

## 고들빼기 추출물이 인지질막 Liposome의 안정성 및 유동성에 미치는 영향

배송자<sup>†</sup> · 노승배\* · 정복미\*\*

신라대학교 식품영양학과

\*양산전문대학 식품영양과

\*\*여수대학교 식품영양학과

### Effects of *Godulbaegi* Extracts on the Stability and Fluidity of Phospholipid Liposomal Membranes

Song-Ja Bae<sup>†</sup>, Sung-Bae Roh\* and Bok-Mi Jung\*\*

Dept. of Food and Nutrition, Shilla University, Pusan 617-736, Korea

\*Dept. of Food and Nutrition, Yangsan College, Yangsan 626-800, Korea

\*\*Dept. of Food Science and Nutrition, Yosu National University, Yosu 550-749, Korea

#### Abstract

We investigated the effects of *godulbaegi* extracts on the physicochemical properties of biological membranes such as membrane stability and fluidity employing the phospholipid liposomal membranes as a biomembrane-mimetic system. The addition of the *godulbaegi* extracts to the phospholipid exerted great effects stabilized the barrier function of the liposomal membranes in proportion to the concentration of the additive and significantly increased the membranes fluidity. The values of the fluorescence polarization of 1,6-diphenyl 1,3,5-hexatriene (DPH) decreased gradually as the temperature increased, and decreased abruptly near the phase transition temperature ( $T_m$ ) of the liposome from gel to liquid crystalline state as usual. These results suggest that the activities of the *godulbaegi* extracts to enhance the stability and fluidity of the liposomal membranes have implication in their biological activities.

**Key words:** *Ixeris sonchifolia* extracts, liposome, stability, calcein, DPPC

#### 서 론

생체막의 조성은 주로 인지질, 콜레스테롤, 단백질 및 당질로 되어 있으며, 그 중 지질막은 생체막의 barrier로서의 기능을 가지고 막에 기계적 강도를 부여한다. 단백질은 생체막의 생리활성, 즉 선택적 수송, 정보 전달, 효소작용 등의 활동을 하고 있으며, 당질은 지질이나 단백질과 공유 결합하여 당지질 혹은 당단백질로 생체막 외부에 비대칭적으로 소량 분포한다. 지질로 만들어진 이중층 구조는 단순한 barrier로의 기능만 가지는 것이 아니라, 지질막 조성에 따라 막의 물리적 성질과 단백질의 입체구조나 움직임에 큰 영향을 미치며 생리활성에도 깊은 관여를 한다고 알려져 있다(1-4). 이러한 지질막의 특성과 깊은 관계가 있는 성질 중에서 가장 중요하게 생각되는 것은 지질막의 안정성과 유

동성이라 할 수 있다(5). 생체의 세포막은 일정한 유동성을 가지고 있고, 이 세포막을 구성하고 있는 인지질의 종류, acyl chain의 길이, 불포화도 및 콜레스테롤 함량을 조절함으로써 안정하게 항상성(homeostasis)을 유지하고 있다고 알려져 있다. Bangham과 Horne(6)은 인지질이 수용액 중에서 생체막과 유사한 이분자층 막소포를 자발적으로 형성하는 것을 발견하여 이를 리포솜(liposome)이라 불렀으며, liposome은 생체막 성질을 연구하는 모형물질로서 광범위하게 사용되게 되었다. 또한 liposome은 생체의 특정 위치로 약물을 효과적으로 수송하기 위한 수단인 약물수송계(DDS)로 활용키 위한 연구로서도 활발하게 진행되고 있다(7, 8). Liposome의 성질은 지질막을 구성하고 있는 물질의 화학적 조성 그 배열방법과 입자의 크기 및 콜레스테롤의 함량에 따라 그 성질이 크게 달라지며, 이러한 성

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

질은 막유동성, 막전하밀도 및 막침투성 등의 막의 성질 규명에도 중요한 역할을 한다. 또 봉입된 약물이거나 물질들이 liposome의 안정성이나 각 물질이 투과성에 미치는 영향은 매우 중요하다고 할 수 있다. 그러나 이 분야의 연구는 그렇게 많이 이루어져 있지 않은 실정이다(9-12). 본 연구에서는 옛부터 알려진 식품이며, 한방효과로서 항염, 항진정 및 간 보호 효과가 있다고 알려져 온 고들빼기에서 콜레스테롤과 같은 세포막 생리활성에 버금가는 효과가 있음을 참고로 하여 여러 용매를 사용한 고들빼기 추출물을 얻고 인지질 세포막인 liposome의 안정성과 유동성에 미치는 고들빼기 추출물의 영향을 알아보기 위하여 phosphatidylcholine (PC) 인지질 중 친수성과 소수성이 알맞게 구조되어 있는 포화 acyl chain을 가진 dimyristoyl phosphatidylcholine(DMPC), dipalmitoyl phosphatidylcholine(DPPC) 및 여러 종류의 PC의 혼합물인 egg phosphatidylcholine(egg PC) 등을 사용하여 막안정성과 막유동성에 미치는 고들빼기 추출물의 영향을 측정하였다. Liposome막의 안정성 측정으로는 자가소광을 일으키는 수용성 calcein을 probe로 하여 liposome에 봉입하였고, 이들 liposome으로부터 시간의 경과에 따른 calcein의 새어 나오는 정도를 측정하여 liposome의 안정도를 구하였다. 또 포화 acyl chain을 가진 PC 인지질인 DPPC에 콜레스테롤을 가하여 초음파 분쇄하여 만든 small unilamella vesicles(SUVs)를 만들어 이 추출물들의 liposome 지질막 투과성에 미치는 영향을 알아보고 막의 활성화에 중요한 역할을 하는 콜레스테롤과 유사한 효과가 있으리라 여겨지는 고들빼기 첨가물의 영향을 비교 검토하였다. 고들빼기의 막유동성 증가 측정으로는 liposome을 만든 후 형광 probe로서는 1,6-diphenyl, 1, 3, 5, -hexatriene(DPH)을 labeling시킨 후에 상전이 온도 근처에서 급격히 감소되는 fluorescence polarization(p)의 감소경향으로 지질막의 유동성 증가정도를 측정하고, 이 변화치를 온도에 대해 그린 곡선의 변곡점으로부터 지질막의 상전이 온도를 구하였으며(13-19) 또 콜레스테롤을 일정량 가하여 만든 liposome에도 DPH로 labelling시킨 후 P값의 변화치로부터 지질막 유동성에 미치는 콜레스테롤의 영향을 분석하여 비교함으로써 고들빼기 추출물이 liposome 인지질 막 유동성에 미치는 영향을 측정하여 막에 미치는 생리활성에 관한 효과를 확인하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

본 실험에 사용된 재료인 고들빼기는 1996년 가을

부산시 감전동에 위치한 새벽시장에서 구입하였다. 이 고들빼기 중에서 실험에 필요한 재료의 추출과정은 전보(17)와 같다.

### 시약

인지질로는 dimyristoyl phosphatidylcholine(DMPC), dipalmitoyl phosphatidylcholine(DPPC), 및 egg phosphatidylcholine(egg PC)을 사용하였으며, 형광 probe인 calcein과 1,6-diphenyl 1,3,5-hexatriene(DPH) 그리고 cholesterol 및 sephadex G-50은 모두 Sigma chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Triton X-100은 Fluka사(독일)의 것을 사용하였고, pH 7.4의 10mM tris buffer는 삼차 증류수로 만들었으며, 기타 모든 시약은 국내에서 시판되는 특급 및 일급 제품을 사용하였다.

### 기기

형광 분석기로는 Perkin Elmer사의 Spectrofluorometer LS-5 모델을 사용하였고, 흡광광도계는 Varian사의 UV와 visible spectrophotometer는 Pharmacia Biotech 3000 모델을 사용하였으며, 초음파 분쇄기로는 Ultrasonic사의 Ultrasonicator 5200 제품을, 그리고 pH 측정기는 Corning 150을, liposome 제조용 Rotary evaporator는 Tokyo Rikakikai Co.의 N-N 10522428 모델을 사용하였다.

### Calcein 수용액의 성상연구

Calcein을 여러 농도로 물에 녹인 후, 농도에 따른 형광의 세기와 흡광도를 측정하고 pH를 변화시키면서 형광의 세기를 측정하였다.

### Calcein 함유 liposome의 제조

DMPC, DPPC 및 egg PC와 같은 인지질을 사용하여 그 일정량을 chloroform/methanol(1:1)의 혼합용액에 녹여서 20ml의 가지형 플라스크에 넣은 다음 rotary evaporator상에서 각 지질의 상전이온도 이상을 유지하면서 감압 증발시켜 플라스크의 하저부에 얇은 지질막을 만들었다. 이것을 진공하에서 하루동안 방치하여 남아있는 용매를 모두 날려보내고, pH 7.4인 50mM의 calcein 수용액을 가해 batch형 sonicator상에서 지질막이 모두 떨어질 때까지 수화시켰다. 이 현탁액을 titanium tip sonicator를 사용하여 20분간 초음파 분쇄를 행하였으며, 이 때 온도 상승을 막기 위하여 ice-bath를 사용하였다. 현탁액 중에 섞여 있는 titanium 잔사는 원

심 분리하여 제거하였다. Liposome내에 들어가지 못한 calcein은 초음파 분쇄가 끝난 뒤 그 현탁액을 Sephadex G-50이 들어있는 1×35cm의 column에 통과시켜 제거하였으며, 이동상으로는 tris buffer를 사용하였다. 분리가 끝나면 calcein이 봉입된 liposome의 지질 농도는 phosphatidylcholine(PC)의 선택적 정량법인 Stewart assay(19)에 따라 측정하였으며 calcein이 봉입된 liposome의 제조방법을 Fig. 1에 나타내었다.

Liposome의 안정성 조사

인지질 liposome의 안정성 조사

DMPC, DPPC 및 egg PC에 일정 농도인 5, 10, 20mol %의 콜레스테롤을 가하여 liposome을 만든 후 calcein을 봉입시키고, 25±0.5°C에서 방치하면서 인지질 세포막 안정성에 미치는 콜레스테롤의 영향을 시간에 따른 calcein의 새어나오는 정도로서 조사하였다(excitation은 482nm, emission은 512nm). 또 liposome 30µM를 100µM triton X-100 수용액 중에 가하여 시간에 따른 calcein leakage %를 측정하였다. 각각의 calcein leakage는 아래의 식에 의해 결정하였다.

$$\text{calcein leakage \%} = [(F - F_0) / (F_T - F_0)] \times 100 \dots (1)$$

F<sub>0</sub>는 calcein을 봉입한 liposome의 초기 형광세기이며, F는 일정시간 경과 후의 형광세기, 그리고 F<sub>T</sub>는 triton X-100을 가하여 liposome을 완전히 파괴시켰을 때의 형광세기를 나타낸다. Liposome에 봉입된 calcein의 양은 calcein의 최대 흡광 파장인 482nm에서의 흡광도를 측정하여 검량선과 비교하며 농도를 결정하였으며, 아울러 calcein의 형광을 512nm에서 측정하여 결정하였다.

Liposome에 대한 고들빼기 추출물의 영향

25±0.5°C를 유지하면서 고들빼기 butanol 및 hexane 추출물을 가하여 만든 liposome으로부터 새어나오는

calcein의 형광을 시간에 따라 측정하였다. 일정시간이 경과한 후에는 10%(v/v)의 triton X-100을 60µl가 되도록 가하여 liposome을 완전히 파괴시킨 후, 그 형광세기를 100%로 하여 calcein이 leakage(%) 되는 정도를 부피 보정 후에 계산하였다.

Liposome의 유동성(fluidity) 측정

Fluorescence polarization method에 의한 liposome의 유동성 측정

① Liposome 제조

일정한 양의 지질을 함유한 chloroform/methanol(1 : 1)의 혼액을 rotary evaporator를 사용하여 상전이온도 이상을 유지하면서 감압 증발시켜 플라스크의 하저부에 얇은 지질막을 만들었다. 이것을 진공 하에서 하루 동안 방치하여 남아있는 용매를 모두 날려보내고, 여기에 tris buffer를 가해 batch형 sonicator상에서 지질막이 모두 떨어질 때까지 수화시켰다. 이 현탁액을 titanium tip sonicator를 사용하여 30분간 초음파 분쇄를 행하는데 온도 상승을 막기 위하여 ice-bath를 사용하였다. 현탁액 중에 섞여있는 titanium잔사는 원심분리하여 제거하였다. 현탁액은 상전이온도 이상에서 최소 10분간 배양시켰다. 현탁액 중의 지질 농도는 0.4mM로 조절하였다.

② 막유동성의 측정

인지질 liposome의 유동성은 fluorescence polarization method를 이용하여 측정하였으며, 형광 probe로 사용한 1,6-diphenyl 1,3,5-hexatriene(DPH)는 인지질 이중층에 깊이 들어가서 발광하여 유동성이 증가됨에 따라 그 fluorophore가 회전 혹은 진동하므로써 그 life time 동안 형광을 발하면서 각 분자의 축이 회전되고 이때 fluorescence polarization값(P)이 감소된다. 0.4 mM의 인지질 liposome액에 1,6-diphenyl 1,3,5-hexatriene(DPH)의 tetrahydrofuran(THF) stock solution을 사용하여 DPH의 최종 농도가 1µM되게 가한 뒤, 암소에서 10분간 incubation하여 형광을 측정했다. 이 실험은 항온이 유지되는 cell holder와 polarimeter를 갖춘 형광 광도계로 행하였으며, DPH의 excitation wavelength는 358nm, emission wavelength는 430nm로 하였다. Fluorescence polarization값 P는 앞서 측정한 형광을 다음 (2)식을 사용하여 나타내었다(20).

$$P = \frac{(I_v)_v - (I_h)_v G}{(I_v)_v + (I_h)_v G} \dots \dots \dots (2)$$

여기서 (I<sub>v</sub>)<sub>v</sub>는 polarizer와 analyzer의 prism이 수직으로 위치할 때 측정한 형광의 세기이며, (I<sub>h</sub>)<sub>v</sub>는 analyzer의 prism이 수평으로 위치할 때의 형광의 세기이

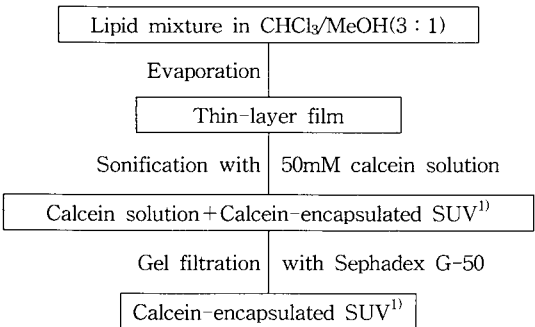


Fig. 1. Preparation of calcein entrapped liposome. <sup>11</sup>SUV: small unilamella vesicle

다. 수직과 수평으로 편광된 단색광의 투과 효율을 보정하는 보정계수 G는 본 실험에서는 1이었다.

**통계처리**

모든 측정은 3회 이상 실험하여 추출된 자료를 통계 처리하였고, 유의성 검증은 Student's t-test로 하였으며, p값이 0.5 이하일 때 유의성을 인정하였다.

**결 과**

**Calcein 수용액의 성상연구**

Calcein을 여러 농도로 물에 용해시킨 후 농도에 따른 형광세기는  $10^{-4}$ mol/L에서 가장 크게 나타났으며, 그 이상의 농도에서는 자가소광에 의해 오히려 형광이 감소하였다.

pH의 변화에 따른 형광세기는 pH가 중성일 때 형광이 가장 크게 나타났다. 농도변화에 따른 흡광도의 변화는 Fig. 2에 제시되어 있는 바와 같이 농도와 흡광도는 거의 직선관계이었다.

**상온에서의 liposome의 조성에 따른 안정성**

Head group이 각각 다른 여러가지 인지질인 dipal-

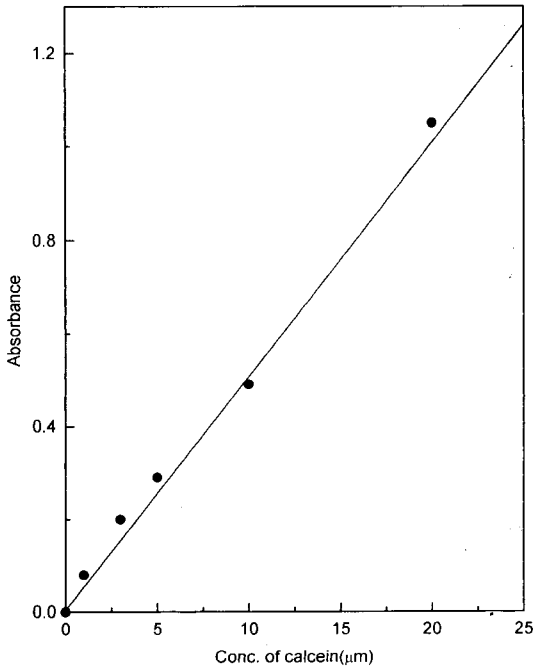


Fig. 2. Absorbance at 482nm of aqueous calcein solutions with changing concentration at 1-cm path length. (correlation coefficient=0.994)

mitoyl phosphatidic acid(DPPA), dipalmitoyl phosphatidylethanolamine(DPPE), dipalmitoyl phosphatidylglycerol(DPPG)과 dipalmitoyl phosphatidylcholine (DPPC)등을 사용하여 각각 liposome을 만들고, 이곳에 calcein을 봉입시켜 그 안정도를 측정하였으나, phosphatidylcholine(PC)류 이외의 인지질인 DPPA, DPPE 및 DPPG 등은 calcein이 봉입된 안정된 liposome이 거의 형성되지 않았다.

이에 반하여 phosphatidylcholine(PC)류의 인지질은 정도의 차이는 있으나, 비교적 안정한 liposome을 만들 수 있었으며 친수성과 소수성이 중간 위치인 acyl chain의 탄소수가 14개와 16개인 DMPC와 DPPC, 그리고 여러 종류의 PC류의 혼합물인 egg PC의 경우에는 calcein이 봉입된 liposome이 비교적 잘 만들어졌다. Fig. 3에서 보듯이 C수가 14개인 DMPC만으로 만든 liposome은 DPPC와 egg PC보다 calcein의 leakage가 심하여 calcein 봉입 후 1,450분(24시간) 경에는 90%의 calcein이 liposome으로부터 새어나왔다.

반면 DPPC의 경우, 24시간 경과시 약 62%, egg PC의 경우는 약 32% 정도의 calcein이 새어나왔다.

막의 안정성과 유동성에 중요한 역할을 하는 콜레스테롤의 영향을 검토하기 위하여 DPPC liposome에 일정량의 콜레스테롤을 가하여 liposome을 만들었다. 즉

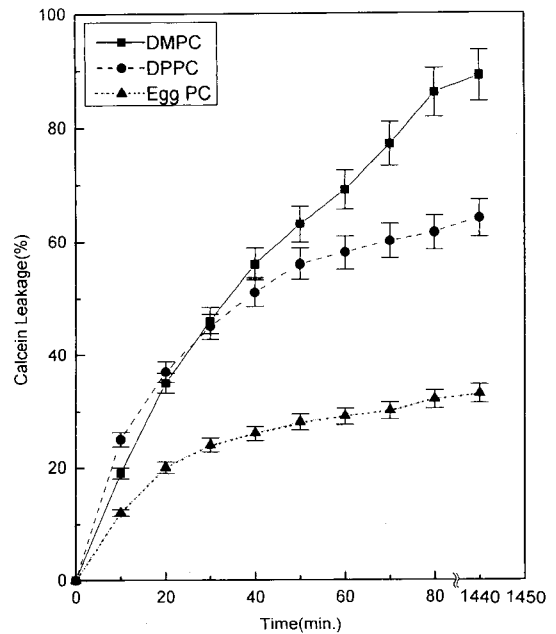


Fig. 3. Time course of the calcein leakages from the phosphatidylcholine(PC) liposomes at 25°C. All data points were significantly different(p<0.01) versus the control.

5, 10 및 20mol%의 콜레스테롤을 점진적으로 증가시켜서 만든 liposome에 calcein을 봉입한 후 gel filtration하여 안정도 시험을 행하였으며, 이들 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 즉 DPPC에 콜레스테롤을 5~20mol% 첨가하여 liposome을 만들면 DPPC 단독으로 만든 liposome에 비하여 크게 안정도가 높아져서 약 50분 경과 후 콜레스테롤을 5mol% 첨가할 경우, 약 18%의 calcein의 leakage를 나타내었으며, 10mol%의 경우 11%정도, 20mol%의 경우 약 8%미만의 calcein의 leakage를 나타내었으며 이 감소정도는 24시간(1,450분) 경과시에도 거의 안정되어 비슷한 leakage를 나타내었다. DPPC liposome에 콜레스테롤을 첨가하였을 때 첨가농도에 따라 그 농도가 증가할수록 calcein의 leakage %가 감소되므로써, 인지질 세포막의 안정화에 미치는 콜레스테롤의 영향을 확실히 확인할 수 있었다. 이것은 아마도 지질 이중층막에 미치는 콜레스테롤의 condensing effect때문이라고 생각한다(1).

Liposome 안정화에 미치는 고들빼기 추출물의 영향

여러 종류의 고들빼기 추출물을 liposome에 가하므로써 막 안정화에 미치는 고들빼기 추출물의 영향을 알아보기 위하여 methanol과 ethyl acetate, butanol과 hex-

ane 등 여러 추출물을 사용하였으나, 그 중 butanol과 hexane 첨가물을 가한 liposome이 각각 막안정화에 현저한 영향을 미쳤다. 고들빼기의 hexane과 butanol 추출물을 가한 실험에서는 DPPC에 일정량의 고들빼기 첨가물을 가하여 sonication방법으로 small unilamellar vesicles(SUVs)를 만들고 self-quenching method에 따라 calcein의 형광을 측정하는 방법을 사용하여 liposome으로부터 새어나오는 calcein의 양을 측정하였으며, 그 결과 고들빼기 추출물의 liposome 막안정화 정도를 확인하였다. DPPC만으로 만든 liposome과 고들빼기 추출물을 혼합하여 만든 liposome의 경우, Fig. 5와 6에서 보듯이 고들빼기 첨가물을 일정 농도별로 가한 liposome은 DPPC만의 liposome에 비하여 liposome으로부터 calcein의 새어나움이 감소되어 막안정화 작용이 탁월하였다. 각 추출물의 첨가농도는 고들빼기 조추출물(crude extract)의 분자량을 문헌(21,22)에서 인용하여 콜레스테롤의 농도와 거의 비슷하게 가하여 그 영향을 살펴보았다. Fig. 5에서와 같이 DPPC 단독으로 만든 liposome은, calcein 봉입이 불안하여 시간의 경과에 따라 봉입한 calcein의 leakage %가 증가하였으며, 50분 경과시 calcein은 약 55%정도 leakage 되었으며, 24시간 경과시 약 60% 정도의 calcein이 새어나왔으나,

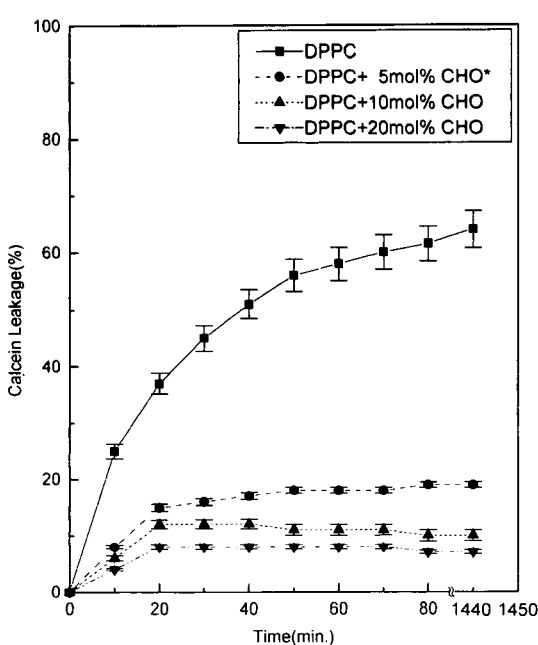


Fig. 4. Time course of the calcein leakages from the DPPC-cholesterol liposomes at 25°C. All data point were significantly different(p<0.01) versus the control. \*CHO: Cholesterol.

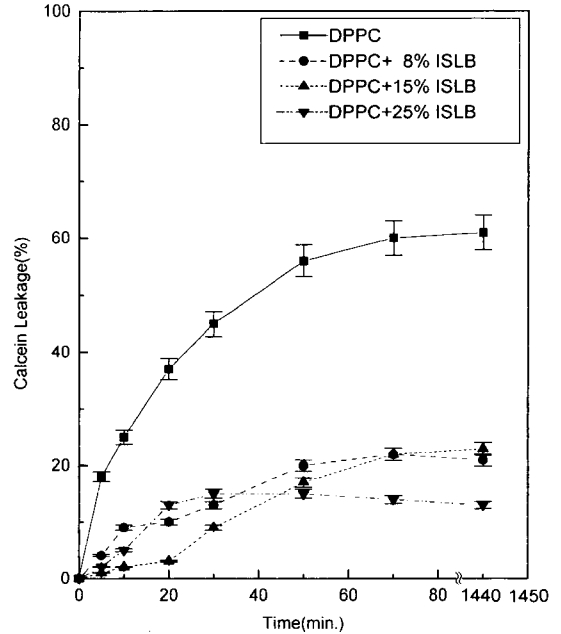


Fig. 5. Time course of the calcein leakages from the DPPC-additive(ISLB) liposomes at 25°C. All data points were significant different(p<0.01) versus the control. ISLB: Butanol extract of *Ixeris sonchifolia* H.

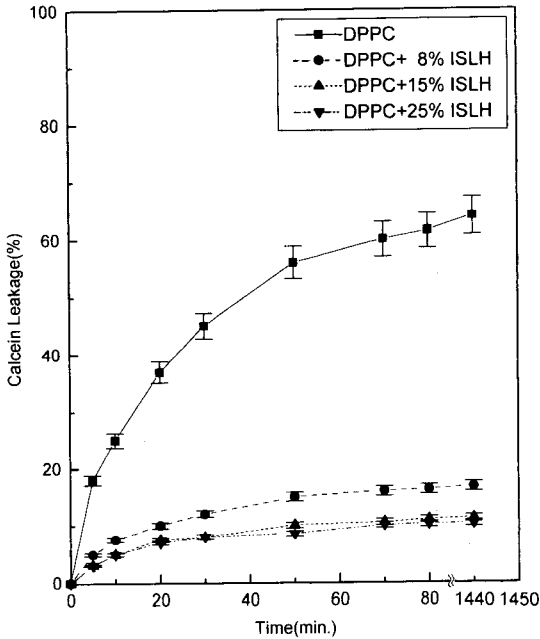


Fig. 6. Time course of the calcein leakages from the DPPC-additive(ISLH) liposomes at 25°C. All data points were significant different( $p < 0.01$ ) versus the control. ISLH: n-Hexane extract of *Ixeris sonchifolia* H.

DPPC liposome에 고들빼기 butanol 추출물(ISLB)의 농도를 증가시켜가면서 가한 경우 quenching % 값도 좋았고, 봉입효율이 매우 좋은 liposome이 만들어졌다. 즉 ISLB 추출물을 가한 liposome의 경우 처음 50분까지는 첨가물의 농도에 관계없이 calcein의 leakage가 비슷하여, 8%를 가한 경우 약 20% 정도, 15% 첨가한 경우 17% 정도 및 25% 첨가한 경우 15% 정도의 calcein leakage가 일어났고 하루(1,440분)가 경과하여도 calcein leakage가 그렇게 증가되지는 않았으며 첨가물의 농도 증가에 따라 약 12~20% 정도의 leakage를 보여 ISLB 추출물을 첨가한 liposome은 인지질 세포막 liposome의 막안정화에 뚜렷한 영향을 미침을 알 수 있었다. Fig. 6에서는 DPPC liposome에 고들빼기 hexane 추출물(ISLH)을 농도별로 가한 경우이며 DPPC만으로 된 liposome의 calcein leakage에 비해 현저히 낮은 %를 나타내었다. 즉 DPPC만으로 된 liposome은 calcein을 봉입한 후 50분 경과시 약 58% 정도 calcein leakage가 일어났으나, ISLH 추출물을 8%, 15% 및 25% 가한 경우 농도의 순서대로 liposome으로부터의 calcein의 leakage가 감소되어 8% 첨가의 경우 14%, 15% 첨가의 경우 9% 및 25% 첨가의 경우 약 8%의 calcein leakage가 일어났으며 24시간(1,440분)경과 후에도 막의 안정화가 지속

적으로 유지되어 50분 경과 후의 결과와 거의 비슷한 경향을 나타내었다. Fig. 5와 6에서 보듯이 인지질막을 안정화시키는 경향은 DPPC만으로 만든 liposome보다 DPPC liposome에 고들빼기 hexane 추출물을 가한 경우가 고들빼기 butanol 추출물을 가한 경우보다 calcein leakage의 정도가 더욱 감소되어 ISLH 추출물의 경우 인지질막 안정화에 미치는 영향이 ISLB 추출물보다 더 컸음을 확인할 수 있었다.

막유동성에 미치는 고들빼기 추출물의 영향

콜레스테롤의 영향

지질막의 유동성에 미치는 콜레스테롤의 영향을 검토하기 위하여 DPPC에 일정량의 콜레스테롤을 가하여 liposome을 만들고 DPH를 가한 후 온도를 증가시키면서 fluorescence polarization값(P)을 측정하였으며 그 결과를 Fig. 7에 나타내었다. DPPC만으로 만든 liposome은 상전이온도(phase transition temperature,  $T_m$  41~42°C)인 41°C에서 급격히 P값이 저하되었다. DPPC만으로 만든 liposome은 상전이온도 이전의 결정 상태에서 P값은 급격히 저하됨으로써 상전이온도 이전에서 인지질층의 유동성이 급히 증가되었음을 알 수 있었

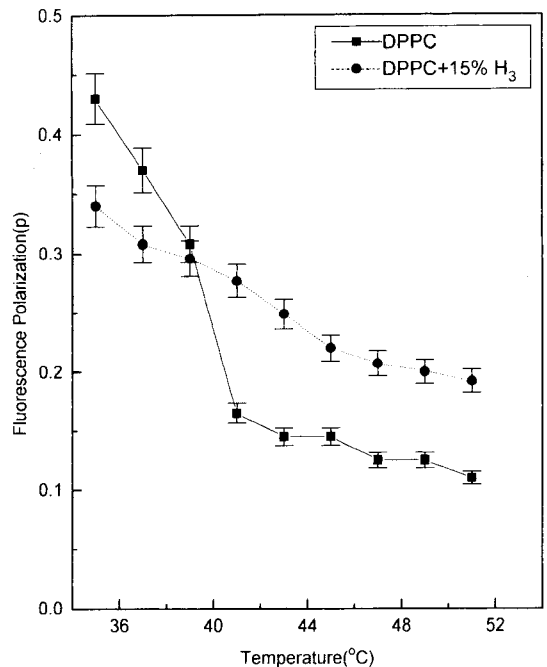


Fig. 7. Fluorescence polarization value of DPH in the DPPC liposomes and in the presence of H<sub>3</sub>(15%) as a function of temperature. Each point represents the mean of five replicate measurements  $\pm$  S.E. \* $p < 0.05$  vs control, \*\* $p < 0.01$  vs control.

고, 상전이온도 이후에서는 시간의 경과에 따라 P값의 감소 정도가 느슨하였다. 한편 20mol% 콜레스테롤 존재하의 DPPC liposome의 경우, 상전이온도 이전의 35°C에서의 P값이 DPPC만으로 된 liposome의 경우보다 많이 저하되었으며 콜레스테롤의 첨가로 인한 이온도에서 상전이온도 이전까지 P값의 저하로 현저한 막유동성 증가를 알 수 있었다. 그러나 상전이온도 이후의 P값은 콜레스테롤을 20mol% 가한 liposome의 경우 DPPC만의 liposome보다 P값이 저하가 느슨하였고 온도가 증가하여도 그 변화는 미미하였다. 즉 콜레스테롤을 첨가하였을 경우 상전이온도 이전의 P값이 훨씬 낮아지므로써 DPPC liposome의 상전이온도 이하인 결정 상태에서는 콜레스테롤의 첨가가 인지질 liposome의 막유동성을 증가시킴을 확인할 수 있었으며 반대로 상전이온도 이후의 P값은 콜레스테롤을 가한 경우가 가하지 않은 경우보다 P값이 증가되어 상전이온도 이전의 P값과 비교되었다.

#### 고들빼기 추출물의 영향

DPPC liposome에 diphenyl hexatriene(DPH)을 label한 후 고들빼기 조핵산 추출물(crude hexane extract) ISLH를 가한 경우, 측정된 P값은 Fig. 8과 같다. 이 그림에서와 같이 DPPC만으로 만든 liposome의 경

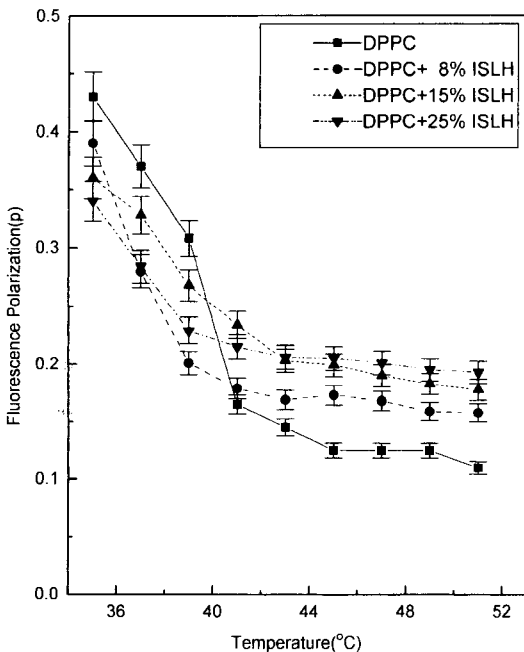


Fig. 8. Fluorescence polarization value of DPH labelled in the DPPC-additive(ISLH) liposomes. Each point represents the mean of five replicate measurements  $\pm$  S.E.(n=5).

우, 상전이온도 이전의 결정 상태에서는 온도가 상승됨에 따라 급격히 fluorescence polarization값(P)이 감소하여 액상결정 상태가 되는 상전이온도(phase transition temperature, 41~42°C) 근처에서는 P값이 현저히 감소되었다. DPPC에 ISLH를 8%, 15% 및 25%를 가한 경우 온도를 증가시킴에 따라 상전이온도 이전의 35°C 근처의 결정상태에서는 DPPC만의 liposome보다 농도의 증가에 따라 P값이 감소되므로써 상전이온도 이전에서의 liposome의 막유동성을 증가시켰음을 알 수 있었다. 그러나 상전이온도 이후에서는, 온도를 증가시킴에 따라 농도별 P값의 변화가 서서히 저하됨을 확인할 수 있었으며 농도증가에 따라 P값의 차이는 적었으나 상전이온도 이후의 P값이 DPPC만으로 만든 liposome보다 증가되었음을 알 수 있었다. 즉 고들빼기 추출물의 첨가로 인해 상전이온도 이전에서는 인지질막의 유동성이 증가되었고, 상전이온도 이후의 액상결정 상태에서는 오히려 고들빼기 첨가물의 농도에 따라 DPPC만의 liposome보다 P값이 증가하여 막유동성의 감소를 볼 수 있었다. 또 농도증가로 인한 뚜렷한 차이는 없지만, DPPC liposome의 상전이온도 근처에서 급격히 감소되던 P값이 첨가물에 의해 아주 그 범위가 느슨해지고, 넓어지게 되었다. 이 결과는 고들빼기 hexane 층 추출물의 분획물인 H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> 및 H<sub>3</sub>를 가한 경우에서도 나타났으며, 그 결과를 Fig. 9, 10 및 11에 나타내었다. Fig. 9~11에서 보듯이 분획물의 농도 증가에 따라 그 정도의 차이는 있으나, H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> 및 H<sub>3</sub>를 첨가한 경우에도 거의 유사한 경향이었으며, 고들빼기 첨가물의 농도가 높을수록 상전이온도 이전에서는 P값의 감소가 뚜렷이 낮아졌고 그 기울기는 더욱 느슨해졌으며 상전이온도 이후에서는 고들빼기 첨가물의 농도 증가에 따라 오히려 P값이 증가되어 막유동성 감소를 볼 수 있다. 이 결과에서 고들빼기 추출물 및 분획물을 첨가함으로써 DPPC liposome의 상전이온도 이전에서는 P값의 급격한 저하로 막유동성의 뚜렷한 증가를 볼 수 있었다.

## 고찰

### 막안정성에 미치는 고들빼기 추출물의 영향

막의 안정성에 중요한 역할을 하는 콜레스테롤의 영향을 검토하여, 그 결과 콜레스테롤의 첨가농도별 calcein의 leakage %가 감소되었음을 알 수 있었으며 이 결과에서 인지질 세포막의 안정화에 영향을 미치는 콜레스테롤의 영향을 재확인할 수 있었다.

이 실험은 DPPC의 상전이온도(41~42°C) 이하인 25°C에서 실시하였으므로 인지질 liposome에 첨가된 콜레

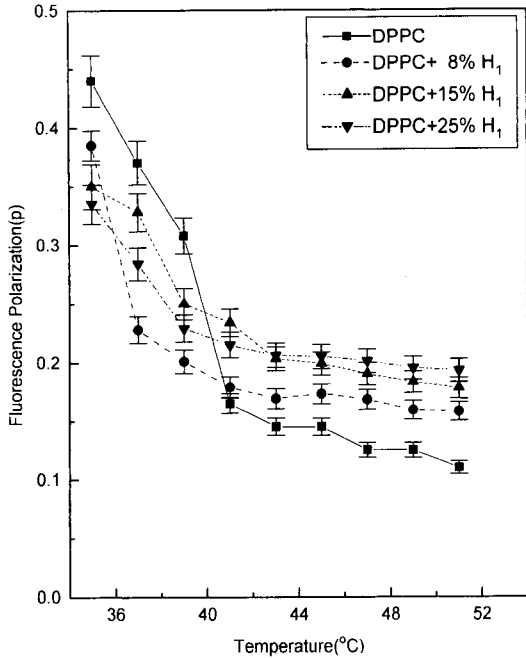


Fig. 9. Fluorescence polarization value of DPH labelled in the DPPC-additive(H<sub>1</sub>) liposomes. Each point represents the mean of five replicate measurements  $\pm$  S.E. (n=5). H<sub>1</sub>: The first fraction of ISLH.

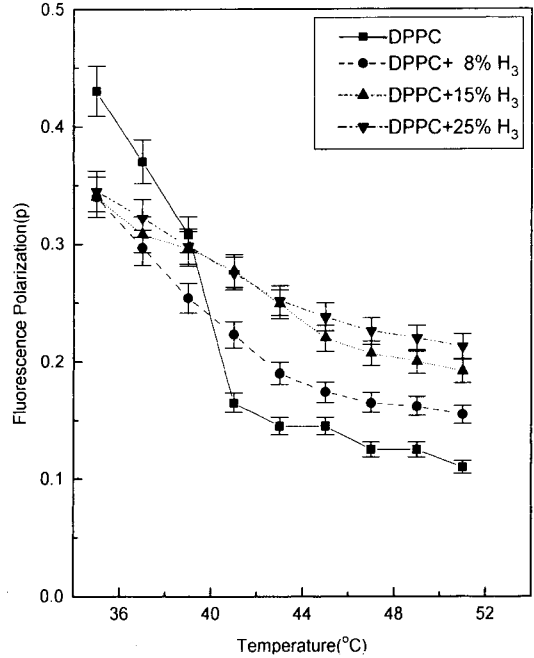


Fig. 11. Fluorescence polarization value of DPH labelled in the DPPC-additive(H<sub>3</sub>) liposomes. Each point represents the mean of five replicate measurements  $\pm$  S.E. H<sub>3</sub>: The third fraction of ISLH.

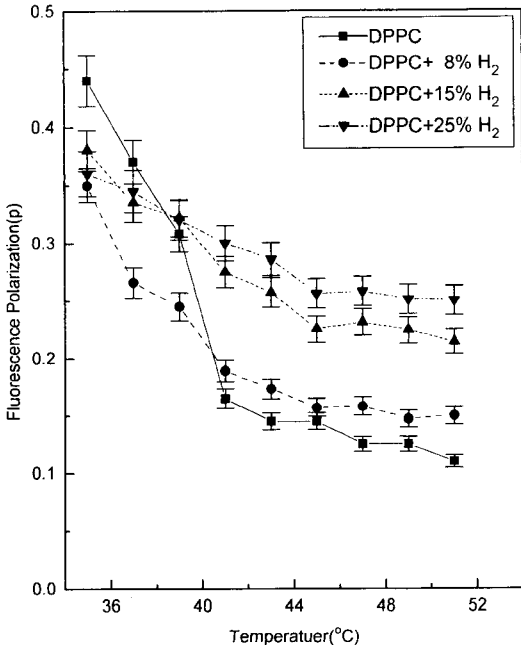


Fig. 10. Fluorescence polarization value of DPH labelled in the DPPC-additive(H<sub>2</sub>) liposomes. Each point represents the mean of five replicate measurements  $\pm$  S.E. H<sub>2</sub>: The second fraction of ISLH.

스테롤은 그 농도에 비례하여 상전이온도 이하에서는 인지질 세포막을 안정화시키는 작용이 있으며 이것은, 일반적으로 콜레스테롤이 DPPC liposome의 이중층 부분에서 interdigitated된 이중층 형성이 이루어져 막의 안정화 작용이 두드러진 것이라 생각된다. Liposome을 안정화시킨다는 콜레스테롤을 가하여 유의한 결과를 얻은 후, 전보(17)의 결과를 참조하여 인지질 liposome에서도 이와 비슷한 효과를 가지리라 기대되는 고들빼기 추출물을 가한 결과에서는 butanol과 hexane 물을 가한 liposome이 각각 막안정화에 현저한 영향을 미침을 밝힐 수 있었으며 고들빼기 hexane 추출물을 가한 경우가 butanol 추출물의 경우보다 그 영향이 크게 나타났다. 이와 같은 경향은 고들빼기 hexane 추출물의 분자구조 중 소수성부분이 인지질 이중층의 꼬리부분 속으로 깊이 침투됨으로써 막안정화에 기여한 영향이 컸다고 생각되어지며 이 결과에서 고들빼기 추출물의 첨가 효과는 liposome에 첨가된 문헌상 발표(19)된 다른 약물의 첨가 효과보다 liposome 막안정화 증가에 더 탁월한 효과가 있는 것으로 나타났다. 즉, 고들빼기 hexane 추출물의 소수성 부분이 상전이온도 근처에서 지질 이중층의 소수성 rigid한 부분으로 깊숙히 침투됨으로써 콜레스테롤과 같이 인지질막의 condensing ef-



fect에 큰 영향을 미치므로써 인지질 liposome의 안정화 효과가 현저하였다고 생각되며 이 경향은 고들빼기 hexane 추출물이 콜레스테롤과 같이 막의 interdigitated bilayer 구조의 형성으로 안정화 되었다고 볼 수 있다. 앞으로 이러한 연구결과를 토대로 옛부터 식품이면서 일정한 약리효과가 있는 물질의 생리활성 측면에서의 체계적이고 심화된 연구를 지속해 나갈 필요가 있을 것이다. 따라서 본 연구자는 이 연구의 후속으로 이에 대해서 계속 연구할 것이다.

#### 막유동성에 미치는 고들빼기 추출물의 영향

DPPC만으로 만든 liposome에 1,6-diphenyl 1,3,5-hexatriene(DPH)을 labeling한 후 측정된 fluorescence polarization값(P)은 상전이온도(DPPC의 상전이온도 41~42°C)이전에서는 P값이 서서히 저하되었으며 일정량의 콜레스테롤을 가한 경우, 콜레스테롤의 첨가로 인해 상전이온도 이전과 근처에서의 P값이 감소됨으로써 막유동성 증가가 진행되어 온도의 변화에 대한 P값의 감소로 상전이온도 이전에서의 콜레스테롤이 인지질 liposome의 유동성에 큰 영향을 미침을 알 수 있었다. 이것은 콜레스테롤의 탄화수소의 소수성 꼬리부분이 인지질 liposome의 막유동성을 증가시키는 역할을 하고 있음을 확인했다고 본다. DPPC liposome에 DPH를 labeling한 후 고들빼기 조핵산 추출물(crude hexane extract) ISLH를 가한 경우, 상전이온도 이하의 결정 상태에서는 온도가 상승됨에 따라 DPPC만의 liposome보다 P값이 감소되다가 액상결정 상태가 되는 상전이온도(phase transition temperature, 41°C~42°C) 근처에서는 random하게 P값의 감소가 일어났으나 상전이온도 이후에서는 온도의 상승에 따라 농도별 P값의 증가는 미미하였으나 각 농도가 증가함에 따라 P값이 비례적으로 증가하였다. 이 변화의 정도는 DPPC만으로 된 liposome의 P값의 감소와 증가에 비교된다고 보겠다.

한편 DPPC liposome에 고들빼기의 hexane 분획물인 H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> 및 H<sub>3</sub>를 농도별로 첨가했을 때의 P값을, 모두 비교해보면 ISLH를 가한 경우와 같이 상전이온도 이전의 35°C에서부터 DPPC만으로 만든 liposome보다 훨씬 그 값이 떨어지므로써 상전이온도 이전에서는 농도별 감소의 차이가 있었으나, 막유동성의 증가를 볼 수 있었다. 이것은 생체막의 활성화와 안정화 및 유동성에 아주 중요 역할을 하는 콜레스테롤의 첨가 결과와 비슷하였으며 첨가한 추출물들이 인지질 이중층의 꼬리부분으로 깊히 침투되어 상전이온도가 둔화되어짐을 알 수 있었다. 고들빼기 첨가물의 농도가 높을수록 상전이온도 이전의 P값의 감소가 서서히 일어나므로써

막유동성을 증가시켰고 상전이온도 이상의 액상결정 상태에서는 첨가물의 농도가 높을수록 P값의 저하가 서서히 일어나 오히려 DPPC만의 liposome보다 농도별 P값이 증가되었다. 또 농도의 증가에 따라 온도가 증가할수록 P값의 sigmoid curve의 기울기가 느슨해짐을 확실히 알 수 있었다.

이때의 P값의 감소정도는 ISLH와 세 분획물 H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> 및 H<sub>3</sub>가 조금의 차이는 있었으나 거의 비슷한 경향이었으며 이는 추출물 ISLH와 각 분획물 H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> 및 H<sub>3</sub>의 구조적 유사성 때문이라고 추정되며 이들의 구조가 규명되는 대로 생리활성물질의 실체도 밝혀지기 바란다. 특히 DPPC liposome의 상전이온도는 41~42°C이며 막유동성을 증가시키는 상전이 이전의 온도는 생체의 온도와 비슷하므로 이 온도에서의 고들빼기 첨가물의 막유동성 증가는 더욱 그 의미가 크다고 보겠다.

#### 요 약

인지질 liposome의 안정성과 유동성에 대한 고들빼기 추출물의 영향을 알아보기 위해 여러 종류의 인지질을 만들어 실험한 결과 PC계 인지질 중 DPPC를 사용하여 인지질 liposome을 만들고, 막안정성에 대한 영향을 calcein을 봉입한 liposome에 형광자가소광법으로 측정하였으며, 막유동성에 대한 영향은 fluorescence polarization방법으로 측정하였고 그 결과는 다음과 같다. Phosphatidylcholine(PC)계 인지질 중 acyl chain의 C수가 14개인 dimyristoyl phosphatidylcholine(DMPC)과 C수가 16개인 dipalmitoyl phosphatidylcholine(DPPC) 및 여러 인지질의 혼합물인 egg phosphatidylcholine(egg PC)을 사용하여 liposome 형성의 안정화와 막안정화에 대한 비교 실험을 하였다. 이중 liposome의 안정성이 가장 좋은 것은 egg PC였고, DPPC 그리고 DMPC의 순으로 calcein의 leakage %가 저하하였다. 콜레스테롤을 농도의 순으로 첨가시킨 DPPC liposome을 만들었을 때, calcein leakage%는 DPPC만의 liposome보다 훨씬 감소하여 막안정성에 영향을 미치는 콜레스테롤의 중요 역할을 확인하였다. 그리하여 고들빼기 추출물이 콜레스테롤과 같이 막의 물리화학적인 면과 생리활성적인 면에서 중요 역할을 하는지의 여부를 비교 검토하였다. DPPC liposome에 고들빼기 butanol과 hexane 추출물을 가한 결과, hexane 추출물의 막안정화에 미치는 영향이 butanol 추출물보다 현저하였으며 이 경향은 콜레스테롤을 농도별로 가했을 때와 거의 비슷함을 보여주었다. 이와같은 경향은 또한 인지질 liposome에 다른 약물을 첨가했을 경우 calcein의 leakage % 정도보다 훨씬 그 영향이 탁월함을 보여주었다. 즉

고들빼기 hexane 추출물의 소수성 부분은 인지질 liposome의 상전이온도 이하( $T_m$ : 41~42°C)인 25°C에서 지질 이중층의 rigid한 부분의 공간속으로 깊숙히 들어가 막안정성 증가에 의한 인지질막의 condensing effect에 현저한 영향을 미침을 알 수 있었다. Liposome에 DPH로 labeling한 후 온도 증가에 따른 DPH의 fluorescence polarization값(P)의 측정에서 DPPC만으로 만든 liposome의 경우 상전이온도 이전의 결정 상태에서 상전이온도(phase transition temperature,  $T_m$ )로 되면서 P값이 현저히 저하하였으며, 고들빼기 추출물을 농도별로 첨가했을 때는 상전이온도 전후에서 DPPC만의 liposome보다 P값의 감소가 더욱 뚜렷해졌으며 이 결과에서 상전이온도 이전에서의 고들빼기 추출물의 막유동성 증가 효과를 읽을 수 있었다. 각 추출물의 생리활성이 있는 분자구조가 아직 연구 중에 있는 현 시점에서는 고들빼기 추출물과 분획물들의 구조 중 소수성부분이 인지질 이중층의 탄화수소의 꼬리부분에 침투되어 더 많이 존재하고 있음을 유추할 수 있었다. 이상의 결과에서 고들빼기 hexane 추출물과 그 분획물 H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> 및 H<sub>3</sub>의 소수성 부분은 인지질 liposome의 이중층으로 깊숙히 들어가서 막안정성과 막유동성을 증가시키므로써 고들빼기 첨가물이 인지질 세포막에 대한 생리적 활성을 일으킬 수 있는 촉진제로서의 가능성을 시사해 준다고 보겠다.

### 감사의 글

본 연구는 한국과학재단 목적기초연구비(95-0401-10-02-2)에 의해 수행되었으며, 이에 깊이 감사드립니다.

### 문헌

1. Houslay, M. D. and Stanley, K. K. : Dynamics of biological membrane. John Wiley and Sons N. Y., p.71 (1982)
2. Robert, L. H. and Luke, S. S. G. : Unilamellar liposomes made with the French pressure cell. *J. Biol. Chem.*, **246**, 5477(1973)
3. Reeves, J. P. and Dowben. R. M. : Water permeability of phospholipid vesicles. *J. Mem. Biol.*, **3**, 123(1970)
4. Huang, C. H. : Studies on phosphatidylcholine vesicles formation and physical characteristics. *Biochemistry*, **8**, 344(1969)
5. Aloia, R. C. : Biomembrane fluidity. In "Membrane fluidity in biology" Academic Press, N. Y., p.5(1983)
6. Bangham, A. D. and Horne, R. W. : Action of saponin

- on biological cell membrane. *Nature*, **196**, 952(1962)
7. Gregoriadis, G. : The use of French pressed vesicles for efficient incorporation of bioactive macromolecule and as a drug carriers *in vitro* and *in vivo*. *Liposome Technology*. II, CRC press, p.38(1984)
8. Ferraretto, A., Sonnino, S., Soria, M. R. and Masserini, M. : Characterization of biotinylated liposomes sensitive to temperature and pH : new tools for anti-cancer drug delivery. *Chem. Phys. Lipids*, **82**, 133(1996)
9. Papahadjopoulos, D., Jacobson, K., Poste, G. and Shephard, G. : Effects of local anesthetics on membrane properties changes in the fluidity of phospholipid bilayers. *Biochim. Biophys. Acta*, **394**, 504(1975)
10. Yuasa, M., Tani, Y., Nishide, T. and Tsuchida, E. : Stabilization effect of tocopherol and catalase on the life-time of liposome-embedded heme as an oxygen carrier. *Biochim Biophys. Acta*, **900**, 160(1987)
11. Conrad, M. J. and Singer, S. J. : The solubility of Amphipathic molecules in biological membrane structure. *Biochemistry*, **20**, 808(1981)
12. Massey, J. B., Diane Hickson-bick, D. P., Antonio, M. G. Jr. and Pownall, H. J. : Fluorescence assay of the specificity of human plasma and bovine liver phospholipid transfer protein. *Biochim. Biophys. Acta*, **835**, 124 (1985)
13. Raymond, F. C. and Harold, E. : Biochemical fluorescence. In "Fluorescence polarization" Marcel Dekker, Inc., N. Y., p.79(1975)
14. Ehringer, W. D., Belche, D., Wassall, S. R. and Sillwell, W. : A comparison of  $\alpha$ -linolenic acid and  $\gamma$ -linolenic acid in phosphatidylcholine bilayers. *Chem. Phys. Lipids*, **57**, 87(1991)
15. Nuss, S., Oudet, P., Mioskowski, C. and Lebeau, L. : Synthesis of new deuterated lipid probes for membrane fluidity measurements. *Chem. Phys. Lipids*, **84**, 13(1996)
16. Ambrosini, A., Bertoli, E., Tanfani, F. and Zolese, G. : Effect of the fungicides tributyltin acetate and tributyltin chloride on multilamella liposomes. *Chem. Phys. Lipids*, **59**, 189(1991)
17. 배송자, 김남홍, 하배진, 정복미, 노승배 : 고들빼기 잎추출물이 흰쥐의 사염화탄소에 의한 간손상에 미치는 영향. *한국식품영양과학회지*, **26**, 137(1997)
18. 박수정 : Oleanane과 ursan계 triterpene의 지질막 안정화 작용. 부산대학교 약학석사 학위논문(1997)
19. David, W. D. and Paul, S. U. : *Liposomes, liposome preparation, methods and mechanisms*. Marcel Dekker, N. Y., p.27(1983)
20. Harris, D. A. and Bashford, C. L. : *Spectrophotometry and spectrofluorimetry*. IRL press(1987)
21. Moyaquiles, M. R., Munoz-Delgado, E. and Vidal, C. J. : The pyrethroid insecticide deltamethrin modifies the thermotropic properties and lipid packing order of model membranes. *Chem. Phys. Lipids*, **82**, 61(1996)
22. 신수철 : 고들빼기 생리활성 물질의 검색. *한국 농화학회지*, **6**, 34(1993)