

복분자 미숙과와 홍삼 추출물의 콜레스테롤 개선 효과

이수정 · 이민정 · 고영중 · 최혜란 · 정종태 · 최경민¹ · 차정단¹ ·
황승미¹ · 정후길² · 박종혁² · 이태범*

고창복분자연연구소, ¹진안홍삼연구소, ²임실치즈연구소

Effects of Extracts of Unripe Black Raspberry and Red Ginseng on Cholesterol Synthesis

Su Jung Lee, Min Jung Lee, Young Jong Ko, Hye Ran Choi, Jong Tae Jeong, Kyung-Min Choi¹,
Jeong-Dan Cha¹, Seung-Mi Hwang¹, Hoo Kil Jung², Jong Hyuk Park², and Tae Bum Lee*

Gochang Black Raspberry Research Institute

¹Institute of JinAn Red Ginseng

²Imsil Research Institute of Cheese Science

Abstract We investigated the effects of water extracts of unripe black raspberry (UBR) and red ginseng (RG) on cholesterol synthesis, 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase activity, and expression of low-density lipoprotein (LDL) or high-density lipoprotein (HDL)-related genes in HepG2 and Caco-2 (human hepatoma and intestinal cell lines, respectively). Our results showed that cholesterol synthesis and HMG-CoA reductase activity in HepG2 cells were inhibited by UBR and RG. Further, co-treatment with UBR and RG had a greater effect than did treatment with either UBR or RG. In Caco-2 cells, treatment with UBR and RG increased the expression of LDL-regulated genes, such as *LDL receptor* and *SREBP-2*, and also upregulated the level of HDL-associated *ABCA1*. Moreover, co-treatment with UBR and RG appeared to be more effective than treatment with either UBR or RG. Taken together, our results indicate that UBR and RG regulate the level of HDL-associated *ABCA1* via signaling pathway, thereby preventing cholesterol synthesis.

Keywords: black raspberry, red ginseng, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, low-density lipoprotein, high-density lipoprotein

서 론

생활수준의 향상으로 인하여 위생환경과 식생활 패턴이 서구 화됨에 따라 평균수명은 과거에 비해 크게 연장되었으나, 질병의 양상은 대사성 질환과 같은 선진국형으로 급격히 변화되고 있다 (1). 대사증후군은 심장발작이나 뇌졸중의 위험을 높이며 당뇨병 과 고혈압과 같은 관련 질환으로 인한 사망 위험을 증가시킨다 (2,3). 2010년을 기준으로 우리나라에서 심혈관 및 뇌혈관 질환에 의한 사망은 암 다음으로 높으며, 뇌혈관 질환에 의한 사망은 10 만 명당 53.2명으로 2위, 심혈관 질환은 46.9명으로 3위로 나타났다. 이외에도 당뇨병은 20.7명으로 5위를 나타냈으며, 고혈압성 질환은 9.6명으로 10위인 것으로 조사되었다(4).

대사증후군을 일으키는 주요 요인 중 하나인 고지혈증(hyperlipidemia)은 총 콜레스테롤(total cholesterol), 중성지방(triglyceride), 인지질(phospholipid) 등 지질의 혈액 내 농도가 비정상적으로 높은 상태를 말한다. 고지혈증의 원인으로는 지방질의 과잉 섭취나

콜레스테롤과 중성지방을 혈액 중으로 운반하는 저밀도 지단백 (low-density lipoprotein, LDL)의 발현이 증가하고 혈액내의 콜레스테롤을 간으로 이동시켜 담즙으로 만들어 체외로 배출시키는 고밀도 지단백(high-density lipoprotein, HDL)의 발현이 감소하거나 지질 분해 감소와 같은 지방의 생화학 대사 이상에 의해 발생하게 된다(5). 이러한 고지혈증 및 심혈관계 질환은 치료보다 예방이 필요한 질환으로 여겨져, 최근에는 콜레스테롤 합성을 저해하는 생리활성물질을 천연물로부터 찾아내려는 연구가 활발하게 진행되고 있다(6,7).

복분자(*Rubus occidentalis*)는 유리당, 무기질의 인, 철 및 칼륨을 많이 함유하고 있고 특히 유기산과 비타민C가 많이 포함되어 있으며, 항암활성 및 면역증진효과, 항산화 및 항균효과, hepatitis B virus 억제 등 다양한 생리활성에 대한 효능이 밝혀진 바 있다. 최근 연구에 의하면, 복분자 물추출물이 동물시험에서 LDL을 억제함으로써 고지혈증 및 지질대사에 효능이 있음을 확인하였고, 혈관질환의 원인이 되는 염증성 사이토카인인 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), prostaglandin F2 (PGF2), 일산화질소 등의 생성을 억제한다고 보고한바 있다(8).

홍삼(red ginseng)은 인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)을 껍질 채 증기로 찌서 말린 것을 말하는데 이러한 가공과정 중 인삼의 생리활성물질인 사포닌(saponin)의 함량이 증가하고 저장성이 우수해진다. 인삼의 사포닌 성분인 ginsenoside는 인삼에 함유된 배당체란 뜻으로 지금까지 31종의 화학적 구조가 밝혀져 구조적 특

*Corresponding author: Tae Bum Lee, Gochang Black Raspberry Research Institute, Gochang, Jeonbuk 525-943, Korea
Tel: 82-63-560-5170
Fax: 82-63-563-6680
E-mail: tblee01@gbri.re.kr
Received May 28, 2013; revised July 2, 2013;
accepted July 10, 2013

성에 따라 dammaran 계열의 triterpenoid인 protopanaxdaiol (PPD) 과 protopanaxtriol (PPT)로 구분된다(9). PPD계 사포닌은 ginsenoside-Rb1, -Rb2, -Rc, Rd, Rg3 등이 포함되고 PPT계 사포닌에는 ginsenoside-Re, Rg1, Rg2, Rh1 등이 포함되며 이중 ginsenoside-Rg2, Rg3, Rh1, Rh2는 인삼이 아닌 홍삼에만 존재하는 물질이다(10). 이러한 홍삼내에 존재하는 ginsenoside는 지방이나 콜레스테롤의 흡수 및 이동속도를 촉진하고(11), 혈청 콜레스테롤 증가를 억제하는 연구 결과가 있다(12). 또한, ginsenoside를 동물에 투여 시 간의 LDL 흡입을 증가시키고 혈액내의 초저밀도 지단백(Very low-density lipoprotein, VLDL) 제거속도를 촉진하여 ginsenoside의 혈청 콜레스테롤 감소효과가 VLDL과 LDL의 농도감소에 기인한 것임이 증명되었고, ginsenoside에 의한 콜레스테롤 저하는 고지방 식이에 의한 LDL 수용체의 합성억제를 완화시킨 결과임이 밝혀졌다(13). 그 뿐만 아니라, 복분자와 홍삼 추출물은 예로부터 식품이나 약제로서 널리 사용되어 왔으므로 오랜 임상 경험에 의해 그 안전성은 문제가 없을 것으로 생각되어진다(14).

본 연구에서는 사람의 간세포에 복분자 추출물과 홍삼 추출물을 단독 처리 또는 복합 처리하여 세포의 콜레스테롤 합성 억제 효과를 확인한 후 콜레스테롤 합성을 억제하는 가장 효과적인 추출물의 추출용매와 농도를 확인하고, 복분자와 홍삼 추출혼합물, 그리고 복분자의 단일물질인 폴리페놀류와 홍삼의 단일물질인 ginsenoside류의 세포내 콜레스테롤 대사관련 효소의 활성을 측정하여 추출물 혼합액이 효소의 활성에 미치는 영향을 확인하며, 이들 추출물이 세포내의 HDL/LDL 관련 유전자의 발현에 미치는 영향을 알아보려고 한다.

재료 및 방법

세포주와 세포배양

복분자와 홍삼 추출물이 혈중 cholesterol의 조절과, 혈중지질의 구성 성분인 HDL, LDL의 생성에 관련된 유전자들의 발현에 미치는 영향을 알아보려고 인간 간암 세포주(human liver hepatocellular carcinoma cell line)인 HepG2 세포와 인간 대장암 세포주(human colorectal adenocarcinoma cell line)인 Caco-2 세포를 실험에 사용하였다.

HepG2, Caco-2 cell line 모두 한국세포주 은행에서 분양 받았으며 Dulbecco's Modified Eagle Media (DMEM, Welgene, Daegu, Korea)에 56°C에서 30분간 열처리된 fetal bovine serum (PAA, Etobicoke, ON, Canada) 10%와 항생제(penicillin/streptomycin, Lonza, Walkersville, MD, USA) 1%를 첨가하여 37°C, 습도 90%, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다.

추출물 제조

복분자 물 추출물은 복분자 미숙과 및 완숙과 생과 1kg에 물 10L를 넣고 환류냉각장치를 부착한 히팅 맨틀을 이용 2시간 동안 100°C에서 가열 추출하였고, 이것을 2회 반복 하였으며 복분자 에탄올 추출물은 복분자 미숙과 및 완숙과 생과 각각 1kg에 25, 50, 75% 에탄올 10L씩을 넣고 환류냉각장치를 부착한 히팅 맨틀을 이용 2시간 동안 80°C에서 가열 추출하였다. 홍삼 물 추출물은 홍삼 1kg에 물 10L를 넣고 환류냉각장치를 부착한 히팅 맨틀을 이용 75°C에서 48시간, 72시간, 48시간 3회 가열 추출 하였으며 홍삼 에탄올 추출물은 홍삼 각각 1kg에 20, 40, 60% 에탄올 10L씩을 넣고 환류냉각장치를 부착한 히팅 맨틀을 이용 75°C에서 48시간, 72시간, 48시간 3회 가열 추출 하였다. 추출물은 여과지(ADVANTEC No. 2, Adventec Toyo Kaisha, Tokyo,

Japan)를 이용 여과하여 감압농축 후 동결 건조 하였다.

세포독성실험(MTT assay)

배양이 끝난 세포의 생존율은 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2, 5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) 환원 방법을 이용하여 측정 하였다. MTT assay는 대사가 왕성한 세포의 농도를 측정하는 방법으로 미토콘드리아의 탈수소 효소작용에 의해 MTT tetrazolium 이 MTT formazan으로 환원되는 방법을 이용하여 450 nm의 파장에서 흡광도를 측정하고 이는 살아있는 세포수를 반영한다. HepG2 세포는 96 well에 1×10⁴ cell/mL 농도로 90 μL씩 분주 한 뒤 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 동안 배양하였다. 이후 복분자와 홍삼 추출물들을 농도별로 제조하여 처리한 후 48시간 동안 배양기에서 배양하였다. 같은 방법으로 Caco-2 세포 또한 96 well에 2×10⁴ cell/mL 농도로 90 μL씩 분주하고, 복분자와 홍삼 추출물들을 농도별로 제조하여 처리한 뒤 48시간 동안 배양기에서 배양 하였다. MTT assay는 cell viability assay kit (EZ-Cytox, Dogen, Seoul, Korea)를 이용하였고, 모든 well에 MTT 용액 10 μL를 가해주고 다시 37°C, 5% CO₂에서 4시간 배양한 뒤 흡광도 측정을 위해 1분 정도 부드럽게 shaking을 한 뒤 microplate reader (Synergy HT, Bio-Tek, Winooski, VT, USA)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Cholesterol 합성 억제 효과

HepG2 세포를 6 well plate에 3×10⁵ cell/mL로 분주하여 24시간 배양 후, 복분자 물추출물과 홍삼 물추출물을 처리하였다. 24시간 후 세포배양액을 centrifugal filter units (Vivaspin 4, Sartorius stedium, Göttingen, Germany)를 사용하여 농축시켰다. 콜레스테롤의 총 양은 콜레스테롤 정량 키트(Cholesterol/cholesterol ester quantitation kit, BioVision, Mountain View, CA, USA)를 사용하여 측정하였다. 시료와 reagent를 섞어 빛을 차단 후 37°C에서 1 시간 동안 배양하여 530/590 nm ELISA reader (Bio-Tek)를 이용해 측정하였다.

HMG-CoA reductase activity assay

복분자와 홍삼 추출물의 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase activity 억제를 확인하기 위해 HMG-CoA reductase activity assay kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 사용하였다.

총 RNA의 추출

HepG2 세포와 Caco-2 세포를 6 well plate 3×10⁵ cell/mL로 분주하여 24시간 배양 후, 복분자 미숙과 물추출물과 홍삼 물추출물을 처리하여 시간에 따른 LDL 및 HDL 관련 유전자 발현 변화를 확인하였다. RNA 추출은 total RNA extraction reagent인 Tri reagent (RNAiso PLUS, TAKARA, Otsu, Japan)를 이용하였다. Tri reagent 1 mL을 세포에 넣은 후 15초 동안 vortex 하였다. 이후 15,000 rpm에서 15분 동안 원심분리한 뒤 chloroform 200 μL를 넣고 20초간 vortex하여 원심 분리한 다음 상층액을 새로운 튜브에 옮겼다. 차가운 isopropanol 동량을 넣고 상온에서 10분 동안 방치하였다. 이를 다시 15,000 rpm에서 20분간 원심 분리하여 RNA 침전물을 얻었다. RNA 침전물을 75% ethanol로 씻은 후, 침전물을 수 분간 실온에서 건조시켜 0.1% diethyl pyrocarbonate (DEPC) water에 녹였다. RNA 농도(1 OD=40 μg/mL)는 spectrophotometer (DU^R730spectrophotometer, Beckman, Fullerton, CA, USA)를 이용하여 260 nm에서 측정하였다.

실시간 역전사 종합효소 연쇄반응(real-time RT-PCR)

First strand cDNA를 50 mM Tris-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 10 mM DTT (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 1 U/μL RNasin (Invitrogen), 1 mM each dNTP, oligo(dT)₂₀ 100 ng 과 MMLV reverse transcriptase (Invitrogen) 200 U가 함유된 20 μL의 용액에서 총 RNA 2 μg으로부터 합성하였다. cDNA를 합성한 뒤, LDL 생성 관련 인자인 LDL 수용체와 전사인자인 sterol regulatory element binding protein (SREBP)-1, SREBP-2, HMG-CoA 환원효소 mRNA 발현 정도와 HDL 관련 인자인 콜레스테롤 transporter ABCA1 (ATP binding cassette transporter A1), SR-B1 (Scavenger receptor class B, type I) mRNA의 발현 정도를 확인 하였다. 실시간 PCR은 Fast Start DNA Master SYBR Green kit (Roche, Mannheim, Germany)을 이용하여 Light Cycler 2.0 (Roche)에서 증폭하였다. 실험에 사용된 primer와 PCR 조건은 Table 1, 2와 같으며 유전자의 정량분석은 Light Cycler Software 4.0 (Roche)을 이용하였다.

통계처리

모든 분석 자료는 평균±표준오차로 나타내었으며 실험결과는 SPSS 12.0K (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서 통계처리 하였고 Duncan's multiple range test로 검증하였다.

결과 및 고찰

간세포주에서 복분자와 홍삼추출물의 세포독성

간세포주인 HepG2 세포주에서 복분자와 홍삼추출물의 세포독성을 조사하였다. 복분자의 경우 미숙과와 완숙과의 물 및 25, 50, 75% 에탄올 추출물 모두 세포독성을 보이지 않았으며(Fig.

1A, 1B) 홍삼 추출물 또한 모든 추출물(물 및 20, 40, 60% 에탄올 추출물)에서 세포독성을 보이지 않았다(Fig. 1C). 복분자와 홍삼 추출물에 있어서 복분자 완숙과와 미숙과의 경우는 100 μg/mL, 홍삼 추출물의 경우는 1,000 μg/mL 농도에서 어떠한 독성도 보이지 않아 두 추출물은 세포독성이 없음을 확인하였다.

복분자와 홍삼 추출물의 콜레스테롤 합성 억제 효과

복분자와 홍삼 추출물의 콜레스테롤 합성 억제 효과를 알아보기 위하여 간세포주인 HepG2 세포를 이용하여 실험을 실시하였다(Fig. 2). 예비실험 결과 복분자 추출물을 1 μg/mL에서 100 μg/mL까지 여러 농도로 처리하였을 때 100 μg/mL에서 가장 우수한 콜레스테롤 합성 억제 효과를 나타내었으며, 홍삼 추출물을 100 μg/mL에서 800 μg/mL까지 여러 농도로 처리하였을 때 800 μg/mL에서 가장 우수한 콜레스테롤 합성 억제 효과를 나타내어 이후의 실험에서는 복분자 추출물의 경우 100 μg/mL, 홍삼 추출물의 경우 800 μg/mL 농도에서 실험을 수행하였다(data not shown). 복분자 추출물의 경우 100 μg/mL의 농도에서 미숙과와 완숙과 추출물을 비교하였을 때 완숙과에 비해 미숙과 추출물이 보다 높은 콜레스테롤 합성 억제 효과를 나타내었으며, 미숙과의 추출용매 조건에 있어서는 에탄올 추출물 보다는 물 추출물이 보다 높은 억제 효과를 보였다(Fig. 2A). 홍삼 추출물은 800 μg/mL 농도를 처리하였을 때 유의한 콜레스테롤 합성 억제 효과를 보였으며 추출용매별로는 물 추출물이 가장 높은 콜레스테롤 합성 억제 효과를 나타내었다(Fig. 2A). 그리고 복분자와 홍삼 물추출물 혼합액을 처리하였을 경우에는 복분자와 홍삼 추출물을 단독으로 처리하였을 때보다 상승효과(synergistic effect)를 나타내었다(Fig. 2B). 따라서 콜레스테롤 합성 억제 효과를 보기 위해 이후 진행된 모든 실험은 복분자 미숙과와 홍삼 물추출물을 선택하여 사용하였다.

Table 1. PCR primers for real-time PCR

Gene	S&AS	Nucleotide sequences	Length of PCR products
LDL receptor	S	GAGTACACCAGCCTCATCC	159 bp
	AS	GCTGATGACGGTGTTCATAG	
SREBP-1	S	CTCAGATACCACCAGCG	163 bp
	AS	CTCACCGTAGACAAAGAGAAG	
SREBP-2	S	TAGACCGCTCACGGATT	182 bp
	AS	AGGCATCATCCAGTCAAAC	
ABCA1	S	AATGTCAAGGTGTGGTTCATA	162 bp
	AS	CTGCTGCTTGGTGTGAGAT	
SR-B1	S	AGCTCAACAACCTCCGAC	200 bp
	AS	GCTGTAGAACTCCAGCGA	
β-Actin	S	CACTGTGCCCATCTACG	157 bp
	AS	CTTAATGTTCACGCACGATTTC	

Table 2. Real-time PCR conditions

Gene	Cycles	Hot start	Denaturation	Annealing	Extension	Melting
LDL receptor	50°C	95°C 10 min	95°C 15 s	60°C 10 s	72°C 10 s	60°C 60 s
SREBP-1						
SREBP-2						
ABCA1						
SR-B1						
β-Actin						

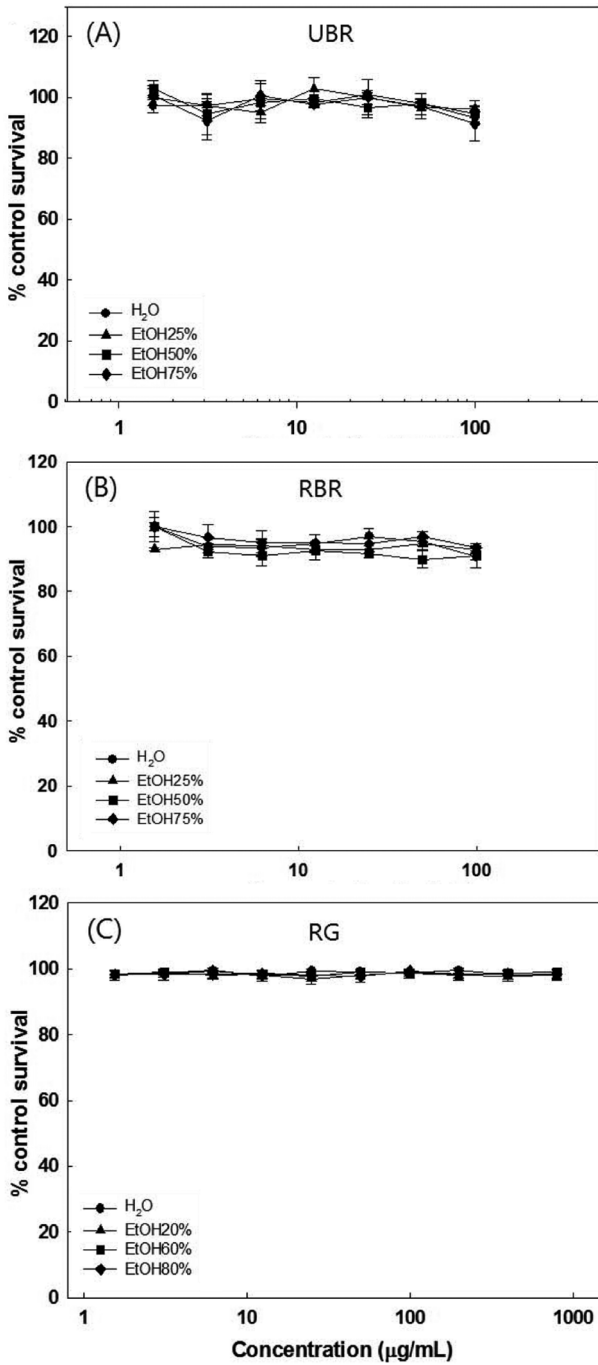


Fig. 1. Cytotoxicity effect of extracts of unripe black raspberry (A), ripe black raspberry (B), and red ginseng (C) in human liver cancer cell line, HepG2. UBR: unripe black raspberry, RBR: ripe black raspberry, RG: red ginseng.

Kim 등은 LPS에 의해 산화적 스트레스를 유도한 쥐에 복분자 미숙과를 투여할 경우 대조군에 비해 총 지질은 59.2%, 중성지방은 56.4%, LDL은 57.4%가 감소하고 HDL은 81.6%가 증대되는 연구결과를 얻었다(15). 홍삼의 혈중 지질 억제 효과 또한 많은 연구자들에 의해 연구되고 있다. 홍삼의 생리활성 물질인 ginsenosides를 고지방 식이 동물에 처리하였을 때 콜레스테롤과 중성지방 수치가 감소되고(16), 비만 환자들이 홍삼을 장기간 섭취하였을 때 혈중 콜레스테롤의 수치가 감소하여 동맥경화가 억

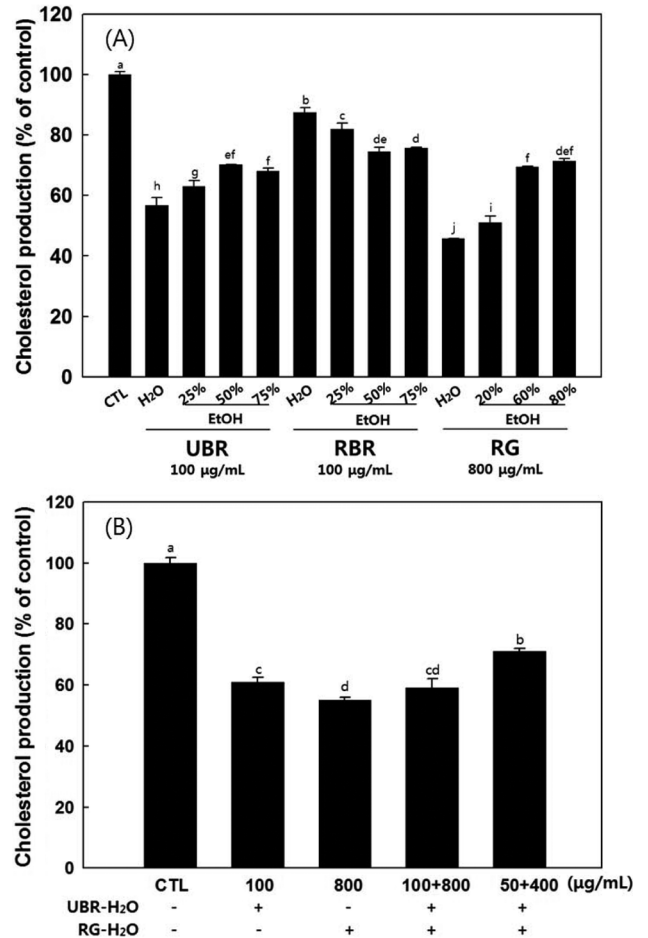


Fig. 2. Effects of cholesterol synthesis inhibition by extracts of black raspberry (unripe and ripe) and red ginseng in HepG2 cells. Values are expressed as mean±SE. Different superscripts in the same column indicate significant differences between groups at $p < 0.05$ by Duncan's multiple comparison test. UBR-H₂O: unripe black raspberry water extract, RG-H₂O: red ginseng water extract.

제됨이 알려졌다(17). 하지만 복분자와 홍삼의 혈중 지질에 미치는 영향에 대한 분자기전은 아직까지 연구되지 않고 있는 실정이다.

복분자와 홍삼 추출물 및 폴리페놀류와 Ginsenoside류의 HMG-CoA 환원효소 활성 억제 효과

복분자 미숙과와 홍삼 물 추출물에서 콜레스테롤 생성효소인 HMG-CoA 환원효소 활성억제효과를 조사하였다. HMG-CoA 환원효소 활성 억제 효과를 보기 위해 비교 대조군으로서 pravastatin 50 nM을 사용하였다.

100 µg/mL 복분자 미숙과 추출물과 800 µg/mL의 홍삼 추출물에서 pravastatin과 비슷한 HMG-CoA 환원효소 활성 억제 효과를 나타내었으며(Fig. 3A), 복분자 미숙과와 홍삼 물추출물 병행 투여시 HMG-CoA 환원효소 활성 억제 효과를 확인한 결과, 복분자 미숙과 및 홍삼 물추출물을 각각 100, 800 µg/mL의 농도로 단독으로 처리하였을 때와 각 추출물을 절반농도로 혼합한 혼합액이 서로 비슷한 억제효과를 보이는 걸로 보아 복분자 미숙과와 홍삼 물추출물은 HMG-CoA 환원효소 활성 억제에 대해 상승효과를 나타냄을 확인하였다(Fig. 3A). 또한, 복분자와 홍삼의 주성분인 폴리페놀류와 ginsenoside를 이용하여 HMG-CoA 환원효소

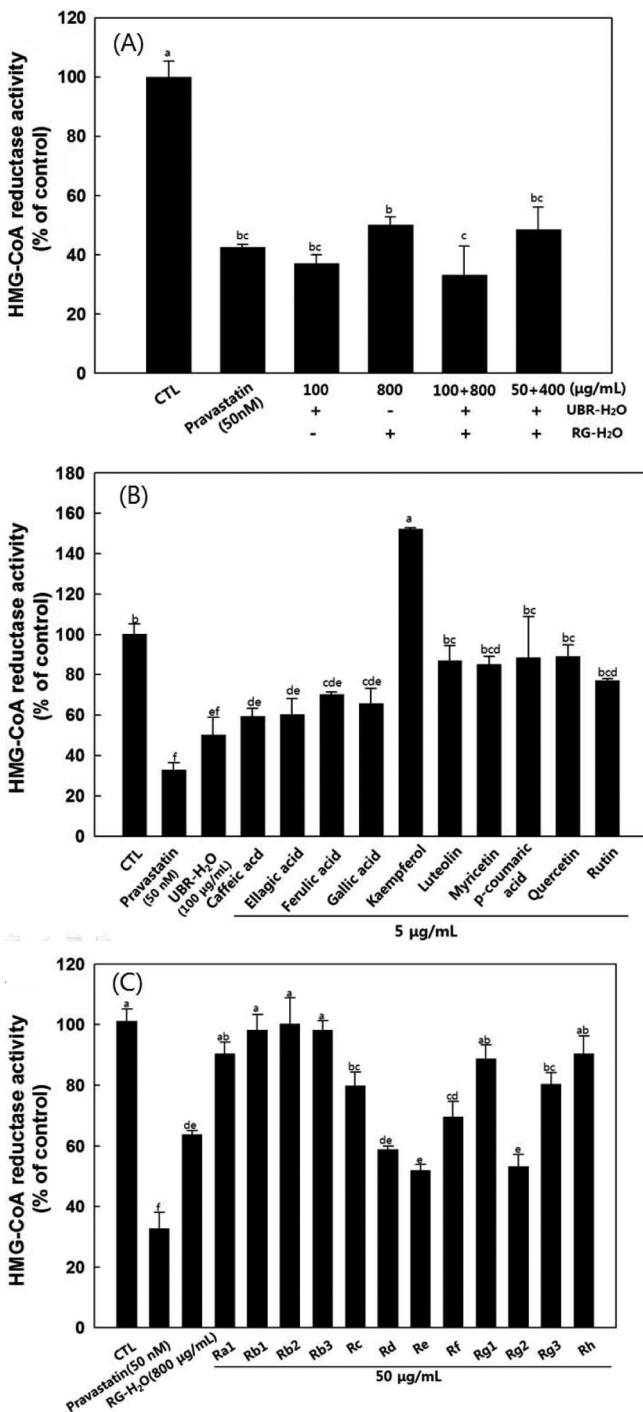


Fig. 3. Effects of water extracts of unripe black raspberry and red ginseng (A), polyphenolic compounds (B), and ginsenosides (C) on HMG-CoA reductase inhibition in HepG2 cells. Values are expressed as mean±SE. Different superscripts in the same column indicate significant differences between groups at $p < 0.05$ by Duncan's multiple comparison test.

활성 억제 효과를 조사하였다. 10가지의 폴리페놀류와 12가지의 ginsenoside를 50 µg/mL 농도로 처리하여 활성억제효과를 본 결과 폴리페놀류에서는 caffeic acid, ellagic acid, ferulic acid 및 gallic acid에서 복분자 미숙과 추출물과 유사한 HMG-CoA 환원효소 활성 억제 효과를 보임을 확인하였다(Fig. 3B). 또한, 12가

지 종류의 ginsenoside에 의한 활성 억제 효과를 확인한 결과 ginsenoside-Rd, -Re, -Rf 및 -Rg2에서 가장 높은 HMG-CoA 환원효소 활성 억제 효과가 있음을 확인할 수 있었다(Fig. 3C).

복분자의 구성성분으로는 유리당, 유기산, 비타민C, 무기질 등이 있으며 특히 생리활성물질의 일종인 폴리페놀과 플라본(flavone)이 풍부하게 함유되어 있다. 기존의 복분자 열매의 숙성 정도에 따른 생리활성 및 특성 연구에 따르면 복분자의 총 폴리페놀 함량은 완숙과에 비해 미숙과가 2배 이상 높게 나타났으며, 총 플라보노이드 함량 또한 미숙과가 완숙과 보다 높다고 보고되었다(18,19). 반면 홍삼은 아미노산, 저분자 단백질, 탄수화물, 무기질 등으로 구성되어 있으며 사포닌 계열의 ginsenoside가 주요 생리활성물질이다.

실제로 폴리페놀의 일종인 ellagic acid는 산화 LDL의 흡수를 억제하고 콜레스테롤 유출을 촉진하여 동맥경화를 예방하는 효과가 알려져 있으며, 이와 관련된 유전자의 발현에 영향을 미친다고 보고 되었다(20). 포도씨 내의 gallic acid는 췌장 콜레스테롤 에스터라제의 활성억제, 담즙분비 촉진, 콜레스테롤의 용해도 향상을 통해 혈중 콜레스테롤을 억제한다고 보고 되었다(21). 또한 홍삼의 ginsenoside 중에서도 -Rb2, -Rd, -Rg3 등이 혈중 콜레스테롤의 함량을 낮춰 고지혈증과 동맥경화를 예방하는 효과가 있음이 알려졌다(22,23). 따라서 복분자 미숙과와 홍삼 물추출물의 콜레스테롤 합성 저하 효과는 복분자와 홍삼에 포함된 폴리페놀류와 ginsenoside들에 의한 것으로 생각된다.

복분자와 홍삼 추출물의 LDL 및 HDL 유전자에 미치는 영향

위장관은 지질과 콜레스테롤 대사에 있어서 중요한 역할을 담당하며 특히 소화관을 통한 콜레스테롤의 흡수와 담즙액에 의한 콜레스테롤 분비의 균형을 통하여 콜레스테롤 항상성을 유지한다. 위장관세포주인 Caco-2 세포에서 복분자 미숙과와 홍삼 물추출물과 추출물 혼합액이 LDL 및 HDL 관련 유전자에 미치는 영향을 알아보기 위하여 각각의 추출물을 배지 내에 첨가한 뒤 48 시간 동안 배양하였다. 이렇게 배양한 세포로부터 total RNA를 분리한 후 역전사 효소를 이용하여 cDNA를 합성하고 이렇게 합성된 cDNA를 이용하여 real-time PCR을 통해 다양한 LDL 및 HDL 관련 유전자의 발현을 조사하였다(Fig. 4).

세포 내에서 콜레스테롤의 생합성은 acetyl CoA로부터 시작되어 HMG-CoA, mevalonic acid 등의 과정을 거쳐 이루어지는데, 혈중 콜레스테롤이 증가하면 LDL 수용체 유전자 발현을 조절하는 SREBPs의 발현이 증가한다. 증가된 SREBPs 유전자는 LDL 수용체의 발현을 증가시켜 세포내로의 콜레스테롤 흡수를 촉진하여 혈중 콜레스테롤 농도를 낮춘다. 또한 세포에서는 여분의 콜레스테롤을 분비하기도 하는데 이는 HDL 콜레스테롤에 의해 uptake되어 간에서 처리되어 체외로 배출된다(24).

SREBPs는 LDL 수용체 외에도 지방 합성효소, HMG-CoA 합성효소, HMG-CoA 환원효소의 발현을 조절한다(25). SREBPs 유전자는 SREBP-1과 SREBP-2로 나뉘어지는데 SREBP-1은 중성지방과 인지질의 생합성에 관련된 유전자의 조절에 관여하며 SREBP-2는 콜레스테롤의 생합성과 대사에 관련된 유전자를 조절한다(26,27).

그리고 콜레스테롤 유출(cholesterol efflux)에 관여하는 transporter인 ABCA1 유전자의 발현 또한 콜레스테롤 대사에 있어 매우 중요하다. ABCA1은 콜레스테롤을 세포외로 분비시켜 분비된 콜레스테롤이 간에서 담즙산으로 바뀌어 체외로 배출하는 역할을 담당한다(28). 뿐만 아니라 안토시아닌을 처리한 대식세포에서 ABCA1의 발현이 증가하면 HDL의 농도가 올라가는데 이는 안

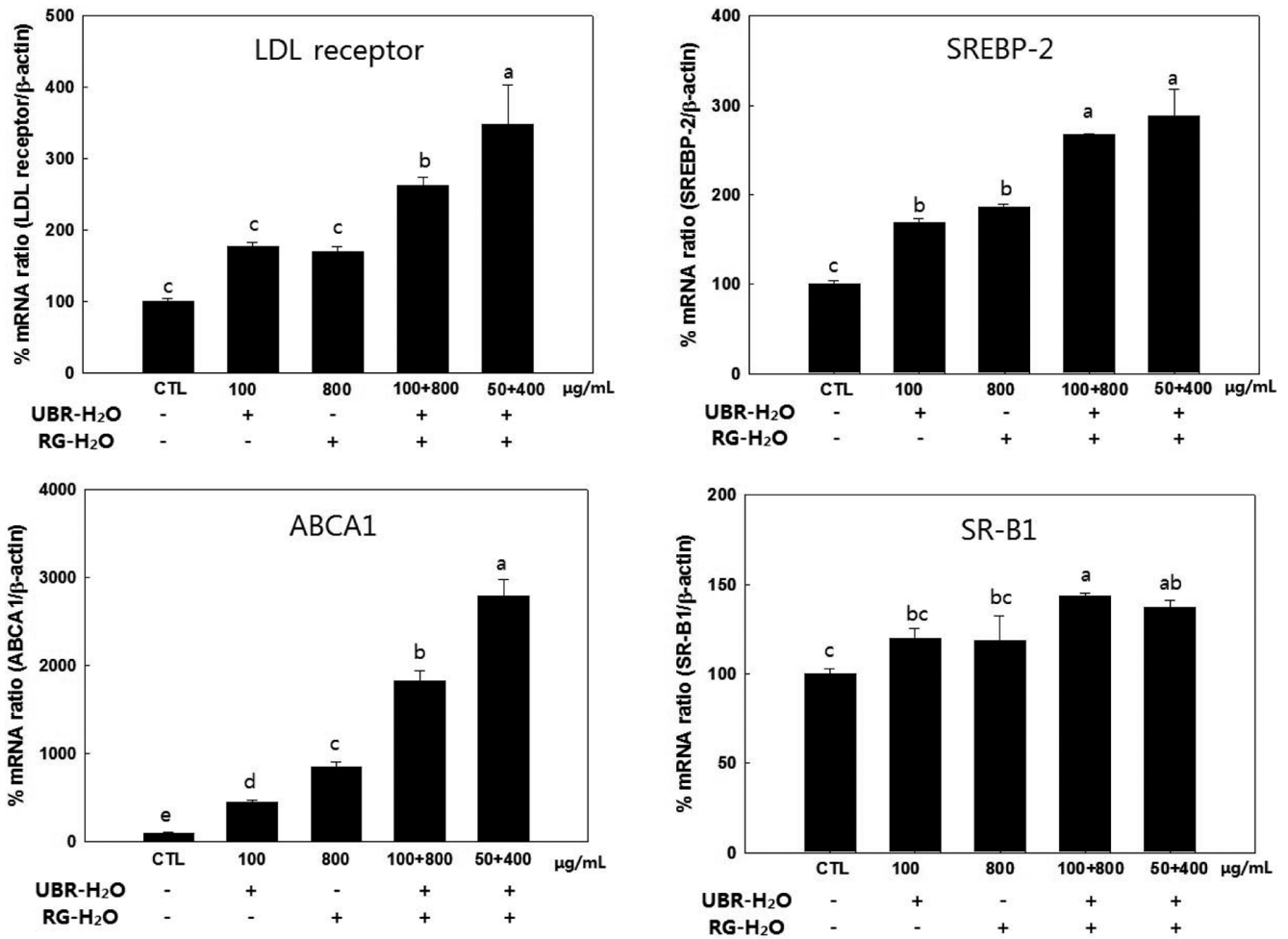


Fig. 4. Effect of UBR and RG water extracts on expression of LDL receptor, SREBP-2, ABCA1, and SR-B1 mRNA in human intestinal cell line, Caco-2. Values are expressed as mean±SE. Different superscripts in the same column indicate significant differences between groups at $p < 0.05$ by Duncan's multiple comparison test.

토시아닌에 의해 liver X receptor (LXR)과 ABCA1의 발현이 증가되어 일어나는 현상이 보고되었다(29). 따라서 본 연구에서도 복분자 미숙과와 홍삼 물추출물에 의해 ABCA1 유전자의 발현이 높아지는 걸로 보아 혈중 HDL 농도를 올리는데 중요한 역할을 하리라고 생각된다.

또한, HDL 대사에 있어 매우 중요한 유전자로는 SR-B1이 있다. SR-B1은 체내 콜레스테롤 대사에 있어서 매우 중요한 역할을 담당하는 수용체로서 HDL의 선택적 흡수에 관여하며 간과 지방대사 조직에 가장 많이 분포한다(30). 기존의 연구자들에 의해 SR-B1 유전자는 체내의 콜레스테롤을 간을 통해 체외로 배출하는 역할을 담당하며 이러한 기능을 통해 뇌심혈관계 질환의 원인이 되는 동맥경화에 대응하는 기작을 가지는 걸로 알려졌다(31).

Yasuda 등의 연구(32)에 의하면 카카오의 폴리페놀을 하루 282 mg씩 12주 동안 복용하게 되면 혈중 LDL의 농도는 낮아지고 HDL의 농도는 높아지는 연구결과를 얻었는데 이는 세포내 LDL 수용체의 발현을 증가시키고 LDL 수용체의 발현에 영향을 미치는 SREBPs 유전자의 발현을 높이는 기작에 의한 것임을 HepG2 세포를 이용한 실험으로 증명하였다. 이 뿐만 아니라 카카오의 폴리페놀은 HepG2 세포에서 SR-B1과 ABCA1 mRNA의 발현을 증가시키는데 이는 기존에 연구된 플라본(flavone) 계열의 화합물들이 보이는 기작과 동일함을 증명하였다. 이외에도 폴리

페놀을 함유한 적포도주나 이소플라본을 함유하는 콩 추출물을 HepG2 세포에 처리하였을 때 LDL 수용체나 SREBPs 유전자의 발현을 증가시켜 혈중 콜레스테롤의 농도를 낮추는 효과가 있음이 세포실험을 통해 증명되기도 하였다(33,34).

위장관세포주인 Caco-2 세포에서 복분자 미숙과와 홍삼 물추출물과 추출물 혼합액이 LDL 및 HDL 관련 유전자에 미치는 영향을 알아보기 위한 실험에서는 복분자 미숙과와 홍삼 물추출물 혼합액을 각각 단독으로 처리하였을 때 보다 추출액 혼합액으로 처리하였을 경우 훨씬 높은 유전자 발현을 보임을 알 수 있었다. 특히 LDL 수용체와 SREBP-2, ABCA1 유전자의 경우 각 추출물의 단독 처리시 보다 추출물 혼합액에서 월등히 높은 유전자 발현을 보였으며 복분자 미숙과 추출물과 홍삼 추출물을 단독 처리농도 기준으로 1:1로 혼합한 실험군보다 각 추출물의 농도를 절반으로 줄인 0.5:0.5로 섞은 실험군에서 훨씬 높은 유전자 발현의 증가를 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 복분자와 홍삼을 소량 사용하여도 그 효과는 극대화를 유도할 수 있어 향후 인체에 대한 부작용을 최소화하고 치료 효과를 높일 수 있는 후보 소재로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

반면 중성 지방과 인지질 대사에 관여하는 유전자인 SREBP-1의 경우 추출물 처리에 있어서 큰 영향을 받지 않음을 확인할 수 있었으며(data not shown), SR-B1 유전자는 복분자 미숙과와

홍삼 물추출물을 단독으로 처리하였을 때에는 그 유전자의 발현에 큰 변화가 없었지만 추출물 혼합액을 처리하였을 경우 유전자의 발현이 다소 증가하는 양상을 나타내었다.

이상의 결과들을 볼 때, 복분자와 홍삼의 추출물 혼합액을 첨가한 배지로 배양한 간세포에서 콜레스테롤 합성이 감소하였음을 확인할 수 있었는데 이는 대조군 또는 복분자 추출물과 홍삼 추출물을 단독으로 사용한 실험군들에 비해 LDL 수용체 mRNA와 이를 조절하는 SREBP-2 mRNA의 발현이 증대되어 나타난 결과임을 확인할 수 있었다. 그뿐만 아니라 복분자와 홍삼 추출물 혼합액은 HDL 합성에 관계되는 유전자인 ABCA1과 SR-B1의 mRNA의 발현을 증대시켜 증가한 HDL 단백질에 의해 콜레스테롤 저하 효과를 나타냄을 증명하였다. 전라북도 고창과 진안의 지역특화작물인 복분자와 홍삼은 오랫동안의 경험을 통해 장기복용에 대한 부작용이 없고 안전성이 확보된 장점이 있다. 이에 본 연구는 천연물을 이용한 고지혈증의 예방 및 치료에 복분자와 홍삼 물추출물을 사용할 수 있다는 분자생물학적 근거를 제시하였다고 생각된다.

요 약

본 연구는 복분자 미숙과와 홍삼 물 추출물을 이용하여 인간 간암세포주(HepG2)와 위장관세포주(Caco-2)를 이용하여 콜레스테롤 억제효과 및 그와 연관된 HMG-CoA reductase 활성 억제효과 및 LDL 및 HDL과 관련된 분자기전을 조사하였다. 그 결과 복분자 미숙과와 홍삼 추출물은 모두 콜레스테롤 합성 억제 효과를 보였을 뿐만 아니라 HMG-CoA reductase 활성 억제효과를 보였다. 또한 두 추출물은 단독 투여시 보다 복합 투여시 부가효과를 보였다.

그리고 LDL receptor와 이를 조절하는 SREBP-2를 증가시키고 콜레스테롤 transport 인 ABCA1의 발현을 증가시켜 LDL를 낮추고 HDL를 높이는 효과가 있을 것으로 판단된다. 특히 두 추출물의 복합 투여시 훨씬 높은 시너지 효과를 나타냄을 확인하였다. 이러한 결과는 전통적으로 오랜 기간 사용되어온 천연물인 복분자와 홍삼이 콜레스테롤 예방에 효과적임을 입증한 결과로 관련 대사증후군의 예방에 기여할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 산업통산자원부의 지역특화기술융·복합연구지원사업의 2012년도 연구비 지원으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

References

- Lim S, Shin H, Song JH, Kwak SH, Kang SM, Won Yoon J, Choi SH, Cho SI, Park KS, Lee HK, Jang HC, Koh KK. Increasing prevalence of metabolic syndrome in Korea: the Korean National Health and Nutrition Examination Survey for 1998-2007. *Diabetes Care* 34: 1323-1328 (2011)
- Zimmet P, Alberti G, Shaw J. A new IDF worldwide definition of the metabolic syndrome: the rationale and the results. *Diabetes Voice* 50: 31-33 (2005)
- Gupta AK, Dahlof B, Sever PS, Poulter NR. Metabolic syndrome, independent of its components, is a risk factor for stroke and death but not for coronary heart disease among hypertensive patients in the ASCOTBPLA. *Diabetes Care* 33: 1647-1651 (2010)
- Korea National Statistics Office. Death statistics in 2011. Korea National Statistical Office, Daejeon, Korea (2011)
- Moon SJ. Nutritional problems of Korean. *J. Nutr. Health* 29: 371-380 (1996)
- Yotsumoto H, Yanagita T, Yamamoto K, Ogawa Y, Cha JY, Mori Y. Inhibitory effect of Oren-Gedoku-to and its components on cholesteryl ester synthesis in cultured human hepatocyte HepG2 cells. Evidence from the cultured HepG2 cells and *in vitro* assay of ACAT. *Planta Med.* 63: 141-145 (1997)
- Kim BK, Shin GG, Jeon BS, Cha JY. Cholesterol-lowering effect of mushrooms powder in hyperlipidemic rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 30: 510-515 (2001)
- Yang HM, Oh SM, Lim SS, Shin HK, Oh YS, Kim JK. Anti-inflammatory activities of *Rubus coreanus* depend on the degree of fruit ripening. *Phytother. Res.* 22: 102-107 (2008)
- Shibata S, Tanaka O, Ando T, Sado M, Tsushima S, Ohsawa T. Chemical studies on oriental plants drugs: Protopanaxadiol, a genuine saponin of ginseng saponin. *Chem. Pharm. Bull.* 14: 595-600 (1966)
- Lee SH, Park JH, Cho NS, Yu HJ, You SK, Cho CW, Kim DC, Kim YH, Kim KH. Sensory evaluation and bioavailability of red ginseng extract (Rg1, Rb1) by complexation with -cyclodextrin. *Korean J. Food Sci. Technol.* 41: 106-110 (2009)
- Joo CN, Koo JH. Biochemical study of some pharmacological effects of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Korean Biochem. J.* 13: 63-80 (1980)
- Yoon SH, Joo CN. Study on the preventive effect of ginsenosides against hypercholesterolemia and its mechanism. *Korean J. Ginseng Sci.* 17: 1-12 (1993)
- Kang BH, Koo JH, Joo CN. Effect of saponin fraction of *Panax ginseng* C. A. Meyer on blood serum lipoprotein distribution of cholesterol fed rabbits. *Korean J. Ginseng Sci.* 10: 114-121 (1986)
- Xiu RJ. Microcirculation and traditional Chinese medicine. *JAMA-J. Am. Med. Assoc.* 260: 1755-1757 (1988)
- Kim ID, Kang KS, Kwon RH, Yang JO, Lee JS, Ha BJ. The effect of *Rubus coreanus* Miquel against lipopolysaccharide-induced oxidative stress and lipid metabolism. *J. Fd. Hyg. Safety* 22: 213-217 (2007)
- Sung JH, So NW, Jeon BH, Chang CC. Effect of white and red *Panax ginseng* extract on serum lipids level in high-fat-diet fed rats. *J. Ginseng Res.* 28: 33-38 (2004)
- Park HJ, Lee JH, Ham HS, Cho HJ, Lim CR, Yoo YB, Park KH. Effects of intaking of red ginseng products on correlation between obesity and blood lipids. *Korean J. Biomed. Lab. Sci.* 6: 253-260 (2000)
- Kwon JW, Lee HK, Park HJ, Kwon TO, Choi HR, Song JY. Screening of biological activities to different ethanol extracts of *Rubus coreanus* Miq. *Korean J. Medicinal Crop Sci.* 19: 325-333 (2011)
- Kim JM, Shin MS. Characteristics of *Rubus coreanus* Miq. fruits at different ripening stages. *Korean J. Food Sci. Technol.* 43: 341-347 (2011)
- Park SH, Kim JL, Lee ES, Han SY, Gong JH, Kang MK, Kang YH. Dietary ellagic acid attenuates oxidized LDL uptake and stimulates cholesterol efflux in murine macrophages. *J. Nutr.* 141: 1931-1937 (2011)
- Ngamukote S, Mäkynen K, Thilawech T, Adisakwattana S. Cholesterol-lowering activity of the major polyphenols in grape seed. *Molecules* 16: 5054-5061 (2011)
- Kim EJ, Lee HI, Chung KY, Noh YH, Ro YT, Koo JH. The Ginsenoside-Rb2 lowers cholesterol and triacylglycerol levels in 3T3-L1 adipocytes cultured under high cholesterol or fatty acids conditions. *BMB Rep.* 42: 194-199 (2009)
- Lee S, Lee MS, Kim CT, Kim IH, Kim Y. Ginsenoside Rg3 reduces lipid accumulation with AMP-activated protein kinase (AMPK) activation in HepG2 cells. *Int. J. Mol. Sci.* 13: 5729-5739 (2012)
- Brown MS, Goldstein JL. The SREBP pathway: Regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* 89: 331-340 (1997)
- Magaña MM, Koo SH, Towle HC, Osborne TF. Different sterol regulatory element-binding protein-1 isoforms utilize distinct co-regulatory factors to activate the promoter for fatty acid synthase. *J. Biol. Chem.* 275: 4726-4733 (2000)

26. Yokoyama C, Wang X, Briggs MR, Admon A, Wu J, Hua X, Goldstein JL, Brown MS. SREBP-1, a basic-helix-loop-helix-leucine zipper protein that controls transcription of the low density lipoprotein receptor gene. *Cell* 75: 187-197 (1993)
27. Horton JD, Shimomura I, Brown MS, Hammer RE, Goldstein JL, Shimano H. Activation of cholesterol synthesis in preference to fatty acid synthesis in liver and adipose tissue of transgenic mice overproducing sterol regulatory element-binding protein-2. *J. Clin. Invest.* 101: 2331-2339 (1998)
28. Tsujita M, Wu CA, Abe-Dohmae S, Usui S, Okazaki M, Yokoyama S. On the hepatic mechanism of HDL assembly by the ABCA1/apoA-I pathway. *J. Lipid Res.* 46: 154-162 (2005)
29. Xia M, Hou M, Zhu H, Ma J, Tang Z, Wang Q, Li Y, Chi D, Yu X, Zhao T, Han P, Xia X, Ling W. Anthocyanins induce cholesterol efflux from mouse peritoneal macrophages: the role of the peroxisome proliferator-activated receptor γ -liver X receptor α -ABCA1 pathway. *J. Biol. Chem.* 280: 36792-36801 (2005)
30. Brundert M, Heeren J, Bahar-Bayansar M, Ewert A, Moore KJ, Rinninger F. Selective uptake of HDL cholesteryl esters and cholesterol efflux from mouse peritoneal macrophages independent of SR-BI. *J. Lipid Res.* 47: 2408-2421 (2006)
31. Krause BR, Auerbach BJ. Reverse cholesterol transport and future pharmacological approaches to the treatment of atherosclerosis. *Curr. Opin. Investig. D.* 2: 375-381 (2001)
32. Yasuda A, Natsume M, Osakabe N, Kawahata K, Koga J. Cacao polyphenols influence the regulation of apolipoprotein in HepG2 and Caco2 cells. *J. Agr. Food Chem.* 59: 1470-1476 (2011)
33. Mullen E, Brown RM, Osborne TF, Shay NF. Soy isoflavones affect sterol regulatory element binding proteins (SREBPs) and SREBP-regulated genes in HepG2 cells. *J. Nutr.* 134: 2942-2947 (2004)
34. Pal S, Ho N, Santos C, Dubois P, Mamo J, Croft K, Allister E. Red wine polyphenolics increase LDL receptor expression and activity and suppress the secretion of ApoB100 from human HepG2 cells. *J. Nutr.* 133: 700-706 (2003)