

건강기능식품 기능성 평가 가이드

‘혈중 콜레스테롤 개선에 도움을 줄 수 있음’ 편

2019.11.



식품의약품안전처

식품의약품안전평가원

지침서 · 안내서 제 · 개정 점검표

명칭

건강기능식품 기능성 평가 가이드
(‘혈중 콜레스테롤 개선에 도움을 줄 수 있음’편)

아래에 해당하는 사항에 체크하여 주시기 바랍니다.

등록대상 여부	☐ 이미 등록된 지침서 · 안내서 중 동일 · 유사한 내용의 지침서 · 안내서가 있습니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☞ 상기 질문에 ‘예’라고 답하신 경우 기존의 지침서 · 안내서의 개정을 우선적으로 고려하시기 바랍니다. 그럼에도 불구하고 동 지침서 · 안내서의 제정이 필요한 경우 그 사유를 아래에 기재해 주시기 바랍니다. (사유 :)	
	☐ 법령(법 · 시행령 · 시행규칙) 또는 행정규칙(고시 · 훈령 · 예규)의 내용을 단순 편집 또는 나열한 것입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 단순한 사실을 대외적으로 알리는 공고의 내용입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 1년 이내 한시적 적용 또는 일회성 지시 · 명령에 해당하는 내용입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 외국 규정을 번역하거나 설명하는 내용입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☐ 신규 직원 교육을 위해 법령 또는 행정규칙을 알기 쉽게 정리한 자료입니까?	☐ 예 ☒ 아니오
☞ 상기 사항 중 어느 하나라도 ‘예’에 해당되는 경우에 지침서 · 안내서 등록 대상이 아닙니다. 지침서 · 안내서 제 · 개정 절차를 적용하실 필요는 없습니다.		
지침서 · 안내서 구분	☐ 내부적으로 행정사무의 통일을 기하기 위하여 반복적으로 행정사무의 세부기준이나 절차를 제시하는 것입니까? (공무원용)	☐ 예(지침서) ☒ 아니오
	☐ 대내외적으로 법령 또는 고시 · 훈령 · 예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것입니까? (민원인용)	☒ 예(안내서) ☐ 아니오
기타 확인 사항	☐ 상위 법령을 일탈하여 새로운 규제를 신설 · 강화하거나 민원인을 구속하는 내용이 있습니까?	☐ 예 ☒ 아니오
	☞ 상기 질문에 ‘예’라고 답하신 경우 상위법령 일탈 내용을 삭제하시고 지침서 · 안내서 제 · 개정 절차를 진행하시기 바랍니다.	
상기 사항에 대하여 확인하였음. 2019년 11 월 일 담당자 확 인(부서장) 이 혜 영		

이 안내서는 건강기능식품 기능성 원료 평가에 대하여 이해를 돕고자, 현재의 과학기술 수준에서 일반적인 사항과 시험방법 등이 제시된 참고자료이며, 질병에 관련된 내용이 포함되는 경우 기능성에 대한 전반적인 이해를 돕기 위한 것이지, 질병의 치료 및 예방을 목적으로 기능성을 설명하는 것은 아닙니다.

본 안내서는 대외적으로 법적 효력을 가지는 것이 아니므로 본문의 기술방식('~하여야 한다' 등)에도 불구하고 민원인 여러분께서 반드시 준수하셔야 하는 사항이 아님을 알려드립니다. 또한, 본 안내서는 2019년 11월 현재의 과학적·기술적 사실 및 유효한 법규를 토대로 작성되었으므로 이후 최신 개정 법규 내용 및 구체적인 사실관계 등에 따라 달리 적용될 수 있음을 알려드립니다.

※ "민원인 안내서"란 대내외적으로 법령 또는 고시·훈령·예규 등을 알기 쉽게 풀어서 설명하거나 특정한 사안에 대하여 식품의약품안전처의 입장을 기술하는 것(식품의약품안전처 지침서등의 관리에 관한 규정 제2조)

※ 본 안내서에 대한 의견이나 문의사항이 있을 경우 식품의약품안전평가원 식품위해평가부 영양기능연구팀으로 문의하시기 바랍니다.

전화번호: 043-719-4416, 4421, 4423, 4428, 4430

팩스번호: 043-719-4420

제·개정 이력

연번	제·개정번호	승인일자	주요내용
1	B1-2012-1-007	2012.12.	제정
2	안내서-0126-01	2017.6.1.	「식약처 지침서등의 관리에 관한 규정」에 따른 등록번호 일괄 정비 (규제개혁담당관실-3761호, 2017.5.16.)
3	안내서-0126-02	2019.6.	개정 (기능성 시험방법 등 업데이트)
4	안내서-0126-03	2019.11.	개정(오기 수정)

CONTENTS

※ 건강기능식품의 기능성 개요	1
※ 약어	3
 Ⅰ 서 론	4
 Ⅱ 일반적 사항	4
1. 개요	4
2. 보건학적 중요성	16
 Ⅲ 기능성 시험 방법	18
1. 바이오마커의 선정	18
2. 주요 바이오마커의 측정 방법	24
3. 시험 설계 시 고려사항	31
 Ⅳ 참고문헌	33

건강기능식품의 기능성 개요

□ 기능성 정의

건강기능식품법 제3조(정의) : 기능성이란 인체의 구조와 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 말한다.

□ 기능성 구분

건강기능식품의 기능성은 3가지로 구분할 수 있다.

○ 건강기능식품의 기능성 구분

기능성 구분	기능성 내용	기능성을 가진 원료 또는 성분
영양소 기능	인체의 정상적인 기능이나 생물학적 활동에 대한 영양소의 생리학적 작용	영양소
생리활성 기능	인체의 정상기능이나 생물학적 활동에 특별한 효과가 있어 건강상의 기여나 기능 향상 또는 건강유지·개선을 나타내는 기능	기능성 원료
질병발생 위험감소 기능	질병의 발생 또는 건강상태의 위험감소와 관련한 기능	

□ 건강기능식품 기능성 원료의 기능성 내용과 인정기준

건강기능식품 기능성 원료의 기능성 내용과 인정기준은 다음과 같다.

○ 건강기능식품 기능성 원료의 기능성 내용과 인정기준

구분	기능성 내용	인정기준
질병발생 위험 감소 기능 ¹⁾	○○발생위험 감소에 도움을 줌	기반연구 자료를 통해 생리학적인 효과 또는 기전이 명확하게 입증되어야 하고 일관성 있는 바이오마커의 개선효과가 다수의 인체적용시험 (RCT)에서 확보되어야 함 ※ 질병 관련 바이오마커의 확인
생리활성 기능 ²⁾	○○에 도움을 줄 수 있음	기반연구 자료를 통해 기능성 있는 생리학적인 효과 또는 기전을 추측할 수 있어야 하고 일관성 있는 바이오마커의 개선효과가 최소 1건 이상의 인체적용시험(RCT)에서 확보되어야 함(추측 제안기전과 관련한 바이오마커가 기반연구시험과 인체적용시험에서 일관성 있게 확인되어야 함) ※ 생리활성 관련 바이오마커의 확인

- 1) 제출된 기능성 자료가 질병의 발생 위험 감소를 나타내며, 확보된 과학적 근거 자료의 수준이 상당한 과학적 합의(Significant Scientific Agreement)에 이를 수 있을 정도로 높을 경우 인정. 상당한 과학적 합의(Significant Scientific Agreement)란 성분 또는 원료와 건강효과 간의 상관성이 새로운 과학에 의해 뒤집어지지 않을 정도의 수준으로 관련 분야의 전문가들에 의한 만장일치에 가까운 합의 수준을 말함
- 2) 제출된 기능성 자료가 인체의 정상기능이나 생물학적 활동에 특별한 효과가 있어 건강상의 기여나 기능향상 또는 건강유지개선을 나타내는 경우 인정

약 어

ABCG5/8	ATP-binding cassette transporter 5 and 8
ACAT	acyl-CoA cholesterol acyl transferase
CE	cholesterol ester
CETP	cholesteryl ester transfer protein
CM	chylomicron
HDL	high-density lipoprotein
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A
LCAT	lecithin : cholesterol acyl transferase
LDL	low-density lipoprotein
LPL	lipoprotein lipase
LRP	LDL receptor-related protein
NCEP	national cholesterol education program
NPC1L1	niemann-pick C1 like 1 protein
pCEH	pancreas cholesterol ester hydrolase
PL	phospholipid
PON	para oxo nas
SREBP2	sterol regulatory element binding protein2
TG	triglyceride
VLDL	very low-density lipoprotein

I

서론

이 가이드라인은 건강기능식품 기능성원료를 개발하는 연구자 및 영업자에게 식품의약품 안전처의 기능성(혈중 콜레스테롤 개선에 도움) 평가 원칙 및 기준 등을 알림으로써 산업체의 기능성원료 연구개발에 적정을 기하고 효율성을 높이고자 작성되었다.

II

일반적 사항

1. 개요

가. 콜레스테롤

(1) 콜레스테롤의 구조

동물의 조직에서 발견되는 스테로이드 알콜에 해당하는 콜레스테롤은 혈관과 세포에 존재하는 왁스 형태의 지질로 인지질과 세포막의 구성 성분이다(그림 1). 구조상 수산기와 이중결합을 1개씩 가지고 있으며, 지질형태인 콜레스테롤은 물에 잘 녹지 않아 혈액에 용해되어 이동할 수 없으므로 지단백질(lipoprotein)이라는 특수한 형태의 구조를 이루어 혈장을 통해 운반된다.

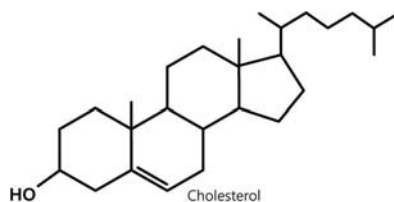


그림 1. 콜레스테롤의 구조

지단백질은 중심부에 소수성 지질(triglyceride, cholesteryl ester), 표면에 친수성 지질(phospholipid, free cholesterol) 및 아포지단백(apolipoprotein)으로 구성된 고분자량의 수용성 복합체이며, 혈장 콜레스테롤의 2/3는 콜레스테릴 에스테르형태를 띄고 있다(표 1).

표 1. 지단백질의 종류 및 특성

지단백	밀도(g/dL)	아포지단백	주요급원	지질구성(%)		
				TG	Chol	PL
킬로미크론	0.95	AI, AII, B48, CI, CII, CIII, E	소장	80~95	2~7	3~9
VLDL	0.95~1.006	B100, CI, CII, CIII, E	간	55~80	5~15	10~20
LDL	1.019~1.063	B100	VLDL	5~15	40~50	20~25
HDL	1.063~1.210	AI, AII, CI, CII, CIII, D, E	간	5~10	5~25	2~30

자료: HARRISON'S, 내과학, 도서출판 MIP

(가) 킬로미크론(chylomicron)

식이지방(중성지질), 콜레스테롤 및 다른 지용성 화합물들이 소장에서 흡수된 후 대사나 저장을 위해 신체의 다른 부분으로 운반되는 대사경로에서 식이지방이 킬로미크론 지단백질을 형성하여 혈중으로 분비하는 중요한 운반체기능을 담당한다.

(나) 초저밀도지단백(VLDL)

간에서 생성되는 중성지방이 풍부한 입자로서, 간에서 처리된 킬로미크론 잔류입자의 중성지방과 간에서 내인적으로 합성된 중성지방이 VLDL지단백질 중성지방의 근원이 된다. VLDL입자는 대사과정에서 중성지방의 함량이 감소되면서 일부 아포지단백성분 이동이 일어나며 중성지방이 풍부한 입자에서 콜레스테롤이 풍부한 입자로 전환되어 최종적으로 LDL로 전환된다.

(다) 저밀도지단백(LDL)

혈액 중의 LDL은 ‘조직의 막 수용체에 의존하는 대사경로’ 또는 ‘수용체에 의존하지 않는 대사경로’를 통해 제거될 수 있다. 막수용체를 매개로 하여 LDL 입자가 조직으로 흡수되는 과정은 콜레스테롤 생합성시 속도조절효소로 작용하는 HMG-CoA reductase의 저해를 유도하며, 이것은 결과적으로 조직의 내인성 콜레스테롤 합성을 감소시키는 작용기전이 된다. LDL 콜레스테롤의 수준은 동맥경화발생률과 양의 상관관계에 있다.

(라) 고밀도지단백(HDL)

콜레스테롤 역수송에 관여하며, 따라서 HDL 콜레스테롤 농도는 동맥경화발생 위험성과 음의 상관관계를 가진다. 이 과정은 말초조직의 콜레스테롤이 간으로 이동되어 대사되거나, 체외로 배설되는 유일한 대사경로이다.

(2) 콜레스테롤의 역할

콜레스테롤은 세포막의 주요 구성성분으로서 막의 유동성(fluidity)을 조절하고 담즙·스테로이드 호르몬·비타민 D의 전구체로 이용된다.

콜레스테롤은 식이를 통하여 체내에 공급되거나 체내에서 합성되는데, 합성된 콜레스테롤은 간에서 담즙 혹은 콜레스테롤 형태로 장으로 배설되거나 지단백질의 형태로 혈액을 통하여 말초조직에서 사용된다(그림 2).

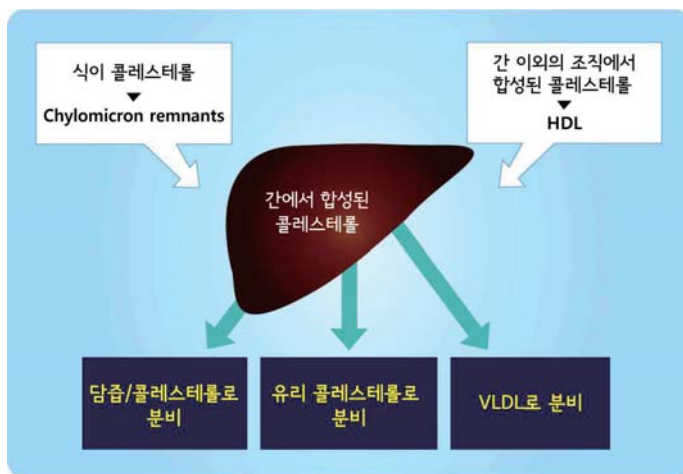


그림 2. 콜레스테롤의 역할

(3) 콜레스테롤의 대사

(가) 외인성 대사

일반적으로 식이를 통하여 체내에 들어온 콜레스테롤은 60~80% 정도가 체내로 흡수되며, 섭취된 콜레스테롤 및 지방은 소장의 상피세포에서 킬로미크론의 형태로 만들어져 림프관(lymph vessel)으로 흡수된다. 킬로미크론 내의 중성지질은 모세혈관 내에 존재하는 지단백질 분해효소(lipoprotein lipase)에 의해 분해되며 유리지방산을 방출시킨다. 이를 통해 생성된

킬로미크론의 잔존물은 간세포 수용체(ApoB48과 E)를 경유하여 세포 내로 유입된 후 지방산과 콜레스테롤 등으로 분해된다.

(나) 내인성 대사

콜레스테롤은 간세포 내에서 여러 단계를 거쳐 생합성되며, 간세포에 존재하는 내인성 및 외인성 콜레스테롤은 중성지질, 인지질 및 아포단백질(ApoB100)과 함께 VLDL을 구성하여 혈액을 통해 이동한다. 혈액 중의 HDL로부터 ApoC와 E를 얻은 VLDL은 몸 전체를 순환하면서 킬로미크론과 동일하게 중성지방을 분해하며, HDL과 중성지방, 아포단백질, 콜레스테롤 에스테르를 교환하며 LDL로 전환된다. 전환된 LDL은 생성과정에서 거의 모든 중성지방이 제거되어 주로 콜레스테롤로 구성되어 있으며, 신체의 각 조직세포로 콜레스테롤을 운반하는 역할을 하는데 혈장 콜레스테롤의 75%가 LDL에 의하여 운반된다. LDL의 일부는 간에서 수용되고, 대부분은 모든 조직세포의 세포막에 존재하는 LDL 수용체를 통해 제거되며, LDL에 의해 운반된 콜레스테롤 에스테르는 가순분해되어 세포 내에서 이용된다.

한편, HDL은 조직세포에서 유리된 콜레스테롤이나 간과 소장에서 합성분비된 콜레스테롤을 VLDL 또는 LDL에 전달하고 이를 통하여 간접적으로 간에 역수송(reverse cholesterol transport)하는 역할을 담당한다. HDL의 ApoA는 LCAT(lecithin/cholesterol acyltransferase)을 활성화하여 말초조직 또는 혈관 내의 유리 콜레스테롤(free cholesterol)을 콜레스테롤 에스테르로 전환시켜 간으로 수송한다(그림 3).

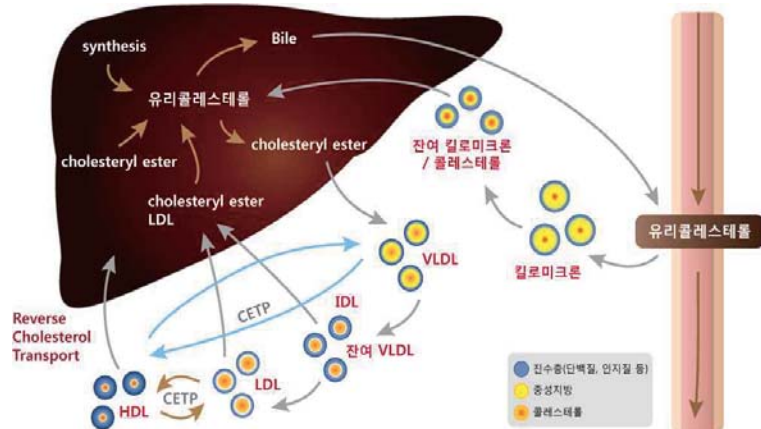


그림 3. 식이 콜레스테롤의 이동

(다) 세포내 지질 대사

각 조직의 세포막에는 LDL 수용체가 존재하며 LDL이 엔도사이토시스(endocytosis) 과정에 의해 세포내로 유입된다. 이 과정에서 LDL 수용체는 세포 표면으로 되돌아가고 LDL 입자는 라이소솜에서 분해된다. 또한 이 과정에서 LDL의 단백질 부분은 그를 구성하는 아미노산으로 분해되고, 콜레스테롤 에스테르는 콜레스테롤과 지방산으로 가수분해된다. 이를 통해 유리된 콜레스테롤은 막의 구성성분으로 사용되기도 하며, 콜레스테롤 아실전달효소(acyl-CoA: cholesterol acyltransferase, ACAT)에 의해 축매되어 콜레스테롤 에스테르로서 저장되기도 한다(그림 4).

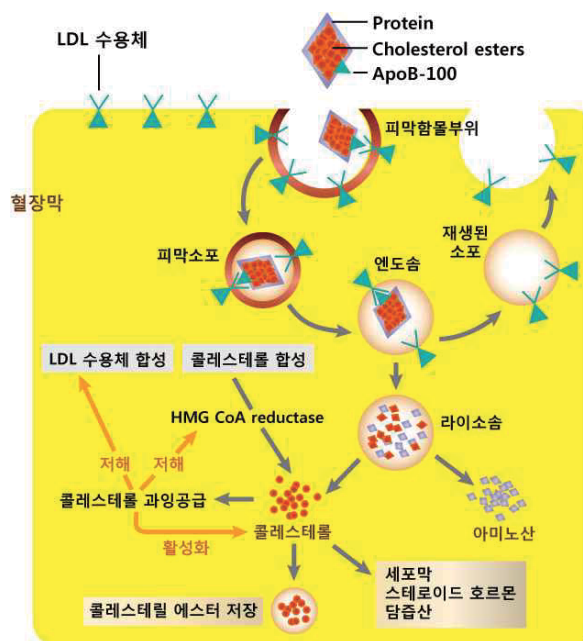


그림 4. 세포 내 콜레스테롤의 대사

(4) 콜레스테롤의 합성

(가) 메발론산 생성

지방산이 산화되어 얻어지는 아세틸-CoA 2분자가 축합과정에서 아세토아세틸-CoA를 생성하고, 여기에 아세틸-CoA 분자가 다시 축합되어 β -하이드록시- β -메틸글루타릴-CoA (β -hydroxy- β -methylglutaryl-CoA, HMG-CoA)를 생성한다. 생성물질은 HMG-CoA Reductase에 의해 축매되어, CoA-SH에 에스테르화 되어 있는 카르복실기가 수산기로 환원되면서 메발론산을 형성한다(그림 5).

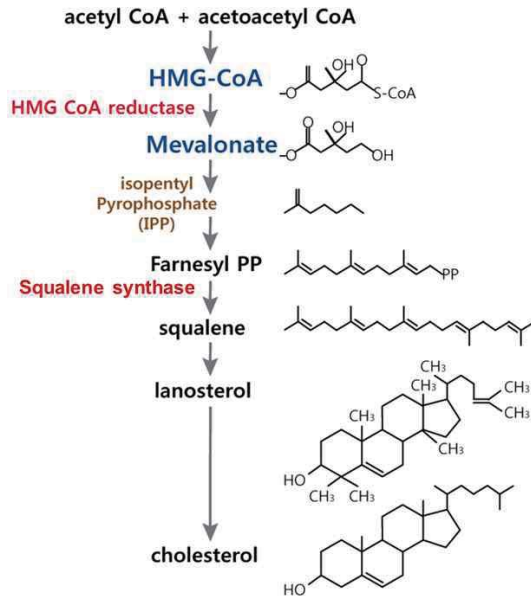


그림 5. 콜레스테롤 생합성

(나) 아이소프렌 전환

메발론산은 인산화 반응, 탈카르복실화반응, 탈인산화반응을 모두 거쳐 아이소펜테닐 파이로인산(isopentenyl pyrophosphate)과 아이소프레노이드 유도체를 생성한다.

(다) 스쿠알렌 생성

아이소프레노이드 단위체에서 축합반응이 일어나 탄소 15개짜리 파네실 파이로인산 (farnesyl pyrophosphate)을 생성하고, 스쿠알렌 synthase에 의해서 두 분자의 파네실 파이로인산의 축합으로 탄소 30개짜리 스쿠알렌이 생성된다.

(라) 콜레스테롤 합성

스쿠알렌은 NADPH와 산소분자의 축매반응으로 스쿠알렌 에폭사이드(squalene epoxide)를 형성하고, 복잡한 고리화 반응을 통하여 만들어진 라노스테롤(lanosterol)을 거쳐 최종적으로 콜레스테롤이 합성된다.

나. 콜레스테롤의 조절

우리 몸은 식이 콜레스테롤을 흡수한 LDL 수용체, 간세포 내 콜레스테롤 합성속도 조절효소인 HMG-CoA reductase, 담즙산의 합성속도 조절효소인 cholesterol 7 α -hydroxylase, 그리고 콜레스테롤을 에스테르 형태로 저장하는 ACAT(acyl-CoA cholesterol acyltransferase)가 서로 긴밀하게 연결되어 세포내 콜레스테롤 농도를 조절한다. 이를 통해 혈장과 조직(특히 혈관)에 콜레스테롤이 축적되지 않도록 하고 있으며, 콜레스테롤이 체내에 축적될 경우 고콜레스테롤혈증이 나타나고, 장기간에 걸쳐 콜레스테롤이 조절되지 않을 경우 동맥경화증으로 이어진다.

또한, 음식으로 섭취되는 콜레스테롤의 흡수 정도와 체내 콜레스테롤 합성 정도에 따라 콜레스테롤을 간에서 말단조직으로 운반하거나 또는 간으로 역수송함으로써 체내 콜레스테롤 양을 조절하여 항상성을 유지한다.

(1) 콜레스테롤 흡수

장내 콜레스테롤은 스테롤 유입 수송체(niemann-pick C1 like 1 protein, NPC1L1)에 의해 소장세포내로 흡수되어 ACAT에 의해 콜레스테롤을 에스테르 형태로 전환 후 킬로미크론 형태로 간으로 이동한다. 따라서 장내 콜레스테롤의 흡수를 억제하거나, 가수분해 및 에스테화 효소를 저해시켜 식이콜레스테롤 흡수 감소시키거나 장내 콜레스테롤이 경쟁적으로 흡수되게 함으로써 식이콜레스테롤 흡수를 감소시킨다(그림 6).

(2) 콜레스테롤 배출

콜레스테롤은 담즙에 섞여 소화관으로 분비되거나 소장세포의 세포막에 위치하는 ATP-binding cassette transporter5/8(ABCG5/8)에 의해 장관으로 배출될 뿐만 아니라, 피부박리, 장상피세포 등을 통하여 장내콜레스테롤과 결합하여 체외 배출된다(그림 6).

담즙산은 콜레스테롤 흡수에 이용되며, 콜레스테롤은 담즙산을 만드는 성분이 되기도 하는 순환구조를 가지고 있어 담즙산의 장내 재흡수를 억제함으로써 혈장 LDL 콜레스테롤 감소의 효과를 나타낸다.

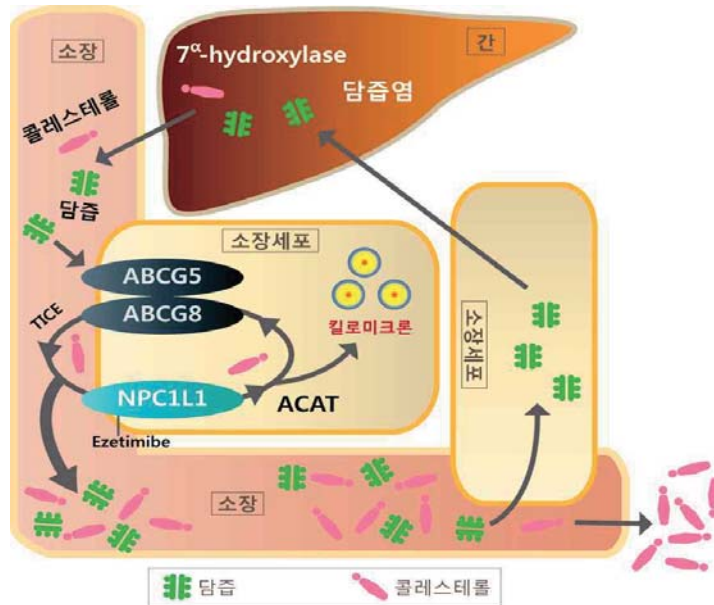


그림 6. 장내 콜레스테롤의 흡수와 배출

[자료 : Jakuli et al., 2016. Cell Metab. 24:783-794.]

(3) 기타

간에서의 콜레스테롤 주요 합성단계 중, 메발론산 생성과정에 관여하는 효소인 HMG-CoA Reductase의 활성을 저해함으로써 체내 콜레스테롤의 생합성량을 감소시키거나, HDL에 의한 역수송을 통하여 동맥혈관 벽의 잉여 콜레스테롤을 제거하여 혈관의 플라그 형성을 억제함으로써 혈장 콜레스테롤 제거율 증가시킨다.

(4) 콜레스테롤 대사 관련 효소

(가) HMG-CoA reductase(3-hydroxymethyl-3-glutaryl-(HMG)CoA-reductase)

콜레스테롤 생합성과정의 rate-limiting enzyme으로 HMG-CoA를 메발론산으로 변환시키는 반응을 촉매하며, feedback inhibition의 일환으로 최종산물인 콜레스테롤, 그리고 중간대사물인 25-OH-cholesterol에 의해 조절된다. 세포내 콜레스테롤 함량이 증가되면 이를 감지하는 SREBP의 매개에 의해 HMG-CoA reductase 활성이 저해되며, 콜레스테롤 항상성 기전을 제공한다. 간조직 HMG-CoA reductase 활성의 감소는 혈중 콜레스테롤농도 저하효과가 있는 것으로 판단 가능하며 현재 HMG-CoA reductase 저해제로써 임상약물인 statins을 사용한다.

(나) LCAT(lecithin; cholesterol acytransferase)

간에서 합성되어 혈장으로 방출되며, 혈장 콜레스테롤의 에스테르화반응을 촉매하는 효소로, HDL 표면에 붙어있는 친수성의 유리 콜레스테롤을 에스테르화하여 이를 HDL의 중심에 축적시키고, 간으로 반송되도록 한다. ACAT의 경우 acyl-CoA를 사용하여 콜레스테릴 에스테르를 형성하는 한편, LCAT은 HDL 표면에서 작용하는 것이 특징이다. 즉, LCAT은 HDL 표면에 존재하는 인지질(lecithin)의 가운데 지방산을 유리시켜 유리 콜레스테롤의 에스테르화에 이용한다. LCAT 결핍시 유리 콜레스테롤을 에스테르화하지 못하여 유리 콜레스테롤과 lecithin의 지단백질 분획이 축적되고, HDL 콜레스테롤이 감소되는 경향을 보인다. HDL은 간 이외의 조직에서 유리 콜레스테롤을 받아들여 LCAT 반응으로 에스테르화하고 간으로 수송하는 수송체 역할을 한다. 간에서 HDL 콜레스테롤은 다른 지단백질의 콜레스테롤보다 더 효율적으로 담즙산으로 전환된다. HDL (HDL2) 농도와 동맥경화 발생 빈도는 반비례관계에 있다.

(다) ACAT(acyl-CoA; cholesterol acytransferase)

체내 콜레스테롤 저장에 관여하는 효소로, 유리 콜레스테롤에 acyl-CoA를 연결하여 콜레스테릴에스테르를 형성하고, 조직에 콜레스테릴에스테르를 축적시킨다. 일반적으로 고콜레스테롤식을 섭취하면 ACAT활성이 증가되는 경향을 보인다.

(라) LPL(lipoprotein lipase)

주로 지방조직과 골격근에서 합성되는 지단백질 분해효소로서 이 기관의 모세혈관 내피 세포 표면에 존재한다. 중성지방을 많이 함유하는 지단백(킬로미크론과 VLDL)을 가수분해하여 지방산을 유리시키고 세포내로 흡입시킨다. 즉, 이 효소는 킬로미크론의 중성지방을 가수분해하여 유리지방산으로 유리시키는 과정을 촉매한다. 그 결과 대부분의 유리지방산들은 주변의 지방세포로 흡수된 후 중성지방으로 재합성되어 저장된다. 골격근의 모세혈관에서 유출된 유리지방산들은 에너지를 내는데 이용된다. ApoCII에 의해 활성화되는 LPL이 정상적으로 기능을 하면, 킬로미크론에 있는 대부분의 중성지방은 가수분해된다. LPL 활성이 감소되거나, 상실되는 경우, 혈장에 킬로미크론이 축적된다.

(마) 7 α -hydroxylase

체내 콜레스테롤의 배출기작에 관여하는 효소로, 간에서 콜레스테롤을 담즙산으로 전환시키는 과정을 촉매하는 효소로 담즙산 생합성 과정의 속도 조절 효소이다. 7 α -hydroxylase 활성이 증가하면 혈중 콜레스테롤 저하효과가 있는 것으로 판단된다.

(바) 스쿠알렌 synthase

콜레스테롤 생합성과정에 관여하는 효소로, HMG-CoA에서 형성된 파이로인산으로부터 스쿠알렌으로 변환시키는 반응을 촉매하는 효소로 콜레스테롤 생합성에 중요한 효소이다. 세포내 콜레스테롤 함량이 증가되면 이를 감지하는 SREBP의 매개에 의해 스쿠알렌 synthase 활성이 저해된다.

(5) 콜레스테롤 대사 관련 유전자

(가) NPC1L1(Niemann-Pick C1 like 1 protein)

소장세포막에 존재하며 식이 콜레스테롤을 흡수하는 기능을 한다. 세포내 콜레스테롤 함량이 증가되면 이를 감지하는 SREBP의 매개에 의해 NPC1L1의 transcription이 조절된다. NPC1L1이 감소하면 소장세포내 콜레스테롤 저하 효과가 있는 것으로 판단 가능하다.

(나) ABCG5/8(ATP-binding cassette sub family G member 5/8)

소장세포막에 존재하며 식이 콜레스테롤을 배출 하는 수송체이다. 세포내 콜레스테롤 함량이 증가되면 이를 감지하는 SREBP의 매개에 의해 ABCG5/8의 transcription이 조절된다. ABCG5/8이 증가하면 소장세포내 콜레스테롤 저하 효과가 있는 것으로 판단 가능하다.

(다) SREBP-2(Sterol regulatory element-binding protein-2)

콜레스테롤 관련 효소의 transcriptional factor이다. 골지체에 위치한 SREBP-2는 콜레스테롤 양이 증가하면 SREBP의 감지되어 콜레스테롤과 관련된 유전자 및 효소의 발현을 증가시키는 기능을 한다. SREBP-2이 감소하면 소장세포내 콜레스테롤 저하 효과가 있는 것으로 판단 가능하다.

(라) LDL 수용체(LDL receptor)

세포막에 존재하며 LDL과 결합하여 흡수하는 기능을 한다. LDL 수용체는 LDL의 endocytosis를 매개하여 혈장의 LDL 수준을 유지한다. 세포내 콜레스테롤 함량이 낮으면 SREBP-2를 활성화시키고 이를 매개로 LDL 수용체 유전자 발현을 유도시킨다. LDL 수용체 농도가 증가되면 혈액내 LDL 콜레스테롤이 저해된다. LDL 수용체가 증가하면 LDL 콜레스테롤 저하 효과가 있는 것으로 판단 가능하다. LDL 수용체가 PCSK9와 결합함으로써 LDL 수용체가 분해되거나 수용체로써의 기능이 약화되어 LDL 농도가 높아지므로 이들의 결합을 방해하는 저해제로써 임상약물인 PCSK9 저해제를 사용한다.

다. 콜레스테롤의 분류기준

콜레스테롤 대사조절에 이상이 생길 경우 일반적으로 혈중 총 콜레스테롤 및 LDL 콜레스테롤의 상승현상이 나타난다. 한국인을 위한 ‘바람직한 총 콜레스테롤 수치’는 200 mg/dL 미만이며, 200~239 mg/dL은 ‘경계수준’, 그리고 240 mg/dL 이상은 ‘고콜레스테롤혈증’이라고 정의한다(표 2).

표 2. 혈장 총 콜레스테롤 분류 기준

총 콜레스테롤(mg/dL)	분 류	대응방법
< 200	적정	정기적인 검사
200~239	경계	식이 조절 및 운동요법 필요
≥ 240	높음	식이 조절 및 약물요법 필요

[출처 : 한국동맥경화·지질학회 설정기준]

고콜레스테롤혈증이 있을 경우, 생활양식 변화, 약물 치료 등의 치료 방법을 선택하거나, 치료 목표를 설정할 때는 물론이고 치료의 표적으로 사용하는 검사수치는 총 콜레스테롤이 아니라 LDL 콜레스테롤이다. LDL 콜레스테롤의 ‘적정수준’은 100 mg/dL 미만이며, 100~129 mg/dL은 ‘정상수준’, 130~159 mg/dL은 ‘경계수준’, 160~189 mg/dL은 ‘높음 수준’ 그리고 190 mg/dL 이상은 ‘매우 높음 수준’으로 규정한다(표 3). 단, 해당 기준은 심장질환과 같은 위험요인이 없는 정상인 성인의 경우에 해당한다.

미국 NCEP(National Cholesterol Education Program)가 설정한 혈장 콜레스테롤 수준과 coronary heart disease의 위험율을 제시하였다. LDL 콜레스테롤은 100 mg/dL 미만이면 ‘적절한 수준’이고, 100~129 mg/dL이면 ‘적정수준에 근접하였거나 조금 상회하는 수준’, 130~159 mg/dL이면 ‘경계위험수준’, 160~189 mg/dL이면 ‘고위험수준’, 그리고 190 mg/dL 이상이면 ‘매우 고위험수준’으로 규정한다(표 4).

표 3. 혈장 LDL 콜레스테롤 기준

LDL 콜레스테롤(mg/dl)	분 류	대응방법
< 100	적정	정기적인 검사
100~129	정상	정기적인 검사
130~159	경계	식이 조절 및 운동요법 필요
160~189	높음	식이 조절 및 약물요법 필요
≥ 190	매우 높음	식이 조절 및 약물요법 필요

[출처: 한국동맥경화·지질학회 설정기준]

표 4. 총 콜레스테롤과 LDL 및 HDL 콜레스테롤 분류

Plasma cholesterol	mg/dl	Definition
Total cholesterol	< 200 200~239 ≥ 240	Desirable Borderline high High
LDL cholesterol	< 100 100~129 130~159 160~189 ≥ 190	Optimal Nearoptimal/above optimal Borderline high High Very high
HDL cholesterol	< 40 ≥ 60	Low High

[출처: 미국 NCEP 2001년 기준]

LDL 콜레스테롤을 중요시하는 이유는 혈장 총 콜레스테롤치가 240 mg/dL를 넘지 않아 고콜레스테롤혈증으로 진단되지 않아도 LDL 콜레스테롤이 160 mg/dL 이상이면 주의가 필요하기 때문이다.

한편 HDL 콜레스테롤이 40 mg/dl이하이면 문제가 된다. 이는 HDL 콜레스테롤이 낮으면 콜레스테롤 역수송 효율이 낮아져 동맥경화의 원인이 되기 때문이다. HDL 콜레스테롤이 저하되는 원인은 영양 균형이 나쁜 식사, 운동부족, 비만, 흡연, 스트레스의 축적 등이다. 그러므로 장기간에 걸친 고농도의 총 콜레스테롤, 고농도의 LDL 콜레스테롤 및 저농도의 HDL 콜레스테롤은 동맥경화증을 유도하게 되며 이를 예방하기 위해서는 약물, 식습관 교정 및 건강기능식품 등의 보충에 의한 콜레스테롤 조절이 이루어져야 한다.

2. 보건학적 중요성

가. 혈중 콜레스테롤 개선의 의의

체내 콜레스테롤은 혈액을 통해 이동하면서 필요한 곳에 쓰이거나, 담즙의 원료로 이용되어 장으로 배출된다. 혈액 내 콜레스테롤은 혈액에 녹지 않기 때문에 지단백의 형태로 이동하게 되는데, 지단백의 구성 성분인 LDL은 콜레스테롤을 세포로 운반하고 이용하도록 하는 역할을 한다. 그러나 LDL은 산화되기 쉬워서 혈관조직에 손상을 줄 수 있으며 손상된 혈관 조직에는 콜레스테롤이 쌓이게 되어 플라그를 형성하게 된다. 이로 인해 혈관을 좁게 만들고 혈관의 기능도 떨어지게 된다. 반면, 지단백 중 HDL은 혈관에 있는 콜레스테롤을 간으로 이동시키는 역할을 한다(그림 7).

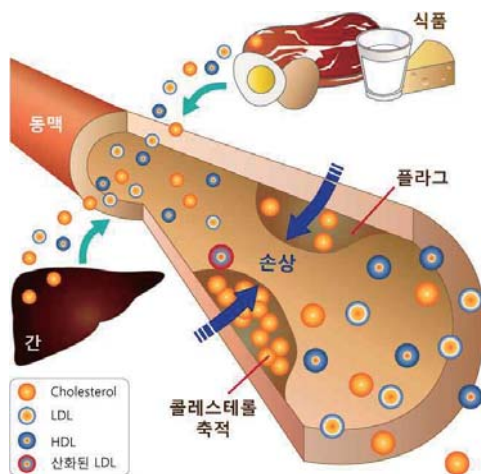


그림 7. 콜레스테롤의 급원경로와 플라그 형성

혈청 콜레스테롤의 농도가 증가하면 동맥 내벽에 지방운반을 담당하는 지단백질이 침착되어 동맥경화를 유발한다. 특히 LDL은 산화감수성이 크며 산화된 LDL은 세포에 독성을 일으켜 혈과 벽에 플라그 형성을 통해 동맥경화증을 유발한다. 콜레스테롤은 동맥경화 발생의 직접적으로 작용하지는 않으나 동맥경화에 깊은 관계가 있는 물질이다.

혈액 내 콜레스테롤을 정상 수준으로 유지하기 위해서는 포화지방산이 많이 함유된 동물성 기름, 버터, 마가린, 쇼트닝, 팜유 등은 피하고 불포화지방산이 많이 함유된 생선, 식물성 기름(콩기름, 옥수수기름, 올리브유 등)을 섭취하며, 콜레스테롤의 배출을 촉진할 수 있는 도정하지 않은 곡류(현미, 통밀, 보리 등), 콩, 채소와 과일의 섭취를 늘리는 것이 좋다. 또한, 적당한 운동은 콜레스테롤 조절에 많은 도움이 되며 담배나 과식은 피하도록 한다(표 5).

표 5. 혈중 고 콜레스테롤의 위험요인

분류	위험요인
식이관련	- 포화지방산 - 고지방 - 고열량
생활습관	- 흡연 - 운동부족 - 과음
질 병	- 고혈압 - 당뇨병 - 과체중 및 비만 - 경동맥 및 기타 동맥 관련 질환 - 심박세동 또는 타 심장병

Ⅲ

기능성 시험 방법

1. 바이오마커의 선정

가. 연구유형별 바이오마커

콜레스테롤 건강 기능성을 확인하기 위한 바이오마커는 콜레스테롤 조절 관련 지표로 구분되며, 각 바이오마커 별 측정 가능한 시험 연구 유형은 다음 표 6과 같다.

표 6. 콜레스테롤관련 기능성식품 평가를 위한 바이오마커의 분류

콜레스테롤 대사부위/ 조절명칭	바이오마커의 의미	주요 바이오마커들	측정 가능한 연구유형		
			in vitro	in vivo	Human
조직 콜레스테롤 축적 조절 (간, 동맥)	조직 콜레스테롤 대사 지표	Cholesterol(간, 동맥, 혈장)		○	
		HMG-CoA reductase 활성도(간)		○	
		ACAT 활성도(간, 동맥)		○	
콜레스테롤 역수송 조절	혈장 콜레스테롤 제거 지표	혈장 CETP 활성도		○	○
		혈장 LCAT 활성도		○	○
		Total cholesterol(혈장)		○	○
		HDL cholesterol		○	○
		LDL cholesterol		○	
		7 α -hydroxylase		○	
		LDL receptor 발현량		○	
콜레스테롤 생합성 조절	간의 콜레스테롤 생합성 지표	Cholesterol(간, 혈장)		○	
		HMG-CoA reductase 활성도(간)		○	
		ACAT 활성도(간, 동맥)		○	
		Squalene synthase		○	
		SREBP-2 발현량		○	

콜레스테롤 대사부위/ 조절명칭	바이오마커의 의미	주요 바이오마커들	측정 가능한 연구유형		
			in vitro	in vivo	Human
장내 콜레스테롤 흡수 조절	장내 콜레스테롤 흡수 관련 효소 저해지표	콜레스테롤 섭취량		○	○
		pCEH 활성도(소장액)		○	
		ACAT활성도(소장조직)		○	
		콜레스테롤 수준(분변, 혈장)		○	○
		NPC1L1 발현량		○	
	흡수 경쟁에 의한 콜레스테롤 흡수 감소 지표	콜레스테롤 섭취량		○	○
		콜레스테롤 수준 (소장 점막조직, 혈장, 분변)		○	○
콜레스테롤과 담즙산 배설 조절	스테롤의 체외 배설 지표	분변 중성스테롤 배설량		○	○
		분변 산성스테롤 배설량		○	○
		Total cholesterol (혈장)		○	○
		ABCG5/8 발현량		○	
혈장 콜레스테롤 대사 조절	고콜레스테롤 혈증 및 동맥경화유도 위험성 예측 지표	Total cholesterol(혈장)		○	○
		LDL cholesterol		○	○
		HDL cholesterol		○	○
		ApoA-I		○	○
		ApoB		○	○
		산화 LDL 수준		○	○
		Atherogenic index		○	○
		Paraoxonase 활성도		○	○

★ 혈중 콜레스테롤 개선과 관련한 바이오마커 해석 ★

- ✓ 임상진료현장에서 혈중 콜레스테롤 개선과 관련하여 약 처방의 근거로 사용하는 바이오마커로는 총 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤, HDL 콜레스테롤임
- ✓ 위에 제시된 바이오마커(총 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤, HDL 콜레스테롤)를 포함한 다른 바이오마커는 심혈관질환 위험도를 평가하는 지표로 사용되거나, 혈중 콜레스테롤 수치 감소에 대한 효과기전을 설명하기 위한 마커로 사용됨

나. 바이오마커 설명

(1) 조직 콜레스테롤 축적 조절

(가) 조직 콜레스테롤 농도(간, 동맥, 혈장)

간, 동맥, 혈장 콜레스테롤 농도는 주로 체내의 조직내에 콜레스테롤 농도를 반영하기에 사용할 수 있는 지표이다.

(나) HMG-CoA reductase 활성도(간)

간조직 내 HMG-CoA reductase 활성의 감소는 혈중 콜레스테롤농도 저하효과가 있는 것으로 판단 가능하다.

(다) ACAT 활성도(간, 동맥)

유리 콜레스테롤에 acyl-CoA를 연결하여 콜레스테릴에스테르를 형성하고, 조직에 콜레스테릴 에스테르를 축적시킨다. 간조직, 동맥의 ACAT 활성이 감소하면 콜레스테롤농도 저하효과가 있는 것으로 판단된다.

(2) 콜레스테롤 역수송 조절

(가) 혈장 CETP 활성도

콜레스테롤 에스테르 전달 단백질로써 CETP가 HDL의 CE를 LDL이나 VLDL로 이동시켜 HDL의 경화증을 완화시킨다.

(나) 혈장 LCAT 활성도

LCAT 결핍시 유리 콜레스테롤을 에스테르화하지 못하여 유리 콜레스테롤과 lecithin의 지단백질 분획이 축적되고, HDL 콜레스테롤이 감소되는 경향을 보인다. HDL은 간 이외의 조직에서 유리 콜레스테롤을 받아들여 LCAT 반응으로 에스테르화하고 간으로 수송하는 수송체 역할을 한다. 간에서 HDL 콜레스테롤은 다른 지단백질의 콜레스테롤 보다 더 효율적으로 담즙산으로 전환된다. HDL (HDL2) 농도와 동맥경화 발생 빈도는 반비례관계에 있다. LCAT 활성이 증가하면 혈중 콜레스테롤농도 저하효과가 있는 것으로 판단된다.

(다) Total 콜레스테롤 농도(혈장)

혈장 콜레스테롤 농도는 주로 체내의 조직내에 콜레스테롤 농도를 반영하기에 사용할 수 있는 지표이다.

(라) HDL 콜레스테롤

콜레스테롤 역수송에 관여하며, 따라서 HDL 콜레스테롤 농도는 동맥경화발생 위험성과 음의 상관관계를 가진다. 이 과정은 말초조직의 콜레스테롤이 간으로 이동되어 대사되거나, 체외로 배설되는 유일한 대사경로이다.

(마) LDL 콜레스테롤

혈중 콜레스테롤의 농도가 증가하면 동맥 내벽에 지방운반을 담당하는 지단백질이 침착되어 동맥경화를 유발한다. 특히 LDL은 산화감수성이 크며 산화된 LDL은 세포에 독성을 일으켜 혈과 벽에 플라그 형성을 통해 동맥경화증을 유발한다. 따라서 콜레스테롤, 특히 LDL 콜레스테롤은 동맥경화 발생의 직접적으로 작용하지는 않으나 동맥경화에 깊은 관계가 있는 물질로 동맥경화발생률과 양의 상관관계가 있다.

(바) 7α -hydroxylase

간에서 콜레스테롤을 담즙산으로 전환시키는 과정을 촉매하는 효소로 체내 콜레스테롤의 배출기작에 관여한다. 7α -hydroxylase 활성이 증가하면 혈중 콜레스테롤 저하효과가 있는 것으로 판단된다.

(사) LDL receptor 발현양

세포내 콜레스테롤 함량이 낮으면 SREBP-2를 활성화시키고 이를 매개로 LDL 수용체 유전자 발현을 유도시킨다. LDL 수용체 농도가 증가되면 혈액내 LDL 콜레스테롤이 저하된다. LDL 수용체가 증가하면 LDL 콜레스테롤 저하 효과가 있는 것으로 판단 가능하다.

(3) 콜레스테롤 생합성 조절

(가) HMG-CoA reductase 활성도

조직 내 HMG-CoA reductase 활성의 감소는 혈중 콜레스테롤농도 저하효과가 있는 것으로 판단 가능하다.

(나) ACAT 활성도

유리 콜레스테롤에 acyl-CoA를 연결하여 콜레스테릴 에스테르를 형성하고, 조직에 콜레스테릴에스테르를 축적시킨다. 간조직, 동맥의 ACAT 활성이 감소하면 콜레스테롤농도 저하효과가 있는 것으로 판단된다.

(다) 스쿠알렌 synthase

HMG-CoA에서 형성된 파이로인산으로부터 스쿠알렌으로 변환시키는 반응을 촉매하는 효소로 콜레스테롤 생합성에 중요한 효소이다. 간 조직 스쿠알렌 synthase 활성이 감소하면 혈중 콜레스테롤농도 저하효과가 있는 것으로 판단 가능하다.

(라) SREBP-2 발현양

콜레스테롤 관련 효소의 transcriptional factor로, 골지체에 위치한 SREBP-2는 콜레스테롤 양이 증가하면 콜레스테롤과 관련된 유전자 및 효소의 발현을 증가시키는 기능을 한다. SREBP-2이 감소하면 소장세포내 콜레스테롤 저하 효과가 있는 것으로 판단 가능하다.

(4) 장내 콜레스테롤 흡수 조절**(가) 콜레스테롤 섭취량**

섭취된 콜레스테롤의 양은 장내 소장세포의 콜레스테롤 흡수를 판단하기 위해 사용할 수 있는 지표이다.

(나) pCEH 활성도(소장액)

췌장에서 분비되는 콜레스테롤 esterase(pCEH, pancreas cholesterol ester hydrolase)는 콜레스테롤 흡수에 관련되는 중요한 지질가수분해효소로 알려져 있다.

(다) ACAT 활성도(소장)

유리 콜레스테롤에 acyl-CoA를 연결하여 콜레스테릴 에스테르를 형성하고, 조직에 콜레스테릴에스테르를 축적시킨다. 소장세포의 ACAT 활성이 감소하면 콜레스테롤농도 저하 효과가 있는 것으로 판단된다.

(라) 콜레스테롤 수준(분변, 혈장, 소장 점막조직)

콜레스테롤의 섭취량과 비교하여 소장 점막조직, 혈장에 존재하는 콜레스테롤의 농도는 콜레스테롤의 흡수를 판단하기 위해 사용할 수 있는 지표이며, 분변으로 배출된 콜레스테롤 또한 흡수를 판단하기 위해 사용할 수 있다.

(마) NPC1L1(Niemann-Pick C1 like 1 protein)

소장세포막에 존재하며 식이 콜레스테롤을 흡수하는 기능을 한다. 세포내 콜레스테롤 함량이 증가되면 이를 감지하는 SREBP의 매개에 의해 NPC1L1의 transcription이 조절된다. NPC1L1이 감소하면 소장세포내 콜레스테롤 저하 효과가 있는 것으로 판단 가능하다.

(5) 콜레스테롤과 담즙산 배설 조절

(가) 분변 중성스테롤 배설량

분변으로 배설되는 중성스테롤의 양은 콜레스테롤 배설을 판단하기 위해 사용할 수 있는 지표이다.

(나) 분변 산성스테롤 배설량

분변으로 담즙산과 유도물질들은 콜레스테롤 배설을 판단하기 위해 사용할 수 있는 지표이다.

(다) ABCG5/8(ATP-binding cassette sub family G member 5/8)

소장세포막에 존재하며 식이 콜레스테롤을 배출 하는 수송체이다. 세포내 콜레스테롤 함량이 증가되면 이를 감지하는 SREBP의 매개에 의해 ABCG5/8의 transcription이 조절된다. ABCG5/8이 증가하면 소장세포내 콜레스테롤 저하 효과가 있는 것으로 판단 가능하다.

(6) 혈장 콜레스테롤 대사 조절

(가) ApoA-1

ApoA-1은 HDL의 중요한 구성아포단백질이며 심장질환의 바이오마커로 이용된다.

(나) ApoB

ApoB는 LDL입자에 1:1로 함유되므로 LDL 입자의 개수를 정확히 반영한다. LDL이 혈관벽에 체류하면 산화될 가능성이 높고 이는 혈관벽을 자극하여 동맥경화를 촉진시킨다.

(다) 산화 LDL 수준

산화된 LDL은 혈관 벽의 작은 상처에도 쉽게 달라 붙어 동맥경화나 혈관 질환을 유발한다.

(라) Atherogenic index

Atherogenic index는 동맥 경화증과 관상 동맥 심장 질환의 위험을 예측하는 강력한 바이오마커이다.

(마) Paraoxonase 활성도

산화 스트레스는 혈관내피세포를 손상시키고 LDL을 과산화시켜 동맥경화증 등 혈관질환을 일으킨다. Paraoxonase는 HDL에 결합하여 LDL의 산화를 막아 동맥경화성 질환을 막는 역할을 하는 효소이다.

2. 주요바이오마커의 측정방법

가. 조직 콜레스테롤 측정 조절

(1) 혈장의 콜레스테롤 함량 변화

혈장 지단백질 중 HDL은 dextran sulfate-MgCl₂ 침전법으로 분리하고, 혈장 총 콜레스테롤과 HDL 콜레스테롤 농도는 Allain 등(1974)의 효소방법에 의한 총 콜레스테롤 측정용 시액의 효소시약과 반응시킨 후 500 nm에서 흡광도를 측정하여 각각의 표준곡선을 기준으로 농도를 계산한다.

Friedewald 공식으로 LDL 콜레스테롤 농도를 산출할 수도 있으나, 이 공식은 대부분의 혈장 중성지질이 VLDL내에 있고, VLDL내의 중성지방:콜레스테롤은 5:1이다 라는 가정 하에 성립한다. 즉, 고 중성지질혈증(>4.5 mmol/L)일 경우에는 이 공식이 부정확하므로 사용할 수 없다.

$$\begin{aligned} \text{LDL 에스테르, mg/dL} \\ (\text{by Fredwald formula}) \end{aligned} = \text{Total Chol.} - \text{HDL Chol.} - (\text{Triglyceride}/5)$$

(2) 간조직의 콜레스테롤 정량

간조직의 지질은 Folch 등(1957)의 방법으로 추출하고, 조직지질정량은 Omodeo Sale 등(1984)에 의해 수정된 방법을 이용한다. 효소시액에 유화제로 0.5% Triton X-100과 3mM sodium cholate를 혼합하여 발색시에 일어나는 탁도를 제거하고, 콜레스테롤 함량은 혈장과 같은 방법으로 측정한다.

(3) HMG-CoA reductase 활성도

효소원인 마이크로솜(microsome) 분리는 Hulcher와 Oleson(1973)의 방법을 약간 수정하여 시행한다. 간 2g을 0.1M Triethanolamine, 0.02 M EDTA(pH 7.4), 2 mM DTT가 포함된 완충용액으로 균질화 한 후, 10,000×g와 12,000×g에서 차례로 원심분리한 상층액을 100,000×g에서 초원심분리하여 상층액을 버리고 현탁하여 세척한 다음, 다시 100,000×g에서 초원심분리한다. 분리된 마이크로솜을 1 mL 완충용액에 현탁시켜 액체 질소에 보관하였다가 필요시마다 사용하고, Bradford 방법으로 단백질을 정량한다. Assay 방법은 Shapiro 등(1974)이 실시한 방법을 수정 보완하여 실시한다. 마이크로솜 100 µg~

300 μ g을 NADPH 500 nmole과 [14 C]-HMG-CoA 50 nmole (1,200 cpm or 2,400 cpm/nmole specific activity)에 혼합하여 37 $^{\circ}$ C 항온수조에서 15분간 반응시킨 후, 1/5 volume(15 μ l) 6N HCl을 혼합하여 다시 15분간 37 $^{\circ}$ C 항온수조에서 반응시킨다. 이렇게 메발론산을 lactone form으로 만든 후 Silica Gel 60F254 TLC plate에 점적하여 전개시키고 메발론산 표준용액(lactone form)와 비교하여 Rf 값이 0.2 부근의 밴드를 잘라 scintillation counting한다. 활성도는 1분 반응당 마이크로솜 단백질 1 mg이 생성하는 메발론산량을 pmole로 나타낸다.

(4) ACAT 활성화도

Erickson 등(1980)과 Gillies 등(1986)의 방법을 수정 적용한다. Triton WR-1339에 녹인 콜레스테롤 6 μ g(20 μ L), 1 M potassium phosphate 완충용액(KPB; pH 7.4), 0.6 mM bovine serum albumin(BSA) 5 μ L와 2)에서 분리한 50~100 μ g 마이크로솜을 잘 섞은 후 물로 180 μ L까지 채우고, 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 전반응시킨다. [14 C]- Oleoyl-CoA(specific activity; 15,000 pm/nmole) 5.62 nmole을 섞어 전체 양이 200 μ L가 되게 한 후 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시키고 500 μ L의 isopropanol:heptane (4:1)용액, 300 μ L의 heptane, 그리고 200 μ L의 0.1M KPB(pH 7.4)를 넣고 잘 섞은 다음 실온에서 2분간 방치한다. 상등액 중 200 μ L를 취하여 scintillation counting한 값을 2배(보정인자)로 곱하여 활성도를 측정한다. 활성도의 계산은 HMG-CoA reductase와 마찬가지로 1 mg의 마이크로솜 단백질이 1분간 생성하는 콜레스테릴 oleoate의 pmole수(pmoles 콜레스테릴 oleoate(CE) formed/min /mg·microsomal protein)로 나타낸다.

나. 콜레스테롤 역수송 조절

(1) CETP 활성화도 측정

사람의 지단백대사와 유사한 토끼와 마우스에 적용된다. CETP 활성분석법은 Park 등(1992)이 발표한 새로운 방법을 사용하여 혈장 CETP가 HDL의 CE를 LDL이나 VLDL로 얼마나 이동시키는가를 측정한다. CETP 반응기질 중 CE-donor로 합성 HDL(HDLR)을, CE-acceptor로는 합성 LDL(LDLR)을 제조하고 HDLR은 agarose에 고정시켜 사용한다. CE transfer활성도 측정을 위해 [3 H]-CE로 표식된 [3 H]-CE-HDLR을 CE-donor로, 그리고 동위원소표식이 없고 콜레스테릴 에스테르 성분이 거의 없는 상태로 합성되어진 LDLR을 CE-acceptor로 사용하며, CETP source는 혈장을 사용한다. 30분간 혈장과 CE-donor 및

CE-acceptor를 넣고 incubation한 뒤 원심분리(3,000×g, 5분)하여 [^3H]-CE-HDLR-agarose를 제거하고 상등액 중 일부를 scintillation vial에 옮겨 5 mL의 scintillation cocktail solution을 넣은 후 방사능 활성은 Liquid scintillation counter로 측정하고, CETP 활성도는 [^3H]-CE-HDLR-agarose에서 LDLR로 이동된 % CE transfer로 나타낸다.

(2) 혈장 LCAT 활성도 측정

Glomest와 Wright(1964)의 방법에 의해 방사성 동위원소를 이용하여 콜레스테롤 기질에 대해 혈장의 에스테르화를 측정한다. 즉, 10 mL의 chloroform과 25 uCi의 7- ^3H (N)-콜레스테롤, 2 g의 celite 545 particle 및 10 mg의 비표식 콜레스테롤을 균일하게 섞은 후 질소가스를 이용하여 기화시키면 콜레스테롤이 celite에 흡착되어 4°C에서 수주 보관이 가능하다. 기질로 사용하게 될 혈장은 56°C에서 30분 동안 배양시켜 LCAT 활성도를 불활성화시키고 혈장 1ml당 50mg의 분말 고체 흡착 가능 표식 celite 입자와 함께 플라스크에 넣어 37°C에서 기계적으로 18~20분 동안 교반한 후 원심분리하여 celite입자를 제거한다.

LCAT 활성도 측정에는 혈장 0.2 mL와 표식기질 혈장 0.5 mL를 37°C 진탕기에서 3시간 방치하고, 대조 플라스크에는 56°C에서 30분 동안 가열한 시험혈장을 사용한다. 지질 추출은 Folch 등(1957)의 방법을 이용한다. 즉 0.5 mL의 혼합 방치액에 10 mL의 methanol-chloroform(2:1) 용액을 가한 후 여과지에 걸러 침전물을 제거하고 0.2 mL의 물을 가하여 흔든 다음 하부 기질함유층에서 1.5mL를 취하여 질소가스로 건조 시킨다. 이 기질을 소량의 chloroform에 녹여 thin-layer chromatography (TLC, Silica Gel 60F245, Sigma)에 점적한 후 petroleum ether-diethylether-glacial acetic acid (90:15:1.5)용매를 이용하여 전개한 후 iodine vapors에 노출시키면 콜레스테롤과 콜레스테롤 에스테르 밴드가 나타난다. 각 밴드를 긁어 각기 다른 counting vial에 넣고 10 mL의 counting cocktail(New England Nuclear Co.의 42 mL Liquiflour + toluene 1,000 mL)을 가하여 용해한 후 liquid scintillation counter로 radioactivity를 측정한다. LCAT 활성도는 반응 혼합액의 유리 콜레스테롤의 양을 측정하여 혈장 1ml당, 시간당 형성된 콜레스테롤 에스테르 양으로 나타낸다.

(3) Cholesterol 7 α -hydroxylase 활성도

Cholesterol 7 α -hydroxylase는 간의 마이크로솜에서 측정한다. 최종 volume 2 mL에 microsomal protein 1.5-2.0 mg/mL, 0.1M potassium phosphate buffer(pH7.4), 0.1 mM EDTA, 50 mM NaF, 2 mM NADPH, 20 mM cysteamine, 200 μM cholesterol, 1.5 mg/mL Tween 80, 6 μCi [7(n)- ^3H] cholesterol 농도가 되도록 첨가한다. 37°C, 30분

간 배양 시킨 후, 20% TCA 6ml을 가해 반응을 중지시키고, 원심분리(1,500×g, 10분)한다. 반응하지 않은 동위원소가 표지된 콜레스테롤을 추출하기 위해 chloroform을 상등액에 가한다. chloroform으로 2회 추출한 후, 상층액 1 mL을 counting vial에 transfer한다. Radioactivity를 scintillation fluid에서 측정하여 pmole/min/mg of microsomal protein로 나타낸다.

다. 콜레스테롤 생합성 조절

(1) 스쿠알렌 synthase 활성화 측정

효소원인 마이크로솜 분리는 Vogeli와 Chappell(1988)의 방법을 약간 수정하여 시행한다. 세포 1 g을 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.5), 0.25 M sucrose, 4 mM magnesium chloride와 5 mM mercaptoethanol이 포함된 완충용액 2 mL로 homogenization한 후, 10,000×g에서 10분간 원심분리한 상층액을 100,000×g에서 초원심분리하여 pellet을 회수한다. 분리된 마이크로솜을 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM mercaptoethanol이 포함된 완충용액 200 μ L에 현탁시켜 액체질소에 보관하였다가 필요시마다 사용하고, Bradford 방법으로 단백질을 정량한다. 마이크로솜 10~25 μ g을 2.5 mM NADPH, 400 mM Tris-HCl(pH 7.5), 20 mM mercaptoethanol, 32 mM magnesium chloride와 [3 H]-FPP 8 nmol(1,200 cpm or 2,400 cpm/nmole specific activity)에 혼합하여 35℃ 항온수조에서 20분간 반응시킨 후, 얼음에서 반응을 종료시킨다. 종료된 반응액에 200 μ L petroleum ether, 2 μ L 4% 스쿠알렌을 첨가하여 원심분리하여 ether 층의 반응액을 회수하여 Silica Gel 60F254 TLC plate에서 점적하여 전개시키고 스쿠알렌 표준용액(lactone form)와 비교하여 해당 밴드를 잘라 scintillation counting 한다. 활성도는 1분 반응당 마이크로솜 단백질 1 mg이 생성하는 squalene양을 nmole로 나타낸다.

라. 장내 콜레스테롤 흡수 조절

(1) pCEH 활성도 측정(소장액과 점막조직)

Harrison(1988)의 방법에 의하여 적당히 희석된 효소원 20ml는 50mM Tris- maleate, PH8.0, 20mM sodium cholate, 0.05 μ Ci of cholesteryl [1-¹⁴C]oleate (mCi/mmol)와 혼합하여 37℃에서 60분간 항온 반응시킨 후 반응 생성물 [1-¹⁴C]oleic acid를 측정한다.

(2) ACAT 활성도 측정(소장조직)

소장 ACAT 활성도는 간 혹은 동맥조직의 ACAT 활성도 측정법과 동일하게 적용한다.

마. 콜레스테롤 담즙산 배설 조절

(1) Fecal Neutral Sterol 정량

분변의 neutral sterol, 즉 coprostanol, coprostanone, 콜레스테롤 배설량은 Czubayko 등(1992)에 의한 방법에 따라 건조된 분변을 막자시발에 갈아 1 g을 취한 후 internal 표준 용액으로서 1 mg 5 α -cholestane을 첨가한다.

여기에 1 N NaOH(in 90% ethanol) 10 ml를 가하여 67℃ 수조에서 1시간 동안 mild alkaline hydrolysis시키고 실온에서 식힌 다음 물 5 mL를 가하고 7 mL cyclohexane으로 3번 추출한다. 추출된 용액은 질소 기체 하에서 건조시킨 다음 cyclohexane 600 μ L에 용해시켜 GC로 정량한다.

(2) Fecal Acidic Sterol 정량

총 담즙산 정량은 Michael 등(1980)의 방법을 보완한 방법을 이용한다. 15 psi하에서 10N NaOH에 의해 가수분해된 담즙산 분획을 CHCl₃:MetOH(2:1)으로 추출건조시킨 후 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase와 반응시킨 생성물의 양을 분광광도계를 사용하여 340 nm에서 측정한다.

바. 혈장 콜레스테롤 대사 배설 조절

(1) 아포지단백 분석

초고속원심분리에 의해 분리한 각 지단백질 분획을 delipidation 시켜 poly-acrylamide gel 전기영동을 실시함으로써 각 식이군간 아포지단백 밴드(ApoA-I, ApoB, ApoC, ApoE 등)를 비교·분석한다. 아울러 각 아포지단백의 절대량은 immunoassay kit를 사용하여 측정한다.

(2) 혈장 lipoprotein(a) (Lp(a))

Lp(a)는 콜레스테롤이 풍부한 지단백질로 LDL의 일부 구조와 LDL의 ApoB-100에 disulfide 결합된 Apo(a)로 구성되어 있으며 일반적으로 혈장 Lp(a)수준의 증가는 동맥경화(atherosclerosis)의 위험인자로 간주된다.

혈장 Lp(a) 농도는 두 개의 monoclonal anti-apo(a)항체, 즉 Sepharose microbeads에 결합하는 trapping 항체와 radioiodinated된 reporting 항체를 이용한 radioimmunoassay (Pharmacia Diagnostics AB)로 측정한다. 혈장과 표준물질을 항체와 항온 반응시켜 원심 분리하여 beads에 결합된 antigen을 분리한 다음, gamma counter로 측정하여 표준곡선을 이용하여 계산한다.

(3) 혈장과 플라그의 산화 LDL(oxLDL) 수준 분석

DLH₃(5 µg/mL in PBS, 100 µL/well)로 코팅된 microtiter wells은 tris-buffered saline(0.05 mol/L, pH 8), 1% BSA에 의해 block된다. 각각의 분석에서 적당히 희석된 혈장과 플라그 LDL 일부 100 µL을 well에 첨가하고(혈장 LDL: 2-10 g protein/well, plaque LDL: 0.5-5 µg protein/well) 표준 oxLDL을 0.2-8.0 ng/well로 첨가한다. 그 plate는 4℃에 overnight로 항온반응시킨다. 세척 후 남은 oxLDL은 sheep anti-human apoB IgG antibody (Boehringer) 100 µL와 alkaline phosphate-conjugated donkey anti-sheep IgG antibody(Chemicon) 100 µL로 측정된다.

Alkaline phosphatase의 반응성은 p-nitrophenylphosphate hexahydrate(Wako) 1 mg/mL이 함유된 100 µL 기질용액에 37℃ 적당한 시간으로 항온반응한 후 405 nm에서 측정된다. µg protein 당 oxLDL은 표준선으로 계산된다. 포화범위에 있는 시료의 data는 버린다. 동시에 ELISA parallel set는 동일한 lipoprotein 일부에서 anti-apoB mAb을 사용하여 apoB의 양을 측정하는데 사용한다(OEM Concepts). apoB 측정을 위해서 native

LDL(0.5-15 ng/well)은 표준물질로서 각각 ELISA plate에 첨가한다. OxLDL 수준은 apoB protein μ g당 oxLDL 양으로 나타낸다.

(4) 혈장의 paraoxonas(PON) 활성도 측정

PON 활성도 측정은 Mackness 등(1991)의 방법을 수정, 적용한다. 반응액으로 2 mM CaCl_2 를 포함한 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 8.0) 및 기질인 5.5 mM paraoxon(O,O-diethyl-O- ρ -nitrophenylphosphate)에 효소원인 혈장을 첨가하여 총 반응액부피를 1 mL로 한다. 효소원 첨가 즉시 25°C, 405 nm에서 90초간 생성되는 ρ -nitrophenol의 흡광도를 측정한다.

사. 콜레스테롤 흡수, 배출 및 조절 관련 유전자 발현

(1) 콜레스테롤 조절관련 유전자 발현

식이 콜레스테롤을 장관에서 소장세포로 수송하는 NPC1L1과 소장세포에서 장관으로 배출하는 ABCG5/8, 혈액으로 LDL C 상태로 전달하는 LDL 수용체 그리고 이들의 발현을 조절하는 SREBP2의 mRNA 발현을 측정한다.

실험방법은 다양한 농도의 시험물질에 노출시킨 세포 또는 실험동물 조직에서 RNA를 추출한 후 정량한다. RNA(2 μ g)에 oligo(dT) primer를 사용하여 NPC1L1, ABCG5/8, LDL 수용체, SREBP2, 각각의 cDNA를 합성한다. SYBR Green PCR Master Mix, cDNA, primers, 그리고 RNase-free water를 넣고 PCR로 증폭시킨다. Sequence Detector software를 사용하여 Amplification data를 분석한다. Relative mRNA expression 수준은 mathematical formulas를 사용하여 분석한다.

3. 시험 설계 시 고려사항

가. 동물시험

(1) 시험대상

콜레스테롤 저하 효과를 확인하기 위하여 흰쥐, 마우스, 토끼 등을 사용한다.

(2) 시험설계

실험동물을 대상으로 식이에 혼합하여 시험물질을 공급하거나, 강제경구 투여할 수 있다.

(3) 바이오마커

혈중 콜레스테롤, 조직(간, 지방)에서의 콜레스테롤 등 다양한 바이오마커를 측정할 수 있다.

(4) 통계처리

시험결과는 대조군과 시험군을 통계적으로 비교하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 판정한다.

나. 인체적용시험

(1) 시험대상

(가) 시험대상자(예시)

LDL 콜레스테롤이 적정(100 mg/dL 미만), 정상(100~129 mg/dL), 경계(130~159 mg/dL) 수준에 속하며 약물을 복용하지 않는 자를 대상으로 한다.

* LDL 콜레스테롤이 높음 수준(160~189 mg/dL)에 속하는 자가 일부(윤리적으로 허용되는 범위) 포함될 경우 약물을 복용하거나 약물 처방이 필요한 자는 반드시 제외되어야 함

(나) 대상자 제외기준(예시)

- 고지혈증을 진단받고 혈중 지질 개선을 위한 약을 처방받아 복용중인 자
- 간염으로 진단받고 항바이러스제를 복용중인 경우
- 임신부, 수유부, 노약자, 그리고 적당한 피임을 하지 않은 가임여성
- 동반질환이 있어 생물학적 조절제, 면역 조절제, 세포 독성제, 전신성 부신 피질 호르몬제를 투여 받고 있는 환자
- 혈청 크레아티닌이 정상 상한치의 1.5배를 초과하는 신기능 부전환자
- 간 기능을 나타내는 바이오마커(ALT, AST)가 정상 상한치의 3배 이상으로 초과하는 경우
- 연구자의 판단에 의해 연구대상자로 부적합한 환자
- 최근 3년 동안 질병이나 만성적인 질병이 있는 경우
- 과도한 음주섭취를 하는 경우
- 3개월 이내 임상 시험자

(2) 시험설계

무작위배정, 위약대조연구(randomized, controlled trial; RCT)를 기본으로 한다.

(3) 바이오마커

혈중 콜레스테롤 농도 등 다양한 바이오마커를 측정할 수 있다.

(4) 통계처리

시험결과는 대조군과 시험군을 통계적으로 비교하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 판정한다.

IV

참고문헌

1. 김미영, 권오란, 김지연 외. 건강기능식품. (주)교문사. 2010
2. 식품의약품안전청. 건강기능식품의 기능성내용 교육프로그램 개발. 2007
3. 한기훈. 고지혈증의 유형에 따른 치료. 대한의사협회지 52:299-311, 2009
4. Mary K. Campbell, 생화학 제8판, 라이프사이언스, 2015
5. Braunwal E. 내과학 vol. 2, 도서출판 McGraw Hill, 2006
6. 한국보건공정서연구회. 건강기능식품의 기능성시험가이드. 2004
7. Benakanakere I, Johnson T, Sleightholm R et al., Targeting cholesterol synthesis increases chemoimmuno-sensitivity in chronic lymphocytic leukemia cells. Exp Hematol Oncol. 3: 24. 2014
8. Cai Y, Xing G, Shen T et al. Effects of 12-week supplementation of Citrus bergamia extracts-based formulation CitriCholess on cholesterol and body weight in older adults with dyslipidemia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Lipids Health Dis. 16: 251. 2017
9. Choi E-K, Park S-H, Ha K-C et al. Clinical Trial of the Hypolipidemic Effects of a Brown Alga Ecklonia cava Extract in Patients with Hypercholesterolemia. Int J Pharm. 11(7): 798-805. 2015
10. Davis HR Jr, Zhu LJ, Hoos LM et al. Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis. J Biol Chem. 279: 33586-33592, 2004
11. EFSA. Outcome of a public consultation on the draft guidance for the scientific requirements for health claims related to antioxidants, oxidative damage and cardiovascular health. EFSA technical report. 208. 2011
12. Gibran L, Maranhao RC, Tavares ER et al. mRNA levels of low-density lipoprotein receptors are overexpressed in the foci of deep bowel endometriosis. Hum Reprod. 32(2): 332-339. 2017
13. Graft GA, Yu L, Li W-P et al. ABCG5 and ABCG8 are obligate heterodimers for protein trafficking and biliary cholesterol excretion. J Biologic Chem. 278: 48275-48282, 2003
14. Houten SM, Argmann CA. New driver for lipid synthesis. Cell. 147: 719-721, 2011
15. Huszar D, Varban ML, Rinninger F et al. Increased LDL Cholesterol and Atherosclerosis in LDL Receptor-Deficient Mice With Attenuated Expression of

- Scavenger Receptor B1. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 4: 1068-1073. 2000
16. Jakulj L, van Dijk TH, de Boer JF et al. Transintestinal cholesterol transport is active in mice and humans and controls ezetimibe-induced fecal neutral sterol excretion. *Cell Metabolism.* 24: 783-794. 2016
17. Kumar P, Malhotra P, Ma K et al. SREBP2 mediates the modulation of intestinal NPC1 L1 expression by curcumin. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 301(1): G148-G155. 2011
18. Ma K, Malhotra P, Soni V et al. Overactivation of intestinal SREBP2 in mice increases serum cholesterol. *PLoS ONE.* 9(1): e84221. 2014
19. Marco S-C, Simon C, Simon J et al. Kinetic characterization of squalene synthase from *Trypanosoma cruzi*: selective inhibition by quinuclidine derivatives. *Am. Soc. Microbiol.* 51(6): 2123-2129. 2007
20. Nagashima S, Yagyu H, Tozawa R-C et al. Plasma cholesterol-lowering and transient liver dysfunction in mice lacking squalene synthase in the liver. *J. Lipid Res.* 56(5): 998-1005. 2015
21. Repa JJ, Berge KE, Pomajzl C et al. Regulation of ATP-binding cassette sterol transporters, ABCG5 and ABCG8, by the oxysterol receptors, LXR α and β . *J Biol Chem.* 277: 18792. 2002
22. Tang W, Ma Y, Jia L et al. Genetic inactivation of NPC1L1 protects against sitosterolemia in mice lacking ABCG5/ABCG8. *J. Lipid Res.* 50: 293-300. 2009
23. U.S. National Library of Medicine. ClinicalTrials.gov. NCT03479983. (<http://clinicaltrials.gov>)
24. Vogeli U, Chappell J. Induction of sesquiterpene cyclase and suppression of squalene synthase activities in plant cell cultures treated with fungal elicitor. *Plant Physiol.* 88: 1291-1296. 198
25. Wang TY, Liu M, Portincasa P et al. New insights into the molecular mechanism of intestinal fatty acid absorption. *Eur. J. Clin. Invest.* 43(11): 1203-1223, 2013
26. Wijesekara N, Kaur A, Westwell-Roper C et al. ABCA1 deficiency and cellular cholesterol accumulation increases islet amyloidogenesis in mice. *Diabetologia.* 59: 1242-1246. 2016
27. Wong J, Quinn CM, Brown AJ. SREBP-2 positively regulates transcription of the cholesterol efflux gene, ABCA1, by generating oxysterol ligands for LXR. *Biochem J.* 400: 485-491, 2006

건강기능식품 기능성 평가 가이드(민원인 안내서)

- ‘혈중 콜레스테롤 개선에 도움을 줄 수 있음’ 편 -

발 행 인 : 이동희

편 집 위 원 장 : 황인균

편 집 위 원 : 이혜영, 권용관, 허수정, 서은채, 국주희, 김준영,
이미영, 오재명, 황경미, 방수진, 이요아, 정혜진,
김선후, 송진희

발 행 처 : 식품의약품안전평가원

발 행 일 : 2019년 11월

문 의 처 : 식품위해평가부 영양기능연구팀

(043-719-4416, 4421, 4423, 4428, 4430)
