

## 복분자 미숙과 물추출물의 콜레스테롤 개선 효과

최혜란 · 이수정 · 이정현 · 권지웅 · 이희권 · 정종태 · 이태범<sup>†</sup>

(재)고창복분자연구소

### Cholesterol-lowering Effects of Unripe Black Raspberry Water Extract

Hye Ran Choi, Su Jung Lee, Jung-Hyun Lee, Ji Wung Kwon, Hee Kwon Lee,  
Jong Tae Jeong, and Tae-Bum Lee<sup>†</sup>

Gochang Black Raspberry Research Institute, Jeonbuk 585-943, Korea

**ABSTRACT** We investigated the effects of unripe black raspberry water extract (UBR-W) and oxidation-LDL treatment on cholesterol levels. Experiments using an established human hepatocellular carcinoma cell line (HepG2) showed a time-dependent increase in expression of LDL receptor after UBR-W treatment. Expression of LDL receptor-related genes, such as SREBP1 and 2, increased upon UBR-W treatment. However, expression of HDL-related genes was unaffected by UBR-W. HMG-CoA reductase activity was reduced by UBR-W treatment, whereas HMG-CoA mRNA expression significantly increased. In addition, the ApoB/ApoA1 mRNA level, which is a predictor of cardiovascular risk, was reduced in a time-dependent manner by UBR-W treatment. Macrophage-like cells (RAW 264.7) showed increased expression of ox-LDL-related genes, such as CD36, scavenger receptor-A, adipophilin, and PPAR-gamma, upon ox-LDL treatment compared to untreated control cells, and quantitative lipid analysis indicated a dramatic increase in lipid accumulation. However, UBR-W treatment significantly reduced expression of ox-LDL-related genes and largely prevented lipid accumulation. The results indicate that UBR-W mediates a cholesterol-lowering effect via inhibition of cholesterol synthesis and induction of LDL uptake through SREBP.

**Key words:** unripe black raspberry, cholesterol, LDL receptor, HMG-CoA reductase, ox-LDL

## 서 론

2007년 통계청 자료에 의하면 각종 암과 순환기계 질환인 뇌혈관 질환과 심장 질환에 의한 사망자가 한국인 전체 사망자 수의 47.6%를 차지하였다. 이는 식생활의 다양화 및 서구화로 인해 고칼로리 및 동물성 식품의 섭취가 증가됨에 따라 당뇨병, 고혈압, 고지혈증과 같은 각종 성인병 발병이 늘어나고 있으며, 특히 심혈관계 질환의 발병율은 지난 수십 년간 계속 증가하여 주요 사망 원인 중 하나가 되었다(1-3). 특히 지방질의 과잉섭취로 인해 유발되는 고지혈증 및 심혈관계 질환은 치료보다 예방이 필요한 질환으로 여겨져, 최근에는 콜레스테롤 합성을 저해하는 생리활성물질을 천연물로부터 찾아내려는 연구가 활발하게 진행되고 있다.

최대 생산지인 고창을 비롯한 전국으로 재배되고 있는 복분자(*Rubus occidentalis*)(4)는 유리당, 무기질의 인, 철 및 칼륨이 많이 함유되어 있고 특히 유기산과 비타민 C가 많이 포함되어 있으며, 항암활성(5) 및 항염증(6), 항산화 및 항균 효과(7) 등 다양한 생리활성에 대한 효능이 밝혀진 바 있다.

최근 연구에 의하면 복분자 미숙과 추출물이 완숙과 추출물보다 총 폴리페놀 함량이 2배 이상 높게 나타났으며, 시험관 시험에서 LDL(low density lipoprotein)의 산화 활성을 억제하고(8) 동물시험에서 복분자 미숙과 물추출물이 LDL을 억제함으로써 고지혈증 및 지질대사에 효능이 있음을 확인하였으며, 혈관질환의 원인이 되는 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$ , IL-6, PGF2, 일산화질소 등의 생성을 억제한다고 보고한 바 있다(9). 예비실험에서 복분자 완숙과와 미숙과 물추출물에 의한 복분자의 콜레스테롤 억제효과를 알아본 결과 완숙과 물추출물보다 미숙과 물추출물에서 보다 높은 콜레스테롤 억제효과를 확인하였다(data not shown). 따라서 본 연구에서는 복분자 미숙과 물추출물을 가지고 실험을 진행하였다.

Apolipoprotein B(ApoB)는 말초조직으로 지질을 전달하는 system 즉 forward transport system인 lipoprotein의 중요성분인 apolipoprotein 구성 성분이다(10). 간에서 조직으로 전달되는 lipoprotein complex(VLDL, IDL 및 LDL)를 흔히 bad cholesterol이라고 부르기도 한다(11). 간에서 형성된 ApoB는 각 조직으로 이동하여 LDL receptor의 ligand와 같은 역할을 하며, 조직으로 cholesterol을 이동시키는 중요한 역할을 수행한다. LDL receptor는 세포막에 존재하는 단백질로 혈중의 LDL-cholesterol의 유전적 결

Received 2 September 2013; Accepted 4 November 2013

<sup>†</sup>Corresponding author.

E-mail: tblee01@gbri.re.kr, Phone: 82-63-560-5170

함 때문에 혈중 콜레스테롤이 제거되지 않아 나이와 상관없이 고콜레스테롤혈증이 유발된다고 보고되었다(12). 이러한 LDL receptor 유전자의 발현은 세포내의 sterol 함량에 의해 조절되는데 이는 sterol regulatory element binding protein(SREBP)이라는 전사인자의 활성화와 밀접하게 연관되어 있다.

반면, 간 이외의 세포에 과잉으로 존재하는 cholesterol은 간으로 이동하여 담즙으로 대사가 되거나 재활용하게 된다. 즉 이러한 말초조직으로부터 여분의 cholesterol을 간으로 이동시키는 reverse cholesterol transport(RCT)에 관여하는 high density lipoprotein(HDL) complex를 good cholesterol이라 한다(13). Apolipoprotein A-1(ApoA-1)은 HDL의 주된 단백질 구성 성분으로서 RCT에 결정적인 역할을 한다. ApoA-1은 말초조직의 세포막에 존재하는 ATP-binding cassette transporter A1(ABCA1)에 결합하여 콜레스테롤을 HDL로 전달하게 하며, 이렇게 형성된 HDL은 간으로 이동되어 대사된다(14,15). 동맥경화 발생가능성을 높이는 ApoB 함유입자에는 ApoA-1이 포함되어 있지 않기 때문에 ApoA-1은 동맥경화 예방에 관여한다고 할 수 있다. 심혈관 질환과 이들 lipoprotein의 구성은 밀접한 관련이 있으므로 심혈관 질환의 지표로 사용한다.

한편, 혈중 콜레스테롤의 농도는 크게 생체 내에서의 생합성과 분해의 두 과정에 의하여 조절되는데 그중 생합성 과정이 더 크게 영향을 미치는 것으로 알려져 있다. 콜레스테롤 합성에 있어서 가장 중요한 단계는 콜레스테롤의 생합성의 효소인 3-hydroxy-3-methylglutaryl(HMG)-CoA reductase 반응으로 잘 알려져 있다. 이 효소활성의 조절은 체내 총 콜레스테롤과 혈청 콜레스테롤 수준에 큰 영향을 미친다. 천연물질이나 합성물질을 이용하여 고지혈증 치료 및 동맥경화 예방효과 여부를 조사할 때 이 HMG-CoA reductase 활성에 미치는 영향이 많이 연구되고 있다.

또한 동맥경화의 주요 발생 과정은 혈중 콜레스테롤의 주요 전달체인 저밀도 지단백(LDL)이 동맥벽에 혈중 농도 의존적으로 전달되어 동맥벽의 내피 하에서 지방성분의 산화가 시작되고, 이들이 순환 중인 monocyte를 동맥벽으로 유도하게 됨으로써 시작이 된다. 동맥벽에 침윤한 monocyte

는 산화된 LDL에 자극 받은 혈관내피세포가 생산한 monocyte-colony stimulating factor(M-CSF)에 의해 macrophage로 분화하고, 이들 세포의 강력한 산화능에 의해 LDL은 완전한 산화상태(ox-LDL)가 되어 macrophage의 표면 수용체인 LDL receptor에 결합하는 능력을 상실하고 대신에 scavenger receptor(SR)를 통하여 macrophage에 수용됨으로써 이들 세포 내의 cholesterol 농도를 조절하게 된다(16). 결과적으로 macrophage에 고농도로 축적된 cholesterol은 소위 foamy cells이 되어 동맥경화의 초기 병변인 지방선조(fatty streak)를 형성한다.

따라서 본 연구에서는 복분자 미숙과 물추출물(unripe black raspberry water extract: UBR-W)의 세포내 콜레스테롤 관련기전을 확인하고, ApoB-1/ApoA-1 ratio를 확인하여 심혈관 질환에 미치는 효능을 살펴봄, LDL의 산화억제 기전을 연구하여 고지혈증 개선에 미치는 효과를 검증하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### Phenolic compounds 함량 분석

복분자(전북 고창산) 추출물의 phenolic compounds 함량을 분석하기 위하여 11개 표준품(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 구입하여 HPLC(Agilent, Palo Alto, CA, USA)를 이용 Table 1, 2의 조건으로 함량 분석을 하였다.

### 실험재료

간은 지방대사의 핵심인 장기로서, 지방산과 콜레스테롤의 합성 및 대사, 분비를 관장하는데 혈중 지질의 구성 성분인 HDL과 LDL의 생성을 알아보고자 인간 간암 세포주(human hepatocellular carcinoma cells: HepG2)를 사용하였고, 산화된 LDL에 의한 대식세포들의 변화를 알아보고자 마우스 대식세포주(mouse macrophage-like cell line: RAW 264.7)를 사용하였다. 이들 세포주에 각각 미치는 효능을 통하여 콜레스테롤 및 다양한 지방대사 관련 유전자들의 발현에 복분자 미숙과 물추출물(UBR-W)이 어떠한 영향

**Table 1.** HPLC condition for compounds analysis

HPLC model	Agilent 1100 series	
Column	OP C18 (250×4.6 mm)	
Detector	UV/Vis	
Column temperature	25°C	
Flow rate	1.0 mL/min	
Injection	10 µL	
Wavelength	360 nm	rutin, myricetin, luteolin, quercetin, kaempferol
	320 nm	caffeic acid, <i>p</i> -coumaric acid, ferulic acid, resveratrol
	280 nm	gallic acid
	260 nm	ellagic acid
Mobile phase	A: 0.2 M ortho-phosphoric acid, pH 1.57	
	B: 20% 50 mM ammonium dihydrogen phosphate, pH 2.6 in 80% acetonitrile	

**Table 2.** HPLC solvent condition

Gradient step	Time (min)	A (%)	B (%)
1	0.0	95.0	5.0
2	10.0	80.0	20.0
3	15.0	70.0	30.0
4	20.0	60.0	40.0
5	25.0	10.0	90.0
6	30.0	10.0	90.0
7	32.0	95.0	5.0
8	40.0	95.0	5.0

을 미치는지 알아보려고 실험을 수행하였다.

### 시료추출

복분자 미숙과 1 kg에 물 10 L를 넣고 환류냉각장치를 부착한 히팅 맨틀을 이용하여 2시간 동안 가열 추출하였고, 이것을 2회 반복하였다. 추출물은 여과지(ADVANTEC No. 2, Adventec Toyo Kaisha, Tokyo, Japan)를 이용 여과하여 감압농축 후 동결건조 하였다.

### 세포배양

HepG2 세포, RAW 264.7 세포는 한국세포주 은행에서 분양 받았으며 Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM, Welgen, Daegu, Korea)에 56°C에서 30분간 열처리된 fetal bovine serum(PAA Laboratories Inc., Etobicoke, ON, Canada) 10%와 항생제(penicillin/streptomycin, Lonza, Walkersville, MD, USA) 1%를 첨가하여 37°C, 습도 90%, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 배양하였다.

### 세포독성 실험(MTT)

배양이 끝난 세포의 생존율은 Mosmann(17)의 방법에 따라 MTT[3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide] 환원 방법을 이용하여 측정하였다. MTT assay는 대사가 왕성한 세포의 농도를 측정하는 방법으로 미토콘드리아의 탈수소 효소작용에 의해 MTT tetrazolium이 MTT formazan[3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide] 환원방법을 이용하여 450 nm의 파장에서 흡광도가 최대가 되어 살아있는 세포수를 반영한다. HepG2 세포는 96 well에 1×10<sup>4</sup>/mL 농도로 90 µL 분주하고, 복분자 미숙과 물추출물을 처리한 뒤 72시간 배양 후에 microplate reader(Synergy HT, Bio-Tek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 독성여부를 확인하였다. 같은 방법으로 RAW 264.7 세포는 96 well에 4×10<sup>4</sup>/mL 농도로 90 µL 분주한 뒤 24시간 동안 배양한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 독성여부를 확인하였다.

### HMG-CoA reductase activity assay

복분자 미숙과 물추출물의 HMG-CoA reductase activ-

ity 억제를 확인하기 위해 HMG-CoA reductase activity assay kit(Sigma-Aldrich Co.)를 사용하였다.

### RNA 분리 및 역전사-실시간 중합효소 연쇄반응(real-time RT-PCR)

HepG2 세포에서 복분자 미숙과 물추출물 처리 시간에 따른 LDL과 HDL 관련 유전자 발현 변화를 확인하고자 UBR-W를 24시간, 48시간, 72시간 동안 처리하였고, 이후 RNA 추출 시약(RNAiso PLUS, TAKARA, Otsu, Japan)을 사용하여 세포를 분리한 뒤 RNA를 분리하였다. 분리된 total RNA 2 µg을 사용하여 cDNA를 합성한 뒤, LDL 관련 인자인 LDL receptor와 전사인자인 SREBP1 및 SREBP2 mRNA의 발현 정도와 HDL 관련 인자인 ABCA1, SR-B1 mRNA의 발현 정도 및 동맥경화 지표로 알려져 있는 Apo B1/ApoA1 ratio를 real-time PCR을 통해 확인하였다.

RAW 264.7 세포 역시 6 well에 5×10<sup>5</sup>개로 분주하고, LDL의 산화를 일으키기 위해 ox-LDL(HI-TBAR ox-LDL)을 농도별로 처리하였다. 복분자 물추출물은 ox-LDL 처리 30분 전에 전처리하였다. 이후 복분자 미숙과 물추출물 처리 후 24시간 뒤에 Trizol 시약을 사용하여 세포를 분리하여 RNA를 획득하였고, total RNA 2 µg을 사용하여 cDNA를 합성하였다. 이후 지방대사에 관련된 유전자인 CD36, PPAR-γ, SR-A, adipophilin mRNA의 발현 정도를 real-time PCR을 통해 확인하였다.

Real-time PCR 수행은 Light Cycler 2.0 Instrument (Roche, Mannheim, Germany)를 사용하였고, 표준대조군(internal housekeeping gene)으로 β-actin을 사용하였다. PCR 조건은 95°C에서 10분 동안 pre-running 후, 95°C에서 15초, 60°C에서 10초, 72°C에서 10초, 60°C에서 60초의 간격으로 50회 반복하여 증폭하였다. 각각의 primer의 염기서열은 Table 3과 같다.

### 통계처리

실험 결과는 평균±표준편차 형태로 나타내며 두 그룹간의 통계적인 분석은 Student's *t*-test 방법을 이용하였다. *P*<0.05인 경우 통계적인 유의성이 있는 것으로 간주하였다.

## 결과 및 고찰

### 복분자 미숙과 물추출물의 세포 독성 검사(MTT)

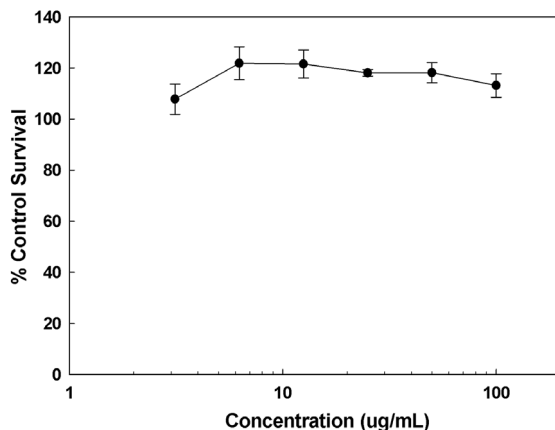
MTT assay를 통해 세포독성을 측정하였는데 복분자 미숙과 물추출물에 대한 세포독성을 알아보기 위해 활성화된 HepG2 세포에 농도 의존적으로 처리하여 72시간 후 세포 생존율을 측정하여 Fig. 1의 결과를 얻었다. 그 결과 3.125~100 µg/mL 모든 농도에서 세포 독성이 없는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 복분자 미숙과 물추출물을 이용한 콜레스테롤 관련 유전자 및 HMG-CoA reductase 활성 측정 시 세포 생존율에 영향을 주지 않는 100 µg/mL 농도로 설정하

**Table 3.** Sequence of primers for PCR

Gene	S&AS	Nucleotide sequences	Length of PCR products
LDL receptor	S	GAG TAC ACC AGC CTC ATC C	159 bp
	AS	GCT GAT GAC GGT GTC ATA G	
SREBP1	S	CTC AGA TAC CAC CAG CG	163 bp
	AS	CTC ACC GTA GAC AAA GAG AAG	
SREBP2	S	TAG ACC GCT CAC GGA TT	182 bp
	AS	AGG CAT CAT CCA GTC AAA C	
ABCA1	S	AAT GTC AAG GTG TGG TTC AAT A	162 bp
	AS	CTG CTG CTT GGT GAG AT	
SR-B1	S	AGC TCA ACA ACT CCG AC	200 bp
	AS	GCT GTA GAA CTC CAG CGA	
ApoB1	S	GTG CAA CGA CCA ACT TGA	175 bp
	AS	GCA CTT CCC AGT GAT AGC	
ApoA1	S	CCA GTT TGA AGG CTC CG	156 bp
	AS	CTC AGG CCC TCT GTC TC	
$\beta$ -Actin	S	CAC TGT GCC CAT CTA CG	157 bp
	AS	CTT AAT GTC ACG CAC GAT TTC	
CD36	S	GAG CCA TCT TTG AGC CTT	405 bp
	AS	TCA GAT CCG AAC ACA GCG	
Adiponectin	S	CCA AGG ATT CTG TAG CCA GCA	523 bp
	AS	ACA GTG GGA CTC ATC GGT GTC	
SR-A	S	TGA ATG TCA GAG TCC GTG AAT CTA	177 bp
	AS	GTC TGA GGT CGT TGG TG	
PPAR- $\gamma$	S	CCG AGA ACC ATC CAG TTG A	277 bp
	AS	CGG GAA GGA CTT TAT GTA TGA	
$\beta$ -Actin	S	AGA GAA GCT GTG CTA TGT T	179 bp
	AS	CAC AGG ATT CCA TAC CCA AG	

여 진행하였다.

RAW 264.7 세포 역시 농도 의존적으로 처리하여 24시간 후 세포 생존율을 측정하였다. 그 결과 복분자 미숙과 물추출물을 6.25~400  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도별로 처리했을 때 100% 세포 생존율을 보여 세포독성이 나타나지 않음을 확인할 수 있었다.

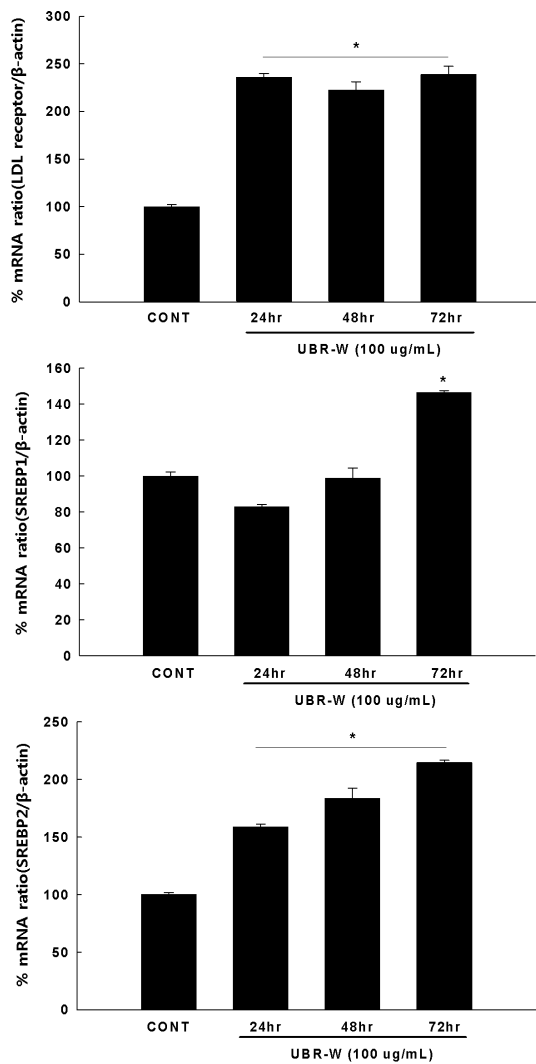


**Fig. 1.** Effect of UBR-W on the survival of HepG2 cells. The cytotoxicity was determined using the MTT assay after 72 hr treatment with UBR-W. UBR-W: unripe black raspberry water extract.

또한 복분자 미숙과와 완숙과 추출용매로서 물과 25%, 50%, 75% 에탄올을 사용하여 추출한 뒤 각각의 추출물을 이용하여 간암세포에서 콜레스테롤 생성 억제효과를 스크리닝한 결과, 복분자 미숙과 물추출물이 콜레스테롤 생성 억제효과가 가장 뛰어남을 확인하였고, 향후 실험에서는 복분자 미숙과 물추출물을 선택하여 실험을 진행하였다.

#### 복분자 미숙과 물추출물의 LDL receptor, SREBP1 및 SREBP2 mRNA 발현에 미치는 영향

HepG2세포에서 LDL receptor, SREBP1 및 SREBP2 mRNA 발현에 미치는 영향을 확인해본 결과(Fig. 2), 복분자 미숙과 물추출물을 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  처리하였을 때 24시간 때부터 2.4배 증가되었으나 그 이상의 시간(48 및 72시간)에서는 증가 경향을 보이지 않았다. 적포도주 유래 poly-phenolic compounds(18)처럼 복분자 미숙과에 함유되어 있는 다량의 폴리페놀류가 LDL receptor 유전자의 발현을 증가시켜 콜레스테롤의 세포 내 유입증가를 통한 세포 내 떨어진 콜레스테롤 양 회복 및 혈중의 콜레스테롤 양을 낮추는데 기인한다고 할 수 있다. 복분자 미숙과는 완숙과에 비해 훨씬 더 많은 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드를 함유하고 있을 뿐만 아니라(8), 복분자 완숙과와 미숙과 물추출물의 폴리페놀 함량을 조사한 결과 완숙과에 비해 미숙과가



**Fig. 2.** Effect of UBR-W extract (100 µg/mL) on expression of LDL receptor, SREBP1 and SREBP2 mRNA in HepG2 cell line. The level of mRNA expression was determined by real-time RT-PCR and normalized by that of mRNA β-actin, which was used as a control for RNA. Values are mean±SE of triplicate determinations. \*Statistically significant from the control ( $P < 0.05$ ).

ellagic acid 함량은 5.3배, garlic acid는 53배 더 높은 함량을 가지고 있다(Table 4).

LDL receptor의 발현을 증가시키는 전사인자로 알려져 있는 SREBP1과 SREBP2 역시 복분자 미숙과 물추출물의 처리 시간이 증가할수록 그 발현량이 증가하였고, 특히 SREBP2의 발현이 현저하게 증가되었다(Fig. 2). 전사인자의 하나인 SREBPs는 SREBP1a, 1c와 SREBP2의 3종류의 isoform으로 존재하며(18), SREBP1a와 SREBP1c는 같은 유전자에서 다른 promoter 부위를 사용하여 만들어지고 SREBP2는 다른 유전자에서 만들어진다. SREBP1은 지질 대사 관련 중성지방과 인지질의 합성에 관여하고 SREBP2는 콜레스테롤 대사에 작용한다(19). 따라서 복분자 미숙과 물추출물에 의한 LDL receptor mRNA의 증가는 LDL receptor의 발현을 조절할 수 있는 SREBPs mRNA의 발현 증가와 관련이 있음을 확인하였다.

**복분자 미숙과 물추출물의 ABCA1 및 SR-B1 mRNA 발현에 미치는 영향**

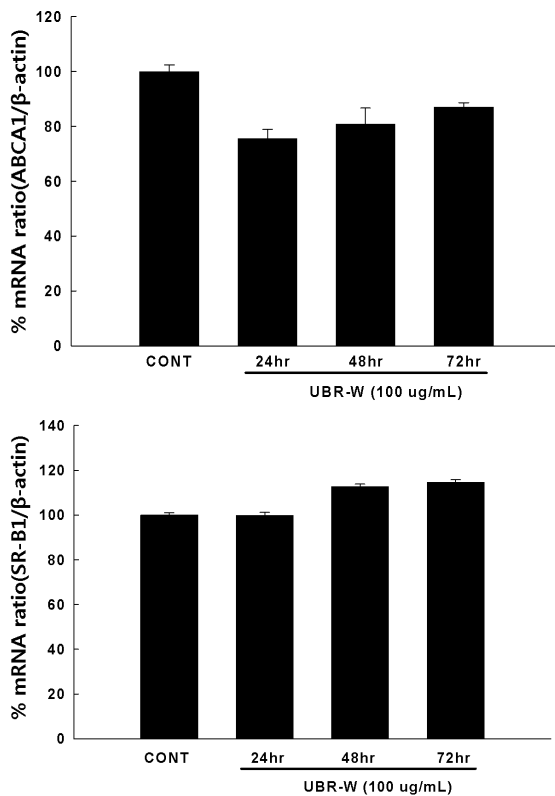
HepG2 세포에서 HDL관련 유전자인 ABCA1 및 SR-B1 mRNA 발현에 미치는 영향을 확인해 본 결과(Fig. 3), 복분자 미숙과 물추출물은 ABCA1 및 SR-B1 mRNA 발현에 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었다.

HDL은 좋은 콜레스테롤로 불리며 혈액속 HDL의 비율이 높을수록 동맥경화의 위험이 낮다고 판단한다. ATP-binding cassette transporter A1(ABCA1)은 HDL 콜레스테롤 운송에 관여한다고 보고되어 있다(20,21). 콜레스테롤 유출에 관여하는 ABCA1은 콜레스테롤을 세포 외로 분비시켜 분비된 콜레스테롤이 간에서 담즙산으로 바뀌어 체외로 배출하는 기능을 담당한다(22). 따라서 ABCA1의 발현이 증가하게 되면 혈중 HDL의 농도가 증가하게 되고 최종적으로 콜레스테롤을 체외로 배출하여 체내의 콜레스테롤을 낮추게 된다.

또한 HDL 대사에 있어 매우 중요한 유전자로는 SR-B1이 있다. SR-B1은 HDL의 선택적 흡수에 관여하며 간과

**Table 4.** Phenolic and flavonoid compound profiles of *Rubus occidentalis*

Gene	Unripe black raspberry (µg/g)					Ripe black raspberry (µg/g)				
	Extraction condition (% ethanol)					Extraction condition (% ethanol)				
	0	25	50	75	100	0	25	50	75	100
Caffeic acid	172	72	82	42	8	ND	42	12	8	12
Ellagic acid	8,502	6,578	6,352	6,186	7,768	1,600	1,524	1,382	1,158	1,010
Ferulic acid	ND	74	100	102	174	40	12	8	6	6
Gallic acid	3,624	698	484	328	24	68	136	68	106	50
Kaempferol	8	4	12	140	22	14	8	6	4	4
Luteolin	14	50	42	36	64	8	10	10	10	4
Myricetin	ND	8	22	18	18	ND	ND	ND	ND	10
p-Coumaric acid	ND	ND	ND	12	10	74	108	124	84	20
Quercetin	82	116	114	100	154	138	100	86	82	44
Resveratrol	ND	ND	ND	ND	ND	4	ND	ND	ND	ND
Rutin	632	112	160	222	262	872	998	956	924	764



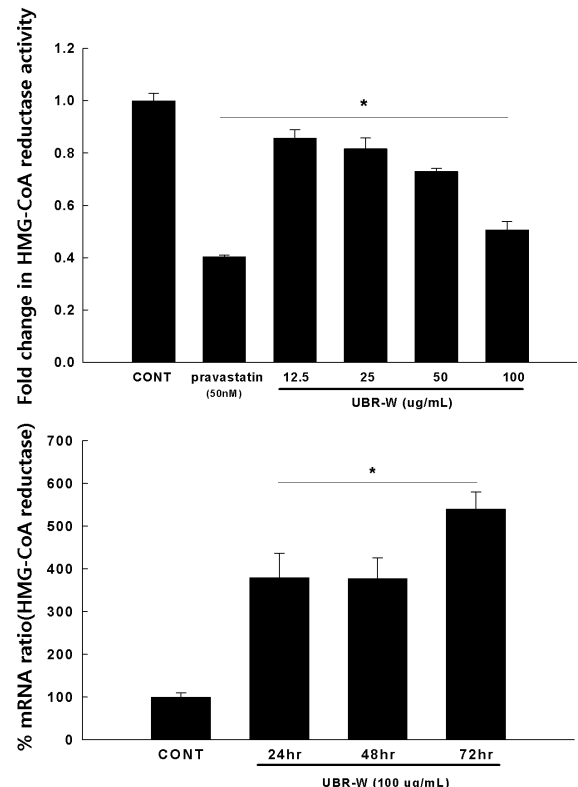
**Fig. 3.** Effect of UBR-W extract (100 μg/mL) on expression of ABCA1, SR-B1 mRNA in HepG2 cell line. There is no statistically difference between control and treatment groups.

지방대사 조직에 가장 많이 분포하고 콜레스테롤을 간을 통해 체외로 배출하는 역할을 담당한다(23,24).

위의 실험결과를 통하여 간세포에서 복분자 미숙과 물추출물은 LDL receptor와 SREBPs mRNA의 발현을 증가시켜 LDL의 농도를 낮추지만, HDL 유전자의 발현에는 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었다.

**복분자 미숙과 물추출물의 HMG-CoA reductase 발현과 활성에 미치는 영향**

콜레스테롤 합성은 많은 연구들에 의하면 최종산물에 의한 피드백으로 조절된다고 알려져 있다. 이의 조절에 가장 중요한 인자로 LDL receptor와 HMG-CoA reductase가 있다. HMG-CoA reductase는 콜레스테롤 생합성 단계에서 작용하는 rate-limiting enzyme으로써 스테롤이나 이소프레노이드계 화합물의 생합성 경로의 중간단계인 mevalonic acid의 합성을 매개하는 역할을 한다(25). 여러 역학 연구(26-28)에서 혈중 콜레스테롤치나 혈중 LDL-콜레스테롤 수치가 높을수록 관상동맥성 심장질환에 걸릴 위험성이 높아진다고 보고해왔다. 동맥경화 치료에 사용되는 대부분의 statin 계열의 약은 HMG-CoA reductase의 저해제로 작용하는데, 값이 너무 고가이며 장기 복용 시 일부 부작용이 있다고 알려져 있다. 따라서 독성이 없고 안전한 식품소재를 대상으로 HMG-CoA reductase 활성 저해제 조성물



**Fig. 4.** Effect of UBR-W extract (100 μg/mL) on HMG-CoA reductase activity and mRNA expression in HepG2 cell line. \*Statistically significant from the control ( $P < 0.05$ ).

을 개발한다면 그 의의가 크다고 할 수 있겠다.

본 연구에서는 HepG2 세포에서 복분자 미숙과 물추출물이 HMG-CoA reductase의 발현과 활성에 어떠한 영향을 미치는지 확인하였다(Fig. 4). 복분자 미숙과 물추출물을 처리한 시간이 증가할수록 HMG-CoA reductase mRNA의 발현이 각각 73.6%, 73.5%, 81.5% 유의성 있게 증가되었다. 그러나 복분자 미숙과 물추출물을 처리하였을 경우 농도에 의존적으로 HMG-CoA reductase의 활성이 감소하였다. 이러한 결과는 statin을 처리 시 HMG-CoA reductase mRNA 발현 증가와 함께 HMG-CoA reductase의 활성 감소와 같은 동일한 결과를 보여주었다. 적포도주와 녹차를 이용한 동맥경화와 관련된 선행연구에서도 같은 결과를 보여주고 있다(18,29).

즉, 복분자 미숙과 물추출물이 HMG-CoA reductase를 저해함으로써 활성을 감소시키고, 이것이 원인이 되어 결과적으로 간에 공급되는 콜레스테롤의 양이 감소하는 현상을 보상하기 위해 HMG-CoA reductase mRNA의 발현이 증가되는 것으로 생각된다(30). 이러한 결과는 콜레스테롤 및 중성지방 합성에 관여하는 전사인자인 SREBPs mRNA를 활성화하여 LDL receptor의 증가와 동시에 HMG-CoA reductase mRNA 양을 증가시켜 콜레스테롤 항상성을 유지한다고 볼 수 있다.

**복분자 미숙과 물추출물의 ApoB1/ApoA1 ratio에 미치는 영향**

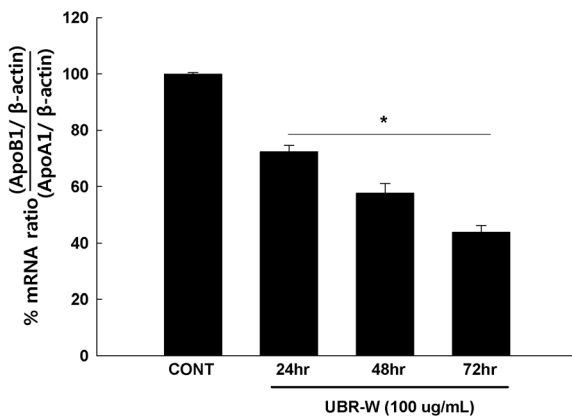
HepG2 세포에서 ApoB1/ApoA1 ratio는 ApoB1과 ApoA1의 mRNA의 발현을 통해 분석하였다. ApoB1은 시간에 따라 발현이 감소되는 경향을 보였고, ApoA1은 24시간, 48시간에서는 뚜렷한 증가를 나타내지 않았으나 72시간에서 51% 유의성 있게 증가됨을 확인하였다(Table 5). 그러나 ApoB1/ApoA1 ratio는 복분자 물추출물의 처리 시간이 증가함에 따라 시간 의존적으로 현저한 감소를 나타내었고, 72시간에는 60%의 감소를 나타내었다(Fig. 5).

Apolipoprotein B1/Apolipoprotein A1 ratio(ApoB1/ApoA1 ratio)는 이상지질혈증, 비만, 대사성질환, 심혈관질환의 위험도를 예측하는데 유용한 임상적 지표로 알려져 있다(31). ApoA1은 고밀도지질단백의 가장 큰 구성 요소이며, ApoB는 chylomicron에 존재하고 중성지방이 풍부한 초저밀도지질단백과 저밀도지질단백의 체내 양을 반영한다. 간으로의 비에스테르화 지방산(nonesterified fatty acid) 유입이 증가하는 경우 간에서의 ApoB 분비가 증가되고 이화작용(catabolism)에 장애가 생겨 ApoB의 상승을 일으킨다. 최근 연구결과에 의하면 LDL-cholesterol보다는 apo-protein B가 더 중요하며 LDL-C/HDL-C보다 ApoB1/ApoA1이 더 중요하다는 연구들이 발표되었다(31-33). 그러므로 앞으로는 이상 동맥경화의 평가와 치료기준을 Apo B1/ApoA1 ratio로 해야 한다는 주장이 설득력을 얻고 있

**Table 5.** Change of ApoB1 and ApoA1 ratio treated with UBR-W (100 µg/mL) in HepG2 cell line

Sample	% ApoB1 ratio	% ApoA1 ratio
CONT	100±0.8	100±1.12
24 hr	88.63±1.92*	122.35±1.45*
48 hr	73.36±4.23*	127.21±5.07*
72 hr	90±2.12*	206.61±6.55*

CONT, control; UBR-W, unripe black raspberry water extract. \*Statistically significant from the control ( $P<0.05$ ).



**Fig. 5.** Inhibitory effect of UBR-W extract (100 µg/mL) on ApoB1/ApoA1 mRNA in HepG2 cell line. \*Statistically significant from the control ( $P<0.05$ ).

다. 따라서 복분자 미숙과 물추출물이 ApoB1/ApoA1 ratio를 현저히 감소시킨 결과로 미루어 고지혈증 개선에 효과가 있는 것으로 사료된다.

**복분자 미숙과 물추출물의 ox-LDL 농도별 처리에 따른 mRNA 발현에 미치는 영향**

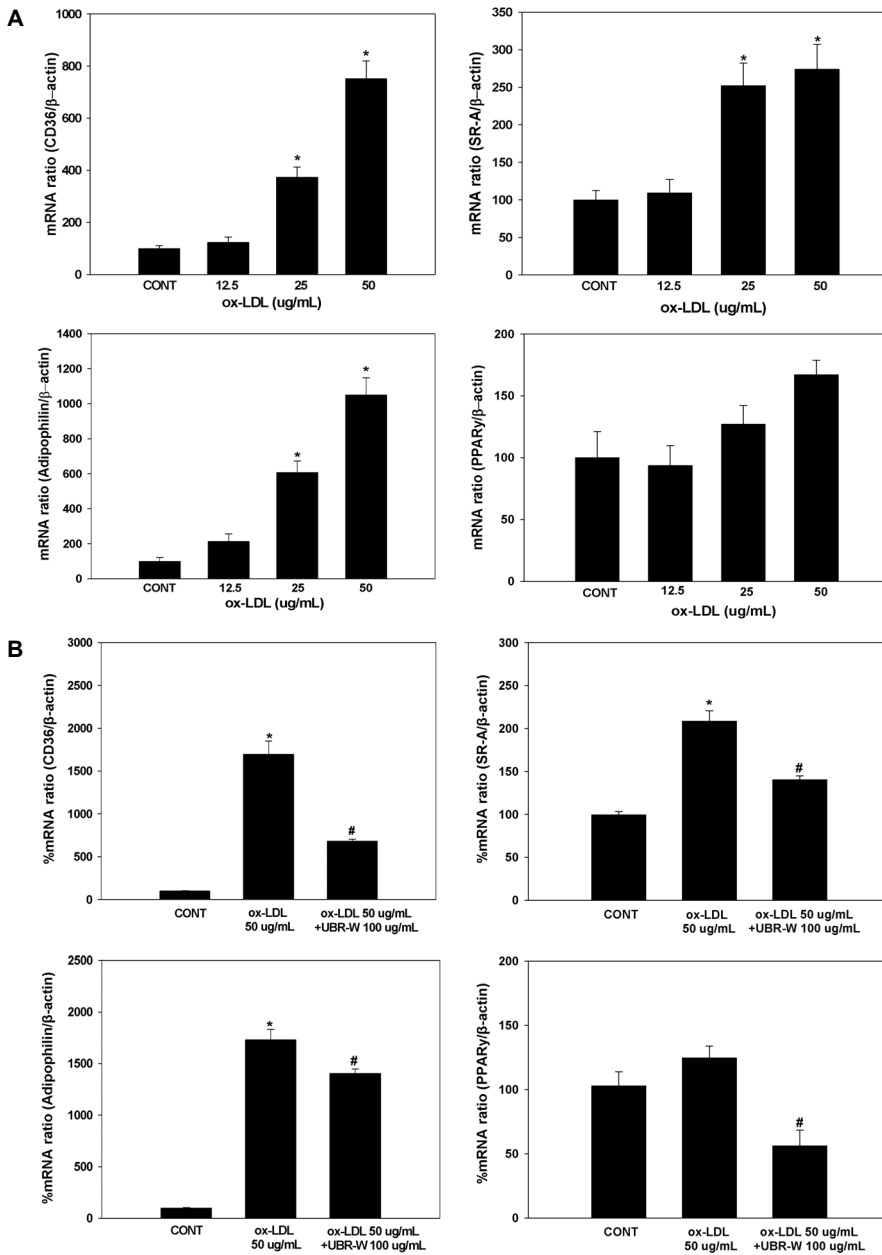
혈액 내에 이동하는 LDL이 내피세포 안으로 침투하게 되면 ox-LDL 형태로 변형이 된다. 변형된 LDL은 macrophage에 있는 CD36, scavenger receptor(SR-A) 수용체에 의해 흡수되고 많은 LDL이 축적된 macrophage는 거품세포로 변형이 되는데, peroxisome proliferator activated receptor gamma(PPAR-γ) 또한 연관성이 있음이 알려져 있다. 이 거품세포가 염증물질을 분비하고 동맥경화 및 다양한 질병을 유발한다고 알려져 있다(34,35). Adipophilin이 활성화되면 세포 내에 있는 콜레스테롤의 방출을 촉진시킴으로 인하여 세포 내에 항상성을 유지시키고, 최근 논문에 의하면 LDL 산화화도 관련이 있다고 보고되었다(36).

ox-LDL은 생체 내에서 일어나는 LDL의 산화 반응을 나타내기 위해 사용하였다. ox-LDL은 12.5, 25, 50 µg/mL 농도로 24시간 동안 처리하였다. 그 결과 ox-LDL의 농도가 증가함에 따라 CD36, SR-A, adipophilin, PPAR-γ mRNA의 발현이 농도 의존적으로 증가하였다. ox-LDL 50 µg/mL 농도에서 CD36은 7.5배, SR-A는 2.8배, adipophilin은 11배, PPAR-γ는 1.6배 정도 증가함으로써 유의성 있는 결과를 나타내었다(Fig. 6A).

이를 바탕으로 LDL의 산화를 유도한 뒤 복분자 미숙과 물추출물을 처리하여 혈중 지질 개선 효과를 확인하였다. 복분자 미숙과 물추출물은 ox-LDL 처리 30분 전에 처리하였고 농도는 50 µg/mL로 시행하였다. 그 결과 ox-LDL을 처리한 그룹에서 지방 산화에 관련된 유전자들의 발현이 현저하게 증가하였고(CD36은 16배, SR-A는 2배, adipophilin은 18배, PPAR-γ는 1.3배), 복분자 미숙과 물추출물을 처리한 그룹에서는 각각 60%, 32.6%, 18.7%, 50% 감소하였다. 특히 CD36, PPAR-γ에서 유의성 있게 억제되는 경향을 확인할 수 있었다. 따라서 복분자 미숙과 물추출물이 LDL 산화와 관련된 유전자를 억제함으로써 혈중지질 개선에 효과가 있는 것으로 사료된다(Fig. 6B).

**요 약**

복분자 미숙과 물추출물이 콜레스테롤 개선에 미치는 영향을 측정한 결과는 다음과 같다. 간세포주(HepG2 cells)에서 복분자 미숙과 물추출물은 SREBPs를 증가시킴으로써 혈액 내에 LDL을 LDL receptor를 통해서 세포 안으로 흡수시키고, 콜레스테롤 합성에 관여하는 HMG-CoA reductase 활성을 억제하면서 체내 콜레스테롤을 조절하였다. 그러나 HDL의 생성에 관여하는 유전자(ABCA1, SR-B1)는 변화를 보이지 않았다. 결과적으로 복분자 미숙과 물추출물이



**Fig. 6.** Effect of various concentration of ox-LDL on expression CD36, SR-A, adipophilin, and PPAR $\gamma$  mRNA (A) and UBR-W extract on mRNA expression of CD36, SR-A, adipophilin, and PPAR $\gamma$  by ox-LDL (B) in RAW264.7 cells. \* $P$ < 0.05 vs. control; # $P$ <0.05 vs. ox-LDL 50  $\mu$ g/mL.

LDL receptor를 통해서 LDL을 억제시키고 체내에서는 콜레스테롤 생합성을 억제하였으며, HDL의 생성에는 관여를 하지 않음을 확인하였다. 또한 ApoB1/ApoA1 ratio 값을 통해서 동맥경화 지표를 확인해 본 결과 유의성 있게 수치가 감소함을 확인하였고, 이는 미숙과 물추출물이 콜레스테롤을 개선하여 동맥경화를 예방할 것으로 기대한다. 또한 대식세포(RAW 264.7 cells)에서 복분자 미숙과 물추출물이 CD 36, SR-A 수용체를 억제시킴으로 인해 세포 내의 ox-LDL의 흡수를 차단시키고, 세포 안에서는 macrophage에 있는 PPAR- $\gamma$ 를 억제시킴으로 인해 LDL 산화가 억제되었다. Adipophilin의 활성이 억제됨에 따라 세포 안에 있는 콜레스테롤 방출을 촉진시킴으로 인해 동맥경화를 완화시킬 수 있다고 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 고창군 지역농식품 선도클러스터 육성사업과 고창복분자연구소 건립사업의 일환으로 수행되었으며 이에 깊이 감사드립니다.

### REFERENCES

- 2006 Annual report on the cause of death statistics. 2007. Korea National statistical Office.
- Huh KB. 1990. The present status if nutrition-related diseased and its countermeasures. *Korean J Nutr* 23: 197-207.
- Moon SJ. 1996. Nutritional problems of Korean. *Korean J Nutr* 29: 371-380.
- Eu GS, Chung BY, Bandopadhyay R, Yoo NH, Choi DG,



- Yun SJ. 2008. Phylogenetic relationships of *Rubus* species revealed by randomly amplified polymorphic DNA markers. *J Crop Sci Biotech* 11: 39-44.
5. Seeram NP, Adams LS, Zhang Y, Lee R, Sand D, Scheuller HS. 2006. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry and strawberry extracts inhibit growth and stimulated apoptosis of human cancer cells in vitro. *J Agric Food Chem* 54: 9329-9339.
  6. Chen T, Hwang HJ, Rose ME, Nines RG, Stoner GD. 2006. Chemopreventive properties of black raspberries in N-nitrosomethylbenzylamine-induced rat esophageal tumorigenesis: Down regulation of cyclooxygenase-2, inducible nitric oxide synthase and c-jun. *Cancer Res* 66: 2853-2859.
  7. Wang SY, Jiao H. 2000. Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals and singlet oxygen. *J Agric Food Chem* 48: 5677-5684.
  8. Kwon JW, Lee HK, Park HJ, Kwon TO, Choi HR, Song JY. 2011. Screening of biological activities to different ethanol extracts of *Rubus coreanus* Miq.. *Korean J Med Sci* 19: 325-333.
  9. Yang HM, Oh SM, Lim SS, Shin HK, Oh YS, Kim JK. 2008. Antiinflammatory activities of *Rubus coreanus* depend on the degree of fruit ripening. *Phytother Res* 22: 102-107.
  10. Russell DW. 1992. Cholesterol biosynthesis and metabolism. *Cardiovasc Drugs Ther* 6: 103-110.
  11. Benn M, Nordestgaard BG, Jensen GB, Tybjaerg-Hansen A. 2007. Improving prediction of ischemic cardiovascular disease in the general population using apolipoprotein B: the Copenhagen City Heart Study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 27: 661-670.
  12. Goldstein JL, Brown MS. 1984. Progress in understanding the LDL receptor and HMG-CoA reductase, two membrane proteins that regulate the plasma cholesterol. *J Lipid Res* 25: 1450-1461.
  13. Barter PJ, Rye KA. 2006. The rationale for using apoA-I as a clinical marker of cardiovascular risk. *J Intern Med* 259: 447-454.
  14. Rees D, Sloane T, Jessup W, Dean RT, Kritharides L. 1999. Apolipoprotein A-I stimulates secretion of apolipoprotein E by foam cell macrophages. *J Biol Chem* 274: 27925-27933.
  15. Wang N, Sliver DL, Costet P, Tall AR. 2000. Specific binding of ApoA-I, enhanced cholesterol efflux, and altered plasma membrane morphology in cells expressing ABC1. *J Biol Chem* 275: 33053-33058.
  16. Chawla A, Bosivert WA, Lee CH, Lafitte BA, Barak Y, Joseph SB, Liao D, Nagy L, Edwards PA, Curtiss LK, Evans RM, Tontonoz P. 2001. A PPAR $\gamma$ -LXR-ABCA1 pathway in macrophages is involved in cholesterol efflux and atherogenesis. *Mol Cell* 7: 161-171.
  17. Mosmann T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65: 55-63.
  18. Pal S, Ho N, Santos C, Dubois P, Mamo J, Croft K, Allister E. 2003. Red wine polyphenolics increase LDL receptor expression and activity and suppress the secretion of ApoB100 from human HepG2 cells. *J Nutr* 133: 700-706.
  19. Shimano H. 2001. Sterol regulatory element-binding proteins (SREBPs): transcriptional regulators of lipid synthetic genes. *Prog Lipid Res* 40: 439-452.
  20. Joyce C, Freeman L, Brewer HB Jr, Santamarina-Fojo S. 2003. Study of ABCA1 function in transgenic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 965-971.
  21. Aiello RJ, Brees D, Francone OL. 2003. ABCA1-deficient mice: insights into the role of monocyte lipid efflux in HDL formation and inflammation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 972-980.
  22. Tsujita M, Wu CA, Abe-Dohmae S, Usui S, Okazaki M, Yokoyama S. 2005. On the hepatic mechanism of HDL assembly by the ABCA1/apoA-I pathway. *J Lipid Res* 46: 154-162.
  23. Brundert M, Heeren J, Bahar-Bayansar M, Ewert A, Moore KJ, Rinninger F. 2006. Selective uptake of HDL cholesteryl esters and cholesterol efflux from mouse peritoneal macrophages independent of SR-B1. *J Lipid Res* 47: 2408-2421.
  24. Krause BR, Auerbach BJ. 2001. Reverse cholesterol transport and future pharmacological approaches to the treatment of atherosclerosis. *Curr Opin Investig Drugs* 2: 375-381.
  25. Endo A. 1992. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. *J Lipid Res* 33: 1569-1582.
  26. Rizzo M, Berneis K. 2006. Low-density lipoprotein size and cardiovascular prevention. *Eur J Intern Med* 17: 77-80.
  27. Pitt B. 2005. Low-density lipoprotein cholesterol in patients with stable coronary heart disease—Is it time to shift our goals?. *N Engl J Med* 352: 1483-1484.
  28. Micheal I, Gurr A. 1992. Dietary lipids and coronary heart disease: old evidence new perspective. *Prog Lipid Res* 31: 195-243.
  29. Bursell C, Roach PD, Pal S. 2001. Green tea upregulates the low-density lipoprotein receptor through the sterol-regulated element binding protein in HepG2 liver cells. *J Agric Food Chem* 49: 5639-5645.
  30. Vinson JA, Teufel K, Wu N. 2001. Red wine, dealcoholised red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in hamster model. *Atherosclerosis* 156: 67-72.
  31. Scanu AM. 1991. Lipoprotein as a cardiovascular risk factor. *Trends Cardiovasc Med* 1: 294-299.
  32. Walldius G, Jungner I, Holme I, Aastveit AH, Kolar W, Steiner E. 2001. High apolipoprotein B, low apolipoprotein A-I, and improvement in the prediction of fatal myocardial infarction (AMORIS study): a prospective study. *Lancet* 358: 2026-2033.
  33. Walldius G, Jungner I. 2006. The apoB/apoA1 ratio: a strong, new risk factor for cardiovascular disease and a target for lipid-lowering therapy—a review of the evidence. *J Intern Med* 259: 493-519.
  34. Han J, Hajjar DP, Febbraio M, Nicholson AC. 1997. Native and modified low density lipoproteins increases the functional expression of the macrophage class B scavenger receptor, CD36. *J Biol Chem* 272: 21654-21659.
  35. Han J, Hajjar DP, Zhou X, Gotto AM Jr, Nicholson AC. 2002. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ -mediated gene expression. A new mechanism of action for high density lipoprotein. *J Biol Chem* 277: 23582-23586.
  36. Liu QN, Dai ZB, Liu AQ, Tang CK, Tian GP, Dai XS, Qiu HE, Ling YE, Yuan ZH. 2011. The effects of high-expression and knockdown adipophilin in the activity of ERK1/2 and expression of PPAR $\gamma$  and lipid accumulation in cells. *Prog Biochem Biophys* 38: 1132-1144.