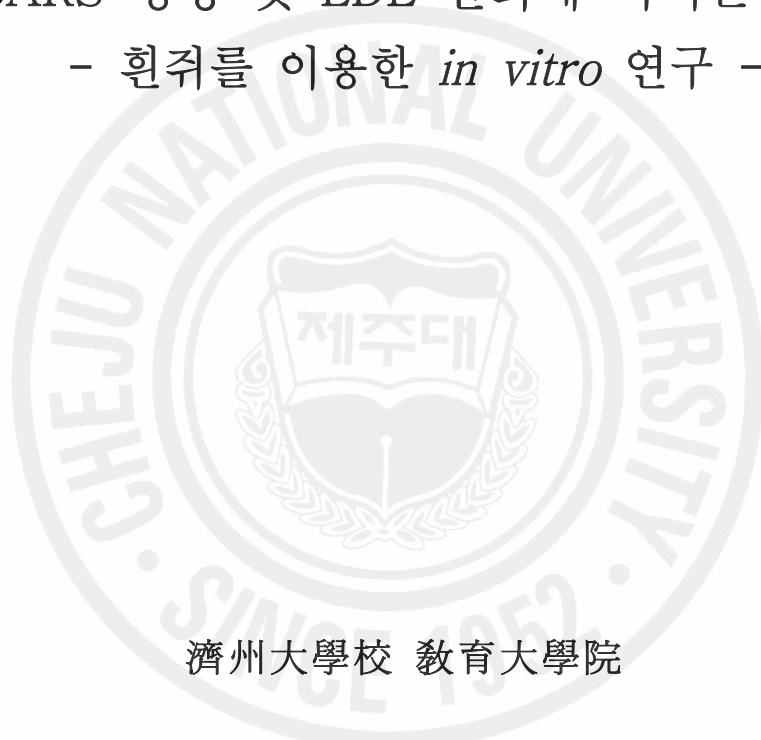


碩士學位論文

녹차, 감귤박, 손바닥 선인장 추출물이
혈소판 응집성, Hemolysis, 적혈구막의 Na-leak,
TBARS 생성 및 LDL 산화에 미치는 영향
- 흰쥐를 이용한 *in vitro* 연구 -



濟州大學校 教育大學院

營養教育專攻

金 侖 姬

2008年 2月

Effect of Green Tea, Tangerine,
Prickly pear cactus Extract on Platelet
Aggregation, Hemolysis, Erythrocyte Na-Leak,
TBARS and LDL oxidation
- In *in vitro* Study Using Rat -

Eun-Hee Kim

(Supervised by professor Jung-Sook Kang)

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER
OF EDUCATION

2008. 2

DEPARTMENT OF NUTRITION EDUCATION
GRADUATE SCHOOL OF EDUCATION
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

녹차, 감귤박, 손바닥 선인장 추출물이
혈소판 응집성, Hemolysis, 적혈구막의 Na-leak,
TBARS 생성 및 LDL 산화에 미치는 영향
- 흰쥐를 이용한 *in vitro* 연구 -

指導教授 姜晶淑

金 侏 姬

이 論文을 教育學 碩士學位 論文으로 提出함.

2008年 2月

金侏姬의 教育學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 _____ (印)

委 員 _____ (印)

委 員 _____ (印)

濟州大學校 教育大學院

2008年 2月

목 차

Abstract	iii
Lists of Table	v
Lists of Figure	vi
I. 서론	1
II. 실험재료 및 방법	15
1. 실험재료	15
1) 실험동물	
2) 재 료	
2. 실험방법	16
1) 시료수집	
(1) 혈액채취	
2) 시료분석	
(1) DPPH Radical 소거능력	
(2) 혈소판 응집	
(3) 적혈구 용혈	
(4) 적혈구막 Na-leak 측정	
가. 적혈구의 전처리	
나. Na-leak 측정	
다. Intracellular Na 측정	
(5) LDL과 PRP의 TBARS 측정	

(6) LDL Oxidation 측정	
가. LDL의 분리	
나. LDL의 산화	
다. Agarose gel electrophoresis	
3. 통계처리방법	24
III. 실험결과 및 고찰	25
1. DPPH법에 의한 추출물의 Radical 소거능의 비교	25
2. 혈소판 응집	30
3. Intracellular Na 및 Na-leak과 Hemolysis	33
4. LDL과 PRP의 TBARS 수준	37
5. LDL - Oxidation	41
IV. 결 론	44
V. 참고문헌	46
VI. 초 록	65

Abstract

Effect of Green Tea, Tangerine, Prickly pear cactus extract
on Platelet Aggregation, Hemolysis, Erythrocyte Na-Leak,
TBARS and LDL oxidation
- In *in vitro* Study Using Rat -

Eun-Hee Kim

Department of Nutrition Education, Graduate School of Education
Cheju National University

We compared the radical scavenging activity of the extracts of green tea, prickly pear cactus, tangerine pulp and vitamin E and their *invitro* effects of antioxidant on erythrocyte Na leak, platelet aggregation and TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substance) production using Sprague Dawley rats. The concentrations of extracts and vitamin E needed for scavenging radical by 50%(SC₅₀) for 0.1mM DPPH (2,2 Diphenyl 1-picryl hydrazyl) were green tea, 8.3 $\mu\text{g}/\ell$; prickly pear cactus, 875 $\mu\text{g}/\ell$; tangerine pulp, 1250 $\mu\text{g}/\ell$ and vitamin E, 7.5 $\mu\text{g}/\ell$. Vitamin E completed its scavenging activity right after addition to DPPH while extracts of prickly pear cactus and tangerine pulp had comparatively slow but long lasting scavenging activity. Platelet aggregation incubated with green tea extract was significantly decreased in the maximum and initial slope compared with other extracts or vitamin E ($p < 0.05$). Intracellular Na was significantly higher in RBC treated with extract of green tea, cactus or tangerine pulp compared with control and vitamin E. Na leak in AAPH treated erythrocyte was significantly lower

when incubated with cactus extract compared with other extracts or vitamin E. Hemolysis of AAPH treated RBC was significantly lower when incubated with vitamin E compared with control and the extracts ($p < 0.05$). TBARS production in platelet rich plasma (PRP) was significantly increased when treated with AAPH compared to the untreated PRP ($p < 0.01$) and vitamin E significantly decreased the increased TBARS production in AAPH treated PRP ($p < 0.01$). TBARS production in human LDL was somewhat increased when treated with AAPH compared with untreated LDL and vitamin E significantly decreased TBARS production in human LDL compared with all other groups ($p < 0.01$). Present study showed that green tea *in vitro* system has lowering effect of platelet aggregation without much of antioxidant effect on erythrocyte membrane stability and TBARS production. Vitamin E has a protective effect on membrane preventing lipid peroxidation and membrane damage.

Lists of Table

Table 1. SC ₅₀ concentration of extracts for 0.1mM DPPH	28
Table 2. Effects of green tea, prickly pear cactus, tangerine extract and vitamin E on platelet aggregation	32
Table 3. Effects of green tea, prickly pear cactus, tangerine extract and vitamin E on Na-leak in erythrocyte and hemolysis	36
Table 4. Effects of green tea, prickly pear cactus, tangerine extract and vitamin E on TBARS production in PRP and LDL	40

Lists of Figure

Figure 1. Model of The Mechanism of AAPH Induced Sodium Leak in Red Blood Cell	6
Figure 2. Structures of catechins	11
Figure 3. Preparation of low density lipoprotein(LDL)	23
Figure 4. Patterns of decrease in absorbance after addition of SC ₅₀ concentration of extracts to 0.1mM DPPH	29
Figure 5. LDL - Oxidation	43

I. 서 론

1980년대 이후 지속적인 경제성장에 따라 생활양식과 식생활 면에서 많은 변화를 가져왔다. 과거에 비하여 양적으로 풍성해지고 다양한 식단을 즐기게 되었으나 동시에 고칼로리, 고지방 섭취로 비만을 비롯한 심혈관계 질환, 암 그리고 노화관련 질환 등의 발병률이 높아지고 있어 사회적인 문제로 대두되고 있다.

최근 2005년 우리나라 국민의 사망 원인 통계자료¹⁾에서도 암에 이어 주요 사망원인이 뇌혈관질환, 심장질환, 고혈압, 동맥경화 등의 순환기계 질환, 당뇨병 등으로 나타나고 있어 심혈관계 질환에 의한 사망률이 높게 나타나고 있음을 알 수 있다. 동맥경화, 심근경색 및 뇌졸중과 같은 심혈관계 질환은 다른 만성질환에 비하여 식이의 영향을 많이 받는다고 알려져 있으며, 위험인자로는 혈중 콜레스테롤, 고혈압, 흡연, 당뇨 및 비만 등이 있다.²⁾ 이와 관련하여 심혈관계 질환을 유발하는 초기 단계에서 식이요인과 직·간접적으로 영향을 받게 되는 조직의 산화적 손상이 또한 주요 인자로 알려지고 있다. Mantha 등³⁾과 Del Boccio 등⁴⁾의 연구에서 과량의 식이 지방이나 콜레스테롤 섭취가 체내 조직의 산화적 손상을 초래한다고 보고된바 있으며, Touyz 등⁵⁾의 연구에서 산화적 스트레스는 활성산소의 증가로 상승되어지며 노화와 당뇨, 고혈압, 암과 같은 여러 질병의 진행에 관계한다는 사실이 알려져 있다. 또한 고콜레스테롤 상태에서 산화적 스트레스를 방어하기에는 항산화 효소의 양과 활성이 불충분하고 항산화 방어계의 불균형 또한 중요한 병인으로 작용하며 특히 심혈관계 질환 유발과 관련이 있다고 하였다.⁶⁾ 따라서 심혈관계 질환뿐만 아니라 생체조직의 산화적 손상에 의한 질병들도 앞으로 계속 증가될 것으로 보인다.

우리 생체 내에서 산소는 생명유지에 절대적으로 필요한 원소이지만 각종 물리적, 화학적, 환경적 요인 등에 의하여 반응성이 매우 큰 활성산소로 전환되면서 생체에 산화적 손상을 일으킨다. free radical이라고 일컫는 활성산소(reactive oxygen species)는 최외곽에 쌍을 이루지 못한 전자가 존재하여 주변 물질로부터 전자를 빼앗아 안정화 하려는 성질이 있는 고반응성의 산소 화합물로서, 유산

소 호흡을 하는 모든 생물에서 필연적으로 발생하며, 일반적인 대사 과정에서 1~5% 정도의 산소가 불완전하게 환원되어 발생하기도 한다. 그 종류에는 Superoxide($\cdot O_2^-$), hydrogen peroxide(H_2O_2), singlet oxygen(1O_2), hydroxyl radical($\cdot OH$), peroxy radical($RO\cdot$)과 같은 활성산소와 peroxinitrite($ONOO^-$), NO 등의 활성질소(reactive nitrogen species, RNS)가 있다.⁷⁾ 뿐만 아니라 많은 실험연구에서 2,2'-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)를 사용하여 인위적인 산화적 스트레스를 조성하였다. AAPH는 물에 녹는 azo화합물(water-soluble azo compound)로서 열성분해에 의해서 자유기를 생성시킨다. 또한 산소 분자와 반응하여 AAPH로부터 생성된 탄소 자유기(carbon radical)는 peroxy radical을 생성하고 이들은 다양한 생물학적 분자와 물리화학적 변질을 유발하여 생체막의 구조를 해체 시킨다.⁸⁾ Terao의 연구에서 AAPH는 간손상을 일으키는 산화 개시제로 작용하고, 생리적 온도에서 열 분해시 일정속도로 peroxy radical($ROO\cdot$)을 형성하여 *in vivo*상에서 미토콘드리아의 팽윤과 미소혈관의 지질변성을 일으키는 것으로 보고되었다.⁹⁾

이와 같이 우리 생체 내에서 유해한 활성산소들은 체내 방어기전에 의해 대부분 제거되지만 그렇지 못할 경우 생체분자들과 빠르게 반응하여 세포사(apoptosis)와 같은 세포손상을 초래하고, 생체막의 구조를 변성시킬 뿐만 아니라 세포막과 핵산의 주성분인 당질, 지질, 단백질 및 DNA와 같은 분자들을 과산화시키며, 세포 내로 확산되거나 혈류를 통해 이동된 지질 과산화물은 새로운 radical reaction을 촉진시켜 각종 만성질환과 노화의 원인으로 작용한다.^{7,10)} 따라서 최근에는 산화적 손상을 감소시켜 노화와 여러 가지 만성 질병을 예방하고자 하는 노력이 증대되고 있고 이와 관련하여 항산화제에 대한 관심과 많은 연구들이 집중되고 있다.

이처럼 조직의 산화적 손상은 생체 내 과잉의 free radical이 축적될 때 일어나며 정상적인 생리 상태에서는 생체 내 항산화 방어계와 생성계가 균형을 이루고 있으므로 free radical의 제거가 원만히 이루어진다. 그러나 당뇨병과 같은 질병 상태에서는 산화적 스트레스 및 기타 여러 가지 요인들에 의해 항산화 방어계와 생성계의 균형이 깨뜨려 졌을 때 free radical 생성이 촉진되고 나아가 조직은 과산화적 손상을 입게 된다. 우리 생체 내에는 이러한 과잉의 free radical로부터

세포막과 세포 내의 물질을 보호하는 효소적, 비효소적 항산화 시스템이 존재한다.¹¹⁾ 항산화 시스템에 속하는 항산화 효소에는 catalase(CAT), superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GSH-Px)와 같은 효소 등이 알려져 있으며^{12,13)} 항산화 효소는 과산화물 생성과정의 시작물질인 superoxide anion radical을 제거하고 hydroxyl radical의 생성을 막아서 과산화적 손상으로부터 세포를 보호한다.^{12,14)} 비효소적 항산화 시스템에는 항산화 효소 이외에 vitamin A, C, E, β -carotene 등의 항산화 비타민들과 구리, 아연, 망간, 셀레늄 등의 무기질 등이 있다. 이 외에도 최근에는 천연항산화제에 대한 관심이 점차 증대 되어 α -tocopherol, β -carotene, α -carotene, lycopene, cryptoxanthin, retinoides, ubiquinol 및 polyphenol, flavonoid 등의 성분이 항산화 물질로서 생체내 oxid LDL의 생성을 억제하는 것으로 알려져 있다.^{15,16)} 이 중에서도 특히 flavonoid 및 그 유도체가 강한 항산화 작용이 있는 것으로 알려져 항산화제로서 많은 관심이 집중되고 있다.

Flavonoids는 과일, 야채, 견과류, 식물의 뿌리, 줄기, 껍질, 차, 커피, 포도주 등에 널리 분포되어 있는 천연물질로서, 담황색 또는 노란색을 띠는 색소화합물로 일일 섭취량은 0.023~1.1g으로 알려져 있다.^{17,18)} phytochemicals의 일종인 flavonoids류는 화학적 구조에 따라 flavonols, flavones, flavanones, catechins, anthocyanidins, isoflavones, dihydroflavonols, chalcones 등으로 분류된다.¹⁸⁾ flavonoids류의 일반적인 구조는 두개의 aromatic ring들이 oxygenated heterocycle을 형성하는 세 개의 탄소로 연결된 diphenylpropanes($C_6-C_3-C_6$)structure를 갖는 benzo- γ -pyrone의 유도체로서,^{19,20)} Flavonoid류가 과산화지질의 생성을 효과적으로 억제하기 위해서는 구조적으로 C ring의 C-3위치에 -OH가 존재하여야 하고, C ring의 C-2와 C-3사이에 이중결합이 있어야 하며²¹⁾, A와 B ring의 -OH의 수가 4개 이상이어야 하고²²⁾, rhamnose, glucose, rutinose 등의 당과 결합된 배당체(glycoside)형태로 존재하여야 한다고 알려져 있다.²³⁾ 따라서 이러한 flavonoids의 화학적 구조는 그들의 생화학적 활성에 영향을 미친다.

사람이 매일 식품을 통해 flavonoids를 섭취하고 있으나 흡수와 대사 등의 기전에 대해서는 아직 확실하게 밝혀져 있지는 않다. 그러나 bioflavonoid의 항산화적 활성을 뒷받침하는 역학조사^{24,25)}와 *in vitro* 연구²⁶⁻³³⁾는 많이 행해져 왔다. 소

위 French paradox라 일컫는 바와 같이 불란서인들이 섭취하는 wine 등의 alcohol 섭취 수준이 coronary heart disease(CHD)의 위험을 낮추어준다는 연구 결과²⁴⁾와 flavonols의 섭취 수준과 CHD 사망률 사이에는 역관계가 존재한다는 역학 조사 결과²⁵⁾들이 발표되어 관심의 대상이 되었고, *in vitro* 연구에서는 flavonoids가 지질 과산화²⁶⁾, low density lipoprotein의 산화 억제²⁷⁾, 혈소판 응집 억제²⁸⁾ 등의 결과들이 보고되어 있다. 이러한 flavonoids는 *in vitro* 연구를 통해 hydroxyl radical, superoxide anion radical, peroxy radical과 peroxy nitrite의 scavenging²⁹⁻³¹⁾할 뿐만 아니라 Fe와 Cu를 chelating하고³²⁾ free radical의 생성을 억제시키며, 생성된 free radical을 포착하여 radical chain reaction을 지연시키고, 항산화 효소의 활성을 증가시킴으로써 각종 산화적 스트레스로부터 생체 조직을 보호하는 것으로 알려져 있다.³³⁾

DPPH는 radical에 대한 소거 활성 능력을 알아보는 방법으로 화학적으로 안정화된 free radical을 가지고 있는 수용성 물질로 항산화 활성이 있는 물질과 만나면 전자를 내어주면서 라디칼이 소멸되고 색깔이 변한다. DPPH는 여러 종의 항산화 성분이 내재된 추출물 등의 항산화 효과를 분석할 수 있는 방법으로 radical 소거 활성이 높다는 것은 항산화능이 높다는 것을 뜻한다.

Morel 등³²⁾의 연구에서 flavonoids의 radical 소거 활성이 catechin > Quercetin > diosmetin 순으로 나타나 녹차의 주요 활성 성분인 catechin의 항산화능이 가장 높을 것으로 생각되어지며, Saito 등³⁴⁾의 연구에 의하면 녹차 추출물의 항산화 활성은 EGCG(epigallocatechin gallate)와 ECG(epicatechin gallate)의 구성 성분과 밀접한 상호관련이 있다고 하였고, Nada 등³⁵⁾은 녹차 추출물의 hydroxyl radical과 superoxide anion scavenging 효과에 대해 보고한 바 있다. 우리나라 고유 과실인 감귤과 유자 과피내의 주된 flavonoids는 hesperidin과 naringin으로 hesperidin의 DPPH 수준은 Trolox와 유사하게 높은 것으로 나타나 hydrogen peroxide에 의해 야기되는 산화적 손상으로부터 세포내 강한 항산화제 역할을 한다고 보고되었다.³⁶⁾ Butera 등³⁷⁾은 손바닥 선인장으로부터 추출한 betanin과 indicaxanthin의 scavenging 활성은 trolox보다 더 효과적이었다고 하였으며, 이 경석 등³⁸⁾의 연구에서 70% 에탄올에서의 천년초 선인장 추출물은 상업용인 BHA와 α -tocopherol에 견줄만한 항산화 활성을 보여주었다. 이러한 여러 연구

결과들과 같이 녹차, 감귤박, 손바닥 선인장의 주요성분은 flavonoids의 한 종류로 free radical 소거 능력을 가지고 있으므로 생체 내에 항산화 물질로 작용하여 지질과산화 억제 또는 세포막의 안정성을 제공해 줄 수 있을 것이라 여겨진다.

생체 내의 free radical로부터 산화적 손상을 쉽게 받을 수 있는 것이 세포막이다. 세포막은 세포 구조와 기능에 가장 중요한 역할을 하며, 인지질과 단백질을 주요 구성성분으로 이루어져 있고, 지질의 이중막 구조로 되어있으며 여기에 단백질이 결합되어 있다. 그 밖의 지질성분으로는 콜레스테롤과 비타민 E로 구성되어 있는데 세포막 지질 내에 함유되어 있는 불포화 지방산은 free radical에 의해 쉽게 공격을 받아 radical 연쇄반응을 일으킴으로써 과산화 지질을 생성한다고 알려져 있다. 따라서 우리 생체 내 조직의 전반적인 항산화 상태의 척도가 되는 것이 적혈구 막의 용혈현상(hemolysis)으로서 적혈구 막의 지질과산화 반응은 적혈구 막의 안정성과 기능에 크게 영향을 미친다.

사람의 세포에서 Na의 이동은 Na-K ATPase, Na-K cotransport, Na-Li counter transport 그리고 Na-passive transport 이 4종류의 channel에 의해 이루어진다. 이 중 Na-passive transport는 사람의 적혈구 또는 백혈구 세포에서 Na-K ATPase 와 Na-K cotransport를 통해 나오는 Na efflux를 차단한 상태에서 흘러나오는 Na량을 말한다. 수용성 물질인 AAPH를 저농도로 세포에 처리하면 세포막 안으로 들어가서 강력한 산화력을 가진 peroxy radical(AOO⁻)을 생성하여 세포막 지질층을 산화시킨다고 알려져 있다.³⁹⁾ 그러므로 AAPH로 처리된 적혈구의 경우 Na efflux는 증가하게 된다. 따라서 적혈구 막의 항산화 기능이 떨어진 경우 막의 안정성이 떨어져 AAPH 처리에 의한 peroxy radical의 영향을 받아 적혈구의 Na-leak은 증가하게 된다 <Figure 1>.

세포막 인지질의 과산화를 억제하는 항산화 물질은 oxygen radicals에 의해 유도되는 병리학적 현상들을 예방하는 약리학적 효과들을 발휘한다. Wiseman의 연구⁴⁰⁾에 의하면 적포도주, 녹차, 양파 등에 많이 함유된 quercetin과 myricetin같은 flavonoids는 세포막 지질과산화를 억제한다고 알려져 있으며, Ferrali 등⁴¹⁾은 Glutathione이 고갈된 mouse의 적혈구를 산화제와 배양시켰을 때 quercetin 첨가는 Fe⁺⁺을 chelate함으로써 지질과산화와 용혈로부터 세포를 보호한다고 하였다.

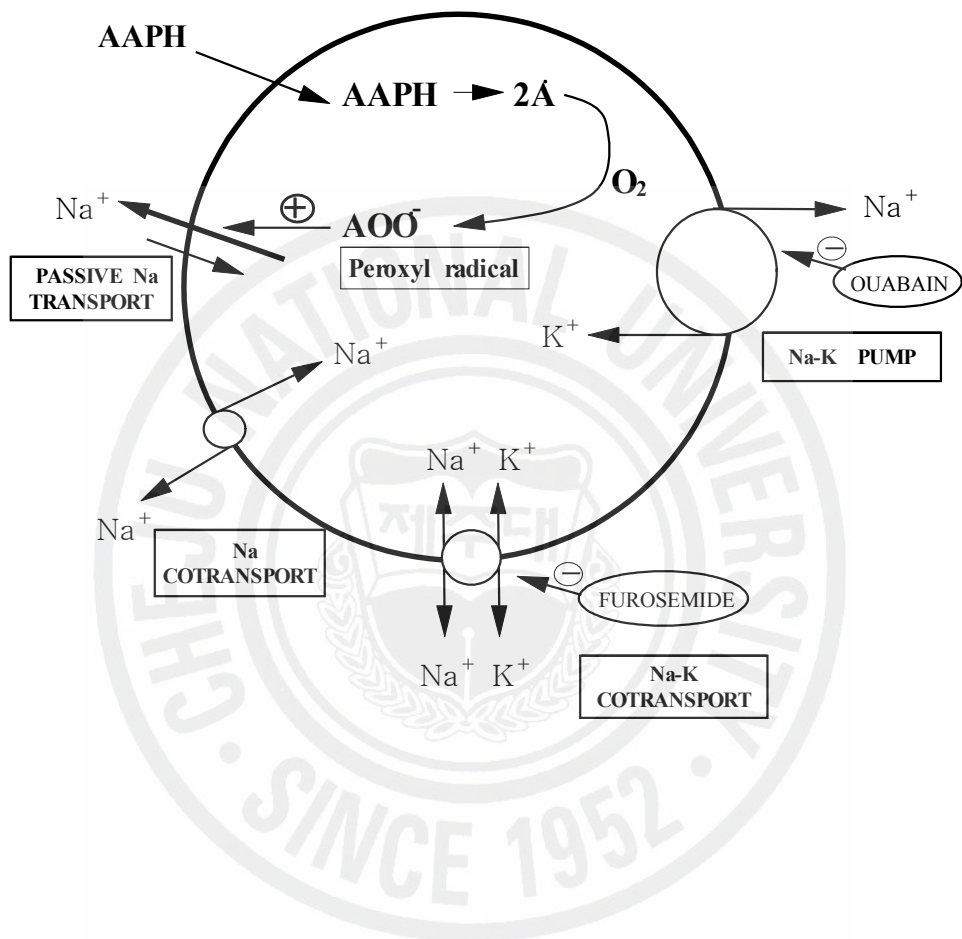


Figure 1. Model of The Mechanism of AAPH Induced Sodium Leak in Red Blood Cell

감골에 존재하는 flavanones인 hesperidin은 모세혈관의 투과성을 유지하는데 필요한 물질로 알려져 있으며,⁴²⁾ Burrer 등⁴³⁾은 손바닥 선인장으로부터 분리한 주요 flavonoids가 quercetin과 kaempferol이었다고 보고하였다. Junji 등⁴⁴⁾의 연구에서 flavonoids는 세포막 표면 친수성부분에 존재하면서 지질과산화 초기단계에서 oxygen radical을 소거하고, 세포막에서 항산화작용을 하는 α -tocopherol의 소모를 막아주어 세포막에 긍정적 영향을 보여주었다. 또한 강력한 항산화제인 V비타민 E는 생체 활성이 가장 큰 물질로 세포막에 존재하면서 과산화로 인해 세포막이 손상되는 것을 막아주는 1차 방어선으로서 free radical을 제거해 주며 연쇄 반응을 종결시키고 세포막의 제한된 부위에 손상을 한정시켜 주는 역할을 함으로써 생체 조직의 지질을 가장 잘 보호한다.⁴⁵⁾

심혈관계 질환은 혈액의 흐름과 밀접한 관계가 있는데 혈액 응고의 의한 혈전생성과 LDL 산화가 혈액의 흐름을 막는 원인이 된다고 알려져 있다.

혈소판은 혈액 중에 있는 원판상의 무핵 세포로서 분비성 입자들을 다량 함유하고 있는데, 정상적인 혈관 내막세포의 표면에는 혈전이 형성되기 어렵지만, 손상된 내막세포에서는 collagen이 외부로 노출되어 혈장 혈소판이 내막에 부착하게 된다. 여기에 혈소판 활성 물질인 collagen이 혈소판 수용체에 부착하면 혈소판의 형태가 변화되는 1차 응집이 일어나고, 뒤이어 혈소판내의 치밀과립(dense granule)에서 내인성 ADP가 분비되는데, 이 ADP가 혈소판의 강력한 2차 응집을 일으킨다. 또한 혈소판의 막 인지질에 존재하는 arachidonic acid가 cyclooxygenase에 의해 prostaglandin(PG)₂와 PGH₂로 전환된 후 thromboxane synthetase의 작용으로 TXA₂(thromboxane A₂)로 생성, 방출되어 혈소판 수용체에 결합함으로써 혈소판을 더욱 활성화시켜 혈소판의 응집을 촉진하고 강력한 혈관수축 작용을 한다.⁴⁶⁾ 이와 같은 기전에 의해 혈소판은 혈관 벽에 상처가 생겼을 때 신속히 응집됨으로써 혈액유실을 방지하는 기능을 한다. 그러나 혈소판이 비정상적으로 활성화 되는 경우 혈전 형성을 초래하여 혈관 내에서 혈액의 흐름을 방해함으로써 병적인 혈전증을 일으킨다. 따라서 과도한 혈소판 응집은 혈전증의 원인이 되는 것은 물론 폐쇄성 혈관질환인 동맥경화증, 심근경색, 협심증, 당뇨병과 고혈압 등의 요인이 되기도 한다.⁴⁷⁾ 혈소판의 활성화를 유도하는 혈소판 응집유도물질(agonist)에는 ADP, epinephrine, collagen 등이 있으며,^{48,49)} 이러한 혈소판 응집

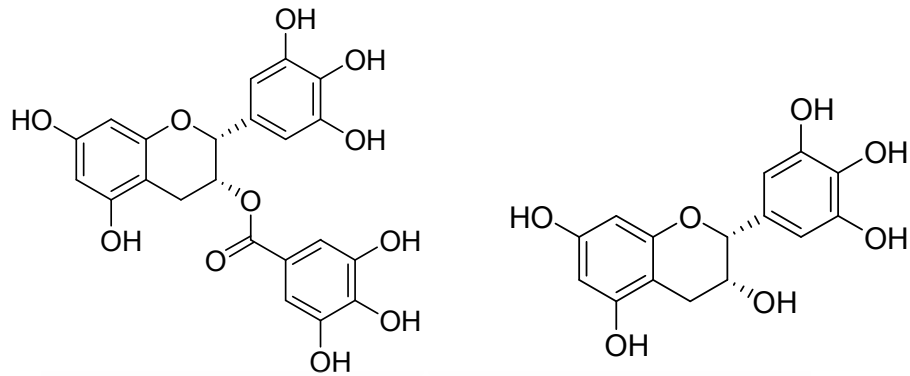
유도물질에 의한 응집 실험은 전혈(whole blood)이나 PRP(platelet rich plasma)에서 이루어지며, 여기에서 나타나는 결과는 생체 내에서 일어나는 응집을 반영한다 할 수 있다.⁵⁰⁾ 여러 연구에서 flavonoids의 혈소판 응집 억제 효과가 보고되었다. 적절한 양의 적포도주 섭취는 혈소판 응집을 감소시키고, 관상심장질환을 예방한다고 보고하였으며,²⁴⁾ Nevia등⁵¹⁾의 연구에서 녹차 카테킨의 혈소판 보호 작용과 과산화지질 생성 억제효과를 보였고, 녹차의 생리활성을 갖는 여러 종류의 카테킨 중 EGCG가 가장 강력한 혈소판 응집 억제 효과^{52,53)}가 있는 것으로 나타났다. 또한 손바닥 선인장 섭취로 인해 혈소판 응집억제 효과가 있었다는 보고가 있으며⁵⁴⁾, 감귤과피에 함유하고 있는 hesperidin과 같은 flavonoids가 혈소판 응집 억제 역할을 한다는 것이 밝혀지고 있다.²⁸⁾ 혈소판 응집에 대한 flavonoids의 억제 효과는 혈소판에서 arachidonic acid 대사와 thromboxane 생성 등과 관련되며, 특히 cyclooxygenase와 lipoxygenase의 활성을 저해함으로써 혈소판의 응집을 억제한다고 한다. flavonoids가 혈소판의 기능과 관련된 여러 경로에 영향을 미쳐 항응집 효과를 나타내는 것으로 관상 심장질환, 동맥경화, 혈전증, 고혈압 등을 예방하는 것으로 알려져 있다.²⁸⁾

정상적인 LDL은 oxygen free radical에 쉽게 산화되며 산화 LDL은 초기 동맥경화의 주요 유발인자임이 보고되었다.⁵⁵⁾ 심혈관계 질환의 주요 원인이 되는 동맥경화증은 혈관 벽 평활근세포의 증식에 의한 내막의 비대화와 혈액의 콜레스테롤 양과 관계가 깊다. 특히 혈청중의 LDL의 양이 많아지면 LDL을 받아들이는 수용체가 부족하거나 결핍되어 LDL이 혈중에 축적되어 산화 LDL이 생성된다. LDL은 혈관 내피세포의 lipoxygenase, 대식세포에서 생성되는 superoxide radical 식품을 통하여 들어온 과산화 지질에 의하여 산화된다. 산화된 LDL은 cholesterol ester로 변하고 macrophage 및 동맥의 내피세포에 축적되어 foam cell을 형성하는데 이 과정에서 일부세포는 사멸되고 foam cell이 점차 많아지면서 지방층이 동맥부위에 쌓여 동맥경화가 일어나게 된다.⁵⁶⁾ 이러한 거대 foam cell의 생성원인의 가장 중요 인자는 산화 LDL 이라고 하였다.⁵⁷⁾ 산화적 스트레스에 의해 생성된 산화 LDL은 높은 세포 독성이 있는 지질 과산화물을 가지고 있어서 세포 조직에 확산되어 독성을 나타내고 내피세포에 염증을 일으켜 동맥경화를 일으키게 된다.^{58,59)} TBARS(Thiobarbituric Acid Reactive Substance)는

지질과산화 생성물질중의 하나로서 산화 LDL과 같은 지질과산화 지표로서 많이 이용되고 있다. 생체막의 주요 구성 성분인 다중 불포화지방산이나 체내 각종 지질은 활성 산소에 의해 TBARS와 같은 과산화지질물로 전환되어 세포에 대한 산화적 손상을 유발하고 각종 기능장애를 야기함으로써 노화와 질병의 원인이 되고 있다.⁶⁰⁾ 따라서 동맥경화와 같은 심혈관계 질환 및 노화를 예방하기 위해서는 LDL의 산화를 방지하는 것이 가장 중요하다. Frankel 등⁶¹⁾은 적포도주의 phenolic compound가 구리에 의해 촉진된 LDL 산화를 억제하는데 효과적이었다고 하였으며, Yoshida 등⁶²⁾은 차의 flavonoids가 세포내의 superoxide 생성을 감소시키고 Fe⁺⁺을 킬레이트화해서 macrophage와 endothelial cell에 의한 LDL 산화를 효과적으로 억제하였다고 보고 하였다. Naderi 등⁶³⁾의 *in vitro* 연구에서 flavonoids는 유의적으로 LDL 산화를 억제하였고, flavonoids중에서 genistein, morin 그리고 naringin은 biochanin A, apigenin 보다 강력한 LDL 산화 억제 효과를 나타내어 flavonoids가 동맥경화를 예방하는데 중요한 요인으로 작용할 것이라고 보고 하였다.

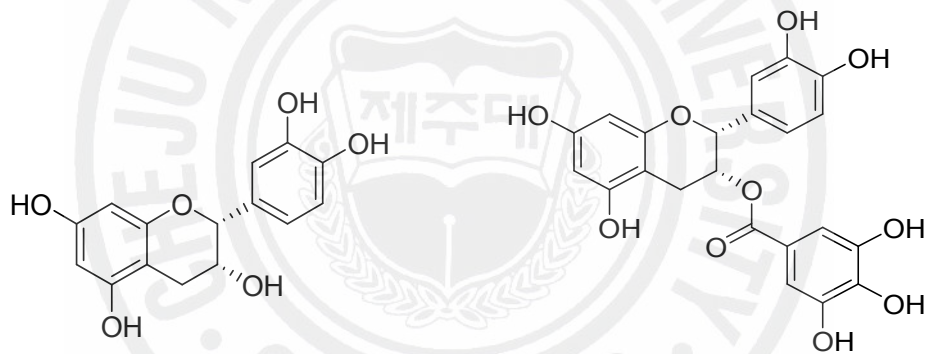
녹차(*Camellia Sinensis* O. Ktze)는 커피, 코코아와 함께 널리 애용되고 있는 비알코올성 기호음료일 뿐만 아니라 식용유지 및 식품의 보존에도 일부 사용되고 있다.⁶⁴⁾ 녹차는 *Camellia* 속으로 90여종이 있으며 현재 많이 음용되는 중국종은 *Camellia sinensis* var. *Sinensis*이고, 아삼종은 *Camellia sinensis* var. *Assamica*로 불려지고 있다.⁶⁵⁾ 우리나라에 차가 처음 들어온 시기는 신라 27대 선덕여왕(AD 632-647)때이며, 그로부터 200년 후인 42대 흥덕왕 3년(AD 828)에 의해 차를 경남 지리산에 심어 음용하기 시작하였다.⁶⁵⁾ 녹차는 머리를 맑게 해주고 오장의 기를 돋우어 주고, 간을 강하게 하며 열을 내리고 체내의 노폐물을 빨리 씻어주며, 소화 작용 및 갈증을 해소하는 약효가 있다고 전해진다.⁶⁵⁾ 녹차의 함유성분 중 flavonoids류에는 catechin, quercetin, myricetin, kaempferol등이 알려져 있고, 그 중에서도 항산화 활성으로 잘 알려져 있는 Catechin류에는 (+)catechin(C), (-)epicatechin(EC), (+)epigallocatechin(EGC), (-)epicatechin gallate(ECG), (-)epigallocatechin-3-gallate(EGCG)등이 있으며 상대적 양은 EGCG (58%) > EGC (12%) > EC (6.6%) > GCG (1.6%) > ECG(0.5%) > Caffeine (0.4%)의 순서이다.⁶⁶⁾ 녹차 한잔 중에는 100mg 내외의 catechin이 함유되어 있는 것으로 알려져 있

다.⁶⁷⁾ 녹차는 역학조사 결과에서 녹차를 음용하는 사람은 비음용자에 비해 관상동맥 질환의 위험이 감소된다는 보고가 있으며,⁶⁸⁾ Yamaguchi 등⁶⁹⁾은 동물실험에서 녹차가 농도 의존적으로 혈중 콜레스테롤 저하 효과를 나타내었으며, *in vivo* 실험에서 녹차의 섭취가 혈중 콜레스테롤 및 중성지방을 감소시키고, HDL-콜레스테롤은 증가시킴으로써 동맥경화를 줄일 수 있는 가능성을 반영하고 있다고 하였다.⁷⁰⁾ 또한 Yang⁷¹⁾ 등은 녹차의 혈중 콜레스테롤 저하효과가 녹차에 다량 함유되어 있는 (-)epicatechin gallate(ECG)와 (-)epigallocatechin gallate(EGCG)의 작용에 의한 것임을 보고하였다. Nada 등³⁵⁾은 녹차추출물의 hydroxyl radical과 superoxide anion 소거능 등을 보았으며, Navia 등⁵¹⁾의 녹차 카테킨에 의한 혈소판 보호 작용 및 운여표 등⁷²⁾의 항 혈전 효과가 있는 것으로 보고되었다. Zhang 등⁷³⁾은 tea catechins이 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)에 의한 적혈구막의 용혈에 대한 효과를 나타내었으며, 녹차 폴리페놀들이 기존의 항산화제들보다 LDL 산화에 더 강력하게 억제효과를 나타내었다는 Zhu 등⁷⁴⁾의 연구 결과도 보고되었다. 이영자 등⁷⁵⁾의 연구에서는 메탄올, 에탄올, 에틸아세테이트 등의 용매별 녹차 추출물 모두에서 기존 항산화제인 BHT, α -tocopherol보다 좋은 항산화 효과를 보였다고 하였다. 또한 녹차 카테킨은 심혈관질환의 기질 형성단계에 관여하는 것으로 알려진 LDL 산화를 억제시키는 기능을 갖고 있는 것으로 보고된 바 있다.⁷⁶⁾



Epigallocatechin gallate [ECGC]

Epigallocatechin [EGC]



Epicatechin [EC]

Epicatechin gallate [ECG]

Figure 2. Structures of catechins.

예로부터 건조시킨 감귤과피를 진피(*Aurantii nobilis pericarpium*)라고 하여 한약재로 사용되어 왔으며, carotenoids, bioflavonoids, pectin, peel oil 및 terpenes가 풍부하게 함유되어 있고,⁷⁷⁾ 천연에서 발견되고 있는 약 300여종의 carotenoids계 색소 중 115종이 감귤에 존재한다.⁷⁸⁾ 감귤과피의 주요 carotenoids로는 β -carotene과 cryptoxanthin을 비롯한 β -citraurin이 있다.⁷⁸⁾ 은종방 등⁷⁹⁾의 flavonoids 함량조사에서 hesperidin과 naringin이 주된 flavonoids로 밝혀졌고, 그 함량은 hesperidin과 naringin이 각각 38.90 mg/100g, 10.77 mg/100g이었다. 손홍수 등⁸⁰⁾은 감귤과피의 hesperidin은 모세혈관의 수축을 촉진시켜 혈압을 강하하여 고혈압을 예방한다고 보고하였으며, Monforte 등⁸¹⁾은 hesperidin을 첨가한 식이 섭취 시 지질 저하 효과가 있었다. Bok 등⁸²⁾의 연구에서 naringin은 혈액 내 LDL콜레스테롤의 함량을 감소시키는 효과가 있다고 하였다. Rapavi E 등⁸³⁾은 Wistar albino rats에 고지방 식이와 diosmin(450 mg/kg)과 hesperidin(50 mg/kg)의 공급으로 대조군에 비해 간의 TBARS 생성 수준을 감소시켜 간 지질의 개선 효과가 있었다고 하였으며, 손정숙 등⁴²⁾의 in vivo 연구에서 hesperidin과 naringin을 각각 0.25, 0.50, 1.0% 수준으로 식이를 섭취시켰을 때 naringin은 0.5, 1.0%수준으로 식이 내에 첨가된 경우 혈장에서의 TBARS 생성 수준을 유의적으로 감소시켰으며, hesperidin은 식이 내 0.25, 0.5, 1.00% 수준 모두에서 간의 TBARS 생성 수준을 유의적으로 감소시켰다고 보고되었다. 또한 hesperidin을 식이 내 1.0%수준으로 첨가시켰을 때 적혈구와 간에 존재하는 항산화계 효소인 CAT, SOD 및 GSH-Px의 활성이 모두 높아지는 경향을 보였다고 하였다. Jin YR 등⁸⁴⁾의 hesperidin에 의한 혈소판 응집 억제효과, Maridonneau-Parini 등⁸⁵⁾의 naringin이 세포막의 지질 과산화를 효과적으로 억제했다고 보고하였으며, Jeon 등⁸⁶⁾의 0.02%의 naringenin의 공급으로 인한 과산화지질 생성 억제 효과 및 SOD와 GSH-Px의 활성을 유의적으로 증가시켜 항산화 효과를 나타내었고, Santus 등⁸⁷⁾의 flavone diosmin 90%와 flavonone hesperidin 10%로 구성된 Daflon 자외선에 의해 유도된 지질과산화와 plasma membrane 손상을 억제하여 TBARS 수준을 낮추어 주었다고 하였고, Han 등⁸⁸⁾의 naringin의 항균 작용 등 이들의 생리 활성이 보고되고 있다.

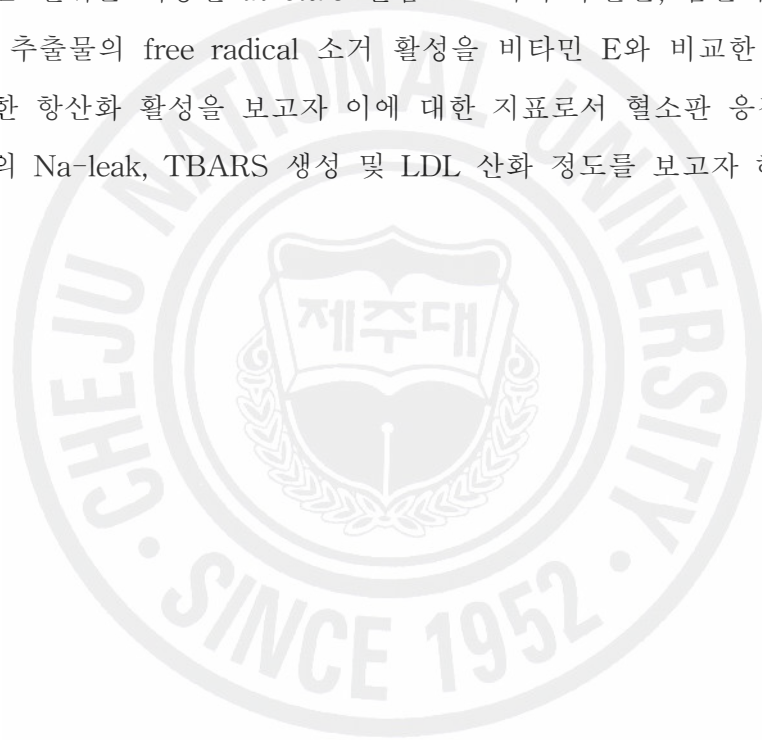
‘백년초’라고도 불리는 손바닥 선인장(*Opuntia ficus-indica var. saboten*)은 맥

시코가 원산지인 다년생 식물로 우리나라의 제주도 등지에서 자생하고 있는 귀화식물이다.⁸⁹⁾ 제주에서 특용작물로 재배되는 손바닥선인장은 다양한 형태의 기호식품으로 개발되어 시판되고 있으며 손바닥선인장 열매의 성분 분석 결과 조단백질 4.24%, 조지방 1.35%, 조섬유 3.79%, 조회분 12.12%이며 이외에 비타민 C와 여러 무기질(Ca, P, Mg 등) 그리고 polyphenol 3~5%, 플라보노이드 1~1.5%를 함유하고 있다고 한다. 선인장 점액질 중의 다당류 함량은 1.8%로 그 구성성분인 mannose는 208mg%이다.⁹⁰⁾ 손바닥선인장의 열매는 서양배 같은 모양으로 적색의 betaine를 함유하고 있으며 항산화 활성을 가진다고 하였다. betaine 색소는 적색의 betacyanines과 황색의 betaxanthines으로 구성되어 있으며 적색 비트에 함유된 betacyanine의 75~95%는 betanine으로 알려져 있다.⁹¹⁾ 현재까지 손바닥 선인장에 함유되어 있는 성분에 대해 알려진 것은 당류 외 flavonoid계 성분으로 isorhamnetin, quercetin, kaempferol 등이 있으며, 최근에는 trans-dihydrokaempferol, trans-dihydroquercetin이 보고⁴³⁾되었고, 이외에 anhalinin, indicaxanthin, isobetain, saponin 등이 있다.⁹²⁾

한방에서는 선인장의 뿌리와 줄기를 약으로 사용하며, 이질, 치질, 해수, 인후통, 폐옹, 유옹, 정창, 화상 등의 치료에 이용되고 있다.⁹³⁾ 특히 우리나라에서는 오래 전부터 변비치료, 이뇨효과, 장운동의 활성화 그리고 식욕증진의 목적으로 선인장의 열매 및 줄기를 사용하여 왔고, 특히 줄기는 피부질환, 류마티스 및 화상치료에 민간요법으로 사용되었다. 이처럼 다양한 효능을 가진 손바닥선인장의 약리작용에 대한 연구 결과로는 Wolfram R 등⁹⁴⁾의 손바닥 선인장 섭취로 혈소판 응집억제 효과가 있었다는 보고가 있으며, Fernandez 등⁹⁵⁾의 고콜레스테롤 혈증을 일으킨 guinea pig에 손바닥 선인장을 공급시켰을 때 펙틴 성분에 의한 혈중 LDL 농도의 감소 효과가 있다는 연구 결과가 보고되었다. 또한 Oh PS 등⁹⁶⁾의 연구에서 손바닥 선인장이 활성산소종(reactive oxygen species : ROS)의 생성을 억제함으로써 지질과산화 생성을 억제하여 혈장 내 지질수준을 감소시켰다고 하였다. Li 등⁹⁷⁾ in vivo 연구에서 선인장 분말 섭취가 대조군에 비해 혈청 TBARS 수준의 감소를 보였으며, SOD의 활성을 높여 고지혈증 쥐에 있어 혈청 지질수준 개선 효과를 볼 수 있었다고 하였고, 이남호 등⁸⁹⁾의 연구에서는 DPPH방법에 의해 손바닥 선인장의 라디칼 소거 활성 측정결과 선인장 줄기의

메탄올 추출물에서 가장 강한 항산화 활성이 나타났으며 이는 선인장에 포함되어 있는 페놀계 물질일 가능성이 있다고 하였다. 이 외에도 손바닥 선인장의 혈중 콜레스테롤 저하 효과,^{98,99)} Palumbo¹⁰⁰⁾의 간의 cholesterol 저하효과, Qiu 등¹⁰¹⁾의 radical scavenging 효과, Tesoriere 등¹⁰²⁾의 항산화 효과, Laurenz과 Shin 등^{103,104)}의 혈당강하 효과, Lee 등¹⁰⁵⁾의 항궤양작용, 항염증 및 항균효과,^{106,107)} 붉은 열매에서 추출한 베타닌 색소의 안전성에 관한 연구¹⁰⁸⁾등 손바닥 선인장은 혈장 내 지질 개선효과 및 항산화 효과 외에도 다양한 효능을 갖고 있는 것으로 보인다.

본 연구는 흰쥐를 이용한 *in vitro* 실험으로 녹차 추출물, 감귤박 추출물, 손바닥 선인장 추출물의 free radical 소거 활성을 비타민 E와 비교한 후 각각의 추출물의 대한 항산화 활성을 보고자 이에 대한 지표로서 혈소판 응집, Hemolysis, 적혈구 막의 Na-leak, TBARS 생성 및 LDL 산화 정도를 보고자 하였다.



II. 실험재료 및 방법

1. 실험재료

1) 실험동물

본 실험은 생후 10~14주 전후의 Sprague Dawley 숫쥐를 이용하여 *in vitro* 실험을 하였으며, 실험기간 동안 다음과 같은 환경에서 동물을 사육 하였다. 동물 사육실의 명암주기는 1일 12시간, 온도 20~25℃와 습도 40~60%를 일정하게 유지되도록 조절하였으며, 실험기간동안 물은 무제한으로 공급하였고 식이는 흰 쥐용 고형사료로 무제한 공급하였다.

2) 재 료

녹차, 손바닥 선인장, 감귤박 추출물이 혈소판 응집, Hemolysis, Na-leak, TBARS 생성 및 LDL 산화에 미치는 영향을 알아보기 위해 흰쥐를 이용한 *in vitro* 실험을 하였다. 이에 필요한 시료는 다음과 같이 구입하여 추출하였다. 녹차는 태평양 제주 녹차박물관내 연구소에서 2006년도 봄에 채취하여 건조된 신선한 녹차분말을 구입하여 실험실에서 사용하였으며, 손바닥 선인장 분말 및 감귤박 분말은 제주 농업 기술 연구 센터에서 구입하여 사용하였다. 녹차, 손바닥 선인장 및 감귤박 추출물은 위의 시료 각각의 분말을 70% 에탄올에 3번 추출하고 진공 농축한 것을 실험에 이용하였으며, 위의 세가지 추출물을 에탄올, 메탄올, DMSO 용매에 각각 녹여 본 결과 DMSO 용매에서 용해도가 가장 높았다. 따라서 본 연구에서는 70% 에탄올에 추출한 녹차, 손바닥 선인장, 감귤박 추출물을 DMSO 용매에 녹여서 *in vitro* 실험에 사용하였다. 또한 녹차, 손바닥 선인장, 감귤박 추출물이 산화적 조건에서의 항산화 활성을 측정하기 위하여 혈소판 응집 실험을 제외한 모든 실험에 100 mM AAPH를 사용하여 인위적으로 산화적 환경을 조성하였다. 2,2'-azobis-(2-amidinopropane) dihydrochloride(AAPH)는

세포막 안으로 들어가서 산소분자와 반응해 free radical을 주는 수용성 물질로서 생체막의 지질층을 과산화 시켜 산화적 손상을 초래한다. 지용성인 비타민 E는 강력한 항산화제로 알려져 있다. 따라서 각 추출물의 항산화 활성 정도를 비교하기 위해 DPPH 방법에 의해 라디칼 소거 활성을 측정하여 비타민 E와 비교 하였다. 실험군은 AAPH를 첨가하지 않은 AAPH 비처리군, AAPH 처리군, AAPH 처리군 중에서 녹차 추출물을 첨가한 Geen tea군, 손바닥 선인장 추출물을 첨가한 Cactus군, 감귤박 추출물을 첨가한 Tangerine군, Tocopherol (5 mM)을 첨가한 비타민 E군으로 6개의 그룹으로 나누어 *in vitro* 실험을 하였다.

2. 실험방법

1) 시료수집

(1) 혈액채취

Sprague Dawley 숫쥐를 ether로 마취시킨 후, heparin이 들어 있는 vacuum tube에 cardiac puncture 방법으로 혈액을 채취하였다. 혈소판 응집과 Na-leak, 적혈구 용혈 실험은 채혈 즉시 전혈로 실시 되었으며, TBARS 측정은 PRP와 human LDL을 분리하여 시료로 사용 되었다. PRP는 쥐의 혈액을 채취하여 2,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 얻었으며, LDL은 사람의 혈장을 초고속원심분리하여 채취하였다. 본 실험은 *in vitro* 실험으로서 혈소판 응집, 적혈구 용혈, Na-leak, PRP와 LDL TBARS 측정은 각각 따로 실험이 진행되었다.

2) 시료분석

(1) DPPH Radical 소거능력

녹차, 손바닥 선인장, 감귤박 에탄올 추출물의 항산화 활성을 DPPH (2,2-Diphenyl 1-Picryl hydrazyl, Sigma-Aldrich)방법¹⁰⁹⁾을 이용하여 비타민 E와 비교하였다. DPPH는 항산화 물질에 의한 radical 소거활성을 측정할 때 이용되며, 그 자체가 짙은 자주색의 질소중심의 라디칼로서 라디칼전자의 비편재화에 의해

안정화된 구조로 존재한다. 그러나 DPPH radical이 항산화 물질과 반응하여 그 농도가 감소됨에 따라 517 nm에서 DPPH에 의한 흡광도가 감소되는데 항산화 시료의 환원력의 크기에 따라 흡광도의 감소가 크다. 본 실험에서는 1 ml의 메탄올에 녹인 여러 농도의 시료를 0.5 ml의 0.3 mM DPPH-메탄올 용액에 첨가하여 시료첨가 후 10분일 때 최종농도 0.1 mM DPPH에 대한 흡광도 50%의 감소를 가져오는 시료의 농도(scavenging activity, SC₅₀)를 측정하여 시료의 radical 소거활성을 비교하였다.

(2) 혈소판 응집 (Whole blood platelet aggregation)

혈소판응집 측정에 앞서 녹차, 손바닥 선인장, 감귤박 각각의 에탄올 추출물은 DMSO 용매에 녹여 시료를 준비하였고, 비타민 E는 α -tocopherol을 에탄올에 녹여 실험에 사용하였다.

혈소판응집은 전혈을 이용한 impedance 방법으로 Chronolog Platelet Aggregometer (Chrono-Log 500-CA, Havertown, USA)를 이용하여 측정되었다. 채혈 즉시 전혈 250 μ l에 DMSO 용매에 녹인 녹차, 손바닥 선인장, 감귤박 각각의 추출물을 최종 농도 400 μ g/ml이 되게 넣었고, 비타민 E는 최종 5 mM이 되게 넣은 후 추출물과 비타민 E가 반응 할 수 있도록 가운데에서 20분간 배양을 하였다. 배양 후 여기에 750 μ l 생리적 식염수 (0.9% NaCl, 1:4)로 희석시켜 혈소판 농도 200,000 / μ l로 조정한 후, 1 mM ADP (adenosine diphosphate)를 20 μ l(최종 농도 2 mM) 넣어 응집을 유도하였으며 3회 반복한 평균치를 사용하였다.

Whole blood platelet aggregation은 응집의 진행에 따라 혈액에 삽입된 두개의 백금전극 사이에 나타나는 전기저항 (impedance)의 상승을 측정하는 방법으로, recorder response를 20 Ω 이 되게 impedance gain을 맞추어 둔 것이다. 이 방법은 신선한 전혈을 사용하여 혈액 내 다른 성분의 존재 하에서 측정하므로, 보다 생리적인 상태에서 혈소판 응집성을 관찰하는 장점이 있다.

(3) 적혈구 용혈

녹차, 손바닥 선인장, 감귤박 에탄올 추출물을 DMSO 용매에 녹여 사용 하였으며, 비타민 E는 α -tocopherol을 에탄올에 녹여 실험에 사용하였다. 여기에 100 mM AAPH를 넣어 산화적 스트레스를 가하여 적혈구 용혈 정도 측정하였다.

적혈구 용혈 정도는 Buckingham¹¹⁰⁾의 방법을 참고하여 측정하였다. 적혈구의 용혈은 Heparin 처리된 혈액을 채혈 즉시 500 μ l 떠서 Phosphate Buffered Saline (PBS, pH 7.4) 5 ml에 분산시킨다. PBS는 phosphate buffer (0.1 M Na_2HPO_4 , 0.02 M HCl)와 0.89% NaCl를 동량으로 혼합하여 제조하였다. PBS에 분산시킨 용액을 1,200 \times g에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 버린 다음, 남은 적혈구 부분에 각각의 DMSO 용매에 녹인 녹차, 손바닥 선인장, 감귤박 추출물을 최종 농도가 400 μ g/ml 되게 넣었고, 비타민 E는 최종 농도가 5 mM이 되게 넣었다. 여기에 100 mM AAPH와 300 μ l PBS를 넣어 20분간 water bath에서 배양하였다. 100 mM AAPH는 최종 1 mM되게 첨가 하였다. 배양 후 다시 4700 μ l의 PBS용액에 분산시킨다. 두 개의 시험관에 각기 4 ml의 PBS와 증류수를 넣은 다음 적혈구 분산액을 1 ml씩 넣어 혼합하고 마개를 한 후 37°C CO₂ 배양기에서 2시간 배양한다. 배양액을 천천히 아래위로 흔들어 액을 섞은 후 10분간 1200 \times g에서 원심분리하고, 상층액을 취해서 spectrophotometer로 415 nm에서 흡광도를 측정했다.

$$[\% \text{ 용혈} = (\text{buffer 분산액의 흡광도} / \text{증류수 분산액의 흡광도}) \times 100]$$

(4) 적혈구막 Na-leak 측정

가. 적혈구의 전처리

in vitro 실험으로 녹차, 손바닥 선인장, 감귤박 추출물은 70% 에탄올에 추출한 것으로서 수용성이므로 배양 후 CWS에 Washing하는 과정에서의 손실을 방지하여 추출물의 생리 활성을 보고자 Na-leak과 Intracellular Na 측정은 분리하여 실험을 하였다. 또한 DMSO용매에 녹인 각각의 추출물과 100 mM AAPH 등의 시료는 #4용액에 넣어 미리 준비하였다.

녹차, 손바닥 선인장, 감귤박 에탄올 추출물을 DMSO 용매에 녹여 최종 농도가 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되게 #4용액에 넣어 미리 준비하였으며, 비타민 E는 α -tocopherol을 에탄올에 녹여 최종 농도 5 mM이 되도록 넣었다. 여기에 100 mM AAPH를 최종 1 mM이 되도록 넣어 인위적인 산화적 스트레스를 가하여 세포막에서 흘러나오는 Na양을 측정하였다.

채혈 즉시 전혈을 2,000 rpm에서 10분간 원심분리 시켜 PRP를 걷어낸다. 걷어낸 PRP는 TBARS측정에 사용되었다. 적혈구 1.5 ml에 500 mM 비타민 E를 최종 5 mM이 되게 넣어 water bath(37°C)에서 20분간 incubation시키고, 나머지 적혈구는 50ml Conical tube에서 대략 5배의 cold isotonic Choline chloride washing solution [CWS, 150 mM choline chloride, 10 mM Tris-4-morpholinopropane sulfonic acid (MOPS) 4°C PH 7.4] 를 넣고 천천히 위아래로 흔들어준 후 다시 3000 rpm에서 10분간 원심분리 시킨 후 상층액을 버린다. 이렇게 CWS로 5번 반복해서 적혈구를 씻어준다. 배양이 끝난 비타민 E군도 동일한 방법으로 CWS로 5회 반복해서 적혈구를 씻어준다. 마지막 상층액을 버린 후 적혈구 pellet을 CWS로 희석하여 hematocrit값이 40 ~ 50 %가 되게 조정 한 후 정확한 hematocrit값을 측정하였다.

나. Na-leak 측정

Na leak은 Ouabain에 의해 Na-K ATPase와 Furosemide에 의해 Na-K cotransport가 차단된 상태에서 흘러나온 Na량을 뜻한다.

AAPH는 free radical을 생성하여 적혈구 막의 지질층을 과산화 시켜 세포막의 손상을 초래하는 것으로서 Intact한 적혈구에 비해 AAPH를 처리한 적혈구의 Na-leak은 증가할 것으로 생각된다.

각각 30 ml의 medium 4 (150 mM choline chloride, 10 mM glucose, 1 mM ouabain, 1 mM furosemide, 10 mM Tris-MOPS 37°C pH 7.4)에 DMSO 용매에 녹인 각각의 녹차, 손바닥 선인장, 감귤박 추출물을 최종 농도 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 되게 넣었으며, 100 mM AAPH를 최종 1 mM 되도록 첨가하여 미리 얼음에 박아두었다. Hmatocrit을 측정한 적혈구 용액 1.5 ml를 미리 준비한 medium 4 (150 mM choline chloride, 10 mM glucose, 1 mM ouabain, 1 mM furosemide, 10 mM

Tris-MOPS 37°C pH 7.4)에 넣어 섞은 후 10개의 test tube에 고르게 분배하여 0, 10, 20, 30, 40분 간격으로 37°C shaking water bath에서 배양하여, 즉시 얼음 속으로 옮겨 Na efflux를 중단시킨 후, 4°C에서 원심 분리하여 상층액을 분리하였다. Na leak실험은 진행되는 동안 모든 medium과 test tubes는 얼음 속에 보관되었다.

분리된 상층액의 Na 농도는 atomic absorption spectrophotometer (AA6701F Shimadzu Corporation, Japan)을 이용하여 측정하였고 기울기 (Na $\mu\text{g}/\text{ml}/\text{min}$)를 구한 후, AAPH를 처리한 적혈구로부터 흘러나온 Na leak값을 계산하였다.

다. Intracellular Na 측정

전혈을 3000 rpm에서 10분간 원심분리 시켜 plasma와 buffy coat를 걸러낸다. 각각의 녹차, 손바닥 선인장, 감귤박 추출물을 DMSO 용매에 녹여 최종 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 되도록 적혈구 1.5 ml에 넣고, 비타민 E는 최종 5 mM이 되도록 넣었다. 여기에 100 mM AAPH를 1 mM이 되도록 첨가하여 water bath에서 20분간 배양한다. 배양 후 대략 5배의 CWS를 넣고 천천히 위아래로 흔들어준 후 다시 3000 rpm에서 10분간 원심분리 시킨 후 상층액을 버린다. 이렇게 CWS로 5번 반복해서 적혈구를 씻어준다. 마지막 상층액을 버린 후 적혈구 pellet을 CWS로 희석하여 hematocrit값이 40~50 %가 되게 조정 한 후 정확한 hematocrit값을 측정하였다.

적혈구 용액 50 μl 를 5 ml의 0.02% acationox (metal free detergent, Scientific Product, USA)을 넣은 것으로, 적혈구내의 Na 농도 (intracellular Na) 값을 계산하기 위하여 원자흡광광도계 (atomic absorption spectrophotometer, AA6701F Shimadzu Corporation, Japan)을 이용하여 Na 농도를 측정하였다.^{111,112)}

적혈구 용액

계산식 :

$$\frac{[\text{Na } \mu\text{g}/\text{ml}]}{[\text{min}]} \times \frac{[60\text{min}]}{[\text{hr}]} \times \frac{[\mu\text{mole}]}{[23\mu\text{g}]} \times \frac{[31.5-(1.5 \times \text{HCT})]}{[1.5 \times \text{HCT}]} = \text{Na mmole}/\ell \text{ rbc}/\text{hr}$$

Intracellular Na :

$$\frac{[\text{Na } \mu\text{g}]}{[\text{ml}]} \times \frac{[\mu\text{mole}]}{[23\mu\text{g}]} \times \frac{[101]}{[\text{HCT}]} = \text{Na mmole}/\ell \text{ rbc}$$

(5) LDL과 PRP의 TBARS 측정

LDL은 사람의 혈장을 <Figure 3>와 같이 sequential discontinuous density gradient의 초 원심분리 과정을 반복하여 얻었으며, PRP은 전혈을 2,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후 채취하였다. 시료는 녹차, 손바닥 선인장, 감귤박 추출물을 DMSO 용매에 녹여 사용하였으며, 비타민 E와 100 mM AAPH를 넣어 LDL과 PRP의 과산화 물질 생성을 측정하였다.

LDL과 PRP의 TBARS 함량은 Yagi¹¹³⁾의 방법을 이용하여 측정하였다. 분리해 놓은 각각의 LDL 및 PRP 250 μl 에 DMSO용매에 녹인 녹차, 손바닥 선인장, 감귤박 각각의 추출물을 최종 4 mg/ml가 되게 넣었으며, 비타민 E는 최종 농도 5 mM, 100 mM AAPH는 최종 농도 2 mM이 되도록 넣고 냉장고에서 24시간 방치 후 실험을 하였다. 배양이 끝난 각각의 시료에 1/12N 황산 4 ml와 10% phosphotungstic acid 0.5 ml를 넣고 5분간 방치한 후 2,200 \times g에서 10분간 원심분리하여 상층액은 버리고 침전물에 1/12N 황산 2 ml와 10% phosphotungstic acid 0.3 ml를 넣고 위와 같은 과정을 다시 한 번 반복하였다. 이 과정 후 얻어진 침전물에 증류수와 TBA reagent를 가하여 잘 섞은 후 뚜껑을 막고 95°C에서 1시간 반응시켰다. 여기에 n-butanol을 가하고 잘 섞은 후 2,200 \times g에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 취하였다. 1,1,3,3,-tetraethoxypropane을 표준용액으로 하여 상층액에 있는 TBARS양을 Spectrofluorometer (Kontron Instruments SFM-25)로 excitation 515 nm, emission 553 nm에서 정량 하였다.

(6) LDL Oxidation 측정

가. LDL 분리

LDL은 <Figure 3>와 같이 사람의 혈장을 sequential discontinuous density gradient의 초 원심분리 과정을 반복하여 얻었다.^{114,115)} 우선, NaCl로 사람의 혈장 밀도를 1.063 g/ml로 조정한 후 원심분리 (150,000 × g, 4°C, 20시간)하여 plasma, chylomicron, very low density lipoprotein(VLDL)과 LDL fraction을 HDL과 lipoprotein deficient serum(LDS) fraction에서 분리하였다. 그리고 LDL이 섞여있는 fraction은 밀도를 1.019 g/ml로 조정하여 원심분리(150,000 × g, 4°C, 20시간)한 후에 상층부분의 chylomicron/VLDL fraction을 제거하였다. 나머지 하층부분은 다시 NaCl로 밀도를 1.063 g/ml로 조정하고 같은 방법으로 원심분리하여 LDL fraction을 순수 분리하였다. 분리된 LDL은 4°C에서 0.154M NaCl, 0.01% EDTA buffer(pH 7.4)로 24시간 투석하였다.

나. LDL의 산화

LDL 100 μ l에 1 mM CuSO₄ 70 μ l를 넣어 산화를 유도하였고, DMSO 용매에 녹인 각각의 녹차, 손바닥 선인장, 감귤박 추출물은 최종 2 mg/ml, 비타민 E는 최종 5 mM되게 넣어 전체부피가 500 μ l가 되도록 F/10배지(pH 7.4)를 섞어 5% CO₂ incubator에서 37°C로 24시간 배양하였으며 배양이 끝난 후 40 mM EDTA 25 μ l로 CuSO₄의 산화를 억제한다.

다. Agarose gel electrophoresis

녹차, 감귤박, 손바닥 선인장 추출물이 LDL산화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 agarose gel electrophoresis를 실시하였다. 0.7% agarose gel을 사용하여 이동도를 관찰하였다. 시료용액과 산화 LDL을 배양하여 20 μ l를 주입하였고 135 mV의 전력으로 pH8.6, 0.05M barbital buffer를 사용하여 전개시켰다.

4. 통계처리방법

본 실험의 측정치는 평균과 표준편차로 표시되었고, 실험 결과들은 one-way ANOVA를 사용하여 분석하였으며, 5% 수준에서 유의차가 있을 때 Duncan multiple range test에 의해 각 처리군 간의 유의차를 검증하였다.



Ⅲ. 실험 결과 및 고찰

1. DPPH법에 의한 추출물의 Radical 소거능의 비교

DPPH법에 의해 녹차 추출물, 손바닥 선인장 추출물, 감귤박 추출물 및 비타민 E의 free radical 소거 활성을 측정하여 그 결과는 <Table 1>에 제시하였다.

각각의 추출물과 비타민 E의 free radical 소거 활성의 순서는 비타민 E > 녹차 추출물 > 손바닥 선인장 추출물 > 감귤박 추출물 순으로 나타났으며, 비타민 E에서 7.5 $\mu\text{g}/\ell$ 으로 radical 소거 활성이 가장 높게 나타났으며, 그 다음으로 녹차 추출물에서 8.3 $\mu\text{g}/\ell$ 으로 높게 나타났다. <Figure 4>에 제시된 DPPH방법에 의한 추출물의 radical 소거 pattern을 살펴보면 비타민 E군에서 radical 소거 활성이 1분이되기도 전에 최종 농도 0.1mM DPPH에 대한 흡광도 50%의 감소를 나타내어 더 이상의 감소가 없는 것으로 보아 radical 소거 활성이 끝난 것으로 생각되어진다. 녹차 추출물 군에서도 비타민 E와 유사한 경향을 나타내고 있다. 감귤박 추출물군의 radical 소거 pattern은 DPPH 메탄올 용액에 시료 첨가 후 10분이 지나서도 계속 감소되는 것으로 보아 radical 소거 활성이 끝나지 않고 지속적인 감소 경향을 나타낼 것으로 생각된다. 따라서 radical 소거 pattern 결과에서도 비타민 E와 녹차 추출물 군에서 가장 높은 radical 소거 활성을 보이고 있으며 감귤박 추출물 군에서 가장 낮은 활성을 나타내고 있다.

생체 내 산화물질로 작용하는 활성 산소 등은 대표적으로 라디칼 물질로서, 라디칼 소거 활성 물질은 항산화제로 인식되고 있다. DPPH는 화학적으로 안정화된 free radical을 가지고 있는 수용성 물질로 515 nm~520 nm부근에서 최대 흡광도를 가지며, 항산화 활성이 있는 물질과 만나면 전자를 내어주면서 라디칼이 소멸되고 색깔이 변한다. DPPH는 radical에 대한 소거 활성 능력을 알아보는 방법으로서 여러 종의 항산화 성분이 내재된 추출물 등의 항산화 효과를 분석할 수 있다.

Yukiko 등⁶⁶⁾은 녹차의 주요 성분은 catechin류로 그 상대적 양은 EGCG가 58%로 가장 많이 함유하고 있으며 가장 강한 활성을 나타낸다고 하였다. 손바닥

선인장 열매에는 적색 비트의 함유성분인 75~95%의 betanin이 함유되어 항산화 활성을 나타내고,⁹¹⁾ isorhamnetin, quercetin, kaempferol 등이 포함되어 있고 3~5%의 polyphenol, 1~1.5%의 flavonoids 등이 함유 성분으로 알려져 있다.⁹⁰⁾ 우리나라 고유 과실유인 감귤 과피 내의 flavonoid 함량 조사 결과 hesperidin과 naringin이 주된 flavonoids임이 알려져 있고,⁷⁹⁾ 감귤에 존재하는 hesperidin은 모세혈관의 투과성을 유지하는데 필요한 물질로 Vit. P의 활성을 가지며 지질과산화물 형성을 억제한다고 알려져 있다.⁴²⁾

Saito 등³⁴⁾의 연구에 의하면 Brazilian green tea의 추출을 DPPH로 분석한 결과 녹차 추출물의 항산화 활성은 EGCG(epigallocatechin gallate)와 ECG(epicatechin gallate)의 구성 성분과 밀접한 상호 관련성이 있다고 보고되었으며, Liuji 등¹¹⁶⁾의 연구에서 녹차 카테킨은 *in vitro* 연구에서 EGCG, EGC, EC, ECG의 4가지 화합물이 환원력의 규칙적인 순서에 따라 항산화 사이클을 이루어 상호 협조적인 증강효과를 나타낸다고 했으며, 녹차의 항산화 기전은 카테킨의 B ring에 있는 수산화기와 갈레이트기가 라디칼 소거 활성에 기여하는 중요한 요소이며, B ring에 존재하는 최소한 한 개의 ortho-dihydroxyl기와 3번 위치의 갈레이트기는 라디칼 소거활성의 효과를 유지하는데 중요한 역할을 하며, 갈레이트기가 있는 카테킨이 강한 항산화 능력을 가지고 있다고 보고하였다. Rafat 등²²⁾의 *in vitro* 연구에서 flavonoids가 높은 hydroxyl radical 소거 활성을 가지고 있어 지질과산화물을 억제할 수 있다고 하였고 이러한 활성은 flavonoids의 aromatic B-ring에 치환된 hydroxyl group의 수에 따라 증가한다고 하였다. Lee 등¹¹⁷⁾은 손바닥 선인장 줄기의 에탄올추출물이 $\cdot\text{OH}$ 를 소거하여 plasmid DNA의 손상으로부터 보호 효과가 있었다고 하였으며, 이러한 결과는 손바닥 선인장 추출물의 활성을 갖고 있는 phenolic의 높은 함량 때문이라고 하였다. 이남호 등⁸⁹⁾의 연구에서도 선인장 줄기의 메탄올 추출물에서 가장 강한 항산화 활성이 나타내었으며 라디칼 소거 활성을 나타내는 유효 성분은 선인장에 포함되어 있는 페놀계 물질일 가능성이 있다고 하였다. Butera 등³⁷⁾의 연구에서 손바닥 선인장으로부터 추출한 betanin과 indicaxanthin의 scavenging 활성은 trolox보다 더 효과적이었다고 보고하였다.

Flavonoid의 화학적 구조가 그들의 생화학적 활성에 영향을 미친다고 하였다. flavonoid가 과산화지질의 생성을 효과적으로 억제하기 위해서는 구조적으로 C ring의 C-3위치에 -OH기가 존재하여야 하고 C ring의 C-2와 C-3 사이에 이중 결합이 있어야 하며,²¹⁾ A와 B ring의 -OH의 수가 4개 이상이어야 하며²²⁾ 당과 결합된 배당체(glycoside)형태로 존재하여야 한다고 하였다.²³⁾ 이러한 flavonoid는 hydroxyl radical, superoxide anion radical, peroxy radical과 peroxy nitrite의 scavenging²⁹⁻³¹⁾할 뿐만 아니라 Fe과 Cu를 chelating³²⁾하고 항산화 효소의 활성을 증가시킴으로써 항산화 활성을 나타내는 것이라고 보고되었다.³³⁾ 그러나 감귤과 피의 함유성분인 hesperidin과 naringin은 모두 flavanone에 속하며 hesperidin은 탄소 5와 3'에 hydroxyl group이 위치하고 탄소 7과 4' 위치에 각각 rhamnose-glucose와 O-methyl group이 치환되어 있어서²¹⁾ 위 조건들을 갖추지 못하여 감귤박 추출물에서 낮은 radical 소거 활성을 나타낸 것으로 생각되어진다.

본 실험에서 녹차 추출물, 손바닥 선인장 추출물, 감귤박 추출물 및 비타민 E의 DPPH radical 소거 활성 측정 결과 비타민 E 및 녹차 추출물에서 radical 소거 활성이 가장 높은 것으로 나타났으며 감귤박 추출물의 radical 소거 활성이 가장 낮은 것으로 나타나 위의 여러 연구 결과들과 유사하다. 비타민 E와 각각의 추출물의 radical 소거 활성은 여러 연구 결과들처럼 각 추출물에 함유되어있는 생리활성 물질의 작용에서 기인되는 것으로 생각되어지고 그 중에서도 비타민 E와 녹차 추출물에 함유되어 있는 카테킨류 성분이 항산화 작용에 효과적인 것으로 생각된다.

Table 1. SC₅₀ concentration of extracts for 0.1mM DPPH

	Green tea	Cactus	Tangerine	Vit. E
SC ₅₀ ¹⁾ (μg/ℓ)	8.3 ²⁾	875 ²⁾	1250 ²⁾	7.5 ²⁾

1) The extract concentrations at which the decrease in absorbance at 517nm by 50% for 0.1mM DPPH at 10minutes after addition extracts in methanol

2) Amount of extracts (mg) for the equivalent scavenging activity to SC₅₀ of flavonoid

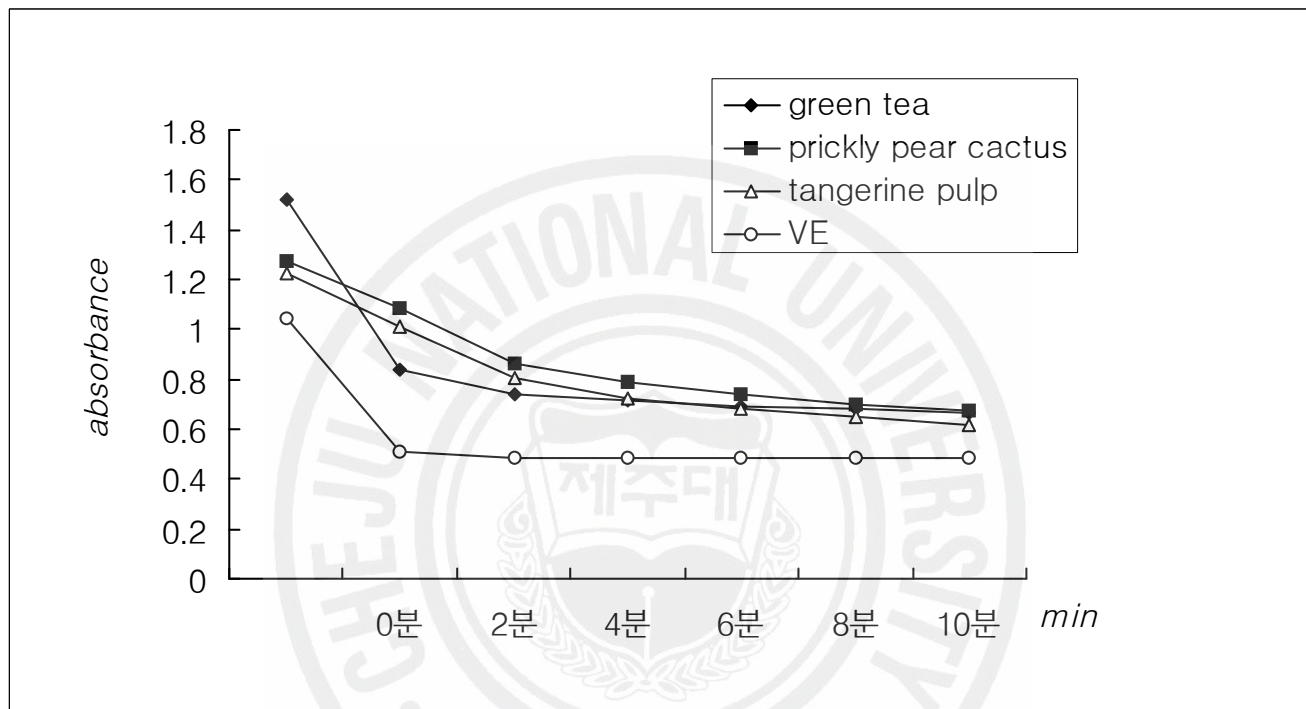


Figure 4. Patterns of decrease in absorbance after addition of SC_{50} concentration of extracts to 0.1mM DPPH.

2. 혈소판 응집

혈소판 응집에 대한 결과는 <Table 2> 에 제시하였다. 혈소판 응집에서 최대 응집치(maximum aggregation)는 대조군에 비해 모든 군에서 감소하는 경향을 보였으며, 특히 녹차군에서 유의적으로 감소하였다 ($p < 0.05$). 초기응집곡선(initial slope)의 경우도 대조군에 비해 감귤박을 제외한 모든 군에서 감소하는 경향을 보였고, 녹차군에서 유의적으로 initial slope을 감소 시켰다 ($p < 0.05$).

생체 내에서 혈액은 응고와 용해작용이 항상 평형을 이루고 있어, 정상적으로 순환하고 있는 동안에는 혈전이 생성되지 않으나 여러 가지 원인으로 그 균형이 깨지게 되면 혈전이 생성된다. 혈전 생성으로 인하여 혈관을 막게 되므로 혈액의 순환이 방해되어 조직으로의 영양분 및 산소공급이 중단되게 된다. 이로 인하여 뇌혈관이 막히면 뇌 혈전증, 심장혈관이 막히면 심부전증이 된다. 심근경색과 뇌경색처럼 혈전이 혈관을 막아 일어나는 병을 혈전증이라 하며 이는 혈소판 응집력의 향진에 의한 혈전의 형성이 직접적인 원인이 된다.

Neiva 등⁵¹⁾의 연구에서 사람의 PRP에 300 μ M arachidonic acid, 3 μ M ADP, 6 μ M epinephrine을 넣어 혈소판 응집을 유도하였으며 그 결과 catechin 또는 epicatechin이 20~200 μ M/ml의 농도에서 의존적으로 혈소판의 과산화적 손상과 응집으로부터 혈소판 보호 작용이 있다고 보고 하였고, Lill 등⁵²⁾은 녹차 카테킨 중 EGCG가 응집을 유도하는 thrombin 형성을 억제하여 혈소판의 기능을 저해함으로써 항혈전작용이 있다고 하였다. Sagesaka-Mitane 등¹¹⁸⁾은 토기의 혈소판을 collagen으로 응집을 유도한 결과 녹차의 온수 추출물의 경우 submaximal 응집과 lag time이 낮아져 카테킨이 혈소판 응집에 대한 활발한 억제 효과를 나타내었고, EGCG와 아스피린의 비교실험에서도 EGCG가 혈소판 응집 억제 효과가 있는 것으로 나타났으며 EGCG는 thrombin과 혈소판 응집에 관여하는 platelet activating factor (PAF)의 활성을 억제하는 것으로 나타났다. 강민숙 등⁹⁹⁾의 연구결과 0.5%의 콜레스테롤을 첨가한 식이에 5%의 감귤박과 손바닥 선인장 분말을 첨가하여 흰쥐에게 공급한 결과 최대 응집치와 초기 응집곡선이 대조군에 비해 다소 감소하는 경향을 보였다. McGregor 등¹¹⁹⁾은 in vivo 실험을 통해 정제된 flavonoid (micronized purified flavonoid fraction : MPFF)가 쥐의 혈소판 기능

을 보호하여 혈소판 응집 억제 효과가 있음을 확인하였다. anesthetized rat에 10 μ M ADP와 50 μ M collagen에 의해 응집을 유도하여 쥐의 혈소판 응집 억제 효과를 측정된 결과 대조군에 비해 MPFF는 혈소판 응집을 감소시키고 disaggregation은 증가시켜 flavonoid가 혈소판 응집 억제 효과가 있다고 보고하였는데 혈소판 응집의 disaggregation은 혈소판의 재생으로 해석 할 수 있다. Wolfram 등⁹⁴⁾은 8명의 대조군과 8명의 heterozygous hypercholesterolemia 환자를 대상으로 하여 손바닥 선인장을 250g/day 을 섭취시켰을 때 대조군과 환자 모두에게 platelet factor 4와 beta-thromboglobulin을 유의적으로 감소시켰고, ADP로 유도한 혈소판 응집 감소 효과를 보였다. 또한 혈소판의 PGI₂ 에 대한 민감도를 개선시켰다. Jin 등¹²⁰⁾의 in vitro 실험 결과 토끼 혈소판에 collagen과 arachidonic acid로 응집 유도한 결과 orange에 함유된 hesperetin은 TXA₂(thromboxane A₂)로의 전환을 억제함으로써 혈소판 응집을 억제 한다고 보고하였다. 한편 Osman 등¹²¹⁾은 grape juice에는 quercetin, Kaempferol, myricetin 등이 다량 함유되어 있으며 orange juice 및 grapefruit juice에는 quercetin 함량이 적고 naringin, luteolin, apigenin glucoside가 함유되어 있는데 이 세 가지 종류의 juice를 섭취시켰을 때 orange, grapefruit juice 보다는 grape juice 섭취가 혈소판 응집 억제 효과를 나타내어 grape juice의 함유성분이 혈소판 응집 억제제로 작용한다고 보고되었다. Mardla등¹²²⁾은 α -tocopherol과 quercetin의 combination은 사람의 PRP에 ADP로 응집을 유도한 결과 혈소판 응집 억제에 효과적이었다고 보고 하였으며, Gonzalez-Correa 등¹²³⁾은 당뇨쥐에 α -tocopherol과 aspirin의 combination은 대조군에 비해 혈소판 응집 억제 효과를 보였다고 하였다.

본 실험의 결과에서는 여러 연구결과와 같이 최대 응집과 초기 응집 모두에서 대조군을 제외한 모든 군에서 혈소판 응집 감소 경향을 보여 녹차, 선인장, 감귤박, 비타민 E 군에서 혈소판 응집 억제 효과가 있다고 볼 수 있으며, 특히 녹차 군에서 유의적으로 감소하였으며 비타민 E 군에서도 다소 감소하는 경향이 나타나 녹차 및 비타민 E가 혈소판 응집을 감소시켜 혈전 생성 억제에 가장 높은 효과가 있다고 생각된다.

Table 2. Effects of green tea, prickly pear cactus, tangerine extract and vitamin E on platelet aggregation

	Control	Green tea	Cactus	Tangerine	Vit.E
Maximum(Ω) ¹⁾	12.50 \pm 4.05 ^a	7.05 \pm 2.80 ^b	11.73 \pm 4.04 ^a	11.60 \pm 4.17 ^a	10.48 \pm 2.76 ^{ab}
Initial Slope(Ω /min) ²⁾	12.06 \pm 4.58 ^a	4.17 \pm 1.29 ^b	10.23 \pm 4.34 ^a	12.05 \pm 5.04 ^a	9.26 \pm 3.09 ^a

1) Maximum aggregation is ohm at the point where aggregate dissociated.

2) Initial slope ohm change for the first one minute of aggregation.

Values are means \pm SD of 10 rats.

Values in the same row not sharing the same superscript differ(p<0.05)

3. Intracellular Na 및 Na-leak과 Hemolysis

녹차 추출물, 손바닥 선인장 추출물, 감귤박 추출물 및 비타민 E가 적혈구 막의 Intracellular Na와 Na-leak 그리고 Hemolysis에 미치는 영향에 대한 결과는 <Table 3> 에 제시하였다. AAPH는 세포막 안으로 들어가서 산소와 반응하여 peroxy radical을 주는 수용성 물질로서 특히 적혈구 막의 지질층을 과산화 시킨다. 따라서 AAPH로 세포막에 damage를 주어 녹차 추출물, 손바닥 선인장 추출물, 감귤박 추출물이 세포막의 안정성에 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

Intracellular Na의 경우 AAPH 처리군과 비타민 E에 비해 녹차, 선인장, 감귤박군이 다소 높은 경향을 보였으나 각 군 간의 유의적 차이는 없었다. Na-leak의 결과를 보면 각 군 간의 유의적 차이는 없었다. 유의적이지는 않지만 AAPH 비처리 군에 비해 AAPH 처리한 군이 다소 증가하였고 녹차, 선인장, 감귤박 및 비타민 E군에서 AAPH 처리한 군에 비해 다소 낮은 경향을 나타내고 있다. AAPH 처리군 중에서도 선인장군이 비타민 E 보다도 Na-leak의 감소 경향을 나타내어 선인장 처리가 Na-leak에 있어서는 다소 긍정적인 영향을 미치는 것으로 생각되어진다.

Hemolysis의 결과는 AAPH 처리 군에 비해 선인장, 감귤박, 비타민 E군에서 감소하는 경향을 나타내고 있고 그 중에서도 비타민 E군에서 유의적으로 감소하였다 ($p < 0.05$). 따라서 비타민 E가 세포막 안정성에 가장 큰 영향을 미치는 것으로 생각된다. 비타민 E는 세포막에 존재하며 가장 강력한 항산화제로서 radical의 공격으로부터 세포막을 가장 잘 보호한다. 세포막에 존재하는 비타민 E와는 달리 각 추출물의 성분인 flavonoids는 친수성으로 세포의 친수성 부분에 위치하여 세포내외의 free radicals을 소거한다. Rizvi 등¹²⁴⁾의 in vitro 연구에서 대조군과 dependent diabetes mellitus(NIDDM)환자에게서 incubating membrane과 intact한 erythrocyte의 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase와 sodium / hydrogen exchanger (NHE) 활성을 모두 차의 카테킨이 농도 의존적으로 억제하였고, $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATPase의 억제 활성은 EGCG와 ECG에서 더 효과적으로 억제를 나타내었으며, 이러한 효과는 차 카테킨의 화합물이 원형질 막의 유동성 변화에 직접적인 영향을 주었기 때문이라고 보고하였다. Saffari 등¹²⁵⁾의 in vitro 연구에서 사람의 적혈구막에

t-BHP(t-butylhydroperoxide)로 산화적 손상을 주었을 때 적혈구 막의 TBARS의 생성은 EGCG에 의해 유의적으로 억제 되었고 EGCG는 t-BHP에 유도된 산화적 손상으로부터 ATPase 활성을 보호함으로써 EGCG가 산화적 스트레스로부터의 강력한 항산화제임을 확인 하였다고 보고되었다. Butera등³⁷⁾은 손바닥 선인장 추출물이 hydroperoxide로부터 세포막 지질과산화물을 억제하였으며 이러한 항산화 활성은 손바닥 선인장 추출성분인 betanin과 indicaxanthin을 포함한 betalain 때문이라고 보고되어 손바닥 선인장의 함유성분인 betalain에 의해 세포막 안정성을 제공해주는 것이라 생각된다. Maridonneau-Parini 등²⁶⁾은 oxygen free radical에 의해 손상된 적혈구에서의 K loss를 보았는데 Kaemperol, naringenie, apigenin, naringin은 이를 막아주었고, myricetin, delphinidin, quercetin은 radical의 활성을 촉진시킴으로써 증가시켰으며, catechin, morin 등은 농도에 따라 증가하거나 억제해준다고 보고하였다. Sridevi 등¹²⁶⁾의 연구에서 rat의 뇌 세포막에 신경독성 물질인 PCB(polychlorinated biphenyls)로 산화적 손상을 유도하여 비타민 E를 처리한 결과 감소되었던 Na⁺-K⁺ ATPase, Ca²⁺-ATPase, Mg²⁺-ATPase의 활성이 정상수준으로 되돌아와 비타민 E처리가 PCB로 인한 산화적 스트레스를 감소시켜 세포 보호효과를 나타내었다. Morel 등³²⁾은 flavonoids의 항산화 연구에서 catechin, quercetin 그리고 diosmetin의 세포보호 효과는 catechin, quercetin, diosmetin 순으로 효과가 있었다고 보고 하여 녹차 카테킨이 세포막 보호 작용에 대한 효과가 높을 것이라고 생각되어지며, Nanjo 등¹²⁷⁾은 고농도의 야자유와 들깨기름이 첨가된 식이를 먹은 쥐에서 식이 녹차 카테킨 공급이 plasma, erythrocytes에서 지질과산화물을 억제시켰고, α-tocopherol 소모를 현저히 감소시켰다고 보고 하였다. 그 결과 *in vivo* 실험에서 녹차 카테킨이 항산화 작용을 함으로써 α-tocopherol의 소모를 감소시켰을 것이라고 했다. Ji 등¹²⁸⁾은 mice의 세포막 단백질과 지질 유동성과 관련하여 Cactus polysaccharide가 tumor-mice의 세포막 기능 개선 효과가 있었다고 보고하여 손바닥 선인장의 함유 성분이 세포막 보호 효과가 있음을 시사하였다. Shiva 등¹²⁹⁾의 *in vitro* 실험에서 세포막에 bis(2-amidinopropane)dihydrochloride (AAPH), 2,2'-azobis 2,4-dimethylvaleronitrile (ADVN) 그리고 hydrogen peroxide (H₂O₂) 처리하여 산화적 스트레스를 가했을 때 비타민 E의 첨가는 적혈구 용혈 억제 효

과를 나타내었다고 보고하였다.

본 실험 결과 Intracellular Na와 Na-leak에서 각 군간의 유의적 차이는 없었으나 Na-leak에서 선인장군이 다른 군에 비해 다소 낮은 경향을 나타내고 있으며 비타민 E 보다는 낮은 경향을 나타내었다. Hemolysis에서는 AAPH 처리군에 비해 선인장, 감귤박 및 비타민 E군에서 감소 경향을 나타내고 있고 비타민 E군에서 가장 낮게 나타났다. 따라서 Na-leak과 Hemolysis 결과 선인장군과 비타민 E가 AAPH 처리에 대한 영향을 가장 적게 받은 것으로 나타나 산화적 스트레스로부터 세포막의 과산화적 손상을 방지하여 세포막의 안정성을 제공해 주는 것으로 생각된다. 또한 비타민 E는 강력한 항산화제로 잘 알려져 있는 물질로서 Hemolysis의 결과 비타민 E군에서 유의적 감소를 나타내어 우리가 예상할 수 있는 결과이나 Na-leak의 결과에서 유의적이지는 않지만 선인장군에서가 비타민 E보다 감소를 보였다. 따라서 Na-leak 및 Hemolysis는 모두 세포막 안정성을 확인할 수 있는 결과이긴 하나 세포에서의 작용기전에 차이가 있는 듯하며 Na-leak에서는 선인장 처리가 긍정적인 효과를 가져다주는 것으로 생각된다.

Table 3. Effects of green tea, prickly pear cactus, tangerine extract and vitamin E on Na-leak in erythrocyte and hemolysis

	Control	Control	Green tea	Cactus	Tangerine	Vit.E
		AAPH Incubated				
Intracellular Na ¹⁾	8.80±0.60	7.74±0.66	9.68±1.61	9.35±1.39	9.52±1.01	7.70±0.86
Na Leak ²⁾	0.26±0.16	0.29±0.16	0.25±0.14	0.19±0.15	0.26±0.16	0.24±0.15
Hemolysis(%) ³⁾	16.53±3.79 ^{ab}	15.30±2.02 ^{abc}	18.15±3.53 ^a	14.12±2.31 ^b	14.31±3.30 ^b	12.08±2.56 ^{bc}

1) Intracellular Na ; upper values are for intact red blood cells. (Na mmole/ℓ rbc)

2) Na-Leak is Na efflux through passive sodium channel in intact red blood cells. (Na mmole/ℓ rbc/hr)

Values are means ± SD of 9 rats.

3) Values are means ± SD of 10 rats.

Values in the same row not sharing the same superscript differ(p<0.05)

4. LDL과 PRP의 TBARS 수준

지질의 과산화 정도를 측정하는 TBARS 생성 수준을 통하여 녹차 추출물, 손바닥 선인장 추출물, 감귤박 추출물 및 비타민 E가 PRP과 LDL의 과산화 정도에 미치는 영향에 대한 결과를 <Table 4>에 제시하였다.

PRP의 지질과산화물함량 수준의 결과를 보면 AAPH 비처리 군에 비해 AAPH 처리 군이 유의적으로 높은 경향을 보여 AAPH 처리가 damage를 줄으로써 지질의 산화를 촉진시킴을 확인 할 수 있다. AAPH 처리 군에 비해 녹차군과 비타민 E군이 감소 경향을 나타내고 있으며 비타민 E군에서는 유의적으로 감소 효과를 나타내었다 ($p < 0.01$).

LDL의 지질과산화물함량 수준의 결과를 보면 AAPH 비처리 군에 비해 AAPH 처리 군에서 다소 높은 경향을 나타내고 있으며 AAPH 처리 군에 비해 녹차, 선인장, 감귤박 및 비타민 E군 모두 감소 경향을 나타내고 있어 지질 과산화 생성을 억제하고 있음을 확인 할 수 있다. 그 중에서도 녹차와 비타민 E군에서 유의적으로 감소시켰다 ($p < 0.01$). AAPH 비처리 군과의 비교에서는 유의적이지는 않지만 녹차와 선인장군에서 다소 감소하였으며, 비타민 E군에서는 유의적으로 감소하였다 ($p < 0.01$).

혈관계 질환의 주요 원인은 음식을 통해 섭취되는 지질 중 콜레스테롤과 LDL이 macrophase에서 생성되는 활성산소, 유리기 그리고 내피세포의 lipoxygenase, 과산화지질에 의하여 쉽게 산화되어 산화 LDL이 된다. LDL 산화는 초기 동맥경화성 병변의 형성과 진전에 주요한 역할을 하며, 산화된 LDL이 정상적인 LDL보다 대식세포에 의해 쉽게 포획되어 거품세포를 형성하여 동맥경화를 유발한다. 따라서 동맥경화를 예방하기 위해서는 LDL의 산화를 막아야 한다. Ostrowska 등¹³⁰⁾의 *in vitro* 연구에서 EGCG, ECG EC 등의 카테킨류와 녹차 추출물이 사람의 혈청 LDL 산화 억제 효과를 비교한 결과 LDL 과산화는 녹차 추출물과 카테킨 모두에서 산화 억제 효과를 보였고 카테킨류 보다는 녹차 추출물에서 강력한 LDL 산화 억제를 보였으며, 카테킨류 중에서는 EGCG가 유의적으로 산화 억제 효과를 보였다고 하였다. 또한 산화적 조건에서 녹차 추출물과 카테킨류의 LDL 산화 억제 활성을 보여 α -tocopherol의 소모를 감소 시켜주

는 효과가 있었다고 하였다. Hirano-Ohmori 등¹³¹⁾은 건강한 사람과 atherosclerotic disease 환자를 대상으로 하루에 7잔의 녹차를 섭취 시켜 혈장 LDL TBARS 수준을 측정한 결과 혈장 LDL TBARS 농도가 감소하여 녹차의 섭취가 LDL 산화의 억제 효과가 있음을 확인하였고, 강원식 등¹³²⁾은 *in vivo* 실험에서 GTC(green tea catechin)를 rat에 경구투여 한 후 항산화활성 실험 결과, GTC는 CCl₄로 유도된 rat 간의 micosome의 지질과산화를 유의성 있게 억제시켰으며 SOD와 catalase 활성을 유의성 있게 증가시켜 GTC는 암과 노화의 예방에 관련이 되는 항산화 활성이 있는 것을 알 수 있었다고 보고하였다. Li 등⁹⁷⁾의 연구에서 hyperlipemia wistar rat에 Opuntia powder를 공급한 결과 대조군에 비해 혈청 TBARS 수준을 감소시키고 SOD활성을 증가시켰으며 총콜레스테롤, LDL-콜레스테롤을 유의적으로 감소시킴으로써 지질개선 효과를 보였다고 하였다. Oh 등⁹⁶⁾은 2주간 50 mg/Kg body weight의 Opuntia ficus-indica Var. saboten MAKINO(OFI) glycoprotein을 mice에 경구 투여한 결과 nitric oxide에 의한 지질과산화 생성을 억제하였다고 하였으며, Jeon 등⁸⁶⁾은 1% 고콜레스테롤과 0.02%의 naringenin의 공급은 혈장과 간의 TBARS 생성 수준을 감소시킴으로서 혈장 내 지질개선 효과와 항산화 효과를 나타내었다고 하였으며, Gnanasoundari 등¹³³⁾의 연구에서 세포독성 물질 oxytetracycline처리한 rat에 50 mg/kg body weight의 naringenin 공급은 혈장내 TBARS 수준을 감소시켰으며 혈청 urea와 creatinine의수준을 유의적으로 감소시켜 세포 독성으로부터의 산화적 손상을 억제하는 효과를 나타내었다. Yen 등¹³⁴⁾은 human lymphocytes system에서 4종류의 flavonoids의 산화적 활성 연구에서 quercetin, morin, naringenin 그리고 hesperetin 이 4종류의 flavonoids는 lymphocyte의 세포막 단백질의 TBARS 생성을 감소시켰다고 보고하였다. Safari 등¹³⁵⁾은 LDL에 Cu²⁺를 첨가하여 TBARS 측정 결과 quercetin > morin > pelargonidin > genistein > naringin > apigenin 순으로 나타났으며, Cirico 등¹³⁶⁾은 LDL에 Cu²⁺에 의해 생성된 TBARS 수준은 catechin 51.1%, hesperidin 76.9%, ferulic acid 166.4% 그리고 quercetin이 191.8%으로 나타내었다. 따라서 같은 flavonoid 종류이나 각기 다른 효과를 나타내고 있어 상호작용을 통해 LDL 산화를 방지함으로써 심혈관계 질환의 예방에 효과적일 것이라고 하였다.

본 실험에서 PRP와 LDL의 TBARS 생성 수준의 결과 녹차 추출물, 손바닥 선인장 추출물, 감귤박 추출물 군에서 다소 감소하는 경향을 나타내어 여러 연구 결과와 유사한 경향을 나타내고 있다. 본 실험 결과 radical 소거 활성과 TBARS 생성과 연관지어보면 녹차 추출물 및 비타민 E군에서 radical 소거 활성이 가장 높게 나타났으며 TBARS 생성 수준 결과에서도 과산화 지질의 억제 효과를 나타내었다. 따라서 과산화 지질 억제 작용에 있어 radical 소거 활성의 영향을 받았을 것으로 생각되며 그 결과 강력한 항산화제인 비타민 E와 녹차가 항산화 효과를 가진 항산화제로서의 가능성을 제시 할 수 있는 것으로 생각되어진다.



Table 4. Effects of green tea, prickly pear cactus, tangerine and vitamin E on TBARS production in PRP and LDL

	Control	Control	Green tea	Cactus	Tangerine	Vit.E
		AAPH	Incubated			
PRP ($\mu\text{mole}/\ell$) ¹⁾	0.24±0.08 ^c	0.37±0.04 ^a	0.32±0.04 ^{ab}	0.37±0.05 ^a	0.38±0.03 ^a	0.29±0.04 ^{bc}
LDL ($\mu\text{mole}/\ell$) ²⁾	0.73±0.02 ^{ab}	0.83±0.18 ^a	0.69±0.16 ^b	0.72±0.19 ^a	0.74±0.18 ^a	0.31±0.12 ^c

1) TBARS production in PRP(Platelet rich plasma)

2) TBARS production in human LDL(Low density lipoprotein)

Values are means ± SD of 8 rats.

Values in the same row not sharing the same superscript differ(p<0.01)

4. LDL - Oxidation

산화정도에 따른 LDL표면의 charge 변화를 agarose gel electrophoresis에서의 이동 정도를 통해 관찰하였는데, 이에 대한 결과는 <Figure 5>에 제시하였다.

Agarose gel electrophoresis에서 산화된 LDL은 (-) charge가 증가됨으로서 (+) charge로 이동하는데, 본 실험에서 이러한 (+) charge로의 이동을 어느 정도를 억제하는지를 관찰함으로써 녹차 추출물, 손바닥 선인장 추출물, 감귤박 추출물 및 비타민 E에 대한 항산화 능력을 조사하였다.

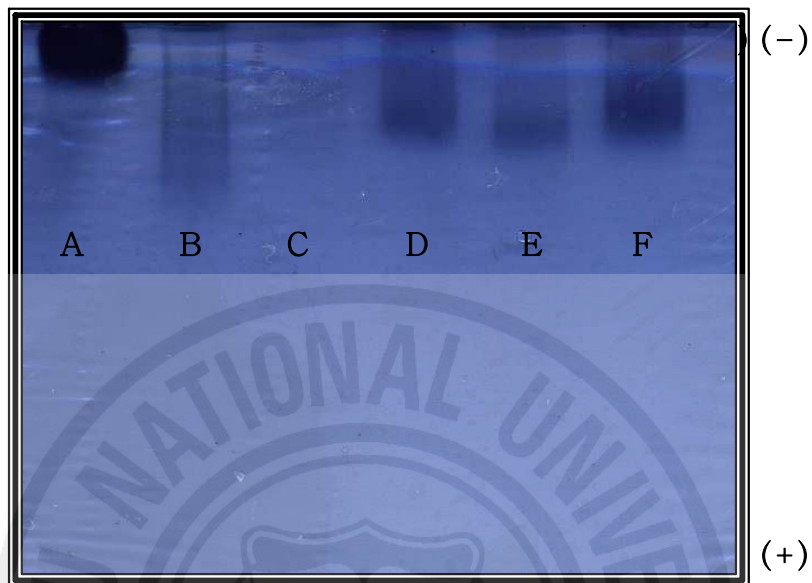
최종 농도가 5 mM이 되도록 tocopherol을 첨가시킨 비타민 E군의 경우 LDL을 CuSO₄로 산화시킨 control에 비해 (+) charge로의 이동을 억제하였다. 녹차 추출물, 손바닥 선인장 추출물, 감귤박 추출물을 각각 최종 농도 2 mg/ml가 되도록 첨가 시킨 경우 또한 control에 비해 LDL의 산화를 억제시키는 효과가 있는 것으로 나타났다.

박춘옥 등¹³⁷⁾의 연구에서 사람의 혈액에서 LDL을 분리하여 native LDL에 5μM CuSO₄와 GTE(green tea extract)를 첨가 하여 agarose gel electrophoresis를 실시하여 LDL의 이동거리를 비교한 결과 대조군인 native LDL의 이동거리는 적었으며 CuSO₄로 산화시킨 Oxid LDL의 이동거리를 컸으나 GTE를 첨가한 경우 Oxid LDL보다 이동거리가 낮아 항산화 효과를 나타내었다고 하였다. Yoshida 등⁶²⁾은 녹차 flavonoid가 LDL 산화를 억제한다고 보고하였으며, 녹차 성분 중 theaflavin digallate가 세포내 superoxide 생성을 감소시키고 iron 이온을 킬레이트화해서 macrophage에 의한 LDL 산화를 억제함으로써 agarose gel electrophoresis에서의 이동을 감소시켰다고 보고하였다. Frankel 등⁶¹⁾의 연구에서는 적포도주의 phenolic compounds가 구리에 의한 LDL 산화를 억제한다고 보고하였으며, Liu 등¹³⁸⁾은 LDL에 Cu²⁺를 첨가하여 산화를 유도하였을 때 isorhamnetin과 hesperidin이 LDL 산화 억제 효과를 나타내었으며 isorhamnetin이 hesperidin 보다 더 강력한 억제 효과를 나타내었다고 보고되었다.

본 실험에서 agarose gel electrophoresis 결과 대조군에 비해 녹차 추출물, 손바닥 선인장 추출물, 감귤박 추출물 그리고 비타민 E에서 (+) charge로의 이동을 억제하여 LDL의 산화를 억제하는 것으로 나타났다. 이는 에탄올 추출물에 함유

되어있는 flavonoids의 성분의 생리활성에 의한 것으로 생각되어지며 그 물질들에 의한 항산화 효과가 나타났을 것으로 사료된다.





A : Native LDL, B : LDL+Cu²⁺, C : Green Tea (2mg/ml),
 D : Cactus (2mg/ml), E : Tangerine (2mg/ml), F : Tocopherol(5mM)

0.7% agarose gel electrophoresis(0.05M barbital buffer)

Figure 5. LDL - Oxidation

IV. 결 론

본 연구는 흰쥐를 이용한 *in vitro* 연구로 녹차, 손바닥 선인장, 감귤박 추출물의 free radical 소거 활성을 비타민 E와 비교한 후 항산화 활성을 보고자 하였으며, 이에 대한 항산화 활성의 지표로서 혈소판 응집성, Hemolysis, 적혈구막의 Na-leak, TBARS 생성 및 LDL 산화 정도를 보았다. 각각의 실험마다 시료의 추출물은 DMSO 용매에 용해시켜 사용하였으며 산화적 조건에서 이 세 가지 추출물 및 비타민 E가 항산화 활성에 미치는 영향을 알아보려고 혈소판 응집 실험을 제외한 모든 실험에 AAPH를 사용하여 인위적으로 산화적 환경을 조성하였다. 이에 대한 연구 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. DPPH방법에 의해 각각의 녹차, 손바닥 선인장, 감귤박 추출물과 비타민 E의 free radical의 소거 활성은 최종농도 0.1mM DPPH에 대한 흡광도 50%의 감소를 가져오는 시료의 농도(scavenging activity, SC_{50})로 나타내었으며, 이에 대한 결과는 녹차추출물 $8.3 \mu\text{g}/\ell$, 손바닥 선인장 추출물 $875 \mu\text{g}/\ell$, 감귤박 추출물 $1250 \mu\text{g}/\ell$ 그리고 비타민 E는 $7.5 \mu\text{g}/\ell$ 로 나타났다.
2. 혈소판 응집에 있어서 최대응집치와 초기응집곡선이 다른 처리 군에 비해 녹차 추출물에서 유의적으로 감소하여 혈소판 응집 억제 효과를 나타내었다 ($p < 0.05$).
3. Intracellular Na량은 AAPH 처리 군과 비타민 E군에 비해 녹차, 손바닥 선인장, 감귤박 추출물에서 높게 나타났으나 유의성은 없었다. Na-leak은 유의적이지 않지만 AAPH 처리한 군에서 녹차, 손바닥 선인장, 감귤박 추출물 그리고 비타민 E에서 감소 경향을 나타내었으며 그 중에서도 손바닥 선인장 추출물에서 가장 낮은 감소를 나타내었다.

4. Hemolysis는 다른 비교 군에 비해 비타민 E에서 유의적으로 감소하였다 ($p < 0.05$).

5. PRP에서 TBARS의 생성 수준은 AAPH 비처리 군에 비해 AAPH 처리 군에서 유의적으로 높게 나타났으며, AAPH 처리한 결과 비타민 E군에서 유의적으로 감소 효과를 보였다 ($p < 0.01$). human LDL에서 TBARS의 생성 수준은 AAPH 비처리 군에 비해 AAPH 처리군에서 다소 높은 경향을 보였고, 다른 비교 군에 비해 비타민 E군에서 TBARS 생성 수준을 유의적으로 감소 시켰다 ($p < 0.01$).

6. LDL-Oxidation 반응 후 agarose gel electrophoresis에서 대조군에 비해 녹차, 손바닥 선인장, 감귤박 추출물 그리고 비타민 E에서 높게 나타났는데 이는 각 추출물의 생리활성물질인 flavonoids의 효과로 생각된다.

본 실험 결과, *in vitro* 연구에서 Intracellular Na와 Na-leak, Hemolysis 실험을 통해 생체 내에서의 녹차, 손바닥 선인장, 감귤박 추출물의 항산화 활성에 대해 단정 짓기는 어렵다. 그러나 DPPH방법을 이용한 free radical 소거 활성에서 녹차 추출물과 비타민 E에서 radical 소거 활성을 나타내었고, 혈소판 응집 실험에서는 녹차 추출물이 유의적으로 감소 효과를 나타내었으며, 혈소판 응집, PRP와 LDL에서의 TBARS 생성 수준은 유의적이지는 않지만 각각의 추출물과 비타민 E에서 감소 경향을 보였다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 녹차, 손바닥 선인장, 감귤박 추출물이 생체 내에서의 항산화 활성 여부를 단정 짓기는 어렵지만 여러 연구 결과들과 같이 각각의 추출물과 비타민 E는 유익한 생리 활성 작용을 하는 것으로 생각되어진다. 본 연구는 *in vitro* 실험으로서 생체 내에서의 각각의 추출물에 대한 뚜렷한 항산화 활성을 나타내지 않아 각 추출물의 성분과 여러 생리 활성 물질들의 작용과 기전에 대해서 좀 더 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 여겨진다.

V. 참고 문헌

- 1) Korea National Statistical Office 2005
- 2) Glowinska B, Urban M, Koput A. Cardiovascular risk factors in children with obesity, hypertension and diabetes: lipoprotein(a) levels and body mass index correlate with family history of cardiovascular disease. *Eur J Pediatr.* 2002; 161(10): 511-518
- 3) Mantha SV, Kalra J, Prasad K. Effects of probucol on hypercholesterolemia-induced changes in antioxidant enzymes. *Life Sci.* 1996; 58(6): 503-509
- 4) Del Boccio G, Lapenna D, Porreca E, Pennelli A, Savini F, Feliciani P, Ricci G, Cuccurullo F. Aortic antioxidant defence mechanisms: time-related changes in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis.* 1990; 81(2): 127-135
- 5) Touyz RM. Reactive oxygen species in vascular biology: role in arterial hypertension. *Expert Rev Cardiovasc.* 2003; Ther 1: 91-106
- 6) Yokozawa T, Nakagawa T, Kitani K. Antioxidative activity of green tea polyphenol in cholesterol-fed rats. *J Agric Food Chem.* 2002; 50(12): 3549-3552
- 7) Brune B, Zhou J, Von Knethen A. Nitric oxide, oxidative stress and apoptosis. *Kidney Int Suppl.* 2003; 84: 22-24
- 8) Yamamoto, Y, Niki, E, Eguchi, I, Kamiya Y, and Shimasaki, H. Oxidation

of biological membranes and its inhibition: Free radical chain oxidation of erythrocyte ghost membranes by oxygen. *Biochim Biophys. Acta* 1985; 819: 27-86

- 9) Terao K, Niki E. Damage to biological tissues induced by radical initiator AAPH and its inhibition by chain-breaking antioxidants. *J. Free Rad. Biol.* 1986; 193-201
- 10) Bauer G. Reactive oxygen and nitrogen species: efficient, selective and interactive signals during intercellular induction of apoptosis. *Anticancer Res.* 2000; 20: 4115-4139
- 11) Sokol RJ, Vitamin E. In : Ekhard EZ, Filler LJ, ed. Present knowledge in nutrition 7th Edition, pp.132, ILSI Press. Washington DC. 1996
- 12) Harris ED. Regulation of antioxidant enzymes. *J Nutr.* 1992; 122 : 625-626
- 13) Sies H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Exp Physiol.* 1997; 82(2): 291-295
- 14) Yi SJ, Kim MJ, Youn HH. Effects of Korean Green tea, Oolong Tea and Black Tea Beverage on the Removal of Cadmium and Antioxidative Detoxification in Cadmium Administered Rats. The 3rd International Symposium on Green Tea, Seoul, Korea, PP. 21-38, 1995
- 15) Mao, S. J. T. and Yates, M. T. Antioxidant activity of probucol and vitamin E(α -tocopherol) in plasma. *Artherosclerosis* 9. 1989; 751
- 16) Esterbauer, H. Streigel, G., Puhl, H., Oberreither. S., Rotherneder, M. and

carotenoids in preventing oxidation of low density lipoproteins. *AA. N. Y. Acad. Sci* 570. 1989; 254

- 17) Hertog MGL, Hollman PCH, Katan MB, Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J Agric Food Chem* 4. 1992; 2379-2383
- 18) Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance, *Nutr Reviews*. 1998; 56(11): 317-333
- 19) Prior RL, Cao G. Flavonoids: Diet and Health Relationships. *Nutrition in Clinical Care*. 2000; 3(5): 279-288
- 20) Laura B. Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutr Rew*. 1998; 56(11): 317-333
- 21) Cook NC, Samman S. Flavonoids-chemistry, metabolism, cardio-protective effects, and dietary source. *Nutr Biochem* 7. 1996; 66-76
- 22) Rafat HS, Josiane C, Pierre C. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochem* 26. 1987; 2489-2491
- 23) Middleton E. Some biological properties of plant flavonoids. *Annal Aller* 61. 1988; 523-527
- 24) Renaud S, Loegeril M. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet* 339. 1992; 1523-1526
- 25) Michael GL Hertog, Edith JM Feskens, Daan Kromhout. Antioxidant

- flavonols and coronary heart disease risk. *The Lancet* 349. 1997; 699
- 26) Maridonneau-Parini I, Braquet P, Garay RP. Heterogenous effect of flavonoids on K⁺ loss and lipid peroxidation induced by oxygen-free radical in human red cells. *Pharmacol Res Comm* 15. 1986; 61-72
- 27) Marta Viana, Coral Barbas, Bartolome Bonet, M Victoria Bonet, Mario Castro, M Victoria Fraile, Emilio Herrera. In vitro effects of a flavonoid-rich extract on LDL oxidation. *atherosclerosis* 123. 1996; 83-91
- 28) Anna Petroni, Milena Blasevich, Marco Slami, Nadia Papini, Gian F Monedoro, Clandio Galli. Inhibitor of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thrombosis Res* 78. 1995; 151-160
- 29) Robak J, Gryglewski RJ. Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochemical Pharmacology*. 1988; 37(5): 837-841
- 30) Husain SR, Cillard J, Cillard P. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry*. 1987; 26(9): 2489-2491
- 31) Haenen GR, Paquay JB, Korthouwer RE, Bast A. Peroxynitrite scavenging by flavonoids. *Biochemical & Biophysical Research Communications*. 1997; 236(3): 591-593
- 32) Morel I, Lescoat G, Cogrel P, Sergent O, Padeloup N, Brissot P, Cillard P, Cillard J. Antioxidant and iron-chelating activities of the flavonoids catechin, quercetin and diosmetin on iron-loaded rat hepatocyte cultures. *Biochem Pharmacol*. 1993; 45(1): 13-19

- 33) Ryu BH, Park CO. Antioxidant effect of green tea extracts on enzymatic activities of hairless mice skin induced by ultraviolet B light. *Korean J Food Sci Technol.* 1997; 29(2): 355-361
- 34) Saito ST, Gosmann G, Saffi J, Presser M, Richter MF, Bergold AM, Characterization of the Constituents and Antioxidant Activity of Brazilian Green Tea(*Camellia sinensis* var. *assamica* IAC-259 Cultivar) Extracts. *J Agric Food Chem.* 2007; 55(23): 9409-9414
- 35) Nada Y, Anzai K, Mori A, Kohno M, Shinmei M, Packer L. Hydroxyl and superoxide anion radical scavenging activities of natural source antioxidants using the computerized JES-FP30 spectrometer system. *Biochem Mol Biol Int.* 1997; 42(1): 35-44
- 36) wilmsen PK, Spada DS, Salvador M. Antioxidant activity of the flavonoid hesperidin in chemical and biological systems. *J Agric Food Chem.* 2005; 53(12): 4757-4761
- 37) Butera D, Tesoriere L, Di Gaudio F, Bongiorno A, Allegra M, Pintaudi AM, Kohen R, Livrea MA. Antioxidant activities of sicilian prickly pear(*Opuntia ficus indica*) fruit extracts and reducing properties of its betalains: betanin and indicaxanthin. *J Agric Food Chem.* 2002; 50(23): 6895-6901
- 38) 이경석, 오창석, 이기영. 천년초 선인장 추출물의 항산화 효과. *한국식품과학회지.* 2005; 37(3): 474-478
- 39) E. Niki, T Saito, A Kawakami, Y Kamiya. Inhibition of oxidation of methyl linoleate in solution by vitamin E and vitamin C. *J. Bio. Chem.*

- 1984; 259: 4177-4182
- 40) Wiseman, H. Dietary influences on membrane function: Importance in protection against oxidative damage and disease. *J. Nutr. Biochem* 7. 1996; 2-5
- 41) Ferrali, M., Signorini, C., Caciotti, B., Sugherini L., Ciccoli, L., Giachetti, D., Comporti, M. Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Letters* 416. 1997; 123-129
- 42) 손정숙, 김미경. Hesperidin과 Naringin이 흰쥐의 항산화능에 미치는 영향, *한국영양학회지*. 1998; 31(4): 687-696
- 43) Burrer, F., Lebreton, P, H. and Voirin, B. Les aglycones falvoniques de cactus. *J. Nat. Prod.* 1982; 45: 687
- 44) Junji Terao, Mariusz Piskula, and Qing Yao. Protective Effects of Epicatechin Gallate and Quercetin on Lipid Peroxidation in Phospholipid Bilayers. *Archives of Biochem. and Biophys.* 1994; 308(1): 278-284
- 45) Watson RR, Leonard TK. Selenium and vitamin A, E and C: Nutrients with cancer prevention properties. *J Am Diet Assoc.* 1986; 86: 505-510
- 46) Verstraete M, Fuster V. Thrombogenesis and antithrombic therapy. In : Alexander RW, Schlant RC, Fuster v. *Hurst's Heart*. 9th Ed, 1998; pp.1501-1532, McGraw-Hill
- 47) Epstein, F. H., Fuster, V., Badjumon, L., Badimon, J. and Chesbro, J. H.

The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *New engl. J. of Med.* 1982; 326: 242

- 48) Holmsen H. Physiological Functions of Platelets. *Annals of Medicine.* 1989; 21: 23-30
- 49) Riess H, Braun G, Brehm G, Hiller E. Critical evaluation of platelet aggregation in whole human blood. *Am J Clin Pathol.* 1996; 85: 50-56
- 50) Carter AJ, Heptinstill S. Platelet aggregation in whole blood : The role of thromboxane A₂ and adenosine diphosphate. *Thrombosis and Haemostasis.* 1985; 54(3): 612-616
- 51) Nevia TJ, Morais L, Polack M, Simoes CM, D'Amico EA. Effects of catechins on human blood platelet aggregation and lipid peroxidtion. *Phytother Res.* 1999; 13: 597-600
- 52) Lill G, Voit S, Schror K, Weber AA. Complex effects of different green tea catechins on human platelets. *FEBS Lett.* 2003; 546 : 265-270
- 53) Kang WS, Lim IH, Yuk DY, Chung KH, Park JB, Yoo HS, Yun YP. Antithrombotic activities of green tea catechins and (-)-epigallocatechin gallate. *Thrombosis Research.* 1999; 96: 229-237
- 54) Wolfram R, Budinsky A, Efthimiou Y, Stomatopoulos J, Oguogho A, Sinzinger H., Daily prickly pear consumption improves platelet function., *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2003; 69(1): 61-66
- 55) Howard, N. H., Dieter, M. K., poetro, A.. Gabriel, B. B.. Giuseppe, G..

- Juluana, H., Hazel, P. and Alex, S. Biochemical and cytotoxic characteristics of an *in vivo* circulation oxidized LDL. *J. Lipid Research*. 1994; 35: 669-677
- 56) Yo, I., Hidekuni, I., Kohji, S., Hideyuki, H., Isamu, F. and Yasushi, S., Sho, Y.: Moderate oxidation of hypertriglyceridemic LDL causes apolipoprotein-B epitope change and enhances its uptake by macrophages. *Biochemical Biophysical Acta*. 1992; 1129: 60-64
- 57) Henriksen, T., Mahoney, E. M. and Steinber, D. : Enhanced macrophage degradation of biologically modified low density lipoprotein. *Atherosclerosis*. 1983; 3: 149-159
- 58) 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. *Atherosclerosis*. 1984; 4: 357-364
- 59) Steinbrecher, U., Parthasarathy, S., Leak, 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. *pro. Natl. Acad. Sci*. 1984; 83: 3883-3887
- 60) Bruce AF, James D, Carpo MD. Biology of disease: Free radicals and tissue injury. *Lab Invest*. 1982; 47: 412-426
- 61) Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet*. 1993; 341(8843): 454-457

- 62) Yoshida H, Ishikawa T, Hosoi H, Suzukawa M, Ayaori M, Hisada T, Sawada S, Yonemura A, Higashi K, Ito T, Nakajima K, Yamashita T, Tomiyasu K, Nishiwaki M, Ohsuzu F, Nakamura H. Inhibitory effect of tea flavonoids on the ability of cells to oxidize low density lipoprotein. *Biochem Pharmacol.* 1999; 58(11): 1695-1703
- 63) Naderi GA, Asgary S, Sarraf-Zadegan N, Shirvany H. Anti-oxidant effect of flavonoids on the susceptibility of LDL oxidation. *Mol Cell Biochem.* 2003; 246(1-2): 193-196
- 64) Shin MK. The science of Green Tea. *Korean J Dietary Culture.* 1994; 9(4): 433-445
- 65) Park CO, Jin SH and Ryu BH. Antioxidant Activity of Green Tea Extracts toward Human Low Density Lipoprotein. *Korea J Food Sci Technol* 1996; 28(5): 850-858
- 66) Yukiko M, Tsuyoshi C, Isao T, Haruko K, Shinji M, Keizo U, Yukihiro H, Masahiko I, Takako T. Tea catechins prevent the development of atherosclerosis in apoprotein E-deficient mice. *J Nutr.* 2001; 131: 27-32
- 67) S Khokhar, SGM Magnusdottir. Total phenol, catechin, and caffeine contents of teas commonly consumed in the United Kingdom. *J Agric Food Chem.* 2002; 50: 565-570
- 68) Vinson JA, Dabbagh YA. Effect of green and black tea supplementation on lipids, lipid oxidation and fibrinogen in hamster: Mechanisms for the epidemiological benefits of tea drinking. *FEBS Lett.* 1988; 33(1-2): 44-46

- 69) Yamaguchi Y, Hayashi M, Yamazoe H, Kunitomo M. Preventive effects of green tea extract on lipid abnormalities in serum, liver and aorta of mice fed a atherogenic diet. *Nippon Yakurigaku Zasshi*. 1991; 7: 329-337
- 70) 진현화, 양정례, 정종화, 김양하, 고 콜레스테롤 식이 투여 흰쥐에 있어서 녹차의 콜레스테롤 저하 효과. *한국식품영양과학회지*. 2004; 33(1) : 47-51
- 71) Yang TT, Koo MW. Hypocholesterolemic effects of Chinese tea. *Pharmacol Res*. 1997; 35: 505-512
- 72) Nevia TJ, Morais L, Polack M, Simoes CM, D'Amico EA. Effects of catechins on human blood platelet aggregation and lipid peroxidation. *Phytother Res*. 1999; 13: 597-600
- 72) 윤여표, 강원식, 이미애. 녹차 카테킨류의 항혈전 효과. *한국식품위생안전성학회지*. 1996; 11(2): 77-82
- 73) Zhang A, Zhu QY, Luk YS, Fung KP, Chen ZY. Inhibitory effects of jasmine green tea epicatechin isomers on free radical-induced lysis of red blood cells. *Life Sci*. 1997; 61: 384
- 74) Zhu QY, Huang Y, Tsang D, Chen ZY, Regeneration of alpha-tocopherol in human low-density lipoprotein by green tea catechin, *J Agric Food Chem*. 1999; 47(5): 2020-2025
- 75) 이영자, 안명수, 오원택. 녹차, 우롱차 및 홍차의 용매별 추출물의 카테킨류 함량 및 항산화효과에 관한 연구. *한국식품위생안전성학회지*. 1998; 13(4): 370-376

- 76) Osada K, Takahashi M, Hoshina S, Nakamura M, Nakamura S, Sugao M. Tea catechin inhibit cholesterol oxidation accomanying oxidation of low density lipoprotein in vitro. *Comp Biochem Physicol C Toxicol Pharmacol*. 2001; 128(2): 153-164
- 77) Moresi, M, Clementi, F, Rossi, J, Medici, R, and Vinti, L. Production of biomass from untreated orange peel by *Fusarium avenaceum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 1987; 27: 37-45
- 78) Grandall, P. G., and Kesterson. J. W. and Dennis, S. Storage stability of carotenoids in orange peel oil. *J. Food Sci*. 1983; 48: 924-927
- 79) 은종방, 정영민, 우건조. 감귤과육 및 과피의 식이섬유와 플라보노이드 검색 및 정량. *Korean J Food Sci Techol*. 1996; 28(2): 371-377
- 80) 손홍수, 김현숙, 권태봉, 주진순. 감귤의 Bioflavonodis 분리, 정제 및 혈압강 하효과. *한국영양식량학회지*. 1992; 21(2): 136-142.
- 81) Monforte MT, Trovato A, Kirjavaninen S, Forestieri AM, galati EM, Lo Curto RB. Biological effects of hesperidin, a citrus flavonoid: hypolipidemic activity on experimental hypercholesterolemia in rat. *Farmaco*. 1995; 50(9): 595-599
- 82) Bok, S. H., Lee, S. H. Park, Y. B., Bae, K. H., Son, K. H., Jeong, T. S. and Choi, M. S. Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydrooxy-3-methyl-glutaryl CoA reductase and acyl CoA: cholesterol transferase are lower in rat fed citrus peel extract or a mixture of citurs bioflavonoids. *J Nutr*. 1999; 129: 1182-1185

- 83) Rapavi E, Kocsis I, Feher E, Szentmihalyi K, Lugasi A, Szekely E, Blazovics A. The effect of citrus flavonoids on the redox state of alimentary-induced fatty liver in rats. *Nat Prod Res.* 2007; 21(3): 274-281
- 84) Jin YR, Han XH, Zhang YH, Lee JJ, Lim Y, chung JH, Yun YP. Antiplatelet activity of hesperetin, a bioflavonoid, is mainly mediated by inhibition of PLC-gamma2 phosphorylation and cyclooxygenase-1 activity. *Atherosclerosis.* 2007; 194(1): 144-152
- 85) Maridonneau-Parini I, Braquet P, Garay RP. Heterogeneous effect of flavonoids on K⁺ loss and lipid peroxidation induced by oxygen-free radicals in human red cells. *Pharmacol Res Commun.* 1986; 18(1): 61-72
- 86) Jeon SM, Kim HK, Kim HJ, Do GM, Jeong TS, Park YB, Choi MS, Hypocholesterolemic and antioxidative effects of naringenin and its two metabolites in high-cholesterol fed rats. *Transl Res.* 2007; 149(1): 15-21
- 87) Santus R, Rerdrix L, Haigle J, Morliere P, Maziere P, Maziere JC, Maziere C, Labrid C. Daflon as a cellular antioxidant and a membrane-stabilizing agent in human fibroblasts irradiated by ultraviolet A radiation. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 1991; 8: 200-205
- 88) Han SS, You IJ. Studies on Antimicrobial Activities and Safety of Natural Naringin in Korea. *Kor J Mycol.* 1988; 16(1): 33-40
- 89) 이남호, 윤진석, 이봉호, 최병욱, 박관하, 손바닥선인장(*Opuntia ficus-indica*)의 라디칼 소거 활성. Tyrosinase 억제 활성, 항알레르기 활성 검색. *생약학회지*/2000; 31(4): 412-415

- 90) Lee, YC, Hwang, KH, Han, DH and Kim, SD. Compositions of *Opuntia ficus-indica*. *Korean J. Food Sci.* 1997; 29: 847-853
- 91) 정미숙, 김경희. 선인장 붉은 열매에서 추출한 Betanine 색소의 안정성. *Korean J. Soc. Food Sci.* 1996; 12(4): 506-510
- 92) Ghansah E, Kopsombut P, Malleque MA, Brossi A. Effect of mescaline and some of its analogs on cholinergic neuromuscular transmission. *Neuropharmacology.* 1993; 32(2): 169-174
- 93) 정세준, 전기용, 강태현, 고응배, 김윤철. 손바닥선인장 열매의 Flavonoid 성분, *생약학회지* 1999; 30(1): 84-97
- 94) Wolfram R, Budinsky A, Efthimiou Y, Stomatopoulos J, Oguogho A, Sinzinger H, Daily prickly pear consumption improves platelet function, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2003; 69(1): 61-66
- 95) Fernandez ML, Lin EC, Trejo A, McNamera DJ. Prickly pear(*Opuntia* sp.) pectin reverses low density lipoprotein receptor suppression induced by a hypercholesterolemic diet in guinea pigs. *J Nutr.* 1992; 122(12): 2330-2340
- 96) Oh PS, Lim KT. Glycoprotein(90 kDa) isolate from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* MAKINO lowers plasma lipid level through scavenging of intracellular radicals in triton WR-1339-induced mice. *Biol Pharm Bull.* 2006; 29(7): 1391-1396
- 97) Li CY, Cheng XS, Cui MZ, Yan YG. Regulative effect of *Opuntia* powder on blood lipids in rats and its mechanism. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2005; 30(9): 694-696

- 98) Ennouri M, Fetoui H, Bourret E, Zeghal N, Attia H. Evaluation of some biological parameters of *Opuntia ficus indica*. 1. Influence of a seed oil supplemented diet on rats. *Bioresour Technol*. 2006; 97(12): 1382-1386
- 99) 강민숙, 강정숙. 감귤박, 다시마, 손바닥 선인장 분말을 함유한 식이의 급여가 고콜레스테롤혈증 흰쥐의 체내 지질수준과 장내 콜레스테롤 흡수, 혈소판 응집성 및 간 조직에 미치는 영향. *한국영양학회지*. 2001; 34(2): 141-149
- 100) Palumbo B, Efthimiou Y, Stamatopoulos J, Oguogho A, Budinsky A, Palumbo R, Sinzinger H. Prickly pear induces upregulation of liver LDL binding in familial heterozygous hypercholesterolemia. *Nucl Med Rev Cent East Eur*. 2003; 6(1): 35-39
- 101) Qiu Y, Chen Y, Pei Y, Matsuda H, Yoshikawa M. Constituents with radical scavenging effect from *Opuntia dillenii*: structures of new alpha-pyrone and flavonol glycoside. *Chem Pharm Bull(Tokyo)*. 2002; 50(11): 1507-1510
- 102) Tesoriere L, Butera D, Pintau AM, Allegra M, Livrea MA. Supplementation with cactus pear(*Opuntia ficus-indica*)fruit decreases oxidative stress in health humans: a comparative study with vitamin C. *Am J Clin Nutr*. 2004; 80(2): 391-395
- 103) Laurenz JC, Collier CC, Kuti JO. Hypoglycemic effect of *Opuntia lindheimeri* Englem in a diabetic pig model. *Phytother Res* 2003; 17(1): 26-29
- 104) Shin, J. E., Han, M. J., Lee, Y. C., Moon, Y. I., Kim, D. H., Antidiabetic activity of *Opuntia ficus-indica* var. *sabotan* on *db/db* mice. *Kor. J.*

Pharmacogn. 2002; 33(4): 332-336

- 105) Lee, H. J., Lee Y. W., Kim, J. H., A study on antiulcer effects of *Opuntia dillenii* Haw. on stomach ulcer induced by water-immersion stress in rats, *K. Fd Hyg. Safety.* 1998; 13(1): 53-61
- 106) Chung, H. J., Antioxidative and antimicrobial activities of *Opuntia ficus indica* var. *saboten*. *Korean J. Soc. Food Sci.* 2000; 16(2): 160-166
- 107) Park, E. H., Hwang, S. E. and Kahng, J. H. Anti-inflammatory activity of *Opuntia ficus-indica*. *Yakhak Hoeji.* 1998; 42: 621-626
- 108) Chung, M. S. and Kim, K. H., Stability of Betanine extracted from *Opuntia ficus-indica* var. *sabolen*. *Korean J. Soc. Food Sci.* 1996; 12(4): 506-51
- 109) Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Technology.* 1995; 28: 25-30
- 110) Buckingham KW. Effect of dietary polyunsaturated/saturated fatty acid ratio and dietary vitamin E on lipid peroxidation in the rat. *J. Nutr.* 1985; 115(11): 1425-1435
- 111) Smith JB, Ash KO. Hentschel WM, Sprowell WL, Williams RR. A simplified method for simultaneously determining countertransport and cotransport in human erythrocytes. *Clin Chim Acta.* 1984; 28: 137(2): 169-177
- 112) Smith JB, Ash KO, Sprowell WL, Hentschel WM, Williams RR. An

- improved non-radioisotopic method for measuring ouabain-sensitive Na⁺-efflux from erythrocytes. *Clin. Chim. Acta.* 1984; 30: 143(3): 295-299
- 113) Yagi K. A simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem Med.* 1976; 15(2) : 212-216
- 114) Fisher WR. Heterogeneity of plasma low density lipoprotein: manifestation of the physiologic phenomenon in man. *Metabolism.* 32 : 283-291
- 115) Basu SK, Goldstein JL, Anderson RGW and Brown MS, Degradation of cationized low density lipoprotein and regulation of cholesterol metabolism in homozygous familial hypercholesterolemia fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1976; 73: 3178-3182
- 116) Liuji Chen, Xianqiang Yanqiang Yang, Park Jaeil, Shengrong Shen, Yuefei Wang, Mechanism of Scavenging Reactive Oxygen Species of Tea catechins. 한국식품과학회 제6회 국제녹차심포지움. 2001, Vol. 6, No. 0
- 117) Lee JC, Kim HR, Kim J, Jang YS, Antioxidant property of an ethanol extract of the stem of *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. *J Agric Food Chem.* 50(22): 6490-6496, 2002
- 118) Sagesaka-Mitane Y, Miwa M, Okada S, Platelet aggregation inhibitors in hot water extract of green tea. *Chem Pharm Bull(Tokyo).* 1990; 38(3): 790-793
- 119) Mcgregor L, Bellangeon M, Chignier E, Lerond L, Rousselle C, Mcgregor HL, Effect of a micronized purified flavonoid fraction on *in vivo* platelet

functions in the rat. *Thromb Res.* 1999; 94(4): 235-240

- 120) Jin YR, Han XH, Zhang YH, Lee JJ, Lim Y, Chung JH, Yun YP, Antiplatelet activity of hesperetin, a bioflavonoid, is mainly mediated by inhibition of PLC-gamma2 phosphorylation and cyclooxygenase-1 activity. *Atherosclerosis.* 2007; 194(1): 144-152
- 121) Osman HE, Maalej N, Shanmuganayagam D, Folts JD, Grape juice but not orange or grapefruit juice inhibits platelet activity in dogs and monkeys. *J Nutr.* 1998; 128(12): 2307-2312
- 122) Mardla V, Kobzar G, Samel N, Potentiation of antiaggregating effect of prostaglandins by alpha-tocopherol and quercetin. *Platelets.* 2004; 15(5): 319-324
- 123) González-Correa JA, Arrebola MM, Guerrero A, Cañada MJ, Muñoz Marín J, Sánchez De la Cuesta F, De la Cruz JP, Antioxidant and antiplatelet effects of the alpha-tocopherol-aspirin combination in type 1-like diabetic rats. *Life Sci.* 2006; 279(15): 1405-12
- 124) Rizvi SI, Zaid MA, Impairment of sodium pump and Na/H exchanger in erythrocytes from non-insulin dependent diabetes mellitus patients : effect of catechis. *Clin Chim Acta.* 2005; 354(1-2): 59-67
- 125) Saffari Y, Sadrzadeh SM, Green tea metabolite EGCG protects membranes against oxidative damage in vitro. *Life Sci.* 2004; 74(12): 1513-1518
- 126) Sridevi N, Venkataraman P, Senthilkumar K, Krishnamoorthy G,

- Arunakaran J. Oxidative stress modulates membrane bound ATPases in brain regions of PCB (Aroclor 1254) exposed rats: protective role of alpha-tocopherol. *Biomed Pharmacother.* 2007; 61(7): 435-440
- 127) Nanjo F, Honda M, Okushio K, Matsumoto N, Ishigaki F, Ishigami T, Hara Y, Effects of dietary tea catechins on alpha-tocopherol levels, lipid peroxidation, and erythrocyte deformability in rats fed on high palm oil and perilla oil diets. *Biol Pharm Bull.* 1993; 16(11): 1156-1159
- 128) Ji YB, Ji CF, Zou X, Gao SY. Study on the effects of two kinds of cactus polysaccharide on erythrocyte membrane protein and fluidity of the lipid in S180 mice, *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2004; 29(10): 967-670
- 129) Shiva Shankar Reddy CS, Subramanyam MV, Vani R, Anbum Devi S, In vitro models of oxidative stress in rat erythrocytes: Effect of antioxidant supplements, *Toxicol In vitro.* 2007; 21(8): 1355-1364
- 130) Ostrowska J, Skrzydlewska E, The comparison of effect of catechins and green tea extract on oxidative modification of LDL in vitro. *Adv Med Sci.* 2006; 51: 298-230
- 131) Hirano-Ohmori R, Takahashi R, Momiyama Y, Taniguchi H, Yonemura A, Tamai S, Green tea consumption and serum malondialdehyde-modified LDL concentrations in healthy subjects. *J Am Coll Nutr.* 2005; 24(5): 342-346
- 132) 강원식, 이윤희, 정현희, 강민경, 김택중, 홍진태, 윤여표. 녹차카테킨이 지질 과산화 및 Superoxide dismutase에 미치는 영향. *한국식품위생안전성학회지*

2001; 16(1): 41-47

- 133) Gnanasoundari M, Pari L, Impact of naringenin on oxytetracycline-mediated oxidative damage in kidney of rats, *Ren Fail.* 2006; 28(7): 599-605
- 134) Yen GC, Duh PD, Tsai HL, Huang SL, Pro-oxidative properties of flavonoids in human lymphocytes, *Biosci Biotechnol Biochem.* 2003; 67(7): 1215-1222
- 135) Safari MR, Sheikh N, Effects of flavonoids on the susceptibility of low-density lipoprotein to oxidative modification. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids.* 2003; 69(1): 73-77
- 136) Cirico TL, Omaye ST, Additive or synergetic effects of phenolic compounds on human low density lipoprotein oxidation. *Food Chem Toxicol* 2005; 44(4): 510-516
- 137) 박춘옥, 진성현, 류병호, 사람의 Low density lipoprotein에 대한 녹차의 항산화 활성. *한국식품과학회지.* 1996; 28(5): 850-858
- 138) Liu R, Meng F, Liu Y, Bai H, Liu BW. Inhibitory effect of Isorhamnetin and Hesperidin on LDL oxidation induced by Cu²⁺. *Zhong Yao Cai.* 2007; 30(6): 677-681

VI. 초 록

본 실험에서는 녹차 추출물, 손바닥 선인장 추출물, 감귤박 추출물의 radical 소거 활성을 비타민 E와 비교하였고 각 추출물의 항산화 활성의 지표로 혈소판 응집, 적혈구막의 Na leak과 TBARS 생성을 보고자 하였으며 Sprague Dawley rats를 이용하여 *in vitro* 실험을 하였다. DPPH radical 소거 활성 실험 결과는 0.1 mM DPPH에 대한 흡광도 50%의 감소를 가져오는 시료의 농도 (SC_{50})로 나타내었으며, 녹차에서 $8.3 \mu\text{g}/\ell$, 손바닥 선인장은 $875 \mu\text{g}/\ell$, 감귤박은 $1250 \mu\text{g}/\ell$ 그리고 비타민 E에서 $7.5 \mu\text{g}/\ell$ 으로 나타났다. 그 결과 비타민 E와 각 추출물을 비교해 보면 비타민 E는 DPPH에 첨가한 직후 라디칼 소거능이 완료되었고 손바닥 선인장과 감귤박 추출물의 경우 계속 감소하는 것으로 나타나 라디칼 소거능이 지속될 것으로 생각되어진다. 혈소판 응집은 녹차 추출물군에서 최대응집과 초기응집 모두 다른 비교군 및 비타민 E 군에 비해 유의적으로 감소하였다 ($p<0.05$). 적혈구의 Intracellular Na는 대조군과 비타민 E에 비해 녹차, 손바닥 선인장, 감귤박 추출물 처리 군에서 높게 나타났다. AAPH 처리한 적혈구의 Na leak은 손바닥 선인장 추출물군에서 다른 비교군과 비타민 E에 비해 감소 경향을 보였다. AAPH처리한 적혈구의 Hemolysis는 대조군과 각각의 추출물 군에 비해 비타민 E군에서 유의적으로 감소하였다 ($p<0.05$). PRP에서의 TBARS 생성 수준은 AAPH 비처리 군에 비해 AAPH 처리 군에서 유의적으로 증가하였고 비타민 E군에서 AAPH 처리에 의해 증가한 TBARS 생성을 유의적으로 감소시켰다 ($p<0.05$). human LDL에서의 TBARS 생성 수준은 AAPH 비처리 군에 비해 AAPH 처리 군에서 유의적이지는 않지만 다소 증가하는 경향을 보였고 다른 비교 군에 비해 비타민 E군에서 유의적으로 TBARS 생성을 감소시켰다 ($p<0.01$).

본 *in vitro* 연구 결과에서는 녹차 추출물 군에서 혈소판 응집 억제 효과를 나타내었고 적혈구 막의 안정성과 TBARS 생성에 대한 항산화 효과를 보여주었다. 비타민 E는 지질과산화 작용과 막 손상을 방지하여 세포막의 산화적 손상으로부터 방어적인 효과를 나타내었다.