

연교 (*Forsythia Viridissima* Lindl.) 추출물이 고콜레스테롤 식이 흰쥐 간조직의 항산화계와 지질과산화에 미치는 영향

이정민 · 최상원 · 조성희 · 이순재[§]

대구가톨릭대학교 식품영양학과

Effect of *Forsythia Viridissima* Extracts 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, Daegu 712-702, Korea

ABSTRACT

This study was conducted to investigate the effects of *Forsythia viridissima* Lindl. (FVL) 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 FVL extract, 0.05% methanol extract diet group (MS1 group), 0.1% methanol extract diet group (MS2 group), 0.025% ethylacetate-souble fraction diet group (ES1 group) and 0.05% ethylacetate-souble fraction diet group (ES2 group). Experimental diets were fed *ad libitum* to the rats for 3 weeks. The hepatic xanthine oxidase (XOD) activity in the MS2 group was decreased to 20% as compared to HC group. The activities of hepatic superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were not significantly different among all the high cholesterol diet groups. The hepatic glutathione peroxidase (GSHpx) activity in MS2, ES2 groups were significantly increased as compared to HC group. The hepatic glutathione S-transferase (GST) activity in the MS2 group was increased to 20% as compared to HC group. The levels of hepatic TBARS in the MS1, MS2, ES1 and ES2 groups were reduced by 13%, 21%, 13% and 21%, respectively, as compared with HC group. The contents of lipofuscin in liver tissue was not significantly different among all the experimental groups. The results indicate that FVL extract may reduce oxidative damage by activating antioxidative defense system of liver in rats fed high-cholesterol diets. (*Korean J Nutrition* 36(10) : 990~996, 2003)

KEY WORDS : *Forsythia viridissima* Lindl. extract, high cholesterol diet, antioxidative system, lipid peroxidation.

서 론

심혈관계질환의 위험인자로는 고콜레스테롤혈증, 흡연 및 고혈압 등이 중요한 위험인자로 알려져 있으며, 이와 연루되는 식이인자로는 식지지방내의 불포화지방산과 포화지방산의 비율,¹⁾ 식이 콜레스테롤²⁾ 및 식이 지방³⁾ 등을 들 수 있다. 그런데 최근에는 이들 질환 유발의 초기단계에서 이러한 식이요인들과 직간접적으로 영향을 받게되는 조직의 산화적 손상이 또한 주요 인자로 알려지고 있다. 조직의 산화적 손상은 생체내 과잉의 자유라디칼이 축적될때에 일어난다. 정상적인 생리상태에서는 생체내 자유라디칼의 제거

계인 항산화 방어계 (antioxidative defense system)와 생성계가 균형을 이루고 있으므로 자유라디칼의 제거가 원만히 이루어진다. 그러나 당뇨병과 같은 질병상태에서나 산화적 스트레스 및 기타 여러 가지 요인에 의해 항산화 방어계와 생성계 사이에 그 균형이 깨뜨려 졌을때 자유라디칼 생성이 촉진되고 나아가 조직은 과산화적 손상을 입게된다. Mantha 등⁴⁾과 Del Boccio 등⁵⁾의 연구에서 고지방식이나 고콜레스테롤 식이와 같은 과량의 식이 지방이나 콜레스테롤 섭취는 체내 조직의 산화적 손상을 초래한다고 보고하였다.

고콜레스테롤 상태에서 산화적 스트레스가 촉진된다는 여러 보고⁶⁻⁸⁾에서 다양한 항산화 방어기전의 활성 변화를 관찰하였다. Jeon 등⁹⁾도 고콜레스테롤 상태에서는 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSHpx) 및 catalase (CAT) 등과 같은 항산화계 효소의 양은 감소되

접수일 : 2003년 8월 17일

채택일 : 2003년 12월 11일

[§]To whom correspondence should be addressed.

고 지질과산화물 함량은 증가되는 반면 항산화제의 보강에 의해 이들 값이 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 보고되고 있다.^{8,10)} 따라서 조직을 과산화로부터 방어하기 위해서는 생체의 항산화 방어계를 강화시키는 것이 바람직하다. 최근에는 식용으로 쓰이는 식물을 비롯하여 생약제에 이르기까지 여러 분야에서 항산화 기능을 비롯한 여러 가지 생리활성 탐색에 대한 연구가 이루어 지고 있다.

연교 (*Forsythia viridissima*)는 물푸레나무과 (木犀科, Oleaceae)에 속하는 개나리의 열매로써 한방과 민간에서 종창, 임질, 통경, 이뇨, 치질, 결핵, 나력, 음, 해독 등의 치료제로 널리 사용되고 있다.¹¹⁾ 지금까지 연교의 생리활성작용에 대한 연구로는 주로 *in vitro*에서 항산화물질 탐색결과 연교의 항산화 활성이 우수한 것으로 보고되었고,¹²⁻¹⁴⁾ 그 외 항염증효과,¹⁵⁾ 항균작용,¹⁶⁾ 혈압강화작용¹⁷⁾의 보고가 있었다. 이와 같이 연교의 생리활성물질의 분리 및 그들의 생리적·약리적 작용에 관한 연구보고는 상당히 많은 반면, 동물실험을 통한 생체내 항산화 효능에 대한 연구는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구에서는 연교추출물의 생체내에서의 항산화 작용을 규명하기 위하여 고콜레스테롤 식이 흰쥐에 연교 메탄올 조추출물과 에틸아세테이트 가용성 분획물을 농도에 따라 공급했을 경우, 간조직의 자유라디칼 생성계와 제거계 및 산화적손상에 미치는 영향을 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 연교의 재취

본 실험에 사용한 연교 (*Forsythia viridissima*)는 대구 약령시장에서 시판되고 있는 열매를 구입하여 이를 분쇄하여 공시재료로 사용하였다.

2. 조추출물 및 에틸아세테이트 가용성 분획물의 조제

연교 10 kg을 분쇄한 후 여기에 메탄올 120 l를 가하여 상온에서 24시간 추출한 후 여과지 (Whatman No.2, England)로 여과하였다. 위의 추출조작을 2회 반복 실시하여 얻은 메탄올 추출액을 rotary evaporater (Buchi, Sweden)로 40℃이하에서 감압·농축하여 메탄올 조추출물 624.4 g을 얻었다. 이 조추출물을 80% 메탄올 수용액 30 l에 현탁시켜 노르말-헥산 20 l을 가하여 2회 반복 탈지한 후 얻어진 하층을 감압·농축하였다. 이 농축물은 20% 수용

성 메탄올로 다시 녹인 후 에틸아세테이트 10 l로 2회 반복 분획하여 에틸아세테이트 가용성 분획물 80.1 g을 얻었다. 본 실험에서는 연교 메탄올 조추출물과 에틸아세테이트 가용성 분획물을 공시재료로 사용하였다.

3. 실험동물 및 사육

실험동물은 체중 100 ± 10 g 내외의 Sprague-Dawley 종 숫컷을 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 연교 메탄올 조추출물과 에틸아세테이트 가용성 분획물의 공급수준에 따라 연교추출물을 공급하지 않은 고콜레스테롤 대조군 (HC group), 0.05% 메탄올 조추출물을 공급한군 (MS1 group), 0.1% 메탄올 조추출물을 공급한군 (MS2 group), 0.025% 에틸아세테이트 가용성 분획물을 공급한군 (ES1 group), 0.05% 에틸아세테이트 가용성 분획물을 공급한군 (ES2 group)군으로 나누어 각각 8마리씩 5군으로 나누어 3주간 사육하였다. 식이와 식수는 자유공급시켰다. 모든 군의 식이는 1주일에 한번씩 제조하여 4℃에 냉장보관하면서 신선한 식이를 매일 공급하였다. 또한 사육기간동안 동물실 온도는 20~23℃, 상대습도는 55~60%로, 그리고 7 : 00~19 : 00까지 dark-light cycle을 유지하였다.

4. 장기제취

실험 종료 후 실험 동물을 가벼운 ether 마취하고 간장은 생리 식염수로 씻어내고 무게를 측정된 후 액체 질소로 급속 동결시켜 -80℃에 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 20분간 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

Table 1. Composition of experimental diets (g/kg diet)

Ingredients	Groups				
	HC	MS1	MS2	ES1	ES2
Corn starch ¹⁾	480	479.95	479.90	479.98	479.95
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⁾	–	0.05	0.1	–	–
Ethyl acetate-soluble fr. ¹¹⁾	–	–	–	0.025	0.05
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, Manganouscarbonate (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, Sodiumselenite (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 6.6079, 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 FVL

¹¹⁾ Ethyl acetate-soluble fraction of FVL

(cytosol)은 xanthine oxidase (XOD), glutathione peroxidase (GSHpx), glutathione S-transferase (GST) 등의 활성도를 측정하였다. 모든 실험 조건은 4°C를 유지하면서 행하였다.

Catalase (CAT) 활성 측정을 위해서는 상기 효소분석용 시료와 같은 방법으로 마쇄하여 10,000 × g에서 30분간 원심분리하여 얻은 미토콘드리아 분획을 다시 10,000 × g에서 30분간 원심분리시켜 침전물을 취하고 0.25 M sucrose용액에 현탁시킨 다음 10,000 × g에서 20분간 재원심분리하여 얻은 침전물에 소량의 0.25 M sucrose용액에 재현탁시켜 CAT 활성 측정에 사용하였다.

6. Xanthine oxidase (XOD), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSHpx), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST) 활성 측정

간조직의 XOD 활성도 측정은 xanthine을 기질로 하여 30°C에서 10분간 반응시켜 생성된 uric acid를 파장 292 nm에서 흡광도를 측정하는 Stirpe와 Della Corte의 방법¹⁸⁾을 이용하였다. 활성도 단위는 간조직의 단백질 1 mg이 1

분 동안 반응하여 기질로부터 생성된 uric acid량을 nmol 농도로 표시하였다.

SOD 활성은 알칼리 상태에서 pyrogallol의 자동산화에 의한 발색을 이용한 Marklund와 Marklund의 방법¹⁹⁾에 따라 측정하였다.

GSHpx 활성은 산화형 glutathione (GSSG)이 glutathione reductase와 NADPH에 의해 환원될 때 340 nm에서 NADPH의 흡광도가 감소하는 것을 이용한 Lawrence 및 Burk의 방법²⁰⁾에 따라 측정하였다.

CAT 활성은 240 nm에서 5분간 H₂O₂의 흡광도 변화를 이용하여 H₂O₂의 몰흡광계수로 H₂O₂의 농도를 구하는 Aebi 등²¹⁾의 방법으로 측정하였다.

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 ($\epsilon_{340nm}^{1mM} = 9.6 \text{ nM}^{-1} \text{ Cm}^{-1}$)를 이용하여 효소활성을 산출하는 Habig 등²²⁾의 방법에 의하여 측정하였고 이 효소활성의 단위는 1분간 1 mg의 단백질이

반응하여 생성한 conjugated DCNB를 nmol로 나타내었다. 각 시료의 단백질량은 표준품으로 bovine serum albumin을 사용하였다.

각 효소의 단백질 정량은 Lowry 등²⁵⁾의 방법을 이용하여 정량하였다.

7. Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS), lipofuscin 정량

간조직의 과산화지질 정량은 thiobarbituric acid (TBA)와 반응하여 생성되는 malondialdehyde를 측정하는 Satho 법²³⁾을 이용하였다. 생체내에서 말론디알데히드 (malondialdehyde : MDA)와 단백질 성분이 결합하여 생성되는 것으로 알려진 소모성 노화색소인 리포푸신 (lipofuscin)의 측정은 Fletcher 등²⁴⁾의 방법에 따라 측정하였다.

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

8. 통계처리

모든 실험 결과에 대한 통계처리는 각 실험군별로 평균차이가 있는가를 검증하기 위하여 분산분석 (ANOVA 검증)을 수행하였으며, 분산분석의 결과 유의성이 발견된 경우 군간의 유의도는 Tukey's-HSD test²⁶⁾에 의해 분석하였다.

결 과

1. 체중증가량 및 간장의 무게

실험기간동안의 체중증가량, 간장의 무게 및 단위 체중당 간장의 무게는 (Table 2) 실험군간의 유의적인 차이가 없었다.

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 (3.4 ± 0.2 nmol/mg protein/min)에 비해 MS1군 (3.0 ± 0.2 nmol/mg protein/min)과 ES1군 (2.9 ± 0.3 nmol/mg protein/min) 및 ES2군 (3.0 ± 0.5 nmol/mg protein/min)에서는 유의적인 차이가 없었으나 MS2군은 (2.7 ± 0.2 nmol/mg protein/min) 약 20% 감소되었다.

Table 2. Effects of methanol extract and ethyl acetate-soluble fraction from *Forsythia viridissima* Lindl. (FVL) on liver weight and liver index in rats fed high-cholesterol diets

Groups	Body weight (g/3wks)	Liver weight (g)	Liver index (g/100 g body wt)
HC	170 ± 37.7 ^{NS}	14.63 ± 2.24 ^{NS}	4.83 ± 0.40 ^{NS}
MS1	165 ± 35.6	13.39 ± 2.84	4.76 ± 0.34
MS2	167 ± 23.5	14.11 ± 2.79	5.04 ± 0.73
ES1	170 ± 32.7	14.24 ± 2.56	5.02 ± 0.38
ES2	176 ± 48.2	13.61 ± 3.91	4.82 ± 0.67

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

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

연교추출물이 생체내 항산화체계에 미치는 영향을 관찰한 결과는 Table 3과 같다. 생체내 항산화 방어기구 중 효소적 방어계의 하나로서 superoxide radical를 H₂O₂로 환원시키므로써 산소독으로부터 생체를 보호하는 SOD 활성을 관찰한 결과 HC군과 연교추출물 공급군간의 유의적인 차이가 없었다. Selenium을 함유하는 항산화 효소로 비타민 E와 함께 과산화물을 제거함으로써 세포막의 손실을 방어하는 GSHpx의 활성을 간조직에서 관찰한 결과 HC군에

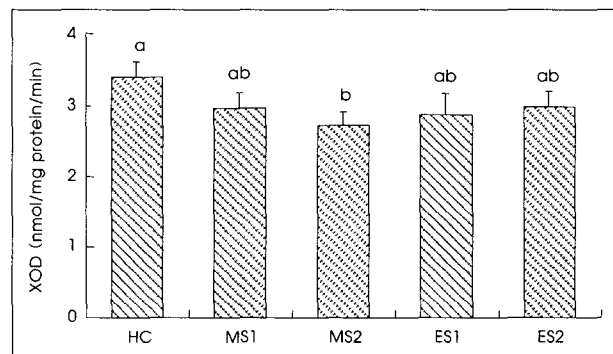


Fig. 1. Effects of methanol extract and ethyl acetate-soluble fraction from *Forsythia viridissima* Lindl. (FVL) on hepatic xanthine oxidase (XOD) activities in rats fed high-cholesterol diets. All values are mean ± SE (n = 8). Values within a column with different superscripts are significantly different at p < 0.05 by Tukey's test. The experimental conditions are the same as Table 1.

Table 3. Effects of methanol extract and ethyl acetate-soluble fraction from *Forsythia viridissima* Lindl. (FVL) 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}
MS1	5.06 ± 0.7	108.3 ± 17.6 ^{ab}	10.15 ± 1.6
MS2	5.06 ± 0.7	121.7 ± 7.0 ^a	10.29 ± 0.9
ES1	5.07 ± 0.7	114.5 ± 13.3 ^{ab}	10.76 ± 2.1
ES2	5.08 ± 0.7	121.7 ± 5.0 ^a	10.38 ± 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

비해 MS1, ES1군은 유의적인 차이가 없었으나 MS2, ES2군에서는 유의적 ($p < 0.05$)으로 증가되었다.

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

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 (283.9 ± 12.0 nmol DCNB/mg protein/min)에 비해 연교 메탄올 조추출물 공급군인 MS1군 (304.8 ± 13.0 nmol DCNB/mg protein/min), ES1군 (320.3 ± 28.2 nmol DCNB/mg protein/min) 및 ES2군 (313.4 ± 30.3 nmol DCNB/mg protein/min)에서는 유의적인 차이가 없었으나 MS2군 (327.1 ± 13.5 nmol DCNB/mg protein/min)은 약 15% 증가되었다.

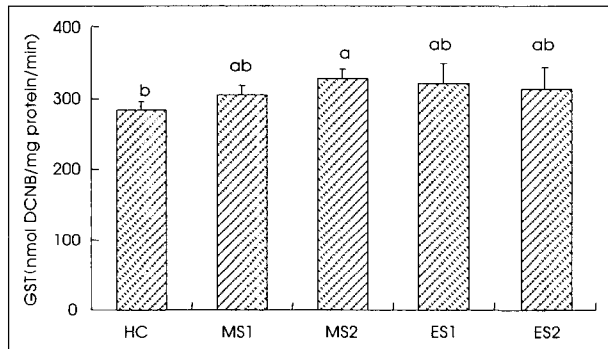


Fig. 2. Effects of methanol extract and ethyl acetate-soluble fraction from *Forsythia viridissima* Lindl. (FVL) on hepatic glutathione S-transferase (GST) activities in rats fed high-cholesterol diets. All values are mean \pm SE (n = 8). Values within a column with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's test. The experimental conditions are the same as Table 1.

Table 4. Effects of methanol extract and ethyl acetate-soluble fraction from *Forsythia viridissima* Lindl. (FVL) on hepatic thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) values and lipofuscin contents in rats fed high-cholesterol diets

Groups	TBARS (MDA nmol/mg protein)	Lipofuscin (μ g/mg protein)
HC	16.57 ± 0.7^a	3.74 ± 0.4^{NS}
MS1	14.39 ± 1.1^b	3.30 ± 0.4
MS2	13.14 ± 1.5^b	3.10 ± 0.3
ES1	14.48 ± 0.9^b	2.97 ± 0.3
ES2	13.15 ± 0.7^b	3.09 ± 0.1

All values are mean \pm 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

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 MS1, MS2, ES1 및 ES2군은 각각 13%, 21%, 13% 및 21%씩 연교추출물 모든군에서 감소되었다. 생체 노화의 중요한 지표로 사용되고 있는 리포푸신의 생성에 미치는 효과를 관찰한 결과 (Table 4)는 실험군간에 차이가 없었다.

고 찰

본 연구는 연교추출물의 생체내 항산화작용을 규명하기 위하여 고콜레스테롤 식이 흰쥐 간조직의 항산화 방어계와 지질과산화에 미치는 영향을 관찰하였다.

본 실험기간동안의 체중증가량, 간장의 무게 및 단위 체중당 간장의 무게는 실험군간의 유의적인 차이가 없었다.

생체내 유리기 생성계의 하나인 XOD는 purine, pyrimidine, aldehyde류 및 heterocyclic compound 등의 대사에 관여하는 비특이적 효소로서 생체내에는 주로 purine 체의 대사산물인 hypoxanthine을 xanthine으로, xanthine을 다시 산화시켜 요산을 생성하는 반응의 촉매로 작용한다.²⁷⁾ 본 실험에서 XOD 활성을 측정된 결과 HC군에 비해 MS2군에서 유의적으로 감소되었다. 이것은 연교추출물이 XOD 활성을 저하시켰다는 Schinella 등¹⁴⁾의 보고에서와 같이 연교추출물중의 lignan과 그 유도체 성분에 의한 것으로 사료된다.

SOD는 superoxide radical을 환원시켜 H₂O₂로 전환시키며 이때 생성된 H₂O₂들은 GSHpx, catalase등의 작용에 의해 H₂O로 무독화됨으로서 산소독으로부터 생체를 보호하게 되는 것이다. 본 실험 결과 간조직의 SOD 활성은 HC군과 연교추출물 공급군간에 유의적인 차이를 보이지 않았는데 이러한 경우 앞으로는 Mn-SOD와 CuZn-SOD로 나누어 관찰할 필요가 있을것으로 여겨진다.

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.²⁸⁾ 본 실험에서 간조직에서의 GSHpx 활성은 HC군에 비해 MS2, ES2군에서 두군 모두 유의적 ($p < 0.05$)으로 증가되었다. 일반적으로 고콜레스테롤 상태에서는 GSHpx 활성이 정상상태보다 감소되지만¹⁰⁾ 본 실험에 사용된 연교 메탄올추출물 0.1% 수준의 공급에서 증가됨으로서 GSHpx 활성화기능이 이 분획에 함유되어 있음을 알 수 있다.

Catalase는 조직 세포 속에 존재하여 대사 산물인 H₂O₂를 순간적으로 산화시켜 H₂O와 O₂로 분해함으로써 생체를 산소 독으로부터 보호한다. 본 실험에서 간조직에서의 catalase 활성은 HC군과 연교추출물 공급군간에 유의적인 차이를 보이지 않았다.

GST는 변이성 물질, 발암성 물질, 독성물질 등의 대사 산물, 그리고 내인성 독소들 중에서 친전자성 물질 등에 환원형 glutathione을 포함시켜 glutathione thioester (R-S-G)를 형성하는 반응을 촉매하는 효소이다.²⁹⁾ 본 실험에서 GST 활성은 HC군에 비해 MS2군에서 약 15% 증가되었다. 이는 Uysal M 등³⁰⁾의 연구에서처럼 고콜레스테롤 상태에서는 GST의 활성이 정상상태보다 감소되었으나 본 실험에 사용된 연교 메탄올추출물 0.1% 공급수준에서 항산화적 해독기능이 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 조직 내 세포의 산화적 스트레스의 증가와 생체내 항산화 방어력의 감소로 야기된다.³¹⁾ 본 실험 결과 과산화물 (TBARS) 함량은 HC군에 비해 모든 연교추출물 공급군에서 유의적으로 감소되었다. 이러한 지질과산화물 수준의 감소는 연교추출물 공급에 따른 간조직의 XOD 활성의 감소와 항산화계 효소활성의 증가에 따른 결과로 볼 수 있다. 이러한 결과는 연교의 주성분인 lignan 화합물의 항산화작용과 관계가 있는 것으로 추측되며 향후 이들 단일 물질의 항산화작용에 대한 연구를 행할 예정이다.

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 연교추출물의 공급은 간조직의 자유기 생성체인 XOD 활성을 억제시키고 제거체인 항산화 방어 효소의 활성을 증가시켜 산화적 손상을 완화시키는 것이 작용이 관찰되었으며 특히메탄올추출물 0.1% 공급군에서 효과가 좋은 편이었다.

요약 및 결론

본 연구는 연교 (*Forsythia viridissima* Lindl.) 추출물의 생체내 항산화작용을 규명하기 위하여 고콜레스테롤 식이 흰쥐 간조직에서의 항산화 방어계와 지질과산화에 미치는 연교 메탄올추출물 및 에틸아세테이트 분획물의 효과를 조사하였다.

실험동물은 100 ± 10 g의 Sprague-Dawley 숫컷 흰쥐를 이용하여 0.5% 고콜레스테롤 식이에 연교 메탄올 조추출물과 에틸아세테이트 가용성 분획물의 공급수준에 따라 추출물을 공급하지 않은 고콜레스테롤 대조군 (HC group), 0.05% 메탄올 조추출물을 공급한군 (MS1 group), 0.1% 메탄올 조추출물을 공급한군 (MS2 group), 0.025% 에틸아세테이트 가용성 분획물을 공급한군 (ES1 group), 및 0.05% 에틸아세테이트 가용성 분획물을 공급한군 (ES2 group) 등 5군으로 나누었다. 식이와 식수는 자유공급 시켰으며 3주간 사육한 후 희생시켰다. 실험기간동안의 체중증가량, 간장의 무게 및 단위 체중당 간장의 무게는 실험군간의 유의적인 차이가 없었다. 간조직의 XOD 활성은 HC군에 비해 MS2이 약 20% 감소하였다. 간조직의 SOD 활성과 catalase 활성은 연교추출물 공급에 의한 유의적인 차이가 없었다. 간조직의 GSHpx 활성은 HC군에 비해 MS2, ES2군에서 두군 모두 유의적으로 증가되었다. 간조직의 GST 활성은 HC군에 비해 MS2군에서 약 20% 증가되었다. 간조직의 지질과산화물가는 HC군에 비해 MS1, MS2, ES1 및 ES2군은 각각 13%, 21%, 13%, 21%씩 감소되었다. 간조직의 lipofuscin 함량은 연교추출물 공급에 의한 유의적인 차이가 없었다.

이러한 결과로부터 연교추출물은 고콜레스테롤 식이 흰쥐 간조직의 항산화계를 강화시켜 조직의 산화적 손상을 감소시키는 항산화 효과가 있고 그중에서 0.1% 메탄올추출물이 가장 좋았다.

Literature cited

- 1) 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
- 2) 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
- 3) 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
- 4) Mantha SV, Kalra J, Prasad K. Effects of probucol on hypercholesterolemia-induced changes in antioxidant enzymes. *Life Sci* 58 (6): 503-509, 1996
- 5) Del Boccio G, Lapenna D, Porreca E, Pennelli A, Savini F, Feliciani P, Ricci G, Cucurullo F. Aortic antioxidant defence mechanisms: time-related changes in cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 81 (2): 127-135, 1990
- 6) 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
- 7) 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
 - 8) 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
 - 9) 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): 2855-66, 2001
 - 10) 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
 - 11) Kim TJ. Korean resources plants. pp.262, Seoul National University Pub. Seoul, 1991
 - 12) Rim YS, Park YM, Park MS, Kim KY, Kim MJ, Choi YH. Screening of antioxidant and antimicrobial activity in native plants. *Korean J Medicinal Crop Sci* 8(4): 342-350, 2000
 - 13) Lim DK, Choi U, Shin DH. Antioxidative Activity of Ethanol Extract from Korean Medicinal Plants. *Korean J Food Sci Technol* 8(4): 342-350, 2000
 - 14) Schinella GR, Tournier HA, Prieto JM, Mordujovich D, Rios JL. Antioxidant activity of anti-inflammatory plant extracts. *Life Sci* 70(9): 1023-1033, 2002
 - 15) Ozaki Y, Rui J, Tang YT. Antiinflammatory effect of Forsythia suspensa V (AHL) and its active principle. *Biol Pharm Bull* 23(3): 365-367, 2000
 - 16) Li ZX, Wang XH, Zhao JH, Yang JF, Wang X. Investigation on antibacterial activity of Forsythia suspense Vahl in vitro with Mueller-Hinton agar. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 25(12): 742-745, 2000
 - 17) Lee EB, Keum HJ. Pharmacological studies on Forsythae Fructus. *Kor J Pharmacogn* 19(4): 262-269, 1988
 - 18) 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
 - 19) 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
 - 20) Lawrence RA, Burk RF. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 71(4): 952-958, 1976
 - 21) 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
 - 22) 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
 - 23) Satho K. Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new colorimetric method. *Clin Chim Acta* 90(1): 37-43, 1978
 - 24) Fletcher BL, Dillard CJ, Tappel AL. Measurement of fluorescent lipid peroxidation products in biological systems and tissues. *Anal Biochem* 52(1): 1-9, 1973
 - 25) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951
 - 26) Sreel RGD, Torrie JH. Principles and procedures of statistics. McGraw Hill, New York, USA, 1990
 - 27) Duke EJ, Joyce P, Ryan JP. Characterization of alternative molecular forms of xanthine oxidase in the mouse. *Biochem J* 131(2): 187-190, 1973
 - 28) Bompert 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
 - 29) Jacoby WB. The glutathione S-transferases: a group of multifunctional detoxification proteins. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* 46: 383-414, 1978
 - 30) 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): 339-42, 1988
 - 31) Plaa GL, Witscri H. Chemicals, drugs, and lipid peroxidation. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 16: 125-41, 1976