

Chitooligosaccharide가 생쥐의 간 기능에 미치는 영향

김세재 · 강소영 · 박승림* · 신태균** · 고영환***

제주대학교 생물학과, *건풍바이오(주),

제주대학교 수의학과, *식품공학과

The Effects of Chitooligosaccharides on Liver Function in the Mouse

Se-Jae Kim, So-Young Kang, Seung-Lim Park*,

Taek-yun Shin** and Young-Hwan Ko***

Department of Biology, Cheju National University

*Kun Pung Bio Co.

**Department of Veterinary Medicine,

Cheju National University

***Department of Food Engineering,

Cheju National University

Abstract

Chitosan is the deacetylated product of chitin. Chitosan and its derivatives have many properties that make them attractive for a wide variety of health applications. This study was performed to investigate some effects of water soluble chitooligosaccharides on liver function in the mouse. The animals given the sterol diet containing 3% cholesterol for 6 weeks showed increase in plasma cholesterol level, which were lowered by 23% when they were fed on 1% chitooligosaccharide. While there was no significant change in liver cholesterol and plasma HDL-cholesterol levels. Continuous administration of 15% ethanol via drinking water to mice for 8 weeks elicited pathological alterations such as inflammation, necrosis, accumulation of lipid droplets in the liver and increase in GPT activity, while simultaneous administration of ethanol and chitooligosaccharide prevented remarkably ethanol-induced liver injury; there was no observable lipid droplet and

GPT activity was decreased by 25% in the liver. These results suggest that chitooligosaccharide play some roles in liver function, such as reducing the plasma cholesterol level and preventing alcoholic liver disease.

Key words : chitooligosaccharide, mouse liver, cholesterol, lipid, ethanol

서론

Chitosan은 glucosamine의 중합체로 균류의 세포벽과 곤충, 갑각류 등의 외골격에 존재하는 chitin을 탈아세틸화시켜 만든다⁽¹⁾. Chitin과 그 유도체들(chitosan, chitin oligosaccharides, chitooligosaccharide)은 대부분의 다당류와는 다른 독특한 특성을 지니고 있어서 의학, 약학, 생화학, 폐수처리, 농업 등 다양한 분야에서 신 소재로 이용되고 있다⁽²⁾. 특히 chitosan은 다양한 동물실험에서 혈장과 간장내 cholesterol 농도를 저하시키는 기능이 있다⁽³⁻⁷⁾. 또한 chitosan의 항암, 항균 및 면역활성에 대한 연구 보고가 나오에 따라 생물 의학적인 응용에 많은 관심이 집중되고 있다⁽⁸⁻¹³⁾.

Lehoux and Grondin(14)은 흰쥐에서 chitosan의 간 기능에 미치는 영향을 보고한 바 있다. 이들의 연구에 의하면 70 kDa의 분자량을 갖는 7.5% chitosan은 간 내 콜레스테롤 항상성을 유지시키는 작용을 한다고 하였다. 그러나 다른 동물에서는 chitosan이 간 기능에 미치는 영향에 대한 보고는 없다. 따라서 본 연구는 생쥐에서 수용성 키토올리고당이 간 기능에 미치는 영향을 분석하기 위해서 실시하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 수용성 chitooligosaccharide(평균 중합도 6.8)은 chitosan 제조회사인 건풍바이오(주식회사, 제주)에서 제공한 제품을 사용하였다.

실험동물의 사육 및 식이

Cholesterol 함량분석을 위한 실험에서는 체중이 비슷한 ICR계 암컷 생쥐를 8마리씩 3군(대조군, 1% chitooligosaccharide+3% cholesterol군, 3% cholesterol군)으로 나누었다. 대조군은 기본식이로 사육하였고, 실험식은 기본식에 cholesterol과 chitooligosaccharide를 첨가하여 만들었다. 물과 식이는 자유로이 섭취하게 하면서 동일한 환경 조건에서 6주간 사육하였다. 알코올에 의해 유도된 간 상해에 키토올리고당의 영향을 보기 위한 실험에서는 ICR계 수컷 생쥐 8마리씩 3군(대조군, 0.5% chitooligosaccharide+15% ethanol 군, 15% ethanol 군)으로 나누었다. Ethanol과 chitooligosaccharide은 식수에 혼합하여 계속적으로 8주 동안 섭취시키며 기본식이로 동일한 환경조건에서 사육하였다. 실험이 끝난 동물은 마취한 후 해부하여 혈액과 간 조직을 분리하였다.

Cholesterol 함량 측정

혈장내 총(total) cholesterol 함량은 Sigma Diagnostics reagents(Sigma Chemical Co.)를 이용해서 측정하였고, HDL-cholesterol 함량은 Wako Diagnostics HDL-cholesterol reagent(Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)를 사용하여 측정하였다. 간 내의 총 cholesterol 함량은 Boehringer Mannheim Diagnostics reagents(Boehringer Mannheim Co.)를 이용하여 측정하였다.

효소활성 측정

혈장내의 Glutamic oxaloacetic transaminase(GOT)와 Glutamic pyruvic transaminase(GPT)의 활성은 Reitman-Frankel 방법(15)으로 측정하였다.

간 조직 검사

각 투여군의 마우스는 방혈한 후 간 조직을 10% 중성 포르말린에 고정하였다. 조직검사는 통상적인 방법에 따라 파라핀 포매 절편을 만들어 헤마톡실린-에오신 염색을 실시하였다. 전자현미경적 관찰을 위해서는 간 조직을 2.5% glutaraldehyde용액 및 2% osmic acid에 순서대로 고정한 후 탈수과정을 거쳐 Epon812에 포매하였다. 그 후 초박

절편을 만들어 uranyl acetate와 lead citrate액으로 전자 염색한 후 투과전자현미경(JEOL 1200EX II)으로 관찰하였다.

결과 및 고찰

Cholesterol 함량에 미치는 영향

각 실험식으로 6주간 사육한 생쥐의 체중 증가량, 실험식이 섭취량, 간 무게, 혈장내 total cholesterol 함량, HDL-cholesterol 함량, 간 내의 cholesterol 함량을 측정된 결과는 Table 1에 나타내었다. 실험식이 섭취량, 체중 증가량은 전 실험군에서 유사하였다. 그러나 상대적인 간 무게는 cholesterol을 함유한 식이를 먹인 두 실험군에서 유의하게 높았다. 혈장내 총 cholesterol 함량은 기본식이를 먹은 대조군에서는 $84.02 \pm 8.86 \text{ mg/dl}$ 으로 가장 낮았으며, 3% cholesterol 식이를 먹은 실험 군에서는 $165.78 \pm 15.87 \text{ mg/dl}$ 로 2배정도 증가하였다. 그러나 1% chitooligosaccharide와 3% cholesterol을 함유한 식이를 먹은 실험 군에서는 $127.45 \pm 5.83 \text{ mg/dl}$ 으로 나타났다. 1% chitooligosaccharide는 고지방을 식이한 생쥐에서 혈장내 총 cholesterol 함량을 23% 정도 감소시키는 효과를 나타내었다. 이는 흰쥐⁽¹⁷⁾와 guinea pig⁽¹⁶⁾에서 보고한 chitosan의 hypcholesterolemic 활성이 있다는 보고와 일치하였다. 그러나 다른 동물에서 보고된 혈장내 HDL-cholesterol 함량과 간 내 cholesterol 함량의 감소효과는 관찰되지 않았다(Table 1). 이러한 차이는 본 실험에 사용한 chitooligosaccharide의 분자량에 차이에 기인할 수 있다고 사료된다.

Ethanol를 투여한 생쥐의 간에 미치는 영향

각 실험 군에서의 생쥐의 체중 증가량, 실험식이 섭취량, 간 무게, 혈장내 GPT 활성을 측정된 결과는 Table 2에 나타내었다. 일일 평균 식이 섭취량은 15% ethanol를 투여한 실험 군에서 가장 낮았으나 유의한 차이는 없었다. 그러나 체중 증가량은 15% ethanol를 투여한 실험 군(28.12 ± 2.78)에서 가장 컸고, 0.5% chitooligosaccharide와 15% eth-

Table 1. Effects of chitooligosaccharides on food intake, body weight gain, liver weight, liver and plasma cholesterol levels.

| | Control | Chitooligosaccharide + Cholesterol | Cholesterol |
|--|---------------------------|--|-----------------------------|
| Food intake (g /day) | 7.5 ± 0.5 ^a | 8.0 ± 0.5 ^a | 7.0 ± 0.5 ^a |
| Gain in Body Weight(BW) (g) | 10.50 ± 2.02 ^a | 11.70 ± 1.54 ^a | 10.86 ± 3.11 ^a |
| Relative liver weight (g liver/100 g BW) | 4.01 ± 0.61 ^a | 7.11 ± 0.53 ^b | 6.57 ± 0.75 ^b |
| Liver cholesterol (mg/ g /wet liver) | 10.40 ± 2.15 ^a | 9.10 ± 1.00 ^a | 10.30 ± 2.25 ^a |
| Plasma cholesterol (mg/dℓ) | 84.02 ± 8.86 ^a | 127.45 ± 5.83 ^b | 165.78 ± 15.87 ^c |
| Plasma HDL cholesterol(mg/dℓ) | 13.38 ± 0.78 ^a | 12.21 ± 6.49 ^a | 13.78 ± 4.26 ^a |

Mice were fed on diets for 6 weeks. When indicated, 3% cholesterol and 1% chitooligosaccharides were added to a normal diet. Values are expressed as the mean ± S.E.(n=8). Statistical significance was determined by Student's test. Means in the same row with different superscripts are significantly different(P<0.05).

Table 2. Effects of chitooligosaccharides on food intake, body weight gain, liver weight and plasma GPT activity

| | Control | Chitooligosaccharide + Cholesterol | Cholesterol |
|--|---------------------------|--|---------------------------|
| Food intake (g /day) | 11.0 ± 2.4 ^a | 10.5 ± 2.2 ^a | 8.5 ± 3.5 ^a |
| Gain in Body Weight(BW) (g) | 20.53 ± 5.31 ^a | 19.98 ± 1.74 ^a | 28.12 ± 2.78 ^b |
| Relative liver weight (g liver/100 g BW) | 4.76 ± 0.83 ^a | 4.71 ± 0.91 ^a | 4.13 ± 0.05 ^a |
| Plasma GPT activity (Karmen unit/mlℓ) | 26.67 ± 2.89 ^a | 36.25 ± 2.65 ^b | 48.33 ± 2.89 ^c |

Mice were fed on normal diets for 8 weeks. When indicated, 15% ethanol and 0.5% chitooligosaccharides were administered to mice with drinking water. Values are expressed as the mean ± S.E(n=8). Statistical significance was determined by Student's test. Means in the same row with different superscripts are significantly different(P<0.05).

anol을 동시에 투여한 실험 군(19.98 ± 1.74)에서는 대조군(20.53 ± 5.31)과 유사하게 측정되어 chitooligosaccharide가 ethanol 투여에 의한 체중증가를 억제하는 효과가 있음을 보여주었다. 그러나 상대적인 간 무게는 실험 군 간에 차이가 없었다. 15% ethanol 투여로 혈장내 GPT 활성은 대조군에 비해 2배 정도 증가하였다. 그러나 0.5% chitooligosaccharide와 15% ethanol을 동시에 투여

한 실험군에서의 GPT 활성은 36.25 ± 2.63 Karmen unit/ml로 대조군보다는 다소 높았지만, 15% ethanol만 투여한 실험군의 GPT 활성 48.33 ± 2.89 Karmen unit/ml에 비하여 25% 정도 감소하였다. 이는 chitooligosaccharide가 ethanol에 의해 유발되는 간기능 장애를 억제하는 효과가 있음을 보여준다고 할 수 있다.

Ethanol은 간 조직의 다양한 생화학적 형태학적 변

화를 초래한다고 알려져 있다^{11,12}. 15% ethanol을 8주간 투여한 생쥐의 간에서는 inflammation과 necrosis 현상이 있었으며, 간 소엽과 문맥 주위에 광범위하게 지방 축적이 관찰되었다(Fig. 1, A). 두과전자현미경으로 관찰한 결과 간 세포 내에는 여러 개의 지방구가 산재하였다(Fig. 1, B). 그러나 15% ethanol과 0.5% chitoooligosaccharide를 함께 경구 투여한 생쥐의 간에서는 지방구의 축적이 확인되지 않았으며(Fig. 1, C) 0.5% chitoooligosaccharide만 투여한 마우스의 간 조직과 조직학적 차이가 관찰되지 않았다(Fig. 1, D). 본 결과는 chitoooligosaccharide 섭취가 ethanol에 의해 유발되는 간 조직내 지방축적을 억제하는데 관여한 것으로 추정된다.

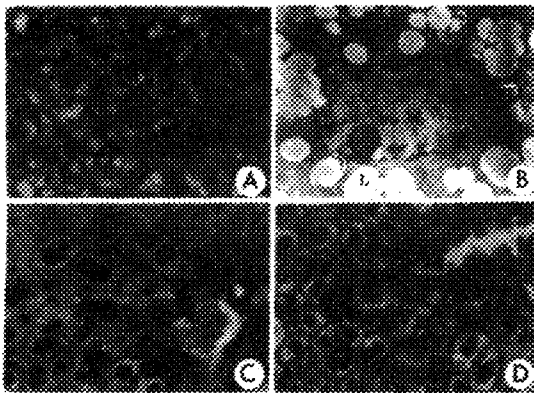


Fig. 1. Representative photographs of livers from ethanol-fed(A and B), combined ethanol and chitoooligosaccharide-fed(C), and chitoooligosaccharide-fed control(D) mice.

Fat accumulation in the liver from ethanol-fed mice (A and B) was panlobular, but was not observed from the combined ethanol and chitoooligosaccharide-fed mice(C), and from the control mice(D). A, C and D are light microscopic findings of the livers; Hematoxylin-eosin staining of paraffin sections with original magnification, X 132. B shows the electron microscopic(X 5000) feature of lipid droplets in the hepatocytes in ethanol-fed mouse.

본 연구 결과는 chitoooligosaccharide가 생쥐에서 간

기능에 작용하는 분자적 작용기작에 대한 정보에 대해서는 분명하지 않지만 chitoooligosaccharide가 혈장내 cholesterol 함량을 감소시킬 뿐만 아니라, ethanol에 의해 유발되는 체중증가, 혈장내 GPT 활성 증가, 지방구의 축적을 현저하게 감소시키는데 관여한다고 사료된다.

요 약

Chitin의 탈아세틸화된 유도물인 chitosan과 chitoooligosaccharides는 다양한 생리활성 기능을 나타내므로 생물 의학적인 응용에 많은 관심이 집중되고 있다. 본 연구는 수용성 chitoooligosaccharide이 생쥐의 간 기능에 미치는 영향을 조사하기 위하여 수행되었다. 6주 동안 3% cholesterol을 식이한 생쥐에서는 혈장 cholesterol 함량이 증가하였으나, 1% chitoooligosaccharide와 3% cholesterol을 함께 식이한 생쥐에서는 혈장 cholesterol 함량이 23% 정도 감소하였다. 그러나 혈장내 HDL-cholesterol과 간내 cholesterol 함량에는 유의한 차이가 없었다. 15% ethanol을 8주간 투여한 생쥐에서는 inflammation, necrosis, 지방구의 축적, GPT의 활성 증가등 간 장애가 관찰되었다. 그러나 0.5% chitoooligosaccharide와 15% ethanol을 함께 투여한 생쥐에서는 ethanol에 의해 유발된 간 장애가 현저히 억제되어 지방구의 축적이 관찰되지 않았고, 혈장의 GPT 활성이 25% 정도 감소하였다. 따라서, chitoooligosaccharide가 생쥐에서 혈장 cholesterol 함량을 감소시키고, 알코올성 지방간을 예방하는 등 부분적인 기능이 있음을 보여주었다.

참 고 문 헌

- Muzzarelli, R.A.A. : Enzymatic synthesis of chitin and chitosan. Occurrence of chitin. In Chitin, Muzzarelli, R. A.A.(Ed.), Pergamon Press, New York, p.5 (1977)
- Sandford, P.A. and Hutchings, G.P. : Chitosan — A natural, cationic biopolymer: Commercial application. In Industrial Polysaccharides: Genetic Engineering, Stru-

- cture/Property Relations and Applications, Yalpani, M. (Ed), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, p.363 (1987)
- Kobayashi, T., Otsuka, S-I. and Yugari, Y. : Effect of chitosan on serum and liver cholesterol levels in cholesterol-fed rats. *Nutr. Rept. Int.*, 19, 327 (1979)
- Knorr, D. : Functional properties of chitin and chitosan. *J. Food Sci.*, 47, 593 (1982)
- Knorr, D. : Use of chitinous polymers in food. *Food Technol.*, 38, 85 (1984)
- Sugano, M., Fujikawa, T., Hiratsuji, Y., Nakashima, N., Fukuda, N. and Hasegawa, Y. : A novel use of chitosan as a hypocholesterolemic agent in rats. *Am. J. Clin. Nutr.*, 33, 787 (1980)
- Chung, G-H., Kim, B-S., Hur, J-W. and Chung, S-Y. : Effect of dietary lobster shrimp chitosan on lipid metabolism in diet-induced hyperlipidemic rats. *J. Korea Soc. Food Nutr.*, 25, 384 (1996)
- Suzuki, K., Mikami, T., Okawa, Y., Tokoro, A., Suzuki, S. and Suzuki, M. : Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose. *Carbohydr. Res.*, 151, 403 (1986)
- Tokoro, A., Tatewari, N., Suzuki, K., Mikami, M., Suzuki, S. and Suzuki, M. : Effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose against Meth-A solid form. *Chem. Pharm. Bull.*, 36, 784 (1988)
- Tsukada, K., Matsumoto, T., Aizawa, K., Tokoro, A., Naruse, R., Suzuki, S. and Suzuki, M. : Antimetastatic and growth-inhibitory effects of N-acetylchitohexaose in mice bearing Lewis Lung Carcinoma. *Jpn. J. Cancer. Res.*, 81, 259 (1990)
- Suzuki, K., Mikami, T., Okawa, Y., Tokoro, A., Suzuki, S. and Suzuki, M. : Antitumor effect of hexa-N-acetylchitohexaose and chitohexaose. *Carbohydr. Res.*, 151, 403 (1986)
- Ryu, B-H. : Antitumor and immunologic activity of chitosan extracted from shell of shrimp. *J. Korea Soc. Food Nutr.*, 21, 154 (1992)
- Okamoto, Y., Tomita, T., Minami, S., Matsubashi, A., Kumazawa, N.H., Tanioka, S. and Shigemasa, Y. : Effect of chitosan on experiments with *Staphylococcus aureus* in dogs. *J. Vet. Med. Sci.*, 57, 765 (1995)
- Lehoux, J-G. and Grondin, F. : Some effects of chitosan on liver function in the rat. *Endocrinology*, 132, 1073 (1993)
- Reitman, S. and Frankel, S. : A colorimetric method for determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Amer. J. Clin. Path.*, 28, 58 (1954)
- Furda, I. : Aminopolysaccharides: their potential as dietary fiber. In ACS Symposium Series: Unconventional Sources of Dietary Fiber. Furda, I. (Ed.), American Chemical Society, Washington DC. p. 105 (1983)
- Bernstein, J., Videla, L. and Israel, Y. : Metabolic alteration produced in the liver by chronic ethanol administration: change related to energetic parameters to cell. *Biochem. J.*, 134, 515 (1973)
- Lieber, C. A. and Leo, M. A. : Alcohol and liver. In *Medical and Nutritional Complications of Alcoholism : mechanism and management*, Liver, C. S.(Ed.), Plenum Medical Book Company, p.185 (1992)
- Mezey, E. : Alcoholic liver disease : Roles of alcohol and malnutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*, 33, 2709 (1980)
- Arteel, G.E., Raleigh, J.A., Bradford, B.U. and Thruman, R.G. : Acute alcohol produces hypoxia directly in rat liver tissue in vivo: role of Kupffer cells. *Am. J. Physiol.*, 271, G494 (1996)
- Nanji, A.A., Khwaja, S., Khettry, U. and Sadrzadeh, S.M.H. : Plasma endothelin levels in chronic ethanol

fed rats: relationship to pathologic liver injury. *Life Science*, 54, 423 (1994)

Imuro, Y., Frankenberg, M.V. and Arteel, G.E. :
Female rats exhibit greater susceptibility to early
alcohol-induced liver injury than males. *Am. J.
Physiol.*, 273, G1186 (1997)