

## Effect of *Orostachys malacophyllus* by Fermented Lactic Acid Bacteria on Plasma Levels of Lipid and Lipid Peroxidation in Alcohol Feeding Rats

Kyu-Rim Park, Hee-Young Ahn and Young-Su Cho\*

Department of Biotechnology, Dong-A University, Busan 604-714, Korea

Received April 9, 2014 / Revised May 21, 2014 / Accepted May 22, 2014

The purpose of this study was to identify the effect on plasma levels of lipid and lipid peroxidation by administration of lactic acid bacteria (*Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*) fermented *Orostachys malacophyllus* (FOM) in alcohol fed rats. Male Sprague-dawley rats were randomly divided into seven groups: normal diet group (N), alcohol treated group (C), 2.5% (w/w) or 5% (w/w) OM treated group (2.5OM, 5OM), 2.5% (w/w) or 5% (w/w) fermented OM treated group (2.5FOM, 5FOM) and silymarin treated group (SM) as a positive control. As a result of measuring serum total lipid, C group were increased total lipid, free fatty acid content and were decreased HDL-cholesterol content, but 5FOM group were significantly decreased lipid content and were increased HDL-cholesterol content and accordingly reduced the incidence of atherosclerosis. Serum total protein content was similarly measured in all groups and serum albumin content was decreased in alcohol feeding groups compared to the N group. The 5FOM group had significantly decreased liver and serum triglycerides compared to the C group. The TBARS content in the liver, serum, testis, kidney, spleen, and heart were slightly decreased in the 5FOM group compared to the C group and the 5FOM group had an increased glutathione concentration. The 5FOM treatment was showed analogous results to those of the SM treatment, suggesting that FOM is can improve the lipid profiles of alcohol-fed rats.

**Key words** : Atherosclerosis, lactic acid bacteria, *Orostachys malacophyllus*, silymarin, TBARS

### 서 론

알코올은 대부분 간에서 대사되며, 알코올을 만성적으로 섭취하면 알코올 분해과정의 acetaldehyde 독성에 의해 free radical이 생성되어 지질 과산화물을 형성한다. 그로 인해 microtubule의 손상이 일어나 간세포가 파괴되어 세포내의 조효소인 NADH/NAD<sup>+</sup>의 비율이 증가하게 되며, 이의 영향으로 탄수화물, 단백질 및 지질대사에 장애가 일어나 간의 지방산 산화는 감소되고, 합성은 증가되어 간에 중성지질이 축적된다. 따라서 지방간이 유발되며, 더 심해지면 알코올성 간염이나 간 경화증이 유발될 수 있다[8, 22]. 알코올 대사에서 유도되는 cytochrome P450 2E1 (CYP2E1), p450 reductase, NADPH oxidase, aldehyde oxidase, xanthine oxidase 등은 생체 내 반응 산소 종의 생성을 낳고, 과량의 알코올 대사에서 이러한 효소들은 다량의 free radical을 생성함으로써 생체 내 산화스트레스를 유발하며, glutathione 등과 같이 free radical을 중화

시키는 항산화제의 생성이나 작용을 저해하여 알코올 간 손상의 주요 요인으로 시사되고 있다[5, 12]. 최근 알코올의 소비가 증가함에 따라 유발되는 질병이나 유해 작용을 해소시키기 위한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 지속적인 알코올 투여로 인해 발생하는 활성산소의 반응성을 감소시키거나 무력화할 수 있는 물질의 발굴과 이용에 관심이 증대되었다[9].

와송(둥근바위솔, *Orostachys malacophyllus*)은 돌나무과(Crassulaceae)에 속하는 바위솔속(*Orostachys*) 식물로 한국, 일본 및 중국 등 주로 동아시아에 많이 분포하는 것으로 알려져 있으며, 우리나라에는 *O. japonicus*, *O. malacophyllus*, *O. minutus*, *O. ivarange* 등이 자생하고 있는 것으로 보고되었다[14]. 와송은 민간요법으로 간염, 종기에 대한 면역작용, 지혈제 및 암 치료제 등으로 사용되어져 왔고, 최근에는 *O. japonicus*에 존재하는 성분으로 friedelin, epifriedlanol, glutinone 및 glutiniol과 같은 triterpenoid 류와  $\beta$ -sitosterol과 campesterol 등의 sterol 계열 물질, fatty acid ester 류, kampferol과 quercetin과 같은 flavonoid 류, 4-hydroxybenzoic acid와 3,4-dihydroxybenzoic acid, gallic acid 등의 aromatic acid 등이 분리되어 소화기 계통의 암에 효과가 있는 것으로 알려지면서 연구가 활발히 진행되고 있다[25, 26]. Shin 등[29]은 streptozotocin 유발 흰쥐에 생약재 복합물과 *O. japonicus* 추출물을 각각 1:1, 1:3의 비율로 제조하여 투여한 결과 *O. japonicus* 추출물 투여 농도가 높을수록 대조군에 비해 더 높은 조직의 지질

#### \*Corresponding author

Tel : +82-51-200-7586, Fax : +82-51-200-7505

E-mail : choys@dau.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

개선능 및 지질과산화 억제능을 보이며, 조직에서 항산화 활성을 나타내어 간장 보호 효능의 가능성을 시사해 주고 있다. 한편, 미생물을 이용한 천연물 발효는 미생물이 분비하는 각종 효소와 세포 내 조직에 있던 생리활성 물질들이 유리되기 때문에 생체이용률이 높아지는 것으로 알려져 있어[16] 본 연구에서는 와송 분말과 유산균 발효시킨 발효 와송 분말을 알코올성 유발 지방간 흰쥐에 각각 식이로 투여하여 흰쥐 조직의 과산화지질 및 혈중 지질에 미치는 효과를 비교 검토하였다.

### 재료 및 방법

#### 실험 재료 및 발효 조건

건조 와송(둥근바위솔, *Orostachys malacophyllus* (OM))은 2013년 4월 ㈜풀그린(서울, 한국)에서 구입한 후 건조시켜 분쇄 후 시료로 실험에 사용하였다. 본 실험에 사용한 시판되고 있는 3종의 유산균 혼합물(*Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*) (Yogourmet, Quebec city, Canada)을 MRS배지(peptone 10%, beef extract 10%, yeast extract 9%, dextrose 36%, polysorbate 1.8%, ammonium citrate 3.6%, sodium acetate 9%, magnesium sulfate 0.2%, manganese sulfate 0.1%, dipotassium phosphate 3.6%)에 접종하여 37°C, 24시간 동안 정치배양 한 후 와송 분말에 접종하였다. 유산균 접종은 배양한 유산균 혼합균을 원심 분리시킨 뒤 배양액을 제거하여 균체를 5% (v/w) 수준으로 접종하였으며, 발효되는 동안의 건조를 막기 위하여 멸균수를 뿌려주면서 37°C에서 48시간 동안 고체 배양한 후 발효 와송을 얻었다[7]. 발효 후 발효물은 60°C에서 8시간 동안 열풍 건조

조한 후 분말화하여 식이에 사용하였다.

#### 실험동물 사육 조건 및 식이 조성

실험동물은 6주령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 (주)대한 바이오링크(충북 음성, 한국)로부터 구입하여 환경에 적응시킨 후 체중이 동일하게 난괴법으로 분류하여, 각 실험군당 6마리씩 나누어 동물 사육실에서 사육하였다. 온도 22±2°C, 습도 50±5%, 명암주기 12시간(09:00~21:00)이 자동 설정된 동물 사육실에서 사육하였으며, 사육 기간 중 식이 섭취량은 매일 측정하였고, 체중은 매주 한번 일정한 시간에 측정하였다. 알코올 투여는 알코올에 의한 급성독성을 방지하기 위해 10% 농도로 시작하여 20% 농도로 1주일마다 단계적으로 높이고, 30%의 알코올 투여와 함께 4주간 식이를 급여하였다.

식이 조성은 Table 1와 같으며, 실험군은 정상군(N), 알코올 투여 대조군(C), 알코올+2.5% (w/w) 와송(2.5OM), 알코올+5% (w/w) 와송(5OM), 알코올+2.5% (w/w) 발효 와송(2.5FOM), 알코올+5% (w/w) 발효 와송(5FOM) 투여군과 간기능 개선제로 알려진 silymarin (SM)을 식이 중에 0.1% (w/w)의 농도로 투여하여 양성 대조군으로 나누어 실험을 진행하였다. 동물 사육 및 실험동물 사용에 대한 국립 보건 연구소의 지침에 따랐으며, 동아대학교 동물실험 윤리심의 위원회의 승인(승인번호: DIACUC-승인-13-4)을 받아 진행하였다.

#### 시료 채취 및 분석 시료 조제

동물실험은 4주간 각 실험 식이를 급여하면서 사육한 후 실험 최종일에 12시간 절식시키고, 디에틸에테르로 가볍게 마취시켜 해부하였다. 개복 후 복부 대동맥으로부터 채혈하여

Table 1. Compositions of experimental diets (%)

Component	N	Alcohol					
		C <sup>1)</sup>	2.5OM <sup>2)</sup>	5OM <sup>3)</sup>	2.5FOM <sup>4)</sup>	5FOM <sup>5)</sup>	SM <sup>6)</sup>
Sucrose	45.0	45.0	42.5	40.0	42.5	40.0	44.9
Casein	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0	20.0
α-Corn starch	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0	15.0
Corn oil	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
Cellulose	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
mineral mixture <sup>7)</sup>	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
vitamin mixture <sup>8)</sup>	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
L-Methionine	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
OM	-	-	2.5	5.0	-	-	-
FOM	-	-	-	-	2.5	5.0	-
SM	-	-	-	-	-	-	0.1
Total (%)	100	100	100	100	100	100	100

<sup>1)</sup>C : Alcohol treatment control, <sup>2)</sup>2.5OM : Alcohol + 2.5% (w/w) *Orostachys malacophyllus*, <sup>3)</sup>5OM : Alcohol + 5% (w/w) *Orostachys malacophyllus*, <sup>4)</sup>2.5FOM : Alcohol + 2.5% (w/w) fermented *Orostachys malacophyllus*, <sup>5)</sup>5FOM : Alcohol + 5% (w/w) fermented *Orostachys malacophyllus*, <sup>6)</sup>SM : Alcohol + Silymarin, <sup>7)</sup>AIN 93 M-MX mineral mix, MP Biomedicals, Illkirch, France, <sup>8)</sup> AIN 93 VX vitamin mix, MP Biomedicals, Illkirch, France

혈액을 채취하였고, 실온에서 약 30분간 방치시킨 후 3,000 rpm에서 20분간 원심분리 하여 얻은 혈청은 혈청 생화학적 분석에 제공하였다. 채혈 후 각 조직을 적출하여 0.9% 생리식염수로 세척하고 여과지로 물기를 제거한 후 무게를 측정하고 분석시료로 제공하였다.

**혈청 지질농도 및 생화학적 지표분석**

혈청 중의 AST, ALT, ALP, LDH,  $\gamma$ -GTP, cholinesterase 활성 및 triglyceride는 의료 전문 수탁 검사기관인 아이케이 사 이언스(부산, 한국)에 의뢰하여 분석하였다.

**간 조직의 분획 조제**

적출한 간 조직으로부터 homogenate 분획의 조제는 조직을 일정량 취해 ice-cold potassium phosphate buffer 용액(0.1 mM/l potassium phosphate containing 1 mM/l sodium EDTA and 1 mM/l dithiothreitol, pH 7.4)을 9배 양을 첨가하여 IKA-ULTRA-TURRAX T25 basic homogenizer (IKA-WERKE GMBH & CO., KG, Staufen, Germany)를 이용하여 균질액을 제조하였다. Homogenate 용액을 원심분리 한 뒤 상등액을 다시 고속원심분리기(VS-24SMTi, Vision Scientific Co., Ltd)로 원심분리 하여 침전된 pellet을 mitochondria fraction으로 하였다. 이 상등액에서 cytosol 분획과 microsome 분획을 얻어 실험에 제공하였다. 간 조직의 Homogenate, mitochondria 및 microsome 분획의 단백질 농도는 Bradford 방법[4]에 준하여 bovine serum albumin을 표준 물질로 하여 측정하였다.

**과산화지질 측정**

각 조직으로부터 얻은 homogenate 분획의 과산화지질 함량은 TBARS 방법[24]에 준하여 측정하였다. 단백질 1 mg을 함유한 분획 용액 1 ml에 각각 TBA (thiobarbituric acid) 시약 2 ml를 가하여 잘 혼합하고, 끓는 물에서 30분간 반응 시킨 뒤 실온에서 방냉하여 3,000 rpm으로 10분간 원심분리 한 후 상등액을 535 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**Glutathione 함량 측정**

각 조직의 glutathione 함량은 조직 homogenate 분획 0.2 ml에 3차 증류수 0.3 ml과 0.4% sulfosalicylic acid 0.5 ml을 가하여 혼합한 후 원심분리 시킨 뒤 상등액 0.3 ml에 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (DTNB) 발색시약을 첨가하여 412 nm 흡광도에서 측정하였으며, glutathione의 표준 검량 곡선에 의해 함량을 산출하여 조직 g당 mg으로 표시하였다[3].

**통계처리**

실험으로부터 얻어진 결과는 one-way ANOVA 검정에 의한 평균치와 표준오차(mean  $\pm$  SE)로 표시하였고, 각 실험군 간의 유의성 검증은 Duncan's multiple range test로 나타내었다[10].

**결과 및 고찰**

**체중, 식이 및 음료 섭취량 변화**

4주 동안 알코올 급여에 의해 정상군에 비해 체중 증가량이 모든 알코올 투여 실험군에서 낮은 수치를 보였으며, Cha 등의 연구[6] 결과에서도 알코올 투여군은 정상군과 비교하였을 때 체중 증가량이 감소된 결과를 나타내어, 이는 알코올 투여가 성장에 영향을 미친 것으로 보여진다(Table 2). 그리고 다량의 알코올을 만성적으로 섭취함으로써 식이 섭취량이 감소하고, 소장에서 영양소나 식이 성분의 흡수를 떨어뜨려 영양 불균형이 일어나 체중 증가량이 감소[23]된 결과와 일치하는 것으로 확인되었다. 특히, 5FOM군과 SM군은 알코올 투여 대조군과 비교하였을 때, 식이 섭취량은 비슷한 수준으로 나타났으나 체중 증가량은 5FOM군에서 유의적으로 증가하여 알코올 투여로 인한 영양 불균형을 완화시켜 영양소의 흡수가 개선된 것으로 사료된다.

**각 장기의 무게**

간장의 무게를 체중에 대한 상대 중량(%)으로 나타내었을 때, 정상군에서 2.85%, 알코올 투여 실험군에서 모두 3.00%

Table 2. Effects of OM and FOM in body weight gain, food intake and water consumption in alcohol feeding rats

Groups	N	Alcohol					
		C	2.5OM	5OM	2.5FOM	5FOM	SM
Initial weight (g)	209.33 $\pm$ 3.38 <sup>a</sup>	209.50 $\pm$ 3.23 <sup>a</sup>	209.21 $\pm$ 2.58 <sup>a</sup>	209.00 $\pm$ 2.53 <sup>a</sup>	209.14 $\pm$ 2.27 <sup>a</sup>	209.07 $\pm$ 2.56 <sup>a</sup>	209.25 $\pm$ 3.12 <sup>a</sup>
Final weight (g)	394.33 $\pm$ 10.36 <sup>a</sup>	335.33 $\pm$ 11.84 <sup>b</sup>	336.57 $\pm$ 7.61 <sup>b</sup>	351.43 $\pm$ 9.34 <sup>b</sup>	344.57 $\pm$ 6.83 <sup>b</sup>	363.17 $\pm$ 8.32 <sup>b</sup>	362.33 $\pm$ 13.40 <sup>b</sup>
Weight gain (g)	185.00 $\pm$ 11.73 <sup>a</sup>	125.83 $\pm$ 13.97 <sup>a</sup>	127.36 $\pm$ 7.63 <sup>a</sup>	142.43 $\pm$ 10.48 <sup>a</sup>	135.43 $\pm$ 8.13 <sup>a</sup>	154.25 $\pm$ 9.80 <sup>ab</sup>	153.08 $\pm$ 12.04 <sup>ab</sup>
Food intake (g/day)	17.92 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>	13.45 $\pm$ 0.28 <sup>b</sup>	12.49 $\pm$ 0.32 <sup>b</sup>	14.46 $\pm$ 0.29 <sup>c</sup>	12.51 $\pm$ 0.37 <sup>b</sup>	13.13 $\pm$ 0.41 <sup>b</sup>	13.33 $\pm$ 0.21 <sup>b</sup>
Water consumption (g/day)	18.73 $\pm$ 0.06 <sup>a</sup>	10.32 $\pm$ 0.04 <sup>b</sup>	11.81 $\pm$ 0.07 <sup>c</sup>	13.45 $\pm$ 0.02 <sup>d</sup>	11.19 $\pm$ 0.06 <sup>e</sup>	11.69 $\pm$ 0.17 <sup>c</sup>	13.64 $\pm$ 0.12 <sup>d</sup>

Values are mean  $\pm$  S.E, n=6, Values with different letters are significantly different at  $p < 0.05$ . Abbreviations are the same as Table 1.

Table 3. Effects of OM and FOM on the relative tissue weight in alcohol feeding rats (% of terminal body weight)

Groups	N	Alcohol					
		C	2.5OM	5OM	2.5FOM	5FOM	SM
Liver	2.85±0.11 <sup>a</sup>	3.29±0.10 <sup>bc</sup>	3.25±0.12 <sup>bc</sup>	3.54±0.17 <sup>b</sup>	3.15±0.09 <sup>ac</sup>	3.24±0.13 <sup>bc</sup>	3.05±0.05 <sup>ac</sup>
Testis	0.85±0.02 <sup>a</sup>	1.01±0.05 <sup>b</sup>	0.97±0.03 <sup>b</sup>	0.95±0.03 <sup>b</sup>	0.98±0.02 <sup>b</sup>	0.93±0.03 <sup>ab</sup>	0.92±0.03 <sup>ab</sup>
Kidney	0.64±0.03 <sup>a</sup>	0.73±0.02 <sup>b</sup>	0.72±0.02 <sup>b</sup>	0.72±0.02 <sup>b</sup>	0.74±0.02 <sup>b</sup>	0.71±0.03 <sup>ab</sup>	0.69±0.02 <sup>ab</sup>
Spleen	0.22±0.01 <sup>a</sup>	0.23±0.01 <sup>a</sup>	0.21±0.01 <sup>a</sup>	0.20±0.01 <sup>a</sup>	0.20±0.01 <sup>a</sup>	0.21±0.01 <sup>a</sup>	0.22±0.01 <sup>a</sup>
Heart	0.32±0.01 <sup>a</sup>	0.33±0.01 <sup>a</sup>	0.32±0.01 <sup>a</sup>	0.31±0.01 <sup>a</sup>	0.31±0.01 <sup>a</sup>	0.32±0.01 <sup>a</sup>	0.33±0.00 <sup>a</sup>
Perirenal fat pad	1.79±0.14 <sup>a</sup>	1.46±0.07 <sup>bc</sup>	1.34±0.14 <sup>bc</sup>	1.38±0.05 <sup>bc</sup>	1.34±0.11 <sup>bc</sup>	1.32±0.19 <sup>b</sup>	1.56±0.10 <sup>ac</sup>
Epididymal fat pad	1.80±0.16 <sup>a</sup>	1.42±0.08 <sup>ab</sup>	1.43±0.14 <sup>b</sup>	1.43±0.06 <sup>b</sup>	1.25±0.10 <sup>b</sup>	1.10±0.10 <sup>b</sup>	1.52±0.10 <sup>ab</sup>

Values are mean ± S.E, n=6, Values with different letters are significantly different at  $p < 0.05$ . Abbreviations are the same as Table 1.

이상의 수치로 나타났다(Table 3). 이는 만성적인 알코올 투여 시 초기증상의 하나로서 알코올 독성으로 인해 간 경변이 초래되어 간세포의 cytosol에 지방, 수분, 단백질이 축적되어 세포용적이 증가함에 따라 간장 비대 현상이 나타나는 것으로 알려져 있다[21]. 고환과 신장의 상대 중량에서 모든 알코올 투여 실험군에서 정상군보다 높은 수치를 보여, 이 또한 알코올 투여에 인한 것으로 사료되며, 5FOM군과 SM군에서는 유의적인 감소 경향을 보였다. 부고환과 신장 주위 지방 조직의 상대 중량은 정상군에 비해 모든 알코올 투여 실험군에서 낮은 수치를 보였고, 특히 5FOM군에서 감소 경향을 나타내었다.

**혈중 지질 농도 및 동맥경화지수 변화**

혈중 총 지질 농도는 알코올 투여 대조군에서 426.00 mg/dl로 정상군인 335.33 mg/dl보다 높은 결과를 나타내었고, OM군과 FOM군에서 농도의존적 감소 형태를 보였으며, 5FOM군에서 정상군에 가까운 유의적인 결과를 나타내었다(Table 4).

혈중의 지방산은 알코올 대사 경로에서 생성된 acetate 일부가 지방산 합성에 사용되어 생성될 수 있으며, 이 지방산은 중성지질 합성에 사용될 수 있다[18]. 혈중 유리지방산 농도는 정상군이 1189.50 uEq/l, 알코올 투여 대조군이 1832.17 uEq/l의 농도로 알코올 투여 대조군에서 높게 나타났고, OM군, FOM군과 SM군 모두 알코올 투여 대조군에 비해 감소한 결과를 나타내었다. 이중 5FOM군과 SM군은 각각 1408 uEq/l와 1420 uEq/l의 농도로 시료군 중 정상군과 근접하게 감소된 수치를 나타내어 간장의 중성지질 축적 억제 가능성 시사하였다. 또한 혈중 총 콜레스테롤 농도는 정상군에 비해 모든 알코올 투여 실험군에서 낮게 측정되었는데, 이는 알코올 투여 대조군이 정상군에 비해 높게 나타나[17]거나 정상군과 유의한 차이를 나타내지 않는 것[1]으로 보고된 결과와 상반되는 결과를 보여 추후 연구가 더 필요할 것으로 판단된다. 혈청의 HDL-콜레스테롤은 소장 및 간세포에서 전구물질로 합성되어 혈중에서 완전한 형태가 되며 콜레스테롤을 체세포로부터 간으로 이동시키는 역할을 하여 동맥경화의 발병률을 낮추는 주요한

Table 4. Effect of OM and FOM on the concentration of total lipid, free fatty acid, total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol and atherogenic index in serum of alcohol feeding rats

Groups	N	Alcohol					
		C	2.5OM	5OM	2.5FOM	5FOM	SM
Total lipid (mg/dl)	335.33±33.02 <sup>ab</sup>	426.00±28.61 <sup>a</sup>	418.29±34.99 <sup>a</sup>	392.29±28.31 <sup>a</sup>	383.14±28.31 <sup>a</sup>	342.14±26.34 <sup>ab</sup>	255.67±19.01 <sup>b</sup>
Free fatty acid (uEq/l)	1189.50±119.02 <sup>a</sup>	1832.17±205.08 <sup>b</sup>	1654.86±188.17 <sup>ab</sup>	1630.83±123.06 <sup>ab</sup>	1661.00±141.93 <sup>ab</sup>	1408.00±99.56 <sup>ab</sup>	1420.00±106.53 <sup>ab</sup>
Total cholesterol (mg/dl)	96.58±4.20 <sup>a</sup>	81.67±2.54 <sup>bc</sup>	85.71±2.55 <sup>ac</sup>	83.42±2.71 <sup>bc</sup>	82.47±2.37 <sup>bc</sup>	79.74±7.27 <sup>bc</sup>	70.69±3.35 <sup>b</sup>
HDL-cholesterol (mg/dl)	16.41±0.73 <sup>a</sup>	13.26±0.38 <sup>b</sup>	14.48±0.33 <sup>c</sup>	14.69±0.44 <sup>c</sup>	13.95±0.28 <sup>bc</sup>	15.08±0.12 <sup>c</sup>	13.90±0.21 <sup>bc</sup>
LDL-cholesterol (mg/dl)	80.17±3.84 <sup>a</sup>	68.41±2.44 <sup>ab</sup>	71.23±2.68 <sup>ac</sup>	68.73±2.72 <sup>ab</sup>	68.52±2.34 <sup>ab</sup>	64.65±7.19 <sup>bc</sup>	56.80±3.25 <sup>b</sup>
AI <sup>1)</sup>	4.82±0.25 <sup>ac</sup>	5.32±0.19 <sup>a</sup>	4.69±0.13 <sup>ab</sup>	4.56±0.25 <sup>ab</sup>	4.83±0.19 <sup>ac</sup>	3.99±0.42 <sup>b</sup>	4.09±0.21 <sup>bc</sup>

Values are mean ± S.E, n=6, Values with different letters are significantly different at  $p < 0.05$ .

<sup>1)</sup>AI (Atherogenic Index) = (total cholesterol-HDL cholesterol)/HDL cholesterol Abbreviations are the same as Table 1.

인자이며, 알코올성 간질환에서 HDL-콜레스테롤의 함량이 유의하게 낮았다고 보고되었다[19]. HDL-콜레스테롤의 농도는 모든 알코올 투여 실험군에서 감소하였지만, OM군, FOM군과 SM군 모두에서 HDL-콜레스테롤의 농도는 알코올 투여 대조군보다 유의적으로 증가하는 경향을 나타내었으며, LDL-콜레스테롤은 5FOM군과 SM군에서 감소하는 경향이였다. 혈중 총 콜레스테롤과 HDL-콜레스테롤을 동맥경화지수(AI)로 환산한 결과 정상군이 4.82, 알코올 투여 대조군이 5.32로 증가한 반면 OM군과 FOM군에서 시료 투여 농도에 따라 더 감소한 결과를 나타내어 HDL-콜레스테롤 농도의 증가로 인해 동맥경화의 발병률을 낮출 것으로 사료된다. 양성 대조구인 SM군은 혈청 총 지질, 총 콜레스테롤 농도와 동맥경화지수가 낮게 측정되어 혈중 지질 개선능을 보였으며, 5FOM군에서 SM군과 유사한 결과를 보여 5FOM은 혈중 지질 개선에 효과적이었다.

**간 조직 및 혈중 중성지질 농도 변화**

알코올의 만성적 섭취는 당질, 단백질 및 지질 대사 장애를 일으키며, 이로 인한 지방산의 지속적인 공급 과다, 지방산 합성 매개 효소의 활성 증가로 인한 지방산의 합성 증가, 간세포 막의 손상으로 인한 중성 지질의 분비 장애가 나타나 알코올성 지방간으로 진행되며 이는 결국 알코올성 간염 및 간경화증까지도 초래된다[2]. 간 조직의 중성지질 농도는 알코올 투여로 인해 알코올 투여 대조군보다 높아진 결과를 확인하였으며, 모든 식이 투여군에서 알코올 투여 대조군의 중성지질 농도보다 유의적으로 낮은 결과를 나타내었고, OM군과 FOM군은 농도 의존적으로 감소하는 경향이였다(Fig. 1). 이중 5FOM군에서 정상 수준의 중성지질 농도를 나타내어 간 조직의 중성지질 농도 회복에 영향을 준 것으로 보인다. 간장의 콜레스테롤, 인지질 및 중성지질 등은 간장의 apolipoprotein A, B, C, E들과 결합되어 VLDL (Very Low Density Lipoprotein)의 형태로 혈중으로 방출된다. 하지만, 알코올 투

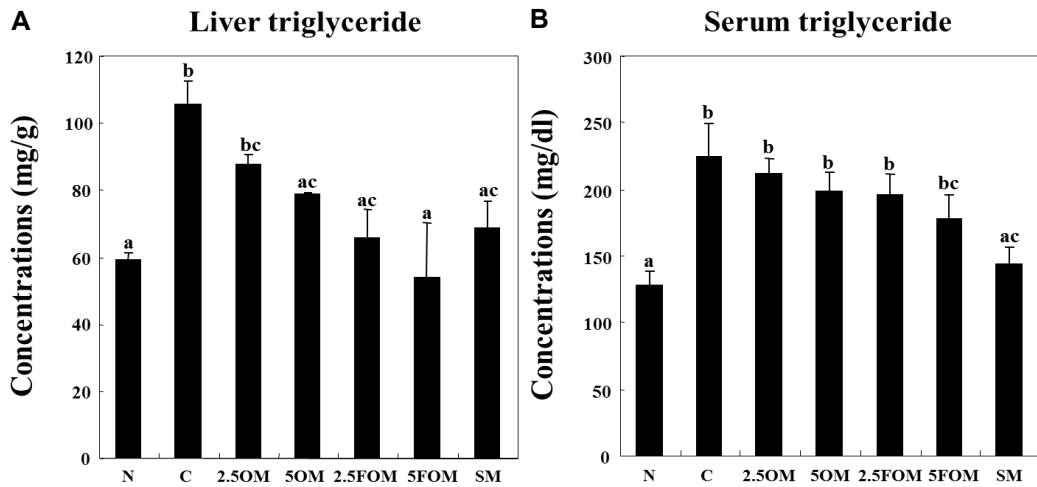


Fig. 1. Effect of OM and FOM on the concentrations of triglyceride in liver (A) and serum (B) in alcohol feeding rats. Values are mean ± S.E, n=6, Values with different letters are significantly different at  $p < 0.05$ . Abbreviations are the same as Table 1.

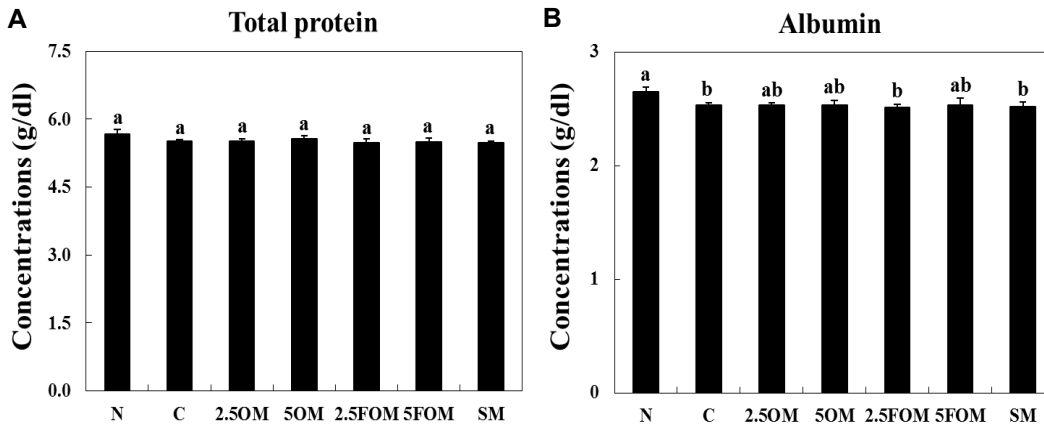


Fig. 2. Effect of OM and FOM on the concentrations of total protein (A) and albumin (B) in serum of alcohol feeding rats. Values with different letters are significantly different at  $p < 0.05$ , Values are mean ± S.E, n=6. Abbreviations are the same as Table 1.

여 시 중성지질을 함유한 VLDL은 혈중으로의 방출이 급속히 증가되는 것으로 알려져 있으며, 혈중 중성지질의 증가는 간에서 VLDL의 생성 증가가 원인인 것으로 알려져 있다[18]. 따라서 간 조직의 중성지질 농도와 혈중 중성지질 농도가 알코올 투여 대조군에서 높은 것을 확인하였고, OM군, FOM군

과 SM군에서 감소 경향을 보였지만, 2.5 OM군, 5 OM군과 2.5 FOM군은 알코올 투여 대조군과 큰 차이는 나타나지 않았다. 반면, 5FOM군과 SM군에서 유의하게 감소하였다. 따라서 5 FOM군은 간장 및 혈중 중성지질 개선에 영향을 미친 것으로 보인다.

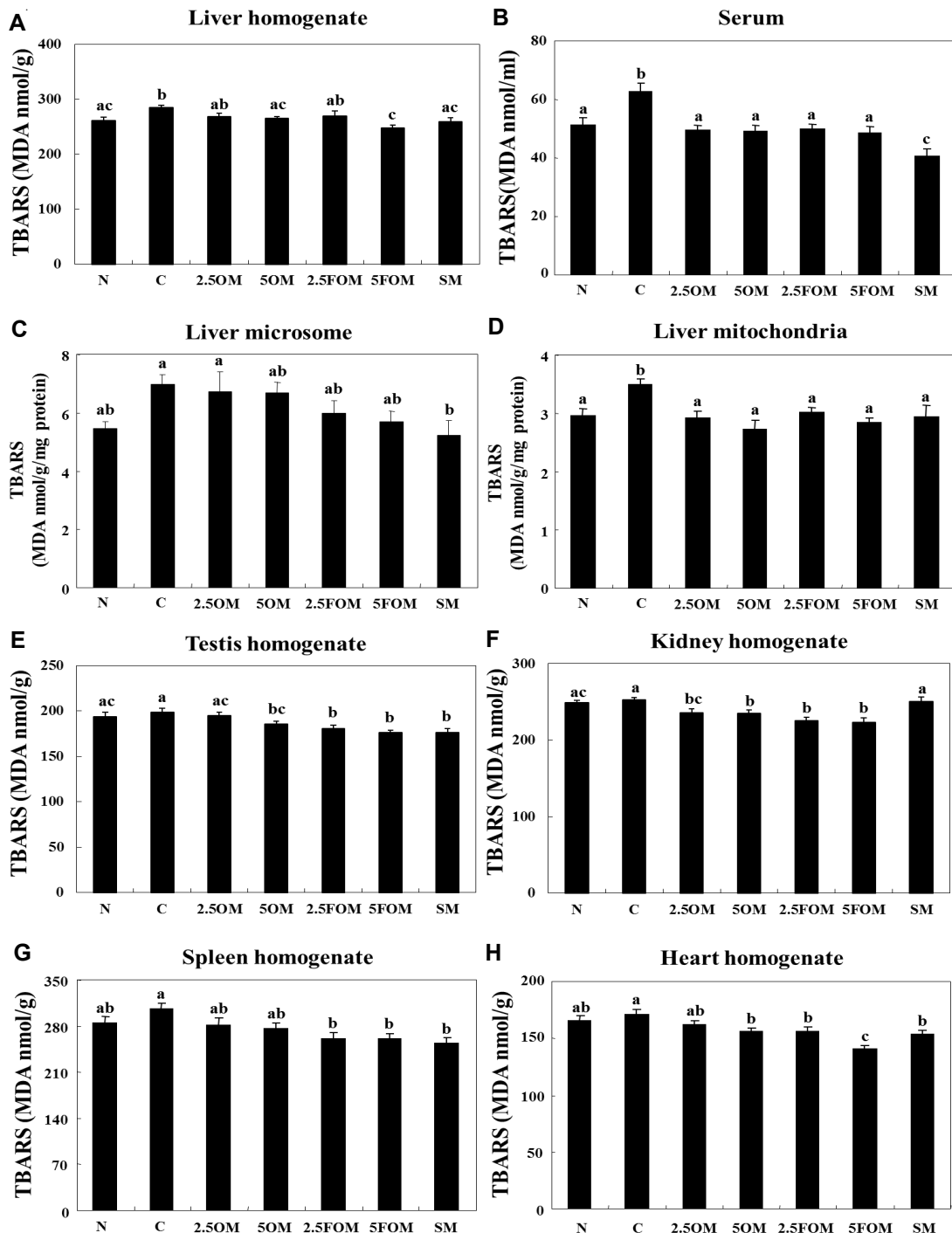


Fig. 3. Effect of OM and FOM on the TBARS concentrations in the hepatic fractions (A, C, D), serum (B), testis (E), kidney (F), spleen (G) and heart (H) of alcohol feeding rats. Values with different letters are significantly different at  $p < 0.05$ . Values are mean  $\pm$  S.E,  $n=6$ . Abbreviations are the same as Table 1.

**혈중 총 단백질 및 알부민 농도 변화**

혈중 총 단백질 농도는 내장단백질의 상태를 반영하며, 혈중 알부민 수준은 부적절한 식사, 간장 질환 및 다른 질병에 의한 단백질 합성 감소를 반영한다[13]. 알부민은 간장에서 합성되는 혈액 단백질로 혈장의 총 단백질의 60% 정도 차지할 정도로 중요하며, 중증 간장 질환에서 감소되는 중요 간장 질환 기능지표로 이용되고 있다[11]. 혈중 총 단백질과 알부민의 농도 변화를 측정된 결과는 Fig. 2에 나타내었다. 혈중 총 단백질 농도는 모든 군에서 유의적인 차이 없이 모두 비슷한 수치를 나타내었고, 혈중 알부민 농도는 모든 알코올 투여 실험군에서 정상군에 비해 감소된 결과로서 알코올 투여 실험군은 만성적인 알코올 투여로 인한 간 질환의 가능성을 보였다. 하지만 2.5OM군, 5OM군과 5FOM군에서 알코올 투여 대조군에 비해 약간의 차이는 보였다.

**과산화지질 측정**

생체에서 과산화지질은 여러 가지 독성 화합물이나 약물에 의한 간장 손상 유발의 가장 중요한 인자로 세포내 산화적 스트레스의 증가, 즉, 유리 라디칼 생성의 증가 및 항산화적 억제력의 감소에 의하여 증가되며, 노화나 동맥경화를 비롯한

많은 퇴행성 질환의 주요한 인자로 보고되었다[20]. TBARS법을 이용한 과산화지질을 측정된 결과는 Fig. 3에 나타내었다. 간장 조직과 혈중 과산화지질 농도는 알코올 투여 대조군에서 모두 높게 나타났고, OM군과 FOM군 모두 감소하였다. 이 중 간 조직의 과산화지질 농도는 OM군과 FOM군에서 농도 의존적인 감소하였으며, 5FOM군에서는 정상군보다도 낮은 과산화지질 농도를 나타내었다. 그리고 간 조직의 microsome과 mitochondria의 과산화지질 농도 측정 결과 OM군과 FOM군에서 감소 경향을 보였고, 혈청의 과산화지질 농도도 OM군과 FOM군 모두 정상군과 유사한 결과를 나타내어 OM과 FOM 모두 과산화지질을 감소시켰다. 고환, 신장, 비장 및 심장 조직의 과산화지질을 측정된 결과, 모든 장기에서 OM군과 FOM군 모두 알코올 투여 대조군보다 낮은 수치를 나타내었으며, 고환과 심장 조직에서 농도 의존적으로 감소하였고, 이 중 5FOM군은 측정된 모든 조직에서 유의적인 감소하였다. Park 등의 연구[27]에서 bromobenzene으로 간독성을 유발한 흰쥐에 *O. japonicus*의 메탄올 추출물을 투여하여 TBARS 함량을 측정된 결과, 메탄올 추출물 투여 농도에 따라 의존적인 감소 효과를 보였으며, 저자들의 연구 결과에서도 OM군과 FOM군 모두 시료 투여 농도에 따라 감소된 결과를 입증하였다. 특히,

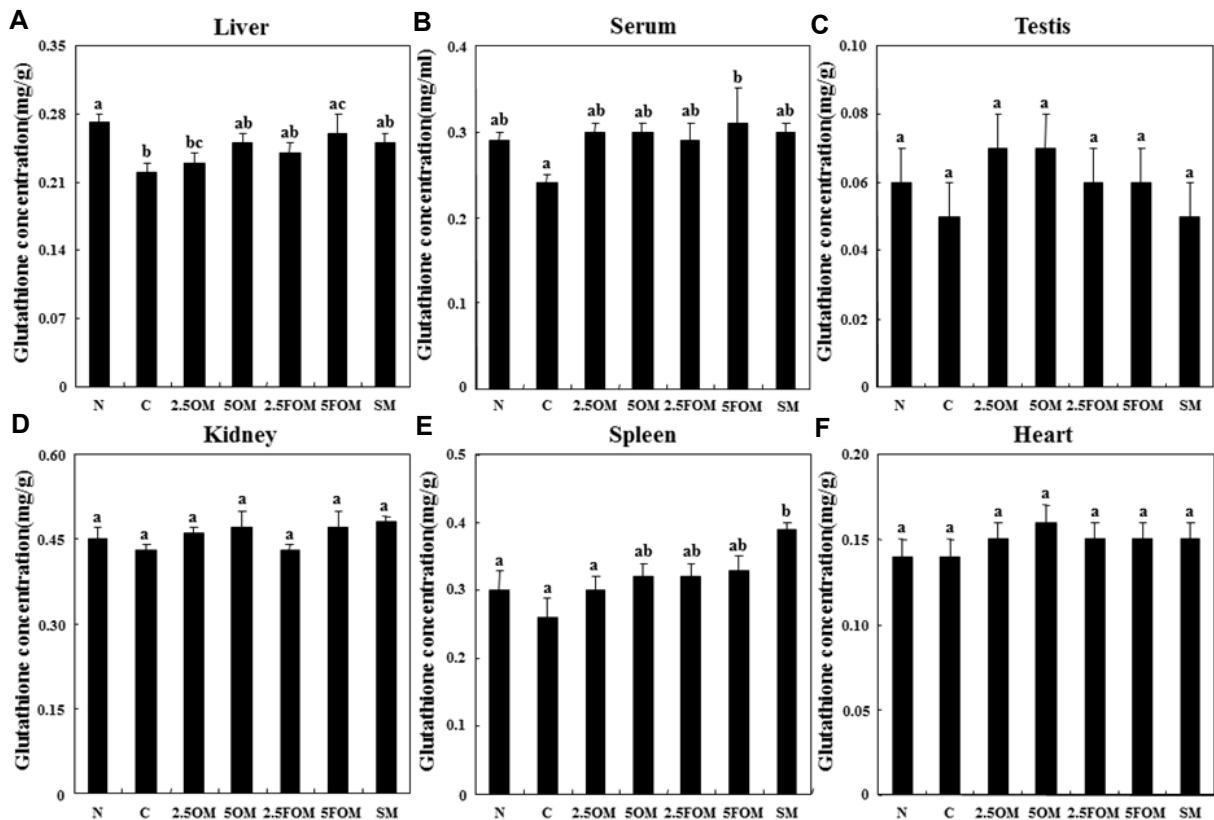


Fig. 4. Effect of OM and FOM on the glutathione concentrations of liver (A), serum (B), testis (C), kidney (D), spleen (E) and heart (F) in alcohol feeding rats. Values are mean ± S.E, n=6, Values with different letters are significantly different at  $p < 0.05$ . Abbreviations are the same as Table 1.

FOM군에서 전반적으로 OM군보다 유의적으로 감소하는 결과를 나타내어 FOM은 우수한 과산화지질 억제능을 가지는 것으로 사료된다.

### Glutathione 함량 변화

간 손상이 유발되면 간장 내에서는 스스로를 보호하기 위한 방어체계가 구축되는데, 방어기전은 항산화 효소뿐만 아니라 glutathione, tocopherol 등의 항산화 물질이 있으며, 이중 glutathione은 동물조직 중에서 nonprotein thiols의 대부분을 차지하며 활성산소의 scavenger로서 과산화지질을 대사시키는 중요한 기질로 세포내 항산화제 중에서 가장 중요한 역할을 담당하고 있다[28]. 각 조직과 혈청의 glutathione 함량을 측정 한 결과는 Fig. 4에 나타내었다. 대부분의 조직에서 알코올 투여 대조군의 glutathione 함량이 감소된 것을 확인할 수 있었고, 그 중 간장 조직과 혈청의 glutathione 농도는 OM군과 FOM군에서 유의하게 증가하였다. 만성적인 알코올 투여 흰 쥐의 간 조직 내 glutathione 농도의 감소와 과산화지질의 증가는 일반적인 현상으로 알려져 있다[15]. 고환, 신장, 심장의 glutathione 농도는 유의적인 차이는 인정되지 않았지만, OM군과 FOM군에서 알코올 투여 대조군에 비해 증가하였다. 조직 중 glutathione 농도는 5FOM군에서 다른 군에 비해 증가한 것을 확인함으로써, 5FOM은 간 조직을 비롯하여 다른 조직의 과산화지질을 감소시키고, glutathione 농도를 증가시키는 결과를 나타내어 조직 내 항산화 기능 개선에 영향을 미치는 것으로 보인다. 이상의 실험 결과에서 FOM은 혈중 지질과 조직의 중성지질을 낮추고, 과산화지질 생성 억제에 영향을 주어 알코올로 인한 생체 내 스트레스를 감소시키며, 지질 개선제로서의 가능성을 보였다.

### 감사의 글

본 연구는 동아대학교 학술연구비 지원에 의하여 연구되었습니다.

### References

- Ahn, H. Y., Park, K. R., Kim, Y. R., Yoon, K. H., Kim, J. W. and Cho, Y. S. 2013. Effects of *Monascus*-fermented *Angelica gigas* Nakai on the contents of serum lipid and tissue lipid peroxidation in alcohol feeding rats. *J Life Sci* **23**, 1371-1380.
- Baraona, E. and Lieber, C. S. 1979. Effects of ethanol on lipid metabolism. *J Lipid Res* **20**, 289-315.
- Beutler, E., Duron, O. and Kelly, B. M. 1963. Improved method for the determination of blood glutathione. *J Lab Clin Med* **61**, 882-888.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Castillo, T., Koop, D. R., Kamimura, S., Triadafilopoulos, G. and Tsukamoto, H. 1992. Role of cytochrome P-450 2E1 in ethanol, carbon tetrachloride and iron-dependent microsomal lipid peroxidation. *Hepatology* **16**, 992-996.
- Cha, J. Y., Ahn, H. Y., Eom, K. E., Park, B. K., Jun, B. S., Park, J. C., Lee, C. H. and Cho, Y. S. 2009. Effects of *Monascus*-fermented korean red ginseng powder on the contents of serum lipid and tissue lipid peroxidation in alcohol feeding rats. *J Life Sci* **19**, 983-993.
- Cha, J. Y., Kim, Y. S., Ahn, H. Y., Eom, K. E., Park, B. K., Jun, B. S. and Cho, Y. S. 2009. Biological activity of fermented silkworm powder. *J Life Sci* **19**, 1468-1477.
- Choe, M., Sin, G. J., Choe, G. P., Do, J. H. and Kim, J. D. 2003. Synergistic effects of extracts from Korean red ginseng, *Saururus chinensis* (Lour.) Baill. and *Rubus coreanus* Miq. on antioxidative activities in rats. *Korean J Medicinal Crop Sci* **11**, 148-154.
- Choo, M. H., Lee, J. J. and Lee, M. L. 2007. Effect of *Pimpinella brachycarpa* ethanol extract on chronically ethanol-induced liver damage in rats. *J Life Sci* **17**, 1406-1413.
- Duncan, D. B. 1959. Multiple range and multiple F test. *Biometrics* **11**, 1-42.
- Friedman, R. B., Anderson, R. E., Entine, S. M. and Hirshberg, S. B. 1980. Effect of diseases on clinical laboratory tests. *Clin Chem* **26**, 1-476.
- Garcia-Ruiz, C., Morales, A., Ballesta, A., Rodes, J., Kaplowitz, N. and Fernandez-Checa, J. C. 1994. Effect of chronic ethanol feeding on glutathione and functional integrity of mitochondria in periportal and perivenous rat hepatocytes. *J Clin Invest* **94**, 193-201.
- Gibson, R. S. 1990. *Principles of nutritional assessment*, pp.187, 2nd eds., Oxford University Press, New York.
- Jeong, K. J., Chon, Y. S., Ha, S. H. and Yun, J. G. 2013. Optimum light intensity, media and fertilization for potted *Orostachys malacophyllus* from Taebaek. *Flower Res J* **21**, 46-51.
- Jewell, S. A., Monte, D. D., Gentile, A., Guglielmi, A., Altomare, E. and Albano, E. 1986. Decreased hepatic glutathione in chronic alcoholic patients. *J Hepatol* **3**, 1-6.
- Katina, K., Liukkonen, K. H., Kaukovirta-Norja, A., Adlercreutz, H., Heinonen, S. M., Lampi, A. M., Pihlava, J. M. and Poutanen, K. 2007. Fermentation-induced changes in the nutritional value of native or germinated rye. *J Cereal Sci* **46**, 348-355.
- Kim, J. Y., Choi, I. W. and Noh, S. K. 2014. Protective effect of *Citrus unshiu* peel extracts on ethanol-induced fatty liver in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **43**, 187-193.
- Kim, M. H., Kwon, O. H. and Park, C. K. 1996. Inhibition of hepatic triglyceride accumulation and stimulation of alcohol metabolism by the herbal extract containing *Phaseoli radiati semen* in rats fed ethanol. *Yakhak Hoeji* **40**, 78-83.
- Lee, E. H. and Chyun, J. H. 2009. Effects of Chongkukjang intake on lipid metabolism and liver function in alcoholic fatty liver rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **38**, 1506-1515.



20. Levine, R. L., Garland, D., Oliver, C. N., Amici, A., Climet, I., Lenz, A. G., Ahn, B. W., Shaltiel, S. and Stadtman, E. R. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* **189**, 464-478.
21. Lieber, C. S. 1985. Alcohol and the liver metabolism of ethanol metabolic effects and pathogenesis of injury. *Acta Med Scand Suppl* **703**, 11-55.
22. Lieber, C. S. 1991. Hepatic metabolic and toxic effect of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* **15**, 573-592.
23. Mendenhall, C. L., Bradford, R. H. and Furman, R. H. 1969. Effects of ethanol on glycerolipid metabolism in rat liver. *Biochim Biophys Acta* **187**, 501-509.
24. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* **95**, 351-358.
25. Park, H. J., Leem, S. C., Lee, M. S. and Young, H. S. 1994. Triterpene and steroids from *Orostachys japonicus*. *Korean J Pharm* **25**, 20-23.
26. Park, H. J., Young, H. S., Kim, J. O., Lee, S. H. and Choi, J. S. 1991. A study on the chemical constituents of *Orostachys japonicus* A. Berger. *Korean J Pharm* **22**, 78-84.
27. Park, J. C., Han, W. D., Park, J. R., Choi, S. H. and Choi, J. W. 2005. Changes in hepatic drug metabolizing enzymes and lipid peroxidation by methanol extract and major compound of *Orostachys japonicus*. *J Ethnopharmacol* **102**, 313-318.
28. Plaa, G. L. and Witschi, H. 1976. Chemicals, drugs and lipid peroxidation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **16**, 125-141.
29. Shin, J. H., Lee, S. J., Seo, J. K., Lee, H. J., Ju, J. C. and Sung, N. J. 2012. Effect of a combined extract of *Orostachys japonicus* with medicinal plants on the lipid composition of the liver and kidney from streptozotocin-induced diabetic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* **41**, 510-518.

## 초록 : 유산균 발효 와송이 알코올성 유발 지방간 흰쥐의 조직 과산화지질 및 혈중 지질농도에 미치는 영향

박규림 · 안희영 · 조영수\*

(동아대학교 생명공학과)

와송(OM) 분말과 3종의 유산균 혼합물로 발효하여 얻은 발효 와송(FOM)을 식이 중에 각각 2.5%와 5%의 농도로 첨가하여 알코올 투여와 함께 4주동안 흰쥐에 급여한 후 조직의 과산화지질 농도와 혈중 지질수준에 미치는 영향에 대하여 검토하였다. 혈중 지질과 혈중 콜레스테롤의 농도는 알코올 투여 대조군(C)에서 높아졌지만, OM군 FOM군 모두 낮은 수치를 보였고, 특히 5FOM군에서 유의적으로 낮은 수치를 나타내었다. 5FOM군에서 혈중 총 콜레스테롤 수치는 감소하는데 반해 HDL-콜레스테롤 수치는 높아 동맥경화지수 수치가 낮았다. 또한, 간장 및 혈중 중성지질 농도는 알코올 투여 대조군(C)에서 증가하였고, OM군 FOM군 모두 농도 의존적으로 감소하였으며, 5FOM군에서 정상 수준의 감소를 보여 정상군과 유의한 수치를 나타내었다. 그리고 5 FOM군에서 혈중 총 단백질 함량의 유의적인 차이는 인정되지 않았지만, 혈중 알부민 함량은 증가하였다. 간장, 혈청, 고환, 신장, 비장, 심장 조직의 TBARS 함량은 모두 알코올 투여 대조군(C)에서 증가하였고, OM군 FOM군 모두 알코올 투여 대조군에 비해 감소하였으나 5FOM군에서 양성 대조군(SM)의 감소 경향과 비슷한 결과를 나타내었다. 간장 및 혈청의 glutathione 농도 또한 5FOM군에서 증가 경향을 나타내었다. 이상의 결과로 알코올 유발 흰쥐에서 FOM투여는 OM 투여보다 지질 개선에 더 긍정적인 영향을 나타내었고, 생체 내 스트레스를 감소시켜 체내 조직의 항산화 증진에 관여할 것으로 판단되어진다.