

## 고지방 식이로 유도된 비만 흰쥐의 간에서 식이섬유와 녹차혼합물의 항산화 및 항염증 효과

김종대\* · 이병일\* · 전윤희\*\* · 박종필\*\* · 김해란\*\* · 임병우\*\*†

\*강원대학교 의료바이오신소재 융복합연구 사업단, \*\*건국대학교 의료생명대학 생명과학부

### Anti-Oxidative and Anti-Inflammatory Effects of Green Tea Mixture and Dietary Fiber on Liver of High Fat Diet-Induced Obese Rats

Jong Dai Kim\*, Byung Il Lee\*, Yun Hui Jeon\*\*, Jong Phil Bak\*\*, Hai Lan Jin\*\* and Beong Ou Lim\*\*†

\*The Regional Core Research Program/Medical & Bio-Material Research Center, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea.

\*\*Department of Applied Biochemistry, College of Biomedical & Health Science, Konkuk University, Chungju 380-701, Korea.

**ABSTRACT:** This study was conducted to investigate anti-oxidative and inflammatory inhibition effects of green tea and dietary fiber mixture on liver of high fat diet-induced obese rats. 21 male rats were divided into 3 dietary groups and control group (A), high fat diet-induced group (B), and high fat (HF) diet-induced + EQ diet-S<sup>®</sup> diet group (C). Immunoblotting and RT-PCR analysis revealed protein expression, and anti-oxidant analysis revealed MDA (malondialdehyde), GSH (glutathione), and free DPPH radical. As a results, Body weight and food consumption were not significantly different between groups. The levels of MDA and GSH were lower in HF + EQS<sup>®</sup> group than in HF group. Also, the EQS<sup>®</sup> demonstrated to be more effective than HF group for a DPPH radicals scavenging activities. In addition, protein and mRNA level of TNF- $\alpha$  in HF + EQS<sup>®</sup> group showed relatively more potent pro-inflammatory activity inhibition compared to HF group. These results suggest that green tea mixture (EQ diet-S<sup>®</sup>) provide positive effects on anti-oxidative and inflammatory inhibition effects on obese animal model or obesity related diseases.

**Key Words :** High Fat, Green tea, MDA, GSH, DPPH, TNF- $\alpha$

## 서 언

오늘날 현대 사회는 급속한 산업화, 자동차에 따라 편리함을 누리게 되었으나 이에 따른 환경 파괴와 스트레스 등에 의해 성인병 및 합병증 등이 나타나고 있다. 특히, 과다 영양 섭취 및 운동 부족 등에 의해 야기되는 비만증은 현대 사회의 심각한 병으로 대두되고 있다. 비만으로 인한 과체중은 섭취한 에너지 중 체내에서의 대사 활동으로 소비하고 남은 것이 지방조직에서 중성지방으로 전환되어 축적되어 발생하는데 일상생활에 지장을 초래하기도 하고, 동맥경화, 고혈압 및 당뇨병 등 여러 합병증의 발생이 최대 문제이다 (Kim *et al.*, 1986; Wald and Law, 1995; Chua *et al.*, 1997).

비만 억제를 위한 주된 노력은 체중 억제 효과를 갖는 약물과 보조 식품의 섭취에 초점이 맞춰져 있는 실정이다. 의약품

으로 복용하는 경우 부작용이 있을 수 있다는 점에서, 안전성이 있는 천연물 및 소재에 대한 개발이 계속해서 요구되어 오고 있다.

비만에 대한 선행연구 결과들에 의하면, 지질과산화물 형성을 촉진시켜 전체적으로 체내 항산화 시스템의 불균형에 이르는 과정과 밀접한 관련이 있다고 보고되고 있다 (Carantoni *et al.*, 1998; Hirai *et al.*, 2000; Hirashima *et al.*, 2000). 체내 산화스트레스 (oxidative stress)는 활성 산화물 (oxidants)과 항산화물질 (antioxidants) 간의 불균형을 초래하고, 생체에서 발생하는 free radical의 이차 생성물인 ROS (reactive oxygen species, 활성 산소종)가 세포막 투과성의 변화를 초래하여 DNA, 단백질, 탄수화물, 지질의 손상으로 이르게 된다 (Gutteridge *et al.*, 1994). 다중 불포화 지방산이나 체내 각종 지질성분은 활성 산소에 의한 지질 과산화로 인하여,

†Corresponding author: (Phone) +82-43-840-3570 (E-mail) beongou@kku.ac.kr

Received 2010 April 26 / 1st Revised 2010 May 24 / 2nd Revised 2010 June 4 / 3rd Revised 2010 July 26 / Accepted 2010 July 28

malondialdehyde (MDA)와 같은 지질과산화물로 전환되며, 활성 산소종의 증가는 항산화 효소 활성저하나 GSH 등의 항산화제 함량 감소를 초래함으로써 지질과산화 생성을 촉진시킨다 (Kim *et al.*, 1998; Lee *et al.*, 1999). 이렇게 생성되는 지질과산화물을 비롯한 여러 가지 체내 과산화물은 세포에 대한 산화적 파괴로 인해 각종 기능장애를 야기함으로써 노화, 동맥경화, 암 등 질병발생의 주요한 원인물질로 인식되고 있다 (Yobimoto *et al.*, 2000).

최근 녹차에 함유된 여러 성분들의 약리학적인 기작이 점차 밝혀지면서 차에 대한 가치가 재인식되고 있으며, 녹차에 있어서 주성분 중 하나인 catechin류 (epicatechin, epigallocatechin, epicatechingallate, epigallocatechingallate)의 혈압강화작용 (Hara *et al.*, 1987), 항산화작용 (Matsuzaki *et al.*, 1985), 항암활성 (Xu *et al.*, 1992; Hayatsu *et al.*, 1992; Sakagami *et al.*, 1992), 혈소판응집저해활성 (Yayabe *et al.*, 1989; Sagesaka-Mitane *et al.*, 1990) 등에 대해 다양한 생리활성이 연구되고 있다. Catechin 성분은 폴리페놀화합물로서 항산화작용과 프리라디칼 소거작용이 큰 물질로 구조적 특징과 항산화능이 관련이 있는 것으로 알려져 있다 (Macrae *et al.*, 1993). 또한 산화촉진제 (pro-oxidant) 효소의 억제를 통해 반응성 산소화합물 (ROS)의 생성을 감소시켜 암이나 심혈관질환과 같은 만성적인 질환의 발병을 감소시키는 강력한 항산화제의 역할을 하는 것으로 많이 연구되고 있다 (Hollman *et al.*, 1999; Row and Jin, 2006). 더불어 catechin 중 EGCG (epigallocatechin gallate)의 효과는 지방세포의 기능을 억제하거나 호르몬 자극에 의한 세포의 분열증식과 분화를 조절하여 지방조직을 조정하고 관련 효소 활성을 억제함으로써 항비만 효과를 나타낸다고 보고되었다 (Watanabe *et al.*, 1998; Erba *et al.*, 2005).

산화적 스트레스가 지방 축적과 밀접한 관계를 가짐으로 인해 지방조직의 leptin과 같은 아디포사이트카인 (adipocytokine)에 분비 이상을 초래하는 것으로 알려져 있다 (Furukawa *et al.*, 2004). 이 사이토카인은 지방대사, 항상성을 조절하는 여러 생리학적 효과를 가지는데 특히, TNF- $\alpha$ 와 같은 염증 반응 사이토카인은 지방조직에서 증가되는 산화적 스트레스와 관련되며, 직접적으로 에너지 대사에 영향을 주므로 여러 질병을 증가시키는 역할을 하는 것으로 나타났다 (Sowers *et al.*, 2003).

이상의 내용을 정리해 보면, 비만은 체지방 축적의 원인이 되며, 간의 글루코스 생성을 억제하게 되어 여러 질병 발생의 원인이 되기 때문에, 비만에서 비롯된 간 기능의 저하로 인하여 간 조직에서의 활성산소 생성 증가와 항산화 방어기전의 이상과 관련한 항산화 효소, 즉 CAT (catalase), SOD (superoxide dismutase), GPX (glutathion peroxidase), GRD (glutathion reductase) 등의 연구에 대해 시도가 많이 이루어지

고 있다. 이로 인하여 비만을 유도한 동물 모델의 간에서 항산화 체계에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다 (Oakes *et al.*, 1997; Yagi *et al.*, 1992). 또한, 항산화 효과를 가지고 있으며, 식품구성 성분의 생체조절기능에 대한 효과를 병행하는 방법으로 천연물이나 기능성 소재에서의 항산화제 개발에 집중이 이루어지고 있다 (Bailey *et al.*, 1989; Hikino *et al.*, 1988).

이에 본 연구에서는 항산화 효능을 가지고 있는 녹차에 식이섬유를 첨가시킨 Easy Quick diet-S<sup>®</sup>(EQS<sup>®</sup>)가 High fat 동물모델에서 항산화 효과 및 염증반응 cytokine 조절에 미치는 영향에 대해 알아보려고 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 재 료

실험에 사용된 녹차혼합물은 식이섬유가 함유된 건강기능식품 EQ diet-S<sup>®</sup> (Easy Quick diet-S, EQS<sup>®</sup>)로, 주된 영양소는 녹차 추출물, 식이섬유 (폴리덱스트로스), 비타민 C 이다. 녹차추출물에 더해 식이섬유와 비타민을 추가하여, 고지방 식이로 유도된 비만 흰쥐의 간에서 녹차성분의 항산화 및 항염증 활성 효과에 대해 연구하고자 녹차혼합물 (EQS<sup>®</sup>)을 사용하였으며 조성은 Table 1에 나타내었다.

### 2. 시 약

Trichloroacetic acid, acetic acid volumetric standard (0.1N solution in water), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), L-glutathione reduced는 Sigma사 제품을 이용했으며 sodium phosphate dibasic dodecahydrate (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O)는 Fluka사 제품을 potassium phosphate monobasic (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), sodium chloride (NaCl)는 Daejung사 제품을 TEP (1,1,3,3-tetraethoxypropane)는 Sigma사 제품을 malonaldehyde bis-(dimethyl acetal) 99%는 Aldrich사 제품을 4,6-diglydroxy-2-mercaptopyrimidine, 98%는 Lancaster사 제품을 각각 이용하였다.

**Table 1.** Formulation of EQS<sup>®</sup> (Easy Quick diet-S<sup>®</sup>).

Items	Compositon (%)	Weight (ml)
Green Tea (leaching)	0.560	1.568
Polydextrose (more than dietary fiber 85%)	2.600	7.280
Water solubility Hydroxy Citric Acid	0.001	0.003
Green tea incense	0.050	0.140
Plant Mixed extracts	0.010	0.028
Vitamin C	0.030	0.084
Sodium bicarbonate	0.025	0.070
Purified water	96.724	270.827
Total	100	280

**Table 2.** Diet composition.

Ingredients	AIN-93G	H-F
	(g/kg diet)	
Casein	200	200
Corn starch	397.5	393.4014
Dyetrose	132	132
Sucrose	100	100
Cellulose	50	50
Soybean oil	70	70
t-Butylhydroquinone	0.014	0.014
Salt mix	35	35
Vitamin mix	10	10
L-Cystine	3	3
Choline bitartrate	2.5	2.5
Garcinia cambogia extract	-	1.518
soy peptide	-	2.53
L-Carnitine	-	0.0506
Total (g)	1,000	1,000

**3. 동물 및 식이 및 비만 유발**

생후 4주령의 수컷 Sprague-Dawley rat을 동물 사육실 (실내온도 22 ± 2°C, 상대습도 55 ± 5%, 12 hour light-dark cycle)에서 일주일간 적응시킨 후 체중에 따라 난괴법 (randomized complete block design)으로 그룹당 7마리씩 무 첨가군 (control), 고지방 유도군(HF), 고지방 유도군에 녹차추출물 투여군(HF + EQS®)의 3군으로 분리하였다. 식이조성은 Table 2에 나타내었다. 녹차추출물의 투여는 일주일에 5회 (1일 2회) 경구로 4주간 투여하였다. 이는 한국인 표준 체중표를 참조 (20~29세의 여성(159 cm, 51.6 kg))하여 Rat의 체중 약 300 g에 대한 35 µg의 식이섬유를 투여하였다. 4주간 실험 종료 후 실험동물은 14시간 이상 절식 시킨 후 ether로 마취시키고 장기를 적출 하였다. 적출한 간 조직은 냉장 생리식염수로 세척하여 무게를 측정하고 액체질소에 급냉시킨 후 실험 전 까지 -70°C의 deep freezer에 보관하였다.

**4. MDA(malondialdehyde) 함량측정**

MDA (malondialdehyde)의 함량측정은 Ohkawa 등의 방법을 응용하여 실시하였다 (Ohkawa *et al.*, 1979). 간 조직을 sonicate homogenizer (60W with 0.5 second intervals for 1 min)를 이용하여 균질화한 뒤 균질액의 총 volume을 측정하였다. 조직 균질액 0.1 ml를 15 ml tube에 옮긴 뒤 8.1% SDS 0.2 ml, 30% acetic acid (pH 3.5) 1.5 ml, 0.8% TBA 1.5 ml 그리고 멸균 증류수 0.7 ml를 넣은 뒤, 잘 혼합하고 95°C에서 75분간 반응시킨 후 얼음에 5분 동안 넣고 식혔다. 0.9%의 차가운 NaCl 1 ml와 n-butanol 5 ml를 넣고 10분간

교반 후 15분간 원심분리 (3000 g, 4°C)하여 상층액 200 µl씩 취하여 96 well plate에 옮겨 담아 microplate reader (TECAN, Austria)를 이용하여 532 nm 에서 흡광도를 측정하였다. standard로는 TEP (1,1,3,3 tetraethoxypropane, Sigma-Aldrich Co.)를 사용하였다.

**5. GSH(Glutathione) 함량측정**

Glutathione의 함량측정은 Griffith의 방법을 응용하여 실시하였다 (Griffith *et al.*, 1980). 간 조직을 sonicate homogenizer (60W with 0.5 second intervals for 1 min)를 이용하여 균질화한 뒤 10분 동안 centrifuge (3000 g, 4°C)한 후 상층액의 총 volume을 측정하였다. 상층액 0.1 ml를 15 ml tube에 옮긴 뒤 0.3 M의 Phosphate buffer (pH 8.4) 2.0 ml, double distilled water (DW) 0.4 ml, 0.75 mM의 DTNB (5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)) 0.5 ml를 넣고 4분간 상온에서 반응 후 microplate reader (TECAN, Austria)를 이용하여 412 nm 에서 흡광도를 측정하였다.

**6. DPPH 함량측정**

항산화 활성은 DPPH법 (Brand *et al.*, 1995)을 응용하여 시료의 라디칼 소거능을 측정하였다. DPPH는 짙은 자주색을 나타내며 그 자체가 질소 중심의 라디칼로서, 라디칼 전자의 비 편재화에 의해 안정화된 상태로 존재한다. 메탄올에 용해된 DPPH는 517 nm에서 최대 흡광도를 나타내며 시료의 환원력에 의해서 시료 첨가와 함께 흡광도가 감소한다. 0.3 mM DPPH 에탄올 용액 1 ml에 표준시료로서 식이섬유를 함유한 EQS®를 첨가하여 에탄올로 3 ml 맞춘 후 microplate reader (TECAN, Austria)를 이용하여 517 nm 에서 최종농도 0.1 mM DPPH에 대한 흡광도의 감소를 측정하였다.

**7. Immunoblotting을 이용한 cytokines 측정**

간 조직 100 mg을 잘라 lysis buffer를 가한 후 혼합하여 4°C, 12000 rpm, 10분간 원심 분리하여 세포막 성분 등이 제거된 상층액을 새로운 1.5 ml tube로 옮겼다. 단백질 농도는 Bradford protein assay에 의해 정량하였다. 20~30 µg의 lysate를 12~15% mini gel SDS-PAGE로 변성 분리하여, PVDF membrane (Millipore Corporation, MA, USA)에 300 mA로 60분간 transfer 하였다. 그리고 membrane은 5% skim milk가 포함된 blocking buffer에 1시간 동안 antibody의 비 특이적 결합 (non-specific binding)을 억제 시킨 후, 1차 항체로 4°C에서 12시간 동안 반응시켰다. 1X TBS-T로 5분간 각각 6번 씻어내고, horseradish peroxidase가 결합된 2차 항체를 실온에서 1시간 반응시킨 후, 다시 1X TBS-T로 5분간 각각 6번 씻어내었다. 그 후, ECL kit에 반응시키고, 현상 및 분석하였다 (Burnette *et al.*, 1981).

8. RT-PCR을 이용한 TNF- $\alpha$  측정

RNA를 분리하기 위해 TRIZOL reagent (Invitrogen Life Technologies, USA)를 이용하여 total RNA를 분리하였다. RNA의 정량은 50배 희석한 후 UV/vis 분광광도계를 이용하여 260 nm 에서 흡광도를 측정하였다. RT-PCR premix (Bioneer, Korea)와 sense primer와 antisense primer (Bioneer, Korea), RNA, DEPC 처리된 증류수를 넣어 최종부피가 50  $\mu$ l 가 되도록 한 후 RT-PCR을 수행하였다. RT-PCR은 cDNA 합성; 42 $^{\circ}$ C, 60분, predenaturation; 95 $^{\circ}$ C, 5분, denaturation; 95 $^{\circ}$ C, 1분, annealing; 55~65 $^{\circ}$ C, 1분, elongation; 72 $^{\circ}$ C, 1분을 31 cycles 한 다음 인 0.5  $\mu$ g/ml 농도의 ethidium bromide (EtBr; Sigma Chemical Co, USA)이 포함된 1% agarose gel을 사용하여 50 volt에서 40분간 전기영동하여 UV에서 관찰하였다. TNF- $\alpha$ 의 유전자 증폭을 위하여 Forward primer: 5'GCGACGTGGAAGTGGCCAGAAG-3', Reverse primer: 5'-TCCATGCCGTTGGCCAGGAGG-3' (156 bp, Bioneer, Korea)를 사용하였다.

9. 통계학적 분석

본 연구의 실험결과는 mean  $\pm$  SD로 나타냈으며, 각 그룹간의 통계처리는 Duncan's multiple range test를 이용하였다.

결과 및 고찰

1. 체중 및 장기무게의 변화

식이 및 EQ diet-S<sup>®</sup>(EQD<sup>®</sup>) 섭취에 따른 흰쥐의 체중의 변화는 Table 3과 같다. 실험 시작하는 시점의 동물의 체중과 4 주후 실험 종료 시 동물을 희생하기 전 체중을 각각 측정하였다. Control군에 비하여 고지방 사료로 유도한 군의 (HF) 체중이 유의적으로 증가하였다. 이는 고지방 사료에 의한 비만 유도가 잘 되었음을 보여준다. 장기무게의 변화는 Table 4에 명시하였다. HF군에서는 증가하였다가 EQD<sup>®</sup>를 섭취한 군에서 control군 수준으로 감소하였다.

2. 지질과산화물 함량 변화

고지방으로 유도된 비만흰쥐의 산화적 스트레스로 인해 발생하는 산화물인 지질과산화물의 농도 변화를 알아보기 위해 EQS<sup>®</sup> 투여후 malondialdehyde (MDA)를 측정한 결과는 Fig. 1에 나타내었다. HF군은 MDA의 수치가 control군의 수치인 133.76  $\mu$ g/g보다 훨씬 높은 1294.0  $\mu$ g/g으로 급격하게 증가하였다. 이는 비만이 간세포의 산화적 스트레스를 유발함을 유추 할 수 있다. EQS<sup>®</sup>를 투여한 군은 HF에 비해 MDA 수치가 유의적으로 감소하였다. 하지만 HF로 유도하지 않은 control군 수준으로 지질과산화물이 떨어지지 않았다. 이러한 현상은 실험기간이 짧아서 생긴 결과로 사료된다. 이 결과로

Table 3. Body weight values in HF and HF + EQS<sup>®</sup> treated rat.

	Body Weight (g)	
	Initial	Final
Control	113 $\pm$ 8.75 <sup>c</sup>	278.5 $\pm$ 21.5 <sup>c*</sup>
HF	118 $\pm$ 5.00 <sup>b</sup>	426.6 $\pm$ 44.6 <sup>a</sup>
HF + EQS <sup>®</sup>	120 $\pm$ 5.00 <sup>a</sup>	412.0 $\pm$ 42.0 <sup>b</sup>

\*Values are the means  $\pm$  SD (n = 7). Those with different superscript letters are significantly at p < 0.05.

<sup>†</sup>Control: normal diet group, HF: high fat diet induced group, HF + EQS<sup>®</sup>: high fat diet induced + EQ diet-S<sup>®</sup> diet group

Table 4. Organ weight values in HF and HF + EQS<sup>®</sup> treated rat.

	Organs weight (g)	
	Liver	Spleen
Control	06.72 $\pm$ 2.42 <sup>bc</sup>	0.29 $\pm$ 0.14 <sup>c*</sup>
HF	07.55 $\pm$ 5.15 <sup>a</sup>	0.41 $\pm$ 0.23 <sup>a</sup>
HF + EQS <sup>®</sup>	06.93 $\pm$ 3.24 <sup>b</sup>	0.37 $\pm$ 0.22 <sup>b</sup>

\*Values are the means  $\pm$  SD (n = 7). Those with different superscript letters are significantly at p < 0.05.

<sup>†</sup>Control: normal diet group, HF: high fat diet induced group, HF + EQS<sup>®</sup>: high fat diet induced + EQ diet-S<sup>®</sup> diet group

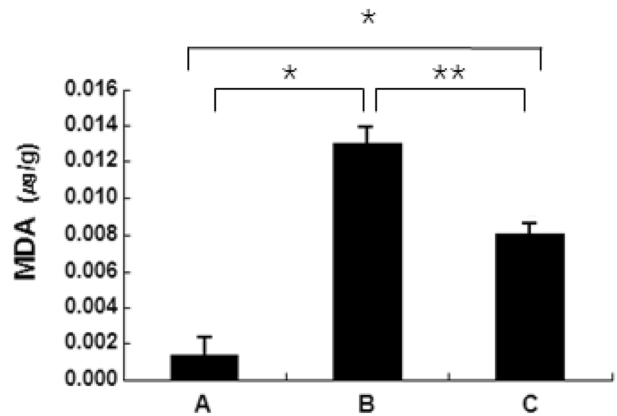
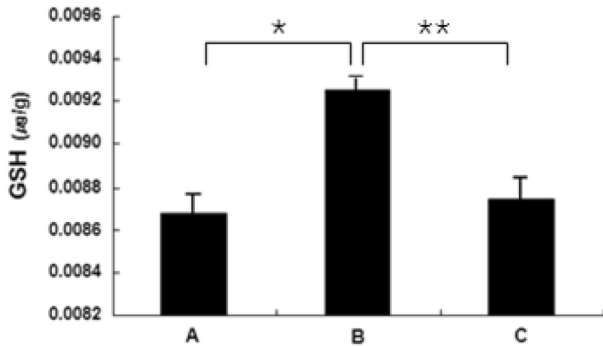


Fig. 1. Effects of EQS<sup>®</sup> on lipid peroxide contents in the liver .

<sup>†</sup>The values are the mean  $\pm$  SD (n = 7 for each group). (A) Normal diet group, (B) High Fat (HF) diet induced group, (C) High Fat(HF) diet induced + EQ diet-S<sup>®</sup> diet group. <sup>†</sup>Significantly different from the normal diet group and the HF diet induced group at p < 0.05.

EQS<sup>®</sup>의 섭취가 비만으로 유도된 MDA 수치를 감소시키는데 효능이 있음을 시사한다. 지질과산화는 활성산소 매개체가 세포 자체의 국소적인 방어 작용을 초과함으로써 발생하는 세포 손상의 주된 형태로서, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH<sup>-</sup> 등이 지질과산화를 유발시키며 (Fridovich *et al.*, 1986), SOD, CAT 등 산소 라디칼을 제거하는 효소 활성이 증가하면 지질 과산화가 결국 감소된다. 세포막의 인지질은 free radical의 공격에 의하여 oxygen centered lipid peroxy radical을 거쳐 carbon centered



**Fig. 2. Effects of EQS<sup>®</sup> on glutathion contents in the liver.** \*The values are the mean  $\pm$  SD (n = 7 for each group). (A) Normal diet group, (B) High Fat(HF) diet induced group, (C) High Fat(HF) diet induced + EQ diet-S<sup>®</sup> diet group. †Significantly different from the normal diet group and the HF diet induced group at p < 0.05.

lipid endoperoxide로 된 후 분해되어 malondialdehyde (MDA)를 생성하므로 지질과산화의 정도를 측정하는 지표가 된다. Fig. 1에서와 같이 HF+EQS<sup>®</sup>군에서 MDA의 수치가 낮아진 것으로 보아 EQS<sup>®</sup>의 투여로 인해 간 조직내 지질과산화물의 생성을 감소시켜 세포 손상으로부터 보호될 것으로 사료된다.

### 3. Glutathione (GSH)의 함량 변화

고지방으로 유도된 비만흰쥐의 EQS<sup>®</sup> 섭취에 의한 농도 변화를 알아보기 위해 GSH 활성을 측정한 결과는 Fig. 2에 나타내었다. Control군에 비해 HF군에서 GSH의 농도가 증가하였다. 또한, EQS<sup>®</sup>를 섭취한 HF군은 대조군과 유사한 수준으로 감소하였다. 이는 비만이 유도되면 간 조직에 산화적 스트레스가 발생하며, 이러한 스트레스를 중화하기 위하여 GSH의 농도가 증가하는 것으로 사료된다. EQS<sup>®</sup>가 비만으로 인한 산화적 스트레스를 감소시킴으로써 GSH의 농도를 감소시키는 것으로 사료된다. Glutathione은  $\gamma$ -glutamylcystine synthetase와 GSH synthetase에 의해 cysteine과 glutamate로부터 합성된 tripeptide로서 (Kimball *et al.*, 1976), 여러 세포의 endogenous, exogenous 화합물의 해독에 관여하는 물질이다. 또한 GSH는 활성산소의 scavenger로서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 및 과산화지질을 대사시키는 GPX의 기질로 세포내 항산화제 중에서 가장 중요한 역할을 담당하고 있는데, 생체내에서 GSH의 결핍은 지질과산화 반응을 촉진시킨다 (Vendemiale *et al.*, 1989). GSH의 thiol기에 포함하여 해독화한 후 (Parke *et al.*, 1993), 단백질이나 DNA 합성,  $\gamma$ -glutamyl amino acid 등과 같은 물질의 이동, 효소 활성의 조정 및 활성 산소나 유리기에 의한 세포 손상 예방 등 생물학적으로 중요한 여러 반응에 관여한다 (Meister *et al.*, 1983). EQS<sup>®</sup>군이 HF군에 비해 GSH의 활성량이 현저히 감소된 것으로 보아 EQS<sup>®</sup>의 섭취가 GSH를 감소시키는데 효능이 있음을 확인할 수 있다.

**Table 5.** The effect of experimental high fat diets on food intake.

	Food intake (g)
Control	36.11 $\pm$ 10.48 <sup>a</sup>
HF	43.95 $\pm$ 20.61 <sup>a</sup>
HF + EQS <sup>®</sup>	42.95 $\pm$ 15.62 <sup>ab</sup>

\*Values are the means  $\pm$  SD (n = 7). Those with different superscript letters are significantly at p < 0.05.

†Control: normal diet group, HF: high fat diet induced group, HF + EQS<sup>®</sup>: high fat diet induced + EQ diet-S<sup>®</sup> diet group

**Table 6.** DPPH free radical scavenging activity of EQ diet-S<sup>®</sup>.

	EGCG	Catechin	Vit. C	EQD
SC <sub>50</sub> (mg/L)	2.5	4.2	3.9	12.2
( $\mu$ M)	5.5	14	22	

†amount required for 50% reduction of DPPH.

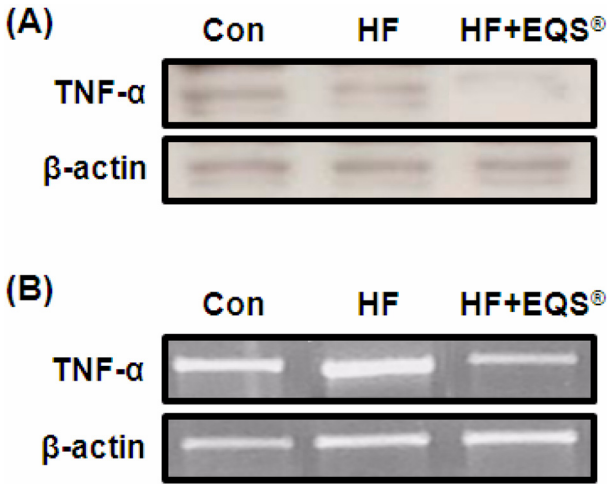
‡EGCG: epigallocatechin gallate, EQD: EQ diet-S<sup>®</sup>

### 4. 자유 라디칼 소거능 변화

전자공여능 (EDA; electron donating abilities)을 측정하기 위하여 자유라디칼인 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)를 사용한 항산화 활성 측정방법을 이용하였다 (Xiong *et al.*, 1996; Brand *et al.*, 1995). 고지방으로 유도된 비만흰쥐에서 EQS<sup>®</sup>의 항산화 활성을 EGCG (Epigallocatechin gallate), 카테킨, 비타민 C와 비교하여 Table 6에 나타냈다. DPPH에 대해 흡광도를 50% 감소시키는데 필요한 항산화 물질의 농도 (SC<sub>50</sub>)로 표현하였다. EGCG가 5.5  $\mu$ M로 가장 낮고 catechin이 14  $\mu$ M, 비타민 C가 22  $\mu$ M로서 가장 높는데, 중량으로 나타내었을 경우 분자량의 차이로 인해 EGCG, catechin, 비타민 C가 각각 2.5 mg/L, 4.2 mg/L, 3.9 mg/L로 나타났다. 식이섭유를 함유한 EQS<sup>®</sup>의 SC<sub>50</sub> 값을 이들 순수 항산화 물질과 비교하는 경우 12.2 mg/L로서 가장 낮은 항산화 활성을 보였으나, 단일물질이 아닌 복합 추출물로 보았을 때 상당히 좋은 활성을 보여준다. 따라서 EQS<sup>®</sup>가 DPPH에 미치는 Table 6의 결과로 보아 항산화 활성에 효능이 있음을 확인할 수 있었다. 또한 DPPH가 앞서 살펴본 지질 과산화물과 자유 라디칼간의 상관관계로 미루어 EQS<sup>®</sup>는 비만으로 유도된 산화적 스트레스를 효과적으로 제어한다.

### 5. Pro-inflammatory cytokine 생성 억제 효과

TNF- $\alpha$ 와 같은 pro-inflammatory cytokine은 정상 조직에서 발현될 뿐만 아니라 병변 과정에서 그 발현 정도가 증가되며, 암 촉진 과정에서 일어나는 염증에 중요한 역할을 한다 (Pociot *et al.*, 1993). 또한 신호전달계도 활성화시켜 세포사멸을 유도하며 다른 cytokine의 발현 세포분열, 세포분화 등 광범위한 생리기능을 유도하는 중요한 cytokine이다 (Benjamini



**Fig. 3. Expression of TNF- $\alpha$  protein by western blotting in the liver** (n = 7 for each group). TNF- $\alpha$  protein level in the liver was determined using the Western blot analysis (A). TNF- $\alpha$  mRNA level in the liver was determined using the RT-PCR (B). Actin was used as an internal control. Control: Normal diet group, HF: High Fat(HF) diet induced group, HF + EQS<sup>®</sup>: High Fat(HF) diet induced + EQ diet-S<sup>®</sup> diet group.

and Leskowitz, 1991). 이러한 cytokine들은 인체의 지방조직에서 분비되어 지방대사, 항상성, 에너지 균형 및 인슐린 저항성을 조절하는 여러 생리학적 효과도 가지며 직접적으로 에너지 대사에 영향을 미친다 (Fasshauer *et al.*, 2002; Hulver *et al.*, 2002). 최근 비만을 만성적인 염증상태로 간주하고 있는 연구로 미루어 가장 중요한 pro-inflammatory cytokine의 하나인 tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) protein의 발현을 immunoblotting analysis와 RT-PCR 방법으로 확인하였다. 간조직에서, TNF- $\alpha$  protein의 발현율은 HF군에서 높게 나타났으며, HF+EQS<sup>®</sup> 군에서는 TNF- $\alpha$  protein의 발현이 낮게 나타났다 (Fig. 3). TNF- $\alpha$ 는 염증 작용에 관여하는 중요한 cytokine으로 활성화된 대식세포 및 다른 여러 세포에서 생성되는데 이는 중앙세포에 영향을 미치는 숙주 방어인자 및 염증 매개물질로 알려져 있다. 따라서 EQS<sup>®</sup>는 TNF- $\alpha$  protein의 발현을 억제하고 이로 인해 산화적 스트레스로부터 발생한 염증을 억제하는 역할을 한다.

본 연구에서는 고지방 식이로 유도된 비만 흰쥐에서 녹차추출물의 항산화 및 항염 효과에 대해서 알아보았다. 위의 결과들은 종합해 볼 때 EQS<sup>®</sup>의 비만으로부터 발생하는 산화적 스트레스에 대해 매우 의미 있는 항산화 효능을 확인하였다. 이는 향후 EQS<sup>®</sup>가 비만에 의해 발생하는 질환과 간에서 지질과산화, 자유 라디칼 소거능 및 관련 cytokine과 연관된 항산화 관련 질환의 예방 및 치료에 긍정적인 적용이 가능할 것으로 사료된다.

### 감사의 글

본 과제는 2010년 교육과학기술부로부터 지원받아 수행된 연구 (지역거점연구단육성사업/의료·바이오신소재융복합연구사업단)와 건국대학교 의료생명대학 일반대학원 응용생명과학과 두뇌한국사업팀의 지원에 의해 사업으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### LITERATURE CITED

Bailey CJ and Day C. (1989). Traditional plant medicines as treatments for diabetes. *Diabetes Care*. 12:553-564.

Benjamini E and Leskowitz S. (1991). *Immunology: a short course*. 2nd edition. Wiley-Blackwell, New York. pp. 186-188.

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

Burnette WN. (1981). Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Analytical Biochemistry*. 112:195-203.

Carantoni M, Abbasi F, Warmerdam F, Klebanov M, Wang PW, Chen YDI, Azhar S and Reaven GM. (1998). Relationship between insulin resistance and partially oxidized LDL particles in healthy, nondiabetic volunteers. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology*. 18:762-767.

Chua S and Leibel RL. (1996). Obesity genes: molecular and metabolic mechanisms. *Diabetes Reviews Journal*. 5:2-7.

Erba D, Riso P, Bordoni A, Foti P, Biagi PL and Testolin G. (2005). Effectiveness of moderate green tea consumption on antioxidative status and plasma lipid profile in humans. *The Journal of Nutritional Biochemistry*. 16:144-149.

Fasshauer M, Klein J, Neumann S, Eszlinger M and Pashke R. (2002). Hormonal regulation of adiponectin, gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 290:1084-1089.

Fridovich I. (1986). Superoxide dismutases. *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology*. 58:61-97.

Furukawa S, Fujita T, Shimabukuro M, Iwaki M, Yamada Y, Nakajima Y, Nakayama O, Makishima M, Matsuda M and Shimomura I. (2004). Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *The Journal of Clinical Investigation*. 114:1752-1761.

Griffith OW. (1980). Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Analytical Biochemistry*. 106:207-212.

Gutteridge JMC and Halliwell B. (1994). *Antioxidants in Nutrition, Health, and Disease*. Oxford University Press.

Hara Y, Matsuzaki T and Suzuki T. (1987). Angiotensin I converting enzyme inhibiting activity of tea components. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*. 61:803-808.

Hayatsu H, Inada N, Kakotani T, Arimoto S, Negishi T, Mori K, Okuta T and Sakata I. (1992). Suppression of genotoxicity of carcinogens by (-)-epigallocatechin gallate. *Preventive*

- Medicine. 21:370-376.
- Hikino H, Takahashi M, Oshima Y and Konno C.** (1988). Isolation and hypoglycemic activity of oryzabrans A, B, C and D glycan of *Oryza sativa* bran. *Planta Medica*. 54:1-3.
- Hirai N, Kawano H, Hirashima O, Motoyama T, Moriyama Y, Sakamoto T, Kugiyama K, Ogawa H, Nakao K and Yasue H.** (2000). Insulin resistance and endothelial dysfunction in smokers: effects of vitamin C. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. 279:1172-1178.
- Hirashima O, Kawano H, Motoyama T, Hirai N, Ohgushi M, Kugiyama K, Ogawa H and Yasue H.** (2000). Improvement of endothelial function and insulin sensitivity with vitamin C in patients with coronary spastic angina: possible role of reactive oxygen species. *Journal of the American College of Cardiology*. 35:1860-1866.
- Hollman PCH, Feskens EJ and Katan MB.** (1999). Tea flavonols in cardiovascular disease and cancer epidemiology. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 220:198-202.
- Hulver MW, Zheng D, Tanner CJ, Houmard JA, Kraus WE, Slentz CA, Shina MK, Pories WJ, Macdonald KG and Dohm GL.** (2002). Adiponectin is not altered with exercise training despite enhanced insulin action. *American Journal of Physiology Endocrinol Metabolism*. 283:861-865.
- Jin HH, Yang JL, Chung JH and Kim YH.** (2004). Hypocholesterolemic effects of green tea in cholesterol-fed rats. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 33:47-51.
- Kim DY and Chang JC.** (1998). Radioprotective effect of ginseng components on antioxidant enzymes, glutathion and lipid peroxidation of liver  $\gamma$ -irradiated mice. *Journal of Ginseng Research*. 22:1-10.
- Kim SI, Kim YS, Jeon BS and Lim CH.** (1986). Effect of ginseng on fat accumulation in the obese rats induced by high fat diet. *Korea Journal of Ginseng Science*. 10:167-179.
- Kimball RE, Reddy K, Peirce TH, Schwartz LW, Mustafa MG and Cross CE.** (1976). Oxygen toxicity: augmentation of antioxidant defense mechanisms in rat lung. *American Journal of Physiology*. 230:1425-1431.
- Lee HJ, Kim DY and Chang JC.** (1999). Antioxidant effects of Korean red ginseng components on the antioxidant enzymes activity and lipid peroxidation in the liver of mouse treated with paraquat. *Journal of Ginseng Research*. 23:182-189.
- Macrae R, Tobinson RK and Sadler MJ.** (1993). Tea. *In Encyclopedia of food science, food technology and nutrition*. Academic Press, UK. pp. 4521-4542.
- Matsuzaki T and Hara Y.** (1985). Antioxidative activity of tea leaf catechins. *Journal of Agricultural Chemical Society of Japan*. 59:129-134.
- Meister A and Anderson ME.** (1983). Glutathione. *Annual Review of Biochemistry*. 52:711-760.
- Oakes NDM, Cooney GJ, Camilleri S, Chisholm DJ and Kraegen EW.** (1997). Mechanism of liver and muscle insulin resistance induced by chronic high fat feeding. *Diabetes*. 46:1768-1774.
- Ohkawa H, Ohishi N and Yagi K.** (1979). Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*. 95:351-358.
- Parke DV.** (1993). The importance of diet and nutrition in the detoxification of chemicals. *In food, nutrition and chemical toxicity*. Smith Gordon & Co. London. pp. 1-15.
- Pociot F, Briant L and Jongeneel CV.** (1993). Association of tumor necrosis factor (TNF) and class major histocompatibility complex alleles with the secretion of TNF- $\alpha$  and TNF- $\beta$  by human mononuclear cells: a possible link to insulin-dependent diabetes mellitus. *European Journal of Immunology*. 23:224-231.
- Row KH and Jin Y.** (2006). Recovery of catechin compounds from korean tea by extraction. *Bioresource Technology*. 97:790-793.
- Sagesaka-Mitane Y, Miwa M and Okada S.** (1990). Platelet aggregation inhibitors in hot water extract of green tea. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*. 38:790-793.
- Sakagami H, Asano K, Hara Y and Shimamura T.** (1992). Stimulation of human monocyte and polymorphonuclear cell Iodination and interleukin-1 production by epigallocatechin gallate. *Journal of Leukocyte Biology*. 51:478-483.
- Sowers JR.** (2003). Obesity as a cardiovascular risk factor. *The American Journal of Medicine*. 8:37-41.
- Vendemiale G, Altomare E, Grattagliano I and Albano O.** (1989). Increased plasma levels of glutathione and malondialdehyde after acute ethanol ingestion in humans. *Journal of Hepatology*. 9:359-365.
- Wald NJ and Law MR.** (1995). Serum cholesterol and ischaemic heart disease. *Atherosclerosis*. 118:11-15.
- Watanabe J, Kawabata J and Niki R.** (1998). Isolation and identification of acetyl-CoA carboxylase inhibitors from green tea (*Camellia sinensis*). *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 62:532-534.
- Xiong Q, Kadota S, Tani T and Namba T.** (1996). Antioxidative effect of phenylethanoids from *Cistanche deserticola*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 19:1580-1585.
- Xu Y, Ho CT, Amin SG, Han C and Chung FL.** (1992). Inhibition of tobacco-specific nitrosamine-induced lung tumorigenesis in A/J mice by green tea and its major polyphenol as antioxidants. *Cancer Research*. 52:3875-3879.
- Yagi K.** (1992). Lipid peroxide and exercise. *Medicine Sport Science*. 2:40-42.
- Yayabe F, Kinugasa H and Takeo T.** (1989). A simple preparative chromatographic separation of green tea catechins. *Nippon Nogeikagaku Kaishi*. 63:845-845.
- Yobimoto K, Matsumoto K, Huong N, Kasai R, Yamasaki K and Watanabe H.** (2000). Suppressive effects of vietnamese ginseng saponin and its major component majonoside-R2 on psychological stress-induced enhancement of lipid peroxidation in the mouse brain. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 66:661-665.