

## 노팔 복합물이 II형 당뇨병쥐에서 지질대사에 미치는 효과

윤진아

배화여자대학교 식품영양과

### Effects of *Opuntia ficus-indica* on Lipid Metabolism in the *db/db* Mouse

Jin A Yoon

Dept. of Food and Nutrition, Baewha Women's University, Seoul 110-735, Korea

#### Abstract

This study investigated the effects of *Opuntia ficus-indica* and other natural resources (OF) in *db/db* and C57 mice. Plasma triglycerides, cholesterol, alanine aminotransferase (ALT) activity, aspartate aminotransferase (AST) activity, fecal bile acid excretion, the histopathological appearance of the liver, and cholesterol-related mRNA expression were determined. Mice (12 *db/db* mice and 12 C57 mice) were assigned to diabetic-control (db-C), diabetic-OF treatment (db-OF), normal-control (C57-C), and normal-OF treatment (C57-OF) groups. Animals in the control group were fed an AIN-76 recommended diet and animals in the OF group were fed an experimental diet containing 5% of OF for 4 weeks. Concentrations of total plasma cholesterol, triglyceride, low density lipoprotein (LDL)-cholesterol, and very low density lipoprotein (VLDL)-cholesterol decreased with the administration of OF. In contrast, high density lipoprotein (HDL)-cholesterol levels were minimally affected by the experimental diet. Plasma AST and ALT showed lower activities in the db-OF group, and the fecal excretion of bile acid was reduced in the db-OF group. Histopathological analysis of the liver showed that fatty liver conditions in the db-OF group were more improved than db-C. Low-density lipoprotein receptor (LDL-R) and cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (*CYP7A1*) mRNA expression were increased in the db-OF group as well. However, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (HMG-CoA-R) mRNA expression was lower in the db-OF group. These results provide experimental evidence about improved lipid metabolism of the OF feeding in the *db/db* mice.

**Key words:** *Opuntia ficus-indica*, *db/db* mice, LDL-receptor, *CYP7A1*, HMG-CoA reductase

#### 서론

인슐린 비의존형인 제2형 당뇨병은 대부분 성인인 된 이후에 유전적인 원인이나 비만 등으로 인해 근육세포 등의 인슐린 수용체에 이상이 생겨 인슐린에 대한 저항성이 증가함으로써 유발된다(1,2). 따라서 지질 이상혈증 빈도가 높아져서 제2형 당뇨병 환자의 54%가 혈청 콜레스테롤이 250 mg/dL 이상이며, 고중성지혈증 및 HDL-콜레스테롤의 감소도 19%로 보고되어 있어 제2형 당뇨병 환자의 40%가 지질이상혈증을 갖는다(3). 제2형 당뇨병 환자의 경우 간의 VLDL-콜레스테롤과 triglyceride의 생성량이 증가하는데, VLDL-콜레스테롤의 증가는 혈장의 총콜레스테롤의 증가를 가져오며, 또한 HDL-콜레스테롤의 수치도 감소한다(4). 또한 이러한 혈중 중성지질 및 콜레스테롤 농도에는 HMG-CoA-R (3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase), LDL-R(low-density lipoprotein receptor), *CYP7A1*(cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase)등이 관련된 것으로 알려져 있다

(6-11).

노팔(*Opuntia ficus-indica*)은 선인장과(Cactaceae) 식물의 한 종류로 국내에서는 제주도 및 남해안에서 자생하고 있으며 '백년초(*Opuntia ficus-indica* var. Saboten)'로 불린다. 이 식물은 멕시코에서 당뇨병 치료에 이용되고 있으며, 혈당과 콜레스테롤 수치 개선에 효과가 있는 것으로 알려져 있다(12-14). 뿐만 아니라 노팔을 주재료로 하며 약리효과가 있는 천연물들의 복합물 역시 혈당 강화와 지질대사 개선에 효과가 있다는 보고도 존재한다(15,16). 천화분(*Trichosanthes kirilowii* Maxim)은 덩굴성 여러해살이풀로 그 뿌리를 천화분이라고 하며 이를 이용해 streptozotocin으로 유발된 당뇨쥐에게 항 당뇨병 효과를 확인하였다(17). 목단피(*Paeonia suffruticosa* Andrews)는 모란의 뿌리껍질을 말하며, 지황(*Rehmannia glutinosa* Liboschitz)은 간조직의 회복에 영향을 주어 혈중의 ALT(alanine aminotransferase), AST(aspartate aminotransferase)와 혈당뿐 아니라 간조직을 재생시키는 효과가 있고(18), 호로파(*Trigonella fo-*

*num-graecum* L)는 씨와 잎에서 당뇨쥐의 혈당을 감소시키고(19), 산약(*Dioscorea batatas* Decaisne)을 증량한 육미지황탕가산약 열탕액이 alloxan으로 유발된 당뇨병 쥐에서 혈당, cholesterol과 triglyceride 등을 개선한다고 보고하였고(20), 삼칠근(*Panax notoginseng*(Burk.) F.H. Chen)의 *db/db* mice와 *ob/ob* mice에서 혈당 강하효과와 GTT 효과를 확인하였다(21).

따라서 본 실험에서는 제2형 당뇨병 모델 쥐인 *db/db* mouse를 이용하여 당뇨병 및 지질대사를 개선하는 효과가 있는 노팔 및 천연물들의 복합물(*Opuntia ficus-indica* complex, OF)을 급여하여 선행 연구들(15,16)의 복합물들보다 효과가 우수한 복합물을 조성하여 지질대사 이상의 완화 효과를 조사하고자 혈장의 화학조성을 분석하고, 간 조직의 변화를 면역염색을 통하여 관찰하며 간세포를 이용한 PCR을 통해 혈당과 지질대사 관련 유전자를 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료 및 실험동물

멕시코산 노팔의 줄기와 중국산 천연물(천화분, 목단피, 지황, 호로파, 산약, 삼칠근)을 건조된 상태에서 구입하여 Disc mill(BM-D-100, McCoy Corporation, San Marcos, TX, USA)과 Cyclone mill(3010-039, UDY Co., Rome Court, Fort Collins, Italia)로 분쇄한 뒤 노팔의 줄기 65%, 천화분 및 목단피 각각 7%, 지황, 호로파, 산약 각 6%, 삼칠근 3%의 비율로 혼합하여 OF를 제조하였다. 각 재료의 배합 비율은 Yoon과 Son(16)의 연구를 참고하여 정하였다.

실험에 이용된 실험동물은 8주령 수컷 C57 생쥐 12마리와 제2형 당뇨병이 주령이 증가하면서 유발되는 *db/db* 생쥐를 사용하였으며, 당뇨병이 충분히 유발된 주령인 12주령 수컷 *db/db* 생쥐 12마리를 (주)중앙실험동물(Seoul, Korea)에서 분양 받았다. 실험동물은 SPF(specific-pathogen-free) system에서 cage에 2마리씩 분리 사육하였으며, 사육실의 조건은 온도 20~25°C, 상대습도 60~70%, 광주기 12시간을 유지하였다. 실험에 사용된 식이와 톱밥, 음수는 모두 멸균 처리하여 사용하였다.

### 실험식이 및 체중 측정

실험동물들은 6마리씩 나누어져 C57 정상대조군(C57-C), C57 OF 정상 실험군(C57-OF), *db/db* 당뇨병 대조군(*db-C*), *db/db* OF 당뇨병 실험군(*db-OF*)으로 배치되었다. 두 대조군은 AIN-76(American Institute Nutrition-76)의 사양 표준에 준한 기초식이로 급여하였고 OF군은 기초식이에 5%의 OF를 첨가하여 급여하였으며, 이 비율은 선행 연구를 바탕으로 결정하였고(16) 총 4주간 실험이 진행되었다. 식이 섭취량은 3일 간격으로 측정하였고, 식이효율(food efficiency ratio, FER)은 체중 증가량(g)/ 총 식이섭취량(g)× 100으로 계산하였다. 체중은 실험식이에 들어가기 전에 측

정한 다음, 급여 후 1주일 간격으로 4회 측정하였다.

### 혈액 검사

실험식이 급여 1, 2, 3주 경과 후 12시간 절식시키고 꼬리 정맥에서 100 μL씩 채혈하였으며, 4주 경과 후에는 12시간 절식시키고 에테르를 이용하여 마취시킨 후 심장에서 혈액을 채혈하였다. 채혈된 혈액은 얼음에 30분 방치한 뒤 10,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 혈장을 얻고 다음 항목을 분석하였다.

혈장 중 중성지방(triglyceride) 함량은 glycerol kinase(GK)-glycerol phospho-oxidase(GPO)법을 이용한 kit(Shinyang Chemical Co. Ltd, Seoul, Korea)를 사용하였으며, 콜레스테롤의 함량은 cholesterol ester hydrolase, cholesterol oxidase 및 hydrogen peroxidase를 이용한 효소법으로 kit(Shinyang Chemical Co. Ltd)을 이용하여 505 nm에서 흡광도를 측정하였고, HDL-cholesterol의 함량은 dextran sulfate와 magnesium sulfate를 이용하여 LDL과 VLDL의 lipoprotein을 침전시킨 후 상층액에 남아있는 HDL 중의 콜레스테롤을 500 nm에서 측정하였으며, 다음 공식에 의해 계산되었다.

$$\text{혈장 중성지방 농도 (mg/100 mL)} = \frac{\text{검체의 흡광도}}{\text{표준액의 흡광도}} \times \text{표준액의 농도}$$

$$\text{혈장 콜레스테롤 농도 (mg/100 mL)} = \frac{\text{검체의 흡광도}}{\text{표준액의 흡광도}} \times \text{표준액의 농도}$$

$$\text{HDL-콜레스테롤 농도 (mg/100 mL)} = \frac{\text{검체의 흡광도}}{\text{표준액의 흡광도}} \times \text{표준액의 농도} \times \text{회석계수}$$

$$\text{회석계수: } \{(\text{혈장량} + \text{시약}) / \text{혈장량}\} = 1.1$$

혈장 중 LDL-콜레스테롤과 VLDL-콜레스테롤 함량은 Friedewald 계산식에 준하여 산출되었다(22).

혈장 중 AST 및 ALT의 활성도 측정은 Reitman과 Frankel(23)의 방법에 따라 kit(Shinyang Chemical Co. Ltd)을 사용하였다. 505 nm에서 증류수를 맹검으로 하여 표준액, 검체 및 대조군의 흡광도를 측정하고 여기서 얻은 검량곡선을 이용하여 효소의 활성단위로 환산하였다.

### 분변의 담즙산 정량

분변은 실험기간 마지막 5일 동안의 분변 전량을 수집하여 -70°C로 냉동시킨 후 동결 건조하여 담즙산 분석에 사용하였다.

담즙산은 Fausa와 Skalhogg(24)의 효소를 이용한 정량법에 준하여 측정하였다. 정량법의 반응 종결 후 1,500×g에서 10분간 원심분리 하여 얻은 상등액을 340 nm에서 흡광도를 측정하였다(I). 이때 효소용액 대신에 0.1 M의 hydrazine hydrate 용액 2.5 mL를 첨가하여 동일하게 반응을 시켜 얻은 흡광도를 control로 하였다(II). E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>는 I 과 II의 흡광도에서 각각 blank 흡광도와와의 차이를 구한 값이며 E<sub>1</sub>과 E<sub>2</sub>의 차이인 ΔE는 3α-hydroxyl group의 산화에 따른 NADH

의 소멸지수이다.

$$\frac{\mu\text{mole 3}\alpha\text{-hydroxyl}}{\text{bile acid/mL}} = \frac{\Delta E \times 3 \times 1000 \times C}{6.2 \times A \times B}$$

- ΔE: The extinction of the unknown sample
- 6.2: The μmole extinction coefficient of NADH at 340 nm
- 3: The total volume of reaction mixture
- A=Volume of extraction added to reaction mixture (10 μL)
- B=Quantity of fecal extracted (0.2 g)
- C=Total volume of fecal extraction (0.5 mL)

간 조직의 H & E 염색

실험기간 종료 후 간 조직을 적출하여 4%의 paraformaldehyde로 24시간 이상 고정시킨 다음 paraffin으로 포매하고 microtome을 사용하여 조직을 4 μm 두께로 절편하였다. 절편한 조직은 전처리를 거쳐 hematoxylin과 eosin으로 이중염색과 Periodic acid-Schiff(PAS) 반응을 시킨 다음 탈수를 하였다. 합성수지 봉입제로 cover glass를 봉합한 후 광학 현미경(Olympus BX50, Tokyo, Japan) 200배율로 관찰하고 현미경이 부착된 카메라(Olympus DP70)로 촬영을 하였다.

유전자 발현 분석

적출된 간 조직 중 50 mg을 잘라내 즉시 액체 질소에 담가 보관한 뒤 Trizol(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 이용해 RNA를 추출하고 260 nm에서 흡광도를 측정하여 농도(μg/μL)를 계산하였다. 이를 이용해 cDNA를 합성하고 이 중 1 μL를 PCR에 사용하였다. β-Actin은 primer(F, CCCAAC-TTGATGTATGAAGG; R, TTTGTGGAAGGTAAGGT-GTGC)를 이용하여 94°C에서 4분간 정치시킨 후 94°C에서 30초 동안 변성, 50°C에서 30초 간 재생, 72°C에서 30초씩 합성을 23회 반복한 후 72°C에서 다시 5분간 정치시켰다. HMG-CoA-R의 경우 동일 조건에서 F, GTTCTTTC-CGTGCTGTGTTCTGGA; R, CTGATATCTTTAGTGC-AGAGTGTGGCAC primer로 57°C에서 재생하여 29회 반복하였으며, LDL-R 역시 동일 조건에서 재생온도 42°C에 반복 횟수 30회로 F, GCTCCATAGGCTATCTGCTCTTCA; R, GCGGTCCAGGGTCATCTTTC를 이용하였다. CYP7A1은 52°C에서 재생을 하였으며 반복 횟수는 30회였고 F,

CCTTGGACGTTTTCTCGCT; R, GCGCTCTTTGAT-TTAGGAAG의 primer를 이용하였다.

통계 처리

본 연구에서 측정된 모든 수치들은 mean±SE로 나타내었고, Statistical Analysis System(SAS, version 9.2, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 ANOVA를 실시하였으며, 각 평균치간 차이에 대한 유의성은 Duncan's multiple range test로 유의수준을 5% 수준에서 분석하였다.

결과 및 고찰

식이섭취량 및 체중변화

Table 1을 살펴보면 db-C군과 db-OF군 간의 사료섭취량과 C57-C군과 C57-OF군 간의 사료섭취량은 유의적인 차이가 없었고, 이와 같은 경향은 기존 연구 보고에서도 찾아볼 수 있다(25).

식이효율은 db-C군과 db-OF군 간의 유의적인 차이가 없었으나 C57-C군과 C57-OF군 간에는 유의적(p<0.05)인 차이를 보이면서 C57-C군이 높게 나타났다. 이것은 C57 생쥐에서 OF의 급여가 낮은 식이효율을 나타내 다이어트 효과가 있다는 것을 의미하며, 이는 노팔 줄기의 조성유 함량이 건조중량의 11.44%에 달하는 것에 의해 포만감을 주었기 때문으로 사료된다(25).

체중변화를 살펴보면 db-C, db-OF, C57-C와 C57-OF 순서로 나타났다. db-C군과 db-OF군은 유의적인 차이가 없었는데 이는 유전적으로 비만과 제2형 당뇨병을 유발시키는 db/db 생쥐의 유전적 특성을 OF의 급여로 억제하기에 역부족이었다고 사료된다. Yajima 등(26)의 연구에서는 당뇨병 대조군에 비하여 당뇨병 실험군에서 2.1배의 체중 증가를 보였다. 한편 C57-C군과 C57-OF군 사이에는 유의적(p<0.05)인 차이를 나타내며 C57-OF군에서 적은 체중 증가를 보였는데 이는 OF의 급여가 체중 증가를 억제하는 효과가 있다는 것을 의미한다.

혈장 중 중성지방 및 콜레스테롤 함량

혈장 중 중성지방 함량의 변화를 살펴보면(Fig. 1A) 처음 1주 후에는 db-C와 db-OF 간의 유의적인 차이를 보이지

Table 1. Effect of OF on diet intake, food efficiency ratio (FER) and weight gain in db/db mice and C57 mice fed experimental diets for 4 weeks

Groups <sup>1)</sup>	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Weight gain (g)	Diet intake (g)	FER <sup>2)</sup> (g/g diet)
db-C	45.71 ± 1.41 <sup>3a4)</sup>	53.11 ± 1.05 <sup>a</sup>	7.40 ± 0.67 <sup>a</sup>	172.68 ± 3.24 <sup>a</sup>	4.29 ± 0.40 <sup>a</sup>
db-OF	44.56 ± 1.20 <sup>a</sup>	51.51 ± 2.91 <sup>a</sup>	6.95 ± 1.71 <sup>a</sup>	164.32 ± 3.06 <sup>b</sup>	4.23 ± 0.61 <sup>a</sup>
C57-C	20.69 ± 0.28 <sup>b</sup>	23.28 ± 0.37 <sup>b</sup>	2.60 ± 0.17 <sup>b</sup>	98.26 ± 2.63 <sup>c</sup>	2.64 ± 0.18 <sup>b</sup>
C57-OF	20.87 ± 0.16 <sup>b</sup>	22.58 ± 0.45 <sup>b</sup>	1.71 ± 0.31 <sup>c</sup>	92.44 ± 2.78 <sup>c</sup>	1.85 ± 0.33 <sup>c</sup>

<sup>1)</sup>db-C, diabetic control diet for db/db mice; db-OF, 5% OF of diabetic diet in db/db mice; C57-C, non-diabetic control diet for C57 mice; C57-OF, 5% OF of non-diabetic diet in C57 mice. OF, *Opuntia ficus-indica* complex.

<sup>2)</sup>FER=(Body weight gain (g)/ Diet intake (g))×100.

<sup>3)</sup>Values are mean±SE, n=6.

<sup>4)</sup>Values with different letters in the same column are significantly different by Duncan's multiple range test (p<0.05).

않았으나 시간이 지날수록 db-C에서는 혈장 중성지방 함량이 점점 증가하였다. 반대로 db-OF에서는 혈장 중성지방 함량이 점점 감소하여 2주 이후부터는 유의적( $p<0.05$ )인 차이를 나타내었고, 특히 db-OF의 혈장 중성지방의 함량이 C57-C와 유사한 수준까지 감소하였으며, C57-C와 C57-OF의 유의적 차이는 관찰되지 않았다.

Yajima 등(26)의 연구에서도 이와 같은 결과와 비슷한 경향을 나타내었는데, pioglitazone, pioglitazone+bezafibrate와 KRP-297을 급여한 *db/db* 생쥐에서 혈장 중성지방의 함량이 감소하였다. Kawasaki 등(27)의 연구에서도 *db/db* 생쥐에게 pioglitazone을 급여하였을 때, 제2형 당뇨병 쥐에게 자두(plum)를 급여한 Utsunomiya 등(28)의 연구에서도 모두 혈장 중성지방의 감소가 확인되었다.

제2형 당뇨병에서는 당대사 이상에 따른 지방대사 이상을 보이는데, 일반적으로 총콜레스테롤, LDL-콜레스테롤과 VLDL-콜레스테롤은 증가하고, HDL-콜레스테롤은 감소한다(5). 본 연구에서도 실험동물들은 이러한 기존 보고 경향과 비슷한 콜레스테롤 대사를 나타내었다. db-C는 실험이 시작된 후 계속적으로 혈장 총콜레스테롤의 증가를 보였고, db-OF에서는 OF급여 1주 후 db-C와 비슷한 혈장 총콜레스테롤 함량을 나타내었으나, 시간이 경과함에 따라 db-C와

유의적( $p<0.05$ )인 차이를 보이며 감소하였다(Fig. 1B). Utsunomiya 등(28)의 연구에서도 *db/db* 생쥐의 혈장 중 총콜레스테롤 함량은 실험기간 동안 상승하였고, 자두를 급여하였을 때 유의적( $p<0.05$ )인 감소를 보였다.

4주간의 실험기간이 끝난 후 측정된 혈장 중 HDL-콜레스테롤 함량은 db-OF에서 증가를 보였으나 통계적으로 유의한 차이는 아니었다(Fig. 2A). MacLean 등(29)은 동맥경화성 식이를 급여한 *db/db* 생쥐에 대한 실험을 수행한 바, 당뇨병 대조군에서 3개월 동안 혈장 HDL-콜레스테롤이 꾸준히 증가함으로써 제2형 당뇨병에서 HDL-콜레스테롤이 반

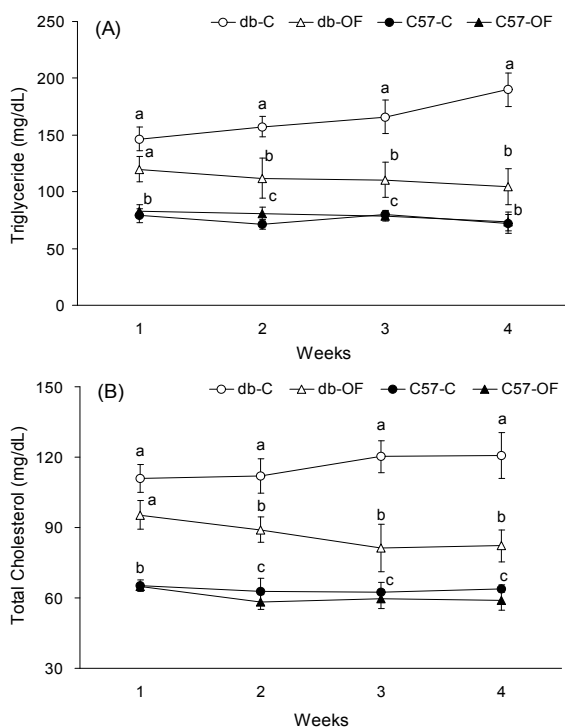


Fig. 1. Changes of plasma triglyceride (A) and total cholesterol (B) by supplementation of OF in *db/db* mice and C57 mice for 4 weeks. Values are mean  $\pm$  SE,  $n=6$ . db-C, diabetic control diet for *db/db* mice; db-OF, 5% OF of diabetic diet in *db/db* mice; C57-C, non-diabetic control diet for C57 mice; C57-OF, 5% OF of non-diabetic diet in C57 mice. OF, *Opuntia ficus-indica* complex. Values with different letters at same week points are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p<0.05$ ).

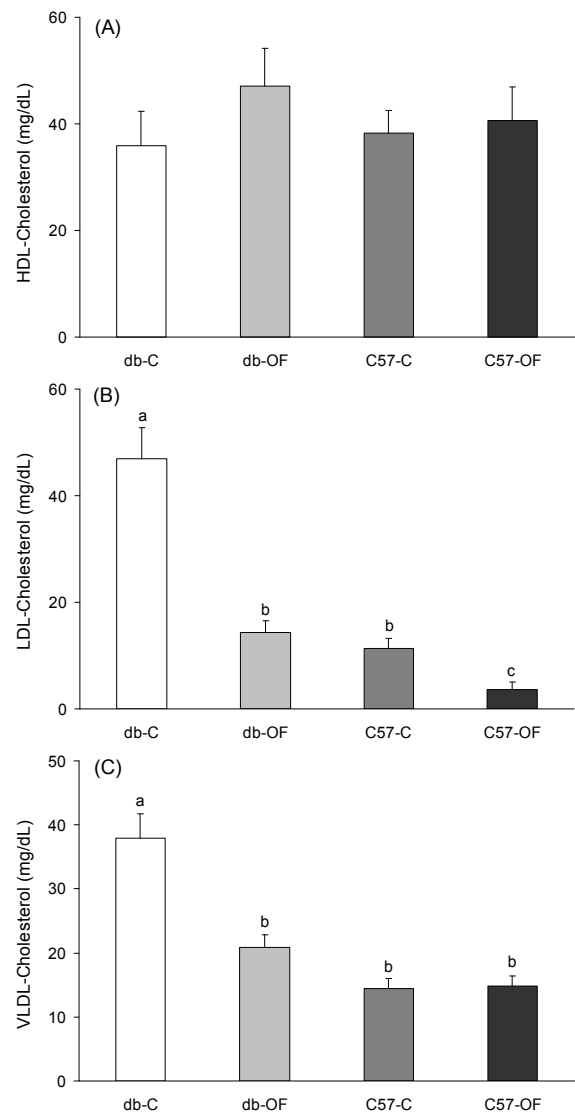


Fig. 2. Comparison of plasma high density lipoprotein (HDL)-cholesterol (A), low density lipoprotein (LDL)-cholesterol (B) and very low density lipoprotein (VLDL)-cholesterol (C) by supplementation of OF in *db/db* mice and C57 mice for 4 weeks. Values are mean  $\pm$  SE,  $n=6$ . db-C, diabetic control diet for *db/db* mice; db-OF, 5% OF of diabetic diet in *db/db* mice; C57-C, non-diabetic control diet for C57 mice; C57-OF, 5% OF of non-diabetic diet in C57 mice. OF, *Opuntia ficus-indica* complex. Values with different letters at same week points are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p<0.05$ ).

드시 감소하는 것이 아님을 확인하였다.

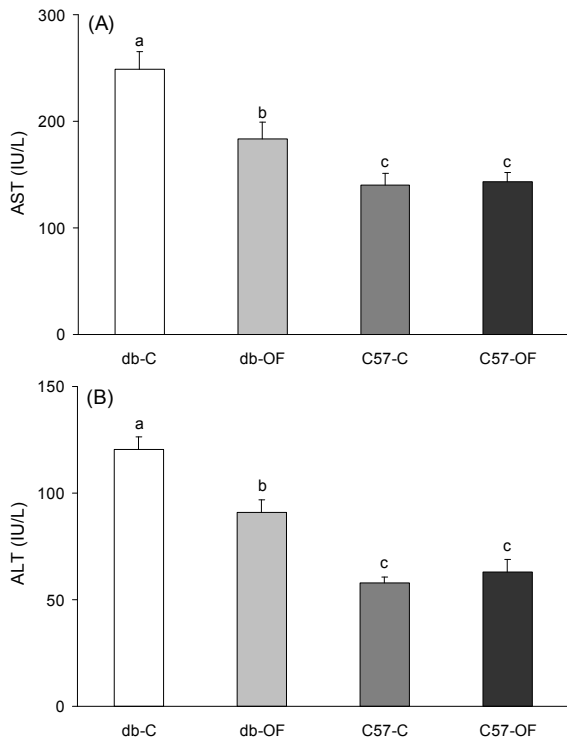
혈장 LDL-콜레스테롤 함량은 4주간의 실험이 끝난 후 측정되었는데, db-C가 db-OF에 비하여 327%의 증가를 보였고, db-OF는 C57-C와 비슷한 LDL-콜레스테롤 함량을 나타내었다( $p < 0.05$ , Fig. 2B). 이러한 현상은 제2형 당뇨병에서 전형적으로 출현하는 지질대사 이상을 보여주는 것으로 OF의 급여가 LDL-콜레스테롤을 저하시킨다는 사실을 알 수 있었다.

Fig. 2C에서 보는 바와 같이 혈장 VLDL-콜레스테롤 함량도 LDL-콜레스테롤 함량과 유사한 경향을 보여 db-OF가 db-C에 비해 45%의 감소를 보여 정상군과 비슷한 수준을 보였다( $p < 0.05$ ). 즉 OF의 급여가 LDL-콜레스테롤과 함께 VLDL-콜레스테롤도 감소시킴이 관찰되었다.

또한 손바닥선인장, 하늘타리, 목단피, 산약, 강황과 호로파를 첨가한 복합물을 streptozotocin으로 유발된 당뇨쥐에게 2%와 5% 수준으로 급여했을 경우와 비슷한 경향을 나타냈으나, db-OF군에서의 중성지방과 콜레스테롤 감소효과가 더 우수한 것을 확인하였다(16).

**혈장 중 AST 및 ALT 함량**

제2형 당뇨병 쥐인 *db/db* 생쥐에서는 비만과 함께 심한



**Fig. 3.** Comparison of plasma aspartate aminotransferase (AST) (A) and alanine aminotransferase (ALT) (B) by supplementation of OF in *db/db* mice and C57 mice for 4 weeks. Values are mean  $\pm$  SE, n=6. db-C, diabetic control diet for *db/db* mice; db-OF, 5% OF of diabetic diet in *db/db* mice; C57-C, non-diabetic control diet for C57 mice; C57-OF, 5% OF of non-diabetic diet in C57 mice. OF, *Opuntia ficus-indica* complex. Values with different letters at same week points are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

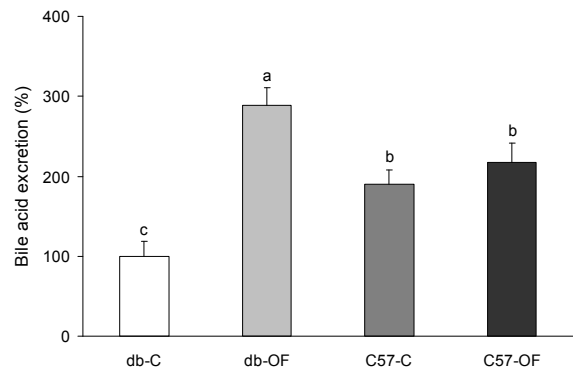
지방간 현상을 나타내는데, 혈장 중 AST와 ALT는 간세포에 다량 존재하는 효소로서 간세포 손상 시에 혈중으로 유출되기 때문에 간세포 손상의 지표로 이용된다(30,31).

AST의 경우(Fig. 3A), C57-C와 C57-OF 간의 차이는 없었으며, db-C는 C57-C에 비하여 77%의 증가를 보였고 db-OF는 30%의 증가를 보였다( $p < 0.05$ ). ALT를 살펴보면(Fig. 3B) C57-C와 C57-OF 간에 차이는 거의 없었으나, db-C는 C57-C에 비하여 2배의 증가를 보였고 db-OF는 57%의 증가를 보였다( $p < 0.05$ ). Holt(5)에 의하면 제2형 당뇨병에서 지방간의 빈도는 21~78%로 제1형 당뇨병의 4~17%에 비해 높은 수준이었는데, 이러한 지방간은 혈액 및 간의 유리지방산 증가로 인해 간에서 중성지방 합성이 촉진되고, 결국 중성지방 합성물이 초저밀도 지단백으로 분비시킬 수 있는 간의 능력을 초과함으로 인해 유발되며, 지방간으로 ALT 등이 상승할 수 있다고 하였다.

본 실험 결과, db-C에서 높은 수준의 AST와 ALT 함량이 나타난 현상은 비만으로 인한 지방간에 의해 간세포가 파괴되었음을 추측할 수 있는 바, 보다 명확한 판단을 위하여 간의 조직학적 관찰이 필요하였다. 혈장 AST와 ALT를 유의적( $p < 0.05$ )인 수준으로 낮추었다는 사실로 비추어 OF의 급여는 간세포의 손상을 억제할 수 있음을 일차적으로 확인할 수가 있었다.

**분변의 담즙산 함량**

Han 등(32)의 보고에 의하면 분변 중 담즙산의 함량으로써 체내 콜레스테롤의 배출을 알 수 있다. 분변으로 배출된 담즙산의 함량은 db-C를 기준으로 하였을 때 db-OF는 2.9배, C57-C는 1.9배, C57-OF는 2.2배의 증가를 보임으로써 OF의 급여가 담즙산의 배출을 높이는 것을 알 수 있었다(Fig. 4). Tiemann 등(10)의 연구 보고를 보면 콜레스테롤을 급여한 C57 mice의 간과 분변에서 담즙산의 함량이 높은 것을 알 수 있는데, 이것은 식이로 섭취한 콜레스테롤이 간에



**Fig. 4.** Effect of OF on fecal bile acid excretion in *db/db* mice and C57 mice fed experimental diet for 4 weeks. Values are mean  $\pm$  SE, n=6. db-C, diabetic control diet for *db/db* mice; db-OF, 5% OF of diabetic diet in *db/db* mice; C57-C, non-diabetic control diet for C57 mice; C57-OF, 5% OF of non-diabetic diet in C57 mice. OF, *Opuntia ficus-indica* complex. Values with different letters at same week points are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

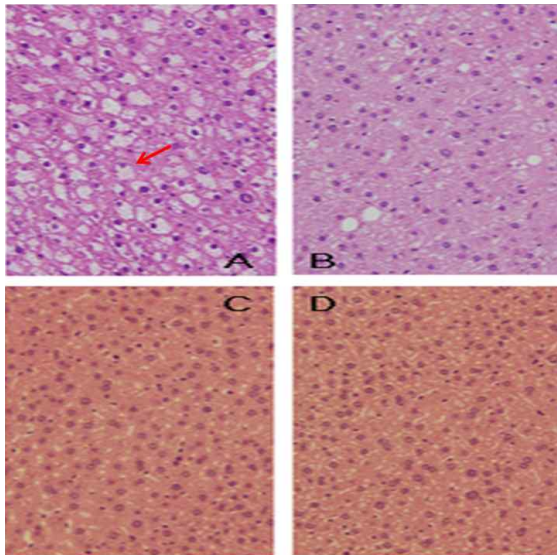


Fig. 5. Hematoxylin and eosin staining of hepatic tissue from diabetic mice fed experimental diet for 4 weeks. (A) db-C, diabetic control diet for *db/db* mice. (B) db-OF, 5% OF of diabetic diet in *db/db* mice. (C) C57-C, non-diabetic control diet for C57 mice; (D) C57-OF, 5% OF of non-diabetic diet in C57 mice. OF, *Opuntia ficus-indica* complex. Original magnification,  $\times 200$ .

서 담즙산으로 바뀌어 분변 중으로 배출되는 것을 의미한다.

Han 등(9)의 연구에서 콩을 급여한 C57 mice와 ApoE mice의 분변에서 보다 많은 담즙산이 배설되었다. 분변에서의 담즙산의 증가는 한편으로 체내 콜레스테롤을 담즙산으로 배설시키는 유전인자인 *CYP7A1*의 RT-PCR을 통해서 확인해볼 수 있어 관련 실험을 수행하였다.

#### 간 조직 관찰

각 실험군들의 간조직의 조직학적 변화 결과(Fig. 5)를 살펴보면, C57-C와 C57-OF에서는 중심정맥 주변부와 문맥 주변부의 간세포에서 세포질이나 세포핵 및 동양모세혈관 등에 병리학적인 소견을 나타내지 않았으며 간세포대의 배열도 매우 규칙적이었다. 그러나 db-C에서는 간세포 내에 지방축적에 의한 공포들이 많이 관찰되며 일부에서는 축적된 지방들에 의해 핵이 세포의 주변으로 밀려나 있었고, 그로 인한 간세포의 괴사도 관찰되었다. 공시한 *db/db* mice에서 관찰된 심각한 지방간 소견은 Xu 등(33)의 연구에서도 관찰되었다. db-OF에서는 db-C에 비해 적게나마 지방간 현상이 나타났고 세포 외부의 지방구를 관찰할 수 있었는데, 이러한 세포 외부의 지방구는 세포 내에 있던 지방이 소비되기 위하여 세포 외부로 유출된 것이거나 세포가 파괴되어 세포 내부의 지방이 세포 외부에 모인 것인데, 병리학적 형태로 볼 때 전자일 가능성이 더 크다.

#### 유전자 발현 분석

혈청 콜레스테롤 농도를 조절하는 콜레스테롤 합성성 메커니즘에 대하여 콜레스테롤합성계, 특히 HMG-CoA-R을 중심으로 알려진 것은 간장의 스테롤합성과 HMG-CoA-R

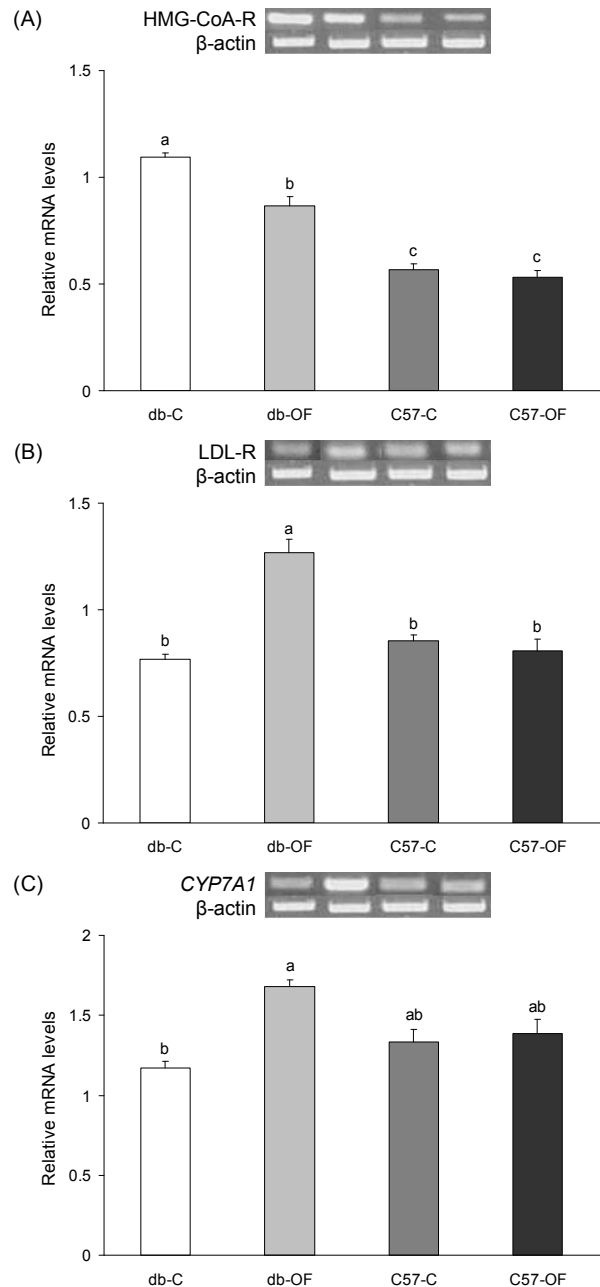


Fig. 6. Effect of the OF on 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (HMG-CoA-R) (A), low density lipoprotein receptor (LDL-R) (B) and cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (*CYP7A1*) (C) mRNA expression. Values are mean  $\pm$  SE, n=6. db-C, diabetic control diet for *db/db* mice; db-OF, 5% OF of diabetic diet in *db/db* mice; C57-C, non-diabetic control diet for C57 mice; C57-OF, 5% OF of non-diabetic diet in C57 mice. OF, *Opuntia ficus-indica* complex. Values with different letters at same week points are significantly different by Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ).

활성과는 밀접한 정의 관계를 나타내며, 콜레스테롤 합성계에서 가장 중요한 율속효소라는 것이다. 콜레스테롤 합성은 세포질에서 acetyl-CoA를 전구체로 HMG-CoA가 합성되며, 이후 mevalonate로 전환되고 복잡한 30여 단계들을 거쳐서 이루어진다. 이 과정 중 HMG-CoA를 mevalonate로 전

환하는 효소가 HMG-CoA-R이다(34). 간에서 콜레스테롤의 합성량을 알아보기 위해 HMG-CoA-R을 측정 한 결과 C57-C에 비하여 db-C는 196%의 증가를 보였으며, db-OF는 152%의 증가를 보였다(Fig. 6A). 이것은 콜레스테롤의 생성이 OF급여군에서 감소한다는 것으로 혈장 중 콜레스테롤 함량 결과와 같은 경향을 보였다.

혈액 중 존재하는 LDL의 약 60% 이상은 간장 LDL-R을 통하여 제거된다. LDL-R을 확인한 결과 db-OF에서 유의적( $p < 0.05$ , Fig. 6B)인 증가를 보여 혈액 중의 LDL-콜레스테롤이 감소되었던 혈장의 조성 과 같은 경향을 보였다.

또한 콜레스테롤로부터 담즙산의 생성을 알 수 있는 *CYP7A1*을 확인한 결과 역시 분변에서 담즙산 배설이 많았던 db-OF군에서 높게 나타났다(Fig. 6C). 이러한 결과들로 비추어 볼 때 OF는 콜레스테롤을 담즙으로 배설시키는 효과가 있다는 것을 확인할 수 있었고 이로 인해 혈장 중의 콜레스테롤을 낮춘다.

## 요 약

유전적으로 제2형 당뇨병이 유발되는 *db/db* 생쥐에 OF를 5% 수준으로 4주간 급여한 결과 지방 대사를 개선시켜, 혈장 총콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, VLDL-콜레스테롤과 중성지방을 유의적으로( $p < 0.05$ ) 감소시켰고, HDL-콜레스테롤은 유의적인 차이를 보이지 않았다. 혈장 총콜레스테롤의 감소는 간에서 HMG-CoA-R의 감소에 의한 콜레스테롤의 생성이 줄어든 것이고, 또한 콜레스테롤을 담즙산으로 합성하는 *CYP7A1*을 증가시켜 콜레스테롤을 담즙산의 형태로 배설시켰기 때문이다. 이 결과 분변 중 담즙산의 함량이 증가하였다. LDL-콜레스테롤의 감소는 LDL-콜레스테롤을 세포로 이동시켜 분해를 촉진하는 LDL-R의 증가로 확인할 수 있었다. *db/db* mice에서는 비만뿐 아니라 심각한 지방간이 유발되는데 OF의 급여로 AST와 ALT를 낮추어 간세포의 파괴를 완화시켰으며, 간 조직의 H&E 염색 소견에서도 지방간의 완화를 확인할 수 있었다. 또한 대조군으로 C57 생쥐에게 5% 수준으로 OF를 급여한 결과 OF를 급여하지 않은 대조군과 OF를 급여한 실험군의 혈장 중성지방, 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, VLDL-콜레스테롤, AST와 ALT 함량의 차이가 없었으며, 간조직 관찰에서도 차이를 나타내지 않았다. 이상의 결과를 종합할 때, OF는 당뇨병이 유발되지 않은 정상혈당의 생쥐에서는 지질대사에 아무런 영향을 주지 않았으며, 제2형 당뇨병인 *db/db* mice의 당뇨병 합병증인 지질대사 이상을 개선하는데 효과가 있는 것으로 사료되며, OF의 어떤 성분이 이와 같은 효과를 나타냈는지 보다 구체적인 성분 분석과 세부적인 연구를 통한 확인이 필요하다고 사료된다.

## 문 헌

1. Yoon KH. 1999. Clinical characteristics of diabetes mellitus in Korea. *Food Industry and Nutrition* 4(3): 73-82.
2. Lee TH. 1999. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Food Industry and Nutrition* 4(2): 61-65.
3. Kim MJ. 2001. Effect of amaranth (*Amaranthus* spp. L.) on lipid metabolism and serum glucose level in diabetic rats. *MS Thesis*. Korea University, Seoul, Korea. p 5-6.
4. Park SH, Lee YK, Lee HS. 1994. The effectss of dietary fiber feeding on gastrointestinal functions and lipid and glucose metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Nutr* 27: 311-322.
5. Holt RIG. 2010 *Textbook of diabetes*. 4th ed. Wiley-Blackwell, West Sussex, UK. p 56-60.
6. O'Meara NM, Devery RA, Owens D, Collins PB, Johnson AH, Tomkin GH. 1990. Cholesterol metabolism in alloxan-induced diabetic rabbits. *Diabetes* 39: 629-633.
7. Sung JH, Lee SJ, Park KH, Moon TW. 2004. Isoflavones inhibit 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase *in vitro*. *Biosci Biotechnol Biochem* 68: 428-432.
8. Brown MS, Goldstein JL. 1986. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 232: 34-47.
9. Han SH, Chung MJ, Lee SJ, Rhee C. 2006. Digestion-resistant fraction from soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] induced hepatic LDL receptor and *CYP7A1* expression in apolipoprotein E-deficient mice. *J Nutr Biochem* 17: 682-688.
10. Tiemann M, Han Z, Soccio R, Bollineni J, Shefer S, Sehayek E, Breslow JL. 2004. Cholesterol feeding of mice expressing cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase increases bile acid pool size despite decreased enzyme activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 1846-1851.
11. Shin DJ, Plateroti M, Samarut S, Osborne TF. 2006. Two uniquely arranged thyroid hormone response elements in the far upstream 5' flanking region confer direct thyroid hormone regulation to the murine cholesterol 7 $\alpha$  hydroxylase gene. *Nucleic Acids Res* 34: 3853-3861.
12. Cárdenas Medellín ML, Serna Saldívar SO, Velazco de la Garza J. 1998. Effect of raw and cooked nopal (*Opuntia ficus indica*) ingestion on growth and profile of total cholesterol, lipoproteins, and blood glucose in rats. *Arch Latinoam Nutr* 48: 316-323.
13. Fernandez ML, Lin EC, Trejo A, McNamara DJ. 1992. Prickly pear (*Opuntia* sp.) pectin reverses low density lipoprotein receptor suppression induced by a hypercholesterolemic diet in guinea pigs. *J Nutr* 122: 2330-2340.
14. Oh PS, Lim KT. 2006. Glycoprotein (90 kDa) isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten* MAKINO lowers plasma lipid level through scavenging of intracellular radicals in triton WR-1339-induced mice. *Biol Pharm Bull* 29: 1391-1396.
15. Yoon JA, Lee SJ, Kim HK, Son YS. 2011. Ameliorating effects of a nopal (*Opuntia ficus-indica*) complex on blood glucose in *db/db* mice. *Food Sci Biothechnol* 20: 255-299.
16. Yoon JA, Son YS. 2009. Effects of *Opuntia ficus-indica* complexes B (OCB) on blood glucose and lipid metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J Food & Nutr* 22: 48-56.
17. Lim SJ, Choi SS. 1997. The effect of *Tricosanthes kiliouii* Max. subfractions on the insulin activity in streptozotocin induced diabetic rats and their acute toxicity. *Korean J Nutr* 30: 25-31.
18. Sima AA, Dunlap JA, Davidson EP, Wiese TJ, Lightle RL, Greene DA, Yorek MA. 1997. Supplemental myo-inositol

- prevents L-fucose-induced diabetic neuropathy. *Diabetes* 46: 301-306.
19. Yadav UC, Moorthy K, Baquer NZ. 2004. Effects of sodium-orthovanadate and *Trigonella foenum-graecum* seeds on hepatic and renal lipogenic enzymes and lipid profile during alloxan diabetes. *J Biosci* 29: 81-91.
  20. Kwack KH, Kim SH, Song HJ. 1993. The effects of *Yukmi-jihwangtang* & *Discoriae radix* on the changes of blood glucose & serum in diabetic rats induced by alloxan. *J Oriental Medical Pathology* 8: 137-156.
  21. Xie JT, Aung HH, Wu JA, Attel AS, Yuan CS. 2002. Effects of American ginseng berry extract on blood glucose levels in *ob/ob* mice. *Am J Chin Med* 30: 187-194.
  22. Warnick GR, Knopp RH, Fitzpatrick V, Branson L. 1990. Estimating low-density lipoprotein cholesterol by the Friedewald equation is adequate for classifying patients on the basis of nationally recommended cutpoints. *Clin Chem* 36: 15-19.
  23. Reitman S, Frankel S. 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases. *Am J Clin Pathol* 28: 56-63.
  24. Fausa O, Skalhogg BA. 1974. Quantitative determination of bile acids and their conjugates using thin-layer chromatography and a purified 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Scand J Gastroenterol* 9: 249-254.
  25. Yoon JA. 2007. Effect of *Opuntia ficus-indica* complexes on blood glucose and lipid metabolism in animal model of type I and type II diabetes. *PhD Dissertation*. Korea University, Seoul, Korea. p 55-58.
  26. Yajima K, Hirose H, Fujita H, Seto Y, Fujita H, Ukeda K, Miyashita K, Kawai T, Yamamoto Y, Ogawa T, Yamada T, Saruta T. 2003. Combination therapy with PPAR $\gamma$  and PPAR $\alpha$  agonists increases glucose-stimulated insulin secretion in *db/db* mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 284: E966-E971.
  27. Kawasaki F, Matsuda M, Kanda Y, Inoue H, Kaku K. 2005. Structural and functional analysis of pancreatic islets preserved by pioglitazone in *db/db* mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E510-E518.
  28. Utsunomiya H, Yamakawa T, Kamei J, Kadonosono K, Tanaka S. 2005. Anti-hyperglycemic effects of plum in a rat model of obesity and type 2 diabetes, Wistar fatty rat. *Biomed Res* 26: 193-200.
  29. MacLean PS, Bower JF, Vadlamudi S, Osborne JN, Bradfield JF, Burden HW, Bensch WH, Kauffman RF, Barakat HA. 2003. Cholesteryl ester transfer protein expression prevents diet-induced atherosclerotic lesions in male *db/db* mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 1412-1415.
  30. Bursch W, Schulte-Hermann R. 1986. Cytoprotective effect of the prostacyclin derivative iloprost against liver cell death induced by the hepatotoxins carbon tetrachloride and brombenzen. *Klin Wochenschr* 7: 47-50.
  31. Jeong KS. 2003. Effects of *Bambusae Caulis* in *Liquamen* obtained from different production process on blood sugar in *db/db* mice. *PhD Dissertation*. Dong-shin University, Jeonnam, Korea.
  32. Han KH, Iijuka M, Shimada KI, Sekikawa M, Kuramochi K, Ohba K, Ruvini L, Chiji H, Fukushima M. 2005. Azuki resistant starch lowered serum cholesterol and hepatic 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA mRNA levels and increased hepatic LDL-receptor and cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase mRNA levels in rats fed a cholesterol diet. *Br J Nutr* 94: 902-908.
  33. Xu A, Lam MC, Chan KW, Wang Y, Zhang J, Hoo RL, Xu JY, Chen B, Chow WS, Tso AW, Lam KS. 2005. Angiotensin-like protein 4 decreases blood glucose and improves glucose tolerance but induces hyperlipidemia and hepatic steatosis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102: 6086-6091.
  34. Choi YS, Lee SY. 1992. Serum cholesterol and 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase. *J Korean Soc Food Nutr* 21: 580-593.

(2012년 11월 8일 접수; 2013년 5월 8일 채택)