

무화과 당단백질의 혈중지질 저하 효과

임계택* · 이세중 · 고정현 · 오필선

전남대학교 생명공학 연구소

Hypolipidemic Effects of Glycoprotein Isolated from *Ficus Carica* Linnoeus in Mice

Kye-Taek Lim*, Sei-Jung Lee, Jeong-Hyeon Ko, and Phil-Sun Oh

Molecular Biochemistry Laboratory, Institute of Biotechnology, Chonnam National University

Glycoprotein (60 kDa) isolated from *Ficus Carica* Linnoeus (FCL glycoprotein) was examined by evaluating its hypolipidemic effects on plasma cholesterol levels and hepatic detoxicant enzyme activities in ICR mice. FCL glycoprotein (100 µg/mL) had strong scavenging activities (38%) against lipid peroxy radicals. When mice were treated with Triton WR-1339 (400 mg/kg), levels of total cholesterol (TC) and low-density lipoprotein (LDL)-cholesterol in plasma significantly increased by 53.9 and 47.5 mg/dL, respectively, compared to the control, whereas, when pretreated with FCL glycoprotein (100 µg/mL), decreased remarkably by 55.4, and 47.0 mg/dL, compared to Triton WR-1339 treatment alone. Interestingly, high-density lipoprotein (HDL)-cholesterol level did not change. Body and liver weights did not change significantly after Triton WR-1339 treatment in presence of FCL glycoprotein. FCL glycoprotein (100 µg/mL) stimulated activities of antioxidative detoxicant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GPx), whereas GPx activity significantly increased compared to the control. These results suggest FCL glycoprotein has abilities to scavenge lipid peroxy radicals, lower plasma lipid levels, and stimulate detoxicant enzyme activity in mouse liver.

Key words: *Ficus Carica* Linnoeus (FCL), glycoprotein, plasma cholesterol, detoxicant enzymes

서 론

비정상적인 대사과정이나 물리, 화학적인 외부적 자극에 의한 reactive oxygen species(ROS, 활성산소)의 발생은 노화 및 암화를 촉진하고 신경장애, 지질대사장애 등의 각종 질병을 유발하는 것으로 알려져 있다(1). 특히, 지질대사과정 중 ROS의 발생은 체내의 고중성지방혈증 및 고지혈증을 유발함으로써 동맥경화, 고혈압, 비만증, 당뇨병 등의 이차적인 질병의 원인이 된다(2). 하지만 생명체 내에는 항산화에 관련된 catalase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase 등을 포함하는 해독 효소들 및 비효소적으로 항산화에 관련된 비타민 C, glutathione and α -tocopherol 등을 포함하는 해독 물질들이 존재하기 때문에, 일반적으로 대사과정에서 발생하는 ROS를 막음으로써 생체는 외부적인 어떤 요인이 개입하지 않을 경우 산화-환원의 균형을 유지하고 있다(3-5).

콜레스테롤은 일반적으로 동물세포막의 필수적인 구성성분

이며 또한, 스테로이드 호르몬의 합성 및 담즙산의 전구체로서도 이용될 뿐만 아니라 식이성 지방산을 유화시키는데 중요한 역할을 담당한다고 알려져 있다(6). 특히 'good 콜레스테롤'이라고 알려진 high density lipoprotein(HDL)은 외부세포로부터 발생된 과잉의 콜레스테롤을 간으로 이동시켜 불필요한 세포의 형성을 방해하는 역할을 하기때문에, HDL의 수치는 동맥경화를 나타내는 중요한 지표로서 이용되고 있다(7). 그러나 고지방 식이요법 등과 같은 잘못된 식이적 요인으로 인해 야기되는 체내 혈장내의 콜레스테롤 합성과 분해의 불균형은 콜레스테롤 수치의 상승을 가져와 고지혈증을 초래하게 되며, 이러한 현상은 'bad 콜레스테롤'이라고 알려진 low density lipoprotein (LDL)과 결합된 콜레스테롤 복합체들의 혈관 침착작용을 더욱 촉진시키기 때문에, 결과적으로 혈관의 폐쇄와 고혈압의 원인이 되는 동맥경화를 일으키게 된다(8). 게다가 LDL이 체내에서 발생하는 ROS에 의해 지질과산화 현상이 일어나게 되면, 생체조직 내에서 더욱 해를 끼치는 산화물질로 변하게 된다(9).

이와 같은 문제점 때문에 항산화 능력을 가지면서, 지질 대사 과정중 지단백질들의 이동 및 콜레스테롤의 수치를 조절할 수 있는 화합물이나 천연물들은, 항고지혈증제 및 항동맥경화제로서 지질대사과정의 균형을 유지하는데 역할이 중요하다고 알려져 있다. 최근 고지혈증의 치료제로서 HMG-CoA reductase의 활성을 억제하여 혈중 콜레스테롤 수치 및 LDL 수용체

*Corresponding author: Kye-Taek Lim, Molecular Biochemistry Laboratory, Institute of Biotechnology, Chonnam National University, Kwangju, 300 Yongbong-dong 500-757, Korea
Tel: 82-62-530-2115
Fax: 82-62-530-2129
E-mail: ktlim@chonnam.ac.kr

의 활성을 조절하여 혈중 LDL-콜레스테롤의 함량을 억제하는 statin계통 등의 의약품이 이용되고 있다(10). 그러나 이러한 화합물은 미생물의 대사 산물이거나 또는 화학적으로 합성한 관계로 일정수준 이상의 섭취 시 안정성과 유해성 여부 문제가 제기되고, 장기간 복용 시에는 여러 급성 및 만성적인 부작용으로 간 독성작용 및 신경장애가 발생한다고 보고되었다(11). 따라서 최근에 많은 학자들은 생체에 부작용이 없고, 콜레스테롤의 주합성 기관인 간에서 효소적 그리고 비효소적 항산화 시스템의 활성을 증가시키거나 콜레스테롤과 관련된 질환을 예방할 수 있는 생리활성물질을 천연물로부터 찾으려는 연구가 다각도로 진행되고 있다(12).

일반적으로, 천연물로부터 추출한 당단백질은 특이적인 항산화 능력을 지니고 있고, 또한 이러한 항산화제는 동맥 혈관조직이나 백혈구를 손상시키는 체내에서 발생된 ROS를 제거하고, 체내 혈장 지단백질 수준에 있어서 반 비례적 상관 관계가 있으며, 결과적으로 혈장 콜레스테롤 수준을 억제할 수 있다고 추론할 수 있다. *Ficus Carica* Linnoeus(FCL, 무화과)는 민간에서 발진 및 궤양, 치질 등에 FCL 유액을 사용하여 왔으며, 소화촉진, 변비완화, 주독이나 어독 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있고, 한방에서는 건과로 하여 청열해독 치료제로 알려져 왔다(13). 최근 무화과에 대한 연구에서 무화과의 잎, 줄기, 및 목질부의 메탄올 추출물에서 psoralen($C_{11}H_6O_4$), bergapten($C_{12}H_8O_4$), β -sitosterol($C_{25}H_{50}O$)과 umbelliferone($C_9H_6O_3$)과 같은 항균 및 항산화 물질이 있다는 연구가 보고 되었다(14).

따라서 본 연구에서는, *Ficus Carica* Linnoeus(무화과)로부터 무화과 당단백질을 추출한 후, 무화과 당단백질이 혈장의 콜레스테롤 수준의 변화 및 간 항산화계 해독 효소들의 활성 변화에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보았다.

재료 및 방법

시약

본 실험에 사용된 시약 중 nitro blue tetrazolium(NBT), 비타민 C, β -NADPH, L-glutathion reduced, 콜레스테롤, dextran sulfate, Triton WR-1339, ethylene diamide tetraacetic acid(EDTA), magnesium chloride 등은 미국 Sigma사로부터 구입하였으며, 그 외 사용된 시약은 순도가 높은 등급을 구입하여 사용하였다.

무화과 당단백질 분리 및 정제

Ficus Carica Linnoeus(FCL, 무화과)는 전라남도 나주에서 자생한 것을 채취하여 작은 크기로 잘라 순수 증류수(이온이 포함되지 않은 증류수)에 2개월간 침지 하였다. 물에 용해된 무화과 추출물은 Whatman 여과지로 여과하여 불순물을 제거하였다. 여과된 용액에 80% ammonium sulfate 첨가하여 침전시키고 원심분리 하였고(5 g), 그 침전물은 다시 물에 용해한 뒤 투석 반투막(Spectra/por, MWCO 6000-8000, CA, USA)을 이용하여 4°C의 20 mM Tris-HCl(pH 7.4) 용액에서 12시간 투석하였으며, 투석된 용액을 -70°C에서 동결한 뒤 동결건조기를 이용하여 건조시켰다(2 g). 건조된 단백질을 전기영동 후, electro-eluter(Mini Whole Gel Eluter; Bio-Rad, CA, USA)를 이용하여 용출하였고, 다시 건조하여(4 mg) 원시료의 0.08%의 무화과 당단백질을 얻을 수 있었으며, 이를 -20°C에 보관하여 실험에 사용하였다.

무화과 당단백질의 전기영동

시료(당단백질 10 mg/mL)는 0.1% SDS(sodium dodecyl sul-

fate)가 포함된 15% polyacrylamide gel에서 4시간동안 100 V, 30 mA로 전기영동기(Mini-Protean II cell, Bio-Rad)를 이용하여 전기영동 한 후 gel은 Schiff's reagent(15)로 염색하였다.

무화과 당단백질의 과산화 지질 라디칼 억제효과 측정

리놀렌산을 기질로 한 과산화반응 하에서 무화과 당단백질의 과산화 지질 라디칼 억제능력의 측정은 Takao 등(16)의 방법을 이용하였다. 무화과 당단백질을 200 μ L의 리놀렌산(25 mg/mL)과 혼합한 후, 이곳에 400 μ L의 phosphate buffer와 200 μ L의 증류수를 더 혼합하여 40°C에서 30분간 정치 하였다. 이 용액의 100 μ L를 튜브에 넣고 3 mL의 에탄올 및 100 μ L의 ammonium thiocyanate(3.0 g/mL), 그리고 100 μ L의 ferrous chloride(2.45 mg/mL)를 차례로 혼합하고 3분 뒤에 500 nm 파장에서 spectrophotometer로 흡광도를 측정하였다.

실험동물 및 시료채취

실험동물은 5주령의 ICR계 수컷 생쥐로 25 \pm 3°C로 조절된 사육실에서 상공화된 마우스용 사료와 물은 자유롭게 먹게(ad libitum) 하고 사육환경에 적응시킨 후 체중 35-40 g의 생쥐만을 선별하여 사용하였다. 생쥐를 6그룹으로 분리하고 각 그룹은 5마리씩 실험구로써 설계하였다. 처리구에 있어서, 각 그룹의 쥐에게는 PBS에 용해한 무화과 당단백질을 50 mg/kg(그룹 2, 5)과 100 mg/kg(그룹 3, 6)씩 14일간 1일 1회 일정 시간에 카테터를 이용하여 섭취 시켰으며, 대조군의 경우 PBS(그룹 1, 4)만을 투여하였다. 생쥐에게 고지혈증을 유발하기 위해 Triton WR-1339(그룹 4, 5, 6)를 PBS에 용해하여 생쥐 체중 kg당 400 mg의 수준으로 1회 복강 주사하였으며, 무화과 당단백질의 최종 투여는 Triton WR-1339 투여 1시간 전에 섭취 시켰다. Triton WR-1339 투여 18시간 뒤인 15일째에 실험동물을 ether로 마취한 후 심장천공법에 의해 혈액을 채취하고 회복하여 간을 적출하였다. 채취한 1 mL 혈액의 지질 산화를 지연시키기 위해 PBS에 용해한 50 mM EDTA 100 μ L를 혈액에 첨가하고 10분간 정치 시킨 후 10,000 \times g로 원심분리하여 상층액을 수집하여 -70°C에서 저장하여 혈장지질 분석실험에 사용하였다. 한편 회복하여 적출한 1.5 g의 간 조직을 0.25 M sucrose와 1.5% potassium chloride를 함유한 10 mM EDTA(pH 7.4) 완충용액에 넣고 균질기로 분쇄한 후 4°C에서 9,000 \times g에서 15분 동안 원심분리하였다. 원심분리된 용액 중 상층액 1 mL를 취하여 catalase(CAT)의 활성 측정에 사용하였고, 그 상층액을 다시 15,000 \times g로 60분 동안 원심분리한 후 상층액을 각 1 mL씩 취하여 superoxide dismutase(SOD)와 glutathione peroxidase(GPx)의 활성 측정에 사용하였다.

혈장 콜레스테롤 함량 측정

Total HDL-콜레스테롤은 EDTA가 들어있는 1 mL의 혈장에 100 μ L의 반응액 A[dextran sulfate(MW 50,000 \pm 5,000: 20 g/L), 1 M $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 을 각각 1:1로 혼합]를 첨가하여 잘 혼합한 뒤, 10분 동안 정치하고 2분간 10,000 \times g로 원심분리 하여 상층액에서 회수 하였다. 한편, HDL subclass(apoprotein A-1과 A-2)는 반응액 A가 처리된 0.5 mL의 Total HDL-콜레스테롤 상층액에, 50 μ L의 반응액 B[dextran sulfate(MW 50,000 \pm 5,000: 40 g/L), 2.0 M $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 을 각각 1:3으로 혼합]를 잘 혼합한 후, 15분간 정치하고 2분간 10,000 \times g로 원심분리 후 상층액을 회수하여 분리하였다. TC, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤에 대한 각각의 양을 측정하기 위하여, 1 mL의 반응

액 $C[FeCl_3]$ solution과 18 M H_2SO_4 를 각각 1:100(v/v)으로 혼합에 각각 100 μ L의 Total HDL-콜레스테롤과 HDL subclass를 넣고, 4°C에서 1시간 동안 정치한 후 560 nm의 파장에서 spectrophotometer로 흡광도를 측정하였으며, 환산 식에 따라 그 측정치를 TC, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 값으로 환산하였다(17-19).

해독 효소 활성 측정

SOD 활성 측정: SOD의 활성도는 Beauchamp 등(20)의 방법을 이용하였다. 20 μ L의 시료에 반응액[0.1 mM NBT, 50 mM sodium carbonate (pH 10.2), 0.1 mM EDTA]을 잘 혼합 하고, 200 μ M riboflavin을 처리하여 최종 부피가 1 mL가 되게 한다. 이 후 2개의 40 W의 형광등 30 cm 떨어진 위치에서 15분간 반응시킨 후 560 nm 파장에서 spectrophotometer로 흡광도를 측정하였다.

CAT 활성 측정: CAT의 활성도는 Thomson 등(21)의 방법을 이용하였다. 먼저 200 μ L의 50 mM phosphate buffer(pH 7.4)에 20 μ L의 시료를 혼합하고 30°C에서 5분간 정치 시킨다. 이곳에 200 μ L의 100 mM sodium perborate(pH 7.4)를 잘 혼합한 후 2 분 동안 220 nm의 파장에서 spectrophotometer로 흡광도를 측정하였다.

GPx 활성 측정: GPx의 활성도는 Mohandas 등(22)의 방법을 이용하였다. 20 μ L의 시료에 반응액[0.05 M phosphate buffer (pH 7.0), 1 mM EDTA, 1 mM sodium azide, 1 unit glutathione, 0.25 M H_2O_2]을 잘 혼합 하고, 37°C에서 10분간 정치 시킨다. 0.2 M의 NADPH 처리한 후 340 nm 파장에서 spectrophotometer로 흡광도를 측정하였다.

체중 및 간 무게 측정

체중 및 간의 무게 변화를 알아보기 위해 실험 식이 개시일로부터 충분한 양의 사료와 물을 급여하여 사육하였다. 식이 개시일과 실험당일에 생쥐의 체중을 측정하였고, 실험당일 개복하여 간을 적출한 뒤 생리식염수를 이용하여 혈액과 수분을 제거한 다음 간 무게를 측정하였다.

통계처리

실험결과는 SAS Program(version 6.12)을 이용하여 분산 분석한 후 유의차가 있는 항목에 대해서는 Duncan's multiple range test로 시료간의 유의차를 검정하였다.

결과 및 고찰

무화과 당단백질

Fig. 1에서 보는 바와 같이, SDS-PAGE에 의해 전기영동 한 후 gel 상에 분리된 무화과 당단백질을 당단백질에 특이한 염색 시약인 Schiff's reagent로 염색한 결과, 약 60 kDa의 분자량을 가진 당단백질임을 알 수 있었다(Lane 1). 본 실험에서는 이 gel상의 60 kDa 무화과 당단백질을 electro-eluter로 용출하였고, 이를 다시 동결 건조한 시료를 사용하였다. 일반적으로 당단백질들은 순수한 단백질 및 핵산과는 다르게 선형 및 가지형 구조와 같은 거대한 삼차원적으로 구조적 다양성과 함께 생물학적 잠재력 기능들을 지니고 있기 때문에, 특히 동물이나 식물 그리고 미생물에서 체내의 대사나 면역기능 그리고 항상성유

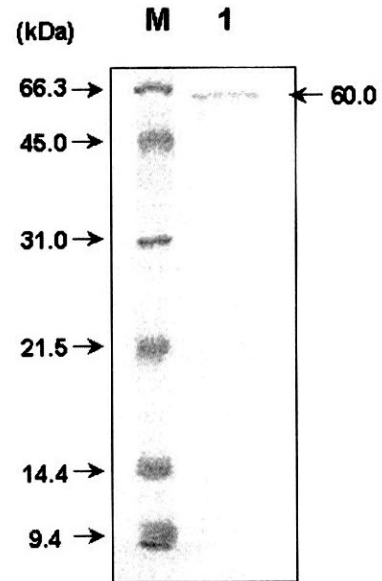


Fig. 1. Electrophoresis of the FCL glycoprotein.

Electrophoresis was performed using a 15% polyacrylamide gel containing 0.1% SDS. The gel was stained with Schiff's reagent for glycoprotein from *Ficus Carica* Linnoeus (FCL). The amount of sample loaded was 10 mg/mL. M: molecular weight marker; Lane 1: glycoprotein of FCL (60 kDa).

지 등을 위하여 특이적인 기능을 하는 것으로 알려져 있고, 또한 거대 분자들 사이에서 그들만의 정보를 인식, 교환 하는데 있어서 필수적이라고 보고되었다(23,24). 당단백질의 특이한 기능을 위한 당의 기능은, 단백질의 구조에 지지체 역할을 하여 단백질 부분의 활성면을 보호해주며 또한 당단백질 전체분자의 극성을 증가 시켜줌으로써 용해도를 증가 시켜준다고 보고되었다(25,26).

무화과 당단백질의 과산화 지질 라디칼 억제효과

무화과 당단백질(60 kDa)이 체내의 지질대사과정의 균형을 유지함에 있어 중요한 역할을 하는지 알아보기 위하여, 리놀렌산을 기질로 한 과산화반응 모델에 무화과 당단백질을 처리하였다. Fig. 2는 무화과 당단백질이 과산화 지질 라디칼 생성에 대한 억제 능력을 가지고 있다는 것을 보여 준다. 예를 들면, 무화과 당단백질 20 μ g/mL, 40 μ g/mL, 100 μ g/mL, 그리고 200 μ g/mL를 첨가하였을 때, 그 억제율은 각각 10.8, 20.3, 38.2 그리고 48.4%로 무화과 당단백질의 농도에 의존적으로 유의적인 항산화 효과를 보여주었다. 특히 IC_{50} 을 측정함에 있어서, 비타민 C는 약 40 μ g/mL가 필요한 반면 무화과 당단백질은 약 200 μ g/mL가 필요하였다($p < 0.01$). 일반적으로 과산화 지질 라디칼과 같은 ROS가 우리 몸의 지질과 결합하게 되면 과산화 지질을 형성하게 되는데, 이렇게 생성된 과산화 지질은 산화되었을 때 생체 내에서 각종 질병을 유발시키며, 특히 콜레스테롤의 산화는 동맥경화 및 심장질환에 가장 큰 요인으로 작용한다. 그러므로 이러한 결과는 무화과 당단백질이 리놀렌산의 산화에 의해 생성된 과산화 지질 라디칼을 억제하는 능력, 즉 항산화 능력을 가지고 있어서, 결과적으로 지질대사과정 중 콜레스테롤의 수치를 조절할 수 있는 항고지혈증제 및 항동맥경화제로서 지질대사의 균형을 유지하는데 중요한 역할을 할 것으로 추론할 수 있다.

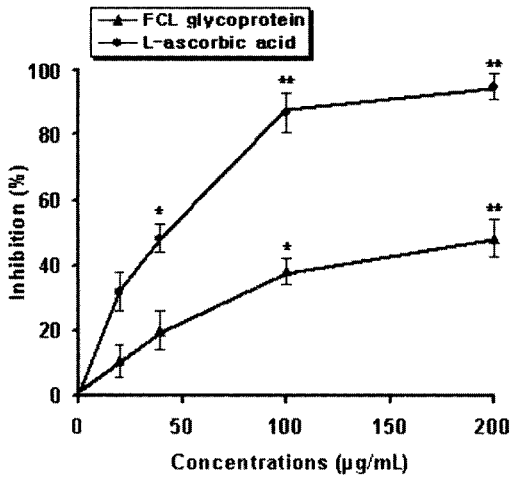


Fig. 2. Lipid peroxyl radical scavenging activity of FCL glycoprotein.

Antioxidative activities of FCL glycoprotein were expressed as relative absorbance (%) compared to the control as the standard. Each experiment was performed in triplicate (n = 9) and the values of the absorbance are expressed as means ± SD. L-ascorbic acid was used as a positive control. (*) represents significantly difference between treatments with L-ascorbic acid and control, and FCL glycoprotein and control, $p < 0.05$. (**) represents significantly difference between treatments with L-ascorbic acid and control, and FCL glycoprotein and control, $p < 0.01$.

생쥐의 혈장에서 콜레스테롤 수준

항산화 능력을 가진 무화과 당단백질이 생쥐에서 항고지혈증 효과를 나타내는지 알아보기 위하여, 2주일 동안 무화과 당단백질을 섭취시키고 혈장 콜레스테롤 수준의 차이를 알아보았다. Table 1은 무화과 당단백질 처리로 인한 혈장 중의 TC 및 HDL-콜레스테롤, 그리고 LDL-콜레스테롤 함량들의 차이를 보여주고 있는데, PBS만 투여한 대조군과 비교하여 무화과 당단백질만 50 mg/kg의 농도로 섭취시킨 그룹의 TC, HDL-콜레스테롤 그리고 LDL-콜레스테롤의 함량은 각각 247.0, 118.0 그리고 118.6 mg/dL였으며 100 mg/kg 농도로 식이한 그룹의 TC, HDL-콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤의 함량은 각각 230.0, 106.6 및 112.0 mg/dL였다. 특히 100 mg/kg로 섭취시킨 그룹의 TC와 LDL-콜레스테롤의 함량은 대조군에 비해 5%의 유의성을 보이며 그들의 수치를 낮추는 효과를 보였는데($p < 0.05$), 이러한 결과는 무화과 당단백질이 생쥐의 체내에서 콜레스테롤을 억제할 수 있다는 가능성을 제시해준다.

생쥐에서 이와 같은 유용한 기능을 가진 무화과 당단백질이 고지혈증을 나타내는 생쥐에서도 유사한 효능을 갖는지 확인하기 위해, Triton WR-1339(400 mg/kg)의 투여로 인해 유발된 고지혈증 병태모델생쥐를 이용하여 혈장 콜레스테롤 수준의 변화를 알아보았다. 고지혈증 유발을 위해 사용된 Triton WR-1339는 간에서 콜레스테롤의 생합성을 증가시킴으로써 혈장 콜레스테롤 수준 및 트리글리세라이드를 증가시키는 물질로서 비이온계 계면활성제 중의 하나로 잘 알려져 있다(25,26). Table 2에서 보듯이 Triton WR-1339만을 투여한 그룹의 TC와 LDL-콜레스테롤의 함량은 각각 305.2와 161.3 mg/dL였으며, HDL-콜레스테롤 함량은 124.5 mg/dL 수준 이었다. 그러나 50 mg/kg 농도로 무화과 당단백질을 섭취시킨 후 Triton WR-1339 투여한 그룹에서의 TC와 LDL-콜레스테롤 함량의 경우, Triton WR-1339만 투여한 그룹과 비교하였을 때 각각 273.8과 130.6 mg/

Table 1. Effects of FCL glycoprotein on plasma cholesterol levels in ICR mice

	Control	FCL glycoprotein (mg/kg/head)	
		50	100
Cholesterol (mg/dL)			
TC	251.3 ± 13.8	247.0 ± 10.4	230.0 ± 12.5*
HDL	115.2 ± 7.4	118.0 ± 6.7	106.6 ± 9.4
LDL	123.8 ± 6.5	118.6 ± 8.4	112.0 ± 6.2*
Weight (g)			
Body (day 1)	38.3 ± 1.8	38.5 ± 2.6	37.1 ± 2.0
Body (day 15)	38.8 ± 1.5	39.1 ± 2.2	38.1 ± 2.6
Liver (day 15)	1.8 ± 0.1	1.9 ± 0.1	1.8 ± 0.2

Results are expressed as means ± SD (n = 5); (*) represents a significant difference compared with the control, $p < 0.05$. TC: total cholesterol, HDL: high density lipoprotein, LDL: low density lipoprotein.

dL 수준으로의 유의적인 감소가 나타났다($p < 0.05$). 특히, 100 mg/kg 농도로 무화과 당단백질을 섭취한 경우 TC와 LDL-콜레스테롤 함량은 각각 249.8과 114.3 mg/dL로 유의적 억제효과를 보였지만($p < 0.01$), 두 그룹 모두 HDL-콜레스테롤 함량에는 어떠한 영향을 주지 못하였다. 비록 무화과 당단백질이 혈중 'good 콜레스테롤'인 HDL-콜레스테롤의 수준에 별 영향을 주지는 못하였지만, TC와 LDL-콜레스테롤의 수준을 감소시키는 두 가지 가능성 있는 추론은, 먼저 무화과 당단백질의 당 부분은 포유류의 소장에서 소화될 수 없다는 점이다. 즉, 무화과 당단백질은 점착성 용액 형태를 취하게 되어 소장에서 다양한 영양 물질이나 화학제의 흡수를 방해하며, 특히 이러한 점착성 당들이 회장에서 담즙산이나 콜레스테롤 재흡수에 관여하여 지질의 흡수를 억제할 수 있다고 추측할 수 있다(27-29). 또 다른 하나는 무화과 당단백질이 콜레스테롤의 생합성 효소의 활성을 막음으로써 콜레스테롤 생합성 및 지단백질 수송을 억제하고 콜레스테롤의 분해를 촉진하는 것으로 추측할 수 있다.

체중과 간 무게의 변화

생쥐의 생체 내에서 무화과 당단백질의 섭취에 따른 부작용이 나타나는지 알아보기 위해 간 무게와 체중변화를 측정하였는데, Table 1과 2 하단은 생쥐의 간 무게와 체중을 보여준다. PBS만 투여한 대조군과 비교하여 무화과 당단백질(50,100 mg/kg)을 섭취한 그룹은 비슷한 체중증가가 나타났는데, 이러한 결과는 무화과 당단백질의 섭취로 인해 나타날 수 있는 병적 이상이나 성장저해 현상이 나타나지 않음을 보여준다(Table 1). 한편 생쥐에서 고지혈증을 유발시키기 위해 100 µL의 Triton WR-1339 복강 주사한 세 그룹의 경우, 투여하지 않은 그룹과 비교해 볼 때, 체중의 증가가 다소 둔하게 나타났는데 이는 Triton WR-1339의 투여가 생쥐에게 심한 스트레스로 작용하여 체중에 영향을 준 것으로 사료된다(Table 2).

간 항산화계 해독효소 활성의 변화

무화과 당단백질을 섭취시킴에 의한 혈중 콜레스테롤을 낮추는 효과가 간의 항산화계 해독효소의 활성의 증가를 수반하는지 알아보기 위해, 간 조직을 적출하여 SOD, CAT 그리고 GPx의 활성도를 측정하였다. 항산화계 해독효소 중 SOD는 두 분자의 $O_2^{\cdot-}$ 을 H_2O_2 와 O_2 로 전환시켜 $O_2^{\cdot-}$ 에 의해 야기되는 산화적 손상에 대한 세포의 방어로서 일차적으로 관여하는 것으로 알려져 있으며(3), 또 다른 효소인 CAT는 간에 가장 많

Table 2. Hypolipidemic effect of FCL glycoprotein in Triton WR-1339-induced ICR mice

	Triton WR-1339	Triton WR-1339+FCL glycoprotein (mg/kg/head)	
		50	100
Cholesterol (mg/dL)			
TC	305.2 ± 15.1	273.8 ± 17.8*	249.8 ± 10.8**
HDL	124.5 ± 5.8	133.8 ± 8.2	129.1 ± 6.3
LDL	161.3 ± 11.9	130.6 ± 8.9*	114.3 ± 9.7**
Weight (g)			
Body (day 1)	35.7 ± 1.8	40.3 ± 2.0	39.5 ± 1.7
Body (day 15)	35.9 ± 2.5	40.6 ± 3.1	39.9 ± 2.0
Liver (day 15)	1.7 ± 0.1	1.8 ± 0.2	1.8 ± 0.1

Results are expressed as means ± SD (n=5); (*) and (**) represent a significant difference between FCL glycoprotein treated with Triton WR-1339 and Triton WR-1339 alone, $p < 0.05$ and $p < 0.01$, respectively. TC: total cholesterol; HDL: high density lipoprotein; LDL: low density lipoprotein.

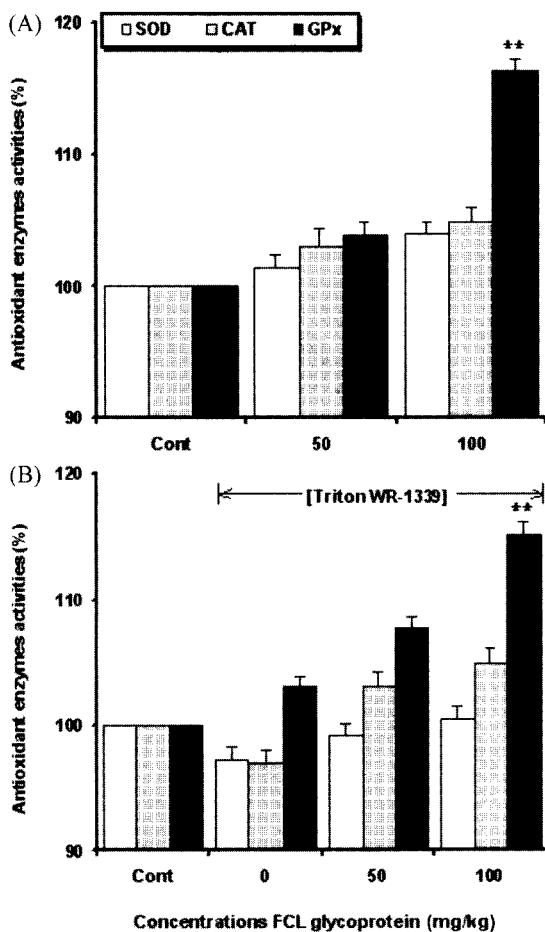


Fig. 3 Effects of FCL glycoprotein on detoxicant enzymes activities.

The activities of SOD, CAT and GPx by FCL glycoprotein were shown in mice liver (A), Triton WR-1339-induced (B) mice liver. Results were expressed as a unit/mg protein in each supernatant and the values were calculated as a percentage of the control value. Each bar represents the means ± SD (n=5). (A) (**) represents a significant difference between FCL treatments and control, $p < 0.01$. (B) (**) represents significant difference between FCL glycoprotein treated with Triton WR-1339 and Triton WR-1339 alone, $p < 0.01$.

이 존재하며 대부분의 호기성 세포에 함유되어 있다. 또한 CAT는 체내에서 지방의 자동산화, 유기물의 산화 및 SOD에 의해 생성된 H_2O_2 를 GPx와 함께 O_2 와 H_2O 로 전환시키는 작용을 하

는데(4), GPx는 일종의 peroxidase로 $NADP^+$ 를 전자수용체로 하여 H_2O_2 를 제거하면서 환원형 glutathione을 산화형 glutathione으로 전환시키는 효소로 알려져 있다(5).

Fig. 3은 50과 100 mg/kg 농도의 무화과 당단백질만 섭취한 그룹과 무화과 당단백질의 섭취후 Triton WR-1339 투여로 고지혈증이 유발된 생쥐그룹에서의 SOD 및 CAT 그리고 GPx 활성을 보여주고 있다. SOD 및 CAT 활성에 있어서 50과 100 mg/kg의 농도로 무화과 당단백질만 섭취한 그룹은 PBS만 처리한 그룹과 비교하였을 때, 그 활성이 다소 증가하는 경향을 나타내었으나 유의적 차이는 보이지 않았다(Fig. 3A). 또한 50과 100 mg/kg 농도의 무화과 당단백질을 섭취시킨 후 Triton WR-1339 투여하여 고지혈증이 유발된 생쥐 그룹에서도 Triton WR-1339만 처리한 그룹과 비교하였을 때, SOD 및 CAT의 활성이 점차 증가하였으나 그 유의성은 나타나지 않았다(Fig. 3B). 그러나 흥미롭게도 GPx 활성의 경우, PBS만 투여하거나 Triton WR-1339만 투여한 그룹과 비교하였을 때, 100 mg/kg 농도로 무화과 당단백질을 섭취한 그룹들의 GPx 활성은 16.4%(Fig. 3A)와 12.3%(Fig. 3B)까지 유의적으로 증가하는 ($p < 0.01$) 효과를 보여주었다. 위의 결과와 유사하게 두중 에탄올 추출물에 의한 쥐의 간 조직에 존재하는 해독효소활성의 변화를 알아본 Nam 등(12)의 보고에서도 SOD나 CAT 활성의 경우 증가가 나타났지만 유의성은 없었던 반면, GPx 활성에 있어서는 유의적인 증가현상을 보였다고 밝힌바 있다. 비록 위와 같은 무화과 당단백질의 정확한 분자적 기전은 현재 연구로서 설명할 수 없지만, 무화과 당단백질의 저지혈증 효과에 세가지 가능성 있는 추론은, 먼저 무화과 당단백질이 간에서 항산화계 해독효소의 활성을 증가시켜 간의 정상적인 기능으로 회복되게 되고, 이를 통해 HMG-CoA reductase에 영향을 주는 kinase를 활성화시켜 HMG-CoA reductase의 인산화를 시켜줌으로써 HMG-CoA reductase의 활성을 억제시켜 콜레스테롤 생합성을 저해 혹은 방해할 수 있다는 점이다(30). 두번째로 무화과 당단백질은 그들의 항산화능을 바탕으로 ROS에 의한 LDL-콜레스테롤의 지질 과산화 작용을 막음으로써, LDL 수용체를 증가시켜 혈중 콜레스테롤 농도를 낮게 할수 있으며, 마지막으로 지방의 분해에 관련되는 담즙산의 분비를 촉진시켜 혈중 콜레스테롤 농도를 낮게 하는데 기여하는 것으로 추측할 수 있다.

지금까지의 연구 결과를 종합해 볼 때, 무화과 당단백질을 섭취시킴에 따라 생쥐의 혈장 내 콜레스테롤 수준의 감소효과가 나타났으며, 특히 100 mg/kg의 농도로 식이 시에는 TC와 LDL-콜레스테롤 수준의 강력한 유의적 개선효능이 나타났

($p < 0.01$). 그리고 무화과 당단백질 식이의 농도가 증가함에 따라 간에 존재하는 항산화계 해독 효소인 SOD, CAT 그리고 GPx의 활성도 증가함을 알 수 있었다. 이는 무화과 당단백질이 간 조직에 존재하는 항산화계 해독효소의 활성을 증가시켜서 혈장에서 ROS에 의해 야기되는 산화적 스트레스를 억제하여 혈장 콜레스테롤 수준의 감소로 이어진 결과로 사료된다. 결국 무화과 당단백질은 ROS에 대한 scavenger로서 기능을 가지고 있다. 따라서 무화과 당단백질은 ROS에 의해 야기되는 여러 질병들, 특히 콜레스테롤과 관련된 고지혈증이나 동맥경화의 예방에 유용하게 사용될 수 있는 가능성을 제시해주며, 결과적으로, 무화과로부터 추출한 당단백질은 항산화 능력이 있고, 혈장 콜레스테롤의 수준을 낮출 수 있으며, 콜레스테롤의 주합성 기관인 간 조직에 존재하는 여러 항산화계 해독 효소들의 활성을 증가시킬 수 있는 것으로 사료된다.

그러나 HMG-CoA reductase에 의한 콜레스테롤 생성과 관련된 유전자의 발현 및 그의 기전을 분자생물학적인 수준에서 보충적인 연구가 향후 더 수행 되어야 할 것이다.

요 약

본 연구는 천연물에서의 생리활성물질 동정의 일환으로 *Ficus Carica* Linnoeus(FCL)로부터 60 kDa의 FCL glycoprotein(무화과 당단백질)을 추출한 후, 무화과 당단백질의 첨가에 따른 과산화 지질 라디칼 억제능력 및 생쥐의 혈장 콜레스테롤 수준과 간 해독효소활성의 개선효과를 평가하였다. *In vitro*에서 리놀렌산 자동산화반응에 기초한 과산화 지질 라디칼 억제능력을 실험한 결과, 무화과 당단백질을 섭취시킨 농도가 증가함에 따라 과산화 지질 라디칼 억제능력은 증가하였다. 한편, 생쥐에게 14일 동안 무화과 당단백질을 50 및 100 mg/kg 농도로 섭취시킨 그룹과 무화과 당단백질을 섭취시킨 후 Triton WR-1339를 투여한 생쥐 그룹에서 혈액 및 간조직을 채취하여 혈장 콜레스테롤의 수준변화 및 해독효소의 활성을 측정하고, 100 mg/kg 농도로 무화과 당단백질을 섭취시킨 그룹에서 TC와 LDL-콜레스테롤의 수준은 유의적 감소효과가 나타났다($p < 0.05$). 또한 Triton WR-1339에 의해 고지혈증이 유발된 생쥐그룹에서도 TC와 LDL-콜레스테롤 수준이 유의적 억제능력을 보였는데, 특히 100 mg/kg 농도에서 그 개선 효과는 더욱 분명하였다($p < 0.01$). 간의 해독효소 중 항산화 기능을 하는 SOD, CAT 그리고 GPx의 활성은 모두 증가되었는데, 특히 GPx는 100 mg/kg의 농도에서 유의성을 보이며 증가하였다($p < 0.01$). 따라서 이러한 결과를 종합하면, 무화과 당단백질이 해독효소의 활성을 증가시킴으로써 체내의 ROS의 수준을 감소시키고, 이러한 항산화 효과가 혈중 콜레스테롤의 수준을 감소시키는데 영향을 미친 것으로 사료된다.

문 헌

- Harrison DG. Endothelial function and oxidant stress. Clin. Cardiol. Suppl. 20: II-11-17 (1997)
- Halliwell B, Gutteridge JM. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. Methods Enzymol. 186: 1-85 (1990)
- Ho YS, Crapo JD. Isolation and characterization of complementary DNAs encoding human manganese-containing superoxide dismutase. FEBS Lett. 229: 256-260 (1988)
- Deisseroth A, Dounce AL. Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. Physiol.

- Rev. 50: 319-375 (1970)
- Jones DP, Eklow L, Thor H, Orrenius S. Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes: relative contributions of catalase and glutathione peroxidase in decomposition of endogenously generated H_2O_2 . Arch. Biochem. Biophys. 210: 505-516 (1981)
- Ha TY, Cho IJ, Seong KS, Lee SH. Effect of Cassia tora ethanol extract on the lipid levels of serum and liver in rats fed high cholesterol diet. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 30: 1171-1176 (2001)
- Tall AR. Plasma high density lipoproteins: Metabolism and relationship to atherogenesis. J. Clin. Invest. 86: 379-384 (1990)
- Law MR, Wald NJ. An ecological study of serum cholesterol and ischaemic heart disease between 1950 and 1990. Eur. J. Clin. Nutr. 48: 305-325 (1994)
- Witztum JL. The oxidation hypothesis of atherosclerosis. Lancet 344: 793-795 (1994)
- Istvan E. Statin inhibition of HMG-CoA reductase: a 3-dimensional view. Atheroscler. Suppl. 4: 3-8 (2003)
- Chong PH, Boskovich A, Stevkovic N, Bartt RE. Statin-associated peripheral neuropathy: review of the literature. Pharmacotherapy 9: 1194-1203 (2004)
- Nam SM, Ham SS, Oh DH, Jung ME, Kang IJ, Chung CK. Effects of *Eucommia ulmoides* olive ethanol extract on lipid metabolism and antioxidant enzyme activities of rats fed high fat diet. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 31: 796-801 (2002)
- Jeong MR, Kim BS, Lee YE. Physicochemical characteristics and antioxidative effects of Korean figs (*Ficus carica* L.). J. East Asian Soc. Dietary Life 12: 566-573 (2002)
- Kim KH. Chemical components of Korean figs and storage stability. Korean J. Food Sci. Technol. 13: 165-169 (1981)
- Neville DM Jr, Glossmann H. Molecular weight determination of membrane protein and glycoprotein subunits by discontinuous gel electrophoresis in dodecyl sulfate. Methods Enzymol. 32: 92-102 (1974)
- Takao T, Kitatani F, Watanabe N, Yagi A, Sakata K. A sample screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. Biosci. Biotech. Biochem. 58: 1780-1783 (1994)
- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin. Chem. 18: 499-502 (1972)
- Tercyak AM. Determination of cholesterol and cholesterol esters. J. Nutr. Biochem. 2: 281-292 (1991)
- Burke RW, Diamondstone BI, Velapoldi RA, Menis O. Mechanisms of the Liebermann-Burchard and Zak color reactions for cholesterol. Clin. Chem. 20: 794-781 (1974)
- Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal. Biochem. 44: 276-287 (1971)
- Thomson JF, Nance SL, Tollaksen SL. Spectrophotometric assay of catalase with perborate as substrate. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 157: 33-35 (1978)
- Mohandas J, Marshall JJ, Duggin GG, Horvath JS, Tiller DJ. Differential distribution of glutathione and glutathione-related enzymes in rabbit kidney. Possible implications in analgesic nephropathy. Biochem. Pharmacol. 33: 1801-1807 (1984)
- Ding JL, Hsu JS, Wang MM, Tzen JT. Purification and glycosylation analysis of an acidic pectin methylesterase in jelly fig (*Ficus awkeotsang*) achenes. J. Agric. Food Chem. 50: 2920-2925 (2002)
- Kimura Y, Miyagi C, Kimura M, Nitoda M, Kawai N, Sugimoto H. Structure features of N-glycans linked to royal jelly glycoprotein: Structure of high-mannose type, hybrid type, and biantennary type glycans. Biosci. Biotechnol. Biochem. 64: 2109-2120 (2000)
- Goldfarb S. Rapid increase in hepatic HMG-CoA reductase activity and in vivo cholesterol synthesis after Triton WR 1339 injection. J. Lipid Res. 19: 489-494 (1978)
- Hirsch RL, Kellner A. The pathogenesis of hyperlipemia induced by means of surface-active agents. II. Failure of exchange of cholesterol between the plasma and the liver in rabbits given Triton

- WR 1339. *J. Exp. Med.* 104: 15-24 (1966)
27. Moundras C, Behr SR, Demigne C, Mazur A, Remesy C. Fermentable polysaccharides that enhance fecal bile acid excretion lower plasma cholesterol and apolipoprotein E-rich HDL in rats. *J. Nutr.* 124: 2179-2188 (1994)
28. Wolever TM, Jenkins DJ, Ninham R, Alberti KG. Guar gum and reduction of post-prandial glycaemia: effect of incorporation into solid food, liquid food, and both. *British J. Nutr.* 41: 505-510 (1979)
29. Stedronsky ER. Interaction of bile acids and cholesterol with non-systemic agents having hypocholesterolemic properties. *Biochim. Biophys. Acta* 1210: 255-287 (1994)
30. Votz D, Voet JG. *Biochemistry*. 2nd Ed. John Wiley & Sons Inc., NY, USA. pp. 692-704 (1995)

(2005년 4월 1일 접수; 2005년 6월 17일 채택)