

홍화씨 폴리페놀이 HMG-CoA reductase, LDL 산화 및 Apo A1 분비에 미치는 영향

조성희 · 박영이 · 윤지영 · 최상원 · 하태열^{1,*}

대구가톨릭대학교 식품영양학과, ¹한국식품연구원 식품기능연구본부

The Effect of Polyphenols from Safflower Seed on HMG-CoA Reductase (HMGR) Activity, LDL Oxidation and Apo A1 Secretion

Sung-Hee Cho, Young-Yi Park, Ji-Young Yoon, Sang-Won Choi, and Tae-Youl Ha^{1,*}

Department of Food Science and Nutrition, Catholic University of Daegu

¹Food Function Research Division, Korea Food Research Institute

Abstract This study was conducted to examine the effect of polyphenols from safflower seed on HMG-CoA reductase (HMGR) activity, LDL oxidation and Apo A1 secretion from Hep3B cell. The safflower seed polyphenols were matairesinol (lignan), enterolactone (lignan metabolite), acacetin (flavone) and serotonin derivative. In addition to safflower polyphenols, mevastatin, α -estradiol, α -tocopherol and soy genistein were tested as reference compounds depending on the type of the test. HMGR source was liver microsome obtained from rat fed 2% cholestyramine for 10 days. Inhibition of HMGR activity was greater with mevastatin (53%) than safflower serotonin derivatives (45%), followed by genistein (35%), but was very small with matairesinol, enterolactone and acacetin. LDL oxidation induced by CuSO_4 was suppressed by all the test material used in the present study and in the order of safflower serotonin derivatives > matairesinol > β -estradiol > genistein > acacetin > enterolactone. Apo A1 secretion from Hep3B cell was significantly stimulated by mevastatin, but moderately ($p < 0.1$) by β -estradiol and genistein as well as enterolactone. These results suggest that the safflower polyphenols improve body lipid status via inhibition of cholesterol synthesis and suppression of LDL oxidation.

Key words: safflower polyphenol, HMG-CoA reductase, Apo A1, LDL oxidation

서 론

홍화(safflower)는 세계의 여러 지역에서 재배되고 있으며 그 종실로 제조되는 홍화유는 식용유로 널리 섭취되고 있다. 홍화유는 α -linoleic acid(n-6)를 다량 함유하여 혈중 콜레스테롤 저하효과가 있지만 지방산의 구성이 n-6계로 치중되고 n-3계의 지방산이 매우 적어 다불포화지방산 균형에 문제점이 가지고 있다. 홍화씨의 유지성분을 제외한 부분에 대하여는 미국 등 서구지역에서는 거의 연구가 이루어지지 않고 있는 실정이다. 본 연구팀에서는 다년간의 연구로 홍화씨의 탈지 추출물로부터 3 종류의 폴리페놀을 분리한 바 있다(1). 이 폴리페놀들은 phytoestrogen으로 분류되는 lignan(matairesinol과 8-hydroxyarctigenin)과 flavone 화합물(acacetin과 acacetin 7-O-glucoside) 및 serotonin 유도체(N-feruloyl-serotonin과 N-(p-coumaroyl) serotonin)들이다. 홍화씨 폴리페놀들은 골아세포 증식 효과가 있었으며 탈지 홍화박을 섭취한 난소 절제쥐는 대조군에 비하여 경골조직이 잘 보존됨을 보여 주었다(2). 탈지 홍화박 및 홍화박 추출물들과 3종의 폴리페놀들은 같

은 난소절제쥐의 혈청 총 콜레스테롤 및 중성지방을 감소시키고 HDL-콜레스테롤을 증가시켰으며(3,4) 체내 과산화물의 생성을 감소시켰다(5). 그러나 이러한 혈청지질상태의 개선효과에 대한 기전은 연구되지 않았으며 과산화물 감소와 LDL 산화 억제와의 관련성도 직접적으로 조사된 바 없다.

체내에 존재하는 콜레스테롤의 60-70%는 내인성으로 알려져 있으며 이 내인성 콜레스테롤 합성에 있어서 가장 중요한 단계는 콜레스테롤의 생합성의 율속효소인 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG) CoA reductase 반응으로 잘 알려져 있다. 이 효소활성의 조절은 체내 총콜레스테롤과 혈청 콜레스테롤 수준에 큰 영향을 미친다. 천연물질이거나 합성물질을 이용하여 고지혈증 치료 및 동맥경화 예방효과 여부를 조사할 때 이 HMGR 활성에 미치는 영향이 많이 연구되고 있다. 곡산 곡류 및 두류에서 HMGR 활성 저해제 검색이 이루어진 바 있으며(6) 기장에서 효소 저해 활성이 큰 물질이 존재함을 보고하였다(7). Moon 등(8)에 의해 홍화씨의 HMGR 활성 저해를 측정하였으나 성분별 조사는 이루어지지 않았다.

혈중 지질상태 개선 측면에서 총콜레스테롤, 특히 LDL-콜레스테롤과 중성지방 농도가 저하되는 것이 바람직하지만 HDL-콜레스테롤 증가(9)도 매우 중요하다. HDL을 증가시키는 대표적인 요소로서는 apolipoprotein(Apo) A1과 lecithin-cholesterol acyltransferase(LCAT)를 들 수 있다. Apo A1은 HDL-콜레스테롤에서 가장 많이 존재하는 apolipoprotein으로 혈중 HDL-콜레스테롤 형성에 작용하는 LCAT 활성에 필수요소이므로(10) 보다 핵심적인

*Corresponding author: Tae-Youl Ha, Food Function Research Division, Korea Food Research Institute, San 46-1, Baekhyun-dong, Bundang-gu, Songnam-si, Kyonggi-do, 463-420, Korea

Tel: 82-31-789-9054

Fax: 82-31-780-9225

E-mail: tyhap@kfri.re.kr

Received November 17, 2005; accepted March 9, 2006

요소라고 할 수 있다. 이 두 단백질의 합성은 지방섭취에 의하여 동시에 촉진되는 것으로 나타났으나(11) 알콜섭취에 의한 HDL의 증가는 Apo A1의 증가를 수반하였으나 LCAT는 변화가 적었다(12)고 보고되었다. 또한 Apo A1은 HDL-콜레스테롤 농도와 90% 이상에 이르는 정의 상관성을 가지며 이미 관상동맥질환의 예측 지표로 임상에서 사용하고 있다. Apo A1은 알콜 뿐 아니라 여성호르몬 에스트로겐, 대두 genistein에 의하여 증가되는 것으로 보고되었다(13). HepG2 세포를 이용한 세포연구에서 HMGR 저해제인 simvastatin에 의하여서도 Apo A1이 증가되었다(14). 에스트로겐 및 대두 isoflavone에 의한 Apo A1의 증가는 식물체에 광범위하게 존재하는 다양한 종류의 식물성 에스트로겐을 스크리닝, 개발 및 활용도를 높여 줄 수 있으리라는 점에서 중요하다. 이러한 결과들이 보편적인 HepG2 세포를 사용한다는 점(15-17)에서 기술적인 측면에서 평가를 용이하게 해주는 지표가 될 수 있다. 본 연구에서 HepG2와 같은 hepatoma cell인 Hep3B cell에서 분비되는 Apo A1을 측정하고자 하였다.

혈청 LDL 수준의 증가가 동맥경화의 제1의 위험인자이지만 LDL은 산화되어 foam cell로 전환될 때 혈관 내 plaque형성을 가속화 시키는 것으로 알려졌다(18). 따라서 LDL 자체의 상승을 억제하는 것도 중요하지만 혈중에서 산화되는 것을 억제하는 것이 동맥경화 예방에 중요하다. 따라서 LDL 산화는 혈중 지질대사를 조사함에 지질함량 변화와 동시에 같이 조사되어야 할 지표이다. LDL 산화 억제에 작용하는 대표적인 항산화물질은 tocopherol, carotenoid, L-ascorbic acid, isoflavone과 flavonoid들로 이들의 효과는 *in vitro* 또는 *ex vivo*에서 모두 관찰되었다(19,20). 그러므로 본 연구에서도 홍화폴리페놀에 대하여 LDL 산화 억제능을 기존의 물질들과 비교하여 조사하고자 하였다.

따라서 본 연구에서는 홍화씨 기능성분의 혈청 지질 대사 기전을 세 가지 *in vitro*계, 즉, HMGR 반응계, 간세포의 Apo A1 분비계 및 LDL 산화억제제를 통하여 조사하는 것을 목적으로 하였다. 또한 이 *in vitro* 시험의 결과를 바탕으로 기능성 물질에 대한 *in vitro* 평가법으로서의 활용을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

실험 재료

일반사료는 삼양유지사료(주)에서 구입하여 분쇄기에 갈아 사용하였고, cholestyramine은 ICN Biomedicals Inc.(Aurora, OH, USA)에서 구입하여 사용하였다. 세포배양을 위해 사용한 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM)과 penicillin-streptomycin은 GIBCO BRL(Gainthersburg, MD, USA)사의 제품을 사용하였고 fetal bovine serum(FBS)는 hyclone(Logan, Utah, USA)사 제품을 사용하였다. 그 외에 trypsin-EDTA와 tryphan blue는 GIBCO BRL(Gainthersburg, MD, USA)사 제품을 phosphate buffered saline(PBS)와 dimethylsulfoxide(DMSO), mevastatin, β -estradiol 및 genistein은 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)제품을 사용하였다. Enterolactone은 Fluka사(Fluka Chemie, Switzerland)에서 구입하여 사용하였다.

HMGR assay에 사용된 NADPH, HMG-CoA, mevalonic acid는 모두 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)제품을 사용하였으며, Apo A1의 분비능 조사는 LINCO Research Inc.(St. Charles, MO, USA)에서 제공하는 Lincoplex kit를 사용하였다. 이외의 시약들은 모두 특급을 사용하였다.

홍화씨 폴리페놀, matairesinol, acacetin 및 *N*-feruloylserotonin은 전보(1)에 보고된 바와 같은 방법을 사용하여 탈지홍화씨로부터

제조하였다. 즉, 간단히 설명하면 탈지한 홍화씨를 methanol로 환류 추출한 다음 감압 건조하여 *n*-hexane과 80% methanol로 분획한 뒤 농축된 methanol 분획을 ethylacetate와 water로 다시 분획하여 ethylacetate 분획을 얻었다. Ethylacetate 분획은 다시 Diaion HP 20(Mitsubishi Chem. Co., Tolyo Japan), Sephadex LH-20(pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) column chromatography를 거쳐 preparative HPLC에 의하여 각각의 물질을 분리하였다.

HMGR assay

대한바이오링크(주)에서 체중 200 g 내외의 Sprague-Dawley종 수컷을 구입하여 1주일간 환경에 적응시킨 다음 cholestyramine을 2% 되도록 혼합 첨가한 사료를 10일간 식이로 공급하였다(21). HMGR의 활성은 24시간 명암주기에서 식이를 섭취한 후 밤에 활성이 최고에 달하므로(21) 식이를 마친 쥐를 밤 11시에 에테르로 마취시켜 간조직으로부터 효소원으로 사용할 microsome을 분리하였다. 효소활성의 측정은 방사선 동위원소를 이용하는 Sapiro(22)의 방법을 아래와 같이 변형시켜 사용하였다. 효소반응액(총 20 μ L)의 기본구성은 50 mM TEA buffer(pH 7.4, 0.02 M EDTA, 2 mM DTT), 10 mM NADPH, 405 μ M HMG-CoA, 0.002 mCi/mL 14-C HMG-CoA이었으며, 효소원으로서 사용한 microsome은 350-400 μ g protein이었다. 시험물질인 홍화 폴리페놀 성분과 기타 시험물질은 기본적으로 0.3 μ g/mL이었으며 경우에 따라 0.0026 μ g/mL까지 낮게 변화시켰다. 동위원소로 표지된 기질 DL-3-[glutaryl-3- C^{14}]-HMG-CoA를 첨가한 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응에 의해 생성된 mevalonate를 mevalonlactone으로 전환시키기 위해 6 N HCl 5 μ L을 첨가하여 다시 37°C에서 30분간 반응시켰다. 이를 원심분리하여 상층액 15 μ L를 silica gel TLC plate에 spotting하여 benzene/acetone(1:1) 용매로 전개시키고 요오드로 mevalonlactone 부위를 검출하였으며 검출된 부위를 liquid scintillation counter(LS6000, Beckman)로 방사능을 측정하였다. 실험은 3회 반복 실험하였다.

Hep3B 세포로부터 Apolipoprotein A1의 분비 측정

배양실험에 사용한 Hep3B 세포주는 한국세포주은행(KCLB, 서울대학교 의과대학 암연구소)에서 구입하였다. 세포를 기본적으로 CO₂ incubator에서 37°C를 유지하며 DMEM medium에 penicillin-streptomycin과 sodium bicarbonate, FBS(10%)를 첨가하여 배양하였다. 세포들이 culture 75 flask 바닥 면적비로 80% 정도의 밀도로 자라면 trypsin-EDTA를 처리해서 세포들을 취한 후, animal cell culture dish(100 \times 20 mm)내에서 4 \times 10⁵ cell의 농도로 분주하였다. 이렇게 분주된 Hep3B 세포를 10% FBS 첨가한 DMEM medium에 48 hr 동안 기본 배양한 후, PBS로 2번 세척한 다음 시험물질로 3종의 홍화성분(matairesinol, acacetin, *N*-feruloylserotonin)과 mevastatin, β -estradiol, enterolactone, genistein을 최종농도 5 μ g/mL의 농도로 처리하였다. 첨가되는 물질들은 50% DMSO에 용해된 상태로 세포배양액의 DMSO의 최종농도는 0.5%로 유지하였다. 물질처리 후 CO₂ incubator에서 24 hr 동안 incubation시킨 뒤(17), 배지를 모아 microcentrifuge membrane filter(10,000 m.w., Millipore Co. USA)로 10배 농축하여 LINCoplex Apolipoprotein immunoassay kit(LINCO Research Inc., USA)를 사용하여 Lumindex100(LINCO Reaserch Inc.)으로 시료내의 Apo A1의 농도를 측정하였다. 표준곡선을 구하기 위한 Apo A1의 농도는 0.61, 3.06, 15.30, 76.48, 382.4, 1,912, 9,560, 47,800 ng/mL이 되게 희석한 다음 10 μ L 씩 사용하였다. 동일 조건의 실험은 3회 실시하였고 1회 실험에서 모든 시료는 duplicate로 분석하였다.

LDL 산화 억제 측정

인체에서 채취한 혈액을 30분간 방치한 다음 3,000 rpm에 10 분간 원심분리하여 혈청을 얻었다. 1.1 mL의 혈청 당 0.3575 g의 KBr을 녹여 원심분리관 용량의 1/3이 되게 넣고 그 위에 saline buffer(0.15 M NaCl, 0.01% EDTA)를 혈청과 섞이지 않게 조심스럽게 얹어 fixed angel rotor로 417,000×g에 40분간 초원심분리하여 LDL층을 분리하였다(23). 분리한 층은 Lowry 법(24)으로 단백질함량을 측정하고 콜레스테롤 kit시약(아산제약)으로 콜레스테롤을 측정하여 LDL층을 확인했다. 확인된 LDL층을 모아서 PBS(pH 7.4)에 24시간 이상 투석하여 KBr과 buffer를 제거한 다음, 4°C에서 보관하여 사용하였다. LDL의 산화는 Hirano(23)의 방법을 따라 LDL 용액 0.8 mL(100 μmole protein/인산완충액, pH 7.0)에 5 mM CuSO₄를 첨가하여 유도하였으며 이때 반응 온도는 37°C를 유지하였다. LDL 산화는 automatic sample changer가 장착된 spectrophotometer를 이용하여 생성되는 conjugated diene의 흡광도를 234 nm에서 경시적으로 자동 측정하였고 blank 및 시험 물질 첨가에 의한 LDL 산화 정도는 산화지연시간(lag time)으로 나타내었다. 시험물질로는 3종의 홍화성분(matairesinol, acacetin, N-feruloylserotonin)과 enterolactone, β-estradiol, genistein이었고 기준물질로 α-tocopherol을 최종농도 2.5 μg/mL 및 그 이하로 하였으며 각각 3회 반복실험 하였다.

통계처리

본 연구의 실험결과에 대한 통계처리는 SAS package를 이용하여 분석하였고, 대조군에 대한 실험군들의 차이를 t-test로서 검정하였으며, p<0.05 수준 이하에서 유의도를 판정하였다.

결과 및 고찰

HMGR 저해활성

홍화씨의 세 가지 폴리페놀 성분과 enterolactone을 mevastatin, β-estradiol, genistein과 비교하여 HMGR 활성에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. 사용한 시험물질들의 농도는 30 ng/mL 이었고 동일농도로 사용한 고지혈증 치료제인 mevastatin은 53%의 저해율로 가장 높았고, 여성호르몬인 β-estradiol은 저해하는 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 없었다. 홍화의 세 가지 폴리페놀 matairesinol, acacetin, N-feruloylseroton 중에서 N-feru-

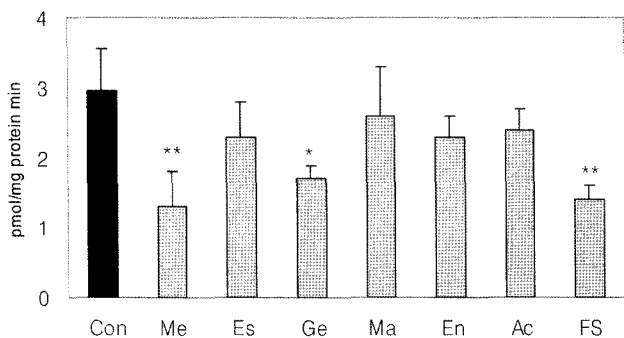


Fig. 1. Effect on HMG-CoA reductase inhibition by three polyphenols from safflower seed in comparison with mevastatin, β-estradiol, genistein and enterolactone. Con: control, Me: mevastatin, Es: β-estradiol, Ge: genistein, Ma: matairesinol, En: enterolactone, Ac: acacetin, FS; N-feruloylserotonin. Concentrations of test compounds in the assay medium were 30 ng/mL. All values are means of five replicates ± SE. *Significantly different from control at p < 0.05 and ** at p < 0.01 by Student's t-test.

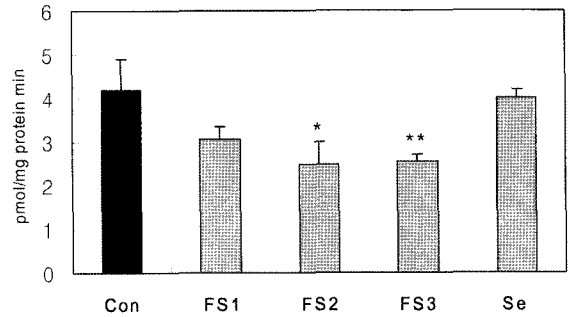


Fig. 2. Effect on HMG-CoA reductase inhibition by N-feruloylserotonin isolated from safflower seed. FS1, FS2, and FS3 represent N-feruloylserotonin at the concentrations of 2.6, 6.5, and 13 ng/mL in the enzyme assay medium, respectively. Se represents serotonin and was added at the 13 ng/mL as hydrochloride salt form. All values are means of four replicates ± SE. *Significantly different from control at p < 0.05 and ** at p < 0.01.

loylseroton의 저해 효과가 뚜렷하였으며 다른 물질들에 비하여 높은 활성을 나타내었다. Matairesinol의 대사물질인 enterolactone은 matairesinol과 acacetin과 함께 거의 미미한 활성을 보였다. 대표적인 폴리페놀 phytoestrogen인 대두의 genistein은 35%의 유의한 저해효과를 나타내었다. 이러한 홍화 N-feruloylseroton의 효과를 재확인하기 위하여 용량을 달리하여 13, 6.5, 2.6 ng/mL 농도에서 HMGR 활성을 조사하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 농도에 비례하여 효소활성을 저해하였다. 그러나 이러한 효과는 ferulic acid가 결합되지 않은 serotonin 자체에서는 볼 수 없었다.

이와 같이 홍화씨의 대표적인 기능성 성분인 N-feruloylserotonin은 HMGR 저해제로 잘 알려진 mevastatin과 유사한 억제 효과가 있었다는 것은 매우 의의가 큰 결과로서 홍화박(3) 및 홍화박 추출물과 분리된 단일성분 섭취(4)에 의한 흰쥐의 혈청 콜레스테롤 저하의 주요 기전의 하나로 생각된다. 그러나 ferulic acid가 결합되지 않은 serotonin에 의한 효소 활성 저해는 볼 수 없으므로 이 효과는 ferulic acid에 크게 기인하는 것으로 사료된다. 그동안 ferulic acid의 기능은 주로 항산화활성이 연구되었으나(25, 26) 쥐에서 혈청 총 콜레스테롤을 감소시켰다는 보고들(27,28)도 있다. 특히 고콜레스테롤 식이에 ferulic acid를 첨가한 경우 간조직의 HMGR 활성의 저하가 수반되었다(28). 반면 홍화씨 에탄올 추출물이나 물추출물을 섭취시킨 쥐에서 혈청과 간조직의 콜레스테롤의 감소가 있었음에도 HMGR은 증가되었다고 보고되었다(8). 이 추출물들이 탈지되지 않은 홍화씨에서 제조되어 N-feruloylserotonin 양이 적게 함유되어 있기 때문인지 아니면 다른 이유인지는 조사가 필요하다.

Apolipoprotein A1 분비능 조사

Apo A1의 측정은 형광의 probe를 이용한 미량의 Apo A1 정량법으로 Linco사에서 개발된 Lincoplex kit로 sensitivity가 ng/mL로서 매우 민감하지만 처음 사용하는 방법이므로 신뢰성을 확인할 필요가 있었다. 지침에 따라 표준물질의 농도를 수 ng에서 수십 μg까지 단계적으로 변화시켜 얻은 표준검정방정식에서 농도(x ng)와 형광단위(y)는 y = -2512.47 + 1365.42*ln(x)의 관계가 있었으며 신뢰도(p<0.0001)로 매우 높아 기능성 물질의 in vitro 검색방법으로 활용할 수 있을 것으로 사료되었다. 본 연구에서 조사하고자 한 시험물질들을 Hep3B 세포 배양에 첨가하여 Apo A1 분비능을 조사한 결과는 Fig. 3과 같다. 고지혈증의 치료제인 mevastatin은 Apo A1의 분비를 유의적으로 촉진시켰으며, β-

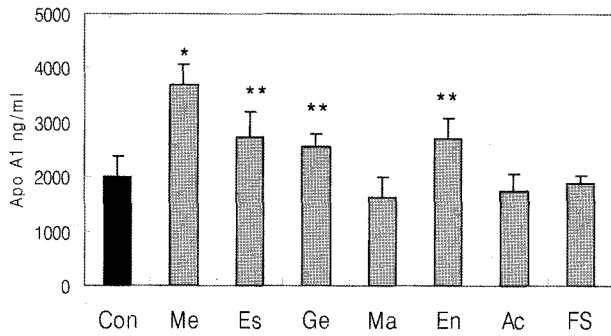


Fig. 3. Effects on Apo A1 secretion from Hep3B cell of three polyphenols from safflower seed in comparison with mevastatin, β -estradiol, genistein and enterolactone. All values are means of four replicates \pm SE. *Significantly different from control at $p < 0.05$ and ** at $p < 0.01$.

estradiol, genistein, enterolactone도 Apo A1의 분비를 촉진시키는 경향이 있음을 알 수 있었다. 홍화 종실의 함유성분인 matairesinol, acacetin과 serotonin은 Apo A1의 분비능에 영향을 미치지 않았다.

Mevastatin에 의한 결과는 같은 statin계 약제인 simvastatin을 사용하였을 때의 결과(14)와 일치하였다. β -Estradiol과 genistein의 효과도 타 연구자들의 결과(16,17)와 유사한 경향을 보여주었다. 홍화 종실의 기능성 성분에서 lignan의 체내 대사물인 enterolactone이 β -estradiol과 genistein과 유사한 효과를 보인 것은 본 연구에서 처음 보고되는 것이다. 이는 홍화성분 섭취에 의한 혈청 HDL 콜레스테롤의 증가(4) 또는 HDL-콜레스테롤/총 콜레스테롤의 증가(4,5)의 주요기전이라고 사료된다. 홍화씨에 함유된 matairesinol보다 그 체내 대사물인 enterolactone이 효과를 보인다는 것은 생리적인 의미를 갖는다. 섭취한 matairesinol의 대부분이 장내 세균에 의하여 enterolactone 형태로 전환되어 흡수되기 때문이다(29). 식사 내의 lignan 섭취와 혈청 enterolactone 농도가 비례한다는 보고들(30,31)은 matairesinol의 대사물인 enterolactone의 생리적인 중요성을 재확인하여 준다.

홍화 폴리페놀 및 기타 시험물질의 LDL 산화 억제

본 연구에서 사용한 Hirano의 방법(23)은 혈청 LDL 분리에 있어서 단계적인 원심분리를 거치는 방법(19)보다 훨씬 시간이 절약되며 또한 산화유도계의 구성도 가장 단순하지만 효율적이었다. Table 1에는 홍화 폴리페놀성분 및 기타 시험물질들을 2.5 μ g/mL의 농도로 LDL 용액에 가한 후 LDL 산화가 유도되는 것을

Table 1. Inhibitory effects of four polyphenols from safflower seed and other test compounds on LDL oxidation *in vitro*

Test compound	Concentration (μ g/mL)	Lag time (min)
None	-	47 \pm 7.2
α -Tocopherol	2.5	54 \pm 7.0*
β -Estradiol	2.5	124 \pm 68.6**
Genistein	2.5	120 \pm 0.0
Matairesinol ¹⁾	2.5	>150**
Enterolactone	2.5	75 \pm 5.4**
Acacetin ¹⁾	2.5	81 \pm 7.4**
<i>N</i> -Feruloylserotonin ¹⁾	2.5	>150**

¹⁾From safflower seed

All values are means of four replicates \pm SE.

*Significantly different from none at $p < 0.05$ and ** at $p < 0.01$.

Table 2. Inhibitory effects of matairesinol and *N*-feruloylserotonin from safflower seed with various concentrations on LDL oxidation *in vitro*

Test compound	Concentration (μ g/mL)	Lag time (min)
None	0	47 \pm 7.2
Matairesinol	0.1	59.3 \pm 7.51*
	0.5	105.3 \pm 5.77**
<i>N</i> -Feruloylserotonin	0.01	65 \pm 4.2*
	0.05	101 \pm 0.0**
	0.1	430 \pm 0.0**
	0.5	>600**

All values are means of three replicates \pm SE.

*Significantly different from none at $p < 0.05$ and ** at $p < 0.01$.

추적하여 lag time을 산정한 결과를 나타내었다. 시험물질이 함유되지 않은 용매만을 첨가한 조건(None)에서의 lag time은 47분이었으나, 항산화제로 알려진 α -tocopherol(2.5 μ g/mL)은 54분으로 LDL의 산화가 억제되는 것을 확인하였다. 그러나 여성호르몬인 β -estradiol은 같은 농도에서 124분으로 그 억제 효과가 훨씬 큰 것을 볼 수 있었으며 콩의 isoflavone인 genistein 또한 유사한 산화 억제효과(120 min)를 나타내었다. 홍화 폴리페놀성분의 하나인 matairesinol은 같은 농도에서 150분을 초과하였고 대사물인 enterolactone은 75분, acacetin은 81분으로 모두 LDL 산화억제에 효과가 있었다. *N*-feruloylserotonin도 matairesinol과 마찬가지로 2.5 μ g/mL에서는 최대 측정시간인 150분을 초과하였다. 따라서 이 두 물질에 대하여는 농도를 낮추어 LDL 산화 지연을 측정하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 matairesinol은 0.1 μ g/mL의 농도에서도 59분으로 지연시켰고 0.5 μ g/mL에서는 105분으로 산화를 지연시켰다. *N*-feruloylserotonin은 0.01 μ g/mL의 낮은 농도에서도 65분으로 산화를 지연시켰고 0.05 μ g/mL, 0.1 μ g/mL, 0.5 μ g/mL으로 농도가 높아짐에 따라 산화지연효과가 증가하였다. 홍화의 *N*-feruloylserotonin은 LDL 산화억제능이 탁월하며 농도 의존적으로 활성이 증가한 본 연구결과는 타 연구자의 결과(25)와도 유사하였다. 본 결과에서 홍화씨 폴리페놀에 의한 LDL 산화지연 효과는 Kang 등(1)이 사용한 DPPH radical 소거활성이나 간조직 microsome 지질과산화 억제 결과와 유사하였다. 그러나 본 방법은 혈중의 LDL을 직접 기질로 사용하였으므로 혈청지질 상태개선이라는 측면에서 생리적인 의미가 크다고 하겠다. LDL의 산화억제는 체내에서 동맥경화 억제와 밀접하게 관련되어 있기 때문이다.

요 약

홍화씨의 폴리페놀 성분들이 HMGR 활성, LDL-oxidation과 Hep3B 세포로부터의 Apo A1 분비능에 미치는 영향을 조사하였다. 홍화씨 성분은 matairesinol(lignan), acacetin(flavone) 및 *N*-feruloylserotonin과 matairesinol의 대사산물인 enterolactone을 사용하였다. 그 결과, HMGR 저해활성은 mevastatin이 53%로 가장 높은 활성을 나타내었고 다음은 홍화씨 serotonin 유도체인 *N*-feruloylserotonin이 45%의 저해활성을 보여 홍화씨 폴리페놀 중에서는 가장 높은 활성을 보였으며 genistein은 35%의 활성을 보인 반면 나머지는 활성이 거의 미미하였다. *N*-feruloylserotonin의 활성은 용량 의존적 반응을 나타내었다. LDL 산화 억제효과는 사용한 모든 홍화씨 폴리페놀성분에서 나타났는데, 특히 *N*-feruloylserotonin에서 가장 강한 활성을 보였고 역시 용량 의존적 반응을 보였다. Hep3B에서의 Apo A1 분비능은 mevastatin에서

가장 높았고 enterolactone, genistein 및 β -estradiol에서 분비 증강 활성을 나타내었다.

이상의 결과들로 미루어 볼 때, 홍화씨 폴리페놀 성분들은 콜레스테롤 생합성과 LDL의 산화를 억제시킴으로서 지질대사 및 동맥경화 개선에 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2003년도 과학기술부 나노바이오기술개발사업 (M10313120003-04N1012-00311)의 지원에 의한 것입니다.

문헌

- Kang GH, Chang EJ, Choi SW. Antioxidative activity of phenolic compounds in roasted safflower (*Carthamus tinctorious* L.) seeds. *J. Food Sci. Nutr.* 4: 221-225 (1999)
- Kim HJ, Bae YC, Park RW, Choi SW, Cho SH, Choi YS, Lee WJ. Bone-protecting effect of safflower seeds in ovariectomized rats. *Calcif. Tissue Int.* 71: 88-94 (2002)
- Cho SH, Choi SW, Choi Y, Lee WJ. Effects of defatted safflower and perilla seed powders on lipid metabolism in ovariectomized female rats fed high cholesterol diets. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 30: 112-118 (2001)
- Cho SH, Lee HR, Kim TH, Choi SW, Lee WJ, Choi Y. Effects of defatted safflower seed extract and phenolic compounds in diet on plasma and liver lipid in ovariectomized rats fed high cholesterol diets. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 50: 32-37 (2004)
- Cho SH, Lee HR, Choi SW, Lee WJ, Choi Y. Formulated product containing safflower seed extract improves lipid status of ovariectomized rats. *Korean J. Gerontol.* 15: 39-46 (2005)
- Ha TY, Cho IJ, Lee SH. Screening of HMG-CoA reductase inhibitory activity of ethanol and methanol extracts from cereals and legumes. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30: 224-229 (1998)
- Cho SH, Jung SE, Lee HK, Ha TY. Effects of methanol extract of proso millet on cholesterol and fatty acid metabolism in rat. *J. Food Sci. Nutr.* 3: 188-192 (1999)
- Moon KD, Back SS, Kim JH, Jeon SM, Lee MK, Choi MS. Safflower seed extract lowers plasma and hepatic lipids in rats fed high-cholesterol diet. *Nutr. Res.* 21: 895-904 (2001)
- von Echardestein A, Assemann G. Prevention of coronary heart disease by raising high-density lipoprotein cholesterol. *Curr. Opin. Lipidol.* 11: 627-637 (2000)
- Segreat J, Li L, Ananthamaiah GM, Harvey SC, Liadaki KN, Zannis V. Structure and function of apolipoprotein A-I and high-density lipoprotein. *Curr. Opin. Lipidol.* 11: 105-115 (2000)
- Fungwe TV, Kudchodkar BJ, Lacko AG, Dory L. Fatty acids modulate lecithin:cholesterol acyltransferase secretion independent of effects on triglyceride secretion in primary rat hepatocytes. *J. Nutr.* 128: 1270-1275 (1998)
- Hendriks HF, Veenstra J, van Tol A, Groener JE, Schaafsma G. Moderate doses of alcoholic beverage with dinner and post-prandial high density lipoprotein composition. *Alcohol* 33: 403-410 (1998)
- Lamon-Fava S. High-density lipoprotein: Effects of alcohol, estrogen and phytoestrogens. *Nutr. Rev.* 60: 1-7 (2002)
- Bonn V, Cheung RC, Chen B, Taghibiglou C, van Iderstine SC, Adeli K. Simvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, induces the synthesis and secretion of apolipoprotein A1 in HepG2 cells and primary hamster hepatocytes. *Atherosclerosis* 163: 59-68 (2002)
- Tam SP, Archer YK, Deeley RG. Effects of estrogen on apolipoprotein secretion by the human hepatocarcinoma cell line, HepG2. *J. Biol. Chem.* 260: 1670-1675 (1985)
- Jin FY, Kamanna VS, Kashyap ML. Estradiol stimulates apolipoprotein A-I but not A-II containing particle synthesis and secretion by stimulating mRNA transcription rate in HepG2 cells. *Arterioscle. Thromb. Vasc. Biol.* 18: 999-1006 (1998)
- Lamon-Fava S. Genestein activates apolipoprotein A-I gene expression in human hepatoma cell line HepG2. *J. Nutr.* 130: 2489-2492 (2000)
- Witzum JL. The role of monocytes and oxidized LDL in atherosclerosis. vol 21, pp. 59-69. In: *Atherosclerosis Reviews*. Leaf A, Weber PC (eds). Raven Press, New York, USA (1990)
- Rotheneder M, Puhl H, Waeg G, Striegl G, Esterbauer H. Effect of oral supplementation with D- α -tocopherol on the vitamin E content of human low density lipoprotein and resistance to oxidation. *J. Lipid Res.* 32: 1325-1332 (1991)
- Meng Q, Lewis P, Wahala K, Adlercreutz H, Tikkanen. Incorporation of esterified soybean isoflavone with antioxidant activity into low density lipoprotein. *Biochim. Biophys. Acta.* 1438: 369-376 (1999)
- Klensek DA, Dugan RE, Baker TA, Porter JW. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase from rat liver. *Methods Enzymol.* 71: 462-79 (1981)
- Shapiro DJ, Nordstrom JL, Mitschele JJ, Rodwell VW, Schimke RT. Micro assay for 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase in rat liver and in L-cell fibroblasts. *Biochim. Biophys. Acta.* 370: 369-377 (1974)
- Hirano R, Kondo K, Iwamoto T, Igarashi O, Itakura H. Effects of antioxidants on the oxidative susceptibility of low-density lipoprotein. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 43: 435-444 (1997)
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275 (1951)
- Chen CY, Milbury PE, Kwak HK, Collins FW, Samuel P, Blumberg JB. Avenanthramides and phenolic acids from oats are bioavailable and act synergistically with vitamin C to enhance hamster and human LDL resistance to oxidation. *J. Nutr.* 134: 1459-1466 (2004)
- Balasubashini M, Rukkumani R, Viswanathan P, Menon VP. Ferulic acid alleviates lipid peroxidation in diabetic rats. *Phytother. Res.* 18: 310-314 (2000)
- Kamal-Eldin A, Fran J, Razdan A, Tengbad S, Basu S, Vessby B. Effects of dietary phenolic compounds on tocopherol, cholesterol, and fatty acids in rat. *Lipids* 35: 427-435 (2000)
- Kim HK, Jeong TS, Lee MK, Park YB, Choi MS. Lipid-lowering efficacy of hesperetin metabolites in high-cholesterol fed rats. *Clinica. Chimica. Acta.* 327: 129-137 (2003)
- Setchell KD, Adlercreutz H. Mammalian lignans and phytoestrogens. Recent studies on their formation, metabolism, and biological role in health and disease. pp. 315-345. In: *Role of the Gut Flora in Toxicity and Cancer*. Rowland I (ed). Academic Press, London, England (1988)
- Horner NK, Kristal AR, Prunty J, Skor HE, Potter JD, Lampe JW. Dietary determinant of plasma enterolactone. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 11: 121-126 (2002)
- Kilkkinen A, Valsta LM, Virtamo J, Stumpf K, Adlercreutz H, Pietinen P. Intake of lignans is associated with serum enterolactone concentration in Finnish men and women. *J. Nutr.* 133: 1830-1833 (2003)
- Ndong-Akoume MY, Mignault D, Perwaiz S, Plaa GL, Yousef IM. Simultaneous evaluation of HMG-CoA reductase and cholesterol 7 α -hydroxylase activities by electrospray tandem MS. *Lipids* 37: 1101-1107 (2002)