

마황으로부터 췌장 Cholesterol Esterase 저해물질 분리 및 규명

조은정 · 류병호 · 송병권* · 이태훈** · 서판길** · 류성호** · 김희숙†

경성대학교 식품공학과

*부산식품의약품안전청 시험분석실

**포항공과대학교 생명과학과

Purification and Characterization of the Inhibitory Principle against Pancreatic Cholesterol Esterase from *Ephedra herba*

Eun-Jung Cho, Byung-Ho Ryu, Byung-Kwon Song*, Taehoon G. Lee**, Pann-Ghill Suh**, Sung-Ho Ryu** and Hee-Sook Kim†

Dept. of Food Science and Technology, Kyungsung University, Pusan 608-736, Korea

*Test and Analytical Lab., Pusan Regional Food Science and Drug Administration, Pusan 608-080, Korea

**Dept. of Life Science, Pohang University of Science and Technology, Pohang 790-784, Korea

Abstract

Cholesterol esterase(pCEH, pancreas cholesterol ester hydrolase, E.C.3.1.1.13) which is secreted from pancreas has been known as an important lipase for cholesterol uptake. cholesteryl acyl esters from a diet must be hydrolyzed to free cholesterol and fatty acid by cholesterol esterase before the absorption in small intestine. For the development of inhibitory substances from natural source, we screened many extracts of oriental herbs for the inhibition of cholesterol esterase *in vitro*. The ethanol extract of *Ephedra herba* showed strong inhibitory activity. Solvent fractionation and silica gel column chromatography with the extract lead to the purification of the inhibitory principle in *Ephedra herba*. Crystallized inhibitor was identified as (-)-ephedrine by using UV, FT-IR, ¹H-NMR, ¹³C-NMR and GC/Mass. These results suggest that (-)-ephedrine can be used as a potential lead compound for the development of inhibitor for cholesterol uptake by cholesterol esterase inhibition.

Key words: pancreas cholesterol esterase, *Ephedra herba*, ephedrine

서론

콜레스테롤은 세포를 구성하는 필수성분으로 세포의 성장, 분화 및 발육에 중요한 역할을 담당하고 있으나 과다섭취로 인하여 혈관에 축적될 때 동맥경화, 협심증 등의 심각한 심혈관질환을 초래하여 치명적 결과를 낳기도 한다. 콜레스테롤 흡수과정에 대한 지금까지의 연구결과에 의하면 섭취된 콜레스테롤 성분 중 콜레스테릴 에스테르는 췌장에서 장내로 분비되는 효소 중의 하나인 췌장 cholesterol esterase(pCEH, pancreas cholesterol ester hydrolase, E.C.3.1.1.13)에 의하여 유리 콜레스테롤과 지방산으로 가수분해되며, 또한 이 효소는 유리 콜레스테롤의 장내흡수를 용이하게 하는 것으로 알려져 있다(1-3). Cholesterol esterase는 담즙산-의존성 효소로서 식이성 cholesteryl ester 및 다른 acyl화된 지질들이 가수분해되는 장소인 소장으로 분비된다. 그러나 많은 연구결과들은

췌장 cholesterol esterase의 역할이 간단히 식이성 지질을 가수분해하는 것을 넘어서 소장의 흡수용도로 pCEH가 흡수된 후 흡수된 유리콜레스테롤과 지방산이 다시 에스테르화(reesterification)하는데도 관여함을 보여주었다(4-6). 가수분해된 유리콜레스테롤이 소장벽으로 흡수된 후에는 대부분의 유리콜레스테롤은 다시 지방산과 에스테르를 형성하게 되는데 이 과정에서 콜레스테롤의 에스테르화는 pCEH와 acyl-CoA:cholesterol acyltransferase(ACAT)가 관여하게 된다. Gallo 등(7)은 췌장의 소화액으로부터 cholesterol esterase를 제거하고 ACAT를 정상으로 유지시키면 혈류로의 콜레스테롤 흡수가 거의 80% 저해된다고 하였으며 이는 ACAT만으로는 외재성 콜레스테롤의 흡수를 유지하지 못하며 췌장 cholesterol esterase가 가장 필수적인 역할을 한다고 주장하였다. 또한 쥐의 췌장세포에서 cholesterol esterase mRNA의 발현정도는 고 콜레스테롤과 고 중성지방 식이에 의해 크게

†To whom all correspondence should be addressed

증가되었다고 하였다(8). 이 밖에도 간장과 췌장의 cholesterol esterase사이의 연관성에 대하여도 많은 연구결과가 보고되었는데(9-11), 첫째, rat의 간조직 균질액에서 정제된 cholesterol esterase가 췌장의 cholesterol esterase에 대한 항체와 반응하였으며, 전기영동 패턴 및 N-말단 아미노산까지 동일하였고, 둘째, 췌장 cholesterol esterase의 cDNA로 간장의 mRNA혼합물에 northern blot하였을 때 같은 크기의 mRNA가 검출되었다고 한 결과들로 볼 때 췌장과 간장의 cholesterol esterase 사이에 높은 상관관계가 있음을 알 수 있다. 최근 개발된 WAY-121,751과 WAY-121,898은 췌장 cholesterol esterase를 효과적으로 저해하며 콜레스테롤을 급여한 동물들의 고콜레스테롤혈증 유발을 억제하고 간의 cholesterol esterase까지도 저해한다고 하였다(12,13).

만일 췌장 cholesterol esterase의 새로운 기능들이 사실이라면 이 효소의 약리학적 저해는 콜레스테롤 흡수의 저해를 가져오고 그로 인한 혈중 콜레스테롤 농도의 감소를 초래할 것이다. 콜레스테롤의 섭취가 증가하는 현대인에게 있어서 cholesterol esterase 활성을 저해하는 약물 또는 기능식물의 개발은 고콜레스테롤혈증을 예방하는데 크게 기여하리라 사료된다. 본 실험에서 사용된 마황은 *Ephedra sinica* STAPF(마황과 *Ephedraceae*)의 지상부에서 제조된 생약으로 한의학에서는 발한, 해열, 진해, 항염, 순환기질환에 적용되어왔다. 마황의 약리작용에 있어 많은 보고가 있으나 이런 작용의 대부분은 ephedrine계 알칼로이드에 의한 것으로 중추흥분작용, 교감신경 흥분작용, 항염증작용 및 혈압상승효과 등이 있고(14, 15) 또한 비만환자들의 식이요법을 돕기 위하여 ephedrine-caffeine혼합물을 복용하는데 이는 ephedrine의 beta-adrenergic 상승효과에 의한 작용으로 식욕감퇴와 지방조직에서의 산소증가를 가져온다고 하였다(16,17). 그러나 본 실험에서는 알려진 마황의 약리효과 외에 마황의 에탄올 추출물이 *in vitro*에서 췌장의 cholesteryl esterase 활성을 저해하였으므로 식이성 고콜레스테롤의 소장에서의 흡수를 저해함으로써 고지혈증 또는 동맥경화증을 예방할 수 있는 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에서 사용한 소의 췌장은 포항시 도축장에서 구입하였으며 마황(*Ephedra sinica* STAPF)은 부산에 소재하는 자유시장의 한약재료상에서 구입하였다. 용점은 differential scanning calorimeter(DSC-7, Perkin-Elmer, USA)로 측정하였으며 UV spectrum은 Shimadzu UV/Vis-1601(Japan)을, IR spectrum은 Jasco FT/IR 200 spectrophotometer(Jasco, Japan)를 사용하여 KBr법으로 측정하였다. ¹H-NMR(300MHz) 및 ¹³C-NMR(125MHz)

spectrum은 Bruker DPX 300(Bruker, Germany)을 사용하였으며 TMS를 내부표준물질로 하여 측정하였다. 물질규명을 위한 질량분석은 Electron Impact(EI) mass spectrum(HP 5890A GC/5870B MSD, Hewlet Packard, USA)를 사용하여 측정하였으며 TLC plate는 Kieselgel 60 F₂₅₄(Merck, Germany)를 사용하였다.

소 췌장으로부터 췌장 cholesterol esterase의 정제

신선한 소 췌장으로부터 cholesterol esterase의 정제는 Lee 등의 방법(18)에 따랐다. 즉, 소 췌장을 완충용액(50mM Tris/HCl, pH 7.4, 5mM EDTA, 2mM EGTA, 2mM PMSF 및 0.1mM DTT)과 함께 균질화하고 13,000 × g에서 원심분리한 후 아세트산으로 pH를 5로 조절하고 침전물을 제거한 후 상층액에 (NH₄)₂SO₄를 가하여 60% 포화되게 하였다. 침전물을 완충용액(20mM HEPES/NaOH, pH 7.0, 3M KCl, 1mM EDTA, 1mM EGTA 및 0.1mM DTT)에 녹이고 같은 완충용액으로 평형시킨 TSKgel phenyl-5PW 컬럼(21.5 × 150mm, Toso, Japan)에 주입하였다. 단백질은 3M KCl이 함유된 완충용액으로부터 0M KCl이 함유된 완충용액까지 농도구배법으로 용출시킨 후 증류수로 20분간 용출시켰다. Cholesterol esterase 활성이 있는 단백질을 모아 농축하고 HEPES완충용액으로 평형시켜 놓은 TSKgel heparin-5PW 컬럼(7.5 × 75mm, Toso, Japan)에 흡착시킨 후 1M NaCl이 함유된 완충용액에서부터 0M NaCl이 함유된 완충용액까지 농도구배법으로 용출시켰다. 400mM NaCl 용출부분에서 효소활성이 나타났으며 SDS-PAGE로 단백질 band를 확인하고 농축한 다음 아래의 효소활성실험에 사용하였다.

효소활성 및 저해제 활성 측정법

100μl 반응혼합물은 방사선동위원소로 표식된 cholesteryl [¹⁴C-1] oleate 20,000 cpm, 10μM cholesteryl oleate, 10μM phosphatidyl choline, 100mM sodium cholate, 50mM Tris/HCl, pH 8.0과 적당한 효소가 함유되었다. 저해제를 넣는 경우 증류수에 현탁시키거나 유기용매에 녹아있는 경우 반응시험관에 미리 저해제를 넣어 질소가스로 건조시키고 완충용액을 넣어 초음파 파쇄기로 균질화시켜 반응시켰다. 37°C에서 10분 동안 반응시킨 후 1.625 ml의 메탄올/클로로포름/헵탄(1.41 : 1.25 : 1.0)과 0.525 ml의 pH 10.0인 50mM sodium carbonate/50mM sodium borate용액으로 반응을 멈추고 실온에서 원심분리한 후 수용액층 0.75ml가 포함하는 방사능 양을 베타선방사능 측정장치(TRI-CARB 2100TR, Packard Instrumental Co., Netherland)로 측정하였다.

여러 용매에 의한 마황추출물의 제조

메탄올, 에탄올, 증류수 등의 용매를 이용하여 마황추

출물을 얻었다. 즉, 잘게 부순 마황 50g을 삼각플라스크에 넣고 용매 300ml를 가하여 실온에서 6시간 동안 방치하면서 가끔 흔들여 주었다. 여과지로 잔사를 거른 다음 다시 100ml의 용매를 넣고 2시간 방치한 후 다시 거르고 그 여액을 합하여 농축하였으며, 비등 수용조 위에서의 추출인 경우 환류 냉각장치를 설치하여 3시간동안 가열하고 여과지로 잔사를 거른 다음 여액을 농축하고 일부를 취하여 cholesterol esterase에 대한 저해활성을 측정하였다.

마황으로부터 저해제 추출

마황으로부터 cholesterol esterase활성을 저해하는 물질을 분획하기 위하여 잘게 부순 마황 2kg을 500g씩 2l의 환저 플라스크에 넣고 95% 에탄올 1000ml를 가하여 환류냉각장치를 설치한 후 플라스크내의 용액을 끓이면서 환류냉각시키고 여액을 거른 다음 잔사를 다시 에탄올로 2회 반복하여 가열 추출한 다음 여액을 합하여 회전증발기로 감압 농축하였다. 감압 농축된 에탄올 추출물을 10% 메탄올로 현탁하여 클로로포름, 에틸아세테이트 및 부탄올로 단계별 추출하고 농축하여 얻은 클로로포름분획, 에틸아세테이트분획, 부탄올분획 및 물분획의 cholesterol esterase에 대한 저해제 활성을 측정하였다.

마황 에틸아세테이트 및 부탄올분획으로부터 저해제의 분리정제

4가지 분획 중 마황의 에틸아세테이트분획 및 부탄올분획을 합하여 농축하고 1차 및 2차 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 행하였다. 시료를 가한 컬럼을 클로로포름과 메탄올의 혼합액으로 단계별 용출하였으며 각각 획분을 TLC검색 및 pCEH에 대한 저해활성을 측정하였다. 추출 cholesterol esterase활성에 대한 저해능이 강한 획분을 농축하고 소량의 CHCl_3 -MeOH(1:1) 혼합액으로 녹인 후 과량의 아세톤을 가하여 4°C에서 하룻밤 방치한 후 원심분리하고 침전물을 다시 소량의 CHCl_3 -MeOH(2:1)으로 녹여 과량의 에테르를 가하여 다시 침전물을 얻은 다음 메탄올로 재결정하여 흰색결정을 얻었으며 침전물과 상층액의 저해활성을 측정하였다.

저해제의 생화학적 특성시험

마황추출물로부터 얻은 저해제의 생화학적 특성을 알기 위하여 생화학실험서(19)에 따라 실험하였다. 각 단계마다 TLC로 전개한 다음 ninhydrin/acetone 용액, conc. H_2SO_4 /ethanol 용액 및 K_2MnO_4 용액을 분무하여 spot들을 비교하였으며 재결정하여 얻은 결정시료는 당검색을 위하여 Molish test를, peptide결합의 검색을 위하여 biuret test를 행하였다.

결정화하여 얻은 시료의 기기 분석

마황의 추출물로부터 분리하여 재결정시킨 시료의 물질규명을 위하여 사용한 방법은 다음과 같았다. UV spectrum을 얻기 위하여 결정을 메탄올/중류수혼합물에 녹여 사용하였으며 220nm에서 320nm까지의 spectrum을 얻어 UV spectrum index와 비교하였고 표준품 ephedrine과 비교분석하였다. Infrared spectrum을 얻기 위하여 시료결정을 KBr결정과 함께 곱게 갈아 pellet을 만들어 사용하였고 $^1\text{H-NMR}$ 및 $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum을 위하여는 시료결정을 DMSO에 녹여 사용하였다.

결과 및 고찰

마황의 용매추출 및 저해활성

여러 용매를 이용하여 얻은 마황추출물로 소의 췌장 cholesterol esterase에 대한 저해활성을 측정한 결과는 Fig. 1과 같았으며 이는 각각의 용매추출물 100 μg 이 cholesterol esterase를 저해하는 정도를 보여준다. 메탄올로 추출하였을 때 89.2%저해로 저해활성물질을 가장 많이 추출할 수 있었으며 에탄올과 에탄올/중류수 혼합액으로 추출하였을 때에도 70% 이상 저해하였고 부탄올이나 에틸아세테이트 및 중류수로 추출하였을 때에는 저해물질의 추출이 저조하였다. 그러므로 앞으로의 실험에서 저해물질을 분리 정제하는데는 동물체내에 독성이 약한 에탄올을 사용하였다.

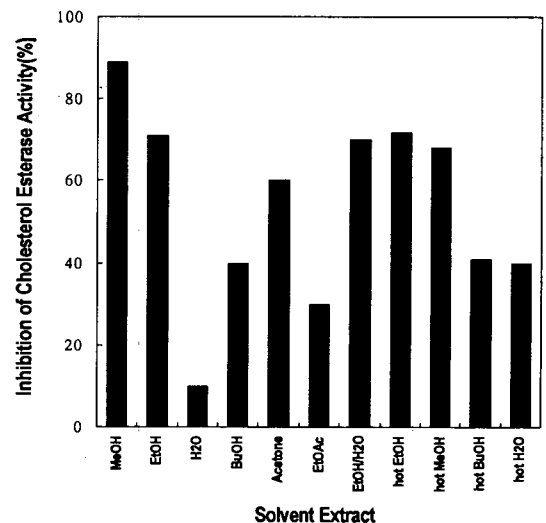


Fig. 1. The inhibitory effects of *Ephedra herba* on cholesterol esterase activity.

50g of *Ephedra herba* was extracted with each solvent 300ml for 6 hr and then 100ml for 2 hr at room temperature or boiling point. The filtrate were pooled and concentrated for assay. 100 μg of each extract was used on inhibition assay.

마황에탄올 추출물의 용매분획과 저해활성

2kg의 마황으로부터 얻은 에탄올 추출물은 346.8g이 있으며 에탄올추출물을 용매분획한 결과 클로로포름분획 30.2g, 클로로포름/물 중간층 49.2g, 에틸아세테이트분획 58g, 부탄올분획 70g 및 물분획 132.6g을 얻었으며 각 분획의 pCEH에 대한 저해활성은 Table 1과 같다. 에탄올추출물 건조중량 10μg이 cholesterol esterase 활성을 85.4% 저해하였으며 용매로 분획한 결과 물분획 5μg이 92.5%로 가장 저해활성이 높았고 에틸아세테이트분획 5μg이 50.3%, 부탄올분획 5μg이 65.4% 저해하였고 클로로포름분획 10μg은 75.0%를 저해하였다.

저해활성물질의 분리 및 정제

우선 에틸아세테이트분획과 부탄올분획을 합하여 농축하고 1차 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 행하여 pCEH에 대한 저해활성을 측정하고 TLC로 검색한 결과 저해활성을 가진 물질들은 10:1의 CHCl₃-MeOH 혼합물에서 용출되었으며 저해활성이 있는 획분을 모아 농축하고 EB획분이라 하였다(Fig. 2). EB획분을 다시 2차 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 행하였을 때 Fig. 3와 같이 2%

Table 1. The inhibitory effects of solvent fractions from ethanol extracts of *Ephedra herba* on cholesterol esterase activity

Fraction	Yield	Amount used for assay	Inhibition (%)
95% Ethanol extract	346.8g	10μg	85.4%
Chloroform layer Fr.	30.2g	10μg	75.0%
CHCl ₃ /H ₂ O interphase	32.1g	10μg	52.3%
Ethylacetate layer Fr.	58.0g	5μg	50.3%
Butanol layer Fr.	70.2g	5μg	65.4%
Aqueous layer Fr.	132.1g	5μg	92.5%

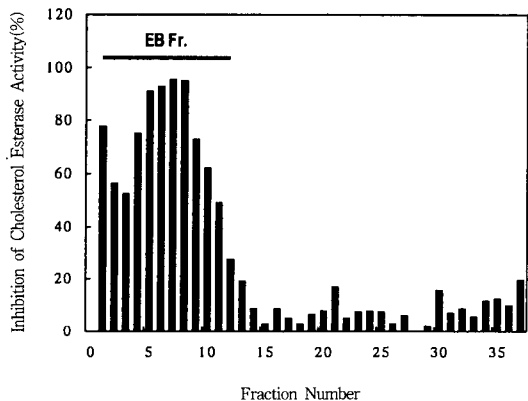


Fig. 2. First silica gel chromatography of EtOAc and BuOH fraction of *Ephedra* ethanol extract and inhibitory effects on cholesterol esterase activity. Fraction 1 to 11 were pooled and concentrated for next experiment.

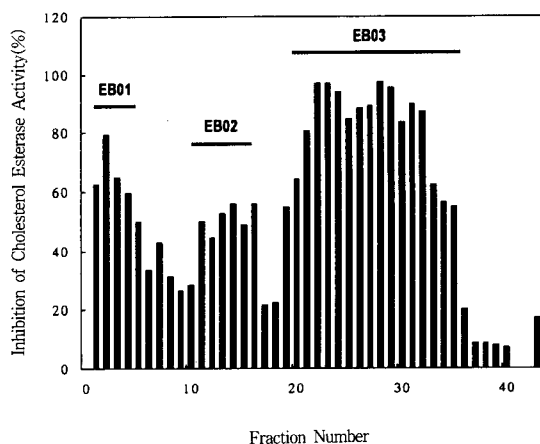


Fig. 3. Second silica gel chromatography of EB fraction of *Ephedra* ethanol extract and inhibitory effects on cholesterol esterase activity. Three fractions, EB01, EB02 and EB03, were pooled and concentrated.

CHCl₃-MeOH에서 EB01획분을, 9% CHCl₃-MeOH에서 EB02획분을 10% CHCl₃-MeOH에서 EB03획분을 얻었으며 각각 건조중량 5.5g, 15.2g 및 36.2g을 얻었고 pCEH에 대한 각각 획분의 저해활성은 100μg당 56%, 60% 및 85%이었다. 저해활성이 가장 우수하고 함량이 많았던 EB03획분을 용매침전법을 이용하여 다시 분획하고 저해활성을 측정한 결과는 Table 2와 같았다. 실험방법에서 나타낸 바와 같이 아세톤으로 침전시켰을 때 하얀 침상을 결정들을 얻을 수 있었고 다시 과량을 에테르 및 메탄올로 재결정하여 흰색결정 15.1g을 얻었으며 CHCl₃/acetone/formic acid로 TLC를 행하였을 때 R_f치는 2.8이었고 ninhydrin 분무시 진한 보라색을 띄었으며 biuret 시험에서도 양성을 보였다. 융점은 220~221°C이었고 IR spectrum은 ephedrine-HCl 표준물질의 spectrum과 같았으나 TLC에서는 ephedrine-HCl 표준물질은 원점에서 움직이지 않았고 정제된 결정을 염산염으로 만들었을 때 표준물질과 같은 R_f치를 보였으므로 실험에서 얻은 결정은 유리 ephedrine임을 알 수 있었다. 재결정으로 얻은 시료의 ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR spectrum은 Fig. 4의 a 및 b와 같았으

Table 2. The inhibitory effects of the obtained fractions from *Ephedra herba* EB03 fraction on cholesterol esterase activity

Fractions	Inhibition(%) ¹⁾	
EB03 Fraction	48.5%	
Adding Acetone	Precipitate	63.6%
	Supernatant	23.2%
Adding Excess Ether	Precipitate	78.3%
	Recrystallization with Methanol	Crystal

¹⁾10μg each fraction was used in an inhibition assay.

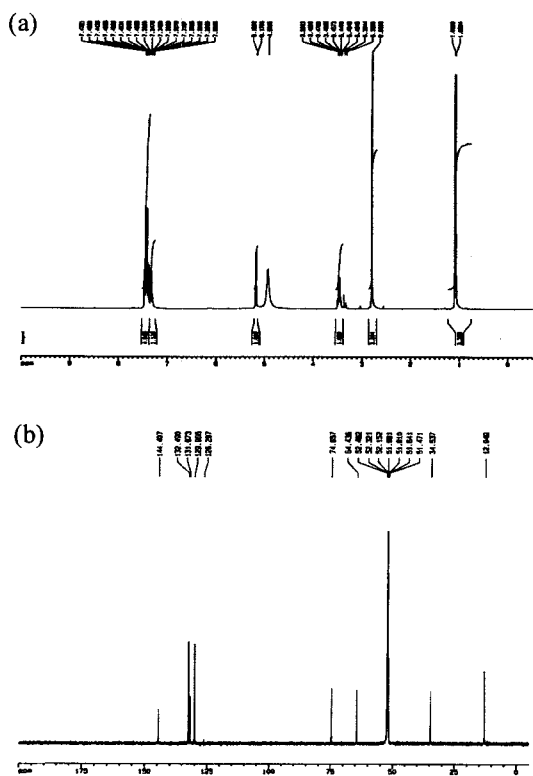


Fig. 4. ¹H-NMR spectrum(a) and ¹³C-NMR spectrum(b) of crystallized sample from *Ephedra* extract.

며 FT-IR spectrum은 Fig. 5과 같았고, GC/MS spectrum 역시 ephedrine 표준품과 같아 (-)ephedrine임이 확인되었다.

Ephedrine의 저해활성

본 실험에서 분리 정제된 ephedrine을 농도를 달리하여 pCEH에 대한 저해활성을 측정된 결과는 Fig. 6과 같았다. Ephedrine 8μg이 췌장 cholesterol esterase 활성을

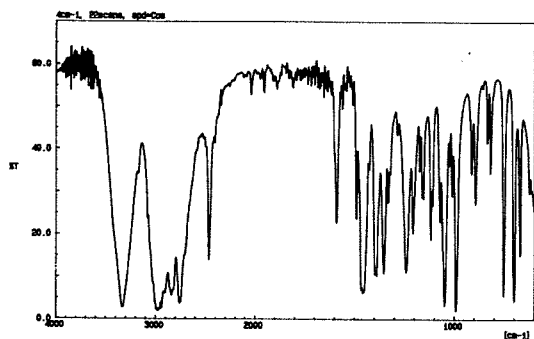


Fig. 5. Infrared spectrum of crystallized sample from *Ephedra* extract.

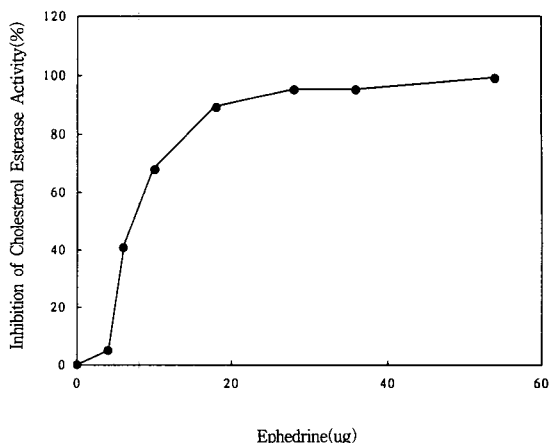


Fig. 6. Inhibitory effects of purified ephedrine on the pancreas cholesterol esterase activity.

50% 저해하였으며 ephedrine 20μg이 90% 저해하는 것으로 나타났다. 인슐린 비의존성 당뇨, 동맥경화 및 고혈압환자들에게 있어 비만은 아주 위험한 인자이기 때문에 여러 나라에서 ephedrine과 caffeine혼합물(16) 또는 ephedrine, caffeine 및 aspirin혼합물 등을 비만환자에게 사용하여 식욕감퇴 및 지방조직에서의 energy 발생효과를 유도하기도 하며 혈당치를 낮추는데 사용하기도 하지만 부작용으로서 몇몇 환자에게서 심계항진, 불면증 및 손떨림 등이 나타났으나 aspirin을 첨가하면 아무런 부작용이 없어 안정하다고 하였다(20). 지금까지의 연구결과를 보면 ephedrine은 혈중 총 콜레스테롤치를 증가시켜 혈압을 상승시킨다는 보고도 있었고, ephedrine과 caffeine혼합물을 섭취시켰을 때 혈중 총콜레스테롤치를 저하시키고 HDL-콜레스테롤치를 증가시킨다는 보고가 있었으나 본 실험에서 ephedrine이 췌장 cholesterol esterase를 강하게 저해하는 것으로 나타나 오히려 고지혈증 및 고콜레스테롤혈증 등에 의하여 발생하게 될 동맥경화증을 예방 또는 치료할 수 있을 것으로 사료된다. 최근 유럽특허증 새로운 carbamate인 WAY-121,898가 췌장 cholesterol esterase의 저해제이면서 장내 콜레스테롤 흡수를 ACAT보다 강하게 저해하고 경구투여가 아닌 주사투여를 하였을 경우에도 혈중 콜레스테롤 및 간장콜레스테롤 함량을 저해하였다고 하였으며(13) 이는 cholesterol esterase의 저해제가 콜레스테롤 흡수를 저해할 뿐 아니라 장관내의 콜레스테롤 에스테르화도 저해하고 간장의 cholesterol esterase 활성도 저해하여 동맥경화증의 예방제 또는 치료제로 사용될 수 있는 가능성을 보여준다.

요 약

췌장으로부터 분리되는 cholesterol esterase(pCEH, pancreas cholesterol ester hydrolase, E.C.3.1.1.13)는 콜

레스테롤 흡수에 관련되는 중요한 지질가수분해효소로 알려져 있다. 식이로부터 섭취되는 cholesteryl acyl ester (이하 콜레스테롤 에스테르)는 소장에서 흡수되기 전에 cholesterol esterase에 의하여 유리콜레스테롤과 지방산으로 가수분해되어야 한다. 천연물질들로부터 동맥경화 또는 고지혈증의 예방제 및 치료제를 개발할 목적으로 본 실험실에서는 여러 가지 한약재료의 추출물들을 이용하여 cholesterol esterase에 대한 저해제활성을 시험관법으로 검색하였는데 마황의 에탄올추출물이 강한 저해활성을 보였다. 마황의 에탄올추출물로부터 용매분획법과 silica gel column chromatography 등을 이용하여 cholesterol esterase활성을 저해하는 물질을 분리 정제하였으며 저해활성을 가진 흰색 결정은 UV, ¹H-NMR, ¹³C-NMR 및 GC/Mass로 분석한 결과 (-)-ephedrine으로 동정되었다. 이러한 결과들은 (-)-ephedrine이 콜레스테롤 에스테레이즈를 저해하므로써 식이중 콜레스테롤의 흡수를 저해하는 흡수저해제를 개발하기 위한 기본 물질로 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

문 헌

1. Shamir, R., Johnson, W. J., Zolfaghari, R., Lee, H. S. and Fisher, E. A. : Role of bile salt-dependent cholesteryl ester hydrolase in the uptake of micellar cholesterol by intestinal cells. *Biochemistry*, **34**, 6351-6358(1995)
2. Howles, P. N., Carter, C. P. and Hui, D. Y. : Dietary free and esterified cholesterol absorption in cholesterol esterase(bile salt-stimulated lipase) gene-targeted mice. *J. Biol. Chem.*, **271**, 7196-7202(1996)
3. Lechene, P. P., Abouakil, N., Lafont, H. and Lombardo, D. : Subcellular localization of cholesterol ester hydrolase in the human intestine. *Biochim. Biophys. Acta*, **920**, 237-246(1987)
4. Huang, Y. and Hui, D. Y. : Metabolic fate of pancreas-derived cholesterol esterase in intestine: an *in vitro* study using Caco-2 cells. *J. Lipid Res.*, **31**, 2029-2037 (1990)
5. Gallo, L. L., Newbill, T., Hyun, J., Vahouny, G. V. and Treadwell, C. R. : Role of pancreatic cholesterol esterase in the uptake and esterification of cholesterol by isolated intestinal cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **156**, 277-281 (1977)
6. Gallo, L. L., Myers, S. and Vahouny, G. V. : Rat intestinal acyl coenzyme A: cholesterol acyl transferase properties and location. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **177**, 188-196(1984)
7. Gallo, L. L., Wadsworth, J. A. and Vahouny, G. V. : Normal cholesterol absorption in rats deficient in intestinal acyl

- coenzyme A: cholesterol acyltransferase activity. *J. Lipid Res.*, **28**, 381-387(1987)
8. Lopez-Candales, A., Bosner, M. S., Spilburg, C. A. and Lange, L. G. : Cholesterol transport function of pancreatic cholesterol esterase: directed sterol uptake and esterification in enterocytes. *Biochemistry*, **32**, 12085-12089 (1993)
9. Harrison, E. H. : Bile salt-dependent, neutral cholesteryl ester hydrolase of rat liver : possible relationship with pancreatic cholesteryl ester hydrolase. *Biochem. Biophys. Acta*, **963**, 28-34(1988)
10. Zolfaghari, R., Harrison, E. H., Ross, A. C. and Fisher, E. A. : Expression in *Xenopus* oocytes of rat liver mRNA coding for a bile salt-dependent cholesteryl ester hydrolase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 6913-6916(1989)
11. Zolfaghari, R., Harrison, E. H., Han, J. H., Rutter, W. J. and Fisher, E. A. : Tissue and species differences in bile salt-dependent neutral cholesteryl ester hydrolase activity and gene expression. *Arterioscler. Thromb.*, **12**, 295-301(1992)
12. Robertson, D. G., Krause, B. R., Welty, D. F., Wolfgang, G. H., Graziano, M. J., Pilcher, G. D. and Urda, E. : Hepatic microsomal induction profile of carbamic acid [[2,6-bis(1-methylethyl)phenoxy] sulfonyl]-2,6-bis(1-methylethyl) phenyl ester, monosodium salt (PD138142-15), a novel lipid regulating agent. *Biochem. Pharmacol.*, **49**, 799-808(1995)
13. Krause, B. R., Sliskovic, D. R., Anderson, M. and Homan, R. : Lipid-lowering effects of WAY-121,898, an inhibitor of pancreatic cholesteryl ester hydrolase. *Lipids*, **33**, 489-498(1998)
14. 히キノ히로시 : 麻黃 治療學, **14**, 265-271(1985)
15. Benezra, S. A. and McRae, J. W. : Pseudoephedrine hydrochloride. In "Analytical profiles of drug substance" Academic Press, Inc., Vol 8, pp.489-507(1979)
16. Malecka-Tendera, E. : Effect of ephedrine and theophylline on weight loss, resting energy expenditure and lipoprotein lipase activity in obese over-fed rats. *International J. Obesity*, **17**, 343-347(1993)
17. Buemann, B., Marckmann, P., Christensen, N. J. and Astrup, A. : The effect of ephedrine plus caffeine on plasma lipids and lipoproteins during a 4.2 MJ/day diet. *International J. Obesity*, **18**, 329-332(1994)
18. Lee, T. G., Lee, Y. H., Kim, J. H., Kim, H. S., Suh, P. G., and Ryu, S. H. : Immunological identification of cholesterol ester hydrolase in the steroidogenic tissues, adrenal glands and testis. *Biochim. Biophys. Acta*, **1346**, 103-108(1997)
19. 한국생화학회 : 실험생화학. 탐구당, 서울, pp.171-184(1997)
20. Daly, P. A., Krieger, D. R., Kullo, A. G., Young, J. B. and Landsberg, L. : Ephedrine, caffeine and aspirin: Safety and efficacy for treatment of human obesity. *International J. Obesity*, **17**(suppl. 1), S73-S78(1993)