

대두 가수분해물에서 분리한 UF-peptide가 *in vivo*에서 자발성 고혈압 흰쥐의 혈압 강하에 미치는 영향

유리나[†] · 박수아 · 정대균* · 남희섭** · 신재익**

울산대학교 식품영양학과

*경희대학교 유전공학과 및 유전공학연구소

**농심 기술개발 연구소

Effect of Soybean Hydrolysate on Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats

Rina Yu[†], Soo-Ah Park, Dae-Kyun Chung*, Hee-Sop Nam** and Zae-Ik Shin**

Dept. of Food and Nutrition, University of Ulsan, Ulsan 680-749, Korea

*Inst. and Dept. of Genetic Engineering, Kyunghee University, Youngin 449-701, Korea

**Research and Development Center, Nongshim, Suwon 435-035, Korea

Abstract

Effect of soybean hydrolysate prepared by ultrafiltration(UF-peptide) was evaluated regarding its action on blood pressure, selected biochemical changes in spontaneously hypertensive rats(SHR). Male SHR were divided into three groups and fed diet with 0, 3, 10% UF-peptide for 6 weeks. Development of hypertension was determined by tail cuff method during the experimental period. After the experimental period, angiotension I converting enzyme(ACE) activity in serum and vascular tissue, and lipids level in serum were measured. Spontaneous elevation of blood pressure was suppressed by the UF-peptide supplementation after two weeks of feeding. After five weeks of feeding the development of hypertension was significantly inhibited in the UF-peptide administered groups compared to the control. In addition, the UF-peptide was effective for lowering serum lipids level such as triglyceride and total cholesterol, as well as ameliorating some pathological changes in SHR.

Key words: hypertension, SHR, soybean peptide, serum lipids

서 론

현대사회에 있어서 주요 3대 사망원인은 악성종양, 심장질환, 뇌졸중이라고 알려져 있다. 이들 질병중 뇌졸중, 심근경색, 동맥경화, 뇌혈관성치매 등의 순환기계 질환은 죽상 동맥경화(atherosclerosis)가 기초질환인 혈관계 질병인데, 죽상동맥경화의 2대 위험인자는 고지혈증(고콜레스테롤증)과 고혈압을 들 수 있다(1). 이들 질병의 발생은 유전적인 요인에 의해 발생하기도 하지만, 환경적인 요인, 특히 식환경(食環境)과 밀접한 관련을 가지는 것으로 알려져 있다(2-5). 예를들어, 식염의 과잉섭취는 고혈압 또는 뇌졸중 발병율을 높이는 것으로 알려져 있는 반면, 동물성 지방질의 과잉섭취

는 혈관계 질환의 발생 빈도를 높이는 것으로 널리 인식되고 있다(6).

최근, 식품으로 부터 영양소 또는 비영양소 성분의 향암, 항노화, 또는 항고혈압 등 다양한 생리활성을 나타내는 기능성 성분들에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 이들 항성인병 효과를 나타내는 새로운 기능성 식품의 개발에 대한 관심이 고조되고 있다. 특히, 고혈압, 동맥경화 등 성인병의 경우 대부분이 식습관과 밀접한 관련을 가지는 점을 고려할 때 일상적으로 섭취 가능한 식품성분들 가운데 혈압강하 효과를 나타내거나 또는 지질대사 개선작용을 하는 물질을 검색하는 것은 이들 질병의 예방 차원에서 매우 의미가 있다고 하겠다.

[†]To whom all correspondence should be addressed

혈압의 상승과 유지에 중요한 작용을 담당하고 있는 효소인 angiotension I 전환효소(ACE, EC 3.4.15.1)는 신장의 방사구체 세포에서 분비되는 레닌의 작용에 의해 angiotensinogen에서 유리되는 angiotensin I을 angiotensin II로 전환시키는 효소이다(7). 또한, ACE는 혈압강하 펩타이드인 bradykinin을 불활성하는 효소이기도 하다. 혈압 상승을 억제하고 고혈압을 치료하기 위한 의약품으로서 합성 개발된 특이적인 ACE 저해제가 사용되고 있으나(8,9), 최근에는 식품유래 ACE 저해제 검색이 주목을 끌고 있다. 특히, 식품에서 분리한 단백질 중에는 카제인 등의 동물성 단백질, 대두 등의 식물성 단백질로부터 *in vitro*에서 ACE 활성을 저해하는 펩타이드가 분리되어 있으며(10-12). 이들을 기능성을 활용하여 새로운 기능성 식품을 개발하고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있다. 이를 위해서는 분리된 기능성 성분의 활성이 *in vitro*에서와 마찬가지로 *in vivo*에서도 발현하는지에 대해 명확히 할 필요가 있으나, 이들 펩타이드의 *in vivo*에서의 효과에 대해서는 아직 확인이 되지 않은 경우가 대부분이다.

본 연구에서는 UF-peptide의 항고혈압 기능성 펩타이드로서 활용 가능성을 검토하기 위해, *in vitro*에서 ACE 저해작용이 있는 것으로 확인된 대두 가수분해물인 UF-peptide가 *in vivo*에서 혈압강하 효과를 나타낼 수 있는지에 대해 조사하였다. 즉, 실험동물로서 고혈압 모델인 자발성 고혈압 흰쥐(spontaneously hypertensive rat, SHR)를 대상으로 UF-peptide를 첨가한 식이 UF-peptide로 일정기간 사육하여 SHR의 혈압강하에 미치는 영향, 혈중 지질 수준 및 혈관조직 중 ACE 활성 등을 조사하였다.

재료 및 방법

실험동물 및 사료조제

SHR(6주령) 수컷을 울산대학교 의과대학 실험동물실로부터 분양받아, 수축기 혈압(systolic blood pressure, SBP)이 145mmHg 이상인 SHR을 사용하였다. 동물을 시판사료(삼양사)로 예비사육한 후 무작위로 군당 6마리씩 대조군, 3% UF-peptide 투여군, 10% UF-peptide 투여군의 3군으로 분류하여 6주간 사육하였다. 사료성분은 조단백질 23.2% 이상, 조지방 4.0% 이상, 조섬유 6.0% 이하, 조회분 10.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.45% 이상이었다. 미세입자로 분쇄한 사료에 UF-peptide 분말을 소정 농도로 첨가하여 충분히 혼합하였다. 실험기간 중 먹이와 물을 자유섭취케 하였으며, 3~4일마다 체중을 측정하며 동물의 외관, 행동 및 증상을 관찰하였다.

대두 단백질을 endopeptidase로 pH 8, 60°C에서 2시간, exopeptidase로 pH 5, 55°C에서 4시간, 그리고 계속해서 amylase와 exopeptidase로 12시간 가수분해 한 후, 이것을 ultrafiltration하여 동결건조하였다(UF-peptide). 이 UF-peptide를 전술한바와 같은 농도로 사료에 첨가하였다.

혈압측정

Rat의 꼬리동맥의 수축기 혈압(SBP)을 tail cuff법(Natsume KN-210, Japan)으로 측정하였다(13). 즉, rat를 약 섭씨 38도 보온상자속에서 10분간 가온 한후, holder로 고정하여 실온에서 소동물 비관혈식 자동혈압계를 사용하여 SBP를 측정하였다. 측정치는 rat가 정지상태에 있을 때 SPB를 5회 이상 측정한 뒤 평균값을 사용하였다. 혈압측정은 전 실험기간 중 정기적으로 3일간격으로 10:00~12:00am 사이에 측정하였다.

생화학적 검사 및 혈관 조직중 ACE 조효소액 조제

실험기간 종료후 rat를 희생시켜 체형 및 각 주요장기를 적출하였다. 혈액을 원심분리(3,000rpm, 10min)하여 혈청을 얻었고, 시판 kit(아산제약)로 glutamate oxaloacetate transaminase(GOT) 및 glutamate pyruvate transaminase(GPT), 총 콜레스테롤, 중성지질을 측정하였고, Iyatron kit(Iyatron Ltd., Japan)로 인지질을 측정하였다(14-17).

혈관조직으로 흉부 대동맥을 적출하여, 0.9% 생리식염수로 세척하였다. 조직을 세분한 후 homogenize(1,300rpm, 3min)하여 원심분리(3,500rpm, 20min, 4°C)한 후 그 상층액을 혈관조직의 ACE 조효소액으로 사용하여 효소활성을 측정하였다(18).

장기중량 측정 및 병리조직학적 검사

각 주요장기조직, 즉, 간, 심장, 신장, 부신, 폐 등을 적출하여 생리식염수로 세척 후 중량을 측정하여 체중에 대한 상대 중량비(%)를 구하였다. 한편, 본 실험에 의해 병변이 예상되는 심장, 신장 및 뇌는 중성 완충 포름알데히드액으로 고정한 후 기존의 방법에 따라 헤마톡신-에오신 염색을 하여 병리학적인 검사를 하였다(19).

통계처리

측정값은 평균±표준오차로 나타냈고, ANOVA 및 Student's t-test로 유의차 검정을 하였다.

결과 및 고찰

Fig. 1에 실험기간 중의 SHR의 체중변화를 나타냈다. 대조군과 3% UF-peptide군 및 10% UF-peptide 투여군 모두 실험기간 4주 이후의 체중변화에 있어서 차이가 관찰되지 않았으나, 실험기간 전반부에서 대조군에 비해 10% UF-peptide 투여군에서 체중 저하 현상이 관찰되었다. 이것은 실험 초기 얼마동안 10% UF-peptide 군의 먹이 섭취량이 다른 군에 비해 저조했던 것이 그 원인일 것으로 사료되며, 실험 중반기로 접어들면서 각 군간에 체중 증가율은 큰 차이를 보이지 않았다.

Table 1에 체중에 대한 장기중량 %를 나타냈다. 각 군사이에 중량비의 차이는 없었으며, 일반적으로 독성 물질의 연속투여시 관찰되는 간장 비대등 장기 비대 현상은 관찰되지 않았다. 한편, 혈압상승에 수반되는 병변이 예상되는 주요 장기조직을 중성 완충 포름알데히드액으로 고정한 후 기존의 방법에 따라 헤마톡신-에오신 염색을 하여 병리학적인 검사를 하였으나, 심장, 신장, 부신 및 뇌조직의 병변정도에 있어서 각 군간의 차이를 명확히 구별할 수는 없었다. 부신의 경우, UF-peptide를 투여하지 않은 대조군의 부신수질내에 비정상적인 수축 또는 확장이 관찰된 반면, UF-peptide 투여군에서는 그러한 현상이 관찰되지 않았다(Data not

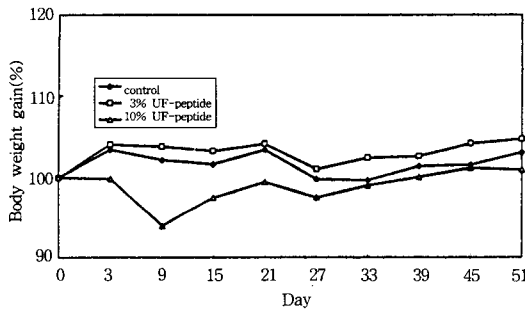


Fig. 1. Effect of UF-peptide on the change of body weight gain in SHR. SEM was less than 10% and was omitted for clarity.

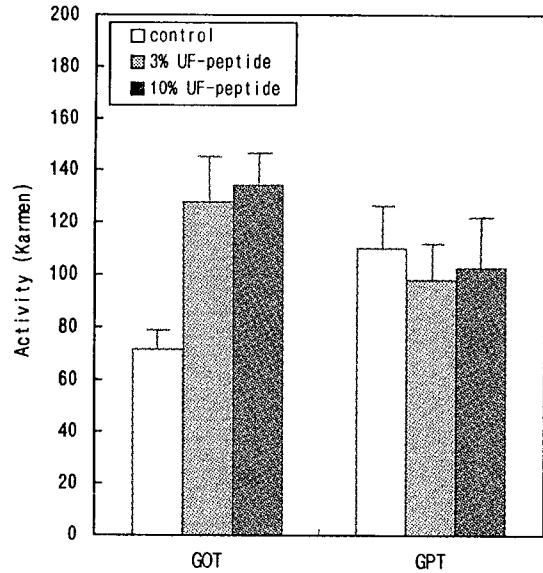


Fig. 2. Effect of UF-peptide on the serum GOT and GPT activities in SHR. Data are expressed as the mean \pm SE.

shown). 이것은 UF-peptide섭취가 고혈압성 스트레스로 여겨지는 부신의 병변을 완화시키는 작용을 하고 있음을 시사하는 것으로 추정된다.

Fig. 2에 UF-peptide 투여에 따른 간장 GOT 및 GPT 효소 활성을 나타냈다. 각 군사이에 GPT 활성의 차이는 없었으나, 대조군에 비해 UF-peptide 투여군의 GOT 활성이 높은 것으로 나타났다. UF-peptide의 아미노산 조성을 살펴 보면 유리아미노산 함량은 His, Leu, Phe이 다른 아미노산 보다 약 3~7배 정도 높으며, 총 아미노산의 경우 Asp, Glu, Leu 함량이 높은 편이다(20). 그러나, 일반적으로 사용되는 카제인의 아미노산 조성 과 비교할 때 본 실험에서 사용된 UF-peptide 중의 이들 특정 아미노산이 독성을 나타내는 수준에 있다고는 생각되지 않는다. 그럼에도 불구하고, 간장장해의 시

Table 1. Effect of UF-peptide on the weight of various organs in SHR

Organ	Group		
	Control	3% UF-peptide	10% UF-peptide(g/100g, B.W.)
Liver	4.03 \pm 0.32	3.52 \pm 0.14	3.39 \pm 0.29
Spleen	0.20 \pm 0.04	0.17 \pm 0.01	0.19 \pm 0.01
Lung	0.85 \pm 0.13	0.75 \pm 0.10	0.77 \pm 0.07
Kidney	0.70 \pm 0.05	0.63 \pm 0.02	0.72 \pm 0.02
Adrenal glands	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00	0.01 \pm 0.00
Thymus	0.03 \pm 0.00	0.03 \pm 0.00	0.03 \pm 0.01
Heart	0.35 \pm 0.04	0.35 \pm 0.02	0.38 \pm 0.02

*Values are means \pm SE. n=6

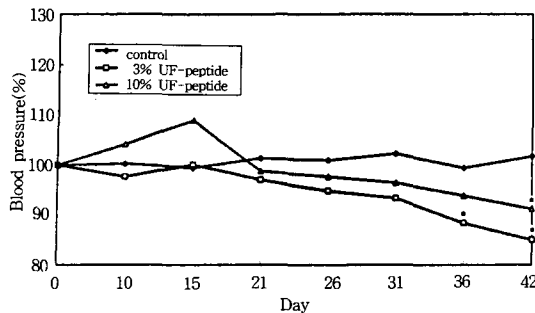


Fig. 3. Effect of UF-peptide on the change of blood pressure in SHR.

*Significantly different from the control group ($p < 0.05$)
SEM was less than 10% and was omitted for clarity.

표로 사용되는 이들 효소의 활성변화가 관찰된 점을 고려하여 UF-peptide 성분을 조금 더 정제하는 등 *in vivo*에서의 UF-peptide 투여 영향에 대해 지속적인 검토가 필요하다고 생각된다.

Fig. 3에 UF-peptide 투여에 따른 SHR의 수축기 혈압의 변화를 나타냈다. UF-peptide 투여 3주 이후, 대조군에 비해 UF-peptide 투여군의 혈압이 강하하기 시작하였고, 5주 이후에는 통계학적인 유의성이 관찰되었다 ($p < 0.05$). 혈압강하 효과는 3% UF-peptide군에서 가장 큰 것으로 평가되었는데, 10% UF-peptide군의 경우 보다도 3% UF-peptide군에서 혈압강하효과가 큰 이유는 현재로서 명확하지가 않다. 10% UF-peptide 투여군의 경우, 실험 초기에 대조군 보다도 혈압이 상승했던 시기가 있었던 점등으로 보아 10% UF-peptide의 섭취가 혈압강하에 효과가 있기는 하지만 UF-peptide 시료에 포함된 다른 성분들에 의해 저해작용의 가능성을 시사하는 것이라고도 추측된다. 현재, UF-peptide 중 혈압강하작용을 하는 분획만의 회수하는 실험을 계속 진행중에 있으며, 이들의 특이적인 혈압강하 효과가 확인될 것으로 기대된다.

Fig. 4에 UF-peptide투여가 혈청 중 지질수준에 미치는 영향을 나타냈다. 대조군에 비해 UF-peptide 투여군의 혈중 중성지질, 총 콜레스테롤 및 인지질 수준이 낮은 경향을 띠었다. 대두 단백질이 혈중 콜레스테롤 수준을 낮추는 효과는 대두 단백질 중 난산화성 펩타이드가 대변으로의 steroid분비를 촉진하며 담즙산과 효율적으로 결합하기 때문에 혈중 콜레스테롤 수준을 저하시키는 작용을 하는 것으로 이해되고 있다(21,22). 또한, 대두 단백질은 지방산의 합성 및 지방분해 촉진 작용을 통해 혈중 중성지질의 수준을 낮춘다고 알려져 있다(23). 본 실험에서 사용한 대두 UF-peptide는 한 외여과지 분자량 50,000 dalton 이상을 cut off하여 얻어진 펩타이드로서(20), 생체내에서 가수분해효소의 작

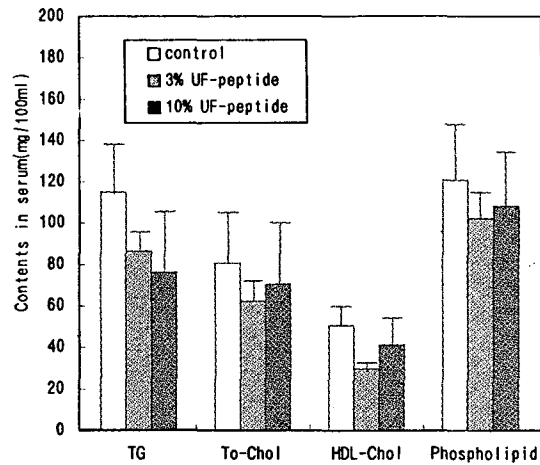


Fig. 4. Effect of UF-peptide on the serum lipids level in SHR.

Data are expressed as the mean \pm SE.

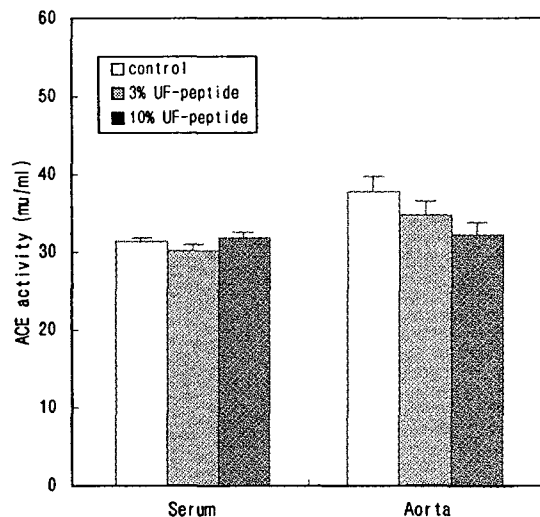


Fig. 5. Effect of UF-peptide on the ACE activity in serum and aorta of SHR.

Data are expressed as the mean \pm SE.

용을 받지 않은 UF-peptide의 일부가 전술한 바와 유사한 기작을 통해 혈중 지질수준의 개선에 기여했을 가능성이 높을 것으로 사료된다.

Fig. 5에 UF-peptide 투여가 혈청 및 흉부대동맥의 ACE 활성에 미치는 영향을 나타냈다. 혈청 중 ACE 활성의 차이는 관찰되지 않았으나, 흉부대동맥의 ACE 활성은 대조군에 비해 UF-peptide 투여군에서 약간 저하하는 경향을 보였다. 본 실험에 사용한 UF-peptide는 *in vitro*에서 ACE저해 활성을 나타내는 것이 이미 확인되어 있는데(24), 본 실험결과 *in vivo*에서도 혈관

조직의 ACE 활성을 억제하는 작용을 하고 있는 것으로 확인되었다. ACE 저해제의 연속투여에 따른 혈중 ACE 활성의 상승이 관찰된 바 있으나(25), 혈중 ACE 활성과 혈압과의 관계는 의문시되고 있다. 한편, 국소 ACE 활성, 특히, 혈관조직의 ACE 활성은 고혈압 발병과 그 관련성이 높은 것으로 알려져 있다(26). 따라서, 본 실험에서 UF-peptide 투여에 따른 흥부대동맥에서의 ACE 활성저하는 혈중 지질 개선작용과 더불어 UF-peptide의 혈압강하 효과와 관련되어 있을 것으로 사료된다. 이 결과는, 또한, UF-peptide의 경구 섭취에 따른 소화 흡수과정 중 ACE 저해활성을 나타내는 펩타이드의 형태로 흡수가 가능했음을 시사하는 것으로 사료되며, UF-peptide의 식품첨가물로서의 활용가능성이 매우 클 것으로 기대된다.

이들 결과를 종합하면, 대두 가수분해물인 UF-peptide는 *in vitro*에서와 마찬가지로 *in vivo*에서도 혈압강하 효과를 나타낼 수 있는 것으로 평가되며, 이러한 효과는 UF-peptide의 ACE 활성 저해작용 및 혈중 지질 수준의 개선작용과 밀접한 관련을 가지고 발현되고 있을 것으로 사료된다. 대두 UF-peptide를 식품에 첨가함으로써 항고혈압 성분을 포함한 새로운 기능성 식품의 개발이 가능할 것으로 기대된다.

요 약

대두 가수분해물인 UF-peptide *in vivo*에서 혈압강하 효과를 나타낼 수 있는지를 조사하기 위해, 실험동물로서 고혈압 모델인 자발성 고혈압 흰쥐(spontaneously hypertensive rat, SHR)를 대상으로 UF-peptide를 0, 3, 10%가 되도록 첨가한 식이 UF-peptide로 6주간 사육하여 SHR의 혈압강하에 미치는 영향, 혈중 지질 수준 및 혈관조직 중 angiotensin I converting enzyme(ACE) 활성 등을 조사하였다. 그 결과, UF-peptide는 자발성 고혈압흰쥐의 혈압을 강하시키는 효과가 있었으며, 이 효과는 혈중 총 콜레스테롤 및 중성지질 등의 지질 개선작용, 흥부동맥의 ACE 활성 저해작용을 통해 발현되는 것으로 추정되었다.

감사의 글

본 연구는 1995년도 농림수산 기술개발 사업 지원 과제이며, 이에 감사드립니다. 본 연구 수행에 있어 협조를 아끼지 않으신 울산의대 아산생명과학연구소 실험동물연구실 김길수 박사님, 상지대학교 한의과대학 하지용 교수님께 감사드립니다.

문 헌

1. Robert, I. : Prevalence and epidemiology of cardiovascular disease. In "Cecil textbook of medicine" Wyngaarden, J. B. and Smith, L. H.(eds.), 17th ed., Philadelphia, WB, Saunders Company, p.155(1985)
2. Ulbright, T. L. V. and Southgate, D. A. T. : Coronary heart disease : Seven dietary factors. *Lancet*, **338**, 985(1991)
3. Bing, R. F., Thurston, H. and Swales, J. D. : Salt intake and diuretic treatment of hypertension. *Lancet*, **2**, 121 (1979)
4. Blaustein, M. P. : Sodium transport and hypertension, Where are you going? *Hypertension*, **6**, 445(1984)
5. Yamori, Y., Kihara, M., Nara, Y., Ohtata, M., Horie, R., Tsunematsu, T. and Note, S. : Hypertension and diet : Multiple regression analysis in a Japanese farming community. *Lancet*, **1**, 1204(1981)
6. Fries, E. D. : Age, race, sex and other indices of risk of hypertension. *Am. J. Med.*, **55**, 275(1973)
7. Manjusri, D. and Richard, L. S. : Pulmonary angiotensin-converting enzyme. *J. Biod. Chem.*, **250**, 6762(1975)
8. Brunner, H. R., Gavras, H. and Waeber, W. : Oral angiotensin-converting enzyme inhibitor in long-term treatment of hypertensive patient. *Ann. Inter. Med.*, **2**, 1317(1979)
9. Atkinson, A. B., Brown, J. J., Cumming, A. M., Fraser, R., Lever, A. F., Leckie, B. J., Morton, J. J., Robertson, J. I. and Davies, D. L. : Captopril in the management of hypertension with renal artery stenosis. *Am. J. Cardiol.*, **49**, 1460(1982)
10. Ariyoshi, Y. : Angiotensin-converting enzyme inhibitor derived from food proteins. *Trends in Food Science & Technology*, **4**, 139(1993)
11. Maruyama, S. and Suzuki, H. : A peptide inhibitor of angiotensin I converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein. *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 1393(1982)
12. Karaki, H., Doi, K., Sugano, S., Uchiwa, H., Sugai, R., Murakami, U. and Takemoto, S. : Antihypertensive effect of tryptic hydrolysate of milk casein in spontaneously hypertensive rats. *Comp. Biochem. Physiol.*, **96C**, 367(1990)
13. Otsuka, M. and Kubo, T. : Action of a Shiitake(*Lentinus edodes*)-fructo-oligosaccharide mixture on hypertension in rats. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, **48**, 109(1995)
14. Reitman, S. and Frankel, S. : A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am. J. Clin. Pathol.*, **28**, 56(1957)
15. Sardesai, V. M. and Manning, J. A. : The determination of triglyceride in plasma and tissues. *Clin. Chem.*, **14**, 156(1968)
16. Pearson, S., Stern, S. and MaGarack, T. H. : A rapid accurate method for the determination of total cholesterol and serum. *Anal. Chem.*, **25**, 813(1953)
17. 岡部和彦, 藤井 守 : 總リン脂質. *Medical Technology*, **8**, 1068(1980)
18. Cushman, D. W. and Cheung, H. S. : Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting

- enzyme of rabbit lung. *Biochem. Pharm.*, **20m**, 1637 (1971)
19. Bernirschke, K., Garner, F. M. and Jones, T. C. : Pathology of laboratory animals. Springer-Verlag, New York (1978)
 20. 신재익 : 대두식품으로부터 유래된 혈압강하 펩티드의 특성 및 생산공정 최적화. 서울대학교 농과대학 박사학위논문, p.79(1997)
 21. Iwami, K., Sakakibara, K. and Ibuki, F. : Involvement of post-digestion hydrophobic peptides in plasma cholesterol-lowering effect of dietary plant proteins. *Agri. Biol. Chem.*, **50**, 1217(1986)
 22. Sugano, M., Goto, S., Yamada, Y., Yoshida, K., Hashimoto, Y., Matsuo, T. and Kimoto, M. : Cholesterol-lowering activity of various undigested fraction of soybean protein in rats. *J. Nutr.*, **120**, 977(1999)
 23. Iritani, N., Hosomi, H., Fukuda, H., Tada, K. and Ikeda, H. : Soybean protein suppresses hepatic lipogenic enzyme gene expression in wistar fatty rats. *J. Nutr.*, **126**, 380(1996)
 24. Shin, J. I., Ahn, S. W., Ahn, C. W., Nam, H. S. and Lee, H. J. : Angiotensin I converting enzyme inhibitor derived from fermented soybean paste and enzymatic soybean hydrolyzed. Proceedings of IUFost 96 Regional Symposium, p.265(1996)
 25. Murakami, T., Hayashi, M. and Yoshizumi, H. : Hypotensive effect of euglena pepsin hydrolysate. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, **48**, 399(1995)
 26. Mizuno, K., Nakamura, M., Higashimori, K. and Inagami, T. : Local generation and release of angiotensin II in peripheral vascular tissue. *Hypertension.*, **11**, 223(1988)

(1996년 9월 20일 접수)