

지구자나무 추출물이 사염화탄소로 유발된 흰쥐의 간손상에 미치는 영향

김 옥 경

대진대학교 식품영양학과

Protective Effects of Extracts of *Hovenia dulcis* Thunb on Hepatotoxicity in Carbon Tetrachloride Intoxicated Rats

Ok Kyung Kim

Dept. of Food and Nutrition, Daejin University, Po Chon 487-711, Korea

Abstract

This study was performed to investigate the protective effects of *Hovenia dulcis* Thunb on hepatotoxicity in carbon tetrachloride-intoxicated rats. Male Sprague-Dawley rats (220~240 g) were used as experimental groups, which were divided into 7 groups; Control group, CCl₄-treated group, hexane fraction pretreated and CCl₄-treated group, chloroform fraction pretreated and CCl₄-treated group, ethylacetate fraction pretreated and CCl₄-treated group, butanol fraction pretreated and CCl₄-treated group, H₂O fraction pretreated and CCl₄-treated group. After 6 days, the activities of aminotransferase, contents of cholesterol, TG and hepatic lipid peroxide content in chloroform fraction pretreated and CCl₄-treated group were significantly decreased ($p < 0.05$) compared to the only CCl₄-treated group. The content of glutathione and activities of GST in chloroform fraction pretreated and CCl₄-treated group were also significantly increased ($p < 0.05$) compared to the only CCl₄-treated group. In addition, activities of SOD, catalase and GSH-Px in chloroform fraction pretreated and CCl₄-treated group were significantly decreased ($p < 0.05$) compared to the only CCl₄-treated group. These results indicated that the chloroform fraction of *Hovenia dulcis* Thunb methanol extract showed hepatoprotective effect in carbon tetrachloride-intoxicated rats.

Key words: *Hovenia dulcis* Thunb, enzyme activity, hepatoprotective effect, carbon tetrachloride

서 론

오늘날 경제 수준의 향상과 함께 건강에 대한 관심이 증가되고, 그에 따른 식품의 기능성에 많은 연구가 진행되고 있다. 생존의 필수 물질인 산소는 체내의 여러 대사 과정에 관여하여 free radical을 만들어 유해 세균의 살균작용, 노화된 단백질의 제거 등에 이용되지만 과량으로 생산되면 제거 영역을 벗어나 노화나 질병의 원인이 된다(1-3). 따라서 최근에는 이의 예방이나 치료를 위해 식용 및 약용 식물 등의 천연물을 통한 free radical 생성 억제 작용에 대한 실험들이 많이 보고되었다(4-7). 세포의 독성을 일으키는 물질 중 화합물의 합성이나 혼합물의 분리를 위해 사용되고 있는 지방족 할로젠 탄화수소인 사염화탄소(CCl₄)는 생체막의 불포화 지방산을 공격하여 지질의 산화, 단백질의 변성 등을 일으켜 생체막의 손상을 초래하여 간과 신장에 독성작용을 일으킨다(8-10). 그러나 생체조직은 superoxide dismutase, catalase, glutathione-S-transferase, glutathione peroxidase와 같은 항산화 효소계(11)와 vitamin A, C 및 E, flavonoid계 색소, polyphenol류,

방향족 amine 등의 생리활성 물질(12,13)들이 체내에서 과잉으로 생성된 유리기에 의한 조직 손상을 방어한다.

한편, 지구자나무(*Hovenia dulcis* Thunb)는 헛개나무로 불리우며 그 열매를 지구자라 하고 주취(酒醉), 빈혈, 구갈, 구토, 사지마비, 류마티즘, 대소변 불통의 치료(14,15)에 쓰이며, 그 성분으로는 씨와 열매의 methanol추출물에서 (+)-ampelopsin, laricetrin, myricetin, (+)-galocatechin과 같은 flavonoids류와 hovenitin I, II, III과 같은 flavonol류, peptide alkaloid인 frangulanine 등(16), hovenidulciosides, jujuboside 등(17), 잎과 줄기의 물추출물에서 vanillic acid와 ferulic acid(18) 등이 분리되었다. 생리활성 실험으로는 D-galactosamine, lipopolysaccharide와 carbon tetrachloride에 의한 간 장애의 보호 작용(16), histamine 방출 억제 작용(17), 항산화 및 항미생물 작용(18), 알콜성 근이완 억제작용(19), anti-sweet작용(20) 등이 보고되었다. 따라서 본 연구에서는 지구자나무 methanol 추출물이 CCl₄로 유발된 흰쥐의 간 독성에 대한 보호작용이 있음을 확인하여 이 추출물을 여러 용매로 분획하여 간 손상에 어떠한 영향을 주는지를 관찰하였다.

재료 및 방법

시료의 추출 및 분획

경동 시장내 한약 전재상으로부터 구입한 지구자나무(경북 영천 산) 2 kg을 95% methanol로 90°C의 수욕상에서 5시간씩 3회 환류 추출한 후 따뜻할 때 여과하고 여액을 감압·농축하여 95 g(수율 4.8%)의 추출물을 얻었다. 이를 용매에 따라 분획하여 감압·농축하여 hexane 분획물 6 g(6.3%), chloroform 분획물 10 g(10.5%), ethylacetate 분획물 10 g(10.5%), n-butanol 분획물 49 g(51.6%) 및 H₂O 분획물 20 g(21.1%)을 얻었다.

시약

시약은 carbon tetrachloride(Janssen Chemical Co.), olive oil(Yakuri Chemical Co.) sodium azide, glutathione, glutathione reductase, NADPH, cumene hydroperoxide, 1-chloro-2,4-dinitrobenzen(CDNB), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid (DTNB), xanthine, xanthine oxidase, cytochrome C, sodium deoxycholate, 1,1,3,3-tetraethoxypropane, thiobarbituric acid, bovine serum albumin(Sigma Chemical Co.)을 사용하였으며, ALT, AST, ALP, γ -GTP, bilirubin, cholesterol 및 TG kit는 영동제약의 것을, LDH kit는 아산제약의 것을 사용하였고, 나머지 기타 시약은 특급시약을 구입하여 사용하였다.

실험동물 및 CCl₄를 이용한 급성 독성 유발

체중 180~190 g 내외의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 7일간 적응시킨 후 평균체중 230±10 g인 것을 난괴법에 따라 7마리씩 7군으로 나누어 사용하였고, 동물실 온도는 22~25°C와 명암 주기 12시간(07:00~19:00)이 자동 조절된 동물 사육실에서 고형사료(삼양유지) 및 물을 자유로이 섭취토록 하였다. hexane, chloroform, ethylacetate, butanol, H₂O분획물은 얻어진 수율에 따라 각각 189 mg/kg, 315 mg/kg, 315 mg/kg, 1547 mg/kg, 632 mg/kg으로 0.5% CMC액에 현탁시켜 흰쥐의 체중 kg당 10 mL씩 1일 1회 6일간 경구 투여한 후 최종 분획물 투여 6시간 후에 Rao와 Nehendale의 방법(21)을 보완, 수정하여 흰쥐에게 CCl₄ 0.6 mg/kg [CCl₄: Olive oil = 3:2 (v/v)로 1.0 mg/kg]씩 복강내 투여하여 급성 간 독성을 유발시켰다.

효소원 조제 및 분석

CCl₄를 복강투여 후 18시간 동안 절식시키고 흰쥐를 ether로 마취하여 복부를 절개하여 심장에서 직접 채혈하고 간을 적출하였다. 적출한 간은 생리식염수로 장기 표면에 묻어 있는 혈액을 씻은 후 여지로 남아 있는 생리식염수를 제거한 다음 무게를 측정한 후 -70°C에 냉동 보관하였다가 본 실험에 사용하였다. 채취한 혈액은 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 혈청중의 alanine aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase(AST) 활성도는 Reitman-Frankel의 방법(22), alkaline phosphatase(ALP) 활성

도는 Kind-King의 변법(23), glutamyl transpeptidase(γ -GTP) 활성도는 Szaz의 방법(24), lactate dehydrogenase(LDH) 활성도는 King의 방법(25), bilirubin의 함량은 Evelyn-Malloy 변법(26), triglycerides(TG)와 cholesterol의 함량은 Belcher와 Egan의 방법(27)에 따라 측정하였다. 한편, 적출한 간은 1 g에 4배의 0.1 M인산용액(pH 7.4)을 가하여 균질화시킨 후 1차 원심분리(600×g, 15분)하여 상등액을 얻고, 이 상등액을 2차 원심분리(10,000×g, 20분)하고 그 상등액을 105,000×g로 1시간 초원심분리하여 cytosol 분획을 얻어 glutathione peroxidase(GSH-Px), glutathione-S-transferase(GST), superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT) 활성의 효소원으로 사용하였고, 간조직 중의 지질과산화물과 glutathione(GSH) 함량은 각각 Uchiyama 등의 방법(28)과 Ellman의 방법(29)에 따라, glutathione peroxidase 활성도는 Flohe 등의 방법(30), glutathione-S-transferase 활성도는 Habig 등의 방법(31), superoxide dismutase 활성도는 Cropo 등의 방법(32), catalase 활성도는 Aebi의 방법(33), 단백질의 함량은 Lowry 등의 방법(34)에 따라 측정하였다.

통계처리

모든 실험 결과는 window용 SPSS 10.0 program을 사용하여 실험군당 평균 ±표준편차로 표시하였고 각 군간의 평균치의 통계적 유의성은 p<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test(35)에 의해 검정하였다.

결과 및 고찰

혈청 중 ALT 및 AST 활성도

분획물 투여에 의한 ALT 및 AST 활성도는 Table 1과 같다. ALT와 AST 활성도는 대조군(I)과 비교하여 CCl₄를 단독으로 투여한 군(II)에서 각각 유의적인 증가를 나타내었고(p<

Table 1. The effect of various fractions of *Hovenia dulcis* Thunb on the serum ALT and AST activities in CCl₄ intoxicated rats

Experimental group ¹⁾	ALT	AST
	(KA unit/L)	(KA unit/L)
Control (I)	41.41 ± 4.63 ^{2)a3)}	89.54 ± 25.67 ^a
CCl ₄ (II)	115.73 ± 43.40 ^{cd}	143.57 ± 21.92 ^{bc}
Hexane (III)	134.38 ± 70.73 ^d	156.50 ± 48.60 ^c
Chloroform (IV)	69.64 ± 12.95 ^{ab}	98.50 ± 14.43 ^a
Ethylacetate (V)	93.18 ± 36.55 ^{bcd}	122.01 ± 44.61 ^{abc}
Butanol (VI)	86.86 ± 25.29 ^{abc}	117.87 ± 33.50 ^{abc}
H ₂ O (VII)	61.45 ± 29.12 ^{ab}	104.38 ± 37.35 ^{ab}

¹⁾I ~ Saline + Olive oil, II ~ Saline + CCl₄ (1.0 mg/kg), III ~ Hexane fr. 189 mg/kg + CCl₄ (1.0 mg/kg), IV ~ Chloroform fr. 315 mg/kg + CCl₄ (1.0 mg/kg), V ~ Ethyl acetate fr. 315 mg/kg + CCl₄ (1.0 mg/kg), VI ~ Butanol fr. 1547 mg/kg + CCl₄ (1.0 mg/kg), VII ~ H₂O fr. 632 mg/kg + CCl₄ (1.0 mg/kg).

²⁾Values are the mean ± SD (n=7).

³⁾Values with different superscripts within the same column were significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

0.05), ALT 활성도는 CCl₄ 단독 투여군(II)과 비교하여 chloroform(IV)과 H₂O(VII) 분획물을 각각 투여한 군에서, AST 활성도는 chloroform(IV) 분획물을 투여한 군에서 유의적인 감소를 나타내었다(p<0.05). 이 결과는 간 손상으로 인한 간 세포의 괴사와 간 조직의 파괴가 진행됨에 따라 transaminase가 혈중으로 유리되어 ALT와 AST의 높은 활성치를 나타낸다는 보고(36)에 따라, chloroform 분획물이 CCl₄로 유발된 흰쥐의 혈청중의 ALT 및 AST 활성치의 감소를 나타내어 간 손상의 억제 효과가 있는 것으로 사료된다.

혈청 중 ALP 및 γ -GTP 활성도

분획물이 ALP 및 γ -GTP 활성도에 미치는 영향은 Table 2와 같다. ALP와 γ -GTP 활성도는 대조군(I)과 비교하여 CCl₄ 단독 투여군(II)에서 각각 유의적인 증가를 나타내었으며(p<0.05), 이 결과는 간 세포의 변성이나 괴사가 되면 혈중으로 이들의 활성도가 증가된다는 보고(37,38)와 유사하였다. ALP 활성도는 CCl₄ 단독 투여군(II)과 비교하여 hexane(III) 분획물을 투여한 군에서 유의적인 감소를 나타내었고(p<0.05), γ -GTP 활성도는 CCl₄ 단독 투여군(II)과 비교하여 분획물을 투여한 모든 군에서 감소를 나타내었으나 유의적인 감소는 아니었다.

혈청 중 LDH 활성도 및 bilirubin 함량

분획물이 LDH 활성도 및 bilirubin 함량에 미치는 영향은 Table 3과 같다. LDH 활성도와 bilirubin 함량은 대조군(I)과 비교하여 CCl₄ 단독 투여군(II)에서 유의적인 증가를 나타내었다(p<0.05). 이 결과는 CCl₄가 cytochrome p450에 의해 독성이 강한 대사물로 되어 지방변성 및 괴사를 일으켜 혈중으로 이들 물질이 증가된다는 보고(39)와 비슷하였으며, LDH 활성도는 CCl₄ 단독 투여군(II)과 비교하여 분획물을 투여한 모든 군에서 감소를 나타내었으나 유의성은 없었고, bilirubin 함량은 butanol(VI)과 H₂O(VII) 분획물을 각각 투여한 군에서 유의적인 감소를 나타내었다(p<0.05).

혈청 중 Cholesterol 및 TG 함량

분획물이 cholesterol 및 TG 함량에 미치는 영향은 Table 4

Table 2. The effect of various fractions of *Hovenia dulcis* Thunb on the serum ALP, γ -GTP activities in CCl₄ intoxicated rats

Experimental group ¹⁾	ALP	γ -GTP
	(KA unit/mL)	(mu/mL)
Control (I)	32.22 ± 5.59 ^{2)a3)}	20.97 ± 5.12 ^a
CCl ₄ (II)	58.48 ± 17.00 ^c	42.32 ± 14.66 ^b
Hexane (III)	35.15 ± 6.40 ^{ab}	39.69 ± 11.39 ^b
Chloroform (IV)	51.15 ± 14.09 ^{bc}	33.75 ± 10.82 ^{ab}
Ethylacetate (V)	50.61 ± 21.88 ^{bc}	39.12 ± 13.56 ^b
Butanol (VI)	40.16 ± 10.09 ^{abc}	34.38 ± 10.29 ^{ab}
H ₂ O (VII)	51.54 ± 18.23 ^{bc}	34.00 ± 15.19 ^{ab}

¹⁾Refer to Table 1.

²⁾Values are the mean ± SD (n=7).

³⁾Values with different superscripts within the same column were significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

Table 3. The effect of various fractions of *Hovenia dulcis* Thunb on the serum LDH activity and bilirubin content in CCl₄ intoxicated rats

Experimental group ¹⁾	LDH	Bilirubin
	(Wroblewski unit/mL)	(mg/mL)
Control (I)	1039.25 ± 347.32 ^{2)a3)}	0.34 ± 0.19 ^{ab}
CCl ₄ (II)	1949.80 ± 249.82 ^b	1.31 ± 1.24 ^{bc}
Hexane (III)	1567.25 ± 657.98 ^{ab}	1.64 ± 1.41 ^c
Chloroform (IV)	1554.15 ± 586.93 ^{ab}	0.79 ± 1.1 ^{abc}
Ethylacetate (V)	1593.62 ± 353.21 ^{ab}	0.45 ± 0.39 ^{ab}
Butanol (VI)	1560.11 ± 764.64 ^{ab}	0.17 ± 0.19 ^d
H ₂ O (VII)	1622.45 ± 663.24 ^{ab}	0.09 ± 0.07 ^a

¹⁾Refer to Table 1.

²⁾Values are the mean ± SD (n=7).

³⁾Values with different superscripts within the same column were significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

Table 4. The effect of various fractions of *Hovenia dulcis* Thunb on the serum cholesterol and TG contents in CCl₄ intoxicated rats

Experimental group ¹⁾	Cholesterol	TG
	(mg/dL)	(mg/dL)
Control (I)	84.60 ± 5.50 ^{2)bc3)}	49.72 ± 15.13 ^a
CCl ₄ (II)	94.17 ± 6.77 ^c	79.18 ± 27.95 ^b
Hexane (III)	82.71 ± 15.16 ^{abc}	80.28 ± 20.51 ^b
Chloroform (IV)	68.15 ± 14.11 ^{ab}	47.18 ± 13.68 ^a
Ethylacetate (V)	80.03 ± 16.74 ^{abc}	52.09 ± 21.29 ^{ab}
Butanol (VI)	67.31 ± 15.74 ^{bc}	61.33 ± 23.65 ^{ab}
H ₂ O (VII)	74.20 ± 8.85 ^{ab}	53.97 ± 29.54 ^{ab}

¹⁾Refer to Table 1.

²⁾Values are the mean ± SD (n=7).

³⁾Values with different superscripts within the same column were significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

와 같다. Cholesterol과 TG 함량은 대조군(I)과 비교하여 CCl₄ 단독 투여군(II)에서 유의적인 증가를 나타내었다(p<0.05). cholesterol 함량은 CCl₄ 단독 투여군(II)과 비교하여 분획물을 투여한 모든 군에서 감소를 나타내었으나, 특히 chloroform(IV)과 H₂O(VII) 분획물을 각각 투여한 군에서 유의적인 감소를 나타내었다(p<0.05). TG 함량은 chloroform(IV) 분획물을 투여한 군에서 유의적인 감소를 나타내었다(p<0.05). 정상적인 간 세포내의 지질 함량은 합성과 이용의 균형을 이루지만 CCl₄에 의한 간 장애를 받으면 cytochrome P-450에 의하여 반응성이 높은 ·CCl₃기가 생성되어 간 세포기능을 저하시켜 cholesterol과 TG의 함량이 증가된다는 보고(36)와 같이, 본 실험에서는 이들 분획물이 간 세포의 손상을 억제한 결과 정상적인 지질대사가 이루어진 결과로 사료된다.

간조직 중의 과산화 지질, glutathione 함량 및 GST 활성 변화

분획물의 간조직 중의 과산화 지질과 glutathione 함량 및 GST 활성 변화는 Table 5와 같다. 과산화 지질 함량은 대조군(I)과 비교하여 CCl₄ 단독 투여군(II)에서 유의적인 증가를 나타내었는데(p<0.05), 이 결과는 Curtis 등(40), Takeda 등

Table 5. The effect of various fractions of *Hovenia dulcis* Thunb on the liver lipid peroxide, glutathione contents and GST activity in CCl₄ intoxicated rats

Experimental group ¹⁾	Lipid peroxide (MDA nmoles/g of tissue)	Glutathione (μmoles/g of tissue)	GST (nmoles/mg protein/min)
Control (I)	2.76 ± 1.75 ^{2)ab3)}	13.53 ± 2.23 ^b	332.14 ± 70.90 ^d
CCl ₄ (II)	7.63 ± 3.68 ^c	10.30 ± 2.46 ^a	229.71 ± 53.38 ^{ab}
Hexane (III)	3.55 ± 2.55 ^{ab}	11.45 ± 1.52 ^{ab}	310.74 ± 22.32 ^{cd}
Chloroform (IV)	2.82 ± 1.77 ^{ab}	12.82 ± 1.78 ^b	316.95 ± 64.82 ^{cd}
Ethylacetate (V)	5.54 ± 4.66 ^{bc}	13.30 ± 1.43 ^b	280.56 ± 85.06 ^{abcd}
Butanol (VI)	2.81 ± 0.76 ^{ab}	11.91 ± 1.54 ^{ab}	240.92 ± 41.71 ^{abc}
H ₂ O (VII)	1.92 ± 0.92 ^a	12.49 ± 2.43 ^{ab}	232.30 ± 92.09 ^{ab}

¹⁾Refer to Table 1.

²⁾Values are the mean ± SD (n=7).

³⁾Values with different superscripts within the same column were significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

(41), Noll과 Groot(42)가 체내의 과산화 지질은 세포막 구성 물질인 다가불포화 지방산의 과산화에 의해서 또는 생체내 내적 요인에 의해 생성된 oxygen free radical에 의해서 생성되며, 특히 CCl₄는 간 세포에서 free radical을 만들고 생체막의 구조적 변화를 일으켜 내부 효소계가 파괴됨으로써 혈액과 조직내의 과산화 지질 함량이 증가한다는 보고와 유사하였다. 그러나 hexane(III), chloroform(IV), butanol(VI) 및 H₂O(VII) 분획물을 각각 투여한 군에서 CCl₄ 단독 투여군(II)과 비교하여 유의적인 감소를 나타내었다(p<0.05). 이는 Hase 등(16)이 지구자나무의 씨와 열매의 methanol 추출물을 투여시 과산화 지질 함량이 감소되었다는 보고와 비슷하였다. 본 실험 결과 과산화 지질 함량의 감소는 투여한 분획물들이 CCl₄에 의해 생성된 ·CCl₃, lipid peroxy radicals 등과 같은 free radical의 생성 억제 또는 소거 작용에 의해 감소된 것으로 사료된다. 간 조직 중의 glutathione 함량은 대조군(I)과 비교하여 CCl₄ 단독 투여군(II)에서 유의적인 감소를 나타내었다(p<0.05), 이 결과는 Surh 등(43), Lee(44)의 보고와 유사한 경향을 나타내었다. 그러나 chloroform(IV)과 ethylacetate(V) 분획물을 각각 투여한 군에서 유의적인 증가를 나타내었다(p<0.05). Glutathione은 체내의 독성 물질을 해독시키며, 단백질이나 DNA의 합성, 아미노산기의 이동, 효소 활성의 조절, 활성 산소나 유리기에 의한 세포의 손상을 예방하는 등 체내의 중요한 반응에 관여하는 물질(45,46)로써, 본 실험 결과 Chlo-

roform(IV)과 ethylacetate(V) 분획물을 각각 투여한 군들이 대조군과 비슷한 수준으로 증가되었다. 이는 이들 분획물에 들어 있는 생리 활성 물질이 CCl₄ 투여에 따른 free radical 생성의 억제와 조직내 산화적 스트레스로 인한 glutathione의 손실을 억제시킨 결과 그 함량이 증가된 것으로 생각된다. 한편, GST는 대조군(I)과 비교하여 CCl₄ 단독 투여군(II)에서 유의적인 감소를 나타내었으나(p<0.05), 분획물을 투여한 군에서는 CCl₄ 단독 투여군(II)과 비교하여 증가를 나타내었으며 특히 hexane(III)과 chloroform(IV) 분획물을 각각 투여한 군에서 유의적인 증가를 나타내었다(p<0.05). 이 결과는 GST가 체내에서 일차적으로 산화된 대사물을 포집하는 glutathione을 이용하여 체내의 독성 물질을 전이 분해시키는 작용을 한다는 보고(47)에 따라, 본 실험 결과 이들 분획물이 free radical과 같은 물질을 glutathione에 포집시켜 배설을 촉진시킴으로써 CCl₄에 의한 간 손상을 보호하여 그 함량이 증가된 결과로 사료된다.

간조직 중의 SOD, catalase 및 GSH-Px의 활성 변화

분획물의 간조직 중의 SOD, catalase 및 GSH-Px의 활성 변화는 Table 6과 같다. SOD는 활성산소(O₂⁻)를 H₂O₂와 O₂로 전환시켜 활성 산소에 의해 생기는 산화적 손상의 일차적 방어에 관여한다(48). 본 실험 결과 대조군(I)과 비교하여 CCl₄ 단독 투여군(II)에서 유의적인 증가를 나타내었으나(p<0.05)

Table 6. The effect of various fractions of *Hovenia dulcis* Thunb on the liver SOD, catalase and GSH-Px activities in CCl₄ intoxicated rats

Experimental group ¹⁾	SOD (Unit/mg protein)	Catalase (μmoles/mg protein/min)	GSH-Px (nmoles NADPH/mg protein/min)
Control (I)	46.57 ± 14.37 ^{2)ab3)}	820.45 ± 148.85 ^a	2.32 ± 0.33 ^a
CCl ₄ (II)	107.43 ± 21.89 ^c	1674.07 ± 327.79 ^f	3.44 ± 0.79 ^b
Hexane (III)	90.99 ± 40.49 ^{bc}	1320.26 ± 424.13 ^{bc}	3.07 ± 0.86 ^{ab}
Chloroform (IV)	76.82 ± 13.99 ^b	823.81 ± 328.66 ^a	2.66 ± 0.39 ^a
Ethylacetate (V)	80.77 ± 15.89 ^b	955.28 ± 501.30 ^{ab}	2.98 ± 0.66 ^{ab}
Butanol (VI)	85.31 ± 14.73 ^{bc}	764.66 ± 293.81 ^a	2.58 ± 0.34 ^a
H ₂ O (VII)	82.52 ± 13.53 ^{bc}	1007.07 ± 378.24 ^{ab}	2.65 ± 0.78 ^a

¹⁾Refer to Table 1.

²⁾Values are the mean ± SD (n=7).

³⁾Values with different superscripts within the same column were significantly different at p<0.05 by Duncan's multiple range test.

분획물을 투여한 군에서 감소를 나타내었고, 특히 chloroform (IV)과 ethylacetate (V) 분획물을 각각 투여한 군에서 CCl₄ 단독 투여군(II)과 비교하여 유의적인 감소를 나타내어(p<0.05) 이들 분획물이 CCl₄에 의해 생성된 활성산소(O₂[·])를 억제할 수 있는 생리활성 물질이 함유되어 있는 것으로 사료된다. Catalase는 체내에서 지방의 자동산화, 유기물의 산화, superoxide dismutase에 의해 생성된 H₂O₂를 GSH-Px와 함께 O₂나 H₂O로 분해 배설시키는 산화 환원 효소의 하나(49)로, 본 실험 결과 대조군(I)과 비교하여 CCl₄ 단독 투여군(II)에서 유의적인 증가를 나타내었으나(p<0.05), hexane을 제외한 나머지 chloroform(IV), ethylacetate(V), butanol(VI) 및 H₂O(VII) 분획물을 각각 투여한 군에서 CCl₄ 단독 투여군(II)과 비교하여 유의적인 감소를 나타내었다(p<0.05). 이것은 이들 분획물이 CCl₄에 의해 형성된 free radical의 생성을 억제시킨 결과로 사료된다. 한편, GSH-Px는 H₂O₂를 제거하면서 환원형 glutathione(GSH)을 산화형 glutathione(GSSG)으로 전환시키는 효소(50)로써, 본 실험 결과 대조군(I)과 비교하여 CCl₄ 단독 투여군(II)에서 유의적인 증가를 나타내었다(p<0.05). 이는 CCl₄의 투여로 다량의 H₂O₂가 생성되어 이를 분해하기 위하여 증가한 것으로 사료된다. 그러나 분획물을 투여한 군에서 감소를 나타내었으며, 특히 chloroform(IV), butanol(VI)과 H₂O(VII) 분획물을 각각 투여한 군에서 CCl₄ 단독 투여군(II)과 비교하여 유의적인 감소(p<0.05)를 나타내었다. 이 결과는 분획물이 이들 항산화 효소 활성을 감소시킨 것으로 사료된다.

요 약

지구자나무 methanol 추출물의 hexane, chloroform, ethylacetate, butanol 및 H₂O 분획물이 CCl₄로 급성 간 독성이 유발된 흰쥐의 효소 활성과 항산화 활성 효과를 검토한 결과, 대조군과 비교하여 CCl₄ 단독 투여군에서 ALT, AST, ALP, γ -GTP 및 LDH의 활성과 bilirubin, cholesterol 및 TG의 함량이 유의적으로 증가(p<0.05)하였으나, ALT 및 AST 활성도는 CCl₄ 단독 투여군과 비교하여 chloroform 분획물을 투여한 군에서, ALP 활성도는 hexane 분획물을 투여한 군에서, bilirubin 함량은 butanol과 H₂O 분획물을 각각 투여한 군에서, cholesterol 함량은 chloroform 과 H₂O 분획물을 각각 투여한 군에서, TG 함량은 chloroform 분획물을 투여한 군에서 유의적인 감소(p<0.05)를 나타내었다. 또한 간조직 중의 과산화 지질 함량과 SOD, catalase 및 GSH-Px 활성은 대조군과 비교하여 CCl₄ 단독 투여군에서 유의적인 증가(p<0.05)를 나타내었으나, 과산화 지질 함량은 CCl₄ 단독 투여군과 비교하여 hexane, chloroform, butanol 및 H₂O 분획물을 각각 투여한 군에서, catalase 활성은 chloroform, ethylacetate, butanol 및 H₂O를 각각 투여한 군에서, GSH-Px 활성은 chloroform, butanol 및 H₂O 분획물을 각각 투여한 군에서 유의적

인 감소(p<0.05)를 나타내었다. 한편, glutathione 함량과 GST 활성은 대조군에 비해 CCl₄ 단독 투여군에서 유의적인 감소(p<0.05)를 나타내었으나, glutathione 함량은 chloroform과 ethylacetate를 각각 투여한 군에서, GST 활성은 hexane과 chloroform을 각각 투여한 군에서 CCl₄ 단독 투여군과 비교하여 유의적인 증가(p<0.05)를 나타내었다. 따라서 본 실험 결과 지구자나무 분획물이 CCl₄로 유발된 흰쥐의 간 손상에 미치는 영향을 검토한 결과, chloroform 분획물이 간세포의 괴사와 변성에 지표가 되는 ALT와 AST 활성도의 저하 효과와 간 손상에 따른 과산화 지질 함량과 SOD, Catalase, GSH-Px 등의 활성 감소, glutathione 함량 및 GST 활성의 증가를 나타내어 생체내의 free radical에 의한 간보호 작용이 있는 생리활성 물질을 함유하고 있음이 추정되며, 아울러 이 분획물을 더욱 분리하여 물질의 구조와 반응 기전 제시와 함께 간 손상의 예방 및 치료에 도움이 될 수 있는 물질을 개발할 가치가 있다고 사료된다.

감사의 글

본 논문은 2001학년도 대전대학교 학술연구비 지원으로 수행된 연구의 결과이며 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Neuzil, J., Gebick, J. and Stocker, R. : Radical induced chain oxidation of proteins and its inhibition by chain breaking antioxidants. *Biochem. J.*, **293**, 601-606 (1993)
2. Steinberg, D., Pathasarathy, S., Carew, T.E., Khoo, J.C. and Witztum, J.L. : Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoproteins that increase its atherogenicity. *N. Engl. J. Med.*, **320**, 915-923 (1989)
3. Gary, W.P. and Cynthia, D.L. : The role of oxidative stress in HIV disease. free radical. *Biology and Medicine.*, **19**, 523-528 (1995)
4. Caragy, A.B. : Cancer-preventive foods and ingredients. *Food Technology*, **46**, 65-68 (1992)
5. Liang, J.Y., Marie, T. and Lester, P. : Gingo bibba extract (EGb 761) protects human low density lipoproteins against oxidative modification mediated by copper. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, **212**, 360-366 (1995)
6. Kim, H.K., Kim, Y.E., Do, J.R., Lee, Y.C. and Lee, B.Y. : Antioxidative activity and physiological activity of some Korean medicinal plants. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **27**, 80-85 (1995)
7. Middleton, E. : Biological properties of plant flavonoids : An Overview. *Int. J. Pharmacognosy*, **34**, 344-348 (1996)
8. Recknagel, R.O. : Carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pharmacol. Rev.*, **19**, 145-149 (1967)
9. Gilman, A.G. : Carbon tetrachloride. *Pharmacological Basis of Therapeutics*, **7**, 1635-1636 (1985)
10. Bruckner, J.V., Mackenzie, W.F. and Muralidhara, S. : Oral toxicity of carbon tetrachloride : Acute, subacute and sub-chronic studies in rats. *Fund. Appl. Toxicology*, **6**, 16-34 (1986)
11. Hassan, H.M. : Free radical. *Biol. Med.*, **5**, 377-385 (1988)
12. Byers, T. and Perry, G. : Dietary carotenes, vitamin C and vitamin E as protective antioxidants in human cancers. *Ann.*

- Rev. Nutr.*, **12**, 135-159 (1992)
13. Lee, Y.K. and Lee, H.S. : Effects of onion and ginger on the lipid peroxidation and fatty acid composition of mackerel during frozen storage. *J. Korean Soc. Food Nutr.*, **19**, 321-329 (1990)
 14. Jungyakdesajon. Sohakkyan, Sanghae science pub., p.413-415 (1985)
 15. Kim, T.J. : Korean Resources Plants. Seoul National University Press, Seoul, Korea, p.72 (1996)
 16. Hase, K., Ohsugi, M., Xiong, Q., Basnet, P., Kadota, S., Namba, T. : Hepatoprotective effect of *Hovenia dulcis* THUNB on experimental liver injuries induced by carbon tetrachloride or D-galactosamine/lipopolysaccharide. *Biol. Pharm. Bull.*, **20**, 381-385 (1997)
 17. Yoshikawa, M., Murakami, T., Ueda, T., Matsuda, H., Yamahara, J. and Murakami, N. : Bioactive saponins and glycosides. IV. Absolute stereo structures and inhibitory activity on histamine release of hovenidulciosides A₁, A₂, B₁ and B₂. *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 1736-1743 (1996)
 18. Cho, J.Y., Moon, J.H. and Park, K.H. : Isolation and identification of 3-methoxy-4-hydroxybenzoic acid and 3-methoxy-4-hydroxycinnamic acid from hat water extracts of *Hovenia dulcis* Thunb and confirmation of their antioxidative and antimicrobial activity. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **32**, 1403-1408 (2000)
 19. Yoshikawa, M., Murakami, T., Ueda, T., Yoshizumi, S. and Ninomiya, K. : Bioactive constituents of Chinese natural medicines. III. Absolute stereo structures of new dihydroflavonoids, Hovenitins I, II and III, Isolated from *Hovenia dulcis* THUNB : Inhibitory effect on alcohol-induced muscular relaxation and hepatoprotective activity. *Yakugaku Zasshi*, **117**, 108-118 (1997)
 20. Yoshikawa, M., Nagai, Y., Yoshida, M. and Arihara, S. : Anti-sweet natural products. VIII. Structures of hodulosides VI-X from *Hovenia dulcis* Thunb var tamentella Makino. *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 1722-1725 (1993)
 21. Rao, V.C. and Nehendale, H.M. : Colchicine antimiosis abolishes CCl₄ autoprotection. *Toxicol. Pathol.*, **19**, 597-606 (1991)
 22. Reitman, S. and Frankel, S. : A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin. Pathol.*, **28**, 58-61 (1957)
 23. Kawano, S., Nakagawa, H. and Toga, H. : Investigation on physiological values of blood in industrial workers, Report 3. Serum colloid reaction and enzyme activity values. *Sangyo Igaku.*, **24**, 275-283 (1982)
 24. Szaz, G. : A kinetic photometric method for serum γ -glutamyltrans peptidase. *Chin. Chem.*, **16**, 124-136 (1969)
 25. King, J. : Effect of hydrogen ion concentration on lactate dehydrogenase (LDH) assays. *Clin. Chem.*, **18**, 1443-1446 (1972)
 26. Bruce, C., Shull, H.L. and Philip, K.L. : Mechanism of interference by hemoglobin in the determination of total bilirubin. 1. Method of Malloy-Evelyn. *Clinical Chemistry*, **26**, 22-25 (1980)
 27. Belcher, J.D. and Egan, J.O. : A microenzymatic method to measure cholesterol and triglyceride in lipoprotein subfractions separated by density gradient ultracentrifugation from 200 microliters of plasma or serum. *J. Lipid Res.*, **32**, 359-370 (1991)
 28. Uchiyama, M. and Mihara, M. : Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal. Biochem.*, **86**, 271-278 (1978)
 29. Ellman, G.L. : Tissue sulfhydryl groups. *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70-77 (1959)
 30. Flohe, L., Wolfgng, A. and Gunzler, W.A. : Assay of glutathione peroxidase. In *Methods in Enzymatic Analysis*, New York, Academic Press, Inc., Vol. 105, p.114-121 (1984)
 31. Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W.B. : Glutathione S-transferase, The first enzymatic step in mercapturic acid reaction. *Anal. Biochem.*, **249**, 7130-7139 (1974)
 32. Croppo, C.H., McCord, J.M. and Fridovich, E. : Preparation and assay of superoxide dismutase. In *Methods in Enzymology*, Fleischer, S. and Packer, L. (eds.), Academic Press, New York, Vol. 52, p.382-393 (1978)
 33. Aebi, H. : Catalase. In *Methods of Enzymatic Analysis*, Bergmeyer, H.U. (ed.), Academic press, New York, Vol. 2, p.673-698 (1974)
 34. Lowry, O.H., Rosebrough, N., Farr, A.L. and Randall, R.J. : Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951)
 35. Duncan, D.B. : Multiple range test for correlated and heteroscedastic means. *Biometrics*, **13**, 164-176 (1993)
 36. Hayes : *Principles and methods of toxicology*. Gabriel, L.P. and William, R.H. (eds.), Raben Press, New York, p.407-445 (1982)
 37. Sherlock, D.S. : *Disease of liver and biliary system*. 8th ed., Oxford, Blackwell Scientific Publications, p.279-284 (1992)
 38. Whitfield, J.B., Pounder, R.E., Neale, G. and Moss, D.W. : Serum γ -glutamyl transpeptidase activity in liver disease. *Gut.*, **13**, 702-708 (1972)
 39. Kim, S.Y., Lee, H.S., Ryu, K.S., Lee, E.J. and Kim, Y.C. : Protective effects of extracts of *Mori Cortec Radicis* on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity. *Yakhak Hoeji*, **43**, 391-396 (1999)
 40. Curtis, M.T., Gilfor, D. and Farber, J.L. : Lipid peroxidation increased the molecular order of microsomal membranes. *Arch. Biochem. Biophys.*, **235**, 644-651 (1984)
 41. Takeda, S., Funo, S., Ilzuka, A., Kase, Y., Arai, I., Ohkura, Y., Sudo, K., Kiuchi, N., Yoshida, C., Maeda, S., Abrada, M. and Hosoya, E. : Pharmacological studies on schizandra fruits. III. Effects of wuweizisu C, a ligand component of schizandra fruits, on experimental liver injuries in rats. *Folia Pharmacol. Japon.*, **85**, 194-208 (1985)
 42. Noll, T. and Groot, H. : The critical steady state hypoxic conditions in carbon tetrachloride induced lipid peroxidation in rat liver microsomes. *Biochim. Biophys. Acta*, **795**, 356-362 (1984)
 43. Surh, I.O., Jeong, C.S. and Jung, K.H. : Mechanism and effect of *Corydalis ternata* on the CCl₄-induced hepatotoxicity. *J. Food Hyg. Safety*, **15**, 226-234 (2000)
 44. Lee, M.Y. : Inhibitory effect of leek green juice on CCl₄-induced hepatotoxicity in rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **30**, 102-106 (2001)
 45. Parke, D.V. : The importance of diet and nutrition in the detoxication of chemicals. In *Food, Nutrition and Chemical Toxicity*, Smith-Gordon, London, p.1-15 (1993)
 46. Meister, A. and Anderson, M.E. : Glutathione. *Ann. Rev. Biochem.*, **52**, 711-760 (1983)
 47. Vos, R.M. and Van Bladern, P.J. : Glutathione s-transferase in relation to their role in the biotransformation of xenobiotics. *Chem. Biol. Interact.*, **75**, 241-265 (1990)
 48. Floh, L. : Determination of glutathione peroxidase. *CRC Handbook of Free Radicals and Antioxidations in Biomedicine*. New York, p.281-286 (1992)
 49. Deisseroth, A. and Dounce, A.L. : Catalase physical and chemical properties, mechanism of catalysis and physiological role. *Physiol. Rev.*, **50**, 3-24 (1970)
 50. Jones, D.P., Eklow, L., Thor, H. and Orrenius, S. : Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes relative contributions of catalase and glutathione peroxidase in decomposition of endogenously generated H₂O₂. *Arch. Biochem. Biophys.*, **210**, 505-516 (1981)