

음양곽의 추출물이 노화에 따른 흰쥐 간의 이물질대사 효소계에 미치는 영향

이영구 · 손형옥 · 이동욱 · 임흥빈*†

한국인삼연초연구원 생화학연구실, *충북대학교 농과대학

The Effect of water-extract of *Epimedium koreanum* Nakai on age-related changes of the xenobiotic metabolizing enzyme system in the liver of rats

Young Gu Lee, Hyung Ok Sohn, Dong Wook Lee and Heung Bin Lim*†

Laboratory of Biochemistry, Korea Ginseng and Tobacco Research Institute, Korea.

*College of Agriculture, Chungbuk National University, Korea.

ABSTRACT : *Epimedium koreanum* Nakai(EKN) has traditionally been well-known as a herbal medicine for the promotion of stamina and the improving sexual activity of human in oriental countries including Korea and China. The aim of this study was to investigate the effect of dietary supplementation of EKN water-extract(0.025%,w/v) on age-related change of xenobiotic metabolizing system in rat liver. Long-term supply of the EKN extract to rats did not induce any discernible signs. However, the mass of liver and kidney were slightly increased by the dietary supplementation. Level of cytochrome P450, NADPH cytochrome P450 reductase, P450 dependent ethoxycoumarin O-deethylase benzphetamine N-demethylase and glutathione-S-transferase in liver were decreased with age, but, these activities in 24 months of age were declined more in rats supplied with EKN extract. Level of cytochrome b5 and NADH-cytochrome b5 reductase were also decreased with age, however, there was no significant difference between with and without EKN extract. These results indicate that long-term supplementation of EKN extract to rats from weaning to 24 months may be a burden on the liver function in old age, and may aggregate the decline of xenobiotic metabolizing enzymes activities in old age.

Key words : *Epimedium koreanum* Nakai, ageing, xenobiotic metabolizing enzymes

서 언

예로부터 우리 나라를 비롯하여 중국, 일본 등 동양에 서는 불로장생 또는 무병장수를 위하여 자연에서 그 실 마리를 찾으려고 꾸준히 노력해 왔으며 여러 가지 강장 을 위한 약재가 많이 알려지고 있다. 그 중에서 삼지구

엽초(*Epimedium koreanum* Nakai)는 매자나무과에 속하 는 다년생초본식물로서 이 식물의 지상부를 약용으로 사 용하는데 한방에서 생약명은 음양곽이라 하며, 한의학에 서 강장, 거풍강정, 이뇨 및 신경성 강장제로 귀히 여겨 온 동양의약제이다(Shin & Lim, 1996).

최근 한방과 서양의학의 접목으로 한약재들의 효과와

† Corresponding author (Phone) : 043-261-2521, E-mail : heungbin@trut.chungbuk.ac.kr
Received 10 January 2001 / Accepted 8 March 2002

효능 검증에 관한 연구결과가 국내외적으로 증가 추세에 있는 가운데 음양곽에 대해서도 그 내용성분이 일부 밝혀지고 있다. 즉, 음양곽의 주요 성분은 prenylflavone glycoside이라는 보고도 있고(Sun et al., 1988), 지상부에서 icariin, icariside A, 2"-5-rhamnosyl icariside A, 2"-rhamnosyl icariside II, 4'-methoxy-5-hydroxy-8,3-dimethyl flavone과 동족배당체 수종이 분리된 바도 있다(Miyase et al., 1987). 이들 성분 중 prenyl flavonoid는 하복부의 혈관을 선택적으로 확장시켜주는 활성이 있는 것으로 알려지고 있다(Stevens et al., 2001). 또한 icariin은 음양곽의 주 약효성분으로 고혈압에 효과를 나타내는 성분으로 보고되고 있으며(Chun et al., 2000), 음양곽 추출물은 식균작용의 기능을 항진시키는 효과와 항산화 활성물질도 함유하고 있는 것으로 알려지고 있다(Chung et al., 1998 ; Lee et al., 2000).

음양곽의 이러한 효능에 근거하여 차 및 추출물을 강장제로 시판되고 있으며 많은 사람들이 애용하고 있다. 대부분의 생약재는 부작용이 없는 것이 주요 장점중의 하나로 이해되어 안전성 걱정없이 이용되고 있는 것이 현실이다. 지금까지의 음양곽의 민간요법 및 유효성분에 대한 연구, 세포배양조건에서 혹은 실험동물을 대상으로 단기간의 투여에 의한 효능연구는 보고되고 있지만 이유 후부터 자연사할 때까지 장기간에 걸쳐 이 추출물을 급여하고 생체에 미치는 영향을 조사한 연구는 없는 실정이다. 또한 음양곽 추출물 또한 하나의 이물질로써 간과 신장 등 이물질을 대사하는 기관에서는 부담이 될 수 있으며, 생체 내에서 어떻게 대사되며, 어떤 성분이 약리 효과를 나타내는지 밝혀진바 없다.

따라서 이 연구에서는 한방에서 강장제로 단방 혹은 복합으로 많이 사용되고 있는 음양곽의 물 추출물을 흰쥐에 이유 후부터 24개월까지 식수에 녹여 공급하면서 장기무게 등의 생리적인 변화와 특히 노화에 따른 간의 이물질 대사 효소들의 활성도에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

1. 시료조제

본 실험에 사용한 음양곽은 대전대학교 한의과대학 본 초학교실의 자문을 받아 구입하고, 음양곽 100g을 1 l의 열수로 2시간씩 2회 추출하고 추출액을 냉동건조하여 시료로 사용하였다.

2. 실험동물 및 사육조건

본 연구를 위하여 사용된 흰쥐는 Sprague-Dawley(SD)

계로 수컷만을 사용하였다. 흰쥐는 개체간의 차이를 최소화하기 위하여 이유 후(분만 후 21-23일) 체중이 50±3g인 상태가 양호한 개체만을 선별하여 대조군과 음양곽 투여군으로 나누었다. 흰쥐의 사육은 이유 후 30일까지는 한 cage에 5마리, 3개월까지는 2마리, 그 후부터 생존시까지 한 마리씩 넣어 사육하였으며 사료는 두 시험군 모두 충분한 양을 공급하였다. 동물사육실의 조건은 open barrier system으로 온도는 20±2 °C, 습도는 40-60 %, 환기는 1시간당 12-15회로 하였으며, 1일 중 12시간은 200-300 Lux로 조명하고, 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 실험동물의 사료는 삼양사(주) 제품의 고품사료(조단백질 22.1% 이상, 조지방 8.0% 이하, 조섬유 5.0% 이하, 조회분 8.0% 이하, 칼슘 0.6% 이상, 인 0.4% 이상 배합사료)를 사용하였다. 그리고 cage는 22x32x17 cm³의 polycarbonate 재질로 만든 것을 사용하였으며 깔집은 삼육실험 동물사(주) 제품의 버드나무로 만든 것을 사용하였다.

3. 음양곽 추출물의 투여방법

음양곽 투여군은 이유 후부터 24개월까지 흰쥐의 체중 변화와 음수량을 고려하여 음양곽 물 추출물이 0.025% (w/v)가 되도록 식수에 녹여 충분한 양을 공급하였으며 대조군은 음수만을 공급하였다. 노화에 따른 생리적인 변화 및 이물질대사효소들의 활성도 변화를 조사하기 위하여 대조군과 음양곽 투여군을 각각 24마리씩 사육되었다.

4. 장기무게 및 혈액성분의 변화 측정

흰쥐의 나이가 6개월, 12개월 및 24개월 되었을 때 각각 희생시키고, 뇌, 심장, 폐, 간, 부신, 비장, 신장, 정소, 뇌하수체 등 각종 장기를 적출하여 무게를 잰 후 -70 °C에 보관하면서 여러 가지 생체성분을 분석하였다.

또한 흰쥐의 나이가 6개월, 12개월 및 24개월 되었을 때 직접 심장채혈법으로 혈액을 포집하였다. 그리고 그 혈액을 원심분리(3,000 rpm, 10분)하여 혈청을 얻었으며 -70 °C에 보관하면서 실험에 사용하였다. 혈청에서 간 기능과 관련된 Glutamate-oxaloacetate transaminase (GOT)와 Glutamate-pyruvate transaminase(GPT)의 활성도는 kit시약(아산제약)을 사용하여 분광광도계로 측정하였다.

5. 간의 이물질대사효소들의 활성도 측정

흰쥐의 나이가 6개월, 12개월 및 24개월 되었을 때 희생시켜 간을 적출하고 즉시 액체질소에 넣었으며 Bansal 등의 방법(1983)에 따라 4배의 130 mM KCl을 함유한 30 mM HEPES 완충액(pH 7.4)으로 희석하여

균질화한 다음, differential centrifugation에 의해서 microsome과 cytosol 분획을 분리하였다. 마이크로솜과 세포질 분획을 분리하는 전 과정은 0-4 °C 저온실에서 수행하였으며 -70 °C에 보관하면서 각종 실험에 사용하였다.

간의 cytochrome P450과 b₅의 함량은 Omura와 Sato의 방법(1964)에 따라 측정하였으며, NADPH P450 reductase 활성도는 Wiliam과 Kamin의 방법(1962)에 준하여 microsome 분획에 의한 cytochrome c의 환원율을 이용하여 측정하였고, NADH cytochrome b₅의 활성도는 Mihara와 Sato의 방법(1975)에 따라 측정하였다. Ethoxycoumarin O-deethylase(ECDM)와 benzphetamine N-demethylase(BPDM)의 활성도는 각각 Greenlee와 Poland의 방법(1978) 및 Thomas등의 방법(1976)에 따라 측정하였다. Glutathione-S-transferase는 Habig등의 방법(1974)에 따라 1-chloro-2,4-dinitrobenzen을 기질로 하여 측정하였고, 단백질 함량은 표준물질로 bovine serum albumin을 사용하여 Lowry 등의 방법(1951)에 따라 측정하였다.

6. 통계처리

모든 데이터는 평균±SD로 나타내었으며, Student's t-test에 의해 p값이 0.05보다 작은 값을 나타내었을 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

1. 장기무게 변화 및 혈액성분의 변화

표 1은 대조군과 음양곽 투여군이 6개월, 12개월, 24개월 되었을 때 희생시키고 흰쥐의 체중 및 뇌, 심장, 간, 폐, 비장, 부신, 좌우 신장과 좌우 고환를 적출하여 무게의 변화를 관찰한 것이다. 노화에 따라 흰쥐의 체중의 변화는 12개월까지 두 그룹 모두 증가하였으나 24개월에서는 감소하였으며 음양곽 투여군은 대조군보다 더 낮게 유지하고 있었다. 한편 대조군과 음양곽 투여군에서 뇌, 심장, 비장과 신장은 노화에 따른 유의한 무게의 차이는 보이지 않았다. 그러나 간과 신장의 무게는 몸무게와 같은 경향으로 6개월에 비해 성숙기가 지난 12개월에서는 10-20% 무게가 증가하였으며 노년기인 24개월에서는 무게가 줄어드는 경향을 나타내었고, 같은 나이에서 음양곽 투여군은 대조군보다 무게가 상대적으로 높았다. 폐의 경우 대조군과 음양곽 투여군 모두 24개월에서는 폐렴이 관찰되었다.

대조군과 음양곽 투여군이 6개월, 12개월 및 24개월 되었을 때 혈청에서 GOT와 GPT의 활성도 변화를 측정

Table 1. Age-related changes in organs weight of rats

Organs	Groups	Age(months) ^{a)}		
		6	12	24
Body weight	Control	476±43	594±50	460±86
	EKN-extract	503±43	613±39	436±40
Brain	Control	2.01±0.08	2.23±0.11	2.26±0.12
	EKN-extract	2.00±0.08	2.21±0.12	2.28±0.14
Heart	Control	1.44±0.17	1.60±0.18	1.76±0.55
	EKN-extract	1.42±0.11	1.51±0.13	1.66±0.53
Liver	Control	15.9±0.8	17.3±2.2	12.0±1.0
	EKN-extract	16.3±1.5	18.1±1.7	14.1±1.2*
Lung	Control	2.13±0.18	2.42±0.32	-
	EKN-extract	2.05±0.14	2.57±0.43	-
Spleen	Control	0.78±0.08	0.78±0.11	0.66±0.21
	EKN-extract	0.87±0.07	0.82±0.12	0.70±0.23
Kidney (both)	Control	3.01±0.17	3.69±0.18	3.86±0.21
	EKN-extract	3.22±0.16	3.75±0.14	4.32±0.24*
Testis (both)	Control	3.48±0.09	3.96±0.11	3.54±0.30
	EKN-extract	3.70±0.10	4.11±0.13	3.18±0.21

a) : g
EKN : Epimedium koreanum Nakai. Male S.D. rats received drinking water with or without EKN water extract(0.025%, w/v). Pneumonia was observed in lungs at the age of 24 months. * : Significantly different from the control(P < 0.05). Values are expressed as mean±SD from 8 male S.D. rats

한 결과는 각각 표 2와 같다. 두 효소 모두 흰쥐가 6개월과 12개월 되었을 때 음양곽 투여군이 대조군에 비해 다소 활성도가 높은 경향이었으나 24개월에서는 유의하게 높은 활성도를 유지하고 있었다.

Table 2. Age-related change of GOT and GPT activities in serum of rats

	Groups	Age(months) ^{a)}		
		6	12	24
GOT	Control	47±4	45±7	66±13*
	EKN-extract	65±6	50±10	89±9*
GPT	Control	37±5	29±5	43±8
	EKN-extract	42±6	30±8	50±3

a : units/l.
GOT : Glutamate-oxaloacetate transaminase, GPT : Glutamate-pyruvate transaminase EKN : Epimedium koreanum Nakai. Male S.D. rtas received drinking water with or without EKN water extract(0.025%, w/v).
* : Significantly different from 6 month month old(P < 0.05). Values are expressed as mean±SD from 8 male S.D. rats

2. 간의 이물질 대사계에 미치는 영향

나이가 들어감에 따라 일반 사육조건하에서 대조군과 음양곽 투여군을 한 흰 쥐의 간 마이크로솜에서 cytochrome P450의 함량과 cytochrome P450 reductase의 활성도 변화는 각각 그림 1과 그림 2와 같다. 나이에 따른 cytochrome P450 함량의 변화는 대조군에서 6개월, 12개월 및 24개월되었을 때 간 마이크로솜 단백질 1 mg당 각각 0.90 ± 0.07 , 0.70 ± 0.11 과 0.54 ± 0.14 nmole이었으며, 음양곽 투여군에서는 각각 0.88 ± 0.09 , 0.79 ± 0.11 , 0.32 ± 0.14 nmole이었다. 즉 두 시험군 모두 나이가 들어감에 따라 간의 cytochrome P450 함량은 유의하게 감소되었으며($p < 0.05$), 특히 그 감소폭이 대

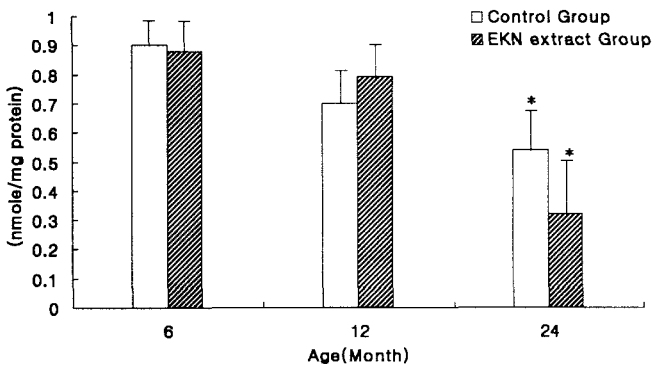


Fig. 1. Age-related change of cytochrome P450 content in liver microsomes of rats.

EKN : *Epimedium koreanum* Nakai. Male S.D. rats received drinking water with or without EKN water extract(0.025%, w/v). Values are expressed as mean \pm SD with 8 male S.D. rats. *: Significantly different from 6 months of rats($p < 0.01$)

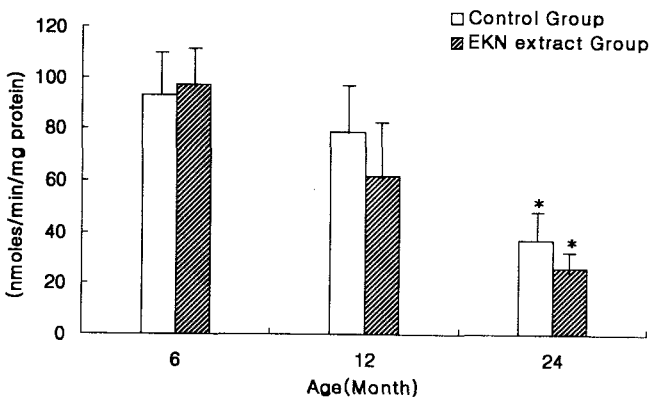


Fig. 2. Age-related change of NADPH-cytochrome P450 reductase activity in liver microsomes of rats

EKN : *Epimedium koreanum* Nakai. Male S.D. rats received drinking water with or without EKN water extracts(0.025%, w/v). Values are expressed as mean \pm SD with 8 male S.D. rats. *: Significantly different from 6 months of rats($p < 0.01$).

조군에 비해 음양곽 투여군이 매우 크게 나타났다. Cytochrome P450 reductase의 활성도도 cytochrome P450의 함량과 같이 대조군에서 6개월, 12개월 및 24개월에서 각각 93 ± 21 , 65 ± 18 과 37 ± 10 unit를 나타내었으며, 음양곽 투여군에서는 각각 97 ± 19 , 62 ± 19 와 26 ± 7 unit이었다. 음양곽 투여군은 나이가 들어감에 따라 활성도 감소폭이 증가되어 6개월에 비해 24개월에서는 73%의 감소로 큰 변화를 보였으나 대조군에서는 24개월에서 65%의 감소를 나타내었다.

표 3은 가령에 따라 대조군과 음양곽 투여군의 간 마이크로솜에서 benzphetamine N-demethylase(BPDM)과 Ethoxycoumarin O-deethylase (ECDE)의 활성도 변화를 나타낸 결과이다. 두 효소 모두 나이가 들어감에 따라 두 시험군 모두 감소하였으며, 6개월에서는 대조군이, 12개월에서는 음양곽 투여군이, 24개월에서는 대조군이 다소 높은 활성을 나타내는 경향을 보였으나 유의성은 나타나지 않았다.

Table 3. Age-related change of ethoxycoumarin O-deethylase and benzphetamine N-demethylase activities in liver microsomes of rats

Age (months)	Ethoxycoumarin O-deethylase		Benzphetamine N-demethylase	
	Control	EKN-extract	Control	EKN
6	3.21 ± 0.07	3.14 ± 0.09	7.76 ± 1.10	7.64 ± 1.12
12	3.02 ± 0.08	3.11 ± 0.09	7.08 ± 1.12	7.22 ± 1.14
24	$2.48 \pm 0.10^*$	$1.42 \pm 0.45^*$	$5.72 \pm 0.91^*$	$4.65 \pm 0.73^*$

a : nmoles/min/mg protein

EKN : *Epimedium koreanum* Nakai. Male S.D. rats received drinking water with or without EKN water extract(0.025%, w/v).

* : Significantly different from 6 months of rats($p < 0.01$)
Values are expressed as mean \pm SD with 8 male S.D. rats.

두 시험군의 흰쥐 간 마이크로솜에서 나이가 들어감에 따라 cytochrome b5의 함량과 NADH-cytochrome b5 reductase의 활성도 변화를 측정된 결과는 표 4와 같다. 표 3에서와 같이 간에서 cytochrome b5의 수준과 cytochrome b5 reductase의 활성도는 나이가 들어감에 따라 감소하는 경향을 나타내었으나 유의성은 없었으며, 같은 나이에서 두 그룹간의 유의성있는 차이를 보이지 않았다.

그림 3은 대조군과 음양곽 투여군의 간 세포질 분획에서 나이에 따른 glutathione-S- transferase(GST)의 활성도 변화를 측정된 결과이다. GST의 활성도는 대조군이 6개월, 12개월 및 24개월에서 각각 1005 ± 103 , $963 \pm$

Table 4. Age-related change of cytochrome b5 level and b5 reductase activity in liver microsomes of rats

Age (months)	Cytochrome b ₅ ^{a)}		Cytochrome b ₅ reductase ^{b)}	
	Control	EKN-extract	Control	EKN-extract
6	0.50±0.06	0.48±0.06	3.52±0.35	3.54±0.24
12	0.41±0.02	0.43±0.06	2.60±0.33	2.66±0.41
24	0.40±0.06	0.35±0.05*	2.67±0.22*	2.44±0.45*

a : nmoles/mg protein. b : umoles/min/mg protein
 EKN : Epimedium koreanum Nakai. Male S.D. rats received drinking water with or without EKN water extracts(0.025%, w/v).
 * : Significantly different from 6 months of rats(p < 0.01)
 Values are expressed as mean ± SD with 8 male S.D. rats.

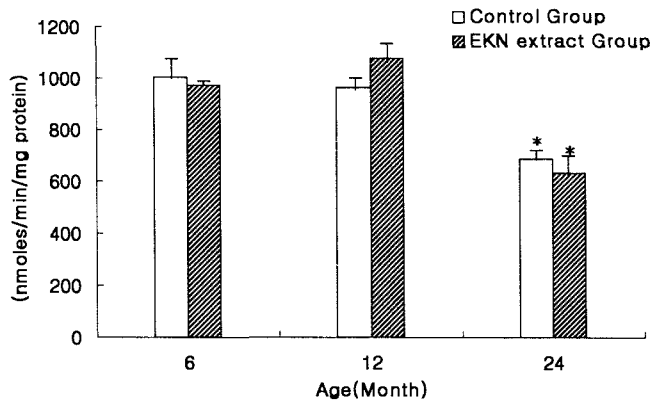


Fig. 3. Age-related change of glutathione-S-transferase activity in liver cytosol of rats

EKN : Epimedium koreanum Nakai. Male S.D. rats received drinking water with or without EKN water extract(0.025%, w/v). Values are expressed as mean ± SD with 8 male S.D. rats.
 * : Significantly different from 6 month old(p < 0.01)

72와 687±35 unit이었으며, 음양곽 투여군은 각각 974±52, 1079±98과 633±70이었다. 즉, 두 시험군 모두 노화에 따라 감소하였으며 특히 음양곽 투여군에서 12개월이 6개월보다 높은 활성도를 나타내었으나 유의성은 없었으며 24개월에서는 큰 폭의 감소를 보였다.

고 찰

흰쥐에 음양곽의 물 추출물을 공급하고, 노화에 따른 몇 가지 생리적인 변화와 간의 이물질대사 효소들의 활성에 미치는 영향을 조사하였다.

본 실험에서 음양곽의 물 추출물 투여로 인하여 흰쥐의 사료섭취, 성장과 발육상태는 같은 나이에서 대조군

과 유의한 차이를 보이지 않고 정상적이었으며, 두 시험군 모두 외관적으로 특이한 생리적 이상증상은 발견되지 않았다. 생체의 정상적인 발육과 성장에 대한 지표로서 나이에 따른 몸무게 및 장기무게의 변화를 들 수 있는데 몸무게의 변화에서 두 그룹 모두 성숙기에는 증가하다가 나이가 들어감에 따라 감소하였으며, 음양곽 투여군은 그 감소폭이 크게 나타났다. 또한 장기의 무게 변화에서도 다른 장기와는 달리 이물질 대사에 관여하는 간과 신장의 무게가 같은 나이에서 음양곽 투여군이 대조군보다 다소 높았다. 따라서 음양곽 열수 추출물이 이물질 대사에 관여하는 간과 신장에 영향을 미치고 있음을 알 수가 있었다.

GOT와 GPT는 여러장기에 분포하며 장기나 조직에 어떤 장애로 변화, 피사가 나타나면 세포내의 효소가 이탈하게 되고 그 일부가 혈중에 유입, 확산하여 혈액중의 활성치는 상승하는데 간세포에는 특히 GOT나 GPT가 고농도로 존재하기 때문에 간 기능 검사의 유용한 지표로 이용되고 있다. 혈청 GOT와 GPT는 두 그룹 모두 6개월에 비해 12개월에서는 약간 감소하였으나 24개월에서는 증가하였고, 특히 음양곽 투여군은 같은 나이에서 모두 대조군보다 높게 유지하였고, 24개월에서는 유의하게 그 활성이 높아 노년기까지 음양곽 투여는 간의 이상을 유발할 수 있다는 것을 알 수 있었다.

한약재의 추출물 투여로 인한 생리적인 변화와 더불어 중요한 것은 간의 이물질 대사효소들의 활성변화이다. 생체외에서 들어온 대부분의 이물질은 대부분 소화기관에서 흡수되어 간의 phase I과 phase II 효소군의 생화학적 반응을 통하여 대사가 이루어진다. Phase I 효소들은 이물질 성분의 체외 배설을 촉진하기 위하여 이들 성분을 산화, 환원과 가수분해 반응을 통하여 극성을 증가시키는 방향으로 진행하는데 phase I 대사산물은 대사전보다 독성이 증가할 수도 감소할 수도 있으며 또한 이들 대사성분이 생체에 생리적인 중요한 효과를 나타낼 수도 있다(Meyer, 1996). Phase II 효소들은 이물질 성분구조에서 독성을 나타내는 작용기에 아미노산, 펩타이드, 당, 이온과 같은 endogeneous substrates와 결합하게 하여 무독화시키고, 혈액과 뇨를 통해 쉽게 배설될 수 있게 하는 역할을 한다(van Bladeren, 2000). 음양곽 물 추출물에는 수많은 성분이 존재하기 때문에 이들을 흰쥐에 공급했을 때 간의 이물질 대사 효소들의 활성도는 달라질 수 있으며, 노화가 진행됨에 따라 그 활성도는 더욱더 달라질 수 있다.

간의 phase I 반응은 mixed-function oxidases(MFOs), alcohol과 aldehyde dehydrogenase, monoamine oxidase, nitro- 및 azo-reductase, esterase와 aminase등이 알려지

고 있다. 이 중에서 MFOs는 약물, 발암제, 살균제 및 환경오염물질과 같은 외부 이물질과 vitamine D, 지방산, 호르몬과 같은 생체내 물질도 대사하는데 물질분자에 분자산소로부터 산소원자를 삽입하는 역할을 하며 소포체 막에 존재하는 효소계이다. 이 효소계는 두 개의 전자수송계 즉 cytochrome P450/P450 reductase와 cytochrome b5/b5 reductase를 필요로 하며 이들 중 cytochrome P450은 MFOs에서 가장 중요한 역할을 한다 (Hollenberg, 1992).

특히 병원체가 없는 사육조건에서와 무균 사육실에서 사육한 설치류의 간 마이크로솜의 cytochrome P450 함량과 cytochrome P450 reductase의 활성도는 노화에 따라 증가된다는 보고(Bimbaum, 1980), 유지된다는 보고(Nakagima et al., 1992)와 감소한다는 보고(Plewka et al., 1998) 등 식이의 종류, 성, 실험동물 종에 따라 다른 결과가 도출되고 있다. 그러나 최근에 발표된 논문에서는 대부분 노화가 될수록 감소한다는 논문이 대세로 되고 있다(Takatori et al., 2000). 본 실험에서 conventional system에서 사육한 흰쥐에서는 그림 1과 2와 같이 대조군과 음양곽 투여군 모두 cytochrome P450 함량과 cytochrome P450 reductase의 활성도는 노화에 따라 감소하였으며, 음양곽 투여군에서 6개월에 비해 12개월에는 감소폭이 적었지만 24개월에서는 대조군에 비해 감소폭이 매우 크다는 것을 확인할 수 있었다.

Cytochrome P450은 약 40여종의 동위효소가 존재한다고 알려지고 있으며 각기 독특한 기질특이성을 가지고 있고 또 이들은 이물질이나 약물등과 같은 유도물질(Lin & Lu, 2001)이나 식이에 따라(Debersac et al., 2001) 영향을 받는다. 본 실험에서도 cytochrome P450에 높은 기질 특이성을 갖는 benzphetamine과 ethoxycoumarine의 산화활성을 조사하였다. 두 시험군 모두 나이가 들어감에 따라 cytochrome P450의 함량과 같이 그 활성도는 감소하였으며 음양곽 투여군에서 12개월에서는 대조군 보다 높은 활성을 유지하였으나 24개월에서는 더 낮은 활성을 나타낸다는 것을 알 수 있었다 따라서 이와 같은 결과는 흰쥐에서 phase I의 MFOs system의 기능이 노령화되면서 감소되는데 음양곽 추출물의 공급은 장년까지 단기간에서는 좋은 효과를 보일지 몰라도 장기간에서의 공급은 이들 기능은 감소시키는 원인이 된다는 것을 암시한다.

한편 만성적인 60% 제한식은 노화에 따라 감소하는 MFOs의 활성을 유지시킨다고 보고하고 있다(Lim et al., 1997). 그 이유로 절식은 간 마이크로솜에서 노화에 의해 증가되는 막의 지질과산화 과정을 억제하는 효과와 막의 지질 함량과 지방산의 조성을 변화를 조절하

고, 항산화 능력을 유지시키기 때문이라고 보고(Yu, 1996)하고 있는데 자체 생체방어능력이 유지되고있는 장년까지 음양곽 추출물의 투여는 효과가 있을지라도 그 이후 노년기에는 절식효과와 반대현상이 일어날 지 모른다. 이에 대한 정확한 원인을 찾기 위해서는 더 많은 연구가 필요하리라 사료된다.

간의 마이크로솜에서 cytochrome b₅/b₅ reductase 전자수송계의 기능은 특히 소포체에서 MFOs와 지질과산화 반응 뿐만 아니라 지방산의 불포화 반응에도 관련이 있기 때문에 막의 유동성과 노화를 유지하는데 매우 중요한 요소로 주목되고 있다(Schenkman & Jansson, 1999). 본 실험에서 cytochrome b₅의 함량과 cytochrome b₅ reductase는 나이에 따라 감소하였으나 같은 나이에서 음양곽 투여에 의해 유의성있는 차이를 보이지 않았고, 6개월에 비해 24개월에서의 감소폭이 cytochrome P450의 함량과 P450 reductase의 활성도에 비해 크지 않음을 알 수 있었다. 이와같은 결과로 보아 이들의 기능이 MFOs 계의 전자전이등의 역할보다는 지방산 불포화계에 더 관계가 있을 것으로 사료되며, 음양곽 물 추출물 투여로 인하여 이들 기능에 미치는 영향은 적은 것으로 사료된다.

Glutathione-S-transferase(GST)는 이물질대사의 phase II 효소중의 하나로서 생체내에서 산소중심의 라디칼 생성물이나 phase I 대사산물을 무독화시키기 위해서 glutathion과 결합시키는 효소이다(Reid & Jahoon, 2001). 노화에 따른 GST 활성도 변화도 GST 기질, 조직, 성, 실험동물 종에 따라 유지(Fujita et al., 1985), 증가(Blanco et al., 1987), 감소(Stohs et al., 1982)등의 여러가지 보고되고 있으나 GST에 의한 1,2-dichloro-4-nitrobenzene의 conjugation은 간에서 노화에 따라 감소한다고 보고되고 있다(Yargicoglu et al., 2001). 본 실험에서도 두 시험군 모두 노화에 따라 GST의 활성도는 감소하였으며 특히 음양곽 투여군에서 12개월은 6개월에 비해 높은 경향이었으나 24개월에서는 급격한 감소를 보였다. Phase II 효소군의 기능도 음양곽 물 추출물 공급에 의해 노령기에서는 대조군보다 더 감소한다는 것을 의미한다.

따라서 이와 같은 결과들을 종합하면 특히 질환이 control되지 않는 open barrier에서 사육된 흰쥐에서 강장제로서 음양곽 물 추출물 단방으로 장기간의 복용은 오히려 노령기에서 간과 신장에 부담이 될지도 모른다는 암시해 준다. 특히 나이가 들어갈수록 간의 이물질 대사 효소기능이 감소하는데 단방의 음양곽의 복용은 장년까지 단기간에서는 좋은 효과를 보일지라도 장기간에서는 오히려 간의 중요한 이물질대사기능을 더욱더 감소시

키는 역할을 한다는 것을 암시해 준다.

적 요

예로부터 우리나라와 중국을 비롯한 동양에서는 음양곽을 강정제 및 정력강화제로 사용되어왔다. 본 연구는 흰쥐에게 장기간 음양곽 물 추출물을 공급하고(0.025%, w/v) 노화에 따른 생리적인 변화와 간의 이물질 대사 효소군의 활성도에 미치는 영향을 조사하였다.

흰쥐에 음양곽의 물 추출물 공급으로 특이한 질병은 발견되지 않았으나 24개월에서 간과 신장의 무게는 대조군에 비해 다소 증가하였으며 혈청의 glutamate-oxaloacetate transaminase와 glutamate-pyruvate transaminase 활성도도 증가하였다. 간의 이물질 대사효소 중 cytochrome P450, NADPH-cytochrome P450 reductase, benzphetamine N-demethylase, ethoxycoumarin O-deethylase, glutathione S-transferase의 활성도는 두 그룹 모두 노화에 따라 감소하였으며, 음양곽 물 추출물 투여에 의해 감소현상이 약화되었다. 간의 cytochrome B5의 함량과 NADH cytochrome b5 reductase의 활성도도 노화에 따라 감소되었으나 같은 나이에서 두 그룹간의 뚜렷한 차이를 보이지 않았다.

이상의 결과로 보아 흰쥐에 장기간 음양곽 물 추출물을 공급은 노년기에 노화에 따라 감소하는 간의 이물질 대사 기능에 부담을 수도 있다는 것을 암시해 준다.

LITERATURE CITED

Bansal, S.K., J. Love and H.L. Gurtoo(1983) : High pressure liquid chromatographic separation of multiple forms of cytochrome P-450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117, 268-274

Birnbaum, L.S.(1980) : Altered hepatic drug metabolism in senescent mice. *Exp. Gerontol.* 15, 259-267

Blanco, P., A. Machado and J. Satrustegui(1987) : Variations due to hypoxia and ageing in the activities of glutathione-S-transferase and NADPH-cytochrome C reductase. *Mech. Ageing Dev.* 39, 11-19.

Chun, H.J., Y.J. Mun, J.H. Kim, I.K. Kim and W.H. Woo(2000) : Effect of aqueous extract of *Epimedium Koreanum* Nakai on melanin formation of mouse melanoma cell line. *Yakhak Hoeji.* 44, 455-462

Chung, I.M., K.H. Kim and J.K. Ahn(1998) : Screening of Korean medicinal food plants with antioxidant activity. *Kor. J. Medicinal Crop. Sci.* 6, 311-322.

Debersac, P., M.F. Verneval, M.J. Amiot, M. Suschetet and M. H. Siess(2001) : Effects of a water-soluble extract of

rosemary and its purified component rosmarinic acid on xenobiotic-metabolizing enzymes in rat liver. *Food Chem. Toxicol.* 39, 109-117

Fujita, S., H. Katagawa, H. Ishizawa, T. Suzuki and K. Kitani (1985) Age-associated alterations in hepatic glutathione-S-transferase activities. *Biochem. Pharmacol.* 34, 3891-3894.

Greenlee, W.F. and A. Poland(1978) : An improved assay of 7-ethoxycoumarin O-deethylase activity. Induction of hepatic enzyme activity in C57BL/6J and DBA/2J mice by phenobarbital, 3-methylcholanthrene and 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 251, 1385-1391

Habig, W.H., M.J. Pabst and W.B. Jakoby(1974) : Glutathione-S-transferase. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.* 249, 7130-7139.

Hollenberg, P.F.(1992) : Mechanisms of cytochrome P450 and peroxidase-catalyzed xenobiotic metabolism. *FASAB J.* 6, 686-694

Lee, J.W., J.H. Do and S.K. Lee(2000) : Antioxidant activity of the aerial part of *Epimedium koreanum* Nakai. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 29, 732-736.

Lim, H.B., H.O. Sohn, Y.G. Lee and D.W. Lee(1997) : Effect of food restriction on age-related changes of liver microsomal cytochrome P450 system. *Kor. J. Gerontol.* 7, 29-3

Lin, J.H. and A.Y. Lu(2001) : Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin. Pharmacokinet.* 35, 361-390

Lowry, O.H., H.J., Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall(1951) : Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275

Meyer, U.A.(1996) : Overview of enzymes of drug metabolism. *Pharmacokinet. Biopharm.* 24, 449-459.

Mihara, K. and R. Sato(1975) : Partial purification of NADH-cytochrome b5 reductase from rabbit liver microsomes with detergents and its properties. *J. Biochem. Tokyo* 71, 725-735.

Miyase, T., A. Ueno, N. Takizawa, H. Kobayashi and H. Oguchi (1987) : Studies on the glycosides of *Epimedium grandiflorum* (II). *Chem. Pharm. Bull.* 35, 3713-3719.

Nakagima, T., R.S. Wang, Y. Katakura, R. Kishi, E. Elovora, S.S. Park, H.V. Gelboin and H. Vainio(1992) : Sex-, age- and pregnancy-induced changes in the metabolism of toluene and trichloroethylene in rat liver in relation to the regulation of cytochrome P450IIE1 and P450IIC11 content. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 261, 849-874.

Omura, T. and R. Sato(1964) : The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature. *J. Biol. Chem.* 239, 2370-2378

Plewka, A., M. Kaminski and D. Plewka(1998) : Ontogenesis of hepatocyte respiration processes in relation to rat liver cytochrome P450-dependent monooxygenase system. *Mech. Ageing.* 105, 197-207.

Reid, M. and F. Jahoon(2001) : Glutathione in disease. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 4, 65-71.

Schenkman, J.B, and I. Jansson(1999) : Interactions between cytochrome P450 and cytochrome b5. *Drug Metab. Rev.* 1999

- 31, 351-364
- Shin, K.H. and S.S. Lim**(1996) : Difference in components of *Epimedium koreanum* in compliance with seasons and places of collection. *Kor. J. Medicinal Crop. Sci.* 4, 321-328
- Stevens, J.F., A.W. Taylor, G.B. Nickerson, M. Ivancic, J. Henning, A. Haunold and M.L. Deinzer**(2000) : Phenylflavonoid variation in *Humulus lupulus* : distribution and taxonomic significance of xanthogalenol and 4'-O-methylxanthohumol. *Phytochem.* 53, 759-775
- Stohs, S.J., W.A. Al-Turk and C.R. Angel**(1982) Glutathione-S-transferase and glutathione reductase activities in hepatic and extra-hepatic tissues of female mice as a function of age. *Biochem. Pharmacol.* 31, 2113-2116.
- Sun, P.Y., Y. Wen, Y.P. Pei, Y.J. Chen, S. Noriko and T. Tadahiro**(1998) : The Chemical constituents of *Epimedium koreanum* Nakai. *Acta Pharmaceutica sinica.* 33, 922-925.
- Takatori, A., M. Akahori, S. Kawamura, S. Itagaki and Y. Yoshikawa**(2000) : Localization and age-related changes in cytochrome P450 expression in *APA hamster livers*. *Exp. Anim.* 49, 197-203
- Thomas, P.E., A.Y.H. Lu, D. Ryant, S.B. West, J. Kawarek and W. Levin**(1976) : Multiple forms of rat liver cytochrome P-450. Immunochemical evidence with antibody against cytochrome P-448. *J. Biol. Chem.* 251, 1385-1395
- Van Bladeren, P.J.**(2000) : Glutathione conjugation as a bioactivation reaction. *Chem. Biol. Interact.* 129, 61-76.
- Williams, C.H.Jr. and M. Kamin**(1962) : Microsomal triphosphopyridine nucleotide- cytochrome C reductase of liver. *J. Biol. Chem.* 237, 587-595.
- Yargicoglu, P., S. Gumusluoriob, A. Agar, D.K. Korgun and V. Kucukatay**(2001) : Effect of sulfur dioxide inhalation on erythrocyte antioxidant status, food intake, and lipid peroxidation during aging. *Arch. Environ. Health.* 56, 53-57.
- Yu, B.P.**(1996) : Aging and oxidative stress : modulation by dietary restriction. *Free Radic. Biol. Med.* 21, 651-668