Korean J. Plant Res. 27(4):271-278(2014)
http://dx.doi.org/10.7732/kjpr.2014.27.4.271

Print ISSN 1226-3591
Online ISSN 2287-8203

Original Research Article

복분자 유래 성분 protocatechuic acid 투여가 고콜레스테롤 식이로 유도된 생쥐의 지질대사에 미치는 영향

구현정[1†], 강세찬[1†], 장선아[1], 권정은[1], 손은수[2], 손은화[3*]

[1]가천대학교 생명과학부, [2]한국과학기술정보연구원 정보분석연구소, [3]강원대학교 생약자원개발학과

Effects of Protocatechuic Acid Derived from *Rubus coreanus* on the Lipid Metabolism in High Cholesterol Diet-induced Mice

Hyun Jung Koo[1†], Se Chan Kang[1†], Seon-A Jang[1], Jung-Eun Kwon[1], Eunsoo Sohn[2] and Eun-Hwa Sohn[3*]

[1]Department of Life Science, Gachon University, Seongnam 461-701, Korea
[2]Division of Information Analysis Research, Korea Institute of Science and Technology Information, KISTI, Seoul 130-741, Korea
[3]Department of Herbal Medicine Resource, Kangwon National University, Samcheok 245-710, Korea

Abstract - *Rubus coreanus* has been used as a traditional medicine in Asia because of its various pharmacological properties. This study examined the effects of protocatechuic acid (PCA), one of phenolic compounds derived from *R. coreanus* on the lipid metabolism in high cholesterol diet-induced mice. A total of 30 male C57BL/6 mice were divided into 5 groups with 6 mice in each group as follows: (1) Control mice received normal diet (ND). (2) Mice received high-cholesterol diet (HCD) plus water, 10% sucrose solution and treated daily oral phosphate-buffered-saline (PBS) of equal volumes through gavage. (3) Mice received HCD and treated daily with 25 ㎎/㎏ b.w./day of PCA (4) with 50 ㎎/㎏ b.w./day or (5) with 10 ㎎/㎏ b.w./day of simvastatin via oral gavage for 12 weeks. Body weights were measured weekly for a period of experiment. After treatment, liver, thymus, spleen and kidney were harvested and weighed, and the lipid metabolite profiles (total cholesterol, triglyceride (TG), HDL-cholesterol (HDL-c), LDL-cholesterol (LDL-c) and liver-damaging markers (GOT and GPT) in serum were examined. PCA significantly reduced the total cholesterol, TG, LDL-c level and increased the HDL-c level. PCA administration also significantly reduced the levels of GOT and GPT. These results indicate that the PCA could be used as a functional material for lowering lipid and an adjuvant for the treatment of hyperlipemia.

Key words - *Rubus coreanus*, Protocatechuic acid, Liver, Lipid metabolite

서 언

세계적으로 고령화 인구 증대, 인스턴트식품의 소비 증가, 운동량 감소, 스트레스 증가 등으로 인해 고지혈증(hyperlipidemia) 환자의 수가 증가하고 있으며, 이는 동맥경화, 고혈압, 뇌졸중 등의 심혈관계 질환 발생의 주된 원인이 되어 인간의 사망률을 높이고 있다. 고지혈증은 체내 지질대사에 이상이 생겨 혈중의 지질이 비정상적으로 높아진 상태로서, 주요 위험 인자로는 콜레스테롤(cholesterol)과 중성지방(triglyceride)이 증가되는 경우이다. 혈액 내 과량의 콜레스테롤과 중성지방은 혈액 내의 단백질과 결합하여 돌아다니는데, 결합정도에 따라 저밀도 지단백(LDL: low density lipoprotein)과 고밀도 지단백(HDL: high density lipoprotein) 등으로 나뉜다. HDL은 혈액 내 지질을 간으로 보내 제거하게 함으로써 심혈관 질환의 위험을 낮추는 반면, LDL은 지질을 동맥혈관에 쌓이게 하여 혈관을 막는 위험을 증가시킴으로, 혈액 내 HDL과 LDL 형태의 콜레스테롤의 수치 변화가 고지혈증 치료 효과 및 심혈관계 질환 발병의 감수성을 평가하는 데에 중요한 지표로 사용되고 있다(Heinecke,

*교신저자(E-mail) : ehson@kangwon.ac.kr
† Hyun Jung Koo and Se Chan Kang contributed equally.

ⓒ 본 학회지의 저작권은 (사)한국자원식물학회지에 있으며, 이의 무단전재나 복제를 금합니다.
This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

2012; Trapani *et al.*, 2012).

간(liver)은 혈액 내 콜레스테롤 양을 유지시키는데 있어서 매우 중요한 기관이다(Maxfield and Tabas, 2005). 간은 콜레스테롤의 생합성 과정과 대사과정이 함께 이루어지는 기관으로, 콜레스테롤 양의 조절은 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase (HMGR) 활성에 의한 콜레스테롤이 생합성과정, 간세포의 low density lipoprotein receptors (LDLr) 및 scavenger receptor B1 (SR-B1) 수용체에 의한 혈액 내 LDL 및 HDL의 uptake 조절, 간세포 내에서의 콜레스테롤 대사 작용에 의한 담즙으로의 배설 과정 등으로 이루어진다(Trapani *et al.*, 2012). 현재 고지혈증 치료제로서 임상적으로 사용되고 있는 지질을 조절하는 약물은 콜레스테롤 합성 시 속도 결정 단계 효소인 HMGR을 억제하는 스타틴(statin)계 약물로서, 이 약물의 작용 기전은 간세포의 콜레스테롤 생합성 효소를 저해하고, 콜레스테롤 합성 저하에 의한 보상작용으로 조직세포 표면의 LDL 수용체 수가 증가하여 결국 혈중 콜레스테롤이 LDL 수용체를 통하여 조직으로 이동되는 것을 증가시켜 혈중 LDL-콜레스테롤 수치를 저하시키는 것이다(Simoens and Sinnaeve, 2013). Simvastatin, atorvastatin, lovastatin 등이 현재 고지혈증 환자에게 처방되고 있는 대표적인 스타틴계 약물이다. 그러나, 스타틴계 약물은 LDL-콜레스테롤치나 중성지방치를 감소시키는 반면 복통, 소화불량, 고혈당, 망막병증, 불면증, 근육병증 등의 부작용이 보고되고 있다(Simoens and Sinnaeve, 2013; Cha, 2001). 따라서 끊임없이 부작용을 최소화 할 수 있고 고지혈증 개선 효과가 뛰어난 안전한 천연소재 개발이 이루어지고 있다.

복분자(*Rubus coreanus*)는 장미과(Rosaceae)에 속하는 낙엽 활엽성 관목으로 중국이 원산지이고 우리나라에서는 제주도 및 남부지역이 주요 산지이며 초여름에 검붉은 열매를 수확하여 식용하고 있다. 원산지로 알려진 중국에서는 일반적으로 Rubus속 식물 약 20여종의 미성숙 과실을 증기로 쪄서 햇볕에 말린 것을 복분자라고 정의하여 강장제 등과 같은 약용으로 쓰이고 있고 우리나라도 약용과 술에 사용하고 있다. 복분자는 국내 전통 약재로써 간기능 강화, 시력 강화, 보양재 등으로 사용되어 왔으며(Kim *et al.*, 2005), 생리 활성연구에 관해서는 항산화 효과, 항피로 효과, 항골다공증 효과, 항당뇨 효과, 여성호르몬 유사 효능 등이 보고되었다(Jung *et al.*, 2007; Lee and Choi, 2006; Lee *et al.*, 2009). 최근 Kim *et al.* (2013)은 미성숙 복분자 추출물을 고지방식이를 섭취한 생쥐에 14주간 투여하였을 때 혈액 내 지질의 균형적인 회복과 우수한 항동맥경화 효능을 보고하였다.

Protocatechuic acid (PCA)는 polyphenolic compound로서 우수한 항산화 효과, 항염증 효과 등이 보고되고 있는 성분이다. 복분자, 오디, 흑밀, 동부, 버섯, 아보카도 등 다양한 식품소재에 함유되어 있어 주목받아 왔지만, 그 함유량이 크지 않아서 생체이용률(bioavailability)에 대한 한계로 인해 크게 연구되지 않았다(Chon, 2013). 그러나, 최근 PCA가 안토시아닌(anthocyanin) 등의 대사체로써 PCA가 polyphenol 성분뿐만 아니라 flavonoid계 등의 대사산물로서 임상적으로 생체이용률이 높다는 보고가 있어(Vitaglione *et al.*, 2007), PCA에 대하여 항산화 효과, 항염증 효과, 항암 효과, 항동맥경화증 및 심혈관계 질환에 대한 영향 등이 다시 재조명되고 있다(Masella *et al.*, 2012). Ju *et al.* (2009)의 연구에 의하면 복분자 추출물의 phenolic acids에는 gallic acid, protocatechuic acid, p-hydrobenzoic acid, vanillic acid, syringic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, salycylic acid, rosmarinic acid가 있으며, aqueous, acetone, ethylacetate subfraction 등 대부분의 용매층에서 protocatechuic acid의 함량이 가장 높다고 보고하였다. 따라서, 본 연구에서는 기존 연구에서 보고된 복분자 추출물에서 나타나는 동맥경화 및 지질대사에 미치는 효과가 복분자의 주요 유효성분인 PCA의 작용인지 확인하기 위하여 고콜레스테롤 식이로 유도한 생쥐에 PCA를 경구 투여하고 현재 임상적으로 처방되고 있는 스타틴계 약물 simvastatin과 비교 분석함으로써 PCA가 고지혈증 치료의 대체용 기능성 소재로써의 가능성을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

실험동물

실험동물은 4주령의 C57BL/6 생쥐를 중앙실험동물(서울)로부터 구입하여 사용하였다. 동물사육실의 환경은 항온(20 ± 2℃), 항습(50 ± 4%), 12시간 간격(07:00~19:00)의 광주기로 일정한 조건을 유지하고 동물들은 polycarbonate cage에 6마리씩 분리하여 사육하였다. 생쥐는 1주일간 기본사료로 적응시킨 후 6개의 군으로 분리하여 제1군은 기본사료를 공급하고 나머지 제2-5군은 고콜레스테롤 식이사료(HCD: high-cholesterol diet; D12336; Research Diet Inc., USA) 및 10% fructose가 함유된 음수를 공급하였다(Kwang *et al.*, 2013). 실험동물의 처리군은 다음과 같다. 제1군: 기본사료군(normal diet, ND), 제2군: 콜레스테롤식이사료군 및 PBS 투여군, 제3, 4군: 고콜레스테롤식이 및 PCA 농도별(25, 50 ㎎/㎏ b.w.) 투여군, 제5군: 고콜레스테롤 식이 및 심바스타틴(Simvastatin, Sigma-aldrich) 10 ㎎/㎏ .w.

Table 1. Composition of the experimental high cholesterol diet

High-cholesterol diet (#D12336)	Ingredients (g/kg)
Casein, 30 Mesh	75
Soy Protein	130
DL-Methionine	2
Corn Starch	275
Maltodextrin 10	150
Sucrose	30
Cellulose, BW200	90
Soy Bean Oil	50
Cocoa Butter	75
Coconut Oil, 76	35
Mineral Mix S10001	35
Calcium Carbonate	5.5
Sodium Chloride	8
Potassium Citrate	10
Vitamin Mix V10001	10
Choline Bitartrate	2
Cholesterol, USP	12.5
Sodium Cholic Acid	5

을 12주 동안 매일 경구 투여하였다. 고지혈증을 유발하기 위해 사용된 고콜레스테롤식이 구성은 Table 1과 같다.

복분자 추출물의 protocatechuic acid 함량 분석

본 실험에 사용된 복분자는 대구 약령시장에서 건조된 것을 구입하여 불순물을 제거하고 세척한 다음 동결건조한 후 분말화하여 사용하였다. 분말화된 시료 중량의 10배량(w/v)의 80% 에탄올로 24시간동안 3회 추출하였으며, 추출액을 여과지(Whatman No.3, England)로 2회 여과하고, 여액을 회전감압농축기(rotary vacuum evaporator, Buchi R-205, Flawil, Switzerland)로 농축한 후 동결 건조하여 복분자의 에탄올 추출물을 제조하였다. 동결 건조한 복분자 추출물 1 g에 70% 메탄올과 70% 아세톤(1:1, v/v) 용액 10 ㎖을 가하여 상온에서 3회 추출하였다. 추출액을 감압하여 용매를 제거한 다음 핵산 1 ㎖을 가하여 3회 추출하였다. 다시 감압하여 용매를 제거한 다음 시험에 사용하였다. 분석시료는 메탄올에 녹이고 0.5 ㎛ filter를 이용하여 여과한 후 분석에 이용하였으며, 표준물질 protocatechuic acid (98% purity, Lot No. S35588)는 Sigma-aldrich사(St. Louis, MO)에서 구입하여 메탄올에 녹여 분석에 이용하였다.

HPLC 장비는 Shimadzu LC-20 (Japan)를 사용하였으며 column은 reverse-phase column (Synergi Hydro-RP, 4.6 × 250 ㎜, Phenomenex, Torrance, CA)을 이용하였다. 검출기는 SPD M20A DAD detector (Shimadzu, Japan)를 이용하여 254 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. 이동상은 solvent A (50 mM phosphoric acid 수용액)와 solvent B (100% acetonitrile)을 사용하여 15% B (30분), 50% B (60분), 100% B (70분)의 기울기로 유속 1.0 ㎖/min에서 15 분간 분석하였다.

혈청의 분리와 체중 및 장기무게 측정

실험동물의 복부대동맥으로부터 획득한 혈액은 3,000 rpm에서 15 분간 4℃에서 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 각 개체에 대한 체중은 1주에 한번 측정하였다. 실험이 종료된 후 생쥐는 희생 전 12 시간 동안 절식시킨 후 에테르를 이용하여 흡입마취 시킨 다음 복부 하대정맥으로부터 혈액을 채취하고, 장기무게를 측정하였다.

중성 지방 (triglyceride) 함량 측정

McGowan *et al.* (1983)의 방법에 준하여 조제된 kit (AM 157S-K,Asan)를 사용하여 실험하였다. 빙냉상에서 효소시약 (lipoprotein lipase 10800 U, glycerol kinase 5.4 U, peroxidase 135000 U, L-α-glycero phosphooxidase 160 U 함유)을 효소시약 용해액 [N,N-bis (2-hydroxyethyl)-2-aminomethane sulfonicacid 0.427 g/dl 함유]에 용해한 용액에 시료 20 ㎕에 조제한 효소시액 3 ㎖을 첨가한 후 37℃에서 10 분간 incubation하여 시약 blank를 대조로 파장 550 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. 표준 검량선에 준하여 혈중 함량은 ㎎/dl로 표시하였다.

총 cholesterol 함량 측정

Richmond (1976)의 효소법에 의하여 조제된 kit (AM 202-K, Asan)를 사용하여 실험하였다. 빙냉상에서 효소시약(cholesterol esterase 20.5 U/L, cholesterol oxidase 10.7 U/L, sodium hydroxide 1.81 g/L 함유)을 효소시약 용해액(potassium phosphate monobasic 13.6 g/L, phenol 1.88 g/L 함유)에 용해한 용액에 시료 20 ㎕에 조제한 효소시약 3 ㎖을 첨가 한 후 37℃에서 5 분간 incubation하여 시약 blank를 대조로 파장 500 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. 표준 검량선에 준하여 혈중 함량은 ㎎/dl로 표시하였다.

HDL-Cholesterol 함량의 측정

Noma *et al.* (1978)의 효소법에 의하여 조제된 kit (AM 203-K,Asan)를 사용하여 실험하였다. 혈청 20 ㎕에 침강시약(dextran

sulfate 0.1%, magnesium chloride 0.1M 함유) 0.2 ㎖을 가하고 잘 혼합한 후 실온에서 10 분간 방치하고 3,000 rpm에서 10 분간 원심분리 하였다. 그 상층액을 0.1 ㎖ 취하여 효소시액 3 ㎖과 잘 혼합하여 37℃에서 5 분간 incubation하여 시약 blank를 대조로 파장 500 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. 표준 검량선에 준하여 그 함량을 ㎎/dl로 표시하였다.

LDL-cholesterol 함량 측정

Low density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) 함량은 Friedewald *et al.* (1972)의 방법에 따라 다음의 식에 의하여 산출하였다. LDL-C = [총콜레스테롤양 − (HDL-C + Triglyceride의 양/5)]

GOT, GPT 효소 분석

Reitman-Frankel의 효소법(Reitman and Frankel, 1957)에 의하여 조제된 kit (AM101-K, 아산)를 사용하여 실험하고, 간세포 손상과 밀접한 관련이 있는 GOT (glutamic oxaloacetic transaminase), AST (Aspartate Aminotransferase), GPT (glutamic pyruvic transaminase), ALT (Alanine Aminotransferase)를 ELISA reader로 측정하여 분석하였다. 먼저 GOT, GPT용 기질액을 1 ㎖씩 취하고 37℃에서 5 분간 방치한 다음 혈청 0.2 ㎖를 가하여 37℃에서 GOT는 60 분, GPT는 30 분간 방치하였다. Dinitro-phenyl hydrazine 발색 용액을 1 ㎖씩 가하여 실온에 20 분간 방치하고 0.4 M NaOH 용액 10 ㎖과 혼합하여 10 분간 방치한 다음 흡광도를 측정하였다. 이 때 사용된 표준곡선은 혈청 trans-aminase 측정용 시약(아산) 중 검량선용 시약을 이용하였다.

통계분석

실험 결과는 3회 반복하였으며, 가장 대표적인 실험결과를 평균 ± 표준오차 (mean ± S.E.M)로 나타내었고, 유의 수준은 $^{\#}p < 0.05$, $^{*}p < 0.05$와 $^{**}p < 0.01$로 Student t'-test를 실시한 결과를 표시하였다.

결과 및 고찰

복분자 추출물의 PCA 함량 분석

복분자 80% 에탄올 추출물의 PCA 함량을 HPLC 분석방법을 이용하여 산출하였다. PCA 표준물질은 2.5-50 ㎎/㎖의 농도에서 HPLC chromatogram을 얻어 각 농도에 대한 피크 면적을 얻었으며 이것을 기초로 하여 검량선을 얻었고 R^2 값이 0.99 이상임을 확인하였다(Fig. 1A). 표준물질 및 복분자 추출물의 PCA 피크는 Fig. 1B에 나타낸 것과 같으며, 3회 측정하여 평균 ± 표준오차로 나타낸 결과 PCA의 함량은 19.73 ± 0.08 ㎎/g으로 나타났다.

PCA투여에 의한 고콜레스테롤 식이생쥐의 체중 변화

PCA 25 및 50 ㎎/㎏ b.w./day의 용량으로 생쥐에 경구 투여하여 실험 개시일로부터 1주일마다 측정하였고, 실험 종료일까지 체중을 측정하였다. 정상사료를 먹인 생쥐에게는 정상적으로 체중증가가 일어났으나, 12주간의 고콜레스테롤 사료 공급에 의해 고지혈증이 유발된 실험동물에서 체중은 유의적으로 증가하지 않았으며, PCA 투여군과 양성대조군 simvastatin 고지혈증 치료제의 투여군에서도 체중증가가 일어나지 않았다(Fig. 2). 이러한 결과는 고콜레스테롤 식이군의 사료섭취량이 유의적으로 증가하지 않은 것과 관련이 있으며, An *et al.* (2013)의 연구에서도 고콜레스테롤을 12주 이상 섭취한 생쥐에서 정상식이와 달리 체중감소와 식이 섭취량의 감소를 보고하였다. An *et al.* (2013)은 체중변화를 18주까지 측정하였는데 정상식이군이 18주까지 지속적인 체중증가를 보인 반면에, 고콜레스

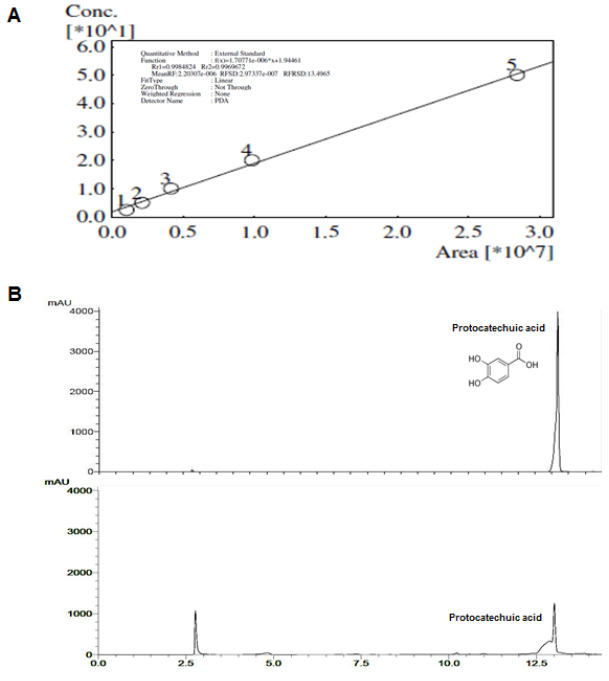

Fig. 1. (A) Calibration curve of protocatechuic acid (PCA) and (B) HPLC chromatogram of the protocatechuic acid (PCA) and *Rubus coreanus* Miq. 80% ethanol extract.

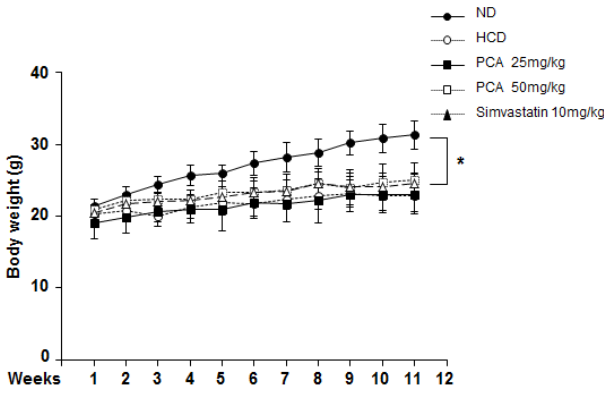

Fig. 2. Effects of protocatechuic acid (PCA) on the body weight in mice fed the high cholesterol diet plus water, 10% sucrose solution (HCD). Body weight changes were measured once a week. The results are mean ± S.E.M of triplicates from a representative experiment ($^{*}p < 0.05$ compared to normal diet control (ND)).

테롤 식이군들이 6주째에서 체중 증가를 멈추었다고 보고하였다. 이는 우리 연구에서 고콜레스테롤 식이군이 5주째부터 체중 증가를 보이지 않은 결과와 매우 유사하다. 저자는 탄수화물 함유량에 따른 섭취 선호도와 탄수화물 섭취량에 따른 glucose 대사가 체중증가에 영향을 미친다고 보고하였고, 이러한 이유로 연구에 사용된 고콜레스테롤 식이조성에서 상대적으로 탄수화물 함량이 정상식이보다 낮아짐으로써 이에 대한 선호도와 탄수화물 섭취량이 함께 낮아짐으로써 정상 식이군에서와 같이 체중 증가가 일어나지 않는다고 설명하였다(Shankar *et al.*, 2010).

PCA 투여에 의한 고콜레스테롤 식이생쥐의 장기 무게 변화

간은 콜레스테롤의 합성과 대사에 매우 중요한 역할을 하는데, 혈중 콜레스테롤의 항상성 유지를 위하여 합성된 지질을 혈액으로 내보내기도 하고, 혈액내로 지질을 다시 회수하여 담즙으로 배설시키기도 한다. 이러한 과정에는 콜레스테롤의 생합성 과정과 콜레스테롤을 회수하기 위한 efflux 과정에 필요한

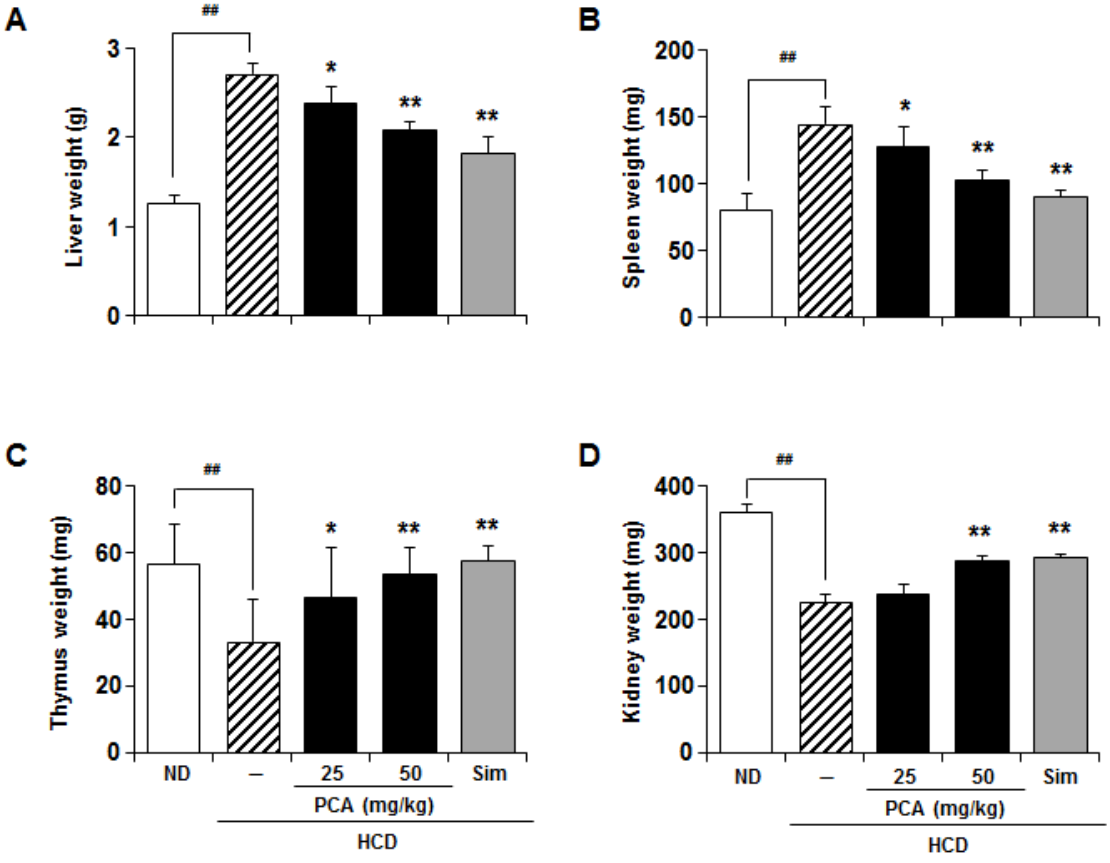

Fig. 3. Effects of protocatechuic acid (PCA) on the weights of (A) liver, (B) spleen, (C) thymus and (D) kidneys in mice fed the high cholesterol diet plus water, 10% sucrose solution (HCD). The results are mean ± S.E.M of triplicates from a representative experiment ($^{\#\#}p < 0.01$ compared to normal diet control (ND), $^{*}p < 0.05$ or $^{**}p < 0.01$ compared to high fat diet control (HCD)).

다양한 관련 단백질들의 작용이 복잡하게 이루어지고 있다(Trapani *et al.*, 2012). 지질대사에 있어서 간 이외에도 고콜레스테롤 혈증에 의해 발생하는 면역 장기의 손상 및 신장의 손상이 보고되고 있다. 콜레스테롤의 침착이 비장 비대를 일으키며 콜레스테롤의 수치가 높을수록 신장 기능이 떨어진다는 연구결과가 보고되고 있다(Buja *et al.*, 1979; Scarpioni *et al.*, 2012). 이에 본 연구에서는 고콜레스테롤 혈증에 대한 PCA의 투여가 지질대사와 관련된 주요 장기인 간, 비장, 흉선, 신장 등의 무게변화에 미치는 영향을 측정하였다. 실험결과, PCA 투여군은 고콜레스테롤에 의해서 비정상적으로 증가한 간 및 비장 무게를 정상군 수준으로 크게 회복시켰으며, 고콜레스테롤 식이에 의해 크게 감소한 신장 및 흉선의 무게를 용량의존적으로 다시 회복시켰다(Fig. 3). 이는 고콜레스테롤 식이에 대한 주요 장기들의 손상 및 변화에 대하여 PCA의 투여가 매우 효과적임을 보여주는 결과이다.

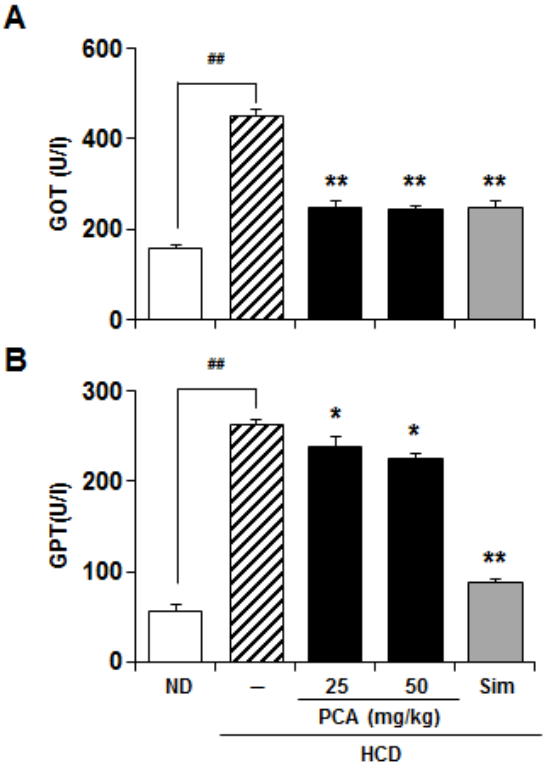

Fig. 4. Effects of protocatechuic acid (PCA) on the plasma levels of GOT and GPT in mice fed the high cholesterol diet plus water, 10% sucrose solution (HCD). The results are mean ± S.E.M of triplicates from a representative experiment ($^{\#\#}p < 0.01$ compared to normal diet control (ND), $^{*}p < 0.05$ or $^{**}p < 0.01$ compared to high fat diet control (HCD)).

PCA 투여에 의한 혈청내 간세포 손상마커 GOT 및 GPT 함량 변화

고콜레스테롤 식이를 섭취한 실험군에서 혈중 GOT와 GPT 수치가 정상식이군에 비하여 190.1% 및 363%로 유의적으로 크게 증가함으로써, 본 연구에 사용된 고콜레스테롤 식이 및 처리조건이 간세포에 손상을 일으켰음을 보여주었다. 이는 고콜레스테롤 식이에 의해 간무게 증가가 일어났던 결과와 함께 콜레스테롤의 과량섭취 및 지질대사의 이상에 지방간 등의 간질환을 일으킨다는 것을 확실히 보여주고 있다. 이러한 조건에서 PCA의 투여는 용량의존적으로 GOT 및 GPT의 혈중 농도를 다시 감소시켰다(Fig. 4). 이러한 결과는 PCA의 투여가 고콜레스테롤 섭취로 증가된 간무게를 다시 감소시켰던 결과와 함께 PCA가 지질대사 이상에 의한 간손상에 유의적인 보호 효과가 있음을 나타낸 것이다. Cha *et al.* (2000)은 쥐에서 분리한 간세포(hepatocyte)를 사염화탄소(CCl_4)로 손상시켜 GPT와 GOT의 분비를 증가시켰을 때, 오배자에서 분리한 PCA의 처리가 간세포의 GPT 및 GOT 분비작용에 억제적으로 작용하여 PCA가 간세포 보호작용이 있다고 보고하였다. 이러한 결과는 PCA가 간세포에 직접적으로 효과를 나타내는 것을 의미하며, 체내 투여되었을 때 나타나는 PCA의 간세포 보호 효과가 혈중 지질대사의 기능에 긍정적인 영향을 나타내는 것으로 사료된다.

PCA 투여에 의한 혈청내 지질 함량 변화

Table 2에 나타난 바와 같이, 고지혈증 생쥐의 혈중 지질양은 일반 식이를 한 생쥐에 비하여 총콜레스테롤 95.3%, triglyceride 125%가 증가하여 특히 중성지질의 증가 비율이 높은 것을 확인할 수 있었고, 정상식이에 비하여 혈중 HDL-C 농도가 92.7% 감소하였으며, LDL-C 농도는 809.6% 증가함을 확인할 수 있었다. PCA를 12주간 투여한 실험군에서 총콜레스테롤양과 중성지질의 함량은 고지혈증 식이군과 실험군을 비교하였을 때, 그 차이가 크진 않지만 용량의존적으로 유의적인 감소효과를 나타내었다. 또한, PCA의 투여는 HDL의 함량을 정상식이군 만큼 높였으며, LDL의 증가를 유의성 높게 감소시켰다. 총지질대사 profile에 대하여 PCA의 결과를 양성대조군으로 사용했던 고지혈증 치료제 simvastatin 실험결과와 비교했을 때, 효능을 나타내는 유의적인 차이면에서 다른 양상을 나타내었다. Simvastatin (10 ㎎/㎏ b.w./day) 투여군에서는 고콜레스테롤 식이에 대하여 총콜레스테롤과 TG의 농도를 정상수준으로 떨어뜨리는 우수한 효과가 있는 반면에, simvastatin은 HDL과 LDL 균형에는 크게 영향을 미치지 못하였다. 12주간의 장기간의 simvastatin

Table 2. Effects of protocatechuic acid on plasma total cholesterol, triglyceride, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol in mice fed high-cholesterol diet

Group	Total cholesterol (㎎/dl)	Triglyceride (㎎/dl)	HDL-cholesterol (㎎/dl)	LDL-cholesterol (㎎/dl)
Control	127 ± 7.30[z]	24.67 ± 3.93	104 ± 1.32	18.8 ± 2.52
High-cholesterol diet	248 ± 5.13	55.5 ± 4.66	94.4 ± 7.68	171 ± 2.63
HCD+PCA 25 ㎎/㎏	244 ± 4.90*	52.33 ± 1.15*	98 ± 4.30*	167 ± 6.11*
HCD+PCA 50 ㎎/㎏	232 ± 5.11**	51.66 ± 4.04*	106 ± 8.50**	162 ± 2.39**
HCD+Simvastatin 10 ㎎/㎏	126 ± 3.13**	29 ± 5.22**	120 ± 4.31**	257 ± 5.21**

[z]All values are represented as the means ± S.E.M (n = 3). $^{*}p<0.05$, $^{**}p<0.01$, compared to control.

의 투여가 오히려 LDL의 혈중 농도를 고콜레스테롤 식이대조군보다 증가시켰다. 이러한 결과와는 달리 PCA의 12주간의 장기 투여는 총콜레스테롤양과 TG 함량 변화가 유의적인 감소를 나타내기는 하지만 simvastatin에 비하여 미비한 반면에, PCA는 HDL의 농도를 올리고, LDL을 낮추는 HDL 및 LDL의 균형을 유지시키는데 크게 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 PCA가 혈중 HDL 및 LDL의 균형을 정상으로 회복시켜줌으로써 동맥경화 유발 및 심혈관계 질환에 효과를 나타낼 가능성을 제시할 뿐만 아니라, PCA가 합성의약품 simvastatin의 장기 투여에 대한 효능 및 부작용에 대하여 상호 보완요법으로 사용될 수 있을 가능성을 나타낸다.

적 요

고지혈증은 체내 지질대사에 이상이 생겨 혈중의 지질이 비정상적으로 높아진 상태로서, 지질이 필요 이상으로 혈액내 존재하게 되면 혈관벽에 쌓이고 굳어지게 되면서 동맥경화증, 고혈압, 뇌졸중 등의 심혈관계 질환을 일으키기도 한다. 본 연구에서는 고콜레스테롤 식이로 고지혈증을 유도한 생쥐의 동물모델에서 복분자 추출물의 유효성분인 protocatechuic acid (PCA)를 경구 투여하여 PCA의 간손상 보호 효과와 지질 대사함량 변화를 분석함으로써 PCA의 고지혈증 치료에 대한 유의적인 임상 효과를 제시하였다. PCA의 투여는 고콜레스테롤 식이에 의한 간무게 증가, 비장무게의 증가, 흉선의 위축, 신장의 위축 등 장기무게변화에 대하여 회복 효과를 보였고, 혈청 내 간세포 손상 마커 GPT 및 GOT의 회복 효과를 나타내었으며, 혈청 내 총콜레스테롤, 중성지방, HDL, LDL의 지질대사산물의 profile에서도 유의적인 회복효과를 보였다. 특히, PCA의 투여군에서는 혈중 HDL의 농도를 정상식이군 수준으로 높이고, LDL의 농도를 크게 낮추는 효과를 나타냄으로써 HDL/LDL의 균형유지에 역할을 나타내는 것으로 보이며 이러한 효과는 simvastatin의 HDL/LDL 조절 효과와는 다른 패턴을 보이고 있다. 따라서 PCA는 단독으로 고지혈증 치료의 기능성 소재로써의 개발 가능성뿐만 아니라, 합성의약품 simvastatin 등의 스타틴계 약물의 보조제로써의 개발 가능성을 제시한다.

사 사

본 연구는 2014년도 강원대학교 학술연구조성비로 연구하였습니다(관리번호-220140127).

References

An, S.J., U.J. Jung, M.S. Choi, C.K. Chae, G.T. Oh and Y.B. Park. 2013. Functions of monocyte chemotactic protein-3 in transgenic mice fed a high-fat, high-cholesterol diet. J. Microbiol. Biotechnol. 23:405-413.

Buja, L.M., P.T. Kovanen and D.W. Bilheimer. 1979. Cellular pathology of homozygous familial hypercholesterolemia. Am. J. Pathol. 97:327-357.

Cha, B.C., S.B. Lee, T.J. Rhim and K.H. Lee. 2000. Antioxidative and hepatoprotective effect of compounds isolated from Galla Rhois (*Rhus javanica* Linne). Korean J. Medicinal Crop Sci. 8:157-164.

Cha, B.Y. 2001. Drug therapy of dyslipidemia. J. Korean Med. Assoc. 44:772-782.

Chon, S.U. 2013. Change in polyphenol content, antioxidant activity, and antioxidant enzyme status of cowpea during germination. Korean J. Plant Res. 26:60-67.

Friedewald, W.T., R.I. Levy and D.S. Fredrickson. 1972.

Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without was of the preparative ultracentrifuge. Clin. Chem. 18:499-502.

Heinecke, J.W. 2012. The not-so-simple HDL story: A new era for quantifying HDL and cardiovascular risk?. Nat. Med. 18:1346-1347.

Ju, H.K., E.J. Cho, M.H. Jang, Y.Y. Lee, S.S. Hon, J.H. Park and S.W. Kwon. 2009. Characterization of increased phenolic compounds from fermented Bokbunja (*Rubus coreanus* Miq.) and related antioxidant activity. J. Pharm. Biomed. Anal. 49:820-827.

Jung, K.A., D. Han, E.K. Kwon, C.H. Lee and Y.E. Kim. 2007. Antifatigue effect of *Rubus coreanus* Miquel extract in mice. J. Med. Food 10:689-693.

Kim, E.J., Y.J. Lee, H.K. Shin and J.H. Park. 2005. Induction of apoptosis by the aqueous extract of Rubus coreanum in HT-29 human colon cancer cells. Nutrition 21:1141-1148.

Kim, S., C.K. Kim, K.S. Lee, J.H. Kim, H. Hwang, D. Jeoung, J. Choe, M.H. Won, H. Lee, K.S. Ha, Y.G. Kwon and Y.M. Kim. 2013. Aqueous extract of unripe Rubus coreanus fruit attenuates atherosclerosis by improving blood lipid profile and inhibiting NF-κB activation via phase II gene expression. J. Ethnopharmacol. 146:515-524.

Kwang, R.Y., J.K. Ryu and E. Lee. 2013. Biological effects of allium monanthum extracts on lipid metabolism, anti-oxidation and the production of pro-inflammatory cytokines in rats fed a high-fat diet. Korean J. Plant Res. 26:337-346.

Lee, J.H., J.B. Whang, N.R. Youn, S.Y. Lee, H.J. Lee, Y.J. Kim and K.H. Koh. 2009. Antioxidant and oxygen radical scavenging capacity of the extract of pear cactus, mulberry and Korean black raspberry fruits. J. Food Sci. Nutr. 14:188-194.

Lee, K.H. and E.M. Choi. 2006. *Rubus coreanus* Miq. extract promotes osteoblast differentiation and inhibits bone-resorbing mediators in MC3T3-E1 cells. Am. J. Chin. Med. 34:643-654.

Masella, R., C. Santangelo, M. D'Archivio, G. Li Volti, C. Giovannini and F. Galvano. 2012. Protocatechuic acid and human disease prevention: biological activities and molecular mechanisms. Curr. Med. Chem. 19:2901-2917.

Maxfield, F.R. and I. Tabas. 2005. Role of cholesterol and lipid organization in disease. Nature 438:612-621.

McGowan, M.W., J.D. Artiss, D.R. Strandbergh and B. Zak. 1983. A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. Clin. Chem. 29:538-542.

Noma, A., K. Nezu-Nakayama, M. Kita and H. Okabe. 1978. Simultaneous determination of serum cholesterolin high-and low-density lipoproteins with use of heparin, Ca2+, and an anion-exchange resin. Clin. Chem. 24:1504-1508.

Reitman, S. and S. Frankel. 1957. A colorimetric method for the determination serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases. Am. J. Clin. Pathol. 28:56-63.

Richmond, W. 1976. Use of cholesterol oxidase for assay of total and free cholesterol in serum by continuous flow anlysis. Clin. Chem. 22:1579-1588.

Scarpioni, R., M. Ricardi, V. Albertazzi and L. Melfa. 2012. Treatment of dyslipidemia in chronic kidney disease: Effectiveness and safety of statins. World J. Nephrol. 1:184-194.

Shankar, K., A. Harrell, P. Kang, R. Singhal, M.J. Ronis and T.M. Badger. 2010. Carbohydrate-responsive gene expression in the adipose tissue of rats. Endocrinology 151:153-164.

Simoens, S. and P.R. Sinnaeve. 2013. Generic atorvastatin, the Belgian statin market and the cost-effectiveness of statin therapy. Cardiovasc. Drugs Ther. 27:49-60.

Trapani, L., M. Segatto and V. Pallottini. 2012. Regulation and deregulation of cholesterol homeostasis: the liver as a metabolic “power station”. World J. Hepatol. 4:184-190.

Vitaglione, P., G. Donnarumma, A. Napolitano, F. Galvano, A. Gallo, L. Scalfi and V. Fogliano. 2007. Protocatechuic acid is the major human metabolite of cyanidin-glucosides. J. Nutr. 137:2043-2048.

(Received 3 December 2013 ; Revised 10 July 2014 ; Accepted 16 July 2014)