

## 고지방식이를 섭취한 쥐에서 눈꽃동충하초 유래 cathepsin S 저해 분획의 비만 억제 효과

허 건\* · 명길선 · 이정희 · 허철성  
(주)한국야쿠르트 중앙연구소

### Anti-Obesitic Effects of Cathepsin S Inhibitory Fraction Derived from *Paecilomyces tenuipes* in Mice Fed a High-Fat Diet

Keon Heo\*, Kil-Sun Myoung, Jung-Hee Lee, and Chul-Sung Huh  
R&D Center, Korea Yakult Co., Ltd.

**Abstract** In this study, cathepsin S (CTSS) inhibitory fraction was isolated from *Paecilomyces tenuipes* and anti-obesitic effects of the fraction were evaluated in mice, fed a high-fat diet. Hot water extract of *P. tenuipes* (DHW) was divided into 2 fractions, water eluate fraction (DHP1) and methanol eluate fraction (DHP2) using Diaion HP-20. IC<sub>50</sub> values for DHW, DHP1 and DHP2 against CTSS were 108.7, 890.3 and 2.3 µg/mL, respectively. To evaluate anti-obesitic effects of the fractions, each fraction was administrated orally to C57BL/6 mice for 4 weeks with a high-fat diet. DHP2 had the highest inhibitory effect on CTSS activity, causing serious reduction in weight gain, a reduction in the amount of adipose tissue and in serum lipids levels. These results suggest that the inhibition of CTSS by compounds derived from *P. tenuipes* may be effective in preventing and in ameliorating obesity.

**Key words:** *Paecilomyces tenuipes*, obesity, cathepsin S

## 서 론

비만은 에너지 섭취와 소비의 불균형에 의해서 체내에 지방이 과잉 축적되어 있는 상태를 의미하는데, 그 원인은 명확히 밝혀져 있지 않지만 생활습관과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다(1,2). 비만은 그 자체로 혹은 다른 질병들과 결합하여 건강에 부정적인 영향을 미치게 되는데 특히 당뇨병, 심혈관계 질환, 암, 호흡기 장애, 골관절염(osteoarthritis) 등의 발생과 관계가 깊다(3,4). 전세계적으로 비만 인구가 급격히 늘어나고 있으며 비만이 건강과 보전에 위협적이기 때문에 세계보건기구에서는 비만을 하나의 현상으로 보지 않고 질병으로 분류하고 있다(5). 따라서 비만에 대한 효과적인 치료 방법이 절실한 상황이다.

Cathepsin S(CTSS)는 cysteine protease의 하나로서 지방의 축적과 관련된 다양한 세포외간질 구성요소(extracellular matrix element)들을 분해하는 활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다(6). CTSS는 세포간질의 핵심 요소인 fibronectin을 분해함으로써 지방 전구세포(pre-adipocyte)의 지방세포로의 분화과정에서 중요한 형태학적인 변화를 야기시킨다. CTSS는 인간의 지방 조직에서도 발현 및 분비되는데 정상인보다 비만환자에게서 과발현되는 것이 밝혀져 비만과 밀접한 관계가 있음이 알려졌다(7). 최근에는

CTSS를 저해함으로써 비만을 억제시킬 수 있다는 가능성을 인식하고 CTSS 선택적 저해제를 고효율로 screening하는 기법들도 활발히 연구되고 있다(8).

눈꽃동충하초(*P. tenuipes*)는 분생포자를 형성하는 불완전균류 *Paecilomyces*속에 속하는 버섯균으로 수분 7.6-9.5%, 조단백질 57.5-61.8%, 조지방 6.4-9.8%, 회분 3.5-5.6% 등으로 구성되어 있으며 필수 아미노산을 포함한 17종의 아미노산이 들어있다(9). 이 밖에도 D-mannitol, ergosterol 등이 함유되어 있는 것으로 알려져 있는데(10) 기존에 밝혀진 눈꽃동충하초의 효능은 항암효과, 면역력증강효과, 항피로효과, 항스트레스효과, 항노화효과, 혈중 지질 개선효과 및 항산화효과 등이 있다(10,11). 최근 눈꽃동충하초 열수추출물이 CTSS의 활성을 저해함으로써 지방세포의 분화를 억제하고 비만을 개선시킬 수 있다는 결과를 확인하였는데(12) 본 연구에서는 눈꽃동충하초 열수추출물로부터 CTSS저해 성분을 선택적으로 분리하여 이용할 경우 항비만 효능을 향상시킬 수 있는지 확인하고자 간단한 크로마토그래피법을 이용하여 CTSS 저해 분획을 분리하고 고지방식이로 비만을 유도시킨 마우스를 이용하여 항비만 효능을 검증하였다.

## 재료 및 방법

### 눈꽃동충하초 추출 및 분획

눈꽃동충하초는 결실부만을 따로 모아 사용하였다. 눈꽃동충하초 400g에 6L의 증류수를 가한 후 90°C로 1시간 동안 가열하여 열수추출한 다음 0.45 µm membrane filter로 여과하였다(DHW). 합성흡착수지인 Diaion HP-20(Mitsubishi Chemical, Tokyo, Japan)는 사용 전 24시간 동안 methanol에 담궈두어 불순물과 기포를

\*Corresponding author: Keon Heo, R&D Center, Korea Yakult Co., Ltd., Yongin, Gyeonggi 446-901, Korea  
Tel: 82-31-899-7845  
Fax: 82-31-899-7710  
E-mail: gunny@re.yakult.co.kr  
Received May 27, 2009; revised June 24, 2009;  
accepted June 25, 2009

제거하였다. Wet volume 500 mL의 수지를 직경 5 cm, 높이 60 cm의 유리컬럼에 충전시킨 후 각각 2 L의 methanol과 증류수를 이용하여 순차적으로 수지를 세척하였다. 눈꽃동충하초 열수 추출물 여과액 500 mL을 수지에 흡착시켰으며 2 L의 증류수로 세척하여 흡착되지 않는 성분들을 따로 모아 DHP1으로 명명하였다. 수지 흡착성분들은 2 L의 80% methanol로 유출시켜 모은 뒤 DHP2로 명명하였다. DHW, DHP1, DHP2는 모두 각각 감압 농축한 뒤 동결건조하여 분말화한 뒤 다음 실험에 사용하였다.

### CTSS억제활성 측정

눈꽃동충하초 유래 분획물들의CTSS 억제활성은 Shindo 등(13)의 방법을 응용하여 측정하였다. 즉, 100 mM potassium phosphate 완충용액(pH 6.5)에 5 mM DTT, 4 mM EDTA, 80  $\mu$ M Z-Val-Val-Arg-MCA(Biomol, Plymouth, PA, USA) 및 적절한 농도의 눈꽃동충하초 시료를 혼합한 후 최종적으로 3 ng의 CTSS효소(Biomol, Plymouth, PA, USA)를 첨가하여 반응용액의 최종 부피가 250  $\mu$ L가 되도록 한 후 효소반응을 시작하였으며 37°C에서 총 25분 동안 반응시키면서 형광도(excitation/emission=360 nm/460 nm)를 측정하였다. CTSS 저해율은 아래와 같은 식으로 계산하였다.

$$\text{CTSS 저해율(\%)} = \frac{(A-B)-(C-D)}{(A-B)} \times 100$$

A: Fluorescence without test sample after incubation for 25 min

B: Fluorescence without test sample before incubation

C: Fluorescence with test sample after incubation for 25 min

D: Fluorescence with test sample before incubation

### 실험동물의 사육 및 식이

체중 8-13 g인 3주령의 수컷 C57BL/6 마우스를 Japan SLC (Kotoh-cho, Japan)에서 구입하여 1주일 동안 고형식이를 공급하면서 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 적응기간 후 마우스들은 무작위적으로 8마리씩 5개의 실험군으로 나누었다. 실험군들은

고지방식이만을 공급한 HFD군, DHW를 고지방식이에 1% 혼합하여 공급한 DHW-1군, DHW를 고지방식이에 0.2% 혼합하여 공급한 DHW-0.2군, DHP1을 고지방식이에 0.2% 혼합하여 공급한 DHP1군, DHP2를 고지방식이에 0.2% 혼합하여 공급한 DHP2군이었으며 비만을 유도하기 위한 고지방식이는 Research Diets 사(New Brunswick, NJ, USA)의 D12451(칼로리 구성: 지방 45%, 탄수화물 35%, 단백질 20%)을 사용하였다. 각 실험군들의 사료 조성은 Table 1에 나타내었다. 마우스는 한 케이지에 1마리씩 사육하였으며 사육실 온도는 24°C, 습도는 50%, 명암은 12시간 간격으로 조절하였다.

식이섭취량과 체중증가량은 1주일일 2회씩 측정하였다. 4주 사육 후 12시간 절식시킨 다음 우레탄으로 마취시킨 후 개복하여 심장혈 및 장기적출하였다. 혈액을 4°C에서 7,000 $\times$ g로 15분간 원심분리하여 혈청을 분리하였으며 즉시 분석에 사용하거나 -80°C에서 보관하였다.

### 혈청 분석

혈청 중의 중성지방, 총 콜레스테롤, HDL콜레스테롤 함량 분석은 모두 아산제약(주)(Seoul, Korea)의 혈액 분석용 kit를 이용하여 측정하였다. 즉, 중성지방은 Triglyceride kit, 총 콜레스테롤은 V-cholesterol kit, HDL콜레스테롤은 HDL-cholesterol kit 를 이용하였다. 동맥경화지수 (Atherogenic index, AI)는 다음과 같이 계산하였다: AI=(총 콜레스테롤-HDL콜레스테롤)/HDL콜레스테롤.

### 지방조직의 무게 및 형태학적 변화 측정

지방조직의 무게를 측정하기 위하여 개복 직후 부고환 지방 조직을 적출한 뒤 인산완충용액으로 세척한 다음 여과지로 수분을 제거하고 중량을 측정하였다. 지방조직의 지방세포 크기를 확인하기 위하여 무게 측정이 끝난 지방조직을 4% formaldehyde용액으로 고정된 다음 수세와 탈수 과정을 거친 후 paraffin용액을 처리하여 paraffin block을 만든 후 4  $\mu$ m의 두께로 절편화하여 hema-

**Table 1. Compositions of experimental diets (Unit: g/100 g diet)**

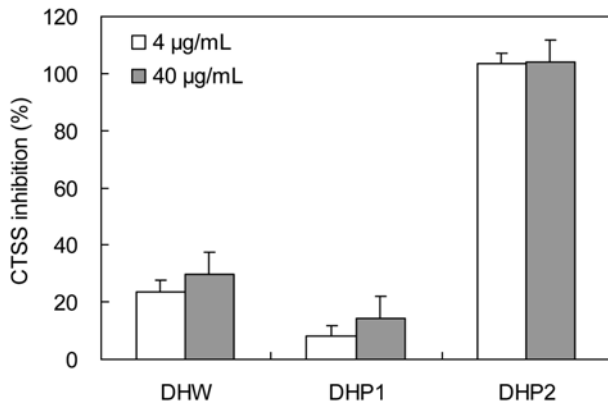
Ingredient	Experimental groups				
	HFD	DHW-1	DHW-0.2	DHP1	DHP2
Casein	23.3	23.1	23.3	23.3	23.3
L-Cystine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Corn Starch	8.5	8.4	8.5	8.5	8.5
Maltodextrin 10	11.7	11.5	11.6	11.6	11.6
Sucrose	20.1	19.9	20.1	20.1	20.1
Cellulose	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8
Soybean oil	2.9	2.9	2.9	2.9	2.9
Lard	20.7	20.5	20.6	20.6	20.6
Mineral mixture <sup>1)</sup>	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
Dicalcium phosphate	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
Calcium phosphate	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
Potassium citrate	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9
Vitamin mixture <sup>2)</sup>	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
Choline Bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
DHW <sup>3)</sup>	-	1	0.2	-	-
DHP1 <sup>4)</sup>	-	-	-	0.2	-
DHP2 <sup>5)</sup>	-	-	-	-	0.2

<sup>1),2)</sup>Research Diets D12451 mineral mix S10026, vitamin mix V10001

<sup>3)</sup>DHW: hot water extract of *P. tenuipes*

<sup>4)</sup>DHP1: water eluate of the partial fraction unadsorbed onto HP-20 resin of DHW

<sup>5)</sup>DHP2: 80% methanol eluate of the partial fraction adsorbed on to HP-20 resin of DHW



**Fig. 1. Inhibitory activity of the fractions derived from *P. tenuipes* on cathepsin S.** Each value is expressed as mean±SD in triplicate experiments. DHW: hot water extract of *P. tenuipes*, DHP1: water eluate of the partial fraction unadsorbed onto HP-20 resin of DHW, DHP2: 80% methanol eluate of the partial fraction adsorbed on to HP-20 resin of DHW.

toxylin과 eosin으로 염색한 뒤 광학현미경으로 관찰하였다.

### 결과 분석

모든 결과는 평균값±표준편차로 표현하였다. 실험군 간의 결과 차이는 student's t-test를 이용하여 분석하였으며  $p < 0.05$  이하만 유의 차가 있는 것으로 표현하였다.

## 결과 및 고찰

### CTSS 저해 분획의 제조

DHW로부터 CTSS 저해활성을 갖는 성분을 효과적으로 농축시키기 위하여 유기용매를 이용한 추출 및 다양한 층진제를 이용한 크로마토그래피 등을 시도한 끝에 합성흡착수지인 Diaion HP-20이 CTSS 저해 성분 분리에 효과가 있음을 알게 되었다. Diaion HP-20은 styrene과 divinyl benzene의 공중합체로 이루어진 고공극성 합성흡착제로서 홍삼유출액으로부터 조사포닌의 분리 등 다양한 생리활성물질의 흡착 및 분리 정제에 활용된다(14,15). 열수추출액을 여과한 뒤 컬럼에 충전되어 있는 수지에 흡착시킨 다음 증류수를 흘려서 수지 미흡착 성분인 DHP1을 얻었으며 80% methanol로 수지에 흡착된 성분들을 용출시켜 DHP2를 얻었

**Table 2. IC<sub>50</sub> values of the fractions derived from *P. tenuipes* for CTSS**

Fraction	IC <sub>50</sub> (µg/mL)
DHW <sup>1)</sup>	108.7
DHP1 <sup>2)</sup>	890.3
DHP2 <sup>3)</sup>	2.3

<sup>1)</sup>DHW: hot water extract of *P. tenuipes*

<sup>2)</sup>DHP1: water eluate of the partial fraction unadsorbed onto HP-20 resin of DHW

<sup>3)</sup>DHP2: 80% methanol eluate of the partial fraction adsorbed on to HP-20 resin of DHW

다. 각각의 분획에 대하여 CTSS저해 활성을 측정해 본 결과 DHP2에서 가장 높은 저해 활성을 보였다(Fig. 1). 각 분획들의 CTSS에 대한 IC<sub>50</sub>을 살펴본 결과 DHP2가 2.3 µg/mL로 합성흡착수지 처리 전에 비하여 약 50분의 1로 감소하여 Diaion HP-20수지를 이용하면 CTSS저해활성이 있는 성분들을 효과적으로 분리 및 농축할 수 있음을 확인할 수 있었다(Table 2).

Shindo 등(13)은 눈꽃동충하초와 동일한 속인 *Paecilomyces carneus*의 배양액으로부터 Paecilopeptin이라는 CTSS 제해제를 분리 및 구조 동정한다. Paecilopeptin은 CTSS의 기질인 펩타이드와 유사한 구조를 가지고 있기 때문에 경쟁적 저해작용을 하는 것으로 보인다. 눈꽃동충하초에도 단백질과 아미노산이 풍부한 것으로 알려져 있으며(9) 분획을 나누는데 사용된 Diaion HP-20 수지가 펩타이드류를 흡착하여 분리하는데 자주 이용되고 있기 때문에(16-18) 눈꽃동충하초의 분획 DHP2에 농축된 CTSS 저해 성분도 펩타이드류일 가능성이 있다. 특히 DHP2를 TLC로 전개한 후 펩타이드류를 분석하는데 쓰이는 ninhydrin으로 발색시켰을 때 붉은색 spot이 강하게 나타나는 것은 이를 뒷받침해주고 있다(data not shown).

### CTSS 저해 분획의 체중증가 억제 효과

고지방식이에 눈꽃동충하초 유래 분획들을 섞어 4주간 먹인 후 체중 변화 및 식이섭취량을 측정된 결과를 Table 3에 나타내었다. 4주 동안의 총 체중증가량을 살펴보면 DHW를 1% 먹인 DHW-1군(4.85±0.77 g)과 CTSS 저해분획인 DHP2를 0.2% 먹인 DHP2군(2.24±1.26 g)이 HFD군 (11.86±1.47 g)에 비하여 체중 증가가 유의적으로 감소하였다( $p < 0.01$ ). 체중 증가 억제율로 보면 DHW-1군과 DHP2군이 각각 59, 81%의 억제율을 보였다. DHP2

**Table 3. Effects of the fractions derived from *P. tenuipes* on the body weight gains, the food intakes and the food efficiency ratio in mice fed a high-fat diet**

Group	Fraction treated	Body weight gains		Food intake (g/day)	Food efficiency Ratio (%) <sup>4)</sup>
		28 days(g)	g/day		
HFD	-	11.86±1.47	0.42±0.05	2.84±0.17	14.86±1.11
DHW-1	1% DHW <sup>1)</sup>	4.85±0.77**	0.17±0.27**	2.17±0.08**	8.00±1.32**
DHW-0.2	0.2% DHW	10.3±1.66 <sup>#</sup>	0.37±0.06 <sup>#</sup>	2.57±0.14 <sup>###</sup>	14.26±1.61 <sup>###</sup>
DHP1	0.2% DHP1 <sup>2)</sup>	11.58±2.04 <sup>#</sup>	0.41±0.07 <sup>#</sup>	2.65±0.12 <sup>###</sup>	15.57±2.49 <sup>#</sup>
DHP2	0.2% DHP2 <sup>3)</sup>	2.24±1.26 <sup>###</sup>	0.08±0.05 <sup>###</sup>	2.21±0.25**	3.76±2.27 <sup>###</sup>

Values are means±SD ( $n=8$  per group).

\*compared with HFD group (\*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ , t-test unpaired comparison)

<sup>#</sup>compared with DHW-1 group (<sup>#</sup>:  $p < 0.05$ , <sup>###</sup>:  $p < 0.01$ , t-test unpaired comparison)

<sup>1)</sup>DHW: hot water extract of *P. tenuipes*

<sup>2)</sup>DHP1: water eluate of the partial fraction unadsorbed onto HP-20 resin of DHW

<sup>3)</sup>DHP2: 80% methanol eluate of the partial fraction adsorbed on to HP-20 resin of DHW

<sup>4)</sup>Food efficiency ratio (%)=body weight gains/day per food intake/day×100.

**Table 4. Effects of the fractions derived from *P. tenuipes* on the adipose tissue weights in mice fed a high-fat diet**

Group	Fraction treated	Epididymal fat pad	
		Fat pad (g)	Fat pad (mg)/BW (g)
HFD	-	1.09±0.18	36.41±4.76
DHW-1	1% DHW <sup>1)</sup>	0.34±0.04**	14.14±1.61**
DHW-0.2	0.2% DHW	0.77±0.19***	26.58±4.4***
DHP1	0.2% DHP1 <sup>2)</sup>	0.97±0.14 <sup>#</sup>	33.01±3.29 <sup>#</sup>
DHP2	0.2% DHP2 <sup>3)</sup>	0.21±0.08***	10.43±3.74***

Values are means±SD ( $n=8$  per group).

\*compared with HFD group (\*:  $p<0.05$ , \*\*:  $p<0.01$ , t-test unpaired comparison)

<sup>#</sup>compared with DHW-1 group (<sup>#</sup>:  $p<0.05$ , <sup>##</sup>:  $p<0.01$ , t-test unpaired comparison)

<sup>1)</sup>DHW: hot water extract of *P. tenuipes*

<sup>2)</sup>DHP1: water eluent of the partial fraction unadsorbed onto HP-20 resin of DHW

<sup>3)</sup>DHP2: 80% methanol eluate of the partial fraction adsorbed on to HP-20 resin of DHW

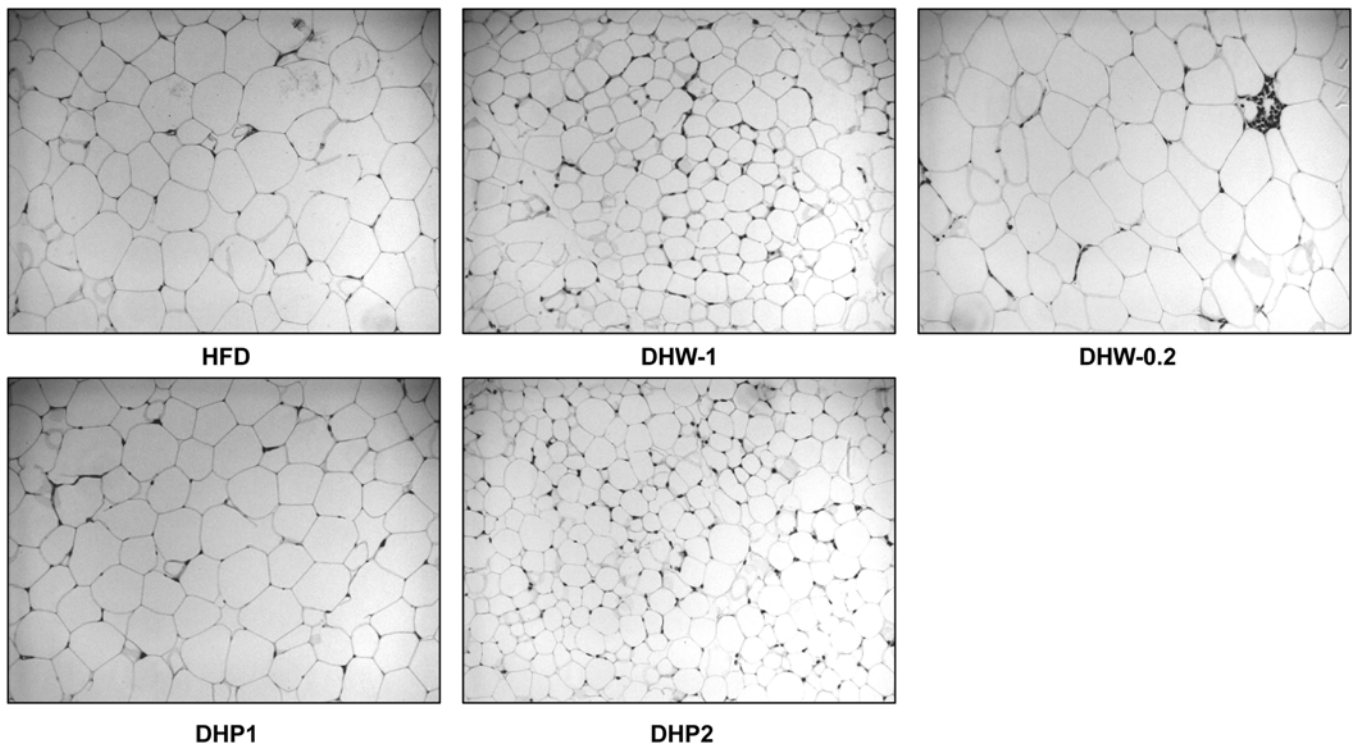
군의 체중증가 억제 효능은 DHW-1군 보다 유의적( $p<0.01$ )으로 높았는데 DHP2의 투여량이 DHW의 5분의 1 수준임을 감안한다면 DHP2의 체중 증가 억제 효능이 DHW에 비하여 월등히 높아졌음을 알 수 있다. Diaion HP-20에 흡착되지 않고 증류수로 용출되었던 DHP1을 0.2% 먹인 DHP1군에서는 체중 증가 억제 효과가 나타나지 않았으며 DHW를 DHP2와 동일하게 0.2% 먹인 DHW-0.2군에서는 체중 증가 억제 효과가 미비하였다. 식이섭취량은 모든 실험군들이 HFD군(2.84±0.17)에 비하여 유의적으로 감

소하는 경향을 보였으며 특히 DHW-1군(2.17±0.08)과 DHP2군이 가장 낮은 편이었다(2.21±0.25). 체중 증가가 억제되었던 실험군들의 사료효율은 모두 HFD군에 비하여 유의적으로 감소하였다. HFD군, DHW-1군, DHP2군의 사료효율은 각각 14.85, 8.00, 3.76% 였는데, DHP2군은 HFD군 뿐만 아니라 DHW-1군에 비하여도 사료효율이 유의적으로 감소하였다( $p<0.01$ ).

DHW를 1% 투여하거나 DHP2를 0.2% 투여한 경우 사료효율을 현저히 감소시켜 체중증가를 억제하는 효과를 보여주고는 있지만 두 실험군에서 모두 식이섭취량이 줄어들었기 때문에 체중 증가 억제 효과가 전적으로 CTSS 저해에 의한 것이라고 판단하기는 힘들며 낮은 식이섭취량이 어느 정도 기여하였을 것으로 보인다. 향후 추가적으로 식이의 양이 동일하게 섭취되도록 restricted diet feeding 또는 pair feeding을 이용한 실험을 수행한다면 이에 대한 보다 명확한 판단을 내릴 수 있을 것이다.

### 지방조직의 무게와 조직의 변화

실험동물들을 희생시킨 후 개복하여 부고환 지방 조직을 적출하여 중량을 측정하였다(Table 4). 부고환 지방 조직의 중량을 단위 체중에 대한 조직 중량으로 환산하여 비교해본 결과 DHW-1군(14.14±1.61 mg/g Body Weight, BW), DHW-0.2군(26.58±4.4 mg/g BW), DHP2군(10.43±3.74 mg/g BW)의 지방조직의 중량이 HFD군(36.41±4.76 mg/g BW)에 비하여 유의적으로 낮았다( $p<0.01$ ). DHP2군의 경우 DHW-1에 비하여도 유의적( $p<0.05$ )으로 낮은 결과를 보여주어 DHP2의 체지방 감소 효과가 DHW보다 더욱 향상되었음을 알 수 있었다. 비만일 경우 체중의 증가보다는 체지방의 증가가 건강에 해로운 것으로 알려져 있는데 본 결과를 통하여 DHP2가 실험동물의 체중을 감소시킬 뿐만 아니라 체지방



**Fig. 2. Effect of the fractions derived from *P. tenuipes* on epididymal fat pads in mice fed a high fat diet.** Epididymal fat pads are stained with Haematoxylin and eosin (Original magnification× 200). HFD, Group fed a high-fat diet; DHW-1, Group treated with 1% (w/w) DHW (hot water extract of *P. tenuipes*); DHW-0.2, Group treated with 0.2% (w/w) DHW; DHP1, Group treated with 0.2% (w/w) DHP1 (water eluate of the partial fraction unadsorbed onto HP-20 resin of DHW); DHP2, Group treated with 0.2% (w/w) DHP2 (80% methanol eluate of the partial fraction adsorbed on to HP-20 resin of DHW).

**Table 5. Effects of the fractions derived from *P. tenuipes* on serum lipid levels in mice fed a high fat diet**

Group	Fraction treated	Triglycerides (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	HDL cholesterol (mg/dL)	AI index <sup>4)</sup>
HFD	-	62.30±14.69	157.24±16.56	87.5±11.80	0.81±0.25
DHW-1	1% DHW <sup>1)</sup>	53.90±8.34	108.20±18.06**	84.70±15.56	0.43±0.41
DHW-0.2	0.2% DHW	54.64±18.91	136.22±19.58 <sup>#</sup>	80.13±8.60	0.69±0.33
DHP1	0.2% DHP1 <sup>2)</sup>	54.64±3.72	155.42±25.59 <sup>##</sup>	98.36±4.78* <sup>#</sup>	0.46±0.23*
DHP2	0.2% DHP2 <sup>3)</sup>	43.47±3.99*	117.44±32.08**	73.03±7.92*	0.73±0.45

Values are means±SD (n=8 per group).

\*compared with HFD group (\*: p<0.05, \*\*: p<0.01, t-test unpaired comparison)

<sup>#</sup>compared with DHW-1 group (<sup>#</sup>: p<0.05, <sup>##</sup>: p<0.01, t-test unpaired comparison)

<sup>1)</sup>DHW: hot water extract of *P. tenuipes*

<sup>2)</sup>DHP1: water eluent of the partial fraction unadsorbed onto HP-20 resin of DHW

<sup>3)</sup>DHP2: 80% methanol eluate of the partial fraction adsorbed on to HP-20 resin of DHW

<sup>4)</sup>Atherogenic index (AI)=(total cholesterol-HDL cholesterol)/HDL cholesterol

량을 낮추는 데도 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 현미경을 이용하여 부고환 지방 조직의 크기를 관찰한 결과 Fig. 2에서 볼 수 있듯이 DHW-1군과 DHP2군의 지방조직의 크기가 현저히 감소하였다. 이러한 현상들은 지방세포 분화에 관여하는 CTSS의 활성이 저해됨으로써 나타나는 결과로 해석할 수 있으며 눈꽃동충하초 분획들이 체내에서 지방의 축적을 감소시킴으로써 체중 증가를 억제할 수 있었다는 예측을 할 수 있다.

#### 혈청 지질 농도

각 실험군들의 혈청지질 농도를 분석한 결과를 Table 5에 나타내었다. 혈청의 중성지방은 HFD군(62.30±14.69 mg/dL)에 비하여 DHP2군(43.47±3.99 mg/dL)에서 유의적으로 감소하였다(p<0.05). DHW, DHP1 등을 투입한 실험군에서도 혈청 중성지방 농도가 감소하였으나 유의적이지 않았다. 동충하초의 총 콜레스테롤의 경우는 DHP2군(117.44±32.08 mg/dL)이 HFD군(157.24±16.65 mg/dL)에 비하여 유의적으로 감소하였으나(p<0.01), DHW-1군(108.20±18.06 mg/dL)과는 유의적인 차이를 보이지 않았다. 콜레스테롤을 조직에서 간으로 운반함으로써 체외로 배출시키는 기능을 하는(19) HDL 콜레스테롤은 DHP2군(73.03±7.92 mg/dL)이 HFD군(87.50±11.80 mg/dL)에 비하여 유의적으로 감소한 반면(p<0.05), DHP1군(98.36±4.78 mg/dL)이 HFD군에 비하여 유의적으로 증가하였다(p<0.05). 동맥경화지수(Atherogenic index, AI)도 DHP1 실험군(0.46±0.23)이 HFD군(0.81±0.25) 보다 유의적으로 감소하였다(p<0.05).

동충하초의 혈청 중성지방 강화 효과는 이미 수차례 보고된 바 있다. Koo 등(20)은 동충하초 *Cordyceps militaris* 추출분말을 3% 이상 사료에 섞여 먹었을 때 혈청 지질을 감소시키는 효과가 있다고 보고하였으며, Koh 등(21-23)도 *Cordyceps militaris* 또는 *Paecilomyces japonica*의 자실체 또는 균사체 분말을 쥐에게 먹었을 때 혈청 지질을 낮추는 효과가 있다고 보고하였다. 본 연구결과에서도 DHW를 1% 투여한 실험군에서 혈청 지질이 감소하였으며 DHP2를 투여한 실험군에서는 그 효과가 향상되는 것으로 나타났다. 동충하초의 지질개선 효과는 일반적으로 동충하초에 함유된 다당류나 섬유소가 지질 흡수를 억제함으로써 나타나는 것으로 예상되고 있는데, DHP2의 지질 개선 효과가 향상된 것은 Diaion HP-20 수지에 의하여 열수추출물에 존재하는 다당류가 흡착 및 농축되어 나타나는 효과일 가능성도 있다. 한편 콜레스테롤 개선 효과는 DHP2보다는 DHP1에서 높게 나타났는데 눈꽃동충하초 열수추출물의 Diaion HP-20처리에 의하여 혈중 콜레스테롤 조성을 개선시킬 수 있는 성분들이 DHP2 보다는 DHP1

으로 이동하였을 가능성을 제시하는 결과로서 추가적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

## 요 약

Cysteine protease의 일종인 CTSS가 비만에 관여한다는 것이 알려진 후 CTSS저해를 통한 비만 억제제의 가능성이 제시되고 있다. 본 연구는 눈꽃동충하초로부터 CTSS저해 활성을 갖는 분획을 분리하여 항비만 효과를 확인하는 것을 목적으로 수행되었다. 눈꽃동충하초 열수추출물을 Diaion HP-20 수지 흡착 여부에 따라서 DHP1, DHP2 두 개의 분획으로 나누었다. CTSS에 대한 IC<sub>50</sub>값은 열수추출물, DHP1, DHP2가 각각 108.7, 890.3, 2.3 µg/mL이었다. 고지방식으로 비만을 유도한 마우스에 각 분획들을 4주간 섭취시키고 체중 변화, 부고환 지방 무게, 지방세포 크기 및 혈중 지질 농도 등을 측정하여 결과 CTSS 저해활성이 가장 높은 분획 DHP2를 섭취시킨 실험군에서 가장 뛰어난 항비만 효능을 확인할 수 있었다. 결론적으로 본 연구는 눈꽃동충하초로부터 분리된 CTSS저해 성분들이 비만을 치료하거나 예방하는데 효과적으로 활용될 수 있는 가능성을 제시한다고 볼 수 있다. 향후 눈꽃동충하초로부터 CTSS저해 물질을 분리 및 동정한다면 보다 명확한 항비만 기작을 밝혀낼 수 있을 것이다.

## 문 헌

1. Grundy SM. Multifactorial causation of obesity: Implication for prevention. *Am. J. Clin. Nutr.* 67: 563S-572S (1998)
2. Albu J, Allison D, Boozer CN, Heymsfield S, Kissileff H, Kretser A, Krumhar K, Leibel R, Nonas C, Pi-Sunyer X, Vanltallie T, Wedral E. Obesity solutions: Report of a meeting. *Nutr. Rev.* 55: 150-156 (1997)
3. Kopelman PG. Causes and consequences of obesity. *Med. Int.* 22: 385-388 (1994)
4. Lew EA. Mortality and weight: Insured lives and the American cancer society studies. *Ann. Intern. Med.* 103: 1024-1029 (1985)
5. McGee DL. Body mass index and mortality: A meta-analysis based on person-level data from twenty-six observational studies. *Ann. Epidemiol.* 15: 377-398 (2005)
6. Taleb S, Canello R, Clement K, Lacasa D. Cathepsin S promotes human preadipocyte differentiation: Possible involvement of fibronectin degradation. *Endocrinology* 147: 4950-4959 (2006)
7. Taleb S, Lacasa D, Bastard JP, Poitou C, Canello R, Pelloux V, Viguier N, Benis A, Zuker JD, Bouillot JL, Coussieu C, Basdevant A, Langin D, Clement K. Cathepsin S, a novel biomarker of adiposity: Relevance to atherogenesis. *FASEB J.* 19: 1540-1542 (2005)

8. Markt P, McGoohan C, Walker B, Krichmair J, Feldmann C, De Martino G, Spitzer G, Distinto S, Schuster D, Wolber G, Laggner C, Langer T. Discovery of novel cathepsin S inhibitors by pharmacophore-based virtual high-throughput screening. *J. Chem. Inf. Model.* 48: 1693-1705 (2008)
9. Oh SW, Kim SH, Song HN, Han DS. Comparative chemical compositions of four kinds of Tochukaso. *Korean J. Food Sci. Technol.* 35: 15-22 (2003)
10. Cho SY. Effect and use of *Paecilomyces japonica*. *Nutr. Diet.* 217: 20-26 (2000)
11. Park EJ, Park NS, Park HR, Jin BR, Lee SM. Fruiting body extracts of *Paecilomyces tenuipes* ameliorate lipid and antioxidant metabolism in rats fed a high fat-cholesterol diet. *Food Sci. Biotechnol.* 15: 710-714 (2006)
12. Myoung KS, Lee JH, Lim KS, Huh CS. Water extracts of *Paecilomyces tenuipes* inhibit cathepsin S-induced adipocyte differentiation in 3T3-L1 cells. *Food Sci. Biotechnol.* 18: 84-88 (2009)
13. Shindo K, Suzuki H, Okuda T. Paecilopeptin, a new cathepsin S inhibitor produced by *Paecilomyces carneus*. *Biosci. Biotech. Bioch.* 66: 2444-2448 (2002)
14. Kwak YS, Kyung JS, Kim SK, Wee JJ. An isolation of crude saponin from red-ginseng efflux by Diaion HP-20 resin adsorption method. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 30: 1-5 (2001)
15. Lim HY, Lee CH. Antiproliferative effect and apoptotic induction of *Bauhinia forficata* extract in human cancer cells. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* 32: 67-71 (2004)
16. Shoji J, Hinoo H, Katayama T, Matsumoto K, Tanimoto T, Hatori T, Higashiyama I. Isolation and characterization of new peptide antibiotics, plusbacins A1-A4 and B1-B4. *J. Antibiot.* 45: 817-823 (1992)
17. Asano T, Matsuoka K, Hida T, Kobayashi M, Kitamura Y, Hayakawa T, Inuma S, Kakinuma A, Kato K. Novel retrovirus protease inhibitors, RPI-856 A, B, C, and D, produced by *Streptomyces* sp. AL-322. *J. Antibiot.* 47: 557-565 (1994)
18. Sakato K, Tanaka H, Misawa M. Broad-specificity proteinase inhibitors in *Scopolia japonica* (Solanaceae) cultured cells. Isolation, physicochemical properties, and inhibition kinetics. *Eur. J. Biochem.* 55: 211-219 (1975)
19. Miwa H, Motokawa K, Yoshida T, Gordon T, Cassfelli WP, Hjortland MC, Kennel WB, Dawher TR. High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease, the Framingham study. *Am. J. Med.* 62: 707-716 (1977)
20. Koo BS, Lee MS. Effects of *Cordyceps militaris* extract powder on plasma lipids and glucose in rats. *Korean J. Food Culture* 19: 217-222 (2004)
21. Koh JB, Choi MA. Effect of *Cordyceps militaris* on lipid metabolism in rats fed cholesterol diet. *Korean J. Nutr.* 34: 265-270 (2001)
22. Koh JB. The effects of *Cordyceps militaris* on lipid metabolism, protein levels and enzyme activities in rats fed a high fat diet. *Korean J. Nutr.* 35: 414-420 (2002)
23. Koh JB, Choi MA. Effect of *Paecilomyces japonica* on lipid metabolism in rats fed high fat diet. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32: 238-243 (2003)