

고지방식이로 유도한 비만 흰쥐에서 *Monascus pilosus* 균사체 추출물의 간 손상 예방효과

이상일¹ · 김재원² · 이예경³ · 양승환³ · 이인애³ · 서주원^{3†*} · 김순동^{3†*}

¹계명문화대학교 식품영양조리학과, ²대구가톨릭대학교 외식식품산업학부, ³명지대학교 생명과학정보학부

Protective Effect of *Monascus pilosus* Mycelial Extract on Hepatic Damage in High-Fat Diet Induced-obese Rats

Sang-Il Lee¹, Jae-Won Kim², Ye-Kyung Lee³, Seung Hwan Yang³, In-ae Lee³, Joo-Won Suh^{3†*}, and Soon-Dong Kim^{3†*}

¹Department of Food, Nutrition and Culinary Arts, Keimyung College, Daegu 704-703, Republic of Korea

²Faculty of Food Science and Industrial Technology, Catholic University of Daegu, Gyeongsan 712-702, Republic of Korea

³Division of Bioscience and Bioinformatics, Myongji University, Cheoin-gu Yongin, Gyeonggi-do 449-728, Republic of Korea

Received September 3, 2011; Accepted September 7, 2011

Hepatoprotective effects of *Monascus pilosus* mycelial ethanol extract (MPME) were examined in high-fat diet induced-obese rats. The rats were randomly divided into 2 groups; normal control (NC) and a high-fat and high cholesterol diet group (HFC). The HFC diet group was fed a 5L79 diet supplemented with 15% lard and 1% cholesterol for 3 weeks for induction of obesity. And then, the rats were divided into 4 groups (n=5); the NC, a HFC diet obesity control group (HF), 0.5% MPME supplemented HFC diet group (MPM), and 2% conjugated linoleic acid (CLA) supplemented HFC diet group for 7 weeks. Whereas the daily weight gain of NC and HFC groups were 3.48 g and 4.48 g, respectively, those of MPM and CLA were 3.09 g and 4.38 g, respectively. Furthermore, activity of serum alanine and aspartic aminotransferase in HF was markedly higher than those of NC group, but, the activity in MPM and CLA was significantly lower than HF. Hepatic reduced glutathione content in MPM and CLA was higher than HF. On the contrary, hepatic lipid peroxide content in MPM and CLA was significantly lower than HF. In conclusion, although the precise mechanisms of the hepatoprotective effects of the MPME in this study are unknown, our study provides experimental evidence that MPME may prevent obesity and hepatic damage by high-fat and high cholesterol diet via inhibition of lipid absorption and induction of reactive oxygen species scavenging enzyme such as superoxide dismutase.

Key words: conjugate linolenic acid, hepatic lipid peroxide, hepatoprotective effect, high-fat and high-cholesterol diet, *Monascus pilosus* mycelial extract, obesity, reactive oxygen species

서 론

경제성장에 따른 생활의 서구화로 비만, 당뇨, 고혈압, 동맥경화 및 암 등과 같은 다양한 생활습관병이 크게 증가하고

있다[Lew, 1985; Hill 등, 1992]. 이들 질환 중 비만은 에너지의 과잉섭취, 유전적 감수성 및 육체적 활동성 감소 등으로 인한 에너지의 불균형으로 체조직에 지방이 과도하게 축적되어 나타나는 것으로 지난 수세기동안 주로 선진국에서 그 유병율이 꾸준히 증가해왔으며[Kopelman, 2000], 자체적으로 혹은 다른 질병과 연계되어 심혈관계 질환, 당뇨, 비알코올성 간염, 암, 치매, 골관절염 등과 같은 심각한 질환들을 유발시키는 결정적인 위해요소로 작용하고 있다[Grundy, 1998; Kopelman, 2000]. 또한 비만은 전신에 영향을 주는 산화적 스트레스를 일으킬 뿐만 아니라 지방조직에서 adipocytokine들의 분비 장애를 초래하여 동맥경화와 당뇨 등과 같은 대사증후군과 허혈성 심질환 및 면역결핍 등을 초래하는 것으로 알려져 있다[Gutteridge와 Swain, 1993; Furukawa 등, 2004]. 그리고 비

J. W. Suh[†] and S. D. Kim[†] contributed equally.

*Corresponding authors

Phone: +82-31-330-6190; Fax: +82-31-336-0870

E-mail: tele-@hanmail.net (Soon-Dong Kim)

Phone: +82-31-330-6190; Fax: +82-31-336-0870

E-mail: jwsuh@mju.ac.kr (Joo-Won Suh)

<http://dx.doi.org/10.3839/jabc.2011.034>

만 상태에서는 비정상적인 지질대사와 더불어 산화적 스트레스가 복합적으로 발생하여[Oben 등, 2007] 대사증후군을 야기한다고 알려져 있어[Furukawa 등, 2004], 비만상태에서는 정상상태에 비하여 더 많은 산화적 스트레스를 받게 된다. 즉, 비만 상태에서는 활성산소(reactive oxygen species, ROS) 생성계로 알려져 있는 세포막 NADPH oxidase [Furukawa 등, 2004], microsome 약물대사효소의 일종인 CYP2E1 [Mantena 등, 2009] 및 세포질 xanthine oxidase [Gwinner 등, 2006]의 활성이 증가되어 과잉의 활성산소가 생성됨으로써 산화적 스트레스를 야기 한다.

일반적으로 생체에서 ROS 생성계에 의해 생성된 ROS는 SOD (superoxide dismutase), catalase, glutathione peroxidase 및 GST (glutathione S-transferase) 등과 같은 ROS 소거계 효소나 GSH (reduced glutathione), ascorbic acid, tocopherol 등과 같은 비효소적 항산화제에 의하여 제거[Valko 등, 2006; Cornelli, 2009; Halliwell, 2009] 됨으로써 ROS의 독작용으로부터 생체조직이 보호되고 있다. 그러나 이들 ROS의 생성계와 소거계 사이의 불균형이 야기되면 과잉의 ROS에 의해 염증과 조직의 손상, 고혈압과 당뇨 및 동맥경화 등과 같은 대사성 질환 뿐만 아니라 발암과 노화가 촉진 되는 것으로 잘 알려져 있다[Halliwell, 2009; Durackova, 2010]. 최근 여러 연구자들은 고지방 식이로 유도한 비만 실험동물에서 ROS 생성계와 소거계사이의 불균형으로 인한 조직의 손상이 야기된다고 보고하고 있다[Carmiel-Haggai 등, 2005; Gwinner 등, 2006].

한편, *Monascus*속 곰팡이는 전통적으로 홍국의 제조에 이용하고 있으며 아시아 여러 나라에서 식품의 보존 목적 및 질병의 치료에 사용하였고[Ma 등, 2000], cholesterol 생합성을 저해하는 monacolin K, mevinolin 및 lovastatin과 같은 statin계 성분을 생성하는 것으로 알려져 동맥경화의 예방에 사용되고 있으며[Endo, 1980], 골 형성을 촉진할 뿐만 아니라 골절률을 감소시키는 것으로 보고되고 있다[Choi와 Yu, 2004]. 또한, *Monascus*속 미생물이 생성하는 적색계의 rubropuntain과 monascorubin, 황색계의 monascin과 ankaflavin, 자색계인 rubropunctamine과 monascorubramine 등[Endo, 1979; Ma 등, 2000]은 항균 및 항암활성을 나타내는 것으로 알려져 있다[Birch 등, 1962; Keisuke 등, 1992]. 그리고 Monacolin K는 항진균, 항당뇨, 항고혈압, 항콜레스테롤 및 항암 등의 효과가 보고되고 있다[Kiyoshi 등, 1995; Yasukawa 등, 1996; Martinkova 등, 1999; Kang 등, 2008; Kim과 Rhyu, 2008]. 최근 Yu 등 [2003]은 *Monascus anka*를 사용하여 제조한 홍국에서 항비만 효과를 관찰한 바 있다. 이 같은 홍국의 효능은 증자미에 *Monascus*속 곰팡이를 번식시켰을 때 생성되는 성분들에 의하여 나타나는 것으로 알려져 있어[Kim 등, 2010] 이를 대상으로 많은 연구가 진행되어 왔으나 균체 또는 균체추출물을 대상으로 한 연구는 미흡하다.

따라서, 본 연구에서는 액체배양하여 얻은 *M. pilosus* 균사체의 에탄올 추출물이 고지방과 고콜레스테롤 식이로 유도한 비만 흰쥐의 간 조직 ROS 생성계 및 소거계 효소활성에 미치는 영향을 항 비만제로 알려져 있는 시판 CLA (Conjugated linoleic acid)와 비교하였다.

재료 및 방법

균주. 실험에 사용한 균주는 한국중균협회에서 분양받은 *M. pilosus* KCCM 60084를 사용하였다.

균사체 배양 및 추출. Mizutani 배지(glucose 5.0 g, peptone 2.0 g, KH_2PO_4 0.8 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g, CH_3COOK 0.2 g, NaCl 0.1 g, distilled water 100 mL, pH 6.0) [Youn 등, 2003] 7 mL씩을 넣은 캡시험관에 활성화시킨 균주를 이식하여 30°C의 shaking incubator (150 rpm)에서 10일간 배양하여 starter로 사용하였다. 동일 배지 1 L에 배양한 캡 시험관 10개를 무균적으로 접종하여 동일 조건에서 배양한 후 15 L의 Jar Fermenter (Value Kio-Reactor, Kiotron, Seoul, Korea)에 이식하여 30°C에서 10일간 통기 배양하였다. 배양액은 3겹의 면포로 여과하여 균사체를 분리한 다음 5배량의 70% ethanol을 가하여 균질기로 파쇄한 후 실온에서 하룻밤 추출하였다. 추출액을 Whatman No. 3 여과지로 여과한 다음 여과액을 40°C에서 ethanol을 유거시킨 후 동결건조하여 ethanol 추출 분말을 얻었다.

동물실험. 실험동물은 5주령의 평균체중 150 ± 5 g인 Sprague-Dawley계 SPF/VAF outbred rats (Orient Ltd., Sungnamsi, Korea) 숫 흰쥐를 일반 배합사료인 5L79 diets (PMI Nutrition, Brentwood, LA)로 1주일간 사육하여 환경에 적응시킨 다음 실험에 사용하였다. 비만 유도군(HF, MPM 및 CLA)은 고지방-고콜레스테롤식이로 3주간 자유 섭취시켜 비만을 유도한 후 고지방-고콜레스테롤식이 대조군(HF), 고지방-고콜레스테롤식이에 0.5% 균사체 에탄올 추출물 혼합 식이군(MPM), 고지방-고콜레스테롤식이에 2% conjugated linoleic acid (Natural ASA, Sandvika, Norway)를 혼합한 식이군(CLA)으로 분류하였으며 정상대조군(NC)과 합하여 총 4개군(5마리/군)으로 구분하여 7주간 사육하였다. 실험식은 1주일에 한 번씩 제조하여 4°C에서 냉장보관하면서 매일 신선한 식이를 공급하였다. 사육장은 stainless steel cage를 사용하였고, 온도 및 습도는 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, $60 \pm 5\%$ 로 조정하였으며, 명암주기는 12시간 간격으로 설정하고, 물과 사료는 자유 섭취시켰다.

식이 섭취량, 체중 증가량 및 식이효율 측정. 체중과 식이섭취량은 전 실험기간 동안 매일 일정시간에 측정하였으며, 식이효율(feed efficiency ratio, FER)은 1일 체중증가량을 1일 식이섭취량으로 나눈 값으로 하였다.

효소활성 측정 시료 준비. 7주간 사육한 흰쥐는 물만 주고 12시간동안 금식시킨 후 ether 마취 하에서 복부 대동맥으로부터 채혈한 다음, 빙냉의 생리식염수로 간을 관류하고 장기를 적출 한 후 습기를 제거하고 무게를 측정하였다. 적출한 간 조직 일정량에 4배량의 빙냉의 0.25 M sucrose 용액을 가하여 마쇄한 균질액을 10,000×g에서 30분간 원심분리한 다음 post-mitochondrial fraction을 취해 효소 활성도 측정에 이용하였다. 채취한 혈액은 실온에서 응고시킨 다음 4°C, 2,500×g에서 20분간 원심분리 하여 혈청을 분리한 후 -70°C 에 두면서 분석용 시료로 사용하였다.

혈청 ALT (alanine aminotransferase) 와 AST (aspartate aminotransferase)의 활성도 측정. 혈청 ALT 및 AST 활성도는 Reitman과 Frankel [1957]의 방법에 따라 조제된 kit 시약

(Asan Pharm., Seoul, Korea)을 사용하여 측정하였으며 효소의 활성은 혈청 1 mL당 분당 NADH의 흡광도를 0.001 감소시키는 Karmen unit [Karmen, 1955]로 나타내었다.

간조직 GSH와 lipid peroxide (LPO) 측정. 간 조직 GSH의 함량은 Ellman [1959]의 방법에 따라 일정량의 간 조직 마쇄균질액에 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)를 가하여 생성되는 thiophenol의 흡광도를 측정하였으며 간 조직 g당 환원형 GSH μmole 로 나타내었다. LPO의 함량은 Ohkawa 등 [1979]의 방법에 따라 일정량의 간 조직 마쇄균질액에 thiobarbituric acid (TBA) 용액을 가하여 반응시킨 후 *n*-butanol을 가하여 이행되는 TBA-reactive substance를 흡광도 532 nm에서 측정한 다음 분자흡광계수($\epsilon=1.5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)를 이용하여 함량을 산출하였으며 간 조직 g 당 malondialdehyde nmole로 나타내었다.

간조직 XOR (xanthine oxidoreductase), SOD 및 GST 활성 측정. XOR 활성은 Stirpe과 Della Corte [1969]의 방법에 따라 total type 활성은 NAD^+ 의 존재 하에서, O type 활성은 NAD^+ 를 첨가하지 않은 상태에서 측정하였으며 활성도는 분당 단백질 1 mg이 기질인 xanthine으로부터 생성시킨 uric acid의 양을 nmole로 나타내었다. SOD 활성은 Martin 등 [1987]의 방법에 따라 superoxide anion radical에 의해 hematoxylin으로부터 생성되는 hematin을 560 nm에서 측정하였으며 효소원을 가하지 않은 대조구의 흡광도를 50% 억제하는 효소량을 1 unit (U)로 하여 1 mg의 단백질이 hematoxylin의 자동산화물을 억제하는 정도를 U로 나타내었다. GST 활성은 Habig 등 [1974]의 방법에 따라 효소에 의해 기질인 1-chloro-2,4-dinitrobenzene과 reduced glutathione이 반응하여 생성되는 thioether의 흡광도를 340 nm에서 측정한 다음 흡광계수($\epsilon=9.5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)를 이용하여 활성도를 계산하였으며 분당 단백질 1 mg이 생성시킨 thioether의 nmole로 나타내었다.

단백질 측정. 간 조직의 단백질 함량은 Lowry 등 [1951]의 방법에 따라 bovine serum albumin (BSA)을 표준용액으로 하여 측정하였다.

간 조직 검사. 7주간 사육한 흰쥐 간 조직을 절취하여 10% neutral formalin에 고정시킨 다음, 알코올 탈수, 파라핀 포매하여 microtome으로 4 μm 두께로 잘라 hematoxylin과 eosin으로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

통계 처리. 데이터는 실험동물 5마리에 대한 평균치와 표준편차로 나타내었다. 유의성 검증은 SPSS ver. 14.0 (SPSS Inc., Chicago, IL) software package program을 이용하여 Duncan's

multiple range test를 행하였다.

결과 및 고찰

체중 증가량 및 식이효율. 비만을 유도한 실험동물은 식이조성과 실험구분에 따라 7주간 사육하면서 체중, 식이섭취량, 식이효율 및 배변량을 관찰한 결과는 Table 1이다. 7주째의 체중과 초기체중의 차이로부터 산출한 1일 평균 체중증가량은 HF군이 4.48 g인데 비하여 MPM군 및 CLA군은 각각 3.09 및 4.38 g으로 HF군에 비하여 각각 31.03% 및 2.24%의 감소를 나타내었다. 1일 평균 식이섭취량은 NC군에서는 29.60 g이었으나 HF, MPM 및 CLA군은 23.01~24.91 g으로 유의적인 차이가 없었다. MPM군의 식이효율은 0.13으로 HF군과 CLA군의 0.18~0.19에 비하여 다소 낮았다. 배변량은 실험군 간에 별다른 차이를 보이지 않았다. CLA는 공액이중결합 지방산으로 자연 식품에 널리 존재하는 인체에 매우 유익한 물질 [Haumann, 1996]로 항돌연변이, 항암, 항동맥경화 및 항당뇨 효과가 있으며 체지방을 감소시켜 비만을 억제하는 효과가 알려져 있다 [Ip과 Scimeca, 1997; DeLany 등, 1999; Munday 등, 1999; Park 등, 1999]. 그러나 CLA는 cytokine에 의해 조절되는 면역 자극반응 성장인자에 의해 유도된 catabolic response를 감소 [Miller 등, 1994]시킨다고 하였으며 또한, CLA의 식이효과는 성별, 연령 및 식이기간에 따라 차이가 있다는 보고 [Sisk 등, 2001; Kang 등, 2002]도 있다. 본 연구에서 CLA군은 4주까지 상당한 체중감소를 나타내었으나 그 이후부터 체중감소효과가 나타나지 않았다. 이러한 결과는 Sisk 등 [2001] 및 Kang 등 [2002]의 보고를 고려해 볼 때 본 실험의 결과만으로는 정확한 기전을 알 수 없으나 식이 기간의 차이에 따른 것으로 생각된다. 한편 MPM군이 HF군과 CLA군에 비하여 식이섭취량에서나 배변량에서 뚜렷한 차이를 보이지 않음에도 CLA에 비하여 높은 체중감소율을 나타낸 것은 한국에서 보고된 소화불량개선 [Rhyu 등, 2003]과 항비만 효과 [Chen 등, 2008]와 관련이 있는 것으로 사료되나 *M. pilosus* 균사체를 대상으로 한 연구 자료가 없어 차후의 지속적인 연구가 요망된다.

간 중량 및 간조직의 ALT와 AST 활성. 고콜레스테롤 함유 고지방 식이로 비만을 유도한 다음 7주간 실험식을 급여한 흰쥐의 체중 당 간 중량(%)과 혈청 aminotransferase (ALT 및 AST)의 활성을 측정한 결과는 Table 1과 같다.

체중당 간 중량(%)은 모든 실험군에서 NC군에 비해 유의하

Table 1. Effects of *M. pilosus* mycelial ethanol extracts on liver weight, activities of ALT and AST in serum of obesity rats fed high fats with cholesterol diet for 7 weeks (g/100 g body weight)

Measurements	Experimental groups			
	NC	HF	MPM	CLA
Liver weight (g/100 g body weight)	2.56±0.06 ^c	4.35±0.07 ^a	3.86±0.30 ^b	4.22±0.53 ^{ab}
ALT (Karmen U/mL of serum)	40.40±3.24 ^d	119.80±10.65 ^a	61.20±4.63 ^c	86.40±6.48 ^b
AST (Karmen U/mL of serum)	73.20±3.70 ^d	186.80±12.04 ^a	85.20±8.26 ^c	132.80±7.41 ^b

*All data are presented as the means ± SD of 5 rats in each group. The different superscripts in the same row (a-d) indicate significant differences ($p < 0.05$).

NC, normal control group; HF, high fat and high cholesterol diet group; MPM, freeze dried *M. pilosus* mycelial ethanol extracts 0.5% supplemented diet group; CLA, conjugated linoleic acid 2% supplemented diet group.

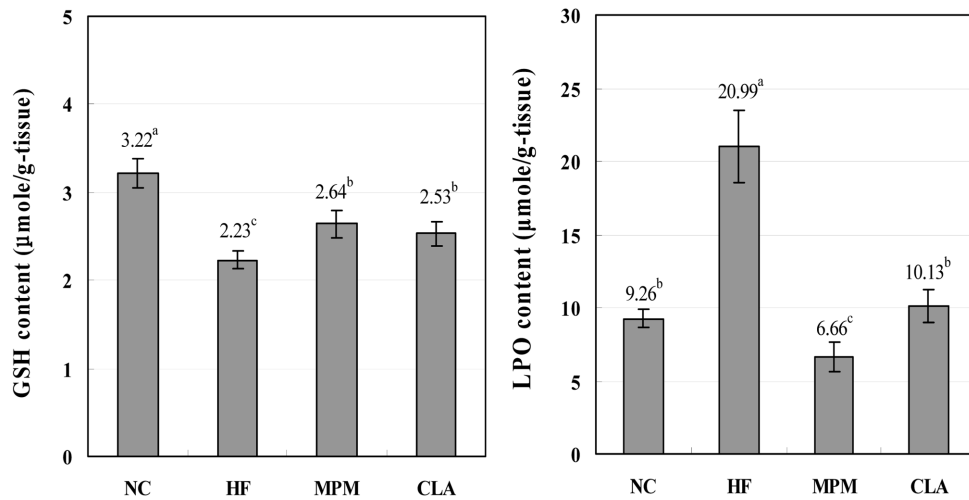


Fig. 1. Effect of *M. pilosus* mycelial ethanol extracts on GSH and LPO contents in high fats with cholesterol diet induced obesity rats fed for 7 weeks. Values are mean \pm SD of 5 rats, different superscripts in the figures indicate significant differences ($p < 0.05$).

게 증가하였으며, MPM군은 HF군에 비하여 유의하게 감소하였으나 CLA군에서는 HF군과의 차이를 보이지 않았다. 또한, 간 조직 손상의 지표로 이용되는 혈청 ALT와 AST의 활성은 HF군에서는 NC군 보다 각각 2.70 및 2.55배 증가하였으며, CLA군은 NC군의 수준으로 회복되지는 못하였으나 HF군에 비해 현저히 감소하였고 MPM군에서는 정상 상태인 NC군 수준으로 저하되었다.

이상의 결과, HF군은 고지방 섭취로 인해 지방이 간 조직에 축적되어 조직 손상이 유발되는 지방간이 발생한 것으로 생각된다. 한편 MPM군에서 CLA군보다 혈청 ALT 및 AST의 활성이 유의하게 감소하는 것으로 보아 간조직의 손상이 예방 혹은 경감된 것으로 판단된다. Oh 등[2004]은 홍국을 2% 및 4% 첨가한 식이로 성장시킨 흰쥐의 간 조직에서 병리조직학적 변화가 관찰되지 않았으며, 2% 홍국 첨가 식이군에서 bromobenzene에 의한 간 손상을 감소시켰다고 한 보고를 고려해 볼 때 본 실험에서 *Monascus* 균사체 추출물 첨가식이 간 조직손상을 예방 및 치료하는 효과에 기인하여 고지방과 고콜레스테롤 식이에 의한 지방간을 예방 혹은 경감시킴으로서 간 조직 손상의 지표인 혈청 ALT와 AST의 활성 및 체중당 간중량(%)이 감소된 것으로 생각한다.

간조직 GSH와 LPO 활성. 고콜레스테롤 함유 고지방 식이로 비만을 유도한 다음 7주간 실험식이를 급여한 흰쥐 간조직의 GSH 및 LPO의 함량을 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. HF군의 GSH 함량은 NC군에 비하여 30.75% 낮았으며, MPM군에서는 HF군에 비하여 18.39% 증가하였고 CLA군은 HF군보다 13.45% 증가하였다. 한편, HF군의 LPO의 함량은 NC군의 9.26 $\mu\text{mole/g-tissue}$ 에 비하여 55.88%가 높은 20.99 $\mu\text{mole/g-tissue}$ 를 나타내었으나 MPM군 및 CLA군은 HF군에 비하여 각각 68.27% 및 51.74% 감소하였으며 MPM군이 CLA군에 비하여 유의적으로 낮았다.

GSH는 glutathione peroxidase와 함께 superoxide radical이 SOD에 의하여 환원되어 생성된 H_2O_2 를 H_2O 로 전환시키는 생체 내의 항산화물질로 산화적 스트레스에 대한 항산화적 방어

계의 기질로 이용된다[Campos 등, 2005]. 그러나 LPO는 세포 내의 산화적 스트레스로 인하여 세포막의 구성성분인 다가불포화지방산이 과산화된 것으로 GSH와 LPO는 생체의 산화-항산화계의 indicator로 잘 알려져 있다[Ohkawa 등, 1979; Eysel 등, 2004]. 각종 스트레스에 의하여 생성된 ROS는 다가불포화지방산을 공격하여 LPO를 생성하며 생성된 LPO는 쉽게 분해되어 aldehyde, ketone 및 alcohol류 등을 생성하여 인체의 각종 세포조직을 손상시키거나 노화를 촉진함으로써 LPO의 함량은 생체막의 손상정도를 나타내는 지표로도 알려져 있다[Ohkawa 등, 1979]. 그러나 GSH는 생성된 ROS 및 LPO를 무독화시킴으로서 생체를 보호하는 역할을 하는 항산화제의 일종으로 생체 내에서 GSH의 함량이 감소하면 ROS에 의한 LPO 생성을 억제하지 못해 LPO의 함량이 증가하게 된다[Wang 등, 1999].

ROS에 의한 조직손상은 ROS 생성계와 해독계의 불균형에 의하여 초래되는 것으로 알려져 있다[Yoon 등, 1998]. MPM군이 HF군보다 LPO의 함량이 현저하게 낮은 것은 *M. pilosus* 균사체 추출물이 간 조직에서 GSH의 함량을 증가시킴과 동시에 ROS의 생성계 효소의 활성 억제와 ROS 해독계 효소의 활성증가를 유도하여 나타난 결과로 생각된다. 그러므로 *M. pilosus* 균사체 추출물은 지질 저하작용을 통하여 비만을 예방 및 경감시킴으로써 비만상태에서 발생할 수 있는 ROS [Halliwell, 2009]에 의한 간 조직 손상을 경감 및 예방할 뿐만 아니라 간조직의 지방 대사를 원활하게 유지하여 비만을 해소시키는 효과를 나타낼 것으로 생각된다.

간조직 XOR의 활성. 고콜레스테롤 함유 고지방 식이로 비만을 유도한 다음 7주간 실험식이를 급여한 흰쥐 간조직의 XOR 활성을 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. HF군에서는 total type (T) 활성이 NC군에 비하여 13.38%가 감소하였고, MPM군과 CLA군은 HF군에 비하여 각각 32.97% 및 19.46%가 감소하였으며 특히 MPM군이 CLA군보다 유의적인 감소를 보였다. XOR의 O type 활성은 HF군에서는 NC군에 비하여 7.78%가 증가하였으나 MPM군과 CLA군에서는 HF군에 비하여 각각 57.40% 및 53.79%가 감소하였으며, O/T 비율도 HF군에

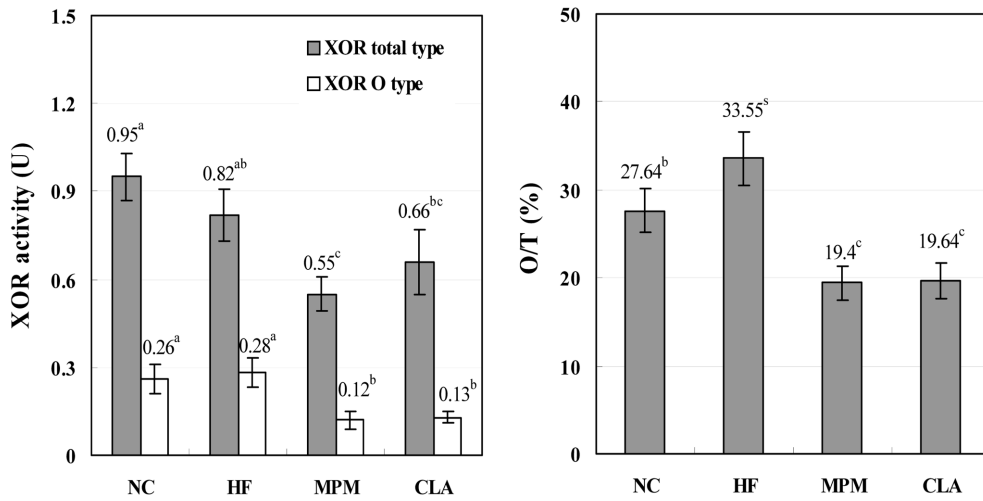


Fig. 2. Effects of *M. pilosus* mycelial ethanol extracts on the XOR activity of rats fed for 7 weeks. T; total type XOR, O; XOR O type activity (unit: uric acid nmole/mg protein/min). Values are mean \pm SD of 5 rats, different superscripts in the figure indicate significant differences ($p < 0.05$).

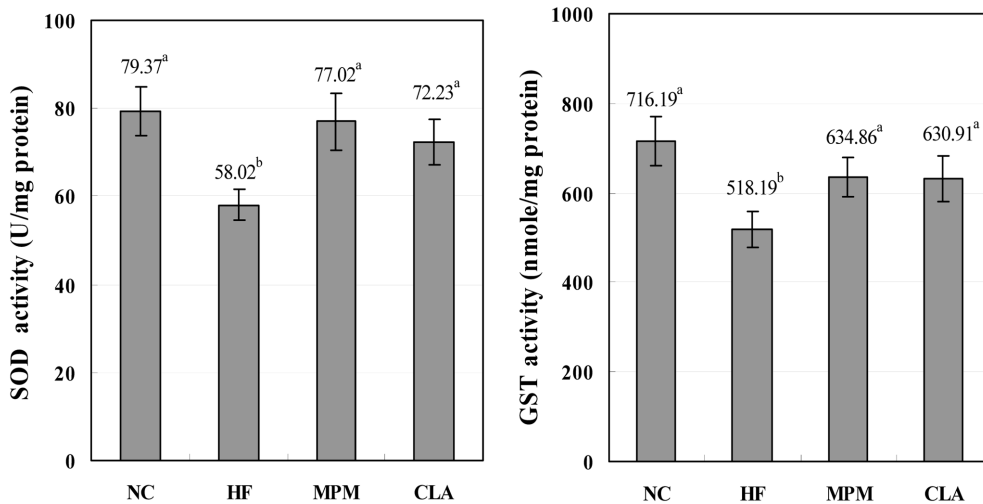


Fig. 3. Effects of *M. pilosus* mycelial ethanol extracts on SOD and GST activities of rats fed for 7 weeks. Values are mean \pm SD of 5 rats, different superscripts in the figures indicate significant differences ($p < 0.05$).

비하여 42.18 및 41.46% 감소하였다. XOR은 purine체인 hypoxanthine을 xanthine으로, xanthine을 산화시켜 uric acid를 생성할 뿐만 아니라 pyrimidine, aldehyde류 및 heterocyclic 화합물의 대사에도 관여하는 비 특이적인 효소[Park 등, 1997]로 정상 생리상태에서는 NAD⁺를 전자수용체로 이용하는 dehydrogenase type (D type)으로 존재하지만, 병태생리학적 조건 하에서는 분자상의 O₂를 전자수용체로 이용하는 oxidase type (O type)으로 전환된다[Parks 등, 1988]. 그러므로 XOR의 O type 활성과 O/T 비율이 증가할 경우 superoxide, hydrogen peroxide 및 hydroxyl radical과 같은 ROS의 과잉생성으로 인하여 조직의 손상을 초래하는 것으로 보고되고 있다 [Frank, 1991; Hashim 등, 2005].

본 실험에서 *M. pilosus* 균사체 추출물 식이군이 콜레스테롤 함유 고지방 식이로 유도된 비만 흰쥐의 간조직에서 XOR의 O type 활성을 경감시키고 동시에 O/T 비율의 감소 현상이 나타난 것은 *M. pilosus* 균사체 추출물의 항산화력에 의해 XOR 단

백의 -SH group이 보호된 결과로 사료되며, 이러한 결과로 보아 *M. pilosus* 균사체 추출물은 비만상태에서 나타나는 간 조직 손상의 예방과 각종 생활습관병 및 합병증의 예방이나 경감에 효과를 나타낼 수 있을 것으로 생각된다.

간조직 SOD와 GST의 활성. 고콜레스테롤을 함유하는 고지방 식이로 비만을 유도한 다음 7주간 실험식을 급여한 흰쥐 간조직의 SOD 및 GST 활성을 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. HF군의 SOD 및 GST활성은 NC군에 비하여 26.90~27.65% 감소하였으나, MPM군과 CLA군에서의 SOD활성은 HF군에 비하여 24.49~32.75% 증가하였으며, GST활성은 21.75~22.51% 증가하였다. 특히 MPM군의 경우 SOD의 활성이 NC군 수준으로 회복되었으며 또한 CLA군보다 높은 활성을 나타내었다. 조직 세포의 microsome에 존재하는 약물대사효소계인 cytochrome P450 및 mitochondria의 호흡연쇄계에서는 생활습관병, 암, 염증 및 노화를 촉진하는 ROS가 지속적으로 생성되며[Nohl과 Jordan 1980], 비만과 고지혈 및 당뇨 등을 포함하는 생활습관

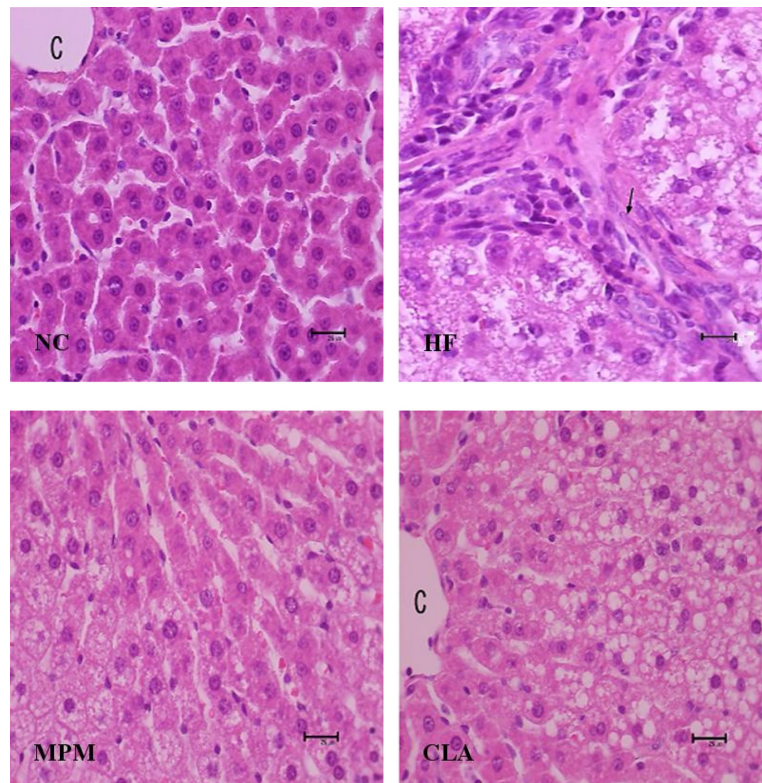


Fig. 4. Light microscopic photographs of liver tissue (bar: 25 μ m) of rats fed with experimental diets for 7 weeks (HE stain). C: central vein. Hepatocytes, structure of hepatic cell plate, and sinusoids in NC group are intact. the hepatocytes in HC group are distended by accumulation of multiple fat droplets and sinusoids are occluded. Focal infiltration of inflammatory cells is found. In MPM group, the hepatocytes of central vein lesion are preserved well from steatosis. Hepatic cell plate and sinusoids in hepatic lobule are mostly distinguished in spite of fat accumulation in hepatocytes. In CLA group, the hepatocytes of central vein lesion and intact hepatic cell plate are preserved well from steatosis.

병에서는 ROS 생성계가 활성화되는 반면 ROS 소거계 활성은 감소한다[Aliciguzel 등, 2003]. ROS 생성계에 의해 생성된 superoxide는 SOD에 의해 반응성이 적은 hydrogen peroxide로 전환되며[Im 등, 1985], GST는 ROS에 의하여 다가불포화지방산으로부터 생성된 LPO인 organic hydroperoxide를 GSH를 이용하여 독성이 낮은 lipid alcohol로 전환시키는 glutathione peroxidase와 같은 역할을 한다[Jakoby, 1978].

이상의 결과로 보아, *M. pilosus* 균사체 첨가 식이군이 고지방식이군에 비하여 ROS 소거계 효소활성이 높게 나타나는 것으로 보아 *M. pilosus* 균사체 추출물은 직접적으로 간 조직 내의 SOD 및 GST를 활성을 증가시키거나 지질의 흡수를 억제하여 비만을 예방함으로써 비만상태에서 과잉의 ROS 생성계를 억제하거나 소거계 활성을 유지시켜줌으로써 간 조직 손상을 경감시킬 뿐만 아니라 정상적인 기능을 유지시켜 주는 효과가 있는 것으로 사료된다.

간조직의 광학 현미경 관찰. 실험식이 7주후의 흰쥐 간 조직을 검정한 결과는 Fig. 4와 같다. NC군에서는 중심정맥과 간 조직 세포, 세포삭 및 sinusoid가 정상 구조를 유지하고 있다. 그러나 HF군에서는 거의 모든 간 조직 세포가 소지방구의 축적에 의해 확장되어 동양혈관이 폐쇄된 상태이며, 염증성 세포들이 부분적으로 침윤되어 있는 간 조직 손상이 나타났다. MPM군에서는 중심정맥 주위의 세포들이 정상적으로 잘 보존되어 있으며 간 소엽의 간세포삭과 간 조직 세포 내에 소지방

구가 축적되어 있음에도 불구하고 대개는 구분이 가능한 경미한 간 손상이 나타났다. CLA군은 중심정맥 주위의 세포와 간 세포사이 어느 정도 보존되어 있으나 간세포 전반에 지방이 축적되어 있는 간 조직 손상이 관찰되었다.

이상의 모든 실험결과들을 종합해 볼 때, *M. pilosus* 균사체 에탄올 추출물은 본 실험의 결과만으로는 정확한 기전은 알 수 없으나 고지방과 고콜레스테롤로 유발시킨 비만흰쥐에서의 혈청지질의 함량을 크게 개선함으로써 비만을 해소하는 효과가 있음이 확인되었으며 또한 조직손상에 관여하는 ROS를 제거시키는 소거계 효소의 활성을 증가시킴으로서 비만과 고지혈증에 의해 나타날 수 있는 간 조직의 손상을 경감 또는 개선하는 효과를 나타내었다.

초 록

본 연구는 *Monascus pilosus* mycelial ethanol extract (MPME)의 간 손상 예방 효과를 관찰할 목적으로 고지방-고콜레스테롤 식이로 유도한 비만 흰쥐(Sprague-Dawley계)를 대상으로 실험하였다. 실험동물은 정상 대조군(NC)과 고지방-고콜레스테롤 식이군(고지방식이군)으로 분류하였으며, 고지방식이군은 15% lard-1% cholesterol 첨가 5L79 diet로 3주간 성장시켜 비만을 유도한 후 고지방식이 대조군(HF), 0.5% MPME extract 첨가 고지방식이군(MPM) 및 2% CLA (conjugated linoleic acid) 첨가

고지방식이군(CLA)의 4개군 (n=5)으로 나누어 7주 동안 성장 시켜 다음과 같은 결과를 얻었다. 1일 평균 체중증가량은 NC군은 3.48 g, HF군은 4.48 g인데 비하여 MPM군과 CLA군은 각각 3.09 g 및 4.38 g으로 HF군에 비하여 각각 31.03% 및 2.24%의 감소를 나타내었다. 체중에 대한 간 중량(%)은 모든 실험군에서 NC군에 비해 유의하게 증가하였으나 MPM군은 HF군에 비하여 유의하게 감소하였으며 CLA군은 HF군과의 차이를 보이지 않았다. 간 조직손상의 지표로 이용되는 혈청 ALT와 AST의 활성은 HF군에서는 NC군 보다 2.70배 및 2.55배가 각각 증가하였으며, CLA군은 NC군의 수준으로 회복되지는 못하였으나 HF군에 비해 현저히 감소하였고 MPM군에서는 정상 상태인 NC군 수준으로 감소되었다. MPM군과 CLA군의 간조직 reduced glutathione의 함량은 HF군에 비해 높게 나타났으며, 이와 반대로 MPM 및 CLA군의 과산화지질 함량은 현저하게 낮았다. HF군의 간 조직 xanthine oxidoreductase (XOR)의 type O활성과 O/T ratio는 NC군에 비해 증가하였으며, MPM과 CLA군의 경우에는 HF군에 비해 감소하였다. 또한 HF군의 간 조직 superoxide dismutase (SOD) 및 glutathione S-transferase (GST)의 활성은 NC군에 비해 감소하였으나 MPM과 CLA군에서는 HF군에 비해 증가하였다. 이상의 결과를 종합해 볼 때, 본 실험의 결과로서는 MPME의 정확한 간 보호 기전을 알 수가 없으나 MPME는 지방의 흡수를 억제함과 동시에 SOD와 같은 ROS 제거제 효소의 유도를 통하여 비만과 간 조직 손상을 예방하거나 경감시키는 효과가 있는 것으로 생각된다.

Key words: conjugate linolenic acid, hepatic lipid peroxide, hepatoprotective effect, high-fat and high-cholesterol diet, *Monascus pilosus* mycelial extract, obesity, reactive oxygen spices

감사의 글

본 논문은 한국 농림수산식품부의 농림바이오 기술 산업화 지원사업 (810007-03-1-SU000)에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

- Aliciguzel Y, Ozen I, Aslan M, and Karayalcin U (2003) Activities of xanthine oxidoreductase and antioxidant enzymes in different tissues of diabetic rats. *J Lab Clin Med* **142**, 172-177.
- Birch AJ, Cassera A, Fitton P, Holker JSE, Smith H, Tompson GA, and Whalley WB (1962) Studies in relation to biosynthesis. Part XXX. Rotiorin, monascin and rubropunctatin. *J Chem Soc* 3583-3587.
- Campos SC, Moreira DA, Nunes TD, Colepicolo P, and Brigagão MR (2005) Oxidative stress in alcohol-induced rat parotid sialadenitis. *Arch Oral Biol* **50**, 661-668.
- Carmiel-Haggai M, Cederbaum AI, and Nieto N (2005) A high-fat diet leads to the progression of non-alcoholic fatty liver disease in obese rats. *FASEB J* **19**, 136-138.
- Chen WP, Ho BY, Lee CL, Lee CH, and Pan TM (2008) Red mold rice prevents the development of obesity, dyslipidemia and hyperinsulinemia induced by high-fat diet. *Int J Obes (Lond)* **32**, 1694-1704.
- Choi MJ and Yu TS (2004) Effects of red-yeast-rice supplementation on bone mineral density and bone mineral content in ovariectomized rats. *Korean J Nutr* **37**, 423-430.
- Cornelli U (2009) Antioxidant use in nutraceuticals. *Clin Dermatol* **27**, 175-194.
- DeLany JP, Blohm F, Truett AA, Scimeca JA, and West DB (1999) Conjugated linoleic acid rapidly reduces body fat content in mice without affecting energy intake. *Am J Physiol* **45**, R1172-R1179.
- Duracková Z (2010) Some current insights into oxidative stress. *Physiol Res* **59**, 459-469.
- Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl group. *Arch Biochem Biophys* **82**, 70-77.
- Endo A (1979) Monacolin-K, a new hypocholesterolemic agent produced by *Monascus* species. *J Antibiot (Tokyo)* **32**, 852-854.
- Endo A (1980) Monacolin K, a new hypocholesterolemic agent that specifically inhibits 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J Antibiot (Tokyo)* **33**, 334-336.
- Eybl V, Kotyzová D, and Bludovská M (2004) The effect of curcumin on cadmium-induced oxidative damage and trace elements level in the liver of rats and mice. *Toxicol Lett* **151**, 79-85.
- Frank L (1991) Developmental aspects of experimental pulmonary oxygen toxicity. *Free Radic Biol Med* **11**, 463-494.
- 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. *J Clin Invest* **114**, 1752-1761.
- Grundy SM (1998) Multi-factorial causation of obesity. Implications for prevention. *Am J Clin Nutr* **67**, 563S-572S.
- Gutteridge JM and Swain J (1993) Lipoprotein oxidation. The 'fruit and vegetable gradient' and heart disease. *Br J Biomed Sci* **50**, 284-288.
- Gwinner W, Scheuer H, Haller H, Brandes RP, and Groene HJ (2006) Pivotal role of xanthine oxidase in the initiation of tubulointerstitial renal injury in rats with hyperlipidemia. *Kidney Int* **69**, 481-487.
- Habig WH, Pabst MJ, and Jacoby WB (1974) Glutathione S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* **249**, 7130-7139.
- Halliwell B (2009) The wanderings of a free radical. *Free Radic Biol Med* **46**, 531-542.
- Hashim MS, Lincy S, Remya V, Teena M, and Anila L (2005) Effect of polyphenolic compounds from *Coriandrum sativum* on H₂O₂-induced oxidative stress in human lymphocytes. *Food Chem* **92**, 653-660.
- Haumann BF (1996) Conjugated linoleic acid offers research promise. *INFORM* **7**, 152-159.
- Hill JO, Lin D, Yakubu F, and Peters JC (1992) Development of dietary obesity in rats. Influence of amount and composition of dietary fat. *Int J Obes Relat Metab Disord* **16**, 321-333.
- Im MJ, Manson PN, Bulkley GB, and Hoopes JE (1985) Effects of superoxide dismutase and allopurinol in survival of acute island skin flaps. *Ann Surg* **201**, 357-359.
- Ip C and Scimeca JA (1997) Conjugated linoleic acid and linoleic acid are distinctive modulators of mammary carcinogenesis. *Nutr*

- Cancer* **27**, 131-135.
- Jakoby JB (1978) The glutathione S-transferase. A group of multifunctional detoxification proteins. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **46**, 383-414.
- Kang KJ, Kim KH, and Park HS (2002) Dietary conjugated linoleic acid did not affect on body fatness, fat cell size and leptin level in male Sprague Dawley rats. *Nutr Sci (Korea)* **5**, 117-122.
- Kang MR, Kim JY, Hyun YJ, Kim HJ, Yeo HY, Song YD, and Lee JH (2008) The effect of red-yeast-rice supplement on serum lipid profile and glucose control in subjects with impaired fasting glucose or impaired glucose tolerance. *Korean J Nutr* **41**, 31-40.
- Karmen A (1955) A note on the spectrophotometric assay of glutamic-oxaloacetic transaminase in human blood serum. *J Clin Invest* **34**, 131-133.
- Keisuke T, Tomio I, Nobukazu T, Hiroshi O, Shirou A, Shouichi T, and Yasue N (1992) Extraction of hypotensive substance from wheat benzi-koji. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi* **39**, 913-918.
- Kim EY and Rhyu MR (2008) Antimicrobial activities of *Monascus Koji* extracts. *Korean J Food Sci Technol* **40**, 76-81.
- Kim JW, Kim SD, and Youn KS (2010) Effects of chicken treated with *Hwangki-BeniKoji* sauces on body weight, serum and hepatic lipid profiles of rats fed high fat and high cholesterol diets. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **39**, 1270-1278.
- Kiyoshi I, Yoshio M, Keisuke T, Nobukazu T, Sjiocjo T, Sjorpi A, and Makoto T (1995) Effect of beni-koji extracts on blood pressure in primary hypertensive volunteers. *Jpn J Nutr* **53**, 263-271.
- Kopelman PG (2000) Obesity as a medical problem. *Nature* **404**, 635-643.
- Lew EA (1985) Mortality and weight. Insured lives and the American Cancer Society studies. *Ann Intern Med* **103**, 1024-1029.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, and Randall RL (1951) Protein measurement Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275.
- Ma JY, Li Y, Ye Q, Li J, Hua Y, Ju D, Zhang D, Cooper R, and Chang M (2000) Constituents of red yeast rice, a traditional Chinese food and medicine. *J Agric Food Chem* **48**, 5220-5225.
- Mantena SK, Vaughn DP, Andringa KK, Eccleston HB, King AL, Abrams GA, Doeller JE, Kraus DW, Darley-Usmar VM, and Bailey SM (2009) High fat diet induces dysregulation of hepatic oxygen gradients and mitochondrial function *in vivo*. *Biochem J* **417**, 183-193.
- Martin JP Jr, Dailey JM, and Sugarman E (1987) Negative and positive assays of superoxide dismutase based on hematoxylin autoxidation. *Arch Biochem Biophys* **255**, 329-336.
- Martinkova L, Patakova-Juzlova P, Krent V, Kucerova Z, Havlicek V, Olsovsky P, Hovorka O, Rihova B, Vesely D, Vesela D, Ulrichova J, and Prikrylova V (1999) Biological activities of oligoketide pigments of *Monascus purpureus*. *Food Addit Contam* **16**, 15-24.
- Miller CC, Park Y, Pariza MW, and Cook ME (1994) Feeding conjugated linoleic acid to animals partially overcomes catabolic responses due to endotoxin injection. *Biochem Biophys Res Commun* **198**, 1107-1112.
- Munday JS, Thompson KG, and James KA (1999) Dietary conjugated linoleic acids promote fatty streak formation in the C57BL/6 mouse atherosclerosis model. *Br J Nutr* **81**, 251-255.
- Nohl H and Jordan W (1980) The metabolic fate of mitochondrial hydrogen peroxide. *Eur J Biochem* **111**, 203-210.
- Oben JE, Enyegue DM, Fomekong GI, Soukontoua YB, and Agbor GA (2007) The effect of *Cissus quadrangularis* (CQR-300) and a *Cissus* formulation (CORE) on obesity and obesity-induced oxidative stress. *Lipids Health Dis* **6**, 4.
- Oh JD, Yoon CG, and Yu TS (2004) Effect of dietary *monascus* koji on the liver damage induced by bromobenzene in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **33**, 965-972.
- Ohkawa H, Ohishi N, and Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* **95**, 351-358.
- Park GY, Lee SJ, and Lim JG (1997) Effects of green tea catechin on cytochrome P450, xanthine oxidase activities in liver and liver damage in streptozotocin induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **26**, 901-907.
- Parks DA, Williams TK, and Beckman JS (1988) Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine. A reevaluation. *Am J Physiol* **254**, G768-G774.
- Park Y, Albright KJ, Storkson JM, Liu W, Cook ME, and Pariza MW (1999) Changes in body composition in mice during feeding and withdrawal of conjugated linoleic acid. *Lipids* **34**, 243-248.
- Reitman S and Frankel S (1957) A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol* **28**, 56-63.
- Rhyu MR, Kim EY, and Chung KS (2003) Effect of *Monascus koji* on the quality characteristics of bologna-type sausage. *Korea J Food Sci Technol* **35**, 229-234.
- Sisk MB, Hausman DB, Martin RJ, and Azain MJ (2001) Dietary conjugated linoleic acid reduces adiposity in lean but not obese Zucker rats. *J Nutr* **131**, 1668-1674.
- Stripe F and Della Corte E (1969) The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion *in vitro* of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J Biol Chem* **244**, 3855-3863.
- Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, and Mazur M (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* **160**, 1-40.
- Wang RS, Nakajima T, and Honma T (1999) Different change patterns of the isozymes of cytochrome P450 and glutathione S-transferases in chemically induced liver damage in rat. *Ind Health* **37**, 440-448.
- Yasukawa K, Takahashi M, Yamanouchi S, and Takido M (1996) Inhibitory effect of oral administration of *Monascus* pigment on tumor promotion in two-stage carcinogenesis in mouse skin. *Oncology* **53**, 247-249.
- Yoon CG, Lee MK, and Lee SI (1998) Effect of growth on the enzyme activities of oxygen free radical generating and scavenging system in CCl₄-treated rats. *Korean J Gerontol* **8**, 35-42.
- Youn UK, Kim YH, and Kim SD (2003) Pigment and monacolin K content of *beni-koji* fermented with soybean curd residue. *Korean J Food Preserv* **10**, 360-364.
- Yu TS, Kim HH, and Yoon CG (2003) Hepatic oxygen free radical metabolizing enzyme activities and serum lipid profile in rats fed diet supplemented with *Monascus* pigment. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **33**, 244-249.