

## 흑미 추출물에 대한 항동맥경화 효과(Notes)

임치환<sup>1)</sup> · 김종민<sup>1)</sup> · 백승화<sup>2)</sup> \*

<sup>1)</sup>충남대학교 농업생명과학대학 생물환경화학전공,

<sup>2)</sup>원광대학교 한의학전문대학원 한약자원개발학과

## Antiarteriosclerosis Effects of Black Rices Extract

Chi Hwan Lim,<sup>1)</sup> Jong Min Kim<sup>1)</sup> & Seung Hwa Baek<sup>2)</sup> \*

<sup>1)</sup>Department of Bioenvironmental Chemistry, College of Agricultural & Life Sciences,  
Chungnam National University, Daejeon, 305-764, Korea.

<sup>2)</sup>Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine,  
Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea.

### Abstract

80% MeOH extract of black rices fractionated with n-hexane, EtOAc, and n-BuOH. Copper-induced LDL oxidation inhibition assay and ACAT inhibition assay examined with fractions. n-Hexane and EtOAc fractions showed high inhibition activity. We divided n-hexane fraction into three sub-layers(H1 - H3) and EtOAc into eight sub-layers(E1 - E8). H1, H2, E6, and E7 are showed higher inhibition activity than standard in Lp-PLA<sub>2</sub> inhibition assay and H1 and E6 are showed higher ACAT inhibition activity than standard.

---

**Key words** : Black rices, Copper-induced LDL Ooxidation inhibition assay, ACAT inhibition assay, Lp-PLA<sub>2</sub> inhibition assay.

---

---

· 접수: 2008년 9월 1일 · 논문심사: 2008년 10월 30일 · 채택: 2008년 12월 5일

\* Corresponding author: Seung Hwa Baek, Department of Herbal Resources, Professional Graduate School of Oriental Medicine, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea. Tel : +82-63-850-6225.

Fax : +82-63-841-4893. Email : shbaek@wonkwang.ac.kr

## I. 서론

흑미는 화본과의 한해살이풀로 한국, 일본, 중국 그리고 남부 아시아에서 재배되는 진한 보라색을 띠는 특용 작물로서 예로부터 그 의학적인 효과가 널리 알려졌으며 떡, 빵, 아이스크림 그리고 술의 착색제로 많이 사용되고 있다.<sup>1)</sup> 흑미 중의 안토시아닌의 항염증 활성,<sup>2)</sup> 환원 활성<sup>3)</sup> 그리고 항산화 활성<sup>4)</sup>이 보고되면서 안토시아닌이 생리활성 물질로서 간주되고 있으며, 최근에 적포도주의 페놀성 물질이 동맥 경화의 주요인이라고 알려진 HDL(human low density lipoprotein)의 산화를 억제한다고 보고되어 있다.<sup>5)</sup>

동맥경화증은 한국인의 사망원인 중 높은 비중을 차지하는 질병으로, 뇌경색, 협심증, 심근경색증 등 허혈성 심질환과 말초혈관 폐쇄를 유발하는 원인 질환으로, 활성산소에 의한 산화적 스트레스의 일례로 들 수 있다.<sup>6)</sup> Cholesterol에 의해 간에서 합성되는 LDL-cholesterol이 활성산소에 의해 산화되면, 허혈성 심장 질환 및 동맥경화증, 뇌혈관 질환 등을 유발하는 고지혈증의 주요 인자가 되는 것이다.<sup>7, 8)</sup> 동맥경화의 발병 초기 메카니즘으로서 혈관벽 평활근 세포 증식에 의한 내막의 비대화와 내막으로의 LDL의 과다 유입을 들 수 있다. 혈중 LDL은 receptor에 의해 세포내에서 분해되지만, 콜레스테롤 다량 섭취로 receptor가 부족하거나 결핍되면 혈중에 많아지게 되고, 결국 축적되어 oxidized LDL이 생성된다.<sup>9-11)</sup> 또한 LDL은 내피세포의 lipoxygenase, 대식세포에서 생성되는 superoxide radical, 그리고 식품을 통하여 들어온 과산화지질에 의하여, oxidized LDL로 산화되는 것으로 밝혀졌다.<sup>12)</sup> 산화적 스트레스에 의해 생성된 oxidized LDL은 높은 세포 독성이 있는 지질과산화물을 가지고 있어

서, 세포 조직에 확산되어 독성을 나타내고 내피세포에 염증을 일으키며, 동맥내에서 지방산조를 일으키고, 섬유소의 용해를 억제하여 조직인자의 발현을 증가시켜 응혈원의 활성도를 촉진시키는 데, 이러한 작용기작에 의해서 동맥이 탄성을 잃게 되는 것이다.<sup>13)</sup> 이와 같이 LDL 산화는 초기 동맥 경화성 병변의 형성과 진전에 주요한 역할을 하므로, 동맥경화의 원인을 예방하기 위해서는 항산화제에 의해 LDL의 산화를 방지해야 하는 것이다.<sup>14-17)</sup>

본 연구에서는 흑미의 ACAT와 Lp-PLA<sub>2</sub> inhibition assay, 동맥경화 발생저해(LDL Oxidation inhibition)에 대한 활성검정 결과를 보고하고자 한다.

## II. 실험방법 및 재료

### 1. 시약 및 기기

본 실험에서 사용된 *n*-hexane, chloroform, EtOAc, EtOH, MeOH, *n*-BuOH, 용매는 국내 삼진순약 제품, 기타 시약은 특급시약을 사용하였다. Medium pressure liquid chromatography (MPLC)용 MeOH는 공업용 용매를 정제하여 사용하였으며, Silica gel(70-230mesh, Merk, Germany), TLC plate(20×20cm, Merck, Kieselgel 60 F<sub>254</sub>)를 사용하였다. 생리활성물질의 정제를 위해 Combi Flash(ISCO, U.S.A)의 MPLC를 이용하였고, UV spectrum은 Carry 100 conc (Varian)로 측정하였다.

### 2. 재료

흑미는 cyanidin-3-glucoside를 약 4.7mg/g, peonidin-3-glucose 약 0.23mg/g을 함유하고 있는 수원 415호를 사용하였다.

### 3. LDL oxidation inhibition assay<sup>18-20)</sup>

LDL 분리는 신선한 human plasma에 0.1% EDTA와 0.02% NaN<sub>3</sub>를 가하고, 교반한 후, KBr(d = 1.006 - 1.025)를 가하고 1차 원심분리(40,000 rpm, 5°C, 24hrs)를 한다. 이때 분리된 VLDL을 제거하고, LDL이 포함된 fraction을 취한 후, KBr(d = 1.026 - 1.055)을 가하여 2차 원심분리(40,000rpm, 5°C, 24hrs)하여, density 1.025 - 1.055g/mL의 신선한 human LDL을 얻었다. 분리한 LDL은 pH 7.4 buffer Tris, 0.05M NaCl, 0.02% EDTA로 투석시키고, 냉동 건조하여 사용하였다. LDL 산화는 LDL(400µg/mL)과 CuSO<sub>4</sub>(16µM)에 전체부피가 1mL가 되도록 phosphate buffer(pH 7.4)를 섞어 37°C에서 배양시키고, 1mM EDTA와 1mM BHT(20µL)를 첨가하여 산화를 중지시켰다.

산화된 LDL에 trichloroacetic acid를 넣어 단백질을 침전시키고 원심분리 후, 산화 지질을 포함한 상층액을 분리하였다. 분리된 상층액에 시료 200µg 및 1mL의 thiobarbituric acid (TBA 25%)를 첨가하여, 95°C에서 10분간 가열 후 얼음으로 냉각시키고, 생성된 MDA의 양을 532nm에서 spectrophotometer를 이용하여 측정하였다.

### 4. Lp-PLA<sub>2</sub> inhibition assay<sup>21)</sup>

신선한 혈액에 0.04% EDTA, 0.05% NaN<sub>3</sub>, 0.015% phenylmethylsulfonyl flouride(PMSF)를 넣어 혈액에 있는 지단백질의 변성을 막는다. 100,000 × g, 4°C에서 20시간 동안 초원심 분리하여 VLDL과 chylomicron을 제거하고, 나머지 하층을 다시 100,000 × g, 4°C에서 20시간 동안 초원심 분리하여 상층의 LDL을 분리하였다. 10µL의 [<sup>3</sup>H] PAF(250µCi, 21.50Ci/mmmole)와 12.5µM PAF(2.5µL)를 질소가스 하에서 완전 농축시킨 후, 2.7mM EDTA를 포함하는 10mM

PBS(3.2mL)를 첨가하여 micellar 형태의 기질을 준비한다. (A)시험관에 희석한 LDL(20µL)와 (A)용액(160 µL)을 DMSO에 녹인 시료 20µL를 첨가하여, 37°C에서 15분간 반응시킨 후, chloroform/methanol(2:1) 용액 600µL를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 무처리군은 시료 대신 DMSO를 사용하였고, 대조군은 Lp-PLA<sub>2</sub> 활성저해 표준물질인 SB 381320을 사용하였다. 1,500 × g에서 3분간 원심분리하여 250µL의 물층을 취하고, chloroform(250µL)을 첨가하여 1,500 × g에서 3분간 원심분리하여, 다시 물층을 취하였다. 최종 물층(500µL) 중 100µL를 취해서 scintillation cocktail(3mL)를 첨가하여, liquid scintillation counter를 이용하여, 1-O-hexadecyl-[acetyl-<sup>3</sup>H(N)] phosphatidyl-choline으로부터 생성된 [<sup>3</sup>H] acetate를 측정하였으며, 아래와 같은 식으로 저해율을 계산하였다.

*Inhibition rates*(%)

$$= 100 \times \left[ 1 - \frac{\text{Sample}(cpm) - \text{Background}(cpm)}{\text{Control}(cpm) - \text{Background}(cpm)} \right]$$

### 5. ACAT inhibition assay<sup>22-24)</sup>

ACAT 효소 저해 활성은 [<sup>14</sup>C]-oleoyl-CoA를 기질로 하여 사용하였다. 4µL Liver microsome, 20µL assay buffer(1M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 10mM DTT, pH 7.4), water(41µL), BSA(15µL, 40mg/mL), cholesterol(2µL, 20mg/mL) 그리고 inhibitor(10 µL, 시료)를 37°C에서 20분간 예비 반응 시키고, 이 반응액에 8µL의 [<sup>14</sup>C]-oleoyl-CoA(0.05 µCi)를 가하여 37°C에서 25분간 반응 시켰다. 1mL의 isopropanol-heptaneL(4:1, v/v)를 가해 반응을 정지시켰다. 0.6mL의 heptane과 0.4mL의 assay buffer를 첨가한 후 vortex하고 원심 분리했다. 원심분리하여 얻은 상층액 100µL에 lipocolumn 3mL를 가하여, scintillation counter를 이용하여 radioactivity를 측정하였다. ACAT 저해 활성은 아래와 같은 식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{Inhibition Rate(\%)} = \left(1 - \frac{CPM^{(a)} - CPM^{(b)}}{CPM^{(c)} - CPM^{(d)}}\right) \times 100$$

CPM<sup>(a)</sup>: 시료와 효소를 넣었을 때 CPM\*

CPM<sup>(b)</sup>: 시료는 넣고 효소는 넣지 않았을 때 CPM

CPM<sup>(c)</sup>: 시료는 넣지 않고 효소는 넣었을 때 CPM

CPM<sup>(d)</sup>: 효소와 시료 모두 넣지 않았을 때 CPM

CPM\*: Counter per minute

### 6. 흑미 추출물에 대한 항동맥경화 활성

흑미 10kg을 80% MeOH(H<sub>2</sub>O:MeOH, v/v)로 상온에서 3회 추출하여 감압 농축하고, *n*-hexane, EtOAc, 그리고 *n*-BuOH의 순으로 분획하여 41g(0.41%), 8g(0.08) 그리고 28g(0.28%)

의 분획물을 얻었다. 이 분획들을 이용하여 LDL-oxidation inhibition assay 그리고 Lp-PLA<sub>2</sub> inhibition assay를 수행하여, *n*-hexane 분획과 EtOAc 분획에 활성이 있음을 확인하였다. *n*-hexane 분획을 이용하여, silica column chromatography(100% *n*-hexane → 100% MeOH)를 수행하여, 3개의 소분획(H1 - H3)을 얻었으며, EtOAc 분획을 이용하여 MPLC(silica packed column, 100% chloroform → 100% MeOH)를 수행하여 8개의 소분획을 얻었다. *n*-Hexane 분획과 EtOAc 분획에서 얻어진 11개의 소분획을 이용해, Lp-PLA<sub>2</sub> inhibition assay 그리고 ACAT-2 inhibition assay를 수행하여 활성을 확인하였다(Fig. 1).

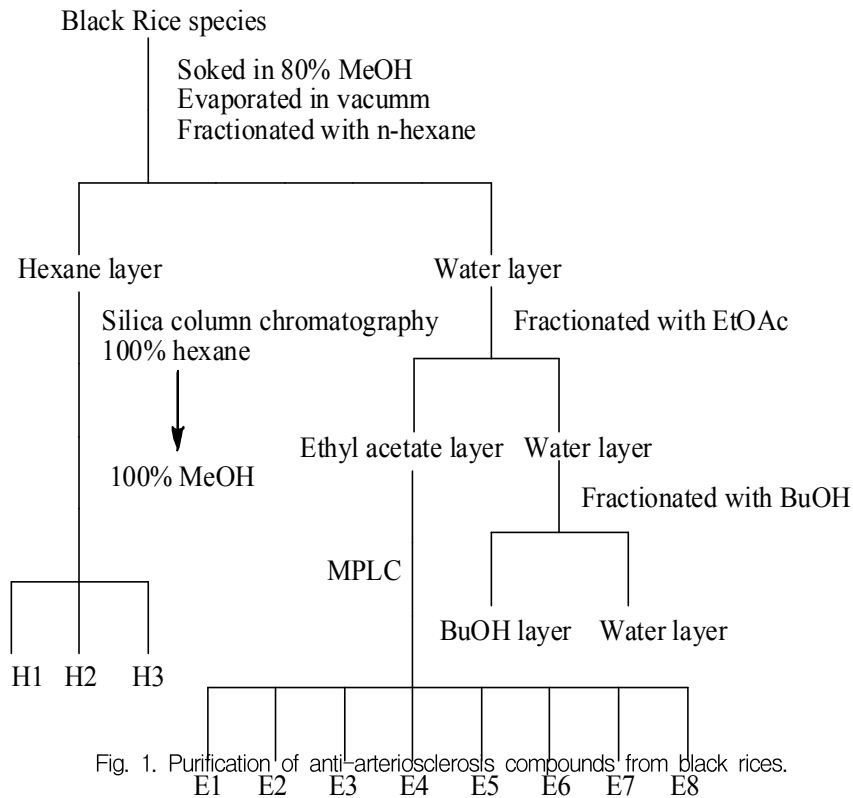


Fig. 1. Purification of anti-arteriosclerosis compounds from black rices.

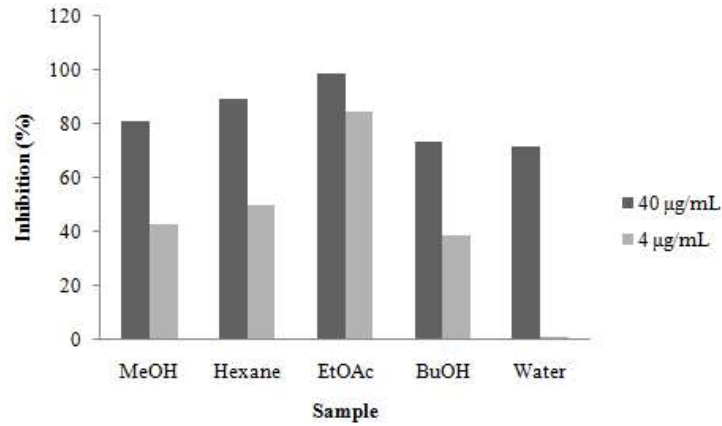


Fig. 2. LDL Oxidation inhibition rates of solvent extract of black rices.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 흑미의 항동맥경화 활성

Copper-induced LDL oxidation inhibition assay에서는 standard로서 probucol을 사용하였으며, 0.5, 1, 2, 4, 10µM의 농도를 만들어 생성된 MDA의 농도를 비교하여, 저해율을 확인하였다. 각 용매 분획물은 4µg/mL와 40µg/mL의 농도를 만들어 저해율을 확인한 결과, 40µg/mL에서는 MeOH(M) 추출물의 저해율이 80.9%로 확인되었으며, EtOAc(E) 분획은 99%의 저해율을 보여 높은 활성을 확인할 수 있었다. 다른 *n*-hexane(H), *n*-BuOH(B) 그리고 water(W) 층은 89.3, 73.8 그리고 71.8%의 저해율을 관찰 할 수가 있었다. 4µg/mL에서는 EtOAc 분획이 84.5%의 저해율이 관찰되어, 낮은 농도에서도 활성을 유지하고 있음을 확인하였으며, 나머지 분획의 저해율은 현저히 떨어졌다(Fig. 2).

Lp-PLA<sub>2</sub> inhibition assay 그리고 ACAT-2 inhibition assay에서는 copper-induced LDL oxidation inhibition assay 결과를 토대로, LDL

항산화 활성이 큰 hexane층과 EtOAc층을 silica column chromatography를 수행하여, 얻은 총 11개의 소분획을 이용하여 표준물질의 저해율과 비교하여, 표준물질보다 높은 저해율을 보인 소분획은 활성이 관찰되었다. 그 결과 Lp-PLA<sub>2</sub> inhibition assay에서는 H2 분획이 90%의 저해율을 관찰되어, 높은 활성이 있음을 확인하였으며, 표준 항산화제(SB)보다 높은 활성을 보인 분획은 H1, E6, E7, 그리고 E8 분획이었다(Fig. 3).

ACAT inhibition assay에서는 H1과 E6 분획이 표준물질(KSS)보다 높은 활성을 보였으며, 나머지 분획은 낮은 활성을 보였다. 전체적인 활성의 크기는 H1 = E6 > KSS = E3 > E7 > E2의 순으로 관찰되었다(Fig. 4). EtOAc 분획의 4µg/mL에서 84.5%의 높은 활성이 관찰되어, 흑미 추출물에 대한 항동맥경화에 효능이 있는 생리활성물질을 분리 및 분석하는 연구를 진행중에 있다.

### IV. 결론

흑미를 이용한 항동맥경화 물질 탐색에서는

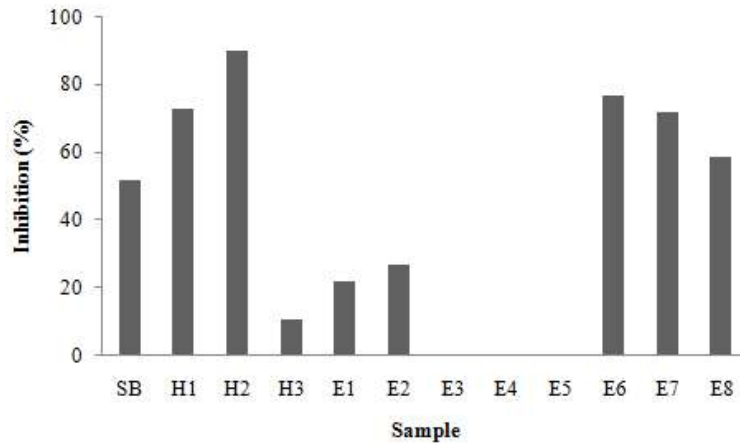


Fig. 3. Lp-PLA2 Inhibition rates of each fraction of black rices.

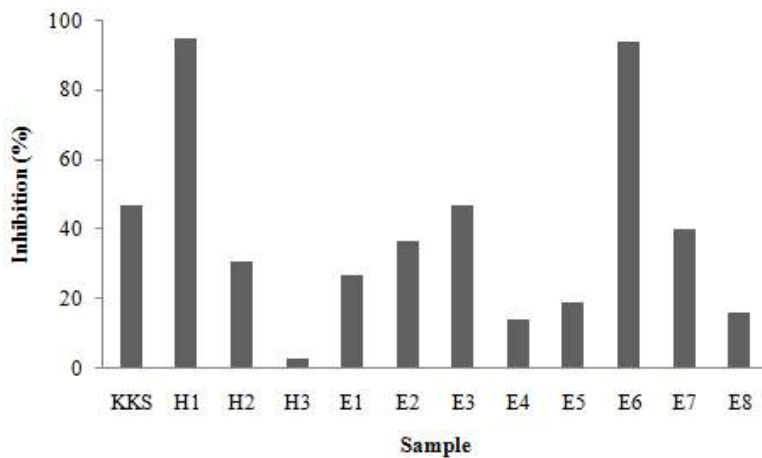


Fig. 4. ACAT Inhibition rates of each fraction of black rice.

80% MeOH 추출물 그리고 각 용매 분획물을 이용하여, LDL oxidation inhibition assay, Lp-PLA<sub>2</sub> inhibition assay, 그리고 ACAT-2 inhibition assay를 확인하였다. LDL oxidation inhibition assay에서 40µg/mL의 농도에서, 모든 추출물 및 분획물의 활성이 70~90%를 보였으나, EtOAc 분획만이 4µg/mL의 농도에서도 84.5%의 높은 활성을 유지하였으며, 나머지는 활성이 현저히 떨어졌다. *n*-Hexane과 EtOAc 분획의 소분획을 이용한 Lp-PLA<sub>2</sub> inhibition

assay에서는, H2 > E6 > H1 > E7 > E8 > SB > E2 > E1 > H3의 순으로 활성이 관찰되었으며, ACAT inhibition assay에서는 H1 > E6 > KKS = E3 > E7 > E2 > H2 > E1 > E5 > E8 > H3의 순으로 활성을 나타내었다.

### 참고문헌

- 1) Cho, M.H., Yoon, H.H., Han, T.R. Thermal

- stability of the major color component, cyanidin 3-glucoside, from a Korean pigmented rice variety in aqueous solution. *Agri. Chem. Biotech.* 39: 245-248, 1996.
- 2) Valskovska, M., Drenska, D., Ovcharov, R. Effect of antioxidant, alone and in combination, on the inflammatory process. *Probl. Vutr. Med.* 18: 13-19, 1990.
  - 3) Gabar, E. Possible biological role of some anthocyanins in foods. *Bull. Liaison Group Polyphenols* 14: 130-133, 1988.
  - 4) Drenska, D., Bantutova, I., Ovcharov, R. Anticonvulsant effect of anthocyanins and antioxidants. *Farmatsiya* 39: 33-40, 1989.
  - 5) Meunier, M. T., Duroux, E., Bastide, P. Antioxidant activity of procyanidol oligomers and anthocyanins with regard to superoxide anion and lipid peroxidation. *Plant Med. Phytother.* 23: 236-247, 1989.
  - 6) Caroline, K. H. *Pharmacognosy Phytochemistry Medicinal Plants; 1. Compounds of Toxic Plants*, Lavoisier Publishing Inc. pp 275-499, 1999.
  - 7) Aruoma, O. I. Nutrition and health aspects of free radicals and antioxidants. *Food Chem. Toxicol.* 32: 671-683, 1994.
  - 8) Davies, K. J. A., Goldberg, A. L. Proteins damaged by oxygen radicals are rapidly degraded in extracts of red blood cells. *J. Biol. Chem.* 262(17): 8227-8234, 1987.
  - 9) Esterbauer, H., Gebicki, J., Pohl, H., Jurgens, G. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic. Biol. Med.* 13: 341-390, 1992.
  - 10) Ishikawa, Y., Inadera, H., Shirai, K., Hashimoto, H., Fukamachi, I., Saito, Y., Yoshida, S. Moderate oxidation of hypertriglyceridemic LDL causes apolipoprotein-B epitope change and enhances its uptake by macrophages. *Biochim Biophys. Acta* 1129: 60-64, 1992.
  - 11) Ross, R. The pathogenesis of atherosclerosis, perspective for the 1990's. *Nature* 29: 801-809, 1993.
  - 12) Fogelman, A.M., Shechter, I., Sieger, J., Hook, M., Child, J. S., Edward, P.A. Malondialdehyde alteration of low density lipoprotein leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 2214-2218, 1980.
  - 13) Morel, D.W., Hessler, J.R., Chisolm, G.M. Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipids. *J. Lipid Res.* 24: 1070-1076, 1983.
  - 14) Akio, K., Yoshinori, O. Antioxidative activities of bioactive substances. *Fragrance J.* 88: 53, 1988.
  - 15) Bakatani, N. Recent advances in the study on natural antioxidants. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi.* 37: 569, 1990.
  - 16) Yang, K.S., Jeon, C.M. Effect of *Taraxacum coreanum* Nakai on LDL oxidation. *Kor. J. Pharmacogn.* 27(3): 267-273, 1996.
  - 17) Chen, G. C., Hardman, D. A., Hamilton, R. L., Mendel, C. M., Chhilling, J. M., Kan, J. P. Distribution of lipid binding regions in human apo B-100. *Biochem.* 28: 2477-2488, 1989.
  - 18) Lue, G., Fruchart, J. C. Oxidation of lipoproteins and atherosclerosis. *Am. J. Clin. Nutr.* 53: 206-210, 1988.
  - 19) Hanfang, Z., Yuzhou, Y., Urs, P. S. Structural requirements for the binding of modified proteins to the scavenger

- receptor of macrophages. *J. Biol. Chem.* 268: 5535-5542, 1993
- 20) Wulf. P., Michael. E. R., Seppo. Y. H., Geoff. C. G., Steve. S. S. LDL undergoes oxydative modification in vivo. *Proe. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1372-1376, 1989.
- 21) Wu, C.A., Tsujita, M., Hayashi, M., Yokoyama, S. Probucol inactivates ABCA1 in the plasma membrane with respect to Its mediation of apolipoprotein binding and high density lipoprotein assembly and to its proteolytic degradation, *J. Biol. Chem.* 279(29): 30168-30174, 2004.
- 22) Asami, Y., Yamagishi, I., Murakami, S., Araki, H., Tsuchida, K., Higuchi, S. HL-004, the ACAT inhibitor, prevents the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Life Sci.* 62(12): 1055-1063, 1998.
- 23) Bang, M.H., Jang, T.O., Song, M.C., Kim, D.H., Kwon, B.M., Kim, Y.K., Lee, H.S., Chung, I.S., Kim, D.K., Kim, S.H., Park, M.H., Baek, N.I. Screening of biologically active compound from edible plant sources. IX. Isolation and identification of sesquiterpene lactones isolated from the root of *Ixeris dentata forma albiflora*; inhibition effects on ACAT, DGAT and FPTase activity. *Han'guk Eungyong Sangmyong Hwahakhoeji*, 47 (2): 251-257, 2004.
- 24) Gill, P.J., Robinson, C., Rathgeb, K. A. Regulation of ACAT activity by a cholesterol substrate pool during the progression and regression phases of atherosclerosis implications for drug discovery. *Atherosclerosis.* 83: 177-185, 1990.