

오미자 메탄올 추출액이 흰쥐에 있어서 Benzo(a)pyrene에 의해 유도된 간장해에 미치는 영향

이 윤 경

영남대학교 식품영양학과

Effect of Omija(*Schizandra chinensis* Baillon) Methanol Extract on Benzo(a)pyrene induced Hepatotoxicity in Rats

Yoon-Kyeung Lee

Dept. of Food and Nutrition, Yeungnam University, Kyong san 712-749, Korea

Abstract

The protective effect of omija methanol extract on benzo(a)pyrene induced liver injury was studied in rats *in vitro* and *in vivo*. *In vitro* experiment, primary cultured hepatocytes(5×10^5 cells/ml) were cultured for 20~24 hours after adding omija methanol extract(5.1 $\mu\text{g/ml}$) and B(a)P(50 μM) in culture medium. *In vivo* experiment, omija methanol extract(0.1 g/kg/day, per os) was administered for 7 days and B(a)P(0.1 mg/kg body weight, intraperitoneally) was given to the rats after the last administration of extract. Omija methanol extract significantly recovered serum enzyme activities(AST, ALT and LDH) and lipid contents(total cholesterol, triglyceride and HDL-cholesterol) changed by benzo(a)pyrene (B(a)P) to normal levels *in vivo*. *In vitro* experiment, as a result of 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) assay, omija methanol extract showed a little hepatotoxicity compared with group I (normal) but significantly recovered enzyme activities(AST, ALT and LDH) changed by B(a)P in comparison to group II administered B(a)P only. It was suggested that omija methanol extract has a protective effect on liver injury induced by B(a)P.

Key words : Benzo(a)pyrene(B(a)P), Protective effect of liver, Enzyme activities, Lipid contents.

서 론

오미자(*Schizandra chinensis* Baillon, Omija)는 오미자 나무의 종실로 목련과(*Magnoliaceae*)에 속하는 낙엽성 만성 목본식물인데 고래로 식품 면에서, 기호음료면에서 그리고 한방의학면에서

널리 이용되고 있다. 오미자는 하절기의 화채재료, 차, 주스, 주(酒) 등으로 이용되거나 혹은 그 홍색소를 녹말다식, 녹말편을 만드는데 이용하고 있는데 최근 오미자의 영양성분 규명을 위한 연구^{1,3)} 및 오미자를 음료화하려는 노력^{4,5)}이 이루어지고 있다. 또한 한방의학면에서는 오미

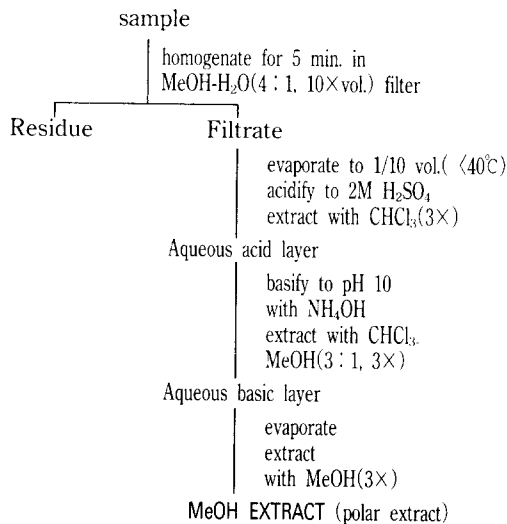
자가 알콜에 대한 해독작용⁶⁾, 간장보호작용⁷⁾ 및 항당뇨작용⁸⁾ 등을 갖는 것으로 알려져 있다.

한편, 의학통계에 의하면 우리나라는 다른 아시아 국가에 비해 약 3배이상의 높은 간염발병율을 나타내고 있는데 간염은 간경변 등 다른 질환을 유발하므로 의학적 및 사회적으로 중요한 문제로 인식되고 있다⁹⁾. 그러나 아직 특효약이나 효과적인 치료약이 없는 형편이므로 그 개발의 필요성이 매우 크다고 할 수 있는데 최근 윤 등^{10,11)}은 민간요법에서 간질환의 치료에 이용되고 있는 식물들의 효능을 체계적으로 연구하고 있다. 이런 시점에서 저자 등은 오미자의 간장보호작용에 대한 좀 더 체계적인 연구를 위하여 오미자를 분획별로 추출하고 이들을 인위적으로 간장해를 유발한 웅성 흰쥐에 투여하여 본 결과 메탄올 분획이 간장보호효과를 나타내었으므로 이를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시료의 조제

오미자의 메탄올 추출액은 scheme 1과 같이 추출하여 감압 농축한 후 증류수로 희석하여



Scheme 1. A procedure for fractionating of omija.

사용하였다. 오미자 500g을 MeOH-H₂O(4:1, 10×vol.) 용액으로 추출, 여과한 후 감압농축(1/10 vol.)하고 여기에 2 M H₂SO₄를 첨가하여 pH 2~3으로 산성화한다. 그후 CHCl₃ 용액(3×)으로 3회 추출하고 수층을 취하여 NH₄OH 용액으로 염기화(pH 10)한다. 염기화한 후 다시 CHCl₃-MeOH 용액(3:1, 3×)으로 추출하고 수층을 취하여 MeOH 용액(3×)으로 다시 추출한 후 감압농축하여 사용하였다.

실험 I (*In vitro*)

간세포의 분리와 배양, 오미자 메탄올 추출액이 간세포 증식에 미치는 영향 측정(MTT assay) 그리고 초대배양 간세포에서 aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase(ALT) 및 lactate dehydrogenase(LDH)의 활성도 측정 등은 전보¹²⁾와 동일한 방법으로 수행하였으며 실험군은 4군으로 나누었는데 다음과 같다. I 군은 오미자 메탄올 추출액과 B(a)P를 첨가하지 않은 정상군, II 군은 B(a)P만 첨가한 군, III 군은 오미자 메탄올 추출액만 첨가한 군 그리고 IV 군은 오미자 메탄올 추출액과 B(a)P를 모두 첨가한 군으로 하였으며 오미자 추출액과 B(a)P의 첨가량은 각각 최종농도 5.1µg/ml와 50 µM로 하였다.

실험 II (*In vivo*)

1. 실험동물

체중 110±10g인 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐를 전보¹²⁾와 동일하게 사용하였으며 *in vitro*에서와 같이 4군으로 나누어서 실험하였다. 이때 B(a)P(0.1 mg/kg body weight)은 오미자 추출액을 투여한 마지막 날에 1회 복강주사하였고 오미자 메탄올 추출액은 투여량을 0.1g/kg body weight/day로 하여 1주일간 1일 1회 정시간에 경구투여하였다.

2. 생화학 검사용 시료액의 조제

B(a)P과 오미자 추출액을 투여한 S.D계 웅성 rat의 복부 대동맥으로부터 채혈한 뒤 원심분리

(600×g, 15 min)하여 얻은 상등액을 혈청으로 사용하였고 간장은 마쇄한 후 600×g에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄 부분을 제거한 상등액을 얻고 이것을 다시 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 얻은 분획을 이용하여 효소 활성도를 측정하였다. 간조직중의 지질 추출은 Folch 등의 방법¹³⁾으로 행하였다.

3. 혈청과 간조직중의 효소 활성도 및 지질 함량 측정

전보¹²⁾에서와 동일한 방법으로 측정하고 통제처리하였으며 효소는 AST, ALT, LDH 및 alkaline phosphatase(ALP)의 활성도를, 지질은 HDL-cholesterol, total cholesterol(TC) 및 triglyceride(TG)의 함량을 측정하였다.

결과 및 고찰

실험 I (In vitro)

1. MTT assay를 이용한 오미자 메탄올 추출액의 간 보호효과

MTT assay는 colorimetric tetrazolium assay로 방사성 동위원소를 사용하지 않고 기질과 생성물이 서로 다른 파장에서 흡수극대를 나타내므로 배양액을 제거한 이후에 별도의 수세과정이 필

Table 1. The Effect of omija MeOH extract on percent survival of B(a)P-treated primary cultured hepatocytes

Group	percent survival(%)
I	99.82
II	67.52
III	85.13
IV	98.36

* Values with common superscript letter are not significantly different (p<0.05, n=5).

I : This group was not treated with omija extract and B(a)P.

II : This group was treated with B(a)P.

III : This group was treated with omija extract.

IV : This group was treated with omija extract and B(a)P.

Each value is mean of 5 experiments.

요없으므로 조작이 비교적 간편하고 신속, 정확하다는 장점이 있어 세포증식, 세포독성 및 세포활성 측정에 많이 이용되고 있다¹⁴⁾. MTT assay 결과, 오미자 메탄올 추출액 단독첨가군은 정상 세포군과 비교했을 때 간세포에 약간의 손상을 주는 것으로 나타났으나 B(a)P과 병용첨가하였을 때 B(a)P 단독첨가로 인해 낮아진 세포 생존율을 약 46% 정도 유의성있게 상승시켰다(Table 1).

2. 효소 활성도를 이용한 오미자 메탄올 추출액의 간 보호효과

B(a)P을 처리한 초대배양 간세포에 오미자 메탄올 추출액을 병행 처리하고 간세포의 AST, ALT 및 LDH의 활성도를 측정할 결과는 다음과 같다. 오미자 메탄올 추출액은 B(a)P독성으로 인해 변화한 AST와 LDH의 활성도를 각각 약 11%와 약 7% 회복시키므로써 거의 정상수준이 되게 하였다. 또한 B(a)P으로 인해 상승한 ALT의 활성도를 약 4% 정도 유의성있게 감소시키나 이는 정상수준에는 미치지 못하였다(Table 2).

Table 2. The Effect of omija MeOH extract on enzyme activities of B(a)P-treated primary cultured hepatocytes

Group	AST(%)	ALT(%)	LDH(%)
I	99.84±2.63 ^a	99.79±0.86 ^a	100.00±2.34 ^a
II	115.94±1.89 ^b	108.61±1.28 ^b	93.25±1.03 ^b
III	104.45±4.11 ^c	99.59±1.31 ^a	96.23±4.69 ^{ab}
IV	102.66±1.70 ^{bc}	104.25±1.09 ^c	99.60±3.34 ^a

* Values with common superscript letter within the same column are not significantly different (p<0.05, n=5).

I : This group was not treated with omija extract and B(a)P.

II : This group was treated with B(a)P.

III : This group was treated with omija extract.

IV : This group was treated with omija extract and B(a)P.

실험 II (In vivo)

1. 혈청중의 효소 활성도와 지질 함량 변화

B(a)P 투여로 인한 혈청 효소 활성도와 지

Table 3. The Effect of omija MeOH extract on the serum enzyme activities in B(a)P treated rats

Group	Serum			
	AST (K. unit/ml)	ALT (K. unit/ml)	ALP (K.A unit/ml)	LDH(x10 ²) (B.B. unit/ml)
I	76.50±9.57 ^a	31.90±2.91 ^a	17.68±3.22 ^a	19.10±0.45 ^a
II	119.38±9.39 ^b	65.08±8.16 ^b	29.88±1.23 ^b	22.28±1.83 ^b
III	80.75±4.27 ^a	36.12±2.60 ^a	24.50±2.35 ^a	18.99±0.48 ^a
IV	85.25±6.79 ^a	38.39±4.43 ^a	23.05±2.06 ^a	18.95±0.20 ^a

※ Values with a common superscript letter within the same column are not significantly different(p<0.05, n=5).

I : This group was not treated with omija extract and B(a)P. K. unit/ml : Karmen unit/ml.

II : This group was treated with B(a)P. K.A. unit/ml : King-Armstrong unit/ml.

III : This group was treated with omija extract. B.B. unit/ml : Berga-Broid unit/ml.

IV : This group was treated with omija extract and B(a)P.

질 함량 변화에 미치는 오미자 메탄올 추출액의 영향은 Table 3, 4와 같다. 혈청 AST, ALT, ALP 그리고 LDH의 활성도는 B(a)P의 투여로 인해 유의성있게 상승하였고 오미자 메탄올 추출액은 상승한 AST, ALT 및 LDH의 활성도를 B(a)P 단독투여군에 비해 각각 약 29%, 41% 및 15% 정도 유의하게 감소시켰다. 또한 ALP의 활성도도 정상수준까지는 아니나 상당히 감소시켰다. 간조직중의 TG와 TC함량은 B(a)P의 투여로 유의하게 증가하였고 HDL-cholesterol함량은 유의성있게 감소하였다. HDL-cholesterol함량의 경

우 B(a)P 투여로 인해 정상군의 약 59%수준으로 현저히 감소하였으나 오미자 메탄올 추출액의 투여로 약 32% 정도 상승하였다. 또한 B(a)P 투여로 인해 상승한 TG와 TC함량도 오미자 메탄올 추출액의 투여로 각각 약 50%와 약 23% 정도 유의하게 감소하였다. 따라서 오미자 메탄올 추출액은 B(a)P의 투여로 인해 변화된 혈청의 효소 활성도와 지질함량을 유의성있게 회복시킴을 알 수 있다.

2. 간조직중의 효소 활성도와 지질 함량 변화

간조직중의 효소 활성도와 지질 함량 변화는 Table 5, 6과 같다. ALP를 제외한 다른 효소들은 실험군들 간에 유의적인 차이가 없었다. ALP의 활성은 B(a)P의 투여로 유의성있게 상승하였으나 오미자 메탄올 추출액이 상승한 ALP의 활성도를 약 28% 정도 감소시키므로써 거의 정상수준으로 회복되었다. 간조직중의 TC와 TG함량도 또한 B(a)P의 투여로 인하여 정상군에 비해 각각 약 45%와 약 50% 정도 증가하였고 오미자 메탄올 추출액의 투여는 B(a)P으로 인한 이러한 상승을 유의성있게 감소시켜 TC와 TG함량을 각각 B(a)P 단독투여군의 약 61%와 약 44% 수준으로 현저하게 감소시켰다.

이상의 결과는 오미자가 간장의 지질축적을 방지하고¹⁵⁾ 알콜투여로 인해 상승한 GOT, GPT

Table 4. The Effect of omija MeOH extract on the serum lipid contents in B(a)P treated rats

Group	Serum		
	HDL-cholesterol (mg/dl)	Total cholesterol (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)
I	26.05±2.55 ^a	60.00±7.26 ^a	70.94±8.55 ^a
II	15.41±2.00 ^b	91.05±7.35 ^b	139.18±13.64 ^b
III	20.88±2.06 ^a	64.82±6.00 ^a	80.85±12.95 ^a
IV	20.27±2.44 ^a	70.19±5.98 ^a	69.67±5.61 ^a

※ Values with a common superscript letter within the same column are not significantly different (p<0.05, n=5).

I : This group was not treated with omija extract and B(a)P.

II : This group was treated with B(a)P.

III : This group was treated with omija extract.

IV : This group was treated with omija extract and B(a)P.

Table 5. The Effect of omija MeOH extract on the liver enzyme activities in B(a)P treated rats

Group	Liver			
	AST(x10 ³) (K. unit/g)	ALT(x10 ³) (K. unit/g)	ALP (K.A unit/g)	LDH(x10 ³) (B.B. unit/g)
I	50.00± 8.04 ^a	21.30± 3.18 ^a	10.85± 3.41 ^a	20.05± 0.43a
II	54.70± 4.66 ^a	22.73± 2.20 ^a	17.50± 2.55b	19.98± 0.55 ^a
III	52.00± 7.52 ^a	23.93± 2.68a	12.06± 1.26 ^a	20.26± 0.31 ^a
IV	49.38± 4.35 ^a	21.80± 2.08 ^a	12.58± 0.75 ^a	20.33± 0.33 ^a

※ Values with a common superscript letter within the same column are not significantly different(p<0.05, n=5).
 I : This group was not treated with omija extract and B(a)P. K. unit/g : Karmen unit/g.
 II : This group was treated with B(a)P. K.A. unit/g : King-Armstrong unit/g.
 III : This group was treated with omija extract. B.B. unit/g : Berga-Broid unit/g.
 IV : This group was treated with omija extract and B(a)P.

및 LDH의 활성도를 감소시킨다⁶⁾는 결과와 일치하는 것이다.

Table 6. The Effect of omija MeOH extract on the liver lipid contents in B(a)P treated rats

Group	Liver	
	Total cholesterol (mg/g)	Triglyceride (mg/g)
I	7.82± 0.63 ^a	22.23± 3.13 ^a
II	14.12± 0.93 ^b	44.95± 2.82 ^b
III	8.38± 0.47 ^a	18.82± 2.75 ^a
IV	8.55± 0.29 ^a	19.84± 2.27 ^a

※ Values with a common superscript letter within the same column are not significantly different (p<0.05, n=5).
 I : This group was not treated with omija extract and B(a)P.
 II : This group was treated with B(a)P.
 III : This group was treated with omija extract.
 IV : This group was treated with omija extract and B(a)P.

간기능을 개선시키는 시료들에 대한 검색방법으로는 *in vivo* 분석과 *in vitro* 분석이 있으며 *in vitro* 분석법으로는 생체조절물질인 nitric oxide를 분비하는 endothelial cell이나 생리활성물질의 90% 이상을 대사시키는 주요장기인 간세포를 분리, 배양하여 세포수, 효소 활성도,

DNA함량 또는 세포의 증식능 및 생존율을 측정하는 방법 등^{16,17)}이 이용되고 있다. *In vitro* 분석은 많은 sample을 동시에 저렴한 비용으로 screening할 수 있으므로 천연물질의 분획 추출물 및 성분의 1차적인 screening에 매우 적합하다¹⁸⁾. 그러나 *in vitro* 분석과 *in vivo* 분석의 결과가 완전히 일치하지는 않으므로 이 두가지를 동시에 실시하는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

본 실험에서 간장해 유발물질로 사용한 B(a)P은 간조직의 효소계를 손상시키거나 파괴시킨다고 알려져 있다^{16,20)}. *In vitro*와 *in vivo* 실험의 결과 B(a)P은 혈청 효소 활성도와 혈청 지질 함량을 증가시킬 뿐만 아니라 간조직중의 지질 함량을 증가시켰으며 이러한 변화들은 오미자 메탄올 추출액의 투여로 정상수준으로 회복되었는데 이는 오미자 메탄올 추출액이 B(a)P의 막손상, 조직괴사 등과 같은 세포의 손상 메카니즘에 대해 방어작용을 하여 간세포의 기능을 유지하고 촉진시킨 결과로 사료된다. 지금까지 알려진 오미자의 간기능 보호효과는 주로 오미자의 lignan 성분인 gomisin A, B, C 및 schizandrin 등에 의한 것으로 알려져 있는데^{21,23)} 본 연구 결과 quaternary alkaloids와 N-oxide가 함유되어있는 오미자 메탄올 추출액도 간기능 보호효과를 갖는 것으로 나타나 이에 대한 좀 더 세부적인 연구가 수행되어야 할 것으로 생각된다.

요 약

오미자 메탄올 추출액이 B(a)P으로 인해 유발된 간장장애에 미치는 영향을 알아보기 위해 흰쥐에게 1주일간 오미자 메탄올 추출액(0.1 g/kg body weight)을 1일 1회 경구투여하고 B(a)P(0.1 mg/kg body weight)을 오미자 추출액을 투여한 마지막 날에 1회 복강주사하여 효소 활성도와 지질함량 변화를 측정하고 MTT assay를 수행한 결과는 다음과 같다. In vitro와 in vivo 실험에서 B(a)P은 간세포 및 간조직에 현저한 독성을 나타내었으며 오미자 메탄올 추출액은 B(a)P으로 인한 세포독성을 정상수준으로 유의성있게 회복시켰다. 이러한 오미자 메탄올 추출액의 간보호효과는 B(a)P에 의한 간세포의 손상 메카니즘에 대해 오미자 추출액이 방어작용을 하여 간세포의 기능을 유지, 촉진시킨 결과라고 사료된다.

참 고 문 헌

1. 이정숙, 이성우. 오미자의 부위별 유리당, 지질과 비휘발성 유기산 조성에 관한 연구, 한국식문화학회지, 4(2) : 177, 1989.
2. 이정숙, 이미경, 이성우. 오미자의 부위별 일반성분과 무기질함량에 관한 연구, 한국식문화학회지, 4(2) : 173, 1989.
3. 이정숙, 이성우. 오미자의 부위별 총 아미노산과 유리 아미노산 조성에 관한 연구, 한국식문화학회지, 4(2) : 181, 1989.
4. 오상룡, 김성수, 민병용, 정동효. 구기자, 당귀, 오미자, 오갈피 추출물의 유리당, 유리아미노산, 유기산 및 타닌의 조성, 한국식품과학회지, 22(1) : 76, 1990.
5. 강찬규, 박재한, 백상봉, 진홍승, 이규순. 반응표면 방법에 의한 오미자 음료제조 최적화, 한국식품과학회지, 24(1) : 74, 1992.
6. 이정숙, 이성우. 오미자 열매의 물추출물이 알콜대사에 미치는 효과, 한국식문화학회지, 5(2) : 259, 1990.
7. Lui, K. T. and Lesca, P., Pharmacological properties of dibenzo(a, c)cyclooctene derivatives isolated from Fructus Schizandrae chinensis III : Inhibitory effects on carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation, metabolism and covalent binding of carbon tetrachloride to lipids, Chem. Biol. Interaction, 41, 39, 1982.
8. 서화중, 이명렬, 황경숙. 오미자 추출물이 alloxan 부하가토의 혈청성분에 미치는 영향, 한국영양학회지, 16(4) : 262, 1989.
9. Woodson, R. D. and Cahill, K. M., Viral hepatitis abroad, *The J. Ame. Med. Asso.*, 219(9) : 1191, 1972.
10. 윤수홍, 조수열, 한성호. 천연자원의 간기능 보호효과에 관한 연구 : Benzo(a)pyrene에 의해 유도된 간기능 장애에 미치는 길경의 효과, 환경위생연구, 2(1) : 123, 1992.
11. 윤수홍, 이승애, 박은주, 이주영. 천연자원의 간기능 보호효과에 관한 연구 : Benzo(a)pyrene에 의해 유도된 간기능 장애에 미치는 강활의 효과, 환경위생연구, 2(1) : 131, 1992.
12. 이윤경. 갈근 메탄올 엑기스가 흰쥐에 있어서 benzo(a)pyrene에 의해 유도된 간장장애에 미치는 영향, 동아시아식생활학회지, 4(2) : 59, 1994.
13. Folch, J., Mee, L. and Stanley, G. S. H., A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue, *J. Biol. Chem.*, 226, 497, 1957.
14. Mosmann, T., Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Method*, 65, 55, 1983.
15. 육창수, 심재호, 류기욱, 김형근, 남준형. 한약학II, 광명의학사, 서울, 394, 1992.
16. Kiso, Y., Tohkin, M. and Hikino, H., Assay method for antihepatotoxic activity using carbon tetrachloride-induced cytotoxicity in primary cultured hepatocytes, *Planta Med.*, 49, 222, 1983.
17. Michel, J., Alain, R. Hacques, F., Francois,

- M. and Pierre, D. Tert-butylhydroperoxide-induced injury in isolated rat hepatocytes : A model for studying antihepatotoxic crude drugs, *Planta Med.*, 56, 171, 1990.
18. Kiso, Y., Tohkin, M. and Hikino, H. Assay method for antihepatotoxic activity using galactosamine-induced cytotoxicity in primary cultured hepatocytes, *J. Natural Pro.*, 46(6) : 841, 1983.
 19. Okey, A. B., Duba, A. W. and Volla, L. M., Binding of benzo(a)pyrene and diben(a, h)anthracene to the Ah receptor in mouse and rat hepatic cytosol, *Cancer*, 44, 1426, 1984.
 20. 김영민. 독성학, 강담사, 서울, 249, 1984.
 21. Maeda, S., Sudo, K., Miyamoto, Y., Takeda, S., Shinbo, M., Aburada, M., Ikeya, Y., Taguchi, H. and Harada, M.. Pharmacological studies on Schizandra Fruits II : Effects of constituents of Schizandra Fruits on drugs induced hepatic damage in rats, *Yakugaku Zasshi*, 102(6) : 579, 1982.
 22. Kiso, Y., Tohkin, M. Hikino, H., Ikeya, Y. and Taguchi, H., Mechanism of anti-hepatotoxic activity of wuweizisu C and gomisin A, *Planta Med.*, 4, 331, 1985.
 23. Hikino, H., Kiso, Y., Taguchi, H. and Ikeya, Y., antihepatotoxic actions of lignans from Schizandra chinensis fruits, *Planta Med.*, 50, 213, 1984.