

## 영경퀴로부터 분리한 Silymarin 및 Silybin이 Macrophages에 의한 사람 Low Density Lipoprotein의 산화에 대한 항산화 효과

이백천<sup>1</sup> · 정영기<sup>2</sup> · 류병호\*

순천당제약(주)<sup>1</sup>, 동의대학교 미생물학과<sup>2</sup>, 경성대학교 식품공학과\*

**Antioxidative Effect of Silymarin and Silybin Purified from *Silybum marianum* on Oxidation of Human Low Density Lipoprotein by Macrophages.** Baek-Chen Lee<sup>1</sup>, Yong-Kee Jeong<sup>2</sup> and Beung-Ho Ryu\*. \*Department of Food Science and Biotechnology, KyungSung University, Pusan 608-736, Korea, <sup>1</sup>Sun Chon Dang Pharmaceutical Co., Pusan 604-042, Korea, <sup>2</sup>Department of microbiology, Dong-eui University, Pusan 614-714, Korea—This study was undertaken to evaluate an antioxidative activity of silymarin and silybin obtained from *Silybum marianum* against oxidation of human low density lipoprotein (LDL). The electrophoretic mobility observed apparently was higher phase for LDL oxidized by macrophages compared to native LDL. Silymarin and silybin inhibited the copper-catalysed oxidation of human LDL in a dose-dependent manner. Silymarin and silybin at the concentration of 50 µM/ml also inhibited the copper catalysed oxidation of LDL induced by the cell J774 and macrophages. LDL reisolated from the cell incubation in the presence of silymarin or silybin was degraded at rates similar with native LDL. Silymarin or silybin found to be potential inhibitors against oxidation of <sup>125</sup>I-LDL by macrophages and endothelial cells.

플라보노이드(flavonoid)는 식물계에 널리 분포되어 있는 폴리페놀 화합물로서 야채류, 과일류, 종실류 등에 들어있다. 플라보노이드는 flavan핵 구조를 가진 저분자량의 폴리페놀 화합물로 페놀이 3개의 A, B 및 C(또는 pyrane)환의 기본구조로 구성되어 있는 diphenyl- propane (C<sub>6</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>6</sub>)의 골격을 지니고 있다(1-3). 지금까지 알려진 플라보노이드는 약 4,000여 종류가 있으며 주요한 플라보노이드로서 flavonols, flavones, flavanones, flavanols anthocyanidins, isoflavones, dihydroflavonols 및 chalcones 등 많은 종류가 있다(4, 5).

플라보노이드는 식물성 성분으로 다양한 구조적 특성을 가지고 있으며 벤젠환(環)의 탄소에 -OH기와 탄소의 2와 3의 위치에 2중결합, 탄소 4번 위치에 카보닐기와 A와 B환에 결합되어 있는 -OH기에 의하여 항산화 활성을 갖는다(5). 사람이 식품으로서 플라보노이드를 섭취하고 있으나 흡수와 대사에 대하여 잘 알려져 있지 않다. 그러나 옛날부터 오랫동안 식품으로 섭취하였으므로 독성이 없으며 소화관에서 흡수된 후 대사되어 우리의 건강에 중요한 역할을 할 것으로 기대된다(6-8).

현재까지 연구된 플라보노이드는 항균제(9, 10), 항바이러스제(11, 12), 항염제(13, 14), 지질 과산화의 억제(15, 16), 항돌연변이의 활성(17) 및 동맥경화(7, 8, 10)

을 나타낸다고 보고 하였다. 동맥경화의 원인중의 하나는 low density lipoprotein(LDL)이 산화되어 oxidized LDL(Oxid LDL)로 되어 macrophage에 의하여 cholesterol esters이 축적되어 동맥부위에 쌓이게 되어 발병하게 된다(19-25). 한편으로는 oxid LDL은 동맥의 내피세포에서 cholesterol esters로 변하고 거품세포를 형성하여 동맥경화를 일으키게 된다(22, 26-28).

LDL은 *in vitro*에서 macrophages(26, 28), 동물의 내피세포(27), 평활근 세포(29) 및 금속이온의 존재하에서도 Oxid LDL로 유도된다(29, 30). Oxid LDL은 높은 세포 독성이 있는 aldehyde등 지질의 과산화물을 함유하고 있고, 세포조직에 확산되어 독성을 나타내며, 내피세포에 염증을 일으키고 결국에는 동맥경화를 유발하게 된다(31). 따라서 동맥경화의 원인을 예방하기 위해서는 LDL의 산화를 방지하는 항산화제를 섭취하지 않으면 안된다. 이와같이 동맥경화를 일으키는 Oxid LDL를 억제하는 천연 항산화제로는  $\alpha$ -tocopherol(32, 33), carotenoid(34)가 있으나 플라보노이드로서는 catechin(35), flavonoid(36) 및 probucol(33) 등이 있으며 이들 대부분은 식물에 존재하는 flavonoid 및 그 유도체로서 강한 항산화 효과가 있는 것으로 알려져 있다(35-37).

식물에 들어있는 플라보노이드중 silymarin 및 silybin은 국화과(*Compositae*)속의 영경퀴(*Silybum marianum* (L)Gaerth)에 들어있으며 옛날부터 간장약, 담즙약 등으로 알려져 있다(38-42). 영경퀴는 유럽 원산의 2년 초로서 그리스 로마 시대부터 간장약으로 알려져 왔고

\*Corresponding author

Tel. 82-51-620-4712, Fax. 82-51-622-4986

E-mail: bhruu@ced.kyungsung.ac.kr

Key words: Silymarin, Silybin, Low density lipoprotein

담즙약으로도 사용되어 왔다. 영정퀴의 주요성분인 *silymarin*은 간장보호작용(40-44)과 약물유도 간경화(40, 43) 등에 대한 보호효과가 있다.

따라서 본 연구는 영정퀴(*Silybum marianum*)에 들어 있는 플라보노이드인 *silymarin*과 *silybin*을 사용하여 사람 LDL을 macrophages내에 배양하여 사람 LDL의 산화에 대한 황산화 효과에 대하여 실험한 결과를 보고하고자 한다.

### 재료 및 실험방법

#### 시 료

시중 한의원에서 구입한 영정퀴(*Silybum marianum*)에서 *silymarin* 및 *silybin*를 분리, 정제하여 사용하였다(45).

#### Cell lines

J774 cells은 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine, 900 units/ml penicillin 및 0.17 mM streptomycin을 함유한 DMEM배지에 배양하였다.

#### 사람 Low Density Lipoprotein(LDL)의 분리

건강한 남자의 혈액 50 ml을 1 mg/ml EDTA을 함유한 plastic 시험관에 넣어 교반한 후 4°C에서 3시간 방치하였다. 혈액 속의 plasma를 상온에서 20분동안 원심분리(2000×g)하였다. 여기에 다음 gentamycin sulfate (1 mg/25 ml)을 첨가하여 LDL (d. 1.019~1.063 g/ml)를 분리하기 위하여 24시간동안 초고속 원심분리(46,000×g)하였다. 분리된 LDL은 0.15 M NaCl, 0.01% EDTA가 함유된 0.01 M phosphate buffer, pH 7.4 로서 16~20시간 투석하였다(46).

#### Human vascular endothelial cells의 배양

Vascular endothelial cells의 분리는 Jaffe등(47) 및 Van Hinsberg 등(48)의 개량 방법에 따라하였다. 세포는 F-10 배지에서 배양 보관하였다.

#### Macrophage의 분리와 배양

Female ICR mice을 CO<sub>2</sub>로 질식시켜 절개한 복부부위에 차게 만든 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>이 없는 Dulbecco's phosphate buffered saline로 세척하여 macrophage을 포집 한 후 원심분리 한 다음 혈액을 제거하고 세포만 분리하였다. 이 세포는 불활성시킨 10% fetal bovine serum과 2 mmol/l L-glutamine, 100 units/ml penicillin 및 0.17 mmol/l streptomycin을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)배지에서 5% CO<sub>2</sub>/air 존재하에서 배양하였다. 배양 24시간 후에 신선한 배지로 교환시킨 다음 5% lipoprotein-deficient serum(LPDS), L-glutamine 함유 DMEM배지에 LDL 또는 산화 LDL의

적당한 농도를 첨가하여 실험하였다(49).

#### LDL의 요오드화

LDL의 요오드화는 iodide monochloride법의 약간의 변형된 방법에 의하여 실험하였다(50). Iodide monochloride을 [<sup>125</sup>I]의 존재하에서 LDL 단백질의 10:1의 mole비로서 혼합하여 반응시켰다. 이 반응에서 결합하지 않은 iodide는 0.1 M Tris, HCl buffer, 0.01% EDTA, 0.85% NaCl, pH 7.4로서 투석에 의하여 제거하였다. 투석한 후 약 98% [<sup>125</sup>I] LDL을 15% trichloroacetic acid 로서 침전시켜 얻었다. <sup>125</sup>I-labeled LDL은 filter(0.22 μm)를 통과시켜 사용하였다.

#### Cell-mediated LDL에 의한 산화

J774 cells, human vascular endothelial cells 또는 mouse peritoneal macrophages의 배양액에 LDL(100 μg/ml) 및 <sup>125</sup>I-LDL (100 μg/ml)과 함께 *silymarin* 및 *silybin*을 일정 농도별로 첨가한 후 5% CO<sub>2</sub> 존재하에서 37°C로 24시간 동안 배양한 후 아래의 방법에 따라 LDL의 산화의 정도를 실험하였다. LDL 및 <sup>125</sup>I-LDL은 serum이 없는 배양액 5 ml을 Sephadex G-25 column에 통과시켜 낮은 분자량의 요오드 산물을 제거하고 멸균하여 여과한 후 TBARS를 측정하였다(51).

#### Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS)의 측정

LDL의 산화는 TBARS의 형성으로서 평가하였다. 100 μg protein/ml LDL이 함유된 배양 혼합액 0.5 ml에 20% TCA 1.5 ml를 가한 다음 여기에 0.05 M NaOH에 0.67% TBA 1.5 ml를 넣어 섞은 후 그 반응 혼합액을 90°C 수욕상에서 45분간 끓였다. 시료를 10분간 원심분리(2,000×g)한 다음 상등액의 흡광도를 Perkin-Elmer fluorescence spectrophotometer (Model 650-10S)로서 510 및 553 nm에서 측정하였다. 시료 중의 TBARS의 수는 malondialdehyde (MDA)로서 만들어진 MDA의 표준 곡선으로부터 MDA의 nmole로서 나타내었다(52).

#### LDL의 gel electrophoresis

LDL의 전기영동은 Nile red를 혼합한 LDL를 barbitol buffer, pH 8.6으로 만든 agarose gel에 loading하여 75 V에서 20 분 동안 전개하였다. 이를 UV lamp로 확인하였다(53).

#### Macrophages에 의한 LDL의 분해

Macrophages를 24시간 동안 배양한 후 5 ml의 serum free DMEM으로써 세척한 다음 먼저 2.7 ml DMEM에 0.3 ml <sup>125</sup>I-LDL(30 μg protein LDL 함유)을 5 mM

CuSO<sub>4</sub>와 각종 농도의 silymarin 및 silybin을 넣고 배양액을 첨가하였다. 이 wells을 95% 습도, 5% CO<sub>2</sub>의 조건 하에서 37°C, 5시간 배양한 후 그 중 0.5 ml을 취하여 2% BSA 0.5 ml을 가한 다음 1M KI 250 µl, 50% trichloroacetic acid 250 µl을 가한 후 혼합액을 원심분리하였다. 상등액 0.5 ml의 유리된 iodide을 침전시키기 위하여 5% 질산은 250 µl을 넣어 침전시켰다. 이때 상등액에 남아있는 방사능 활성(radioactivity)으로서 LDL의 분해를 측정하고, 5시간당 세포 단백질의 mg당 µg LDL로서 산출하였다(26).

### 단백질의 정량

LDL의 단백질의 정량은 Lowry등의 방법(54)에 따라 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### LDL의 electrophoretic mobility

Table 1은 macrophage에 의한 LDL의 산화식을 알아보기 위하여 LDL의 electrophoretic mobility에 대한 silymarin과 silybin의 효과에 대하여 실험하였다. LDL을 macrophage와 함께 24시간 동안 배양한 후 LDL의 산화를 나타내었다. LDL의 이동은 0.17±0.03에서 1.79±0.12 mm로 이동거리간의 차이가 있었다. 이때 silymarin 및 silybin을 첨가한 LDL은 대조군보다 LDL의 이동거리가 적었으므로 LDL의 산화를 억제한 것으로 볼 수 있다.

### Macrophage유도 LDL의 산화에 대한 silymarin 및 silybin의 억제효과

Fig. 1은 macrophage와 macrophage cell line인 J774을 이용하여 5 µM Cu<sup>2+</sup>를 첨가하여 LDL를 산화시켜 각종 농도의 silymarin 및 silybin을 첨가하여 산화억제 효과를 실험한 결과이다. macrophage로서 실험한 결과

**Table 1. Inhibitory effect of silymarin and silybin on LDL oxidation as assessed by electrophoretic mobility**

Incubation conditions	Relative electrophoretic mobility	p
Native LDL	1.0	
LDL+cell	1.79±0.12	<0.05
LDL+cell+silymarin 50 µM	1.10±0.02	<0.01
LDL+cell+silybin 50 µM	1.07±0.03	<0.01

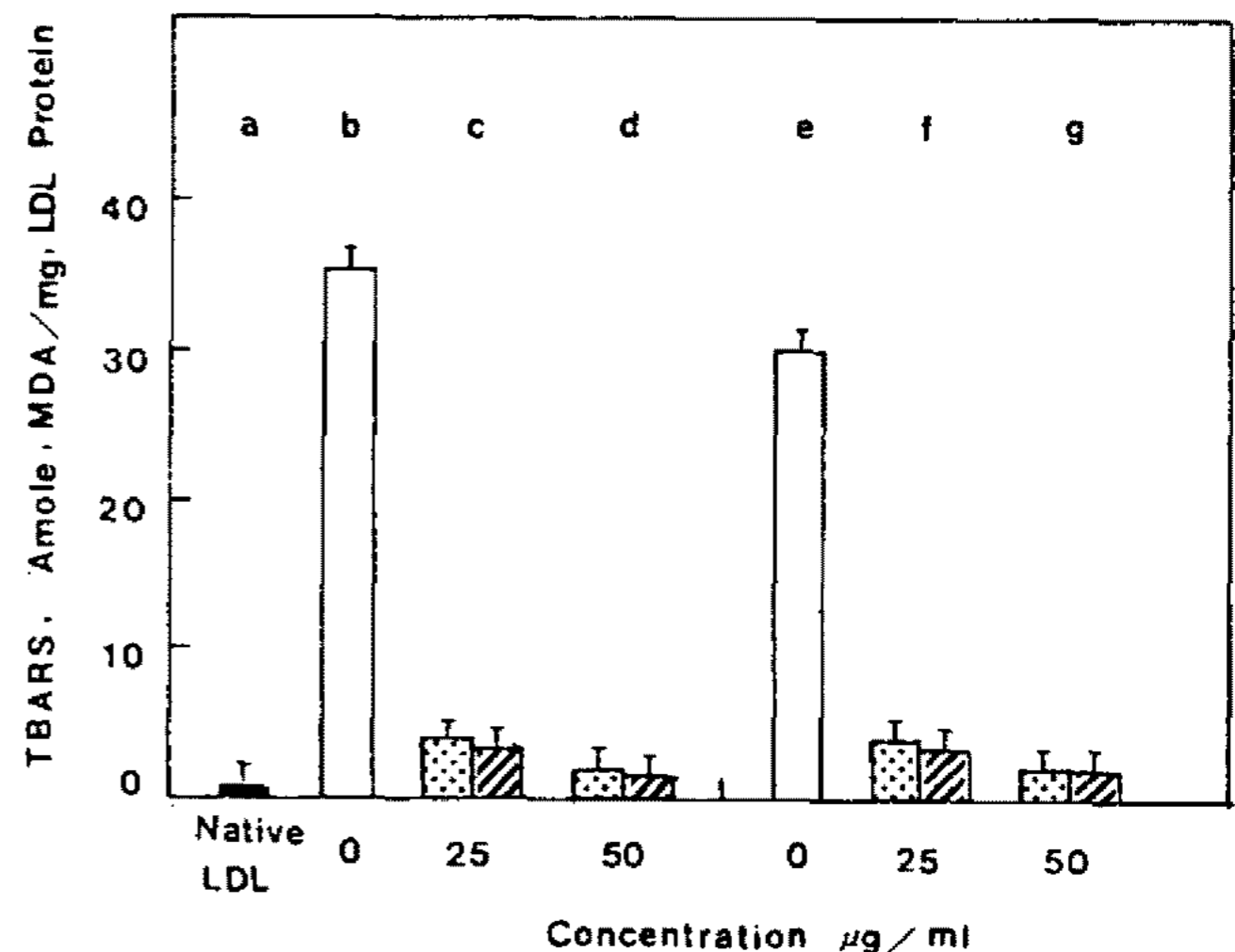
LDL (100 µg/ml) was incubated for 24h in Ham's F-10 medium in 35 mm dishes containing macrophages in the presence or absence of the silymarin and silybin. The electrophoretic mobility of LDL was determined in agarose gels as described in *Methods*. The electrophoretic mobility was measured in mm. The data are presented as mean ±S.E.M for 3~5 experiments.

native LDL의 TBARS는 1.20±0.23 nmol MDA/mg LDL이었으나 항산화제를 첨가하지 않은 대조구에서는 TBARS가 35.83±6.27 nmol MDA/mg LDL이었으며 silymarin 및 silybin의 농도를 25 µg/ml 첨가시에는 각각 2.64±0.17 및 2.15±0.15 nmol MDA/mg LDL이었다.

한편 J774에 의한 LDL의 산화에 대한 silymarin 및 silybin의 산화 억제효과는 대조군의 LDL의 TBARS는 30.21±1.43 nmol MDA/mg LDL이었으나 silymarin 및 silybin을 25 µg/ml 첨가시에는 LDL의 TBARS는 각각 2.42±0.20 및 2.00±0.17 nmol MDA/mg LDL이었다. 그리고 silymarin 및 silybin을 50 µg/ml 첨가하여 실험한 경우 LDL의 TBARS는 각각 1.90±0.08 및 1.87±0.10 nmol MDA/mg LDL이었다.

본 실험결과 silymarin 및 silybin은 macrophage와 J774에서 거의 비슷한 항산화효과를 나타내었고, silymarin 및 silybin을 25 µg/ml 첨가시에는 높은 항산화효과가 나타났으며 50 µg/ml첨가시에는 LDL의 산화를 거의 억제하는 것을 알 수 있었다. 비록 LDL에 대한 플라보노이드의 항산화 메커니즘이 아직까지 잘 알려져 있지 않으나 세포내에서 고도 불포화지방산이 세포로부터 방출되는 자유기나 과산화물의 생성을 억제하는 것으로 추정된다(55, 56). 한편으로는 LDL의 산화는 세포내의 lipoxygenase의 활성에 의해서 일어나며 이때 polyphenol화합물이 lipoxygenase의 활성을 억제한다고 하였다(14, 56).

본 연구에 사용된 silymarin 및 silybin은 flavonoid로서 macrophage 유도 LDL의 산화에 대한 항산화효과가



**Fig. 1. Antioxidative effect of silymarin(▨) and silybin(▩) on the cell induced oxidation of LDL.**

LDL (100 mg/ml) was incubated with mouse peritoneal macrophage (b~d) or J774 cell (e~g) for 24hr at 37°C in the presence or absence of silymarin or silybin. The medium was then removed and assayed for TBARS as described in *Methods*. Results are expressed as means ±SD of triplicate analyses. The significance of the differences between silymarin or silybin treated and control values was calculated by an *t*-test.

우수한 것으로 판단된다.

<sup>125</sup>I-LDL의 macrophage에서의 분해

Macrophage는 식균작용을 하지만 한편으로는 native LDL 보다 훨씬 큰 비율로 소거제 수용체로서 Oxid LDL을 분해시킨다(26, 28). 이러한 특성은 항산화 활성

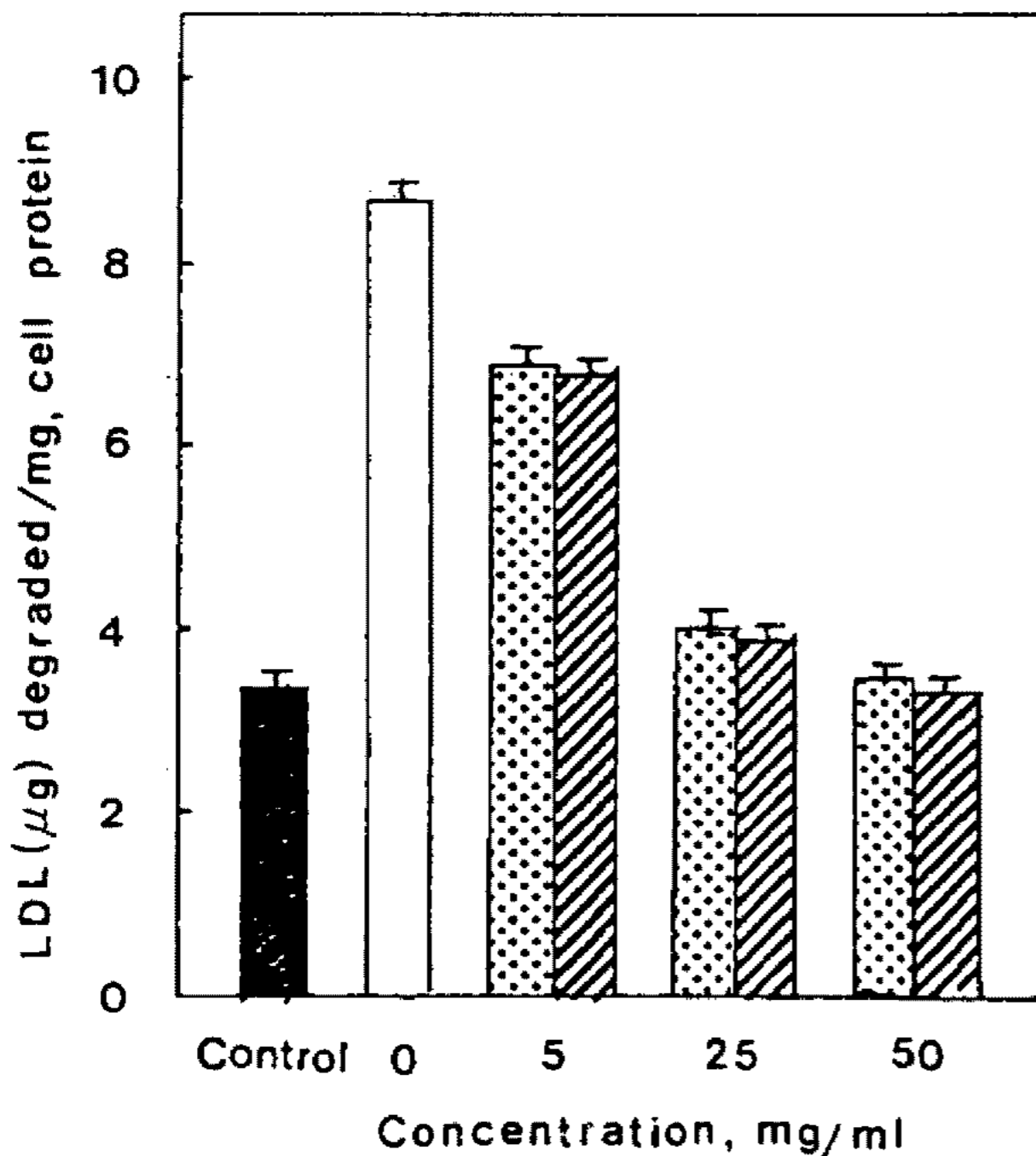


Fig. 2. Degradation by human macrophages of LDL oxidized in the presence of increasing concentrations of silymarin(■) and silybin(▨).

<sup>125</sup>I-LDL (200 μg/ml) was incubated in the presence of various concentrations of silymarin or silybin with phosphate buffer saline containing 5 μM CuSO<sub>4</sub> for 24h at 37°C. The LDL was reisolated by chromatography on Sephadex-G 25 and aliquots (12 μg) were incubated with macrophages in 1 ml medium for 6h at 37°C. Degradation of the modified LDL was measured as [<sup>125</sup>I]iodotyrosine in the medium as described in Methods. Results are expressed as means ± SD of triplicate analyses. The difference between silymarin or silybin treated or non-oxidized native LDL and modified in the absence of silymarin or silybin was calculated using *t*-test.

이 있는 silymarin 및 silybin를 첨가한 실험에 의하여 밝혀질 수 있었다.

Native LDL에 silymarin 및 silybin의 첨가구와 첨가하지 않은 구로 구분하여 일정시간 Cu<sup>2+</sup>로 유도한 Oxid LDL을 gel여과하여 재 분리시킨 다음 신선한 macrophage로서 일정시간 배양하여 조사하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 silymarin 및 silybin를 각각 5, 25 및 50 μg/ml의 농도를 첨가하고 LDL을 macrophage에서 배양하는 동안 배지로 유리되어 나오는 TCA 용해 방사능의 방출로부터 산화 LDL의 분해를 측정하였다. Silymarin 및 silybin를 첨가하지 않은 무첨가구에서 Cu<sup>2+</sup>존재하에 <sup>125</sup>I-LDL의 분해는 8.43 ± 0.46 μg/ml cell protein이었다. 그러나 silymarin 및 silybin을 5 μg/ml 첨가한 경우에는 각각 6.83 ± 0.4 및 6.80 ± 0.01 μg/ml cell protein이었으나 25 μg/ml을 첨가하였을 때는 각각 4.00 ± 0.03 및 2.87 ± 0.06 μg/ml cell protein 이었고 50 μg/ml 첨가한 경우는 각각 3.41 ± 0.07 및 3.20 ± 0.04 μg/ml cell protein으로 대조구인 native LDL의 3.36 ± 0.05 μg/ml cell protein과 비슷한 수치를 나타내었다. 이와같이 silymarin 및 silybin을 각각 5 μg/ml씩 첨가하였을 때는 분해가 많이 일어났으나 25 μg/ml일 때는 약간 일어나며 50 μg/ml일 때는 대조구와 거의 비슷한 경향으로 분해를 거의 억제하였다.

현재 음식물중에 들어 있는 플라보노이드가 LDL의 산화를 억제한다는 보고가 있다(35, 36) 플라보노이드는 macrophages로부터 나오는 유리기의 형성을 감소시키고 유리기로 인한 LDL의 산화를 예방한다(55, 56). 또 flavonoid는 지방의 산화의 원인물질인 hydroperoxide와 반응하여 산화를 억제시키고 유리기의 생성을 촉진시키는 금속이온과 결합이 용이하여 free cell이나 macrophages에서 유리기의 형성을 억제시킨다(31, 33, 37).

Silymarin 및 silybin에 의한 Oxid LDL의 분해 억제

Table 2는 silymarin 및 silybin를 각각 50 μg/ml씩 첨가한 후 LDL의 분해정도를 조사하였다. LDL에 5 μM

Table 2. Degradation by endothelial cell and human macrophages of Oxid LDL in the absence and presence of silymarin or silybin

	Silymarin (μg/ml)		Silybin (μg/ml)	
	0	100	0	50
CuSO <sub>4</sub>	8.43 ± 0.46	4.56 ± 0.23	8.43 ± 0.46	4.03 ± 0.17
Endothelial cell	0.047 ± 0.005	0.0036 ± 0.020	0.047 ± 0.005	0.0032 ± 0.002
Macrophage	0.821 ± 0.16	0.0530 ± 0.04	0.821 ± 0.16	0.47 ± 0.011

Values are μg LDL degraded /mg cell protein. LDL was preincubated in the absence or presence of silymarin and silybin with endothelial cell, macrophage or phosphate buffered saline containing 5 μM CuSO<sub>4</sub> for 18h at 37°C. The LDL was reisolated by chromatography on Sephadex-G 25 and reincubated with fresh endothelial or macrophage. Degradation of LDL was determined as the release of [<sup>125</sup>I]-LDL into the medium during the incubation period as described in Methods. Results are expressed as means ± SD of triplicate experiments. The significance of differences between silymarin and silybin treated and values was calculated by an unpaired *t*-test.



Cu<sup>2+</sup>만 첨가하였을 때와 macrophage에 나타난 결과 보다 내피세포에 의한 LDL의 분해가 매우 낮았다. Steinbrecher등(34)은 내피세포에 의하여 유도된 산화는 Cu<sup>2+</sup> 또는 macrophages때 보다 더욱 낮았다고 보고한 바 본 실험결과와 일치하였다. <sup>125</sup>I-LDL은 silymarin 및 silybin를 첨가하지 않은 경우에도 macrophages 유도 산화가 진행됨을 알 수 있고, 배지에 silymarin 및 silybin를 각각 100 µg/ml 및 50 µg/ml를 첨가하였을 경우 시료를 첨가하지 않은 LDL에 비하여 LDL의 분해는 어느정도 감소하였다. 이러한 결과는 silymarin 및 silybin이 유리기의 소거적 성질이 있음을 보여 주고 있다. Rankin등(57)의 연구에 의하면 세포의 15-lipoxygenase는 LDL의 산화 *in vivo*에 관여한다고 하였는데 이 silymarin 및 silybin는 세포 분자의 lipoxygenases의 강력한 억제제로 생각된다. 이와 같은 비슷한 연구로는 flavonoid가 쥐의 neutrophils 및 쥐의 peritoneal macrophages에서 5-lipoxygenase을 억제한다고 보고하였다. 이들 억제성분은 탄소의 4', 3 및 7의 위치에 하이드록시기가 있기 때문에 5-lipoxygenase에 대하여 강력한 억제 효과가 있다(56). 이상의 결과로 보아 silymarin 및 silybin는 polyphenol 화합물로서 그 구조적 특성으로 보아 Oxid LDL로 인하여 손상이 생겼을 경우 endothelium으로 이동하여 LDL의 산화를 방지하는 것으로 사료된다. Polyphenol 화합물의 대표적인 probucol(58)은 강력한 항산화 작용이 알려져 있는데 이는 지질의 분해 부분에 직접적으로 이동하여 LDL의 입자 안으로 스며들어 항산화 작용을 하여 동맥경화의 예방과 치료에 유용하게 사용되고 있다. 따라서 silymarin 및 silybin도 역시 lipoprotein와 부분적으로 결합하여 항산화 작용을 하는 것으로 판단된다.

## 요 약

본 연구는 사람의 low density lipoprotein (LDL)의 산화에 대한 항산화 효과를 조사하기 위하여 엉겅퀴 (*Silybum marianum*)으로부터 분리한 silymarin 및 silybin를 사용하여 실험하였다.

사람 LDL을 native LDL과 macrophage의 산화 LDL의 전기영동에 의한 이동상을 비교한 결과 native LDL보다 산화 LDL에서 약간 높은 이동상을 볼 수 있었다. 사람 low density lipoprotein(LDL)를 J774, macrophage에서 배양한 결과 silymarin 및 silybin은 용량의존형으로 LDL의 산화를 억제하였고, silymarin 및 silybin의 농도가 각각 50 µM/ml일 때 산화가 거의 억제되었다. LDL를 macrophage의 배양시 LDL에 대한 분해가 대조구에 비하여 적었다. 또 silymarin 및 silybin은 macrophage와 내피세포의 배양에서 <sup>125</sup>I-LDL의 산화에 대

하여 강한 억제효과를 나타내었다.

## 참고문헌

1. Harborne, J. B., T. J. Mabry, H. Mabry, 1975. The flavonoids. London: Chapman and Hall.
2. Herrmann, K. 1976. Flavonols and flavones in plants. A review. *J. Food Technol.* **11**: 433-448.
3. Kuhnau, J. 1976. The flavonoids. A class of semi-essential food components. Their role in human nutrition. *World Rev. Nutr. Diet.*, **24**: 117-191.
4. Pierpoint, W. S. 1986. Flavonoids in the human diet. In *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationships*. p. 125-140, Alan R. Liss, New York, NY USA.
5. Cody, V. 1988. Crystal and molecular structure of flavonoids. In *Plant Flavonoids in Biology and Medicine II. Biochemical, Cellular, and Medicinal Properties*, p. 29-44, Alan R. Liss, New York, NY USA.
6. Middleton, E., Jr. and C. Kandaswami, 1993. The impact of plant flavonoids on mammalian biology. Implications for immunity, inflammation and cancer. In the *Flavonoids. Advances in Research Since 1986*. (J.B. Harborne, ed.), p. 619-652, Chapman and Hall, London, UK.
7. Ratty, A. K. and N. P. Das, 1988. Effects of flavonoids on nonenzymic lipid peroxidation. Structure activity relationship. *Biochem. Med. Metabol. Biol.* **39**: 69-79.
8. Hackett, A. M. 1986. The metabolism of flavonoid compounds in mammals. In *Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structural Activity Relationships*. p. 177-194, Alan R. Liss, New York, NY. USA.
9. Das, N. P., ed. 1990. *Flavonoids in biology and medicine III-Curent issues in flavonoids research*. Singapore: Singapore University Press.
10. Kandaswami, C. 1994. Middleton, E. Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. *Adv. Exp. Med. Biol.* **366**: 351-376.
11. Nonaka, G., L. Nishioka, M. Nishizawa., T. Yamagishi, Y. Kashiwada, G. E. Dutschman, A. J. Bodner, R. E. Kilkuskie, Y.-C. Cheng and K.-H. Lee, Anti-AIDS agents 2. 1990. Inhibitory effects of tannins on HIV reverse transcriptase and HIV replication in H9 lymphocyte cells. *J. Natl. Prod.* **53**: 587-595.
12. Nakane, H. and K. Ono, 1990. Differential inhibitory effects of some catechin derivatives on the activities of human immunodeficiency virus reverse transcriptase and cellular deoxyribonucleic and ribonucleic acid polymerases. *Biochemistry* **29**: 2841-2845.
13. Middleton, E. and C. Kandaswami, 1992. Effects of flavonoids on immune and inflammatory functions. *Biochem. Pharmacol.* **43**: 1167-1179.
14. Sudina, G. F., O. K. Mirzoeva, M. A. Pushkareva, G. A. Korshunova, N. V. Sumbutya and S. D. Varfolomeev,

1993. Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. *FEBS Lett.* **329**: 21-24.
15. Ho, C.-T., Q. Chen, H. Shi, K.-Q. Zhang and R. T. Rosen, 1992. Antioxidative effect of polyphenol extract prepared from various chinese teas. *Prev. Med.* **21**: 520-525.
16. Kinsella, J. E., E. Frankel, B. German and J. Kanner, 1993 Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technol.* April: 85-8
17. Namiki, M. 1990. Antioxidants/antimutagens in food. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **29**: 273-300.
18. 박춘옥, 류병호. 1996. 사람 LDL 수식에 의한 녹차의 항산화활성. *한국식품과학회지* **28**: 850-858.
19. Steinberg, D., S. Parthasarathy, T. E. Carew, J. C. Khoo and J. L. Witztum, Beyond cholesterol. 1989. Modification of low-density lipoprotein that increases its atherogenicity. *New Engl. J. Med.* **320**: 915-924.
20. Greenspan, P., B. H. Ryu, F. Mao and R. L. Gutman, 1995. Association of negatively-charged phospholipids with low density lipoprotein (LDL) increases its uptake and the deposition of cholesteryl esters by macrophages, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1257**: 257-264.
21. Ross, R. 1989. The pathogenesis of atherosclerosis: perspective for the 1990's, *Nature.*, **362**: 801-809, 1993.2) Steinberg D., Parthasarathy S., Carew T. E., J. C. Khoo, J. L. Witztum Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increases its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.*, **320**: 915-924.
22. Esterbauer, H., M. Dieber-Rotheneder, G. Waeg and G. Striegl. 1990. Biochemical, structural and functional properties of oxidized low-density lipoprotein. *Chem. Res. Toxicol.*, **3**, 77-92.
23. Greenspan, P., R. L. Gutman, F. Mao, B. H. Ryu and P. Low, 1996. Iron-ascorbate-phospholipid mediated modification of low density lipoprotein, *Biochim. Biophys. Acta*, **1301**: 242-248.
24. Carpenter, K. L. H., C. E. Brabbs and M. J. Mitchinson, 1991. Oxygen radicals and atherosclerosis. *Klin Wochenschr.*, **69**: 1039-1045.
25. Henriksen, T., E. Mahoney and D. Steinberg, 1981. Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells. Recognition by the receptor for acetylated low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **78**: 6499-6503.
26. Henriksen, T., E. M. Mahoney and D. Steinberg, 1983. Enhanced macrophage degradation of biologically modified low density lipoprotein. *Arteriosclerosis.*, **3**: 149-159.
27. Morel, D. W., P. E. Docorleto and G. M. Chisolm, 1984. Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein *in vitro* by free radical oxidation. *Arteriosclerosis* **4**: 357-364.
28. Ryu, B. H., F. W. Mao, P. Lou, R. L. Gutman and P. Greenspan, 1995. Cholesteryl ester accumulation in macrophages treated with oxidized low density lipoprotein, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**: 1619-1662.
29. Heinecke, J. W., H. Rosen and A. Chait, 1984. Iron and copper promote modification of low density lipoprotein by human arterial smooth muscle cells in culture. *J. Clin. Invest.*, **74**: 1890-1894.
30. Steinbrecher U., S. Parthasarathy, D. S. Leake, J. L. Witztum and D. Steinberg, 1984. Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **83**: 3883-3887.
31. Bruckdorfer, K. R. 1990. Free radicals, lipid peroxidation and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.*, **1**: 529-535.
32. Esterbauer H., H. Puhl, M. Dieber-Rotheneder, G. Striegl and G. Waeg, 1991. Role of vitamin E in preventing the oxidation of low-density lipoprotein. *Am. J. Clin. Nutr.*, **53**: 314S-321S.
33. Mao, S. J. T. and M. T. Yates, 1989(abstract). Antioxidant activity of probucol and vitamin E( $\alpha$ -tocopherol) in plasma. *Artherosclerosis* **9**: 751 a.
34. Esterbauer, H., G. Striegl, H. Puhl, S. Oberreither, M. Rotheneder, M. El-Saadani and G. Urgens, 1989. The role of vitamin E and carotenoids in preventing oxidation of low density lipoproteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **570**: 254-267.
35. Mangiapane, H., J. Thomson, A. Salter, S. Brown, G. D. Bell, and D. A. White, 1992. The inhibition of the oxidation of low density lipoprotein by (+)-catechin, a naturally occurring flavonoid. *Biochem. Pharmacol.*, **43**: 445-450.
36. De Whalley, C. V., S. M. Rankin, J. R. S. Hoult, W. Jessup, and D. S. Leake, 1990. Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem. Pharmacol.*, **39**: 1743-1750.
37. Machlin, L. J. and A. Bendich, 1987. Free radical tissue damage: Protective role of antioxidant nutrients. *FASEB J.*, **1**: 441-445.
38. Salmi, H. A. and S. Sarna, 1982. Effect of silymarin on chemical, functional, and morphological alterations of the liver. *Scand. J. Gastroenterol.*, **17**: 517-521.
39. Rauen, H. M. and H. Schriewer, 1973. Die Antihepatotoxische Wirkung von parenteral verabreichtem silymarin bei der Leberchädigung der Ratte durch CCl<sub>4</sub>. *Arzneimittelforsch.*, **23**: 148-149.
40. Rauen, H. M. and H. Schriewer, 1971. Die antihepatotoxische Wirkung von Silymarin bei experimentellen Leberschädigungen der Ratte durch Tetrachlorkohlenstoff, D-Galaktosamin und Allylalkohol., *Arzneimittelforsch.*, **21**: 1194-1201.
41. Mourelle, M., P. Murrel, L. Favari, and T. Franco, 1989. Prevention of CCl<sub>4</sub>-induced cirrhosis by silymarin. *Fund. Clin. Pharmacol.*, **3**: 183-192.

42. Ferenci, P, B. Dragosics, H. Dittrich, H. Frank, L. Benda, H. Lochs, S. Meryn, W. Base, and B. Schneider, 1989. Randomized controlled trial of silymarin treatment in patients with cirrhosis of the liver. *J. Hepatol* **9**: 105-113.
43. Nikino, N., Y. Kiso, H. Wagner, and M. Fiebig, 1984. Antihepatotoxic actions of flavonolignans from *Silybum marianum* fruits, *Planta Med.*, **50**: 248-250.
44. Muriel, P. and M. Mourelle, 1990. Prevention by silymarin of membrane alterations in acute CCl<sub>4</sub> liver damage. *J. Appl. Toxicol.*, **10**: 275-279.
45. 이백천. 1976. 엉겅퀴에서 정제한 silymarin 및 silybin의 항산화 효과. 경성대학교 박사학위논문.
46. Havel, R. J., H. A. Eder. and J. H. Bragdon, 1995. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.* **34**: 1345-1352.
47. Jaffe, E. A., R. L. Nackman, C. G. Becker and C. R. Minick, 1973. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. *J Clin. Invest.*, **52**: 2745-2756.
48. Van Hinsberg, V. W. M., I. Havekes., J. J. Eneis, E. Van Corven, and M. Scheffer, 1983. Low density lipoprotein metabolism by endothelial cells from human umbilical cord arteries and veins, *Arteriosclerosis* **3**: 547-559.
49. McCarron, R. M., D. K. Goroff, J. E. Luhr, M. A. Murphy and H. B. Herscowitz, 1984. Methods for the collection of peritoneal and alveolar macrophages, *Methods Enzymol.*, **108**: 274-284.
50. Mac Farland, A. S., 1956. Efficient trace-labeling of proteins with iodide, *Nature*, **182**: 158.
51. Esterbauer, H., G. Striegl, H. Puhl and M. Rotheneder, 1989. Continuous monitoring of *in vitro* oxidation of human low density lipoprotein. *Free Rad. Res. Commun.* **6**: 67-75.
52. Yaki, K. 1976. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem., Med.*, **15**: 212-217.
53. Greenspan, P. and JR. L. Gutman, 1993. Detection by Nile red of agarose gel electrophoresed native and modified low density lipoprotein. *Electrophoresis* **14**: 65-68.
54. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randell, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent., *J. Biol. Chem.*, **193**: 265-275.
55. Ruch, R. J., S. J. Cheng and J. E. Klauning, 1986. Prevention of cytotoxicity and inhibition of intracellular communication by antioxidant catechins isolated from Chinese green tea, *Carcinogenesis*, **10**: 1003-1008.
56. Jiala, I. and C. Scaccini, 1992. Antioxidants and atherosclerosis. *Current opin. Lipidology.* **3**: 324-330.
57. Rankin, S. M., S. Parthasarathy and D. Steinberg, 1991. Evidence for a dominant role of lipoxygenase(5) in the oxidation of low density lipoprotein by mouse peritoneal macrophage, *J. Lipid Res.*, **32**: 449-454.
58. Kuzuga, M. and F. Kuzuza, 1993. Probucol as an antioxidant and antiatherogenic drug, *Free Rad. Biol. med.*, **14**: 66-67.

(Received 4 February 1997)