



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

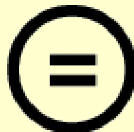
다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

교 육 학 석 사 학 위 논 문

에탄올로 유도된 흰쥐의 위 손상에 대한 클로렐라 추출물의 보호작용



2011 년 8 월

부경대학교 교육대학원

영양교육 전공

김 경 옥

교 육 학 석 사 학 위 논 문

에탄올로 유도된 흰쥐의 위 손상에 대한 클로렐라 추출물의 보호작용

지도교수 남택정

이 논문을 교육학석사 학위논문으로 제출함.



2011 년 8 월

부경대학교 교육대학원

영양교육 전공

김 경 옥

김경옥의 교육학석사 학위논문을 인준함.

2011 년 8 월 26 일



주 심 약학박사 최 재 수 (인)

위 원 이학박사 김 재 일 (인)

위 원 농학박사 남 택 정 (인)

목 차

ABSTRACT	iii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	7
1. 재료	7
가. 시약 및 재료	7
2. 실험방법	8
가. 시료의 조제	8
(1) 클로렐라 추출물의 제조	8
(2) SDS-PAGE electrophoresis	8
나. 동물실험 설계	10
(1) 사육 및 군 분리	10
(2) 알코올 및 시료 투여	10
(3) 체중 및 장기의 중량 측정	11
(4) 혈액내 간기능 관련 효소 및 Triglyceride 함량 측정 ...	11
(가) Transaminase (GOT, GPT) 활성 측정	11
(나) Triglyceride (TG) 함량 측정	12
(5) Ethanol 함량 측정	12
(6) 위조직 내 항산화 활성 측정	12
(가) Superoxide dismutase (SOD) 활성	12
(나) Reduced glutathine (GSH) 함량	13
(7) 위조직 내 caspase-3, -8 활성 측정	14
다. 통계처리	14

III. 결과 및 고찰	15
1. CVE의 제조 및 일반성분 분석	15
2. 체중 및 식이효율, 장기의 변화	18
가. 체중 및 식이효율에 미치는 영향	18
나. 장기무게에 미치는 영향	23
다. 장기의 표면손상에 미치는 영향	25
3. 혈액 내 간기능 관련 효소 및 triglyceride 변화	28
가. transaminase (GOT, GPT) 활성에 미치는 효과	28
나. Triglyceride (TG) 함량에 미치는 영향	31
4. 혈액 내 Ethanol 농도에 미치는 영향	33
5. 위조직 내 항산화 활성 변화	35
가. Superoxide dismutase (SOD) 활성에 미치는 영향	35
나. Reduced glutathine (GSH) 함량에 미치는 영향	37
6. 위조직 내 caspase-3, -8 활성 변화	39
IV. 요약 및 결론	41
V. 참고문헌	47
감사의 글	55

Protective effect of extract from *Chlorella vulgaris* on ethanol-induced gastric injury in rats

Kyung Ok Kim

*Major in Nutrition Education, Graduate School of Education,
Pukyong National University*

Abstract

Acute gastric mucosal lesions (AGML), accounting for 10–20% of all digestive diseases causes gastritis and peptic ulcer disease scattered the balance between protect defend factors and damaging offensive factors in the gastric mucosa. There is *Helicobacter pylori* bacteria infection, NSAID (non-steroid anti-inflammatory drugs), stress, alcohol, gastric acid, bile, smoking etc. by the cause. Gastric mucosa major offensive factor, especially alcohol have been reported as the mechanism of overdose ingested ethanol is metabolism to generate acetaldehyde. Acetaldehyde generates free radical, form lipid peroxide, and produce ROS (reactive oxygen species) leads to oxidative stress in the body. From this experiment, the protective effect of AGML by ethanol were investigated to target *Chlorella* of marine alga conducted fairly active functional studies.

Chlorella is a unicellular microalgae that is ubiquitous in freshwater or seawater environments. It contains highly nutritious substances such as protein, carbohydrates, vitamins, minerals, fatty acids, dietary fibers and nucleic acids and exerts various biological effects. *Chlorella*

vulgaris extract (CVE) is powdered concentrate *Chlorella* original powder extracted the active ingredient in hot water, and is centrifuged to remove insoluble material of cells. This was used as experimental material.

This study was carried out to investigate the protective effect of *Chlorella vulgaris* extract (CVE) on the gastric injury by ethanol in rats. Male Sprague-Dawley rats (7 weeks old) were divided into four groups and orally administered with or without for 7 days: normal group (received D-W), control group (received 6ml 40% ethanol/kg B.W.), CVE-1 group (received 40% ethanol with 150mg CVE/kg B.W.), CVE-2 group (received 40% ethanol with 300mg CVE/kg B.W.). The animals were measured body weight change and food efficiency ratio for 7 days, were killed 1hr after alcohol treatment. And observed gastric mucosal lesions, measured stomach and liver weight, transaminase (GOT, GPT) activity, antioxidant enzyme (SOD, GSH) activity, caspase-3, 8 activity, triglyceride and ethanol concentration.

In the results of in vivo assay, the body weight and liver and stomach weight was unremarkable changed. But ethanol treatment induced gastric bleeding, surface epithelial cell destruction compared to the normal group, but co-treatment with CVE inhibited these damages. In order to determine damage of the liver tissue, the levels of GOT and GPT were slightly increased by ethanol treatments, but it was significantly decreased by treatment of CVE. In order to evaluate the anti oxidative effect of CVE in gastric tissue, the activity of SOD (superoxide dismutase) was significantly decreased by treatment of CVE compared to the control group, but the activity of GSH (Reduced glutathione) was unremarkable changed. Caspase-3 activity was

increased when ethanol was injected compared to the normal group, and it was decreased by treatment of CVE. And Caspase-8 activity was the same.

Taken together, this study was confirmed that CVE have beneficial effects for alcoholic gastric injury by oxidative stress and apoptosis. Therefore, we suggest that CVE could provide a new, natural treatment option for gastric injury in humans.



I. 서론

최근 우리나라는 음주연령의 저령화, 여성음주의 증가 등으로 지속적으로 알코올 소비량이 증가하고 있으며, 그로 인한 개인의 건강상 문제뿐만 아니라 사회적, 경제적 손실이 계속적으로 늘어나고 있다. 이러한 음주문제의 심각성 및 문제의식이 높아져 사회 전반에 걸쳐 알코올 문제 해결을 위한 노력은 다각적으로 이루어지고 있다. 그러나 통계청에 따르면 2010년 우리나라 술 소비량은 소주 30억 500만병으로 국민 1인당 84.5병, 맥주 173만kl로 1인당 137병으로 조사되었으며, 하루 평균 10잔 이상 마시는 가구수 비율은 2007년 16.4%, 2008년 16.2%, 2009년 16.1%로 눈에 띄게 줄지 않고 있는 실정이다(KOSIS, 2011). 이는 예부터 술에 대한 한국인의 인식이 관대하며, 독특한 음주문화와 스트레스 해소, 사회생활을 위해 필요하다는 인식이 크게 자리 잡고 있기 때문이다.

알코올은 인류가 처음 사용한 약물이며 지금은 약리학적인 면보다 사회적, 독성학적으로 중요한 남용 약물이다. 중추신경계와 간 및 위에 대한 작용이 가장 크며, 알코올 흡수는 주로 위와 소장에서 일어나며 위내 음식물, 알코올-함유 음료의 종류와 알코올 농도, 섭취시간 등에 의하여 영향을 받을 수 있다(Ryu *et al.*, 1999). 즉, 알코올은 분자량이 작아서 섭취된 후 위와 소장의 상부에서 확산작용에 의하여 흡수되고 혈액을 통해 간, 뇌 등 체조직으로 운반된다(Lee, 2000). 흡수 속도는 여러 인자에 영향을 받기 때문에 공복시에 술을 마시면 바로 취기를 느끼나, 식품과 함께 섭취하면 알코올 흡

수가 늦어진다. 흡수된 알코올의 일부는 대사되지 않은 채 소변, 땀으로 배설되고 대부분은 간에서 산화되어 제거된다(Von and Buhler, 1984).

알코올이 인체에 미치는 영향 중 적당한 음주는 신체 이완을 촉진시켜 스트레스 해소에 도움을 주고, 정신안정제 역할과 위를 자극하여 위액의 분비를 촉진시키는 작용을 한다. 또한 소량의 알코올은 관상동맥 심장질환 위험을 낮추고 혈중 콜레스테롤 수치도 낮춰 준다는 보고도 있다(장, 2005). 그러나 지나친 알코올 섭취는 체내 대사과정 중 인체에 해로운 물질로 전환되어 뇌, 간, 심장, 위와 같은 소화기관에 유해물질로 작용함으로써(Kim *et al.*, 2004) 신체 기관을 손상시켜 알코올성 간경변과 췌장염 등의 만성질환, 정신질환과 연관되어 있고 각종 악성종양의 원인으로 작용한다(Srensen, 1989). 알코올 자체는 발암물질이 아니지만 암의 발생을 촉진하는데 기여하여 국소적으로 농도 20%이상의 알코올은 점막에 직접적인 손상을 입히고 손상된 점막은 재생과정에서 과증식을 보여 DNA 합성과정에서 돌연변이가 발생할 가능성이 높아진다(장, 2005). 또한 식도의 운동기능에 장애를 일으켜 위, 식도 역류를 유발하고 식도염과 식도 선암 전구병변인 Barrett 식도의 발생을 촉진할 수 있고, 만성적 음주는 영양결핍을 일으켜 과일, 채소, 아연, 셀레늄, 엽산, 토코페롤 등의 암예방 영양소 섭취가 부족해질 수 있다(Blot, 1992).

단시간의 과음으로 야기될 수 있는 급성 위점막 병변 (acute gastric mucosal lesion, AGML)이란 위내벽의 점막, 점막하 조직 및 근육층까지 침범되는 조직의 결손이며, 위점막을 보호하는 방어인자와 위점막을 손상시키는 공격인자 사이의 균형을 깨뜨려 위염 및

소화성궤양을 유발하여 심와부 동통, 오심, 소화불량, 구토, 복통 등의 상부 위장관 증상을 주요 증상으로 한다(Yang, 1987; Kim *et al.*, 1989; 이 등, 2001). 전체 소화기질환 중에 10-20%를 차지하는데, 원인으로서는 *Helicobacter pylori* 균 감염, NSAID (non-steroid anti-inflammatory drugs), 스트레스, 알코올, 위산, 담즙, 흡연 등이 있다(Kim *et al.*, 1989). 특히 알코올은 위점막에 주요 공격 인자로 보고되고 있는데 그 기전은 과량 섭취된 에탄올이 대사되어 acetaldehyde를 생성하고 이로 인해 free radical이 생성되어 지질과 산화물을 형성하여 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 인체내에 생성하게 되며, 산화적 스트레스(oxidative stress)를 유발하게 된다(Pryor *et al.*, 1977)(Fig. 1). 이러한 산화적 스트레스로부터 세포막과 세포내 물질을 보호하고 생체내 균형을 맞추기 위해 우리 몸에서는 free radical scavenger로 항산화 효소인 glutathione peroxidase

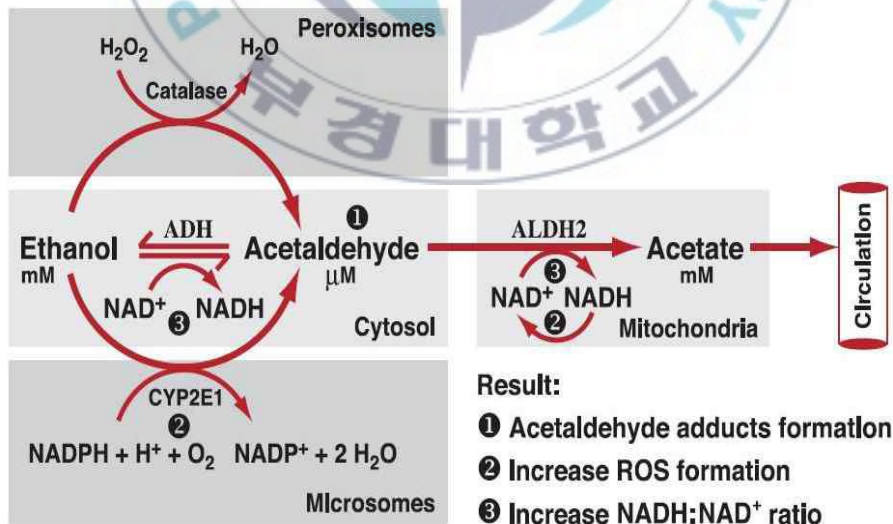


Fig. 1. Oxidative pathways of alcohol metabolism (Zakhari, 2006)

(GSH-Px), catalase, superoxide dismutase(SOD) 등과 항산화물질인 vitamin C, vitamin E, β -carotene, lipoic acid, uric acid, selenium(Se), glutathione(GSH) 등이 존재하여 활성산소들을 제거하지만 과량의 알코올을 지속적으로 섭취할 경우 소화성 궤양이 발생하게 된다(Cho *et al.*, 2007; Sung *et al.*, 2000).

알코올에 대한 보호효과는 주로 간손상과 관련지어 연구되어 왔으며, 위손상 보호효과 관련 논문으로는 헛개나무 열매 추출물, 애엽추출물, 사물탕, 귀비탕, 산약 등 한약재료를 투여하여 위점막 손상 치료 효과가 보고된 바 있으며(Park *et al.*, 2006; Kim, 2004; Kim *et al.*, 2003; Lee and Lim, 2004; Oh *et al.*, 1997), 그 외 식혜의 위궤양 예방 효과가 보고되기도 했다(Park *et al.*, 1997). 해조류 중에서도 알코올에 대한 보호 효과가 연구(Hwang *et al.*, 2008; Raghavendran *et al.*, 2004; Kamath *et al.*, 2008)되고 있긴 하나 위손상 관련 연구는 미흡하여 해조류중 기능성 연구가 비교적 활발히 이루어져온 클로렐라를 대상으로 위손상 보호효과를 확인하고자 하였다.

클로렐라는 호수나 습지 등에서 흔히 볼 수 있으며, 담수나 해수에서 생육이 가능한 지름 10 μ m 이하의 구형 또는 타원형의 단세포 미세조류로 녹조류의 일종이다. 1890년 네덜란드의 미생물학자 바이엘링(Beijerinck)에 의해 발견되었고 분류학상 *Chlorophyceae* 강, *Chlorococcum* 목, *Chlorella* 속으로 주요종(species)으로는 *vulgaris*, *pyrenoidosa*, *ellipsoidea* 등 약 10종이 널리 알려져 있다(Song, 2008). 클로렐라는 50~60%가 단백질, 15~20%가 탄수화물이며, 이외에 엽록소, 비타민, 미네랄,식이섬유 등과 같은 영양소가 풍부하

며, 지질은 30% 정도가 리놀레인산이고 탄수화물도 헤미셀룰로오스를 많이 함유하고 있으며, 단백질 중에 함유된 핵산은 성장 촉진 효과로도 잘 알려져 있다. 또한 광합성 능력이 뛰어나 식물의 광합성 연구에 사용되다가 적당한 조건하에서는 약 10배나 증가하며 배양 조건에 따라 지방은 20~80%, 단백질은 90%까지, 그리고 탄수화물은 37%까지 함량을 높일 수 있어서 인간의 식량문제를 해결하고자 연구되어 왔다. 그러나 개체가 너무 작고, 특유한 맛과 소화가 잘 안 되어 식품으로 개발되지 못하고 있다가 최근 무균 순수배양으로 소화흡수율을 높인 건강보조식품과 유제품 등에 개발, 이용되고 있다(성, 2010; 한 등, 2002).

지금까지 알려진 클로렐라의 기능성 연구로는 환경호르몬인 다이옥신의 체내 배출작용(Morita *et al.*, 1999), 중금속의 축적 억제 및 배설작용(Kim *et al.*, 2009), 환경 독성물질의 생물학적 분해와 폐수종의 중금속 제거작용(Tam *et al.*, 2002; Travieso *et al.*, 2002), 동맥경화 및 간장장애의 억제작용(Singh *et al.*, 1998; Peng *et al.*, 2009), 항산화작용(Lee *et al.*, 2010) 식품의 풍미 향상 및 보습효과(Park *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003) 등이 있다. 클로렐라의 단백질에 관한 연구로 *Chlorella vulgaris*의 부산물로부터 항산화 활성을 가지는 peptide를 분리했으며(Sheih *et al.*, 2009), *Chlorella pyrenoidosa*로부터 단백질인 haemagglutinin를 분리하였으며(Chu *et al.*, 2006), trypsin을 처리하여 가수분해한 *Chlorella vulgaris*로부터 생리활성을 나타내는 단백질을 분리하였으며(Kang *et al.*, 2004), 클로렐라 배양액 내에 함유된 glycoprotein을 분리하여 항암효과를 확인하였다(Noda *et al.*, 1996). 또한 해수 클로렐라 추출물이 신경세포의 분

화를 촉진한다는 연구 결과와 항암 및 면역 활성화, 항염증 효과 등이 보고되었다(Lee *et al.*, 2003; Choi *et al.*, 2010).

그리고 클로렐라 추출물은 클로렐라 원말을 열수에서 유효성분을 추출한 후 원심분리법으로 균체의 불용성 물질을 제거한 후 농축 분말화한 것으로 단백질, 아미노산, 펩타이드, 당류, 핵산, 비타민, 무기질 및 *Chlorella growth factor*(CGF)를 함유하고 있어(Kang *et al.*, 2004) 면역기능 향상(An *et al.*, 2010; Hsu *et al.*, 2010), 항암작용(Konishi *et al.*, 1996), 성장촉진작용(Kanno *et al.*, 1996; Kim *et al.*, 2002), 뇌졸중 개선 및 예방, 세포 재생 등의 효과가 보고된 바 있다(Song, 2008). 그 외에도 관련 논문은 찾을 수 없었지만 한국과학기술정보연구원(KISTI)의 기술뉴스브리프(성기태)에 의하면 콜레스테롤 저하작용, 스트레스 예방작용, 항바이러스 작용, 각종 성인병 예방 효과, 체질개선 등의 연구 결과가 지속적으로 뒷받침되어 오고 있다고 한다.

지금까지 클로렐라의 생리 활성 및 작용기전에 대한 연구는 많이 이루어져 오고 있지만 위손상과 관련된 연구는 미비한 실정이다. 따라서, 본 연구는 클로렐라 추출물이 에탄올에 의한 위손상에 어떠한 영향을 미치는지 알아보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

가. 시약 및 재료

본 실험에 사용된 클로렐라는 (주)대상에서 구입한 분말상태의 원말(*Chlorella vulgaris*)을 사용하였다.

실험에 사용한 GOT, GPT 측정은 혈청중 GOT, GPT 성분 정량 검사용 시약으로 (주)아산제약(Korea) 제품을 사용하였고, 혈청중 TG 측정은 TRIGLYZYME-V 혈청중성지방측정용으로 (주)신양화학약품(Korea) 제품을 사용하였다. SOD Assay Kit는 Cayman Chemical Company(Ann Arbor, U.S.A) 제품, Glutathione Assay Kit는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, U.S.A) 제품을 사용하였고, Ethanol Assay Kit는 R-BIOPHARM(Germany) 제품을 사용하였다. caspase -3, -8 활성을 측정하기 위해 CaspACE™ assay system(Promega, U.S.A)을 구입해서 사용하였다.

2. 실험방법

가. 시료의 조제

(1) 클로렐라 추출물의 제조

2009년 7월에 (주)대상에서 구입한 분말 클로렐라 (*Chlorella vulgaris*) 40 g을 증류수 2 L에 넣고 교반한 후, 121℃에서 15분간 고압 상태에서 추출한 다음, 원심분리 (2,500 rpm, 15 min, 4℃)하여 상층액을 감압 농축하였다. 이것을 동결건조한 후 분말화하여 시료로 이용하였으며, 이를 클로렐라 추출물 (extract of *Chlorella vulgaris*, CVE)로 명명하였다(Fig. 2).

(2) SDS-PAGE electrophoresis

15% SDS-PAGE (Laemmli, 1970)로 전기영동을 한 후, CVE의 단백질을 Coomassie blue 염색을 통해 밴드를 확인하였다. 즉, staining solution (7% aceticacid, 40% methanol, 0.1% bromophenol blue)으로 실온에서 일정시간 동안 반응시킨 후, destaining solution (7% aceticacid, 20% methanol)으로 탈색시켜 밴드를 확인하였다. 그리고 periodic acid-Schiff (PAS) 염색을 통해 CVE의 glycoprotein 부분을 확인하였으며, PAS 염색은 Pierce® Glycoprotein Staining Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.)를 사용하였다.

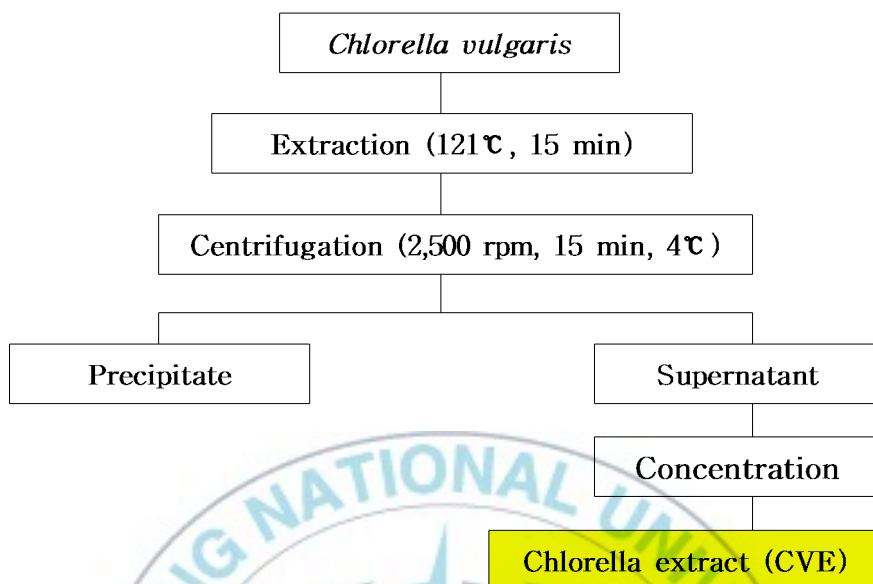


Fig. 2. Extraction process from *Chlorella vulgaris*.

나. 동물실험 설계

(1) 사육 및 군 분리

본 실험에 사용된 실험동물은 샘타코에서 분양받은 7주령의 Sparague Dawley계 숫쥐(체중, 230 ± 10 g) 40마리로 각각 10마리씩 4그룹(정상군, 대조군, CVE-1군, CVE-2군)으로 나누어 연립식 사육 케이지에 넣고 10일간 순치 예비사육을 하였다. 이때 고형사료와 물은 자유롭게 먹을 수 있도록 하였고, 사육실 온도($22 \pm 1^{\circ}\text{C}$), 습도($50 \pm 10\%$) 및 명암 12시간(08:00~20:00)을 엄격히 조절하였다.

- 정 상 군 : Normal rats treated with ddH₂O
- 대 조 군 : Control rats orally received 40% ethanol (6 ml/kg body weight).
- CVE-1군 : CVE-1 rats orally received 40% ethanol with *Chlorella vulgaris* extracts (150 mg/kg body weight).
- CVE-2군 : CVE-2 rats orally received 40% ethanol with *Chlorella vulgaris* extracts (300 mg/kg body weight).

(2) 알코올 및 시료 투여

10일간의 적응 기간이 끝난 후 매일 일정한 시간에 시료 투여군에는 클로렐라 추출물(150 mg/kg, 300 mg/kg) 1.5 ml를 정상군과 대조군에는 동량의 증류수를 7일간 경구 투여하였다. 실험종료 18시간 동안 절식시킨 후 시료투여군에는 클로렐라 추출물(150 mg/kg, 300 mg/kg) 1.5 ml를, 정상군과 대조군에는 동량의 증류수를 투여하고, 2

시간 후 40% 에탄올 6 ml/kg B.W.를 대조군과 시료투여군에 각각 경구 투여하고, 정상군에는 동량의 증류수를 경구 투여하였다.

(3) 체중 및 장기의 중량 측정

시료를 경구투여 시작한 날부터 7일째 되는 마지막 날까지 체중을 측정하였고, 고형사료는 매일 일정한 시간에 일정량(20 g/day)을 제한 급식하여 식이섭취량을 측정하고 체중증가량에 따른 식이효율(Food Efficiency Ratio, FER)을 구하였다.

실험 종료일 대조군과 시료군에 에탄올 투여 1시간 후 ether로 마취하고 단두하여 채혈하였고, 각 혈액 시료는 빙수 중에 1시간 방치한 후 원심분리(2,500 rpm, 20 min, 10℃)하여 채취한 혈청을 -70℃에 보관하였다. 그리고 위와 간을 적출하여 생리 식염수로 세척한 다음 수분을 여과지로 제거하고 사진 촬영한 즉시 액체질소로 동결시켜 -70℃에 보관하면서 실험재료로 사용하였다.

(4) 혈액내 간기능 관련 효소 및 Triglyceride 함량 측정

(가) Transaminase (GOT, GPT) 활성 측정

간세포 손상시 혈액으로 유리되어 나오는 Glutamic oxaloacetic transaminase (GOT)와 Glutamic pyruvic transaminase (GPT)의 양을 측정함으로써 간세포 손상 여부를 확인하였다.

Reitman-Frankel의 방법(Rentiman and Frankel, 1957)에 따라 제조된 GOT 및 GPT 측정용 kit (아산제약주식회사, Korea)를 사용하여 GOT와 GPT 기질액 100 μ l을 시험관에 넣고 37℃에서 3분간 방치한 뒤 혈청 20 μ l을 넣어 잘 혼합한 다음, 37℃에서 GOT는 60분, GPT는 30분간 방치한다. 정색시약 100 μ l을 첨가하여 실온에서 20

분 방치하고 0.4 N NaOH용액 1 ml 가하여 실온에서 20분간 방치한 후, 분광광도계 (Ultraspec 2001 pro. Amersham Phamacia biotech, England)로 505 nm에서 흡광도를 측정하고, 표준곡선에 준해 활성도를 계산하였다. 이때 활성도는 혈청 ml당 Karmen unit로 나타내었다.

(나) Triglyceride (TG) 함량 측정

혈청 내 Triglyceride 함량은 GPO효소법(Karmen, 1955)을 응용한 것으로 Triglyceride 측정용 kit (신양화학약품, Korea)를 사용하여 CVE가 지질대사에 미치는 영향을 확인하였다. 혈청 10 μ l에 발색시액 1.5 ml를 가하여 37°C 5분간 가온한 후, 505 nm에서 흡광도를 측정하여 혈청 내 TG함량 (mg/dl)을 계산하였다.

(5) Ethanol 함량 측정

혈중 알코올 농도는 Bucher(1951)의 방법을 이용하여 제조한 알코올 측정 kit (R-BIOPHARM, Germany)로 분석하였다. Potassium diphosphate buffer (pH 9.0) 3 ml에 NAD 1 tablet (4 mg)을 녹여 reaction mixture를 만들고, 여기에 혈청 0.1 ml를 가하여 3분간 반응시킨 후 340 nm에서 흡광도를 측정한 값과 여기에 0.05 ml의 ADH를 가하여 5분간 반응시킨 후 흡광도를 측정한 값을 구하여 혈중 에탄올 함량을 계산하였다.

(6) 위조직 내 항산화 활성 측정

(가) Superoxide dismutase (SOD) 활성

Superoxide radical(O_2^-)을 과산화수소로 전환시켜 활성 산소로부터 세포를 보호하는 SOD를 Cayman chemical assay kit를 사용하

여 측정하였다.

동결된 위조직 0.1 g을 잘라 균질액을 얻기 위하여 1 mL SOD buffer에 넣고 homogenizer로 균질화 시킨 후, 원심분리(1,500×g, 4℃, 5 min)하여 얻은 상층액을 효소원으로 사용하였다. 96-well에 효소원과 SOD Standard를 각각 20 μ l씩 분주하고, 희석시킨 radical detector 200 μ l를 첨가한 다음 xanthine oxidase 20 μ l를 신속하게 넣는다. 실온에서 20분간 반응 시킨 후 ELISA plate reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선에 준해 SOD 활성도를 계산하였다.

(나) Reduced glutathine (GSH) 함량

GSH는 여러 독성물질로 인한 손상과 질병으로부터 몸을 보호하는 항산화작용 물질로써 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, U.S.A) 제품을 사용하여 측정하였다..

GSH 함량을 측정하기 위해 먼저 위조직을 얼음 위에서 0.1 g 채취한 뒤, 5% SSA 용액에 넣어 homogenizer를 이용하여 4℃에서 균질화하였다. 이 균질액을 액체질소로 동결, 37℃ 온수조에서 해동 과정을 2회 반복 실시한 후, 4℃에서 5분간 방치했다가 원심분리(10,000×g, 10 min)하여 얻은 상층액을 GSH 농도를 측정하기 위한 효소원으로 이용하였다.

효소원과 5% SSA 용액을 96-well에 각각 10 μ l씩 분주한 다음, working mixture를 첨가하고 실온에서 5분간 반응시킨 후 NADPH 용액을 넣고 ELISA plate reader로 412 nm에서 5분간 1분 간격으로 흡광도를 측정하였다.

(7) 위조직 내 caspase-3, -8 활성 측정

위조직을 protease inhibitor가 포함된 lysis buffer (25 mM HEPES, pH 7.5, 5 mM EDTA, 2 mM DTT, 0.1% CHAPS)로 균질화시킨 후, 원심분리(12,000×g, 4℃)하였다. 상층액을 취해 BCA protein assay kit (Pierce, U.S.A)로 단백질 농도를 측정하여 100 µg의 단백질을 96-well에 넣고 여기에 DEVD-pNA substrate를 넣은 후 37℃에서 2시간 30분간 반응시켜 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

다. 통계처리

실험의 분석 결과는 각각의 군별로 평균과 표준편차(mean ± S.D.)를 사용하여 표기하였으며 모든 자료는 Window용 SPSS 프로그램 (Statistical Package for Social Science, SPSS Inc, Chicago, IL, USA)을 이용하여 처리하였고 반복 측정에 의한 ANOVA test와 Duncan's multiple range test를 적용하여 유의성 검증을 실시하였다. 이때 모든 통계적 유의도 수준은 $p < 0.05$ 에서 살펴보았다.

III. 결과 및 고찰

1. CVE의 제조 및 일반성분 분석

클로렐라 원말 80 g으로부터 추출물(extract of *Chlorella vulgaris*, CVE) 약 12 g을 추출하여 클로렐라 원말의 일반성분을 Association of Analytical Communities (AOAC) 방법에 의해 분석한 결과, 수분이 $3.48 \pm 0.03\%$, 조단백질이 $54.53 \pm 0.11\%$, 조회분이 $3.88 \pm 0.02\%$, 탄수화물이 38.11% 로 단백질이 가장 많은 비율을 차지하는 것을 확인하였다. 그리고 CVE의 일반성분을 분석한 결과, 수분이 $5.17 \pm 0.08\%$, 조단백질이 $61.41 \pm 0.18\%$, 조회분이 $14.24 \pm 0.10\%$, 탄수화물이 19.18% 로 단백질이 가장 많은 양을 차지하는 것을 확인하였다(Table 1).

CVE에 존재하는 단백질과 당 회분을 확인하기 위해 15% SDS-PAGE로 전기영동한 후 coomassie blue staining을 통해 단백질 밴드를 확인하였다 (Fig. 3). 그 결과 CVE에 존재하는 단백질과 당의 회분은 다양한 분자량의 범위에 걸쳐 존재하는 것으로 나타났다.

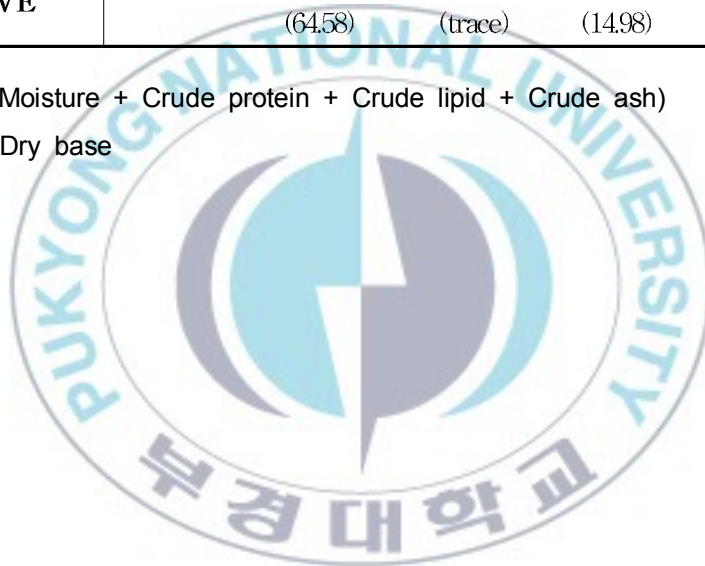
Table 1. Proximate composition of *Chlorella vulgaris* and extract of *Chlorella vulgaris* (CVE)

(%)

	Moisture	Crude protein	Crude lipid	Crude ash	Carbo-hydrate ^{*1}
<i>Chlorella vulgaris</i>	3.48±0.03	54.53±0.11 (56.43)	trace (trace)	3.88±0.02 (4.02)	38.11 (39.44)
CVE	5.17±0.08	61.41±0.18 (64.58)	trace (trace)	14.24±0.1 (14.98)	19.18 (20.17)

¹100 - (Moisture + Crude protein + Crude lipid + Crude ash)

() = Dry base



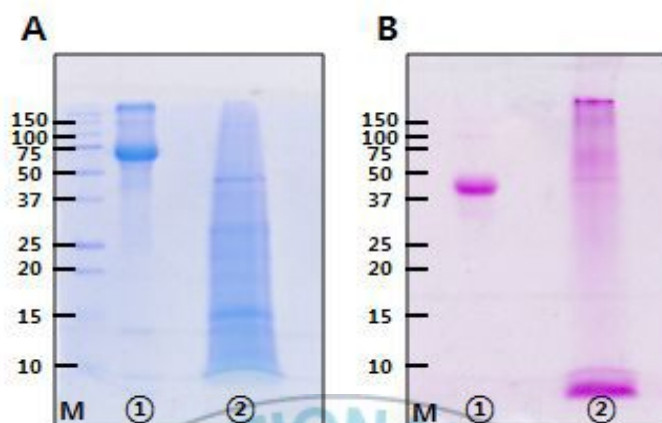


Fig. 3. SDS-PAGE bands of CVE

CVE was separated by 15% SDS-PAGE, and then stained with coomassie blue staining and PAS staining.

A : coomassie blue staining. ① : positive control (albumin, $10\mu\text{g/ml}$), ② : CVE ($50\mu\text{g/ml}$)

B : PAS staining. ① : positive control (horseradish peroxidase, $10\mu\text{g/ml}$), ② : CVE ($50\mu\text{g/ml}$)

M : protein standard

2. 체중 및 식이효율, 장기의 변화

가. 체중 및 식이효율에 미치는 영향

7일간 클로렐라 추출물의 농도별 경구투여가 흰쥐의 체중변화에 미치는 영향을 비교 관찰한 결과, Fig. 4과 같이 나타났으며 정상군, 대조군, 시료투여군 모두 지속적인 체중증가를 보였다(Table 2). 그러나 실험기간동안 군별간 체중증가량은 정상군 5.46 ± 1.44 g, 대조군 5.29 ± 1.0 g, CVE-1군 5.73 ± 1.29 g, CVE-2군 4.11 ± 1.67 g을 나타내어 타군에 비해 CVE-2군에 있어서 유의적 차이를 보였다(Table 2, Fig. 5).

또한 체중증가량에 따른 식이효율(FER)을 구한 결과, 체중증가량과 마찬가지로 CVE-2군에 있어서 유의적 차이를 보였다(Table 2, Fig. 6). 이는 클로렐라 추출물에 포함된 식이섬유 등 생리 활성 물질이 체내 대사를 조절하여 단기간이지만 고농도 투여로 체중 감소에도 영향을 미치는 것으로 사료된다.

Table 2. Changes in body weight and food efficiency ratio of rats administered with extract of *Chlorella vulgaris* (CVE)

Group	Normal	Control	CVE-1	CVE-2
Initial body weight (g)	279.0±5.8 ^{1)NS3)}	277.8±4.4	277.9±5.7	276.0±7.1
Final body weight (g)	314.6±10.4	313.9±8.5	316.4±4.5	301.6±7.6
Total body weight gain (g/7 day)	5.46±1.44 ^a	5.13±1.63 ^a	5.73±1.29 ^a	4.11±1.67 ^b
FER ²⁾ (%)	28.06±4.7 ^a	27.14±3.3 ^a	28.39±4.7 ^a	18.37±4.87 ^b

1) Values are mean±SD (n=10)

2) FER: Food efficiency ratio = (body weight gain / food intake) × 100

3) NS: not significant

4) a-b: Data values in the same column with different superscripts are significantly different at p<0.05.

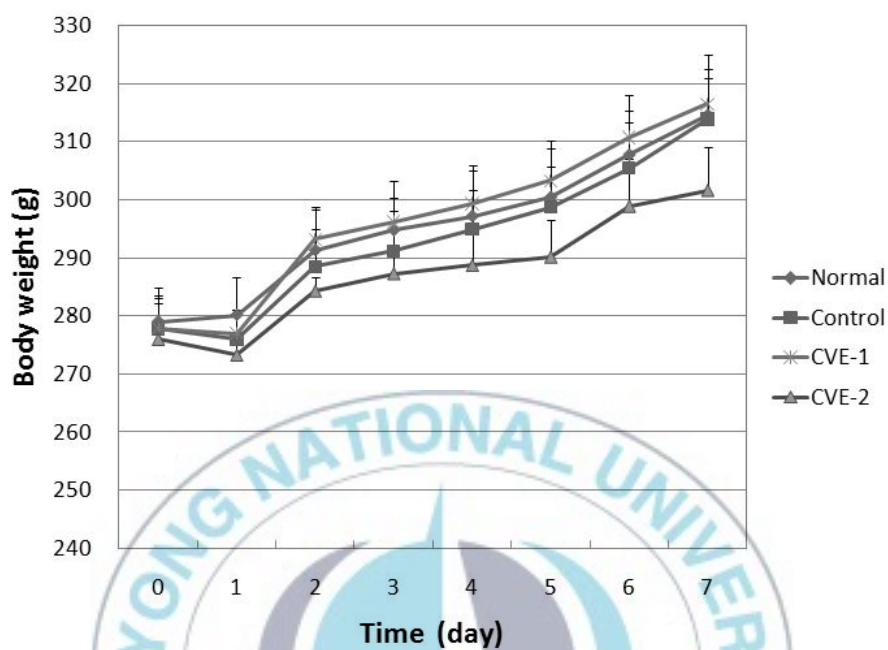


Fig. 4. Changes in body weight of rats administered with extract of *Chlorella vulgaris* (CVE)

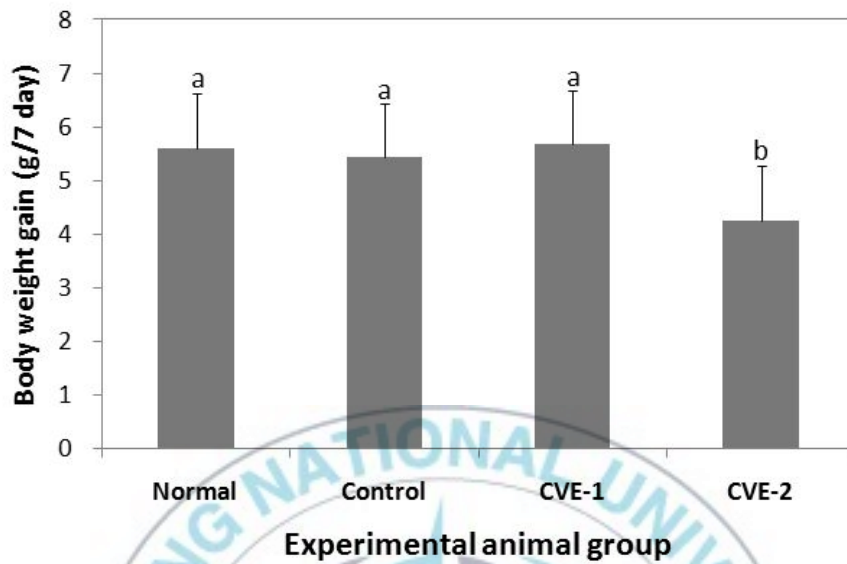


Fig. 5. Changes in body weight gain of rats administered with extract of *Chlorella vulgaris* (CVE)

Values are mean $\pm$ SD of four experiments. Values with different superscripts are significantly different by ANOVA and Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

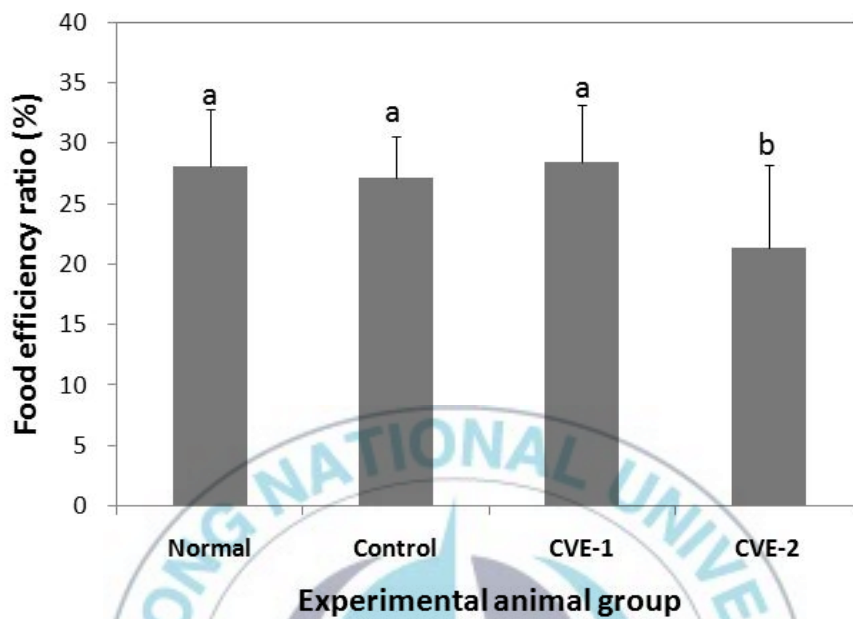


Fig. 6. Changes in food efficiency ratio of rats administered with extract of *Chlorella vulgaris* (CVE)

Values are mean $\pm$ SD of four experiments. Values with different superscripts are significantly different by ANOVA and Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

나. 장기무게에 미치는 영향

에탄올과 시료 투여로 무게에 영향을 미칠 수 있는 간과 위를 적출하여 그 무게를 측정한 결과, Table 3에서 보는 바와 같이 각각 간과 위의 무게가 체중 100당 정상군은 2.98 ± 0.12 g, 0.48 ± 0.05 g, 대조군은 3.0 ± 0.12 g, 0.50 ± 0.06 g, CVE-1군은 3.09 ± 0.13 g, 0.54 ± 0.05 g, CVE-2군은 3.07 ± 0.17 g, 0.57 ± 0.06 g으로 유의적 차이가 없는 것으로 나타났다. 이는 1회의 에탄올 투여와 단기간 클로렐라 섭취가 장기의 무게에는 영향을 주지 않았음을 알 수 있다.



Table 3. Liver and Stomach weight following ethanol or ethanol+CVE treatment in the rats

Group	Normal	Control	CVE-1	CVE-2
Liver (g/100g B.W.)	2.98±0.12 ^{1)NS2)}	3.0±0.12	3.09±0.13	3.07±0.17
Stomach (g/100g B.W.)	0.48±0.05	0.50±0.06	0.54±0.05	0.57±0.06

1) Values are mean ± SD (n=10)

2) NS : not significant



다. 장기의 표면손상에 미치는 영향

클로렐라 추출물과 에탄올을 경구 투여하여 장기의 표면손상에 미치는 영향을 육안으로 관찰한 결과, 에탄올 투여군인 대조군에서 위출혈이 일어난 것을 확인 할 수 있었고, 시료를 먹인 군에서는 농도별로 큰 차이를 보이지 않았지만 위출혈이 저해된 것을 확인하였다(Fig. 7). 반면 간조직에 있어서는 군별간 큰 변화를 확인할 수 없었다(Fig. 8).

고농도의 알코올은 세포간의 tight junction을 파괴하여 위점막을 손상시키고 수소 이온이 점막으로 역확산되어 나트륨 이온이 위강으로 이동하여 위점막 세포 내외의 전위차가 감소하며, 역확산된 수소 이온은 점막하조직, 세포혈관, 세정맥의 파괴를 유발하여 혈장단백질의 소실과 출혈을 유발한다고 한다(Dinosa *et al.*, 1970). 본 실험에서도 40%의 에탄올 투여로 위출혈과 점막손상을 육안으로 확인하였으며, 클로렐라 추출물을 투여한 군에서는 정상군과 비슷한 위점막 조직 형태가 관찰되었다. 그러나 1회의 알코올 투여로 간의 표면조직 손상은 유발하지 않은 것으로 사료된다.

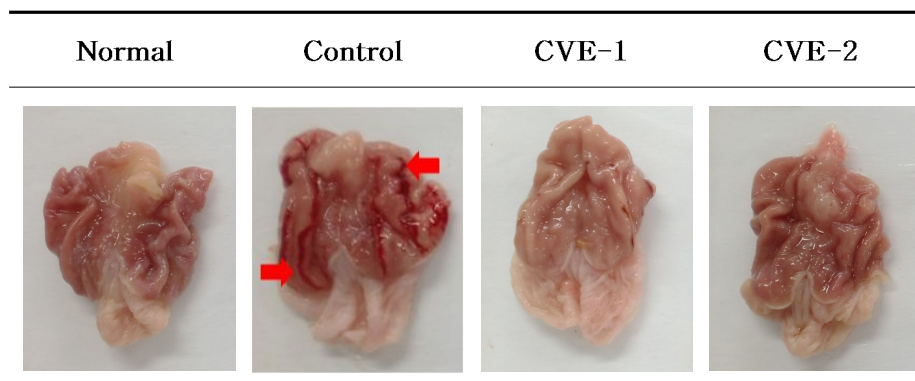
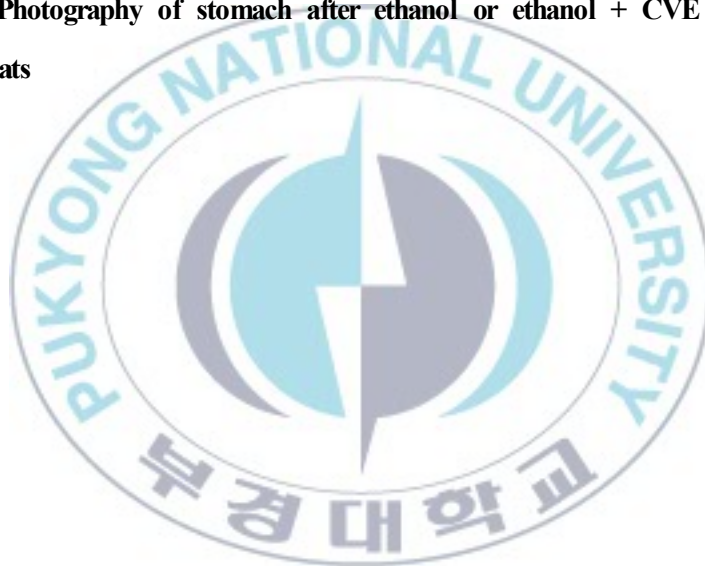


Fig. 7. Photography of stomach after ethanol or ethanol + CVE treatment in the rats



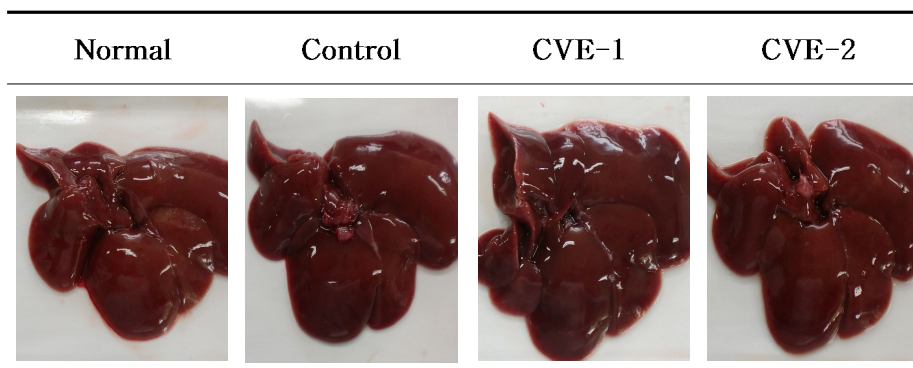


Fig. 8. Photography of liver after ethanol or ethanol + CVE treatment in the rats



3. 혈액 내 간기능 관련 효소 및 triglyceride 변화

가. transaminase (GOT, GPT) 활성에 미치는 효과

Glutamic oxaloacetic transaminase (GOT)와 Glutamic pyruvic transaminase (GPT)는 생체 내 TCA 회로에 있어 대사산물과 아미노산 사이에서 아미노기 전이를 조절하는 효소로서 간장, 신장, 심장 등에 분포되어 있다가 간 손상으로 인한 간세포의 괴사와 간조직의 파괴가 진행됨에 따라 혈중으로 유리되어 높은 활성치를 나타낸다.

클로렐라 추출물과 에탄올을 경구 투여하여 효소의 혈중 유리 정도를 측정한 결과, GOT는 정상군이 475.8 ± 122.2 karmen/ml, 대조군이 675.9 ± 159.8 karmen/ml, CVE-1군이 520.0 ± 120.2 karmen/ml, CVE-2군이 492.3 ± 112.3 karmen/ml로 나타나 CVE군 모두 정상군과 비슷한 수준까지 유의성 있게 감소하였다(Fig. 9). GPT는 정상군 29.08 ± 3.87 karmen/ml, 대조군 33.28 ± 6.2 karmen/ml, CVE-1군 28.12 ± 3.88 karmen/ml, CVE-2군 27.01 ± 2.76 karmen/ml로 측정되어 CVE-1군과 CVE-2군에서 대조군보다 유의적 감소를 보였다(Fig. 10).

알코올 투여에 따른 간독성은 투여기간과 투여량에 영향을 받으며, 급성투여는 GOT, GPT의 변화에 뚜렷한 영향을 주지 않는다는 보고(Zima *et al.*, 1993)가 있지만, 본 실험에서는 단회 에탄올 투여 시에도 GOT와 GPT활성이 정상군과 비교하여 볼 때 큰 수치는 아니지만 유의적으로 증가함을 볼 수 있었고, 7일간의 클로렐라 섭취로 간기능 손상에 보호 효과가 있음을 알 수 있었다.

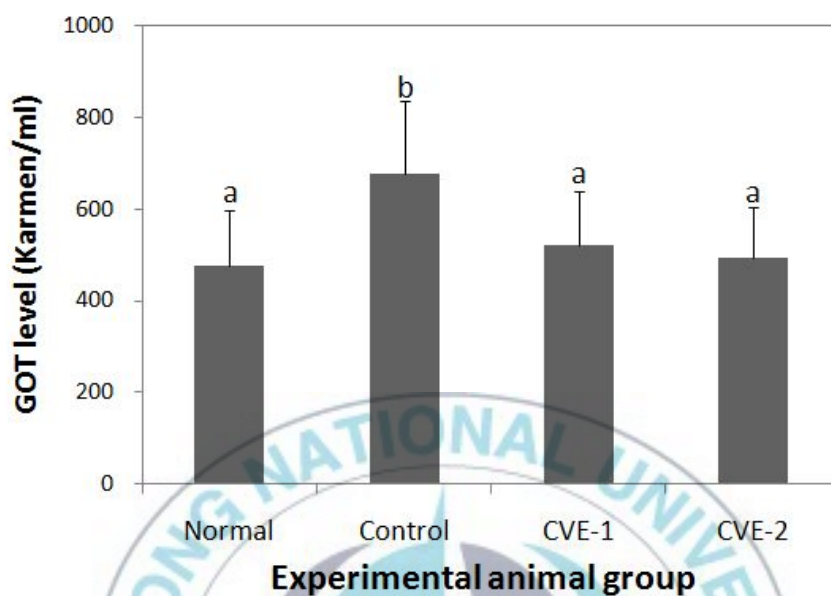


Fig. 9. Effects of CVE on serum GOT activities in ethanol-induced rats

Values are mean $\pm$ SD of four experiments. Values with different superscripts are significantly different by ANOVA and Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

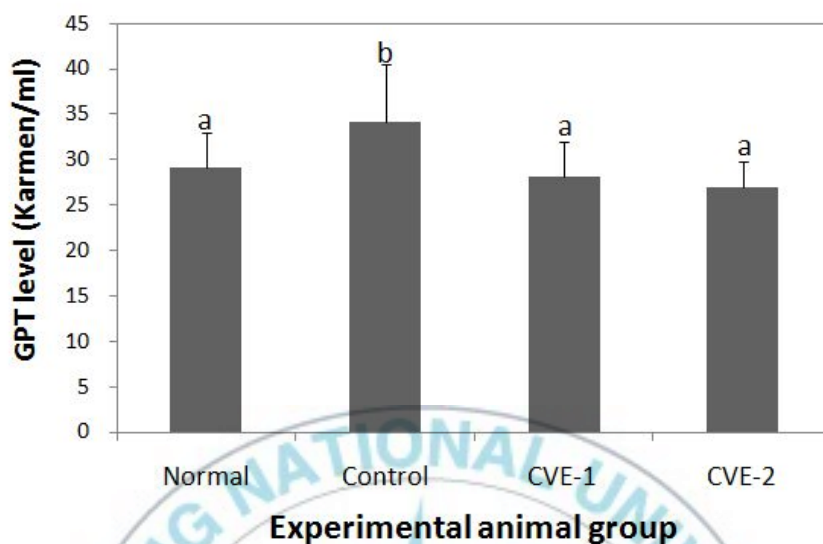


Fig. 10. Effects of CVE on serum GPT activities in ethanol-induced rats
 Values are mean $\pm$ SD of four experiments. Values with different superscripts are significantly different by ANOVA and Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

나. Triglyceride (TG) 함량에 미치는 영향

혈중 중성지질 수준은 알코올만을 투여한 대조군에서 38.82 ± 10.18 mg/dl로 정상군의 30.3 ± 6.7 mg/dl와 비교하여 그 값이 유의적으로 높게 나타났으며, 클로렐라 추출물 투여로 혈중 중성지질의 수준이 CVE-1군에서 27.42 ± 5.39 mg/dl, CVE-2군에서 28.72 ± 4.12 mg/dl로 정상군보다 낮게 유의적 차이를 보였다(Fig. 11).

Karsenty 등(Karsenty *et al.*, 1985)에 의하면 알코올의 섭취는 쥐의 중성지질을 5배까지 증가시킨다고 하였으며, 이는 알코올에 의해 간에서의 중성지질 합성이 증가하기 때문인 것으로 보고되었다(Nestel and Hirsch, 1965). 본 실험에서도 에탄올에 의해 혈액 내 중성지방이 증가함을 볼 수 있었고, 클로렐라 추출물의 섭취로 중성지질 합성이 억제되어 지질대사에 긍정적 영향을 미치는 것으로 사료된다.

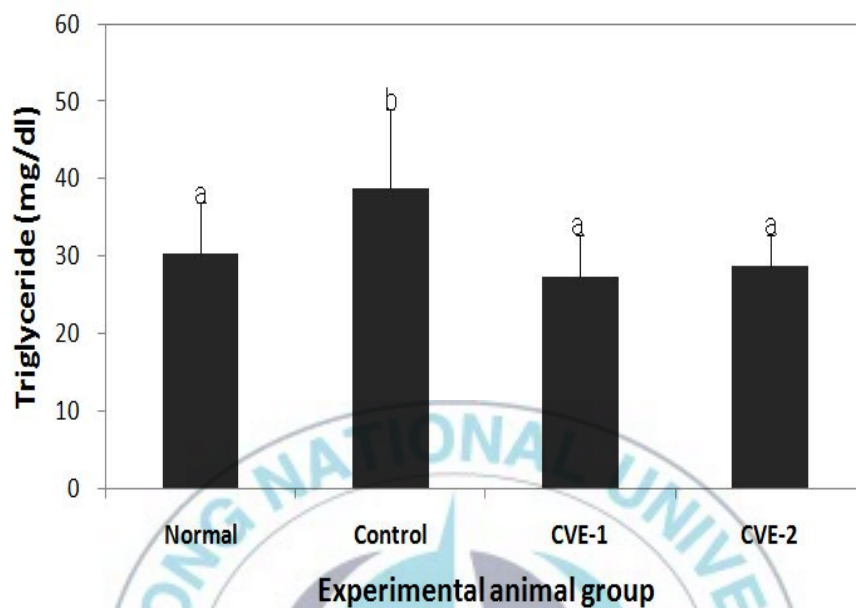


Fig. 11. Effects of CVE on serum TG levels in ethanol-induced rats

Values are mean $\pm$ SD of four experiments. Values with different superscripts are significantly different by ANOVA and Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

4. 혈액 내 Ethanol 농도에 미치는 영향

7일간 클로렐라 추출물을 농도별로 투여하다가 알코올을 경구 투여하고 1시간 후 혈청 중 알코올 농도를 측정한 결과, 대조군 0.25 ± 0.05 g/L에 비해 CVE-1군과 CVE-2군에서 0.21 ± 0.03 g/L, 0.18 ± 0.03 g/L로 유의적 감소를 보였다(Fig. 12). 정상적인 상태에서 소량의 알코올 섭취는 효소 작용에 의해 acetic acid, CO_2 , 물로 배설되지만 장기적으로 섭취하거나 다량 섭취시 알코올성 장애를 유발하게 되는데, 본 실험을 통해 클로렐라 추출물이 알코올 분해 능력을 증진시키는데 영향을 미치는 것으로 사료된다.



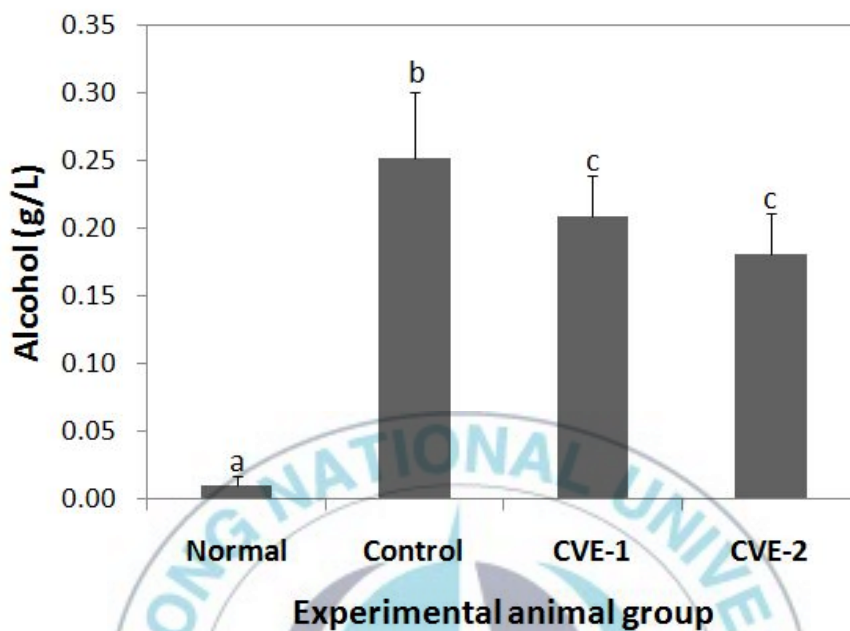


Fig. 12. Effects of CVE on serum alcohol concentration in ethanol-induced rats

Values are mean $\pm$ SD of four experiments. Values with different superscripts are significantly different by ANOVA and Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

5. 위조직 내 항산화 활성 변화

가. Superoxide dismutase (SOD) 활성에 미치는 영향

Superoxide dismutase(SOD)는 mitochondria에 존재하는 superoxide radical(O_2^-)을 보다 반응성이 약한 과산화수소(hydrogen peroxide, H_2O_2)로 전환시켜 superoxide anion(O_2^-)을 제거하는 효소로 생체 내의 항산화 방어기구 중 하나이다(Deisseroth and Dounce, 1970).

위조직 중 SOD 활성을 측정한 결과, 에탄올만을 투여한 대조군에서는 73.06 ± 8.3 U/ml로 정상군 55.36 ± 8.15 U/ml 에 비하여 유의적으로 증가하였고, CVE-1군과 CVE-2군에서는 55.94 ± 8.18 U/ml, 54.69 ± 4.47 U/ml 로 대조군과 비교하여 유의적으로 낮은 값을 나타내었다(Fig. 13).

에탄올 투여 시 체내 구성성분인 구리, 망간, 아연 등 미량원소의 고갈에 의해 SOD과 catalase 활성이 감소된다는 보고(Kim *et al.*, 1997)가 있긴 하나, 최근 알코올로 위점막 손상이 유발되었을 때 superoxide anion를 제거하기 위해서 SOD의 양이 증가한다는 보고처럼(정, 2009), 본 실험에서도 에탄올 투여로 SOD 활성이 정상군에 비해 유의성 있게 증가한 것은 증가된 활성산소를 제거하려는 생리적 적응 현상으로 사료되며, 클로렐라 추출물 투여로 SOD 활성이 대조군에 비해 유의성 있게 감소한 것은 클로렐라에 활성산소를 억제할 수 있는 생리활성 물질을 함유하고 있어 위손상을 예방한다고 사료된다.

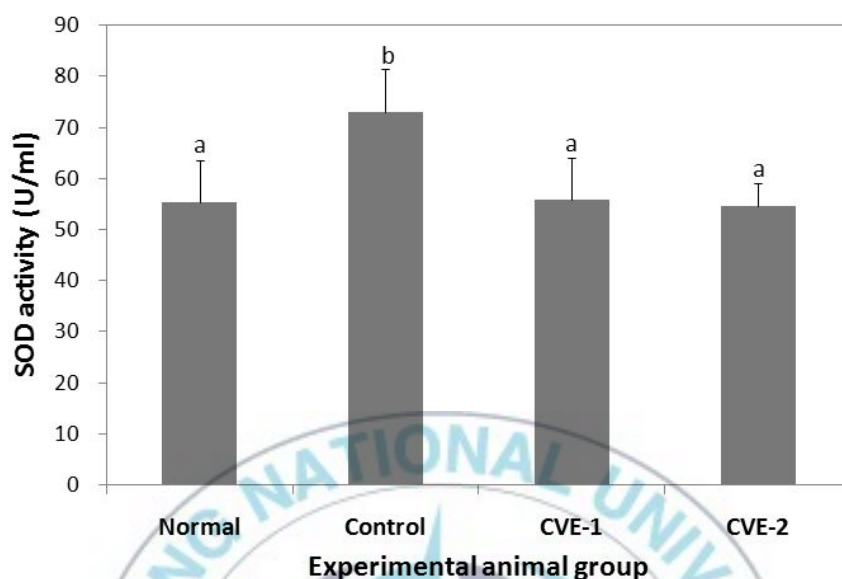


Fig. 13. Effects of CVE on gastric SOD activities in ethanol-induced rats

Values are mean $\pm$ SD of four experiments. Values with different superscripts are significantly different by ANOVA and Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

나. Reduced glutathione (GSH) 함량에 미치는 영향

Reduced glutathione (GSH)은 glutathione-S-transferase (GST) 와 glutathione-peroxidase (GPx)의 기질로 작용하여, 세포내 과산화물과 이물질 제거, 아미노산 수송 및 저장 등 다양한 세포 기능을 수행하는 물질로 알려져 있다(Lieber, 1980). 에탄올은 산화적 스트레스의 대표적 요인으로 GSH가 이들과 반응하여 제거하는 역할을 하고, 세포내 GSH 농도가 감소되어 산화적인 손상이 발생하는 것으로 알려져 있으며 (Cohen, 1983), 만성적 에탄올 섭취로 인해 GSH 함량이 감소되고 GST 활성이 유의적으로 상승된다는 보고가 있다(Yoon *et al.*, 2001).

그러나 본 실험에서는 위조직 내 GSH 함량을 측정한 결과(Fig. 14), 정상군의 GSH level을 100%로 했을 때 대조군은 $104.5 \pm 16.9\%$, CVE-1군과 CVE-2군에서는 각각 $114.1 \pm 13.1\%$, $123.5 \pm 15.9\%$ 로 실험군별간 유의적 차이를 볼 수 없었다.

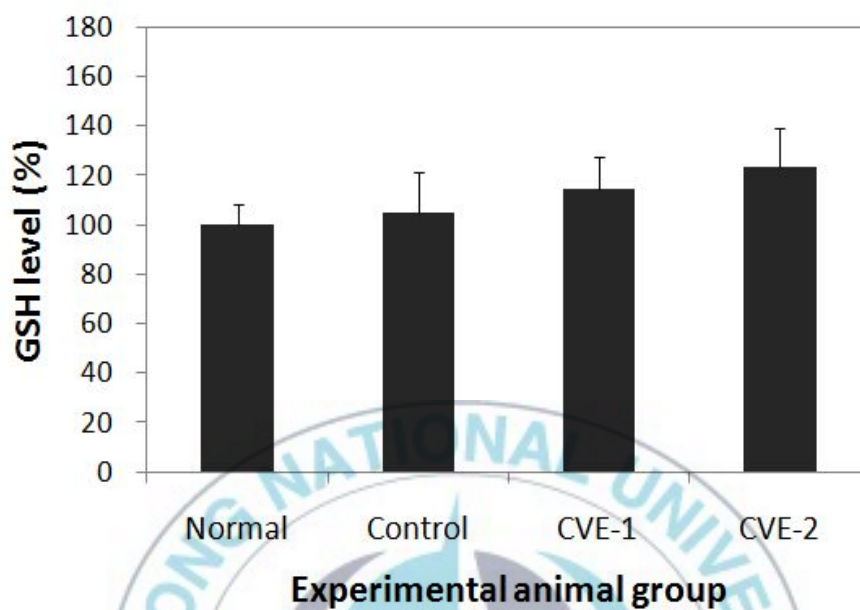


Fig. 14. Effects of CVE on gastric GSH level in ethanol-induced rats

Values are mean $\pm$ SD of four experiments. Values with different superscripts are significantly different by ANOVA and Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

6. 위조직 내 caspase-3, -8 활성 변화

Caspase는 세포사멸의 결정적인 신호 전달물질로 세포사멸 진행 시 활성화된다. 본 실험에서는 위 점막 상피세포 손상이 에탄올로 인한 세포사멸인지 확인하기 위해 세포사멸 지표인 caspase -3, -8의 활성을 측정하였다. 그 결과, caspase-3의 활성은 정상군 1.0 ± 0.11 에 비해 에탄올만을 처리한 대조군에서 1.18 ± 0.15 로 유의적으로 증가하였으며, CVE-1군과 CVE-2군은 각각 1.02 ± 0.11 , 0.87 ± 0.08 로 정상군 수준으로 감소하였다. 또한 caspase-8 활성에서도 정상군 1.0 ± 0.08 에 비해 대조군은 1.12 ± 0.06 으로 유의적 증가를 보였고, CVE-1군 1.05 ± 0.13 , CVE-2군 0.88 ± 0.09 로 유의적 감소를 보였다(Fig. 15). 이는 클로렐라 투여가 에탄올에 의한 세포의 산화적 스트레스를 줄여줌으로써 위 세포의 apoptosis를 어느 정도 억제시키는 것으로 사료된다.

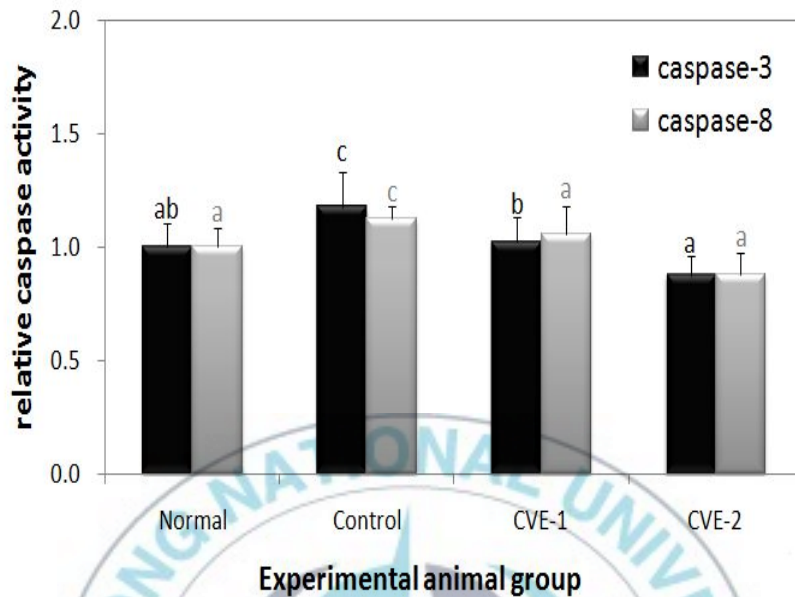


Fig. 15. Effects of CVE on gastric caspase-3, -8 activity in ethanol-induced rats.

Values are mean $\pm$ SD of four experiments. Values with different superscripts are significantly different by ANOVA and Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

IV. 요약 및 결론

알코올은 인류가 처음 사용한 약물이며, 적당한 음주는 신체 이완을 촉진시켜 스트레스 해소에 도움을 주고, 정신안정제 역할과 위를 자극하여 위액의 분비를 촉진시키는 작용을 할 뿐만 아니라 관상동맥 심장질환 위험을 낮추고, 혈중 콜레스테롤 수치도 낮춰 주는 것으로 알려져 있다. 그러나 지나친 알코올 섭취는 체내 대사과정 중 인체에 해로운 물질로 전환되어 뇌, 간, 심장, 위와 같은 소화기관에 유해물질로 작용함으로써 알코올성 간경변과 췌장염 등의 만성질환, 정신질환 등과 연관되어 있고 각종 악성종양의 원인으로 작용한다.

그 중 단시간의 알코올 섭취로 유도되는 급성 위점막 병변 (acute gastric mucosal lesion, AGML)은 위염 및 소화성궤양을 유발하여 명치 동통, 오심, 소화불량, 구토, 복통 등의 상부 위장관 증상을 주요 증상으로 하며, 전체 소화기질환 중에 10-20%를 차지한다.

알코올에 의한 보호효과는 주로 간손상과 관련지어 연구되어 왔으며, 위궤양으로 인한 위출혈이나 위천공 같은 병을 치료하기 위해 많은 약들이 개발되긴 했으나 비싼 뿐만 아니라 다양한 부작용을 가지고 있다. 이에 해조류 중에서 기능성 연구가 비교적 활발히 이루어져온 클로렐라를 대상으로 알코올에 의한 위손상 보호 효과를 확인하고자 하였다.

클로렐라 추출물은 클로렐라 원말을 열수에서 유효성분을 추출한 후 원심분리법으로 균체의 불용성 물질을 제거한 후 농축 분말화한 것으로 단백질, 아미노산, 펩타이드, 당류, 핵산, 비타민, 무기질 및

Chlorella growth factor (CGF) 등을 함유하고 있어 기능성 연구가 활발히 이루어져 오고 있다. 그러나 위손상 보호작용과 관련된 연구는 미비하여, 지금까지의 연구를 토대로 CVE가 에탄올로 유도한 위손상에 어떠한 영향을 미치는지 *in vivo* 실험을 통해 살펴보았다.

1. CVE의 제조 및 일반성분 분석

클로렐라 원말의 일반성분을 AOAC 방법에 의해 분석한 결과, 수분이 $3.48 \pm 0.03\%$, 조단백질이 $54.53 \pm 0.11\%$, 조회분이 $3.88 \pm 0.02\%$, 탄수화물이 38.11% 로 확인하였고, CVE의 일반성분을 분석한 결과, 수분이 $5.17 \pm 0.08\%$, 조단백질이 $61.41 \pm 0.18\%$, 조회분이 $14.24 \pm 0.10\%$, 탄수화물이 19.18% 로 단백질이 가장 많은 양을 차지하는 것을 확인하였다.

2. 체중 및 식이효율, 장기의 변화

가. 체중 및 식이효율에 미치는 영향

클로렐라 추출물의 농도별 경구투여로 정상군, 대조군, 시료투여군 모두 지속적인 체중증가를 보였으나 실험기간동안 군별간 체중증가량은 정상군 5.46 ± 1.44 g, 대조군 5.29 ± 1.0 g, CVE-1군 5.73 ± 1.29 g, CVE-2군 4.11 ± 1.67 g을 나타내어 CVE-2군이 타군에 비해 식이효율 또한 낮아 체중 감소 효과를 보였다.

나. 장기무게에 미치는 영향

에탄올과 시료 투여로 간과 위의 무게가 체중 100 g당 정상군은 2.98 ± 0.12 g, 0.48 ± 0.05 g, 대조군은 3.00 ± 0.12 g, 0.50 ± 0.06 g, CVE-1군은 3.09 ± 0.13 g, 0.54 ± 0.05 g, CVE-2군은 3.07 ± 0.17 g, 0.57 ± 0.06 g으로 유의적($p < 0.05$) 차이가 없는 것으로 나타나, 1회의 에탄올 투여와 단기간 클로렐라 섭취는 장기의 무게에 영향을 주지 않음을 알 수 있었다.

다. 장기의 표면손상에 미치는 영향

장기의 표면손상에 미치는 영향을 육안으로 관찰한 결과, 에탄올 투여군인 대조군에서 위출혈이 일어난 것을 확인 할 수 있었고, 시료를 먹인 군에서는 농도별로 큰 차이를 보이지 않았지만 위출혈이 억제된 것을 확인하였다. 그러나 1회의 에탄올 투여로 간의 표면조직 손상은 유발되지 않았음을 육안으로 확인하였다.

3. 혈액 내 간기능 관련 효소 및 triglyceride 변화

가. Transaminase (GOT, GPT) 활성화에 미치는 효과

클로렐라 추출물과 에탄올을 경구 투여하여 간기능 관련 효소의 혈중 유리 정도를 측정한 결과, GOT는 정상군이 475.8 ± 122.2 karmen/ml, 대조군이 675.9 ± 159.8 karmen/ml, CVE-1군이 520.0 ± 120.2 karmen/ml, CVE-2군이 492.3 ± 112.3 karmen/ml 로 나타나

CVE군 모두 정상군과 비슷한 수준까지 유의성($p<0.05$) 있게 감소하였다. GPT는 정상군 29.08 ± 3.87 karmen/ml, 대조군 33.28 ± 6.2 karmen/ml, CVE-1군 28.12 ± 3.88 karmen/ml, CVE-2군 27.01 ± 2.76 karmen/ml 로 측정되어 CVE-1군과 CVE-2군에서 대조군보다 유의적($p<0.05$) 감소를 보여, 간기능 손상에 보호 효과가 있음을 알 수 있었다.

나. Triglyceride (TG) 함량에 미치는 영향

혈중 중성지질 수준은 알코올만을 투여한 대조군에서 38.82 ± 10.18 mg/dl로 정상군의 30.3 ± 6.7 mg/dl와 비교하여 그 값이 유의적($p<0.05$)으로 높게 나타났으며, 클로렐라 추출물 투여로 혈중 중성지질의 수준이 CVE-1군에서 27.42 ± 5.39 mg/dl, CVE-2군에서 28.72 ± 4.12 mg/dl로 정상군보다 낮게 유의적($p<0.05$) 차이를 보여, 클로렐라 추출물이 지질대사에 영향을 미치는 것으로 확인되었다.

4. 혈액 내 Ethanol 농도 변화

단기간 클로렐라 추출물을 농도별로 투여한 결과, 대조군 0.25 ± 0.05 g/L에 비해 CVE-1군과 CVE-2군에서 0.21 ± 0.03 g/L, 0.18 ± 0.03 g/L로 유의적($p<0.05$) 감소를 보여, 클로렐라 추출물이 알코올 분해 능력을 증진시키는데 영향을 미치는 것으로 확인되었다.

5. 위조직 내 항산화 활성 변화

가. Superoxide dismutase (SOD) 활성에 미치는 영향

위조직 중 SOD 활성을 측정한 결과, 에탄올만을 투여한 대조군에서는 73.06 ± 8.3 U/ml로 정상군 55.36 ± 8.15 U/ml에 비하여 유의적($p < 0.05$)으로 증가하였고, CVE-1군과 CVE-2군에서는 55.94 ± 8.18 U/ml, 54.69 ± 4.47 U/ml로 대조군과 비교하여 유의적($p < 0.05$)으로 낮은 값을 나타내어 클로렐라 추출물 투여로 활성산소를 억제할 수 있는 항산화 활성에 영향을 미침을 확인하였다.

나. Reduced glutathine (GSH) 함량에 미치는 영향

위조직 내 GSH 함량을 측정한 결과, 정상군의 GSH level을 100%로 했을 때 대조군은 $104.5 \pm 16.9\%$, CVE-1군과 CVE-2군에서는 각각 $114.1 \pm 13.1\%$, $123.5 \pm 15.9\%$ 로 실험군별간 유의적($p < 0.05$) 차이를 볼 수 없었다.

6. 위조직 내 caspase-3, -8 활성 변화

Caspase-3의 활성은 정상군 1.0 ± 0.11 에 비해 에탄올만을 처리한 대조군에서 1.18 ± 0.15 로 유의적($p < 0.05$) 증가를 보였으며, CVE-1군과 CVE-2군은 각각 1.02 ± 0.11 , 0.87 ± 0.08 로 정상군 수준으로 감소하였다. 또한 caspase-8 활성에서도 정상군 1.0 ± 0.08 에 비해 대조군은 $1.12 \pm$

0.06으로 유의적($p<0.05$) 증가를 보였고, CVE-1군 1.05 ± 0.13 , CVE-2군 0.88 ± 0.09 로 유의적($p<0.05$) 감소를 보여, 위 세포의 apoptosis를 억제시키는 것으로 확인되었다.

이상의 결과에서 에탄올로 유도한 위손상이 클로렐라 추출물을 처리함으로써 위점막 보호와 산화적 스트레스 감소에 농도 의존적이진 않지만 그 효과가 입증되므로 알코올성 위손상 보호를 위한 기능성 소재로 그 이용가치가 있음을 제시한다.



V. 참고문헌

- An H.J., Rim H.K., Jeong H.J., Hong S.H., Um J.Y., Kim H.M. (2010) Hot water extracts of *Chlorella vulgaris* improve immune function in protein- deficient weanling mice and immune cells. *Immunopharmacology and immunotoxicology* 1-8.
- Blot W.J. (1992) Alcohol and cancer. *Cancer Research* 52(suppl), 2119S-2123S.
- Boo Sung Kim, Chang Don Lee, Jin Woo Jeong, Sang wook Choi, Young Min Park, Nam Ik Han, Suk Hwan Yu. (1989) The Effect of Nizatidine in the Treatment of Popitic Ulcer Disease. *Korean J Gastroenterol* 21(1), 56-60.
- Cho H.Y., Lee H.J., Kong K.H. (2007) A Phi Class Glutathione S-transferase from *Oryza sativa* (OsGSTF5): Molecular Cloning, Expression and Biochemical Characteristics. *Biochemistry and Molecular Biology Reports*. 40(4), 511~516.
- Choi Y.J., Jo W.S., Kim H.J., Nam B.H., Kang E.Y., Oh S.J., Lee G.A., Jeong M.H. (2010) Anti-inflammatory effect of *Chlorella ellipsoidea* extracted from seawater by organic solvents. *Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 43, 39-45.
- Chu C.Y., Huang R. and Ling L.P. (2006) Purification and characterization of a novel haemagglutinin from *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of Industrial Microbiology and*

Biotechnology 33, 967-973.

Cohen G. (1983) The pathobiology of Parkinson's disease : Biochemical aspects of dopamine neuron senescence. *J Neural Transm Suppl.* 19, 89-103.

Deisseroth A., Dounce A.L.(1970) Catalase physical and chemical properties, mechanism of catalysis and physiological role. *Physiol. Rev.* 50, 3-24.

Dinosa U.P., Chey W.Y., Siplet H., Lorbers H. (1970) Effects of ethanol on the gastric mucosa of the Heidenham pouch of dogs. *Dig Dis* 15, 809-817

Eun Ji Park, Hyun Jung Kim, Jung Man Kim and Hyang Sook Chun. (1997) Originals : Antiulcerative Effect of *Sikhe* on Stomach Ulcer Induced by Ethanol. *J. Korean Soc. Food Sci, Nutr* 26(1), 98-102.

Hak-Jae Kim, Jun-Hyuk Choi, Seong-Woo Lim. (2003) The Defensive Effect of *Keuibi-tang* on the Gastric Mucos Membrane of Mouse Injured by Stress and Ethanol. *J Korean Oriental Med* 24(1), 155-168.

Hsu H.Y., Jeyashoke N., Yeh C.H., Song Y.J., Hua K.F., Chao L.K. (2010) Immunostimulatory bioactivity of algal polysaccharides from *Chlorella pyrenoidosa* activates macrophages via toll-like receptor 4. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58, 927-936.

Hwang H.J., Kwon M.J., Kim I.H., Nam T.J. (2008) The effect of polysaccharide extracted from the marine alga *Capsosiphon*

fulvescens on ethanol administration. *Food Chem Toxicol.* 46(8), 2653-2657.

Jong Hyun Ryu, Ju Seop Kang, Chang Ho Lee, In Chul Shin, Yong Chul Jeon, Ho Soon Choi. (1999) Effects of Aging on the Gastric and Hepatic Alcohol Dehydrogenase Activities in Rats. *Korean J Gastroenterol* 34, 756 - 763.

Kamath B.S., Srikanta B.M., Dharmesh S.M., Sarada R., Ravishankar G.A. (2008) Ulcer preventive and antioxidative properties of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Eur J Pharmacol.* 590(1-3), 387-395.

Kang M.S., Sim S.J. and Chae H.J. (2004) Chlorella as a functional biomaterial. *Korean Journal of Biotechnology and Bioengineering* 19, 1-11.

Kanno T., Shinpo K., Masada M., Tamura G. (1996) Growth-promoting factor for an extract of *Chlorella vulgaris* CK-5. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 81, 159-162.

Karmen A. (1955) A note on the spectrophotometric assay of glutamic oxaloacetic transaminase in human blood serum, *J. Clin Invest* 34, 131.

Karsenty B.C., Chanussot F., Ulmer M., Debry G. (1985) Influence of chronic ethanol intake on obesity liver steatosis and hyperlipidemia in Zucker fa/fa rat. *Br J Nutr* 54, 5-13.

Kim D., Cho Y., Cho J., Ham T., Lee J. and Rhee C. (2004) Development of liquid phase product from red ginseng and medicinal herbs for alcoholic beverage. *J. Ginseng Res.* 28(1), 45-51.

- Kim J.S. (2004) Ethanol of a Alcohol Detoxification Beverage (ADB) contained *Radix puerariae* and *Bambusae caules in Liquamen Phyllostachyos* on the alcohol administered mouse. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 33(2), 318-323.
- Kim M.J., Park E.M., Lee M.K., Cho S.Y. (1997) Effect of methionine and selenium levels on alcohol meatbolic enzyme system inrats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26(2), 319-326.
- Kim S.S., Park M.K., Oh N.S., Kim D.C., Han M.S. and In M.J. (2003) Studies on quality characteristics and shelf-life of chlorella soybean (Tofu). *Journal of the Korean Society of Agricultural Chemistry and Biotechnology* 46, 12-15.
- Kim Y.H., Hwang Y.K., Kim Y.Y., Ko S.M., Hwang J.M., Lee Y.W. (2002) Effect of Chlorella growth factor on the proliferation of human skin keratinocyte. *The Korean Society for Biomedical Laboratory Sciences* 8, 229-234.
- Kim Y.J., Kwon S.H. and Kim M.K. (2009) Effect of Chlorella vulgaris intake on cadmium detoxification in rats fed cadmium. *Nutrition Research and Practice* 3, 89-94.
- Konishi F., Mitsuyama M., Okuda M., Tanaka K., Hasegawa T., Nomoto K. (1996) Protective effect of an acidic glycoprotein obtained from culture of Chlorella vulgaris against myelosuppression by 5-fluorouracil. *Cancer Immunology Immunotherapy* 42, 268-274.
- KOSIS. (2011) Retrieved from http://kosis.kr/bsis/themes/themes_04List.jsp .
- Lee H.S., Lee, S.H., Mun H.C. and Lee H.Y. (2003) Screening of

- the immuno-stimulatory activity of the marine alga *Chlorella* capsulata. *Korean Journal of Biotechnology and Bioengineering* 18, 19-24.
- Lee S.H., Kang H.J., Lee H.J., Kang M.H. and Park Y.K. (2010) Six-week supplementation with *Chlorella* has favorable impact on antioxidant status in Korean male smokers. *Nutrition* 26, 175-183.
- Lee S.O. (2002) Effects of *Sorbus comixta* extract on alcohol metabolism and detoxification system. Mater thesis, *Keimyung University*.
- Lieber C.S. (1980) Interaction of ethanol with drug, hepatotoxic agent, carcinogen and vitamins. *Alcoholism* 25, 157.
- Morita K., Matsueda T., Iida T. and Hasegawa T. (1999) *Chlorella* accelerates dioxin excretion in Rats. *Journal of Nutrition* 129, 1731 - 1736.
- Nestel P.J., Hirsch E.Z. (1965) Clinical and experimental mechanism of alcohol-induced hypertriglycemia. *J Lab Clin Med* 65, 357-365.
- Noda K., Ohno N., Tanaka K., Kamiya N., Okuda M., Yadomae T., Nomoto K. and Shoyama Y. (1996) A water soluble antitumor glycoprotein from *Chlorella vulgaris*. *Planta Medica* 62, 423-426.
- Park E.M., Ye E.J., Kim S.J., Choi H.I., Bae M.J. (2006) Eliminatory effect of health drink containing *Hovenia Dulcis Thunb* extracton ethanol-induced hangover in rats. *Korean J.*

Food Culture. 21(1), 71-75.

Park M.K., Lee J.M., Park C.H. and In M.J. (2002) Quality characteristics of Sulgidduk containing chlorella powder. *Korean Journal of Society of Food Science and Nutrition* 31, 225-229.

Peng H.Y., Chu Y.C., Chen S.J. and Chou S.T. (2009) Hepatoprotection of chlorella against carbon tetrachloride-induced oxidative damage in rats. *in vivo* 23, 747-754.

Pryor G.T., Larsen F.F., Carr J.D., Braude M.C., (1977) Interactions of delta 9-tetrahydrocannabinol with phenobarbital, ethanol and chlordiazepoxide. *Pharmacol Biochem Behav* 7(4), 331-345.

Raghavendran H.R., Sathivel A., Devaki T. (2004) Efficacy of brown seaweed hot water extract against HCl-ethanol induced gastric mucosal injury in rats. *ArchPharm Res.* 27(4), 449-53.

Rentiman S. and Frankel S. (1957) A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin. Pathol.* 28, 8.

Seo-Hyeon Song (2008) The effects of hot water extract from *Chlorella vulgaris* on the IEC-6 cells' proliferation. *Pukyong National University*.

Seong-Hwan Lee, Seong-Woo Lim. (2004) The defensive effect of *Samooltang* on injury of gastric mucous membrane of mouse bStudies on Protective Effect of DA-9601, an Artemisiae Herba Extract, against Ethanol-induced Gastric

- Mucosal Damage and its Mechanism ethanol. *J Korean Oriental* 25(3), 1-11.
- Sheih I.C., Wu T.K. and Fang T.J. (2009) Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein water hydrolysate in different oxidation systems. *Bioresource Technology* 100, 3419-3425.
- Singh A., Singh S.P. and Bamezai R. (1998) Perinatal influence of *Chlorella vulgaris* (E-25) on hepatic drug metabolizing enzymes and lipid peroxidation. *Anticancer Research* 18, 1509-1514.
- Srensen T.I.A. (1989) Alcohol and liver injury. Dose-related or permssive effect. *Liver* 9, 489-497.
- Sung K.S., Chun C., Kwon Y.H., Chang C.C. (2000) Effects of red ginseng component administration on glutathione and lipid peroxidation levels in mice liver. *J. Ginseng Res.* 24(4), 176-182.
- Tae Young Oh, Byoung Ok Ahn, Jun Il Ko, Byung Kweon Ryu, Mi Won Son. (1997) Studies on Protective Effect of DA-9601, an *Artemisiae Herba* Extract, against Ethanol-induced Gastric Mucosal Damage and its Mechanism. *Biomolecules & Therapeutics* 5, 202-210.
- Tam N.F.Y., Chong A.M.Y. and Wong Y.S. (2002) Removal of tributyltin (TBT) by live and dead microalgal cells. *Marine Pollution Bulletin* 45, 362-371.
- Travieso L., Pellóon A., Benítez F., Sánchez E., Botj R.,

- O'Farrill N. and Weiland P. (2002). BIOALGA reactor: preliminary studies for heavy metals removal. *Biochemical Bioengineering Journal* 33, 87-91.
- Ung Suk Yang (1987) The Effect of Peptic Ulcer Famotidine (Gaster) in the Treatment. *Korean J Gastroenterol* 19(1), 56.
- Von Warturg Jp, Buhler R. (1984). Biology of disease. Alcoholism and aldehydism : new biomedical concepts. *Lab. Invest.* 50(1), 5-15.
- Yoon C.G., Jeon T.W., Oh M.J., Lee G.H., Jeong J.H. (2001) Effect of the ethanol extract of *Lycium chinese* on oxygen free radical and alcohol metabolizing enzyme activities in rats. *Korean Sco. Food Sci. Nutr.* 29, 268-273.
- Zakhari S. (2006) Overview: how is alcohol metabolized by the body? *Alcohol Res Health* 29, 245-254.
- Zima T.L., Lovak and S. Stipek (1993) Plasma xanthine oxidase level and alcohol administration. *Alcohol Alcohol* 28, 693-694.
- 성기태 (2010) 클로렐라의 생산 및 기능성 연구 현황. 한국과학기술 정보연구원 기술뉴스브리프. 1-7.
- 이화영 외 7인 (2001) 급성 위 점막 병변의 임상적 고찰(Abstract). *대한소화기내시경학회지* 23, 391.
- 장동경 (2005) 위장관 2 : 장질환에 대한 알코올의 영향. *소화기연관 학회 공통 춘계학술대회*, 177-188.
- 정용연 (2009) 산약이 알콜로 유도된 흰쥐의 위 점막 손상 예방에 미치는 영향. *동신대학교 대학원 한의학과*.
- 한재갑, 강기권, 김진국, 김상환 (2002) 클로렐라 추출물 현황 및 전망. *식품과학과 산업* 35(2), 64-69.

감사의 글

늦은 나이에 영양교사가 되어 보겠다고 교육대학원에 입학하여 열정 하나만으로 무작정 영양학 실험실에 들어와 많은 분들의 도움으로 이렇게 석사과정을 마치고 논문 한권을 마무리하였습니다. 그동안 여러모로 부족한 저에게 아낌없는 성원 보내주신 모든 분께 한분한분 찾아가 인사를 드리는게 도리지만 이렇게 짧은 글로나마 감사의 마음을 대신하고자 합니다.

우선 직장생활과 학업을 병행하다보니 실험실 생활을 제대로 할 수 없었던 나의 여건을 배려해 주시고, 예상치 못한 실험 결과에 석사과정을 포기할까 망설일 때마다 방향을 잡아주셔서 이 글을 쓸 수 있게 해주신 남택정 교수님께 머리 숙여 감사드립니다. 낯설었던 대학원 생활에 언제나 반갑게 맞아주시고, 교육대학원에 누구보다 열정을 가지시고 많은 조언을 해주신 류은순 교수님, 감사합니다. 그리고 논문이 완성되기까지 많은 가르침을 주셨던 류홍수 교수님, 최재수 교수님, 김형락 교수님, 김재일 교수님께도 감사드립니다. 또 행정적으로 많은 지원을 해주신 조교 선생님께도 감사의 인사 전합니다.

실험 시작에서 끝까지 쓴소리 마다않고 많은 지도를 해준 김인혜 박사님, 덕분에 지금은 웃을 수 있는 것 같습니다. 그리고 진아쌤, 수진쌤, 정옥씨, 영민씨, 희경씨, 지금은 없지만 서현씨, 히로애쌤까지, 다들 본인 실험하기도 바쁜데 아는 것 하나라도 도와줄려고 마음 써준 거 이 논문 볼 때마다 잊지 않습니다.^^ 새털같이 많은 날 내가 도움줄 수 있는 날 기대하겠습니다. 그리고 실험 결과에 함께 울고 웃으며 이번에 같이 졸업하게 되는 선옥쌤과 나의 활력소 미경이, 당신들이 있었기에 가능했습니다. 끝으로 대학원 동기 현정이, 민지, 지혜도 함께 한 시간 감사하고 다음 학기엔 좋은 논문으로 마무리하기 바랍니다.

실험 한다고, 논문 쓴다고, 바쁘다고 연락 안해도 항상 몸 챙기라고 걱정만 하는 엄마와 우리 가족들, 시집 안가고 대학원 간다고 많은 조롱 날려준 미정씨, 진옥씨 외 군병원 식구들, 먼길 마다않고 학교까지 자주 실어다준 임연진 대위, 학교 다닌다고 자주 만나진 못했지만 대단하다고 응원해준 나의 친구들, 힘들 때마다 몸보신 시켜준 심과장님... 이 모든 분들의 아낌없는 격려에 부족하나마 논문을 완성할 수 있었습니다. 다시한번 감사합니다, 그리고 사랑합니다.

"당뇨실험과 알콜실험을 위해 희생된 쥐들이들의 명복을 빌며"

2011년 7월 김경옥 올림.