

우방자 분획물의 저밀도 지질단백질 산화에 미치는 영향

양기숙,* 심정민

숙명여자대학교 약학대학

Effect of Arctii Fructus on Low Density Lipoprotein Oxidation

Ki Sook Yang* and Jeong Min Sim

College of Pharmacy, Sook Myung Women's University, Seoul 140-742, Korea

Abstract - Fruits of *Arctium lappa* L. (Compositae), which has been used as the anti-inflammatory, detoxifying and diuretic agents in the folk remedies, was examined on the *in vitro* oxidation of human low density lipoprotein (LDL). Several lines of evidence indicate that oxidized LDL (Ox-LDL) may promote atherogenesis. Hence, the role of antioxidants in the prevention of LDL oxidation needs to be determined. The activity of fractions of Arctii Fructus treated with oxidized LDL which was incubated with 16 μ M of Cu²⁺ for metal catalyzed oxidation was investigated. The BuOH fraction (4 ppm) inhibited the oxidative modification of LDL as evidenced by a decrease in the lipid peroxide content (thiobarbituric acid reacting substances activity), the negative charge of LDL (electrophoretic mobility) and increase of the vitamin E content.

Key words - Arctii Fructus; Compositae; atherosclerosis; low density lipoprotein oxidation.

우방자(Arctii Fructus)는 오실(惡實), 대력자(大力子), 서점자(鼠粘子), 우자(牛子) 등으로도 불리우며 국화과(Compositae)에 속하는 우양(*Arctium lappa* L.)의 성숙한 과실로 한국, 중국, 일본 등 아시아에서 널리 재배되고 있으며 민간에서 소산풍열(疏散風熱), 거담지해(祛痰止咳), 청열해독(淸熱解毒), 이노, 소염 및 피부질환 등에 이용되고 있다.^{1,2)}

성분으로 lignan계 arctiin I, arctogenin, marteresinol, lappaol계 sesquilignan, 지방유 arachidonic acid, stearic acid, palmitic acid, linoleic acid 등이 알려져 있다.³⁾ 수침액은 수종의 항원성 진균에 대해 억제작용이 있고 추출물은 흰쥐에 대해 지속적인 혈당강하 작용을 나타내며^{4,5)} PAF(Platelet Activating Factor) antagonist

활성성분과 desmutagenic factor 등이 보고 되었다.⁶⁾ 최근 식생활의 서구화로 인하여 야기되는 고지혈증은 저밀도지단백(Low density lipoprotein, LDL)의 이상대사로 일어나는 죽상경화화 관련이 깊고 특히 관상동맥경화로 인한 심장질환은 우리나라 성인병 사망률의 수위를 차지하고 있다.^{7,8)} 천연물의 LDL대사에 관한 연구로는 Yan,⁹⁾ Yang^{10,11)} 등의 연구가 있으며 본 연구에서는 동맥경화에 효과가 있는 천연자원을 개발하기 위하여 우방자 분획물의 LDL에 대한 항산화효과를 측정하였다.

재료 및 방법

실험재료 - 우방자는 경동시장의 한약전재상에서 구입하여 기원을 확인하여 사용하였으며 확증표본은 숙명여자대학교 생약표본실에 보관하였다.

시료의 조제 - 재료 300 g을 MeOH로 가열추출하

*교신저자 : Fax 02-710-9578

고 감압농축하여 MeOH extract(수득률:12.8%)를 얻었다. 이것을 증류수에 녹여 현탁시키고 Petroleum ether, CHCl₃, BuOH, 물로 상법에 따라 추출하여 얻은 분획을 감압농축하여 사용하였다.

저밀도 지단백(LDL)의 분리¹²⁾ - 혈액에서 density 1.025-1.055 g/ml에 해당하는 lipoprotein을 얻기 위하여 신선한 human plasma에 aprotinin 0.002%, EDTA 0.05%, NaN₃ 0.05%를 섞어 교반한 후 KBr(d=1.006-1.025)를 가하고 1차 원심분리 하였다.(40,000 rpm, 5℃, 15 hr.)

이때 분리된 VLDL을 제거하고 LDL이 포함된 fraction을 취한 후 KBr(d=1.026-1.055)을 가하여 2차 원심분리(40,000 rpm, 5℃, 24 hr.)하여 LDL을 분리하였다. 분리한 LDL은 pH 7.4 buffer, 0.005 M Tris, 0.05 M NaCl, 0.02% EDTA의 buffer로 투석시키고 냉동건조하여 사용하였다. LDL중 단백질의 정량 및 순수도 확인은 Lowry's method에 의해 Bovine serum albumin (sigma)을 사용하여 LDL중의 단백질의 농도를 확인하였고 SDS page electrophoresis를 실시하여 순수도를 확인하였다.

Oxidation of LDL - LDL(400 ug/ml)과 CuSO₄ (16 uM)에 전체부피가 1 ml가 되도록 phosphate buffer(pH 7.4)를 섞어 37℃ shaking incubator에서 배양시키고 EDTA(1 mM)와 BHT(1 mM) 20 uM를 첨가하여 산화를 중지시켰다.¹³⁻¹⁵⁾

Relative electrophoretic mobility¹⁶⁾ - 시료가 LDL산화에 미치는 영향을 보코자 각 분획의 시료를 200 ug/ml씩 가해 산화시킨 LDL 용액의 mobility를 측정하였다. 그 중 효과가 우수한 분획을 취하여 시간별로 산화시켜 일정시간(0, 2, 4, 6, 8시간) 간격으로 mobility를 측정하였다. 시료 농축은 산화된 LDL 용액을 speed vac concentrator에서 1시간 농축시키고 sample buffer(1 M tris base 0.26 ml, glycerol 1 ml, 1% bromphenol blue 0.5 ml에 증류수를 가해 10 ml이 되도록 조제)와 3:1로 혼합하였다. 7% agarose gel에 loading하고 TBE buffer(pH 7.4)를 이용하여 14-16 mA의 전력으로 전기영동을 실시하여 mobility를 측정하였으며 nature LDL의 mobility에 대한 상대 이동도를 계산하였다.

Thiobarbituric acid reactive substance

(TBARS) 측정 - Agarose gel electrophoresis를 실시한 결과 산화억제 효과가 가장 강한 분획을 취하여 LDL에 농도별(0-50 ppm)로 첨가하고 일정시간 산화 후 생성되는 Malondialdehyde(MDA)의 함량변화를 측정하였다.¹⁷⁾ 즉 산화된 LDL에 25% trichloroacetic acid를 넣어 단백질을 침전시키고 원심분리 후 산화지질을 포함한 상층액을 분리하였다. 분리된 상층액에 시료 200 ug 및 1% thiobarbituric acid를 가하여 95℃에서 10분 가열 후 냉각시키고 생성된 MDA의 양을 532 nm에서 spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

HPLC를 이용한 LDL중의 vitamine E의 분석 - nature LDL, oxidized LDL 및 시료를 가하여 산화를 억제시킨 LDL 용액을 n-hexane 1 ml와 혼합 후 5분간 원심분리 하였다. 상층을 취하고 이 과정을 수회 반복하여 LDL내의 vitamin E를 추출하였다.¹⁸⁾ 이 용액을 질소가스를 통하면서 건조시켜 methanol에 녹이고 Novapak C₁₈ Column, elution solvent 100% methanol, Detector 280 nm(Schimadzu SPD-10A)에서 HPLC를 실시하여 vitamin E의 함량을 구하였다.

결과 및 고찰

Low density lipoprotein은 죽상동맥경화의 병리적 측면에서 중요한 역할을 하며 쉽게 산화되어 동맥혈관이 좁아지는 역할을 하고 vitamine C, vitamine E, carotenoid,¹⁹⁾ probucol²⁰⁾ 등의 항산화제가 첨가되면 산화가 억제된다. LDL은 plasma protein중 density 1.025에서 1.058에 해당하는 lipoprotein으로 hydrophobic한 triglyceride cholesteryl ester로 이루어져 있으며 중심부는 극성인 phospholipid와 free cholesterol로 둘러싸여 있다. 외부는 인체내 혈관에서 cholesterol의 조절 및 대사에 직접 관여하는 apo B-100이라 부르는 특수단백질로 구성되어 있고 이것은 LDL-receptor에 결합할 수 있는 ligand로 작용한다.²¹⁾ 정상적인 LDL은 oxygen free radical에 의해 쉽게 산화되므로 LDL수용체와 결합하지 못하고 산화된 LDL(oxidized LDL)은 혈액내의 단백질에 의해 함입되어 단백질은 조직내의 탐식세포로 발전된다.²²⁾ 탐식세포는 정상 LDL에 대해서는 세포내 콜레스테롤의

농도에 따라 조절하여 받아 들임으로서 세포내콜레스테롤 양을 항상 일정하게 유지시킬 수 있으나 산화된 LDL에 대해서는 조절능력을 상실하여 탐식세포내 과산화지질의 축적과 콜레스테롤의 계속된 축적이 일어나고 결과적으로 콜레스테롤과 콜레스테롤 에스터 등이 주성분인 지질이 침착된 포말세포(foam cell)로 까지 이르게 된다.²³⁾ 또한 산화된 LDL은 높은 세포내 화학적 독성을 지니므로서 국소적인 혈관내피세포와 평활근세포의 손상을 일으켜 죽상동맥경화의 병변으로 작용할 수 있게 한다.²⁴⁾ 이러한 결과들은 산화 LDL이 동맥경화의 중요한 유발인자임을 말해주고 있다. 이에 우방자 분획물이 LDL 산화에 미치는 영향은 다음과 같다.

Inhibition of apo B electrophoretic mobility

경시변화 - 정상 LDL에 Cu²⁺만 가한 경우와 정상 LDL에 Cu²⁺ 및 시료엑스를 가한 후 시간경과(0, 2, 4, 6, 8 hrs.)에 따른 이동도를 비교해본 결과 산화 시간이 증가할수록 mobility가 증가하는데 이것은 Cu²⁺의 산화에 의해 LDL 중 apolipoprotein-B의 lysine derivatization이 negative charge를 증가시켜 anode쪽에서의 이동에 기인한다. 이동도를 측정 한 결과 4시간 이후부터는 mobility의 변화에 별로 차이가 없었으므로 LDL의 산화시간을 4시간으로 정하였다. LDL에 우방자의 용매분획을 각각 200 ppm씩 가하여 4시간 산화 후 7% agarose gel에 loading 하였다. loading 한 결과 산화된 LDL에 비하여 각 시료를 가한 LDL의 mobility가 감소되어 시료가 항산화작용이 있음을 알 수 있었다 (Fig. 1). 따라서 Pet. ether, CHCl₃, BuOH, 물

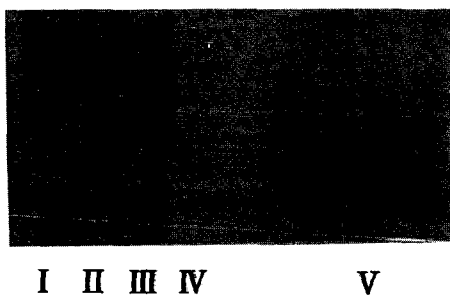


Fig. 1. Inhibition of apo B electrophoretic mobility by solvent fractions of Arctii Fructus on 0.7% agarose gel electrophoresis.
I: ox-LDL+CHCl₃ fr.(4 hr), II: ox-LDL+BuOH fr., III: ox-LDL+H₂O fr., IV: ox-LDL+Pet.ether fr., V: ox-LDL.

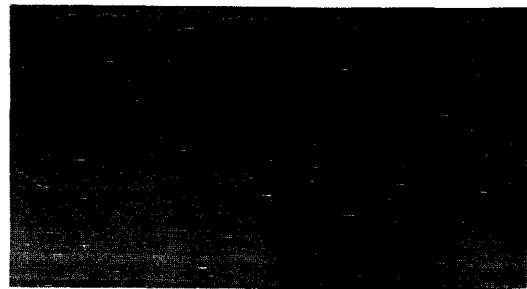


Fig. 2. Inhibition of apo B electrophoretic mobility of Arctii Fructus BuOH fr. by agarose gel electrophoresis. Ox-LDL+BuOH fr.(200 ppm) represents as A, B, C, D, E and according to reaction time 0, 2, 4, 6, 8, ox-LDL expressed as I, II, III, IV, V.

분획 중 항산화 효과가 가장 뛰어난 Butanol 분획을 시간별(0, 2, 4, 6, 8 hr.)로 산화시켜 그 mobility를 측정한 결과 시간이 경과함에 따라 relative electrophoretic mobility가 감소하여 8시간 까지 산화억제 작용이 완만하게 증가함을 알 수 있었다(Fig. 2).

Inhibition of LDL lipid peroxidation - 지질의 산화정도를 측정하는 방법으로는 생성된 Malondialdehyde의 양을 측정하거나 hydroperoxide의 양을 Iodometry에 의한 측정, 불포화지방산(conjugated dien) 측정법등 다양하지만 TBARS를 이용한 MDA측정법이 널리 이용되고 있다. 가장 우수한 항산화 효과를 나타낸 BuOH분획에 대해 LDL 산화 억제 효과를 산화시간 4시간에서 농도별로

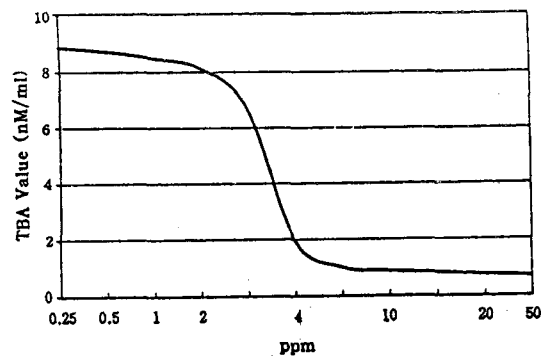


Fig. 3. Inhibitory effect of BuOH fr. of Arctii Fructus on MDA formation.

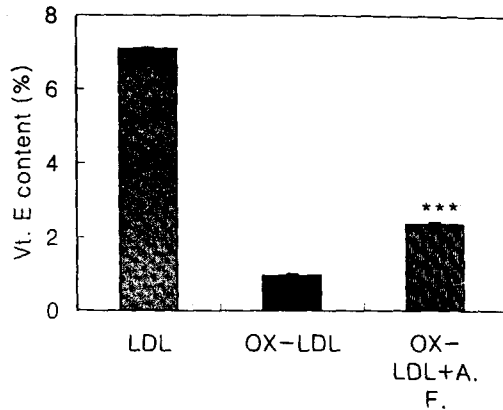


Fig. 4. Protection of Vitamin E in oxidized LDL treated with BuOH fr. of *Arctii Fructus* by HPLC. Colume: Novapak C18, eluent: methanol detector: 280 nm, Shimadzu SPD-10A. Each value represents the mean \pm S.E. of rats. Significantly different from Ox-LDL: *** p <0.001.

MDA양을 측정된 결과 시료 4 ppm 이상의 농도에서 강한 항산화 효과를 나타내었다(Fig. 3).

LDL중의 vitamin E 함량변화 - Native LDL에 들어있는 천연 vitamin E는 여러 요인으로 인하여 산화되어 그 함량이 감소하게 된다. BuOH 분획이 LDL을 Cu^{2+} 에 의해 산화시킬 때 파괴되는 vitamin E의 산화억제에 미치는 효과를 native LDL, Oxidized LDL과 비교하였다(Fig. 4). 즉 native LDL중 vitamin E의 함량은 7.04 %인데 비하여 산화된 LDL은 0.96%로 현저히 감소하였다. 이에 우방자 BuOH분획을 가하여 산화시킨 LDL중의 vitamin E 함량은 2.28%를 나타내어 산화억제 효과가 있음을 알 수 있었다(Fig. 4).

결 론

우방자(*Arctii Fructus*)는 우영의 성숙한 종자로 자원이 풍부하며 민간에서 소염, 이뇨, 소산풍열(疏散風熱), 청열해독(淸熱解毒) 등에 사용되어 왔다. 이에 우방자 분획물의 관상동맥경화 등의 유발인자로 알려진 저밀도 지단백에 미치는 효과를 검색한 결과는 다음과 같다.

Relative electrophoretic mobility를 측정된 결과 산화된 LDL에 비하여 우방자 분획물을 가한 산화 LDL의 mobility가 현저히 감소하여 항산화화

과가 있음을 인정하였고 이중 가장 효과가 우수한 BuOH 분획에 대해 8시간 산화시킨 결과 시간이 경과할수록 mobility가 감소하였다. TBA method를 이용하여 우방자의 BuOH 분획을 농도별로 가하여 산화억제 효과를 측정된 결과 시료 4 ppm에서 현저한 항산화 효과를 나타내었다. HPLC를 이용한 LDL중 vitamin E의 함량은 산화에 의해 현저히 감소하였으며 BuOH 분획에 의해 항산화효과를 나타내었다. 이상의 결과로 우방자는 동맥경화 유발인자로 알려진 Low density lipoprotein의 Cu^{2+} 에 의한 산화를 억제하는 효과가 인정되어 활성성분에 대한 연구가 기대된다.

사 사

본 연구는 숙명여자대학교 '96년도 교비연구비 지원에 의해 수행되었기에 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. 李昌福 (1982) 大韓植物圖鑑, 770. 鄉文社, 서울.
2. 陸昌洙 (1997) 亞細亞 生藥圖鑑, 509. 도서출판 경원, 서울.
3. 鄭普燮, 辛民教 (1990) 圖解藥大辭典, 1010. 영림사, 서울.
4. 難波恒雄 (1993) 和漢藥百科圖鑑, 208. 保育社, Osaka.
5. 奥田拓男 (1991) 資源·應用 藥用植物學, 176. 廣川書店, 東京.
6. 강영화 (1988) 우방자의 PAF antagonist 활성성분에 관한 연구. 서울대 석사논문.
7. 김일순 (1989) 질병발생의 변화와 식습관. 대한의학협회지 32: 474.
8. 이흥규 (1989) 비만과 관련된 질환. 한국영양학회지 23: 341
9. Yan, L. J., Droy-Lefaix, M. T. and Packer, L. (1995) Gingo biloba extract (EGb 761) protects human low density lipoprotein against oxidative modification mediated by copper. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 212: 360-366.
10. Yang, K. S. and Kim, H. S. (1997) Effect of Methanol extract of *Arctii Radix* on Low density Lipoprotein Oxidation. *J. Pharmaceutical Sciences* 13: 97-105.
11. 양기숙, 전철민 (1996) 흰민들레의 동맥경화 유발인자 인 저밀도 지질단백질 산화에 미치는 영향. 생약학회지

- 27: 267-273.
12. Converse, C. A. and Skinner, E. R. (1992) Lipoprotein analysis, a practical approach, 113. Oxford university, New York.
 13. Heinecke, J. W., Rosen, H. and Chait, A. (1984) Iron and copper promote modification of low density lipoprotein by human arterial smooth muscle cell in culture. *J. Clin. Invest.* 74: 1890.
 14. Choi, J. H., Park, Y. J., Son, H. S., Yang, K. S. and Kim, T. W. (1995) Functional properties of modified low density lipoprotein and degradation of modified LDL by human monocyte-macrophage. *J. Kor. Soc. Food Nutr.* 24: 362-370.
 15. Park, Y. J., Yang, K. S., Kim, T. H. and Kim, T. W. (1995) Effect of glucose and nonenzymatic glycation on LDL oxidation. *Kor. J. Lipidology* 5: 249-253.
 16. Steinbrecher, U. P. (1987) Oxidation of human low density lipoprotein results in derivatization of lysine residues of apolipoprotein B by lipid peroxide decomposition products. *J. Biol. Chem.* 262: 3603-3608.
 17. 金田尚志, 植田伸夫 (1990) 増補版 過酸化脂質實驗法, 85. 醫齒藥出版社, 東京.
 18. Reto, A. and Vicenta, C. (1985) Prevention of cholesteryl ester accumulation in P388D1 macrophage-like cells by increased cellular vitamin E depends on species of extracellular cholesterol. *Eur. J. Biochem.* 233: 171-178.
 19. Jialal, I., Norkus, E. P. and Grundy, S. M. (1991) β -carotene inhibits the oxidative modification of LDL. *Atherosclerosis* 1086: 134.
 20. Thomas, E. C., Dawn, C. S. and Daniel, S. (1987) Antiatherogenic effect of probucol unrelated to its hypocholesterolemic effect: Evidence that antioxidants *in vivo* can selectively inhibit low density lipoprotein degradation in macrophage-rich fatty streaks and slow the progression of atherosclerosis in the Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 7725-7729.
 21. Chen, G. C., Hardman, D. A., Hamilton, R. L., Mendel, C. M., Schilling, J. M. and Kan, J. P. (1989) Distribution of lipid binding regions in human apo B-100. *Biochem.* 28: 2477-2484.
 22. Hanfang, Z., Yuzhou, Y. and Urs, P. S. (1993) Structural requirements for the binding of modified proteins to the scavenger receptor of macrophages. *J. Biol. Chem.* 268: 5535-5542.
 23. Wulf, P., Michael, E. R., Seppo, Y. H., Geoff, C. G. and Steve, S. S. (1989) Low Density lipoprotein undergoes oxidative modification *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 1372-1376.
 24. Howard, N. H., Dieter, M. K., Poetro, A., Gabriel, B. B., Giuseppe, G., Juluana, H., Hazel, P. and Alex, S. (1994) Biochemical and cytotoxic characteristics of an *in vivo* circulating oxidized LDL. *J. Lipid Research.* 35: 669-677.

(1997년 11월 5일 접수)