

Chitooligosaccharide가 생쥐의 간 기능에 미치는 영향

김세재 · 강소영 · 박승림* · 신태균** · 고영환***
제주대학교 생물학과 · 생명과학연구소, *건풍바이오(주),
제주대학교 수의학과, *식품공학과

Effects of Chitooligosaccharides on Liver Function in the Mouse

Se-Jae Kim, So-Young Kang, Seung-Lim Park*, Taekyun Shin** and Young Hwan Ko***

Department of Biology and Institute of Life Science, Cheju National University

*Kun Pung Bio Co.

**Department of Veterinary Medicine, Cheju National University

***Department of Food Engineering, Cheju National University

Abstract

Chitosan is the deacetylated product of chitin. Chitosan and its derivatives have many properties that make them attractive for a wide variety of health applications. This study was performed to investigate some effects of water soluble chitooligosaccharides on liver function in the mouse. The animals given the sterol diet containing 3% cholesterol for 6 weeks showed increase in plasma cholesterol level, which were lowered by 23% when they were fed on 1% chitooligosaccharide. While there was no significant change in liver cholesterol and plasma HDL-cholesterol levels. Continuous administration of 15% ethanol via drinking water to mice for 8 weeks elicited pathological alterations such as inflammation, necrosis, accumulation of lipid droplets in the liver and increase in GPT activity, while simultaneous administration of ethanol and chitooligosaccharide prevented remarkably ethanol-induced liver injury; there was no observable lipid droplet and GPT activity was decreased by 25% in the liver. These results suggest that chitooligosaccharide play some roles in liver function, such as reducing the plasma cholesterol level and preventing alcoholic liver disease.

Key words: chitooligosaccharide, mouse liver, cholesterol, lipid, ethanol

서 론

Chitosan은 glucosamine의 중합체로 균류의 세포벽과 곤충, 갑각류 등의 외골격에 존재하는 chitin을 탈아세틸화시켜 만든다⁽¹⁾. Chitin과 그 유도체들(chitosan, chitin oligosaccharides, chitooligosaccharide)은 대부분의 다당류와는 다른 독특한 특성을 지니고 있어서 의학, 약학, 생화학, 폐수처리, 농업 등 다양한 분야에서 신 소재로 이용되고 있다⁽²⁾. 특히 chitosan은 다양한 동물실험에서 혈장과 간 장내 cholesterol 농도를 저하시키는 기능이 있다⁽³⁻⁷⁾. 또한 chitosan의 항암, 항균 및 면역활성에 대한 연구 보고가 나옴에 따라 생물 의학적인 응용에 많은 관심이 집중되고 있다⁽⁸⁻¹²⁾.

Lehoux and Grondin⁽¹³⁾은 흰쥐에서 chitosan의 간 기

능에 미치는 영향을 보고한 바 있다. 이들의 연구에 의하면 70 kDa의 분자량을 갖는 7.5% chitosan은 간내 콜레스테롤 항상성을 유지시키는 작용을 한다고 하였다. 그러나 다른 동물에서는 chitosan이 간 기능에 미치는 영향에 대한 보고는 없다. 따라서 본 연구는 생쥐에서 수용성 키토올리고당이 간 기능에 미치는 영향을 분석하기 위해서 실시하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 수용성 chitooligosaccharide(평균 중합도 6.8)은 chitosan 제조회사인 (주)건풍바이오(제주)에서 제공한 제품을 사용하였다.

실험동물의 사육 및 식이

Cholesterol 함량분석을 위한 실험에서는 체중이 비

Corresponding author: Young Hwan Ko, Department of Food Engineering, Cheju National University, Cheju, Chejudo 690-756, Korea

슷한 ICR계 암컷 생쥐를 8 마리씩 3군(대조군, 1% chitooligosaccharide+3% cholesterol군, 3% cholesterol군)으로 나누었다. 대조군은 기본식으로 사육하였고, 실험식은 기본식이에 cholesterol과 chitooligosaccharide를 첨가하여 만들었다. 물과 식이는 자유로이 섭취하게 하면서 동일한 환경조건에서 6주간 사육하였다. 알코올에 의해 유도된 간 상해에 키토올리고당의 영향을 보기 위한 실험에서는 ICR계 수컷 생쥐 8마리씩 3군(대조군, 0.5% chitooligosaccharide+15% ethanol 군, 15% ethanol 군)으로 나누었다. Ethanol과 chitooligosaccharide은 식수에 혼합하여 계속적으로 8주 동안 섭취시키며 기본식으로 동일한 환경조건에서 사육하였다. 실험이 끝난 동물은 마취한 후 해부하여 혈액과 간 조직을 분리하였다.

Cholesterol 함량 측정

혈장내 총(total) cholesterol 함량은 Sigma Diagnostics reagents (Sigma Chemical Co.)를 이용해서 측정하였고, HDL-cholesterol 함량은 Wako Diagnostics HDL-cholesterol reagent (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)를 사용하여 측정하였다. 간 내 총 cholesterol 함량은 Boehringer Mannheim Diagnostics reagents (Boehringer Mannheim Co.)를 이용하여 측정하였다.

효소활성 측정

혈장내의 Glutamic oxaloacetic transaminase (GOT)와 Glutamic pyruvic transaminase(GPT)의 활성은 Reitman-Frankel 방법⁽¹¹⁾으로 측정하였다.

간 조직 검사

각 투여군의 마우스는 방혈한 후 간 조직을 10% 중성 포르말린에 고정하였다. 조직검사는 통상적인 방법에 따라 파라핀 포매 절편을 만들어 헤마톡실린에

오신 염색을 실시하였다. 전자현미경적 관찰을 위해서는 간 조직을 2.5% glutaraldehyde용액 및 2% osmic acid에 순서대로 고정 한 후 탈수과정을 거쳐 Epon 812에 포매하였다. 그 후 초박절편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate액으로 전자염색한 후 투과전자현미경(JEOL 1200EX II)으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

Cholesterol 함량에 미치는 영향

Chitooligosaccharide가 생쥐의 cholesterol 함량에 미치는 영향을 조사하고자 하였다. 각 실험식으로 6주간 사육한 생쥐의 체중 증가량, 실험식이 섭취량, 간의 무게, 혈장 내 총 cholesterol 함량, HDL-cholesterol 함량, 간 내의 cholesterol 함량을 측정된 결과는 Table 1에 나타내었다. 실험식이 섭취량, 체중 증가량은 전 실험군에서 유사하였다. 그러나 상대적인 간 무게는 cholesterol을 함유한 식이를 먹인 두 실험군에서 유의하게 높았다. 혈장내 총 cholesterol 함량은 기본식이를 먹은 대조군에서는 84.02 ± 8.86 mg/dl로 가장 낮았으며, 3% cholesterol 식이를 먹은 실험 군에서는 165.78 ± 15.87 mg/dl로 2배 정도 증가하였다. 그러나 1% chitooligosaccharide와 3% cholesterol을 함유한 식이를 먹은 실험 군에서는 127.45 ± 5.83 mg/dl로 나타났다. 1% chitooligosaccharide는 고지방을 식이한 생쥐에서 혈장내 총 cholesterol 함량을 23% 정도 감소시키는 효과를 나타내었다. 이는 흰쥐⁽¹²⁾와 guinea pig⁽¹³⁾에서 보고한 chitosan의 hypocholesterolemic 활성이 있다는 보고와 일치하였다. 그러나 다른 동물에서 보고된 혈장내 HDL-cholesterol 함량과 간 내 cholesterol 함량의 감소효과는 관찰되지 않았다(Table 1). 이러한 차이는 본 실험에 사용한 chitooligosaccharide의 분자량에 차이에 기인할 수 있다고 사료된다.

Table 1. Effects of chitooligosaccharides on food intake, body weight gain, liver weight, liver and plasma cholesterol levels

	Control	Chitooligosaccharide+Cholesterol	Cholesterol
Food intake (g/day)	7.5 ± 0.5^a	8.0 ± 0.5^a	7.0 ± 0.5^a
Gain in Body Weight (BW) (g)	10.50 ± 2.02^a	11.70 ± 1.54^a	10.86 ± 3.11^a
Relative liver weight (g liver/100 g BW)	4.01 ± 0.61^a	7.11 ± 0.53^b	6.57 ± 0.75^b
Liver cholesterol (mg/g wet liver)	10.40 ± 2.15^a	9.10 ± 1.00^a	10.30 ± 2.25^a
Plasma cholesterol (mg/dl)	84.02 ± 8.86^a	127.45 ± 5.83^b	165.78 ± 15.87^c
Plasma HDL cholesterol (mg/dl)	13.38 ± 0.78^a	12.21 ± 6.49^a	13.78 ± 4.25^a

Mice were fed on diets for 6 weeks. When indicated, 3% cholesterol and 1% chitooligosaccharide were added to a normal diet. Values are expressed as the mean \pm S.E. (n=8). Statistical significance was determined by Student's t-test. Means in the same row with different superscripts are significantly different (P<0.05).

Table 2. Effects of chitoooligosaccharides on food intake, body weight gain, liver weight and plasma GPT activity

	Control	Chitoooligosaccharide+Ethanol	Ethanol
Food intake (g/day)	11.0±2.4 ^a	10.5±2.2 ^a	8.5±3.5 ^a
Gain in Body Weight (BW)(g)	20.53±5.31 ^a	19.98±1.74 ^a	28.12±2.78 ^b
Relative liver weight (g liver/100g BW)	4.76±0.83 ^a	4.71±0.91 ^a	4.13±0.05 ^a
Plasma GPT activity (Karmen unit/ml)	26.67±2.89 ^a	36.25±2.63 ^b	48.33±2.89 ^c

Mice were fed on normal diets for 8 weeks. When indicated, 15% ethanol and 0.5% chitoooligosaccharide were administered to mice with drinking water. Values are expressed as the mean±S.E. (n=8). Statistical significance was determined by Student's t-test. Means in the same row with different superscripts are significantly different (P<0.05).

Ethanol을 섭취한 생쥐의 간에 미치는 영향

Chitoooligosaccharide가 ethanol에의해서 유발된 간기능 저해에 미치는 효과를 조사하고자 하였다. 각 실험군에서의 생쥐의 체중 증가량, 실험식이 섭취량, 간 무게, 혈장내 GPT 활성을 측정된 결과는 Table 2에 나타내었다. 일일 평균 식이 섭취량은 15% ethanol을 투여한 실험군에서 가장 낮았으나 유의한 차이는 없었다. 그러나 체중 증가량은 15% ethanol을 투여한 실험군(28.12±2.78 g)에서 가장 컸고, 0.5% chitoooligosaccharide와 15% ethanol을 동시에 투여한 실험군(19.98±1.74 g)에서는 대조군(20.53±5.31 g)과 유사하게 측정되어 chitoooligosaccharide가 ethanol 투여에 의한 체중 증가를 억제하는 효과가 있음을 보여주었다. 그러나 상대적인 간 무게는 실험군간에 차이가 없었다. 15% ethanol 투여로 혈장내 GPT 활성은 대조군에 비해 2배 정도 증가하였다. 그러나 0.5% chitoooligosaccharide와 15% ethanol을 동시에 투여한 실험군에서의 GPT 활성은 36.25±2.63 Karmen unit/ml으로 대조군보다는 다소 높았지만, 15% ethanol만 투여한 실험군의 GPT 활성 48.33±2.89 Karmen unit/ml에 비하여 25% 정도 감소하였다. 이는 chitoooligosaccharide가 ethanol에 의해 유발되는 간기능 장애를 억제하는 효과가 있음을 보여준다고 할 수 있다(Table 2).

Ethanol은 간 조직의 다양한 생화학적 형태학적 변화를 초래한다고 알려져 있다^(16,21). 15% ethanol을 8주간 투여한 생쥐의 간에서는 inflammation과 necrosis 현상이 있었으며(자료제시 생략), 간 소엽과 문맥 주위에 광범위하게 지방 축적이 관찰되었다(Fig. 1, A). 투과전자현미경으로 관찰한 결과 간 세포 내에는 여러 개의 지방구가 산재하였다(Fig. 1, B). 그러나 15% ethanol과 0.5% chitoooligosaccharide를 함께 경구 투여한 생쥐의 간에서는 지방구의 축적이 확인되지 않았으며(Fig. 1, C) 0.5% chitoooligosaccharide만 투여한 마우스의 간 조직과 조직학적 차이가 관찰되지 않았다(Fig. 1, D). 본 결과는 chitoooligosaccharide 섭취가 ethanol에 의해 유발되는 간 조직내 지방축적을 억제하는데 관여한 것으로 추정된다.

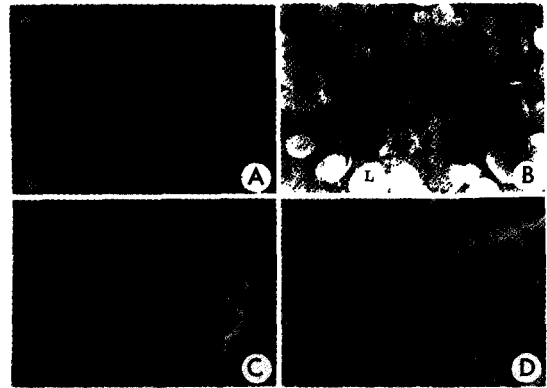


Fig. 1. Representative photographs of livers from ethanol-fed (A and B), combined ethanol and chitoooligosaccharide-fed(C), and chitoooligosaccharide-fed control(D) mice. Fat accumulation in the liver from ethanol-fed mice (A and B) was panlobular, but was not observed from the combined ethanol and chitoooligosaccharide-fed mice(C), and from the control mice(D). A, C and D are light microscopic findings of the livers; Hematoxylin-eosin staining of paraffin sections with original magnification, X 132. B shows the electron microscopic (X 5000) feature of lipid droplets (L) in the hepatocytes in ethanol-fed mouse.

본 연구 결과는 chitoooligosaccharide가 생쥐에서 간기능에 작용하는 분자적 작용기작에 대한 정보에 대해서는 분명하지 않지만 chitoooligosaccharide가 혈장내 cholesterol 함량을 감소시킬 뿐만아니라, ethanol에 의해 유발되는 체중증가, 혈장내 GPT 활성 증가, 지방구의 축적을 현저하게 감소시키는데 관여한다고 사료된다.

요 약

Chitin의 탈아세틸화로 얻어지는 화합물인 chitosan과 chitoooligosaccharide는 다양한 생리활성 기능을 나타내므로 생물의학적인 응용에 많은 관심이 집중되고 있다. 본 연구는 수용성 chitoooligosaccharide가 생쥐의 간 기능에 미치는 영향을 조사하기 위하여 수행되었다. 6주 동안 3% cholesterol을 식이한 생쥐에서는 혈

장 cholesterol 함량이 증가하였으나, 1% chitoooligosaccharide와 3% cholesterol을 함께 식이한 생쥐에서는 혈장 cholesterol 함량이 23% 정도 감소하였다. 그러나 혈장내 HDL-cholesterol과 간내 cholesterol 함량에는 유의한 차이가 없었다. 한편, 15% ethanol을 8주간 투여한 생쥐에서는 inflammation, necrosis, 지방구의 축적, GPT의 활성 증가 등 간 상해가 관찰되었다. 그와 반면에 0.5% chitoooligosaccharide와 15% ethanol을 함께 투여한 생쥐에서는 ethanol에의해 유발된 간 상해가 현저히 억제되어 지방구의 축적이 관찰되지 않았고, 혈장의 GPT 활성이 25% 정도 감소하였다. 따라서, chitoooligosaccharide가 생쥐에서 혈장 cholesterol 함량을 감소시키고, 알코올성 지방간을 예방하는 등 부분적인 기능이 있음을 보여주었다.

감사의 글

본 연구는 1997년도 제주대학교발전기금 학술연구비와 1997년도 산·학·연 공동기술개발사업, 제주대학교 투과전자현미경(KOSEF 운영지원)으로 수행된 결과중의 일부이며 연구비지원에 감사를 드립니다.

문 헌

- Muzzarelli, R.A.A.: Enzymatic synthesis of chitin and chitosan. Occurrence of chitin. In *Chitin*, Muzzarelli, R.A. A.(Ed.), Pergamon Press, New York, p. 5 (1977)
- Sandford, P.A. and Hutchings, G.P.: Chitosan-A natural, cationic biopolymer: Commercial application. In *Industrial Polysaccharides: Genetic Engineering, Structure/Property Relations and Applications*, Yalpani, M.(Ed), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, p. 363 (1987)
- Kobayashi, T., Otsuka, S.I. and Yugari, Y.: Effect of chitosan on serum and liver cholesterol levels in cholesterol-fed rats. *Nutr. Rept. Int.*, **19**, 327-334 (1979)
- Knorr, D.: Functional properties of chitin and chitosan. *J. Food Sci.*, **47**, 593-595 (1982)
- Knorr, D.: Use of chitinous polymers in food. *Food Technol.*, **38**, 85-97 (1984)
- Sugano, M., Fujikawa, T., Hiratsujii, Y., Nakashima, N., Fukuda, N. and Hasegawa, Y.: A novel use of chitosan as a hypocholesterolemic agent in rats. *Am. J. Clin. Nutr.*, **33**, 787-793 (1980)
- Chung, G.H., Kim, B.S., Hur, J.W. and Chung, S.Y.: Effect of dietary lobster shrimp chitosan on lipid metabolism in diet-induced hyperlipidemic rats (in Korean). *J. Korea Soc. Food Nutr.*, **25**, 384-391 (1996)
- Suzuki, K., Mikami, T., Okawa, Y., Tokoro, A., Suzuki, S. and Suzuki, M.: Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose. *Carbohydrate Res.*, **151**, 403-408 (1986)
- Tokoro, A., Tatewari, N., Suzuki, K., Mikami, M., Suzuki, S. and Suzuki, M.: Effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose against Meth-A solid form. *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 784-790 (1988)
- Tsukada, K., Matsumoto, T., Aizawa, K., Tokoro, A., Naruse, R., Suzuki, S. and Suzuki, M.: Antimetastatic and growth-inhibitory effects of N-acetylchitohexaose in mice bearing Lewis lung carcinoma. *Jpn. J. Cancer. Res.*, **81**, 259-265 (1990)
- Ryu, B.H.: Antitumor and immunologic activity of chitosan extracted from shell of shrimp (in Korean). *J. Korea Soc. Food Nutr.*, **21**, 154-162 (1992)
- Okamoto, Y., Tomita, T., Minami, S., Matsuhashi, A., Kumazawa, N.H., Tanioka, S. and Shigemasa, Y.: Effect of chitosan on experiments with *Staphylococcus aureus* in dogs. *J. Vet. Med. Sci.*, **57**, 765-767 (1995)
- Lehoux, J.G. and Grondin, F.: Some effects of chitosan on liver function in the rat. *Endocrinology*, **132**, 1078-1084 (1993)
- Reitman, S. and Frankel, S.: A colorimetric method for determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Amer. J. Clin. Path.*, **28**, 56-63 (1957)
- Furda, I.: Aminopolysaccharides: their potential as dietary fiber. In *ACS Symposium Series: Unconventional Sources of Dietary Fiber*, Furda, I.(Ed.), American Chemical Society, Washington DC, p. 105 (1983)
- Bernstein, J., Videla, L. and Israel, Y.: Metabolic alteration produced in the liver by chronic ethanol administration: change related to energetic parameters to cell. *Biochem. J.*, **134**, 515-521 (1973)
- Lieber, C.A. and Leo, M.A.: Alcohol and liver. In *Medical and Nutritional Complications of Alcoholism: mechanism and management*, Liver, C. S.(Ed.), Plenum Medical Book Company, p. 185 (1992)
- Mezey, E.: Alcoholic liver disease: roles of alcohol and malnutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*, **33**, 2709-2715 (1980)
- Arteel, G.E., Raleigh, J.A., Bradford, B.U. and Thurman, R.G.: Acute alcohol produces hypoxia directly in rat liver tissue in vivo: role of Kupffer cells. *Am. J. Physiol.*, **271**, G494-G500 (1996)
- Nanji, A.A., Khwaja, S., Khettry, U. and Sadrzadeh, S. M.H.: Plasma endothelin levels in chronic ethanol fed rats: relationship to pathologic liver injury. *Life Science*, **54**, 423-428 (1994)
- Iimuro, Y., Frankenberg, M.V. and Arteel, G.E.: Female rats exhibit greater susceptibility to early alcohol-induced liver injury than males. *Am. J. Physiol.*, **273**, G1186-G1194 (1997)