

The Preventive Effect of *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 and *Angelica gigas* Nakai Extract on Triton WR-1339-induced Hyperlipidemia

Kang Min Kim¹, Bo Seul Kim² and Jae Seon Kang^{2*}

¹Department of Pharmaceutical Science and Technology, Kyungsoong University, Busan 48434, Korea

²Department of Pharmacy, Kyungsoong University, Busan 48434, Korea

Received January 10, 2018 / Revised March 21, 2018 / Accepted March 22, 2018

The purpose of this study was to investigate the effects of *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 (*B. polyfermenticus* KJS-2) and *Angelica gigas* Nakai extracts (AGNE) on hyperlipidemia. The purity of the major decursin and decursinol angelate (D/DA) in the AGNE were analyzed at 78%. Increased concentrations of AGNE (0.1-20 mg/ml) showed a higher 3-hydroxy-3-methylglutaryl (HMG)-CoA reductase inhibition activity. Endospore-forming *B. polyfermenticus* KJS-2 (1×10^9 CFU/ml) exhibited good bile tolerance (0.3 mm) on an agar plate. An animal study was carried out using different groups, including a normal control, positive control (atorvastatin), negative control (triton WR-1339), AGNE group, *B. polyfermenticus* KJS-2 group, AGNE + *B. polyfermenticus* KJS-2 group, and Atorvastatin + AGNE + *B. polyfermenticus* KJS-2 group to determine the effect of hyperlipidemia. There were no significant changes in body weight, kidney weight, or liver weight except for the liver weight of the triton WR-1339-treated group. Groups with AGNE and *B. polyfermenticus* KJS-2 had increased HDL-cholesterol and decreased total cholesterol and triglycerides. The liver histopathological results also showed that all AGNE and *B. polyfermenticus* KJS-2-treated groups contained lower fat accumulation in the liver tissues. The findings of this study verified that AGNE and Endospore-forming *B. polyfermenticus* KJS-2 combination materials have a hyperlipidemic effect.

Key words : *Angelica gigas* Nakai, *Bacillus polyfermenticus* KJS-2, decursin, decursinol angelate, hyperlipidemia

서론

과량의 콜레스테롤(cholesterol) 섭취 또는 지질대사의 이상으로 체내 아포지질단백질(apolipoprotein)과 지질의 복합체인 지단백질에 포함된 총 콜레스테롤, 중성지방, low density lipoprotein (LDL)-콜레스테롤과 같은 혈중 지질의 수치가 기준치보다 증가하거나 정체되어 관상 동맥질환의 위험이 증가된 상태를 고지혈증이라 한다. 최근 서구화된 식습관의 변화로 인한 고 열량식, 인스턴트 음식 등의 섭취는 증가하는 반면, 운동부족으로 인한 비만의 발생이 높아지며 생활수준의 향상에 비례해서 고지혈증의 증가율이 매우 높아졌다[6]. 통계청의 국가통계포털(Korean Statistical Information Service) 한국 복지 패널 조사 보고에 의하면 우리나라 고지혈증 환자는 2007년도 27%, 2008년도 28%, 2009년도 33%, 2010년도 30%, 2011년도 32%, 2012년도 40%, 2013년도 48%로 증가하는 것으로

나타났으며[21], 20대부터 70대까지 뿐만 아니라, 10-18세 청소년에서도 고지혈증의 유병률은 남아 25.2%, 여아 21.7%로 보고되고 있다[19]. 고지혈증은 이제 흔한 질병이고, 환자가 늘어날 전망이다. 따라서 고지혈증의 적절한 예방과 치료를 위한 대책이 필요하다. 고지혈증 치료의 목표는 혈중 지질수치를 낮추는 것으로 식이요법, 생활습관 개선과 약물요법이 있다. 고지혈증 치료제에 사용되는 치료제는 크게 콜레스테롤 생합성 저해제와 흡수억제제, 대사·배설 촉진제가 있으며, 나이아신(Niacin), 담즙산 결합수지(Bile acid sequestrants), CETP 저해제(Cholesteryl ester transfer protein inhibitor), ACAT 저해제(Acyl-CoA cholesterol acyltransferase inhibitor), 프로부콜(Probucol), 피브레이트계(Fibrate), 스타틴계(Statin)약물 등이 있다[18, 19, 24, 29].

당귀는 미나리과(Umbelliferae)에 속하는 유용 식물자원으로 우리나라에서 생산되는 참당귀 또는 토당귀(*Angelica gigas* Nakai), 중국당귀(*Angelica acutiloba* Kitagaw)와 일본당귀(*Angelica sinensis* Diels)로 한국, 중국 그리고 일본에서 생산되는 한방 생약제 중의 하나이며, 다양한 약리학적 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 당귀는 특히 부인과 질환에 많이 사용되며, 대표적으로는 빈혈치료, 진정작용, 진통효과, 면역증강작용, 항산화 작용, 관절염치료, 항암작용, 알코올 대사 촉진작용 및 간질환 개선작용 등이 있다[13, 20]. 참당귀의 뿌리, 줄기에

*Corresponding author

Tel : +82-51-663-4882, Fax : +82-51-663-4809

E-mail : jskang8551002@ks.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.

는 쿠마린(Coumarin)계의 decursin, decursinol, decursinol angelate, nodakenetin, nodakenin, umbelliferone, α -pinene, β -sitosterol 등이 함유되어 있으며, 주성분은 pyranocoumarin 계열의 decursin과 decursinol angelate 이고, 국내산 참당귀에서 decursin과 decursinol angelate의 성분 비율은 6:4 정도로 알려져 있다[13]. Kim [12] 등은 참당귀에서 분리한 decursin 이 소장과 간에서의 콜레스테롤 흡수와 방출을 조절하는 ACAT 효소 저해활성을 나타낸다고 하였으며 동맥경화나 고지혈증을 예방할 수 있다고 하였다.

B. polyfermenticus KJS-2는 일본 TOA제약에서 판매되고 있는 'Bispan'으로부터 분리하여 등록번호 KCCM10769P로 한국미생물보존센터에 종균을 기탁하였다. *B. polyfermenticus* KJS-2는 다양한 소화효소를 분비하며, 포자를 생성함으로써 섭취 시 소화관에 매우 안정하다. 또한, 비타민과 유산을 생성하며, 대사산물로 macrolactin A, 7-O-malonyl macrolactin A, 7-O-succinyl macrolactin A 및 macrolactin E 등의 macrolactin 화합물을 생산한다[2, 10]. 또한 Kim [14] 등은 *B. polyfermenticus* KJS-2의 probiotic로서의 생화학적 특성에 대하여 확인을 하였다.

본 연구에서는 사용한 70% 에탄올로 추출 및 농축한 참당귀 정제물과 포자가 형성된 *B. polyfermenticus* KJS-2를 이용하여 생화학적 분석과 조직의 병리학적 검사를 통하여 고지혈증 방어효과에 대하여 확인하였다.

재료 및 방법

시약 및 기기

경상남도 함양군 지리산의 참당귀는 심마니 산삼영농조합(Hamyang, Korea)에서 구입하였으며 경성대학교 약학대학에 소장된 표본번호는 No. 17-01-AG이다. 주정 에탄올은 식음용으로 ㈜우리주정(Busan, Korea)에서 구입하여 사용하였다. Decursin 및 decursinol angelate 표준물질은 한국식품의약품안전처에서 분양 받아 참당귀 추출물의 순도 확인에 사용하고, 분석용 acetonitrile, methanol 및 water은 Duksan Chemical Co. Ltd (Ansan, Korea)로부터 구입하였다. 실험 중 사용된 기기로는 rotary-vacuum evaporator는 Buchi R-205 (Flawil, Switzerland)를 이용하고 HPLC는 Agilent 1200 series HPLC system (Agilent Technologies, Santa Clara, USA), 검출기는 HPLC Photo-Diode array UV/Vis detector, 컬럼은 Agilent Zorbax XDB-C18 (4.6 mm \times 150 mm, 5 μ m particle size)의 Agilent Technologies (Santa Clara, USA)를 사용하였다.

균주 배양에 사용된 Bacto™ Tryptic Soy Broth (TSB)와 Bacto™ Agar (TSA)는 Dickinson and company (Becton, USA)에서 구입하여 사용하였다. Potassium phosphate, Sodium chloride, Potassium chloride, Manganese (II) sulfate monohydrate, Potassium phosphate, Magnesium sulfate, Calcium

chloride, Bile extract porcine 및 모든 사용된 시약은 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, USA)에서 구입하여 사용하였으며 배양기는 Seyoung scientific Co. (Bucheon, Korea)사를 이용하였다.

참당귀의 추출 및 농축물 제조

참당귀 뿌리부분을 물로 세척 후, 80°C 열풍건조기에 수분 함량이 5% 이하로 되도록 dry tray (Vision, Kyungki-do, Korea)에서 건조하고 분쇄기를 이용하여 당귀 분말을 만들었다. 당귀분말 10 g에 40 ml의 60% 주정에탄올을 첨가하여 진탕 추출을 2-3회 반복하여 추출액을 받았다. 이후 rotary evaporator를 이용하여 농축을 시켰으며, 다시 에탄올(100 ml)을 첨가하여 주성분을 녹이고 -20°C에서 24시간 냉동 침전하여 상등액을 농축하는 단계를 3회 반복하여 주고, 마지막 농축액에는 증류수(100 ml)를 첨가하여 가열한 후 상등액을 제거해주는 과정을 3회 반복하여 정제하였다. 정제된 농축액은 다시 100% 에탄올을 이용하여 완전히 용해시킨 후 상등액만 취하여 열풍건조기에서 건조시킨 후 rotary evaporator로 농축하여 최종 decursin/decursinol angelate (D/DA)의 함량이 높은 참당귀 추출 정제 농축물을 얻었다.

참당귀 추출물의 유효성분 함량 분석

분석용 HPLC로는 Agilent 1200 series HPLC system (Agilent Technologies, USA), 검출기는 UV/Vis detector, 컬럼은 Zorbax XDB-C18 column (4.6 mm \times 150 mm, 5 μ m particle size, Phenomenex, USA)을 사용하였고 이동상은 ethanol:distilled water in 0.1% formic acid=1:1를 이용하였다. 이동상의 유속, 컬럼온도, 검출파장은 각각 1 ml/min, 30°C, 329 nm이며 이러한 분석 조건으로 농축물의 D/DA를 추출물에서의 순도를 확인하였다[13].

HMG-CoA reductase activity 분석

당귀 농축물의 HMG-CoA reductase activity 억제를 확인하기 위해 HMG-CoA reductase activity assay kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)를 이용하였으며 양성대조군은 pravastatin을 사용하였다. 실험에 사용된 참당귀 농축물(AGNE)의 농도는 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 및 20 mg/ml로 하여 확인하였다.

B. polyfermenticus KJS-2의 endospore 형성 배양 및 확인

B. polyfermenticus KJS-2의 endospore 형성은 Choi [3] 등의 방법에 따라 TSB에 Potassium phosphate, Sodium chloride, Potassium chloride, Manganese (II) sulfate monohydrate, Potassium phosphate, Magnesium sulfate 및 Calcium chloride를 첨가한 배지를 배양기를 이용하여 150 rpm으로 37°C에

서 48시간 동안 배양하여 endospore를 형성하였다. Endospore 균수 측정은 80°C에서 2시간 동안 열처리 후 총 0.1% 펄프수로 희석하여 최적 온도에서 배양 후 콜로니형성단위 (colony forming unit)를 확인하였다[7]. 또한, 미생물의 포자는 malachite green 염색으로 하여 endospore 형성 유무를 현미경(DP-70, Olympus, Tokyo, Japan)으로 확인하였다.

B. polyfermenticus KJS-2의 담즙산 분해

담즙산 분해능 시험은 Dashkevich와 Feighner [4]의 agar plate assay 방법을 이용하여 확인 하였다. TSA 배지에 0.5% bile extract와 0.5% oxgall을 첨가하여 한천배지평판을 만들고 paper disc를 배지 위에 올린 후 *B. polyfermenticus* KJS-2 20 µl (1×10^9 CFU/ml)를 paper disc에 접종하고 37°C에서 3일간 배양하여 paper disc주위에 형성된 투명환을 육안으로 관찰하였다.

지질대사 효과 확인을 위한 실험동물

본 연구는 경성대학교의 실험동물윤리위원회의 승인을 받은 후 규정에 따라 실행하였으며(승인번호: 2014-07A), 실험동물로는 7주령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 효창사이언스(Daegu, Korea)에서 구입하여 1주일 동안 적응 시킨 후에 실험을 진행하였다. 체중을 동일하게 분류하여 무균 사육 장치 내에서 사육조건은 온도 22 ± 2 °C, 습도 50-60%로 유지시키고 명암주기는 12시간(09:00~21:00)으로 자동 조절 하였다. 각 군마다 각각 7마리의 실험동물을 배정하고 5% tween 80 및 20% ethanol 1 ml 경구 투여군(Normal control군, NC), triton WR-1339 300 mg/kg/body weight를 복강 투여한 군(Positive control 군, TP), 5% tween 80 및 20% ethanol 1 ml에 atorvastatin 0.167 mg/kg/body weight 를 용해시켜 경구 투여한 군(Negative control군, AN), 5% tween 80 및 20% ethanol 1 ml에 AGNE 7.5 mg/kg/body weight를 용해시켜 경구 투여한 군(AGNE 투여군, AGNE), 5% tween 80 및 20% ethanol 1 ml에 *B. polyfermenticus* KJS-2 5×10^4 CFU/kg/body weight 를 용해시켜 경구 투여한 군(*B. polyfermenticus* KJS-2 투여군, BP), 5% tween 80 및 20% ethanol 1 ml에 AGNE 및 *B. polyfermenticus* KJS-2 를 용해시켜 투여한 군(AGBP), 5% tween 80 및 20% ethanol 1 ml에 atorvastatin, AGNE 및 *B. polyfermenticus* KJS-2 를 용해시켜 투여한 군(ABA)로 나누어 실험을 진행하였다. AGNE 및 BP의 고지혈증에 대한 예방효과를 확인하기 위하여 투여는 NC 및 TP군은 1주일 동안 5% tween 80 및 20% ethanol 1 ml을 1일 1회 경구 투여하고 이 중 TP군만 1주일 후 saline에 triton WR-1339 mg/kg/body weight를 1일 1회 복강 투여하였다. 다른 모든 군들은 1주일 동안 1일 1회씩 atorvastatin, AGNE 및 *B. polyfermenticus* KJS-2를 실험군에 맞게 경구 투여하고 1주일 후 triton WR-1339를 1일 1회 복강 투여하고 다음 날 몸무게를 측정하였다. 몸무게 측정 후

ethyl ether로 마취하여 심장채혈법으로 채혈한 후 lipid profile을 아산제약 kit (Asan Pharmaceutical, Seoul, Korea)를 사용하여 총콜레스테롤, 중성지방, 고밀도 지단백 콜레스테롤(HDL-콜레스테롤)를 측정하기 위하여 24 wells plate를 이용하여 흡광도 540 nm에서 효소면역측정기 ELISA microplate reader (ELX 800, BioTek Instrument Inc., Winooski, USA)로 확인하였다. 채혈 후 장기를 적출하고 무게를 측정하였다.

조직학적 검사

혈액 채취 후, 각 군의 실험동물의 간을 절취하여 optimal cutting temperature compound (OCT compound)에 고정시켜 동결조직 block을 만들었으며, -70°C에서 동결 한 후 냉동조직절편기(Cryostat cryocut microtome)을 이용하여 4-6 µm의 두께로 미세 절단을 하여 냉동 절편을 제작하였다. 냉동 절편되어 있는 슬라이드는 Oil Red O powder를 99% isopropanol solution에 포화용액(60°C 보관)을 염색 직전에 증류수와 6:4의 비율로 혼합한 용액을 whatman filter paper #2, England로 여과한 Oil Red O 용액에서 염색을 시행하였는데 물에 수세한 간 조직 슬라이드를 넣고 10분간 염색하고 70% isopropanol에 3분간 탈색한 후, 흐르는 물에서 5분간 수세하고 hematoxylin solution (Sigma, USA)에 30초간 염색한 후 흐르는 물로 수세하여 현미경(DP-70, Olympus, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복으로 진행하여 평균치와 표준편차로 나타내었고, 통계 프로그램은 Microsoft office excel 2010 (Microsoft, USA)를 사용하였다. 유의차 검증은 분산분석(Analysis of variance ANOVA)을 한 후, $p < 0.05$ 수준에서 Student's *t*-test에 의해 유의성을 분석하였다.

결과 및 고찰

고지혈증치료제는 콜레스테롤의 생합성 저해제, 흡수 억제 및 대사, 배설 촉진제가 있으며, 종류로는 니아신(Niacin), 피브레이트계(Fibrate), 스타틴계(Statin), 오메가-3 지방산(Omega-3) 및 ezetimibe 등이 있다[30]. 하지만, LDL-콜레스테롤, 총콜레스테롤, 중성지방감소에 효과에 우수한 단일제 및 복합제 제품은 많이 있지만 그 효과는 우수하지 못하며 부작용 또한 많이 있어 신중히 투여하여야 된다[8]. 참당귀 추출물은 고혈당에서의 혈당강하 효과를 확인하였고, 그 기전은 AMP-activated protein kinase (AMPK) 및 glucose transporter activator 작용으로 확인을 하였다[22]. 고혈당은 중성지방으로 전화되는 특성이 있으므로 참당귀 추출물을 이용하여 지방에 대한 감소효과를 확인하였다. *Bacillus polyfermenticus* SCD의 경우는 인체 내에서 복용 시 혈액 내에서 중성지방 감소 및 콜레스테롤 합성 억제를 밝혔다[1, 9]. 따라서 *B. poly-*

fermenticus KJS-2에 의한 지질대사 억제와 혈중지질 감소효과와 더불어 참당귀추출물의 중성지방 감소 효과를 병용요법에 의한 효과를 규명하고자 하였다.

이번 연구에서는 기존의 사용 약물인 atorvastatin, 천연물인 참당귀를 사용하여 추출 정제한 AGNE, 그리고 중균 등록한 *B. polyfermenticus* KJS-2를 사용하여 총콜레스테롤 감소효과, LDL-콜레스테롤 감소효과, 중성지방 감소효과 그리고 high density lipoprotein (HDL)-콜레스테롤 증가를 동시에 가지는 효과에 대하여 확인을 하였다.

참당귀 추출물의 D/DA 확인

당귀는 오래전부터 특히 부인과 질환에 많이 사용되며, 대표적으로는 빈혈치료, 진정작용, 진통효과, 면역증강작용, 항산화작용, 관절염치료, 항암작용, 알코올 대사 촉진작용 및 간질환 개선작용 등이 있다[13, 15, 16]. 또한, 동맥경화나 고지혈증을 예방할 수 있다고 되어 있다[12]. 본 연구에서는 복합물중 하나인 참당귀로부터 높은 유효성분 함량을 가지는 추출물을 다음과 같이 얻었다. 본 저자는 이전 연구에서 참당귀로부터 recycle HPLC를 이용하여 순도 약 95%의 순수한 decursin 및 decursinol angelate를 확보하였다[13]. 이 D/DA의 표준품을 토대로 검량선을 작성하여 60% 에탄올로 추출한 AGNE의 유효성분인 D/DA의 순도를 확인한 결과 약 78%를 확인하고 본 실험에 이용하였다[17].

AGNE의 HMG-CoA reductase 저해능 분석

고지혈증 치료에 있어서의 약물 기전 중 AGNE의 HMG-CoA reductase 활성 억제 효과를 평가하기 위하여 HMG-CoA reductase assay를 실시하였다(Fig. 1). HMG-CoA reductase 저해제인 양성대조군인 pravastatin (74.12%)는 Virginia [28] 등의 결과와 유사하게 나타났으며 효과는 약하지만 HMG-

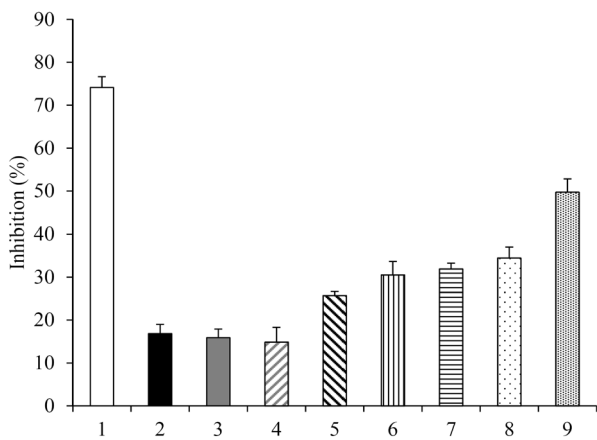


Fig. 1. HMG-CoA reductase inhibition of AGNE. 1: pravastatin, AGNE (2: 0.1 mg/ml, 3: 0.2 mg/ml, 4: 0.5 mg/ml, 5: 1.0 mg/ml, 6: 2.0 mg/ml, 7: 5.0 mg/ml, 8: 10.0 mg/ml, 9: 20.0 mg/ml).

CoA reductase 활성 억제능이 AGNE의 용량이 증가(0.1 mg/ml:16.84%, 0.2 mg/ml:15.88%, 0.5 mg/ml:14.86%, 1 mg/ml: 25.7%, 2 mg/ml:30.52%, 5 mg/ml:31.9%, 10 mg/ml:34.46%, 20 mg/ml:49.74%) 할수록 증가됨을 알 수 있었다. 이 결과는 Kim [12] 등의 연구에서 acyl-CoA:Cholesterol acyltransferase 저해 활성을 확인하였을 때, D/DA가 높은 저해활성을 가졌던 것처럼, 이번 연구도 마찬가지로 높은 D/DA의 함량을 가진 AGNE는 고지혈증 치료제로써 유용하게 사용될 수 있음을 한번 더 시사한다.

***B. polyfermenticus* KJS-2의 endospore 형성 및 담즙산 분해능**

기존의 유기 합성 물질의 고지혈증 치료제와 더불어 천연물 유래의 물질의 중요성이 높아지고 있다. 또한, 유산균의 여러 중요한 작용 중 총콜레스테롤 감소효과가 있는 많은 연구 결과가 있다[5, 23]. 본 저자는 *B. polyfermenticus* KJS-2로부터의 대사산물 중 항바이러스, 항염증, 항균성, 항암효과가 있는 macrolide계열인 macrolactin A, 7-O-malonyl macrolactin A, 7-O-succinyl macrolactin A 및 macrolactin E를 생산하는 것을 확인하였다[10, 11]. Macrolide계열 약물 중 macrolactin A와 F가 acetyl-CoA에서 시작되는 콜레스테롤이 합성되는 과정 중 farnesyl pyrophosphate가 squalene으로 전환되는 단계를 촉매하는 효소인 squalene synthase를 억제함을 보고 하였다[1]. 배양된 *B. polyfermenticus* KJS-2를 80°C에서 2시간 동안 열처리 후 총균수를 확인한 결과 약 1.4×10⁹ CFU/ml로 확인이 되었으며, malachite 염색에 의해서도 양성을 확인하였다. Fig. 2에서의 결과와 같이 macrolide계열의 대사물질을 생산하는 *B. polyfermenticus* KJS-2도 마찬가지로 0.5%(w/v) bile extract 및 oxgall이 첨가된 TSA배지에 접종하여 3일간 배양한 결과 약 0.3 mm 이하의 clear zone이 측정 되었다.

실험동물의 체중, 간 및 신장조직의 무게

급성 고지혈증을 유발하여 콜레스테롤 및 중성지방 연구를 진행하는데 사용한 약물로는 triton WR-1339가 이용하여 실험

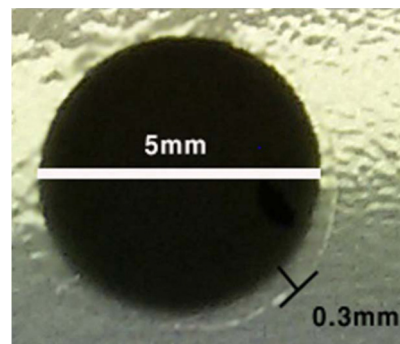


Fig. 2. The bile salt hydrolase activity of *B. polyfermenticus* KJS-2. Arrows showed clear areas surrounding the bacterium.

Table 1. Body, liver and kidney weights of control and triton WR-1339 induced hyperlipidemic rats

Groups	Body weight (g)	Relative organs weight (g) (organ/100 g body weight)	
		Liver	Kidney (Right)
NC	321.47±16.17	13.14±1.01	1.48±0.23
TP	342.12±14.21	16.89±0.85*	1.49±0.19
AN	339.14±10.08	14.81±2.48	1.52±0.25
AGNE	399.14±13.74	14.77±1.55	1.43±0.11
BP	365.40±10.12	14.23±0.87	1.51±0.08
AGBP	358.28±9.37	14.57±2.19	1.53±0.40
ABA	361.12±12.66	14.34±3.45	1.51±0.32

All values are mean ± SD (n=7).

*Significantly different from the NC group (p<0.05).

을 진행하였다. Triton WR-1339은 주사 후 일시적인 대사 장애로 콜레스테롤의 합성이 증가되어 간에 과다하게 축적되는 결과를 나타내어 단기간의 예방효과를 평가하는데 이용된다 [25]. 이번 연구에서도 triton WR-1339를 이용하여 급성 고지혈증을 유발 후 AGNE 및 *B. polyfermenticus* KJS-2 효과를 확인하였다. 실험 1주일 후 각 군별로의 몸무게, 간 및 신장 무게는 Table 1과 같으며, 각 군별로의 몸무게 및 신장 무게는 triton WR-1339 투여와는 상관없이 모든 군에서 유사한 결과를 나타내었다. 하지만, 신장의 무게는 triton WR-1339만 투여 된 TP 군에서는 유의성 있게 증가되었고 NC군과 비교하여 대체적으로 증가함이 확인되어 triton WR-1339에 의해 일시적인 대사 장애로 인해 간에서의 콜레스테롤이 축적이 되었음을 예상할 수 있을 것이다.

실험동물에서의 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 및 중성 지방 함량

Fig. 3은 실험 1주일 후 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 및 중성지방수치를 나타낸다. NC군과 TP군을 비교하였을 때, TP군의 총 콜레스테롤이 529.01±25.81 mg/dL로 NC군의 74.67±25.81 mg/dL의 약 7배 증가한 것으로 보아 triton WR-1339에 의한 급성 고지혈증이 유발되었음을 나타낸다(Fig. 3). 모든 군에서 총 콜레스테롤 수치는 유사한 수치를 나타냈는데 AN군(98.67±22.14 mg/dL), AGNE군(98.01±15.47 mg/dL), BP군(110.67±10.21 mg/dL), AGBP군(109.67±26.72 mg/dL) 및 ABA군(127.67±24.52 mg/dL)으로 확인되어 그 중 AGNE 단독 투여군에서 가장 많이 감소하였다(Fig. 3). 중성지방도 마찬가지로 TP군에서는 NC군과 비교 시 TP군(982.21±21.36 mg/dL)과 NC군(71.21±1.54 mg/dL)로 약 11배가 증가되어 급성 고지혈증 유발이 이루어졌음을 재확인 할 수 있고 TP군의 중성지방과 모든 군의 중성지방 수치를 비교 시 AN군(281.02±14.57 mg/dL), AGNE군(176.67±18.57 mg/dL), BP군(171.03±5.98 mg/dL), AGBP군(277.24±6.24 mg/dL) 및 ABA

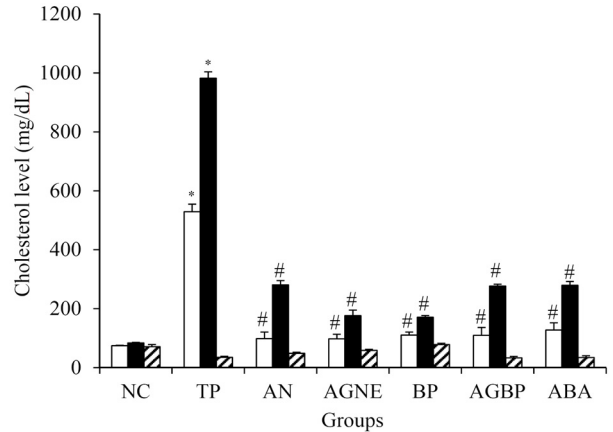


Fig. 3. Total cholesterol, triglycerides and HDL-cholesterol of rats. All values are mean ± SD (n=7). *#Significantly different from the NC and TP groups (p<0.05).

군(227.67±12.89 mg/dL)로 약 4-6배가 감소하였음을 알 수 있다(Fig. 3). 거의 모든 군에서의 감소된 중성지방 수치를 보였고, 그 중에서 AGNE군과 BP군의 감소가 가장 높았다. HDL-콜레스테롤 같은 경우는 TP군(35.21±3.24 mg/dL)에서 NC군(71.21±7.14 mg/dL)과 비교 시 약 50%가 감소함을 알 수 있고 TP군을 기준으로 AN군(48.67±3.58 mg/dL), AGNE군(58.50±3.66 mg/dL), BP군(78.33±4.57 mg/dL), AGBP군(33.24±4.98 mg/dL) 및 ABA군(34.25±5.87 mg/dL)로 약 1-2배 증가함을 확인하였다(Fig. 3). 이번 결과로써 rat에서 총 콜레스테롤, 중성지방이 증가하고, HDL-콜레스테롤이 감소함으로써 급성

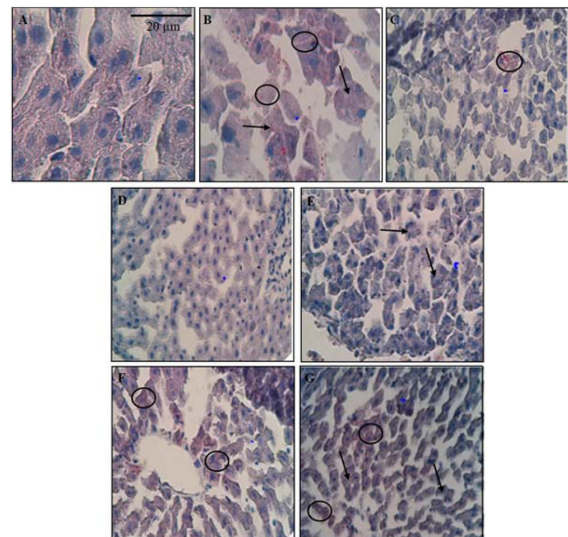


Fig. 4. The effect of AGNE and *B. Polyfermenticus* KJS-2 on rat liver tissue. Arrows showed small, irregular lipid vacuoles in the cytoplasm. Lipid droplets (round) show red color. (A) NC group, (B) TP group, (C) AN group, (D) AGNE group, (E) BP group, (F) AGBP group, (G) ABA group.

고지혈증 증세가 뚜렷하게 나타났으며, 급성 고지혈증이 유발된 실험동물 rat의 혈액분석을 통해 ABA군의 결과에 의해 총콜레스테롤과 중성지방의 감소 및 HDL-콜레스테롤을 증가시키는 효과가 있음을 나타낸다. 따라서, 현재 시판되고 있는 statin계 물질, AGNE 및 *B. polyfermenticus* KJS-2의 3중 복합제를 이용한다면, 고지혈증 관련 질환 관련 의약품 개발로도 충분히 가능성이 있음을 시사한다.

조직학적 분석

Rat의 간 조직을 Oil red O 염색으로 염색하여 관찰한 결과, 정상 조직의 NC군에서는 대부분의 세포의 핵이 간세포의 가운데에 위치해 있으며 붉은색으로 염색된 지방은 관찰되지 않았다. 이때, 붉은색 착색이 많을수록 지질이 많이 침착되어 있음을 의미한다[26]. 음성대조군인 TP군에서는 붉은색으로 착색된 부분이 많았으며 지방의 침윤으로 인해 세포의 핵이 한쪽으로 많이 치우쳐있음을 알 수 있다. 양성대조군인 AN군에서는 세포의 핵은 가운데 위치하였지만, 붉은색으로 착색된 조직 지방은 조금 관찰이 되었다. 나머지 AGNE군은 NC군과 거의 유사한 형태를 보였으며 BP군, AGBP군, ABA군 모두 붉은색으로 침착된 부분이 조금 보였지만 거의 모든 군에서는 AN군과 유사함을 확인 할 수 있었다. 이 결과로 AGNE와 *B. polyfermenticus* KJS-2의 고지혈증 치료제로써 가능성이 있음을 알 수 있다.

감사의 글

이 논문은 2017학년도 경성대학교 학술연구비에 지원에 의하여 연구되었음.

References

- Choi, S. W., Bai, D. H., Yu, J. H. and Shin, C. S. 2003. Characteristics of the squalene synthase inhibitors produced by a *Streptomyces* species isolated from soils. *Can. J. Microbiol.* **49**, 663-668.
- Cho, M. S. 2010. Production optimization of spore and macrolactin A from *Bacillus polyfermenticus* KJS-2. Master. dissertation, Inje university, Kimhae, Korea.
- Choi, S. M., Park, M. H., Jung, T. S., Moon, K. H., Kim, K. M. and Kang, J. S. 2011. Characterization of *Bacillus mojavensis* KJS-3 for industrial applications. *Arch. Pharm. Res.* **34**, 289-298.
- Dashkevich, M. P. and Feighner, S. D. 1989. Development of a differential medium for bile salt hydrolase-active *Lactobacillus* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 11-16.
- Getachew, T. 2016. A review on effects of probiotic supplementation in poultry performance and cholesterol levels of egg and meat. *J. World Poult. Res.* **6**, 31-36.
- Ha, T. H. 2013. Effects of ephedra herba ethyl-acetate fraction (EEAF) on hyperlipidemic mice. Ph. D. dissertation, Dong-eui University, Busan, Korea.
- Jun, K. D., Kim, H. J., Lee, K. H., Paik, H. D. and Kang, J. S. 2002. Characterization of *Bacillus polyfermenticus* SCD as a probiotic. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **30**, 359-366.
- Kang, J. S., Ji, Y. H., Lee, S. H., Kim, B. S., Ha, S. M., Kim, D. H. and Hong, Y. G. 2006. Pharmaceutical composition for treating hyperlipidaemia. Korea patent 10-1658350.
- Kang, J. S., Jun, K. D., Kim, W. S., Jo, W. S., Kwon, J. Y. and Moon, K. H. 2004. Antibacterial Activities of *B. polyfermenticus* SCD against pathogenic bacteria and effects on animals and humans. *Yakhak Hoeji* **48**, 70-74.
- Kim, D. H., Kang, K. R., Kim, H. W., Yoon, S. Y., Kim, C. G., Yamaguchi, T., Kyung, S. J. and Kang, J. S. 2010. Structure determination of macrolactin compounds with antibacterial activities isolated from *Bacillus polyfermenticus* KJS-2. *J. Life Sci.* **20**, 1792-1800.
- Kim, D. H., Kim, H. K., Kim, K. M., Kim, C. K., Jeong, M. H., Ko, C. Y., Moon, K. H. and Kang, J. S. 2011. Antibacterial activities of macrolactin A and 7-O-succinyl macrolactin A from *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 against vancomycin-resistant enterococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Arch. Pharm. Res.* **34**, 147-152.
- Kim, G. S., Park, C. G., Jeong, T. S., Cha, S. W., Baek, N. I. and Song, K. S. 2009. ACAT (Acyl-CoA:cholesterol Acyltransferase) inhibitory effect and quantification of pyranocumarin in different parts of *Angelica gigas* Nakai. *J. Appl. Biol. Chem.* **52**, 188-194.
- Kim, K. M., Jung, J. Y., Hwang, S. W., Kim, M. J. and Kang, J. S. 2009. Isolation and purification of decursin and decursinol angelate in *Angelica gigas* Nakai. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* **38**, 653-656.
- Kim, K. M., Kim, M. J., Kim, D. H., Park, Y. S. and Kang, J. S. 2009. Characterization of *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 as a probiotic. *J. Microbiol. Biotechnol.* **19**, 1013-1018.
- Kim, K. M., Kim, T. H., Park, Y. J., Kim, I. H. and Kang, J. S. 2009. Evaluation of the genotoxicity of decursin and decursinol angelate produced by *Angelica gigas* Nakai. *Mol. Cell. Toxicol.* **5**, 83-87.
- Kim, K. M., Lee, Y. J., Hong, Y. G. and Kang, J. S. 2009. Oral acute and subacute toxicity studies of decursin and decursinol angelate of *Angelica gigas* Nakai. *Mol. Cell. Toxicol.* **5**, 153-159.
- Kim, K. M., Seo, J. L. and Kang, J. S. 2014. Decursin and decursinol angelate affect spermatogenesis in the adult rat at oral administration. *Mol. Cell. Toxicol.* **10**, 83-89.
- Kim, M. K., Kwon, B. M., Bae, K. H., Choi, D. H. and Lee, H. J. 1999. Screening of Acyl-CoA:cholesterol acyltransferase (ACAT) inhibitors from natural sources. *Kor. J. Pharmacogn.* **30**, 384-396.
- Kim, S. H., Ahn, B. C., Joung, H. J. and Park, M. J. 2012. Lipid profiles and prevalence of dyslipidemia in Korean adolescents. *Endocrinol. Metab.* **27**, 208-216.
- Kim, W. T. 2012. Effect of *Angelica gigas* Nakai extract on hepatic damage in rats. Master. dissertation, Kyung-sung university, Busan, Korea.

21. Korea Institute for Health & Social Affairs. Korean Statistical Information Service. The statistics of DT_33109_A206, http://kosis.kr/statHtml/statHtml.do?orgId=331&tblId=DT_33109_A206&conn_path=I3
22. Ok, S., Lee, J. H., Kim, I. H. and Kang, J. S. 2011. Glucose transporters and AMP-activated protein kinase modulation effects of decursin and decursinol angelate on diabetic rats. *Yakhak Hoeji* **55**, 301-308.
23. Ooi, L. G. and Liong, M. T. 2010. Cholesterol-lowering effects of probiotics and prebiotics: A review of *in vivo* and *in vitro* findings. *Int. J. Mol. Sci.* **11**, 2499-2522.
24. Park, H. Y. 2000. Hyperlipidemia. *Kor. J. Med.* **59**, 596-599.
25. Park, I. S., Ahn, S. H. and Kim, J. T. 1997. Accumulation of lipid including cholesterol in murine hepatocytes with hyperlipidemia induced by Triton WR-1339. *Dongguk J. The Institute of Oriental Medicine* **6**, 107-115.
26. Song, H. G. and Lee, H. 2011. The Effects of persicae semen herbal-acupuncture at GB34 (Yangneungcheon) on a rat model of hyperlipidemia. *J. Kor. Med.* **32**, 151-163.
27. Tsai, C. C., Lin, P. P., Hsieh, Y. M., Zhang, Z. Y., Wu, H. C. and Huang, C. C. 2014. Cholesterol-lowering potentials of lactic acid bacteria based on bile-Salt hydrolase activity and effect of potent strains on cholesterol metabolism *in vitro* and *in vivo*. *Scientific World Journal* **2014**, 690752.
28. Virginia, A., Rachmawati, H., Riani, C. and Retnoningrum, D. S. 2016. Study of HMG-CoA reductase inhibition activity of the hydrolyzed product of snakehead fish (*Channa striata*) skin collagen with 50 kDa collagenase from *Bacillus licheniformis* F11.4. *Sci. Pharm.* **84**, 81-88.
29. Xie, L., Li, J., Xie, L. and Bourne, P. E. 2009. Drug discovery using chemical systems biology: identification of the protein-ligand binding network to explain the side effects of CETP inhibitors. *PLoS Comput. Biol.* **5**, e1000387.
30. Yu, B. Y., Kim, Y. S. and Yoo, B. W. 2012. Management of dyslipidemia in primary care. *Kor. J. Fam. Pract.* **2**, 98-103.

초록 : *Bacillus polyfermenticus* KJS-2와 참당귀 추출물의 triton WR-1339 유발 고지혈증에 대한 예방효과

김강민¹ · 김보슬² · 강재선^{2*}

(¹경성대학교 제약공학과, ²경성대학교 약학과)

이번 연구의 목표는 *Bacillus polyfermenticus* KJS-2 (*B. polyfermenticus* KJS-2) 및 *Angelica gigas* Nakai extracts (AGNE) 추출물의 고지혈증에 대한 효과를 확인 하기 위한 것이다. AGNE에 활성을 나타내는 성분인 decursin과 decursinol angelate (D/DA)의 순도를 확인하였을 때 약 78%로 나타났다. AGNE (0.1-20 mg/ml)를 이용한 HMG-CoA reductase 저해활성은 농도가 증가함에 따라 높은 활성을 나타내었다. Endospore를 형성한 *B. polyfermenticus* KJS-2 (1×10^9 CFU/ml)는 약 0.3 mm의 담즙산이 함유된 배지에서 내성이 관찰되었다. Normal control, positive control (atorvastatin), negative control (triton WR-1339) 및 AGNE, *B. polyfermenticus* KJS-2, AGNE + *B. polyfermenticus* KJS-2와 Atorvastatin + AGNE + *B. polyfermenticus* KJS-2투여군의 7개군으로 나누어 실시한 동물실험에서는 몸무게 및 간의 무게는 거의 차이가 없었으나, 신장의 무게는 triton WR-1339만 처리한 군에서 조금 높게 나타났다. *B. polyfermenticus* KJS-2 및 AGNE를 투여는 HDL-콜레스테롤은 증가시키고, 총콜레스테롤 및 중성지방 함량은 감소시켰다. 또한, 간조직 내에서의 지방 축적 정도를 확인한 결과 *B. polyfermenticus* KJS-2 및 AGNE투여군에서는 지방 염색의 감소가 나타나 지방의 축적이 감소하였음을 알 수 있다. 따라서, *B. polyfermenticus* KJS-2 및 AGNE는 고지혈증에 효과가 있음을 시사한다.