

## 고지방 식이로 유도된 비만 흰쥐에서 해당근에서 분리된 Euscaphic Acid 및 Tormentic Acid의 효과

박희준 · 남정환 · 정현주 · 이명선 · 이경태<sup>1</sup> · 정민화<sup>2</sup> · 최종원<sup>2\*</sup>  
상지대학교 자원식물학과, <sup>1</sup>경희대학교 약학대학, <sup>2</sup>경성대학교 약학대학

### Inhibitory Effect of Euscaphic Acid and Tormentic Acid from the Roots of *Rosa rugosa* on High Fat Diet-Induced Obesity in the Rat

Hee-Juhn Park, Jung-Hwan Nam, Hyun-Ju Jung, Myung-Sun Lee,  
Kyung-Tae Lee<sup>1</sup>, Min-Hwa Jung<sup>2</sup>, and Jongwon Choi<sup>2\*</sup>

Department of Botanical Resources, Sangji University, Wonju 220-702, Korea

<sup>1</sup>College of Pharmacy, Kyung-Hee University, Seoul 130-701, Korea

<sup>2</sup>College of Pharmacy, Kyungsung University, Busan 608-736, Korea

**Abstract** – The roots of *Rosa rugosa* have been used to treat *diabetes mellitus* in the folkloric society of Korea. To demonstrate the active component for the rat obesity induced by high fat diet for 6 weeks, the phytochemical fractionation and the pharmacological activity test were performed on this crude drug. It was shown that the methanolic extract and its EtOAc fraction inhibited the weight increase of the rat body, abdominal fat pad and hyperlipidemia at 200 mg/kg dose. Further, the triterpenoids, euscaphic acid and tormentic acid, isolated from *R. rugosa* roots were active at 30 mg/kg in the same assay. The two components shifted serum total-, HDL, and LDL-cholesterol levels toward the values of the untreated group, suggesting that the active compounds has hypolipidemic effects. The rats fed euscaphic acid and tormentic acid also reduced thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS) and hydroxyl radical in the rat blood and increased superoxide dismutase activity compared to the control. TBARS values and carbonyl content of the hepatic protein were reduced by treatment with the two triterpenoids. Antioxidative enzyme (SOD, glutathione peroxidase, and catalase) activities in hepatic tissues were increased by treatment of rats with the triterpenoids, which suggests that triterpenoids inhibited the reduction of hepatic antioxidative activity caused by high fat diet. Taken together, these results support that euscaphic acid and tormentic acid improve a high fat diet-induced hyperlipidemia via the activation of antioxidative mechanism.

**Key words** – *Rosa rugosa*, Rosaceae, triterpenoid, euscaphic acid, tormentic acid, obesity, hypolipidemic

## 서 론

간장은 지질대사에서 있어 중추적인 역할을 담당하고 있는 기관으로 지방산의 합성 및 산화, 그리고 중성지방, 인지질, 콜레스테롤 및 지단백질 등의 합성을 위한 중요한 장기이다. 여러가지 이유로 중성지방이 간장 내에 축적될 수 있는데 과도한 간장 내 지방축적은 병적상태로 간주된다. 이러한 간장내 지방의 만성적 축적이 일어나면 세포내 섬

유성 변화로 인해 점차 간경변과 간기능 장애로 진전된다.

지방간이 발생하는 원인으로 크게 두 가지 예를 들 수 있다. 첫째, 지방조직으로부터의 지방동원이나 간장 이외의 조직에서 lipoprotein 혹은 chylomicron triacylglycerol의 가수분해로 인해 상승한 혈장 유리지방산 수준과 관련이 있다. 결국, 유리지방산이 간장 내에 흡수되는데 혈청 lipoprotein의 생산이 이의 유입정도를 따르지 못하면 간장 내에 중성지방의 축적이 일어나게 된다. 둘째, 독성물질 등은 정상적인 지방대사를 저해하여 간장에서 조직으로 중성지방을 운반하는데 필요한 apoprotein이나 lipoprotein의 합성을 억제하여 간장내 지방을 축적시키는 결과를 초래한다. 이러한

\*교신저자(E-mail) : jwchoi@ks.ac.kr  
(FAX) : 051-628-6540

간장내의 지방축적은 간장조직의 기능장애와 형태학적인 변화를 일으키게 되어 간장의 정상적인 대사에 치명적인 영향을 초래한다.<sup>1-3)</sup>

해당화의 뿌리를 해당근이라고 하여 한국의 민간에서 당뇨병 치료제로 널리 사용되고 있다. 해당화로부터 triterpenoid로서 euscaphic acid, tormentic acid와 그 배당체 kaji-ichigoside F<sub>1</sub>, rosamultin, 그리고 catechin 성분 등을 함유하고 있다.<sup>4,5)</sup> Murakami 등<sup>6)</sup>은 euscaphic acid와 tormentic acid가 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate (TPA)로 유도된 mouse ear edema를 억제한다고 하였을 뿐 아니라 mammalian DNA polymerase 활성을 감소시킨다고 하였다. Jung 등<sup>7)</sup>은 또한 해당근 euscaphic acid 및 tormentic acid가 진통소염작용을 나타낸다고 하였다. 그러나 해당근으로 고지방식이로 유도된 지방간과 고지혈에 대한 유효성에 대한 연구는 없었으므로 본 연구에서는 이의 유효물질을 찾고자 연구를 수행하였다.

## 재료 및 방법

**시약 및 기구** - cytochrome C, pyrogallol, NADPH, NADP 및 bovine serum albumin은 Sigma제, NaN<sub>3</sub>, deoxyribose, ferrous ammonium sulfate, sodium dodecyl sulfate, thiobarbituric acid, hydroxylamine, hypoxanthine은 Aldrich제, reduced glutathione, oxidized glutathione은 Fluka제, 또한 kit 시약 중 total cholesterol 및 triglyceride는 영동제약, 인지질측정용 kit는 Itron(Japan)을 사용하였다. 실험에 사용한 기구는 생화학 분석장비(Hitachi 7600-110), 혈액분석기(Coulter GEN-S), UV-spectrophotometer(Shimadzu, UV-440), refrigerated centrifuge(Beckman J4-41), ultracentrifuge(Hitachi, 65-P7), Electrothermal digital melting point apparatus, MB-100 FT-IR spectrometer(Bomen), Bruker-AM 300 spectrometer, Rudolph Autopol III automatic polarimeter 및 cold laboratory chamber(Korean manhattan, KMC-8514) 등이었다.

**추출, 분획 및 분리** - 추출, 분획 및 분리는 전보에 따라 수행하여 해당근의 MeOH 추출물, CHCl<sub>3</sub> 분획, EtOAc 분획을 얻었으며, EtOAc 분획을 컬럼 크로마토그래피를 반복 수행하여 kaji-ichigoside F<sub>1</sub>, rosamultin, euscaphic acid, tormentic acid를 얻어서 실험에 사용하였다. 여기서 분리 물질은 표준품과 용점, 선광도, co-TLC에서 비교동정한 후 사용하였다.

**실험동물** - 본실험에 사용된 SPF Sprague Dawley (SD) 계 흰쥐를 (주)BioLink (충북 음성)로부터 웅성 흰쥐를 1주일 간 검역과 순화 및 사육을 거쳐 건강한 동물반을 실험에 사용하였다. 본 실험의 사육환경은 온도 22 ± 3°C, 상대습도 50 ± 10%, 조명시간 12시간(07:00-19:00)로 설정하였다. 사료

**Table I.** Composition of normal diet and high-fat diet (g/100 g)

Ingredient	Normal diet	High-fat diet
Casein	20	29
Corn starch	60	10
Sugar	0	10
Lard	0	35
Corn oil	9	5.0
Cellulose	5.0	5.0
Mineral mixture*	3.5	3.5
Vitamin mixture*	1.0	1.0
Cholesterol	1.0	1.0
DL-methionine	0.3	0.3
Choline	0.2	0.2

\*AIN76 mixture

는 실험동물용 고형사료를, 음용수는 상수도를 자유섭취시켰다. 실험시간 전 24시간 동안 물만 주고 절식하였다. 이때 효소활성의 일중변동을 고려하여 실험동물을 일정시간(오전 10:00-12:00) 내에서 처치하였다.

**비만유발** - 식이성 비만(diet-induced obesity)을 유도하기 위하여 예비실험을 실시하였다. 정상식이와 고지방식이를 Table I에 리스트하였다. 그 결과 실험동물에 고지방 식이를 총 6주간 먹이면서 체중 및 혈중 지질을 측정된 결과, 고지방 식이를 섭취한 쥐의 체중이 기본식이를 섭취한 쥐에 비해서 약 130% 이상의 체중 증가를 보이고, 지방 조직과 혈중 지질의 수치도 높게 나타내어서 총 6주의 사육기간이 비만증 유도에 적절한 것으로 생각되었으며, 정상군으로서 기본식이를 다른 한 그룹은 고지방 식이를 6주간 섭취케 하여 식이성 비만쥐를 유도하였으며, 이 기간 동안에 물을 임의로 음용하도록 하였다.

**검액의 제조** - 검액을 제조하기 위해 메탄올 추출물, 클로로포름 분획물, 에틸아세테이트 분획물, 부탄올 분획물 및 분리 화합물 kaji-ichigoside F<sub>1</sub>, rosamultin, euscaphic acid와 tormentic acid를 10% Tween 80에 용해한 후 생리식염수로 희석하여 실험동물에 경구투여하였다. 투여용량은 투여직전 체중의 변화에 따라 산출하였다. 대조군은 동일량의 상기 용매를 사용하였다. 투여용량과 기간은 예비실험을 행한 후 본 실험에 효과가 있다고 생각되는 해당근 메탄올 추출물, 에틸아세테이트 분획물은 200 mg/kg을, euscaphic acid와 tormentic acid는 30 mg/kg을 경구로 4주간 투여하였다.

**체중변화 및 지방조직의 무게 측정** - 체중변화는 실험 개시일로부터 1주일마다 측정하여 최초무게에 대한 체중변화를 산출하였다. 지방조직의 무게는 복강 및 고환부위의 지방을 채취하여 산출하였다.

**Total cholesterol 함량의 측정** - Richmond 등의 효소법<sup>8)</sup>에 의하여 조제된 kit(AM 202-K, Asan)를 사용하여 실험하

였다. 즉, 빙냉상에서 효소시약(cholesterol esterase 20.5 U/l, cholesterol oxidase 10.7 U/l, sodium hydroxide 1.81 g/l 함유)을 용해한 후 시료 20 ml에 조제한 효소시액을 첨가한 후 37°C에서 5분간 incubation하여 시약 blank를 대조로 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준검량선에 준해 혈중 함량은 mg/dl로 표시하였다.

**Triglyceride 함량의 측정** - Ajit 등의 방법<sup>9)</sup>에 준하여 조제된 kit(AM 157S-K, Asan)를 사용하여 실험하였다. 즉, 빙냉상에서 효소시약(lipoprotein lipase 10800U, glycerol kinase 5.4U, peroxidase 135000U, L- $\alpha$ -glycerol phosphooxidase 160U 함유)을 효소시약 용해액 [N,N-bis(2-hydroxyethyl)2-aminoethane sulfonic acid 0.427 g/dl 함유]에 용해한 후 시료 20 ml에 조제한 효소시액 3.0 ml을 첨가한 후 37°C에서 10분간 incubation하여 시약 blank를 대조로 파장 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 검량선에 준해 혈중 함량은 mg/dl로 표시하였다.

**Phospholipid의 함량 측정** - Ven Gent, C.M., and Roseleur의 효소법(10)에 의해 조제된 kit(Iatron Chem. Co.)를 사용하여 실험하였다. 즉, 빙냉상에서 효소시약(Phospholipase 3.9U, choline oxidase 5.6U, peroxidase 3.6U, 4-aminoantipyrine 0.3252 mg 함유)을 효소시약 용해액 [tris(hydroxymethyl)-aminomethane 6.057 mg 함유]에 용해한 후 시료 20 ml에 조제한 효소시액 3.0 ml을 첨가한 후 37°C에서 20분간 인큐베이션하여 시약 blank를 대조로 파장 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 검량선에 준해 그 함량을 mg/dl로 표시하였다.

**혈중 Hydroxyl radical 함량의 측정** - Kobatake 등의 방법<sup>11)</sup>에 따라 혈청 34.8  $\mu$ l에 0.54 M NaCl, 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.4), 10 mM NaN<sub>3</sub>, 7 mM deoxyribose, 5 mM ferrous ammonium sulfate 및 증류수로서 333.3  $\mu$ l가 되도록 첨가하여 vortex에서 잘 혼합하여 37°C에서 15분간 정치한다. 혈청 67  $\mu$ l를 취하고 여기에 8.1% sodium dodecyl sulfate 75  $\mu$ l, 20% acetic acid 500  $\mu$ l 및 재증류수 25  $\mu$ l를 넣어 혼합한 다음, 여기에 다시 1.2% thiobarbituric acid 333  $\mu$ l를 가하여 water bath(100°C)에서 30분간 가열한 후 실온에서 냉각한 다음 700  $\times$  g에서 5분간 원심분리하여 얻은 상층액을 파장 532 nm에서 흡광도를 측정하여 표준 검량선에 의하여 hydroxyl radical(nmole/mg protein)의 함량을 정량하였다.

**혈중 Superoxide dismutase(SOD) 활성의 측정** - Oyanagui의 방<sup>12)</sup>에 따라 정량하였다. 혈청을 potassium phosphate buffer로써 100배 희석하여 그 중의 100  $\mu$ l를 시험관에 넣고 여기에 증류수 500  $\mu$ l, 시약 A(3 mM hydroxylamine/3 mM hypoxanthine) 200  $\mu$ l 및 시약 B[7.5 mU/ml xanthine oxidase(XO) with 0.1 mM EDTA-2Na] 200  $\mu$ l를 넣고 vortex에서 잘 혼합한 다음, 37°C water bath에서 40

분간 정치한다. 반응액에 시약 C(300 mg of sulfanilic acid/5.0 mg N-1-naphthyl-ethylenediamine in 500 ml of 16.7% acetic acid) 2.0 ml를 넣어 잘 혼합하여 실온에서 20분 동안 정치한 다음 550 nm에서 흡광도를 측정하여 표준 검량선에 준하여 혈청 중의 superoxide dismutase 활성을 측정하였다.

**간 Superoxide dismutase(SOD) 활성의 측정** - Gao 등의 방법<sup>13)</sup>에 준하여 0.2 M potassium phosphate buffer (200  $\mu$ M cytochrome C, 100  $\mu$ M EDTA 함유 pH 8.6) 1.0 ml에 효소액 0.2 ml를 가하여 ice bath상에서 20분간 방치하고 test에는 alkaline dimethyl sulfoxide (DMSO) 용액 0.5 ml, blank에는 non-alkaline DMSO 용액 0.5 ml를 각각 가하고 37°C에서 30분간 반응시키고 파장 550 nm에서 감소되는 cytochrome C의 흡광도를 측정하였다. SOD 1 unit는 측정계에서 생성되는 superoxide dismutase에 의해 50% 저해될 경우의 반응액 중의 검체량 (ID<sub>50</sub>)을 나타내었다.

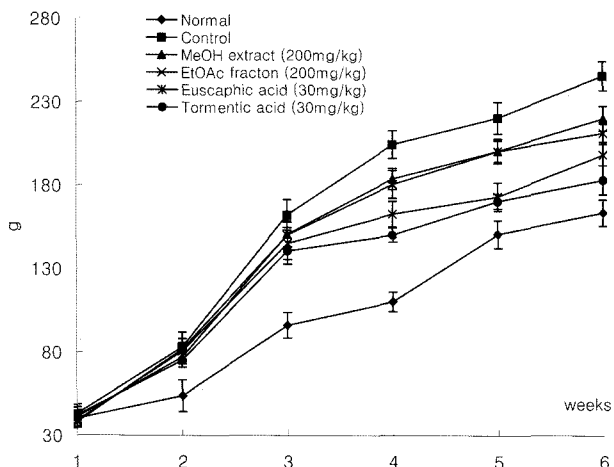
**Catalase 활성의 측정** - Aebi의 방법<sup>14)</sup>에 준하여 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)중에 기질인 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 환원되는 정도를 파장 240 nm에서 흡광도의 변화를 읽고 분자흡광계수 0.041 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>을 이용하여 활성도를 산정하였다. 효소활성의 단위는 1분당 1 mg protein이 분해하는 hydrogen peroxide의 양을  $\mu$ mole로 표시하였다.

**Glutathione peroxidase(GSH Px) 활성의 측정** - Berenice 등의 방법<sup>15)</sup>에 준해 hydrogen peroxide, glutathione 및 NADPH가 함유된 0.1 mM Tris buffer(pH 7.2)중에서 효소액을 가하여 파장 340 nm에서 흡광도를 측정하고 표준검량선에 준하여 활성도를 산정하였다. 효소 활성의 단위는 1분간 1  $\mu$ M NADPH를 산화시키는 효소의 양으로 정의하였다. 활성도의 표시는 1 mg protein이 생성하는 NADP의 양을 nmole로 표시하였다.

**단백질 정량 및 통계처리** - 단백질의 함량은 Lowry 등의 방법<sup>16)</sup>에 준하여 bovine serum albumin(Sigma, Fr. V)을 표준품으로 하여 측정하였다. 본 실험에서 얻어진 결과는 평균치 $\pm$ 표준편차로 표시하였고, 통계적 유의성 검증은 Duncan's multiple range test로 그 유의성을 나타내었다.

## 결 과

**체중변화** - 식이성 고지혈증을 유도한 흰쥐에서 체중의 변화에 미치는 해당근 매탄올 추출물, 그 에틸아세테이트 분획물, 그리고 분리 화합물은 euscaphic acid와 tormentic acid를 4주간 투여하고 그 체중을 측정하여 Fig. 1에 나타내었다. 고지방식이 비만 유도군은 6주간 사육한 결과 정상군에 비해 체중이 현저히 증가하였다. 해당근 추출물과 분리 물질을 경구로 4주간 투여했을 때 2주 투여 때부터 체중이 감소하다 3주, 4주 투여함으로써 체중감소효과가 더욱 뚜렷하였다.



**Fig. 1.** Effect of the *R. rugosa* extract and its components on the body weight increase of the rat fed a high fat diet. Values are mean  $\pm$  S.D. for eight experiments. Values followed by the same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ).

**지방조직에 미치는 영향** - 식이성 비만을 유도한 흰쥐에서 지방조직에 미치는 영향을 관찰한 성적이 Table II이다.

비만 유도군은 총복강의 지방 무게가 24.6 mg/g으로 정상식이군에 비해 약 2배 정도 증가하였다. 이에 시료를 4주간 투여했을 때 EtOAc 분획, euscaphic acid, tormentenic acid가 대조군에 비해 현저히 감소되었다. 이러한 결과는 부고환 주위 및 후복강 주위 조직의 지방함량 변화와 유사한 경향을 나타내었다.

**혈청 지질성분의 변화** - 식이성 비만을 유도한 흰쥐에서 혈중 total lipid, phospholipid, triglyceride 농도가 증가하여 고지혈증이 유발되었다(Table III). 시료를 4주간 투여한 군은 대조군에 비해 총지질이 함량이 크게 감소하였다. 중성 지방은 총지방의 감소와 유사하게 관찰되었으나 인지질은 그 감소경향이 매우 약하게 나타났다.

**혈청 콜레스테롤 함량변화 및 동맥경화지수** - 고지방식이 비만 흰쥐의 고지혈증 유발시 total cholesterol, LDL-cholesterol, HDL-cholesterol 농도가 매우 높게 증가하였다(Table IV). 고지혈증의 유도로 total cholesterol, LDL-cholesterol 함량이 정상군에 비해 약 2배 정도 증가하던 것이 해당군 EtOAc 분획, euscaphic acid 및 tormentenic acid의 투여로 현저히 감소하였으나 정상군 수준에는 미치지 못하였

**Table II.** Abdominal fat pad weight in the normal and diet-induced obesity rats fed *R. rugosa* extracts or its components for 6 weeks

Treatment	Dose (mg/kg)	mg/g body weight		
		Retroperitoneal	Epididymal	Total-abdomal
Normal		6.53 $\pm$ 0.4 <sup>c</sup>	7.32 $\pm$ 0.51 <sup>e</sup>	13.39 $\pm$ 0.87 <sup>d</sup>
Control		11.30 $\pm$ 0.81 <sup>a</sup>	13.27 $\pm$ 0.48 <sup>a</sup>	24.60 $\pm$ 1.27 <sup>a</sup>
MeOH extract	200	10.53 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup>	11.17 $\pm$ 0.42 <sup>b</sup>	21.73 $\pm$ 0.92 <sup>b</sup>
EtOAc fraction	200	8.56 $\pm$ 0.39 <sup>b</sup>	10.26 $\pm$ 0.50 <sup>c</sup>	18.35 $\pm$ 0.77 <sup>c</sup>
Euscaphic acid	30	8.48 $\pm$ 0.38 <sup>b</sup>	9.77 $\pm$ 0.33 <sup>c,d</sup>	18.16 $\pm$ 0.85 <sup>c</sup>
Tormentenic acid	30	8.07 $\pm$ 0.45 <sup>b</sup>	9.13 $\pm$ 0.49 <sup>d</sup>	17.23 $\pm$ 0.55 <sup>c</sup>

Rats were orally pretreated *Rosa rugosa* extract and compound daily for consecutive four weeks of orally administration on hyperlipidemic state animal, and killed 24 hr after the last treatment of fraction. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean $\pm$ S.D. for eight experiments. Values followed by the same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ).

**Table III.** Effect of MeOH extract, EtOAc fraction, Euscaphic acid and Tormentenic acid obtained from *R. rugosa* roots on hyperlipidemia in high fat fed rats

Treatment	Dose (mg/kg)	Total lipid (mg/dl)	Phospholipid (mg/dl)	Triglyceride (mg/dl)
Untreated		286.2 $\pm$ 23.5 <sup>d</sup>	119.8 $\pm$ 15.8 <sup>b</sup>	87.9 $\pm$ 9.21 <sup>e</sup>
Control		498.5 $\pm$ 37.8 <sup>a</sup>	147.6 $\pm$ 16.4 <sup>a,b</sup>	200.7 $\pm$ 6.25 <sup>b</sup>
MeOH extract	200	468.2 $\pm$ 19.4 <sup>a,b</sup>	128.7 $\pm$ 10.5 <sup>a,b</sup>	182.9 $\pm$ 7.36 <sup>b</sup>
EtOAc fraction	200	425.8 $\pm$ 23.9 <sup>b</sup>	121.5 $\pm$ 14.2 <sup>b</sup>	161.4 $\pm$ 5.43 <sup>c</sup>
Euscaphic acid	30	430.2 $\pm$ 30.9 <sup>b</sup>	133.8 $\pm$ 10.9 <sup>a,b</sup>	150.9 $\pm$ 6.29 <sup>c</sup>
Tormentenic acid	30	376.6 $\pm$ 17.5 <sup>c</sup>	120.3 $\pm$ 16.7 <sup>b</sup>	123.8 $\pm$ 5.11 <sup>d</sup>

Rats were orally pretreated the extracts (MeOH extract and EtOAc fraction) and its components (Euscaphic acid and Tormentenic acid) daily for consecutive 4 weeks after the induction of high fat-fed animal, and then killed 24 h after the last treatment. Values are mean $\pm$ S.D. for eight experiments. Values followed by the same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ).

**Table IV.** Effect of MeOH extract, EtOAc fraction, Euscaphic acid and Tormentic acid obtained from *R. rugosa* roots on serum hypercholesterolemia in high fat fed rats

Treatment	Dose (mg/kg)	Cholesterol (mg/dl)			A.I.
		Total	HDL	LDL	
Untreated		94.6±8.63 <sup>e</sup>	36.8±1.36 <sup>a</sup>	51.7±3.26 <sup>e</sup>	1.57±0.09 <sup>c</sup>
Control		186.2±6.22 <sup>a</sup>	25.3±1.88 <sup>d</sup>	131.2±8.47 <sup>a</sup>	6.36±0.87 <sup>a</sup>
MeOH extract	200	160.3±5.23 <sup>b</sup>	26.5±2.09 <sup>c,d</sup>	93.2±4.36 <sup>b</sup>	5.05±0.73 <sup>b</sup>
EtOAc fraction	200	160.3±5.23 <sup>b</sup>	28.6±1.43 <sup>b,c,d</sup>	80.5±2.47 <sup>c</sup>	4.21±0.38 <sup>b,c</sup>
Euscaphic acid	30	148.9±9.23 <sup>b,c</sup>	29.3±3.01 <sup>b,c</sup>	77.8±3.11 <sup>c,d</sup>	3.76±0.60 <sup>c,d</sup>
Tormentic acid	30	139.5±4.28 <sup>d</sup>	30.9±2.36 <sup>b</sup>	70.9±3.40 <sup>d</sup>	3.13±0.33 <sup>d</sup>

Rats were orally pretreated the extracts (MeOH extract and EtOAc fraction) and its components (Euscaphic acid and Tormentic acid) daily for consecutive 4 weeks after the induction of high fat-fed animal, and then killed 24 h after the last treatment. Values are mean±S.D. for eight experiments. Values followed by the same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ).

다. 혈청 HDL-cholesterol 함량은 고지혈증군은 정상군보다 약 48% 감소하던 것이 시료의 투여로 증가하였다. 동맥 경화지수를 계산하였을 때 고지방식으로 처리로 정상군에 비해 약 5배정도 현저히 증가하던 것이 해당군 성분의 투여로 감소하는 것으로 나타났다.

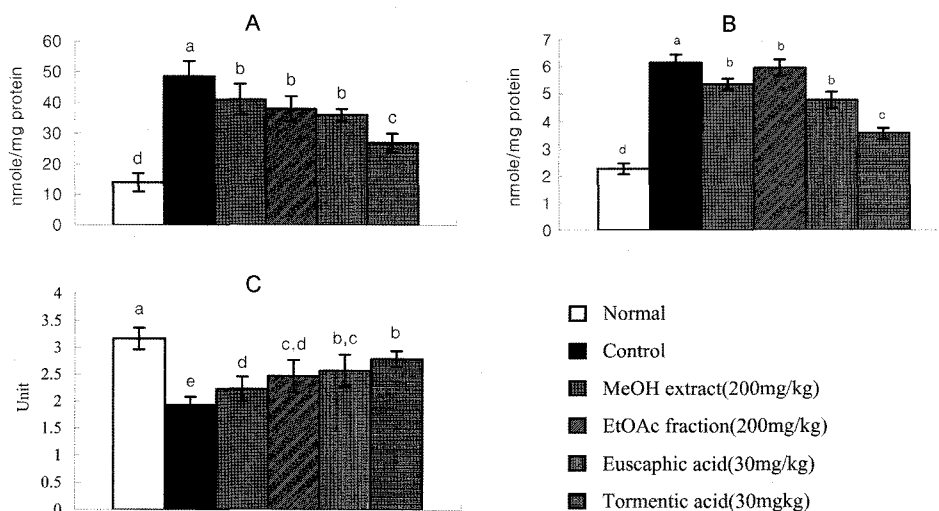
**간장조직 중의 지질 및 콜레스테롤 함량변화** - 고지방 식이로 유발된 비만 흰쥐는 간장 조직 중에서도 total cholesterol, triglyceride 및 cholesterol이 약 2배 증가되어 있는 것으로 나타났다(Table IV). 시료의 투여로 이러한 간장조직 중의 total cholesterol, triglyceride 및 cholesterol의 함량이 현저히 감소하였으나 정상군에는 미치지 못하였다.

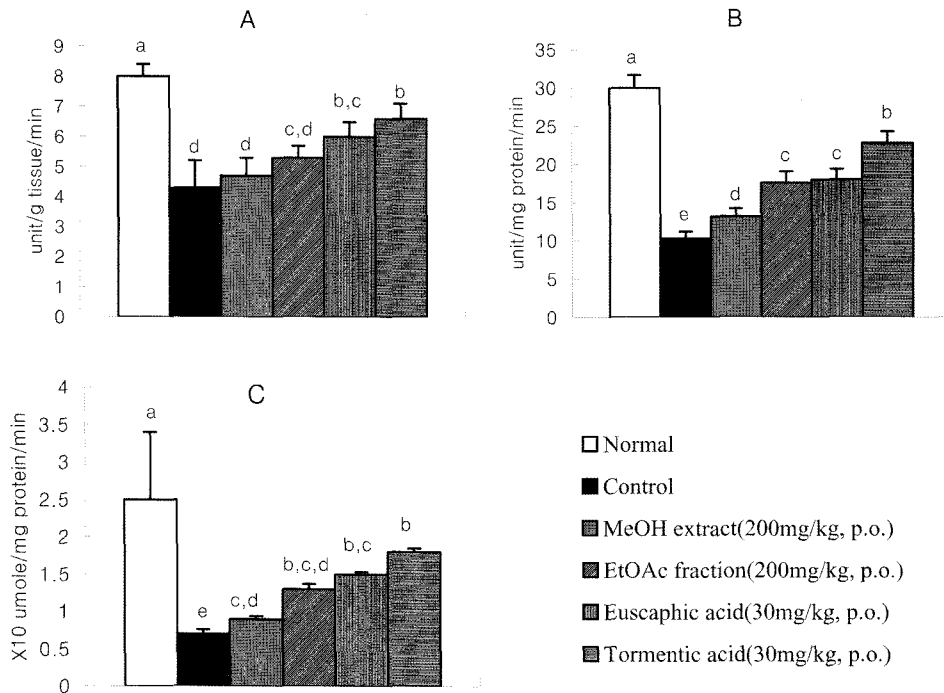
**혈중 과산화지질 생성과 hydroxyl radical 및 SOD 활성 변화** - 고지방 식이로 유발된 비만 흰쥐는 혈중 과산화지질, hydroxy radical 생성이 크게 증가하였으며 SOD 활성은 감소하였다(Fig. 2A). 정상군의 malondialdehyde(MDA)의 함량이  $23 \pm 1.17$  MDA nmol/ml of serum인데 비하여 고지

방식으로 유도한 실험동물에서는  $42.9 \pm 2.03$  MDA nmol/ml of serum으로 약 2배 정도 증가되었다. 이에 비해 시료투여 군들은 각 시료를 4주간 투여함으로써 이러한 과산화지질을 크게 억제하는 것으로 나타났다. 그 활성의 크기는 MeOH extract, EtOAc fraction, euscaphic acid, tormentic acid의 순으로 나타났다.

그리고 혈중 hydroxyl radical을 측정 한 결과 정상군은  $2.56 \pm 0.09$  nmol/mg protein인데 비하여 고지방 식이 비만 흰쥐는  $5.87 \pm 0.19$  nmol/mg protein으로 2배 증가하였으며 시료 투여군은 이를 현저히 감소시켰다(Fig. 2B). 고지방식이 비만 흰쥐는 혈중 SOD의 활성이  $1.99 \pm 0.04$  unit/mg protein으로 정상군  $3.09 \pm 0.18$  unit/mg protein보다 약 65.7% 정도 억제되었다. 해당군에서 얻은 시료를 투여하였을 때 SOD 활성은 상당히 회복되는 것으로 나타났다(Fig. 2C).

**간 조직 내 항산화계 효소 활성의 변화** - Fig. 3은 고지방 식이로 유도한 비만흰쥐의 항산화계 효소에 미치는 효

**Fig. 2.** Effect of the *R. rugosa* extract and its components on the blood lipid peroxide- (A), hydroxyl radical (B) concentrations and SOD (C) activity in high fat-fed rats.



**Fig. 3.** Effect of *R. rugosa* on hepatic antioxidant enzymes activities of the rats fed hyperlipidemic diet. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean  $\pm$  S.D. for eight experiments. Values followed by the same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ). SOD: superoxide dismutase (A),: one unit of SOD was defined as the which inhibited the reduced of alkaline DMSO-mediated cytochrome C by 50%, GSH-Px: glutathione peroxidase (B): oxidized NADPH nmole/mg protein/min, Catalase (C): decreased hydrogen peroxide nmole/mg protein/min.

과를 관찰한 결과이다. 비만쥐에서 SOD 활성이 정상군에 비하여 약 50% 감소하던 것이 EA와 TA의 투여로 상당히 회복되는 것이 관찰되었다. 이러한 결과는 GPx 및 catalase의 활성에서도 유사한 경향으로 나타났다.

### 고찰

고지방의 섭취로 인한 비만에 따르는 고지혈증 및 간장해 등의 질환에 유익한 물질을 개발하는 것은 매우 기대되는 약화학적 연구이다. 그러므로, 저자 들은 해당근이 한국의 민간에서 당뇨병에 효과가 크다고 알려져 있기 때문에 고지방식이에 따르는 비만 및 고지혈에 유익할 것이라는 기대 하에 해당근 추출물과 분획물로 고지방식이 흰쥐에 대한 항고지혈 실험을 한 결과 해당근 메탄올 추출물과 그 에틸아세테이트 추출물이 효과가 있었으므로, 에틸아세테이트 분획물을 silica gel column chromatography로 물질을 분리한 결과 kaji-ichigoside F<sub>1</sub>, rosamultin, euscaphic acid, tormentic acid가 얻어졌으며, 이들의 물리화학적 실험결과 각 화합물들이 동정되었다. 이들 4 화합물들에 대한 예비실험결과 kaji-cihigoside F<sub>1</sub>과 rosamultin은 효과가 없었으며, 나머지 2 화합물인 euscaphic acid와 rosamultin은 유의성있는 효과를 나타내었으므로 이들 2 분리된 물질과 해당화 메

탄올 추출물 및 에틸아세테이트 추출물을 본 실험을 위해 실험재료로 사용하였다.

본 연구에서는 6주간 고지방 식이한 고지혈증 실험동물에 해당근의 분획 및 각 성분을 4주간 투여하고서 체중의 측정, 혈액 및 간장 중의 지질의 함량측정 및 혈액 중 항산화 효소 활성의 측정, 간조직 항산화활성 등을 측정하였다. 해당근 메탄올 추출물과 그 에틸아세테이트 분획물은 고지방식이 체중을 감소시켰으므로 해당근이 비만에 유효한 것으로 나타났으며, 그 분획물에 활성성분이 존재하는 것으로 나타났다. 에틸아세테이트 분획물에서 분리된 4종의 triterpenoid 중 kaji-ichigoside F<sub>1</sub>, rosamultin, euscaphic acid, tormentic acid 중 euscaphic acid와 tormentic acid가 유의성 있는 체중감소효과를 나타내었다. 또한 tormentic acid가 euscaphic acid보다 더 강한 효과를 나타내었다. 이러한 결과는 해당근 중 존재하는 특이적인 triterpenoid가 유효성분인 것을 의미하며 배당체는 효과가 미약하였다. 한편, 해당근 추출물, 분획물 및 활성성분 euscaphic acid, tormentic acid 투여는 고지방식이의 결과 증가된 후복강내 지질 및 부고환 주위의 지방 중량이 감소시켰으므로 사용된 시료들이 지질대사에 관여하고 있음을 보였다.

고지혈증은 소장에서 중성지질의 합성과 합성과 chylomicron의 분비증가, 간장에서 중성지방의 합성증가, VLDL, LDL-

**Table V.** Effect of MeOH extract, EtOAc fraction, Euscaphic acid and Tormentic acid obtained from *R. rugosa* roots on hepatic lipid concentration in high fat fed rats

Treatment	Dose (mg/kg)	Total lipid (mg/g of tissue)	Triglyceride (mg/g of tissue)	Cholesterol (mg/g of tissue)
Untreated		12.7±1.07 <sup>e</sup>	9.13±0.72 <sup>d</sup>	2.50±0.27 <sup>c</sup>
Control		28.9±2.33 <sup>a</sup>	19.6±1.48 <sup>a</sup>	5.27±0.49 <sup>a</sup>
MeOH extract	200	25.8±1.88 <sup>a,b</sup>	17.4±1.36 <sup>a,b</sup>	4.63±0.24 <sup>b</sup>
EtOAc fraction	200	23.2±1.45 <sup>b,c</sup>	16.2±1.30 <sup>b,c</sup>	4.27±0.31 <sup>b,c</sup>
Euscaphic acid	30	21.9±2.10	16.0±2.00	4.01±0.25 <sup>c,d</sup>
Tormentic acid	30	18.5±2.37 <sup>d</sup>	13.7±1.57 <sup>c</sup>	3.63±0.19 <sup>d</sup>

Rats were orally pretreated the extracts (MeOH extract and EtOAc fraction) and its components (Euscaphic acid and Tormentic acid) daily for consecutive 4 weeks after the induction of high fat-fed animal, and then killed 24 h after the last treatment. Values are mean±S.D. for eight experiments. Values followed by the same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ).

cholesterol 합성 및 분비증가, HDL-cholesterol의 합성 감소 및 lipase의 활성감소로 인한 말초조직에서의 중성지방의 제거감소에 기인한다.<sup>17,18)</sup> 본 실험에서 해당근에서 얻은 각 시료들은 고지방식이의 결과 유도된 흰쥐의 증가된 total cholesterol, LDL-cholesterol의 혈중 함량 및 동맥경화지수를 현저히 감소시키는 한편 감소된 HDL-cholesterol 함량은 정상군 수준으로 회복시켰다. 이러한 현상은 해당근 시료의 투여로 고지방 식이 비만 흰쥐의 동맥경화 위험이 감소되었다는 것을 뜻한다.

또한, 고지방식으로 유도된 고지혈증 흰쥐는 혈중 hydroxyl radical 생성과 SOD 활성이 현저히 증가하였으며, 해당근 시료의 투여로 이들이 감소되었다. 혈액에서 과도하게 생성된 과산화지질은 혈중으로 방출되어 glutathione peroxidase-glutathione reductase system 같은 효소계에 의해 분해될 때까지 혈중을 순환하며 혈관 벽에 상해를 입히게 된다.<sup>19)</sup> 본 실험으로 해당근에서 분리된 EA와 TA는 고지방식으로 유도된 ·OH기와 같은 유리기를 감소시키는 것으로 나타난 바지질과산화에 따르는 조직손상을 예방할 것으로 추측된다.

또한 고지방식이 유도 고지혈 흰쥐는 간조직의 지질과산화물 TBARS 함량으로, 단백질 산화를 단백질 카르보닐 함량으로 측정하였다. TBARS 중 malondialdehyde는 지질과산화의 주요 부산물로서 LDL 산화의 유발인자로 보고되고 있다.<sup>20)</sup> 유리기에 의한 생체내 손상을 측정하는 방법에 있어 단백질법은 지질과산화 측정법보다 예민한 방법으로 알려져 있다.<sup>21)</sup> 단백질 카르보닐의 생성은 지질의 과산화시에 생성되는 유리기들이 생체내 단백질과 반응한 결과이다. 당뇨병 동맥경화 환자의 동맥조직내 단백질 산화를 관찰한 결과 정상인에 비해 현저히 높은 것은 주목할만하다. 해당근은 비만 흰쥐의 단백질 카르보닐의 함량을 낮춘 것은 해당근 활성성분이 조직단백질의 산화를 효과적으로 억제한 결과에 의한 것이라 생각된다.

비만 흰쥐에 대한 해당근 시료가 미치는 영향을 알아보기 위해 실험하였다. 즉, 고지방 식이 흰쥐에 시료들을 4주간 투

여하고서 활성산소 해독제인 total SOD, GPx, catalase 활성을 측정하였다. 이들 효소들은 활성산소종을 소거시키는데 작용하는 효소들이다. 생체내 발생 활성산소종으로부터 세포를 보호하기 위해 생체는 항산화제로 SOD, GPx, catalase 등의 효소들과 비효소계 항산화제로 비타민 C, tocopherol, selenium, uric acid, sulfhydryl compounds, phenol, 환원성 Glutathione, carotenoids, mannitol 등을 가지고 있다.<sup>22)</sup> 이러한 효소적 및 비효소적 항산화제들은 산화적 스트레스를 감소시킬 뿐 아니라 iNOS의 발현을 증가시켜 endothelial derived relaxing factor (EDRF)인 NO의 합성을 촉진함으로써 내피의존성 혈관확장에 관여하여 죽상동맥경화를 완화시키는 것으로 알려져 있다.<sup>23)</sup> 따라서 해당근의 활성성분에는 콜레스테롤 식이로 인한 항산화 효소계 활성의 저하를 완화시켜 줌으로써 항동맥경화 효과를 나타낼 것으로 생각된다.

이상과 같이 해당근은 고지방식으로 유도된 비만을 감소시키는 효과가 있었으며 그 활성성분은 tormentic acid와 euscaphic acid와 같은 triterpenoid인 것으로 확인되었다. 이들 성분들은 비만 흰쥐의 고지혈증을 개선하였으며, 간조직내 항산화계 효소 활성을 회복시킴으로써 비만 흰쥐의 지질대사의 정상화에 기여하였을 것으로 예측되었다. 궁극적으로 euscaphic acid와 tormentic acid는 고지방 식이에 따르는 비만을 개선하는 해당근의 유효성분인 것으로 결론지을 수 있었다.

## 사 사

본 연구는 21세기 프론티어연구개발사업인 자생식물이용 기술개발사업단의 연구비지원(과제번호 : PF0320301-00)에 의해 수행되었습니다.

## 인용문헌

1. Rees, K. R. (1964) *Fatty acid induction by toxic agent* (in

- metabolism and physiological significance of lipid), 443-453, John Wiley & Son Ltd.
2. Gordis, E. (1969) Lipid etabolism of carbon tetrachloride, *J. Clin. Invest.*, **48**: 203-209.
  3. Redgraviln, T. G and Zilversmit, B. B. (1969) Does puro-mycin block release of chylomicrin from the intestine, *Amer. J. Physiol.*, **217**: 336-340.
  4. Young, H. S., Park J. C., and Choi, J. S. (1987) Triterpenoid glycosides from *Rosa rugosa*, *Arch. Pharm. Res.*, **10**: 219-222.
  5. Young, H. S., Park, J. C., and Choi, J. S. (1987) Isolation of (+)-catechin from the roots of *Rosa rugosa*, *Kor. J. Pharmacogn.*, **18**: 177-179.
  6. Murakami, C., Ishijima, K., Hirota, M., Sakaguchi, K., Yoshida, H., and Mizushina, Y. (2002) Novel anti-inflammatory compounds from *Rubus sieboldii*, triterpenoids, are inhibitors of mammalian DNA polymerases, *Biochimica et Biophysica Acta*, **1596**: 193-200.
  7. Jung, H. J., Nam, J. H., Coi, J., Lee, K. T., and Park, H. J. (2005) 19 $\alpha$ -Hydroxyursane-type triterpenoids: antinociceptive antiinflammatory principles of the roots of *Rosa rugosa*, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, **28**: 101-104.
  8. Richmond, W. (1976) Use of cholesterol oxidase for assay of total and free cholesterol in serum by continuous flow analysis, *Clin. Chem.*, **22**: 1579-1588.
  9. Ajit, S., Joseph, D., and Bennie, Z. (1987) A method for the sequential colorimetric determination of serum triglycerides and cholesterol, *Clin. Biochem.*, **20**: 167-172.
  10. Ven Gent, C.M., and Roseleur, O.J. (1974) Quantitative determination of phospholipids in blood serum or plasma by a nondestructive method, *Clin. Chim. Acta*, **57**: 197-203.
  11. Kobatake, Y., Saito, M., Kuroda, K. Kobayashi, S., and Innami, S. (1987) Influence of fish consumption on serum lipid and lipid peroxide concentrations in middle aged subjects. *J. Japan Soc. Nutr & Food Sci.*, **40**: 103-107.
  12. Oyanagui, Y. (1984) Reevaluation of assay methods and establishment of Kit for superoxide dismutase activity. *Anal. Biochem.*, **42**: 290-296.
  13. Gao, R., Yuan, Z., Zhao, Z., and Gao, X. (1998) Mechanism of pyrogallol autoxidation and determination of superoxide dismutase enzyme activity, *Bioelectrochem. Bioener.*, **45**: 41-45.
  14. Aebi, H. (1974) *Catalase in the Method of enzymatic analysis*-(H. U. vergmeter, ed.). Academic press, New York, **2**: 673-675.
  15. Berenice, C. W., Michel, V., Allain, F., Catherine, G, Veronique, D., Josianne A., and Marie, J. R. (1992) Selenium, glutathione peroxidase (GSH-Px) and lipid peroxidation products before and after selenium supplementation. *Clin. Chim. Acta*, **207**: 137-142.
  16. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr, and R. J. Rendall (1951) Protein Measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **256**: 9994-9998.
  17. Raul, G. M., Ivete, A. R., and Mario, H. H. (1990) Effects of triton WR-1339 and heparin on the transfer of surface lipids from triglyceride rich emulsions to HDL in rats, *Lipid*, **25**: 7012-705.
  18. Goldstein, J. L. and Brown, M. S. (1975) Familial hypercholesterolemia. A genetic regulatory defect in cholesterol metabolism, *Am. J. Med.*, **58**: 147-150.
  19. Minor, L. K., Mahlberg, F. H., Jerome, W. G., Leis, J. C., Rothblat, G. H., and Glick, J. M. (1991) Lysosomal hydrolysis of lipids in a cell culture model of smooth muscle foam cells, *Experimental and Molecular Pathology*, **54**: 159-171.
  20. Gilland, F. D., Berhane, K. T., Li, Y. F., Gauderman, W. J., McConnell, R., and Peters, J. (2003) Children's lung function abd antioxidant vitamin, fruit, juice, and vegetable intake, *American Journal of Epidemiology*, **158**: 576-584.
  21. Urano, S., Asai, Y., Mataka, S., Matsuo, S., Izumiyama, M., Ohtsubo, K., and Endo, T. (1997) Oxidative injury of synapse and alteration of antioxidative defence systems in rats, and its prevention by vitamin E, *European Journal of Biochemistry*, **245**: 64-70.
  22. Rodriguez-Porcel, M., Lerman, L. O., Holmes, D. R., Richardson, D., Napoli, C., and Lerman, A. (2002) Chronic antioxidant supplementation attenuates nuclear factor-B activation and preserves endothelial function in hypercholesterolemic pigs, *Cardiovascular Research*, **53**: 1010-1018.
  23. Fang, Y. Z., Yang, S., and Wu, G. (2002) *Free radicals, antioxidants, and nutrition*, *Nutrition*, **18**: 872-879.

(2005년 11월 25일 접수)