

홍국(*Monascus purpureus*)쌀을 첨가한 고콜레스테롤 식이가 흰쥐의 항산화 활성에 미치는 영향

권 정 숙

안동대학교 생활과학대학 식품영양학과

Effect of Red Yeast (*Monascus purpureus*) Rice Supplemented Diet on Lipid Profiles and Antioxidant Activity in Hypercholesterolemic Rats

Chong Suk Kwon

Dept. of Food Science and Nutrition, Andong National University, Gyeongbuk 760-749, Korea

ABSTRACT Red yeast rice (RYR) has been known to exhibit various biological effects, including anti-hyperlipidemia, antioxidant, anti-tumor, and anti-inflammatory activities. Oxidative stress is a main risk factor in the development of cardiovascular disease, such as atherosclerosis. Therefore, the aim of this study was to investigate the possible hypolipidemic and antioxidant effect of RYR on rats fed a high-cholesterol diet supplemented with either 0.2%, 1%, or 5% RYR for 4 weeks. We measured lipid profiles in the plasma and liver, antioxidant enzyme activities in plasma and erythrocyte, gene expression of antioxidant enzymes in the liver, and oxidative DNA damage in lymphocytes. The group supplemented with 0.2% RYR had total cholesterol level in plasma decreased by 24%, while the group supplemented with 5% RYR had high-density cholesterol increased by 20% compared to the control. The antioxidant enzyme activities were also affected by RYR supplementation. Total superoxide dismutase activities in plasma significantly decreased by 11% in the 1% RYR group, while these activities in the liver significantly decreased by 16% and 21% in the 1% and 5% supplemented group compared to the control, respectively. Glutathione peroxidase activities in plasma and erythrocytes increased 13% and 48% in the 1% RYR group, respectively. Catalase (CAT) activity in erythrocytes significantly increased by 49% and 68% in the 1% and 5% RYR group compared to the control, respectively. The gene expression of CAT was up-regulated 7.9 fold compared to the control in the 5% RYR supplemented group. These results suggest that RYR can control hyperlipidemia by improving the lipid profile and modulating oxidative stress.

Key words: red yeast rice, *Monascus purpureus*, oxidative DNA damage, antioxidant enzymes, gene expression

서 론

찐 백미에 홍국(*Monascus purpureus*)을 접종하고 배양하여 만든 홍국쌀은 'red Koji' 또는 'Hong Qu'로도 불리며, 중국에서는 수세기 동안 식품으로서뿐 아니라 술을 비롯한 발효식품 제조에 향미 증진제나 착색제로 사용되고 있으며 민간에서는 소화촉진과 혈액순환 개선에 효과가 있는 것으로 널리 알려져 왔다(1). 최근에는 홍국의 발효과정에서 생성되는 이차 대사산물의 다양한 기능이 보고되고 있으며 그중에서도 콜레스테롤 합성 저해 작용이 있는 monacolin K(lovastatin)(2-4), 혈압 강하 작용이 있는 γ -aminobutyric acid(5), 항산화 작용이 있는 dimeric acid(6)와 3-hydroxy-4-methoxybenzoic acid(7) 등이 잘 알려져 있다. 이외에도 홍국에는 알코올성 간 손상에 대한 간

보호 작용(8), Alzheimer's disease 발생과 관련 있는 amyloid β -peptide의 신경세포에 대한 독성 억제 효과(9) 및 각종 항균 활성(10,11)에 대한 연구도 보고되어 있다.

생체에는 활성산소종을 생성하는 시스템과 생성된 활성산소종을 제거하는 항산화 방어 시스템이 공존하고 있으며, 활성산소종이 생체에 미치는 산화적 손상은 최소화하면서 유익한 기능을 수행하도록 하기 위해서는 이 두 시스템 간의 균형을 유지하는 것이 매우 중요하다. 만약 항산화 방어 시스템이 활성산소종을 효율적으로 처리하지 못하는 상태, 즉 산화적 스트레스(oxidative stress) 상태가 되면 DNA를 비롯하여 세포와 조직을 구성하는 단백질, 지질 및 다른 성분들이 활성산소종에 의해 손상될 수 있고 이로 인해 각종 질병의 발생으로 이어질 수 있다(12). 고지혈증 특히 고콜레스테롤 상태에서 산화 스트레스는 지질과산화물의 생성 및 low-density lipoprotein(LDL)의 산화를 촉진시키고 이로 인해 관상심장질환과 동맥경화증의 발생을 유도하는 것으로 알려져 있다. 따라서 산화 스트레스와 이들 질환의 관련

성에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다(13-15).

홍국쌀은 2009년 KFDA로부터 혈액 콜레스테롤 저하 작용을 주 기능으로 하는 기능성 원료로 인정받았으며, 노인 인구의 증가와 건강에 대한 관심이 높아지면서 기능성 쌀로써 홍국쌀에 대한 관심도 함께 증가하고 있는 추세이다. 하지만 홍국쌀의 콜레스테롤 개선 효과에 대해 알려진 것에 비해, 고콜레스테롤혈증에서 나타나는 산화 스트레스에 대한 홍국쌀의 유용성에 대한 정보는 부족한 것으로 사료된다. 이에 본 연구에서는 고콜레스테롤 식이에 홍국쌀 분말을 첨가한 식이를 섭취한 동물에서 홍국쌀의 지질 개선 효과와 함께 항산화 효과를 혈액과 간의 항산화 효소 활성, 항산화 효소의 유전자 발현 및 DNA 손상에 미치는 영향으로 분석하였다.

재료 및 방법

동물사육 및 식이

Sprague-Dawley계 흰쥐(170±10g) 수컷을 중앙실험동물(주)(Seoul, Korea)로부터 구입하여 1주일간 적응시킨 후 6마리씩 4군으로 나누어 5주간 사육하였다. 실험 식이는 AIN-76 diet를 기준으로 조제하였으며 모든 실험군에 우지 10%와 콜레스테롤 1%를 함유한 식이를 투여하였다. 홍국쌀은 한스바이오(주)(경북 영양군, 한국)로부터 제공받아 마쇄하여 100 mesh 체를 통과한 것을 사료의 0.2%(0.2% RYR), 1%(1% RYR) 및 5%(5% RYR)로 각각 첨가하고 홍국쌀이 첨가되는 양만큼 기본 식이에서 전분량을 조절하였으며, 홍국쌀을 첨가하지 않은 실험군을 대조군(control)으로 하였다(Table 1). 실험동물의 체중과 식이섭취량은 일주일에 두 번 일정한 시간에 측정하였으며, 식이와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다. 사육실 환경은 24±2°C, 습도 55±5%로 유지하고 명암은 12시간 주기로 일정하게 조절하였다.

Table 1. Composition of the experimental diets (w/w, %)

Ingredients	Group			
	Control	0.2% RYR	1% RYR	5% RYR
Corn starch	39	38.8	38	34
Sucrose	15	15	15	15
Casein	20	20	20	20
Beef tallow	10	10	10	10
Corn oil	5	5	5	5
Cellulose	5	5	5	5
Mineral mixture ¹⁾	3.5	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture ²⁾	1	1	1	1
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2
Methionine	0.3	0.3	0.3	0.3
Cholesterol	1	1	1	1
Red yeast rice	0	0.2	1	5
Total	100.0	100.0	100.0	100.0

¹⁾AIN-76 mineral mixture (g/100 g diet).

²⁾AIN-76 vitamin mixture (g/100 g diet).

시료 채취

실험 식이를 공급하고 4주 후에 동물을 12시간 절식시킨 후 CO₂ 가스로 마취시켜 개복한 후 복부대동맥을 통해 채혈하고, 일부 혈액은 채혈한 즉시 histopaque 1077을 사용하여 림프구를 분리한 후 comet assay를 시행하였으며, 나머지 혈액은 원심분리(3,000 rpm, 20분) 하여 혈장과 적혈구를 분리한 후 -70°C에 보관하였다. 간을 적출하여 생리식염수로 행군 후 수분을 제거하고 무게를 측정하였으며, cytosol을 분리하여 항산화 효소 활성 측정용 시료로 사용하였다. 채취한 간의 일부를 RNA_{later} 처리하여 -70°C에 보관하고 항산화 효소 유전자 발현 측정용 시료로 사용하였다.

혈장 및 간의 지질 농도

혈장의 중성지방, 총 콜레스테롤 및 HDL(high-density lipoprotein) 콜레스테롤 농도는 측정용 kit(아산제약, 서울, 한국)를 사용하여 측정하였고, LDL 콜레스테롤은 Friedwald 식을 사용하여 계산하였다. 간의 총 지질은 간 조직을 Folch 법으로 추출한 후 정량하였으며, 추출한 간 지질을 시료로 하여 간의 중성지방과 총 콜레스테롤량을 측정용 kit를 사용하여 측정하였다.

혈장 transaminase 활성 측정

혈장 aspartate aminotransferase(AST)와 alanine aminotransferase(ALT) 활성을 kit(아산제약)로 측정하였다.

항산화 효소 활성과 TBARS 측정

혈장, 적혈구 및 간의 glutathione peroxidase(GPx) 활성은 Paglia와 Valentine(16)의 방법에 따라, superoxide dismutase(SOD) 활성은 Flohe와 Otting(17)의 방법에 따라, catalase(CAT) 활성은 Aebi(18)의 방법에 따라, 간 조직의 TBARS는 Ohkawa 등(19)의 방법에 따라 각각 분광광도계(Hitachi U-3010, Tokyo, Japan)로 측정하였다.

Comet assay

DNA 손상 정도를 측정하기 위하여 Singh 등(20)의 방법에 따라 림프구를 시료로 하여 comet assay를 행하였다. 슬라이드에 1% high melting point agarose(100 µL), 림프구(슬라이드 당 약 10,000개)와 1% low melting point agarose의 현탁액 그리고 1% low melting point agarose의 순으로 도포한 후 4°C에 10분간 방치한다. 림프구가 도포된 슬라이드를 phosphate-buffered saline(unstressed lymphocytes) 또는 50 µM H₂O₂가 함유된 phosphate-buffered saline(stressed lymphocytes)에 5분간 각각 방치(4°C)한다. 슬라이드를 lysis buffer(pH 10)에 1시간 방치(4°C)한 후 unwinding buffer(pH 13)에 30분간 두었다가 저온 암실에서 전기영동(25 V/300 mA, 20분)한다. 중화시킨 후 ethidium bromide로 염색하여 형광현미경(Leica DM IL, Bensheim, Germany)과 'Komet 5.0' software

Table 2. Nucleotide sequences of PCR Primers used for semi-quantitative RT-PCR of the antioxidant enzymes

Target gene	Primer sequence (5'→3')
β -Actin	F: CTA TGA GCT GCC TGA CCG TC R: AGT TTC ATG GAT GCC ACA GG
Zn/Cu SOD	F: GTC GTC TCC TTG CTT TTT GC R: TCT GCT CGA AGT GAA TGA CG
Mn SOD	F: CGT CAC CGA GGA GAA GTA CC R: CAG CCT GAA CCT TGG ACT CC
GPx	F: GTC CAC CGT GTA TGC CTT CT R: ATT CTC GAT GAG CAG CAC CT
CAT	F: AAG CTG GTT AAT GCG AAT GG R: CAA GTT TTT GAT GCC CTG GT

(Kinetic Imaging, Liverpool, UK)로 image를 분석하고, DNA 손상 정도를 tail extent moment(TEM=tail length×% tail DNA)로 나타내었다. 각 처리구에 2개씩의 슬라이드를 만들고 슬라이드 당 50 개씩의 림프구를 임의로 선정하여 DNA image를 분석하였다.

항산화 효소의 유전자 발현

홍국쌀 식이가 항산화 효소의 유전자 발현에 미치는 영향을 semi-quantitative real time PCR(RT-PCR)로 측정하였다. 간 조직으로부터 RNA를 추출(Quiagen, Santa Clara, CA, USA)하고 SuperScript II reverse transcriptase(Life Technologies, Paisley, UK)를 사용하여 cDNA를 합성한다. 다음 mRNA 발현 정도를 Exicycler(Bioneer Co., Daejeon, Korea)로 분석하였다. 항산화 효소 primer는 Bioneer Co.에 주문 제작하였으며, primer sequence는 Table 2와 같고 internal control로 β -actin을 사용하였다. 유전자 발현 정도는 측정된 Ct(threshold cycle) 값을 사용하여 the comparative CT($2^{-\Delta\Delta CT}$) method(21)로 계산하여 대조군에 대한 상대적 발현비로 나타내었다.

통계처리

자료 분석은 SPSS 18.0(statistical package for the social science, Chicago, IL, USA) PC package를 이용하였다. 결과는 평균±표준편차로 나타내었으며, 각 변수에 대해 일원배치분산분석(one-way ANOVA)을 실시하였다. 사후 검정으로는 Duncan's multiple range test를 적용하였으며

$\alpha=0.05$ 수준에서 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

식이섭취량, 체중증가량 및 간 무게

홍국쌀 분말을 각각 0.2%, 1% 및 5% 첨가한 식이를 투여하고 4주 후의 체중 변화, 식이섭취량, 식이 효율 및 간 무게를 측정하여 결과를 Table 3에 나타내었다. 식이섭취와 체중증가량 그리고 간 무게에 있어서 대조군과 홍국 쌀 첨가군에 있어서 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다. Rhyu 등(22)도 홍국쌀 분말을 0.3%까지 식이에 첨가하여 8주간 실험동물에 투여한 실험에서 실험군 간에 식이섭취량과 체중에 있어서 유의적인 차이가 없었다고 보고한 바 있으며, Yu 등(23)이 홍국쌀 2%와 4% 첨가한 식이를 투여한 동물에서도 대조군과 체중, 식이섭취량 및 간 무게에 있어서 유의적인 차이가 없었음을 보고하였다. 홍국쌀의 안전성을 연구하기 위해 홍국쌀 분말을 식이에 2%, 4%, 8% 및 12% 첨가하여 14주간 실험 동물에 투여한 결과에서도 체중과 식이섭취량 및 주요 장기의 무게에 있어서 대조군과 차이가 없는 것으로 나타났다고 보고한 바 있다(24).

혈장과 간의 지질 농도

고콜레스테롤 식이에 홍국쌀 0.2%, 1% 또는 5% 첨가한 식이로 4주간 사육한 동물의 혈장 지질 농도를 Table 4에 나타내었다. 혈장 총 콜레스테롤은 고콜레스테롤 식이만을 공급한 대조군의 81.9 mg/dL에 비해 0.2% 첨가군 62.0 mg/dL, 1% 첨가군 71.3 mg/dL 및 5% 첨가군 72.1 mg/dL로 홍국쌀 0.2% 첨가군에서 대조군에 비해 유의적으로 감소하였으며, 1%와 5% 첨가군에서도 유의성은 없었으나 대조군보다 감소하는 경향을 보였다. HDL 콜레스테롤의 경우 5% 첨가군에서 28.6 mg/dL로 대조군의 22.9 mg/dL에 비해 유의적으로 증가한 것으로 나타났으며, LDL 콜레스테롤의 경우 대조군의 42.2 mg/dL에 비해 0.2% 첨가군에서 24.4 mg/dL로 유의적으로 감소하였다. 중성지방의 경우는 실험군 간에 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 간의 경우(Table 5) 총 지질 함량, 중성지방량 및 총 콜레스테롤 함량에 있어서 실험군 간에 유의성이 나타나지 않았다. 홍국쌀에는 콜레스테롤 합성 억제 물질로 monacolin K(lovastatin)가 함유되어 있어서 고지혈증 유발 동물에서 총 콜레

Table 3. Weight gain, food intake, food efficiency ratio and relative liver weight of rats fed red yeast rice (RYR) with hypercholesterolemic diet for 4 weeks

Group	Weight gain (g)	Food intake (g)	FER (%)	Liver (g/100 g bw)
Control	217.6±20.7 ^{NS}	639.1±13.4 ^{NS}	34.0±3.5 ^{NS}	4.72±0.58 ^{NS}
0.2% RYR	217.2±52.5	630.8±78.0	34.1±4.5	4.82±0.66
1% RYR	216.8±18.7	609.8±64.7	35.6±1.5	4.70±0.34
5% RYR	228.5±17.7	629.0±9.30	36.3±2.7	4.96±0.29

Values are mean±SD (n=6).

NS: not significant.

FER (food efficiency ratio)=[body weight gain (g)/ food intake (g)]×100.

Table 4. Plasma lipid profiles of rats fed red yeast rice (RZR) with hypercholesterolemic diet for 4 weeks (mg/dL)

Group	Total cholesterol	HDL cholesterol	LDL cholesterol	Triglyceride
Control	81.9±14.8 ^a	22.9±6.8 ^a	42.2±12.6 ^a	83.5±28.9 ^{NS}
0.2% RZR	62.0±9.8 ^b	21.4±5.5 ^a	24.4±15.3 ^b	102.2±30.8
1% RZR	71.3±6.5 ^{ab}	22.0±3.9 ^a	32.58±9.4 ^a	84.1±16.3
5% RZR	72.1±8.5 ^{ab}	28.6±5.7 ^b	36.5±12.9 ^a	71.5±27.3

Values are mean±SD (n=6). Different letters within a column indicate significant differences from one another (P<0.05). NS: not significant.

Table 5. Liver lipid profiles of rats fed red yeast rice (RZR) with hypercholesterolemic diet for 4 weeks (mg/g liver)

Group	Total lipid	Triglyceride	Total cholesterol
Control	266.2±20.8 ^{NS}	87.0±11.2 ^{NS}	73.7±6.8 ^{NS}
0.2% RZR	283.5±34.9	87.5±9.6	81.9±13.2
1% RZR	277.6±26.7	93.2±11.9	80.0±14.1
5% RZR	268.6±58.1	80.7±20.4	74.4±11.2

Values are mean±SD (n=6). NS: not significant.

스테롤, 중성지방 및 LDL 콜레스테롤 농도를 감소시키는 효과를 나타내는 것으로 여러 논문에서 보고하고 있다(3,4, 25). Mohan Kumari 등(24)은 고지방 식이가 아닌 일반 식이에 홍국쌀 분말을 각각 2%, 4%, 8% 및 12% 첨가하여 동물에 투여한 경우 12% 첨가군에서 대조군에 비해 총콜레스테롤과 중성지방이 혈액에서는 각각 16%와 22%, 간에서는 각각 38%와 25% 유의성 있게 감소하였다고 하였다. 하지만 홍국쌀 0.2%, 1% 및 5% 식이를 고지방, 고콜레스테롤 식이와 함께 공급한 본 실험에서는 홍국쌀 섭취로 간에서의 지질 변화는 관찰되지 않았으며, 혈액에서는 0.2% 군에서 유의성 있게 감소하였으나 1%와 5% 군에서는 대조군에 비해 감소하는 경향으로 나타났다. Yu 등(23)은 일반 식이에 홍국쌀 2%와 4%를 각각 첨가하여 한 달 동안 투여한 동물에서 혈청 총 콜레스테롤, HDL과 LDL 콜레스테롤 및 중성지방에 있어서 홍국쌀 섭취로 감소하는 경향은 보였으나 유의성은 나타나지 않았다고 하였으며, Rhyu 등(22)도 일반 식이에 홍국쌀 0.03%, 0.1% 및 0.3% 첨가 식이를 8주간 공급한 실험동물에서 혈액의 총 콜레스테롤, HDL 콜레스테롤과 LDL 콜레스테롤 모두 실험군 간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다고 보고하였다. 본 실험에서는 고지방 식이와 함께 홍국쌀 식이를 첨가한 것이 다른 실험들과 결과에 있어서 다소 차이를 보인 요인이 아닌가 사료되며, 1%와 5% 첨가군에서는 감소 경향이었고 오히려 농도가 낮은 0.2% 군에서 유의성 있게 혈액 지질 농도가 개선되는 결과를 보였으므로 0.2%의 낮은 농도에서도 지질 개선 효과가 있는지에 대해서는 앞으로 여러 범위의 농도에서 다시 검증해 볼 필요성이 있는 것으로 사료된다.

혈장 transaminase 활성

고콜레스테롤 식이에 홍국쌀을 첨가한 식이를 4주간 공급하여 사육한 동물의 혈장 ALT와 AST 활성을 측정된 결

Table 6. AST and ALT activities of rats fed red yeast rice (RZR) with hypercholesterolemic diet for 4 weeks (Karmen Unit)

Group	Control	0.2% RZR	1% RZR	5% RZR
AST	120.5±27.1 ^{NS}	113.3±24.6	121.8±16.0	106.7±16.8
ALT	29.6±13.9 ^{NS}	23.3±5.6	29.8±16.0	29.2±26.5

Values are mean±SD (n=6). NS: not significant.

과를 Table 6에 나타내었다. ALT와 AST 활성 모두 홍국쌀 첨가로 인한 영향은 나타나지 않았다. Mohan Kumari 등(24)은 홍국쌀의 안전성을 시험하기 위해 일반 식이에 홍국쌀 분말을 12%까지 첨가하여 흰쥐에 14주간 투여하였지만 ALT, AST, lactate dehydrogenase 및 alkaline phosphatase 모두 대조군에 비해 유의적인 변화가 관찰되지 않았고 보고하였다. 이상의 결과들로부터 홍국쌀의 섭취로 인한 간 조직 손상은 없는 것으로 사료된다.

항산화 효소 활성

혈장, 적혈구 및 간의 항산화 효소 활성을 측정된 결과를 Table 7에 나타내었다. SOD의 경우 혈장에서는 홍국쌀 첨가로 인해 활성이 낮아지는 경향을 보여 대조군의 7.98 unit/min/mL에 비해 1% 첨가군에서 7.14 unit/min/mL로 유의적으로 낮았으나 5% 첨가군에서는 7.75 unit/min/mL로 오히려 대조군 수준으로 높아지는 경향을 보였고, 적혈구에서는 그룹 간에 유의적인 차이가 없었으며, 간에서는 홍국쌀 첨가군의 SOD 활성이 대조군의 28.3 unit/min/mg protein보다 유의적으로 낮아서 0.2%, 1% 및 5% 첨가군에서 각각 25.5, 23.8 및 22.4 unit/min/mg protein으로 나타났다. GPx 활성의 경우 혈장에서는 1% 첨가군(15.9 unit/min/mL)에서 대조군(14.1 unit/min/mL)에 비해 유의적으로 높았고, 적혈구에서도 대조군(16.8 unit/min/mL)에 비해 1%와 5% 첨가군에서 각각 24.8과 24.1 unit/min/mL로 유의적으로 높았으며, 간에서의 활성은 그룹 간에 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 적혈구와 간에서 CAT 활성을 측정한 결과 적혈구에서는 5% 첨가군(2.19 k/mg Hb)에서 대조군(1.30 k/mg Hb)에 비해 유의적으로 높았고, 간에서의 CAT 활성은 그룹 간에 유의성이 없었다. 간의 TBARS 생성량을 측정한 결과 5% 첨가군(323.9 nmol/g liver)에서 대조군(398.2 nmol/g liver)에 비해 19% 유의적으로 감소한 것으로 나타났다. 고지혈증 상태에서 산화 스트레스는 지질과

Table 7. Antioxidant status in blood and liver of rats fed red yeast rice (RYR) with hypercholesterolemic diet for 4 weeks

Antioxidant enzymes	Control	0.2% RY	1% RY	5% RY
Plasma				
SOD (unit/min/mL)	7.98±0.73 ^a	7.30±0.55 ^{ab}	7.14±0.31 ^b	7.75±0.58 ^{ab}
GPx (μmole/min/mL)	14.1±0.6 ^a	15.4±1.0 ^{ab}	15.9±2.1 ^b	14.6±1.2 ^{ab}
Erythrocyte				
SOD (unit/min/mg Hb)	10.5±2.36 ^{NS}	10.6±2.18	10.7±1.20	11.2±1.46
GPx (μmole/min/mg Hb)	16.8±3.7 ^a	22.3±9.2 ^{ab}	24.8±5.0 ^b	24.1±3.3 ^b
CAT (k/mg Hb)	1.30±0.23 ^a	1.61±0.59 ^{ab}	1.94±0.60 ^{ab}	2.19±0.78 ^b
Liver				
SOD (unit/min/mg protein)	28.3±2.31 ^a	25.5±1.50 ^b	23.8±0.87 ^{bc}	22.4±2.70 ^c
GPx (μmol/min/mg protein)	47.3±5.98 ^{NS}	47.1±8.69	49.8±10.9	47.5±7.51
CAT (k/mg protein)	0.41±0.08 ^{NS}	0.44±0.17	0.43±0.06	0.40±0.09
TBARS (nmol/g liver)	398.2±70.5 ^a	397.4±63.1 ^a	359.7±91.7 ^{ab}	323.9±45.3 ^b

Values are mean±SD (n=6).

Different letters within a row indicate significant differences from one another ($P<0.05$).

NS: not significant.

산화물의 생성을 초래하게 되고 이는 동맥경화증을 비롯한 심혈관계 장애를 일으키는 원인이 된다(13). 또 고지혈증은 세포막의 지질 조성을 변화시켜 라디칼에 의한 산화반응이 일어나기 쉬운 상태로 만들고 이로 인해 동맥경화증, 암, 당뇨병 및 각종 염증성 질환들을 유발하는 것으로 알려져 있다(14,15). 항산화 효소들 중에서 SOD는 superoxide anion을 hydrogen peroxide로 전환시키며 생성된 hydrogen peroxide는 CAT와 GPx에 의해 분해되는데, 분해되지 못한 여분의 hydrogen peroxide는 Fe^{2+} 와 반응하여 세포에 매우 강한 독성을 나타내는 hydroxyl radical로 전환되고 세포 내 단백질, 세포막, DNA 등에 손상을 주어 세포의 노화와 괴사 등을 초래한다(26,27). 홍국에서 콜레스테롤 합성 저해 물질로 작용하는 statins은 LDL 콜레스테롤의 농도를 감소시킬 뿐 아니라 LDL의 산화도 억제하여 산화 스트레스로 인한 심혈관계 질환의 발생을 억제하는 것으로 알려져 있다(13). 홍국균에서 분리된 dimerumic acid와 dihydromonacolin-MV는 항산화 작용을 나타내는 물질로서 dimerumic acid는 2 mM 농도에서 DPPH radical을 완전 소거하며, hydroxyl radical과 superoxide radical은 각각 40%와 25%의 소거율을 보이는 것으로 알려져 있다(6). 또 dihydromonacolin MV는 BHA와 비슷한 수준의 DPPH radical 소거능을 가지며, 지질과산화물 억제 활성(IC₅₀)과 superoxide radical 소거능(IC₅₀)은 BHA보다 더 강한 항산화력을 가지는 것으로 보고하고 있다(28). Yu 등(23)이 홍국쌀 2%와 4% 첨가 식이를 한 달 동안 투여한 동물의 간에서 항산화 효소 활성을 측정할 결과 GPx와 SOD에는 유의적인 변화가 없었고, CAT 활성은 대조군에 비해 2% 첨가군에서 41%, 4% 첨가군에서 25% 각각 유의적으로 증가하였다고 보고하였다. Mohan Kumari 등(24)이 홍국쌀을 고콜레스테롤 식이에 8%, 12% 및 16% 첨가하여 실험동물에 14주간 투여하고 혈액과 간의 항산화 효소 활성을 측정할 결과, 고콜레스테롤 식이만 섭취한 대조군에서는 산화 스트레스로 인해 혈액과 간의 항산화 물질들, 즉 ascorbic acid와 glu-

tathione뿐 아니라 SOD, GPx 및 CAT가 콜레스테롤이 함유되어 있지 않은 일반 식이를 투여한 군에 비해 감소한 것으로 나타난 반면 홍국쌀 분말을 첨가한 실험군에서는 항산화 물질과 항산화 효소 활성 모두 농도 의존적으로 유의성 있게 증가하였고, 지질과산화물질의 생성은 억제되었음이 TBA의 유의적인 감소로 나타났다고 보고하였다. Cheng과 Pan(8)은 Lieber-DeCarli alcohol-containing liquid diet에 0.1%, 0.2% 및 0.5% 홍국쌀 분말을 첨가한 식이를 mouse에 5주간 투여한 후 간의 항산화 효소 활성을 측정할 결과 SOD, GPx 및 CAT 모두 알코올 식이 섭취군에서는 비알코올군에 비해 유의적으로 감소하였고, 알코올과 홍국쌀 분말을 함께 투여한 실험군에서는 알코올군에 비해 이들 항산화 효소의 활성이 모두 유의적으로 증가하였으며, 그중에서도 CAT의 활성 증가가 가장 커서 알코올 섭취군에 비해 100% 이상의 활성 증가를 보였고, SOD는 최대 57%, GPx는 34%로 유의성 있게 증가하였음을 보고하였다. 이상의 결과들로부터 홍국쌀은 생체 내 항산화 효소 중 SOD의 활성보다는 GPx와 CAT의 활성을 유도함으로써 ROS에 의한 세포 손상을 억제하는 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

항산화 효소 유전자 발현

홍국쌀 첨가 식이 섭취가 항산화 효소의 유전자 발현에 미치는 영향을 조사한 결과를 Fig. 1에 제시하였다. 항산화 효소 중 Cu/Zn SOD, Mn SOD와 GPx의 mRNA 발현은 대조군에 비해 유의성 있는 변화가 없었다. 그러나 CAT의 경우 홍국쌀 첨가군에서 대조군에 비해 유전자 발현이 증가하는 경향으로 보이며 5% 첨가군에서는 대조군에 비해 7.9배 유의성 있는 증가를 나타내었다. 알코올 섭취로 인한 세포 손상의 원인 중 하나가 알코올을 대사과정에서 생성되는 reactive oxygen species로 알려져 있으며, 홍국쌀은 항산화 효소를 통한 ROS의 제거를 촉진하여 알코올로 인한 세포 손상을 경감시킬 수 있다고 하였다(29).

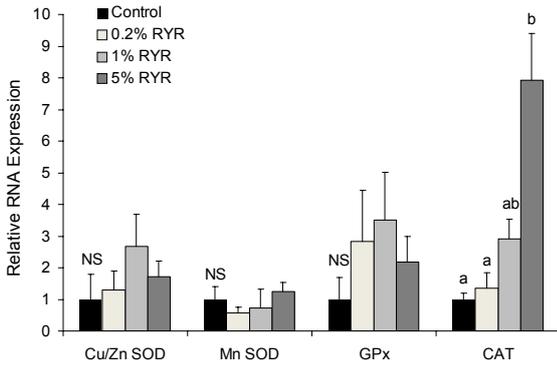


Fig. 1. Relative mRNA expression of the hepatic antioxidant enzymes in rats fed red yeast rice (RZR) with hypercholesterolemic diet for 4 weeks. Different letters indicate significant differences from one another ($P < 0.05$). NS: not significant.

림프구 DNA 손상(Comet assay)

DNA 손상 정도는 생체의 산화 스트레스 정도를 말해 주는 매우 신뢰성이 높은 측정 지표이다. 홍국쌀 섭취가 림프구 DNA 손상에 미치는 영향을 조사하기 위하여 4주간의 사육이 끝난 후 채혈하여 림프구를 분리하고 comet assay를 실행하여 림프구의 DNA 손상 정도를 tail extent moment(TEM=tail length×% tail DNA)로 나타내었다(Fig. 2). 분리한 림프구를 둘로 나누어 받은 홍국쌀 섭취 자체가 림프구 DNA 손상에 미치는 영향을 조사하기 위하여 림프구를 phosphate-buffered saline에 5분간 담그고(no oxidant), 나머지 받은 홍국쌀 섭취가 산화 스트레스로 인한 DNA 손상에 미치는 영향을 알아보기 위해 25 μM H₂O₂에 5분간 담갔다가 comet assay를 실행하였다.

산화 스트레스를 주지 않은 림프구(no oxidant)의 경우 TEM 값이 홍국쌀 1%와 5% 첨가군에서 각각 0.32와 0.27로 대조군의 0.43보다 낮았으며 5% 첨가군은 대조군에 비해 유의성 있는 감소를 보였다. 25 μM H₂O₂로 산화 스트레스를 준 림프구의 경우 산화 스트레스로 인한 DNA 손상으로 대조군의 TEM 값이 0.86으로 산화 스트레스를 가하지 않은 림프구의 0.43에 비해 200% 증가하였으며, 홍국쌀 첨

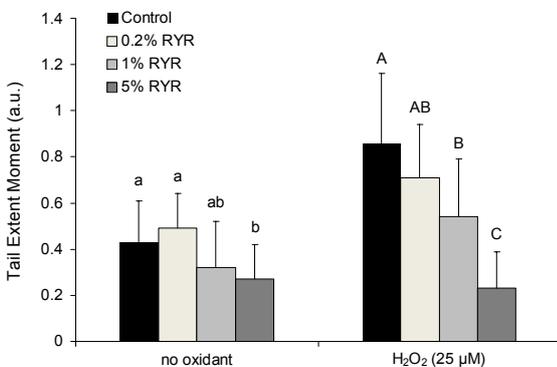


Fig. 2. Lymphocyte DNA damage by comet assay in rats fed red yeast rice (RZR) with hypercholesterolemic diet for 4 weeks. Different letters indicate significant differences from one another ($P < 0.05$).

가군의 림프구는 농도 의존적으로 DNA 손상이 감소하여 0.2%에서는 0.71, 1%는 0.54, 5%는 0.23이었으며 1%와 5% 첨가군은 대조군에 비해 유의성 있게 감소한 것으로 나타났다. HepG₂ cell을 홍국쌀 ethyl acetate 추출물로 전처리하고 산화 스트레스를 가한 세포(25 μM H₂O₂)와 가하지 않은 세포(no oxidant)에서 DNA 손상 정도를 분석한 전보에서도 홍국쌀 ethyl acetate 추출물 자체로 인한 DNA 손상은 관찰되지 않았으며 추출물을 첨가했을 때 농도 의존적으로 DNA 손상이 감소하는 경향이 있음을 보고한 바 있다(30). 장기간에 걸친 산화적 DNA 손상은 여러 종류의 암, 대장암, 전립선암, 직장암 및 유방암 그리고 퇴행성 질환의 발병 원인이 되므로 산화적 DNA 손상을 억제시키는 식이와 기능성 물질 또는 치료제는 암 발생을 지연 또는 예방할 수 있는 것으로 알려져 있으며(31-34), 홍국쌀에 함유된 색소가 mouse의 피부암 세포와 대장암 세포의 증식을 억제하는 것으로 보고된 바 있다(35,36).

이상으로부터 홍국쌀 첨가 식이로 인한 항산화 효과를 종합적으로 살펴보면, 홍국쌀 섭취가 혈액에서는 SOD 활성보다 GPx와 catalase의 활성화를 유도하고 이로써 림프구에서 H₂O₂를 신속히 물로 전환시켜 림프구 DNA의 산화적 손상을 유의적으로 감소시킨 것으로 보이며, 간의 항산화 효소 활성에서는 SOD가 감소하고 GPx와 catalase는 변화가 없었으나 유전자 발현에서는 SOD와 GPx에는 변화가 없고 catalase의 경우 유의적으로 증가하였으며 TBARS는 유의적으로 감소한 것으로 나타났다. 이는 홍국쌀의 섭취로 인해 간에서 H₂O₂의 제거가 신속하게 이루어졌음을 결과적으로 나타내고는 있지만 홍국쌀의 섭취로 나타난 catalase 합성 증가가 활성 증가로 나타나지 않은 이유가 catalase의 어떤 특성과 연관성이 있는지 또는 홍국쌀 섭취로 인한 영향인지, 단순한 실험상의 오류인지에 대해서는 지속적인 연구를 통해 다시 검토해봐야 할 필요성이 있는 것으로 사료된다.

요 약

고콜레스테롤 식이에 홍국쌀 분말을 0.2%, 1% 및 5% 첨가한 식이를 4주간 섭취한 동물에서 홍국쌀의 지질 개선 효과와 함께 항산화 효과를 혈액과 간의 항산화 효소 활성, 항산화 효소의 유전자 발현 및 DNA 손상에 미치는 영향으로 분석하였다. 홍국쌀 분말 첨가 식이를 섭취한 후의 체중 변화, 식이섭취량, 식이 효율 및 간 무게는 대조군과 유의한 차이가 없었다. 혈장에서 총 콜레스테롤은 대조군에 비해 0.2% 첨가군에서 24% 감소하였으며, HDL 콜레스테롤은 5% 첨가군에서 20% 증가하였고 LDL 콜레스테롤은 0.2% 첨가군에서 42% 감소한 것으로 나타났다. 항산화 효소 활성에서는 SOD 활성이 감소하거나 유의성이 없었으나 적혈구에서 GPx와 CAT의 활성이 대조군에 비해 유의성 있게 증가하는 것으로 나타났으며, 간의 TBARS는 5% 첨가군에서 대조군에 비해 19% 유의적으로 감소한 것으로 나타났다.

항산화 효소의 유전자 발현에서는 5% 첨가군에서 CAT의 발현이 대조군에 비해 7.9배 유의성 있게 증가하였다. 홍국 쌀 분말 섭취로 인한 DNA 손상은 관찰되지 않았으며, H₂O₂로 산화 스트레스를 가했을 때 DNA 손상이 농도 의존적으로 억제되는 것으로 나타났다. 이상의 결과로부터 홍국쌀의 섭취가 혈액과 간의 지질 대사 개선 효능을 가지며, 항산화 효소의 활성화를 통해 ROS에 의한 세포 손상을 억제할 뿐 아니라 LDL 콜레스테롤의 산화도 억제할 것으로 예상되므로 심혈관계 질환에 대한 예방 효과가 있을 것으로 사료된다.

REFERENCES

1. Ma J, Li Y, Ye Q, Li J, Hua Y, Ju D, Zhang D, Cooper R, Chang M. 2000. Constituents of red yeast rice, a traditional Chinese food and medicine. *J Agric Food Chem* 48: 5220-5225.
2. Wang J, Lu Z, Chi J, Wang W, Su M, Kou W, Yu P, Yu L, Chen L, Zhu JS, Chang J. 1997. Multicenter clinical trial of the serum lipid-lowering effects of a *Monascus purpureus* (red yeast) rice preparation from traditional Chinese medicine. *Curr Ther Res* 58: 964-978.
3. Li C, Zhu Y, Wang Y, Zhu JS, Chang J, Kritchevsky D. 1998. *Monascus purpureus*-fermented rice (red yeast rice): a natural food product that lowers blood cholesterol in animal models of hypercholesterolemia. *Nutr Res* 18: 71-81.
4. Heber D, Yip I, Ashley JM, Elashoff DA, Elashoff RM, Go VLW. 1999. Cholesterol-lowering effects of a proprietary Chinese red-yeast-rice dietary supplement. *Am J Clin Nutr* 69: 231-236.
5. Su YC, Wang JJ, Lin TT, Pan TM. 2003. Production of the secondary metabolites gamma-aminobutyric acid and monacolin K by *Monascus*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 30: 41-46.
6. Aniya Y, Ohtani II, Higa T, Miyagi C, Gibo H, Shimabukuro M, Nakanishi H, Taira J. 2000. Dimeric acid as an antioxidant of the mold, *Monascus anka*. *Free Radic Biol Med* 28: 999-1004.
7. Wu GF, Wu X. 2000. Screening DPPH radical scavengers from *Monascus* sp. *Acta Microbiol Sin* 40: 394-399.
8. Cheng CF, Pan TM. 2011. Protective effect of *Monascus*-fermented red mold rice against alcoholic liver disease by attenuating oxidative stress and inflammatory response. *J Agric Food Chem* 59: 9950-9957.
9. Lee CL, Wang JJ, Pan TM. 2008. Red mold rice extract represses amyloid beta peptide-induced neurotoxicity via potent synergism of anti-inflammatory and antioxidative effect. *Appl Microbiol Biotechnol* 79: 829-841.
10. Blanc PJ, Laussac JP, Le Bars J, Le Bars P, Loret MO, Pareilleux A, Prome D, Prome JC, Santerre AL, Goma G. 1995. Characterization of monascidin A from *Monascus* as citrinin. *Int J Food Microbiol* 27: 201-213.
11. Blanc PJ, Loret MO, Goma G. 1995. Production of citrinin by various species of *Monascus*. *Biotechnol Lett* 17: 291-294.
12. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. 1992. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 119: 598-620.
13. Rosenson RS. 2004. Statins in atherosclerosis: lipid-lowering agents with antioxidant capabilities. *Atherosclerosis* 173: 1-12.
14. Baskar AA, Manoharan S, Manivasagam T, Subramanian P. 2004. Temporal patterns of lipid peroxidation product formation and antioxidants activity in oral cancer patients. *Cell Mol Biol Lett* 9: 665-673.
15. Kasiske BL, O'Donnell MP, Schmitz PG, Kim Y, Keane WF. 1990. Renal injury of diet-induced hypercholesterolemia in rats. *Kidney Int* 37: 880-891.
16. Paglia DE, Valentine WN. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70: 158-169.
17. Flohe L, Otting F. 1984. Superoxide dismutase assays. *Methods Enzymol* 105: 93-104.
18. Aebi H. 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* 105: 121-126.
19. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358.
20. Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1998. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175: 184-191.
21. Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{-ΔΔCT} method. *Methods* 25: 402-408.
22. Rhyu MR, Kim EY, Han JS. 2003. Effect of *Monascus koji* on blood pressure and serum cholesterol composition of SHR by chronic dietary administration. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 464-468.
23. Yu TS, Kim HH, 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* 32: 244-249.
24. Mohan Kumari HP, Naidu KA, Vishwanatha S, Narasimhamurthy K, Vijayalakshmi G. 2009. Safety evaluation of *Monascus purpureus* red mould rice in albino rats. *Food Chem Toxicol* 47: 1739-1746.
25. Journoud M, Jones PJ. 2004. Red yeast rice: a new hypolipidemic drug. *Life Sci* 74: 2675-2683.
26. Guemouri L, Artur Y, Herbeth B, Jeandel C, Cuny G, Siest G. 1991. Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clin Chem* 37: 1932-1937.
27. Fridovich I. 1978. The biology of oxygen radicals. *Science* 201: 875-880.
28. Dhale MA, Divakar S, Kumar SU, Vijayalakshmi G. 2007. Isolation and characterization of dihydromonacolin-MV from *Monascus purpureus* for antioxidant properties. *Appl Microbiol Biotechnol* 73: 1197-1202.
29. Dey A, Cederbaum AI. 2006. Alcohol and oxidative liver injury. *Hepatology* 43: s63-s74.
30. Kwon CS. 2012. Antioxidant properties of red yeast rice (*Monascus purpureus*) extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 437-442.
31. Halliwell B. 2002. Effect of diet on cancer development: is oxidative DNA damage a biomarker? *Free Radic Biol Med* 32: 968-974.
32. Totter JR. 1980. Spontaneous cancer and its possible relationship to oxygen metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 1763-1767.
33. Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. 1993. Oxidants, antioxidants, and the degenerative disease of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 7915-7922.
34. Thompson HJ, Heimendinger J, Haegle A, Sedlacek SM, Gillette C, O'Neill C, Wolfe P, Conry C. 1999. Effect of

- increased vegetable and fruit consumption on markers of oxidative cellular damage. *Carcinogenesis* 20: 2261-2266.
35. Yasukawa K, Takahashi M, Yamanouchi S, 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.
36. Hong MY, Seeram NP, Zhang Y, Heber D. 2008. Anticancer effects of Chinese red yeast rice versus monacolin K alone on colon cancer cells. *J Nutr Biochem* 19: 448-458.