한국가축위생학회지 제42권 제2호 (2019)
Korean J Vet Serv, 2019, 42(2), 43-51
ISSN 1225-6552, eISSN 2287-7630
https://doi.org/10.7853/kjvs.2019.42.2.43

Korean Journal of
Veterinary Service
Available online at http://kjves.org

< Original Article >

벌나무(*Acer tegmentosum* Maxim) 추출물의 항산화 활성 및 고지방식이를 급이한 흰쥐의 지방간 개선 효과

이수정[2] · 조항희[1] · 송윤오[1] · 장선희[1] · 조재현[1]*
경상대학교 수의학과 동물의학연구원[1], 경상대학교 농업생명과학연구원[2]

Antioxidant activity and improvement effect of *Acer tegmentosum* Maxim of dietary fatty liver in rat fed on a high-fat diet

Soo-Jung Lee[2], Hang Hee Cho[1], Yuno Song[1], Sun-Hee Jang[1], Jae-Hyeon Cho[1]*

[1]*Institute of Animal Medicine, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea*
[2]*Institute of Agriculture and Life Sciences, Gyeongsang National University, Jinju 52828, Korea*

(Received 4 December 2018; revised 20 January 2019; accepted 11 March 2019)

Abstract

The effects on the radical scavenging activities and hepatic lipid levels in rats fed a high-fat diet (HFD) in the 70% ethanolic extract from *Acer tegmentosum* Maxim (ATM) were evaluated. Total phenol content of ATM was 168.60 mg catechin/g in the 70% ethanolic extract of *Acer tegmentosum*. The DPPH and ABTS radical scavenging activities were 18.32 mM TE/g and 32.25 mM TE/g, respectively. Food efficiency ratio was lower significantly in supplemented group with 150 mg/kg BW/day during 5 weeks (HFD+ATM) compared to HFD. Total cholesterol and triglyceride contents in liver tissue of HFD+ATM were lower significantly compared to those of the HFD. Supplementation of ATM significantly decreased lipid peroxide contents and increased radical scavenging activity in the liver tissue compared with that of HFD group. Moreover, the hepatocytes of HFD rats showed a typical fatty liver morphology showing the presence of cytoplasmic lipid droplets, whereas administration of ATM attenuated the number and the size of lipid droplets. In the liver tissue of ATM administrated HFD group, the mRNA levels of SREBP-1c, PPARγ, and FAS were decreased. Therefore, these results suggest that *Acer tegmentosum* extracts could have antioxidant activities and the hypolipidemic effects in liver tissue by its phenolic compounds.

Key words : *Acer tegmentosum*, Antioxidant activity, Hig-fat diet, Fatty liver, Hepatic lipid improvement

서 론

바식생활의 풍요, 소득 수준의 증가로 인한 식생활 트랜드의 편의 지향, 가공식품의 소비 증대는 총 열량에 대한 지방의 섭취 비율을 증가시켜 이상지질혈증 및 지방간의 발생 빈도가 증가되는 추세에 있다. 특히 지방간(fatty liver)은 간에 콜레스테롤 및 중성지방 함량이 비정상적으로 축적되는 현상으로 비만의 발생과도 관련성이 높아 선진 국가에서 지방간 발생율이 총 인구의 약 20～30% 정도에서 나타나고 있는 현상으로 보고되어 있다(Bellentani, 2017). 지방간은 대사증후군 뿐만아니라 비만, 2형 당뇨, 심혈관 질환 등의 원인과도 관련성이 높으며(Mgaggini 등, 2013), 특히 비알콜성 지방간의 경우 간경변으로 진행된 환자의 4～27%정도에서 간암을 초래하며 사망률도 높은 것으로 알려져 있다(Starley 등, 2010). 이러한 현상은 간조직 내 중성지방이 과다하게 축적될 경우 단순지방종에서 비알콜성 지방간염으로 진행되는 것으로

*Corresponding author: Jae-Hyeon Cho, Tel. +82-55-772-2358, Fax. +82-55-772-2349, E-mail. jaehcho@gnu.ac.kr

Copyright © 2019, The Korean Society of Veterinary Service. All Rights Reserved.

추정되고 있다. 2016년 기준으로 우리나라에서 고콜레스테롤혈증 유병률은 19.9%, 고중성지방혈증 유병률은 17.2%로 2015년에 비해 증가 추세를 보여 이상지질혈증의 개선에 대한 관심은 지속적으로 증가되고 있다(Ministry of Health and Welfare).

비알콜성 식이성 지방간은 단순 지방증에서 시작되어 간세포 내 염증의 초래, 조직의 괴사, 간염, 간경변 및 간암으로 이어지는 일련의 질환으로 이에 대한 예방 및 치료를 위한 소재의 발굴은 지속적으로 요구되고 있다. 특히 고중성지방혈증은 간 기능의 저하, 지용성 비타민의 결핍 초래 등의 부작용을 동반하며, 이를 치료하기 위한 약제의 개발은 아직까지 미미한 실정이다(Chang과 Schiano, 2007). 따라서 화학적인 약제의 단점이나 부작용을 배제하며, 총콜레스테롤의 저하에도 긍정적인 영향을 줄 수 있는 천연소재의 개발이 필요하다.

단풍나무과(Aceraceae)에 속하는 벌나무(*Acer tegmentosum* Maxim)는 국내에서 북부 고산지대를 중심으로 분포되고 있으며 산겨릅나무, 산청목으로도 알려져 있다(Kim, 1996). 벌나무의 잎이나 잔가지, 수피 등은 민간에서 간염, 지방간, 간경변 및 간암 등 간질환 치료에 효과가 있으며, 간의 해독, 부종, 간 세포의 회복 등에도 효능이 있는 것으로 알려져 있다(Hong 등, 2007). 벌나무의 간보호(Lee와 Moon, 2010; Lee와 Woo, 2010) 및 항산화 활성(Tung 등, 2008)은 식물체 중의 quercetin, catechin 등과 같은 페놀 화합물 등에 의존적이라고 보고되어 있다(Park 등, 2006). 벌나무의 식이성 지방섭취에 따른 지방간 개선에 관한 연구는 보고된 바 있으나(Seo 등, 2016), 기작에 대한 체계적인 연구는 미미한 실정이다.

또한 벌나무의 간보호 관련 생리활성으로 수피의 ethyl acetate 및 butanol 분획물에서 항산화 활성과 지질과산화 억제활성이 분획물 중 catechin, *p*-hydroxyphenethyl alcohol 1-*O*-β-D-(6''-*O*-galloyl)-glucopyranoside의 페놀계 배당체에 기인되며(Hong 등, 2007), 벌나무 주정추출물은 CCl_4, d(+)-galactosamine, DL-ethionine에 의한 간 손상(Kwon 등, 2008)에 효능이 있으며, 리포다당에 의한 급성 간 손상에 대해 벌나무 부탄올 분획물의 간보호 효과(Shin 등, 2006)가 보고된 바 있다.

따라서 본 연구에서는 벌나무 추출물의 *in vitro*에서 항산화 활성을 평가하고 *in vivo*에서 고지방 식이를 급이한 흰쥐의 간 조직 중 지질 함량 및 체내 지질 개선에 미치는 기작에 대해서 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

시료 및 추출물의 제조

벌나무(*Acer tegmentosum* Maxim)는 진주시내 한약재료상에서 건조된 가지 및 수피를 구입하였으며, 분쇄한 시료 50 g에 10배의 70% 에탄올을 가하여 60°C의 항온수조에서 80 rpm의 속도로 진탕하여 3시간씩 2회 반복 추출하였다. 이를 모두 모아 회전식 진공증발 농축기로 60°C 이하에서 농축하여 완전 건조시킨 다음 −20°C에 보관해 두고 실험에 사용하였다.

라디칼 소거활성 측정

벌나무 에탄올 추출물은 70% 에탄올로 재용해한 후 라디칼 소거활성을 측정하였다. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼 소거활성은 시료액에 5 mg/100 mL의 DPPH 용액을 동량으로 혼합한 다음 실온에서 10분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다(Blois, 1958). ABTS (2,2-azinobis-3-ethylbenz–thiazoline-6-sulphonate) 라디칼 소거활성은 Re 등(1999)의 방법에 따라 ABTS 용액을 제조한 후 415 nm에서 1.5의 흡광도가 되도록 증류수로 조절한 ABTS 기질용액 1 mL에 시료액 0.5 mL를 혼합하여 실온에서 5분간 반응시켜 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 벌나무 추출물의 라디칼 소거활성은 TEAC (Trolox equivalent antioxidant capacity) 분석법을 이용하였으며, Trolox (Sigma Co., St. Louis, MO, USA)를 사용하여 검량선을 작성하고 시료 1 g당 Trolox 농도(mM TE/g)로 나타내었다.

총 페놀 및 플라보노이드 정량

총 페놀 함량은 Folin-Denis법(Gutfinger, 1981)에 따라 벌나무 추출물을 70% 에탄올에 일정농도로 재용해한 시료액 1 mL에 Folin-Ciocalteau 시약 0.5 mL, 10% Na_2CO_3 시약 0.5 mL를 혼합하여 실온에서 60분간 반응시켜 760 nm에서 분광광도계(Evolution 300 UV-VIS spectrophotometer, Thermoscientific, Worcester, MA, USA)로 흡광도를 측정하였다. 시료의 총 페놀 함량은 gallic acid (Sigma Co.)를 표준물질로 한 검량선에 따라 계산하였다. 플라보노이드 함량은 상기의 시료액 1 mL과 10% aluminum nitrate 0.1 mL, 1 M potassium acetate 0.1 mL, 80% ethanol 4.3 mL를 혼합

하여 실온에서 40분간 반응시켜 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 quercetin (Sigma Co.)에 의한 검량선에 따라 계산하였다(Moreno 등, 2000).

실험동물의 사양 및 실험군 구성

실험동물은 생후 4주령으로 90～110 g의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 (주)중앙실험동물(Seoul, Korea)로부터 분양받아 온도 22±2℃, 습도 50±5%, 명암주기 12시간(07:00～19:00)으로 자동 설정된 동물사육실에서 실험 사육하였다. 첫 1주간은 시판 고형사료(Samyang Co., Korea)로 적응시켰으며, 2주째 체중에 따른 난괴법에 의해 10마리씩 3그룹으로 구분하여 사육 상자에 2마리씩 넣어 5주간 사육하였다.

실험군은 정상군(Normal, Rodent diet), 고지방식이 급이군(HFD, 60% kcal fat, #55VXT0038, Samyang Co., Korea) 및 벌나무 추출물 급이군(HFD+ATM, 150 mg/kg BW)으로 구분하였다. 사육기간 동안 물과 식이는 자유 급이 시켰으며, 벌나무 추출물은 물에 용해하여 1일 1회 일정시간에 경구 투여하였다. 식이섭취량은 매일 오전에 잔량을 측정하였으며, 체중은 주 1회 측정하였다. 식이효율(%)은 실험 사육 5주간의 체중 증가량을 총 식이 섭취량으로 나누어 계산하였다.

5주간의 실험 사육기간 최종일에 실험동물을 16시간 절식시킨 후 에테르로 가볍게 마취시킨 다음 복부 절개하여 간 조직을 적출하여 생리식염수로 혈액을 씻은 후 표면의 물기를 제거한 즉시 액체 질소로 3분간 급속 동결하여 −70℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

혈청 ALT 및 AST 활성 측정

간기능 평가를 위한 혈중 지표로 인지되는 ALT (alanine aminotransferase) 및 AST (aspartate aminotransferase) 활성도는 ALT 및 AST 측정용 kit 시약(AM 101-k, Asan pharm Co., Seoul, Korea)으로 측정하여 혈액 1 mL당 Karmen unit로 나타내었다.

간조직의 총 콜레스테롤 및 중성지방 측정

간조직 1 g에 chloroform:methanol 혼합액(C:M=2:1, v/v)을 가하여 Poter-Elvehjem tissue grinder (WOS01010, DAIHAN, Wonju, Korea)로 마쇄하여 30 mL로 정용한 다음 4℃에서 24시간 추출하였다. 이를 여과(Whatman No. 6) 한 후 시험관에 일정량을 취하여 용매를 모두 제거하였으며, 총 콜레스테롤 함량은 총 콜레스테롤 측정용 kit (AM 202-k, Asan pharm. Co.) 시약, 중성지방 함량은 중성지방 측정용 kit (AM 157S-k, Asan pharm. Co.) 시약을 첨가하여 각각 분석하였다.

간조직의 지질과산화물 함량 및 DPPH 라디칼 소거활성 측정

간조직 1 g에 1.5% KCl 용액을 가하여 10% 균질액을 제조하였다. 지질과산화물 함량은 상기의 균질액 0.5 mL에 1% phosphoric acid 3 mL 및 0.6% thiobarbituric acid 용액 1 mL를 잘 혼합한 다음 95℃의 수욕상에서 45분간 반응시켰다. 이때 생성된 malondialdehyde (MDA)를 butanol 4 mL에 이행시켜 531 nm에서 흡광도를 측정하였다. MDA 함량은 표준물질인 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP, Sigma Co.)으로부터 얻은 검량곡선에 따라 산출하였으며, TBARS 값(mmol MDA/g)으로 나타내었다(Uchiyama와 Mihara, 1978).

간조직의 DPPH 라디칼 소거활성은 상기의 균질액 100 μL에 pH 7.4의 100 mM tris-HCl 완충액 및 0.5 mM DPPH 용액 각 4 mL를 혼합하여 37℃에서 15분간 반응시켰다. 여기에 chloroform 4 mL를 가하여 혼합한 다음 원심 분리시켜(4000 rpm, 10 min) 얻은 chloroform층을 517 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 시료 무첨가구에 대한 시료 첨가구의 흡광도 비율(%)로 나타내었다(Lim 등, 2000).

간조직의 형태 관찰

간조직은 적출한 즉시 4% neutral buffered paraformaldehyde로 고정시킨 다음, 수세하여 고정액을 제거하고 70, 80, 90, 95 및 100% 에탄올과 xylene을 차례로 사용하여 탈 수 및 투명화 과정을 거쳐 paraffin embedding center (Leica, Wetzlar, Germany)에서 포매하였다. 이후 회전식 박절기(Leica, Wetzlar, Germany)를 이용하여 파라핀 블록을 5 μm로 박절하였다. 절편된 조직은 다시 xylene, 100, 95, 90, 80, 70% 에탄올의 순서로 탈파라핀 및 함수 과정을 거친 다음 hematoxylin과 eosin으로 염색시켰으며, permount를 이용하여 봉입한 후, 현미경(Leica, Wetzlar, Germany)으로 간 조직 중의 지질 분포 정도를 관찰하였다.

지방산합성 유전자 발현

간조직으로부터 추출한 총 2 μg의 total RNA로부터 cDNA를 합성하기 위해 super script III first synthesis system kit (Invitrogen, Grand Island, NY, USA)를 이용하였다. RNA 2 μg을 Oligo (dT)20 및 dNTP와 1.5 mL tube에 넣고 65°C에서 5분 동안 반응시킨 후에 얼음에 1분간 방치하였다. 10x buffer와 MgCl2, DTT, RNase 저해제 및 RTase가 혼합된 용액을 각 RNA mixture에 분주하고, 50°C에서 50분간 반응하였다. 그 후 85°C의 water bath에서 5분 동안 반응시킨 후 cDNA 합성을 종결하였다. 마지막으로 1 μL의 RNase H를 넣고 37°C에서 20분 동안 반응시켜 불필요한 RNA를 제거하였다. PCR은 95°C에서 10분 동안 초기 변성을 한 후, 95°C에서 15초, 60°C에서 1분, 30 cycles 조건으로 PCR 하였으며, housekeeping gene인 GAPDH mRNA 발현량으로 표준화하였다. 본 실험에서 사용된 primer의 염기서열들은 다음과 같다. SREBP-1c–F 5′-CTTCTGGAGACATCGCAAAC-3′& SREBP-1c-R 5′-GGTAGACAACAGCCGCATC-3′, FAS-F 5′-GCGGTGTGAAAACGAACTTT-3′ & FAS-R 5′-CTGTCTGGGCATAACGGTCT-3′, PPARγ-F 5′-TCCAAGGAAGCCTTTGAGAA-3′ & PPARγ-R 5′-CCATCCTCAGTCCCAGAAAA-3′, GAPDH-F 5′-CATGGCCTTCCGTGTTC-3′ & GAPDH-R 5′-CCTGGTCCTCAGTGTAGC-3′.

통계 분석

실험결과는 반복 측정하여 평균±표준편차로 나타내었다. 각 실험군에 대한 유의차 검정은 SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) 을 사용하여 분산분석을 한 후 $P<0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 분석하였다.

Table 1. Radical scavenging activities, total phenol and flavonoids contents in 70% ethanol extract from *Acer tegmentosum*

	Acer tegmentosum extract
DPPH radical scavenging activity (mM TE/g)[1)]	18.32±1.63
ABTS radical scavenging activity (mM TE/g)[1)]	32.25±2.40
Total phenol (catechin mg/g)	168.60±12.47
Flavonoids (quercetin mg/g)	45.78±3.85

Values are mean±SD (n=4).
[1)]DPPH and ABTS radical scavenging activities were measured Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay.

결 과

벌나무 추출물의 라디칼 소거활성, 총 페놀 및 플라보노이드 함량

벌나무(*Acer tegmentosum*)의 70% 에탄올 추출물 중 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활성과 총 페놀 및 플라보노이드 함량을 측정한 결과는 Table 1과 같다. 라디칼 소거활성을 Trolox 당량으로 나타낸 결과, DPPH 라디칼 소거활성을 Trolox 당량으로 나타낸 결과, 18.32 mM TE/g이었으며, ABTS 라디칼 소거활성은 32.25 mM TE/g으로 벌나무 추출물은 DPPH 라디칼 소거활성에 더 민감하게 반응하는 것으로 나타났다.

총 페놀 함량은 168.60 mg catechin/g, 플라보노이드 함량은 45.78 mg quercetin/g으로 플라보노이드 함량은 총 페놀의 27%에 해당되는 수준이었다.

식이 섭취량, 체중 증가량, 식이효율 및 간조직 중량

식이 중 지방의 에너지 비율이 60%로 조절된 고지방 식이를 급이를 5주간 급이하는 동안 벌나무 추출물의 보충급이에 따른 흰쥐에서 식이섭취량, 체중 증가량 및 식이효율을 측정한 결과는 Table 2와 같다.

1일 식이 섭취량은 정상군(Normal), 고지방 식이를 급이한 대조군(HFD) 및 벌나무 추출물을 급이한 HFD+ATM군간에 유의차가 없었다. 실험 사육기간 동안 체중 증가량은 정상군에 비해 대조군에서 유의적으로 높았으며, 벌나무 추출물 급이군은 대조군에 비해 유의적인 감소를 보였으나, 정상군 보다는 높은 수준이었다. 식이효율은 정상군에 비해 대조군 및 벌

Table 2. Effect of *Acer tegmentosum* extract for food intake, body weight gain and ood efficiency ratio in rats fed a high-fat diet

	NC	HFD	HFD+ATM
Food intake (g/day)	22.04±0.43[NS]	21.74±0.85	21.45±0.75
Total body weight gain (g/5 weeks)	202.00±18.38[a]	286.00±27.82[c]	248.00±23.84[b]
FER	26.16±1.87[a]	37.53±2.19[c]	32.99±2.02[b]

Values are mean±SD (n=10).
NC: group fed a normal diet. HFD: group fed a high-fat diet. HFD+ATM: group fed a high-fat diet with 70% ethanol extract from *Acer tegmentosum* by 150 mg/kg BW (body weight). FER: food efficiency ratio. NS: not significant.
Different letters in superscript following values indicate statistical significance ($P<0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

나무 추출물 급이군에서 유의적으로 높았으나, 고지방 식이에 벌나무 추출물의 보충급이로 식이효율은 유의적으로 감소되는 경향이었다.

혈청 중 ALT 및 AST 활성

고지방 식이를 급이한 실험동물에서 벌나무 추출물의 보충급이에 따른 간기능 지표효소인 ALT 및 AST 활성을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. ALT 및 AST 활성은 정상군에 비해서 고지방 식이의 급이 시 유의적으로 증가되었으나, 벌나무 추출물의 보충급이 시 모두 유의적인 감소를 보여 정상군과 유사한 수준으로 회복되는 경향이었다.

간조직의 총 콜레스테롤 및 중성지방 함량

고지방 식이에 벌나무 추출물을 5주간 보충급이하여 사육한 실험동물의 간조직 중 총 콜레스테롤 및 중성지방 함량을 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. 60%의 고지방 식이로 인하여 정상군에 비해 대조군의 총 콜레스테롤 및 중성지방 함량은 1.2배 및 1.4배 증가된 경향이었다. 벌나무 추출물의 보충급이 후 간조직 중 총 콜레스테롤 함량은 6.77 mg/g이었으며, 중성지방 함량은 6.08 mg/g으로 대조군에 비해 유의적으로 감소되어 정상군과 유사한 수준으로 회복됨을 보였다.

간조직의 지질과산화물 함량 및 항산화 활성

고지방 식이에 벌나무 추출물을 보충급이한 실험동물에서 간조직 중 지질과산화물 함량 및 DPPH 라디칼 소거에 의한 항산화 활성을 측정한 결과는 Table 3과 같다. 지질과산화물 함량은 정상군에 비해 대조군에서 유의적으로 증가되었으며, 벌나무 추출물

Table 3. Effect of *Acer tegmentosum* extract on lipid peroxide contents and DPPH radical scavenging activity in liver tissue of rats fed a high-fat diet

	NC[1)]	HFD	HFD+ATM
Lipid peroxide contents (mmol MDA/g)	186.34±15.75[a2)]	253.24±21.45[c]	208.46±17.87[b]
DPPH radical scavenging activity (%)	41.67±2.07[b]	33.25±3.28[a]	46.34±3.86[b]

[1)]Refer to the Table 2.
[2)]Values are mean±SD (n=10).
Different letters in superscript following values indicate statistical significance ($P<0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

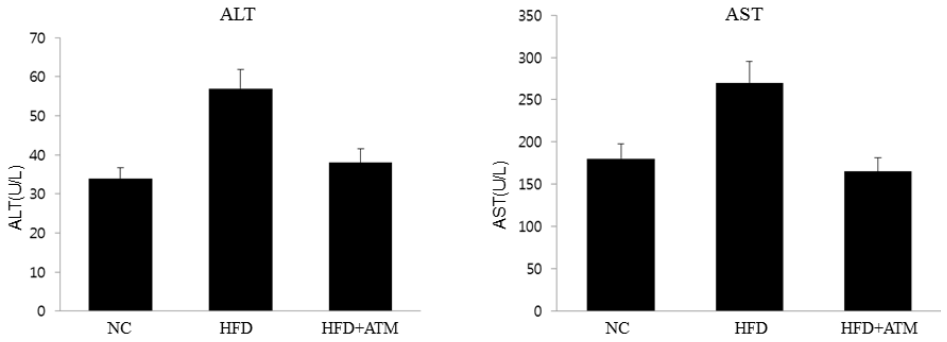

Fig. 1. Effect of *Acer tegmentosum* extract for the ALT and AST activities in serum of rats fed a high-fat diet. Different letters in superscript following values indicate statistical significance ($P<0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

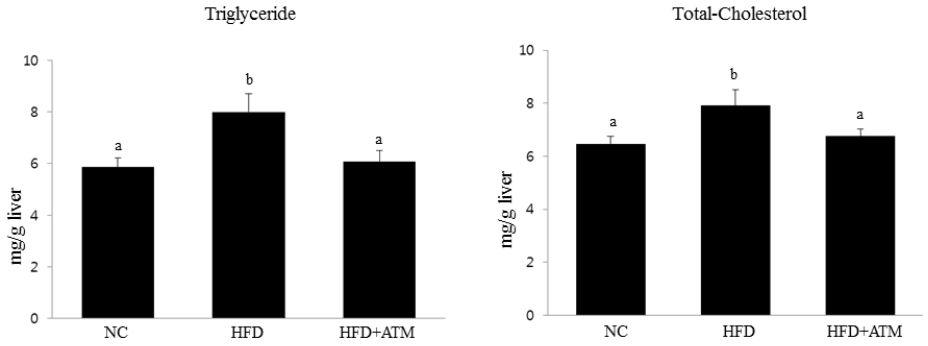

Fig. 2. Effect of *Acer tegmentosum* extract for the total cholesterol and triglyceride level in liver tissues of rats fed a high-fat diet. Different letters in superscript following values indicate statistical significance ($P<0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

급이군은 대조군에 비해 17% 정도 유의적으로 감소됨을 보였다. 간조직의 항산화 활성은 대조군이 정상군에 비해 유의적으로 낮았으나, 벌나무 추출물의 보충급이로 인하여 대조군에 비해 유의적으로 증가되어 정상군과 유사한 수준이었다.

간조직의 형태 관찰

고지방 식이에 벌나무 추출물을 보충 급이한 실험동물의 간조직에서 지방과립의 분포 및 크기를 관찰한 결과는 Fig. 3와 같다. 정상식이군 간 조직은 세포의 밀집도가 크고 지방구가 거의 관찰되지 않고 붉은 색을 띠는 반면 고지방식이 간 조직에서는 지방입자와 지방축척이 증가하였고, 조직 전체적으로 퍼져있는 지방의 축척에 의한 지방간이 현저하게 진행된 것을 관찰할 수 있었다. 이에 반해 벌나무 추출물 급이군에서는 간조직의 지질 축적이 고지방식이 섭취 대조군에 비해 크게 저하되고 소포성의 지방세포 수가 확연하게 감소되는 것으로 관찰되었다. 이로써 고지방 식이에 의해 유도된 식이성 지방간에 대한 벌나무 추출물은 간세포의 지방축척을 억제하고 지방간을 개선시킬 수 있을 것으로 사료된다.

간조직에서 지방산 합성 유전자 발현

벌나무 추출물이 지방합성 기전에 미치는 영향을 알아보기 위해 간 조직에서 지방산합성 기전에 관여하는 지표들의 mRNA 수준을 측정하였다. 각 군에서 지방합성 관련 지표들의 mRNA 수준을 측정한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 지방생성을 조절하는 주요 전사인자 중의 하나인 SREBP-1c는 정상식이군보다 고지방식이군에서 약 3.5배 유의하게 증가하였으며, PPARγ 및 FAS 또한 각각 4.3배, 11배 mRNA 발현이 크게 증가되었다. 벌나무 추출물을 급이한 군에서는 SREBP-1c 및 PPARγ, FAS의 mRNA 발현은 유의하게 감소하였다. 이는 본 연구와 같은 결과로 벌나무 추출물은 고지방식이 유도 간 조직 내 지방축적을 억제하는 효과가 큰 것으로 나타났으며, 간에서 지방 합성에 관여

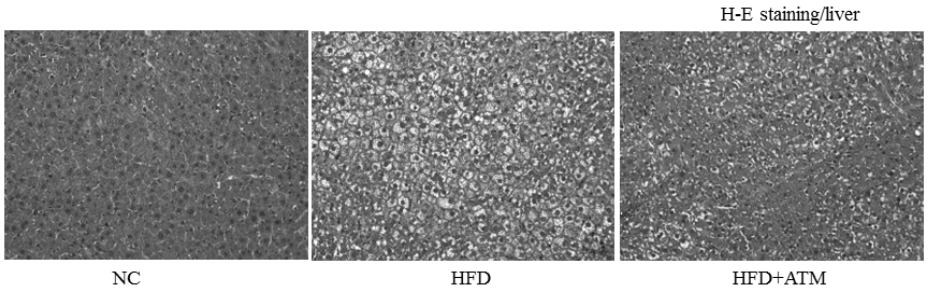

Fig. 3. Representative photographs showing liver tissue histology in rats fed a high-fat diet.

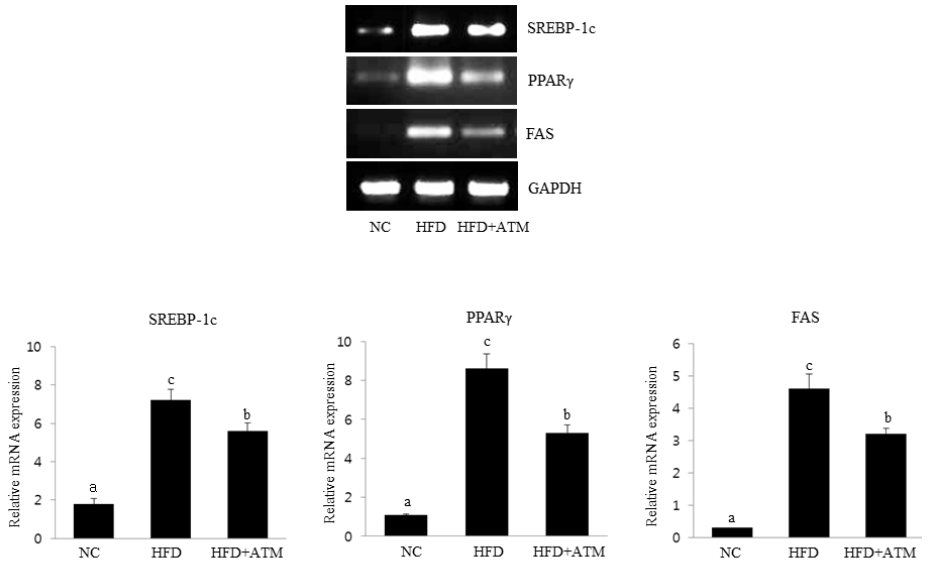

Fig. 4. Effect of ATM on hepatic mRNA expresssion of lipogenesis-related genes in high fat diet-fed rats. Optical density analysis was performed to quantify the levels of mRNA expression with GAPDH as loading control. Different letters in superscript following values indicate statistical significance ($P<0.05$) as determined by Duncan's multiple range test.

하는 유전자들을 크게 억제하고 지방세포 분화에 관여하는 전사인자의 발현을 억제시킴으로서 지방간 생성을 억제하는 것으로 확인되었다.

고 찰

본 연구는 벌나무 추출물의 라디칼 소거에 의한 항산화 활성을 평가하고 고지방식이를 급이한 마우스의 간 조직 중 지질 함량 및 체내 지질 개선에 미치는 기작에 대해서 알아보고자 수행되었다.

식물체로부터 유래된 페놀 화합물은 *in vitro*에서 유리 라디칼을 소거하거나 환원시키는 기작이 있어 생체 내에서도 유리 라디칼에 의한 산화 억제에 대한 척도로 활용되고 있다(An 등, 2004). 본 연구에서 벌나무 에탄올 추출물의 총 페놀(168.60 mg catechin/g) 및 플라보노이드(45.78 mg quercetin/g) 함량은 Choi 등(2013)이 보고한 벌나무 에탄올 추출물의 총 페놀(152.69 μg/mg) 및 플라보노이드(5.01 μg/mg) 함량에 비해 높은 수준이었으며, 항산화 활성이 우수한 것으로 알려진 편백나무 추출물의 총 폴리페놀 함량이 138.3 μg/mg이었으며, 플라보노이드 함량은 8.12 μg/mg이었다는 보고(Jung 등, 2012)에 비해서도 높은 함량이었다.

벌나무 에탄올 추출물의 DPPH 라디칼 소거활성은 50%의 라디칼 소거에 관여하는 농도로 17.23 μg/mL이었으며, ABTS 라디칼에 대한 50% 소거에 관여하는 농도로는 10.58 μg/mL이었다는 보고가 있다(Choi 등, 2013). 벌나무의 열수 및 에탄올 추출물에서 DPPH 라디칼 소거활성에 대한 IC_{50}값은 각각 50.74 μg/mL, 33.15 μg/mL이었으며, ABTS 라디칼 소거활성에서 IC_{50}값은 142.74 μg/mL, 62.35 μg/mL로 에탄올 추출물이 열수 추출물에 라디칼 소거활성이 높았다고 보고되어 있다(Lee 등, 2017a). 벌나무 추출물 중 주요 페놀 화합물은 salidroside, tyrosol, 6-*O*-galloylsalidroside, catechin 및 (−)-epigallocatechin 등이 알려져 있으며(Lee 등, 2017b), DPPH 라디칼 소거활성은 (+)-catechin 및 (−)-epicatechin에 더 의존적인 것으로 보고된 바 있다(Kwon 등, 2011). 본 연구에서 ABTS 라디칼 소거활성에 비해 DPPH 라디칼 소거활성이 더 높게 측정되었는데, 이는 DPPH이 경우 자유 라디칼이며, ABTS는 양이온 자유 라디칼로써 시료 중 항산화 물질의 화학적 특성에 기인한다는 보고(Wang 등, 1998)에 잘 부합하며, 시료 및 시약의 농도에 따른 활성 차이 때문이라고 추정된다.

4주령 흰쥐에 60%의 고지방 식이를 5주간 급이하는 동안 실험동물의 1일 식이 섭취량에는 유의차를 보이지 않았으나, 5주간의 체중 증가량 및 이에 따른 식이효율은 벌나무 추출물의 급이로 유의적인 감소를 보였다. 5주령의 SD계 암컷 흰쥐에 대한 벌나무 추출물의 30～120 mg/kg BW급이는 실험 사육 4일동안 체중 증가량에 유의차를 보이지 않았는 보고가 있는데(Seo 등, 2016), 이는 사육 기간의 상이함에 따른 차이인 것으로 사료된다. 더욱이 quercetin은 체내 지방조직의 중량 감소에는 유의적이나, 총 체중의 감소에는 유의적이지 않았다는 보고(Kim과 Yu, 2014)로 볼 때 본 연구에서 벌나무 추출물의 급이로 인한 체중 증가량의 감소는 시료 중의 여러 페놀 화합물의 복합적인 작용에 기인된 것으로 추정된다.

간 기능 활성의 지표로 평가되는 ALT 및 AST 활성은 고지방식이나 알콜 등에 의한 간 기능 장애가 발생될 때 혈중 방출량이 증가되는 것으로 수용성 식물섬유나 페놀성 화합물의 섭취가 ALT 및 AST 활성을 낮추는 것으로 알려져 있다(Lee 등, 2000). 혈청 중 간기능 지표효소로써 간조직 내 염증의 발생과 함께 증가되는 ALT 및 AST 활성은 고지방 식이를 급이하므로써 정상군에 비해 유의적으로 증가되었으나, 벌나무 추출물의 급이로 정상군과 통계적인 유의차가 없는 수준까지 감소되는 경향을 보였다. 이러한 결과는 간조직 중 지질의 축적 감소 뿐만 아니라 간염의 예방과도 관련이 있을 것으로 생각된다. 또한 벌나무로부터 추출된 부탄올, 에틸아세테이트 및 에탄올 분획물은 수용성 분획물에 비해 간암 세포 HepG2에 대한 세포 생존 억제율이 높았으며, 부탄올 분획물에서 간암 세포의 생존 억제활성이 우수하였다고 보고(Kwon 등, 2011)로 볼 때, 벌나무 추출물의 활성성분으로 수용성 및 지용성 성분이 상호작용에 의한 것으로 추정된다.

생체 내에서 지질과산화는 가령에 따라 자연 발생되어 여러 유형의 유리 라디칼에 의해 세포막 중 불포화지방산이 산화되는 현상으로 고지방 식이의 지속적인 섭취에 의해 가속화될 수 있다. 따라서 유리 라디칼의 소거는 생체 내 지질과산화 억제와 관련성이 높으며(Park 등, 2004), 식물류의 *in vitro* 항산화 활성은 *in vivo*에서 세포의 산화적 손상 예방에 긍정적인 영향을 주는 것으로 평가된다.

60%의 고지방 식이를 5주간 급이한 흰쥐에서 간조직 중 총콜레스테롤 및 중성지방 함량이 정상군에 비

해 유의적으로 증가되어 체내 이상지질혈증 및 지방간 현상의 유도가 확인되었다. 반면에 벌나무 추출물 급이군에서 간조직의 지질 수준은 대조군에 비해 유의적으로 감소되었으며, 조직 내 지질과산화물 및 항산화 활성도 고지방 식이 급이군에 비해 유의적으로 감소된 경향을 보였다. 또한 간의 병리조직학적 관찰 결과에서도 고지방 식이에 대한 벌나무 추출물의 보충급이로 지방구 수의 현저한 감소가 관찰되었다. 벌나무 추출물의 급이와 DL-ethionine의 투여에 의한 지방간 유도 흰쥐에서 간조직 중 총 콜레스테롤 함량은 시료의 투여량에 비례하여 감소되었으나, 중성지방의 함량에는 유의적인 차이를 보이지 않았으며, 지질과산화물의 유의적인 감소와 간조직의 지질 축적 감소는 벌나무 추출물이 식이 지방이나 DL-ethionine에 의한 지방간 발병 시 간조직 중 지질 축적 억제에 효과적이었기 때문이라고 보고되어 있다(Seo 등, 2016). 더욱이 ALT 및 AST 활성의 감소는 벌나무 추출물의 간 조직 내 지질 감소와 더불어 혈중 지질 개선에도 긍정적인 영향을 줄 것으로 예상된다.

SREBP-1c와 PPARγ는 간과 같은 지방 생합성 기관에서 지방산과 트리글리세리드 생합성을 조절한다(Shimano 등, 1997). 이들 유전자는 체 지방생성과 지방축척량에 중요한 영향을 미치는 전사인자로 알려있다. SREBP-1c가 증가하게 되면 FAS 같은 유전자의 발현이 유도되어 간 내 지방의 합성이 촉진된다. 본 실험 결과 고지방식이 급여는 전사인자인 SREBP-1c와 PPARγ의 발현을 증가시킴으로써, FAS의 발현을 유도하였다. 벌나무 추출물이 이러한 간지질 대사 관련 유전자들에 미치는 영향을 조사하기 위해 고지방식이와 함께 벌나무 추출물을 처리하였으며, 벌나무 추출물이 함께 급여 된 경우에는 이들 유전자 발현이 모두 감소하는 것이 관찰되었다. 따라서, 벌나무 추출물이 간 지질 축적을 완화시키는 작용은 지질 합성 억제 작용을 통해 이루어질 가능성이 높은 것으로 판단된다.

이상의 결과는 벌나무의 *in vitro* 및 간조직의 항산화 활성이 시료 중의 총 페놀 및 플라보노이드 성분에서 기인된 것으로 추정되며, 간조직의 총 콜레스테롤 및 중성지방 함량의 감소도 이들 성분이 관여된 것으로 생각된다. 더욱이 벌나무 추출물은 간 질환의 치료 및 예방과 관련하여 민간에서 사용되어져 온 식물소재로 최근 안전성에 대한 연구도 보고된 바 있다(Hwang 등 2013).

따라서 본 연구를 통하여 벌나무의 지방간 개선 효과는 체내 지질대사 관련 인자에 의한 것으로 사료되며, 벌나무 추출물은 현대인의 식이성 지방의 과다섭취에 대한 지방간 예방에 기능성 소재로 활용 가치가 높을 것으로 판단된다.

결 론

벌나무의 70% 에탄올 추출물에 대한 라디칼 소거활성 및 고지방 식이를 급이한 흰쥐의 간조직 중 지질대사에 미치는 영향을 분석하였다. 벌나무 추출물 중 총 페놀 함량은 168.60 mg catechin/g이었다. DPPH 라디칼 소거활성은 18.32 mM TE/g이었으며, ABTS 라디칼 소거활성은 32.25 mM TE/g이었다. 고지방 식이에 벌나무 추출물(150 mg/kg BW/day)을 5주간 보충급이하여 사육한 흰쥐에서 식이효율은 고지방식이에 비해 고지방식이군 플러스 벌나무 추출물군에서 유의적으로 낮았다. 간조직의 총 콜레스테롤 및 중성지방 함량은 대조군에 비해 고지방식이군 플러스 벌나무 추출물군에서 유의적으로 감소되었으며, 지질과산화물 함량 및 라디칼 소거활성은 벌나무 추출물 급이군이 대조군에 비해 유의적으로 감소되었으며, 벌나무 추출물 급이군에서 간조직의 지질 축적이 대조군에 비해 감소된 것으로 관찰되었다. 간조직의 지질 합성 관련 전사인자인 SREBP-1c와 PPARγ의 발현은 벌나무 추출물 투여군에서 유의하게 감소하였으며, 더욱 이들 전사인자의 표적유인자인 FAS의 발현도 유의하게 감소하였다. 따라서 벌나무는 총 페놀 화합물에 의존하여 체내 항산화 활성, 지방간 예방 및 치료에 도움이 될 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2016년도 교육과학기술부의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기본연구사업 연구임 (No. 2016R1D1A1A09918213).

REFERENCES

An BJ, Lee JT, Lee SA, Kwak JH, Park JM, Lee JY, Son JH. 2004. Antioxidant effects and application as natural ingredients of Korean *Sanguisorbae officinalis* L. J Korean

Soc Appl Biol Chem 47: 244-250.

Bellentani S. 2017. The epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease. Liver Int 37: 81-84.

Chang CY, Schiano TD. 2007. Review article: drug hepatotoxicity. Aliment Pharmacol Ther 25: 1135-1151.

Choi JH, Lee SH, Park YH, Lee SG, Jung YT, Lee IS, Park JH, Kim HJ. 2013. Antioxidant and alcohol degradation activities of extracts from *Acer tegmentosum* Maxim. J Korean Soc Food Sci Nutr 42: 378-383.

Hong BK, Eom SH, Lee CO, Lee JW, Jeong JH, Kim JK, Cho DH, Yu CY, Kwon YS, Kim MJ. 2007. Biological activities and bioactive compounds in the extract of *Acer tegmentosum* Maxim stem. Korean J Medicinal Corp Sci 15: 296-303.

Hwang YH, Park H, Ma JY. 2013. *In vitro* and *in vivo* safety evaluation of *Acer tegmentosum*. J Ethnophamacol 148: 99-105.

Jung YT, Lee IS, Whang K, Yu MH. 2012. Antioxidant effects of *Picrasma quassioides* and *Chamaecyparis obtusa* (S. et Z.) ENDL extracts. J Life Sci 22: 354-359.

Kim CS, Yu RN. 2014. The inhibitory effect of quercetin on adipose tissue inflammation in mice fed on a high-fat diet. Korean J Obes 23: 170-178.

Kim TW. 1996. The woody plants of Korea in color. Kyohak Co., Seoul.

Kwon HN, Bang WS, Kim JY, Park JR, Jeon JR. 2011. Effect of *Acer tegmentosum* M. extracts on hepatocarcinoma cell. Korean J Food Sci Technol 43: 787-790.

Kwon HN, Park JR, Jeon JR. 2008. Antioxidative and hepatopretective effects of *Acer tegmentosum* M. extracts. J Korean Soc Food Sci Nutr 37: 1389-1394.

Lee CE, Jeong HH, Cho JA, Ly SY. 2017a. *In vitro* and *in vivo* anti-oxidative and anti-inflammatory activities of *Acer tegmentosum* Maxim extracts. J Korean Soc Food Sci Nutr 46: 1-9.

Lee HS, Kim HD, Ryu BH. 2000. Effects of soybean germ on the lipid composition of serum in cholesterol fed rats. Korean J Food & Nutr 13: 312-318.

Lee JI, Hwang IH, Jang TS, Na MK. 2017b. Isolation and quantification of phenolic compounds in *Acer tegmentosum* by high performance liquid chromatography. Bull Korean Chem Soc 38: 392-396.

Lee S, Moon G. 2010. Effects of mixture with *Hovenia dulcis* Thunb and *Acer tegmentosum* Maxim on liver failure induced by D-galactosamine in rats. J Korean Orient Int Med 31: 11-24.

Lee SB, Woo HJ. 2010. A study of the inhibitory effect of *Acer tegmentosum* Max. on fibrogenesis in hepatic stellate cell line T6. J Korean Orient Int Med 31: 346-355.

Lim BO, Seo TW, Shin HM, Park DK, Kim SU, Cho KH, Kim HC. 2000. Effect of *Betulae platyphyllae* Cortex on free radical in diabetic rats induced by streptozotocin. Kor J Herbology 15: 69-77.

Maggini M, Morelli M, Buzzigoli E, DeFronzo RA, Bugianesi E, Gastaldelli A. 2013. Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and its connection with insulin resistance, dyslipidemia, atherosclerosis and coronary heart disease. Nutrients 5: 1544-1560.

Ministry of Health and Welfare. 2017. Korea Health Statistics 2016. Korea National Health and Nutrition Examination Survey (KNHANES VI-3), Sejong. Korea Centers for Disease Control and Prevention.

Park KM, Yang MC, Lee KH, Kim KR, Choi SU, Lee KR. 2006. Cytotoxic phenolic constituents of *Acer tegmentosum* Maxim. Arch Pharm Res 29: 1086-1090.

Seo YH, Lee SH, Hwang HS, Choe SY. 2016. Effects of non-alcoholic fatty liver in rats by *Acer tagmentosum* Maxim extract. Korean J Food Nutr 29: 307-312.

Shimano H, Horton JD, Shimonura I, Hammer RE, Brown MS, Goldstein JL. 1997. Isoform 1c of sterol regulatory element binding protein is less active than isoform 1a in livers of transgenic mice and in cultured cells. J Clin Invest 99: 846-854.

Shin IC, Sa JH, Shim TH, Lee JH. 2006. The physical and chemical properties and cytotoxic effects of *Acer tegmentosum* Maxim. extracts. J Korean Soc Appl Biol Chem 49: 322-327.

Starley BQ, Calcagno CJ, Harrison SA. 2010. Nonalcoholic fatty liver disease and hepatocellular carcinoma: A weighty connection. Hepatology 51: 1820-1832.

Tung NH, Ding Y, Kim SK, Bae K, Kim YH. 2008. Total peroxyl radical-scavenging capacity of the chemical components from the stems of *Acer tegmentosum* Maxim. J Agric Food Chem 56: 10510-10514.

Uchiyama M, Mihara M. 1978. Determination of malondialdehyde precursor in tissues by TBA test. Anal Biochem 86: 271-278.

Wang M, Li J, Rangarajan M, Shao Y, Lavoie EJ, Huang TC, Ho CT. 1998. Antioxidative phenolic compounds from sage (*Salvia officinalis*). J Agric Food Chem 46: 4869-4873.