

현쥐에서 감귤과피 추출물의 알코올성 지방간 개선 작용

김주연¹ · 최인욱² · 노상규^{1*}

¹국립창원대학교 식품영양학과

²한국식품연구원

Protective Effect of *Citrus unshiu* Peel Extract on Ethanol-Induced Fatty Liver in Rats

Juyeon Kim¹, In-wook Choi², and Sang Kyu Noh^{1*}

¹Dept. of Food and Nutrition, Changwon National University, Gyeongnam 641-773, Korea

²Korea Food Research Institute, Gyeonggi 463-746, Korea

ABSTRACT This study investigated whether or not *Citrus unshiu* peel extract (CPE) affects fat accumulation in livers of rats fed an ethanol-containing liquid diet. Initially, male Sprague-Dawley rats were housed individually in stainless steel, wire-bottomed cages with free access to a Lieber-Decarli control liquid diet. Rats were divided by body weight into three groups of eight each: one group of rats was fed the Lieber-Decarli control liquid diet devoid of ethanol (control), another was fed the Lieber-Decarli ethanol diet (ethanol), and third was fed the same ethanol diet except containing CPE. All three groups were fed their respective diets for 6 weeks. Serum and liver lipids were analyzed and liver histology performed. Body weight did not differ among the groups over the 6-wk duration. Histology images showed that CPE administration significantly improved fat accumulation in livers, which was induced by ethanol diet. Serum levels of transaminases and lipids also were reduced by CPE consumption. Taken together, the results indicate that CPE may protect ethanol-induced fatty liver by lowering fat accumulation in both the liver and blood. The protective effects of CPE appear to be due to its phenolic contents.

Key words: alcoholic fatty liver, cholesterol, citrus peel extract, rat, triglycerides

서 론

음주는 오랫동안 인류의 고유한 식문화로 발전되어 왔으나 현대사회에서 과잉섭취로 인한 음주 관련 환자의 증가는 전 세계적으로 커다란 사회문제가 아닐 수 없다. 우리나라도 음주로 인한 환자 치료 및 교육비 부담이 증가하는 추세이며 (1), 음주 관련 질병을 억제하거나 도움이 되는 생리활성물질 연구가 어느 때보다 주목받고 있다.

알코올성 지방간(alcoholic fatty liver)은 과음으로 인해 중성지방이 간 조직에 축적되는 질환이다(2). 알코올은 당대사와 지방대사에 영향을 미쳐 간세포의 NADH/NAD⁺ 비율과 지방 합성에 필요한 전구체 증가를 유도하여 중성지방의 합성은 증가시키고 분해는 감소시킨다(2-5). 또한 과잉 생산된 아세트알데히드는 간세포의 주요 단백질과 지질의 기능을 약화시켜 단백질 합성 감소와 중성지방 축적을 유도하며 간세포 손상을 일으킨다(3-5). 지속적으로 알코올에 노출 시, 지방간은 간염, 간경변증, 간암으로 발전하기도 한다

(2-6).

감귤(*Citrus unshiu*)은 우리나라를 비롯한 동남아에서 재배되는 대표적인 겨울철 과수이다. 2009년 통계에 따르면 연간 생산량이 약 72만 톤으로 전체 과실 중 30%를 차지하여 1인당 연간 소비량이 약 14.8 kg에 이른다. 감귤은 비타민 C, 유기산, 당류 등의 일반 성분 외에 플라보노이드, carotenoids, coumarins, phenylpropanoids, limonoids 등의 생리적으로 활성을 띠는 약 60여종의 활성물질을 함유하며, 이 중에는 감귤 특유의 hesperidin, naringin, tangeretin, mobiletin 등도 다량 있다(7). 감귤의 껍질에도 carotenoids, bioflavonoids, terpenes류 등이 풍부한 것으로 조사된다(8). 이러한 성분들은 혈액 LDL 콜레스테롤 상승을 억제하고 HDL 콜레스테롤은 증가시켜 순환기계 질환을 예방하고 개선하는 데 효과가 있는 것으로 알려졌으며(9-12), 항산화작용(13,14), 항암 효과(15), 항염증 효과(16) 등이 보고된 바 있다. 또한 감귤 과육과 과피 플라보노이드 성분의 지질 대사 억제작용과 항산화작용에 의해 알코올의 간조직 손상이 완화된다는 보고도 있다(10,13,14).

이러한 감귤은 식품산업에 있어서 대부분이 감귤 주스나 감귤을 원료로 한 음료에 주로 사용되고 있으나 과즙으로서의 효율성이 약한 과피는 연간 15만 톤 이상이 부산물로

Received 21 November 2013; Accepted 29 November 2013

*Corresponding author.

E-mail: sknolog@changwon.ac.kr, Phone: +82-55-213-3516

남기 때문에(17), 감귤과피를 이용한 효율적 이용이 어느 때보다 요구되는 실정이다. 이에 본 연구는 흰쥐를 이용하여 최근 다양한 생리활성 함유료 주목받고 있는 감귤과피 추출물(citrus peel extract)의 지속적인 공급이 알코올 과다 공급으로 유도한 지방간의 지방 축적에 어떤 영향을 미치는지 조사하기 위하여 설계되었다.

재료 및 방법

동물사육

실험동물은 8주령의 수컷 Sprague-Dawley rat(Harlan Sprague Dawley, Inc., (주)중앙실험동물, Seoul, Korea)으로 국립창원대학교 식품영양학과 동물사육실에서 항온항습장치를 이용하여 실내온도 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $55\pm 5\%$ 로 유지하였고 12시간 간격의 명암주기 환경에서 개인별 케이지로 자유롭게 공급된 증류수와 AIN-93G 표준식으로 실험식이 공급 시까지 사육하였다. 난괴법으로 8마리씩 3군으로 나누어 7일 동안 Lieber-DeCarli 액체 표준식에 적응시켰다. Lieber-DeCarli 액체 표준식을 공급받는 동물군을 대조군(control), 대조군 표준식의 탄수화물 대신에 에탄올에 의한 열량 보충으로 대조군과 동일한 열량의 액체식을 공급받는 동물군을 에탄올군(ethanol), 에탄올군과 동일한 식이와 감귤박 추출물을 마리당 1 mL 혼합한 액체식을 공급받는 동물군을 감귤과피 추출물군(CPE)으로 정하였다. 저농약 친환경 감귤껍질을 한국식품연구원(Korea Food Research Institute)에서 개발된 분리기술로 추출한 추출물을 실험에 이용하였다. 동물사육에 사용된 Lieber-DeCarli 액체식이(Diet Inc., Bethlehem, PA, USA)는 지방간을 효과적으로 유도하기 위해서 corn oil을 첨가하여 지방의 함량이 상향 조정된 식이다(18). 대조군의 식이는 열량의 41.4%를 지방, 18.1%를 단백질, 39.3%를 탄수화물에서 공급받았으며, 에탄올군의 식이는 지방과 단백질은 대조군의 것과 같으며 탄수화물을 3.43%로 줄이는 대신 에탄올에서 35.8%의 열량이 공급되도록 조성되었다(Table 1). 이러한 조건 하에서 각각의 액체식을 매일 70 mL씩 6주 동안 지속적으로 공급하였다. 또한 동물의 체중 변화량을 측정하기 위해서 2주마다 각 동물의 체중을 측정하였다.

감귤껍질 추출물 및 주요 성분 분석

건조한 감귤과피 분말에 20배 용량(w/v)의 70% 에탄올을 첨가한 후 극초음파장치(VCX 750, Sonics and Materials Inc., Newtown, CT, USA)를 이용, 30°C 에서 20분간 추출하였다. 추출 후 원심분리(8,000 rpm, 10분) 하여 고형분과 상등액을 분리하였으며, 추출액에 동량의 hexane을 첨가하여 carotenoids 등 지용성 성분을 제거하였다. 지용성 성분 제거 후 40°C 에서 rotary evaporator(R205, Buchi, Fostfach, Switzerland)를 이용해 농축하였다. 용매를 제거하고 남은 추출물은 물로 재추출하여 수용성의 narirutin을

Table 1. The composition of Lieber-DeCarli liquid diet¹⁾

Ingredient	Amount (g/L)		
	Control	Ethanol	CPE
Casein	41.4	41.4	41.4
L-Cystine	0.5	0.5	0.5
DL-Methionine	0.3	0.3	0.3
Corn oil	15.7	15.7	15.7
Olive oil	28.4	28.4	28.4
Safflower oil	2.7	2.7	2.7
Maltose dextrin	99.2	8.7	8.7
Cellulose	10.0	10.0	10.0
Mineral mix	8.8	8.8	8.8
Vitamin mix	2.5	2.5	2.5
Choline bitartrate	0.5	0.5	0.5
Xanthan gum	3.0	3.0	3.0
Ethanol (mL)	—	67.0	—
Citrus peel extract (mL)	—	—	14.3

¹⁾Basal diet was formulated and supplied from Dyets Inc. (Bethlehem, PA, USA) according to the recommendations of the AIN.

용출하였으며, 여기서 불용성인 hesperidin을 분리하였다. 분리된 hesperidin은 증류수를 넣어 현탁시킨 후 NaOH를 첨가하여 pH 11.3으로 조정하여 완전히 녹였다. 다시 HCl을 첨가하여 pH 7.0으로 조정하고 12°C 로 냉각하여 여과하였다. 여과 후 남은 고형분은 동결건조 하여 감귤과피 90% 이상의 순도를 가진 hesperidin을 획득하였고, 물 추출물은 ethyl acetate를 첨가하여 층 분리 후 감압농축기로 ethyl acetate 층의 용매를 제거하고 동결건조 하여 순도 70%의 narirutin을 획득하였다. 본 연구에서는 hesperidin fraction(95% hesperidin)과 narirutin fraction(70% narirutin, 12% narirutin)을 일반적인 감귤과피에 함유된 조성에 맞춰 4:1로 혼합하여 최종적으로 액상의 형태로 본 실험에 사용하였고, 이러한 과정을 통해 순도를 향상시킨 hesperidin과 narirutin의 함량은 HPLC(Waters 2545, Waters Corp., Milford, MA, USA)를 이용하여 분석하였다(19). Table 1의 Lieber-DeCarli 액체식에는 매일 실험동물에 제공된 양(1 mL)이 약 449 μg 의 hesperidin과 약 105 μg 의 narirutin이 함유되어 있다.

혈청 지방간 지표성분 분석

동물 혈액의 지질 농도 및 지방간 주요 표지자의 변화를 6주 동안 살펴보기 위하여, 안구혈액채취법(retro-orbital sinus bleeding)으로 Lieber-DeCarli 액체식을 공급하기 직전(0주), 3주, 6주째 시점에서 12시간 공복 혈액을 채취하였다. 혈청 총콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 그리고 중성지방 농도는 효소적 방법((주)아산제약, Seoul, Korea)으로 측정하였다. 혈청의 alanine transaminase(ALT)와 aspartate transaminase(AST)의 활성 측정은 Reitman-Frankel 법을 이용하여 측정하였고, alkaline phosphatase(ALP)의 활성은 kit((주)아산제약)을 이용하여 측정하였다.

간 조직 관찰(hepatic histology)

지방간 증상 정도 측정을 위한 간 조직 관찰은 동결절편기(Leica CM 1850, Heidelberg, Germany)와 광학-형광 현미경(Leica DM6000B)을 이용하였다. 6주째에 각 그룹에서 평균 체중에 가장 근접한 동물의 간 조직을 이용하였다. 간은 적출하여 급 동결시킨 후 5 µm 두께로 잘라 Hema-toxylin(Invitrogen Corp., Camarillo, UK)과 Eosin(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 염색을 실시하였다. 간 조직의 지방구를 확인하기 위하여 Oil-Red-O(Sigma-Aldrich Co.)로 염색하여 광학-형광현미경(Leica DM6000B)으로 관찰하였다.

간 지질성분 분석

간의 지질은 chloroform : methanol(v/v, BHT 151.3 µmol/L) 혼합 유기용매 방법으로 추출하였으며(20), 유기용매 휘발 후(N-EVAPTM 111, Organomation Associates Inc., Berlin, MA, USA) 총지방량을 측정하였다. 간의 총지방 추출을 통한 주요 지방은 분획칼럼(aminopropyl solid phase column: Bond Elut NH₂, Varian Sample Preparation Products, Harbor City, CA, USA)과 추출장치(VAC ELUT SPS 24, Varian, Sao Paulo, Brazil)를 이용하여 분획하였다(21,22). 17:0과 에스테르 결합된 콜레스테롤, 중성지질, 인지질을 표준물질(internal standard)로 간 총지질 추출물과 혼합한 후, hexane, hexane : chloroform : ethyl-acetate(100:5:5, v/v/v), chloroform : methanol : acetic-acid(100:2:2, v/v/v), methanol : chloroform : water (10:5:4, v/v/v)의 용매를 이용하여 콜레스테롤, 중성지방, 인지질을 순서대로 분획하였다. 분획한 지방질의 각 지방산

분석은 GC를 이용하여 Folch 등(20) 및 Slover와 Lanze (23)의 방법에 따라 측정하였다. 메틸화된 지방산의 분리 및 계산은 같은 분석조건의 표준 지방산(Nu-Chek Prep Inc., Elysian, MN, USA)과 비교하여 DB-23(50%-cyanopropyl-methyl polysiloxane; 0.15 µm, 0.2 mm; 60 m, Agilent Technologies, Inc., Wilmington, DE, USA)로 장착된 GC(model GC 7890A, Agilent Technologies, Inc.)를 이용하여 측정하였다.

통계 및 결과 처리

실험의 결과들은 평균치와 표준편차(means±SD)로 나타내었고, 분석결과는 SPSS program software(version 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 분산분석(ANOVA)으로 검증한 후, P<0.05 수준에서 Duncan의 다중 범위검정으로 비교, 분석하여 각 동물군 간의 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

체중 변화

6주 동안 hesperidin과 narirutin이 다량 함유된 감귤과피 추출물이 실험동물의 체중 증가에 미치는 영향은 Table 2에 정리하였다. 대조군과 실험군 모두 실험이 시작된 시점부터 종료시점인 6주째까지 지속적인 체중증가율을 보였다. 그리고 알코올을 공급받은 동물군인 에탄올군과 감귤과피 추출물군의 체중 증가는 대조군과 비교하여 실험 2주째부터 6주째까지 유의적으로 감소한 것으로 나타났으나 이 두 동물군 사이에는 유의적인 차이가 없었다. 지속적인 알코올

Table 2. Changes in the mean body weights and serum and hepatic levels of triglycerides, cholesterols, transaminases, and other alcoholic fatty liver-related biomarkers of rats fed a diet containing either ethanol (ethanol) or ethanol plus citrus peel extract (CPE), compared with pair-fed controls¹⁾⁻³⁾

Biomarkers	Control	Ethanol	CPE
Body weights (g)			
0 week	349.5±25.04	330.8±20.89	333.5±16.31
6 weeks	458.4±22.51 ^a	395.5±12.07 ^b	395.4±13.73 ^b
Serum			
Triglyceride, mg/dL	94.95±14.34 ^a	77.60±6.45 ^b	56.10±7.27 ^c
Total cholesterol, mg/dL	69.07±7.20 ^b	93.61±10.23 ^a	83.53±11.58 ^a
HDL-cholesterol, mg/dL	45.06±6.98 ^b	58.69±6.11 ^a	54.41±9.19 ^a
Non-HDL cholesterol, mg/dL	24.01±3.51 ^b	34.92±7.44 ^a	29.12±7.05 ^{ab}
ALT, U/L	38.18±5.86 ^c	90.53±9.35 ^a	54.78±9.84 ^b
AST, U/L	6.80±2.12 ^c	29.93±8.06 ^a	17.30±3.18 ^b
ALP, K-A	30.15±4.03 ^b	46.88±8.87 ^a	28.86±8.31 ^b
γ-GTP, U/L	2.16±0.53 ^b	4.56±1.32 ^a	3.75±1.15 ^{ab}
Liver			
Total cholesterol, µmol/g	10.15±0.90 ^c	21.40±2.62 ^a	17.19±3.70 ^b
Total lipid, mg/g	213.97±13.50 ^c	340.60±49.73 ^a	288.57±46.90 ^b
Weight, g	11.19±1.15	10.55±0.69	10.45±0.72

¹⁾Values are means±SD, n=8.

²⁾Values in a row not sharing a common superscript differ significantly (P<0.05).

³⁾Abbreviations used: ALT, alanine transaminase; AST, aspartate transaminase; ALP, alkaline phosphatase; γ-GTP, gamma-glutamyl transpeptidase.

섭취로 인한 일련의 체중감소 현상은 알코올 산화시스템에서의 ATP 생성의 저하가 원인일 수 있으며(24), 식이섭취량 감소에 따른 영양결핍 현상을 배제시킨 Lieber와 Decarli (25)의 연구와 Nam 등(26)의 연구에서도 알코올을 투여한 군에서 유사한 체중감소 현상이 나타난다고 보고하였다. 이와 유사하게 본 연구에서도 나타난 알코올을 공급받은 에탄올군과 알코올식이에 감귤과피 추출물을 첨가해서 공급받은 감귤과피 추출물군의 지속적인 체중감소 현상은 6주간 공급한 알코올의 영향으로 인한 소화율 대사의 변화, 영양소의 흡수율 변화 등으로 인한 영양소의 불충분한 흡수 때문으로 판단되며 이러한 영향으로 대조군의 약 86.3%에 준하는 체중을 형성한 것으로 생각된다.

혈청 지질과 지방간 주요 표지자의 농도 변화

6주 동안 감귤과피 추출물의 공급이 혈액의 중성지방과 콜레스테롤 농도, 지방간 표지자 그리고 간의 총지방 함량에 미치는 영향은 Table 2와 같다. 6주째 나타난 혈중 중성지방 농도는 알코올 섭취에 의한 영향으로 대조군에 비해 유의적으로 감소하였으며 에탄올군에 비해 감귤과피 추출물 투여군에서 더욱더 유의적으로 감소하여, 감귤과피 투여에 의한 혈액의 중성지질 농도가 억제된 것으로 나타났다. 혈청의 총 콜레스테롤 농도는 대조군에 비해 알코올을 섭취한 두 동물군의 각각의 수치가 유의적으로 증가하였으나, 에탄올만 투여 받은 동물군과 감귤과피 추출물을 함께 제공받은 동물군 간의 비교에서는 유의적인 차이 없이 억제되는 경향만 보였다. HDL-콜레스테롤과 non-HDL 콜레스테롤 농도도 대조군에 비해 에탄올군과 감귤과피 추출물 투여군의 유의적인 증가가 나타났으나 감귤과피 추출물에 의한 유의적인 영향 없이 감소하는 경향만 보였다. 간 조직의 총지방 함량(total lipid, mg/g)은 대조군과 비교해서 6주간의 지속적인 알코올 투여로 알코올 투여군의 수치는 약 59% 이상 유의적으로 증가하였고 이에 비해서 알코올 투여군과 같은 양의 알코올식이와 함께 감귤과피 추출물을 투여 받은 동물군에서는 중성지질 함량이 급격히 감소하여 대조군 수준으로 감소하였다. 또한 간 조직의 콜레스테롤 수치도 약 110% 이상 유의적으로 증가하였고 6주간의 지속적인 감귤과피 투여에 의해서 대조군 수준에는 미치지 못했으나 유의적으로 감소하는 경향을 보였다.

간은 유입되는 혈액의 지방산을 이용하여 중성지방을 합성하고 필요시에는 중성지방을 혈액으로 방출하기도 하는데, 장기간의 알코올 섭취에 의한 간조직의 손상은 중성지방의 간의 유출을 억제하여 혈액순환계의 중성지방 및 기타 지방의 농도를 낮추고 동시에 간의 조직 축적으로 유도하는 것으로 알려졌다(27). 이와 유사하게 본 연구에서 나타난 알코올 동물군의 혈중 중성지질 농도 감소는 간 조직의 손상으로 인한 혈액으로의 중성지방 및 콜레스테롤 유출 및 간의 제거 기능 저하로 판단된다. 한편 감귤과피 추출물을 공급받은 동물군의 혈액 중성지방 및 콜레스테롤 농도가 각

각 대조군에 비해 유의적으로 감소한 결과는 naringin을 하루에 약 200 mg/kg 농도의 식이로 5주간 섭취시킨 결과 혈액의 중성지질 수치를 감소시킨다는 Jung 등(28)의 연구결과와 5주간의 naringin 공급이 혈중 중성지질의 농도를 대조군에 비해 30%까지 감소시킨다고 보고한 Kim 등(29)의 연구결과들을 고려해 볼 때, 본 연구의 혈액 중성지질과 콜레스테롤 억제현상은 상당히 일치하는 것으로 생각된다. 이는 감귤과피 추출물에 포함된 대표적인 항산화성 플라보노이드 성분인 hesperidin과 narirutin이 소장 분해 및 흡수 차원에서의 억제와 각종 영양소의 장 분해 후 변으로의 배설 증가(30), 또한 흡수 후 간의 중성지방 합성기능도 억제한다는 점을 고려해 볼 때(31), 감귤과피 추출물에 다량 함유된 플라보노이드 성분들이 혈액과 간 조직의 지질을 감소시킨 것으로 생각된다.

6주째 나타난 간 조직 손상과 관련된 지방간 표지자 중 ALT, AST, ALP의 혈중 농도는 대조군에 비해 에탄올군에서 각각 137%, 340%, 56%로 급격히 유의적으로 증가하였으나 감귤과피 추출물의 공급으로 인해 대조군에 준한 수준으로 유의적으로 감소하는 경향을 보였다. 특히 ALT의 혈중 농도는 에탄올군과 비교하여 감귤과피 추출물을 공급받은 동물군은 추출물 섭취로 약 65% 이상 감소하였다(Table 2). 혈중 γ -GTP 농도는 에탄올군에서 유의적으로 증가하였고 감귤과피 추출물 섭취로 감소하는 경향은 보였으나 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다. 간 조직 손상의 지표로 이용되는 혈중 ALT, AST, ALP 활성이 대조군에 비해 에탄올군에서 증가된 것은 알코올에 의한 간 조직의 손상 때문이며 감귤과피 추출물의 공급으로 효소활성이 낮아진 것은 Shin 등(32)의 연구에서와 같이 플라보노이드 성분이 항산화작용으로 에탄올대사 과정에서 생기는 활성산소의 독성을 감소시킴으로써 에탄올에 의한 세포손상을 억제하였기 때문이라 판단된다. 이는 플라보노이드 성분이 에탄올에 의한 간 손상을 억제시킨다는 Park 등(33)의 연구와 Yoon 등(34)의 연구결과와 일치한다 할 수 있으며 결론적으로 감귤과피 추출물의 섭취는 간 조직 손상을 완화할 수 있는 것으로 생각된다.

광학현미경을 통한 조직병리학적 관찰

지방간 증상을 육안으로 직접 판단하기 위해 Oil-Red-O 시약으로 염색하여 조직학적 분석을 실시하였다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 대조군의 간에서는 간세포질에 축적된 지방구의 크기가 작고 고루 펼쳐져 있으며 그 양이 적었으나, 6주간 알코올을 섭취한 에탄올군의 간에서는 지방구의 크기가 급격히 늘어난 것을 확인할 수 있었다. 이와 비교하여 6주간 감귤과피 추출물을 알코올식이와 함께 섭취한 군의 간조직 사진에서는 에탄올군에 비해 축적되는 지방구의 양과 크기가 확연히 감소된 것을 확인할 수 있었으며, 이는 Table 2에서 나타난 바와 같이 간의 총 지방함량(mg/g liver)도 대조군이 213.97 ± 13.50 mg/g, 에탄올군이 340.60

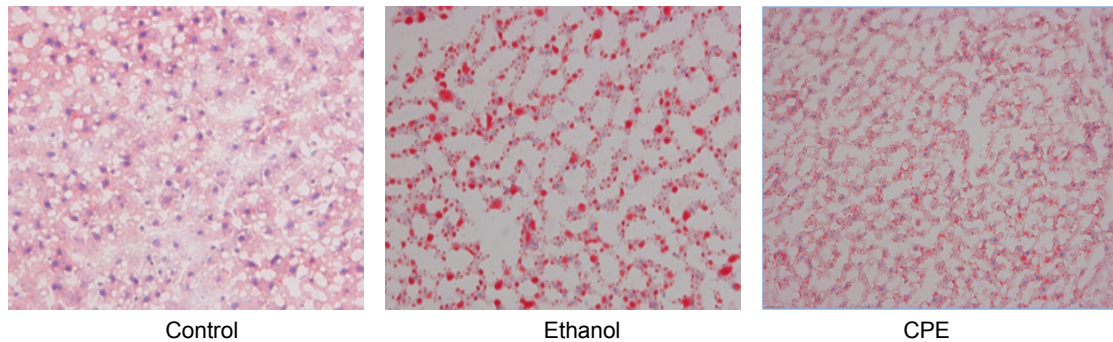


Fig. 1. Liver histology of rats fed a diet containing either ethanol (ethanol) or ethanol plus citrus peel extract (CPE), compared with pair-fed controls (Hematoxylin & Eosin stain, ×200).

±49.73 mg/g, 감귤과피 추출물 투여군이 288.57±46.90 mg/g으로 나타난 점을 고려해 볼 때, 감귤과피 추출물이 간 조직에서의 지방축적을 유도한 것으로 조직학적으로 확인할 수 있었다. Moon 등(35)은 알코올을 투여한 군에서는 지방구가 증가하는 반면 감귤 추출물을 함께 투여한 군에서는 지방구의 축적이 완화되었다고 보고하였고, Seo 등(36)은 알코올만 투여한 군에 비해 naringin을 함께 투여한 군에서 간세포에 축적되는 지방구의 함량이 유의적으로 낮은 것으로 보고하였다. 본 연구에서도 감귤과피 추출물에 함유된 다양한 플라보노이드 성분이 알코올을 섭취한 동물의 간지질 함량을 개선하여 간 조직 지방질 축적에 긍정적인 효과를 보인 것으로 사료된다.

간의 주요 지방의 지방산 함량

6주 동안 감귤과피 추출물의 공급이 간조직의 주요 지방(콜레스테롤, 중성지방, 인지질)을 구성하는 주요 지방산의 구성에 미치는 영향은 Table 3과 같다. 간 조직의 총지질 함량은 대조군에 비해 에탄올군에서 유의적으로 급격히 증가하였고, 에탄올군에 비해 감귤과피 추출물 투여군에서는 대조군 수준으로 유의적으로 감소하였다(Table 2). 이와 관련하여 총지질을 구성하는 주요 지방에 에스테르화된 지방산의 함량을 조사하기 위하여 먼저 주요 지방 분획을 실시하였다. 6주간의 에탄올 공급을 통해 주요 지방으로 에스테르화된 지방산은 중성지방 분획에서 가장 두드러지게 유의적으로 증가하였으며, 그중 팔미트산(16:0), 올레산(18:1), 리놀렌산(18:2)이 가장 높은 농도로 증가됨을 알 수 있었다. 이들 주요 지방산들은 콜레스테롤이나 인지질 분획에서도 중성지방 분획과 유사한 양상으로 유의적으로 현저히 증가됨을 확인하였다. 팔미트산(16:0), 올레산(18:1), 리놀렌산(18:2)이 동물군에 공급된 액체식이의 주요 식이성 지방질(corn oil, olive oil, safflower oil)을 구성하는 주요 지방산임을 간주해 볼 때, 식이를 통해 유입된 이들 식이성 지방산들이 간의 주요 지방에 축적됨을 알 수 있었다. 이들 지방산의 농도는 6주간의 감귤과피 추출물 투여에 의해서 대부분의 지방산이 유의적으로 감소되었으며, 이들 지방산중 식이성 지방산들(팔미트산, 올레산, 리놀렌산)이 가장 크게 영

향을 받아 감소되는 것으로 나타났다.

만성적인 에탄올의 섭취로 인한 알코올성 지방간은 phosphatidate phosphohydrolase(PAP)와 diacylglycerol acyltransferase(DGAT)의 활성이 증가되어 지방산의 합성을 촉진시키고 혈중지질 농도를 높이며 활성산소종이 증가하여 간세포가 손상되는 것으로 알려졌다(37,38). 플라보노이드류는 간으로의 NADH 공급을 감소시켜 지방산 합성을 감소시키고(39), hesperetin은 간의 중성지질 합성효소인 PAP와 DGAT의 활성을 억제시켜 간의 중성지질 농도를 낮추는 것으로 보고하였다(40). 또한 감귤과피의 주요 플라보노이드 성분인 hesperidin, hesperetin, naringin, nar-

Table 3. Major fatty acid composition of cholesterol esters, triglycerides and phospholipid fractions of the livers of rats fed a diet containing either ethanol (ethanol) or ethanol plus citrus peel extract (CPE), compared with pair-fed controls^{1,2)} (unit: μmol/g liver)

Fatty acids	Control	Ethanol	CPE
Cholesteryl ester			
16:0	1.49±0.18 ^b	2.20±0.36 ^a	1.65±0.20 ^b
18:0	0.40±0.05 ^b	0.56±0.11 ^a	0.55±0.12 ^a
18:1	4.67±0.81 ^c	14.98±5.73 ^a	8.62±2.00 ^b
18:2	1.66±0.29 ^b	4.53±1.66 ^a	4.17±1.64 ^a
20:4	1.00±0.21 ^b	2.18±0.69 ^a	2.09±0.61 ^a
Triglyceride			
16:0	3.51±1.83 ^c	22.59±5.64 ^a	14.75±4.34 ^b
18:0	0.27±0.11 ^c	1.60±0.63 ^a	1.22±0.55 ^a
18:1	5.30±2.24 ^c	44.17±9.43 ^a	30.81±8.34 ^b
18:2	3.75±1.84 ^c	33.48±8.41 ^a	20.49±5.67 ^b
20:4	0.30±0.10 ^b	4.21±1.78 ^a	3.18±1.34 ^a
22:6	0.02±0.01 ^b	0.68 ±0.35 ^a	0.61±0.41 ^a
Phospholipid			
16:0	4.40±0.76 ^c	7.19±0.63 ^a	6.10±1.67 ^b
18:0	6.57±1.71 ^c	13.31±1.03 ^a	11.29±2.62 ^b
18:1	1.59±0.37 ^b	3.00±0.78 ^a	2.51±0.33 ^{ab}
18:2	1.70±0.55 ^c	3.44±0.74 ^a	2.62±0.17 ^b
20:4	6.14±1.32 ^b	11.23±0.60 ^a	11.84±1.59 ^a
22:6	1.30±0.25 ^b	2.20±0.31 ^a	1.91±0.14 ^a

¹⁾Values are means±SD, n=8.

²⁾Values in a row not sharing a common superscript differ significantly (*P*<0.05).

ingenin, narirutin은 간의 콜레스테롤 합성수준을 조절하는 HMG-CoA reductase와 acyl-CoA:cholesterol acyl-transferase의 활성을 억제시켜 간에서 콜레스테롤의 생합성을 감소시킨다(41). 또한 Bose 등(42)은 녹차의 폴리페놀 성분 중 가장 대표적인 epigallocatechin gallate의 공급이 고지방 식이로 유도된 지방간 증상을 억제시켜 줄 수 있다고 보고하였고, Gnoni 등(43)은 quercetin 성분의 섭취가 간조직의 중성지방과 지방산의 합성을 억제시켜 준다고 보고하였다. 이처럼 식품 중에 함유된 플라보노이드 성분이 간의 지방수준을 낮추준다는 보고들과 관련하여 본 연구에서 나타난 감귤과피 추출물을 공급받은 동물군에서의 지방간 완화 효과는 6주 동안 급여한 감귤과피 추출물에 함유된 플라보노이드 성분에 기인한다고 판단된다.

요 약

본 연구는 최근 다양한 생리활성으로 주목받고 있는 감귤과피 추출물의 급여가 지속적인 알코올 섭취로 인한 알코올성 지방간 개선에 미치는 영향을 동물실험을 통해 조사하였다. 지방간 유도식이인 Lieber-DeCarli 액체식이를 공급하였으며, 액체 표준식이만 공급받는 동물군을 대조군(control), 대조군과의 열량 차이를 에탄올로 보충한 액체식이를 공급받는 동물군을 에탄올군(ethanol), 에탄올군과 동일한 식이와 감귤과피 농축액을 마리당 1 mL 혼합한 액체식이를 공급받는 동물군을 감귤과피 추출물 투여군으로 하여 그룹당 8 마리씩 6주간 사육하였다. 실험 시작 전, 3주째 그리고 6주째에 혈액을 채취하였고 간은 6주 혈액 채취 직후 적출하였다. 체중증가율은 대조군과 비교하여 에탄올군, 감귤과피 추출물 투여군에서 유의적으로 감소하였으며, 혈액의 중성지방 농도는 대조군, 에탄올군, 감귤과피 추출물 투여군의 순으로 높게 나타났고, 혈중 ALT, AST, ALP의 농도는 대조군과 비교해서 에탄올군에서 유의적으로 증가하였으나 감귤과피 추출물에 의해서 감소하였다. 영상촬영을 통한 간 조직의 지방구 양은 대조군에 비해 에탄올군의 간 조직에서 지방구가 축적되어 크기가 커진 것을 확인할 수 있었고 감귤과피 추출물 투여에 의해서 대조군 수준으로 작아진 것으로 나타났다. 이와 유사하게 간조직의 총지방 함량과 콜레스테롤의 농도는 알코올 투여로 유의적으로 증가하였으나 감귤과피 추출물 투여에 의해서 감소되는 것으로 나타났다. 간 조직의 주요 지방 종류별 총지방산 비교에서도 콜레스테롤, 중성지방, 인지질 분획의 대부분의 지방산 함량이 에탄올군에 비해 감귤과피 추출물 투여군에서 유의적으로 대조군 수준으로 낮아진 것으로 나타났다. 본 연구에서는 감귤과피 추출물이 알코올의 섭취로 인해 증가된 간 기능 지표 수준을 개선시키고, 간조직의 지방간 형성을 유의적으로 억제시키는 것을 확인하였다. 이는 감귤과피 추출물에 함유되어 있는 다양한 플라보노이드 성분이 알코올에 의한 지방 축적을 억제하고 간 기능을 개선시켜 지방간 증상을 완화시킬 수 있음을 증명

하여 앞으로 감귤과피가 지방대사 개선 식품소재로서 이용 가치가 높아질 것으로 사료된다.

감사의 글

이 논문은 2010년도 한국식품연구원(Korea Food Research Institute)의 연구비 지원과 2013~2014년도 창원대학교 연구비에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Rehm J, Mathers C, Popova S, Thavorncharoensap M, Teerawattananon Y, Patra J. 2009. Global burden of disease and injury and economic cost attributable to alcohol use and alcohol-use disorders. *Lancet* 373: 2223-2233.
2. Neuman MG, French SW, Casey CA, Kharbanda KK, Nanau RM, Rasineni K, McVicker BL, Kong V, Donohue TM Jr. 2013. Changes in the pathogenesis of alcohol-induced liver disease - Preclinical studies. *Exp Mol Pathol* 95: 376-384.
3. Reuben A. 2008. Alcohol and the liver. *Curr Opin Gastroenterol* 24: 328-338.
4. Lieber CS. 2004. Alcoholic fatty liver: its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol* 34: 9-19.
5. Siegmund SV, Brenner DA. 2005. Molecular pathogenesis of alcohol-induced hepatic fibrosis. *Alcohol Clin Exp Res* 29: 102S-109S.
6. Nagata K, Suzuki H, Sakaguchi S. 2007. Common pathogenic mechanism in development progression of liver injury caused by non-alcoholic or alcoholic steatohepatitis. *J Toxicol Sci* 32: 453-468.
7. Chung SK, Kim SH, Choi YH, Song EY, Kim SH. 2000. Status of citrus fruit production and view of utilization in Cheju. *Food Ind Nutr* 5: 42-52.
8. Lee MH, Hur D, Jo DJ, Lee GD, Yoon SR. 2007. Flavonoids components and functional properties of citrus peel hydrolysate. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 36: 1358-1364.
9. Son HS, Kim HS, Kwon TB, Ju JS. 1992. Isolation, purification and hypotensive effects of bioflavonoids in *Citrus sinensis*. *J Korean Soc Food Nutr* 21: 136-142.
10. Park HJ, Jung UJ, Cho SJ, Jung HK, Shim S, Choi MS. 2013. *Citrus unshiu* peel extract ameliorates hyperglycemia and hepatic steatosis by altering inflammation and hepatic glucose- and lipid-regulating enzymes in db/db mice. *J Nutr Biochem* 24: 419-427.
11. Iwata E, Hotta H, Goto M. 2012. Hypolipidemic and bifidogenic potentials in the dietary fiber prepared from Mikan (Japanese mandarin orange: *Citrus unshiu*) albedo. *J Nutr Sci Vitaminol* 58: 175-180.
12. Monfote MT, Trovato A, Kirjavanine S, Forestieri AM, Galati EML, Curto TB. 1995. Biological effects of hesperidin a citrus flavonoid: hypolipidemic activity on experimental hypercholesterolemia in rat. *Farmaco* 50: 595-599.
13. Xu GH, Chen JC, Liu DH, Zhang YH, Jiang P, Ye XQ. 2008. Minerals, phenolic compounds, and antioxidant capacity of citrus peel extract by hot water. *J Food Sci* 73: C11-C18.
14. Yang X, Kang SM, Jeon BT, Kim YD, Ha JH, Kim YT, Jeon YJ. 2011. Isolation and identification of an antioxidant flavonoid compound from citrus-processing by-product. *J Sci Food Agric* 91: 1925-1927.

15. Lee S, Ra J, Song JY, Gwak C, Kwon HJ, Yim SV, Hong SP, Kim J, Lee KH, Cho JJ, Park YS, Park CS, Ahn HJ. 2011. Extracts from *Citrus unshiu* promote immune-mediated inhibition of tumor growth in a murine renal cell carcinoma model. *J Ethnopharmacol* 133: 973-979.
16. Yoshigai E, Machida T, Okuyama T, Mori M, Murase H, Yamanishi R, Okumura T, Ikeya Y, Nishino H, Nishizawa M. 2013. Citrus nobiletin suppresses inducible nitric oxide synthase gene expression in interleukin-1 β -treated hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 439: 54-59.
17. Kang HJ, Chawla SP, Jo C, Kwon JH, Byun MW. 2006. Studies on the development of functional powder from citrus peel. *Bioresource Technology* 97: 614-620.
18. Lieber CS, DeCarli LM. 1986. The feeding of ethanol in liquid diets. *Alcohol Clin Exp Res* 10: 550-553.
19. Park HY, Park Y, Lee Y, Noh SK, Sung EG, Choi I. 2012. Effect of oral administration of water-soluble extract from citrus peel (*Citrus unshiu*) on suppressing alcohol-induced fatty liver in rats. *Food Chem* 130: 598-604.
20. Folch PJ, Lees M, Sloane-Stanley GM. 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226: 497-509.
21. Agren JJ, Julkunen A, Penttilä I. 1992. Rapid separation of serum lipids for fatty acid analysis by a single aminopropyl column. *J Lipid Res* 33: 1871-1876.
22. Noh SK, Koo SI, Jeon IJ. 1999. Estrogen replacement in ovariectomized rats increases the hepatic concentration and biliary secretion of alpha-tocopherol and polyunsaturated fatty acids. *J Nutr Biochem* 10: 110-117.
23. Slover HT, Lanze E. 1979. Quantitative analysis of food fatty acids by capillary gas chromatography. *J Am Oil Chem Soc* 56: 933-943.
24. Pikaar NA, Wedel M, van der Beek EJ, van Dokkum W, Kempen HJ, Klufft C, Ockhuizen T, Hermus RJ. 1987. Effects of moderate alcohol consumption on the platelet aggregation, fibrinolysis, and blood lipids. *Metabolism* 36: 538-543.
25. Lieber CS, DeCarli LM. 1974. An experimental model of alcohol feeding and liver injury in the baboon. *J Med Prim* 3: 153-163.
26. Nam KS, Kim JY, Noh SK, Park JH, Sung EG. 2011. Effect of sweet persimmon wine on alcoholic fatty livers in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 1548-1555.
27. Zeman FJ. 1991. Liver disease and alcoholism. In *Clinical Nutrition and Dietetics*. 2nd ed. Macmillan Publ, New York, NY, USA. p 517-553.
28. Jung UJ, Lee MK, Park YB, Kang MA, Choi MS. 2006. Effects of citrus flavonoids on lipid metabolism and glucose-regulating enzyme mRNA level in type-2 diabetic mice. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 1134-1145.
29. Kim SJ, Kim J, Kim HJ, Kim SH, Lee SH, Park YS, Park BK, Kim BS, Kim SK, Yoon SI, Choi CS, Jung JY. 2008. Effect of naringin on lipid metabolism and antithrombotic capacity in rat. *J Fd Hyg Safety* 23: 297-303.
30. Noh SK, Koo SI. 2004. Milk sphingomyelin is more potent inhibitor than egg sphingomyelin of intestinal absorption of cholesterol and α -tocopherol in rats. *J Nutr* 134: 2611-2616.
31. Yugarani T, Tan BK, Das NP. 1993. The effect of tannic acid on serum lipid parameters and tissue lipid peroxides in the spontaneously hypertensive and Wistar Kyoto rats. *Planta Med* 59: 28-31.
32. Shin HK, Seo YJ, Kim CS, Noh SK. 2007. Onion favorably affects serum markers of ethanol-induced fatty liver in rats. *Korean J Food Preserv* 14: 662-668.
33. Park PS, Lee BR, Lee MY. 1996. Effects of onion juice on ethanol-induced hepatic lipid peroxidation in rats. *J Korean Soc Food Nutr* 23: 750-756.
34. Yoon OH, Kang BT, Lee JW, Kim KO. 2008. Effect of plum wine on the lipid metabolism and lipid peroxidation of rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 422-427.
35. Moon SW, Kang SH, Jin YJ, Park JG, Lee YD, Lee YK, Park DB, Kim SJ. 2004. Fermentation of *Citrus unshiu* Marc. and functional characteristics of the fermented products. *Korean J Food Sci Technol* 36: 669-676.
36. Seo HJ, Jeong KS, Lee MK, Park YB, Jung UJ, Kim HJ, Choi MS. 2003. Role of naringin supplement in regulation of lipid and ethanol metabolism in rats. *Life Sci* 73: 933-946.
37. Lieber CS. 1994. Alcohol and the liver. *Gastroenterology* 106: 1085-1105.
38. Moncade C, Torres V, Barghese G, Albano E, Isrsel Y. 1994. Ethanol-derived immuno reactive species formed by radical mechanisms. *Mol Pharmacol* 46: 786-791.
39. Anila L, Vijayalakshmi NR. 2002. Flavonoids from *Embllica officinalis* and *Mongifera indica – effectiveness for dyslipidemia. *J Ethnopharmacol* 79: 81-87.*
40. Cha JY, Cho YS, Kim IS, Anno N, Rahman SH, Yanagita T. 2001. Effect of hesperetin, a citrus flavonoid, on the liver triacylglycerol content and phosphatidate phosphohydrolase activity in orotic acid-fed rats. *Plant Food Human Nutr* 56: 1-10.
41. Bok SH, Lee SH, Yark YB, Bae KH, Son KH, Jeong TS, Choi MS. 1999. Plasma and hepatic cholesterol and hepatic activities of 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase and acyl CoA:cholesterol transferase are lower in rats fed citrus peel extract or a mixture of citrus bioflavonoids. *J Nutr* 127: 1282-1285.
42. Bose M, Lambert JD, Ju J, Reuhl KR, Shapses SA, Yang CS. 2008. The major green tea polyphenol, (-)-epigallocatechin-3-gallate, inhibits obesity, metabolic syndrome, and fatty liver disease in high-fat-fed mice. *J Nutr* 138: 1677-1683.
43. Gnoni GV, Paglialonga G, Siculella L. 2009. Quercetin inhibits fatty acid and triacylglycerol synthesis in rat-liver cells. *Eur J Clin Invest* 39: 761-768.