

## 솔잎추출물이 고지방식이를 급여한 흰쥐의 혈청, 간장의 효소 및 간조직구조에 미치는 영향

강윤한 · 박용곤<sup>†</sup> · 하태열 · 문광덕\*

한국식품개발연구원  
\*경북대학교 식품공학과

### Effects of Pine Needle Extracts on Enzyme Activities of Serum and Liver, and Liver Morphology in Rats Fed High Fat Diet

Yoon-Han Kang, Yong-Kon Park<sup>†</sup>, Tae-Youl Ha and Kwang-Deog Moon\*

Korea Food Research Institute, Kyonggido 463-420, Korea

\*Dept. of Food Science and Technology, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

#### Abstract

The effects of pine needle extracts on lipid contents and antioxidative enzyme activities in liver of rat were evaluated. Thirty male Sprague-Dawley rats were divided into five groups and fed high fat diets for four weeks. Each group was administered with pine needle extract in the following doses: control, water; WE-3, hot water extract(3% PN); WE-6, hot water extract(6% PN); AE-3, acetone extract(3% PN); AE-6, acetone extract(6% PN). The results obtained from the experiment were as follows: GOT activities were not significantly different among experimental groups but GPT activities were significantly low in the experimental groups compared to the control group. Liver superoxide dismutase(SOD) activity of pine needle extract administered groups was higher than that of control group. Catalase activities of liver had a similar tendency to SOD activities, but were not significantly different among the groups. Liver TBARS of WE-3 WE and AE-6 groups were slightly lower than those of other groups. Microscopic observation of liver tissue revealed that pine needle extracts increased cellular swelling, which was markedly increased in WE-6 group compared with control group.

**Key words:** pine needle extracts, superoxide dismutase, catalase, liver morphology

#### 서 론

일반적으로 생체막 구성성분인 다가불포화지방산의 과산화로 생성된 free radical( $^1O_2$ ,  $O_2^-$ , OH,  $H_2O_2$ )들은 생체조직세포의 손상을 초래하며 생체내에는 정상 경우 free radical을 제거해 주는 scavenging system이 존재한다. 즉 항산화 비타민류와 같은 비효소적 방어계와 이러한 생성물의 소거작용을 촉매하는 효소인 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase 등과 같은 효소적 방어계가 존재한다. 권 등(1)은 카테킨 투여로 SOD 활성 저하, 생체내 지질과산화 억제를 보고하였으며, 간손상 예방효과로는 지의류의 수용성 추출물(2), 버섯분말식이(3) 등으로 효과를 얻었으며, 박 등(4)은 흰쥐에 양파투여로 간장 등의

SOD, catalase 활성의 변화를 둔화시켰다고 하였다.

본 연구에서는 전보(5)에 이어 솔잎 열수추출물과 70% 아세톤추출물이 고지방식이를 섭취한 흰쥐의 혈중 GOT, GPT 활성, 간장의 항산화관련 효소 활성도 및 간장조직에 미치는 영향을 검토하였다.

#### 재료 및 방법

##### 솔잎추출물의 제조

추출물의 제조는 Nakabayashi의 방법(6)에 준하여 전보(5)와 동일하게 제조하여 열수추출물(솔잎 건조분말 3, 6%), 70% 아세톤추출물(솔잎 건조분말 3, 6%)로 하였다.

<sup>†</sup>To whom all correspondence should be addressed

**실험동물과 실험식이**

실험동물과 실험식이는 전보(5)와 동일하게 처리하였다.

**효소활성 측정**

혈청 중의 glutamic oxaloacetic transaminase(GOT) 및 glutamic pyruvic transaminase(GPT) 활성도는 Reitman과 Frankel법(7)에 준하여 행하였다. 각 test tube에 s-GOT용 기질액, s-GPT용 기질액 1ml씩을 취하고 27°C water bath에서 3분간 가온한 다음 혈청 0.2ml를 취하여 가한 후 정확히 37°C에서 s-GOT인 경우는 1시간, s-GPT는 30분간 가온하였다. Dinitrophenyl hydrazine 발색용액을 1ml씩 가하여 실온에 방치하고 0.4N NaOH용액 10ml를 넣어 잘 혼합하여 5분간 정지한 다음 증류수를 대조로 하여 분광광도계로 505nm에서 흡광도를 측정하였으며, 이때 GOT와 GPT 단위인 Karmen 환산은 혈청 transaminase 측정시약을 이용하여 작성한 표준곡선으로 부터 효소 활성치를 구하였다.

Superoxide dismutase 활성도는 Nandi법(8)에 따라 간조직 균질액 0.01ml를 사용하여 2.9ml Tris 완충용액(50mM Tris-cacodylate buffer/10mM diethylene-triamine pentaacetic acid, pH 8.5) 및 catalase(mg/ml) 40µg 넣고 25°C에서 항온한 후 3.9mM pyrogallol 0.1ml를 가하여 420nm에서 pyrogallol의 자동산화가 저해되는 정도를 측정하였다. 이때 SOD 1unit는 pyrogallol의 자동산화 속도를 50% 억제하는데 필요한 SOD의 양으로 정의하였다. Catalase 활성도는 Abei법(9)에 따라 10% 간균질액을 50mM phosphate buffer(pH 7.0)로 500배 희석한 후 2ml를 취하여 반응액내의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30mM)의 소모를 240nm에서 흡광도의 감소를 측정하였다. 효소액의 단백질 함량은 Lowry법(10)으로 측정하였으며 표준품으로는 bovine serum albumin을 사용하였다.

**지질과산화물**

지질과산화물의 함량은 Ohkawa 등(11)의 방법에 준하여 분석하였다. 즉 간장 1g에 1.15% KCl용액 9ml를 가하여 Teflon potter-Elvehjem homogenizer로 균질화하여 시료로 하였다. 시료 0.1ml에 8.1% SDS 용액 0.2ml, acetic acid buffer 1.5ml, 0.8% TBA용액 1.5ml를 넣고 반응용액에 증류수를 가하여 4ml를 정용한 뒤 95°C에서 1시간 반응시켰다. 실온으로 식힌 후 1ml의 증류수와 butanol-pyridine(15 : 1, V/V) 혼합용액 5ml를 가하여 충분히 혼합한 후 4,000rpm에서

10분간 원심분리하여 상층액을 532nm에서 흡광도를 측정하였다.

**간장의 조직학적 조사**

채혈 직후 간장의 적출을 행하여 간엽의 일정부위를 절취하여 즉시 적당한 크기의 간 절편을 10%중성 formalin액에 10시간 고정하고 70%, 80%, 90%, 95% 및 100% ethanol액에 각각 3시간, 100% ethanol/xylol(2 : 1), 100% ethanol/xylol(1 : 2)액에 각각 2시간 방치시켜 탈수하고 55°C incubator에서 xylol/hard paraffin (2 : 1), xylol/hard paraffin(1 : 2) 및 hard paraffin용액으로 3시간 처리한 후 paraffin 포매하였다. 이것을 5µm의 두께로 절편하고 hematoxylin-eosin염색하여 광학현미경으로 400배의 배율에서 관찰하였다.

**통계처리**

실험식이에 의한 결과는 평균±표준오차로 나타내었으며 통계처리는 SAS를 이용하였고 각군에 따른 유의차 검정은 분산분석을 한 후 α=0.05 수준에서 Duncan의 다중비교법으로 하였다.

**결과 및 고찰**

**혈청 GOT, GPT 활성**

Table 1에는 각군에 따른 혈청 중 GOT와 GPT의 효소 활성도를 나타내었다. GOT의 활성은 경우 3% 열수추출물 급여군을 제외한 나머지 실험군은 대조군에 비해 상승하였다. 그러나 GPT의 경우 대조군은 50.03unit에 비해 실험군에서는 3%, 6% 아세트추출물 급여군이 각각 32.93unit, 26.47unit으로서 통계적으로 유의하게 낮은 값을 나타내어 슬임추출물 투여에 의한 GPT의 현저한 감소는 오히려 간기능을 개선시킬 가능성이 있음을 시사하고 있다고 사료된다.

이러한 결과는 영지 엑기스의 투여로 GOT 활성도에 변화가 없었으나, GPT 활성도는 대조군 보다 저하되어 영지엑기스는 GPT 활성 상승억제 효과가 있다고 보고한 정(12)의 결과와 비슷한 경향이였다.

Ryle 등(13)에 의하면 사염화탄소로 유도된 급성간손상에 의한 GOT, GPT 활성 증가가 카테킨의 투여에 의해 억제되었다. 서 등(14)은 초산납을 투여한 흰쥐에 양파즙을 이용하여 납해독능력 시험에서 양파를 투여하지 않고 납만 투여한 경우 증독성 간염에 의해 높은 증가치를 나타내었으나, 납과 양파를 동시에 투여한 군은 납만 투여한 군 보다 GOT, GPT 활성이 낮다고

**Table 1. Serum glutamic oxaloacetic transferase(GOT) and glutamic pyruvic transferase(GPT) activities of rats fed experimental diet for 4 weeks** (Unit : Karmen)

	Control <sup>1)</sup>	WE-3	WE-6	AE-3	AE-6
GOT	151.22 ± 10.63 <sup>NS</sup>	150.15 ± 7.43	168.02 ± 9.20	171.85 ± 13.55	164.34 ± 4.95
GPT	50.03 ± 7.08 <sup>a</sup>	42.10 ± 5.29 <sup>ab</sup>	44.43 ± 5.34 <sup>ab</sup>	32.93 ± 3.96 <sup>bc</sup>	26.47 ± 3.00 <sup>c</sup>

Each value represents the mean ± standard error(SE) of seven rats

Values with different superscript within the same row are significantly different(p<0.05)

NS, not significant(p<0.05)

<sup>1)</sup>Control: high fat diet and water, WE-3; high fat diet and hot water extract(3% solution of dried pine needle), WE-6; high fat diet and hot water extract(6% solution of dried pine needle), AE-3; high fat diet and 70% acetone extract (3% solution of dried pine needle), AE-6; high fat diet and 70% acetone extract(6% solution of dried pine needle)-3g(6g) of dried pine needle was extracted by water(70% acetone). After extraction, certain amount of water was added to make 100ml extract

**Table 2. Activities of hepatic superoxide dismutase(SOD) and catalase in rats fed each experimental diet for 4 weeks**

Group	SOD	Catalase
	(Units <sup>1)</sup> /min/mg protein)	(μmoles of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> disappearance/min/mg protein)
Control	11.97 ± 1.12 <sup>b</sup>	74.18 ± 11.88
WE-3	16.54 ± 4.58 <sup>ab</sup>	68.08 ± 23.69
WE-6	18.37 ± 4.23 <sup>ab</sup>	82.50 ± 23.98
AE-3	12.74 ± 4.14 <sup>b</sup>	56.56 ± 20.57
AE-6	30.97 ± 6.76 <sup>a</sup>	80.21 ± 19.19

<sup>1)</sup>One unit of SOD is described as the amount of enzyme required to cause 50% inhibition of pyrogallol autoxidation  
Each value represents the mean ± standard error(SE) of seven rats

Values with different superscript within the same column are significantly different(p<0.05)

NS, not significant(p<0.05)

Refer to Table 1 for the abbreviations

하였다.

#### 간장의 항산화관련 효소활성도

Superoxide dismutase(SOD)의 활성은 Table 2에서와 같이 대조군에 비해 솔잎추출물 급여군에서 높은 경향이였으며, 특히 6% 아세톤추출물 급여군은 30.97unit로 대조군의 11.97unit의 약 2.6배 활성이 있는 것으로 나타났다. 산소를 이용하는 생물체는 superoxide를 제거하는 효소인 SOD를 가지고 있어 생체는 superoxide에 의한 손상으로 부터 보호되고 있으며 SOD의 활성 증가는 외부물질의 투여에 의한 oxygen free radicals에 의해 SOD가 유도되어 효소활성이 증가된 것으로 사료된다. Igarashi와 Ohmuma(15)는 흰쥐에서 isorhamnetin, rhamnetin, quercetin의 flavonoid를 첨가한 식이를 급여하여 간장 중 SOD, catalase 활성을 측정 한 결과 콜레스테롤 첨가유무에 관계없이 이들 효소활성도에 영향을 미치지 않았다고 보고하고 있다. 그러나 박 등(4)은 양파식이이 흰쥐에서 사염화탄소 독성에 미치는 영향을 검토한 결과 양파의 투여로 효소활성이 정상회복된 것으로 보아 양파가 사염화탄소 독성에 대한 해독효과가 있는 것이라고 하였다. Xia 등(16)

은 제한식이에 의해 조직 중의 SOD 등 항산화 관련효소의 활성을 증가시킨 것으로 나타났다.

Catalase는 조직내에서 SOD 등의 효소적 반응에 의해 생성된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 제거하여 생체를 방어하는 기능을 나타내는데 본 실험에서의 catalase의 효소활성도에 있어서도 각군에 따른 통계적인 유의차는 없었으나 SOD와 유사한 활성을 보였으며, 6% 열수 및 아세톤추출물 급여군은 대조군에 비하여 현저하게 높은 값을 나타내었다(Table 2).

따라서 솔잎추출물 급여는 항산화효소의 활성을 조

**Table 3. Lipid peroxide levels in liver of rats fed each experimental diet for 4 weeks**

Groups	MDA(nmol/g wet wt.)
Control	510.3 ± 183.35 <sup>NS</sup>
WE-3	414.2 ± 156.60
WE-6	882.2 ± 167.07
AE-3	659.1 ± 133.46
AE-6	427.0 ± 43.64

Each value represents the mean ± standard error(SE) of seven rats

NS, not significant(p<0.05)

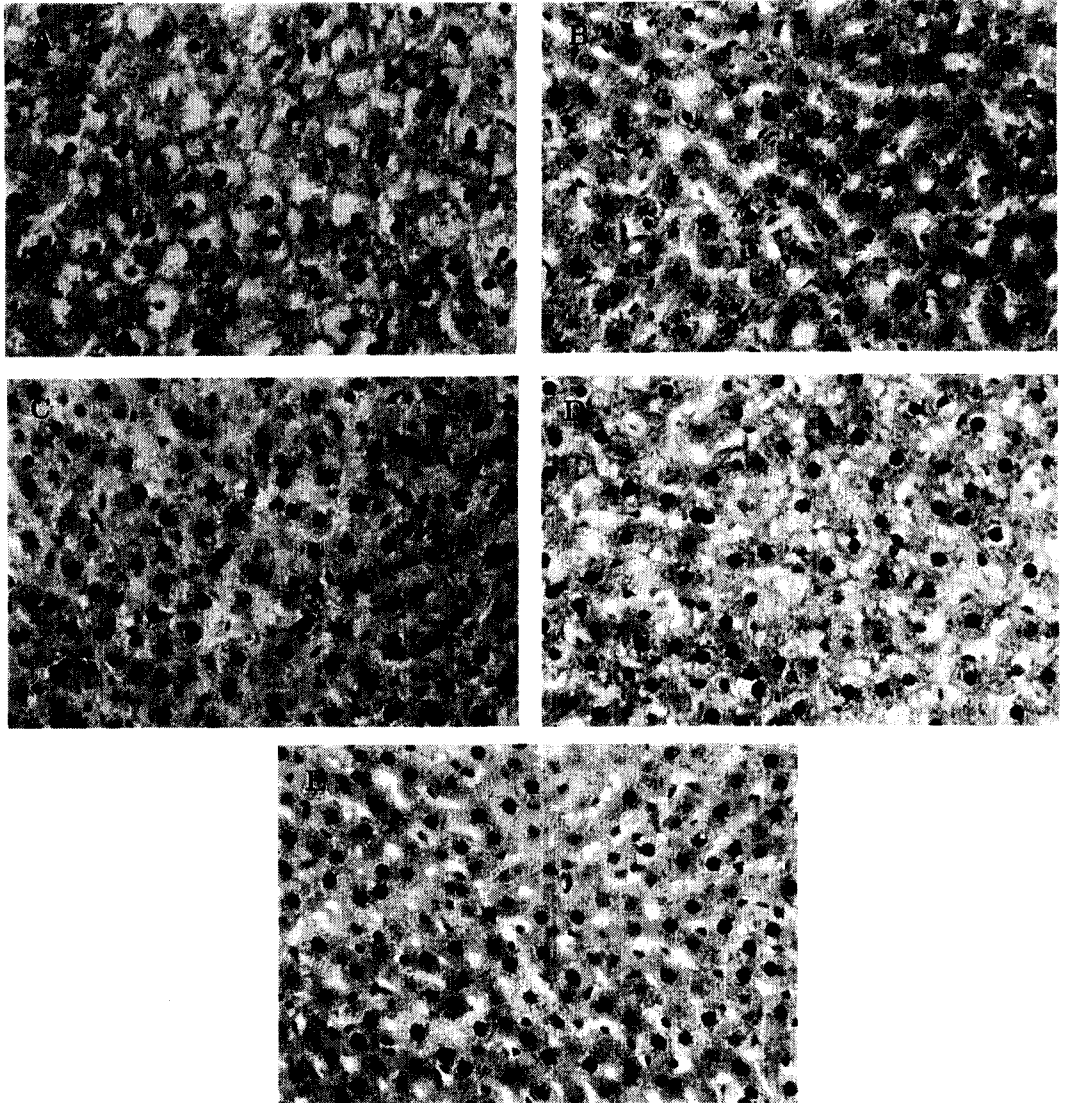
Refer to Table 1 for the abbreviations

절해 생체의 free radical에 의한 손상을 감소시키는데 기여할 가능성이 시사되었다.

**지질과산화물**

지질과산화물은 유리산소, 금속이온이 생체막의 불포화지방산에 작용하여 일어나는 반응 생성물로서 생체내 지질대사 이상을 초래하기도 한다(17). 간장 중의 산화물인 TBA 반응성 산물(thiobarbituric acid-reactive substances : TBARS)은 대조군에 비해 실험군 중 6%

열수 및 3% 아세톤추출물 급여군에서 높은 함량이었고, 3% 열수 및 6% 아세톤추출물 급여군에서는 낮은 함량을 나타내었으나 통계적인 유의성은 없었다(Table 3). 일반적으로 항산화성 물질이 함유된 식이를 급여하면 과산화물가는 낮아지는 것으로 알려져 있으며, 박등(18)은 양과즙이 에탄올에 의한 백서의 지질과산화물 생성에 미치는 영향 연구에서 에탄올 투여군이 정상군에 비하여 TBA 반응성 산물량을 증가시키고 에탄올과 양과즙 병합투여군이 에탄올 투여군에 비하여 간



**Fig. 1. Light micrograph of livers of rats fed.**

A: high fat diet and administrated to water(control), B: high fat diet with hot water extract(WE-3 ; 3% PN), C: high fat diet with hot water extract(WE-6 ; 6% PN), D: high fat diet with 70% acetone extract(AE-3 ; 3% PN), E: high fat diet with 70% acetone(AE-6 ; 6% PN).

TBA 반응성 산물량을 현저하게 감소시켰다고 하였다.

본 실험의 경우 6% 열수추출물과 3% 아세트추출물 급여군에서 과산화물가의 함량이 고지방식이와 물을 급여한 대조군 보다 오히려 높게 나타나 향후 이에 대한 검토가 필요하다고 사료된다.

간장의 조직학적 조사

실험식으로 4주간 사육한 쥐의 간세포 조직을 hematoxylin-eosin으로 염색하여 광학현미경으로 관찰한 결과는 Fig. 1과 같다. 광학현미경상으로 볼 때 지방구의 관찰은 힘들었으며 일반적인 간조직 중의 혈관인 sinusoid가 분명히 나타나는 3% 열수추출물에 반하여 6% 열수추출물의 경우 세포변성의 초기단계에서 일어나는 병변의 일종인 cellular swelling이 일어남을 알 수 있었다. 마찬가지로 6% 아세트추출물에서도 유사한 결과를 볼 수 있었고 3% 아세트추출물 급여군은 대조군과 3% 열수추출물의 중간 현상을 볼 수 있었다.

요 약

솔잎추출물 급여가 고지방식이를 섭취한 흰쥐의 혈중 GOT, GPT 활성, 간장의 항산화효소 및 간장조직에 미치는 영향을 검토하기 위하여 SD계 흰쥐에 고지방식이와 함께 추출용매 대비 솔잎건조분말을 3, 6% 함유하도록 하고 물과 70% 아세트추출물 추출하여 얻은 열수추출물과 70% 아세트추출물을 섭취시켜 대조군(control), 3% 열수추출물 급여군(WE-3), 6% 열수추출물 급여군(WE-6), 3% 아세트추출물 급여군(AE-3) 및 6% 아세트추출물 급여군(AE-6)의 5군으로 나누어 실험군에는 고지방식이와 함께 대조군의 물대신 각 솔잎추출물을 급여하여 4주간 사육하였다. GOT는 군간 유의차가 없었으나 GPT는 대조군에 비해 솔잎추출물 투여군이 낮게 나타났다. SOD 활성은 대조군에 비해 전 실험군에서 높게 나타났으며, 특히 AE-6군에서는 유의하게 높은 값을 나타내었다. Catalase의 활성도도 SOD와 비슷한 경향을 나타내었으나 각 군에 따른 유의차는 없었다. 과산화물가는 WE-3 및 AE-6군에서 낮은 함량을 나타내었으나 통계적인 유의성은 없었다. 간장의 조직학적 조사에서 솔잎추출물 WE-6군에서는 병변이 나타났다. 이상의 결과로써 솔잎추출물의 급여는 간 기능 개선효과가 있는 것으로 생각된다.

문 헌

1. 권미나, 최재수, 변대석 : 어유 및 과산화 어유를 섭취한 흰쥐에 있어서 플라보노이드 (+)- 카테킨의 산화안정

효과. 한국영양식량학회지, 22, 381(1993)

2. 조옥량, 서정순, 안미정, 이인자, 조성희 : 地依類의 수용성 추출물이 흰쥐의 각 장기무게, 혈액성분 및 trans-aminase와 5-nucleotidase 활성에 미치는 영향(I). 한국영양식량학회지, 14, 137(1985)

3. 杉山公男, 左伯 茂, 田中明雄, 吉田知史, 坂本秀樹, 石黒幸雄 : ニンギョウタケ(*Polyporus confluens*)의血漿コレステロール低下作用. 日本營養·食糧學會誌, 45, 265(1992)

4. 박평심, 이병래, 이명렬 : 양파식이가 흰쥐에서 사염화탄소 독성에 미치는 영향. 한국영양식량학회지, 20, 121(1991)

5. 강윤한, 박용곤, 하태열, 문광덕 : 솔잎추출물이 고지방식이를 급여한 흰쥐의 혈청과 간장 지질조성에 미치는 영향. 한국영양식량학회지, 25, (1996)

6. Nakabayashi, T. : Studies on tannin of fruits and vegetables. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 15, 73(1968)

7. Reitman, S. and Frankel, S. : A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin. Pathol.*, 28, 58(1957)

8. Nandi, A. and Chatterjee, I. B. : Assay of superoxide dismutase activity in animal tissues. *J. Biosci.*, 13, 305(1988)

9. Buege, A. J. and Aust, D. S. : Microsomal lipid peroxidation. In "Methods in enzymology" Fleischer, S. and Packer, L.(eds.), Academic Press, New York, p.52(1978)

10. Lowry, O. H., Rosenbrough, W. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265(1951)

11. Ohkawa, H., Oshishi, N. and Yagi, K. : Assay for lipid peroxide in animal tissue by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, 95, 351(1979)

12. 정명현 : 영지엑기스의 간중독 및 고지혈증에 대한 약효. 제3회 영지버섯 심포지움, p.38(1991)

13. Ryle, P. R., Chakraborty, J. and Thomson, A. D. : Biochemical mode of action of a hepatoprotective drug : Observation on (+)-catechin. *Pharm. Biochem. Behavior*, 18, 473(1983)

14. 서화중, 임현지, 정두례 : 양파즙 투여가 rat의 납 독성에 미치는 영향. 한국영양식량학회지, 22, 138(1993)

15. Igarashi, K. and Ohmura, M. : Effects of isorhamnetin, rhamnetin, and quercetin on the concentrations of cholesterol and lipoperoxide in the serum and liver and on the blood and liver antioxidative enzyme activities of rats. *Biosci. Biotech. Biochem.*, 59, 595(1995)

16. Xia, E., Rao, G., Remmen, H. V., Heydari, A. R. and Richardson, A. : Activities of antioxidant enzymes in various tissues of male fisher 344 rats are altered by food restriction. *J. Nutr.*, 125, 195(1995)

17. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. : Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.*, 219, 1(1984)

18. 박평심, 이병래, 이명렬 : 양파즙이 에탄올에 의한 백서의 지질과산화물 생성에 미치는 영향. 한국영양식량학회지, 23, 750(1994)