

고콜레스테롤혈증 유발 가토를 이용한 우리밀의 LDL 산화 및 동맥경화 예방 효과

최 면[†] · 김현숙*

강원대학교 축산가공학과
*한국영양과학연구소

Effects of Korean Wheat on LDL Oxidation and Atherosclerosis in Cholesterol-Fed Rabbits

Myeon Choe[†] and Hyun-Sook Kim*

Dept. of Animal Products Science, and *Institute of Korea Nutritional Science,
Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea

Abstract

Numerous studies have suggested the involvement of oxidative processes in the pathogenesis of atherosclerosis and especially of oxidized low density lipoproteins (LDL). We studied the effect of Korean wheat on the oxidizability of LDL and the development of experimental atherosclerosis in rabbits on cholesterol diet. For the approach of the aim, antioxidative activity of wheat extracts against oxidation of LDL was investigated. The antiatherogenic effect of wheat was studied against Newzealand white (NZW) rabbits fed containing the wheat powder for 12 weeks. PBS extracts of Korean and imported wheats decreased LDL oxidation induced by copper ion by 62.3%, 52.6% respectively in comparison with control. Liver thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) levels of rabbits were significantly lowered in Korean wheat fed group (0.397 ± 0.029 nmol MDA/mg protein, $p < 0.05$) compared to control (0.496 ± 0.021 nmol MDA/mg protein) and imported wheat group (0.478 ± 0.019 nmol MDA/mg protein). TBARS levels of kidney showed no significant difference among treatment groups. The aorta of cholesterol-fed rabbits showed typical atherosclerotic lesions when compared with the controls, but the microscopic differences between groups was not clear. The present study suggests that Korean wheat may have higher antioxidative capacity than imported wheat and have more beneficial effects for the treatment of disease by inhibiting the oxidation of LDL.

Key words: atherosclerosis, cholesterol, Korean wheat, LDL oxidation

서 론

한국인의 사망 원인 중 동맥경화증은 뇌경색, 협심증, 심근경색증 등 허혈성 심질환과 말초혈관 폐쇄를 유발하는 원인 질환으로(1), 발병 초기의 메카니즘으로서 혈관벽 평활근 세포 증식에 의한 내막의 비대화, 그리고 혈중 콜레스테롤 및 LDL 양과도 밀접한 것으로 밝혀졌다(2). 혈중 LDL은 receptor에 의해 세포내에서 분해되지만 콜레스테롤 다량 섭취로 receptor가 부족하거나 결핍되면 혈중에 많아지게 되고 결국 축적되어 oxidized LDL이 생성된다(3-5). 또한 LDL은 내피세포의 lipoxigenase, 대식세포에서 생성되는 superoxide radical, 그리고 식품을 통하여 들어온 과산화지질에 의하여 oxidized LDL로 산화되는 것으로 밝혀졌다(6). 산화적 스트레스에 의해 생성된 oxidized LDL은 높은 세포 독성이 있는 지질 과산화물을 가지고 있어서 세포 조직에 확산되어 독성을 나타내고 내피세포에 염증을 일으켜 동맥경화를 유발한

다(7). 이와 같이 LDL 산화는 초기 동맥경화성 병변의 형성과 진전에 주요한 역할을 하므로 동맥경화의 원인을 예방하기 위해서는 항산화제에 의해 LDL의 산화를 방지해야 한다.

밀(*Triticum aestivum*)의 건강 기능성에 대한 연구에서 밀에 존재하는 gluten은 장내에서 소화, 흡수된 후 opioid peptide인 gluten exorphins A5, B5, B4 분비를 촉진시키는 작용이 있으며(8), 세포 독성물질인 thionin은 대식세포의 식작용을 강화하는 기능이 있다고 하였다(9). 또한 밀기울은 유방암과 직장암의 발병율을 크게 낮추고, 밀기울의 보충급여와 밀에 존재하는 amylase inhibitor는 식후 혈당 농도를 감소시켜 type II 당뇨병에 대한 개선효과가 있었다고 보고되어 있다(10,11). 그러나 우리밀을 중심으로 특히 동맥경화 예방 효과에 대한 연구는 전무한 실정이므로 이에 대한 연구가 필요하다.

따라서 본 연구는 우리밀의 동맥경화 예방 효과를 연구하기 위한 일환으로 우리밀과 수입밀의 PBS 추출물에 대한 LDL 산화 억제 효과를 비교하였고, 콜레스테롤식이 토끼의 조직중

[†]Corresponding author. E-mail: mchoe@kangwon.ac.kr
Phone: 82-33-250-8645. Fax: 82-33-244-2198

지질과산화 및 대동맥의 조직 변화를 관찰함으로써 항산화 측면에서 우리밀의 동맥경화 예방 효과를 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

추출물 제조

밀 추출물의 LDL에 대한 항산화 효과를 알아보기 위하여 우리밀 품종인 고분밀과 수입밀인 Australian standard white (ASW)을 선정하여 PBS 추출물을 Choe 등(12)의 방법으로 제조하였고, 추출물의 수율은 우리밀과 수입밀 50 g으로부터 각각 72 mL, 78 mL이었다.

LDL의 분리

밀 추출물의 LDL 산화 억제 효과는 사람의 혈장에서 LDL을 분리하여 측정하였다(13). LDL($1.019 < d < 1.063$)은 건강한 사람의 혈액을 450 g, 4°C에서 20분간 원심분리하여 상층부의 혈장을 취한 다음, gentamycin sulfate 1 mg/25 mL을 첨가하여 46,000 g에서 24시간 동안 원심분리하여 얻었다. 이를 0.15 M NaCl, 0.01% EDTA가 함유된 0.01 M phosphate buffer(pH 7.4)에서 20시간 투석하여 순수 LDL을 분리하였다. 분리된 LDL의 양은 Lowry 등(14)의 방법을 이용한 단백질 양으로 결정하였다.

LDL 산화 억제 효과

LDL 산화 유발을 위해 400 µg LDL/mL, 16 µM CuSO₄, 밀 추출물을 첨가하지 않는 대조군과 PBS 추출물의 단백질을 기준으로 0.5 mg 첨가한 후 전체 부피가 1 mL 되도록 인산완충 용액을 가하고 37°C에서 2시간 동안 배양하였다. 1 mM EDTA 20 µL를 첨가하여 산화를 중지시킨 후 25% TCA 1 mL과 1% TBA를 첨가하여 95°C에서 10분 정도 증탕한 다음 얼음으로 냉각시킨 후 생성된 TBA 반응물질(TBARS)을 532 nm에서 측정하여 밀 추출물의 LDL 산화 억제 정도를 비교하였다.

동물사육 및 식이

실험동물은 2.5 kg 정도의 NZW rabbit를 독립된 사육장 한 칸에 한 마리씩 배정하여 적응시킨 후 대조군, 우리밀 섭취군, 수입밀 섭취군으로 나누어 각 군당 4마리씩 12주간 사육하였다. 식이와 물은 자유급식하였고 사육실 온도 20°C, 상대 습도 55%를 유지하며 12시간 간격으로 명암을 조절하였다.

식은 대조군은 시판사료를 공급하였고, 우리밀과 수입밀 섭취군은 각각의 밀가루에 옥수수, 카제인, 대두유, 섬유소, 무기질 등을 첨가하여 시판사료와 동일한 조성(탄수화물 50.5%, 조단백질 20%, 조지방 2.5%, 칼슘 0.6%, 인 0.4%, 조섬유 15%, 조회분 11%)이 되도록 조제하여 섭취시켰다. 또한 고콜레스테롤혈증을 유발하기 위하여 식이에 1% 콜레스테롤을 첨가하였고, 모든 식이는 4°C 냉장보관하면서 신선하게 공급하였다.

시료수집

실험종료후 가토는 24시간 절식시키고 sodium pentobarbital

(50 mg/kg)을 주사하여 마취시킨 후 개복하여 간장과 신장을 적출하였다. 적출된 조직은 지방을 제거하고 차가운 0.9% NaCl로 세척하여 조직내의 혈액과 수분을 제거한 다음 바로 액체 질소에 넣어 급속냉동시켰고 -70°C에서 냉동보관하면서 시료로 사용하였다.

조직중 지질 과산화 측정

지질 과산화물은 Buege와 Aust(15)의 TBARS 방법으로 측정하였으며, 결과는 MDA nmol로서 나타냈다. 간장과 신장조직 1 g을 세절하여 완충용액(20 mM HEPES+140 mM KCl, pH 7.4) 10 mL로 균질화한 후 이를 1,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 여기에 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.4), 1.7 mM ADP, 0.1 mM FeCl₃를 가한 후 0.1 mM NADPH를 첨가하여 37°C 진탕항온기에서 지질과산화를 유발하였다. 20 mM EDTA를 가하여 반응을 중지시킨 후 2% BHT가 포함된 TBA-TCA-HCl 용액을 가하고 95°C에서 15분간 끓여 TBA와 MDA가 반응하도록 하였다. 반응액을 5분간 냉각시킨 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 취하여 535 nm에서 흡광도를 측정하였다.

대동맥 변화

고콜레스테롤혈증 유발 가토의 좌심실에 18G 주사바늘을 통하여 4% Robertson 고정액(paraformaldehyde 1% glutaldehyde 고정액)으로 관류 고정 후에 도살하여 그 동맥의 석회침착 정도를 육안으로 관찰하였고, 흉부와 복부 동맥에서 병변이 심한 곳을 골라 각각 두 부위씩 그리고 심장의 관상 동맥을 각각 절제하여 동맥경화의 진행양상을 현미경으로 관찰하였다.

통계분석

실험결과는 평균과 표준편차로 표시하였으며 SAS를 이용하여 $\alpha = 0.05$ 수준에서 Duncan의 다중검증법으로 유의성을 검증하였다(16).

결과 및 고찰

LDL에 대한 항산화 효과

LDL에 대한 추출물의 항산화 효과를 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 대조군의 TBARS 함량은 26.8 nmole MDA/mg protein, 우리밀 10.1 nmole MDA/mg protein, 수입밀 12.7 nmole MDA/mg protein로 나타나 밀 추출물이 대조군에 비해 높은 항산화 활성을 보였으며($p < 0.05$), 우리밀의 산화 억제능이 수입밀에 비해 약간 높았지만 커다란 유의차는 보이지 않았다. 결과적으로 대조군의 TBARS 함량을 100으로 했을 때 우리밀과 수입밀이 37.7%, 47.4%로 나타나 각각 62.3%와 52.6%의 과산화지질 함량이 억제되었다. 이는 우리밀의 항산화 활성이 산화된 LDL 내의 지질 과산화물질의 축적으로 일어나는 각종 연쇄반응을 억제함으로써 세포의존성 동맥경화의 초기단계를 예방할 수 있는 기능성 물질로 이용할 수 있음을

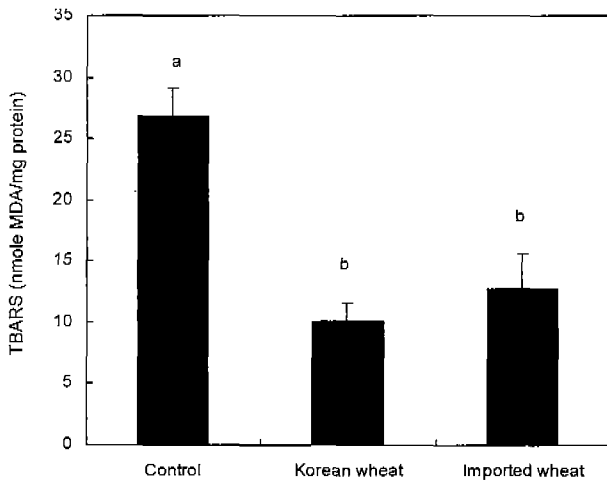


Fig. 1. The inhibitory effect of wheat extracts on LDL oxidation.

LDL was subjected to a 2 hr oxidation with 16 μ M CuSO_4 in the presence of PBS extracts. The lipoperoxide content was determined using thiobarbituric acid (TBA) and is expressed as nmol malondialdehyde equivalents/mL. The data was given as the mean \pm SD.

시사해 주고 있다. LDL에 대한 항산화 효과 연구에서 같은 puerarin 성분과 속성된 양파 추출물의 높은 항산화 효능이 입증되어 동맥경화를 예방하는데 효과가 있음을 보고하였다(17,18). Rosenblat 등(19)은 isoflavan glabridin이 LDL의 cell-mediated oxidation을 80% 정도까지 억제하였고, apolipoprotein E가 결핍된 동맥경화성 마우스를 이용한 생체내 실험에서도 LDL oxidation이 감소되었다고 보고하였다. 이는 isoflavan glabridin을 함유한 대식세포가 NADPH oxidase system 활성을 저해하였고, 이로 인해 oxysterol에 의한 조직 손상이 감소되었거나 대동맥의 조직 병변을 저하시킴으로써 동맥경화를 완화시킬 수 있다고 하였다. 그리고 Sparrow와 Olszewski(20) 및 Rankin 등(21)에 의하면 LDL의 산화는 세포내의 lipoxygenases의 활성에 의하여 일어나며 polyphenol 화합물이 lipoxygenase의 활성을 억제한다고 하여 앞으로 이에 대한 연구가 필요하다고 사료된다.

조직중 지질과산화물 억제 효과

우리밀과 수입밀을 함유한 식이를 12주간 섭취한 토끼 조직중 TBARS를 측정할 결과는 Table 1과 같다. 간장의 TBARS 함량은 대조군 0.496 ± 0.021 nmol MDA/mg protein, 우리밀 섭취군이 0.397 ± 0.029 nmol MDA/mg protein, 수입밀 섭취군이 0.478 ± 0.019 nmol MDA/mg protein로 나타나 우리밀 섭취시 지질 과산화를 생성이 유의적으로 감소하였는데 ($\alpha = 0.05$), 이는 우리밀 섭취가 콜레스테롤 섭취로 인한 조직의 지질 과산화적 손상을 완화시킬 수 있음을 의미한다. 신장의 TBARS 함량은 대조군 6.76 ± 0.28 nmol MDA/mg protein, 우리밀 섭취군 6.30 ± 0.35 nmol MDA/mg protein, 수입밀 섭취군 6.90 ± 0.53 nmol MDA/mg protein로 나타나 우리밀 섭취군이 가장 낮았지만 개체간의 차이로 인해 유의적인 차이는 없었다. 본 연구와 유사한 연구에서 Kwon 등(22)이 김

Table 1. TBARS contents in liver and kidney of rabbits fed Korean wheat and imported wheat (unit: nmol MDA/mg protein)

	Liver	Kidney
Control	$0.496 \pm 0.021^{a1)2)}$	$6.76 \pm 0.28^{NS3)}$
Korean wheat	0.397 ± 0.029^b	6.30 ± 0.35
Imported wheat	0.478 ± 0.019^a	6.90 ± 0.53

¹⁾Values are mean \pm S.D.

²⁾Values with different superscript within the same column are significantly different at $p < 0.05$.

³⁾N.S: not significant.

Table 2. Calcification occurrence of rabbits aorta fed wheat diet with cholesterol supplementation

Diet groups	Calcification occurrence (%)
Control	4/4 (100)
Korean wheat	3/4 (75)
Imported wheat	3/4 (75)

치의 동맥경화 예방 효과를 항산화 측면에서 관찰한 결과, 콜레스테롤 섭취 토끼의 간조직중 TBARS 값이 마늘섭취군에서 대조군에 비해 51% 정도 낮았다고 하여 마늘이 동맥경화 발생과 직접적인 관계가 있는 LDL 산화를 억제하는 효과가 있음을 보고하였다. 이는 김치재료가 가지는 항산화물질인 폴리페놀화합물, 플라보노이드류, 비타민 C, 비타민 E, 베타 카로틴 그리고 알리신 등에 의한 작용 때문이라고 하였다.

대동맥 변화

대동맥의 변화를 측정할 결과 Table 2에서 보는 바와 같이 대조군은 4마리 모두에서 석회 침착현상이 나타나 석회 침착 발생율이 100%로 나타났고, 우리밀 섭취군과 수입밀 섭취군은 4마리중 3마리에서 석회 침착이 관찰되어 75% 발생율을 나타냈다. 따라서 두군 모두 대조군에 비해 낮은 석회 침착현상을 보였지만 우리밀과 수입밀 섭취로 인한 차이는 명확하게 관찰되지 않았다. 이러한 결과를 현미경으로 관찰한 그림은 Fig. 2와 같으며, 그림 B에서 보는 바와 같이 대동맥 혈관 중막 및 주위에 석회침착이 발생되었음을 볼 수 있었다. 본 연구에서 동맥의 석회 침착 발생 정도에서 우리밀과 수입밀 간의 유의적인 차이를 볼 수 없었지만 앞으로 좀 더 다양한 (식이내 콜레스테롤 첨가량, 실험기간, 유효성분 투여방법 등) 방법으로 재검증할 가치가 있다고 판단된다.

요 약

우리밀과 수입밀의 PBS 추출물의 LDL 산화 억제 효과를 비교하였고, 고콜레스테롤혈증 유발 가토의 조직중 지질과산화 및 대동맥의 조직 변화를 측정함으로써 우리밀이 동맥경화의 진행 양상 변화에 어떠한 효과가 있는지 검토하였다. 밀 추출물의 LDL 산화 억제 효과는 우리밀과 수입밀이 각각 62.5%, 52.8%로 나타나 우리밀 추출물의 LDL 산화 억제 효과가 수입밀에 비해 약간 높았다. 고콜레스테롤혈증 유발 가토의 간장중 TBARS 함량은 수입밀보다 우리밀 섭취시 낮게

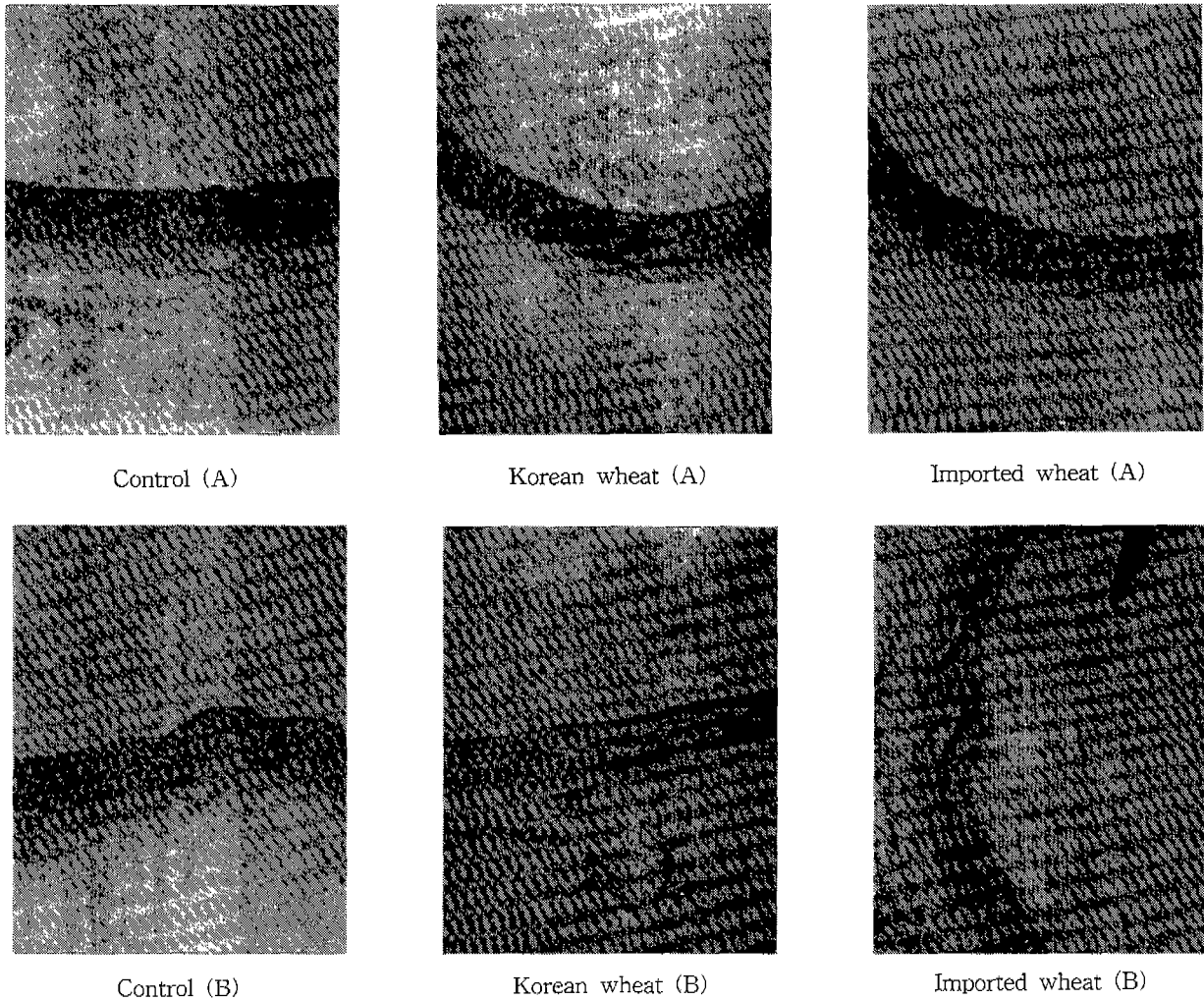


Fig. 2. The photograph of aorta in rabbits fed cholesterol supplemented diet with wheat (magnification $\times 100$).
 Control (A): Aorta from rabbit in normal diet.
 Control (B): Aorta from rabbit in normal diet.
 Korean wheat (A): Aorta from rabbit without calcification in Korean wheat.
 Korean wheat (B): Aorta from rabbit with calcification in Korean wheat.
 Imported wheat (A): Aorta from rabbit without calcification in imported wheat.
 Imported wheat (B): Aorta from rabbit with calcification in imported wheat.

나타나 우리밀이 지질 과산화를 억제하는데 효과가 있는 것으로 나타났지만, 신장에서의 억제 효능은 비슷한 것으로 나타났다. 대동맥의 석회 침착 발생률은 대조군에 비해 낮았지만 우리밀과 수입밀의 섭취로 인한 뚜렷한 차이는 입증되지 않았다. 이상의 결과로 우리밀 추출물의 LDL 산화 억제 효과가 입증되었으며, 우리밀 섭취가 콜레스테롤 섭취로 인한 간장중 지질 과산화적 손상을 완화시키는데 기여함을 알 수 있었지만 우리밀과 수입밀 섭취로 인한 동맥경화 예방효과에 대한 뚜렷한 차이는 나타나지 않았다.

감사의 글

본 연구는 한국학술진흥재단의 지원과제로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문헌

1. Lee, Y.G. : Cardiovascular disease, truly is that increased? *J. Korean Med. Association*, **35**, 734-737 (1992)
2. Cho, S.H. : Dietary lipid and atherosclerosis. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **23**, 170-179 (1994)
3. Esterbauer, H., Gebicki, J., Pohl, H. and Jurgens, G. : The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic. Biol. Med.*, **13**, 341-390 (1992)
4. Ishikawa, Y., Inadera, H., Shirai, K., Hashimoto, H., Fukamachi, I., Saito, Y. and Yoshida, S. : Moderate oxidation of hypertriglyceridemic LDL causes apolipoprotein-B epitope change and enhances its uptake by macrophages. *Biochim. Biophys. Acta*, **1129**, 60-64 (1992)
5. Ross, R. : The pathogenesis of atherosclerosis, perspective for the 1990's. *Nature*, **29**, 801-809 (1993)
6. Fogelman, A.M., Shechter, I., Sieger, J., Hook, M., Child, J.S. and Edward, P.A. : Malondialdehyde alteration of low

- density lipoprotein leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 2214-2218 (1980)
7. Morel, D.W., Hessler, J.R. and Chisolm, G.M. : Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipids. *J. Lipid Res.*, **24**, 1070-1076 (1983)
 8. Fukudome, S., Jinsma, Y., Matsukawa, T., Sasaki, R. and Yoshikawa, M. : Release of opioid peptides, gluten exorphins by the action of pancreatic elastase. *FEBS Lett.*, **412**, 475-479 (1997)
 9. Stein, G.M., Schaller, G., Pfuller, U., Wagner, M., Wagner, B., Schietzel, M., Bussing, A. and Krebsforschung, H. : Characterization of granulocyte stimulation by thionins from European mistletoe and from wheat. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1426**, 80-90 (1999)
 10. Vaaler, S., Hanssen, K.F., Dahl-Jorgensen, K., Frolich, W., Aaseth, J., Odegaard, B. and Aagenaes, O. : Diabetic control is improved by guar gum and wheat bran supplementation. *Diabet. Med.*, **3**, 230-233 (1986)
 11. Lankisch, M., Layer, P., Rizza, R.A. and DiMugno, E.P. : Acute postprandial gastrointestinal and metabolic effects of wheat amylase inhibitor in normal, obese, and diabetic humans. *Pancreas*, **17**, 176-181 (1998)
 12. Choe, M., Park, J.B. and Kim, H.S. : Screening of immune-enhancing substances from Korean wheats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **29**, 307-311 (2000)
 13. Havel, R.J., Eder, H.A. and Bragdon, J.H. : The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.*, **34**, 1341-1353 (1955)
 14. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Fan, A.L. and Randall, R.J. : Protein measurement with Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-271 (1951)
 15. Buege, J.A. and Aust, S.D. : Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.*, **52**, 302-310 (1978)
 16. 허명희 : SAS 범주형 데이터 분석. 자유아카데미, 서울 (1989)
 17. Park, J.O., Kim, K.S., Ji, Y.A. and Ryu, B.H. : Antioxidant activity of daidzin and puerarin toward oxidation of human low density lipoprotein. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **26**, 25-31 (1997)
 18. Munday, J.S., James, K.A., Fray, L.M., Kirkwood, S.W. and Thompson, K.G. : Daily supplementation with aged garlic extract, but not raw garlic, protects low density lipoprotein against in vitro oxidation. *Atherosclerosis*, **143**, 399-404 (1999)
 19. Rosenblat, M., Belinky, P., Vaya, J., Levy, R., Hayek, T., Coleman, R., Merchav, S. and Aviram, M. : Macrophage enrichment with the isoflavan glabridin inhibits NADPH oxidase induced cell-mediated oxidation of low density lipoprotein. A possible role for protein kinase C. *J. Biol. Chem.*, **14**, 13790-13799 (1999)
 20. Sparrow, C.P. and Olszewski, J. : Cellular oxidative modification of low density lipoprotein does not require lipoxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 128 (1992)
 21. Rankin, S.M., Parthasarathy, S. and Steinberg, D. : Evidence for a dominant role of lipoxygenase(s) in the oxidation of LDL by mouse peritoneal macrophage. *J. Lipid Res.*, **32**, 449 (1991)
 22. Kwon, M.J., Song, Y.S. and Song, Y.O. : Antioxidative effect of kimchi ingredients on rabbits fed cholesterol diet. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **27**, 1189-1196 (1998)

(2001년 5월 25일 접수; 2002년 1월 9일 채택)