

고지방식이 섭취 마우스의 간 조직의 지질 축적에 대한 밀순 추출물의 억제 효과

이선희¹ · 임성원¹ · 이영미² · 서주원³ · 김대기^{1*}

¹전북대학교 의과대학 및 의과학연구소, ²원광대학교 약학대학 한약학과 및 원광한약연구소,
³명지대학교 자연과학대학 생명과학정보학부 및 농생명바이오식의약소재개발사업단

Inhibitory Effects of *Triticum aestivum* L. Extracts on Liver Lipid Accumulation in High Fat-Fed Mice

Sun Hee Lee¹, Sung-Won Lim¹, Young-Mi Lee², Joo-Won Seo³ and Dae-Ki Kim^{1*}

¹Department of Immunology and Institute of Medical Science, Chonbuk National University Medical School, Jeonju, Jeonbuk, 561-756, Korea

²Department of Oriental Pharmacy, College of Pharmacy and Wonkwang-Oriental Medicines Research Institute, Wonkwang University, Iksan, Jeonbuk, 570-749, Korea

³Division of Bioscience and Bioinformatics, College of Natural Science and Research Center for Bio Food and Drug Materials, Myongji University, Yongin, Gyeonggi-Do, 449-728, Korea

Abstract – Fatty liver disease refers to a range of disorders associated with fatty liver, which occur in excessive eating, evident infection or significant consumption of alcohol. This study was to investigate the effects of water and ethanol extracts of *Triticum aestivum* young leaf on lipid metabolism and accumulation in liver of mice fed with high-fat diet. Male C57BL/6 mice were divided into normal diet group, high fat diet (HFD) group, high fat diet group administrated with 200 mg/kg/day of *T. aestivum* water extract (HFD-TAWE) and high-fat group administrated with 200 mg/kg/day of *T. aestivum* ethanol extract (HFD-TAEE). TAWE and TAEE were administrated orally for 5 weeks once at the same time point. Both TAWE and TAEE significantly reduced body weight, food intake and liver tissue weight, which were augmented in high fat-fed mice. The serum levels of triglyceride, total and LDL-cholesterol also were significantly attenuated in both HFD-TAWE and HFD-TAEE groups compared to the HFD group. Moreover, administration of HFD-TAWE or HFD-TAEE reduced the lipid accumulation in liver tissue of mice fed with high fat diet. Levels of total lipids and triglyceride in liver tissues also was significantly reduced in HFD-TAWE and HFD-TAEE groups compared to HFD group. The activities of serum ALT and AST revealed in HFD group were remarkably decreased in HFD-TAEE groups. These results indicate that both water and ethanol extract of *T. aestivum* may improve the lipid accumulation in liver as well as lipid metabolism in serum, and that in particular, the ethanol extract of *T. aestivum* may has the potent anti-hyperlipidemic effect, suggesting that it may be a useful candidate for the therapy preventing fatty liver diseases.

Key words – *Triticum aestivum*. hepatosteatosis, cholesterol, triglyceride, high-fat diet

최근 경제적 풍요와 식생활의 서구화로 인해 고혈압, 당뇨, 비만, 고지혈증, 관상동맥질환, 및 지방간증 등의 생활 습관병이 증가하고 있으며, 이로 인해 사람들의 삶의 질이 떨어지고 합병증으로 인한 사망률이 증가하면서 사회적인 이슈가 되고 있다. 우리나라 간질환은 중장년층의 사망원인

2위가 될 정도로 심각하다. 특히 스트레스로 인한 음주 및 과도한 에너지 섭취 등이 늘어나면서 나타나는 간질환이 간경변 및 간암으로 발전하여 사망하는 경우가 많다. 일반적으로 지방 및 콜레스테롤 함유 식품의 과다 섭취는 간 조직의 지질대사 이상을 초래하여 지질 침착을 일으켜 간비대를 유발시키는 것으로 알려져 있다.^{1,2)} 또한 제2형 당뇨병 등의 대사성질환에서도 빈발하며, 지방간이 있는 사람의 대부분은 생활에 큰 영향을 미치지 않지만 고혈압, 제2당뇨병,

*교신저자(E-mail): daekim@jbnu.ac.kr
(Tel): +82-63-270-3080

고지방혈증, 고인슐린증과 같은 위험질환이 동반되면 지방간증(hepatostaeosis)으로 진행한다고 보고되었다.³⁾ 또한 인슐린저항성 당뇨병과 고인슐린혈증과는 연관성이 적은 독립적인 병인으로 밝혀지면서 최근에는 대사성질환의 한 요소로 분류하려는 추세이다.⁴⁾

지방간증은 간 기능 이상의 가장 대표적인 원인으로 알코올성 지방간(alcoholic hepatostaeosis, ASH)과 비알코올성 지방간(nonalcoholic hepatostaeosis, NASH)으로 구분된다.⁵⁾ 알코올성 지방간은 알코올이 직접적인 원인으로 만성 과다음주자의 대부분은 지방간증 소견을 보이며 장기간 방치하면 단순한 지방증과 달리 섬유화 단계를 거쳐 간경변증으로 진행할 수 있는 중간 단계의 진행성 병변이라고 할 수 있다. 알코올성 지방간증은 알코올을 차단하면 바로 상태가 호전되므로 특별한 치료가 필요하지는 않다.⁶⁾ 비만, 당뇨, 고지혈증 등의 대사증후군과 연관성이 있는 비알코올성 지방간증은 대부분 과다한 지방섭취에 의해 체내에서 대사되지 못하고 간 및 지방 조직에 축적이 주된 원인이며, 일부는 유전 및 환경적 원인에 기인한 복합 대사성질환으로 나타난다.⁷⁾ 지방간의 병인은 대사이상으로 야기되는 고인슐린혈증에 의해 간 및 지방조직으로 유리지방산의 이동을 증가시키고 지방축적이 초래된다. 이 과정에서 산화적 스트레스를 유발하며 이에 노출된 간 조직에서는 염증반응 및 조직손상이 일어난다고 알려져 있다.⁸⁾ 또한 간 조직 세포와 복부 지방세포와의 상호작용의 이상으로 정상적인 인슐린 신호 전달체계가 손상되고 결국은 지방간염을 유발하여 대사이상 및 면역학적 손상으로 이어진다고 보고되었다.⁹⁾

지방간증의 건강상 위험에 대한 관심이 높아지고 있음에도 불구하고 효과적인 치료법은 미비하며, 특별한 치료제가 없는 실정이다. 일반적으로 체중감량, 운동요법, 식이요법 등을 통한 생활습관 개선과 선택적으로 인슐린 감수성 개선제, 항산화제 고지혈증 치료 약물의 복용을 권장하고 있다. 하지만 이들을 장기복용 할 경우 부작용이 있어 효과적인 치료법이 아니며 현재 이상적인 치료약물은 없는 실정이다.¹⁰⁾ 따라서 전통적인 한방 및 민간요법과 식이섭유가 다량 함유된 새싹들을 이용하여 지방간 및 고지혈증을 개선하고자 하는 많은 관심을 보이고 있다.

밀(*Triticum aestivum* Lamarck: TA)은 화본과 식물로 세계적으로 생산량 1위를 유지하는 작물이다. 최근 기능성 식품에 관심이 높아지면서 밀을 소재로 하여 다양한 기능성 제품을 개발하고자 하는 추세이다. 서양에서는 밀순을 wheetglass라는 명칭으로 분말 또는 착즙하여 영양부족 및 성인병 등의 건강 기능성보조식품으로 많이 이용되고 있다.¹¹⁾ 밀순에는 밀 낱알에 없는 비타민, 미네랄 등의 영양소가 풍부하며,¹²⁾ 항산화작용이 있는 클로로필의 함유하여 위장관의 기능을 향상시키는 효과가 보고되었다.¹³⁾ 또한 밀순즙은 암세포의 사멸시키는 항암작용,¹⁴⁾ 발암성물질의 억제작용,¹⁵⁾

항염작용¹⁶⁾ 및 혈당저하작용¹⁷⁾ 등의 약리학적 효능이 보고되었다. 그러나 우리나라에서는 밀순에 대한 연구가 미진한 상태이다.

본 연구자는 선행연구로서 streptozotocin(STZ)으로 유도한 제1형 당뇨 마우스모델에게 밀순 물 추출물을 투여하여 혈당 및 체중개선을 보고한 바 있다.¹⁸⁾ 또한 식욕조절호르몬 leptin이 결여된 돌연변이 개체이며 비만, 인슐린저항성 당뇨병, 고인슐린혈증 등 제 2형 당뇨병의 임상적 특징을 갖는 C57BL/6J *ob/ob*마우스에서¹⁹⁾ 밀순 물 추출물이 혈당과 인슐린 저항성에 대한 개선효과는 미약하여 기대에 미치지 못하는 결과를 보였지만 혈중지질 대사를 개선하는 효과를 보고하였다.²⁰⁾ 하지만 간조직의 지질 대사 및 축적에 대한 밀순의 효과는 보고된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는 밀순 물 추출물과 에탄올 추출물을 제조하고, 고지방식이 마우스에게 제공하여 유발되는 비만 및 지방간증 동물에게 추출물을 경구투여 하여 혈액중의 지질 수준 및 간조직의 지질 축적에 밀순 추출물의 개선효과를 비교 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

추출물 제조 - 본 실험에 사용된 밀순은 국립식량과학원에서 공급받은 밀품종 금강밀(*Triticum aestivum* Lamarck: TA)을 수정 우리밀농원(Gyeonggi-do, Korea)에서 온실의 평균 온도를 20±2°C로 유지하며 무균 유기농 밭이용 피트머스 위에서 밭아시켜 2주간 재배하여 수확하였다. 밀순은 동결건조하고 곱게 분쇄하였다. 밀순 추출물을 제조하고자 500 ml 정제수 및 500 ml 에탄올에 동결건조분말 50 g을 각각 넣고 실온에서 30분 간격으로 2회 초음파 추출하고, 이를 Whatmann paper filter로 여과하여 용매와 잔류물을 분리하고, 잔류물을 다시 동일한 방법으로 추출물을 얻어 초기 추출물과 합하여 회전감압 농축기(EYELA사, Tokyo, Japan)에서 감압농축 하였다. 농축된 추출물을 동결 건조기에서 완전히 건조하고 물 추출물(TAWE)과 에탄올 추출물(TAEE)을 얻었다. 각각의 추출물을 생리식염수에 적정농도로 희석하여 동물실험에 사용하였다.

실험동물 사육 - C57BL/6J계 6주령의 수컷 마우스를 (주)샘타코(Gyeonggi-do, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 실험동물은 전북대학교 동물 사육실에서 온도 22±2°C, 상대습도 50±10%, 12시간 명암주기의 조건에서 사육하였으며, 7일의 환경적응 후 체중 측정 및 육안적 건강 상태를 확인하여 적합한 마우스들을 선별하여 실험에 사용하였다. 간지방증을 유도하기 위해서 마우스에 제공한 사료는 Research Diets사(New Brunswick, NJ)의 지방 45%를 함유하는 고지방식이 사료(D12451)를 중앙실험동물 통하여 구입하였으며 실험동물에게 6주간 물과 함께 자유롭게 섭취하게 하였다.

한편 대조군으로 정상식이 사료를 동일한 방법으로 제공하였다. 실험군은 정상식이 대조군 (ND), 고지방식이 대조군 (HFD), 고지방식이+밀순 물 추출물 투여군(HFD-TAWE), 및 고지방식이+밀순 에탄올 추출물 투여군(HFD-TAEE) 등의 4개로 나누고 난괴법에 준하여 마우스 분리하여 사육하였다. 고지방식이를 제공하는 마우스에 TAWE 또는 TAEE를 생리식염수에 현탁 하여 하루 200 mg/kg 용량으로 1회 동일한 시간에 경구로 5주간 투여하였다. 실험 대조군들은 생리식염수를 동일한 방법으로 투여하고 추출물 투여군과 비교 조사하였다. 본 연구의 동물실험은 전북대학교 동물실험 윤리 위원회에서 승인 하에 윤리규정을 준수하며 실시하였다.

체중 및 식이섭취량 측정 - 실험동물을 식이섭취량은 1주에 3회, 체중은 주1회 측정하였다. 각 실험군의 체중 증가율은 실험기간동안 1주일 간격으로 일정시간에 측정하였으며, 최종 체중에서 실험개시전의 체중을 감하여 실험개시전의 체중으로 나누어 산출하였고, 에너지섭취량은 체중 증가량을 동일사육기간의 식이섭취량으로 나누어 구하였다.

혈액 및 조직시료채취 - 실험동물은 시험 종료일에 에테르로 흡입마취한 후 주사기(21G)를 이용하여 심장에서 혈액을 채취하여 안락사 시키고 혈액을 1,900×g에서 20분간 원심 분리하여 혈청을 분리하여 혈청지질 함량 및 효소활성 측정용 시료로 사용하였다. 한편 간 조직을 적출하여 0.9% 생리식염수로 남아있는 혈액을 행구고 여지로 수분을 제거한 후 중량을 측정하였으며, 간 조직 시료들의 일부는 조직염색을 위해 포르말린용액에 고정하고, 나머지는 조직 내 지질 분석을 위한 시료로 사용 전까지 액체질소에 급속 동결하여 -70°C의 deep freezer에서 보관하였다.

혈중 및 간 조직내의 지질함량 측정 - 중성지질(Triglycerides) 및 총콜레스테롤(Total cholesterol)함량은 혈액에서 혈청을 분리하여 (주)아산제약 (Seoul, Korea)에서 구입한 각각의 효소분석 Kit들을 사용하여 제공된 프로토콜에 따라 550 nm에서 흡광도를 측정하여 산출하였다. HDL-콜레스테롤 함량을 측정하기 위해 혈청에 2% dextran sulfate 용액

과 1M의 MgCl₂ 용액 (1:1, v/v)을 가하여 원심분리 후 그 상층액을 시료로 표준효소법에 의해 kit(Asan., Korea)를 사용하여 500 nm에서 흡광도를 측정하여 산출하였다. 혈중 LDL-콜레스테롤 함량은 Friedewald식²¹⁾에 의하여 계산하였다. 간 조직중의 총지질 함량은 Folch 등의 방법²²⁾에 준하여 클로로포름 : 메탄올 (2:1, v/v) 혼합액으로 지질을 추출한 후 총지질함량은 Frings와 Dunn의 방법²³⁾으로 측정하였으며, 중성지질 함량은 혈청에서 분석 방법과 동일하게 분석하였다.

혈중 ALT 및 AST활성 측정 - 간의 손상정도를 측정하기 위하여 아미노산전이효소인 ALT와 AST 활성은 (주)아산제약에서 구입한 효소법에 의한 정량용 kit를 이용하여 측정하였다.

간조직의 현미경 관찰 - 마우스로부터 조직을 적출하여 즉시 10% formalin 용액에 고정시킨 후 PBS로 세척하였다. 파라핀 블록을 제작한 후 절편기를 사용하여 5 μm두께로 잘라 조직절편을 제작하였다. 조직절편을 xylene으로 탈파라핀화 과정을 거쳐 파라핀을 제거하고 hematoxylin & eosin (Sigma)시액으로 핵과 세포질을 염색하여 광학현미경(200x)에서 각 실험군들의 조직을 형태학적으로 관찰하였다.

통계처리 - 모든 실험결과는 SPSS 통계 package(Version 10.0)를 이용하여 평균치와 표준편차를 산출하였고 p < 0.05 수준에서 Duncan's multiple range test를 사용하여 실험군 평균치간의 유의성을 검정 하였다.

결과 및 고찰

체중 및 식이섭취량에서 추출물의 효과 - 고지방식이 섭취를 통해 유도되는 비만 마우스 실험모델에서 체중, 식이섭취량 및 에너지섭취량 증가에 밀순 물 추출물(TAWE) 또는 에탄올 추출물(TAEE)이 미치는 영향을 조사하고자 추출물들을 마우스에 5주간 1일 1회 200 mg/kg씩 경구투여하여 그 변화를 측정하였다(Table I). 고지방식이 투여 개시 전 평균 체중은 20.63 g이었으며 일반식이와 고지방식이를

Table I. Effect of *Triticum aestivum* extracts on body weight, food intake and energy intake in mice²⁾

Variables	Groups ¹⁾			
	ND	HFD	HFD-TAWE	HFD-TAEE
Initial (g)	20.92±1.26	20.71±1.12	20.33±0.97	20.55±1.02
Final (g)	26.63±1.33 ^a	38.32±3.41 ^b	34.25±2.13 ^c	29.72±2.34 ^c
Weight gain (g)	5.71±1.32 ^a	17.61±2.01 ^b	13.92±2.54 ^c	9.17±2.26 ^b
Food intake (g/day)	3.10±0.53 ^a	4.25±0.67 ^b	3.32±0.56 ^a	3.00±0.57 ^a
Energy intake (kcal/day)	11.94±2.94 ^a	22.07±3.24 ^b	17.36±3.04 ^c	15.12±3.10 ^c

¹⁾ND, normal diet group; HFD, high fat diet group; HFD-TAWE, HFD+*T. aestivum* water extract group; HFD-TAEE, *T. aestivum* ethanol extract group.

²⁾Values are mean±SE (n=7). Values with different letters in a column are significantly different at p<0.05.

5주간의 제공한 후 최종 체중증가량은 정상식이 대조군(ND)은 27.3%이며, 고지방식이 대조군(HFD)은 85.0%으로 고지방식이군에서 3배 이상 체중 증가량을 보였다. 한편 HFD+TAWE 투여군에서는 68.5%, HFD+TAEE 투여군에서는 44.6%의 체중 증가를 보였다. 고지방식이 대조군 대비 체중증가 억제율을 비교하면 TAWE 투여군은 10.6%, TA에탄올 추출물은 22.4%의 억제 효과를 보였다. 특히 TAWE 투여에 의한 체중감소에 비하여 TAEE 투여군에서 체중감소 효과가 유의하게 2배 이상 높았다. 체중 증가에 밀접한 관련이 있는 각 실험군들의 1일 식이 섭취량을 비교한 결과 정상식이대조군에서 3.10 ± 0.53 g/day이고, 고지방식이군에서 4.25 ± 0.67 g/day으로 식이섭취량이 증가하였다. 그러나 TAWE 투여군은 3.32 ± 0.56 g/day, TAEE 투여군은 3.00 ± 0.57 g/day로 고지방식이군에서 비하여 추출물 투여 그룹에서 식이섭취량이 유의적으로 감소하였다. 그러나 TAWE 투여군과 TAEE 투여군 간의 유의적인 큰 차이를 보이지 않았다. 각 실험군들의 식이섭취량에서 산출된 에너지 섭취량 역시 식이섭취량과 동일한 결과를 나타냈다. 이와 같이 밀순 에탄올 추출물 및 물 추출물을 투여할 경우 고지방 식이에 의해 야기되는 높은 식이 섭취량이 유의적으로 감소되고 이로써 체중 증가가 유의적으로 억제되는 것으로 확인하였으며, 특히 밀순 에탄올 추출물이 체중감소 및 식이 섭취량 감소에 훨씬 효과적인 것으로 사료된다.

혈중 지질에서 추출물의 효과 - 혈중 지질은 각종 지방 조직의 구성성분으로써 생체 에너지 저장에 관여하며 비만일 경우 중성지질과 총콜레스테롤함량이 증가된다. 반면에 말초 조직으로부터 콜레스테롤을 간으로 운반하여 혈중 콜레스테롤을 제거하는 작용을 하는 HDL-콜레스테롤의 농도가 감소되어 동맥경화증의 위험성이 높아지게 된다.²⁴⁾ 따라서 고지방식을 제공한 마우스에 TAWE 및 TAEE의 투여가 중성지질, 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 등의 혈중 지질 함량에 미치는 영향을 조사하고자 각 실험군의 혈청을 분리하여 분석하였다(Table II). 고지방 식이에 의해 야기되는 대표적인 혈중 중성지질 함량은 정상식이군에서 122.72 ± 12.31 mg/dl, 고지방식이군에서 191.04 ± 12.94 mg/dl로 고지방식이 섭취한 경우 혈중 중성지질 함

량이 55.7% 증가하였다. HFD+TAWE 투여군에서는 167.50 ± 14.24 mg/dl, HFD+TAEE 투여군에서는 142.35 ± 10.31 mg/dl로 고지방 식이로 인한 증가된 혈중 중성지질 함량이 유의적으로 감소하였다. 혈중 총콜레스테롤 함량은 고지방식에 의해서 151.32 ± 9.83 mg/dl로 증가하지만 HFD+TAWE 투여군과 HFD+TAEE 투여군에서는 128.32 ± 7.22 mg/dl과 125.94 ± 5.63 mg/dl로 고지방식에 의해 증가된 혈중 총콜레스테롤 수준이 유의적으로 감소하였다. 또한 혈중 LDL-콜레스테롤 함량도 총콜레스테롤 수준과 비례하여 고지방식에 의해 증가하였으며, TAWE 투여군과 TAEE 투여군에서 유의적으로 감소하였다. 한편 혈중 HDL-콜레스테롤 함량은 정상식이 대조군과 비교할 경우 고지방식이 대조군에서 유의하게 감소하는 경향을 보였고, TAWE 투여군과 TAEE 투여군에서는 정상식이군의 수준으로 혈중 HDL-콜레스테롤 함량이 유의하게 증가하였다. 이상의 결과로부터 고지방식에 의해 야기되는 혈중 지질 함량이 TAEE 및 TAWE 투여에 의해 억제되며, 혈중 HDL-콜레스테롤 수준이 개선되는 효과가 있음을 확인하였다. 그러나 TAEE과 TAWE 투여군을 비교하면 혈중 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤 수준에는 유의적인 차이가 없었지만, 혈중 중성지질함량이 TAEE 투여군에서 억제효과가 유의하게 증가하였다. 포화지방산 및 탄수화물의 과다 섭취는 혈중지질 수준을 증가시킨다고 보고 되었으며,²⁵⁾ 최근 한국인 30세 이상의 성인의 경우 탄수화물과 포화지방산의 과다 섭취로 인하여 고지혈증 환자가 증가는 추세이다. 고지혈증 환자 중 고중성지방혈증의 유병률이 17.4%로 중성지방혈증이 더욱 문제가 되고 있으며,²⁶⁾ 혈중 총 콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤 수준 상승은 심혈관계 질환의 위험인자로 밝혀짐에 따라 고지혈증 환자에서 혈중 LDL-콜레스테롤을 감소시키는 치료가 강조되고 있다.²⁷⁾ 따라서 상기 결과로부터 밀순 에탄올 추출물이 고지혈증 환자의 혈중 지질 수준을 개선하는데 매우 효과적인 것으로 사료된다.

간조직의 형태학적 변화에 미치는 효과 - 비만식이 섭취에서 동반되는 간 크기와 무게의 증가는 간조직의 지방축적에 기인한다. 따라서 각 실험군의 간 조직에서 파라핀 절편을 제작하여 Hematoxylin & Eosin 시액으로 조직염색을

Table II. Effect of *Triticum aestivum* extracts on serum lipid contents in mice²⁾

Factors (mg/dl)	Groups ¹⁾			
	ND	HFD	HFD-TAWE	HFD-TAEE
Triglyceride	122.72 ± 12.31^a	191.04 ± 12.94^b	167.50 ± 14.24^a	142.35 ± 10.31^c
Total cholesterol	114.06 ± 6.62^a	151.32 ± 9.83^b	128.32 ± 7.22^a	125.94 ± 5.63^a
HDL-cholesterol	37.65 ± 4.26^a	28.36 ± 3.76^b	34.65 ± 4.86^a	35.76 ± 4.18^a
LDL-cholesterol	51.83 ± 5.74^a	84.87 ± 7.68^b	60.26 ± 8.38^a	61.76 ± 6.17^a

¹⁾Groups are the same as in Table I.

²⁾Values are mean \pm SE (n=7). Values with different letters in a column are significantly different at p<0.05.

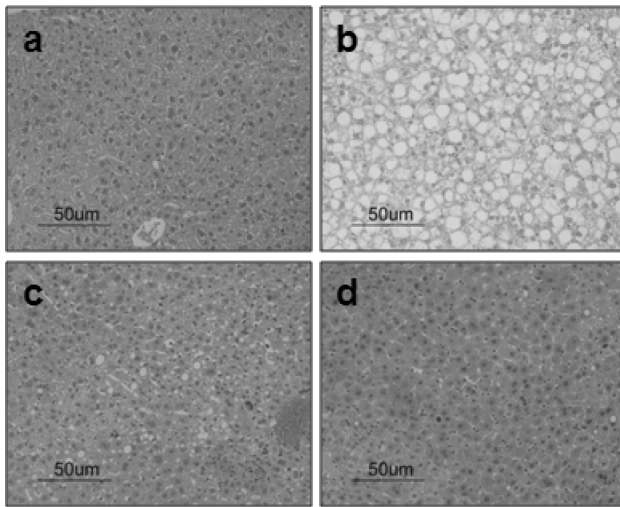


Fig. 1. Effect of *Triticum aestivum* extracts on lipid accumulation in liver tissues of mice fed with high fat diet by histological assess(200x). Liver tissue was stained with hematoxylin/eosin reagent. a) normal diet group, b) high fat diet (HFD) group, c) HFD+*T. aestivum* water extract group; d) HFD+*T. aestivum* ethanol extract group.

실시하였다. 정상식이군과 고지방식이군으로부터 적출한 간 조직의 형태를 관찰하면 정상식이군에서는 전체적으로 균일한 진한 선홍색을 나타내지만, 고지방식이군에서는 간의 부피와 무게가 증가하였으며 전체적으로 옅은 분홍색에 황색 및 백색의 지방들이 침착된 전형적인 지방간 현상을 보였다. 또한 간조직을 파라핀절편으로 제작하여 Hematoxylin & Eosin 시액으로 염색하여 관찰하면 Fig. 1에서와 같이 정상식이군은 간세포가 균일하고 지방공포가 전혀 보이지 않았지만, 고지방식이 대조군의 간 조직에서는 세포질에 크고 작은 지방축적으로 인해 간세포질의 지방 공포가 많이 출현 하였으며 간세포 내 지방 축적의 흔적이 뚜렷하게 관찰되었다(Fig. 1b). 한편 HFD+TAWЕ 투여군에서는 지방축적이 현저히 감소했지만 작은 지방공포가 부분적으로 관찰되었다(Fig. 1c). 반면 HFD+TAEЕ 투여군에서는 간 조직의 지방침착이 뚜렷하게 억제 되었으며, 지방침착이 정상식이군과 유사한 수준으로 개선시키는 효과를 보였다(Fig. 1d). 이상의 결과로 밀순 에탄올 추출물이 고지방식이로 유도되는 지방간증의 개선에 효과적인 기능성소재로 가치가 높을 것으로 사료된다.

혈청 ALT 및 AST 함량에서 추출물의 효과 - ALT(alanine aminotransferase) 및 AST(aspartate aminotransferase)는 간세포에서 다량 존재하는 효소로 간 손상 시 세포외로 다량 유출되어 혈액에 증가됨으로써 간 손상의 지표로 이용되는 효소라고 알려져 있다.²⁸⁾ 고지방식이를 제공한 마우스의 간기능 이상에 대한 TAWЕ 및 TAEЕ의 영향을 조사하고자 간조직 손상의 지표로 이용되는 효소인 혈청중의 ALT 및 AST

Table III. Effects of *Triticum aestivum* extracts on serum alanine transaminase (ALT) and aspartate transaminase (AST) activity in high fat-fed mice²⁾

Groups ¹⁾	ALT(IU/L)	AST(IU/L)	AST/ALT ratio
ND	45.54±7.87 ^a	109.12±10.66 ^a	2.39±0.36
HFD	57.47±9.82 ^b	138.61±18.32 ^b	2.41±0.39
HFD-TAWЕ	53.61±6.61 ^b	127.36±13.11 ^b	2.37±0.32
HFD-TAEЕ	48.38±9.61 ^a	112.85±15.14 ^a	2.33±0.35

¹⁾Groups are the same as in Table I.

²⁾Values are mean±SE (n=7). Values with different letters in a column are significantly different at p<0.05.

활성도를 측정하였다(Table III). 지방간 현상을 보인 고지방식이에서 ALT 및 AST 활성이 각각 57.47±9.82 IU/L와 138.61±18.32 IU/L 로 유의적으로 높은 수치를 보였으며, HFD-TAWЕ 투여군은 각각 53.61±6.61 IU/L와 127.36±13.11 IU/L로 고지방식이군에 비해 낮아졌으나 유의적인 차이를 보이지 않았다. HFD-TAEЕ 투여군의 ALT활성은 48.38±9.61 IU/L이었고 AST활성은 112.85±15.14 IU/L로 정상식이군의 효소 활성수준으로 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. ALT는 거의 전적으로 간세포 내에만 있는 반면, AST는 간세포 외에 적혈구나 뇌, 신장, 근육세포 등 신체 다른 부위에도 있기 때문에 ALT가 보다 더 간질환을 반영한다고 할 수 있다. 알코올에 의한 간 손상 시에는 ALT보다 AST가 더 많이 상승하고, AST와 ALT의 비율이 2가 넘으면 알코올성 간질환을 더욱 의심할 수 있다. 마우스 경우 사람의 정상범위 수치와 다르기 때문에 AST, ALT 수치보다는 AST와 ALT의 비율로 간 건강상태를 암시할 수 있다.²⁸⁾ 이를 토대로 AST와 ALT의 비율에서 정상대조군과 비교하면 모든 실험군에서 유의적인 차이는 보이지 않았다. 이상의 결과로 고지방식이로 야기된 간기능 손상이 밀순 에탄올 추출물이 효과적으로 개선할 수 있을 것으로 사료된다.

간 조직내 지질 함량에서 추출물의 효과 - 고지방식이를 공급한 마우스의 간 조직 지방축적 증가에 대하여 TAWЕ 또는 TAEЕ 억제효과를 조사하고자 간 중량, 간조직중의 총지질 및 중성지질 함량을 분석하였다. Table IV에서 보인바와 같이 정상식이군에서 간 중량이 1.20±0.34 g이었지만 고지방 식이에 의해 2.65±0.45 g로 2.2배 증가하였다. 반면에 HFD+TAWЕ 투여군과 HFD+TAEЕ 투여군에서 간 중량은 고지방식이 대조군에 비하여 각각 38%, 50%의 간 중량이 감소율을 보였다. 한편 간 조직내의 총지질, 중성지질 함량이 정상식이군에 비해서 고지방식이군에서 각각 약186.7%, 115.1% 유의적으로 증가하였으며, 한편 HFD+TAWЕ 투여군에서 정상식이군 대비 총지질이 27.7%, 중성지방이 31.4% 증가하였으며, HFD+TAEЕ 투여군에서는 총지질이 9.9%, 중성지질이 8.5% 증가하였다. 이상의 결과로 TAWЕ와

Table IV. Effect of *Triticum aestivum* extracts on liver weights and lipid contents in high fat-fed mice²⁾

Factors	Groups ¹⁾			
	ND	HFD	HFD-TAWE	HFD-TAEE
Liver weight (g)	1.20±0.34 ^a	2.65±0.45 ^b	1.64±0.21 ^a	1.31±0.34 ^a
Total lipid (mg/g)	62.14±3.14 ^a	178.21±12.07 ^b	79.35±4.45 ^a	68.34±3.14 ^a
Triglyceride (mg/g)	31.45±2.10 ^a	67.66±3.11 ^b	41.32±2.20 ^a	34.14±2.65 ^a

¹⁾Groups are the same as in Table I.

²⁾Values are mean±SE (n=7). Values with different letters in a column are significantly different at p<0.05.

TAEE 모두 간조직의 총지질 및 중성지질 수준을 유의하게 저하시키는 효과가 있었으며, 특히 밀순 에탄올 추출물은 고지방식이 의존적 간조직의 지질 축적을 정상대조군 수준으로 억제하는 뛰어난 효과가 있는 것으로 사료된다. 밀순 물 추출물의 지질대사 개선 효과는 밀순에 함유된 수용성 식이섬유 β -glucan에 의해 나타날 것으로 예측된다. 수용성 β -glucan은 β -glycosyl unit가 β -(1→3)결합과 β -(1→4)결합으로 연결된 가지 없는 선형사슬로서 단백질 혹은 기타 세포벽 성분과 결합하여 분자구조와 크기가 다양하며²⁹⁾ 점성이 높고 인체의 소화기관에서 쉽게 분해되지 않고 콜레스테롤 수치를 저하시키는 등의 인체건강에 유용한 생리적 작용이 있다고 알려져 있다.³⁰⁾ 선행연구에서 밀순 물 추출물에 수용성 β -glucan이 함유되고 있음을 보고하였으며,³¹⁾ 본 실험과 유사한 결과로써 Yang 등은 보리순 물 추출물을 고지방식이를 제공한 마우스의 혈중 지질 및 간조직의 지방 침착을 억제한다고 보고하였다.³²⁾ 하지만 밀순 에탄올 추출물에서 간조직의 지방축적 억제효과를 향상시키는 효과는 폴리페놀 또는 플라보노이드 등의 생리활성물질들이 관여할 것으로 추측된다. 식물체의 폴리페놀화합물은 고지방식이 비만모델에서 혈중 지질 및 간 조직 지질축적을 억제시킨다고 보고되었다.³³⁻³⁵⁾ 본 연구자는 선행연구에서 총플라보노이드와 총폴리페놀 분석을 통하여 밀순에 이들이 함유되어 있는 것을 확인하였다.¹⁸⁾ 하지만 지질대사를 향상시키고 지방축적을 억제하는 생리활성물질에 대한 연구는 밀순에서 보고된 바가 없다. 따라서 이들을 분리 정제하여 구조 규명과 지질합성 및 분해에 관련된 효소의 mRNA와 protein 발현수준을 확인하여 기전을 밝히고자 연구를 진행할 계획이다.

결 론

본 연구는 고지방식이를 공급한 마우스에서 간조직의 지질축적에 미치는 밀순의 물 추출물과 에탄올 추출물의 영향을 규명하고자 정상식이를 급여한 정상대조군, 고지방식이대조군(HFD), 고지방-밀순 물 추출물 투여군(HFD-TAWE) 및 고지방-밀순 에탄올 추출물 투여군(HFD-TAEE)으로 4개 실험군으로 나누어 5주간 사육하고 지질함량을 분석하였다.

고지방식이를 공급한 대조군과 비교하여 HFD-TAWE 투여군과 HFD-TAEE 투여군에서 체중 및 식이섭취량이 유의적으로 감소하였으며, 혈중 중성지질, 총콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 수준을 유의적으로 저하시켰다. 그러나 HFD-TAEE 투여군과 HFD-TAWE 투여군을 비교하면 혈중 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤 수준을 개선하는 효과는 서로 유의적인 차이가 없었지만, 체중 및 혈중 중성지질 수준의 감소효과는 밀순 에탄올 추출물에서 유의하게 2배 높았다. 고지방식이에 유도된 간조직에서 지질 축적량상과 지질 함량을 비교한 결과 HFD-TAWE 투여군에서는 간조직에 작은 지방공포가 부분적으로 관찰되었지만 지방 축적이 현저히 감소했으며, 고지방식이대조군과 비교해서 간 중량은 38%, 총지질 및 중성지질 함량은 각각 55.5%, 38.9%의 유의적인 감소를 보였다. 한편 HFD-TAEE 투여군에서는 간조직에 지방공포가 전혀 관찰되지 않았으며, 고지방식이대조군과 비교해서 간 중량은 50.6%, 총지질 및 중성지질 함량은 각각 61.6%, 49.5%의 유의적인 감소를 보였다. 이와 같이 밀순 물 추출물과 밀순 에탄올 추출물 모두에서 간조직의 지질 침착도를 유의하게 억제하는 효과를 보였으며, 특히 밀순 에탄올 추출물에서 보다 증가된 지질 침착을 억제효과가 보였다. 또한 간손상 지표 ALT 및 AST 효소활성을 TAEE 투여군에서 유의적으로 억제하였지만 AST와 ALT의 비율로서 비교하면 모든 실험군에서 유의적인 차이는 보이지 않았다. 본 연구 결과를 종합하면 밀순 물 추출물과 밀순 에탄올 추출물 모두 고지혈증 및 간 조직 지질 침착을 개선하는 효과가 있는 것으로 나타났다. 일반적으로 고지혈증 및 간지방증 환자의 경우 심각한 지질축적과 동반되는 대사성 질환의 합병증으로 효과적인 치료요법이 요구된다. 또한 비알콜성 지방간 환자의 경우 현재 효과적인 치료제가 없기 때문에 밀순 물 추출물 및 밀순 에탄올 추출물은 간지방증 환자를 치료 또는 치료보조제로써 유용한 후보물질이 될 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 농촌진흥청 차세대 바이오그린21사업(과제번호: PJ0080932011)의 지원에 의해 수행되었음.

인용문헌

1. Choi, M. S., Lee, M. K., Jung, U. J., Kim, H. J., Do, G. M., Park, Y. B. and Jeon, S. M. (2009) Metabolic response of soy pinitol on lipid-lowering, antioxidant and hepatoprotective action in hamsters fed-high cholesterol diet. *Mol. Nutr. Food Res.* **53**: 751-759.
2. Cha, J. Y., Cho, Y. S. and Kim, D. J. (2001) Effect of chicory extract on the lipid metabolism and oxidative stress in rats. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **30**: 1220-1226.
3. Clark, J. M., Brancati, F. I. and Diehl, A. M. (2002) Non-alcoholic fatty liver disease. *Gastroenterology* **122**: 1649-1657.
4. Cortez-Pinto, H., Camilo, M. E., Baptista, A., De Oliveira, A. G. and De Moura, M. C. (1999) Non-alcoholic fatty liver: another feature of the metabolic syndrome? *Clin. Nutr.* **18**: 353-358.
5. Ludwig, J., Viggiano, T. R. and McGill, D. B. (1980) Non-alcoholic steatohepatitis: Mayo Clinic experiences with a hitherto unnamed disease. *Mayo Clin. Proc.* **55**: 434-438.
6. Marchesini, G., Bugianesi, E., Forlani, G., Cerrelli, F., Lenzi, M. and Manini, R. (2003) Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. *Hepatology* **37**: 917-923.
7. Day, C. P. and James, O. F. (1998) Steatohepatitis: a tale of two "hit"? *Gastroenterology* **114**: 842-845.
8. Schaffler, A., Scholmerich, J. and Buchler, C. (2005) Mechanism of disease: adipocytokines and visceral adipose tissue emerging role in nonalcoholic fatty liver disease. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.* **2**: 273-280.
9. Delgado, J. S. (2008) Evolving trends in nonalcoholic fatty liver disease. *Eur. J. Int. Med.* **19**: 75-82.
10. Park, S. H. (2008) Nonalcoholic steatohepatitis: Pathogenesis and treatment. *Kor. J. Hepatol.* **14**: 12-27.
11. Hanninen, O., Rauma, A. L., Kaartinen, K. and Nenonen, M. (1999) Vegan diet in physiological health promotion. *Acta Physiol. Hung.* **86**: 171-180.
12. Nagaoka, H. (2005) Treatment of germinated wheat to increase levels of GABA and IP6 catalyzed by endogenous enzymes. *Biotechnol. Prog.* **21**: 405-410.
13. Ben-Arye, E., Goldin, E., Wengrower, D., Stamper, A., Kohn, R. and Berry, E. (2002) Wheat grass juice in the treatment of active distal ulcerative colitis: a randomized double blind placebo-controlled trial. *Scand. J. Gastroenterol.* **37**: 444-449.
14. Bonfili, L., Amici, M., Cecarini, V., Cuccioloni, M., Tacconi, R., Angeletti, M., Fioretti, E., Keller, J. N. and Eleuteri, A. M. (2009) Wheat sprout extract-induced apoptosis in human cancer cells by proteasomes modulation. *Biochimie.* **91**: 1131-1144.
15. Tudek, B., Peryt, B., Miłoszewska, J., Szymczyk, T., Przybyszewska, M. and Janik, P. (1998) The effect of wheat sprout extract on benzo(a)pyrene and 7,2-dimethylbenz(a)anthracene activity. *Neoplasma* **35**: 515-523.
16. Watzl, B. (2008) Anti-inflammatory effects of plant-based foods and of their constituents. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* **78**: 293-298.
17. Eddouks, M., Maghrani, M. and Michel, J. B. (2005) Hypoglycaemic effect of *Triticum repens* P. Beauv. in normal and diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* **102**: 228-232.
18. Lee, S. H., Lee, Y. M., Lee, H. S. and Kim, D. K. (2009) Anti-oxidative and anti-hyperglycemia effect of *Triticum aestivum* wheat sprout water extracts on the streptozotocin-induced diabetic mice. *Kor. J. Pharmacogn.* **40**: 408-414.
19. Lindström, P. (2007) The physiology of obese-hyperglycemic mice [ob/ob mice]. *Sci. World J.* **7**: 666-685.
20. Lee, S. H., Lim, S. W., Lee, Y. M., Lee, H. S. and Kim, D. K. (2011) Administration of *Triticum aestivum* sprout Water Extracts regulate the level of Blood Glucose and Lipid in Leptin Deficient ob/ob Mice. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **40**: 401-408.
21. Friedewald, W., Levy, R. and Fredrickson, D. (1972) Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem.* **18**: 499-502.
22. Folch, J., Mee, L. and Stanley, G. S. H. (1975) A simple method for the isolation and purification of total lipid from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**: 497-509.
23. Frings, C. S. and Dunn, R. T. (1970) A colorimetric method for determination of total serum lipids based on the sulfo-phospho-vanillin reaction. *Am. J. Clin. Pathol.* **53**: 89-91.
24. Hong, H. S., Ryu, H. K. and Kim, W. Y. (2008) The association of plasma HDL-Cholesterol level with cardiovascular disease related factors on Korean type 2 diabetic patients. *J. Kor. Diabet.* **32**: 215-223.
25. Rim, J. C. K. and Kang, S. A. (2001) Effect of high fat and high carbohydrate diet on serum leptin and lipids concentration in rats. *Kor. J. Nutr.* **34**: 123-131.
26. Ministry of Health and Social Affairs. (2008) 2008 national health and nutrition survey: overview. Ministry of health and Welfare, Seoul, Korea. 272-275.
27. National Cholesterol Education Program Expert Panel. (2002) Third Report of the National Cholesterol Education Program Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report. *Circulation* **106**: 3143-3421.
28. Friedman, S. F., Martin, P. and Munoz, J. S. (2003) Laboratory evaluation of the patient with liver disease. *Hepatology, a textbook of liver disease*. Philadelphia; Saunders publication **1**: 661-709.
29. Burkus, Z. and Temelli, F. (1998) Effect of extraction conditions on yield, composition and viscosity stability of barley β gum. *Cereal Chem.* **75**: 805-809.
30. Lee, Y. T., Yoo, J. W., Yoo, M. S., Choi, K. H., Kim, J. H. and Seog, M. H. (2003) Retarding effects of β -glucans separated

- from barley bran on in vitro transport of bile acid and glucose. *Food Sci. Biotechnol.* **12**: 298-302.
31. Lee, S. H., Lee, Y. M., Lee, H. S. and Kim, D. K. (2010) Anti-diabetic Effects of *Triticum aestivum* L. Water Extracts in *db/db* Mice as an Animal Model of Diabetes Mellitus Type II. *Kor. J. Pharmacogn.* **41**: 282-288.
32. Yang, E. J., Cho, Y. S., Choi, M. S., Woo, M. N., Kim, M. J., Shon, M. Y. and Lee, M. K. (2009) Effect of Young Barley Leaf on Lipid Contents and Hepatic Lipid-Regulating Enzyme Activities in Mice Fed High-Fat Diet. *Kor. J. Nutr.* **42**: 14-22.
33. Won, H. R., Lee, S. G. and Park, D. Y. (2005) Effects of hot water soluble extract from green tea on the lipid metabolism and antioxidant effect in rats fed animal or vegetable protein and a hypercholesterol diet. *Kor. J. Comm. Living Sci.* **16**: 39-45.
34. Yugarani, T., Tan, B. K., The, M. and Das, N. P. (1992) Effects of polyphenolic natural products on the lipid profiles of rats fed high fat diets. *Lipids* **27**: 181-186.
35. Wang, J. Q., Li, J., Zou, Y. H., Cheng, W. M., Lu, C., Zhang, L., Ge, J. F., Huang, C., Jin, Y., Lv, X. W., Hu, C. M. and Liu, L. P. (2009) Preventive effects of total flavonoids of *Litsea coreana* leave on hepatic steatosis in rats fed with high fat diet. *J. Ethnopharmacol.* **121**: 54-60.
- (2011. 10. 31 접수; 2011. 11. 10 심사; 2011. 11. 17 게재확정)