺]

해된 것으로 보여진다. 이관계를 densitometer를 이용하여 수치적으로 나타내면 정상 LDL의 apo B-100 함량을 100%로 하였을 때 Cu²⁺산화에 의한 apo B-100 함량이 10%를 나타내어 감소하였지만 에탄올 추출물의 경우 77.8%, 메탄올 추출물의 경우 92.5% 그리고 물추출물의 경우 82.3%의 apo B-100 함량을 나타냄으로서 이들 시료들이 높은 항산화효과를 가지고 있음을 알수 있었다.

LDL에 대한 곰취에탄올 분획물의 항산화 효과

높은 항산화 효과를 나타낸 곰취 에탄올 추출물을 TBARS, agarose gel electrophoresis, conjugated diene 및 apo B-100을 분석하여 LDL에 대한 항산화 효과를 측

정하였다.

TBARS 측정: 분획물에 대한 농도에 따른 MDA값의 변화를 Fig. 7에 나타내었다. Hexan 분획물을 제외한 ethyl acetate 분획물과 물분획물의 MDA생성 억제율은 거의 유사하게 나타났고 농도가 증가함에 따라 모든 분획물에서 높은 억제율을 나타내었다. 15 µg/mL의 농도에서 Hexan 분획물은 42.88 nmol/mg (9.6%), ethyl acetate 분획물의 경우에는 1.351 nmol/mg (97%) 그리고 물분획물의 경우에는 1.98 nmol/mg (95.8%)의 MDA값과 산화억제율을 나타내었다. 분획물의 경우에는 알콜추출물보다 적은 농도에서 활성이 더 강하게 나타났으므로 이후의 실험농도는 20 µg/mL로 결정하였다.

(1) 시간에 따른 TBARS 값의 측정: 산화 시간에 따른 MDA값의 변화량은 20 µg/mL의 농도첨가시 Hexan 분획물의 경우 control과 거의 유사한 변화량을 보이므로서 시간에 따른 산화억제능력이 미약한 것으로 나타났고 물분획물의 경우 4시간까지 산화를 억제하였으나 6시간대부터는 산화를 억제하지 못하여 급격한 산화가 일어남을 알수있었다. 그러나 ethyl acetate 분획물의 경우에는 최고 8시간까지 산화를 억제하므로서 곰취 추출물과 분획물들 중에서 가장 강력한 산화억제능을 보였다(Fig. 8). 이와같은 결과로 ethyl acetate 분획물의 내부에 천연 항산화제로서 개발가능성이 있는 물질이 존재하고 있음 유추할수 있었다.

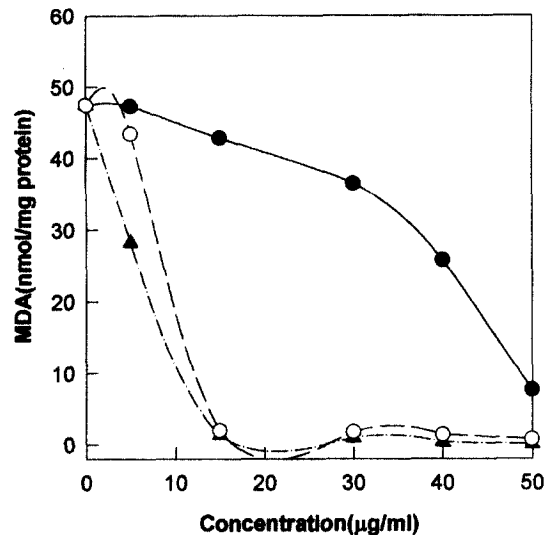


Fig. 7. Inhibitory effect of MDA formation on LDL by increasing concentration of each fraction from the ethanol extract of *Ligularia fischeri*. ●-●: Hexane Fr., ▲-▲: Ethylacetate Fr., ○-○: Aqueous Fr.

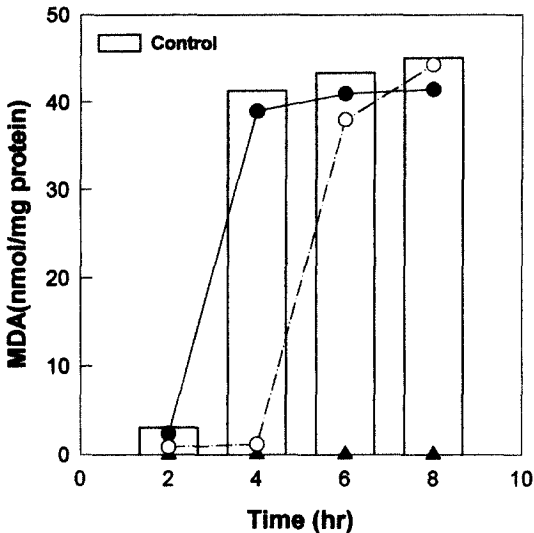


Fig. 8. Inhibitory effects of each fraction (20 µg/mL) from the ethanol extracts of *Ligularia fischeri* according to LDL oxidation time. ●-●: Hexane Fr., ▲-▲: Ethylacetate Fr., ○-○: Aqueous Fr.

Agarose gel electrophoresis : 에탄올 추출물 분획물들의 산화억제 효과를 보기 위하여 hexan, ethyl acetate, 물 분획물을 20 µg/mL의 농도로 첨가하여 LDL 표면의 charge 변화를 Fig. 9에 나타내었다. hexan 분획물의 경우 LDL을 산화시킨 control과 유사하게 positive 쪽으로의 이동거리를 나타냄으로서 산화를 억제하지 못하는 것으로 나타났고 ethyl acetate 분획물과 물 분획물의 경우에는 positive 쪽으로의 이동을 억제함으로써 LDL의 산화를 억제하고 있는 것으로 나타났다.

Conjugated diene 함량 : 분획물들을 20 µg/mL의 농도로 첨가하였을 때의 conjugated diene 형성의 억제는 234 nm에서 흡광도 측정시 control 0.412에 비하여 hexan 분획물의 경우 0.182, ethyl acetate 분획물의 경우 0.13, 물 분획물의 경우 0.144으로 약 2.26배 3.16배, 2.8배의 감소량을 나타내었다(Fig. 10).

SDS-PAGE를 이용한 apo B-100의 분석 : 곰취 분획물 첨가에 따른 apo B-100부분의 분해 정도를 Fig. 11에 나타내었다. 시료 20 µg/mL 첨가시 ethyl acetate 분획물과 물 분획물의 경우 정상 LDL의 band와 유사한 band를 나타내었고 band 밑으로 작은 단편들이 보임으로서 apo B-100부분이 약간 분해된 것으로 추정된다. 하지만 hexan 분획물의 경우에는 LDL이 산화된 band와 거의 유사하게 나타남으로서 산화억제력이 미약한 것을 알 수 있었다. 이러한 관계를 densitometer

Fig. 9. The electrophoretic mobility of LDL according to the addition of each fraction (20 µg/mL) from the ethanol extracts of *Ligularia fischeri* on 0.7% agarose gel electrophoresis. [A: native LDL, B: hexane Fr., C: ethylacetate Fr., D: aqueous Fr., E: LDL+Cu²⁺]

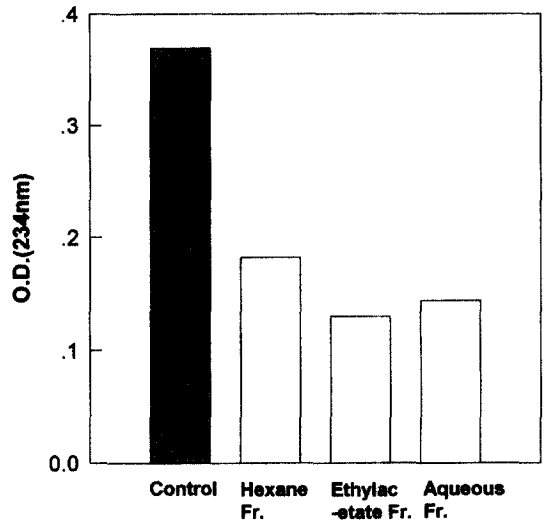


Fig. 10. Inhibitory effects of each fraction (20 µg/mL) from the ethanol extracts of *Ligularia fischeri* on conjugated diene formation.

를 이용하여 수치적으로 나타내면 정상 LDL의 apo B-100함량을 100%로 하였을 때 Cu²⁺산화에 의한 apo B-100함량이 12%, ethyl acetate 분획물의 경우 94.5%, 물 분획물의 경우 65.46%, hexan 분획물의 경우 38.75%의 함량을 보이므로 ethyl acetate 분획물이 가장 높은 항산화 효과를 가지고 있음을 알 수 있었다.

Fig. 11. Inhibitory effects of each fraction (20 µg/mL) from the ethanol extracts of *Ligularia fischeri* extracts on degradation of Apo B-100 using 3% SDS-PAGE. [A: satandard, B: native LDL, C: hexane Fr., D: ethylacetate Fr., E: aqueous Fr., F: LDL+Cu²⁺]

곰취 추출물 및 분획물에 대한 MTT assay

인체내에서 modifide된 LDL을 포집하여 동맥경화의 원인을 일으키는 대식세포로 알려진 macrophage를 분리하여 곰취 추출물 및 분획물 투여에 따른 macrophage의 생육도를 관찰하였다.

곰취 추출물의 macrophage에 대한 MTT assay: Macrophage생육에 미치는 곰취 추출물의 영향을 알아보기 위하여 0.2, 0.4, 0.6 0.8 µg/µL의 농도로 추출물들을 투여한 후 흡광도(570nm)측정을 통하여 macrophage의 생육도를 살펴보았는데 0.8 µg/µL농도에서 에탄올 추출물의 경우 69%, 메탄올 추출물의 경우에는 75%, 물추출물의 경우 77.3%, 상온 추출물의 경우 58.1%의 생육 저해도를 나타내었다. 저농도에서도 비교적 고른 억제율을 보이므로서 곰취추출물이 macrophage생육을 크게 억제함을 알수 있었다. 동맥경화의 또하나의 원인이 되는 macrophage의 생육을 억제함은 인체내에서 macrophage가 거품세포 이후 혈관벽에 침착되는 것을 막을 수 있을 것이라는 추정을 할수 있다. 면역학의 측면에서 macrophage의 실험은 실험동물을 통해 이루어져야하기 때문에 *in vitro*상에서의 실험에서 면역학적인 관계는 다루기가 어려우며 배양된 macrophage를 이용한 실험을 감안할때 동맥경화 억제제의 측면으로 보는 것이 바람직 할 것으로 본다.

곰취 분획물의 macrophage에 대한 MTT assay: 분획물에 대한 MTT assay는 crud시료와 동일하게 이루어졌으며 0.6 µg/µL의 농도 투여시 hexan 분획물의 경우 74.3%, ethyl acetate 분획물의 경우 77.9%, 물분획물의 경우 33.6%의 생육저해율을 보였다. 주목할만한 것은 LDL산화 실험에서 항산화능이 미약했던 hexan 분획물

이 물 분획물보다 높은 억제율을 나타낸 점인데 이 것으로 LDL 산화억제 mechanism과 macrophage의 생육저해 mechanism이 서로 다름을 알수 있었고 ethyl acetate 분획물의 효과는 지속적으로 양쪽 모두에서 나타나므로서 가장 좋은 항산화 능력을 가지고 있음을 알수 있었다.

요 약

지질 산화에 의해 생성하는 MDA (malondialdehyde)를 thiobarbituric acid와 반응시켜 측정된 MDA 값은 곰취 추출물의 농도가 증가함에 따라 감소하므로서 추출물들에 의해 산화가 억제됨을 알 수 있었다. 메탄올 추출물의 경우 15 µg/mL농도로 첨가시 71.7% (13.36 nmol/mg)의 산화억제율을 나타내었으며 분획물의 경우 ethyl acetate 분획물이 동일농도에서 97% (1.35 nmol/mg)의 억제율을 나타내었다. 산화시간에 따른 MDA 값의 변화는 25 µg/mL의 농도를 첨가시 에탄올, 메탄올 및 물 추출물의 경우 4시간까지 산화를 억제하였으며 분획물의 경우에는 20 µg/mL의 농도를 첨가시 ethyl acetate 분획물이 8시간까지 강한 항산화효과를 나타내었다. Agarose gel electrophoresis에서는 에탄올, 메탄올 그리고 물 추출물 모두 항산화 효과가 인정되었다.

지질산화에 의해 생성되는 conjugated diene은 곰취 추출물의 경우 Cu²⁺로 산화시켰을 때 대조에 비해 약 1.1배에서 2.8배까지 감소시키는 효과를 나타내었고 분획물의 경우 약 2.2배에서 3.2배까지의 감소효과를 나타냄으로서 강한 산화 억제효과를 나타내었다. SDS-PAGE를 이용하여 LDL내부에 존재하는 apo B-100부분에 대하여 산화에 따른 분해정도를 측정할 결과 에탄올, 메탄올 및 물 추출물이 천연 LDL의 band와 유사한 band를 나타내었다. Densitometer를 이용한 apo B-100함량은 천연 LDL의 함량을 100%로 하였을 때 에탄올, 메탄올 및 물 추출물의 경우 각각 77.8, 92.5 그리고 82.3%의 함량을 나타내었다. 분획물의 경우 hexan, ethyl acetate 및 물 분획물에서 각각 38.8, 94.5% 그리고 65.5%의 함량을 나타냄으로서 ethyl acetate 분획물이 강하게 산화를 억제함으로써 apo B-100의 분해를 막아주고 있음을 알 수 있었다.

문 헌

1. Caslake, M.J. and Packard, C.J. and Shepherd, J.: Plasma triglyceride and LDL metabolism. *Eur. J. Clin. Invest.*, **22**, 96-104 (1992)

2. Coppel, H.C. and Mertins, J.W.: Biological control insect pest suppression. Springer-verlag Berlin Heidelberg, New York, p.17-18 (1977)
3. Yo, I., Hidekuni, I., Kohji, S., Hideyuki, H., Isamu, F. and Yasushi, S., Sho, Y.: Moderate oxidation of hypertriglyceridemic LDL causes apolipoprotein-B epitope change and enhances its uptake by macrophages. *Biochemical Biophysical Acta.*, **1129**, 60-64 (1992)
4. Ross, R.: The pathogenesis of atherosclerosis, perspective for the 1990'S. *Nature*, **362**, 801-809 (1993)
5. Henriksen, T., Mahoney, E.M. and Steinberg, D.: Enhanced macrophage degradation of biologically modified low density lipoprotein. *Atherosclerosis*, **3**, 149-159 (1983)
6. Morel, D.W., Docorleto, P.E. and Chisolm, G.M.: Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein *in vitro* by free radical oxidation. *Atherosclerosis*, **4**, 357-364 (1984)
7. Bruckdorfer K.R.: Free radicals, lipid peroxidation and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.*, **1**, 529-535 (1990)
8. Steinbrecher, U., Parthasarathy, S., Leake, D.S., Witztum, J.L. and Steinberg, D.: Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **83**, 3883-3887 (1984)
9. Branen. A.L.: Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J. Am. Oil Chem.*, **52**, 59-63 (1975)
10. Farag, R.S., Badei, A.Z.M.A., Hewedi, F.M. and El-Baroty, G.S. A.: Antioxidant activity of some spice essential oils on linolenic acid oxidant in aqueous media. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **66**, 792-799 (1989)
11. Farag, R.S., Badei, A.Z.M.A. and Baroty, G.S.A.: Influence of thyme and clove essential oils in cotton seed oil oxidation. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **66**, 800-804 (1989)
12. Liang-jun, Y., Marie, T. and Lester, P.: Gingo biloba extract (EGb 761) protects human low density lipoproteins against oxidative modification mediated by copper. *Biochem. and Biophys. Res. Com.*, **212**(2), 360-366 (1995)
13. Park, C.O., Kim, K.S., Ji, Y.A. and Ryu, B.H.: Antioxidant activity of daidzin and puerarin toward oxidant of human low density lipoprotein (in Korean). *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **26**(1), 25-31 (1997)
14. Yeo, S.G., Ahn, C.W., Lee, Y.W., Lee, T.G., Park, Y.H. and Kim, S.B.: Antioxidative effect of tea extracts from green tea, oolong tea and black tea (in Korea). *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **24**(2), 299-304 (1995)
15. Maeng, Y.S. and Park, H.K.: Antioxidant activity of ethanol extract from Dōdōk (*Codonopsis lanceolata*) (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **23**, 311-316 (1991)
16. Choi, U., Shin, D.H., Chang Y.S. and Shin, J.I.: Antioxidant activity of ethanol extract from *Rhus javanica* Linne on edible oil (in Korean). *Korean J. Food Sci. Technol.*, **24**, 320-325 (1992)
17. Ham, S.S., Oh, D.H., Hong, J.K. and Lee, J.H.: Antimutagenic effects of juices from edible Korean wild herbs. *J. Food Sci. Nutr.*, **2**, 155-161 (1997)
18. Converse, C.A. and Skinner, E.R.: Lipoprotein analysis, a practical approach, 113. Oxford university, New york. (1992)
19. Choi, J.H., Park, Y.J., Son, H.S., Yang, K.S. and Kim, T.W.: Functional properties of modified low density lipoprotein and degradation of modified LDL by human monocyte macrophage (in Korean). *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **24**, 362-370 (1995)
20. Hermann, E., Martina. D.R., Georg. W.S. and Gunther. J.: Biochemical, structural functional properties of oxidized low-density lipoprotein. *Chemical Research in Toxicology*, **3**, 236-254 (1990)
21. Park, Y.J., Yang, K.S., Kim T.H. and Kim, T.W.: Effect of glucose and nonenzymatic glycation on LDL oxidation (in Korean). *Korean J. Lipidology*, **5**, 249-253 (1995)
22. Esterbauer H., Striegl, G., Puhl, H. and Rothender, M.: Continuous monitoring of *in vitro* oxidation of human low density lipoprotein. *Free Radical Res. Commun.*, **6**, 67-75 (1989)
23. Noriko, N., Naohiro, G. and Etsuo, N.: Dynamics of the oxidation of low density lipoprotein induced by free radicals. *Biochemical Biophysica Acta.*, **1168**, 348-357 (1993)
24. Fogelman, A.M., Haberland, M.E., Seager, J., Hokom, M. and Edwards, P.A.: Factors regulating the activities of the low density lipoprotein receptor and the scavenger receptor on human monocyte-macrophages. *J. Lipid Res.*, **22**, 1131-1141 (1981)
25. Sakai, M., Miyazaki, A., Hakamata, H., Sasaki, T., Yui, S., Yamazaki, M., Shichiri, M. and Horiuchi, S.: Lysophosphatidylcholine plays an essential role in the mitogenic effect of oxidized low density lipoprotein on murine macrophages. *J. Biol. Chem.*, **269**, 31430-31435 (1994)