

오디 추출물(*Morus alba* L.)의 혈행개선 효과

박연실¹ · 강성선¹ · 최형자¹ · 양성준¹ · 손호형² · 서형호² · 정종문^{2*}

¹부안군농업기술센터

²(주)벤스랩

Effect of Mulberry (*Morus alba* L.) Extract on Blood Flow Improvement

Youn-Sil Park¹, Seong-Sun Kang¹, Hyoung-Ja Choi¹, Sung-Jun Yang¹,
Ho-Hyeong Shon², Hyeong-Ho Seo², and Jong-Moon Jeong^{2*}

¹Agricultural Development & Technology Center of Buan-gun, Jeonbuk 579-833, Korea

²Research Center of Ben's Lab Co., Ltd., Gyeonggi 445-743, Korea

ABSTRACT The objective of this study was to investigate the beneficial effects of mulberry extract (MBE) on blood flow improvement. The SC₅₀ value for the DPPH radical scavenging activity of MBE was 89.36±5.46 µg/mL. Analysis of the cellular toxicity of MBE on RAW 264.7 and HepG2 cells showed no toxicity under a concentration of 2,500 µg/mL. We found that MBE inhibited the enzyme activity of cyclooxygenase (COX)-2 as well as oxidation of human LDL. Western blotting analysis showed that MBE inhibited protein expression of COX-2 and 5-lipoxygenase in RAW 264.7 cells. In addition, MBE inhibited protein expression of intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in human umbilical vein endothelial cells. Furthermore, MBE reduced the serum levels of total cholesterol and C-reactive protein in a concentration-dependent manner. These results both *in vitro* and *in vivo* suggest that MBE can be employed for the improvement of blood flow.

Key words: mulberry, blood flow, HMG-CoA reductase, VCAM-1, ICAM-1

서 론

오디는 상심자, 상심, 상실, 오심이라고도 불리며 뽕나무과(*Moraceae*), 뽕나무속(*Morus*)에 속하는 뽕나무(*Morus alba* L.)의 열매로서 식품공전에서 주원료(열매, 잎, 어린가지)로 식품에 사용 가능한 동식물로 분류된다. 오디는 cyanidin-3-glucoside와 cyanidin-3-rutinoside와 같은 anthocyanin 계통의 색소를 다량 가지고 있으며(1,2), citric acid, malic acid 및 succinic acid와 같은 유기산과 polyphenol 등이 다량 함유되어 있다(3-5). 현재까지 확인된 오디의 생리활성 기능들에는 항당뇨(6), 혈관신생억제효능(7), 항산화(8) 효과 등이 있다.

혈액순환장애는 혈액이나 림프액의 순환에 장애가 생기는 질병이며 원인으로서는 당뇨, 고혈압, 이상지질혈증, 고연령, 가족력, 흡연, 비만, 운동부족 및 스트레스 등이 있으며(9,10), 관련된 질환으로는 고혈압, 협심증, 심근경색증, 관상동맥경화증, 고지혈증, 뇌졸중 및 뇌출혈 등이 있다(11-14).

혈액순환장애를 유발하는 인자들 중에서 이상지질혈증은 total cholesterol, triglyceride 및 LDL-cholesterol이 정

상보다 혈중농도가 높은 경우나 HDL-cholesterol이 정상보다 혈중농도가 낮은 경우이다(15). 또한 체내 cholesterol 합성을 조절하는 효소인 HMG-CoA 환원효소(3-hydroxy-3-methyl glutaryl-coenzyme A reductase, HMGR)의 활성화(16), 혈관협착을 유발하는 세포 간 접착분자인 ICAM-1(inter cellular adhesion molecule-1) 및 VCAM-1(vascular cell adhesion molecule-1)의 생성 증가(17), 동맥경화증에서 정상보다 높게 나타나는 염증지표인자인 혈중 C-reactive protein의 농도(18), 혈전형성에 관여하는 물질인 thromboxane A₂(19), 대식세포와 같은 염증세포의 활성화로 동맥경화증의 진행 및 죽상판의 취약성에 관여하는 효소인 COX-2(cyclooxygenase-2)(20) 및 혈전의 형성과 확대에 관련된 LDL(low density lipoprotein)의 산화(21) 등이 혈액순환장애에 관련되어 있다.

따라서 본 연구에서는 오디의 HMGR 활성화억제 및 human LDL의 산화억제 효과를 예비실험에서 확인하고 오디 추출물의 직·간접적인 혈행개선 효과를 체계적으로 검증하기 위하여 *in vitro*에서 항산화 활성, human LDL의 산화억제 및 COX-2의 효소 활성 저해, 마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포와 인간 간세포주인 HepG2에 대한 세포안전성 측정, 인간제대혈관내피세포(human umbilical vein endothelial cell, HUVEC)에서의 ICAM-1과 VCAM-1의 세포내 발현억제 및 RAW 264.7 세포에서의 COX-2 및 5-LO의

Received 2 May 2013; Accepted 26 March 2014

*Corresponding author.

E-mail: jmjeong@suwon.ac.kr, Phone: +82-31-222-6514

발현억제를 연구하였다. 또한 *in vivo*에서는 고지혈증 동물 모델을 이용하여 혈중 total cholesterol의 감소 효과 및 염증지표인자인 혈청 CRP의 농도를 측정하였다. 이에 본 연구의 결과들을 고찰하여 오디추출물의 혈행개선 효과를 확인하였다.

재료 및 방법

오디추출물의 제조

오디(전라북도 부안군) 1 kg을 식품용 분쇄기로 700 rpm에서 5분간 분쇄 후 4배량(w/v)의 40% 에탄올 수용액으로 50°C에서 4시간, 총 3회 추출하였다. 추출액을 0.125 mm (80 mesh) 규격의 스테인리스 스틸 거름망을 사용하여 여과한 후 여액을 여과지(Whatman No. 2, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK)를 사용하여 여과하였다. 얻어진 여액을 60°C에서 50 Brix까지 감압 농축하고 여기서 얻어진 농축액을 동결건조 하여 오디추출분말 113.2 g을 수득하였으며 이를 MBE(mulberry fruit extract)라 명하였다.

DPPH 라디칼 소거능 실험

각 시료를 농도별로 용해한 시료용액 75 µL에 DPPH(0.2 mM in ethanol) 750 µL를 첨가하고 다시 3차 정제수 675 µL를 넣고 교반하였다. 상온에서 30분간 반응하고 96 well plate에 반응액 200 µL를 옮긴 후 ELISA reader(VERSA max, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) 기기로 520 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거활성(%)은 $(1 - \text{시료 첨가구의 흡광도} / \text{시료 무첨가구의 흡광도}) \times 100$ 의 계산식을 사용하였다. SC₅₀값은 발생한 라디칼 50%를 소거하는데 필요한 최소농도를 µg/mL 단위로 표시한 것이다.

COX-2의 활성저해

아라키돈산을 기질로 하여 프로스타글란딘(PG)을 생성하는 COX-2의 효소활성을 측정하기 위하여 COX inhibitor screening assay kit(Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)을 사용하였다. 먼저 1.5 mL 튜브에 COX-2 효소용액(30 units/mL) 10 µL, heme 용액(150 µM/mL) 10 µL, 반응 완충액(0.1 M Tris-HCl, 5 mM EDTA, 2 mM phenol, pH 8.0) 950 µL를 넣고 여기에 농도별로 희석된 시료 20 µL를 첨가한 후 37°C에서 5분간 안정화하였다. 여기에 기질인 아라키돈산 용액(10 mM)을 10 µL 넣고 37°C에서 2분간 반응시킨 후 1 M HCl 50 µL를 넣고 반응을 정지하였다. 생성된 prostaglandin H₂(PGH₂)를 prostaglandin F_{2α}(PGF_{2α})로 전환하기 위하여 SnCl₂ 용액(50 mg/mL) 100 µL를 첨가하여 교반한 후 상온에서 5분간 반응시켰다. 생성된 PGF_{2α}를 정량하기 위하여 경쟁적 효소면역반응(EIA, enzyme immunoassay)을 실시하기 위하여 상기 반응액을 EIA 완충액(0.1 M phosphate, 0.1% BSA, 0.4 M NaCl,

1 mM EDTA, 0.01% sodium azide)으로 2,000배 희석하고 이를 프로스타글란딘 항체가 코팅된 96 well plate에 50 µL씩 분주 후 PGs screening AChE tracer를 50 µL와 antiserum을 50 µL씩 첨가한 후 18시간 동안 4°C에서 반응시켰다. 반응을 완료하고 완충액으로 5회 세척한 후 Ellman's reagent를 200 µL씩 넣고 60분간 발색한 후 ELISA reader(Molecular Devices) 기기를 이용하여 410 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. COX-2 활성억제의 정도는 제조사의 방법을 준용하여 50% 억제하는 농도인 IC₅₀(µg/mL)값으로 나타내었다. 실험 결과는 3회 반복하여 평균±표준편차로 나타내었다.

Human LDL 산화억제

Human LDL의 산화억제 실험은 thiobarbituric acid reacting substance(TBARS) 방법을 사용하였다. 즉 10 mM PBS buffer(pH 7.4) 10 mL에 human LDL(≥ 5 mg/mL, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 희석한 후 320 µL를 취하여 각 시험관에 분주하고 여기에 0.1 mM CuSO₄ 40 µL 및 농도별로 희석한 시료 40 µL를 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 20% TCA(trichloroacetic acid) 1 mL 및 0.67% TBA(2-thiobarbituric acid, in 0.05 M NaOH)를 1 mL 첨가하였다. 95°C, 45분간 water bath에서 반응시키고 얼음으로 냉각시킨 후 1,000×g에서 10분간 원심분리 하였다. 생성된 MDA(malondialdehyde)를 ELISA reader(Molecular Devices) 기기를 이용하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. LDL의 산화율은 다음과 같은 식을 사용하여 나타내었다.

$$\text{LDL 산화율(\%)} = \frac{\text{시료 처리군의 흡광도}}{\text{시료 무처리군의 흡광도}} \times 100$$

세포주 배양

마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 세포와 인간 간세포주인 HepG2는 한국세포주은행(Seoul, Korea)으로부터 분양받았으며, 세포배양을 위해 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% penicillin-streptomycin을 포함하는 DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium, Gibco-BRL, Rockville, MD, USA) 배지를 사용하였다. 또한 인간 제대정맥혈 관내피세포주인 HUVEC는 MTCC사(Seoul, Korea)에서 분양받았으며, 세포배양을 위해 10% FBS가 함유된 EGM-2(Endothelial Growth Media-2, Lonza, Walkersville, MD, USA) 배지를 사용하였다. 각 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양(MCO-17AIC, SANYO, Osaka, Japan)하였다.

세포(RAW 264.7) 독성 측정

RAW 264.7 세포와 HepG2 세포에 대한 MBE의 독성 측정은 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)법을 실시하여 측정하였다(22). RAW 264.7 세포 또는 HepG2 세포를 96 well culture plate에

분주(1×10^4 cells/well)한 다음, 37°C, 5% CO₂에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후 이전 배양에 사용된 배지를 제거하고 시료를 각 농도별로 용해한 배지를 분주하고 37°C, 5% CO₂의 배양조건에서 24시간 동안 각각 반응시켰다. 24시간 후 각 well 당 0.2% MTT용액을 20 µL씩 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 3시간 동안 반응시켰다. 반응 후 상등액을 모두 제거하고 생성된 formazan을 DMSO(dimethyl sulfoxide) 200 µL씩을 넣어 상온에서 10분간 모두 용해하고 ELISA reader(Molecular Devices) 기기를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율(%)은 다음과 같은 식을 사용하여 나타내었다.

$$\text{세포 생존율(\%)} = \frac{\text{시료 처리군의 흡광도}}{\text{시료 무처리군의 흡광도}} \times 100$$

웨스턴 블랏(Western blot)

세포접착단백질(ICAM-1, VCAM-1)의 세포내 발현억제 효과를 확인하기 위하여 HUVEC 세포에 시료 및 TNF- α (10 ng/mL)를 처리하였고 염증관련 효소(COX-2, 5-LO)의 세포내 발현억제 효과를 확인하기 위하여 RAW 264.7 cell에 시료 및 LPS(1 µg/mL)를 처리하였다. 시료의 처리농도는 세포독성실험에서 세포에 안전하며 예비실험에서 ICAM-1, VCAM-1, COX-2 및 5-LO의 발현을 억제하는 최소 농도범위를 참고하여 100 µg/g, 200 µg/g 및 400 µg/g으로 정하였다. 시료처리 24시간 후, 세포를 lysis buffer (20 mM Tris, 50 mM NaCl, 0.05 mM EDTA, 10 mM MgCl₂, 0.1% SDS, 1% Triton X100, pH 7.5)로 용해시키고 4°C에서 20분간 4,000 rpm으로 원심분리 한 후 총 단백질을 분리하고 정량하였다. 동일한 농도로 희석한 단백질을 각 well당 1 mg의 양으로 10% SDS-PAGE로 전기영동한 후 nitro-cellulose 막에 transfer한 다음, blocking 완충용액(5% skim milk, 0.5% tween in PBS)에 넣고 상온에서 1시간 교반한 후, TBS-T 완충용액(20 mM tris, 137 mM NaCl, 0.1% tween 20, pH 7.4)에 1/1,000로 희석한 anti-ICAM-1(Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA) 또는 anti-VCAM-1(Cell Signaling Technology) 또는 anti-COX-2(Cell Signaling Technology) 또는 anti-5-LO(Cell Signaling Technology) 일차 항체에 넣고 상온에서 1시간 교반한 후 4°C에서 24시간 교반하였다. TBS-T 완충용액으로 3회 세척 후 TBS-T 완충용액으로 1/2,000로 희석한 이차 항체(Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA)로 상온에서 1시간 교반한 후 화학발광키트(Enhanced Chemiluminescence kit, Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용하여 X-ray 필름에 현상하였고 총 단백질량의 동일성은 β -actin(Santa Cruz Biotechnology)의 양으로 검증하였다. 각 단백질의 발현량은 ImageJ(National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) 프로그램을 이용하여 정량하였다.

고지혈증 동물모델의 사육 및 식이

고지혈증 동물모델 제작을 위하여 실험에 사용한 동물은 260~300 g의 7주령 수컷 Sprague Dawley계 흰쥐(샘타코, 오산, 한국)를 구입한 후 체중을 기준으로 골고루 분산하여 대조군 및 실험군을 각각 6마리로 구분하고 1주 동안 고탄사료(샘타코) 및 정제수를 자유롭게 섭취시켰으며, 사육실 온도는 $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도는 $55 \pm 5\%$ 를 유지하였고 광주기와 암주기를 12시간이 되도록 빛을 조절하여 새로운 사육 환경에 적응시켰다. Table 1에 나타난 바와 같이 정상 식이 조성의 사료와 고지혈증을 유도하기 위한 고콜레스테롤 식이조성으로 조절된 사료를 제조하고 적응이 끝난 동물에게 2주간 sham군에는 정상 식이조성 사료를 공급하였고 음성대조군과 양성대조군 및 실험군에는 고콜레스테롤 식이조성 사료를 공급하였다. 2주 후 각 실험동물의 식이 섭취량 및 체중을 측정하고 Table 2에 나타난 바와 같은 시료의 섭취량이 되도록 각 시료를 고콜레스테롤 식이조성 사료에 첨가하고 다시 2주간 식이 하였다. 마지막 식이의 공급 24시간 후 실험동물의 체중을 측정하여 사료에 첨가한 시료에 따른 체중의 증가가 없었음을 확인하였고 에테르로 마취한 후 하대정맥에서 채혈하고 20분간 상온에서 방치한 후 고속 원심분리기(MF80, 쉐한일에스엠이, 안양, 한국)를 이용하여 3,000 rpm으로 15분간 원심분리를 시행하여 혈청을 얻었다.

MBE의 섭취량은 예비실험에서 탐색된 혈청 total cholesterol의 유의적인 감소가 가능한 최소 섭취량 범위를 참

Table 1. Ingredient of diet

Ingredient	Diet % (w/w)	
	Normal diet	High-cholesterol diet
Casein (from milk)	20	20
Corn starch	15	15
Sucrose	49	49
Cellulose	6	4.5
Corn oil	5	5
Mineral mixture	3.5	3.5
Vitamin mixture	1	1
Choline bitartrate	0.2	0.2
DL-Methionine	0.3	0.3
Cholesterol	0	1
Cholic acid	0	0.5
Total	100	100

Table 2. Classification of groups

Diet	Groups	Intake of sample/day (14 days)
Normal diet	Sham	—
	(-)Control	—
High-cholesterol diet	(+)Control	Lovastatin 20 mg/kg body weight
	MBE-100	MBE 100 mg/kg body weight
	MBE-200	MBE 200 mg/kg body weight
	MBE-400	MBE 400 mg/kg body weight

MBE: mulberry extract.

고하여 MBE 100, 200 및 400 mg/kg 체중으로 설정하였다.

혈청 total cholesterol 농도 측정

혈청 total cholesterol 농도는 총콜레스테롤 정량 검사용 kit(아산제약, 서울, 한국)을 이용하여 측정하였다. 즉 시험관에 혈청 또는 순차적 농도로 희석한 표준 cholesterol 용액을 20 μ L 넣고 kit에 포함된 효소시액을 3 mL 첨가한 후 교반하고 37°C에서 5분간 반응시킨 후 ELISA reader(Molecular Devices) 기기를 이용하여 500 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 혈청 total cholesterol의 농도는 표준 cholesterol의 표준곡선을 이용하여 계산하였다.

혈청 C-reactive protein 농도 측정

염증지표인 혈청 C-reactive protein의 농도는 Rat C-reactive protein ELISA kit(BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 이용하여 측정하였다. 즉 시험관에 혈청 또는 kit에 포함된 표준 CRP를 농도별로 희석한 후 100 μ L를 96 well plate에 넣고 well에 코팅되어 있는 일차 항체에 혈장 중의 항원을 결합시키고 각 well을 5번 세척하며 여기에 conjugate가 결합되어 있는 detection 항원을 일차 항체(anti-CRP antibody)에 30분간 반응시킨 후 각 well을 5번 세척하고 기질인 TMB(tetramethyl-benzidine)로 10분간 발색하고 반응을 정지시킨 후 ELISA reader(Molecular Devices) 기기를 이용해서 450 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

통계학적 분석

실험결과는 3회 반복하여 평균±표준오차(mean±SEM)로 나타냈으며, SPSS(version 21, IBM Corp., New York, NY, USA) 통계프로그램으로 Student's t-test를 이용하여 $P<0.05$ 일 때 유의한 것으로 판정하였고, one-way ANOVA를 실시한 후 $P<0.05$ 의 유의수준에서 Duncan's multiple range test에 의하여 각 실험군의 평균치 간의 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

DPPH 라디칼 소거능

DPPH는 비교적 안정한 자유라디칼로서, 항산화 물질에 의해 환원되어 탈색되므로 항산화능을 측정할 때 DPPH 라디칼 포착능 측정법이 많이 이용된다. MBE가 각 농도별로 DPPH 라디칼을 소거하는 비율은 Fig. 1에 나타내었고 DPPH 라디칼을 50% 소거하는 SC_{50} 값을 μ g/mL 단위로 Table 3에 나타내었다. MBE의 SC_{50} 값은 89.36 ± 5.46 μ g/mL이며 양성대조군으로 사용한 EGCG 및 비타민 C의 SC_{50} 값은 각각 6.24 ± 1.10 μ g/mL 및 4.51 ± 0.96 μ g/mL로 나타났다.

현재까지 혈액순환장애를 비롯한 다양한 퇴행성질환의 발병이 생체 내 에너지 대사과정에서 생성되는 활성산소와

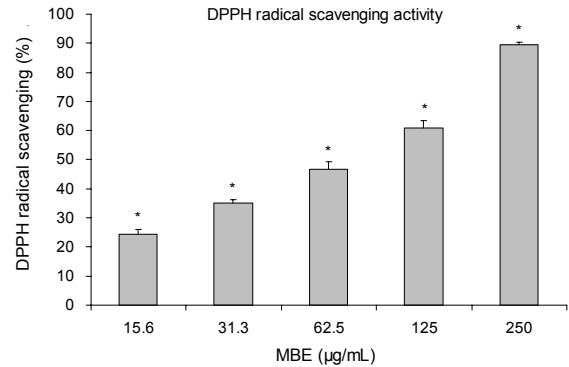


Fig. 1. DPPH assay of MBE. Data were obtained from three independent experiments and are expressed as the mean±SE. *Significantly different from the negative control at $P<0.05$.

Table 3. DPPH radical scavenging effects of MBE (unit: μ g/mL)

DPPH radical scavenging activities SC_{50} ¹⁾	
MBE	89.36 ± 5.46
EGCG ²⁾	6.24 ± 1.10
Vitamin C ³⁾	4.51 ± 0.96

Results were represented as mean±SEM of three independent experiments.

¹⁾ SC_{50} : half maximal scavenging concentration.

^{2),3)}Positive control.

밀접한 관련이 있다는 연구는 꾸준히 보고되고 있다(23). MBE의 우수한 항산화능은 LDL의 산화 및 혈전의 생성 부위에 발생하는 염증을 직·간접적으로 억제함으로써 혈액순환장애의 개선에 긍정적인 영향을 미칠 것으로 사료된다.

COX-2의 활성저해 효과

각 농도별 MBE가 COX-2 효소를 억제하는 비율은 Fig. 2에 나타내었으며, COX-2 효소를 50% 저해하는 IC_{50} 값은 Table 4와 같다. MBE의 IC_{50} 값은 215.94 ± 18.15 μ g/mL로 COX-2 저해제로 시판되는 합성의약품인 Ibuprofen과 Aspirin의 IC_{50} 값인 43.78 ± 3.43 μ g/mL 및 80.56 ± 18.15 μ g/mL인 값보다는 높지만 MBE는 정제되지 않은 복합성분임을 감안하면 상당히 우수한 효과가 있다고 사료된다. COX

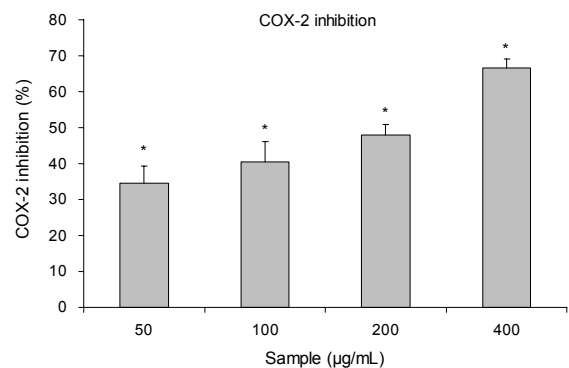


Fig. 2. COX-2 activity assay of MBE. Data were obtained from three independent experiments and are expressed as the mean±SE. *Significantly different from the negative control at $P<0.05$.

Table 4. Inhibitory effect of cyclooxygenase-2 by MEB (unit: $\mu\text{g/mL}$)

	COX-2 IC ₅₀ ¹⁾
MBE	215.94±41.37
Ibuprofen ²⁾	43.78±3.43
Aspirin ³⁾	80.56±18.15

Results were represented as mean±SEM of three independent experiments.

¹⁾IC₅₀: half maximal inhibitory concentration of cyclooxygenase-2.

^{2),3)}Positive control.

Table 5. Inhibitory effect of human LDL oxidation by MBE

Final concentration	LDL oxidation (%)
MBE 100 $\mu\text{g/mL}$	94.68±3.20
MBE 200 $\mu\text{g/mL}$	90.03±3.92*
MBE 400 $\mu\text{g/mL}$	76.48±5.55*

Results were represented as mean±SEM of three independent experiments.

*Significantly different from the positive control at $P<0.05$.

는 두 가지 종류로 구분되어 있다. COX-1은 생체 내에서 일정하게 발현되어 위장, 신장, 혈소판 및 혈관 등의 조직에서 정상적인 생리적 항상성을 유지시키는 기능을 하지만, COX-2는 염증 자극원에 의해 주로 염증성 세포에서 유도되며, 염증 및 알레르기 반응을 매개하는 프로스타글란딘류를 형성한다(24). 또한 COX-2는 죽상판의 확대에 관여한다는 연구도 보고되었다(25). MBE의 COX-2 활성저해 효과는 이러한 죽상판의 확대를 방지함으로써 혈액순환장애의 개선에 긍정적인 효과를 낼 것으로 기대된다.

Human LDL 산화억제 효과

Cu²⁺로 유도된 human LDL의 산화억제 효과를 Table 5에 나타내었다. MBE의 최종반응 농도가 100 $\mu\text{g/mL}$, 200 $\mu\text{g/mL}$ 및 400 $\mu\text{g/mL}$ 일 경우 human LDL의 산화는 각각 94.68±3.20%, 90.03±3.92% 및 76.48±5.55%로, LDL의 산화는 MBE가 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 경우 유의적으로 감소하지 않았지만, 200 $\mu\text{g/mL}$ 및 400 $\mu\text{g/mL}$ 일 경우 유의적($P<0.05$)으로 감소하였다. 산화된 LDL은 대식세포에 탐식되어 거품세포(foam cells)를 형성하여 혈관내피세포의 손상, 혈전형성 및 죽상판의 확대를 야기하는 것으로 알려져 있다(26-29). 따라서 MBE의 LDL 산화억제 효과는 혈전형성 및 동맥경화증에 있어서 죽상판 확대를 억제함으로써 혈액순환장애의 개선에 도움을 줄 것으로 예상된다.

세포독성 실험 결과

마우스 대식세포주인 RAW 264.7 세포와 인간 간세포주인 HepG2에 대한 MBE의 세포독성을 알아보기 위하여 MTT assay를 실시하였다. MBE를 농도별(5,000, 2,500, 1,250, 625, 312.5, 156.25 $\mu\text{g/mL}$)로 24시간 동안 각각 처리한 결과는 Fig. 3에 나타내었다. MBE를 5,000 $\mu\text{g/mL}$ 처리한 경우 RAW 264.7 세포의 생존율은 68.90±4.61%이

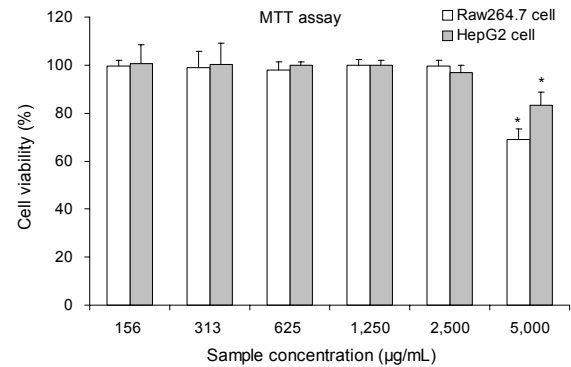


Fig. 3. Effect of MBE on the cell viability of RAW 264.7 and HepG2 cells. RAW 264.7 and HepG2 cells were treated with various concentrations (5,000, 2,500, 1,250, 625, 312.5, 156.25 $\mu\text{g/mL}$) of MBE for 24 hours. Cell viability was measured by MTT assay. Data were obtained from three independent experiments and are expressed as the mean±SE. *Significantly different from the negative control at $P<0.05$.

었으며 HepG2세포의 생존율은 83.33±5.40%로 약간의 독성을 보였으나, 2,500 $\mu\text{g/mL}$ 이하의 농도를 처리한 경우 세포독성을 보이지 않았다.

세포접착단백질(ICAM-1, VCAM-1)의 세포내 발현억제 효과

Fig. 4는 MBE가 TNF- α 에 의하여 활성화된 인간 제대정 맥내피세포에서 증가된 ICAM-1 및 VCAM-1의 발현을 유의적으로 감소($P<0.05$)시킴을 확인한 웨스턴 블랏 결과이다. 동맥경화증에서 ICAM-1 및 VCAM-1의 발현 증가와 이에 따른 세포 간 접착의 유발로 혈관협착 및 혈전형성이 가속화된다는 사실이 국내외 많은 연구에서 입증되었다(30-33). MBE는 이러한 ICAM-1 및 VCAM-1의 발현을 효과적으로 억제함으로써 혈액순환장애의 발생 및 악화를 개선할 수 있을 것으로 기대된다.

염증관련 효소(COX-2, 5-LO)의 세포내 발현억제 효과

MBE가 LPS에 의하여 활성화된 마우스 대식세포(RAW 264.7 cells)에서 증가된 COX-2 및 5-LO의 발현을 유의적으로 감소시킴($P<0.05$)을 확인한 웨스턴 블랏 결과는 Fig. 5에 나타내었다. 고지혈증이나 당뇨병 등의 원인으로 형성된 혈전은 COX-2 및 5-LO와 같은 효소 및 TNF- α , IL-1 β 그리고 IL-6와 같은 사이토카인 등의 작용에 의해 염증이 확대된다(24,25). MBE는 이러한 COX-2와 5-LO의 발현을 억제함으로써 혈전이 생성된 혈관에서 가속화되는 염증을 억제하여 혈액순환장애의 악화를 방지할 수 있을 것으로 사료된다.

혈청 total cholesterol 농도

MBE에 의해 고콜레스테롤 식이로 고지혈증을 유발한 SD계 흰쥐에서 혈청 total cholesterol의 감소 효과를 Table 6에 나타내었다. 고콜레스테롤 식이를 하고 정제수를

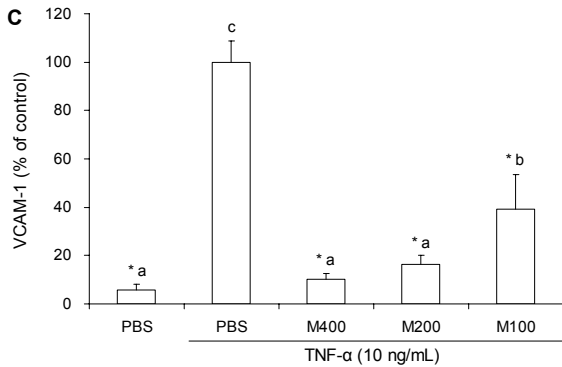
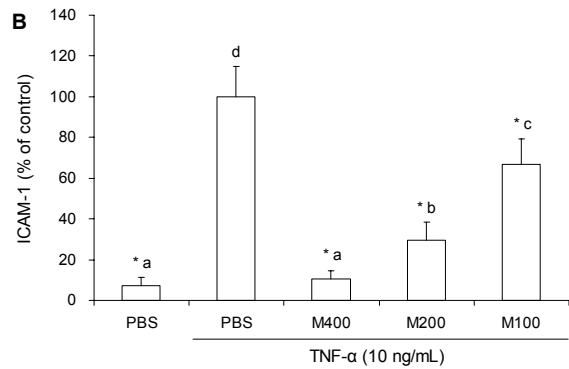
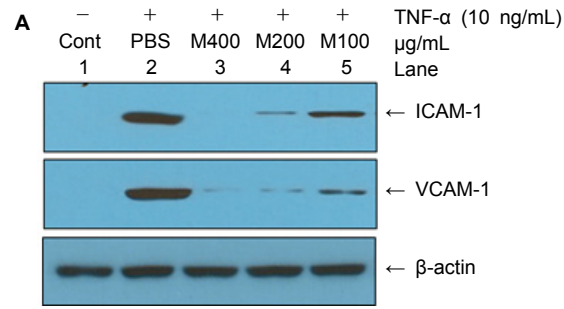


Fig. 4. Western blot analysis of ICAM-1 or VCAM-1 in HUVECs. The ICAM-1 or VCAM-1 protein expression was induced by TNF- α only (10 ng/mL, lane 2), TNF- α and MBE 400 μ g/mL (lane 3), TNF- α and MBE 200 μ g/mL (lane 4), TNF- α and MBE 100 μ g/mL (lane 5), respectively. The total protein was fractionated by 10% SDS-PAGE, and the blotted membrane was reacted with anti-ICAM-1 or VCAM-1 IgG. Anti-IgG-HRP was used as secondary antibody and immunoreactive protein was detected by chemiluminescence. Data were obtained from three independent experiments and are expressed as the mean \pm SE. *Significantly different from the TNF- α and PBS treatment group at P <0.05. ^{a-d}Different letters denote statistically significant differences at P <0.05.

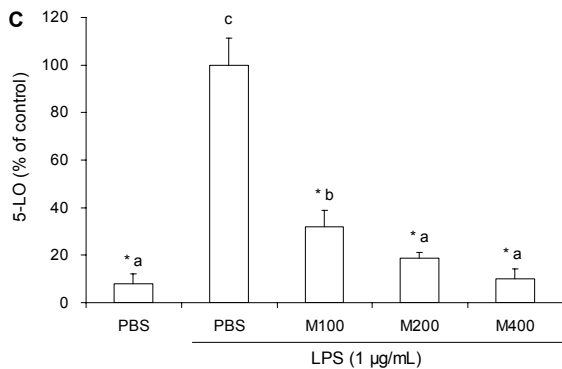
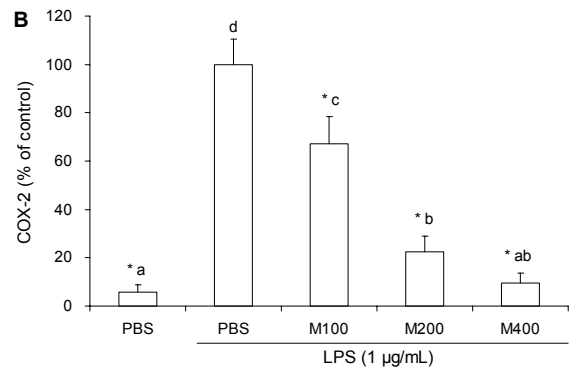
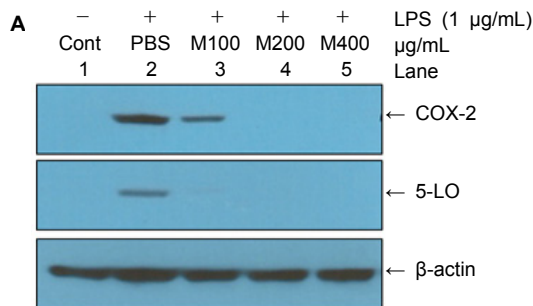


Fig. 5. Western blot analysis of COX-2 or 5-LO in RAW 264.7 cells. The COX-2 or 5-LO protein expression was induced by LPS only (1 μ g/mL, lane 2), LPS and MBE 100 μ g/mL (lane 3), LPS and MBE 200 μ g/mL (lane 4), LPS and MBE 400 μ g/mL (lane 5), respectively. The total protein was fractionated by 10% SDS-PAGE, and the blotted membrane was reacted with anti-COX-2 or 5-LO IgG. Anti-IgG-HRP was used as secondary antibody and immunoreactive protein was detected by chemiluminescence. Data were obtained from three independent experiments and are expressed as the mean \pm SE. *Significantly different from the LPS and PBS treatment group at P <0.05. ^{a-d}Different letters denote statistically significant differences at P <0.05.

식이한 음성대조군의 혈청 total cholesterol은 정상 식이한 sham군의 271.4%로 증가하였다(P <0.05). 또한 HMGR의 저해제로 사용되는 Lovastatin을 14일간 식이한 양성대조군은 sham군의 133.9%로 유의적 증가(P <0.05), 음성대조군의 49.3%로 유의적으로 감소(P <0.05)하였다. MBE를 식

이한 실험군(MBE-100, MBE-200, MBE-400)은 sham군의 각각 251.8%, 233.9% 및 205.4%로 유의적으로 증가(P <0.05)하였으며 음성대조군과 비교해서는 MBE-100군은 유의적인 감소를 하지 않았고 MBE-200 및 MBE-400군은 각각 86.2% 및 75.7%로 유의적인 감소(P <0.05)를 하는

Table 6. Reducing effect of total cholesterol by MEB (unit: $\mu\text{g/mL}$)

Diet	Groups	Total cholesterol
Normal diet	Sham	0.56±0.15*
	(-)Control	1.52±0.12
High-cholesterol diet	(+)Control	0.75±0.10*
	MBE-100	1.41±0.10
	MBE-200	1.31±0.04*
	MBE-400	1.15±0.05*

Data were obtained from animal experiments and are expressed as the mean±SE (n=5).

*Significantly different from the negative control at $P<0.05$.

것으로 나타났다. 난소를 절제하여 갱년기를 유도한 흰쥐에서 오디추출물은 혈소판 응집을 억제하며 혈중 triglyceride 및 total cholesterol의 농도를 감소시킨다고 보고되었다(34). 본 연구에서는 고지혈증 동물모델을 사용하여 오디추출물의 total cholesterol 생성억제를 확인한 결과 MBE가 양성대조군으로 사용한 합성의약품인 Lovastatin보다 혈청 total cholesterol을 효과적으로 감소시키지는 않지만, 200 mg/kg 체중 이상으로 MBE를 섭취할 경우 유의적으로 감소($P<0.05$)시킴을 알 수 있었다.

혈청 C-reactive protein 농도

MBE에 의해 고콜레스테롤 식이로 고지혈증을 유발한 SD 계 흰쥐에서 혈청 C-reactive protein의 감소 효과를 Table 7에 나타내었다. 고콜레스테롤 식이를 하고 정제수를 식이한 음성대조군의 혈청 C-reactive protein은 39.79±4.81 $\mu\text{g/mL}$ 로 sham군의 12.60±4.08 $\mu\text{g/mL}$ 에 비해 약 316% 유의적 증가($P<0.05$)를 하여 고콜레스테롤 식이로 고지혈증을 유발했음을 확인하였다. 그러나 HMGR의 저해제로 사용되는 Lovastatin을 14일간 식이한 양성대조군은 sham군에 비해 유의적 증가($P<0.05$)를 하였으나 음성대조군에 비해 통계적 유의수준 이하($P>0.05$)로 3.29% 감소하였다. 또한 MBE를 식이한 실험군은 각 농도별(100 mg, 200 mg 및 400 mg/kg B.W/day, 14days)로 각각 음성대조군에 비해 통계적 유의수준 이하($P>0.05$)로 7.62%, 11.11% 및 14.93% 감소하는 것으로 나타났다. 혈액순환장애 및 죽상동맥경화증 환자들에게서 증가하는 것으로 보고된(35-40)

Table 7. Reducing effect of C-reactive protein by MEB (unit: $\mu\text{g/mL}$)

Diet	Groups	C-reactive protein
Normal diet	Sham	12.60±4.08*
	(-)Control	39.79±4.81
High-cholesterol diet	(+)Control	38.48±2.00
	MBE-100	36.76±3.56
	MBE-200	35.37±5.81
	MBE-400	33.85±6.51

Data were obtained from animal experiments and are expressed as the mean±SE (n=5).

*Significantly different from the negative control at $P<0.05$.

염증지표인 혈청 C-reactive protein 농도가 본 연구의 고지혈증 동물모델에서 MBE의 식이에 의해 유의적으로 감소하지 않은 이유는 MBE의 식이기간이 충분하지 않았다고 판단됨으로 향후 장기간의 MBE 식이에 따른 혈청 C-reactive protein의 농도 유의적 변화를 연구할 필요가 있다고 사료된다.

요 약

본 연구에서는 다양한 생리활성물질을 다량 함유하고 있는 국내산(전라북도 부안군) 오디의 혈액순환장애의 개선 효과를 확인하기 위하여 *in vitro* 및 고지혈증 동물모델을 이용한 실험을 진행하였다. MBE가 DPPH 라디칼을 50% 소거하는 SC_{50} 값은 89.36±5.46 $\mu\text{g/mL}$ 로 정체되지 않은 복합물질임을 감안하면 다른 식물추출물에 비해 항산화능이 우수함을 알 수 있었다. RAW 264.7 세포 및 HepG2 세포에 대한 MBE의 세포독성은 2,500 $\mu\text{g/mL}$ 이하의 농도를 처리한 경우 세포독성을 나타내지 않았다. *In vitro* 실험에서 COX-2의 활성저해 효과를 측정된 결과 MBE의 IC_{50} 값은 215.94±18.15이었고, human LDL의 산화억제 효과는 최종반응 농도가 200 및 400 $\mu\text{g/mL}$ 일 경우 유의적인 감소($P<0.05$) 효과가 있었다. 또한 TNF- α 에 의하여 활성화된 HUVECs에서 MBE가 증가된 ICAM-1 및 VCAM-1의 발현을 감소($P<0.05$)시켰으며 LPS에 의하여 활성화된 RAW 264.7 세포에서 MBE가 증가된 COX-2 및 5-LO의 발현을 감소($P<0.05$)시킴을 알 수 있었다. 고지혈증 동물모델을 이용한 실험에서 MBE의 일부 실험군(200 mg 및 400 mg/kg 체중/day, 14 days)에서 혈청 total cholesterol의 수치는 음성대조군에 비해 유의적으로 감소($P<0.05$)시켰으나 혈청 C-reactive protein의 수치는 모든 실험군에서 음성대조군 대비 유의적으로 감소하지 않았다. 이러한 MBE의 항산화능, COX-2 활성억제 및 COX-2와 5-LO의 발현억제를 통한 염증억제, 혈중 total cholesterol 감소를 통한 이상지질혈증의 개선 효과 및 ICAM-1과 VCAM-1의 발현억제를 통한 혈관협착 방지의 효과들을 종합해 보면 오디추출물인 MBE가 혈액순환장애를 유발하거나 확대시키는 다양한 핵심요소들을 다각도로 개선시킴으로써 혈액순환장애의 예방과 치료에 긍정적인 효과가 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 부안군의 지원으로 수행하였으며 이에 감사를 드립니다.

REFERENCES

1. Park SW, Jung YS, Ko KC. 1997. Quantitative analysis of anthocyanins among mulberry cultivars and their pharmacological screening. *Hortic Environ Biotechnol* 38: 722-724.

2. Kim HB, Kim SL. 2003. Identification of C3G (cyanidin-3 glucoside) from mulberry fruits and quantification with different varieties. *Korean J Seric Sci* 45: 90-95.
3. Kim EO, Lee YJ, Leem HH, Seo IH, Yu MH, Kang DH, Choi SW. 2010. Comparison of nutritional and functional constituents, and physicochemical characteristics of mulberry from seven different *Morus alba* L. cultivars. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1467-1475.
4. Kim HB, Kim AJ, Kim SY. 2003. The analysis of functional materials in mulberry fruit and food product development trends. *Food Sci Ind* 36: 49-60.
5. Kim MH, Ko KC, Lim SH, Yu YS. 1980. Study on the usability of mulberry fruit. Fruit characteristics of mulberry. *Coll of Agric Bull SNU* 5: 221-223.
6. Kim TW, Kwon YB, Lee JH, Yang IS, Youm JK, Lee HS, Moon JY. 1996. A study on the antidiabetic effect of mulberry fruits. *Korean J Seric Sci* 38: 100-107.
7. Lee SH, Kim GH. 2008. Inhibitory Effect of mulberry extracts on angiogenesis in porcine artery endothelial cells. *J Life Sci* 18: 653-659.
8. Kim HY, Park JY. 2000. Oxidative stress and atherosclerosis. *J Korean Soc Endocrinol* 15: 1-14.
9. Lutgens E, van Suylen RJ, Faber BC, Gijbels MJ, Eurlings PM, Bijmens AP, Cleutjens KB, Heeneman S, Daemen MJ. 2003. Atherosclerotic plaque rupture: local or systemic process? *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 2123-2130.
10. Ross R. 1999. Atherosclerosis – an inflammatory disease. *New Engl J Med* 340: 115-126.
11. Libby P, Ridker PM, Maseri A. 2002. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* 105: 1135-1143.
12. Kockx MM, Cromheeke KM, Knaapen MW, Bosmans JM, De Meyer GR, Herman AG, Bult H. 2003. Phagocytosis and macrophage activation associated with hemorrhagic microvessels in human atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 440-446.
13. Moreno PR, Purushothaman KR, Fuster V, Echeverri D, Trusczyńska H, Sharma SK, Badimon JJ, O'Connor WN. 2004. Plaque neovascularization is increased in ruptured atherosclerotic lesions of human aorta: implications for plaque vulnerability. *Circulation* 110: 2032-2038.
14. Topper JN, Cai J, Falb D, Gimbrone MA Jr. 1996. Identification of vascular endothelial genes differentially responsive to fluid mechanical stimuli: cyclooxygenase-2, manganese superoxide dismutase, and endothelial cell nitric oxide synthase are selectively up-regulated by steady laminar shear stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 10417-10422.
15. Dichtl W, Nilsson L, Goncalves I, Ares MP, Banfi C, Calara F, Hamsten A, Eriksson P, Nilsson J. 1999. Very low-density lipoprotein activates nuclear factor- κ B in endothelial cells. *Circ Res* 84: 1085-1094.
16. Kiener PA, Davis PM, Murray JL, Youssef S, Rankin BM, Kowala M. 2001. Stimulation of inflammatory responses in vitro and in vivo by lipophilic HMG-CoA reductase inhibitors. *Int Immunopharmacol* 1: 105-118.
17. Nagel T, Resnick N, Atkinson WJ, Dewey CF Jr, Gimbrone MA Jr. 1994. Shear stress selectively upregulates intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured human vascular endothelial cells. *J Clin Invest* 94: 885-891.
18. Libby P, Simon DI. 2001. Inflammation and thrombosis: the clot thickens. *Circulation* 103: 1718-1720.
19. Racz A, Veresh Z, Lotz G, Bagi Z, Koller A. 2010. Cyclooxygenase-2 derived thromboxane A₂ and reactive oxygen species mediate flow-induced constrictions of venules in hyperhomocysteinemia. *Atherosclerosis* 208: 43-49.
20. Nodai A, Machida T, Izumi S, Hamaya Y, Kohno T, Igarashi Y, Iizuka K, Minami M, Hirafuji M. 2007. Sphingosine 1-phosphate induces cyclooxygenase-2 via Ca²⁺-dependent, but MAPK-independent mechanism in rat vascular smooth muscle cells. *Life Sci* 80: 1768-1776.
21. Stemme S, Faber B, Holm J, Witztum JL, Hansson GK. 1995. T lymphocytes from human atherosclerotic plaques recognize oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 3893-3897.
22. Sladowski D, Steer SJ, Clothier RH, Balls M. 1993. An improved MTT assay. *J Immunol Methods* 157: 203-207.
23. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90: 7915-7922.
24. Jacob S, Laury-Kleintop L, Lanza-Jacoby S. 2008. The select cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib reduced the extent of atherosclerosis in apo E^{-/-} mice. *J Surg Res* 146: 135-142.
25. Gabriel AB, Wulf H, Anne B, Roland S, Klaus AD, Hans PD, Wulf D, Jürgen M, Ralf K. 2005. Increased cyclooxygenase-2 expression in peripheral blood mononuclear cells of smokers and hyperlipidemic subjects. *Free Radic Biol Med* 38: 235-242.
26. Tsukasa N, Chifuyu U, Shiori O, Teruo I, Noriaki S, Hikaru K. 2003. Effect of low-density lipoprotein apheresis on plasma endothelin-1 levels in diabetic hemodialysis patients with arteriosclerosis obliterans. *J Diabetes Complications* 17: 349-354.
27. Fuhrman B, Judith O, Keidar S, Ben-Yaish L, Kaplan M, Aviram M. 1997. Increased uptake of LDL by oxidized macrophages is the result of an initial enhanced LDL receptor activity and of a further progressive oxidation of LDL. *Free Radic Biol Med* 23: 34-46.
28. Pérez-Jiménez F, López-Miranda J, Mata P. 2002. Protective effect of dietary monounsaturated fat on arteriosclerosis: beyond cholesterol. *Atherosclerosis* 163: 385-398.
29. Rosenblat M, Oren R, Aviram M. 2006. Lysophosphatidylcholine (LPC) attenuates macrophage-mediated oxidation of LDL. *Biochem Biophys Res Commun* 344: 1271-1277.
30. Hwang SJ, Ballantyne CM, Sharrett AR, Smith LC, Davis CE, Gotto AM Jr, Boerwinkle E. 1997. Circulating adhesion molecules VCAM-1, ICAM-1, and E-selectin in carotid atherosclerosis and incident coronary heart disease cases: the Atherosclerosis Risk In Communities (ARIC) study. *Circulation* 96: 4219-4225.
31. Li H, Cybulsky MI, Gimbrone MA Jr, Libby P. 1993. An atherogenic diet rapidly induces VCAM-1, a cytokine-regulatable mononuclear leukocyte adhesion molecule, in rabbit aortic endothelium. *Arterioscler Thromb* 13: 197-204.
32. Utsumi K, Kawabe M, Hirama A, Ueda K, Kamada Y, Arai K, Komaba Y, Katsura K, Iino Y, Katayama Y. 2007. Effects of selective LDL apheresis on plasma concentrations of ICAM-1, VCAM-1 and P-selectin in diabetic patients with arteriosclerosis obliterans and receiving maintenance hemodialysis. *Clin Chim Acta* 377: 198-200.
33. Schmidt A, Goepfert C, Feitsma K, Buddecke E. 2002. Lovastatin-stimulated superinduction of E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 in TNF-alpha activated human vascular endothelial cells. *Atherosclerosis* 164: 57-64.
34. Choi KH, Shon JH, Choi IS, Choi YJ, Bae SJ, Kim MH. 2007. The effect of mulberry fruits extracts on blood flow improvement in ovariectomized rats. *J Life Sci* 17: 575-580.
35. Koenig W, Sund M, Fröhlich M, Fischer HG, Löwel H, Döring A, Hutchinson WL, Pepys MB. 1999. C-Reactive protein, a sensitive marker of inflammation, predicts future

- risk of coronary heart disease in initially healthy middle-aged men: results from the MONICA (Monitoring Trends and Determinants in Cardiovascular Disease) Augsburg Cohort Study, 1984 to 1992. *Circulation* 99: 237-242.
36. Mendall MA, Strachan DP, Butland BK, Ballam L, Morris J, Sweetnam PM, Elwood PC. 2000. C-Reactive protein: relation to total mortality, cardiovascular mortality, and cardiovascular risk factors in men. *Eur Heart J* 21: 1584-1590.
37. Biasucci LM, Liuzzo G, Grillo RL, Caligiuri G, Rebuffi AG, Buffon A, Summaria F, Ginnetti F, Fadda G, Maseri A. 1999. Elevated levels of C-reactive protein at discharge in patients with unstable angina predict recurrent instability. *Circulation* 99: 855-860.
38. Tracy RP, Lemaitre RN, Psaty BM, Ives DG, Evans RW, Cushman M, Meilahn EN, Kuller LH. 1997. Relationship of C-reactive protein to risk of cardiovascular disease in the elderly: results from the Cardiovascular Health Study and the Rural Health Promotion Project. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 1121-1127.
39. Ridker PM, Buring JE, Shih J, Matias M, Hennekens CH. 1998. Prospective study of C-reactive protein and the risk of future cardiovascular events among apparently healthy women. *Circulation* 98: 731-733.
40. Danenberg HD, Szalai AJ, Swaminathan RV, Peng L, Chen Z, Seifert P, Fay WP, Simon DI, Edelman ER. 2003. Increased thrombosis after arterial injury in human C-reactive protein-transgenic mice. *Circulation* 108: 512-515.