

발효 청미래덩굴잎 추출물이 사염화탄소에 의한 마우스의 간 손상 보호 효과

김 미 정

신성대학교 호텔조리제빵계열

Hepatoprotective Effects of Fermented *Smilax china* Leaf Extract on Carbon Tetrachloride-induced Liver Injury in Mice

Mee-Jung Kim

Division of Hotel Food & Bakery, Shinsung University, Chungnam 343-861, Korea

Abstract

This study was conducted to investigate the hepatoprotective effects of fermented *Smilax china* leaf ethylacetate extracts by *Aspergillus oryzae* on carbon tetrachloride-induced liver injury in mice. Experimental mice were divided into four groups (five mice/group) (NC; normal control group, CB; basic diet supplemented before CCl₄ treatment group, NS ; basic diet mixed with 0.5% *Smilax china* leaf ethyl acetate extract supplemented before CCl₄ treatment group, FS; basic diet mixed with 0.5% fermented *Smilax china* leaf ethyl acetate extract supplemented before CCl₄ treatment group) fed for 4 weeks each. In the CCl₄-treated groups (CB, NS and FS) compared with the NC group, liver weights, activities of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, xanthine oxidase and aldehyde oxidase, contents of triglycerides, total cholesterol and LDL-cholesterol in serum, and hepatic lipid peroxide levels increased, whereas body weight gain and contents of glutathione and HDL-cholesterol decreased.

Furthermore, in the FS groups compared with the NS and CB groups, increased or decreased indicators by CCl₄ treatment significantly decreased or increased, respectively. This study suggests that fermented *Smilax china* L. leaf extracts may regulate xanthine oxidase and aldehyde oxidase inhibitory activities and hepatoprotective effects due to flavonoid aglycone derived from its glycoside in leaves of *Smilax china* by fermentation of *A. oryzae*.

Key words : *Smilax china* L., fermentation, *Aspergillus oryzae*, hepatoprotective effect, carbon tetrachloride

서 론

경제개발과 급속한 산업화에 따라 지구의 온난화, 중금속, 화학물질을 포함하는 산업폐기물의 발생 및 농약의 오·남용 등으로 공기와 토양은 물론, 수질과 식품에 이르기까지 그 오염의 정도가 광범해지고 있으며, 이와 함께 식생활의 서구화에 따른 대사의 불균형, 의약품의 오용, 운동 부족과 스트레스 등으로 인류의 건강에 심각한 영향을 주고 있다(Jung JH 2011, Carr MC 2003). 환경오염 물질을 비롯한 각종 내·외인성의 독성물질들은 간에서 해독 과정을 거치게 됨으로써 간에 심각한 손상을 주게 된다(Weber & Boll 2003). 이에 따라 간의 기능을 증진 또는 보호할 수 있는 해독성 식·의약 소재 개발에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있다(Janbaz et al 2002). 녹차의 소비량과 간 질환자 수 사이에 부의 상관성이 있다는 연구가 보고(Imai & Nakachi 1995)된 이래, poly-

phenol 성분 중 특히 flavonoid의 함량이 높은 소재들에 대한 간 해독작용 연구가 활발하게 이루어지고 있다(Janbaz et al 2002, La et al 2000, Park SN 2010, Park et al 2013). 사염화탄소(CCl₄)는 간에서 microsomal cytochrome P450 type 2E1 (CYP2E1), 2B1(CYP2B1) 및 2B2(CYP2B2)의 탈염소 반응을 통하여 trichloromethyl radical 및 trichloromethyl peroxy radical 과 같은 free radicals을 생성하며, 이들에 의하여 간 세포가 괴사되거나 경화를 유발케 함으로서 독성학에서는 CCl₄를 free radical에 의한 간 독성유발 표준물질로 활용되고 있다(Weber & Boll 2003, Recknagel et al 1989, Williams & Burk 1990, Mcgregor & Lang 1996).

한편, 청미래덩굴(*Smilax china* L.)은 우리나라를 비롯한 동아시아 지역에 널리 분포하는 활엽덩굴성 관목(Shao et al 2007)으로 그 근경인 토복령에 대하여는 다양한 연구가 이루어져 있으나(Guo et al 2007), 잎에 대하여는 연구 자료가 매우 부족하다(Cha & Lee 2007). 그러나 청미래덩굴의 잎에는 토복령에서도 검출되는 α-tocopherol 수준의 항산화 활성을 나타내는 flavonoid 배당체인 kaempferol-7-O-α-L-rhamnopy-

† Corresponding author : Mee-Jung Kim, Tel : +82-41-350-1462, E-mail: cocoa1g@daum.net

ranoside와 kaempferol-3,7-O- α -L-dirhamno-pyranoside가 함유되어 있다(Cha & Lee 2007). 일반적으로 flavonoid 배당체는 그 aglycone에 비하여 항산화 활성을 비롯한 기능이 낮은 것으로 알려져 있으며(Hamzeh-Mivehroud *et al* 2013), 발효에 의하여 이들 배당체의 aglycone 화를 촉진시킬 수 있는 것으로 보고되고 있다(Lee *et al* 2012). 차를 포함한 식물체의 발효는 항산화 작용이 있는 polyphenol의 함량을 감소시키는 반면, hydrogen peroxide와 같은 산화 작용이 높은 물질을 감소시키는 효과가 있다(Lee *et al* 2012). 또한 단백질 등과 결합하여 소화성을 감소시키고 동시에 떫은맛을 띠는 tannin 성분을 감소시킴으로써 기호도를 높이며, 발효 중에 수용성의 새로운 flavonoid 성분을 생성하는 효과가 있고, 세계적으로 차 생산량의 80%가 발효차로 소비되고 있다(Halder *et al* 2006).

본 연구에서는 발효 청미래덩굴잎의 차 또는 음료로의 활용성을 높이기 위한 일련의 연구로 전통발효 미생물로 알려진 *Aspergillus oryzae*로 발효시킨 청미래덩굴잎 추출물의 간해독 효과를 조사하였다. 아울러 사염화탄소를 처리한 마우스 간 조직의 ALT 및 AST 활성과 GSH 및 LPO 함량을 비교하는 동시에 활성산소 생성계효소인 XO(xanthine oxidase) 및 AO(aldehyde oxidase)의 활성에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 재료 및 발효용 균주

실험에 사용한 청미래덩굴(*Smilax china* L.) 잎은 2012년 7월 10일에 경기도 용인시의 야산에서 채취한 후, 40°C의 열풍 건조기에서 충분히 건조시킨 후 Food Mixer(HNF-1710, Hanil Electric Co Ltd, Seoul, Korea)를 사용하여, 40 mesh 입도로 분쇄하여 polyethylene bag에 넣어 4°C에서 보관하면서 시료로 사용하였다. 발효용 균주는 Korea Food Research Institute에서 분양받은 *Aspergillus oryzae* KFRI 995를 malt extract (Bacto™, Becton, Dickinson and Co, Sparks, MD, USA)를 사용하여 25°C에서 7일간 진탕배양하여 10⁸ cells/mL로 균수를 조정하여 종균으로 사용하였다.

2. 발효차 제조 방법

청미래덩굴잎은 수돗물로 깨끗이 세척하고, 70% ethanol을 분무하여 10분간 둔 후 무균수로 2~3회 세척하였으며, 5 mm 내외 크기로 잘라 40°C에서 열풍 건조하였다. 충분히 건조된 것은 Food Mixer(HNF-1710, Hanil Electric Co. Ltd., Seoul, Korea)를 사용하여 40 mesh로 분쇄하였다. 발효는 시료 1 kg에 대하여 종균 배양액 100 mL의 비율로 첨가하였으며, 종균 배양액은 가수용 물과 혼합하여 총 1 L가 되게 조정된 후

혼합하여 첨가한 수분 함량을 50%로 조정하였다. 발효용 상자는 70% ethanol로 세균한 플라스틱 발효상자 (가로 40 × 세로 60 × 높이 12 cm)에 두께 5cm 정도로 펴 담은 후 polyethylene film으로 밀봉하여 25°C에서 10일간 발효시켰다. 발효가 끝난 청미래덩굴잎은 polypropylene bag에 담아 121°C에서 60분간 증자한 후 45~50°C에서 건조시켜 발효 청미래덩굴잎을 제조하였다.

3. 실험 방법

1) 추출, 분획물의 수율

발효 청미래덩굴잎 분말 1 kg을 냉각관을 부착한 추출장치에 넣어 5 L의 80% ethanol을 가하여 3시간 동안 가열 추출하였다. 추출한 액은 Whatman No 2 filter paper(Whatman International Ltd., Maidstone, England)로 여과하였으며, 여액은 40°C에서 증발, 건조시켰다. 이 건조물은 증류수에 현탁시킨 후 동일 양의 ethylacetate를 가하여 3회 추출하여 ethylacetate 가용 획분을 얻었으며, 용매를 제거시킨 농축액을 식이용 재료로 사용하였다.

2) 동물 실험

실험동물은 4주령의 평균 체중 20~23 g의 ICR(Crljori : CD-1), SPF/VAF outbred mice(Orient Ltd., Sungnam, Korea)를 1주간 기본 사료(5L79 diets : PMI Nutrition, Brentwood, LA)만을 급여하면서 환경에 적응시킨 후 기본 사료만을 급여한 정상식이군과 기본식이에 비발효 청미래덩굴잎 또는 발효 청미래덩굴잎으로부터 추출한 ethylacetate 획분을 0.5% 되게 혼합한 식이를 급여한 군으로 나누어 4주간 성장시켰다. 그 다음 정상식이군(NC), 기본식이를 급여한 다음, 간 손상을 유도한 실험군(CB), 기본식이에 비발효 청미래덩굴잎으로부터 추출한 ethylacetate 획분을 0.5%되게 혼합한 식이를 급여하였다. 간 손상을 유도한 실험군(NS), 기본식이에 발효 청미래덩굴잎으로부터 추출한 ethylacetate 획분을 0.5% 되게 혼합한 식이를 급여한 다음, 간 손상을 유도한 실험군(FS) 등 4개군 (5마리/군)으로 구분(Table 1)하여 실험하였다. 식이와 음용수는 자유 섭취케 하였으며, 실온은 20±2°C, 상대습도는 60±5%로 조정하였고, 동물실험실의 광은 12시간 주기로 낮과 밤으로 조정하였다.

3) 간 손상의 유도

50% 사염화탄소(Sigma Co., St. Louis, MO, USA)를 olive oil 1:1(v/v)로 혼합하여 실험 종료 2일전에 실험동물의 체중 100 g 당 0.1 mL씩을 2일간 오전 9:00~10:00에 매일 1회씩 복강에 주사하였다. 정상군(NC)은 olive oil만 복강에 주사하였다.

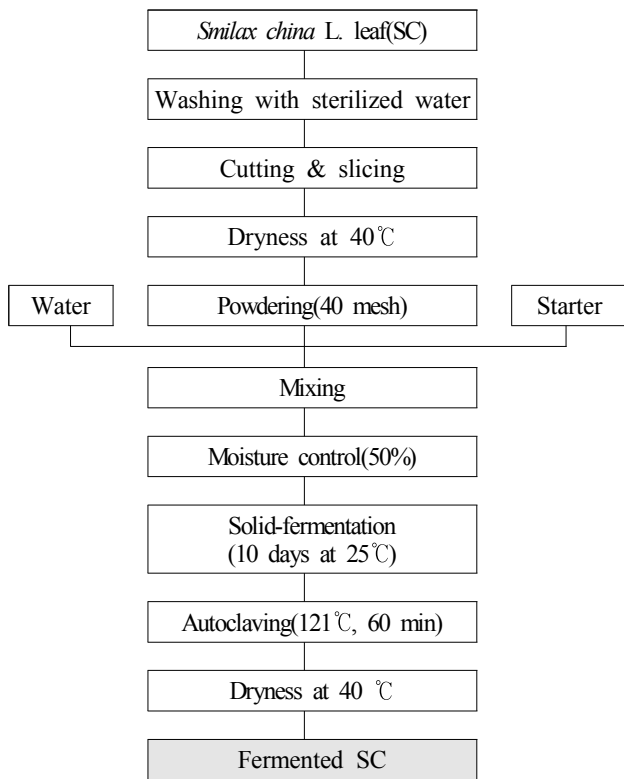


Fig. 1. Fermentation procedures of *Smilax china* L. leaf by *Aspergillus oryzae*.

Table 1. Experimental plots and diet compositions (% , w/w)

Ingredients	Experimental groups ¹⁾			
	NC	CB	NS	FS
Pellet stew(5L79 diets) ²⁾	100	100	99.50	99.50
EtOAc fraction of fermented <i>Smilax china</i>	-	-	0.50	0.50
CCl ₄ treatment	×	○	○	○

¹⁾ Abbreviations : NC; basic diet supplemented normal control group, CB; basic diet supplemented group before CCl₄ treatment, NS; non-fermented *Smilax china* leaf ethylacetate fraction 0.5% supplemented group before CCl₄ treatment, FS; fermented *Smilax china* leaf ethylacetate fraction 0.5% supplemented group before CCl₄ treatment.

²⁾ The diets for animal experiments manufactured in the PMI Nutrition, LLC, PO Box 19798, Brentwood MO 63144, USA. Guaranteed analysis: crude protein, 18%; crude fat, 5%; crude fiber, 5%; ash, 8%.

4) 체중 증가량, 식이 및 음용수 섭취량, 식이효율

체중, 식이 및 음용수 섭취량은 매일 동일한 시간에 조사하였다. 식이효율(Food Efficiency ratio)은 1주간의 체중 증

가량을 1주간의 식이섭취량으로 나눈 값으로 하였다.

5) 실험동물의 처치 및 효소원의 조제

4주간 실험식이를 행한 mouse는 물만 주고 24시간 동안 금식한 후, ethylether 마취 하에서 하대정맥으로부터 채혈하고, 빙냉의 생리식염수로 관류한 후, 간 조직을 적출하였다. 적출한 간 조직 일정량에 4배량의 0.25 M sucrose 용액을 가하여 마쇄한 균질액을 10,000×g(4°C)에서 20분간 원심분리한 다음, postmitochondrial fraction(PMF)을 취해 효소 활성도 측정에 이용하였다.

4. 혈액과 조직 중 분석

1) 혈청 ALT 및 AST 활성도 측정

혈청 ALT(alanine aminotransferase) 및 AST(aspartate aminotransferase) 활성도는 Reitman & Frankel(1957)의 방법에 준하여 조제된 kit 시약(Asan Pham, Seoul, Korea)을 사용하여 측정하였으며, Karmen A(1955)의 방법에 따라 혈청 1 mL 당 분당 NADH의 흡광도를 0.001 감소시키는 Karmen unit로 나타내었다.

2) 혈청 지질 함량

혈청 triglyceride, total cholesterol 및 HDL-cholesterol의 함량은 kit 시약(AM 157S-K, AM 202-K, AM 203-K, Asanpharm Co., Korea)으로 측정하였으며, LDL-콜레스테롤 함량은 Friedewald 등 (Friedewald *et al* 1972)의 방법에 따라 계산하였다. Atherogenic index(AI)는 계산식(Total cholesterol - HDL-cholesterol)/HDL-cholesterol에 의하여 산출하였다.

3) XO 및 AO 활성도 측정

간 조직으로부터 추출한 PMF를 효소원으로 XO(xanthine oxidase) 활성도는 Stirpe & Della Corte(1969)의 방법에 따라 0.1M phosphate buffer(pH 7.4) 일정량에 60 μM xanthine을 첨가하여 30°C에서 5분간 반응시켜 생성된 uric acid의 함량을 292 nm에서 측정하였으며, 활성은 uric acid nmole/mg protein/min으로 나타내었다. 그리고 AO(aldehyde oxidase) 활성도는 Rajagopalan *et al*(1962)의 방법에 따라 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4) 일정량에 기질인 15 mM NMN(N¹-methyl nicotinamide)을 가해 30°C에서 5분간 반응시켜 생성된 pyridone을 300 nm에서 측정하는 다음, 활성을 pyridone nmole/mg protein/min으로 나타내었다.

4) GSH 및 LPO 함량의 측정

간 조직 GSH (reduced glutathione)의 측정은 Ellman GL

(1959)의 방법에 따라, 간 조직 마쇄액 일정량에 4% sulfo-salicylic acid 용액을 가해 단백질을 제거한 다음, 0.1 mM 5,5-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) 용액으로 발색시켜 412nm에서 흡광도를 측정하고, 표준검량선에 준해 GSH의 함량을 $\mu\text{mole/g}$ of tissue로 나타내었다. 그리고 LPO(lipid peroxide)의 측정은 Ohkawa *et al*(1979)의 방법에 따라 간 조직 마쇄액 일정량에 8.1% sodium dodecyl sulfate, 20% acetate bufer (pH 3.5) 및 0.8% thiobaburic acid 용액을 가해 1시간동안 가열한 다음 냉각시켜 532nm에서 흡광도를 측정하고, MDA (malondialdehyde) 표준검량선에 준해 LPO의 함량을 nmole/g of tissue로 나타내었다. 단백질의 함량은 Lowry *et al*(1951)의 방법에 따라 표준으로 bovine serum albumin을 사용하여 측정하였다.

5. 통계 분석

모든 실험은 실험동물 5마리에 대하여 각각 측정하였으며, 평균과 표준편차로 나타내었다. 유의성은 SPSS(Statistical Package for Social Science, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 Duncan's multiple range test로 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

1. 체중증가량, 식이섭취량 및 식이효율

발효 청미래덩굴잎의 간 해독 효과를 조사하기 위하여 정상식이군(NC), CCl₄를 처리한 후, 기본식이를 급여한 군(CB), 사염화탄소를 처리한 후 비발효 청미래덩굴잎으로부터 추출한 ethylacetate 분획 건조물 0.5%를 기본식이에 혼합한 식이군(NS) 및 CCl₄를 처리한 후 발효 청미래덩굴잎으로부터 추출한 ethylacetate 분획 건조물 0.5%를 기본식이에 혼합한 식

이군(FS)의 4개군으로 구분하여 4주간 사육하였을 때의 체중증가량, 식이섭취량 및 식이효율을 조사한 결과는 Table 2와 같다.

체중증가량은 NC군이 1.74 g/week를 나타내었으나, CB군, NS군 및 FS군에서는 각각 0.45 g/week, 0.54 g/week 및 0.79 g/week으로 FS군은 NC군보다는 낮으나, 여타 군들에 비하여는 유의적으로 높았다. 식이섭취량은 모든 CCl₄ 처리군(CB, NS, FS)이 NC군에 비하여 다소 높은 경향을 나타내었으나, CCl₄ 처리군 간의 유의차는 없었다. 이상의 결과는 CCl₄의 처리군 들에서는 식이섭취량에서 대조군인 NC군과 대등하거나, 오히려 높음에도 불구하고 체중증가량이 감소하는 것으로 나타나, rat를 실험동물로 사용하여 CCl₄를 처리하였을 때 간 손상에 의한 영양대사의 불균형에 의하여 체중이 감소한다는 Lee *et al* (2008)의 결과와 유사하다. 발효 청미래덩굴 ethylacetate 추출물(FS)이 비발효(NS)의 경우에 비하여 체중 증가량이 유의적으로 높게 나타난 것으로 미루어, CCl₄로 유도한 간독성에 대한 해독효과가 높음을 시사한다.

2. 간 중량

발효 청미래덩굴잎 ethylacetate 추출물이 CCl₄의 처리 mouse의 간 조직 중량에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 2와 같다. 간의 중량은 NC군(0.84 g/mouse)이 CB군(1.34 g/mouse)에 비하여 59.52%가 증가하였으나, NS군과 FS군은 각각 1.02 및 0.96 g/mouse로 NC군에 비하여는 높았으나, CB군에 비하여는 낮은 수치를 나타내었다. 체중에 대한 간의 중량(%)도 동일한 경향을 나타내었으나, FS군이 NS군에 비하여 유의적으로 낮아 발효 청미래덩굴잎 추출물을 급여한 군이 비발효 경우와 차이를 보였다. CCl₄는 간 독성유발 물질로 체중은 감소시키나, 간의 중량은 증가시키는 것으로 알려져 있다(Yuan *et al* 2008). 식이를 통하여 섭취된 영양소를 비롯하여 화학

Table 2. Effects of fermented *Smilax china* L. leaf ethylacetate fraction on the body weight gain, feed intakes and feed efficiency ratio in CCl₄-treated mouse after feeding for 4 weeks

Measurements	Experimental groups ¹⁾			
	NC	CB	NS	FS
Initial body weight(g)	26.45±1.30 ^{NS,3)}	26.17±1.27	26.88±1.32	26.08±1.38
Final body weight(g)	33.41±1.69 ^{a,4)}	27.98±1.35 ^b	29.05±1.32 ^b	29.25±1.31 ^b
Body weight gain(g/week)	1.74±0.09 ^a	0.45±0.03 ^d	0.54±0.04 ^c	0.79±0.04 ^b
Feed intakes(g/week)	31.29±2.30 ^{NS}	34.37±1.54	33.25±3.78	32.06±1.53
FER ²⁾	0.06±0.02 ^a	0.01±0.01 ^b	0.02±0.00 ^b	0.02±0.01 ^b

¹⁾ Abbreviations : See Table 1.

²⁾ FER(feed efficiency ratio) : weekly weight gain/weekly feed intake.

³⁾ NS : not significant.

⁴⁾ Values are mean±S.D. of 5 mice, different superscripts on the same row indicate significant differences($p < 0.05$).

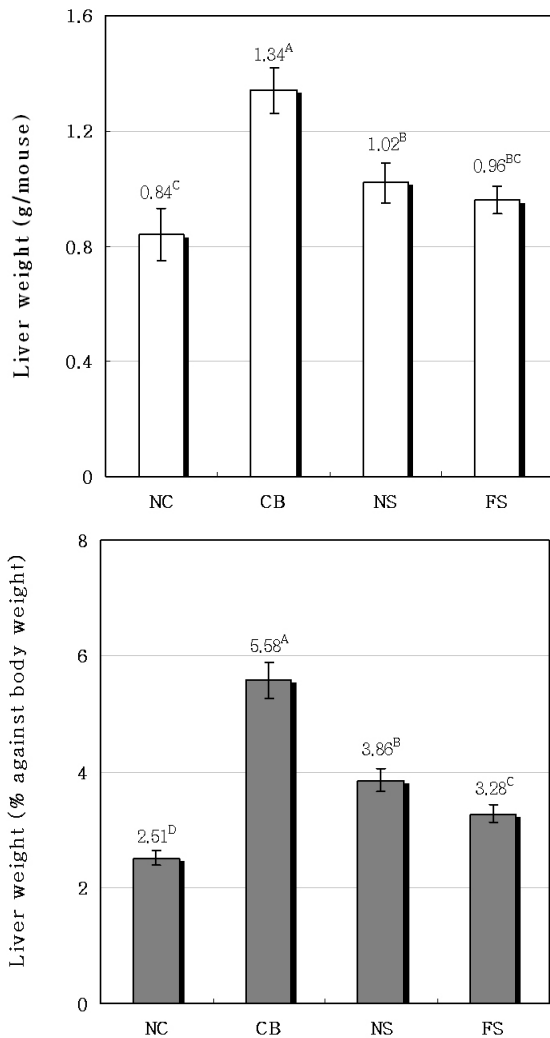


Fig. 2. Effects of fermented *Smilax china* L. leaf ethylacetate fraction on the liver weight in CCl₄-treated mouse after feeding for 4 weeks.

Abbreviations : See Table 1.

Values are mean±S.D. of 5 mice, different superscripts on the bar indicate significant differences($p < 0.05$).

물질과 의약은 간에서 대사되거나, 해독과정을 거치게 되며, 이러한 과정 중에 일부의 물질은 세포독성을 일으키는 free radical로 전환됨으로써 간 손상을 유도하며, 이에 따라 간을 비롯한 장기들의 중량이 비대해진다(Amdur *et al* 1980, Perce *et al* 1987). 당뇨나 비만 또는 고지방 식이 하에서도 간 기능 장애에 의한 불균형적인 대사로 인하여 장기들의 비대현상이 나타나며, 특히 간에서 뚜렷한 것으로 알려져 있다(Park & Kang 2003, Sung *et al* 1997).

3. ALT 및 AST 활성

발효 청미레딩굴잎 ethylacetate 추출물이 CCl₄의 처리

mouse의 혈청 ALT 및 AST 활성에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 3과 같다. ALT의 활성(Karmen U/mL of serum)은 NC군(22.07)에 비하여 CB군(83.93)이 3.80배가 높았으나, NS군과 FS군은 CB군에 비하여 각각 37.35% 및 45.66%가 낮았다. AST의 활성(Karmen U/mL of serum)은 CB군(150.84)은 NC(64.56)에 비하여 2.34배가 높았으나, NS 및 FS군은 각각 126.19 및 98.09로 CB군에 비하여 16.34% 및 34.97%가 낮았으며, FS군이 NS군에 비하여 유의적으로 낮았다. CCl₄는 free radical에 의한 간 손상 유도 물질로 간 보호 물질의 screening을 위한 동물실험에 많이 이용되며, 간의 손상 정도는 혈청 ALT와 AST의 활성 정도로 평가할 수 있다(Janbaz *et al* 2002). CCl₄와 같은 독성물질은 물론 고지방 또는 고콜레스테롤 식이나 알코올 및 간염 등으로 간세포가 손상되면, 손상된 간 조직세포로부터 유출되어 혈액 중 ALT와 AST의 활성이 증가하게 되며, 활성 증가의 정도는 간 손상의 정도를

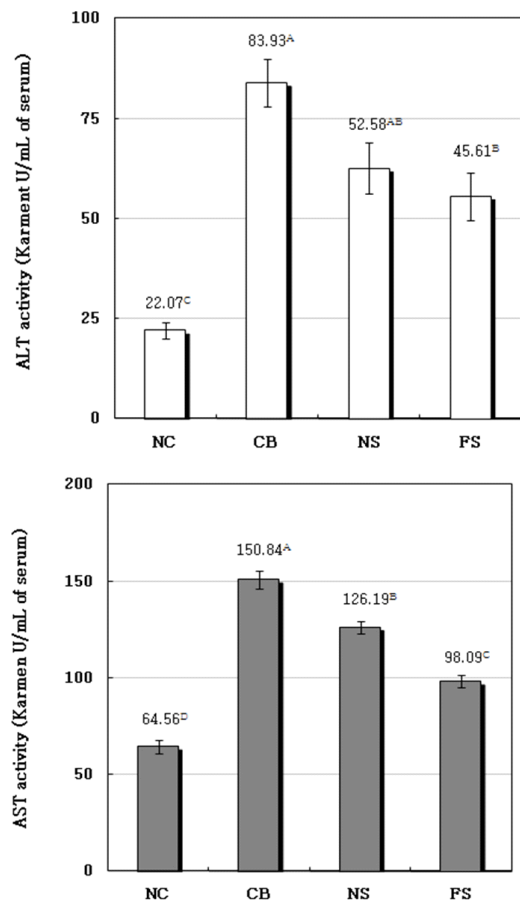


Fig. 3. Effects of fermented *Smilax china* L. leaf ethylacetate fraction on the serum ALT and AST activities in CCl₄-treated mouse after feeding for 4 weeks.

Abbreviations : See Table 1.

Values are mean±S.D. of 5 mice, different superscripts on the same bars indicates significant differences($p < 0.05$).

나타낸다(Reitman & Frenke 1957, Hue *et al* 1975).

따라서 상기의 결과는 CCl₄의 처리가 mouse 간 조직을 크게 손상시킴을 나타내며, 비발효 청미래덩굴잎과 발효 청미래덩굴잎의 ethylacetate 추출물이 CCl₄ 처리에 의하여 손상된 간조직을 치유하는 효과가 있으며, 이러한 효과는 발효 청미래덩굴잎에서도 높게 나타남을 나타낸다.

4. 혈청 지질의 함량

발효 청미래덩굴잎 ethylacetate 추출물이 CCl₄의 처리 mouse의 혈청 지질 함량에 미치는 영향을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 중성 지질의 함량은 CB군(53.75 mg/dL)이 NC군 (29.58 mg/dL)에 비하여 81.71%가 높았으며, NC군과 FS군은 CB군에 비하여 각각 15.61% 및 28.22%가 감소하였다. Total cholesterol 함량도 CB군(92.49 mg/dL)은 NC군(60.03 mg/dL)에 비하여 54.07%가 높았으나, NS군 및 FS군은 CB군에 비하여 각각 10.59% 및 17.99%가 낮았다. 반면에 HDL-cholesterol의 함량은 CB군(19.55 mg/dL)이 NC군(43.52 mg/dL)에 비하여 55.08%가 낮았으나, NS군 및 FS군은 CB군에 비하여 각각 26.96% 및 72.12%가 높았다. LDL-cholesterol의 함량은 total cholesterol과 유사한 경향으로 NS군과 FS군이 CB군에 비하여 낮았으며, FS군이 NS군에 비하여 낮았다. 동맥경화지수(AI : atherogenic index)는 NC군(0.38)에 비하여 CB군(3.73)에서 현저하게 높았으나, NS군과 FS군에서는 NC군에는 미치지 못하나, 감소하는 경향을 나타내었으며, FS군에서 감소율이 높았다. CCl₄ 처리로 간이 손상되면 간에서 생합성되는 단백질이 감소되며(Jeong *et al* 1997, Cho *et al* 2001), 혈청 albumin을 비롯한 단백질의 함량도 감소한다(Arthus CG 1991). 반면에 혈청 TG와 TC의 함량은 증가하는 것으로 알려져 있다(Lee *et al* 2008). 본 연구에서도 혈청 lipid profiles은 Lee *et al*(2008)의 연구와 동일한 경향을 나타내었으며, NS군과

FS군의 결과를 미루어 볼 때, 청미래덩굴잎 추출물이 CCl₄ 처리로 인한 혈청 지질의 불균형을 개선하는 효과가 있음을 나타내며, 발효시킨 경우에도 그 효과가 큰 것으로 평가된다.

5. 간 조직의 GSH 및 LPO 함량

발효 청미래덩굴잎 ethylacetate 추출물이 CCl₄의 처리 mouse의 간 조직 GSH 및 LPO 함량에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. GSH의 함량($\mu\text{mole/g of tissue}$)은 CB군(4.42)이 NC군(5.09)에 비하여 13.16%가 낮았으나, NS군과 FS군은 각각 4.84 및 4.93으로 NC군과의 유의적인 차이를 보이지 않았으며, NS군과 FS군 간에도 뚜렷한 차이를 보이지 않았다. 그러나 LPO의 함량(MDA nmole/g of tissue)은 CB군(25.17)이 NC군(15.93)에 비하여 36.71%가 높았으나, NS군과 FS군에서는 각각 20.30 및 17.51로 FS군에서의 감소율이 컸으며, FS군의 경우는 NC군 수준으로 회복되었다.

CCl₄는 간에서 trichloromethyl radical 또는 이의 peroxy radical이 되어 간세포의 손상에 관여 한다(Dong *et al* 2000). 이 결과, 생성된 free radical은 간세포를 구성하는 지질을 산화시켜 LPO를 생성한다. 간에 존재하는 GSH는 LPO의 생성을 억제시키는데 관여함으로써 LPO의 생성이 많아지면 GSH의 함량은 감소하는 것으로 알려져 있다. 즉, 체내 반응성이 높은 free radical이 과량으로 생성되면, 이의 작용을 억제하는 전자공여체인 GSH 및 α -tocopherol과 같은 성분들의 고갈을 촉진시킴으로써 지질 과산화와 함께 생체막 성분의 손상을 동반하게 된다(Arthus CG 1991).

6. XO 및 AO 활성

발효 청미래덩굴잎 ethylacetate 추출물이 CCl₄의 처리 mouse 간 조직의 XO 및 AO 활성에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 5와 같다. XO 활성은 NC군에 비해 CB군은 30.3% 유의

Table 3. Effects of fermented *Smilax china* L. leaf ethylacetate fraction on the serum lipid profiles in CCl₄-treated mice fed for 4 weeks (mg/dL)

Measurements	Experimental groups ¹⁾			
	NC	CB	NS	FS
Triglyceride	29.58±3.15 ^{c,4)}	53.75±4.45 ^a	45.36±4.06 ^{ab}	38.58±3.37 ^b
Total cholesterol	60.03±3.17 ^c	92.49±5.11 ^a	82.70±5.21 ^{ab}	75.85±3.25 ^b
HDL-cholesterol	43.52±4.62 ^a	19.55±3.11 ^c	24.82±2.59 ^c	33.65±3.05 ^b
LDL-cholesterol ²⁾	10.59±0.94 ^d	62.19±6.22 ^a	48.81±4.18 ^b	34.98±2.57 ^c
AI ³⁾	0.38±0.03 ^d	3.73±0.40 ^a	2.33±0.20 ^b	1.25±0.08 ^c

¹⁾ Abbreviations: See Table 1.

²⁾ LDL-cholesterol = Total cholesterol - HDL-cholesterol - (TG/5).

³⁾ AI(atherogenic index) = (Total cholesterol - HDL-cholesterol)/HDL-cholesterol.

⁴⁾ Values are mean±S.D. of 5 mice, different superscripts on the same row indicate significant differences($p<0.05$).

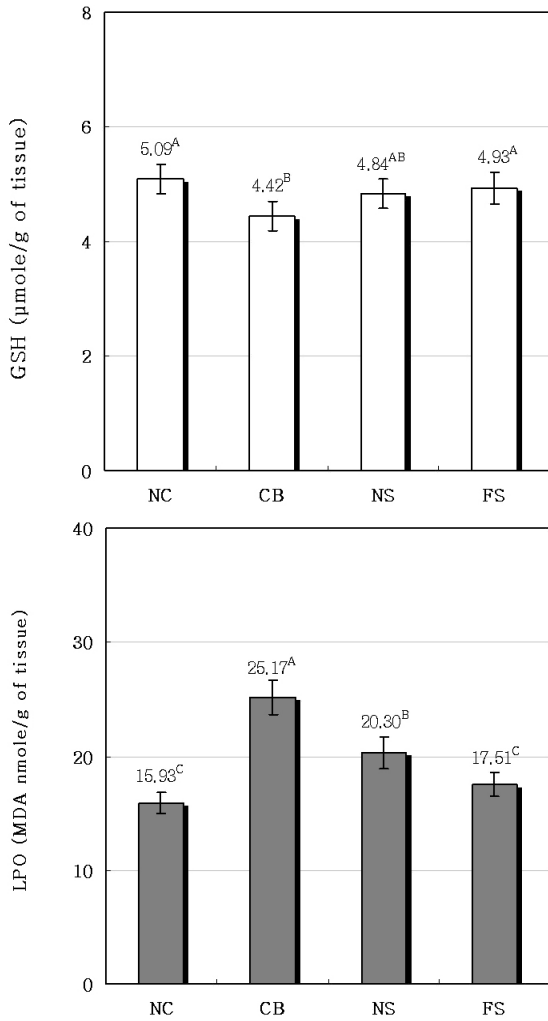


Fig. 4. Effects of fermented *Smilax china* L. leaf ethylacetate fraction on the contents of GSH and LPO in CCl₄-treated mouse after feeding for 4 weeks.

Abbreviations : See Table 1.

NS : not significant.

Values are mean±S.D. of 5 mice, different superscripts on the same bars indicates significant differences($p<0.05$).

하게 증가하였고, NS군은 CB군에 비해 6.98% 정도 감소하는 경향을 나타내었으나, FS군은 30.23% 정도 유의하게 감소하여 대조군 수준으로 회복되었다. 그리고 AO의 활성 역시 NC군에 비해 CB군은 25.83% 유의하게 증가하였으나, NS군은 CB군에 비해 9.27% 감소하는 경향을 보였으며, FS군은 15.89% 유의하게 감소하여 대조군 수준으로 회복되었다. 그러나 NS군과 FS군 사이에 유의적인 차이는 없었다. XO는 XOR(xanthine oxidoreductase)의 oxidase type 효소로 정상적인 생리 상태에서는 NAD⁺를 전자수용체로 이용하는 dehydrogenase type으로 작용하나, 병태적인 상태에서는 분자상의 O₂를 전자수용체로 이용하는 oxidase type으로 작용하

는 비 특이적인 효소(Parks & Granger 1986, Roy & McCord 1982)로 식이로부터 섭취되거나 체내에서 *de novo* 합성된 hypoxanthine 또는 xanthine을 uric acid로의 전환에 관여함으로써 관절염의 일종인 통풍의 유발과 생체 조직의 손상을 유도하는 활성산소종을 생성하는데도 관여한다(Rott & Agudelo 2003).

한편, AO(aldehyde oxidase)는 N-heterocyclic 화합물(Garattini *et al* 2009) 또는 방향족 화합물의 산화(Krenitsky TA 1978)와 azo 염료(Stoddart & Levine 1992), 항암제(Itoh K 2009)와 항고혈압제(Dambrova *et al* 1998) 등의 환원에 관여함으로써 생체 내에서 약물에 대한 해독효과를 나타내나, 한편으로는 약효를 감소시키기도 하지만, 치료 후 체내에 잔존하는 약성

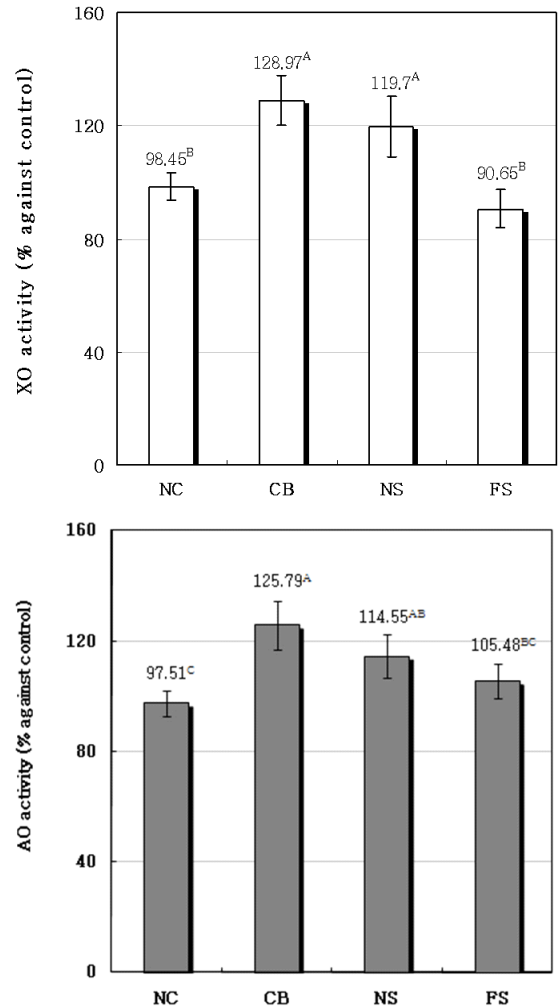


Fig. 5. Effects of fermented *Smilax china* L. leaf ethylacetate fraction on the XO and AO activities in CCl₄-treated mouse after feeding for 4 weeks.

Abbreviations : See Table 1.

Values are mean±S.D. of 5 mice, different superscripts on the same bars indicates significant differences($p<0.05$).

을 해독시키는 작용도 있다. 또한 ethanol, thioacetamide 및 chloroform에 의한 간 손상(Ali *et al* 2008)을 촉진하고, 지방 세포(adipocyte)의 분화와 지질의 저장 및 지방 세포 내의 단백질(adiponectin) 분비에 관여함으로써 비만과 관련이 있으며(Weigert *et al* 2008), 고지방 식이 및 알코올성 지방간 생성에도 관여한다(Shaw & Jayatilleke 1990).

이상의 결과, CCl₄를 처리한 mouse에서 NC군에 비하여 XO와 AO의 활성이 증가하는 현상은 Nishino & Tamura (1991)의 보고에서와 같이 CCl₄ 처리로 인한 간 조직의 손상과 해독작용과 관련이 있는 것으로 사료되며, 특히 발효 청미래덩굴잎 ethylacetate 추출물에서 이들 효소의 활성이 유의적으로 억제되는 현상은 Hamzeh-Mivehroud *et al*(2013)이 flavonoid 배당체의 aglycone이 AO의 저해활성이 높다는 보고를 고려해 볼 때, 청미래덩굴잎에 존재하는 flavonoid 배당체가 발효에 의해 분해되어 aglycone화함으로써 XO 또는 AO에 대한 저해활성이 높아진 것으로 생각된다.

요 약

발효 청미래덩굴잎의 해독효과를 조사하기 위하여 정상식이군(NC), 기본식이를 급여한 후 CCl₄ 처리군(CB), 비발효 청미래덩굴잎 ethylacetate 추출 분획물을 기본 식이에 0.5% 혼합한 식이로 4주간 사육하였다. CCl₄를 처리한 군(NS), *Aspergillus oryzae*로 발효시킨 청미래덩굴잎 ethylacetate 추출 분획물을 기본 식이에 0.5% 혼합한 식이로 4주간 사육한 후, CCl₄를 처리한 군(FS)의 4개군(5마리/군)으로 구분하여 체중, 식이섭취량, 식이효율, ALT 및 AST 활성, GSH 및 LPO 함량, 혈청 지질 함량, XO 및 AO 활성도를 조사하였다. CCl₄를 처리한 군(CB, NS, FS)의 체중증가량은 NC군에 비하여 현저하게 감소하였으나, NS군과 FS군에서는 그 감소율이 낮았으며, FS군에서 더욱 낮았다. 이와 반대로 간의 중량은 CCl₄ 처리군들에서 높았으나, FS군에 NS군에 비하여 낮았다. ALT 및 AST 활성은 CB군이 NC군에 비하여 32.34~3.80배가 높았으며, NS군 및 FS군은 CB군에 비하여 각각 16.34~37.35% 및 34.97~45.66%가 낮았다. 혈청 중성 지질의 함량은 NC군에 비하여 CB군이 81.71%가 높았으며, NS군과 FS군은 CB군에 비하여 각각 15.61% 및 28.22%가 낮았다. Total cholesterol 함량은 CB군이 NC군에 비하여 54.07%가 높았으나, NS군 및 FS군은 CB군에 비하여 각각 10.59% 및 17.99%가 낮았으며, LDL-cholesterol의 함량도 유사한 경향이였다. 반면에, HDL-cholesterol의 함량은 CB군이 NC군에 비하여 55.08%가 낮았으나, NS군 및 FS군은 CB군에 비하여 각각 26.96% 및 72.12%가 높았다. GSH의 함량(μmole/g of tissue)은 CB군(4.42)이 NC군(5.09)에 비하여 13.16%가 낮았으나, NS군과

FS군은 각각 4.84 및 4.93으로 NC군과의 유의적인 차이를 보이지 않았으며, NS군과 FS군 간에도 뚜렷한 차이를 보이지 않았다. 그러나 LPO의 함량(MDA nmole/g of tissue)은 CB군이 NC군에 비하여 36.71%가 높았으나, 특히 FS군에서는 NC군 수준으로 회복되었다. XO(xanthine oxidase) 활성(% against control)은 NC군이 98.45, CB군 128.97, NS군 119.70, FS군 90.65로 NS군은 CB군과, FS군은 NS군과의 유의적인 차이를 보이지 않았다. AO(aldehyde oxidase)의 활성(% against control)은 CB군이 NC군에 비하여 22.48%가 높았으나, NS군 및 FS군은 NC군에 비하여 각각 14.88% 및 7.56%가 높았으며, CB군에 비하여는 각각 8.94% 및 16.15%가 감소하였다.

이상의 결과, *Aspergillus oryzae*로 발효시킨 청미래덩굴잎 ethylacetate 추출물은 비발효 경우에 비하여 CCl₄를 처리한 mouse에서 간 조직의 손상을 회복시키는 효과가 높으며, 이는 FS군에서 XO 및 AO의 저해활성이 높은 것으로 미루어, 청미래덩굴잎에 존재하는 flavonoid 배당체가 발효에 의하여 분해되어 aglycone화함으로써 나타난 결과라 사료된다.

Reference

- Ali S, Pawa S, Naime M, Prasad R, Ahmad T, Farooqui H, Zafar H (2008) Role of mammalian cytosolic molybdenum Fe-S flavin hydroxylases in hepatic injury. *Life Sci* 82: 780-788.
- Amdur MO, Doull J, Klaassen CD (1980) Toxicology. 2th ed. Pergamon Press, New York, USA, p 210-231.
- Arthus CG (1991) Textbook of Medical Physiology. 8th ed. Sanders PA, USA, p 754-764.
- Carr MC (2003) The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 88: 2404-2411.
- Cha BC, Lee EH (2007) Antioxidant activities of flavonoids from the leaves of *Smilax china* Linne. *Kor J Pharmacogn* 38(1): 31-36.
- Cho SY, Jang JY, Kim MJ (2001) Effects of *Pueraria flos* and radix water extracts on levels of several serum biomarkers in theanol-treated rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 92-96.
- Dambrova M, Uhle'n S, Welch CJ, Wikberg JES (1998) Identification of an N-hydroxyguanidine reducing activity of xanthine oxidase. *Eur J Biochem* 257: 178-184.
- Dong H, Hailing RL, Thummel KE, Rettie AE, Nelson SD (2000) Involvement of human cytochrome P450 2D6 in the bioactivation of acetaminophen. *Drug Metab Dispos* 28,

- 1397-1400.
- Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl group. *Arch Biochem Biophys* 82: 70-77.
- Fridewald WT, Levy RI, Fredrickson DS (1972) Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18: 499-502.
- Garattini E, Fratelli M, Terao M (2009) The mammalian aldehyde oxidase gene family. *Hum Genomics* 4: 119-130.
- Guo J, Qian F, Li J, Xu Q, Chen T (2007) Identification of a new metabolite of astilbin, 3-O-methylastilbin, and its immunosuppressive activity against contact dermatitis. *Clin Chem* 53(3): 465-471.
- Halder B, Pramanick S, Mukhopadhyay S, Giri AK (2006) Anticlastogenic effects of black tea polyphenols theaflavins and thearubigins in human lymphocytes *in vitro*. *Toxicol In Vitro* 20: 608-613.
- Hamzeh-Mivehroud M, Rahmani S, Rashidi MR, Hosseinpour Feizi MA, Dastmalchi S (2013) Structure-based investigation of rat aldehyde oxidase inhibition by flavonoids. *Xenobiotica* 43(8): 661-670.
- Hue FS, Krook L, Pond WG, Duncan JR (1975) Interactions of dietary calcium with toxic levels of lead and zinc in pigs. *J Nutr* 105: 112-118.
- Imai K, Nakachi K (1995) Cross sectional study of effects of drinking green tea on cardiovascular and liver diseases. *Br Med J* 310: 693-696.
- Itoh K (2009) Individual and strain differences of aldehyde oxidase in the rat. *Yakugaku Zasshi* 129: 1487-1493.
- Janbaz KH, Saeed SA, Gilani AH (2002) Protective effect of rutin on paracetamol- and CCl₄-induced hepatotoxicity in rodents. *Fitoterapia* 73: 557-563.
- Jeong TC, Kim HJ, Park JI (1997) Protective effects of red ginseng saponins against carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in spargue Dawley rats. *Planta Med* 63: 136-140.
- Jung JH (2011) Risk factors of environmental diseases in an industrial complex area. *Korean J Ind Heal* 5: 69-77.
- Karmen A (1955) A note on the spectrophotometric assay of glutamic oxaloacetic transaminase in human blood serum. *J Clin Invest* 34: 131-133.
- Krenitsky TA (1978) Aldehyde oxidase and xanthine oxidase-functional and evolutionary relationships. *Biochem Pharmacol* 27: 2763-2764.
- La Casa C, Villegas I, Alarcón de la Lastra C, Motilva V, Martin Calero MJ (2000) Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. *J Ethnopharmacol* 71: 45-53.
- Lee JS, Kim HS, Lee YJ, Yong CS, Choi HG, Han GD (2008) Hepatoprotective effect of *Grifola frondosa* water extract on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *Food Sci Biotechnol* 17(1): 203-207.
- Lee SI, Lee YK, Kim SD, Kang YH, Suh JW (2012) Antioxidative activity of *Smilax china* L. leaf teas fermented by different strains. *Korean J Food Nutr* 25(4): 807-819.
- Lee YK, Lee SI, Kim JS, Yang SH, Lee IA, Kim SD, Suh JW (2012) Antioxidant activity of green tea fermented with *Monascus pilosus*. *J Appl Biol Chem* 55(1): 19-25.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RL (1951) Protein measurement by folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- McGregor D, Lang M (1996) Carbon tetrachloride: Genetic effects and other modes of action. *Mutation Res* 366: 181-195.
- Nishino T, Tamura I (1991) The mechanism of conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase and the role of the enzyme in the reperfusion injury. *Adv Exp Med Biol* 309: 327-337.
- Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K (1979) Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 248-254.
- Parks DA, Granger DN (1986) Xanthine oxidase: Biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol Scand Suppl* 548: 87-99.
- Park JW, Lee HH, Oh MS, Kim JP, Jang TK, You YN, Ha DR, Kim ES, Seo KW (2013) A survey on pesticide residues of commercial flowering teas. *J Korean Pesticide Science* 17(1): 1-15.
- Park SJ, Kang MH (2003) The effect of dietary nuddle with glucomannan on the weight loss in high fat diet-induced obese rats. *J Korean Soc Sci Nutr* 32: 893-898.
- Park SN (2010) A study on entry strategies of Korean green tea into the world market. Wonkwang University Graduate School of Oriental Studies.
- Pierce RA, Glaug MR, Greco RS, Mackenzie JW, Boyd CD, Deak SB (1987) Increased procollagen mRNA levels in CCl₄-induced liver fibrosis in rats. *J Biol Chem* 262: 1652-1658.
- Rajagopalan KV, Fridovich I, Handler P (1962) Hepatic aldehyde

- hyde oxidase. I. Purification and properties. *J Biol Chem* 237: 922-928.
- Recknagel RO, Glende Jr EA, Dolak JA, Waller RL (1989) Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmac Ther* 43:139-154.
- Reitman S, Frankel S (1957) A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic pyruvic transaminase. *AM J Clin Pathol* 28: 58-63.
- Rott KT, Agudelo CA (2003) Gout. *J Am Med Assoc* 289: 2857-2860.
- Roy R, McCord JM (1982) Ischemia-induced conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. *Fed Proc* 41: 767-773.
- Shaw S, Jayatilleke E (1990) The role of aldehyde oxidase in ethanol-induced hepatic lipid peroxidation in the rat. *Biochem J* 268: 579-583.
- Shao B, Guo HZ, Gui YJ, Ye M, Han J, Guo DA (2007) Steroidal saponins from *Smilax china* L. and their anti-inflammatory activities. *Phytochem* 68: 623-630.
- Stirpe F, Della Corte E (1969) The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion *in vitro* of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J Biol Chem* 244: 3855-3863.
- Sung IS, Kim MJ, Cho SY (1997) Effect of *Quercus acutissima* Carruthers extracts on the lipid metabolism. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26: 327-333.
- Stoddart AM, Levine WG (1992) Azoreductase activity by purified rabbit liver aldehyde oxidase. *Biochem Pharmacol* 43: 2227-2235.
- Weber LWD, Boll M, Stampfl A (2003) Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: Carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol* 33: 105-136.
- Weigert J, Neumeier M, Bauer S, Mages W, Schnitzbauer AA, Obed A, Gröschl B, Hartmann A, Schäffler A, Aslanidis C, Schöolmerich J, Buechler C (2008) Small-interference RNA-mediated knock-down of aldehyde oxidase 1 in 3T3-L1 cells impairs adipogenesis and adiponectin release. *FEBS Lett* 582: 2965-2972.
- Williams AT, Burk RF (1990) Carbon tetrachloride hepatotoxicity: An example of free radical-mediated injury. *Seminars Liver Dis* 10: 279-284.
- Yuan LP, Chen FH, Ling L, Dou PF, Bo H, Zhong MM, Xia LJ (2008) Protective effects of total flavonoids of *Bidens pilosa* L. (TFB) on animal liver injury and liver fibrosis. *J Ethnopharmacol* 116(3): 539-546.

접 수: 2014년 2월 7일
 최종수정: 2014년 3월 3일
 채 택: 2014년 4월 16일