고지방식이로 인한 간의 지방축적 및 손상에 대한 뽕은감 추출물의 개선 효과

강진용^{1*} · 이 욱^{2*} · 김종민¹ · 박선경¹ · 김민지¹ · 문종현¹ · 이효림¹ · 정혜린¹ · 고민지¹ · 허호진¹

¹경상국립대학교 응용생명과학부 (BK21), 농업생명과학연구원

²국립산림과학원 산림소득자원연구과

Effect of Persimmon Extracts on High-Fat Diet-Induced Lipid Accumulation and Liver Damage

Jin Yong Kang^{1*}, Uk Lee^{2*}, Jong Min Kim¹, Seon Kyeong Park¹, Min Ji Kim¹, Jong Hyun Moon¹, Hyo Lim Lee¹, Hye Rin Jeong¹, Min Ji Go¹, and Ho Jin Heo¹

¹Division of Applied Life Science (BK21), Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University

²Division of Special-Purpose Trees, National Institute of Forest Science

ABSTRACT This study was performed to investigate the effects of persimmon (*Diospyros kaki*) on a high-fat diet (HFD)-induced lipid accumulation and lipotoxicity and in the liver. The persimmon extract (DKE) was orally administered at 50 and 100 mg/kg body weight with an HFD for 8 weeks in mice. The weight gain, including the weight of liver and adipose tissues, was suppressed in the DKE groups compared with the HFD group. In addition, improved glucose tolerance was observed in the DKE groups. The results of serum biomarkers indicate that DKE could inhibit liver injury and dyslipidemia. In addition, it was confirmed that oxidative stress and mitochondrial dysfunction were improved in the DKE groups. DKE suppressed lipid accumulation by inhibiting AMPK phosphorylation in the liver. In addition, with the inhibition of JNK phosphorylation by DKE, insulin resistance, inflammation, and apoptosis were suppressed. The metabolite analysis of liver tissue using ultra-high performance liquid chromatography with quadrupole time-of-flight mass spectrometry (UPLC Q-TOF/MS) showed that DKE affected metabolite composition in the liver tissue. In particular, it was confirmed that DKE was involved in liver lipid metabolism. DKE reduced phosphatidylcholines (PCs) and lysophosphatidylcholines (lysoPCs), and their reduction was closely related to the reduction of lipotoxicity.

Key words: high fat diet, fatty liver, persimmon, lipotoxicity, lysophosphatidylcholines

서 론

체내에 과도한 지방이 축적된 상태인 비만은 다양한 합병증을 유발한다. 비알코올성 지방간은 비만으로 인해 발생하는 대표적인 합병증 중 하나이며, 지방간이 방치되어 심각해질 경우 심각한 간 질환인 간경변증으로 진행될 수 있다 (Marchesini 등, 2003). 간은 인체에서 아주 중요한 장기이며, 간 기능에 문제가 발생할 경우 다양한 질병이 야기될 수 있으며 비알코올성 지방간은 2형 당뇨병, 이상지질혈증 고

혈압과 같은 질병의 발병률을 높이는 것으로 보고되었다 (Adams 등, 2005). 또한, 간의 지방축적으로 인한 간지질 독성은 산화적 스트레스, 세포사멸, 염증뿐만 아니라 인슐린 신호전달을 방해하여 인슐린 저항성을 초래하고, 지질 독성으로 인한 만성적인 손상은 간의 섬유화 반응을 활성화하여 결국에는 말기 간 질환을 유도한다 (Trauner 등, 2010).

간 질환 및 비만을 치료하기 위한 다양한 약물들이 개발되고 있지만 몇몇 약물들에 대한 부작용들이 보고되고 있다 (Yun, 2010). 그에 따라 안전한 소재를 통한 비만 및 지방간

Received 14 September 2021; Revised 16 November 2021; Accepted 29 November 2021

Corresponding author: Ho Jin Heo, Division of Applied Life Science (BK21), Institute of Agriculture and Life Science, Gyeongsang National University, 501, Jinju-daero, Jinju-si, Gyeongnam 52828, Korea, E-mail: hjher@gnu.ac.kr

Author information: Jin Yong Kang (Researcher), Jong Min Kim (Researcher), Seon Kyeong Park (Researcher), Min Ji Kim (Graduate student), Jong Hyun Moon (Graduate student), Hyo Lim Lee (Graduate student), Hye Rin Jeong (Graduate student), Min Ji Go (Graduate student), Ho Jin Heo (Professor)

*These authors contributed equally to this work.

© 2022 The Korean Society of Food Science and Nutrition.

This is Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

개선에 관한 연구들이 수행되었고, 다양한 연구를 통해 폴리페놀이 이러한 퇴행성 질환을 예방하는 데 주요한 소재로서 가능성이 있다는 것이 확인되었다(Manach 등, 2004).

감(*Diospyros kaki* Thunb.)은 한국, 중국, 일본 등과 같은 동아시아에서 주로 재배되는 과실로, 우리나라의 경우 감을 재배하기에 기후 및 풍토가 적합하여 전국 어디서나 널리 재배되고 있다(Jo 등, 2010). 감은 영양학적으로 매우 뛰어난 과일 중 하나로써 주성분은 탄수화물이며, 포도당과 과당의 함유량이 많고, 프롤린(proline)과 글루탐산(glutamic acid), 아스파르트산(aspartic acid)의 함량이 높으며, 불포화 지방산의 함량이 높은 것으로 알려져 있다(Jeong 등, 2010). 또한, 감에는 다양한 파이토케미컬이 함유되어 있어서, 일부 아시아 문화권에서 감은 다양한 질병을 예방하기 위한 식이 요법으로 제안되고 있다(Butt 등, 2015; George와 Redpath, 2008). Matsumoto 등(2006)은 감의 이상지질혈증 개선에 대한 효능을 확인하였고, 이상지질혈증의 예방 및 치료제 개발을 위한 감 열매의 가능성을 제시하였다. 감은 크게 뚝은감과 단감으로 분류되는데, 단감은 주로 생과로 소비되지만 뚝은감은 뚝은맛을 없애고자 탈삼 과정을 거쳐 소비된다(No 등, 2014). 뚝은감에는 tanin이 풍부하게 함유되어 있으며 tanin은 콜레스테롤 수치를 감소시키는데 주요한 역할을 하는 것으로 보고되었다(Zou 등, 2012).

이처럼 현재까지 뚝은감의 다양한 생리활성이 표면적으로 확인되고 있지만 관련 개선 기작에 대한 연구는 부족한 실정이다. 따라서 본 연구는 고지방식으로 인해 발생하는 지방간 및 간 손상에 대한 뚝은감 추출물의 개선 효능을 확인하고 탄백질 발현 변화 및 대사체 분석을 통한 개선 기작을 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 추출물 제조

본 실험에 사용된 뚝은감(*Diospyros kaki* Thunb.) 열매는 당시 품종으로 경상북도 상주시 낙동면 운평리에서 2020년 7월에 재배된 것을 실험에 사용하였다. 세척 후에 분쇄한 뚝은감 20 g과 증류수 1 L를 혼합하여 40°C에서 2시간 동안 환류냉각장치(Joylab, Seoul, Korea)를 이용하여 추출하고 여과한 뒤, 진공농축 후 동결건조하여 건조물(*Diospyros kaki* extract, DKE)을 획득하였으며 추출 수율은 6.18%로 확인되었다. 이후 추출물을 -20°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다.

실험동물 사육 및 디자인

실험동물은 (주)샘타코 바이오(Osan, Korea)에서 구입한 C57BL/6N 마우스(4주령, 수컷)로 그룹은 총 4개의 그룹으로 정상 대조군(Control), 고지방식이(high-fat diet, HFD)군, 저농도 샘플군(DKE 50), 고농도 샘플군(DKE 100)으로 분류하였다. 샘플의 농도는 이전의 동물실험에서 실험동물

에 대한 독성이 없었고 생리활성이 확인된 농도이다(Yoo 등, 2019). 1~8주 동안 정상 대조군을 제외한 다른 군들은 고지방 식이를 공급하였으며, DKE는 50과 100 mg/kg of body weight(kg B.W.)로 매일 경구 투여하였다. 사육조건은 온도 22±2°C, 상대습도 50±5%를 유지하며 조명 시간을 12시간 간격으로 조절하면서 사육 환경을 제공했다. 8주간 실험 동물의 체중을 매주 측정하였으며, 모든 실험은 경상국립대학교 동물실험 윤리위원회 승인(IACUC 승인번호: GNU-161116-M0065)하에 수행하였다.

경구 당부하 검사(oral glucose tolerance test, OGTT)

8시간 공복을 유지한 실험동물의 공복혈당을 측정된 뒤, 2 g/kg B.W.의 농도로 포도당을 경구 투여하였다. 이후 꼬리 정맥에서 혈액을 채취하여 당 측정 검사기(Accu-chek, Roche Diagnostic, Basel, Switzerland)를 활용하여 일정 시간(15, 30, 60 및 120분)마다 혈당을 측정하였다(Bartoli 등, 2011).

혈청 내 바이오마커 분석

실험동물의 복대 정맥에서 혈액을 채취한 후 원심분리(10,000×g, 10분, 4°C)하여 혈청을 분리하였다. 분리된 혈청에서 glutamic oxaloacetic transaminase(GOT), glutamic pyruvic, transaminase(GPT), blood urea nitrogen(BUN), creatine(CRE), lactate dehydrogenase(LDH), triglyceride(TG), total cholesterol(TCHO) 및 high density lipoprotein cholesterol(HDLc)을 혈청분석기(Fuji dri-chem 4000i, Fujifilm Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 분석하였다. Low density lipoprotein cholesterol은 TCHO-(HDLc+ TG/5)로 계산하였으며, HDLc 함량은 TCHO에 대한 비율{HTR(%)=(HDLc/TCHO)×10}로 계산하여 나타냈다(Friedewald 등, 1972).

혈청 FRAP 활성 측정

분리된 혈청을 ferric reducing antioxidant power (FRAP) 시약 [0.3 M sodium acetate buffer(pH 3)+10 mM 2,4,6-tripyridyl-S-triazine(TPTZ) solution dissolved in 40 mM HCl+20 mM FeCl₃ solution]과 암실에서 30분 동안 반응시킨 뒤, 594 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다.

간 조직의 지질 함량 측정

간의 총 지질 측정은 Mopuri 등(2020)의 방법에 따라 수행되었다. 간 조직을 20배 부피의 클로로포름/메탄올로 균질화하고 균질액을 4°C에서 3일 동안 보관한 후, 균질액을 원심분리하여 액상을 회수하였다. 액상을 0.2 부피의 증류수로 세척하고 혼합물을 900×g에서 원심분리하여 층을 분리한 후 클로로포름 층을 얻었다. 마지막으로 질소 가스를 이용하여 클로로포름 층을 증발시킨 후 무게를 측정하였다.

간 조직 중의 malondialdehyde(MDA) 함량 측정

간 조직을 인산염 완충용액을 활용하여 균질화한 뒤, 원심분리(3,000×g, 10분, 4°C)하여 상층액을 1% 인산 그리고 1% thiobarbituric acid와 함께 95°C에서 1시간 반응시켰다. 이후 이것을 상온에서 5분간 방치한 뒤에 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 함량은 표준곡선에 대입하여 mg protein당 함량으로 표시하였다.

간 조직 중의 superoxide dismutase(SOD) 활성 측정

인산염 완충용액으로 균질화한 간 조직을 원심분리(400×g, 5분, 4°C)한 후 상층액을 제거하고 펠렛에 1×cell extraction buffer(10×SOD buffer 0.5 mL, 20% triton X-100 0.1 mL, distilled water 4.4 mL, phenylmethanesulfonyl fluoride in ethanol 5 µL)를 넣은 뒤 ice에서 30분 동안 추출하였다. 추출물은 다시 원심분리(10,000×g, 10분, 4°C)하여 상층액의 SOD 함량을 SOD assay kit (Sigma-Aldrich Chemical Co., Dublin, Ireland)을 사용하여 측정하였다.

간 조직 중의 환원형 glutathione(GSH) 함량 측정

간 조직을 인산염 완충용액에 넣고 균질화한 뒤 10,000×g, 4°C에서 15분간 원심분리하여 얻어진 상층액에서 환원형 GSH를 측정하였다. 상층액에 동일한 양의 30% 메타인산을 넣고 2,000×g에서 원심분리를 하여 다시 한번 상층액을 취하였다. 이후 이 상층액에 0.26 M Tris 염산 완충용액(pH 7.8)과 0.65 N 수산화나트륨, 1 mg/mL 농도의 o-phthalaldehyde(OPT)를 넣고 15분간 상온에서 반응시킨 뒤, excitation wave 320 nm 및 emission wave 420 nm에서 1분 간격으로 형광을 측정하였다.

간 조직 중의 미토콘드리아 추출 및 기능 평가

간 조직에 1 mM ethylene glycol tetra acetic acid (EGTA)가 포함된 isolation buffer(215 mM mannitol, 75 mM sucrose, 0.1% BSA, 20 mM HEPES(Na⁺), pH 7.2)를 첨가하여 균질화하였다. 이후 1,300×g, 10분, 4°C에서 원심분리하고 상층액을 다시 13,000×g, 4°C에서 10분간 원심분리하였다. 이후 pellet에 1 mM EGTA와 0.1% digitonin이 포함된 isolation buffer를 첨가하고 5분 뒤 다시 13,000×g, 4°C에서 10분간 원심분리하고 마지막으로 10,000×g, 4°C에서 15분간 원심분리한 후에 pellet을 간 조직의 미토콘드리아로 활용하여 실험에 사용하였다(Wang 등, 2014).

분리된 미토콘드리아는 25 µM 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA)와 KCl-based respiration buffer를 혼합한 뒤 20분 동안 반응시킨 후, excitation wave 485 nm 및 emission wave 528 nm로 형광을 측정하여 미토콘드리아 내의 활성산소(reactive oxygen species, ROS) 수준을 측정하였다. 미토콘드리아 막전위(mitochondrial membrane potential, MMP)는 1 µM JC-1과 20분 동안 혼합하

고 반응시킨 뒤 excitation 530 nm, emission 590 nm에서 형광을 측정하여 측정하였으며, ATP 수준은 ATP bioluminescence assay kit(Promega, Madison, Wisconsin, USA)을 활용하여 측정하였다.

Western blotting

간 조직을 1% protease inhibitor cocktails(Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)가 첨가된 Protin ExTM animal cell/tissue(GeneAll Biotechnology, Seoul, Korea)를 사용하여 균질화한 뒤, 13,000×g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취하여 이것을 실험에 사용하였다. 단백질 샘플은 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)에서 분리되고 poly-vinylidene difluoride(PVDF) membrane(Millipore, Billerica, MA, USA)으로 전달되었다. 이후 membrane은 TBST(0.1% Tween 20이 첨가된 tris-buffered saline(TBS))에 희석된 1차 항체(1:1,000)와 하루 동안 4°C에서 반응한 뒤 TBST 용액으로 각각 10분씩 3회 세척하고 상온에서 2차 항체와 1시간 동안 반응시켰다. 또다시 세척 과정을 거친 뒤 membrane을 ECL 시약(Bionote, Hwaseong, Korea)과 반응시키고 이것을 iBrightTM CL1000 imaging system(Thermo Fisher, Waltham, MA, USA)으로 측정하였다. 이후 발현 밀도는 이미지 감지 소프트웨어(image J software, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 분석하였다.

UPLC Q-TOF/MS를 활용한 간 조직의 대사물질 분석

동결 건조된 간 분말(5 mg)을 zidovudine(Sigma-Aldrich Chemical Co.)이 내부표준물질로 함유된 70% 메탄올 1 mL로 균질화하였다. 이후 13,000×g에서 10분 동안 원심분리한 다음 상층액을 UPLC 시스템이 장착된 Acquity UPLC BEH C18 컬럼에 주입하고 0.1% trifluoroacetic acid(TFA)를 14.5분간 0.35 mL/min의 유량으로 40°C를 유지하여 분석하였다. 분리되어 나온 대사물질은 Q-TOF에서 ESI positive mode로 분석하였으며, capillary 및 sampling cone의 전압은 각각 2.78 kV 및 26 V로, desolvation 흐름은 300°C의 온도에서 700 L/h, source 온도는 110°C로 설정하였다. 대사물질의 MSe 스펙트럼은 10~30 eV 충돌 에너지에 의해 얻어졌으며, SIMCA-P⁺ 버전(Umetrics, Umeå, Sweden)을 사용하여 다변량 통계 분석에 의해 확인되었고 partial least squares-discriminant analysis(PLS-DA)를 사용하여 시각화되었다. PLS-DA 모델은 적합도(R²X 및 R²Y), 예측도(Q²) 및 P-value로 검증되었으며 permutation test(n=200)로 교차 검증하였다.

통계처리

실험결과는 SAS software(version 9.4, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용한 일원배치 분산분석(one

way analysis of variance)을 통해 통계처리 하였으며, Duncan의 다중범위 검정법(Duncan's multiple range test)으로 P -value는 5% 수준 내에서 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

DKE 섭취를 통한 체중 및 내당능

8주간의 고지방식이는 체중을 급격히 상승시켰으며, 내당능 또한 현저히 감소시켰다. 하지만 DKE를 섭취한 그룹에서는 체중의 급격한 증가와 내당능의 저하가 유의적으로 개선되는 것으로 확인되었다(Fig. 1). 체중의 경우 5주차부

터 고지방식이만을 섭취한 그룹과 고지방식이와 함께 DKE를 섭취한 그룹 간의 유의적인 차이가 확인되었으며, 내당능의 경우에는 DKE를 100 mg/kg B.W.로 섭취하였을 때 유의적으로 개선되는 것으로 확인되었다. 또한, 간 조직 및 다양한 지방조직(부고환 지방조직, Epididymal white adipose; 장간막 지방조직, Mesenteric fat; 후복강 지방조직, Posterior peritoneal fat)을 적출하여 각각의 무게를 측정하였을 때, DKE를 섭취한 그룹의 간 조직뿐만 아니라 다양한 지방 조직의 무게가 HFD 그룹에 비해 현저하게 감소한 것이 확인되었다(Table 1). 이러한 결과는 DKE가 체중의 증가 억제 및 내당능 개선에 효과가 있다는 것을 의미한다. 본

Fig. 1. Effect of *Diospyros kaki* extract (DKE) on body weight changes and glucose tolerance in mice with a high-fat diet. (A) Body weight, (B) oral glucose tolerance test (OGTT) and (C) area under curve (AUC) in OGTT. Results shown are mean±SD (n=7). Different small letters represent a statistical difference ($P<0.05$) in high order.

Table 1. Effects of *Diospyros kaki* extract (DKE) on tissues weight in mice with a high-fat diet

Group	Liver (g)	Lipid in liver (mg/g)	Epididymal white adipose (g)	Mesenteric fat (g)	Posterior peritoneal fat (g)
Control	1.03±0.04 ^b	47.2±3.4 ^c	0.80±0.12 ^c	0.18±0.07 ^c	0.15±0.03 ^c
HFD	1.26±0.12 ^a	98.8±14.2 ^a	2.65±0.27 ^a	0.75±0.04 ^a	0.88±0.09 ^a
DKE 50	1.02±0.06 ^b	78.2±13.8 ^b	2.33±0.39 ^b	0.45±0.10 ^b	0.79±0.07 ^a
DKE 100	1.06±0.06 ^b	76.8±11.8 ^b	2.32±0.16 ^b	0.57±0.17 ^b	0.66±0.13 ^b

Results shown are mean±SD (n=7). Data were statistically considered at $P<0.05$ and different small letters represent a statistical difference.

연구 이외에도 몇몇 연구에서 감의 섭취가 당뇨, 심혈관 질환, 비만 및 고혈압과 같은 다양한 질병을 개선하는 데 효과가 있는 것으로 보고되었다(Xie 등, 2015; Lee 등, 2006). 특히, 뽕은감의 탄닌 성분은 콜레스테롤 수치를 감소시키는 데 주요한 영향을 주는 것으로 보고되었다(Zou 등, 2012). 뽕은감의 가용성 탄닌의 분자구조는 대개 포도당에 갈산이 결합된 형태로 되어있으며, 갈산 또한 감에 풍부하게 함유되어 있다(Lee 등, 2012). 그뿐만 아니라 감에 풍부하게 함유되어 있는 갈산 또한 포도당 및 지질의 항상성을 유지하는 데 효과가 있는 것으로 보고되었다(Chao 등, 2014). 추가적인 연구를 통해 뽕은감의 이러한 생리활성에 대한 유효성 물질에 관한 연구가 이루어져야겠지만, 본 연구 결과는 DKE가 고지방식으로 인한 비만 및 당뇨의 진행을 억제하는 데 효과가 있어 기능성 소재로서의 가능성이 있다는 것을 보여준다.

DKE 섭취를 통한 혈청 바이오마커

혈청은 다양한 바이오마커들을 함유하고 있다. GOT와 GPT는 간독성의 지표로 사용될 수 있고 CRE와 BUN은 신장 독성의 바이오마커로 간주하고 있다(Angulo, 2002). CRE와 BUN은 HFD의 섭취로 인해서 유의적으로 증가하지 않았고, DKE 그룹 역시 대조군과 유사하거나 오히려 CRE의 수준이 낮게 확인되었다. 반면, GOT와 GPT는 HFD 그룹에서 모두 현저하게 증가하였고 DKE를 섭취한 그룹에서는 HFD 그룹에 비해 이들의 증가가 유의적으로 감소한 것이 확인되었다. 지질대사와 관련된 다양한 바이오마커 역시 HFD 그룹에서 크게 증가하였지만 DKE 그룹에서는 이들의 증가가 억제되는 경향을 확인하였다. 특히, TG와 TCHO의 수준의 감소가 명확하게 확인되었다. 그뿐만 아니라 혈청의 산화적 스트레스 바이오마커인 혈청 LDH의 증가 및 FRAP 활성의 감소 또한 DKE를 섭취한 그룹에서 개선된 것으로 확인되었다(Table 2). 결국 혈청의 다양한 바이오마커들에 대한 분석 결과에서 DKE가 고지방식이의 장기적인 섭취로 인한 간의 지방축적 및 손상 그리고 지질축적과 산화적 스트레스

의 증가를 억제하는 데 유의적 효과가 있다는 것을 보여준다.

이러한 결과는 이전의 결과(Table 1)에서 DKE가 간 조직의 지방축적 및 지방조직의 무게 증가를 유의적으로 감소시킨 것과 밀접한 관련이 있는 것으로 추측된다. GOT와 GPT는 간독성 수치를 나타내는 것뿐만 아니라 지방간의 지표로도 간주될 수 있으며(Angulo, 2002), 결국 DKE가 간 조직의 지질 함량을 감소시킨 것과 밀접한 관련이 있는 것으로 보인다(Table 2). 그리고 지질의 과도한 축적은 지질 독성으로 인한 산화적 스트레스를 유발하는데(Yazici와 Sezer, 2017), 결국 지질의 축적 감소로 인한 산화적 스트레스가 감소하여 LDH의 수준이 DKE 그룹에서 감소한 것으로 판단된다. 또한, 감의 항산화 활성이 LDH 수준 감소에도 관여한 것으로 추측된다. 감 열매의 항산화 활성은 주로 고분자량 탄닌 함량에 의해 기인되는 것으로 보고되었고 감의 항산화 활성은 딸기 및 블루베리에 필적하는 매우 높은 활성을 가진 것으로 확인되었다(George와 Redpath, 2008). 이는 DKE를 섭취한 그룹에서 혈청의 FRAP 활성이 높아진 것과도 관련이 있을 것으로 판단된다.

DKE 섭취를 통한 간 조직의 산화적 스트레스 억제

고지방 사료의 장기간 섭취로 인한 간 조직의 산화적 스트레스 증가를 확인하기 위해 다양한 바이오케미칼을 분석한 결과는 Fig. 2와 같다. 우리의 몸에는 SOD, catalase 및 GSH와 같은 항산화 효소가 존재하며, 이들은 자유라디칼을 소거해주어 궁극적으로 신체 조직에 대한 손상에 저항하기 위한 항산화 방어 시스템을 구축하고 있다(Ighodaro와 Akinloye, 2018). 자유라디칼은 유기체에서 지질 과산화 과정을 유도하며, MDA는 고도 불포화 지방산 과산화의 최종 생성물 중 하나이다. 즉, 자유라디칼의 증가는 MDA의 과잉생산을 유발하며 MDA 수준은 일반적으로 암 환자의 산화 스트레스 및 항산화 상태의 지표로 알려져 있다(Gawel 등, 2004). HFD 그룹의 간 조직에서 MDA의 수준이 현저하게 증가하는 것이 확인되었을 뿐만 아니라 항산화 효소인 SOD와 환원형 GSH의 수준이 control 그룹에 비해 유의적으로

Table 2. Effects of *Diospyros kaki* extract (DKE) on tissues weight in mice with a high-fat diet

Group	GOT ¹⁾ (U/L)	GPT ²⁾ (U/L)	CRE ³⁾ (mg/dL)	BUN ⁴⁾ (mg/dL)	TCHO ⁵⁾ (mg/dL)	TG ⁶⁾ (mg/dL)	LDLC ⁷⁾ (mg/dL)	LDH ⁸⁾ (U/L)	HTR ⁹⁾ (%)	FRAP ¹⁰⁾ (Absorbance)
Control	38.4± 1.5 ^c	28.4± 1.5 ^c	0.16± 0.03 ^a	16.02± 1.51 ^a	125.2± 6.9 ^c	136.0± 8.6 ^{ab}	18.1± 4.7 ^b	149.2± 17.0 ^c	61.35± 2.21 ^b	0.32± 0.02 ^a
HFD	60.80± 4.3 ^a	57.0± 6.0 ^a	0.15± 0.01 ^{ab}	15.98± 0.8 ^a	213.2± 10.9 ^a	139.8± 24.0 ^a	35.8± 3.1 ^a	278.4± 51.3 ^a	69.00± 1.41 ^a	0.27± 0.03 ^c
DKE 50	55.2± 6.3 ^b	45.2± 11.5 ^b	0.08± 0.02 ^c	16.20± 1.35 ^a	179.8± 17.1 ^b	123.4± 14.7 ^{ab}	31.5± 6.2 ^a	272.4± 55.9 ^a	70.34± 1.61 ^a	0.28± 0.03 ^{bc}
DKE 100	54.8± 5.3 ^b	48.6± 9.7 ^{ab}	0.13± 0.02 ^b	15.26± 1.78 ^a	187.6± 8.0 ^b	121.0± 19.9 ^b	31.7± 5.5 ^a	214.2± 23.3 ^b	69.70± 3.67 ^a	0.31± 0.02 ^{ab}

¹⁾Glutamic oxalacetic transaminase. ²⁾Glutamic pyruvate transaminase. ³⁾Creatine. ⁴⁾Blood urea nitrogen. ⁵⁾Total cholesterol.

⁶⁾Triglyceride. ⁷⁾Low density lipoprotein cholesterol. ⁸⁾Lactate dehydrogenase. ⁹⁾Ratio of HDLC to TCHO.

¹⁰⁾Ferric reducing antioxidant power.

Results shown are mean±SD (n=7). Data were statistically considered at $P<0.05$ and different small letters represent a statistical difference.

Fig. 2. Effect of *Diospyros kaki* extract (DKE) on liver damage in mice with a high-fat diet. (A) Malondialdehyde (MDA) contents, (B) superoxide dismutase (SOD) contents, (C) reduced glutathione (GSH) in liver. Results shown are mean±SD (n=7). Different small letters represent a statistical difference ($P<0.05$) in high order.

감소한 것이 확인되었다. 이러한 산화적 스트레스 증가에는 간 지질 함량의 증가와 밀접한 관련이 있는 것으로 추측된다. 간의 지질 함량 증가는 지질 독성을 유도하고 결국에는 산화적 스트레스의 수준을 증가시키는 것으로 보고되었다 (Trauner 등, 2010). 하지만 DKE 그룹에서는 이러한 변화가 유의적으로 개선되는 것이 확인되었다. 즉, DKE의 섭취가 고지방식으로 인한 지질의 함량 증가와 그로 인한 지질 독성의 증가를 억제함으로써 간의 산화적 스트레스를 억제할 수 있다는 것을 보여준다. 더불어 DKE의 섭취로 인한 체내의 항산화 활성의 증가 또한 간의 산화적 스트레스를 감소시키는 데 영향을 준 것으로 판단된다.

DKE 섭취를 통한 간 조직의 미토콘드리아 기능 개선

세포의 산화 스트레스는 미토콘드리아의 구조적 및 기능적 변화를 유발하며, 이러한 미토콘드리아 변화는 세포가 제어할 수 없는 ROS를 생성하여 궁극적으로 질병을 발생시킨다(Bhatti 등, 2017). 그에 따라 산화적 스트레스가 크게 증가한 HFD 그룹 간 조직의 미토콘드리아 기능평가를 확인한 결과에서 ROS 수준의 증가, MMP 및 ATP 수준의 감소

와 같은 미토콘드리아 기능장애가 HFD 그룹에서 확인되었다. 그에 반해 산화적 스트레스가 감소한 DKE 그룹의 간 조직에서는 미토콘드리아 기능장애가 개선된 것으로 확인되었다(Fig. 3). MMP는 ATP 생산의 원동력인 전자 수송 및 산화적 인산화 과정을 반영하기 때문에 미토콘드리아 활동의 핵심 지표이다. 하지만 과도하게 형성된 ROS는 MMP의 수준을 감소시키는 것으로 확인되었다(Perry 등, 2011). 이를 고려하면 DKE의 섭취는 간 조직의 지질축적을 감소시킬 뿐만 아니라 항산화 활성을 통해 간 조직의 산화적 스트레스를 감소시키고, 그로 인해 간 조직의 미토콘드리아 기능장애를 개선하는 것으로 판단된다.

DKE 섭취를 통한 지방축적 관련 단백질

지방축적과 관련된 단백질의 분석결과를 Fig. 4와 같다. 간 조직의 AMP-activated protein kinase(AMPK) 인산화는 HFD 그룹에서 유의적으로 감소하였지만, DKE 그룹에서는 증가하였다. AMPK는 에너지 균형과 탄수화물 및 지방대사를 조절하는 중요한 역할을 하며 비만, 당뇨병, 암과 같은 주요 만성 질환에서 AMPK가 조절에 문제가 발생한다(Ix

Fig. 3. Effect of *Diospyros kaki* extract (DKE) on liver mitochondrial damage in mice liver tissues with a high-fat diet. (A) Reactive oxygen species (ROS) contents, (B) mitochondrial membrane potential (MMP), and (C) adenosine triphosphate (ATP) levels in liver mitochondria. Results shown are mean±SD (n=7). Different small letters represent a statistical difference ($P<0.05$) in high order.

와 Sharma, 2010). AMPK는 세포 내 AMP:ATP 비율이 증가하고 AMPK의 Thr172 잔기 α -subunit이 인산화될 때 활성화되고, 활성화된 AMPK는 지방산 산화를 자극한다 (Daval 등, 2006). 그에 따라 인산화된 AMPK는 sterol regulatory element-binding protein-1c(SREBP-1c), peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ) 및 fatty acid synthase(FAS)와 같은 지방세포 전사인자의 발현 억제를 통해 지방 합성을 억제하고 acetyl-CoA carboxylase(ACC)의 비활성화와 carnitine palmitoyltransferase-1(CPT-1)의 활성화를 통해 베타 산화를 촉진시킨다 (Foretz 등, 1998; Hardie, 2003; Park 등, 2015). 따라서 지질 흡수와 지방 생성을 촉진하는 PPAR γ 뿐만 아니라 지방 합성효소인 FAS의 발현은 HFD군에 비해 AMPK의 인산화가 증가한 DKE 그룹에서 유의적으로 감소하였다. Zou 등(2012)의 연구에 따르면, 감 또는 감의 tannin 식이가 AMPK의 인산화를 자극함으로써 베타 산화 촉진, 지방산 합성효소의 수준 감소, 지방 생성에 관여하는 유전자를 하향 조절하는 것으로 보고하였다. 결국 본 연구에서도 DKE는 AMPK의 인산화 억제를 통해 지질축적이 일정 수준에서 억

제된 것을 확인하였다.

DKE 섭취를 통한 간 손상 관련 단백질

c-Jun N-terminal kinases(JNK)는 인산화를 통해 활성화되며 염증신호, 활성산소 수준의 변화, 자외선 및 다양한 스트레스에 의해 활성화된다(Vlahopoulos와 Zoumpourlis, 2004). 인산화를 통해 활성화된 JNK는 HFD 그룹에서 크게 증가한 것으로 확인되었는데, JNK의 인산화는 다양한 대사반응을 유도한다. 우선 JNK 경로의 활성화는 T 세포의 성숙 및 활성화와 인터루킨-2(IL-2), IL-6 및 TNF- α 와 같은 전염증성 사이토카인의 합성을 증가시킨다(Roy 등, 2008). 그에 따라 HFD 그룹에서의 TNF- α 발현 증가가 확인되었지만, JNK의 활성이 감소한 DKE 그룹에서는 TNF- α 발현이 유의적으로 감소한 것이 확인되었다(Fig. 5). Zou 등(2012)의 연구에서도 감과 tannin의 섭취가 간의 TNF- α 뿐만 아니라 C-reactive protein과 nuclear factor-kappa B와 같은 염증성 사이토카인들의 수준을 감소시키는 것으로 확인되었다. 결국 DKE는 JNK의 경로를 조절하여 염증성 사이토카인의 증가를 억제하는 데 효과가 있는 것으로 판단

Fig. 4. Effect of *Diospyros kaki* extract (DKE) on protein expression related to lipid accumulation in mice liver with a high-fat diet. p-AMPK, FAS, and PPAR γ in liver. Results shown are mean $\pm$ SD (n=7). Different small letters represent a statistical difference ($P<0.05$) in high order.

된다. 뿐만 아니라 DKE의 섭취로 인해 JNK 경로의 억제는 인슐린 저항성과 세포사멸 경로 억제와도 관련이 있는 것으로 판단된다. JNK의 경로 활성화는 인슐린 저항성과 세포사멸을 유도한다(Solinas와 Becattini, 2017). DKE 그룹에서 HFD 그룹에 비해 insulin degradation enzyme(IDE)의 발현은 증가하고 Bax의 증가는 감소한 것으로 확인이 되었다(Fig. 5). IDE는 인슐린 분해를 담당하는 주요 효소이며 인슐린 저항성은 IDE 수준을 낮추고 동시에 인슐린 회전을 낮추어 고인슐린혈증 상태를 유지할 수 있어 2형 당뇨 진행에 기여한다(Tundo 등, 2017). Bax는 pro-apoptotic 단백질로, JNK는 미토콘드리아에서 활성 Bax의 축적을 촉진하며 JNK는 Bax 발현을 증가시키는 데 필수적이다. 미토콘드리아에 대한 Bax, Bid 및 Bim의 표적화는 caspase 캐스케이드의 활성화를 유발하는 사이토크롬 c(cytochrome c)의 방출을 촉진하여 세포사멸을 유도한다(Papadakis 등, 2006). 결국 이러한 결과들은 DKE가 JNK의 활성화 억제를 통해 염증 증가, 인슐린 저항성 및 세포사멸 경로를 개선할 수

있는 가능성을 보여준다.

간 대사물질 분석결과

UPLC Q-TOF/MS를 사용한 간 조직 대사물질 분석결과, 그룹 간 대사물질에 상당한 차이가 있음을 확인하였다(Fig. 6). 모든 대사물질을 PLS-DA로 나타내었을 때, HFD군, 대조군, DKE 그룹 간에 대사산물에 유의한 차이가 있는 것으로 관찰되었으며, PLS-DA의 적합도(R2X 및 R2Y), 예측가능성(Q2) 및 P -value 수치는 각각 R2X=0.352, R2Y=0.489, Q2=0.323, P -value=4.56E-0.3으로 확인되었다. PLS-DA 모델의 유의성을 확인하기 위해 permutation test로 교차 검증을 하였으며, 이러한 결과는 그룹 간의 대사산물에 통계적 차이가 명확하게 있음을 보여준다(Fig. 6A).

Heat map은 variable importance in the projection (VIP) 값이 1 이상인 대사산물의 변화를 보여준다(Fig. 6B). VIP는 가변 중요도이며 1.00 이상의 값은 그룹들의 차이를 설명하는 데 높은 관련성을 나타낸다. VIP 지수가 높은 대사

Fig. 5. Effect of *Diospyros kaki* extract (DKE) on protein expression related to inflammation, insulin resistance, and apoptosis in mice liver with a high-fat diet. p-JNK, IDE, TNF- α , and Bax in liver. Results shown are mean $\pm$ SD (n=7). Different small letters represent a statistical difference ($P < 0.05$) in high order.

산물은 대부분 지질과 관련된 대사산물로서 지방산, phosphatidylcholines(PCs), lysophosphatidylcholines(lyso PCs) 그리고 지질 대사중간체(betaine and carnitine)로 확인되었다(Kim 등, 2011). 특히 DKE 100 그룹과 HFD 그룹 간에 차이가 있었고, 지질 대사체 관련 물질의 대부분이 DKE 100 그룹에서 크게 감소하였다. 주목할 부분은 lysoPCs의 VIP 값의 변화가 다른 대사체보다 높게 나타난 것이다. 즉,

lysoPC는 그룹 간의 대사산물 차이에 중요한 요소라는 것을 의미한다. Kim 등(2011)의 연구에 따르면 HFD는 PC, lyso PC 및 지방산과 같은 지질 프로파일을 증가시키며, 특히 lyso PC가 HFD의 만성 소비에 대한 잠재적인 바이오마커가 될 수 있다고 제안하였다. LysoPCs는 세포막의 미량 성분으로 PC의 가수분해에 의해 형성되며, 인간 비알코올성지방간염 환자와 비알코올성지방간염 동물모델 모두의 간이나 혈장

Fig. 6. Effect of *Diospyros kaki* extract (DKE) on metabolite changes in mouse liver tissue. (A) PLS-DA score scatter and permutation test and (B) heat maps of changing metabolites. The qualification of the PLS-DA models was evaluated by the goodness of fit measure (R2X and R2Y) and predictive ability (Q2), and cross-validated with a permutation test (n=200).

에서 lysoPCs 수치가 증가하는 것으로 관찰되었다(Mota 등, 2016). 또한, Kakisaka 등(2012)은 lysoPCs가 지질 독성의 주요 원인이며 lysoPCs는 JNK의 인산화를 유도하여 활성화시키는 것으로 보고하였다. 결국 이러한 결과는 DKE가 간 지질대사에 관여하며, 특히 lysoPCs의 수준을 현저하게 감소시켜 지질 독성을 억제한다는 것을 의미하는 것으로 판단된다.

요 약

DKE는 고지방식으로 인한 비만 및 간의 지방축적을 효과적으로 억제하는 것으로 확인되었다. 뿐만 아니라 DKE는 AMPK인 활성을 증가시켜 간에서의 지질축적과 관련된 단백질을 감소시켰으며 JNK 경로를 억제하여 염증의 증가, 인슐린 저항성 및 세포사멸을 억제하는 데에도 관여를 하는 것으로 확인되었다. DKE의 섭취를 통한 간의 지방 축적감소는 간의 지질 독성을 억제하였으며, 주목할 부분으로 DKE가 지질대사에 직접적으로 관여를 하는 것이다. DKE는 PCs와 lysoPCs의 증가를 현저하게 억제하였으며, 이들의 감소와 지질 독성의 감소에는 밀접한 관련이 있는 것으로 추측된다. 지질 독성의 감소는 간 조직의 산화적 스트레스와 그로 인한 미토콘드리아 기능장애의 발생을 억제한 것으로 추측되며, 결국 DKE는 간의 지질대사에 관여함으로써 고지방식으로 인한 간의 지방축적 및 손상을 예방할 수 있는 소재로서의 활용 가능성이 있는 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2020년 국립산림과학원의 재정지원(2020031160 D-00)을 받아 수행되었습니다. 강진용, 김종민, 박선경, 김민지, 문종현, 이효림, 정혜린, 고민지는 Brain Korea(BK) 21 program의 지원을 받아 연구를 수행하였고, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Adams LA, Lymp JF, Sauver JS, Sanderson SO, Lindor KD, Feldstein A, et al. The natural history of nonalcoholic fatty liver disease: A population-based cohort study. *Gastroenterology*. 2005. 129:113-121.
- Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med*. 2002. 346:1221-1231.
- Bartoli E, Fra GP, Schianca GPC. The oral glucose tolerance test (OGTT) revisited. *Eur J Intern Med*. 2011. 22:8-12.
- Bhatti JS, Bhatti GK, Reddy PH. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in metabolic disorders – A step towards mitochondria based therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2017. 1863:1066-1077.
- Butt MS, Sultan MT, Aziz M, Naz A, Ahmed W, Kumar N, et al. Persimmon (*Diospyros Kaki*) fruit: hidden phytochemicals and health claims. *EXCLI J*. 2015. 14:542-561.
- Chao J, Huo T, Cheng HY, Tsai JC, Liao JW, Lee MS, et al. Gallic acid ameliorated impaired glucose and lipid homeostasis in high fat diet-induced NAFLD mice. *PLoS One*. 2014. 9:e96969. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096969>
- Daval M, Fougelle F, Ferré P. Functions of AMP-activated protein kinase in adipose tissue. *J Physiol*. 2006. 574:55-62.
- Foretz M, Carling D, Guichard C, Ferre P, Fougelle F. AMP-acti-

- vated protein kinase inhibits the glucose-activated expression of fatty acid synthase gene in rat hepatocytes. J Biol Chem. 1998. 273:14767-14771.
- Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. Clin Chem. 1972. 18:499-502.
- Gawel S, Wardas M, Niedworok E, Wardas P. Malondialdehyde (MDA) as a lipid peroxidation marker. Wiad Lek. 2004. 57: 453-455.
- George AP, Redpath S. Health and medicinal benefits of persimmon fruit: a review. Adv Horti Sci. 2008. 22:244-249.
- Hardie DG. Minireview: The AMP-activated protein kinase cascade: The key sensor of cellular energy status. Endocrinology. 2003. 144:5179-5183.
- Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. Alexandria J Med. 2018. 54:287-293.
- Ix JH, Sharma K. Mechanisms linking obesity, chronic kidney disease, and fatty liver disease: The roles of fetuin-A, adiponectin, and AMPK. J Am Soc Nephrol. 2010. 21:406-412.
- Jeong CH, Kwak JH, Kim JH, Choi GN, Jeong HR, Kim DO, et al. Changes in nutritional components of Daebong-gam (*Diospyros kaki*) during ripening. Korean J Food Preserv. 2010. 17:526-532.
- Jo YH, Park JW, Lee JM, Ahn GH, Park HR, Lee SC. Antioxidant and anticancer activities of methanol extracts prepared from different parts of jangseong Daebong persimmon (*Diospyros kaki* cv. Hachiya). J Korean Soc Food Sci Nutr. 2010. 39:500-505.
- Kakisaka K, Cazanave SC, Fingas CD, Guicciardi ME, Bronk SF, Werneburg NW, et al. Mechanisms of lysophosphatidylcholine-induced hepatocyte lipoapoptosis. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2012. 302:G77-G84.
- Kim HJ, Kim JH, Noh S, Hur HJ, Sung MJ, Hwang JT, et al. Metabolomic analysis of livers and serum from high-fat diet induced obese mice. J Proteome Res. 2011. 10:722-731.
- Lee JH, Lee YB, Seo WD, Kang ST, Lim JW, Cho KM. Comparative studies of antioxidant activities and nutritional constituents of persimmon juice (*Diospyros kaki* L. cv. Gapjubaekmok). Prev Nutr Food Sci. 2012. 17:141-151.
- Lee SO, Chung SK, Lee IS. The antidiabetic effect of dietary persimmon (*Diospyros kaki* L. cv. Sangjudungsi) peel in streptozotocin-induced diabetic rats. J Food Sci. 2006. 71:S293-S298.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. Am J Clin Nutr. 2004. 79:727-747.
- Marchesini G, Bugianesi E, Forlani G, Cerrelli F, Lenzi M, Manini R, et al. Nonalcoholic fatty liver, steatohepatitis, and the metabolic syndrome. Hepatology. 2003. 37:917-923.
- Matsumoto K, Watanabe Y, Ohya M, Yokoyama S. Young persimmon fruits prevent the rise in plasma lipids in a diet-induced murine obesity model. Biol Pharm Bull. 2006. 29: 2532-2535.
- Mopuri R, Kalyesubula M, Rosov A, Edery N, Moallem U, Dvir H. Improved folch method for liver-fat quantification. Front Vet Sci. 2020. 7:594853. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.594853>
- Mota M, Banini BA, Cazanave SC, Sanyal AJ. Molecular mechanisms of lipotoxicity and glucotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease. Metab Clin Exp. 2016. 65:1049-1061.
- No J, Kim J, Zhang C, Kim H, Shin M. Effect of astringency removal conditions on the quality of *Daebong* persimmon. Korean J Food Cook Sci. 2014. 30:351-359.
- Papadakis ES, Finegan KG, Wang X, Robinson AC, Guo C, Kayahara M, et al. The regulation of Bax by c-Jun N-terminal protein kinase (JNK) is a prerequisite to the mitochondrial-induced apoptotic pathway. FEBS Lett. 2006. 580:1320-1326.
- Park YM, Lim JH, Seo EW. Anti-obesity effect of by-product from soybean on mouse fed a high fat diet. Korean J Plant Res. 2015. 28:168-177.
- Perry SW, Norman JP, Barbieri J, Brown EB, Gelbard HA. Mitochondrial membrane potential probes and the proton gradient: A practical usage guide. Biotechniques. 2011. 50:98-115.
- Roy PK, Rashid F, Bragg J, Ibdah JA. Role of the JNK signal transduction pathway in inflammatory bowel disease. World J Gastroenterol. 2008. 14:200-202.
- Solinas G, Becattini B. JNK at the crossroad of obesity, insulin resistance, and cell stress response. Mol Metab. 2017. 6:174-184.
- Trauner M, Arrese M, Wagner M. Fatty liver and lipotoxicity. Biochim Biophys Acta. 2010. 1801:299-310.
- Tundo GR, Sbardella D, Ciaccio C, Grasso G, Gioia M, Coletta A, et al. Multiple functions of insulin-degrading enzyme: A metabolic crosslight?. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2017. 52: 554-582.
- Vlahopoulos S, Zoumpouris V. JNK: A key modulator of intracellular signaling. Biochemistry (Mosc). 2004. 69:844-854.
- Wang DM, Li SQ, Wu WL, Zhu XY, Wang Y, Yuan HY. Effects of long-term treatment with quercetin on cognition and mitochondrial function in a mouse model of Alzheimer's disease. Neurochem Res. 2014. 39:1533-1543.
- Xie C, Xie Z, Xu X, Yang D. Persimmon (*Diospyros kaki* L.) leaves: A review on traditional uses, phytochemistry and pharmacological properties. J Ethnopharmacol. 2015. 163:229-240.
- Yazici D, Sezer H. Insulin resistance, obesity and lipotoxicity. Adv Exp Med Biol. 2017. 960:277-304.
- Yoo SK, Kim JM, Park SK, Kang JY, Han HJ, Park HW, et al. Protective effect of Gabjubaekmok (*Diospyros kaki*) extract against amyloid beta (Aβ)-induced cognitive impairment in a mouse model. Korean J Food Sci Technol. 2019. 51:379-392.
- Yun JW. Possible anti-obesity therapeutics from nature—A review. Phytochemistry. 2010. 71:1625-1641.
- Zou B, Li C, Chen J, Dong X, Zhang Y, Du J. High molecular weight persimmon tannin is a potent hypolipidemic in high-cholesterol diet fed rats. Food Res Int. 2012. 48:970-977.