

## 에탄올, 아세트알데히드-유도 뇌조직의 산화적 스트레스에 대한 은행잎 추출물의 항산화 효과

박성욱<sup>1)</sup> · 김종봉<sup>1)</sup> · 허 용<sup>1)</sup> · 이선동<sup>2)</sup> · 김희정<sup>3)</sup> · 이인선<sup>4)</sup> · 한정호<sup>5)</sup> · 박영철<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>대구가톨릭대학교 자연과학연구소, <sup>2)</sup>상지대학교 한의과대학 <sup>3)</sup>(주)경원엔터프라이즈, <sup>4)</sup>계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터, <sup>5)</sup>서울대학교 의학연구원

## Effects of Ginkgo Biloba Extracts on Rthanol and Acetaldehyde-induced Oxidative Stress in Rat Brain

Seong-Uk Park,<sup>1)</sup> Jong-Bong Kim,<sup>1)</sup> Yong Heo,<sup>1)</sup> Sun-Dong Lee,<sup>2)</sup>

Hee-Jung Kim,<sup>3)</sup> In-Sun Lee,<sup>4)</sup> Jung-Ho Han<sup>5)</sup> & Yeong-Chul Park<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Natural Science Institute, Catholic University of Daegu, Hayang-Up, Keongsan-Si, Keongbuk, Korea,

<sup>2)</sup>Sangji University, Wonju-Si Kangwon-Do,

<sup>3)</sup>Keongwon Enterprise Ltd, Samsung-Meon, Umsung-Gun, Chungbuk <sup>4)</sup>Keimyung University, Daegu

<sup>5)</sup>Seoul National University, Medical Research Center, Seoul.

### Abstract

Oxidative stress is one of the major reasons for brain aging and neurodegeneration. Ethanol and acetaldehyde increase the level of oxidative stress in brain tissue resulting in aging and neurodegeneration related alcoholic dementia. Ginkgo biloba extracts are used as therapeutic and preventive agent for dementia. Here, it was investigated whether Ginkgo biloba extract show the effectiveness against ethanol- and acetaldehyde-induced oxidative stress in rat brain. Ethanol and acetaldehyde increased the level of oxidative stress by about 35% to 50% in rat brain tissue. However, Ginkgo biloba extracts reduced the level of ethanol- and acetaldehyde-induced oxidative stress. This result might reveal the link between the effectiveness of Ginkgo biloba extracts on oxidative stress and its effectiveness on alcoholic dementia.

---

**Key words** : Ethanol, Acetaldehyde, Rat Brain, Oxidative Stress, Ginkgo Biloba Extracts

---

\* Corresponding author : National Science Institute, Catholic University, Daegu.

Tel : 82-019-624-7996. E-mail : ycpark@cu.ac.kr

## I. 서론

에탄올(Ethanol ; EtOH) 및 1차 대사물질인 아세트알데히드(Acetaldehyde ; AcH)는 일반적으로 세포 구성물과의 "adduct formation" 반응, 그리고 자체 대사에 의한 프리라디칼(free radical) 생성과 더불어 세포내 항산화 물질인 GSH(glutathione)의 감소를 통해 산화적 스트레스를 증가시킨다(Pratt 등, 1990 ; Tuma 등, 1996). 특히 뇌조직에서 산화적 스트레스의 증가는 뇌혈관 및 뇌세포의 손상에 의해 노화를 비롯하여 치매의 원인으로 확인되었다(Herrera 등, 2003 ; Calabrese 등, 1998).

이러한 연유로 에탄올 및 아세트알데히드에 의한 뇌조직의 산화적 상해를 예방하기 위해 다양한 항산화물질의 응용되어 왔다(Mansouri 등, 2001 ; Bhargava 등, 1998). 그러나 혈액순환과 항산화 효능을 지닌 은행잎추출물(Ginkgo biloba extracts)과 알콜 또는 아세트알데히드-유도 산화적 스트레스에 의한 뇌조직 손상에 관한 연구는 극히 부족하다. 본 연구에서는 에탄올과 1차 대사물질인 아세트알데히드를 투여한 뇌조직에서 은행잎추출물의 항산화적 효능을 확인하는 것이 목적이다.

## II. 실험방법

### 1. 에탄올과 아세트알데히드의 투여

체중  $250 \pm 10$ g의 Sprague-Dawley 실험쥐를 모든 실험에 이용되었다. 실험쥐에 각각 25% 에탄올 2 ml과 0% AcH 2 ml, 그리고 kg 체중당 2 mg 은행잎 추출물(SK제약 제조, 분말)을 30분 간격으로 구강 투여한 후 8시간이 지나 뇌조직의 산화적 손상정도를 측정하기 위해

희생되었다. 또한 10% AcH 2 ml과 은행잎추출물 2 mg/kg body weight을 구강 투여한 후 30분이 지나 대조군의 실험쥐를 희생시켜 뇌조직의 산화적 스트레스에 의한 손상을 측정하였다. 각 실험군의 쥐는 4~6 마리였고 희생된 쥐의 뇌조직은 액체질소에 보관하였다. 3시간 이내에 뇌 각각 1g을 측정하여 1.15% KCl 완충액 3 ml에 넣고 homogenizer를 이용하여 균질화시켰다. 균질화된 시료는 800g(10분, 4°C)에서 원심분리하여 그 상등액을 측정하였다. 모든 실험쥐는 24시간 단식 후 실시하였다.

### 2. 산화적 스트레스에 의한 뇌의 산화적 손상 측정

산화적 스트레스 측정을 위해 지질과산화 정도와 단백질의 산화적 손상의 지표인 단백질 카르보닐기를 측정하였다. 지질과산화 정도는 TBA (thiobarbituric acid) 반응을 통해 확인하였다. 세포를 용해한 후 균질화하여  $3000 \times g$ 에서 20분 동안 냉온(4°C) 원심분리하였다. 상등액을 10% trichloroacetic acid(TCA)로 침전시킨 후 5분 동안 4000 rpm(4°C)으로 다시 원심분리시켰다. 상층을 동일한 양의 0.67% TBA으로 15분 동안 100°C에서 반응시키며 어두운 실온에서 냉각시킨다. 이들을 spectrofluorimeter(ex.=515 nm ; em.=553 nm)을 이용하여 측정하였다. 또한 지질과산화 정도의 비교를 위해 malondialdehyde(MDA)을 이용하여 standard curve을 이용하여 계산하였다.

단백질 카르보닐기는 원심분리에 의한 세포 침출을 Levine 등(2002)의 방법에 따라 측정하였다. 상층액의 고형물을 vacuum을 이용하여 건조시킨 후 2M HCl(10 mM dinitrophenylhydrazine 함유)으로 다시 혼합하였다. 20% TCA 침전물의 단백질을 guanidine solution(6 M guanidine, 20 mM potassium

박성욱 외 7인 : 에탄올, 아세트알데히드-유도 뇌조직의 산화적 스트레스에 대한 은행잎 추출물의 항산화 효과

phosphate, pH 2.3)으로 37°C에서 녹였다. 불용성 물질을 원심분리시켜 제거한 후, 375 nm에서 spectrophotometer로 측정하였다. Molar extinction coefficient인 22,000 M-cm<sup>-1</sup>를 이용하여 단백질 카르보닐기의 양을 측정하였다.

### III. 결 과

에탄올 급성 투여 후 뇌조직에서의 산화적 스트레스가 대조군보다 월등히 높았다. 지질과산화 정도를 나타내는 TBARS(thiobarbituric acid-reactive substance) 농도는 에탄올 투여군에서 1.86 nmol/mg protein으로 대조군 1.38 nmol/mg protein보다 약 35% 정도 증가하였다. 반면에 은행잎 추출물을 에탄올과 같이 투여한 군에서는 1.14 nmol/mg protein으로 대조군보다 약 20% 정도 낮은 농도로 확인되었다(그림 1).

프리라디칼에 의해 단백질 산화 정도를 나타내는 단백질 카르보닐기의 농도 또한 지질과산화 정도와 유사한 결과를 보였다. 에탄올 투여군의 카르보닐기의 함량은 2.75 nmol/mg protein으로 대조군의 3.8 nmol/mg protein보다 약 40% 증가하였다. 에탄올 투여 후, 은행잎추출물을 투여한 실험군은 2.8 nmol/mg protein으로 대조군과 유사한 카르보닐기의 함량을 보였다(그림 2).

에탄올 1차 대사물인 아세트알데히드를 처리한 실험에서도 에탄올과 은행잎 추출물을 투여한 실험과 비교하여 산화적 스트레스 정도가 유사한 양상을 나타냈다. 아세트알데히드에 의한 지질과산화 정도는 2.1 nmol/mg protein으로 대조군의 1.42 nmol/mg protein보다 약 50% 증가하였다(그림 3).

은행잎 추출물 투여로 1.3 nmol/mg protein의 지질과산화 정도를 보였고 에탄올 투여군과 비교하여 약 60% 감소하였다. 이는 대조군

보다 약 10% 정도 낮은 TBARS의 함량이다. 카르보닐기의 함량에서도 아세트알데히드에 의한 뇌조직에서의 지질과산화정도가 대조군 2.1 nmol/mg protein보다 약 20% 높은 2.5 nmol/mg protein이었다. 그러나 은행잎 추출물을 처리한 결과 아세트알데히드 처리군보다 약 50%, 대조군보다 약 40% 낮은 1.3 nmol/mg protein으로 확인되었다(그림 4).

### IV. 고 찰

에탄올과 그 1차 대사물인 아세트알데히드에 의한 프리라디칼 생성은 에탄올에 기인하는 다양한 질병의 중요한 발병기전의 하나이다. 특히 알콜의 산화적 스트레스에 의한 뇌 신경세포의 손상은 알콜성 치매의 중요한 원인의 하나로 추정되고 있다. 이러한 측면에서 항산화적 효능을 나타내며 치매증의 개선을 위해 사용되고 있는 은행잎추출물과 더불어 알콜-유도 산화적 스트레스에 의한 뇌조직의 손상 과정에 대한 이해는 알콜성 치매 예방에 있어서 대단히 중요하다고 사료된다.

본 연구에서는 에탄올과 아세트알데히드가 약 35%와 약 50% 정도 뇌조직의 지질과산화 정도를 증가시키는 것으로 확인되었다. 또한 라디칼에 의한 단백질의 손상 정도를 나타내는 카르보닐기의 생성 역시 약 20~40% 정도 에탄올과 아세트알데히드 투여로 증가되었다. 다른 조직보다 뇌는 높은 양의 산소 소비, 불포화지방산(polyunsaturated fatty acid)의 풍부함과 적은 양의 항산화물질에 때문에 산화적 손상에 민감하다.

에탄올에 의한 뇌조직의 산화적 손상은 다양한 방법에 기인한다. 먼저 뇌세포질의 microsome의 cytochrome P450 2E1(CYP2E1)의 유도에 의한 유해활성산소 생성을 요한 기전으로 설명되고 있다. CYP2E1은 에탄올에 의해

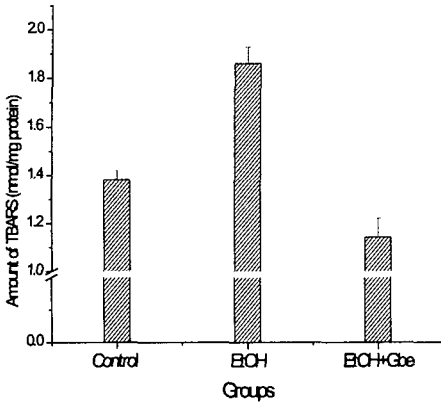


그림 1. 에탄올(EtOH)과 은행잎 추출물(Gbe) 투여에 의한 지질과산화 양상

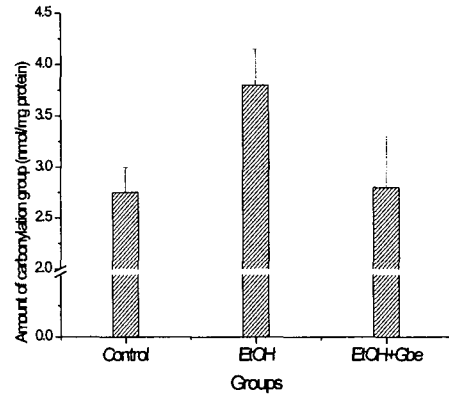


그림 2. 에탄올(EtOH)과 은행잎 추출물(Gbe) 투여에 의한 카르보닐기 생성 양상

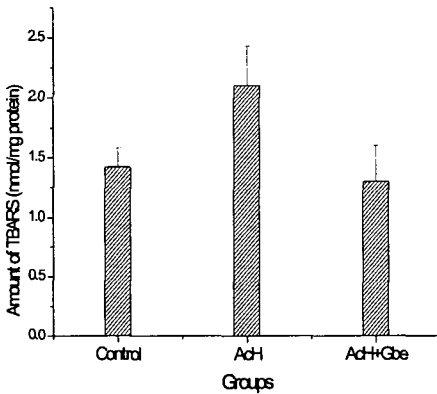


그림 3. 아세트알데히드(ACh)와 은행잎 추출물(Gbe) 투여에 의한 지질과산화 양상

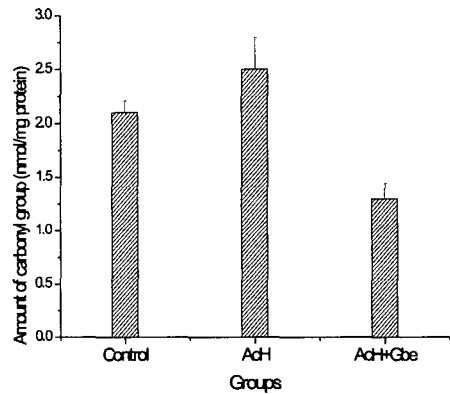


그림 4. 아세트알데히드(ACh)와 은행잎 추출물(Gbe) 투여에 의한 카르보닐기 생성 양상

발현이 유도되어 에탄올 대사를 통해 superoxide anion을 발생시켜 산화적 스트레스를 증가시킨다(Li 등, 1997 ; Niemela 등, 1998).

또한 산화성 물질의 생성뿐만 아니라 항산화물질의 감소를 또한 유도하여 산화적 스트레스를 증가시키는 것으로 알려졌다. 이는 에탄올에 의한 철이온( $Fe^{++}$ )의 이동 유도 역시 Fe-관련 항산화효소 및 항산화물질에 영향을 주어 산화적 스트레스를 증가로 확인되었다(Cederbaum 등, 2001). 특히 알콜에 의한 항산

화효소 및 항산화물질의 감소는 에탄올의 1차 대사물질인 아세트알데히드 그 자체 그리고 지질과산화의 최종산물인 malondialdehyde(MDA)가 직접적으로 'adduct'를 형성하여 설명되고 있다(Kamimura 등, 1992, Chen 등, 1999).

그러나 에탄올 및 아세트알데히드에 의한 뇌조직의 증가된 산화적 스트레스는 은행잎추출물 투여로 대조군보다 유사하거나 보다 낮은 수준으로 지질과산화와 단백질 카르보닐화를 보였다. 대부분의 식물성추출물이 갖고

있는 성분처럼 은행잎 추출물의 유효 성분은 플라보노이드배당체와 테르펜이며 특히 플라보노이드배당체 중 quercetin, kaempferol과 isorhamnetin 등이 항산화 효과를 나타내는 것으로 알려졌다(Sestili 등, 1998). 그러나 은행잎만 함유한 특유의 성분인 bilobalid와 ginkgolide 또한 항산화 효능이 있는 것으로 확인되었다(Pietta 등, 2000 ; Ahlemeyer 등, 2003).

은행잎 추출물에 의한 항산화적 효과는 superoxide anion을 제거시키는 superoxide dismutase와 유사한 역할을 하는 것으로 확인되었다 (Pincemail 등, 1989). 또한 은행잎 추출물은 에탄올 대사에 관여하는 CYP2E1 효소에 대해 활성을 저해시킴으로써 superoxide anion 생성을 감소하여 알콜에 의한 산화적 스트레스 증가를 억제시킨다(White 등, 1996). 이러한 다양한 기전을 통해 은행잎 추출물은 다른 어떤 물질보다 강력한 항산화적 효능을 가지는 것으로 사료된다.

본 연구와 다른 연구 결과를 통해 에탄올과 아세트알데히드에 의한 뇌조직의 산화적 스트레스를 증가시키는 것으로 확인되었다. 노인성 치매의 경우 베타-아밀로이드성 펩티드가 직접적으로 산화적 스트레스를 유발하여 신경세포 손상에 의한 치매 발병기전의 하나로 설명되고 있다(Nuria 등, 1999). 그러나 알콜성 치매의 경우, 알콜 자체가 베타-아밀로이드 생성 증가를 유도하는 것은 아직 확실하지 않으나 알콜에 의한 산화적 스트레스가 베타-아밀로이드에 의한 산화적 스트레스 정도에 어느 정도 영향을 줄 것으로 예측된다. 따라서 은행잎 추출물의 항산화적 효능은 알콜성 치매에 대한 예방과 동시에 악화를 지연시키는 주요 기전으로 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화 연구센터의 지원에 의한 것입니다.

## 참고문헌

- Bhargava B, Agarwal R, Behl VK, Reddy KS, Kaul U, Manchanda SC, Alcohol therapy for hypertrophic cardiomyopathy : Is it time to toast? *Circulation*. 1998, 26 ; 97(20) : 2096-7
- Calabrese V, Renis M, Calderone A, Russo A, Reale S, Barcellona ML, Rizza V. Stress proteins and SH-groups in oxidant-induced cellular injury after chronic ethanol administration in rat. *Free Radic Biol Med*. 1998, 24(7-8) : 1159-67.
- Cederbaum AI, Wu D, Mari M, Bai J. CYP2E1-dependent toxicity and oxidative stress in HepG2 cells. *Free Radic Biol Med*. 2001, 15 ; 31(12) : 1539-43.
- Chen J, Robinson NC, Schenker S, Frosto TA, Henderson GI. Formation of 4-hydroxynonenal adducts with cytochrome c oxidase in rats following short-term ethanol intake. *Hepatology*. 1999, 29(6) : 1792-8.
- Herrera DG, Yague AG, Johnsen-Soriano S, Bosch-Morell F, Collado-Morente L, Muriach M, Romero FJ, Garcia-Verdugo JM. Selective impairment of hippocampal neurogenesis by chronic alcoholism : Protective effects of an antioxidant. *Proc*

- Natl Acad Sci USA. 2003, 24 ; 100(13) : 7919-24.
- Kamimura S, Gaal K, Britton RS, Bacon BR, Triadafilopoulos G, Tsukamoto H. Increased 4-hydroxynonenal levels in experimental alcoholic liver disease : Association of lipid peroxidation with liver fibrogenesis. *Hepatology*. 1992, 16(2) : 448-53.
- Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med*. 2002, 1 ; 32(9) : 790-6.
- Li CJ, Nanji AA, Siakotos AN, Lin RC. Acetaldehyde-modified and 4-hydroxynonenal-modified proteins in the livers of rats with alcoholic liver disease. *Hepatology*. 1997, 26(3) : 650-7.
- Mansouri A, Demeilliers C, Amsellem S, Pessayre D, Fromenty B. Acute ethanol administration oxidatively damages and depletes mitochondrial dna in mouse liver, brain, heart, and skeletal muscles : protective effects of antioxidants. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001, 298(2) : 737-43.
- Niemela O, Parkkila S, Pasanen M, Iimuro Y, Bradford B, Thurman RG. Early alcoholic liver injury : Formation of protein adducts with acetaldehyde and lipid peroxidation products, and expression of CYP2E1 and CYP3A. *Alcohol Clin Exp Res*. 1998, 22(9) : 2118-24.
- Pietta P, Simonetti P, Gardana C, Mauri P. Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) of Ginkgo biloba flavonol and Camellia sinensis catechin metabolites. *J Pharm Biomed Anal*. 2000, 1 ; 23(1) : 223-6.
- Pincemail J, Dupuis M, Nasr C, Hans P, Haag-Berrurier M, Anton R, Deby C. Superoxide anion scavenging effect and superoxide dismutase activity of Ginkgo biloba extract. *Experientia*. 1989, 15 ; 45(8) : 708-12.
- Pratt OE, Rooprai HK, Shaw GK, Thomson AD. The genesis of alcoholic brain tissue injury. *Alcohol Alcohol*. 1990, 25 (2-3) : 217-30.
- Sestili P, Guidarelli A, Dacha M, Cantoni O. Quercetin prevents DNA single strand breakage and cytotoxicity caused by tert-butylhydroperoxide : Free radical scavenging versus iron chelating mechanism. *Free Radic Biol Med*. 15 ; 25(2) : 196-200.
- Tuma DJ, Thiele GM, Xu D, Klassen LW, Sorrell MF. Acetaldehyde and malondialdehyde react together to generate distinct protein adducts in the liver during long-term ethanol administration. *Hepatology*. 1996, 23(4) : 872-80.
- White HL, Scates PW, Cooper BR. Extracts of Ginkgo biloba leaves inhibit monoamine oxidase. *Life Science*. 1996, 58(16)1315-21.