



원유에서 분리한 *Enterococcus faecalis* MD366가 고지방식을 급여한 마우스의 비만 억제에 미치는 영향

박선영 · 조성아 · 한누리 · 성기승 · 임상동*

한국식품연구원

Anti-Obesity Effect of *Enterococcus faecalis* MD366 isolated from Raw Milk in Diet-Induced Obese Mice

Sun-Young Park, Seong-A Cho, Noo-Ri Han, Ki-Seung Seong and Sang-Dong Lim*

Korea Food Research Institute, Seongnam 463-746, Korea

Abstract

This study aimed to investigate the anti-obesity effects of *Enterococcus faecalis* MD366, isolated from raw milk, in diet-induced obese mice. To examine the effect, male C57BL/6J mice were fed for six weeks on three different diets, i.e., a normal diet and orally administrated saline solution (ND), a high-fat diet and orally administrated saline solution (HFD), and a high-fat diet and orally administrated *E. faecalis* MD366 (10^9 CFU/day) in saline solution (HFD+MD366). After six weeks, the rate of increase in body weight was 18.1% lower in the HFD+MD366 group compared to that in the HFD group. In addition, the weight of epididymal fat pad in the HFD+MD366 group was lower than that in the HFD group. The average levels of triglycerides, total cholesterol (TC), and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) were slightly reduced in the HFD+MD366 group compared to those in the HFD group. However, there were no significant differences between the groups. Measuring the adipocytes revealed that the percentage of adipocytes with a size of $2,000 \mu\text{m}^2$ was higher than the percentages of other size classes in ND and HFD+MD366 groups, while the percentage of adipocytes larger than $5,000 \mu\text{m}^2$ was highest in the HFD group. The mean adipocyte size in the HFD+MD366 group was smaller than that in the HFD group.

Keywords: *Enterococcus faecalis*, anti-obesity activity, adipocyte size, diet-induced obese mice

서 론

최근 전 세계적으로 과체중 및 비만 인구가 증가함에 따라 현대인들의 건강에 비만이 주요한 문제점 중 하나로 인식되고 있다. 비만은 유전적, 환경적 및 사회적 구조 변화와 식습관의 변화 등 다양한 원인들이 관여하여 나타나는 복합적 증후군으로, 과도한 에너지 섭취로 체내 대사활동이 소비되고 남은 것이 지방조직에 중성지방으로 축적되어

발생하는 질병이다(Albu *et al.*, 1997; Grundy *et al.*, 1998). 비만으로 인해 지방세포의 축적과 지방세포의 대사이상이 유발되고, 이로 인한 만성염증 및 인슐린 저항성 등의 병리상태는 제2형 당뇨병으로 이행되거나, 고혈압, 담낭질환, 고지혈증, 동맥경화증 등을 발생시키는 주된 원인이 되며, 비만은 또한 정신적, 사회적 기능 저하와 같은 문제를 야기시킨다(Aneja *et al.*, 2003; DeFronzo and Ferrannini, 1991; Kim *et al.*, 2001; Jun, 2004).

Probiotics는 숙주동물의 장내 미생물 균형을 향상시키고 건강에 유익한 효과를 나타내는 생균으로, *Lactobacillus* sp, *Bifidobacterium* sp, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium*

* Corresponding author: Sang-Dong Lim, Korea Food Research Institute, Seongnam 463-746, Korea. Tel: +82-31-780-9082, Fax: +82-31-780-9160, E-mail: limsd@kfri.re.kr

등이 이에 속한다(Furrie, 2005). Probiotics의 효과로는 항암 작용, 혈압 조절, 면역체계 조절, 변비 완화, 알러지 개선 등으로 알려져 있다(Isorauri *et al.*, 2004; Aneja *et al.*, 2003; Aihara *et al.*, 2005; Furrie, 2005). 또한 다양한 *in vitro* 및 *in vivo* 실험결과, probiotics가 지방세포의 크기, 체지방 및 체중을 감량하고, 혈중 지질 및 콜레스테롤 대사를 개선시키는 것으로 나타났다. Kim 등(2014)은 고지방식이를 투여한 동물에 *L. plantarum* 혼합물을 경구투여한 결과, 체중 증가량, 간과 부고환 지방 무게가 현저히 감소한 것을 확인할 수 있었다. Sato 등(2008)은 고지방식이에 *L. gasseri* SBT2055 이용한 발효유를 함께 투여한 결과, 백색지방조직의 평균 지방세포 크기가 상당히 작은 것으로 나타났고, 복막과 장점막의 지방세포가 대조군에 비해 크기가 작은 지방세포 수가 많은 것으로 나타났다.

본 연구는 원유로부터 분리되고 *in vitro* 실험을 통해 잠재적인 비만 효과가 확인된 *Enterococcus faecalis* MD366 균주가 고지방식으로 비만이 유도된 마우스의 체지방 및 지방세포 크기의 차이에 어떠한 영향을 미치는지 확인하여, 항비만 및 지질저하 효과가 있는지를 살펴보고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험 균주의 준비

원유에서 분리, 선발된 *Enterococcus faecalis* MD366 균주는 Lactobacilli MRS broth (Difco, USA)에서 37°C, 18시간 배양하였으며, 배양 후 15,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 배지는 제거하고, 증류수로 세 번 더 세척하여 남아있는 MRS 배지를 제거해 주었다. 세척한 균체는 생리식염수(0.9%)에 희석하여 준비하였다.

2. 실험동물 및 식이

본 연구에서는 6주령의 C57BL/6J 마우스를 (주)두얼 바이오텍(Seoul, Korea)으로부터 구입하여 1주간 적응시킨 뒤 실험에 사용하였다. 실험 기간 중에 사육실 온도는 20±2°C, 습도는 55±10%, 명암은 12시간 주기로 자동 조절하였다. 실험 동물은 1주간의 정상 식이 후에 난괴법에 의거하여 3개의 군으로 분리하였다. 실험군은 정상식이군(normal diet, ND; n=6), 고지방식이 대조군(high fat diet, HFD; n=6), 고지방식이를 섭취시키며, *E. faecalis* MD366을 경구투여한 군(HFD+MD366, n=6)으로 구분하였다. 물과 사료는 자유로이 섭취시켰으며, ND군과 HFD군에는 생리식염수를, HFD+MD366군에는 생리식염수에 희석한 *E. faecalis* MD366 균주(10⁹ CFU/day)를 하루에 한 번 씩 경구투여하였다(2.5 µg/g bodyweight). 시험군은 고지방식으로 6주간 비만을 유도

Table 1. The formula of normal diet and high fat diet

| Formula | Normal diet | High fat diet |
|--------------------------------|-------------|---------------|
| | g/kg | |
| Casein | 210.0 | 265.0 |
| L-Cystine | 3.0 | 4.0 |
| Maltodextrin | 50.0 | 160.0 |
| Sucrose | 325.0 | 90.0 |
| Lard | 20.0 | 310.0 |
| Soybean oil | 20.0 | 30.0 |
| Cellulose | 37.15 | 65.5 |
| Mineral mix, AIN-93G-MX(94046) | 35.0 | 48.0 |
| Calcium phosphate, dibasic | 2.0 | 3.4 |
| Vitamin mix, AIN-93-VX(94047) | 15.0 | 21.0 |
| Choline bitartrate | 2.75 | 3.0 |
| Food color | 0.1 | 0.1 |

하였고, 체중은 시험물질 급여 직전 및 급여 개시 후 주 1회씩 측정하였다. 실험에 사용된 고지방식은 34.3%의 지방, 27.3%의 탄수화물, 34.3%의 단백질로 구성되어 5.1 kcal/g의 열량을 내며, 정상식은 4.2%의 지방, 64.7%의 탄수화물, 18.6%의 단백질로 구성되어 3.7 kcal/g의 열량을 낸다. 자세한 조성비는 Table 1과 같다. 본 연구에서의 모든 동물 실험은 서울대학교 의과대학 실험동물운영위원회(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)의 승인 하에 수행하였다.

3. 혈액분석 및 장기와 지방 무게 측정

실험식이 6주 후, 마우스의 혈청 내 중성지방, 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 및 AST(aspartate transaminase), ALT(alanine transaminase) 수치를 측정하기 위해 24시간 절식 후에 흰쥐를 에틸에테르로 마취한 다음 안와채혈법으로 혈액을 얻었으며, 2,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 혈청 분석은 녹십자(Yong-In, Korea)에 의뢰하였다. 지방 조직 무게는 혈액 채취 후 간과 신장 및 고환의 장기조직과 부고환 지방 조직을 조심스럽게 적출하여 생리식염수로 세척한 다음 여과지로 수분을 제거한 후에 측정하였다.

4. 부고환 지방조직 세포의 크기 측정

부고환 지방세포의 크기를 측정하기 위해 적출된 부고환 지방조직을 10% formalin으로 고정한 뒤 250 µm의 나일론 필터에 통과시켜 섬유 조직과 작은 조직들을 제거한 후 PBS로 세척하여 완전히 제거하였다. 고정된 조직은 동결절편

기를 이용하여 18 μm 으로 절편하였으며, H&E (hematoxylin and eosin) 지방 염색방법으로 지방세포를 염색하였다(van Goor *et al.*, 1986). 염색 후 60% isopropanol을 이용하여 탈색한 뒤 현미경 하에서 디지털 카메라를 이용하여 이미지를 측정하였다. 지방세포의 크기 분석을 위해 Image J Software (National Institute of Health, Maryland, USA)를 이용하여 지방세포의 직경을 측정하였다.

5. 통계처리

결과는 평균 \pm 표준편차(SD)로 나타내고, 통계분석은 Statistical Package for Social Sciences(SPSS, SPSS Inc., USA)로 실시하였다. 유의차는 one-way ANOVA로 통계처리하였고, Duncan's multiple range tests를 사용하여 유의성 5% 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 체중 증가량과 장기 및 지방 무게

시험 물질 급여 개시 직전부터 급여 개시 6주까지의 체중 증가량은 Fig. 1에 나타내었다. 사육 6주 후 일반식이 대조군인 ND군의 평균 무게는 26.3 \pm 0.70 g, 고지방식이 대조군인 HFD군의 평균 무게는 28.84 \pm 3.72 g, *E. faecalis* MD366 균주를 경구투여한 HFD+MD366군은 27.95 \pm 1.39 g으로, 고지방식이 대조군보다 균주를 함께 투여한 군의 평균 무게가 적었지만, 세 군의 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다($p < 0.05$). 초기 무게 대비 체중 증가율은 HFD+MD366군이 HFD군에 비해 18.10% 감소하였다. Lee 등(2006)에 따르면 마우스를 정상식이군(STD), 고지방식이군(HFD-Veh), 고

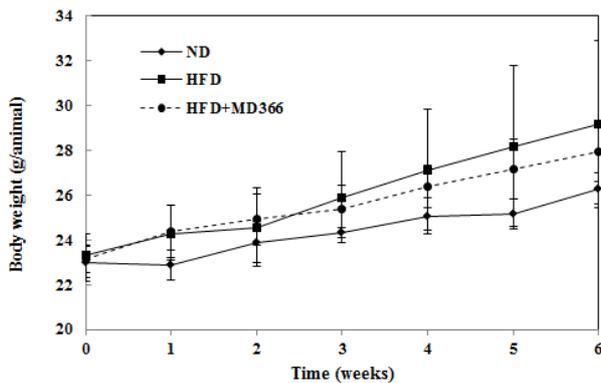


Fig. 1. Changes in body weight gain of mice fed high fat diet with lactic acid bacteria for 6 weeks. All values are the mean \pm SD of 6 mice per group. There is no significantly different ($P < 0.05$). ¹⁾ ND: normal diet, HFD: high fat diet with saline solution, HFD+MD366: high fat diet with *E. faecalis* MD366 (10^9 CFU/day)

Table 2. Weights of liver, kidney and spleen epididymal fat pad

| | ND ¹⁾ | HFD | HFD+MD366 |
|------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Liver (g) | 0.90 \pm 0.05 ^a | 0.89 \pm 0.08 ^a | 0.87 \pm 0.08 ^a |
| Kidney (g) | 0.29 \pm 0.02 ^a | 0.33 \pm 0.02 ^a | 0.32 \pm 0.01 ^a |
| Spleen (g) | 0.06 \pm 0.01 ^a | 0.07 \pm 0.01 ^a | 0.07 \pm 0.01 ^a |
| Epididymal fat pad (g) | 0.31 \pm 0.05 ^a | 0.81 \pm 0.41 ^b | 0.63 \pm 0.12 ^b |

All values are the mean \pm SD of 6 mice per group.

^{a,b} Means values with different superscript within same organ are significantly different.

¹⁾ ND: normal diet, HFD: high fat diet with saline solution, HFD+MD366: high fat diet with *E. faecalis* MD366 (10^9 CFU/day)

지방식이와 함께 *Lactobacillus rhamnosus* PL60 균주를 각각 2×10^7 CFU/mL, 2×10^9 CFU/mL 농도로 경구투여한 군(HFD-PL60L, HFD-PL60H)으로 나누어 8주 후 무게를 비교해 보았을 때, STD군의 평균 무게가 가장 작았으며, HFD-PL60L, HFD-PL60H군은 비슷한 무게를 나타내었고, HFD-Veh군이 무게가 균주를 경구투여한 군보다 약 19% 많은 체중 증가를 보였다. 이와 비교해 보았을 때 *E. faecalis* MD366 균주는 체중 감소 능력이 떨어지긴 하지만, 이와 비슷하게 체중을 감소시키는 경향을 보였다. 대조군과 실험군의 간과 신장 및 고환의 장기조직과 부고환 지방은 채혈 후 즉시 적출하여 생리식염수에 행군 후 표면의 수분을 제거하여 측정하였으며, 중량을 측정한 결과는 Table 2에 나타내었다. 간과 신장, 고환의 장기조직 무게는 세 군 모두 비슷하였으며, 부고환 지방의 평균무게의 경우 ND군이 0.31 \pm 0.05 g으로 가장 작았고, HFD군은 0.81 \pm 0.41 g, HFD+MD366군이 0.63 \pm 0.12 g으로 *E. faecalis* MD366 균주를 투여한 군이 무게가 적었으나, HFD군과 HFD+MD366군 간 유의적 차이는 보이지 않았다.

2. 혈액분석

E. faecalis MD366의 투여가 혈청 지질 농도에 미치는 영향은 Table 3과 같다. 혈청의 중성지방(TG)의 농도는 ND군의 경우 81.00 \pm 12.77 mg/dL이었고, 이에 비해 HFD군은 110.00 \pm 21.34 mg/dL, HFD+MD366군은 107.67 \pm 21.57 mg/dL로 정상식이군에 비해 증가하여 나타났다. HFD+MD366군이 HFD군에 비해 감소시키는 했지만 유의적 차이는 없었다. 총 콜레스테롤(TC)과 LDL-콜레스테롤(LDL-C) 수치에 있어서도 HFD+MD366군이 HFD군에 비해 평균적으로 적은 수치를 나타내었으나 유의적 차이는 보이지 않았다. 간장과 심장에 분포하며 간세포 손상 시 농도가 현저히 상승하므로 간질환의 지표가 되는 간 효소치인 AST와 ALT

Table 3. Serum level of triglyceride, cholesterol, AST and ALT

| | ND ¹⁾ | HFD | HFD+MD366 |
|----------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Triglyceride (mg/dL) | 81.00±12.77 ^a | 110.00±21.34 ^b | 107.67±21.57 ^b |
| TC (mg/dL) | 137.00±13.10 ^a | 173.00±8.88 ^b | 163.50±6.69 ^b |
| LDL-C (mg/dL) | 14.40±2.30 ^a | 18.50±1.87 ^b | 17.17±2.32 ^{ab} |
| HDL-C (mg/dL) | 127.20±11.30 ^b | 163.17±7.19 ^a | 156.00±5.10 ^a |
| AST (U/L) | 144.80±70.07 ^a | 139.33±50.35 ^a | 159.17±58.99 ^a |
| ALT (U/L) | 56.40±25.97 ^a | 147.40±13.24 ^{ab} | 166.17±121.44 ^b |

All values are the mean ± SD of 6 mice per group. ^{a,b} Means values with different superscript are significantly different.

¹⁾ ND: normal diet, HFD: high fat diet with saline solution, HFD+MD366: high fat diet with *E. faecalis* MD366 (10⁹ CFU/day)

분석 결과에 의하면, AST 수치는 세 군의 유의적 차이가 없었으며, ALT 수치는 HFD+MD366군이 약간 높기는 하였으나 유의적 차이를 보이지 않았다.

3. 부고환 지방조직 세포 크기

부고환 지방세포의 크기를 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. 지방세포 크기의 분포를 본 결과, ND와 HFD+MD366군은 2,000 μm² 크기의 지방세포가 가장 많이 분포하였으며, HFD군에서는 5,000 μm² 이상 크기의 지방세포가 가장 많이 분포하는 것으로 보아, 고지방식이 대조군인 HFD군에 크기가 큰 지방세포가 많이 분포하는 것으로 나타났다(Fig. 2A). 지방 세포의 평균 크기는 ND, HFD+MD366, HFD 순으로 큰 것으로 나타났다(Fig. 2B). H&E 염색액으로 염색된 지방세포를 현미경으로 관찰해 보았을 때 역시 육안으로도 지방세포의 크기가 차이 나는 것을 알 수 있었다(Fig. 2C). 지방세포 크기의 측정은 항비만 효능을 입증할 수 있는 효과적인 방법으로 알려져 있으며, 고지방식을 섭취하였을 경우 지방세포의 중성지방 축적을 증가시켜 지방 세포의 크기가 증가하게 된다(Park *et al.*, 2005). Sato 등(2008)에 따르면 *Lactobacillus gasseri* SBT2055로 발효시킨 우유를 랫트에 4주간 급여하였을 때 지방세포의 크기가 우유만 급여시킨 대조군에 비해 유의적으로 감소하였으며, 작은 크기의 지방세포의 수가 큰 크기의 지방세포 수보다 증가하였다고 보고하였다. 또한 Takemura 등(2010)은 체내 지방량 감소에 효과가 있다고 보고된 *Lactobacillus plantarum* strain No. 14 균주를 정상식이군과 고지방식이군에 경구투여한 결과, 정상식이군에서는 균주를 먹인 군이 대조군에 비해 지방세포 크기가 약간 증가하였지만, 유의적 차이를 보이지 않았고, 고지방식이군에서는 대조군에 비해 균주를 먹인 군의 지방세포 크기가 유의적으로 감소함을 보였다. 위의 결과들과 비교해 보았을 때 *E. faecalis* MD366 균주를 먹인 군 역시 대조군에 비해 지방세포 크기가 감소하였기 때문에 항비만 효과가 있는 것으로 추정되었다.

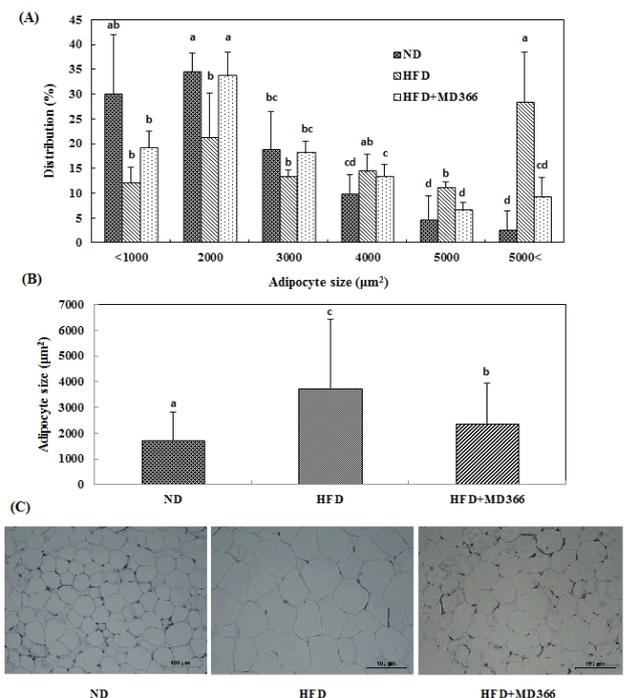


Fig. 2. Changes in adipocyte size of the epididymal fat pads in mouse. All values are mean±SD of 6 mice per group; (A) Percentage of cell number; ^{a-d} Means that the values with different superscripts within the same groups are significantly different (*p*<0.05). (B) The adipocyte size. ^{a-c} Means that the values with different superscripts are significantly different (c) Photograph of the epididymal fat pads in mouse (original magnification 200). ¹⁾ ND: normal diet, HFD: high fat diet with saline solution, HFD+MD366: high fat diet with *E. faecalis* MD366 (10⁹ CFU/day)

요 약

본 연구에서 우리는 고지방식으로 유도된 비만 마우스의 몸무게, 장기 무게, 부고환 지방조직 무게, 부고환 지방조직의 지방세포 크기 및 혈장 지질 농도가 *E. faecalis* MD366

균주의 투여로 어떤 영향을 미치는지 연구하였다. *E. faecalis* MD366균주의 항비만 효과를 알아보기 위하여 C57BL/6J 마우스를 정상식이군(ND), 고지방식이군(HFD), 고지방식 이과 함께 *E. faecalis* MD366 균주를 경구투여한 군(HFD+MD366)으로 나누어 6주 동안 실험을 진행하였다. 6주 후 무게는 ND, HFD+MD366, HFD군 순으로 높게 나타났으며, 초기 무게 대비 체중 증가율은 HFD+MD366군이 HFD군에 비해 18.10% 감소하였다. 간과 신장, 고환의 장기조직 무게는 세 군 모두 비슷하였으며, 부고환 지방의 평균무게의 경우 ND군이 가장 작았으며, HFD+MD366군은 HFD군보다 작게 나타났지만 유의적 차이는 보이지 않았다. *E. faecalis* MD366의 투여가 혈청 지질 농도에 미치는 영향을 본 결과, TG의 농도는 HFD+MD366군이 HFD군에 비해 감소시키는 했지만 유의적 차이는 없었으며, 총 콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤 수치에 있어서도 HFD+MD366군이 HFD군에 비해 평균적으로 적은 수치를 나타내었으나, 유의적 차이는 보이지 않았다. 부고환 지방세포 크기의 분포를 본 결과 ND와 HFD+MD366군은 2,000 μm^2 크기의 지방세포가 가장 많이 분포하였고, HFD군에서는 5,000 μm^2 이상 크기의 지방세포가 가장 많이 분포하였으며, 지방 세포의 평균 크기는 ND, HFD+MD366, HFD 순으로 큰 것으로 나타났다. 비록 체중과 장기, 지방 무게와 혈청 지질농도 수치에는 *E. faecalis* MD366 균주가 큰 효과를 보이지 못했지만 부고환 지방세포 형성 및 지방세포 크기 증가를 저해함으로써 항비만 효과가 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 농림축산식품부 농림수산식품기술기획평가원 고부가가치식품기술개발사업(No. 111151-3)의 지원에 의하여 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Aihara, K., Kajimoto, O., Hirata, H., Takahashi, R. and Nakamura, Y. 2005. Effect of powdered fermented milk with *Lactobacillus helveticus* on subjects with high-normal blood pressure or mild hypertension. *J. Am. Coll. Nutr.* 24:257-265.
- Albu, J., Allison, D., Boozer, C. N., Heymsfield, S., Kissileff, H., Kretser, A., Krumhar, K., Leibel, R., Nonas, C., Pi-Sunyer, X., Vanliallie, T. and Wedral, E. 1997. Obesity solution: report of a meeting. *Nutr. Res.* 55:150-156.
- Aneja, A., El-Atat, F., McFarlane, S. I. and Sowers, J. R. 2003. Hypertension and obesity. *Recent Prog. Horm. Res.* 59:169-205.
- DeFronzo, R. A. and Ferrannini, E. 1991. Obesity, hypertension, dyslipidemia, and atherosclerotic cardiovascular disease. *Diabetes Care* 14:94-173.
- Furrie E. 2005. Probiotics and allergy. *P. Nutr. Soc.* 64:465-469.
- Grundy, S. M. 1998. Multifactorial causation of obesity: implications for prevention. *Am. J. Clin. Nutr.* 67:563S-572S.
- Isolauri, E., Salminen, S. and Ouwehand, A. C. 2004. Microbial-gut interactions in health and disease. *Probiotics. Best Prac. Res. Clin. Gastroenterol.* 18:299-313.
- Jun, Y. S. 2004. The comparative analysis between mental health and obese factor of elementary school children. *The Korea Journal of Sports Science* 13:533-542.
- Kim, D. H., Choi, M. R., Hong, J. E., Lee, J. Y., Lee, S. I., Jung, S. H. and Kim, E. J. 2014. Effect of mixture of *Lactobacillus plantarum* CECT 7527, 7528 and 7529 on obesity and lipid metabolism in rats fed a high-fat diet. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 43:1484-1490.
- Kim, K. A., Kwon, I. S. and Kwon, C. S. 2001. Potential relationship between children obesity and risk for coronary heart disease in Kyungbuk area. *Korea J. Nutr.* 34:664-670.
- Lee, H. Y., Park, J. H., Seok, S. H., Baek, M. W., Kim, D. J., Lee, K. E., Paek, K. S., Lee, Y. H. and Park, J. H. 2006. Human originated bacteria, *Lactobacillus rhamnosus* PL60, produce conjugated linoleic acid and show anti-obesity effects in diet-induced obese mice. *Biochim. Biophys. Acta.* 7:736-744.
- Park, S. H., Ko, S. K. and Chung, S. H. 2005. *Euonymus alatus* prevents the hyperglycemia and hyperlipidemia induced by high-fat diet in ICR mice. *J. Ethnopharmacol.* 102:326-335.
- Sato, M., Uze, K., Yoshida, T., Hamad, E. M., Kawakami, H., Matsuyama, H., Abd, El-Gawad, I. A. and Imaizumi, K. 2008. Effects of milk fermented by *Lactobacillus gasseri* SBT2055 on adipocyte size in rats. *Br. J. Nutr.* 99:1013-1017.
- Takemura, N., Okubo, T. and Sonoyama, K. 2010. *Lactobacillus plantarum* strain No. 14 reduces adipocyte size in mice fed high-fat diet. *Exp. Biol. Med.* (Maywood), 7:56-849.
- van Goor, H., Gerrits, P. O. and Grond, J. 1986. The application of lipid-soluble stains in plastic-embedded sections. *Histochem.* 85:251-253.

(Received 19 November, 2014 / Accepted 16 December, 2014)