

작약(*Paeonia Lactiflora* Pall.) 씨 추출물이 고콜레스테롤 식이 흰쥐 간조직의 항산화계와 지질과산화에 미치는 영향*

이정민 · 최상원 · 조성희 · 이순재[§]

대구가톨릭대학교 식품영양학과

Effect of Seeds Extract of *Paeonia Lactiflora* on Antioxidative System and Lipid Peroxidation of Liver in Rats Fed High-Cholesterol Diet*

Lee, Jeong-Min · Choi, Sang-Won · Cho, Sung-Hee · Rhee, Soon-Jae[§]

Department of Food Science and Nutrition, Catholic University of Daegu, Gyeongsan, 712-702, Korea

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the antioxidative effects of *Paeonia lactiflora* (PL) seeds on antioxidative defense system and lipid peroxidation of liver in rats fed high-cholesterol diet. Sprague-Dawley male rats weighing 100 ± 10 g were randomly assigned into five experimental groups fed 0.5% cholesterol : HC group which was not supplemented PL seeds extract, 0.1% methanol extract diet group (MP1 group), 0.2% methanol extract diet group (MP2 group), 0.05% ether-souble fraction diet group (EP1 group) and 0.1% ether-souble fraction diet group (EP2 group). Experimental diets were fed *ad libitum* to the rats for 3 weeks. The activity of hepatic superoxide dismutase (SOD) was not significantly different among all the high cholesterol diet groups. The hepatic glutathione peroxidase (GSHpx) activity in MP2 group was increased to 27% compared to HC group. The activity of hepatic catalase (CAT) was not significantly different among the all high cholesterol diet groups. The hepatic glutathione S-transferase (GST) activity in the EP1 and EP2 groups were increased to 12% and 13%, respectively, as compared to HC group. The levels of hepatic TBARS in the MP1, MP2, EP1 and EP2 groups were reduced by 18%, 21%, 20% and 23%, respectively, as compared with HC group. The contents of lipofuscin in liver was not significantly different among all the experimental groups. The results indicated that PL seeds extract may be reduced oxidative damage by activating antioxidative defense system of hepatic in rats fed high-cholesterol diets. (*Korean J Nutrition* 36(8): 793~800, 2003)

KEY WORDS : *paeonia lactiflora* pall seed extract, high cholesterol diet, antioxidative system, lipid peroxidation.

서 론

최근 고지혈증, 동맥경화증, 뇌혈관질환, 심장병과 같은 심혈관계 질환이 한국인 사망요인의 1순위가 되었다.^{1,2)} 이러한 심혈관계질환의 위험인자로는 고콜레스테롤혈증, 흡연 및 고혈압 등이 중요한 위험인자로 알려져 있으며, 이와 연루되는 식이인자로는 식이지방내의 불포화지방산과 포화지방산의 비율,³⁾ 식이 콜레스테롤⁴⁾ 및 식이 지방⁵⁾ 등을 들 수 있다. Mantha 등⁶⁾과 Del Boccio 등⁷⁾의 연구에서

고지방식사와 콜레스테롤 식이의 공급으로 인한 조직과 혈청 중 지질과산화물 함량의 증가를 보고하여 과량의 식이지방이나 콜레스테롤 섭취가 체내 조직의 산화적 손상을 초래함을 규명하였다.

고콜레스테롤 상태에서 산화적 스트레스가 촉진된다는 여러 보고⁸⁻¹⁰⁾에서 다양한 항산화 방어기전의 활성변화를 관찰하였다. Jeon 등¹¹⁾도 고콜레스테롤 상태에서는 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSHpx), catalase (CAT)와 같은 항산화효소의 양은 감소되고 지질과산화물 함량은 증가되나 항산화제에 의해 개선되는 것을 입증하였다. 고콜레스테롤 상태에서 산화적 스트레스를 방어하기에는 항산화 효소의 양과 활성이 불충분하고 항산화 방어계의 불균형 또한 중요한 병인으로 작용하며 특히 심혈관계질환 유발과 관련이 있다고 보고^{10,12)}되고 있다.

생체내 자유라디칼의 제거계인 항산화 방어계 (antioxi-

접수일 : 2003년 6월 19일

채택일 : 2003년 8월 28일

*This research was supported by the grants from the Catholic University of Daegu(2001).

§ To whom correspondence should be addressed.

dative defense system)는 정상적인 생리상태에서는 생성 계와 균형을 이루고 있다. 그러나 내인적 혹은 외인적인 산화적 스트레스의 증가로 체내에서 자유라디칼이 과다 생산되거나 혹은 항산화계의 활성이 감소되어 불균형상태가 되면 조직에 산화적 손상을 주게된다. 그러므로 조직을 과산화로부터 방어하기 위해서는 생체의 항산화 방어계를 강화시켜야 한다. 최근에는 식용으로 쓰이는 식물을 비롯하여 생약제에 이르기까지 여러 분야에서 항산화 기능을 비롯한 생리활성 탐색에 대한 연구가 이루어 지고 있다.

작약은 미나리아재비과 (Ranunculaceae) 작약속 (Paeonia)에 속하는 다년생 초본으로 뿌리는 비대하며 원주 및 원추상으로 길이 7~20 cm 내외이고 줄기는 곧게 서고 60 cm 안팎의 높이를 갖는다.¹³⁾ 작약은 국내에서는 생약체계의 원료로서 널리 이용되고 있으며 더덕, 당귀, 도라지, 두충, 황기와 더불어 6대 주요 약용작물에 속한다.

작약씨는 진한 갈색을 띠고 있으며, 독특한 쓴맛과 향기를 지니고 있는 것으로 현재 종자 번식용으로만 이용되고 있으며, 생약으로 활용되지 않고 거의 미활용상태로 폐기되고 있으며 대량 생산은 가능하나 현재 작약뿌리 생산을 위해 작약꽃을 제거함으로써 작약씨의 생산이 낮으며 작약씨의 생리활성이 뛰어난에도 불구하고 작약씨추출물의 생체내 효능에 대한 연구가 미비한 실정이다.

지금까지 작약의 생리활성에 대한 연구로는 주로 *in vitro*에서 항산화물질 탐색 결과 작약의 항산화 활성이 우수한 것으로 보고¹⁴⁻¹⁶⁾되었고, 또한 작약 약침의 항산화 효능에 대한 보고^{17,18)}가 있다. 그 외 작약뿌리의 생리활성물질의 분리 및 그들의 생리적·약리적 작용에 관한 연구보고는 상당히 많은 반면, 작약씨에 관한 연구는 거의 없는 실정이다.^{19,20)} 작약씨에 대한 연구로는 *in vitro*에서 작약씨로부터 분리된 resveratrol, 그 배당체 및 oligomers 성분에서 높은 항암,²¹⁾ 항산화²²⁾ 및 tyrosinase와 lipoxigenase의 저해²³⁾작용을 보고한 바 있으나 생체내 항산화 효능에 관한 연구는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 작약씨의 항산화 효과를 규명하기 위하여 고콜레스테롤 식이 흰쥐에 작약씨 메탄올 조추출물과 에테르 가용성 분획물을 농도에 따라 공급했을 경우, 간 조직의 자유라디칼 생성계와 제거계 및 지질과산화에 미치는 영향을 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 작약씨의 채취

본 실험에 사용한 작약씨는 경북 의성군 소재 약초시험

장의 약초원에서 재배한 적작약 (*Paeonia lactiflora* Pall.) 씨로 2000년 8월 중순에 채취하여 음건한 후 100 mesh 크기로 마쇄하여 공시재료로 사용하였다.

2. 조추출물 및 에테르 가용성 분획물의 조제

건조 작약씨 300 g을 분쇄한 후 여기에 메탄올 2 l를 가하여 상온에서 24시간 추출한 후 여과지 (Whatman No.2, England)로 여과하였다. 위의 추출조작을 3회 반복 실시하여 얻은 메탄올 추출액을 rotary evaporator (Büchi, Sweden)로 40°C이하에서 감압·농축하여 메탄올 조추출물 37.5 g을 얻었다. 이 조추출물을 80% 메탄올 수용액 1 l에 현탁시킨 후 여기에 n-hexane 500 ml를 가하여 2회 반복 탈지한 후 얻어진 하층을 감압·농축하였다. 이 농축물 25.5 g은 10% 수용성메탄올로 다시 녹인 후 에테르 1 l로 2회 반복 분획하여 상층의 에테르 가용성 분획물 7.88 g을 얻었다.

3. 실험동물 및 사육

실험동물은 체중 100 ± 10 g 내외의 Sprague-Dawley 중 수컷을 바이오 제노믹스 (Bio Genomics, INC., Seoul, Korea)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 환경에 적응시키기 위해 일반 배합사료 (Purina Co., Seoul, Korea)로 일주일간 예비사육한 후, 난괴법 (randomized complete block design)에 의해 Table 1과 같이 0.5% 고콜레스테롤 식이에 작약씨 메탄올 조추출물과 에테르 가용성 분획물의 공급수준에 따라 작약씨추출물을 공급하지 않은 고콜레스테롤 대조군 (HC group), 0.1% 메탄올 조추출물을 공급한군 (MP1 group), 0.2% 메탄올 조추출물을 공급한군 (MP2 group), 0.05% 에테르 가용성 분획물을 공급한군 (EP1 group), 0.1% 에테르 가용성 분획물을 공급한군 (EP2 group)군으로 나누어 각각 8마리씩 5군으로 나누어 3주간 사육하였다. 식이와 식수는 자유공급 시켰다. 모든 군의 식이는 1주일에 한번씩 제조하여 4°C에 냉장보관하면서 신선한 식이를 매일 공급하였다. 또한 사육기간동안 동물실 온도는 20~23°C, 상대습도는 55~60%로, 그리고 7:00~19:00까지 dark-light cycle을 유지하였다.

4. 장기채취

실험 종료 후 실험 동물을 가벼운 ether 마취하고 간장은 생리 식염수로 씻어내고 무게를 측정 후 액체 질소로 급속 동결시켜 -80°C에 보관하였다.

5. 분석 시료의 전 처리

간장을 각 간엽에서 고르게 일정량을 취하여 Potter-Elvehjem homogenizer를 사용하여 0.25 M sucrose/0.5

mM ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA)/5 mM N-2-hydroxyethyl-piperazine-N-2-ethane sulfonic acid (HEPES) 용액으로써 10% (w/v) 마쇄액을 만들었다. 마쇄액의 일부를 8,000 × g에서 20 분간 원심분리하여 그 상층액을 과산화지질 정량에 사용하였고, 나머지는 10,000 × g에서 30분간 원심분리하여 그 상층액 중 일정량을 취해 0.4배량의 ethanol : chloroform 냉혼합액 (5 : 3)을 가하고 2분간 진탕한 다음 10,000 × g에서 30분간 원심분리하여 얻은 상층액을 세포질 superoxide dismutase (SOD) 원액으로 사용하였다. 또 10,000 × g 상층액의 일부는 다시 105,000 × g에서 30분간 원심분리하여 얻은 상층액 (cytosol)은 xanthine oxidase (XOD), glutathione peroxidase (GSHpx), glutathione S-transferase (GST) 등의 활성도를 측정하였다. 모든 실험 조건은 4℃를 유지하면서 행하였다.

CAT 활성 측정을 위해서는 상기 효소분석용 시료와 같은 방법으로 마쇄하여 10,000 × g에서 30분간 원심분리하여 얻은 미토콘드리아 분획을 다시 10,000 × g에서 30

분간 원심분리시켜 침전물을 취하고 0.25 M sucrose 용액에 현탁시킨 다음 10,000 × g에서 20분간 재원심분리하여 얻은 침전물에 소량의 0.25 M sucrose 용액에 재현탁시켜 CAT 활성 측정에 사용하였다.

6. Xanthine oxidase (XOD) 활성 측정

간조직의 XOD 활성도 측정은 xanthine을 기질로 하여 30℃에서 10분간 반응시켜 생성된 uric acid를 파장 292 nm에서 흡광도를 측정하는 Stirpe와 Della Corte의 방법²⁴⁾을 이용하였다. 활성도 단위는 간조직의 단백질 1 mg이 1 분 동안 반응하여 기질로부터 생성된 uric acid량을 nmol 농도로 표시하였다.

7. Superoxide dismutase (SOD), Glutathione peroxidase (GSHpx), Catalase (CAT), Glutathione S-transferase (GST) 활성 측정

SOD 활성은 알칼리 상태에서 pyrogallol의 자동산화에 의한 발색을 이용한 Marklund와 Marklund의 방법²⁵⁾에 따라 측정하였으며, GSHpx 활성은 산화형 glutathione (GSSG)

Table 1. Composition of experimental diets

Ingredients	Groups				
	HC	MP1	MP2	EP1	EP2
Corn starch ¹⁾	480	479.9	479.8	479.95	479.9
Casein ²⁾	150	150	150	150	150
Sucrose ³⁾	150	150	150	150	150
Lard ⁴⁾	40	40	40	40	40
Soy oil ⁵⁾	75	75	75	75	75
Salt mix ⁶⁾	40	40	40	40	40
Vitamin mix ⁷⁾	10	10	10	10	10
Cholesterol ⁸⁾	5	5	5	5	5
Cellulose ⁹⁾	50	50	50	50	50
Methanol ext. ¹⁰⁾	-	0.1	0.2	-	-
Ether-soluble fr. ¹¹⁾	-	-	-	0.05	0.1
Total (g)	1000	1000	1000	1000	1000

1) Sam Yang Co., Seoul, Korea
 2) Lactic Casein, 30 mesh, New Zealand Dairy Board, Wellington, N. Z.
 3) Sam Yang Co., Seoul, Korea
 4) Cheiljedang Co., Seoul, Korea
 5) Cheiljedang Co., Seoul, Korea
 6) Mineral mix, AIN-76 (g/kg mixture): Calcium Phosphate, dibasic (CaHPO₄ · 2H₂O) 500, Sodium chloride (NaCl) 74, Potassium citrate, monohydrate (K₃C₆H₅O₇ · H₂O) 220, Potassium sulfate (K₂SO₄) 52, Magnesium oxide (MgO) 24, Manganous carbonate (45 - 48% Mn) 3.5, Ferric citrate (16 - 17% Fe) 6, Zinc carbonate (70% ZnO) 1.6, Cupric carbonate (53 - 55% Cu) 0.3, Potassium iodate (KIO₃) 0.01, Sodium selenite (Na₂SeO₃ · 5H₂O) 0.01, Chromium potassium sulfate [CrK (SO₄)₂ · 12H₂O] 0.55, filled up to 1,000 with sucrose, Harlan TEKLAD Co.
 7) Vitamin mix, AIN-76A (g/kg mixture): p-Aminobenzoic Acid 11.0132, Ascorbic Acid, coated (97.5%) 101.6604, Biotin 0.0441, Vitamin B₁₂ (0.1% trituration in mannitol) 2.9736, Calcium Pantothenate 5.6079, Choline Dihydrogen Citrate 349.6916, Folic Acid 0.1982, Inositol 11.0132, Menadione 4.9559, Niacin 9.9119, Pyridoxine HCl 2.2026, Riboflavin 2.2026, Thiamin HCl 2.2026, Dry Vitamin A Palmitate (500,000 U/g) 3.9648, Dry Vitamin D₃ (500,000 U/g) 0.4405, Dry Vitamin E Acetate (500 U/g) 24.2291, Corn Starch, Harlan TEKLAD Co.
 8) Sigma Chem. Co. CMC (Sodium carboxyl methyl cellulose, non-nutritive fiber), St. Louis, Missouri, U.S.A
 9) Harlan TEKLAD Co., Madison, Wisconsin, USA
 10) Methanol extract of PL seeds
 11) Ether-soluble fraction of PL seeds

이 glutathione reductase와 NADPH에 의해 환원될 때 340 nm에서 NADPH의 흡광도가 감소하는 것을 이용한 Lawrence 및 Burk의 방법²⁶⁾에 따라 측정하였고, CAT 활성은 240 nm에서 5분간 H₂O₂의 흡광도 변화를 이용하여 H₂O₂의 몰흡광계수로 H₂O₂의 농도를 구하는 Aebi 등²⁷⁾의 방법으로 측정하였다. 그리고 GST 활성도 측정은 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DCNB)와 환원형 glutathione (GSH)을 기질로 하여 25°C에서 20분간 반응하는 동안에 생성된 GSH-DCNB conjugate의 분자 흡광계수 ($E^{mM}/_{340nm} = 9.6 \text{ nM}^{-1} \text{ Cm}^{-1}$)를 이용하여 효소활성을 산출하는 Habig 등²⁸⁾의 방법에 의하여 측정하였고, 이 효소활성의 단위는 1분간 1 mg의 단백질이 반응하여 생성한 conjugated DCNB를 nmol로 나타내었다.

8. Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) 정량

간조직의 과산화지질 정량은 thiobarbituric acid (TBA)와 반응하여 생성되는 malondialdehyde를 측정하는 Satho 법²⁹⁾을 이용하였다.

9. Lipofuscin 정량

생체내에서 말론디알데히드 (malondialdehyde : MDA)와 단백질 성분이 결합하여 생성되는 것으로 알려진 소모성 노화색소인 리포푸신 (lipofuscin)의 측정은 Fletcher 등³⁰⁾의 방법에 따라 측정하였다.

Lipofuscin ($\mu\text{g}/\text{mg protein}$) =

$$\frac{\text{Sample 형광도}}{\text{Standard 형광도}} \times \text{표준용액 농도} (\mu\text{g}/\text{ml})$$

10. 단백질 정량

각 시료의 단백질량은 표준품으로 bovine serum albumin을 사용하였고 각 효소의 단백질 정량은 Lowry 등³¹⁾의 방법을 이용하여 정량하였다.

11. 통계처리

모든 실험 결과에 대한 통계처리는 각 실험군별로 평균차

이가 있는가를 검증하기 위하여 분산분석 (ANOVA 검증)을 수행하였으며, 분산분석의 결과 유의성이 발견된 경우 군간의 유의도는 Tukey's-HSD test³²⁾에 의해 분석하였다.

결 과

1. 체중증가량 및 간장의 무게

실험기간동안의 체중증가량은 모두 HC군에 비해 모든 작약씨 추출물 공급군에서 다소 낮은 경향이었으나 유의적인 차이는 없었다. 간장의 무게와 단위 체중당 간장의 무게는 (Table 2) 모두 HC군에 비해 모든 작약씨추출물 공급군에서 다소 낮은 경향이었으나 유의적인 차이는 없었으며 에테르 가용성 분획물 0.1% 공급군인 EP2군에서는 유의적 ($p < 0.05$)으로 감소하였다.

2. Xanthine oxidase (XOD) 활성

Xanthine을 기질로 하여 요산을 생성하는 과정에서 superoxide radical을 생성하는 효소로 알려진 XOD의 활성을 간조직에서 관찰한 결과는 Fig. 1과 같다. HC군 (3.41 ± 0.21)에 비해 MP1군 (3.12 ± 0.54)과 EP1군 ($2.86 \pm$

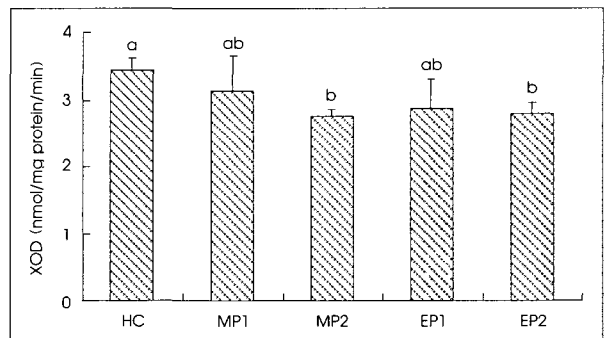


Fig. 1. Effects of methanol extract and ether-soluble fraction from seeds of *Paeonia Lactiflora* Pall. (PL) seeds on hepatic xanthine oxidase (XOD) activities in rats fed high cholesterol diets. All values are mean \pm SE (n = 8). Values within a column with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's test. The experimental conditions are the same as Table 1.

Table 2. Effects of methanol extract and ether-soluble fraction from seeds of *Paeonia Lactiflora* Pall. (PL) seeds on liver weight and liver index in rats fed high cholesterol diets

Groups	Body weight gains (g/3 wks)	Liver weight (g)	Liver index (g/100 g body wt)
HC	170 \pm 37.7 ^{ab}	14.53 \pm 2.63 ^a	4.83 \pm 0.40 ^a
MP1	162 \pm 25.6	12.06 \pm 1.92 ^{ab}	4.34 \pm 0.35 ^{ab}
MP2	168 \pm 27.9	13.61 \pm 1.90 ^a	4.62 \pm 0.48 ^{ab}
EP1	163 \pm 42.8	12.36 \pm 2.60 ^{ab}	4.28 \pm 0.45 ^{ab}
EP2	148 \pm 24.7	9.70 \pm 1.13 ^b	3.60 \pm 0.31 ^b

All values are mean \pm SE (n = 8)

Values within a column with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's test

The experimental conditions are the same as Table 1

Table 3. Effects of methanol extract and ether-soluble fraction from seeds of *Paeonia Lactiflora* Pall. (PL) seeds on hepatic superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSHpx) and catalase (CAT) activities in rats fed high cholesterol diets

Groups	SOD (unit/min/mg protein)	GSHpx (nmol NADPH/min/mg protein)	CAT (nmol/min/mg protein)
HC	4.86 ± 0.5 ^{NS}	112.4 ± 9.4 ^b	9.03 ± 1.2 ^{NS}
MP1	5.06 ± 0.4	120.5 ± 15.2 ^{ab}	9.62 ± 1.1
MP2	5.06 ± 0.3	142.6 ± 18.0 ^a	9.72 ± 1.6
EP1	5.07 ± 0.3	126.0 ± 14.7 ^{ab}	9.93 ± 1.3
EP2	5.08 ± 0.2	132.9 ± 13.1 ^{ab}	10.35 ± 1.5

All values are mean ± SE (n = 8)

NS: Not significant

Values within a column with different superscripts are significantly different at p < 0.05 by Tukey's test.

The experimental conditions are the same as Table 1

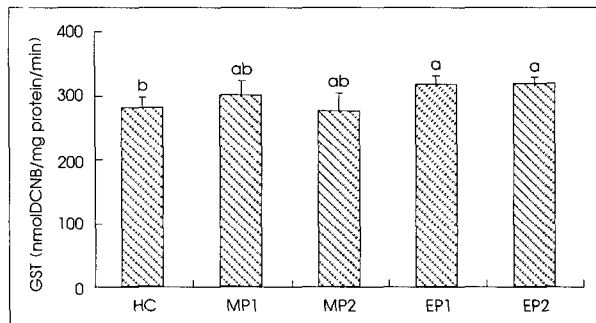


Fig. 2. Effects of methanol extract and ether-soluble fraction from seeds of *Paeonia Lactiflora* Pall. (PL) seeds on hepatic glutathione S-transferase (GST) activities in rats fed high cholesterol diets. All values are mean ± SE (n = 8). Values within a column with different superscripts are significantly different at p < 0.05 by Tukey's test. The experimental conditions are the same as Table 1.

0.44)에서는 유의적인 차이가 없었으나 MP2군 (2.73 ± 0.13)과 EP2군 (2.78 ± 0.19)이 각각 20%, 18%씩 감소되었다.

3. Superoxide dismutase (SOD) 활성, glutathione peroxidase (GSHpx) 활성 및 catalase (CAT) 활성

생체내 항산화 방어기구 중 효소적 방어계의 하나로서 superoxide radical를 H₂O₂로 환원시키므로써 산소독으로부터 생체를 보호하는 SOD 활성을 관찰한 결과는 Table 3과 같다. HC군과 작약씨추출물 공급군간의 유의적인 차이가 없었다. Selenium을 함유하는 항산화 효소로 비타민 E와 함께 과산화물을 제거함으로써 세포막의 손실을 방어하는 GSHpx의 활성을 간조직에서 측정된 결과 (Table 3) HC군에 비해 MP2군에서 27% 증가되었고 MP1, EP1, EP2군은 다소 증가 되었으나 유의적인 차이가 없었다.

과산화수소 및 유기 과산화물을 제거시킴으로써 과산화적 손상을 방지하는 간조직의 CAT 활성은 (Table 3) 실험군간의 유의적인 차이가 없었다.

Table 4. Effects of methanol extract and ether-soluble fraction from seeds of *Paeonia Lactiflora* Pall. (PL) seeds on hepatic thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) values and lipofuscin contents in rats fed high cholesterol diets

Groups	TBARS (MDA nmol/mg protein)	Lipofuscin (µg/mg protein)
HC	16.57 ± 0.7 ^a	3.74 ± 0.4 ^{NS}
MP1	13.59 ± 0.4 ^b	3.31 ± 0.3
MP2	13.09 ± 0.8 ^b	2.81 ± 0.5
EP1	13.32 ± 1.0 ^b	3.40 ± 0.7
EP2	12.79 ± 0.9 ^b	3.15 ± 0.3

All values are mean ± SE (n = 8)

NS: Not significant

Values within a column with different superscripts are significantly different at p < 0.05 by Tukey's test

The experimental conditions are the same as Table 1

4. Glutathione S-transferase (GST) 활성

변이원성물질, 발암물질, 독성물질의 대사산물, 그리고 내인성 독소들 중에서 친전자성 물질 등에 환원형 glutathione (GSH)을 포함시켜 glutathione thioester (R-S-G)을 형성하는 반응을 촉매하는 GST 활성을 간조직에서 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. HC군 (283.86 ± 12.0)에 비해 작약씨 메탄올 조추출물 공급군인 MP1군 (301.39 ± 24.1), MP2군 (278.47 ± 46.8)에서는 유의적인 차이가 없었으나 작약씨 에테르 가용성 분획물 공급군인 EP1군 (319.39 ± 11.6)과 EP2군 (319.54 ± 6.6)에서 두군 모두 약 13%씩 증가되었다.

5. 간조직의 과산화지질 (TBARS) 및 lipofuscin 함량

조직의 산화적 손상, 노화 및 기타 퇴행성 질환 유발의 요인이 되는 과산화지질 함량을 간조직에서 관찰한 결과는 Table 4와 같다. HC군에 비해 MP1, MP2, EP1 및 EP2군은 각각 18%, 21%, 20%, 23%씩 작약추출물 모든군에서 감소되었다. 생체 노화의 중요한 지표로 사용되고 있는 리포푸신의 생성에 미치는 효과를 관찰한 결과 (Table 4)는 HC군에 비해 MP1, MP2, EP1 및 EP2군은 각각 11%, 25%,

9% 및 16%로 감소되었으나 유의적인 수준은 아니었다.

고 찰

본 연구는 작약씨추출물의 생체내 항산화효과를 규명하기 위하여 고콜레스테롤 식이 흰쥐 간조직의 항산화 방어체와 지질과산화에 미치는 영향을 관찰하였다.

본 실험기간동안의 체중증가량은 모두 HC군에 비해 모든 작약씨 추출물 공급군에서 다소 낮은 경향이었으나 유의적인 차이는 없었다. 간장의 무게와 단위 체중당 간장의 무게는 HC군에 비해 모든 작약씨추출물 공급군에서 유의적인 차이는 없었으나 에테르 가용성 분획물 0.1% 공급군인 EP2군에서는 유의적 ($p < 0.05$)으로 감소하였다. 이는 Kim²¹⁾에 의해 보고된 바와 같이 작약씨추출물 중에는 resveratrol과 그 유도체가 다량 함유되어 있고 메탄올 조추출물에 resveratrol과 그 유도체 외에도 다른 물질들이 많이 함유되어 있는 반면 에테르 가용성 분획물에는 resveratrol과 그 유도체가 대부분 차지하고있으므로 이들이 간조직 지질대사에 관여한 결과로 볼 수 있다. Kolla 등³³⁾의 연구에서도 와인에 다량 함유된 resveratrol이 고콜레스테롤 혈증 쥐의 간에서 total cholesterol과 HDL-cholesterol의 수치를 감소시켰다는 결과에서와 같이 resveratrol이 간조직 지질대사 개선 효과가 있다고 볼 수 있다.

생체내 유리기 생성계의 하나인 XOD는 purine, pyrimidine, aldehyde류 및 heterocyclic compound 등의 대사에 관여하는 비특이적 효소로서 생체내에는 주로 purine체의 대사산물인 hypoxanthine을 xanthine으로, xanthine을 다시 산화시켜 요산을 생성하는 반응의 촉매로 작용한다.³⁴⁾ 본 실험에서 XOD 활성을 측정된 결과 HC군에 비해 MP2군과 EP2군에서 유의적으로 감소되었다. 이것은 와인에서 분리한 resveratrol 성분이 XOD 활성을 저하시켰다는 Orallo 등³⁵⁾의 보고에서와 같이 작약씨추출물중의 resveratrol과 그 유도체 성분에 의한 것으로 사료된다.

SOD는 superoxide radical을 환원시켜 H₂O₂로 전환시키며 이때 생성된 H₂O₂ 등은 GSHpx, catalase 등의 작용에 의해 H₂O로 무독화됨으로서 산소독으로부터 생체를 보호하게 되는 것이다. 본 실험 결과 간조직의 SOD 활성은 HC군과 작약씨 추출물 공급군간에 유의적인 차이를 보이지 않았다.

GSHpx는 생체내에서 H₂O₂와 환원형 glutathione (GSH)으로부터 산화형 glutathione (GSSG)과 H₂O를 생성하는 반응과 기타 과산화물 (ROOH)로부터 alcohol (ROH) 및 H₂O를 생성하는 반응을 촉매한다.³⁶⁾ 본 실험에서 간조직에서의 GSHpx 활성은 HC군에 비해 0.2% 메탄올 조추출물

군인 MP2군에서 유의적으로 증가되었다. 이것은 Moon¹⁸⁾의 연구에서 작약 약침액이 tert-butyl hydroperoxide로 유도된 흰쥐 간조직에서 GSHpx 활성이 유의적으로 증가하는 보고와 일치한다.

Catalase는 조직 세포 속에 존재하여 대사 산물인 H₂O₂를 순간적으로 산화시켜 H₂O와 O₂로 분해함으로써 생체를 산소독으로부터 보호한다. 본 실험에서 간조직에서의 catalase 활성은 HC군과 작약씨추출물 공급군간에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 이것은 Lim 등¹⁷⁾의 연구에서 작약 약침 acetaminophen의 대량투여로 유도된 급성 간 손상 마우스의 catalase 활성이 유의적인 차이를 보이지 않는 것과 일치했다.

GST는 변이성 물질, 발암성 물질, 독성물질 등의 대사산물, 그리고 내인성 독소들 중에서 친전자성 물질 등에 환원형 glutathione을 포함시켜 glutathione thioester (R-S-G)를 형성하는 반응을 촉매하는 효소이다.³⁷⁾ 본 실험에서 GST 활성은 HC군에 비해 작약씨 에테르 가용성분획물 공급군인 EP1군과 EP2군에서 유의적으로 증가되었다. 이는 Uysal M 등³⁸⁾의 연구에서 고콜레스테롤 상태에서는 GST의 활성이 정상상태보다 감소 된다는 것과 일치하며 본 실험에 사용된 작약씨 에테르 추출물에 항산화적 해독 기능이 있음을 알 수 있었다.

지질과산화 반응은 여러 가지 독성 화합물이나 약물 또는 질병에 의한 병태 생리학적 현상이나 조직의 손상 정도를 나타내는 가장 중요한 기전으로 인정되고 있는데, 이는 조직내 세포의 산화적 스트레스의 증가와 생체내 항산화 방어력의 감소로 야기된다.³⁹⁾ 본 실험 결과 과산화물 (TBARS) 함량은 HC군에 비해 모든 작약씨추출물 공급군에서 유의적으로 감소되었다. 이러한 지질과산화물 수준의 감소는 작약씨 추출물 공급에 따른 간조직의 XOD 활성의 감소와 항산화계 효소활성의 증가에 따른 결과로 볼 수 있다.

노화의 정도를 평가하고 조직세포에 독성작용으로 성인병을 유발하고 노화를 촉진하는 자유기로 인해 생성되는 소모성 노화 색소인 리포푸신의 생성은 모든 실험군간의 유의적인 차이가 없었다.

이상과 같이 고콜레스테롤 식이 흰쥐에서 작약씨 추출물의 공급은 간조직의 자유기 생성계를 억제시키고 체계적인 항산화 방어 효소의 활성을 증가시키고 지질과산화물 축적을 감소시킴을 알 수 있다.

따라서 본 연구에서 작약씨추출물은 고콜레스테롤 식이 흰쥐의 간조직에서의 항산화 강화작용과 산화적 손상 완화작용이 뚜렷함이 관찰되었으며 앞으로 더 구체적이고 작용기전적인 측면의 많은 연구를 추구할 필요가 있다고 사료된다.

요약 및 결론

본 연구는 작약 (*Paeonia lactiflora* Pall.) 씨 추출물의 생체내 항산화작용을 규명하기 위하여 고콜레스테롤 식이 흰쥐 간조직에서의 항산화 방어계와 지질과산화에 미치는 작약씨 메탄올추출물 및 에테르 분획물의 효과를 조사하였다.

실험동물은 100 ± 10 g의 Sprague-Dawley 숫컷 흰쥐를 이용하여 0.5% 고콜레스테롤 식이에 작약씨 메탄올 조추출물과 에테르 가용성 분획물의 공급수준에 따라 추출물을 공급하지 않은 고콜레스테롤 대조군 (HC group), 0.1% 메탄올 조추출물을 공급한군 (MP1 group), 0.2% 메탄올 조추출물을 공급한군 (MP2 group), 0.05% 에테르 가용성 분획물을 공급한군 (EP1 group), 및 0.1% 에테르 가용성 분획물을 공급한군 (EP2 group) 등 5군으로 나누어 각 군 모두 8마리씩 하였다. 식이와 식수는 자유공급 시켰으며 3주간 사육한 후 희생시켰다. 실험기간동안의 체중증가량은 모두 HC군에 비해 모든 작약씨추출물 공급군에서 다소 낮은 경향이었으나 유의적인 차이는 없었다. 간조직의 무게와 단위체중당 간조직의 무게는 HC군에 비해 EP2군에서 유의적 ($p < 0.05$)으로 낮았다. 간조직의 XOD 활성은 HC군에 비해 MP2군과 EP2군이 각각 20%, 18%로 유의적 ($p < 0.05$)으로 감소하였다. 간조직의 SOD 활성과 catalase 활성은 고콜레스테롤군 (HC군)과 작약씨 추출물 공급군간의 유의적인 차이가 없었다. 간조직의 GSHpx 활성은 HC군에 비해 MP2군에서 27% 증가되었다. 간조직의 GST 활성은 HC군에 비해 작약씨 메탄올 조추출물 공급군에서는 유의적인 차이가 없었으나 에테르 가용성 분획물 공급군인 EP1, EP2군에서 유의적 ($p < 0.05$)으로 증가되었다. 간조직의 지질과산화물가는 HC군에 비해 MP1, MP2, EP1 및 EP2군은 각각 18%, 21%, 20% 및 23%씩 감소되었다. 간조직의 lipofuscin 함량은 HC군과 작약씨 추출물 공급군간의 유의적인 차이가 없었다.

이러한 결과로부터 작약씨 추출물은 고콜레스테롤 식이 흰쥐 간조직의 항산화계를 강화시켜 조직의 산화적 손상을 감소시키는 항산화 효과가 있음이 규명되었다.

Literature cited

- 1) Moon SJ. Nutritional problems in korea. *Kor J Nut* 29(4) : 371-380, 1996
- 2) Lee HG. Nutritional problems in korean: Pattern of disease incidence and nutrition in korea. *Kor J Nut* 29(4) : 381-384, 1996

- 3) Shepherd J, Packard CJ, Grundy SM, Yeshumin P, Gotto AM, Taunton OD. Effect of saturated and polyunsaturated fat diet in the chemical composition and metabolism of low density lipoprotein in man. *J Lipid Res* 21(1) : 91-99, 1980
- 4) Sacks FM. The role of high-density lipoprotein (HDL) cholesterol in the prevention and treatment of coronary heart disease: expert group recommendations. *Am J Cardiol* 90(2) : 139-143, 2002
- 5) Hegsted DM, McGandy RB, Myers ML, Stare FJ. Quantitative effects of dietary fat on serum cholesterol in man. *Am J Clin Nutr* 17(5) : 281-286, 1965
- 6) Mantha SV, Kalra J, Prasad K. Effects of probucol on hypercholesterolemia-induced changes in antioxidant enzymes. *Life Sci* 58(6) : 503-509, 1996
- 7) Del Boccio G, Lapenna D, Porreca E, Pennelli A, Savini F, Feliciani P, Ricci G, Cuccurullo F. Aortic antioxidant defence mechanisms: time-related changes in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 81(2) : 127-135, 1990
- 8) Balkan J, Kanbagli O, Hatipoglu A, Kucuk M, Cevikbas U, Aykac-Toker G, Uysal M. Improving effect of dietary taurine supplementation on the oxidative stress and lipid levels in the plasma, liver and aorta of rabbits fed on a high-cholesterol diet. *Biosci Biotechnol Biochem* 66(8) : 1755-1758, 2002
- 9) Naito M, Wu X, Nomura H, Kodama M, Kato Y, Kato Y, Osawa T. The protective effects of tetrahydrocurcumin on oxidative stress in cholesterol-fed rabbits. *J Atheroscler Thromb* 9(5) : 243-250, 2002
- 10) Yokozawa T, Nakagawa T, Kitani K. Antioxidative activity of green tea polyphenol in cholesterol-fed rats. *J Agric Food Chem* 50(12) : 3549-3552, 2002
- 11) Jeon SM, Bok SH, Jang MK, Lee MK, Nam KT, Park YB, Rhee SJ, Choi MS. Antioxidative activity of naringin and lovastatin in high cholesterol-fed rabbits. *Life Sci* 69(24) : 2855-2866, 2001
- 12) Bok SH, Park SY, Park YB, Lee MK, Jeon SM, Jeong TS, Choi MS. Quercetin dihydrate and gallate supplements lower plasma and hepatic lipids and change activities of hepatic antioxidant enzymes in high cholesterol-fed rats. *Int J Vitam Nutr Res* 72(3) : 161-169, 2002
- 13) Kang BS. Bonchohak, pp.581-583, sulimsa. Seoul, 1992
- 14) Song JC, Park NK, Hur HS, Bang MH, Beak NI. Examination and isolation of natural antioxidants from korean medicinal plants. *Korean J Medicinal Crop Sci* 8(2) : 94-101, 2000
- 15) Rim YS, Park YM, Park MS, Kim KY, Kim MJ, Choi YH. Screening of antioxidants and antimicrobial activity in native plants. *Korean J Medicinal Crop Sci* 8(4) : 342-350, 2000
- 16) Bang MH, Song JC, Lee SY, Park NK, Beak NI. Isolation and structure determination of antioxidants from the root of *paeonia lactiflora*. *J Kor Agric Chem Soc* 42(2) : 170-175, 1999
- 17) Lim CS, Kim KS. Antioxidant effects of *Paeoniae Radix* aqua-acupuncture. *The Journal of Korea Acupuncture on Moxibustion Society* 16(3) : 269-286, 1999
- 18) Moon JY. Effects of *Paeoniae Radix* aqua-acupuncture solution on tert-butyl hydroperoxide induced lipid peroxidation and antioxidative enzymes in cultured rat liver cells. *The Journal of Korea Acupuncture on Moxibustion Society* 17(3) : 176-187, 2000
- 19) Kang SS, Kim JS, Kim EM, Yun HS. Platelet anti-aggregation of

- Paeony root. *Kor J Pharmacogn* 22(4) : 215-218, 1991
- 20) Goto H, Shimada Y, Akechi Y, Kohta K, Hattori M, Terasawa K. Endothelium-dependent vasodilator effect of extract prepared from the roots of *Paeonia lactiflora* on isolated rat aorta. *Planta Med* 62(5) : 436-439, 1996
 - 21) Kim HJ, Chang EJ, Bae SJ, Shim SM, Park HD, Rhee CH, Park JH, Choi SW. Cytotoxic and antimutagenic stilbenes from seeds of *Paeonia lactiflora*. *Arch Pharm Res* 25(3) : 293-299, 2002
 - 22) Kim HJ, Chang EJ, Cho SH, Chung SK, Park HD, Choi SW. Antioxidative activity of resveratrol and its derivatives isolated from seeds of *Paeonia lactiflora*. *Biosci Biotechnol Biochem* 66(9) : 1990-1993, 2002
 - 23) Kim HJ, Ha SC, Choi SW. Inhibition of tyrosinase and lipoxygenase activities by resveratrol and its derivatives from seeds of *Paeonia lactiflora*. *Nutraceuticals & Food* 7(4) : 447-450, 2002
 - 24) Stirpe F, Della Corte E. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J Bio Chem* 244(14) : 3855-3863, 1969
 - 25) Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47(3) : 467-474, 1974
 - 26) Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 71(4) : 952-958, 1976
 - 27) Aebi H, Wyss SR, Scherz B, Skvaril F. Heterogeneity of erythrocyte catalase II. Isolation and characterization of normal and variant erythrocyte catalase and their subunits. *Eur J Biochem* 48(1) : 137-145, 1974
 - 28) Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249(22) : 7130-7139, 1974
 - 29) Satho K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acta* 90(1) : 37-43, 1978
 - 30) Fletcher BL, Dillard CJ, Tappel AL. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues. *Anal Biochem* 52(1) : 1-9, 1973
 - 31) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193 : 265-275, 1951
 - 32) Sreel RGD, Torrie JH. Principles and procedures of statistics. *McGraw Hill*, New York, USA, 1990
 - 33) Kollar P, Kotolova H, Necas J, Karpisek M, Bartosikova L, Karesova P. Experimental study of resveratrol and flavonoids in red wine with regard to their possible hypolipemic effects. *Vnitr Lek* 46(12) : 856-860, 2000
 - 34) Duke EJ, Joyce P, Ryan JP. Characterization of alternative molecular forms of xanthine oxidase in the mouse. *Biochem J* 131(2) : 187-190, 1973
 - 35) Orallo F, Alvarez E, Camina M, Leiro JM, Gomez E, Fernandez P. The possible implication of trans-Resveratrol in the cardioprotective effects of long-term moderate wine consumption. *Mol Pharmacol* 61(2) : 294-302, 2002
 - 36) Bompart GJ, Prevot DS, Bascands JL. Rapid automated analysis of glutathione reductase, peroxidase and S-transferase activity: application to cisplatin-induced toxicity. *Clin Biochem* 23(6) : 501-504, 1990
 - 37) Jacoby WB. The glutathione S-transferases: a group of multifunctional detoxification proteins. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 46 : 383-414, 1978
 - 38) Uysal M, Kutalp G, Seckin S. The effect of cholesterol feeding on lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in the liver of rats. *Int J Vitam Nutr Res* 58(3) : 339-342, 1988
 - 39) Plaa GL, Witscri H. Chemicals, drugs and lipid peroxidation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 16 : 125-141, 1976