

당근추출물이 인지질막 Liposome의 유동성에 미치는 영향

신미옥 · 배송자[†]

신라대학교 식품영양학과

The Effect of *Daucus carota* L. Extracts on the Fluidity of Phospholipid Liposomes

Mi-Ok Shin and Song-Ja Bae[†]

Dept. of Food and Nutrition, Silla University, Pusan 617-736, Korea

Abstract

In this study, we investigated the thermotropic behavior of *Daucus carota* L. (DCS) extracts in phosphatidylcholine (PC) liposomes using high-sensitivity differential scanning calorimetry (nano-DSC). We used dipalmitoyl-phosphatidylcholine (DPPC) bilayers which made most stable liposomes among the other phosphatidylcholine. The sample DCS was extracted and fractionated to four different types, hexane (DCSMH), ethylacetate (DCSMEA), butanol (DCSMB) and aqueous (DCSMA) fractions. Compared to the other fractions of *Daucus carota* L., the DCSMH and DCSMEA fractions markedly affected the thermotropic properties of DPPC liposomes, broadened and shifted the thermograms of transition to lower temperatures. The incorporation of DCSMH and DCSMEA in DPPC liposomes were preferentially located in the hydrophobic core of DPPC bilayers, where it reduced the lipid packing orderness (cooperative unit) in the gel state compared to it in the liquid-crystalline state. These results suggest that the activities of the *Daucus carota* L. extracts to enhance the fluidity of the liposomal membrane have implication in their biological activities.

Key words: DPPC, *Daucus carota* L., DSC, fluidity, liposome

서 론

생체막은 세포와 조직을 보호하고, 체내 이온의 수송, 호르몬, 효소, 대사산물 및 영양물 교환 등 체내 중요한 생리 기능을 다양하게 수행하고 있다. 그러나 생체막의 복잡한 구조와 특이성 때문에 생체막을 이용한 여러 물질과의 상호작용을 규명하기란 그리 쉽지 않으므로 세포막의 주요성분인 인공 인지질막을 만들어 이 막을 통과하는 대사산물, 영양물 등의 투과 및 막의 침투성 연구에 많이 이용되고 있다(1-5). 1962년 Bangham과 Horne(6)은 인지질이 수용액 중에서 원형질 막이나 세포 내의 여러 작은 기관의 막과 유사한 이분자층 막소포를 자발적으로 형성하는 것을 발견하여 이를 리포솜(liposome)이라 불렀으며, 이후 liposome은 생체막의 성질을 연구하는 모형물질 즉, 생체막유사물질계(biomembrane-mimetic system)로서 광범위하게 사용하게 되었다. 또한 liposome은 내부에 약물을 봉입시켜 생체의 pH 등 특정조건을 부여하고 약물을 효과적으로 수송하기 위한 수단인 약물 수송 체계(drug delivery system, DDS)로 활용하는 연구로서도 활발하게 진행되고 있다(7,8). 세포막 유사물질계로서의 liposome의 가치는, 천연 지질이 가지는 여러 조성의 성질중

세포막주성분인 인지질이 지질막 이중층(lipid bilayer)을 쉽게 만들 수 있고, 이들의 성질을 이용한 생체막의 투과성, 안정성, 유동성, 세포 융합 및 효소의 활성화와 세포막 재현(reconstitution) 등과 같은 연구에 널리 응용되어 오고있어 이제까지 많은 관심을 가지고 연구되고 있다(9). 생체막의 주성분인 인지질은 온도의 상승에 따라 결정상태(gel state)에서 액상결정 상태(liquid-crystalline state)로의 상전이(phase transition temperature, T_m) 또는 상분리 등의 성질들이 나타난다. 또한 liposome막은 반투과막과 같은 성질을 가지므로 친수성 용매와 소수성 용매에 녹는 물질은 잘 투과시키나, 극성이 큰 물질과 분자량이 큰 물질은 잘 투과시키지 못한다. 이와같이 지질막의 투과성과 지질막을 구성하는 분자들의 움직임과는 긴밀한 관계가 있음은 주지의 사실이다. liposome의 성질 중에서 지질의 조성과 봉입된 약물에 의한 liposome의 구조와 막성질의 변화에 대한 연구는 liposome을 생체막 구조와 기능의 연구를 위하여 사용할 때와, 약물수송체로서의 개발을 위해 사용할 때 가장 기초되는 연구과제라 할 수 있겠다. 본 연구는 우리 식생활 주변에서 손쉽게 구할 수 있고, 널리 이용되고 있는 식품인 당근(*Daucus carota* L.: DCS) 성분 중의 생리활성물질을 규명하는 한 측면으로,

[†]Corresponding author. E-mail: sjbae@silla.ac.kr
Phone: 82-51-309-5462. Fax: 82-51-309-5176

인지질 세포막 유동성에 미치는 당근분획물의 용매별 영향을 열시차 분석법(differential scanning calorimetry; DSC)을 이용하여 측정하였다. 미나리과의 채소인 당근은 가식부 100 g 중 수분 89.6%, 단백질 1.0 g, 지질 0.2 g, 당질 7.8 g, 섬유질 0.8%, 회분 0.6 mg, 칼슘 38 mg, 인 37 mg, 비타민 A 1257 R.E, β -carotene 7.5 mg 및 비타민 C 6.0 mg 그리고 그 외 비타민 B₁, B₂ 등을 골고루 함유한 아주 높은 영양가를 가진 야채이다(10,11). 예로부터, 당근의 생즙은 혈을 보하고 조혈(造血) 효과가 있으며 식욕을 돋우고 변비나 신경쇠약에 유효하고 여자의 미용식으로도 좋은 식품이라고 알려져 왔다. 또 당근은 눈을 밝게 하고, 점막의 저항력을 길러 천식과 위궤양을 미리 막아주고, 몸을 따뜻하게 하여 혈액순환이 잘 이루어지도록 도우므로써 냉증과 동상 등에도 좋은 식품이라고 하였다(12). 특히, 당근 중에 잘 알려져 있는 β -carotene은 생체내에서 vitamin A로 전환되는 provitamin A로서 근래 β -carotene이 가지고 있는 생리활성에 대한 연구가 계속 진행되어 주목을 받고 있다. Han 등(13,14)의 연구에 의하면 당근의 5가지 분획물 중 ethylacetate 분획층이 암세포증식억제효과와 암 예방 효과가 뛰어났으므로 이 분획층에 생리활성물질이 존재함이 확인되었다. 본 연구는 당근이 식용으로써 뿐만 아니라 체내의 생리활성면에서 생체막유동성에 어떠한 효과들이 있는지 알아보기 위하여 당근의 용매별 각 추출물들을 모형세포막 인지질 liposome에 가하였을 때, 농도별 첨가로 인한 열역학적 factor의 변화 즉 ΔH_{cal} 및 Vant' hoff enthalpy (ΔH_{VH})를 구한 후, $\Delta H_{VH}/\Delta H_{cal}$ 의 비의 변화로써 인지질 liposome 이중층의 협동단위(cooperative unit)를 계산하고 이 비의 감소에 의해 당근의 용매별추출물이 인지질 liposome에 미치는 유동성 증가를 측정 분석하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험에 사용된 당근은 양산 임기농장에서 구입하여 사용하였다. 당근 220 g을 methanol로 추출하여 추출물(DCSM) 74.4 g을 얻은후 이 methanol 추출물을 각 용매별 계통 분획에 의해 n-hexane분획층(DCSMH) 2.85 g, ethylacetate분획층(DCSMEA) 2.75 g 및 n-butanol분획층(DCSMB) 13.28 g을 얻었으며 물가용부는 37.55 g을 얻었다. DL- α -dipalmitoylphosphatidylcholine(DPPC)은 Sigma(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고, 기타 시료 및 시약은 특급을 사용하였다.

기기

열시차분석 기기는 nano-differential scanning calorimeter(CSC-5100)를 사용하였으며 측정속도는 $0.25^{\circ}\text{C min}^{-1}$ 에서, 지질의 최종농도는 1 mg/mL로 하였다.

Differential scanning calorimetry(DSC)에 의한 유동성 측정

Liposome 제조: 비교적 안정한 liposome을 만드는 인지

질인 dipalmitoylphosphatidylcholine(DPPC)을 일정량 취한 후 소정의 $\text{CHCl}_3/\text{CH}_3\text{OH}(1:1)$ 혼합 용매를 사용하여 인지질을 용해시킨다. 당근추출물(DCS)을 각 용매별 분획별로 0.02 mg/mL에서 0.32 mg/mL의 범위내에서 농도별로 증가시켜 가하고 잘 혼합한 후 N_2 가스 하에서 시험관을 계속 돌려가면서 용매를 다 날려 보내어 균일한 얇은 인지질막 필름을 만들었다. 이 시료를 진공 오븐에 넣어 상전이 온도(DPPC의 상전이 온도, 약 $41\sim 42^{\circ}\text{C}$)이상에서 약 1시간 동안 잔류용매를 다 날려 보내고 동결건조기에서 하루동안 방치하였다. 만든 건조 인지질막에 일정량의 완충용액(phosphate buffer, pH 7.4)을 가한 후 상전이온도 이상의 수조에서 2분간 방치하고, vortex를 이용하여 1분간 흔들어서 다시 상전이온도 이상의 수조에 넣어 2분간 방치 후 1분간 흔들는 조작을 3회 반복하여 인지질 liposome(multilamellar vesicles, MLVs)을 제조하였다.

DSC 곡선 측정: DSC 곡선 측정은 nano-differential scanning calorimeter(CSC-5100: DSC)를 사용하였으며 지질의 최종 농도는 1 mg/mL로 하였다. Baseline은 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4) 완충용액을 사용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

DSC법에 의한 막유동성 측정에서, DPPC liposome에 당근의 용매별 분획 추출물 중 DCSMH와 DCSMEA분획물을 첨가한 경우 그 결과는 Fig. 1과 같다. 이 그림에서 보듯이 DPPC만으로 만든 liposome의 thermogram은 매우 뾰족하며, 상전이온도 이전 약 38°C 근처에서 흡열곡선의 peak가 서서히 시작되어 이와같은 경향은 상전이온도를 지나 약 45°C 까지 계속된다. 주 상전이온도(main phase transition temperature, T_m)는 약 41.5°C 근처에서 뾰족한 thermogram의 정점을 볼 수 있다. 또한 첨가물을 전혀 넣지 않은 DPPC liposome에 DCSMH와 DCSMEA분획물을 첨가한 경우 첨가물의 농도에 따라 specific heat capacity의 변화와 함께 DPPC liposome의 곡선은 점점 넓어지게 되고 결정 상태에서 액상결정 상태로 되는 상전이온도가 서서히 감소되었다. 이 결과를 온도에 대한 반응도 α 로 대표적으로 표시한 DCS-MEA의 그림은 Fig. 2와 같으며, DPPC liposome의 sigmoid curve에 비해 인지질 liposome에 DCSMEA분획물을 첨가한 경우의 sigmoid curve는 농도의 증가 즉 DCSMEA분획물을 0.02, 0.04, 0.16 및 0.32 mg/mL로 첨가한 순으로 그 기울기가 완만해짐을 확실히 알 수 있었다. 즉 DPPC liposome에 DCSMEA분획물을 농도별로 첨가할 경우 상전이온도(T_m)는 조금씩 감소하게 되고, $\Delta H_{VH}/\Delta H_{cal}$ 의 비는 첨가물의 농도증가 순서대로 점점 낮아져 rigid상태의 인지질의 협동단위의 수가 줄어들므로써 이 첨가물 중의 생리활성분이 인지질 세포막의 유동성 증가에 중요한 역할을 함을 확인

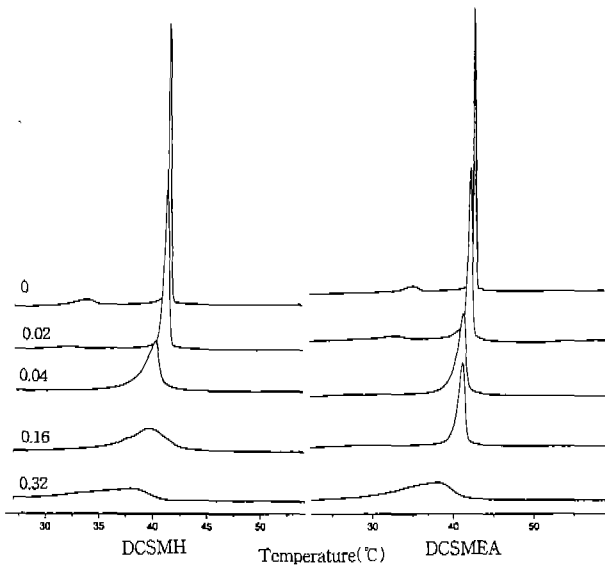


Fig. 1. The DSC thermograms of DPPC liposomes without and with various concentration of DCSMH and DCSMEA. The concentration (mg/mL⁻¹) of DCS fractions in DPPC liposome is expressed on the curves. DCSMH: Hexane fraction of DCS, DCSMEA: Ethylacetate fraction of DCS.

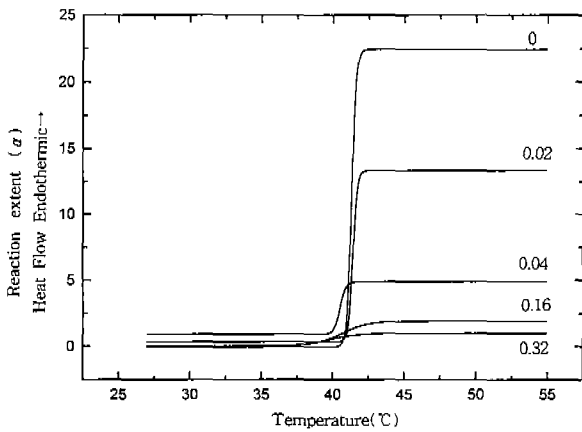


Fig. 2. Reaction extent (α) of the gel to the liquid-crystalline transition vs. the phase transition temperature (T_m) of DPPC liposomes without and with various concentrations (mg/mL⁻¹) of DCSMEA.

할 수 있었다(Fig. 3). 이 반응도 α 에서 DPPC 인지질의 상전이 반응도의 곡선 기울기를 측정한 후 상전이온도에서의 Van't Hoff enthalpy(ΔH_{VH})를 구할 수 있으며, 그 식은 다음 (1)과 같다.

$$\Delta H_{VH} = 4RT_m^2 \left(\frac{d\alpha}{dT} \right) T_m \quad (1)$$

α 는 liquid crystalline 상태에서의 인지질의 분획도이고, T_m 은 인지질의 주 상전이온도(main phase transition temperature)이다. Enthalpy(ΔH_{cal})에 대한 Van't Hoff enthalpy(ΔH_{VH})의 비는 협동단위(cooperative unit)로써 나타내어지며 이는 인지질성분 중의 견고한 형태의 지방산의 분자수

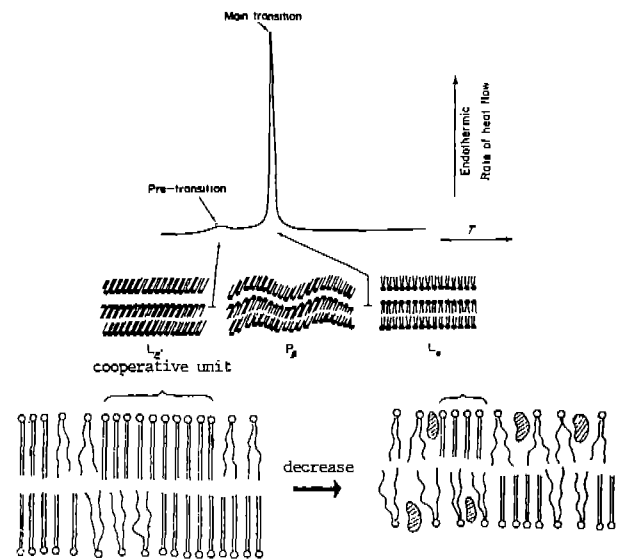


Fig. 3. Lipid phase transition from gel to liquid-crystalline state in lipid bilayer.

를 나타낸다(15,16). 즉 DPPC liposome에 DCSMH와 DCSMEA분획물을 첨가한 경우 농도별 상전이온도(T_m), enthalpy(ΔH) 및 Van't Hoff enthalpy($\Delta H_{VH} / \Delta H_{cal}$)변화를 Table 1에 나타내었다. 이 표에서와 같이 추출물농도 0.02에서 0.32 mg/mL의 DCSMH와 DCSMEA분획물을 DPPC liposome에 첨가한 경우, 약 1°C에서 3.5°C정도의 상전이온도 감소를 보였으며 이에 따라 협동단위수도 점점 감소되어짐을 알 수 있었다. 이것은 DCSMH와 DCSMEA분획물의 첨가로 지질막유동성에 영향을 주는 결과로 보여진다. 특히, DCSMH분획물 첨가의 경우는 DCSMEA분획물의 첨가의 경우보다 협동단위가 더욱 감소되어 일정농도 이상에서는 유동성효과가 더 좋음을 관찰할 수 있었다. Fig. 4는 DCSMB와 DCSMA분획물을 농도별로 첨가한 경우의 DSC곡선을 나타낸 그림이다. DPPC liposome에 DCSMB분획물의 첨가경우는 앞 Fig. 1의 DCSMH와 DCSMEA분획물을 첨가한 경우와 비슷한 경향을 나타내었으나 첨가물의 농도 증가에 따라 DCSMB의 경우 DCSMH와 DCSMEA분획물의 경우보다는 느리게 상전이온도가 저하되었고, DSC곡선도 서서히 넓어지므로서 인지질 이중층의 유동성 증가가 서서히 진행됨을 확인할 수 있었다. 그러나 수층인 DCSMA분획물 첨가의 경우는 상전이온도 변화가 거의 없었으므로 이는 아마도 수층에 녹아있는 수용성물질이 인지질 liposome 이중층의 머리 부분에 머물고 acylchain으로는 진입하지 못하여 세포막의 유동성 증가에 거의 영향을 미치지 않음을 확인할 수 있었다. DPPC liposome에 DCSMB분획물을 첨가한 경우의 농도별 상전이온도(T_m), enthalpy(ΔH) 및 Van't Hoff enthalpy($\Delta H_{VH} / \Delta H_{cal}$)변화의 결과는 Table 2와 같다. DCSMB분획물의 경우 0.02에서 0.32 mg/mL의 농도로 증가시켜 첨가하였을 때 약 1°C에서 2°C정도의 상전이온도의 감소를 보였으며,

Table 1. Thermodynamic parameters for DSC main transition curves of DPPC liposomes incorporated with DCSMH and DCSMEA

Conc. (mg m ⁻¹)	DCSMH			DCSMEA		
	T _m (°C)	ΔHcal (kcal mol ⁻¹)	ΔH _{VH} /ΔHcal	T _m (°C)	ΔHcal (kcal mol ⁻¹)	ΔH _{VH} /ΔHcal
0	41.4	8.8	434	41.4	8.8	434
0.02	41.2	10.4	169	41.3	10.2	273
0.04	40.6	10.9	52	40.2	10.3	86
0.16	38.5	10.9	23	38.6	10.2	25
0.32	37.9	11	3	38	9.7	11

The transition temperatures (T_m) and the calorimetric enthalpies (ΔHcal) were calculated by DSC, the temperature being scanned at 0.25°C min⁻¹.

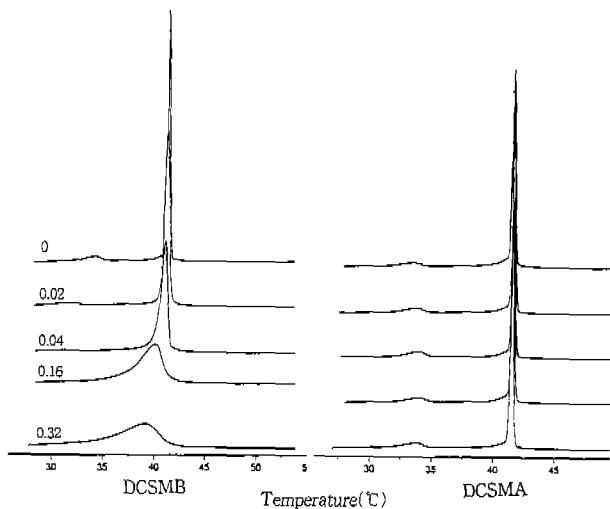


Fig. 4. The DSC thermograms of DPPC liposomes without and with various concentration of DCSMB and DCSMA.

The concentration (mg/mL⁻¹) of DCS fractions in DPPC liposome is expressed on the curves. DCSMH: Butanol fraction of DCS, DCSMA: Aqueous fraction of DCS.

이와 같은 결과는 DCSMH와 DCSMEA분획물을 첨가한 경우보다 다소 적은 감소를 보여, 낮은 유동성증가효과를 나타낸 것으로 보여진다. 전반적으로 DPPC liposome에 미치는 당근분획물의 유동성 증가에 대한 결과를 각 용매 분획별 DCSMH, DCSMEA, DCSMB, 및 DCSMA로 각각 비교해 보았을 때, 첨가물의 농도와 종류에 따라 약간의 차이는 있었으나 그 경향은 비슷하였으며 첨가물의 농도를 점차 증가시켜감에 따라 상전이온도가 조금씩 저하되면서 서서히 넓

Table 2. Thermodynamic parameters for DSC main transition curves of DPPC liposomes incorporated with DCSMB

Conc. (mg mL ⁻¹)	DCSMB		
	T _m (°C)	ΔHcal (kcal mol ⁻¹)	ΔH _{VH} /ΔHcal
0	41.4	8.8	434
0.02	41.3	10.9	379
0.04	41.1	9.1	247
0.16	40.1	10.3	33
0.32	39.2	10.2	12

The transition temperatures (T_m) and the calorimetric enthalpies (ΔHcal) were calculated by DSC, the temperature being scanned at 0.25°C min⁻¹.

혀진 곡선을 나타내었다. 즉 ΔH_{VH}/ΔHcal의 감소 경향 즉 유동성 증가 경향은 DCSMH의 경우가 가장 컸고, 그 다음으로 DCSMEA 그리고 DCSMB 및 DCSMA의 순이었다. 이 결과로 미루어보아, 각각의 분획물층 생리활성물질의 구조가 규명되는 대로 그 기전에 대한 연구가 더 상세히 밝혀지겠지만, 당근의 여러 분획물 중 DCSMH와 DCSMEA분획물의 경우 인지질 이중층의 hydrophobic core 부분에서 머무는 소수성 성분이 인지질 이중층의 acylchain 부분쪽으로 깊숙히 침투되어 있음을 유추할 수 있었다. 그러나 이 분획물 중 어느 부분이 특히 이 같은 thermogram에 민감하게 작용했는지는 구조적 배경을 토대로 여러 측면에서 더 연구되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

본 연구는 세포막의 유동성이 막의 항상성(homeostasis)을 유지하는 가장 기본적인 중요한 성질이라는 점을 감안하여, 용매별로 분획한 식품의 추출물을 첨가함으로써 인지질 이중층(liposome)의 물리·화학적 성질에 미치는 막 유동성(membrane fluidity)의 변화를 열시차 열량 분석법(differential scanning calorimeter, DSC)에 의해 측정하였다. 즉 식탁의 애용식품인 당근의 용매별 분획물이 인지질 liposome에 미치는 막의 유동성에 미치는 증가효과를 본 결과, DPPC liposome에 당근의 용매별 분획물을 첨가했을 때, 일반적으로 첨가하지 않은 경우보다 첨가농도의 증가에 따라 의존적으로 초기 상전이온도가 낮아졌고 흡열곡선의 모양이 넓어졌으며 그로 인하여 협동단위(ΔH_{VH}/ΔHcal)값이 감소됨을 확인하였다. 이와 같은 현상은 일정농도의 당근분획물의 첨가가 DPPC liposome의 막유동성을 증가시킨 결과로 생각되어진다. 그리고 각 용매별 당근분획물의 유동성효과를 각각 비교해본 결과, DCSMH와 DCSMEA의 분획물첨가가 DCSMB와 DCSMA에 비해 DPPC liposome의 초기 상전이온도 및 협동단위를 더욱더 감소시켜 막유동성에 더 많은 영향을 주는 것을 확인하였다. 이와 같은 현상은 DCSMH와 DCSMEA의 분획물이 DCSMB와 DCSMA분획물의 경우보다 hydrophobicity가 더 크므로인해 DPPC 인지질막 이중층의 acylchain쪽으로 더 깊숙히 용해하여 침투되므로서 생긴

현상이라 하겠다. 즉 당근분획물의 막유동성 증가작용은 세포막에서 일어나는 대사물, 약물, 이온 등의 운반 및 영양물의 교환, 흡수 등 생체막의 주요기능에 영향을 미치는 효과가 있는 것으로 사료되며, 앞으로 막유동성을 증가시키는 구체적인 생리활성물질의 추구가 기대되어진다.

감사의 글

본 연구는 2000년도 신라대학교 교내연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

문헌

1. Yamamoto, Y., Niki, E., Kamiya, Y. and Shimasaki, H. : Oxidation of lipid. *Biochim. Biophys. Acta*, **795**, 332-340 (1984)
2. Bangham, A.D. : Liposome and their uses in biology and medicine. In *Properties and uses of lipid vesicles*, Academic Press, New York, p.2 (1978)
3. Viani, P., Gervato, G., Fiorilli, A., Rigamoni, E. and Cestaro, B. : Studies on peroxidation processes of model membranes and synaptosome : role of phosphatidic acid. *Chem. Phys. Lipids*, **52**, 49-55 (1990)
4. Lang, J., Vigo-Pelfrey, G. and Martin, F. : Liposomes composed of partially hydrogenated egg phosphatidylcholine : fatty acid composition, thermal phase behavior and oxidative stability. *Chemistry Physics Lipids*, **53**, 91-101 (1990)
5. Gregoriadis, G. : *Liposomes, Drug Carriers in Biology and Medicine*. Academic Press, New York, p.287 (1979)
6. Bangham, A.D. and Horne, R.W. : Action of saponin on biological cell membranes. *Nature*, **196**, 193-195 (1962)
7. Gregoriadis, G. : The use of French pressed vesicles for efficient incorporation of bioactive macromolecule and as a drug carriers *in vitro* and *in vivo*. In *Liposome Technology II*, CRC Press, Florida, p.38 (1984)
8. Ferraretto, A., Sonnino, S., Soria, M.R. and Masserini, M. : Characterization of biotinylated liposomes sensitive to temperature and pH : new tools for anti-cancer drug delivery. *Chem. Phys. Lipids*, **82**, 133-139 (1996)
9. Takashi, K., Ninomiya, C., Masakazu, K., Kobayashi, H., Hirota, T. and Fujita, Y. : Action mechanism of amphipatic peptides gramicidins and mellitin of erythrocyte membrane. *Biochim. Biophys. Acta.*, **939**, 57-63 (1978)
10. 한국영양학 부설 영양정보센터 : 식품연구소 합량 자료집. p.84-85 (1998)
11. 중약대사전. 상해과학기술출판사, 상해 (1985)
12. 신재용 : 밥상위에 숨은 보약찾기. 삶과꿈, 서울 (1998)
13. Han, E.J., Roh, S.B. and Bae, S.J. : Cytotoxicity of *Daucus carota* L. on various cancer cells. *J. Korean. Soc. Food Sci. Nutr.*, **29**, 153-160 (2000)
14. Han, E.J., Roh, S.B. and Bae, S.J. : The effect on quinone reductase induction of *Daucus carota* L.. *Korean J. Life Sci.*, **10**, 79-85 (2000)
15. Eizo, S., Shigeo, K., Masaaki, T., Hiroyuki, K. and Massahito, K. : Effects of surface charges and cholesterol content on amino acid permeabilities of small unilamellar vesicles. *J. Pharm. Sci.*, **79**, 232-235 (1990)
16. Maggio, B., Anga, T., Sturtevant, J.M. and Yu, R.K. : Thermotropic behavior of binary mixtures of dipalmitoyl phosphatidylcholine and glycosphingolipids in aqueous dispersions. *Biochim. Biophys. Acta.*, **818**, 1-12 (1985)

(2001년 5월 15일 접수)