흰쥐 상부 소장에서 녹차추출물이 다이옥신과 지질의 소장 점막 진입과정에 미치는 영향

— 연구노트 —

김주연 · 노상규

창원대학교 식품영양학과 · 시니어 휴먼 에콜로지 협동과정

Effect of Green Tea Extract on the Luminal Uptake of Dioxin and Oleic Acid by the Intestinal Mucosa in a Rat Model

Juyeon Kim and Sang Kyu Noh

Department of Food and Nutrition, Interdisciplinary Program in
Senior Human Ecology, Changwon National University

ABSTRACT Previously, we have shown that green tea extract (GTE) lowers intestinal lipid absorption in rats. Evidence indicates that dioxins are lipophilic food pollutants. This study was conducted to investigate whether GTE would affect the luminal uptake of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (2,3,7,8-TCDD) by the intestinal mucosa in a rat model. Male rats were given free access to deionized water and an AIN-93G diet containing GTE at 0, 5, or 20 g/kg for 3 weeks. Rats weighing 320~400 g were fasted for 14 hours prior to the experiment. Under isoflurane anesthesia, the abdomen was opened and a 10 cm long jejunal segment was quickly ligated *in situ*. A micellar solution [1.0 μ Ci 3 H-2,3,7,8-TCDD, 0.026 pmol unlabelled 2,3,7,8-TCDD, 1.0 μ Ci 14 C-Oleic acid, 133.0 μ mol unlabelled oleic acid, 66.7 μ mol 2-monooleoylglycerol, and 16.5 mmol Na-taurocholate per L of PBS (pH 6.4)] was injected into the ligated jejunal segment. At 10 min, each rat was sacrificed and the segment was removed for lipid analysis. GTE lowered the luminal uptake of 3 H-2,3,7,8-TCDD in a dose-dependent manner. Likewise, the mucosal rates of 14 C-Oleic acid esterification into lipids were dose-dependently decreased by GTE. These results indicate that both the lowered luminal 3 H-2,3,7,8-TCDD uptake and the slower 14 C-Oleic acid esterification rates are attributable to the presence of GTE. This may be attributed to the inhibitory effect of GTE on the intestinal uptake and intracellular processing of lipids, thereby resulting in lowered intestinal absorption of dioxin and fats. Further studies are warranted to investigate the mechanisms underlying the inhibition of dioxin absorption by green tea or its catechins.

Key words: green tea extract, luminal uptake, dioxin, oleic acid, mucosa

서 론

다이옥신(dioxin)은 지용성 식품 오염물질이다. 식이성 지질과 함께 흡수되어 신체 조직에 축적되며 호르몬처럼 작용하면서 질병을 유발하는 내분비계 교란 물질이다(Greenspan과 Lee, 2018; Brehm과 Flaws, 2019). 다이옥신은 보통 polychlorinated dibenzo(PCD) 다이옥신(PCDD)이라 칭하는데, 통상적으로 PCDD 외에 다이옥신 유사 물질인 PCD 퓨란(furans)계 화합물과 PCB(polychlorinated biphenyls)계 화합물을 포함하면 130여 종에 이르며, 이중

약 30여 종은 생활환경에서 인체에 다양한 독성을 보인다(Tuomisto, 2019). 이들 중 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin(2,3,7,8-TCDD, Fig. 1)이 생체에 가장 강한 독성을 나타내지만(Fracchiolla 등, 2016), 체내 흡수, 저장 및 분비 과정에 대한 연구는 거의 알려지지 않다.

녹차(*Camellia sinensis*)는 기호음료로써 다양한 건강증진 작용을 하는 것으로 보고된다(Mancini 등, 2017; Shirakami와 Shimizu, 2018; Khan과 Mukhtar, 2019). 녹차의 추출물(green tea extract, GTE)은 혈액의 지방뿐만 아니라 다양한 심혈관계 질환의 증상을 완화한다고 보고된다(Rains 등, 2011). GTE의 카테킨(catechin)은 주로 epi-

Fig. 1. Chemical structure of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin.

gallocatechin gallate(EGCG), epicatechin-gallate(EGC), epigallocatechin(EGC), epicatechin(EC) 등으로 구성이 되며, 특히 EGCG는 녹차 카테킨 건조중량 중 대부분을 차지하고 신체 내에서 항산화 작용을 바탕으로 가장 강력한 건강 증진 작용을 하는 것으로 알려져 있다(Gan 등, 2018; Koo와 Noh, 2007).

이전 GTE 관련 일련의 연구에서 GTE는 소장의 지방 흡수를 억제하는 것으로 보고되었다(Löest 등, 2002; Noh 등, 2013). 이러한 지방 흡수 억제 현상은 지질 분해에 필수적으로 관여하는 췌장성 지질 분해 효소의 활성이 녹차의 카테킨과 밀접한 관련이 있다(Wang 등, 2006; Juhel 등, 2000). 또한, 한 연구는 GTE가 지용성 식품 오염물질인 벤조피렌(benzo[a]pyrene)의 장간순환(enterohepatic circulation) 대사에 어떤 영향을 미치는지를 조사하였다(Kim 등, 2012). 이 연구에서 사람의 하루 2~3잔에 해당하는 GTE에 의해 벤조피렌의 소장 흡수가 현저히 감소하고 동시에 담관으로 배설되는 벤조피렌의 양도 크게 증가한다고 보고하였다. 담관을 경유하여 소장으로 배설될 때, GTE가 지질 분해 및 흡수에 필수 단계인 벤조피렌을 포함한 지질의 유화(emulsification), 가수분해(luminal hydrolysis), 마이셀화(micellization) 그리고 소장세포 진입(luminal uptake)을 차례대로 방해해서 최종적으로 흡수를 억제한 것으로 설명하였다(Kim 등, 2012; Koo와 Noh, 2007).

지금까지 국내외적으로 GTE가 2,3,7,8-TCDD의 소장 흡수에 어떠한 영향을 미치는지에 대한 연구는 아직 보고되어 있지 않다. 그래서 본 연구에서는 3주간의 GTE 공급이 2,3,7,8-TCDD의 흡수과정에 미치는 영향을 조사하기 위하여 일차적으로 다이옥신 소장 흡수의 핵심단계라 할 수 있는 소장 내강(intestinal lumen)에서 소장 점막 소장세포로의 진입과정(luminal uptake by enterocytes)에 어떠한 영향을 미치는지를 조사하였다. 깨어있는 흰쥐의 복막 장기가 위치한 그 상태(*in situ*)에서 공장소분절(jejunal segment)을 이용, 10분 동안 ^3H -2,3,7,8-TCDD와 ^{14}C -Oleic acid의 진입 및 재합성 상태를 각각 조사하였다.

재료 및 방법

녹차추출물

GTE는 분말 형태로 Indena(Seattle, WA, USA)가 무상으로 공급하였고 이 추출물의 HPLC 분석에 대한 결과는 이전 연구에서 자세히 보고하였다(Kim 등, 2012). 간략히 요약하면, 추출물의 카테킨 함량(w/w)은 29.2%였고 카테킨의 분포(%)는 EGCG가 47.7, EGC 31.2, ECG 13.4, EC 7.6 순이었다. 그리고 이 녹차추출물에는 5.6%의 카페인(w/w)도 포함된 것으로 분석되었다.

실험동물 및 사육

(주)중앙실험동물(Seoul, Korea)로부터 공급받은 약 180

g 수컷 Sprague-Dawley 흰쥐를 1주일간 사육환경에 적응시킨 후 난괴법으로 6마리씩 세 동물군으로 나누었다. AIN-93G 표준식이만 공급받은 동물군을 대조군(GTE0), 0.5% GTE가 혼합된 식이(5 g/kg diet)를 공급받은 동물군을 저농도 녹차군(GTE1), 2.0% GTE가 혼합된 식이(20 g/kg diet)를 공급받은 동물군을 고농도 녹차군(GTE2)으로 설정하여 3주간 사육하였다. 동물 식이에 혼합된 GTE의 양은 카테킨 함량을 기준으로 사람의 경우와 비교했을 때 GTE1군은 하루 4잔에 해당하는 양으로, GTE2군은 하루 15잔 분량의 녹차에 해당하는 양으로 설정하였다(Löest 등, 2002). 창원대학교 식품영양학과 동물사육실은 온도 $22 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$, 12시간 명암주기를 유지하였다. 동물실험은 창원대학교 동물실험 윤리위원회의 승인을 받아 시행되었으며, 창원대학교 동물실험 윤리지침을 준수하였다(CWNUIACUC 2010-01).

Micelle 용액 제조

Johnston과 Borgström(1964)의 실험 방법에 준하여 micelle 용액을 제조하였다. Micelle 용액은 초음파기(UW 2200, Bandelin, Berlin, Germany)와 질소농축기(N-EVAPTM111, Organomation Associates Inc., West Berlin, MA, USA)를 이용하여 실험 당일에 준비하였다. 식이를 통해 공급된 GTE의 영향만을 점검하기 위해 micelle 용액에 녹차추출물을 포함하지 않고 대조군과 동일하게 조제하였다. PBS 용액(6.75 mM Na_2HPO_4 , 16.5 mM NaH_2PO_4 , 115 mM NaCl, 5 mM KCl, pH 6.4)을 수용액 시스템으로 사용하였다. Micelle 용액의 조성은 Table 1과 같다.

Table 1. Composition of micellar solution¹⁾

Ingredient	Amount
^3H -2,3,7,8-TCDD (kBq) ²⁾	33.3
^{14}C -Oleic acid (kBq) ³⁾	33.3
2,3,7,8-TCDD (pg) ⁴⁾	8.33
Oleic acid (μg) ⁵⁾	30.0
2-Mono-oleoyl glycerol (μg) ⁵⁾	18.9
Glucose (μg) ⁵⁾	317.0
Albumin (mg) ⁵⁾	2.67
Na-taurocholate (mg) ⁵⁾	7.10
L-α-Lysophosphatidylcholine (μg) ⁵⁾	28.5
PBS buffer (mL, pH 6.4)	0.8

¹⁾Prepared using a ultrasonicator.

²⁾ ^{14}C -Oleic acid (specific activity, 3.8 GBq/mmol; Dupont-New England Nuclear, Boston, MA, USA).

³⁾ ^3H -2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (specific activity, 1.85 MBq/mmol; American Radiolabeled Chemicals, Inc., St. Louis, MO, USA).

⁴⁾2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (American Radiolabeled Chemicals, Inc.).

⁵⁾Oleic acid (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), 2-mono-oleoyl glycerol (Sigma-Aldrich Co.), glucose (Sigma-Aldrich Co.), albumin (Sigma-Aldrich Co.), Na-taurocholate (Sigma-Aldrich Co.), L-α-lysophosphatidylcholine (Sigma-Aldrich Co.).

Micelle 용액 주입 및 소장 점막 채취

녹차 혼합 식이로 3주간 사육한 흰쥐는 14시간 이상 절식하였다. Micelle 용액 주입과 소장 시료 채취는 Noh와 Koo (1997)의 실험 방법을 참고하여 수행하였다. 마취상태(2.0 % isoflurane in 2.0 L O₂/min) 하에서 쥐는 복부의 중앙선을 따라 절개하였고 복막 장기가 위치한 그 상태(*in situ*)에서 소장의 Treitz 인대(ligament of Treitz)를 기준으로 약 10 cm 공장소분절(jejunal segment) 위아래 양 끝을 봉합사(4-0 Silk, Ailee Co., Ltd., Busan, Korea)로 각각 묶고 0.8 mL micelle 용액을 공장소분절 내강에 주사하였다. 그리고 복막 절개선을 clip 처리하여 깨어난 상태로 10분간 방치하였다. 10분 후 micelle 성분의 혈액순환계 유출 여부를 점검하기 위하여 안구혈액채취법(retro-orbital sinus bleeding)으로 혈액을 채취하였다. 이어서 경추 분리로 희생시킨 후 얼음 위에 준비된 유리판(glass plate) 위로 봉합사로 묶인 공장소분절만 꺼내 냉각시켰다. 공장소분절 한 쪽을 열어 장강 내용물을 플라스틱 튜브에 수거한 후, 10 mM Na-taurocholate(Sigma-Aldrich Co.)가 포함된 냉각 PBS 용액을 5 mL 주입하여 내강을 세척하였고, 이 과정을 3번 반복하였다. 냉각된 유리판 위에서 길이대로 공장소분절을 절개하였고 장점막(luminal mucosa)은 물기를 제거한 후 커버글라스로 긁어모아 총 무게를 측정하였다.

공장소분절 내강과 점막의 ³H-2,3,7,8-TCDD 분포

공장소분절 내강에 남아있는 ³H-2,3,7,8-TCDD와 ¹⁴C-Oleic acid의 양(% dose)은 내강 세척액을 이용하여 액체섬광계수기(Wallac 1414, Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA)로 측정하였다. 채취한 공장소분절 점막의 총 지질은 Folch 등(1957)의 방법에 따라 chloroform/methanol 혼합용매(2:1, v/v)로 추출하였다. 추출한 총 지질을 이용하여 공장소분절 점막의 ³H-2,3,7,8-TCDD의 양(% dose)을 측정하였다. 공장 시료의 단백질 농도는 BCA 분석방법(Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA)을 이용하여 측정하였다.

공장소분절 점막 ¹⁴C-Oleic acid의 지질별 에스테르화

공장소분절 점막 ¹⁴C-Oleic acid의 지질별 분포를 측정하기 위해 고체상추출(solid phase extraction, SPE) 지방분획법을 이용하여 지질 종류별로 분획하였다(Noh와 Koo, 1997; Agren 등, 1992). Aminopropyl SPE column(Bond Elut NH₂, Varian Sample Preparation Products, Harbor City, CA, USA)이 장착된 진공추출장치(VAC ELUT SPS 24, Agilent, Santa Clara, CA, USA)에 공장소분절 점막의 총 지질액을 소량 넣어 절차에 따라 4종의 지질별[(cholesterol esters(CE), triglycerides(TG), free fatty acids(FFA), phospholipids(PL)]로 분획하였다. 분획된 각 시료는 질소농축기(Organomation Associates Inc.)를 이용하여 휘발시켰으며 각 시료의 ¹⁴C-Oleic acid 양(% dose)은

액체섬광계수기(Perkin Elmer Inc.)를 이용하여 측정하였다. ¹⁴C-Oleic acid가 4종의 주요 지질로 에스테르화(재합성)된 비율은 nmol/10 min/100 mg tissue protein으로 나타내었다.

통계 처리

실험 결과들은 평균치와 표준편차(mean±SD)로 나타내었고, SPSS(Ver. 21, IBM, Armonk, NY, USA)를 이용하여 ANOVA로 검증하였다. 조사 항목 간의 유의성 검정은 Duncan의 다중 검정법으로 *P*<0.05 수준에서 실시하였다.

결 과

³H-2,3,7,8-TCDD의 소장 점막 진입

3주 동안 식이를 통한 GTE(GTE1, 0.5%/kg 식이; GTE2, 2.0%/kg 식이) 섭취가 흰쥐의 체중에 영향을 미치는 것으로 나타났다(Table 2). 3주째 흰쥐의 체중은 대조군과 GTE1 군에 비해 GTE2군이 유의적으로 낮은 것으로 나타났다. 3주째 각 그룹의 체중은 대조군 369.0±24.6 g, GTE1군 376.4±21.2 g, GTE2군 344.3±18.0 g으로 나타났다.

GTE가 다이옥신의 소장 점막 조직으로의 이동에 미치는 영향은 Table 3에 나타났다. 공장소분절 내강에 남아있는 다이옥신의 양은 대조군에서 18.02±2.07% dose, GTE1군에서 24.90±3.26% dose, GTE2군에서 30.27±4.84% dose로 나타나 GTE의 섭취량이 증가할수록 점막 조직(소장세포)으로 이동되는 ³H-2,3,7,8-TCDD 양이 농도에 비례해서 감소한 것으로 나타났다. 이는 대조군과 비교했을 때 GTE1 군에서는 약 38%, GTE2군에서는 약 68% 수준으로 공장소분절에 잔류하는 ³H-2,3,7,8-TCDD의 양이 증가한 것이다.

Table 2. Changes in the mean body weights of rats fed a diet containing green tea extract (GTE) at 0, 5, or 20 g/kg for 3 weeks¹⁾

Week	GTE0 ²⁾	GTE1	GTE2
1	274.0±13.4	277.4±16.7	262.1±12.4
2	335.9±20.4 ^{ab}	344.0±19.4 ^a	317.3±16.8 ^b
3	369.0±24.6 ^a	376.4±21.2 ^a	344.3±18.0 ^b

¹⁾Values are means±SD, n=6. Different superscript letters (a,b) indicate a significant difference (*P*<0.05).

²⁾Had a free access to diet containing GTE at 0 (GTE0), 5 (GTE1), or 20 (GTE2) g/kg.

Table 3. Recovery (% dose/10 min) of ³H-radioactivity in the jejunal segment of rats after a 10-min injection of a micellar solution containing ³H-2,3,7,8-TCDD¹⁾

Fractions	% Recovery		
	GTE0	GTE1	GTE2
Jejunal lumen	18.02±2.07 ^c	24.90±3.26 ^b	30.27±4.84 ^a
Jejunal mucosa	78.05±4.23 ^a	70.64±5.18 ^b	64.90±4.33 ^c

¹⁾Values are means±SD (n=6). Different superscript letters (a-c) indicate a significant difference (*P*<0.05).

이와 관련하여 소장세포로 유입된 ^3H -2,3,7,8-TCDD의 양은 대조군에서 $78.05 \pm 4.23\%$ dose, GTE1군에서 $70.64 \pm 5.18\%$ dose, GTE2군에서 $64.90 \pm 4.33\%$ dose로 나타났으며, 이는 대조군과 비교하여 GTE1군에서는 약 10%, GTE2군에서는 13%가량 소장세포로의 진입이 감소한 것으로 GTE의 섭취량이 증가할수록 소장세포로의 다이옥신 유입이 억제된 것으로 나타났다.

소장세포 내에서 ^{14}C -Oleic acid의 에스테르화

본 연구에서는 GTE가 내장에서 효소 분해된 대표적인 지방 분해산물인 지방산이 소장세포 내로 유입된 후 이 지방산의 에스테르화 과정에 영향을 미치는지를 확인하고자 하였다. 특히, 소장세포로 유입된 지방들이 순환계로 진입하기 위해 흡수과정의 필수단계인 지방의 에스테르화가 GTE에 의해 영향을 받는지를 점검하기 위해서 흰쥐의 소장(공장)으로 ^{14}C -Oleic acid가 포함된 micelle을 주입하여 소장 점막 조직의 TG, PL, CE, FFA로의 분배율을 분석하였다. GTE가 소장세포 내에서 ^{14}C -Oleic acid의 에스테르화에 미치는 영향은 Fig. 2와 같다. ^{14}C -Oleic acid가 TG, PL, CE, FFA로 분배된 비율은 대조군에서 각각 $65.07 \pm 3.91\%$, $24.21 \pm 3.15\%$, $1.82 \pm 0.29\%$, $1.65 \pm 0.13\%$ 로 나타났다. 주어진 시간 동안에 지질 micelle 형태로 내장에 주입하면 소장 점막으로 이동하여 대부분 TG나 PL로 에스테르화되고 소량만 FFA 상태로 존재하는 것으로 확인되었다. ^{14}C -Oleic acid가 TG, PL, CE, FFA로 분배된 비율은 녹차추출물을 공급한 실험군의 경우에 GTE1군에서는 각각 $53.50 \pm 4.00\%$, $19.53 \pm 0.95\%$, $1.85 \pm 0.14\%$, $1.47 \pm 0.20\%$, GTE2군에서는 $47.62 \pm 2.53\%$, $15.48 \pm 0.51\%$, $1.73 \pm 0.11\%$, $1.50 \pm 0.14\%$ 로 나타났다(데이터 미제시). Fig. 2에서와 같이 10분 동안 소장세포 안으로 흡수되어 TG, PL, CE, FFA으로 분배된 비율(nmol/10 min/100 mg tissue protein)은 대조군에서 각각 68.11 ± 4.45 , 25.71 ± 3.34 , 1.96 ± 0.28 , 1.74 ± 0.13 로 나

타났다. GTE1군에서는 56.16 ± 4.06 , 20.74 ± 1.01 , 1.96 ± 0.15 , 1.58 ± 0.20 이었고, GTE2군은 42.83 ± 2.69 , 16.44 ± 0.54 , 1.84 ± 0.11 , 1.61 ± 0.14 로 나타났다.

고 찰

본 연구에서 3주 동안 식이를 통한 GTE 공급이 농도에 비례해서 다이옥신의 소장 점막세포로의 통과를 억제하는 것으로 나타났다. 대조군에 비해 GTE1군에서는 10%, GTE2군에서는 13% 정도로 다이옥신의 유입이 억제된 것으로 확인되었다. 다이옥신과 같은 지용성 물질은 지방과 함께 섭취할 경우 공복 시의 환경보다 지질과 잘 혼합이 되어 소장세포로의 확산이 수월해지고 담즙에 의한 용해도가 증가하여 소장세포로 흡수되는 속도가 촉진되는 것으로 알려져 있다(Rezhdoo 등, 2016; Ikeda, 2015). 그러나 GTE 식이 공급으로 다이옥신의 소장 점막 이동이 감소한 것과 관련해서는 현재 정확한 기전이 알려지지 않았다. 최근의 연구에서 소장은 콜레스테롤과 같은 지질의 흡수뿐만 아니라 필요에 따라 지질의 역 배출(intestinal cholesterol efflux) 작용도 한다는 것이 밝혀졌다. 즉, 이미 소장 점막 안으로 유입된 콜레스테롤과 같은 지질을 소장 내강으로 다시 배출한다는 주장이다(Liu, 2019; Ye 등, 2019). 심지어 이 역 배출은 소장 주위를 순환하는 혈액의 콜레스테롤도 장강으로 배출해 혈액의 콜레스테롤 양을 감소시킨다는 연구 결과도 있다(Cai 등, 2001; Altmann 등, 2004).

본 연구에서의 다이옥신 소장 점막 통과 감소 현상과 관련해 GTE가 다이옥신의 역 배출에 직접적으로 관여했는지는 알 수 없다. 그렇지만 관련 연구들에 의하면 다이옥신의 흡수 과정에 있어 결정적으로 영향을 미치는 단계는 일차적으로 유화작용(micellar solubilization)이며, 다음으로 소장의 점막 장세포 진입(uptake process by the enterocytes)이라 판단된다. Ogawa 등(2016)은 NMR 기법을 이용하여 GTE의 주요 성분인 EGCG가 micelle의 담즙산(taurocholate)과 강한 수소결합을 형성, 이로 인해 수화구조(hydration shell)와 장세포벽(brush border membrane, BBB)에 존재하는 단백질의 흡착을 유도하는데, 결과적으로 EGCG 자체의 소장 흡수도 감소한다고 보고하였다. 또한 이러한 EGCG는 인지질(예로, phosphatidylcholine)과도 강한 결합을 형성하고, micelle 구조 변화와 용해도를 감소시켜 micelle 지질(cholesterol, phosphatidylcholine 등)의 침전을 유도한다고 보고하였다(Kobayashi 등, 2014). 이러한 관계로 이번 연구 결과와 관련하여 EGCG를 포함한 녹차의 카테킨은 micelle의 핵심 성분인 인지질의 용해도를 감소시켜 micelle에 의해서 운반되는 다이옥신을 포함한 지질들이 영향을 받은 것으로 판단이 된다. 이전 연구에서 극지용성 식품 오염물질인 벤조피렌을 지질 유화 형태로 공급했을 때, GTE에 의해서 벤조피렌의 소장 흡수가 현저히 감소하는 현상도 이와 같은 선상에 있다고 하겠다(Kim 등, 2012).

Fig. 2. Rate of ^{14}C -Oleic acid esterification into four different lipids (TG, PL, CE, and FFA) in the jejunal mucosa of rats fed with diet containing GTE at 0 (GTE0), 5 (GTE1), 20 (GTE2) g/kg for 3 weeks. Values are expressed as means $\pm$ SD (n=6). Means with different letters (a-c) above the bars at each fraction indicate a significant difference ($P < 0.05$).

본 연구에서는 녹차의 섭취가 소장세포 내로 유입된 지방의 에스테르화 과정에 미치는 영향도 점검하였다. 결과적으로 GTE가 공급된 양에 비례해서 지방산(oleic acid)의 에스테르화를 억제하는 것으로 나타났다. 특히, TG의 경우 대조군에 비해 GTE1군에서 18%, GTE2군에서는 27% 정도로 에스테르화가 억제된 것을 확인할 수 있었으며, PL의 경우에도 대조군에 비해 GTE1군에서 19%, GTE2군에서 36% 가까이 억제된 것으로 나타났다. 이는 소장세포 내 지방의 재합성 과정에 GTE가 영향을 준 것으로 판단된다. 소장 점막 장세포에서 각종 지방으로의 ^{14}C -Oleic acid 분배율은 녹차 공급에 의해서 TG와 PL의 분획에서 유의적인 감소 현상을 보였다. 이는 녹차의 주요 카테킨에 의해 소장세포 내 TG와 PL의 에스테르화 속도가 지연되고, 소장의 킬로미크론을 형성하여 소장으로 흡수되는 비율이 억제되는 것을 살아있는 동물의 흡수 장기가 원래의 위치 상태(*in situ*)에서 실험적으로 증명한 결과라 할 수 있다. 각 지질의 에스테르화가 GTE 공급 농도에 비례해서 감소한 이유는 정확히 알 수 없지만, 소장의 분해과정에서 생성된 fatty acid, lyso-phosphatidylcholine, 콜레스테롤 등은 장세포막을 통과한 후 소포체(smooth endoplasmic reticulum)에서 지방 재합성에 이용되는데, 이 과정에서 에스테르화에 관여하는 효소의 활성이 감소하여 지질의 재합성(예로, 킬로미크론)도 영향을 받은 것으로 추정한다. 다이옥신과 같이 함께 이동하는 지용성 물질도 이동이 감소한 것으로 생각된다. CE 대사와 관련, 소장세포 내에서 CE 형태로의 전환을 유도하는 acyl-CoA cholesterol acyltransferase(ACAT)는 microsomal triglyceride transfer protein(MTP)에 의해 apo B 함유 지질단백질과 결합하여 킬로미크론을 만들어 림프순환계로 흡수를 돕고, 일부 콜레스테롤은 ABCG5/ABCG8 운반체에 의해 다시 장강으로 역 배출된다(Manabe 등, 2019; Wang 등, 2018; Ye 등, 2019; Patel 등, 2018). 이 과정에서 GTE 카테킨 성분이 소장세포에 존재하는 ACAT의 활성을 억제하는 것으로 보고되었다(Pal 등, 2013; Meuwese 등, 2006; Chan 등, 1999). 또한 TG의 합성에 관여하는 diacylglycerol acyltransferase(DGAT)의 활성은 Caco-2 cell에서 식물성 폴리페놀에 의해서 억제되고, 결과적으로 MTP에 의한 apo B의 지질화도 감소한다고 보고하였다(Shimizu 등, 2015; Almatrafi 등, 2017; Casaschi 등, 2002; Kondo 등, 2011). 이러한 결과들을 종합해볼 때, 소장세포 내에서 지질의 재합성 관련 효소의 활성이 억제되면 함께 대사되는 극지용성 다이옥신 및 지질의 재합성 과정도 억제될 것으로 예상해볼 수 있으며, 다이옥신을 포함한 지방 성분들은 소장에서 유래하는 킬로미크론의 형성을 지연시켜 림프순환계로의 운반(흡수)을 억제할 것으로 사료된다.

그러나 본 연구에서는 몇 가지 제한점이 있다. 먼저 소장에서의 다이옥신의 흡수 경향을 파악하기 위하여 10분이라는 제한된 시간과 소장 장기 전체가 아닌 공장소분절을 이용

하여 GTE의 영향을 조사했다는 것이다. 또한 살아있는 동물의 흡수 장기를 있는 그대로(*in situ*) 깨어있는 상태에서 지질의 이동과 에스테르화를 측정했지만, 지질의 소화 및 흡수 환경은 다양하고 복잡한 게 사실이다. 이 실험을 바탕으로 한 추후 연구는 녹차추출물이 다이옥신의 소화, 흡수 그리고 체외 분비에 미치는 영향을 점검하기 위하여 *in vivo* 생체조건에서 장·간 순환 과정에서의 다이옥신의 소장 흡수와 담관 분비를 조사하는 것이다.

요 약

녹차는 지질의 소장 흡수를 억제하는 것으로 알려져 있다. 이 연구는 식이를 통한 녹차추출물(green tea extract, GTE) 공급 후, 흰쥐의 소장에서 극지용성 다이옥신(2,3,7,8-TCDD)과 지질이 소장 장강에서 점막 조직으로의 이동이 영향을 받는지를 조사하였다. AIN-93G 식이에 적응시킨 후 흰쥐들을 세 군으로 나누어 GTE 혼합 정도(0, 5, 20 g/kg)를 달리한 식이로 3주간 사육하였다. 마취 하에서 개복한 후, 복막 장기가 위치한 그 상태에서 공장소분절 10 cm 길이의 양 끝을 수술실로 매듭지었다. 이어서 $1.0\ \mu\text{Ci}\ ^3\text{H}$ -2,3,7,8-TCDD, $0.026\ \text{pmol}$ 2,3,7,8-TCDD, $1.0\ \mu\text{Ci}\ ^{14}\text{C}$ -Oleic acid, $133.0\ \mu\text{mol}$ oleic acid, $66.7\ \mu\text{mol}$ 2-monooleoyl-glycerol 그리고 $16.5\ \text{mmol}$ Na-taurocholate 등이 포함된 micelle 용액을 공장소분절 내강으로 주사한 후, wound clip을 이용하여 복막을 닫았다. 깨어 있는 상태로 10분간 자유롭게 둔 후에 경주 분리로 희생시키고 매듭된 공장소분절 시료를 얻었다. 공장소분절의 내강과 점막의 시료를 분석한 결과, ^3H -2,3,7,8-TCDD는 GTE 농도에 비례하여 내강에서 점막으로의 이동이 유의적으로 감소하였다. 또한, 식이에 혼합된 GTE 농도에 비례해서 점막 내에서 주요 지질(cholesteryl esters, triglycerides, free fatty acids, phospholipids)로의 ^{14}C -Oleic acid의 에스테르화 비율도 감소하는 것으로 나타났다. 이는 지질 소장 흡수과정에서 필수 단계인 점막 이동(luminal uptake)과 에스테르화 과정에 GTE가 억제 작용을 한 것으로 판단이 된다. 이러한 결과는 GTE 공급이 소장 점막 세포 내에서 지질 재합성(resynthesis) 과정에도 영향을 미쳐 최종적으로 소장의 다이옥신과 지질의 흡수를 억제하리라 판단된다. 현재 이 결과를 바탕으로 녹차 또는 그 활성 성분이 생체조건(*in vivo* conditions) 하에서 다이옥신의 소장 흡수에 어떠한 영향을 미치는지를 연구 중에 있다.

감사의 글

이 논문은 2019~2020년도 창원대학교 자율연구과제 연구비 지원으로 수행된 연구 결과입니다.

REFERENCES

- Agren JJ, Julkunen A, Penttilä I. Rapid separation of serum lipids for fatty acid analysis by a single aminopropyl column. *J Lipid Res.* 1992. 33:1871-1876.
- Almatrafi MM, Vergara-Jimenez M, Murillo AG, Norris GH, Blesso CN, Fernandez ML. Moringa leaves prevent hepatic lipid accumulation and inflammation in guinea pigs by reducing the expression of genes involved in lipid metabolism. *Int J Mol Sci.* 2017. 18:1330. <https://doi.org/10.3390/ijms18071330>
- Altmann SW, Davis HR, Zhu LJ, Yao X, Hoos LM, Tetzloff G, et al. Niemann-pick C1 like 1 protein is critical for intestinal cholesterol absorption. *Science.* 2004. 303:1201-1204.
- Brehm E, Flaws JA. Transgenerational effects of endocrine-disrupting chemicals on male and female reproduction. *Endocrinology.* 2019. 160:1421-1435.
- Cai SF, Kirby RJ, Howles PN, Hui DY. Differentiation-dependent expression and localization of the class B type I scavenger receptor in intestine. *J Lipid Res.* 2001. 42:902-909.
- Casaschi A, Wang Q, Dang K, Richards A, Theriault A. Intestinal apolipoprotein B secretion is inhibited by the flavonoid quercetin: potential role of microsomal triglyceride transfer protein and diacylglycerol acyltransferase. *Lipids.* 2002. 37: 647-652.
- Chan PT, Fong WP, Cheung YL, Huang Y, Ho WKK, Chen ZY. Jasmine green tea epicatechins are hypolipidemic in hamsters (*Mesocricetus auratus*) fed a high fat diet. *J Nutr.* 1999. 129: 1094-1101.
- Folch J, Lees M, Sloane Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J Biol Chem.* 1957. 226:497-509.
- Fracchiolla NS, Annaloro C, Guidotti F, Fattizzo B, Cortelezzi A. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) role in hematopoiesis and in hematologic diseases: a critical review. *Toxicology.* 2016. 374:60-68.
- Gan RY, Li HB, Sui ZQ, Corke H. Absorption, metabolism, anticancer effect and molecular targets of epigallocatechin gallate (EGCG): an updated review. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2018. 58:924-941.
- Greenspan LC, Lee MM. Endocrine disrupters and pubertal timing. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* 2018. 25:49-54.
- Ikeda I. Factors affecting intestinal absorption of cholesterol and plant sterols and stanols. *J Oleo Sci.* 2015. 64:9-18.
- Johnston JM, Borgström B. The intestinal absorption and metabolism of micellar solutions of lipids. *Biochim Biophys Acta.* 1964. 84:412-423.
- Juhel C, Armand M, Pafumi Y, Rosier C, Vandermader J, Lairon D. Green tea extract (AR25®) inhibits lipolysis of triglycerides in gastric and duodenal medium in vitro. *J Nutr Biochem.* 2000. 11:45-51.
- Khan N, Mukhtar H. Tea polyphenols in promotion of human health. *Nutrients.* 2019. 11:39. <https://doi.org/10.3390/nu11010039>
- Kim J, Koo SI, Noh SK. Green tea extract markedly lowers the lymphatic absorption and increases the biliary secretion of ¹³C-benzo[a]pyrene in rats. *J Nutr Biochem.* 2012. 23:1007-1011.
- Kobayashi M, Nishizawa M, Inoue N, Hosoya T, Yoshida M, Ukawa Y, et al. Epigallocatechin gallate decreases the micellar solubility of cholesterol via specific interaction with phosphatidylcholine. *J Agric Food Chem.* 2014. 62:2881-2890.
- Kondo H, Hashizume K, Shibuya Y, Hase T, Murase T. Identification of diacylglycerol acyltransferase inhibitors from *Rosa centifolia* petals. *Lipids.* 2011. 46:691-700.
- Koo SI, Noh SK. Green tea as inhibitor of the intestinal absorption of lipids: potential mechanism for its lipid-lowering effect. *J Nutr Biochem.* 2007. 18:179-183.
- Liu X. ABC family transporters. *Adv Exp Med Biol.* 2019. 1141: 13-100.
- Löest HB, Noh SK, Koo SI. Green tea extract inhibits the lymphatic absorption of cholesterol and α -tocopherol in ovariectomized rats. *J Nutr.* 2002. 132:1282-1288.
- Manabe Y, Ichihara M, Fukuda K, Tomonaga N, Li ZS, Yamashita Y, et al. Niemann-pick C1-like 1 promotes intestinal absorption of siphonaxanthin. *Lipids.* 2019. 54:707-714.
- Mancini E, Beglinger C, Drewe J, Zanchi D, Lang UE, Borgwardt S. Green tea effects on cognition, mood and human brain function: a systematic review. *Phytomedicine.* 2017. 34:26-37.
- Meuwese MC, Franssen R, Stroes ESG, Kastelein JJP. And then there were acyl coenzyme A: cholesterol acyl transferase inhibitors. *Curr Opin Lipidol.* 2006. 17:426-430.
- Noh SK, Koo SI, Jiang Y. (+)-Catechin is a potent inhibitor of intestinal absorption of cholesterol in rats. *J Food Sci Nutr.* 2003. 8:1-6.
- Noh SK, Koo SI. The lymphatic absorption of lipids is normalized by enteral phosphatidylcholine infusion in ovariectomized rats with estrogen replacement. *J Nutr Biochem.* 1997. 8:152-161.
- Ogawa K, Hirose S, Nagaoka S, Yanase E. Interaction between tea polyphenols and bile acid inhibits micellar cholesterol solubility. *J Agric Food Chem.* 2016. 64:204-209.
- Pal P, Gandhi H, Giridhar R, Yadav MR. ACAT inhibitors: the search for novel cholesterol lowering agents. *Mini Rev Med Chem.* 2013. 13:1195-1219.
- Patel SB, Graf GA, Temel RE. ABCG5 and ABCG8: more than a defense against xenosterols. *J Lipid Res.* 2018. 59:1103-1113.
- Rains TM, Agarwal S, Maki KC. Antiobesity effects of green tea catechins: a mechanistic review. *J Nutr Biochem.* 2011. 22:1-7.
- Rezhdo O, Speciner L, Carrier R. Lipid-associated oral delivery: mechanisms and analysis of oral absorption enhancement. *J Control Release.* 2016. 240:544-560.
- Shimizu M, Li J, Inoue J, Sato R. Quercetin represses apolipoprotein B expression by inhibiting the transcriptional activity of C/EBP β . *PLoS ONE.* 2015. 10:e0121784. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121784>
- Shirakami Y, Shimizu M. Possible mechanisms of green tea and its constituents against cancer. *Molecules.* 2018. <https://doi.org/10.3390/molecules23092284>
- Wang S, Noh SK, Koo SI. Green tea catechins inhibit pancreatic phospholipase A₂ and intestinal absorption of lipids in ovariectomized rats. *J Nutr Biochem.* 2006. 17:492-498.
- Tuomisto J. Dioxins and dioxin-like compounds: toxicity in humans and animals, sources, and behaviour in the environment. *Wiki J Med.* 2019. 6:8. doi: 10.15347/wjm/2019.008.
- Wang L, Zhu H, Zhao Y, Jiao R, Lei L, Chen J, et al. Cranberry anthocyanin as an herbal medicine lowers plasma cholesterol by increasing excretion of fecal sterols. *Phytomedicine.* 2018. 38:98-106.
- Ye G, Chen G, Gao H, Lin Y, Liao X, Zhang H, et al. Resveratrol inhibits lipid accumulation in the intestine of atherosclerotic mice and macrophages. *J Cell Mol Med.* 2019. 23:4313-4325.