한국생물공학회지 제 15권 제 2호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 15, No. 2, 156-161(2000)

Macrophage 유도 사람 Low Density Lipoprotein(LDL)의 수식에 대한 *Streptomyces* sp. BH-405 배양액의 항산화 활성

†류 병 호 · [2]박 종 옥 · [1]김 희 숙 · [1]김 민 정
[1]경성대학교 식품공학과 · [2]화학과
(접수 : 2000. 3. 19., 게재승인 : 2000. 4. 21.)

Antioxidative Activity of Culture of *Streptomyces* sp. BH-405 on Macrophage Mediated Modification of Human Low Density Lipoprotein(LDL)

Beung-Ho Ryu†, Jong-Ok Park[2], Hee-Sook Kim[1], and Min-Jung Kim[1]
[1]Department of Food Science and Biotechnology
[2]Department of Chemistry, Kyungsung University, Pusan, 608-736, Korea
(Received : 2000. 3. 19., Accepted : 2000. 4. 21.)

This study was designed to investigate the antioxidative activity on oxidation of human low density lipoprotein(LDL) of band 2 fractionated from culture broth of *Streptomyces sp.* BH-405. Antioxidative activity of band 2 obtained from fractionation of BH-405 culture purification was measured against Cu^{2+} mediated human LDL oxidation by thiobarbituric acid reactive substance. $CuSO_4$ mediated oxidation of LDL was degraded at a much higher rate than native LDL. Band 2 at a concentration of 100 or 200 μg/mL inhibited the oxidation of LDL induced by $CuSO_4$, The formation of conjugated dienes induced in the presence of 5 μM CuSO4 of the mouse macrophage and J744. The electrophoretic mobility of the LDL in addition of 200 μg band 2 in the presence of 5 μM $CuSO_4$ was lower than that of native LDL. LDL modified by copper mediated or cell mediated uptake was degraded by macrophage at much greater than native LDL, and band 2 was found as potential inhibitor of modification of 125I-labelled LDL by macrophage.

Key Words : Antioxidative activity, low density lipoprotein(LDL), macrophage.

서 론

순환기계 질환은 미국과 서유럽에서 사망 원인의 제 1위를 차지할 만큼 사망의 주 요인이 된다. 우리나라도 식생활이 서구화 되면서 동맥경화, 심근경색, 심장마비 등의 뇌혈관계 질환, 뇌졸증 및 말초 혈관계 질환 등 혈액 순환기계 질환이 날로 증가하고 있다. 이러한 질환을 예방하려면 이들의 원인으로 알려진 혈관계의 low density lipoprotein(LDL)의 산화로 인한 cholesterol ester의 지방층(fatty streak)의 축적을 막아야 한다(1). 혈액중의 LDL은 cholesterol ester의 운반체로서 그 조성은 3~5% triacylglycerol, 40~44% cholesteryl ester, 20~24% phospholipid, 9~10% cholesterol 및 20~26% apolipoprotein으로 구성되어 있다(2). LDL이 산화되어 산화 LDL (Oxid LDL)이 되면 동맥경화 등 성인병을 일으키며 혈청 중의 LDL의 산화적 수식이 고콜레스테롤 혈증과 함께 동맥경화를 일으킨다(3). LDL은 macrophage, 상피세포(4), 평활근세포(5)에서 LDL내의 고도 불포화 지방산이 산화되어 monocyte/ macrophage의 LDL 수용체와는 다른 acetyl-LDL 또는 scavenger(소거) 수용체에 의해 Oxid LDL이 된다. 산화된 Oxid LDL은 거품 세포(foam cell)의 형성으로 혈관벽에 축적되어(6) 세포조직에 확산되어 독성을 나타내고(7), 내피세포에 염증을 일으켜 결국에는 동맥경화를 유발하게 된다(8,9,10). 따라서 동맥경화의 원인을 예방하게 위해서는 LDL의 산화를 방지하는 것이 보다 효과적인 방법으로 지적되고 있다. 천연 항산화제로서는 지금까지 많은 보고가 있으나 인체의 독성이나 경제적인 이유로 실용하기 어려운 실정이다. 현재 사용되고 있

†Corresponding Author : Department of chemistry, Kyungsung University, Pusan, 608-736, Korea
Tel : 051-622-4712, Fax : 051-622-4986
E-mail : bhryu@star.kyungsung.ac.kr

는 토코페롤은 내열성이 강하나 합성 황산화제에 비하여 고가이고 항산화 활성이 약하며 식물성 기름에는 효과가 약한 것으로 지적되고 있어 값이 저렴하고 항산화 효과가 강한 천연 항산화제의 개발이 요구되고 있다. 이와같이 LDL의 산화를 억제하는 천연 항산화제로는 비타민 E(11), Carotenoids(12), Catechin(13), Flavonoid(14,15) 및 그 유도체 등이 알려져 있으나 미생물에 의한 항산화제에 대한 연구는 미비한 실정이다.

미생물의 대사산물을 대상으로 한 생리 활성물질은 1940년 Chains등이 penicillin을 실용화한 이래 미생물로부터 생리 활성물질에 대한 연구가 시작되었다. 최근에는 미생물 유래 의약품, 식품 첨가물 및 생리 활성 물질을 분리 정제하고 그 구조를 분석하여 대량생산을 하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 미생물로부터 항산화제에 대한 연구는 penicillium(16), fungi(17), bacteria(18) 및 marine bacteria(19) 등에서 항산화 효과가 우수한 성분이 있는 것으로 알려지고 있어 미생물로부터 항산화제의 개발은 바람직한 연구라 할 수 있다.

따라서 본 연구는 부산 인근 연안에서 채취한 해수(海水)에서 분리한 *Streptomyces* sp.으로부터 항산화 활성이 우수한 균주를 분리한 다음, 동맥경화의 원인이 되는 LDL의 산화를 억제하는 항산화 활성 물질을 분리 정제하고, 그들의 항산화 활성에 대하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

균 주

본 실험에 사용한 균주는 *Streptomyces* sp. BH-405이며 marine broth 2216배지에 (Difco)에서 25℃에서 3일간 배양한 배양액을 사용하였다(20).

Cell lines

J774 cells은 미국 조오지아 대학교 약학대학에서 분양받았으며 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine, 100 units/mL penicillin 및 0.17 mM streptomycin을 함유한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 배지에 배양하였다.

사람 Low Density Lipoprotein(LDL)의 분리

건강한 남자의 혈액 50 mL을 EDTA(1 ㎎/50 H_2O mL) 50mL를 함유한 plastic 시험관에 넣어 교반한 후 4℃에서 3시간 방치하였다. 혈액 속의 plasma는 상온에서 20분 동안 원심분리(2000×g)하여 분리한 다음 gentamycin sulfate (1 mg/25 H_2O mL) 1mL을 첨가하였다. 혈청중의 LDL(밀도 1.019~1.063g/mL) 분리는 초고속 원심분리기(46,000×g)로 24시간 동안 분리하여 얻었다. 분리한 LDL은 0.15 M NaCl, 0.01 M EDTA가 함유된 200mL 0.01 M phosphate buffer(pH 7.4)로서 16~20시간동안 투석하였다(21).

Macrophage의 분리와 배양

Female ICR mice를 CO_2로 질식시키고 절개한 복부부위에 차게 만든 Dulbecco's phosphate buffered saline을 넣고 세척하여 macrophage을 포집 한 후 원심분리 한 다음 혈액을 제거하고 세포만 분리하였다. 이 세포를 불활성화시킨 10% fetal bovine serum과 2 mM/L, L-glutamine, 100 units/mL penicillin 및 0.17 mM/L streptomycin을 첨가한 DMEM배지 1mL에서 5% CO_2/air 존재하에서 배양하였다. 37℃에서 24시간 배양 후에 신선한 배지로 교환시킨 다음 5% lipoprotein-deficient serum(LPDS), L-glutamine을 함유한 DMEM배지에 LDL 또는 Oxid LDL를 적당한 농도로 첨가하여 실험하였다(22).

LDL의 copper 유도 산화

정제한 시료 band 2 용액(1 ㎎/ ethanol mL)을 일정량씩 취하고 여기에 LDL(100 ㎍ protein/ mL) 10 ㎕, 5 ㎛M $CuSO_4$ 5 ㎕를 넣고 phosphate buffer saline (PBS)를 넣어 전량을 100 ㎕로 한 후 37℃에서 18시간 배양하여 LDL의 산화를 조사하였다(23).

LDL의 cell 유도 산화

Macrophages 및 J774의 배양액에 LDL(100 ㎍ protein/mL) 10 ㎕와 시료(1 ㎎/ethanol mL) 8 ㎕를 각각 첨가하고 PBS를 넣어 전량을 100 ㎕로 한 후 5% CO_2 존재하에서 18시간 배양하여 LDL의 산화 정도를 실험하였다. 별도로 대조군은 이 배양액에 시료를 첨가하지 않고 동일하게 실험하였다(24).

Thiobarbituric acid reacting substances(TBARS)의 측정

LDL의 산화는 TBARS의 형성으로서 평가하였다. LDL(100 ㎍ protein/mL) 10 ㎕이 함유된 각 농도별 배양 혼합액 100 ㎕에 20% TCA 1.5 mL를 가한 다음 여기에 0.05 M NaOH 2 mL와 0.67% TBA 1.5 mL을 넣어 섞은 후 그 반응 혼합액을 90℃ 수조상에서 45분간 가열하였다. 이를 10분간 원심분리(2,000×g)한 다음 상등액의 형광을 Perkin-Elmer fluorescence spectrophotometer (Model 650-10S, USA)로서 510 및 553 nm에서 측정하였다. 시료 중의 TBARS의 수는 malondialdehyde (MDA)로서 만들어진 MDA의 표준곡선으로 부터 MDA의 nmole로 나타내었다(25).

LDL의 gel electrophoresis

LDL의 전기영동은 Nile red를 혼합한 LDL을 barbital buffer, pH 8.6으로 만든 agarose gel로서 75V에서 20분 동안 전개하여 이를 UV lamp로서 확인하였다(26).

Diene conjugation의 측정

LDL이 Oxid LDL이 됨으로써 생성가능한 공액 2중결합의 형성을 Perkin-Elmer fluorescence spectrophotometer (Model 650-10S, USA)로 234 ㎚에서 측정하였다(31). 즉 LDL(100 ㎍ protein/mL) 10 ㎕, 5 ㎛M $CuSO_4$ 5 ㎕ 및 시료(1 ㎎/mL) 160 ㎕를 혼합한 후 PBS(pH 7.4)로 2 mL로 희석한 후(최종농도 80 ㎍/mL) 37℃에서 210분동안 배양하면서 매 30분 간격으로 7회 측정하였다(26).

Human vascular endothelial cells의 배양

Jaffe등(27)의 개량 방법에 따라 분리한 세포를 미국 조오지아 대학에서 분양 받았다. 세포 배양은 F-10 배지에서 배양하였다.

LDL의 요오드화

LDL의 요오드화는 iodine monochloride법의 변형된 방법에 의하여 실험하였다(28). Iodine monochloride를 [^{125}I]의 존재하에서 LDL 단백질의 10 : 1의 mole비로서 혼합하여 반응시키고 반응에서 결합하지 않은 iodine는 0.1 M Tris-HCl buffer, 0.01% EDTA, 0.85% NaCl, pH 7.4에 투석하여 제거하였다. 투석한 후 약 98% [^{125}I] LDL을 15% trichloroacetic acid로서 침전시켜 얻었다. ^{125}I-labeled LDL은 filter(0.22 μm)를 통과시켜 사용하였다.

단백질의 정량

단백질의 정량은 표준품으로 bovine serum albumin을 사용하여 Lowry 등의 방법(29)에 따라 측정하였다.

통계 처리

통계 처리가 필요한 data는 mean±SD로서 나타내었다. Data는 각 실험군을 Duncan's multiple range test를 사용하여 통계 처리하였다(30).

결과 및 고찰

Streptomyces sp. BH-405 배양액의 추출물이 사람 LDL에 대한 항산화 효과

Streptomyces sp. BH-405의 배양액을 ethylether 추출한 후 TLC에 의하여 분리 정제한 획분을 진공 농축하여 TLC 및 Column chromatography 로 분획한 각종 획분중 band 2가 항산화활성이 가장 우수하였다. 항산화 효과가 우수한 band 2를 시료로 하여 사람 LDL에 대한 Cu^{2+} 촉매 산화의 억제효과를 실험하였다.

항산화 활성을 측정하기 위하여 LDL에 band 2를 각각 50, 100 및 200 μg/mL씩 첨가한 후 $CuSO_4$를 1, 2, 3, 4, 5 및 6 μM을 첨가하여 실험하였다. Figure 1에서 보는 바와 같이 항산화제 시료인 band 2의 첨가 용량이 높을수록 항산화 효과도 증가하였다. 반응액에서 금속이온의 산화유도 물질인 $CuSO_4$의 첨가 농도의 증가에 따라 산화속도가 증가하였으며, 5~6 μM $CuSO_4$ 농도에서는 거의 비슷하였으므로 앞으로 5 μM $CuSO_4$를 사용하였다. 본 실험에서 LDL을 $CuSO_4$로 산화촉매제로 첨가한 후 *Streptomyces* sp. BH-405의 배양액에서 분리 정제한 band 2를 200 μg/mL 첨가하였을 때 항산화 효과가 좋은 것으로 나타났으므로 LDL에 대한 산화 억제 효과가 우수한 것으로 판단되었다.

Human LDL의 수식에 대한 항산화 효과

지질의 산화 즉 LDL이 산화되면 cholesterol 및 cholesterol ester가 혈관벽에 축적되면서 지방층(fatty streak)이 형성되어 동맥경화가 유발된다. Figure 2는 macrophage 및 J774로써 사람 LDL을 $CuSO_4$ 존재하에서 *Streptomyces* sp. BH-405의 ethylether 추출물로부터 분획한 band 2에 대한 실험 결과를 나타냈다.

Macrophage에 LDL(100 μg protein/mL)을 넣고 실험한 결과에 native LDL에서는 TBARS는 2.54±0.05 nmole MDA/mg LDL protein이였으나, $CuSO_4$를 첨가한 대조군에서는 TBARS

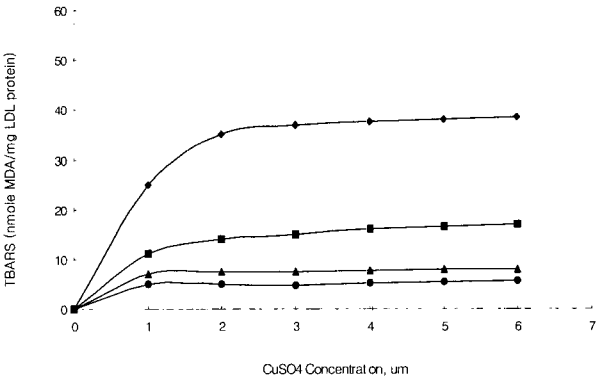

Figure 1. Antioxidative effect of band 2 obtained from *Streptomyces* sp. BH-405 cultivation on the oxidation of LDL. Control : ◆ - ◆, 50 μg/mL band 2 ; ■ - ■, 100 μg/mL band 2 ; ▲ - ▲, 200 μg/mL band 2 : ● - ●. LDL(100 μg, protein/mL) was incubated for 18 hr at 37℃ in the presence or absense of band 2. Oxidation was initiated by the addition of 1~6 μM $CuSO_4$. The lipoperoxide content was measured as thiobarbituric acid reactive substance(TBARS) and was expressed as nmol malondialdehyde equivalents/mg : Data are the mean of three separate experiments.

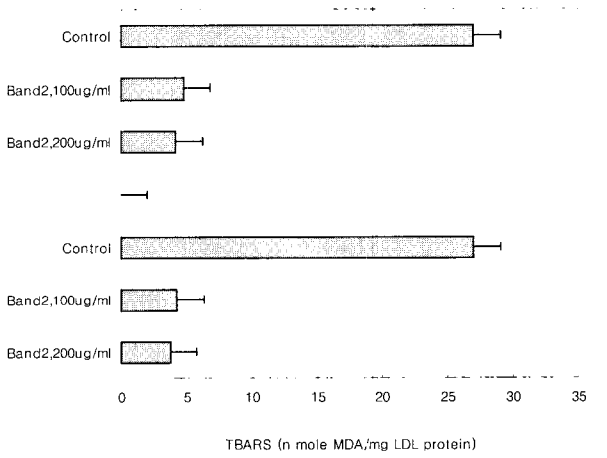

Figure 2. Antioxidative effects of band 2 obtained from cultivation of *Streptomyces* sp. BH-405 on cell-mediated oxidation of LDL. 10μg LDL(100 μg/mL) was incubated with macrophages or J774 cells for 18hr at 37℃ in presence or absence of band 2. The medium was then removed and assayed for TBARS as described in *Methods*. Results are expressed as mean±SD of triplicate analyses. The significance of the difference between band 2 treated and control values evaluated by *t*-test.

는 28.4±0.05 nmole MDA/mg LDL protein이었다. 그러나 band 2를 100 및 200 μg/mL 첨가한 실험군에는 각각 4.48±0.04 및 4.26±0.01 nmole MDA/mg LDL protein이였다.

한편 J774를 이용하여 band 2를 각각 100 및 200 μg/mL씩 첨가하여 실험한 결과 human LDL을 산화시킨 대조군의 경우 TBARS는 28.0±0.05 nmole MDA/mg LDL protein 이였으나, band 2를 각각 100 및 200 μg/mL첨가한 실험군에서는 각각의 TBARS는 4.97±0.02 및 4.63±0.01 nmole MDA/mg LDL protein이였다. 이러한 결과는 *Streptomyces* sp. BH-405 배양액으로부터 ethylether로 추출한 후 획분한 band 2가 사람 LDL의 산화에 대한 억제 효과가 높았다.

본 실험에서 LDL를 *Streptomyces* sp. BH-405의 추출물의

band 2을 첨가 후 18시간 배양한 후 LDL의 산화 억제 효과에 관한 실험에서는 억제 효과는 용량에 따른 약간의 차이가 있었다. Jialal 및 Scaccini(31)는 Cu^{2+}의 존재하에서 LDL의 산화를 2~3시간 동안의 짧은 시간 배양한 후 TBARS를 평가하여 산화정도를 측정하였으나 본 실험에서는 2~3시간보다 4~5배 많은 배양시간으로 실험하였다. 이것은 개체에 따라 다르지만 사람의 혈장에서 채취하여 얻은 LDL의 자체에 존재하는 항산화제에 약간의 영향을 받기 때문이다. 비타민 A 및 E와 같은 항산화제가 LDL의 획분에 미량 함유되어 있을 경우 항산화력이 있으며 반대로 담배를 피우는 사람은 혈액에서 산화가 쉽게 일어날 수 있기 때문에 산화가 완전히 되는 18시간 동안 배양하였다(31). 이와 같이 LDL의 산화는 LDL 자체에 항산화제가 극미량 들어 있어도 산화가 쉽게 일어나지 않는다. 본 실험결과 *Streptomyces* sp. BH-405가 생산하는 항산화 물질인 band 2는 macrophage 와 J774를 이용한 실험에서 거의 비슷한 항산화 효과를 나타내었고 band 2를 100 및 200 μg/mL씩 첨가한 결과로 첨가 농도에 따른 용량 의존형으로 나타났다.

사람 LDL 및 Oxid LDL의 gel electrophoreis

사람의 혈액중에서 분리한 native LDL, $CuSO_4$ 및 *Streptomyces* sp. BH-405의 추출물의 획분인 band 2을 일정 조건하에서 혼합하여 agarose gel electrophoresis를 실시하여 LDL의 이동거리를 비교하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 native LDL를 대조구로 하고 LDL에 5 μM $CuSO_4$와 배양액 추출물을 첨가하여 전기영동 이동상을 조사한 결과 native LDL과 배양액 추출물을 첨가한 경우에는 이동상이 낮았으나 LDL에 macrophage만 반응시킨 경우에는 이동상이 높았다. 이러한 결과는 LDL이 Cu^{2+}에 의한여 산화되면 LDL이 분해되어 이동거리가 높아지지만 여기에 band2를 첨가 할 경우 LDL의 산화 분해를 억제하므로 이동거리가 낮다.이와 같이 *Streptomyces* sp. BH-405 배양액의 추출물을 첨가한 경우에는 Oxid LDL보다 이동거리가 낮았으므로 항산화 효과가 있는 것으로 판단된다.

공액 diene 형성의 억제 효과

LDL이 산화되면 LDL의 지방산 에스테르가 2중 결합을 형성하는데 이를 이용하여 산화의 정도를 측정할 수 있다.

Table 1. Antioxidative effect of band 2 firom *Streptomyces* sp. BH-405 culture on LDL oxidation as determined by electrophoretic mobility.

Incubation Conditions	Relative electrophoretic mobility(unit,mm)	P
Native LDL	1.40	
LDL + 5 μM $CuSO_4$	1.77±0.04	<0.05
LDL + 5 μM $CuSO_4$ + Band 2, 100 μg/mL	1.47±0.01	<0.01
LDL + 5 μM $CuSO_4$ + Band 2, 200 μg/mL	1.25±0.01	<0.01

LDL(100 μg/mL) was incubated for 18 hr in DMEM medium in 35 mm dishes containing macrophages in the presence or absence of the band 2 obtained from the culture of *Streptomyces* sp. BH-405. The electrophoretic mobility of LDL was determined in agarose gels as described in *Methods*. The data are presented as mean ±S.D.

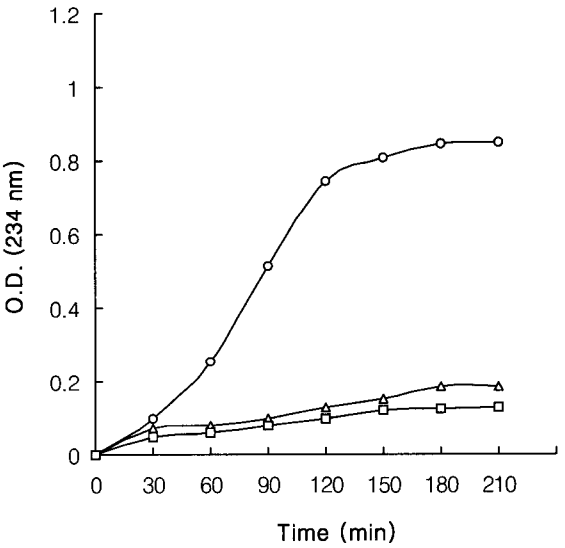

Figure 3. Antioxidative effect of band 2 obtained from cultivation of *Streptomyces* sp. BH-405 on the formation of conjugated dienes observed during different times of the LDL oxidation. Control, ○-○; 100 μg/mL band 2, △-△; 200 μg/mL band 2, □-□. LDL(100 μg protein/mL) was incubated in the presence or absence of 100 μg or 200 μg/mL band 2. Oxidation was initiated by the addition of 5 μM $CuSO_4$.

Figure 3은 LDL(100 μg protein/mL) 10 μg를 5 μM $CuSO_4$ 5 $\mu\ell$을 첨가한 다음 37℃에서 배양시간에 따른 공액 2중 결합의 증가 여부를 실험하였다. *Streptomyces* sp. BH-405의 배양액의 획분인 band 2를 각각 100 및 200 μg/mL를 첨가한 결과 시간경과에 따라 공액 2중 결합의 형성이 억제되는 것을 볼 수 있었다. 이와 같은 결과는 *Streptomyces* sp. BH-405에서 분리 정제한 band 2가 공액 2중 결합의 형성을 억제하는 구조적 특성이 지방산 에스테르의 생성을 감소시킨다는 것을 알 수 있었다.

^{125}I-LDL 의 macrophage에서의 분해

Table 2에서 보는 바와 같이 100 및 200 μg/mL로 band 2를 첨가하고 LDL을 macrophage에 넣어 배양하는 동안 배지로 유리되어 나오는 TCA 용해 방사능의 방출로부터 산화 LDL의 분해를 측정하였다. 본 실험에서 band 2를 첨가하지 않은 무첨가구에서 Cu^{2+}존재하에 ^{125}I-LDL의 분해는 9.23±0.04 μg/mL cell protein이였다. 그러나 band 2를 100 μg/mL 첨가한 경우에는 각각 6.65±0.01 μg/mL cell protein이였으나 200 μg/mL을 첨가하였을 때는 각각 5.62±0.02 μg/mL cell protein 이였다.

Endothelial cell의 경우는 band 2의 무첨가구는 0.083±0.003 μg/mL cell protein 이였으나, band 2를 100 및 200 μg/mL 첨가하였을 때는 각각 0.0054±0.001 및 0.023±0.004로 LDL의 분해 억제 효과가 있었다. Macrophage을 이용한 실험에서는 band 2의 무첨가구에서는 0.093±0.01 μg/mL cell protein 이였으나, 100 및 200 μg/mL 씩 첨가한 경우 각각 0.05±0.03 및 0.44±0.02 μg/mL cell protein으로 band 2의 무첨가구에 비하여 LDL의 분해억제 효과가 높았다.

이 실험에서 대조구에서 LDL에 5 μM $CuSO_4$만 첨가하였을 때와 macrophage에 나타난 결과 보다 내피세포에서의

Table 2. Degradation of Oxid LDL by human monocyte derived macrophages and endotherial cells in the absence or presence of band 2 fractionated from cultivation of *Streptomyces* sp. BH-405.

	Band 2		
	0	100 μg/mL	250 μg/mL
Control(Cu^{2+})	9.23±0.47	6.65±0.01	5.62±0.01
Endothelial cell	0.083±0.003	0.0054±0.001	0.0023±0.004
Macrophage	0.093±0.01	0.050±0.03	0.044±0.02

Values are μg Oxid LDL degraded /mg cell protein.
LDL was preincubated in the absence or presence of band 2 with endothelial cell or macrophage with phosphate buffered saline containing 5 μM $CuSO_4$ for 18 hr at 37℃. The LDL was reisolated by chromatography on Sephadex-G 25 and reincubated with fresh endothelial or macrophage. Degradation of LDL was determined by measuring the release of [^{125}I]-LDL into the medium during the incubation period as described in *Methods*.
Results are expressed as means±SD of triplicate experment. The significance of differences between band 2 treated and values was calculated by an unpaired *t*-test and is indicated by $^{*}P< 0.05$.

분해가 매우 낮았다. 내피세포에 의하여 유도된 산화는 Cu^{2+} 또는 macrophages때보다 더욱 낮았다고 보고한 연구결과와 일치하였다(28). 이상의 결과로 보아 Oxid LDL로 인하여 손상이 생겼을 경우*Streptomyces* sp. BH-405에서 분비하는 항산화성 물질이 subendothelium으로 이동하여 LDL의 산화를 방지하는 것으로 사료된다.

감사의 말

본 연구는 1997년도 교육부의 생물화학공학 학술연구 조성비에 의해 수행하였으므로 이에 감사드립니다.

요 약

해양에서 분리한 *Streptomyces* sp. BH-405의 배양액으로부터 정제하여 얻은 항산화 활성이 우수한 획분 band 2 에 대하여 사람 Low Density Lipoprotein(LDL)의 산화 억제 효과에 대하여 실험하였다. *Streptomyces* sp. BH-405의 배양액으로부터 분리 정제한 획분 band 2는 LDL에 대한 5 μM $CuSO_4$의 유도 산화를 측정한 결과 100 및 200 μg/mL에서 LDL의 산화억제 효과가 높았다. 그리고, band 2를 이용한 macrophage 및 J774 유도 LDL의 수식에 대한 항산화 효과도 native LDL에 비하여 높았다. 이때 같은 농도의 band 2를 첨가하여 산화 LDL의 전기영동의 이동거리를 측정한 결과 native LDL보다는 약간 높았으나 Oxid LDL의 대조군보다는 이동거리가 낮으며 공액2중결합의 생성억제 효과도 있었다. 사람 LDL의 산화에 대하여 macrophage 및 내피세포를 이용하여 ^{125}I-LDL 산화에 대하여 band 2를 각각 100 및 200 μg /mL씩 첨가하여 실험한 결과 사람 LDL의 분해는 대조구보다 낮았으며 용량 의존형의 결과를 나타내었다.

REFERENCES

1. Bruckdorfer K. R. (1990), Free radicals, lipid peroxidation and atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.*, **1**, 529-535.
2. Harland, W. A., Gilbert, J. D., Steel G. and Brooks C. J. W. (1971), Lipids of human atherma part 5, The occurren ce of human atherosclerosis, *Atherosclerosis*, **13**, 239-244.
3. Steinberg, D., Parthasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J.C. and Witztum, .L. (1989), Beyond cholesterol, Modification of low-density lipoprotein that increases its atherogenicity. *New Engl. J. Med,* **320**, 915-924.
4. Henriksen, T., Mahoney, E., and Steinberg, D. (1981), Enhanced macrophage degradation of low density lipoportein previously incubated with culture dendothelial cells, Recognition by the receptor for acetylated low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* **78**, 6499-6503.
5. Morel, D. W., Docorleto, P. E., and Chisolm, G. M. (1984), Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein *in vitro* by free radical oxidation. *Arterloscerosis,* **4**, 357-364.
6. Ross. R. (1993), The Pathogenesis of atherosclerosis, perspective for the 1990'S, *Nature.*, **362**. 801-809
7. Chisolm, G. M. (1991), Cytotoxicity of oxidized lipoproteins. *Curr. Opin. Lipidol.*, **2**, 311-316.
8. Esterbauer, H., Dieber-Rotheneder, M., Waeg, G., and Striegl. G. (1990), Biochemical, structural and functional properties of oxidized low-density lipoprotein. *Chem. Res. Toxicol.* **3**, 77-92.
9. Jurgens, G., Hoff, H.F., Chisolm, G.M., and Esterbauer, H. (1987), Modification of human serum low density lipoprotein by oxidation. Characterization and pathophysiological implications. *Chem. Phys. Lipids.* **45**, 315-336.
10. Henriksen, T., Mahoney, E. M., and Steinberg, D. (1983), Enhanced macrophage degrad-ation of biologically modified low density lipoprotein. *Atheriosclerosis,* **3**, 149-159.
11. Morel, D. W., Docorleto, P. E. and Chisolm, G. M. (1984), Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein *in vitro* by free radical oxidation, *Arterloscerosis* 4, 357-363.
12. Quinn, M. T., Parthasarathy, S., Fong, LG. and Steinberg D. (1987), Oxidatively modified low density lipoproteins. Apotential role in recruitment and retention of monocyte/ macrophages during atherogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci.,* USA, 84, 2995-3002.
13. Steinbrecher, U., Parthasarathy, S., Leake, K. S., Witztum, J. L. and Steinberg D. (1984), Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low denisity lipoprotein phospholipids, *Proc. Natl. Acad. Sci.,* USA, 83, 3883-3891.
14. Bruckdorfer, K. R. (1990), Free radicals, lipid peroxidation and atherosclerosis, *Curr. Opin. Lipidol.*, 1, 529-536.
15. Esterbauer, H., Puhl H., Dieber-Rotheneder, M., Striegl, G. and Waeg, G. (1991), Role of vitamin E in prevention the oxidation of low-density lipoprotein, *Am. J. Clin. Nulr.*, 53, 3145-3152.
16. Hayashi, K., Suzaki, K., Kawaguchi, M., Nakajima, T., Suzaki, T., Numata, M. and Nakamura, T. (1995), Isolation of an antioxidant from *Penicillium roquefortii* IFO 5956, *Biosci. Biotech. Biochem.,* **59**(2), 319-320.
17. Harun-Or-Rachid, Ma., Kato, Murata, A. and Kondok, M., (1993), Purification and characterization of the antioxidative substance produced by *Aspergillus ojae* K, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**(6), 935-937.
18. Hattori, T., Ohishi, H., Yokota, T., Ohoami, H. and Watanabe, K. (1995), Antioxidative effect of crude antioxidant preparation from soybean fermented by *Bacillus natto., Lebensm-Wiss. Technol.*, **28**, 135-138.

19. Takao, T., Kitatani, F., Watanabe. N., Yagi, A, and Sakata, K. (1994), simple screening method for antioxidants and isolation of several ntioxidants produced by marine bacteria, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **58**(10), 1780-1783.
20. Jeong, J. W. (1998), Antioxidative activity on human low density lipoprotein oxidation by *Streptomyces* sp. isolated from marine origin. *M. D. thesis, Kyungsung University*, p.p.88
21. Havel, R. J., Eder, H. A. and Bragdon, J. H. (1955), Distribution and hemical composition of ultracentrifugally seperatred lipoproteins in human serum, *J. Clin. Invest.*, **34**, 1341-1353.
22. Henriksen, T., Mafoney, E. M. and Steinberg, D. (1983), Enchanced macrophage degradation of biologically modified low density lipoprotein. *Atheriosclerosis*, **3**, 149-159.
23. Esterbauer. H., Gebicki, J., Puhl, H., and Jürens, G. (1992), The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radical Biol. Med.*, **13**, 341-352.
24. Esterbauer, H., Striegl, G., Puhl, H. and Rotheneder, M. (1989), Continuous monitoring of *in vivo* oxidation of human low density lipoprotein. *Free Rad. Res. Commun.*, **6**, 67-75.
25. Yaki, K. (1976), A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med.*, **15**, 212-218.
26. Greenspan. P., Ryu, B. H., Mao, F., Gutman, R. L. (1995), Association of negative charged phospholipids with low density lipoprotein(LDL) increases its take and the deposition of cholesteryl esters by macrophages. *Biochimei Biophysica Acta.* **1257**, 257-264.
27. Jaffe, E. A., Nackman, R. L., Becker, C. G. and Minick, C. R. (1973), Culture of human endotherial cells derived from umbilical veins. *J. Clin. Invest.*, **52**, 2745-2756.
28. Salter, A. M., Bugant, M., Saxton. J., Fisher, S. C. and Brindley, D. N. (1987), Effects of preincubation of primarymonolayer of rat heptatocytes with low and high density lipoproteins on the subsequent binding and metabolism of human low density lipoprotein. *Biochem. J.*, **247**, 79-84.
29. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr. A. L. and Randall, R. J. (1951), Protein measurement with Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265.
30. Ducan, D. B. (1959), Multiple range and multiple test, *Biometrics*, 1, 1-42.
31. Jialal, I. and Scaccimi, C. (1992), Antioxidants and atherosclerosis, *Current opin.* **3**. 324-332.