

고과당식이 랫드모델에서 복분자 투여에 의한 대사증후군 개선효과

고민철^{1,2} · 이윤정^{1,2} · 윤정주^{1,2} · 강대길^{1,2} · 이호섭^{1,2*}

1 : 원광대학교 한의과대학 생리학교실, 2 : 한방체액조절연구센터

Beneficial Effect of *Rubus Coreanus* Miq in a Rat Model of High Fructose Diet-induced Metabolic Syndrome

Min Chul Kho^{1,2}, Yun Jung Lee^{1,2}, Jung Joo Yoon^{1,2}, Dae Gill Kang^{1,2}, Ho Sub Lee^{1,2*}

1 : College of Korean Medicine, 2 : Hanbang Body-fluid Research Center, Wonkwang University

Overconsumption of fructose results in dyslipidemia, hypertension, which have documented as a risk of cardiovascular diseases. This experimental study was designed to investigate the beneficial effects of *Rubus coreanus* Miq (RCM) in high-fructose diet-induced metabolic syndrome. Animals were divided into three groups: Control group fed regular diet and tap water, fructose groups were fed the 65% high-fructose (HF) diet with/without RCM 100 mg/kg/day for 8 weeks, respectively. Chronic treatment with RCM significantly decreased body weight, fat weight and adipocyte size. Moreover, RCM significantly prevented the development of the metabolic disturbances such as hyperlipidemia and hypertension. RCM also led to increase in high density lipoprotein level in the HF group. In addition, RCM suppressed vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) expression and significantly recovered the levels of endothelial nitric oxide synthase (eNOS) expression in aorta. These results demonstrates that RCM may be a beneficial therapeutic for metabolic syndrome through the improvement of hyperlipidemia, obesity, and hypertension.

keywords : *Rubus coreanus* Miq, metabolic syndrome, obesity, hyperlipidemia, hypertension

서 론

만성적으로 대사 장애가 진행되면 고혈압, 고지혈증, 비만, 당뇨병, 관상 또는 경동맥경화증과 같은 여러 가지 질환이 복합적으로 발생하게 되는데, NCEP-ATPⅢ (National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel Ⅲ)에서는 이러한 현상을 대사증후군 (Metabolic syndrome)이라 규정하고 있다¹⁾. 대사증후군은 조기 사망의 직간접적인 원인이 되며, 2005년 남성 32.9%, 여성 31.8%로 높게 나타나고 있어서 1998년 남성 20.1%, 여성 23.9%에 비해 매우 빠른 속도로 증가함을 알 수 있다²⁾. 임상에서는 대사증후군의 발생기전을 보통 과도한 에너지 섭취에 인하여 필요 이상 과도하게 축적되는 지방조직과 그로 인한 비만과 상관성이 있다고 보고 있다. 결국 정상적인 생리, 생화학적 기능에 영향을 미쳐 염증 질환의 주된 원인으로 작용하게 되고, 혈중 중성지방과 LDL-cholesterol의 증가, HDL-cholesterol의 농도 감소 그리고 혈관 내피손상 등으로 인하여 고혈압, 고지혈증과 같은 심혈관 질환을 유발하게 된다³⁾. 혈관 내피세포의 손상은 세포 유착 분자(cell adhesion molecule), 예를 들어 vascular cell adhesion

molecule-1 (VCAM-1)와 같은 분자들을 발현 증가를 유도하여 혈관 내피 세포 기능 저하 및 조직손상을 불러와 혈관염증을 유발하게 된다⁴⁾.

현재 임상에서 사용되는 대사성 질환의 치료 약물들은 일시적 복용이 아닌 일생동안 복용되어야 하므로 각종 부작용이 발생할 수 있다. 최근에는 이러한 질환은 치료보다 예방이 필요한 질환으로 여겨져, 고지혈증, 고혈압등을 저해하는 각종 생리활성 물질을 천연물로부터 찾아내려는 연구가 활발하게 진행되고 있으며, 치료효과에 대한 관심이 높아져 이에 대한 수요도 증가하고 있다⁵⁻⁷⁾.

복분자 (*Rubus coreanus* Miq.)는 장미과에 속하는 열매로서, 한방에서는 덜 익은 열매(미숙과)를 약재로 사용하였고 예로부터 신(腎) 기능을 개선시키고 정력 감퇴 및 빈뇨 등을 치료하는데 이용되어 왔다. 복분자는 anthocyanins, flavonoids, tannins, stilbenoids, phenolic acids 및 lignans 와 같은 생리활성 물질이 풍부하게 존재하는 것으로 보고되었으며, 각종 항염증 효과, 항암효과, 면역증강작용, 피부노화억제작용 및 항산화 효과 등 다양한 생리 활성에 대한 효능이 알려져 있다⁸⁻¹⁰⁾. 현재 복분자의 약리, 화학적 특성을 이용해 한방의약품, 화장품 등 새로운 소재 개발에도 많

* Corresponding author

Ho Sub Lee, College of Korean Medicine, Wonkwang University, 344-2, Sinyong-dong, Iksan-si, Jeollabuk-do, Korea

E-mail : host@wku.ac.kr · Tel : +82-63-850-6841

Received : 2014/11/03 · Revised : 2014/12/05 · Accepted : 2014/12/09

© The Korean Society of Oriental Pathology, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2015.02.29.1.11

Available online at http://society.kisti.re.kr/sv/SV_svjsj03L.do?method=list&poid=ksomp&kojic=DRSRDH&sVnc=v28n5&menuid=1&subid=13

은 연구가 진행되고 있다¹¹⁻¹³⁾.

이와 같이 복분자의 각종 생리 활성에 관한 연구 결과에서 각종 효능이 입증되었음에도 불구하고 만성적인 대사성 질환에 대한 효능연구는 미비하다. 따라서 본 연구는 고과당 식이군에서 유발되는 고혈압, 고지혈증 및 비만 등과 같은 대사성 질환을 복분자의 투여로 인한 개선 효과를 검토하고자 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 복분자 추출물의 제조

복분자 (RCM)는 전북 고창에서 생산-재배된 미숙과를 구입하여 사용하였다. 건조되어 있는 상태의 400 g의 복분자를 분쇄한 후 삼각 플라스크에 4 L의 95% 에탄올을 넣고 상온상태에서 일주일 동안 추출하였다. 추출물을 Whatman No.3 filter paper (Whatman International Ltd, England) 을 이용하여 여과하였다. 여과된 복분자 추출물을 농축한 후 냉동건조기를 이용하여 동결 건조시켜 수율 약 5.43%의 양을 획득한 후 사용 전까지 -20°C에서 보관하였다.

2. 실험동물 및 식이

모든 실험은 원광대학교 동물실험 윤리위원회의 승인을 얻어 시행하였으며, 동물관리 규정을 준수하였다(WKU14-90). 7 주령 수컷 Sprague-Dawley (SD) 랫드 30마리를 샘타코 (오산, 한국)에서 구입하여 온도 23 ± 2°C, 습도 50~60%의 상태로 유지되는 항온-항습 장치에서 12시간씩 암기와 명기가 자동으로 조성되는 환경에서 사육하였다. 1주일간 사육하여 환경에 적응시킨 후, 다음과 같이 총 3개의 군으로 각각 10마리씩 나누어서 사용하였다: 1) Control (regular diet), 2) HF (65% high fructose diet), 3) HF + RCM (HF + RCM 100 mg/kg/day of RCM). Control 그룹은 8주 동안 regular diet (50% starch, 21% protein, 4% fat and standard vitamins and mineral mix)를 먹였으며, HF 그룹은 Research Diet (Research Diet, USA) 사의 65% high fructose diet (65% fructose, 20% protein, 10% fat and standard vitamins and mineral mix)를 구입하여 8주 동안 투여하였다. 그리고 HF + RCM 그룹은 HF와 함께 복분자 에탄올 추출물 100 mg/kg/day의 농도로 증류수에 녹여 경구투여하였다. Control 그룹과 HF 그룹은 복분자 대신 vehicle로서 일반 식음을 같은 기간 동안 경구투여하였다.

3. 혈압의 측정

Automatic sphygmotography (Muromachi Kikai, Tokyo, Japan)를 이용하여 랫드의 꼬리 동맥에서 수축기 평균혈압을 측정하였다. 각 개체마다 최소 8번의 혈압을 측정하고 그 중 5 mmHg 내에 있는 6번의 측정값을 평균값으로 이용하였다.

4. 콜레스테롤 및 지질 함량 측정

랫드를 희생시켜 얻은 혈장을 3,000 rpm으로 20분 동안 원심 분리하고 수집하였으며, 공복시 혈장 내 콜레스테롤 및 지질 함량을

측정하였다. Total cholesterol (T-Cho), triglyceride (TG), low-density lipoproteins cholesterol (LDL-c), high-density lipoproteins cholesterol (HDL-c) 의 혈액생화학적 수치를 각각 Hitachi 7080 (Hitachi, Japan)과 HDL and LDL/VLDL Assay kit (E2HL-100, BioAssay Systems)를 이용하여 분석하였다.

5. 부고환 지방조직 무게 측정 및 부고환 지방조직 세포의 크기 측정

랫드를 희생시킨 후 복부를 절개하여 부고환 지방 조직을 적출하여 생리식염수를 이용하여 혈액 및 이물질을 제거하여 무게를 측정하였다. 그리고 부고환 지방조직의 세포의 크기를 측정하고자, 무게를 측정한 후 지방조직을 4% paraformaldehyde 용액에 담가 4°C에서 8시간 고정하고, 30% sucrose 용액에 조직을 침적시켰다. 조직을 O.C.T. compound (Tissue-Tek, Sakura Finetech, Torrance)에 넣고 영하 30°C에서 동결한 후 cryotome SME (Thermo Electron Corporation, Pittsburg, PA, USA)를 이용하여 30µm의 두께로 평행하게 횡단절편을 만든 후 poly-L-lysine 으로 코팅한 슬라이드에 부착시켰다. 충분히 건조시킨 다음 H-E (hematoxylin-eosin) 염색을 거쳐 봉입제로 봉합 한 후 광학현미경으로 Axiovision 4 Imaging/Archiving software (Axiovision 4, Carl Zeiss, Germany)를 사용하여 400배 시야에서 관찰한 후 사진을 촬영하였다.

6. 혈관조직 절편 제작과 hematoxylin-eosin 염색

랫드에서 흉부대동맥 조직을 적출하여 10% 포르말린에 3일 동안 고정시킨 후, 수세를 통해 조직 내에 남아있는 포르말린을 제거하였다. 60% 에탄올에서부터 100% 에탄올까지 농도 상승 순으로 탈수하고 xylene으로 치환하였다. 파라핀 침투과정을 거친 후 포매하여 ब्ल록을 제작하였다. 이렇게 준비된 파라핀 ब्ल록을 회전형 박절기 (microtome; Thermo Electron Corporation, Pittsburg, PA)를 사용하여 5 µm 으로 자른 후 슬라이드 위에 부착 시켜 실온에서 건조하였다. 절편된 조직이 붙어있는 슬라이드를 xylene 용액에 넣어 탈파라핀화의 과정을 거친 후, 100%, 80% 70%의 에탄올 순으로 탈 xylene, 함수과정을 거쳤다. Harris-hematoxylin solution (Sigma, USA)를 이용하여 핵 염색을 하였고, 1% eosin Y solution (Muto, Japan)을 이용하여 세포질 염색을 거쳐 H-E 염색을 진행하였다. Xylene 용액에서 투명 과정을 거쳐 봉입제로 봉합 한 후 광학현미경으로 Axiovision 4 Imaging/Archiving software (Axiovision 4, Carl Zeiss, Germany)를 사용하여 400배 시야에서 관찰한 후 사진을 촬영하였다.

7. 혈관 조직의 조직면역염색

파라핀 ब्ल록을 이용하여 제작한 혈관 조직에 관하여 조직면역염색을 진행하였다. 조직면역염색은 HISOTO-STAIN®-SP kits (Invitrogen Inc, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 Labeled-[strept] Avidin-Biotin (LAB-SA) 방법을 이용하여 진행하였다. 탈파라핀, 함수화 과정을 거친 후, 내인성 과산화효소의 활성을 방지하기 위해 3% hydrogen peroxide 용액에 10분간 실온에 방치하였다. 이후 조직을 PBS로 세척한 다음, 10%

non-immune goat serum을 사용하여 10분 동안 반응시켜 항체의 비특이적 결합을 방지하였다. 그런 다음 VCAM-1, eNOS (Santa Cruz, CA, USA)의 primary 항체를 각각 1:200의 농도로 희석하여 4°C에서 하룻밤 동안 방치하였다. 이후 biotinylated secondary 항체로 20분간 실온에서 반응시킨 후 PBS로 세척하였다. 3,3'-Diaminobenzidine (DAB; Novex®, CA) chromogen과 hematoxylin (Zymed, CA, USA)를 이용하여 일정시간 동안 발색시킨 다음 세척한후 붓입제로 붓입하였다. 각각의 발현 정도는 광학현미경으로 Axiovision 4 Imaging/Archiving software (Axiovision 4, Carl Zeiss, Germany)을 사용하여 400배 시야에서 사진을 촬영하고, Image J (NIH, Bethesda, MD, USA)를 이용하여 정량화하여 수치화하였다.

8. 혈관의 Western blot 분석

랫드에서 적출된 흉부대동맥 조직을 250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 0.1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 그리고 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.6)로 조성된 Homogenase buffer로 용해시켜 단백질을 추출하였다. 추출한 단백질은 Bradford (Bio-Rad, USA) 법으로 정량하여 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (SDS-PAGE)로 전기영동하여 분리하였다. 전기영동 후에 gel 내에 있는 단백질들을 nitrocellulose membranes로 전이시켜 5% BSA powder가 포함된 0.05% Tween 20-Tris-buffered saline (TBS-T) 용액에 1시간 동안 비특이성 결합을 방지하기 위하여 blocking을 시행하였다. Blocking 과정을 거친 후, VCAM-1, eNOS (Santa Cruz, CA, USA)의 primary 항체를 각각 1:1000의 농도로 TBS-T용액에 희석하여 4°C에서 하룻밤 동안 방치하였다. 그 후 TBS-T에 1:5000의 농도로 horseradish peroxidase-conjugated secondary 항체를 1시간 동안 실온에서 반응시키고, 충분한 세척 과정을 거쳐 enhanced chemiluminescence (Amersham, Buckinghamshire, UK)을 이용하여 발현을 측정하고, Chemi-doc image analyzer (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 정량 및 분석하였다.

9. 통계처리

실험 결과의 유의성은 Systat의 SigmaPlot version 10.0을 사용하여 Student's t-test나 one-way ANOVA test를 통하여 p값이 0.05 이하인 경우 유의한 차이로 판정하였다.

결 과

1. 체중 및 부고환 지방조직 무게의 변화

8주간 일반식과 고과당 식이를 실시하여 복분자 추출물이 체중에 미치는 영향을 비교하였다. 실험 시작시의 체중에서는 각 군간의 유의성 있는 차이는 보이지 않았다. 실험 종결시의 체중에서는 일반식군에 비교하여 고과당 식이군에서 체중이 6.57%정도 유의성 있게 증가하였지만, 고과당+복분자 투여군에서 체중이 7.35%정도 유의성 있게 감소하는 결과를 나타내었다(p<0.05, Table 1). 또한 총 실험기간 동안 체중 증가량은 고과당+복분자 투여군에서 고

과당 식이군에 비해 유의성 있게 감소한 결과를 보였다.

부고환 지방조직 무게를 측정한 결과, 일반식이군에 비교하여 고과당 식이군에서 57.14%정도 유의성 있게 증가하였으나, 고과당+복분자 투여군에서는 고과당 식이군에 비해 45.88%정도 유의성 있게 감소하였다 (p<0.05, Table 1).

Table 1. Effect of an RCM on body weight and epididymal fat pads

Groups	Control	HF	HF+RCM
Initial BW(g)	245.8±2.4	244.4±2.3	246.9±2.9
Terminal BW(g)	4.33±5.1	459.4±10.7*	421.2±5.9 [#]
Gain BW(g)	189.4±3.7	207.8±7.8*	174.4±5.7 [#]
Epididymal fat pads weight(g)	2.5±0.2	3.9±0.4**	2.8±0.2 [#]

Values were expressed as mean ± S.E. (n=10). *p < 0.05, **p < 0.01 vs. Cont.; #p < 0.05 vs. HF. Abbreviations: HF, high fructose; HF+RCM high fructose diet with ethanol extract of *Rubus coreanus* Miq.; BW, body weight.

2. 혈장 내 콜레스테롤 및 지질 대사에 미치는 영향

혈장 내 지질 함량 분석 결과, 고과당 식이군에서 총콜레스테롤 (T-Cho) 함량이 일반식이군에 비해 51.70% 정도 유의성 있게 증가하였으나, 복분자 투여로 인해 34.18% 정도 유의성 있게 감소하는 결과를 보였다(p<0.05, Table 2). 중성지방 (TG) 그리고 저밀도 콜레스테롤 (LDL-c)의 수치 역시 고과당 식이군에서 일반식이군에 비해 57.08%정도 유의성 있게 증가하였으나, 복분자 투여로 인해 52.86%정도 유의성 있게 감소되는 결과를 나타내었다. 고밀도 콜레스테롤 (HDL-c)에서는 고과당 식이군에서 일반식이군과 유의성 있는 변화가 보이지 않았으나 고과당+복분자 투여군에서는 유의성 있는 증가효과를 보였다.

Table 2. Effect of treatment RCM on plasma lipids

Groups	Control	HF	HF+RCM
T-Cho(mg/dl)	67.86±3.8	102.94±8.8**	79.75±7.0 [#]
TG(mg/dl)	83.83±6.7	272.67±43.7**	174.17±15.5 [#]
HDL-c(mg/dl)	13.75±0.6	16.00±1.3	20.8±0.6 ^{##}
LDL-c(mg/dl)	28.37±1.7	44.56±3.6**	29.57±3.4 [#]

Values were expressed as mean ± S.E. (n=10). **p < 0.01 vs. Cont.; #p < 0.05 vs. HF, ##p < 0.01. Abbreviations: HF, high fructose; HF+RCM high fructose diet with ethanol extract of *Rubus coreanus* Miq.; T-Cho, total cholesterol; TG, triglyceride; HDL-c, high-density lipoprotein cholesterol; LDL-c, low-density lipoprotein cholesterol.

3. 혈압 변화

복분자 투여가 혈압의 변화에 미치는 영향을 알아보기 위하여 랫드의 꼬리 동맥에서 수축기 평균혈압을 측정하였다. 그 결과 고과당 식이군의 수축기 평균혈압은 7주째에 일반 식이를 실시한 군에 비해 27.26% 정도 유의적으로 증가하였으나, 고과당+복분자 투여군은 고과당 식이군에 비해 11.66% 유의성 있게 감소하는 결과를 보였다(p<0.01, Fig. 1).

4. 혈관의 조직학적 변화

8주간 고과당 식이를 통한 랫드에서 복분자 투여에 의한 혈관 병변 개선효과를 알아보기 위하여 흉부대동맥을 적출한 후, Hematoxylin & Eosin (H-E) staining을 실시하였다. 일반 식이를 실시한 군에서는 정상적인 혈관 형태를 보였으나, 고과당 식이군에서는 혈관 내막-중막의 두께가 24.13% 정도 증가하는 결과를 보

였다. 그러나 고과당+복분자 투여군에서는 증가했던 혈관 내막-중막의 두께가 12.62% 정도 감소하는 결과를 보였다($p < 0.01$, Fig. 2).

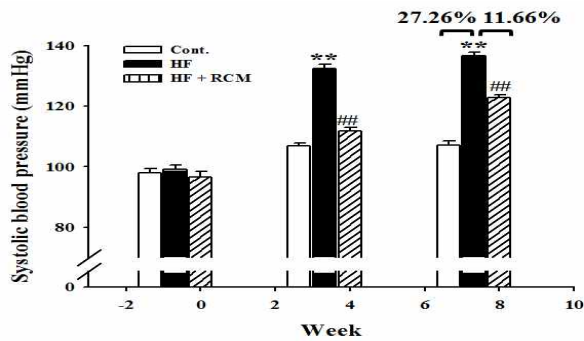


Fig. 1. Effect of an RCM on systolic blood pressure (SBP) in fructose-diet rats. Values were expressed as mean \pm S.E. ($n=10$). ** $p < 0.01$ vs. Cont.; ## $p < 0.01$ vs. HF. Abbreviations: Cont, control ; HF, high fructose ; HF+RCM high fructose diet with ethanol extract of *Rubus coreanus* Miq.

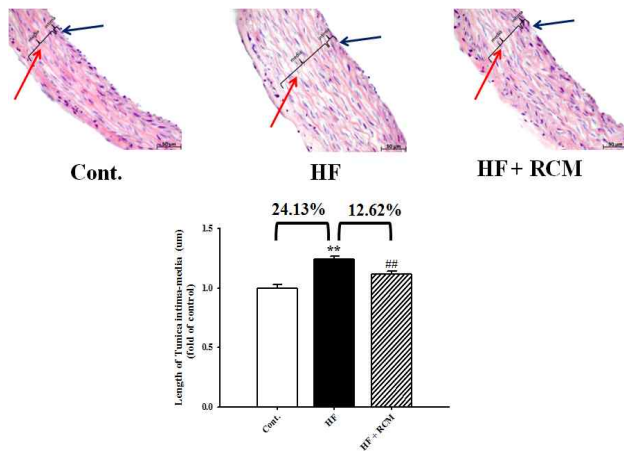


Fig. 2. Representative microscopic photographs of H&E stained section of the thoracic aorta in HF diet rats. Lower panel indicated length of intima-media (magnification $\times 400$). Point of red arrows are media. Point of blue arrows are intima. Scale bar = 50 μ m. Values were expressed as mean \pm S.E. ($n=5$). ** $p < 0.01$ vs. Cont.; ## $p < 0.01$ vs. HF. Abbreviations: Cont, control ; HF, high fructose ; HF+RCM high fructose diet with ethanol extract of *Rubus coreanus* Miq.

5. 혈관 염증 마커 및 혈관내피세포 기능 조절인자에 대한 발현변화

8주간 고과당 식이를 통한 랫드에서 복분자 투여에 의한 혈관에서의 혈관 염증 마커인 vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) 발현변화를 확인하기 위하여 immunohistochemistry와 western blotting을 각각 실시하였다. 그 결과, 고과당 식이군은 일반식이군에 비해 흉부대동맥 VCAM-1의 발현이 각각 315.55%, 144.97% 정도 유의성 있게 증가하였지만, 복분자 투여로 인하여 증가되었던 발현이 각각 195.44%, 72.68% 정도 유의성 있게 감소한 것을 확인할 수 있었다($p < 0.01$, Fig. 3).

또한 혈관내피세포의 기능에 있어 중요조절 인자 중의 하나인 endothelial nitric oxide synthase (eNOS) 변화를 알아보고자 immunohistochemistry를 진행하였다. 그 결과, 고과당 식이군은 일반식이군에 비해 eNOS의 발현이 63.15% 정도 유의성 있게 확연

히 감소하였지만, 복분자 투여로 인하여 발현이 88.55% 정도 유의성 있게 증가한 것을 확인할 수 있었다($p < 0.01$, Fig. 4).

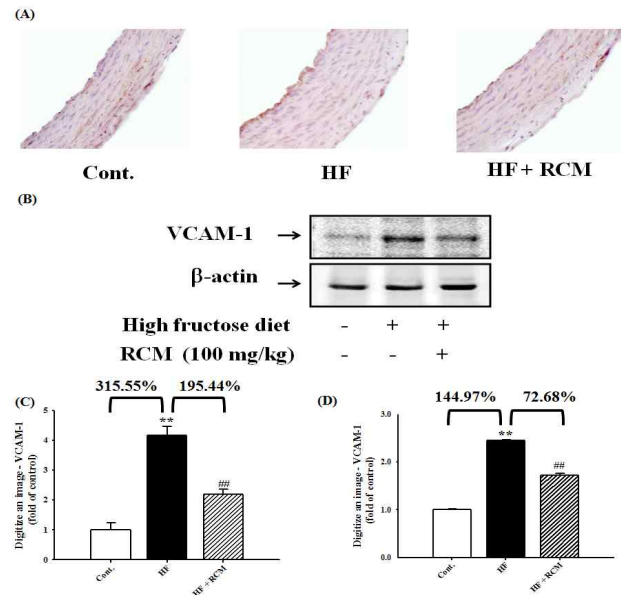


Fig. 3. Effects of RCM on VCAM-1 immunoreactivity in thoracic aortic tissues of HF diet rats. Representative Immunohistochemistry (A) and quantifications (C) are shown (magnification $\times 400$). Western blot analysis (B) and quantifications (D) are shown. Values were expressed as mean \pm S.E. ** $p < 0.01$ vs. Cont.; ## $p < 0.01$ vs. HF. Abbreviations: Cont, control ; HF, high fructose ; HF+RCM high fructose diet with ethanol extract of *Rubus coreanus* Miq.

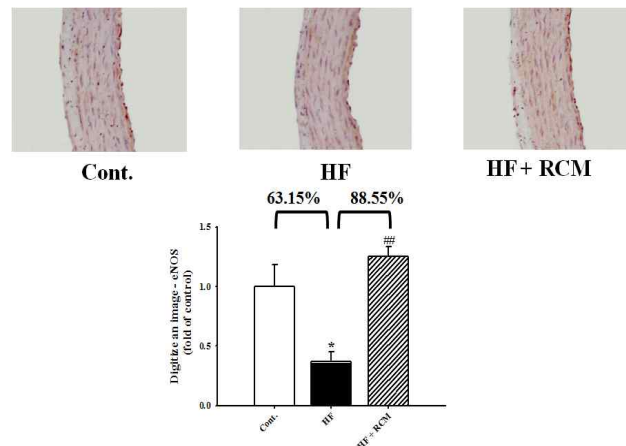


Fig. 4. Effects of RCM on eNOS immunoreactivity in thoracic aortic tissues of HF diet rats. Representative Immunohistochemistry and quantifications are shown (magnification $\times 400$). Values were expressed as mean \pm S.E. * $p < 0.05$ vs. Cont.; ## $p < 0.01$ vs. HF. Abbreviations: Cont, control ; HF, high fructose ; HF+RCM high fructose diet with ethanol extract of *Rubus coreanus* Miq.

6. 부고환 지방세포의 크기변화

고과당식이 랫드에서 복분자 투여는 부고환 지방 조직의 무게를 유의성있게 감소시켰다. 그러므로 지방세포의 크기변화를 관찰하기 위하여 부고환 지방조직의 Hematoxylin & Eosin (H-E) staining을 실시하여 Axiovision 4 Imaging/Archiving software

으로 측정 및 분석하였다. 그 결과, 고과당 식이군에서 일반식이군과 비교하여 지방세포의 크기가 41%정도 증가하였으나, 복분자를 투여함에 따라 증가되었던 지방세포의 크기가 10%정도 감소되는 결과를 보였다(Fig. 5).

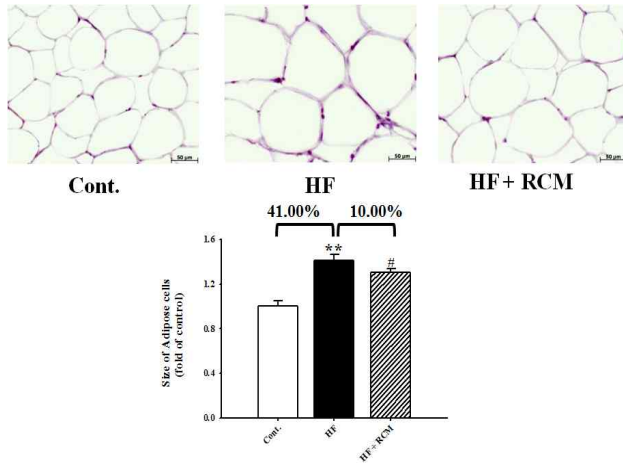


Fig. 5. Representative microscopic photographs of H&E stained section of the epididymal fat pads in HF diet rats. Lower panel indicated size of adipose cells (magnification x400). Scale bar = 50 μ m. Values were expressed as mean \pm S.E. (n=5). **p < 0.01 vs. Cont.; #p < 0.05 vs. HF. Abbreviations: Cont., control ; HF, high fructose ; HF+RCM high fructose diet with ethanol extract of *Rubus coreanus* Miq.

고찰

대사증후군은 복부비만, 고혈압, 고혈당, 고중성지방혈증, 저고밀도지단백혈증 등의 5가지 심혈관계질환 위험인자 중 3가지 이상을 가지고 있으면 진단한다. 즉 대사증후군이 중요한 것은 그 자체가 질병이기도 하지만 심혈관 및 뇌혈관질환 등의 위험인자이기 때문이다. 제 2형 당뇨병 환자에서 가장 흔히 나타나는 지질대사 이상은 고지혈증, 특히 고중성지방 혈증으로 나타나며, 이러한 고지혈증은 죽상경화증의 주요 위험인자의 하나로 작용하여 결과적으로 허혈성 심질환을 비롯한 심혈관계 합병증의 발생에 영향을 미친다^{14,15}. 본 연구는 고과당식이 유발 대사증후군 동물모델에서 복분자 투여에 의한 지질 대사 및 혈관질환 인자의 억제에 통한 대사증후군 개선효과를 보고한 것이다.

최근 식이성 과당의 섭취는 비만이나 대사증후군의 임상증상을 발달시키는데 가장 적절하며, 실제로 가장 잘 알려진 대사증후군의 실험모델은 고과당식이 또는 비만형 당뇨병 모델인 OLETF (Otsuka Long-Evans Tokushima Fatty) 랫드 등이 있다. 고지방 식이에 의하여 비만이 유도되면, 지방세포들의 크기가 현저하게 증가한다^{16,17}. 비대해진 지방 세포는 최대 용량의 인슐린으로 자극하여도 당수송과 당대사가 저하되어 말초조직의 인슐린 저항성 및 고인슐린혈증이 동반된다. 복분자 미숙과 추출물을 8주간 투여한 후의 체중 증가는 고과당 식이군에 비하여 유의성있게 감소하였다. 정상 대조군에 비해 복분자 투여군에서 체중의 감소가 보이긴 하였지만, 유의성 있는 차이는 보이지 않았다. 복부지방을 직접적으로 확인하지는 않았으나 부교한 지방 무게 역시 유의적으로 감소시켰으며, 지

방세포 역시 감소시켰으므로 복분자 추출물에 의한 항비만효과를 확인할 수 있었다.

지방이 체내에 쌓여 증가된 산화성 스트레스는 염증성 사이토카인인 PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1), MCP-1 (monocyte chemoattractant protein-1), IL-6 등을 증가시키고, 반대 작용을 하는 adiponectin 분비를 감소시켜 atherosclerosis의 발병원인이 된다¹⁸. 죽상경화의 초기 단계에서 내피세포에서의 ICAM-1, VCAM-1, E-selectin과 같은 세포 유착분자의 발현은 증가한다. 그 결과로 단핵구 및 백혈구의 염증부위로 침투가 증가하고 이들에 의한 염증 사이토카인의 분비는 혈관염증을 더욱 진행시킨다. 과사성 지방핵은 염증 반응의 지속으로 인해 거품 세포의 숫자가 증가하면서 일부가 괴사하게 되고 죽은 세포들이 머금고 있던 지질이 배출되면서 형성된다. 이러한 과사성 지방핵은 평활근 세포의 증식으로 생겨나는 fibrous cap과 함께 죽상경화반 (atherosclerotic plaque)을 형성하게 된다^{19,20}. Immunohistochemistry 와 western blotting 결과, 고과당 식이군은 흉부 대동맥 내 VCAM-1의 발현이 현저히 증가하였으며, 복분자 추출물 투여군에서 그 발현이 감소함을 알 수 있었다. 또한 조직 염색을 통한 실험결과에서 복분자 추출물은 고과당식에 의한 흉부대동맥 내피층 표면의 거칠고, 중막 평활근의 비후함을 유의적으로 개선시켰다. 그러므로 대사증후군 모델에서 중증의 죽상경화 병변은 나타나지 않았으며, 복분자는 혈관 부착인자의 발현을 억제시켜 염증을 억제함으로써 초기 단계의 항-죽상경화 효과를 나타낸다고 보여진다.

최근 연구에서는 비만 쥐에서 내피세포 손상에 의해 아세틸콜린에 대한 혈관이완 반응성이 현저히 감소됨을 보고하였다²¹. 또한 고지방 식이에 의한 산화성 스트레스로 eNOS의 발현이 감소되어 고혈압이 유발됨을 보고하였다²². NO는 평활근 세포내로 확산되어 평활근 세포내의 sGC를 활성화시켜 cGMP를 생성하는데 이차전령인 cGMP의 역할로 인해 칼슘 통로가 닫힘으로써 혈관 평활근이 이완된다. 내피 세포의 손상으로 인한 내피 세포 내의 NO 농도의 감소는 혈관 장력 조절의 실패로 이어지고 이로 인한 혈관 긴장도 증가는 고혈압, 혈관염증, 죽상경화 등을 유발시킨다고 여러 연구에서 보고된 바가 있다^{23,24}. 본 연구에서 고과당식을 실시한 지 4주 후부터 현저한 혈압증가를 볼 수 있었고, 복분자 추출물은 유의적으로 혈압증가가 감소하였다. 이러한 결과는 복분자 추출물의 항-고혈압 효과를 보여주는 것이며 혈관내피에서 eNOS의 발현을 확인하고자 western blotting을 수행한 결과 복분자 추출물이 고과당 식이군에서 보여진 eNOS의 감소를 유의적으로 회복시켰으므로 이 사실을 뒷받침하고 있다. 그러므로 복분자 추출물은 대사증후군 모델에서 eNOS의 발현을 증가시켜 NO의 활성을 증가시켜 혈관내피의 기능부전을 개선시켰으므로 고혈압을 감소시키고 항-죽상경화 효능을 나타내었다. 대표적인 항산화물질 flavonoid 계열 quercetin은 복분자에 다량 포함되어 있다. Quercetin을 고지방 식이 랫드에 먹였을 경우, eNOS활성을 증가시켰으므로 항고혈압 효과를 나타내었다고 보고되었다²⁵. 이러한 결과는 본 연구에서 보여진 복분자 추출물의 항고혈압 효과에 기여할 것으로 사료된다.

본 연구에서 고과당식이군에서 보여진 고지혈증은 중성지방의 증가와 저밀도 콜레스테롤의 증가로 나타났다. 복분자 추출물을 투

여하였을 때 중성지방과 저밀도 콜레스테롤 함량은 유의적으로 감소하였으며, 고밀도 콜레스테롤 함량은 유의적으로 증가하였다. 최근 고창복분자 연구소에 따르면 복분자 미숙과는 LDL receptor와 이를 조절하는 SREBP-2를 증가시키고 cholesterol transporter ABCA1의 발현을 증가시켜 콜레스테롤 개선효과를 나타낸다고 보고하였다²⁶⁾. 이러한 결과는 세포수준의 연구로써 대사증후군 동물모델을 사용한 본 연구결과와 일치하고 있다. 또한 RAW 264.7 세포에서 복분자 추출물은 NF- κ B/MAPK 신호전달경로를 억제시켜 항염증 효과를 나타낸다고 보고하였다²⁷⁾. 그러므로 복분자 추출물은 콜레스테롤 개선효과 뿐만 아니라 세포수준에서 항염증 효과가 제시되었고 대사증후군 모델에서 혈관 내벽의 염증관련 인자의 발현을 감소시켜 혈관 병변의 진행을 억제시킨다는 것을 확인하였다.

결 론

고과당식을 실시한 대사증후군 랫드모델에서 복분자 미숙과 추출물을 8주간 투여하였을 때, 체중 및 부고환 조직의 무게 감소와 지방조직의 크기 감소를 보여주었다. 중성지방 및 LDL 저밀도 콜레스테롤 함량을 감소시키고 HDL 고밀도 콜레스테롤 함량을 증가시켰다. 혈관 내피에서 eNOS발현을 증가시켜 혈관유착인자 발현을 억제시키고 혈관기능부전을 개선시킴으로써 항-고혈압 효과와 초기 항-죽상경화 효과를 보여주었다. 그러므로 복분자 추출물은 대사증후군 치료 및 예방에 있어 긍정적으로 기여할 수 있음을 시사하고 있다.

감사의 글

본 연구는 원광대학교 연구비지원(2013)에 의해 수행되었음.

References

1. Journal of the American Medical Association (JAMA). National Cholesterol Education Program: Executive summary of the third report of the national cholesterol education program (NCEP) expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults (adult treatment panel III). *Circulation*. 285: 2488-2497, 2001.
2. Report on National health and nutrition survey. Ministry of health and welfare 2007(Korean).
3. Sharma, A.M. Adipose tissue: a mediator of cardiovascular risk. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* 4: S5-S7, 2002.
4. Quagliaro, L., Piconi, L., Assaloni, R., Da, Ros, R., Maier, A., Zuodar, G., Schreyer, S.A., Vick, C., Lystig, T.C., Mystkowski, P., LeBoeuf, R.C. LDL receptor but not apolipoprotein E deficiency increases diet-induced obesity and diabetes in mice. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 282: 207-214, 2002.
5. Yotsumoto, H., Yanagita, T., Yamamoto, K., Ogawa, Y., Cha, J.Y., Mori, Y. Inhibitory effect of Oren-Gedoku-to and its components on cholesteryl ester synthesis in cultured human hepatocyte HepG2 cells: Evidence from the cultured HepG2 cells and in vitro assay of ACAT. *Planta. Medica*. 63: 141-145, 1997.
6. Miettinen, T.A. Cholesterol absorption inhibition: A strategy for cholesterol-lowering therapy. *Int. J. Clin. Pract.* 55: 710-716, 2001.
7. Shin, M.K., Han, S.H. Effects of methanol extracts from bamboo(*Pseudosasa japonica* Makino) leaves extracts on lipid metabolism in rats fed high fat and high cholesterol diet. *Korean J. Food Culture*. 17: 30-36, 2002.
8. Jeong, J.H., Jung, H.N., Lee, S.R., Lee, H.J., Hwang, K.T., Kim, T.Y. Antioxidant, anti-proliferative and anti-inflammatory activities of the extracts from black raspberry fruits and wine. *Food Chem.* 123: 338-344, 2010.
9. Zhang, Z., Knobloch, T.J., Seamon, L.G., Stoner, G.D., Cohn, D.E., Paskett, E.D., Fowler, J.M., Weghorst, C.M. A black raspberry extract inhibits proliferation and regulates apoptosis in cervical cancer cells. *Gynecol. Oncol.* 123: 401-406, 2011.
10. Wang, S.Y., Lin, H.S. Antioxidant activity in fruits and leaves of blackberry, raspberry, and strawberry varies with cultivar and developmental stage. *J. Agr. Food Chem.* 48: 140-146, 2000.
11. Lee, J.W., Do, J.H. Determination of total phenolic compounds from the fruit of *Rubus coreanus* and antioxidative activity. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 29: 943-947, 2000.
12. Kwon, K.H., Cha, W.S., Kim, D.C., Shin, H.J. 2006. A research and application of active ingredients in Bokbunja (*Rubuscoreanus*Miquel). *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 21: 405-409, 2006.
13. Kim, T.G., Park, M.S., Han, H.M., Kang, S.Y., Jung, K.K., Pheu, H.M., Kim, S.H. Inhibitory effects of *Terminalia chebula*, *Sanguisorba officinalis*, *Rubus coreanus* and *Rheum palmatum* on hepatitis B virus replication in HepG2.2.15cells. *Yakhak Hoeji* 43: 458-463, 1999.
14. Egan BM, Greene EL, Goodfriend TL. Insulin resistance and cardiovascular disease. *Am J Hypertens.* 14: S116-125, 2001.
15. Grundy SM. Obesity, metabolic syndrome, and coronary atherosclerosis. *Circulation*. 105: 2696-2698, 2002.
16. Krotkiewski, M., Björntorp, P., Sjöström, L., Smith, U. Impact of obesity on metabolism in men and women. Importance of regional adipose tissue distribution. *J.*

- Clin. Invest. 72: 1150-1162, 1983.
17. Hajnal, A., Covasa, M., Bello, N.T. Altered taste sensitivity in obese, prediabetic OLETF rats lacking CCK-1 receptors. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 289: R1675-R1686, 2005.
 18. Furukawa, S., Fujita, T., Shimabukuro, M., Iwaki, M., Yamada, Y., Nakajima, Y. Increased oxidative stress in obesity and its impact on metabolic syndrome. *J. Clin. Invest.* 114: 1752-1761, 2004.
 19. Johnson, J.L. Matrix metalloproteinases: influence on smooth muscle cells and atherosclerotic plaque stability. *Expert. Rev. Cardiovasc. Ther.* 5: 265-282, 2007.
 20. Li, G., Sanders, J.M., Phan, E.T., Ley, K., Sarembock, I.J. Arterial macrophages and regenerating endothelial cells express P-selectin in atherosclerosis-prone apolipoprotein E-deficient mice. *Am. J. Pathol.* 167: 1511-1518, 2005.
 21. Nishimatsu, H., Suzuki, E., Satonaka, H., Takeda, R., Omata, M., Fujita, T., Nagai, R., Kitamura, T., Hirata, Y. Endothelial dysfunction and hypercontractility of vascular myocytes are ameliorated by fluvastatin in obese Zucker rats. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 288: 1770-1776, 2005.
 22. Ilan, E., Tirosh, O., Madar, Z. Triacylglycerol-mediated oxidative stress inhibits nitric oxide production in rat isolated hepatocytes. *J. Nutr.* 135: 2090-2095, 2005.
 23. Busse, R., I, Fleming. Endothelial dysfunction in atherosclerosis. *J. Vasc. Res.* 33: 181-194, 1996.
 24. Kim, S.H., Kang, K.W., Kim K.W., Kim., N.D. Procyanidins in crataegus extract evoke endothelium-dependent vasorelaxation in rat aorta. *Life sci.* 67: 121-131, 2000.
 25. Yamamoto, Y., Oue, E. Antihypertensive effect of quercetin in rats fed with a high-fat high-sucrose diet. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 70: 933-939, 2006.
 26. Lee, S.J., Lee, M.J., Ko, Y.J., Choi, H.R., Jeong, J.T., Choi, K.M., Cha, J.D., Hwang, S.M., Jung, H.K., Park, J.H., Lee, T.B. Effects of Extracts of Unripe Black Raspberry and Red Ginseng on Cholesterol Synthesis. *Korean J. Food. Sci.. Technol.* 45: 628-635, 2013.
 27. Yang, H.M., Oh, S.M., Lim, S.S., Shin, H.K., Oh, Y.S., Kim, J.K. Antiinflammatory activities of *Rubus coreanus* depend on the degree of fruit ripening. *Phytother. Res.* 22: 102-107, 2008.