

말초동맥 순환장애 개선 소재의 선발 및
목적 기능성 함유 제품 개발
Selection of Food Additives Improving Blood
Circulation and Their Application for Target
Foods

연구 기관
한국식품연구원

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “말초동맥 순환장애 개선 소재의 선발 및 목적 기능성 함유 제품 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2006 년 7 월 14 일

주관연구기관명 : 한국식품연구원

총괄연구책임자 : 김영언 (선임연구원)

세부연구책임자 : 김인호 (책임연구원)

세부연구책임자 : 이창호 (선임연구원)

연 구 원 : 한대석 (책임연구원)

연 구 원 : 권은경

요 약 문

I. 제 목

말초동맥 순환장애 개선 소재의 선발 및 목적 기능성 함유 제품 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

혈액순환이 원활하지 못할 때 여러 가지 허혈현상이 생기게 된다. 허혈성 심장질환의 치료제로는 항혈소판제, 질산염, 베타-아드레날린 수용체 차단제, 칼슘길항제, ACE 억제제, 고지혈증 치료제, 니트로 글리세린 등을 사용하고 있다. 이중 질산염, 니트로그리세린, 칼슘길항제, 베타-아드레날린 수용체 차단제는 단일 약물로 생각되어지기 때문에 식품학적 접근이 어려우며 따라서 식품 소재를 이용하여 효과를 거둘 수 있는 항혈전작용, 콜레스테롤 저하작용, ACE 억제작용을 검색시스템으로 하여 적합한 식품원료를 선발하여 그 효과를 적절한 방법으로 평가한다면 혈액순환을 개선시키는 기능성식품을 개발할 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 말초동맥 순환 장애를 개선할 수 있는 식품선도소재를 탐색하고 동물실험과 인체실험을 통해 효과를 검증한 다음 산업적인 활용도를 개발함으로써 효과에 대해 health-claim을 인정받을 수 있는 건강기능성식품 개발에 이르는 체계적인 연구의 수행이 필요하다.

III. 연구개발 내용 및 범위

기존 database 및 자료조사로부터 천연물을 포함한 식품생물자원의 활성물질을 조사하고 주 활성물질의 관능기 분석(functional group analysis), 정량적 구조활성관계(QSAR), 물리화학적 성질 등을 고려하여 시료를 선발하고자 하였다. 선발된 시료에 대해 시험관내 혈전용해활성, 항고혈압 활성 및 콜레스테롤 생합성에 관여하는 효소 중 율속효소인 HMG-CoA reductase에 대한 저해활성을 검토하여 3종 이상의 후보 추출물을 도출하고자 하였다. 말초혈관 순환장애 개선을 위한 식품소재의 선발은 각종 문헌과 인터넷 조사를 통해서 순환기계 질환에 효능이 알려져 있는 허브류와 천연물들을 대상으로 하여 실험하였다. 1차 스크리닝 대상인 허브와 천연물은 lavender flowers extract, rosemary extract, rose extract, green tea extract, grape leaf extract, buckwheat water extract,

gingko bilobae extract, red ginseng extract로 8종이며 2차 스크리닝 대상은 마조람, 라벤더, 딜, 로즈마리, 히습, 로즈, 레몬밤, 파인애플 세이지 및 에키네시아 등 9종으로 모두 17종의 천연물과 허브류의 angiotensin I converting enzyme(ACE) 저해활성, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase 저해활성 및 혈전용해활성을 측정하였다. 1년차 연구에서 효과가 뛰어났었던 buckwheat extract, grape leaf extract, green tea extract, lavender extract, rosemary extract의 rutin, quercetin, caffeine, resveratrol, catechin, vitamin C 및 총 플라보노이드의 함량을 HPLC로 분석하여 비교하였다. 또한 라벤더, 로즈마리, 녹차추출물을 가지고 반응표면분석을 실시하여 최적의 배합비를 도출해내어 시험관 모델을 확립하고자 하였다.

In vitro test의 결과를 토대로 활성이 뛰어난 각각 3종의 추출물을 선정하여 동물실험을 실시하여 생체내에서의 작용을 관찰하고자 하였다. 먼저 *in vitro* test에서 다양한 천연물들의 혈액순환기능과 관련된 생리활성으로 HMG-CoA reductase 저해활성과 ACE 저해활성을 검색하여 효능이 우수한 녹차, 라벤더, 로즈마리 추출물을 선발하여 1차 동물실험시료로 하고 장미, 파인애플 세이지 및 이들을 함유한 타블렛 제품을 2차 동물실험시료로 선정하였다. F1B golden Syrian 햄스터를 동맥경화 유발식이에 각 시료를 실험기간동안 급여하여 햄스터 체내의 지질성분과 대동맥 내에서의 지방의 축적 정도에 미치는 영향을 조사하고자 하였다.

마지막으로 시험관내 실험과 동물실험을 통해 효능이 우수한 녹차, 로즈마리 및 라벤더 등 3종의 시료를 선발하였다. 이를 이용하여 음료, 타블렛, 과립차 및 캔디 등의 제품개발에 응용하고자 하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

식품소재 중 혈류개선에 효과가 있다고 알려져 있는 시료를 대상으로 항혈전활성, angiotensin converting enzyme inhibitory activity와 HMG-CoA reductase inhibitory activity에 대한 활성을 측정하였다. 1차 screening test에서 혈전용해활성이 뛰어난 시료로는 라벤더, 장미 및 녹차 추출물이었고, ACE 저해활성이 뛰어난 시료로는 로즈마리, 녹차 및 메밀 추출물이었으며, HMG-CoA reductase 저해활성이 높은 시료는 라벤더, 로즈마리 및 녹차 추출물이었다. 이 결과를 토대로 3가지 생리활성에 공통적으로 우수한 작용

을 보인 시료로 라벤더, 로즈마리, 녹차, 메밀, 포도잎 추출물을 선정하고 이들의 rutin, quercetin, caffeine, resveratrol, catechin, vitamin C 및 총 플라보노이드의 함량을 HPLC로 분석하여 비교하였다. 또한 라벤더, 로즈마리, 녹차추출물을 가지고 반응표면분석을 실시하여 최적의 배합비를 도출해낸 결과 HMG-CoA reductase 저해활성도는 라벤더 추출물 12.2 mg/3 mL, 로즈마리 추출물 14.4 mg/3 mL, 녹차 추출물 10.3 mg/3 mL를 각각 첨가하여 혼합하였을 때 가장 높은 값을 나타내었으며 그때의 예상되는 HMG-CoA reductase 저해활성도는 약 48.5%였다.

2차 screening test는 혈액순환 개선 효능을 알아보기 위해 민간에서 빈번하게 사용하는 허브류인 마조람, 라벤더, 딜, 로즈마리, 히습, 로즈, 레몬밤, 파인애플 세이지 및 에키네시아 등 총 9종을 실험 시료로 선정하였다. 이들을 부위별 및 용매별로 추출하여 angiotensin I converting enzyme(ACE) 저해활성, hydroxy-methylglutaryl coenzyme A reductase 저해활성 및 혈전용해활성을 측정하였다. 추출수율은 장미꽃이 가장 높았으며 열수 추출의 경우 43.3%였고 70% 에탄올 추출의 경우 45%였다. ACE 저해활성은 열수 추출의 경우 장미꽃이 133.8%로 가장 높았고 70% 에탄올 추출의 경우에는 파인애플 세이지 잎이 91.2%로 가장 높았다. HMG-CoA reductase 저해활성의 경우에는 장미꽃이 열수 추출물 48.9%, 70% 에탄올 추출물 80.5%로 모두 높았다. 혈전용해활성도 장미꽃에서 열수 추출이나 에탄올 추출물 모두 가장 높은 활성을 보였다. 이상의 결과로 볼 때 장미꽃 추출물의 혈액순환 개선 효과가 뛰어난 것으로 나타나 기능성 식품으로의 개발 가능성이 기대되었다.

2차에 걸친 screening test의 결과를 종합하여 in vivo test를 위한 시료로 라벤더, 로즈마리, 녹차, 장미 및 파인애플 세이지 등을 선정하고 동물실험을 수행하였다. 8주령의 F1B golden Syrian 햄스터에게 동맥경화 유발식이와 함께 라벤더 추출물을 각각 500 혹은 1000 mg/kg B.W.의 양을 매일 경구투여하면서 6주간 사육하였을 때 햄스터 체내의 지질성분과 대동맥 내에서의 지방의 축적 정도에 미치는 영향을 조사하였다. 라벤더 추출물의 섭취로 인해 동맥경화가 유발된 햄스터의 혈중 중성지방, 총콜레스테롤, non-HDL-콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤치를 분석한 결과 라벤더 추출물을 500 mg/kg B.W.의 농도로 투여한 군에서는 혈중지질성분의 감소효과가 전혀 없었으나 1000 mg/kg B.W.의 농도로 투여한 군에서는 혈중 중성지질, 총 콜레스테롤 및 non HDL-콜레스테롤치가 감

소하는 경향을 보여 개선효과가 있음을 확인하였다. 또한 햄스터의 대동맥궁 내벽에서의 지질의 축적 정도를 경감시키는 효과도 있어서 라벤더 추출물의 식이보조제로써의 가능성을 확인하였다.

8주령의 F1B golden Syrian 햄스터에게 동맥경화 유발식이와 함께 로즈마리 추출물을 각각 500 혹은 1000 mg/kg B.W의 양을 매일 경구투여하면서 6주간 사육하였을 때 햄스터 체내의 지질성분과 대동맥 내에서의 지방의 축적 정도에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 로즈마리 추출물은 햄스터의 체중의 변화와 식이섭취량에 영향을 미치지 않음은 물론 혈중 지질성분에도 아무런 영향을 미치지 않았다. 그러나 간장의 HMG-CoA reductase mRNA level과 LDL receptor mRNA level에 영향을 미쳐 이로 인해 햄스터의 대동맥궁 내벽의 지질의 축적 정도를 경감시키는 효과가 있었다.

8주령의 F1B golden Syrian 햄스터에게 동맥경화 유발식이와 함께 녹차 추출물을 각각 500 혹은 1000 mg/kg B.W.의 양을 매일 경구투여하면서 6주간 사육하였을 때 햄스터 체내의 지질성분과 대동맥 내에서의 지방의 축적 정도에 미치는 영향을 조사하였다. 실험 결과 녹차추출물의 경구투여는 동맥경화유발식이를 섭취하는 햄스터의 혈중 중성지방과 총콜레스테롤치를 농도의존적으로 감소시켰고, 대동맥궁내에서의 지방의 축적을 예방하였고, 간장내 HMG-CoA reductase mRNA level을 감소시키고 LDL receptor mRNA level을 증가시켜서 궁극적으로 혈중 콜레스테롤치를 낮추는 것에 기여하는 것으로 나타났다.

7주령의 웅성 F1B golden Syrian 햄스터에게 동맥경화 유발식이와 함께 장미꽃 추출물을 7.6 g/kg diet 혹은 15 g/kg diet의 양으로 급여하며 12주간 사육하였을 때 햄스터 체내의 지질성분과 대동맥 내에서의 지방의 축적 정도에 미치는 영향을 조사하였다. 실험 결과 장미꽃 추출물은 동맥경화유발식이를 섭취하는 햄스터의 혈중 지질성분을 개선시키는 효과는 없었으나 대동맥궁내에서의 지방의 축적은 어느 정도 경감시키는 효과를 보였다.

7주령의 웅성 F1B golden Syrian 햄스터에게 동맥경화 유발식이와 함께 파인애플 세이지 잎 추출물을 7.6 g/kg diet 혹은 15 g/kg diet의 양으로 급여하며 12주간 사육하였을 때 햄스터 체내의 지질성분과 대동맥 내에서의 지방의 축적 정도에 미치는 영향을 조사하였다. 실험 결과 파인애플 세이지 잎 추출물은 7.6 g/kg diet양으로 급여한 경우에 혈중 중성지질, 총 콜레스테롤 및 non HDL-콜레스테롤치를 약간 감소시키긴 했으나 통계적으

로 유의하지는 않았다. 반면 15 g/kg diet의 양으로 급여한 경우에 오히려 혈중지질성분의 개선효과가 없어서 차후 보충 연구가 필요할 것으로 판단되었다..

7주령의 웅성 F1B golden Syrian 햄스터에게 동맥경화 유발식이와 함께 장미, 파인애플 세이지 및 녹차 추출물을 함유한 타블렛 제품을 6.5% 혹은 13%의 양으로 급여하며 12주간 사육하였을 때 햄스터 체내의 지질성분과 대동맥 내에서의 지방의 축적 정도에 미치는 영향을 조사하였다. 실험 결과 장미, 파인애플 세이지 및 녹차 추출물을 함유한 타블렛 제품은 동맥경화가 유발된 햄스터의 체내 지질대사를 개선시키는 효과가 없는 것으로 나타났다.

시험관내 실험과 동물실험 결과를 종합하여 혈류개선효과가 뛰어난 시료로 라벤더, 로즈마리, 녹차를 선정하였다. 이들을 이용하여 음료, 과립차, 타블렛 및 캔디류 형태의 제품을 개발하였으며 관능검사를 실시한 결과 기호도가 좋은 것으로 나타나 산업적 활용기술을 위한 기반으로의 가능성을 확인하였다.

SUMMARY

I. Title

Selection of food additives improving blood circulation and their application for target foods

II. Objective and Importance

Objective:

The object of this study is to formulate functional materials for blood circulation and to apply them for commercial purpose. Scientific evidence is expected to support the health-claim of the developed products.

Importance:

- It was estimated that the ratio(7.2%) of old people in our population in 2000 will be doubled(14.4%) in 2019. We have not an enough time to treat the problem, if it is considered that a doubling time of the old people was 40-115 years in the developed countries.

- Cancer is a number 1 cause of the Korean death followed by stroke and cardiovascular diseases. This means that the disease related to blood circulation is the major cause of death in Korea. Worse situation is that the patients related to blood circulation was 7 times increased as compared to those in 1980 ' s.

- Ischemic stroke occurs suddenly, accompanying the side-effect or aftereffect including neuropathy. It is well known that the complete recovery from ischemic stroke is impossible. Recently, complementary and alternative medicine attracts an interest as a new approach for the prevention of the disease.

- The first-step approach to prevent ischemic stroke was to remove or reduce the dangerous factors such as hypercholesterolemia, hypertension, and fibrinolysis, etc. The second-step approach was to relieve the side-effect and aftereffect of the disease.

- In the field of functional foods, we tried to screen for plant extracts which could aid the blood circulation. Three criteria of screening *in vitro* was their effect on HMG-CoA reductase inhibitory activities, fibrinolytic activities and ACE inhibitory activities.

III. Range and Scope

- Development of industrial applicable technology
- Determination of food processing acceptability
- Determination of the efficacy in atherogenic animal models

IV. Result

To screen plants which would improve blood circulation, antithrombotic activities, angiotensin converting inhibitory activity and HMG-CoA reductase inhibitory activity of many plant extracts were evaluated *in vitro*. In the first screening assay, lavender, rosemary and green tea extract were selected for candidate materials which were high biological activities, and in secondary assay, rose' flower and pineapple sage leaves were selected.

To evaluate the beneficial effect of the selected candidate materials, 6 kinds of extract were tested in atherogenic hamster models. After hamsters were administered by atherogenic diet for 6 or 12 weeks, their plasma triglyceride, total cholesterol, HDL-cholesterol and non HDL-cholesterol levels were measured. Also, hepatic mRNA expression levels of HMG-CoA reductase and LDL receptor were measured by real-time PCR. Fatty streak lesions on inner surface of hamster's aortic arch were observed by microscope. The groups fed lavender, rosemary or green tea extract were reduced plasma triglyceride, total cholesterol and non HDL cholesterol levels significantly and showed inhibitory effect on aortic lipid deposition. In conclusion, lavender, rosemary or green tea extract showed preventive effects of atherosclerosis by reducing triglyceride and total cholesterol levels in hamster model, and it was

expected to reveal a similar activity in human.

From both *in vitro* and *in vivo* experiment, lavender, rosemary and green tea extract were selected to formulate a functional food. By using the selected plant extracts, beverage, tablet product, granule tea product and candies were developed.

CONTENTS

Summary in Korean	2
Summary in English	7
Chapter 1. Outline of the interest	16
§1. Purpose of the study	16
1. Technical aspect	16
2. Economical, industrial aspect	17
3. Social, cultural aspect	18
§2. Prospect	18
Chapter 2. State of the art	20
Chapter 3. Methods and results	21
§1. Introduction	21
§2. Materials and Methods	27
1. Screening assays for 8 natural products - <i>in vitro</i> test	27
A. Materials	27
B. Methods	27
1) ACE inhibitory activity	27
2) HMG-CoA reductase inhibitory activity	29
3) Fibrinolysis	30
C. Quantitative analysis of the effective constituents	31
1) Rutin	31
2) Catechins	32
3) Resveratrol	34
4) Vitamin C	34
5) Caffeine	35
6) Total flavonoids	36
D. Response surface analysis for optimum mixing ratio of herbs	36
2. Screening assays for 9 herbs - <i>in vitro</i> test	39
A. Materials	39
B. Methods	40

1) ACE inhibitory activity	40
2) HMG-CoA reductase inhibitory activity	42
3) Fibrinolysis	43
C. Data analysis	43
3. Effect of green tea extract, lavender extract and rosemary extract in F1B golden Syrian hamsters	44
A. Materials	44
B. Methods	44
1) Experimental animals and diets	44
2) Collection of blood and organs	46
3) Biological analysis	47
4) Hepatic mRNA level of HMG-CoA reductase and LDL receptor	48
5) Quantification of fatty streak lesions	48
C. Data analysis	49
4. Effect of rose's flowers, pineapple sage's leaves and tablet products in golden Syrian hamsters	49
A. Materials	49
B. Methods	50
1) Experimental animals and diets	50
2) Collection of blood and organs	52
3) Biological analysis	53
4) Hepatic mRNA level of HMG-CoA reductase and LDL receptor	54
5) Quantification of fatty streak lesions	55
C. Data analysis	55
5. Product development of selected herb extracts	55
A. Materials	55
B. Methods	55
1) Drink-type product	55
2) Tablet-type product	55
3) Granule-type product	56
4) Candy-type product	56
§3. Results and Discussion	56
1. Screening assays for 8 natural products - <i>in vitro</i> test	56
A. ACE inhibitory activity	57
B. HMG-CoA reductase inhibitory activity	59

C. Fibrinolytic activity	61
D. Selection of candidate materials	62
E. Quantitative analysis of the effective constituents	63
1) Rutin, Quercetin	64
2) Caffeine	65
3) Resveratrol	65
4) Catechin	66
5) Vitamin C	66
6) Total flavonoids	67
F. Response surface analysis for optimum mixing ratio of herbs	67
2. Screening assays for 9 herbs - <i>in vitro</i> test	73
A. Extraction yield of herbs	73
B. ACE inhibitory activity	77
C. HMG-CoA reductase inhibitory activity	80
D. Fibrinolytic activity	83
3. Effect of green tea, lavender and rosemary in F1B golden Syrian hamsters ..	86
A. Lavender extract	86
B. Rosemary extract	101
C. Green tea extract	115
4. Effect of rose, pineapple sage and tablet in F1B golden Syrian hamsters	129
A. Rose's flowers extract	130
B. Pineapple sage's leaves extract	144
C. Tablet product containing rose, pineapple sage and green tea extract	158
5. Product development of selected herb extracts	171
A. Drink-type product	171
B. Tablet-type product	183
C. Granule-type product	184
D. Candy-type product	185
Chapter 4. Degree of achievement and contribution	189
Chapter 5. Application plans	190
Chapter 6. Informations for international trends	191
Chapter 7. Reference	195

목 차

요 약 문	2
SUMMARY	7
제 1 장. 연구개발과제의 개요	16
1 절. 연구개발의 필요성	16
1. 기술적 측면	16
2. 경제·산업적 측면	17
3. 사회·문화적 측면	18
2 절. 앞으로의 전망	18
제 2 장. 국내외 기술개발 현황	20
제 3 장. 연구개발수행 내용 및 결과	21
1 절. 서 론	21
2 절. 연구내용	27
1. 1차 screening assays - in vitro test	27
가. 실험재료	27
나. 실험방법	27
1) ACE 저해활성	27
2) HMG-CoA reductase 저해활성	29
3) 혈전용해활성	30
다. 성분분석	31
1) Rutin 분석	31
2) 카테킨류 분석	32
3) Resveratrol 함량	34
4) Vitamin C 함량	34
5) Caffeine 함량	35
6) 총플라보노이드 함량	36
라. 추출물의 최적배합비를 위한 Response surface analysis	36
2. 2차 스크리닝 assays - in vitro test	39
가. 실험재료	39
나. 실험방법	40

1) ACE 저해활성	40
2) HMG-CoA reductase 저해활성	42
3) 혈전용해활성	43
다. 통계처리	43
3. 1차 동물실험-녹차, 라벤더, 로즈마리	44
가. 실험재료	44
나. 실험방법	44
1) 실험동물, 식이 및 실험군	44
2) 혈액과 장기의 채취	46
3) 생화학적 검사	47
4) 간장내에서의 HMG-CoA reductase와 LDL receptor의 mRNA level	48
5) 조직학적 검사 - Fatty streak area 측정	48
다. 통계처리	49
4. 2차 동물실험 - 장미꽃 추출물, 파인애플 세이지 잎 추출물 및 장미, 파인애플 세이지와 녹차 추출물을 함유한 타블렛 제품	49
가. 실험재료	49
나. 실험방법	50
1) 실험동물, 식이 및 실험군	50
2) 혈액과 장기의 채취	52
3) 생화학적 검사	53
4) 간장내에서의 HMG-CoA reductase와 LDL receptor mRNA level	54
5) 조직학적 검사 - Fatty streak area 측정	55
다. 통계처리	55
5. 선발된 시료들을 이용한 제품개발	55
가. 공시재료	55
나. 제품개발 방법	55
1) 음료 제품	55
2) 타블렛 제품	55
3) 과립차 제품	56
4) 캔디 제품	56
3 절. 연구 결과	56
1. 1차 screening assays 결과 - in vitro test	56
가. ACE 저해활성	57
나. HMG-CoA reductase 저해활성	59
다. 혈전용해활성	61

라. 말초순환장애 개선을 위한 소재 선발	63
마. HPLC를 이용한 성분분석	64
1) Rutin, Quercetin의 분석 결과	64
2) Caffeine의 분석 결과	66
3) Resveratrol의 분석 결과	66
4) Catechin의 분석 결과	67
5) Vitamin C의 분석 결과	67
6) 총플라보노이드 함량의 분석결과	68
바. 최적배합비 선정을 위한 response surface analysis	68
2. 2차 screening assays 결과 - in vitro test	74
가. 허브류의 추출수율	74
나. ACE 저해활성	78
다. HMG-CoA reductase 저해활성	81
라. 혈전용해활성	84
3. 1차 동물실험 결과 - 녹차, 라벤더, 로즈마리	87
가. 라벤더	87
나. 로즈마리	102
다. 녹차	116
4. 2차 동물실험 결과 - 장미, 파인애플 세이지, 타블렛 제품	130
가. 장미꽃 추출물	131
나. 파인애플 세이지	145
다. 장미, 파인애플 세이지 및 녹차 추출물을 함유한 타블렛 제품	159
5. 음료, 타블렛, 과립차 및 캔디 형태의 제품개발 결과	172
가. 음료 제품	172
나. 타블렛 제품	184
다. 과립차 제품	185
라. 캔디 제품	186
제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	190
제 5 장. 연구개발 결과의 활용계획	191
제 6 장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보	192
제 7 장. 참고문헌	196

제 1 장. 연구개발과제의 개요

1 절. 연구개발의 필요성

1. 기술적 측면

혈액순환이 원활히 일어나지 않을 때 협심증, 심근경색증, 부정맥에 의한 급사, 좌심실 부전이나 울혈성심부전 및 뇌경색 등이 진행될 수 있으며 따라서 혈액순환 장애에 의한 동맥경화증의 발생 및 심화는 많은 질환의 시초라고 할 수 있다. 말초동맥에 혈전이나 지질에 의해서 순환장애가 일어나게 되면 혈액의 공급이 원활하게 일어나지 않기 때문에 허혈현상이 발생하여 손·발 저림 등의 증상이 나타날 수 있다. 말초동맥 순환장애 중 말초동맥폐쇄는 주로 하지동맥에 발생하고 이때는 폐쇄부위 아래에 간헐적인 통증(죄거나 쥐가 나는 듯한)을 보행 등 근육을 쓰는 동안 느끼며, 심한 피로감을 느끼기도 하고, 혈류 장애가 심해지면 쉬고 있을 때에도 통증을 느끼게 된다. 그리고 동맥의 맥박이 약하거나 소실되고, 피부가 차게 느껴지고, 창백하거나 청색을 띄게 되며 그와 동시에 피부가 건조하거나 피부 표면이 매끄럽게 되거나 털이 없어지거나 발톱이 잘 부스러지거나 금이 가며 심하면 피부 표면에 궤양이나 괴사가 생기게 된다. 또한, 복부의 장골동맥이 폐쇄되면 허리를 비롯하여 엉덩이·허벅지 혹은 장단지에 운동에 따른 통증을 느끼게 되며, 성욕 감퇴증을 느끼게 된다.

말초동맥 순환 장애도 동맥경화의 일종이며 따라서 동맥경화에 관한 여러 가지 정보를 이용하여 말초순환 장애 개선 식품 개발에 이용할 수 있다. 말초동맥 순환 장애 및 동맥경화는 흡연, 비만, 운동을 하지 않음 등에 의해서 발생할 수 있으며 부분적으로 치료하여 증상을 호전시킬 수 있는 항목으로는 고지혈증, 고혈당, 고비중지단백 함량 증가 등이 있다.

동맥경화 예방에 좋은 식품으로는 옥소제, 루틴제, 레시틴 등이 있으며 이중 옥소제의 옥소는 요오드와 같은 원소로 옥화물로 해산동물에 포함되어 있으며 옥소를 포함한 해조류가 동맥경화 예방에 좋은 것은 오랫동안 알려져 왔던 민간요법의 하나로, 다시마나 미역, 톳 등이 사용되어 질 수 있음. 옥소를 성분으로 하는 약이 시판되고 있으나 장복 시

혈청 콜레스테롤이 낮아지는 결점이 있다. 루틴제는 뇌출혈의 예방약으로 모세혈관을 정상 상태로 유지시키는 효과가 있다. 루틴은 토마토, 양파 등 30여 종 이상의 식물에 포함되어 있는 담황색의 배당체로 대량으로 사용하면 혈관 보강 및 지혈효과가 있는 것으로 알려져 있다. 레시틴은 콩의 단백질에서 추출한 인지질로 식품의 산화방지제로도 쓰이며 혈청 콜레스테롤 농도를 낮추는 효과가 있다고 알려져 있다.

혈액순환이 원활하지 못할 때 여러 가지 허혈현상이 생기게 된다. 허혈성 심장질환의 치료제로는 항혈소판제, 질산염, 베타-아드레날린 수용체 차단제, 칼슘길항제, ACE 억제제, 고지혈증 치료제, 니트로 글리세린 등을 사용하고 있다. 이중 질산염, 니트로그리세린, 칼슘길항제, 베타-아드레날린 수용체 차단제는 단일 약물로 생각되어지기 때문에 식품학적 접근이 어려우며 따라서 식품 소재를 이용하여 효과를 거둘 수 있는 항혈전작용, 콜레스테롤 저하작용, ACE 억제작용을 검색시스템으로 하여 적합한 식품원료를 선별하여 그 효과를 적절한 방법으로 평가한다면 혈액순환을 개선시키는 기능성식품을 개발할 수 있을 것으로 사료된다. 따라서 말초동맥 순환 장애를 개선할 수 있는 식품선도소재를 탐색하고 동물실험과 인체실험을 통해 효과를 검증한 다음 산업적인 활용도를 개발함으로써 효과에 대해 health-claim을 인정받을 수 있는 건강기능성식품 개발에 이르는 체계적인 연구의 수행이 필요하다.

2. 경제·산업적 측면

미국의 경우, herb 제품 중 은행잎 제품이 판매고 3위를 기록할 정도로 수요가 많으며 (1999년, 6.11%), 독일의 경우 은행잎으로부터 ginkoflavone glycoside(활성분획)를 분리하여 개발한 혈액순환 개선제는 연간 약 20억 달러(약 2조4천억원) 이상의 매출을 보이고 있고, 독일 슈바베社의 경우 혈액순환개선제인 Rokan은 10년간 판매 1위 품목이다. 혈청 콜레스테롤은 허혈성 뇌혈관 질환 및 관상동맥질환의 위험인자로 밝혀졌고, 콜레스테롤을 1% 저하시키면 심장사나 심근경색을 2% 감소, 허혈성 뇌졸중의 발병율을 5배 감소시킬 수 있다고 한다. 현재 각국의 제품별 기능성식품 시장은 건강보조식품(1조 5,000억원, 한국), 건강식품(8,100억엔, 일본), Dietary supplements(130억\$, 미국) 등이며, 전세계의 기능성식품은 1,380억\$의 시장을 형성하고 있는 대형 산업군에 속하고 있을 뿐만 아니라 년 평균 8-11%의 시장 증가율을 나타내고 있다. 70세까지는 암에 의한 사망률이 가장 높으

나 70세 이후에는 동맥경화가 제1의 사망원인이 된다고 한다. 이미 서구의 산업화된 국가들에서는 동맥경화가 사망원인의 수위를 점하고 있으며 근래의 WHO 통계자료에 의하면 2020년에는 전세계적으로 동맥경화가 제1의 사망원인이 된다고 하였다.

근래에 들어 눈에 띄게 많아지고 있는 질환중의 하나가 관상동맥 심장병으로 70년도와 비교할 때 현재 관상동맥심장병의 환자는 10배정도이며 80년대 초와 비교할 때는 7배정도로 폭발적으로 증가하고 있다. 우리나라 통계청의 보고에 의하면 1990년도 초부터 사망원인의 첫 번째가 순환기계 질환으로 암질환을 능가하고 있는 것으로 알려져 있다.

3. 사회·문화적 측면

우리나라 노령인구의 비중이 2000년 7.2%에서 2019년 14.4%로 배가 될 것으로 전망되고 있어, 선진국의 노령인구 배가기간이 40-115년 소요된 것과 비교할 때 우리나라의 경우 노령인구 비중 증가에 따른 대처가능 시간이 너무 짧다. 한국인의 사망원인은 1위 암, 2위는 혈액순환기 계통의 질환이 주요 사망원인의 2, 3위를 차지하고 있으며(2000년 통계청 자료), 혈액순환관련 환자는 80년대 초와 비교할 때 7배 정도로 급증하고 있는 상황이다. 65세 이상의 노인성인구가 급격하게 증가되고 있고, 식생활에서 기인되는 소위 성인병이 단지 노인에만 국한되는 것이 아니고 어린이에게까지 확대되고 있어 의료비와 연금 등 사회복지비의 부담이 날로 가중되고 있다. 이러한 상황에서 혈류를 개선 할 수 있는 식품은 시장성이 매우 좋을 뿐만 아니라 기하급수적으로 늘어가는 의료비 부담을 감소시킬 수 있는 한 가지 해결책이 될 것이다.

2 절. 앞으로의 전망

국내 식품생물자원으로부터 혈류 개선을 유도할 수 있는 건강기능성 선도물질 및 후보물질이 적어도 3종 이상 도출되고, 산업적으로 활용할 수 있는 기초 기술이 축적될 수 있을 것으로 예상된다. 기술적으로는 혈류개선 관련 assay법, 기능성 소재의 究明, 체내 활성 발현기작, 발굴 소재의 改質 등의 기반기술이 축적되고, 경제적으로는 건강기능성 식품 원료의 해외의존도('94-'99 평균치로 약 18% 수준)를 낮추어 외화유출방지에 일부 기여할 것이며, 관련 기술을 향후 산업체에 이전하고 제품화함으로써 순이익 창출이 가능하다. 사회적으로는 효과에 대해 health-claim을 인정받을 수 있는 건강기능성 식품을 개

발함으로써 건강기능성 식품의 효능 및 안정성에 대한 소비자들의 의구심을 해소시키는데 기여할 수 있을 것으로 전망된다.

제 2 장. 국내외 기술개발 현황

1 절. 기술개발 현황

미국 머크연구소의 칼 스페로 박사는 의학전문지 '동맥경화-혈전-혈관생물학' 최신호에 발표한 연구보고서에서 심바스타틴이 심장으로 들어가는 대동맥의 콜레스테롤을 크게 감소시키는 작용을 하는 것으로 보고하였으며 비타민 E와 아스피린도 동맥경화 진행속도를 낮추는 것으로 보고되고 있다. 미국 팬더빌트대학의 맥레이 린턴 박사는 동맥경화에 매우 중요한 역할을 하는 단백질 aP2를 발견했으며 이 단백질을 제거하면 동맥경화 위험이 낮아지는 것으로 동물실험 결과 확인되었다고 보고하였으며 이 단백질은 콜레스테롤의 흡수에 관여하는 것으로 알려져 있다. 이외에도 외국의 경우 콜레스테롤의 합성 저해 및 혈관에서 원활히 제거를 위한 receptor protein에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

또한 국내의 경우 혈전 방지나 혈류 개선에 관한 대부분의 연구들도 실험실적 assay 정도에서 그치고 있는 실정이며, 기능성 소재의 究明, 체내 생리활성 발현기작, 소재의 改質 기반기술이 취약하다. 국내 시판되고 있는 혈액순환제제의 경우도 기능성소재의 단순 복합제 형태이며, 일부 기능성 식품들은 산소접촉에 의한 산화, 갈변 등에 의하여 유용성이 저해되고 식품소재로서의 외형적 가치도 저급한 수준이므로 코팅에 의한 차단막 형성으로 저장안정성을 확보하고 유용성분의 활성을 유지시킬 수 있는 기본 기술뿐만 아니라 활성 소재를 적정 동반 식품(food vehicle)에 적용하여 활용도를 증진시킬 수 있는 가공기술이 요구되나 이에 관한 시도는 미흡한 수준이다.

2 절. 기술도입의 타당성

외국의 경우 말초동맥 순환 장애 및 혈액순환을 개선하는 기능성 식품은 은행잎을 이용한 ginkgo biloba를 이용한 제품이 주를 이루고 있으나 다양한 제품은 없는 것으로 생각된다. 혈액순환에 대한 *in vitro* assay 및 동물실험을 통한 체계적인 실험에 의해서 제품이 생산되었다기보다는 항혈전 활성, 콜레스테롤 제거효과, 고혈압 억제 효과 등의 부분적인 실험의 결과에 의해 제품이 생산되고 있기 때문에 기술도입의 필요성이 없다.

제 3 장. 연구개발수행 내용 및 결과

1 절. 서 론

최근 우리나라는 식생활의 변화로 인해 질병의 양상 또한 급격히 변화하여 비만, 관상동맥질환, 당뇨, 암과 같은 영양과잉이나 영양불균형에서 오는 만성 퇴행성 질환이 지속적으로 증가하였다. 보건복지부가 발간한 '2003 보건복지통계연보'에 따르면 2002년에 인구 10만명 당 암으로 인한 사망자가 131.9명에 달했고 이어 뇌혈관질환(77.2명), 심장질환(36.2명) 등과 같은 혈액순환기계 질환으로 인한 사망자가 주요 사망원인의 2, 3위를 차지하고 있으며 혈액순환관련 환자는 80년대 초와 비교할 때 7배 정도로 급증하고 있다. 이와 더불어 65세 이상의 노인성 인구가 급격하게 증가할 뿐 아니라 식생활에서 기인되는 성인병이 어린이에게까지 확대되고 있어 의료비와 연금 등 사회복지비의 부담이 날로 가중되고 있다.

허혈성 뇌손상은 혈액순환에 의존적인데 뇌로 혈액을 공급하는 혈관에 여러 가지 병리학적 이상이 발생되어 정상적 뇌혈류(50 mL/g/min)의 장애가 초래되면 일과성 뇌허혈증(transient cerebral ischemia)으로부터 완전 뇌졸중(complete stroke)으로 급속히 발전하게 되며, 2003년 우리나라 인구 10만 명당 77.2명이 뇌졸중으로 사망한 것으로 보고되고 있다. 허혈성 뇌졸중은 갑자기 발생하고, 신경학적 이상을 동반하며 단시간내 급격하게 질병의 경과가 진행되어 응급 치료법인 색전용해술에 의해서도 완전 치유가 불가능하며 사망에 이르지 않더라도 부작용 및 후유증이 초래되어 직접, 간접적으로 심각한 사회, 경제적인 손실까지 야기되고 있으므로 예방이 매우 중요하게 인식되고 있다. 허혈성 뇌손상은 주로 혈청 콜레스테롤의 증가, 고혈압, 심장질환 등 혈류량의 변화를 야기 시키는 위험인자들의 제거에 주력하는 일차적 예방과 질환의 발생 후 악화를 예방하는 이차적 예방으로 나누어 볼 수 있는데, 특히 혈류의 개선은 허혈성 뇌졸중을 포함한 혈액순환기계 관련 질환의 예방을 위해서는 필수적으로 연구되어야 한다. 이러한 상황에서 혈액순환기계 질환을 예방하기 위하여 혈중의 콜레스테롤치를 감소시키는 것이 가장 우선이다. 혈청 콜레스테롤은 허혈성 뇌혈관 질환 및 관상동맥질환의 위험인자로 밝혀졌고 콜레스테롤

1%를 저하시키면 심장사나 심근경색을 2% 감소, 허혈성 뇌졸중의 발병률을 5배 감소시킬 수 있다고 한다. 이와 관련하여 약물치료 대신 민간에서 사용하는 허브류를 대상으로 그 효능을 검색하여 식이보조제의 형태로 사용한다면 비용이나 안전성 측면에서 효과적이므로 그 의의가 크다고 할 수 있다.

허브는 오래전부터 약용이나 식용 또는 향을 즐기기 위해 이용되어져 왔다. 오늘날 허브의 용도로는 약용, 관상, 향료, 염료, 요리 및 차 등에 다양하게 사용되어지고 있으며, 전세계적으로 약 2500여종 이상이 알려져 있다. 서구에서 주로 사용되는 허브의 생리활성에 대하여 많은 연구가 보고되었으며 특히 항산화 작용이 매우 큰 것으로 알려져 있다.

마조람(marjoram, *Origanum majorana*)은 이용역사가 가장 오래된 허브 중의 하나로 오한, 소화기능을 높이는 효용이 있어서 식용과 약용 및 화장수로 널리 사용되며 또한 체내의 독소를 배출시키고 고혈압에 효능을 갖는다고 한다. 라벤더(lavender, *Lavandula angustifolia*, *Lavandula vera*, *Lavandula officinalis* Chaix)는 진정작용, 진통과 두통의 해소, 기분전환, 항균작용 등과 함께 고혈압에 효능이 있다고 알려졌으며 임신 중에는 라벤더유를 복용하지 않도록 하고 있다. 딜(dill, *Anethum graveolens* L.)은 국내에서는 서양 자초라 불리며 소화관 평활근의 항경련, 정균 효과를 나타낸다고 하였으며 소화, 구풍, 진정, 최면의 효과가 뛰어나고 동맥경화의 예방에 좋다고 하였다. 중국에서는 시라라고 하며 그 열매를 시라실이라 하여 방향성 구풍제, 거담제, 건위제로 이용하고 있다. 로즈마리(rosemary, *Rosmarinus officinalis* L.)는 약용과 향신료로 주로 사용되는데 강장, 진정, 소화, 수렴의 효과가 있으며 구풍작용, 항균작용이 있다. 특히 두통에 대한 치료효과가 탁월하다고 하며 로즈마리 오일을 외용했을 경우, 피부자극 효과로 혈액순환을 개선시킨다고 한다. 또한 로즈마리는 순환기와 신경조직을 자극하여 강하게 해준다고 하였다. 단 로즈마리의 과용은 금물이며 임신 중의 복용은 절대 피해야 한다고 알려져 있다. 히썬(hyssop, *Hyssopus officinalis* L.)은 국내에서는 우슬초로 불리며 소화촉진, 강장작용, 거담작용, 구풍작용, 진정작용, 발한작용, 이뇨작용, 수렴작용, 진경작용, 진해작용 등을 갖는다고 알려져 있다. 또한 항균, 항바이러스 작용을 하고 약간의 항경련 작용이 있으며 고혈압, 건위작용, 감기예방에 효과가 있으며 정신적 불안감과 가벼운 히스테리에 사용하면

좋다고 하였다. 그러나 한편에서는 임신부와 고혈압 환자의 사용을 삼가는 경우도 있었다. 로즈(rose, *Rosa spp.*)는 다양한 종류가 있는데 일반적으로 그 열매와 꽃잎, 순은 식품의 제조, 가공 시 식품원료로 사용이 허가되어있다. 위장의 효소를 증가시켜 소화를 촉진하며 강신작용이 있다. 혈압을 내리고 콜레스테롤치를 내리는 작용이 있다고 한다. 레몬밤(lemon balm, *Melissa officinalis* L.)은 주로 잎을 식용으로 사용하며 우울증, 신경성 두통, 기억력 저하, 신경통, 발열 등에 효능이 있으며 뇌의 활동을 높여 기억력을 증진시키며 우울증과 노화를 예방하는데도 좋다고 한다. 레몬과 유사한 향이 있는데 이 향은 감정을 편안하게 진정시켜주며 심장 박동수를 낮추어 혈압을 강하시키는 작용을 한다고 하였다. 세이지(sage, *Salvia officinalis* L.)는 셀비어라고도 불리며 다른 이름으로 common sage 혹은 garden sage라고도 불린다. 항박테리아, 진균억제, 바이러스 억제, 수렴제, 분비물 용해제, 발한 억제 효과를 가지고 있다고 하며 동물실험에서 항고혈압과 이담작용이 관찰되었다고 한다. 약용으로는 잎을 삶아서 인후염 및 위장염에 사용하며 방부·항균·항염 등 살균 소독작용이 있고 염증의 소염제로도 이용한다. 또한 중풍이나 심한 운동 뒤의 피로도 씻어준다고 한다. 또한 로즈마리와 마찬가지로 임신 중에는 사용을 금한다고 알려져 있다. 파인애플 세이지(pineapple sage, *Salvia elegans*)는 세이지의 한 종류이며 식용으로 잎이 사용된다. 에키네시아(*Echinacea angustifolia*, *Echinacea pallida*, *Echinacea purpurea*)는 다른 이름으로 purple coneflower로 불리며 평원에 사는 아메리카 원주민들이 가장 많이 사용했던 약용식물이다. 최근 유럽에서의 연구조사에 따르면 이 식물의 성분이 발암물질을 억제하고 항생 및 소염제 역할을 하며 상처를 낫게 해주는 효과가 있다는 사실이 밝혀졌다. 또한 면역체계를 강화해주는 효과가 있어서 미국과 유럽에서는 콘플라워를 원료로 제조된 감기약과 독감약이 시판되고 있다.

마지막으로 녹차는 처음 전래될 때부터 만병통치약으로 알려진 녹차에는 특히 건강에 이로운 성분이 많다. 고혈압, 당뇨 등의 성인병 예방에서 다이어트에 이르기까지 녹차의 효능은 일일이 꼽을 수 없을 정도로 다양하다. 녹차의 성분은 카페인, 테아닌, 타닌 세키세놀과 특유한 향기 성분 등이다. 색소에 관계되는 성분은 엽록소, 카로티노이드 등이 많다. 많이 함유되어 있는 항산화물질 폴리페놀은 항암 효과가 있다. 녹차가 지방암, 폐암 등 몇 가지 질병의 진행을 방지해 주는 효과가 있고, 파킨슨병 예방에도 도움이 된다.

녹차의 효능으로는 먼저 동맥경화와 고혈압 예방 효과가 있다. 콜레스테롤이 심장질환이나 동맥경화, 고혈압 등의 질병과 밀접한 관련이 있다는 사실이 널리 알려짐에 따라 콜레스테롤은 건강에 나쁜 영향을 주는 위험한 물질로 간주되고 있다. 그러나 건강한 사람의 혈액 중에도 어느 정도 함유되어 있고 지방의 흡수에 필요한 담즙산이나 호르몬, 비타민D의 전구 물질로서 생명현상유지에 없어서는 안될 중요한 물질 중 하나가 바로 콜레스테롤이다. 문제가 되는 것은 콜레스테롤 중 LDL콜레스테롤이 필요 이상으로 많아지면 동맥혈관 벽에 부착되어 혈관이 더욱 좁아지고, 혈액의 흐름이 힘들어지기 때문에 고혈압의 원인으로 작용하는 것이다. 더욱 심각한 것은 혈관 내벽에 부착된 콜레스테롤이 여러가지 변화를 받아 혈관 조직과 함께 딱딱하게 굳어지는 동맥경화를 유발하는 원인이라는 점이다. 이를 방지하기 위해서는 혈중의 LDL콜레스테롤의 상승을 억제하는 것이 중요한데, 녹차의 떫은 맛을 내는 탄닌의 주된 구성 요소인 여섯 가지 카테킨(catechin) 성분에 이러한 작용이 있는 것으로 밝혀졌다. 카테킨을 꾸준히 섭취하면 혈장 및 간장 콜레스테롤 농도의 상승을 억제하고, 대변으로 체외 배출을 촉진한다는 것이다. 또한 카테킨에는 혈압 상승 작용을 하는 안지오텐신 II의 생성효소를 저해하는 성분이 있어서 고혈압을 예방하는 데 효과적이라는 사실이 밝혀졌다. 다음은 알코올과 담배 해독·해소작용이다. 술을 많이 마실 경우에 녹차를 함께 마시면 차에 함유된 다양한 성분에 의해 숙취가 해소된다. 이는 녹차 중의 카테킨과 비타민C, 아스파라긴산, 알라닌이라는 아미노산 성분이 알코올 분해 효소의 작용을 도와 알코올의 분해를 촉진하기 때문이다. 술 마시고 난 후의 두통과 같은 숙취 해소에도 효과적이다. 또한 카테킨 성분이 담배의 발암물질을 억제하는 작용을 하는 것으로 연구 결과 밝혀지고 있다. 일본인의 담배소비량이 미국인에 비해 월등히 많은데도 폐암에 의한 사망률은 미국인보다 훨씬 낮은 이유가 녹차소비량과 관계가 있다는 주장이 학계에서 주목받고 있다. 세 번째는 환경호르몬의 체외 배설 촉진 효과이다. 녹차가 최악의 맹독성 물질로 알려져 있는 다이옥신의 흡수를 억제하고 배설을 촉진하는 효과를 가지고 있다는 사실이 일본 학자에 의해 밝혀졌다.

녹차의 식이섬유가 다이옥신을 흡착하여 소화기 내에서 흡수되는 것을 막고 변으로 배설시키는 한편, 클로로필 성분이 다이옥신과 결합, 복합체를 형성하여 소화관의 다이옥신 흡수를 막기 때문이라고 보고 있다. 네 번째는 급격한 혈당치 상승을 억제해 당뇨병을 완화 하는 효과이다. 당뇨병에 걸리면 혈당치가 급격히 상승되지 않도록 인슐린을 투여하고

적당한 식사를 하는 것이 가장 중요하다. 최근 녹차에 함유된 다당체 성분이 인슐린 합성을 촉진하고, 카테킨 성분은 당질의 소화흡수를 지연하는 작용을 함으로써 포도당이 혈액으로 흡수되는 것이 늦어져 급격한 혈당치의 상승을 억제하는 것으로 밝혀졌다. 또한 일본의 연구팀들은 녹차추출액이 혈당강화작용을 한다는 사실과 녹차에서 분리한 다당류 성분을 첨가한 녹차드링크가 당뇨병의 합병증으로 발생하는 제반 증상을 크게 감소시킨다는 사실을 알아내었다. 다섯 번째는 높은 살균력으로 주방 위생에도 효과적이라는 점이다. 녹차에는 매우 강력한 살균 효과가 있어서 대표적인 식중독균인 포도상구균, 장염비브리오균, 황색 포도상구균, 콜레라균 등에 대해서는 보통차를 마시는 농도보다 낮은 농도에서도 살균할 수가 있다. 하지만 우리 몸속에서는 정상작용을 하여 장 내의 비피더스균에 대해서는 오히려 생육을 도와주는 역할을 해준다. 여섯 번째는 무칼로리 기호 음료로 다이어트에 효과가 있다는 사실이다. 녹차는 열량을 지닌 성분이 거의 없는 무칼로리 음료로 체중 조절에 이상적이라고 할 수 있다. 특히 녹차를 마시고 운동하면 지방이 에너지원으로 먼저 사용되므로 효과적으로 지방을 줄일 수 있다. 이러한 지방축적 억제 효과는 카테킨 성분의 콜레스테롤이나 중성 지질의 감소 효과와 함께 나타나므로 훨씬 좋은 다이어트 결과를 가져오는 것으로 알려져 있다. 이밖에도 충치 예방, 입냄새 제거 효과 등도 알려져 있다.

식품의약품안전청의 원료분류표에는 식품에 주원료로 사용가능한 동식물의 목록을 수재하고 있으며 본 연구에 사용된 마조람, 라벤더, 딜, 히솝, 장미, 레몬밤, 세이지 등 7종의 허브류는 모두 주원료로서 사용이 가능한 동식물로 분류되었다. 로즈마리는 식품공전 원재료분류표에 향신식물로 분류되어 있다. 에키네시아는 식규 61110-664의 민원회신에 따르면 임산부는 결핵 및 자가면역 등의 질환을 가진 사람은 사용 자제토록 권고하고 있는 등 식품원재료로서의 안전성과 건전성이 입증되지 않아 1998년 현재로서는 식품원료로 사용할 수 없다고 하였다.

햄스터는 지단백질 대사와 동맥경화증에 대한 약물과 식이의 영향에 관한 연구에 가장 많이 사용되는 동물모델중의 하나이다. Bravo 등의 보고에 의하면 햄스터의 지단백질의 profile은 다른 흰쥐나 생쥐에 비해 인간의 지단백질 분포와 가장 흡사한 것으로 알려져

있다. 또한 Nistor 등은 햄스터가 동맥경화증에 매우 민감하게 반응한다고 하였으며 특히 햄스터에게 식이로 유도된 동맥경화증은 인간에게서 일어나는 것과 유사하게 진행된다고 하였다. Rein 등은 동맥경화유발 햄스터 모델은 간단한 광학현미경을 이용한 대동맥의 지방축적정도를 측정하여 식품의 동맥경화 예방 효과를 평가하는데 유용하게 사용될 수 있다고 보고하였다. 국내에서는 아직 golden Syrian 햄스터 모델을 이용하여 고지혈증이나 고콜레스테롤혈증의 개선효과를 관찰한 보고는 거의 없는 실정이다.

기존 database 및 자료조사로부터 천연물을 포함한 식품생물자원의 활성물질을 조사하고 주 활성물질의 관능기 분석(functional group analysis), 정량적 구조활성관계(QSAR), 물리화학적 성질 등을 고려하여 시료를 선별하고자 하였다. 선별된 시료에 대해 시험관내 혈전용해활성, 항고혈압 활성 및 콜레스테롤 생합성에 관여하는 효소중 율속효소인 HMG-CoA reductase에 대한 저해활성을 검토하여 3종 이상의 후보 추출물을 도출하고자 하였다. 말초혈관 순환장애 개선을 위한 식품소재의 선별은 각종 문헌과 인터넷 조사를 통해서 순환기계 질환에 효능이 알려져 있는 허브류와 천연물들을 대상으로 하여 실험하였다. 1차 스크리닝 대상인 허브와 천연물은 lavender flowers extract, rosemary extract, rose extract, green tea extract, grape leaf extract, buckwheat water extract, ginkgo bilobae extract, red ginseng extract로 8종이며 2차 스크리닝 대상은 마조람, 라벤더, 달, 로즈마리, 히습, 로즈, 레몬밤, 파인애플 세이지 및 에키네시아 등 9종으로 모두 17종의 천연물과 허브류의 angiotensin I converting enzyme(ACE) 저해활성, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase 저해활성 및 혈전용해활성을 측정하였다. 1년차 연구에서 효과가 뛰어났었던 buckwheat extract, grape leaf extract, green tea extract, lavender extract, rosemary extract의 rutin, quercetin, caffeine, resveratrol, catechin 및 vitamin C의 함량을 분석하여 비교하였다. 또한 라벤더, 로즈마리, 녹차추출물을 가지고 반응표면분석을 실시하여 최적의 배합비를 도출해내어 시험관 모델을 확립하고자 하였다.

In vitro test의 결과를 토대로 활성이 뛰어난 각각 3종의 추출물을 선정하여 동물실험을 실시하여 생체내에서의 작용을 관찰하고자 하였다. 먼저 in vitro test에서 다양한 천

연물들의 혈액순환기능과 관련된 생리활성으로 HMG-CoA reductase 저해활성과 ACE 저해활성을 검색하여 효능이 우수한 녹차, 라벤더, 로즈마리 추출물을 선발하여 1차 동물 실험시료로 하고 장미, 파인애플 세이지 및 이들을 함유한 타블렛 제품을 2차 동물실험 시료로 선정하였다. F1B golden Syrian 햄스터를 동맥경화 유발식이에 각 시료를 실험기간동안 급여하여 햄스터 체내의 지질성분과 대동맥 내에서의 지방의 축적 정도에 미치는 영향을 조사하고자 하였다.

시험관내 실험과 동물실험을 통해 효능이 우수한 녹차, 로즈마리 및 라벤더 등 3종의 시료를 선발하였다. 이를 이용하여 음료, 타블렛, 과립차 및 캔디 등의 제품개발에 응용하고자 하였다.

2 절. 연구내용

1. 1차 screening assays - in vitro test

가. 실험재료

말초동맥 순환장애 개선에 효과가 있다고 알려져 있는 총 8가지의 천연물을 대상으로 실험하였다. 3종의 허브류 중에서 로즈마리와 라벤더는 액상의 추출물 상태로 된 것을 시중에서 구입하여 동결건조 후 분말로 하여 시료로 사용하였고 로즈 추출물은 49.2° brix 인 농축액 상태의 시료를 구입하여 사용하였다. 녹차추출물, 포도잎 추출물, 은행 추출물은 상업적으로 분말화된 것을 구입하여 사용하였으며 홍삼 추출물도 상업적으로 추출된 것으로 64° brix의 농축액을 구입하여 사용하였다. 메밀추출물은 직접 통메밀을 구입하여 냉침추출하였으며 농축한 후에 동결건조 후 분말로 하여 사용하였다. 로즈 추출물을 제외한 모든 시료는 분말로 하여 실험에 사용하였다.

나. 실험방법

1) ACE 저해활성

고혈압이 발생하는 기작에서 renin-angiotensin system이 혈압조절에 매우 중요한 역할

을 한다. Angiotensin-converting enzyme(ACE)은 angiotensin I에서 angiotensin II를 합성하는 마지막 단계에 관여하는 효소이다. Angiotensin II는 A-II 수용체와 결합하여 직접 동맥과 소동맥을 수축시키고 부신피질을 흥분시켜 알도스테론의 유리를 촉진시켜 결과적으로 혈압의 증가를 가져온다. 따라서 ACE 저해물질은 ACE의 활성을 억제함으로써 고혈압을 직접적으로 억제할 수 있다.

ACE 저해 활성의 측정은 Cushman and Cheung의 spectrophotometric assay of angiotensin-converting enzyme 방법을 응용하여 측정하였다. 먼저 효소원을 준비하기 위해서 rabbit lung acetone powder 10 g을 50 mM potassium phosphate buffer 100 mL에 충분히 섞어준 후에 40,000 g에서 40 분간 원심분리한다. 원심분리된 상층액은 활성이 매우 높고 5 °C에서 한달간 보관이 가능한 angiotensin converting enzyme의 효소원이 된다.

0.25 mL assay mixture(100 mM potassium phosphate buffer pH 8.3, 300 mM NaCl, 5 mM HHL, 0~10 mU enzyme 0.15 mL)를 30 분간 37 °C에서 반응시킨다. 이때 assay mixture에서 시료구에는 시료를 60 µL를 첨가하고 대조구에는 시료대신 증류수를 동량으로 첨가한다. 여기서 사용된 시료는 0.1%와 0.01% 수용액을 사용하였다. blank로는 효소원을 첨가하기 전에 먼저 0.25 mL HCl을 첨가하여 반응을 정지시킨 후 효소원을 첨가한다. 반응을 끝낸 후 0.25 mL 1 N HCl을 첨가하여 반응을 정지시키고 1.5 mL ethyl acetate를 넣어준 후에 15초간 잘 섞어 2800 rpm에서 15 초간 원심분리하여 ethyl acetate 층을 분리한다. 분리한 ethyl acetate 1 mL을 tube에 담은 후 120 °C oil bath에서 15분간 증류 건조시킨다. 건조가 끝나면 1 내지 2 mL 증류수에 다시 녹이고 228 nm에서 흡광도를 측정한다.

$$\text{ACE inhibition activity (\%)} = \left[1 - \frac{(S-SB)}{(C-CB)} \times 100 \right]$$

이때 효소 1단위는 37 °C에서 1 분간 HHL에서 hippuric acid 1 µM을 생산하는 활성으로 하였으며 이때 대조구의 활성은 100 %로 간주하였다.

ACE 저해활성 측정을 위해 사용된 시료는 모두 10 mg/mL의 농도로 증류수에 용해한

후 0.45 μm syringe filter로 여과한 후에 10배씩 순차적으로 희석하여 사용하였으며, IC_{50} value는 Least Square method를 사용하여 계산하였다.

2) HMG-CoA reductase 저해활성

Cholesterol은 체내에 약 140 g이 존재하며 이중 7% 이하가 혈장에 분포되어 있다. 체내 총 cholesterol 중 매우 작은 부분에 속하는 혈장 cholesterol은 심근경색, 뇌혈전 및 동맥경화 등과 같은 순환기계 성인질환의 발생과 밀접하게 관련되어 있다. 성인에 있어 하루 체내에 생합성 되는 cholesterol량은 체중 kg당 9~11 mg 정도로, 식사로 공급되는 외인성 양보다 훨씬 더 많아 내인성 cholesterol 함량을 조정하는 것이 중요하다. 혈중 cholesterol 함량을 낮출 수 있는 방법은 간에서 cholesterol 합성에 관여하는 효소 중에서 HMG-CoA reductase의 activity를 저해 하는 것으로서 lovastatin, simvastatin pravastatin 등이 큰 시장을 형성하고 있으나 값이 너무 고가이며 장기 복용시 일부 부작용이 있다고 알려져 있다. 따라서 독성이 없고 안전한 식품소재를 대상으로 활성 저해제 조성물을 개발한다면 그 의의가 크다고 할 수 있다.

HMG-CoA reductase 저해활성의 측정은 Kleinsek 등의 방법에 따라 먼저 효소원을 조제하였다. 실험동물은 4주령의 SD계 숫컷 흰쥐를 일주일간 예비사육하여 사육실 환경에 적응시킨 후에 AIN-76 diet를 주어 7일간 사육하였다. 사육이 끝난 흰쥐는 밤 11시에 해부하여 간을 적출하여 무게를 측정하였다. 적출한 간은 ice cold buffer A(50 mM phosphate buffer, pH 7.0 with sucrose 0.2 M, dithiothreitol 2 mM)에 rat liver 1g당 2 mL을 첨가한 후 Potter Elvehjem type glass homogenizer로 15초간 full speed로 균질화한 다음 15,000 g에서 10분간 원심분리하였다. 상등액은 다시 100,000 g에서 75분간 초원심분리하여 상등액을 버리고 흰색의 지방층을 제거하였다. 얻어진 microsome pellet은 buffer A(containing 50 mM EDTA)를 rat liver 1 g당 1 mL씩 첨가하여 세척하고 100,000 g에서 60분간 원심분리 한 다음 상등액은 버리고 -20°C 에서 보관하였다.

-20°C 에서 최소 2시간에서 수주간 보관되었던 microsome pellet을 실온에서 해동시킨 후에 buffer B(50 mM phosphate buffer, pH 7.0 with sucrose 0.1 M, dithiothreitol 2 mM, KCl 50 mM, EDTA 30 mM)을 3 mL/1.5 rat liver을 가하여 균질화 하였다. 다시

같은 buffer를 7 mL/1.5 rat liver 첨가한 후에 상온에서 15~30분을 방치한 다음 100,000 g, 20 °C에서 60분간 초원심분리하여 상등액을 효소원으로 하였고 사용할 때 까지 -70 °C에서 보관하였다.

HMG-CoA reductase 활성의 측정은 1 mL cuvette에 시료 20 µL(control은 DMSO 20 µL), 0.5 µM phosphate buffer(pH 7.0), 20 mM DTT 100 µL, 3 mM NADPH 100 µL, 효소원 100 µL를 넣었다. 반응액의 온도는 37°C로 일정하게 유지하여 약 10 분간 preincubation 한 후에 HMG-CoA(3 mM)을 100 µL를 가하여 효소반응을 시작하였다. 340 nm에서 5분간의 흡광도 변화를 기록하였다. HMG-CoA reductase의 억제활성은 다음 식에 의하여 계산하였다.

$$\text{HMG-CoA reductase inhibition rate (\%)} = 1 - \frac{T}{C} \times 100$$

T : sample의 흡광도의 변화

C : blank의 흡광도의 변화

3) 혈전용해활성

생체내의 혈액은 응고와 용해작용이 항상 평형을 이루고 있으며 정상적으로 순환되고 있을 때에는 혈전이 생성되지 않는다. 여러 가지 원인으로 균형이 깨져 혈전이 생성되면 혈관이 막히게 되어 혈액 순환이 방해되어 영양분과 산소공급에 영향을 끼쳐 심부전증이나 심장질환 등의 혈전증(thrombosis)으로 사망하게 된다. 이와 같은 혈전형성을 방지하기 위해 혈소판응집을 억제하거나 혈전을 용해할 필요가 있고 그 역할을 하는 항혈소판제제, 즉 혈소판 활성화 억제제 등 항혈전제가 요구된다. 그리고 일단 형성된 혈전은 쉽게 용해되지 않지만, 섬유소 및 혈전 축소 기능을 갖는 혈전용해제를 사용함으로써 혈전으로 유발되는 질병의 예방 및 치료가 가능하다.

본 실험에서는 여러 가지 가능성이 있는 식품소재를 대상으로 혈전용해활성을 알아보

기 위해 Fayek 등과 Kim 등의 방법을 수정하여 *in vitro* test로 fibrin에 대한 분해정도를 측정하여 혈전용해능을 측정하였다.

Fibrin을 0.6 %(w/v)의 농도로 제조하기 위해 1 N NaOH 용액에 fibrin을 녹인 후 6 M의 HCl로 pH를 7.4에 맞추어 주고 증류수에 담그어 18시간동안 투석하여 fibrin 용액을 만든다. 준비된 fibrin 용액 3 mL에 시료용액 500 μ L를 첨가하고 40 $^{\circ}$ C에서 10 분간 반응시킨다. 여기서 시료용액은 말초순환장애 개선에 효과가 있다고 알려져서 선정된 8가지의 식품소재로써 5% 농도로 증류수에 녹여 사용하였다. 반응이 끝난 후 0.4 M TCA 용액 3 mL을 첨가하여 반응을 정지시킨 후 3500 rpm에서 15 분간 원심분리하여 상등액만 분리해낸다. 상등액 중에서 용출된 tyrosine의 양을 측정하기 위하여 1 N Folin 시약 0.5 mL을 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 방치하고 이때 다시 침전물이 생긴다면 원심분리를 한번더 실시한 다음 상등액의 흡광도를 660 nm에서 측정하고 tyrosine 표준곡선에 의하여 분해 용출된 tyrosine의 양을 산출하여 혈전용해활성을 알아내었다. 효소 1 unit는 조효소액 1 mL이 1분 동안 tyrosine 1 μ g을 생산하는 활성으로 설정하였다.

다. 성분분석

성분분석에 사용된 시료 중에서 buckwheat extract는 봉평농협에서 구입한 통메밀을 열수추출하여 동결건조한 분말을 시료로 하였고, grape leaf extract, green tea extract, lavender extract, rosemary extract는 삼정향료(주)에서 상업적으로 만들어진 것을 구입하여 사용하였다.

1) Rutin 분석

각 시료의 루틴 함량은 Ohara등의 방법을 응용하여 HPLC로 분석하였다. 즉, 시료 1 g에 메탄올 20 mL를 가한 다음 80 $^{\circ}$ C 수욕조에서 1시간 동안 환류 냉각 추출한 후 냉각하였다. 냉각된 추출용액을 여과지(Whatman No. 41)로 여과한 후 50 mL로 정용하고 즉시, millipore filter(pore size 0.45 μ m)로 여과하여 그 여액을 HPLC에 injection 하였다. 이때 사용한 HPLC(Jasco 851-AS, Japan) 분석조건은 다음의 Table 1과 같았다.

Table 1. Operating condition of HPLC for rutin.

Instrument	: Semi μ -HPLC(Jasco 851-AS, Japan)
Detector	: Variable UV/VIS Detector
Wave length	: 350 nm
Column:	ODS Column(Capcellpak AU 80.5 μ m, 4.6 mm Φ X 250 mm)
Solvent:	2.5% Acetic acid : Methanol : Acetonitril = 35:5:10(V/V/V)
Oven Temp.	: 30 $^{\circ}$ C
Injection Vol.	: 20 μ L
Flow Rate	: 1 mL/min

2) 카테킨류 분석

시료의 카테킨류(EGC, EC, EGCG 및 ECG)의 함량은 Ikegaya 등의 방법을 약간 변형하여 Fig. 1과 같이 시료를 전처리한 후 HPLC로 동시 분리·정량하였다. 카테킨류 혼합용액 표준용액은 메틸알콜 : 물 : 0.2 M 인산완충액 (pH 3.0)을 3:15:2로 용해하여 EGC, EC, EGCG 및 ECG가 각각 100, 100, 100 및 200 ppm이 되도록 조제하였다. 시험용액 및 혼합표준용액을 각각 10 μ L씩 HPLC에 주입하였으며 Peak 면적법으로 계산하였다. 이때 사용한 High performance liquid chromatograph (Jasco 851-AS, Japan)의 조건은 칼럼 : Capcellpak C18 UG120 5 μ m, 4.6 mmX250 mm, 이동상 : Acetonitrile:Acetic acid:Methanol:H₂O = 113:5:20:863, 유속 : 0.5 mL/min, 검출기 : UV, 280 nm이었다.

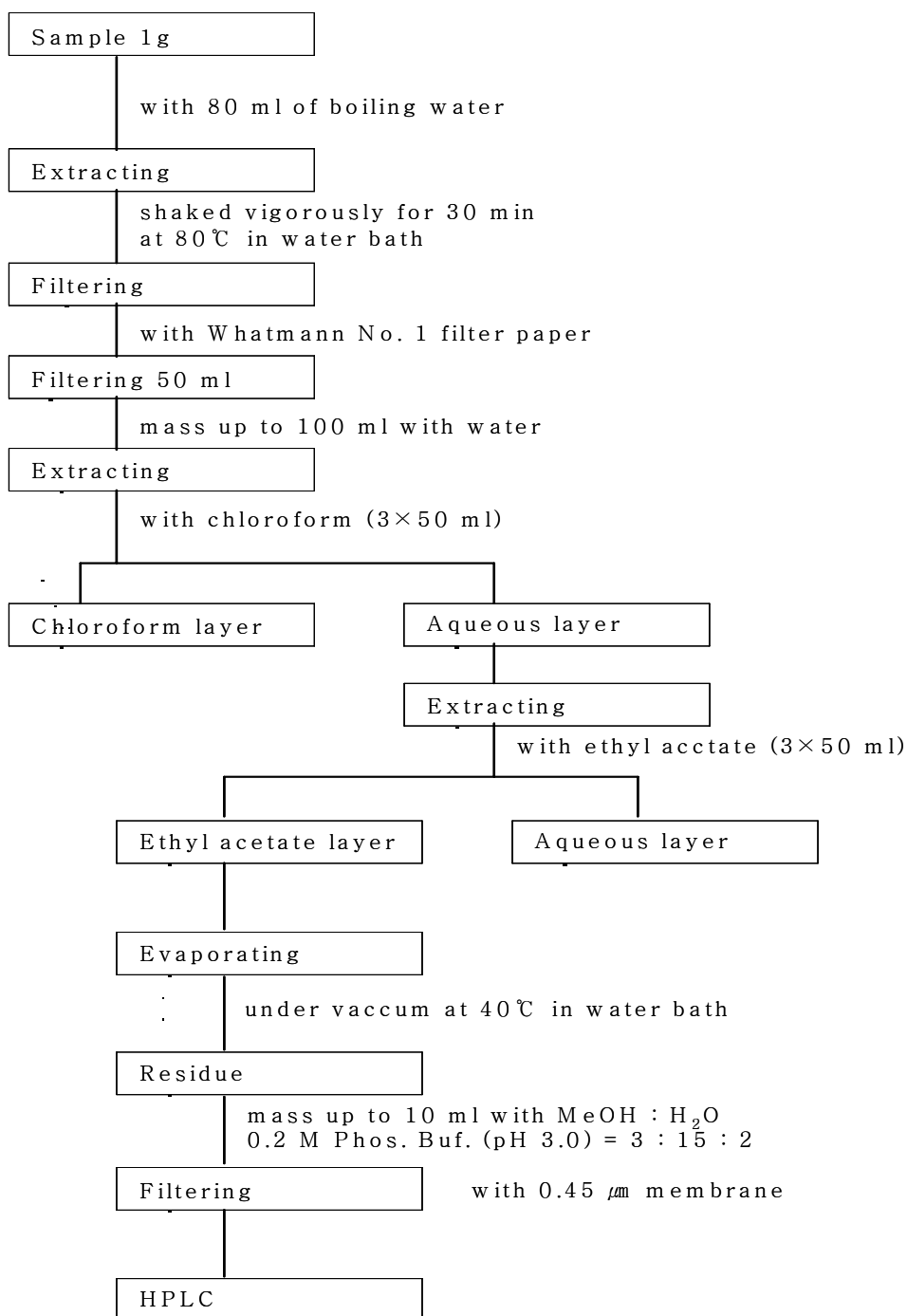


Fig. 1. Flow sheet for the analysis of catechins

3) Resveratrol 함량

각 시료의 resveratrol 함량은 HPLC로 분석하였다. 시료를 이동상으로 용해하여 millipore filter (pore size $0.45\mu\text{m}$)로 여과하여 그 여액을 HPLC에 injection 하였다. 이때 사용한 HPLC (Jasco 851-AS, Japan) 분석조건은 아래의 Table 2와 같았다.

Table 2. Operating condition of HPLC for Resveratrol.

Instrument	: Semi μ -HPLC (Jasco 851-AS, Japan)
Detector	: Variable UV/VIS Detector
Wave length	: UV 320 nm
Column:	ODS Column(Capcellpak AU 80 $5\mu\text{m}$, $4.6\text{ mm}\Phi$ X 250 mm)
Solvent:	MeOH : Water = 40 : 60
Oven Temp.	: 30°C
Injection Vol.	: 20 μL
Flow Rate	: 0.8 mL/min

4) Vitamin C 함량

각 시료의 Vitamin C 함량은 HPLC로 분석하였다. 시료를 이동상으로 용해하여 millipore filter (pore size $0.45\mu\text{m}$)로 여과하여 그 여액을 HPLC에 injection 하였다. 이때 사용한 HPLC(Jasco 851-AS, Japan) 분석조건은 Table 3와 같았다.

Table 3. Operating condition of HPLC for vitamin C

Instrument	: Semi μ -HPLC (Jasco 851-AS, Japan)
Detector	: Variable UV/VIS Detector
Wave length	: UV 270 nm
Column	: ODS Column(Capcellpak AU 80 5 μ m, 4.6 mm Φ X 250 mm)
Solvent	: 100% Water with Pic B ₇ 5 mM
Oven Temp.	: 30 $^{\circ}$ C
Injection Vol.	: 20 μ L
Flow Rate	: 1 mL/min

5) Caffeine 함량

각 시료의 Caffeine 함량은 HPLC로 분석하였다. 시료를 80 $^{\circ}$ C의 증류수로 용해하여 millipore filter (pore size 0.45 μ m)로 여과하여 그 여액을 HPLC에 injection 하였다. 이때 사용한 HPLC (Jasco 851-AS, Japan) 분석조건은 아래와 Table 4과 같았다.

Table 4. Operating condition of HPLC for Caffeine.

Instrument	: Semi μ -HPLC (Jasco 851-AS, Japan)
Detector	: Variable UV/VIS Detector
Wave length	: UV 254 nm
Column	: ODS Column(Capcellpak AU 80 5 μ m, 4.6 mm Φ X 250 mm)
Solvent: MeOH : Water	= 30 : 70
Oven Temp.	: 30 $^{\circ}$ C
Injection Vol.	: 20 μ L
Flow Rate	: 1 mL/min

6) 총플라보노이드 함량

시료 중의 총플라보노이드 함량분석은 식품공전의 분석법에 준하여 실험하였다. 즉, 시료 0.5 g을 칭량하고 90% 에탄올 20 mL를 가해 용해, 원심분리(3,000 rpm, 10 min)를 실시한 후 상등액을 취하고 잔류물을 80% 에탄올 8 mL로 3회 추출하고 전추출액을 합하여 80% 에탄올을 사용하여 전량을 50 mL로 하여 시험용액으로 하였다. 시험용액 0.5 mL를 시험관에 취하여 에탄올 1.5 mL, 10% 질산알루미늄용액 0.1 mL, 1M 초산칼륨용액 0.1 mL, 물 2.8 mL를 가하여 충분히 교반한 후, 실온에서 40분간 정치 한 후 액층을 cell을 사용하여 물을 대조액으로 하여 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 검량선 작성은 quercetin을 무수물로 혼합하여 50 mg을 정확히 달아 에탄올에 넣어 용해하고 정확히 50 mL가 되게 한다. 이 용액에 에탄올을 가하여 100, 20, 10배로 희석하고 0.01, 0.05, 0.1 mg/mL의 각 표준용액을 조제하고 상기 조작에 준하여 흡광도를 구하여 검량선을 작성하였으며, 각각의 농도마다 공시험을 실시하였다. 시료의 흡광도로부터 별도로 상기 조작 중 질산알루미늄용액 대신 물 0.1 mL를 가한 것의 흡광도를 뺀 흡광도 차를 이용하여 검량선에 의거 총플라보노이드 a mg/mL를 산출하였다.

$$\text{총플라보노이드 함량(w/w \%)} = a \text{ mg/ml} \times \frac{50 \text{ mL}}{\text{검체채취량(g)} \times 1,000(\text{mg})} \times 100$$

라. 추출물의 최적배합비를 위한 Response surface analysis

1차년도 연구의 *in vitro* test에서 선발된 시료 3종인 lavender, rosemary, green tea extract의 최적배합비를 선정하기 위해 반응표면분석법을 실시하였으며 중심합성설계법을 사용하여 실험을 계획하였다. 각 시료의 배합조건은 lavender extract의 첨가량 (X_1), rosemary extract (X_2)의 첨가량 및 green tea extract (X_3)의 첨가량이었으며, 이들 독립 변수들은 -2, -1, 0, 1, 2의 5단계로 부호화하여 Table 5에 나타내었다.

Table 5. Levels of composition conditions in experimental design for RSM

Xi	Composition conditions	Levels				
		-2	-1	0	1	2
X ₁	LV ¹⁾ (mg/3ml D.W.)	0	4	8	12	16
X ₂	RM ²⁾ (mg/3ml D.W.)	0	4	8	12	16
X ₃	GT ³⁾ (mg/3ml D.W.)	0	4	8	12	16

1) LV : lavender extract

2) RM : rosemary extract

3) GT : green tea extract

배합물의 품질특성에 관련된 종속변수 (Y)로는 HMG-CoA reductase 저해활성을 측정하여 사용하였다. 아래 Table 6의 실험 계획에 따라 각 조건별로 시료를 배합하고 배합한 시료로 HMG-CoA reductase 저해활성(%)를 측정하고 실험결과의 반응표면분석을 위하여 SAS(statistical analysis system) program을 이용하였다. 이를 이용하여 1차년도에서 선발된 소재에 대한 최적 배합비를 선정하였다.

Table 6. Experimental design of RSM

Exp No.	Variables		
	LV ¹⁾ (mg/3ml)	RM ²⁾ (mg/3ml)	GT ³⁾ (mg/3ml)
1	4(-1)	4(-1)	4(-1)
2	4(-1)	4(-1)	12(1)
3	4(-1)	12(1)	4(-1)
4	4(-1)	12(1)	12(1)
5	12(1)	4(-1)	4(-1)
6	12(1)	4(-1)	12(1)
7	12(1)	12(1)	4(-1)
8	12(1)	12(1)	12(1)
9	8(0)	8(0)	8(0)
10	8(0)	8(0)	8(0)
11	0(-2)	8(0)	8(0)
12	16(2)	8(0)	8(0)
13	8(0)	0(-2)	8(0)
14	8(0)	16(2)	8(0)
15	8(0)	8(0)	0(-2)
16	8(0)	8(0)	16(2)

1) LV : lavender extract

2) RM : rosemary extract

3) GT : green tea extract

2. 2차 스크리닝 assays - in vitro test

가. 실험재료

실험에 사용된 9종의 허브는 홍천의 허브농장에서 건조되지 않은 것으로 구입하였다. 9종의 허브 중에서 라벤더, 로즈마리 및 파인애플 세이지는 잎과 줄기를 분리하고 허쉬은 꽃과 잎을 같이 모으고 줄기를 분리하였다. 마조람, 딜 및 레몬밤은 줄기와 잎을 같이 사용하고, 로즈는 꽃부분을 사용하였으며 에키네시아는 꽃, 줄기, 잎을 다함께 사용하였고 이는 Table 7에 나타내었다. 이렇게 분리한 허브는 완전히 마를 때까지 음건하고 분쇄기로 분쇄하였다. 분쇄된 분말은 각각 물과 70% 에탄올을 용매로 하여 1:20의 비율로 희석하여 3시간동안 100 °C에서 추출하였다. 추출액은 와트만 여과지 No. 42로 여과한 후에 감압농축하여 동결건조한 후 분말로 하여 실험시료로 사용하였다. 분말로 된 시료를 실험에 사용하기 위해 필요한 농도별로 물추출물은 증류수에 녹이고 70% 에탄올 추출물은 DMSO에 녹인 후 0.45 μm syringe filter로 여과하여 본 실험에 사용하였다.

Table 7. List of herbs for assays on biological activities.

No	Sample Name	Scientific Name	Used Parts	Edible
1	marjoram	<i>Origanum majorana</i>	L ¹⁾ +S ²⁾	O
2	lavender	<i>Lavandula vera</i> <i>Lavandula officinalis chaix</i>	L, S	O
3	dill	<i>Anethum graveolens</i> L.	L+S	O
4	rosemary	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.	L, S	O
5	hyssop	<i>Hyssopus officinalis</i> L.	F ³⁾ +L,S	O
6	rose	<i>Rosa spp.</i>	F	O
7	lemon balm	<i>Melissa officinalis</i> L.	L+S	O
8	pineapple sage	<i>Salvia elegans</i>	L, S	O
9	echinacea ⁴⁾	<i>E. angustifolia</i> , <i>E. pallida</i> <i>E. purpurea</i>	L+S+F	X

1) L : leaves

2) S : stems

3) F : flowers

4) Echinacea was commonly known as American coneflower and purple coneflower and historically used by North American natives for enhancing resistance (oral) and prompting wound healing (topical).

나. 실험방법

1) ACE 저해활성

ACE 저해활성의 측정은 Cushman과 Cheung의 spectrophotometric assay of angiotensin-converting enzyme 방법을 응용하여 측정하였다. 먼저 효소원을 준비하기

위해서 rabbit lung acetone powder(L-0756, Sigma-Aldrich Chemical Co., MO, USA) 10 g을 50 mM potassium phosphate buffer 100 mL에 충분히 섞어준 후에 40,000 g에서 40 min간 원심분리하였다. 원심분리된 상등액은 활성이 매우 높고 5 °C에서 한 달 정도 보관이 가능한 ACE의 효소원이 된다.

ACE 저해활성의 측정은 먼저 0.25 mL assay mixture (100 mM potassium phosphate buffer pH 8.3, 300 mM NaCl, 5 mM hippuryl-his-leu (HHL, H-1635, Sigma-Aldrich Chemical Co., MO, USA), 0~10 mU enzyme 0.15 mL)를 30 분간 37 °C에서 반응시켰다. 이때 assay mixture에 시료구에는 시료를 60 µL를 첨가하고 대조구에는 시료대신 증류수 또는 DMSO를 동량으로 첨가하였다. 여기서 사용된 시료는 물추출물의 경우에는 10 mg/mL DW 농도로 하고 70% 에탄올 추출물의 경우에는 10 mg/mL DMSO 농도로 희석하여 사용하였다. blank는 효소원을 첨가하기 전에 먼저 0.25 mL HCl을 첨가하여 반응을 정지시킨 후 효소원을 첨가하였다. 반응을 끝낸 후 0.25 mL 1 N HCl을 첨가하여 반응을 정지시키고 1.5 mL ethyl acetate를 넣어준 후에 15초간 잘 섞어 900 g 에서 15 초간 원심분리하여 ethyl acetate 층을 분리하였다. 분리한 ethyl acetate 1 mL을 tube에 담은 후 120 °C oil bath에서 15분간 증류 건조시켰다. 건조가 끝나면 2 mL의 증류수에 다시 녹이고 228 nm에서 흡광도를 측정하였다. ACE 저해활성도는 아래의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{ACE inhibition activity (\%)} = \left[\left(1 - \frac{(S-SB)}{(C-CB)} \right) \times 100 \right]$$

- ┌ S : sample의 O.D.
- | C : control의 O.D.
- | SB : sample blank의 O.D.
- └ CB : control blank의 O.D.

효소 1단위는 37 °C에서 1 분간 HHL에서 hippuric acid 1 µM을 생산하는 활성으로 하였으며 이때 대조구의 활성은 100%로 간주하였다.

2) HMG-CoA reductase 저해활성

HMG-CoA reductase 저해활성도의 측정을 위해서 먼저 Kleinsek 등의 방법에 따라 효소원을 조제하였다. 실험동물은 4주령의 SD계 웅성 흰쥐를 일주일간 예비사육하여 사육실 환경에 적응시킨 후에 AIN-76A diet(Dyet Inc., PA, USA)를 주어 7일간 사육하였다. 사육이 끝난 흰쥐는 밤 11시에 해부하여 간을 적출하여 무게를 측정하였다. 적출한 간은 ice cold buffer A(50 mM phosphate buffer, pH 7.0 with 0.2 M sucrose, 2 mM DL-dithiothreitol(DTT, D-0632, Sigma-Aldrich Chemical Co., MO, USA))에 rat liver 1 g당 2 mL을 첨가한 후 Potter Elvehjem type glass homogenizer(GlassCol, LLC., Terre Haute, USA)로 15초간 full speed로 균질화 한 다음 15,000 g에서 10분간 원심분리하였다. 상등액은 다시 100,000 g에서 75분간 초원심분리하여 상등액을 버리고 흰색의 지방층을 제거하였다. 얻어진 microsome pellet은 buffer A(containing 50 mM EDTA)를 rat liver 1 g당 1 mL씩 첨가하여 세척하고 100,000 g에서 60분간 원심분리 한 다음 상등액은 버리고 -20℃에서 보관하였다. -20℃에서 최소 2시간에서 수주간 보관되었던 microsome pellet을 실온에서 해동시킨 후에 buffer B(50 mM phosphate buffer, pH 7.0 with 0.1 M sucrose, 2 mM DTT, 50 mM KCl, 30 mM EDTA)을 3 mL/1.5 rat liver를 가하여 균질화 하였다. 다시 같은 buffer를 7 mL/1.5 rat liver 첨가한 후에 상온에서 15~30분을 방치한 다음 100,000 g, 20 ℃에서 60분간 초원심분리하여 상등액을 취한 후 효소원으로 하였고 사용시까지 -70 ℃에서 보관하였다.

측정방법은 1 mL cuvette에 시료 20 μ L(control은 DMSO 20 μ L), 0.5 μ M phosphate buffer(pH 7.0), 20 mM DTT 100 μ L, 3 mM NADPH(N-1630, Sigma-Aldrich Chemical Co., MO, USA) 100 μ L, 효소원 100 μ L를 넣었다. 이때 시료액의 농도는 10 mg/mL DW or DMSO로 하였다. 반응액의 온도는 37℃로 일정하게 유지하여 약 10 분간 preincubation 한 후에 3 mM HMG-CoA(H-6132, Sigma-Aldrich Chemical Co., MO, USA) 100 μ L를 가하여 효소반응을 시작하였다. 반응이 시작됨과 동시에 340 nm에서 5 분간의 흡광도 변화를 기록하였다. HMG-CoA reductase의 억제활성은 다음 식에 의하여 계산하였다.

$$\text{HMG-CoA reductase inhibition rate (\%)} = 1 - \frac{T}{C} \times 100$$

T : Δ O.D. of sample

C : Δ O.D. of blank

3) 혈전용해활성

혈전용해활성은 Astrup과 Müllertz의 fibrin plate법을 수정하여 사용하였다. 먼저 0.6% bovine fibrinogen(F-4129, in 0.17 M borate-saline buffer, pH 7.8, Sigma-Aldrich Chemical Co., MO, USA) 10 mL를 10 cm petri dish에 조심스럽게 부은 후 bovine thrombin(T-3399, 20 U/mL, in same buffer, Sigma-Aldrich Chemical Co., MO, USA) 0.5 mL을 첨가하여 1시간동안 실온에서 응고시켰다. 응고된 plate 위에 시료 30 μ L를 조심스럽게 점적한다. 대조구로는 시료 대신 plasmin을 사용하였다. 이때 사용된 시료는 100 mg/mL DW or DMSO의 농도로 사용하였다. 이 plate를 37°C에서 18시간동안 배양한 후 lytic circle의 크기를 측정하였다. fibrin plate법에서는 fibrin이 가수분해됨에 따라서 생기는 투명환의 면적을 관찰할 수 있으며 이는 혈전용해능과 비례관계에 있다. 그러므로 혈전용해활성은 투명환의 면적으로 나타낼 수 있다.

다. 통계처리

본 연구의 실험 결과는 실험군당 평균과 표준편차를 계산하였고, SAS V8 프로그램 (SAS Institute INC., Cary, USA)을 이용하여 one-way ANOVA를 실시한 후 $\alpha=0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test에 의하여 각 실험군의 평균치간의 유의성을 검정하였다.

3. 1차 동물실험-녹차, 라벤더, 로즈마리

가. 실험재료

본 실험에 사용된 라벤더 추출물(lavender flower's extract, 910.462), 로즈마리 추출물(rosemary extract, 77.030), 녹차추출물(green tea extract powder : 103.533)은 삼정향료(주)에서 구입하여 사용하였다. 이중에서 라벤더 추출물과 로즈마리 추출물은 액상형태로 각각 53 °Brix와 42 °Brix였으며 녹차추출물은 분말형태로 되어 있는 것을 사용하였다.

나. 실험방법

1) 실험동물, 식이 및 실험군

생후 7주된 Golden Syrian종 수컷 F1B 햄스터 64마리를 중앙실험동물(주)에서 구입하여 실험시작 전 1주일간 고형배합사료로 적응시켰다. 적응기간 후 햄스터들을 체중에 따라 난괴법 (randomized complete block design)에 의해 8마리씩 8군으로 분류하여 6주간 사육하였다. 실험에 사용된 식이는 AIN-76A purified diet(Dyets Inc. Bethlehem, USA)를 대조사료로 사용하였고 동맥경화유발식이는 AIN-76A 식이에 10% coconut oil과 0.1% cholesterol을 첨가하여 사용하였으며 Table 8에 나타내었다.

Table 8. Composition of experimental diets

(g/kg diet)

Ingredients	Groups ¹⁾	
	NC	AC, LV5, LV10 RM5, RM10 GT5, GT10
Casein	200	200
DL-Methionine	3	3
Corn starch	150	150
Sucrose	500	500
Cellulose	50	50
Corn oil	50	50
Salt Mix ²⁾	35	35
Vitamin Mix ³⁾	10	10
Choline bitartrate	2	2
Coconut oil	-	100
Cholesterol	-	1.0

1) NC was normal control group fed AIN-76A diet, AC was atherogenic control group induced atherosclerosis fed atherogenic diet, LV5, RM5 and GT5 were fed atherogenic diet with oral administration of lavender, rosemary and green tea extract 500 mg/kg B.W. respectively, LV10, RM10 and GT10 were fed atherogenic diet with oral administration of lavender, rosemary and green tea extract 1000 mg/kg B.W. respectively.

2) AIN-76 Salt Mix #200000 (use at 35 g/kg Diet, g/kg mixture) : Calcium phosphate dibasic 500, sodium chloride 74, potassium sulfate 52, magnesium oxide 24, manganous carbonate 3.5, ferric citrate U.S.P. 6, zinc carbonate 1.6, cupric carbonate 0.3, potassium iodate 0.01, sodium selenite 0.01, chromium potassium 0.55, sulfate 12H₂O 0.55, sucrose 118.033)

3) AIN-76A Vitamin Mix #300050(use at 10 g/kg Diet, g/kg mixture) : Thiamine HCl

0.6, riboflavin 0.6, pyridoxine HCl 0.7, niacin 3, calcium pantothenate 1.6, folic acid 0.2, biotin 0.02, vitamin B₁₂(0.1%) 1, vitamin A palmitate(500,000 IU/g) 0.8, vitamin D₃ (400,000 IU/g) 0.25, vitamin E acetate (500 IU/g) 10, menadione sodium bisulfate 0.08, sucrose 981.15

정상대조군(NC)은 대조사료를 급여하고 동맥경화유발대조군(AC)은 동맥경화유발식이를 급여하여 사육하였다. 시료군에서 LV5, RM5 및 GT5군은 동맥경화유발식이와 함께 각각 lavender, rosemary 및 green tea 추출물을 500 mg/kg B.W.의 양으로 매일 경구투여하였으며, LV10, RM10 및 GT10군은 위의 추출물을 각각 1000 mg/kg B.W.의 양으로 매일 경구투여하였다. 실험동물은 네 마리를 한 cage에서 사육하였으며 식이와 물은 자유롭게 먹도록 하였다. 식이섭취량과 체중은 매주 1회 일정한 시각에 측정하였다. 사육기간 동안의 일일 평균 식이섭취량과 체중증가량을 측정하였고 사육기간 중의 체중증가량을 같은 기간의 식이섭취량으로 나누어 각 실험군들의 식이효율(food efficiency ratio, F.E.R)을 계산하였다.

2) 혈액과 장기의 채취

실험기간이 종료된 실험동물은 16시간 절식시킨 후 0.5 mL 염산케타민(50 mg/mL, 유한양행)로 마취시켜 개복한 후 10 mL 주사기를 이용하여 복부대동맥에서 혈액을 채취하였다. 채취된 혈액은 응고되는 것을 방지하기 위하여 헤파린 처리된 tube에 담아 ice bath에 20분간 방치한 후 원심분리기로 3000 rpm에서 15 분간 원심분리하여 혈장을 분리하고, 혈장은 분석 전까지 -70 °C deep freezer에 보관하였다.

대동맥은 좌심실을 통해 산화를 방지하기 위하여 20 mL phosphate-buffered saline (10 mmol/L, contained EDTA (2.5 mmol/L) and Trolox (0.4 mmol/L : Sigma-Aldrich, Chemical Co.))로 5분 동안 관류하였다. 관류 후에 대동맥은 stereo-microscope 하에서 적출하였다. 대동맥 주위의 결체조직을 제거하고 대동맥궁의 주요한 가지들을 잘라내었다. 심장에서부터 시작하여 inner curvature까지의 길이를 측정했을 때 약 7-9 mm 정도의 긴 대동맥궁 부위를 사용하며 이를 평평하게 열은 후에 10% neutral-buffered formalin 용액(Sigma Chemical Co., USA)에 실험시까지 담구어 4°C에서 보관하였다.

혈액을 채취한 후 ice bath 위에서 즉시 간, 심장, 신장, 비장을 떼어 ice cold saline에 넣어 세척한 다음 여지로 물기를 제거한 후 무게를 측정하고 간장은 HMG-CoA reductase와 LDL receptor의 mRNA level을 측정하기 위하여 약 100 mg 정도의 크기로 세절하여 약 5배 volume의 RNAlater(Ambion Inc., Austin, USA)에 담그어 두고 분석 전 까지 4℃에서 보관하였다.

3) 생화학적 검사

혈장의 중성지방농도는 GPO, Trinder w/o serum blank(비색법)으로 검사하였으며 Triglyceride reagents kit(Bayer, NY, U.S.A.)를 사용하여 Chemistry Autoanalyzer (ADVIA 1650, Bayer, Tokyo, Japan)로 분석하였다. 혈액내 총 콜레스테롤의 함량은 효소 법으로 검사하였으며 Cholesterol reagent kit (Bayer, NY, U.S.A.)를 사용하여 Chemistry Autoanalyzer(ADVIA 1650, Bayer, Tokyo, Japan)로 분석하였다. 혈액내 HDL-콜레스테롤의 함량은 효소법으로 검사하였으며 Direct HDL-cholesterol II reagent kit (Bayer, NY, U.S.A.)를 사용하여 Chemistry Autoanalyzer (ADVIA 1650, Bayer, Tokyo, Japan)으로 분석하였다. 혈액내 LDL-콜레스테롤 함량은 Friedewald 식(아래)을 이용하여 계산하였다. VLDL과 LDL-콜레스테롤의 합(non HDL-cholesterol)은 총콜레스테롤에서 HDL-콜레스테롤의 양을 뺀 값으로 계산하였다.

$$\text{non HDL-cholesterol} = \text{Total cholesterol} - \text{HDL-cholesterol}$$

임상진단에서 순환계와 관련한 진단 지수인 동맥경화지수(Atherogenic index, A.I.)와 심장위험지수(Cardiac risk factor, C.R.F)는 아래와 같은 공식에 의하여 산출하였다.

$$\text{A.I.} = \frac{\text{Total cholesterol} - \text{HDL cholesterol}}{\text{HDL cholesterol}}$$

$$\text{C.R.F} = \frac{\text{Total cholesterol}}{\text{HDL cholesterol}}$$

간기능 지표로 사용되는 SGOT, SGPT 활성은 상업적 분석 kit를 이용하여 분석하였다. 혈중 SGOT 및 SGPT 활성은 IFCC법에 의한 AST reagents kit(Bayer, NY, USA)를 이용하여 ADVIA 1650(Bayer, Tokyo, Japan)으로 분석하였다.

4) 간장내에서의 HMG-CoA reductase와 LDL receptor의 mRNA level

간장의 Total RNA는 Micro-to-Midi Total RNA Purification system (Invitrogen, Carlsbad, USA)을 사용하여 추출하였다. cDNA의 합성은 2 µg total RNA, 0.5 µL oligo-dT 18 mer 및 3.2 µL dNTP를 함께 넣고 70°C에서 5분간 incubation한 후에 ice bath에서 1분간 cooling하고 RT enzyme (1 up, 200), 5× buffer 4 up과 함께 total volume을 20 µL로 맞추었다. 이를 42°C에서 1시간동안 incubation 하고 70°C에서 15분간 inactivation하여 cDNA를 얻었다. Real-time PCR은 0.5 µL template (10 ng/µL), 0.8 µL primer (forward+reverse), 10 µL 2× SYBR I mixture, 8.7 µL distilled water로 total volume을 20 µL로 한 PCR mix로 PCR을 수행하였다. 그때의 조건은 denature (95°C, 30 sec), annealing (60°C, 1 min), extension (72°C, 0 sec)을 40 cycle을 수행하였으며 ABI 7900 HT(Applied Biosystems, Foster City, USA)를 사용하여 측정하였다. House keeping gene과 HMG-CoA reductase와 LDL receptor는 control의 cDNA를 control template으로 하여 각각 1, 0.5, 0.25 으로 희석하여 standard curve를 도출해내었고 이를 이용하여 각각의 template의 변이에서 기인하는 증폭 양을 normalization하였고, 또한 house keeping gene의 GAPDH를 이용하여 각 유전자의 기준으로 정하여 정량을 유도해 내었고 control sample에서의 각 유전자를 calibrator로 정하여 상대적인 정량을 하였다.

5) 조직학적 검사 - Fatty streak area 측정

대동맥내벽의 지방의 축적 정도는 Rein 등의 방법에 따라 대동맥 부위는 oil red O (3 g/L in 60% isopropanol and 40% water, Sigma Co.)로 20분간 염색하였다. 염색 후 증

류수에 세척하고 glycerol과 0.1 vol sodium-phosphate buffer (10 mmol/L, pH 7.4)를 mounting medium으로 사용하여 대동맥 내부표면이 위로 향하게 하여 현미경 (OLYMPUS CKX41, Sanyo VCC-6574A color CCD Camera) 슬라이드 위에 올려놓고 관찰하였다.

다. 통계처리

본 연구의 실험결과는 실험군당 평균과 표준편차를 계산하였고, one-way ANOVA를 실시한 후 $\alpha=0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test에 의하여 각 실험군 평균치간의 유의성을 검정하였다.

4. 2차 동물실험 - 장미꽃 추출물, 파인애플 세이지 잎 추출물 및 장미, 파인애플 세이지와 녹차 추출물을 함유한 타블렛 제품

가. 실험재료

실험에 사용된 장미꽃은 경동시장에서 건조된 것으로 구입하였고 파인애플 세이지는 홍천의 허브농장에서 건조되지 않은 것으로 구입하였으며 녹차추출물(green tea extract powder : 103.533)은 삼정향료(주)에서 구입하였다. 파인애플 세이지(pineapple sage' leaves, *Salvia elegans*)는 잎과 줄기를 분리하여 잎을 사용하였으며 장미(rose's flowers, *Rosa spp.*)는 꽃부분을 사용하였다. 이렇게 분리한 허브는 완전히 마를 때까지 음건하고 분쇄기로 분쇄하였다. 분쇄된 분말은 증류수를 용매로 하여 1:20의 비율로 희석하여 3시간동안 100 °C에서 추출하였다. 추출액은 와트만 여과지 No. 42로 여과한 후에 감압농축하여 동결건조한 후 분말로 하여 실험시료로 사용하였다. 장미와 파인애플 세이지 및 녹차를 포함한 타블렛 제품의 배합비는 Table 9에 나타내었다.

Table 9. Composition of the tablet product included rose's flowers extract, pineapple sage' leaves extract and green tea extract

Ingredients	(%)
Mixture ¹⁾	11.4
Polydextrose	11.4
Taurine	1.0
Brewery yeast	76.2
Total	100

1) The mixture was mixed rose's flowers ex. : pineapple sage' leaves ex. : green tea ex. = 1:1:1

나. 실험방법

1) 실험동물, 식이 및 실험군

생후 6주된 Golden Syrian종 수컷 F1B 햄스터 64마리를 중앙실험동물(주)에서 구입하여 실험시작 전 1주일간 고형배합사료로 적응시켰다. 적응기간 후 햄스터들을 체중에 따른 난피법(randomized complete block design)에 의해 8마리씩 8군으로 분류하여 12주간 사육하였다. 실험에 사용된 식이는 AIN-76A purified diet (Dyets Inc., Bethlehem, USA)를 대조사료로 사용하였고 동맥경화유발식이는 AIN-76A 식이에 10% coconut oil과 0.1% cholesterol을 첨가하여 사용하였으며 구성성분은 Table 10에 나타내었다.

Table 10. Composition of experimental diets

(g/kg diet)

Ingredients	Groups ¹⁾							
	NC	AC	R5	R10	S5	S10	T5	T10
Casein	200	200	200	200	200	200	200	200
Sucrose	500	500	441.4	434	441.4	434	384	319
Cornstarch	150	150	150	150	150	150	150	150
Cellulose	50	50	50	50	50	50	50	50
Mineral Mix #200000	35	35	35	35	35	35	35	35
Vitamin Mix #300050	10	10	10	10	10	10	10	10
DL-Methionine	3	3	3	3	3	3	3	3
Choline Bitartrate	2	2	2	2	2	2	2	2
Coconut Oil	-	100	100	100	100	100	100	100
Cholesterol	-	1	1	1	1	1	1	1
Rose's flower ex.	-	-	7.6	15	-	-	-	-
Pineapple sage ex.	-	-	-	-	7.6	15	-	-
Tablet product	-	-	-	-	-	-	65	130

1) NC : Normal control group fed AIN-76A diet, AC : Atherogenic control group induced atherosclerosis fed atherogenic diet, T5, T10 : Atherogenic diet added tablet product of 6.5% and 13% respectively, R5, R10 : Atherogenic diet added rose's flower extract of 7.6 g/kg diet and 15 g/kg diet respectively, S5, S10 : Atherogenic diet added pineapple sage's leaves extract of 7.6 g/kg diet and 15 g/kg diet respectively.

2) AIN-76 Mineral Mix #200000 (use at 35g/kg Diet, g/kg mixture) : Calcium phosphate dibasic 500, sodium chloride 74, potassium sulfate 52, magnesium oxide 24, manganous carbonate 3.5, ferric citrate U.S.P. 6, zinc carbonate 1.6, cupric carbonate 0.3, potassium iodate 0.01, sodium selenite 0.01, chromium potassium 0.55, sulfate

12H₂O 0.55, sucrose 118.033)

3) AIN-76A Vitamin Mix #300050 (use at 10g/kg Diet, g/kg mixture) : Thiamine HCl 0.6, riboflavin 0.6, pyridoxine HCl 0.7, niacin 3, calcium pantothenate 1.6, folic acid 0.2, biotin 0.02, vitamin B₁₂(0.1%) 1, vitamin A palmitate(500,000 IU/g) 0.8, vitamin D₃ (400,000 IU/g) 0.25, vitamin E acetate (500 IU/g) 10, menadione sodium bisulfate 0.08, sucrose 981.15

정상대조군(NC)은 정상사료를 급여하고 동맥경화유발대조군(AC)과 모든 시료군들은 동맥경화유발식이료를 급여하여 사육하였다. 시료군에서 T5군과 T10군은 동맥경화유발식이에 장미추출물, 파인애플 세이지 추출물 및 녹차 추출물을 함유한 타블렛 제품을 각각 6.5%와 13%로 첨가한 식이를 급여하였으며, R5군과 R10군은 동맥경화유발식이에 장미꽃추출물을 각각 7.6 g/kg diet와 15 g/kg diet의 양으로 첨가한 식이를 급여하였으며 S5군과 S10군은 동맥경화유발식이에 파인애플 세이지 잎 추출물을 각각 7.6 g/kg diet와 15 g/kg diet의 양으로 첨가한 식이를 급여하여 사육하였다. 실험동물은 네 마리를 한 cage에서 사육하였으며 식이와 물은 자유롭게 먹도록 하였다. 식이섭취량과 체중은 매주 1회 일정한 시각에 측정하였다. 사육기간 동안의 일일 평균 식이섭취량과 체중증가량을 측정하였고 사육기간 중의 체중증가량을 같은 기간의 식이섭취량으로 나누어 각 실험군들의 식이효율(food efficiency ratio, F.E.R)을 계산하였다.

2) 혈액과 장기의 채취

실험기간이 종료된 실험동물은 16시간 절식시킨 후 0.5 mL 염산케타민(50 mg/mL, 유한양행)로 마취시켜 회복한 후 10 mL 주사기를 이용하여 복부대동맥에서 혈액을 채취하였다. 채취된 혈액은 아무것도 처리되지 않은 tube에 담아 실온에 방치한 후 3000 rpm에서 15 분간 원심분리하여 혈청을 분리하고, 분리된 혈청은 분석 전까지 -70 °C deep freezer에 보관하였다.

대동맥은 좌심실을 통해 산화를 방지하기 위하여 20 mL phosphate-buffered saline (10 mmol/L, contained EDTA (2.5 mmol/L) and Trolox (0.4 mmol/L : Sigma-Aldrich, Chemical Co.))로 5분 동안 관류하였다. 관류 후에 대동맥은 stereo-microscope 하에서

적출하였다. 대동맥 주위의 결체조직을 제거하고 대동맥궁의 주요한 가지들을 잘라내었다. 심장에서부터 시작하여 inner curvature까지의 길이를 측정했을 때 약 7-9 mm 정도의 긴 대동맥궁 부위를 사용하며 이를 평평하게 열은 후에 10% neutral-buffered formalin 용액 (Sigma Chemical Co.)에 실험시까지 담구어 4°C에서 보관하였다.

혈액을 채취한 후 ice bath 위에서 즉시 간, 심장, 신장, 비장을 떼어 ice cold saline에 넣어 세척한 다음 여지로 물기를 제거한 후 무게를 측정하고 간장은 HMG-CoA reductase와 LDL receptor의 mRNA level을 측정하기 위하여 약 100 mg 정도의 크기로 세절하여 약 5배 volume의 RNAlater(Ambion Inc., Austin, USA)에 담그어 분석 전까지 4°C에서 보관하였다.

3) 생화학적 검사

혈장의 중성지방농도는 GPO, Trinder w/o serum blank(비색법)으로 검사하였으며 Triglyceride reagents kit(Bayer, NY, U.S.A.)를 사용하여 Chemistry Autoanalyzer (ADVIA 1650, Bayer, Tokyo, Japan)로 분석하였다. 혈액내 총 콜레스테롤의 함량은 효소법으로 검사하였으며 Cholesterol reagent kit (Bayer, NY, U.S.A.)를 사용하여 Chemistry Autoanalyzer(ADVIA 1650, Bayer, Tokyo, Japan)로 분석하였다. 혈액내 HDL-콜레스테롤의 함량은 효소법으로 검사하였으며 Direct HDL-cholesterol II reagent kit (Bayer, NY, U.S.A.)를 사용하여 Chemistry Autoanalyzer (ADVIA 1650, Bayer, Tokyo, Japan)으로 분석하였다. VLDL과 LDL-콜레스테롤의 합(non HDL-cholesterol)은 총콜레스테롤에서 HDL-콜레스테롤의 양을 뺀 값으로 계산하였다.

$$\text{Non HDL-cholesterol} = \text{Total cholesterol} - \text{HDL-cholesterol}$$

임상진단에서 순환계와 관련한 진단 지수인 동맥경화지수(Atherogenic index, A.I.)와 심장위험지수(Cardiac risk factor, C.R.F)는 아래와 같은 공식에 의하여 산출하였다.

$$\text{A.I.} = \frac{\text{Total cholesterol} - \text{HDL cholesterol}}{\text{HDL cholesterol}}$$

$$\text{C.R.F} = \frac{\text{Total cholesterol}}{\text{HDL cholesterol}}$$

간기능 지표로 사용되는 SGOT, SGPT 활성은 상업적 분석 kit를 이용하여 분석하였다. 혈중 SGOT 및 SGPT 활성은 IFCC법에 의한 AST reagents kit(Bayer, NY, USA)를 이용하여 ADVIA 1650(Bayer, Tokyo, Japan)으로 분석하였다.

4) 간장내에서의 HMG-CoA reductase와 LDL receptor mRNA level

간장의 Total RNA는 Micro-to-Midi Total RNA Purification system (Invitrogen, Carlsbad, USA)을 사용하여 추출하였다. cDNA의 합성은 2 µg total RNA, 0.5 µL oligo-dT 18 mer 및 3.2 µL dNTP를 함께 넣고 70°C에서 5분간 incubation한 후에 ice bath에서 1분간 cooling하고 RT enzyme (1 up, 200), 5× buffer 4 up과 함께 total volume을 20 µL로 맞추었다. 이를 42°C에서 1시간동안 incubation 하고 70°C에서 15분간 inactivation하여 cDNA를 얻었다. Real-time PCR은 0.5 µL template (10 ng/µL), 0.8 µL primer (forward+reverse), 10 µL 2× SYBR I mixture, 8.7 µL distilled water로 total volume을 20 µL로 한 PCR mix를 PCR을 수행하였다. 그때의 조건은 denature (95°C, 30 sec), annealing (60°C, 1 min), extension (72°C, 0 sec)을 40 cycle을 수행하였으며 ABI 7900 HT(Applied Biosystems, Foster City, USA)를 사용하여 측정하였다. House keeping gene과 HMG-CoA reductase와 LDL receptor는 control의 cDNA를 control template으로 하여 각각 1, 0.5, 0.25 으로 희석하여 standard curve를 도출해내었고 이를 이용하여 각각의 template의 변이에서 기인하는 증폭 양을 normalization하였고, 또한 house keeping gene의 GAPDH를 이용하여 각 유전자의 기준으로 정하여 정량을 유도해 내었고 control sample에서의 각 유전자를 calibrator로 정하여 상대적인 정량을 하였다.

5) 조직학적 검사 - Fatty streak area 측정

대동맥내벽의 지방의 축적 정도는 Rein 등의 방법에 따라 대동맥 부위는 oil red O (3 g/L in 60% isopropanol and 40% water, Sigma Co.)로 20분간 염색하였다. 염색 후 증류수에 세척하고 glycerol과 0.1 vol sodium-phosphate buffer (10 mmol/L, pH 7.4)를 mounting medium으로 사용하여 대동맥 내부표면이 위로 향하게 하여 현미경 (OLYMPUS CKX41, Sanyo VCC-6574A color CCD Camera) 슬라이드 위에 올려놓고 관찰하였다.

다. 통계처리

본 연구의 실험결과는 실험군당 평균과 표준편차를 계산하였고, one-way ANOVA를 실시한 후 $\alpha=0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test에 의하여 각 실험군 평균치간의 유의성을 검정하였다.

5. 선발된 시료들을 이용한 제품개발

가. 공시재료

본 실험에 사용된 녹차추출물(green tea extract powder : 103.533), rosemary 추출물(rosemary extract, 77.030) 및 lavender 추출물(lavender flower's extract, 910.462))은 삼정향료(주)에서 구입하여 사용하였다.

나. 제품개발 방법

1) 음료 제품

음료제품은 녹차 추출물 등 3가지 추출물에 벌꿀, 비타민 C 등을 혼합하여 제조한 후 기호도 검사를 통해 품질을 개선하였다.

2) 타블렛 제품

타블렛 제품은 녹차 추출물 등 3가지 추출물, 유청칼슘, 효모 등을 원료로 제조하였다.

3) 과립차 제품

과립차 제품은 녹차 추출물 등 3가지 추출물에 포도당을 첨가하여 제조하였다.

4) 캔디 제품

캔디 제품은 녹차 추출물 등 3가지 추출물을 이용하여 설탕 함유 제품, 무설탕 제품 및 소프트형 제품 등을 제조하였다.

3 절. 연구 결과

1. 1차 screening assays 결과 - in vitro test

기존 database 및 자료조사로부터 천연물을 포함한 식품생물자원의 활성물질을 조사하고 주 활성물질의 관능기 분석(functional group analysis), 정량적 구조활성관계(QSAR), 물리화학적 성질 등을 고려하여 시료를 선별하고자 하였다. 선별된 시료에 대해 시험관내 혈전용해활성, 항고혈압 활성 및 콜레스테롤 생합성에 관여하는 효소 중 율속효소인 HMG-CoA reductase에 대한 저해활성을 검토하여 3종 이상의 후보 추출물을 도출하고자 하였다. 말초혈관 순환장애 개선을 위한 식품소재의 선별은 각종 문헌과 인터넷 조사를 통해서 순환기계 질환에 효능이 알려져 있는 허브류와 천연물들을 대상으로 하여 실험하였다. 연구에 사용된 천연물 목록은 Table 11에 나타내었다.

Table 11. Selected samples used in this study

No.	Sample name	Abbreviation	Form
1	Lavender flowers extract	LV-ex	powder
2	Rosemary extract	RM-ex	powder
3	Rose extract	RS-ex	extract
4	Green tea extract	GT-ex	powder
5	Grape leaf extract	GL-ex	powder
6	Buckwheat water extract	BW-ex	powder
7	Gingko biloba extract	GB-ex	powder
8	Red ginseng extract	RG-ex	extract

가. ACE 저해활성

Angiotensin converting enzyme inhibitor는 일반적으로 고혈압 치료제로 알려져 있으나 급성 심근 경색에도 사용되어 심실의 재형성을 억제하며 생존율을 증가시키는 것으로도 알려져 있다. 고혈압은 동맥경화에 관련된 질병을 유발하는 4대요인들 중의 하나로 알려져 있다. 따라서 ACE 억제활성이 우수한 식품소재는 고혈압을 예방하여 궁극적으로 혈관내의 혈류를 개선시킬 수 있다고 할 수 있다.

혈액순환에 효과가 있다고 알려져 있는 식품소재를 선발하여 ACE 저해활성을 측정하여 그 결과를 Table 12에 나타내었다. ACE 저해 활성 측정을 위해 사용된 시료는 모두 10 mg/mL의 농도로 증류수에 용해한 후 0.45 μ m syringe filter로 여과하여 사용하였다. ACE의 효소원은 rabbit lung acetone powder에서 분리하였고, 기질로 HHL(Hippuryl-His-Leu tetrahydrate)를 사용하여 효소원에 의해 HHL이 hipuric acid로 분해되고 이 분해된 hipuric acid의 양을 측정하여 활성도를 알아보게 된다. 이때 hipuric acid는 ethyl acetate에 용해되는 성질을 갖고 있어 ethyl acetate를 첨가하여 혼합한 후에 원심분리하여 ethyl acetate 층을 분리하였다. 이를 증류하고 다시 증류수에 녹여

spectrophotometer로 흡광도를 측정하는데 여기에 첨가하는 증류수의 양을 달리하여 실험하였으며 그 결과를 Table 12에 나타내었다. 대조약물로는 captopril을 사용하였다.

Table 12. ACE inhibition activities of several natural product extracts.

No.	sample	% inhibition of ACE	
		method 1 ¹⁾	method 2 ²⁾
1	LV-ex	³⁾ 40.5±21.50 ^{c4)}	31.1±11.87 ^c
2	RM-ex	40.1±16.48 ^c	74.5±18.74 ^b
3	RS-ex	40.35±23.55 ^c	10.0±24.32 ^c
4	GT-ex	220.9±15.56 ^a	214.2±0.00 ^a
5	GL-ex	-15.35±1.62 ^d	16.9±3.04 ^c
6	BW-ex	90.0±0.07 ^b	89.5±17.25 ^b
7	GB-ex	34.9±25.00 ^c	29.2±23.90 ^c
8	RG-ex	-51.45±18.46 ^d	29.45±0.07 ^c
	Captopril ⁵⁾	92.7±4.67 ^b	105.85±5.02 ^b

1) Method 1 : resolved hippuric acid in 1 mL distilled water

2) Method 2 : resolved hippuric acid in 2 mL distilled water

3) Values are Mean±Standard deviation (n=3)

4) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha = 0.05$ by Duncan's multiple range test.

5) Captopril is anti-hypertensive drug.

방법 1과 방법 2를 비교해보면, 거의 유사한 경향으로 나타나지만 RM-ex, GL-ex, RG-ex의 경우에 약간의 차이를 나타내었다. ACE 저해활성도를 보았을 때 음의 값을 나타내는 경우는 저해활성이 극히 낮다는 것으로 간주하게 되는데 방법 1에서는 음의 값이 보이지만 방법 2에서는 음으로 나타나는 값은 없었으며 반복성도 높아서 1 mL water

에 용해시키는 것보다는 2 mL water에 용해하는 것이 더 나은 방법임을 알 수 있었다.

각 시료를 비교해 보면, 우선 GT-ex의 경우에 보통 100% 이면 최고 억제활성이 되는데 200% 이상의 억제활성이 나타났다. 이는 원래 GT-ex의 ACE 저해활성이 뛰어나며 보통 0.1% 농도에서 거의 100% 저해활성을 나타내는데 본 연구에서는 그보다 10배 높은 농도를 가지고 측정하였기 때문인 것으로 추측되면 농도를 낮춰서 재실험을 해야 할 필요성이 있었다. RM-ex와 BW-ex가 각각 74.5%와 89.5%로 비교적 높은 저해활성을 보였으며 그 외의 시료는 군간에 유의한 차이가 없었다. 대조약물로 사용된 captopril은 1mM의 농도일때 105%의 저해활성을 보였다. 또한 문헌에 따르면 captopril의 IC₅₀ value는 1.6 nM로 매우 강력한 ACE 저해제로 알려져 있다.

나. HMG-CoA reductase 저해활성

현재, 전 인류 사망 원인의 30% 이상을 차지하는 관상동맥성 심혈관 질환은 미국, 유럽 등 선진국에서 심각한 문제가 되고 있으며 개발도상국에서도 식생활의 서구화, 운동부족 등으로 인해 점차 증가하는 추세에 있다. 한국에서 문제가 되고 있는 뇌질환 질환도 모세혈관의 경화에서 기인되는 경우가 흔하다. 특히, 혈중 콜레스테롤 농도가 높을 경우에는 혈관벽에 지방과 더불어 대식세포, 포말세포 등이 생성, 침착되고 플라크를 형성하여 혈액순환을 저해하는 동맥경화 증세가 일어나기 쉬운 것으로 알려져 있다.

혈중 콜레스테롤의 양을 줄이기 위해서는 식이요법을 통해 콜레스테롤 및 지방 성분의 섭취를 줄이는 방법 이외에, 간에서 활발하게 진행되는 콜레스테롤 생합성 속도를 늦춤으로써 혈중 농도를 낮추는 방법도 있다. HMG-CoA reductase는 스테롤이나 이소프레노이드계 화합물의 생합성 경로의 중간단계인 mevalonic acid 합성을 매개하므로, 이 효소의 활성을 억제하면 콜레스테롤 생합성 속도를 늦추게 되고, 따라서 콜레스테롤 과잉혈증의 치료에 효과적으로 이용할 수 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 rat liver에서 분리한 microsomal HMG-CoA reductase에 대한 각 시료들의 저해활성 정도를 측정하였으며 그 결과는 Table 13에 나타내었다.

Table 13. HMG-CoA reductase inhibitory activity

No.	Sample	HMG-CoA reductase inhibitory activity(%)
1	LV-ex	¹⁾ 100.6±15.88 ^{a2)}
2	RM-ex	101.7±28.08 ^a
3	RS-ex	51.8±7.24 ^c
4	GT-ex	96.3±9.24 ^a
5	GL-ex	87.1±13.17 ^{ab}
6	BW-ex	63.4±9.97 ^{bc}
7	GB-ex	89.2±9.51 ^{ab}
8	RG-ex	77.8±20.57 ^{abc}

1) Values are Mean±Standard deviation (n=3)

2) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha = 0.05$ by Duncan's multiple range test.

LV-ex, RM-ex, GT-ex의 HMG-CoA reductase 저해활성은 각각 100.6%와 101.7%로 8종의 시료중에서 가장 높았고, 그 다음으로 GB-ex와 GL-ex가 약 80%의 저해활성을 나타내었으며 RG-ex, BW-ex, RS-ex의 순이었으며 RS-ex의 저해활성은 51.8%로 가장 낮았다.

Penicillium sp. 및 Aspergillus sp.에서 유래된 몇몇 inhibitor들은 산업화에 크게 성공하였는데, 예를 들어 미국 Merck사의 lovastatin, simvastatin 및 일본 Sankyo사의 pravastatin 등은 연간 300억 달러에 상당하는 시장을 형성하고 있다. 본 연구과제의 목적은 HMG-CoA reductase를 효과적으로 저해하면서도 약물에 비해 비교적 안전할 것으로 생각되는 생약재, 식물체를 대상으로 하여 혈액순환을 원활하게 할 수 있는 예방 효과가 있는 건강기능성 식품을 개발함을 목적으로 하고 있다.

다. 혈전용해활성

본 실험에서는 fibrin을 기질로 하여 이에 대한 분해정도를 정량적으로 분석하는 방법에 의하여 실험하였다. Fibrin 용액을 제조하여 시료를 첨가한 후 fibrin의 분해정도를 측정하여 상대적인 활성을 측정하였으며 그 결과를 Table 14에 나타내었다.

Table 14. Fibrinolytic activity of several natural products(used by fibrin)

No.	Sample	Fibrinolytic activity(U)
1	LV-ex	¹⁾ 20.9±0.43 ^{a2)}
2	RM-ex	8.9±0.13 ^f
3	RS-ex	13.3±0.22 ^b
4	GT-ex	10.4±0.34 ^e
5	GL-ex	12.0±0.28 ^c
6	BW-ex	7.6±0.02 ^g
7	GB-ex	11.2±0.08 ^d
8	RG-ex	8.5±0.06 ^f

1) Values are Mean±Standard deviation (n=3)

2) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha = 0.05$ by Duncan's multiple range test.

이상의 결과에서 볼때, LV-ex가 20.9±0.43 U으로 가장 높은 혈전용해활성을 보였으며 다음으로 RS-ex와 GL-ex의 활성이 높았으며 RM-ex, BW-ex, RG-ex 등은 10 U 이하의 낮은 활성을 보였다. 혈관이 손상을 받아 출혈이 일어나면 혈액이 응고되는 체내방어 작용이 작동하게 되는데 이 과정은 활성화된 thrombin에 의해 fibrinogen이 fibrin으로 전환됨으로써 유도된다. 이렇게 생성된 혈전은 상처 회복 후 plasmin과 같은 혈전용해효소에 의해 용해되는데 만약 생성된 혈전이 체내에 과도하게 축적되거나 혈전용해 기작이 원활하게 작동하지 못할 경우 혈전증을 유발하여 인체에 치명적일 수 있다. 최근 streptokinase, urokinase 및 tPA(tissue-type plasminogen activator)등과 같은 plasminogen activator가 혈전증의 치료제로 사용되고 있다. 식품에서 혈전용해효소를 얻기 위한 연구들이 수행되고 있으며, 청국장, 된장, 젓갈 및 나토와 같은 발효식품으로부터

혈전용해효소의 정제 및 생산균주의 분리가 보고되었고 버섯을 이용한 시도도 있었다.

라. 말초순환장애 개선을 위한 소재 선발

기존 database 및 자료조사로부터 천연물을 포함한 식품생물자원 중 혈액순환개선 가능성이 있다고 생각되는 물질을 선발하였다. 선발된 8종의 시료에 대해 *in vitro* fibrinolysis, ACE inhibitory activity 및 콜레스테롤 생합성에 관여하는 효소 중 committed step에 관여하는 효소인 HMG-CoA reductase에 대한 저해활성을 검토하였으며 그 결과를 Table 15에 나타내었다.

Table 15. Total assayed activities related to improving blood circulation

No.	Sample	Fibrinolytic activity (U)	ACE inhibition (%)	HMG-CoA reductase inhibition(%)
1	LV-ex	¹⁾ 20.9±0.43 ^{a2)}	31.1±11.87 ^c	100.6±15.88 ^a
2	RM-ex	8.9±0.13 ^f	74.5±18.74 ^b	101.7±28.08 ^a
3	RS-ex	13.3±0.22 ^b	10.0±24.32 ^c	51.8±7.24 ^c
4	GT-ex	10.4±0.34 ^e	214.2±0.00 ^a	96.3±9.24 ^a
5	GL-ex	12.0±0.28 ^c	16.9±3.04 ^c	87.1±13.17 ^{ab}
6	BW-ex	7.6±0.02 ^g	89.5±17.25 ^b	63.4±9.97 ^{bc}
7	GB-ex	11.2±0.08 ^d	29.2±23.90 ^c	89.2±9.51 ^{ab}
8	RG-ex	8.5±0.06 ^f	29.45±0.07 ^c	77.8±20.57 ^{abc}

1) Values are Mean±Standard deviation (n=3)

2) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha = 0.05$ by Duncan's multiple range test.

위의 결과에서 보면, 혈전용해활성이 뛰어난 시료로는 LV-ex, RS-ex, GL-ex이고,

ACE 저해활성이 뛰어난 시료로는 RM-ex, GT-ex, BW-ex이며 HMG-CoA reductase 저해활성이 높은 시료는 LV-ex, RM-ex, GT-ex로 나타났다. 이 결과를 토대로 1차 동물실험의 시료를 선발하였으며 라벤더, 로즈마리 및 녹차 추출물이 선발되었다.

마. HPLC를 이용한 성분분석

1차년도 연차보고서에서 밝힌 바와 같이 메밀, 녹차, 포도잎 추출물, 라벤더 및 로즈마리 등이 말초동맥 순환장애 개선에 효과가 있는 것으로 나타났으며 이들에 대한 rutin, quercetin, caffeine, resveratrol, catechin류, vitamin C 및 총 플라보노이드 등의 성분을 HPLC를 사용하여 분석하였다.

1) Rutin, Quercetin의 분석 결과

비타민 P는 정상적인 모세혈관의 투과성을 유지하는데 필요한 물질로 알려져 있다. 부족할 시에는 동물실험 결과 모세혈관이 부족해져 혈관을 통해 쉽게 단백질이 유출되며 쉽게 출혈현상이 나타난다고 알려져 있다. 또한 사람의 경우에도 모세혈관의 취약성과 비타민 P의 부족과는 관계가 있는 것으로 추측되고 있다. Rutin과 quercetin은 이와 같은 비타민 P 작용이 있음이 알려져 있다. 분석 결과 rutin 함량이 높은 것으로 알려진 메밀보다도 녹차를 비롯한 라벤더, 포도잎 추출물 등이 더 많은 함량을 나타내었고 quercetin의 경우에도 비슷한 결과가 나타났다. 현재 단정지을 수는 없으나 플라보노이드 화합물이 혈액순환과 관계가 있을 것으로 판단하고 있으며 동물실험이 완전 종료된 후 그 결과를 확인할 수 있을 것으로 예측된다.

Table 16. Content of rutin and quercetin in water extracts from selected samples

	Rutin (mg/100 g)	Quercetin (mg/100 g)
Buckwheat	2.1	2.9
Grape leaf	90.0	39.9
Green Tea	812.1	13.1
Lavender	398.7	4.7
Rosemary	4.0	63.1

2) Caffeine의 분석 결과

Caffeine은 쓴맛을 대표하는 물질로 앞으로 개발할 제품에 대한 참고사항으로 분석하여 보았다. 녹차에서 다량의 caffeine이 검출되었으며 나머지 시료에서는 검출되지 않았거나 매우 미량 검출되었다.

Table 17. Content of caffeine in water extracts from selected samples

	Caffeine(mg/100 g)
Buckwheat	0.1
Grape leaf	1.9
Green Tea	121.1
Lavender	-
Rosemary	-

3) Resveratrol의 분석 결과

적포도주에서 발견되는 물질인 resveratrol은 폴리페놀의 일종으로 세포 안에서 활성을 보이는 항노화 효소(sirtuins)를 자극한다고 알려져 있으며 심장질환에 효과가 있다는 보고가 있다. 따라서 말초동맥 순환장애 개선 효과와도 관련이 있을 것으로 판단되어 분석을 실시하였으나 포도잎 추출물외에는 검출되지 않아 본 실험과는 크게 연관성이 없는 것으로 판단되었다.

Table 18. Content of resveratrol in water extracts from selected samples

	Resveratrol (mg/100 g)
Grape leaf	49.9

4) Catechin의 분석 결과

현재까지 실험결과 녹차의 효과가 우수한 것으로 나타나 녹차의 주성분인 catechin을 분석하였다. 잘 알려진 것처럼 catechin은 차의 탄닌 성분 중 대표적인 것으로 현재 여러 가지 다양한 기능성에 대한 보고가 이루어지고 있다. 분석 결과 예상대로 녹차 추출물에 가장 많은 catechin류가 함유되어 있었고 허브류에도 상당량 함유되어 있어 본 실험의 결과에 가장 큰 영향을 미치는 성분 중 하나로 예측되었다.

Table 19. Content of catechins in water extracts from selected samples

	EGC	EC	EGCG	ECG	Total
	(mg/100 g)				
Buckwheat	1058.9	793.6	1041.8	373.2	3267.5
Grape leaf	6728.6	1529.7	1653.4	560.6	10472.3
Green Tea	33094.4	5399.9	24177.8	7619.5	70291.6
Rosemary	29559.7	920.6	1273.8	-	31754.1
Lavender	5601.7	563.0	710.4	-	6875.1

5) Vitamin C의 분석 결과

Vitamin C는 본 실험과는 크게 관계는 없으나 성분분석의 한 가지 항목으로 분석하였으며 제품 개발시 참고로 하고자 하였다. 결과 녹차, 라벤더 및 로즈마리의 함량이 비교적 높게 나타났다.

Table 20. Content of Vitamin C in water extracts from selected samples

	Vitamin C (mg/100g)
Buckwheat	4.0
Grape leaf	47.5
Green Tea	6.2
Lavender	41.4
Rosemary	33.8

6) 총플라보노이드 함량의 분석결과

분석결과 총플라보노이드 함량은 녹차 0.86%, rosemary 0.45%, lavender는 1.51%로 나타났다.

Table 21. Content of total flavonoids in water extracts from selected samples

	Total flavonoids (%)
Green Tea	0.86
Lavender	1.51
Rosemary	0.45

바. 최적배합비 선정을 위한 response surface analysis

1년차의 연구에서 여러 천연물 추출물 중에서 ACE inhibitory activity, HMG-CoA reductase inhibitory activity, 혈전용해활성 측정하여 우수한 효과를 나타낸 시료를 3종 선정하였다. 선정된 3종의 시료를 혼합하여 사용할 때를 가정하여 가장 우수한 효능을 나타내는 배합비를 선정하고자 각각의 시료의 첨가량을 영향인자로 하여 배합조건을 최적화하기 위하여 반응표면분석법(Response Surface Methodology : RSM)으로 분석하였다.

선정된 3종의 시료는 LV extract, RM extract, GT extract로 효율적으로 배합비를 최적화시키기 위하여 배합비에 대한 첨가량의 다중 회귀분석을 실시하고 모델식을 선정하여 반응표면분석을 이용한 등고분석과 3차원 분석(3D-plot)을 수행하여 그 유의성을 조사함으로써 배합조건의 타당성을 검토하여 최적화된 배합비를 산출하고자 하였다.

3종의 천연물 추출물들을 혼합하는 최적의 배합비를 예측하고자 실험계획에 따라 혼합한 혼합물의 HMG-CoA reductase 저해활성을 측정하여 Table 22에 나타내었다. 14번 처리구인 LV 8 mg/3 mL, RM 16 mg/3 mL, GT 8 mg/3 mL를 첨가한 혼합물의 저해활성도가 51.1%로 가장 높은 반응치를 보였다. 반면에 가장 낮은 반응치를 보인 처리구는 1번 처리구로 LV 4 mg/3 mL, RM 4 mg/3 mL, GT 4 mg/3 mL를 첨가한 혼합물이 -0.6%의 저해활성을 보였다.

Table 22. Experimental data on HMG-CoA reductase inhibition for mixtures of LV, RM and GT extract

Exp No.	Variables			HMG-CoA inhibition (%)	
	LV-Ex (mg/3 mL)	RM-Ex (mg/3 mL)	GT-Ex (mg/3 mL)		
1	4(-1)	4(-1)	4(-1)	-0.6	11.2
2	4(-1)	4(-1)	12(1)	2.7	1.0
3	4(-1)	12(1)	4(-1)	13.2	16.7
4	4(-1)	12(1)	12(1)	8.3	22.4
5	12(1)	4(-1)	4(-1)	11.8	3.6
6	12(1)	4(-1)	12(1)	-0.1	-6.7
7	12(1)	12(1)	4(-1)	20.4	27.6
8	12(1)	12(1)	12(1)	51.0	29.1
9	8(0)	8(0)	8(0)	26.4	13.9
10	8(0)	8(0)	8(0)	20.1	8.3
11	0(-2)	8(0)	8(0)	13.1	12.8
12	16(2)	8(0)	8(0)	29.4	26.6
13	8(0)	0(-2)	8(0)	12.2	4.4
14	8(0)	16(2)	8(0)	51.1	23.7
15	8(0)	8(0)	0(-2)	17.7	20.2
16	8(0)	8(0)	16(2)	23.0	10.1

이러한 결과를 이용하여 혼합물에 대한 LV의 첨가량, RM의 첨가량, GT의 첨가량 등의 배합조건(X_1 - X_3)과 HMG-CoA reductase 저해활성도 (Y)에 대한 각각의 반응표면회귀식은 다음의 Table 23에 나타내었다.

Table 23. Taylor second equations calculated by RSM program on HMG-CoA reductase inhibition rate for mixtures of 3 kinds of natural product

Response	Taylor second equation	R ²	Significance
HMG-CoA inhibition rate	$Y = 36.4562 - 2.6593X_1 - 3.4390X_2 - 2.6265X_3$ $+ 0.0515X_1^2 + 0.2859X_1X_2 + 0.0886X_2^2$ $+ 0.0625X_1X_3 + 0.2421X_2X_3 + 0.0089X_3^2$	0.6789	p<0.0008

여기서 R²값은 가정된 모형이 자료에 얼마나 잘 적합하는 지를 알려주는 통계적 수치로서 그 값이 1에 가까울수록 통계적으로 유의하다고 볼 수 있는데 HMG-CoA reductase 저해활성의 R²값이 0.6789로 나타났으며 P-value는 0.0008로 통계적인 유의성을 보였다.

LV의 첨가량, RM의 첨가량, GT의 첨가량에 따른 각 반응변수들을 3차원 반응표면 분석하여 contour map으로 나타내었다. 첨가조건별 혼합물의 HMG-CoA reductase inhibitory rate에 대한 3차원 반응표면은 다음의 Fig. 2와 3에 A, B, C로 나타내었다.

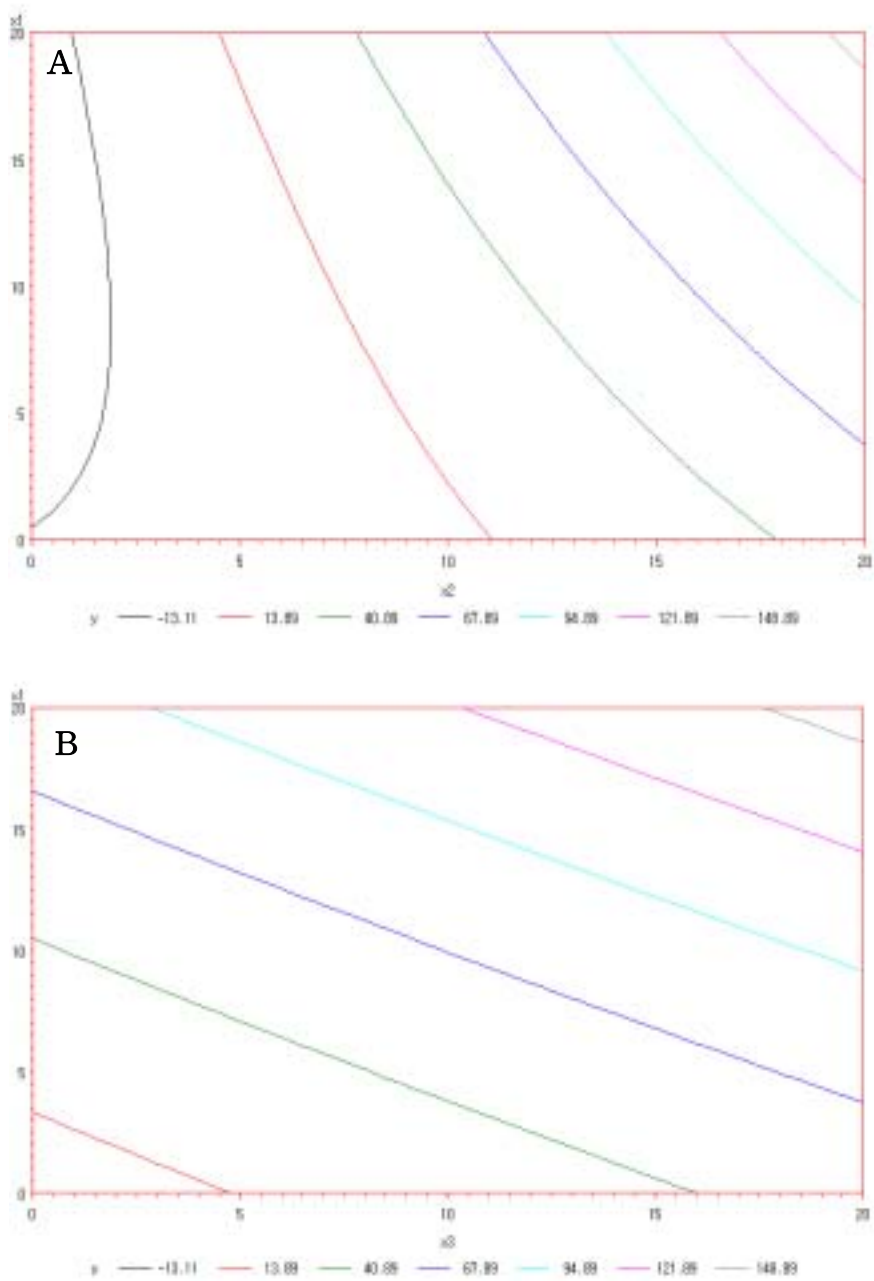


Fig. 2. Contour maps of HMG-CoA reductase inhibition rate for mixtures of 3 kinds of natural product (A : $X_1 \cdot X_2$, B : $X_1 \cdot X_3$), X_1 : LV ex., X_2 : RM ex., X_3 : GT ex. (mg/3 mL)

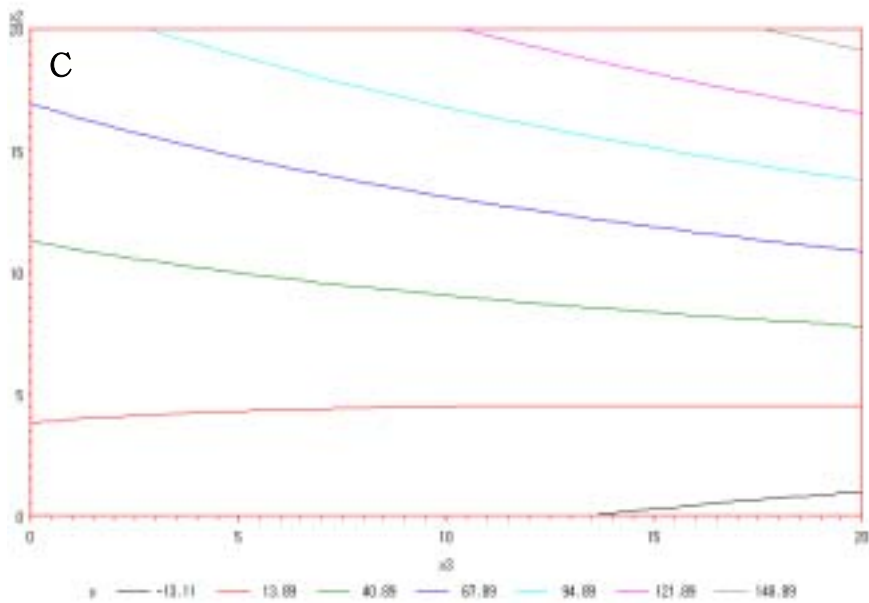


Fig. 3. Contour maps of HMG-CoA reductase inhibition rate for mixtures of 3 kinds of natural product ($C : X_2 \cdot X_3$), $X_1 : LV \text{ ex.}$, $X_2 : RM \text{ ex.}$, $X_3 : GT \text{ ex.}$ (mg/3 mL)

위의 결과를 토대로 첨가량별로 배합한 혼합물의 HMG-CoA reductase rate을 회귀분석한 결과 안장점을 나타내었고 능선분석을 실시하여 최적점의 좌표를 구하여 그 결과를 Table 24에 나타내었다. HMG-CoA reductase 저해활성도는 LV 12.2 mg/3 mL, RM 14.4 mg/3 mL, GT 10.3 mg/3 mL를 각각 첨가하여 혼합하였을 때 가장 높은 값을 나타내었으며 그때의 예상되는 HMG-CoA reductase 저해활성도는 약 48.5%였다.

Table 24. Predicted levels for functional properties for mixtures of 3 kinds of natural product yielding optimum response by analysis of ridge

Composition conditions	Levels for optimum responses
	HMG-CoA inhibition (%)
LV (mg/3 mL)	12.2
RM (mg/3 mL)	14.4
GT (mg/3 mL)	10.3
Morphology	S.P. ¹⁾

1) S.P. : Saddle point

2. 2차 screening assays 결과 - *in vitro* test

본 연구는 혈액순환 개선 효능을 알아보기 위해 민간에서 빈번하게 사용하는 허브류인 마조람, 라벤더, 달, 로즈마리, 히습, 로즈, 레몬밤, 파인애플 세이지 및 에키네시아 등 총 9종을 실험 시료로 선정하였다. 이들을 부위별 및 용매별로 추출하여 angiotensin I converting enzyme(ACE) 저해활성, 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase 저해활성 및 혈전용해활성을 측정하였다.

가. 허브류의 추출수율

허브류의 생리활성을 검색하기 위해 수집한 13종의 허브류를 물과 70% 에탄올로 추출하여 분말로 하여 그 수율을 계산하였다. 먼저 물추출물의 수율을 Table 25에 나타내었다. 물추출물의 경우에 가장 수율이 높은 것은 장미꽃 추출물로 43.3%이었고 파인애플 세이지 잎 추출물이 37%, 달과 라벤더 잎 추출물이 35.3%의 순으로 나타났다. 부위별로는 라벤더, 로즈마리 및 파인애플 세이지에서 잎과 줄기로 분리하여 추출한 경우에는 잎의 추출수율이 줄기에 비해 훨씬 높았다. 로즈마리 줄기 추출물의 경우에는 10.0%로 가장 낮은 추출수율을 보였다.

Table 25. Water extraction yield of herbs

Sample name	Abbr ¹⁾	Sample weight (g)	Extract weight (g)	Yield (%) ²⁾ (w/w dry base)
Marjoram(W, water)	MW	40	5.7	14.3
Lavender (L, water)	LLW	30	10.6	35.3
Lavender (S, water)	LSW	30	4.5	15.0
Dill (L+S, water)	DW	30	10.6	35.3
Rosemary (L, water)	RSLW	30	7.3	24.3
Rosemary (S, water)	RSSW	30	3	10.0
Hyssop (F+L, water)	HFLW	30	6.5	21.7
Hyssop (S, water)	HSW	30	4.3	14.3
Rose (F, water)	RFW	30	13	43.3
Lemon balm (L+S, water)	LBLSW	30	7.4	29.6
Pineapple sage (L, water)	PSLW	30	11.1	37.0
Pineapple sage (S, water)	PSSW	60	13.9	23.2
Echinacea (W, water)	EW	30	6.7	22.3

1) Abbr : abbreviation

2) Extraction yield (%) = [used sample weight (g, dry base)]/[dried water extract weight (g)]×100

13종의 허브를 70% 에탄올로 추출한 추출수율을 Table 26에 나타내었다. 장미꽃 추출물이 45%로 가장 수율이 높았고 다음으로 파인애플 세이지 잎 추출물이 33.3%로 물 추출물의 결과와 유사하였다. 70% 에탄올 추출물에서도 물 추출물과 마찬가지로 잎과 줄기로 분리한 경우에 잎의 추출수율이 줄기에 비해 좋았다. 장미꽃이 물이나 70% 에탄올 추출에서 가장 높은 추출수율을 보인 것은 다른 허브들의 사용부위가 줄기나 잎인데 비해 장미는 꽃 부위로 유효추출성분이 더 많은 부위였기 때문으로 판단되었다. 용매에 따른 추출수율을 비교하였을 때는 70% 에탄올을 용매로 사용한 경우가 추출수율이 더 높을 것으로 예상되었으나, 실험 결과로 볼 때 일부는 물 추출물의 수율이 높고 일부에서는 70% 에탄올 추출물의 수율이 높아서 일관성이 없었다.

Table 26. 70% EtOH extraction yield of herbs

Sample name	Abbr ¹⁾	Sample Weight (g)	Extract Weight (g)	Yield(%) ²⁾ (w/w dry base)
Marjoram(70% EtOH)	ME	30	8.4	28.0
Lavender (L, 70% EtOH)	LLE	30	9.7	32.3
Lavender (S, 70% EtOH)	LSE	30	3.9	13.0
Dill (L+S, 70% EtOH)	DE	30	8.1	27.0
Rosemary (L, 70% EtOH)	RSLE	20	6.1	30.5
Rosemary (S, 70% EtOH)	RSSE	30	2.9	9.7
Hyssop (F+L,70% EtOH)	HFLE	30	8.2	27.3
Hyssop (S, 70% EtOH)	HSE	30	3.5	11.7
Rose (F, 70% EtOH)	RFE	30	13.5	45.0
Lemon balm (L+S, 70% EtOH)	LBLSE	20	4	20.0
Sage (L, 70% EtOH)	PSLE	30	10	33.3
Pineapple sage (S, 70% EtOH)	PSSE	30	6.3	21.0
Echinacea (W, 70% EtOH)	EE	30	4.7	15.7

1) Abbr : abbreviation

2) Extraction yield (%) = [used sample weight (g, dry base)]/[dried water extract weight (g)]×100

Kim 등의 연구에서는 국내산 약용식물 21종의 열수 추출물과 70% 에탄올 추출물의 수율을 비교하였는데 열수추출의 경우에는 1.0%-64.4%의 수율을 보였고 70% 에탄올 추출의 경우에는 1.7%-55.9%의 추출수율을 보였다. 여기에서도 본 연구와 마찬가지로 약용식물의 종류 및 사용부위에 따라 큰 차이를 보였는데 당귀나 현삼처럼 유효성분이 많이 함유되어 있는 뿌리부위에서 높은 추출수율을 보여 사용한 식물의 부위에 따라 추출수율에 차이가 남을 알 수 있었다.

나. ACE 저해활성

Fig. 4에는 허브 물추출물들의 ACE 저해활성을 측정된 결과를 나타내었다. RFW의 ACE 저해활성이 133.8%로 가장 높았고 다음으로 PSLW가 70.5%, HFLW가 44.6%로 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다. DW는 ACE 저해활성이 거의 없었으며 나머지 다른 허브들은 약 10-30%의 저해활성을 나타내었으나 통계적 유의차가 없었다. 부위별로 보면 라벤더의 경우에는 잎보다는 줄기가 ACE 저해활성이 약간 더 높았고 로즈마리는 잎과 줄기에서 거의 차이가 없었으며 히속과 파인애플 세이지의 경우에는 줄기보다는 잎에서의 ACE 저해활성이 더 컸다. Fig. 5에는 70% 에탄올 추출물들의 ACE 저해활성을 측정된 결과를 나타내었다. PSLE의 ACE 저해활성이 91.2%로 통계적으로 유의하게 가장 높았으며 다음으로 LBLSE가 57.5%, RSSE 56.5%, RSLE가 53.6%, ME가 51%의 순으로 나타났다. 반면에 PSSE, DE 및 EE는 ACE 저해활성이 거의 없었다. 부위별로 보면 라벤더와 파인애플 세이지는 잎이 줄기보다 ACE 저해활성이 더 높았고 로즈마리는 줄기와 잎에서 거의 차이가 없었으며 히속은 꽃과 잎보다 줄기의 ACE 저해활성이 더 높았다. 특히 파인애플 세이지의 경우에 잎의 ACE 저해활성은 가장 높은 반면에 줄기 추출물은 ACE 저해활성이 가장 낮아서 대조를 이루었다. 물추출물과 70% 에탄올 추출물을 비교해 보면 물추출물에서는 장미꽃의 ACE 저해활성이 가장 높았고 70% 에탄올 추출물에서는 파인애플 세이지 잎의 저해활성이 가장 높았다. 딜은 물추출물이나 에탄올 추출물 모두 ACE 저해활성을 거의 나타내지 않았다.

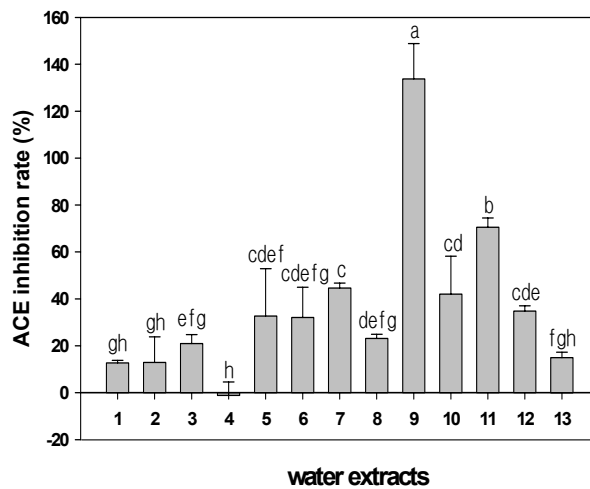


Fig. 4. ACE inhibition rate of water extracts

1:MW, 2:LLW, 3:LSW, 4:DW, 5:RSLW, 6:RSSW, 7:HFLW, 8:HSW, 9:RFW, 10:LBLSW, 11:PSLW, 12:PSSW, 13:EW. Sample solution was 10 mg/mL. Bars represent means \pm SD. Bars without a common letter differ, $p < 0.05$.

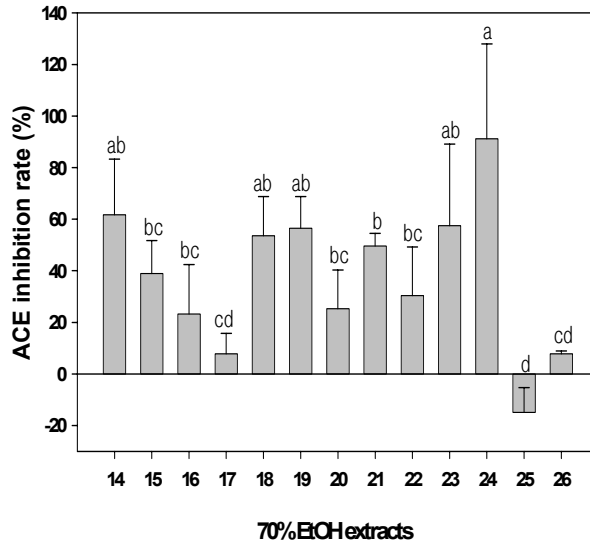


Fig. 5. ACE inhibition rate of 70% EtOH extracts
 14:ME, 15: LLE, 16:LSE, 17:DE, 18:RSLE, 19:RSSE, 20:HFLE, 21:HSE, 22:RFE,
 23:LBLSE, 24:PSLE, 25:PSSE, 26:EE. Sample solution was 10 mg/mL. Bars represent
 means \pm SD. Bars without a common letter differ, $p < 0.05$.

고혈압이 발생하는 기작에서 renin-angiotensin system은 혈압조절에 매우 중요한 역할을 한다. Angiotensin I converting enzyme(ACE)은 angiotensin I에서 angiotensin II를 합성하는 마지막 단계에 관여하는 효소이다. Angiotensin II는 A-II 수용체와 결합하여 동맥과 소동맥을 수축시키고 부신피질을 흥분시켜 알도스테론의 유리를 촉진시켜 결과적으로 혈압의 증가를 가져온다. 따라서 ACE 저해물질은 ACE의 활성을 억제함으로써 고혈압을 직접적으로 억제할 수 있다. Angiotensin converting enzyme inhibitor는 일반적으로 고혈압 치료제로 알려져 있으나 이런 합성 약물은 높은 활성과 특이성 때문에 유의한 부작용을 나타낼 가능성을 가지고 있다. 이러한 문제점을 해소하기위해 식품 단백질에서 유래하는 ACE 저해활성을 가진 peptide류들을 검색하는 연구가 다양하게 이루어지고 있으며 이들이 ACE 저해 약물들을 대신할 수 있을 것이다. 국내에서는 녹차, 키토산 올

리고당, 양파, 물냉이(watercress), 팔, 소라껍데기, 대두 및 키위 등에서 ACE 저해물질 및 저해효과에 대해 보고하였다. 본 연구에서도 여러 허브류 중에서 장미꽃과 파인애플 세이지의 ACE 저해활성이 다른 것들에 비해 커서 이들의 생리활성 물질에 대한 분리 및 동정에 대한 후속 연구를 계속 진행하여 고혈압을 예방하는 기능성 식품으로 이용하기 위한 기초자료로의 활용이 기대된다.

다. HMG-CoA reductase 저해활성

허브 물 추출물의 HMG-CoA reductase 저해활성을 측정한 결과는 Fig. 6에 나타내었다. RFW의 HMG-CoA reductase 저해활성이 48.9%로 통계적으로 유의하게 높았고 다음으로 PSLW 29.1%, RSLW 14.0%, LBLSW 13.7%의 순이었다. 반면에 DW의 저해활성은 0.4%로 가장 낮았으며 HFLW와 LLW도 낮은 저해활성을 나타내었다. 부위별로 보면 라벤더의 경우에는 잎보다는 줄기 추출물의 HMG-CoA reductase 저해활성이 더 컸으며, 히습도 꽃과 잎 추출물보다 줄기 추출물의 저해활성이 컸다. 로즈마리와 파인애플 세이지는 잎이 줄기보다 저해활성이 더 컸으며 파인애플 세이지는 그 차이가 더욱 확연하였다. Fig 7.에는 허브류의 70% 에탄올 추출물들의 HMG-CoA reductase 저해활성을 그림으로 나타내었다. RFE의 저해활성이 80.5%로 가장 높았으며 LLE와 RSLE가 각각 61.9%와 62.6%로 그다음으로 높은 활성을 나타내었다. 반면에 EE의 저해활성은 5.0%로 가장 낮았으며 DE는 9.4%, ME는 18.7%로 낮은 저해활성을 보였다. 부위별로 보면 라벤더, 로즈마리, 히습, 파인애플 세이지 모두 줄기보다는 잎의 저해활성이 더 컸다. 또한 용매별로 보면 전반적으로 물 추출물보다는 70% 에탄올 추출물의 HMG-CoA reductase 저해활성이 더 높은 경향을 보였다.

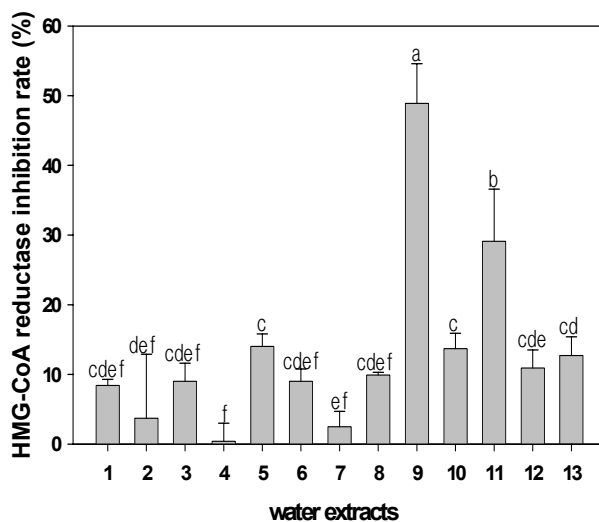


Fig. 6. HMG-CoA reductase inhibition rate of water extracts

1:MW, 2:LLW, 3:LSW, 4:DW, 5:RSLW, 6:RSSW, 7:HFLW, 8:HSW, 9:RFW, 10:LBSW, 11:PSLW, 12:PSSW, 13:EW. The reaction mixture consisted of sample solution 20 μL (10 mg/mL water), 0.5 μM phosphate buffer(pH 7.0) 100 μL , 20 mM DTT 100 μL , 3 mM NADPH 100 μL , enzyme source 100 μL and 3 mM HMG-CoA 100 μL . Bars represent means \pm SD. Bars without a common letter differ, $p < 0.05$.

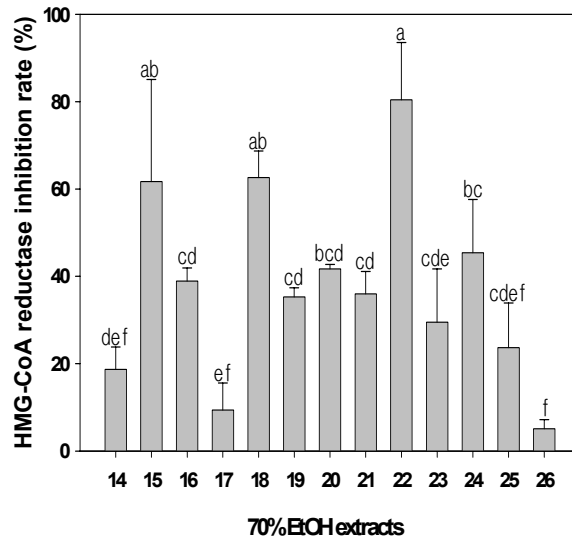


Fig. 7. HMG-CoA reductase inhibition rate of 70% EtOH extracts

14:ME, 15: LLE, 16:LSE, 17:DE, 18:RSLE, 19:RSSE, 20:HFLE, 21:HSE, 22:RFE, 23:LBLSE, 24:PSLE, 25:PSSE, 26:EE. The reaction mixture consisted of sample solution 20 μ L(10 mg/mL DMSO), 0.5 μ M phosphate buffer(pH 7.0) 100 μ L, 20 mM DTT 100 μ L, 3 mM NADPH 100 μ L, enzyme source 100 μ L and 3 mM HMG-CoA 100 μ L. Bars represent means \pm SD. Bars without a common letter differ, $p < 0.05$.

HMG-CoA reductase는 콜레스테롤 생합성 단계에서 작용하는 rate-limiting enzyme으로써 스테롤이나 이소프레노이드계 화합물의 생합성 경로의 중간단계인 mevalonic acid의 합성을 매개하는 역할을 한다. 여러 역학 연구에서 혈중 콜레스테롤치나 혈중 LDL-콜레스테롤치가 높을수록 관상동맥성 심장질환에 걸릴 위험성이 높아진다고 보고해왔다. 1950년대에서 1960년대 사이에 nicotinic acid, cholesterylamine, clofibrate(CPIB), neomycin, plant sterol, triparanol(MER-29), D-thyroxine, estrogenic hormone 등과 같이 다양한 cholesterol lowering-agent에 대한 보고가 있었다. 이들은 다양한 경로로 혈중의 콜레스테롤을 낮추는 작용을 하지만 장기복용에 따르는 부작용이 있어서 이상적인 cholesterol lowering-agent가 되지 못한다고 하였다. 콜레스테롤 대사에 관한 동물실험과 임상실험을 거치면서 혈중 콜레스테롤 강하 수단으로 콜레스테롤의 생합성 경로를 조절하는 것이

보다 효과적임이 밝혀졌다. 그 중 하나가 HMG-CoA reductase를 저해하는 것으로 1973년 Brown 등이 이 효소의 활성이 저하되면 LDL-receptor의 활성이 증가하여 혈청 콜레스테롤 농도가 감소한다는 기작을 발표하였다. 이러한 작용을 하는 저해제로는 lovastatin, simvastatin, pravastatin 등이 큰 시장을 형성하고 있으나 값이 너무 고가이며 장기 복용시 일부 부작용이 있다고 알려져 있다. 따라서 독성이 없고 안전한 식품소재를 대상으로 HMG-CoA reductase 활성 저해제 조성물을 개발한다면 그 의의가 크다고 할 수 있다. 허브류의 물추출물이나 에탄올 추출물에 대한 HMG-CoA reductase 저해활성에 대한 연구보고는 거의 없는 실정이지만, 다른 식물추출물이나 한약재에 대한 연구는 많이 이루어져 있다. Lee 등의 연구에서는 다양한 식물의 열수추출물의 HMG-CoA reductase 저해활성을 검색하였으며 *Typha augustifolia*, *Polygonum cuspidatum*, *Crataegus pinnatifida*, *Polygonum multiflorum* 등이 약 50-30%의 저해활성을 갖는다고 하였다. 파, 마늘, 양파, 고추 등의 식용식물들을 대상으로 HMG-CoA reductase 저해활성을 탐색한 Park 등의 연구에서는 물추출물에서는 10% 내외의 약한 활성을 보였으며 메탄올 추출물에서는 참취 등이 50-20% 내외의 강한 활성을 보였다고 보고하였다. Lee 등의 연구에서는 심혈관계 질환과 관련하여 전래되고 있는 한약재, 약용식물들을 대상으로 HMG-CoA reductase 저해활성을 측정된 결과 물추출물에서는 솔잎, 해당화, 메밀겉질에서 높은 저해활성이 관찰되었다고 하였다. Ha 등의 연구에서는 곡류 및 두류를 에탄올 및 메탄올로 추출하여 각 추출물에 대해서 HMG-CoA reductase 저해활성을 검색한 결과 수수와 기장이 높은 활성을 보였다고 보고하였다. 본 연구에서는 장미꽃에서 열수 추출하거나 70% 에탄올로 추출한 추출물 모두 다른 허브류에 비해 HMG-CoA reductase 저해활성이 현저히 높게 나타나 새로운 저해제의 후보 물질로써의 가능성을 시사하였으며 이를 위해 분획과 분리정제를 통한 활성 검색에 대한 후속연구의 필요성이 있었다.

라. 혈전용해활성

Table 27에는 각 허브들의 물 추출물과 70% 에탄올 추출물의 혈전용해활성을 측정된 결과를 나타내었다. 허브 물 추출물의 경우에는 RFW의 혈전용해활성이 가장 높았고 다음으로 PSLW와 PSSW가 약간의 혈전용해활성을 보였다. 70% 에탄올 추출물의 경우에는 RFW와 PSSE가 혈전용해활성을 보였으며 RSSE, HSE, PSLE, EE 등도 약간의 혈전

용해활성을 보였다. 부위별로 보면 파인애플 세이지의 경우 물 추출물은 잎이나 줄기에서 혈전용해활성이 비슷하게 나타났으나 70% 에탄올 추출물의 경우에는 파인애플 세이지 잎보다는 줄기의 혈전용해활성이 더 컸다. 로즈마리 70% 에탄올 추출물의 경우에도 줄기에서는 활성이 나타났으나 잎에서는 활성이 나타나지 않아 대체적으로 잎보다는 줄기의 활성이 더 컸음을 알 수 있었다. 용매의 종류에 상관없이 장미꽃과 파인애플 세이지에서 혈전용해활성이 큰 것으로 나타났다.

Table 27. Fibrinolytic activities of herb extracts

water extract	activity	70% EtOH extract	activity
MW	-	ME	-
LLW	-	LLE	-
LSW	-	LSE	-
DW	-	DE	-
RSLW	-	RSLE	-
RSSW	-	RSSE	+
HFLW	-	HFLE	-
HSW	-	HSE	+
RFW	+++	RFE	++
LBLSW	-	LBLSE	-
PSLW	+	PSLE	+
PSSW	+	PSSE	++
EW	-	EE	+

Sample solution was 100 mg/mL.

생체내의 혈액은 응고와 용해작용이 항상 평형을 이루고 있으며 정상적으로 순환되고 있을 때에는 혈전이 생성되지 않는다. 그러나 여러 가지 원인으로 균형이 깨져 혈전이 생성되면 혈관이 막히게 되고 혈액 순환이 방해되어 영양분과 산소공급에 영향을 끼쳐 심부전증이나 심장질환 등의 혈전증(thrombosis)으로 사망하게 된다. 이와 같은 혈전형성을 방지하기 위해 혈소판응집을 억제하거나 혈전을 용해할 필요가 있고 그 역할을 하는 항혈소판제제, 즉 혈소판 활성화 억제제 등 항혈전제가 요구된다. 혈전증(thrombosis)의 치료제로는 urokinase, streptokinase, tPA(tissue type plasminogen activator), nattokinase, plasminogen activator 등이 알려져 있다. 이와 더불어 식품에서 유래하는 혈전용해효소를 찾는 연구들이 수행되고 있으며 청국장, 된장, 젓갈, 나토와 같은 발효식품으로부터 혈전

용해효소의 정제 및 생산균주의 분리가 보고되었고 버섯과 대두에서도 활발한 연구가 이루어지고 있다. 김치 및 김치재료의 피브린 분해활성에 대한 보고에서는 김치의 경우 메탄을 추출물이 물추출물에 비해 6배가량 높은 활성을 보였다고 하며 김치재료들에서는 미나리, 사과, 고춧가루, 무 등의 피브린 분해활성이 높았다고 하였다. 반면에 다른 임상연구들에서 혈전용해능이 확인된 마늘의 경우에는 활성이 나타나지 않았다고 하였다. 허브류의 혈전용해활성에 대한 연구는 아직 미흡한 상태이므로 앞으로의 연구에서 다른 허브류에 대한 스크리닝이 계속 되어야 할 것이며 활성이 높게 나타난 허브에 대해서는 생리활성 성분 에 대한 분리동정을 위한 연구가 이어져야 할 것이다.

3. 1차 동물실험 결과 - 녹차, 라벤더, 로즈마리

본 연구의 목적은 동맥경화식이를 섭취하는 햄스터에게 라벤더, 로즈마리, 녹차 추출물을 경구투여하여 6주간 사육하였을 때 햄스터 체내의 지질성분과 대동맥 내에서의 지방의 축적 정도에 미치는 영향을 조사하여 궁극적으로 동맥경화에 대한 개선효과가 있는지 알아보려고 실시되었다.

가. 라벤더

1) 체중과 식이섭취량에 미치는 영향

라벤더 추출물의 경구투여가 동맥경화를 유발시킨 햄스터의 체중에 미치는 영향은 Fig. 8에 나타내었다. 그림에서 보는 것처럼 실험 시작시에 전군에서 체중이 약 112 g 내외로 동일하게 시작되었으며 동맥경화유발 사료를 섭취한 AC군의 체중은 정상대조군에 비해 실험이 진행되는 동안 점차로 증가하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. LV5군은 AC군의 체중보다 약간 높았으며 LV10군은 AC군의 체중보다 약간 낮았으며 정상대조군보다는 높은 체중을 유지하였다. Pitman 등의 연구에서 햄스터에게 atherogenic diet를 섭취시킨 군의 경우 대조군에 비해 체중의 증가량이 유의하게 높았으며 혈중의 콜레스테롤치를 낮추는 약물로 알려진 로바스타틴을 atherogenic diet와 함께 섭취시킨 결과 체중의 증가량이 정상대조군과 유사했다고 보고하였다. 이러한 결과로 볼 때 AC군, LV5 및 LV10군은 동맥경화유발식이에 포함된 coconut oil과 cholesterol에 의

해 체중이 증가한 것으로 보이며 LV5군과 LV10군의 경우에 라벤더 추출물의 섭취가 체중의 증가에는 크게 영향을 미치지 않았음을 알 수 있었다. Table 28에 나타낸 6주간의 체중 증가량은 26-40 g 내외로 전군에서 유의한 차이가 없었다. 햄스터의 일일 식이 섭취량은 NC군이 5.9 g/day로 AC군, LV5 및 LV10군의 6.1-6.4 g/day에 비해 낮았으나 통계적 유의차는 없었으며 체중에 대한 식이섭취량의 비로 나타내 식이효율은 0.11-0.15의 범위로 통계적 유의차를 나타내지 않았다.

2) 혈중 지질성분에 미치는 영향

라벤더 추출물이 동맥경화를 유발시킨 햄스터의 혈중 지질성분에 미치는 영향을 알아보기 위해 혈중 중성지방, 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 및 non-HDL-콜레스테롤치를 분석하여 그 결과를 Table 29에 나타내었다. 혈중 지질성분을 전체적으로 살펴보면 채혈 전 절식을 시켰음에도 불구하고 표준편차가 매우 크게 나타나는 군들이 있는데 이는 Rein 등의 보고에 의하면 햄스터들은 그들의 볼주머니에 음식을 저장할 수 있는 능력이 있는데 이 때문에 변이가 크다고 하였다.

혈중의 중성지방은 정상식을 급여한 NC군은 279.4 mg/dL이었으며 동맥경화유발식을 섭취한 AC군은 약 3배가량 증가한 814.0 mg/dL를 나타내었다. LV5군은 AC군보다 중성지질농도가 좀더 증가하는 경향을 보였으며 LV10군은 601.8 mg/dL로 NC군에 비해 약 2배가량 증가하는데 그쳤다. 이는 Pitman 등의 연구결과와도 일치하는 것으로 정상대조군에 비해 atherogenic diet를 섭취한 군에서 중성지질의 농도는 크게 증가하였고 로바스타틴을 섭취한 군에서는 정상대조군보다는 높지만 많이 감소하는 경향을 보였다.

혈중 총콜레스테롤 함량은 NC군이 172.0 mg/dL이고 AC군이 302.0 mg/dL로 NC군에 비해 AC군이 약 1.8배가량 증가하였다. LV5군은 359.4 mg/dL로 AC군보다 더욱 증가하였으나 LV10군은 283.0 mg/dL로 AC군에 비해 약간 감소하는 경향을 보였다. Pitman 등의 연구에서는 atherogenic diet와 로바스타틴을 같이 섭취한 경우에 총콜레스테롤 함량이 정상대조군과 같은 정도로 회복되는 것으로 나타났다. 그리고 동맥경화유발 식이를 섭취한 군에 비해 로바스타틴을 같이 섭취한 군에서 총 콜레스테롤 함량이 약 63.7% 감소하는 경향을 보였다. 본 연구의 감소폭보다 훨씬 컸으며 이는 Pitman의 연구기간이 본 연구보다 더 긴 11주였던 점과 시료의 종류 및 투여량의 차이에 따라 기인하는 것으로 생

각할 수 있었다. 햄스터를 대상으로 한 많은 연구들에서 포화지방과 콜레스테롤의 급여는 혈중의 LDL receptor의 활성을 down-regulation하고 간장에서의 LDL 생산을 증가시킴으로써 혈장콜레스테롤과 중성지질의 농도를 증가시킨다고 보고하였다.

혈중 HDL 콜레스테롤치는 NC군이 74.6 mg/dL로 가장 낮았으며 AC군은 89.6 mg/dL, LV5군은 94.5 mg/dL 및 LV10군은 94.8 mg/dL로 모두 NC군에 비해 통계적으로 유의하게 높은 경향을 보였다. 이는 보통의 경우 HDL-콜레스테롤이 증가하면 동맥경화나 심장질환의 위험이 감소한다는 견해와 불일치하는 것이었다. 그러나 여러 연구들에서 햄스터의 동맥내의 지질축적이 감소하는 경우에 동시에 HDL-콜레스테롤치가 감소한다는 보고가 있었다. Woollett 등의 연구에서는 햄스터에게 고콜레스테롤 식이를 급여하면 혈장의 HDL과 LDL 콜레스테롤이 동시에 증가하지만 이것이 reverse cholesterol transport의 정도가 증가한 것은 아니라고 하였다. 즉 다시 말해 햄스터에 있어서 HDL 콜레스테롤의 증가가 동맥경화에 따른 변화를 예방하는데 유의하지 않을 수도 있다고 하였다. Otto 등의 연구에서는 로바스타틴이 식이로 유도된 HDL-콜레스테롤의 증가에 영향을 미치지 않으면서 선택적으로 동맥경화 유발인자들을 저해하는 것이라고 하였으며 이는 토끼와 비둘기를 대상으로 한 연구에서도 관찰되었다. 이러한 결과는 Uehara 등의 연구에서도 유사하게 나타났다. SUN-C8257(3-[(3-amino-4-carboxy) phenylsulfonyl]-7-chloroquinazoline - 2,4 (1H,3H)-dione)은 chymase 저해제의 하나로 체내에서 chymase의 작용을 저해한다고 하였다. 사람의 동맥경화성 대동맥에는 유의하게 높은 chymase-dependent Ang II-forming activity(dAIIFA)가 존재한다고 하며 또한 혈청 LDL 콜레스테롤치에 양의 상관관계를 갖는다고 하였다. 이러한 사실은 동맥내의 chymase은 고콜레스테롤혈증인 경우에 더욱 증가하며 동맥경화증의 발생에 중요한 역할을 할 것으로 짐작된다. 즉 chymase를 저해함으로써 동맥경화를 억제하는 효과를 볼 수 있다는 가정하에 Uehara의 연구가 진행되었다. 고콜레스테롤 식이를 햄스터에게 급여한 결과 혈중의 HDL 콜레스테롤이 증가하였으며 SUN-C8257이라는 chymase 저해제를 처리한 군에서는 HDL 콜레스테롤이 오히려 약간 감소하는 경향을 보였다. 이로써 SUN-C8257의 처리가 대동맥의 지질축적을 감소시키는 역할을 하는데 있어서 HDL의 대사과정과 reverse cholesterol transport를 변화시키는 것으로 짐작할 수 있었다고 하였다. 결국 이러한 현상은 동맥경화를 감소시키는 또 다른 메커니즘일 것으로 추측되어졌다.

Non-HDL-콜레스테롤의 함량은 혈중 총콜레스테롤 함량에서 HDL-콜레스테롤 함량을 뺀 값으로 NC군은 97.4 mg/dL로 가장 낮았으며 AC군은 212.4 mg/dL이고 LV5군은 264.9 mg/dL로 NC군에 비해 높았으나 LV10군은 188.3 mg/dL로 AC군에 비해 약간 감소하였다. Nistor 등의 보고에 의하면 일반사료에 콜레스테롤이 3%, 버터가 15% 첨가된 고지방식이를 섭취한 햄스터를 12개월간 사육하여 동맥경화가 유발되는 과정을 설명하였다. 혈청 총콜레스테롤치의 경우에 3주만에 정상군에 비해 2배 증가하였고 4주째에는 4배가 증가하고 10개월 후에는 약 17배로 증가하였다. 혈중 LDL-콜레스테롤은 섭취 4주째에 약 4배정도 증가하였고 섭취한 지 약 10개월 후에는 대조군에 비해 약 13배 정도 증가하였다고 했다. 또한 이와 더불어 대동맥궁내의 혈관벽을 관찰한 결과 2주째부터 mononuclear cell이 혈관내벽에 붙기 시작하고 약 4주째 말기에는 특히 대동맥궁 내에 oil red O에 의해 붉게 염색되는 지질의 축적이 관찰되었다. 6개월 정도 지난후에는 smooth muscle cell에 지질이 축적되기 시작하였고 10개월 후에는 사람의 atherosclerotic plaque와 유사한 거대한 콜레스테롤 덩어리와 칼슘축적 및 괴사가 일어나는 등의 병변이 생겼다. 본 연구에서도 콜레스테롤 0.1%와 coconut oil 10%를 함유한 사료를 급여한지 6주째에 혈액검사와 해부학적 검사를 실시한 결과 정상대조군에 비해 동맥경화유발대조군에서 총콜레스테롤과 LDL 콜레스테롤이 증가하였으며 대동맥궁내에 지질이 축적되었음을 확인할 수 있었다. 단 본 연구에서는 Nistor 등의 연구에 비해 콜레스테롤과 지방의 첨가량이 적어서 그 영향으로 상대적으로 증가폭이 작았다.

위의 혈액 중 지질성분 분석결과를 토대로 하여 동맥경화지수와 심장위험지수를 계산한 결과는 Table 30에 나타내었다. 동맥경화지수는 체내 고밀도 지단백질에 대한 중성지질의 농도를 대표하는 값으로 임상에서 3.0 이상의 값을 나타낼 때 동맥경화에 대한 위험신호로 사용하고 있다. 심혈관위험지수는 동맥경화지수와 더불어 심혈관계질환에 대한 위험신호로 사용되고 있으며 임상에서 7.0 이상의 수치를 나타낼 때 위험신호로 인지된다. 동맥경화지수와 심장위험지수가 높을수록 동맥경화나 심혈관계 질환에 걸릴 위험성이 높다고 할 수 있는데, 본 실험에서는 NC군이 AI는 1.3, CRF는 2.3으로 낮았으며 AC군은 AI가 2.6, CRF가 3.6을 NC군에 비해서 유의적으로 높았다. LV5군은 AI가 2.9, CRF가 3.9로 AC군에 비해 높지만 통계적 유의차는 없으며 LV10의 경우 AI가 2.0, CRF가 3.0으로 AC군에 비해 낮아지는 경향을 보였다. Faia 등의 연구에서는 햄스터에게 1% 콜레스

테롤과 22% coconut oil을 함유한 식이를 12주, 24주, 49주간 급여한 결과 혈중 총콜레스테롤 함량이 급격하게 증가하여 심장위험지수가 정상대조군에 비해 약 10배 정도 높아졌다고 보고하였다. 본 연구에서는 Faia 등의 연구에서 사용된 식이보다는 콜레스테롤과 coconut oil의 함유량이 적어 총 콜레스테롤치가 증가하는 폭은 작았지만 그래도 정상대조군에 비해 동맥경화유발식이를 급여한 군의 심장위험지수는 높아지는 경향을 보였다.

이로써 라벤더 추출물의 섭취로 인해 동맥경화가 유발된 햄스터의 혈중 중성지방, 총콜레스테롤, non HDL-콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤치를 분석한 결과 라벤더 추출물을 500 mg/kg B.W.의 농도로 투여한 군에서는 혈중지질성분의 감소효과가 전혀 없었으나 1000 mg/kg B.W.의 농도로 투여한 군에서는 혈중 중성지질, 총 콜레스테롤 및 non HDL-콜레스테롤치가 감소하는 경향을 보여 개선효과가 있음을 확인하였다.

3) 햄스터 체내 장기의 무게변화와 간기능 지표의 변화

라벤더 추출물의 투여가 동맥경화를 유발한 햄스터의 장기무게에 미치는 영향을 알아보기 위해 간장, 심장, 신장 및 비장을 적출하여 무게를 측정하였으며 그 결과는 Table 31에 나타내었다. 간장의 무게는 NC군은 3.3 g/100 g B.W.이고 AC군, LV5군 및 LV10군은 각각 4.1, 4.1 및 3.9 g/100 g B.W.로 NC군에 비해 모두 유의적으로 높은 경향을 보였다. 이는 고지방/고콜레스테롤 식이의 섭취로 인해 간장내 지질이 축적되어 간장이 상당히 비대해진다는 것을 확인하였다. 심장의 경우에는 NC군은 0.40 g/100 g B.W.으로 AC군의 0.36 g/100 g B.W.보다 유의적으로 높았으며 LV5군과 LV10군은 각각 0.28, 0.30 g/100 g B.W.으로 NC군이나 AC군에 비해 심장의 무게가 작은 경향을 보였다. 신장과 비장의 무게는 전군에서 유의한 차이를 나타내지 않았다.

라벤더 추출물의 투여로 인한 간손상 정도를 알아보기 위해 간기능 지표인 혈액내의 SGOT와 SGPT의 활성을 측정하였으며 그 결과는 Table 32에 나타내었다. SGOT 활성은 전군에서 45.6-52.6 U/L의 범위로 나타났으며 통계적 유의차는 없었으며 SGPT 또한 75.1-81.5 U/L의 범위로 통계적 유의차를 나타내지 않았다. 일반적으로 볼 때 본 연구에서 사용한 햄스터의 경우에 SGOT 활성은 약 35-57 U/L의 범위에 있을 때 정상수준이며 SGPT 활성은 47-67 U/L 정도에 들면 정상수준이라고 한다. 이에 따르면 SGOT 활성은 전군이 정상범위에 들었으며 SGPT의 경우에는 전군이 정상범위를 약간 웃도는 수준이지

만 이 정도의 오차는 실험방법상으로 차이가 날 수 있는 것으로 큰 의미가 없다고 할 수 있어서 라벤더 추출물의 투여가 햄스터의 간손상을 유발하지 않아서 투여량이 적정한 선이었음을 알 수 있었다.

4) 간장내의 HMG-CoA reductase 와 LDL receptor의 mRNA의 변화

라벤더 추출물의 투여가 동맥경화 유발식을 섭취한 햄스터의 간장에서의 HMG-CoA reductase 및 LDL receptor mRNA level에 미치는 영향을 알아보기 위하여 real-time PCR로 분석하였으며 그 결과를 Fig. 9에 나타내었다. HMG-CoA reductase mRNA level의 경우 정상대조군을 1로 놓고 AC군, LV5군 및 LV10군을 비교한 결과, 전군에서 유의한 차이를 나타내지는 않았지만 NC군에 비해 AC군은 약간 증가하였고 LV5군은 AC군보다 더욱 증가하였으며 LV10군은 AC군에 비해 약간 감소하는 경향을 보였다. LDL receptor의 경우에는 정상대조군의 mRNA level을 1로 보았을 때 NC군에 비해 AC군, LV5군 및 LV10군에서 통계적으로 유의하게 감소하는 경향을 보였으며 LV10군은 AC군에 비해 약간 증가하였다. Chambers 등에 따르면 콜레스테롤을 식이로 섭취하게 되면 HMG-CoA reductase의 활성이 감소함에 따라 내인성 콜레스테롤의 합성이 감소한다고 보고되어졌다. Dorfman 등이 햄스터를 대상으로 기본적으로 콜레스테롤을 0.1% 첨가한 식이에 butter, stick margarine, canola oil 및 soybean oil을 각각 10% 첨가하여 급여한 실험에서 지질의 첨가로 인해 지질의 종류에 상관없이 HMG-CoA reductase의 활성을 감소시키는 현상이 둔화되며 이러한 둔화현상은 지질의 cis-불포화도가 높을수록 증가한다고 보고하였다.

5) 대동맥궁내에서의 지방선의 축적 정도

라벤더 추출물의 투여가 동맥경화를 유발시킨 햄스터의 대동맥에서의 지방 축적에 미치는 영향을 알아보기 위하여 햄스터의 대동맥궁 내벽을 Oil red O로 염색한 후 현미경으로 관찰하였으며 현미경 사진은 Fig. 10에 나타내었다.

Adams 등은 지용성인 bis-azo 염색약인 Oil red O는 수단 용액들 중의 하나로 조직 내에 축적된 지질의 현미경 관찰에 널리 이용되어진다고 하였다. 또한 햄스터 대동맥내의 지질축적에 관한 다른 연구들에 따르면 Oil red O에 의해 붉게 염색된 대동맥의 지질부

분의 면적을 계산하여 도표화하였으나 본 연구에서는 면적을 구하기에 어려움이 있어 현미경상의 사진으로만 지질의 축적정도를 관찰하였다. NC군의 대동맥궁 내벽의 사진에는 Oil red O에 의해 붉게 염색된 부분이 보이지 않아서 지질의 축적이 거의 없었으며 AC군은 붉게 염색된 부분이 NC군에 비해 약간씩 존재하였다. Faia 등의 연구에서 약 12주간 고지방/고콜레스테롤 식이를 급여한 햄스터의 대동맥궁내에는 fatty streak lesion이 존재하였으며 이는 초기 동맥경화증의 증세로 본래의 혈관내막을 foam cell이 덮고 있다고 하였다. 이에 따라 본 연구에서도 AC군의 대동맥궁 사진으로 보아 초기 동맥경화증이 진행된 상태로 판단되었다. LV5군의 대동맥궁 내벽의 사진은 AC군과 거의 차이가 없었으나 LV10군의 경우에는 붉게 염색된 부분이 조금 줄어든 것을 확인할 수 있었다. 이로써 라벤더 추출물의 투여가 1000 mg/kg B.W.의 농도로 경구투여한 경우에는 고지방/고콜레스테롤 식이의 섭취로 인해 대동맥내벽에 쌓이는 지질의 축적 정도를 경감시키는 효과가 있음을 알 수 있었다. 동맥경화유발 식이를 섭취한 햄스터의 foam cell 축적을 예방하는 것으로는 bile acid sequestrant, cholesterylamine 혹은 α -1 adrenergic inhibitor와 doxazosin 등이 있으며 lovastatin도 동일한 작용이 있음이 밝혀졌다.

6) 요약

8주령의 F1B golden Syrian 햄스터에게 동맥경화 유발식이와 함께 라벤더 추출물을 각각 500 혹은 1000 mg/kg B.W.의 양을 매일 경구투여하면서 6주간 사육하였을 때 햄스터 체내의 지질성분과 대동맥 내에서의 지방의 축적 정도에 미치는 영향을 조사하였다. 라벤더 추출물의 섭취로 인해 동맥경화가 유발된 햄스터의 혈중 중성지방, 총콜레스테롤, non-HDL-콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤치를 분석한 결과 라벤더 추출물을 500 mg/kg B.W.의 농도로 투여한 군에서는 혈중지질성분의 감소효과가 전혀 없었으나 1000 mg/kg B.W.의 농도로 투여한 군에서는 혈중 중성지방, 총 콜레스테롤 및 non HDL-콜레스테롤치가 감소하는 경향을 보여 개선효과가 있음을 확인하였다. 또한 햄스터의 대동맥궁 내벽에서의 지질의 축적 정도를 경감시키는 효과도 있어서 라벤더 추출물의 식이보조제로서의 가능성을 확인하였다.

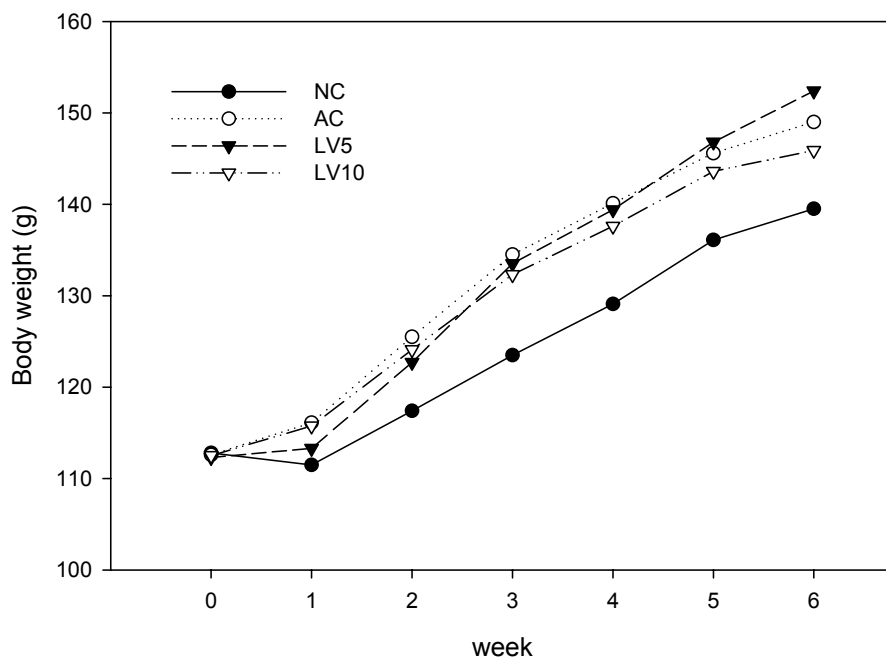


Fig. 8. Changes of body weight for 6 weeks. NC group(-●-) were fed normal diets, AC group(-○-) were fed atherogenic diets, LV5 group(-▼-) and LV10(-▽-) group were orally administrated lavender extract 500 mg/kg B.W. or 1000 mg/kg B.W. with atherogenic diets. There was no significance.

Table 28. Body weight gain, food intake and food efficiency ratio

Groups ¹⁾	Body weight gain (g/6 weeks)	Food intake (g/day)	Food efficiency ratio ²⁾
NC	26.7±7.3 ^{3)N.S.4)}	5.9±0.6 ^{N.S.}	0.11±0.02 ^{N.S.}
AC	36.4±14.6	6.4±0.6	0.14±0.02
LV5	40.1±6.8	6.4±0.4	0.15±0.005
LV10	33.5±7.1	6.1±0.1	0.13±0.01

1) NC group were fed normal diets, AC group were fed atherogenic diets, LV5 group and LV10 group were orally administrated lavender extract 500 mg/kg B.W. or 1000 mg/kg B.W. with atherogenic diets.

2) FER = Body weight gain for 6 weeks/ Food intake for 6 weeks

3) Mean±Standard deviation (n=7-8).

4) Not significant

Table 29. Plasma triglyceride(TG), total cholesterol, HDL-cholesterol and non-HDL-cholesterol concentrations

Groups ¹⁾	Triglyceride (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	HDL-cholesterol (mg/dL)	Non HDL-cholesterol ²⁾ (mg/dL)
NC	279.4±85.2 ^{3)c4)}	172.0±25.2 ^c	74.6±12.7 ^b	97.4±13.4 ^c
AC	814.0±152.3 ^{ab}	302.0±36.0 ^{ab}	89.6±20.8 ^a	212.4±30.6 ^{ab}
LV5	1111.9±539.3 ^a	359.4±82.4 ^a	94.5±7.8 ^a	264.9±87.9 ^a
LV10	601.8±351.5 ^{bc}	283.0±63.3 ^b	94.8±7.5 ^a	188.3±60.5 ^b

1) NC group were fed normal diets, AC group were fed atherogenic diets, LV5 group and LV10 group were orally administrated lavender extract 500 mg/kg B.W. or 1000 mg/kg B.W. with atherogenic diets.

2) Non HDL-cholesterol = (Total cholesterol) - (HDL-cholesterol)

3) Mean±Standard deviation (n=7-8).

4) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 30. Atherogenic index and cardiac risk factor

Groups ¹⁾	Atherogenic index ²⁾	Cardiac risk factor ³⁾
NC	1.3±0.1 ^{4) b5)}	2.3±0.1 ^b
AC	2.6±1.0 ^a	3.6±1.0 ^a
LV5	2.9±1.1 ^a	3.9±1.1 ^a
LV10	2.0±0.6 ^{ab}	3.0±0.6 ^{ab}

1) NC group were fed normal diets, AC group were fed atherogenic diets, LV5 group and LV10 group were orally administrated lavender extract 500 mg/kg B.W. or 1000 mg/kg B.W. with atherogenic diets.

2) Atherogenic index = (total cholesterol - HDL cholesterol)/HDL cholesterol

3) Cardiac risk factor = total cholesterol/HDL cholesterol

4) Mean±Standard deviation (n=7-8).

5) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 31. Organs weight

Groups ¹⁾	Liver	Heart	Kidney	Pancreas
	(g/100g B.W.)	(g/100g B.W.)	(g/100g B.W.)	(g/100g B.W.)
NC	3.3±0.2 ^{2)b3)}	0.40±0.04 ^a	0.72±0.04 ^{N.S.}	0.086±0.014 ^{N.S.}
AC	4.1±0.3 ^a	0.36±0.05 ^b	0.73±0.05	0.093±0.020
LV5	4.1±0.1 ^a	0.28±0.02 ^c	0.72±0.03	0.081±0.010
LV10	3.9±0.3 ^a	0.30±0.02 ^c	0.77±0.03	0.091±0.012

1) NC group were fed normal diets, AC group were fed atherogenic diets, LV5 group and LV10 group were orally administrated lavender extract 500 mg/kg B.W. or 1000 mg/kg B.W. with atherogenic diets.

2) Mean±Standard deviation(n=7-8).

3) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test.

4) not significant

Table 32. SGOT, SGPT activities and blood glucose levels

Groups ¹⁾	SGOT (U/L)	SGPT (U/L)	Glucose (mg/dL)
NC	46.9±8.2 ^{2)N.S.3)}	75.1±6.9 ^{N.S.}	150.9±33.5 ^{a4)}
AC	50.5±6.1	81.3±15.5	115.0±25.9 ^b
LV5	52.6±9.8	78.8±9.3	131.4±30.4 ^{ab}
LV10	45.6±4.3	81.5±8.8	112.1±12.5 ^b

1) NC group were fed normal diets, AC group were fed atherogenic diets, LV5 group and LV10 group were orally administrated lavender extract 500 mg/kg B.W. or 1000 mg/kg B.W. with atherogenic diets.

2) Mean±Standard deviation(n=7-8).

3) Not significant

4) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test.

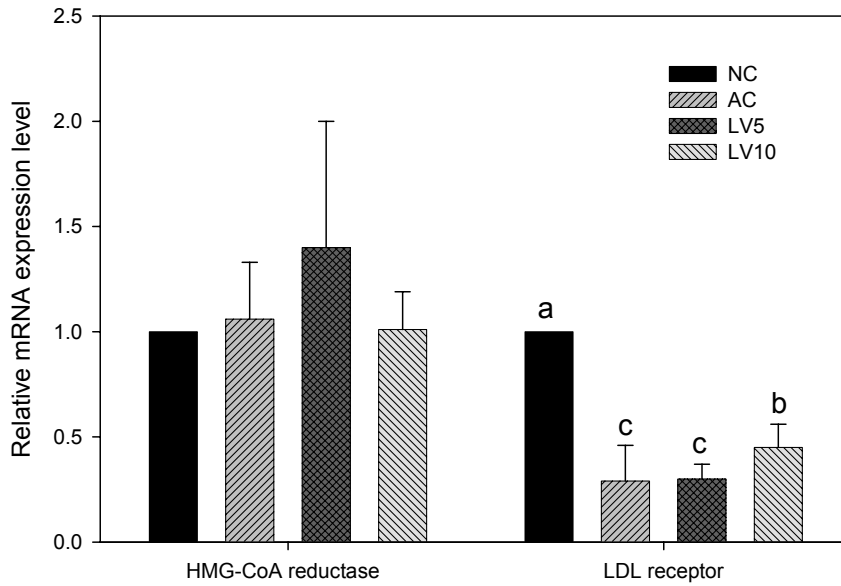


Fig. 9. Hepatic mRNA levels of HMG-CoA reductase and LDL receptor in F1B hamsters. Relative mRNA expression levels of HMG-CoA reductase and LDL receptor were measured by SYBR green I PCR analysis. Values represent the ratio of the target gene/GAPDH of the treated animals to that of the normal control, where the value for normal control was set at 1.0.

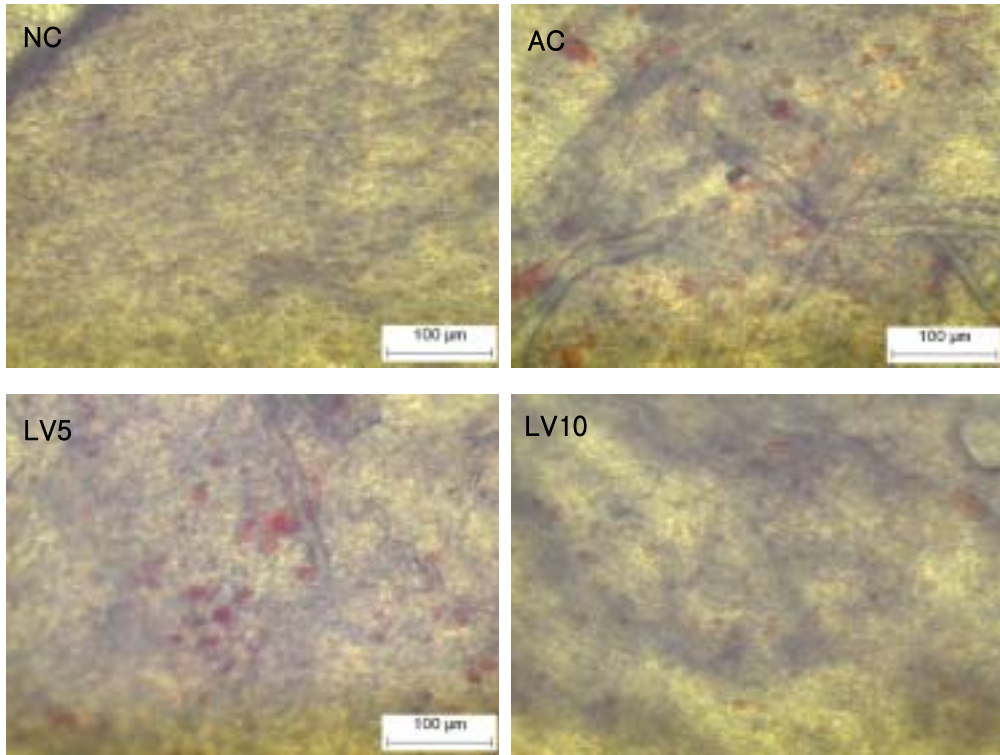


Fig. 10. Computer-generated micrographs of lipid-stained (oil red O) aortic arch sections of hamsters. NC group were fed normal diets, AC group were fed atherogenic diets, LV5 group and LV10 group were orally administered lavender extract 500 mg/kg B.W. or 1000 mg/kg B.W. with atherogenic diets. Shown is the inner surface of aortic arch from an animal in each group.

나. 로즈마리

1) 체중과 식이섭취량에 미치는 영향

로즈마리 추출물을 경구투여한 동맥경화를 유발시킨 햄스터의 체중의 변화는 Fig. 11에 나타내었다. 그림에서 보는 것처럼 실험 시작시에 전군에서 체중이 약 112 g 내외로 동일하게 시작되었으며 동맥경화유발 사료를 섭취한 AC군의 체중은 정상대조군에 비해 실험이 진행되는 동안 점차로 증가하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 나타내지 않았다. RM5군과 RM10군의 체중은 실험 3주째에 NC군과 비슷한 수준으로 감소하였다가 다시 AC군과 비슷한 수준으로 증가하면서 실험 마지막에는 RM5군의 체중은 AC군과 거의 유사하였으며 RM10군도 NC군보다는 높은 수준을 유지하였다. Pitman 등의 연구에서 햄스터에게 atherogenic diet를 섭취시킨 군의 경우 대조군에 비해 체중의 증가량이 유의하게 높았으며 혈중의 콜레스테롤치를 낮추는 약물로 알려진 로바스타틴을 atherogenic diet와 함께 섭취시킨 결과 체중의 증가량이 정상대조군과 유사했다고 보고하였다. 이러한 결과로 볼 때 AC군, LV5 및 LV10군은 동맥경화유발식이에 포함된 coconut oil과 cholesterol에 의해 체중이 증가한 것으로 보이며 RM5군과 RM10군의 경우에 라벤더 추출물의 섭취가 체중의 증가에는 크게 영향을 미치지 않았음을 알 수 있었다. Table 33에서 6주간의 체중 증가량은 26-36 g 내외로 전군에서 유의한 차이가 없었다. 햄스터의 일일 식이 섭취량은 NC군이 5.9 g/day로 AC군, LV5 및 LV10군의 6.1-6.4 g/day에 비해 낮았으나 통계적 유의차는 없었으며 체중에 대한 식이섭취량의 비로 나타낸 식이효율은 0.11-0.14의 범위로 통계적 유의차를 나타내지 않았다.

2) 혈중 지질성분에 미치는 영향

로즈마리 추출물의 경구투여가 동맥경화를 유발시킨 햄스터의 혈중 지질성분에 미치는 영향을 알아보기 위해 혈중 중성지방, 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 및 non HDL-콜레스테롤치를 분석하여 그 결과를 Table 34에 나타내었다. 혈중 지질성분을 전체적으로 살펴보면 채혈 전 절식을 시켰음에도 불구하고 표준편차가 매우 크게 나타나는 군들이 있는데 이는 Rein 등의 보고에 의하면 햄스터들은 그들의 볼주머니에 음식을 저장할 수 있는 능력이 있는데 이 때문에 변이가 크다고 하였다.

혈중의 중성지방은 정상식이를 급여한 NC군은 279.4 mg/dL였으며 동맥경화유발식이를 섭취한 AC군은 약 3배가량 증가한 814.0 mg/dL를 나타내었다. RM5군과 RM10군의 중성지방농도는 각각 867.8, 808.3 mg/dL로 AC군과 유의한 차이를 나타내지 않았다. Pitman 등의 연구에서는 정상대조군에 비해 atherogenic diet를 섭취한 군에서 중성지방의 농도는 크게 증가하였고 로바스타틴을 섭취한 군에서는 정상대조군보다는 높지만 많이 감소하는 경향을 보였다고 보고하였다. 본 연구결과와는 차이를 보이는 것으로 로즈마리 추출물의 경구투여가 햄스터의 혈중 중성지방의 감소에 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

혈중 총콜레스테롤 함량은 NC군이 172.0 mg/dL이고 AC군이 302.0 mg/dL로 NC군에 비해 AC군이 약 1.8배가량 증가하였다. RM5군과 RM10군은 각각 305.4, 305.8 mg/dL로 AC군과 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다. Pitman 등의 연구에서는 atherogenic diet와 로바스타틴을 같이 섭취한 경우에 총콜레스테롤 함량이 정상대조군과 같은 정도로 회복되는 것으로 나타났다. 그리고 동맥경화유발 식이를 섭취한 군에 비해 로바스타틴을 같이 섭취한 군에서 총 콜레스테롤 함량이 약 63.7% 감소하는 경향을 보였다. 햄스터를 대상으로 한 많은 연구들에서 포화지방과 콜레스테롤의 급여는 혈중의 LDL receptor의 활성을 down-regulation하고 간장에서의 LDL 생산을 증가시킴으로써 혈장콜레스테롤과 중성지방의 농도를 증가시킨다고 보고하였다.

혈중 HDL 콜레스테롤치는 NC군이 74.6 mg/dL로 가장 낮았으며 AC군은 89.6 mg/dL, RM5군은 90.1 mg/dL 및 RM10군은 96.1 mg/dL로 모두 NC군에 비해 통계적으로 유의하게 높은 경향을 보였다. 이는 보통의 경우 HDL-콜레스테롤이 증가하면 동맥경화나 심장질환의 위험이 감소한다는 견해와 불일치하는 것이었다. 그러나 여러 연구들에서 햄스터의 동맥내의 지질축적이 감소하는 경우에 동시에 HDL-콜레스테롤치가 감소한다는 보고가 있었다. Woollett 등의 연구에서는 햄스터에게 고콜레스테롤 식이를 급여하면 혈장의 HDL과 LDL 콜레스테롤이 동시에 증가하지만 이것이 reverse cholesterol transport의 정도가 증가한 것은 아니라고 하였다. 즉 다시 말해 햄스터에 있어서 HDL 콜레스테롤의 증가가 동맥경화에 따른 변화를 예방하는데 유의하지 않을 수도 있다고 하였다. Otto 등의 연구에서는 로바스타틴이 식이로 유도된 HDL-콜레스테롤의 증가에 영향을 미치지 않으면서 선택적으로 동맥경화 유발인자들을 저해하는 것이라고 하였으며 이는 토끼와 비둘기를 대상으로 한 연구에서도 관찰되었다. 이러한 결과는 Uehara 등의 연구에서도 유

사하게 나타났다. SUN-C8257 (3-[(3-amino-4-carboxy) phenylsulfonyl]-7-chloroquinazoline-2,4(1H,3H)-dione)은 chymase 저해제의 하나로 체내에서 chymase의 작용을 저해한다고 하였다. 사람의 동맥경화성 대동맥에는 유의하게 높은 chymase-dependent Ang II-forming activity(dAIIFA)가 존재한다고 하며 또한 혈청 LDL 콜레스테롤치에 양의 상관관계를 갖는다고 하였다. 이러한 사실은 동맥내의 chymase은 고콜레스테롤혈증인 경우에 더욱 증가하며 동맥경화증의 발생에 중요한 역할을 할 것으로 짐작된다. 즉 chymase를 저해함으로써 동맥경화를 억제하는 효과를 볼 수 있다는 가정하에 Uehara의 연구가 진행되었다. 고콜레스테롤 식이를 햄스터에게 급여한 결과 혈중의 HDL 콜레스테롤이 증가하였으며 SUN-C8257이라는 chymase 저해제를 처리한 군에서는 HDL 콜레스테롤이 오히려 약간 감소하는 경향을 보였다. 이로써 SUN-C8257의 처리가 대동맥의 지질축적을 감소시키는 역할을 하는데 있어서 HDL의 대사과정과 reverse cholesterol transport를 변화시키는 것으로 짐작할 수 있었다고 하였다. 결국 이러한 현상은 동맥경화를 감소시키는 또 다른 메커니즘일 것으로 추측되어졌다.

Non-HDL-콜레스테롤의 함량은 혈중 총콜레스테롤 함량에서 HDL-콜레스테롤 함량을 뺀 값으로 NC군은 97.4 mg/dL로 가장 낮았으며 AC군은 212.4 mg/dL로 NC군에 비해 유의하게 높았다. Nistor 등의 보고에 의하면 일반사료에 콜레스테롤이 3%, 버터가 15% 첨가된 고지방식이를 섭취한 햄스터를 12개월간 사육하여 동맥경화가 유발되는 과정을 설명하였다. 혈청 총콜레스테롤치의 경우에 3주만에 정상군에 비해 2배 증가하였고 4주째에는 4배가 증가하고 10개월 후에는 약 17배로 증가하였다. 혈중 LDL-콜레스테롤은 섭취 4주째에 약 4배정도 증가하였고 섭취한 지 약 10개월 후에는 대조군에 비해 약 13배 정도 증가하였다고 했다. 또한 이와 더불어 대동맥궁내의 혈관벽을 관찰한 결과 2주째부터 mononuclear cell이 혈관내벽에 붙기 시작하고 약 4주째 말기에는 특히 대동맥궁 내에 oil red O에 의해 붉게 염색되는 지질의 축적이 관찰되었다. 6개월 정도 지난 후에는 smooth muscle cell에 지질이 축적되기 시작하였고 10개월 후에는 사람의 atherosclerotic plaque와 유사한 거대한 콜레스테롤 덩어리와 칼슘축적 및 괴사가 일어나는 등의 병변이 생겼다. 본 연구에서도 콜레스테롤 0.1%와 coconut oil 10%를 함유한 사료를 급여한지 6주째에 혈액검사와 해부학적 검사를 실시한 결과 정상대조군에 비해 동맥경화유발대조군에서 총콜레스테롤과 LDL 콜레스테롤이 증가하였으며 대동맥궁내에 지질이 축적되었음을 확

인할 수 있었다. 단 본 연구에서는 Nistor 등의 연구에 비해 콜레스테롤과 지방의 첨가량이 적어서 그 영향으로 상대적으로 증가폭이 작았다.

위의 혈액 중 지질성분 분석결과를 토대로 하여 동맥경화지수와 심장위험지수를 계산한 결과는 Table 35에 나타내었다. 동맥경화지수는 체내 고밀도 지단백질에 대한 중성지질의 농도를 대표하는 값으로 임상에서 3.0 이상의 값을 나타낼 때 동맥경화에 대한 위험신호로 사용하고 있다. 심혈관위험지수는 동맥경화지수와 더불어 심혈관계질환에 대한 위험신호로 사용되고 있으며 임상에서 7.0 이상의 수치를 나타낼 때 위험신호로 인지된다. 동맥경화지수와 심장위험지수가 높을수록 동맥경화나 심혈관계 질환에 걸릴 위험성이 높다고 할 수 있는데, 본 실험에서는 NC군의 AI는 1.3, CRF는 2.3으로 낮았으며 AC군의 AI가 2.6, CRF가 3.6으로 NC군에 비해서 유의적으로 높았다. RM5군 AI는 2.4, CRF가 3.4이고 RM10군의 경우 AI가 2.2, CRF가 3.2으로 AC군에 비해 약간 낮아지는 경향을 보였으나 통계적 유의차는 없었다. Faia 등의 연구에서는 햄스터에게 1% 콜레스테롤과 22% coconut oil을 함유한 식이를 12주, 24주, 49주간 급여한 결과 혈중 총콜레스테롤 함량이 급격하게 증가하여 심장위험지수가 정상대조군에 비해 약 10배 정도 높아졌다고 보고하였다. 본 연구에서는 Faia 등의 연구에서 사용된 식이보다는 콜레스테롤과 coconut oil의 함유량이 적어 총 콜레스테롤치가 증가하는 폭은 작았지만 그래도 정상대조군에 비해 동맥경화유발식이를 급여한 군의 심장위험지수는 높아지는 경향을 보였다.

이로써 로즈마리 추출물의 섭취로 인해 동맥경화가 유발된 햄스터의 혈중 중성지방, 총콜레스테롤, non-HDL-콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤치를 분석한 결과 로즈마리 추출물은 햄스터의 혈중 지질성분을 감소시키는 효과가 나타나지 않았다. 이는 in vitro test의 결과와는 상반되는 것으로 투여량의 문제이거나 체내에서 로즈마리 추출물이 대사되는 과정에서 생리활성이 사라졌을 것이라고 추측된다.

3) 햄스터 체내 장기의 무게변화와 간기능 지표의 변화

로즈마리 추출물의 투여가 동맥경화를 유발한 햄스터의 장기무게에 미치는 영향을 알아보기 위해 간장, 심장, 신장 및 비장을 적출하여 무게를 측정하였으며 그 결과는 Table 36에 나타내었다. 간장의 무게는 NC군은 3.3 g/100 g B.W.이고 AC군, RM5군 및 RM10군은 모두 4.1 g/100 g B.W. 내외로 나타나 NC군에 비해 모두 유의적으로 높은 경향을

보였다. 이는 고지방/고콜레스테롤 식이의 섭취로 인해 간장내 지질이 축적되어 간장이 상당히 비대해진다는 것을 확인하였다. 심장의 경우에는 NC군은 0.40 g/100 g B.W.으로 AC군의 0.36 g/100 g B.W.보다 유의적으로 높았으며 RM5군과 RM10군은 각각 0.30, 0.32 g/100 g B.W.으로 NC군이나 AC군에 비해 심장의 무게가 감소하는 경향을 보였다. 신장과 비장의 무게는 전군에서 유의한 차이를 나타내지 않았다.

로즈마리 추출물의 투여로 인한 간손상 정도를 알아보기 위해 간기능 지표인 혈액내의 SGOT와 SGPT의 활성을 측정하였으며 그 결과는 Table 37에 나타내었다. SGOT 활성은 전군에서 41.8-50.5 U/L의 범위로 나타났으며 통계적 유의차는 없었으며 SGPT 또한 75.1-84.5 U/L의 범위로 통계적 유의차를 나타내지 않았다. 일반적으로 볼 때 본 연구에서 사용한 햄스터의 경우에 SGOT 활성은 약 35-57 U/L의 범위에 있을 때 정상수준이며 SGPT 활성은 47-67 U/L 정도에 들면 정상수준이라고 한다. 이에 따르면 SGOT 활성은 전군이 정상범위에 들었으며 SGPT의 경우에는 전군이 정상범위를 약간 웃도는 수준이지만 이 정도의 오차는 분석방법상으로 차이가 날 수 있는 것으로 큰 의미가 없는 것으로 로즈마리 추출물의 경구투여량이 햄스터의 간손상을 유발하지 않는 적절한 선이었음을 알 수 있었다.

4) 간장내의 HMG-CoA reductase 와 LDL receptor의 mRNA의 변화

로즈마리 추출물의 투여가 동맥경화 유발식을 섭취한 햄스터의 간장에서의 HMG-CoA reductase 및 LDL receptor mRNA level에 미치는 영향을 알아보기 위하여 real-time PCR로 분석하였으며 그 결과를 Fig. 12에 나타내었다. HMG-CoA reductase mRNA level의 경우 정상대조군을 1로 놓고 AC군, RM5군 및 RM10군을 비교한 결과, 유의한 차이는 아니지만 NC군에 비해 AC군은 약간 증가하였다. RM5군과 RM10군은 AC군에 비해 유의하게 감소하는 경향을 보였다. LDL receptor의 경우에는 정상대조군의 mRNA level을 1로 보았을 때 NC군에 비해 AC군은 확연하게 감소하였으며 RM5군 및 RM10군은 AC군에 비해서는 유의하게 증가하는 경향을 보였다. Chambers 등에 따르면 콜레스테롤을 식이로 섭취하게 되면 HMG-CoA reductase의 활성이 감소함에 따라 내인성 콜레스테롤의 합성이 감소한다고 보고되어졌다. Dorfman 등이 햄스터를 대상으로 기본적으로 콜레스테롤을 0.1% 첨가한 식이에 butter, stick margarine, canola oil 및

soybean oil을 각각 10% 첨가하여 급여한 실험에서 지질의 첨가로 인해 지질의 종류에 상관없이 HMG-CoA reductase의 활성을 감소시키는 현상이 둔화되며 이러한 둔화현상은 지질의 cis-불포화도가 높을수록 증가한다고 보고하였다.

5) 대동맥궁내에서의 지방선의 축적 정도

로즈마리 추출물의 투여가 동맥경화를 유발시킨 햄스터의 대동맥에서의 지방 축적에 미치는 영향을 알아보기 위하여 햄스터의 대동맥궁 내벽을 Oil red O로 염색한 후 현미경으로 관찰하였으며 현미경 사진은 Fig. 13에 나타내었다.

Adams 등은 지용성인 bis-azo 염색약인 Oil red O는 수단 용액들 중의 하나로 조직 내에 축적된 지질의 현미경 관찰에 널리 이용되어진다고 하였다. 또한 햄스터 대동맥내의 지질축적에 관한 다른 연구들에 따르면 Oil red O에 의해 붉게 염색된 대동맥의 지질부분의 면적을 계산하여 도표화하였으나 본 연구에서는 면적을 구하기에 어려움이 있어 현미경상의 사진으로만 지질의 축적정도를 관찰하였다. NC군의 대동맥궁 내벽의 사진에는 Oil red O에 의해 붉게 염색된 부분이 보이지 않아서 지질의 축적이 거의 없었으며 AC군은 붉게 염색된 부분이 NC군에 비해 약간씩 존재하였다. Faia 등의 연구에서 약 12주간 고지방/고콜레스테롤 식이를 급여한 햄스터의 대동맥궁내에는 fatty streak lesion이 존재하였으며 이는 초기 동맥경화증의 증세로 본래의 혈관내막을 foam cell이 덮고 있다고 하였다. 이에 따라 본 연구에서도 AC군의 대동맥궁 사진으로 보아 초기 동맥경화증이 진행된 상태로 판단되었다. RM5군과 RM10군의 대동맥궁 내벽의 사진은 AC군에 비해 붉게 염색된 부분이 줄어든 것을 확인할 수 있었다. 이로써 로즈마리 추출물의 투여가 고지방/고콜레스테롤 식이의 섭취로 인해 대동맥내벽에 쌓이는 지질의 축적 정도를 경감시키는 효과가 있음을 알 수 있었다. 동맥경화유발 식이를 섭취한 햄스터의 foam cell 축적을 예방하는 것으로는 bile acid sequestrant, cholesterylamine 혹은 α -1 adrenergic inhibitor와 doxazosin 등이 있으며 lovastatin도 동일한 작용이 있음이 밝혀졌다.

6) 요약

8주령의 F1B golden Syrian 햄스터에게 동맥경화 유발식이와 함께 로즈마리 추출물을 각각 500 혹은 1000 mg/kg B.W의 양을 매일 경구투여하면서 6주간 사육하였을 때 햄스

터 체내의 지질성분과 대동맥 내에서의 지방의 축적 정도에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 로즈마리 추출물은 햄스터의 체중의 변화와 식이섭취량에 영향을 미치지 않음은 물론 혈중 지질성분에도 아무런 영향을 미치지 않았다. 그러나 간장의 HMG-CoA reductase mRNA level과 LDL receptor mRNA level에 영향을 미쳐 이로 인해 햄스터의 대동맥궁 내벽의 지질의 축적 정도를 경감시키는 효과가 있었다.

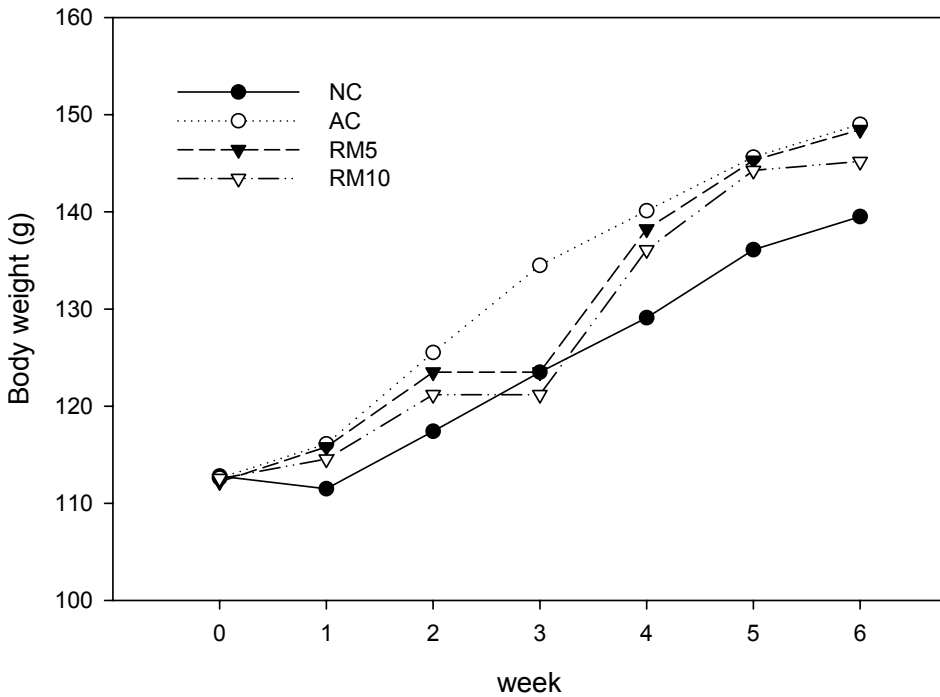


Fig. 11. Changes of body weight for 6 weeks. NC group(-●-) were fed normal diets, AC group(-○-) were fed atherogenic diets, RM5 group(-▼-) and RM10(-▽-) group were orally administrated rosemary extract 500 mg/kg B.W. or 1000 mg/kg B.W. with atherogenic diets. There was no significance.

Table 33. Body weight gain, food intake and food efficiency ratio

Groups ¹⁾	Body weight gain (g/6 weeks)	Food intake (g/day)	Food efficiency ratio ²⁾
NC	26.7±7.3 ^{3)N.S.4)}	5.9±0.6 ^{N.S.}	0.11±0.02 ^{N.S.}
AC	36.4±14.6	6.4±0.6	0.14±0.02
RM5	36.3±9.0	6.2± 0.5	0.14±0.01
RM10	32.6±8.8	6.1± 0.4	0.13±0.00

1) NC group were fed normal diets, AC group were fed atherogenic diets, RM5 group and RM10 group were orally administrated rosemary extract 500 mg/kg B.W. or 1000 mg/kg B.W. with atherogenic diets.

2) FER = Body weight gain for 6 weeks/ Food intake for 6weeks

3) Mean±Standard deviation (n=7-8).

4) Not significant

Table 34. Plasma triglyceride(TG), total cholesterol, HDL-cholesterol and non-HDL-cholesterol concentrations

Groups ¹⁾	Triglyceride (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	HDL-cholesterol (mg/dL)	Non HDL-cholesterol ²⁾ (mg/dL)
NC	279.4±85.2 ^{3)b4)}	172.0±25.2 ^b	74.6±12.7 ^b	97.4±13.4 ^b
AC	814.0±152.3 ^a	302.0±36.0 ^a	89.6±20.8 ^a	212.4±30.6 ^a
RM5	867.8± 391.2 ^a	305.4± 60.7 ^a	90.1± 8.8 ^a	215.3± 57.3 ^a
RM10	808.3± 354.6 ^a	305.8± 54.3 ^a	96.1± 5.5 ^a	209.6± 57.2 ^a

1) NC group were fed normal diets, AC group were fed atherogenic diets, RM5 group and RM10 group were orally administrated rosemary extract 500 mg/kg B.W. or 1000 mg/kg B.W. with atherogenic diets.

2) Non HDL-cholesterol = (Total cholesterol) - (HDL-cholesterol)

3) Mean±Standard deviation (n=7-8).

4) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 35. Atherogenic index and cardiac risk factor

Groups ¹⁾	Atherogenic index ²⁾	Cardiac risk factor ³⁾
NC	1.3±0.1 ^{4)b5)}	2.3±0.1 ^b
AC	2.6±1.0 ^a	3.6±1.0 ^a
RM5	2.4±0.6 ^a	3.4±0.6 ^a
RM10	2.2±0.7 ^a	3.2±0.7 ^a

1) NC group were fed normal diets, AC group were fed atherogenic diets, RM5 group and RM10 group were orally administrated rosemary extract 500 mg/kg B.W. or 1000 mg/kg B.W. with atherogenic diets.

2) Atherogenic index = (total cholesterol - HDL cholesterol)/HDL cholesterol

3) Cardiac risk factor = total cholesterol/HDL cholesterol

4) Mean±Standard deviation (n=7-8).

5) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 36. Organs weight

Groups ¹⁾	Liver (g/100g B.W.)	Heart (g/100g B.W.)	Kidney (g/100g B.W.)	Pancreas (g/100g B.W.)
NC	3.3±0.2 ^{2)b3)}	0.40±0.04 ^a	0.72±0.04 ^{N.S.}	0.086±0.014 ^{N.S.}
AC	4.1±0.3 ^a	0.36±0.05 ^b	0.73±0.05	0.093±0.020
RM5	4.1±0.3 ^a	0.30±0.02 ^c	0.73±0.06	0.079±0.010
RM10	4.1±0.2 ^a	0.32±0.02 ^c	0.74±0.03	0.076±0.005

1) NC group were fed normal diets, AC group were fed atherogenic diets, RM5 group and RM10 group were orally administrated rosemary extract 500 mg/kg B.W. or 1000 mg/kg B.W. with atherogenic diets.

2) Mean±Standard deviation(n=7-8).

3) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test.

4) Not significant

Table 37. SGOT and SGPT activities

Groups ¹⁾	SGOT (U/L)	SGPT (U/L)	Glucose (mg/dL)
NC	46.9±8.2 ^{2)N.S.3)}	75.1±6.9 ^{N.S.}	150.9±33.5 ^{a4)}
AC	50.5±6.1	81.3±15.5	115.0±25.9 ^b
RM5	41.8±6.7	84.5±16.6	122.5±22.4 ^b
RM10	44.5±8.2	82.9±8.6	111.4±14.8 ^b

1) NC group were fed normal diets, AC group were fed atherogenic diets, RM5 group and RM10 group were orally administrated rosemary extract 500 mg/kg B.W. or 1000 mg/kg B.W. with atherogenic diets.

2) Mean±Standard deviation(n=7-8).

3) Not significant

4) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test.

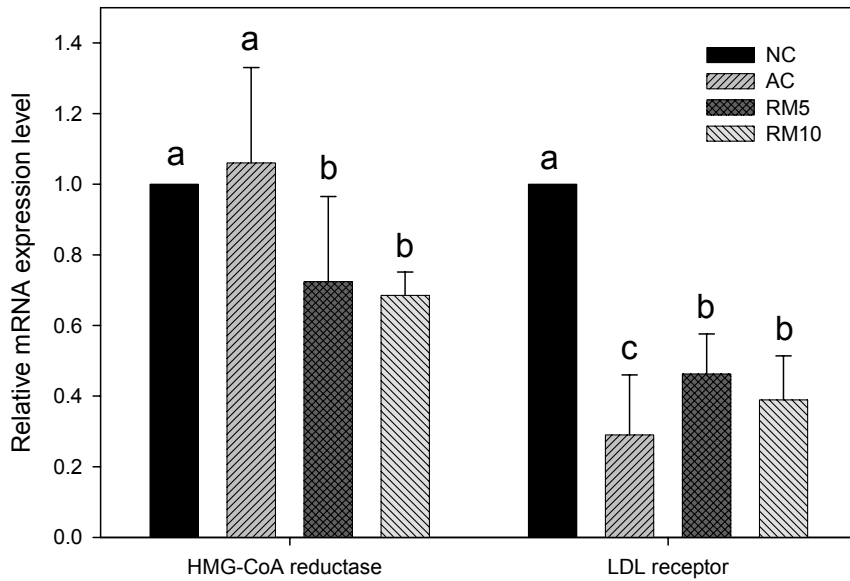


Fig. 12. Hepatic mRNA levels of HMG-CoA reductase and LDL receptor in F1B hamsters. Relative mRNA expression levels of HMG-CoA reductase and LDL receptor were measured by SYBR green I PCR analysis. Values represent the ratio of the target gene/GAPDH of the treated animals to that of the normal control, where the value for normal control was set at 1.0.

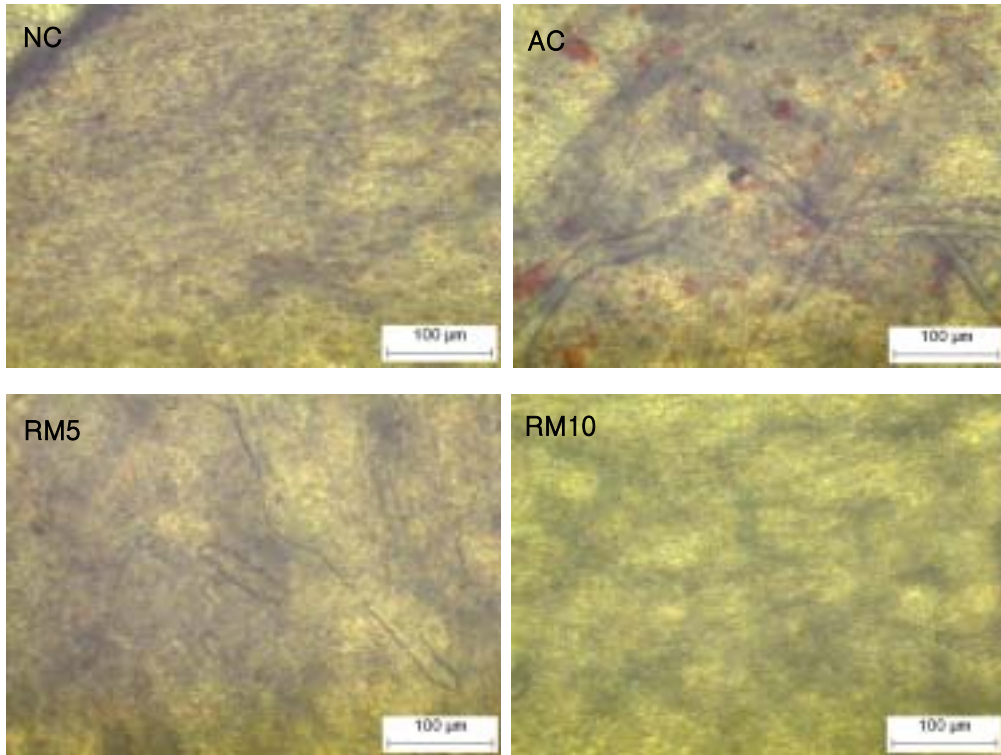


Fig. 13. Computer-generated micrographs of lipid-stained (oil red O) aortic arch sections of hamsters. NC group were fed normal diets, AC group were fed atherogenic diets, RM5 group and RM10 group were orally administrated rosemary extract 500 mg/kg B.W. or 1000 mg/kg B.W. with atherogenic diets. Shown is the inner surface of aortic arch from an animal in each group.

다. 녹차

1) 체중과 식이섭취량에 미치는 영향

녹차 추출물을 경구투여한 동맥경화를 유발시킨 햄스터의 체중의 변화는 Fig. 14에 나타내었다. 그림에서 보는 것처럼 실험 시작시에 전군에서 체중이 약 112 g 내외로 동일하게 시작되었으며 동맥경화유발 사료를 섭취한 AC군의 체중은 정상대조군에 비해 실험이 진행되는 동안 점차로 증가하는 경향을 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 나타내지 않았다. GT5군과 GT10군은 AC군보다 체중이 감소하는 경향을 보여 NC군과 거의 동일한 체중을 유지하였다. 이는 Pitman 등의 연구에서 햄스터에게 atherogenic diet를 섭취시킨 군의 경우 대조군에 비해 체중의 증가량이 유의하게 높았으며 혈중의 콜레스테롤치를 낮추는 약물로 알려진 로바스타틴을 atherogenic diet와 함께 섭취시킨 결과 체중의 증가량이 정상대조군과 유사했다고 보고한 것과 일치하였다. 이러한 결과로 볼 때 AC군은 동맥경화유발식이에 포함된 coconut oil과 cholesterol에 의해 체중이 증가한 것으로 보이며 GT5군과 GT10군은 녹차추출물의 투여로 체중증가 억제효과가 있었음을 알 수 있었다. Table 38에서 6주간의 체중 증가량은 통계적 유의차는 없었지만 AC군이 36.4 g으로 가장 컸으며 NC군, GT5 및 GT10군은 모두 26 g 내외로 AC군에 비해 적었다. 햄스터의 일일 식이 섭취량은 NC군이 5.9 g/day로 AC군, LV5 및 LV10군의 5.8-6.4 g/day에 비해 낮았으나 통계적 유의차는 없었으며 체중에 대한 식이섭취량의 비로 나타내 식이효율 또한 0.10-0.14의 범위로 통계적 유의차를 나타내지 않았다.

2) 혈중 지질성분에 미치는 영향

녹차 추출물이 동맥경화를 유발시킨 햄스터의 혈중 지질성분에 미치는 영향을 알아보기 위해 혈중 중성지방, 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 및 non-HDL-콜레스테롤치를 분석하여 그 결과를 Table 39에 나타내었다. 혈중 지질성분을 전체적으로 살펴보면 채혈 전 절식을 시켰음에도 불구하고 표준편차가 매우 크게 나타나는 군들이 있는데 이는 Rein 등의 보고에 의하면 햄스터들은 그들의 볼주머니에 음식을 저장할 수 있는 능력이 있는데 이 때문에 변이가 크다고 하였다.

혈중의 중성지방은 정상식을 급여한 NC군은 279.4 mg/dL였으며 동맥경화유발식을

섭취한 AC군은 약 3배가량 증가한 814.0 mg/dL를 나타내었다. GT5군은 603.4 mg/dL로 AC군에 비해 약간 감소하는 경향을 보였으며 GT10군은 408.6 mg/dL로 AC군에 비해 유의적으로 감소하였다. 특히 녹차 추출물을 투여한 경우에는 500 mg/kg B.W.의 양으로 투여한 GT5군보다 1000 mg/kg B.W.의 양으로 투여한 GT10군의 감소량이 더 커서 농도의존적으로 혈중 중성지방농도를 낮추는 경향을 보였다. 이는 Pitman 등의 연구결과와도 일치하는 것으로 정상대조군에 비해 atherogenic diet를 섭취한 군에서 중성지질의 농도는 크게 증가하였고 로바스타틴을 섭취한 군에서는 정상대조군보다는 높지만 많이 감소하는 경향을 보였다.

혈중 총콜레스테롤 함량은 NC군이 172.0 mg/dL이고 AC군이 302.0 mg/dL로 NC군에 비해 AC군이 약 1.8배가량 증가하였다. GT5군은 275.4 mg/dL로 AC군에 비해 낮아지는 경향을 보였으며 GT10군은 256.1 mg/dL로 AC군에 비해 유의하게 낮아졌으며 중성지질의 경우와 마찬가지로 농도의존적인 경향을 보였다. Pitman 등의 연구에서는 atherogenic diet와 로바스타틴을 같이 섭취한 경우에 총콜레스테롤 함량이 정상대조군과 같은 정도로 회복되는 것으로 나타났다. 그리고 동맥경화유발 식이를 섭취한 군에 비해 로바스타틴을 같이 섭취한 군에서 총 콜레스테롤 함량이 약 63.7% 감소하는 경향을 보였다. 본 연구의 감소폭보다 훨씬 컸으며 이는 Pitman의 연구기간이 본 연구보다 더 긴 11주였던 점과 시료의 종류 및 투여량의 차이에 따라 기인하는 것으로 생각할 수 있었다. 햄스터를 대상으로 한 많은 연구들에서 포화지방과 콜레스테롤의 급여는 혈중의 LDL receptor의 활성을 down-regulation하고 간장에서의 LDL 생산을 증가시킴으로써 혈장콜레스테롤과 중성지질의 농도를 증가시킨다고 보고되었다.

혈중 HDL 콜레스테롤치는 NC군이 74.6 mg/dL로 가장 낮았으며 AC군은 89.6 mg/dL, GT5군은 97.5 mg/dL 및 GT10군은 102.4 mg/dL로 모두 NC군에 비해 통계적으로 유의하게 높은 경향을 보였다. 이는 보통의 경우 HDL-콜레스테롤이 증가하면 동맥경화나 심장질환의 위험이 감소한다는 견해와 불일치하는 것이었다. 그러나 여러 연구들에서 햄스터의 동맥내의 지질축적이 감소하는 경우에 동시에 HDL-콜레스테롤치가 감소한다는 보고가 있었다. Woollett 등의 연구에서는 햄스터에게 고콜레스테롤 식이를 급여하면 혈장의 HDL과 LDL 콜레스테롤이 동시에 증가하지만 이것이 reverse cholesterol transport의 정도가 증가한 것은 아니라고 하였다. 즉 다시 말해 햄스터에 있어서 HDL 콜레스테롤의

증가가 동맥경화에 따른 변화를 예방하는데 유의하지 않을 수도 있다고 하였다. Otto 등의 연구에서는 로바스타틴이 식이로 유도된 HDL-콜레스테롤의 증가에 영향을 미치지 않으면서 선택적으로 동맥경화 유발인자들을 저해하는 것이라고 하였으며 이는 토끼와 비둘기를 대상으로 한 연구에서도 관찰되었다. 이러한 결과는 Uehara 등의 연구에서도 유사하게 나타났다. SUN-C8257 (3-[(3-amino-4-carboxy) phenylsulfonyl]-7-chloroquinazoline-2,4(1H,3H)-dione)은 chymase 저해제의 하나로 체내에서 chymase의 작용을 저해한다고 하였다. 사람의 동맥경화성 대동맥에는 유의하게 높은 chymase-dependent Ang II-forming activity(dAIIFA)가 존재한다고 하며 또한 혈청 LDL 콜레스테롤치에 양의 상관관계를 갖는다고 하였다. 이러한 사실은 동맥내의 chymase은 고콜레스테롤혈증인 경우에 더욱 증가하며 동맥경화증의 발생에 중요한 역할을 할 것으로 짐작된다. 즉 chymase를 저해함으로써 동맥경화를 억제하는 효과를 볼 수 있다는 가정하에 Uehara의 연구가 진행되었다. 고콜레스테롤 식이를 햄스터에게 급여한 결과 혈중의 HDL 콜레스테롤이 증가하였으며 SUN-C8257이라는 chymase 저해제를 처리한 군에서는 HDL 콜레스테롤이 오히려 약간 감소하는 경향을 보였다. 이로써 SUN-C8257의 처리가 대동맥의 지질축적을 감소시키는 역할을 하는데 있어서 HDL의 대사과정과 reverse cholesterol transport를 변화시키는 것으로 짐작할 수 있었다고 하였다. 결국 이러한 현상은 동맥경화를 감소시키는 또 다른 메커니즘일 것으로 추측되어졌다.

Non HDL-콜레스테롤의 함량은 혈중 총콜레스테롤 함량에서 HDL-콜레스테롤 함량을 뺀 값으로 NC군은 97.4 mg/dL로 가장 낮았으며 AC군은 212.4 mg/dL이고 GT5군은 177.9 mg/dL로 AC군에 비해 감소하였으며 GT10군은 153.8 mg/dL로 AC군에 비해 유의하게 감소하였다. Nistor 등의 보고에 의하면 일반사료에 콜레스테롤이 3%, 버터가 15% 첨가된 고지방식을 섭취한 햄스터를 12개월간 사육하여 동맥경화가 유발되는 과정을 설명하였다. 혈청 총콜레스테롤치의 경우에 3주만에 정상군에 비해 2배 증가하였고 4주째에는 4배가 증가하고 10개월 후에는 약 17배로 증가하였다. 혈중 LDL-콜레스테롤은 섭취 4주째에 약 4배정도 증가하였고 섭취한 지 약 10개월 후에는 대조군에 비해 약 13배 정도 증가하였다고 했다. 또한 이와 더불어 대동맥궁내의 혈관벽을 관찰한 결과 2주째부터 mononuclear cell이 혈관내벽에 붙기 시작하고 약 4주째 말기에는 특히 대동맥궁 내에 oil red O에 의해 붉게 염색되는 지질의 축적이 관찰되었다. 6개월 정도 지난 후에는 smooth

muscle cell에 지질이 축적되기 시작하였고 10개월 후에는 사람의 atherosclerotic plaque와 유사한 거대한 콜레스테롤 덩어리와 칼슘축적 및 괴사가 일어나는 등의 병변이 생겼다. 본 연구에서도 콜레스테롤 0.1%와 coconut oil 10%를 함유한 사료를 급여한지 6주째에 혈액검사와 해부학적 검사를 실시한 결과 정상대조군에 비해 동맥경화유발대조군에서 총콜레스테롤과 LDL 콜레스테롤이 증가하였으며 대동맥궁내에 지질이 축적되었음을 확인할 수 있었다. 단 본 연구에서는 Nistor 등의 연구에 비해 콜레스테롤과 지방의 첨가량이 적어서 그 영향으로 상대적으로 증가폭이 작았다.

위의 혈액 중 지질성분 분석결과를 토대로 하여 동맥경화지수와 심장위험지수를 계산한 결과는 Table 40에 나타내었다. 동맥경화지수는 체내 고밀도 지단백질에 대한 중성지질의 농도를 대표하는 값으로 임상에서 3.0 이상의 값을 나타낼 때 동맥경화에 대한 위험신호로 사용하고 있다. 심혈관위험지수는 동맥경화지수와 더불어 심혈관계질환에 대한 위험신호로 사용되고 있으며 임상에서 7.0 이상의 수치를 나타낼 때 위험신호로 인지된다. 동맥경화지수와 심장위험지수가 높을수록 동맥경화나 심혈관계 질환에 걸릴 위험성이 높다고 할 수 있는데, 본 실험에서는 NC군의 AI는 1.3, CRF는 2.3으로 낮았으며 AC군의 AI가 2.6, CRF가 3.6으로 NC군에 비해서 유의적으로 높았다. 반면에 GT5군의 AI는 1.9, CRF가 2.9이고 GT10군의 AI는 1.6, CRF는 2.6으로 AC군에 비해 유의하게 낮아졌다. Faia 등의 연구에서는 햄스터에게 1% 콜레스테롤과 22% coconut oil을 함유한 식이를 12주, 24주, 49주간 급여한 결과 혈중 총콜레스테롤 함량이 급격하게 증가하여 심장위험지수가 정상대조군에 비해 약 10배 정도 높아졌다고 보고하였다. 본 연구에서는 Faia 등의 연구에서 사용된 식이보다는 콜레스테롤과 coconut oil의 함유량이 적어 총 콜레스테롤치가 증가하는 폭은 작았지만 그래도 정상대조군에 비해 동맥경화유발식이를 급여한 군의 심장위험지수는 높아지는 경향을 보였다.

이로써 녹차 추출물의 섭취로 인해 동맥경화가 유발된 햄스터의 혈중 중성지방, 총콜레스테롤, non-HDL-콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤치를 분석한 결과 녹차 추출물을 500 mg/kg B.W.의 농도로 투여한 군에서는 혈중지질성분의 감소효과는 AC군에 비해 유의차는 없었지만 전반적으로 낮아지는 경향을 보였고 1000 mg/kg B.W.의 농도로 투여한 군에서는 혈중 중성지질, 총 콜레스테롤 및 non HDL-콜레스테롤치가 유의하게 감소하여서 농도의존적인 개선효과가 있음을 확인하였다.

3) 햄스터 체내 장기의 무게변화와 간기능 지표의 변화

녹차 추출물의 투여가 동맥경화를 유발한 햄스터의 장기무게에 미치는 영향을 알아보기 위해 간장, 심장, 신장 및 비장을 적출하여 무게를 측정하였으며 그 결과는 Table 41에 나타내었다. 간장의 무게는 NC군은 3.3 g/100 g B.W.이고 AC군은 4.1 g/100 g B.W.로 NC군에 비해 유의적으로 높았으며 GT5군과 GT10군은 3.8 g/100g B.W.으로 AC군에 비해 유의하게 감소하였다. 이는 고지방/고콜레스테롤 식이의 섭취로 인해 간장내 지질이 축적되어 간장이 상당히 비대해지며 녹차추출물을 섭취함으로써 간장의 무게가 감소됨을 확인하였다. 심장의 경우에는 NC군은 0.40 g/100 g B.W.으로 AC군의 0.36 g/100 g B.W.보다 유의적으로 높았으며 GT5군과 GT10군은 각각 0.31, 0.32 g/100 g B.W.으로 NC군이나 AC군에 비해 심장의 무게가 유의하게 작은 경향을 보였다. 신장과 비장의 무게는 전군에서 유의한 차이를 나타내지 않았다.

녹차 추출물의 투여로 인한 간손상 정도를 알아보기 위해 간기능 지표인 혈액내의 SGOT와 SGPT의 활성을 측정하였으며 그 결과는 Table 42에 나타내었다. SGOT 활성은 전군에서 45.6-50.5 U/L의 범위로 나타났으며 통계적 유의차는 없었으며 SGPT 또한 70.1-81.3 U/L의 범위로 통계적 유의차를 나타내지 않았다. 일반적으로 볼 때 본 연구에서 사용한 햄스터의 경우에 SGOT 활성은 약 35-57 U/L의 범위에 있을 때 정상수준이며 SGPT 활성은 47-67 U/L 정도에 들면 정상수준이라고 한다. 이에 따르면 SGOT 활성은 전군이 정상범위에 들었으며 SGPT의 경우에는 전군이 정상범위를 약간 웃도는 수준이지만 이 정도의 오차는 실험방법상으로 차이가 날 수 있는 것으로 큰 의미가 없다고 할 수 있어서 녹차추출물의 경구투여량이 햄스터의 간손상을 유발하지 않을 정도의 선이었음을 알 수 있었다.

4) 간장내의 HMG-CoA reductase 와 LDL receptor의 mRNA의 변화

녹차 추출물의 투여가 동맥경화 유발식이를 섭취한 햄스터의 간장에서의 HMG-CoA reductase 및 LDL receptor mRNA level에 미치는 영향을 알아보기 위하여 real-time PCR로 분석하였으며 그 결과를 Fig. 15에 나타내었다. HMG-CoA reductase mRNA level의 경우 정상대조군을 1로 놓고 AC군, LV5군 및 LV10군을 비교한 결과, NC군, AC군은 유의한 차이를 나타내지 않았다. GT5군의 경우 AC군에 비해 유의하게 낮은 경향을

보였으며 GT10군은 AC군과 유의한 차이를 보이지 않았다. LDL receptor의 경우에는 정상대조군의 LDL receptor mRNA level을 1로 보았을 때 NC군에 비해 AC군의 발현정도가 매우 낮아짐을 알 수 있었다. GT5군은 AC군과 차이가 없었으며 GT10군은 AC군에 비해 LDL receptor mRNA 발현정도가 유의하게 증가하는 경향을 보였다. Chambers 등에 따르면 콜레스테롤을 식이로 섭취하게 되면 HMG-CoA reductase의 활성이 감소함에 따라 내인성 콜레스테롤의 합성이 감소한다고 보고되어졌다. Dorfman 등이 햄스터를 대상으로 기본적으로 콜레스테롤을 0.1% 첨가한 식이에 butter, stick margarine, canola oil 및 soybean oil을 각각 10% 첨가하여 급여한 실험에서 지질의 첨가로 인해 지질의 종류에 상관없이 HMG-CoA reductase의 활성을 감소시키는 현상이 둔화되며 이러한 둔화현상은 지질의 cis-불포화도가 높을수록 증가한다고 보고하였다.

5) 대동맥궁내에서의 지방선의 축적 정도

녹차 추출물의 투여가 동맥경화를 유발시킨 햄스터의 대동맥에서의 지방 축적에 미치는 영향을 알아보기 위하여 햄스터의 대동맥궁 내벽을 Oil red O로 염색한 후 현미경으로 관찰하였으며 현미경 사진은 Fig. 16에 나타내었다.

Adams 등은 지용성인 bis-azo 염색약인 Oil red O는 수단 용액들 중의 하나로 조직 내에 축적된 지질의 현미경 관찰에 널리 이용되어진다고 하였다. 또한 햄스터 대동맥내의 지질축적에 관한 다른 연구들에 따르면 Oil red O에 의해 붉게 염색된 대동맥의 지질부분의 면적을 계산하여 도표화하였으나 본 연구에서는 면적을 구하기에 어려움이 있어 현미경상의 사진으로만 지질의 축적정도를 관찰하였다. NC군의 대동맥궁 내벽의 사진에는 Oil red O에 의해 붉게 염색된 부분이 보이지 않아서 지질의 축적이 거의 없었으며 AC군은 붉게 염색된 부분이 NC군에 비해 약간씩 존재하였다. Faia 등의 연구에서 약 12주간 고지방/고콜레스테롤 식이를 급여한 햄스터의 대동맥궁내에는 fatty streak lesion이 존재하였으며 이는 초기 동맥경화증의 증세로 본래의 혈관내막을 foam cell이 덮고 있다고 하였다. 이에 따라 본 연구에서도 AC군의 대동맥궁 사진으로 보아 초기 동맥경화증이 진행된 상태로 판단되었다. GT5군과 GT10군의 햄스터 대동맥궁 내벽의 사진은 AC군에 비해 붉게 염색된 부분이 줄어든 것을 확인할 수 있었다. 이로써 녹차 추출물의 투여가 고지방/고콜레스테롤 식이의 섭취로 인해 대동맥내벽에 쌓이는 지질의 축적 정도를 경감

시키는 효과가 있음을 알 수 있었다. 동맥경화유발 식이를 섭취한 햄스터의 foam cell 축적을 예방하는 것으로는 bile acid sequestrant, cholesterylamine 혹은 α -1 adrenergic inhibitor와 doxazosin 등이 있으며 lovastatin도 동일한 작용이 있음이 밝혀졌다.

6) 요약

8주령의 F1B golden Syrian 햄스터에게 동맥경화 유발식이와 함께 녹차 추출물을 각각 500 혹은 1000 mg/kg B.W의 양을 매일 경구투여하면서 6주간 사육하였을 때 햄스터 체내의 지질성분과 대동맥 내에서의 지방의 축적 정도에 미치는 영향을 조사하였다. 실험결과 녹차추출물의 경구투여는 동맥경화유발식이를 섭취하는 햄스터의 혈중 중성지방과 총콜레스테롤치를 농도의존적으로 감소시켰고, 대동맥궁내에서의 지방의 축적을 예방하였고, 간장내 HMG-CoA reductase mRNA level을 감소시키고 LDL receptor mRNA level을 증가시켜서 궁극적으로 혈중 콜레스테롤치를 낮추는 것에 기여하는 것으로 나타났다.

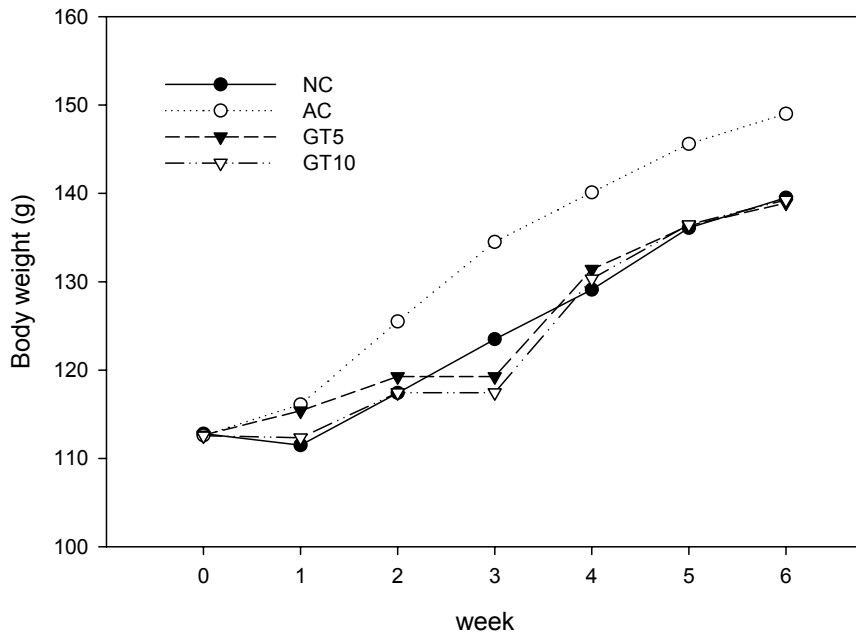


Fig. 14. Changes of body weight for 6 weeks. NC group(-●-) were fed normal diets, AC group(-○-) were fed atherogenic diets, GT5 group(-▼-) and GT10(-▽-) group were orally administrated green tea extract 500 mg/kg B.W. or 1000 mg/kg B.W. with atherogenic diets. There were no significance.

Table 38. Body weight gain, food intake and food efficiency ratio

Groups ¹⁾	Body weight gain (g/6 weeks)	Food intake (g/day)	Food efficiency ratio ²⁾
NC	26.7±7.3 ^{3)N.S.4)}	5.9±0.6 ^{N.S.}	0.11±0.02 ^{N.S.}
AC	36.4±14.6	6.4±0.6	0.14±0.02
GT5	26.3±12.9	5.9±0.8	0.10±0.04
GT10	26.7±10.4	5.8±0.1	0.11±0.01

1) NC group were fed normal diets, AC group were fed atherogenic diets, GT5 group and GT10 group were orally administrated green tea extract 500 mg/kg B.W. or 1000 mg/kg B.W. with atherogenic diets.

2) FER = Body weight gain for 6 weeks/ Food intake for 6weeks

3) Mean±Standard deviation (n=7-8).

4) Not significant

Table 39. Plasma triglyceride(TG), total cholesterol, HDL-cholesterol and non-HDL-cholesterol concentrations

Groups ¹⁾	Triglyceride (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	HDL-cholesterol (mg/dL)	Non HDL-cholesterol ²⁾ (mg/dL)
NC	279.4±85.2 ^{3)c4)}	172.0±25.2 ^c	74.6±12.7 ^b	97.4±13.4 ^c
AC	814.0±152.3 ^a	302.0±36.0 ^a	89.6±20.8 ^a	212.4±30.6 ^a
GT5	603.4±291.1 ^{ab}	275.4±42.5 ^{ab}	97.5±9.0 ^a	177.9±46.0 ^{ab}
GT10	408.6±191.6 ^{bc}	256.1±30.0 ^b	102.4±11.6 ^a	153.8±36.7 ^b

1) NC group were fed normal diets, AC group were fed atherogenic diets, GT5 group and GT10 group were orally administrated green tea extract 500 mg/kg B.W. or 1000 mg/kg B.W. with atherogenic diets.

2) Non HDL-cholesterol = (Total cholesterol) - (HDL-cholesterol)

3) Mean±Standard deviation (n=7-8).

4) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 40. Atherogenic index and cardiac risk factor

Groups ¹⁾	Atherogenic index ²⁾	Cardiac risk factor ³⁾
NC	1.3±0.1 ^{4)b5)}	2.3±0.1 ^b
AC	2.6±1.0 ^a	3.6±1.0 ^a
GT5	1.9±0.6 ^b	2.9±0.6 ^b
GT10	1.6±0.5 ^b	2.6±0.5 ^b

1) NC group were fed normal diets, AC group were fed atherogenic diets, GT5 group and GT10 group were orally administrated green tea extract 500 mg/kg B.W. or 1000 mg/kg B.W. with atherogenic diets.

2) Atherogenic index = (total cholesterol - HDL cholesterol)/HDL cholesterol

3) Cardiac risk factor = total cholesterol/HDL cholesterol

4) Mean±Standard deviation (n=7-8).

5) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 41. Organs weight

Groups ¹⁾	Liver (g/100g B.W.)	Heart (g/100g B.W.)	Kidney (g/100g B.W.)	Pancreas (g/100g B.W.)
NC	3.3±0.2 ^{2)c3)}	0.40±0.04 ^a	0.72±0.04 ^{N.S.}	0.086±0.014 ^{N.S.}
AC	4.1±0.3 ^a	0.36±0.05 ^b	0.73±0.05	0.093±0.020
GT5	3.8±0.3 ^{ab}	0.31±0.02 ^c	0.703±0.06	0.075±0.008
GT10	3.8±0.2 ^b	0.32±0.02 ^c	0.71±0.04	0.076±0.011

1) NC group were fed normal diets, AC group were fed atherogenic diets, GT5 group and GT10 group were orally administrated green tea extract 500 mg/kg B.W. or 1000 mg/kg B.W. with atherogenic diets.

2) Mean±Standard deviation(n=7-8).

3) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test.

4) Not significant

Table 42. SGOT and SGPT activities

Groups ¹⁾	SGOT (U/L)	SGPT (U/L)	Glucose (mg/dL)
NC	46.9±8.2 ^{2)N.S.3)}	75.1±6.9 ^{N.S.}	150.9±33.5 ^{a4)}
AC	50.5±6.1	81.3±15.5	115.0±25.9 ^b
GT5	48.1±10.3	70.1±6.6	114.6±14.3 ^b
GT10	48.9±11.6	77.5±14.2	107.1±8.4 ^b

1) NC group were fed normal diets, AC group were fed atherogenic diets, GT5 group and GT10 group were orally administrated green tea extract 500 mg/kg B.W. or 1000 mg/kg B.W. with atherogenic diets.

2) Mean±Standard deviation(n=7-8).

3) Not significant

4) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test.

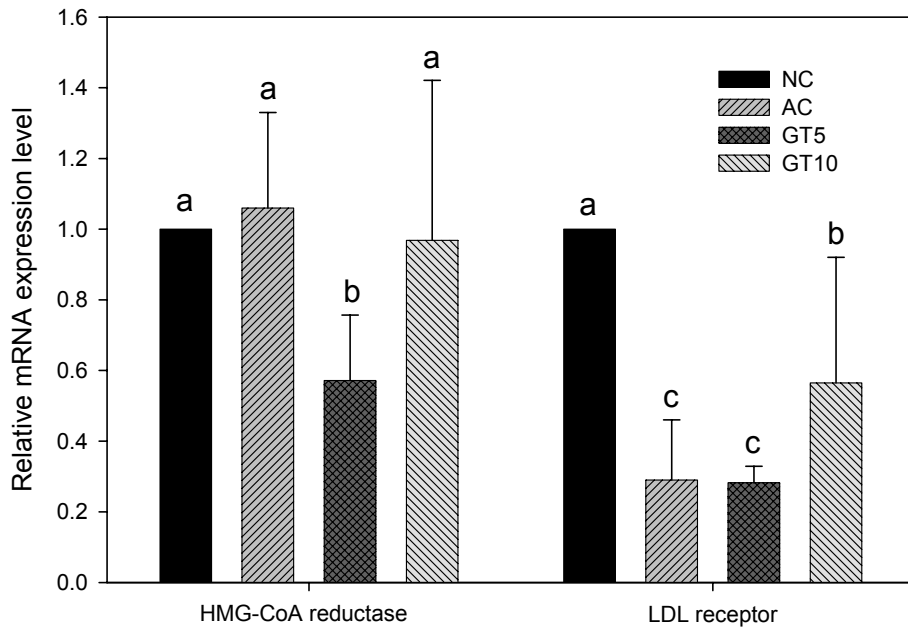


Fig. 15. Hepatic mRNA levels of HMG-CoA reductase and LDL receptor in F1B hamsters. Relative mRNA expression levels of HMG-CoA reductase and LDL receptor were measured by SYBR green I PCR analysis. Values represent the ratio of the target gene/GAPDH of the treated animals to that of the normal control, where the value for normal control was set at 1.0.

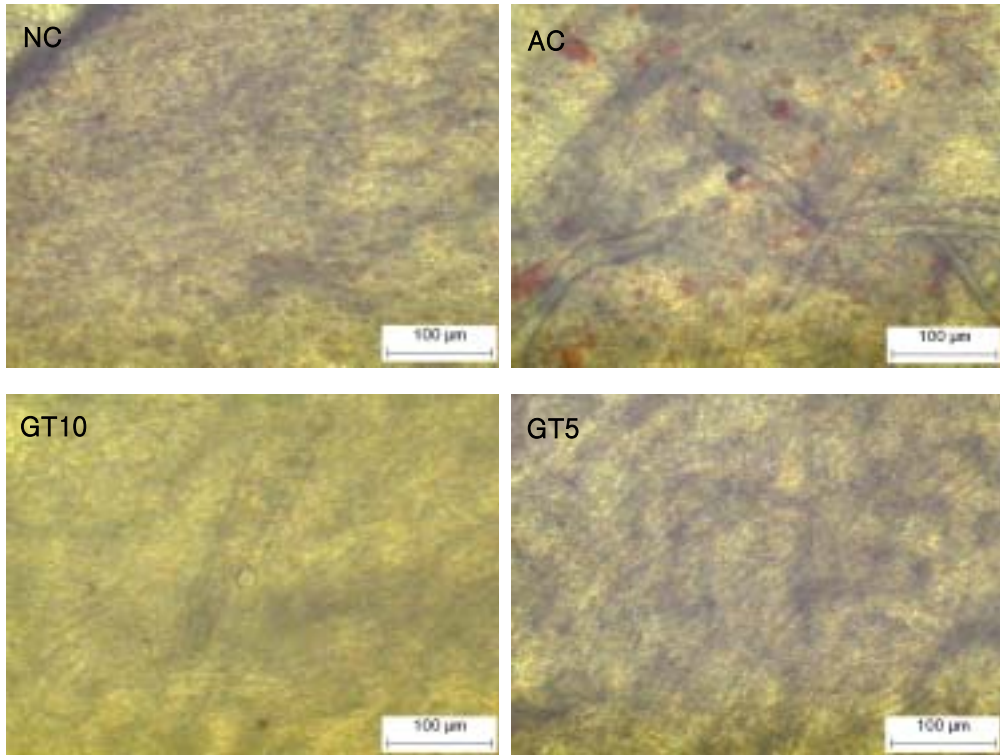


Fig. 16. Computer-generated micrographs of lipid-stained (oil red O) aortic arch sections of hamsters. NC group were fed normal diets, AC group were fed atherogenic diets, GT5 group and GT10 group were orally administrated green tea extract 500 mg/kg B.W. or 1000 mg/kg B.W. with atherogenic diets. Shown is the inner surface of aortic arch from an animal in each group.

4. 2차 동물실험 결과 - 장미, 파인애플 세이지, 타블렛 제품

본 연구의 목적은 동맥경화식이를 섭취하는 7주령의 웅성 F1B 햄스터에게 장미꽃 추출물, 파인애플 세이지 잎 추출물 및 장미, 파인애플 세이지 및 녹차를 혼합하여 제조한 타블렛 제품을 식이와 함께 급여하여 12주간 사육하였을 때 햄스터 체내의 지질성분과 대동맥 내에서의 지방의 축적 정도에 미치는 영향을 조사하여 궁극적으로 동맥경화에 대한 개선효과가 있는지 알아보려고 실시되었다.

가. 장미꽃 추출물

1) 체중과 식이섭취량에 미치는 영향

장미꽃 추출물이 동맥경화를 유발시킨 햄스터의 체중에 미치는 영향은 Fig. 17에 나타내었다. 그림에서 보는 것처럼 실험 시작시에 전군에서 체중이 약 91 g 내외로 동일하게 시작되었으며 동맥경화유발 사료를 섭취한 AC군의 체중은 정상대조군에 비해 실험이 진행되는 동안 점차로 증가하는 경향을 보였으며 실험 마지막 주에는 다른 군들에 비해 통계적으로 유의하게 높았다. R5군과 R10군은 AC군보다 체중이 감소하는 경향을 보여 NC군과 거의 동일한 체중을 유지하였다. Pitman 등의 연구에서 햄스터에게 atherogenic diet를 섭취시킨 군의 경우 대조군에 비해 체중의 증가량이 유의하게 높았으며 혈중의 콜레스테롤치를 낮추는 약물로 알려진 로바스타틴을 atherogenic diet와 함께 섭취시킨 결과 체중의 증가량이 정상대조군과 유사했다고 보고하였다. 이러한 결과로 볼 때 AC군은 동맥경화유발식이에 포함된 coconut oil과 cholesterol에 의해 체중이 증가한 것으로 보이며 R5군과 R10군은 장미꽃 추출물의 투여로 약간의 체중증가 억제효과가 있었음을 알 수 있었다. Table 43에서 12주간의 체중 증가량은 NC군이 71.4 g이고 AC군이 80.8 g으로 AC군이 약간 높았으며 R5군은 74.0 g이고 R10군은 67.5 g으로 AC군에 비해 유의하게 낮아지는 경향을 보였다. 햄스터의 12주간의 식이 섭취량은 NC군이 490.5 g이고 AC군은 512.6 g으로 AC군이 유의하게 높았고 R5군과 R10군은 각각 502.0 g, 483.2 g 으로 유의하게 낮았다. 전 실험기간동안의 체중의 증가량에 대한 식이섭취량의 비로 나타내 식이효율은 0.14-0.16의 범위로 통계적 유의차를 나타내지 않았다.

2) 혈중 지질성분에 미치는 영향

장미꽃 추출물이 동맥경화를 유발시킨 햄스터의 혈중 지질성분에 미치는 영향을 알아보기 위해 혈중 중성지방, 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 및 non-HDL-콜레스테롤치를 분석하여 그 결과를 Table 44에 나타내었다. 혈중 지질성분을 전체적으로 살펴보면 채혈 전 절식을 시켰음에도 불구하고 표준편차가 매우 크게 나타나는 군들이 있는데 이는 Rein 등의 보고에 의하면 햄스터들은 그들의 볼주머니에 음식을 저장할 수 있는 능력이 있는데 이 때문에 변이가 크다고 하였다.

혈중의 중성지방은 정상식을 급여한 NC군은 275.9 mg/dL였으며 동맥경화유발식을 섭취한 AC군은 약 2.5배가량 증가한 675.4 mg/dL를 나타내었다. R5군과 R10군은 각각 753.6, 778.4 mg/dL로 나타나 AC군과 차이를 나타내지 않았다. Pitman 등의 연구결과에서는 정상대조군에 비해 atherogenic diet를 섭취한 군에서 중성지방의 농도는 크게 증가하였고 로바스타틴을 섭취한 군에서는 정상대조군보다는 높지만 많이 감소하는 경향을 보였다.

혈중 총콜레스테롤 함량은 NC군이 145.9 mg/dL이고 AC군이 274.6 mg/dL로 NC군에 비해 AC군이 약 1.9배가량 증가하였다. R5군과 R10군은 각각 311.8, 310.4 mg/dL로 AC군과 차이가 없었다. Pitman 등의 연구에서는 atherogenic diet와 로바스타틴을 같이 섭취한 경우에 총콜레스테롤 함량이 정상대조군과 같은 정도로 회복되는 것으로 나타났다. 그리고 동맥경화유발 식이를 섭취한 군에 비해 로바스타틴을 같이 섭취한 군에서 총 콜레스테롤 함량이 약 63.7% 감소하는 경향을 보였다. 햄스터를 대상으로 한 많은 연구들에서 포화지방과 콜레스테롤의 급여는 혈중의 LDL receptor의 활성을 down-regulation하고 간장에서의 LDL 생산을 증가시킴으로써 혈장콜레스테롤과 중성지방의 농도를 증가시킨다고 보고되었다.

혈중 HDL 콜레스테롤치는 NC군이 69.0 mg/dL이고 AC군이 109.8 mg/dL로 NC군에 비해 AC군이 유의하게 높았으며 R5군과 R10군은 각각 108.8, 116.6 mg/dL로 AC군과 차이를 나타내지 않았다. 이는 보통의 경우 HDL-콜레스테롤이 증가하면 동맥경화나 심장질환의 위험이 감소한다는 견해와 불일치하는 것이었다. 그러나 여러 연구들에서 햄스터의 동맥내의 지질축적이 감소하는 경우에 동시에 HDL-콜레스테롤치가 감소한다는 보고가 있었다. Woollett 등의 연구에서는 햄스터에게 고콜레스테롤 식이를 급여하면 혈장의 HDL과 LDL 콜레스테롤이 동시에 증가하지만 이것이 reverse cholesterol transport의 정도가 증가한 것은 아니라고 하였다. 즉 다시 말해 햄스터에 있어서 HDL 콜레스테롤의 증가가 동맥경화에 따른 변화를 예방하는데 유익하지 않을 수도 있다고 하였다. Otto 등의 연구에서는 로바스타틴이 식이로 유도된 HDL-콜레스테롤의 증가에 영향을 미치지 않으면서 선택적으로 동맥경화 유발인자들을 저해하는 것이라고 하였으며 이는 토끼와 비둘기를 대상으로 한 연구에서도 관찰되었다. 이러한 결과는 Uehara 등의 연구에서도 유사하게 나타났다. SUN-C8257 (3-[(3-amino-4-carboxy)

phenylsulfonyl]-7-chloroquinazoline-2,4(1H,3H)-dione)은 chymase 저해제의 하나로 체내에서 chymase의 작용을 저해한다고 하였다. 사람의 동맥경화성 대동맥에는 유의하게 높은 chymase-dependent Ang II-forming activity(dAIIFA)가 존재한다고 하며 또한 혈청 LDL 콜레스테롤치에 양의 상관관계를 갖는다고 하였다. 이러한 사실은 동맥내의 chymase은 고콜레스테롤혈증인 경우에 더욱 증가하며 동맥경화증의 발생에 중요한 역할을 할 것으로 짐작된다. 즉 chymase를 저해함으로써 동맥경화를 억제하는 효과를 볼 수 있다는 가정하에 Uehara의 연구가 진행되었다. 고콜레스테롤 식이를 햄스터에게 급여한 결과 혈중의 HDL 콜레스테롤이 증가하였으며 SUN-C8257이라는 chymase 저해제를 처리한 군에서는 HDL 콜레스테롤이 오히려 약간 감소하는 경향을 보였다. 이로써 SUN-C8257의 처리가 대동맥의 지질축적을 감소시키는 역할을 하는데 있어서 HDL의 대사과정과 reverse cholesterol transport를 변화시키는 것으로 짐작할 수 있었다고 하였다. 결국 이러한 현상은 동맥경화를 감소시키는 또 다른 메커니즘일 것으로 추측되어졌다.

Non-HDL-콜레스테롤의 함량은 혈중 총콜레스테롤 함량에서 HDL-콜레스테롤 함량을 뺀 값으로 NC군은 76.9 mg/dL이고 AC군은 164.9 mg/dL로 NC군에 비해 유의하게 높았으며 R5군과 R10군은 각각 203.0, 193.8 mg/dL로 AC군과 유의한 차이가 없었다. Nistor 등의 보고에 의하면 일반사료에 콜레스테롤이 3%, 버터가 15% 첨가된 고지방식이를 섭취한 햄스터를 12개월간 사육하여 동맥경화가 유발되는 과정을 설명하였다. 혈청 총콜레스테롤치의 경우에 3주만에 정상군에 비해 2배 증가하였고 4주째에는 4배가 증가하고 10개월 후에는 약 17배로 증가하였다. 혈중 LDL-콜레스테롤은 섭취 4주째에 약 4배정도 증가하였고 섭취한 지 약 10개월 후에는 대조군에 비해 약 13배 정도 증가하였다고 했다. 또한 이와 더불어 대동맥궁내의 혈관벽을 관찰한 결과 2주째부터 mononuclear cell이 혈관내벽에 붙기 시작하고 약 4주째 말기에는 특히 대동맥궁 내에 oil red O에 의해 붉게 염색되는 지질의 축적이 관찰되었다. 6개월정도 지난후에는 smooth muscle cell에 지질이 축적되기 시작하였고 10개월 후에는 사람의 atherosclerotic plaque와 유사한 거대한 콜레스테롤 덩어리와 칼슘축적 및 괴사가 일어나는 등의 병변이 생겼다. 본 연구에서도 콜레스테롤 0.1%와 coconut oil 10%를 함유한 사료를 급여한지 6주째에 혈액검사와 해부학적 검사를 실시한 결과 정상대조군에 비해 동맥경화유발대조군에서 총콜레스테롤과 LDL 콜레스테롤이 증가하였으며 대동맥궁내에 지질이 축적되었음을 확인할 수 있었다. 단 본 연

구에서는 Nistor 등의 연구에 비해 콜레스테롤과 지방의 첨가량이 적어서 그 영향으로 상대적으로 증가폭이 작았다.

위의 혈액 중 지질성분 분석결과를 토대로 하여 동맥경화지수(AI)와 심장위험지수(CRF)를 계산한 결과는 Table 45에 나타내었다. 동맥경화지수는 체내 고밀도 지단백질에 대한 중성지질의 농도를 대표하는 값으로 임상에서 3.0 이상의 값을 나타낼 때 동맥경화에 대한 위험신호로 사용하고 있다. 심혈관위험지수는 동맥경화지수와 더불어 심혈관계 질환에 대한 위험신호로 사용되고 있으며 임상에서 7.0 이상의 수치를 나타낼 때 위험신호로 인지된다. 동맥경화지수와 심장위험지수가 높을수록 동맥경화나 심혈관계 질환에 걸릴 위험성이 높다고 할 수 있는데, 본 실험에서는 AI는 1.1에서 2.1의 범위로 전군에서 유의한 차이를 나타내지 않았으며 CRF 또한 2.1-3.1의 범위로 전군에서 통계적 유의차가 없었다. Faia 등의 연구에서는 햄스터에게 1% 콜레스테롤과 22% coconut oil을 함유한 식이를 12주, 24주, 49주간 급여한 결과 혈중 총콜레스테롤 함량이 급격하게 증가하여 심장위험지수가 정상대조군에 비해 약 10배 정도 높아졌다고 보고하였다.

이로써 장미꽃 추출물의 섭취로 인해 동맥경화가 유발된 햄스터의 혈중 중성지방, 총콜레스테롤, non-HDL-콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤치를 분석한 결과 전반적으로 혈중 지질에 대한 개선효과를 나타내지 않아서 시험관내 실험 결과와는 상이한 결과를 보였다.

3) 햄스터 체내 장기의 무게변화와 간기능 지표의 변화

장미꽃 추출물의 투여가 동맥경화를 유발한 햄스터의 장기무게에 미치는 영향을 알아보기 위해 간장, 심장, 신장 및 비장을 적출하여 무게를 측정하였으며 그 결과는 Table 46에 나타내었다. 간장의 무게는 NC군이 3.6 g/100 g B.W., AC군이 4.6 g/100 g B.W.으로 NC군에 비해 유의하게 높았다. R5군과 R10군은 각각 4.5, 4.7 g/100 g B.W.으로 AC군과 유의한 차이를 나타내지 않았다. 심장의 무게의 변화는 NC군이 0.32 g/100 g B.W.이고 AC군이 0.28 g/100 g B.W.으로 NC군에 비해 유의하게 낮았다. R5군은 0.29 g/100 g B.W.으로 AC군과 차이가 없었으나 R10군은 0.31 g/100 g B.W.으로 AC군에 비해 유의하게 증가하였다. 신장과 비장의 무게는 전군에서 유의한 차이를 나타내지 않았다.

장미꽃 추출물의 투여로 인한 간손상 정도를 알아보기 위해 간기능 지표인 혈액내의 SGOT와 SGPT의 활성을 측정하였으며 그 결과는 Table 47에 나타내었다. SGOT 활성

은 전군에서 61.9-68.8 U/L의 범위로 나타났으며 통계적 유의차는 없었으며 SGPT 또한 73.8-91.9 U/L의 범위로 전군에서 통계적 유의차를 나타내지 않아서 장미꽃 추출물의 투여로 인한 간독성은 일어나지 않았다.

4) 간장내의 HMG-CoA reductase 와 LDL receptor의 mRNA의 변화

장미꽃 추출물의 섭취가 동맥경화 유발식을 섭취한 햄스터의 간장에서의 HMG-CoA reductase 및 LDL receptor mRNA level에 미치는 영향을 알아보기 위하여 real-time PCR로 분석하였으며 그 결과를 Fig. 18에 나타내었다. HMG-CoA reductase mRNA level의 경우 정상대조군을 1로 놓고 AC군, LV5군 및 LV10군을 비교한 결과, NC군에 비해 AC군은 유의하게 낮았으며 R5군과 R10군은 AC군에 비해 높은 경향을 보였다. LDL receptor의 경우에는 정상대조군의 LDL receptor mRNA level을 1로 보았을 때 NC군에 비해 AC군의 발현정도는 유의한 차이를 보이지 않았으며 R5군은 AC군에 비해 발현정도가 유의하게 낮았으며 R10군은 AC군과 차이가 없었다. Chambers 등에 따르면 콜레스테롤을 식이로 섭취하게 되면 HMG-CoA reductase의 활성이 감소함에 따라 내인성 콜레스테롤의 합성이 감소한다고 보고되어졌다. Dorfman 등이 햄스터를 대상으로 기본적으로 콜레스테롤을 0.1% 첨가한 식이에 butter, stick margarine, canola oil 및 soybean oil을 각각 10% 첨가하여 급여한 실험에서 지질의 첨가로 인해 지질의 종류에 상관없이 HMG-CoA reductase의 활성을 감소시키는 현상이 둔화되며 이러한 둔화현상은 지질의 cis-불포화도가 높을수록 증가한다고 보고하였다.

5) 대동맥궁내에서의 지방선의 축적 정도

장미꽃 추출물의 투여가 동맥경화를 유발시킨 햄스터의 대동맥에서의 지방 축적에 미치는 영향을 알아보기 위하여 햄스터의 대동맥궁 내벽을 Oil red O로 염색한 후 현미경으로 관찰하였으며 현미경 사진은 Fig. 19에 나타내었다.

Adams 등은 지용성인 bis-azo 염색약인 Oil red O는 수단 용액들 중의 하나로 조직 내에 축적된 지질의 현미경 관찰에 널리 이용되어진다고 하였다. 또한 햄스터 대동맥내의 지질축적에 관한 다른 연구들에 따르면 Oil red O에 의해 붉게 염색된 대동맥의 지질부분의 면적을 계산하여 도표화하였으나 본 연구에서는 면적을 구하기에 어려움이 있어 현

미경상의 사진으로만 지질의 축적정도를 관찰하였다. NC군의 대동맥궁 내벽의 사진에는 Oil red O에 의해 붉게 염색된 부분이 보이지 않아서 지질의 축적이 거의 없었으며 AC군은 붉게 염색된 부분이 NC군에 비해 약간씩 존재하였다. Faia 등의 연구에서 약 12주간 고지방/고콜레스테롤 식이를 급여한 햄스터의 대동맥궁내에는 fatty streak lesion이 존재하였으며 이는 초기 동맥경화증의 증세로 본래의 혈관내막을 foam cell이 덮고 있다고 하였다. 이에 따라 본 연구에서도 AC군의 대동맥궁 사진으로 보아 초기 동맥경화증이 진행된 상태로 판단되었다. R5군과 R10군의 햄스터 대동맥궁 내벽의 사진은 AC군에 비해 붉게 염색된 부분이 줄어든 것을 확인할 수 있었다. 이로써 녹차 추출물의 투여가 고지방/고콜레스테롤 식이의 섭취로 인해 대동맥내벽에 쌓이는 지질의 축적 정도를 경감시키는 효과가 있음을 알 수 있었다. 동맥경화유발 식이를 섭취한 햄스터의 foam cell 축적을 예방하는 것으로는 bile acid sequestrant, cholesterylamine 혹은 α -1 adrenergic inhibitor와 doxazosin 등이 있으며 lovastatin도 동일한 작용이 있음이 밝혀졌다.

6) 요약

7주령의 웅성 F1B golden Syrian 햄스터에게 동맥경화 유발식이와 함께 장미꽃 추출물을 7.6 g/kg diet 혹은 15 g/kg diet의 양으로 급여하며 12주간 사육하였을 때 햄스터 체내의 지질성분과 대동맥 내에서의 지방의 축적 정도에 미치는 영향을 조사하였다. 실험결과 장미꽃 추출물은 동맥경화유발식이를 섭취하는 햄스터의 혈중 지질성분을 개선시키는 효과는 없었으나 대동맥궁내에서의 지방의 축적은 어느정도 경감시키는 효과를 보였다.

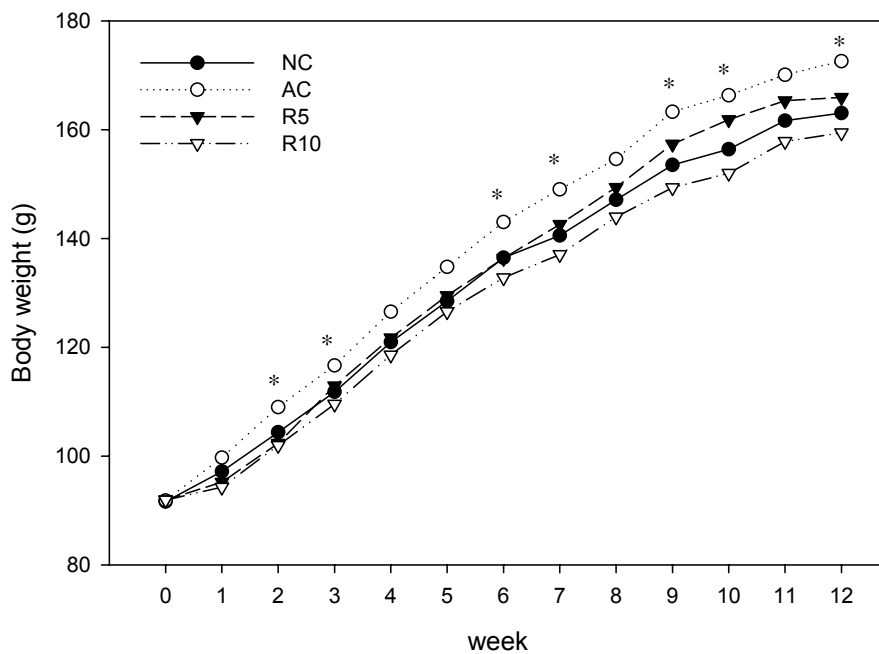


Fig. 17. Changes of body weight for 12 weeks. NC group(-●-) were fed normal diets, AC group(-○-) were fed atherogenic diets, R5 group(-▼-) and R10 group(-▽-) were fed atherogenic diets added rose's flowers extract 7.6 g/kg diet or 15 g/kg diet respectively. * represented significant difference at $p < 0.05$.

Table 43. Body weight gain, food intake and food efficiency ratio

Groups ¹⁾	Body weight gain (g/12 weeks)	Food intake (g/12 weeks)	Food efficiency ratio ²⁾
NC	71.4±5.3 ^{3)ab4)}	490.5±3.3 ^c	0.15±0.01 ^{N.S.5)}
AC	80.8±9.1 ^a	512.6±3.4 ^a	0.16±0.02
R5	74.0±8.6 ^{ab}	502.0±6.0 ^b	0.15±0.02
R10	67.5±11.0 ^b	483.3±3.2 ^d	0.14±0.02

1) NC group were fed normal diets, AC group were fed atherogenic diets, R5 group and R10 group were fed atherogenic diets added rose's flowers extract 7.6 g/kg diet or 15 g/kg diet respectively.

2) FER = Body weight gain for 12 weeks/ Food intake for 12 weeks

3) Mean±Standard deviation (n=7-8).

4) Values with different alphabet within the column are significantly different at α =0.05 by Duncan's multiple range test.

5) Not significant

Table 44. Plasma triglyceride(TG), total cholesterol, HDL-cholesterol and non-HDL-cholesterol concentrations

Groups ¹⁾	Triglyceride (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	HDL-cholesterol (mg/dL)	Non-HDL-cholesterol ²⁾ (mg/dL)
CON	275.9±48.6 ^{3)b4)}	145.9±15.9 ^b	69.0±11.1 ^b	76.9±8.6 ^b
AC	675.4±135.0 ^a	274.6±26.3 ^a	109.8±11.8 ^a	164.9±22.4 ^a
R5	753.6±289.4 ^a	311.8±59.7 ^a	108.8±27.9 ^a	203.0±53.9 ^a
R10	778.4±386.6 ^a	310.4±68.9 ^a	116.6±14.4 ^a	193.8±78.5 ^a

1) NC group were fed normal diets, AC group were fed atherogenic diets, R5 group and R10 group were fed atherogenic diets added rose's flowers extract 7.6 g/kg diet or 15 g/kg diet respectively.

2) Non HDL-cholesterol = (Total cholesterol) - (HDL-cholesterol)

3) Mean±Standard deviation (n=7-8).

4) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 45. Atherogenic index and cardiac risk factor

Groups ¹⁾	Atherogenic index ²⁾	Cardiac risk factor ³⁾
NC	1.1±0.2 ^{4)N.S.5)}	2.1±0.2 ^{N.S.}
AC	1.5±0.3	2.5±0.3
R5	2.1±1.1	3.1±1.1
R10	1.8±1.1	2.8±1.1

1) NC group were fed normal diets, AC group were fed atherogenic diets, R5 group and R10 group were fed atherogenic diets added rose's flowers extract 7.6 g/kg diet or 15 g/kg diet respectively.

2) Atherogenic index = (total cholesterol - HDL cholesterol)/HDL cholesterol

3) Cardiac risk factor = total cholesterol/HDL cholesterol

4) Mean±Standard deviation (n=7-8).

5) Not significant

Table 46. Organs weight

Groups ¹⁾	Liver (g/100g B.W.)	Heart (g/100g B.W.)	Kidney (g/100g B.W.)	Pancreas (g/100g B.W.)
NC	3.6±0.4 ^{2) b3)}	0.32±0.01 ^a	0.63±0.05 ^{N.S.4)}	0.091±0.015 ^{N.S.}
AC	4.6±0.3 ^a	0.28±0.02 ^b	0.65±0.05	0.084±0.016
R5	4.5±0.5 ^a	0.29±0.02 ^b	0.67±0.05	0.088±0.016
R10	4.7±0.3 ^a	0.31±0.02 ^a	0.64±0.02	0.093±0.026

1) NC group were fed normal diets, AC group were fed atherogenic diets, R5 group and R10 group were fed atherogenic diets added rose's flowers extract 7.6 g/kg diet or 15 g/kg diet respectively.

2) Mean±Standard deviation(n=7-8).

3) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test.

4) Not significant

Table 47. SGOT, SGPT activities and blood glucose levels

Groups ¹⁾	SGOT (U/L)	SGPT (U/L)	Glucose (mg/dL)
NC	68.8±13.0 ^{2)N.S.3)}	74.4±14.3 ^{N.S.}	93.3±17.6 ^{N.S.}
AC	61.9±6.5	91.9±18.7	95.9±12.7
R5	64.4±14.3	81.9±21.2	93.9±20.5
R10	60.0±6.0	73.8±12.8	87.1±18.1

1) NC group were fed normal diets, AC group were fed atherogenic diets, R5 group and R10 group were fed atherogenic diets added rose's flowers extract 7.6 g/kg diet or 15 g/kg diet respectively.

2) Mean±Standard deviation(n=7-8).

3) Not significant

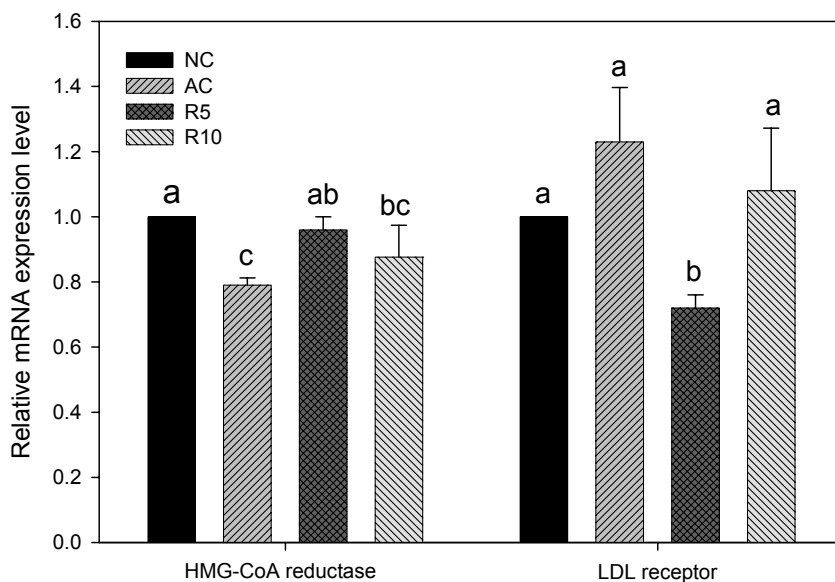


Fig. 18. Hepatic mRNA levels of HMG-CoA reductase and LDL receptor in F1B hamsters. Relative mRNA expression levels of HMG-CoA reductase and LDL receptor were measured by SYBR green I PCR analysis. Values represent the ratio of the target gene/GAPDH of the treated animals to that of the normal control, where the value for normal control was set at 1.0. NC group were fed normal diets, AC group were fed atherogenic diets, R5 group and R10 group were fed atherogenic diets added rose's flowers extract 7.6 g/kg diet or 15 g/kg diet respectively.

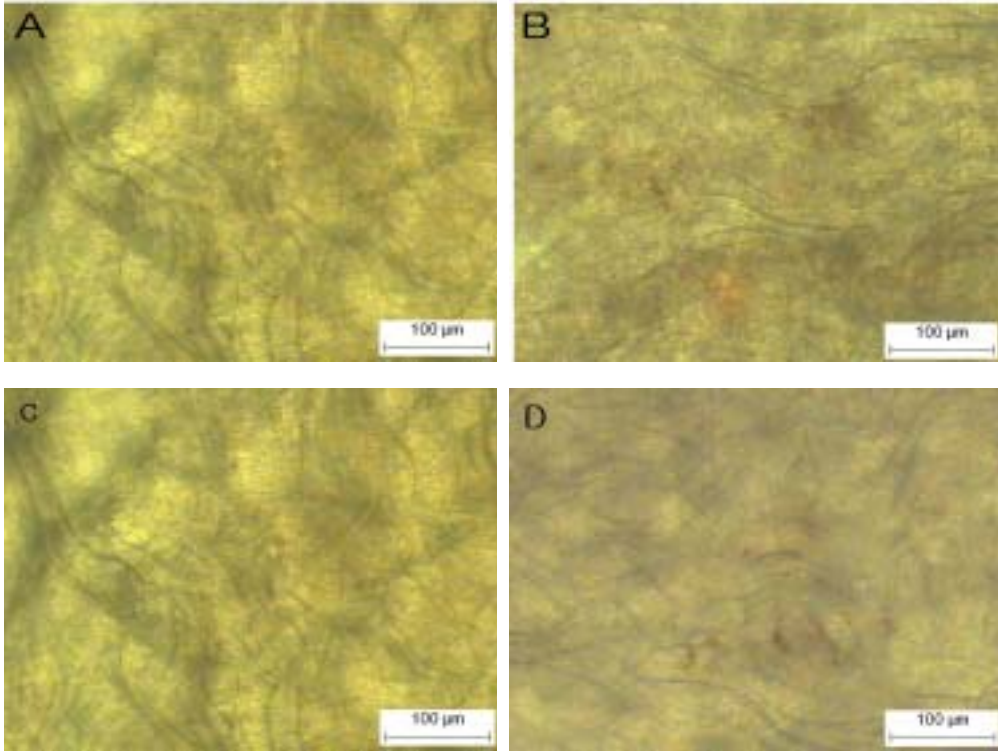


Fig. 19. Computer-generated micrographs of lipid-stained (oil red O) aortic arch sections of hamsters. NC group(A) were fed normal diets, AC group(B) were fed atherogenic diets, R5 group(C) and R10 group(D) were fed atherogenic diets added rose's flowers extract 7.6 g/kg diet or 15 g/kg diet respectively. Shown is the inner surface of aortic arch from an animal in each group.

나. 파인애플 세이지

1) 체중과 식이섭취량에 미치는 영향

파인애플 세이지 잎 추출물이 동맥경화를 유발시킨 햄스터의 체중에 미치는 영향은 Fig. 20에 나타내었다. 그림에서 보는 것처럼 실험 시작 시에는 전군에서 체중이 약 91 g 내외로 동일하게 시작되었으며 동맥경화유발 사료를 섭취한 AC군의 체중은 정상대조군에 비해 실험이 진행되는 동안 점차로 증가하는 경향을 보였다. S5군과 S10군은 AC군과 차이를 보이지 않았다. Pitman 등의 연구에서 햄스터에게 atherogenic diet를 섭취시킨 군의 경우 대조군에 비해 체중의 증가량이 유의하게 높았으며 혈중의 콜레스테롤치를 낮추는 약물로 알려진 로바스타틴을 atherogenic diet와 함께 섭취시킨 결과 체중의 증가량이 정상대조군과 유사했다고 보고하였다. 이러한 결과로 볼 때 AC군은 동맥경화유발식이에 포함된 coconut oil과 cholesterol에 의해 체중이 증가한 것으로 보이며 S5군과 S10군은 파인애플 세이지 잎 추출물의 섭취가 체중 증가를 감소시키는 효과는 없는 것으로 보였다. Table 48에서 12주간의 체중 증가량은 71.4-80.9 g의 범위내에서 전군에서 유의한 차이를 나타내지 않았다. 햄스터의 12주간의 식이 섭취량은 NC군이 490.5 g이고 AC군은 512.6 g으로 AC군이 유의하게 높았고 S5군은 496.4 g으로 AC군에 비해 낮았고 S10군은 AC군에 비해 유의하게 높았다. 전 실험기간동안의 체중의 증가량에 대한 식이섭취량의 비로 나타낸 식이효율은 0.15-0.16의 범위로 통계적 유의차를 나타내지 않았다.

2) 혈중 지질성분에 미치는 영향

파인애플 세이지 잎 추출물이 동맥경화를 유발시킨 햄스터의 혈중 지질성분에 미치는 영향을 알아보기 위해 혈중 중성지방, 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 및 non-HDL-콜레스테롤치를 분석하여 그 결과를 Table 49에 나타내었다.

혈중의 중성지방은 정상식이를 급여한 NC군은 275.9 mg/dL였으며 동맥경화유발식을 섭취한 AC군은 약 2.5배가량 증가한 675.4 mg/dL를 나타내었다. S5군은 586.1 mg/dL로 AC군에 비해 약간 감소하는 경향을 보였고 S10군은 823.6 mg/dL로 AC군에 비해 높은 경향을 보였다. Pitman 등의 연구결과에서는 정상대조군에 비해 atherogenic diet를 섭취한 군에서 중성지질의 농도는 크게 증가하였고 로바스타틴을 섭취한 군에서는 정상대조

군보다는 높지만 많이 감소하는 경향을 보였다.

혈중 총콜레스테롤 함량은 NC군이 145.9 mg/dL이고 AC군이 274.6 mg/dL로 NC군에 비해 AC군이 약 1.9배가량 증가하였다. S5군과 S10군은 각각 260.3, 297.8 mg/dL로 AC군과 차이가 없었다. Pitman 등의 연구에서는 atherogenic diet와 로바스타틴을 같이 섭취한 경우에 총콜레스테롤 함량이 정상대조군과 같은 정도로 회복되는 것으로 나타났다. 그리고 동맥경화유발 식이를 섭취한 군에 비해 로바스타틴을 같이 섭취한 군에서 총 콜레스테롤 함량이 약 63.7% 감소하는 경향을 보였다. 햄스터를 대상으로 한 많은 연구들에서 포화지방과 콜레스테롤의 급여는 혈중의 LDL receptor의 활성을 down-regulation하고 간장에서의 LDL 생산을 증가시킴으로써 혈장콜레스테롤과 중성지방의 농도를 증가시킨다고 보고되었다.

혈중 HDL 콜레스테롤치는 NC군이 69.0 mg/dL이고 AC군이 109.8 mg/dL로 NC군에 비해 AC군이 유의하게 높았으며 S5군과 S10군은 각각 111.6, 97.6 mg/dL로 AC군과 유의한 차이를 나타내지 않았다. 이는 보통의 경우 HDL-콜레스테롤이 증가하면 동맥경화나 심장질환의 위험이 감소한다는 견해와 불일치하는 것이었다. 그러나 여러 연구들에서 햄스터의 동맥내의 지질축적이 감소하는 경우에 동시에 HDL-콜레스테롤치가 감소한다는 보고가 있었다. Woollett 등의 연구에서는 햄스터에게 고콜레스테롤 식이를 급여하면 혈장의 HDL과 LDL 콜레스테롤이 동시에 증가하지만 이것이 reverse cholesterol transport의 정도가 증가한 것은 아니라고 하였다. 즉 다시 말해 햄스터에 있어서 HDL 콜레스테롤의 증가가 동맥경화에 따른 변화를 예방하는데 유의하지 않을 수도 있다고 하였다. Otto 등의 연구에서는 로바스타틴이 식이로 유도된 HDL-콜레스테롤의 증가에 영향을 미치지 않으면서 선택적으로 동맥경화 유발인자들을 저해하는 것이라고 하였으며 이는 토끼와 비둘기를 대상으로 한 연구에서도 관찰되었다. 이러한 결과는 Uehara 등의 연구에서도 유사하게 나타났다. SUN-C8257 (3-[(3-amino-4-carboxy) phenylsulfonyl]-7-chloroquinazoline-2,4(1H,3H)-dione)은 chymase 저해제의 하나로 체내에서 chymase의 작용을 저해한다고 하였다. 사람의 동맥경화성 대동맥에는 유의하게 높은 chymase-dependent Ang II-forming activity(dAIIFA)가 존재한다고 하며 또한 혈청 LDL 콜레스테롤치에 양의 상관관계를 갖는다고 하였다. 이러한 사실은 동맥내의 chymase은 고콜레스테롤혈증인 경우에 더욱 증가하며 동맥경화증의 발생에 중요한 역할

을 할 것으로 짐작된다. 즉 chymase를 저해함으로써 동맥경화를 억제하는 효과를 볼 수 있다는 가정하에 Uehara의 연구가 진행되었다. 고콜레스테롤 식이를 햄스터에게 급여한 결과 혈중의 HDL 콜레스테롤이 증가하였으며 SUN-C8257이라는 cymase 저해제를 처리한 군에서는 HDL 콜레스테롤이 오히려 약간 감소하는 경향을 보였다. 이로써 SUN-C8257의 처리가 대동맥의 지질축적을 감소시키는 역할을 하는데 있어서 HDL의 대사과정과 reverse cholesterol transport를 변화시키는 것으로 짐작할 수 있었다고 하였다. 결국 이러한 현상은 동맥경화를 감소시키는 또 다른 메커니즘일 것으로 추측되어졌다.

Non-HDL-콜레스테롤의 함량은 혈중 총콜레스테롤 함량에서 HDL-콜레스테롤 함량을 뺀 값으로 NC군은 76.9 mg/dL이고 AC군은 164.9 mg/dL로 NC군에 비해 유의하게 높았으며 S5군은 148.6 mg/dL로 AC군에 비해 유의한 차이를 보이지 않았으며 S10군은 200.1 mg/dL로 AC군에 비해 높았다. Nistor 등의 보고에 의하면 일반사료에 콜레스테롤이 3%, 버터가 15% 첨가된 고지방식이를 섭취한 햄스터를 12개월간 사육하여 동맥경화가 유발되는 과정을 설명하였다. 혈청 총콜레스테롤치의 경우에 3주만에 정상군에 비해 2배 증가하였고 4주째에는 4배가 증가하고 10개월 후에는 약 17배로 증가하였다. 혈중 LDL-콜레스테롤은 섭취 4주째에 약 4배정도 증가하였고 섭취한 지 약 10개월 후에는 대조군에 비해 약 13배 정도 증가하였다고 했다. 또한 이와 더불어 대동맥궁내의 혈관벽을 관찰한 결과 2주째부터 mononuclear cell이 혈관내벽에 붙기 시작하고 약 4주째 말기에는 특히 대동맥궁 내에 oil red O에 의해 붉게 염색되는 지질의 축적이 관찰되었다. 6개월 정도 지난 후에는 smooth muscle cell에 지질이 축적되기 시작하였고 10개월 후에는 사람의 atherosclerotic plaque와 유사한 거대한 콜레스테롤 덩어리와 칼슘축적 및 괴사가 일어나는 등의 병변이 생겼다. 본 연구에서도 콜레스테롤 0.1%와 coconut oil 10%를 함유한 사료를 급여한지 12주째에 혈액검사와 해부학적 검사를 실시한 결과 정상대조군에 비해 동맥경화유발대조군에서 총콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤이 증가하였으며 대동맥궁내에 지질이 축적되었음을 확인할 수 있었다. 단 본 연구에서는 Nistor 등의 연구에 비해 콜레스테롤과 지방의 첨가량이 적어서 그 영향으로 상대적으로 증가폭이 작았다.

위의 혈액 중 지질성분 분석결과를 토대로 하여 동맥경화지수(AI)와 심장위험지수(CRF)를 계산한 결과는 Table 50에 나타내었다. 동맥경화지수는 체내 고밀도 지단백질에 대한 중성지질의 농도를 대표하는 값으로 임상에서 3.0 이상의 값을 나타낼 때 동맥경화

에 대한 위험신호로 사용하고 있다. 심혈관위험지수는 동맥경화지수와 더불어 심혈관계 질환에 대한 위험신호로 사용되고 있으며 임상에서 7.0 이상의 수치를 나타낼 때 위험신호로 인지된다. 동맥경화지수와 심장위험지수가 높을수록 동맥경화나 심혈관계 질환에 걸릴 위험성이 높다고 할 수 있는데, 본 실험에서는 AI는 NC군이 1.1이고 AC군은 1.5로 NC군에 비해 높았으며 S5군은 1.4로 AC군과 차이가 없었으나 S10군은 2.2로 AC군보다 높았다. CRF도 AI와 비슷한 경향을 보였다. Faia 등의 연구에서는 햄스터에게 1% 콜레스테롤과 22% coconut oil을 함유한 식이를 12주, 24주, 49주간 급여한 결과 혈중 총콜레스테롤 함량이 급격하게 증가하여 심장위험지수가 정상대조군에 비해 약 10배 정도 높아졌다고 보고하였다.

이로써 파인애플 세이지 잎 추출물의 섭취로 인해 동맥경화가 유발된 햄스터의 혈중 중성지방, 총콜레스테롤, non-HDL-콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤치를 분석한 결과 S5군에서 중성지질을 약간 낮추는 것 이외에는 혈중 지질성분을 개선시키는 효과는 나타나지 않았다.

3) 햄스터 체내 장기의 무게변화와 간기능 지표의 변화

파인애플 세이지 잎 추출물의 투여가 동맥경화를 유발한 햄스터의 장기무게에 미치는 영향을 알아보기 위해 간장, 심장, 신장 및 비장을 적출하여 무게를 측정하였으며 그 결과는 Table 51에 나타내었다. 간장의 무게는 NC군이 3.6 g/100 g B.W., AC군이 4.6 g/100 g B.W.으로 NC군에 비해 유의하게 높았다. S5군과 S10군은 각각 4.5, 4.4 g/100 g B.W.으로 AC군과 유의한 차이를 나타내지 않았다. 심장의 무게의 변화는 NC군이 0.32 g/100 g B.W.이고 AC군이 0.28 g/100 g B.W.으로 NC군에 비해 유의하게 낮았다. R5군과 R10군은 각각 0.29 g/100 g B.W.으로 AC군과 차이가 없었다. 신장과 비장의 무게는 전군에서 유의한 차이를 나타내지 않았다.

장미꽃 추출물의 투여로 인한 간손상 정도를 알아보기 위해 간기능 지표인 혈액내의 SGOT와 SGPT의 활성을 측정하였으며 그 결과는 Table 52에 나타내었다. SGOT 활성은 전군에서 61.9-68.8 U/L의 범위로 나타나 차이가 없었으나 SGPT의 경우에는 AC군은 91.9 U/L로 NC군의 74.4 U/L에 비해 높았으나 S5군과 S10군에서는 각각 77.5, 66.3 U/L로 AC군에 비해 낮아졌다.

4) 간장내의 HMG-CoA reductase 와 LDL receptor의 mRNA의 변화

파인애플 세이지 잎 추출물의 섭취가 동맥경화 유발식을 섭취한 햄스터의 간장에서 HMG-CoA reductase 및 LDL receptor mRNA level에 미치는 영향을 알아보기 위하여 real-time PCR로 분석하였으며 그 결과를 Fig. 21에 나타내었다. HMG-CoA reductase mRNA level의 경우 정상대조군을 1로 놓고 AC군, S5군 및 S10군을 비교한 결과, NC군에 비해 AC군은 유의하게 낮았으며 S5군은 AC군에 비해 감소하였고 S10군은 AC군에 비해 상당히 증가하였다. LDL receptor의 경우에는 정상대조군의 LDL receptor mRNA level을 1로 보았을 때 NC군에 비해 AC군의 발현정도는 유의한 차이를 보이지 않았으며 R5군은 AC군에 비해 발현정도가 유의하게 낮았으며 R10군은 AC군에 비해 상당히 증가하는 경향을 보였다. Chambers 등에 따르면 콜레스테롤을 식이로 섭취하게 되면 HMG-CoA reductase의 활성이 감소함에 따라 내인성 콜레스테롤의 합성이 감소한다고 보고되어졌다. Dorfman 등이 햄스터를 대상으로 기본적으로 콜레스테롤을 0.1% 첨가한 식이에 butter, stick margarine, canola oil 및 soybean oil을 각각 10% 첨가하여 급여한 실험에서 지질의 첨가로 인해 지질의 종류에 상관없이 HMG-CoA reductase의 활성을 감소시키는 현상이 둔화되며 이러한 둔화현상은 지질의 cis-불포화도가 높을수록 증가한다고 보고하였다.

5) 대동맥궁내에서의 지방선의 축적 정도

파인애플 세이지 잎 추출물의 투여가 동맥경화를 유발시킨 햄스터의 대동맥에서의 지방 축적에 미치는 영향을 알아보기 위하여 햄스터의 대동맥궁 내벽을 Oil red O로 염색한 후 현미경으로 관찰하였으며 현미경 사진은 Fig. 22에 나타내었다.

Adams 등은 지용성인 bis-azo 염색약인 Oil red O는 수단 용액들 중의 하나로 조직 내에 축적된 지질의 현미경 관찰에 널리 이용되어진다고 하였다. 또한 햄스터 대동맥내의 지질축적에 관한 다른 연구들에 따르면 Oil red O에 의해 붉게 염색된 대동맥의 지질부분의 면적을 계산하여 도표화하였으나 본 연구에서는 면적을 구하기에 어려움이 있어 현미경상의 사진으로만 지질의 축적정도를 관찰하였다. NC군의 대동맥궁 내벽의 사진에는 Oil red O에 의해 붉게 염색된 부분이 보이지 않아서 지질의 축적이 거의 없었으며 AC군은 붉게 염색된 부분이 NC군에 비해 약간씩 존재하였다. Faia 등의 연구에서 약 12주

간 고지방/고콜레스테롤 식이를 급여한 햄스터의 대동맥궁내에는 fatty streak lesion이 존재하였으며 이는 초기 동맥경화증의 증세로 본래의 혈관내막을 foam cell이 덮고 있다고 하였다. 이에 따라 본 연구에서도 AC군의 대동맥궁 사진으로 보아 초기 동맥경화증이 진행된 상태로 판단되었다. S5군은 AC군에 비해 붉게 염색된 부분이 줄어들었으나 S10군의 현미경 사진에선 붉게 염색된 부분이 AC군과 거의 유사한 정도였다. 동맥경화유발 식이를 섭취한 햄스터의 foam cell 축적을 예방하는 것으로는 bile acid sequestrant, cholesterylamine 혹은 α -1 adrenergic inhibitor와 doxazosin 등이 있으며 lovastatin도 동일한 작용이 있음이 밝혀졌다.

6) 요약

7주령의 웅성 F1B golden Syrian 햄스터에게 동맥경화 유발식이와 함께 파인애플 세이지 잎 추출물을 7.6 g/kg diet 혹은 15 g/kg diet의 양으로 급여하며 12주간 사육하였을 때 햄스터 체내의 지질성분과 대동맥 내에서의 지방의 축적 정도에 미치는 영향을 조사하였다. 실험 결과 파인애플 세이지 잎 추출물은 7.6 g/kg diet양으로 급여한 경우에 혈중 중성지질, 총 콜레스테롤 및 non HDL-콜레스테롤치를 약간 감소시키긴 했으나 통계적으로 유의하지는 않았다. 반면 15 g/kg diet의 양으로 급여한 경우에 오히려 혈중지질성분의 개선효과가 없어서 보충 연구가 필요한 것으로 판단되었다.

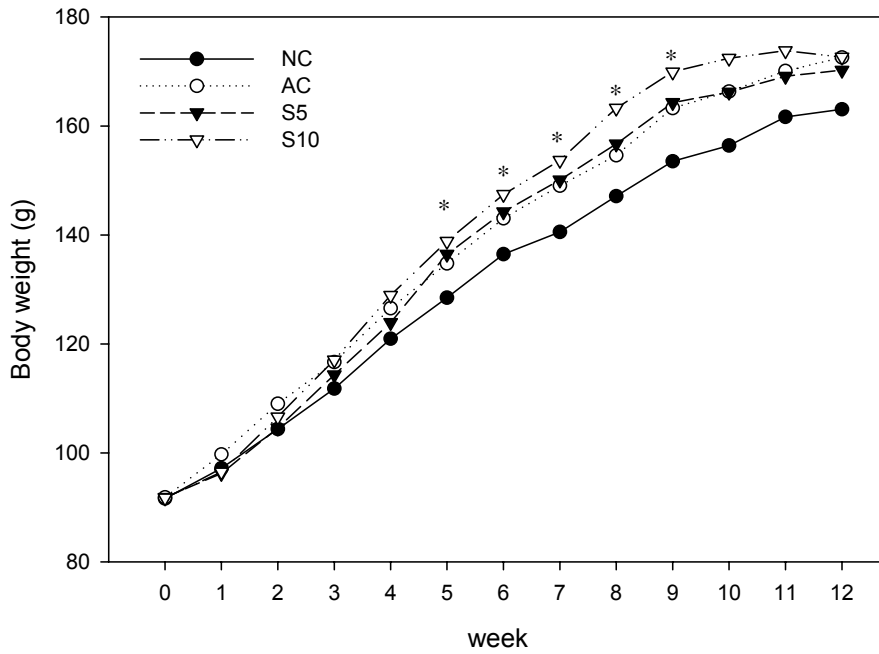


Fig. 20. Changes of body weight for 12 weeks. NC group(-●-) were fed normal diets, AC group(-○-) were fed atherogenic diets, S5 group(-▼-) and S10 group(-▽-) were fed atherogenic diets added pineapple sage's leaves extract 7.6 g/kg diet or 15 g/kg diet respectively. * represented significant difference at $p < 0.05$.

Table 48. Body weight gain, food intake and food efficiency ratio

Groups ¹⁾	Body weight gain (g/12 weeks)	Food intake (g/12 weeks)	Food efficiency ratio ²⁾
NC	71.4±5.3 ^{3)N.S.4)}	490.5±3.3 ^{c5)}	0.15±0.01 ^{N.S.}
AC	80.8±9.1	512.6±3.4 ^b	0.16±0.02
S5	78.4±3.6	496.4±20.2 ^c	0.16±0.01
S10	80.9±13.6	529.4±22.0 ^a	0.15±0.02

1) NC group were fed normal diets, AC group were fed atherogenic diets, S5 group and S10 group were fed atherogenic diets added pineapple sage's leaves extract 7.6 g/kg diet or 15 g/kg diet respectively.

2) FER = Body weight gain for 12 weeks/ Food intake for 12 weeks

3) Mean±Standard deviation (n=7-8).

4) Not significant

5) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha = 0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 49. Plasma triglyceride(TG), total cholesterol, HDL-cholesterol and non-HDL-cholesterol concentrations

Groups ¹⁾	Triglyceride (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	HDL-cholesterol (mg/dL)	Non-HDL-cholesterol ²⁾ (mg/dL)
CON	275.9±48.6 ^{3)c4)}	145.9±15.9 ^b	69.0±11.1 ^b	76.9±8.6 ^c
AC	675.4±135.0 ^{ab}	274.6±26.3 ^a	109.8±11.8 ^a	164.9±22.4 ^b
S5	586.1±90.2 ^b	260.3±15.5 ^a	111.6±10.0 ^a	148.6±16.4 ^b
S10	823.6±277.4 ^a	297.8±64.5 ^a	97.6±24.8 ^a	200.1±52.6 ^a

1) NC group were fed normal diets, AC group were fed atherogenic diets, S5 group and S10 group were fed atherogenic diets added pineapple sage's leaves extract 7.6 g/kg diet or 15 g/kg diet respectively.

2) Non HDL-cholesterol = (Total cholesterol) - (HDL-cholesterol)

3) Mean±Standard deviation (n=7-8).

4) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 50. Atherogenic index and cardiac risk factor

Groups ¹⁾	Atherogenic index ²⁾	Cardiac risk factor ³⁾
NC	1.1±0.2 ^{4)c5)}	2.1±0.2 ^c
AC	1.5±0.3 ^b	2.5±0.3 ^b
S5	1.4±0.2 ^b	2.4±0.2 ^b
S10	2.2±0.8 ^a	3.2±.8 ^a

1) NC group were fed normal diets, AC group were fed atherogenic diets, S5 group and S10 group were fed atherogenic diets added pineapple sage's leaves extract 7.6 g/kg diet or 15 g/kg diet respectively.

2) Atherogenic index = (total cholesterol - HDL cholesterol)/HDL cholesterol

3) Cardiac risk factor = total cholesterol/HDL cholesterol

4) Mean±Standard deviation (n=7-8).

5) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 51. Organs weight

Groups ¹⁾	Liver (g/100g B.W.)	Heart (g/100g B.W.)	Kidney (g/100g B.W.)	Pancreas (g/100g B.W.)
NC	3.6±0.4 ^{2)bc3)}	0.32±0.01 ^a	0.63±0.05 ^{N.S.4)}	0.091±0.015 ^{N.S.}
AC	4.6±0.3 ^a	0.28±0.02 ^b	0.65±0.05	0.084±0.016
S5	4.5±0.2 ^a	0.29±0.02 ^b	0.61±0.04	0.093±0.013
S10	4.4±0.4 ^a	0.29±0.02 ^b	0.59±0.04	0.088±0.013

1) NC group were fed normal diets, AC group were fed atherogenic diets, S5 group and S10 group were fed atherogenic diets added pineapple sage's leaves extract 7.6 g/kg diet or 15 g/kg diet respectively.

2) Mean±Standard deviation(n=7-8).

3) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test.

4) Not significant

Table 52. SGOT and SGPT activities

Groups ¹⁾	SGOT (U/L)	SGPT (U/L)	Glucose (mg/dL)
NC	68.8±13.0 ^{2)N.S.3)}	74.4±14.3 ^{b4)}	93.3±17.6 ^{N.S.}
AC	61.9±6.5	91.9±18.7 ^a	95.9±12.7
S5	66.3±28.0	77.5±8.9 ^b	91.3±9.2
S10	66.9±18.9	66.3±11.3 ^b	83.8±15.9

1) NC group were fed normal diets, AC group were fed atherogenic diets, S5 group and S10 group were fed atherogenic diets added pineapple sage's leaves extract 7.6 g/kg diet or 15 g/kg diet respectively.

2) Mean±Standard deviation(n=7-8).

3) Not significant

4) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test.

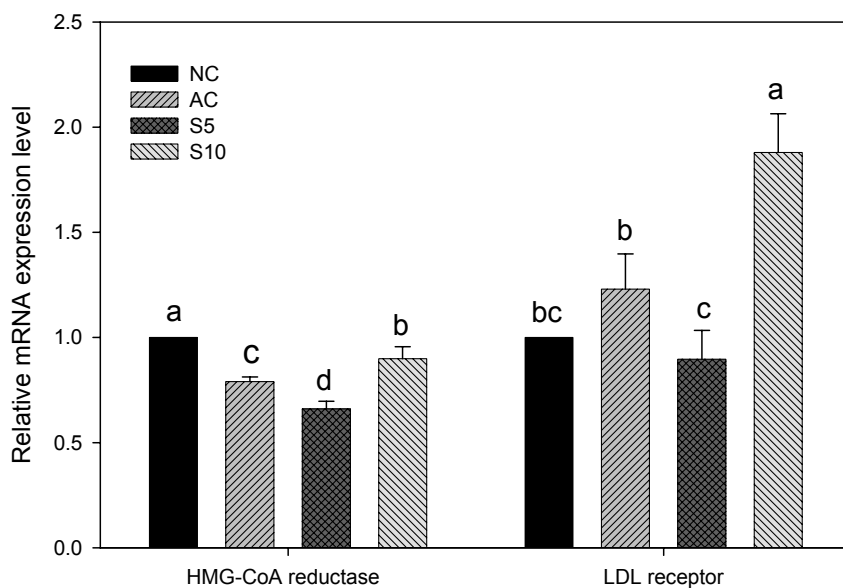


Fig. 21. Hepatic mRNA levels of HMG-CoA reductase and LDL receptor in F1B hamsters. Relative mRNA expression levels of HMG-CoA reductase and LDL receptor were measured by SYBR green I PCR analysis. Values represent the ratio of the target gene/GAPDH of the treated animals to that of the normal control, where the value for normal control was set at 1.0. NC group were fed normal diets, AC group were fed atherogenic diets, S5 group and S10 group were fed atherogenic diets added pineapple sage's leaves extract 7.6 g/kg diet or 15 g/kg diet respectively.

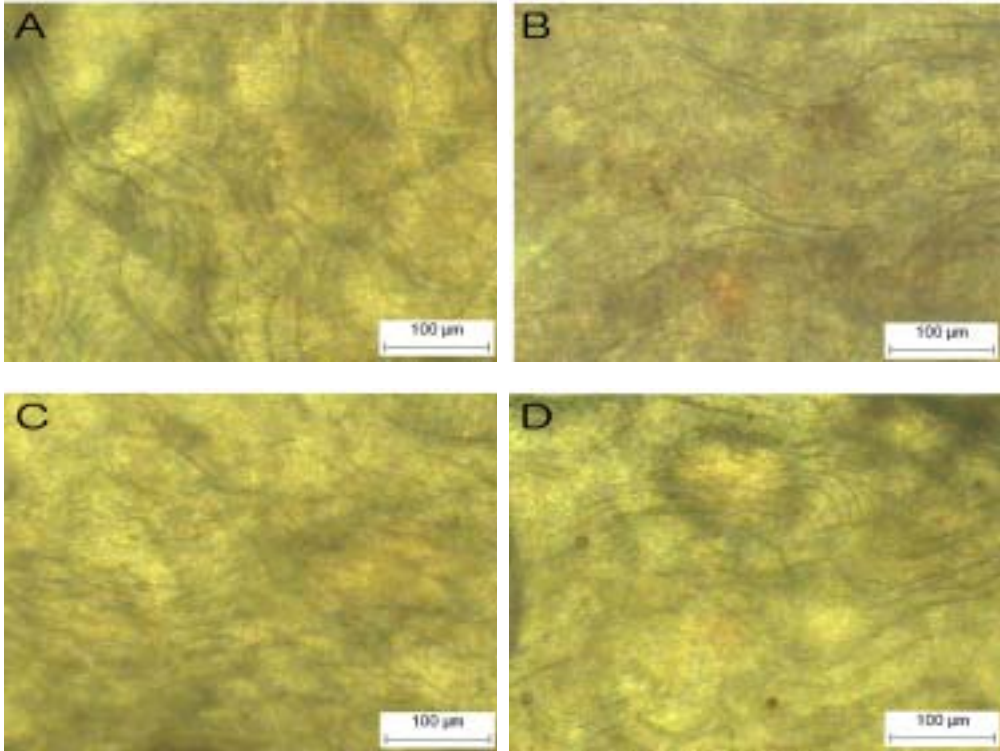


Fig. 22. Computer-generated micrographs of lipid-stained (oil red O) aortic arch sections of hamsters. NC group(A) were fed normal diets, AC group(B) were fed atherogenic diets, S5 group(C) and S10 group(D) were fed atherogenic diets added pineapple sage's leaves extract 7.6 g/kg diet or 15 g/kg diet respectively. Shown is the inner surface of aortic arch from an animal in each group.

다. 장미, 파인애플 세이지 및 녹차 추출물을 함유한 타블렛 제품

1) 체중과 식이섭취량에 미치는 영향

장미, 파인애플 세이지 및 녹차 추출물을 함유한 타블렛 제품이 동맥경화를 유발시킨 햄스터의 체중에 미치는 영향은 Fig. 23에 나타내었다. 그림에서 보는 것처럼 실험 시작 시에는 전군에서 체중이 약 91 g 내외로 동일하게 시작되었으며 동맥경화유발 사료를 섭취한 AC군의 체중은 정상대조군에 비해 실험이 진행되는 동안 점차로 증가하는 경향을 보였다. T5군은 실험기간의 중반 이후부터 AC군에 비해 체중이 낮아지는 경향을 보였으며 실험 마지막주에는 AC군에 비해 유의하게 체중이 감소하였다. T10군은 실험전기간동안 NC군과 체중의 변화가 유사하게 나타났다. Pitman 등의 연구에서 햄스터에게 atherogenic diet를 섭취시킨 군의 경우 대조군에 비해 체중의 증가량이 유의하게 높았으며 혈중의 콜레스테롤치를 낮추는 약물로 알려진 로바스타틴을 atherogenic diet와 함께 섭취시킨 결과 체중의 증가량이 정상대조군과 유사했다고 보고하였다. 이러한 결과로 볼 때 AC군은 동맥경화유발식이에 포함된 coconut oil과 cholesterol에 의해 체중이 증가한 것으로 보이며 장미, 파인애플 세이지 및 녹차 추출물을 함유한 타블렛 제품의 섭취가 체중 증가를 어느정도 감소시키는 효과는 있는 것으로 보였다. Table 53에서 12주간의 체중 증가량은 NC군의 경우 71.4 g이었고 AC군은 80.8 g으로 NC군에 비해 컸으며 T5군은 59.1 g으로 AC군에 비해 증가량이 작았으며 T10군은 69.4 g으로 T5만큼은 아니지만 체중의 증가량이 AC군에 비해 작은 경향을 보였다. 햄스터의 12주간의 식이 섭취량은 NC군이 490.5 g이고 AC군은 512.6 g으로 AC군이 유의하게 높았고 T5군은 467.4 g으로 AC군에 비해 낮았고 S10군은 504.5 g으로 AC군과 차이가 나지 않았다. 전 실험기간동안의 체중의 증가량에 대한 식이섭취량의 비로 나타낸 식이효율은 다른 군들에 비해 T5군이 0.13으로 약간 낮은 경향을 보였다.

2) 혈중 지질성분에 미치는 영향

장미, 파인애플 세이지 및 녹차 추출물을 함유한 타블렛 제품이 동맥경화를 유발시킨 햄스터의 혈중 지질성분에 미치는 영향을 알아보기 위해 혈중 중성지방, 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 및 non-HDL-콜레스테롤치를 분석하여 그 결과를 Table 54에 나타내었

다.

혈중의 중성지방은 정상식이를 급여한 NC군은 275.9 mg/dL였으며 동맥경화유발식이를 섭취한 AC군은 약 2.5배가량 증가한 675.4 mg/dL를 나타내었다. T5군과 T10군은 각각 786.1, 916.0.1 mg/dL로 AC군과 차이가 없거나 더 높았다.

혈중 총콜레스테롤 함량은 NC군이 145.9 mg/dL이고 AC군이 274.6 mg/dL로 NC군에 비해 AC군이 약 1.9배가량 증가하였다. T5군과 T10군은 각각 307.3, 326.6 mg/dL로 AC군과 차이가 없거나 더 높았다. Pitman 등의 연구에서는 atherogenic diet와 로바스타틴을 같이 섭취한 경우에 총콜레스테롤 함량이 정상대조군과 같은 정도로 회복되는 것으로 나타났다. 그리고 동맥경화유발 식이를 섭취한 군에 비해 로바스타틴을 같이 섭취한 군에서 총 콜레스테롤 함량이 약 63.7% 감소하는 경향을 보였다. 햄스터를 대상으로 한 많은 연구들에서 포화지방과 콜레스테롤의 급여는 혈중의 LDL receptor의 활성을 down-regulation하고 간장에서의 LDL 생산을 증가시킴으로써 혈장콜레스테롤과 중성지질의 농도를 증가시킨다고 보고되었다.

혈중 HDL 콜레스테롤치는 NC군이 69.0 mg/dL이고 AC군이 109.8 mg/dL로 NC군에 비해 AC군이 유의하게 높았으며 T5군과 T10군은 각각 111.4, 110.4 mg/dL로 AC군과 유의한 차이를 나타내지 않았다.

Non-HDL-콜레스테롤의 함량은 혈중 총콜레스테롤 함량에서 HDL-콜레스테롤 함량을 뺀 값으로 NC군은 76.9 mg/dL이고 AC군은 164.9 mg/dL로 NC군에 비해 유의하게 높았으며 T5군과 T10군은 195.9, 216.3 mg/dL로 AC군과 차이가 없나 더 높았다.

위의 혈액 중 지질성분 분석결과를 토대로 하여 동맥경화지수(AI)와 심장위험지수(CRF)를 계산한 결과는 Table 55에 나타내었다. 동맥경화지수는 체내 고밀도 지단백질에 대한 중성지질의 농도를 대표하는 값으로 임상에서 3.0 이상의 값을 나타낼 때 동맥경화에 대한 위험신호로 사용하고 있다. 심혈관위험지수는 동맥경화지수와 더불어 심혈관계 질환에 대한 위험신호로 사용되고 있으며 임상에서 7.0 이상의 수치를 나타낼 때 위험신호로 인지된다. 동맥경화지수와 심장위험지수가 높을수록 동맥경화나 심혈관계 질환에 걸릴 위험성이 높다고 할 수 있는데, 본 실험에서는 AI는 NC군이 1.1이고 AC군은 1.5로 NC군에 비해 높았으며 T5군과 T10군은 1.9와 2.0으로 AC군에 비해 높았다. CRF도 AI와 비슷한 경향을 보였다. Faia 등의 연구에서는 햄스터에게 1% 콜레스테롤과 22% coconut

oil을 함유한 식이를 12주, 24주, 49주간 급여한 결과 혈중 총콜레스테롤 함량이 급격하게 증가하여 심장위험지수가 정상대조군에 비해 약 10배 정도 높아졌다고 보고하였다. 이로써 장미, 파인애플 세이지 및 녹차 추출물을 함유한 타블렛 제품의 섭취로 인해 동맥경화가 유발된 햄스터의 혈중 중성지방, 총콜레스테롤, non-HDL-콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤치를 분석한 결과 제품의 섭취가 혈중 지질성분을 개선시키는 효과는 없는 것으로 나타났다.

3) 햄스터 체내 장기의 무게변화와 간기능 지표의 변화

장미, 파인애플 세이지 및 녹차 추출물을 함유한 타블렛 제품의 섭취가 동맥경화를 유발한 햄스터의 장기무게에 미치는 영향을 알아보기 위해 간장, 심장, 신장 및 비장을 적출하여 무게를 측정하였으며 그 결과는 Table 56에 나타내었다. 간장의 무게는 NC군이 3.6 g/100 g B.W., AC군이 4.6 g/100 g B.W.으로 NC군에 비해 유의하게 높았다. T5군과 T10군은 각각 4.8, 4.6 g/100 g B.W.으로 AC군과 유의한 차이를 나타내지 않았다. 심장의 무게의 변화는 NC군이 0.32 g/100 g B.W.이고 AC군이 0.28 g/100 g B.W.으로 NC군에 비해 유의하게 낮았다. T5군은 0.30 g/100 g B.W.으로 AC군에 비해 컸으며 T10군은 0.29 g/100 g B.W.으로 AC군에 비해 작았다. 신장과 비장의 무게는 전군에서 유의한 차이를 나타내지 않았다.

장미, 파인애플 세이지 및 녹차 추출물을 함유한 타블렛 제품의 섭취로 인한 간손상 정도를 알아보기 위해 간기능 지표인 혈액내의 SGOT와 SGPT의 활성을 측정하였으며 그 결과는 Table 57에 나타내었다. SGOT 활성은 전군에서 61.9-68.8 U/L의 범위로 나타나 차이가 없었으며 SGPT의 경우에도 74.4-99.4 U/L로 전군에서 유의한 차이를 나타내지 않았다.

4) 간장내의 HMG-CoA reductase 와 LDL receptor의 mRNA의 변화

장미, 파인애플 세이지 및 녹차 추출물을 함유한 타블렛 제품의 섭취가 동맥경화 유발 식이를 섭취한 햄스터의 간장에서의 HMG-CoA reductase 및 LDL receptor mRNA level에 미치는 영향을 알아보기 위하여 real-time PCR로 분석하였으며 그 결과를 Fig. 24에 나타내었다. HMG-CoA reductase mRNA level의 경우 정상대조군을 1로 놓고 AC군, T5

군 및 T10군을 비교한 결과, NC군에 비해 AC군은 유의하게 낮았으며 T5군과 T10군은 AC군과 차이가 없었다. LDL receptor의 경우에는 정상대조군의 LDL receptor mRNA level을 1로 보았을 때 NC군에 비해 AC군, T5군 및 T10군에서 모두 차이가 나타나지 않았다. Chambers 등에 따르면 콜레스테롤을 식이로 섭취하게 되면 HMG-CoA reductase의 활성이 감소함에 따라 내인성 콜레스테롤의 합성이 감소한다고 보고되어졌다. Dorfman 등이 햄스터를 대상으로 기본적으로 콜레스테롤을 0.1% 첨가한 식이에 butter, stick margarine, canola oil 및 soybean oil을 각각 10% 첨가하여 급여한 실험에서 지질의 첨가로 인해 지질의 종류에 상관없이 HMG-CoA reductase의 활성을 감소시키는 현상이 둔화되며 이러한 둔화현상은 지질의 cis-불포화도가 높을수록 증가한다고 보고하였다.

5) 대동맥궁내에서의 지방선의 축적 정도

장미, 파인애플 세이지 및 녹차 추출물을 함유한 타블렛 제품의 섭취가 동맥경화를 유발시킨 햄스터의 대동맥에서의 지방 축적에 미치는 영향을 알아보기 위하여 햄스터의 대동맥궁 내벽을 Oil red O로 염색한 후 현미경으로 관찰하였으며 현미경 사진은 Fig. 25에 나타내었다.

Adams 등은 지용성인 bis-azo 염색약인 Oil red O는 수단 용액들 중의 하나로 조직 내에 축적된 지질의 현미경 관찰에 널리 이용되어진다고 하였다. 또한 햄스터 대동맥내의 지질축적에 관한 다른 연구들에 따르면 Oil red O에 의해 붉게 염색된 대동맥의 지질부분의 면적을 계산하여 도표화하였으나 본 연구에서는 면적을 구하기에 어려움이 있어 현미경상의 사진으로만 지질의 축적정도를 관찰하였다. NC군의 대동맥궁 내벽의 사진에는 Oil red O에 의해 붉게 염색된 부분이 보이지 않아서 지질의 축적이 거의 없었으며 AC군은 붉게 염색된 부분이 NC군에 비해 약간씩 존재하였다. Faia 등의 연구에서 약 12주간 고지방/고콜레스테롤 식이를 급여한 햄스터의 대동맥궁내에는 fatty streak lesion이 존재하였으며 이는 초기 동맥경화증의 증세로 본래의 혈관내막을 foam cell이 덮고 있다고 하였다. 이에 따라 본 연구에서도 AC군의 대동맥궁 사진으로 보아 초기 동맥경화증이 진행된 상태로 판단되었다. T5군이나 T10군의 붉게 염색된 부분이 약간 줄어든 것처럼 보였다. 동맥경화유발 식이를 섭취한 햄스터의 foam cell 축적을 예방하는 것으로는 bile acid sequestrant, cholesterylamine 혹은 α -1 adrenergic inhibitor와 doxazosin 등이 있으

며 lovastatin도 동일한 작용이 있음이 밝혀졌다.

6) 요약

7주령의 웅성 F1B golden Syrian 햄스터에게 동맥경화 유발식이와 함께 장미, 파인애플 세이지 및 녹차 추출물을 함유한 타블렛 제품을 6.5% 혹은 13%의 양으로 급여하며 12주간 사육하였을 때 햄스터 체내의 지질성분과 대동맥 내에서의 지방의 축적 정도에 미치는 영향을 조사하였다. 실험 결과 장미, 파인애플 세이지 및 녹차 추출물을 함유한 타블렛 제품은 동맥경화가 유발된 햄스터의 체내 지질대사를 개선시키는 효과가 없는 것으로 나타났다.

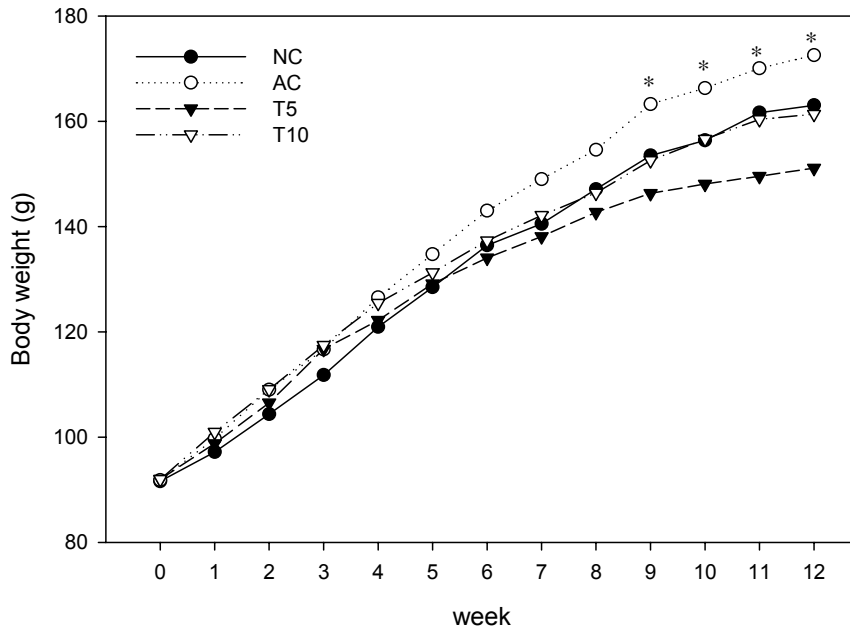


Fig. 23. Changes of body weight for 12 weeks. NC group(-●-) were fed normal diets, AC group(-○-) were fed atherogenic diets, T5 group(-▼-) and T10 group(-▽-) were fed atherogenic diets added tablet product 6.5% or 13% respectively. * represented significant difference at $p < 0.05$.

Table 53. Body weight gain, food intake and food efficiency ratio

Groups ¹⁾	Body weight gain (g/12 weeks)	Food intake (g/12 weeks)	Food efficiency ratio ²⁾
NC	71.4±5.3 ^{3)ab4)}	490.5±3.3 ^{ab}	0.15±0.01 ^{ab}
AC	80.8±9.1 ^a	512.6±3.4 ^a	0.16±0.02 ^a
T5	59.1±10.9 ^c	467.4±27.7 ^b	0.13±0.02 ^c
T10	69.4±13.8 ^{bc}	504.5±45.5 ^a	0.14±0.02 ^{bc}

1) NC group were fed normal diets, AC group were fed atherogenic diets, T5 group and T10 group were fed atherogenic diets added tablet product 6.5% or 13% respectively.

2) FER = Body weight gain for 12 weeks/ Food intake for 12 weeks

3) Mean±Standard deviation (n=7-8).

4) Values with different alphabet within the column are significantly different at α =0.05 by Duncan's multiple range test.

Table 54. Plasma triglyceride(TG), total cholesterol, HDL-cholesterol and non-HDL-cholesterol concentrations

Groups ¹⁾	Triglyceride (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	HDL-cholesterol (mg/dL)	Non-HDL-cholesterol ²⁾ (mg/dL)
CON	275.9±48.6 ^{3)c4)}	145.9±15.9 ^c	69.0±11.1 ^b	76.9±8.6 ^c
AC	675.4±135.0 ^b	274.6±26.3 ^b	109.8±11.8 ^a	164.9±22.4 ^b
T5	786.1±162.1 ^{ab}	307.3±56.8 ^{ab}	111.4±32.5 ^a	195.9±40.5 ^{ab}
T10	916.0±343.8 ^a	326.6±60.7 ^a	110.4±13.2 ^a	216.3±64.0 ^a

1) NC group were fed normal diets, AC group were fed atherogenic diets, T5 group and T10 group were fed atherogenic diets added tablet product 6.5% or 13% respectively.

2) Non HDL-cholesterol = (Total cholesterol) - (HDL-cholesterol)

3) Mean±Standard deviation (n=7-8).

4) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 55. Atherogenic index and cardiac risk factor

Groups ¹⁾	Atherogenic index ²⁾	Cardiac risk factor ³⁾
NC	1.1±0.2 ⁴⁾⁵⁾	2.1±0.2b
AC	1.5±0.3 ^{ab}	2.5±0.3 ^{ab}
T5	1.9±0.7 ^a	2.9±0.7 ^a
T10	2.0±0.8 ^a	3.0±0.8 ^a

1) NC group were fed normal diets, AC group were fed atherogenic diets, T5 group and T10 group were fed atherogenic diets added tablet product 6.5% or 13% respectively.

2) Atherogenic index = (total cholesterol - HDL cholesterol)/HDL cholesterol

3) Cardiac risk factor = total cholesterol/HDL cholesterol

4) Mean±Standard deviation (n=7-8).

5) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 56. Organs weight

Groups ¹⁾	Liver (g/100g B.W.)	Heart (g/100g B.W.)	Kidney (g/100g B.W.)	Pancreas (g/100g B.W.)
NC	3.6±0.4 ^{2)b3)}	0.32±0.01 ^a	0.63±0.05 ^{N.S.4)}	0.091±0.015 ^{N.S.}
AC	4.6±0.3 ^a	0.28±0.02 ^b	0.65±0.05	0.084±0.016
T5	4.8±0.4 ^a	0.30±0.02 ^a	0.65±0.05	0.087±0.028
T10	4.6±0.3 ^a	0.29±0.02 ^b	0.63±0.04	0.073±0.012

1) NC group were fed normal diets, AC group were fed atherogenic diets, T5 group and T10 group were fed atherogenic diets added tablet product 6.5% or 13% respectively.

2) Mean±Standard deviation(n=7-8).

3) Values with different alphabet within the column are significantly different at $\alpha=0.05$ by Duncan's multiple range test.

4) Not significant

Table 57. SGOT, SGPT activities and blood glucose levels

Groups ¹⁾	SGOT (U/L)	SGPT (U/L)	Glucose (mg/dL)
NC	68.8±13.0 ^{2)N.S.3)}	74.4±14.3 ^{N.S.}	93.3±17.6 ^{N.S.}
AC	61.9±6.5	91.9±18.7	95.9±12.7
T5	62.9±25.1	88.6±44.7	98.6±13.8
T10	68.8±8.8	99.4±33.2	91.5±18.5

1) NC group were fed normal diets, AC group were fed atherogenic diets, T5 group and T10 group were fed atherogenic diets added tablet product 6.5% or 13% respectively.

2) Mean±Standard deviation(n=7-8).

3) Not significant

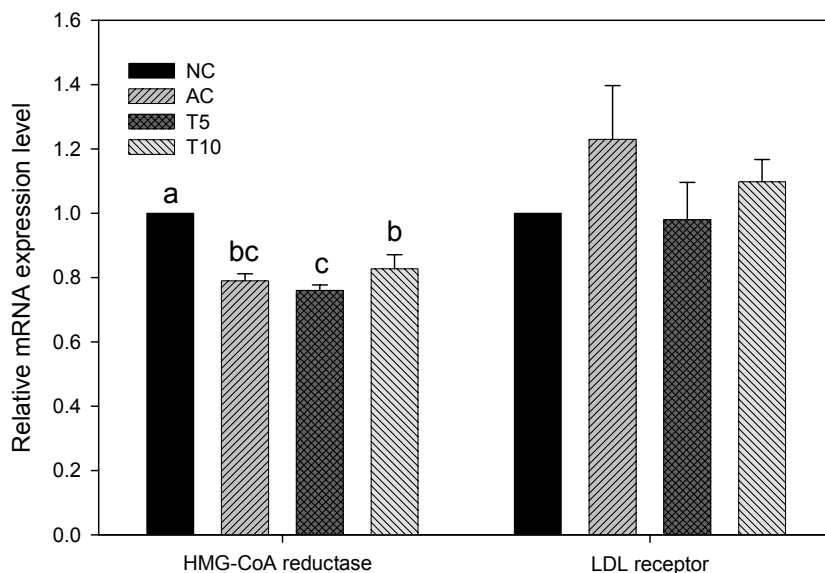


Fig. 24. Hepatic mRNA levels of HMG-CoA reductase and LDL receptor in F1B hamsters. Relative mRNA expression levels of HMG-CoA reductase and LDL receptor were measured by SYBR green I PCR analysis. Values represent the ratio of the target gene/GAPDH of the treated animals to that of the normal control, where the value for normal control was set at 1.0. NC group were fed normal diets, AC group were fed atherogenic diets, T5 group and T10 group were fed atherogenic diets added tablet product 6.5% or 13% respectively.

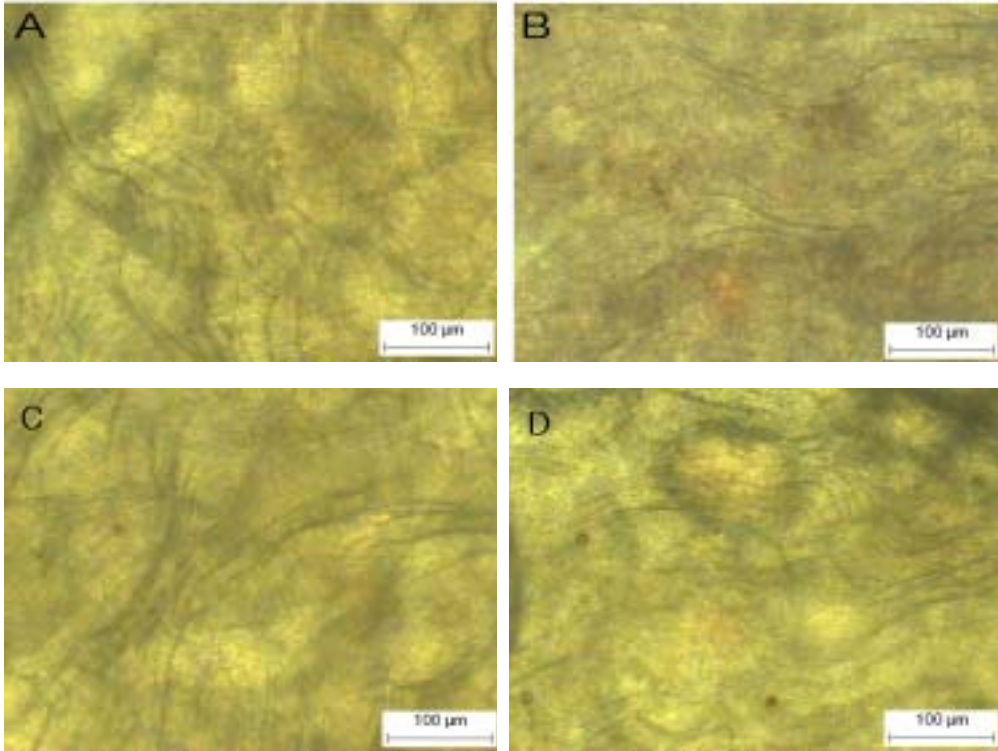


Fig. 25. Computer-generated micrographs of lipid-stained (oil red O) aortic arch sections of hamsters. NC group(A) were fed normal diets, AC group(B) were fed atherogenic diets, T5 group(C) and T10 group(D) were fed atherogenic diets added tablet product 6.5% or 13% respectively. Shown is the inner surface of aortic arch from an animal in each group.

5. 음료, 타블렛, 과립차 및 캔디 형태의 제품개발 결과

가. 음료 제품

음료 제품 개발은 녹차 추출물, rosemary 추출물, lavender 추출물에 단맛을 내기 위한 감미료와 신맛을 내기 위한 산미료에 기능성 첨가물인 타우린을 보강하여 제조하였다. 먼저 제품 개발을 위해 아래와 같은 예비적인 관능검사를 실시하였다. 관능검사에 사용된 검사지는 아래의 Fig. 26에 나타내었다.

허브 음료 예비 관능검사

제품번호:

매우 강하다 : ++++++ 매우 약하다 : +

매우 좋다 : ++++++ 매우 싫다 : +

1. 허브향

강도 :

기호도 :

2. 색

강도 :

기호도 :

3. 허브맛

강도 :

기호도 :

4. 단 맛

강도 :

기호도 :

5. 신 맛

강도 :

기호도 :

6. 쓴 맛

강도 :

기호도 :

바라는 점 :

Fig. 26. Sheet for preliminary sensory evaluation test of herb drink product

그 결과는 다음의 Table 58과 같았다.

Table 58. Preliminary sensory evaluation test for herb drink product

	Acceptability	Intensity
flavor of herb	3.4±1.1	3.6±0.7
color	3.2±1.1	3.5±0.5
taste of herb	3.4±0.8	3.5±0.7
sweetness	3.8±0.9	3.0±0.9
sourness	3.2±1.0	2.0±0.8
bitterness	3.9±0.9	1.9±1.1

예비 관능검사 결과 기호도가 전반적으로 무난한 것으로 판단되어 이를 기초로 녹차, rosemary, lavender 추출물의 농도를 달리한 3가지 음료를 제조한 후 다음 Fig. 27과 같은 관능검사를 실시하였다.

관능검사 결과를 통해 허브 음료의 최적 배합비를 선별하기 위하여 반응표면 분석법 (response surface methodology, RSM)을 이용하여 조사하였다. 중심합성계획(central composite design)에 의하여 다음의 Table 59과 같이 독립 변수는 녹차(X_1)와 rosemary(X_2), lavender(X_3)로 하였고, 각 처리 효과는 예비 실험을 기준으로 녹차는 0.06-0.18 %, rosemary는 0.06-0.18 %, lavender는 0.1-0.3 %로 하였다. 중심합성계획에 의한 최적 허브 음료 배합비는 SAS program을 이용하여 독립 변수를 녹차(X_1)와 rosemary(X_2), lavender(X_3)로 하고 종속변수인 관능검사 각 특성과의 상관계수를 유도한 후 종속 변수와 다중회귀 분석하여 모델식을 유도하였다.

Table 59. Experimental design of the coded and composite design matrix using green tea, rosemary and lavender

Design point	X_1 (green tea, %)	X_2 (rosemary, %)	X_3 (lavender, %)
1	-1(0.06)	-1(0.06)	-1(0.09)
2	1(0.18)	-1(0.06)	-1(0.09)
3	-1(0.06)	1(0.18)	-1(0.09)
4	1(0.18)	1(0.18)	-1(0.09)
5	-1(0.06)	-1(0.06)	1(0.27)
6	1(0.18)	-1(0.06)	1(0.27)
7	-1(0.06)	1(0.18)	1(0.27)
8	1(0.18)	1(0.18)	1(0.27)
9	0(0.12)	0(0.12)	0(0.18)

중심합성계획(central composite design)에 의한 실험계획에 의하여 제조된 허브 음료의 독립 변수인 허브의 함량과 종속변수인 관능검사 각 항목간의 다중회귀분석을 한 결과는 다음의 Table 60에 나타내었다. 즉 각 허브 함량을 독립변수(independent variables)로 하고, 관능검사 항목은 선호도와 강도를 종속변수(dependent variables)로 하여 회귀 분석한 결과 상관관계를 나타내는 R^2 값이 Y8(색도)를 제외하고 0.02 이하의 낮은 값을 나타내어 상관성이 높지 않게 나타났다. 한편 실험 계획에 의해 제조된 허브 음료의 각 관능검사 항목의 평균 점수를 표시한 결과를 나타낸 Table 61을 보면, 통계 분석 결과 유의성은 없었으나, 전반적인 선호도 항목(Y7)의 보통 이상(5점)의 점수로 평가한 배합비는 No. 1, No. 5, No. 7로 나타났다. 보통 이하의 점수로 평가한 배합비는 No. 2, No. 4, No. 6, No. 8, No. 9로 선호도가 높은 시료와 낮은 시료를 구별할 수 있었다.

Table 60. The values of regression equation calculated with independent and dependent variables in the sensory evaluation of herb drink

Independent variables		Regression equation
Sensory attribute acceptability		
Color (Y1)		$= 5.25+0.29X_1-0.06X_2+0.31X_3+0.27X_1X_2-0.31X_1X_3+0.16X_2X_3-1.12X_1^2+0.95X_2^2$
Herb flavor(Y2)		$= 5.08+0.0X_1+0.14X_2-0.06X_3-0.02X_1X_2-0.02X_1X_3-0.12X_2X_3+0.58X_1^2-0.33X_2^2$
Taste	Herb(Y3)	$= 4.75-0.27X_1-0.18X_2+0.41X_3+0.31X_1X_2-0.17X_1X_3+0.46X_2X_3+0.28X_1^2+0.23X_2^2$
	Sweetness(Y4)	$= 4.90-0.55X_1-0.02X_2+0.08X_3+0.18X_1X_2+0.41X_1X_3+0.25X_2X_3-0.59X_1^2+1.16X_2^2$
	Sourness(Y5)	$= 5.16-0.16X_1-0.31X_2+0.39X_3+0.29X_1X_2-0.08X_1X_3+0.56X_2X_3-1.39X_1^2+1.29X_2^2$
	Bitterness(Y6)	$= 4.25-0.27X_1-0.02X_2+0.25X_3+0.68X_1X_2+0.0X_1X_3+0.62X_2X_3-0.89X_1^2+1.37X_2^2$
Total accept(Y7)		$= 4.58-0.72X_1-0.06X_2+0.16X_3+0.16X_1X_2+0.31X_1X_3+0.22X_2X_3-0.33X_1^2+1.16X_2^2$
Sensory attribute intensity		
Color(Y8)		$= 5.66-0.31X_1+0.70X_2-0.02X_3-1.14X_1X_2+0.12X_1X_3-1.18X_2X_3+1.87X_1^2-2.62X_2^2$ *
Herb flavor(Y9)		$= 4.50-0.22X_1+0.79X_2-0.02X_3-1.66X_1X_2-0.02X_1X_3-0.70X_2X_3+1.93X_1^2-1.75X_2^2$
Taste	Herb(Y10)	$= 5.33-0.17X_1+0.58X_2-0.12X_3-0.58X_1X_2+0.37X_1X_3-0.62X_2X_3+0.13X_1^2-0.09X_2^2$
	Sweetness(Y11)	$= 4.92-0.62X_1+0.22X_2-0.10X_3-0.16X_1X_2+0.58X_1X_3-0.10X_2X_3-0.52X_1^2+0.62X_2^2$
	Sourness(Y12)	$= 4.75-0.02X_1-0.02X_2+0.25X_3+0.12X_1X_2-0.02X_1X_3-0.10X_2X_3-0.29X_1^2+0.0X_2^2$
	Bitterness(Y13)	$= 5.33+0.43X_1+0.33X_2-0.35X_3-0.60X_1X_2+0.12X_1X_3-0.52X_2X_3+1.29X_1^2-1.20X_2^2$

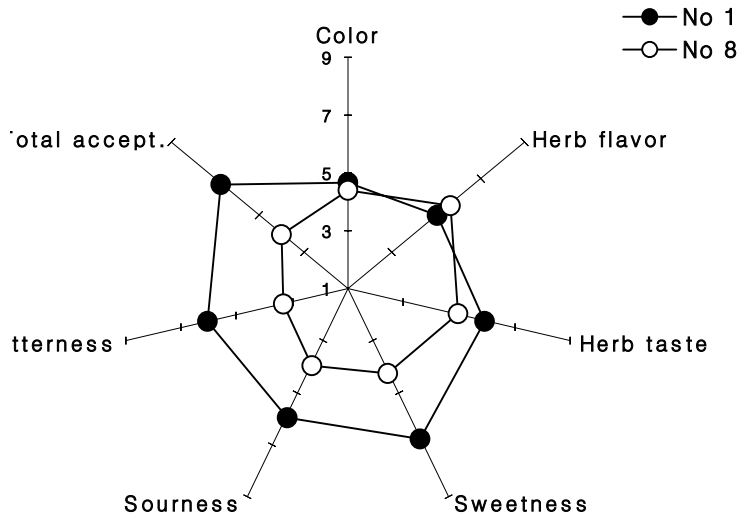
* means significant at $p < 0.05$

Table 61. Sensory score of herb drink

Sensory attribute	Sample								
	No1	No2	No3	No4	No5	No6	No7	No8	No9
Y1	4.7±1.9	5.3±1.6	5.8±1.6	5.4±0.9	5.6±1.4	5.0±1.8	5.3±2.0	4.4±1.9	5.3±1.0
Y2	5.1±1.7	5.2±1.7	5.3±1.2	5.7±1.1	5.3±1.5	5.23±1.5	5.3±1.4	5.6±1.3	5.1±1.7
Y3	5.9±1.2	5.1±1.8	5.8±1.4	4.4±1.6	6.2±1.1	4.6±1.9	6.1±1.2	5.0±1.5	4.8±1.1
Y4	6.8±1.3	4.5±1.6	5.8±1.6	4.3±1.4	5.7±1.2	5.0±1.3	5.8±1.1	4.3±1.0	4.9±1.0
Y5	5.9±1.2	5.2±1.6	5.8±1.5	4.0±1.5	6.2±1.4	4.7±1.4	5.7±1.2	3.9±0.9	5.2±1.6
Y6	6.1±1.1	4.2±1.5	6.0±1.7	4.3±1.6	5.7±1.4	3.4±0.7	5.2±1.3	3.3±1.0	4.3±1.4
Y7	6.8±1.1	4.3±1.9	5.5±1.8	4.1±1.4	6.0±1.1	4.8±1.3	6.0±1.7	4.0±1.4	4.6±1.5
Y8	2.3±0.7	3.8±1.1	3.1±0.9	5.3±1.1	4.4±1.9	6.3±1.5	5.8±1.5	7.3±1.0	5.7±1.2
Y9	2.8±0.9	3.7±1.9	3.8±0.8	5.3±1.6	4.2±1.3	5.0±1.9	5.7±1.6	6.2±0.9	4.5±1.6
Y10	4.3±1.5	4.3±2.1	4.8±1.5	5.6±1.8	4.5±1.3	6.1±1.8	5.6±1.6	5.6±1.3	5.3±1.6
Y11	5.8±2.1	3.8±1.5	4.8±1.5	4.1±1.3	4.7±1.6	4.9±1.3	5.3±0.9	4.3±1.3	4.9±1.3
Y12	4.3±1.8	4.0±1.4	4.8±1.3	4.4±2.0	5.0±1.5	4.7±1.9	4.5±1.9	4.7±1.8	4.8±1.9
Y13	4.0±1.4	5.8±1.8	4.8±2.2	6.3±1.7	4.1±1.4	6.4±1.4	4.9±1.8	6.8±1.1	5.3±1.9

다음의 Fig. 28는 선호도의 점수가 가장 높았던 No. 1 시료와 가장 낮은 점수로 평가하였던 No. 8의 시료의 관능검사 특성의 선호도와 강도를 QDA로 나타낸 결과이다. 선호도의 경우 높은 점수로 평가한 No. 1이 색과 허브 향미를 제외하고 허브 맛, 단맛, 신맛, 쓴맛 항목에서 높은 점수로 평가하였다. 반면에 각 항목의 강도는 선호도가 높은 No. 1시료는 선호도가 낮게 평가되었던 No. 8에 비하여 색도, 허브 향과 맛이 낮은 점수로 평가한 반면, 단맛, 신맛, 쓴맛의 강도는 시료 간에 큰 차이가 없었다. 즉 허브 차의 선호도에 영향을 주는 관능검사 항목은 허브 차의 색도와 허브 향과 맛이였다.

A. Acceptability



B. Intensity

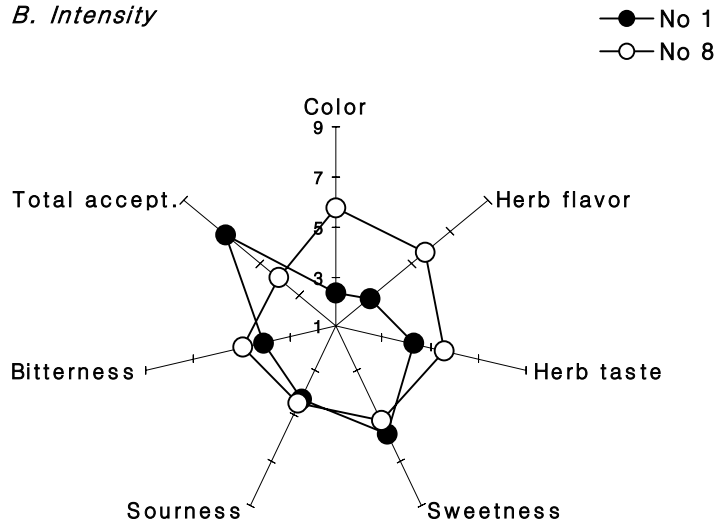


Fig. 28. Quantitative descriptive analysis(QDA) of herb tea. A: acceptability, B: intensity

이상의 결과를 바탕으로 제조한 음료 제품의 recipe는 다음의 Table 62와 같다.

Table 62. Recipe for drink-type product

원료명	함량 (g)
녹차 추출물	0.5-2.0
Rosemary 추출물	0.5-2.0
Lavender 추출물	0.7-2.5
올리고당	60.0
고과당	50.0
벌꿀	20.0
구연산	0.5
Vit. C	0.5
구연산나트륨	0.1
타우린	10.0
정제수	750ml
lemon concentrate	1.5ml



Fig. 29. Beverage product

나. 타블렛 제품

타블렛 제품은 휴대가 용이하고 고농도로 기능성 추출물을 첨가할 수 있는 장점이 있다. 먼저 녹차추출물, rosemary 추출물, lavender 추출물을 혼합한 후 polydextrose, 유청칼슘, 효모 등을 혼합하여 타정 하였다. 타블렛 제품의 제조 recipe는 다음과 같다.

Table 63. Recipe for tablet-type product

원료명	함 량(g)
녹차 추출물	5.0-15.0
Rosemary 추출물	5.0-15.0
Lavender 추출물	5.0-15.0
Polydextrose	30.0g
유청칼슘	30.0g
효모	200.0g



Fig. 30. Tablet product

다. 과립차 제품

과립차 제품은 녹차 추출물, rosemary 추출물, lavender 추출물에 단맛을 내기 위해 함수포도당을 첨가하여 제조하였다. 과립차 제품의 제조 recipe는 다음과 같다.

Table 64. Recipe for granule-type product

원료명	함 량(g)
녹차 추출물	0.5-1.7g
Rosemary 추출물	0.5-1.7g
Lavender 추출물	0.5-2.5g
함수포도당	90g
정제수	10ml



Fig. 31. Granule-type product

라. 캔디 제품

캔디 제품은 녹차 추출물, rosemary 추출물, lavender 추출물에 단맛을 내기 위해 당류를 첨가하여 제조하였다. 캔디류 제품의 제조공정은 다음과 같다.



Fig. 32. Flow sheet for preparation of candy

캔디는 설탕, 무설탕, 소프트 캔디 등 3종을 제조하였으며 그 recipe는 다음과 같다.

Table 65. Recipe for herb candy

원료명	배합비
설탕	59.660
물엿	39.774
허브 3종 추출물(65Brix)	0.186
멘톨	0.032
레몬향	0.023
라벤더향	0.093
구연산	0.232
합계	100

Table 66. Recipe for sugarless herb candy

원료명	배합비
이소말트	99.389
허브 3종 추출물(65 °Brix)	0.199
멘톨	0.040
레몬향	0.025
라벤더향	0.099
구연산	0.248
합계	100

Table 67. Recipe for herb soft candy

원료명	배합비
설탕	32.115
물엿	41.707
식물성 유지	8.309
레시틴	0.103
자당 지방산 에스테르	0.214
분당	0.970
혼단트	11.639
젤라틴 용액	3.880
허브 3종 추출물(65Brix)	0.453
멘톨	0.017
레몬향	0.054
라벤더향	0.377
구연산	0.162
합계	100



Fig. 33. Sugar, sugarless and soft herb candy

제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구 분	연구개발목표	평가착안점	목표달성도 및 기여도
1차년도 (2003)	- 말초동맥 순환 장애 개선 가능성이 있는 천연물의 수집 및 시험관모델을 이용한 시료선발(5종 이내)	- 인구인력과 협동과의 연계성 - 연구비 편성 및 집행의 적정성 - 연구목표의 성공가능성	- 시험관 모델을 통한 녹차 등을 비롯한 식물추출물 약 5종을 선발하였으며 세부책임자간의 연계성을 가지고 과제를 수행하였음 - 예상과는 다른 식물체에서 효과를 나타내어 앞으로 다양한 식물에 대한 연구의 계기가 될 것으로 판단됨
2차년도 (2004)	-동물모델을 이용한 활성 조사 및 작용기전 연구	- 동물실험의 합리성 - 개발제품의 개발 체계의 합리성 - 개발제품의 완성도	- 동물모델을 선정하는데 있어 일반적으로 이용하는 실험용 흰쥐를 배제하고 국내에서 거의 사용하지 않았던 햄스터를 이용함 - 햄스터를 이용한 결과 실험 결과가 더욱 뚜렷하게 구분되는 효과를 얻었음 - 현재 다른 실험자들도 햄스터를 이용하는 사례가 늘고 있음 - 동물실험을 기초로 개발제품에 대한 신뢰성을 구축하였으며 완성도 제고에 도움이 되었음
3차년도 (2005)	- 산업적 활용 기술 개발 및 개발제품의 기능성 조사	- 개발제품 concept의 합리성 - 개발제품의 완성도 - 상업화 기반 기술 개발	- 개발제품을 다시 동물실험에 적용하여 신뢰도를 높였음 - 관능검사 등을 통해 개발제품의 완성도를 높였음 - 허브관련 농민 또는 단체와 기술이전을 추진 중임

제 5 장. 연구개발 결과의 활용계획

본 연구는 계획 단계에서의 예상과는 달리 말초동맥 순환장애 개선 효과가 허브류 작물에서 나타났다. 기존에 알려져 있던 식물 추출물보다도 효과가 우수했고 아직은 그 효능이 잘 알려져 있지 않다는 점에서 앞으로 다양한 연구가 필요할 것으로 예측된다. 허브는 서양에서 유래된 일종의 약용작물이기는 하나 이미 우리 생활에 널리 사용되고 있다. 하지만 현재 허브농장 등에서 자체적으로 생산하는 제품은 거의 없다고 해도 될 정도로 그 기반은 미약한 실정이다. 현재 판매되고 있는 허브 제품은 대부분 수입품이며 국산화된 것은 단순가공을 통한 허브차 정도이다. 허브가 특히 웰빙 등의 영향으로 점차 대중화되어가고, 이에 따라 허브를 재배하는 농가가 증가추세에 있는 시점에서 허브에 대한 본격적이고 다양한 연구가 필요한 때라고 생각된다. 또한 기술개발을 통한 제품의 국산화를 통해 고가의 수입품을 대체할 필요가 있으며 서양 허브 뿐 만 아니라 국내산 약용작물에 대한 재평가가 필요한 시점이라 생각된다. 앞으로 허브류를 이용한 아로마 관련 제품 연구와 현재 국내에서 생산되고 있는 허브차의 품질 제고를 위한 연구 등 식품과 관련된 연구 외에도 화장품 등 연구 분야가 다양해질 필요가 있다. 지속적으로 늘어나고 있는 허브 농가의 보호를 위해서도 앞으로 이에 대한 준비가 필요할 것으로 생각된다.

허브에 관한 연구는 원예 분야 등과의 공동연구도 필요하리라 생각되며, 본 과제의 연구 결과는 현재 허브 농가를 중심으로 기술이전을 추진하고 있다. 특히, 음료와 과립차 등은 허브 농원 등에서 관광객을 대상으로 판매가 가능할 것으로 예측되어 기술이전이 이루어질 경우 농가 소득에도 기여할 것으로 생각된다. 또한 현재까지 각종 학회에서 허브류의 기능성을 발표를 통해 홍보했으며, 학술지에도 게재하였다. 앞으로 3편 정도의 논문이 투고될 예정이며 이를 통해 허브에 대한 우수성에 대한 홍보를 지속하고자 한다.

제 6 장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

본 연구를 진행하면서 특히 관심을 가진 곳은 인도네시아이다. 인도네시아는 기후적으로 허브류를 비롯한 다양한 식물이 자라는 곳이기도 하고 인도네시아 사람들이 자무(인도네시아산 허브류)에 대한 관심이 높기 때문이다. 인도네시아에서 자무를 연구 또는 생산하는 곳으로는 Biopharmaca Research Center와 Indofarma 등을 들 수 있다. 이들이 연구하고 생산하는 자무 제품은 다이어트와 자양강장 등에 초점이 맞추어져 있다. 국내산 허브를 이용한 제품개발을 통해 동남아 등에 수출을 하는 것도 그리 어려운 것은 아닐 것으로 판단되었다.

수집한 자무 제품은 다음과 같다.

Prolipid : 지질 대사를 증진시켜 체내 지질과 콜레스테롤을 감소

성분 : guazuma ulmifolia 670 mg
murraya paniculata 120 mg / capsule
sonchus arvensis 200 mg

Prouric : 요산 과다로 인한 통증 완화

성분 : andrographis paniculata 600 mg
curcuma xanthorrhiza 240 mg
sonchus arvensis 475 mg
piper nigrum 200 mg
cyperus rotundus 220 mg

SM Diabe : 혈당 강하 효과

성분 : phyllanti herba 50 mg
mori folium 100 mg
orthosiphonis folium 50 mg / capsule

andrographidis herba 200 mg
eugeniae polyanthae folium 100 mg

V-Talytea : 스테미너 및 건강 증진

성분 : panax ginseng ext.
tribulus terrestris ext.
maltitol
citric acid
flavour lemon

Pacekap : 고혈압, 당뇨, 신체면역력 증강

성분 : noni fruit ext. 450 mg/capsule

Bio vision : 눈 및 시력보호

성분 : bilberry ext. 80 mg
betacaroten 3 mg / capsule
Vit C 60 mg
Vit B₂ 1.5 mg

Alang tea : 체열 강하 및 구강 궤양에 효과

성분 : imperatae rhizoma, sucrose

Ginger milk : 건강 및 스테미너 증진

Tolak angin : 일반적 감기에 효과(두통, 발열, 이후 통증, 오한 등)

성분 : foeniculi fructus 10%
caryophylli folium 10%
zingiberis rhizoma 10%

menthae arvensis herba 10%
other plant ingredients up to 100%

Ceking : 체중감량 및 다이어트

성분 : guazumae folium 30%
parameriae cortex 20%
coriondri fructus 20%
kaempferiae rhizoma 20%
myristicae semen 10%

Ragavit : 스테미너 증진, 혈액순환 개선

성분 : Curcumae rhizoma 25%
zingiberis rhizoma 20%
ginseng radix 15%
hippocampus 10%
other ingredients up to 100%

Ginseng : 허리통증 개선, 식욕 및 스테미너 증진

성분 : peperis nigri fructus 3.5%
zingiberis rhizoma 15%
piper betle fructus 17.5%
alix yae cortex 2.5%
other ingredients up to 100%

Herbalax : 비만 해소 효과

KLB6 Grapefruit diet plan : 다이어트 효과

성분 : grapefruit ext. glucomannan, lecithin, kelp

cider vinegar, phenylalanine, Vit B₆ 등

Merit : 다이어트 효과

성분 : guazumae folium 30%
rhei radix 10%
granati fructus cortex 10%
other ingredients up to 100%

Natur slim : 다이어트 효과

성분 : rhei radix 500 mg
guazumae folium 1500 mg / pill
glacilaria 500 mg

Majun : 스테미너 증진, 혈액순환 개선

성분 : piperis nigri fructus 6.5%
retrofracti fructus 6.5%
zingiberis rhizoma 4%
melaeucae fructus 4%
cubebae fructus 4%
other ingredients up to 100%

제 7 장. 참고문헌

1. Oh MH, Whang HJ. Chemical composition of several herb plants. Korean J. Food Sci. Technol. 35: 1-6 (2003)
2. Cuvelier ME, Richahard H, Berset C. Antioxidant activity of phenolic composition of pilot and commercial extracts of sage and rosemary. J. Am. Oil Chem. Soc. 73: 645-652 (1998)
3. Choi YJ. Guidebook of herbs and spices. 1st ed. Yeaga Press, Seoul, Korea. pp. 156 (1997)
4. Balch P, Balch J. Prescription for nutritional healing. 3rd ed. Avery Publishing, NY, USA (2000)
5. Han MJ, Hong JY, Lyu JH, Kim DB. One hundred of herbs used for healing. 1st ed. Hyoil Press, Seoul, Korea. pp. 52-53 (2004)
6. Lipp FJ. Herbalism. 1st ed. Changhea Press, Seoul, Korea (2004)
7. Korea Food and Drug Administration. Food sources. Available from: <http://www.kfda.go.kr/cgi-bin/t4.cgi/food>. Accessed Apr. 5, 2006.
8. Korea Food and Drug Administration. Database of food sources. Available from: <http://rndmoa.kfda.go.kr>
9. KNSO. Annual report on the cause of death statistics. Korea National Statistical Office, Seoul, Korea (2003)
10. Cushman DW, Cheung HS. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin-converting enzyme of rabbit lung. Biochem. Pharmacol. 20: 1637-1648 (1971)
11. Kleinsek DA, Ranganathan S, Porter JW. Purification of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase from rat liver. Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 1401-1435 (1977)
12. Astrup A, Mullertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity.

- Arch. Biochem. Biophys. 40: 346-351 (1952)
13. Kim MJ, Yook HS, Byun MW. Effects of gamma irradiation on microbial contamination and extraction yields of Korean medicinal herbs. *Radiat. Phys. Chem.* 57: 55-58 (2000)
 14. Ma SJ. Inhibitory effect of onion seasoning on angiotensin converting enzyme. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 29: 395-400 (2000)
 15. Vermeirssena V, Campb JV, Verstraetea W. Optimization and validation of an angiotensin-converting enzyme inhibition assay for the screening of bioactive peptides. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 51: 75-87 (2002)
 16. Erdos EG, Skidgel RA, The angiotensin I -converting enzyme. *Lab. Invest.* 56:3 45-348 (1987)
 17. Messerli FH. Combination in the treatment of hypertension: ACE inhibitors and calcium antagonists. *Am. J. Hypertens.* 12: 86s-90s (1999)
 18. Ariyoshi Y. Angiotensin-converting enzyme inhibitors derived from food proteins. *Trends Food Sci. Technol.* 4: 139-144 (1993)
 19. Cho YJ, An BJ, Choi C. Inhibition effect of against angiotensin converting enzyme of flavan-3-ols isolated korean green tea. *Korean J. Food Sci. Technol.* 25: 238-242 (1993)
 20. Hong SP, Kim MH, Oh SW, Han CK, Kim YH. ACE inhibitory and antihypertensive effect of chitosan oligosaccharides in SHR. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30: 1476-1479 (1998)
 21. Kim KM, Suh HJ, Chung SH, Cho WD, Ma SJ. Chemical structure of angiotensin converting enzyme inhibitor isolated from onion flesh. *Food Sci. Biotechnol.* 8: 329-332 (1999)
 22. Ma SJ. Inhibitory effect of onion seasoning on angiotensin converting enzyme. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 29: 395-400 (2000)
 23. Park EJ, Lee HG, Park HH, Kwon IB, Shin HK, Yang CB. Purification and identification of angiotensin- I converting enzyme inhibitory compounds from

- watercress(*Nasturtium officinale*). Food Sci. Biotechnol. 9: 163–167 (2000)
24. Kwon YS, Lee HG, Shin HK, Yang CB. Purification and identification of angiotensin- I converting enzyme inhibitory peptide from small red bean protein hydrolyzate. Food Sci. biotechnol. 9: 292–296 (2000)
 25. Kim YH, Lee HG, Do JR, Shin HK, Yang CB. Purification and identification of angiotensin- I converting enzyme inhibitory peptide from turban shell(*Turbo cornutus*). Food Sci. biotechnol. 9: 353–357 (2000)
 26. Ahn SW, Kim KM, Yu KW, Noh DO, Suh HJ. Isolation of angiotensin I converting enzyme inhibitory peptide from soybean hydrolysate. Food Sci. biotechnol. 9: 378–381 (2000)
 27. Jung KA, Song TC, Han D, Kim IH, Kim YE, Lee CH. Cardiovascular protective properties of kiwifruit extracts *in vitro*. Biol. Pharm. Bull. 28: 1782–1785 (2005)
 28. Endo A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. J. Lipid Res. 33: 1569–1582 (1992)
 29. Rizzo M, Berneis K. Low-density lipoprotein size and cardiovascular prevention. Eur. J. Intern. Med. 17: 77–80 (2006)
 30. Pitt B. Low-density lipoprotein cholesterol in patients with stable coronary heart disease – Is it time to shift our goals? ACC Curr. J. Rev. 14: 4 (2005)
 31. Michael I, Gurr A. Dietary lipids and coronary heart disease: Old evidence, new perspective. Prog. Lipid Res. 31: 195–243 (1992)
 32. Hakim AA, Curb JD, Burchfiel CM, Rodriguez BL, Sharp DS, Yano K, Abbott RD. Screening for coronary heart disease in elderly men based on current and past cholesterol levels. J. Clin. Epidemiol. 52: 1257–1265 (1999)
 33. Altschul R, Hoffer A, Stephen JD. Influence of nicotinic acid on serum cholesterol in man. Arch. Biochem. Biophys. 54: 558–559 (1955)
 34. Tennet DM, Siegel H, Zanetti ME, Kuron GW, Ott WH, Walf FJ. Plasma cholesterol lowering action of bile acid binding polymers in experimental animals. J. Lipid Res. 1: 469–473 (1960)

35. Thorp JM, Waring WS. Modification of metabolism and distribution of lipids by ethyl chlorophenoxyisobutylate. *Nature* 194: 948-949 (1962)
36. Goldsmith GA, Hamilton JG, Miller ON. Lowering of serum lipid concentrations. Mechanisms used by unsaturated fats, nicotinic acid and neomycin: excretion of sterols and bile acids. *Arch. Intern. Med.* 105: 512-517 (1960)
37. Pollak OJ. Reduction of blood cholesterol in man. *Circulation* 7: 702-706 (1953)
38. Bhattacharyya AK, Eggen DA. Effect of triparanol on cholesterol absorption in rhesus monkeys. *Atherosclerosis* 51: 293-298 (1984)
39. Starr P, Roen P, Freibrun JL, Schleissner LA. Reduction of serum cholesterol by sodium D-thyroxine. *Arch. Intern. Med.* 105: 830-842
40. Knopp RH. Risk factors for coronary artery disease in women. *Am. J. Cardiol.* 89: 28-34 (2002)
41. Siperstein MD, Fagan VM. Feedback control of mevalonate synthesis by dietary cholesterol. *J. Biol. Chem.* 241: 602-609 (1966)
42. Siperstein MD. Regulation of cholesterol biosynthesis in normal and malignant tissues. *J. Lipid Res.* 8: 97-104 (1970)
43. Brown MS, Dana SE, Dietschy JM, Siperstein MD. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. Solubilization and purification of a cold-sensitive microsomal enzyme. *J. Biol. Chem.* 248: 4731-4738 (1973)
44. Lee HJ, Choi MS. Measurement of inhibitory activities on 3-hydroxy-3-methylglutaryl CoA reductase and acyl-CoA:cholesterol acyltransferase by various plant extracts in vitro. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 28: 958-962 (1999)
45. Park JR, Park JC, Choi SH. Screening and characterization of anticholestelogenic substances from edible plant extracts. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 26: 236-241 (1997)
46. Lee YH, Shin YM, Lee JE, Choi YS, Lee SY. In vitro screening of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A reductase inhibitor from plant extracts.

- Korean J. Biotechnol. Bioeng. 6: 55-61 (1991)
47. 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)
 48. Voet D, Voet JG. Biochemistry. John Wiley Sons. New York, USA. pp. 1087-1095 (1990)
 49. Yun YP, Kang WS, Lee MY. The antithrombotic effects of green tea catechins. J. Food Hyg. Saf. 11: 77-82 (1996)
 50. Lee KY, Kim JH, Son JR, Lee JS. Detection and extraction condition of physiological functional compounds from bran of Heugjinju rice (*Oryza sativa* L.). Korean J. Postharvest Sci. Technol. 8: 296-301 (2001)
 51. Kim YT, Kim WK, Oh HI. Screening and identification of the fibrinolytic bacterial strain from Chungkook-jang. Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 23: 1-5 (1995)
 52. Fujita M, Nomura K, Hong K, Ito Y, Asada A, Nishimuro S. Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese Natto, a popular soybean fermented food in Japan. Biochem. Biophys. REs. Comm. 197: 1340-1347 (1993)
 53. Oh HS, Park YH, Kim JH. Isoflavone contents, antioxidative and fibrinolytic activities of some commercial cooking-with-rice soybeans. Korean J. Food Sci. Technol. 34: 498-504 (2002)
 54. Choi NS, Seo SY, Kim SH. Screening of mushrooms having fibrinolytic activity. Korean J. Food Sci. Technol. 31: 553-557 (1999)
 55. Kim MJ, Song YS, Song YO. The fibrinolytic activity of Kimchi and its ingredients *in vivo* and *in vitro*. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 27:633-638 (1998)
 56. Shin DH. The research and prospect of natural antioxidants. Bulletin of Food Technology 8: 28-33 (1995)
 57. Kim YJ. The protect the living organ from free radicals and the failure of protection : age-related disease. Bulletin of Food Technology 10: 4-26 (1997)

58. Buring JE, Henekens CH. Antioxidant vitamins and cardiovascular disease. *Nutrition Reviews* 55: S53-S60 (1997)
59. Jacques PF, Halpner AD, Blumberg JB. Influence of combined antioxidant nutrient intake on their plasma concentrations in an elderly population. *Am. J. Clin. Nutr.* 62: 1228-1233 (1995)
60. Oh SW, Kwon EK, Kim KY. Screening of angiotensin converting enzyme inhibitory activity in several natural products(abstract no P7-17). In: Abstract: 69th symposium of Food Science and Technology. October 24-26, Hotel Tirol in Muju resort, Muju, Korea. The Korean Society of Food Science and Technology, Seoul, Korea (2002)
61. Kwon EK, Oh SW, Lee CH, Han D. Screening of HMG-CoA reductase inhibitory activity in several natural products(abstract no P7-32). In: Abstract: 70th Nutrigenomics Symposium: Recent trends in food science and technology. June 26-28, Gyeongju TEMF Hotel, Gyeongju, Korea. The Korean Society of Food Science and Technology (2003)
62. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma without use of ultracentrifuge. *Clin. Chem.* 18: 499-502 (1972)
63. Rosenfeld L. Lipoprotein analysis. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 113: 1101-1110 (1989)
64. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay of lipid peroxides in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anaytical. Biochem.* 95: 351-358 (1979)
65. Hornstra G, Christ-Hazelhof E, Haddeman E, Hoor FT, Nugteren DH. Fish oil feeding lowers thromboxane- and prostacylin production by rat platelets and aorta and does not result in the formation of prostagladin I3. *Prostaglandins* 21: 727-738 (1981)
66. Kim ES, Kim MK. Effect of dried leaf powders and ethanol extracts of persimmon, green tea and pine needle on lipid metabolism and antioxidative capacity in rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32: 337-352 (1999)

67. Yun YP, Kang WS, Lee MY. The antithrombotic effects of green tea catechins. *J. Food Hyg. Safety* 11: 77-82 (1996)
68. Kannel, WB. Risk factors in hypertension. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 13: S4-S10 (1989)
69. Oh HS, Park YH, Kim JH. Isoflavone contents, antioxidative and fibrinolytic activities of some commercial cooking-with-rice soybeans. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 498-504 (2002)
70. Lee E, Choi MY. Effects of pine needle on lipid composition and TBARS in rat fed high cholesterol. *Korean J. Food Sci. Technol.* 32: 1186-1190 (2000)
71. Kim SY, Lee WC, Kim HB, Kim AJ, Kim SK. Antihyperlipidemic effects of methanol extracts from mulberry leaves in cholesterol-induced hyperlipidemia rats. *Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 27: 1217-1222 (1998)
72. Han CK, Lee BH, Song KS, Lee NH, Yoon CS. Effects of antihypertensive diets Mainley Consisting of Buckwheat, Potato and perilla seed on spontaneously hypertensive rats. *Korean J. Nutr.* 29: 1087-1095 (1996)
73. Wooller LA, Spady DK, Dietschy JM. Saturated and unsaturated fatty acids independently regulate low density lipoprotein receptor activity and production rate. *J. Lipid Res.* 33: 77-88 (1992)
74. Holme I. An analysis of randomized trials evaluating the effect of cholesterol reduction on total mortality and coronary heart disease incidence. *Circulation* 82: 1916-1924 (1990)
75. Spady DK, Dietschy JM. Interaction of dietary cholesterol and triglyceride in the regulation of hepatic low density lipoprotein transport in the hamster. *J. Clin. Invest.* 81: 300-309 (1988)
76. Liu CH, Huang MT, Huang PC. Sources of triglycerol accumulation in liver of rats fed a cholesterol supplemented diets. *Lipids* 30: 527-531 (1995)
77. Chi MS, Koh ET, Stewart TJ. Effects of gallic on lipid metabolism in rats fed cholesterol of lard. *J. Nutr.* 112: 241-248 (1982)

78. Kang JA, Kang JS. Effect of gallic and Onion on plasma and liver cholesterol and triacylglycerol and platelet aggregation in rats fed basal or cholesterol supplemented diets. *Korean J. Nutr.* 30: 132-138 (1997)
79. Fridovich I. Biological effects of the superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.* 247: 1-15 (1986)
80. Miquel J, Quintailha AT. Historical introduction to free radical and antioxidant biomedical research. Vol. 1, pp. 3-16. In: *CRC handbook of free radical and antioxidants in biomedicine*. Weber H(ed). CRC Press, Inc., Boca Raton, FL, USA (1989)
81. Babiy AV, Gebicki JM, Sullivan DR. Vitamin E content and low density oxidizability induced by free radicals. *Atherosclerosis* 81: 175-182 (1990)
82. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. Vol. 52, pp. 302-310, In: *Methods in enzymology*. Sidney F, Lester P(eds). Academic Press, Inc., NY, USA (1978)
83. Adams CWM, Bayliss OB. Lipid histochemistry. In: Glick D, Rosenbaum R, eds. *Techniques of Biochemical and Biophysical Morphology*, Vol. 2 New York, NY:Wiley, 1975:99-156
84. Nistor A, Bulla A, Filip DA, Radu A. The hypercholesterolemic hamster as a model of experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1987; 68: 159-73
85. Rein D, Yokoyama WH, Xu R, Walzem RL, German JB. Dietary vitamin E in an atherogenic hamster model. *Nutrition research* 18: 567-579 (1998)
86. Faia KL, Davis WP, Marone AJ, Foxall TL. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in hamster aortic atherosclerosis: correlation with in-situ zymography. *Atherosclerosis* 160: 325-337 (2002)
87. Uehara Y, Urata H, Ideishi M, Arakawa K, Saku K. Chymase inhibition suppresses high-cholesterol diet-induced lipid accumulation in the hamster aorta. *Cardiovascular research* 55: 870-876 (2002)
88. Woollett LA, Spady DK, Dietschy JM. Mechanisms by which saturated

triacylglycerols elevate the plasma low density lipoprotein-cholesterol concentration in hamsters. Differential effects of fatty acid chain length. *J Clin Invest* 84: 119-128 (1989)