

간장 세포막의 유동성과 산화적 스트레스에 미치는 솔잎(Pine Needle) 에틸아세테이트획분의 영향

최진호* · 김대익 · 백승진 · 박시향 · 김남주 · 최민경^{1*} · 조원기² · 김창목³

부경대학교 생화학교실, *최민경요리아카데미,
조아제약(주), *한국산업정보기술연구원 생화학실

Effects of Pine Needle Ethyl Acetate Fraction on Membrane Fluidity and Oxidative Stress in Liver Membranes of Rats

Jin-Ho Choi*, Dae-Ik Kim, Seung-Jin Baek, Si-Hyang Park, Nam-Ju Kim,
Min-Gyung Choi¹, Weon-Ki Cho² and Chang-Mok Kim³

Lab. of Biochemistry, Pukyong National University,
*Choi Min-Gyung Academy, **Choa Pharmacy Co. Ltd., Seoul Korea
***Dept of Biochemistry, Korea Institute of Industry and Technology Information

Abstract

This study was designed to investigate the effects of ethyl acetate (EtOAc) fraction of pine (*Pinus densiflora* Sieb et Zucc) needle extract on membrane fluidity (MF), basal and induced oxygen radical (BOR and IOR), lipid peroxide (LPO) and oxidized protein (OP) as an oxidative stress, and lipofuscin (LF) in liver membranes of male Sprague-Dawley rats. Rats were fed basic diets (control) and experimental diets (EtOAc-25, EtOAc-50 and EtOAc-100) for 45 days. MFs were significantly increased (about 10%) in mitochondria of EtOAc-100 group compared with control group. BOR and IOR formations in mitochondria were significantly inhibited (about 12~18% and 9~12%, respectively) in EtOAc-50 and EtOAc-100 groups, while BOR and IOR formations in microsomes were significantly inhibited (about 9~13% and 18~19%, respectively) compared with control group. LPO levels were significantly inhibited (about 10% and 12~13%, respectively) in mitochondria of EtOAc-100 and microsomes of EtOAc-50 and EtOAc-100 groups, whereas OP levels were significantly inhibited (about 13~14%) in mitochondria of EtOAc-50 and EtOAc-100 groups compared with control group. LF formations were significantly inhibited (about 10~14%) in these three EtOAc groups. These results suggest that ethyl acetate fraction of pine needle may play an effective role in attenuating an oxidative stress and increasing a membrane fluidity.

Key words – Pine (*Pinus densiflora* Sieb et Zucc), Lipid peroxide (LPO), Oxidized protein, Carbonyl group, Membrane fluidity (MF), Lipofuscin (LF)

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 051-620-6332, Fax : 051-628-6343
E-mail : jhchoi@pknu.ac.kr

서 론

소나무(*Pinus densiflora* Sieb et Zucc.)는 상록성 침엽수로서 우리나라를 비롯하여 중국, 일본 등 극동지방에 널리 자생하고 있다. 옛날부터 송향(松香)은 《신농본초경(神農本草經)》의上品에 송지(松脂)로서 수재되어 있고, “...풍(風)을 치료하고, 오장을 안정시키며 열을 내리게 한다. 오래 복용하면 몸이 가볍고, 늙지 않으며, 수명(天年)을 연장한다”는 기록이 있다. 특히 솔잎은 《학포헌집(學圃軒集)》의 葉救荒說에 의하면 “솔잎은 위장에 위해가 없고 배고픔을 잊게 하며 음식을 절제하고 수명을 연장한다”고 하였고, 《동의보감(東醫寶鑑)》에는 “風濕瘡을 主治하고 毛髮을 나게하며 오장을 편히 하여 수명을 연장한다”고 기록되어 있다[23]. 최근의 생리·생화학적 연구로서는 솔잎 추출물의 혈청 및 간장의 지질함량과 효소활성 연구[15-16], 솔잎 첨가식이의 세포독성 및 지질대사 연구[17-18] 등이 있다. 최근 솔잎 추출물의 항암효과까지 연구되고 있으며[19]. 최근 솔잎 추출물의 생리활성연구로서 혈청중의 지질 및 산소라디칼 대사에 관한 연구[10], 뇌세포막의 산소라디칼 및 제거효소에 관한 연구[11], 및 뇌세포막의 유동성 및 신경전달관련효소에 관한 연구[12]를 수행한 적이 있다.

본 연구는 저자 등의 산화적 스트레스 관련 연구[6-9]에 이어 솔잎관련연구로서 솔잎을 80% 메탄올로써 80℃에서 추출하여 감압·농축한 솔잎 추출물을 용매분획법에 따라 분획한 ethyl acetate(EtOAc) 획분을 동결·건조하여 농도별로 사료에 첨가·조제한 사료로써 SD계 랫트에 45일동안 투여하여 간장조직의 세포막 유동성 및 산화적 스트레스에 미치는 영향을 평가하여 유의적인 결과를 얻었기에 보고한다.

재료 및 방법

실험 동물모델

Sprague Dawley계 랫트(male : 160 ± 10 g)를 한국화학연구소에서 구입하여 본 실험에 사용하였다. 사육 및 실험 조건은 매일 18 : 00에 사료와 물을 공급한다. 동물사육실은 자동조절($22 \pm 2^\circ\text{C}$; $65 \pm 2\%$ RH)되고, 명암도 12시간 사이클(18 : 00~06 : 00)로 조절된다.

실험용 사료조성

실험에 사용한 기본사료(control)의 조성은 탄수화물 58.0%

(corn starch 45.0%+sucrose 13.0%), 단백질 18.0%(sodium-free casein), 지질 15.0%(lard)로 하였고, 비타민 및 무기질 혼합물 각각 1.0% 및 3.5% 첨가하고, 셀룰로오스(3.0%), DL-methionine(0.3%), choline chloride(0.2%)를 첨가하고, 여기에 고콜레스테롤 혈증을 유도하기 위하여 cholesterol 0.8% 및 sodium cholate 0.2%를 첨가·혼합하여 조제하였다. 그리고 실험그룹은 솔잎의 EtOAc획분을 25, 50, 100 mg/kg BW가 섭취될 수 있도록 기본사료에 첨가·조제하는 대신 그 첨가량 만큼 탄수화물에서 제외하고 실험용 사료를 조제하여 SD계 랫트에 45일동안 투여하여 실험에 사용하였다.

솔잎의 EtOAc획분의 분획

실험에 사용할 솔잎 추출물은 봄에 소나무(*Pinus densiflora* Sieb et Zucc.)의 솔잎을 지난 해 3월 부경대 식품생명공학부에서 음근하여 파쇄한 다음(8.5 kg), 80% methanol로써 추출·농축한 솔잎 추출물(2.1 kg)을 용매분획법에 따라 EtOAc획분 200 g을 얻어 동결·건조하여 사용하였다.

간장조직의 분획

간장조직의 분획은 Choi와 Yu의 방법[1]에 따라 HEPES 완충용액(10 mM HEPES, 10 mM KCl, 280 mM sucrose, pH 7.4)을 사용하여 mitochondria 및 microsome획분으로 분획하여 사용하였다. 이들 획분의 단백질의 함량은 Lowry 등의 방법[22]에 따라 측정하였다.

세포막 유동성의 측정

간장의 mitochondria 및 microsome획분중의 세포막 유동성(membrane fluidity : MF)은 형광 probe로서의 1,6-diphenyl-1,3,5-hexatriene(DPH)을 사용한 Heron 등의 방법[14]에 의한 형광분광법으로 측정하였다. 50 mM 인산완충용액(pH 7.2, 2,750 μl), 증류수(250 μl), 시료(100 μl)를 첨가·혼합하여 37℃ 항온 수조에서 5분간 방치한 후, 프로브인 0.167 mM TMA-DPH[1-(4-trimethylammoniumphenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene, p-toluene-sulfonate] 용액을 6.67 μl 를 첨가·혼합하여 37℃ 항온 수조에서 진탕하면서 30분간 반응시킨 후 37℃을 유지하면서 형광광도계(Luminescence Spectrophotometer, Aminco-Bowman, U.S.A.)를 이용하여 360 nm (excitation)와 430 nm (emission)에서 측정하였다.

기초 및 유도산소라디칼의 정량

간장획분 중에 있어서 산화적 스트레스(oxidative stress)의 유무를 확인하기 위해서 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)를 프로브로 이용한 뇌세포의 mitochondria와 microsome획분의 기초활성산소(basal oxygen radical : BOR)의 생성량의 측정은 Lebel 등의 방법[20]에 따라 측정하였다. BOR의 측정은 기저상태와 라디칼 생성을 유도하기 위해 ascorbic acid와 FeSO₄·7H₂O로 자극한 유도상태의 두 가지 조건에서 비교 측정하였다. 기저상태와 라디칼 유도의 경우 모두 시료 500 μl를 완충용액(40 mM Tris-HCl buffer pH 7.4)으로 10배 희석하고, probe인 5 μM DCF-DA (Molecular probe, USA) 12 μl를 첨가, 10,000 rpm 8분간 원심분리한다. 잔사를 40 mM Tris-HCl 3.0 ml에 녹인 후 라디칼 유도상태의 경우에는 1 mM ascorbic acid (300 μl)와 100 μM FeSO₄·7H₂O(150 μl)를 혼합하였고 기저상태의 경우는 아무것도 첨가하지 않았다.

이후 37°C에서 30분간 반응시킨 후 37°C 유지하면서 형광 강도의 변화를 형광광도계를 이용하여 488 nm (excitation)와 525 nm(emission)에서 측정하였다. 이 때 분광형광도의 변화를 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)을 표준품으로 해서 표준검량선에 의하여 생성된 DCF의 양(nmol/mg protein/min)으로 환산하고, 이 양으로써 기초산소라디칼(basal oxygen radical : BOR) 및 유도산소라디칼(induced oxygen radical : IOR)의 산소라디칼 생성량으로 정량하였다.

산화적 스트레스의 분석

1) 과산화지질의 정량

간장획분중의 과산화지질(lipid peroxide : LPO)의 함량은 Choi와 Yu의 방법[2]에 따라 분광광도계를 사용하여 TBA법으로 말론디알데히드(malondialdehyde : MDA)의 함량으로 정량하였다.

2) 산화단백질의 정량

간장획분으로서 mitochondria와 microsome의 산화된 단백질의 함량은 Levine 등의 방법[21]에 따라 carbonyl group의 생성량을 측정하였다. 시료 0.1 ml에 30% TCA (trichloro-acetic acid)를 0.5 ml 혼합, 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 제거한 뒤 잔사에 10 mM

DNP (dinitrophenyl hydrazine) 0.5 ml 첨가, 15분마다 혼합하며 1시간 동안 실온에 방치 후 3000 rpm에서 10분간 원심분리하였다.

상층액을 제거한 후 잔사에 ethanol/ethyl acetate (1:1, v/v) 3.0 ml를 첨가하여 실온에서 10분 방치하였다. 다시 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 잔사를 얻은 뒤, 6 M guanidine (20 mM potassium phosphate buffer, pH 2.3) 1.0 ml 첨가·혼합하여 37°C의 항온 수조에서 15분간 가온한 후, 3,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 얻었다. 이때 carbonyl group의 양은 360 nm와 370 nm사이에 있는 흡광도의 파장에서 분자흡광계수($E=22,000$)를 이용하여 계산하였다.

리포푸신 함량의 측정

노화색소로서 리포푸신(lipofuscin)의 측정은 Fletcher 등의 방법[13]에 따라 조직의 표면에 수분과 오물을 제거한 후 간장조직 0.2 g에 chloroform-methanol(2:1, v/v) 혼합용액 4.0 ml에 첨가 후 1분간 균질화시킨후 원심분리하여 chloroform층 2.0 ml를 분취하여 형광광도계를 사용, 345 nm(excitation)와 435 nm(emission)에서 표준용액 (quinine sulfate μg/ml of 0.1N H₂SO₄)을 대조군으로 형광도를 측정하여 리포푸신의 함량(μg/mg protein)을 정량하였다.

분석결과의 통계처리

본 연구의 모든 실험결과는 통계 처리하여 평균치와 표준편차를 계산하였으며, 각 실험군간의 유의성 검정은 Student's t-test[24]로 실시하였다.

결과 및 고찰

세포막 유동성의 평가

우리가 살아가는데 생체의 항상성만큼 매우 중요한 것은 없다. 세포막 유동성(MF)이 좋아야 항상성을 유지할 수 있고 체내 대사가 원만하게 진행될 수 있기 때문이다[3-4]. 그런 의미에서 세포막 유동성에 미치는 술잎의 EtOAc획분의 영향을 평가하여 보면 Table 1과 같다.

간장 microsomes에서는 EtOAc의 투여량에 따라 MF가 약간씩 증가할 뿐 유의성은 인정할 수 없었다. 간장 mit-

Table 1. Effects of pine needle ethyl acetate fractions on membrane fluidity in liver membranes of SD rats for 45 days

Fractions	% Polarization			
	Control	EtOAc-25	EtOAc-50	EtOAc-100
Mitochondria	6.80 ± 0.63 ^a	6.93 ± 0.56	7.26 ± 0.52	7.46 ± 0.60 [*]
	-	101.9% ^b	106.8%	109.7%
Microsomes	8.73 ± 0.57	8.75 ± 0.48	9.00 ± 0.46	9.25 ± 0.67
	-	100.2%	103.1%	106.0%

EtOAc-25, EtOAc-50 and EtOAc-100: Ethyl acetate fraction of 25, 50 and 100 mg/kg BW/day added to control diet; ^aMean ± SD with 7 rats per group; ^bPercent of control values; ^{*}p<0.05 compared with control group.

ochondria획분에서도 microsome획분과 마찬가지로 EtOAc의 용량의존적으로 MF가 약간씩 증가하고 있었지만, 유의성은 EtOAc-100투여그룹에서만 유의성이 인정될 뿐이었다. 이러한 사실은 솔잎의 EtOAc획분중에 MF를 효과적으로 증가할 수 있는 성분이 있을 것으로 기대할 수 있다. 사실 노화과정에 대한 연구중에 MF의 증가가 매우 좋은 것으로 평가한다는 사실도 이해할 수 있을 것이다. 저자 등 [4]도 뇌세포의 synaptosome획분의 MF를 측정하여 본 결과, 평균수명이 50%나 증가한 것으로 구명된 칼로리 제한에 의하여 MF가 유의적으로 증가되었다는 연구결과를 학회에 보고한 적이 있다.

기초 및 유도산소라디칼의 평가

활성산소(oxygen radicals)는 생체에 유해한 독성산소로서, 이것이 세포막의 지질성분이나 단백질 및 핵산을 공격

하여 여러 가지 질병을 유발하고 노화를 촉진하는 것으로 알려져 있다[3-4]. 따라서 SD계 랫트에 대한 솔잎 EtOAc획분의 투여에 의한 활성산소의 생성량을 평가하기 위하여 기본적인 조건 및 Fe²⁺-ascorbate로 유도한 활성산소를 각각 기초활성산소(BOR) 및 유도활성산소(IOR)로 구분하여 솔잎 EtOAc획분의 영향을 분석하여 본 결과는 Table 2와 같다. 간장조직에서 BOR의 생성량에 미치는 EtOAc획분의 영향을 비교하여 보면 EtOAc-25, EtOAc-50 및 EtOAc-100 투여그룹의 mitochondria획분에서 BOR의 생성은 4.80 ± 0.38, 4.60 ± 0.21 및 4.31 ± 0.38 nmol/mg protein/min로서 대조그룹(5.23 ± 0.47 nmol/mg protein : 100%) 대비 각각 8.2%, 12.0% 및 17.6%의 효과적인 증가효과로서 EtOAc-50 및 EtOAc-100 투여그룹에서 유의적인 BOR의 생성 억제효과가 인정되었을 뿐만 아니라 microsome획분에서도 BOR의 생성은 3.95 ± 0.12, 3.66 ± 0.18 및 3.52 ± 0.15 nmol/mg

Table 2. Effects of pine needle ethyl acetate fractions on basal and induced oxygen radicals in liver membranes of SD rats for 45 days

Groups	Oxygen radical formation (nmol/mg protein/min)			
	Mitochondria		Microsomes	
Basal oxygen radical(BOR)				
Control	5.23 ± 0.47 ^a	-	4.03 ± 0.32	-
EtOAc-25	4.80 ± 0.38	91.8% ^b	3.95 ± 0.12	98.0%
EtOAc-50	4.60 ± 0.21 [*]	88.0%	3.66 ± 0.18 [*]	90.8%
EtOAc-100	4.31 ± 0.38 ^{**}	82.4%	3.52 ± 0.15 [*]	87.3%
Induced oxygen radical(IOR)				
Control	23.85 ± 2.25 ^a	-	16.76 ± 0.80	-
EtOAc-25	22.28 ± 2.26	93.4% ^b	15.71 ± 0.45	93.7%
EtOAc-50	21.61 ± 2.80 [*]	90.6%	13.73 ± 0.46 ^{**}	81.9%
EtOAc-100	21.10 ± 1.90 [*]	88.5%	13.58 ± 0.80 ^{***}	81.0%

EtOAc-25, EtOAc-50 and EtOAc-100: Ethyl acetate fraction of 25, 50 and 100 mg/kg BW/day added to basic control diet; ^aMean ± SD with 7 rats per group; ^bPercent of control values; ^{*}p<0.05; ^{**}p<0.01; ^{***}p<0.001 compared with control group.

protein/min)으로서 대조그룹(4.03 ± 0.32 nmol/mg protein/min : 100%) 대비 각각 2.0%, 9.2% 및 12.7%의 효과적인 BOR의 생성 억제효과로 나타났지만, EtOAc-50 및 EtOAc-100 투여그룹에서만 유의성이 인정되었다.

마찬가지 방법으로 간장조직획분중의 IOR의 생성량에 미치는 영향을 평가하여 보면 EtOAc-50 및 EtOAc-100 투여그룹에서만 간장 mitochondria 및 microsome획분에서 IOR의 생성은 각각 9.4% 및 11.5%, 18.1% 및 19.0%의 유의적인 억제효과가 인정되었다. 이상의 결과에서 볼 때 기초 및 유도상태에서 EtOAc획분의 투여중에서 EtOAc-50 및 EtOAc-100 투여그룹에서 매우 효과적으로 활성산소의 생성을 억제할 수 있다는 사실이 입증되었다. 따라서 이들 활성산소의 공격에 의해 유도될 산화적 스트레스를 효과적으로 억제할 수 있을 것으로 기대된다.

산화적 스트레스의 평가

활성산소중에서 전체적으로 볼 때 전항에서 지적했듯이 BOR 및 IOR를 비롯하여 superoxide radical (O_2^-)나 hydroxyl radical ($\cdot OH$)의 공격목표는 조직세포중의 지질 성분의 공격에 의한 과산화지질(lipid peroxide : LPO)의 생성, 단백질 성분의 공격에 의한 산화단백질(oxidized protein : OP)의 생성 및 핵산의 공격에 돌연변이(mutation)의 생성 등을 들 수 있다. 따라서 이들 산화적 스트레스의 평가는 LPO는 말론디알데히드(MDA), 산화단백질은 카르보닐그룹($>C=O$ group)의 측정 및 핵산의 산화는 8-OHdG의 생성량을 측정하여 평가할 수 있다[5, 20-21].

1) 과산화지질의 생성 억제효과

세포막의 지질이 활성산소의 공격을 받아 산화될 때 생성되는 LPO는 강력한 세포독성 때문에 성인병(chronic degenerative diseases)과 노화의 지표물질로 알려져 있다

[25-26]. EtOAc획분의 투여에 의한 간장조직중의 LPO의 생성에 미치는 영향을 비교하여 보면 Table 3과 같다. 간장조직의 mitochondria획분에서 EtOAc-25, EtOAc-50, EtOAc-100투여그룹의 LPO의 생성량은 각각 3.18 ± 0.17 , 3.15 ± 0.12 , 3.00 ± 0.13 nmol/mg protein)으로서 대조그룹의 LPO의 생성량(3.31 ± 0.13 nmol/mg protein : 100%) 대비 각각 3.9%, 4.8%, 9.4%의 용량의존적인 LPO의 생성 억제효과가 나타났지만, 유의성은 EtOAc-100 투여그룹에서만 인정되었다.

또한 간장조직의 microsome획분에서 EtOAc-25, EtOAc-50, EtOAc-100투여그룹의 LPO의 생성량은 각각 2.38 ± 0.05 , 2.23 ± 0.05 , 2.21 ± 0.06 nmol/mg protein)으로서 대조그룹의 LPO의 생성량(2.52 ± 0.10 nmol/mg protein : 100%) 대비 각각 5.6%, 11.5%, 12.3%의 용량의존적인 LPO의 생성 억제효과가 나타났지만, EtOAc-50 및 EtOAc-100 투여그룹에서만 유의성이 인정되었다. 따라서 술잎의 EtOAc획분의 투여는 BOR 및 IOR에서 나타난 것과 마찬가지로 활성산소의 생성을 효과적으로 억제할 수 있을 뿐만 아니라 간장조직의 두 획분에서 다같이 세포독성으로 작용할 수 있는 LPO의 생성을 매우 효과적으로 억제할 수 있을 것으로 기대된다.

2) 산화단백질의 생성 억제효과

간장조직 세포의 단백질 성분이 활성산소의 공격을 받아 생성되는 카르보닐 그룹의 생성에 미치는 술잎 EtOAc획분의 투여효과를 평가하기 위하여 산화단백질(oxidized protein : OP)의 생성량을 분석하여 본 결과는 Table 4와 같다. 간장조직 획분중의 OP의 생성에 미치는 EtOAc획분의 투여에 따른 영향을 비교하여 보면 간장조직의 mitochondria획분에서 EtOAc-25, EtOAc-50, EtOAc-100투여그룹의 OP의 생성량은 각각 9.17 ± 0.71 , 8.72 ± 0.51 , 8.64 ± 0.27

Table 3. Effects of pine needle ethyl acetate fractions on lipid peroxide (LPO) of liver membranes of SD rats for 45 days

Fractions	Control	EtOAc-25	EtOAc-50	EtOAc-100
Mitochondria	3.31 ± 0.13^a	3.18 ± 0.17	3.15 ± 0.12	$3.00 \pm 0.13^*$
	-	96.1% ^b	95.2%	90.6%
Microsomes	2.52 ± 0.10	2.38 ± 0.05	$2.23 \pm 0.05^{**}$	$2.21 \pm 0.06^{**}$
	-	94.4%	88.5%	87.7%

EtOAc-25, EtOAc-50 and EtOAc-100: Ethyl acetate fraction of 25, 50 and 100 mg/kg BW/day added to basic control diet; ^aMean \pm SD(nmol/mg protein) with 7 rats per group; ^bPercent of control values; *p<0.05, **p<0.01 compared with control group.

Table 4. Effects of pine needle ethyl acetate fractions on oxidized protein (OP) levels in liver membranes of SD rats for 45 days

Fractions	Control	EtOAc-25	EtOAc-50	EtOAc-100
Mitochondria	10.02±0.67 ^a	9.17±0.71	8.72±0.51 [*]	8.64±0.27 ^{**}
	—	91.5% ^b	87.0%	86.2%
Microsomes	8.54±0.10	8.55±0.69	8.37±0.42	8.06±0.51
	—	100.1%	98.0%	94.4%

EtOAc-25, EtOAc-50 and EtOAc-100: Ethyl acetate fraction of 25, 50 and 100 mg/kg BW/day added to basic control diet; ^aMean±SD(ng/mg protein) with 7 rats per group; ^bPercent of control values; *p<0.05; **p<0.01; compared with control group.

ng/mg protein으로서 대조그룹의 OP의 생성량(10.02±0.67 ng/mg protein : 100%) 대비 각각 8.5%, 13.0%, 13.8%의 OP의 생성 억제효과로 나타났지만, 유의성은 EtOAc-50 및 EtOAc-100의 투여그룹에서만 인정되었다.

또한 간장조직의 microsome획분에서 EtOAc-25, EtOAc-50, EtOAc-100투여그룹의 OP의 생성량은 각각 8.55±0.69, 8.37±0.42, 8.06±0.51 ng/mg protein으로서 대조그룹의 OP의 생성량(8.54±0.10 ng/mg protein : 100%) 대비 약간의 OP의 생성 억제효과가 나타났지만, 어느 투여그룹에서도 유의성은 인정할 수 없었다. 이러한 사실은 EtOAc획분의 투여량과 관계가 있겠지만, EtOAc획분의 투여는 OP의 생성 억제효과에 간장조직의 획분에 따라 작용하는 경향이 매우 선택적일 것으로 판단된다.

리포푸신의 생성 억제효과

리포푸신(lipofuscin : LF)은 연령의 증가에 따라 얼굴 등 피부를 비롯하여 여러 가지 장기에 침착하는 노화색소로 알려져 있기 때문에 LF의 생성량은 바로 노화의 지표로 사용되고 있다. 간장조직중의 LF의 침착에 미치는 솔잎 EtOAc획분의 투여영향을 비교하여 보면 Table 5와 같다. 간장조직 파쇄액의 chloroform획분을 사용하여 LF의 생성에 미치는 EtOAc획분의 영향을 비교하여 보면 EtOAc-25, EtOAc-50, EtOAc-100 투여그룹의 LF의 생성량은 2.00±

0.02, 1.98±0.03, 1.90±0.03 µg/mg protein으로서 대조그룹(2.20±0.05 µg/mg protein : 100%) 대비 각각 9.1%, 10.0%, 13.6%의 유의적인 LF의 축적 억제효과가 인정되었다. 노화과정을 어느 정도 억제할 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

솔잎 EtOAc획분을 하루 25, 50, 100 mg/kg체중으로서 SD계 랫트에 45일동안 투여하여 간장획분의 세포막 유동성(membrane fluidity : MF), 기초 및 유도활성산소(BOR 및 IOR), 산화적 스트레스로서 과산화지질(lipid peroxide : LPO) 및 산화단백질(oxidized protein : OP), 그리고 리포푸신(lipofuscin : LF)의 축적에 미치는 영향을 평가하여 보았다. 솔잎 EtOAc획분의 투여에 의하여 간장의 mitochondria 및 microsome획분에서 어느 정도 MF가 증가하였지만, 유의성은 EtOAc-100 투여그룹의 mitochondria획분에서만 인정되었다. 기초 및 유도활성산소로서 BOR 및 IOR의 생성 억제효과는 간장의 두 획분의 EtOAc-50 및 EtOAc-100투여그룹에서 유의적인 활성산소의 생성 억제효과가 인정되었다. 산화적 스트레스에 미치는 영향에서는 mitochondria획분에서는 EtOAc-100투여그룹에서, 그리고 microsome획분에서는 EtOAc-50 및 EtOAc-100투여그룹에서 유의적인 LPO의 생성 억제효과가 인정되었고, mito-

Table 5. Effects of pine needle ethyl acetate fractions on lipofuscin (LF) levels in liver of SD rats for 45 days

Fractions	Control	EtOAc-25	EtOAc-50	EtOAc-100
CHCl ₃ layer	2.20±0.05 ^a	2.00±0.02 [*]	1.98±0.03 [*]	1.90±0.03 ^{**}
	—	90.9% ^b	90.0%	86.4%

EtOAc-25, EtOAc-50 and EtOAc-100: ethyl acetate fraction of 25, 50 and 100 mg/kg BW/day added to basic control diet; ^aMean±SD(µg/mg protein) with 7 rats per group; ^bPercent of control values; *p<0.05; **p<0.01 compared with control group.

chondria획분에서는 EtOAc-50 및 EtOAc-100투여그룹에서 유의적인 OP의 생성 억제효과가 인정되었지만, microsome획분에서는 아무런 유의성도 인정할 수 없었다. 그렇지만, 간장의 클로로포름층에서 측정된 LF의 축적은 EtOAc-25, EtOAc-50 및 EtOAc-100 투여그룹에서 다같이 유의적인 LF의 축적 억제효과가 인정되었다. 이상의 결과에서 평가하여 볼 때 술잎 EtOAc획분의 투여는 간장의 유동성을 촉진하고 산화적 스트레스를 효과적으로 억제할 수 있을 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

- Choi, J. H. and B. P. Yu. 1989. The effect of food restriction on kidney membrane structures of aging rats. *Age* **12**, 133-136.
- Choi, J. H. and B. P. Yu. 1990. Unsuitability of TBA test as a lipid peroxidation marker due to prostaglandin synthesis in the aging kidney. *Age* **13**, 61-64.
- Choi, J. H. and B. P. Yu. 1994. Studies on age-related physiological changes in brain of senescence accelerated mouse(SAM). *Kor. J. Gerontol.* **4(2)**, 61-70.
- Choi, J. H. and B. P. Yu. 1995. Brain synaptosomal aging : Free radicals and membrane fluidity. *Free Rad. Biol. & Med.* **18(2)**, 133-139.
- Choi, J. H., J. I. Kim, D. W. Kim, Y. S. Moon, H. Y. Chung and B. P. Yu. 1996. Analysis of lipid composition and hydroxyl radicals in brain membranes of senescence-accelerated mice. *Age* **19**, 1-5.
- Choi, J. H. and B. P. Yu. 1998a. The effects of dietary restriction on age-related changes in rat serum prostaglandins. *J. Nutr. Health & Aging* **2(3)**, 451-455.
- Choi, J. H. and B. P. Yu. 1998b. Dietary restriction as a modulator of age-related changes in rat kidney prostaglandin production. *J. Nutr. Health & Aging* **2(3)**, 456-460.
- Choi, J. H., D. W. Kim and B. P. Yu. 1998c. Modulation of age-related alterations of iron, ferritin, and lipid peroxidation in rat brain synaptosomes. *J. Nutr. Health & Aging* **2(3)**, 461-465.
- Choi, J. H. and B. P. Yu. 1999. The effects of dietary restriction on age-related changes in rat serum prostaglandins. *Age & Nutrition* **10(1)**, 47-51.
- Choi, J. H., D. W. Kim, J. H. Kim, K. S. Kim and J. S. Lee. 1997. Effect of pine needle extract (PNE) on physiological activity of SD rats I. Feeding effect of PNE on lipid and oxygen radical metabolisms in serum of SD rats. *Korean J. Life Science* **7(4)**, 371-376.
- Choi, J. H., J. H. Kim, D. W. Kim, K. S. Kim, J. S. Lee and Y. H. Baek. 1998a. Effect of pine needle extract (PNE) on physiological activity of SD rats II. Feeding effect of PNE on oxygen radicals and their scavenger enzymes in brain membranes of SD rats. *Korean J. Life Science* **8(1)**, 91-96.
- Choi, J. H., J. H. Kim, D. W. Kim, C. H. Hwang, D. I. Kim and J. S. Lee. 1998b. Effect of pine needle extract (PNE) on physiological activity of SD rats III. Feeding effect of PNE on fluidity and neurotransmitter-related enzymes in brain membranes of SD rats. *Korean J. Life Science* **8(2)**, 167-172.
- Fletcher, B. L., C. J. Dillard and S. A. L. Tappel. 1973. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues. *Anal. Biochem.* **52**, 1-9.
- Heron, D. S., M. Shinitzky, M. Hershkowitz, and D. Samuel, 1980 Lipid fluidity markedly modulates the binding of serotonin to mouse brain membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **12**, 7463-7467.
- Kang, Y. H., Y. K. Park, T. Y. Ha and K. D. Moon. 1996a. Effects of pine needle extracts on serum and liver lipid contents in rats fed high fat diet. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **25(3)**, 367-373.
- Kang, Y. H., Y. K. Park, T. Y. Ha and K. D. Moon. 1996b. Effects of pine needle extracts on enzyme activities of serum and liver, and liver morphology in rats fed high fat diet. *J. Korean Soc. Food Nutr.* **25(3)**, 374-378.
- Kim, E. J., S. W. Jung, K. P. Choi, S. S. Ham and H. Y. Kang. 1998. Cytotoxic effect of the pine needle extract. *Korean J. Food Sci. Technol.* **30(1)**, 213-217.
- Kim, J. D., T. H. Yoon, M. Choi, K. J. Im, J. S. Ju and S. Y. Lee. 1990. Effect of dietary supplementation with pine leaf on lipid parameters in rats. *Kor. J. Gerontol.* **1(1)**, 47-50.
- Kong, Z., Z. Liu and B. Ding. 1995. Study on the antimutagenic effect of pine needle extract. *Mutat. Res.* **347(3)**, 101-104.
- Lebel, C. P., I. N. Odunze, A. Jr and S. C. Bondy. 1989. Perturbations in cerebral oxygen radical formation and membrane order following vitamin E deficiency. *Biochem. & Biophysic. Res. Com.* **163(2)**, 860-866.
- Levine, R. L., D. Garland, C. N. Oliver, A. Amici, I.

- Climent, A. G. Lenz, B. Ahn, S. Shaltiel, and E. R. Stadtman. 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186, 464-478.
22. Lowry, O. H., N. J. Roseborough, L. A. Farr, and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
23. Namba, T. 1980. Colored Illustrations of WAKAN-YAKU, Vol. II. pp. 82-83.
24. Steel, R. G. D. and J. H. Torrie, 1960. *Principles and procedures of statistics.* McGrawhill. New York.
25. Yu, B. P., D. W. Lee, C. G. Marler, and J. H. Choi. 1990. Mechanism of food restriction: Protection of cellular homeostasis. *Soc. Exp. Biol. Med.* 193, 13-15.
26. Yu, B. P. 1996. Aging and oxidative stress : Modulation by dietary restriction. *Free Rad. Biol. Med.* 21, 651-668.

(Received June 5, 2003; Accepted October 17, 2003)