

고콜레스테롤 랫드에서 파리유충 추출물의 혈액지질 감소기전

박병성¹ · 박상오^{2†}

강원대학교 동물생명공학과¹, 동물자원공동연구소^{2†}
(2014년 2월 20일 접수; 2014년 3월 13일 수정; 2014년 3월 14일 채택)

Extracts of Housefly Maggot Reduces Blood Cholesterol in Hypercholesterolemic Rats

Byung-Sung Park¹ · Sang-Oh Park^{2†}

¹Department of Animal Biotechnology,

²Institute of Animal Resources, Kangwon National University,
Chuncheon 200-701, Republic of Korea

(Received February 20, 2014 ; Revised March 13, 2014 ; Accepted March 14, 2014)

요약 : 본 연구는 고콜레스테롤 식이를 섭취한 랫드에서 파리유충 에탄올추출물(Ethanol extract of fly maggot, EM)의 경구투여가 혈액 지질감소에 미치는 영향을 조사하였다. Sprague-Dawley 수컷 랫드를 이용하여 4 처리군(EM 투여량; 대조군=0, 5.0, 7.0, 9.0 mg/100 g 체중)로 구분해서 6주 동안 진행하였다. EM 투여군은 대조군과 비교할 때 혈청 중성지방, 총콜레스테롤, LDL-C가 유의하게 낮았다($p < 0.05$). HMG-CoA reductase activity는 대조군과 비교할 때 EM 투여군에서 낮았으나 총스테롤, 중성스테롤 및 담즙산 배설량은 EM 투여군에서 유의하게 높았다($p < 0.05$). EM의 혈액 콜레스테롤 감소와 관련한 생물학적 작용기작을 규명하기 위해서 고콜레스테롤 식이를 섭취한 랫드에서 유도된 생체유전자 sterol response element binding proteins (SREBPs) 및 the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR α) 발현을 측정하였다. EM은 고콜레스테롤 식이를 공급받은 랫드의 간에서 SREBP-1 α , SREBP-2 mRNA 발현을 억압함과 동시에 PPAR α mRNA 발현을 촉진시키는 것으로 나타났다($p < 0.05$). 본 연구의 결과는 파리유충 에탄올추출물이 고콜레스테롤 식이를 섭취한 랫드에서 지질대사와 관련한 생화학적 매개변수 및 유전자발현 조절을 통하여 혈액 콜레스테롤을 낮춘다는 새로운 사실을 발견하였다.

Abstract : The aim of this study was to evaluate the biological mechanism of orally administered ethanolic extract of fly maggot(EM) on hypocholesterolemic rats fed a high-cholesterol diet. Sprague Dawley male rats were divided into four groups (EM dose control=0, 5.0, 7.0, and 9.0 mg/100 g BW) and were treated for 6 weeks. EM groups revealed a significant reduction in serum triglyceride, total cholesterol, and LDL-C when compared with the control group($p < 0.05$). HMG-CoA reductase activity in EM groups were lower than those of the control group, but total

[†]Corresponding author
(E-mail: sopark@kangwon.ac.kr)

sterol, neutral sterol, and bile acid excretion were increased in EM groups when compared with the control group ($p < 0.05$). To identify the biological mechanism of EM towards the hypocholesterolemic effect, sterol response element binding proteins (SREBPs) and the peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR α transcription system were determined in rats fed a high-cholesterol diet. It was discovered that EM suppress the expression of SREBP-1 α and SREBP-2 mRNA in the liver tissues of high-cholesterol diet fed rats, while simultaneously increasing the expression of PPAR α mRNA ($p < 0.05$). This finding indicates that EM may have hypocholesterolemic effects in rats fed a high-cholesterol diet, by regulating cholesterol metabolism-related biochemical parameters and SREBP-1 α SREBP-2 and PPAR α gene expression.

Keywords : Blood lipid, HMG-CoA reductase, sterol, SREBPs, PPAR α .

1. 서 론

2012년도 한국인 사망률 1위인 암 다음으로 지질대사 이상에 기인한 뇌혈관, 심혈관 질환으로 인한 사망률이 매우 높은 것으로 알려졌다. 혈액 LDL-C와 중성지방 수준의 증가는 심혈관질환의 증가 위험 및 제2형 당뇨병, 비만을 포함하는 대사증후군 발생을 초래할 수 있다[1-2]. 혈액 중 유해한 지질 LDL-C와 중성지방은 유전자 및 식이에 의해 조절할 수 있다[3-4]. 지질대사에 포함된 여러 가지 목표 유전자 가운데 Sterol regulatory element binding proteins (SREBPs: SREBP-1 α , SREBP-1c, SREBP-2)는 콜레스테롤, 지방산, 중성지방 및 인지질의 합성 및 획득에 포함된 30개 이상의 유전자발현을 직접적으로 활성화하는 중요한 전사활성 유전자이다[5]. SREBP-1 α 는 콜레스테롤과 지방산 생합성 효소와 LDL 수용체 전사유전자의 발현을 촉진 조절하지만, SREBP-1c는 중성지방과 지방산의 합성에 포함된 유전자를 선택적으로 활성화하는 한편 SREBP-2는 HMG-CoA synthase, HMG-CoA reductase, LDL 수용체 전사유전자의 발현을 촉진 조절해서 콜레스테롤 항상성 유지에 중요한 유전자를 조절한다[6]. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs: α alpha, gamma, delta)은 유전자발현을 조절하는 전사인자로서 핵 수용체 단백질이다. PPAR- α 는 간에서 지질대사의 주요 조절자로서 PPAR- α 의 활성은 지방산 수송 그리고 퍼옥시좀과 미토콘드리아에서 지방산의 β -산화에 포함된 유전자의 촉진 조절에 의한 지방산의 획득, 이용 및 분해를 높여준다[7-8]. 천연물로부터 혈액 지질을 낮추기 위한

새로운 소재 개발과 함께 영양 및 의학적 관심이 집중되고 있다. 인위적인 환경에서 사육된 집파리 (*Musca domestica* L.)는 옥수수, 대두박, 분유, 설탕을 배지로 하여 자라는 곤충 의생명소재로서 약리 및 영양기능 분야에서 활용할 수 있다. 유충은 천연면역 구성분의 하나인 비특이적 항균펩타이드를 지닌 잠재적인 의생명 소재이다[9]. 유충은 예부터 오곡충으로 불려왔으며 유충은 독성이 전혀 없고 사람의 생체활성 기능과 함께 다양한 약리적 효능이 알려졌다. 중국 한의약재 총서인 중약대사전, 성체충류 및 조선시대의 본초강목에는 유충이 열병 발생 시 열을 내리는 효과가 있으며 본초편독에는 입술에 난 악성종기 치료에 처방한다고 명기되어 있다[10]. 유충을 이용한 화상 및 욕창환자에 대한 생체치료 기술이 항생제 내성균의 출현으로 의학분야에 새롭게 접목되기 시작했다[11]. 유충 분비물과 추출물로부터 MRSA, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* 균주에 대하여 강력한 항균펩타이드[12]가 보고되었다. 이전의 연구에서, 우리는 인위적인 환경에서 사육한 유충으로부터 에탄올추출물이 5 kDa의 항균펩타이드[13]를 함유함과 동시에 MRSA, VRE와 같은 항생제 내성균에 대한 *in vitro* 항균활성을 보고하였다[14]. 일반식이를 섭취하는 정상 랫드에서 혈액지질, 글루코스 함량 감소와 함께 면역물질, 맹장에서 유익한 미생물 *Bifidobacterium*의 선택적 증식 및 유기산 증가를 확인하였다[10]. 유충의 *in vitro* 항종양, 항균활성 및 *in vivo* 지질수준에 관한 많은 연구가 진행되었지만 고콜레스테롤 식이를 섭취하는 동물에서 혈액 지질 감소효과에 관련한 보고는 거의 없다[10, 15].

본 연구는 고콜레스테롤 식이를 섭취하는 랫드에게 파리유충 에탄올추출물(Ethanol extract of fly maggot, EM)의 경구투여가 혈액 지질 감소에 미치는 영향 및 그 작용기전을 규명하였다. 본 연구의 초점은 고콜레스테롤 식이를 섭취하는 랫드에서 추출물의 경구투여가 혈액 지질대사와 관련한 생화학적 매개변수 및 유전자 SREPB-1 α , SREPB-2, PPAR α -mRNA의 생체발현을 조사하는 것이다.

2. 실험

2.1. 추출물 제조

30°C의 공기순환 건조기에서 건조한 500 g의 2-3일령 유충을 (주)골든킹바이오 (서울)로부터 제공받아서 150 °C의 고온, 1,000 PSI로 30분 간 압착하여 98%의 지질을 제거한 다음 2차로 헥산을 이용하여 지질을 완전히 제거하였고 탈지유충 잔사를 얻었다. 탈지유충 잔사와 순수한 에탄올을 1:10의 비율로 혼합한 후 환류 냉각장치(Reflux condensing system)를 이용해서 EM을 얻었다. EM은 50°C 수욕 상에서 Rotary vacuum evaporator (Eyela N-1000, Tokyo Rikakikai Co., Japan)를 사용하여 감압, 농축하여 5 kDa의 항균펩타이드를 함유하는 추출물 4.30%를 얻었다. 항균펩타이드 분류 방법을 요약하면 아래와 같다. 파리유충에 Thermolysin을 처리하여 37°C, 8시간 배양을 통해서 수용성 단백질 가수분해물을 조제하였다. 가수분해물을 에탄올과 혼합한 다음 -20°C에서 24시간 동안 정치한 후 여과해서 에탄올 추출물을 얻었다. 에탄올추출물에서 MRSA strain 3595와 VRE strain 5117의 성장 억제 곡선과 최소억제 농도는 배양 후 농도 의존적으로 증가한다는 사실을 확인하였다. 에탄올추출물로부터 항균펩타이드는 Gel Chromatography에 의해서 분리하였으며 RP-HPLC를 이용하여 분석하였다[14, 16].

2.2. 실험설계 및 동물실험

동물실험은 유럽 실험동물취급 면허고재[17]에서 제시된 윤리적이고 과학적인 절차에 따라서 수행하였으며 강원대학교 동물실험윤리위원회 의 승인 (No: 017/07/2009)을 얻었다. 40마리 수컷 Sprague-Dawley strain (체중 200-210 g)을 대 한바이오텍(충청북도 진천)로부터 공급받았다.

4그룹 (EM 투여량: 대조군=0, 5.0, 7.0, 9.0 mg/100 g 체중)으로 구분하여 그룹 당 10마리씩 케이지 당 1마리씩 완전임의배치 하였다. 기초 실험식은 AIN-93[18]에 기초한 정제식이를 조제, 펠렛팅하였고 조단백질, 총에너지함량을 동일하게 조절하였다. 실험식의 조성은 카제인(casein-vitamin free) 20%, 옥수수전분 39.75%, 말토덱스트린 13.20%, 설탕 10.00%, 대두박 7.00%, 분말 셀룰로오스 5.00%, AIN 93G 미네랄 혼합제 3.50%, AIN 93G 비타민 혼합제 1.00%, L-시스틴 0.30%, choline bitartrate 0.25%, t-butylhydroquinone 0.0014%로 구성되었다. 고콜레스테롤 식이는 혈액 중 VLDL-콜레스테롤의 고수준을 유도하기 위해서 Sodium cholate 0.25%와 콜레스테롤 (Sigma Chemical Co., St, Louis, MO, USA) 0.5%를 기초 실험식의 옥수수 첨가량을 낮추어서 조절, 제조하였다. EM을 제공받지 않은 대조군은 생리식염수 1 mL, EM 투여군은 서로 다른 EM 경구투여량 (5.0, 7.0, 9.0 mg/100 g 체중)을 생리식염수 1mL에 용해 후 매일 일정한 시간에 직경 1 mm의 위관을 이용해서 경구투여 하였다. 물과 식이에 자유롭게 접근할 수 있는 표준환경 하에서 6주간 실험처리를 하였다. 사육실의 온도 21-23°C, 상대습도 55-57%, 12시간 조명으로 조절하였다.

2.3. 혈액 지질

랫드는 6주 후 희생 10시간 전에 사료를 철취하였고 에틸에테르로 가볍게 마취시킨 후 심장천공에 의해서 전혈 2 mL를 혈청 분리튜브 (SST tube, BD, Falcon, SanJose, CA, USA) 속으로 수집하여 2,200 g 원심분리에 의해서 혈청을 얻었다. 중성지방, 총콜레스테롤, 고밀도지단백질-콜레스테롤 (High density lipoprotein-cholesterol, HDL-C), 저밀도지단백질-콜레스테롤 (Low density lipoprotein-cholesterol, LDL-C) 농도는 상업용 효소키트 (Sigma Co., Louis, MO, USA)을 이용하여 자동분석장치 (Hitachi 917, Japan)에 의해서 측정하였다[19].

2.4. HMG-CoA reductase activity

HMG-CoA reductase activity는 Qureshi *et al.* (1983)의 방법[20]에 따라서 균질화용 완충제를 이용하여 105,000 g에서 3회의 원심분리에 의해서 얻어진 추출한 마이크로솜 20 mg을

Potassium phosphate buffer (100 mM, pH 7.4), EDTA (1 mM) 및 dithiothreitol 1 mM에 부유 후 균질화 하였다. 균질물 20 μ L (마이크로솜 단백질 50~300 μ g)를 취하였다. Triton X-100 (0.5%, v/v)를 이용하여 0°C에서 60분 배양 후 10분 동안 8,000 g에서 원심분리 한 다음 얻어진 상등액을 생화학적 분석 시까지 -80°C에서 보관하였다. NADPH, HMG-CoA reductase를 이용하여 제조된 각각의 혼합용액을 첨가하여 37°C에서 30분간 배양하였다. 340 nm에서 반응 직전과 반응 후의 흡광도를 Jasco-UVIDEc-610 double beam spectrophotometer (Japan)를 이용하여 측정하였다. NADPH의 내인성 산화율을 측정하여 그 값을 보정해주었고 HMG-CoA reductase activity는 NADPH의 산화에 의해 감소된 양으로서 표시하였다.

Specific activity = pmoles NADPH oxidised/mg microsomal protein/min

2.5. 스테로이드 배설

동물의 분변으로 배설된 중성스테롤과 담즙산은 Park과 Jang (2008)의 방법[21]에 따라서 진행하였다. 실험종류 5일 동안 분변을 수집하였으며 동결건조기 (SFDSF12, Samwon Co. Ltd, Busan, Korea)에서 동결건조 하였다. 건조된 분변의 중성스테롤과 담즙산은 2×10 Volumes of alkaline ethanol (KOH 0.5 mol/L)에 의해서 70°C에서 2시간 동안 2회 추출하였다. 담즙산은 3- α -hydroxysteroid dehydrogenase (Sigma, USA)에 의한 촉매반응으로 정량하였다. KOH 용액(100 μ L) 중 중성스테롤은 내부 표준물질로써 5- α -cholestane (Sigma, USA)을 첨가 후 헥산 (500 μ L)을 이용하여 3회 추출하였다. 헥산 추출물은 200 μ L로 농축하였고 trimethylsilyl (TMS) ethers로 유도하였으며 2 μ L를 DBM capillary column (0.25 mm×30m, J & W Scientific, Folsom, CA)과 flame ionization detector가 부착된 Gas-liquid chromatography (GLC, Packard model 439, USA) 속으로 주입하였다. 이동가스로써 헬륨을 사용하였고 스테롤 분리를 위해서 Isocratic temperature (260°C)를 유지하였다. Split ratio는 10:1이었으며 스테롤 농도는 내부 표준물질 면적에 대한 시료 피크 면적의 상대적인 비율로 계산하였다.

2.6. 생체 유전자 SREPBs, PPAR α 발현

간에서 Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)에 대한 sterol regulatory element binding proteins (SREPB-1 α , SREPB-2), Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR α) 및 지방조직에서 β -Actin에 대한 lipoprotein lipase (LPL) mRNA transcripts의 상대적인 수준을 Real-Time Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)에 의해서 측정하였다. 요약하면, 간, 지방조직을 채취 후 액체질소에 급속 동결해서 -80°C 보관하였다. 30 mg의 간, 지방조직에 Xprep Tissue RNA Mini Kit (Philekorea Technology, PKT)의 lysis buffer를 사용하여 총 RNA를 추출하였다. RNA 농도는 NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (USA)를 사용하여 260 nm에서 흡광도에 의해서 측정하였으며 추출된 RNA 300-500 ng/ μ L를 얻었다. 추출된 1 μ g RNA를 cDNA synthesis kit (PKT)를 이용하여 1st strand cDNA를 합성하였다. cDNA는 70°C 5분, 42°C 30분, 85°C 5분 배양하여 증폭하였다. 최종적으로, cDNA는 RT-PCR에 의해서 주형 (Template)으로써 사용되고 기준 유전자 (Reference gene)인 GAPDH에 대한 각 목표 유전자의 mRNA 전사에 관한 상대적인 농도를 확인하였다. RT-PCR은 QuantiMix SYBR Kit (PKT)를 이용하였으며 cDNA를 증류수로써 1/5로 희석한 후 각 프라이머 (Forward 및 Reverse)를 혼합하여 수행하였다. 유전자 발현은 Eco Real-Time PCR (Illumina Inc.)에서 제시한 유전자발현 프로토콜의 메뉴얼에 따라서 실행하였다. GAPDH와 β -actin는 기준유전자 (house keeping gene)로써 mRNA의 농도 조절로써 사용하였다. Specific oligonucleotide primer는 다음과 같다: GAPDH

forward 5'-TGCACCACCAACTGCTTAG-3',

reverse 5'-GGATGCAGGGATGATGTTTC-3';

SREPB-1 α

forward

5'-ATGGACGAGCTGCCCTTCGGTGAGGCG

GCT-3',

reverse

5'-CCTGGCGATGGCTGTGTGCTG-3';

SREPB-1

forward

5'-TTTGTGAGCAATCAAGTGGGAGAGTTC-

3',
reverse
5'-GCTGCGTTCTGGTATATCAAAGGCTGC-
3';
PPAR α forward
5'-CCCTCTCTCCAGCTTCCAGCCC-3',
reverse
5'-CCACAAGCGTCTTCTCAGCCATG-3'
 β -actin
forward 5'-CTCTTCCAGCCTTCCTTCCT-3',
reverse 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3';
LPL
forward 5'-CAGCTGGGCCTAACTTTGAG-3'
reverse 5'-AATGGCTTCTCCAATGTTGC-3'.

2.7. 통계분석

본 연구로부터 얻어진 결과는 SAS 프로그램을 이용하여 일원분산 (ANOVA)에 의해서 분석하였다. 모든 자료는 평균 \pm 표준편차(n=10 마리/그룹)로 나타냈으며 그룹간의 차이는 던칸의 다중검정에 의하여 p<0.05에서 유의성을 검정하였다 [22].

3. 결 과

3.1. 혈액지질

동물에서 식이섭취량 (34.12 \pm 3.20 g/일)과 체중 증가량 (0.93 \pm 0.68 g/일)은 처리구 사이의 차이가 없었다. EM을 경구투여 한 랫드의 혈액 지질농도를 조사한 결과는 Fig. 1에서 보는바와 같다. HDL-C를 제외한 지질은 대조군과 비교할 때 EM투여군에서 감소하였고 EM 7, 9 mg 투여군은 EM 5 mg 투여군에 비해서 더 많은 감소를 보였다. 각 처리구 사이의 통계적인 유의차가 나타났다 (p<0.05). 중성지방, 총콜레스테롤, LDL-C는 EM 투여군이 대조군과 비교할 때 각각 20.15, 18.77 및 27.60% 감소하였다. HDL-C는 EM 투여군이 대조군과 비교할 때 141.43% 유의하게 증가하였다 (p<0.05).

3.2. HMG-CoA reductase activity

EM을 경구투여 한 랫드에서 HMG-CoA reductase activity는 Fig. 2에 나타났다. 간에서 콜레스테롤 합성과 관련한 중요한 효소 HMG-CoA reductase activity는 대조군과 비교

할 때 EM 투여군에서 19.85%까지 유의하게 낮아졌다 (p<0.05). EM 9 mg 투여군은 EM 5, 7 mg 투여군에 비해서 더 낮은 효소활성을 보였으며 각 처리구 사이의 통계적인 유의차가 나타났다 (p<0.05).

3.3. 스테롤의 배설

EM을 경구투여 한 랫드에서 분변을 통해서 배설한 스테롤의 제거율은 Fig. 3에 나타났다. 총스테롤의 제거는 EM 투여량에 의존적으로 26.78% 증가하였으며 총중성스테롤, 총콜레스테롤, Coprostanol은 EM 투여군에서 23.76, 36.25, 5.55%(EM 5 mg 투여군)까지 각각 유의하게 증가하였다 (p<0.05,). 총산성스테롤, 담즙산의 배설량은 EM을 투여 했을 때 31.17~33.35% 더욱 커졌으며 EM 7, 9 mg 투여군은 5 mg 투여군보다 더 높은 담즙산을 배설하였고, Lithocholic acid, Deoxycholic acid, Cholic acid 및 Chenodeoxycholic acid의 농도는 EM 투여군이대조군 보다도 각각 17.65, 21.48, 30.10, 107.87% 더욱 커졌다 (p<0.05).

3.4. SREPBs 및 PPAR α 유전자 발현

EM을 경구투여 한 랫드에서 SREPB-1 α , SREPB-2와 PPAR- α 의 상대적 수준은 Fig. 4에서 보는 바와 같다. SREPB-1 α , SREPB-2의 상대적 수준은 EM 투여군에서 대조군 보다도 각각 0.25-0.54, 0.22-0.59 낮았으며 PPAR- α 의 상대적 수준은 0.55 유의하게 높았다 (p<0.05). EM 투여군에서 SREPB-1 α , SREPB-2의 상대적 수준은 7, 9 mg 투여군이 5 mg 투여군과 비교할 때 각각 0.25-0.29, 0.32-0.37 낮았다. 이와 반대로 PPAR- α mRNA 전사유전자의 상대적 수준은 7, 9 mg 투여군이 5 mg 투여군 보다도 0.16-0.20 유의하게 높았다 (p<0.05). 한편, EM 7, 9 mg 투여군 사이에서 SREPB-1 α , SREPB-2, PARR- α 의 상대적 수준은 통계적인 유의차가 나타나지 않았다.

4. 고 찰

본 결과에서 발견한 중요한 사실은 고콜레스테롤 식이를 섭취한 랫드에서 EM의 투여가 혈액 내 유해한 LDL-C를 낮출 수 있다는 점이었다. 정상 랫드에서 EM이 혈액 LDL-C를 유의하게

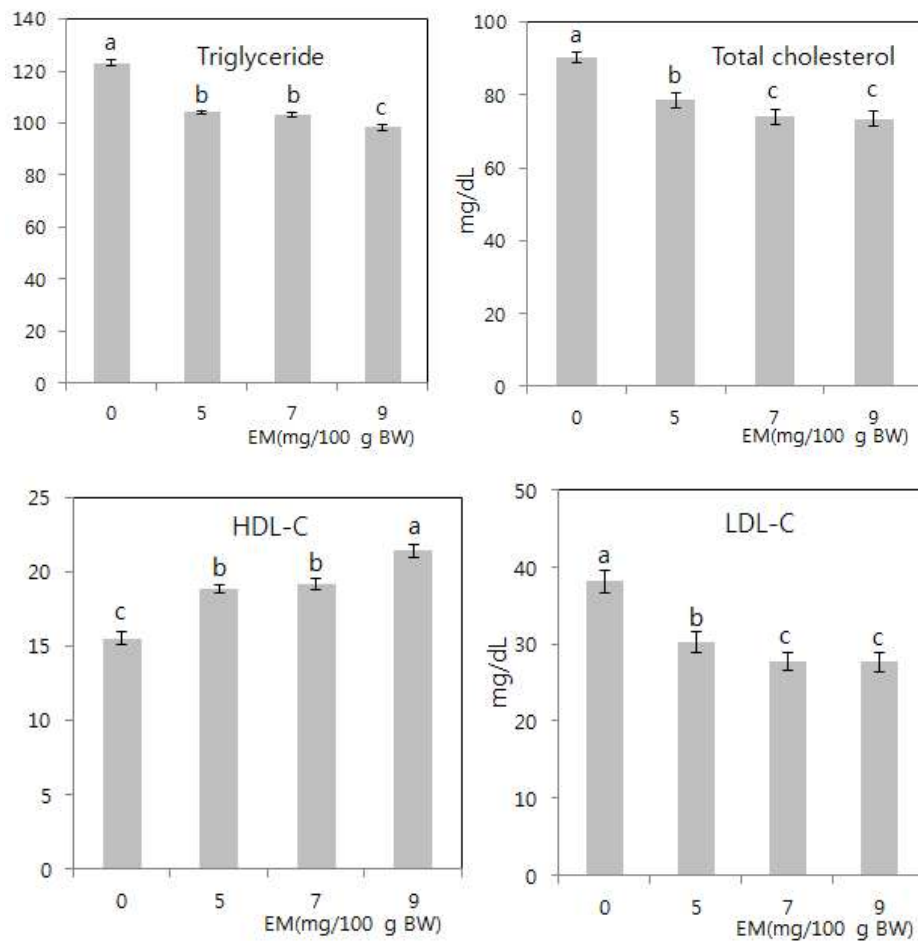


Fig. 1. Changes in serum lipid profiles after ethanolic extracts of fly maggot(EM) oral administration in rats fed high-cholesterol diets. Bars \pm SD(n=10). ^{a,b,c}p<0.05 among groups.

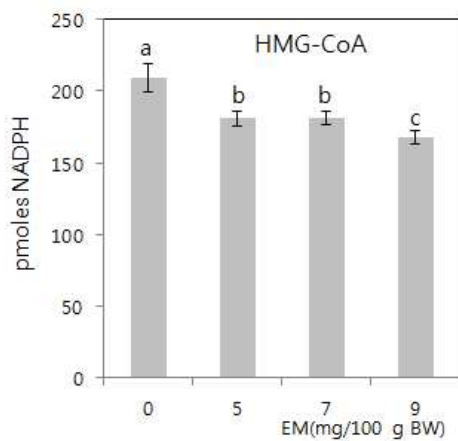
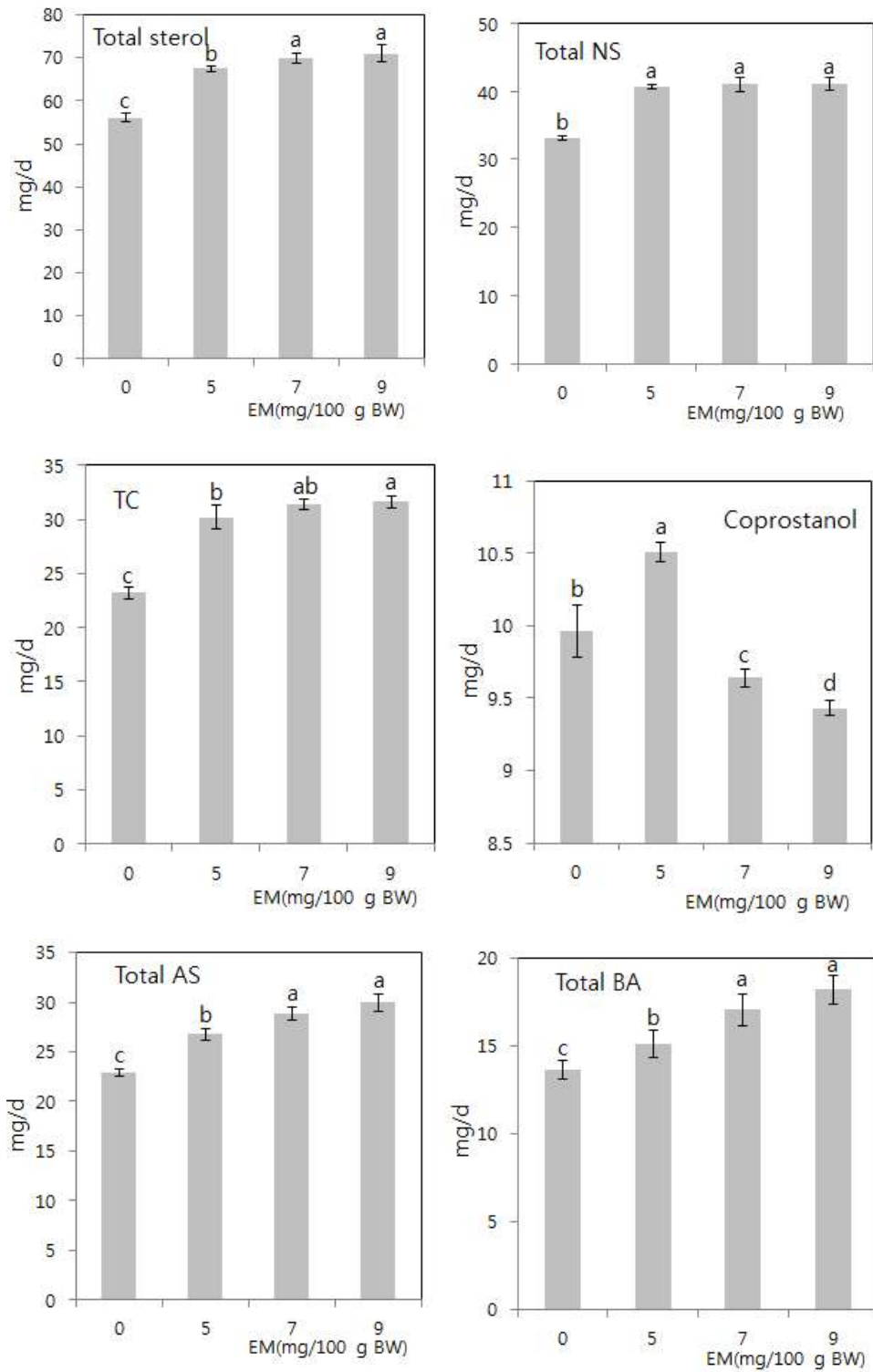


Fig. 2. Changes in HMG-CoA reductase activity after ethanolic extracts of fly maggot(EM) oral administration in rats fed high-cholesterol diets. Bars \pm SD(n=10). HMG-CoA reductase activity: pmoles NADPH oxidized/mg microsomal protein/min. ^{a,b}p<0.05 among groups.



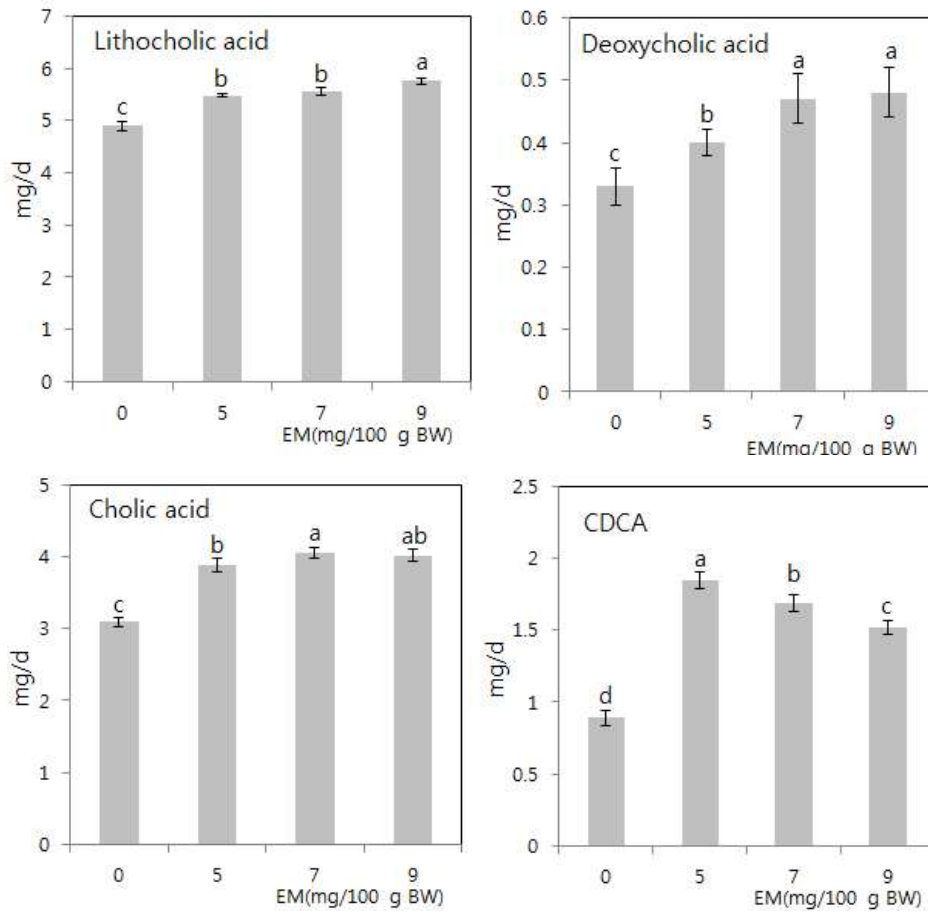


Fig. 3. Excretions of fecal sterol after ethanolic extracts of fly maggot(EM) oral administration in rats fed high-cholesterol diets. Bars±SD(n=10). Fecal excretion: mg/rat/day. ^{a,b,c}p<0.05 among groups.

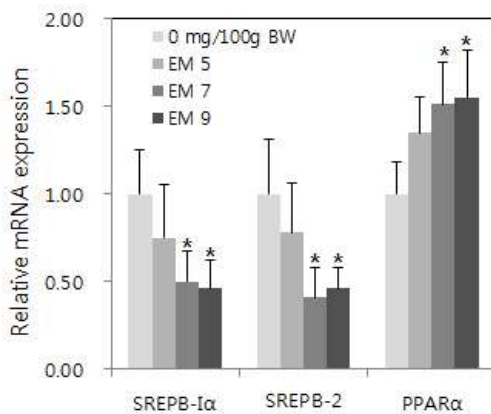


Fig. 4. Relative mRNA expression after ethanolic extracts of fly maggot(EM) oral administration in rats fed high-cholesterol diets. SREPB-1α, SREPB-2: Sterol regulatory element binding proteins, PPARα: Peroxisome proliferator-activated receptors. Bars±SD(n=10). *p<0.05 EM groups vs Control group.

낮출 수 있었다는 Park (2007)[13]의 결과는 본 결과를 지지해준다. EM에 의한 혈액 지질감소 기전은 완전히 이해되지 않았다. EM은 항균펩타이드를 함유하고 있기 때문에 콜레스테롤 감소효과는 동물의 맹장에서 *Bifidobacteria* 및 *Lactobacillus*의 증식에 의한 비피더스 활성화에 의한 것으로 생각할 수 있다[10, 23]. 항균펩타이드는 유해세균의 막전위 파괴 및 자기면역성에 의해서 *Bifidobacteria* 와 *Lactobacillus* 균수를 증가시키는 것으로 알려졌다[24]. *Bifidobacteria* 및 *Lactobacillus*는 혈액 지질대사를 조절하여 줌으로써 중성지방과 콜레스테롤을 낮춘다[25]. 본 연구에서 EM의 콜레스테롤 감소효과는 지질 매개 변수에 대한 각 변화가 짧은 사슬지방산에 의해 유도될 수 있는 간 조직의 대사적응의 결과일 것으로 가설한다. 최근에 우리는 EM을 경구투여한 정상 랫드에서 맹장 내 *Bifidobacteria* 및 *Lactobacillus*의 선택적 증식에 의해 초산, 프로피온산과 같은 짧은 사슬지방산이 증가함을 보고하였다[10]. 랫드에서 간 세포분리 실험결과 초산, 프로피온산은 생체 콜레스테롤 합성을 억압하고 짧은 사슬지방산은 혈액 콜레스테롤을 낮추는 것으로 보고되었다[23]. 올리고프럭토스를 섭취한 랫드로부터 분리된 간 세포배양 결과에서 유리지방산, 초산으로부터 중성지방의 합성이 낮아지고 Fatty acyl synthase activity가 감소하는 것으로 보고되었다[25]. 고콜레스테롤 식이를 섭취한 랫드에서 EM의 투여가 이와 같은 LDL-C의 감소를 나타낸 점으로 볼 때 사람에게 대한 지질대사 개선의 생체활성 효과를 갖는 것으로 생각할 수 있다.

본 결과 EM의 투여가 동물의 간에서 HMG-CoA reductase의 활성을 억제함과 동시에 분변을 통한 스테롤의 배설을 촉진시켜줌으로써 혈액 LDL-C를 낮춘다는 사실을 새롭게 확인할 수 있었다. 간에서 HMG-CoA reductase activity가 억제되었고 분변을 통한 스테롤 배설량이 증가한 점은 EM 내 함유된 항균 펩타이드의 *Bifidobacteria*의 선택적 증식에 의한 비피더스 활성화효과로 생각할 수 있다[10, 23-24]. 간에서 콜레스테롤 생합성의 비울제한 효소인 HMG-CoA reductase activity의 억제는 혈액 콜레스테롤 농도를 낮춘다[26]. 고콜레스테롤 랫드에서 HMG-CoA 유전자 발현(측정하지 않았음)은 정상식이를 섭취한 랫드에 비해서 억제되었으며 혈액 중 중성지방과 LDL-콜레스테롤이 감소

하는 것으로 보고되었다 [26].

EM 경구투여는 간에서 콜레스테롤로부터 합성된 1차 담즙산 (CA, CDCA)의 증가 및 장 내 미생물에 의해서 만들어진 2차 담즙산 (LCA=불용성, 재흡수되지 않음, DCA)를 현저하게 증가시켜서 분변을 통한 담즙산의 배설 양상을 바꿨다[27]. Higaki *et al.* (2006)은 정상 랫드에서 대두 단백질에 포함된 펩타이드가 담즙산과 결합하고 이러한 담즙산이 분변으로 배설되었다고 하였다[28]. 인간과 동물에서 *Bifidobacteria* 및 *Lactobacillus*의 혈액 콜레스테롤 감소효과에 관한 기전은 이러한 미생물의 발효산물이 콜레스테롤 합성효소의 활성을 억제하여 콜레스테롤 생성을 낮춤과 동시에 분변을 통한 콜레스테롤 제거를 촉진하기 때문으로 알려졌다. *Bifidobacteria* 및 *Lactobacillus*가 콜레스테롤과 결합해서 신체속으로 콜레스테롤의 흡수를 억제함과 동시에 담즙염의 재순환 (콜레스테롤의 대사산물)을 간섭하고 콜레스테롤로부터 만들어진 담즙산의 제거를 촉진하는 것으로 알려졌다[29]. 담즙산의 배설량 증가는 간에서 지질단백질 합성을 초래하는 소량의 콜레스테롤이 담즙산 합성으로 바뀌는 것으로 볼 수 있다[23].

EM의 투여가 간 조직의 콜레스테롤 대사를 조절하는 SREPB-1 α , SREPB-2와 PPAR α 유전자의 mRNA 수준을 조절하여 줌으로써 혈액 콜레스테롤을 낮춘다는 사실을 확인하였다. SREPBs는 콜레스테롤 합성에 포함된 HMG-CoA와 또 다른 효소에 대한 유전자 전사를 활성화시킨다. 혈액 콜레스테롤의 증가는 핵에서 막 중지와 단백질 분해로부터 SREPBs의 단백질 가수분해를 촉진한다[30]. EM 투여군에서 HMG-CoA reductase activity와 SREPB-1 α , SREPB-2의 유전자 발현이 낮았던 점은 이와 관련되었을 것으로 볼 수 있다. SREPB-1 α , SREPB-2는 지단백질 획득, 콜레스테롤, 중성지방 및 LDL 합성에 포함된 대다수의 유전자발현을 조절할 수 있다[6]. PPAR- α 는 미토콘드리아와 간 지방산의 β -산화에 포함된 유전자발현을 조절한다[30]. 일반식이를 섭취하는 랫드와 비교할 때 고콜레스테롤 유도 랫드에서 SREPBs와 HMG-CoA 유전자 발현은 억제되며 이는 혈액 지질을 낮추는 원인이 될 수 있다[26]. EM의 경구투여가 랫드의 간에서 SREBP-1 α , SREBP-2의 억압을 통하여 콜레스테롤 생합성 유전자 발현이 하향조절 되었고 PPAR α 의 활성화를 통하여 지질분해 유전자가

상향조절 되었을 것으로 본다. 고콜레스테롤 식이를 섭취하는 랫드에서 SREPB-1 α , SREPB-2 mRNA 전사를 억제하였지만 PPAR- α mRNA 전사가 증가하였다는 점을 밝혀냈다. 그러므로 지방합성을 촉진하는 SREPB-1 α , SREPB-2의 하향조절된 유전자 발현과 지질분해를 조장하는 PPAR- α 의 상향조절된 유전자 발현은 EM 내 존재하는 항균 펩타이드에 의해서 나타난 비피더스 활성효과의 기여로 볼 수 있을 것이다.

5. 결 론

결론적으로, 고콜레스테롤 식이를 섭취하는 랫드에서 EM의 경구투여가 혈액 지질 감소효과를 갖는다는 새로운 사실을 확인하였다. 혈액 지질 감소와 관련한 기전으로 HMG CoA reductase activity 억제, 분변을 통해서 배설되는 스테롤의 배설량 증가 그리고 SREPB-1 α , SREPB-2 mRNA의 하향조절과 동시에 PPAR- α mRNA의 상향조절에 의해서 나타난다는 점을 규명하였다.

감사의 글

본 연구는 2009년도 농림축산식품부 기술개발 과제 일반자유공모비로 지원되었습니다.

References

1. B. S. Park, N. K. Sungh, and A. M. M. T. Reza, Obesity, obesity-related diseases and application of animal model in obesity research, An overview, *J. Korean Oil Chemists' Soc*, 30, 622-634 (2013).
2. O. Quehenberger, and E. A. Dennis, The Human Plasma Lipidome, *New Engl. J. Med*, 365, 1812-1823 (2011).
3. O. Belguith, M. Bouaziz, K. Jamoussi, A. F. Feki, S. Sayadi, and F. Makni, Lipid-lowering and antioxidant effects of an ethyl acetate extract of fenugreek seeds in high-cholesterol-fed rats, *J. Agric. Food Chem*, 58, 2116-2122 (2010).
4. X. Liu, A. Zeng, T. Song, L. Li, F. Yang, Q. Wang, B. Wu, Y. Liu, and X. Zhi, Hypocholesterolemic effects of n-[(2-hydroxy-3-n, n-dimethylhexa decyl ammonium) propyl] chitosan chloride in high-fat-diet-induced rats, *J. Biomaterials Sci*, 23, 1107-1114 (2012).
5. L. N. Rodríguez, J. A. Gutiérrez, J. Arriola, D. D. La, R. I. Garza, J. W. Fahey, and S. O. Serna-Saldivar, Broccoli (*Brassica oleraceavar. italica*) sprouts and extracts rich in glucosinolates and isothiocyanates affect cholesterol metabolism and genes involved in lipid homeostasis in hamsters, *J. Agric. Food Chem*, 59, 1095-1103 (2011).
6. N. Rotllan, and C. Fernández, MicroRNA regulation of cholesterol metabolism, *Cholesterol*, 2012, 8-15 (2012).
7. A. C. Frazier, J. M. Ordovas, R. J. Straka, J. E. Hixson, I. B. Borecki, H. K. Tiwari, and D. K. Arnett, The PPAR alpha gene is associated with triglyceride, low-density cholesterol and inflammation marker response to fenofibrate intervention: the GOLDN study, *The Pharmacogenomics J*, 12, 93-95 (2012).
8. G. L. Kelley, and S. Azhar, Reversal of high dietary fructose-induced PPAR α suppression by oral administration of lipoxygenase/cyclooxygenase inhibitors, *Nutrition & Metabolism*, 2, 18-27 (2005).
9. N. A. Ratcliffe, C. B. Mello, E. S. Garcia, T. M. Butt, and P. Azambuja, Insect natural products and processes: New treatments for human disease, *Insect Biochem. Mol. Biol*, 41, 747-842 (2011).
10. S. O. Park, and B. S. Park, Effects of grain larvae extracts on hepatotoxicity and blood lipid in obese rats, *J. Anim. Veter. Adv*, 11, 988-994 (2012).
11. J. Domen, L. Ale, Z. Klemen, S. Dragica, and G. C. Nina, Selective antimicrobial activity of maggots against pathogenic bacteria, *J. Med. Microbiol*, 57, 617-625 (2008).

12. A. Bexfield, Y. Nigam, S. Thomas, and N. A. Ratcliffe, Detection and partial characterisation of two antibacterial factors from the excretions/ secretions of the medicinal maggot *Lucilia sericata* and their activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Microbes Infect*, 6, 1297-1304 (2004).
13. B. S. Park, A study on the bioactive effect of ethanol extracts from fly larvae, *J. Environ. Agri. Res*, 9, 9-22 (2007).
14. S. O. Park, B. S. Park, and J. S. Oh, Antibacterial activity of house fly maggot extract against MRSA and VRE, *J. Environ. Biol*, 31, 865-871(2010).
15. Y. Wang, D. Lu, Y. Zhao, C. Lei, and F. Zhu, Antiviral and antitumor activities of the protein fractions from the larvae of house fly, *Musca Domestica. African J. Biotechnol*, 11, 9468-9474 (2012).
16. A. Jang, B. S. Park, and K. Y. Yoon, Separation of antibacterial low molecular peptides from *Musca domestica* maggot against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and vancomycin resistant enterococcus (VRE). 2007 International Symposium and Annual Meeting, *The Korean Soc. Food Sci Nutr*, October, 275 (2007).
17. Scot PIL training manual, Glasgow Univ. UK (1994).
18. P. G. Reeves, F. H. Nielsen, and G. C. Fahey, AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet, *J. Nutr*, 123, 1939-1951 (1993).
19. S. O. Park, J. Hwangbo, and B. S. Park, Effects of extreme heat stress and continuous lighting on growth performance and blood lipid in broiler chickens, *J. Korean Oil Chemists' Soc*, 30, 78-87 (2013)b.
20. A. A. Qureshi, N. Abuirmeileh, Z. Z. Din, Y. Ahmad, W. C. Burger, and C. E. Elson, Suppression of cholesterologenesis and reduction of LDL cholesterol by dietary ginseng and its fractions in chicken liver, *Atherosclerosis*, 48, 81-94 (1983).
21. B. S. Park, and A. Jang, Dietary β -cyclodextrin reduces the cholesterol levels in meats and backfat of finishing pigs, *J. Sci. Food Agric*, 88, 813-18 (2008).
22. SAS SAS User's Guide: Statistics. Version 9.1 Ed. SAS Institute Inc., Cary, NC (2005)
23. S. S. Cho, L. Prosky, and D. Dreher, Complex carbohydrates in foods, Marcel Dekker, Inc., New York, NY 10016, USA (1999).
24. B. Sánchez, M. C. Urdaci, and A. Margolles, Extracellular proteins secreted by probiotic bacteria as mediators of effects that promote mucosa-bacteria interactions, *Microbiology* 156, 3232-3242 (2010).
25. M. B. Roberfroid, Prebiotics and probiotics: are they functional foods, *Am. J. Clin. Nutr*, 71, 1682S-1687S (2000).
26. T. Rogi, N. Tomimori, Y. Ono, and Y. Kiso, The mechanism underlying the synergistic hypocholesterolemic effect of sesamin and α -tocopherol in rats fed a high-cholesterol diet, *J. Pharmacol. Sci*, 115, 408-416 (2011).
27. L. Huang, Y. Sun, H. Zhu, Y. Zhang, J. Xu, and Y. M. Shen, Synthesis and antimicrobial evaluation of bile acid tridentate conjugates, *Steroids*, 74, 701-706 (2009).
28. N. Higaki, K. Sato, H. Suda, T. Suzuka, T. Komori T. Saeki, T. Nakamura, K. Ohtsuki K, K. Iwami, and R. Kanamoto, Evidence for the existence of a soybean resistant protein that captures bile acid and stimulates its fecal excretion, *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 70, 2844-2852 (2006).
29. N. J. Ha, Antiobesity and lipid-lowering effects of *Bifidobacterium spp.* in high fat diet-induced obese rats, *Lipids in Health*

- and Disease*, 10, 116–125 (2011).
30. G. Ji, X. Zhao, L. Leng, P. Liu, and Z. Jiang, Comparison of dietary control and atorvastatin on high fat diet induced hepatic steatosis and hyperlipidemia in rats, *Lipids in Health and Disease*, 10, 23–31 (2011).