

고지방식이 비만 유도 mouse에서 누에체액의 항비만 및 LDL-cholesterol 저하효과

남유리 · 고영은 · 이선영[†]

충남대학교 식품영양학과

Anti-obesity and LDL-cholesterol lowering effects of silkworm hemolymph in C57BL/6N mice fed high fat diet

Nam, You Ree · Ko, Young Eun · Ly, Sun Yung[†]

Department of Food and Nutrition, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea

ABSTRACT

Purpose: Obesity, a worldwide epidemic, is associated with insulin resistance, hyperlipidemia, hypertension, cardiovascular disease, and certain cancers. Many strategies, including natural alternative anti-obesity agents, are used widely to prevent obesity. This study examined the effects of silkworm hemolymph on the weight control of C57BL/6N mice fed with a high-fat diet. **Methods:** The mice were divided into five groups: normal group (N), high-fat diet group (HFC), high-fat diet and silkworm hemolymph (at dose of 1 mL/kg BW (HFS-1), 5 mL/kg BW (HFS-5) and 10 mL/kg (HFS-10) for 12 weeks. **Results:** After 12 weeks treatment, the administration of silkworm hemolymph decreased the final body weight significantly along with a decrease in the weights of epididymal fat and total fat. The plasma LDL-cholesterol concentration was significantly lower in the HFS-1, HFS-5, and HFS-10 groups than in the HFC group. In addition, the leptin level of the HFS groups was significantly lower than those of the HFC group without a change in the plasma insulin concentration. **Conclusion:** These findings suggest that the silkworm hemolymph may have the potential to prevent obesity.

KEY WORDS: silkworm hemolymph, anti-obesity, LDL-cholesterol lowering effect

서 론

비만은 에너지 섭취와 소모의 균형이 맞지 않아 지방조직이 증가하는 상태로¹⁻³ 심장질환, 암, 관절염, 폐쇄성수면무호흡증, 고혈압, 이상지질혈증, 제2형 당뇨병과 같은 다양한 질환에 크게 영향을 미친다.⁴ 그러므로 현대와 같이 다양한 생활습관 요인으로 인하여 발병률이 늘고 있는 상황에서는 비만의 예방과 치료는 건강을 지키기 위한 필수요건이 되고 있다. 비만 예방과 치료를 위한 많은 천연소재들이 대해 연구·개발되고 있으며 이들 중 일부는 안전하고 효과적인 항비만 소재가 될 수도 있다.

누에 (silkworm, *Bombyx mori*)는 누에나방 (*Bombycidae*) 과에 속하는 곤충으로 그 유충의 분말과 누에 체액들은 많은 생물학적인 연구의 대상이 되어 왔다. 그 결과로 1-Deoxyojirimycin (DNJ) 과 같은 물질이 뽕잎과 누에로

부터 분리 동정되었으며⁵⁻⁷ piperidine alkaloid 종류인 DNJ는 탁월한 α -glycosidase 억제효능을 보이는 소재로 알려지게 되었다.^{8,9} DNJ는 혈당과 혈중 triglyceride 효능을 보이고 있으며 그로 인하여 식사성 요인으로 인한 비만의 치료에 효과적인 것으로 알려져 있다.¹⁰ 누에의 5령 유충의 분말이 혈당 강하 효과가 있다는 사실은 Ryu 등¹¹에 의하여 최초로 알려졌고 이후 많은 연구진들에 의해 누에 성분의 생리활성에 대한 후속 연구들이 진행되어 왔다.¹² 누에의 혈당강하 효능에 관한 연구는 주로 한국과 일본, 중국 등 아시아 지역에서 수행되었으며,^{13,14,15} 뽕잎은 누에의 성장과 고치형성에 크게 기여하는 유일한 먹이이므로 최근에는 뽕잎의 생리활성 연구결과를 누에의 분말이나 체액에서도 얻을 수 있을 것으로 기대하고 많은 연구들이 진행되어 왔다. 한국의 전통의학에서는 뽕나무의 여러 부분을 약재로 사용하여 왔는데 주로 열, 기침, 이상지질혈증, 고

Received: April 16, 2018 / Revised: May 18, 2018 / Accepted: June 4, 2018

[†] To whom correspondence should be addressed.

tel: +82-42-821-6838, e-mail: sunly@cnu.ac.kr

© 2018 The Korean Nutrition Society

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.

혈압, 비만, 간손상 등에 대한 치료효과를 기대해 왔다.¹⁶ 최근 곤충의 혈청이라 할 수 있는 누에 체액이 곤충¹⁷이나 포유류^{18,19}의 세포사멸을 억제할 수 있고 이러한 효능은 30K 단백질질을 밝히고 있다.^{20,21} 누에단백질 30Kc6을 섭취시킴으로서 토끼에서 혈청지질을 낮춤으로서 동맥경화 증세가 개선되었다고 보고하였다.²⁰ 그러나 누에 체액의 항비만 관련 연구는 많이 진행되지 않았다.

고지방식 섭취로 비만이 유도된 마우스는 내장지방 증가, 이상지질혈증, 고인슐린혈증, 지방간 등을 일으키며 이러한 현상은 인체에서와 유사하게 나타난다.^{22,23} 그러므로 고지방 식이로 비만을 유도한 마우스 모델을 이용하여 비만과 고지혈증의 예방과 치료 소재의 효능을 탐색하는 연구는 그 결과를 인체에도 적용 가능한 의미 있는 연구가 될 수 있다. 본 연구에서는 C57BL/6N 마우스에 열량비 45% 고지방식이로 비만을 유도하면서 농도별로 누에체액을 투여하였을 때 동물의 체중과 혈중지질에 변화를 줄 수 있는지 탐색하고 간지표를 통해 안전성 여부를 검토하고자 하였다.

연구 방법

누에체액의 추출 및 전처리

시료는 (주)헨스바이오텍 (Seoul, Korea)에서 제공받아 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 시료는 5령 3일된 누에를 24시간 공복상태를 유지시킨 후 체액을 추출하여 식이의 영향을 최대한 배제하였다. 체액은 배발(腹尾)에 바늘로 상처를 내어 채취하였으며 65°C에서 30분간 가열하여 효소활성을 억제함으로써 흑화를 방지하였다. 1000 rpm에서 60분간 원심분리한 후 상층액을 취하여 소분한 후 분석시까지 -70°C에 보관하였다.

실험동물 및 실험식이

생후 3주령 C57BL/6N 수컷 마우스를 (주)중앙실험동물에서 공급받아 본 연구실의 동물사육실에서 1주일간 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 사육실 환경은 온도 23 ± 2°C, 습도 55 ± 5°C, 12시간 낮밤 주기를 유지하였다. 사료는 고품사료를 공급하였고 음용수는 제한없이 공급하였다. 모든 동물 실험은 충남대학교 동물실험윤리위원회의 승인(승인번호 : 2009-3-24)을 얻어 수행하였다.

적응기간 1주일 후에 4주령 된 마우스를 임의로 체중이 비슷하도록 6마리씩 5군으로 나누었다. 각 군은 정상군(열량비 10% 지방섭취군; N), 고지방대조군(열량비 45% 고지방식이군; HFC)과 누에체액을 투여한 군으로 45% 고지방식은 동일하게 섭취시키되 각각 누에체액을 1 mL/kg,

Table 1. Composition of experimental diets (%)

Ingredient	Experimental diets ¹⁾	
	Normal diet	High fat diet
Casein	19.0	23.3
L-cystine	0.3	0.3
Corn starch	29.9	8.5
Maltodextrin	3.3	11.7
Sucrose	33.2	20.1
Cellulose	4.7	5.8
Soybean oil	2.4	2.9
Lard	1.9	20.7
Mineral mix ²⁾	0.9	1.2
Dicalcium phosphate	1.2	1.5
Calcium carbonate	0.5	0.6
Potassium citrate	1.6	1.9
Vitamin mix ³⁾	0.9	1.2
Choline bitartrate	0.2	0.2
Calorie (kcal%)		
Carbohydrate	70	35
Protein	20	20
Fat	10	45

1) Normal diet containing 10 kcal% fat (D12450B, Research Diets, Inc., NJ, USA); high fat diet containing 45 kcal% fat (D12451, Research Diets, Inc., NJ, USA) 2) Mineral mix: Mineral mix S10026 (Research Diets, Inc., NJ, USA) 3) Vitamin mix: Vitamin mix V10001 (Research Diets, Inc., NJ, USA)

5 mL/kg, 10 mL/kg를 경구 투여한 군 (HFS-1, HFS-5, HFS-10)이었다. 투여량은 3T3-L1 세포를 사용하여 예비 실험을 수행한 결과에 근거하여 설정하였으며, 누에체액의 1%, 5%, 10% 농도로 처리한 세포에서 지방 분화가 억제되었다. 누에체액은 마우스용 경구투여기 (Zonde, JD-S-124, Jeungdo B&P Co., Ltd, Seoul, Korea)를 사용하여 1일 1회 동일한 시간에 12주 동안 투여하였으며, 정상대조군과 고지방대조군에는 누에체액 대신 생리식염수를 동량 투여하였다. 정상군과 고지방식이군의 실험식이 조성은 Table 1과 같다. 정상지방군의 식이는 열량비 10%의 지방 식이 (D12450B, Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ, USA)를 공급하였으며 고지방 식이는 시판되는 열량비 45%의 고지방 식이 (D12451, Research Diets, Inc., New Brunswick, NJ, USA)를 사용하였다.

실험동물의 사육기간 동안 식이섭취량은 매일 일정한 시간에 측정하였으며 체중은 1주일에 1회 측정하였다. 식이효율 (food efficiency ratio, FER)은 아래의 식에 의해 산출하였다.

$$\text{식이효율 (food efficiency ratio)} = \frac{\text{체중증가량 (g/day)}}{\text{식이섭취량 (g/day)}}$$

시료수집

실험동물은 희생하기 전 12시간 이상 절식시켜 에틸에

테르로 마취한 후 헤파린 처리한 주사기를 이용하여 심장에서 전혈을 채취하였다. 전혈은 상온에서 30분간 방치한 후 4°C에서 3000 rpm의 속도로 10분간 원심 분리하여 혈장을 취해 -70°C에 보관하여 실험에 사용하였다. 채혈 후 간, 신장, 비장을 취하고 체지방으로 피하지방, 부고환지방, 내장지방, 신장지방을 취하여 차가운 0.9% 생리식염수로 세척한 후 무게를 측정하였다.

혈장의 생화학분석

혈장의 총콜레스테롤, 고밀도 지단백-콜레스테롤 (high-density lipoprotein cholesterol; HDL-cholesterol), 저밀도 지단백-콜레스테롤 (low-density lipoprotein cholesterol; LDL-cholesterol), 트리글리세리드 (TG), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) 수준은 시판되는 kit 시약 (Asan Pharm. Co., Korea)을 사용하여 비색법으로 측정하였다. 혈중 인슐린과 렙틴 농도는 시판되는 ELISA kit (ALPCO Co., NY, USA)를 사용하여 측정하였다.

통계 처리

실험결과는 SPSS 20.0 (IBM SPSS statistics, ver. 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 통계처리 하였으며 평균과 표준편차 (mean \pm SD)로 나타내었다. 통계 프로그램을 이용하여 일원배치분산분석 (one-way analysis

of variance, ANOVA)을 실시하였으며, 유의성 검증을 위하여 Duncan's multiple range test를 수행하였다. 모든 통계적인 유의성은 $p < 0.05$ 수준에서 실시하였다.

결 과

체중, 식이섭취량 및 식이효율

12주 동안의 실험식이를 섭취한 동물의 체중 변화는 Table 2에 나타내었다. 실험을 시작할 때는 5개 군의 평균 체중에 차이가 없었으나 실험식이를 12주 동안 섭취한 후 HFC군의 체중은 N군에 비하여 48.9% 증가하였다. HFC군과 비교하여 누에체액을 투여한 모든 군에서 12주 짜 약 10% 정도 유의한 감소 결과를 보였다. 12주 동안의 식이 섭취량은 HFS-5군이 HFC군에 비하여 유의하게 적었고 N, HFC, HFS-1, HFS-10 군 간에는 차이가 없었다. 식이 효율 (FER)은 N군이 고지방식이를 급여한 다른 네 군에 비하여 유의하게 낮았으나 고지방식이를 섭취한 군들 간의 차이는 보이지 않았다 (Table 3). 즉, 누에체액 섭취는 고지방식이로 인하여 유도될 수 있는 체중증가를 억제한 것으로 판단된다. Miller 등에 의하면 체지방 축적은 에너지 섭취나 운동보다는 오히려 식이조성 중 지방의 섭취 비율이 더 영향을 미친다고 보고하였으며,²⁴ HFS-1과 HFS-5군의 체중 감소는 부분적으로 식욕 감퇴로 인한 식이섭취량 감소인 것으로 사료된다.

Table 2. Changes in body weight of mice treated with high fat diet and silkworm hemolymph for 12 weeks

Group ¹⁾	0 week	2 week	4 week	6 week	8 week	10 week	12 week
NC	19.717 \pm 0.818 ²⁾	19.833 \pm 0.677 ³⁾	21.433 \pm 0.826 ^a	22.617 \pm 0.581 ^a	24.083 \pm 0.882 ^a	24.183 \pm 1.063 ^a	25.333 \pm 0.763 ^a
HFC	20.717 \pm 1.256	22.733 \pm 0.903 ^b	25.500 \pm 1.664 ^b	28.000 \pm 2.864 ^b	30.667 \pm 3.903 ^b	34.100 \pm 3.978 ^b	37.717 \pm 3.156 ^c
HFS-1	20.117 \pm 1.694	21.767 \pm 2.017 ^b	24.383 \pm 2.122 ^b	27.217 \pm 2.714 ^b	29.233 \pm 3.383 ^b	30.250 \pm 4.930 ^b	33.867 \pm 4.085 ^b
HFS-5	19.233 \pm 1.104	22.050 \pm 1.480 ^b	24.317 \pm 1.332 ^b	26.967 \pm 2.071 ^b	29.200 \pm 3.175 ^b	30.350 \pm 3.028 ^b	33.667 \pm 3.380 ^b
HFS-10	20.103 \pm 1.335	22.217 \pm 0.977 ^b	24.883 \pm 1.850 ^b	27.433 \pm 2.388 ^b	27.950 \pm 2.170 ^b	30.917 \pm 2.125 ^b	33.967 \pm 2.973 ^b
F-value	0.536	4.370 ^{**4)}	14.718 ^{**}	28.378 ^{**}	4.466 ^{**}	7.051 ^{***}	13.125 ^{***}

1) NC; normal diet, HFC; 45 kcal% high fat diet, HFS-1; 45 kcal% high fat diet with 1 mL/kg/day silkworm hemolymph, HFS-5; 45 kcal% high fat diet with 5 mL/kg/day silkworm hemolymph, HFS-10; 45 kcal% high fat diet with 10 mL/kg/day silkworm hemolymph 2) The results are mean \pm SD for 6 mice in each group. 3) Mean values with the different letter in the same column are significantly different by Duncan's multiple range test at $\alpha = 0.05$. 4) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ by one way ANOVA

Table 3. Weight gain and food efficiency ratio (FER) of mice treated with high fat diet and silkworm hemolymph for 12 weeks

Group	Weight gain (g/12 weeks)	Food intake (g/12 weeks)	FER ¹⁾
NC	5.567 \pm 0.266 ²⁾³⁾	235.503 \pm 17.689 ^b	0.023 \pm 0.003 ^a
HFC	16.883 \pm 3.267 ^b	231.747 \pm 31.031 ^b	0.073 \pm 0.013 ^b
HFS-1	13.583 \pm 3.627 ^b	203.245 \pm 38.021 ^{ab}	0.071 \pm 0.029 ^b
HFS-5	12.633 \pm 3.672 ^b	172.597 \pm 40.273 ^a	0.077 \pm 0.033 ^b
HFS-10	12.850 \pm 4.607 ^b	236.343 \pm 48.562 ^b	0.059 \pm 0.032 ^b
F-value	8.753 ^{***4)}	3.457 [*]	4.513 ^{**}

1) FER, food efficiency ratio {FER=Body weight gain (g/day) / food intake (g/day)} 2) The results are mean \pm SD for 6 mice in each group. 3) Mean values with the different letter in the same column are significantly different by Duncan's multiple range test at $\alpha = 0.05$. 4) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ by one way ANOVA

장기 및 부위별 체지방 무게

실험동물의 장기 무게는 Table 4에 나타내었다. N군의 체중 대비 간과 신장의 무게는 고지방식이로 비만을 유도했던 다른 군들에 비하여 유의하게 높았다. 이는 체중의 차이로 인한 결과로 고지방 식이군들의 체중이 N군에 비하여 높았던 데에서 기인한다. HFC군에 비하여 누에체액을 섭취한 다른 군들의 간과 신장 무게 간에는 유의한 차이를 보이지 않았다. 그러나 체중 대비 비장의 무게는 HFC군에 비해서 HFS-10군에서 유의적인 차이가 보였으나 HFS-10을 제외한 모든 군에서 유의한 차이를 보이지 않았다. 체중 대비 지방조직들의 무게는 Table 5에 나타내었다. 피하지방, 부고환 지방, 내장지방, 신장주위의 지방은 모두 N군에 비하여 고지방식을 섭취한 군들에서 유의하게 높았다. 누에체액을 섭취한 군들의 체지방 중 HFC군에 비하여 유의한 차이를 보였던 부위는 부고환과 총체지방이었다. 피하지방과 내장지방, 신장주위의 지방량은 통계적으로 유의한 차이를 나타내지 않았다. 부고환지방량은 HFC군에 비하여 누에체액을 1%와 5% 경구투여한 HFS-1와 HFS-10군에서 유의하게 적었다. 또한 네 부위의 지방량을 합한 총지방 무게는 누에체액 투여군들에서 유의하게 감소하였으나 누에체액 투여량에 따른 차이는 보이지 않았다.

AST와 ALT 활성 및 혈장 지질, insulin 및 leptin 농도 체중 감소가 간 독성 관련 변화에 의한 것인지 확인하기

Table 6. AST and ALT activities in plasma of mice treated with high fat diet and silkworm hemolymph for 12 weeks

Group	AST (IU/L)	ALT (IU/L)
NC	73.833 ± 16.952 ^{1)c2)}	26.000 ± 4.437 ^b
HFC	73.833 ± 14.470 ^c	24.889 ± 9.646 ^b
HFS-1	63.250 ± 25.361 ^{bc}	25.778 ± 11.720 ^b
HFS-5	42.833 ± 20.653 ^{ab}	14.000 ± 2.951 ^a
HFS-10	34.833 ± 19.813 ^a	11.833 ± 5.054 ^a
F-value	4.959 ^{**3)}	5.136 ^{**}

1) The results are mean ± SD for 6 mice in each group. 2) Mean values with the different letters in the same column are significantly different by Duncan's multiple range test at $\alpha = 0.05$. 3) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ by one way ANOVA

위해 AST 및 ALT 활성을 측정하였다 (Table 6). AST 및 ALT 활성은 N군과 HFC군 간에 차이를 보이지 않았으나 AST와 ALT 활성은 HFC군에 비하여 HFS-5와 HFS-10군에서 유의하게 낮았고, HFS-1군에서는 AST 활성이 통계학적 유의성이 보이지 않았다.

혈장 지질의 profile은 Table 7에 나타내었다. 혈장 triglyceride, total-cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, 모두 N군에 비하여 고지방 식이 섭취 군들에서 유의하게 높았으나, HFC군에 비하여 누에체액 투여군에서 유의한 변화를 보였던 것은 LDL-cholesterol로 국한되었다. LDL-cholesterol 농도는 HFC군과 비교하여 HFS-1, HFS-5, HFS-10 군에서 유의적으로 감소하였으며 이들 군 간의 차이는 보이지 않았다. 동맥경화지수 (atherogenic index)에

Table 4. Organ weight of mice treated with high fat diet and silkworm hemolymph for 12 weeks

Group	Organ weight (mg/g BW)		
	Liver	Kidney	Spleen
NC	37.917 ± 2.048 ^{1)b2)}	10.912 ± 0.723 ^b	2.034 ± 0.429
HFC	26.408 ± 2.152 ^a	8.000 ± 1.183 ^a	1.733 ± 0.328
HFS-1	28.830 ± 1.321 ^a	8.929 ± 1.220 ^a	2.022 ± 0.100
HFS-5	27.856 ± 1.811 ^a	8.174 ± 1.363 ^a	2.044 ± 0.448
HFS-10	28.326 ± 3.770 ^a	8.054 ± 1.021 ^a	2.507 ± 0.667
F-value	22.523 ^{***3)}	7.108 ^{***}	NS

1) The results are mean ± SD for 6 mice in each group. 2) Mean values with the different letter in the same column are significantly different by Duncan's multiple range test at $\alpha = 0.05$. 3) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ by one way ANOVA

Table 5. Adipose tissue mass of mice treated with high fat diet and silkworm hemolymph for 12 weeks

Group	Body fat (g/100g body weight)		
	Epididymal fat	Visceral fat	Total fat
NC	19.741 ± 1.528 ^{1)a2)}	7.440 ± 1.181 ^a	51.540 ± 4.884 ^a
HFC	59.073 ± 4.361 ^d	16.147 ± 3.599 ^b	165.084 ± 13.690 ^c
HFS-1	43.705 ± 11.843 ^b	14.984 ± 2.951 ^b	137.104 ± 34.399 ^b
HFS-5	54.808 ± 5.929 ^{cd}	13.388 ± 3.315 ^b	143.041 ± 18.427 ^b
HFS-10	47.388 ± 7.907 ^{bc}	12.949 ± 3.250 ^b	136.235 ± 27.163 ^b
F-value	27.180 ^{***3)}	7.552 ^{***}	23.024 ^{***}

1) The results are mean ± SD for 6 mice in each group. 2) Mean values with the different letter in the same column are significantly different by Duncan's multiple range test at $\alpha = 0.05$. 3) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ by one way ANOVA

Table 7. Plasma lipid profiles of mice treated with high fat diet and silkworm for 12 weeks

Group	TG ¹⁾ (mg/dL)	TC (mg/dL)	HDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)	AI ²⁾ (mg/dL)	LHR ³⁾ (mg/dL)
NC	76.433 ± 12.847 ⁴⁾⁵⁾	82.889 ± 5.568 ^a	46.376 ± 6.136 ^a	39.071 ± 1.829 ^a	0.818 ± 0.292	0.853 ± 0.091 ^c
HFC	101.189 ± 10.261 ^b	162.985 ± 28.416 ^b	92.608 ± 17.614 ^b	57.934 ± 9.551 ^c	0.767 ± 0.078	0.629 ± 0.031 ^b
HFS-1	98.833 ± 19.672 ^b	149.537 ± 27.388 ^b	92.781 ± 12.882 ^b	46.867 ± 6.527 ^b	0.610 ± 0.167	0.510 ± 0.071 ^a
HFS-5	97.049 ± 10.172 ^b	144.615 ± 16.218 ^b	81.278 ± 15.879 ^b	45.970 ± 5.246 ^{ab}	0.808 ± 0.194	0.575 ± 0.066 ^{ab}
HFS-10	92.057 ± 15.275 ^{ab}	139.473 ± 19.160 ^b	78.025 ± 9.614 ^b	47.047 ± 4.770 ^b	0.791 ± 0.162	0.612 ± 0.106 ^b
F-value	2.963 ⁶⁾	12.908 ^{***}	12.570 ^{***}	7.314 ^{***}	NS	16.953 ^{***}

1) TG: triglyceride, TC: total cholesterol, HDL: HDL cholesterol, LDL: LDL-cholesterol 2) AI (atherogenic index) = (total cholesterol - HDL cholesterol) / HDL cholesterol 3) LHR (LDL cholesterol / HDL cholesterol ratio) = LDL cholesterol / HDL cholesterol 4) The results are mean ± SD for 6 mice in each group. 5) Mean values with the different letters in the same column are significantly different by Duncan's multiple range test at $\alpha = 0.05$. 6) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ by one way ANOVA

Table 8. Plasma insulin and leptin levels of mice treated with high fat diet and silkworm hemolymph for 12 weeks

Group	Leptin (ng/mL)	Insulin (ng/mL)
NC	1.012 ± 0.268 ¹⁾²⁾	0.513 ± 0.288
HFC	3.103 ± 0.194 ^c	0.822 ± 0.306
HFS-1	2.521 ± 0.519 ^b	0.433 ± 0.093
HFS-5	2.669 ± 0.236 ^b	0.975 ± 0.553
HFS-10	2.522 ± 0.287 ^b	0.580 ± 0.278
F-value	36.547 ^{***3)}	NS

1) The results are mean ± SD for 6 mice in each group. 2) Mean values with the different letters in the same column are significantly different by Duncan's multiple range test at $\alpha = 0.05$. 3) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ by one way ANOVA

는 차이를 보이지 않았으나 심혈관계질환의 발생 위험요인으로 보고된 비²⁵ 있는 LDL/HDL비율 (LHR)은 HFC군에 비하여 HFS-1군에서 유의하게 낮았고 HFS-5군에서 감소하는 경향을 보여주었다.

혈장 insulin은 모든 실험군 간에 유의한 차이를 보이지 않았으나 혈장 leptin은 N군에서 가장 낮았고 HFC군에서 206% 증가하였으며 누에체액을 투여한 군들에서 유의하게 감소하였다 (Table 8).

고찰

비만한 사람은 인슐린 저항성과 체지방 대사 이상으로 인하여 제2형 당뇨, 고지혈증, 심혈관계질환, 고혈압, 특정 압등과 같은 질병으로 이환될 가능성이 크다.^{4,26} 그러므로 개인이나 사회에서의 비만 치료 및 관리를 위한 기능성 소재에 대한 요구는 매우 크다고 할 수 있다. 최근, 천연물을 이용한 대체요법이 비만 치료에 다양하게 응용되고 있는데 이러한 소재들은 임상적으로 나타날 수 있는 부작용이 적은 이점이 있으므로 많은 기능성 소재들에 대한 연구가 진행되어 발표되고 있다.

선행연구에 따르면 누에과 뽕잎은 혈당을 낮추는 소재로 알려져 있으며 작용기전으로는 이당류가수분해 효소의

활성 억제를 통해 소장 점막에서 흡수를 방해함으로써 그 효과를 나타내는 것으로 보고되었다.^{8-10,27} 누에분말은 α -glucosidase의 활성을 억제하였고 SGLT1 발현을 억제하여 소장 점막에서 포도당이 흡수되는 것을 방해하였다.¹² 본 연구에서는 열량비 45%의 고지방식으로 비만을 유도한 마우스에 누에체액을 투여했을 때 비만 치료 효과를 보일 수 있는지를 탐색하고자 하였다. 본 연구에서 사용한 비만 모델의 동물에서 누에체액의 투여로 인한 체중의 감소와 체지방의 감소를 볼 수 있었다. 또한 고지방식이만을 투여한 군에 비하여 누에체액을 투여한 모든 군에서 혈중 렙틴 수치가 유의하게 감소하여 식욕의 저하와 관련한 효과라 볼 수 있었다. 또한 체지방은 부고환지방과 총 체지방량이 감소하였다. 내장지방의 축적은 상당량의 유리지방산과 사이토카인, 호르몬 등을 간문맥으로 방출하여 간으로 유입되게 하여 간세포 및 다양한 면역세포에 영향을 준다.²⁸ 본 연구에서 비록 부위별 모든 체지방량에서 군간에 유의한 차이를 보여주지 않았지만 총 체지방량의 감소가 유의하게 관찰된 것으로 보아 누에체액은 식욕을 억제하여 체지방 감소를 유도하고 체중 감소를 초래한 것으로 풀이된다. 렙틴은 주로 지방조직에서 방출되는 호르몬으로 방출량은 대체로 체지방량에 비례하는 것으로 알려져 있다. 혈중 렙틴의 농도에 따라 식욕이 조절되고 에너지 소모에도 영향을 주는 것으로 알려져 있다.²⁹ Lin 등은 설치류를 대상으로 연구한 결과 지속적으로 고지방식을 섭취하게 하면 혈액의 렙틴 수치가 증가하여 렙틴저항성이 생긴다고 보고하였다.³⁰ 혈중 렙틴은 지방세포의 축적과 관련이 있는 것으로 알려져 있으며 혈청 렙틴 수치는 체중감소와 함께 감소하는 것으로 알려져 있다.^{31,32} 본 연구 결과 고지방식이만 섭취한 쥐들에 비하여 누에체액을 병행투여 받은 쥐들에서 총 체지방량의 유의한 감소와 함께 혈중 렙틴 수치가 낮아지는 것으로 보아 누에체액의 체지방 감소 효과를 고려할 수 있다.

아울러 고지방군에 비해 누에체액을 섭취한 군들에서

LDL-콜레스테롤 농도가 유의하게 감소되어 누에체액은 고콜레스테롤혈증을 치료하는 효능을 가진 소재가 될 수 있을 것으로 보인다. 총콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, triglyceride 등과 같은 혈청지질은 비만한 실험동물과 인체에서 유의하게 증가하므로^{21,22} 혈청지질 profile의 변화는 실험동물의 비만 정도와 관련을 지어 볼 수 있다.

본 연구에서는 비록 triglyceride의 농도에 유의한 차이를 보이지 않았지만 누에체액의 경구 투여로 LDL-콜레스테롤 혈중 농도가 고지방 대조군에 비하여 유의하게 감소하여 비만에 동반하는 이상지질혈증이나 고혈압 등의 증상을 예방할 수 있는 의미 있는 결과라 할 수 있다. LDL-콜레스테롤은 비만인의 심순환계 질환과 직접적인 연관성이 있어 위험요인으로 간주된다. Choi 등³³과 Choi 등¹⁶은 누에 체액이 햄스터 난소세포 (Chinese hamster ovary cells; CHO cells)의 세포사멸을 방지하여 CHO 세포를 안정적으로 유지함으로써 재조합 인체 조혈인자 (erythropoietin; EPO)의 생산성을 5~10배 증가시켰다고 보고 하였다. 누에체액에서 이 역할을 하는 성분은 30K protein (30Kc6)이었다. 선행 연구에서 누에단백질인 protein 30Kc6은 세포 내 reactive oxygen species (ROS)의 생성을 억제하여 산화된 저밀도 지단백에 의해 초래되는 세포사멸을 방지할 수 있다고 하였다.²⁰ 또한 30Kc6 protein을 섭취시켰을 때 토끼의 혈중 triglyceride, 총콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 등을 낮추어 동맥경화 증상을 개선시킴을 보고하였다.²⁰ 이러한 결과는 누에단백질이 동맥경화 질환의 치료제로도 사용될 수 있음을 시사한다.

본 연구에서는 누에체액의 투여가 동물의 체중감소와 LDL-콜레스테롤의 감소 뿐 아니라 HFS-5와 HFS-10군에서는 유의하게 혈청 aspartate transaminase (AST)와 alanine aminotransferase (ALT) 활성도 감소시켜 체지방 감소나 혈청지질 감소 효과가 간독성으로 나타난 결과는 아니라는 결론을 내릴 수 있어, 누에체액이 안전한 식용소재임을 알 수 있다. 결론적으로 누에체액은 렙틴 수치를 낮추어 식욕을 조절하고 체지방 축적을 억제하며 LDL-콜레스테롤 혈중 농도를 낮추는 등의 건강지향적이며 비교적 안전한 항비만 소재로서의 가능성을 보여주었다. 아울러 누에체액의 투여가 농도 의존적으로 항비만 지표의 결과 차이가 없는 것으로 보아 경제학적으로 가치가 있는 저용량의 누에체액인 1 mL/kg 농도에서도 항비만 효과가 있음을 알 수 있었다.

요 약

본 연구에서는 고지방식으로 유도한 비만 C57BL/6N 마

우스 모델에서 누에체액 투여가 마우스의 체중 감소 및 혈중 지질 개선 효과를 보이는지 평가하였다. 실험동물은 정상군 (N), 고지방대조군 (HFC), 누에체액투여군 (HFS-1, HFS-5, HFS-10)으로 분리하여 12주 동안 열량비 10% 지방식이나 45% 지방식을 섭취시키고 고지방식이 급여군들의 일부에 누에체액을 체중 대비 1%, 5%, 10% 경구투여 하였다. 그 결과 체중과 부고환지방 및 총지방의 무게가 유의하게 감소하였으며 혈장 LDL-cholesterol 농도가 고지방대조군 (HFC)군에 비하여 HFS-1, HFS-5, HFS-10군에서 유의하게 감소하였다. 혈중 ALT와 AST의 활성은 고지방대조군에 비하여 HFS-5, HFS-10 군에서 유의하게 저하되었고 누에체액을 투여한 모든 군에서 HFC군과 비교하여 혈장 leptin 수준이 유의하게 감소하였다. 비록 누에체액의 유효성분을 동정하고 그 특성을 규명하기 위해서는 더 많은 연구를 필요로 하지만 본 연구 결과는 누에체액이 비만을 예방할 수 있는 잠재적인 천연소재로서 가능성을 보여준다.

ORCID

남유리: <https://orcid.org/0000-0002-1258-4467>

고영은: <https://orcid.org/0000-0002-3893-1527>

이선영: <https://orcid.org/0000-0001-6813-8673>

References

1. Woods SC, Seeley RJ, Porte D Jr, Schwartz MW. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science* 1998; 280(5368): 1378-1383.
2. Weiser M, Frishman WH, Michaelson MD, Abdeen MA. The pharmacologic approach to the treatment of obesity. *J Clin Pharmacol* 1997; 37(6): 453-473.
3. Surwit RS, Kuhn CM, Cochrane C, McCubbin JA, Feinglos MN. Diet-induced type II diabetes in C57BL/6J mice. *Diabetes* 1988; 37(9): 1163-1167.
4. Antipatis VJ, Gill TP. Obesity as a global problem. In: Björntorp P, editor. *International Textbook of Obesity*. Chichester: John Wiley & Sons, Ltd.; 2001. p.3-22.
5. Asano N, Oseki K, Tomioka E, Kizu H, Matsui K. N-containing sugars from *Morus alba* and their glycosidase inhibitory activities. *Carbohydr Res* 1994; 259(2): 243-255.
6. Kimura T, Nakagawa K, Kubota H, Kojima Y, Goto Y, Yamagishi K, Oita S, Oikawa S, Miyazawa T. Food-grade mulberry powder enriched with 1-deoxynojirimycin suppresses the elevation of postprandial blood glucose in humans. *J Agric Food Chem* 2007; 55(14): 5869-5874.
7. Thaipitakwong T, Numhom S, Aramwit P. Mulberry leaves and their potential effects against cardiometabolic risks: a review of chemical compositions, biological properties and clinical

- efficacy. *Pharm Biol* 2018; 56(1): 109-118.
8. Miyahara C, Miyazawa M, Satoh S, Sakai A, Mizusaki S. Inhibitory effects of mulberry leaf extract on postprandial hyperglycemia in normal rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2004; 50(3): 161-164.
 9. Kim GN, Kwon YI, Jang HD. Mulberry leaf extract reduces postprandial hyperglycemia with few side effects by inhibiting α -glucosidase in normal rats. *J Med Food* 2011; 14(7-8): 712-717.
 10. Tsuduki T, Kikuchi I, Kimura T, Nakagawa K, Miyazawa T. Intake of mulberry 1-deoxynojirimycin prevents diet-induced obesity through increases in adiponectin in mice. *Food Chem* 2013; 139(1-4): 16-23.
 11. Ryu KS, Lee HS, Chung SH, Kang PD. An activity of lowering blood-glucose levels according to preparative conditions of silkworm powder. *J Seric Entomol Sci* 1997; 39(1): 79-85.
 12. Han J, Inoue S, Isoda H. Effects of silkworm powder on glucose absorption by human intestinal epithelial cell line Caco-2. *J Nat Med* 2007; 61(4): 387-390.
 13. Jung EY, Lee HS, Lee HJ, Kim JM, Lee KW, Suh HJ. Feeding silk protein hydrolysates to C57BL/KsJ-db/db mice improves blood glucose and lipid profiles. *Nutr Res* 2010; 30(11): 783-790.
 14. Okazaki Y, Kakehi S, Xu Y, Tsujimoto K, Sasaki M, Ogawa H, Kato N. Consumption of sericin reduces serum lipids, ameliorates glucose tolerance and elevates serum adiponectin in rats fed a high-fat diet. *Biosci Biotechnol Biochem* 2010; 74(8): 1534-1538.
 15. Xue R, Wang Y, Cao G, Pan Z, Zheng X, Zhou W, Gong C. Lowering the blood glucose of diabetes mellitus mice by oral administration with transgenic human insulin-like growth factor I silkworms. *J Agric Food Chem* 2012; 60(26): 6559-6564.
 16. Chan EW, Lye PY, Wong SK. Phytochemistry, pharmacology, and clinical trials of *Morus alba*. *Chin J Nat Med* 2016; 14(1): 17-30.
 17. Rhee WJ, Park TH. Silkworm hemolymph inhibits baculovirus-induced insect cell apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 271(1): 186-190.
 18. Choi SS, Rhee WJ, Park TH. Inhibition of human cell apoptosis by silkworm hemolymph. *Biotechnol Prog* 2002; 18(4): 874-878.
 19. Choi SS, Rhee WJ, Kim EJ, Park TH. Enhancement of recombinant protein production in Chinese hamster ovary cells through anti-apoptosis engineering using 30Kc6 gene. *Biotechnol Bioeng* 2006; 95(3): 459-467.
 20. Yu W, Ying H, Tong F, Zhang C, Quan Y, Zhang Y. Protective effect of the silkworm protein 30Kc6 on human vascular endothelial cells damaged by oxidized low density lipoprotein (Ox-LDL). *PLoS One* 2013; 8(6): e68746.
 21. Koo TY, Park JH, Park HH, Park TH. Beneficial effect of 30Kc6 gene expression on production of recombinant interferon- β in serum-free suspension culture of CHO cells. *Process Biochem* 2009; 44(2): 146-153.
 22. Thupari JN, Kim EK, Moran TH, Ronnett GV, Kuhajda FP. Chronic C75 treatment of diet-induced obese mice increases fat oxidation and reduces food intake to reduce adipose mass. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2004; 287(1): E97-E104.
 23. Yun SN, Moon SJ, Ko SK, Im BO, Chung SH. Wild ginseng prevents the onset of high-fat diet induced hyperglycemia and obesity in ICR mice. *Arch Pharm Res* 2004; 27(7): 790-796.
 24. Miller WC, Lindeman AK, Wallace J, Niederpruem M. Diet composition, energy intake, and exercise in relation to body fat in men and women. *Am J Clin Nutr* 1990; 52(3): 426-430.
 25. Morton GJ, Gelling RW, Niswender KD, Morrison CD, Rhodes CJ, Schwartz MW. Leptin regulates insulin sensitivity via phosphatidylinositol-3-OH kinase signaling in mediobasal hypothalamic neurons. *Cell Metab* 2005; 2(6): 411-420.
 26. Sullivan PW, Ghushchyan VH, Ben-Joseph R. The impact of obesity on diabetes, hyperlipidemia and hypertension in the United States. *Qual Life Res* 2008; 17(8): 1063-1071.
 27. Yatsunami K, Ichida M, Onodera S. The relationship between 1-deoxynojirimycin content and α -glucosidase inhibitory activity in leaves of 276 mulberry cultivars (*Morus* spp.) in Kyoto, Japan. *J Nat Med* 2008; 62(1): 63-66.
 28. Lafontan M, Girard J. Impact of visceral adipose tissue on liver metabolism. Part I: heterogeneity of adipose tissue and functional properties of visceral adipose tissue. *Diabetes Metab* 2008; 34(4 Pt 1): 317-327.
 29. Brennan AM, Mantzoros CS. Drug Insight: the role of leptin in human physiology and pathophysiology--emerging clinical applications. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2006; 2(6): 318-327.
 30. Lin S, Thomas TC, Storlien LH, Huang XF. Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24(5): 639-646.
 31. Scarpace PJ, Zhang Y. Leptin resistance: a predisposing factor for diet-induced obesity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2009; 296(3): R493-R500.
 32. Maffei M, Halaas J, Ravussin E, Pratley RE, Lee GH, Zhang Y, Fei H, Kim S, Lallone R, Ranganathan S, Kern PA, Friedman JM. Leptin levels in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. *Nat Med* 1995; 1(11): 1155-1161.
 33. Choi SS, Rhee WJ, Park TH. Beneficial effect of silkworm hemolymph on a CHO cell system: Inhibition of apoptosis and increase of EPO production. *Biotechnol Bioeng* 2005; 91(7): 793-800.