

LDL Receptor Knockout Mouse에서 영지추출물의 죽상경화증 개선 효과

권오준^{1#} 김민영², 노성수^{2*}

1 : 대경지역사업평가원 경북지역산업평가단, 2 : 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실

Improving Effect of Extract of *Ganoderma lucidum* in Atherosclerosis from LDL Receptor Knockout Mouse

O Jun Kwon^{1#}, MinYeong Kim², Seong-Soo Roh^{2*}

1 : Gyeongbuk Regional industry Evaluation, Daegyeong Institute for Regional Program Evaluation, Republic of Korea

2 : College of Korean Medicine, Daegu Hanny university, Republic of Korea

ABSTRACT

Objectives : This study was designed to protect effect on atherosclerosis through regulation of low density lipoprotein(LDL) by 70 % ethanol extract *Ganoderma lucidum* (GL) in LDL receptor knockout mouse (LDLr ko mice) fed Western diet.

Methods : The LDLr ko mice were divided into 3 groups ; Control, GL100, and GL300. After grouping, LDLr ko mice were fed Western diet. The GL (100 or 300 mg/kg body weight/day, p.o.) was administered every day for 8 weeks. The body weight and food intake were measured every day. The changes in the levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), creatinine, triglyceride (TG), total cholesterol (TC), and high-density lipoprotein (HDL) in serum were analyzed after experiment.

Results : The LDLr ko mice fed Western diet were increased body weight gain and blood biochemistry parameters such as ALT, AST, TG, TC, and LDL. However GL300 group significantly reduced the body weight. Also TG, TC, and LDL level did not increase. The levels of ALT, AST, HDL were not changed. Also, LDLr ko mice model liver were observed lipid drop, but GL groups did not appear. Futhermore, histological analysis of GL groups aorta tissue were similar to NOR groups.

Conclusions : We confirmed that whether GL administration is protect atherosclerosis or not. As the results, blood biochemistry and histological analysis did not changed much in GL administration groups. This study provides scientific evidence that GL protect the atherosclerosis through the reduction of LDL cholesterol. Therefore GL has potential medicine inhibition of atherosclerosis.

Key words : *Ganoderma lucidum*, LDL receptor knockout mouse, atherosclerosis, LDL cholesterol

서론

생활수준이 증가함에 따라 서구화된 식습관, 운동부족 등의 요인으로 비만이 일반화되어 동맥경화증, 심장병 등 각종 혈관 질환의 발병율이 높아지고 있다¹⁾. 죽상경화증 (Atherosclerosis) 은 지질과 섬유성 조직으로 형성된 죽상판 혹은 죽상 경화성 판이 형성되어 혈관내막이 탄력을 잃어 단단해지는 질병으로,

발병은 연령, 성별, 당뇨, 고혈압, 흡연, 스트레스 등에 다양한 원인에 의해 발생되지만 특히 고지혈증이 관상동맥질환 발생을 증가시키는 것으로 보고되어 있다^{2,3)}. 이러한 원인을 통해 혈관내피의 손상과 동맥벽의 이상기능을 초래해 혈소판의 접착 및 분비반응을 유도하여 혈소판 응집반응과 혈액 응고반응에 의한 혈전 형성이 수반되고, 지속적인 혈전생성에 의해 합병증을 유발할 수 있다^{4,5)}.

*Corresponding author : Seong-Soo Roh, College of Korean Medicine, Daegu Hanny university, Republic of Korea
· Tel : +82-53-770-2351 · Fax : +82-53-819-1752 · E-mail : ddede@dhu.ac.kr

#First author : O Jun Kwon, Gyeongbuk Regional industry Evaluation, Daegyeong Institute for Gegendal Program Evaluation, 27, Sampung-ro, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, 38542, Korea

· Tel : +82-53-818-9504 · Fax : +82-53-818-9520 · E-mail : gbria@hanmail.net

· Received : 18 December 2015 · Revised : 22 January 2016 · Accepted : 22 January 2016

저밀도 지질단백질 (low density lipoprotein : LDL) 은 간이나 장의 콜레스테롤을 말초조직으로 수송하는 지단백으로, 세포막의 수용체와 결합을 통해 세포내로 운반되어 가수분해 되는데 수용체에 이상이 생기면 고지혈증이 유발된다⁶⁾. 고지혈 증에 의해 LDL의 축적이 증가하면 대식세포와 혈관내피세포에 의해 산화되어 oxLDL로 바뀌고, 산화된 LDL은 탐식작용을 통해 거품세포 (foam cell)가 되어 혈관내벽에 축적이 일어난다. 이처럼 죽상경화증의 완화를 위해서 LDL의 축적을 막아 주거나 oxLDL의 생성을 억제하는 것이 매우 중요하다⁷⁾. 선행 연구에 의하면 혈중 지질의 농도 및 LDL의 감소를 통해 low density lipoprotein receptor knockout (LDLr ko) 마우스에서 동맥 내의 지질 함량의 감소가 보고되어 있다⁸⁾.

영지버섯(*Ganoderma lucidum*(GL))은 구멍버섯과에 속하는 진균인 영지 *Ganoderma lucidum* Karst 및 근연종의 자실체를 건조한 것으로, 性味는 平하고 甘微苦하여 心·脾·肺經에 歸經하여 養心安神, 補氣益血, 止咳平喘의 效能으로 失眠多夢, 心悸怔忡, 健忘, 肺虛久咳, 喘咳 등을 主治한다. 한국, 중국, 일본 등에서 한약재로서 사용되어 왔고 맛은 달고 성질은 평하다. 심경, 비경, 폐경에 작용해 오장의 기를 보하고 정혈을 보충 한다⁹⁾. 영지는 진정, 진통, 강심, 강압, 항종양과 항산화작용 등이 보고되어 있다¹⁰⁻¹²⁾. 특히 선행연구에 의해 영지의 콜레스테롤 농도의 감소효과가 보고되어져 있는데, Berger 등의 연구에 의하면 햄스터와 미니돼지에서 영지 추출물의 투여가 혈중 콜레스테롤의 수치를 유의적으로 감소하는 것을 확인하였고, Kabir의 연구에서 고혈압 쥐에 영지 추출물을 투여한 결과 콜레스테롤의 수치를 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다^{13,14)}.

이처럼 영지버섯은 콜레스테롤의 수치를 감소하는 효능을 가졌음에도 불구하고 LDLr ko 마우스에서 죽상경화증 예방효과를 확인하는 연구는 진행되지 않았다. 따라서 본 실험에서는 LDLr ko 마우스에 영지추출물의 투여로 혈중 지질농도 및 콜레스테롤 감소를 통한 죽상경화증 예방효과를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 동물

모든 실험은 대전대학교 동물실험 윤리위원회의 승인 (DJUAR2015-045)을 얻어 시행하였으며 동물관리 규정을 준수하였다. 본 실험을 위하여 LDLr ko 마우스 6주령 수컷을 Jackson Lab. ((주)중앙실험동물, 경기도)에서 분양받아 1주일 동안 실험실 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 온도 22 ± 2 °C, 습도 50 ± 5 %, 명암주기 (light : dark cycle)는 12 시간 주기로 조절하였다. 사료는 고형사료 (조단백질 22.1 % 이상, 조지방 8.0 % 이하, 조섬유 5.0 % 이하, 조회분 8.0 % 이하, 칼슘 0.6 % 이상, 인 0.4 % 이상, 삼양사 Co. Korea, 항생제 무첨가)와 물을 충분히 공급하였다.

2) 시료

본 실험에 사용한 영지 *Ganoderma lucidum*(GL)는 옴니 허브 (대구, 한국)에서 구입한 것을 생약규격집에 맞추어 관능검사하여 규격에 합격한 것만을 정선하여 사용하였다.

2. 방법

1) 시료 추출

영지추출물에는 당 성분이 많아 에탄올을 이용하여 추출하였을 때 물 추출물과 비교하여 유효 성분이 다량 추출되기 때문에 영지 500 g을 한일본쇄기 (FM-700SS, 한국)로 분쇄하여 환류추출기 (heating Mantle, MS-DM609/20L)에 넣고 45 °C에서 70 % 에탄올을 2 L 가하여 60분 추출한 후 다시 70 % 에탄올 2 L를 가하여 같은 조건으로 60분 동안 재탕하였다. 그 후 감압증류기 (N-1200A, EYELA, CO. LTD, Japan)를 이용하여 유기용매를 제거하는 농축과정을 거치고, 동결건조기 (PF-10/ALPHA 1-2LD, Germany)를 통하여 건조된 영지 70 % 에탄올 추출물 (7.86 g)을 얻었다.

2) 죽상경화증 동물모델

1주간 적응기간을 거친 LDLr ko 마우스에 2주간 AIN-76A diet사료 (protein 20.8 %, carbohydrate 67.7 % fat 11.5 %)에 적응시킨 후 실험동물을 정상군 (NOR), 대조군 (CON), 영지 추출물 100 mg/kg 투여군 (GL100), 영지 추출물 300 mg/kg 투여군 (GL300)으로 군 분리하여 실험에 사용하였다. 군 분리 후 정상군에는 AIN-76A diet사료를, 대조군 및 약물투여군에는 Western diet (D12079B)를 8주간 공급하였다(Table 1). Western diet는 콜레스테롤이 다량 함유 되어있는 사료를 공급하여 약물투여군은 영지추출물을 각각 100 mg/kg, 300 mg/kg의 농도로 8주간 투여하였다. 식이섭취량 및 체중은 매주 일정한 시간에 측정하여 기록하였다. 실험이 끝난 동물은 희생 3시간 전 절식시킨 후 혈액을 채취하여 30분 이내에 3,000 rpm, 4 °C에서 15분간 원심 분리하여 혈장 (plasma)을 분리하여 -70 °C에 보관하였고, 실험동물의 장기조직 (간, 지방, 신장, 대동맥)은 혈액 채취 후 즉시 적출하여 액체질소로 급냉시켜 -70 °C 냉동고에 보관하였다.

Table 1. Western diet formula

Product # D12079B	gm%	kcal%
Protein	20	17
Carbohydrate	50	43
Fat	21	41
Total		100
Kcal/gm	4.7	
Ingredient	gm	kcal
Casein, 80Mesh	195	780
DL-Methionine	3	12
Corn Starch	50	200
Maltodextrin 10	100	400
Sucrose	341	1364
Cellulose	50	0
Milk Fat, Anhydrous	200	1800
Corn Oil	10	90
Mineral Mix S10001	35	0
Calcium Carbonate	4	0
Vitamin Mix V10001	10	40
Choline Bitartrate	2	0
Cholesterol, USP	1.5	0
Ethoxyquin	0.04	0
Total	1001.54	

3) LDLr ko 죽상경화증 마우스의 조직 무게 측정

영지추출물을 8주간 투여 후 각 실험동물들 간, 신장조직과 피하 (subcutaneous), 부고환 (epididymal), 신장 주변 (kidney leaf) 및 내장 (intraabdominal)의 지방조직 (adipose tissue)을 부위별로 적출하여 무게를 측정하였다.

4) LDLr ko 죽상경화증 마우스의 혈장 내 간 기능 지표 측정

실험 종료 후 각 실험동물로 부터 분리한 혈장 (plasma)에서 간 기능의 지표인 alanine aminotransferase (ALT) 및 aspartate aminotransferase (AST)를 생화학 자동 분석기 (Hitachi-720, Hitachi Medical, Japan)를 이용하여 측정하였다.

5) LDLr ko 죽상경화증 마우스의 혈장 내 creatinine 측정

실험 종료 후 각 실험동물로부터 분리한 혈장에서 creatinine을 생화학 자동 분석기(Hitachi-720, Hitachi Medical, Japan)를 이용하여 측정하였다.

6) LDLr ko 죽상경화증 마우스의 혈장 내 지질함량의 지표 측정

실험 종료 후 각 실험동물로부터 분리한 혈장에서 지질함량의 지표인 triglyceride (TG), total cholesterol (TC), High-density lipoprotein (HDL)의 함량을 생화학 자동 분석기 (Hitachi-720, Hitachi Medical, Japan)를 이용하여 측정하였다. LDL의 수치는 Iranian 2008 Formula for LDL Cholesterol (TC/1.19 + TG/1.9 - HDL / 1.1 - 38 (mg/dL))을 이용하여 계산하였다¹⁵⁾.

7) LDLr ko 죽상경화증 마우스의 간조직의 조직병리학적 변화

간 조직에서의 조직병리학적 관찰을 수행하기 위해 간 조직을 절취하여 10% neutral buffered formalin에 24시간 동안 고정 시킨 다음 graded alcohol로 탈수시키고 파라핀으로 포매하여 block을 제작한 다음 microtome으로 4 μm 두께의 조직절편을 제작하여 hematoxylin & eosin (H&E) 염색을 시행한 뒤 광학현미경위에서 특이 병변의 유무를 관찰하였다.

8) LDLr ko 죽상경화증 마우스의 대동맥의 조직병리학적 변화

대동맥에서의 조직병리학적 관찰을 수행하기 위해 대동맥을 절취하여 10% neutral buffered formalin에 24시간 동안 고정 시킨 다음 graded alcohol로 탈수시키고 파라핀으로 포매하여 block을 제작한 다음 microtome으로 4 μm 두께의 조직절편을 제작하여 H&E 염색을 시행한 뒤 광학현미경위에서 특이 병변의 유무를 관찰하였다.

9) 통계분석

실험동물은 각 군당 6마리를 사용하였고, 모든 수치는 mean ± standard error (Mean ± S.E)로 표시하였으며, Student's T-test 분석방법을 이용하여 각 자료의 통계적 유의성을 검

증 하였고, 대조군과 투여군 사이에 p-value < 0.05 일 때 유의성이 있는 것으로 판정 하였다.

결 과

1. 영지추출물 투여를 통한 체중 및 식이효율 변화

영지추출물의 통해 체중의 조절 및 식이효율의 변화를 확인하였다 (Table 2). 정상군(7.75 ± 0.97 g)과 대조군(7.17 ± 1.78 g)의 체중의 변화는 큰 차이가 없었지만, GL100 (6.25 ± 0.32 g)에서는 감소하는 경향을 보였으며 GL300 (4.50 ± 0.50 g)에서는 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다 (p < 0.05). 체중에 섭취량을 나눈 값으로 계산한 식이효율은 정상군 (3.92 ± 0.55 %)에 비하여 대조군 (5.86 ± 1.45 %)에서 증가하였으나 GL100 (4.84 ± 0.22 %)에서는 감소하는 경향을 보였고, GL300 (3.18 ± 0.32 %)은 대조군에 비해 유의하게 (p < 0.05) 감소하였다(Table 2).

Table 2. Body weight and Food efficiency ratio in LDLr ko mice fet the Western diets for 8 weeks.

Group	Body weight (g)			Food efficiency ratio (%)
	Initial	Final	Gain	
NOR	25.13±0.50 ^b	32.88±1.36 ^b	7.75±0.97	3.92±0.55
CON	19.88±0.56	27.0±2.21	7.13±1.82	5.86±1.45
GL100	21.00±1.08	27.25±1.32	6.25±0.32	4.84±0.22
GL300	23.13±0.74 ^b	27.63±0.42	4.50±0.50 ^a	3.18±0.32 ^a

Normal LDLr ko mice; NOR, LDLr ko control mice fet Western diet ; CON, LDLr ko fet Western diet with *Ganoderma lucidum* extract 100 mg/kg administration mice ; GL100, LDLr ko fet Western diet with *Ganoderma lucidum* extract 300 mg/kg administration mice ; GL300. Values represent mean ± S.E. ^{a,b}significant : ^ap < 0.05, ^bp < 0.001 vs. Western diet LDLr ko control mice values.

2. 영지추출물 투여를 통한 조직무게 변화

영지추출물의 투여를 통해 LDLr ko 마우스의 조직무게 변화를 측정하였다(Fig. 1.). 대조군의 간 무게 (1.19 ± 0.12 g)는 정상군의 간 무게 (0.73 ± 0.06 g)에 비해 유의성 있는 증가를 보였고 (p < 0.01), GL100 (1.07 ± 0.04 g)과 GL300 (1.09 ± 0.02 g)은 감소하는 경향을 보였다. 신장 무게는 대조군 (0.34 ± 0.04 g)은 정상군 (0.22 ± 0.02 ± g)과 비교하여 유의성 있게 증가하였고 (p < 0.01), GL100 (0.32 ± 0.02 g)과 GL300 (0.33 ± 0.01 g)에서는 큰 변화를 보이지 않았다. 대조군의 피하지방 무게 (1.27 ± 0.20 g)는 정상군 (0.35 ± 0.05 g)에 비해 유의성 있는 증가를 보였고 (p < 0.001), GL100 (0.88 ± 0.23 g)은 대조군과 비교하여 감소하는 경향만 보였지만 GL300 (0.42 ± 0.03 g)은 유의하게 감소하였다. LDLr ko 마우스에 영지추출물을 투여한 결과 대조군의 부고환지방 무게 (0.89 ± 0.16 g)는 정상군 부고환지방의 무게 (0.18 ± 0.02 g)에 비해 유의성 있게 증가하였고 (p < 0.001), 영지 추출물을 투여한 GL100 (0.86 ± 0.19 g) 크게 변화가 없었지만 GL300 (0.25 ± 0.12 g)에서는 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다 (p < 0.01). 신장주변 지방을 측정 한 결과 정상군 (0.13 ± 0.03 g)에 비해 대조군 (0.37 ± 0.06 g)에서 유의적인 증가를 보였고 (p < 0.01), GL100의 지방무게 (0.26 ± 0.07 g)는 감소하는 경향을 보였지만 GL300

(0.04 ± 0.00 g)에서는 정상군보다 감소하였다 ($p < 0.001$), 내장지방의 무게 역시 대조군 (0.32 ± 0.08 g)에서는 정상군 (0.11 ± 0.4 g)에 비해 유의성 있는 증가를 보였고($p < 0.05$), GL100 (0.26 ± 0.07 g)과 GL300 (0.15 ± 0.03 g)에서는 대조군과 비교하여 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보였다.

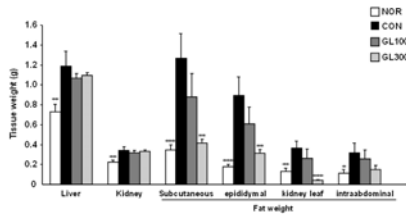


Fig. 1. Tissue weight change in LDLr ko mice fed the Western diets for 8 weeks.

Normal LDLr ko mice; NOR, LDLr ko control mice fed Western diet ; CON, LDLr ko fet Western diet with *Ganoderma lucidum* extract 100 mg/kg administration mice ; GL100, LDLr ko fet Western diet with *Ganoderma lucidum* extract 300 mg/kg administration mice ; GL300, Values represent mean ± S.E., **** significant : $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ vs. Western diet LDLr ko control mice values,

3. 영지추출물 투여를 통한 간 기능 지표 변화

Western diet를 시행하지 않은 정상군의 ALT수치는 23.67 ± 1.17 IU/l 대조군은 62.60 ± 20.64 IU/l이었고, 영지추출물을 투여한 GL100의 ALT수치는 12.50 ± 1.96 IU/l로 대조군과 비교하였을 때 유의성 있는 감소를 보였지만 ($p < 0.05$) GL300에서는 19.75 ± 1.94 IU/l로 감소하는 경향만 보였다. AST의 수치 또한 대조군은 148.60 ± 35.96 IU/l로 정상군의 수치 (112.33 ± 8.67 IU/l)에 비해 증가하는 경향을 보였고, GL100의 AST수치는 67.75 ± 9.12 IU/l, GL300은 91.25 ± 6.43 IU/l로 감소하는 경향만 보였다(Fig. 2).

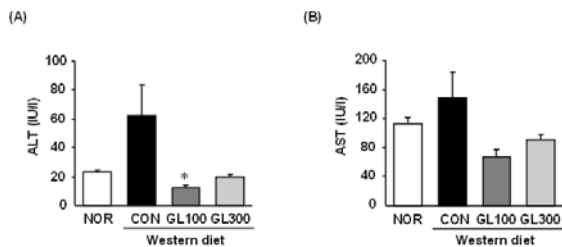


Fig. 2. Analyzed for plasma ALT and AST level in LDLr ko mice fed the Western diets for 8 weeks.

Alanine Aminotransferase ; (A), hAspartate Aminotransferase ; (B), Normal LDLr ko mice; NOR, LDLr ko control mice fed Western diet ; CON, LDLr ko fet Western diet with *Ganoderma lucidum* extract 100 mg/kg administration mice ; GL100, LDLr ko fet Western diet with *Ganoderma lucidum* extract 300 mg/kg administration mice ; GL300, Values represent mean ± S.E., * significant : $p < 0.05$ vs. Western diet LDLr ko control mice values,

4. 영지추출물 투여를 통한 신장 기능 지표 변화

LDLr ko 마우스에 8주간 Western diet를 시행한 후 채취한 혈액에서 신장 기능 지표를 측정된 결과(Fig. 3.) 대조군의 creatinine 수치 (0.32 ± 0.01 umol/l)는 정상군의 수치(0.28 ± 0.01 umol/l)에 비해 유의하게 증가하였고 ($p < 0.01$), GL100의 creatinine 수치 (0.18 ± 0.01 umol/l)와 GL300의 수치 (0.20 ± 0.01 umol/l) 모두 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였다 ($p < 0.001$).

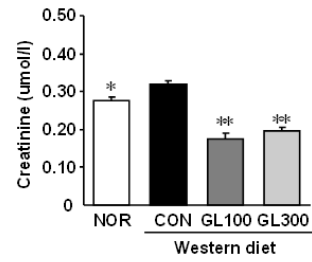


Fig. 3. Analyzed for plasma creatinine level in LDLr ko mice fed the Western diets for 8 weeks.

Normal LDLr ko mice; NOR, LDLr ko control mice fed Western diet ; CON, LDLr ko fet Western diet with *Ganoderma lucidum* extract 100 mg/kg administration mice ; GL100, LDLr ko fet Western diet with *Ganoderma lucidum* extract 300 mg/kg administration mice ; GL300, Values represent mean ± S.E., * significant : $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ vs. Western diet LDLr ko control mice values,

5. 영지추출물 투여를 통한 지질함량 측정 변화

혈장에서 TG의 함량을 측정된 결과 정상군 (113.60 ± 8.85 mg/dl)에 비하여 대조군의 TG수치 (835.75 ± 216.92 mg/dl)는 유의성 있게 증가하였고 ($p < 0.01$), 영지추출물 투여군인 GL100의 TG수치 (714.25 ± 186.78 mg/dl)와 GL300의 TG수치 (425.25 ± 77.14 mg/dl)는 대조군에 비하여 농도 의존적인 감소경향을 보였다(Fig. 4A). 혈장 TC의 수치는 대조군 (1146.00 ± 131.48 mg/dl)이 정상군 (252.80 ± 16.59 mg/dl)의 수치와 비교하여 유의적인 증가를 보였고 ($p < 0.001$), 영지 추출물에서는 GL300 (595.75 ± 57.52 mg/dl)만 유의성 있는 ($p < 0.01$) 감소가 관찰되었다(Fig. 4B). HDL 콜레스테롤의 함량을 측정된 결과 정상군은 203.33 ± 41.81 mg/dl, 대조군은 192.40 ± 14.98 mg/dl, GL100은 211.50 ± 8.73 mg/dl, GL300은 182.75 ± 9.48 mg/dl로 각 군간의 차이가 없었다(Fig. 4C). 반면 LDL 콜레스테롤의 수치는 대조군이 1171.37 ± 212.78 mg/dl로 정상군 (119.32 ± 31.18 mg/dl)에 비해 유의한 증가를 보였으며 ($p < 0.001$), 영지추출물 투여군에서는 GL100의 수치가 1064.26 ± 174.31 mg/dl로 큰 변화가 없었지만 GL300에서는 534.52 ± 82.37 mg/dl로 대조군과 비교하여 통계적인 유의성 ($p < 0.05$)을 나타내었다(Fig. 4D).

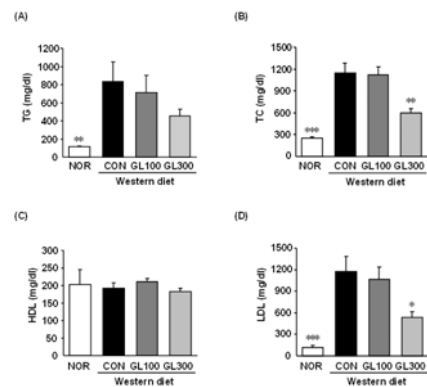


Fig. 4. Analyzed for plasma lipid contents level in LDLr ko mice fed the Western diets for 8 weeks.

Triglyceride ; (A), Total cholesterol ; (B), High-density lipoprotein ; (C), Low-density lipoprotein ; (D), Normal LDLr ko mice; NOR, LDLr ko control mice fed Western diet ; CON, LDLr ko fet Western diet with *Ganoderma lucidum* extract 100 mg/kg administration mice ; GL100, LDLr ko fet Western diet with *Ganoderma lucidum* extract 300 mg/kg administration mice ; GL300, Values represent mean ± S.E., * significant : $p < 0.01$, ** $p < 0.001$ vs. Western diet LDLr ko control mice values,

6. 영지추출물 투여를 통한 간조직의 조직병리학적 변화

간 조직 고정 후 H&E염색을 실시하여 간 조직사진을 얻었다. 정상군의 간 조직(Fig. 5A)에서는 간세포가 정상적인 형태를 이루고 조직사이의 지방방울이 존재하지 않았지만, Western diet를 실시한 대조군에서는 조직사이의 지방방울의 수가 크게 증가되었음이 관찰되었다(Fig. 5B). 영지추출물을 투여한 GL100에서는 대조군에 비하여 지방방울의 수가 크게 관찰되지 않았고(Fig. 5C), GL300에서는 지방방울이 거의 관찰되지 않았을 뿐만 아니라 세포의 형태도 유지하고 있음을 확인 할 수 있었다(Fig. 5D).

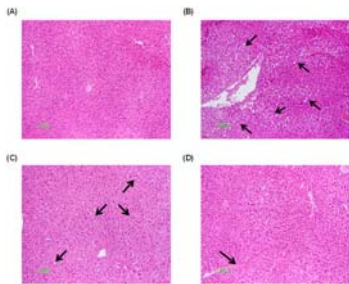


Fig. 5. Liver histological analysis in LDLr ko mice fet the Western diets for 8 weeks.

Normal LDLr ko mice ; (A), LDLr ko control mice fet Western diet ; (B), LDLr ko fet Western diet with *Ganoderma lucidum* extract 100 mg/kg administration mice ; (C), LDLr ko fet Western diet with *Ganoderma lucidum* extract 300 mg/kg administration mice ; (D). The black arrows were means lipid drop and hepatocyte injury. (Original magnification $\times 50x$)

7. 영지추출물 투여를 통한 대동맥의 조직병리학적 변화

부검 시 채취한 대동맥을 H&E염색을 실시하여 조직사진을 얻었다. 대조군의 대동맥 조직(Fig. 6B)에서는 동맥벽의 두께가 정상군(Fig. 6A)과 비교하여 두꺼워짐을 확인할 수 있었으며, 또한 플라크가 발생하였음을 확인할 수 있었다. 하지만 GL100의 대동맥 사진(Fig. 6C)에서는 대조군에 비하여 동맥벽의 두께가 현저히 얇았으며, GL300에서는(Fig. 6D) 정상군과 비슷한 두께를 가지고 있음이 관찰되었다.

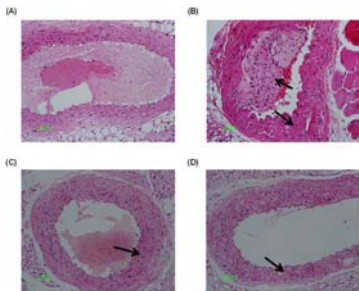


Fig. 6. Aorta tissue histological analysis in LDLr ko mice fet the Western diets for 8 weeks.

Normal LDLr ko mice ; (A), LDLr ko control mice fet Western diet ; (B), LDLr ko fet Western diet with *Ganoderma lucidum* extract 100 mg/kg administration mice ; (C), LDLr ko fet Western diet with *Ganoderma lucidum* extract 300 mg/kg administration mice ; (D). The black arrows were means thickness of aorta wall and plaque. (Original magnification $\times 50x$)

고찰

영지는 구멍쟁이 버섯과에 속한 赤芝 또는 紫芝의 자실체를 건조한 것으로 性은 平하고, 毒이 없으며 味는 甘, 苦하다. 心과 脾로 들어가 養心安心하고 肺經으로 들어가 止咳去痰, 平喘, 納氣한다. 또한 고혈압, 고지혈증, 관상동맥경화증, 간염 및 질병을 앓은 후 허약해진 몸에도 사용하며, 선행연구에는 죽상동맥경화증에도 효과가 있다고 보고되어 있다^{16,17}.

죽상경화증은 다양한 병인으로 인한 혈관 내막에 생기는 질병으로, 서양에서는 다른 질병들 보다 높은 질병율과 치사율을 보이고 있으며, 각종 심장병, 뇌졸중 등의 주된 요인이기도 하다. 죽상경화증은 동맥벽의 만성적인 염증반응에 의해 발생하며, 혈전, LDL, oxLDL, 면역세포 등 다양한 발병기전을 가진다¹⁸⁻²⁰. 죽상경화증은 연령, 유전, 성별에 따른 원인뿐만 아니라 고혈압, 스트레스, 운동부족, 고지혈증, 비만 등에 의해서도 발병한다. 특히 우리나라도 서구화된 식습관으로 인한 고지방 식이의 증가로 비만, 고지혈증 환자가 늘어감에 따라 죽상경화증의 위험도 역시 커져가는 추세이다²¹.

혈액내의 중성지방 및 콜레스테롤의 수치가 높은 고지혈증이 지속되면 동맥벽에 LDL 및 oxLDL이 축적이 발생하게 되고, 단핵세포가 형질변환 후 scavenger receptors를 통해 oxLDL을 탐식 한다²². 이러한 탐식활동의 결과 foam cell이 만들어지고, 세포 외의 콜레스테롤 축적이 증가해 죽종을 형성하게 된다. LDL 콜레스테롤은 말초조직의 세포표면에 존재하는 LDL 수용체와 결합으로 대사가 조절되고 있는데, LDL 수용체의 이상을 초래하면 콜레스테롤의 조절이 일어나지 않아 콜레스테롤 과잉생산이 발생하고 고지혈증을 일으킨다^{6,7}. LDL 수용체의 결핍으로 죽상경화증 형성이 가속화 되는데, 이러한 이유로 본 실험에서는 LDL 수용체 결핍 마우스를 이용하여 영지버섯 70% 에탄올 추출물의 LDL 콜레스테롤 조절을 통한 죽상경화증 예방효과를 확인하고자하였다.

비만이나 고콜레스테롤 식이에 의해 발생한 고지혈증이 죽상경화증의 직접적인 원인이 되므로 본 실험에서는 2주간 모든 LDLr ko 마우스에 11.5% 콜레스테롤이 함유되어있는 사료(AIN-76A)로 적응기간을 거친 후 죽상경화증 유발군(CON, GL100, GL300)에는 고콜레스테롤 식이인 (D12079B) Western diet로 죽상경화증 유발과 함께 영지 추출물을 8주간 투여하여 체중증가와 식이효율을 확인하였다. 그 결과 대조군의 몸무게 증가는 정상군과 비교하여 큰 차이가 없었지만 GL300에서는 유의성 있게 체중의 변화가 감소하였다. 식이 효율 역시 GL300에서 대조군에 비교하여 유의한 감소를 보였는데 이러한 결과를 보았을 때 영지추출물은 체중증가의 감소를 통한 고지혈증 억제로 죽상경화증을 예방하는 효과가 있을 것으로 생각된다.

고지혈증이 발생하면 간에 지방이 축적되어 지방간이 발생하고 간 기능의 이상 및 간 조직내의 지방방울이 발견되기도 한다. Nuotio-Antar AM 등의 연구에 따르면 LDLr ko 마우스에 Western diet를 실시한 결과 간 조직의 무게 증가 및 간 조직에서 지방의 양이 증가하는 것이 관찰 되었다^{23,24}. 본 실험에서도 간 조직의 무게가 정상군과 비교하여 대조군에서 유의하게 증가하였지만, 영지추출물을 투여한 군에서는 감소하는 경향을 보였다. 또한 혈장에서 간 기능의 지표인 ALT, AST를 측정된 결과 영지추출물의 투여가 정상군의 수치와 비

숫하게 감소하는 것을 확인하였고, 이는 영지추출물의 투여가 간 손상을 억제 할 것으로 예상된다. Western diet를 실시한 대조군의 간 조직사진에서는 정상군과 비교하여 현저하게 지방방울의 수가 증가한 것을 발견하였지만, 영지추출물 투여군에서는 농도 의존적으로 지방방울이 감소하고 간세포가 정상적인 모양을 이루는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 영지추출물은 지방의 축적을 억제함으로써 죽상경화증을 예방할 뿐만 아니라 간 기능의 손상을 막아주는 것으로 예상된다.

고콜레스테롤 식이로 인해 혈중 지질의 농도가 증가하는데 이로 인해 손상된 동맥벽에 지질의 축적이 증가하고, 죽상경화증의 증세는 더욱 악화하게 된다. 선행연구에 의해서도 LDLr ko 마우스 Western diet가 중성지방 및 지단백의 증가를 가져오고 그 결과 죽상경화증의 경과가 진행됨이 보고되어 있다. 본 실험에서도 대조군에서 TG, TC, LDL의 수치가 고지혈증이 지속됨에 따라 정상군에 비해 유의한 증가를 보였다. 하지만 영지 추출물에서 TG의 수치는 농도 의존적으로 증가하는 것을 보였으며, TC와 LDL의 수치가 GL300에서 유의한 억제를 관찰할 수 있었다. 따라서 혈중 지질의 감소가 간 조직의 손상 및 지질의 축적을 막을 수 있었고, 죽상경화증을 억제하였을 것으로 예상된다.

산화된 LDL의 탐식반응으로 동맥 내에 지질축적, 염증세포침윤, 평활근세포 및 섬유모세포의 증식으로 죽상판이 생성돼 동맥의 혈관 벽이 두터워 지는데¹⁸⁻²²⁾, 본 실험에서도 대조군의 동맥이 두터워질 뿐만 아니라 플라크의 형성을 확인할 수 있었는데 이는 고콜레스테롤 식이를 통하여 죽상경화증이 발생하였음을 예상 할 수 있다. 하지만 영지추출물 투여군의 경우 동맥벽이 정상군과 상이한 두께를 보이므로 영지추출물이 죽상경화증 예방에 도움이 될 것이라고 사료된다. 또한 혈중 creatinine의 수치는 혈류량의 감소가 발생하였을 경우 증가하게 된다²⁵⁾. 본 실험에서 혈중 creatinine의 수치를 확인한 결과 대조군의 경우 creatinine의 수치가 정상군과 비교하여 유의적으로 증가한 것을 확인할 수 있었는데 이는 고콜레스테롤 식이를 통하여 죽상경화증이 유발되어 혈류량이 감소하였을 것으로 사료된다. 하지만 영지추출물 투여군에서는 creatinine의 수치가 대조군과 비교하여 유의적인 감소를 보였는데 이러한 결과는 영지추출물이 죽상경화증을 예방하여 혈류량 감소를 억제하였기 때문으로 사료된다.

영지추출물의 투여를 통해 죽상경화증의 예방 효과를 확인한 결과 동맥벽에 염증반응 및 지질축적의 주 역할을 하는 LDL 콜레스테롤의 수치를 감소 뿐 만 아니라 동맥 조직에서의 효과 또한 확인하였다. 이러한 작용의 정확한 기전은 밝혀지지 않았지만 영지추출물이 죽상경화증 예방효과에 효과가 있다고 생각되며 추후연구를 진행할 예정이다.

결론

본 연구에서는 고콜레스테롤 식이인 Western diet를 섭취한 LDL receptor knockout 마우스에 100 mg/kg, 300 mg/kg의 농도로 영지 70% 에탄올 추출물을 8주간 투여하여 영지 추출물의 투여가 죽상경화증 예방에 효과가 있는지 확인한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Western diet 공급한 LDLr ko 죽상경화증 마우스의 체중증가는 영지추출물 300 mg/kg 투여군에서 대조군과 비교하여 유의적으로 감소되었다.
2. Western diet 공급한 LDLr ko 죽상경화증 마우스의 간조직 및 신장조직 무게는 영지추출물 투여군은 대조군과 큰 차이가 없었으며, 지방조직에서는 영지추출물 300 mg/kg 투여군에서 대조군과 비교하여 유의적으로 감소하였다.
3. Western diet 공급한 LDLr ko 죽상경화증 마우스의 간기능 지표의 수치를 확인한 결과 ALT의 수치는 영지추출물 100 mg/kg에서 대조군과 비교하여 유의적으로 감소하였지만 AST의 수치는 감소하는 경향만 보였다.
4. Western diet 공급한 LDLr ko 죽상경화증 마우스의 신장기능의 지표 변화를 확인한 결과 영지추출물 투여군 모두 대조군에 비해 유의한 감소를 보였다.
5. Western diet 공급한 LDLr ko 죽상경화증 마우스의 혈중 TG 및 HDL의 수치는 영지추출물 투여군이 대조군에 비해 감소하는 경향만 보였으며, TC와 LDL의 수치는 영지추출물 300 mg/kg투여군에서 대조군과 비교하여 유의한 감소를 보였다.
6. Western diet 공급한 LDLr ko 죽상경화증 마우스에 영지추출물의 투여는 간 조직 내의 지방축적을 막았고, 간세포의 손상을 억제하였다.
7. Western diet 공급한 LDLr ko 죽상경화증 마우스에 영지추출물의 투여는 대동맥 조직벽의 두께가 증가하는 것과 플라크 형성을 막았다.

따라서 고콜레스테롤 식이를 섭취한 LDLr ko 마우스에 영지추출물의 투여함으로써 인해 죽상경화증의 예방에 효과가 있음이 사료된다.

감사의 글

본 연구는 한국연구재단 'TLR4 antagonist를 타겟으로 한 죽상경화증 유효 한약조성 복합제 개발 연구 (2012R1A1A1011626)'의 지원에 의해 수행되었습니다.

References

1. Kim TH, Son YK, Hwang KH, Kim MH. Effects of Angelica keiskei Koidzumi and Turmeric Extract Supplementation on Serum Lipid Parameters in Hypercholesterolemic Diet or P-407-Induced Hyperlipidemic Rats. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2008 ; 37(6) : 708-13.

2. Lee CH, Yi HS, Kim JE, Heo SK, Cha CM, Won CH, Park SD. Anti-oxidative and Anti-inflammatory Effect of Fractionated Extracts of *Smilacis Glabrae* Rhizoma in Human Umbilical Vein Endothelial Cell, *Kor J Herbol*. 2009 ; 24(3) : 39-50.
3. Kim KH, Kim DH, Kim YS. Effects of Dodam-tang on Cerebral Ischemic Damage of Hyperlipidemic Rats, *Kor J Herbol*. 2014 ; 29(5) : 23-30.
4. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell R. ROBBINS basic pathology, 8th edition, E public korea, 2009
5. Eberini I, Wait R, Calabresi L, Sensi C, Miller I, Gianazza E. A proteomic portrait of atherosclerosis, *J Proteomics*. 2013 ; 82 : 92-112.
6. Glass CK, Witztum JL. Atherosclerosis. the road ahead, *Cell*, 2001 ; 104(4) : 503-16.
7. Li AC, Glass CK. The macrophage foam cell as a target for therapeutic intervention, *Nat Med*. 2002 ; 8(11) : 1235-42.
8. Huszar D, Varban ML, Rinninger F, Feeley R, Arai T, Fairchild-Huntress V, Donovan MJ, Tall AR. Increased LDL cholesterol and atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice with attenuated expression of scavenger receptor B1, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2000 ; 20(4) : 1068-73.
9. The whole country a college of Oriental medicine, The joint textbook publish commission compilation, *Herbalogy*. Seoul : younglimsa, 1995.
10. Miyazaki T, Nishijima M. Studies on fungal polysaccharides, XXVII. Structural examination of a water-soluble, antitumor polysaccharide of *Ganoderma lucidum*, *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1981 ; 29(12) : 3611-6.
11. Park MH, oh KY, Lee BW, Anti-cancer activity of *Letinus edodes* and *Pleurotus*, *Korean J Food Sci Technol*. 1998 ; 30 : 702-8.
12. Wang SY, Hsu ML, Hsu HC, Tzeng CH, Lee SS, Shiao MS, Ho CK. The anti-tumor effect of *Ganoderma lucidum* is mediated by cytokines released from activated macrophages and T lymphocytes, *Int J Cancer*. 1997 ; 70(6) : 699-705.
13. Berger A, Rein D, Kratky E, Monnard I, Hajjaj H, Meirim I, Pigué-Welsch C, Hauser J, Mace K, Niederberger P. Cholesterol-lowering properties of *Ganoderma lucidum* in vitro, ex vivo, and in hamsters and minipigs, *Lipids Health Dis*. 2004 ; 3 : 2.
14. Kabir Y1, Kimura S, Tamura T. Dietary effect of *Ganoderma lucidum* mushroom on blood pressure and lipid levels in spontaneously hypertensive rats (SHR), *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 1988 ; 34(4) : 433-8.
15. http://homepages.slingshot.co.nz/~geoff36/LDL_mg.htm
16. The ministry of Food and Drug Safety, Herbal Medicine Databasde, Avaliable from : URL : <http://www.mfds.go.kr/herbmed/index.do?nMenuCode=7&codeKHP=N218&includeUrl=/herbmed/view.jsp>
17. Boh B, Berovic M, Zhang J, Zhi-Bin L. *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds, *Biotechnol Annu Rev*. 2007 ; 13 : 265-301.
18. Rosenfeld ME, Ross R. Macrophage and smooth muscle proliferation intherosclerotic lesions of WHHL and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits, *Atherosclerosis*. 1990 ; 10 : 680-7.
19. Sakai M, Kobori S, Miyazaki A, Horiuchi S. Macrophage proliferation in atherosclerosis, *Curr Opin Lipidol*. 2000 ; 11 : 504-9.
20. Lin ZB, Zhang HN. Anti-tumor and immunoregulatory activities of *Ganoderma lucidum* and its possible mechanisms, *Acta Pharmacol Sin*. 2004 ; 25(11) : 1387-95.
21. Yang YH, Yang J, Jiang QH. Hypolipidemic effect of gypenosides in experimentally induced hypercholesterolemic rats, *Lipids Health Dis*. 2013 ; 12 : 154.
22. Li AC, Brown KK, Silvestre MJ, Willson TM, Palinski W, Glass CK. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands inhibit development of atherosclerosis in LDL receptor-deficient mice, *J Clin Invest*. 2000 ; 106(4) : 523-31.
23. Nuotio-Antar AM, Hachey DL, Hasty AH. Carbenoxolone treatment attenuates symptoms of metabolic syndrome and atherogenesis in obese, hyperlipidemic mice, *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007 ; 293(6) : E1517-28.
24. Coenen KR, Hasty AH. Obesity potentiates development of fatty liver and insulin resistance, but not atherosclerosis, in high-fat diet-fed agouti LDLR-deficient mice, *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2007 ; 293(2) : E492-9.
25. Hommels MJ, van der Ven AJ, Kroon AA, Kessels AG, van Dieijen-Visser MP, van Engelshoven JA, Bruggeman CA, de Leeuw PW. C-reactive protein, atherosclerosis and kidney function in hypertensive patients, *J Hum Hypertens*. 2005 ; 19(7) : 521-6.