韓國營養學會誌 36(2) : 101~108, 2003

흰쥐에서 Curcuminoid 및 이를 함유한 천연식물 혼합물이 심혈관계에 미치는 영향

안수현[1)2)] · 이종호[1)] · 박하림[2)] · 권승택[2)]
고유석[2)] · 손영덕[3)] · 장양수[3)] · 정광회[2)3)§]

연세대학교 생활과학대학 식품영양학과,[1)] (주)바이오버드 심혈관치료연구실,[2)]
연세대학교 의과대학 심혈관연구소[3)]

Effect of Curcuminoids and Natural Plants Extract Mixture on the Cardiovascular System in Rats

Ahn, Soo Hyun[1)2)] · Lee, Jong Ho[1)] · Park, Ha Rim[2)] · Kwon, Seoung Taek[2)]
Koh, You Seok[2)] · Sohn, Young Doug[3)] · Jang, Yang Soo[3)] · Chung, Kwang Hoe[2)3)§]

Department of Food and Nutrition,[1)] College of Human Ecology, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea
Cardiovascular Biology Lab.,[2)] BioBud Co. Ltd., Seoul 120-110, Korea
Cardiovascular Research Institute,[3)] Yonsei University College of Medicine, Seoul 120-752, Korea

ABSTRACT

Antiplatelet aggregation, anticoagulant and lipid-lowering drugs are clinically widely used for secondary preventive purpose in the cardiovascular patients, but there is no primary preventive agents to prevent these diseases. With the aim of developing effective primary agents for cardiovascular diseases, we tried to formulate an optimized mixture of natural plants extract containing *Theae sinensis, Camelliae sinensis, Vitis vinifera, Gingko folium* and curcuminoids from *Curcuma longa* and to evaluate its anti-thrombotic and anti-hypercholesterolemic effects *in vivo*. The inhibitory effect of curcuminoids on vascular smooth muscle cell proliferation and migration were also investigated *in vitro*. In the animal experiments treated with hyperlipidemic diet, oral treatment of curcuminoids and natural plants extracts mixture (100 mg/kg) into male Sprague Dawley rats for 7 week simultaneously inhibited platelet aggregation as well as improved lipid profile in the blood. Compared to control group, both of curcuminoids-treated and mixture-treated groups revealed significantly decrease of total cholesterol (24.4%, 28.6%), free cholesterol (25.1%, 24.0%), cholesterol ester (14.6%, 29.0%), LDL-cholesterol (27.0%, 32.0%) and triglyceride (15.0%, 31.0%), respectively. However, both groups showed increase of HDL-cholesterol (46.6% and 51.5%). In particular, atherogenic index of curcuminoids and mixture treatment group was significantly decreased to 47.0% and 56.0%, respectively. Furthermore, oral treatment of curcuminoids and mixture significantly inhibited collagen-induced platelet aggregation (21.1% and 29.1%, respectively), compared to control group. The anti-thrombotic values of mixture was almost similar to that of aspirin treatment (100 mg/kg) group. These results suggest that the oral treatment of curcuminoids-based natural plant extract mixture improved cardiovascular conditions in hyperlipidemic rats. (*Korean J Nutrition* 36(2) : 101~108, 2003)

KEY WORDS : natural plants extract mixture, curcuminoids, anti-platelet, cholesterol-lowering.

서 론

현대인에 있어서 심혈관질환의 발생증가가 식생활과 높은 연관성있다는 보고를 근거로 이들 질환에 대한 1차 예방 및 치료 효과를 입증하고자, 인체에 안전한 천연식물 소재의 유효성분을 섭취하여 항혈전 및 항동맥경화 활성에 대한 연구들이 활발하게 수행되고 있다.[1)] 예를 들어, 적색 포도주와 심혈관 질환의 상관관계,[2)] 동맥경화와 eicosapentaenoic acid (EPA) 및 docosahexaenoic acid (DHA)의 상관관계,[3)] 전통발효식품인 납두와 혈전과의 상관관계,[4)] 녹차의 항혈전과 혈중 콜레스테롤 강하작용 및 항암효과,[5-10)] 청국장,[11)] 된장,[12)] 젓갈,[13)] 김치[14)] 등의 항혈전

접수일 : 2002년 12월 31일
채택일 : 2003년 3월 10일
§To whom correspondence should be addressed.

© 2003 The Korean Nutrition Society

연구 등이 보고되었다.

최근 새로운 천연식물 소재로 울금의 주성분인 curcuminoid가 여러가지 질환에 대한 예방효과가 보고되면서 주목 받고 있다. 울금 (학명 : *Curcuma longa L.*)은 생강과 (*Zingiberaceae*)에 속하는 다년생초로 인도를 중심으로 중국 등 아시아 지역에서 재배되며, 고대로부터 뿌리를 이용하여 식용, 약용, 염색용 등의 용도로 사용되어왔다. 현재 국내에서 한약재로 이용되고 있는 울금의 생리활성물질은 3~6%정도 함유된 황색색소 성분인 curcuminoid로 curcumin (Ⅰ)과 그의 유도체 (curcumin Ⅱ, Ⅲ)로 구성된 페놀계 혼합물이다.[15,16] Curcuminoid의 약리작용으로는 항산화,[17,18] 항혈전,[19] 혈중 콜레스테롤 저하[20] 및 간에 과다축적된 중성지방 분해작용[21]이 보고되고 있으며, 세포 사멸을 유도하여 암세포의 성장과 전이를 억제한다는 보고도 있다.[22] 또한, 뇌에서 일어나는 베타아밀로이드 형성을 억제하므로써 노인성치매 치료와 예방에도 효과가 있을 것으로 기대되고 있다.[23]

혈소판 응집과 혈관 prostacyclin (PGI_2) 합성에 대한 curcumin의 효과는 쥐 실험에서 100~300 mg/kg 처리시 adenosine diphosphate (ADP), epinephrine (adrenaline)과 collagen에 의해 유발되는 혈소판 응집을 강하게 억제하고 PGI_2의 증가를 나타내었다.[24] 또한, Streptozotocin에 의해 유발된 당뇨성 쥐에 0.5% curcumin을 8주간 투여한 결과 혈중 콜레스테롤 저하가 관찰되었고, cholesterol-7α-hydroxylase의 활성도도 매우 증가하는 것으로 보고되었다.[25] 이 외에도 curcumin이 고콜레스테롤 식이를 시킨 토끼에서 산화 stress 감소와 동맥경화 억제 효과를 나타내었고,[26] 배양세포를 이용한 실험에서도 curcumin에 의한 혈관평활근세포의 증식억제 효과가 관찰되었다.[27] 이상의 보고들을 종합해보면, curcumin이 혈중 콜레스테롤의 저하, 혈소판 활성 및 혈액응고활성의 억제, 혈관평활근세포의 증식억제 효과를 나타내므로 기타 다른 소재들과 최적의 배합조건을 확립하면 심혈관계 질환을 효과적으로 예방할 수 있을 것으로 사료된다.

따라서, 본 연구에서는 울금 추출물 (이하 curcuminoid로 표기함)를 주원료로 하면서 선행된 연구[28]에서 콜레스테롤 억제 및 항혈소판 활성을 나타낸 다른 천연물 소재인 catechin, 포도종자 추출물 등을 추가하여 최적의 새로운 혼합물을 제조한 후, 실험동물 모델에서 *ex vivo* 및 *in vivo* 실험을 통해 이 혼합물이 혈중 지질에 미치는 영향 및 혈소판활성 억제활성을 조사하고자 하였다. 또한, 세포배양 실험을 통해 혼합물에 사용한 curcuminoid가 혈관평활근세포의 증식과 이동에도 실제로 억제효과를 갖는지 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 울금 및 기타 천연식물 소재 주출물

본 실험에 사용한 천연식물 유래 소재로 사용된 녹차 · 홍차 · 은행잎 · 포도종자추출물 분말과 DHA, EPA는 (주)바이오버드 (한국)에서 공급받아 사용하였다. 주원료 중의 하나인 curcuminoid는 (주)바이오버드 연구소에서 울금 원물으로부터 acetone과 hexane 추출공정을 수행하여 curcuminoid가 95%이상 함유된 추출물을 사용하였다. 추출물의 순도측정을 위해 reversed-phase HPLC column (Spherisorb 3 μm ODS2 4.6 × 150 mm, Waters Corp., MA, USA)을 사용하였으며, 고정상으로 0.1% trifluroacetic acid (TFA)가 함유된 증류수를, 이동상으로 acetonitrile을 사용하였다. 시료 주입 전 0.1% TFA가 함유된 물을 1 ml/min의 속도로 주입하여 column을 평형 시킨 후 ethanol에 녹인 curcuminoid용액 100 μl을 주입하였다. 0.1% TFA가 함유된 물에 acetonitrile 0~100%의 gradient를 20분간 주고, 427 nm의 파장에서의 흡광도를 측정하였다. 표준 curcuminoid를 이용한 표준곡선을 통하여 HPLC를 이용한 정량법의 유효성을 확인하였고 시료 중의 curcuminoids 양을 정량분석하였다.

2. 실험 동물 및 실험식이

혈소판 응집활성 측정과 고지혈 모델 유도를 위한 실험동물은 각각 체중 200~230 g, 60~70 g 정도의 male Sprague Dawley 쥐를 (주)대한바이오링크 (한국)로부터 구입하여, 5일 동안 기본사료 (삼양유지사료)로 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 사육환경 온도는 22 ± 2.0℃, 습도 55 ± 5.0%로 유지하였고, 조명주기는 12시간으로 조절하였다. 식이는 매일 오전 10~11시 사이에 물과 함께 공급하였고, 식이량은 식이를 공급할 때 마다, 체중은 1주일에 한번 씩 측정하였다.

고지혈 모델 유도를 위해 실험기간에 사용한 실험식이는 정상식이, 고지방식이, 고지방 · curcuminoid식이, 고지방 · 천연식물혼합물식이 4종류이며, 정상식이 (Normal)는 미국 영양학회에서 발표된 AIN-93 실험동물용 식이조성[29]에 따라 제조하였고, 고지방식이는 정상식이의 corn starch와 corn oil 일부를 대체하여 10% lard를 첨가하여 제조하였다. 고지방 · curcuminoid 식이와 고지방 · 천연식물혼합물 식이는 고지방식이의 일부 corn starch를 대체하여 curcuminoid와 천연식물혼합물을 각각 2% 첨가하였

다. 각 실험식이의 조성은 Table 1과 같다. 항혈소판응집 및 고지혈증 개선 활성을 지닌 천연식물 혼합물의 제조는 선행된 *in vitro* 연구[27]에서 측정된 항혈전 활성 결과와 이미 보고된 자료 및 국가에서 공시한 식품공전을 근거로 식품 소재로 사용 가능한 소재들을 엄선하여 Table 2와 같이 제조하였다.

실험식이 배합에 사용된 모든 구성 성분은 ICN Pharmaceuticals, Inc. (Irvine, CA, USA)에서 구입하였고, 혈소판 응집활성 측정에 사용한 collagen은 Chrono-Log Co. (Havertown, PA, USA), 양성 대조약물로 이용된 aspirin은 Sigma Co. (St. Louis, Missouri, USA), 콜레스테롤, 중성지방 등의 혈중 지질관련 측정시약은 (주)아산제약 제품을 구입하여 사용하였다.

Table 1. Compositions of experimental diets (g %)

Components	Normal	Control	Curcuminoids	Mixture
Casein	15	15	15	15
Corn starch	60	50	48	48
Sucrose	10	10	10	10
Corn oil	5	4	4	4
Lard	–	10	10	10
Cholestrol	–	1	1	1
Cellulose	5	5	5	5
Vitamin[1]	1	1	1	1
Mineral[2]	3.5	3.5	3.5	3.5
DL-Methionine	0.3	0.3	0.3	0.3
Choline bitartarate	0.2	0.2	0.2	0.2
Curcumioids[3]	–	–	2	–
Extracts mixture	–	–	–	2

1) AIN-93G Mineral mixture (%): Calcium Carbonate 35.7, Monopotassium Phosphate 19.6, Potassium Citrate Monohydrate 7.078, *Sodium Chloride 7.4, Potassium Sulfate 4.66, Magnesium* Oxide 2.4, Ferric Citrate 0.606, Zinc Carbonate 0.165, Manganese Carbonate 0.063, Cupric carbonate 0.03, Potassium Iodate 0.001, Sodium Selenate Anhydrous 0.00103, Ammonium Molybdate. $4H_2O$ 0.000795, Sodium Metasilicate.$12H_2O$ 0.0275, Lithium Chloride 0.00174, Boric Acid 0.008145, Sodium Fluoride 0.00635, Nickel Carbonate 0.00318, Ammonium Vanadate 0.00066, Powdered Sugar 22.1.
2) AIN-93 Vitamin mixture (g/kg): Nicotinic Acid 3.00, D-Calcium Pantothenate 1.60, Pyridoxine HCL 0.70, Thiamine HCL 0.60, Riboflavin 0.60, Folic Acid 0.20, D-Biotin 0.02, Vitamin B12 (0.1% triturated in mannitol) 2.50, α-Tocopherol Powder (250 U/g) 30.00, Vitamin A Polmitate (250,000 U/g) 1.60, Vitamin D3 (400,000 U/g) 0.25, Phylloquinone 0.075, Powderde Sucrose 959.655
3) Curcuminoids contain 18% Curcuma longa

Table 2. Compositions of a new natural products mixture

Name of component	Effective content	Optimum content	Property
Curcuma longa (tumeric)	5 – 40%	18.0%	Powder
Theae sinensis (black tea)	1 – 10%	6.5%	Powder
Camelliae sinensis (green tea)	1 – 10%	5.0%	Powder
Vitis vinifera (grape seed)	0.5 – 5%	1.5%	Powder
Gingko folium (gingko leaf)	0.1 – 1%	0.5%	Powder
DHA/EPA (fish oil)	30 – 80%	60.0%	Oil
Others	2 – 20%	8.5%	Powder

3. Curcuminoid 및 이를 함유한 혼합물의 심혈관계에 미치는 영향조사를 위한 실험설계

본 연구는 curcuminoid의 *in vitro* 실험 (Ⅰ)과 curcuminoid와 천연식물 혼합물의 *in vivo* 실험 (Ⅱ)으로 크게 두 가지로 나누어 수행하였다. 구체적으로 실험 (Ⅰ)은 혈관평활근세포 증식 억제와 이동에 대한 억제효과를 조사하였고, 실험 (Ⅱ)는 고지방식이를 하였을 때 curcuminoid와 울금함유 천연혼합물의 섭취가 혈중 지질상태 변화와 혈소판 응집 활성에 미치는 억제효과를 측정하였다. 특히, 실험 (Ⅱ)의 경우 고지방식이를 시킨 후 curcuminoid와 천연혼합물에 의한 혈중 지질상태 변화 조사를 위하여 정상식이 (Normal), 고지방식이 (Control), 고지방 · 울금추출물식이 (Curcuminoids), 고지방 · 천연식물 혼합물식이 (Mixture)의 4그룹으로 실험군을 구성하였고, 혈소판 응집 활성 측정을 위해서는 정상식이를 하면서 양성 대조약물인 aspirin (100 mg/kg body weight), curcuminoid (100 mg/kg body weight), 천연식물 혼합물식이 (100 mg/kg body weight)를 투여하는 실험군으로 나누었다. 총 실험군은 모두 8군으로 비슷한 체중 분포를 보이는 쥐를 각 군별로 8마리씩 총 64마리를 사육했으며, 고지혈군에서는 고지방식이와 각각의 시료를 7주동안 공급하였고, 정상군에게는 정상식이를 공급하면서 15일간 시료를 매일 일정시간에 경구투여 하였다.

실험 개시일을 0일로 하여 1주 마다 12시간 절식 후 체중을 측정하여 실험 종료일까지 동물의 체중 변화상태를 측정하였고, 전 실험 기간동안의 사료 섭취량과 체중 증가량으로 부터 식이효율[food efficiency ratio : 체중증가량 (g)/사료섭취량 (g) × 100]을 구하였다.

4. 채혈 및 혈액분석

각 실험동물은 희생시키기 전 12시간 절식시킨 후 diethyl ether로 마취시켜 복부대동맥으로부터 신선한 혈액을 채취하여 전혈 혈소판 응집능 분석에 사용하였다. 사용된 항응고제는 sodium citrate였으며, 전혈을 채취하고 남은 혈액은 4,500 × rpm으로 10분간 원심분리하여 혈장을 얻은 후 −70℃에서 보관하여 혈액분석 시 사용하였다.

원심 분리하여 얻어진 혈장 중의 중성지방은 Bucolo방법[30]에 의거한 효소 측정시약 (아산제약)을 사용하여 550 nm에서 흡광도의 변화로 비색정량하였다. HDL-콜레스테롤은 혈청 내 HDL-콜레스테롤을 제외한 콜레스테롤을 침

전시켜 제거한 후 상층액을 검체로하여 혈중 총콜레스테롤과 같은 방법으로 측정하였다. LDL-콜레스테롤은 분리시약으로 혈청 내 LDL-콜레스테롤만을 침전시켜 역시 총콜레스테롤과 같은 방법으로 측정하였다. 혈중 유리 콜레스테롤, 콜레스테롤 에스테르의 측정도 효소법을 사용하여 비색정량하였다.

혈소판응집 활성측정은 전기전도 측정법 (impedance method)으로 collagen을 처리한 후, 혈소판응집 측정기 (Chrono-log Co., Havertown, PA, USA)를 이용하여 다음과 같이 수행하였다.[31] 먼저, 예열된 실리콘처리 응고분석 cuvette에 생리식염수 0.45 ml과 전혈 0.5 ml를 교반막대기와 함께 잘 섞어 37℃에서 3분간 가온한 후 collagen (1 mg/ml)를 첨가한 다음 혈소판 응집 억제능을 측정하였다.

5. Curcuminoid가 혈관평활근 세포증식에 미치는 영향 측정

1) 평활근세포증식억제 효과

4대째 계대배양 중인 쥐 대동맥유래 평활근세포를 10% fetal bovine serum (FBS : Gibco BRL, Grand Island, NY., USA)와 항생제가 첨가된 Dulcecco's Modified Eagle Medium (DMEM : Gibco BRL, Grand Island, NY., USA) 배지에 세포 수가 10^4/ml의 농도가 되도록 부유시킨 다음, 96 well plate의 각 well에 100 μl씩 분주하여 37℃, 5% CO_2 배양조건에서 24시간 배양하였다. 24시간 후 각 well로부터 배양액을 제거하고 0.2% FBS가 함유된 DMEM배지로 3일간 저혈청처리 (serum starvation)를 수행하였다. 72시간 후 배양액을 제거하고 여러 가지 농도의 울금추출물 (curcuminoids 95%이상)을 함유한 5% FBS DMEM을 100 μl씩 각 well에 처리하여 37℃, 5% CO_2 배양조건에서 배양하였다. 48시간 배양 후에 WST-1시약 (Takara BIO Inc., Shiga, Japan)을 각 well 당 10 μl씩 처리한 뒤 동일 조건에서 추가배양한 다음 발색정도로 세포증식 억제효과를 분석하였다. 이 방법은 제조사의 실험지침에 따라 수행하였으며 원리는 세포증식에 의한 미토콘드리아 내의 succinate-tetrazolium-reductase 활성 증가로 나타난 formazan 색소량의 흡광도 변화를 ELISA microplate reader로 측정하였다. 처리한 curcuminoids의 농도에 따른 흡광도 값을 대조군과 각각 비교하여 시험군의 세포 생존율 값을 산출 하였다.

2) 평활근세포 이동 (Migration) 억제효과

10% FBS를 포함한 DMEM 배지에서 배양된 평활근세포를 trypsin-EDTA로 처리해 배양 plate에서 떼어낸 후, 생리적 식염수로 세 번 세척한 다음 FBS를 포함하지 않은 DMEM 배지로 교체하였다. 준비된 세포 100 μl (5×10^4/well)를 Transwell plate (Corning Inc., NY, USA)의 상단 well에 넣고, 하단 well에는 1% FBS와 10 ng/ml platelet-derived growth factor (PDGF, Lake Placid, NY, USA)가 포함된 배지를 넣어준 다음 37℃에서 12시간 동안 방치하였다. 상단 well을 꺼내어 4% paraformaldehyde용액으로 세포를 고정시킨 후 well의 막 윗부분의 세포를 제거하고 염색한 다음, 막을 통과해 이동한 세포의 수를 측정하였다.

6. 통계 처리

실험 결과는 SPSS 11.0을 이용하여 각 실험군의 평균과 표준편차를 구하였고, ANOVA 및 Duncan's multiple range test에 의해 $p<0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 울금추출물의 유효성분의 정량 및 *in vitro* 실험

1) 울금추출물 분말에 함유된 Curcuminoids의 정량

울금원물로부터 분리정제한 추출물 분말 5 μg을 HPLC 분석을 통하여 정량분석 한 결과 4.77 μg의 curcuminoid를 얻어 95.4%의 순도를 나타냈다 (Fig. 1).

2) 울금추출물이 혈관평활근 세포증식 및 이동에 미치는 영향의 측정

본 실험에 사용한 curcuminoid (95% 이상 함유)가 혈관평활근 세포의 증식에 미치는 영향을 조사한 결과, Fig. 2

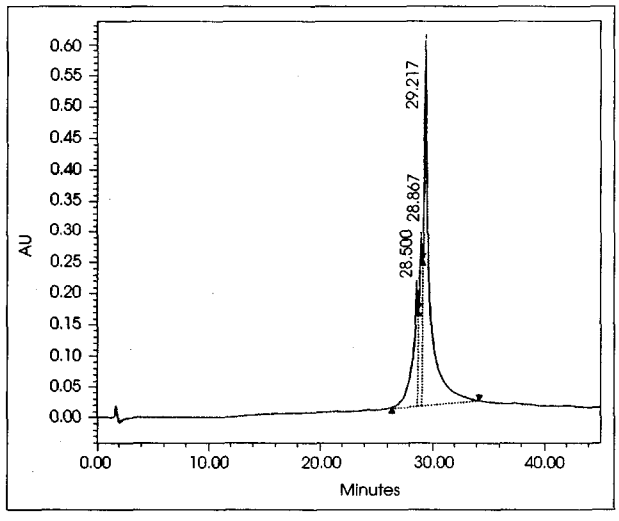

Fig. 1. HPLC analysis of curcuminoids from *Curcuma longa L.* extract.

에서 보듯이 curcuminoid가 농도 의존적으로 평활근 세포 증식을 강하게 억제함을 확인할 수 있었으며 이를 통해서 측정한 IC_{50} 값은 약 68 μM 이었다.

또한, curcuminoid가 혈관평활근 세포의 이동에 억제효과가 있는지 확인하기 위한 Transwell plate를 이용한 실험에서도 농도의존적으로 대조군에 비해 각각 61%와 99%로 매우 강하게 억제함을 확인할 수 있었다 (Fig. 3).

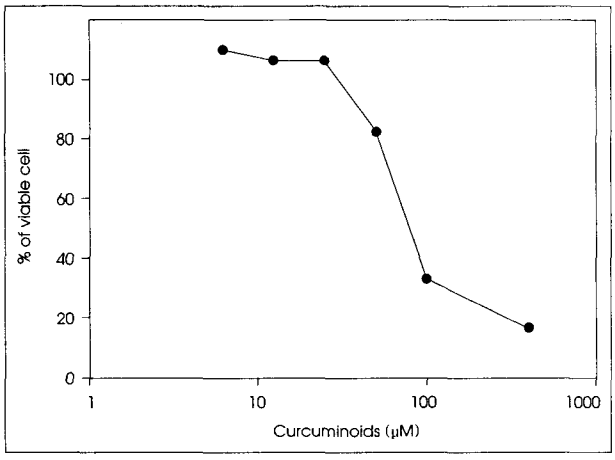

Fig. 2. Inhibitory effect of curcuminoids on vascular smooth muscle cell proliferation.

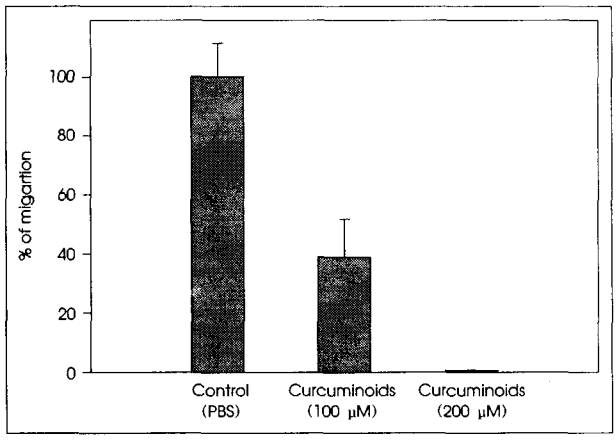

Fig. 3. Inhibitory effect of curcuminoids on vascular smooth muscle cell migration.

2. 울금 추출물과 천연식물 혼합물의 *in vivo* 실험

1) 실험동물의 식이섭취량, 체중 증가량 및 사료 효율

Table 3에서 식이섭취량과 체중 증가량은 정상군에 비해 고지혈 유도군에서 낮은 경향을 보였으나, 사료효율에 대한 각군 간에 유의적인 차이는 없었다 (Table 3).

2) 혈장의 지질 농도의 변화

Curcuminoid와 천연식물 혼합물 (mixture)이 심혈관계에 미치는 영향을 조사하기 위하여 고지혈 실험군의 혈장 지질 농도 변화를 측정하였다 (Table 4).

대조군의 총 콜레스테롤 농도는 212.6 mg/dl로 정상군보다 3배 정도 증가하였고, curcuminoid와 혼합물 (mixture)식이 섭취군에서 각각 약 24%, 29%씩 유의하게 감소함을 확인하였다. 이는 curcuminoid 단독 투여군보다 이를 포함한 혼합물식이 섭취가 총 콜레스테롤 저하에 보다 더 효과적인 것으로 나타났다.

고지혈식이 동물군 (대조군)에서의 콜레스테롤 에스테르와 유리 콜레스테롤 수치는 정상식이 군 (정상군)에 비해

Table 3. Body weight gain, food intake, food efficiency ratio in experimental groups

Groups	Food intake (g/7weeks)	Body weight gain (g/7weeks)	FER[1] (%)
Normal	[2]490 ± 41.3	194 ± 3.90	40.1 ± 5.63[N.S.3]
Control	338 ± 33.1	127 ± 13.7	37.6 ± 3.92
Curcuminoids	332 ± 32.9	130 ± 20.5	39.0 ± 6.25
Mixture	327 ± 40.1	137 ± 11.2	41.9 ± 3.51

1) Food efficiency ratio (FER) = [(Body weight gain for experimental period) / (Food intake for experimental period) × 100]
2) Values are Mean ± SD, n = 8
3) Not significant at $p < 0.05$

Table 4. Effects of curcuminoids and mixture on cholesterol, atherogenic index, and triglyceride after oral treatment in the animal experiments

	Normal	Control	Curcuminoids	Mixture
Total-cholesterol (mg/dl)	[1]73.0 ± 1.6[c2]	212.6 ± 12.4[a]	160.8 ± 7.9[b]	151.9 ± 8.4[b]
Free-cholesterol (mg/dl)	4.0 ± 0.3[b]	16.7 ± 2.5[a]	12.5 ± 0.7[a]	12.7 ± 2.4[a]
Cholesterol ester (mg/dl)	69.0 ± 1.3[c]	195.9 ± 15.0[a]	167.3 ± 7.2[ab]	139.1 ± 14.0[b]
HDL-cholesterol (mg/dl)	53.2 ± 1.1[a]	20.4 ± 1.7[b]	29.9 ± 1.3[c]	30.9 ± 1.4[c]
LDL-cholesterol (mg/dl)	12.0 ± 0.5[c]	77.1 ± 6.4[a]	56.3 ± 2.5[b]	52.4 ± 3.3[b]
HDL/LDL Ratio	4.46 ± 0.2[a]	0.28 ± 0.06[b]	0.54 ± 0.05[c]	0.58 ± 0.08[c]
Atherogenic Index[3]	0.37 ± 0.05[c]	9.8 ± 1.1[a]	5.09 ± 0.4[b]	4.32 ± 0.9[b]
Triglyceride (mg/dl)	35.8 ± 0.9[c]	65.0 ± 2.0[a]	54.3 ± 1.4[ab]	44.7 ± 1.9[b]

1) Values are Mean ± SD, n = 8 in each group
2) Values in each raw not sharing a common superscript letter are significantly different, $p < 0.05$
3) Atherogenic Index = (Total Cholesterol -HDL Cholesterol) /HDL-Cholesterol

각각 약 3배, 4배 높은 수치를 나타냈는데, 이는 고지혈식이 시 특징적으로 나타나는 총 콜레스테롤의 농도 증가와 동일한 양상을 보였다. 한편, curcuminoid과 혼합물 (mixture) 식이 투여군의 콜레스테롤 에스테르 농도와 유리 콜레스테롤 농도는 대조군에 비해서 유의적으로 감소되었다. 이를 통해서 curcuminoid 단독 투여보다는 천연식물 혼합물 투여가 혈중 지질농도를 개선하는데 보다 효과적임 알 수 있었다. 혈장 LDL-콜레스테롤의 증가와 HDL-콜레스테롤의 저하는 심혈관질환 발생의 위험요인으로 알려졌으므로 울금추출물 자체와 이를 함유한 천연 혼합물의 유효성을 살펴보기 위하여 LDL-콜레스테롤과 HDL-콜레스테롤 농도변화를 비교측정하였다.

대조군의 HDL-콜레스테롤 농도는 정상군에 비해 현저히 (61.6%) 감소한 반면, 울금추출물 투여군과 혼합물 투여군에서의 HDL-콜레스테롤 농도는 정상군에 비해 각각 43.8%, 41.9% 감소한 결과를 보였다. 이는 울금추출물과 혼합물 투여 시 대조군에 비해 각각 46.6%와 51.5%의 HDL-콜레스테롤의 상승효과를 나타낸다고 볼 수 있다. 한편, 고지혈식이를 시킨 대조군에서의 LDL-콜레스테롤 농도는 정상식이를 시킨 정상군에 비해 약 6.4배 정도로 현저하게 증가함을 관찰할 수 있었다. 울금추출물 투여군과 혼합물 투여군에서의 LDL-콜레스테롤 농도는 대조군에 비해 각각 27%, 32%씩 감소시키는 결과를 보였다. 이는 선행된 연구결과[28]에서는 확인하지 못했던 LDL-콜레스테롤 개선효과를 매우 증가시킨 결과로써 울금을 포함한 혼합물이 고지혈 개선에 상당히 영향을 준 것으로 설명할 수 있다. 또한, 이상의 결과를 통합하여 HDL/LDL-콜레스테롤의 비율과 동맥경화지수를 비교한 결과, Table 4에서 보듯이 총 콜레스테롤과 HDL-콜레스테롤의 상관관계를 나타내는 동맥경화지수 (atherogenic index)의 경우, 울금추출물 투여군과 혼합물 투여군의 동맥경화지수는 대조군에 비해 각각 48%, 56%의 감소효과를 보였으며, 혼합물 투여가 울금 추출물 단독투여보다 좀 더 동맥경화지수 개선효과 (17%)를 나타내었다.

중성지방의 농도 변화에서도 콜레스테롤농도 증가와 유사하게 정상군에 비해 대조군이 약 1.8배 증가하였으며, 울금추출물 투여군과 혼합물 투여군에서의 중성지방 농도는 대조군에 비해 각각 15%, 31% 정도 감소된 결과를 보였다. 이러한 사실은 curcuminoid를 포함한 천연식물 혼합물이 중성지방 농도 저하에도 효과적임을 암시하고 있다. 이상의 결과를 종합해보면, 본 실험에 사용한 혼합물의 고지혈증 개선 효과가 선행된 연구[28]에서 사용된 기존의 혼합물보다 HDL-콜레스테롤은 5배 이상 증가하였고, LDL-콜레스테롤은 28%, 중성지방은 1.2배 감소함을 보여주고 있는데, 그 차이는 새로운 소재인 curcuminoid 자체의 약리활성과 기존의 혼합물에서 사용되었던 일부 소재 (예 ; 녹차의 카테킨 함량을 50%이상인 것을 사용)의 유효성분 농도의 증가에 기인한 것으로 추정하고 있다.

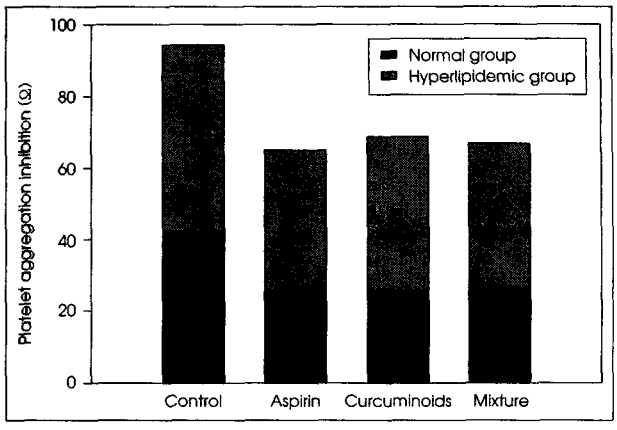

Fig. 4. Effect of curcuminoids and mixture on platelet aggregation activity after oral treatment in the animal experiments. Bars with different alphabet were significantly different at $p < 0.05$ between groups.

3) 고지혈 식이 동물군과 정상 식이 동물군에서의 혈소판응집 활성의 변화

Fig. 4는 전혈을 이용한 전기전도도 측정방법을 통하여 일반 실험동물 및 고지혈 실험동물에서 혈소판 응집활성 변화를 나타낸 것이다. 정상식이 실험동물에서의 혈소판 응집 억제효과를 살펴본 결과, 대조군에 비해 아스피린, 울금추출물, 혼합물 투여 시 각각 24.6%, 15.8%, 23.1% 정도의 혈소판응집 억제효과를 관찰할 수 있었다. 고지혈식이 실험동물 모델에서 혈소판 응집활성은 정상식이군에 비해 약 1.8배 정도의 강한 혈소판 응집활성을 나타냈는데, 이는 혈액 내 높은 콜레스테롤 농도가 혈소판응집을 비롯한 혈전형성에 밀접한 관련이 있을 가능성을 보여주고 있다. 고지혈식이를 시킨 동물군에서 혈소판응집 활성을 조사한 결과, 양성 대조군으로 아스피린을 경구투여한 군, curcuminoid만 단독 투여한 군, 혼합물 (mixture)을 투여한 군에서의 혈소판응집은 대조군에 비해 각각 31.2%, 21.1%, 29.1%의 억제효과를 나타내었다. 이상과 같이 두 실험군에서 혼합물의 억제 효과가 양성대조군인 아스피린 투여군과 유사하게 나타난 것은 혼합물에 사용된 특정소재의 직접적인 항혈소판 활성과 curcuminoid의 고지혈증 개선에 의한 상승효과로 생각된다. 특히, 선행된 연구결과보다 항혈소판 활성이 증가된 이유 중의 하나는 주성분 중의 하나인 녹차의 카테킨 함량이 기존 소재보다 2~3배 높은

것을 사용하였기 때문일 것으로 생각된다.

또한, 정상식이 섭취군과 고지방식이 섭취군에서의 혈소판응집 억제활성 차이는 매우 흥미로운 연구결과로써, curcuminoid와 이를 함유한 혼합물의 혈소판 응집억제 활성과 콜레스테롤 농도 변화 간의 정확한 기전을 규명한다면 의학적으로 중요한 정보를 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

요약 및 결론

본 연구에서는 curcuminoid와 이를 함유한 천연식물 혼합물이 심혈관질환의 독립적인 위험요인으로 알려진 고지혈증과 혈전 형성에 미치는 영향을 알아보기 위하여, curcuminoid의 혈관평활근 세포 증식 및 이동에 대한 *in vitro* 실험 및 고지혈식이 동물모델과 정상식이 동물을 이용한 고지혈증 개선효과와 항혈소판 개선효과를 조사하였다.

Curcuminoid의 혈관평활근 세포 증식 억제활성 즉, IC_{50} 값은 본 실험에서 확립된 분석조건에서 약 68 μM 값을 나타냈으며, 혈관평활근 세포의 이동도 매우 강하게 억제한다는 사실을 확인하였다. 심혈관질환 예방에 보다 효과적인 혼합물을 만들기 위해 curcuminoid를 주원료로 하고, 이미 선행된 연구에서 확인한 천연식물 소재들을 이용하여 새로운 제형의 천연혼합물을 제조하였다. 또한, 이들의 생체 내 활성을 확인하기 위해 각각의 실험동물에 경구투여한 다음 혈액을 채취하여 항혈전활성과 항고지혈활성을 분석하였다. 즉, 고지혈식이 실험동물 군에서 curcuminoid 단독투여와 이를 함유한 혼합물 (mixture)를 7주 동안 경구투여한 결과, 현저한 혈중 내 지질 개선효과를 나타내었다. 두 실험군 모두에서 총 콜레스테롤, 유리 콜레스테롤, 콜레스테롤 에스테르, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, 중성지방의 변화가 각각 24.4%와 28.6%의 감소, 25.1%와 24.0% 감소, 14.6%와 29.0% 감소, 46.6%와 51.5%증가, 27.0%와 32.0% 감소, 15.0%와 31.0%감소 등 유의하게 개선되었다. 특히, curcuminoid 단독투여와 이를 함유한 혼합물 (mixture) 모두, HDL-콜레스테롤의 증가와 LDL-콜레스테롤의 감소로 동맥경화 지수가 대조군에 비해 각각 48.0%와 56% 이상 현저히 감소되었다.

혈전예방효과를 살펴보기 위하여 7주간 고지혈식이를 투여한 실험동물에서 혈소판응집 억제효과를 측정한 결과, 대조군에 비해 curcuminoid 단독투여군과 이를 포함한 혼합물투여군에 각각 21.1%, 29.1%의 억제효과를 나타냈다. 이는 양성대조군으로 투여한 아스피린 투여군의 31.2% 억제효과와 혼합물의 혈소판응집 효과가 거의 유사한 결과를 보여주고 있어 본 실험에서 제조한 혼합물이 혈중 내 지질개선 뿐 아니라 혈전예방에도 매우 효과적이라는 사실을 시사하고 있다. 이러한 결과를 종합해보면, curcuminoid의 도입과 유효성분이 증강된 식물소재를 이용한 새로운 제형의 혼합물이 심혈관질환의 주요 위험인자인 혈중 내 콜레스테롤의 저하, 지질함량의 개선, 혈소판의 응집억제 등을 통해 질환의 예방과 치료에 기여를 할 것으로 기대된다.

Literature cited

1) Okuyama T, Naru T, Kurata H, Wang JD, Hashimoto T, Takeuchi K. Hematological studies on naturally occurring substances. Part I. *J Med Pharm Soc WAKAN-YAKU* 5: 167, 1988
2) Goldberg DM. Does wine work? *Clin Chem* 21: 14-16, 1995
3) Harris WS, Connor WE, McMurry MP. The comparative reductions of the plasma lipids and lipoproteins by dietary polyunsaturated fats: Salmon oil versus vegetable oils. *Metabolism* 32: 179, 1983
4) Sumi H, Hamada H, Tsushima H, Mihara H, Muraki H. A novel fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto: a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experientia* 43: 1110-1111, 1987
5) Yamaguchi Y, Hayashi M, Yamazoe H, Kunitomo M. Preventive effects of green tea extract on lipid abnormalities in serum, liver and aorta of mice fed an atherogenic diet. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 97: 329-337, 1991
6) Muramatsu K, Fukuyo M, Hara Y. Effect of green tea catechins on plasma cholesterol level in cholesterol-fed rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 32: 613-622, 1986
7) Stoner GD, Mukhtar H. Polyphenols as cancer chemopreventive agents. *J Cell Biochem* 22 Suppl: 169-180, 1995
8) Kang WS, Chung KH, Chung JH, Lee JY, Park JB, Zhang YH, Yoo HS, Yun YP. Antiplatelet activity of green tea catechins is mediated by inhibition of cytoplasmic calcium increase. *J Cardiovasc Pharmacol* 38: 875-884, 2002
9) Hwang KC, Lee KH, Jang YS, Yun YP, Chung KH. Epigallocathechin-3-gallate inhibits bFGF-induced intracellular signaling transduction pathway in rat aortic smooth muscle cell. *J Cardiovasc Pharmacol* 39: 271-277, 2002
10) Kang WS, Lim IH, Yuk DY, Chung KH, Park JB, Yoo HS, Yun YP. Antithrombotic activities of green tea catechins and (−)-epigallocatechin gallate. *Thromb Res* 96: 229-237, 1999
11) Kim YT, Kim WK, Oh HI. Screening and identification of the fibrinolytic bactierial strain from Chungkook-jang. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 23(1): 1-5, 1995
12) Choi NS, Kim SH. Pattern of the activity of fibrinolytic enzyme secreted from Bacillus amyloliquefaciens isolated from Doen-Jang. *Kor J Hemost Thromb* 5: 139-145, 1998
13) Kim HK, Kim GT, et al. Characterization of a novel fibrinolytic enzyme from Bacillus sp. KA38 originated from fermented fish. *J Ferment Biotech* 84: 307-312, 1997
14) Chung YK, Yang WS, Kang JO, Kong IS, Kim JO. Fibrinolysis of fermented Kimchi. *Kor J Life Sci* 5(4): 203-210, 1995

15) Paolo S, Ester S. Review on some plants of Indian traditional medicine with antioxidant activity. *J Ethnopharm* 72: 23-43, 2000
16) Ammon HP, Wahl MA. Pharmacology of Curcuma longa. *Planta Med* 57: 1-7, 1999
17) Jitoe VR, Masuda T, Tengah IGP, Suprapta DN, Gara IW, Nakatani N. Antioxidant activity of tropical ginger extracts and analysis of the contained curcuminoids. *J Agri Food Chem* 40: 1337-1340, 1992
18) Meydani M. Dietary antioxidants modulation of aging and immune-endothelial cell interaction. *Mech Ageing Dev* 111: 123-132, 1999
19) Bukhtiar HS, Zafar N, Shamin AP, Asad R, Hammad M, Sheikh AS, Anwar HG. Inhibitory effect of Curcumin, a food spice from turmeric, on platelet-activating factor- and Arachidonic acid-mediated platelet aggregation through inhibition of thromboxane formation and Ca^{2+} signaling. *Biochem Pharm* 58: 1167-1172, 1999
20) Babu PS, Srinivasan K. Hypolipidemic action of curcumin, the active principle of turmeric (Curcuma longa) in streptozotocin induced diabetic rats. *Mol Cell Biochem* 166: 169-175, 1997
21) Akira A, Teruo M. Dietary Curcuminoids prevent high fat diet-induced lipid accumulation in rat liver and epididymal adipose tissue. *J Nutr* 131: 2932-2935, 2001
22) Lin JK, Lin-shiau SY. Mechanisms of cancer chemoprevention by curcumin. *Proc Natl Sci Counc* 25(2): 59-66, 2001
23) Giselle PL, Teresa C, Fusheng Y, Walter B, Sally AF, Greg MC. The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. *J Neurosci* 21 (21): 8370-8377, 2001
24) Srivastava R, Puri V, Srimal RC, Dhawan BN. Effect of curcumin on platelet aggregation and vascular prostacyclin synthesis. *Arzneimittelforschung* 36: 715-717, 1986
25) Ramirez-Tortosa MC, Mesa MD, Aguilera MC, Quiles JL, Baro L, Ramirez-Tortosa CL, et al. Oral administration of a turmeric extract inhibits LDL oxidation and has hypocholesterolemic effects in rabbits with experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis* 147: 371-378, 1999
26) Quiles JL, Mesa MD, Ramirez-Tortosa CL, Aguilera CM, Battino M, Gil A, et al. Curcuma longa extract supplementation reduces oxidative stress and attenuates aortic fatty streak development in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22: 1225-1231, 2002
27) Zhang W, Liu D, Wo X, Zhang Y, Jin M, Ding Z. Effects of Curcuma Longa on proliferation of cultured bovine smooth muscle cells and on expression of low density lipoprotein receptor in cells. *Chin Med J (Engl)* 112: 308-311, 1999
28) Kwon ST, Park EH, Paek GY, Jang YS, Hwang JK, Pyun YR, Kim SB, Yed IH, Chung KH. Anti-thrombotic and anti-hypercholesterolemic effects of natural plants extract mixture. *Kor J Hemost Thromb* 6(1): 11-23, 1999
29) Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. AIN-93 purified diets for laboratory rodents final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent. *J Nutr* 123: 1939-1951, 1993
30) Bucolo G, David H. Quantitative determination of serum triglycerides by the use of enzymes. *Clin Chem* 19: 456, 1973
31) Lee HS, Kang KS, Lee BC, Yu KH. Effect of triflusal on the platelet aggregation in human whole blood. *Kor J Neur* 15: 60-66. 1997