

흰쥐의 생리활성에 미치는 송엽(松葉) 추출물(PNE)의 영향

II. 뇌세포막의 산소라디칼 및 제거효소의 활성화에 미치는 PNE의 투여효과

최진호[†] · 김정화 · 김동우 · 김경석 · 이종수 · 백영호*

부경대학교 식품생명과학과, *부산대학교 체육교육과

Effect of Pine Needle Extract (PNE) on Physiological Activity of SD Rats II. Feeding Effect of PNE on Oxygen Radicals and Their Scavenger Enzymes in Brain Membranes of SD Rats

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

Dept. of Food and Life Science, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

*Dept. of Physical Education, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Abstract

Pine (*Pinus densiflora* Sieb et Zucc.) is one of the popular plant drugs which has been used as a medicine in Asia. To investigate the effect of pine needle extract (PNE) on oxygen radicals and their scavenger enzymes in brain membranes of Sprague-Dawley (SD), male SD rats were fed basic diets (control group), and experimental diets (PNE group) with 0.5 and 1.0% of PNE for 6 weeks.

Mitochondrial hydroxyl radical levels in brain of 0.5%-PNE and 1.0%-PNE groups were significantly inhibited to 30% and 25%, respectively, and microsomal hydrogen peroxide levels in brain of 0.5%-PNE and 1.0%-PNE groups were significantly inhibited to 15% compared with control group. Cytosolic superoxide radical levels in 1.0%-PNE group were significantly inhibited to 20% compared with control group. Lipid peroxide(LPO) levels in brain mitochondria of 0.5%-PNE and 1.0%-PNE groups were significantly lower(25% and 35%) than that in control group. Mn-superoxide dismutase (SOD) activities in brain of 0.5%-PNE and 1.0%-PNE groups were significantly higher (18% and 12%) than those in control groups, but Cu,Zn-SOD activities in brain of 0.5%-PNE were significantly activated to 15% compared with control group. Glutathione peroxidase(GSHPx) activities in brain of 0.5%-PNE and 1.0%-PNE groups were significantly higher(14% and 12%) than those in control group. These results suggest that more beneficial effects such as inhibition of oxygen radicals and lipid peroxide(LPO), and increases of scavenger enzymes in brain membranes of SD rats may be effectively modulated by administration of pine needle extract (PNE).

Key words : Pine(*Pinus densiflora* Sieb et Zucc.), Pine needle extract(PNE), Scavenger enzyme, Oxygen radical, Lipid peroxide(LPO), Superoxide dismutase(SOD), Glutathione peroxidase(GSHPx)

[†] Corresponding author

서 론

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⁾. 이때의 소나무(*Pinus densiflora* Sieb et Zucc.)는 우리나라를 비롯하여 중국, 일본 등 극동지방에 널리 자생하고 있는 상록성 침엽수이다. 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. 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 항암효과⁶⁾가 연구되어 있고, 저자 등⁷⁾이 SD계 흰쥐를 사용하여 송엽 추출물(pine needle extract : PNE)을 투여하여 혈청중의 지질 및 산소라디칼 대사에 미치는 영향을 평가하였다.

본 실험에서는 전보(최 등, 1997)⁷⁾에 이은 연구로서, 송엽을 80% 에탄올로써 water bath(80°C)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, 뇌를 적출하여 뇌세포핵분을 사용하여 히드록시 라디칼($\cdot\text{OH}$), 슈퍼옥시드 라디칼($\text{O}_2^{\cdot-}$) 등의 산소 라디칼에 의한 과산화지질의 생성, 그리고 이들 활성산소의 제거효소로서 슈퍼옥시드 디스무타아제(superoxide dismutase : SOD), 글루타치온 퍼옥시다아제(glutathione peroxidase : GSHPx)등의 활성산소 제거효소의 활성에 미치는 송엽 추출물(PNE)의 투여효과를 평가하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 사료의 조제

Sprague Dawley계 흰쥐(male rats : $160 \pm 10\text{g}$)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 섭취량을 계산하였다. 그리고 동물사육실은 자동조절($22 \pm 2^\circ\text{C}$; $65 \pm 2\%$ RH)되며 명암은 12시간 사이클(18 : 00 ~ 06 : 00)로 조절된다.

본 실험에 사용한 사료는 전보(1997)⁷⁾와 마찬가지로 0.5%-PNE 1.0%-PNE 투여그룹의 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 조제하여 실험용 사료로 사용하였다.

2. 뇌세포 핵분의 분획

뇌세포의 분획은 저자 등(1996)⁸⁾의 방법에 따라 균질 완충용액(1.15% KCl/10mM phosphate buffer/5mM EDTA, pH 7.4)을 사용하여 미토콘드리아, 마이크로솜 및 시토히분을 분획하여 사용하였다. 이들 핵분의 단백질의 함량은 Lowry 등⁹⁾의 방법에 따라 정량하였다.

3. 활성산소(oxygen radical)의 측정

생체내에서 과산화지질(malondialdehyde)의 생성에 깊이 관계하는 활성산소로서 히드록시 라디칼(hydroxyl radical) 및 과산화수소의 측정은 Chan 등¹⁰⁾의 방법을 일부 수정하여 측정하였다. 또한 슈퍼옥시드 라디칼(superoxide radical)은 McCord 등¹¹⁾의 방법에 따라 슈퍼옥시드 디스무타아제(superoxide dismutase : SOD)를 억제할 수 있는 ferricytochrome C의 환원속도를 측정하였다.

4. 과산화지질(LPO)의 측정

생체내의 각 장기의 생리적 기능저하와 성인병의 발병 및 생체노화의 중요한 지표로 사용되고 있는 과산화지질(lipid peroxide : LPO)의 함량은 말론디알데히드(malondialdehyde : MDA)의 함량을 최 등(1990)¹²⁾의 방법에 따라 측정하였다.

5. 활성산소 제거효소의 활성 측정

생체내의 모든 호기적 세포에 존재하고 있는 활성산소의 제거효소(scavenger enzymes)로서 슈퍼옥시드 디스무타아제(superoxide dismutase : SOD)의 활성은 Oyanagui 등¹³⁾의 방법에 따라 측정하였다. 또한 글루타치온 퍼옥시다

아제(glutathione peroxidase : GSHPx)의 활성은 Lawrence 등¹⁴⁾의 방법에 따라 뇌세포의 시토플라즘에서 측정하였다.

6. 분석결과와 통계처리

본 연구의 모든 실험결과를 통계 처리하여 평균치와 표준편차를 계산하였으며, 각 실험군간의 유의성 검정은 Student's t-test(Steel 등, 1960)¹⁵⁾로 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 활성산소의 생성량 비교

성인병을 유발하거나 노화를 촉진하는 것으로 알려진 활성산소중에서 가장 강력한 독성을 가진 히드록시 라디칼(hydroxyl radical) 및 과산화수소의 생성에 미치는 송엽추출물(PNE)의 투여효과를 비교하여 보면 Fig. 1과 같다. Fig. 1(A)에서 보는 바와 같이 0.5%-PNE 및 1.0%-PNE 투여그룹의 뇌의 미토콘드리아획분에서 히드록시 라디칼의 생성량은 각각 1.14 ± 0.10 n mol/mg protein 및 1.18 ± 0.11 n mol/mg protein으로서 대조그룹의 히드록시 라디칼의 생성량(1.61 ± 0.23 n mol/mg protein : 100%) 대비 각각 70.8% 및 73.3%로서 30% 및 25%의 히드록시 라디칼의 생성량이 유의적으로 억제됨을 알 수 있었다($p < 0.001$). 또한 Fig. 1(B)에서 0.5%-PNE 및 1.0%-PNE 투여그룹의 마이크로솜획분의 과산화수소의 생성량은 각각 1.26 ± 0.09 n mol/mg protein/min 및 1.24 ± 0.08 n mol/mg protein/min으로서 대조그룹의 과산화수소의 생성량(1.47 ± 0.14 n mol/mg protein/min : 100%) 대비 각각 85.7% 및 84.4%로서 약 15%의 과산화수소의 생성 억제효과가 인정되었다($p < 0.01$).

한편 0.5%-PNE 및 1.0%-PNE 투여그룹의 뇌시토플라즘의 슈퍼옥사이드 라디칼(superoxide radical)의 생성량은 0.5%-PNE 투여그룹은 유의적인 차이를 발견할 수 없었지만, 그보다 두 배인 1.0%-PNE 투여그룹은 0.049 ± 0.004 n mol/mg protein으로서 대조그룹(0.062 ± 0.002 n mol/mg protein : 100%) 대비 79.0%로서 약 20%의 슈퍼옥사이드 라디칼의 생성량 억제효과가 인정되었다.

따라서 송엽 추출물(PNE) 투여는 히드록시 라디칼과 과산화수소 뿐만 아니라 슈퍼옥사이드 라디칼까지 모든 활성산

소를 효과적으로 억제할 수 있다는 사실을 알 수 있다. 이 때문에 송엽의 유효성분이 강력한 활성산소를 제거함으로써 성인병의 예방은 물론 노화과정에도 매우 유익한 효과가 있을 것으로 기대된다.

2. 과산화지질(LPO)의 함량 비교

조직세포내의 지질성분이 활성산소의 연쇄반응의 결과로서 생성되는 과산화지질(lipid peroxide : LPO)로서 말론디알데하이드(malondialdehyde : MDA)의 생성에 미치는 송엽추출물(PNE)의 투여효과를 비교하여 보면 Fig. 2와 같다.

Fig. 2(A)에서 뇌획분중의 미토콘드리아획분에서 0.5%

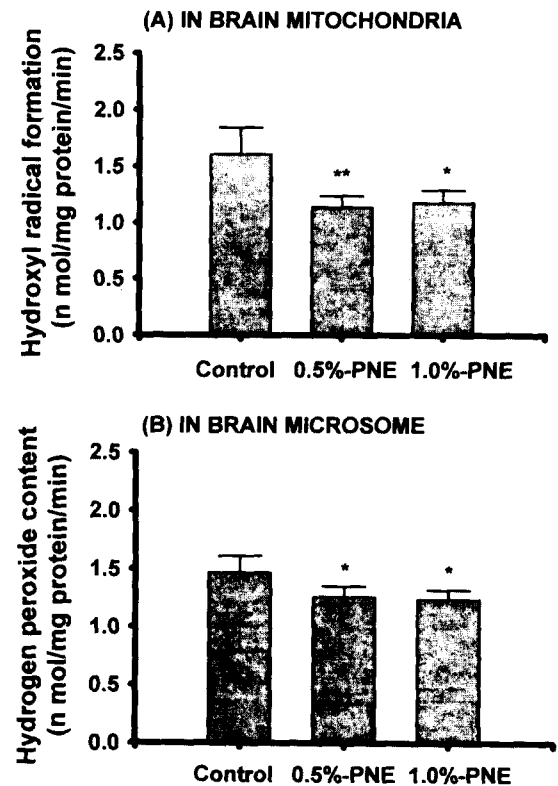


Fig. 1. Feeding effect of pine needle extract(PNE) on hydroxyl radical (A) and hydrogen peroxide (B) formations in brain membranes of SD rats after 6 weeks.

* $p < 0.01$; ** $p < 0.001$ compared with control group.

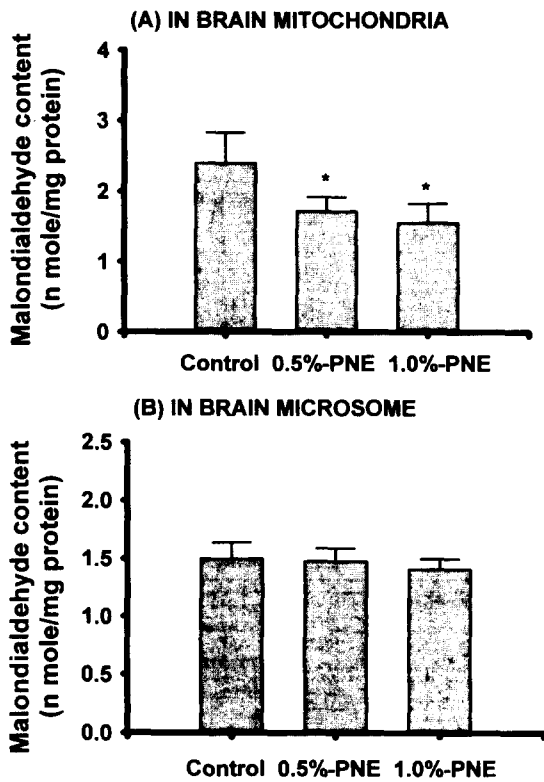


Fig. 2. Feeding effect of pine needle extract(PNE) on lipid peroxide(LPO) levels in mitochondria (A) and microsome(B) of brain of SD rats after 6 weeks

*p<0.001 compared with control group.

-PNE 및 1.0%-PNE 투여그룹의 MDA의 함량은 각각 1.72 ± 0.20 n mol/mg protein 및 1.56 ± 0.27 n mol/mg protein으로서 대조그룹의 MDA의 함량(2.40 ± 0.43 n mol/mg protein : 100%) 대비 각각 71.7% 및 65.0%로서 각각 25% 및 35%의 과산화지질 유의적인 억제효과가 인정되었다(p<0.001). 그렇지만, Fig. 2(B)의 마이크로솜획분에서 0.5%-PNE 및 1.0%-PNE 투여그룹의 MDA의 함량은 각각 1.48 ± 0.11 n mol/mg protein 및 1.41 ± 0.09 n mol/mg protein으로서 대조그룹의 MDA의 함량(1.50 ± 0.14 n mol/mg protein : 100%) 대비 각각 98.7% 및 94.0%로서 과산화지질이 약간 감소하긴 했지만, 유의적인 억제효과를 인정할 수 없었다.

이미 Fig. 1에서 송엽 추출물(PNE)의 투여가 뇌세포획분중의 히드록시 라디칼을 25-30%, 과산화수소를 15%, 그리고 수퍼옥시드 라디칼을 20% 정도 억제할 수 있다는 사실과 Fig. 2에서 미토콘드리아획분에서 0.5%-PNE 및 1.0%-PNE 그룹이 각각 25% 및 35%의 과산화지질의 억제효과가 인정된다는 사실은 이들에 대한 방어시스템이 그만큼 강력하다는 사실을 암시하고 있다.

사실 히드록시 라디칼이나 과산화수소 등 활성산소의 생성에 의한 과산화지질(LPO)의 함량 증가 등에 의한 성인병의 발병 뿐만 아니라 노화과정을 촉진하는 것으로 알려져 있다¹⁶⁻²¹⁾. 그런 의미에서 이들 활성산소의 억제효과는 매우 중요한 의미를 갖는다고 생각된다.

3. 제거효소의 활성 변화

활성산소의 제거효소(scavenger enzymes)로서 가장 활성이 강한 수퍼옥시드 디스무타아제(superoxide dismutase : SOD) 중에서 뇌세포획분중의 미토콘드리아획분에서 Mn-SOD (Fig. 3-A) 및 시토졸획분에서 Cu, Zn-SOD(Fig. 3-B)의 활성을 측정·비교하여 보았다.

Fig. 3(A)에서 보는 바와 같이 0.5%-PNE 및 1.0%-PNE 투여그룹의 뇌세포중의 미토콘드리아획분에서의 Mn-SOD의 활성은 각각 7.00 ± 0.54 unit/mg protein 및 6.66 ± 0.29 unit/mg protein으로서 대조그룹의 Mn-SOD의 활성(5.92 ± 0.42 unit/mg protein : 100%) 대비 각각 118.2% 및 112.5%로서 각각 18% 및 12%의 Mn-SOD의 활성 증가가 인정되었다(p<0.05-0.01). 그렇지만, Fig. 3(B)의 시토졸획분에서 0.5%-PNE 및 1.0%-PNE 투여그룹의 Cu, Zn-SOD의 활성은 각각 4.68 ± 0.47 unit/mg protein 및 3.74 ± 0.54 unit/mg protein로서 대조그룹의 Cu,Zn-SOD의 활성(4.26 ± 0.74 unit/mg protein : 100%) 대비 각각 109.9% 및 87.8%로서 0.5%-PNE 투여그룹만이 유의적인 Cu,Zn-SOD의 활성 증가효과가 인정되었다.

결국 SOD의 활성에서 본다면 송엽 추출물(PNE)의 용량 의존성은 나타나지 않고 오히려 적은 양인 0.5%-PNE 투여그룹이 그 두 배의 용량인 1.0%-PNE 투여그룹보다 효과적이란 사실은 매우 흥미로운 사실이 아닐 수 없다.

한편 뇌세포의 시토졸획분에서 글루타치온 퍼옥시다아제(glutathione peroxidase : GSHPx)의 활성에 미치는 이들 송엽 추출물(PNE) 투여효과를 비교하여 보면 Fig. 4와 같다.

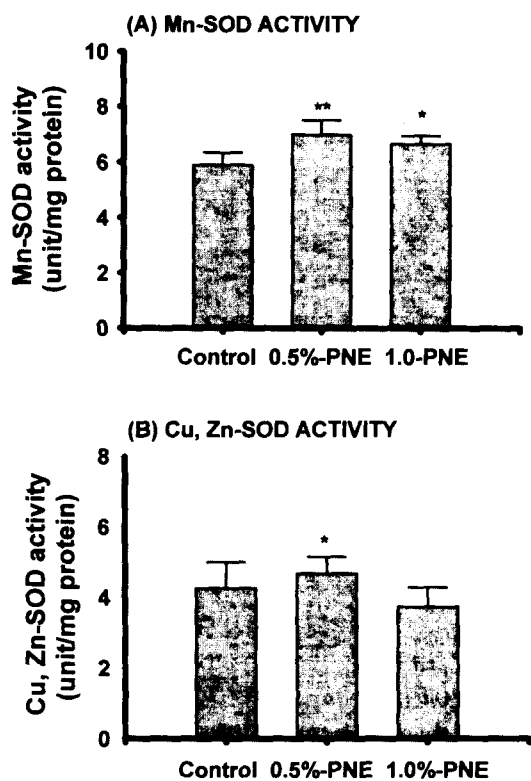


Fig. 3. Feeding effect of pine needle extract(PNE) on Mn-SOD(A) and Cu,Zn-SOD(B) activities in brain membranes of SD rats after 6 weeks. * $p < 0.05$; ** $p < 0.001$ compared with control group.

Fig. 4에서 보는 바와 같이 0.5%-PNE 및 1.0%-PNE 투여그룹의 뇌세포중의 시토솔획분에서의 GSHPx의 활성은 각각 108.84 ± 3.21 unit/g protein 및 106.64 ± 2.94 unit/g protein으로서 대조그룹의 GSHPx의 활성(95.23 ± 4.21 unit/g protein : 100%) 대비 각각 114.3% 및 112.0%로서 각각 14% 및 12%의 GSHPx의 활성 증가가 인정되었다($p < 0.05$).

따라서 송엽 추출물(PNE)의 투여에 의하여 뇌세포중에서 생성되는 히드록시 라디칼이나 과산화수소 등의 활성산소가 유의적으로 감소할 뿐만 아니라 이들 활성산소의 공격에 의해 생성되는 과산화지질(LPO)의 함량이 유의적으로 억제된다는 사실은 생체 방어효소로서 Mn-SOD 및 Cu,

Zn-SOD의 활성 뿐만 아니라 GSHPx의 활성이 유의적으로 증가된다는 사실과 깊은 관계가 있다는 사실을 알 수 있다.

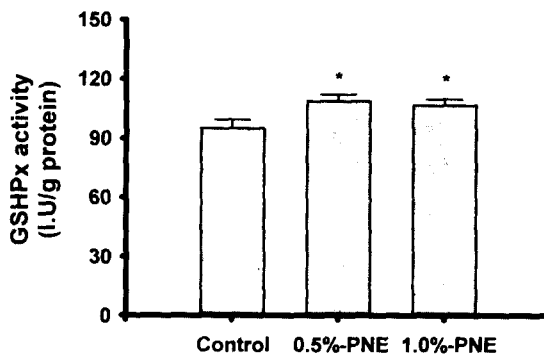


Fig. 4. Feeding effect of pine needle extract(PNE) on glutathione peroxidase(GSHPx) activity in brain membranes of SD rats after 6 weeks.

* $p < 0.05$ compared with control group.

요 약

송엽 추출물(pine needle extract : PNE)을 0.5% 및 1.0%가 되도록 첨가·조제한 실험용 사료로서 6주동안 사육한 다음, 뇌세포획분을 사용하여 히드록시 라디칼($\cdot OH$), 과산화수소(H_2O_2) 및 슈퍼옥시드 라디칼($O_2^{\cdot -}$)의 생성, 이들 산소 라디칼에 의한 과산화지질의 생성, 그리고 이들 활성산소의 제거효소로서 슈퍼옥시드 디스무타아제(superoxide dismutase : SOD), 글루타치온 퍼옥시다아제(glutathione peroxidase : GSHPx) 등의 활성산소 제거효소의 활성에 미치는 송엽 추출물(PNE)의 투여효과를 평가하였다.

0.5%-PNE 및 1.0%-PNE 투여그룹의 히드록시 라디칼 생성량은 대조그룹 대비 각각 30% 및 25%의 히드록시 라디칼의 생성이 억제되었고, 과산화수소의 생성량은 대조그룹 대비 각각 15%의 과산화수소의 생성이 억제되었으며, 슈퍼옥시드 라디칼의 생성량은 1.0%-PNE 투여그룹만이 대조그룹 대비 약 20%의 슈퍼옥시드 라디칼의 생성이 억제되었다. 뇌의 미토콘드리아획분에서 0.5%-PNE 및 1.0%-PNE 투여그룹의 MDA의 함량은 대조그룹 대비 각각 25% 및 35%의 과산화지질이 유의적으로 억제되었지만, 마이크로솜획분에서 MDA의 생성은 유의적인 억제효과를 인정할 수 없었다. 0.5%-PNE 및 1.0%-PNE 투여그룹의

뇌세포중의 Mn-SOD의 활성은 대조그룹 대비 각각 18% 및 12%의 Mn-SOD의 활성 증가가 인정되었고, 0.5% PNE 투여그룹의 Cu,Zn-SOD의 활성만이 대조그룹 대비 약 15%의 유의적인 증가효과가 인정되었다. 뇌세포중의 GSHPx의 활성은 대조그룹 대비 각각 14% 및 12%의 GSHPx의 활성 증가가 인정되었다.

따라서 송엽 추출물(PNE)의 투여는 뇌세포내에서 생성되는 활성산소 및 이들 활성산소에 의해 생성되는 과산화 지질의 합성을 효과적으로 억제할 뿐만 아니라 수퍼옥시드 디스무타아제(SOD) 등의 활성산소의 제거효소의 활성을 유의적으로 증가한다는 사실은 송엽 추출물이 성인병 예방 및 노화를 효과적으로 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. 김중대 · 윤태현 · 최 면 · 임경자 · 주진순 · 이상영 : 술 잎 첨가식이가 흰쥐의 혈청 지방질 대사에 미치는 영향. 한국노화학회지 1(1), 47-50(1991).
4. 강윤한 · 박용곤 · 하태열 · 문광덕 : 술잎 추출물이 고지방식을 급여한 흰쥐의 혈청과 간장의 지질 조성에 미치는 영향. 한국영양식량학회지 25(3), 367-373(1996).
5. 강윤한 · 박용곤 · 하태열 · 문광덕 : 술잎 추출물이 고지방식을 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 anti-mutagenic effect of pine needle extract. *Mutat Res Aug.* 347(3-4), 101-104(1995).
7. 최진호 · 김동우 · 김정화 · 김경석 · 이종수 : 흰쥐(SD rats)의 생리활성에 미치는 송엽(松葉) 추출물(PNE)의 영향 I. 혈청중의 지질 및 산소라디칼 대사에 미치는 PNE의 투여효과. 한국생명과학회지 7(4), 371-476(1997).
8. Choi, J. H. and Yu, B. P. : Analysis of lipid composition and hydroxyl radicals in brain membranes of senescence-accelerated mice. *Age*, 19, 1-5(1996).
9. Lowry, O. H., Roseborough, N. J., Farr, L. A. and Randall, R. J. : Protein measurement with the Fohlin-Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275(1951).
10. Chan, P. C. and Bielski, B. H. T. : Enzyme catalyzed free radical reactions with nicotinamide adenine nucleotide. *Chem. J. Biol.* 249, 1317-1320(1974).
11. McCord, J. M. and Fridovch, I. : Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyuprein(hemocuprein). *Chem. J. B.* 244, 6049-6054(1969).
12. Choi, J. H. and Yu, B. P. : Unsuitability of TBA test as a lipid peroxidation marker due to prostaglandin synthesis in the aging kidney. *Age* 13, 61-64(1990).
13. Oyanagui, Y. : Reevaluation of assay methods and establishment of Kit for superoxide dismutase activity. *Anal. Biochem.* 42, 290-296(1984).
14. Lawrence, R. A. Burk, R. F. : Species, tissuer and subcellular distribution of non Sedependent glutathione peroxidase activity. *Lipid* 19, 444-449(1978).
15. Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. : Principles and procedures of statistics McGrawhill. New York(1960).
16. Choi, J. H. and Yu, B. P. : Unsuitability of TBA test as a lipid peroxidation marker due to prostaglandin synthesis in the aging kidney. *Age* 13, 61-64(1990).
17. Yagi, K. : Lipid peroxides and human diseases. *Chemistry and Physics of Lipids* 45, 337-351(1987).
18. Choi, J. H. and Yu, B. P. : The effect of food restriction on kidney membrane structures of aging rats. *Age* 12, 133-136(1989).
19. Choi, J. H. and Yu, B. P. : Unsuitability of TBA test as a lipid peroxidation marker due to prostaglandin synthesis in the aging kidney. *Age* 13, 61-64(1990).
20. Choi, J. H. and Yu, B. P. : Brain synaptosomal aging : free radicals and membrane fluidity. *Free Rad. Biol. & Med.* 18(2), 133-139(1995).
21. Choi, J. H. and Yu, B. P. : Analysis of lipid composition and hydroxyl radicals in brain membranes of senescence-accelerated mice. *Age*, 19, 1-5(1996).