

사람의 Low Density Lipoprotein에 대한 녹차의 항산화 활성

박춘옥 · 진성현* · 류병호**

부산여자전문대학, *부산시보건환경연구원, **경성대학교 식품공학과

Antioxidant Activity of Green Tea Extracts toward Human Low Density Lipoprotein

Park Chun Ok, Jin Seung Heun* and Ryu Beung Ho**

Pusan Women's Junior University

*Institute of Pusan Environment and Public Health

**Department of Food Science and Biotechnology, Kyung Sung University

Abstract

Green tea leaves 12.5 g were extrated twice with 500 ml boiling water. The green tea extract (GTE) contained 4.67 mg solid. The GTE contained polyphenols such as 54.12% (-) epicatechin gallate, 26.21% (-) epicatechin, 10.71% epicatechin gallate, 7.09% (-) epicatechin and 1.85% catechin. The GTE inhibited the copper-catalyzed oxidation of human LDL at the concentrations of 50 and 100 µg/ml GTE in the presence of 5 µM CuSO₄. The electrophoretic mobility of the LDL oxidized in the presence of 5 µM CuSO₄ was higher than that of the native LDL. The GTE also inhibited LDL oxidation induced by J774, human monocyte-derived macrophages and vascular endothelial cells. The LDL modified by copper or cells was inhibited by human macrophages at a much greater rate than native LDL in the presence of GTE. The GTE was found to be a potent inhibitor of modification of LDL. GTE inhibited the uptake of cell-modified ¹²⁵I-labelled LDL by macrophages. The formation of conjugated dienes was strongly inhibited in the presence of 50 or 100 µg/ml GTE.

Key words: low density lipoprotein, antioxidant, green tea extracts

서 론

녹차는 *Camellia* 속으로 90여종이 있으며 현재 많이 응용되는 중국종은 *Camellia sinensis* var. *Sinensis*이고, 아삼종은 *Camellia sinensis* var. *Assamica*로 불리고 있다⁽¹⁾. 우리나라에 차가 처음 들어온 시기는 신라 27대 선덕여왕(AD 632-647) 때이며⁽²⁾, 그로부터 200년 후인 42대 흥덕왕 3년(AD 828)에 왕명에 의해 차를 경남 지리산에 심어 응용하기 시작하였다⁽³⁾. 녹차는 차엽을 더운 물에 우려내어 마시는 기호음료로서 애용되기 시작하였으나 약용으로도 사용되었다. 차의 약리학적 효능에 대한 고문헌으로는 *茶事茶話者陸茶傳*⁽⁴⁾, *本草綱目*⁽⁵⁾ 및 *茶業通史*⁽⁶⁾ 등이 있다. *本草從新*에서는 차가 머리를 맑게 해주고 오장의 기를 돋우어

주고, 간을 강하게 하며 열을 내리고 체내의 노폐물을 빨리 씻어 주고 신장내 독소를 씻어 주며 소화작용, 갈증을 해소하는 약효가 있다고 기술하고 있다⁽⁷⁾.

「동의보감」의 *湯液篇*에 따르면 차는 병의 치료효과가 높고 그 외에 해독, 소화, 이뇨, 갈증 및 반신불수 등에 이용되기도 하였다고 한다⁽⁸⁾. 최근 차를 응용하는 인구가 늘어남에 따라 차의 성분과 효과에 대한 연구가 다양하게 진행되고 있다^(9,11).

녹차의 특징적인 성분은 polyphenol로서 항산화 활성으로 잘 알려져 있는 카테킨류인 (-)epicatechin (EC), (-)epigallocatechin gallate ((-)EGCG) 및 epicatechin gallate ((-)ECG), epigallocatechin ((-)EGC) 등이 함유되어 있다^(11,13). 녹차에 들어있는 polyphenol은 콜레스테롤을 저하시키고⁽⁷⁾, 고혈압이나 동맥경화를 억제하며⁽¹⁵⁾, 과산화지질의 생성을 억제하여 노화를 예방하고⁽¹⁶⁾, 혈청중의 지질농도를 저하시키며, 중성지질의 생성을 억제하여 비만을 방지하고 모세혈관의 저

Corresponding author: Ryu Beung Ho, Department of Food Science and Biotechnology, Kyung Sung University, Daeyen-dong, Nam-gu, Pusan 608-736, Korea

항력을 증진시킨다고 하였다⁽¹⁸⁾.

한편 동맥경화의 원인인 혈관 내벽에 쌓인 지방층 (fatty streak)이 산화되면 독성이 강한 유리기인 유리 지방산, aldehyde, ketone 등이 생성되어 혈관 내벽을 손상시키고, 지방층 중에서도 저밀도 단백질(low density lipoprotein, 이하 LDL이라고 함)이 산화되어 산화 LDL (oxidized low density lipoprotein, 이하 Oxid LDL이라고 함)의 생성원인이 된다고 보고하고 있다⁽¹⁹⁻²²⁾. LDL은 원래 LDL 수용체에 의하여 규칙적으로 대사되지만, Oxid LDL은 단핵세포와 macrophage에 의하여 동맥혈관에 쉽게 이행되며 혈관 내에서 cholesterol 및 cholesteryl ester로 축적되어 foam cells을 형성하여 동맥경화를 일으킨다⁽²³⁻²⁵⁾.

결국 동맥경화의 원인을 예방하기 위해서는 항산화제에 의해 LDL의 산화를 방지해야 한다. 이와같이 동맥경화를 일으키는 Oxid LDL의 생성을 억제하는 천연 항산화제로는 α -tocopherol, β -carotene, α -carotene, lycopene, cryptoxanthin, retinoides 및 ubiquinol 등이 있다. 이들은 대부분의 식물에 존재하는데 polyphenol, flavonoid 및 그 유도체가 강한 항산화 작용이 있는 것으로 알려져 있다^(26,27).

따라서 본 연구는 항산화효과가 있는 polyphenol 화합물이 많이 들어 있는 녹차의 수 추출물을 이용하여 동맥경화의 원인이 되는 LDL의 산화억제에 대하여 연구한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

재 료

1994년 경남 하동군 화계면에서 재배된 야부끼다種을 채취하여 사용하였다.

Catechin 류의 분석

시료액 조제 : 시료 100 mg을 100 ml 메스플라스크에 취해 증류수 약 70~80 ml를 가해 80°C의 항온 수조중에서 30분간 가온 추출하였다. 실온에서 냉각 후 내부 표준 물질인 카테콜의 5 mg에 상당하는 수용액을 정확히 물로 100 ml로 만든 후 여과하여 최초의 여액 10~20 ml를 제거하였다. 그 후 여액 50 ml를 분액 여두에 취해서 caffeine을 제거하기 위해 50 ml의 클로로포름을 가해 진탕하여 클로로포름층을 제거하였다. 수층은 ethyl acetate 50 ml를 가하여 진탕하면서 catechin을 ethyl acetate로 추출하였다. 이 ethyl acetate층을 rotary evaporator에서 증발 건조한 후 ethyl acetate 10 ml를 가해 측정용 시료로 하였다⁽²⁸⁾.

표준곡선 작성 : 몰식자산 (GA) 10 mg을 ethyl acetate에 용해하여 25 ml로 정용하였다. EC, EGC, ECG, EGCG 및 내부 표준물질 catechol 각각 10 mg을 ethyl acetate에 용해하여 10 ml로 하였다. 이 용액 1.0 ml를 ethyl acetate로 10 ml가 되게 만들었다. 시료와 이 용액 5 μ l를 HPLC에 주입하여 얻어진 시료의 peak와 표준품 peak의 면적비로서 함량을 계산하였다⁽²⁸⁾.

녹차 추출물의 항산화 효과

시료의 조제 : 녹차잎 12.5 g을 500 ml의 끓는 물에 넣고 15분동안 담근 후 얼음 수욕상에서 상온으로 식힌 후 여과하였다. 여과하고 남아 있는 차잎을 다시 500 ml의 끓는 물에 반복하여 추출한 후 여과한 여액을 모두 한 곳에 모았다. 이 용액은 1.25% 녹차 수 추출물(1.25 g tea leaves/100 ml water)을 함유하며 이 추출물 수용액은 사람들이 평상시에 녹차를 마시는 양에 해당된다⁽²⁸⁾. 이때 1.25% 녹차 추출물에 존재하는 건물량은 65°C의 건조기에서 18시간동안 건조하였을 때 ml당 4.6 mg이었다.

Cell lines : J774 cell (mouse macrophage)은 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine, 900 units/ml penicillin 및 0.17 mM streptomycin을 함유한 DMEM배지로 배양하였다.

Human low density lipoprotein (LDL)의 분리 : 건강한 남자(34세, 비흡연자)의 혈액 50 ml를 EDTA 1 mg/ml을 함유한 plastic 시험관에 넣어 교반한 후 4°C에서 3시간 방치하였다. 혈액 속의 plasma는 상온에서 20분동안 원심분리(2000×g)하여 분리한 다음 gentamycin sulfate (1 mg/25 ml)를 첨가하였다. LDL (밀도 1.019~1.063 g/ml)은 초고속 원심분리기(46,000×g)로 24시간동안 원심분리하여 얻었다. 분리된 LDL은 0.15 M NaCl, 0.01% EDTA가 함유된 0.01 M phosphate buffer (pH 7.4)를 이용하여 16~20시간 투석하였다⁽²⁹⁾.

Human vascular endothelial cells : 이 cells의 분리는 Van Hinsberg 등⁽³⁰⁾의 방법에 따라 분리하였다. 세포는 F-10 배지에서 배양 보관하였다.

Macrophage의 분리과 배양 : Female ICR mice를 CO₂로 질식사시켜 절개한 복부부위에 Ca²⁺, Mg²⁺이 없는 차거운 Dulbecco's phosphate buffered saline을 넣어 세척하여 macrophage를 포집한 후 원심분리한 다음 혈액을 제거하고 세포만 분리하였다. 이 세포는 불활성시킨 10% fetal bovine serum과 2 mmol/l, L-glutamine, 100 units/ml의 penicillin 및 0.17 mmol/l의 streptomycin을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)배지에서 5% CO₂/air 존재하에서 배양하였

다. 배양 24시간 후에 신선한 배지로 교환시킨 다음 5% lipoprotein-deficient serum (LPDS), L-glutamine 함유 DMEM에 LDL 또는 수식 LDL의 적당한 농도를 첨가하여 실험하였다⁽³¹⁾.

LDL의 요오드화: LDL의 요오드화는 MacFane의 iodide monochloride법을 약간 변형하여 실험하였다⁽³²⁾. Iodide monochloride를 [¹²⁵I]의 존재하에서 LDL 단백질의 10:1의 mole비로 혼합하여 반응시켰다. 이 반응에서 결합하지 않은 iodide는 0.1 M Tris-HCl buffer, 0.01% EDTA, 0.85% NaCl, pH 7.4를 이용하여 투석에 의하여 제거하였다. 투석한 후 약 98% [¹²⁵I] LDL을 15% trichloroacetic acid로 침전시켜 얻었다. ¹²⁵I-labeled LDL은 filter (0.22 µm)를 통과시켜 멸균한 후에 사용하였다.

LDL의 산화

Copper mediated 산화: LDL (100 µg/ml)과 1~5 µM CuSO₄를 함유한 phosphate buffer saline (PBS)에 적당한 농도의 녹차 추출물을 가하여 5% CO₂ 존재하에서 37°C에서 24시간 배양하여 LDL의 산화를 조사하였다⁽³³⁾. 별도로 대조군은 배양액에 녹차 추출물을 첨가하지 않고 배양하였다.

Cell-mediated LDL: J774 cells, human vascular endothelial cells 또는 human monocyte derived macrophages의 배양액에 LDL (100 µg/ml) 및 ¹²⁵I-LDL (100 µg/ml)과 함께 녹차 추출물을 일정 농도별로 가한 후 5% CO₂ 존재하에서 37°C에서 24시간동안 배양한 후 아래의 방법에 따라 LDL의 산화 정도를 실험하였다. LDL 및 ¹²⁵I-LDL은 serum이 없는 배양액 5 ml를 Sephadex G-25 column에 통과시켜 낮은 분자량의 요오드 산물을 제거하고 멸균하여 여과한 후 측정하였다⁽³²⁾.

Thiobarbituric acid reacting substances (TBARS)의 측정: LDL의 산화는 TBARS의 형성으로서 평가하였다. 50 µg LDL이 함유된 배양 혼합액 0.5 ml에 20% TCA 1.5 ml를 가한 다음 여기에 0.05 M NaOH에 녹인 0.67% TBA 1.5 ml를 넣어 섞은 후 그 반응 혼합액을 90°C 수욕상에서 45분간 끓였다. 시료를 10분간 원심분리(2,000×g)한 다음 상정액을 Perkin-Elmer fluorescence spectrophotometer (Model 650-10S)를 사용하여 510 및 553 nm에서 측정하였다. 시료 중의 TBARS의 수는 malonaldehyde (MDA)의 표준곡선을 이용하여 MDA의 nmole로 나타내었다⁽³³⁾.

LDL의 gel electrophoresis: LDL의 전기영동은 agarose gel로서 75 V에서 20분동안 전개하였고 UV lamp로 확인하였다⁽³⁴⁾.

Diene conjugation의 측정: 100 µg protein/ml의 LDL을 PBS (pH 7.4)에 녹이고, 5 µM CuSO₄ 및 50 µM GTE의 존재하에서 37°C에서 배양하면서 매 30분 간격으로 234 nm에서 측정하였다⁽³⁵⁾. 별도로 대조군으로서 50 µM GTE를 첨가하지 않은 상태에서 측정하였다.

Macrophages에 의한 LDL의 분해: Macrophages를 24시간동안 배양한 후 5 ml의 serum free DMEM으로 세척하였다. 여기에 2.7 ml DMEM에 0.3 ml ¹²⁵I-LDL (30 µg LDL protein 함유)과 5 mM CuSO₄ 및 각종 농도의 녹차 추출물을 넣고 배양액을 첨가하였다. 이 wells을 95% 습도, 5% CO₂의 조건하에서 37°C, 5시간 배양한 후 그 중 0.5 ml를 취하여 2% BSA 0.5 ml를 가한 다음 1 M KI 250 µl, 50% trichloroacetic acid 250 µl를 가한 후 혼합액을 원심분리하였다. 상정액에 유리된 iodide를 침전시키기 위하여 5% 질산은 250 µl를 넣어 침전시켰다. 이때 상정액에 남아있는 방사능 활성(radioactivity)으로서 LDL의 분해를 측정하고, 5시간당 세포 단백질의 mg당 µg LDL로서 산출하였다⁽³⁶⁾.

결과 및 고찰

녹차의 열수 추출물 중의 polyphenol 성분의 함량

1.25% 녹차 수추출물(1.25 g of tea leaves/100 ml of water)의 양은 사람이 일반적으로 매일 마시는 녹차의 음료량이다. 녹차의 열수 추출물에 들어있는 고형분은 m/당 4.67 mg이었다. 녹차의 추출고형분을 HPLC로 분석한 결과는 Table 1과 같다. Catechin 중 (-)epigallocatechin gallate가 702 µg/ml, (-)epigallocatechin이 340 µg/ml, (-)epicatechin gallate 139 µg/ml, (-)epicatechin이 92 µg/ml이었으며 caffeine은 389 µg/ml, theobromine은 24 µg/ml이었다. Catechin중 epigallocatechin gallate가 전체 고형분의 약 90%를 차지하였다.

Table 1. Composition of 1.25% green tea¹⁾ extracted by hot water

Compounds	µg/ml	% of solids in extract
Total catechin	1297	100
Catechin	702	54.12
(-)Epicatechin gallate	340	26.21
(-)Epigallocatechin	139	10.71
(-)Epicatechin gallate	92	7.09
(-)Epicatechin	24	1.85

¹⁾Green tea leaves (12.5 g) were extracted twice with 500 ml hot water and filtrated with filter paper (Toyo, No 2); The filtrates were mixed and analyzed by HPLC; The filtrate contained 4.67 mg green tea solids per ml

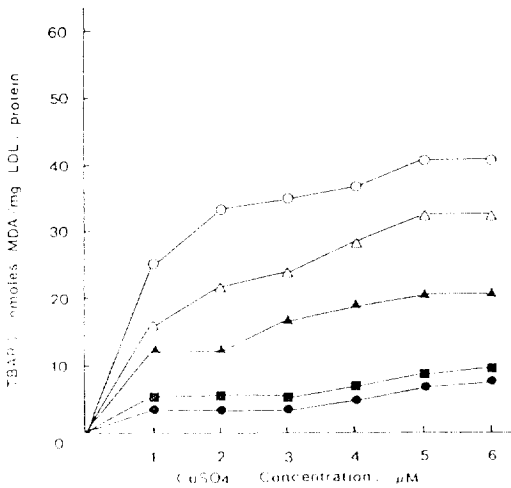


Fig. 1. Effects of green tea extract (GTE) on the oxidation of LDL by cupric sulfate ○—○; Oxid LDL, △—△; LDL+5 µM GTE, ▲—▲; 25 µM LDL+25 µM GTE; ■—■; LDL+50 µM GTE; ●—●; LDL+100 µM GTE; LDL(100 µg protein/ml) was incubated for 18 h at 37°C in the presence or absence of 5, 25, 50 or 100 µM GTE; Oxidation was initiated by the addition of 1~6 µM CuSO₄; The liperoxide content was measured as thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and was expressed as nmol malondialdehyde equivalents/mg; Data are the mean of three separate experiments

녹차 열수 추출물의 LDL에 대한 항산화 효과

LDL의 CuSO₄에 의한 산화 및 GTE억제 효과 : 녹차 추출물(green tea extract, GTE)의 LDL에 대한 항산화 효과를 알아보기 위하여 LDL (100 µg/ml)에 녹차의 추출물을 5, 25, 50 및 100 g/ml 농도와 1~6 M 농도의 CuSO₄ 존재하에서 검토하였다. Fig. 1에서 보듯바와 같이 배양 혼합액을 37°C에서 18시간 배양한 후 LDL의 산화 억제효과를 조사하였다. LDL의 산화는 CuSO₄를 각각 1, 2, 3, 5 및 6 M를 첨가하여 실험한 결과 TBARS의 수치는 CuSO₄의 함량이 증가할수록 증가하였으나, CuSO₄의 농도가 5 및 6 M일 때는 거의 비슷한 TBARS의 수치를 나타내었다.

LDL 및 Oxid LDL의 gel electrophoresis : Fig. 2는 사람의 혈액에서 LDL를 분리한 다음 native LDL, CuSO₄ 및 GTE를 첨가 하였을 때의 agarose gel electrophoresis를 실시하여 LDL의 이동거리를 비교한 것이다. Native LDL을 대조구로 하고 LDL에 5 µM CuSO₄를 가하여 산화시킨 Oxid LDL 및 LDL에 5 µM CuSO₄와 GTE를 첨가한 경우를 비교한 결과 native LDL의 이동거리는 적었다. CuSO₄로 산화시킨 Oxid LDL의 이동거리는 컸으나 GTE를 첨가한 경우

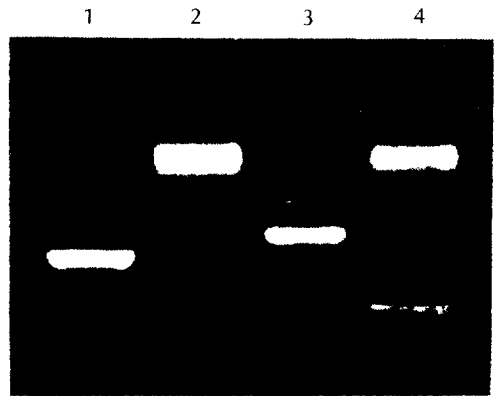


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of native LDL, oxid LDL, and LDL that were oxidized in the presence of GTE; LDL (100 µg protein/ml) was incubated in the absence and presence of 50 µM GTE for 18 hr at 37°C; After the incubation period, lipoprotein (2 µg protein) were stained with Nile red, and subjected to electrophoresis Lane 1; Native LDL. Lane 2; LDL+5 µM CuSO₄, Lane 3; LDL+50 µM GTE+5 µM CuSO₄. Lane 4; LDL+5 µM GTE+5 µM CuSO₄.

에는 Oxid LDL보다 이동거리가 낮았으므로 항산화 효과가 있는 것으로 판단되었다. 녹차 추출물 농도의 산화 억제능력은 5 µM CuSO₄의 대조구에서 LDL의 산화가 쉽게 일어나 TBARS값은 41.5 nmol MDA/mg LDL protein이었으나, 녹차 추출물을 5 µM 첨가하였을 때는 34.8 nmol MDA/mg LDL protein으로 TBARS의 값이 가장 낮았으며 GTE를 50 µM/ml 내지 100 µM/ml를 첨가하였을 때 최대 산화억제 효과를 나타내었다. 이와같은 결과로 보아 녹차 추출물의 농도가 증가할수록 TBARS가 감소하는 농도 의존성 항산화 효과를 볼 수 있었다. Esterbauer 등⁽⁴⁵⁾은 Cu²⁺ 촉매 LDL의 산화에 있어서는 2~3.5시간 배양하여 산화를 시켰으나 본 연구에서는 18시간 배양하여 산화시켰다. 이는 사람의 혈장에서 채취하여 얻은 LDL의 제조에 있어서 LDL 자체에 존재하는 항산화제에 약간의 영향을 받기 때문이다⁽⁴⁶⁾. 비타민 E와 같은 항산화제가 LDL의 핵분에 미량 함유되어 있을 경우 항산화력이 있을 수 있으며, 또 담배를 피우는 사람의 혈액에서 얻은 LDL은 담배를 피우지 않은 사람에 비하여 산화가 쉽게 일어날 수 있기 때문에 산화에 필요한 배양 시간을 18시간으로 하였다⁽⁴⁸⁾. 이와같이 LDL의 산화는 LDL 자체에 항산화제가 미량이라도 들어있으면 산화가 일어나지 않는다. 이러한 관점에서 본 실험에서는 LDL의 산화는 mg당 100 µg LDL을 최대량으로 하여 실험하였고, LDL의 농도가 증가하면 그 수는 감소하였다. LDL의

농도가 ml 당 1.3 mg 정도로 많아지면 산화가 되지 않는다. 이러한 결과는 LDL은 저장 동안에는 산화를 최소화하기 위하여 희석 용액보다는 농축된 상태로 보관해야 할 것을 시사해 주고있다.

LDL의 배양시간에 따른 TBARS의 변화 : Fig. 3은 5 μM CuSO_4 의 존재하에서 GTE의 5~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도별로 37°C에서 6시간 및 18시간 LDL을 산화하였을 때의 산화능을 나타낸 것이다. 이 때 CuSO_4 를 5 μM 첨가한 이유는 앞의 실험결과에서 보는 바와 같이 5 μM CuSO_4 농도에서 LDL의 산화가 용이하기 때문이다. 본 실험에서는 native LDL의 TBARS는 1.3 ± 0.23 nmole MDA/mg LDL이었으며, 배양 6시간에서는 대조군이 23.34 ± 2.0 nmole MDA/mg LDL이었으나, GTE 농도 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 TBARS의 값이 각각 15.62 ± 3.62 , 10.08 ± 1.63 , 53.36 ± 4.60 및 2.47 ± 3.23 nmole MDA/mg LDL이었다. 본 실험 결과로 미루어 보아 GTE의 항산화력은 GTE의 농도가 증가할수록 높아졌으며, GTE의 농도가 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 일 때 TBARS의 값의 유의적인 차이는 찾아 볼 수 없었다.

그리고 같은 조건에서 LDL에 5 μM CuSO_4 를 첨가하여 18시간 배양하였을 때 대조군의 TBARS는 50.16 ± 4.36 nmole MDA/mg LDL이었으며, GTE를 5, 25, 50 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 구분하여 측정된 결과 TBARS는 각각 33.70 ± 5.02 , 20.43 ± 6.71 , 3.83 ± 4.91 및 2.78 ± 4.02 nmole MDA/mg LDL이었다. 배양 18시간 후의 LDL의 산화 억제력을 배양 6시간과 비교해 볼 때 시간 경과에 따라 항산화 활성이 낮아졌으나, GTE를 50 및 100 μM 의 높은 농도로 첨가하였을 때는 시간 경과에 따른 항산화능의 차이는 거의 없었고 LDL의 산화에 대한 TBARS는 큰 차이가 없었다. 이러한 실험결과를 기초로 하여 본 실험에서는 GTE의 농도를 5, 25, 50 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도 범위로만 국한하여 실험하였다.

Macrophage 유도 산화에 따른 GTE의 항산화 효과 : 사람에게 있어서 지질, 주로 cholesteryl ester의 축적은 LDL의 산화로부터 생성된다. Native LDL에서 Macrophages에 의한 지질의 축적은 산화에 의하여 늦게 나타나지만 이러한 현상은 세포내에서 LDL 수용체의 친화력과 내부세포에서 cholesterol의 축적으로 일어난다⁽³⁰⁾. Macrophages에서는 native LDL의 축적은 잘 이루어지지 않으나 수식된 LDL은 수용체에 쉽게 축적이 이루어진다. 수식된 LDL은 배양세포인 동맥 내피세포⁽³⁰⁾, 동맥 윤활근 세포⁽³⁷⁾ 등에서 이러한 LDL 수용체에 의하여 쉽게 축적된다고 알려져 있다. Henricksen

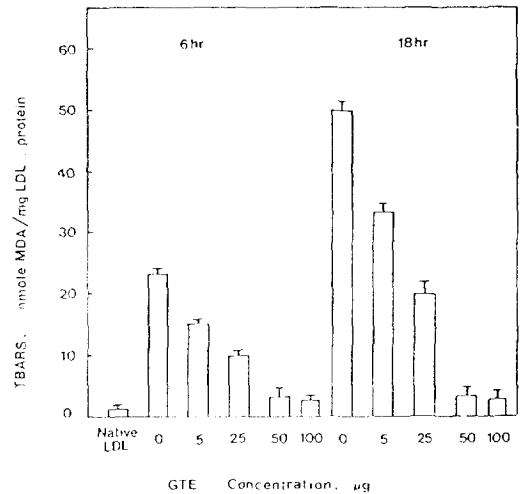


Fig. 3. Effect of GTE on the oxidation of LDL by cupric sulfate LDL (100 μg protein/ml) was incubated for 6 or 18 hr at 37°C in the presence of different concentration of GTE; Oxidation was initiated by the addition of 5 μM CuSO_4 in the presence or absence of increasing concentration of GTE; The lipoperoxide content was expressed as nmol malonaldehyde equivalents/ml; Data were expressed as mean \pm SD of triplicate analyses

등⁽³⁰⁾이 내피세포가 LDL의 유도산화에 관여한다고 발표한 이래 동맥 윤활 근육세포⁽³⁸⁾, mouse의 macrophages⁽³⁹⁾, human monocyte derived macrophages⁽³⁷⁾ 등에서 LDL의 산화가 보고되었다.

Fig. 4는 LDL을 mouse macrophages인 J774와 human monocyte derived macrophages로 CuSO_4 존재 하에서 각종 농도별로 GTE (5~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 첨가한 후 DMEM배지로 배양하여 GTE의 항산화작용을 실험한 결과이다. Native LDL의 TBARS의 값은 1.24 ± 0.12 nmole MDA/mg LDL이었다. J774에서 GTE의 산화 억제효과를 살펴본 결과 GTE를 첨가하지 않았을 때는 TBARS의 값이 47.93 ± 4.36 nmole MDA/mg LDL이었으나 GTE를 5, 25, 50 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 씩 첨가한 경우 TBARS가 각각 30.06 ± 5.12 , 16.10 ± 4.80 , 2.70 ± 0.50 및 2.54 ± 0.61 nmole MDA/mg LDL로 낮아졌다. 이러한 항산화 효과는 GTE의 농도가 높아질수록 LDL의 산화 억제효과가 우수한 용량 의존형이었다. 그러나 GTE의 농도가 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서는 거의 비슷한 수준으로 LDL의 산화를 억제하는 것을 볼 수 있었다.

Human monocyte derived macrophages에서도 J774와 거의 비슷한 산화 억제효과를 나타내고 있는데 GTE를 첨가하지 않은 무첨가 대조군의 TBARS는 $50.56 \pm$

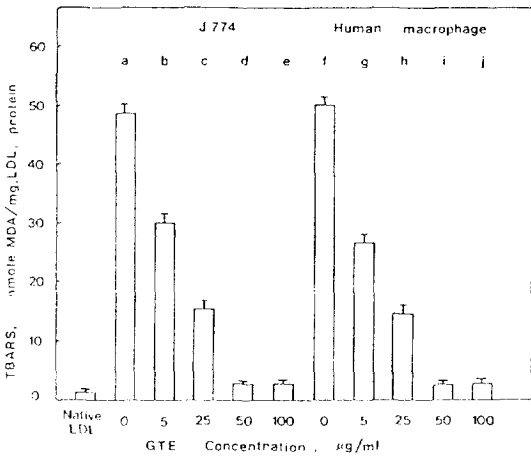


Fig. 4. Effect of GTE on cell induced oxidation of LDL LDL (100 µg/ml) was incubated with macrophages, J774 cells (a-e) or human monocyte-derived macrophages (f-j) for 18 hr at 37°C in the presence of different concentration of GTE; Oxidation was initiated by the addition of 5 µM CuSO₄. The lipoperoxide content was determined and is expressed as nmol malonaldehyde equivalents/mg; Results are expressed as mean ±SD of triplicate analyses

4.83 nmole MDA/mg LDL이었으나 GTE를 각각 5, 25, 50 및 100 µg/ml씩 첨가하여 항산화 효과를 실험한 결과 TBARS는 각각 26.30±3.46, 14.80±4.18, 2.58±0.66 및 2.57±0.27 nmole MDA/mg LDL이었다.

이와같이 human monocyte derived macrophages로 배양 하였을 경우에도 GTE의 용량이 증가할수록 항산화능이 우수하였고, GTE가 50 및 100 µg/ml의 농도 일 경우 거의 완전히 LDL의 산화를 억제함을 알 수 있었다. 비록 항산화의 메커니즘이 아직까지 잘 알려져 있지 않으나 Steinbrecher 등⁽⁴⁰⁾에 의하면 세포내에서 LDL의 고도 불포화지방산이 세포로부터 방출되는 자유기에 의해서 과산화물이 형성된다고 추정할 바 있다. 그리고 Sparrow⁽⁴¹⁾와 Rankin⁽⁴²⁾ 등에 의하면 LDL의 산화는 세포내의 lipoxygenases의 활성에 의하여 일어나며 polyphenol 화합물이 lipoxygenase의 활성을 억제한다고 하였다.

¹²⁵I-LDL이 GTE의 존재하에서의 분해와 추적 : Macrophages는 native LDL보다 훨씬 큰 비율로서 수식된 LDL을 분해시킨다. 이러한 메커니즘을 밝히기 위하여 GTE 첨가구와 무첨가구로 구분하여 CuSO₄로 산화를 유도한 산화 LDL과 신선한 macrophages를 배양한 후 다시 분리한 다음 ¹²⁵I-lipoprotein에서 유리되어 나오는 ¹²⁵I의 활성을 측정함으로써 lipoprotein의 추적과 분해를 검토하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 GTE를

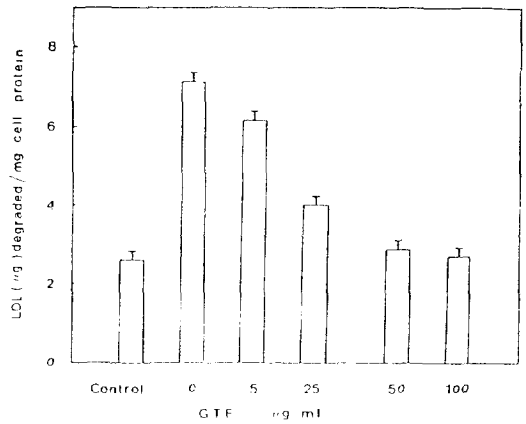


Fig. 5. Uptake and degradation of oxid LDL by mice peritoneal macrophages of LDL oxidation in the presence or absence of various concentrations of GTE ¹²⁵I-LDL (100 µg/ml) was incubated in the presence of 5, 25, 50 or 100 µg/ml GTE for 18 hr at 37°C; Oxidation was initiated by the addition of 5 µM CuSO₄; The LDL was reisolated by chromatography on Sephadex G-25 and aliquots of 10 µg/ml were incubated human monocyte derived macrophages in 1 ml medium for 5 hr at 37°C; After incubation trichloroacetic acid-soluble ¹²⁵I, corrected for no cell control values, was determined as a measure of LDL degradation; Results represent averages from two separate experiments in each of which duplicate dishes were incubated for each specified conditions and separately assayed

5~100 µg/ml의 농도로 각각 첨가하고 5 µM CuSO₄ 존재하에서 LDL의 분해를 측정할 결과 GTE의 첨가농도가 증가할수록 소거 수용체에 의해 LDL의 축적이 감소되는 것을 볼 수 있었다. GTE를 첨가하지 않을 경우 분해되는 수치는 7.24±0.63 LDL g/mg cell protein이었으나 GTE를 25 µg/ml 첨가하였을 때 4.00±0.51 µg/mg cell protein이었다. 그러나 GTE의 첨가농도가 50 및 100 µg/ml일 때 LDL의 분해는 7.28±0.52 및 2.83±0.49 µg/ml로 대조구와 거의 비슷한 수치를 나타내었다. 이와같이 GTE의 농도를 50 µg/ml 및 100 µg/ml로 각각 첨가 하였을 때는 human monocyte derived macrophages에서의 분해가 거의 일어나지 않음을 알 수 있었다. GTE는 Cu²⁺가 촉매하는 LDL의 산화를 억제하고, GTE중에 지용성의 항산화제인 polyphenol 화합물이 lipoprotein으로 이행되어 LDL의 산화를 억제하는 것으로 판단된다. 현재 어떤 polyphenol 화합물도 LDL 산화 억제 메커니즘은 밝혀진 바 없다. Polyphenol 화합물은 macrophages에 있는 유리의 형성이나 방출을 감소시키거나, 유리로 인한 산화로부터 LDL의 산화를 예방하는 것으로 생각

Table 2. Uptake and degradation by human monocyte derived macrophage of Oxid LDL in the absence and presence of GTE
(μg LDL/mg, cell protein)

	GTE ($\mu\text{g}/\text{ml}$)			P ¹⁾
	0	50	100	
CuSO ₄	6.82 \pm 0.6	4.30 \pm 0.81	2.09 \pm 0.40	0.01
Endothelial cell	0.063 \pm 0.08	0.0089 \pm 0.022	0.00345 \pm 0.002	0.01
Macrophages	0.863 \pm 0.143	0.0531 \pm 0.041	0.034 \pm 0.021	0.01

¹⁾P>0.05

된다^(43,44).

Polyphenol 화합물은 지방 산화의 원인 물질인 hydroperoxide기 및 지질 과산화물과 반응하여 산화를 억제시킨다고 생각된다. 또 다른 하나의 가능성은 polyphenol 화합물이 radical 생성촉진 물질인 철 및 구리 이온과 쉽게 결합하여 macrophages나 free cells 상태에서 유리기의 형성을 줄이기 때문일 수도 있다^(19,24,26).

Table 2는 GTE를 50 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 씩 첨가한 후 LDL의 축적 또는 분해의 정도를 조사한 결과이다. 대조구로서 LDL에 5 μM CuSO₄만 첨가하였을 때 LDL의 분해는 상당히 높은 경향을 보였으며 human vascular endothelial cells로서 배양한 후 분리한 LDL의 축적 및 분해, monocyte derived macrophages로서 배양 LDL의 축적 및 분해는 아주 낮은 경향을 나타내었다. 내피세포에 의해서 유도된 산화는 Cu²⁺ 또는 macrophages 때보다 더욱 낮다고 하였던 바 본 실험 결과와 유사하였다⁽³⁸⁾. ¹²⁵I-LDL은 GTE를 첨가하지 않은 경우에도 macrophages 유도 산화가 진행됨을 알 수 있고, 배지에 GTE를 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 첨가하였을 때는 GTE를 첨가하지 않아도 그것에 의하여 수식된 LDL의 분해는 30%정도 감소하였다. 이러한 결과는 GTE가 유리기의 소거적 성질이 있음을 보여 주고 있다. Rankin 등⁽⁴²⁾은 세포의 15-lipoxygenase는 LDL의 *in vivo* 산화에 관여한다고 하였는데, GTE는 세포 분자의 lipoxygenases의 강력한 억제제로 생각된다. 이와 비슷한 연구로는 flavonoid가 쥐의 neutrophils 및 쥐의 peritoneal macrophages에서 5-lipoxygenase을 억제 한다는 보고가 있다⁽⁴⁵⁾. 이들 억제 성분은 탄소의 4', 3 및 7의 위치에 하이드록시기가 있기 때문에 5-lipoxygenase에 대하여 강력한 억제 효과가 있다. Soybean 15-lipoxygenase⁽⁴⁴⁾도 polyphenol 화합물, flavonoid에 의하여 억제되는 유사한 경향을 보였다. 이상의 결과로 보아 GTE는 polyphenol 화합물로서 그 구조적 특성으로 보아 어떤 세포에 Oxid LDL로 인하여 손상이 생겼을 경우 subendothelium으로 이동하여 LDL의 산화를 방지하는 것으로 생각된다. 대표적인 po-

lyphenol 화합물인 probucol^(41,44)의 강력한 항산화 작용도 알려져 있다. 이것은 지질 분해부분에 직접 이동한 후 LDL의 입자 안으로 스며들어 항산화 작용을 하므로 동맥경화의 예방과 치료에 유용하게 사용되고 있다⁽⁴³⁾. 따라서 GTE도 역시 lipoprotein과 부분적으로 결합하여 항산화 작용을 하는 것으로 판단된다.

Diene의 형성 : LDL의 산화과정을 측정하는 방법으로 공액 2중결합의 형성에 있어서 GTE의 효과를 조사하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 LDL을 5 μM CuSO₄로서 37°C에서 3시간 배양하는 동안 공액 2중결합이 증가하는 것을 볼 수 있으며, GTE를 25, 50 μM 첨가하였을 때 공액 2중결합의 형성이 GTE를 첨가하지 않고 배양하였을 때보다 낮았다.

Esterbauer 등⁽²⁰⁾이 공액 2중결합은 처음 log period에서 형성된다고 보고한 바와 유사한 경향이었다. 본 연구결과에서 나타난 바와 같이 GTE의 첨가가 공액 2중결합의 형성을 억제하는 것으로 볼수있다.

요 약

본 연구는 녹차를 열수로 추출하여 LDL에 대한 항산화 활성을 연구한 결과이다. 녹차 1.25 g에 열수 500 ml를 가하여 추출한 후 다시 500 ml를 가하여 재추출하였으며 이를 증발, 건조한 결과 추출액의 건물량은 4.67 mg이었다. 녹차잎의 함량이 1.25%가 되도록 조절된 녹차에는 항산화 활성이 강한 polyphenol 화합물중 (-) epicatechin gallate 54.1%, (-) epicatechin gallate 26.2%, (-) epigallocatechin 10.7%, (-) epicatechin 이 7.0% 및 catechin이 1.8% 함유되었다. Low density lipoprotein (LDL)의 산화에 있어서 LDL은 CuSO₄ 존재하에서 macrophage와 배양시켰더니 빠르게 산화를 일으켰다. 그러나 5 μM CuSO₄ 매개 LDL의 산화에 50 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 GTE를 넣어 배양하면 거의 완전히 산화를 억제하였다. 5 μM CuSO₄ 존재하에서 산화시킨 LDL의 전기영동 이동거리는 native LDL보다 높았다. 또 50 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도의 GTE는 J774, human monocyte derived macrophages 및 vascular endothelial cells에서 유도되는 LDL의 산화를 억제하였다. CuSO₄ 및 cell 유도에 의하여 산화되는 LDL은 native LDL보다 더욱 많은 양이 human macrophage에 의하여 분해되고 GTE는 macrophage에 의한 ¹²⁵I-LDL의 산화를 강력히 억제하였다. 그리고 GTE는 cell 매개 LDL의 macrophage에 의한 축적 또는 분해를 억제하였다. LDL을 5 μM CuSO₄ 존재하에서 산화시킬 때 GTE를 50 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 넣어 배양하면 공액

dienes의 생성이 억제되고, 또한 Oxid LDL macrophage derived human monocytes에서도 축적이 억제되었다.

문헌

1. 정보섭, 신민교 : 도해 한약(생약)대사전, 원전 기원 식물 1,000종 선정 식물별분류-식물편, 도서출판, 영림사, p.403
2. 金富軾 : 三國史記, 十卷, 高麗 仁宗
3. 李盛雨 : 韓國食品文化史, 敎文社, p.238 (1984)
4. 郁懋 : 茶事茶話, 世界文物出版社, pp.125-129 (1969)
5. 李時珍 : 本草綱目, 高文社, pp.1069-1072 (1975)
6. 障祿 : 茶業通史, 農業出版社, pp.318-342 (1984)
7. 吳儀洛 : 本草從新, 杏林書院, pp.160-16 (1972)
8. 許浚 : 東醫寶鑑, 南山堂, p.743 (1975)
9. Muktar, H., Wang, Z. Y., Katiyar, S. K. and Hgarwal, R.: Tea omponents, antimutagenic and anticarcinogenic effects. *Preventive Medicine*, **21**, 351 (1992)
10. Katiyar, S. K., Agarwal, R. and Mukrtar, H.: Green tea in chemoprevention of cancer. *Comprehensive Ther.*, **18**, 3 (1992)
11. 富田勳 : 綠茶の有効成分と新機能研究. 月刊フドケミカル, pp.110-130 (1991)
12. Stahl, W. S.: The chemistry of tea and tea manufacturing. *Adv. Food Res.*, pp.11-202 (1962)
13. Roberts, E. and Williams, D.: The phenolic substances of manufactured tea. *J. Sci. Food Agr.*, 217 (1958)
14. 林榮一, 姜禹植, 癌·高血壓을 豫防하는 茶의 效能. 東亞出版社, p.20 (1980)
15. 福生吉裕, 小林陽一 : 動脈硬化, **10**(5), 981 (1982)
16. 林榮一 : 茶の 藥理學的 研究. 静岡縣茶商工業協同組合聯合會 (1977)
17. 大森正司, 岡本順子 : 嫌氣處理綠茶の血壓上昇抑制作用. 第39回 日本家庭學會, p.5 (1987)
18. Akinyanju P. and Yudkin J.: Effect of coffee and tea on serum lipids in the rats. *Nature*, **214**, 1025 (1967)
19. Ross, R.: The pathogenesis of atherosclerosis: perspective for the 1990's. *Nature.*, **362**, 801 (1993) [Steinberg D., Parthasarathy S., Carew T. E., Khoo J. C. and Witztum J. L.: Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increases its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.*, **320**, 915 (1989)]
20. Esterbauer H., Dieber-Rotheneder M., Waeg G. and Striegl G.: Biochemical, structural and functional properties of oxidized low-density lipoprotein. *Chem. Res. Toxicol.*, **3**, 77 (1990)
21. Chisolm G. M.: Cytotoxicity of oxidized lipoproteins. *Curr. Opin. Lipidol.*, **2**, 311 (1991)
22. Carpenter, K.L.H., Brabbs, C.E. and Mitchinson, M. J., Oxygen radicals and atherosclerosis. *Klin Wochenschr.*, **69**, 1039 (1991)
23. Henriksen, T., Mahoney, E. M. and Steinberg, D.: Enhanced macrophage degradation of biologically modified low density lipoprotein. *Arteriosclerosis.*, **3**, 149 (1983)
24. Esterbauer H., Puhl H., Dieber-Rotheneder M., Waeg G. and Rabl H.: Effect of antioxidants on oxidative modification of LDL. *Ann. Med.*, **23**, 573 (1991)
25. Garew, T. E., Schwenke, D. C. and Steinberg, D.: Antiatherogenic effect of probucol unrelated to its hypocholesterolemic effect: Evidence that antioxidants *in vivo* can selectively inhibit low density lipoprotein degradation in macrophage-rich fatty streaks and slow the progression of atherosclerosis in the Watanabe heritable hypercholesterolemic Watanabe rabbits. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **84**, 7725 (1987)
26. Mao, S. J. T. and Yates, M. T.: Antioxidant activity of probucol and vitamin E (α -tocopherol) in plasma. *Artherosclerosis* **9**, 751 (1989)
27. Esterbauer, H., Striegel, G., Puhl, H., Oberreither, S., Rotherneder, M. and El-Saadani, M., Urgens, G.: The role of vitamin E and carotenoids in preventing oxidation of low density lipoproteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **570**, 254 (1989)
28. Iwasa, K.: Methods of chemical analysis of green tea. *Japan agricultural research quaterly* **9**, 161 (1975)
29. Havel, R. J., Eder, H. A. and Bragdon, J. H.: The distribution and chemical composition of ultracentrifugally seperated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.*, **34**, 1341 (1955)
30. Van Hinsberg., V. W. M., Havekes, I., Emeis, J. J., Van Corves, E. and Scheffer, M.: Low density lipoprotein metabolism by endothelial cells from human umbilical cord arteries and veins. *Artherosclerosis*, **3**, 547 (1983)
31. Fong, L. G., Fong, T. A. T. and Cooper, A. D.: Inhibition of mouse macrophage degradation of acetyl low density lipoprotein by interferon. *J. Biol. chem.*, **265**, 11751 (1990)
32. Mac Farland, A. S.: Efficient trace-labeling of proteins with iodide. *Nature*, **182**, 158 (1956)
33. Yaki, K.: A Simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med.*, **15**, 212 (1976)
34. Greenspan P. and Gutman, L.: Detection by nile red of agarose gel electrophoresis native and modified low density lipoprotein. *Electrophoresis*, **14**, 65 (1993)
35. Esterbauer, H., Striegl, G., Puhl, H. and Rotheneder, M.: Continuous monitoring of *in vitro* oxidation of human low density lipoprotein. *Free. Red. Res. Commun.*, **6**, 67 (1989)
36. Henriksen, T, Mafoney E. M. and Steinberg, D.: Enhanced macrophage degradation of biologically modified low density lipoprotein. *Arteriosclerosis* **3**, 149 (1983)
37. Morel, D. W., Docorleto, P. E. and Chisolm, G. M.: Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein *in vitro* by free radical oxidation. *Arteriosclerosis* **4**, 357 (1984)
38. Henriksen, T., Mahoney, E. and Steinberg, D.: Enhanced macrophage degradation of low density lipoprotein previously incubated with cultured endothelial cells: Recognition by the receptor for acetylated low density lipoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 6499 (1981)
39. Quinn MT., Parthasarathy S., Fong LG. and Steinberg D.: Oxidatively modified low density lipoproteins: A potential role in recruitment and retention of monocyte/ma-

- crophages during atherogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 2995 (1987)
40. Steinbrecher U. P., Parthasarathy S., Leake D. S., Witztum J. L. and Steinberg D.: Modification of low density lipoprotein by endothelial cells involves lipid peroxidation and degradation of low density lipoprotein phospholipids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 3883 (1984)
41. Sparrow, C. P. and Olszewski, J.: Cellular oxidative modification of low density lipoprotein does not require lipoxygenases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 128 (1992)
42. Rankin, S. M., Parthasarathy, S. and Steinberg, D.: Evidence for a dominant role of lipoxygenase(s) in the oxidation of LDL by mouse peritoneal macrophage, *J. Lipid Res.*, **32**, 449 (1991)
43. Jilal, I. and Scaccini, C.: Antioxidants and atherosclerosis. *Current Opin. Lipidologie*, **3**, 324 (1992)
44. Carew, TE, Schwenke, D. and Steinberg, D.: Antiatherogenic effect of probucol unrelated to its hypocholesterolemic effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 7725 (1987)
45. Sugiura, M., Naito, Y., Yamaura, Y., Fugaya, C. and Yokoyama, K.: Inhibitory activities and inhibition specificities of caffeic acid derivatives and related compounds toward 5-lipoxygenase. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **37**, 1039 (1989)

(1996년 2월 26일 접수)