

# 碩士學位論文

생선기름을 공급받은 흰쥐에 있어서  
적혈구 나트륨 유출, 혈소판 응집, TBARS의 생성과 LDL  
산화에 대한 flavonoids의 항산화 효과



濟州大學校 大學院

金 良 姬

2002 年 12 月

생선기름을 공급받은 흰쥐에 있어서  
적혈구 나트륨 유출, 혈소판 응집, TBARS의 생성과 LDL  
산화에 대한 flavonoids의 항산화 효과

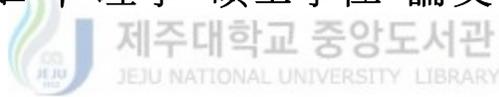
指導教授 姜晶淑

金良姬

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함.

2002 年 12 月

金良姬의 理學 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 大學院

2002 年 12 月

Antioxidant effects of flavonoids on  
erythrocyte Na leak, platelet aggregation,  
TBARS production and LDL oxidation  
in Sprague Dawley rats fed fish oil

Yang-Hee Kim

(Supervised by professor Jung-Sook Kang)

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

DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND NUTRITION  
GRADUATE SCHOOL  
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY

2002. 12.

# 목 차

초 록 .....	VI
I. 서론 .....	1
II. 실험재료 및 방법.....	7
1. 실험동물 및 식이배합.....	7
2. 시료수집 .....	9
3. 시료분석 .....	9
1) DPPH Radical 소거능력	
2) 혈소판 응집	
3) Na efflux 측정	
(1) 적혈구 용액의 준비	
(2) Na leak	
4) 적혈구 용혈	
5) 혈장 지질 농도 분석	
6) 혈장 당 농도 분석	
7) 혈장, PRP의 TBARS 측정	
8) LDL-Oxidation	
4. 통계처리방법 .....	15

III. 실험결과 및 고찰 .....	16
1. 항산화물질의 Radical 소거능의 비교 .....	16
2. 체중증가량, 식이섭취량, 식이효율 .....	19
3. 혈장 포도당, 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 및 중성지방.....	22
4. 혈소판 응집.....	25
5. Hematocrit와 적혈구 용혈 .....	28
6. Na leak .....	31
7. 혈장과 PRP의 TBARS의 수준 .....	34
8. LDL-Oxidation .....	37
IV. 결론 .....	40
V. 참고문헌 .....	42
Abstract .....	53

## List of tables

Table 1. Composition of experimental diets .....	8
Table 2. Comparison of radical scavenging activity of dietary flavonoids .....	18
Table 3. Effects of feeding diets containing vit. E, hesperidin, quercetin or prickly pear cactus on growth rate and feed intake .....	21
Table 4. Effects of feeding diets containing vit. E, hesperidin, quercetin or prickly pear cactus on the plasma glucose, cholesterol and triglyceride contents in rats.....	24
Table 5. Effects of feeding diets containing vit. E, hesperidin, quercetin or prickly pear cactus on the platelet aggregation in rats.....	27
Table 6. Effects of feeding diets containing vit. E, hesperidin, quercetin or prickly pear cactus on hematocrit and erythrocyte hemolysis.....	30

Table 7. Effects of feeding diets containing vit. E, hesperidin, quercetin or prickly pear cactus on the erythrocyte Na efflux in rats.....33

Table 8. Effects of feeding diets containing vit. E, hesperidin, quercetin or prickly pear cactus on TBARS levels in plasma and PRP..... 36

## List of figures

Figure 1. The generic structure of flavonoids .....	6
Figure 2. Preparation of low density lipoprotein (LDL).....	14
Figure 3 LDL-Oxidation.....	39

## 초 록

Flavonoids는 콩류, 포도, tea, 양파, 감귤류 등의 식물에 담황색 또는 노란색의 수용성 색소물질로 존재한다. 역학조사에서 flavonoids가 함유된 식품 섭취와 관상심장질환 이환률 사이에는 역의 상관관계가 존재한다고 알려져 있다. *In vitro* 연구에서 flavonoids는 강력한 free radicals 소거 활성을 통해 지질과산화와 혈소판 응집 억제 효과를 나타냈다고 한다. 생선기름의 섭취는 혈중 지질 수준을 감소시키고, 혈소판 응집을 억제시켜 관상심장질환의 예방 효과가 있다고 알려져 있다. 그러나 과도한 섭취는 생선기름이 갖는 고도의 불포화도로 인해 체내 외에서 free radicals에 의한 산화적 손상을 쉽게 받을 수 있다. 따라서 본 실험에서는 생선기름을 섭취하는 흰쥐에서 적혈구 나트륨 유출, 혈소판 응집, 혈장과 PRP에서의 TBARS 생성, 그리고 혈장 지질 수준에 대해 vit. E와 flavonoids의 첨가가 어떠한 영향을 주는지 알아보하고자 4주간 vit. E를 결핍시킨 8주령 Sprague Dawley 숫쥐를 각 군에 9마리씩 나누어 *in vivo* 실험을 수행하였다. 식이의 지방 급원에 따라 lard군과 어유섭취군들로 크게 나뉘고, 어유섭취군들은 vit. E 결핍군을 대조군으로 하여, vit. E 첨가군, hesperidin군, quercetin군, 선인장열매군으로 구성하였다. Lard군과 vit. E 첨가군에는 vit. E를 50 IU/kg diet 첨가하였고, hesperidin군과 quercetin군은 각각 0.5%를, 선인장열매군에는 10%의 선인장열매 분말을 식이에 첨가하여 4주간 급여하였다.

DPPH radical 소거 실험 결과에 의한 식이의 잠재적 항산화능은 quercetin 식이가 1480으로 가장 높고, vit. E, hesperidin, 선인장열매 식이는 각각 12.2, 15.5, 5이었다. 혈장의 포도당, 총콜레스테롤 그리고 중성지방은 어유섭취군들이 lard군에 비해 유의적으로 감소하였다 ( $P < 0.05$ ). 총 콜레스테롤은 선인장열매군이 다른 어유섭취군들에 비해 유의적으로 감소하였고, HDL-콜레스테롤은 vit. E 첨가군이 유의적으로 증가하였다 ( $P < 0.05$ ). 혈소판 응집은 각 그룹 간 유의차가 없었으며, 생선기름 섭취에 의한 항응집 효과도 나타나지 않았다. 그리고 hesperidin군은 유의적이지는 않지만, initial slope이 가장 낮고

maximum aggregation이 가장 높게 나타났다. 적혈구 용혈과 PMS처리에 의한 적혈구 나트륨 유출은 각 그룹간 유의적 차이가 없었으나, vit. E 첨가군과 hesperidin군이 다른 비교군에 비해 감소한 것을 볼 수 있었다. 혈장과 PRP에서의 TBARS 생성은 다른 어유섭취군들에 비해 vit. E 결핍군과 hesperidin군이 유의적으로 증가하였고 ( $P < 0.05$ ), 식이 지방에 따른 TBARS생성은 vit. E를 공급한 경우 차이는 없었다. LDL-Oxidation 반응 후 agarose gel electrophoresis에서 flavonoids의 LDL 산화 억제 효과는 선인장열매 에탄올추출물이 가장 높았으며, quercetin과 hesperidin도 다소 억제 효과가 있었다.

본 연구 결과 vit. E와 flavonoids의 항산화 효과는 free radical 소거 활성과 밀접한 상관관계는 없는 것으로 보이며, vit. E와 선인장열매는 생체 내에서 일관되게 유의한 효과들을 나타냈다.

## I. 서론

오늘날 경제성장으로 인한 생활수준의 향상과 의학의 발달로 인간의 평균 수명은 계속해서 증가하고 있으나, 뇌혈관 질환·고혈압 등의 순환기계 질환, 암 그리고 노화관련 질환 등의 발생률 또한 크게 높아지고 있어 건강한 상태로 장수하는 것에 대한 관심이 집중되고 있다 (사망원인통계결과보고서, 2000). 암에 이어서 사망원인이 되고 있는 순환기계 질환의 주요 원인은 동맥경화증이며, 동맥경화증은 혈액내의 콜레스테롤 수준이 높은 경우 발병률이 높음은 잘 알려진 사실이다. 혈액 내의 콜레스테롤의 수준은 식이 내의 콜레스테롤 함량보다는 포화지방산과 불포화 지방산의 함량에 의해 더 큰 영향을 받는다 (Herold et al., 1986).

Eicosapentaenoic acid (EPA, C<sub>20:5</sub>)와 Docosahexaenoic acid (DHA, C<sub>22:6</sub>) 같은  $\omega$ -3계 고도 불포화 지방산을 다량 함유하고 있는 생선기름을 섭취할 경우, PUFA가 혈청지질의 수준을 감소시키고, HDL-콜레스테롤을 증가시킴으로써 생선기름은 항 동맥경화 기능을 가진다고 보고되었다 (Dyerberg et al., 1975; Simopoulos, 1991; Harris, 1989). 생선기름에 있는  $\omega$ -3계 지방산은 간에서 합성·분비되는 중성 지방량을 감소시킴으로써 VLDL 생성 분비량을 떨어뜨린다 (Clarke et al., 1988). 그리고 간에서의 콜레스테롤 합성율을 낮추며 대변을 통한 스테로이드의 배설량을 높여 줌으로써 혈액내의 콜레스테롤 수준을 저하시킨다 (Simopoulos, 1991). 또한 HDL의 역수송 기능을 보다 활성화시켜 줌으로써 혈액 내 유해 콜레스테롤 함량을 낮추고 유익한 콜레스테롤인 HDL-콜레스테롤을 높여준다 (Harris, 1989).

EPA는 cyclooxygenase와 lipoygenase에 의해 Thromboxane A<sub>3</sub> (TX A<sub>3</sub>)와 Prostaglandin I<sub>3</sub> (PG I<sub>3</sub>)등을 합성한다. 혈액을 응고하는 작용을 하는 TX A<sub>3</sub>는 활성이 낮지만, PG I<sub>3</sub>는 혈관을 확장시키고, 혈전생성을 저해하는 항응고 효과 작용이 높다. 따라서 EPA는 높은 항응고 작용과 혈소판 응집 저해 작용에 의해 동맥경화증을 예방하거나 치료하는 효과가 있다 (Samuelsson,

1978). 그러나 이러한 생선기름을 많이 섭취할 경우 세포막을 이루는 인지질 층이 고도의 불포화지방산으로 구성되게 되며, 이로 인해 인지질 층은 체내의 정상적인 대사과정에 의해 생긴 free radical의 공격을 쉽게 받아 산화됨으로써 지질과산화가 촉진될 가능성이 높다. 지질과산화 연쇄 반응이 계속 진행됨으로써 superoxide, hydrogen peroxide, hydroxyl radical 같은 과산화물과 free radical은 세포내 DNA, 단백질, 핵산등의 고분자물질과 반응하여 다른 안정된 radical을 형성한다 (Esterbauer, 1993). 이러한 radicals에 의해 세포막이나 미토콘드리아, 리소솜 등의 미세 구조막의 구조가 변형되고, 세포내외의 물질이동이나 세포막 기능에 산화적 손상을 가져올 수 있다 (Wiseman, 1996). 또한, free radical과의 반응으로 야기되는 DNA의 결함이 완벽히 복구되지 않으면 체내에 불완전한 DNA가 누적되고 이것이 노화와 관련된 퇴행성 질환의 주요한 원인이 될 수 있다 (Hori et al., 1990). 그러나, 생체 내에는 이런 free radical로부터 세포막과 세포내 물질을 보호하는 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase와 같은 항산화 효소들이 있으며 이들에 의해 지질의 과산화로부터 세포막이 보호된다 (Harris, 1992). 이외에도 항산화 효소의 기능을 돕고, 효소 대신 지질의 과산화로부터 세포를 보호할 수 있는 항산화 물질에 대한 연구가 계속해서 이뤄지고 있으며, vit. E, vit. C, carotenoids, flavonoids 등의 성분이 항산화 물질로서 생체 내 지질과산화를 억제하는 효과가 있는 것으로 알려져 있다 (Wiseman, 1996). 이 중에서도 특히 최근에 항산화제로서 많은 관심이 쏠리고 있는 물질이 flavonoids이다.

Flavonoids는 그리스어로 황색을 의미하는 flavus에서 유래된 말로, 플라본을 기본구조로 갖는 식물색소를 일컬으며, 투과성 비타민이라 해서 비타민 P 또는 비타민C의 상승효과를 가졌다 해서 비타민 C<sub>2</sub>라고도 한다 (Roger, 1988). Flavonoids는 식물의 잎이나 꽃, 열매, 뿌리, 줄기 등에 많이 들어 있으며, 차나 음료, 과일, 채소 등을 통해 주로 섭취하고 있다 (Bravo, 1998).

Bioflavonoids로 알려져 있는 flavonoids는 polyphenolic compound로서 화학적 구조에 따라 flavonols, flavones, flavanones, catechins, anthocyanidins, isoflavones, dihydroflavonols 그리고 chalcones로 구분된다 (Cook et al., 1996). Flavonoids류의 일반적인 구조는 <figure 1> 과 같이 C<sub>3</sub>사슬을 매개로 하여 두

개의 aromatic ring들이 결합한 C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>형 탄소골격구조로 되어 있는 diphenylpropanes이며 (Bravo, 1998; Cook et al., 1996), 이것이 rhamnose, glucose 등의 여러 당류와 에테르 결합을 통해 배당체의 형태로 존재하는 경우가 많다 (Kana et al., 1998). Flavonoids류가 과산화지질의 생성을 효과적으로 억제하기 위해서는 구조적으로 C-ring에 -OH가 존재하여야 하고 C-ring의 C-2와 C-3사이에 이중결합이 있어야 하며 (Mora et al., 1990), A와 B ring의 -OH의 수가 4개 이상이어야 한다고 알려져 (Rafat et al., 1987), 화학적 구조는 그들의 생화학적 활성에 영향을 미친다고 여겨진다.

Flavonoids의 항산화 효과 기전은 아직 확실하게 밝혀져 있지는 않지만, 역학조사 (Renaud et al., 1992; Hertog et al., 1993; 1997)와 *in vitro* 연구 (Mora et al., 1990; Morel et al., 1993; Viana et al., 1996)를 통해 flavonoids가 항산화 효과를 나타내는 것으로 알려졌다. Flavonoids는 소위 French paradox라 일컫는 바와 같이 불란서인들이 섭취하는 Wine 등의 알콜 섭취가 관상심장질환의 위험을 낮추어 준다는 연구 결과 (Renaud et al., 1992)를 통해 관심의 대상이 되었고, Zutphen Elderly Study 결과 flavonoids 섭취와 관상심장질환 사망률 사이에는 역의 관계가 존재한다고 발표되었다 (Hertog, et al., 1993; 1997).

*In vitro* 연구에서 flavonoids는 superoxide anion radical, hydroxy radical과 peroxy radical 등을 소거하는 활성을 가졌고, Fe·Cu등을 chelating하며, 항산화 효소의 활성을 증가시킴으로써, lipid peroxidation, low density lipoprotein(LDL) oxidation을 방지한다고 알려져 있다 (Cook et al., 1996; Rafats et al., 1987). 특히 flavonoids는 peroxy radical을 소거할 수 있는 phenolic hydrogen을 가지고 있기 때문에 peroxy radical의 연쇄반응을 정지할 수 있는 항산화제로서 작용할 수 있다 (Cook et al., 1996).

심혈관계 질환의 주요 원인인 동맥경화증은 혈액 중의 산화된 low density lipoprotein (LDL)과 관련된다. 혈청 중의 LDL의 양이 많아지면, LDL을 받아들이는 수용체가 부족하거나 결핍되어 LDL이 혈중에 축적되게 된다. 이러한 LDL은 endothelial cell이나 macrophage 그리고 smooth muscle cell에서 생성되는 free radicals에 의해 지질과산화가 일어난다. 산화된 LDL은 macrophage 및

동맥의 내피세포에 축적되어 거대 foam cell이 형성되는데, 이 foam cell이 커지면서 지방층이 동맥부위에 쌓여 동맥경화가 일어나게 된다. 따라서 free radicals에 의한 LDL의 지질과산화 억제는 관상심장질환 이환률을 감소하는데 중요하다 (Morel, et al., 1984; Henriksen, et al., 1983).

1988년에 Rankin et al.에 의해 flavonoids가 *in vitro* 연구에서 LDL의 산화를 억제할 수 있다는 보고 이래로 LDL과 flavonoids의 상호작용에 대한 관심이 증가되고 있다. Frankle et al. (1993)은 wine에서 추출한 phenolic compound가 구리에 의해 촉진된 LDL 산화를 억제하는데 효과가 있었다고 보고하였으며, Leake et al. (1990)은 macrophage에 의한 LDL의 산화를 morin, quercetin, fisetin이 억제하였다고 하였고, Hiroshi et al. (1999)는 차의 flavonoids가 macrophage와 endothelial cells에 의한 LDL 산화를 효과적으로 억제하였다고 보고하였다.

적절한 양의 red wine 섭취는 혈소판 응집을 감소시키고, 관상심장질환을 예방시킨다고 보고되었다 (Renaud, 1992). 혈소판 응집에 대한 flavonoids의 억제 효과는 혈소판에서의 arachidonic acid 대사와 thromboxane 생성 등과 관련된다. 특히, cyclo-oxygenase와 lipoxygenase의 활성을 저해하고 (Laughton et al., 1991; Schewe et al., 2002), 혈소판에서의 hydrogen peroxide 생성을 억제함으로써 혈소판의 기능을 저하시킨다 (Pignatelli et al., 2000)고 보고하였다. Flavonoids는 혈소판의 기능과 관련된 여러 경로에 영향을 미쳐 항응집 효과를 나타내며, 이로서 flavonoids는 관상 심장질환, 동맥경화증, 혈전증, 고혈압 등을 예방하는 것으로 알려져 있다 (McGregor, 1999; Anna, 1995; Demrow, 1995).

생체막은 세포 구조와 기능에 가장 중요하며, 인지질은 모든 막의 기본 구조를 형성한다. Oxygen radicals 주요 공격 대상 중에 하나가 세포막 인지질 이중층이라는 것은 의심할 여지가 없으며, 적혈구막 인지질의 과산화반응은 적혈구막의 안정성과 기능에 크게 영향을 미친다. 막 인지질의 과산화를 억제하는 화합물은 oxygen radicals에 의해 유도되는 병리학적 현상들을 예방하는 약리학적 효과들을 발휘한다. Red wine, tea, 사과, 양과 등에 많이 함유된 quercetin과 myrecetin 같은 flavonoids는 막지질 과산화를 억제한다고 알려져 있다 (Wiseman, 1996). GSH가 고갈된 mouse 적혈구를 산화제와 배양시켰을 때

quercetin 첨가는 iron을 chelate하고, 적혈구막을 통과함으로써 지질과산화와 용혈로부터 세포를 보호한다고 발표하였다 (Ferrali, 1997). Flavonoids는 세포막 표면 (친수성부분)에 존재하면서 지질과산화 초기단계에서 친수성의 oxygen radicals를 소거하고, 세포막에서 항산화 작용을 하는  $\alpha$ -tocopherol의 소비를 막아준다 (Junji, 1994). Vit. E는 peroxyradical과 관련한 가장 강력한 항산화제로서 radical의 공격으로부터 혈액과 조직의 지질을 가장 잘 보호한다. 생체 내 지질 분자는 peroxyradical의 공격을 받아 매우 안정한 지질과산화물을 형성하며, 이는 세포 구조를 손상시킬 수 있는데, vit. E는 우선적으로 peroxyradical과 반응하여 tocopheroxyradical을 형성하지만, flavonoids에 의해 vit. E로 재생산된다.

감귤에 존재하는 flavanones인 hesperidin은 vit. P의 활성을 가지며, 정상적인 모세혈관의 투과성을 유지하는데 필요한 것으로, 혈압강하 효과가 있다고 보고 되었으며 (Shon et al., 1992), 식물의 꽃이나 열매에 널리 분포되어 있는 flavonols인 quercetin은 지질과 ascorbic acid의 항산화제로 알려져 있고 (Hollman, 1997), 항암작용과 항돌연변이작용도 있다고 보고 되었다 (Kang, 1997). 그리고 ‘백년초’라고 알려져 있는 선인장열매는 phenolic compound와 flavonoids가 약 5%정도 함유하고 있어 (북제주군 농업기술센터) 항산화 효과가 우수하리라 예상된다.

본 실험에서는 고도 불포화지방산을 함유하는 생선기름을 공급받은 흰쥐에 있어서 생선기름이 혈중 포도당과 혈중 지질 수준에 미치는 영향을 조사한다. 그리고 생선기름 섭취시 인지질의 불포화도가 높아짐에 따라 인지질의 과산화가 쉽게 진행되고 이로 인해 세포막의 손상이 일어날 수 있는데, 이러한 조건 하에서 세포막의 기능, 세포내외의 물질이동, 혈소판 응집성 그리고 혈장의 TBARS의 생성에 대한 vit. E와 hesperidin, quercetin, 선인장열매의 항산화 효과에 대해서 알아보려고 하였다.



Figure 1. The generic structure of flavonoids

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 1) 실험동물 및 식이배합

생후 4주된 체중 90~120g 전후의 Sprague Dawley 숫쥐 54마리를 식이지방 급원에 따라 9마리의 Lard군과 45마리의 어유섭취군들로 크게 나누었다. 그리고 생선기름을 공급받을 숫쥐는 체내에 저장되어 있는 vit. E를 고갈시키기 위해 vit. E 결핍 식이를 4주간 공급하였다. 결핍 식이 공급 4주 후 생선기름 (Menhaden oil)을 공급받을 250~300g 전후의 8주령 숫쥐 45마리를 vit. E 결핍군, vit. E 첨가군, hesperidin군, quercetin군, 그리고 선인장열매군의 5개 군에 각각 9마리씩 나누었다.

Stainless steel cage에서 4주간 분리·사육하였으며, 동물 사육실의 명암주기는 12시간, 온도 20~25℃와 습도 40~60%는 일정하게 유지되도록 조절하였다. 실험 기간 동안 물과 식이는 무제한으로 공급되었다.

기본 실험 식이는 AIN-76을 참고로 하여 <Table 1> 과 같이 제조되었다. 탄수화물 급원으로는 sucrose와 corn starch를, 단백질 급원으로는 casein을, 지방 급원으로는 lard군은 lard (9%)와 corn oil (1%)을 어유섭취군들은 fish oil (9%)과 corn oil (1%)을 사용하였다. 생선기름은 미국 Omega Protein, Inc. 에서 공급받은 실험동물 식이용 ARBP menhaden oil를 사용하였다. 어유섭취군들은 대조군의 vit. E 결핍군, vit. E 첨가군, 0.5% hesperidin 군 또는 quercetin군 그리고 10% 선인장열매군의 5 비교군으로 식이를 조제하였다. 선인장열매 분말은 제주 농업 기술 연구 센터에서 구입하여 사용하였다. 각각의 처리에 따른 함량 차이는 corn starch에서 보정해 주었다.

Table 1. Composition of experimental diets (%)

Ingredient	Lard	Fish oil				
		Vit. E def	Vit. E	Hesperidin	Quercetin	Cactus
Casein <sup>a)</sup>	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
L-methionine <sup>a)</sup>	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Lard <sup>b)</sup>	9.0	-	-	-	9.0	9.0
Fish oil <sup>c)</sup>	-	9.0	9.0	9.0	-	-
Corn oil <sup>d)</sup>	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Choline chloride <sup>e)</sup>	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
Vitamin mix <sup>f)</sup> -VitE	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Mineral mix <sup>g)</sup>	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
Sucrose <sup>d)</sup>	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
Corn starch <sup>h)</sup>	40.0	40.0	40.0	39.5	39.5	35.0
Cellulose <sup>i)</sup>	5	5	5	5	5	-
DL- $\alpha$ -tocopheryl acetate <sup>a)</sup>	(50IU)	-	(50IU)	-	-	-
Hesperidin <sup>i)</sup>	-	-	-	0.5	-	-
Quercetin <sup>i)</sup>	-	-	-	-	0.5	-
Prickly pear cactus <sup>j)</sup>	-	-	-	-	-	10
<b>Total (%)</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>	<b>100.0</b>

<sup>a)</sup> Teklad, Harlan Madison WI, USA

<sup>b)</sup> Samlip Yugi Co.

<sup>c)</sup> Menhaden oil, Omega Protein, Inc. (Reedville, VA, USA)

<sup>d)</sup> Jeil Jedang Co.

<sup>e)</sup> Junsei Chemical Co., Ltd.

<sup>f)</sup> Vitamin mixture(mg/100g) : Thiamine HCl 60.0, Riboflavin 60.0, Pyridoxine HCl 70.0, Nicotinic Acid 300.0, D-Calcium Pantothenate 160.0, Folic Acid 20.0, D-Biotin 2.0, Vit. B<sub>12</sub> 0.1, Vit. A 80.0, Vit. D<sub>3</sub> 0.25, Vit. K 0.5, Sucrose 99247.15

<sup>g)</sup> Mineral mixtuer(g/100g) : CaHPO<sub>4</sub> 50.0, NaCl 7.4, K<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> · H<sub>2</sub>O 22.0, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5.2, MgO 2.4, Manganous carbonate(43-48%Mn) 0.35, Ferric citrate(16.7%Fe) 0.6, Zinc carbonate(70% Zn) 0.16, Cupric carbonate(53-55%Cu) 0.03, KIO<sub>3</sub> 0.001, Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> · 5H<sub>2</sub>O 0.001, CrK(SO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> · 12H<sub>2</sub>O 0.055, Sucrose 11.804

<sup>h)</sup> Samyang genescs Co.

<sup>i)</sup> Sigma Chemical Co., USA

<sup>j)</sup> Cheju A.T.I

## 2) 식이 섭취량과 체중 및 식이효율

식이 섭취량은 전날 채워둔 식이 공급량에서 남은 식이량을 뺀 값으로 계산되었고, 체중은 식이 섭취로 인한 일시적인 체중 변화를 막기 위하여 측정하기 1시간 전에 식이를 제거한 후 이틀마다 측정되었다. 식이 공급과 체중 측정은 매번 같은 시각에 이루어졌다. 어유섭취군은 식이에 포함된 생선기름의 산패를 최소화하기 위해 식이를 매일 새로 만들어서 공급하였다.

식이 효율 (FER, Food Efficiency Ratio)은 전 실험기간에 대해서 계산되었다.

## 2. 시료수집

실험기간 종료 전에 16 시간을 절식시키고 ether로 마취시킨 후, cardiac puncture로 heparin이 들어 있는 vacuum tube에 혈액을 채취하였다. 혈소판 응집과 Na-leak, 적혈구 용혈, 그리고 Hematocrit 측정은 채혈 즉시 전혈로 실시되었다. 나머지 혈액은 1000×g에서 15분간 원심 분리하여 혈장을 분리하고, 혈당, 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, 중성지방 분석과, MDA 측정을 위해 -20℃ 냉동고에 보관하였다.

## 3. 시료분석

### 1) DPPH Radical 소거능력

Flavonoids의 항산화 활성 검색은 DPPH (2,2 Diphenyl 1-picryl hydrazyl, Sigma-Aldrich)을 이용하여 시료의 radical 소거효과를 측정하는 DPPH법을 이용한다. DPPH는 짙은 자주색을 나타내며 화합물 내 질소 중심의 radical로 radical 전자의 비 편재화에 의해 안정화된 구조의 radical로 존재한다. 0.3mM DPPH 메탄올 용액 0.5ml에 여러 농도의 시료를 탄 메탄올 용액 1ml를 첨가함으로써 DPPH 최종농도 0.1mM에 대한 흡광도의 감소를 517nm에서 측정한다. 시료의 환원력 크기는 radical 소거 활성 (scavenging activity,  $SC_{50}$ )으로 표시하며  $SC_{50}$ 은 DPPH의 농도가 50% 감소하는데 필요한 시료의 농도로 나타낸다 (Brand-Williams et al., 1995).

## 2) 혈소판 응집 (Whole blood platelet aggregation)

혈소판 응집은 전혈을 이용한 impedance 방법으로 Chronolog Platelet Aggregometer (Chrono-Log 500-CA, Havertown, USA)를 이용하여 측정되었다. 채혈 즉시 전혈 500 $\mu$ l를 등장액(isotonic saline)으로 희석시켜 (1:1) 혈소판 농도 400,000/ $\mu$ l로 조정 한 후, 20  $\mu$ l의 1mM ADP (adenosine diphosphate)를 넣어 최종 농도 20 $\mu$ M이 되게 하여 응집을 유도하였으며, 3회 반복한 평균치를 사용하였다.

Whole blood platelet aggregation은 응집의 진행에 따라 혈액에 삽입된 두 개의 platinum electrodes 사이에 나타나는 impedance의 상승을 측정하는 방법으로, recorder response를 20 $\Omega$ 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) Na efflux 측정

### (1) 적혈구 용액의 준비

혈액 2ml를 2개의 tube에 각각 넣고 1개의 tube에는 최종 농도가 0.5mM되게 phenazinemethosulfate (PMS)처리를 하고 10분간 37 $^{\circ}$ C에서 incubation 하였다. 550 $\times$ g에서 10분간 원심 분리한 후 상층의 PRP를 걷어내고 적혈구를 cold isotonic washing solution [150mM choline chloride, 10mM Tris-4-morpholinopropane sulfonic acid (MOPS) 4 $^{\circ}$ C pH 7.4]으로 5번 씻어준다. 적혈구를 다시 washing solution으로 희석하여 hematocrit 40-50%의 적혈구 용액이 되게 조정 한 후 hematocrit를 측정한다. 적혈구 용액 50  $\mu$ l를 5ml의 0.02% acationox (metal free detergent, Scientific Product, USA) 넣은 것으로 intracellular Na를 측정하였고 적혈구 용액 1.5ml은 Na leak 측정에 사용하였다.

### (2) Na leak (Na passive efflux)

Na leak은 Na-K ATPase과 Na-K cotransport을 통해 나타나는 Na efflux를 차단하기 위해 ouabain과 furosemide가 함유된 medium 4에서 적혈구 배양

시 흘러나온 Na을 말한다.

적혈구용액 1.5ml를 30ml의 medium 4 (150mM choline chloride, 10mM glucose, 1mM ouabain, 1mM furosemide, 10mM 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 배양한 즉시 얼음 속으로 옮겨 Na efflux를 중단시킨 후, 4°C에서 원심 분리하여 상층액을 분리하였다. 분리된 상층액의 Na 농도를 atomic absorption spectrophotometer (AA6701F Shimadzu Corporation, Japan)을 이용하여 측정하였고 기울기 (Na  $\mu\text{g}/\text{ml}/\text{min}$ )를 구한 후, 두 medium 간 기울기 값의 차이로부터 아래와 같이 Na leak 값을 구하였다. (Smith et al., 1984a : 1984b)

계산식 :

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



Intracellular Na :

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

#### 4) 적혈구 용혈

적혈구 용혈 정도는 Draper et al. (1969)의 autohemolysis 방법을 약간 변형시킨 Buckingham (1985)의 방법을 참고하여 측정하였다. 적혈구의 용혈은 Heparin 처리된 혈액을 채혈 즉시 20 $\mu\text{l}$  떠서 saline-phosphate buffer (pH 7.4) 5ml에 분산시킨다. Saline-phosphate buffer는 phosphate buffer (0.1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.02M HCl)와 0.89% NaCl를 동량으로 혼합하여 제조하였다. Saline-phosphate buffer에 분산시킨 용액을 1200 $\times$ 에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 버린 다음, 적혈구 부분만을 다시 5ml의 saline-phosphate buffer용액에 분산시킨다. 두 개의 시험관에 각기 4ml의 saline-phosphate buffer 와 증

류수를 넣은 다음 적혈구 분산액을 2ml씩 넣어 혼합하고 마개를 한 후 37℃에서 4시간 incubation한다. 배양액을 천천히 아래위로 흔들어 액을 섞은 후 10분간 1200×g에서 원심분리하고, 상층액을 취해서 spectrophotometer로 415nm에서 흡광도를 측정했다.

#### 5) 혈장 지질 농도 분석

총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, 그리고 중성지방의 성분분석에는 commercial assay kit (ASAN Pharmaceutical Co., Ltd, Korea)를 사용하였다. 총콜레스테롤과 중성지방 분석에는 혈장 20 $\mu$ l을 사용하였고, HDL-콜레스테롤의 분석에는 200 $\mu$ l을 사용하여 두 반복으로 진행하였다. 총콜레스테롤과 HDL-콜레스테롤은 500nm에서, 중성지방은 550nm에서 spectrophotometer로 흡광도를 측정하였다. Atherogenic index는 총콜레스테롤과 HDL-콜레스테롤 수치를 이용하여  $[(T\text{-cholesterol} - \text{HDL-cholesterol})/\text{HDL-cholesterol}]$ 로 계산되었다.



#### 6) 혈장 당 농도 분석

혈장 당 분석에도 commercial assay kit (ASAN Pharmaceutical Co., Ltd, Korea)를 사용하였다. 분석 시 혈장 20 $\mu$ l를 사용하였고, spectrophotometer로 500 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 두 반복으로 진행하였다.

#### 7) 혈장, PRP의 TBARS 측정

혈장과 혈액을 550×g로 원심 분리한 후 채취한 PRP (Platelet Rich Plasma)의 TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substance) 함량은 Yagi (1976)의 방법을 이용하여 측정하였다. 혈장에 1/12N 황산 4ml와 10% phosphotungstic acid 0.5ml를 넣고 5분간 방치한 후 2200×g에서 10분간 원심 분리하여 상층액은 버리고 침전물에 1/12N 황산 2ml와 10% phosphotungstic acid 0.3ml를 넣고 위와 같은 과정을 다시 한 번 반복하였다. 이 과정 후 얻어진 침전물에 증류수와 thiobarbituric acid (TBA) reagent를 가하여 잘 섞은 후 뚜껑을 막고 95℃에서 1시간 반응시켰다. 여기에 n-butanol을 가하고 잘

섞고 2200×g에서 15분간 원심분리한 후 상층액을 취하였다.

1,1,3,3-tetraethoxypropane을 표준용액으로 하여 상층액에 있는 TBARS 양을 Spectrofluorometer (Kontron Instruments SFM-25)로 excitation 515nm, emission 553nm에서 정량 하였다.

## 8) LDL Oxidation 측정

### (1) LDL의 분리

LDL은 <Figure 2> 와 같이 사람의 혈장을 sequential discontinuous density gradient의 초 원심분리 과정을 반복하여 얻었다 (Fisher, 1983; Basu et al., 1976). 우선, NaCl로 사람의 혈장 밀도를 1.063g/ml로 조정한 후 원심분리 (150,000×g, 4℃, 20시간)하여 plasma chylomicron, very low density lipoprotein (VLDL)과 LDL fraction을 HDL과 lipoprotein deficient serum (LDS) fraction에서 분리하였다. 그리고 LDL이 섞여있는 fraction은 밀도를 1.019g/ml로 조정하여 원심분리 (150,000×g, 4℃, 20시간)한 후에 상층부분의 chylomicron/VLDL fraction을 제거하였다. 나머지 하층부분은 다시 NaCl로 밀도를 1.063g/ml로 조정하고 같은 방법으로 원심 분리하여 LDL fraction을 순수 분리하였다. 분리된 LDL은 4℃에서 0.154M NaCl, 0.01% EDTA buffer (pH 7.4)로 24시간 투석하였다.

### (2) LDL의 산화

LDL (0.15mg/ml)과 CuSO<sub>4</sub> (5μM)의 전체부피가 500μl가 되도록 F/10배지 (pH 7.4)를 섞어 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 37℃로 24시간 배양하였으며 배양이 끝난 후 40mM EDTA 25μl로 CuSO<sub>4</sub>의 산화를 억제한다.

### (3) Agarose gel electrophoresis

2mM vit. E (0.86mg/ml), 2.5mM hesperidin (1.5mg/ml), 2.5mM quercetin (0.85mg/ml) 및 선인장열매 에탄올 추출물 (1.5mg/ml)이 LDL산화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 agarose gel electrophoresis를 실시하였다. 0.7% agarose gel을 사용하여 이동도를 관찰하였다. 시료용액과 함께 산화시킨 LDL 배양액을 20μl 주입하였고 135mV의 전력으로 pH 8.6, 0.05 M barbital buffer를 사용하여 전개시켰다.

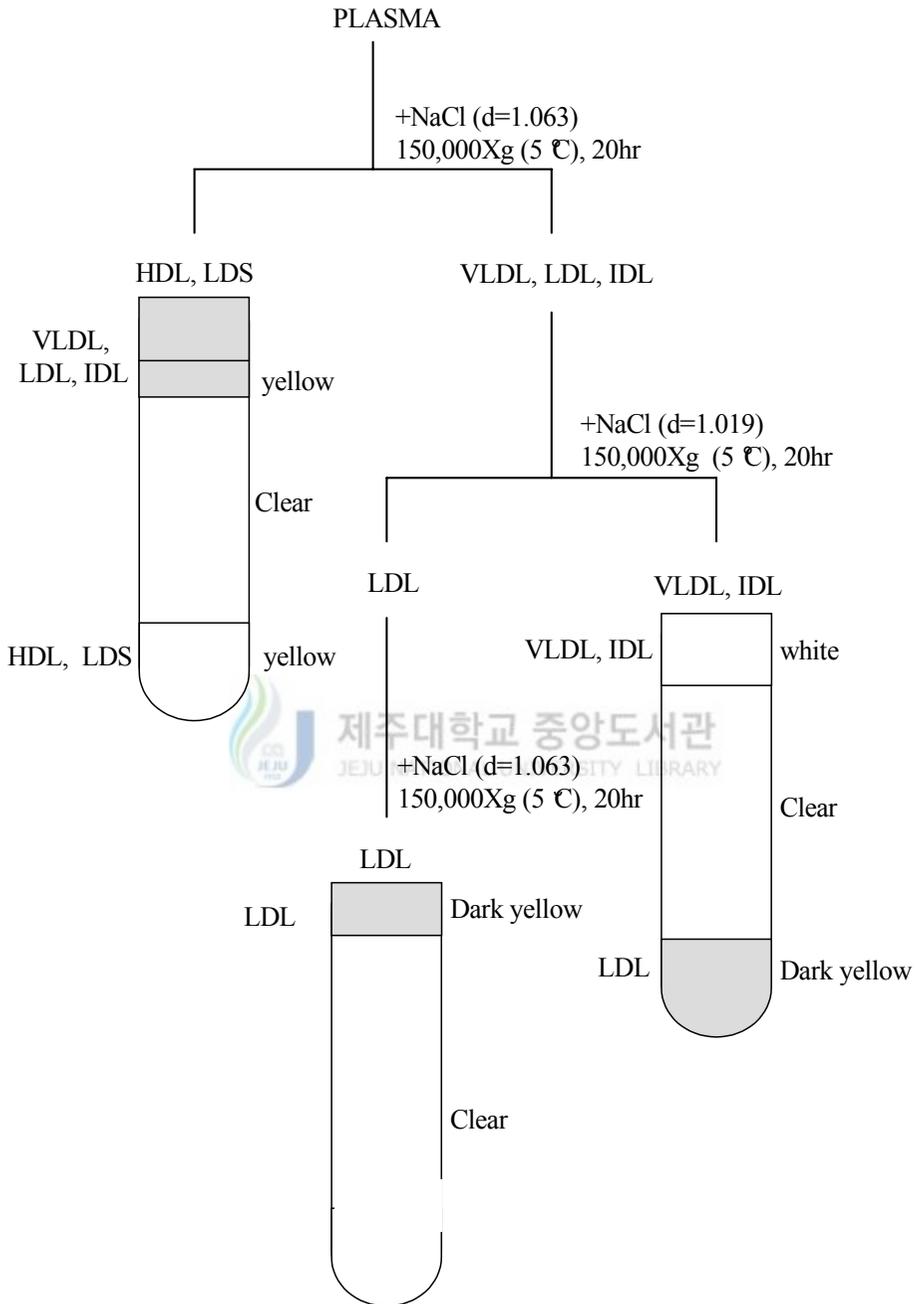


Figure 2. Preparation of low density lipoprotein (LDL)

#### 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. 결과 및 고찰

#### 1. 항산화 물질의 Radical 소거능의 비교

DPPH법에 의해 vit. E와 flavonoids의 free radical 소거 활성을 측정하였고, 이 값을 가지고 식이의 항산화능을 추정하였다. 그 결과는 <Table 2>에 제시되었다.

Vit. E와 flavonoids의 free radical 소거 활성 순서는 quercetin>hesperidin>vit. E>선인장열매 추출물 순으로, quercetin이 가장 높은 radical 소거 활성을 나타냈다.

0.5% quercetin, hesperidin, 50 IU vit. E, 10% 선인장열매 분말이 첨가된 식이의 항산화능을 추정한 수치는 각각 1480, 15.5, 12.2 그리고 5였다. 이러한 값은 flavonoids가 free radical을 직접 소거함으로써 지질과산화를 억제할 수 있다는 예상 하에 계산된 수치이다.

*In vitro* 연구에서 Igor et al. (1989)은 철 이온에 의한 lecithin liposomes의 지질과산화와, NADPH와 CCl<sub>4</sub>에 의한 rat liver microsomes의 지질과산화는 rutin과 quercetin의 첨가에 의해 효과적으로 억제되었다고 한다. 이것은 flavonoids의 금속이온 chelating 능력과 free radical 소거 활성에 의해 지질과산화를 개시단계에서 효과적으로 억제할 수 있음을 설명해 준다. 즉, rutin과 quercetin은 지질과산화 개시단계에서 superoxide anion, hydroxyl radicals 그리고 lipid peroxy radicals 생성을 억제할 수 있음을 보여준다.

Rafat et al. (1987)은 *in vitro* 연구에서 flavonoids는 높은 hydroxyl radical 소거 활성을 가지고 있으므로 개시단계에서 지질과산화를 억제할 수 있다고 발표하였다. 그리고 hydroxyl radical 소거 활성 순서는 myricetin>quercetin>rhamnetin>morin>diosmetin>naringenin 순이었고, 이러한 소거 활성은 flavonoids의 aromatic B-ring에 치환된 hydroxyl group의 수에 따라 증가하였다고 보고하였다.

Flavonoids의 free radical 소거 활성은 그것들의 화학적 구조에 의해 영향을 받는다고 한다. Flavonoids가 지질과산화를 효과적으로 억제하기 위해서는 구조적으로 C-ring의 C-3위치에 hydroxyl group이 존재하여야 하고, C-ring의 C-2, 3사이에 이중결합이 있어야 하며 (Mora et al., 1990; Bors et al., 1990), A와 B-ring의 hydroxyl group 수가 4개 이상이어야 한다고 발표하였다 (Rafat et al., 1987). 또한 flavonoid glycoside 형태보다 aglycone 형태로 존재하여야 한다고 하였다 (Ioku et al., 1995).

Flavonol의 일종인 quercetin은 구조상 C-2, 3사이에 이중결합을 갖고 있고, B-ring의 3', 4' 위치에 hydroxyl group을 갖고 있어 (Cook et al., 1996) 뛰어난 radical 소거 활성을 가진 것으로 보인다. Flavanone에 속하는 hesperidin은 탄소 5와 3'에 hydroxyl group이 위치하고 탄소 7과 4' 위치에 각각 rhamnose-glucose와 O-methyl group이 치환되어 있어서 (Cook et al., 1996) 위의 조건들을 갖추지 못하였으므로 낮은 radical 소거 활성을 나타낸 것으로 생각되어진다.

그러나 *in vivo*에서는 flavonoids의 radical 소거 활성과 항산화 작용과의 명확한 증거가 없으므로 좀 더 많은 *in vivo* 실험을 통해 관련성을 입증하여야 할 것이다.

Table 2. Comparison of Radical Scavenging activity of dietary flavonoids

	Vit. E	Hesperidin	Quercetin	Cactus
Dietary contents(g/kg diet)	0.1	5	5	100
Flavonoids for SC <sub>50</sub> <sup>1)</sup> (mg/ℓ)	8.2	3.23×10 <sup>2</sup>	3.38	2×10 <sup>4</sup>
Antioxidant potency	12.2	15.5	1480	5

1) SC<sub>50</sub> : Concentration of flavonoids, Vit E or methanol extract of prickly pear cactus at which the decrease in absorbance at 517nm by 50% for 0.1mM DPPH at 10 minutes after addition of flavonoids, Vit. E or methanol extract of prickly pear cactus

## 2. 체중 증가량, 식이섭취량과 식이 효율

실험동물의 평균 일일 증체량 (ADG), 평균 일일 식이섭취량 (ADFI) 및 식이효율 (Feed Efficiency Ratio)은 <Table 3> 에 제시되었다.

4주간의 실험 종료 후 실험동물의 최종 무게는 400~450g 정도였으며, 평균 일일 증체량은 vit. E 첨가군이 유의적으로 가장 높고, vit. E 결핍군과 hesperidin 군이 유의적으로 낮게 나타났다 ( $P<0.05$ ). Hesperidin군, quercetin군, 선인장열매군에서는 체중 감소는 나타나지 않았으며, 이는 식이에 첨가한 flavonoids의 양이 성장에 악영향을 주지 않는 정도인 것으로 보인다.

평균 일일 식이섭취량은 vit. E 첨가군이 vit. E 결핍군과 hesperidin군, 선인장열매군에 비해 유의적으로 높았다 ( $P<0.05$ ). Vit. E 첨가군과 lard군의 식이섭취량은 vit. E 첨가군이 다소 높기는 하지만 유의차는 없으므로, 생선기름의 특유한 냄새에 의한 식이 섭취 감소는 없었던 것으로 생각된다. Hesperidin, quercetin, 선인장열매군의 식이섭취량은 quercetin이 다소 높기는 하지만, 유의차가 없으므로 식이 flavonoids의 색이나 맛 등이 식이섭취량에 미치는 영향 또한 없는 것으로 보인다.

Vit. E 첨가군은 증체량, 식이섭취량과 함께 높은 식이효율을 나타냈으며 ( $P<0.05$ ), 선인장열매군은 식이섭취량은 낮은데 반해, 증체량은 높아서 유의적이지는 않지만 높은 식이효율을 나타내었다.

식이지방에 따른 식이효율을 보면, 생선기름을 섭취한 vit. E 첨가군이 lard군에 비해 식이 효율이 유의적으로 높게 나타났다 ( $P<0.05$ ). Buckingham (1985)은 Sprague Dawley rats에게 포화지방인 lard와 불포화도가 높은 식물성 기름을 식이지방으로 하여 16주간 공급하였을 때, 두 그룹간 체중의 차는 나타나지 않았다고 한다. Fremont et al. (1998)은 식이 지방으로 단일불포화 지방산이 함유된 식이와 다중불포화 지방산이 함유된 식이를 공급하였을 때, 식이섭취량과 체중증가량에는 별 차이가 없었다고 한다. 따라서 식이지방의 포화도가 혈액의 지질 성분 조성이나 지질 수준에는 영향을 미치나 체중증가와 큰 관련이 없는 것으로 생각되어진다.

Vit. E 첨가군은 vit. E 결핍군에 비해 유의적으로 식이효율이 높는데, 이는

생선기름을 섭취할 경우 vit. E는 섭취한 지방을 체성분으로 전환하는데 중요한 역할을 하는 것으로 보인다.

본 실험에서 flavonoids를 첨가한 식이군들 중에서 hesperidin군의 식이 효율이 다소 낮기는 하지만 각 처리구간 유의적 차이는 없었다. 따라서 0.5% 정도의 hesperidin과 quercetin의 첨가 그리고 10% 선인장열매 첨가는 흰쥐의 성장에 큰 영향을 미치지 않았다는 것을 알 수 있었다. 다른 연구에서도 이런 유사한 결과들을 볼 수 있었는데, Manach et al. (1995)의 연구에서는 식이 내에 0.5% quercetin과 1% rutin을 첨가시켜 10일간 rats에게 공급한 경우 식이섭취량과 체중증가량에 유의적인 차이가 없었다고 보고하였다. 그리고 4주령된 Sprague Dawley 숫쥐에게 4주간 0.5% hesperidin과 naringin을 각각 섭취시킨 경우 식이섭취량과 성장률에는 별 차이가 없었다고 보고한 Sohn et al. (1998)의 결과와도 일치한다.

Flavonoids가 동물의 성장에 어떠한 영향도 미치지 않는다는 결론을 내리기에는 더 많은 연구가 필요하리라 생각된다.



Table 3. Effects of feeding diets containing vit. E, hesperidin, quercetin or prickly pear cactus on growth rate and feed intake

	Lard			Fish oil		
	Vit. E	Vit. E def	Vit. E	Hesperidin	Quercetin	Cactus
Initial B.W(g)	279.42±21.98	274.68±23.73	274.66±21.11	274.94±22.66	274.86±18.17	274.11±22.04
Final B.W(g)	422.72±34.60 <sup>ab</sup>	406.83±45.08 <sup>b</sup>	448.38±20.57 <sup>a</sup>	404.69±31.04 <sup>b</sup>	435.06±18.29 <sup>ab</sup>	422.82±21.30 <sup>ab</sup>
ADG(g/d) <sup>2)</sup>	4.78±0.70 <sup>bc</sup>	4.41±0.51 <sup>c</sup>	5.79±1.10 <sup>a</sup>	4.32±0.47 <sup>c</sup>	5.34±0.41 <sup>ab</sup>	4.96±0.51 <sup>bc</sup>
ADFI(g/d) <sup>3)</sup>	19.85±2.51 <sup>ab</sup>	18.20±2.61 <sup>b</sup>	20.74±0.98 <sup>a</sup>	18.00±1.79 <sup>b</sup>	19.54±1.87 <sup>ab</sup>	17.99±1.65 <sup>b</sup>
F.E.R <sup>4)</sup>	0.242±0.03 <sup>b</sup>	0.243±0.05 <sup>b</sup>	0.282±0.02 <sup>a</sup>	0.243±0.03 <sup>b</sup>	0.277±0.04 <sup>ab</sup>	0.278±0.04 <sup>ab</sup>

1) B.W. : Body weight

3) ADFI : Average daily feed intake

Values are means ± SD of 9 rats.

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

2) ADG : Average daily gain

4) F.E.R : Feed Efficiency Ratio (ADG/ADFI)

### 3. 혈장 포도당, 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 및 중성지방

혈장 포도당, 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤과 중성지방 수준 및 atherogenic index는 〈Table 4〉에 제시되었다.

Lard군은 다른 어유비교군들에 비해 혈장 포도당 수준이 유의적으로 높게 나타났다 ( $P < 0.05$ ). 이는 역학조사에서, 생선기름 섭취와 혈장 포도당 수준과는 양의 상관관계를 갖는다는 Bjerregaard et al. (2000)의 보고와는 상반되는 결과를 나타냈다. 그러나 Kuda et al. (2000)는 mouse에게 식이 지방으로 1%의 corn oil과 9%의 Menhaden fish oil을 섭취시킨 경우, 10%의 corn oil과 1% corn oil + 9% beef tallow를 섭취시켰을 때보다 혈장의 포도당 수치가 더 낮게 나타났다고 보고하였다. 이것으로 보아, 생선기름 oil 섭취와 혈장 포도당과의 상관관계에 대해서는 좀 더 많은 연구가 요구된다. Hesperidin군은 다른 어유군에 비해 높은 혈당 수치를 나타내었고, quercetin군은 유의적으로 혈당을 낮추었다 ( $P < 0.05$ ). 그리고 선인장열매군은 lard군에 비해 낮은 혈당을 나타내었다. Coldiron et al. (2002)은 streptozotocin으로 유도된 당뇨쥐와 정상쥐에 14일간 10mg/kg/d의 quercetin 처리는 두 군 모두에서 혈당을 상승시켰다고 하여 본 실험과는 다른 결과를 보고하였다. 본 실험에서 선인장열매군이 다른 어유섭취군들에 비해 유의적이지는 않지만 낮은 혈당을 나타내는 것은 선인장에 들어있는 수용성 펙틴이 gel화되어 포도당의 흡수를 지연시켰을 것이라 생각된다.

어유 섭취군들의 총콜레스테롤, 중성지방 수준이 lard군에 비해 유의적으로 낮았으며 ( $P < 0.05$ ), 이는 식이 지방 급원의 종류에 영향을 받는 것으로 보이며 어유 섭취군들의 수치가 약 50% 정도 감소하였다. 이것은 생선기름에 함유된 EPA와 DHA 같은 다중 불포화지방산이 혈중 지질의 수준을 감소시킨다는 것을 확실하게 보여주고 있으며, 이러한 결과는 이미 여러 연구에 나타나 있다 (Simopoulos, 1991; Harris, 1983).

총콜레스테롤은 선인장열매군이 다른 어유섭취군들에 비해 유의적으로 가장 많이 낮추었다 ( $P < 0.05$ ). 이는 생선기름 영향 이외에, 선인장열매 속에 함유되어 있는 polyphenolic compound에 의한 hypocholesterolemic 효과이거나 선인장열매 식품 자체에 함유된 수용성 식이 섬유인 pectin에 의한 효과일 가능

성이 있다. 실제로, 선인장에서 추출한 pectin의 효과를 관찰한 연구에 의하면, 0.25% 콜레스테롤이 함유된 식이에 단지 1%의 선인장 pectin을 첨가한 경우에도 26% 정도 유의적으로 낮추었다고 한다 (Fernandez et al., 1992). 수용성 식이 섬유는 콜레스테롤 저하 효과는 bile salt와 결합하여 bile acid의 장관 순환을 억제함으로써 콜레스테롤의 재 흡수가 방해되기 때문으로 해석된다.

본 실험에서 flavonoids 섭취에 의한 총콜레스테롤 감소 효과는 뚜렷하게 나타나지 않는데, 이는 flavonoids의 섭취보다 생선기름 섭취에 의한 영향을 더 크게 받아서 flavonoids에 의한 영향을 받지 못하기 때문인 것으로 생각된다. Basarkar et al. (1983)은 1%의 콜레스테롤을 첨가한 식이를 12주 동안 급여한 rat에서 혈액 및 간 내의 콜레스테롤 함량이 quercetin 급여에 의해 감소하였다고 보고하였으며, Bok et al. (1999)은 1%의 콜레스테롤이 첨가된 식이를 급여하는 rat에게 같은 비율의 hesperin+naringin 혼합물을 0.1g/100g diet로 보충하였을 때 혈장의 콜레스테롤 수준이 감소한다고 보고하였다. 이러한 결과들을 보면, flavonoids는 혈액내의 cholesterol 수준에 변화가 나타날 때, hypocholesterolemic 효과를 발휘하는 것으로 생각되어 진다.

본 실험에서 중성지방 수준은 어유 섭취군들 중에서는 유의차가 없었고, flavonoids를 첨가한 군들 중에서는 선인장열매군이 가장 낮게 나타났다. Kaku et al. (1999)는 Sprague Dawley rat에게 quercetin을 식이에 첨가하여 공급한 결과 혈청 중성지방 수준이 대조군에 비해 낮았다고 보고하였다.

또한 본 실험에서 HDL-콜레스테롤은 vit. E 첨가군이 다른 어유군들에 비해 유의적으로 높게 나타났으며 ( $P < 0.05$ ), 동맥경화의 위험도를 나타내는 atherogenic index 도 유의적으로 낮게 나타났다 ( $P < 0.05$ ). 선인장열매군 또한 혈장 총콜레스테롤은 유의적으로 낮추고 HDL-콜레스테롤은 비율적으로 증가시켜 동맥경화의 예방효과가 있는 것으로 사료된다.

역학조사에 의하면 flavonoids의 섭취 증가가 혈중 지질의 수준을 낮추어 CHD의 이환율을 낮춘다고 알려져 있으나 (Yusuke et al., 2000), 본 실험에서는 flavonoids의 첨가에 의한 효과는 뚜렷하게 확인되지는 않았다.

본 실험 결과 생선기름 섭취는 혈액의 지질수준을 낮추는데 중요한 역할을 하였으며, vit. E와 선인장열매 첨가는 혈액의 지질 수준을 이로운 방향으로 이끌어 주는 좋은 역할을 하고 있다고 생각되어 진다.

Table 4. Effects of feeding diets containing vit E, hesperidin, quercetin or prickly pear cactus on the plasma glucose, cholesterol and triglyceride contents in rats

	Lard		Fish oil			
	Vit. E	Vit. E def.	Vit. E	Hesperidin	Quercetin	Cactus
Glucose	136.06±27.78 <sup>a</sup>	117.20±27.60 <sup>abc</sup>	119.81±14.82 <sup>abc</sup>	129.81±21.20 <sup>ab</sup>	101.00±19.02 <sup>c</sup>	109.89±28.51 <sup>bc</sup>
Total-cholesterol	82.76±11.28 <sup>a</sup>	56.17±6.22 <sup>bc</sup>	59.53±6.15 <sup>b</sup>	60.24±4.89 <sup>b</sup>	57.41±8.72 <sup>bc</sup>	51.47±7.86 <sup>c</sup>
HDL-cholesterol	52.66±7.58 <sup>a</sup>	32.30±3.63 <sup>c</sup>	39.85±4.69 <sup>b</sup>	34.78±4.96 <sup>c</sup>	30.75±5.11 <sup>c</sup>	34.45±4.22 <sup>c</sup>
Triglyceride	117.25±22.0 <sup>a</sup>	64.08±8.73 <sup>b</sup>	66.11±7.38 <sup>b</sup>	65.42±5.34 <sup>b</sup>	63.82±8.71 <sup>b</sup>	58.34±6.23 <sup>b</sup>
Atherogenic index	0.59±0.26 <sup>bc</sup>	0.76±0.29 <sup>ab</sup>	0.50±0.16 <sup>c</sup>	0.76±0.27 <sup>ab</sup>	0.89±0.29 <sup>a</sup>	0.50±0.18 <sup>c</sup>

Plasma levels in mg/100ml

Atherogenic index = (T-cholesterol — HDL-cholesterol) / HDL-cholesterol

Values are means ± SD of 9 rats.

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

#### 4. 혈소판 응집

혈소판 응집에 대한 결과는 <Table 5> 에 제시되었다.

혈소판 응집에서 initial slope과 maximum aggregation은 처리구간에 유의적 차이는 없었다. 생선기름을 섭취할 경우 생선기름에 함유되어 있는 고도 불포화지방산의 작용으로 혈관이 확장되고 혈전 생성을 억제하며 혈소판 응집 저해 효과가 있다고 알려져 있으나 (Simopoulos, 1991), 본 실험에서 lard군에 비해 어유 비교군이 혈소판 응집을 억제하는 효과는 나타나지 않았다. 또한 flavonoids 처리에 따른 혈소판 응집 저해 효과도 나타나지 않았으며, hesperidin군인 경우 initial slope은 가장 낮고, maximum aggregation은 가장 높게 나타났다. 실험동안 hesperidin군은 혈소판 응집 후 dissociation이 나타나지 않는 것을 관찰할 수 있었는데, 이러한 현상이 hesperidin과 다른 물질과의 상호 작용에 의한 것인지 또는 독특한 화학적 구조에 의해서 일어나는 것인지에 대해서는 좀 더 연구해 볼 필요가 있다고 생각되어진다.

Flavonoids의 혈소판 응집 억제 효과는 혈소판에서의 arachidonic acid 대사와 thromboxane 생성과 같은 산화적 요인들과 관련될 수 있다 (Laudolfi et al., 1984). Petroni et al. (1995)는 *in vitro* 연구에서 올리브유의 phenolic 성분이 혈소판의 기능과 TB X<sub>2</sub>의 생성을 감소시켜 collagen에 의해 유도된 혈소판 응집을 효과적으로 억제하였다고 보고하였다. 또한 Laughton et al. (1991)은 혈소판에서 arachidonic acid 대사에 관여하는 효소인 cyclooxygenase와 5-lipoxygenase의 활성을 flavonoids가 억제함으로써 혈소판 응집을 억제한다고 보고하였다. Pignatelli et al. (2000)은 quercetin 10-20μmol/L는 collagen으로 유도된 혈소판 응집과 혈소판의 콜라겐 협착을 억제하였고, 25μmol/L catechin과 5μmol/L quercetin 혼합물 또한 collagen으로 유도된 혈소판 응집과 혈소판의 콜라겐 협착을 좀 더 강하게 억제하여 두 물질에 의한 시너지 효과를 보여 주었다고 한다. 이 혼합물은 또한 콜라겐으로 유도된 hydrogen peroxide 생성을 강하게 억제하였다고 하였으므로 혈소판의 응집 억제 효과는 hydrogen peroxide 생성을 더디게 하면서 혈소판의 기능을 억제하는 것으로 보인다. 그러나 이러한 *in vitro* 실험 결과들이 그대로 *in vivo*에

서 적용되는지는 더 고려해 보아야 할 사항이다.

McGregor et al. (1999)는 90% diosmin과 10% hesperidin이 함유된 flavonoids를 rat에게 공급하였을 때 ADP에 의해 유도된 혈소판 응집과 collagen에 의해 유도된 혈소판 응집을 유의적으로 억제하였다고 하였다. Janssen et al. (1998)은 *in vitro* 연구에서 순수한 quercetin을 PRP에 여러 농도 (0, 0.25, 2.5, 25, 250, 2500 $\mu$ mol/L)로 첨가하여 collagen과 ADP로 응집을 유도한 경우 낮은 농도 (0-250)에서는 응집 억제효과가 없었고, 2500 $\mu$ mol/L의 농도에서 응집을 유의적으로 억제하였다고 하였다. 그러나, 건강한 9명의 남성과 9명의 여성에게 114mg quercetin/d (220g 양파/d)을 섭취시킨 경우 plasma에서의 quercetin 농도는 1.5 $\mu$ mol/L이었고, 이때 혈소판 응집 억제효과는 없었다고 보고하였다. 여기서 보면 *in vitro* 연구에서의 flavonoids의 항응집 효과는 *in vivo*에서 기대할 수 없는 높은 농도로 실험하였기 때문인 것으로 생각되어진다. *In vivo* 연구에서 flavonoids의 항응집 효과는 생체 내에서 flavonoids와 다른 물질과의 상호 작용, flavonoids의 흡수량 등이 고려되어야 할 것이다.

Flavonoids의 혈소판 응집 억제 효과를 알아보기 위해서는 *in vitro* 실험을 토대로 하여 더 많은 *in vivo* 연구가 이루어져야 할 것이다.



Table 5. Effects of feeding diets containing vit E, hesperidin, quercetin or prickly pear cactus on the platelet aggregation in rats.

	Lard			Fish oil		
	Vit. E	Vit. E def	Vit. E	Hesperidin	Quercetin	Cactus
Initial Slope( $\Omega$ /min) <sup>1)</sup>	14.68±4.74	17.92±6.71	15.44±4.72	13.55±3.37	15.95±5.40	15.67±5.76
Maximum( $\Omega$ ) <sup>2)</sup>	17.71±3.71	19.30±5.04	17.50±3.59	20.97±4.90	19.79±4.14	17.51±2.58

1) Initial slope is the base of one minute in tangent drawn to steepest part of curve.

2) Maximum aggregation is ohm at the point where aggregation dissociated.

Values are means ± SD of 9 rats.

## 5. Hematocrit와 적혈구 용혈

헤마토크리트 수치와 적혈구 용혈 실험 결과는 <Table 6>에 제시되었다. 헤마토크리트 수치는 각 처리구간에 유의적 차이는 나타나지 않았으나, lard 군이 약간 높게 나타났다.

적혈구 용혈 또한 각 그룹간 유의적 차이는 없었으나, vit. E 결핍군이 용혈 현상이 다소 높게 나타났다. 그리고 식이 지방 급원에 따른 차이는 크게 나타나지 않았다.

적혈구의 용혈 현상은 적혈구 막의 안정성에 의해 좌우되며, 적혈구막 지질의 과산화 반응은 막의 안정성에 큰 영향을 미친다. 따라서 용혈 현상도 체내 조직의 전반적인 항산화 상태의 척도로서 여겨지고 있다.

Mouse 적혈구의 용혈 현상에 대한 포화지방산과 불포화지방산의 영향을 알아본 Lee (1998)의 실험에서는 oil type에 대한 유의적 차이는 없었고, 적혈구를 2시간이상 배양하였을 경우 vit. E를 공급한 군에 비해 vit. E 결핍군의 용혈현상이 높게 나타났다고 한다.

Buckingham (1985)은 P/S ratio를 달리한 식이를 공급받은 rat의 적혈구를 saline-phosphate buffer (pH 7.4)에 넣고 20시간 배양하였을 때 식이의 P/S ratio가 높은 경우에 40, 100 IU/kg diet 정도의 vit. E 공급은 약 50% 가량 용혈 현상을 억제하였다고 보고하였다. 이는 적혈구 용혈 현상을 억제하는데 vit. E가 중요한 역할을 하고 있음을 알 수 있다.

본 실험에서 hesperidin군이 다른 flavonoids 처리군에 비해 유의적 차이는 없지만, 적혈구 용혈 수치가 다소 낮게 나타났다. Hesperidin은 혈관 강화 효과를 갖고 있는 물질로 혈관의 투과성 유지에 꼭 필요한 성분으로, hesperidin이 여타의 flavonoids와는 서로 다른 생리적 기능을 갖고 있을 수 있으므로 좀 더 많은 실험을 통해 관찰해 볼 필요가 있다.

생체막에서 일어나는 lipid peroxidation에 대한 flavonoids의 항산화 효과를 알아보기 위한 연구로 Igor et al. (1989)은 quercetin과 quercetin-3-O-rhamnoglucoside, 그리고 rutin이 free radicals을 소거함으로써 phosphatidyl choline liposomes과 rat의 liver microsomal membranes의 lipid peroxidation

을 강력하게 억제하는 효과를 주었다고 하였다. Morel et al. (1993)은 rat의 hepatocyte 배양액에서 catechin, quercetin, 그리고 diosmetin의 세포보호효과는 catechin, quercetin, diosmetin 순으로 효과가 있었다고 보고하였다. Kostyuk et al. (1997)은 실리카에 의해 유도되는 세포 손상을 quercetin과 rutin이 억제하였는데, 이는 이러한 물질들이 radical를 소거하고 iron을 chelate 함으로써 가능한 것으로 여겨진다. 그러나 quercetin의 radical 소거활성은 유기용매 내에서 감소하였고, phosphatidyl choline liposomes에서 quercetin이 먼저 작용을 하고 나서 vit. E가 항산화 작용을 하는 것으로 봐서 flavonoids가 지질의 과산화로부터 세포막을 보호하는 작용은 vit. E와는 다를 것이다 (Junji, 1994). 즉, vit. E는 세포막 내에 존재하면서 peroxyradical를 매우 급속히 포착하여 lipid hydroperoxide의 연쇄반응을 막아주지만, flavonoids는 세포막의 표면에 (세포내외의 친수성부분)에 존재하여 수용성 radicals에 의한 지질과산화를 개시 단계에서 효과적으로 막아줌으로써, vit. E를 절약해주는 역할을 한다. 또한 vit. E가 peroxyradical과 반응하여 생긴 tocopherylradical을 vit. E로 재생하는데 작용한다.

본 실험에서 vit. E 결핍군의 적혈구 용혈이 다소 높기는 하였지만, 다른 비교군들과 유의적 차이가 없었는데, 이는 4주간의 vit. E 결핍식을 공급하는 동안 체내에 있는 vit. E의 고갈정도가 높지 않았던 것으로 생각된다. 그리고 vit. E가 체내에 부족하므로, corn oil과 fish oil의 산화방지를 위해 식품 자체에 소량 들어있는 vit. E가 효과적으로 이용되어 세포막을 보호하는데 관여하였을 것으로 생각되어진다.

Table 6. Effects of feeding diets containing vit E, hesperidin, quercetin or prickly pear cactus on Hematocrit and Erythrocyte Hemolysis

	Lard		Fish oil			
	Vit. E	Vit. E def	Vit. E	Hesperidin	Quercetin	Cactus
Hematocrit(%)	43.69±4.11	42.19±3.83	40.63±3.66	41.81±2.67	40.5±2.74	41.69±4.95
Hemolysis(%)	9.59±1.96	10.41±3.11	9.05±2.07	8.84±2.40	9.19±2.23	9.40±2.37

Values are means ± SD of 9 rats.

## 6. Na leak

적혈구 막의 Na efflux는 Na-K ATPase와 Na-K cotransport 그리고 Na-leak 등 3가지 형태로 이루어진다. 본 실험에서는 Ouabain과 furosemide로 각각 Na-K ATPase와 Na-K cotransport를 차단한 상태에서의 passive Na permeability를 나타내는 Na leak을 측정하였고, 그 결과는 〈Table 7〉에 제시하였다. Na leak과 intracellular Na의 경우는 모든 처리구간에서 유의적 차이가 나타나지 않았으나, 생선기름을 섭취시킨 군들이 lard 군에 비해 다소 높은 수치를 나타내었다. 이는 생선기름에 함유된 고도 불포화지방산에 의해 막의 유동성이 증가되어서 인 것으로 생각된다. Intracellular Na는 intact인 경우에 비해 PMS처리에 의해 높은 수치가 나왔다. Intracellular Na에서는 intact인 경우는 그룹간 유의적 차이는 나타나지 않았으나, PMS 처리한 경우에는 lard군에 비해 quercetin군과 선인장열매군이 유의적으로 높게 나타났다.

세포막의 기능은 여러 가지 광범위한 물질들에 의해 변화될 수 있다. 그 중 하나로 radical 생성을 위해 사용되는 PMS는 쉽게 적혈구막을 통과할 수 있고 세포내에서 NADH 존재 하에 oxygen-free radicals를 생성한다. 따라서 PMS를 처리하는 경우 막의 지질과산화화가 계속해서 진행되고, 그로 인해 세포막의 손상을 가져오게 되며, 이는 passive K permeability를 증가 시킨다 (Maridonneau, 1983).

본 실험에서 적혈구에 PMS를 처리한 경우 Na leak은 처리구간 유의적 차이는 나타나지 않았으나, intact인 경우에 비해 증가한 것을 볼 수 있다. 그리고, vit. E군이 PMS 처리에 대한 영향을 가장 적게 받고 있으며, hesperidin과 quercetin도 PMS 처리에 대한 방어 효과가 다소 있는 것으로 나타났다. Vit. E는 세포막에 존재하며 peroxyradical과 관련한 가장 강력한 항산화제로서 radical의 공격으로부터 세포막을 가장 잘 보호한다. 세포막에 존재하는 vit. E와는 달리 flavonoids는 세포의 친수성부분에 위치하여 세포내외의 free radicals를 소거한다. Maridonneau-Parini et al. (1986)는 PMS에 의해 손상된 적혈구에서의 K loss를 보았는데, kaempferol, naringenin, apigenin, naringin은 이를 막아주었고, myricetin, delphinidin, quercetin은 PMS에 의해

생긴 oxygen radicals의 활성을 촉진시켜 증가시켰으며, catechin, morin 등은 농도에 따라 증가시키거나 막아준다고 보고하였다. 여기서 free radical 소거 활성이 뛰어난 quercetin이 PMS에 의한 K loss를 억제하지 못하였고, 같은 flavonols 종류에 해당하는 kaempferol, myricetin, morin들이 세포막 보호에 대하여 각기 다른 효과를 나타내고 있다. 따라서 세포막에 대한 flavonoids의 항산화 작용은 flavonoids와 세포막과의 독특한 상호작용을 통해 이루어지고 있는 것으로 사료된다.



Table 7. Effects of feeding diets containing vit E, hesperidin, quercetin or prickly pear cactus on the Erythrocyte Na efflux in rats.

	Lard		Fish oil			
	Vit. E	Vit. E def.	Vit. E	Hesperidin	Quercetin	Cactus
<b>Intracellular Na</b>			(Na mmole/l rbc)			
Intact	2.96±0.94	3.52±1.22	3.61±1.07	3.56±0.82	3.87±0.61	3.91±1.47
PMS	3.14±0.90 <sup>b</sup>	4.22±1.36 <sup>a</sup>	3.75±0.87 <sup>ab</sup>	3.91±0.88 <sup>ab</sup>	4.30±0.75 <sup>a</sup>	4.59±1.26 <sup>a</sup>
<b>Na Leak</b>			(Na mmole/l rbc/hr)			
Intact	0.56±0.15	0.53±0.12	0.68±0.26	0.66±0.15	0.65±0.13	0.59±0.22
PMS	0.70±0.21	0.70±0.22	0.74±0.22	0.76±0.19	0.76±0.20	0.77±0.36
△ Na-leak	0.14±0.15	0.17±0.15	0.06±0.13	0.09±0.13	0.10±0.15	0.18±0.17

Values are means ± SD of 9 rats.

Na leak is Na efflux through passive sodium channel in red blood cells.

## 7. 혈장과 PRP의 TBARS의 수준

혈장과 PRP에서의 TBARS의 생성수준에 대한 결과를 <Table 8>에 제시하였다. 본 실험에서 혈장과 PRP에서의 TBARS 함량은 항산화물질의 종류에 따라 영향을 받는 것으로 나타났다.

혈장과 PRP에서의 TBARS 수준은 lard군이 다른 어유섭취군에 비해 낮게 나타났으나, 생선기름을 식이지방으로 급여한 vit. E 첨가군과는 유의차가 없었다. Lard군은 혈장 지질 수준이 다른 비교군에 비해 높은 수치였으나, TBARS 생성수준이 낮은 것은 포화지방을 섭취함으로써 free radicals에 의한 산화가 덜 일어났을 것이라 생각된다. 또한 vit. E 첨가군의 TBARS 생성수준이 lard군과 비슷하다는 것은 다중 불포화 지방산이 많이 함유된 생선기름을 섭취하더라도 항산화제를 추가로 충분히 섭취하게 되면, free radicals에 의한 산화적 손상은 적게 나타날 것이라 생각된다.

혈장에서는 어유를 섭취한 군들 중에 vit. E 첨가군이 vit. E 결핍군에 비해 유의적으로 TBARS 함량을 낮추었고 ( $P < 0.05$ ), quercetin군과 선인장열매군도 유의적 차이는 없었지만, TBARS 생성을 다소 억제하는 경향을 보이고 있다. 그러나 hesperidin군에서는 TBARS 생성 억제 효과가 없는 것으로 나타났다.

PRP에서는 어유 섭취군들 중 vit. E 첨가군, quercetin군, 선인장열매군이 vit. E 결핍군에 비해 TBARS 생성이 유의적으로 낮게 나타났다 ( $P < 0.05$ ). 그러나 PRP에서도 혈장에서와 마찬가지로 hesperidin군은 항산화 효과가 나타나지 않았다.

Flavonoids의 지질과산화 억제 효과에 대한 많은 *in vitro* 연구 결과들이 발표되고 있다. Morel(1993)은 Fe이 들어있는 쥐의 hepatocyte 배양액에 150 $\mu$ M catechin, quercetin, diosmetin을 첨가하여 24시간 동안 배양하였을 때 이는 약 40%의 MDA 생성을 억제하였다고 보고하였고, Kostyuk et al. (1998)은 rat 복막의 macrophage를 asbesto (석면 섬유)에 노출시켰을 때 rutin과 quercetin이 TBARS 생성을 억제하였다고 보고하였다. Santus et al. (1991)은 flavone인 diosmin 90%와 flavanone인 hesperidin 10%로 구성된 Daflon이 자외선에 의해 유도된 지질과산화와 plasma membrane 손상을 억제하여

TBARS 생성수준을 낮추어 주었다고 보고하였고, Igor et al. (1989)도 lecithin liposomes와 rat liver microsomes에 철 이온, NADPH, CCl<sub>4</sub>로 산화적 손상을 가하였을 때 rutin과 quercetin이 농도에 비례하여 MDA 형성을 억제한다고 보고하였다. *In vitro* 실험에서 보여진 이러한 결과들은 지질과산화 개시 단계에서 flavonoids가 금속을 효과적으로 chelating 하고 free radicals를 직접 소거하여 지질의 과산화를 억제함으로써 가능하리라 생각된다.

*In vivo* 실험에서 Shon et al. (1998)은 4주령 Sprague Dawley rats에게 hesperidin과 naringin을 0.25, 0.5, 1%씩 각각 식이에 첨가하여 공급한 경우, 혈장 TBARS 생성수준은 대조군에 비해 hesperidin에서는 유의차가 없었으나, naringin에서는 0.5, 1%수준에서 유의적으로 억제하였다고 보고하였다. 그리고 Fremont et al. (1998)은 다중불포화 지방산을 섭취하고 있는 rats에게 flavonoids (quercetin+catechin, 2:1)를 공급한 후, 그 rats의 VLDL+LDL을 12 시간 배양했을 때 TBARS 생성 수준은 유의적으로 억제하였으며, 24시간 배양했을 경우는 유의적 차는 없지만 다소 낮추는 경향을 나타냈다고 한다.

그러나, 본 실험에서 *in vivo* 실험결과는 *in vitro* 실험 결과를 그대로 반영하지는 않는 것으로 보인다. 본 실험에서 free radical 소거 활성과 TBARS 생성과 관련지어 보면, quercetin은 vit. E와 다른 flavonoids에 비해 가장 높은 free radical 소거 활성을 갖고 있는데 반해, TBARS의 생성 억제 효과는 vit. E에 비해 낮았다. 그리고 free radical 소거 활성이 가장 낮았던 선인장열매와는 비슷한 수준으로 TBARS 생성을 억제하였다. 따라서 flavonoids의 지질의 과산화 억제는 radical 소거 작용뿐만 아니라 다른 생리적 영향을 받는 것으로 사료된다.

본 실험에서 식품의 항산화 효과를 알아보기 위해 식이에 첨가된 선인장열매는 TBARS의 생성을 효과적으로 억제하였으므로 우수한 항산화 식품으로 개발될 가능성이 있다고 생각되어지며, 이러한 효과는 선인장열매에 함유된 phenolic compounds에 의한 것일지도 모른다.

Table 8. Effects of feeding diets containing vit E, hesperidin, quercetin or prickly pear cactus on TBARS levels in plasma and PRP

	Lard			Fish oil		
	Vit. E	Vit. E def.	Vit. E	Hesperidin	Quercetin	Cactus
Plasma	1.58±0.31 <sup>d</sup>	2.35±0.56 <sup>ab</sup>	1.86±0.57 <sup>cd</sup>	2.71±0.47 <sup>a</sup>	2.13±0.37 <sup>bc</sup>	2.03±0.47 <sup>bcd</sup>
PRP	1.37±0.60 <sup>b</sup>	2.21±0.74 <sup>a</sup>	1.40±0.51 <sup>b</sup>	2.14±0.49 <sup>a</sup>	1.54±0.52 <sup>b</sup>	1.42±0.53 <sup>b</sup>

PRP : Platelet rich plasma

Values are means ± SD of 9 rats.

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

## 8. LDL-Oxidation

산화정도에 따른 LDL표면의 charge변화를 agarose gel electrophoresis에서의 이동 정도를 통해 관찰하였는데, 이에 대한 결과가 <figure 3>에 나타나 있다. Niki et al. (1991)은 LDL이 산화되는 동안에 apoB의 응집, 단편화 그리고 (-)charge의 증가 등이 지질과산화 정도와 관련이 있음을 보고하였다. Agarose gel electrophoresis에서 산화된 LDL은 (-) charge가 증가됨으로서 (+) charge로 이동하는데, 본 실험에서 이러한 (+) charge로의 이동을 어느 정도를 억제하는지를 관찰함으로써 vit. E와 flavonoids에 대한 항산화 능력을 조사하였다.

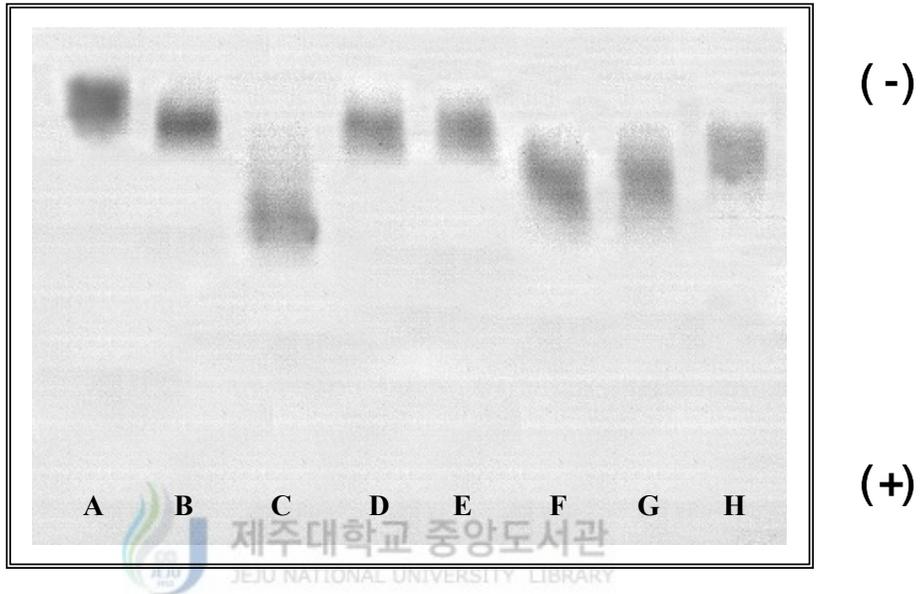
2mM tocopherol을 첨가시킨 경우 LDL을 CuSO<sub>4</sub>로 산화시킨 control에 비해 (+) charge로의 이동을 억제하였다. 선인장열매 에탄올 추출물을 1.5mg/ml의 농도로 첨가시킨 경우 또한 control에 비해 LDL의 산화를 억제하는 효과가 있는 것으로 나타났다. Quercetin과 hesperidin 또한 (+) charge로의 이동을 control에 비해 억제시키나, 항산화제로 알려진 tocopherol에 비해 LDL 산화 억제효과는 낮게 나타났다.

Viana et al. (1996)은 anthocyan, catechin, chalcone, aurone등의 성분이 함유된 flavonoid-rich extract이 agarose gel에서의 LDL 이동을 농도에 비례하여 억제하였다고 보고하였다. Hiroshi et al. (1999)는 녹차의 flavonoids가 LDL의 산화를 억제시켰다고 보고하였다. 그리고 녹차성분 중에 theaflavin digallate가 macrophage에 의한 LDL 산화를 억제함으로써 agarose gel electrophoresis에서의 이동을 감소시켰다고 하였다. Frankel et al. (1993)은 적포도주의 phenolic compounds가 구리에 의해 산화되는 LDL의 산화를 억제하였고, 이러한 것은 phenolic compounds가 좋은 electron donor로서의 역할을 할 수 있어서 가능할지도 모른다고 발표하였다. 또한 Anderson et al. (2001)은 walnut에서 추출한 polyphenolics가 *in vitro*연구에서 LDL oxidation을 효과적으로 억제하였다고 보고하였다.

선인장열매 에탄올 추출물이 다른 flavonoids에 비해 높은 억제효과를 나타냈는데, 이는 에탄올 추출물에는 한 종류 이상의 flavonoids가 함유되어 있을

가능성이 있고, 그 물질들에 의한 시너지효과가 나타날 수 있다고 생각된다. 또한 선인장 에탄올 추출물 속에는 flavonoids이외의 다른 물질이 함유되어 있을 수 있고, 그 물질들에 의한 항산화 효과가 나타났을 가능성도 배제할 수 없다.





A: Native LDL, B: LDL incubated, C: LDL+Cu<sup>2+</sup>, D: Tocopherol (2mM), E: Tocopherol (4mM), F: Quercetin (2.5mM), G: Hesperidin (2.5mM), H: Cactus (1.5mg/ml)

0.7% agarose gel eletrophoresis (0.05M barbital buffer)

Figure 3. LDL - Oxidation

## IV. 결 론

심순환기질환의 예방 및 치료에 효과가 있다고 알려진 생선기름을 섭취시킨 흰쥐에게서 vit. E와 flavonoid 공급이 혈소판 응집성, 적혈구 나트륨 유출, 적혈구 용혈, 체내 혈당 및 지질수준, LDL산화에 대한 항산화 효과를 조사하기 위해 이 실험을 수행하였다. 생후 8주령의 Sprague Dawley계 숫쥐를 대상으로 lard 군 (1% corn oil + 9% lard)에 50 IU/kg diet의 vit. E를 첨가하였고, 어유섭취군 (1% corn oil + 9% fish oil)은 체내 vit. E가 결핍된 8주령 숫쥐를 대상으로 vit. E 결핍군을 대조군으로하여 각 식이에 50 IU/kg diet의 vit. E, 0.5% hesperidin, quercetin, 10% 선인장열매분말을 첨가하여 4주간 실험하였다. 결과를 요약하면 다음과 같다:

1. 식이의 vit. E와 플라보노이드의 항산화능은 quercetin이 1480으로 가장 높게 나타났으며, vit. E와, hesperidin, 그리고 선인장열매가 각각 12.2, 15.5, 5로 나타났다.
2. 증체량, 식이섭취량, 식이효율은 vit. E 첨가군이 다른 군에 비해 유의적으로 높았고 ( $P<0.05$ ), 선인장열매군은 일일 식이 섭취량이 가장 낮았으나 최종 무게가 다소 높게 나타나 유의적 차이는 없지만 식이효율이 높게 나타났다.
3. Lard 군은 혈장 포도당, 콜레스테롤, 중성지방 수준이 생선기름을 공급받은 다른 비교군에 비해 유의적으로 높았다 ( $P<0.05$ ). 선인장열매군은 혈장 총콜레스테롤은 유의적으로 낮추고 ( $P<0.05$ ), 이와 비례적으로 HDL-콜레스테롤은 증가시켜 동맥경화 예방효과가 있었다.
4. 어유섭취군들이 lard군에 비해 혈소판 응집을 억제하는 효과가 나타나지 않았다. 그리고 flavonoids의 공급에 따른 혈소판 응집 억제 효과도 나타나지 않았다. Hesperidin군의 경우에 유의적이지는 않지만 Initial slope은 가장 낮고

maximum aggregation은 가장 높게 나타났다.

5. Vit. E와 hesperidin은 유의적이진 않지만, hemolysis를 억제하는 효과가 있었다.

6. Lard군은 어유의 다른 비교군에 비해 PMS 처리된 적혈구의 intracellular Na를 유의적으로 낮추었다 ( $P < 0.05$ ). Vit. E 첨가군과 hesperidin군은 intracellular Na과 Na leak에 있어서 PMS 처리에 의한 손상을 가장 적게 받았다.

7. Lard 군은 plasma와 PRP에서 TBARS의 생성수준이 어유의 다른 비교군에 비해 낮았다. 혈장에서는 어유비교군들 중에서 vit. E 첨가군이 vit. E 결핍군에 비해 TBARS의 생성수준을 유의적으로 낮추었고 ( $P < 0.05$ ), PRP에서는 vit. E 첨가군, quercetin군, 선인장열매군이 vit. E 결핍군에 비해 TBARS 생성수준을 유의적으로 낮췄다 ( $P < 0.05$ ).

8. LDL-Oxidation 반응 후 agarose gel electrophoresis에서 flavonoids의 산화 억제 효과는 quercetin과 hesperidin에 비해 선인장열매의 에탄올추출물이 높았는데 이는 선인장열매의 여러 flavonoids의 시너지 효과로 추정할 수 있다.

본 실험 결과에 의해 *in vitro* 연구에서 flavonoids의 free radicals 소거 활성은 생체 내에서의 항산화능과 그대로 관련짓기는 어려우며, vit. E와 선인장열매는 생체 내에서 유익한 생리 활성 작용을 하는 것으로 여겨진다.

## V. 참고 문헌

Ameer B., Weintraub R.A., Johnson J.V., Yost R.A., Rouseff R.L. (1996) Flavanone absorption after naringin, hesperidin, and citrus administration. *Clin Pharmacol Ther* 60:34-40

American Institute of Nutrition, AIN 76A semipurified diet : Report of the American Institute of Nutrition ADOC Committee on standards for Nutritional Studies. (1977) *J Nutr.* 107:1340-1348

Anderson, K.J., Teuber, S.S., Gobeille, A., Cremin, P., Waterhouse A.L., and Steinberg F.M. (2001) Walnut polyphenolics inhibit in vitro Human plasma and LDL oxidation *J. Nutr.* 131:2837-2842

Aviram, M. and Fuhrman B. (1998) Polyphenolic flavonoids inhibit macrophage-mediated oxidation of LDL and attenuate atherogenesis. *therAogenesis* 137:S45-S50

Aviram, M. and Fuhrman B. (2002) Wine Flavonoids Protect against LDL Oxidation and Atherosclerosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 957:146-161

Basarkar PW and Nath N (1983) Hypocholesterolemic and hypolipidemic activity of quercetin - a vitamin P - like compound in rats. *Indian J Med Res.* 77:122-126

Basu, S.K., Goldstein, J.L., Anderson, R.G.W. and Brown, M.S. (1976) Degradation of cationized low density lipoprotein and regulation of cholesterol metabolism in homozygous familial hypercholesterolemia

fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 73:3178-3182

Bjerregaard, P., Pedersen, H.S. and Mulvad, G. (2000) The associations of a marine diet with plasma lipids, blood glucose, blood pressure and obesity among the Inuit in Greenland. *European J. of Clinical Nutr.* 54(9):732-737

Bok S.H., Lee S.H., Park Y.B., Bae K.H., Son K.H., Jeong T.S., Choi M.S. (1999) Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-Hydroxy-3-Methyl-Glutaryl-CoA Reductase and Acyl CoA: Cholesterol Transferase are lower in rats fed citrus peel extract of a mixture of citrus bioflavonoids. *J Nutr* 129:1182-1185

Bors, W., Heller, W., Michael, C., Saran, M. (1990) Flavonoids as antioxidants : determination of radical scavenging efficiencies. *Methods in Enzymol* 186:343-355



Brand-Williams W., Cuvalier ME, Berset C. (1995) Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Technology* 28:25-30

Bravo, L. (1998) Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance. *Nutrition Reviews* 56(11):317-333

Buckingham, K.W. (1985) Effects of Dietary Polyunsaturated/Saturated Fatty Acid Ratio and Dietary Vitamin E on Lipid Peroxidation in the Rat. *J Nutr.* 115:1425-1435

Catapano, A.L. (1997) Antioxidant Effect of flavonoids. *Angiology* 48(1):39-44

Clarke SD, Armstrong MK (1988) Suppression of rat liver fatty acid

synthetase mRNA level by dietary fish oil. *FASEB J* 2:A852

Coldiron A.D. Jr, Sanders R.A., Watkins J.B. 3rd (2002) Effect of combined Quercetin and Coenzyme Q (10) Treatment on oxidative stress in Normal and Diabetic rats. *J Biochem Mol Toxicol* 16(4):197-202

Cook, N.C. and Samman, S. (1996) Flavonoids - chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources *J Nutr Biochem* 7:66-76

De Whalley, C.V., Rankin, S.M., Hoult, J.R.S., Jessup, W., Leake, D.S. (1990) Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Biochem. Pharmacology.* 39:1743-1750

Demrow, H.S., Salne, P.R., Folts, J.D. (1995) Administration of wine and grape juice inhibits in vivo platelet activity and thrombosis in stenosed canine coronary arteries. *Circulation* 91:1182-1188

Draper, H.H. and Csallany, A.S. (1969) A simplified hemolysis test for vitamin E deficiency. *J Nutr* 98:390-394

Dyerberg J, Bang H.O., Hjerne N. (1975) Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos. *Am J Nutr* 28:958-966

Esterbauer, H., (1993) Cytotoxicity and genotoxicity of lipid-oxidation products. *Am J Clin Nutr* 57:779S-786S

Fernandez M.L., Lin, E.C.K., Trejo, A. and Mcnamara, D.J. (1992) Prickly pear(*Opuntia SP.*) pectin reverses low density lipoprotein receptor suppression induced by a hypercholesterolemic diet in quinea pigs. *J. Nutr.* 122:2330-2340

Ferrali, M., Signorini, C., Caciotti, B., Sugherini L., Ciccoli, L., Giachetti, D., Comporti, M. (1997) Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Letters* 416:123-129

Fisher, W.R., (1983) Heterogeneity of plasma low density lipoprotein : manifestation of the physiologic phenomenon in man. *Metabolism*, 32:283-291

Formica, J.V., Regelson, W. (1995) Review of the biology of Quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol* 33(12):1061-1080

Frankel, E.N., Kanner, J., German, J.B., Parks, E. and Kinsella, J.E. (1993) Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *The Lancet* 341:454-457

Fremont, L., Marie T. Gozzelino, Marie P. Franchi and Alain Linard (1998) Dietary Flavonoids Reduce Lipid Peroxidation in Rats Fed Polyunsaturated or Monounsaturated Fat Diets. *J. Nutr.* 128:1495-1502

Harris E.D. (1992) Regulation of antioxidant enzyme. *J Nutr* 122:625-626

Harris W.S. (1983) Fish oils and plasma lipid and lipoprotein metabolism in humans : a critical reviews. *J Lipid Res* 30:785-807

Henriksen, T., Mahoney, E.M. and Steinberg, D. (1983) Enhanced macrophage degradation of biologically modified low density lipoprotein. *Atherosclerosis*, 3:149-159

Herold PM, Kinsella JE. (1986) Fish oil consumption and decreased risk of

cardiovascular disease. *AM J clin Nutr* 43:566-598

Hertog, Michael G.L., Edith J.M. Feskens, Peter C.H. Hollman, Martijn B. Katan, Daan Kromhout (1993) Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease: Zutphen Elderly Study. *The Lancet* 342:1007-1011

Hertog, Michael G.L., Edith JM Feskens, Daan Kromhout (1997) Antioxidant flavonols and coronary heart disease risk. *The Lancet* 349:699

Hiroshi Y., Toshitsugu I., Heroshi H., Michio S., Makoto A., Tetsuya H., Shojiro S., Atsushi Y., Kenji H., Toshimitsu I., Kei N., Takeshi Y., Koji T., Masato N., Fumitaka O. and Haruo N. (1999) Inhibitory Effect of Tea Flavonoids on the Ability of Cells to Oxidize Low Density Lipoprotein. *Biochem. Pharmacology.* 58:1695-1703

Hollman, P.C.H., van Trijp, J.M.P., Mengelers, M.J.B., de Vries, J.H.M., and Katan, M.B. (1997) Bioavailability of the dietary antioxidant flavonol quercetin in man. *Cancer Letters* 114:139-140

Hori T., Yamanaka Y., Hayakawa M., Shibamoto S., Oku N., and Ito F. (1990) Growth inhibition of human fibroblasts by epidermal growth factors in the presence of arachidonic acid. *Biochem Biophysics Res Comm* 169:957-965, 1990

Hseu, Y.C., Chang, W.C., Hseu, Y.T., Lee, C.Y., Yech, Y.J., Chen, P.C., Chen, J.Y., Yang, H.L. (2002) Protection of oxidative damage by aqueous extract from *Antrodia camphorata* mycelia in normal human erythrocytes. *Life Sci.* 71:469-482

Igor B. Afanas'ev, Anatolii I. Dcrozsko, Aleksander V. Brodskii, Vladimir

A. Kostyuk and Alla I. Potapovitch (1989) Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem Pharmacology* 38(11):1763-1769

Janssen, K., Mensink, R.P., Cox, F.J., Harryvan, J.L., Hovenier, R., Hollman, P.C., and Katan, M.B. (1998) Effects of the flavonoids quercetin and apigenin on hemostasis in healthy volunteers : results from an in vitro and a dietary supplement study. *Am J Clin Nutr* 67:255-262

Junji Terao, Mariusz Piskula, and Qing Yao (1994) Protective Effect of Epicatechin Gallate, and Quercetin on Lipid Peroxidation in Phospholipid Bilayers. *Archives of Biochem. and Biophys.* 308(1):278-284

Kana Ioku, Tojiro Tsushida, Yoko Takei, Nobuji Nakatani and Junji Terao (1995) Antioxidative activity of quercetin and quercetin monoglucosides in solution and phospholipid bilayers. *Biochim Biophys Acta* 1234:99-104

Kang, Tie-bang and Liang Nian-ci (1997) Studies on the Inhibitory Effects of Quercetin on the Growth of HL-60 Leukemia. *Biochem Pharmacology* 54:1013-1018

Kostyuk, Vladimir A., and Potapovich, Alla I. (1998) Antiradical and chelating effects in flavonoid protection against silica-induced cell injury. *Archives of Biochemistry and Biophysic* 355(1):43-48

Kuda T, Enomoto T, Yano T, Fujii T. (2000) Cecal environment and TBARS level in mice fed corn oil, beef fallow and menhaden fish oil. *J Nutr Sci Vitaminol(Tokyo)* 46(2):65-70

Laughton, M. J., Evans, P. J., Moroney, M. A., Hoult, J. R. S., and

Halliwell B. (1991) Inhibition of mammalian 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase by flavonoids and phenolic dietary additives. *Biochem. Pharmacology* 42(9):1673-1681

Leake DS, Rankin SM. (1990) The oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *J Biochem* 270:741-748

Lee U.S. (1998) Effects of saturated and unsaturated oil diets on the lipid peroxidation and hemolysis of mouse erythrocytes. *J Industrial Sci* 6:389-396

Manach, C., Morand, C., Texier, O., Favier, M.L., Agullo, G., Demigne, C., Regerat, F. and Remesy, C. (1995) Quercetin metabolites in plasma of rats fed diets containing rutin or quercetin. *J Nutr* 125:1911-1922

Maridonneau, I., Braquet, P. and Garay, R.P. (1983) Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> Transport Damage Induced Oxygen Free Radicals in Human Red Cell Membranes. *J. of Biological Chem.* 258(5):3107-3113

Maridonneau-Parini, P. Braquet and R.P. Garay (1986) Heterogenous Effect of Flavonoids on K<sup>+</sup> loss and Lipid Peroxidation induced by Oxygen-Free Radicals in Human Red Cells. *Pharmacol. Research Communications*, 18(1):61-72

McGregor, L., Bellangeon, M., Chignier, E., Lerond, L., Rousselle, C., and McGregor J. L. (1999) Effect of a Micronized Purified Flavonoid Fraction on in vivo platelet functions in the rat. *Thrombosis Research* 94:235-240

Mora A., Paya M., Rios J.L. and Alcaraz M.J. (1990) Structure-activity relationships of polymethoxy flavones and other flavonoids as inhibitors of

non-enzymic lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 40:793-797

Morel, D.W., Docorleto, P.E. and Chisolm, G.M. (1984) Endothelial and smooth muscle cells alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Atherosclerosis*, 4:357-364

Morel, I., Gerard Lescoat, Pascale Cogrel, Odile Sergent, Nicole Padeloup, Pierre Brissot, Pierre Cillard and Josiane Cillard (1993) Antioxidant and Iron-Chelating activities of the Flavonoids Catechin, Quercetin and Diosmetin on Iron-Loaded Rat Hepatocyte Cultures. *Biochemical Pharmacology* 45(1):13-19

Niki E., Yamamoto Y., Komuro E., and K. (1991) Membrane damage due to lipid oxidation. *Am L Clin Nutr* 53:201

O'Reilly, J.D., Sanders, T.A., Wiseman, H. (2000) Flavonoids protect against oxidative damage to LDL in vitro: use in selection of a flavonoid rich diet and relevance to LDL oxidation resistance ex vivo? *Free Radic Res* 33(4):419-426

Ollila, F., Halling, K., Vuorela, P., Vuorela, H., and Slotte, J. P. (2002) Characterization of flavonoid-Biomembrane interactions. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 399(1):103-108

Petroni, A., Milena Blasevich, Marco Salami, Nadia Papini, Gian F. Montedoro and Claudio Galli (1995) Inhibition of Platelet Aggregation and Eicosanoid Production by Phenolic Components of Olive Oil. *Thrombosis Research* 78(2):151-160

Pignatelli, P., Pulcinelli, F. M., Celestini, A., Lenti, L., Ghiselli, A.,

Gazzaniga, P.P., Violi, F. (2000) The flavonoids quercetin and catechin synergistically inhibit platelet function by antagonizing the intracellular production of hydrogen peroxide. *Am J Clin Nutr* 72(5):1150-1155

Rafat Husain, S. , Cillard, J. and Cillard, P. (1987) Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. *Phytochemistry* 26(9):2489-2491

Rankin SM, Hoult JRS, Leake DS. (1988) Effects of flavonoids on the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages. *Br J Pharmacol* 95:727P

Rein, D., Paglieroni T. G., Pearson D. A., Wun, T., Schmitz, H. H., Gosselin, R., and Keen, C. L. (2000) *J. Nutr.* 130:2120S-2126S

Renaud S. and Loegeril M. (1992) Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease. *The Lancet* 339:1523-1526

Roser CR. (1988) The nutritional incidence of flavonoids: some physiological and metabolic consideration *Experientia* 44(9):725-733

Samuelson E et al.: Prostaglandins and thromboxanes (1978) In: Harper's Biochemistry, 21th ED., Murray RK, Granner DK, Mayers PA, Rodwell VW eds. (1988) Metabolism of unsaturated fatty acids and eicosanoids., *Norwalk: Appleton & Lange* :210-217

Santus R., Rerdrix L., Haigle J., Morliere P., Maziere P., Maziere J.C. Maziere C., and Labrid C. (1991) Daflon as a cellular antioxidant and a membrane-stabilizing agent in human fibroblasts irradiated by ultraviolet a radiation. *Photodermatol photoimmunol photomed* 8:200-205

Schewe, T., Kuhn, H., Sies, H. (2002) Flavonoids of cocoa inhibit recombinant human 5-lipoxygenase. *J. Nutr.* 132(7):1825-1829

Simopoulos, A.P. (1991) Omega-3 fatty acids in health and disease and in growth and development. *Am J Clin Nutr* 54:438-463

Smith, J.B., Ash, K.O., Hentschel, W.M., Sprowell, W.L., Williams, R.R. (1984b) A simplified method for simultaneously determining countertransport and cotransport in human erythrocyte. *Clin Chim Acta*, 137:167-177

Smith, J.B., Ash, K.O., Sprowell, W.L., Hentschel, W.M., Williams, R.R. (1984a) An improved non-radioisotopic method for increasing ouabain-sensitive  $\text{Na}^+$  efflux from erythrocytes. *Clin Chim Acta*, 143:295-299

Sohn, J.S., Kim, M.K. (1998) Effects of Hesperidin and Naringin on Antioxidative Capacity in the Rat. *Korean J. Nutr.* 31(4):687-696

Viana, M. Coral Barbas, Bartolome Bonet, M. Victoria Bonet, Mario Castro, M. Victoria Fraile, Emilio Herrera (1996) In vitro effects of a flavonoid-rich extract on LDL oxidation. *Atherosclerosis* 42(9):1673-1681

Wiseman, H. (1996) Dietary influences on membrane function: Importance in protection against oxidative damage and disease. *J. Nutr. Biochem.* 7:2-15

Yagi K. (1976) A simple fluometric assay for lipoperoxide in plasma. *Biochem Med.* 15:212-216

Young J.F., Nielsen S.E., Haraldsdóttir J., Daneshvar B., Lauridsen S.T., Knuthsen P., Crozier A., Sandström B., Dragsted L.O. (1999) Effect of fruit

juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status. *Am J Clin Nutr* 69:87-94

Yusuke Arai, Shaw Watanabe, Mitsuru Kimira, Kayoko Shimoi, Rika Mochizuki, and Naohide Kinae (2000) Dietary Intakes of Flavonols, Flavones and Isoflavones by Japanese Women and the Inverse Correlation between Quercetin intake and Plasma LDL Cholesterol Concentration. *J. Nutr.* 130:2243-2250

대한통계협회. 사망원인 통계 보고서. 2000

손홍수, 김현숙, 권태봉, 주진순. (1992) 감귤의 Bioflavonoids 분리, 정제 및 혈압강하효과. *한국영양식량학회지* 21:136-142



# Abstract

## Antioxidant effects of flavonoids on erythrocyte Na efflux, platelet aggregation, TBARS production and LDL-oxidation in Sprague Dawley Rats fed fish oil

Yang Hee Kim

Department of Food Science and Nutrition, Graduate School  
Cheju National University, Cheju, Korea

Flavonoids of about 4000 varieties are present in plants such as legume, grape, citrus fruits, tea and garlic in form of water soluble yellowish pigment. Epidemiological study showed that the incidence of cardiovascular diseases is inversely correlated with the consumption of flavonoid containing foods. Flavonoids in vitro study prevent lipid peroxidation and platelet aggregation by way of their radical scavenging activities. Fish oils are known to have beneficial effects on cardiovascular diseases by decreasing plasma lipids and thrombosis. However, consumption of highly unsaturated fish oil may lead to cellular damages because they are more susceptible to lipid peroxidation.

The purpose of present study was to investigate the antioxidant effects of quercetin, hesperidin, vit. E and prickly pear cactus in Sprague Dawley rats fed fish oil by examining erythrocyte Na-leak, platelet aggregation, TBARS production and plasma cholesterol. Diet mix of 0.5% quercetin and hesperidin, 50IU tocopheryl acetate and 10% of prickly pear cactus had comparative potencies of 1480, 15.5, 12.2 and 5 respectively in DPPH radical scavenging test. Plasma glucose, total cholesterol and triglyceride were significantly decreased ( $P<0.05$ ) in rats fed fish oil compared with rats fed lard. Total cholesterol was decreased significantly ( $P<0.05$ ) in rats fed prickly pear cactus and HDL-cholesterol was increased significantly ( $P<0.05$ ) in rats fed vit. E compared with other groups fed fish oil. Fish oil

itself did not affect platelet aggregation, but fish oil with hesperidin decreased the initial slope and increased the maximum platelet aggregation although no statistical difference. Hemolysis and increase in Na leak after PMS treatment were lower in rats fed vit. E and hesperidin compared with other groups. TBARS production in plasma and PRP was significantly increased ( $P < 0.05$ ) in rats fed fish oil without vit. E or with hesperidin, but there was no difference between rats fed fish oil and lard. Extract of prickly pear cactus had more antioxidant effects than quercetin or hesperidin in LDL oxidation which may be associated with synergic effects of the extract flavonoids.

In present study, antioxidant effects of flavonoids and vit. E were not well correlated with their radical scavenging potencies, and vit. E and prickly pear cactus had consistently favorable effects in biological system.



## 감사의 글

학문에 대한 동경과 열의만으로 시작했던 대학원을 이제 이 조그만 논문과 함께 마무리하려고 합니다. 돌아보면 어렵고 힘들었던 순간도 많았지만, 그 시간들이 모두 소중한 추억이 되었습니다. 많은 분들의 도움이 있었기에 논문을 마무리할 수 있었습니다.

부족한 제자를 늘 격려해주시고 사랑으로 끝까지 지켜봐 주신 강정숙 교수님께 진심으로 감사드립니다. 교수님이 아니셨다면 제가 어려운 고비들을 어떻게 헤쳐 나갈수 있었을까 생각해 보며, 다시 한번 깊은 감사드립니다. 진정한 학문의 길과 삶에 대한 자세를 가르쳐 주신 윤창훈 교수님께 깊은 감사드립니다. 바쁘신 가운데도 언제나 제게 기회와 시간을 내어주시며 세심한 지도와 조언을 아끼지 않으신 고양숙 교수님, 신동범 교수님께 깊은 감사드립니다. 그리고, 제가 학문이나 인생에 있어서 힘들어할 때 항상 바른길로 인도하신 홍양자 교수님과 늘 따뜻하게 지켜봐 주시고 격려해주셨던 양양한 교수님께 감사드립니다.

논문을 위해 보낸 많은 시간 동안 함께 고생해주었고, 힘들 때나 짜증날 때도 한결같이 항상 옆에 있어준 정말 사랑스런 후배 인선, 지현, 은희, 주현에게 고마움을 전합니다. 그리고 항상 도와주려고 애쓰고, 어려운 일이 있을 때 같이 걱정해주던 봉연이, 선미, 은정에게도 고마움을 전합니다. 대학원 생활 동안 든든한 힘이 되어주시고, 많은 조언을 아끼지 않았던 민숙언니, 천언니처럼 자상하게 여러 가지 일을 도와주시고 건강을 늘 염려해 주신 지영언니에게 감사드립니다. 언제나 나의 반쪽처럼 모든 일을 함께 즐거워 해주고 슬퍼해 준 승의에게 또한 진심으로 감사의 마음을 전합니다. 어려모로 챙겨주고 마음의 힘이 되어 주었던 친구 지원, 순영, 영옥, 지숙, 현주, 유심, 상미, 우석, 정범, 희철, 학진, 도권, 병철, 정용이에게도 고맙다는 말을 하고 싶습니다. 어려운 부탁을 하는데도 흔쾌히 그 부탁을 들어 주었던 인혜, 연주, 경희, 윤미에게도 고마움을 전합니다. 전화와 방문으로 힘이 되어준 은숙언니, 용알오빠, 형숙언니, 그리고 사대부고 룸비니 동기·선후배. 헤아릴 수 없이 너무 많은 분들에게 고개 숙여 감사를 드립니다. 논문이 완성되도록 지극하게 마음 내어주신 한마음 선원 청년법우님들께 깊은 감사드립니다.

빠쁜 언니를 이해해주고, 마음의 격려가 되어 주었던 동생 은희, 정희 그리고 늘 의젓한 남규에게 고마움을 전합니다. 어려운 부탁만 하는 나를 이해와 사랑으로 이해해 주신 형부, 성희언니께 뒤늦게 감사의 말씀을 전하고, 조카 현승, 현관에게도 그간 전하지 못했던 사랑의 마음을 전합니다.

오늘이 있기까지 항상 제 곁에서 말로 다할 수 없는 사랑과 희생으로 도와주셨던 아버지, 어머니께 진심으로 감사드립니다. 언제나 저에게 큰 언덕이 되어 제가 뭘 하든 믿어주시고 살피주시고 저의 큰 후원자가 되어 주신 부모님께 사랑한다는 말과 함께 이 작은 결실을 드립니다.