

해조류 김 추출물의 Triton WR-1339 유발 고콜레스테롤혈증 감소효과

홍용기 · 박인식* · 정영하** · 송상호*** · 홍성열

부경대학교 생물공학과 · **해양생물학과, *동국대학교 한의과대학 해부학교실, ***여수대학교 생물공학과

Effect of the Seaweed *Porphyra yezoensis* Extract on Triton WR-1339 Induced Hypercholesterolemia in Mouse

Yong-Ki HONG, In-Sick PARK*, Yeongha JUNG**, Sang-Ho SONG*** and Sung-Youl HONG

Department of Biotechnology, **Department of Marine Biology, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

*Department of Anatomy, College of Oriental Medicine, Dongguk University, Kyongju 780-714, Korea

***Department of Biotechnology, Yosu National University, Yosu 550-749, Korea

An antihypercholesterolemic effect was observed by intraperitoneal injection of the seaweed *Porphyra yezoensis* extract. Hypercholesterolemia was induced by intraperitoneal injection of Triton WR-1339 (600 µg/g-body weight) into a mouse. Maximum level of blood cholesterol was reached at 20 hours after Triton injection. By simultaneous injection of the *P. yezoensis* extract (30 µg/g-body weight) with the Triton into each right and left sides of the peritoneal cavity, levels of total cholesterol and low density lipoprotein were decreased to 37% and 24% compared to Triton injection only. For histochemical changes, hepatic tissues obtained at 40 hours after injection of the Triton and the *P. yezoensis* extract were fixed in fromol-calcium solution. Numbers of lipid drops and cholesterol particles decreased in the portal space of the hepatic cytoplasm. This indicates that the accumulation of lipid, including cholesterol, caused by Triton was prevented by the antihypercholesterolemic effect of extract from the seaweed *P. yezoensis*.

Key words: antihypercholesterolemia, antihyperlipidemia, *Porphyra yezoensis*, seaweed extract, Triton WR-1339

서 론

지단백질의 대사 이상으로 인해 나타나는 고콜레스테롤혈증 (hypercholesterolemia)은 최근 식생활의 변화 등으로 인하여 급증하고 있는 실정으로 (Myant, 1991; Robbins et al., 1989), 이의 가장 현저한 변화는 전체 콜레스테롤의 60~70%를 차지하는 저밀도지단백 (low-density lipoprotein: LDL) 농도의 상승으로 Karen et al. (1994) 및 Noriaki et al. (1989)은 간의 LDL receptor의 결핍, Hornick et al. (1983)은 apolipoprotein (Apo) 과잉생성. 그리고 Raul et al. (1990)은 식이로 유발된 triglyceride가 풍부한 chylomicron과 초저밀도지단백 (very low-density lipoprotein: VLDL)의 증가에 의해서 기인되는 것으로 보고되었다. 이러한 고콜레스테롤혈증은 Emeson and Shen (1993) 및 Keith (1991)의 보고에 의하면 임상적으로 동맥경화 (atherosclerosis)의 가장 뚜렷한 위험인자로 인지되고 있으며, 현재 고콜레스테롤혈증 예방 및 치료제의 개발을 위한 많은 연구가 진행되고 있는 실정이다. 본 연구는 해조류중 가장 양식 생산량이 많은 김 (*Porphyra yezoensis*)을 대상으로하여 그 추출물을 조제한후 항고콜레스테롤혈증 효과를 조사하였다.

해조류 김으로 부터의 콜레스테롤 감소효과 연구는 Abe and Kaneda (1973a)에 의하여 gamma-butyrobetaine이 주 작용 물질이라고 하였으나, 이의 화학합성물은 콜레스테롤 감소효과를 나타내지 못하였다 (Abe and Kaneda, 1973b). Noda (1993)에 의하여는 gamma-butyrobetaine, porphyran, taurine 등이 감소물질들이며 그중 고분자 다당류인 porphyran이 주 작용물질이라고 하였다. 그러나 김 추출물을 복강 (intraperitoneal cavity) 내에 주사하였을 경우에도 그 감소효과를 나타내었으므로 이의 주 작용물질이 고분자는 아닌 것으로 여겨져서 이들의 유효물질을 확인하기 위하여 보다 간편한 실험방법의 확립이 필요하다. 또한 김의 항고콜레스테롤혈증 효과가 강한 품종의 선별육종을 위하여 소량의 시료, 즉, 업체 단위에서의 감소효과를 측정할수 있는 방법이 필요하다. 따라서 장시간의 사육과 대량의 시료를 필요로 하는 식이섭취 실험이 아닌 고콜레스테롤 유발제인 Triton WR-1339 (Hayashi et al., 1982; Zeniya and Reuben, 1988)를 복강주사한 생쥐에 김의 추출물을 동시에 복강주사하여 혈중 총콜레스테롤 (total cholesterol: TC), 유리콜레스테롤 (free cholesterol: FC), 중성지방, 고밀도지단백 (high density lipoprotein: HDL), 저밀도지단백, 동

맥경화지수 (atherosclerogenic index; AI) 등의 변화를 측정하였으며, 동시에 간 조직내에서 일어난 지방의 분포 변화 및 콜레스테롤의 분포 변화 등의 형태학적인 세포 성분변화도 관찰하였다.

재료 및 방법

실험동물

실험에 사용한 쥐는 유전공학연구소 실험동물사육실에서 분양받은 태령 4 주된 ICR계 생쥐 수컷을 사육장치 내에서 2 주일동안 적응시킨 후, 체중 30~40 g된 생쥐를 선별하여 사용하였다. 이를 생리식염수 주사군, Triton 주사군, Triton과 김 추출물 주사군으로 나누었으며, 각각 10마리이상씩 배정하였다.

Triton 주사에 의한 고지혈증 유발

혈중 콜레스테롤 성분들을 인위적으로 증가시키기 위하여 생리식염수로 만든 120 mg/ml의 Triton WR-1339 (Sigma Chemical Co., USA) 용액을 사용하여, Triton 주사군과 또한 Triton-김추출물 투여군에 각각 생쥐 몸무게 1 g당 600 µg씩 복강주사하였으며, 그리고 대조군에는 동량의 생리식염수를 주사하였다.

김 추출물의 투여

김 시료는 경북 포항 장기곶 연안에서 건강한 성숙 조체를 채취하여, 증류수로 세척한 후 실온에서 약 15시간 정도 완전 건조시켜서 조체 1 g당 증류수 30 ml를 넣어 막자사발에서 약 3분간 충분히 마쇄한 다음, 2,000 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 그 상등액을 모아 0.22 µm filter 여과로 제균한후 시료로 사용하였다. 시료는 생쥐 몸무게 1 g당 추출물 건조 중량으로 30 µg 정도되게 주사하였다. 이때 Triton과 김 추출물은 복강 왼쪽과 오른쪽에 각각 위치를 달리하여 주사하였다.

혈장분리

생쥐의 꼬리 정맥 혈관부분을 칼로 약간 상처를 낸후, 혈액을 heparine처리된 모세관으로 채취한 다음, 석고로 밀봉하고 원심분리후에 혈장과 혈구를 분리하여 사용하였다.

콜레스테롤 정량

콜레스테롤 정량에 쓴 시액은 각각 아산제약회사에서 제조한 측정시액을 사용하였으며, 혈중 총콜레스테롤은 총콜레스테롤 측정시액 (AM 202-K)을 사용하여 혈장 4

µl에 효소시액 600 µl를 섞어 37°C에서 5분간 반응시켜 500 nm파장에서 그 흡광도를 측정하였다. 유리콜레스테롤은 측정시액 (AM 302-K)을 사용하여 혈장 20 µl에 효소정색시액 600 µl를 섞어 37°C에서 15분간 반응시켜 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 중성지방은 측정시액 (AM 157S-K)을 사용하여 혈장 4 µl에 측정시액 600 µl를 섞어 37°C에서 10분간 반응시켜 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 고밀도지단백은 측정시액 (AM 203-K)을 사용하여 혈장 40 µl에 분리침전시액 40 µl를 혼합하여 10분간 실온에 방치한후, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액 20 µl에 측정효소시액 600 µl를 혼합한후에 37°C에서 5분간 반응시킨 다음 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 저밀도지단백은 총콜레스테롤에서 고밀도지단백의 함량을 뺀 값으로 표시하였다. 그리고 동맥경화지수는 저밀도지단백을 고밀도지단백으로 나눈 값으로 표시하였다. 항고지혈증값 (antihyperlipidemic value; %)은 $100 \times (TE-S)/(T-S)$, 즉, TE는 Triton과 김 추출물을 주사한 군의 지질 성분 함량, S는 생리식염수를 주사한 군의 지질 성분 함량, T는 Triton만을 주사한 군의 지질 성분 함량으로 표시하였다.

통계분석

실험 자료는 평균 ± 표준편차로 표시하였으며, 유의수준 p<0.01로 student t-test를 실시하였다.

간 조직 표본 제작

Triton을 주사한 후 40시간이 되었을 때 생리식염수 주사군, Triton 주사군, 그리고 Triton과 김 추출물 주사군의 생쥐들을 경추탈구로 희생시켜 phosphate-buffered saline (PBS)으로 cardiac perfusion한 후 간을 적출하였다. 적출된 간조직은 10% 중성 포르말린 (neutral-buffered formalin; NBF) 용액에 담구어 실온에서 24시간 동안 고정된 후, 통상적인 방법으로 paraffine에 포매하고 5 µm두께로 연속절편을 만들었다. 연속절편은 hematoxyline과 eosin으로 염색하여 표본을 제작하였다.

간 조직 냉동절편 제작

지방 염색에 사용될 간 조직의 냉동절편의 제작은 위에서 서술한 방식대로 Triton 주사 후 40시간이 되었을 때, 생쥐를 경추탈구로 희생시켜 PBS로 cardiac perfusion한 후 간을 적출하였다. Sudan black B를 통한 지방 염색 시행에 필요한 냉동절편은 NBF에 고정된 후 30% sucrose 용액에 침지시켰다. 그런 다음 냉동절편기로 5 µm 두께의 냉동절편을 제작하였다. 한편, perchloric

acid - naphthoquinone (PAN) 염색법을 통한 콜레스테롤 염색에 사용될 냉동절편은 fromol-calcium 용액에 1 주 일동안 고정한 후, 위와 동일한 방법으로 냉동절편을 제작하였다.

간 조직의 지방 염색

간 조직의 지방염색은 Sudan black B 염색법으로 행해졌는데 우선 냉동절편을 100% propylene glycol로 10분간 탈수한 후, Sudan black B 용액에 10분간 염색하였다. 85% propylene glycol로 3분간 탈색한 후 증류수에 수세하고 nuclear fast red로 1분간 대조 염색하였다. 대조 염색 후, 증류수에 3회 수세한 다음 glycerin jelly로 봉입한 후, 광학현미경으로 관찰하였다.

간 조직의 콜레스테롤 염색

간 조직의 콜레스테롤 염색은 PAN 염색법으로 시행되었다. 우선 냉동절편위에 PAN 시약을 도포한 후 60°C incubator에서 용액의 색깔이 적색에서 청색으로 변화될 때까지 반응시킨다. 반응이 완료되면 60% perchloric acid를 적하한 후, 봉입하여 광학현미경으로 관찰하였다.

결 과

항고콜레스테롤혈증 효과

인위적인 고콜레스테롤혈증을 유발시키기 위하여 Triton WR-1339를 생쥐의 체중 1g당 600 µg 정도 생리식염수에 녹여 복강내에 주사하고 난 후, 시간별로 혈중 총콜레스테롤의 함량 변화를 측정된 결과는 Table 1과 같다. Triton 주사 후, 20시간부터 최고치에 도달하여 생리식염수 투여구보다 약 8배 정도의 총콜레스테롤 함량이 30시간까지 유지하다가 서서히 감소되었다. 또한 Triton과 김 추출물을 양쪽 복강에 각각 동시에, 혹은 10시간 후에 김 추출물을 주사하였을 경우 전반적으로 Triton에 의한 총콜레스테롤의 혈중 함량의 증가분에 대하여 약 1/2 정도 이하로 콜레스테롤이 감소되었으며, 특히 50시간째의 경우는 공히 Triton에 의한 증가분의 약 20%, 혹은 27% 정도 량만으로 비울적으로 감소시켰으므로, 김 추출물이 콜레스테롤의 혈중 유발방어보다는 배출에 더욱 강한 작용을 하는 것으로 나타났다.

지질 함량 변화

Triton 주사후 총콜레스테롤이 최고치에 도달하는 20시간후에 총콜레스테롤, 유리콜레스테롤, 중성지방, 고밀도지단백, 저밀도지단백, 동맥경화지수 등을 측정된 값은 Table 2와 같다. 김 추출물을 Triton과 동시에 주사하였을 경우에 총콜레스테롤 및 저밀도지단백이 Triton에 의해서만 증가하는 량에 대하여 각각 약 46% 및 24% 정도 량으로 감소되었으며, 그중 특히 저밀도지단백에 대

Table 1. Changes of total cholesterol in mouse injected with Triton WR-1339 and *P. yezoensis* extract

Time (hr)	0	10	20	30	40	50	60
Saline	54.2 ± 7.0	55.2 ± 6.8	57.7 ± 5.6	59.1 ± 6.6	56.7 ± 10.7	62.4 ± 6.3	57.9 ± 7.2
Triton	61.4 ± 5.4	294.2 ± 74.7	465.7 ± 11.6	466.1 ± 31.0	402.3 ± 76.4	365.8 ± 62.9	165.8 ± 53.8
Triton & extract ¹	—	—	295.0 ± 72.8	257.3 ± 71.7	190.7 ± 52.1	142.7 ± 35.0	96.3 ± 12.4
Antihypercholesterolemic value (%)	—	—	58	49	39	27	36
Triton & extract ²	58.6 ± 3.5	183.8 ± 68.3	243.4 ± 39.1	227.4 ± 59.5	150.6 ± 23.9	123.4 ± 34.8	87.8 ± 16.3
Antihypercholesterolemic value (%)	—	54	46	41	27	20	28

Total cholesterol was expressed as mean value (mg/dl) ± SD of at least 10 mice, and the statistical significance was $p < 0.01$. 600 µg of Triton WR-1339 were injected intraperitoneally per one gram of body weight. ¹30 µg of *P. yezoensis* extract were injected intraperitoneally per one gram of body weight, at 10 hours after Triton injection. ²30 µg of *P. yezoensis* extract were injected intraperitoneally per one gram of body weight, simultaneously with Triton injection.

Table 2. Levels of blood lipids in mouse injected with Triton WR-1339 and *P. yezoensis* extract

	TC (mg/dl)	FC (mg/dl)	TG (mg/dl)	HDL (mg/dl)	LDL (mg/dl)	AI (LDL/HDL)
Saline	57.7 ± 5.6	19.9 ± 1.0	267.0 ± 2.2	15.0 ± 0.8	47.7 ± 7.1	3.2
Triton	465.7 ± 11.6	165.9 ± 25.2	863.1 ± 42.8	71.5 ± 6.4	434.0 ± 26.6	6.1
Triton & extract	243.4 ± 39.1 ^a	127.5 ± 39.4 ^c	779.0 ± 39.6 ^b	67.0 ± 10.1 ^d	141.4 ± 27.9 ^b	2.1
Antihypercholesterolemic value (%)	46	74	86	92	24	

Total cholesterol was expressed as mean value (mg/dl) ± SD of at least 10 mice, and the statistical significance was ^a $p < 0.001$, ^b $p < 0.01$, ^c $p < 0.05$, ^d $p < 0.1$. 600 µg of Triton WR-1339 were injected intraperitoneally per one gram of body weight. 30 µg of *P. yezoensis* extract were injected intraperitoneally per one gram of body weight, simultaneously with Triton injection. Abbreviations; TC=total cholesterol, FC=free cholesterol, TG=triglyceride, HDL=high density lipoprotein, LDL=low density lipoprotein, AI=atherosclerogenic index.

하여는 강하게 이의 생성 억제 효과를 나타내었다. 그리고 고밀도지단백에 대한 저밀도지단백 비율로 표시되는 동맥경화지수는 김 추출물의 투여로 인하여 Triton 혹은 생리식염수 주사구에서 보다도 훨씬 낮은 수치로서 동맥경화 유발 가능성을 매우 낮추어주는 기능을 가지는 것으로 나타났다.

간 조직의 일반적인 형태 변화

간 조직내의 형태적 변화는 Triton 투여에 의하여 간 조직으로부터 지방 방울 및 콜레스테롤 입자의 수나 크기가 가장 많이 형성된 투여후 40 시간을 기준으로 하여 이때의 Triton 및 김 추출물이 간 조직에 미치는 영향을 조사하였다. 우선 생리식염수를 복강주사한 40 시간 후의 대조군은 정상적인 간세포판 (hepatic plate)의 배열을 볼 수 있었으며, 간조직 손상의 증거인 간세포의 괴사 (necrosis), 괴사된 간세포 주변의 림프구나 섬유아세포의 침적 (infiltration), 응혈 (blood coagulation) 및 액포화 (vacuolation)된 세포질 유실에 의한 간세포질의 그물구조 등의 형태적 변화는 나타나지 않았다 (Fig. 1). Triton 주사 후 40 시간대의 Triton 주사군은 대조군과 다른 양상의 형태적 변화가 관찰되었는데, Triton 주사 후 생긴 세포질의 액포화된 부분이 유실됨으로 생기는 그물구조를 가진 간세포가 중심정맥 주변부의 간세포에서 문맥공간 주변부의 간세포까지 골고루 나타났다 (Fig. 2). 특히 문맥공간 주변부의 간세포에서 세포질의 유실이 심해져 간세포들의 세포 경계의 구분이 어려워졌으며 그 결과 전체적인 간세포판의 배열이 사라졌다. 그러나 괴사 간세포 주변부에서 나타나는 림프구나 섬유아세포의 침적, 응혈은 관찰되지 않았다. 한편 Triton과 김 추출물을 양쪽 복강에 동시에 주사한 투여군에서 관찰된 간 조직의 형태적 변화의 차이는 액포화된 세포질 성분의 유실에 의한 세포질의 그물구조가 일부 문맥공간 주변부의 간세포에서만 나타났다. 또한 Triton 주사군에서 파괴되어 사라진 간세포판의 배열은 김 추출물 투여군에서는 관찰할 수 있었다 (Fig. 3).

지방 분포 변화

대조군인 생리식염수 주사군에서는 Sudan black B에 흑색으로 염색된 지방 방울이 간소엽 전체에 골고루 분포하는 양상이었으며 (Fig. 4), 그 염색된 지방입자의 크기도 적혈구에 비해 훨씬 작은 것으로 관찰되었다 (Fig. 5). 그러나 Triton 주사군에서 관찰된 지방 방울은 중심정맥 주변부에서부터 문맥 공간 주변부까지 전체 간소엽에서 그 수가 증가한 것으로 관찰되었으며 (Fig. 6),

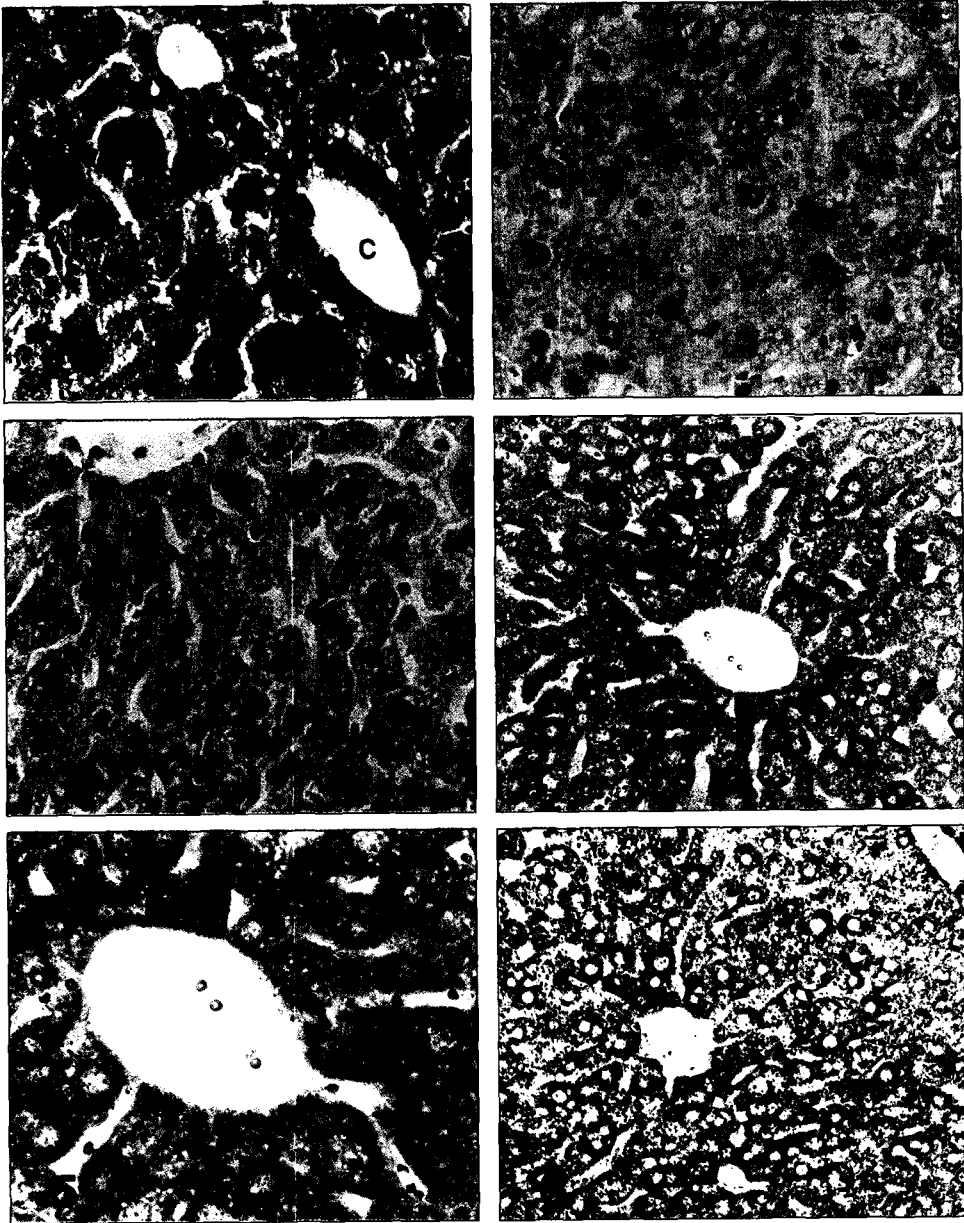
또한 간세포에 존재하는 지방의 입자도 커져 그 크기가 공 모양 모세혈관에서 관찰되는 적혈구와 비슷하였다 (Fig. 7). 김 추출물 투여군의 지방염색 결과는 대조군과 비슷한 양상으로 관찰되었는데 (Fig. 8), 그 크기도 적혈구보다 훨씬 작았다 (Fig. 9). 그러나 일부 간소엽의 문맥공간 주변부의 간세포에서 지방방울의 축적이 대조군 보다는 많은 것으로 나타났다. 또한 이 지역에서 나타난 지방입자의 크기도 대조군에 비해서는 큰 것으로 관찰되었다.

콜레스테롤 분포 변화

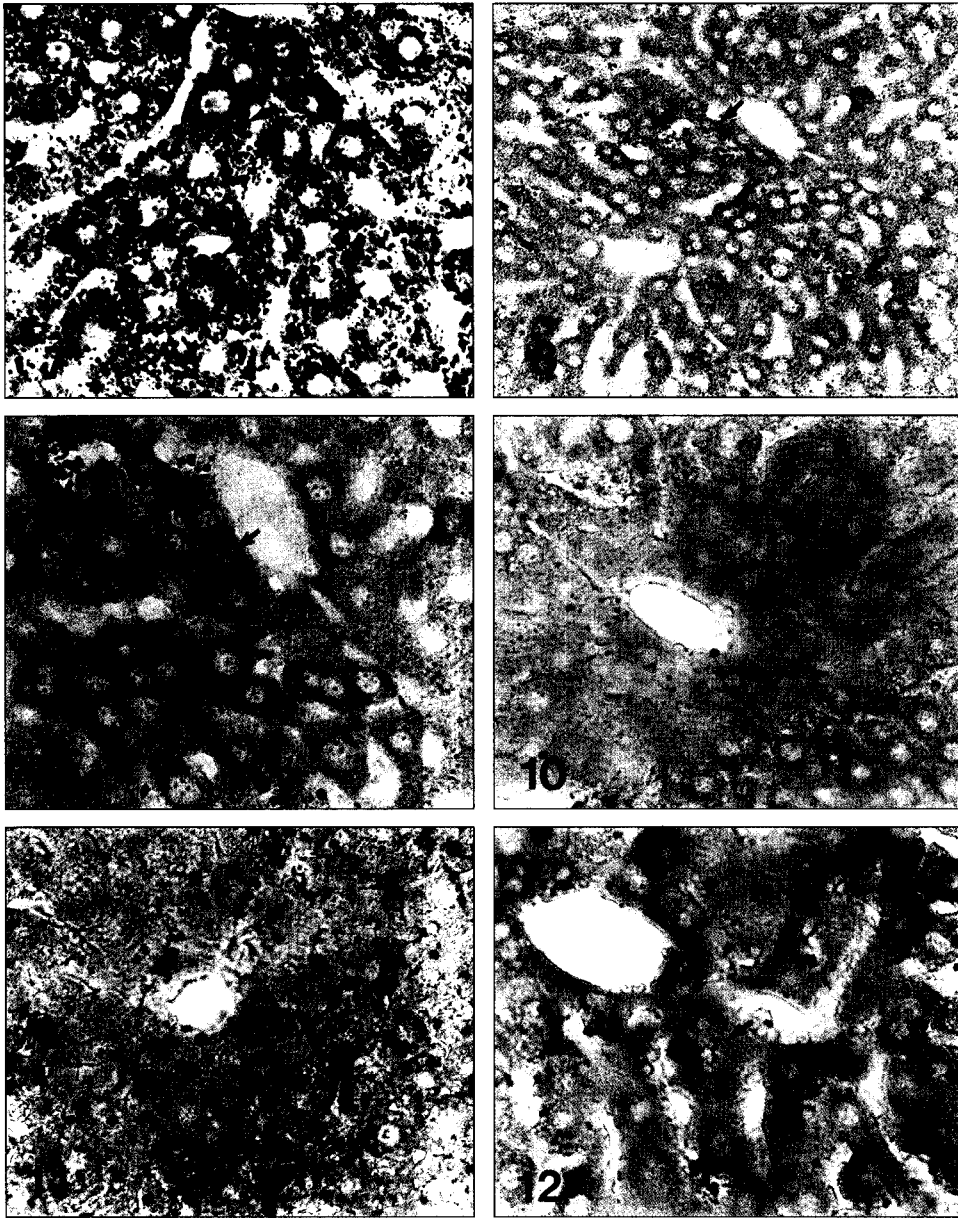
PAN에 짙은 흑색으로 염색된 콜레스테롤은 그 입자의 형태가 눈 입자와 유사하며 생리식염수군에서는 간소엽 전체에 골고루 분포하는 양상으로 관찰되었다 (Fig. 10). Triton 주사군에서 관찰된 콜레스테롤 입자의 분포 양상은 생리식염수군과 같이 전체에 골고루 분포하지만 많은 수의 콜레스테롤이 침착된 것으로 확인되었다 (Fig. 11). 그리고 콜레스테롤 입자의 크기도 대조군보다는 커진 것으로 나타났다. 김 추출물 투여군의 콜레스테롤 염색 결과는 그 분포면에서 대조군과 비슷한 양상으로 관찰되었다 (Fig. 12). 그러나 일부 문맥공간 주변부의 간세포에서 대조군보다는 많은 양의 콜레스테롤 침착이 나타났다. 그러나 Triton 주사군에 비해서는 그 침착되는 양이 어느정도 적은 것으로 관찰되었다.

고 찰

고콜레스테롤혈증은 Robbins et al. (1989)에 의하면 혈액내 콜레스테롤, 콜레스테롤에스터 및 triglyceride와 같은 지질의 농도가 증가되는 것이라고 하였으며, 실질 조직내에서는 지방의 비정상적 축적으로 인한 지방변성을 유도한다고 하였다 (Catlos and Goetz, 1984; Hayashi et al., 1982; Venkatesan et al., 1988). 이러한 고콜레스테롤의 병인으로는 triglyceride의 hydrolysis의 저해 (Dominique et al., 1991; Gerber and Erdman, 1981; Raul et al., 1990), LDL receptor 결핍의 결과인 LDL의 대사이상 (Karen et al., 1994; Noriaki et al., 1989), 그리고 Apo B의 transport율의 증가와 같은 지질과 지단백의 대사 이상으로 생기는 원발성인 것 (Vushkin and Dolgov, 1986)과 당뇨병, 갑상선 기능감퇴, 알콜성 간질환 등의 속발성인 것 (Robbins et al, 1989)으로 나눌수 있다. 특히 근래에 들어 식이성향의 서구화와 지방섭취량의 변화로 인해 지속적인 증가를 보이고 있으며, 콜레스테롤이 혈관내막에 침적됨으로서 야기되는 동맥경화의



- Fig. 1. The structure of liver tissue of mouse 40-hr after intraperitoneal saline injection. Hepatocytes and hepatic plates appear as normal. C, central vein. H & E stain. $\times 400$.
- Fig. 2. Liver tissue of mouse 40-hr after intraperitoneal Triton WR-1339 injection. Hepatocytes having meshlike cytoplasm are shown in the hepatic lobule, and the hepatic plates were disappeared in the region of lipid accumulation. Arrows indicate meshlike cytoplasm. H & E stain. $\times 400$.
- Fig. 3. Liver tissue of mouse 40-hr after intraperitoneal injection of each Triton WR-1339 and *P. yezoensis* extract into left and right sides of peritoneal cavity. The hepatic meshlike cytoplasm has disappeared in hepatic lobule. H & E stain. $\times 400$.
- Fig. 4. Central vein area of the liver 40-hr after intraperitoneal saline injection. The lipid drops in hepatocyte were demonstrated as dark blue colored spot by Sudan black B staining. Arrow indicates lipid drops. Sudan black B stain. $\times 200$.
- Fig. 5. Magnification of fig. 4. The size of lipid drops became smaller than RBCs in sinusoidal capillaries. Sudan black B stain. $\times 400$.
- Fig. 6. Lipid drops of the liver 40-hr after intraperitoneal Triton injection. Numbers of lipid drops were remarkably increased in all hepatic area. Arrows indicate lipid drops. Sudan black B stain. $\times 200$.



- Fig. 7. Magnification of fig. 6. The size of lipid drops are larger than in saline injected group. Sudan black B stain. $\times 400$.
- Fig. 8. Lipid drops of the liver 40-hr after intraperitoneal injection of each Triton WR-1339 and *P. yezoensis* extract into left and right sides of peritoneal cavity. The lipid drops were conspicuously decreased in all hepatic area compared to the Triton injected group. Arrows indicate lipid drops. Sudan black B stain. $\times 200$.
- Fig. 9. Magnification of fig. 8. The size of lipid drops was diminished compared to the Triton injected group. Sudan black B stain. $\times 400$.
- Fig. 10. Cholesterol particles of the liver 40-hr after intraperitoneal saline injection. The cholesterol particles in hepatocytes were demonstrated as dark green asterisk by perchloric acid-naphthoquinone (PAN) stain. Arrow indicates a cholesterol particle. $\times 400$.
- Fig. 11. Cholesterol particles of the liver 40-hr after intraperitoneal Triton-1339 injection. Numbers of particles were remarkably increased in all hepatic areas. Arrows indicate cholesterol particles. PAN stain. $\times 400$.
- Fig. 12. Cholesterol particles of the liver 40-hr after intraperitoneal injection of each Triton-1339 and *P. yezoensis* extract into left and right sides of peritoneal cavity. The cholesterol particles were conspicuously decreased in all hepatic areas compared to the Triton injected group. Arrows indicate cholesterol particles. PAN stain. $\times 400$.

발병 증가를 주도한다 (Keith, 1991; Myant, 1991).

이와같은 고콜레스테롤혈증은 지금까지 주로 쥐를 대상으로한 식이섭취 실험을 통하여 기작 연구 및 강하인자의 탐색 등 많은 연구가 이루어져 왔다 (최, 1992; 최와 양, 1993; Ren et al., 1994). 그러나 이같은 식이섭취 실험은 식품을 대상으로 한 그 효과 검증에는 매우 효과적이지만 선별육종 등의 목적으로는 소량의 시료로 단시간내의 효과 검증이 필요하므로 인위적인 고콜레스테롤 유발과 항고콜레스테롤 물질의 복강주사로 그 실험방법을 재확인하였다. 인위적인 고콜레스테롤혈증을 유발시키기 위하여 사용된 Triton WR-1339은 세포의 lipase 활성을 억제하여 혈액 내 triglyceride와 LDL를 증가시키고 (Hayashi et al., 1982; Lottenberg et al., 1992; Zeniya and Reuben, 1988), high-molecular-weight Apo B, free and ester-bound cholesterol, phospholipid, fatty acid의 농도도 증가시키며 (Hornick et al., 1983; Sharma, 1979), 또한 세포내 lipase 활성 억제에도 관여하여 세포내 triglyceride의 축적이 증가된다고 하였다 (Dominique et al., 1991). 그리고 복강주사로 인한 항고콜레스테롤 효과는 김의 추출물을 사용하여 Triton과 동시에 투여 한 실험군이나 10 시간 이후, 즉 고콜레스테롤이 유도된 이후 투여한 실험군에서 모두 40~50 시간후에 콜레스테롤의 현저한 감소를 나타내었으므로 이는 콜레스테롤의 배출에 강한 작용을 하는 것으로 여겨진다. 김에는 이미 γ -butyrobetaine, porphyran, taurine 등의 콜레스테롤 강하물질들이 존재한다고 알려져 있으며 (Noda, 1993), 이외에도 glycine의 함량도 매우 높아 (농촌영양개선연수원, 1986) 콜레스테롤에서 유래된 담즙산과 결합하여 최종적으로 taurocholic acid 및 glycocholic acid 형태로의 배출에 직접 도움을 주어 콜레스테롤 감소가 쉽게 이루어 진것으로도 여겨진다. 김 추출물을 복강내에 주사하여 그 감소효과를 확인하였으므로 이의 주 작용물질은 고분자 다당류인 porphyran 이외의 물질일 수도 있다. 김의 항고콜레스테롤혈증에 대한 주 작용물질을 확인하는 연구는 계속 중이다.

그리고 Triton 주사 후 간조직에서 나타나는 일반적인 형태변화는 간세포에 축적된 지방이 염색과정에서 유실되어 나타난 그물구조의 세포질을 가진 간세포가 중심정맥주변부에서 문맥공간주변부까지의 전체 간소엽에서 나타나는 것이다. 이러한 지방의 축적은 Triton이 세포내 lipase의 활성을 저해하여 triglyceride의 축적이 증가한다고 보고한 Dominique et al. (1991)의 견해와 일치한다. 한편 지방입자의 증가는 주로 콜레스테롤의 증가에 의해 주도된 것으로 이러한 생각은 Triton 주사 후 콜레스테

롤입자의 분포경향으로 설명할 수 있다. PAN 염색결과 눈입자모양을 하고 있는 콜레스테롤 입자의 분포변화는 Triton 주사군에서는 간소엽 전체에서 콜레스테롤 입자의 침착이 증가하였다. 이러한 콜레스테롤의 일련의 변화는 지방입자의 증가경향과 증가가 일어난 지역과 일치하는 것으로 관찰되었다. 이러한 Triton 주사군에서 나타나는 일련의 변화는 고지혈증에서 나타나는 병변으로서, 이것은 간세포에서 일시적인 지방대상장애 즉, 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA (HMG CoA) reductase에 의한 간세포내에서 cholesterol 합성 증가로 야기된 혈장 지단백의 증가와 같은 기전에 의한 지방축적이 나타난다는 사실과 일치하는 결과였다 (Baran et al., 1985; Goldfarb, 1978; Kasim et al., 1992).

간조직에서 나타나는 김 추출물의 항고콜레스테롤 효과는 일부 문맥공간 주변부를 제외하고는 Triton 주사군에 비해서는 이러한 그물구조가 적게 나타나는 일반적인 형태변화가 관찰되었다. 또한 지방분포도 일부 문맥공간 주변부를 제외하고는 지방방울이 어느정도 감소되었으며 콜레스테롤 입자의 분포도 크게 작아졌다. 이러한 김추출물에서 나타나는 결과는 Triton 주사에서 야기된 지방대사의 손실을 김추출물이 회복시키는 역할을 수행함으로써 간세포내에서 콜레스테롤축적이 Triton 주사군에 비해 저하된 것으로 생각할 수 있다. 이상의 결과로 미루어 보아 김 추출물은 항고콜레스테롤혈증에 유의한 작용을 할 것으로 사료되며, 아울러 동맥경화의 한 예방인자로서의 역할도 기대되는 바 앞으로 이 부분의 연구도 진행되어야 할 것이다.

요 약

대표적인 양식 해조류 중인 김 (*Porphyra yezoensis*) 추출물을 쥐에 복강주사하여 항고콜레스테롤 효과를 조사하였다. 고콜레스테롤혈증은 Triton WR-1339 (600 μ g/g-체중)를 복강주사하여 유도시켰다. 이때 혈중 콜레스테롤은 Triton 주사후 20시간만에 최대치로 상승되었다. 김 추출물 (30 μ g/g-체중)을 Triton과 동시에 복강 오른쪽과 왼쪽에 주사하였을 때 총콜레스테롤 및 저밀도지질단백은 Triton만의 주사 경우에 비하여 37% 및 24% 정도로 감소되었다. 그리고 조직화학적 변화를 보기위하여 쥐의 간 조직을 Triton 및 김 추출물을 주사한 후 40시간째에 fromol-calcium 용액에 고정시켰다. Triton 주사 후 간조직에서 나타난 일반적인 형태변화는 그물구조의 세포질을 가진 간세포가 간엽 전체에서 관찰되었고, 간세

포 손상으로 인한 간세포판은 사라졌다. 그러나 김 추출물 투여군에서는 그물구조의 세포질을 가진 간세포가 줄었으며, 간세포내에 침착되어 있던 지방 입자와 콜레스테롤 입자의 수와 크기도 감소하였다. 따라서 김 추출물은 Triton 주사로 인한 지방대사장애로 초래되는 고콜레스테롤혈증의 감소에 유의한 작용을 하는 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 1997년도 교육부 학술연구조성비 (해양수산 과학 KIOS-97-F-06)에 의하여 연구되었음.

참 고 문 헌

Abe, S. and T. Kaneda. 1973a. Occurrence of *r*-butyrobetaine in a red alga. *Porphyra yezoensis*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 39, 239.

Abe, S. and T. Kaneda. 1973b. Studies on the effect of marine products on cholesterol metabolism in rats. IX. Effect of betaines on plasma and liver cholesterol levels. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish., 39, 391~393.

Baran, J. S., I. Laos, D. D. Langford, J. E. Miller, C. Jett, B. Taite, and E. Rohrbacher. 1985. 3-Alkyl-3-hydroxyglutaric acid; a new class of hypocholesterolemic HMG CoA reductase inhibitors. J. Med. Chem., 28, 597~601.

Catlos, T. and W. R. Goetz. 1984. Sandritter's color atlas & textbook of histopathology. 7th ed. Year Book Med. Co., pp. 153~155.

Dominique, H., H. Paul, and N. B. David. 1991. Effect of lipase inhibitor, triton WR-1339 and tetrahydrolipstatin, on the synthesis and secretion of lipids by rat hepatocytes. FEBS., 286, 186~188.

Emeson, E. E. and M. L. Shen. 1993. Accelerated atherosclerosis in hyperlipidemic C57BL/6 mice treated with cyclosporin A. Am. J. Pathol., 142, 1906~1915.

Gerber, L. E. and J. W. Erdman. 1981. Hyperlipidemia in rat fed retinoic acid. Lipid, 16, 496~501.

Goldfarb, S. 1978. Rapid increase in hepatic HMG CoA reductase activity and in vivo cholesterol synthesis after triton WR-1339 injection. J. Lipid Res., 19, 489~494.

Hayashi, H., M. Shitara, and F. Yamasaki. 1982. The origin of lipid accumulated in the liver lysosomes after administration of triton WR-1339. J. Biochem., 92, 1585~1590.

Hornick, C. A., T. Kita, R. L. Hamilton, J. P. Kane, and R. J. Havel. 1983. Secretion of lipoproteins from the liver of normal and WHHR. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 80, 6096~6100.

Karen, F. K., R. M. Dawn, L. A. Linda, E. R. Steven, D. S.

Leslie, and M. W. James. 1994. In vivo correction of LDL receptor deficiency in the WHHR with recombinant adenoviruses. J. Bio. Chem., 269, 13695~13702.

Kasim, S. E., R. C. Leboeuf, S. Khilnani, L. Tallapaka, D. Dayananda, and K. L. Jen. 1992. Mechanisms of triglyceride-lowering effect of an HMG-CoA reductase inhibitor in a hypertriglyceridemic animal model, the Zucker obese rat. J. Lipid Res., 33, 1~7.

Keith, E. S. 1991. Atherosclerosis. Encyclo. Human Bio., 1, 447~455.

Lottenberg, A. M., H. C. Oliveira, E. R. Nakandakare, and E. C. Quintao. 1992. Effect of dietary fish oil on the rate of very LDL, triacylglycerol formation and on the metabolism of chylomicrons. Lipid, 27, 326~330.

Myant, N. B. 1991. Cholesterol. Encyclo. Human Bio., 2, 411~418.

Noda H. 1993. Health benefits and nutritional properties of nori. J. Appl. Phycol., 5, 255~258.

Noriaki, K., K. Toru, M. Atsushi, Y. Masayuki, I. Kenji, N. Yutaka, and K. Chuichi. 1989. Induction of mRNA for LDL receptors in heterozygous Watanabe heritable hyperlipidemic rabbit treated with CS-514 (Pravastatin) and Cholestyramine. Circulation, 79, 1084~1090.

Raul, G. M., A. R. Ivete, and H. H. Mario. 1990. Effects of triton WR-1339 and heparin on the transfer of surface lipids from triglyceride rich emulsions to HDL in rats. Lipid, 25, 701~705.

Ren, D., H. Noda, H. Amano, and T. Nishino, K. Nishizawa. 1994. Study on antihypertensive and antihyperlipidemic effects of marine algae. Fish. Sci., 60, 83~88.

Robbins, S. L., R. Cotran, and V. Kumar. 1989. Robbins pathologic basis of disease. 4th ed., W. B. Saunders, pp. 556~561.

Sharma, R. D. 1979. Effect of various isoflavones on lipid levels in triton-treated rats. Atherosclerosis, 33, 371~375.

Venkatesan, S., R. J. Ward, and T. J. Peter. 1988. Effect of chronic ethanol feeding on the hepatic secretion of VLDL. Biochim. Biophys. Acta., 96, 61~66.

Vushkin, M. L. and A. V. Dolgov. 1986. Activity of cholesterol metabolism enzymes and lipid levels in the rat liver, aorta, adrenals and serum after exposure to triton WR-1339. Vopr. Med. Khim., 32, 98~101.

Zeniya, M. and A. Reuben. 1988. Triton WR-1339 induced changes in serum lipids and biliary lipid secretion. Am. J. Physiol., 254, 346~354.

농촌영양개선연수원. 1986. 식품성분표. 3판. 농촌진흥청, 수원, 175 pp.

최재수, 양한석. 1993. 천연에 존재하는 고지혈증 개선 활성 성분의 탐색. 생명과학, 3, 79~90.

최재수. 1992. 고지질혈증과 그 치료약. 생명과학, 2, 134~137.

1998년 4월 16일 접수
1998년 7월 6일 수리