



당뇨를 유도한 동물모델에서 지유 추출물의 항산화 활성

조진하*** · 배은영*** · 이태경**** · 김명현**** · 이승웅** · 김병수****† · 임치환*†

*충남대학교 농업생명과학대학 생물환경화학과, **한국생명공학연구원 천연물소재연구센터,
대전대학교 LINC 사업단, *대전대학교 한의과대학 생리학교실

Antioxidative Activities of *Sanguisorba officinalis* L. in Diabetic Rats

Jin Ha Jo***, Eun Young Bae***, Tae Kyoung Lee****, Myung Hyun Kim****,
Seung Woong Lee**, Byoung Soo Kim****† and Chi Hwan Lim*†

*Department of Bio Environmental Chemistry, College of Agriculture and Life Science, Chungnam National University, Daejeon 34134, Korea.

**Natural Product Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Jeongeup 56212, Korea.

***LINC project group, Daejeon University, Daejeon 34520, Korea.

****Department of Physiology, College of Korean Medicine, Daejeon University, Daejeon 34520, Korea.

ABSTRACT

Background: *Sanguisorba officinalis* has been used in traditional Asian medicine owing to its beneficial effects on various diseases. The purpose of this study was to evaluate the effect of *S. officinalis* on the antioxidant system of Streptozotocin (STZ) and Alloxan (ALL) induced diabetic rats.

Methods and Results: Triglyceride and Low-Density Lipoprotein (LDL)-cholesterol levels decreased in the STZ-induced diabetic groups treated with *S. officinalis* extract (SOE) compared to the corresponding levels in the control groups. Moreover, in the ALL-induced diabetic groups, SOE reduced triglyceride, LDL-cholesterol, and High-Density Lipoprotein (HDL)-cholesterol levels. Malondialdehyde (MDA) levels decreased significantly in the STZ and ALL-induced groups treated with SOE compared to the corresponding levels in the control group. Further, Glutathione (GSH) levels increased but did not reach statistical significance. The levels of Superoxide Dismutase (SOD) and Glutathione-S-Transferase (GST) showed a tendency to recover with SOE treatment in the STZ and ALL-induced diabetic groups. In addition, Catalase (CAT) levels in the SOE treatment group decreased significantly compared to those in the control group.

Conclusions: These results suggest that SOE might be an effective agent in attenuating oxidative stress in diabetic patients by improving blood lipid profiles and inducing the anti-oxidative enzyme systems.

Key Words: *Sanguisorba officinalis* L., Alloxan, Antioxidant Activity, Streptozotocin

서 언

당뇨는 췌장에서 분비되는 인슐린의 분비 장애 및 기능 장애로 유발된 대사 장애로 당의 과잉 생산, 체지방 분해, 그리고 글루카곤 분비의 비정상적인 향진에 의한 대사상의 혼란이 야기되는 것으로 보고되고 있다 (Abrams *et al.*, 1982; Tisch

and Mcdevitt, 1996; Georg and Ludvik, 2000). 특히, 당뇨는 동맥경화, 고혈압 등과 같은 혈관성 질환의 발병률이 높고, 이러한 증상은 산화적 스트레스와 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있다 (Baynes, 1991; Wonhaieb and Godin, 1987). 당뇨의 경우 정상인과 비교하였을 때 생체내 활성산소와 자유라디칼 (H_2O_2 , O_2^- , HO^\cdot)의 활성화 세포, 조직에서의 산화적

†Corresponding author: (Phone) +82-42-821-6734, +82-42-280-2616 (E-mail) chlim@cnu.ac.kr, kbsoo25@dju.kr

Received 2016 January 18 / 1st Revised 2016 February 2 / 2nd Revised 2016 February 19 / 3rd Revised 2016 March 7 / 4th Revised 2016 April 6 / Accepted 2016 April 6

This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

스트레스/손상 및 지질과산화물의 증가, 그리고 혈중 지질조성 변화 등으로 인하여 혈관질환과 성인병 등의 발병이 높은 것으로 보고되고 있다 (Wolff and Dean, 1987; Young and Stout, 1987; Urano *et al.*, 1991; Junqueira *et al.*, 1986). 그러므로 당뇨 생성의 예방을 위해서는 기본적으로 혈당의 조절과 함께 지질과산화물 생성 및 산화적 스트레스를 감소시키는 것이 필수적이라고 할 수 있다. 최근 당뇨 관련 예방 및 치료를 위한 혈당조절기능과 항산화 활성 강화 기능을 가진 생리활성 물질 및 기능성소재 발굴 등의 항당뇨에 관한 연구가 진행되고 있고 부작용이 적은 천연물로부터 개발하고자 심혈을 기울이고 있다 (Atkinson and Maclaren, 1994; Yki-Jarvinen, 1994).

지유 (*Sanguisorba officinalis* L.)는 장미과 (Rosaceae)에 속하는 오이풀 또는 기타 동속 식물의 다년생 초본의 뿌리를 말하며 중국, 일본 및 한국 전 지역에 널리 분포하고 있다 (Ban *et al.*, 2005). 민간에서는 주로 지혈, 상처부위의 치료, 피부염, 습진, 화상 등의 치료에 이용하는 것으로 보고되고 있다 (Son *et al.*, 2004; Marklund and Marklund, 1974). 지유의 주요 활성성분으로는 ziguglycoside I, II와 pomolic acid, flavonoid 성분인 quercetin과 kaempferol, triterpenoid계 화합물인 ursolic acid 등의 연구가 활발히 진행되고 있다 (Cheng and Cao, 1992; Liu *et al.*, 2005; Mimaki *et al.*, 2001; Yokozawa *et al.*, 2000). 지유 추출물 및 분리된 화합물은 항산화, 항암, 항균, 그리고 항바이러스 등의 다양한 생리활성이 보고되었다 (Rhim, 2013; Goun *et al.*, 2002; An *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2001).

이와 같이, 지유는 항산화, 항균, 항암 등의 다양한 *in vitro* 생리활성에 관한 연구결과는 많이 보고되고 있으나, *in vivo* 모델을 이용한 생체 내 항산화 활성에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 따라서, 본 연구에서는 당뇨 동물 모델을 이용하여 지유 추출물로부터 생체 내 지질과산화 (MDA; Malondialdehyde)와 항산화 효소 (CAT; Catalase, SOD; Superoxide Dismutase, GSH; Glutathione, GST; Glutathione-S-Transferase)활성에 미치는 영향에 대하여 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험 재료 및 추출

본 실험에 사용한 지유는 중국 하북 지역에서 생산되어 건조된 것으로 중국 안국시장에서 구입하였으며, 대전대학교 한의과대학에 보관하였고 지유 100 g에 증류수 1,000 ml을 넣고 2 시간 동안 가열한 후 여과하여 회전식 진공 농축기로 감압 농축하여 소량의 액체 추출을 얻었다. 이 추출물은 0.45 μm 의 pore size를 가진 filter (Advantec MFS Inc., Dublin, CA, USA)로 부유성분을 제거한 후 freeze dryer (Samwon engineering Co., Busan, Korea)로 동결 건조하여 12.4 g의 지유 추출물 (SOE)

분말을 얻었으며, 실험 전까지 냉동고에 보관하면서 사용 시 필요한 농도로 희석하여 0.25 μm 의 pore size를 가진 filter로 여과하여 사용하였다.

2. 시 약

Streptozotocin (STZ), Alloxan (ALL), Bovine Serum Albumin (BSA), Superoxide Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutathione-S-Transferase (GST), Glutathione (GSH) 그리고 Malondialdehyde (MDA)는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 혈청분리용 원심분리관 (SST-tube)은 BD vacutainer (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA)로부터 구입하였다. 그리고 D-PBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)은 Gibco BRL Life Technology (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)에서 구매하였으며, 기타 일반 시약은 특급시약을 구입하여 사용하였다.

3. 실험동물 및 사육 조건

실험동물은 (주)코아텍 (Peongteak, Korea)으로부터 Sprague-Dawley계 수컷 50 마리 (평균 체중 약 180 - 200 g)를 분양받아 습도 $50 \pm 5\%$, 온도 $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 12시간 주기로 명암을 유지하여 동물 실험실에서 stainless steel cage에 한 마리씩 분리하여 넣고 5주간 사육하며 각각의 고형배합사료 (Samyang, Seoul, Korea)와 음수를 자유식으로 공급하였다. 실험은 1주일 동안 예비 사육 후 시행하였으며, 실험동물은 체중에 따라 난괴법으로 10마리를 1군으로 하여 정상군, STZ와 ALL로 당뇨를 유발한 대조군, 당뇨 유발 후 지유 추출물 (SOE)를 투여한 실험군 (STZ + SOE 투여군, ALL + SOE 투여군)으로 구분하였다 (n = 10, 200 mg/kg 추출물 경구투여). 본 연구는 대전대학교 동물실험 승인하에 동물실험 가이드라인에 따라서 진행하였다 (승인번호: DJUAR2014-024).

4. 당뇨유발

실험동물은 당뇨유발 전 12시간 절식시킨 후 STZ을 0.01 M citrate buffer (pH 4.5) 에 녹인 후 50 mg/kg b.w. (0.2 ml/200 g)로 복강투여 하고 정상군은 동량의 citrate buffer 용액만 주사하였다. ALL은 STZ와 같은 방법으로 용해하여 90 mg/kg b.w. (0.2 ml/200 g)로 복강투여 하고, 주사 후 60시간 후 꼬리 정맥에서 혈액을 채취하여 혈당측정기 (Allmedicus Co., GlucoDr AGM-2100, Anyang, Korea)를 이용하여 측정하였다.

5. 혈액생화학적 검사

혈액생화학적 검사는 부검전일 20 - 24시간 절식 시킨 동물을 에테르 마취 후 복대정맥에서 전체혈로 얻은 혈액을 혈청분리용 원심분리관 (SST-tube)에 넣고 실온에서 30분간 방치

하여 응고시킨 후, 원심분리 (3,000 rpm × 15분)하여 얻은 혈청에 대해서 중성지방 (Triglyceride, TG), 총콜레스테롤 (Total Cholesterol, TC), 저밀도 지단백 콜레스테롤 (Low-Density Lipoproteins Cholesterol, LDL-C), 고밀도 지단백 콜레스테롤 (High-Density Lipoproteins Cholesterol, HDL-C) 을 포함한 생화학적인 검사를 생화학 자동분석기 (Hitachi-7180, Hitachi Medical, Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였으며, 모든 실험과정과 검사법은 진단검사 의학적 가이드라인에 준하여 실험하였다.

6. 간 사이토졸 분획에서 항산화 활성

SOD, CAT, GST, GSH 및 MDA의 실험은 적출한 쥐의 간을 조각내어 150 mM KCl이 포함된 30 mM hepes 완충액 (pH 7.4)으로 5배 희석하여 균질화한 후 700 g로 20분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 그 상등액을 10,000 g로 30분간 고속 원심 분리하여 pellet을 제거하였다. 그 상등액을 다시 100,000 g로 60분간 초원심 분리하여 세포질 분획을 얻었으며, 이 세포질 분획은 130 mM KCl 함유 hepes 완충액으로 씻어낸 다음 같은 완충액으로 재균질하여 마이크로솜 분획을 얻었다. 마이크로솜과 세포질 분획을 분리하는 전 과정은 4°C의 저온실에서 수행하였으며, 조제한 분획을 -70°C에 보관하면서 실험에 각각 사용하였다. 단백질 정량은 BSA를 표준물질로 사용하여 Lowry 등 (1951)의 방법에 따라 측정하였다.

간 조직에서 산화적 손상에 의한 세포 방어에 일차적으로 관여하는 효소로써 superoxide anion을 과산화수소로 전환시키는데 관여하는 SOD의 활성은 Crapo 등 (1978)의 방법에 준하여 실험하였고 세포내 cytochrome C를 억제하는 효소의 양을 1 unit으로 산정하였다. CAT의 활성은 이후 생성된 과산화수소를 H₂O로 전환시켜 활성산소에 의한 산화적 손상으로부터 생체를 보호하는 효소로써 Lee 등 (2012)의 방법에 준하여 기질 10 mM 과산화수소용액 및 효소액을 가하여 반응시킴으로써 240 nm에서 소실되는 과산화수소의 양을 측정하였다. GST의 활성은 Habig 등 (1974)의 방법을 응용하여 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)에 1 mM의 GSH를 사용하여 pH

6.5, 37°C에서 측정하였다.

MDA의 함량은 Suematsu 등 (1977)의 방법에 준하여 시험관에 20% acetic acid 1.5 ml, 8.1% SDS 0.225 ml, 증류수 0.075 ml, 1.2% TBA 용액 1 ml, 그리고 간 균질액을 각각 넣었다. 반응액은 100°C에서 30분 가열 후 원심분리 (3,000 rpm, 10분)하여 상등액에 대하여 532 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 검량선은 MDA를 사용하여 환산하였다. 또한 microsomal membrane의 지질 과산화도를 비교하기 위하여 NADPH 0.1 mM과 ADP-Fe²⁺ (ADP 0.5 mM, Fe²⁺ 0.02 mM)을 첨가하고 시험관에 마이크로솜을 넣은 후 각각 37°C에서 0, 5, 10, 30, 60분 반응 시켜 위와 동일한 방법으로 MDA의 함량 변화를 측정하였다. 모든 시험항목에 대해서는 3번을 공히 반복 측정하여 각각의 농도를 구하였다.

7. 통계처리

실험 결과는 PASW (version 19.0, IBM, Somers, NY, USA)을 이용하여 각 실험군마다 평균과 표준편차를 구하였고, one-way Analysis of Variance (ANOVA) *t*-test를 한 후 Duncan's Multiple Range Test (DRMT)에 의하여 각 실험군 간의 유의 차 검증을 확인하였다.

결과 및 고찰

1. 체중 측정

실험 5주 동안 정상군, 당뇨대조군 (STZ, ALL 투여군) 및 실험군 (STZ + SOE, ALL + SOE 투여군)의 체중변화를 측정하였다 (Table 1). 실험기간 동안 체중변화를 보면 정상군의 체중은 지속적으로 증가하였으나 당뇨유발 후 실험 5주차부터 정상군과 비교하여 당뇨대조군에서 체중의 유의적인 감소 ($p < 0.01$)를 확인하였다. 실험군 중 STZ + SOE 투여군에서 STZ와 비교하여 실험 4주차와 5주차에서 유의적인 체중 증가를 확인할 수 있었으며, ALL + SOE 투여군에서는 ALL에 비해 마지막인 5주차에서만 유의적인 체중증가 ($p < 0.05$)를 확인하였다.

Table 1. Effects of *Sanguisorba officinalis* L. extract on body weight in streptozotocin or alloxan induced diabetic rats.

Groups/Week	0	1	2	3	4	5
Normal	180.3 ± 10.5 ¹⁾	213.7 ± 13.4	245.6 ± 15.5	286.1 ± 16.9	340.4 ± 23.7	390.5 ± 17.1
STZ ²⁾	193.5 ± 8.4	215.1 ± 10.5	234.6 ± 23.4	257.5 ± 28.7	265.2 ± 30.4**	249.4 ± 28.1**
STZ + SOE ³⁾	185.5 ± 6.7	218.7 ± 21.4	240.5 ± 16.7	268.7 ± 16.7	287.3 ± 16.9* [#]	302.6 ± 35.4* [#]
ALL ⁴⁾	191.4 ± 6.7	219.5 ± 6.9	238.4 ± 19.4	245.8 ± 10.9	263.5 ± 14.9**	255.3 ± 33.0**
ALL + SOE	188.4 ± 6.2	215.6 ± 14.2	235.2 ± 20.7	261.4 ± 15.5	295.7 ± 13.8*	315.8 ± 23.5* [†]

¹⁾All data are expressed as mean standard deviations for triplicate experiments (n = 10). *Significantly different from normal at $p < 0.05$, **Significantly different from normal at $p < 0.01$, [#]Significantly different from STZ-control at $p < 0.05$, [†]Significantly different from ALL-control at $p < 0.05$ by student's *t*-test. ²⁾Streptozotocin (50 mg/kg, b.w.) and was injected intraperitoneally into Sprague-Dawley rats. ³⁾The extract of *Sanguisorba officinalis* was administrated orally for 5 weeks. ⁴⁾Alloxan (90 mg/kg, b.w.) was injected intraperitoneally into Sprague-Dawley rats.

Table 2. The serum lipid profiles in streptozotocin or alloxan induced diabetic rats on extract of *Sanguisorba officinalis*.

Groups	TC (mg/dl)	TG (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)
Normal	62.3 ± 12.6 ¹⁾	48.2 ± 12.7	48.3 ± 1.8	18.9 ± 3.3
STZ ²⁾	83.7 ± 17.6**	73.0 ± 26.3**	65.4 ± 1.8	30.5 ± 5.5**
STZ + SOE ³⁾	87.8 ± 23.3**	62.3 ± 16.5*	64.2 ± 1.7	31.2 ± 9.3**
ALL ⁴⁾	74.8 ± 17.1**	70.0 ± 16.8**	57.6 ± 1.12	29.5 ± 5.9**
ALL + SOE	72.8 ± 27.5**	62.8 ± 16.9*	59.8 ± 2.78	22.6 ± 5.2**

TC; Total Cholesterol, TG; Triglyceride, LDL-C; Low Density Lipoprotein Cholesterol, HDL-C; High Density Lipoprotein Cholesterol. ¹⁾All data are expressed as mean standard deviations for triplicate experiments (n = 10). *Significantly different from normal at $p < 0.05$, **Significantly different from normal at $p < 0.01$ by student's *t*-test. ²⁾Streptozotocin (50 mg/kg, b.w.) and was injected intraperitoneally into Sprague-Dawley rats. ³⁾The extract of *Sanguisorba officinalis* was administrated orally for 5 weeks. ⁴⁾Alloxan (90 mg/kg, b.w.) was injected intraperitoneally into Sprague-Dawley rats.

2. 지질성분의 변화

당뇨 쥐의 혈장 지질성분 증가 원인은 당뇨 유발에 의한 당 대사의 이상이 지질대사에 장애를 일으킨 것으로 보고되고 있다 (Siegel *et al.*, 1996). 식이패턴, 당뇨병 및 간장의 지방침착 등은 생체 내 지질대사의 이상을 초래하는 원인으로 혈중 콜레스테롤 및 중성지방의 함량을 증가시켜 고지혈증을 유발하는 것으로 알려져 있으며, 당뇨를 유발시킨 토끼에서 고지혈증이 확인되는 등 여러 연구를 통하여 고지혈증은 당뇨에 수반되는 합병증이 입증되고 있다 (Abrams *et al.*, 1982; O'meara *et al.*, 1990). 따라서, 본 실험에서는 STZ 및 ALL로 유발된 당뇨 쥐에 SOE를 투여함으로써 혈중 지질성분의 변화를 확인하였다.

혈청 중에 함유되어있는 TC, TG, LDL-C 및 HDL-C 함량을 측정된 결과 정상군과 비교하여 TC, TG, LDL-C 및 HDL-C은 STZ 및 ALL을 처리한 대조군 모두에서 유의적인 증가를 보였다. STZ 처리하여 당뇨 유발 후 SOE를 투여한 실험군에서는 TG와 LDL-C은 감소하였으며, TC 및 HDL-C의 혈중 농도는 일부 증가하였으나 유의적인 차이는 없었다. 또한, ALL 대조군에서의 TC, TG 및 HDL-C의 혈중 농도는 SOE 투여에 의하여 감소하였으나 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았다 (Table 2).

3. MDA 및 GSH 함량 변화

지질 과산화물의 증가는 여러 가지 독성 화합물과 약물에 의한 간 손상이 원인이라는 학설이 인정되고 이러한 것들은 세포내 산화 스트레스 즉 자유기 생성의 증가 및 항산화 효소 활성의 감소로 인해 발생하는 것으로 보고되어 있다 (Kadowak *et al.*, 1989). 과산화 지질 반응은 유리기들에 의해 세포막 지질의 불포화지방산들이 산화적 분해를 일으키는 것으로 MDA는 과산화지질의 지표가 된다.

따라서, 본 실험에서는 STZ 및 ALL로 유발된 당뇨 쥐에 SOE를 투여함으로써 MDA 함량 변화를 확인하였다. MDA는 정상군과 비교하여 STZ 및 ALL 처리로 유발된 당뇨 대조군

Table 3. The contents of MDA and GSH in streptozotocin or alloxan induced diabetic rats on extract of *Sanguisorba officinalis*.

Groups	MDA (nmol/g)	GSH (nmol/g)
NC	1.39 ± 0.15 ¹⁾	8.05 ± 0.85
STZ ²⁾	2.98 ± 0.65**	6.56 ± 0.62**
STZ + SOE ³⁾	2.14 ± 0.29**,#	7.34 ± 0.51*
ALL ⁴⁾	2.83 ± 0.53**	6.56 ± 1.00**
ALL + SOE	2.51 ± 0.12**†	7.29 ± 1.25*

MDA; Malondialdehyde, GSH; Glutathione. ¹⁾All data are expressed as mean standard deviations for triplicate experiments (n = 10). *Significantly different from normal at $p < 0.05$, **Significantly different from normal at $p < 0.01$, #Significantly different from STZ-control at $p < 0.05$, †Significantly different from ALL-control at $p < 0.05$ by student's *t*-test. ²⁾Streptozotocin (50 mg/kg, b.w.) and was injected intraperitoneally into Sprague-Dawley rats. ³⁾The extract of *Sanguisorba officinalis* was administrated orally for 5 weeks. ⁴⁾Alloxan (90 mg/kg, b.w.) was injected intraperitoneally into Sprague-Dawley rats.

에서 유의적인 증가 ($p < 0.01$)를 확인 할 수 있었으며, 이것은 STZ 투여로 인한 당뇨 유발시 oxygen free radical의 생성과 산화적 스트레스가 증가하여 조직 내의 과산화지질이 증가된 결과 간 조직에서 MDA 함량이 증가한다는 보고 (Bang *et al.*, 2002)와 비슷한 결과를 나타냈다. SOE 투여 시 당뇨 대조군과 비교하여 유의적인 감소 ($p < 0.01$)를 나타냈다 (Table 3).

당뇨 유발에 의해서 생성된 지질 과산화물은 GSH에 의해서 분해되어 제거된다. GSH는 생체내 생성된 과산화수소 (H_2O_2)등의 독성물질을 해독시켜 세포내 활성산소종의 농도를 조절하는 물질로 알려져 있으며, 이외에도 단백질이나 DNA의 합성, 아미노산의 이동, 효소 활성의 조절 및 자유기를 제거하여 이들에 의한 세포 손상 예방 등에 관여하는 것으로 보고되고 있다 (Kim, 1994). STZ 및 ALL로 유발된 당뇨 쥐에 SOE를 투여 함으로써 GSH 함량 변화를 확인한 결과, Table 3과 같이 GSH의 함량은 정상군과 비교하여 당뇨대조군에서 감소를 나타냈다. SOE 투여에 의해서 각각 7.34 ± 0.51 nmol/g

(STZ 투여군) 및 7.29 ± 1.25 nmol/g (ALL 투여군)로 증가를 나타냈으나 유의성은 없었다.

기존 연구에서는 흰쥐의 대뇌피질 신경세포를 이용한 연구에서 지유 에탄올 추출물이 과산화수소 처리에 의한 뇌세포 사멸과 활성산소의 생성을 억제시켜 뇌세포 보호효과를 확인하였다고 보고되었고 (Nguyen *et al.*, 2008), 간세포주를 이용한 세포독성 분석에서는 지유 추출물에서 분리한 (+)-gallicocatechin은 acetylcholinesterase 억제제인 tacrine으로 유발된 세포독성을 농도 의존적으로 억제한다는 연구 결과 (An *et al.*, 2005)가 보고된 바 있어 본 연구의 동물모델에서 과산화수소에 의한 산화적 스트레스를 지유 추출물이 유의적으로 감소한 결과와 유사하였다.

4. 항산화 효소의 활성 변화

당뇨 질환은 죽상동맥경화증을 비롯한 혈관합병증은 조기에 발병하여 더 심한 병변 형태를 나타내는 것으로 보고되고 있으며, 이러한 혈관합병증의 발생에 산화스트레스가 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다 (Baynes, 1991; Wonhaieb and Godin, 1987). 이와 같은 산화 스트레스는 LDL 산화, 세포 내 신호 전달 기능이상, 세포손상을 일으키는 유전자 산물 생성 등을 야기하여 당뇨병성 혈관합병증을 일으키는 주요한 인자로 알려져 있다 (Wolff and Dean, 1987; Junqueira *et al.*, 1986).

따라서, 당뇨병으로 인한 활성산소 및 자유라디칼의 생성 및 활성에 대한 항산화 효소의 작용은 혈관합병증 발병에 매우 중요한 것으로 알려져 있다. 이에, 본 연구에서는 STZ 및 ALL로 유발된 당뇨 쥐에 SOE를 투여함으로써 활성산소와 자유라디칼을 제거하는데 중요한 항산화 효소로 알려진 SOD, CAT 그리고 GST의 활성변화를 확인하였으며, 측정 결과는 Table 4와 같다.

SOD 효소활성은 정상군과 비교하여 당뇨대조군에서 감소 ($p < 0.01$)하였으며, SOE 투여에 의해서 저하된 SOD를 회복시키는 경향을 나타냈으나 유의성은 없었다. 이는 세포 내 산화스트레스가 감소함에 따라 간 손상이 억제되어 SOD의 활성이 증가되는 것으로 사료된다. 과산화수소를 제거하는 항산화 효소로 알려진 CAT의 경우 정상군과 비교하여 당뇨대조군에서 증가 ($p < 0.01$)하는 경향을 나타냈으며, 이와 같이 간 사이토졸 분획물에서 CAT가 증가한 것은 지방의 자동산화, 유기물 산화 또는 SOD에 의해 생성된 과산화수소를 분해하기 위한 것이라는 연구결과와 유사하였다 (Gao *et al.*, 2012). STZ와 ALL 투여로 증가된 CAT는 SOE를 투여한 결과 당뇨대조군과 비교하여 유의적인 감소 ($p < 0.01$)를 확인하였다. 이는 당뇨 유발에 의해 간 사이토졸 분획물에서 낮아진 SOD 활성이 SOE 투여에 의해 증가한 결과 과산화수소의 생성을 감소하여 CAT 활성이 감소된 것으로 사료된다.

Table 4. The hepatic cytosolic activities of SOD, CAT, and GST in streptozotocin or alloxan induced diabetic rats on extract of *Sanguisorba officinalis*.

Group	SOD (unit/mg)	CAT (nmol/min)	GST (nmol/g)
NC	$13.49 \pm 2.98^{1)}$	185.47 ± 10.63	107.81 ± 4.79
STZ ²⁾	$9.16 \pm 1.44^{**}$	$392.40 \pm 13.71^{**}$	$79.07 \pm 7.89^{**}$
STZ + SOE ³⁾	$10.20 \pm 0.68^{*}$	$226.10 \pm 35.60^{**\#}$	95.13 ± 9.84
ALL ⁴⁾	$9.88 \pm 1.27^{**}$	$347.50 \pm 49.90^{**}$	$81.84 \pm 8.28^{*}$
ALL + SOE	$10.72 \pm 1.39^{*}$	$236.70 \pm 29.40^{**\dagger}$	$90.70 \pm 8.63^{*}$

SOD; Superoxide Dismutase, CAT; Catalase, GST; Glutathione S-Transferase. ¹⁾All data are expressed as mean standard deviations for triplicate experiments (n = 10). *Significantly different from normal at $p < 0.05$, **Significantly different from normal at $p < 0.01$, #Significantly different from STZ-control at $p < 0.05$, †Significantly different from ALL-control at $p < 0.05$ by student's *t*-test. ²⁾Streptozotocin (50 mg/kg, b.w.) and was injected intraperitoneally into Sprague-Dawley rats. ³⁾The extract of *Sanguisorba officinalis* was administrated orally for 5 weeks. ⁴⁾Alloxan (90 mg/kg, b.w.) was injected intraperitoneally into Sprague-Dawley rats.

GST는 체내에서 생성된 친전자성 독성 물질에 glutathione의 thiol기를 포집시켜서 독성 물질을 전이 분해시키는 작용을 하는 효소로 알려져 있으며 (Won *et al.*, 2010), STZ 및 ALL 투여로 유발된 당뇨대조군에서 감소하는 경향을 나타냈다. 그러나 감소된 GST의 활성은 SOE 투여에 의해서 증가하는 경향을 나타냈으나 유의성은 없었으며, 이것은 SOE 투여에 의해 독성 물질이 glutathione에 포집되어 배설이 촉진됨으로써 얻어진 결과로 판단된다. 본 연구에서 실험 5주 동안의 체중 증가율을 측정된 결과, STZ와 ALL에 의해 유발된 당뇨대조군에서는 체중이 감소하였으며, 지유 추출물 투여군에서는 4-5주차부터 당뇨대조군과 비교하여 유의적인 증가를 확인하였다. 또한, 지질성분들인 콜레스테롤, 중성지방, LDL-C 및 HDL-C의 혈 중 농도는 당뇨대조군 모두에서 정상군과 비교하여 유의적으로 증가하였으나, 지유 추출물 투여군에서는 유의적인 변화를 확인할 수 없었다.

간 사이토졸 분획물에서 지질 과산화물 생성의 지표인 MDA 함량은 SOE를 투여한 쥐에서 유의적으로 감소하였으며, 생성된 지질 과산화물을 제거하는 작용을 하는 것으로 알려진 GSH 함량은 SOE 투여에 의해 증가하였으나 유의성은 없었다. 특히, 생체 내 주요한 항산화 효소인 SOD 및 GST의 활성은 SOE 투여 의해 증가하는 경향을 나타냈으며, CAT의 활성은 당뇨대조군과 비교하여 유의적인 감소 경향을 나타냈다. 기존 지유 추출물의 연구에서는 에탄올 추출물로부터 DPPH 라디칼 소거효능이 0.33 mg/ml (50% 저해 농도)로 이는 대표적 항산화제로 알려진 α -tocopherol보다 우수하였으며 superoxide 라디칼은 catechin보다, peroxy라디칼은 ascorbic acid보다 소거활성의 우수함을 보고하였다 (Rhim, 2013). 이미 알려진 천연자원 유래 추출물의 항산화 활성은 도라지, 일엽초, 고추냉이 그리고 베리류 등 많은 연구가 보고 되고 있지만 (Lee *et*

al., 2015; Yang *et al.*, 2015; Park and Lee, 2015; Li and Jeong, 2015) 본 연구는 STZ와 ALL에 의해 유발된 당뇨 모델을 이용하여 지유 추출물 투여 후 지질대사와 항산화 효소계에 미치는 영향을 조사한 것으로 혈중지질성분의 개선 효과 및 생체 내 항산화 효소계의 활성화에 영향을 주는 것을 확인할 수 있었다.

향후 추가적으로 활성성분 분석 및 기초 생화학적 연구를 통해 지유 추출물이 당뇨 발병에 의해 유도되는 혈관성 질환의 예방 및 치료를 위한 기능성 소재로써 개발이 가능 할 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2010년 한국연구재단의 기초연구사업지원(과제 번호: 2010-0022019)에 의해 이루어진 결과로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Abrams JJ, Ginsberg H and Grundy SM. (1982). Metabolism of cholesterol and plasma triglycerides in nonketotic diabetes mellitus. *Diabetes*. 31:903-910.
- An BJ, Lee SA, Son JH, Kwak JH, Park JM and Lee JY. (2004). Cytotoxic and antibacterial activities of *Sanguisorbae officinalis* L. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 47:141-145.
- An RB, Tian YH, Oh H and Kim YC. (2005). *In vitro* free radical scavenging and hepatoprotective compound from *Sanguisorbae radix*. *Natural Product Sciences*. 11:119-122.
- Atkinson MA and Maclaren NK. (1994). The pathogenesis of insulin dependent diabetes mellitus. *The New England Journal of Medicine*. 331:1428-1436.
- Ban JY, Cho SO, Jeon SY, Song KS, Bae KH and Seong YH. (2005). Protective effect of *Sanguisorba officinalis* L. root on amyloid β protein(25-35)-induced neuronal cell damage in cultured rat cortical neuron. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 13:219-226.
- Bang MA, Cho YJ and Kim HA. (2002). Effect of Indongcho(*L. japonica* Thumb) on glucose a and lipid metabolism and antioxidative enzyme system in streptozotocin induced diabetic rats. *Journal of the Korean Society of Dietary Culture*. 17:377-386.
- Baynes JW. (1991). Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes*. 40:405-412.
- Cheng DL and Cao XP. (1992). Pomolic acid derivatives from the root of *Sanguisorba officinalis*. *Phytochemistry*. 31:1317-1320.
- Crapo JD, McCord JM and Fridovich I. (1978). Preparation and assay of superoxide dismutases. *Methods in Enzymology*. 53:382-393.
- Gao D, Li Q, Gao Z and Wang L. (2012). Antidiabetic effects of Corni fructus in streptozotocin-induced diabetic rats. *Yonsei Medical Journal*. 53:691-700.
- Georg P and Ludvik B. (2000). Lipid and diabetes. *Journal of Clinical and Basic Cardiology*. 3:159-162.
- Goun EA, Petrichenko VM, Solodnikov SU, Suhinina TV, Kline MA, Cunningham G, Nguyen C and Miles H. (2002). Anticancer and antithrombin activity of Russian plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 81:337-342.
- Habig WH, Pabst MJ and Jakoby WB. (1974). Glutathione S-transferases: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*. 249:7130-7139.
- Junqueira VBC, Simizu K, Videla LA and Barros SB. (1986). Dose dependent study of the effects of acute lindane administration on rat liver superoxide anion production antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation. *Toxicology*. 41:193-204.
- Kadowak M, Harada N, Takahashi S, Noguchi T and Naito H. (1989). Differential regulation of degradation of myofibrillar and total proteins in skeletal muscle of rats: Effects of streptozotocin-induced diabetes, dietary protein and starvation. *The Journal of Nutrition*. 119:471-477.
- Kim TG, Kang SY, Jung KK, Kang JH, Lee E, Han HM and Kim SH. (2001). Antiviral activities of extracts isolated from *Terminalis chebula* Retz, *Sanguisorba officinalis* L., *Rubus coreanus* Miq. and *Rheum palmatum* L. against hepatitis B virus. *Phytotherapy Research*. 15:718-720.
- Kim TW. (1994). Functional properties of low density lipoprotein (LDL) and oxidized-LDL. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 23:530-539.
- Lee BJ, Jeon SH, No IR, Kim YG and Cho YS. (2015). Effect of saponin content and antioxidant activities of *Platycodon grandiflorum* Radix by cutting length. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 23:363-369.
- Lee SJ, Kim YS, Hwang JW, Kim EK, Moon SH, Jeon BT, Jeon YJ, Kim JM and Park PJ. (2012). Purification and characterization of a novel antioxidative peptide from duck skin by-products that protects liver against oxidative damage. *Food Research International*. 49:285-295.
- Li H and Jeong JM. (2015). Antioxidant activity of various berries ethanolic extract. *Korean Journal of Medicinal Crop Science*. 23:49-56.
- Liu X, Cui Y, Yu Q and Yu B. (2005). Triterpenoids from *Sanguisorba officinalis*. *Phytochemistry*. 66:1671-1679.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*. 193:265-275.
- Marklund S and Marklund G. (1974). Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*. 47:469-474.
- Mimaki Y, Fukushima M, Yokosuka A, Sashida Y, Furuya S and Sakagami H. (2001). Triterpene glycosides from the roots of *Sanguisorba officinalis*. *Phytochemistry*. 57:773-779.
- Nguyen TTH, Cho SO, Ban JY, Kim JY, Ju HS, Koh SB, Song KS and Seong YH. (2008). Neuroprotective effect of *Sanguisorbae radix* against oxidative stress-induced brain damage: *In vitro* and *in vivo*. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 31:2028-2035.
- O'meara NMG, Devery RAM, Owens D, Collins PB, Johnson AH and Tomkin GH. (1990). Cholesterol metabolism in alloxan-induced diabetic rabbits. *Diabetes*. 39:626-633.
- Park SJ and Lee HY. (2015). Component analysis and antioxidant

- activity of *Wasabi japonica* Matsum leaves. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 23:207-213.
- Rhim TJ.** (2013). *In vitro* antioxidant activity of Sanguisorbae radix ethanol extracts. Korean Journal of Plant Resources. 26:149-158.
- Siegel RD, Cupples A, Schaefer EJ and Wilson PWF.** (1996). Lipoproteins, apolipoproteins, and low-density lipoprotein size among diabetics in the Framingham offspring study. Metabolism. 45:1267-1272.
- Son KJ, Lee SA, Lee GD, Kim YS, Jeon JG and Chang KY.** (2004). Effects of crude *Sanguisorba officinalis* L. extract on the growth and the adherence to hydroxyapatite beads of mutans streptococci. Journal of the Korean Academy of Dental Health. 28:97-104.
- Suematsu T, Kamada T, Abe H, Kikuchi S and Yagi K.** (1977). Serum lipoperoxide levels in patients suffering from liver disease. Clinica Chimica Acta. 79:267-770.
- Tisch R and Mcdevitt H.** (1996). Insulin-dependent diabetes mellitus. Cell. 85:291-297.
- Urano S, Hoshi-Hashizume M, Tochigi N, Matsuo M, Shiraki M and Ito H.** (1991). Vitamin E and the susceptibility of erythrocytes and reconstituted liposomes to oxidative stress in aged diabetics. Lipids. 26:58-61.
- Wolff SP and Dean RT.** (1987). Glucose autoxidation and protein modification: The potential role of autoxidative glycosylation in diabetes. Biochemical Journal. 245:243-250.
- Won HJ, Lee HS, Kim JT, Hong CO, Koo YC and Lee KW.** (2010). The anti-diabetic effects of Kocat-D1 on streptozotocin induced diabetic rats. Korean Journal of Food Science and Technology. 42:204-209.
- Wonhaieb SA and Godin DV.** (1987). Alterations in free radical tissue defense mechanism in streptozotocin-induced diabetic rats: Effects of insulin treatment. Diabetes. 36:1014-1018.
- Yang J, Kwon YS, Lim JD, Yu CY and Kim MJ.** (2015). Antioxidant and anticancer properties of the extracts from *Lepisorus thunbergianus*(Kaulf.) Ching. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 23:324-333.
- Yki-Jarvinen H.** (1994). Pathogenesis of non-insulin dependent diabetes mellitus. The Lancet. 343:91-95.
- Yokozawa T, Chen CP, Tanaka T and Kitani K.** (2000). A study on the nitric oxide production-suppressing activity of Sanguisorbae radix components. Biological and Pharmaceutical Bulletin. 23:717-722.
- Young IR and Stout RW.** (1987). Effects of insulin and glucose on the cells of the arterial wall: Interaction of insulin with dibutyryl cyclic AMP and low density lipoprotein in arterial cells. Diabetes and Metabolism. 13:301-306.