

## 알콜유도 지질과산화에 미치는 어성초 영향

康 坼 林

大田大學校 韓醫科大學

### Effect of *Houttuynia cordata* on EtOH-induced Lipidperoxidation in Rat.

Tak Lim Kang

*College of Oriental Medicine, Taejon University*

#### ABSTRACT

The antilipidperoxidative and hepatopreventive effects of *Houttuynia cordata* extract(HCE) were investigated at the level of liver homogenates and serum of SD rats intoxicated EtOH(3g/kg for 3days). We measured MDA(malondialdehyde) in the liver homogenate, AST(1-aspartate-2-oxoglutarate aminotransferase) and ALT( 1-alanine-2-oxoglutarate aminotransferase) in the serum. The analysis of the measurement indicated that HCE reduced MDA, ALT and AST significantly and their reduction was in relation to dose dependence. In rat liver homogenate intoxicated with EtOH, HCE treatment group inhibited lipidperoxidation by 50-75%. In rat serum intoxicated EtOH, HCE inhibited AST and ALT by 40-70%.

#### I. 서 론

과산화지질은 불포화지방산이 Free radical로 활성화되어 산소와 반응하여 형성되며 생체내에서의 지질과산화현상은 주로 mitochondria, microsome, 적혈구, 혈소판등의 생체막에서 일어난다(1,2). 과산화지질의 생성원인은 radiation(X-ray, ultraviolet, visible, ionization) 및 전이금속등에 의해 생성되고 효소적으로는 NADPH-cytochrome P450 reductase와 Cytochrome P450계의 활성화로 생성된 free radical을 통해서 생성되는데(5,9), 이 것은 생체내의 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase 및 항산화제에 의해서 억제되거나 hydroxy acid 등으로 분해된다(3-6). 알콜에 의해 생성이 증가된다고 보고된 과산화지질은 여러 가지 질병을 유발 할 수 있다고 보고되고 있다(7,10). 급성간염, alcohol성 지방간과 과

산화지질 생성에는 합수관계가 있으며, 심근경색, 뇌경색, 뇌출혈등의 혈행장애 환자 및 간질성 폐렴, 만성관절염, 류마티즘, 피부병 및 당뇨병 상태에서도 과산화지질 생성이 증가하여 이와 같은 질병과 밀접한 관련이 있는 것으로 알려져 있다(15-20). 또한, 과산화지질은 세포의 노화원인으로도 작용하여 혈중의 각종 효소 및 lipoprotein과 같은 성분의 변성을 촉진하는 것으로 보고되고 있다(10). 어성초는 淸熱解毒, 利尿消腫의 작용이 있어 예로부터 肺炎, 膿瘍, 脫肛, 水腫, 濕疹, 熱痢 등을 치료할 목적으로 사용되었다(11). 어성초에서는 다양한 생리활성 물질이 분리되었는데, 정유성분으로 beta-myrcene, beta-pinene, geraniol, linalool, o-cresol, p-cresol, decanoylacetaldehyde, 1-decanol등이 보고되었으며, methylnonnylketone, 3-ketodecanol, oscimene, methylauylsulfide등의 volatile물질, 기타 flavonoid 성분등이 보고되었다(12). 어성초 성분은 다양한 생리활성을 나타내는데, decanoylacetate에 의한 항균작용, 항염증작용, 지통, 해열작용, 항균작용등이 보고되었다(13-15). 저자는 어성초가 flavonoid를 비롯한 다양한 활성물질이 함유된 보고를 기초로 알콜로 유도된 간장해를 비롯한 지질과산화를 억제할 수 있을 것으로 판단하고 연구를 수행하였다.

## II. 실험 방법

### 1. 실험동물

Sprague-Dawley 웅성랫드(체중 200g 내외)를 대한실험동물센터에서 구입하여 1주일간 사육장에 적응시킨 후 사용하였다. 사육장의 조명은 인공적으로 오전 7:00 부터 오후 7:00 까지 12시간으로 조정하였으며, 온도는 22C, 습도는 55%로 조절하였다. 사료는 고품사료를 사용하였으며 식용수는 수도물을 사용하였고 제한하지 않고 공급하였다.

### 2. 어성초의 추출 및 분획

어성초 200g을 추출조에 넣고 70% MeOH로 6시간 이상 환류 추출한 후, 온시 여과하여 얻은 여액을 Evaporator를 이용하여 감압건조하였다. 건조한 내용물을 증류수에 현탁시킨 다음 Ethylacetate로 추출하고 다시 BuOH로 추출하여 Ethylacetate층과 BuOH층, 수층으로 각각 나누어 증발 건조시켰다. 이중 수층을 실험에 사용하였다.

### 3. 약물투여

실험군은 정상군(N), EtOH 투여 대조군(C), 고용량(100mg/kg)의 어성초추출물 물분획과 EtOH 투여군(H), 저용량(50mg/kg)의 어성초추출물 물분획과 EtOH 투여군(L)으로 나누었다. 어성초추출물 물분획은 EtOH 투여 3일전부터 1일 1회 경구투여하고, 3일간은 EtOH 투여 30분전에 투여하였다. EtOH 1회 투여 용량은 3g/kg P.O. 이었으며, 마지막 투여 45분 후에 처사시켰다.

### 4. 채혈 및 각종 장기 중량 측정

마지막 EtOH 투여 후 45분에 ethylether로 가볍게 마취한 다음, 심장으로 부터 채혈하였다. 채혈 즉시, 단독 치사시켜 뇌를 적출하고, 간장, 비장, 신장, 흉선, 췌장, 심장, 고환을 차례로 적출 하였다. 적출한 장기는 찬 생리식염수로 세척한 후 여과지로 수분과 혈액 및 기타 부저 물질을 제거한 다음 칭량하였으며, 즉시  $-80^{\circ}\text{C}$ 에 냉동 보관하였다. 혈액은 ethylether로 마취한 랫드의 심장에서 채취하고 실온에서 30분간 방치하여 응고시킨 다음 3000rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 얻었다.

## 5. 혈청 transaminase 활성도 측정

혈청중의 AST 및 ALT는 생화학적 kit(Asan Pharm. Co.)를 사용하여 측정하였다. 즉, AST(100 ml에 L-aspartic acid 2.60 mg, ketoglutaric acid 29.2 mg 함유) 및 ALT(100 ml에 D,L-alanine 1.78mg 및 ketoglutaric acid 29.2 mg 함유) 기질액 1.0ml를 37C에서 AST는 60분, ALT는 30분간 반응시킨 후 정색시약(100 ml에 2,4-dinitrophenylhydrazine 19.8 mg 함유) 1.0ml를 가해 반응을 종료시킨 후, 0.4N NaOH 용액 10ml 가하여 잘 혼화하고 10분간 방치한 다음, 505nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성은 혈청 1ml당 karmen unit로 표시하였다.

## 6. 장기 적출 및 지질과산화 측정

Tissue slice를 무게를 측정하여 5배(w/v)용량의 1/20M Phosphate buffered saline (PBS, pH 7.0)을 가하여 Polytron homogenizer를 이용하여 homogenation 시켰다. homogenate 0.5 ml에 7% sodium dodecyl sulfate(SDS) 용액 0.4ml를 가하고 37 °C에서 30분 동안 incubation 시키고, trichloroacetic acid를 가하여 단백질을 침전시켰다. 3,000 rpm에서 10 분간 원심분리한 후 상등액을 얻어 thiobarbituric acid (0.67 % in M HCl solution)를 가하여 100 °C에서 20 분간 반응시킨 후, 535 nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 7. 통계학적 분석

실험군 간의 유의성은 student's t-test에 의해 통계적으로 분석하였다.

## 8. 결과 및 고찰

### 1) 장기 무게변화에 미치는 영향

EtOH를 마지막으로 투여하고 45분후에 단독 치사시켜 뇌를 적출하고, 간장, 비장, 신장, 흉선, 췌장, 심장, 고환을 차례로 적출 한 다음, 생리식염수로 세척한 후 여과지로 수분과 혈액 및 기타 부착물질을 제거한 다음 칭량하였다. 3일간 3g/kg씩 경구 투여한 결과, 장기 무게에는 큰 변화를 유발하지 않았으며, 어성초 수층을 투여한 경우에도 별다른 차이를 나타내지 못했다(Table I).

### 2) EtOH에 의한 각 장기 homogenate의 MDA 생성에 미치는 영향

EtOH를 투여할 경우 지질의 과산화가 진행되는 것이 각장기에서 관찰되었다. SD rat에 ethanol을 3g/kg씩 3일간 투여한 경우는 심장, 이자, 신장, 고환에서 각각 지질과산화가 유의적으로 증가하였으며, 부신, 뇌, 비장, 신장에서는 별다른 영향을 미치지 못했다. 심장의 경우,

EtOH투여가 약 50%의 MDA 생성 증가를 보였으며, 어성초 고용량 투여군은 증가된 과산화 지질을 약 35% 정도의 억제 효과를 나타내었다. 신장의 경우, EtOH가 지질과산화를 약 27% 증가시켰으며, 어성초 추출물의 수층투여 군은 약 52% 억제 효과를 보였다. 고환에서도 EtOH 투여에 의해 유사한 과산화지질 생성 증가가 나타났으며, 어성초 추출물 수층은 이를 억제 하였다. EtOH 투여에 의한 각장기의 막손상과 관련이 있는 지질과산화 반응은 아직까지 명확하게 밝혀지지 않았지만, 전반적인 세포노화와 지질과산화 생성은 상관성이 인정되고 있다(21-25). 따라서, 어성초가 지질과산화를 억제하여 free radical에 의한 세포손상을 억제할 수 있을 것으로 사료된다.

### 3) 혈청중의 GOT, GPT에 미치는 영향

알콜을 투여한 랫드의 혈청중 GOT, GPT는 Fig.1, Fig.2 에 나타난 바와 같이 증가하였다. 정상군은 GOT  $99.8 \pm 3.3$  u/ml, GPT  $61.7 \pm 0.7$  u/ml 인데 비하여 EtOH 투여군은 GOT  $117.6 \pm 2.4$  u/ml, GPT  $78.7 \pm 1.9$  u/ml로 나타났다. HCE 100mg/kg 투여군은 GOT  $108.5 \pm 1.1$  u/ml, GPT  $68.2 \pm 1.3$  u/ml 로 감소 현상을 보였고, HCE 200mg/kg을 전처리한 랫드의 경우는 GOT  $106.7 \pm 3.0$  u/ml, GPT  $65.3 \pm 0.6$  u/ml로 HCE 투여용량이 증가할수록 억제 경향이 강하였다. 간독성을 유발하는 물질은 CCl<sub>4</sub>, thioacetamide, diethyl-nitrosamin, alcohol등이 알려져 있으며, 모두 실험동물에 투여후 GOT, GPT치의 상승을 보였다(4,6). 본 실험에서도 EtOH의 투여로 GOT, GPT상승이 유발되었으며, HCE 수층은 이를 억제하였다.

### 4) Liver homogenate의 lipidperoxidation에 미치는 영향

EtOH에 의한 간 homogenate의 과산화지질 생성에 미치는 HCE의 영향은 Table V와 같다. EtOH를 전처리한 랫드의 간 homogenate에서의 과산화지질 생성은 증가하였다. 랫드에 EtOH를 3 g/kg의 용량으로 3일간 연속으로 투여한 경우, 지질막 과산화 결과 생성되는 MDA양이  $6.84 \pm 0.082$  nmol/g tissue로서 정상군 MDA양  $4.26 \pm 0.062$  nmol/g tissue 보다 약 60% 정도 증가하였다. HCE 100 mg/kg을 투여한 경우 MDA  $5.43 \pm 0.056$  nmol/g tissue, 200 mg/kg을 투여한 경우  $4.82 \pm 0.068$  nmol/g tissue로서 EtOH에 의해 증가된 MDA 생성을 약 50-75% 억제하였다. EtOH에 의한 간에서의 과산화지질생성의 기전은 아직 명확히 밝혀지지 않았지만, EtOH가 간에서 대사되는 과정에서 생성되는 acetaldehyde의 작용으로 free radical을 생성하는 세포의 활성이 증가하고 이와 함께 GSH 함량을 비롯한 항산화작용 물질의 함량이 감소한다(26-27). 또한, Kuffer cell, endothelial cell, neutrophil등이 관여하는 신호전달이 존재할 것이라는 보고들이 있으며, retinoic acid 대사에 관련이 있는 효소계에 알콜이 영향을 미치는 것과 함께 과산화지질이 초기 간경변을 유발하는 것으로 보고되어 있다. 알콜성 초기 간경변은 세포가 과산화지질의 작용으로 파괴된 것을 복구하는 과정의 일부로서 나타날 수 있다는 점을 고려해 보면 과산화지질의 생성을 억제하는 것은 매우 중요한 일이 될 것이다.

실험 결과, 어성초 추출물의 수층분획은 EtOH 유도 간 상해 및 다른 장기의 손상도 보호할 수 있을 것으로 사료되었다. 세포 손상은 다양한 기전에 의해서 나타날 수 있다. 어성초는 세포막의 지질과산화를 억제하여 세포보호 작용을 나타내는 것으로 판단된다.

### Ⅲ. 참고 문헌

1. Kowaltski, A.J., Castilho, R.F., Grijalba, M.T., Bechara, E.J., Vercesi, A.E., Effect of inorganic phosphate concentration on the nature of inner mitochondrial membrane alterations mediated by Ca ions. A proposed model for phosphate-stimulated lipid peroxidation. *J. Biol. Chem.*, 271, 2929-34, 1996
2. Riedl, A., Anderton, M., Shamsi, Z., Goldfarb, P., Wiseman, A., Structural modulation of lipidperoxidation by the proteins within membranes: model protein studies with liposomes. *Biochem. Soc. Trans.*, 23, 251S, 1995
3. Schmitz, S., Thomas, P.D., Allen, T.M., Pozmansky, M.J., Jimbow, K., Dual role of melanins and melanin precursors as photoprotective and phototoxic agents: inhibition of ultraviolet radiation-induced lipid peroxidation. *Photochem. Photobiol.*, 61, 650-5, 1995
4. Tien, M., Morehouse, L.A., Bucher, J.R., Aust, S.D., The multiple effects of ethylenediaminetetraacetate in several model lipid peroxidation systems. *Arch. Biochem. Biophys.* 218, 450-8, 1982
5. Yang, M.X., Cederbaum, A.I., Role of cytochrome b5 in NADH-dependent microsomal reduction of ferric complexes, lipid peroxidation, and hydrogen peroxide generation. *Arch. Biochem. Biophys.* 324, 282-92, 1995
6. Wendel, A., Feuerstein, S., Drug-induced lipid peroxidation in mice-I. Modulation by monooxygenase activity, glutathione and selenium status. *Biochem. pharmacol.* 30, 2513-20, 1981
7. Suematsu, T., Kamada, T., Abe, H., Kikuchi, S., Yagi, K., Serum lipidperoxide level in patients suffering from liver diseases. *Clin. Chim. Acta.* 79, 267-70, 1997
8. Cederbaum, A. I., Becker, F.F., Rubin, E., Ethanol metabolism by a transplantable hepatocellular carcinoma. Role of microsomes and mitochondria. *J. Biol. Chem.* 251, 5366-74, 1976
9. Azri, S., Mata, H.P., Gandolfi, A.J., Brendel, K., CCl4-induced cytochrome p-450 loss and lipid peroxidation in rat liver slices. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 283, 669-74, 1991
10. Bevez, V.P., Panchisina, M.V., Age-related blood lipid levels in healthy persons and rheumatism patients. *Vopr. Revm.* 2, 59-61, 1981
11. 中藥大辭典, p1920-1922, 新文豐出版公司
12. 龜岡, 三宅: 日化 No6, 1157, 1972

13. Suzuki et al., *Yakukaku zasshi*, 72, 1277, 1952
14. Sugaya et al., *Applied Pharmacology*, 30, 403, 1985
15. 곽재욱, 권창호, *경희약대논문집*, 16, 137, 1989
16. Soto, C., Muriel, P., Reyes, J.L., Pancreatic lipid peroxidation in alloxan induced diabetes mellitus. *Arch. Med. Res.* 25, 377-80, 1994
17. Cederbaum, A.I., Organic hydroperoxide-dependent oxidation of ethanol by microsomes: lack of a role for free hydroxyl radicals. *Arch. Biochem. Biophys.* 227, 329-38, 1983
18. Yamada, K., Fukushima, T., Mechanism of cytotoxicity of paraquat II. Organic specificity of paraquat-stimulated lipid peroxidation in the inner membrane of mitochondria. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 45, 375-80, 1993
19. Clark, D.L., Queener, S.F., Effect of diabetes mellitus on  $\Delta^6$  fatty acid activation and desaturation. *Biochem. Pharmacol.*, 34, 4305-10, 1985
20. Gelhorn, A., Benjamin, W., The effect of insulin on monounsaturated fatty acid synthesis in diabetic rats. The stability of the informational RNA and of the enzyme system concerned with fatty acid desaturation. *Biochim. Biophys. Acta*, 116, 460-6, 1966
21. Noller, D.C., *Chemistry of organic compounds*, 3rd ed. (Philadelphia) p561, 1966
22. Liebler, D.C., Burr, J.A., Antioxidant stoichiometry and the oxidative fate of vitamin E in peroxy radical scavenging reactions. *Lipids* 30, 789-93, 1995
23. Woods, J.A., Knauer, T.E., Lamb, R.G., The acute effects of streptozotocin-induced diabetes on rat liver glycerolipid biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* 666, 482-92, 1981
24. R.O. Pihl and David Lemarquand, Serotonin and aggression and the alcohol-aggression relationship. *Alc. Alcoholism* 33,55-65,1998
25. H.G. Brunner, M. H. Nellen, X.G. Breakfield, H.H. Ropers, B.A. Oost, Abnormal behavior associated with a point mutation in the structural gene for monoamine oxidase A. *Science* 262, 578-580, 1993.
26. J.T. Coyle, P.Putfarken, Oxidative stress, glutamate and neurodegenerative disorders. *Science* 262, 689-695, 1993.
27. W.R. Markesbery, Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Rad. Biol. Med.* 23, 134-147, 1997.

Table I. Weight of various organs.

	liver	spleen	kidney	adrenal gland
Normal	6.10 ± 0.33	0.73 ± 0.08	0.76 ± 0.04	0.02 ± 0.002
Control	6.59 ± 0.37	0.80 ± 0.08	0.81 ± 0.04	0.03 ± 0.002
HCEL	6.45 ± 0.34	0.70 ± 0.06	0.77 ± 0.03	0.03 ± 0.003
HCEH	6.41 ± 0.38	0.69 ± 0.07	0.79 ± 0.04	0.02 ± 0.002

All data are the means ± SEM of 8 rats.

\*=p<0.05 vs Control group (by Student's t-test)

Normal : saline treatment group

Control: EtOH treatment group

HCEL : HCE(100mg/kg, P.O. for 3days) and EtOH treatment group

HCEH : HCE(200mg/kg, P.O for 3days) and EtOH treatment group

Table II Weight of various organs.

	pancreas	testis	heart	thymus
Normal	0.55 ± 0.05	1.29 ± 0.06	0.77 ± 0.02	0.45 ± 0.04
Control	0.69 ± 0.06	1.20 ± 0.07	0.84 ± 0.04	0.66 ± 0.08
HCEL	0.63 ± 0.04	1.39 ± 0.06	0.87 ± 0.04	0.47 ± 0.04
HCEH	0.62 ± 0.04	1.20 ± 0.06	0.83 ± 0.02	0.49 ± 0.04

All data are the means ± SEM of 8 rats.

\*=p<0.05 vs Control group (by Student's t-test)

Normal : saline treatment group

Control: EtOH treatment group

HCEL : HCE(100mg/kg, P.O. for 3days) and EtOH treatment group

HCEH : HCE(200mg/kg, P.O for 3days) and EtOH treatment group

Table III Lipid peroxidation in various organs of HCE-treated rats. (MDA nmol/g tissue)

group	Heart	Adrenal gland	Pancrease	Kidney
Normal	2.42 ± 0.03*	3.44 ± 0.036	3.29 ± 0.052*	6.33 ± 0.052*
Control	3.36 ± 0.06	3.43 ± 0.094	3.52 ± 0.06	7.90 ± 0.128
HCEL	3.16 ± 0.04*	3.41 ± 0.068	3.38 ± 0.036*	7.38 ± 0.044*
HCEH	3.11 ± 0.09*	3.38 ± 0.081	3.36 ± 0.056*	8.93 ± 0.064*

All data are the means ± SEM of 8 rats.

\*=p<0.05 vs Control group (by Student's t-test)

Normal : saline treatment group

Control: EtOH treatment group

HCEL : HCE(100mg/kg, P.O. for 3days) and EtOH treatment group

HCEH : HCE(200mg/kg, P.O for 3days) and EtOH treatment group

Table IV Lipid peroxidation in various organs of HCE-treated rats. (MDA nmol/g tissue)

group	Brain	Testis	Spleen	Thymus
Normal	3.22 ± 0.046	3.24 ± 0.036*	3.68 ± 0.036	3.66 ± 0.050
Control	3.18 ± 0.053	3.55 ± 0.052	3.70 ± 0.092	3.68 ± 0.054
HCEL	3.09 ± 0.091	3.53 ± 0.072	3.67 ± 0.052	3.56 ± 0.052
HCEH	3.20 ± 0.056	3.37 ± 0.036*	3.65 ± 0.084	3.62 ± 0.068

All data are the means ± SEM of 8 rats.

\*=p<0.05 vs Control group (by Student's t-test)

Normal : saline treatment group

Control: EtOH treatment group

HCEL : HCE(100mg/kg, P.O. for 3days) and EtOH treatment group

HCEH : HCE(200mg/kg, P.O for 3days) and EtOH treatment group

Table V. Antilipidperoxidative effect of HCE on the liver homogenate of EtOH -treated rats..

	Normal	Control	HCEL	HCEH
MDA(nmol/g)	4.26 ± 0.062*	6.84 ± 0.082	5.43 ± 0.056*	4.82 ± 0.086*

All data are the means ± SEM of 8 rats.

\*=p<0.05 vs Control group (by Student's t-test)

Normal : saline treatment group

Control: EtOH treatment group

HCEL : HCE(100mg/kg, P.O. for 3days) and EtOH treatment group

HCEH : HCE(200mg/kg, P.O for 3days) and EtOH treatment group



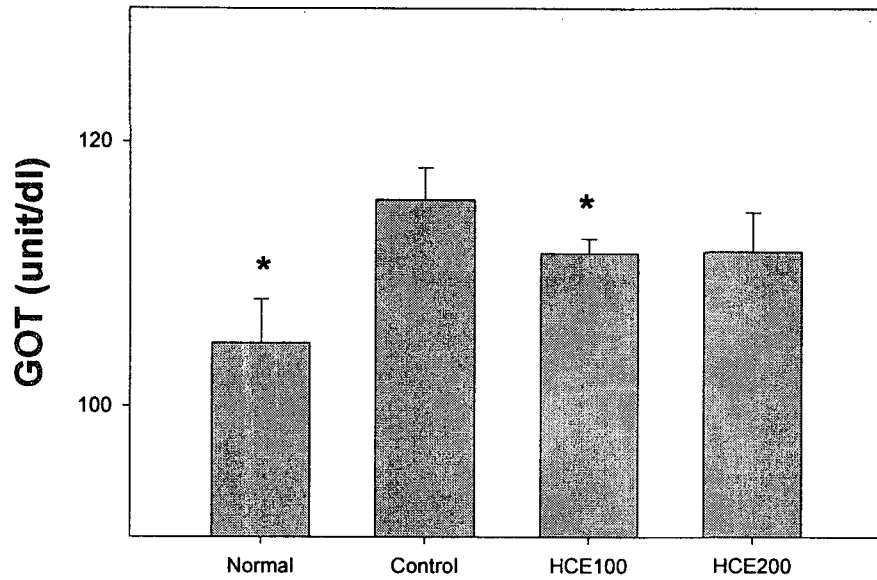


Fig .1 Hepatopreventive effect of HCE on the serum of EtOH-treated rats.

All data are the means  $\pm$  SEM of 8 rats.

\*= $p < 0.05$  vs Control group (by Student's t-test)

Normal : saline treatment group

Control : EtOH treatment group

HCE100: HCE(100mg/kg, P.O. for 3days) and EtOH treatment group

HCE200: (200mg/kg, P.O for 3days) and EtOH treatment group

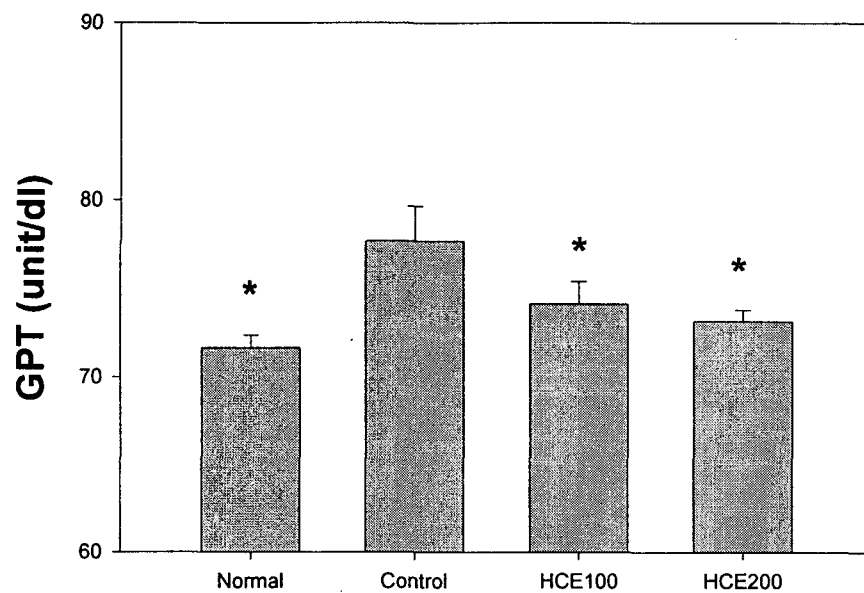


Fig. 2 Hepatopreventive effect of HCE on the serum of EtOH-treated rats

All data are the means  $\pm$  SEM of 8 rats.

\*= $p < 0.05$  vs Control group (by Student's t-test)

Normal : saline treatment group

Control : EtOH treatment group

HCE100: HCE(100mg/kg, P.O. for 3days) and EtOH treatment group

HCE200: (200mg/kg, P.O for 3days) and EtOH treatment group