

Effect of *Ledebouriella seseloides* Extracts on Lipid Parameters in Ovariectomized Rats

Myeong-Jeong Jeon and Mihyang Kim*

Department of Food and Nutrition, Silla University, Busan 617-736, Korea

Received November 11, 2015 / Revised January 25, 2016 / Accepted January 27, 2016

This study was investigated the improvement effects of *Ledebouriella seseloides* (LS) ethanol extracts on lipid parameters in an ovariectomized animal model. Sixty, nine-week old female Sprague Dawley rats were randomly assigned to four groups as follows: sham-operated rats (SHAM), ovariectomized rats (OVX-CON) and ovariectomized rats that were treated with LS ethanol extracts (50 mg/kg/day and 200 mg/kg/day, respectively). The diets were fed to the rats for six weeks after their operation. The total-cholesterol and triglyceride contents on serum increased in the OVX-CON group compared to the SHAM group, but supplementation with the LS extract caused these factors to decrease. Notably, the serum LDL-cholesterol concentration in the supplemented 200 mg/kg/day LS ethanol extract group was significantly more reduced than the OVX-CON group. In addition, the platelet aggregation ability was lower in groups treated with LS than in the OVX-CON group. The alkaline phosphatase (ALP) activity was lower in the LS extract group compared to the OVX-CON group. Collagen content, in bone and cartilage, were reduced by ovariectomy, but the supplemented LS extract groups exhibited higher concentrations in their bones. According to these results, the improvement effects of LS extract on serum lipid parameters and osteogenesis in ovariectomized rats were illuminated.

Key words : ALP, collagen, *Ledebouriella seseloides*, lipid parameters, ovariectomized rats

서 론

여성은 폐경 후 에스트로겐 감소에 의해 지방이 점점 복부 내장에 축적되어 중심성 비만(centralobesity)이 유발되는 것으로 보고되고 있다[24, 34, 39]. 이러한 복부 지방 축적은 폐경 후 많은 대사 변화와 연관되며, 지질대사의 변화에서 HDL 콜레스테롤은 감소하고 총 중성지방, 총 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤은 증가하게 된다[6]. 특히, 복부비만은 대사증후군의 중요한 위험인자로 제2형 당뇨병, 고혈압, 고중성지방혈증, 고 LDL 콜레스테롤혈증의 위험이 증가할 뿐만 아니라, 심혈관계 질환의 가장 중요한 위험인자이기도 하다. 여성에서 심혈관계 질환의 위험도가 남성에 비해 10년 정도 늦은 50-64세경에 급격히 증가하는 것 또한 이를 뒷받침한다[9]. 임상적 실험결과들에 의하면 폐경 이후 여성의 경우 에스트로겐이 lipid profiles, endothelial cell function, vascular reactivity, hemostatic factors 등에 이로운 효과가 있는 것으로 나타났다[2, 21, 30]. 한편, 골다공증은 뼈의 강도를 약화시키고 골량을 감소시키

며, 뼈에 미세구조의 이상을 야기하여, 결과적으로 뼈가 약해져서 골절이 되기 쉬운 상태로 만드는 전신적 질환이다[12, 13]. 폐경이 골 대사질환의 원인이 되는 이유로는 체내의 에스트로겐이 감소되면 부갑상선호르몬에 대한 골격 반응도가 높아져 골 흡수가 증가함에 따라 골 내의 칼슘이 혈액으로 유출되어 혈청 칼슘농도가 증가하고, 그 결과 부갑상선호르몬의 분비가 감소하여 골 흡수 증가하게 되는 것으로 알려져 있다[7]. 따라서, 골 대사질환에 여성호르몬 및 thyroid hormone, calcitonin과 ipriflavone 등을 투여하여 골의 흡수를 차단하는 약물이 많이 사용되고 있다[26, 32]. 하지만, 기존의 약물들은 각각의 한계점을 가져 최근 에스트로겐이나 천연에 존재하면서 약한 에스트로겐 활성을 나타내는 식물 유래의 phytoestrogen이 폐경 후 골다공증 예방에 매우 유용하게 처방되고 있다[5]. 이와 같이 에스트로겐 일정량은 인체 내 유익한 효과를 가지는 반드시 필요한 물질로써, 에스트로겐 손실은 심혈관계 및 골 대사에 불균형을 가져오기 때문에 최근 이러한 갱년기 장애가 가져오는 부작용을 줄이기 위해 호르몬 대체요법(Hormone replacement therapy)이 개발되어 사용되고 있다[23].

본 연구에서 사용된 방풍(*Ledebouriella seseloides*)은 산형과(미나리과)에 속하며, 진방풍, 산방풍, 병풍나물, 산방풍나무, 방풍나무뿌리 등으로 불리는 약용식물이다[3]. 방풍에 대한 기존 연구는 항염, 항진통 등에 대한 검토가 대부분이며[36], 방풍이 혈중 지질 수준 및 골 형성에 미치는 영향에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 난소를 절제하여

*Corresponding author

Tel : +82-51-999-5620, Fax : +82-51-999-5457

E-mail : mihkim@silla.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

갱년기 장애를 유도한 흰쥐에 방풍 추출물을 투여함으로써 난소절제에 의한 estrogen 결핍으로 야기되는 지질 변화 수준 및 혈소판 응집능, 골 중 collagen 함량 변화에 대한 방풍나물의 효과를 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

추출물의 제조

본 실험에서 사용한 방풍(*Ledebouriella seseloides*)은 2013년 4월 여수에서 채취된 것을 구입하여 흐르는 물에 4~5회 세척하여 불순물을 제거하였다. 세척된 방풍은 건조 후 분쇄하여 실험에 사용하였다. 분말시료에 각각 10배량(w/v)의 80% ethanol을 첨가한 후, 80°C에서 4시간 동안 추출을 수행하였으며, 추출액을 지름 200 mm의 여과지(Advantec, Japan)를 이용하여 2회 여과한 후, rotary vacuum evaporator (R-200, Buchi, Switzerland)로 농축하여 동결건조장치(FD8518, Ilshin Biobase, Korea)로 동결건조 후 추출물을 얻었다.

실험동물 사육조건

체중이 200-250 g인 9주령의 암컷(Sprague-Dawley) 쥐 24마리를 (주)오리엔트바이오에서 분양받아 1주일간 적응시킨 후, 난괴법(randomized complete block design)에 의해 균을 나누어 난소절제 수술(ovariectomy)을 하였고 비 난소절제 대조군에게는 sham-operation을 실시하였다. 즉 실험동물은 비 난소절제 대조군(SHAM), 난소절제 대조군(OVX-CON), 난소절제 후 방풍 추출물 50 mg/kg/day 투여군(OVX-LE50) 및 난소절제 후 방풍 추출물 200 mg/kg/day 투여군(OVX-LE200)의 각 6마리씩 4군으로 나누어 1 ml의 시료를 매일 경구 투여하며 6주간 사육하였다(Table 1). 실험기간 동안 식이 섭취량과 체중은 매일 일정한 시간에 측정하였으며, 동물실험실의 사육조건은 온도 24±2°C, 습도 50-55%를 유지시켰고, 실험시료는 증류수로 용해하여 대조군은 동일용량의 증류수를 투여하였으며, 실험기간 동안 식이와 물은 제한 없이 섭취하게 하였다. 동물실험은 신라대학교 동물실험윤리 위원회의 승인(SUACUC-2014-008)하의 관리지침에 따라 수행하였다.

난소절제시술

1주일 동안 주위환경에 적응시켜 체중에 따라 난괴법(randomized complete block design)에 의해 균을 나누어 난

소절제 수술을 실시하였다. 수술은 zoletil과 rompun (Morning Korea Co. Korea)을 이용하여 마취 후 심마취기에 이르면 복부를 절개하여 난소를 제거하고 절개부는 봉합하였다. 또한 대조군 설정을 위하여 비 난소절제군은 복막 절개까지 난소절제 수술과 같은 방법으로 시행하고, 양측의 난소를 노출하였다가 절제하지 않고 복막 속으로 다시 넣어 난소절제와 같은 스트레스를 주고 다시 봉합하는 모의수술(sham operation)을 시행하여, 이들을 대조군으로 사용하였다.

혈액 및 조직 채취

혈액은 실험동물을 해부 전 24시간 절식시킨 후 zoletil과 rompun 마취하에 개복한 후 복대동맥에서 채취하여 헤파린으로 처리된 튜브를 사용하고, 혈액응고 실험을 위해 3.2% sodium citrate를 1:9의 비율로 혼합하여 분석에 사용하였다. 또한 혈액의 생화학적 분석을 위해 상온에서 30분간 방치 한 후, 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리에 의해 혈청을 분리하여 사용하였다. 한편, 심장, 신장, 부신, 자궁, 폐, 간은 적출하여 주위의 지방과 물기를 제거하였고, 늑골과 연골은 경계면에서 분리하여 실험 시까지 -70°C에 보관하였다.

Alkaline phosphatase 활성 분석

골격 형성 지표인 혈청 중 alkaline phosphatase (ALP) 활성은 측정용 kit (FUJIFILM Co. Japan)를 사용하였다. FUJI DRI-CHEM SLIDE 위에 분리한 혈청 10 µl를 점착하여 DRY CHEM (3600i, Fuji Co, Japan)을 사용하여 500 nm의 파장에서 분석하였다.

혈청 중의 지질농도 분석

실험동물에서 채취한 혈액은 실온에서 30분 방치한 후 4°C, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 중성 지방, 총 콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤 분석은 자동 측정용 slide kit (FUJI FILM, Japan)를 이용하여 Dry Chemistry Analyzer 3500i (FUJI, Japan)를 사용하여 측정하였다.

혈소판 응집력 분석

방풍의 항 혈소판 응집효과는 Whole blood lumi-aggregometer (Chrono-log, USA)를 사용하여 37°C에서 optical 방법으로 혈소판 응집을 측정하였다. 응집 유도제로 collagen을 사용하였으며, micro-magnetic bar를 넣은 cuvette에는 미리 37

Table 1. Experimental design of animals

Group (No) ¹⁾	Treatment
SHAM (6)	operated rats
OVX-CON (6)	ovariectomized rats
OVX-LS50 (6)	ovariectomized rats supplemented <i>Ledebouriella seseloides</i> ethanol extract 50 mg/kg bw/day
OVX-LS200 (6)	ovariectomized rats supplemented <i>Ledebouriella seseloides</i> ethanol extract 200 mg/kg bw/day

¹⁾No : number of rats

℃에서 incubation시킨 PRP 50 μl와 suspending buffer, 10 mM CaCl₂를 넣고 다시 incubation한 후 collagen 2.5 μl를 가하여 5분간 반응시켰다. 교반 속도는 1,100 rpm으로 유지하였고, PRP를 얻은 후 2시간 안에 모든 실험을 진행시켰다. 혈소판 응집에 작용하는 약물의 효과는 응집 저해율과 slop, lag time, amplitude로 나타낼 수 있다. Slop은 반응이 일어나기 시작할 때의 속도를 나타내며, lag time은 반응하는 시간, amplitude는 최대 응집력을 나타낸다. 응집력은 반응이 최종적으로 끝났을 때의 광학밀도를 나타내는 것이다.

결합조직 중의 collagen 함량 측정

적출한 결합 조직인 골 및 연골에 6 N HCl 10 ml를 첨가하여 110℃에서 20시간 가수분해한 후 여과 농축하여 증류수로 5배 희석하여 시료용액으로 하였다. 결합조직의 collagen 함량은 Woessner법[37]을 이용하여 분석하였다. Hydroxyproline의 정량분석을 위해 조제한 시료를 다시 증류수로 일정량 희석한 후 실험에 사용하였다. 반응액은 UV spectroscopy (Ultrospec 2100 pro, GE Healthcare Bioscience, Sweden)를 이용하여 흡광도 560 nm에서 측정하였다. 표준 곡선을 이용하여 hydroxyproline양을 구한 다음 collagen양으로 환산하였다. 골 및 연골 collagen의 아미노산 조성으로부터 collagen 중의 hydroxyproline 비율은 평균 110잔기/1,000잔기이므로 collagen 양의 환산은 일반적으로 다음 식에 준한다.

$$\text{Collagen (ug)} = 9.09 \times \text{hydroxyproline (ug)}$$

통계처리

실험결과 얻어진 자료를 SPSS (statistical package for social science, version 17.0) 통계 프로그램을 사용하여 하위그룹 각각의 기술 통계치(mean, SD)를 산출하였다. 집단 간의 차이를 알아보기 위해 일원변량분석(one-way ANOVA)를 이용하여 분석하였고, 사후검정은 Duncan's multiple range test에 의해 $p < 0.05$ 수준에서 각 실험군 간의 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

실험동물의 체중 증가량, 식이 섭취량 및 장기 중량

난소절제 및 방풍 에탄올 추출물의 투여에 따른 체중 변화와 식이 섭취량은 Table 2와 같다. 난소절제에 의한 에스트로겐 분비감소가 체중 증가를 가져온 여러 보고와 마찬가지로 [27, 28], 체중은 난소를 절제한 군(OVX)이 난소를 절제하지 않은 군(SHAM)에 비하여 높은 경향을 나타내었다. 이는 흰쥐에서 난소를 제거하면 성장속도가 증가하여 체중이 증가하는 것이고, 체중 증가의 대부분은 체내 지방의 축적에 기인하는 것으로 보인다[38].

또한, 에스트로겐은 지방세포대사에 있어 국소적 특이효과를 나타내어 대퇴부 지방세포에서는 지단백리파제(lipoprotein lipase, LPL)의 활성을 증가시키는 반면, 복부 및 유방 지방세포에서는 지방분해를 촉진시킨다[15]. 따라서 폐경 전 여성은 폐경 후 여성에 비해 복부지방조직에서 지방분해 활성도가 높으며, 대퇴부 지방조직에서는 LPL 활성도가 더 높아 대퇴부에 지방의 축적이 초래되는 반면, 폐경 후 에스트로겐 결핍 시에는 대퇴부 지방에서 LPL 활성도의 감소와 복부지방에서 지방분해의 감소로 인해 상대적인 복부지방의 증가가 나타난다[15]. 한편, Gale와 Sclafani은 난소절제는 식이 섭취량과 식이효율을 증가시켜 과식증(hyperphagia)과 비만을 야기한다고 보고하였으며[11], 이[20]등은 난소를 절제한 실험동물의 체중과 체지방 무게의 증가를 보고하였다. 본 연구에서도 난소 절제군인 OVX-CON군과 비 난소 절제군(SHAM)을 비교하였을 때 난소절제에 의한 체중 증가 현상이 나타났다. 또한, 난소절제 후 방풍 에탄올 추출물을 투여한 모든 군에서 SHAM과 비교해 높은 체중 증가를 나타내었다. 이는 SHAM군에 비해 난소절제 군의 사료섭취량 증가로 인해 체중 증가를 초래한 것으로 추측된다. 한편, 식이효율에 있어서는 OVX-CON군은 SHAM군에 비해 유의적으로 높은 결과를 나타내었으나, 난소 절제 후 방풍 에탄올 추출물을 투여한 군에서는 SHAM군의 수준에는 미치지 못하나 OVX-CON군에 비해 식이효율이 감소한 것으로 나타났다.

Table 2. Body weight gain, food intake and food efficiency ratio of rats supplemented *Ledebourriella seseloides* ethanol extract for 6 weeks

Group ¹⁾	Final body weight (g)	Body weight gain (g/day)	Food intake (g/day)	Food efficiency ratio (FER) ²⁾
SHAM	309.43±04.51 ^{3)a4)}	2.44±0.29 ^a	38.95±5.42 ^a	0.06±0.00 ^a
OVX-CON	356.91±14.36 ^c	5.40±0.41 ^b	45.18±8.45 ^b	0.12±0.02 ^b
OVX-LS50	332.30±24.96 ^b	3.96±2.00 ^{ab}	42.47±8.42 ^{ab}	0.09±0.01 ^{ab}
OVX-LS200	343.95±19.16 ^{bc}	4.17±0.80 ^b	45.05±8.50 ^b	0.09±0.02 ^{ab}

¹⁾Refer the legend to Table 1.

²⁾FER : Body weight gain/Food intake.

³⁾Values are mean±S.D.(n=10).

⁴⁾Means with different subscripts are significantly different at $p < 0.05$ by duncan's multiple range test.

Table 3. Effect of *Ledebouriella seseloides* ethanol extract on weight of liver, heart, lung, spleen, adrenal, kidney and uterus in ovariectomized rats

Group ¹⁾	Liver	Heart	Lung	Spleen	Adrenal	Kidney	Uterus
SHAM	8.55±1.07 ^{2)NS4)}	0.90±0.10 ³⁾	1.21±0.20 ^a	0.55±0.08 ^a	0.13±0.08 ^{NS}	1.98±0.26 ^a	0.60±0.17 ^b
OVX-CON	9.23±1.56	1.00±0.13 ^{ab}	1.45±0.20 ^{ab}	0.68±0.16 ^{ab}	0.13±0.05	2.05±0.15 ^{ab}	0.11±0.04 ^a
OVX-LS50	8.76±0.41	1.00±0.12 ^{ab}	1.36±0.19 ^{ab}	0.63±0.12 ^a	0.10±0.00	2.21±0.31 ^{ab}	0.30±0.21 ^a
OVX-LS200	9.98±1.34	1.08±0.11 ^b	1.51±0.18 ^b	0.83±0.19 ^b	0.10±0.00	2.35±0.25 ^b	0.30±0.20 ^a

¹⁾Refer the legend to Table 1.

²⁾Values are mean±S.D.(n=10).

³⁾Means with different subscripts are significantly different at $p<0.05$ by duncan's multiple range test.

⁴⁾NS : Not significantly.

Table 3은 각 실험동물의 장기 중량을 나타낸 것이다. 간, 신장, 폐, 비장, 부신과 신장 무게는 각 군 간의 큰 차이를 보이지 않았다. 그러나 각 군의 자궁 무게에서는 난소를 절제한 OVX-CON군이 난소를 절제하지 않은 SHAM군과 비교하여 유의적으로 낮은 자궁무게를 나타내었으며, 이는 난소 절제로 인한 자궁의 퇴화로 인한 것으로 추측된다. 방풍 에탄올 추출물 투여군은 OVX-CON군과 비교하여 자궁 무게가 증가하는 결과가 나타났으나, SHAM군의 수준에는 미치지 못하여 방풍 추출물이 자궁무게의 회복에는 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

혈청지질 조성 개선 효과

정상상태에서 식이성 중성지방과 콜레스테롤은 조직세포에서 합성된 지질과 균형을 이루며 혈관 내 순환 lipoprotein들의 농도는 항상성에 의해 적절하게 유지되나, 유전적 요인과 환경적 요인에 의해 체내 지질의 균형이 깨어질 수 있으며, 그 결과 혈장 lipoprotein인 LDL-콜레스테롤 농도의 증가와 HDL-콜레스테롤 농도의 감소가 유발되었을 때, 동맥경화증, 고혈압 및 심혈관계 질환을 일으키게 된다[21]. 폐경에 이르게 되면 혈중 중성지방과 HDL-콜레스테롤은 폐경 전과 변화가 없으나 총 콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤은 증가되어 폐경기 이후 혈관 관련 질환의 발병률이 높아지는 원인으로 작용하는 것으로 알려져 있다[4].

본 연구에서는 인위적으로 갱년기를 유도한 실험동물에게

방풍 에탄올 추출물을 투여하여 혈청 내 총 콜레스테롤, 중성지방, HDL-콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤 함량 변화를 검토하였다(Table 4). 혈청 내 총 콜레스테롤의 경우 난소절제군인 OVX-CON이 비 난소절제 대조군인 SHAM군에 비해 증가하였으며, 난소 절제 후 방풍 에탄올 추출물에 의해 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다. 혈청 LDL-콜레스테롤 함량 또한 난소절제로 인해 증가하였으나, 방풍 에탄올 추출물 투여로 SHAM 수준으로 감소하는 결과가 나타났다. Starzec와 Berger 등은 난소절제가 혈장 콜레스테롤을 증가시켰다고 보고하였고, 난소절제에 의한 에스트로겐 수준저하는 lipoprotein lipase (LPL)과 lecithin:cholesterol acyltransferase (LCAT)를 활성화시켜 LDL-콜레스테롤 합성을 증가시킴으로써 고콜레스테롤혈증을 일으킨다고 하였다[31]. 한편, 혈청 중의 HDL-콜레스테롤의 농도는 방풍 에탄올 추출물 50 mg/kg/day 투여군에서는 OVX-CON군보다 유의적으로 증가하는 것으로 나타난 반면 SHAM군 수준에는 미치지 못하였으나, 200 mg/kg/day 투여군에서는 SHAM군 수준의 HDL-콜레스테롤 함량을 나타내었다. 혈중 HDL-콜레스테롤 농도의 증가는 혈관 내피세포의 기능장애를 방지하며, 세포내의 접착물질(adhesion molecule)로 인한 세포의 증식을 감소시킨다고 보고되어 있다[8, 40]. 또한, 혈청 중의 중성 지질 함량 또한 난소절제에 의해 증가하였고, 방풍 에탄올 추출물 투여군에서 OVX-CON에 비해 유의적으로 감소하는 경향을 나타냈다. 이는 방풍 에탄올 추출물이 에스트로겐 유사활성을 나타내어 혈 중 지질함

Table 4. Effect of *Ledebouriella seseloides* ethanol extract on serum total-cholesterol, triglyceride, high density lipoprotein cholesterol and low density lipoprotein cholesterol in ovariectomized rats

Group ¹⁾	T-CHO (mg/dL)	TG (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)	LDL-C ²⁾ (mg/dL)
SHAM	99.66±5.85 ^{3)ab4)}	34.33±9.60 ^a	69.00±2.00 ^c	37.52±5.77 ^a
OVX-CON	134.00±3.60 ^c	47.00±1.00 ^b	61.00±1.73 ^a	82.40±2.07 ^b
OVX-LS50	92.66±1.52 ^a	32.33±4.50 ^a	64.66±1.15 ^b	34.46±1.27 ^a
OVX-LS200	102.66±5.03 ^b	31.00±6.24 ^a	68.00±1.00 ^c	40.86±5.27 ^a

¹⁾ See the legend of Table 1.

²⁾ LDL cholesterol={total cholesterol - (HDL-cholesterol - triglyceride/5)}.

³⁾ The results are mean±S.D. for 6 rats in each group.

⁴⁾ Means with different subscripts are significantly different at $p<0.05$ by duncan's multiple range test.

량을 개선하는 것으로 사료되며, 심혈관 질환의 위험률을 저하시킬 수 있는 소재 개발로의 가능성이 기대된다.

혈소판 응집에 미치는 영향

상동맥 질환 및 뇌혈관 질환을 포함한 순환계 질환은 우리나라 사람의 사망원인의 대부분을 차지한다. 심혈관계 질환은 남성과 마찬가지로 여성들에 있어서도 주요한 사망원인으로 작용하고 있으며, 특히 폐경 후에는 폐경 전에 비해 심혈관계 질환의 위험성이 두 배 이상 증가될 수 있다고 보고되었다[14]. 혈관이 손상되었을 때 혈소판은 collagen, thrombin, ADP 등과 같은 각종 agonists의 자극에 응답해서 활성화되어 점착 반응(adhesion), 방출반응(secretion) 및 응집반응 (aggregation)을 일으켜 인체의 혈관이 손상을 받아 출혈이 일어난 후 혈액이 혈관 또는 조직 내에서 응고됨으로써 혈전이 생성된다 [11, 29]. 혈전은 혈류를 따라 흐르다가 미세혈관을 막아 심근 경색, 허혈 등의 혈행 장애를 유발하게 된다[13].

본 연구에서는 방풍 에탄올 추출물이 난소를 절제한 흰쥐의 항 혈전능에 미치는 영향을 검토하였다(Table 5). 난소절제로 인하여 혈 중 지질 함량이 증가한 상태에서 washed platelet을 분리하고 collagen 2 µg으로 혈소판 응집을 유도하였다. Amplitude (%)는 각 실험동물의 혈액에서 정제된 혈소판만을 분리하여 응집을 유도하였을 때 일어나는 최대 응집 정도를 나타내는 것으로 난소절제를 하지 않은 SHAM군에 비해 난소절제를 한 OVX-CON군은 응집이 촉진되었고, OVX-CON군에 비해 방풍 에탄올 추출물 투여군에서 유의적으로 감소하는 경향이 나타났다. Slop (Ω/min)은 응집 유도물질인 콜라겐을 넣은 직후부터 1분 동안의 응집곡선의 기울기를 말하며 이때 응집의 진행과 함께 혈소판이 platinum electrodes에 부착됨으로써 발생하는 전기저항(impedance: Ω)의 크기를 혈소판 응집치로 나타낸다. 난소절제로 인해 OVX-CON군이 비 난소절제군인 SHAM군과 비교하여 Slop가 증가하였지만 방풍 에탄올 추출물 투여군에서 OVX-CON군에 비해 유의적으로 감소하는 경향을 나타냈다. 이것은 방풍 에탄올 추출물의 투여

가 혈전이나 thrombus의 생성을 막아 혈소판 응집을 억제하는 것으로 사료된다. 응집시간을 나타내는 lag time (sec)은 난소절제에 의해 반응이 일어나는 시간이 짧아졌으며, 이는 응집제 첨가에 대한 응집효과가 빨리 나타나 난소절제로 인해 응집효과가 더욱 촉진된 것으로 추측된다. 방풍 에탄올 추출물 투여한 경우, 200 mg/kg/day 투여군인 OVX-LS200군의 경우 OVX-CON군에 비해 lag time이 연장되어 혈소판 응집이 지연되는 결과가 나타났다. 따라서 방풍 에탄올 추출물이 난소절제로 인한 혈소판 응집 억제 효과를 나타내었으며, 이러한 결과로 미루어 방풍 에탄올 추출물이 혈소판 응집 저해 효과가 있을 것으로 기대된다.

혈청 중 alkaline phosphatase 활성

Alkaline phosphatase (ALP)는 phosphomonoesterase, phosphodiesterase, phosphoric anhydrase 등으로 분류될 수 있는데 phosphomonoesterase의 경우 십이지장이나 장의 점막에 상당히 많은 양이 있으나, 신장, 고등동물의 선(gland), 뼈(bone), 정상적인 혈액에서는 적은 농도로 존재하고 있다. 따라서 이러한 정상적인 조직에 이상이 생기거나 골육종(osteosarcoma)의 경우 혈청 내에서 ALP의 활성도가 증가하게 된다[17]. ALP는 폐경 시 에스트로겐의 결핍으로 인하여 골 전환이 증가하여[25] 폐경 후 여성의 골다공증에서 증가하는 양상을 보이며, 성인기 여성에서는 골절과의 관련성을 보여 폐경 전후 여성에게 있어 골 형성지표로서 널리 사용되고 있다[16].

Table 6은 방풍 에탄올 추출물이 혈청 ALP 활성에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 난소절제 시(OVX-CON군) 에스트로겐 결핍으로 골 교체가 증가되어 비 난소절제(SHAM)군에 비해 혈청 중의 ALP 활성이 증가되었으나 유의성 있는 결과는 나타나지 않았다. 한편, 방풍 에탄올 추출물 투여군에서는 난소절제로 인하여 그 활성이 증가된 OVX-CON군에 비해 활성이 감소하는 경향을 나타내었으며, 200 mg/kg/day 투여군의 경우 SHAM군보다 활성이 감소하여 난소절제로 인한 골 손실 정도를 완화시켜준 것으로 추측된다.

Table 5. Effect of *Ledebouriella seseloides* ethanol extract against collagen induced platelet aggregation

Group ¹⁾	Amplitude (%)	Slop (Ω/min) ²⁾	Lag time (sec)
SHAM	22.00±2.12 ³⁾⁴⁾	20.40±2.19 ^a	0:33±0:04 ^b
OVX-CON	27.00±4.35 ^b	38.00±15.5 ^b	0:15±0:13 ^a
OVX-LS50	19.40±1.30 ^a	22.20±3.89 ^a	0:13±0:02 ^a
OVX-LS200	17.20±4.38 ^a	24.00±1.41 ^a	0:22±0:05 ^{ab}

¹⁾Refer to comment in Table 1.

²⁾Initial slope is ohm change for the first on minute.

³⁾All values are mean±SD.

⁴⁾Means with different subscripts are significantly different at p<0.05 by duncan's multiple range test.

결합조직 중 collagen 함량

Collagen은 인체 각 결합조직에 분포하는 중요한 단백질로

Table 6. Effect of *Ledebouriella seseloides* ethanol extract on serum alkaline phosphatase activity in ovariectomized rats

Group ¹⁾	ALP (U/L)
SHAM	321.11±28.67 ^{2)NS3)}
OVX-CON	348.00±22.91
OVX-LE50	327.33±28.86
OVX-LE200	306.33±9.07

¹⁾Refer to comment in Table 1.

²⁾All values are mean±SD.

³⁾NS : Not significantly.

Table 7. Effect of *Ledebouriella seseloides* ethanol extract on collagen content in cartilage and bone of ovariectomized rats

Group ¹⁾	Cartilage (mg/g)	Bone (mg/g)
SHAM	250.40±12.06 ^{2)bb3)}	298.46±9.05 ^b
OVX-CON	191.41±10.20 ^a	177.60±15.22 ^a
OVX-LE50	221.20±5.72 ^a	203.58±5.00 ^a
OVX-LE200	278.16±8.21 ^b	255.11±17.50 ^b

¹⁾Refer to comment in Table 1.

²⁾All values are mean±SD.

³⁾Means with different subscripts are significantly different at $p<0.05$ by Duncan's multiple range test.

서 골의 nonlinear부분은 주로 type I collagen으로 이루어져 있으며[19], 조직 내의 collagen의 손상은 연골 조직의 노화와 골 관절염, 골다공증 병인의 원인이 된다고 한다[33]. 피부 섬유아세포 중의 collagen은 에스트로겐에 의하여 생성량이 증가한다고 알려져 있으며, 여성호르몬 에스트로겐은 피부 진피층의 섬유아세포를 자극해 collagen 합성을 증진시키는 것으로 알려져 있다[35]. 또한, collagen의 대사에 관여하는 분해효소 matrix metalloproteinase-1 (MMP-1)의 발현을 조절하여 collagen의 분해를 억제하며[18], 에스트로겐이 결핍되면 골수 내 미세 환경에서 사이토카인에 의한 조절기전의 장애로 인해 비정상적으로 골 재형성과정이 촉진된다. 본 연구에서는 난소 절제로 인하여 에스트로겐이 결핍되었을 때 collagen 생성 변화에 있어 방풍 추출물의 영향을 검토하였다(Table 7). 연골의 경우 비 난소절제군인 SHAM군에 비해 난소절제군인 OVX-CON군의 collagen 함량이 감소하였으나, 방풍 에탄올 추출물을 투여함으로써 OVX-LS200 군에서 유의적으로 증가하는 것으로 나타났다. 골 조직에서 또한 난소를 절제한 OVX-CON군이 난소를 절제하지 않은 SHAM군과 비교해 유의적으로 감소하는 결과가 나타났다. 한편, 난소를 절제한 후 방풍 추출물을 50 mg/kg/day 투여한 OVX-LS50군에서는 대조군에 비해 collagen 함량이 증가하는 경향이 나타났으며, 200 mg/kg/day 투여한 OVX-LS200군의 경우 유의적으로 증가하였다. 따라서 골 조직의 collagen 합성에는 추출물의 양을 50보다 200 mg/kg/day 정도는 투여해야 할 것으로 추측된다. 이상의 결과로부터 연골 및 골 조직에서 난소절제로 인하여 감소된 결합조직 중의 collagen 함량은 에스트로겐 부족으로 인한 골 손실의 예방에 방풍 에탄올 추출물 투여가 유익한 효과를 가질 것으로 기대된다.

References

- Badimon, L., Badimon, J. J., Penny, W., Webster, M. W., Chesebro, J. H. and Fuster, V. 1992. Endothelium and atherosclerosis. *J. Hypertens.* **10**, 43-50.
- Barrett-Connor, E. and Bush, T. L. 1991. Estrogen and coronary heart disease in woman. *JAMA.* **265**, 1861-1867.
- Bea, K. H., 1999. The medicinal plants of Korea. Kyohaksa, Seoul, Korea.
- Campos, H., Wilson, P. W., Jiménez, D., McNamara, J. R., Ordovas, J. and Schaefer, E. J. 1990. Differences in apolipoproteins and low-density lipoprotein subfractions in postmenopausal women on and off estrogen therapy: results from the Framingham Offspring Study. *Metabolism* **39**, 1033-1038.
- Cassidy, A. 1996. Physiological effects of phytoestrogens in relation to cancer and other human health risks. *Proc. Nutr. Soc.* **55**, 399-418.
- Carr, M. C. 2003. The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**, 2404-2411.
- Cho, S. J., Park, M. N., Kim, H. K., Kim, J. H., Kim, M. H., Kim, W. S. and Lee, Y. S. 2011. Effects of organic Ca supplements on Ca bioavailability and physiological functions in ovariectomized osteoporotic model rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **40**, 665-672.
- Clarkson, T. B. 2002. Soy, soy phytoestrogens and cardiovascular disease. *J. Nutr.* **132**, 566S-569S.
- Ford, E. S., Giles, W. H. and Dietz, W. H. 2002. Prevalence of the metabolic syndrome among US adults. *JAMA.* **287**, 356-359.
- Furie, B. and Furie, B. C. 1988. The molecular basis of blood coagulation. *Cell.* **53**, 505-518.
- Gale, S. K. and Sclafani, A. 1977. Comparison of ovarian and hypothalamic obesity syndromes in the female rat: Effects of diet palatability on food intake and body weight. *J. Comp. Physiol. Psychol.* **91**, 381-392.
- Gao, Y., Luo, E., Hu, J., Xue, J., Zhu, S. and Li, J. 2009. Effect of combined local treatment with zoledronic acid and basic fibroblast growth factor on implant fixation in ovariectomized rats. *Bone* **44**, 225-232.
- Guideline Development Committee, Korean Society of Bone Metabolism. 2008. Osteoporosis diagnosis and treatment. 2007. **23**, 76-108.
- Je, S. Y. and Park, W. H. 1998. The relationship of cardiopulmonary fitness to plasma fibrinogen, plasminogen activator inhibitor Type-1 (PAI-1), and lipoprotein (a) [LP (a)] in healthy postmenopausal women. *J. Kor. Sports Med.* **16**, 282-291.
- Kassem, M., Brixen, K., Mosekilde, L., Blum, W. F. and Flyvbjerg, A. 1998. Effects of growth hormone treatment on serum levels of insulin like growth factors (IGFs) and IGF binding proteins 1 - 4 in postmenopausal women. *Clin. Endocrinol.* **49**, 747-756.
- Khandwala, H. M., Mumm, S. and Whyte, M. P. 2006. Low serum alkaline phosphatase activity and pathologic fracture: case report and brief review of hypophosphatasia diagnosed in adulthood. *Endocr. Pract.* **12**, 676-681.
- Kim, I. G., Kim, S. B., Kim, J. G. and Kim, K. C. 1993. Serum enzymes as indicators of radiation exposure in rat. *J. Radiation Protection* **18**, 37-44.
- Kim, M. J. 2004. Anti-wrinkle effect of safflower (*Carthamus tinctorius* L.) seed extract (II). *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea* **14**, 373-377.

19. Lubec, G., Labudova, O., Seebach, D., Beck, A., Hoeger, H., Hermon, M. and Weninger, M. 1995. Alpha-methyl-proline restores normal levels of bone collagen type I synthesis in ovariectomized rats. *Life Sci.* **57**, 2245-2252.
20. Lee, S. S. and Park, J. H. 1989. Long-term effect of ovariectomy on body composition. *Kor. J. Nutr.* **22**, 102-107.
21. Miller, Valery T., et al. 1995. Effects of estrogen or estrogen/progestin regimens on heart disease risk factors in postmenopausal women. The postmenopausal estrogen/progestin interventions (PEPI) trial. *JAMA.* **273**, 199-208.
22. Park, S. H., Jang, M. J., Hong, J. H., Rhee, S. J., Choi, K. H. and Park, M. R. 2007. Effects of mulberry leaf extract feeding on lipid status of rats fed high cholesterol diets. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **36**, 43-50.
23. Park, Y. S. 2011. Effects of *Eisenia bicyclis* extracts on lipids and bone turnover in ovariectomized rats. *MS Thesis*. Silla University.
24. Poehlman, E. T., Toth, M. J. and Gardner, A. W. 1995. Article RETRACTED: Changes in energy balance and body composition at menopause: A controlled longitudinal study. *Ann. Intern. Med.* **123**, 673-675.
25. Raisz, L. G. 1988. Local and systemic factors in the pathogenesis of osteoporosis. *N. Engl. J. Med.* **318**, 818-828.
26. Recker, R. R., Saville, P. D., and Heaney, R. P. 1977. Effect of estrogens and calcium carbonate on bone loss in postmenopausal women. *Ann. Intern. Med.* **87**, 649-655.
27. Schemmel, R. A., Teague, R. J. and Bray, G. A. 1982. Obesity in Osborne-mendel and S 5B/Pl rats: effects of sucrose solutions, castration, and treatment with estradiol or insulin. *Am. J. Physiol.* **243**, R347-R353.
28. Shimizu, H., Shimomura, Y., Sato, N., Uehara, Y. and Kobayashi, I. 1992. Colonic temperature was not changed in the development of obesity after ovariectomy. *Exp. Clin. Endocrinol.* **99**, 99-101.
29. Siess, W. 1989. Molecular mechanism of platelet activation. *Physiol. Rev.* **69**, 58-178.
30. Stampfer, M. J. and Colditz, G. A. 1991. Estrogen replacement therapy and coronary heart disease: a quantitative assessment of the epidemiologic evidence. *Prev. Med.* **20**, 47-63.
31. Starzec, J. J. and Berger, D. F. 1986. Effects of stress and ovariectomy on the plasma cholesterol, serum triglyceride, and aortic cholesterol levels of female rats. *Physiol. Behav.* **37**, 99-104.
32. Sziklai, I. and Ribari, O. 1985. The effect of flavone treatment on human otosclerotic ossicle organ cultures. *Arch Otorhinolaryngol.* **242**, 67-70.
33. Tiku, M. L., Allison, G. T., Naik, K. and Karry, S. K. 2003. Malondialdehyde oxidation of cartilage collagen by chondrocytes. *Osteoarthr. Cartil.* **11**, 159-166.
34. Toth, M. J., Tchernof, A., Sites, C. K. and Poehlman, E. T. 2000. Menopause-related changes in body fat distribution. *Ann. NY Acad. Sci.* **904**, 502-506.
35. Wakatsuki, A. and Sagara, Y. 1995. Lipoprotein metabolism in postmenopausal and oophorectomized women. *Obstet. Gynecol.* **85**, 523-528.
36. Wang, C. C., Chen, L. G. and Yang, L. L. 1999. Inducible nitric oxide synthase inhibitor of the Chinese herb I. *Saposhnikovia divaricate* (Turcz.) Schischk. *Cancer Lett.* **145**, 151-157.
37. Woessner, J. F. 1961. The determination of hydroxyproline in tissue and protein sample containing small proportion of this amino acid. *Arch. Biochem. Biophys.* **93**, 440-447.
38. Yamazaki, I. and Yamaguchi, H. 1989. Characteristics of an ovariectomized osteopenic rat model. *J. Bone Miner. Res.* **4**, 13-22.
39. Zamboni, M., Armellini, F., Milani, M. P., De Marchi, M., Todesco, T., Robbi, R. and Bosello, O. 1992. Body fat distribution in pre- and post-menopausal women: metabolic and anthropometric variables and their inter-relationships. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **16**, 495-504.
40. Zeiher, A. M., Schachlinger, V., Hohnloser, S. H., Saurbier, B. and Just, H. 1994. Coronary atherosclerotic wall thickening and vascular reactivity in humans. Elevated high-density lipoprotein levels ameliorate abnormal vasoconstriction in early atherosclerosis. *Circulation* **89**, 2525-2532.

초록 : 방풍나물 추출물이 난소절제 흰쥐의 혈중 지질 변화에 미치는 영향

전명정, 김미향*

(신라대학교 식품영양학과)

본 연구는 방풍나물 에탄올 추출물을 이용하여 갱년기 유도 흰쥐의 혈중지질 수준의 향상, 항 혈소판 응집력에 미치는 효과를 검토하고자 하였다. 9주령 흰쥐를 각 군당 6마리씩 난소절제 모의 수술군, 난소절제군, 난소절제 후 방풍나물 추출물 50 mg/kg/day 및 200 mg/kg/day군의 4군으로 나누어 시술 후 6주간 추출물을 투여하며 사육하였다. 동물실험 결과 갱년기 유도로 인하여 증가된 혈청 중 중성지방 및 총콜레스테롤 함량은 방풍나물 추출물의 투여에 의해 저하되었다. 혈중 LDL-콜레스테롤 함량은 방풍나물 추출물 200 mg/kg/day 투여에 의해 난소절제 대조군(OVX-CON)에 비해 유의하게 감소하였다. 또한 방풍나물 추출물의 항 혈전능에 미치는 영향을 검토하기 위해, 난소절제로 인하여 혈 중 지질 함량이 증가한 상태에서 washed platelet을 분리하고 콜라겐으로 혈소판 응집을 유도하였다. 그 결과 방풍나물 추출물을 투여한 군이 OVX-CON군에 비해 혈소판 응집을 억제하는 것으로 나타났다. 응집율을 나타내는amplitude (%)는 OVX-CON군이 난소절제를 하지 않은 SHAM군과 비교하여 증가하였으나, 방풍나물 추출물 투여군인 OVX-LS50 및 OVX-LS200군 모두에서 유의적으로 감소하는 결과를 나타내었다. 비교하여 반응이 일어나기 시작하는 속도를 나타내는Slop은 SHAM군에 비해 난소절제로 인해 OVX-CON군이 증가하였으나, 방풍나물 추출물 투여군에서 OVX-CON군에 비해 유의적으로 감소하는 결과를 나타냈다. 응집시간을 나타내는 lag time (sec)은 난소절제에 의해 반응이 일어나는 시간이 짧아져, 혈소판 응집이 촉진되는 결과가 나타났다. 방풍 나물 추출물 투여한 경우, 200 mg/kg/day 투여군인 OVX-LS200군의 경우 OVX-CON군에 비해 lag time이 연장되어 혈소판 응집이 지연되는 결과가 나타났다. 난소절제 시(OVX-CON군) 에스트로겐 결핍으로 골 교체가 증가되어 SHAM군에 비해 혈청 중의 ALP 활성이 증가되었으나 유의성 있는 결과는 나타나지 않았다. 한편, 방풍나물 추출물 투여군에서는 난소절제로 인하여 그 활성이 증가된 OVX-CON군에 비해 활성이 감소하는 경향을 나타내었으며, 200 mg/kg/day 투여군의 경우 SHAM군보다 활성이 감소하여 난소 절제로 인한 골 손실 정도를 완화시켜준 것으로 추측된다. 연골의 경우 비 난소절제군인 SHAM군에 비해 난소절제군인 OVX-CON군의 collagen 함량이 감소하였으나, 방풍 에탄올 추출물을 투여함으로써 OVX-LS200 군에서 유의적으로 증가하였으며, 골 조직에서 또한 난소를 절제한 OVX-CON군이 난소를 절제하지 않은 SHAM군과 비교해 유의적으로 감소하는 결과가 나타났다. 한편, 난소를 절제한 후 방풍 추출물을 50 mg/kg/day 투여한 OVX-LS50군에서는 대조군에 비해 collagen 함량이 증가하는 경향이 나타났으며, 200 mg/kg/day 투여한 OVX-LS200군의 경우 유의적으로 증가하였다. 이상과 같이 방풍나물 추출물은 난소절제로 인하여 증가된 혈중 지질 조성 개선 및 에스트로겐 부족으로 인한 골 손실의 예방에 유익한 효과를 가질 것으로 기대된다.