

## 참나물이 만성적으로 알코올 유도된 흰쥐의 간손상에 미치는 영향

추명희 · 이재준 · 이명렬\*

조선대학교 식품영양학과

Received August 30, 2007 / Accepted September 27, 2007

**Effect of *Pimpinella Brachycarpa* Ethanol Extract on Chronically Ethanol-Induced Liver Damage in Rats.** Myung Hee Choo, Jae Joon Lee and Myung Yul Lee\*. *Dept. of Food and Nutrition, Chosun University, Gwangju 500-759, Korea* - This study was performed to investigate the effect of ethanol extract of *Pimpinella brachycarpa*(PBE) on chronically ethanol-induced hepatotoxicity in rat liver. Sprague-Dawley rats weighing 90-130 g were divided into 5 groups; normal group(NOR), ethanol(35%, 10 ml/kg) treated group(CON), PBE 200 mg/kg treated group(P1), PBE 200 mg/kg and ethanol treated group(P2), and PBE 400 mg/kg and ethanol treated group(P3). PBE was also fractionated by the following solvent: n-hexane, chloroform, ethylacetate and n-butanol. The antioxidative capacity of the n-hexane fraction was the highest among fractions and was similar to that of butylated hydroxytoluene(BHT). The body weight gain and feed intake of the rats were decreased by ethanol administration, but were gradually increased to the similar levels of the NOR group by administering PBE. The AST activity in serum elevated by ethanol was significantly decreased by administering the high dosage of PBE, but exerted no significant change on serum ALT activity. It was also observed that the hepatic activities of xanthine oxide(XO), catalase and glutathione peroxidase(GSH-Px) increased by ethanol were markedly decreased in the combined ethanol and PBE administered groups(P2 and P3), but not in the activity of superoxide dismutase(SOD) as compared with the CON group. The glutathione(GSH) contents were decreased by ethanol administration, however, increased after administering PBE. These results suggest that ethanol extract of *Pimpinella brachycarpa* has a possible positive effect on the liver function in hepatotoxicity-induced rats by ethanol administration.

**Key words** – *Pimpinella brachycarpa*, ethanol, hepatotoxicity, antioxidative enzymes

### 서 론

경제수준이 향상되고 복잡해지는 현대 생활 속에서 알코올은 그 소비가 과도하게 증가하고 있어 만성적이나 과량의 섭취로 인한 건강장애가 사회문제가 되고 있다. 알코올의 분해는 일차적으로 간에서 일어나며 주로 alcohol dehydrogenase와 NAD<sup>+</sup>에 의해 acetaldehyde와 NADH를 생성한다 [35]. 간에서 생성된 acetaldehyde는 혈액을 통해 간의 조직으로 운반되어 에너지 대사에 이용될 수도 있으나 간에서 주로 지방산의 합성에 이용됨으로써 지방간의 원인이 된다 [24]. 또한 과량 섭취된 알코올의 독성은 그 대사물인 acetaldehyde의 여러 가지 생물분자들과의 다양한 반응성과 알코올 분해대사 시 증가되는 자유기 발생에 주된 작용을 한다 [19]. 자유기 발생에 의한 세포손상은 이미 많은 연구에 의해 밝혀져 있으며 간에서 주로 일어나는 알코올 분해는 당연히 간조직과 세포막을 비롯한 여러 가지 생물분자들에 손상을 줌으로써 간의 손상과 함께 간 질환들을 초래하게 되고, 이때 생성된 유리산소와 세포막에 다량 함유되어 있는 불포화

지방산과 결합되어 지질과산화물이 생성되거나 단백질이나 DNA 손상을 유발하여 산화적 세포손상이 촉진된다.

이로 인해 최근 음주로부터 발생하는 알코올로 인한 질병이나 유해 작용을 해소시키거나 경감시키기 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다[7,8]. 특히 식품분야에서는 활성산소의 반응성을 감소시키거나 무력화할 수 있는 물질의 발굴과 이용에 커다란 관심을 가지고 있다[2,7,8].

참나물(*Pimpinella brachycarpa* Nakai)은 산형과(Umbelliferae)에 속하고 웅달진 산지에 자생하며, 방향성을 지닌 다년생 초본으로 예로부터 한국 사람들이 즐겨먹어 온 산나물로[26] 미나리향과 셀러리향이 복합된 독특한 향기를 지니고 있을 뿐만 아니라 무기질 성분, 비타민 등 각종 영양소[29]는 물론 고혈압, 중풍을 예방하고 신경통과 대하증에도 좋으며 지혈과 해열제로서의 효과도 있는 것으로 보고되어 약용으로도 널리 사용되었다[47]. 참나물은 *in vitro*에서 항돌연변이 활성을 나타내고[30], 열처리한 녹즙에서도 돌연변이 억제효과가 있으며[37], polyphenol oxidase 효소 갈변반응 생성물이 돌연변이를 억제시키는 활성이 강한 것[21]으로 보고되었다. Kim 등 [25]은 흰쥐의 brain homogenate와 참나물을 반응시켜서 NADPH dependent lipid peroxidation을 측정된 결과 과산화지질 생성을 억제시켜 항산화효과가 있음을 보고하였다.

따라서 본 연구에서는 알코올에 대한 간 보호 효과가 우

#### \*Corresponding author

Tel : +82-62-230-7722, Fax : +82-62-225-7726

E-mail : mylee@mail.chosun.ac.kr

수할 것으로 예견되는 참나물 에탄올 추출물 투여가 흰쥐의 만성적인 알코올에 의한 간의 산화적 세포손상에 미치는 영향을 검토코자 하였다.

## 재료 및 방법

### 참나물 추출물의 제조 및 다용매 분획추출

참나물(*Pimpinella brachycarpa*)은 2003년 4월 전남 나주시 소재 전라남도 농업기술원에서 재배한 전초를 수세하고 음건한 것을 분쇄한 후 시료로 사용하였다. 참나물 100 g과 80% 에탄올 500 ml를 혼합하여 blender(Braun MR 350, CA, USA)로 조분쇄하고 65°C에서 환류냉각기를 부착하여 3시간씩 3회 추출한 후 Whatman filter paper (No. 2)로 여과하였다. 여액을 40°C 수욕 상에서 rotary vacuum evaporator (R-144, Buchi, Switzerland)로 용매를 제거하고 감압·농축한 후 -70°C에 냉동 보관하면서 시료로 사용하였다. 참나물 에탄올 추출물은 separating funnel에 의한 용매별 분획으로 n-hexane, chloroform, ethylacetate 및 n-butanol로 연속 추출한 후 각 분획물을 농축하여 *in vitro* 항산화활성 측정용 시료로 하였다[23].

### Rancimat에 의한 항산화지수(antioxidant index, AI) 측정

항산화지수는 Joo 등의 방법[22]에 의하여 Rancimat (Metrohm 679, Herisan, Switzerland)을 이용하여 측정하였는데, 분획에 포함된 용매를 완전히 제거한 후 각 분획의 함량이 600 ppm이 되도록 soybean oil(Sigma Co., USA)에 첨가하고 초음파(Ultrasonic processor, UCX-750, USA)를 이용하여 시료 추출물과 유지가 잘 혼합되도록 하였다. 항산화지수의 측정 조건은 시료 3.0 g를 반응용기에 취하고 증류수 70 ml를 측정용기에 넣은 후 110°C에서 air flow rate를 20 l/hr로 하여 산화 안정성을 비교하였다[13]. 항산화지수(antioxidant index, AI)는 분획을 첨가한 실험군의 유도시간을 분획을 첨가하지 않은 대조군의 유도시간으로 나눈 값으로 구하였고, 모든 측정치는 3회 반복 시험하여 얻은 값의 평균치로 표시하였다. 기존의 상업용 합성항산화제인 butylated hydroxytoluene(BHT)를 참나물 에탄올 분획들과 동일하게 유지에 첨가하여 비교 실험하였다.

### 실험동물 사육 및 식이

조선대학교 실험동물센터에서 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐를 공급받아 실험 전 1주일간 고형 배합사료(삼양사료)와 물로 적응시킨 후, 체중 90~130 g인 것을 난괴법(randomized complete block design)에 의하여 Table 1과 같이 각 군당 8마리씩 5군으로 분류하였다. 실험식은 AIN-93을 기준[43]으로 조제하였으며, 실험군은 정상군(NOR), 대조

Table 1. Composition of experimental diet

Groups	Diet composition
NOR	Basal diet <sup>1)</sup>
CON	Basal diet + EtOH <sup>2)</sup>
P1	Basal diet + PBL <sup>3)</sup>
P2	Basal diet + PBL <sup>3)</sup> + EtOH <sup>2)</sup>
P3	Basal diet + PBH <sup>4)</sup> + EtOH <sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>According to AIN-93 diet composition[43].

<sup>2)</sup>EtOH : 35 % ethanol 10 ml/kg of b.w./day.

<sup>3)</sup>PBL : *P. brachycarpa* ethanol extract 200 mg/kg of b.w./day.

<sup>4)</sup>PBH : *P. brachycarpa* ethanol extract 400 mg/kg of b.w./day.

군(35% 알코올 10 ml/kg of b.w./day, CON, 알코올 투여군) 참나물 에탄올 추출물(200 mg/kg of b.w./day) 단독투여군(P1), 알코올과 참나물 에탄올 추출물 저용량(200 mg/kg of b.w./day) 병합투여군(P2), 알코올과 참나물 에탄올 추출물 고용량(400 mg/kg of b.w./day) 병합투여군(P3)으로 분류하였다. 흰쥐는 cage에 1마리씩 넣어 6주 동안 사육하였다. 참나물 에탄올 추출물 투여 용량은 예비 실험을 토대로 독성이 나타나지 않은 수준인 흰쥐 체중 kg 당 200 mg 과 400 mg이 함유되도록 생리식염수에 조제한 시료를, 알코올은 Fujji 등의 방법[17]에 준하여 35% 알코올을 체중 kg 당 10 ml를 투여하였으며, 정상군은 동일한 양의 생리식염수를 6주간 경구 투여하였다. 실험기간 중 동물의 상태를 관찰하면서 체중은 1주일 간격으로, 식이섭취량은 2일 간격으로 측정하였고 사육기간의 체중증가량을 동일 기간의 식이섭취량으로 나누어 각 실험군의 식이효율을 구하였다.

### 실험동물 처치

실험동물은 처치 전 18시간 동안 절식시킨 후 CO<sub>2</sub>로 가볍게 마취된 상태에서 단두 절단하여 채혈한 후 4,500×g에서 20분간 원심분리한 다음 분리한 혈청을 ALT 및 AST 활성 측정에 사용하였다. 혈액을 채취한 후 얼음위에서 즉시 간을 적출하여 0.9% 생리식염수로 남아 있는 혈액 및 기타 부착물질을 제거하고 여지로 수분을 제거한 후 효소 활성 저하를 예방하기 위하여 급속 동결하여 -70°C의 deep freezer에 보관하면서 항산화 관련 효소 활성 및 항산화 능력 측정에 사용하였다.

### 혈청 중 AST 및 ALT 활성 측정

혈청 aminotransferase 활성은 Reitman과 Frankel의 방법[43]으로 조제된 혈청 transaminase 측정용 kit(Shinyang Co., Seoul, Korea)를 사용하여 ALT 및 AST 활성을 측정하였고, 단위는 혈청 ml 당 Karmen unit로 표시하였다.

### 간조직 중 항산화 효소계의 활성 측정

간조직 1 g 당 4배량의 0.25 M sucrose buffer (pH 7.5)를

가하고 4℃에서 ultra turax homogenizer(Janke & Kunkel, Germany)로 10,000× g에서 마쇄한 후, 마쇄액은 600× g 4℃에서 10분간 원심분리하여 핵과 미마쇄 부분을 제거한 다음 상정액을 15,000× g에서 20분간 다시 원심분리하였다. 상정액을 취하여 xanthine oxidase (XO), superoxide dismutase (SOD), catalase 및 glutathione peroxidase (GSH-Px) 활성 측정을 위한 효소원으로 사용하였다. XO 활성은 Downey 방법[11], SOD 활성은 Crapo 등의 방법[9], catalase 활성은 Aebi 방법[1], GSH-Px 활성은 Flohe 등의 방법[15]으로 측정하였다.

**간조직 중 과산화지질 함량 분석**

과산화지질 함량은 Buege와 Aust의 방법[5]에 의하여 측정하였다. TBA 시약(0.375% TBA in 0.25 N HCl) 1.0 ml에 BHT를 최종농도가 0.01%가 되게 가하고 균질액 1.0 ml를 가하여 잘 혼합한 후 98℃로 15분간 가열하였다. 즉시 냉각시켜 1,500× g 으로 15분간 원심분리하고 535 nm에서 상정액의 흡광도를 측정하였다. Malondialdehyde(MDA)의 흡광계수  $1.56 \times 10^2 \text{ l} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 를 이용하여 계산하였다.

**간조직 중 GSH 함량 측정**

GSH 함량은 Tietze의 방법[48]을 약간 변형하여 측정하였다. 간조직 0.1 g과 10배의 5%(w/v) sulfosalicylic acid(SSA) 2 ml를 첨가하여 마쇄한 다음 10,000× g에서 10분간 원심분리한 후 상정액을 GSH 함량 측정을 위하여 사용하였다. 시험관에 working buffer 700 μl, 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid 100 μl, 시료액 20 μl 및 증류수 180 μl를 가하여 30℃에서 3분간 방치한 후 GSSG 5 μl를 첨가하고 412 nm에서 1분 동안 변화되는 흡광도를 측정하였다. GSH 함량은 GSH 표준액 1 μM, 2 μM, 3 μM 및 4 μM을 상기와 같은 방법으로 측정하여 계산하였다.

**단백질 정량**

단백질의 정량은 Lowry 등의 방법[33]에 의하여 bovine serum albumin(Sigma, A-2153)을 표준물질로 하여 측정하였다.

**통계처리**

본 실험에서 얻은 결과는 SPSS 통계 package를 이용하여 실험군당 평균과 표준오차를 계산하였고, 일원배치 분산분석(one-way analysis of variance)을 한 후 p<0.05 수준에서 Tukey's test에 의하여 각 실험군의 평균치간의 유의성을 검정하였다.

**결과 및 고찰**

**Rancimat로 측정된 항산화 지수**

참나물 에탄올 추출물 분획과 BHT의 농도가 600 ppm이

되도록 soybean oil에 첨가한 후 공기에 의한 지질 자동산화 를 유발시켜 지질 산패도를 Rancimat으로 측정된 항산화지 수는 Table 2와 같다.

Rancimat에 의한 항산화지수는 시료를 첨가 후 유지의 복잡한 산화과정 중 유도기간 마지막에 상당량의 저분자량 휘발성 카보닐산이 유리되는 양으로 측정한다[6,13]. 항산화지 수는 n-hexane 분획이 1.98로 가장 높게 나타났으며, ethylacetate 분획이 1.29, chloroform 분획이 1.09, n-butanol 분획이 1.07 및 water 분획이 1.02로 대조구의 항산화지수 1.00보다 높은 활성을 나타냈으며, 특히 n-hexane 분획의 활성이 가장 높아 기존의 항산화제인 BHT와 유사한 활성을 나타냈다. 본 실험에서 참나물 에탄올 추출물의 전 분획에서 대조구보다 높은 항산화활성을 나타냈는데 이는 참나물 에탄올 추출물에 항산화활성을 나타내는 물질이 다량 함유되어 있는 것으로 판단되며 우수한 항산화제로의 개발이 기대된다.

**체중증가율, 식이섭취량 및 식이효율**

참나물 에탄올 추출물과 알코올을 6주간 경구 투여하여 측정된 흰쥐의 체중증가량, 식이섭취량 및 식이효율은 Table 3과 같다.

6주간의 체중증가량은 Table 3과 같이 대조군은 정상군에 비하여 현저히 감소되었으나, 알코올과 참나물 에탄올을 병합투여한 P2군과 P3군은 알코올 투여로 감소된 체중을 정상군에 근접토록 유의하게 증가시켰으나 투여 용량에 따른 변화는 나타나지 않았다. 식이섭취량의 경우도 알코올을 단독 투여한 대조군이 다른 군에 비하여 유의하게 저하되었으나, 알코올과 참나물 에탄올 추출물을 용량별 병합투여한 P2군과 P3군은 정상군에 가깝게 식이섭취량이 증가되었다. 식이효율은 실험군 간에 유의차가 나타나지 않았다. 이러한 결과는 알코올을 섭취 시 체중 및 식이섭취량이 감소되었다는 보고

Table 2. Antioxidative activities of each fraction of *Pimpinella brachycarpa* ethanol extract on soybean oil

Fraction <sup>1)</sup>	IP <sup>2)</sup>	AI <sup>3)</sup>
Control	7.05 <sup>4)</sup>	1.00 <sup>c</sup>
n-Hexane	14.0 <sup>a</sup>	1.98 <sup>a</sup>
Chloroform	7.72 <sup>c</sup>	1.09
Ethylacetate	9.11 <sup>b</sup>	1.29 <sup>b</sup>
n-Butanol	7.55 <sup>c</sup>	1.07 <sup>c</sup>
Water	7.21 <sup>c</sup>	1.02 <sup>c</sup>
BHT	13.96 <sup>a</sup>	1.97 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>Fractions were separated by separatory funnel.

<sup>2)</sup>Induction period(IP) of oil was determined by Rancimat's test at 110℃.

<sup>3)</sup>Aantioxidant index(AI) was expressed as IP of oil containing various fraction/IP of soybean oil.

<sup>4)</sup>Means with different letters are significantly different (p<0.05).

Table 3. Body weight gain, feed intake and feed efficiency ratio in alcohol and/or *Pimpinella brachycarpa* ethanol extract administered rats

Groups <sup>1)</sup>	Body weight gain (g/day)	Feed intake (g/day)	Feed efficiency ratio <sup>2)</sup>
NOR	5.20±0.31 <sup>3)a3)</sup>	25.50±3.21 <sup>a</sup>	0.20±0.002 <sup>NS4)</sup>
CON	4.89±0.21 <sup>b</sup>	20.81±2.08 <sup>b</sup>	0.23±0.005
P1	5.23±0.24 <sup>a</sup>	25.64±1.08 <sup>a</sup>	0.20±0.008
P2	4.92±0.36 <sup>b</sup>	22.15±3.12 <sup>b</sup>	0.22±0.005
P3	5.14±0.41 <sup>a</sup>	24.79±3.62 <sup>a</sup>	0.20±0.009

<sup>1)</sup>See the legend of Table 1.  
<sup>2)</sup>Feed efficiency ratio : FER(body weight gain/feed intake).  
<sup>3)</sup>Values are mean ± S.E. of 8 rats per each group and different superscripts in the same column indicate significance at p<0.05 between groups by Tukey's test.  
<sup>4)</sup>NS : not significantly different among groups.

[32,45]와 일치하였다. 알코올 중독 환자들의 경우에도 식이 섭취량이 유의적으로 감소되었으며, 다른 영양소들의 흡수도 저하되어 결국 영양 결핍으로 인해 체중 감소를 초래한다고 보고[35]하였으며, 또한 과량의 알코올 섭취는 열 발생을 통해 에너지 소모가 증가되기 때문에 체중 감소 현상이 나타나는 것이라 보고하였다[44].

**혈청 중 ALT 및 AST 활성**

참나물 에탄올 추출물과 알코올을 6주간 경구 투여한 후 측정된 흰쥐의 혈청 중 ALT와 AST 활성은 Table 4와 같다.

Table 4에서와 같이 혈청 중 ALT 활성에서, P1군은 46.51±5.03 unit로 정상군의 49.52±3.30 unit와 유사하였고, 대조군은 57.74±5.11 unit로 정상군에 비하여 유의적인 증가를 나타내었으며, P2군과 P3군은 54.55±3.18 unit와 50.41±3.22 unit로 대조군에 비하여 감소는 되었으나 유의적인 변화는 없었다.

혈청 중 AST 활성은 P1군이 61.30±7.23 unit로 정상군의 64.90±5.35 unit와 유사하였으나 알코올만을 단독 투여한 대

Table 4. Activities of ALT and AST in serum of rats treated with alcohol and/or ethanol extract of *Pimpinella brachycarpa*

Groups <sup>1)</sup>	ALT (Karmen unit/ml)	AST (Karmen unit/ml)
NOR	49.52±3.30 <sup>b2)</sup>	64.90±5.35 <sup>b</sup>
CON	57.74±5.11 <sup>a</sup>	84.08±6.95 <sup>a</sup>
P1	46.51±5.03 <sup>b</sup>	61.30±7.23 <sup>b</sup>
P2	54.55±3.18 <sup>a</sup>	80.01±4.50 <sup>a</sup>
P3	50.41±3.22 <sup>a</sup>	67.42±3.38 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>See the legend of Table 1.  
<sup>2)</sup>Values are mean ± S.E. of 8 rats per each group and different superscripts in the same column indicate significance at p<0.05 between groups by Tukey's test.

조군은 84.08±6.95 unit로 정상군에 비하여 유의하게 증가되었고, 알코올과 참나물 에탄올 추출물 저용량 병합투여한 P2군은 80.01±4.50 unit로 유의적인 변화를 나타내지 않았으나, 고용량 병합투여한 P3군은 67.42±3.38 unit로 활성이 감소되어 정상군의 수치에 근접하였다. 본 실험에서 알코올 투여로 ALT와 AST 활성이 증가되었음은 Koo 등이 보고[27]한 바와 같이 지질대사 장애로 간세포의 괴사 및 파괴가 진행됨에 따라 간 중의 aminotransferase가 혈중으로 유출된 결과로 판단되며, 참나물 에탄올 추출물이 알코올 투여로 증가된 AST 활성을 정상식이만을 급여한 정상군에 근접되게 감소시켰음은 참나물이 손상된 간세포 기능을 회복시킨 것으로 사료된다.

**흰쥐의 간 조직 중 항산화효소 활성**

참나물 에탄올 추출물과 알코올을 6주간 투여하여 측정된 간 조직 중의 유리기 생성에 관여하는 효소인 XO 활성, 유리기 소거에 관여하는 효소인 SOD, catalase 및 GSH-Px 활성은 Table 5와 같다.

Xanthine을 기질로 하여 요산을 생성하는 과정에서 superoxide radical을 생성하는 효소로 알려진 간 조직의 XO 활성에서, 알코올 투여로 대조군은 37.97±5.69 unit로 정상군의 23.31±1.88 unit에 비하여 증가되었으나 참나물 에탄올 추출물을 병합투여한 P2군 26.97±5.63 unit, P3군 26.50±2.16 unit로 알코올 투여로 증가된 XO 활성이 대조군에 비하여 유의하게 감소되었으나 투여용량 간에는 유의차가 없었다. 알코올은 다른 식품과 달리 인체 조직 내에서 저장되지 못하는 xenobiotics이며, xenobiotics 투여 시 급성 간 손상이 유도되고 그로 인하여 간세포가 괴사되어 핵 분해가 초래되며 [12], 간이 손상을 받으면 ATP 함량이 감소되어 purine 대사가 촉진됨으로서 XO 활성이 증가되고 이로 인하여 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 생성

Table 5. Activities of XO, catalase, SOD, and GSH-Px in liver of rats treated with alcohol and/or ethanol extract of *Pimpinella brachycarpa*

Enzyme activity	XO <sup>2)</sup>	Catalase <sup>3)</sup>	SOD <sup>4)</sup>	GSH-Px <sup>5)</sup>
NOR <sup>1)</sup>	23.31±1.88 <sup>b6)</sup>	301.77±29.37 <sup>b</sup>	87.73±4.27 <sup>b</sup>	87.61±11.95 <sup>b</sup>
CON	37.97±5.69 <sup>a</sup>	499.24±20.42 <sup>a</sup>	110.12±7.40 <sup>a</sup>	120.43±18.85 <sup>a</sup>
P1	24.69±2.54 <sup>b</sup>	322.49±36.98 <sup>b</sup>	84.20±7.42 <sup>b</sup>	99.64±14.15 <sup>b</sup>
P2	26.97±5.63 <sup>b</sup>	461.29±30.01 <sup>a</sup>	101.21±8.23 <sup>a</sup>	98.06±10.40 <sup>b</sup>
P3	26.50±2.16 <sup>b</sup>	388.23±16.99 <sup>b</sup>	99.99±6.52 <sup>ab</sup>	96.51±11.95 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>See the legend of Table 1.  
<sup>2)</sup>mU/g protein.  
<sup>3)</sup>Decreased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> μmol/min/mg protein.  
<sup>4)</sup>μmol/min/mg protein.  
<sup>5)</sup>Decreased NADPH μmol/min/mg protein.  
<sup>6)</sup>Values are mean ± S.E. of 8 rats per each group and different superscripts in the same column indicate significance at p<0.05 between groups by Tukey's test.

이 증가되어 나타나는 산화적 손상을 유발하는 것으로 알려져 있다.

Table 5에서와 같이 간 조직 중 catalase 활성은 대조군이 499.24±20.42 unit로 정상군의 301.77±29.37 unit에 비하여 유의하게 증가되었는데 참나물 에탄올 추출물 병합투여로 증가된 활성을 감소시켰으나, 고용량 병합투여한 P3군에서만 유의하게 감소되었다. Catalase는 대사 과정 중 발생하는 활성산소종의 유리기를 제거할 뿐만 아니라 이들 활성산소에 의해 비가역적으로 불활성화 될 수도 있으며, 지방산화에 의해 생성된 유리기도 제거하는 것으로 보고되었다[16]. 알코올 투여로 인하여 catalase 활성도가 증가된 것은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 같은 free radical 생성이 증가되어 나타난 결과로 생각된다. 또한 참나물 에탄올 추출물 투여로 유리기 해독 효소의 일종인 catalase의 활성이 유의하게 감소된 것으로 보아 catalase가 비만에 의한 고지혈증 시 동맥경화증의 발생율이 증가한다는 사실[39]과 유리기가 동맥경화증의 발생에 상당한 관련이 있다는 보고[41]를 감안해 볼 때, 본 실험에서 혈청 중 지질 성분의 변동을 검토함은 의의가 있을 것으로 사료된다. 따라서 본 연구진은 참나물 에탄올 추출물이 고콜레스테롤 식이를 급여한 흰쥐의 혈청 중 지질 성상에 관한 연구도 수행하였는데, 참나물은 혈청 중 지질 성상에도 변화를 주어 고지혈증 예방효과가 있는 것으로 보고[28]하였다.

SOD는 superoxide anion radical(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)을 보다 반응성이 약한 과산화수소(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)로 전환시켜 이때 생성된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 GSH-Px, catalase 등의 작용에 의해 H<sub>2</sub>O로 무독화 됨으로써 산소독으로부터 생체를 보호하게 되는 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 소거효소이다 [10,34]. 간 조직 중 SOD 활성은 대조군이 110.12±7.40 unit로 정상군의 87.73±4.27 unit에 비하여 현저히 증가된 것은 알코올 투여로 증가된 활성산소(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)를 소거하려는 생리 적응 현상으로 생각되며 이 활성은 참나물 에탄올 추출물 병합투여로 감소되었으나 유의차는 나타나지 않았다.

간 조직 중 GSH-Px 활성은 대조군이 120.43±18.85 unit로 정상군의 87.61±11.95 unit에 비하여 증가되었으나 참나물 에탄올 추출물 병합투여한 P2군은 98.06±10.40 unit, P3군은 96.51±11.95 unit로 유의하게 감소하였다. GSH-Px는 세포질과 사립체내에 존재하므로 사립체내에서 생성된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 소거에 일차적으로 작용하며 Km값이 낮기 때문에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 농도가 낮을 때에도 작용한다. 또한 selenium을 함유하는 항산화 효소로 체내에서 NADP<sup>+</sup>를 전자수용체로 GSH를 산화형 glutathione(GSSG)과 물 그리고 기타 과산화물을 생성하는 반응을 촉매 함으로써 조직의 과산화적 손상을 방지하고 산소독을 해독하는 효소이다[4]. 생성된 GSSG는 NADPH를 전자공여체로 glutathione reductase에 의해 GSH로 환원되며 NADPH는 주로 hexose monophosphate pathway에 의해서 공급된다[40]. 이처럼 알코올 투여군의 GSH-Px 활성이 높게 나타나는 것은 알코올의 산화작용으로 인해 증가되는 산화

물들의 환원을 위한 것으로 사료되며, 이러한 결과는 알코올의 섭취가 간 조직 내 GSH의 단백질 양을 감소시키고, 이차적으로 자유기 생성에 의한 지질과산화 반응을 일으킨다는 보고[38,46]와 관련됨을 보여준다.

**흰쥐의 간 조직 중 과산화지질 함량**

참나물 에탄올 추출물 200 mg/kg과 400 mg/kg 및 알코올을 6주간 투여 후 흰쥐의 간 조직 중 과산화지질 함량은 Fig. 1과 같다.

간 조직 중 과산화지질 함량은 대조군이 11.06±0.57 nmole/g liver로 정상군의 6.36±0.32 nmole/g liver에 비하여 증가되었으며 참나물 에탄올 추출물 다량 병합투여한 P3군은 9.95±0.62 nmole/g liver로 알코올 투여로 증가된 간 조직 중의 과산화지질 함량을 대조군에 비하여 감소시켰으나 유의차는 없었다. 지질과산화반응은 손상된 간 독성 발생의 중요한 기전으로, 세포내 산화적 스트레스의 증가, 즉 free radical 생성의 증가 및 항산화적 방어력의 감소로 인하여 야기되고[31], 급성 혹은 만성적인 알코올 투여가 간 조직 중 지질과산화물량을 증가시킨다는 보고[49]와 같이 대조군이 정상군에 비하여 높은 간 조직 중 과산화지질 함량을 나타내었는데 이는 알코올의 분해산물인 acetaldehyde가 cytosolic xanthine oxidase와 작용하여 부산물로 생성된 O<sub>2</sub><sup>-</sup>양이 증가되고 이 물질이 세포막의 불포화지질과 결합하여 생성된 결과로 추정된다. 이와 같이 알코올을 섭취 시 지질과산화가 증가되어진다는 연구는 다양하게 수행되었는데 만성적인 알코올 섭취는 뇌조직의 지질과산화반응을 유발시키며[8], 간조직 내 MDA와 conjugated diene화된 지방산을 증가시키고 [20], 적혈구내 MDA 함량도 알코올 섭취로 증가되었다고 [14] 보고하였다.

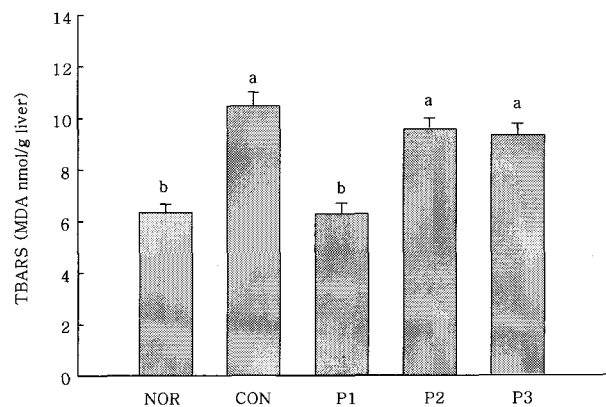


Fig. 1. Content of TBARS in liver of rats treated with alcohol and/or ethanol extract of *Pimpinella brachycarpa*. Abbreviations: See the legend of Table 1. Values are mean±S.E. of 8 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at p<0.05 by Tukey's test.

**혈주의 간 조직 중 GSH 함량**

혈주에 참나물 에탄올 추출물 200 mg/kg과 400 mg/kg 및 알코올을 6주간 투여 후 간 조직 중 GSH 함량의 변화를 측정 한 결과는 Fig. 2와 같다.

참나물 에탄올 추출물만을 단독 투여한 P1군은 25.64±1.71 µg/mg protein로 정상군의 24.48±1.75 µg/mg protein에 비하여 큰 변화를 나타내지 않았으나, 알코올만을 단독투여한 대조군의 16.11±1.19 µg/mg protein은 GSH 함량이 정상군에 비하여 현저히 감소되었다. 그러나 알코올과 참나물 에탄올 추출물 고용량 병합투여한 P3군은 23.10±0.9 µg/mg protein으로 알코올 투여로 감소된 GSH 함량을 유의적으로 증가시켰다. 간에서 GSH는 외부의 산화적 손상에 세포의 방어작용을 나타내는 효소인 glutathione-S-transferase(GST)와 GSH-Px의 기질로 작용하여 세포내 지질과산화물과 이물질 제거, 아미노산 수송 및 thiol기의 저장고로서 또한 여러 가지 해독반응, 단백질이나 DNA 합성 등 생체 내에서 생물학적으로 중요한 반응에 직접 관여한다[37].

알코올에 의한 간 조직 중 GSH 함량의 감소기전에 대해서는 아직도 많은 논란이 되고 있다. 즉 알코올 대사산물인 acetaldehyde가 GSH와 직접 작용하여 GSH 함량을 감소시키거나[46], 알코올에 의하여 생성된 과산화지질이 GSH와 반응하여 산화됨으로서 GSH 함량이 감소된다는 연구결과[38]가 있다. 또한 GSH의 합성전구체인 cysteine이나 glycine이 알코올 대사산물인 acetaldehyde와 반응함으로써 간접적으로 GSH 함량이 감소되어 지거나, 알코올이 각종 호르몬 분비를 촉진시켜 조직 내 GSH 함량의 감소가 일어나고 이로 인해 이차적으로 free radical에 의한 지질과산화반응이 촉진된다는 보고[3]도 있다. 이와는 반대로 조직 내 GSH 함량의 감소는 지질과산화반응이 일어난 후에 이차적

으로 GSH 함량의 고갈이 촉진된다는 연구[18]도 있다. 그러나 지질과산화물과 GSH 함량 사이에는 역상관 관계를 나타내고 있다. 알코올 투여로 간조직 중 GSH 함량이 정상군에 비하여 낮게 나타났는데 이는 GSH를 기질로 하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 제거하는 GSH-Px 활성 증가에 의하여 GSH가 소모된 것으로 생각된다. 또한 참나물 에탄올 추출물과 알코올 병합투여한군들이 대조군보다 GSH 함량이 높게 나타난 것은 참나물 에탄올 추출물이 알코올에 의하여 생성된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 등 free radical을 소거하여 GSH-Px를 소모시킴으로서 그 양이 감소되어 나타난 결과로 추정되며, 이 결과는 참나물 에탄올 추출물과 알코올 병합투여군의 thiobarbituric acid 반응성 산물 양이 대조군에 비하여 낮게 나타난 것과 연관성이 있을 것으로 생각되어진다.

**요 약**

본 연구에서는 참나물의 항산화효과를 구명하기 위하여, *in vitro*에서 Rancimat에 의한 항산화력 측정과 *in vivo*에서 Sprague Dawley 중 수컷에게 만성적으로 알코올 과량 섭취로 유도된 간조직의 산화적 스트레스가 참나물을 처리함으로써 간조직의 항산화 체계에 어떠한 영향을 미치는지를 비교 관찰하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 실험군은 정상군(NOR), 대조군(CON, 35% 알코올 10 ml/kg of b.w./day), 참나물 에탄올 추출물 단독투여군(P1), 알코올과 참나물 에탄올 추출물 저용량(200 mg/kg of b.w./day) 병합투여군(P2) 및 알코올과 참나물 에탄올 추출물 고용량(400 mg/kg of b.w./day) 병합투여군(P3)의 5군으로 나누어 6주간 사육하였다. *In vitro* 연구 결과는 참나물 에탄올 추출물을 계통 분석하여 Rancimat에 의한 항산화지수를 측정하였는데, 분석 중 n-hexane의 항산화력이 가장 우수하였으며, 합성항산화제인 BHT와 항산화력이 비슷하였다. *In vivo*에서 항산화효과를 측정 한 결과는 정상식이만을 급여한 정상군과 정상식이와 참나물 에탄올 추출물을 단독투여 한 P1군 간에는 유의차가 없었으나, 알코올을 투여한 군(대조군, P2 및 P3)들 간에는 유의차를 보였으며 특히, 고용량 병합투여 시 항산화효과가 높게 나타났다. 즉 만성 알코올 투여로 감소되어진 체중과 식이섭취량은 참나물 에탄올 추출물 병합투여로 정상식이군 수준으로 회복시켰다. 또한 참나물 에탄올 추출물 병합투여 시 알코올 투여로 증가된 간조직의 유리기 해독효소인 XO, catalase 및 GSH-Px 활성 억제와 항산화작용을 나타내는 GSH 함량을 증가시킴으로서 지질과산화물에 대한 방어력이 증가되었다. 이상의 결과 알코올과 참나물 에탄올 추출물을 병행 투여함으로써 항산화 효소 체계가 항상되었으며, 참나물 에탄올 추출물은 알코올 섭취로 유도된 산화적 스트레스와 알코올성 독성으로부터 간을 보호하는 항산화효과가 있는 것으로 추정된다.

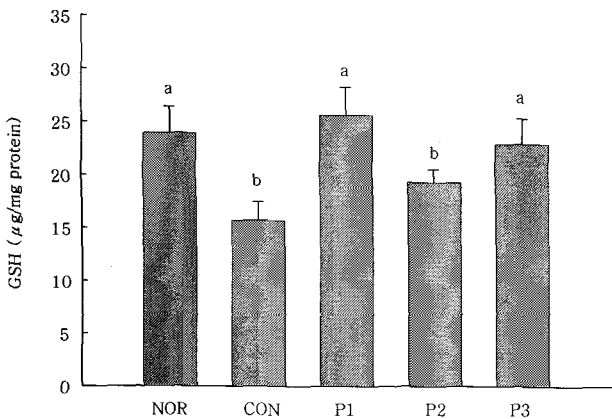


Fig. 2. Content of GSH in liver of rats treated with alcohol and/or ethanol extract of *Pimpinella brachycarpa*. Abbreviations: See the legend of Table 1. Values are mean±S.E. of 8 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at p<0.05 by Tukey's test.

## 참고 문헌

1. Aebi, H. 1984. Catalase *in vitro*. *Method Enzymol.* **105**, 121-126.
2. Akaike, T., S. Ijiri, K. Sato, T. Katsuki and H. Maeda. 1995. Determination of peroxy radical-scavenging activity in food by using bacterial action of alkyl peroxy radical. *J. Agri. Food Chem.* **43**, 1864-1870.
3. Aykac, G., M. Uysal., A. S. Yalcin, N. Kocak-Toker, A. Sivas and H. Oz. 1985. The effects of chronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione peroxide, and glutathione transferase in rats. *Toxicol.* **36**, 71-76.
4. Bompard, G. J., D. S. Prevot and J. L. Bascabds. 1990. Rapid automated analysis of glutathione reductase, peroxidase and S-transferase activity: application to cisplatin-induced toxicity. *Clin. Biochem.* **23**, 501-504.
5. Buege, J. A. and S. D. Aust. 1978. The thiobarbituric acid assay. *Methods in Enzymology* **5**, 306-307.
6. Cha, G. S. and C. U. Choi. 1990. Determination of oxidation stability of perilla oil by the Rancimat method. *Korean J. Food Sci. Technol.* **22**, 61-65.
7. Cho, S. H., J. C. Kim and S. W. Kim. 2001. Effect of plant extracts on the activity of alcohol dehydrogenase and the antioxidant in alcohol-treated rat hepatocyte. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **30**, 679-683.
8. Cho, S. Y., M. K. Lee, E. M. Park, J. Y. Jang and M. J. Kim. 1997. Effect of methionine levels on brain lipid peroxidation in ethanol-treated rats of selenium deficiency. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **26**, 109-115.
9. Crapo, J. D., J. M. McCord and I. Fridovich. 1978. Preparation and assay of superoxide dismutase. *Methods enzymol.* ed. Fleischer, S. and Packer, L. Academic press., New York, **53**. 382-393.
10. Dolphin, D., A. Forman, D. C. Borg, J. Fajer and R. H. Felton. 1971. Compounds I of catalase and horseradish peroxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**, 614-618.
11. Downey, J. M., Y. Miura, L. J. Eddy, D. E. Chambers, T. Mellert, D. J. Hearse and D. M. Yellon. 1987. Xanthine oxidase is not a source of free radicals in the ischemic rabbit heart. *J. Mol. Cell Cardiol.* **19**, 1053-1060.
12. Duke, E. J., P. Joyce and J. P. Ryan. 1973. Characterization of alternative molecular forms of xanthine oxidase in the mouse. *Biochem. J.* **131**, 187-190.
13. Esquivel, M. M., M. A. Ribeiro and M. G. BermardoGil. 1999. Supercritical extraction of savory oil: study of antioxidant activity and extract characterization. *J. Supercritical Fluids* **14**, 129-138.
14. Ferrali, M., L. Ciccoli and M. Comporti. 1989. Ally alcohol induced hemolysis and its relation to iron release and lipid peroxidation. *Biochem. Pharmacol.* **38**, 1819-1825.
15. Flohe, L., A. Wolfgang and W. A. Gunzler. 1984. Assay of glutathione peroxidase. *Methods in enzymatic analysis.* Packer, L, eds., Academic Press., New York, **105**, 114-130.
16. Fritche, K. and P. V. Johnston. 1988. Rapid autooxidation of fish oil in diets without added antioxidants. *J. Nutr.* **118**, 425-426.
17. Fujji, H., T. Ohmachi, I. Sagami and M. Watanabe. 1985. Liver microsomal drug metabolism in ethanol-treated hamsters. *Biochem. Pharmacol.* **34**, 3881-3884.
18. Girotti, A. W., J. P. Thomas and J. E. Jordan. 1985. Inhibitory effect of Zinc(II) on free radical lipid peroxidation in erythrocyte membranes. *J. Free Radic. Biol. Med.* **1**, 395-401.
19. Glueck, C. J., E. Hogg, C. Allen and P. S. Gartside. 1980. Effects of alcohol ingestion on lipid and lipoprotein in normal man. *Am. J. Clin. Nutr.* **33**, 2287-2293.
20. Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge. 1989. Lipid peroxidation a radical chain reaction. pp. 189-233. In *Free radicals in Biology and Medicine*, 2nd ed., Oxford University Press., London.
21. Ham, S. S., S. W. Kim and Y. M. Kim. 1990. Studies on antimutagenic effects and gene repair of enzymatic browning reaction products. *Korean J. Food Sci. Technol.* **22**, 632-639.
22. Joo, K. L. and J. J. Kim. 2002. Oxidative stability and components of sesame oils blended with vegetable oils. *Korean J. Food Sci. Technol.* **34**, 499-502.
23. Jung, G. T., I. O. Ju, J. S. Choi and J. S. Hong. 2000. The antioxidative, antimicrobial and nitrite scavenging effects of *Schizandra chinensis* RUPRECHT(Omija) seed. *Korean J. Food Sci. Technol.* **32**, 928-935.
24. Keshavarzian, A., J. Z. Fields, J. Vaeth and E. W. Holmes. 1994. The differing effects of acute and chronic alcoholic on gastric and intestinal permeability. *Am. J. Gastro.* **8**, 2205-2212.
25. Kim, J. D., S. Y. Lee and S. W. Kim. 1997. Modulation of hepatic lipid peroxidation and antioxidant defenses by wild plants extracts. *Kor. J. Pharmacogn.* **28**, 48-53.
26. Ko, K. S. and E. S. Jeon. 2003. Ferns, fern-allies and seed bearing plant of Korea. pp. 481, Iljinsa., Seoul.
27. Koo, B. K., J. M. Chung and H. S. Lee. 1998. Biochemical evaluation of nutritional status of protein and lipid in patients with alcoholic liver disease. *Korean J. Food Sci. Nutr.* **27**, 1236-1243.
28. Lee, J. J., M. H. Choo and M. Y. Lee. 2006. Effect of *Pimpinella brachycarpa* extract on lipid metabolism in rats fed high cholesterol diet. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **35**, 1151-1158.
29. Lee, J. J., M. H. Choo and M. Y. Lee. 2007. Physicochemical compositions of *Pimpinella brachycarpa*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **36**, 327-331.
30. Lee, S. H. 1998. Studies on antimutagenicity and cytotoxicity of edible mountain herbs extracts. *Master's thesis*, Kangwon University.
31. Lieber, C. S. 1991. Hepatic, metabolic and toxic effects of ethanol. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **15**, 573-592.
32. Lieber, C. S. 1994. Alcohol and liver. *Gastro.* **106**, 1085-1180.
33. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
34. McCord, J. M. and I. Fridovich. 1969. Superoxide dis-

- mutase: An enzymatic function for erythrocyte (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* **244**, 6049-6055.
35. Mezey, E. 1980. Alcoholics liver disease: roles of alcohol and malnutrition. *Am. J. Clin. Nutr.* **33**, 2709-2718.
  36. Munday, R and C. C. Winterbourn. 1989. Reduced glutathione in combination with superoxide dismutase as an important biological antioxidant defence mechanism. *Biochem. Pharmacol.* **38**, 4349-4352.
  37. Oh, D., S. S. Ham, S. Y. Lee, B. K. Park, S. H. Kim, C. K. Chung and I. J. Kang. 1998. Effect of irradiation and blanching on the quality of juices of *Spuriopinella brachycarpa* during storage. *Korean J. Food Sci. Technol.* **30**, 333-340.
  38. Oh, S. I., C. I. Kim and S. C. Park. 1998. Chronic ethanol consumption affects glutathione status in rat liver. *J. Nutr.* **128**, 758-763.
  39. Okeefe, J. H., C. J. Lavie and B. D. McCallister. 1995. Insights into the pathogenesis and prevention of coronary artery disease. *Mayo Clin. Proc.* **70**, 69-79.
  40. Plaa, G. L. and H. Witschi. 1976. Chemicals, drugs and lipid peroxidations. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **16**, 125-141.
  41. Prasad, K. and J. Kalra. 1993. Oxygen free radicals and hypercholesterolemic atherosclerosis: effect of vitamin E. *Am. Heart J.* **125**, 958-973.
  42. Reeves, P. G., F. H. Nielson and G. C. Fahey Jr. 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* **123**, 1939-1951.
  43. Reitman, S. and S. Frankel. 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic determination and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin. Pathol.* **28**, 56-63.
  44. Rya, S. Y. and Kim. J. H. 1995. Effect of chronic alcohol feeding and 2-acetylaminofluorence treatment on hepatic mitochondrial ATPase activity and membrane lipid composition in rats. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **24**, 867-873.
  45. Shaw, S. and C. S. Lieber. 1983. Nutrition and alcohol, A clinical perspective, In : Weinger J. Briggs GM, eds. Nutrition Update John Wiley & Sons, New York, **1**, 79-104.
  46. Speisky, H., Y. Kera, K. E. Penttila, Y. Israel and K. O. Lindros. 1988. Depletion of hepatic glutathione by ethanol occurs independently of ethanol metabolism. *Alcohol Clin. Exp. Res.* **12**, 224-228.
  47. Sun, B. Y. 2002. The plants of the *Umbelliferae* family distributed in Korea. *Korean J. Pl. Taxon.* **30**, 93-104.
  48. Tietze, F. 1969. Enzymatic methods for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. *Anal. Biochem.* **27**, 502-522.
  49. Vina, J., J. M. Estrella, C. Guerro and F. J. Romero. 1980. Effects of ethanol on glutathione concentration in isolated hepatocytes. *Biochem. J.* **188**, 549-552.