

고지방식이 섭취 마우스를 이용한 복분자종자유의 혈행 개선 효과

전혜린¹ · 광성민¹ · 오수진² · 남현수² · 한두원³ · 송윤석³ · 송진우³ · 최경철¹

¹울산대학교 의과대학 의생명과학과

²(주)제이크린베리너리

³(재)전북생물산업진흥원

Blood Flow Improvement Effect of Bokbunja (*Rubus coreanus*) Seed Oil in High-Fat Diet-Fed Mouse Model

Hyelin Jeon¹, Sungmin Kwak¹, Su-Jin Oh², Hyun Soo Nam², Doo Won Han³,
Yoon Seok Song³, Jinwoo Song³, and Kyung-Chul Choi¹

¹Department of Biomedical Sciences, University of Ulsan College of Medicine

²JKberryary

³Jeonbuk Institute for Bioindustry

ABSTRACT Bokbunja (*Rubus coreanus*) is a Korean fruit and wild black raspberry that has antioxidant, anticancer, and beauty effects due to its abundant polyphenols and anthocyanins. The purpose of this study was to investigate the blood flow improvement effect of Bokbunja seed oil (BSO) in a high-fat diet-fed mouse model. We examined improvement of blood flow and its related biomarkers *in vivo*. Mice were divided into four groups; Control, high fat diet control (negative control, HFD), salmon oil control (positive control, HFD+commercial n-3 fatty acid), and BSO experiment groups (HFD+2 g/2,000 kcal, HFD+4 g/2,000 kcal). After the mice were sacrificed, plasma triglyceride, cholesterol, and blood flow-related biomarkers (coagulation factor 7, 12, serotonin, TXB2, PT, and aPTT) were measured in mouse blood and organs. BSO reduced blood viscosity through improvement of blood lipids (cholesterol and plasma triglycerides) as well as levels of blood coagulation factors and blood platelet activity. BSO also delayed blood coagulation time. Thus, we confirmed that BSO inhibits excessive blood clotting of blood vessels and improves blood flow. Taken together, these results suggest that BSO decreases plasma triglycerides and cholesterol and improves blood flow by regulating biomarkers.

Key words: Bokbunja seed oil (BSO), *Rubus coreanus*, blood lipid, blood flow improvement, biomarker

서 론

2013년 통계청이 발표한 바에 따르면 지난 2003년부터 2013년까지 우리나라 국민 사망원인으로 악성 신생물에 의한 사망과 순환기계통에 의한 사망이 1, 2위를 차지하고 있다. 2013년 신생물에 의한 사망은 10만 명당 151.5명으로 전체 사망 원인의 28.8%를 차지하였고 순환기계통에 의한 사망은 113.1명으로 21.5%에 달했다(1). 그중에서도 순환기계통에 의한 사망 중 특히 뇌혈관질환과 심장질환에 의한 사망이 많기 때문에 고혈압이나 고지혈증, 동맥경화와 같은 질병의 치료와 예방을 위한 건강기능식품 개발뿐만 아니라 치료 지침에 대한 연구가 계속되고 있고(2-5), 혈액순환 개선에 대한 연구도 활발히 이루어지고 있다(6,7). 순환기계통

질환의 발병 원인으로는 유전적 요인 외에 비만, 고지혈증, 고혈압 및 당뇨, 음주, 흡연, 운동부족, 스트레스, 잘못된 식습관 등이 있으며(8-10), 심혈관계 질환의 발병을 효과적으로 예방하기 위해서는 혈중 콜레스테롤과 중성지방 수치의 저하, 혈소판 활성화 및 혈액응고인자의 과한 활성화 억제 등이 요구된다.

인체 내에서 혈액은 응고 작용과 용해 작용이 평형을 이루어 항상성을 유지하고 있기 때문에 정상 상태에서는 출혈이나 혈전 생성 등에 의해 혈액순환에 방해를 받지 않는다. 그러나 혈관 손상 등으로 혈전이 생성될 때 조절 이상으로 인해 혈전이 과다하게 생기거나 과량 생성된 혈전에 대한 용해 작용이 적절하게 일어나지 않는 것과 같이 평형 상태가 깨지게 되면 혈액의 흐름이 원활하게 이루어지지 못하게 되고 결국 심혈관계 질환은 악화된다(11-14). 임상에서는 혈전성 질환을 치료하기 위해 와파린(coumadin)과 같은 항응고제, 아스피린과 같은 항혈소판제, urokinase나 t-PA와 같은 혈전용해제를 복용하도록 하고 있으며, 혈액의 점도를

Received 7 April 2015; Accepted 23 April 2015

Corresponding author: Kyung-Chul Choi, Department of Biomedical Sciences, University of Ulsan Collage of Medicine, Seoul 05535, Korea

E-mail: choikc75@amc.seoul.kr, Phone: +82-2-3010-2087

낮추기 위해 스타틴 계열의 콜레스테롤 저하제를 복용하도록 하고 있다. 그러나 너무 강한 활성으로 인해 와파린은 출혈의 부작용과 피부 괴사와 같은 부작용이 나타나고(15,16), 아스피린은 효과가 뛰어나지만 위장관 출혈과 같은 부작용이 보고되고 있으며(17), 스타틴 계열의 약제는 혈중 LDL 콜레스테롤 수치를 낮추는 데 아주 좋은 효과를 보이지만 근육관련 질환 유발의 부작용을 가지고 있다(18). 따라서 장기 복용 시 부작용이 적고 근원적으로 심혈관계 질환을 예방할 수 있는 기능성 식품의 개발이 필요하다.

복분자 딸기(*Rubus coreanus* Miquel)는 장미과(Rosaceae)에 속하는 낙엽관목으로 우리나라 중부 이남의 산기슭 양지에서 자생하는 식물이다. 흰 분으로 덮인 줄기와 갈고리 모양의 가시를 특징으로 하는 복분자는 높이가 약 2~3 m 정도이며, 5~6월에는 꽃이 피고 7~8월에는 열매가 성숙되어 감에 따라 붉게 익다가 완숙될 때엔 흑색 빛을 띤다. 이 열매의 미성숙과를 건조시킨 것을 복분자라고 하며(19-21), 동의보감에 따르면 한방에서 보제(補劑), 청량, 지갈(止渴), 강장약 등의 약제로 쓰인다. 복분자 딸기는 성숙 단계별로 생리활성 성분의 함량 차이가 있고(22) 추출방법에 따라서도 생리활성 성분 함량에 차이가 있다(23). 근래 이루어진 연구에 따르면 복분자의 활성물질은 항노화 및 주름개선(24), 면역 활성 증진(25), 항산화(26,27), 항암 및 항스트레스(28), 콜레스테롤 개선 효과(29,30) 등을 가진다고 알려져 있다. 그러나 최근까지 이루어진 대부분의 연구는 복분자 딸기의 과즙이나 미숙, 중간숙, 완숙의 복분자 딸기 또는 잎의 추출물을 이용한 것이고 복분자 씨나 종자유를 이용한 연구는 미비한 실정이다. 이 연구에서 사용된 복분자종자유는 복분자 열매의 과즙을 착즙하고 난 슬러지(찌꺼기)를 이용해 착유하여 얻게 되는데, 오메가-6 지방산인 linoleic acid(리놀레산)와 오메가-3 지방산인 linolenic acid(리놀렌산)를 풍부하게 포함하고 있으며, 비타민 E와 약간의 폴리페놀과 플라보노이드를 가지는 것을 특징으로 한다. 플라보노이드에 의해 혈중지질 개선의 효과를 가진다는 보고(31,32)와 혈중 비타민 E, 플라보노이드, 폴리페놀이 강력한 항산화제로 기능한다는 연구(33-35)가 있는데, 복분자종자유 내의 물질들로 인해 혈중지질 개선 및 혈행 개선에 대한 가능성을 가질 것이라 예상하였고, 그 가능성을 확인하고자 이 연구를 수행하게 되었다.

재료 및 방법

복분자종자유 의 공급

복분자종자유(Bokbunja seed oil; BSO)는 (주)제이크린 베리너리(Seoul, Korea)에서 공급받아 사용하였다. 복분자종자유는 특허기술(특허등록번호: 10-1168169-0000)(36)을 이용해 착유한 것인데, 간단히 서술하자면 다음과 같다. 복분자 열매는 두 단계를 거쳐 종자유를 착유한다. 착즙을 거친 복분자 열매의 잔사는 체-진동기에서 껍질과 씨를

분리하고 원심분리기(ADS-1003CS, Hanil SME, Anyang, Korea)를 이용해 2,000~5,000 rpm에서 10~30분간 씨를 분리하는 과정을 거치게 되는데, 이 씨를 오일러브형(OIL LOVE, Dasan FoodMachine, Shiheung, Korea) 또는 익스펠라형(D-1680, Dasan FoodMachine) 착유기를 사용하여 80~150°C에서 5~40분간 압착·착유하여 얻는다.

동물사육

본 실험에서 사용된 고지혈증 모델은 ICR 마우스에 45% fat을 포함하는 고지방식을 제공하여 후천적으로 고지혈증을 유도하는 모델로, 5주령의 수컷 마우스(25±2 g)를 (주)오리엔트바이오(Seongnam, Korea)를 통해 공급받아 난괴법을 이용, 무작위로 배정하여 일주일 동안 안정기를 가진 뒤, 사료 일정량과 식수를 충분히 공급하고 항온(25±2°C), 항습(50±5%), dark/light 12시간의 조건을 유지하도록 하였다. 총 8주간의 동물실험은 서울아산병원 아산생명과학연구원 실험동물연구실에서 동물실험윤리위원회 승인(승인번호: 2014-12-151)을 받아 진행하였으며, 실험기간 동안 연구 지침을 준수하였다.

실험군은 마우스 5마리를 한 군으로 하고 두 그룹으로 나누어 실험을 진행하였으며, 이는 일반식이 투여 그룹과 고지방식이 투여 그룹 모두에 복분자종자유를 제공하였을 때 두 그룹 간의 결과 차이를 확인하였다. 첫 번째 그룹은 일반 사료를 자율 급식하며 양성대조군으로 오메가-3 지방산과 복분자종자유를 농도별로 제공하였고, 두 번째 그룹은 고지방 사료를 자율 급식하며 첫 번째 그룹과 마찬가지로 오메가-3 지방산과 복분자종자유를 농도별로 제공하도록 하였다. 일반적으로 성인의 하루 섭취권장 열량은 2,000 kcal이며, 평균 2,000 kcal의 열량을 섭취하는 사람의 복분자종자유 하루 섭취권장량을 2 g과 4 g으로 가정하고 그에 상응하는 양을 실험동물에게 투여하도록 하였으며, 실험동물의 하루 평균 식이섭취량은 약 2~3 g이므로 섭취열량에 비례하는 양의 복분자종자유를 제공하였다. 따라서 복분자종자유(BSO) 급이군은 복분자종자유를 하루 2 g 섭취하는 군인 'BSO 2 g'과 BSO를 하루 4 g 섭취하는 군인 'BSO 4 g'으로 표기하였다. 또한 보통 혈행 개선 목적으로 섭취하도록 하는 건강기능식품의 성인 하루 섭취권장량은 2~4 g 수준인데, 이 실험의 양성대조군으로 사용된 오메가-3 지방산의 섭취권장량은 2 g이었으므로 실험동물에게 섭취열량에 대비하여 2 g에 비례하는 양을 제공하였다.

실험동물의 급식 방법은 모두 자율급식으로 하며 모든 실험동물에게 같은 강도의 스트레스를 주기 위해 음성대조군 마우스에게도 경구투여를 실시하였는데, 투여 물질은 0.5% carboxymethyl cellulose(CMC) 용액으로 하였으며 양성대조군 및 복분자종자유 급이군에게 제공되는 부피와 같은 양을 주입하였다. 실험이 시작된 이후 종료될 때까지 체중은 매주 2회 측정하여 기록하였고, 식이섭취량 또한 매주 2회 측정하여 식이효율을 산출하는 데 이용하였다.

식이효율 산출

매주 제공된 일정량의 사료 무게에서 섭취 후 남은 사료의 값을 제외하고 각 군의 평균 식이섭취량을 구하고 체중의 증감을 비교하여 식이효율을 산출하여 결과 값은 표에 나타내었다.

$$\text{Food efficiency rate (FER)} = \frac{\text{Weight gain (g)}}{\text{Food intake (g)}}$$

혈액 및 간 채취와 장기 무게 측정

실험 종료 시 avertin(2,2,2-tribromoethanol, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)으로 마취한 뒤 안와채혈 방법을 통해 혈액을 채취하였고 이는 항응고제인 3.8% sodium citrate(Sigma-Aldrich Co.)와 9:1 비율로 섞어 혈액이 응고되지 않도록 하였다. 실험동물을 개복하여 체내 장기의 변화가 있는지 육안으로 확인하고 주요 장기의 무게를 측정하고 기록한 뒤 군 간 유의적 차이가 있는지 확인하였다. 또한 간은 phosphate buffered saline(PBS)에 수세하여 혈액을 최대한 제거한 뒤 채취하여 실험에 쓰일 때까지 초저온 냉동고에 저장하였다.

혈중 중성지방 및 콜레스테롤 측정

혈액은 1,500×g에서 원심분리(Sorvall™ Legend™ Micro 17 Micro centrifuge, Thermo Scientific Inc., Waltham, MA, USA) 하여 혈구와 혈장을 분리한다. 이때 혈장은 멸균된 1.5 mL 튜브에 옮겼고 혈중 중성지방과 콜레스테롤 수치를 측정하는 데에 이용하였다. 혈중 중성지방은 triglyceride colorimetric assay kit(Cayman, Ann Arbor, MI, USA)을 이용하여 측정하였고, 콜레스테롤은 EnzyChrom HDL and LDL/VLDL assay kit(Bioassay system, Hayward, CA, USA)을 이용해 측정하였으며 각각의 흡광도는 SpectraMax 340PC384 Microplate Reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

Alanine aminotransferase(ALT)와 aspartate aminotransferase(AST) 활성 측정

일정량의 간 조직에 조직 용해 완충액을 넣고 균질화하여 간세포 내 단백질을 용해시킨 뒤, 4°C에서 17,000×g로 30분간 원심분리 하고 조직 찌꺼기와 간 조직 단백질을 용해액을 멸균된 1.5 mL 튜브로 이동하여 분리시킨다. ALT 활성은 Alanine Aminotransferase(ALT of SGPT) Activity Colorimetric/Fluorometric Assay Kit(BioVision, Milpitas, CA, USA)을 이용하였고 AST 활성은 Aspartate Aminotransferase(AST of SGOT) Activity Colorimetric Assay Kit(BioVision)을 이용해 측정하였는데, 이들의 흡광도는 SpectraMax 340PC384 Microplate Reader를 이용하여 측정하였다.

혈장의 coagulation factor VII와 XII 측정

혈장의 혈액응고인자는 ELISA kit을 사용하여 측정하였는데, coagulation factor VII는 Mouse Coagulation Factor VII(F7) ELISA Kit(Sincere Biotech Co., Beijing, China)을 이용하였고, coagulation factor XII는 Mouse Coagulation factor XII(F12) ELISA Kit(Sincere Biotech Co.)을 이용하였다. 흡광도는 SpectraMax 340 PC384 Microplate Reader로 측정하였으며 결과 값은 그래프로 나타내었다.

혈소판으로부터 방출되는 serotonin의 측정

혈중 serotonin의 농도를 알기 위한 시험으로 항체가 코팅되어 있는 ELISA kit을 사용하였다. Serotonin ELISA kit(Abnova, Taipei, Taiwan)을 이용하였고 흡광도는 SpectraMax 340PC384 Microplate Reader를 통해 측정하고 그 결과를 그래프로 나타내었다.

Thromboxane B2의 측정

혈장을 이용한 실험으로 ELISA 방식의 kit을 사용해 측정하였다. TXB2 ELISA kit(Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, NY, USA)을 이용하였고 흡광도는 SpectraMax 340PC384 Microplate Reader를 통해 측정하였다.

Protrombin time(PT)와 activated partial thromboplastin time(aPTT) 측정

혈장으로 PT와 aPTT를 측정하였는데, PT 측정에는 HemosIL ReconbiPlasTin 2G(Instrumentation Laboratory, Orangeburg, NY, USA)를 사용하였고, aPTT는 APTT-SP-0020006300(Instrumentation Laboratory) 시약을 사용하였다. 시약과 혈장을 반응시켜 혈액응고 분석기 ACL9000(Instrumentation Laboratory)에 넣고 혈장이 응고되는 시간을 측정하였다.

통계처리

본 실험에서 얻어진 모든 분석 자료는 평균±표준오차(mean±SE)로 나타내었으며, 군 간 유의성 검증은 SPSS (Statistical Package for Social Science, version 20.0. SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 통계프로그램의 Student's t-test 분석법을 실시하여 $P < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

식이효율 및 체중 증가

Table 1의 결과와 같이 식이섭취량은 각 군당 유의적 차이가 나지 않는 반면에 체중 증가와 식이효율(FER)은 일반 식이를 하는 그룹의 음성대조군에 대비하여 고지방식을 하는 그룹의 모든 군에서 유의적인 차이를 보였다. 비슷한 식사량에도 불구하고 사료 자체의 열량이 높아 식이효율이 높아지고 그만큼 체중이 증가한 것으로 사료된다. 흥미롭게

Table 1. Weight gain, food intake and food efficiency rate of mice

Group		Weight gain ¹⁾	Food intake ²⁾	FER ³⁾
Normal chow	NC	16.71±2.28 ^{††}	3.65±1.38	0.15±0.05 ^{††}
	PC	18.46±2.51 ^{††}	3.55±1.56	0.15±0.06 ^{††}
	BSO 2 g	17.04±2.21 ^{††}	3.83±1.48	0.14±0.01 ^{††}
	BSO 4 g	17.92±3.52 ^{††}	3.67±1.50	0.14±0.02 ^{††}
High fat diet	NC	25.83±1.56 ^{**}	3.21±1.32	0.23±0.07 ^{**}
	PC	23.01±3.46 ^{**}	3.46±1.31	0.22±0.07 ^{**}
	BSO 2 g	22.83±1.13 ^{***††}	3.25±0.96	0.18±0.06 ^{***}
	BSO 4 g	22.26±1.77 ^{***††}	3.49±1.40	0.20±0.05 ^{***}

¹⁾Weight gain (g)=final body weight - initial body weight.

²⁾Food intake (g)=food intake (g/d).

³⁾FER=weight gain/ food intake.

Each result represents the mean±SE (n=5/group).

**P<0.01 compared with the normal chow negative control.

†P<0.05 and ††P<0.01 compared with the high fat diet negative control.

도 고지방식을 하는 그룹 내의 군 간에도 체중 증가와 식이효율에서 유의적 차이가 보였다. 고지방식이 음성대조군에 비해서 복분자종자유 급이군의 체중 증가 폭이 유의적으로 낮았으며 식이효율 또한 음성대조군 대비 복분자종자유 급이군 모두에서 낮은 것을 확인할 수 있었다. 본 연구팀에서 진행했던 복분자종자유에 대한 이전의 연구 결과에 따르면 복분자종자유에 항비만 효과가 있는 것으로 알려져 있는 공액리놀레산(CLA)이 1.11 mg/g 포함되어 있고(37) 주요 이성질체인 cis-9-, trans-11-CLA와 trans-10-, cis-12-CLA의 비율은 47.03%를 차지한다. 이 이성질체들이 hormone sensitive lipase와 carnitine palmitoyl transferase의 활성을 증가시켜 체지방을 감소시킨다는 연구 결과(38)와 같이 CLA를 통한 식이효율에 유의적 차이가 있는 것으로 여겨진다. 일반식을 섭취하는 그룹에서도 유의적인 차이는 아니지만 음성대조군에 비해 식이효율이 낮은 것을 볼 수 있었는데, 특히 고지방식을 섭취할 때 BSO를 섭취한 그룹에서 더욱 식이효율 감소를 보이는 것으로 사료된다.

복분자종자유 섭취에 따른 장기 무게

각 군당 장기의 무게를 나타낸 Table 2의 결과를 보면 군당 장기의 무게에 유의적 차이가 나타나지 않았고, 일반식이 그룹과 고지방식이 그룹 사이에 어떤 해부학적인 이상

또한 발견하지 못했다. 본 연구에서 고지혈증을 유도하기 위하여 45% fat을 포함하는 고지방식을 섭취하도록 하였는데, 혈중 중성지방이나 콜레스테롤 수치가 유의적으로 증가한 결과로 고지혈증이 발생했다는 것을 확인하였다. 반면에 각 장기의 색깔이나 모양 등이 일반식이 그룹의 음성대조군과 차이가 없다는 결과를 통해 고지혈증 외에 다른 질환의 유도는 되지 않은 것을 알 수 있었다.

혈중 중성지방과 콜레스테롤 변화

Fig. 1의 A는 실험동물의 혈중 중성지방 수치를 나타낸 그래프이다. 일반식을 제공하는 그룹 내에서 각 군은 음성대조군이 86.6±5.46 mg/dL, 양성대조군이 83.81±2.68 mg/dL, BSO 2 g 급이군이 83.14±4.13 mg/dL, BSO 4 g 급이군이 84.69±2.15 mg/dL로 수치에 유의적 변화가 없는 것에 반해, 고지방식을 제공하는 그룹 내에서는 음성대조군의 중성지방 수치가 125.92±4.91 mg/dL로 유의적으로 증가한다. 오메가-3 지방산이 중성지방 강하 효과가 있다는 연구 결과(39,40)와 마찬가지로 양성대조군의 중성지방은 84.55±6.33 mg/dL, BSO 2 g 급이군은 84.71±5.67 mg/dL, BSO 4 g 급이군은 88.09±3.78 mg/dL로, 일반식을 제공하는 그룹의 중성지방 수치만큼 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

Fig. 1의 B, C, D는 실험동물의 콜레스테롤 수치를 나타낸 그래프로 B는 총콜레스테롤, C는 HDL-콜레스테롤, D는 LDL/VLDL-콜레스테롤 수치를 나타낸 것이다. 일반식을 섭취한 실험동물의 HDL-콜레스테롤과 LDL/VLDL-콜레스테롤은 각각 평균값이 102.66±5.08 mg/dL와 20.86±2.47 mg/dL로 군 간 유의적 차이가 없었으나, 고지방식을 섭취한 음성대조군은 HDL-콜레스테롤 수치가 146.18±5.69 mg/dL, LDL/VLDL-콜레스테롤의 수치가 36.47±2.56 mg/dL로 유의적으로 높아졌다. 반면 양성대조군과 BSO 급이군은 HDL-콜레스테롤이 각각 106.07±1.38 mg/dL, 105.29±1.43 mg/dL, 103.78±0.17 mg/dL, LDL/VLDL-콜레스테롤이 각각 22.18±1.28 mg/dL, 21.75±3.31 mg/dL, 21.97±1.51 mg/dL로 감소하는 결과를 통해 양성대조군과 BSO 급이군 모두 콜레스테롤 감소에 유의적 영향을 미치는 것을 알 수 있었다. 일반식을 섭취하는 그룹에서도 양성대조군과 BSO를 급이하였을 때 음성대조군에 대비하여 유의적 차이가 나는 결과는 아니었으나 약간씩 콜레스테롤 수치가 감소하는 결과를 얻었다. 이는 오메가-3 지방산이 중성

Table 2. Average organ weight of each experiment group

	Normal chow				High fat diet			
	NC	PC	BSO 2 g	BSO 4 g	NC	PC	BSO 2 g	BSO 4 g
Heart	0.22±0.03	0.19±0.03	0.20±0.04	0.18±0.02	0.20±0.01	0.20±0.01	0.21±0.02	0.21±0.02
Liver	1.65±0.12	1.87±0.06	1.85±0.13	1.93±0.19	1.65±0.19	1.74±0.29	1.74±0.08	1.79±0.15
Kidney	0.64±0.04	0.63±0.04	0.66±0.09	0.61±0.08	0.65±0.04	0.63±0.07	0.64±0.04	0.65±0.04
Spleen	0.11±0.01	0.12±0.01	0.11±0.01	0.11±0.02	0.12±0.02	0.12±0.01	0.12±0.01	0.13±0.03

Each result represents the mean±SE (n=5/group).

지방을 감소시키고 LDL 콜레스테롤과 apoB48을 감소시키는 효과가 있다는 선행 연구 결과(41)와 연관이 있다고 여겨지며, 동맥경화질환과 혈행 개선에 도움을 주는 효과를 줄

수 있다고 사료된다.

ALT와 AST 활성 측정

Aminotransferase는 간세포 괴사의 정도를 가장 민감하게 나타내주는 검사로 간세포의 손상 정도를 평가하기 위해 가장 흔히 사용되는 검사로 알려져 있으며 ALT는 간 특이성을 가지고 있고 AST는 간과 다른 장기 손상 시에 그 수치가 증가한다(42). 급성 간세포 손상에 의해 AST와 ALT 수치가 상승하게 되는데 이러한 급성 간세포 손상을 일으키는 경우에는 바이러스 감염(43), 독성 손상(44,45), 저산소증이나 저관류(46,47) 등이 있다.

Fig. 2의 A는 실험동물 간 조직을 이용한 ALT 활성을 나타낸 그래프이고 B는 AST 활성을 나타낸 그래프이다. ALT는 일반식이를 제공하는 그룹에서 평균 23.31±1.74 mU/mL, 고지방식이를 제공하는 그룹에서 평균 23.47±2.41 mU/mL로 유의적인 차이를 보이지 않았고 AST 또한 일반식이를 제공하는 그룹에서 평균 4.35±0.43 mU/mL, 고지방식이를 제공하는 그룹에서 평균 4.27±0.46 mU/mL로 유의적 차이를 보이지 않았다. 따라서 Fig. 2의 결과를 바탕으로 동물에게 복분자종자유를 실험기간 동안 투여한 결과 독성이 없는 것으로 확인되었으며, 이러한 결과를 바탕으로 사람이 복분자종자유를 복용하였을 때 독성을 나타내지 않을 것이라 여겨진다.

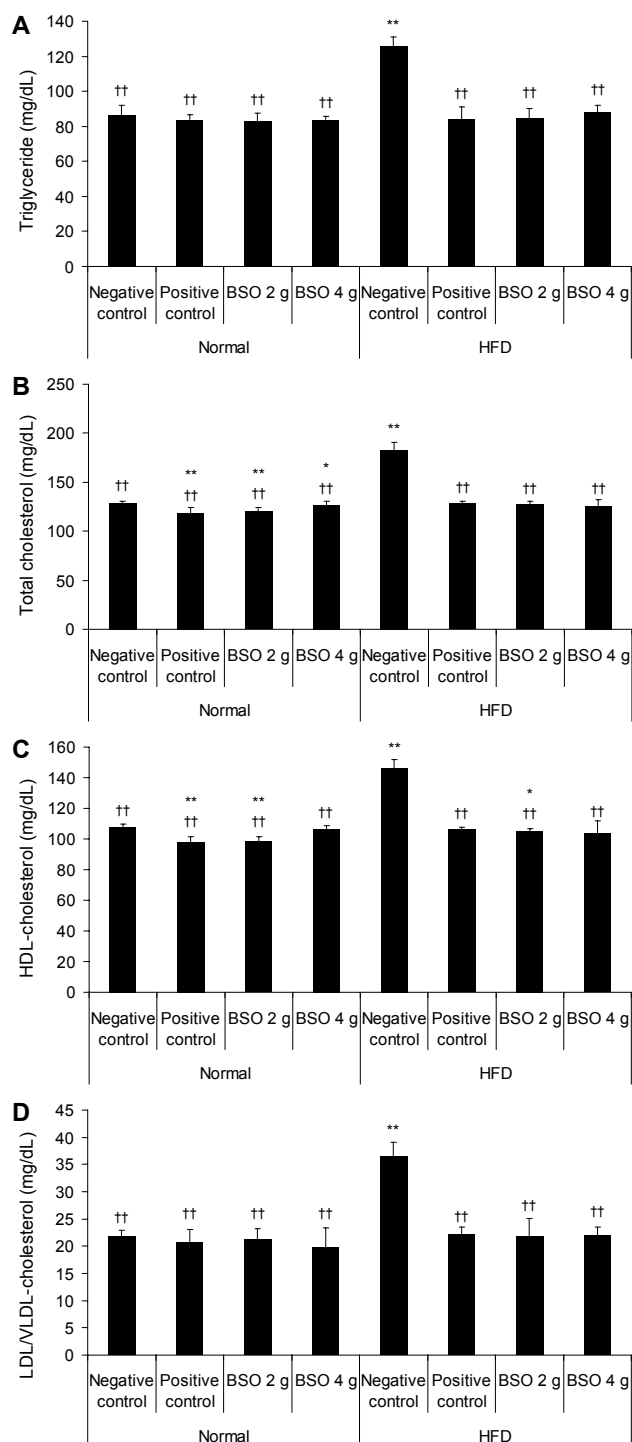


Fig. 1. Effects of Bokbunja seed oil (BSO) in mice fed normal chow or high fat diet on the plasma triglyceride and cholesterol. A, triglyceride; B, total cholesterol; C, HDL-cholesterol; D, LDL/VLDL-cholesterol. Each bar represents the mean±SE of 5 mice. **P*<0.05 and ***P*<0.01 compared with the normal chow negative control. ††*P*<0.01 compared with the high fat diet negative control.

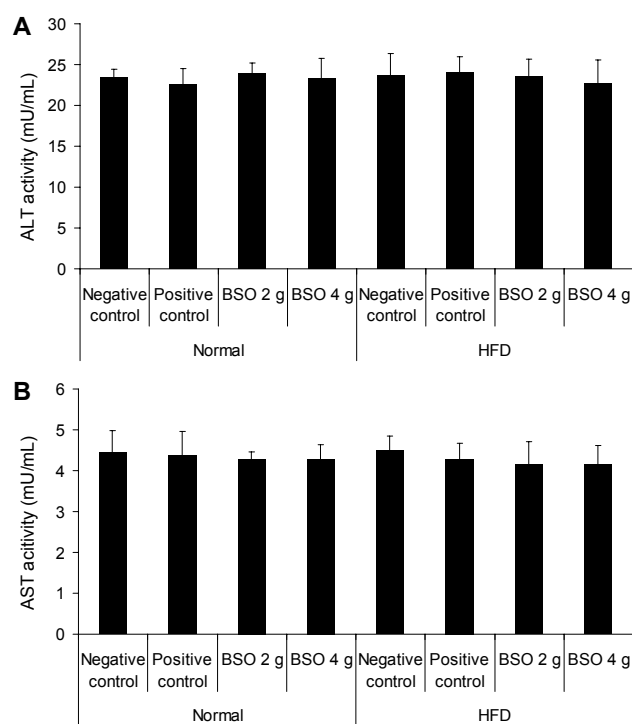


Fig. 2. Effects of Bokbunja seed oil (BSO) in mice fed normal chow or high fat diet on the liver tissue alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities. A, alanine aminotransferase (ALT); B, aspartate aminotransferase (AST). Each bar represents the mean±SE of 5 mice.

혈장의 coagulation factor VII와 XII 측정

혈액응고는 혈액응고인자 활성화에 따라 섬유소 형성이 결정되며 내인성 경로와 외인성 경로가 존재한다. 내인성 경로는 접촉인자에 의해 12인자의 활성화가 이루어져 순차적으로 thrombin을 형성하게 된다. 반면 외인성 경로는 혈관 내 피하 세포막 단백질인 tissue factor와 7인자가 결합하여 9, 10 인자를 활성화하게 되는데 이러한 경로들을 통해 혈액응고가 일어난다(48). 진단검사에서 혈액응고와 관련되어 기본적으로 시행하고 있는 aPTT 검사는 내인성 경로의 이상 유무를 알아보는 검사이고, PT는 외인성 경로의 이상 유무를 알아보는 실험이다(49). 각 경로의 응고인자 활성을 알아보기 위한 실험을 진행하였는데, 결과는 다음 Fig. 3의 그래프와 같으며 A는 응고인자 7의 수치를 나타낸 그래프고 B는 응고인자 12의 수치를 나타낸 그래프다. 이 결과에 따르면 일반식이를 제공하는 그룹에서 평균 38.14 ± 1.22 ng/dL였던 반면에, 고지방식이를 제공하는 그룹의 음성대조군에서 47.17 ± 1.58 ng/dL로 수치가 유의적으로 증가하였고 양성대조군과 BSO 급이군에서는 각각 38.04 ± 1.49 ng/dL, 38.17 ± 1.46 ng/dL, 39.24 ± 1.66 ng/dL로 일반식이를 제공하는 그룹과 비슷한 수준으로 감소하는 것을 확인하였다. 또한 응고인자 12에서도 7과 비슷하게 일반식이를 제공하는 그룹에서 평균 23.36 ± 0.98 ng/dL였는데 반해 고지방식이 음성대조군에서는 31.68 ± 0.92 ng/dL로 수

치가 유의적으로 증가하고 양성대조군과 BSO 급이군에서는 각각 23.57 ± 0.67 ng/dL, 24.56 ± 1.33 ng/dL, 25.54 ± 0.73 ng/dL로 음성대조군 대비 유의적으로 감소하지만 일반식이를 제공하는 그룹의 수치만큼 감소하지는 않는 결과를 얻었다. 따라서 복분자종자유는 혈액응고 기전에 영향을 주며 고지방식이를 섭취하는 사람의 혈행 개선에 도움을 줄 것이라 사료되었다.

혈소판으로부터 방출되는 serotonin과 thromboxane B2의 측정

혈소판 응집에 의한 혈관 수축을 매개하는 혈관 조절물질로는 serotonin과 thromboxane A2(TXA2)가 가장 대표적인 물질로 알려져 있다. Serotonin은 혈액 중에서 대부분 혈소판에 의해 uptake 되어 저장되었다가 혈소판이 활성화되면 유리되어 혈소판의 5-HT 수용체에 작용해 응집을 촉진시키기 때문에 혈소판 활성화의 바이오마커로 사용되기도 한다(50,51). 한편 TXA2 반감기가 약 37초 정도로 짧기 때문에 그보다 안정적인 형태인 thromboxane B2(TXB2)를 주로 측정하며 혈중 TXB2의 분비량이 증가할수록 혈액의 응고는 강해지게 되는데, 이러한 이유로 아스피린의 약리학적 효과를 측정하는 데 가장 유용한 지표로 쓰인다(52). Fig. 4의 A는 serotonin을 측정한 결과로, 일반식이를 제공하는 그룹에서 serotonin의 평균 분비량은 14.64 ± 1.99 ng/

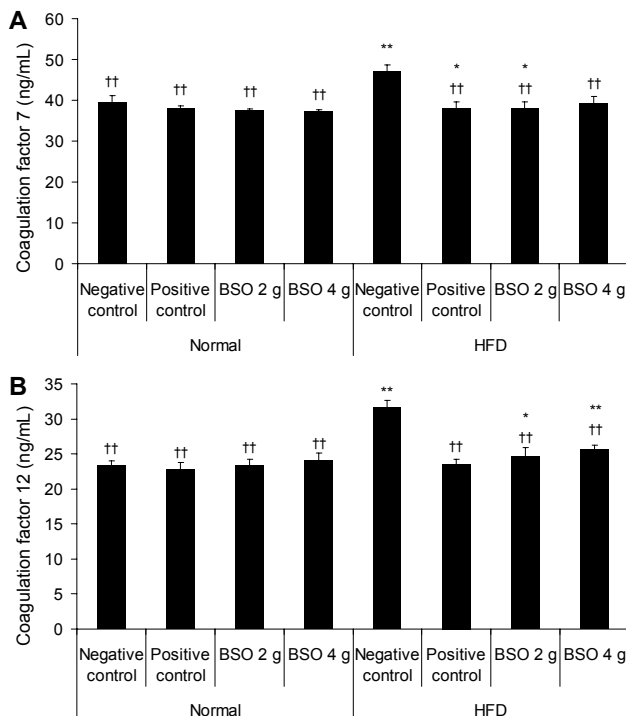


Fig. 3. Effects of Bokbunja seed oil (BSO) in mice fed normal chow or high fat diet on the plasma coagulation factor VII and XII. A, coagulation factor VII; B, coagulation factor XII. Each bar represents the mean±SE of 5 mice. * $P<0.05$ and ** $P<0.01$ compared with the normal chow negative control. †† $P<0.01$ compared with the high fat diet negative control.

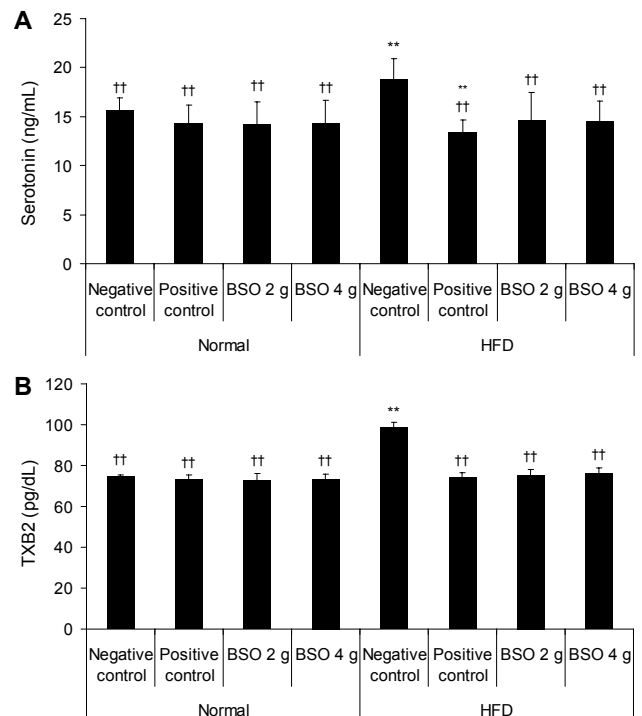


Fig. 4. Effects of Bokbunja seed oil (BSO) in mice fed normal chow or high fat diet on the plasma release of serotonin and thromboxane B2. A, serotonin; B, thromboxane B2. Each bar represents the mean±SE of 5 mice. ** $P<0.01$ compared with the normal chow negative control. †† $P<0.01$ compared with the high fat diet negative control.

mL인데 반해 고지방식이를 제공하는 그룹의 음성대조군에서 serotonin의 분비량이 18.81±2.10 ng/mL로 유의적으로 증가하고 양성대조군과 BSO를 제공할 때 각각 13.36±1.27 ng/mL, 14.65±2.79 ng/mL, 14.51±2.05 ng/mL로 유의적으로 감소하는 사실을 알게 되었다. Fig. 4의 B는 TXB2를 측정된 결과로 serotonin과 마찬가지로 일반식이를 제공하는 경우 평균 TXB2 분비량은 73.37±2.52 pg/dL였고 고지방식이를 제공하는 그룹의 음성대조군에서는 98.87±2.23 pg/dL로 유의적으로 증가하며 양성대조군과 BSO를 제공할 때 각각 74.17±2.23 pg/dL, 75.46±2.52 pg/dL, 76.15±2.66 pg/dL로 유의적으로 감소하는 결과를 얻었다. 따라서 복분자종자유는 혈소판으로부터의 serotonin 분비와 TXB2의 분비를 저해함으로써 혈소판 응집 억제를 통한 혈행 개선에 도움을 줄 수 있다고 사료된다.

PT와 aPTT 측정

Fig. 5의 결과와 같이 일반식이를 제공한 그룹의 평균 PT는 23.63±0.66초, aPTT는 32.21±0.95초였고 고지방식이를 제공하는 그룹의 음성대조군은 PT와 aPTT 각각 21.66±0.84초, 30.19±0.65초로 일반식이를 제공한 그룹의 PT와 aPTT 시간보다 유의적으로 감소함을 보였다. 반면에 양성대조군과 복분자종자유를 섭취한 마우스의 PT는 24.68±0.44초, 24.90±0.56초, 24.89±0.41초로, aPTT는 32.64

±0.83초, 32.93±0.98초, 32.90±1.12초로 유의적으로 증가하는 결과를 확인하게 되었는데, 이는 Fig. 3의 coagulation factor 측정과 Fig. 4의 serotonin, TXB2 분비 측정에서 보인 것처럼 혈액응고인자의 수치 감소와 혈소판이 분비해내는 serotonin, TXB2 감소의 영향인 것으로 보인다. 따라서 복분자종자유는 혈행 개선의 바이오마커를 효과적으로 조절함으로써 혈관계질환 환자들의 혈행 개선을 위한 건강기능식품으로서 기능을 할 수 있을 것으로 판단된다.

요 약

복분자종자유는 혈행 개선 기능성을 평가하기 위하여 8주 동안 일반식이와 고지방식이를 제공하는 그룹에 오메가-3 지방산과 복분자종자유를 일정량 제공하는 실험을 실시하였다. 실험군은 일반식이 그룹과 고지방식이 그룹으로 나누어 각 그룹 내에 음성대조군, 양성대조군(오메가-3 지방산), 복분자종자유(2 g, 4 g/2,000 kcal) 급이군으로 구성하였다. 양성대조군과 복분자종자유는 매일 경구 투여되었고 실험기간 종료 후 동물을 희생시켜 혈액과 장기를 얻어 혈중중성지방 및 콜레스테롤, 혈행 개선에 관련된 바이오마커(coagulation factor7, 12, serotonin과 TXB2)를 측정하였는데, 그 결과 복분자종자유는 혈중지질의 농도 개선을 통해 혈액의 점도를 감소시키고 혈액의 응고를 억제하여 혈행을 개선하는 기능이 있는 것을 확인하게 되었다. 따라서 복분자종자유를 이용한 건강기능식품 개발은 혈관계질환 환자에게 혈행 개선을 통한 건강증진 효과를 보여줄 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 (재)호남광역경제권 선도산업육성사업 라이프케어사업(과제번호: R0002192, 최경철)의 일환으로 수행된 결과로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Statistics Korea. 2014. *Official cause of death statistics*. Statistics Korea, Daejeon, Korea. p 4-43.
2. Lee SJ, Ha WH, Choi HJ, Cho SY, Choi JW. 2010. Antiobesity and antihyperlipidemia of red crab shells in Sprague Dawley rat. *J Chitin Chitosan* 15: 156-163.
3. Lee KH, Kim Y, Park E, Cho S. 2008. Study on dietary habit and effect of onion powder supplementation on serum lipid levels in early diagnosed hyperlipidemic patients. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 561-570.
4. Shin HH. 2002. Korean guidelines of hyperlipidemia treatment for prevention of atherosclerosis. *Korean J Lipidol* 12: 226-228.
5. Lim HJ, Cho KH, Choue R. 2005. The effects of functional tea (*Mori Folium, Lycii Fructus, Chrysanthemi Flos, Zizyphi Fructus, Sesamum Semen, Raphani Semen*) supplement with medical nutrition therapy on the blood lipid levels and antioxidant status in subjects with hyperlipidemia. *J Korean*

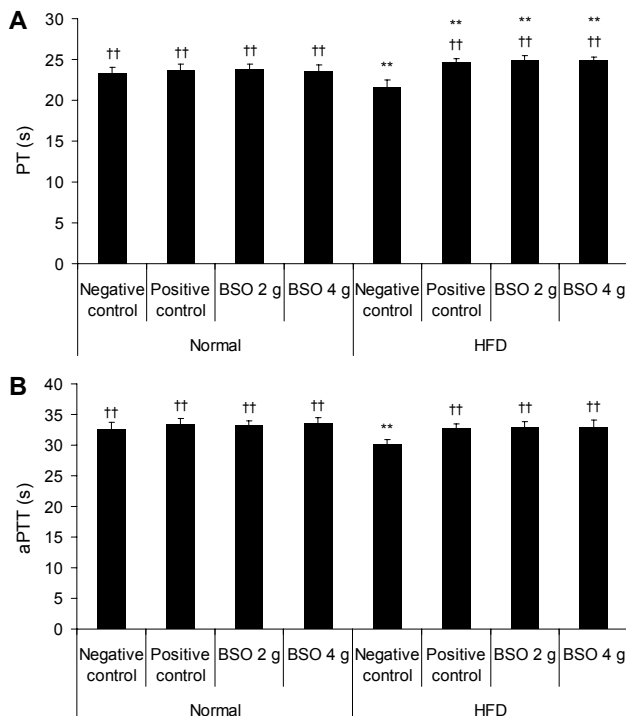


Fig. 5. Effects of Bokbunja seed oil (BSO) in mice fed normal chow or high fat diet on the prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT). A, PT; B, aPTT. Each bar represents the mean±SE of 5 mice. **P<0.01 compared with the normal chow negative control. ††P<0.01 compared with the high fat diet negative control.

- Soc Food Sci Nutr* 34: 42-56.
6. Ryu KH, Han HY, Lee SY, Jeon SD, Im GJ, Lee BY, Kim K, Lim KM, Chung JH. 2009. *Ginkgo biloba* extract enhances antiplatelet and antithrombotic effects of cilostazol without prolongation of bleeding time. *Thromb Res* 124: 328-334.
 7. Cho HJ, Nam KS. 2007. Inhibitory effect of ginkgolide B on platelet aggregation in a cAMP- and cGMP-dependent manner by activated MMP-9. *J Biochem Mol Biol* 40: 678-683.
 8. Nam SM, Ha EH, Suh YJ, Park H, Chang MH, Seo JH, Kim BM. 2008. Effect of obesity and blood lipid profiles on hyperlipidemia in adults aged over 40 years. *Korean J Obes* 17: 20-28.
 9. Moon JH. 2006. Effect of aerobic and resistance exercise to hyperlipidemia. *Health & Medicine* 8: 137-143.
 10. Hwang GH, Huh YR. 1999. A study of hyperlipidemia in Koreans - II. Specially related to drinking, smoking, exercise and environmental characteristics and it's risk factor for hyperlipidemia -. *Korean J Food & Nutr* 12: 290-299.
 11. Klafke JZ, Arnoldi da Silva M, Fortes Rossato M, Trevisan G, Banderó Walker CI, Martins Leal CA, Olschowsky Borges D, Chitolina Schetinger MR, Noal Moresco R, Medeiros Frescura Duarte MM, Soares Dos Santos AR, Nazário Viecili PR, Ferreira J. 2012. Antiplatelet, antithrombotic, and fibrinolytic activities of *Campomanesia xanthocarpa*. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012: 954748.
 12. Davies MJ, Thomas AC. 1985. Plaque fissuring—the cause of acute myocardial infarction, sudden ischaemic death, and crescendo angina. *Br Heart J* 53: 363-373.
 13. Lau AJ, Toh DF, Chua TK, Pang YK, Woo SO, Koh HL. 2009. Antiplatelet and anticoagulant effects of *Panax notoginseng*: Comparison of raw and steamed *Panax notoginseng* with *Panax ginseng* and *Panax quinquefolium*. *J Ethnopharmacol* 125: 380-386.
 14. May AE, Seizer P, Gawaz M. 2008. Platelets: inflammatory firebugs of vascular walls. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 28: 5-10.
 15. Ahn SH, Choo IS, Kim DM, Lim GH, Kim JH, Kim HW. 2008. Warfarin induced skin necrosis. *J Korean Neurol Assoc* 26: 142-145.
 16. Bircher AJ, Harr T, Hohenstein L, Tsakiris DA. 2006. Hypersensitivity reactions to anticoagulant drugs: diagnosis and management options. *Allergy* 61: 1432-1440.
 17. Wong KS, Mok V, Lam WW, Kay R, Tang A, Chan YL, Woo J. 2000. Aspirin associated intracerebral hemorrhage: Clinical and radiologic features. *Neurology* 54: 2298-2301.
 18. Kim YH, Kim KW, Ahn SH, Oh MS, Ma HI, Kim YJ, Lee BC. 2014. Myotonic potentials in the myopathy induced by HMG-CoA reductase inhibitor. *J Korean Neurol Assoc* 32: 186-189.
 19. Kim JM, Shin M. 2011. Characteristic of *Rubus coreanus* Miquel fruits at different ripening stages. *Korean J Food Sci Technol* 43: 341-347.
 20. Park PJ, Lo SC, Han SS. 2004. Control of disease, insect pest and weed cultivation area of *Rubus coreanus* Miquel. *J Life Sic Nat Res* 26: 56-67.
 21. Kim SJ, Kim JY, Baek SH. 2011. Effect of composts fermented with Korean medicinal herb wastes on physiological activity of *Rubus coreanus* Miquel (*Bokbunja*). *Korean J Plant Res* 24: 243-252.
 22. Cha HS, Youn AR, Park PJ, Choi HR, Kim BS. 2007. Comparison of physiological activities of *Rubus coreanus* Miquel during maturation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 683-688.
 23. Cho YJ, Chun SS, Kwon HJ, Kim JH, Yoon SJ, Lee KH. 2005. Comparison of physiological activities between hot-water and ethanol extracts of Bokbunja (*Rubus coreanus* F.). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 790-796.
 24. Kim ID, Kwon RH, Heo YY, Jung HJ, Kang HY, Ha BJ. 2008. Supercritical extraction of Oriental herb: Anti-aging and anti-wrinkle effects. *Korean J Biotechnol Bioeng* 23: 529-534.
 25. Kim DH, Park JH, Kim JH, Kim CH, You JH, Kwon MC, Lee HY. 2005. Enhancement of immune activities of *Ephedrae* Herba and *Rubi* Fructus at low temperature extraction. *Korean J Medicinal Crop Sci* 13: 81-86.
 26. Lee JW, Do JH. 2000. Determination of total phenolic compounds from the fruit of *Rubus coreanus* and antioxidative activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 943-947.
 27. Yoon I, Wee JH, Moon JH, Ahn TH, Park KH. 2003. Isolation and identification of quercetin with antioxidative activity from the fruits of *Rubus coreanus* Miquel. *Korean J Food Sci Technol* 35: 499-502.
 28. Kim JH, Kim CH, Kim HS, Kwon MC, Song YK, Seong NS, Lee SE, Yi JS, Kwon OW, Lee HY. 2006. Effect of aqueous extracts from *Rubus coreanus* Miquel and *Angelica gigas* Kakai on anti-tumor and anti-stress activities in mice. *Korean J Medicinal Crop Sci* 14: 206-211.
 29. Lee SJ, Lee MJ, Ko YJ, Choi HR, Jeong JT, Choi KM, Cha JD, Hwang SM, Jung HK, Park JH, Lee TB. 2013. Effect of extracts of unripe black raspberry and red ginseng on cholesterol synthesis. *Korean J Food Sci Technol* 45: 628-635.
 30. Lee MJ, Lee SJ, Choi HR, Lee JH, Jeong JT, Choi KM, Cha JD, Hwang SM, Park JH, Lee JH, Lee TB. 2014. Cholesterol improvement effects of co-treatment with black raspberry and red ginseng extracts in mice fed a high cholesterol diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 1491-1499.
 31. Choi Y, Lee YJ, Lee S, Chae C, Park S, Kim SS, An H, King D, Han C, Hong H. 2012. Effect of concentrated danggyooja-derived flavonoids extract added to citrus beverage on obesity and blood lipids in rats. *Kor J Hort Sci Technol* 30: 214-219.
 32. Lee SJ, Park HJ, Song Y, Jang SH, Goo AJ, Ko YG, Cho JH. 2014. Antioxidant activity and anti-obesity effect of *Coprinus comatus* in Zucker rat (*fa/fa*). *Korean J Ver Serv* 37: 51-58.
 33. Lee CM. 2000. The effect of the administration of red ginseng and vitamin E on the activation of antioxidizing enzyme and the formation of lipid peroxidation in blood. *The Korean Journal of Physical Education* 39: 476-488.
 34. Lee JW, Do JH. 2000. Determination of total phenolic compounds from the fruit of *Rubus coreanus* and antioxidative activity. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 943-947.
 35. Chung SH, Moon YJ, Kim SG, Kim KY, Lee KT, Kim HK, Whang WK. 2008. Isolation of flavonoids from *Carthami* flos and their antioxidative activity. *Yakhak Hoeji* 52: 241-251.
 36. Nam HS. 2012. *Rubus coreanus* Miquel oil composition, use and preparation method thereof. *Korean Patent* 10-1168169-0000.
 37. Hong SG, Park CK, Lee MJ, Chung SG, Lee YH, Hyun SH. 2009. Acute oral toxicity and anti-obesity effect of diglyceride preparation containing conjugated linoleic acid in rat. *Korean J Food Sci Technol* 41: 320-325.
 38. Moon HS, Lee HG, Seo JH, Chung CS, Kim TG, Kim IY, Lim KW, Seo SJ, Choi YJ, Cho CS. 2006. Down-regulation

- of PPAR γ 2-induced adipogenesis by PEGylated conjugated linoleic acid as the pro-drug: Attenuation of lipid accumulation and reduction of apoptosis. *Arch Biochem Biophys* 456: 19-29.
39. Davidson MH. 2006. Mechanisms for the hypotriglyceridemic effect of marine omega-3 fatty acids. *Am J Cardiol* 98: 27-33.
 40. Han KH. 2012. Omega-3-fatty acid and triglyceride. *Korean J Med* 83: 724-727.
 41. Jun HJ, Ko JH, Jung HS, Yoon CS, Kim TK, Kwon MJ, Lee SH, Suk JH, Kim MK, Kim DK, Park JH. 2011. Effect of omega-3 fatty acids on low density lipoprotein subfraction, adiponectin and apolipoprotein B in type 2 diabetic patients. *Endocrinol Metab* 26: 218-224.
 42. Suriawinata AA, Thung SN. 2006. Acute and chronic hepatitis. *Semin Diagn Pathol* 23: 132-148.
 43. Whitworth JR, Mack CL, O'Connor JA, Narkewicz MR, Mengshol S, Sokol RJ. 2006. Acute hepatitis and liver failure associated with influenza A infection in children. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 43: 536-538.
 44. Ebert EC. 2006. Hypoxic liver injury. *Mayo Clin Proc* 81: 1232-1236.
 45. Tang W. 2007. Drug metabolite profiling and elucidation of drug-induced hepatotoxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 3: 407-420.
 46. Jeon NL, Kim BS, Kim YK, Hong SJ. 2000. Etiology and clinical features of severe acute viral lower respiratory tract infections in children. *Korean J Pediatr* 43: 1558-1568.
 47. Wang J, Atchison RW, Walpusk J, Jaffe R. 2001. Echovirus hepatic failure in infancy: Report of four cases with speculation on the pathogenesis. *Pediatr Dev Pathol* 4: 454-460.
 48. Lyu CJ. 2011. Introduction to coagulation system. *J Korean Soc Neonatol* 18: 1-5.
 49. Vine AK. 2009. Recent advances in haemostasis and thrombosis. *Retina* 29: 1-7.
 50. Duerschmied D, Suidan GL, Demers M, Herr N, Carbo C, Brill A, Cifuni SM, Mauler M, Cicko S, Bader M, Idzko M, Bode C, Wagner DD. 2013. Platelet serotonin promotes the recruitment of neutrophils to sites of acute inflammation in mice. *Blood* 121: 1008-1015.
 51. Hallbäck I, Hägg S, Eriksson AC, Whiss PA. 2012. *In vitro* effects of serotonin and noradrenaline reuptake inhibitors on human platelet adhesion and coagulation. *Pharmacol Rep* 64: 979-983.
 52. Kidson-Gerber G, Weaver J, Gemmell R, Prasan AM, Chong BH. 2010. Serum thromboxane B2 compared to five other platelet function tests for the evaluation of aspirin effect in stable cardiovascular disease. *Heart Lung Circ* 19: 234-242.