

HepG2 cell에서 식용수산자원 추출물의 지질축적억제효과

김병목* · 정지희 · 김동수¹ · 김영명 · 정인학²

한국식품연구원 대사기능연구본부, ¹한국식품연구원 융합기술연구본부, ²강릉원주대학교 해양식품공학과

Inhibitory Activity of Intracellular Lipid Accumulation by Various Marine Extracts in HepG2 Cells

Byoung-Mok Kim*, Ji-Hee Jung, Dong-Soo Kim¹, Young-Myoung Kim, and In-Hak Jeong²

Division of Metabolism and Functionality Research, Korea Food Research Institute

¹Division of Convergence Technology, Korea Food Research Institute

²Department of Marine Food Science and Technology, Gangneung-Wonju National University

Abstract This study was performed to promote the effective utilization of edible marine resources and to develop functional food material from edible marine resource extracts for inhibiting lipid accumulation in liver. Edible marine resource extracts (ME) were prepared by hot water (MWE) and 80% ethanolic (MEE), and both the MWE and MEE extracts were assessed as to their cell cytotoxicity, and Oil Red O staining. Results demonstrated that ME showed no cytotoxic effects. However, treatment with MEE in the concentration of 1000, 500, and 250 µg/mL significantly inhibited the lipid accumulation in HepG2 cells compared to MWE. Especially, among the 80% ethanolic extracts, *Pagrus major*, *Larimichthys polyactis*, *Clupea pallasii*, *Octopus minor*, *Enteroctopus dofleini*, *Styela clava*, dried sea mustard, and *Enteromorpha intestinalis* showed greater lipid accumulation inhibitory activity than the others.

Keywords: HepG2, water extract, ethanolic extract, edible marine resource, fatty liver

서 론

수산물은 크게 어류, 패류, 연체류, 갑각류, 극피류, 해조류 등으로 분류되고 있고, 그 종류만 하더라도 매우 광범위하다. 수산물유래 기능성 성분으로는 푸코이단, EPA(eicosapentaenoic acid)/DHA(docosahexaenoic acid), 키틴/키틴산, 폴리페놀, 함황아미노산 등이 있고, 이들은 항암(1), 항산화(2), 항고혈압(3), 항균(4), GABA(gamma-aminobutyric acid)함량 증진(5), 항고지혈증(6), 간기능장애 보호(7) 등 다양한 생리활성 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 산업발달, 경제성장 및 식생활이 서구화됨에 따라 각종 만성 질환과 뇌혈관 질환, 당뇨병, 고혈압 등 순환기계 질환이 사망원인의 대부분을 차지하고 있으며, 특히 과잉의 알코올 섭취는 영양소의 대사에 영향을 미쳐 간질환을 일으키는 원인이 된다. 간은 단백질대사, 지질대사, 약물 및 독성물질대사 등 생체내에서 발생하는 여러 가지 대사를 담당하고 있으며(8), 흡연, 음주, 스트레스 및 약물 남용 등의 외인적 스트레스에 의해 간기능은 저하되고 지방간을 야기하게 된다(9). 특히 만성적인 알코올 섭취는 알코올 산화시 발생하는 다량의 NADH와 acetyl-CoA가 만들어져 이들로부터 합성되는 glycerol-3-phosphate와 유리지방산이

중성지방을 합성하여 간내 중성지방 축적을 야기시키고, 또한 알코올 산화 부산물인 acetaldehyde에 의해 지질대사 활성화와 효소 활성을 억제하여 대사 장애를 유발함으로써 지방간을 유발하게 된다(10-13). 현재까지 지방간 또는 알코올성 지방간 형성 억제 목표로서는 수산물유래 유효성분 탐색 연구는 미흡한 실정으로 본 연구에서는 48종의 수산물(어류, 패류, 갑각류, 연체류, 극피류, 해조류 등)로부터 열수 및 에탄올 추출물을 제조하여, 그 추출물의 인체 정상 간세포인 HepG2 cell에서의 중성지질축적억제를 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 연구에 사용한 수산물은 2010년 10월-2011년 5월까지 서울시 가락시장 및 강원도 강릉시 주문진 어시장에서 어류, 패류, 갑각류, 해조류, 극피류 등 48종의 수산물을 생물로 구입하였고, 실험실로 옮겨와 이물질 제거 후 냉동 보관하면서 추출시료로 사용하였다.

추출물제조

각 시료는 전체 중량 대비 20배 부피(w/v)의 water 또는 80% EtOH를 첨가하여 수직으로 환류 냉각관을 부착시킨 둥근 플라스크에서 100°C에서 6시간 동안 3회 반복 추출하였고, 추출이 끝난 후 6000 rpm에서 20분간 원심분리(SUPRA 22K, Hanil, Seoul, Korea)하고, 여과(Whatman, Maidstone, UK)한 후 얻어진 상등액을 모아 동결건조(PVTFD30R, ILSHINBIODASE, Sungnam, Korea)하였으며, 열수 및 에탄올추출물은 -20°C 냉동실에 보관하

*Corresponding author: Byoung-Mok Kim, Division of Metabolism and Functionality Research, Korea Food Research Institute, Seongnam, Gyeonggi 463-746, Korea
Tel: 82-31-780-9313
Fax: 82-31-780-9192
E-mail: bmkim@kfri.re.kr
Received February 17, 2012; revised April 27, 2012; accepted April 28, 2012

Table 1. Effect of marine resource hot water extract on intracellular lipid accumulation in HepG2 cell

Marine resource samples	Cell cytotoxicity (%)			ORO staining relative to control (%)		
	1000 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	1000 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL
Not treatment (control)	-			78.4		
0.5 mM FAs	2.6			102.1		
<i>Portunus trituberculatus</i>	-	-	-	106.4	102.1	97.3
<i>Acetes japonicus</i>	0.5	-	-	97.0	97.0	98.2
<i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	106.1	103.7	98.8
<i>Styela plicata</i>	-	-	-	102.7	100.2	98.5
<i>Halocynthia roretzi</i>	0.2	1.1	-	99.0	102.0	106.6
<i>Styela clava HERDMAN</i>	-	0.7	-	99.1	99.5	105.0
<i>Anthocidaris crassispina</i>	-	-	-	99.0	100.3	106.9
<i>Eopsetta grigorjewi</i>	-	-	-	101.3	100.6	102.0
<i>Trichiurus lepturus</i>	9.0	1.0	-	110.8	103.2	102.1
<i>Scomber japonicus Houttuyn</i>	2.6	2.3	-	101.0	103.5	103.6
<i>Cololabis saira</i>	-	-	-	102.0	97.0	95.6
<i>Gadus macrocephalus</i>	14.0	0.7	-	96.0	94.8	90.9
<i>Arctoscopus japonicus</i>	-	-	-	105.3	101.1	103.8
<i>Aptocyclus ventricosus</i>	-	-	-	100.5	100.4	106.3
<i>Lophiomus setigerus</i>	-	-	-	99.5	103.2	102.5
<i>Sebastes schlegeli Hilgendorf</i>	2.6	0.8	1.5	103.5	97.6	99.7
<i>Pagrus major</i>	2.5	1.3	0.9	110.2	107.5	99.9
<i>Larimichthys polyactis Bleeker</i>	5.3	0.7	1.6	96.2	93.3	92.7
<i>Chupea pallasii</i>	2.1	4.2	-	94.6	93.4	93.1
<i>Theragra chalcogramma</i>	-	-	-	91.5	96.6	95.5
<i>Dasycottus setiger</i>	11.6	1.3	-	98.7	96.9	98.0
<i>Gymnothorax kidako</i>	8.5	1.6	-	100.1	97.7	98.0
<i>Cypselurus agoo agoo egg</i>	2.3	2.0	-	105.6	104.8	107.8
<i>Hypoptychus dybowskii</i>	3.3	3.0	-	102.2	101.6	104.8
<i>Octopus minor</i>	3.4	3.0	2.0	101.3	106.5	109.2
<i>Enteroctopus dofleini</i>	9.6	2.9	-	103.4	107.9	108.2
<i>Todarodes pacificus</i>	11.6	6.2	-	102.7	106.9	104.6
<i>Octopus ocellatus</i>	9.6	11.2	-	107.1	102.2	98.4
<i>Tegillarca granosa</i>	4.0	6.1	3.0	104.6	98.6	93.7
<i>Solen grandis</i>	9.6	4.7	-	101.0	99.2	98.1
<i>Ruditapes philippinarum</i>	6.0	6.1	-	101.8	100.6	100.9
<i>Peronidia venulosa</i>	-	-	-	101.9	102.6	98.9
<i>Semisulcospira libertina</i>	3.0	2.4	-	94.8	95.7	99.0
<i>Haliotis gigantea Gmeil</i>	8.8	2.9	-	96.5	97.7	101.0
<i>Atrina pectinata</i>	4.4	2.4	-	99.3	96.8	102.0
<i>Mytilus coruscus</i>	1.5	5.9	-	97.6	99.6	98.2
<i>Enteromorpha prolifera</i>	4.5	2.6	-	97.3	93.5	92.3
<i>Ecklonia cava</i>	2.7	0.6	-	97.9	94.0	95.4
<i>Scytosiphon lomentaria</i>	3.6	2.2	1.1	100.3	96.4	100.9
<i>Sargassum horneri</i>	-	-	-	104.2	101.0	101.8
<i>Ulva pertusa Kjellwan</i>	0.7	8.3	1.7	105.0	104.5	109.9
<i>Agarum cribrosum</i>	-	-	-	97.8	99.3	100.5
<i>Porphyra tenera</i>	-	-	-	97.5	98.0	101.0
<i>Kjellmaniella crassifolia</i>	0.4	-	-	101.8	99.6	104.0
<i>Capsosiphon fulvescens</i>	12.3	2.2	-	96.4	92.2	96.1
<i>Undaria pinnatifida</i>	6.7	3.9	-	100.1	96.6	97.8
<i>Undaria pinnatifida Sporophyll</i>	-	-	-	103.2	102.3	108.6
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	1.8	0.1	-	91.2	92.7	90.7

*0.5 mM FAs (containing palmitate, oleate in proportions of 6:4)

Table 2. Effect of marine resource 80% ethanolic extract on intracellular lipid accumulation in HepG2 cell

Marine resource samples	Cell cytotoxicity (%)			ORO staining relative to control (%)		
	1000 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL	1000 µg/mL	500 µg/mL	250 µg/mL
Not treatment (control)	-			78.8		
0.5 mM FAs	4.9			100.2		
<i>Portunus trituberculatus</i>	1.0	-	-	96.2	101.9	110.4
<i>Acetes japonicus</i>	-	-	-	88.1	90.0	95.8
<i>Litopenaeus vannamei</i>	-	-	-	100.0	91.4	96.9
<i>Styela plicata</i>	1.3	6.5	-	96.5	92.5	90.2
<i>Halocynthia roretzi</i>	-	-	-	102.5	93.7	96.9
<i>Styela clava HERDMAN</i>	-	-	-	90.7	90.6	87.0
<i>Anthocidaris crassispira</i>	-	-	-	90.3	99.4	99.7
<i>Eopsetta grigorjewi</i>	11.9	1.9	-	97.1	97.2	105.5
<i>Trichiurus lepturus</i>	11.5	1.1	-	105.2	111.0	123.1
<i>Scomber japonicus Houttuyn</i>	-	-	-	105.5	99.0	101.8
<i>Cololabis saira</i>	-	-	-	106.5	109.1	118.6
<i>Gadus macrocephalus</i>	2.4	1.0	-	109.9	113.9	121.2
<i>Arctoscopus japonicus</i>	6.9	1.9	-	104.3	105.8	115.8
<i>Aptocyclus ventricosus</i>	-	-	-	103.0	104.4	116.3
<i>Lophiomus setigerus</i>	-	-	-	97.2	98.1	107.6
<i>Sebastes schlegeli Hilgendorf</i>	5.1	6.0	3.4	109.8	117.0	128.3
<i>Pagrus major</i>	2.3	-	-	77.1	80.5	85.6
<i>Larimichthys polyactis Bleeker</i>	-	-	-	77.4	88.4	97.3
<i>Chupea pallasii</i>	4.9	-	-	88.9	85.8	96.3
<i>Theragra chalcogramma</i>	-	-	-	91.0	101.1	111.6
<i>Dasycottus setiger</i>	10.7	1.2	-	-	-	-
<i>Gymnothorax kidako</i>	-	-	-	-	-	-
<i>Cypselurus agoo agoo egg</i>	11.3	6.8	-	-	-	-
<i>Hypoptychus dybowskii</i>	5.7	4.3	-	-	-	-
<i>Octopus minor</i>	-	-	-	79.3	84.0	84.2
<i>Enteroctopus dofleini</i>	4.1	5.0	-	86.8	82.9	85.9
<i>Todarodes pacificus</i>	-	-	-	88.9	86.0	100.3
<i>Octopus ocellatus</i>	-	-	-	92.9	91.2	106.4
<i>Tegillarca granosa</i>	8.6	16.5	-	97.0	104.0	109.1
<i>Solen grandis</i>	7.1	6.3	-	96.7	98.9	100.0
<i>Ruditapes philippinarum</i>	10.9	5.4	-	92.1	94.2	101.8
<i>Peronidia venulosa</i>	6.7	4.9	-	95.3	94.6	100.0
<i>Semisulcospira libertina</i>	14.4	9.8	-	109.6	108.6	112.5
<i>Haliotis gigantea Gmeil</i>	8.0	7.2	2.7	102.9	100.7	101.8
<i>Atrina pectinata</i>	7.6	3.0	3.3	107.6	97.8	96.8
<i>Mytilus coruscus</i>	5.6	4.9	5.7	102.5	96.8	105.3
<i>Enteromorpha prolifera</i>	11.2	5.2	5.0	101.6	109.8	123.0
<i>Ecklonia cava</i>	6.4	-	-	105.9	105.4	111.5
<i>Scytosiphon lomentaria</i>	-	-	-	105.9	106.5	107.6
<i>Sargassum horneri</i>	-	-	-	107.6	101.8	103.2
<i>Ulva pertusa Kjellwan</i>	8.6	-	-	104.9	105.8	115.2
<i>Agarum cribrosum</i>	1.2	4.4	2.7	103.1	109.2	109.2
<i>Porphyra tenera</i>	-	-	-	102.6	113.5	120.0
<i>Kjellmaniella crassifolia</i>	4.9	-	-	103.4	106.3	115.6
<i>Capsosiphon fulvescens</i>	7.0	4.5	-	98.9	103.8	108.7
<i>Undaria pinnatifida</i>	13.0	-	-	95.0	96.3	95.6
<i>Undaria pinnatifida Sporophyll</i>	3.9	1.6	-	93.2	91.4	85.0
<i>Enteromorpha intestinalis</i>	3.2	-	-	100.8	98.1	96.0

*0.5 mM FAs (containing palmitate, oleate in proportions of 6:4)

면서 분석용 시료로 사용하였다.

세포배양 및 중성지방질측적

실험에 사용한 인간 정상간세포주인 HepG2 세포는 한국세포주은행에서 분양 받았으며, 세포배양을 위해 5% CO₂, 37°C 배양기(MCO-15AC, SANYO, Gunma, Japan)에서 MEM(10% FBS, 100 unit/mL of penicillin G sodium, 100 µg/mL of streptomycin sulfate)배지를 이용하여 배양하였다. 96 well plate(Corning, New York, NY, USA)에 5×10⁴ cells/well의 농도로 seeding하여 배양하였고, 24시간 후 2% FBS medium을 사용하여 100 µL 0.5 mM FAs(containing palmitate, oleate in proportions of 6:4)를 처리한 후 다시 24시간 동안 배양하였다. 이 때, HepG2 cell에 0.5 mM FAs를 처리한 후 30분 뒤에 추출물을 각각 100 µL씩 첨가하였고, 시료를 첨가하지 않고 중성지방질측적이 유도된 것을 control group으로, control group에 열수 또는 에탄올추출물을 첨가한 것을 실험군으로 하여 각각 중성지방질축적억제효과를 조사하였다.

MTT Assay

HepG2 세포에 대한 식용수산자원 열수 또는 에탄올추출물의 세포독성 여부를 알아보기 위하여 MTT assay를 시행하였다. 96 well plate(Corning)에 5×10⁴ cells/well의 농도로 세포를 MEM 배양액에 분주하여 24시간 동안 안정화시킨 후, 제조한 각각의 시료를 농도별(1000, 500, 250 µg/mL)로 처리하였고, 24시간 동안 반응시켰다. 배양액을 제거한 후 EZ-Cytox Cell viability assay kit(ITSBIO, Seoul, Korea)를 사용하여 MEM 배양액에 1/10로 희석하여 처리한 후 37°C incubator에서 1시간 배양하였고, 생성된

formazan을 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 3회의 측정으로 그에 대한 평균값과 표준 오차를 구하였다.

Oil Red O 염색 및 정량

세포내 중성지방질축적을 확인하기 위하여 Oil red O 염색을 실시하였다. 배양된 세포는 PBS(phosphate-buffered saline)로 세척하고 Oil red O 50 µL를 처리하였으며 실온에서 1시간 염색하였다. 그 후 염색액을 제거하고 PBS로 세척하여 염색된 세포를 microscopic image(Olympus, Tokyo, Japan)로 관찰하였다. 또한 정량을 위해 isopropanol 100 µL를 가하여 세포의 염색을 추출 후 microplate reader(Thermo Scientific, Fiji, Finland)를 사용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계처리

본 실험의 결과는 통계분석용 프로그램인 SPSS package program 18.0을 사용하여 평균과 표준편차를 구하였다. 두 집단 간 평균치 분석은 독립 T 검정을 수행하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의차 검증을 실시하였고, 세 집단이상의 평균치 분석은 one-way ANOVA 방법에 따라 실시하였으며, 평균들간의 유의성 검증은 Duncan's multiple comparison test($p < 0.05$)를 이용하여 검정하였다.

결과 및 고찰

최근 대사성질환 유병률 증가하고 있고, 이 중 만성 간질환이 차지하는 비중이 급격하게 증가하고 있는 것으로 보고되고 있다 (14). 알코올은 사회생활에 기호식품으로 애용되어 오고 있지만,

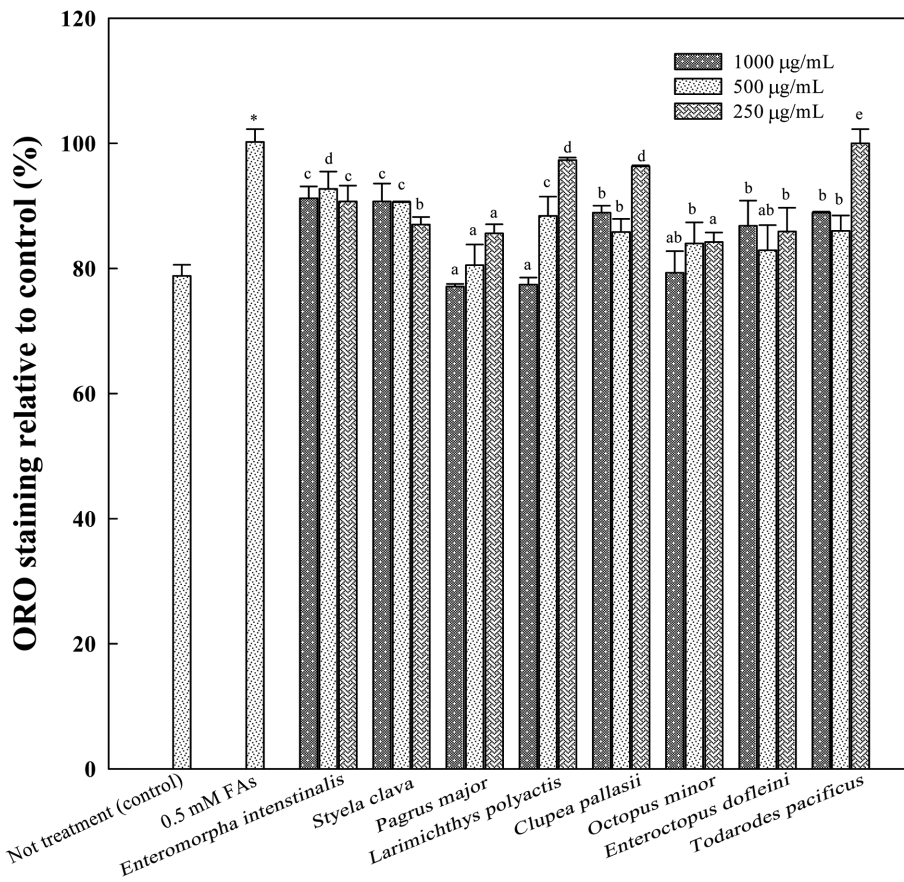


Fig. 1. Effects of 8 types extract on intracellular lipid accumulation in HepG2 cells. Differences were considered significant at $p < 0.05$

다량의 알코올 섭취로 인해 주로 간장에 중성지방이 이상적으로 축적되어 지방간이 유발될 수 있고, 심할 경우 알코올성 간염 및 간경변과 같은 간손상을 야기시킬 수도 있다(15,16). 이러한 중성지방으로 인해 근래에 지방간 질환의 병리 기전과 치료 약물에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 헛개나무의 열매가 알코올성 간염, 간경화, 지방간, 황달 등에 효능이 알려져 있고(17), 김, 미역, 매생이 등 여러 해조류에서 콜레스테롤 저하작용, 중성지방 저하 등 지질개선에 효과가 있는 것으로 나타났다(18). 수산물의 생리활성 물질에 대한 관심이 고조되고 있고, 지방간 유발과 밀접한 중성지방에 대한 저하작용이 기대되고 있으나, 그 기작에 관해 명확하게 밝혀져 있지 않고 있다. 따라서 본 연구에서 수산물 추출물로부터 간세포내 지질축적억제효과를 밝힐 목적으로 0.5 mM FAs를 사람 간암세포유래의 HepG2 세포주에 처리한 후 세포내 중성지방량을 조사하였다. 총 48종의 수산물을 열수 및 에탄올로 각각 추출하여 얻은 추출물을 1000, 500, 250 µg/mL의 농도로 처리한 후 세포독성과 지질축적억제효과를 조사한 결과는 각각 Table 1과 2에 나타내었다. HepG2 세포에 세포독성을 MTT 시험법에 의해 측정된 결과, 수산물 추출물을 1000 µg/mL의 농도로 처리하였을 때, *Gadus macrocephalus*(ethanolic), *Semiscospora libertina*(water)에서 각각 14.0%와 14.4%로 가장 높게 나타났지만 다른 수산물 추출물에서는 HepG2 세포의 성장에 영향을 미치지 않을 정도로 독성이 낮은 것으로 조사되었다. 유의적으로 지질축적억제효과를 보인 6종의 수산물 추출물인 *Pagrus major*(ethanolic), *Octopus minor*(ethanolic), *Enteroctopus dofleini*(ethanolic), *Styela clava*(ethanolic), *Undaria pinnatifida* Sporophyll(ethanolic), *Enteromorpha intestinalis*(water)은 Fig. 1에 나타내었다. 즉, 수산물 48종의 열수 및 에탄올추출물의 0.5 mM FAs에 의해 유도된 HepG2 세포내 중성지방축적억제효과를 조사한 결과, 열수추출물보다는 에탄올 추출물에서 유의적인 효과가 있음을 관찰하였다. 또한, 열수추출물의 경우 *Enteromorpha intestinalis*, *Larimichthys polyactis*, *Clupea pallasii*, *Theragra chalcogramma*, *Enteromorpha prolifera*, *Gadus macrocephalus*, *Capsosiphon fulvescens* 등이 다른 시료에 비해 높은 지질축적억제효과가 있었고, 0.5 mM FAs처리군에 비해 약 16.4-47.8%의 지질축적억제효과가 있었다. 에탄올추출물의 경우, *Pagrus major*, *Styela clava*, *Octopus minor*, *Enteroctopus dofleini*, *Undaria pinnatifida* Sporophyll, *Styela plicata* 등이 다른 시료에 비해 유의적으로 높은 지질축적억제효과가 있었으며, 0.5 mM FAs처리군에 비해 약 32.4-91.8%의 지질축적억제효과가 있었다.

요 약

수산물 추출물로부터 간세포내 지질축적억제효과 추출물의 탐색을 통해 지방간 형성 억제 활성물질을 밝힐 목적으로, 각 48종의 수산물 추출물의 사람 간암세포유래인 HepG2 세포주에서의 중성지방축적억제 효과를 조사하였다. 그 결과, 18개의 추출물에서 유의적인 지질축적억제효과를 보였고, 그 중 *Pagrus major*, *Octopus minor*, *Enteroctopus dofleini*, *Undaria pinnatifida* Sporophyll, *Styela clava*, *Enteromorpha intestinalis* 등 6개의 추출물이 유효한 효과가 있음을 관찰하였다. 이상의 결과를 바탕으로 지질대사에 관여하는 단백질들의 발현 정도를 조사하고, 활성물질의 분리 및 정제 등에 관한 연구와 지방간 형성 억제 효과에 대한

기전 연구가 진행되어야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2010년 한국식품연구원 자체사업(ER111002)의 지원을 받아 수행된 연구결과의 일부이며, 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Choi MS, Han HD, Kim TW, Song CK, Park ES, Shin BC. Antitumour efficiency of chitosan hydrogel containing anionic liposomes as a depot system. *J. Korean Pharm. Sci.* 35: 25-31 (2005)
2. Shin SL, Lee CH. Antioxidant activities of ostrich fern by different extraction methods and solvents. *J. Life Sci.* 21: 56-61 (2011)
3. Choi JH, Kim DI, Park SH, Kim DW, Kim CM, Koo JG. Effects of sea tangle extract and fucoidan drinks on oxygen radicals and their scavenger enzymes in stressed mouse. *J. Korean Fish. Soc.* 32: 764-769 (1999)
4. Cho SH, Kim YJ, Cho JC, Moh SH. Preparation and antibacterial properties of quaternary amine chitosan. *J. Korea Academia-Industrial Coop. Soc.* 12: 937-940 (2011)
5. Ko JA, Kim KO, Park HJ. Effects of molecular weight and chitosan concentration on GABA (gamma-aminobutyric acid) contents of germinated brown rice. *Korean J. Food Sci. Technol.* 42: 688-692 (2010)
6. Kim HS, Seong JH. Effects of chitosan oligosaccharide supplementation on blood glucose, lipid components, and enzyme activities in hyperglycemic rats. *Korean J. Food Nutr.* 21: 328-335 (2008)
7. Nam CS, Kang KS, Ha BJ. Ulva lactuca fucoidan extract and its protective effects on CCl₄-induced liver dysfunction. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 22: 73-77 (2007)
8. Cha JY, Mameda Y, Oogami K, Yamamoto K, Yanagita T. Association between hepatic triacylglycerol accumulation induced by administering orotic acid and enhanced phosphatidate phosphohydrolase activity in rat. *Biosci. Biotech. Bioch.* 62: 508-513 (1998)
9. Sorenson TIA, Orholm M, Bentsen KD, Hoybye G, Eghoje K, Christoffersen P. Prospective evaluation of alcohol abuse and alcoholic liver in men as predictors of development of cirrhosis. *Lancet* 2: 241-244 (1984)
10. Ontko JA. Effects of ethanol on the metabolism of free fatty acids in isolated liver cells. *J. Lipid Res.* 14: 78-84 (1973)
11. Lieber CS, Decarli LM. Study of agents for the prevention of the fatty liver prolonged alcohol intake. *Gastroenterology* 50: 316-322 (1966)
12. William FA, Enrique S. The useful BCAA in patients with acute or chronic hepatic encephalopathy. *Am. J. Gastroenterol.* 84: 91-96 (1989)
13. Wildi SM, Reich J, Flury R, Lauper U, Risti B, Mullhaupt B, Meyenberger C. Acute fatty liver in pregnancy: Clinical and histopathological course. Case report. *Schweiz. Rundsch. Med.* 91: 267-273 (2002)
14. Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labte AM, Bianchi G, Bugianesi E, McCullough AJ. Association of nonalcoholic fatty liver disease with insulin resistance. *Am. J. Med.* 107: 450-455 (1999)
15. Maher JJ. Exploring alcohols effects on liver function. *Alcohol Health Res. W.* 21: 5-12 (1997)
16. Neuman MG. Cytokines-central factors in alcoholic liver disease. *Alcohol Health Res. W.* 27: 307-316 (2003)
17. Kim TJ. *Korean Resources Plants*. Seoul National University Press, Seoul, Korea. p.72 (1996)
18. Koo JK, Jo KS, Do JR, Park JH, Yang CB. Chemical properties of fucoidans from *Hizikia fusiformis* and *Sargassum fulvellum*. *Bull. Korean Fish. Soc.* 28: 659-666 (1995)