

갈화가 에탄올을 투여한 흰쥐의 지질과산화와 알코올 대사효소의 활성도에 미치는 영향

이정숙[†] · 김나영* · 이경희* · 김갑순** · 박희준*** · 최종원**** · 김석환*

고신대학교 식품영양학과, *등이대학교 식품영양학과
경남정보대학 식품영양과, *상지대학교 응용식품과학부
****경성대학교 약학과

Effects of Flower of *Pueraria lobata* on Lipid Peroxidation and Activities of Alcohol Metabolic Enzymes in Alcohol-treated Rats

Jeong-Sook Lee[†], Na-Young Kim*, Kyung-Hee Lee*, Gap-Soon Kim**
Hee-Juhn Park***, Jong-Won Choi**** and Seok-Hwan Kim*

Dept. of Food and Nutrition, Kosin University, Pusan 606-701, Korea
*Dept. of Food and Nutrition, Dong-A University, Pusan 604-714, Korea
**Div. of Food and Chemical Engineering, Kyungnam College of
Information & Technology, Pusan 617-701, Korea
***Dept. of Botanical Resources, Sangji University, Wonju 220-701, Korea
****Dept. of Pharmacy, Kyungsung University, Pusan 608-736, Korea

Abstract

This study was designed to investigate the effect of flower of *Pueraria lobata* on lipid peroxidation and activities of alcohol metabolic enzymes in alcohol-treated rats. Male Sprague-Dawley rats were given 25% ethanol (Alcohol), 25% ethanol and 5 mg tectorigenin/kg B.W. (Alc.-Tec), 25% ethanol and 5 mg kaikasaponin III/kg B.W. (Alc.-Kai). The contents of serum total lipid, triglyceride and phospholipid were increased by ethanol treatment and were lower in the Alc.-Tec and Alc.-Kai group than in the Alcohol group. Decreased serum HDL-cholesterol by alcohol treatment was recovered by tectorigenin and kaikasaponin III. Microsomal cytochrome P-450, aniline hydroxylase and aminopyrine N-demethylase activities were increased by ethanol and were lower in the Alc.-Tec and Alc.-Kai group than in the Alcohol group. Activity of hepatic alcohol dehydrogenase was increased by ethanol and was higher in the Alc.-Tec and Alc.-Kai group than in the Alcohol group. Microsomal ethanol oxidizing system activity was higher in Alc.-Tec group than in the other groups. No significant difference was found in catalase activity among treatment groups. These data indicate that tectorigenin and kaikasaponin III were effected alcohol metabolic enzyme system and the liver damage associated with chronic ethanol consumption.

Key words: flower of *Pueraria lobata*, tectorigenin, kaikasaponin III, ethanol

서 론

알코올은 인류의 역사와 더불어 세계각지에서 자연 발생적으로 출현하여 의식, 축제 등 우리의 일상생활과 밀접한 관계를 유지하고 있는 기호식품이다 그러나 섭취량의 증가에 따라 알코올자체 또는 산화과정에서 생성되는 중간 대사산물에 의해 간 손상 및 대사성 질환이 유발되어 여러 가지 문제를 야기시키고 있다.

섭취되어진 알코올의 일부(~10%)는 대사되지 않은 채 폐를 통하여 또는 소변 및 땀으로 배설되고 나머지는 주로 간에서 산화되어 제거된다(1). 간에서 알코올 대사

는 주로 NAD⁺-linked enzymes, 즉 alcohol dehydrogenase(ADH)와 acetaldehyde dehydrogenase(ALDH)에 의해서 이루어진다. 이들 효소는 각각 acetaldehyde와 acetate를 생성하며, acetate는 acetyl-CoA를 거쳐 에너지를 발생하거나 또는 cholesterol과 지방산을 합성하는데 이용된다(2)

알코올의 최초 대사산물인 acetaldehyde는 알코올에 비해 월등히 반응성이 높고 독성이 강하여 알코올성 간장해의 주원인 물질로서 미토콘드리아 호흡에 지장을 주고 산화적 인산화반응을 억제하며(3), 막 단백질(4) 및 콜라겐 단백질(5)과 결합하여 항체를 생성하고 면역학적

[†]To whom all correspondence should be addressed

으로 세포 독성을 나타내며(6), 간세포 분비 단백질의 방출기구의 저해, myofibroblast의 콜라겐합성 촉진, 간 섬유화를 촉진시키는 것으로 보고되고 있다(7)

갈화(葛花, flower of *Pueraria lobata*)란 취의 꽃을 건조시킨 것으로 名醫別錄에 술의 독을 없애는 약제(消酒毒濟)로서 최초로 수록된 이후 음주후 갈증, 두통, 구토, 飮食過小, 정신 혼란, 손발 떨림 등을 치료하기 위해서 葛花解醒湯, 葛花清熱丸으로 조제되어 민간요법에서 널리 사용되어 왔다(8,9).

갈화의 급여로 알코올로 인해 증가된 혈중의 alcohol, acetaldehyde, ketone체 등이 저하되었다는 보고(10,11)와 알코올로 유도된 혈중의 포도당, triglyceride, urea nitrogen의 함량이 감소되었으며, 사염화탄소 혹은 고지방식으로 유도된 간 손상을 회복시켰다는 보고(12) 등이 있고, Yamazaki 등(13)은 갈화의 구성 성분인 kakkalide (isoflavonoid)는 알코올로 유도된 혈중의 GPT와 GOT 활성의 증가와 hyperglycemia를 개선시켰다고 했다.

갈화로부터 분리동정한 tectorigenin, glycitein, kaikasaponin III 등의 간 보호 기능에 관한 보고(14-16)로 미루어 알코올의 해독에도 도움을 줄 수 있을 것으로 기대되나 아직 연구가 미비한 실정이다 그러므로 본 연구는 실험동물을 알코올의 아급성 중독 상태로 유도하고 갈화로부터 분리한 이들 성분이 혈액중 지질 성분, 간에서의 대사 효소계 및 알코올의 산화에 관여하는 효소계에 어떠한 영향을 주는가를 관찰하므로써 알코올 해독 및 치료에 필요한 기초자료를 제공하고자 시도되었다

재료 및 방법

갈화 분획 및 활성 성분의 제조

치약산에서 채취한 갈화(1 kg)를 세정한 후 MeOH을 가하여 수욕상에서 3시간동안 환류 냉각하면서 추출하였으며 3회 추출분을 모아 rotary evaporator로 용매를 제거하여 MeOH 엑스(300 g)를 얻었다. MeOH 엑스를 10% MeOH로 녹여 잔사를 제거한 후 용매의 극성을 증가시킨 계통 분획법에 의해 CHCl₃(60 g), EtOAc(11 g), n-BuOH(16 g) 및 H₂O 분획분을 얻었다. n-BuOH분획을 sephadex(10% MeOH), silica gel의 CHCl₃-MeOH-H₂O (5:1:1, 하층), CHCl₃-MeOH-H₂O(25:8:5, 하층), CHCl₃-MeOH-H₂O(7:3:1, 하층) 및 CHCl₃-MeOH-H₂O(65:35:10, 하층) 용출 용매로 column chromatography를 실시하여 tectorigenin, glycitein, kaikasaponin III를 분리하였다(17)

실험동물 및 계획

예비 실험에서 n-BuOH의 성분인 tectorigenin, glycitein, kaikasaponin III 각 5 mg/kg B.W., 10 mg/kg B.W.을 알코올과 함께 4주간 급여하면서 관찰하니, tectorigenin 5 mg/kg B.W와 kaikasaponin III 5 mg/kg B.W.

를 급여했을 때 alcohol dchyrogenase(ADH)의 활성이 가장 유의성 있는 증가를 했다 그러나 glycitein은 용량과 시간에 따른 유의성있는 차이를 보이지 않았다. 따라서 본 실험에서는 갈화의 활성 성분 중 tectorigenin과 kaikasaponin III을 선택하였다. 실험동물은 한국실험동물개발로부터 분양받아 본 대학 동물사에서 일정한 조건(온도: 20±2°C, 습도 40~60%, 조명: 12시간 light/dark cycle)으로 2주 동안 적응시킨 체중 150 g 내외의 Sprague-Dawley계 웅성(雄性) 흰쥐를 난괴법에 의해 8마리씩 4군으로 나누어 Table 1과 같이 사육하였다 알코올은 Liu 등의 방법(18)에 따라 25% 알코올 용액을 물대신 임의로 6주간 섭취시켰고, 대조군은 알코올과 동일한 열량의 sucrose 용액을 물대신 임의로 섭취시켰다. 알코올 급여 6주후부터 3주동안 알코올-갈화 tectorigenin군에는 tectorigenin 5 mg/kg B.W, 알코올-갈화 kaikasaponin III군에는 kaikasaponin III 5 mg/kg B.W.을 매일 같은 시간에 1일 1회 경구 투여하였고, 대조군과 알코올 단독 급여군은 생리식염수를 경구투여하였다.

각 실험 식이는 AIN-76(19)에 의하여 조성되었으며 (Table 2), 단백질 급원으로는 casein(Wako Co., 일본)을, 탄수화물 급원으로는 옥수수 전분(삼양 제믹스)과 설탕(제일제당)을, 지방 급원으로는 옥수수기름(동방유량)을 사용하였다.

Table 1. Experimental design

Group ¹⁾	Dose (mg/kg body weight)	Alcohol (%)
Control	-	-
Alcohol	-	25
Alc -Tec.	5	25
Alc -Kai.	5	25

¹⁾Control: None-alcohol, none-extract flower of *Pueraria lobata* administrated group
Alcohol: Alcohol administrated group, none-extract flower of *Pueraria lobata* administrated group.
Alc -Tec: Alcohol and tectorigenin extracted from flower of *Pueraria lobata* administrated group
Alc -Kai: Alcohol and kaikasaponin III extracted from flower of *Pueraria lobata* administrated group.

Table 2. Composition of basal diet

Ingredient	%
Casein	20.0
DL-Methionine	0.3
Corn starch	15.0
Sucrose	50.0
Cellulose	5.0
Corn oil	5.0
AIN-mineral mixture ¹⁾	3.5
AIN-vitamine mixture ¹⁾	1.0
Choline bitartrate	0.2

¹⁾According to AIN 76

시료의 채취

9주 사육한 흰쥐를 16시간 절식후 CO₂로 마취시켜 개복하고, 복부대동맥으로부터 채혈하여 실온에서 30분간 방치한 다음, 3000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 얻어 시료로 사용하였다. 채혈 직후 간을 적출하여 생리 식염수로 씻고 여과지로 혈액을 제거한 뒤 즉시 mitochondria 분획, microsome 분획과 cytosol 분획을 취하여 -40°C에서 보관하였다.

시료의 분석

혈청 총지질의 함량은 Folch 등의 방법(20)으로 조제된 kit로, 혈청 triglyceride의 함량은 McGowan과 Artiss의 방법(21)에 준하여 조제된 kit로, 혈청 phospholipid의 함량, 혈청 총 cholesterol과 혈청 HDL-cholesterol의 함량은 효소법에 의하여 조제된 kit(아산제약)를 사용하여 측정하였다. LDL-cholesterol 함량은 Friedwald 등(22)이 제안한 공식, 총 cholesterol-(HDL-cholesterol+triglyceride/5)을 이용하여 산출하였으며, VLDL-cholesterol은 총 cholesterol에서 HDL-cholesterol과 LDL-cholesterol을 감하여 계산하였다.

간조직 1 g당 2 mM-mercaptoethanol이 함유된 4배량의 0.25 M sucrose buffer(pH 7.5)를 가하여 빙냉하에서 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. 이 마쇄액을 600×g에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄 세포부분을 제거하고, 다시 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 그 침전물에 일정량의 0.25 M sucrose buffer(2 mM-mercaptoethanol 함유, pH 7.5)를 가하고 현탁시켜 mitochondria 분획으로 하고, 상침액을 다시 105,000×g에서 1시간 동안 초원심분리하여 얻은 상침액을 cytosol 분획으로, 그 침전물에 동일한 양의 0.25 M sucrose buffer를 가하여 현탁시킨 액을 microsome 분획으로 하였다. Mitochondria와 microsome 분획은 현탁한 후 재원심분리하여 효소원으로 사용하였다. 얻어진 mitochondria 분획으로는 aldehyde dehydrogenase, catalase 활성을 측정하였으며, microsome 분획으로 cytochrome P-450, aniline hydroxylase, aminopyrine N-demethylase 활성을 측정하였다. Cytosol 분획은 xanthine oxidase, aldehyde oxidase의 활성 측정에 사용하였다.

Cytochrome P-450의 활성 측정은 Omura와 Sato의 방법(23)에 준하였으며, aniline hydroxylase의 활성은 Bidlack과 Lowery의 방법(24)에 따라 파장 640 μm에서 흡광도를 측정하여 산출하였다. Aminopyrine N-demethylase의 활성은 Nash의 방법(25)을 약간 변경하여 반응시킨 후 파장 415 μm에서 흡광도를 측정하였다. Aldehyde oxidase의 활성은 Rajagopalan 등의 방법(26)에 준하여 기질인 N-methylnicotinamide chloride와 효소액을 가하여 반응시킨 후 생성물인 2-pyridone을 300 μm에서 측

정하였다. Xanthine oxidase의 활성은 Stirpe와 Della의 방법(27)에 의해 potassium phosphate buffer(pH 7.5) 3.0 mL에 효소액과 기질인 sodium xanthine 0.1 mL를 가하여 37°C에서 반응시킨 후 uric acid를 292 μm에서 흡광도를 측정하였다. Alcohol dehydrogenase(ADH)의 활성은 Borson 등의 방법(28)으로, microsomal ethanol-oxidizing system의 활성은 Lieber와 DeCarh의 방법(29), catalase의 활성은 Aebi의 방법(30), aldehyde dehydrogenase의 활성은 Inoue 등의 방법(31)에 준하여 측정하였다.

단백질의 함량은 Lowry 등의 방법(32)에 따라 bovine serum albumin(Sigma사)을 표준품으로 하여 측정하였다.

통계처리

실험에서 얻어진 결과를 통계 처리하여 평균치±표준편차로 표시하였고, 처리 평균간의 통계적 유의성은 5% 수준에서 Duncan's new multiple range test로 검정하였다.

결과 및 고찰

체중 증가량

알코올과 갈화 활성 성분의 급여에 따른 체중의 변화를 Table 3에 나타내었다. 알코올 단독 급여군은 대조군에 비하여 체중이 감소되었으며, 알코올-갈화 tectorigenin 급여군의 체중증가량은 대조군 수준에는 미치지 못하였으나, 알코올 단독 급여군보다는 유의적인 회복을 나타냈다.

이는 알코올의 생체내 산화는 혈중 알코올이 저농도일 때는 alcohol dehydrogenase와 acetaldehyde dehydrogenase에 의해 대사되어 에너지를 생성하는 반응에 관여하게 되지만, 혈중 알코올이 고농도이거나 혹은 알코올 섭취가 장기간일 경우 microsomal ethanol-oxidizing system(MEOS)에 의해 대사되어 열 발생 반응만을 일으키고 ATP는 생성하지 않는 등(33) 에탄올에 의한 에너지의 비효율적인 이용에 기인하는 것으로 생각되며, 에탄올 섭취량이 1일 열량요구량의 상당부분을 차지하므로 다른 영양소의 섭취를 감소시킴에 따라 식이섭취량이 감소함(34)에도 그 원인이 있다고 하겠다.

Table 3. Effect of flower of *Pueraria lobata* extract on body weight gain in subacute alcohol-treated rats

Treatment	Net weight gain (g)
Control	63.6±3.2 ^{1a2)}
Alcohol	21.2±4.2 ^d
Alc.-Tec.	54.2±4.1 ^b
Alc.-Kai	30.2±3.3 ^c

¹⁾ Mean±S.D. (n=8).

²⁾ Values with different superscripts in the same column are significantly different at 5% level.

혈청 지질의 변화

총지방, 중성지방 및 인지질 함량

혈청중 총지방, 중성지방 및 인지질 함량을 Table 4에 나타내었다. 알코올 단독 급여군의 총지방, 중성지방, 인지질 함량이 대조군에 비하여 증가하였고, 알코올-갈화 tectorigenin 급여군과 알코올-갈화 kaikasaponin III 급여군의 총지방, 중성지방 함량은 대조군 수준에는 미치지 못하였으나, 알코올 단독 급여군에 비하여 유의적으로 회복되었다. Niho 등(12)의 알코올로 유도되어 증가된 중성지방 함량은 갈화의 triterpenoid saponin 분획 급여군에서 유의적으로 억제되었다는 보고는 본 실험 결과와 일치한다. Lieber(35)와 Chiat 등(36)은 만성 알코올 중독자에 있어서 혈청 중성지방 함량이 증가하는 것은 알코올 섭취에 따른 유리 지방산의 에스테르화 촉진, 체내의 알코올 대사에 따른 NADH/NAD⁺ 비율 증가, 알코올 섭취에 따른 간의 chylomicron remnants의 대사 또는 분해 기능의 저해, 혈청 중성지방 함량의 증가와 중성지방의 이용률이 감소했기 때문이라고 하였다. 또한 Kim 등(37)은 만성적인 알코올 섭취시 간에서 지방산 합성은 증가되고 분해는 감소되는데, 이때 지방산 합성은 세포질에서 일어나기 때문에 지방산 결합 단백질(fatty acid binding protein)의 역할이 크게 기대되지 않으나, 지방산의 분해는 미토콘드리아에서 일어나기 때문에 지방산 결합 단백질의 양과 지방산 결합 능력이 감소된 경우에 미토콘드리아로 지방산 이동이 감소되고 이로 인한 지방산 분해 감소가 일어나 결과적으로 간에서 중성지방

합성이 증가되고 혈액 내 중성지방 증가에 기여한다고 설명한 바 있다.

본 실험의 결과를 볼 때 갈화의 tectorigenin, kaikasaponin III는 알코올로 유도된 고지혈증의 완화에 도움을 줄 수 있는 것으로 생각된다.

Total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, VLDL-cholesterol 함량 및 동맥경화지수

혈청중 total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, VLDL-cholesterol 함량 및 동맥경화지수 (atherogenic index, AI)는 Table 5와 같다. 알코올 단독 급여군의 total cholesterol, LDL-cholesterol, VLDL-cholesterol 함량, AI는 대조군에 비하여 증가하였고, 알코올-갈화 tectorigenin, kaikasaponin III 급여군은 대조군 수준에는 미치지 못했으나, 알코올 단독 급여군에 비해 유의적으로 회복되었다. 알코올을 만성적으로 섭취시킨 쥐를 이용한 실험에서 혈청 중성지방과 총 콜레스테롤 함량이 정상 쥐에 비해 유의적으로 증가하였다는 보고(38)는 본 실험 결과와 유사하다.

Kim과 Choi(39)는 만성 알코올 중독자들을 대상으로 한 혈청지질의 연구에서 정상인에 비해 LDL-cholesterol 함량이 증가하였다는 보고를 한 바 있으나, Naruszewicz 등(40)은 알코올의 대사산물인 acetaldehyde가 LDL의 이화작용에 영향을 줄 것이라고 하면서, 알코올 중독자에 있어서 alcohol dehydrogenase의 활성에 따라 acetaldehyde의 생성 정도가 개인마다 다를 수 있기 때문에 LDL의 정도가 다양하게 되어 알코올 중독자들에서 혈청 LDL은 증가 혹은 감소될 수 있다고 하였다.

알코올 단독 급여군의 HDL-cholesterol의 함량은 대조군에 비하여 감소하던 것이 알코올-갈화 tectorigenin 급여군과 알코올-갈화 kaikasaponin III 급여군에서는 대조군 수준에는 미치지 못하나, 알코올 단독 급여군에 비하여 증가하였다. HDL-cholesterol은 cholesterol을 말초조직으로부터 간으로 역 수송하며, HDL 입자가 유리 cholesterol을 에스테르화하는 lecithin cholesterol acyltransferase(LCAT)의 활성화에 관여하여 cholesterol의 세포내 유입을 억제하는 항 동맥경화 작용을 나타낸다(41). Parkes 등(42)은 만성적으로 알코올을 섭취한 흰쥐

Table 4. Influence of flower of *Pueraria lobata* extract on serum total lipid, triglyceride and phospholipid levels in subacute alcohol-treated rats (mg/dL)

Treatment	Total lipid	Triglyceride	Phospholipid
Control	256.4±15.3 ^{1c2)}	78.6±7.4 ^d	118.8±19.2 ^c
Alcohol	347.8±65.1 ^a	164.2±12.8 ^a	150.2±18.4 ^a
Alc.-Tec.	279.5±18.7 ^c	98.4±7.9 ^c	128.9±14.9 ^{bc}
Alc.-Kai.	300.3±25.5 ^b	119.2±11.1 ^b	133.4±17.3 ^b

¹⁾Mean±S.D. (n=8).

²⁾Values with different superscripts in the same column are significantly different at 5% level

Table 5. Influence of flower of *Pueraria lobata* extract on serum total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol, VLDL-cholesterol levels and atherosclerotic index (AI) in subacute alcohol-treated rats (mg/dL)

Treatment	Total cholesterol	HDL-cholesterol	LDL-cholesterol	VLDL-cholesterol	AI
Control	53.2±5.2 ^{1c2)}	30.3±5.8 ^a	18.5±2.4 ^c	11.2±2.0 ^c	0.80±0.13 ^d
Alcohol	80.3±6.2 ^a	16.2±2.4 ^d	30.7±3.3 ^c	30.8±4.3 ^a	3.95±0.27 ^a
Alc.-Tec.	68.7±5.1 ^b	26.8±3.1 ^b	23.6±2.0 ^b	18.6±3.2 ^c	1.56±0.19 ^c
Alc.-Kai.	71.6±3.5 ^b	20.9±2.4 ^c	26.1±2.4 ^b	23.6±2.4 ^b	2.42±0.47 ^b

¹⁾Mean±S.D. (n=8).

²⁾Values with different superscripts in the same column are significantly different at 5% level

는 hepatic 중성지방 lipase분비를 감소시켰으며, 이로 인하여 간에서의 HDL 흡수율이 떨어져서 혈장의 HDL-cholesterol 농도가 증가한 것으로 보고했다.

본 실험의 결과로 볼 때 갈화 tectorigenin과 kaikasaponin III는 콜레스테롤 함량과 동맥경화지수를 저하시킴으로써 동맥경화 예방효과를 나타낼 것으로 사료된다.

Microsomal cytochrome P-450, aniline hydroxylase 및 aminopyrine N-demethylase활성

Microsomal cytochrome P-450, aniline hydroxylase (AH), aminopyrine N-demethylase (AD)활성은 Table 6에 나타났다. 알코올 급여 시 cytochrome P 450, AH와 AD활성은 대조군에 비하여 증가했으나, 알코올-갈화 tectorigenin 급여군과 알코올-갈화 kaikasaponin III 급여군의 경우 알코올 단독 급여군보다 낮게 나타났다. Kitahara 등(43)은 이물질이 들어오면 생체를 보호하기 위하여 해독작용에 관여하는 cytochrome P-450의 활성을 증가시킨다고 하였는데, Dobbins(44)와 Ariyoshi 등(45)의 만성적으로 알코올을 섭취시킨 흰쥐에게서 AH가 최대 2배 증가하였다는 보고는 본 실험 결과와 비슷하였다. Ramsey와 Fallon(46)은 만성적으로 알코올을 섭취시키고 즉시 처치한 흰쥐의 AD의 활성은 대조군에 비하여 감소하였다고 보고한 바 있으나, Ariyoshi 등(45)은 흰쥐를 처치하기 전 18시간 절식시키고 microsomes을 분리하였을 때, AD의 활성은 증가하였다고 한다.

일반적으로 간에서 일어나는 해독작용은 oxidation 및 nonsynthesis단계인 phase I 과 conjugation 및 synthesis단계인 phase II로 나눌 수 있는데, 그 중 phase I 단계에 관여하는 cytochrome P450은 mixed function oxidase(MFO)로서 microsomes protein의 약 20%를 차지하며 약물을 비롯한 다양한 외인성물질들을 산화시키는 효소계로 AD와 AH 등이 있으며, 이들은 microsomes 계의 free radical 생성에 관여한다(47,48). MFO계에 의

해 기질이 산화될 때는 NADPH-cytochrome P-450 reductase를 통한 환성산소 생성이 많아지게 되어 간 내의 환성산소로부터의 방어체계에 불균형으로 인해 superoxide 및 hydrogen peroxide의 생성량이 증대하므로 알코올을 다량 섭취하거나 장기 섭취 시 MFO계에 의해 알코올이 산화될 때 과산화지질 양이 증가한다(49)

본 실험으로 갈화의 tectorigenin과 kaikasaponin III은 cytochrome P-450, AH 및 AD의 활성을 억제시켜 간조직의 과산화지질 생성을 저하하고 간 보호효과를 보일 수 있을 것으로 생각된다

Xanthine oxidase 와 Aldehyde oxidase활성

Xanthine oxidase와 aldehyde oxidase 활성은 Table 7에서의 같이 알코올 단독 급여 시 대조군에 비하여 증가하였으며, 알코올-갈화 tectorigenin 급여군과 알코올-갈화 kaikasaponin III 급여군에서는 대조군 수준에는 미치지 못하나, 알코올 단독 급여군보다 유의적으로 감소되었다.

Xanthine oxidase는 aldehyde dehydrogenase가 결합된 *in vitro* system에서, 고농도의 acetaldehyde를 기질로 하여 superoxide를 생산한다고 알려져 있는데(50), Shunzo 등(51)은 알코올에 의해 purine의 분해가 증가됨에 따라 xanthine dehydrogenase의 활성은 다량 생성된 NADH에 의하여 억제되므로, hypoxanthine과 xanthine의 대사는 xanthine oxidase에 의하여 이루어지며, 이때 생성된 oxygen free radical은 과산화지질을 유도한다고 설명한 바 있다

Aldehyde oxidase는 xanthine oxidase보다 acetaldehyde에 더 낮은 Km을 가지는데(52), Shaw와 Jayatilake (53)는 알코올이 대사되는 동안 쥐의 간세포를 분리하여 과산화지질을 측정 한 결과, aldehyde oxidase에 의해 acetaldehyde가 대사되는 동안 생성된 free radical은 알코올로 유도된 간 손상의 개시기에 중요한 역할을 한다고 보고했다

Table 6. Influence of flower of *Pueraria lobata* extract on the hepatic microsomal cytochrome P450 (P450), aniline hydroxylase (AH) and aminopyrine N-demethylase (AD) activity in subacute alcohol-treated rats

Treatment	P450 ¹⁾	AH ²⁾	AD ³⁾
Control	0.52±0.09 ^{4d5)}	0.60±0.05 ^c	5.17±0.53 ^c
Alcohol	1.53±0.24 ^a	1.48±0.10 ^d	9.89±0.48 ^b
Alc.-Tec.	0.85±0.06 ^c	0.85±0.07 ^b	5.92±0.34 ^{bc}
Alc.-Ka.	1.10±0.10 ^d	0.98±0.09 ^b	6.39±0.29 ^b

¹⁾ nmole/mg protein

²⁾ p-aminophenol nmole/mg protein/min

³⁾ HCHO nmole/mg protein /min

⁴⁾ Mean±S.D. (n=8).

⁵⁾ Values with different superscripts in the same column are significantly different at 5% level.

Table 7 Influence of flower of *Pueraria lobata* extract on the hepatic cytosolic xanthine oxidase (XO) and aldehyde oxidase (AO) activity in subacute alcohol-treated rats

Treatment	XO ¹⁾	AO ²⁾
Control	2.37±0.14 ^{3)c4)}	1.27±0.19 ^f
Alcohol	3.86±0.21 ^c	3.18±0.12 ^a
Alc.-Tec	2.84±0.18 ^b	2.17±0.14 ^b
Alc.-Ka.	3.09±0.15 ^b	2.60±0.17 ^b

¹⁾ uric acid nmole/mg protein/min

²⁾ pyridone nmole/mg protein/min

³⁾ Mean±S.D. (n=8).

⁴⁾ Values with different superscripts in the same column are significantly different at 5% level

본 실험 결과는 갈화 tectorigenin과 kaikasaponin III는 aldehyde oxidase와 xanthine oxidase의 활성을 억제시켜, 알코올로 인한 간 손상을 회복시켜줄 수 있음을 시사한다고 생각된다

알코올 대사 효소 활성화도

알코올과 갈화의 활성 성분을 급여한 흰쥐의 간조직의 alcohol dehydrogenase(ADH), microsomal ethanol oxidizing system(MEOS), catalase, mitochondrial aldehyde dehydrogenase(ALDH)의 활성을 Table 8에 나타내었다. 알코올 급여 시 ADH활성이 증가하였으며 알코올-갈화 tectorigenin 급여군과 알코올-갈화 kaikasaponin III 급여군은 알코올 단독 급여군보다 높게 나타났다. ADH는 알코올을 acetaldehyde로 산화시키는 효소로서 급성의 경우, 이급성 중독시에 비해 활성도가 높으며, 장기 급여시 간 자체의 변성으로 활성이 감소되어 다른 알코올 대사 효소계인 MEOS에 의해 알코올 대사가 이루어진다(54). 또한, 알코올의 이급성 중독 상태의 흰쥐는 대조군에 비하여 ADH의 활성이 증가된다고 알려져 있다(55).

MEOS의 활성은 알코올 급여 시 대조군에 비하여 증가를 보였고, 알코올-갈화 tectorigenin 급여군에서는 알코올 단독 급여군보다 유의적인 증가를 나타냈다. 생체 내에서 MEOS에 의한 알코올대사는 약 10~20%정도이며 MEOS는 Km치가 높으므로 혈중 알코올 농도가 높은 경우, 특히 만성적인 알코올 섭취에 의해 그 활성도가 증가되어 중요한 역할을 하게 된다(3). 본 실험결과로 갈화 tectorigenin은 이급성 알코올 중독상태에서 ADH와 MEOS에 선택적으로 작용하여 간에서의 알코올 대사를 촉진시켜 알코올의 해독에 도움을 줄 것으로 사료된다.

Catalase의 활성은 각 군간의 유의적인 차이를 볼 수 없었다. Catalase는 *in vitro*에서 과산화수소의 생성계에서 알코올을 산화하는 기능을 가지기 때문에 생리적인 상태에서 알코올 대사에 관여하는 가능성이 적은 것으로

알려져 있다(33) ALDH의 활성은 알코올 단독 급여군은 대조군의 활성에 비하여 감소되었으며, 알코올-갈화 tectorigenin 급여군과 알코올-갈화 kaikasaponin III 급여군에서는 알코올 단독 급여군보다 유의적인 활성 증가를 보였다. Acetaldehyde는 알코올의 대사산물로 생체 내에서의 반응성이 강하며 알코올 중독의 주 원인물질로 알려져 있는데 과량의 알코올을 섭취하면 이를 대사시키는 ALDH의 활성이 감소됨으로써 체내 acetaldehyde는 간의 마이크로솜 단백질과 높은 친화력을 가지어 혈장막의 지질성분변화를 유발하여 간 손상을 일으키게 된다(56).

요 약

갈화(flower of *Pueraria lobata*) 분획 및 활성 성분의 급여가 이급성 알코올 중독된 흰쥐에서의 해독에 미치는 영향을 연구할 목적으로, 25% alcohol을 6주간 투여하여 이급성 알코올 중독상태를 유발한 흰쥐를 3주 더 사육하면서 혈액중 지질 함량의 변동, 알코올 대사계 효소의 활성을 비교 검토한 결과는 다음과 같다. 알코올 단독 급여군은 대조군에 비하여 체중이 감소되었으며, 알코올-갈화 tectorigenin 급여군의 체중증가량은 대조군 수준에는 미치지 못하였으나, 알코올 단독 급여군보다는 유의적인 회복을 나타냈다. 알코올 단독 급여군의 총지방, 중성지방, 인지질 함량이 대조군에 비하여 증가하였고, 알코올-갈화 tectorigenin 급여군과 알코올-갈화 kaikasaponin III 급여군의 총지방, 중성지방 함량은 대조군 수준에는 미치지 못하였으나, 알코올 단독 급여군에 비하여 유의적으로 회복되었다. 알코올 단독 급여군의 total cholesterol, LDL-cholesterol, VLDL-cholesterol 함량, AI는 대조군에 비하여 증가하였고, 알코올-갈화 tectorigenin, kaikasaponin III 급여군은 대조군 수준에는 미치지 못했으나, 알코올 단독 급여군에 비해 유의적으로 회복되었다. 알코올 단독 급여군의 HDL-cholesterol의 함량은 대조군에 비하여 감소하던 것이 알코올-갈화 tectorigenin 급

Table 8 Influence of flower of *Pueraria lobata* extract on the hepatic cytosolic alcohol dehydrogenase (ADH), microsomal ethanol oxidizing system (MEOS), catalase and mitochondrial aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity in subacute alcohol-treated rats

Treatment	ADH ¹⁾	MEOS ²⁾	Catalase ³⁾	ALDH ⁴⁾
Control	9.0±0.7 ⁵⁾⁶⁾	5.43±0.29 ^a	3.04±0.19 ⁵⁾⁷⁾	25.9±2.4 ^c
Alcohol	13.6±1.0 ^b	8.41±0.45 ^b	3.07±0.23	14.3±2.0 ^e
Alc.-Tec.	17.2±0.9 ^a	9.47±0.76 ^c	3.23±0.27	18.2±1.5 ^b
Alc.-Kai	16.8±1.5 ^a	8.96±0.63 ^{bc}	3.19±0.29	18.2±2.0 ^b

¹⁾NADH nmole/mg/min

²⁾Acetaldehyde formed nmole/mg protein/min

³⁾H₂O₂ decreased umole/mg protein/min

⁴⁾NADH formed nmole/mg protein/min

⁵⁾Mean±S.D (n=8)

⁶⁾Values with different superscripts in the same column are significantly different at 5% level.

⁷⁾Not significantly different at 5% level.

여군과 알코올-갈화 kaikasaponin III 급여군에서는 대조군 수준에는 미치지 못하나, 알코올 단독 급여군에 비하여 증가하였다. 알코올 급여 시 cytochrome P 450, AH와 AD활성은 대조군에 비하여 증가했으나, 알코올-갈화 tectorigenin 급여군과 알코올-갈화 kaikasaponin III 급여군의 경우 알코올 단독 급여군보다 낮게 나타났다. 알코올 급여시 ADH활성이 증가하였으며 알코올-갈화 tectorigenin 급여군과 알코올-갈화 kaikasaponin III 급여군은 알코올 단독 급여군보다 높게 나타났다. MEOS의 활성은 알코올 급여 시 대조군에 비하여 증가를 보였고, 알코올-갈화 tectorigenin 급여군에서는 알코올 단독 급여군보다 유의적인 증가를 나타냈다. Catalase의 활성은 각 군간의 유의적인 차이를 볼 수 없었다. ALDH의 활성은 알코올 단독 급여군은 대조군의 활성에 비하여 감소되었으나, 알코올-갈화 tectorigenin 급여군과 알코올-갈화 kaikasaponin III 급여군에서는 알코올 단독 급여군보다 유의적인 활성 증가를 보였다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 갈화로부터 분리된 tectorigenin과 kaikasaponin III는 아급성 알코올 중독된 흰쥐 간의 free radical 생성계 효소를 억제시켜 알코올로 인한 간손상을 회복시키고, 알코올 대사 효소계에 관여하여 해독작용에 영향을 미침으로써 알코올 해독에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다

감사의 글

본 연구는 2000학년도 동아대학교 학술연구조성비(공모과제)로 이루어졌으며, 연구비 지원에 대하여 감사드립니다.

문헌

1. Warturg, J.P. and Buhler, R. ' Biology of disease. Alcoholism and aldehydeism : new biomedical concepts. *Lab. Invest.*, **50**, 5-15 (1984)
2. Linder, M.C : *Nutritional biochemistry and metabolism with clinical applications*. Elsevier, New York, p 80 (1991)
3. Leiber, C.S. ' Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clin. Chim Acta*, **257**, 59-84 (1997)
4. Lumeng, L., Minter, R and Li, T.K. : Distribution of stable acetaldehyde adducts in blood under physiological conditions. *Fed Proc.*, **41**, 765-773 (1982)
5. Koskinas, J, Kenna, J.G, Bird, G.L., Alexander, G.J. and Willams, R. : Immunoglobulin a antibody to a 200 kilodalton cytosolic acetaldehyde adduct on alcoholic hepatitis *Gastroenterology*, **103**, 1860-1867 (1992)
6. Zetterman, R.K. . *Autoimmune manifestation of alcoholic liver diseases* Kravitt, KI and Wiesner, R.H (eds.). Raven Press, New York, p.247 (1991)
7. Friedman, S.L : Acetaldehyde and alcoholic fibrogenesis. Fuel to the fire, but not the spark *Hepatology*, **12**, 609-612 (1990)
8. Kim T J : *Korean resources plant*. Seoul National University, Seoul, Vol. III, p.232 (1986)

- 9 江蘇新醫學院(編) . 中藥大辭典(下卷). 上海人民出版社, 上海, p2307 (1977)
10. Niho, Y., Yamazaki, T., Nakajima, Y, Itoh, H., Takeshita, T, Kinjo, J. and Nohara, T. : Pharmacological studies on Puerariae Flos. I. The effects of Puerariae Flos on alcoholic metabolism and spontaneous movement in mice. *Yakugaku Zasshi*, **109**, 424-431 (1989)
11. Sun, M.S. : Lowering effects of the flower of *Pueraria lobata* on blood ethanol levels. *M.S. Thesis*, Chonnam National University, Korea (1997)
12. Niho, Y., Yamazaki, T., Nakajima, Y, Itoh, H., Takeshit, A.T., Kinjo, J and Nohara, T : Pharmacological studies on Puerariae Flos II. The effects of Puerariae Flos on alcohol-induced unusual metabolism and experimental liver injury in mice. *Yakugaku Zasshi*, **110**, 604-611 (1990)
13. Yamazaki, T, Nakajima, Y., Niho, Y., Hosono, T and Kinjo, J. : Pharmacological studies on Puerariae Flos III, Protective effects of kakkalide on ethanol-induced lethality and acute hepatic injury in mice *J Pharm Pharmacol.*, **49**, 831-833 (1997)
14. Park, H.J, Park, J.H., Moon, J.O., Lee, K.T. and Jung, W.T : Isoflavone glycosides from the flower of *Pueraria lobata*. *Phytochemistry*, **51**, 147-151 (1999)
15. Lee, S O. Woo, W S, Woo, E.H. and Kim, K.S. : Isoflavonoids of *Belamcanda chinensis*. *Kor. J. Pharmacogn.*, **20**, 219-222 (1989)
16. Kinjo, J., Aoki, K, Okawa, M, Shu, Y, Hirakawa, T., Nohara, T, Nakajima, Y, Yamazaki, T., Niho, Y and Kurashige, T. : HPLC profile analysis of hepato protective oeanene-glucuronides in Puerariae Flos *Chem. Pharm Bull.*, **47**, 708-710 (1999)
17. Park, H.J., Han, S J, Lee, K.E., Kim, D.H., Choi, J.W. and Lee, H.K. : Isolation of new flavone glycosides and antidiabetic principles from the flowers of *Pueraria thunbergiana*. *2000 Years of Natural Products Research*, Amsterdam, Netherlands, p.126 (2000)
18. Liu, S.J., Ramsey, R.K. and Fallon, H.J. ' Effects of ethanol on hepatic microsomal drug metabolizing enzymes in the rat. *Biochem. Pharmacol.*, **24**, 369-378 (1975)
19. American Institute of Nutrition . Report of the American Institute of Nutrition, Ad Hoc committee on standards for nutritional studies. *J. Nutr.*, **107**, 1340-1348 (1977)
20. Folch, J., Lees, M. and Sloane-Stanley, G.H. : A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissue *J. Biol. Chem.*, **266**, 497-509 (1957)
21. McGowan, J.D. and Artiss, D.R. Strandbergh, A., Peroxidase coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. *Clin. Chem.*, **29**, 538-542 (1983)
22. Fridewald, W T, Levy, R.I. and Fedreicson, D.S. : Estimation of concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma without use of the preparative ultracentrifuge *Clin. Chem.*, **18**, 499-508 (1979)
23. Omura, T. and Sato, R. The carbon mono oxide binding pigments of liver microsomes in evidence for its hemo-protein nature *J Biol. Chem.* **239**, 2370-2378 (1964)
24. Bidlack, W.R. and Lowery, G.L. Multiple drug metabolism P-Nitro anisole reversal of acetone enhanced aniline hydroxylation. *Biochim. Pharmacol.*, **31**, 311-317 (1982)
25. Nash, T. . The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the hentisch reaction *J. Biol. Chem.*, **55**, 416-421 (1953)

26. Rajagopalan, K.V., Fridovich, I. and Handler, P. · Hepatic aldehyde oxidase, purification and properties *J. Biol. Chem.*, **237**, 922-928 (1962)
27. Stirpe, F. and Della, C.E. · 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 (1969)
28. Borson, W.F., Li, T.K. and Lange, L.G. · Isolation and characterization of an anodic form of human liver alcohol dehydrogenase *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **74**, 85-91 (1977)
29. Lieber, C.S. and DeCarli, L.M. · Ethanol oxidation by hepatic microsomes: Adaptive increase after ethanol feeding. *Science*, **162**, 917-918 (1968)
30. Aebi, H. · Catalase. In *Methods of enzymatic analysis*, Bergmeyer, H.U. (ed.), Academic Press, New York, Vol. 2, p.673-698 (1974)
31. Inoue, K., Fukunaga, M. and Yamasawa, K. · Correlation between human erythrocyte aldehyde dehydrogenase activity and sensitivity to alcohol. *Biochem. Behav.*, **13**, 295-297 (1980)
32. Lowry, O.H., Roscibrough, N.J., Farr, A.L. and Rendall, R.J. · Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951)
33. Lieber, C.S. · Alcohol and the liver *Gastroenterology*, **106**, 1085-1105 (1994)
34. Pirola, R. and Lieber C.S. · The energy cost of the metabolism of drugs including ethanol. *Pharmacology*, **7**, 185-194 (1972)
35. Lieber, C.S. · Aetiology and pathogenesis of alcoholic liver disease. *Bail. Clin. Gastroent.*, **7**, 581-608 (1993)
36. Chiat, A., February, A.W., Mancini, M. and Lewis, B. · Clinical and metabolic study of alcoholic hyperlipidemia. *Lancet*, **2**, 62-64 (1972)
37. Kim, H.K., Kwon, Y.A., Pho, S.R. and Hahn, Y.T. · The role of fatty acid binding protein in the fatty liver induced by alcohol or high cholesterol diet in rats. *Korean J. Nutr.*, **32**, 628-636 (1999)
38. Baraona, E. and Lieber, C.S. · Effects of chronic ethanol feeding on serum lipoprotein metabolism in the rat *J. Clin. Invest.*, **49**, 769-778 (1970)
39. Kim, M.H. and Choi, M.K. · A comparative study on serum lipid levels in normals and chronic alcoholics. *Korean J. Nutr.*, **27**, 53-58 (1994)
40. Naruszewicz, M., Mirkiewicz, W. and Wehr, H. · Abnormal low density lipoproteins composition in some chronic alcoholics · A possible mechanism. *Alcohol*, **25**, 533-538 (1990)
41. Glomset, J.A. · Physiological role of lecithin cholesterol-acyltransferase. *Am. J. Clin. Nutr.*, **23**, 1129-1136 (1970)
42. Parkes, J.G., Auerbach, W. and Goldberg, D.M. · Effect of alcohol on lipoprotein metabolism II · Lipolytic activities and mixed function oxidase. *Enzyme*, **43**, 47-55 (1990)
43. Kitahara, A., Satoh, K., Nishimura, K., Ishikawa, T., Ruike, K., Sato, K., Tsuda, H. and Ito, N. · Changes in molecular forms of rat hepatic glutathione S-transferase during chemical hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.*, **44**, 2698-2703 (1984)
44. Dobbins, W.O., Rollins, D.L., Brooks, S.G. and Fallon, H.J. · A quantitative morphological analysis of ethanol effect upon rat liver. *Gastroenterology*, **62**, 1020-1023 (1972)
45. Ariyoshi, T., Takabatake, E. and Remmer, H. · Drug metabolism in ethanol-induced fatty liver *Life Sci.*, **9**, 361-369 (1970)
46. Ramsey, R.K. and Fallon, H. · Antioxidant status and alcohol-related disease. *Gastroenterology*, **62**, 174-185 (1972)
47. Routledge, P.A. and Shand, D.G. · Presystemic drug elimination. *Annu. Res. Pharmacol. Toxicol.*, **19**, 447-468 (1979)
48. Schenkman, J.B., Remmer, H. and Estabrook, R.W. · Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome *Mol. Pharmacol.*, **3**, 113-123 (1967)
49. Moon, J.O. · Cytochrome P-450 induced lipid peroxidation and oxygen consumption of the liver *Pusan Bull Pharm. Sci.*, **27**, 38-49 (1993)
50. Shaw, S. and Jayatilke, E. · Acetaldehyde-mediated hepatic lipid peroxidation: role of superoxide and ferritin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **143**, 984-990 (1987)
51. Shinzo, K., Tateo, K., Jeffrey, A., Nobuhiko, I. and Lieber, C.S. · Role of xanthine oxidase on ethanol-induced lipid peroxidation on rats. *Gastroenterology*, **98**, 203-210 (1990)
52. Hall, W.H. and Krenitsky, T.A. · Aldehyde oxidase from rabbit liver · Specificity toward purines and their analogs. *Arch. Biochem. Biophys.*, **15**, 36-46 (1986)
53. Shaw, S. and Jayatilke, E. · The role of aldehyde oxidase in ethanol-induced hepatic lipid peroxidation in the rat *Biochem. J.*, **268**, 579-583 (1990)
54. Koivula, T. and Lindros, K.O. · Effects of long-term ethanol treatment on aldehyde and alcohol dehydrogenase activities in rat liver. *Biochem. Pharmacol.*, **24**, 1937-1942 (1975)
55. Kim, D.H. · Study on the Puffer fish Fugu xanthopterus water extract of detoxification mechanism in subacute alcohol-treated rats *Ph.D. Dissertation*, Kyungsoong University, Korea (1995)
56. Nordmann, R., Ribiere, C. and Rouach, H. · Ethanol induced lipid peroxidation and oxidative stress in extrahepatic tissues *Alcohol-Alcoholism*, **25**, 231-238 (1990)