

Culinary Cinnamon and Clove Powder Ameliorate Fatty Liver Formation Induced by Ethanol Supplementation in Zebrafish

Ji-Hye Lee¹, Seung-Hyeon Jung² and Kyung-Hyun Cho^{1,†}

¹School of Biotechnology, Yeungnam University, Gyeongsan, 712-749, South Korea

²Ottogi Research Center, Anyang, South Korea

Culinary herbs and spices have received much attention since they contain high concentrations of bioactive ingredients for antioxidant and anti-inflammatory activities. Protection effect of the herb and spice against acute alcohol consumption has been investigated using zebrafish as a vertebrate model. During 30 days bathed in water containing 1% Et-OH and the designated herb or spice, the survival rate of the Et-OH group was decreased sharply (up to 20% at 10 days). The cinnamon-fed group showed the highest and longer survival rate up to 80% up to for 30 days under the presence of Et-OH, while clove-fed group showed 40% survival rate for 25 days. Et-OH group serum exhibited the weakest antioxidant ability from ferric ion removal ability (FRA) assay; FRA ability was increased in the cinnamon-fed group up to 414%, while the clove and laurel group increased 256% and 309%, respectively. Histologic observation and Oil-red O staining showed hepatic tissue damage was severe in the Et-OH group. The cinnamon- or clove-fed group showed much ameliorated hepatic tissue morphology with minimized steatosis. The cinnamon- or clove-fed group showed lower serum GOT and GPT levels than the Et-OH group. Among hepatic tissue extract, the clove-fed group exhibited the lowest level of GOT and GPT. These results suggest that consumption of cinnamon and clove might be beneficial to attenuate progress of acute fatty liver change by alcohol consumption.

Key Words: Herb, Spice, Alcohol consumption, Zebrafish

서 론

간조직에 지방이 차지하는 비율이 5~10% 이상 많이 축적된 상태를 지방간이라 하며, 음주와 비만에 의한 지방간 환자가 늘어나는 추세이고 (Reddy et al., 2006), 혈중 리피드 농도가 높은 고지혈증, 당뇨병 등과 동반되어 흔히 나타난다. 지방간의 큰 분류로 알코올성 지방간과 고지혈증, 비만, 당뇨병, 약물 등으로 인해 나타나는 비 알코올성 지방간으로 나눌 수 있다. 특히 알코올성 지방간은 에탄올을 많이 섭취하여 간에 지방 합성이 촉진되고 이에 따라 에너지 대사가 정상적으로 이루어지지 않아 발생한다. 2007년 한국 통계청 자료에 따르면 국내 알코올 관련 질환에 의한 사망자수는 한해 인구 10만 명당

9.6명인데 전체 간질환 사망이 10만 명당 15.5명 사망수인 것을 비교해 보면 알코올이 건강에 미치는 영향이 매우 크다는 것을 알 수 있다 (Chae, 2009).

향신료들은 수 천년 동안 인류가 상용해 왔으며, 본 연구에서는 cinnamon과 clove, laurel을 대상으로 하였다. Cinnamon은 쌍떡잎식물 미나리아재비목 녹나무과의 상록활엽 교목으로 주로 당뇨병 치료에 이용되는데 수용성 추출물은 인슐린 receptor를 활성화하여 글리코겐 합성 활동을 증가, 혈당을 낮추어 적절한 상태를 유지하도록 한다 (Nahas et al., 2009). 또한 단백질 인산화에 영향을 주는 phosphatidylinositol 3'-kinase 통해 신호를 활성화하고 protein tyrosine phosphatase-1 (PTP-1)는 억제된다고 알려져 있다 (Imparl-Radosevich et al., 1998). 특히 cinnamon polyphenol extract는 산소-포도당 결핍이 유도된 세포의 팽창을 약화시키며 면역반응에 영향을 준다 (Panickar et al., 2009). Cinnamon 추출물은 염증, 인슐린, 장세포 내에 지단백질 회로를 조절함으로써 tumor necrosis factor alpha 유도된 장의 지단백질 ApoB48 과생산을 약화시키며 또한 생쥐에서 에탄올 급어로 유도된 급성 간경변에 대한

*접수일: 2009년 9월 11일 / 수정일: 2010년 2월 19일

채택일: 2010년 3월 2일

†교신저자: 조경현, (우) 712-749 경북 경산시 대동 214-1, 영남대학교 생명공학부

Tel: 053-810-3026, Fax: 053-814-3026

e-mail: chok@yu.ac.kr

Table 1. Experimental design of alcohol induced fatty liver formation in zebrafish*

	Normal control group	Et-OH Control Group	Cinnamon group (cinnamon)	Clove group (clove)	Laurel group (laurel)
n	25	25	25	25	25
Concentration of Et-OH in water (mL/mL)	0	1%	1%	1%	1%
Content of herb and spice (wt/wt)	0	0	10% of cinnamon in the diet (wt/wt)	10% of clove in the diet (wt/wt)	10% of laurel in the diet (wt/wt)

*The zebrafish consumed plain diet (Tetrabit, Protein 47.5%, Oil 6.5%, Fibre 2.0%, Ash 10.5%, Moisture 6.0%, Tetra, Germany) for 30 days with ethanol and each herb

하여 보호하는 효과가 있는 것으로 보고되었다 (Kanuri et al., 2009).

Clove는 쌍떡잎식물 도금양목 도금양과의 상록 소교목으로 항산화 활성 (Lee et al., 2001), 항곰팡이 활성 (Pawar et al., 2006), 항균 활성 (Betoni et al., 2006)이 우수하고 폐암 예방을 위한 화학적 치료제로 사용하며 (Banerjee et al., 2006) 또한 면역 시스템에 긍정적인 영향을 준다. Clove oil은 대개 eugenol (89.6%), eugenol acetate (4.5%)로 구성되어 있고 치통의 경감을 얻기 위해 진통제와 같이 마취제로 사용되며 (Ghelardini et al., 2001) 치주염과 관련된 있는 그람 음성 혐기성 박테리아에 대해 항균 활성을 가진다고 보고된 바 있다 (Cai et al., 1996).

Laurel은 쌍떡잎식물 미나리아재비목 녹나무과의 상록 교목으로 말린 잎을 bay leaf라고 하는데 식품조리 등에 사용되며 열매와 잎을 건위제나 증기를 없애는 약재로 쓰기도 한다. 또한 잎에 포함된 essential oil은 위액분비를 증가하고 소화장애에 대항하여 활동하며 약간의 항산화 활성을 가진다고 보고된 바 있다 (Politeo et al., 2007).

Zebrafish는 잉어과에 속하는 인도산 소형 열대어이며, 유전학, 발생학의 동물 모델로서의 장점을 가지는데 (Kishi et al., 2009), 척추동물로서 한 세대의 길이가 약 3개월로 짧고, embryo의 발생기간도 24시간으로 짧다. Zebrafish 모델을 이용한 에탄올성 지방간 형성이 최근에 보고된 바 있고 (Passeri et al., 2009), 특히 zebrafish는 고지혈증 모델로서도 사용되어 4% 콜레스테롤 식이 공급으로 고지혈증과 동맥경화가 심각하게 유발되는 등의 사람과 유사한 생리적 특징을 보여 주었다 (Stoletov, 2009). 본 연구에서는 상기 3종의 향신료를 대상으로 에탄올성 지방간의 개선효과를 비교하였다.

재료 및 방법

향신료

계피 (Cinnamon, 원산지: 인도네시아)은 나무의 껍질 부위, 정향 (clove, 원산지: 마다가스카르)는 꽃봉우리, 월계수 (laurel, 원산지: 터키)는 잎으로부터 제조된 것을 (주)오뚜기로부터 분말 형태로 공급받아 사용하였다.

에탄올과 향신료 처리

알코올성 간손상을 유발하기 위해 아크릴수조 (3 L)에 최종 농도 1%의 에탄올 (Merck, Darmstadt, Germany)이 포함된 물 3 L당, 25마리 zebrafish를 사육했으며, 매일 아침마다 물을 교환해주었고, Table 1에 표시한 바와 같이 개체 수 당 향신료 분말 (powder)을 각각 동일한 양으로 1회에 10 mg의 사료 (TetraBit, Tetra, Germany)와 1 mg의 향신료 (10%, wt/wt)들을 30일간 급여하였다.

지방간 형성 비교

각각 다른 향신료를 처리한 zebrafish 간의 지방간 형성 및 개선효과를 보기 위해 간을 채취하여 -70℃에 보관한 후 Koopman의 방법 (Koopman et al., 2001)에 따라 Cryotome (Leica CM1850, Leica, Germany)을 이용해 두께 5 µm로 횡단면 절단하여 section slides를 제작하였다. 제작된 sample을 2시간 동안 air dry하고 10% formalin으로 고정시킨 뒤 증류수로 씻어내고 100% propylene glycol을 각각 5분씩 처리한 뒤에 0.7% Oil red O에 넣고 7분간 교반하여 85% propylene glycol에 탈색한 후 3분간 증류수로 세정하였다.

철 이온 환원능력 비교

향신료의 급여에 따른 항산화 능력 중 환원능력을 비교하기 위하여 zebrafish의 심장으로부터 혈액을 채취하고 혈청을 분리하여 하여 Benzie의 방법 (Benzie et al.,

1996)에 따라 FRAP (ferric reducing antioxidant power) 정량을 실시하였다. 추출한 각 혈청을 PBS에 10%로 희석하여 첨가한 후 FRAP reagent를 첨가하여 spectrophotometer (DU 800, Beckman Coulter, USA)를 이용해 실온에서 593 nm의 흡광도를 측정하였다.

간 염증인자 비교

Reitman-Frankel법 (Reitman et al., 1957)을 이용하여 혈청 Glutamate-oxaloacetate transaminase (GOT), Glutamate-pyruvate transaminase (GPT)를 측정하기 위해 아산셋트 지오티·지피티 측정용 시액 (C081, 아산제약, 경기도)을 사용하여 각 군별의 혈청은 phosphate buffered saline (PBS)을 이용해 10%로 희석하여 실험을 진행하였고, homogenized hepatic tissue는 4분간 12,000 rpm으로 원심분리한 상층액을 0.18 mg/mL로 희석하여 제조사의 방법에 따라 실험을 진행한 후 ELISA reader (680 model, BIORAD, Hercules, CA, USA)로 490 nm에서 흡광하여 정량하였다.

간조직 분쇄 및 단백질 정량

Zebrafish 각 그룹별의 간 10 mg씩과 500 mL의 PBST (Phosphate Buffered Saline Tween-20)를 첨가한 다음 단백질의 변성을 최소화 하기 위하여 Jar를 ice-bath내에서 Homogenizer (EURO-ST Dmodel, IKA, Germany)로 900 rpm

으로 3분간 분쇄 (Homogenize)하여 emulsion 상태로 만들었고, 총 단백질량을 Bradford의 방법에 따라 정량한 후 (Bradford, 1976), PBS를 사용하여 동일한 농도인 0.18 mg/mL로 희석하였다.

결과 및 고찰

향신료의 급여에 따른 zebrafish의 알코올성 지방간에

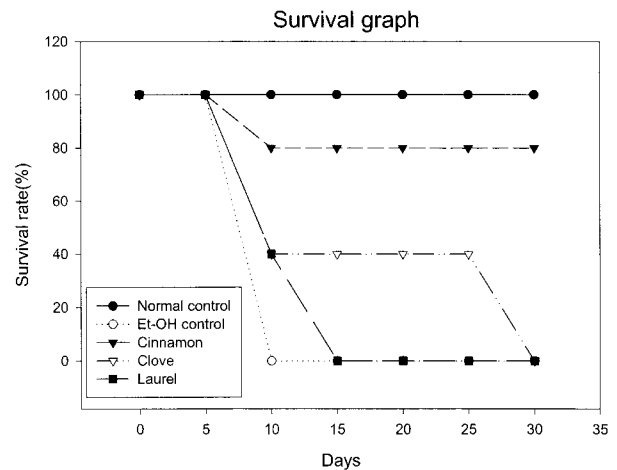


Fig. 1. Survival graph of zebrafish group treated with designated spiced (10% wt/wt). All experimental zebrafishes were maintained water containing 1% alcohol.

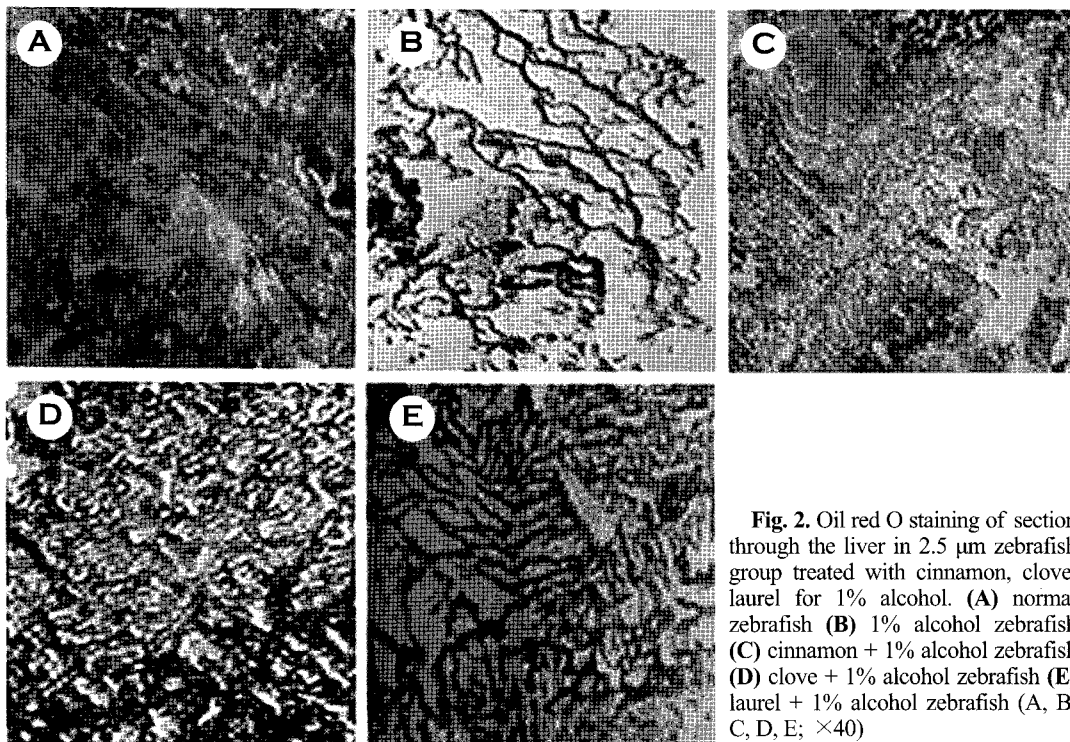


Fig. 2. Oil red O staining of section through the liver in 2.5 μ m zebrafish group treated with cinnamon, clove, laurel for 1% alcohol. (A) normal zebrafish (B) 1% alcohol zebrafish (C) cinnamon + 1% alcohol zebrafish (D) clove + 1% alcohol zebrafish (E) laurel + 1% alcohol zebrafish (A, B, C, D, E; $\times 40$)

미치는 효과를 비교했을 때 생존 곡선에서 에탄올의 급여가 없는 정상대조군 (normal control)의 개체들은 30일간 모두 생존하였고, 에탄올 (1% 최종 처리군)은 에탄올 공급 이후 10일째에 더 이상 생존개체가 없었다. 이는 에탄올의 공급에 따라 생존능력과 항상성 유지에 심각한 손상이 있음을 의미한다. 에탄올 공급 하에서 향신료 급여군 중 cinnamon 처리군의 개체들이 80% 생존하였으며 clove 처리군과 laurel 처리군 순으로 생존하였다 (Fig. 1).

간조직을 절단하여 Oil red O staining을 실시한 결과 에탄올이 없는 상태에서 사육한 정상대조군은 정상적인 간조직의 절단면 (Fig. 2A)을 보였으며 에탄올만 급여한 에탄올 대조군 (Fig. 2B)은 간조직과 세포가 괴사되고 붕괴되어 가장 심하게 손상된 모습을 보였다. Cinnamon 처리군은 간손상이 매우 적어 정상대조군과 유사한 모습을 보였고 (Fig. 2C), clove 처리군의 간조직도 거의 정상적인 모습을 보였으나 (Fig. 2D), laurel 처리군은 간조직이 많이 손상된 모습을 보였다 (Fig. 2E). 이는 지방간의 형성이 심할수록 생존율과 반비례하는 결과와 잘 일치하였다.

선행논문에서 설명된 바와 같이, 알코올성 간손상과 항산화 능력의 감소는 밀접한 관계를 가지는데 에탄올의 산화로 인해 독성 물질인 acetaldehyde와 활성산소 (reactive oxygen species)가 생성되고 이들이 세포손상과 세포괴사를 일으키는 산화적 스트레스의 주범이 된다 (Das, 2007). 철이온의 환원능력과 라디칼의 소거능력은 항산화 능력 비교를 위한 대표적인 실험 방법이다. 항산화 효과 중 철이온 환원능력을 비교할 수 있는 FRAP 정량의 결과에서 초기값에 비해 흡광도가 증가할수록 환원능력이 높음을 의미하는데, cinnamon 처리군 혈청의 항산화 능력이 (초기값의 414% 증가) 가장 높았고 다음으로 laurel 처리군 (초기값의 309% 증가), clove 처리군 (초기값의 256% 증가) 순으로 나타남을 알 수 있었다 (Fig. 3A). 각 향신료들의 항산화 활성 및 라디칼소거 능력을 비교하기 위해 DPPH 소거 활성 측정을 실시한 결과, clove (최종 농도 0.1 mg/mL)는 반응 시작 후 초기부터 강한 소거 활성을 보여주었고 (Fig. 3B), laurel은 초기값의 -0.07에서 -0.18의 흡광도 감소를 보여, 향신료의 급여에 따른 zebrafish 혈청의 철 이온의 환원능력과 라디칼의 소거능력은 잘 일치함을 보여주었다. 이는 향상된 라디칼소거 능력과 항산화 기능이 알코올성 간손상을 개선할 수 있음을 의미하며, vitamin E 같은 항산화제가 알코올에 의해 유발된 생쥐의 간손상을 완화시킨다는 최근 보고와도 잘 일치하였다 (Kaur et al., 2010).

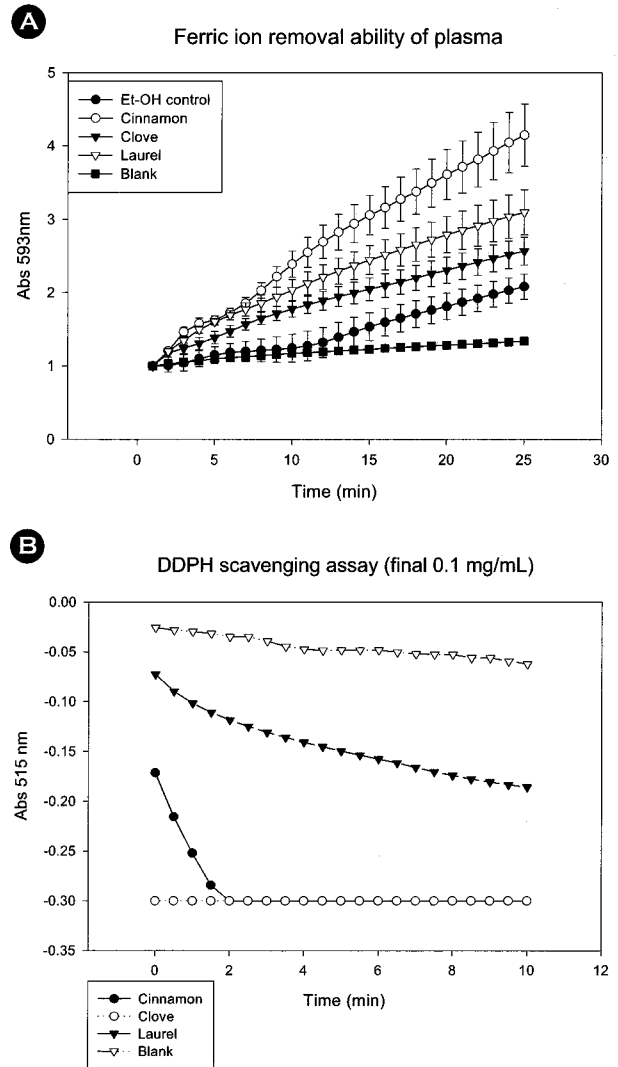


Fig. 3. A. Continuous monitoring of absorbance 593 nm to compare ferric reducing ability of serum from each zebrafish group. **B.** Continuous monitoring of absorbance 515 nm to compare reduction of free DPPH radicals (Brand-Williams, 1995) by each herb and spice

간손상과 염증의 악화를 비교하기 위해 혈청 GOT, GPT 정량을 실시하였다. Fig. 4에서와 같이 각 그룹의 zebrafish 혈청을 GOT값을 측정해 본 결과 정상대조군 (5369 mU/L)이 가장 낮게 나타났고 에탄올 대조군 (7762 mU/L)에서 현저히 증가하였다. Cinnamon 처리군 (7372 mU/L)과 clove 처리군 (7558 mU/L)에서 감소하였으며 laurel 처리군 (8022 mU/L)은 에탄올 대조군 보다 높게 나타났다. GPT값을 측정해 본 결과, 그룹별 유의적 차이는 보이지 않았으나 정상대조군 (3393 mU/L)이 가장 낮고, 에탄올 대조군 (3930 mU/L)에서 증가하였고, 향신료 처리군들도 에탄올 처리군과 유사한 경향을 보여주었다.

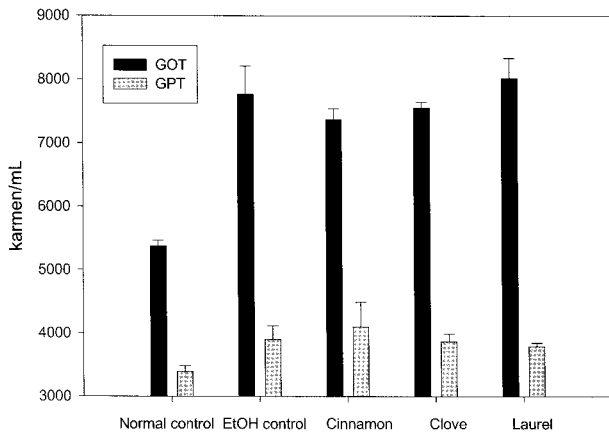


Fig. 4. Change of serum GOT and GPT level in zebrafish group, which was fed herb or spice

이는 에탄올의 장기 급여에 따라 혈청 GOT와 GPT의 상승으로 발생하는 에탄올 소비에 의한 간조직의 손상이 심각함을 의미하고, 향신료의 섭취로 개선될 수 있음을 시사한다 (Fig. 4).

간조직을 분쇄하여 PBS를 사용하여 동일 농도 (1.4 mg/mL)로 희석한 후, GOT와 GPT를 측정해본 결과 정상 대조군 (302 karmen/mL)과 에탄올 대조군 (318 karmen/mL)이 유사한 값을 보여주었고, 향신료 처리군에서도 cinnamon 처리군 (306 karmen/mL)과 laurel 처리군 (320 karmen/mL)이 대조군과 유사한 값을 보여주었다. 그러나 clove를 처리한 군에서 현저히 감소된 GOT 값을 보여주어 (254 karmen/mL), 에탄올 섭취에 따른 간조직의 염증 유발 억제에 가장 우수하였다.

지방간은 인간이 노화되면서 발생하는 빈도가 높은 질병으로 주기적인 모니터링과 관리가 필요 시 되고 있기 때문에 일반 식생활을 통하여 예방하는 것이 중요하다. 본 연구는 zebrafish 모델을 이용한 알코올성 지방간 형성에 향신료가 미치는 개선효과를 중점으로 두고 진행하였다. Cinnamon, clove, laurel을 각 군에 처리하여 얻어지는 결과에서 cinnamon과 clove가 지방간 억제에 가장 좋은 효과를 나타냄을 알 수 있었고, 이 결과는 cinnamon이 생쥐 모델에서 에탄올 유도된 급성 지방간 및 간경변에 대항하여 보호하는 효과가 있다고 밝혀진 선행 논문과도 잘 일치하여 (Kanuri et al., 2009), zebrafish를 이용한 본 연구에서도 다른 향신료를 처리한 군 보다 hepatic tissue의 정상적인 모습을 볼 수 있었으며 또한 이와 일치하는 생존 곡선과 FRAP 정량의 결과를 얻을 수 있었다. 이 결과는 zebrafish 모델이 항염증 항산화 모델로 사

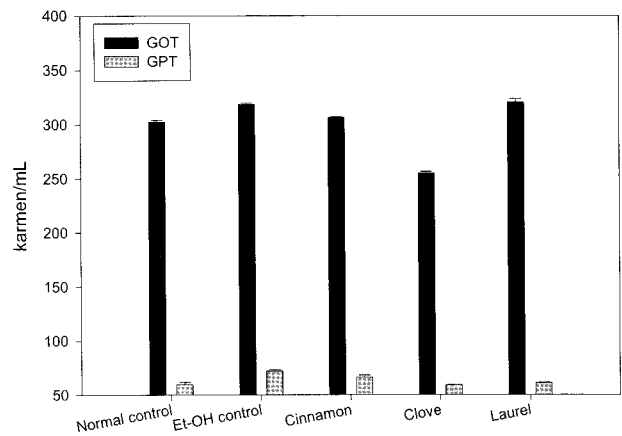


Fig. 5. Change of GOT and GPT level in homogenized hepatic tissue from zebrafish.

용될 수 있음을 보여준다.

본 연구결과는 cinnamon과 clove가 급성 에탄올 급여에 따른 지방간의 형성을 현저히 억제하여 강력한 항산화 효과와 간보호 효과가 우수하여 건강기능성 식품의 주요소재로 사용될 수 있다는 것을 시사한다.

Acknowledgments

This work was supported by the Korea Science and Engineering Foundation (KOSEF) through the Aging-associated Vascular Disease Research Center at Yeungnam University (R13-2005-005-01003-0 (2009)). We wish to thank to Jung Heun Park, Seo-Ri Jin, and Wookju Jang in Biochemistry Lab at Yeungnam University for their technical assistance.

REFERENCES

- Banerjee S, Panda CK, Das S. Clove (*Syzygium aromaticum* L.), a potential chemopreventive agent for lung cancer. *Carcinogenesis*. 2006. 27: 1645-1654.
- Benzie IF, Strain JJ. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Anal Biochem*. 1996. 239: 70-76.
- Betoni JE, Mantovani RP, Barbosa LN, Di Stasi LC, Fernandes A. Jr. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on *Staphylococcus aureus* diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006. 101: 387-390.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of

- protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976. 72: 248-254.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensm Wiss Technol.* 1995. 28: 25-30.
- Cai L, Wu CD. Compounds from *Syzygium aromaticum* possessing growth inhibitory activity against oral pathogens. *J Nat Prod.* 1996. 59: 987-990.
- Chae HB. Alcoholic Liver Disease. *Korean J Gastroenterol.* 2009. 53: 275-282.
- Das SK, Vasudevan DM. Alcohol-induced oxidative stress. *Life Sciences.* 2007. 81: 177-187.
- Ghelardini C, Galeotti N, Mannelli LDC, Mazzanti G, Bartolini A. Local anaesthetic activity of β -caryophyllene. *Farmaco.* 2001. 56: 387-389.
- Imparl-Radosevich J, Deas S, Polansky MM, Baedke DA, Ingebritsen TS, Anderson RA, Graves DJ. Regulation of PTP-1 and Insulin Receptor Kinase by Fractions from Cinnamon: Implications for Cinnamon Regulation of Insulin Signalling. *Horm Res.* 1998. 50: 177-182.
- Kaur J, Shalini S, Bansal MP. Influence of vitamin E on alcohol-induced changes in antioxidant defenses in mice liver. *Toxicol Mech Methods.* 2010. 20: 82-89
- Kanuri G, Weber S, Volynets V, Spruss A, Bischoff SC, Bergheim I. Cinnamon Extract Protects against Acute Alcohol-Induced Liver Steatosis in Mice. *J Nutr.* 2009. 139: 482-487.
- Kishi S, Slack BE, Uchiyama J, Zhdanova IV. Zebrafish as a Genetic Model in Biological and Behavioral Gerontology: Where Development Meets Aging in Vertebrates - A Mini-Review. *Gerontology.* 2009. 55: 430-441.
- Koopman R, Schaart G, Hesselink MK. Optimisation of oil red O staining permits combination with immunofluorescence and automated quantification of lipids. *Histochem Cell Biol.* 2001. 116: 63-68.
- Lee KG, Shibamoto T. Inhibition of malonaldehyde formation from blood plasma oxidation by aroma extract and aroma components isolated from clove and eucalyptus. *Food Chem Toxicol.* 2001. 39: 1199-1204.
- Nahas R, Moher M. Complementary and alternative medicine for the treatment of type 2 diabetes. *Can Fam Physician.* 2009. 55: 591-596.
- Panickar KS, Polansky MM, Anderson RA. Cinnamon polyphenols attenuate cell swelling and mitochondrial dysfunction following oxygen-glucose deprivation in glial cells. *Exp Neurol.* 2009. 216: 420-427.
- Passeri MJ, Cinaroglu A, Gao C, Sadler KC. Hepatic Steatosis in Response to Acute Alcohol Exposure in zebrafish Requires Sterol Regulatory Element Binding Protein Activation. *Hepatology.* 2009. 49: 443-452.
- Pawar VC, Thaker VS. In vitro efficacy of 75 essential oils against *Aspergillus niger*. *Mycoses.* 2006. 49: 316-323.
- Politeo O, Jukic M, Milos M. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Free Volatile Aglycones from Laurel (*Laurus nobilis* L.) Compared to Its Essential Oil. *CCACAA.* 2007. 80: 121-126.
- Reddy JK, Rao MS. Lipid metabolism and liver inflammation. II. Fatty liver disease and fatty acid oxidation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2006. 290: G852-G858.
- Reitman S, Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol.* 1957. 28: 56-63.
- Stoletov K, Fang L, Choi SH, Hartvigsen K, Hansen LF, Hall C, Pattison J, Juliano J, Miller ER, Almazan F, Crosier P, Witztum JL, Klemke RL, Miller YI. Vascular Lipid Accumulation, Lipoprotein Oxidation, and Macrophage Lipid Uptake in Hypercholesterolemic zebrafish. *Circ Res.* 2009. 104: 952-960.