생 약 학 회 지
Kor. J. Pharmacogn.
35(3) : 233 ~ 238 (2004)

곤충자원으로부터 항동맥경화 활성물질 탐색

박두상 · 윤미애 · 서명철 · 유하나[1] · 김주령[1] · 정태숙[1] · 박호용*
한국생명공학연구원 곤충자원연구실, [1]지질대사연구실

Screening of Anti-atherogenic Substances from Insect Resources

Doo-Sang Park, Mi-Ae Yoon, Ming-Zhe Xu, Hana Yu[1], Ju-Ryoung Kim[1], Tae-Sook Jeong[1], and Ho-Yong Park*
Insect Resources Laboratory, [1]Lipid Metabolism Research Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon 305-333, Korea

Abstract – Lipoprotein-associated phospholipase A_2 (Lp-PLA_2) is a potential biomarker of coronary heart disease and plays an important proinflammatory role in the progression of atherosclerosis. Also acyl-CoA: cholesterol acyltransferase (ACAT) and oxidized low-density lipoprotein (LDL) play a key role in atherosclerosis, respectively. And so, the inhibitory activities of the methanol extracts of 42 insect resources were examined on Lp-PLA_2, ACAT, and LDL oxidation for screening of anti-atherogenic substances. Among them, the methanol extracts of *Eurydema rugosa* significantly inhibited all of upper three activities. Several kinds of tested insects having high inhibitory effect with the methanol extracts were extracted with *n*-hexane, ethyl acetate, and acetone, and their inhibitory activities were tested.

Key words – Lp-PLA_2, ACAT, LDL-oxidation, inhibitor, atherosclerosis, insect resources

최근 관상심장질환(coronary heart diesease : CHD)으로 인한 사망률이 크게 증가하고 있으며, 그 주요 원인 중의 하나가 동맥경화(atherosclerosis)이다.[1] 동맥경화는 동맥 내막벽에 지질과 섬유질 요소가 축적되어 진행되는 염증성 질환으로서, 동맥혈관 내강이 좁아지고, 경화됨으로서 탄력성을 잃게 되는 비가역적 변성과정을 거쳐 관상동맥 등에서 혈류장애를 일으키게 되는 현상을 말한다.[2,3] 특히 혈관벽 내의 plaque 형성과 파열이 심근경색 발병에 주요한 요인으로 알려지면서 동맥경화는 혈관벽의 손상에 대한 만성 염증과정으로서 혈관의 자기방어기작에 의한 발병으로 제시되고 있다.[4] 동맥경화 예방 및 치료제의 개발을 위해서 이러한 일련의 발병과정에서 중요한 역할을 담당하는 효소 및 지질단백질의 활성을 조절하는 방법들이 제시되고 있으며, 그 중 lipoprotein-associated phospholipase A_2(Lp-PLA_2) 저해제, acyl-CoA:cholesterol acyltransferase(ACAT) 저해제, 저밀도지질단백질(low-density lipoprotein, LDL) 항산화제의 개발에 관한 보고가 급증하고 있다.[5]

*교신저자(E-mail) : hypark@kribb.re.kr
(FAX) : 042-860-4659

Lp-PLA_2는 관상심장질환의 독립적인 위험인자로 알려져 있다.[6] 혈장 Lp-PLA_2는 platelet-activating factor acetylhydrolyase(plasma PAF-AH)로도 알려져 있으며, LDL이 산화되면 Lp-PLA_2가 활성화되어 빠른 속도로 산화된 phosphophatidylcholine(PC)을 oxidized fatty acid와 lyso-PC로 분해한다.[7] 그 결과 생성된 두 가지 분해산물의 농도가 높아지면 marcrophage 축적과 관련된 만성 염증을 촉진하여 혈관질환의 진전을 가속화하는데,[8] Lp-PLA_2 저해제의 투여로 동맥벽의 지방선 생성이 감소되었다는 보고와 함께 Lp-PLA_2는 동맥경화 예방 및 치료의 타겟으로 주목받고 있다.[9,10]

ACAT은 동물조직과 세포내에서 저장형 cholesterol인 cholesteryl ester (CE)의 합성을 촉매하는 효소이며, ACAT1과 ACAT2의 두 가지 형태로 존재한다.[11,12] ACAT1은 macrophage 내에 foam cell 형성에 결정적인 역할을 하며, ACAT2는 소장 점막세포를 통해 음식물로부터 유입된 콜레스테롤의 흡수를 담당한다.[12] $ACAT1^{-/-}$ 생쥐에서 동맥병변의 형성이 감소되었으며,[13] 반면 $ACAT2^{-/-}$ 생쥐에서는 소장에서 콜레스테롤 흡수가 제한되어, 간과 혈장의 콜레스테롤 농도가 감소되었다는 보고로부터의 ACAT 저해제 개발이 고지혈증 및 동맥경화 치료를 위한 유용한 타겟이 되고 있다.[14]

콜레스테롤 증가, 특히 높은 LDL-cholesterol은 동맥경화와 관련된 질병의 위험요인으로 알려져 있다. 정상적인 LDL은 세포내에서 cholesterol 합성을 조절하는 역할을 하지만, 산화·변형된 ox-LDL은 동맥경화 발병초기에 중요한 발병요인이 된다.[15] 특히 LDL의 과산화와 구조변형을 통해 생성된 highly modified LDL (HM-LDL)의 macrophage로의 유입에 따른 foam cell의 생성 기작이 밝혀짐에 따라 LDL peroxide의 생성요인과 제거에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며,[16] 동물모델에서 LDL-항산화제의 투여로 foam cell의 형성을 억제하여 항동맥경화 효과를 나타내었다.[17]

현존 지구상의 생물 중 가장 많은 종을 차지하고 있는 곤충은 뛰어난 환경적응력으로 인해 전 세계 도처에서 성공적으로 서식하고 있을 뿐 아니라 무한한 응용 잠재력을 보유하고 있다. 그간 동맥경화 치료제의 탐색을 위하여 미생물, 식물 등을 이용하여 많은 연구가 이루어져 있으나, 재료 확보의 어려움 등으로 인하여 곤충자원에 대한 유용물질 탐색은 거의 시도되지 않은 상황이다. 본 연구에서는 곤충의 풍부한 다양성에 근거하여 곤충자원으로부터 새로운 동맥경화 치료제 개발을 위하여, 기존에 알려진 생약곤충 및 여러 곤충자원에 대한 Lp-PLA_2와 ACAT의 저해활성, LDL-항산화 활성 등을 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료 – 실험에 사용된 시료는 본 연구실에서 사육 또는 채집하거나, 대전시내 약재상에서 구입한 곤충의 methanol 추출물 또는 *n*-hexane, ethyl acetate, acetone 추출물을 확보하여 이용하였다. 각각의 곤충 추출물은 DMSO에 녹여 0.5 – 1.0 mg/ml의 농도로 제조하여 사용하였다.

시약 – [1-^{14}C] oleoyl-CoA (56 mCi/mmol, CFA 634)는 Amersham Biosciences에서 구입하였으며, [^{3}H] platelet activating factor (PAF 250 μCi, 21.50 Ci/mmole, NET 910)는 Dupont-New England Nuclear에서 구입하였고, phophate buffered saline (PBS), EDTA, DMSO 등 기타 시약은 Sigma Co.에서 구입하였다.

ACAT 부분정제[18] – 효소원으로는 흰쥐(Male Sprague-Dawley rats 250 – 300 g)의 간을 적출하여 microsome buffer A (0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, 0.01 M Tris-HCl, pH 7.4)로 세척하고 teflon-glass homogenizer로 균질화한 다음, 그 균질액을 4°C, 14,000 × g에서 20분 동안 원심분리하여 상등액을 얻었다. 이 상등액을 다시 100,000 × g에서 1시간 동안 초원심분리한 후, 침전물을 microsome buffer B (0.25 M sucrose, 0.01 M Tris-HCl, pH 7.4)를 가하여 100,000 × g에서 1시간 동안 다시 초원심분리하였다. 2차 침전물에 microsome buffer B를 첨가하여 용해시키고, 용액의 단백질 농도[19]가 10 mg/ml로 되도록 희석하고 소량으로 분주한 후, –70°C에서 보관하면서 사용하였다.

ACAT의 활성 분석 – ACAT의 활성은 Brecher와 Chan의 방법[20]을 일부 수정하여 측정하였다.[21] 4 μl 쥐 간조직의 microsomal enzyme, 20 μl assay buffer (0.5 M potassium-phosphate, 10 mM dithiothreitol, pH 7.4), 15 μl의 bovine serum albumin (essentially fatty acid free, 40 mg/ml), 2 μl cholesteol (20 mg/ml, added last), 41 μl H_2O를 혼합하여 반응용액을 만들고, 10 μl의 시료(1 mg/ml)를 가하여 37°C에서 20분 동안 전반응시킨다. 이 혼합액에 8 μl의 [1-^{14}C] oleoyl coenzyme A (0.05 μCi, final conc. 10 μM)를 첨가하여 37°C에서 25분 동안 반응시킨 후, isopropanol:hepane (4:1, v/v) 1 ml를 가해 반응을 종결하였다. 여기에 0.6 ml의 hepthane과 0.4 ml의 5배로 희석된 assay buffer (0.1 M potassium-phosphate, 2 mM dithiothreitol, pH 7.4)를 첨가한 후 교반하고, 원심분리하여 반응물인 cholesteryl oleate를 포함하는 상부의 heptane층(0.9 – 1.0 ml)을 분리한다. Heptane층 100 μl를 scintillation vail에 옮기고, 3 ml의 scintillation cocktail (Lipoluma, Lumac Co.)을 첨가하여 생성된 [1-^{14}C] cholesteryl oleate의 radioactivity (1450 Microbeta Trilux Wallac Oy, Turku, Finland)를 측정하였다. 양성대조군으로는 oleic acid anilide와 pyripyropene A를 사용하였다.[22]

LDL의 분리 – 사람의 혈장으로부터 초원심분리기(Beckman LB-70M Ultracentrifuge)를 이용하여 LDL을 분리하였다.[23] 먼저 혈액원에서 가져온 혈장에 0.04% EDTA, 0.05% NaN_3, 0.015% phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF)를 첨가하여 100,000 × g (55.2 Ti, 45,000 rpm), 4°C에서 20시간 동안 초원심 분리하였다. 상층에 떠있는 chylomicron과 VLDL을 걷어내고 나머지 하층은 NaBr (*heavy density solution*)을 이용해서 밀도를 1.063 g/ml로 맞추었다. 이를 다시 100,000 × g, 4°C에서 24시간 동안 초원심 분리한 후, 상층에 떠있는 노란색의 LDL을 분리했다. 이 LDL을 PBS(10 mM, pH 7.4)로 투석하여 고농도의 NaBr을 제거하고, 4°C에서 보관하면서 1개월 이내에 사용하였다.

Lp-PLA_2 활성 분석 – Lp-PLA_2의 활성 측정은 Boyd 등의 방법[24]을 일부 수정하여 사용하였으며,[25] 측정 표준 조건은 반응액 200 μl에 2.2 mM EDTA, 8 mM PBS (pH 7.4)와 10 μM PAF [^{3}H] PAF 0.05 μCi/tube)와 LDL 4 – 5 μg을 포함하였다. 유기용매에 녹여있는 20 μl [^{3}H] PAF (250 μCi, 21.50 Ci/mmole)와 12.5 μM Cold-PAF 2.5 μl를 질소가스 하에서 용매를 완전히 제거한 후 2.7 mM EDTA를 포함하는 10 mM PBS (pH 7.4) 3.2 ml를 첨가하여 micellar 형태의 기질(A)을 준비하였다. 시험관에 희석한 LDL 20 μl

Table I. Inhibitory effects of MeOH extracts of insect samples on Lp-PLA_2, ACAT, and LDL-oxidation

Insect samples	Order	Inhibition (%)*			
		Lp-PLA_2	ACAT	LDL-oxidation	비고
Apis mellifera (꿀벌)	Hymenoptera	1	15	0	Adult
Acantholyda parki (잣나무넓적잎벌)	Hymenoptera	29	60	30	Larvae
Aglaeomopha histrio (흰무늬왕불나방)	Lepidoptera	11	3	40	Adult
Allomyrina dichotoma (장수풍뎅이)	Coleoptera	0	21	58	Larvae
Allomyrina dichotoma (장수풍뎅이)	Coleoptera	1	9	56	Adult
Ampelophaga rubiginosa (머루박각시나방)	Lepidoptera	22	3	0	Adult
Bombycis corpus (백강잠)	Lepidoptera	31	37	6	Infected Larvae(약재)
Bombus ignitus Smith (호박벌)	Hymenoptera	0	24	28	Adult
Chionarctia nivea (흰제비불나방)	Lepidoptera	16	2	41	Adult
Cicadae Periostracum (선퇴)	Homoptera	0	23	100	Exuvium
Cryptotympana dubia (말매미)	Homoptera	33	9	0	Adult
Epilachna vigintioctopunctata (28점박이무당벌레)	Coleoptera	8	11	32	Adult
Epilachna vigintioctopunctata (28점박이무당벌레)	Coleoptera	14	33	29	Nymph
Eurydema rugosa (비단노린재)	Hemiptera	54	70	62	Adult
Formica fusca (흑개미)	Hymenoptera	0	5	0	Adult
Formica rufa (백두산홍개미)	Hymenoptera	8	13	62	Adult(약재)
Hyphantria cunea (흰불나방)	Lepidoptera	3	0	0	Larvae
Hyphantria cunea (흰불나방)	Lepidoptera	18	18	0	Adult
Mantidis Ootheca (상표초)	Orthoptera	25	21	97	Ooecium(약재)
Margattea kumamotonis (토별충)	Blattaria	8	17	14	Adult(약재)
Marumba sperchius (등줄박각시)	Lepidoptera	13	3	37	Adult
Massicus raddei (하늘소)	Coleoptera	6	2	17	Adult
Megopis sinica (버들하늘소)	Coleoptera	0	0	35	Adult
Megopis sinica (버들하늘소)	Coleoptera	10	0	33	Larvae
Meimuna opaifera (애매미)	Homoptera	22	50	100	Adult
Mylabris phalerate (반묘)	Homoptera	19	32	37	Adult(약재)
Neoligochaeta (지렁이)	Neoligochaeta	35	6	21	Adult
Neoperla quadrata (두눈강도래)	Plecoptera	16	0	34	Adult
Oides decempunctata (왕더듬이긴잎벌레)	Coleoptera	6	17	5	Adult
Oxya chinensis (벼메뚜기)	Orthoptera	0	7	0	Nymph
Pandinus cavimanus (전충)	Scorpionida	9	8	36	Adult(약재)
Platynus magnus (큰납작먼지벌레)	Coleoptera	9	0	23	Adult
Protaetia brevitarsis (흰점박이꽃무지)	Coleoptera	17	6	0	Larvae
Protaetia brevitarsis (흰점박이꽃무지)	Coleoptera	24	0	0	Adult
Psacothea hilaris (울도하늘소)	Coleoptera	0	5	66	Larvae
Scolopendra subepinipes (지네)	Myriapoda	39	23	85	Adult(약재)
Sylepta invalidalis (들명나방)	Lepidoptera	18	6	52	Adult
Sympetrum depressiusculum (고추잠자리)	Odonnata	18	17	4	Adult
Tenodera aridibolia (왕사마귀)	Orthoptera	0	4	10	Nymph
Thecodiplosis japonensis (솔잎혹파리)	Diptera	2	0	61	Larvae
Undulosa jankowskii (무늬콩박각시나방)	Lepidoptera	9	0	25	Adult
Vespa crabro flavofasciata (말벌)	Hymenoptera	13	0	94	Adult

*Test samples were treated at final concentration of 100 μg/ml for Lp-PLA_2, 100 μg/ml for ACAT, and 20 μg/ml for LDL-oxdation, respectively, and the values were expressed as mean of duplication.

(약 4 – 5 μg)와 10 μM PAF를 포함한 (A) 용액 160 μl, DMSO에 녹인 시료 20 μl (최종농도 100 μg/ml)를 첨가하여, 37°C에서 15 분간 반응시킨 후 chloroform/methanol (2:1) 용액 600 μl를 첨가하여 반응을 중지시켰으며, 1,500 × g에서 3분간 원심분리하여 유기용매층과 물층을 분리했다. 상층액(물층) 200 μl를 취하고 200 μl chloroform을 첨가하여 위의 실험을 반복하였다. 최종 상층액 100 μl를 취하여 위와 같은 방법으로 liquid scintillation counter를 이용하여 1-*O*-hexadecyl-[acetyl-^{3}H(N)]-PC로부터 생성된 [^{3}H] acetate의 radioactivity를 측정하였다. 양성대조군은 GlaxoSmithKline으로부터 분양받은 Lp-PLA$_2$ 활성저해물질인 SB-381320 (IC_{50}=55 nM)을 사용하였다.[26]

LDL-antioxidant 활성 분석 – Cu^{2+}는 LDL의 산화를 유도하는 것으로 알려져 있다. 이때 생성된 불포화 지방산의 산화물인 malondialdehyde를 thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) 방법으로 측정하여 시료의 항산화 활성을 조사하였다.[27] 양성대조군으로는 기존의 알려진 LDL-항산화제인 pdobucol을 Sigma Co.로부터 구입하여 사용하였다.

활성 저해도 – 42종의 곤충시료 추출물에 대한 Lp-PLA$_2$, ACAT, LDL-oxidation 활성 저해도는 아래와 같은 방법으로 계산하였다.

$$\text{활성 저해도 (\%)} = 100 \times \left[1 - \frac{\text{Sample value} - \text{Background value}}{\text{Control value} - \text{Background value}}\right]$$

결과 및 고찰

삼장마비, 고혈압, 동맥경화, 뇌졸중 등의 심혈관질환은 전체 사망률의 30%를 차지하며, 이 중 동맥경화는 식생활의 변화와 함께 성인병의 주된 발병 요인이 되고 있다. 지금까지의 동맥경화 치료제 연구는 LDL-콜레스테롤 강하제, HDL-콜레스테롤 조절제 및 혈관벽에 작용하는 약물로 집중되어 있었으나, 최근에는 동맥경화 또는 고지혈증의 표적특이적인 효소나 수용체들을 선택적으로 조절하는 방법을 도입하고 있다.[5] 따라서 본 연구실에서는 동맥경화/고지혈증 예방 및 치료용 선도물질을 탐색하기 위하여, 한방에서 이용되고 있는 반묘 등의 생약곤충과 인공사육과 야외채집을 통해 확보한 총 42종의 곤충시료의 methanol 추출물을 대상으로 하여 곤충자원 42종의 메탄올 추출액에 대한 *in vitro* Lp-PLA$_2$ (최종농도 100 μg/ml)와 ACAT(최종농도 100 μg/ml)의 저해활성, LDL-항산화 활성(최종농도 20 μg/ml)을 검색하여 그 결과를 Table I에 표시하였다.

42종의 곤충시료 중 *E. rugosa*의 methanol 추출물은 Lp-PLA$_2$, ACAT, LDL-oxidation에 공통적으로 강한 저해활성을 나타내었으며, 특히 Lp-PLA$_2$ 및 ACAT에 대해서는 탐색된 곤충 시료 중에서 가장 강한 저해활성을 나타내었다.

조사된 42 종의 methanol 추출물은 대체적으로 Lp-PLA$_2$에 대한 저해활성이 매우 낮았으며, 이중 미약하나마 Lp-PLA$_2$ 저해활성을 보이는 곤충시료 (*A. parki, B. corpus, C. dubia, E. rugosa, M. Ootheca, P. brevitarsis, S. subepinipes*)를 대상으로 하여 극성이 다른 용매 (*n*-hexane, ethyl acetate, acetone)를 이용한 추출물에 대한 저해활성을 조사하였다 (Table II). 특히 *A. parki*와 *P. brevitarsis*의 hexane 추출물이 각각 63%, 69%의 높은 저해활성을 나타내었으며, *C. dubia*와 *S. subepinipes*의 acetone 추출물도 각각 60%, 71%의 높은 저해활성을 나타내었다. 현재 *A. parki, P. brevitarsis*의 hexane 추출물을 이용하여 Lp-PLA$_2$ 활성저해물질의 분리가 진행 중이다.

ACAT에 대해 강한 저해활성을 보이는 곤충시료인 *A. parki, E. rugosa, M. opaifera*를 각각 *n*-hexane, ethyl acetate, acetone으로 추출하여 methanol 추출물과 저해활성을 비교하였다(Table III). *A. parki*는 mehanol 추출물에 비해 acetone 추출물이 월등히 높은 저해활성(89%)을 나타내었으며, *E. rugosa, M. opaiferas*는 *n*-hexane, ethyl acetate, acetone보다

Table II. Inhibitory effects of solvent extracts of selected insect samples on Lp-PLA$_2$

Insect samples	Inhibition (%)*			
	MeOH	*n*-Hexane	EtOAc	Acetone
Acantholyda parki	29	63	53	45
Bombycis corpus	31	-	43	39
Cryptotympana dubia	33	54	53	60
Eurydema rugosa	54	25	26	23
Mantidis Ootheca	25	14	39	39
Protaetia brevitarsis	24	69	34	58
Scolopendra subepinipes	39	28	55	**71**

*Test samples were treated at final concentration of 100 μg/ml and the values were expressed as mean of duplication. –: Not determined.

Table III. Inhibitory effects of solvent extracts of selected insect samples on ACAT

Insect samples	Inhibition (%)*			
	MeOH	*n*-Hexane	EtOAc	Acetone
Acantholyda parki	60	23	46	89
Eurydema rugosa	70	26	39	34
Meimuna opaifera	50	4	48	43

*Test samples were treated at final concentration of 100 μg/ml and the values were expressed as mean of duplication.

Table IV. Inhibitory effects of solvent extracts of selected insect samples on LDL-oxidation

Insect samples	Inhibition (%)*			
	MeOH	*n*-Hexane	EtOAc	Acetone
Allomyrina dichotoma	58	21	76	26
Cicadae periostracum	100	0	54	96
Eurydema rugosa	62	12	0	20
Formica rufa	62	20	-	20
Mantidis ootheca	97	0	32	27
Meimuna opaifera	100	25	62	45
Scolopendra subepinipes	85	8	12	83
Vespa crabro flavofasciata	94	68	100	30

*Test samples were treated at final concentration of 20 μg/ml and the values were expressed as mean of duplication.
–: Not determined.

는 methanol 추출물의 저해활성이 높은 것으로부터 활성유효성분이 비교적 극성이 높은 물질임을 추정할 수 있다.

1차 탐색 결과 곤충시료의 methanol 추출물로부터 20 μg/ml의 저농도에서 50% 이상의 LDL 항산화 활성을 나타내는 시료 8종(*A. dichotoma, C. periostracum, E. rugosa, F. rufa, M. ootheca, M. opaifera, S. subepinipes, V. flavofasciata*)을 선별하였다. 이들 시료를 대상으로 각각 *n*-hexane, ethyl acetate, acetone으로 추출하여 methanol 추출물과 LDL 항산화 활성을 비교하였다(Table IV). *A. dichotoma*는 ethyl acetate 추출물(76%)이 가장 높은 항산화 활성을 나타내었으며, *C. periostracum*는 methanol 추출물과 acetone 추출물이 각각 100%와 96%로 매우 높은 항산화 활성을 나타내었고, *V. flavofasciata*는 methanol 추출물 및 ethyl acetate 추출물이 각각 94% 및 100%로 높은 활성을 나타내었다. 반면에 *E. rugosa, F. rufa, M. ootheca, M. opaifera, S. subepinipes* 등은 다른 용매 추출물보다는 methanol 추출물이 월등히 강한 항산화 활성을 나타내어, 이들 곤충 시료가 함유한 LDL 항산화 물질들이 상대적으로 극성이 높은 물질임을 추정할 수 있었다. 현재 *M. opaifera*로부터 LDL 항산화물질을 분리하고 있다.

Lp-PLA_2, ACAT, LDL-oxidation에 공통적으로 강한 저해활성을 나타낸 *E. rugosa*는 methanol, *n*-hexane, ethyl acetate, acetone 추출물에 대해 각각 Lp-PLA_2, ACAT, LDL-oxidation 억제 활성을 측정한 결과, 공통적으로methanol 추출물만이 강한 저해활성을 나타내었다.

위에서 언급한 Lp-PLA_2 저해제, ACAT 저해제, LDL-항산화제 탐색체계로부터 선별된 곤충 시료들을 대상으로 하여 활성물질을 분리하고자 하였으며, 그 중 기지물질이지만 신규활성을 나타내는 물질[28] 및 신규물질이 분리(unpublished data)되어 곤충자원으로부터 항동맥경화 예방 및 치료제 개발을 위한 선도물질의 도출 가능성을 확인하였다. 또한 지구상에서 가장 많은 종을 가지는 곤충의 높은 다양성과 더불어 다른 생물자원들에 비해 상대적으로 많은 연구가 이루어지지 않은 분야인 점을 감안할 때, 곤충자원으로부터 새로운 활성유용물질을 분리할 수 있는 가능성이 매우 높다 할 수 있다.

결 론

Lp-PLA_2, ACAT, LDL-oxidation은 inflammatory and sclerosing arterial disease(ISAD)로 명명되기도 하는 동맥경화(atherosclerosis)의 유발에 관여하는 중요 인자들이다. 본 연구에서는 동맥경화의 예방, 치료제를 개발할 목적으로 약용곤충 및 자원 확보가 매우 어려운 곤충시료 42종의 methanol 추출물을 이용하여 Lp-PLA_2, ACAT, LDL-oxidation의 저해활성을 검색하였다. 그 중 높은 저해활성을 보이는 시료를 선별하여 극성이 다른 용매(*n*-hexane, ethyl acetate, acetone)를 이용한 추출물에 대한 저해활성을 조사하였다. 그 결과 *E. rugosa*의 methanol 추출물은 Lp-PLA_2, ACAT, LDL-oxidation에 공통적으로 강한 저해활성을 나타내었으며, *S. subepinipes*의 acetone 추출물은 Lp-PLA_2에 대해 *A. parki*의 acetone 추출물은 ACAT에 대해 강한 저해활성을 나타내었다. *C. periostracum*는 methanol 추출물과 acetone 추출물이 각각 100%와 96%로 매우 높은 LDL-항산화 활성을 나타내었고, *V. flavofasciata*는 methanol 추출물 및 ethyl acetate 추출물이 각각 94% 및 100%로 높은 LDL-항산화 활성을 나타내었다. 현재 선별된 시료들을 이용한 활성물질의 분리 및 구조규명 연구가 진행되고 있다.

감사의 말씀

본 연구는 2004년도 한국생명공학연구원 (KRIBB) 기관고유사업의 연구비 지원 및 과학기술부 국가지정연구실사업(지질대사조절소재연구실)의 공공기능 서비스 지원으로 수행되었읍니다.

인용문헌

1. Glass, C. K. and Witztum, J. L. (2001) Atherosclerosis: The road ahead. *Cell* **104**: 503-516.
2. Lusis, A. J. (2000) Atherosclerosis. *Nature* **407**: 233-241.
3. Ross, R. (1999) Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N. Engl. J. Med.* **340**: 233-241.
4. Hurt-Camejo, E., Camejo, G., Peilot, H., Oorni, K., and Kovanen, P. Phospholipase A_2 in vascular disease. (2001) *Circ. Res.* **89**: 298-304.

5. Bays, H. and Stein, E. A. Pharmacotherapy for dyslipidemia - current therapies and future agents. (2003) *Expert Opin. Pharmacother.* **4**: 1901-1938.
6. Prescott, S. M., Zimmerman, G. A., Stafforini, D. M., and Mcintyre, T. M. (2000) Platelet activating factor and related lipid mediators. *Ann. Rev. Biochem.* **69**: 419-445.
7. Packard, C. J., O'Reilly, S. J., Caslake, M. J., McMahon, A. D., Ford, I., Cooney, J., Macphee, C. H., Suckling, K. E., Krishna, M., Wilkinson, F. E., Rumley, A. and Lowe. G. D. O. (2000) Lipoprotein associated phospholipase A_2 as independent predictor of coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.* **343**: 1148-1155.
8. MacPhee, C. H., Moores, K. E., Boyd, H. F., Dhanak, D., Ife, R. J., Leach, C. A., Leake, D. S., Milliner, K. J., Patterson, R. A., Suckling, K. E., Tew, D. G., and Hickey, D. M. (1999) Lipoprotein-associated phospholipase A2, platelet-activating factor acetylhydrolase, generates two bioactive products during the oxidation of low-density lipoprotein: use of a novel inhibitor. *J. Biochem.* **338**: 479-487.
9. Macphee, C. H. (2001) Lipoprotein-associated phospholipase A_2: a potential new risk factor for coronary artery disease and a therapeutic target. *Curr. Opin. Pharmacol.* **1**: 121-125.
10. Suckling, E. S. and Macphee, C. H. (2002) Lipoprotein-associated phospholipase A_2: a tagget directed at the atheroslcerotic plaque. *Expert Opin. Ther. Targets* **6**: 309-413.
11. Chang, T. Y., Chang, C. C. Y., and Cheng, D. (1997) Acyl-coenzyme A : cholesterol acyltransferase. *Annu. Rev. Biochem.* **66**: 613-638.
12. Rudel, L. L. (2001) Acyl coenzyme A:cholesterol acyltransferade type 1 and 2 : structure and function in atherosclerosis. *Curr. opin. lipidol.* **12**: 121-127.
13. Accad, M., Smith S. J., Newland, D. L., Sanan, D. A., King, L. E. Jr, Linton, M. F., Fazio, S., and Farese, R. V. Jr. (2000) Massive xanthomatosis and altered composition of atherosclerotic lesions in hyperlipidemic mice lacking acyl CoA:cholesterol acyltransferase 1. *J. Clin. Invest.* **105**: 711-719.
14. Buhman, K. K., Accad, M., Novak, S., Choi, R. S., Wong, J. S., Hamilton, R. L., Turley, S., and Farese, R. V. Jr. (2000) Resistance to diet-induced hypercholesterolemia and gallstone formation in ACAT2-deficient mice. *Nautre Med.* **6**: 1341-1347.
15. Steinberg, D.; Parthasarathy, S.; Carew, T. E.; Khoo, J. C.; Witztum, J. L. (1989) Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.* 1989, 320, 915-924.
16. Jessup, W. and Kritharides L. (2000) Metabolism of oxidized LDL by macrophages. *Curr. Opin. lipidol.*, **11**: 473-481.
17. Bjorkhem, I., Henriksson-Freyschuss, A., Breuer, O., Diczfalusy, U. Berglund, L., and Henriksson, P. (1991) The antioxidant butylated hydroxytoluene protects against atherosclerosis. *Arterioscler. Thromb.* **11**: 15-22.
18. Erickson, S. K., Shrewsbury, M. A., Brooks, C., and Meyer, D. J. (1980) Rat liver acyl coemzyme A:cholesterol acyltransferase: its regulation *in vivo* and some of its properties *in vitro*. *J. Lipid Res.* **21**: 930-941.
19. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
20. Brecher, P. and Chan, C. (1980) Properties of Acyl-CoA : cholesterol acyltransferase in aortic microsomes from atherosclerotic rabbit. *Biochim. Biophys. Acta* **617**: 458-471.
21. Jeong, T. S., Kim, S. U., Son, K. H., Kwon, B. M., Kim, Y. K., Choi, M. U., and Bok, S. H. (1995) GERI-BP001 compounds, new inhibitors of Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase from *Aspergillus fumigatus* F37. I. Production, isolation, and physico-chemical and biological properties. *J. Antibiotics* **48**: 751-756.
22. Cho, K. H., An, S. J., Lee, W. S., Paik, Y. K., Kim, Y. K., and Jeong. T. S. (2003) Mass-production of human ACAT-1 and ACAT-2 to screen isoform-specific inhibitor: a different substrate specificity and inhibitory regulation. *Biochem. Biophysic. Res. Comm.* **309**: 864-872.
23. Havel, R. J., Edger, H. A., and Bradgon, J. H. (1955) The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.* **34**: 1345-1353.
24. Boyd, H. F., Fell, S. C. M., Flynn, S. T., Hickey, D. M. B., life, R. J., Leach, C. A., Macphee, C. H., Milliner, K. J., Moores, K. E., Pinto, I. L. (2002) N-1 substituted pyrimidine-4-ones:novel, orally active inhibitors of lipoprotein-associated phospholipase A_2 *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **10**: 2557-2561.
25. Yu, H. N., Sok, D. E., and Jeong, T. S. (2003) Inhibitory effects of natural plant extracts on lipoprotein-associated phospholipase A_2 inhibitor. *Kor. J. Pharmacogn.* **34**: 100-108.
26. Bloomer, J. C., Boyd, H. F., Hickey, D. M. B., Ife, R. J., Leach, C. A., Macphee, C. H., Miller, K. J., Pinto, I. L., Rawlings, D. A., Smith, S. A., *et al.* (2001) 1-(arylpiperazinylamidoalkyl)-pyrimidones: orally active inhibitors of lipoprotein-assiciated phospholipase A_2. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **11**: 1925-1929.
27. Ahn, B. T., Lee, S., Lee, S. B., Lee, E. S., Kim, J. G., Bok, S. H., and Jeong, T. S. (2001) Low-density lipoprotein-antioxidant constituents of *Saururus chinensis*. *J. Nat. Prod.* **64**: 1562-1564.
28. Xu, M.-Z., Lee, W. S., Kim, M. J., Park, D.-S., Yu, H., Tian, G.-R., Jeong, T.-S., and Park, H.-Y. (2004) Acyl-CoA: cholesterol acyltransferase inhibitory activities of fatty acid amides isolated from *Mylabris phalerate Pallas Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **14**: 4277-4280.

(2004년 7월 20일 접수)