

흰쥐(SD rats)의 생리활성에 미치는 송엽(松葉) 추출물(PNE)의 영향

I. 혈청중의 지질 및 산소라디칼 대사에 미치는 PNE의 투여효과

최진호 · 김동우 · 김정화 · 김경석 · 이종수[†]

부경대학교 자연과학대학 식품생명과학과

Effect of Pine Needle Extract (PNE) on Physiological Activity of SD Rats I. Feeding Effect of PNE on Lipid and Oxygen Radical Metabolisms in Serum of SD rats

Jin-Ho Choi, Dong-Woo Kim, Jung-Hwa Kim, Kyung-Suk Kim and Jong-Soo Lee[†]

Dept. of Food and Life Science, National Fisheries University

Abstract

This study was designed to investigate the effect of pine needle extract (PNE) on lipid and oxygen radical metabolisms in serum of Sprague-Dawley (SD). Pine (*Pinus densiflora* Sieb et Zucc.) is one of the popular plant drugs which has been used as a medicine in Asia. Male SD rats were fed basic diets (control group), and experimental diets (RGE group) with 0.5 and 1.0% of PNE for 6 weeks.

Body weights gain in 0.5-PNE and 1.0-PNE groups were slightly lower than that in control group, but there is no significant differences between these groups. Total energy intake, feed and gross efficiencies showed almost no change in these groups. Total cholesterol and triglyceride (TG) levels in serum of SD rats in 0.5-PNE and 1.0-PNE groups showed almost no change compared with control group. Serum LDL-cholesterol levels significantly decreased (12%) in 0.5-PNE group, while serum HDL-cholesterol levels significantly increased(14%) in 1.0-PNE group compared with control group. Malondialdehyde (MDA) and lipid peroxide (LPO) levels in 0.5-PNE and 1.0-PNE groups were significantly lower (17 and 13%, 24% and 12%, respectively) than those in control group. Superoxide dismutase (SOD) activity in 0.5-PNE and 1.0-PNE groups significantly increased about 30 to 15% compared with control group. These results suggest that lower LDL-cholesterol and LPO levels, higher HDL-cholesterol level, and higher SOD activity in serum of rats may be effectively modulated by administration of pine needle extract (PNE).

Key words : Sprague Dawley(SD) rats, Pine (*Pinus densiflora* Sieb et Zucc.), Triglyceride (TG), LDL and HDL-cholesterol, Hydroxyl radical

[†] Corresponding author

서 론

소나무(*Pinus densiflora* Sieb et Zucc.)는 상록성 침엽수로서 우리나라를 비롯하여 중국, 일본 등 극동지방에 널리 자생하고 있다. 옛날부터 소나무는 잎(松葉)을 비롯하여 꽃가루(松花), 솔방울(松實), 송진(松脂), 껍질(松皮) 등은 구황식품(救荒食品)으로 널리 이용되어 왔다. 소나무 향기로서 송향(松香)은 《신농본초경(神農本草經)》의上品에 송지(松脂)로서 수재되어 있고, ‘...풍(風)을 치료하고, 오장을 안정시키며 열을 내리게 한다. 오래 복용하면 몸이 가볍고, 늙지 않으며, 수명(天年)을 연장한다’는 기록이 있다¹⁾. 특히 솔잎은 《학포헌집(學圃軒集)》의 葉救荒說에 의하면 ‘솔잎은 위장에 위해가 없고 배고픔을 잊게 하며 음식을 절제하고 수명을 연장한다’고 하였고, 《동의보감(東醫寶鑑)》에는 ‘風濕瘡을 主治하고 毛髮을 나게하며 오장을 편히 하여 수명을 연장한다’는 기록이 있다²⁾.

옛날 문헌상에 나타난 한방의 기록이외에 생리·생화학적 연구는 솔잎 첨가식의 혈청지질대사 연구³⁾, 솔잎 추출물의 혈청 및 간장의 지질과 효소연구⁴⁻⁵⁾ 등이 있을 뿐이다. 그런데 최근 솔잎 추출물의 항암효과가 연구되어 있다⁶⁾.

본 실험에서는 송엽을 80% 에탄올로써 water bath(80℃)에서 가열·추출하여 감압 농축한 송엽 추출물(pine needle extract : PNE)을 0.5% 및 1.0%가 되도록 첨가하여 조제한 실험용 사료로서 6주동안 사육한 다음, 혈청을 분리하여 LDL 및 HDL-콜레스테롤의 함량, 동맥경화증의 발병지표로서 동맥경화지수(atherogenic index)의 변화, 과산화지질(lipid peroxide : LPO) 및 말론디알데히드(MDA)의 변화, 수퍼옥시드 디스무타아제(superoxide dismutase : SOD) 등의 활성산소의 제거효소에 미치는 송엽 추출물(PNE)의 영향을 평가하였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물모델

Sprague Dawley계 흰쥐(male rats : 160±10g)를 한국 화학연구소에서 구입하여 본 실험에 사용하였다. 사육 및 실험조건은 매일 오후 18:00에 체중의 측정과 함께 평량된 사료를 제공하고 다음 날 사료잔량을 평량하여 사료 섭

취량을 계산하였다. 그리고 동물사육실은 자동조절(22±2℃ ; 65±2% RH)되며 명암은 12시간 사이클(18:00~06:00)로 조절된다.

2. 실험용 사료의 조제

본 실험에 사용한 기본사료(control group)의 조성은 탄수화물 59.0% (corn starch 44.0% + sucrose 15.0%), 단백질 18.0% (sodium-free casein), 지질 15.0% (lard)로 하였고, 여기에 셀룰로오스(3.0%), 비타민 및 무기질 혼합물 각각 1.0% 및 3.5%로 하였으며 DL-메티오닌(0.3%) 및 폴린콜로이드(0.2%)를 혼합하여 조제하였다. 그리고 실험그룹으로서 0.5%-PNE 및 1.0%-PNE 그룹의 사료조성은 기본사료의 조성에서 송엽 추출물을 각각 0.5% 및 1.0%를 첨가하는 대신, 탄수화물중의 corn starch를 각각 0.5% 및 1.0%만큼 줄여서 조제하였다.

3. 사료 및 에너지 효율의 측정

기본사료 투여그룹(control group)과 0.5%-PNE 및 1.0%-PNE 투여그룹으로 나눈 다음, 각 그룹당 8마리씩으로 하여 6주동안 사육실험을 하였다. 이들 그룹의 사료 및 에너지 효율은 저자 등⁷⁾ 및 Applegate 등⁸⁾의 방법에 따라 정량하였다.

4. 콜레스테롤 함량의 측정

혈청중의 총콜레스테롤 함량은 Rudel 등⁹⁾의 방법에 따라 o-phthalaldehyde법으로 측정하여 표준 검량선에 의거 혈청중의 총콜레스테롤의 함량을 정량하였다. 또한 혈청중의 저밀도리포단백(LDL) 및 고밀도리포단백(HDL)-콜레스테롤의 함량은 Noma 등¹⁰⁾의 방법에 따라 다음과 같은 방법으로 측정하였다.

●HDL+LDL-콜레스테롤의 測定 : 혈청 100ul을 시험관에 넣고 sodium heparin/sodium chloride reagent(150mg + 4g/1000ml DW) 4.0ml을 첨가하여 혼합하여 실온에서 15분간 방치한 다음, 이 시험관에 다시 Amberlite IRA-400을 0.5g씩 넣고 혼합하여 10분간 방치한다. 10분이 지난 후 700xg에서 10분간 원심분리시켜 상층액을 2.0ml씩 새로운 시험관에 옮긴 다음, 2.0M PCA 용액을 2.0ml씩 첨가·혼합하고 다시 700xg에서 15분간 원심분리한다.

●HDL-콜레스테롤의 測定: 혈청 100ul을 시험관에 넣고 sodium heparin/calcium chloride /nickel chloride reagent(300mg+60mM+2.0mM/1000ml DW) 4.0 ml을 첨가 혼합하여 실온에서 30분간 방치한 다음, 700×g에서 15분간 원심분리시킨다. 이 때 얻어진 상층액 2.0 ml씩을 새로운 시험관에 옮긴 다음, 여기에 2.0M PCA 용액 2.0ml씩을 첨가 혼합하여 다시 700×g에서 15분간 원심분리한다.

●HDL 및 LDL-콜레스테롤의 決定: 위에서 전처리한 두 가지를 원심분리한 다음, 상층액은 버리고 잔사에 발색 시약(50g of sulfosalicylic acid/1000ml of acetic acid/acetic acid anhydride/c-sulfuric acid=35/65/10, V/V/V) 2.0ml씩을 첨가 혼합하여 실온에서 10분간 방치한 다음, spectrophotometer의 625nm에서 흡광도를 측정, 표준 검량선에 의해 정량하였다.

5. 과산화지질 함량의 측정

혈청중에서 생성된 과산화지질(malondialdehyde : MDA)의 함량으로서 TBA를 사용한 말론디알데히드(malondialdehyde : MDA)의 측정은 저자(최 등)¹¹⁾의 방법에 따라 측정하였고, 또한 과산화지질(lipid peroxide : LPO)의 함량은 fluorometer를 사용하여 Yagi¹²⁾의 방법에 따라 형광광도계로써 측정하였다.

6. 수퍼옥시드 디스무타아제 활성의 측정

수퍼옥시드 라디칼(superoxide radical), 히드록시 라디칼(hydroxyl radical) 등 활성산소의 제거효소(scavenger

enzyme)로서 중요한 수퍼옥시드 디스무타아제(superoxide dismutase : SOD) 활성의 측정은 Oyanagui¹³⁾의 방법에 따라 정량하였다.

7. 분석결과와 처리

본 연구의 모든 실험결과를 통계 처리하여 평균치와 표준편차를 계산하였으며, 각 실험군간의 유의성 검정은 Student's t-test(Steel 등)¹⁴⁾로 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 체중, 사료 및 에너지효율의 평가

본 실험에서 송엽 추출물(pine needle extract : PNE)을 기본사료(control group)에 0.5% 및 1.0%가 되도록 첨가하여 조제한 실험용 사료(0.5%-PNE 및 1.0%-PNE)로써 6주동안 사육한 다음, 체중변화, 사료 및 에너지효율을 비교하여 보면 각각 Fig. 1 및 Table 1과 같다.

Fig. 1에서 보는 바와 같이 사육 3주까지는 0.5%-PNE 및 1.0%-PNE 투여그룹이 대조그룹에 비해 체중증가가 약간 억제되었지만, 이들 그룹사이에는 유의성은 인정할 수 없었다. 그렇지만, 사육 3주 이후부터는 이들 세 그룹사이에는 전연 체중변화의 차이를 발견할 수 없었다.

6주동안 송엽 추출물 투여그룹의 체중변화가 거의 없다는 사실은 Table 1에서 보는 바와 같이 총사료 섭취량에도 유의적인 변화가 없었을 뿐만 아니라 사료 1g당의 체중증가를 나타내는 사료효율(feed efficiency)이나 1kcal당의 체중증가를 나타내는 에너지효율(gross efficiency)의 유의

Table 1. Effect of pine needle extract (PNE) on body weight, feed and gross efficiencies in SD rats for 6 weeks

Parameter	Control group	0.5%-PNE group	1.0%-PNE group
Body weight gain (g)	72.7± 14.1	78.1± 6.7	75.3± 9.5
Total food intake (g)	589.8± 23.5	622.3± 20.7	609.0± 21.4
Diet energy (kcal/g)	4.43	4.41	4.39
Total energy intake(kcal)	2,613.0± 96.2	2,744.2± 102.3	2,674.4± 105.3
Feed efficiency ^a	12.3± 1.2	12.6± 1.1	12.4± 1.1
Gross efficiency ^b	27.8± 3.2	28.5± 3.0	28.2± 3.1

^aBody weight gain(g)/food intake(g)×10²

^bBody weight gain(g)/energy intake(kcal)×10³

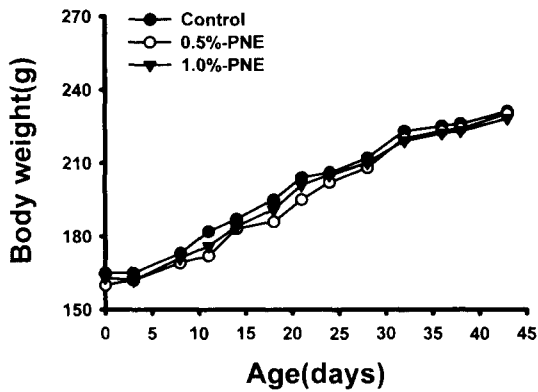


Fig. 1. Feeding effects of pine needle extract (PNE) on body weight in SD rats for 6 weeks.

적인 변화가 없다는 것을 의미한다.

2. 혈청 콜레스테롤의 변화

송엽 추출물(pine needle extract : PNE)을 기본사료(control group)에 0.5% 및 1.0%가 되도록 첨가하여 조제한 실험용 사료(0.5%-PNE 및 1.0%-PNE)로써 6주동안 사육한 다음, 혈청중의 총콜레스테롤, LDL 및 HDL-콜레스테롤의 함량변화를 비교하여 보았다(Fig. 2).

혈청중의 총콜레스테롤 함량은 송엽 추출물(PNE) 투여그룹이 대조그룹에 비해 오히려 약간 증가하는 경향이였지만, 유의적인 차이는 발견할 수 없었다. 이러한 사실은 김 등(1991)³⁾이 발표한 솔잎 첨가식이 쥐의 혈청 지방질 대사에 미치는 영향에서 밝힌 결과와 일치하였다. 그렇지만, Fig. 2(A)에서 보는 바와 같이 만성퇴행성 질환으로 알려진 성인병의 발병에 직접 관계하는 것으로 알려진 LDL-콜레스테롤의 함량은 0.5%-PNE 및 1.0%-PNE 투여그룹이 각각 46.24 ± 3.12 mg/dl 및 49.21 ± 2.10 mg/dl로서 대조그룹(52.58 ± 3.74 mg/dl : 100%) 대비 각각 87.9% 및 93.6%로서, 7~12%의 LDL-콜레스테롤 억제효과가 인정되었지만, 0.5%-PNE 투여그룹만이 유의성이 인정되었다.

콜레스테롤 억제인자(anti-cholesterol factor) 또는 장수인자(longevity factor)로서 알려진 HDL-콜레스테롤에 미치는 송엽 추출물(PNE)의 영향을 Fig. 2(B)에서 비교하여 보면 HDL-콜레스테롤의 함량은 0.5%-PNE 및 1.0%-PNE 투여그룹이 각각 30.47 ± 1.94 mg/dl 및 $33.21 \pm 2.$

11mg/dl로서 대조그룹(29.14 ± 2.10 mg/dl : 100%) 대비 각각 104.6% 및 114.0%로서, 5~14%의 HDL-콜레스테롤 상승효과가 인정되었지만, 1.0%-PNE 투여그룹만이 유의성이 인정되었다.

일반적으로 조직세포를 포함한 혈액의 콜레스테롤의 침착은 연령과 함께 유의적으로 증가되는 것으로 알려져 있는데(Schilling 등)¹⁵⁾, 송엽 추출물은 성인병을 유발하는 LDL-콜레스테롤의 함량을 유의적으로 억제할 뿐만 아니라 콜레스테롤 억제인자로 알려진 HDL-콜레스테롤의 함량을 유의적으로 증가할 수 있다는 사실은 매우 고무적이라고 하겠다.

3. 과산화지질(LPO)의 생성량 비교

성인병의 또하나의 발병지표로서, 그리고 노화의 지표로서

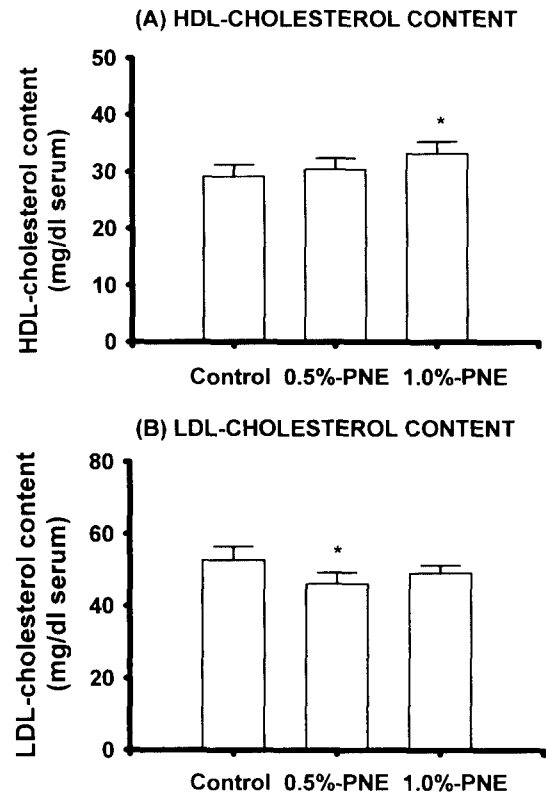


Fig. 2. Feeding effects of pine needle extract(PNE) on LDL and HDL-cholesterol levels in serum of SD rats after 6 weeks.

*p<0.05 compared with control group.

광범위하게 사용되고 있는 과산화지질의 생성량은 조직세포의 지질성분이 활성산소의 공격을 받아 생성되는 것으로 알려져 있다.

먼저 저자 등(1989)¹¹⁾이 사용한 TBA 방법에 따라 측정된 말론디알데히드(malondialdehyde : MDA)의 생성량에 미치는 송엽 추출물(PNE)의 영향을 비교하여 보면(Fig. 3-A) MDA 생성량은 0.5%-PNE 및 1.0%-PNE 투여그룹이 각각 10.50 ± 1.51 n mol/ml 및 11.02 ± 0.15 로서 대조그룹(12.64 ± 1.47 n mol/ml : 100%) 대비 각각 83.1% 및 87.2%로서 13~17%의 과산화지질(MDA)의 생성 억제효과가 인정되었다. 또한 Yagi(1987)¹²⁾가 형광광도계를 써서 측정된 과산화지질(lipid peroxide : LPO)의 함량을

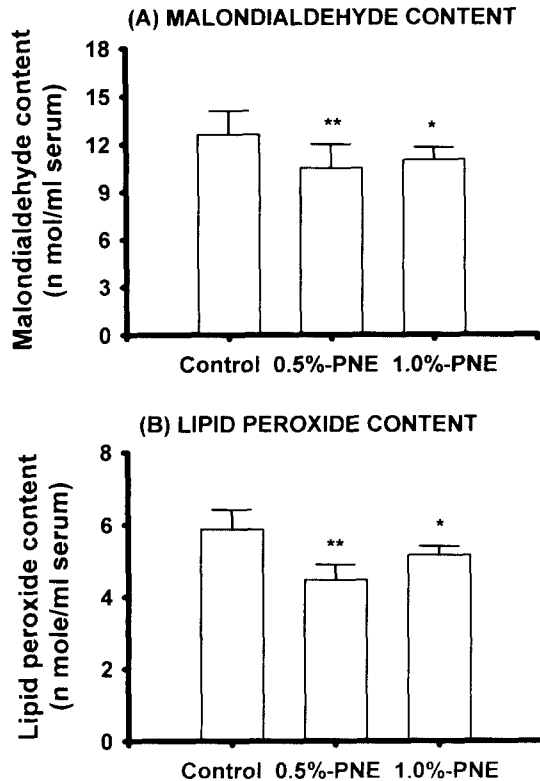


Fig. 3. Feeding effect of pine needle extract(PNE) on lipid peroxide(LPO) in serum of SD rats after 6 weeks
*p<0.05 ; **p<0.01 compared with control group.

Fig. 3-B에서 비교하여 보면 LPO의 함량은 0.5%-PNE 및 1.0%-PNE 투여그룹이 각각 4.47 ± 0.43 n mol/ml 및 5.16 ± 0.24 n mol/ml로서 대조그룹(5.88 ± 0.54 n mol/ml : 100%) 대비 각각 76.0% 및 87.8%로서 12~24%의 과산화지질(LPO)의 생성 억제효과가 인정되었다.

송엽 추출물(PNE)의 투여에 의한 히드록시 라디칼(hydroxyl radical) 등의 활성산소가 유의적인 억제효과가 인정되지 않았는데도 불구하고 Fig. 4에서 보는 바와 같이 과산화지질의 생성이 송엽 추출물(PNE)의 투여에 의하여 유의적으로 억제되었다는 사실은 흥미로운 사실이 아닐 수 없다.

4. 제거효소의 활성 변화

Fig. 3에서 본 것과 마찬가지로 송엽 추출물(PNE)의 투여가 과산화지질(LPO)의 생성을 유의적으로 억제한다는 사실은 송엽 추출물(PNE)의 투여가 그만큼 활성산소의 생성을 억제하는 제거효소의 활성이 강하다는 사실을 의미한다.

송엽 추출물(PNE)의 투여가 활성산소의 제거효소로서 강력한 슈퍼옥시드 디스무타아제(SOD)의 활성에 미치는 영향을 비교하여 보면 Fig. 4와 같다. SOD의 활성은 0.5%-PNE 및 1.0%-PNE 투여그룹이 각각 0.47 ± 0.05 unit/mg protein 및 0.41 ± 0.03 unit/mg protein으로서 대조그룹(0.36 ± 0.04 unit/mg protein : 100%) 대비 각각 130.6% 및 113.9%로서 15~30%의 SOD의 활성 증가효과가 인정되었다.

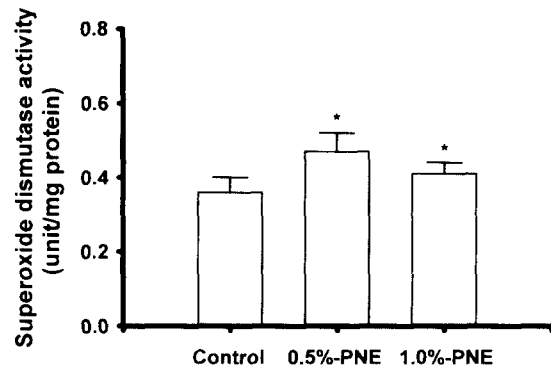


Fig. 4. Feeding effect of pine needle extract(PNE) on superoxide dismutase(SOD) activity in serum of SD rats after 6 weeks
*p<0.01 compared with control group.

따라서 송엽 추출물(PNE)의 투여가 과산화지질(LPO)의 생성을 효과적으로 억제할 수 있다는 사실은 수퍼옥시드 디스무타아제(SOD)와 같은 활성산소의 제거효소의 존재와 이들 효소의 활성이 강하기 때문으로 생각된다.

요 약

80% 에탄올로써 추출한 송엽 추출물(pine needle extract : PNE)을 0.5% 및 1.0%가 되도록 첨가·조제한 실험용 사료로써 6주동안 사육하여 혈청중의 LDL 및 HDL-콜레스테롤의 함량, 동맥경화지수(atherogenic index), 과산화지질(lipid peroxide : LPO)의 생성 및 수퍼옥시드 디스무타아제(superoxide dismutase : SOD) 등의 활성산소의 제거효소에 미치는 영향을 평가하였다.

PNE 투여에 의한 체중의 변화는 인정할 수 없었고, 사료 및 에너지효율도 같은 결과였다. 혈청중의 총콜레스테롤 함량은 송엽 추출물(PNE) 투여그룹이 대조그룹에 비해 유의적인 차이를 발견할 수 없었다. 0.5%-PNE 및 1.0%-PNE 투여그룹이 대조그룹 대비 7~12%의 LDL-콜레스테롤 억제효과가 인정되었지만, 0.5%-PNE 투여그룹만이 유의성이 인정되었다. 또한 0.5%-PNE 및 1.0%-PNE 투여그룹이 대조그룹 대비 5~13%의 HDL-콜레스테롤 상승효과가 인정되었지만, 1.0%-PNE 투여그룹만이 유의성이 인정되었다.

TBA 방법에 따라 측정된 말론디알데히드(MDA)의 생성량은 0.5%-PNE 및 1.0%-PNE 투여그룹이 대조그룹 대비 13~17%의 MDA의 생성 억제효과가 인정되었다. 또한 형광광도계로써 측정된 과산화지질(LPO)의 함량은 0.5%-PNE 및 1.0%-PNE 투여그룹이 대조그룹 12~24%의 LPO의 생성 억제효과가 인정되었다. 이러한 사실은 0.5%-PNE 및 1.0%-PNE 투여그룹의 SOD 활성이 대조그룹 대비 15~30%나 증가하기 때문으로 판단된다. 따라서 송엽 추출물(PNE)의 투여는 성인병을 효과적으로 예방할 수 있을 뿐만 아니라 생체의 노화과정도 어느 정도 억제할 수 있을 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

1. 難波恒雄 著 : 原色和漢藥圖鑑(下) 東京 保育社 발행 pp. 191-194(1980).

2. 李盛雨 著 : 韓國食經大典. 서울 鄉文社 발행 pp. 414-417(1981).

3. 김종대 · 윤태현 · 최 먼 · 임경자 · 주진순 · 이상영 : 솔잎 첨가식이 흰쥐의 혈청 지방질 대사에 미치는 영향. 한국노화학회지 1(1), 47-50(1991).

4. 강윤한 · 박용곤 · 하태열 · 문광덕 : 솔잎 추출물이 고지방식이를 급여한 흰쥐의 혈청과 간장의 지질 조성에 미치는 영향. 한국영양식량학회지 25(3), 367-373(1996).

5. 강윤한 · 박용곤 · 하태열 · 문광덕 : 솔잎 추출물이 고지방식이를 급여한 흰쥐의 혈청, 간장의 효소 및 간조직 구조에 미치는 영향. 한국영양식량학회지 25(3), 374-378(1996).

6. Kong, Z., Liu, Z. and Ding, B. : Study on the antimutagenic effect of pine needle extract. *Mutat. Res.* Aug. 347(3-4), 101-104(1995).

7. 최진호 · 임체환 · 김재연 · 양종순 · 최재수 · 변대석 : 비만 치료식 개발을 위한 기초연구 (1) 식물섬유로서 알긴산의 비만 억제효과. 한국수산학회지 19(4), 303-311(1986).

8. Applegate, E. A., Upton, D. E. and Stern, J. S. : Exercise and detraining : Effect on food intake, adiposity and lipogenesis in Osborne-Mendel rats made by a high fat diet. *J. Nutr.* 114, 447-459(1984).

9. Rudel, L. L. and Morris, M. D. Determination of cholesterol using o-phthalaldehyde. *J. Lipid. Res.* 14, 364-366(1973).

10. Noma, A., Nakayama, K. N., Kita, M. and Okabe, H. : Simultaneous determination of serum cholesterol in high and low density lipoprotein with use of heparin, Ca^{2+} and an anion exchange resin. *Clin. Chem.* 24, 1504-1510(1978).

11. Choi, J. H. and Yu, B. P. : The effect of food restriction on kidney membrane structures of aging rats. *Age* 12, 133-136(1989).

12. Yagi, K. : Lipid peroxides and human diseases. *Chemistry and Physics of Lipids* 45, 337-351(1987).

13. Oyanagui, Y. : Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Anal. Biochem.* 42, 290-296(1984).

14. Steel, R.G.D. and Torrie, J. H. : Principles and procedures of statistics. McGrawhill. New York(1960).

15. Schilling, R. J., Christakis, G., Orbach, A. and Becker, W.H. : Serum cholesterol and triglyceride. An epidemiological and pathogenetic interpretation. *Am. J. Clin. Nutr.* 22, 133-138(1969).