

난소절제 흰쥐에서 녹차가공품의 지질강하와 항산화 작용을 통한 항동맥경화 효과

조미경 · 노경희 · 김진주 · 송영선[†]

인제대학교 의생명공학대학 식품생명과학부, 식품과학연구소 및 바이오헬스 소재 연구센터

Anti-atherogenic Effect of Green Tea Product through Hypolipidemic and Anti-oxidative Action in Ovariectomized Rats

Mi-Kyung Cho, Kyung-Hee Noh, Jin-Ju Kim, and Young-Sun Song[†]

School of Food and Life Sciences, Food Science Institute, and Biohealth Product Research Center,
Inje University, Gimhae 621-749, Korea

Abstract

This study was carried out to investigate the effect of green tea product (GTP) on the risk factors of atherosclerosis in ovariectomized (OVX) rats. Sprague-Dewley female rats (10 weeks) weighing approximately 279 ± 2 g were divided into 4 groups: sham operated control group treated with high cholesterol diet (Sham-C), OVX control group treated with high cholesterol diet (OVX-C), OVX-G 5% group treated with high cholesterol containing 5% GTP and OVX-G 20% group treated with high cholesterol diet containing 20% GTP. Serum TG concentrations was lower in OVX-G 20% group than in the OVX-C group, whereas ratio of HDL-cholesterol to total cholesterol (%) was significantly ($p < 0.05$) increased in the 20% GTP supplementation group than in the Sham-C and OVX-C groups. Tumor necrosis factor- α levels were significantly ($p < 0.05$) decreased in the OVX-G 20% group. Hepatic TG levels were significantly ($p < 0.05$) lowered in OVX-G 20% group than in the other groups. Glutathione levels and antioxidant enzyme activities including glutathione-reductase and Mn-superoxide dismutase in liver were significantly ($p < 0.05$) higher in the OVX-G 20% group in the OVX-C group. Fecal total cholesterol concentrations were increased in the GTP supplementation groups than in the OVX-C group. From the above results, it is concluded that GTP may reduce the risk of atherosclerosis via hypolipidemic action. Therefore, it may be used to possibly improve the hyperlipemia in menopausal women.

Key words: green tea product, ovariectomized rats, anti-atherogenic effect, hypolipodemic and anti-oxidative actions

서 론

우리나라 여성의 평균수명이 연장됨에 따라 인생의 1/3을 폐경상태에서 보내게 되므로 이 시기의 삶의 질을 보다 향상시키기 위한 노력들이 이루어지고 있으며(1,2), 폐경기에 도달함에 따라 에스트로겐의 생산과 분비가 중단되고 그에 따른 병리현상으로는 안면홍조, 불안증, 우울, 신경과민 및 기억력 감퇴 등의 증상이 나타난다(3,4). 폐경기 여성은 호르몬 불균형과 칼슘 결핍 및 체내 산화적 스트레스 증가로 인해 여러 질병의 위험에 처해 있으므로 이러한 질환의 예방을 위해서는 운동과 식사요법 그리고 폐경기 증상을 완화시킬 수 있는 기능성 성분의 규명이 필요하다. 호르몬 치료요법은 골다공증, 심혈관계 질환, 알츠하이머 등을 감소시키는 것으로 알려져 있으나 에스트로겐 치료요법은 유방암 및 자궁암의 발생위험도는 높아지는 것으로 보고되고 있다(5). 폐경이나 난소 절제시 에스트로겐이 감소됨과 동시에 high density

lipoprotein cholesterol(HDL-C) 및 apolipoprotein A-1이 감소되고 low density lipoprotein cholesterol(LDL-C)은 증가하여 심혈관계 질환의 발병 위험률이 증가한다고 한다(6,7).

혈청의 지질수준이 동맥경화 유발을 설명하는 주요한 부분이지만 산화적 스트레스와 같은 다른 위험인자들, 내피세포의 활성화와 염증 및 plaque의 안정성 등이 현재 동맥경화 유발의 중요한 기여자로서 인정되고 있다(8). 동맥경화와 산화적 스트레스, 염증과의 관련성은 죽상동맥경화의 진행과정에서 활성화된 대식세포는 여러 가지 cytokine과 활성 산소종을 생성하여 염증반응의 전사인자를 활성화시켜 염증을 일으키고 세포부착물질인 vascular cell adhesion molecule-1, intracellular adhesion molecule-1과 monocyte chemoattractant protein-1 등을 발현시켜 혈액 중의 monocyte 유입을 도와 동맥경화를 계속 진행시킨다(9,10). 그러므로 동맥경화는 산화적 스트레스에 의해 활성화된 대식세포가

[†]Corresponding author. E-mail: fdsnsong@inje.ac.kr
Phone: 82-55-320-3235, Fax: 82-55-321-0691

중요한 역할을 담당하는 만성적 염증질환이라 할 수 있다(11,12). 일반적으로 대식세포는 외부 침입자에 대해해 식균 작용 등을 통해 신체방어 작용을 한다고 알려져 있으며 산화적 스트레스 상황에서 cytokine, tumor necrosis factor- α (TNF- α), prostaglandin 등을 생성하여 염증반응에 있어 중요한 역할을 한다.

녹차는 차나무(*Camellia sinensis*)의 잎으로 여러 기능성이 과학적으로 규명됨에 따라 기능성 식품으로 그 가치가 재평가되고 있다. 녹차의 폴리페놀류는 카테킨으로 알려져 있으며 주요 카테킨 성분으로 (-)-epicatechin, (-)-epicatechin-3-gallate, (-)-epigallocatechin, (-)-epigallocatechin-3-gallate(EGCG) 등이 보고(13-15)되었고, 이 가운데 EGCG가 주요 구성성분으로서 항산화·항동맥경화 및 암 예방 활성이 높은 것으로 알려져 있다(16-19). 녹차의 제조방법에 따라 생리활성성분의 함량이 크게 변화하는 것으로 알려져 있으며, 일반적으로 녹차에는 말린 잎을 기준으로 카테킨 함량이 30~42% 함유되어 있다. 녹차의 카테킨 성분이 암, 당뇨, 동맥경화 등 각종 질병을 예방하고 다이어트에도 효과가 있는 것으로 알려지면서 마시는 녹차에 대한 수요가 증가하고 있으나 녹차를 마실 경우 카테킨이 충분히 우려나오지 않는 문제가 있다.

따라서 녹차가루와 녹차추출물, 두충추출물, 감잎추출물 및 검정콩 등을 배합하여 조제된 녹차가공품은 칼슘, 이소플라본, 비타민 C, 카테킨 등이 풍부하여 여성호르몬 저하 등으로 인한 폐경 후 병리현상의 개선에 기여할 수 있을 것으로 사료된다. 그러므로 본 연구에서는 난소절제 흰쥐에서 녹차가공품의 지질강하와 항산화작용을 통한 항동맥경화효과를 분석하여 폐경기 증후 개선에 위한 기능성식품으로의 가능성을 확인하기 위해 체내 지질 농도, 염증반응인자인 TNF- α 및 항산화효소의 활성에 미치는 영향을 분석하였다.

재료 및 방법

실험재료

녹차가루(15%)와 녹차잎 추출물(35%), 두충추출물(15%), 감잎추출물(15%), 검정콩(18%) 및 참쌀 풀과 꿀 2% 등을 배합하여 조제된 녹차가공품(GTP)은 경남하동 소재 화개제다(花開製茶)로부터 제공받아 분말화하여 식이조제에 첨가하였다. GTP의 일반성분은 Table 1에서 보는 바와 같이 100g 당 조단백질 30.1 ± 0.28 g, 조지방 8.2 ± 0.10 g, 수분 6.1 ± 0.02 g, 조회분 5.1 ± 0.01 g, Ca 201.9 ± 9.57 mg이었다.

실험동물 관리 및 식이조성

10주령의 Sprague-Dewley 암컷 흰쥐에게 2주간의 적응

기를 거친 후 평균 체중 279 ± 2 g인 실험동물을 완전입의배치로 한 군당 10마리씩 4군으로 나누어 stainless steel wire cage에서 사육하였다. 난소를 절제하기 위해 ketamin(유한)과 rumpun(바이엘코리아)을 체중 100 g당 0.11 μ L과 0.05 μ L을 사용하여 마취시킨 후 양쪽 난소를 절제한 후(ovariectomy: OVX) 2주간의 회복기를 거친 후 실험 식이를 급여하여 녹차가공품의 항동맥경화 및 항산화효과를 확인하였다. Sham 대조군은 실험군과 동일한 스트레스를 주기 위해 난소를 절제하지 않고 개복수술만 실시한 후 실험하였다. 사육실의 온도는 20~25°C, 상대습도 60~70%로 유지하였으며 명암은 12시간 간격으로 점등 및 소등하였다. 난소 절제 후 2주간 배합사료를 급여한 후 Sham-대조군(Sham-C)과 OVX-대조군(OVX-C)은 AIN' 76에 기초해서 제조한 콜레스테롤 첨가 식이(20)를, OVX 실험군은 콜레스테롤 첨가 식이에 GTP 5%(OVX-G 5%)와 20%(OVX-G 20%)로 함유한 실험식이를 조제하여 6주간 급여하였다. 식이 조제시 Ca 함량은 총 식이의 0.4% 수준으로 GTP 첨가량 5%(Ca 함량 50%와 CaCO₃ 50%)와 GTP 첨가량 20%(Ca 함량 0.4%)로 조정하였으며 Sham-C와 OVX-C는 20% GTP 수준의 Ca 함량과 동일한 양으로 CaCO₃로 조정하여 첨가하였다. 식이 제조는 Table 2와 같은 조성으로 혼합한 후 분말의 형태로 급여하였으며 식이제조에 사용한 vitamin mixture(AIN-76A), mineral mixture(Ca free), α -cellulose, casein(vitamin free), DL-methionine, cholesterol, choline chloride 등은 ICN Biochemicals(ICN Aurora, ohio, USA) 제품을 사용하였다. 옥수수 전분(두산), 옥수수유(제일제당), 코코아 버터(선인) 제품을 사용하였다. 실험식이와 탈 이온수는 자유섭취방법으로 급여하였으며 사육에 필요한 모든 기구는 0.4% EDTA로 씻은 후 탈 이온수로 헹구어 사용하였다. 실험동물의 식이섭취량과 체중은 각각 1주일에 3회와 1회씩 정기적으로 측정하였다.

시료수집

실험 종료 전 실험동물을 하룻밤 절식시킨 후 dry ice로 마취시킨 후 희생하였다. 채취된 혈액은 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 분리된 혈청을 -70°C에서 냉동 보관하였다. 혈액 채취 후 즉시 간장을 적출하여 부착되어 있는 지방 등을 깨끗이 제거한 후 차가운 생리식염수로 세척하여 혈액을 제거한 다음 여과지로 물기를 제거하고 무게를 측정하여 -70°C에서 냉동 보관하면서 분석에 사용하였다. 변은 실험 종료 전 대사장에서 적응시킨 후 24시간 동안 채취하여 80±5°C에서 3시간 건조시켜 분말로 만들었다.

시료분석

혈액의 생화학적 분석: 혈청의 중성지방(TG) 및 총 콜

Table 1. General composition of the green tea product used in this experiment

(per 100 g)

Crude protein (g)	Crude fat (g)	Moisture (g)	Crude Ash (g)	Ca (mg)
30.07±0.28	8.22±0.10	6.13±0.02	5.13±0.01	201.89±9.57

Table 2. Composition of the experimental diets

(g/kg)

	Experimental group			
	Sham-C ¹⁾	OVX-C ²⁾	OVX-G5% ³⁾	OVX-G20% ⁴⁾
Casein	200	200	184.95	139.8
Corn oil	50	50	47.95	41.8
Coconut butter	50	50	47.95	41.8
Vitamin mixture	10	10	10	10
Mineral mixture	40	40	40	40
DL-methionine	3	3	3	3
Choline chloride	2	2	2	2
Corn starch	587	587	556.39	464.6
α-Cellulose	50	50	50	50
Cholesterol	5	5	5	5
Sodium cholate	2	2	2	2
CaCO ₃	1.009	1.009	0.76	-
GTP ⁵⁾	-	-	50	200

¹⁾Sham-C: sham-operated control group. ²⁾OVX-C: ovariectomized control group. ³⁾OVX-G5%: ovariectomized and 5% GTP supplemented group. ⁴⁾OVX-G20%: ovariectomized and 20% GTP supplemented group. ⁵⁾GTP: green tea product.

레스테롤과 HDL-C 농도 변화는 효소법에 의한 정량용 kit(영동제약)를 사용하여 분석하였으며 LDL-C 농도는 Friedwald 공식(21)으로 계산하였다. 지질과산화 정도는 thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) 함량으로 확인하였으며 TBARS 함량은 Buege와 Aust에 의한 방법(22)을 다소 수정하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준으로는 1,1,3,3-tetramethoxypropane(TMP)을 사용하였고 측정된 값을 표준곡선에 대입시켜 malondialdehyde(MDA)의 양으로 환산하였다. 혈청의 tumor necrosis factor-α(TNF-α) 수준은 Rat TNF-α kit(RTA00, R&D Systems, Inc., USA)를 사용하여 immunoassay 방법으로 분석하였다.

간 지질조성 및 TBARS 농도

간의 지질은 Folch 등의 방법(23)으로 추출하였다. 즉, 간 2 g을 CHCl₃:MeOH (2:1 v/v)을 60 mL 가하여 3분간 균질화시킨 후 여과지(Whatman #1)를 사용하여 여과시킨 용액에 0.88% KCl을 총 부피의 20%를 가하여 CHCl₃ 층을 받은 후 CHCl₃:MeOH:H₂O(8:4:3 v/v) 용액 15~20 mL을 가하여 CHCl₃ 층을 받아 30~35°C에서 evaporator를 사용하여 건조시켜 CHCl₃를 사용하여 25 mL로 정용하여 분석에 사용하였다. 간의 총 지질함량은 비중법으로 측정하였으며 Triton-X 100을 0.5% 첨가하여 탁도에 의한 오차를 최소화한 후 TG와 총 콜레스테롤농도를 효소법으로 kit(영동제약)를 사용하여 분석하였다. 지질과산화 정도는 혈청에서 분석한 방법과 동일한 방법으로 측정하였다.

Glutathione 함량 및 항산화 효소계 활성

항산화 영양소인 glutathione(GSH)의 함량은 Tietze의 방법(24)으로 측정하였다. 즉, 간 1 g을 0.1 M phosphate buffer(pH 8.0) 10 mL을 가하여 균질화시킨 후 원심분리하여 그 상등액 0.5 mL에 4% sulfosalicylic acid 0.5 mL을 가한 후 10분 간 방치하여 2,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액 0.3 mL을 취한다. 이 상등액에 disulfide 시약 2.7 mL

을 가하여 20분 방치 후 412 nm에서 흡광도를 측정하며 이때 표준물질로는 GSH를 농도별로 조제하여 사용하였다.

항산화 효소계 활성 측정을 위한 시료조제는 간 0.2 g을 얼음 위에서 50 mM phosphate buffer(pH 7.4) 4 mL을 가해 균질화시킨 후 -4°C 이하에서 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취하여 10,000 rpm에서 30분간 -4°C 이하에서 원심분리하여 상등액으로는 catalase, GSH-reductase(GSH-px), GSH peroxidase(GSH-px), Cu,Zn-superoxide dismutase(Cu,Zn-SOD) 측정에 사용하였으며 침전물로는 Mn-SOD 활성을 분석에 이용하였다. Catalase 활성은 Aebi 방법(25)으로 분석하였으며 시료 50 µL에 50 mM phosphate buffer(pH 7.0) 600 µL을 첨가하여 30 mM H₂O₂ 300 µL을 가하여 240 nm에서 120초간 10초 간격으로 scanning하여 측정하였으며 효소활성은 1분간 1 µmol의 H₂O₂를 분해시키는 효소의 양을 1 unit로 하였다. Cu,Zn-superoxide dismutase(Cu,Zn-SOD)와 Mn-SOD 활성은 Marklund와 Marklunds의 방법(26)으로 분석하였다. 즉, Cu,Zn-SOD와 Mn-SOD 활성은 80배, 400배, 1200배로 조제한 시료를 각각 희석한 후 150 µL를 취하여 H₂O 60 µL를 첨가(단, Mn-SOD 측정시는 4 mM KCN 60 µL)하고 75 mM Na-xanthine 15 mL과 10 mM hydroxylamine hydrochloride 15 µL를 가하여 37°C에서 10분 간 방치한 후 37°C의 0.1 unit xanthine oxidase 60 µL를 가하여 잘 혼합하여 37°C에서 20분 간 방치하여 1% sulfanilamide 300 µL를 가하여 잘 혼합하고 0.02% N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride 300 µL을 혼합하여 20분간 실온에 방치한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 50%의 inhibition을 나타내는 농도 graph를 이용하여 50% inhibition에 해당하는 검체량(ID₅₀)을 구하여 1 Nitrate unit로 하였다. GSH-px 활성은 Lawrence과 Burk의 방법(27)으로 측정하였으며 H₂O₂를 제거하면서 소비된 GSH를 환원형으로 전환시키는데 필요한 NADPH의 양으로 표시하였다. GSH-red 활성은 Inger와 Bengt의 방법(28)

으로 2 mM EDTA를 함유한 0.2 M phosphate buffer(pH 7.0) 250 μ L, NADPH 25 μ L, GSSG 25 μ L 및 탈이온수 200 μ L를 혼합한 반응시약에 시료 조제액 500 μ L를 넣은 즉시 340 nm에서 10초 간격으로 90초간 측정하였으며 GSH-red 활성 unit는 1분 당 1 nmol의 NADPH의 환원을 촉매하는 효소의 양으로 분석하였다. 단백질 농도는 Bradford 방법(29)으로 측정하였다.

변의 지질농도

변의 지질농도는 Soxhlet 방법(30)으로 지방을 추출하여 총 지방함량은 비중법으로, TG와 총 콜레스테롤 함량은 간의 지질농도 측정과 같은 방법으로 영동제약 kit를 사용하여 분석하였다.

통계분석

실험 결과는 SPSS PC⁺ package를 이용하여 각 실험군의 평균 \pm 표준오차로 표시하였고 one-way ANOVA 분석 후 Duncan's multiple range test에 의해 각 실험군 간의 유의성을 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

체중변화와 식이효율

실험군의 체중증가와 식이효율은 Table 3에서 보는 바와 같다. 실험군의 체중증가량과 식이섭취량은 난소절제군(OVX군)이 Sham-C군에 비해 상대적으로 높은 수준을 보였다. 난소 절제로 유발된 체중 증가 현상은 여러 연구에서 보고(31-34)되었다. 조골세포(osteoblast)와 지방세포는 같은 배아세포에서 분화되며 에스트로젠은 같은 배아세포에서 조골세포의 분화를 촉진하는 반면에 지방세포의 분화는 억제시킨다는 보고(35)에 근거할 때 난소 제거 후 에스트로젠

결핍으로 인한 체중증가는 지방조직 축적에서 기인(31,36)된 것으로 사료된다. 식이효율은 OVX군에서 GTP 20%를 첨가한 식이를 제공받은 군에서 유의적으로($p < 0.05$) 낮아 Sham-C군과 유사한 수준을 보였다.

혈청의 지질 조성

혈청의 지질조성 및 총 콜레스테롤에 대한 HDL-C 농도비(%)를 비교한 결과는 Table 4에서 보는 바와 같다. 혈청의 TG농도는 OVX군에서 GTP를 첨가한 식이를 제공받은 군에서 OVX-C군에 비해 TG의 농도가 감소하는 것으로 나타났다. GTP 20%를 첨가한 식이를 제공받은 군에서는 Sham-C군과 비슷한 수준을 보여, 이러한 결과는 GTP의 섭취가 난소를 절제한 흰쥐에서 혈액 속의 TG의 농도를 감소시키는 것으로 사료된다. 혈청의 총 콜레스테롤 농도는 Sham-C군에 비해 OVX군에서 증가하였으며 OVX군 간에는 유의적인 차이를 보이지 않았다. HDL-C 농도는 Sham-C군에 비해 GTP를 첨가한 식이를 제공받은 군에서 유의적으로 증가하였으며($p < 0.05$) GTP 20%를 첨가한 식이를 섭취한 군에서 가장 높은 수준을 보였다. LDL-C 수준은 OVX군 간에 유의적인 차이는 보이지 않았으나 GTP 20%를 첨가한 식이를 섭취한 군에서 가장 낮은 경향을 보였다. 실험군의 총 콜레스테롤에 대한 HDL-C 농도비(%)를 비교한 결과는 OVX-C군에 비해 GTP 20%를 첨가한 식이를 섭취한 군에서 유의적으로($p < 0.05$) 높은 수준이었다. 따라서 본 연구에서 난소를 절제한 흰쥐에게 GTP의 첨가가 혈 중의 지질 수준을 개선하고 HDL-C 수준을 향상시켜 항동맥경화 효과를 나타내는 것으로 보인다.

지질과산화 및 TNF- α 수준

혈청의 지질과산화 정도는 TBARS의 생성량으로 확인하였다. GTP를 첨가한 식이를 섭취한 실험군의 지질과산화

Table 3. Body weight gain and food efficiency ratio in the experimental groups

Group ¹⁾	Initial BW (g)	Final BW (g)	Weight gain (g/week)	Food intake (g/week)	FER ²⁾ (%)
Sham-C	260 \pm 4 ^{3)a4)}	297 \pm 6 ^a	6.2 \pm 0.91 ^a	115 \pm 5 ^a	5.49 \pm 0.92 ^a
OVX-C	277 \pm 7 ^b	359 \pm 1 ^b	13.6 \pm 1.44 ^b	127 \pm 2 ^a	10.7 \pm 1.06 ^b
OVX-G5%	288 \pm 5 ^b	374 \pm 9 ^b	14.4 \pm 1.06 ^b	136 \pm 6 ^a	10.6 \pm 0.67 ^b
OVX-G20%	283 \pm 5 ^b	354 \pm 6 ^b	11.9 \pm 0.63 ^b	178 \pm 16 ^b	6.97 \pm 0.77 ^a

¹⁾Refer to Table 2. ²⁾FER: Food efficiency ratio. ³⁾Mean \pm SE. ⁴⁾Values within column with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

Table 4. Serum lipid concentrations in the experimental groups

Group ¹⁾	TG (mg/dL)	TC (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)	LDL-C (mg/dL)	HDL-C/TC (%)
Sham-C	111.1 \pm 1.7 ^{2)ab3)}	92.0 \pm 5.0 ^a	52.9 \pm 4.4 ^a	16.4 \pm 0.94 ^{NS}	58.2 \pm 4.1 ^a
OVX-C	120.1 \pm 4.9 ^b	123.7 \pm 4.7 ^b	68.5 \pm 7.4 ^{ab}	28.8 \pm 4.57	55.9 \pm 4.73 ^a
OVX-G5%	113.3 \pm 2.6 ^{ab}	122.2 \pm 9.9 ^b	76.0 \pm 6.6 ^b	22.9 \pm 5.0	64.4 \pm 1.8 ^{ab}
OVX-G20%	106.9 \pm 3.2 ^a	132.92 \pm 6.2 ^b	88.2 \pm 6.9 ^b	20.7 \pm 5.38	68.45 \pm 3.3 ^b

¹⁾Refer to Table 2. ²⁾Mean \pm SE. ³⁾Values within column with same superscript are not significantly different by Duncan's multiple range test at $p < 0.05$. NS: not significant.

TG: triglyceride, TC: total cholesterol, HDL-C: high density lipoprotein, LDL-C: low density lipoprotein.

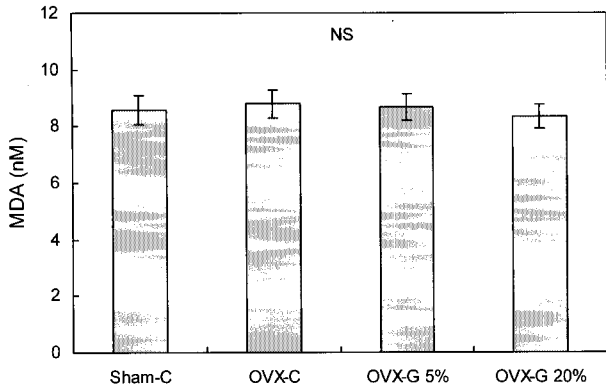


Fig. 1. Effect of the green tea product used on serum TBARS concentrations of ovariectomized-rats fed high cholesterol diets for 6 weeks.

Data represent the means±SE of ten animals, each values being the mean of triplicate assays. Values sharing same superscript are not significantly different by one-way ANOVA followed Duncan's multiple range at p<0.05. NS: not significant.

수준은 대조군에 비해 유의적인 차이를 보이지 않았다(Fig. 1). 염증반응의 초기에는 혈액 속을 순환하던 단핵구, 백혈구가 내피 표면으로 부착하여 혈관 속으로 침투하게 되며 TNF-α와 같은 염증성 cytokine이 내피세포의 세포 부착 분자의 유전자 발현을 증가시켜 동맥경화를 유발하게 된다. TNF-α는 암뿐 아니라 류머티즘 등의 여러 다른 질환을 유발하는 주요한 cytokine이다(37,38). Fig. 2에서 보는 바와 같이 TNF-α 농도는 GTP 20%를 첨가한 식이를 제공받은 군에서 TNF-α의 농도가 유의적으로 감소하여(p<0.05) Sham-C군과 유사한 수준이었으며 GTP 5%를 첨가한 식이에 비해 유의적으로 낮은 수준(p<0.05)을 보였다. 동맥경화의 초기반응에는 산화적 스트레스와 염증반응이 관련되어 있는데(9,10) GTP 20% 첨가물을 급여한 본 실험에서는 TBARS에는 영향을 미치지 않았으나 TNF-α 농도는 현저한 감소효과를 보였는데 이것은 염증반응 지표가 TBARS보다 예민한 지표일 가능성 때문으로 사료된다(39,40).

간의 지질 농도 및 TBARS 수준

간의 무게 및 지질 농도와 TBARS 수준은 Table 5에서 보는 바와 같다. 체중 100g 당 간의 무게는 각 군 간에 유의적인 차이를(p<0.05) 보였으며 GTP를 첨가한 식이를 섭취한 군에서 OVX-C군에 비해 감소하였다. GTP의 첨가가 체내 지방 축적을 감소시켜 간의 무게를 감소시키는 것으로 보인다

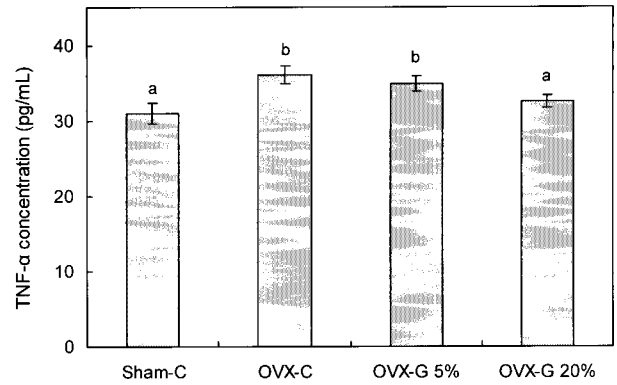


Fig. 2. Effect of the green tea product used on serum TNF-α concentrations of ovariectomized-rats fed high cholesterol diets for 6 weeks.

Refer to Fig. 1.

다. Lee 등(41)은 동물실험에서 난소절제와 콜레스테롤이 함유된 고지방식이에 따른 고지혈증으로 간에 지방축적이 증가하여 간의 무게가 증가하였다고 보고하였으며 본 연구에서도 Sham-C군에 비해 OVX-C군의 간 무게의 증가가 나타났다.

간의 총 지방함량은 각 군 간의 유의적인 차이를 보이지 않았다. 간의 TG 농도는 Sham-C군에 비해 OVX-C군에서 증가하였으며 OVX-C군에 비해 GTP를 첨가한 식이를 제공받은 군에서는 감소하는 경향으로 특히 GTP 20%를 첨가한 식이를 제공받은 군에서는 Sham-C군보다 낮은 수준을 보였다. 간의 총 콜레스테롤 농도는 OVX-C군에 비해 GTP를 첨가한 식이를 제공받은 군에서 다소 감소하는 경향을 보였으나 OVX군 간에 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 간의 TBARS의 생성량은 GTP를 첨가한 식이를 제공받은 군에서 OVX-C군에 비해 유의적으로(p<0.05) 감소하는 것으로 나타났다.

이러한 결과들은 GTP의 첨가가 난소절제 흰쥐에서 간의 TG 및 총 콜레스테롤 농도와 지질과산화를 감소시키는 것으로 사료된다.

간의 GSH 함량 및 항산화 효소계 활성

항산화 영양소인 GSH의 함량은 Table 6에서 보듯이 GTP를 첨가한 식이를 제공받은 군에서 OVX-C군에 비해 증가하였다. 동물조직 중 비단백성 티올의 대부분을 차지하는 GSH는 유리기 제거제 역할과 과산화수소 및 과산화지질을 대사시키는 GSH-px의 기질로써 세포내 항산화제 중 중

Table 5. Hepatic lipid concentrations in the experimental groups

Group ¹⁾	Liver (g/100 g BW)	Lipid (%/ liver)	TG (mg/liver)	TC (mg/liver)	TBARS (MDA nM)
Sham-C	3.07±0.14 ^{2)a3)}	13.9±0.61 ^{NS}	67.9±5.01 ^b	38.1±2.89 ^a	10.3±0.64 ^{ab}
OVX-C	5.09±0.16 ^d	15.2±0.85	78.1±4.46 ^c	51.4±2.48 ^b	11.8±0.63 ^b
OVX-G5%	4.34±0.13 ^c	14.8±0.43	64.8±4.96 ^{bc}	50.6±3.21 ^b	9.0±0.58 ^a
OVX-G20%	3.90±0.88 ^b	14.2±0.37	46.5±1.66 ^a	44.4±4.58 ^{ab}	8.5±0.75 ^a

¹⁻³⁾Refer to Table 3. NS: not significant, TG: triglyceride, TC: total cholesterol, TBARS: thiobarbituric acid reactive substances.

Table 6. Effect of the green tea product used on hepatic glutathione levels and antioxidative enzyme activities in experimental groups

	Group ¹⁾			
	Sham-C	OVX-C	OVX-G5%	OVX-G20%
Glutathione (µg/g liver)	0.552±0.082 ^{2)ab3)}	0.406±0.067 ^a	0.646±0.038 ^b	0.695±0.078 ^b
Catalase (µmol/mg protein)	1.383±0.005 ^a	1.714±0.077 ^b	1.477±0.053 ^a	1.769±0.070 ^b
GSH-reductase (Units/mg protein)	25.24±5.63 ^{bc}	10.77±0.57 ^a	15.07±0.86 ^{ab}	32.37±7.56 ^c
GSH-peroxidase (Units/mg protein)	2.016±0.293 ^a	5.569±0.466 ^c	4.493±0.284 ^b	4.725±0.290 ^{bc}
Cu,Zn-SOD (Nitrate Units/mg protein)	15.25±1.38 ^{NS}	17.48±1.85	21.06±2.92	21.49±2.62
Mn-SOD (Nitrate Units/mg protein)	2.673±0.113 ^{ab}	2.510±0.122 ^a	2.995±0.170 ^{ab}	3.168±0.246 ^b

¹⁻³⁾Refer to Table 3. NS: not significant.

요한 역할을 담당한다(42). 따라서 본 연구의 결과를 볼 때 난소 절제 흰쥐의 간에서 TBARS의 농도 감소와 간조직의 GSH 함량 증가는 GTP의 첨가가 항산화 기능을 향상시키는 작용을 보여주는 것으로 사료된다.

간의 항산화효소인 catalase 활성은 OVX-C군에 비해 GTP 5%를 첨가한 식이를 제공받은 군에서는 유의적으로 ($p<0.05$) 낮은 수준이었으나 20%의 GTP를 첨가한 군에서는 OVX-C군과 유사한 수준이었다. Catalase 활성은 Sham-C군에 비해 OVX군에서 다소 높은 활성을 보였다. Catalase는 조직 내에서 SOD 등의 효소적 반응에 의해 생성된 과산화수소를 제거하여 생체를 방어하는 기능을 나타낸다(43). 또한 대사과정 중 발생하는 활성 산소종의 유리기를 제거할 뿐 아니라 이들 활성 산소종에 의해 비가역적으로 불활성화 될 수도 있으며 지방산화에 의해 생성된 유리기도 제거하는 것으로 알려져 있다(44,45). GSH-red 활성은 OVX-C군에 비해 GTP 20%를 첨가한 식이를 제공받은 군에서 유의적으로 ($p<0.05$) 높은 활성을 보였다. GSH-px 활성은 OVX군이 Sham-C군에 비해 현저하게 높은 수준으로 OVX-C군이 가장 높은 활성을 보였다. GSH-px는 셀레늄 의존성 항산화효소로 지질과산화와 과산화수소의 무독화과정을 촉매하는 역할을 한다(46). Cu,Zn-SOD 활성은 각 군 간에 유의적인 차이를 보이지 않았으나 GTP 첨가한 식이를 제공받은 군에서 다소 높은 경향을 나타냈다. Mn-SOD 활성은 OVX-C군에 비해 GTP 5%를 첨가한 식이를 제공받은 군에서는 유의적인 차이는 없었으나 다소 증가하는 경향이였으며 GTP를 20% 첨가한 식이를 제공받은 군에서 유의적으로($p<0.05$) 높은 활성을 보였다. 산소를 이용하는 생물체에는 superoxide를 제거하는 효소인 SOD를 가지고 있어 생체는 superoxide에 의한 손상으로부터 보호되고 있다. GTP의 섭취

가 Mn-SOD에는 영향을 미쳐 superoxide로부터 조직을 보호하는 것으로 보인다. 따라서 5% GTP를 제공받은 군에 비해 20% GTP를 첨가한 식이를 제공받은 군에서 항산화 효소의 활성이 높은 수준을 보여 GTP의 첨가가 항산화 영양소 및 항산화 효소계에 영향을 미치는 것으로 보인다.

본 연구의 결과들을 미루어 볼 때 난소절제 흰쥐에서 GTP가 항산화 영양소 및 항산화 효소계의 활성을 증진시키는 것으로 나타나 GTP의 섭취가 산화적 스트레스를 억제하여 항산화효과를 갖는 것으로 보이며 염증 생성 및 동맥경화를 예방하는 효과가 있는 것으로 사료된다.

변의 지질 농도

GTP를 첨가한 식이를 섭취한 실험군의 1일 변의 배설량, 총 지질 농도와 TG 및 총 콜레스테롤 함량은 Table 7에서 보는 바와 같다. 1일 변의 배설량은 각 군 간에 유의적인 차이를 보이지 않았으나 GTP를 첨가한 식이를 제공받은 군에서 높은 배설량을 보였다. 변 중의 총 지질과 TG 농도는 군 간에 유의적인 차이를 보이지 않았으나 GTP 20%를 첨가한 식이를 제공받은 군에서 가장 높은 수준으로 나타났다. 변 중의 총 콜레스테롤 농도는 Sham-C군에 비해 OVX-C군에서 다소 낮아지는 경향을 보였고 5% GTP를 첨가한 군이 OVX-C군에 비해 유의적인 차이는 없었으나 다소 높은 경향을 보였으며 20% GTP를 첨가한 식이를 제공받은 군에서 유의적으로($p<0.05$) 증가하는 것으로 나타났으며 GTP의 첨가량이 높을수록 총 콜레스테롤 배설량이 높았다. GTP 함유 식이섭취 혹은 활성성분이 이러한 결과를 초래했을 가능성이 있는 것으로 사료된다.

이상의 결과들로 미루어 볼 때 GTP 첨가가 변의 총 지질과 TG 및 콜레스테롤 배설을 증가시켜 혈청과 간의 총 지질 농도와 TG 및 총콜레스테롤 농도를 감소시키는 것과 관련

Table 7. Fecal lipid concentrations in the experimental groups

Group ¹⁾	Fecal weight (g/day)	Lipid (%)	TG (mg/day)	TC (mg/day)
Sham-C	1.53±0.20 ^{2)NS}	10.15±1.89 ^{NS}	38.4±2.05 ^{NS}	92.4±5.36 ^{ab3)}
OVX-C	1.15±0.20	6.04±0.88	38.4±2.58	79.9±1.13 ^a
OVX-G5%	1.67±0.24	9.83±1.65	39.6±1.78	82.2±3.25 ^a
OVX-G20%	1.95±0.34	14.42±2.78	40.6±4.99	103.0±9.19 ^b

¹⁻³⁾Refer to Table 3. NS: not significant, TG: triglyceride, TC: total cholesterol.

이 있는 것으로 보인다. 따라서 난소절제 흰쥐에서 GTP의 섭취가 체내 총 지질 농도를 감소시키고 간의 항산화 효소계를 활성화시켜 항산화 및 항동맥경화에 효과가 있는 것으로 사료된다.

요 약

난소절제 흰쥐에서 녹차가공품(GTP)의 항동맥경화 효과를 분석하여 폐경기 증후 개선을 위한 기능성식품으로의 활용 가능성을 확인하고자 하였다. 본 연구에 사용된 GTP는 경남하동 소재 화개제다(花開製茶)로부터 제공받았다. 실험 동물은 10주령의 Sprague-Dewley 암컷 흰쥐로 평균 체중 279±2 g인 실험동물을 완전임의배치로 한 군당 10마리씩 4군으로 나누어 양쪽 난소를 절제한 후(OVX) 실험 식이를 제공하였다. Sham 대조군은 실험군과 동일한 스트레스를 주기 위해 난소를 절제하지 않고 개복수술만 실시한 후 실험하였다. 난소 절제 후 2주간 배합사료를 급여한 후 Sham-대조군(Sham-C)과 OVX-대조군(OVX-C)은 AIN' 76에 기초해서 제조한 콜레스테롤 첨가 식이를, OVX 실험군은 콜레스테롤 첨가 식이에 GTP 5%(OVX-G 5%)와 20%(OVX-G 20%)로 함유한 실험 식이를 조제하여 6주간 급여하였다. 식이 조제시 Ca 함량은 총 식이의 0.4% 수준으로 GTP 첨가량 5%(Ca 함량 50%와 CaCO₃ 50%)와 GTP 첨가량을 20%(Ca 함량 0.4%)로 조정하였으며 Sham-C와 OVX-C는 20% GTP 수준의 Ca 함량과 동일한 양으로 CaCO₃로 조정하여 첨가하였다. 혈청의 TG 농도는 OVX-C군에 GTP 20%를 첨가한 식이를 섭취한 군에서 유의적으로(p<0.05) 낮은 수준을 보였다. 총 콜레스테롤 농도에 대한 HDL-C 농도비(%)는 GTP 20%를 첨가한 식이를 제공받은 군에서 유의적으로(p<0.05) 높았으며 TNF-α 수준은 GTP 20%를 첨가한 식이를 제공받은 군에서 유의적으로(p<0.05) 감소하였다. 간의 TG와 TBARS 수준은 GTP 20%를 첨가한 식이를 제공받은 군에서 감소하는 경향을 보였으며 GTP의 첨가가 간에서의 GSH 함량 및 항산화 효소계의 활성을 증진시키는 것으로 나타났다. GTP를 첨가한 식이를 섭취한 실험군의 1일 변 중의 총 지방 및 TG 배설량은 유의적인 차이는 보이지 않았으나 OVX-C군에 비해 다소 높은 경향을 보였으며 총 콜레스테롤 배설량은 OVX-C군에 비해 높은 수준이었다. 난소절제 흰쥐에서 5% GTP를 제공받은 군에 비해 20% GTP를 첨가한 식이를 제공받은 군에서 혈액과 간에서의 지질농도 감소와 항산화 효소의 활성이 높은 수준을 보여 GTP의 첨가량이 높을수록 더 효과적인 것으로 나타났다. 이상의 결과들로 미루어 볼 때 난소절제 흰쥐에서 GTP 첨가가 변의 총 지질과 TG 및 콜레스테롤 배설을 증가시켜 혈청과 간의 총 지질 농도와 TG 및 총콜레스테롤 농도를 감소시키는 것과 관련이 있는 것으로 보이며 GTP의 섭취가 체내 총 지질 농도를 감소시켜 항 동맥경화 작용을 나타내는 것으로 사료된다.

다. 따라서 녹차가공품의 폐경기 고지혈증 개선을 위한 기능성식품으로의 가능성을 보여 준다고 할 수 있다.

감사의 글

본 연구는 제13차 산학연 공동기술개발 컨소시엄 사업의 연구 사업비 지원으로 이루어진 결과이며 이에 감사드립니다.

문 헌

- Ahn HS, Kwon JR, Lee SS. 1997. Effect of dietary lipids and guar gum on lipid metabolism in ovariectomized rats. *Korean J Nutr* 30: 2028-2034.
- Kim SK, Sunwoo JG, Lee EJ. 2006. Relation of mineral nutrition status and climacteric symptoms in pre- and postmenopausal women. *Korean J Nutr* 39: 121-132.
- Notman MT, Nadelson C. 2002. The hormone replacement therapy controversy. *Arch Womens Ment Health* 5: 33-35.
- Bush TL, Barret-Connor E. 1985 Noncontraceptive estrogen use and cardiovascular disease. *Epidemiol Rev* 7: 89-104.
- Grodstein E, Stampfer MJ, Colditz GA, Willet WC, Manson JE, Joffe M, Rosner B, Fuchs C, Hankinson SE, Hunter DJ, Hennekens CH, Speizer FE. 1997. Postmenopausal hormone therapy and mortality. *New Engl J Med* 336: 569-573.
- Ross RK, Paganm-Hill A, Mark TM, Henderson BE. 1989. Cardiovascular benefits of estrogen replacement therapy. *Am J Obstet Gynecol* 160: 1301-1306.
- Campos H, Wilson PWE, Jimenez D, Mcnamara JR, Ordovas J, Schaefer EJ. 1997. Differences in apolipoproteins and low density lipoprotein subfractions in postmenopausal women on and off estrogen therapy: result from the Framingham offspring study. *Metabolism* 39: 1033-1038.
- Roberts CK, Chen AK, Barnard RJ. 2006. Effect of a short-term diet and exercise intervention in youth on atherosclerotic risk factors. *Atherosclerosis* 9668: 1-9.
- Ito T, Ikeda U. 2003. Inflammatory cytokines and cardiovascular disease. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 2: 257-265.
- Bratus VV, Talaieva TV, Radalovska NV. 1999. The role of a systemic inflammatory process in the atherogenic modification of lipoproteins and the development of hypercholesterolemia. *Fiziol Zh* 45: 40-49.
- Kanters E, Pasparakis M, Gijbels M. 2003. Inhibition of NF-κB activation in macrophages increase atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 112: 1176-1185.
- Kunsch C, Luchoomun J, Grey JY. 2004. Selective inhibition of endothelial and monocyte redox-sensitive genes by AGI-1067: a novel, antioxidant and anti-inflammatory agent. *J Pharmacol Exp Ther* 308: 820-829.
- Hayashi E, Hayashi M, Yamazoe H. 1990. Pharmacological action of tea extracts on the central nervous system in mice. *Oyo Yakuri* 40: 351-356.
- Kada T, Kaneko K, Matzuzaki S, Mntzaki T, Hara Y. 1985. Detection and chemical identification of natural bio-antimutagen. *Muta Res* 150: 127-131.
- Matzuzaki T, Hata Y. 1985. Antioxidative activity of tea leaf catechins. *Nippon Nogeikagaku Kaish* 59: 129-134.
- Kim MJ, Choi JH, Yang JA, Kim SY, Kim JH, Lee JH, Kim JK, Rhee SJ. 2002. Effects of green tea catechin on enzyme activities and gene expression of antioxidative system in rat liver exposed to microwaves. *Nutr Res* 22: 733-744.

17. Rhee SJ, Kwag OG, Kim SO. 1998. Effect of catechin on the microsomal mixed function oxidase system and lipid peroxidation of lung in diabetic rats. *Kor J Gerontol* 8: 49-55.
18. Sartippour MR, Heber D, Ma J, Lu Q, Go VL, Nguyen M. 2001. Green tea and its catechins inhibit breast cancer xenografts. *Nutr Cancer* 40: 149-156.
19. Sin MK, Han SH, Han GJ. 1997. The effect of green tea on the serum lipid and liver tissue of cholesterol fed rats. *Korean J Food Sci Technol* 29: 1255-1263.
20. Liao F, Andalibi A, deBeer FC, Fogelman AM, Lusis AJ. 1993. Genetic control of inflammatory gene induction and NF- κ B-like transcription factor activation in response to an atherogenic diet in mice. *J Clin Invest* 91: 2572-2579.
21. Friedwald W, Levy RI, Fredrickson DS. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifugation. *Clin Chem* 18: 499-502.
22. Buege JA, Aust SD. 1978. Microsomal lipid peroxidation. In *Methods in Enzymology*. Fleischer S, Packer L, eds. Academic press, New York, USA. Vol 52, p 302-306.
23. Folch I, Lees M, Sranley GHS. 1956. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue. *J Biochem* 223: 497-509.
24. Tietze F. 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissue. *Anal Biochem* 27: 502-522.
25. Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 150: 121-126.
26. Marklund S, Marklund G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in antioxidant of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47: 469-474.
27. Lawrence RA, Burk F. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Comm* 71: 952-958.
28. Inger C, Bengt M. 1985. Glutathione reductase. In *Methods in Enzymology*. Fleischer S, Packer L, eds. Academic press, New York, USA. Vol 113, p 484-490.
29. Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann Biochem* 72: 248-254.
30. 한국식품영양과학회. 2000. 식품영양실험핸드북 식품편. 도서출판 효일, 서울, 대한민국. p 124-126.
31. Lee JW, Kim HJ, Jhee OH, Won HD, Yu YJ, Lee MH, Kim TW, OM AS, Kang JS. 2005. Effects of alternative medicine extract on bone mineral density, bone strength and biochemical markers of bone metabolism in ovariectomized rats. *Korean J Food & Nutr* 18: 72-80.
32. Frolik CA, Bryant HU, Black EC, Magee DE, Chandrasekhar S. 1996. Time-dependent changes in biochemical bone markers and serum cholesterol in ovariectomized rats: effects of raloxifene HCl, tamoxifen, estrogen and alendronate. *Bone* 18: 621-627.
33. Kalu DN, Arjmandi BH, Liu CC, Salih MA, Bimbaum RS. 1994. Effects of ovariectomy and estrogen on the serum levels of insulin-like growth factor-1 and insulin-like growth factor binding protein-3. *Bone Miner* 25: 135-148.
34. Lee YB, Lee HJ, Kim KS, Lee JY, Nam SY, Cheon SH, Shon HS. 2004. Evaluation of the preventive effect of iso-flavone extract on bone loss in ovariectomized rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 68: 1040-1045.
35. Okasaki R, Inoue D, Shibata M, Saika M, Kido S, Ooka H, Tomiyama H, Sakamoto Y, Matsumoto T. 2002. Estrogen promotes early osteoblast differentiation and inhibits adipocyte differentiation in mouse bone marrow stromal cell lines that express estrogen receptor (ER) α or β . *Endocrinology* 143: 2349-2356.
36. O JH, Lee YS. 1993. Effects of dietary calcium levels on the reduction of calcium availability in ovariectomized osteoporosis model rats. *Korean J Nutrition* 26: 277-285.
37. Barlozzari T, Leonhardt J, Wiltrout R. 1985. Direct evidence for the role of LGL in the inhibition of experimental tumor metastases. *J Immunol* 134: 2783-2789.
38. Suganuma M, Okabe S, Marino MW. 1999. Essential role of tumor necrosis factor- α in tumor promotion as revealed by TNF- α -deficient mice. *Cancer Res* 59: 4516-4518.
39. Liu SX, Hou FF, Guo ZJ, Nagai R, Zhang WR, Liu ZQ, Zhou ZM, Zhou M, Xie D, Wang GB, Zhang X. 2006. Advanced oxidation protein products accelerate atherosclerosis through promoting oxidative stress and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26: 1156-1162.
40. Roberts CK, Chen AK, Barnard RJ. 2007. Effect of a short-term diet and exercise intervention in youth on atherosclerotic risk factors. *Atherosclerosis* 191: 98-106.
41. Lee YM, Jung MH, Lee YS, Song J. 2005. Effect of genistein and soy protein on lipids metabolism in ovariectomized rats. *Korean J Nutrition* 38: 267-278.
42. Cho SY, Oh YJ, Park JY, Lee MK, Kim MJ. 2003. Effect of dandelion (*Taraxacum officinale*) leaf extracts on hepatic antioxidative system in rats fed high cholesterol diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 458-463.
43. Kang YH, Park YK, Ha TY, Moon KD. 1996. Effects of pine needle extracts on enzyme activities of serum and liver and liver morphology in rats fed high diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 25: 374-378.
44. Frintche K, Johnston PV. 1988. Rapid autooxidation of fish oil in diets without added antioxidants. *J Nutr* 118: 425-426.
45. Geeta S, Ravindra N, Kiran DG. 1991. Effect of ethanol on Cd-induced lipid peroxidation and antioxidant enzymes in rat liver. *Biochem Pharmacology* 42: 9-16.
46. Connye K, Barbara CP. 1991. Changes in colonic antioxidant status in rats during long-term feeding of different high fat diet. *J Nutr* 121: 1562-1569.

(2007년 7월 31일 접수; 2007년 10월 8일 채택)