

결명자 에탄올추출물이 알코올 투여 흰쥐의 항산화물질 및 지질대사에 미치는 영향

최현숙 · 차선숙 · 나명순 · 신길만* · 이명렬†

조선대학교 식품영양학과

*순천대학교 조리과학과

Effect of the Ethanol Extract of *Cassia tora* L. on Antioxidative Compounds and Lipid metabolism in Hepatotoxicity of Rats-induced by Ethanol

Hyun-Sook Choi, Sun-Sook Cha, Myung-Soon Na, Kil-Man Shin* and Myung-Yul Lee†

Dept. of Food and Nutrition, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea

*Dept. of Food and Cooking Science, Suncheon National University, Suncheon 540-742, Korea

Abstract

This study was done to investigate the effects of ethanol extract of Cassia semen (*Cassia tora* L.) on the activities of hepatic oxygen free radicals metabolizing enzymes and blood lipid profile in rats of hepatotoxicity induced by ethanol. Sprague-Dawley male rats weighing 100~160 g were divided into 5 groups; control group (CON), Cassia semen ethanol extracts (200 mg/kg) treated group (CEL), ethanol (10 mL/kg, 35%) treated group (ETH), Cassia semen ethanol extracts (200 mg/kg) and ethanol treated group (CE1) and Cassia semen ethanol extracts (400 mg/kg) and ethanol treated group (CE2), respectively. Compared with ETH, the growth rate of CE1 and CE2 were to be increased tendency, and in blood levels of total cholesterol, LDL-cholesterol and the activities of alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase elevated by ethanol were significantly decreased ($p < 0.05$). It was observed that the activities of superoxide dismutase, catalase, xanthine oxidase and glutathione peroxidase of rat liver increased by ethanol, were more decreased by the treatment of Cassia semen ethanol extract than the only ethanol-treated group. The content of glutathione depleted by ethanol treatment was increased in CE1 and CE2. TBA-reactants of liver increased by ethanol were decreased in CE1 and CE2, compared with ethanol-treated group. These results suggested that ethanol extract of Cassia semen may influence upon the ability of oxygen free radical detoxication and lowering of blood lipid level on ethanol-induced hepatotoxicity in rat.

Key words: oxygen free radicals, hepatotoxicity, TBA-reactants

서 론

콩과(Leguminosae)에 속하는 결명(*Cassia tora* L.) 및 초결명(*Cassia obtusifolia*)은 1년생 초본으로 북아메리카가 원산지이며 우리나라의 따뜻한 남쪽지방의 산야 각지에서 재배되고 있다(1). 예로부터 민가에서는 결명의 부드러운 잎은 식용으로 이용되기도 하였으며 줄기는 민간요법으로 이용되기도 하였다. 건조한 종자를 결명자(決明子, Cassia semen)(2)라고 하며, 약용으로는 주로 청간, 풍열, 통변, 살균작용, 급성 결막염과 시신경 및 망막위축에 의한 시력감퇴의 예방, 콜레스테롤저하작용, 이뇨작용, 항균작용, 완하작용, 각종 부인병, 방광염, 심장병, 당뇨병 및 고혈압 등에 효과가 있다하여 사용되고 있으며, 주요 약리 성분으로는 chryso-

phanol, emodin, aloe-emodin, torachryson, rubrofusarin-6- β -gentiobioside, nor-rubrofusarin, aurantio-obtusin, rubrofusarin, toralactone, rhein, physcion, obtusifolin, obtusin, chryso-obtusin 등이 보고 되었다(3-6). 특히 결명자의 emodin 성분은 완하작용이 있으며 chrysophanic acid-9-anthrone는 dermatophytes의 발육을 억제하고 살균작용이 있으며(7), 결명자 엑기스를 공복시 위내에 투여할 경우 위액분비 항진작용이 있는 것으로 보고되었다(8). 효능 실험으로는 혈소판 응집 억제작용 성분에 관한 연구(9), Joo 등(10)의 균체증식에 미치는 영향, 결명자의 brassinosteroid 활성물질의 동정(11), Jang 등(12)은 결명자 종실에서 추출한 알코올 추출물이 사염화탄소에 의하여 유발된 간 손상 방지효과가 우수하였다고 보고하였으며, Lim과 Han(13)의 저혈당효과 및 Park

†Corresponding author. E-mail: mylee@mail.chosun.ac.kr
Phone: 82-62-230-7722, Fax: 82-62-225-7726

등(14)의 아질산염 소거 인자의 특성 등이 보고 되었다. 알코올 섭취량 및 빈도수 증가로 간세포 상해가 초래되고(15,16) 알코올성 간질환이 유발되는데, 이는 알코올 자체가 그 중간 대사 산물인 acetaldehyde에 의한 직접적 손상, 면역학적 반응 및 생화학적 변화 등으로 인하여 일어나는 것으로 알려져 있다(17). 또한 알코올이나 그 대사산물인 acetaldehyde와 기타 이물질에 의하여 oxygen free radical 생성이 증가되고 이로 인하여 생성된 지질과산화물이 간세포 파괴 및 섬유화 등 간손상에 관여할 것이라는 추측도 가능하게 된다. 이러한 각종 free radical들을 효과적으로 제거하기 위해서는 여러 항산화효소 및 항산화물질들의 존재가 필요하다. 본 논문에서는 결명자가 에탄올에 의한 간의 산화적 세포손상에 작용하는 oxygen free radical대사와 혈액중의 지질대사에 영향을 검토하기 위하여 흰쥐를 6주간 사육 후 체중증가율, 식이 효율, 혈액중의 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 및 LDL 콜레스테롤농도, 혈청중의 alanine aminotransferase(ALT)와 aspartate aminotransferase(AST) 활성을 측정하는 한편, oxygen free radical 대사기전을 검토하기 위하여 해독계 항산화효소인 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase(GSH-Px) 활성과 생성계 효소인 xanthine oxidase(XO) 활성, 지질과산화물인 thiobarbituric acid(TBA)-reactants 및 glutathione(GSH)함량을 측정하여 상호비교 관찰하였다.

재료 및 방법

재료

결명자(Cassia semen)는 1999년 12월 전라북도 순창에서 재배된 것을 구입하여 분쇄후 적당량의 에탄올을 가하고 65°C에서 환류 냉각기를 부착하여 12시간씩 2회 추출·여과한 후 45°C 수욕상에서 rotary vacuum evaporator를 이용하여 용매를 완전 제거하고 농축한 후 -70°C에 냉동 보관하여 실험시료로 사용하였다.

*In vitro*에서 용매별 각 분획의 항산화력 측정

결명자 100 g과 메탄올-물(80 : 20)용액 적당량을 혼합한 후 추출·농축하여 얻은 농축물을 n-헥산으로 분획하여 헥산분획을 얻고, 수층을 클로로포름으로 분획하여 클로로포름분획을 얻은 후, 수층을 다시 에틸아세테이트, 부타놀 및 증류수 순으로 분획하여 각 분획물을 얻었다. 각 분획물을 45°C 수욕상에서 rotary vacuum evaporator를 이용하여 용매를 완전히 제거하고 각 분획별 추출물의 일정량을 취하여 soybean oil에 첨가하여 600 ppm농도가 되도록 조제한 후 Rancimat 676(Metrohm, Swiss)를 이용하여 추출물을 첨가하지 않는 유지를 대조구로 하여 항산화력을 상호비교하였다. Anti-oxidant index(AI)는 각 분획별 추출물을 첨가한 실험구의 유도기간을 대조구의 유도기간으로 나눈 값으로 구하였다. Rancimat의 측정조건은 시료 유지 3.0 g을 reaction vessel

에 취하고, 증류수 70 mL을 measuring vessel에 넣은 후, air flow rate 20 L/hr, 반응온도 110°C에서 산화 안정성을 비교하였다. 모든 측정치는 3회 반복 시험하여 얻은 값의 평균치로 표시하였다(18,19).

실험 동물 및 처치

조선대학교 실험 동물 센터에서 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐(체중 120~160 g)를 1 주일간 고형배합사료(삼양사료)로 적응시킨 후, 난괴법에 의하여 군당 6마리씩 정상군(CON), 결명자 에탄올 추출물을 체중 kg당 200 mg/kg 투여한 군(CEL), 알코올 투여군(ETH), 알코올과 결명자 에탄올 추출물을 체중 kg당 200 mg/kg 투여한 군(CE1) 및 알코올과 결명자 에탄올 추출물을 체중 kg당 400 mg/kg 투여한 군(CE2) 등 5군으로 하였다(Table 1). 알코올 투여는 Fujji 등(20)의 방법에 준하여 35% 에탄올을 10 mL/kg, bw/day의 수준으로, 결명자 에탄올 추출물 투여는 체중 kg 당 200 mg 및 400 mg이 함유되도록 생리식염수에 용해시켜 1일 1회 6주간 경구 투여하였다. 실험 기간중 동물의 상태를 관찰하면서 1주일에 3회 체중과 사료섭취를 측정하였고, 실험동물은 처치 전 16시간 동안 절식시킨 후 diethyl ether 마취하에 경동맥으로부터 혈액을 채취하였으며, 간은 적출하여 0.9% 생리식염수로 남아 있는 혈액 및 기타 부착물질을 제거하고 여지로 수분을 제거한 후 -70°C의 deep freezer에 보관하면서 효소 활성 측정에 사용하였다.

효소원 조제

간조직 1 g당 4배량의 0.25 M sucrose buffer(pH 7.5)를 가하여 빙냉하에서 ultra turax homogenizer(10,000×g, 2분)로 마쇄하였다. 이 마쇄액의 일부는 thiobarbituric acid(TBA)-reactants함량 측정에 사용하고, 나머지는 4°C에서 600×g로 10분간 원심 분리하여 핵 및 미마쇄 부분을 제거한 후 15,000×g에서 20분간 원심 분리하여 얻은 상정액은 SOD, catalase, XO 및 GSH-Px 활성측정의 효소원으로 사용하였고, 경동맥에서 혈액을 채취하여 전혈중의 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤 함량을 측정하였으며, 혈액을 원심분리하여 얻은 혈청을 ALT 및 AST활성 측정에 사용

Table 1. Composition of experimental diet¹⁾

Group	Diet composition
CON ²⁾	basal diet
CEL	basal diet + CEL ³⁾
ETH	basal diet + ETH ⁵⁾
CE1 ⁶⁾	basal diet + CEL + ETH
CE2 ⁷⁾	basal diet + CEH ⁴⁾ + ETH

¹⁾According to AIN-93 diet composition.

²⁾CON: normal group.

³⁾CEL: Cassia semen ethanol extract (200 mg/kg, bw/day, p.o.).

⁴⁾CEH: Cassia semen ethanol extract (400 mg/kg, bw/day, p.o.).

⁵⁾ETH: ethanol 35% (10 mL/kg, bw/day, p.o.).

⁶⁾CE1: Cassia semen ethanol extract (200 mg/kg, bw/day, p.o.) & ethanol 35% (10 mL/kg, bw/day, p.o.).

⁷⁾CE2: Cassia semen ethanol extract (400 mg/kg, bw/day, p.o.) & ethanol 35% (10 mL/kg, bw/day, p.o.).

하였다.

효소활성 및 지질함량 측정

간조직 중의 XO활성은 Downey 등(21)의 방법, SOD활성은 Crapo 등(22)의 방법, catalase활성은 Aebi(23)의 방법, GSH-Px 활성은 Flohe 등(24)의 방법으로 측정하였다. 혈액 중 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤함량 측정에는 Cholestech LDX(Cholestech Corporation, USA)를 이용하였으며, 혈청중 ALT 및 AST활성은 Reitman-Frankel 방법(25)에 의하여 조제된 아산제약 kit를 사용하여 측정하였다. 과산화지질 함량은 malondialdehyde량을 thiobarbituric acid로 비색정량하는 Buege와 Aust의 방법(26), glutathione 함량은 Tietze의 방법(27)으로 측정하였다.

단백질 정량

단백질의 정량은 Lowry 등의 방법(28)에 준하여 bovine serum albumin(Sigma Fr.v)을 표준품으로 하여 측정하였다.

실험결과와 통계처리

실험결과는 SPSS Package를 이용하여 실험군당 평균 ± 표준오차로 표시하였으며, 통계적 유의성 검정은 일원배치 분산분석(one-way analysis of variance)을 한 후 p<0.05 수준에서 Tukey(T) test를 이용하여 상호 검정하였다.

결과 및 고찰

In vitro에서 용매별 각 분획의 항산화력 측정

Soybean oil에 대한 결명자 추출물의 분획별 항산화력을 비교한 결과는 Table 2와 같다. Table 2에서 보면 n-헥산 분획이 AI 1.65로 가장 우수한 항산화력을 나타냈으며 다음으로 클로로포름, 부타놀, 에틸아세테이트, 물 및 메탄올 순으로 결명자에 함유된 항산화성 물질은 주로 n-헥산과 클로로포름층에 많이 이행됐음을 알 수 있었다.

체중증가율과 식이효율

Table 3에 나타난 바와 같이 6주간의 체중 증가율에서, ETH는 CON에 비하여 체중이 현저히 감소되었고(p<0.05), CE1 및

Table 3. The growth rate and FER in liver of ethanol and/or Cassia semen ethanol extract treated rats

Groups	Weeks						
	FER ³⁾	Growth rate ²⁾					
CON ¹⁾	0.148 ^{a)}	1.309 ^{a)}	1.362 ^{a)}	1.433 ^{a)}	1.509 ^{a)}	1.711 ^{a)}	1.918 ^{a)}
CEL	0.123 ^{a)}	1.110 ^{b)}	1.244 ^{b)}	1.323 ^{c)}	1.475 ^{a)}	1.560 ^{ac)}	1.725 ^{a)}
ETH	0.074 ^{c)}	0.992 ^{c)}	1.039 ^{c)}	1.091 ^{b)}	1.228 ^{b)}	1.249 ^{b)}	1.265 ^{b)}
CE1	0.109 ^{ac)}	1.107 ^{b)}	1.181 ^{b)}	1.264 ^{b)}	1.318 ^{b)}	1.354 ^{bc)}	1.367 ^{b)}
CE2	0.137 ^{ac)}	1.114 ^{b)}	1.215 ^{b)}	1.323 ^{b)}	1.332 ^{b)}	1.446 ^{c)}	1.450 ^{b)}

¹⁾See the legend of Table 1.

²⁾Growth rate (W₁/W₀) : Ratio of the body weight (W₁) to initial body weight (W₀).

³⁾FER (feed efficiency ratio) : The total amount of weight increased / the total intake of food.

⁴⁾Mean ± SE (n = 6).

Values with different superscripts in the same row are significantly different (p<0.05) between groups by Tukey (T) test.

CE2는 ETH와 비교하여 볼 때 증가율은 다소 상승되었으나 통계적인 유의성은 없었으며, 투여량에 따른 변화도 보이지 않았다. 일일 평균 식이 섭취량은 ETH가 CON에 비하여 유의성있게 감소되었으나(p<0.05) CE1 및 CE2는 ETH에 비하여 높은 증가를 나타냈으며, 투여량이 증가할수록 식이효율은 더욱 높았다(Table 3). 이 결과는 알코올 섭취시 체중 및 식이 섭취량이 감소되었다는 Lieber(29)와 Shaw 등(30)의 보고와 일치하며, 이러한 현상은 알코올 독성에 의한 소화율의 감소와 영양소의 흡수율저하 및 높은 열량 공급으로 인한 식사량의 감소에 의한 것이라고 하였다. 본 실험에서 6주간 체중증가율이 결명자 에탄올추출물과 알코올 병합투여로 에탄올만을 투여한 군에 비하여 증가되는 경향을 보였고, 식이효율이 정상군에 근접하게 상승되었음은 흰쥐에서 결명자 에탄올추출물이 알코올 투여로 감소된 체중 및 식이량에 영향을 미쳐 나타난 결과로 생각된다.

혈청중 ALT 및 AST 활성 변화

흰쥐에 알코올 및 결명자 에탄올추출물을 6주간 투여 후 간 손상 정도를 나타내는 지표로 알려진 혈청중 ALT 및 AST 활성 변화를 측정한 결과는 Table 4와 같다. ALT 활성의 경우, 알코올 투여(ETH)로 CON에 비하여 활성이 약 26% 정도 증가되었으나(p<0.05) CE1 및 CE2는 ETH에 비하여 약 20%정도 감소되었다. 한편 AST활성은 ETH가 CON에 비하여 약 39% 정도 증가되었고(p<0.05), CE1 및 CE2는 ETH에 비하여 유의한 결과는 아니었으나 약 24%정도 감소되었다. 따라서 알코올투여로 증가된 ALT & AST활성이 결명자 에탄올추출물을 병합투여하여 이들 효소의 활성이 감소되었음과 Table 7에서 TBARS함량이 감소된 결과와 관련지어 볼 때 결명자 에탄올 추출물이 간기능에 영향을 미치는 것으로 생각되나 단정할 수는 없고 앞으로 조직의 병리학적 소견 등이 뒷받침되어야 될 것으로 사료된다.

혈액중 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, LDL- 콜레스테롤 농도 및 동맥경화지수(AI) 변화

흰쥐에 알코올 및 결명자 에탄올추출물을 6주간 투여한 후

Table 2. Antioxidative activities of each fraction¹⁾of Cassia semen methanol extract on soybean oil

Fraction ¹⁾	IP ²⁾	AI ³⁾
Control	7.83 h	1.00
n-Hexane	12.9 h	1.65
CHCl ₃	11.3 h	1.44
EtoAc	8.49 h	1.08
BuOH	8.74 h	1.11
Water	8.46 h	1.08
Methanol	8.81 h	1.03

¹⁾Fractions were separated by separatory funnel.

²⁾Induction period (IP, hr, min) of oil was determined by Rancimat test at 110°C, 600 ppm of each fraction was added.

³⁾AI (antioxidant index) was expressed as IP of oil containing various fractions/IP of natural oil.

Table 4. The activities of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) in serum of ethanol and/or Cassia semen ethanol extract treated rats

Enzyme activities	6 weeks				
	CON ¹⁾	CEL	ETH	CE1	CE2
ALT ²⁾	28.41 ± 2.30 ^{3)abde4)}	23.98 ± 1.73 ^{bde}	35.94 ± 1.29 ^c	28.09 ± 1.90 ^{de}	26.73 ± 0.65 ^c
AST	121.67 ± 4.56 ^d	120.90 ± 5.60 ^d	168.85 ± 8.97 ^b	128.74 ± 8.45 ^d	124.70 ± 4.21 ^a

¹⁾See the legend of Table 1.

²⁾Karmen unit/mL of serum.

³⁾Mean ± SE (n = 6).

⁴⁾Values with different superscripts in the same row are significantly different (p < 0.05) between groups by Tukey (T) test.

혈액중 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 농도 및 동맥경화지수에 미치는 변화는 Table 5와 같다. 알코올 투여로 총 콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤 농도는 CON에 비하여 각각 약 54%, 35%의 유의한 증가를 보였으나(p < 0.05) CE1 및 CE2는 CON에 비하여 27%, 23%의 감소를 나타냈다. 반면 HDL-콜레스테롤 농도는 ETH가 CON에 비하여 약 28%의 유의적인 감소를 나타내었으나 결명자 에탄올추출물 병합투여로 정상군의 치료 회복되었다. 특히 결명자 에탄올추출물만을 투여한 군(CEL)의 농도는 CON보다 높았다. 본 실험에서 알코올 투여로 혈중 총 콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤 농도가 정상군에 비하여 높은 증가를 나타냈는데, 이 결과는 알코올을 만성적으로 섭취시킨 쥐를 이용한 실험에서 혈청 중성지질과 총 콜레스테롤량이 정상쥐에 비하여 유의적으로 증가되었다는 Baraona와 Lieber(31)의 보고와 일치하였다. 따라서 본실험 결과는 결명자 에탄올 추출물이 총 콜레스테롤양과 고콜레스테롤혈증의 중요한 요인이며,

심장 순환기 질환의 발생과 밀접한 관계(32,33)가 있는 LDL-콜레스테롤 치를 낮추고 혈관벽에 콜레스테롤 축적을 방지하여 동맥경화증 등 심장 순환기 질환의 발생과는 역상관계가 있다고 보고(34-36)된 HDL-콜레스테롤 치를 상승시키므로 동맥경화지수를 낮추어 동맥경화 및 혈관장애를 개선시키는 효과가 있음을 시사해주고 있으나 이에 대한 정확한 기작은 계속 연구 검토해야 할 것으로 생각된다.

간조직 중 유리기 해독계 및 생성계 효소활성 변화

결명자 에탄올추출물이 알코올투여로 유발된 간 조직 손상을 회복시키는 작용이 어떠한 작용에 기인되어 나타나는지를 검토하기 위하여 알코올 및 결명자 에탄올추출물을 흰쥐에 6주간 투여 후 간조직 중의 oxygen free radical 대사에 관여하는 효소활성의 변화를 나타낸 결과는 Table 6과 같다. 결명자 에탄올추출물이 유리기 해독계의 효소활성을 조절하여 해독작용을 나타내는지를 알아보기 위하여 O₂^{·-}, ·OH,

Table 5. Concentrations of total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol in serum of ethanol and/or Cassia semen ethanol extract treated rats

Concentrations	6 weeks				
	CON ¹⁾	CEL	ETH	CE1	CE2
Total cholesterol (mg/dL)	101.5 ± 0.71 ^{2)ac3)}	100.8 ± 0.37 ^c	156.0 ± 10.02 ^b	135.0 ± 9.47 ^b	112.8 ± 7.01 ^{ac}
HDL-cholesterol (mg/dL)	28.16 ± 1.47 ^{ac}	33.10 ± 1.00 ^c	20.25 ± 1.49 ^b	25.50 ± 2.87 ^a	26.20 ± 0.80 ^a
LDL-cholesterol (mg/dL)	64.33 ± 1.08 ^{acd}	60.80 ± 0.96 ^{cd}	86.75 ± 3.81 ^b	71.25 ± 1.93 ^{acd}	67.20 ± 0.86 ^d
HDL-C/total-C	0.28 ± 0.01	0.33 ± 0.02	0.13 ± 0.01	0.19 ± 0.02	0.23 ± 0.01
AI	2.6	2.1	6.7	4.3	3.3

¹⁾See the legend of Table 1.

²⁾Mean ± SE (n = 6).

³⁾Values with different superscripts in the same row are significantly different (p < 0.05) between groups by Tukey (T) test.

Table 6. The activities of catalase, GSH-Px, SOD, XO in liver of ethanol and/or Cassia semen ethanol extract treated rats

Enzyme activities	6 weeks				
	CON ¹⁾	CEL	ETH	CE1	CE2
Catalase ²⁾	4619.00 ± 439.9 ^{6)a}	4288.00 ± 271.3 ^b	6971.00 ± 519.6 ^c	4707.00 ± 279.2 ^{ab}	4598.00 ± 300.6 ^{ab}
GSH-Px ³⁾	327.80 ± 30.39	312.55 ± 14.09	421.90 ± 43.66	375.10 ± 60.91	323.50 ± 49.93
SOD ⁴⁾	22.41 ± 2.05	23.42 ± 4.51	28.66 ± 1.93	25.52 ± 1.97	20.40 ± 1.56
XO ⁵⁾	28.98 ± 2.18 ^a	27.67 ± 6.12 ^a	42.46 ± 1.00 ^c	40.05 ± 9.02 ^c	29.87 ± 4.81 ^{ab}

¹⁾See the legend of Table 1.

²⁾μmol / min / mg protein.

³⁾decreased H₂O₂ μmol / min / mg protein.

⁴⁾mU / g protein.

⁵⁾decreased NADPH μmol / min / mg protein.

⁶⁾Mean ± SE (n = 6).

Table 7. The contents of thiobarbituric acid (TBA)-reactants in liver of ethanol and/or Cassia semen ethanol extract treated rats

Content	Groups		TBA-reactants			
	CON ¹⁾	CEL	ETH	CE1	CE2	
6 weeks	5.09±0.28 ^{2)a3)}	4.61±0.46 ^a	8.71±0.30 ^{bc}	7.56±0.24 ^d	7.04±0.58 ^d	

¹⁾See the legend of Table 1.

²⁾Mean±SE (n = 10).

³⁾Values with different superscripts in the same row are significantly different (p<0.05) between groups by Tukey (T) test.

Table 8. The contents of glutathione in liver of ethanol and/or Cassia semen ethanol extract treated rats

Content	Groups		Glutathione (mg/g liver)			
	CON ¹⁾	CEL	ETH	CE1	CE2	
6 weeks	51.34±2.30 ^{2)a3)}	54.20±1.89 ^a	30.84±1.95 ^b	48.56±2.56 ^d	49.89±2.36 ^a	

¹⁾See the legend of Table 1.

²⁾Mean±SE (n = 6).

³⁾Values with different superscripts in the same row are significantly different (p<0.05) between groups by Tukey (T) test.

H₂O₂ 등 oxygen free radical을 소거하여 항산화작용을 나타내는 효소인 SOD, catalase의 활성을 측정한 결과, 결명자 에탄올추출물이 알코올투여로 상승된 catalase의 활성을 ETH에 비하여 유의하게 저하시켰으나 SOD활성은 감소시키지 못했으며, 또한 알코올 섭취에 따른 산소유리기에서 유래한 간조직 손상에 대한 보호작용이 큰 것으로 알려진 GSH-Px 활성은 본 실험에서는 일관성있는 변화를 나타내지 않았다. 유리기 생성계 효소인 세포질내의 XO는 내외인성 핵산성 물질대사에 관여하는 효소로 알코올 투여시 활성이 상승되고 이로 인하여 O₂의 생성이 증가되어 간조직에 산화적 손상을 유발시키는 것으로 보고(37)되고 있는데, 본 실험에서 결명자 에탄올추출물이 알코올 투여로 상승된 XO활성을 약 42%정도 감소시켰는데 이는 결명자 에탄올추출물이 알코올에 의한 산화적 손상을 줄일 수 있을 것으로 여겨진다.

간조직 중 과산화지질 함량 변화

흰쥐에 알코올 및 결명자 에탄올추출물을 6주간 투여 후 간조직 중 과산화지질 함량에 미치는 변화는 Table 7과 같다. 급성 혹은 만성적인 알코올투여가 지질과산화물량을 증가시키는 잘 알려져 있다(38). 본 실험에서도 ETH에 비하여 약 71%의 유의한 증가를 보였다. 그리고 CE2는 ETH에 비하여 유의하게 감소를 나타내었다. 이 결과는 알코올의 분해산물인 acetaldehyde가 세포질내의 XO와 작용하여 부산물로 생성된 O₂의 양이 증가되어 세포막의 불포화지방산과 결합하여 지질과산화물 생성이 증가된 것으로 여겨진다. 결명자 에탄올추출물은 알코올에 의해 증가된 간 TBA 반응성 물질 함량을 유의하게 감소시켰는데 이는 결명자 에탄올추출물이 간에서 알코올에 의해 유도되는 지질과산화물량 증가를 유효하게 억제할 수 있을 것으로 사료된다. 특히 결명자 에탄올추출물만을 투여한 군(CEL)의 간 TBA 반응성 산물량이 CON보다 오히려 낮게 나타났음은 결명자 에탄올추출물을 계속 섭취하므로서 과다한 지질과산화작용으로 인한 노화 등 만성 질환을 예방할 수 있을 것으로 기대되어지며 이러한 작용

은 결명자 에탄올추출물에 함유되어있는 물질이 체내의 항산화작용에 직접 혹은 간접적으로 관여하는 것으로 추측되어지지만 본 실험만으로는 명확한 기전은 알 수 없고 앞으로 이에 대한 체계적인 연구가 요구되어진다.

간조직 중 GSH함량 변화

결명자 에탄올 추출물이 알코올 투여로 생성된 oxygen free radical해독에 미치는 효과를 알아보기 위해 흰쥐에 알코올 및 결명자 에탄올추출물을 6주간 투여 후 간조직 중 GSH함량에 미치는 영향은 Table 8과 같다. 알코올 섭취로 간 조직중의 GSH함량이 CON에 비하여 약 51%정도 감소되었으나 결명자 에탄올추출물투여로 정상군의 함량에 근접하도록 증가되었다. GSH는 glutathione-S-transferase와 GSH-Px와 같은 외부의 산화적 세포 손상에 대한 방어작용을 나타내는 효소의 기질로 사용되며 세포내 지질과산화물과 이물질 제거, 아미노산 수송 및 저장 등 다양한 세포기능을 수행하는 중요한 물질이다(39). 알코올에 의한 간 조직중의 GSH 함량의 감소기전에 대해서는 아직도 확실하게 밝혀져 있지 않았으나 여러 문헌과 본 실험의 결과인 Table 7과 8을 연결지어 보면 지질과산화물량과 GSH함량 사이에는 역상관관계가 있음을 생각할 수 있으며 Videla 등(40)의 주장처럼 알코올에 의해 생성된 과산화지질이 GSH와 반응하여 산화됨으로서 GSH함량이 감소된 것으로 보여진다. 그러나 결명자 에탄올추출물은 알코올투여로 감소된 GSH함량을 약 49% 정도 증가시켜 정상군의 함량과 유사하게 증가되었는데 이는 결명자 에탄올추출물과 알코올 병합투여군의 지질과산화물량이 알코올만을 투여한 군에 비해 유의하게 감소된 것과 관련지어 볼 때 결명자 에탄올추출물에 의한 지질과산화물량의 감소로 GSH함량이 증가된 원인으로 생각된다.

요 약

결명자 에탄올추출물이 알코올을 투여한 흰쥐의 간손상에 미치는 영향을 알아보기 위해, 정상군, 결명자 에탄올추출물

(200 mg/kg)투여군, 알코올 투여군(35% ethanol 10 mL/kg, b.w./day), 알코올 및 결명자 에탄올추출물(200 mg 및 400 mg/kg) 병합투여군 등 5군으로 나누어 6주간 사육후 체중증가율, 식이효율 및 혈액중 총 콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤농도, 혈청중 ALT 및 AST활성, 간손상 억제 효과를 확인하기 위해 유리기 해독계 효소인 SOD, catalase, GSH-Px 등의 활성과 유리기 생성계 효소인 XO활성을 측정하고, 지질과산화물인 TBARS 및 GSH함량에 미치는 영향을 관찰하였다. 1) 각 분획구의 항산화력은 n-헥산>클로로포름>에틸아세테이트>물>메탄올 순이었다. 2) 결명자 에탄올추출물과 알코올을 병합투여하므로써 체중증가율은 알코올만을 투여한 군에 비하여 유의적인 변화는 아니었으나 증가되는 경향을 보였으며 식이효율은 정상군의 치에 근접하게 증가되었다. 3) 간 손상의 지표의 하나인 혈청 중 ALT 및 AST활성의 경우, 알코올 투여로 정상군에 비하여 유의적으로 증가되었으나 결명자 에탄올추출물을 병합투여하므로써 정상군보다 오히려 낮았다. 4) 알코올 투여로 총 콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤함량은 정상군에 비하여 많이 증가되었으나 결명자 에탄올추출물 병합투여로 투여량이 증가됨에 따라 더욱 우수한 감소효과를 나타내었다. 반면 HDL-콜레스테롤함량은 알코올 투여로 정상군에 비하여 유의적으로 감소되었으나 결명자 에탄올추출물 병합투여로 정상군의 농도에 근접하게 증가되었는데, 특히 결명자 에탄올추출물만을 투여한 군의 함량이 정상군보다 높았다. 5) 결명자 에탄올추출물이 알코올 투여로 상승된 유리기 생성계효소인 XO활성은 알코올만을 투여한 군에 비하여 약 42%정도 현저하게 감소시켰으나, 유리기 해독계 효소인 SOD, catalase 및 GSH-Px 활성에는 유의한 영향을 미치지 못했다. 6) 알코올 투여로 증가된 간 중의 TBA반응성 산물량을 결명자 에탄올추출물이 유효하게 감소시켰으며, 특히 결명자 에탄올추출물만을 투여한 군의 간 TBA 반응성 산물량이 정상군보다 오히려 낮았다. 7) 알코올 섭취로 간조직 중의 GSH함량이 정상군에 비하여 약 51%정도 감소되었으나 결명자 에탄올추출물투여로 정상군의 함량에 근접하도록 증가되었다. 이상의 실험 결과에서 결명자 에탄올추출물의 항산화작용은 주로 알코올투여로 증가된 유리기 생성계 효소인 XO활성억제와 비효소적 항산화작용을 나타내는 GSH함량을 증가시키므로써 지질과산화물에 대한 방어력이 증강되어 나타난 결과로 여겨지고, 또한 혈청중 지질함량, ALT 및 AST의 활성을 유의성있게 감소시켰음은 결명자 에탄올추출물이 알코올에 의한 지방간 또는 손상된 간세포를 회복시키는 작용이 있는 것으로 추정된다.

감사의 글

이 논문은 1999년도 조선대학교 교내 학술연구비 지원에 의하여 연구되었으며 이에 깊이 감사드립니다.

문헌

1. 박중희, 이정규 : 상용약용식물도감. 도서출판 신일상사, p.26-28 (1992)
2. 생약학 연구회 : 현대 생약학. 학창사, 서울, p.212-215 (1992)
3. 上海科學技術出版社 小學館編 : 中藥大辭典. 株式會社 小學館, 東京, 第二卷, p.1139-1143 (1985)
4. Kim, J.S. : Studies on the adsorption of cholic acid and cholesterol in aqueous solution by Cassia semen. *M.S. Thesis*, Won-Kwang University (1988)
5. Masaji, K., Noriko, H., Yasuko, I. and Yoshio, T. : Estimation of anthraquinone in Cassia seeds. *Shoyakugaku Zasshi*, **32**, 168-181 (1978)
6. 陳在仁 : 漢方醫學大事典(中國藥學辭典). 清談社, p.192-193 (1992)
7. Junzo, I., Tomaaki, F. and Shyusuke, W. : The pharmacognostical study on Cassia plants (I). *Shoyakugaku Zasshi*, **7**, 17-25 (1954)
8. 한국 약학대학협의회 약전분과회 편저 : 대한 약전해설. 문성사, p.885-886 (1987)
9. Kim, Y.H. : Studies on the platelet antiaggregating components of *Cassia obtusifolia*. *M.S. Thesis*, Suk-Myung University (1986)
10. Joo, H.K., Yun, J.B., Kim, K.G., Sa, T.M. and Lee, Y.T. : Effects of roasted *Cassia tora* L. extracts on the chemical changes and microbial growth. *Agricultural Chemistry and Biotechnology*, **40**, 472-477 (1997)
11. Park, K.H., Kim, S.J. and Hyun, K.H. : Brassinosteroid in immature *Cassia tora* seeds. *J. Korean Agric. Chem. Soc.*, **36**, 99-104 (1993)
12. Jang, D.J., Joo, H.K. and Cho, Y.J. : The protective effect of the seeds of *Cassia tora* L. against carbon tetrachloride-induced hepatic injury on rats. *Analytical Sci. & Technol.*, **2**, 331-335 (1989)
13. Lim, S.J. and Han, H.K. : Hypoglycemic effect of fractions of *Cassia tora* extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Korean J. Soc. Food Sci.*, **13**, 23-29 (1997)
14. Park, Y.B., Lee, T.G., Kim, O.K., Do, J.R., Yeo, S.G., Park, Y.H. and Kim, S.B. : Characteristics of nitrite scavenger derived from seeds of *Cassia tora* L. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **27**, 124-128 (1995)
15. Pryor, W.A. : Free radical in biology. In *Involvement of free reactions in aging and carcinogenesis in medicine chemistry*, Elsevier, Amsterdam, p.331-361 (1977)
16. Weiner, H., Tank, A.W., Von, Wortburg, J.P. and Weber, S. : Interactions of aldehyde and protein. *Int. Symp. Alcohol Aldehyde Metab. Syst.*, 3rd., p.264-267 (1979)
17. Bird, G.L.A. and Williams, R. : Factors determining cirrhosis in alcohol liver disease. *Mol. Astects Med.*, **10**, 97-105 (1988)
18. Paguot, C. and Hautfenne, A. : Standard method for the analysis of oils, fats and derivatives. 7th revised, Blackwell Scientific Publication, London, p.199-214 (1987)
19. Frank, J., Geil, J.V. and Freaso, R. : Automatic determination of oxidation stability of oils and fatty products. *Food Technology*, **36**, 71-76 (1982)
20. Fujii, M., Ohmachi, T., Sagami, I. and Watanabe, M. : Liver microsomal drug metabolism in ethanol treated hamsters. *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 3881-3885 (1985)
21. Downey, J.M., Miura, Y., Eddy, L.J., Chambers, D.E., Mellert, T., Hearse, D.J. and Yellon, D.M. : Xanthine oxidase is not a source of free radicals in the isochemic rabbit heart. *J. Mol. Cell Cardiol.*, **19**, 1053-1060 (1987)
22. Crapo, C.H., McCord, J.M. and Fridovich, I. : Preparation and assay of superoxide dismutase. In *Methods in Enzymol.*,

- Fleischer, S. and Packer, L. (eds.), Academic press, New York, Vol. 53, p.382-393 (1978)
23. Aebi, H. : Catalase, Methods of enzymatic analysis. Bergmeyer, H.U., Bergmeyer, J. and Grabi, M. (eds.), 3rd ed., Verlag. chemie., Vol. 2, p.673-689 (1974)
 24. Flohe, L., Wolfng, A. and Gunzler, W.A. : Assay of glutathione peroxidase. In *Methods Enzymol.*, Fleischer, S. and Packer, L. (eds.), Academic Press, New York, Vol. 53, p.673-684 (1978)
 25. Reitman, S. and Frankel, S. : A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic determination and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin. Pathol.*, **28**, 56-63 (1957)
 26. Buege, J.A. and Aust, S.D. : Microsomal lipid peroxidation. In *Methods in Enzymology*, Packer, L. (ed.), Academic Press, New York, Vol. 27, p.502-520 (1969)
 27. Tietze, F. : Enzymatic methods for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. *Anal. Biochem.*, **27**, 502-522 (1969)
 28. Lowry, C.H., Rsenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. : Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951)
 29. Lieber, C.S. : The influence of alcohol on nutritional status. *Nutr. Rev.*, **46**, 241-254 (1988)
 30. Shaw, S. and Lieber, C.S. : Nutrition and alcohol, a clinical perspective. In *Nutrition Update*, Weininger, J. and Briggs, G.M. (eds.), John Wiley & Sons, New York, Vol. 1, p.79-104 (1983)
 31. Baraona, E. and Lieber, C.S. : Effects of chronic ethanol feeding on serum lipoprotein metabolism in the rat. *J. Clin. Invest.*, **49**, 769-778 (1970)
 32. Brown, M. and Goldstein, J.L. : A receptor mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science*, **232**, 34-47 (1986)
 33. Brown, M.S., Kovanen, P.T. and Goldstein, J.L. : Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science*, **212**, 628-635 (1981)
 34. Daniels, R.J., Guerther, L.S., Parker, T.S. and Steinberg, D. : Studies on the rate of efflux of cholesterol from cultured human skin fibroblast. *J. Biochem.*, **256**, 4978-4983 (1981)
 35. Bates, S.R. : Accumulation and loss of cholesterol esters in monkeys arterial smooth muscle cells exposed to normal and hyperlipidemic serum lipoproteins. *Atherosclerosis*, **43**, 165-176 (1979)
 36. Gorden, T., Castelli, W.P., Hortland, M.C., Kannel, W.B. and Dawber, T.R. : High density lipoprotein as a protective factor against coronary heart disease : the Framingham study. *Am. J. Med.*, **62**, 707-714 (1977)
 37. Krenitsky, T.A. : Xanthine oxidase and aldehyde oxidase in purine and purine analogue metabolism. *Exp. Med. Biol.*, **41**, 57-74 (1973)
 38. Plaa, G.L. and Wistschin, H. : Chemicals, drugs and lipid peroxidation. *Am. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **16**, 125-141 (1976)
 39. Lieber, C.S. : Interaction of ethanol with drug, hepatotoxic agent, carcinogen and vitamins. *Alcoholism*, **25**, 157-171 (1980)
 40. Videla, L.A., Fernandez, V., Valenzuela, A. and Ugarte, G. : The effect of chronic alcohol on glutathione concentration in isolated hepatocytes. *Biochem. J.*, **188**, 549-562 (1980)

(2001년 6월 1일 접수)