목재공학 32(1): 17~27, 2004
Mokchae Konghak 32(1): 17~27, 2004

산마늘로부터 단리한 kaempferol과 quercetin의 콜레스테롤 저하 활성*1

이 성 숙*2 · 문 서 현*3 · 이 학 주*2 · 최 돈 하*2† · 조 명 행*3

Cholesterol inhibitory activities of kaempferol and quercetin isolated from *Allium victorialis var. platyphyllum**1

Sung-Suk Lee*2 · Seo-Hyun Moon*3 · Hak-Ju Lee*2 · Don-Ha Choi*2† · Myung-Haing Cho*3

요 약

식용 임산자원인 산채류를 기능성 식품으로 개발하고자 산마늘을 비롯한 총 13종의 에탄올 조추출물에 대한 콜레스테롤 저하활성을 검정하였다. 즉, 콜레스테롤 생합성 과정 초기에 관여하는 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase(HMG-CoA reductase)와 후기에 관여하는 squalene synthase의 효소 활성을 조사한 결과 산마늘 잎 에탄올 추출물이 두 효소의 활성을 공히 70% 이상 저해하여 활성이 가장 우수한 것으로 나타났다. 그리고 이러한 콜레스테롤 저하활성과 관련이 있는 물질을 탐색하고자 산마늘로부터 물질 단리를 시도하여 디클로로메탄 가용부로부터 kaempferol과 quercetin을 단리하였다. 또한 유전자 레벨에서의 콜레스테롤 저하 활성을 조사하기 위해 단리물질과 분획물을 C100세포(햄스터 유래 HMG-CoA reductase 고발현 세포주)에 각각 5 μg/mℓ과 10 μg/mℓ로 24시간 처리하여 HMG-CoA reductase와 squalene synthase의 mRNA 발현 정도를 조사하였다. 그 결과 10 μg/mℓ로 kaempferol과 quercetin을 처리한 경우 두 효소의 mRNA가 전혀 발현하지 않는 것으로 나타나 유전자 레벨에서의 콜레스테롤 생합성 저해 효과를 확인할 수 있었다. 이상의 결과 산마늘 잎 에탄올 추출물은 콜레스테롤 생합성에 관여하는 HMG-CoA reductase와 squalene synthase의 활성을 저해하며 이러한 활성 저해 효과는 kaempferol과 quercetin에 기인하는 것으로 사료되었다. 특히 kaempferol과 quercetin은 여러 식물의 성분으로서 이미 알려진 화합물이지만 콜레스테롤 저하활성이 있는 것으로 밝혀진 것은 이번이 처음으로 금후 이들 물질과 이들 물질을 함유하고 있는 식물 활용에 필요한 자료를 제공하였다고 사료된다.

* 1 접수 2003년 2월 28일, 채택 2003년 4월 3일
본 연구는 산림청 임업공동연구사업의 지원에 의하여 수행되었음.
* 2 임업연구원 Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea
* 3 서울대학교 수의과대학 College of Veterinary Medicine, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
† 주저자(corresponding author) : 최돈하(e-mail: cdonha@foa.go.kr)

ABSTRACT

Cholesterol inhibitory activity was investigated to develop the functional food from edible forest resources such as *Allium victorialis* var. *platyphyllum* and other 12 species. Among tested samples by enzyme-linked immunosorbant assay (ELISA), leaf extracts of *A. victorialis* var. *platyphyllum* inhibited 73.9% of the activities of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMG-CoA reductase) which is the highly regulated and major rate-limiting of the cholesterol biosynthesis pathway. Moreover, those extracts inhibited 76.7% of squalene synthase which catalyzes the head-to-head condensation of two farnesyl pyrophosphate molecules to form squalene in the biosynthesis of cholesterol. In order to find out the compounds which would play a key role in inhibitory activity of cholesterol, kaempferol and quercetin were isolated from the dichloromethane soluble fraction of extracts of *A. victorialis* var. *platyphyllum*. Kampferol, quercetin and each soluble fraction was also subjected to the test of the mRNA expression of HMG-CoA reductase and squalene synthase by reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay, respectively. By treating both enzymes with 10 $\mu g/m\ell$ of kaempferol and quercetin for 24 hours, respectively, the mRNA expression was not observed, suggesting that both compounds inhibited the biosynthesis of cholesterol at mRNA level. In this regard, it could be inferred that cholesterol inhibitory activity of *A. victorialis* var. *platyphyllum* was derived from kaempferol and quercetin. Both compounds have already been found in many plant extracts including hardwood and softwood, but it might be first known that they have cholesterol inhibitory activity.

Keywords: *Allium victorialis* var. *platyphyllum, cholesterol inhibitory activity, HMG-Co A reductase, squalene synthase, kampferol, quercetin*

1. 서 론

최근 생활수준의 향상으로 인해 지방질의 과다섭취와 육류 소비량의 증가, 복잡한 사회생활에 따른 스트레스는 심장 및 혈관계질환의 급격한 증가를 가져오게 되었다. 이러한 순환기계 질환은 미국, 유럽뿐만 아니라 우리나라에서도 주요 사망원인으로 대두되고 있으며 특히 동맥경화성 질환인 허혈성 심질환(협심증, 심근경색증)과 뇌혈관 질환에 의한 사망률이 큰 폭으로 증가되고 있다(송영득, 1996). 동맥경화를 유발하는 인자로는 고콜레스테롤혈증, 흡연, 고혈압, 비만, 당뇨, 스트레스, 나이, 성별 등이 있으며 그 중에서도 혈중 콜레스테롤의 상승으로 인한 고콜레스테롤혈증은 동맥경화증의 발생과 진전에 가장 큰 요인으로 알려져 있다(Naito, 1995). 동맥경화증이란 과잉의 콜레스테롤이 콜레스테릴 에스터의 형태로 동맥의 내막벽에 침착된 후 굳어져서 동맥벽이 비후되고 경화됨으로써 혈관이 좁아지는 비가역적 변성으로, 대부분 관상동맥에서 발병되어 혈류장애를 일으키므로 심근에 혈액공급이 부족하여 발병한다(Ross, 1993; Witztum & Steinberg, 1991). 동맥경화증에 대한 연구는 고콜레스테롤혈증과 여러 위험인자들의 복잡한 반응에 의한 동맥경화로의 진행을 차단하여 예방하는 것이 주목적인데, 현재의 의학수준에서는 모두 제거하지 못하므로 식생활을 개선하여 야채 및 과일을 섭취함으로써 예방하도록 권장하고 있는 실정이다. 식용 임산자원의 하나인 산채의 경우 지금까지는 경험적으로 전통식품의 소재로 단순히 이용되어져 왔으나 이들의 효능을 과학적으로 분석하여 현대인의 요구에 부응하는 기능성 가공 식품의 형태로 개발하면 보다 부가가치가 높은 식품용 소재 개발이 가능하다고 생각된다. 따라서 본 연구에서는 산채류의 콜레스테롤 생합성 과정 중 초기의 율속효소로 작용하는 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMG-CoA reductase)와 후기에 작용하는 squalene synthase에 대한 활성 저해율을 조사함으로써 산채

Table 1. List of tested plants

Korean name	Scientific name	Family name	Sampled tissue
산 마 늘	*Allium victorialis* var. *platyphyllum*	Liliaceae	Leaf
들 깨	*Perilla frutescens* var. *japonica*	Labiatae	Leaf
소 엽	*Perilla frutescens* var. *acuta*	Labiatae	Leaf
산 초 나 무	*Zanthoxylum schinifolium*	Rutaceae	Leaf
쇠 비 름	*Portulaca oleracea*	Portulacaceae	Leaf
전 호	*Anthriscus sylvestris*	Umbelliferae	Root
참 나 물	*Pimpinella brachycarpa*	Umbelliferae	Leaf
누 룩 치	*Pleurospermum camtschaticum*	Umbelliferae	Leaf
잔 대	*Adenophora triphylla* var. *japonica*	Campanulaceae	Root
모 시 대	*Adenophora remotiflora*	Campanulaceae	Leaf
미 역 취	*Solidago virga-aurea* var. *asiatica*	Compositae	Leaf
참 취	*Aster scaber*	Compositae	Leaf
수 리 취	*Synurus deltoides*	Compositae	Leaf

류의 콜레스테롤 저하활성을 구명하여 부가가치가 높은 식용 자원으로 개발하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 공시재료

공시재료로서는 백합과 1종, 꿀풀과 2종, 운향과 1종, 쇠비름과 1종, 산형과 3종, 초롱꽃과 2종 및 국화과 3종 등 총 13종의 식물체를 채집하여 사용하였으며 학명 및 채취부위는 Table 1과 같다. 각 시료는 실온에서 음건한 후 분쇄하여 95% 에탄올로 72시간 침적시켜 2회 추출한 액을 회전 농축기로 농축하여 HMG-CoA reductase와 squalene synthase의 효소활성을 검정하였다.

2.2. HMG-CoA reductase 및 squalene synthase 활성검정

2.2.1. HMG-CoA reductase 및 squalene synthase에 대한 단클론항체의 제작

2.2.1.1. 실험 동물 및 시약

단클론항체를 생산하기 위해 5 주령 암컷 Balb/c 마우스를 수의과학연구소에서 분양받아 사용하였다. 실험 동물은 무균 동물사육기에서 수돗물과 실험동물용 사료를 자유로이 급식하면서 1 주간 사육하여 적응시킨 후 실험에 사용하였다.

HMG-CoA reductase 촉매부위 peptide 19mer, H_2N-RESREGRPIWQLSHFARVL-COOH (Roitelman 등, 1992), squalene synthase의 경우에는 16mer, H_2N-YCHYVAGLVGIGLSRL-COOH (Liscum 등; Roitelman 등, 1992)를 합성하여 HPLC와 Mass spectroscopy분석을 마친 후 항원으로 사용하였고, keyhole limpet hemocyanine (KLH), chicken ovalbumin, horseradish peroxidase, *O*-phenylenediamine dihydrochloride (OPD), goat antimouse IgG-horseradish peroxidase conjugate, pristane, tween 20, 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC), Freund's complete adjuvant, Freund's incomplete adjuvant 등의 시약은 Sigma(USA)에서 구입하였다. 세포배양과 세포융합용으로 사용한 Dulbecco's modification of Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), hyphoxanthine aminopterine thymidine (HAT) supplement 등은 Gibco(USA)에서, polyethylene glycol (PEG)은 Boeringer Mannheim (Germany)에서 입수하였다.

2.2.1.2. 면역원의 제조와 면역

항원으로 사용할 peptide를 증류수에 5 mg/5 mℓ로 희석하고 EDC를 50 mg/5 mℓ가 되도록 첨가한 후 pH 5로 맞추어 실온에 5분 동안 방치하였다. 여기에 〔1 mole peptide/KLH의 amino acid 50개〕의 비가 되도록 KLH를 첨가하여 다시 실온에 4시간 방치한 후 sodium acetate (pH 4.2)를 100 mM의 최종 농도로 첨가하여 반응을 정지시켰다. 그리고 1시간 동안 실온에 방치하였다가 gel filtration한 후 spectrophotometer (Jasco, Japan)로 흡광도를 측정하여 conjugation 여부를 확인하고 면역원으로 사용하였다.

제조한 면역원은 PBS로 100 mg/50 mℓ로 희석한 후 같은 양의 Freund's complete adjuvant (Sigma, USA)를 섞어 emulsion화하여 Balb/c 마우스의 복강내에 주사하였다. 이 후 2주 간격으로 3차례에 걸쳐 위와 같은 방법으로 Freund's incomplete adjuvant (Sigma, USA)를 혼합한 면역원을 마우스의 복강에 주사하였다.

2.2.1.3. 간접 효소면역측정법에 의한 항체 역가의 측정

면역원을 주사한 매 10일 후에 마우스의 안와정맥에서 채혈하여 혈청을 분리한 다음 간접 ELISA를 실시하여 항체의 역가를 측정하였다. 흡착 항원인 peptide-ovalbumin conjugate 100 mℓ를 96-well immunoplate의 각 well에 가하여 4℃에서 12시간 정치시킴으로써 흡착시켰다. 이를 washing buffer (0.02% tween 20 in PBS, pH 7.2)로 3회 세척한 후 blocking solution (0.2% skim milk in 40 mM carbonate buffer, pH 9.6) 200 mℓ를 넣고 37℃에서 1시간 정치하였다. 이 후 항혈청 20 mℓ를 단계별로 희석하여 각 well에 넣은 후 37℃에서 1시간 반응시켰다. Plate를 다시 3회 세척한 후 goat anti-mouse IgG-HRPO conjugate를 0.1% gelatin이 포함된 PBS로 2,000배 희석한 용액 100 mℓ를 각 well에 넣어 37℃에서 1시간 반응시켰다. 이를 3회 세척 후 0.04% *O*-phenylenediamine dihydrochloride (OPD, in citrate phosphate buffer, pH 5.2)에 H_2O_2를 0.01%의 농도로 가한 기질 용액 100 mℓ씩 각 well에 넣어 37℃, 20분간 반응시킨 다음 3 N HCl 용액 25 mℓ씩 각 well에 가하여 반응을 정지시켰다. 흡광도는 파장 490 nm에서 Thermomax microplate reader (Molecular Devices, USA)로 측정하였다.

2.2.1.4. 단클론 항체의 생산

면역된 Balb/c 마우스로부터 비장을 적출하여 두 개의 주사기로 잘게 찢어 나일론 망에 통과시킴으로써 단세포 부유액을 만들었다. 이 부유액을 1000 rpm, 5분 2회 원심분리하여 세포를 세정한 후 세포 융합에 사용하였다. SP2/0-Ag14 myeloma cell은 적어도 융합일 2 주전에 해동하여 배양, 수확하여 융합에 사용하였다.

비장 세포와 myeloma cell의 수를 hemocytometer로 측정한 후 7 : 1의 비로 conical tube에 섞는다. 이를 DMEM으로 2회 세척한 후 tube의 아랫부분을 가볍게 두드려서 세포가 tube의 바닥에 균등히 깔리게 하였다. 여기에 37℃로 유지된 1 mℓ의 PEG 1,500 (Boeringer Mannheim, Germany)을 1분에 걸쳐 서서히 저어주면서 넣은 후 1 mℓ의 DMEM을 서서히 첨가하고 이를 1분간 방치 후 다시 3 mℓ의 DMEM을 서서히 저어주면서 3분에 걸쳐 첨가하였다. 이어서 10 mℓ의 DMEM을 1분에 걸쳐 서서히 첨가하고 1,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 세포를 침전시켰다. 원심분리 후 상층액을 완전히 제거하고 myeloma cell의 부유액으로부터 얻은 conditional media 20 mℓ와 2×HAT media 20 mℓ를 섞어 천천히 부유시킨 후 미리 feeder cell을 깔아 놓았던 3개의 96-well plate에 well 당 100 mℓ씩 첨가하였다. 융합 다음날 상층액의 반을 뽑아내고 1×HAT media를 well 당 100 mℓ씩 첨가하였으며 이 후 3일에 한 번 씩 1×HAT media를 갈아주며 세포를 유지하였다.

융합 일주일 후에 원하는 항체를 분비하는 융합 잡종 세포를 분리하였다. 즉, 96-well plate에서 융합 잡종 세포가 자라고 있는 well의 상층액을 50 mℓ씩 취하여 간접 ELISA 방법으로 항체를 screening하였다. 높은 역가를 보이는 well의 융합 잡종 세포를 대상으로 단계 희석법을 실시하여 단일 클론을 얻었다. 즉, 융합 잡종 세포를 한 well 당 0.5개의 세포가 들어

가도록 희석하여 하루 전에 feeder cell을 접종해 놓은 96-well plate에 넣어 주었다. 안정된 클론이 얻어질 때까지 계속 클로닝을 실시하여 그 중 일부는 배양하고 일부는 액체 질소에 보관하였다. 마우스 복강에서의 단클론 항체의 대량 생산을 위해서는 복강에 융합 잡종 세포를 넣기 7일 전에 pristane (Sigma, USA) 0.5 mℓ을 복강 안으로 주사하였다. 융합 잡종 세포 1×10^6개를 복강 안에 넣고 12일 후 복강에서 복수를 얻었다. 마우스의 복강에서 얻은 복수에 동량의 포화 $(NH_4)_2SO_4$ 용액을 넣은 후 4℃에서 1시간 방치한 후 1,000 rpm, 30분간 원심분리를 실시하였다. 원심분리 후 상등액을 PD-10 column (Pharmacia, USA)에 통과시켜 염을 제거하였다. 이 후 280 nm 파장에서 흡광도를 측정하여 항체가 들어 있는 분획을 확인한 후 사용하였다.

2.2.2. ELISA용 세포의 배양 및 시약과 시료의 처리

ELISA에 사용할 C100 세포(SV-40-transformed baby hamster kidney 유래세포, HMG-CoA reductase의 발현 수준이 높은 세포주)는 minimum essential medium (MEM, Gibco, USA)에 지방을 추출한 fetal bovine serum (FBS) 10%와 gentamicin (Gibco, USA)을 첨가하여 37℃, 5% CO_2의 조건 하에서 배양하였다.

FBS로부터의 지방 추출은 5 mℓ의 FBS에 isopropyl ether (Sigma, USA) 6 mℓ, butanol (Sigma, USA) 4 mℓ와 ethylenediamine tetraacetate (EDTA, Sigma, USA) 0.5 mg의 비율로 첨가하여 28~30 rpm으로 30분간 원심분리하여 혼합한 후 aqueous phase와 organic phase로 분리하기 위하여 2000 rpm, 2분 동안 다시 원심분리를 실시하였다(Cham & Knowles, 1976). 혼합액이 두 층으로 분리되면 aqueous phase를 주사기로 뽑아내어 0.22 μm filter unit (Millipore, USA)를 이용하여 무균상태로 만든 후 4℃에 보관하고 세포배양에 사용하였다.

2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD, Supelco, USA)와 benzo[*a*]pyrene (Aldrich, USA)은 각각 30 nM과 3 μM의 최종농도가 되도록 dimethyl sulphoxide (DMSO)에 녹여 사용하였다. 각 추출 시료는 DMSO에 녹여 10 μg/mℓ의 농도로 투여하여 효과를 관찰하였다.

HMG-CoA reductase 및 squalene synthase의 저해를 위하여 투여하는 lovastatin (종근당, Korea)은 *in vitro* 실험 시 사용 전에 lactone 고리를 분해하여 활성화 형태로 만들어야 작용을 발휘한다(Keyomarsi 등, 1991). 먼저 52 mg의 lovastatin을 15 mℓ의 tube (Falcon, USA)에서 1.04 mℓ의 95% ethanol에 녹인 후 813 mℓ의 1 N NaOH를 첨가하고, 50℃에서 2시간 동안 방치해서 완전히 용해시킨 후 pH 7.2로 맞추었다. 그 후 증류수를 첨가하여 최종 부피를 13 mℓ로 맞추면 lovastatin의 최종 농도는 10 mM이 된다. 이 용액을 분주하여 -20℃에서 보관하며 실험 시 희석하여 사용하였다.

2.2.3. HMG-CoA reductase 및 squalene synthase activity를 확인하기 위한 ELISA의 실시

C100 세포는 25 cm^2 세포배양용 플라스크에 배양하여 환경성 발암물질인 30 nM의 TCDD와 3 μM의 benzo[*a*]pyrene (Aldrich, USA), 그리고 10 μg/mℓ의 추출 시료를 세포에 병용 투여하였다. 시료들의 HMG-CoA reductase 및 squalene synthase 저해 효과를 비교하기 위한 대조군으로는 시료 대신 lovastatin을 투여한 세포로 설정하였다. 즉, TCDD와 benzo[*a*]pyrene로 야기된 HMG-CoA reductase 및 squalene synthase의 활성증가 효과를 각 시료가 얼마나 저해하는가를 lovastatin군을 기준으로 삼아 저해율로 계산하였다.

위 각 시약과 시료를 C100 세포에 투여하여 96시간 배양 후 세포배양용 플라스크에서 배지를 제거하고 phosphate buffered saline (PBS)으로 세척한 후 1% NP-40 (Amresco, USA), 0.5% sodium deoxycholate (Sigma, USA), 0.1% sodium dodecyl sulfate (Sigma, USA)의 비율로 PBS에 녹인 buffer를 25 cm^2 플라스크 당 0.2 mℓ의 비율로 가하고, cell scraper로 플라스크 바닥의 세포를 긁어서 수확하였다. 이 세포현탁액에 phenylmethylsulphonyl chloide (Sigma, USA)

10 mg/mℓ stock solution을 10 μℓ/mℓ의 비율로 첨가한 후 얼음 위에서 30~60분간 방치하였다. 이 후 이 현탁액을 15,000 *g*, 20분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 이 액 1 mℓ을 40 mM carbonate buffer (pH 9.6) 11 mℓ에 섞어 96-well plate의 한 개 well 당 100 μℓ씩 넣어 4℃에서 12시간 동안 흡착시켰다. 40 mM carbonate buffer (pH 9.6)는 0.2 M Na_2CO_3 (21.2 g/ℓ) 16.0 mℓ와 0.2 M $NaHCO_3$ (16.8 g/ℓ) 34.0 mℓ를 섞어 200 mℓ로 희석하여 만들어 사용하였다. Blocking을 위해서 각 well을 PBS로 세척 후 skim milk를 0.2%로 첨가한 40 mM carbonate buffer (pH 9.6)를 각 well에 200 μℓ씩 넣어 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 이 후 well을 PBS로 세척하고 HMG-CoA reductase 및 squalene synthase 항체를 5 μg/mℓ로 skim milk를 0.2%로 첨가한 PBS에 희석 100 μℓ/well로 첨가한 후 37℃에서 1시간 반응시켰다. 반응 후 well을 PBS로 다시 세척하고 goat anti-mouse IgG Ab-peroxidase conjugate (Sigma, USA)를 0.2% skim milk 첨가 PBS에 희석하여 각 well에 100 μℓ씩 첨가 37℃에서 1시간 반응시켰다. 다시 plate를 PBS로 세척한 다음 0.1 M citric acid (Sigma, USA) 23.3 mℓ와 0.2 M Na_2HPO_4 (Sigma, USA) 26.7 mℓ을 섞어 100 mℓ로 희석하여 만든 citrate phosphate buffer (pH 5.2)에 *O*-phenylenediamine dihydrochloride (OPD, Sigma, USA)를 0.04%, H_2O_2를 0.01%로 넣은 용액을 well 당 100 mℓ로 첨가한 후 37℃, 20분 동안 반응시켰다. 이 후 stopping solution으로서 3 N의 HCl를 well 당 25 μℓ로 첨가하여 반응을 정지시켰다. 흡광도는 파장 490 nm에서 Thermomax microplate reader (Molecular Devices, USA)로 측정하였다.

결과의 분석에 있어서 HMG-CoA reductase 및 squalene synthase의 저해율은 천연물 대신 lovastatin을 투여한 대조군과 천연물 시료 투여군의 흡광도를 이용하여 다음 식으로 나타내었다.

저해율(%) =

$$\left[1-\frac{(\text{시료군의 흡광도})-(\textit{lovastatin}\ \text{대조군의 흡광도})}{(\text{시료군의 흡광도})}\right]\times 100$$

2.3. 산마늘의 물질단리

2.3.1. 추출 및 분획

산마늘 잎을 실내에서 건조시킨 후 95% 에탄올로 실온에서 72시간 2회 반복 침적시켜 추출한 후 40℃에서 감압 · 농축하였다. 이렇게 얻어진 에탄올 조추출물을 헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트 및 부탄올로 순차 연속 추출하여 분획하였다. 이 분획물 중 디클로로메탄 가용부(17.69 g)를 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그라피(컬럼 ; 107×6.5 cm, 용출용매 ; methanol)하여 50 mℓ씩 100개로 분취하였다. 이를 TLC(toluene : ethyl formate : formic acid = 5 : 4 : 1, v/v)상에서 검색하여 7개의 분획물(산DC-1~산DC-7)로 나누었다.

2.3.2. 기기분석

단리한 화합물의 질량(EI-MS) 스펙트럼은 JEOL JMS-600W, 핵자기공명(NMR) 스펙트럼은 기초과학지원연구원 서울분소의 Varian UI 500을 이용하여 측정하였다.

2.3.3. 단리물질의 spectral data

2.3.3.1. 화합물 I (Quercetin)

위의 산DC-7 분획물(180 mℓ)을 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그라피(컬럼 ; 7.5×3.5 cm, 용출용매 ; ethanol : methanol = 7 : 3, v/v)하여 3 mℓ씩 180개의 분취물을 얻었으며, UV검색에 의해 4개의 분획물(산DC-7-1~산DC-7-4)로 나누어 산DC-7-3 분획물로부터 화합물 I (20 mg)를 단리하였다.

화합물 I의 EI-MS m/z : 302 (M+, base ion), 285, 273, 245, 229, 153, 137, 109. ^{1}H-NMR(500 MHz, CD_3OD) : δ 6.17(1H, *d*, *J* = 2.0 Hz, H-6), 6.38(1H, *d*, *J*=2.0 Hz, H-8), 6.88(1H, *d*, *J* = 8.5 Hz, H-5′), 7.62(1H, *dd*, *J* = 2.0, 8.5 Hz, H-6′), 7.73(1H, *d*, *J* = 2.0 Hz, H-2′). ^{13}C-NMR(125 MHz, CD_3OD) : δ 94.45(CH-8), 99.28(CH-6), 104.52(C-10), 116.02(CH-2′), 116.25(CH-5′), 121.70(CH-6′), 124.17(C-1′), 137.23(C-3),

146.23(C-3'), 148.02(C-2), 148.78(C-4'), 158.25(C-9), 162.51(C-5), 165.64(C-7), 177.34(C-4). HMBC correlation : H-6→C-5/C-7/C-8/C-10, H-8→C-6/C-7/C-9/C-10, H-2'→C-1'/C-3'/C-6', H-5'→C-1'/C-3'/C-4', H-6'→C-2/C-4이었다.

2.3.3.2. 화합물 II(Kaempferol)

위의 산마늘 잎 디클로로메탄 가용부를 Sephadex LH-20 컬럼 크로마토그라피(컬럼 : 57×6 cm, 용출용매 : MeOH)하여 20 mℓ씩 65개의 분취물을 얻었으며, UV로 검색하여 6개의 분획물(산D-1~산D-6)로 나누어 산D-5 분획물로부터 화합물 II(113 mg)을 단리하였다.

화합물 II의 EI-MS m/z : 286 (M+, base ion), 258, 229, 184, 153, 121, 93, 69. ^{1}H-NMR(500 MHz, CD_3OD) : δ 6.17(1H, *d*, *J* = 2.0 Hz, H-6), 6.38(1H, *d*, *J* = 2.0 Hz, H-8), 6.89(2H, *dd*, *J* = 2.0, 6.8 Hz, H-3', 5'), 8.07(2H, *dd*, *J* = 2.0, 6.8 Hz, H-2', 6'). ^{13}C-NMR(125 MHz, CD_3OD) : δ 94.54(CH-8), 99.37(CH-6), 104.49(C-10), 116.32(CH-3',5'), 123.76(C-1'), 130.69(CH-2',6'), 137.12(C-3), 148.01(C-2), 158.28(C-9), 160.55(C-4'), 162.50(C-5), 165.83(C-7), 177.34(C-4). HMBC correlation : H-6→C-5/C-7/C-8/C-10, H-8→C-6/C-7/C-9/C-10, H-2'/6'→C-2/C-4'/C-2'/C-6', H-3'/5'→C-1'/C-3'/C-4'/C-5'이었다.

2.4. HMG-CoA reductase 및 squalene synthase mRNA의 전기영동

2.4.1. 세포의 처리

MEM 배지에 배양한 C100 세포를 접종하기 하루 전에 2×10^6 cells/mℓ로 seeding하여 배양하였다. 이렇게 배양한 C100세포에 산마늘로부터 단리한 quercetin, kaempferol과 산마늘의 헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄을 분획물 및 잔사를 10 μg/mℓ (고농도군), 5 μg/mℓ(저농도군)으로 24시간 처리하였다. 대조군으로는 phosphate buffered saline (PBS), dimethyl sulphoxide(DMSO)를 사용하였다.

2.4.2. Total RNA 추출

시료를 24시간 처리한 세포의 각 flask를 5 mℓ의 PBS로 2번 세척 후 Tris-reagent(Sigma) 1 mℓ을 처리하여 cell clapper로 flask에 붙어있는 세포를 떼어내고 부유액을 eppendorf tube에 넣고 10 분간 실온에서 incubation하였다. 여기에 chloroform 0.2 mℓ을 첨가한 후 5분간 방치하여 12,000 *g* 4℃에서 15분간 원심분리하여 상층액을 새 tube로 옮긴 후 다시 isopropanol 0.5 mℓ을 첨가하여 5분간 incubation하였다. 12,000 *g* 4℃에서 15분간 원심분리하여 상층액을 버린 다음 침전된 RNA를 75% ethanol로 씻은 후 멸균 diethyl pyrocarbonate(DEPC)로 처리한 증류수로 녹인 후 RNasin(Promega) 1 μℓ씩 처리하였다. 위의 RNA 시료를 260 nm 파장에서 spectrophotometer로 RNA의 양을 정량한 다음 1 μg/μℓ 농도로 모든 RNA 시료를 희석하여 1% agarose gel로 전기영동하여 RNA 상태를 관찰한 후 -70℃에 보관하였다.

2.4.3. Oligonucleotide의 제작

HMG-CoA reductase와 squalene synthase의 complete mRNA sequence를 Genbank에서 찾아 primer designing program으로 디자인한 후(Table 2) Bioneer사에서 구입하였다. 대상으로 한 oligonucleotide는 200-600 bp 증폭이 가능하도록 디자인하였다.

Table 2. Primer design for RT-PCR

Gene	Forward oligonucleotide	Reverse oligonucleotide
HMG-CoA reductase	5'-CTTTGCCCTTTTTCCTGCTT-3'	5'-AATGTTCTGTTGTGCTGTT-3'
Squalene synthase	5'-ATGGAGTTCGTCAAGTGTCTAGGCCACCCG-3'	5'-TTGGTCTTCCAGATAATCACGAATGATATT-3'

Table 3. Effects of plant extracts on HMG-CoA reductase and squalene synthase

Extracts[1)]	Inhibition rate (%)	
	HMG-CoA reductase	Squalene synthase
Allium victorialis var. *platyphyllum*	73.9	76.7
Perilla frutescens var. *japonica*	67.4	79.6
Perilla frutescens var. *acuta*	65.8	56.7
Zanthoxylum schinifolium	73.2	77.2
Portulaca oleracea	72.8	60.2
Anthriscus sylvestris	66.3	75.5
Pimpinella brachycarpa	68.5	82.9
Pleurospermum camtschaticum	61.8	66.9
Adenophora triphylla var. *japonica*	41.6	70.9
Adenophora remotiflora	68.5	77.9
Solidago virga-aurea var. *asiatica*	67.4	89.8
Aster scaber	64.0	69.4
Synurus deltoides	62.9	72.6
Lovastatin	100	100

[1)] 10 μg/mℓ of each samples was added

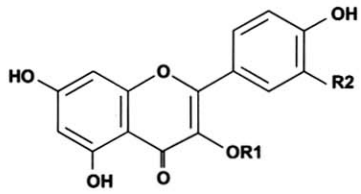
2.4.4. Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction(RT-PCR) assay

RT-PCR은 Promega의 RT-PCR kit를 이용하여 측정하였고, 증폭주기는 예비실험을 통하여 40cycle을 실행하였다. RT-PCR 반응물질은 1×AMV/*Tfl* reaction buffer, 0.2 mM dNTP mix, 1 μM downstream primer, 1 μM upstream primer, 1 mM $MgSO_4$, 0.1 u/μℓ AMV reverse transcriptase, 0.1 u/μℓ *Tfl* DNA polymerase와 1 μg RNA 샘플을 혼합하여 총 부피가 50 μℓ이 되도록 하였다. 역전사에 의한 첫 번째 cDNA 가닥의 합성은 48℃에서 45분간, RNA/cDNA/primer의 denaturing은 94℃에서 2분간 반응시켰다. 두 번째 cDNA 가닥의 합성과 PCR 증폭과정은 94℃에서 30초간 denaturing시켰고, 1분간 annealing, 68℃에서 2분간 extension하여 총 증폭 주기는 40 cycle을 실행하였으며, 마지막 extension은 68℃에서 7분간 반응시켰다(Robocycler gradient 96, Stratagene, USA). PCR 결과는 ethidium bromide를 첨가한 2% agarose gel을 이용한 전기영동으로 확인하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 산마늘의 콜레스테롤 저하 활성

공시시료 총 13종의 에탄올 추출물을 10 μg/mℓ의 농도로 처리하여 콜레스테롤 생합성 과정의 초기와 후기에 작용하는 대표적인 효소인 HMG-CoA reductase와 squalene synthase의 활성 저해율을 조사하였다. 그 결과 산마늘, 산초나무 및 쇠비름 잎이 HMG-CoA reductase의 활성을 각각 73.9, 73.2, 72.8% 저해하는 것으로 나타났으며(Table 3), 소엽, 쇠비름, 누룩치 및 참취를 제외한 9종의 시료가 squalene synthase의 활성을 70% 이상 저해하는 것으로 나타났다(Table 3). 이상의 결과, 산마늘과 산초나무 잎이 콜레스테롤 생합성에 관여하는 중요 효소인 HMG-CoA reductase와 squalene synthase의 활성을 공히 70% 이상 저해하는 것으로 나타나 콜레스테롤 저하 효능이 있는 것으로 판단되었다.



R1 = H, R2 = OH : Quercetin (3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavone)
R1, R2 = H : Kaempferol (3,4',5,7-Tetrahydroxyflavone)

Fig. 1. The chemical structures of compounds isolated from leaf of *A. victorialis* var. *platyphyllum*.

3.2. 산마늘로부터의 물질단리 및 구조 동정

HMG-CoA reductase 및 squalene synthase 활성 저해율을 조사한 결과, 활성을 저해하여 콜레스테롤 합성 저하 효능이 있는 것으로 판단된 산마늘 잎으로부터 콜레스테롤 저하활성과 관련이 있는 물질을 탐색하고자 산마늘 잎 에탄올 추출물로부터 물질을 단리하였다. 단리 물질을 기기분석하여 참고문헌 등(Agrawal, 1989; 윤순영 등, 2000)과 비교·검색한 결과, 화합물 Ⅰ, Ⅱ는 각각 기보고된 quercetin (3,3′,4′,5,7-pentahydroxyflavone)과 kaempferol (3,4′,5,7-tetrahydroxyflavone)로 확인되었다(Fig. 1).

3.3. 산마늘 단리물질에 의한 콜레스테롤 합성 효소의 mRNA 발현 억제

햄스터 유래 HMG-CoA reductase 고발현 세포주인 C100세포에 산마늘로부터 단리한 quercetin과 kaempferol 그리고 에탄올, 헥산, 디클로로메탄, 에틸아세테이트, 부탄올 분획물 및 잔사를 투여한 후 세포내 HMG-CoA reductase와 squalene synthase의 유전자 발현을 조사하였다. 즉, 각 시료를 5, 10 $\mu g/m\ell$의 농도로 24시간 처리한 세포로부터 RNA를 추출하여 RT-PCR로 증폭시킨 다음 전기영동하여 mRNA의 발현을 확인하였으며 발현 정도를 β-actin mRNA발현에 대한 비율로 나타내었다. 그 결과, HMG-CoA

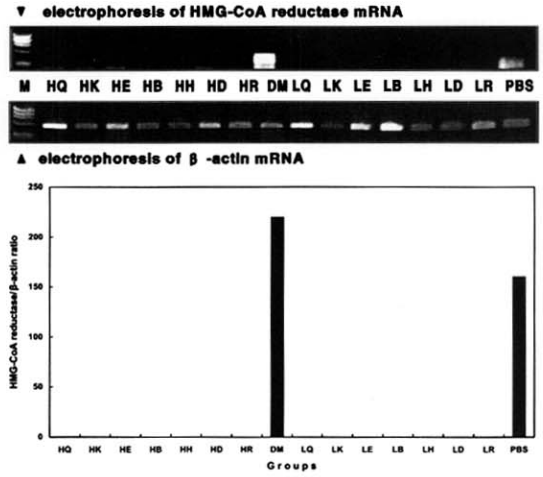


Fig. 2. Effects of quercetin, kaempferol, each fraction and residue on mRNA expression of HMG-CoA reductase. M : Hae III/Φ174marker(lane1 : 1,353bp, lane2 : 1,078bp, lane3 : 872bp, lane4 : 603bp, lane5 : 281bp), HQ : 10 $\mu g/m\ell$ quercetin, HK : 10 $\mu g/m\ell$ kaempferol, HE : 10 $\mu g/m\ell$ ethyl acetate soluble fraction, HB : 10 $\mu g/m\ell$ butanol soluble fraction, HH : 10 $\mu g/m\ell$ hexane soluble fraction, HD : 10 $\mu g/m\ell$ dichloromethane soluble fraction, HR : 10 $\mu g/m\ell$ residue, DM : dimethyl sulphoxide, LQ : 5 $\mu g/m\ell$ quercetin, LK : 5 $\mu g/m\ell$ kaempferol, LE : 5 $\mu g/m\ell$ ethyl acetate soluble fraction, LB : 5 $\mu g/m\ell$ butanol soluble fraction, LH : 10 $\mu g/m\ell$ hexane soluble fraction, LD : 10 $\mu g/m\ell$ dichloromethane soluble fraction, LR : 5 $\mu g/m\ell$ residue, PBS : phosphate buffered saline.

reductase의 경우 대조구로 사용한 DMSO와 PBS 처리구에서는 각각 220과 160의 발현율을 나타내어 (Fig. 2) RT-PCR에 의해 mRNA가 증폭되어 발현하고 있음을 확인할 수 있었다. 그러나 대조구 이외의 quercetin, kaempferol 그리고 각 분획물을 처리한 모든 처리구에서 mRNA의 밴드를 관찰할 수 없어 이들 시료에 의해 mRNA의 발현이 억제되는 것으로 판

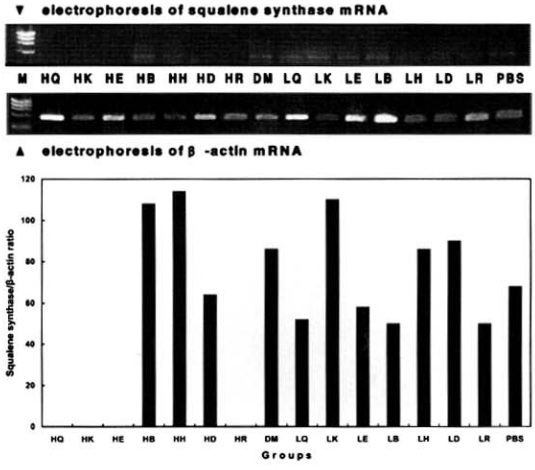


Fig. 3. Effects of quercetin, kaempferol, each fraction and residue on mRNA expression of squalene synthase. Marker and treatment were the same as Fig. 2.

단되었다(Fig. 2). 이상의 결과 산마늘로부터 단리한 quercetin과 kaempferol를 비롯한 각 분획물들은 HMG-CoA reductase의 mRNA 발현을 억제하여 유전자 레벨에서의 콜레스테롤 생합성 저해 효과를 확인할 수 있었다.

동일한 방법으로 squalene synthase mRNA 발현 정도를 조사한 결과 5 μg/mℓ의 농도의 모든 처리구에서 50 이상의 발현율을 나타내어(Fig. 3) mRNA가 발현하는 것을 알 수 있었다. 그러나 10 μg/mℓ 농도의 quercetin, kaempferol, 에틸아세테이트 분획물과 잔사를 처리한 경우에는 mRNA가 전혀 발현하지 않는 것으로 나타나(Fig. 3) 고농도에서는 콜레스테롤 생합성 과정 후기에 작용하는 squalene synthase의 활성을 억제하는 것으로 판단되었다. 그러나 10 μg/mℓ 농도의 부탄올, 헥산, 디클로로메탄 분획물 처리 시에는 mRNA가 발현하는 것으로 나타나(Fig. 3) 이들 분획물들은 고농도 처리에도 squalene synthase의 활성을 억제하지 못하는 것으로 사료되었다. 이상의 결과 고농도의 quercetin, kaempferol, 에틸아세테이트 분획물 및 잔사는 squalene synthase mRNA의 발현을 억제하여 콜레스테롤 생합성 과정 후기에 작용하는 squalene synthase의 활성을 억제하나 저농도에서는 억제하지 못하는 것으로 판단되었다.

4. 결 론

식용 임산자원인 산채류를 기능성 식품으로 개발하고자 산마늘을 비롯한 총 13종의 에탄올 조추출물에 대한 콜레스테롤 저하활성을 검정하였다. 즉, 콜레스테롤 생합성에 관여하는 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase(HMG-CoA reductase)와 squalene synthase의 효소 활성을 조사한 결과 산마늘과 산초나무 잎이 두 효소의 활성을 공히 70% 이상 저해하여 활성이 가장 우수한 것으로 나타났다. 이러한 콜레스테롤 저하활성과 관련이 있는 물질을 탐색하고자 산마늘로부터 물질 단리를 시도하여 디클로로메탄 가용부로부터 kaempferol과 quercetin을 단리하였다. 그리고 유전자 레벨에서의 콜레스테롤 저하활성을 조사하기 위해 단리물질과 분획물을 C100세포(햄스터 유래 HMG-CoA reductase 고발현 세포주)에 각각 5, 10 μg/mℓ로 24시간 처리하여 HMG-CoA reductase와 squalene synthase의 mRNA 발현 정도를 조사하였다. 그 결과 10 μg/mℓ로 kaempferol과 quercetin을 처리한 경우 두 효소의 mRNA가 발현하지 않는 것으로 나타나 유전자 레벨에서의 콜레스테롤 생합성 저해 효과를 확인할 수 있었다. 이상의 결과 산마늘 잎 에탄올 추출물의 HMG-CoA reductase와 squalene synthase의 활성 저하는 kaempferol과 quercetin에 기인하는 것으로 사료되었다. 이러한 kaempferol과 quercetin은 여러 식물의 추출성분으로서 이미 잘 알려진 화합물이지만(Wollenweber & Jay, 1988; Wollenweber, 1994) 이렇게 콜레스테롤 저하활성이 있는 것으로 밝혀진 것은 이번이 처음으로 금후 이들 물질과 이들 물질을 함유하고 있는 식물 활용에 필요한 자료를 제공하였다.

참 고 문 헌

1. 송영득. 1996. 고콜레스테롤증 환자의 임상적 접근. 한국지질학회지 6(2): 163~170.
2. 윤순영, 이학주, 이성숙, 최돈하, 백기현. 2000. 수목추출

성분의 생리활성에 관한 연구(V) - 일본잎갈나무 심재부의 플라보노이드 성분분리 및 항산화 활성-. 목재공학 28(3): 78~84.

3. Agrawal, P. K. 1989. Carbone-13 NMR of flavonoids. Elsevier Science Co. New York. p. 564.
4. Cham, B. E. and B. R. Knowles. 1976. A solvent system for delipidation of plasma or serum without protein precipitation. *J. Lipid Res.* 17: 176~181.
5. Keyomarsi, K., L. Sandoval, and V. Band. 1991. Synchronization of tumor and normal cells from G1 to multiple cell cycles by lovastatin. *Cancer Res.* 51: 3602~3609.
9. Liscum, L., K. L. Luskey, D. J. Chin, Y. K. Ho, J. L. Goldstein, and M. S. Brown. 1983. Regulation of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase and its mRNA in rat liver as studied with a monoclonal antibody and a cDNA probe. *J. Biol. Chem.* 258: 8450~8455.
6. Naito, H. K. 1995. The 18th annual NACB symposium. Atherogenesis : current topics on etology and risk factors. *Clin. Chem.* 41(1): 132~133.
7. Roitelman, J., E. H. Olender, S. Bar-nun, W. A. Dunn Jr., and R. D. Simoni. 1992. Imunological evidence for eight spans in the membrane domain of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase : implications for enzyme degradation in the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* 117(5): 379~385.
8. Ross, R. 1993. The pathogenesis of atherosclerosis : a perspective for the 1990s. Nature 362: 801-809.
9. Witztum, J. L. and D. Steinberg. 1991. Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J. Clin. Invest.* 88: 1785~1792.
10. Wollenweber, E. 1994. Flavones and flavonols. *In*: The Flavonoids advances in research since 1986. Ed. J. B. Harborne. Chapman & Hall. London, pp. 259~335.
11. Wollenweber, E. and M. Jay. 1988. Flavones and flavonols. *In*: The Flavonoids advances in research since 1980. Ed. J. B. Harborne. Chapman & Hall. London, pp. 233~302.