

가자(*Terminalia chebula*) 추출물이 흰쥐의 간장 활성화에 미치는 영향

박종옥* · 이인섭¹ · 최종원²

경성대학교 화학과, ¹경성대학교 생물학과, ²경성대학교 약학과

Received October 29, 2003 / Accepted December, 2003

Effect of *Terminalia chebula* Extract on Liver in Rat. Jong Ok Park*, In-Sup Lee¹ and Jong Won Choi². Dept of chemistry, kyungsoong university, Busan, ¹Dept of biology, kyungsoong university, Busan, ²Dept of pharmacy, kyungsoong university, Busan – In this study, we investigated the effect of *Terminalia Chebula* (TC) water extract on liver in Rat. Treatment of TC water extract was orally administered 200, 300 mg/kg daily for one week and two weeks. The clinical parameters of serum, values of AST, ALT showed significantly higher than in normal group. Xanthine oxidase and aldehyde oxidase activities were significantly increased comparison with normal group. Microsomal enzymes, aminopyrine N-demethylase and aniline hydroxylase were not affected. Water extract of TC also increased hepatic malondialdehyde formation and reduced glutathione content. We also found that water extract of TC decreased activities of glutathione S-transferase and glutathione reductase but was not affected activities of γ -glutamylcysteine synthetase. Thus, it seems that the water extract of TC induced decrease of oxygen free radical scavenger, glutathione content by inhibition of glutathione reductase which may reform oxidized glutathione to reduced glutathione.

Key words – *Terminalia Chebula*, xanthine oxidase, aldehyde oxidase, glutathione, γ -glutamylcysteine synthetase

현대인들에게는 불규칙한 식사, 스트레스, 과도한 음주 및 흡연 등으로 인하여 간 기능이 손상되거나, 심하면 간 질환으로 발전하는 경우가 빈번하게 일어나고 있다. 이와 같은 간 기능의 손상 및 간 질환은 인체에 치명적인 영향을 끼치며 또한 회복되기도 힘들다. 이렇듯 다양한 생활 환경과 식생활의 변화로 인하여 질병의 형태에 있어서도 많은 변화를 가져왔으며 특히 고혈압과 뇌졸중, 당뇨병 등의 맥관계 질환과 순환계, 내분비계 등의 노화와 관련된 대사성 질환이 증가되고 있는 실정이다. 노화에 의해 생체 내 각 조직 중의 활성 산소의 반응 산물이 증가되어 여러 대사성 질환이 증가하는 것으로 알려져 있으며 대표적인 것 중의 하나가 과산화 지질이다. 여러 가지 병리 현상을 유도하는 것으로 알려져 있는 지질의 과산화 반응에 미치는 천연물, 즉 식품, 한약 및 민간약 등으로부터 생리 활성 물질을 탐구하는 연구가 최근 활발하게 진행되고 있다.

현재 우리 나라는 약 400여종이 넘는 천연 약물 및 식물을 한방 치료 목적에 사용할 뿐만 아니라, 식용으로 섭취하고 있다. 이러한 천연 약물 및 식물은 신약의 발굴대상으로 연구자의 관심이 높고 이로 인해 생성된 생약 재제가 공급되어 국민이 복용하고 있는 바이다. 그러나 이들 중에는 독성이 강한 것도 있어서 때로는 인체에 부작용을 일으킬 위험성이 있다는 사실을 배제할 수 없다.

가자(訶子)는 사군자과(使君子科; Combretaceae)에 속한

낙엽교목(落葉喬木)인 가자(槲子 *Terminalia chebula* chebula RETZ.), 또는 옹모가자(*T. chebula* RETZ. var. *tomentella* KuRT.)의 성숙(成熟)한 열매를 건조한 것이다. 이명으로는 가여록(訶藜勒)이라 하며 *Terminalia fructus*라 해서 약용으로 사용되고 있다[1].

가자의 약리학적 연구로는 tannin이 많아서 수렴, 지사작용이 있다고 보고되어 있으며, 녹농균, 디프테이라균, 황색포도상구균, 용혈성 연쇄상구균에 억제작용을 일으킨다고 알려져 있다[2]. 이밖에도 가자에는 적혈구 응집소라고 불리는 렉틴이 존재한다고 알려져 있다[3].

본 연구에서는 가자 수용성 추출물을 흰쥐에 투여한 뒤 간장에서 여러 가지 효소 변동을 측정하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

동물 및 처치

실험동물은 대한 BioLink (충북 음성)로부터 분양받아 본 대학 동물사에서 일정한 조건(온도 : $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도 : $55 \pm 3\%$, 명암 : 12시간 light/dark cycle)으로 1주 동안 고형 사료로 적응시킨 체중 200 ± 10 g의 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐(rat)를 사용하였다. 가자 추출물 투여는 매일 200 mg/kg 그리고 300 mg/kg의 용량으로 saline에 용해하여 1주 및 2주간 경구 투여하여 실험하였다.

실험재료

본 실험에 사용한 생약은 부산시내 한의원에서 구입하여

*Corresponding author

Tel : +82-51-620-4633, Fax : +82-51-627-4115

E-mail : gopark@ks.ac.kr

사용하였다.

효소원의 분리

실험동물을 CO₂ gas로 마취시킨 후 복부 대동맥으로부터 혈액을 채취하였고 간장은 생리식염수로 관류시켜 조직 내 혈액을 제거하고 적출하여 생리식염수로 씻은 후 여지로 가볍게 압박하여 남아 있는 혈액 및 생리식염수를 제거하였다. 채취한 혈액은 실온에서 30분간 방치한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리한 다음 aminotransferase (AST, ALT) 측정과 superoxide dismutase (SOD) 활성 측정에 사용하였다. 간장 조직을 1 g 당 4배량의 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4)를 가하여 병냉하에서 teflon homogenizer를 사용하여 homogenate를 만들었다. 이 homogenate를 계통분리법에 따라 초원심분리하였고 homogenate 분획은 lipid peroxide 및 glutathione의 함량 측정에, cytosolic fraction은 glutathione S-transferase (GST), γ -glutamylcysteine synthetase (γ -GCS), glutathione reductase (GR), glutathione peroxidase (GP), xanthine oxidase (XO) 및 aldehyde oxidase (AO) 활성의 측정에 사용하였다. 이밖에 microsomal fraction은 aminopyrine N-demethylase (AD), aniline hydroxylase (AH) 활성 측정에, mitochondria fraction은 catalase 활성 측정의 효소원으로 사용하였다.

시료 채취

가자 분말 50 g에 0.1 M potassium phosphate 완충용액 (pH 7.4) 500 ml를 가한 후 교반기로 24시간 방치시킨 다음 균질화하여, 이것을 20,000 × g에서 30분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액을 동결 건조하여 17.14 g의 분말상 추출물을 얻어 이를 시료로 사용하였다.

혈청 중 AST, ALT의 측정

Reitman과 Frankel의 방법[4]에 준하여 조제된 kit(아산제약)를 사용하여 alanine transaminase (ALT, 100 ml 당 DL-alanine 1,780 mg 및 α -ketoglutaric acid 29.2 mg 함유)와 aspartate transaminase (AST, 100 ml 당 L-aspartic acid 2,650 mg 및 α -ketoglutaric acid 29.2 mg 함유) 함량을 측정하였다. 기질액 1.0 ml를 37°C에서 5분간 preincubation 시켰다. 그 다음 혈청 0.2 ml를 넣어 37°C에서 ALT 30분, AST는 60분간 반응시킨 후 정색시액(2,4-dinitrophenylhydrazine, 19.8 mg/100 ml 함유) 1.0 ml를 첨가하고 0.4N-NaOH 용액 1.0 ml를 가하여 혼합하였다. 10분간 실온에 방치한 후 활성도를 표준검량선에 근거하여 혈청 1 ml당 Karmen unit로 표시하였다.

혈청 중 SOD 활성의 측정

혈청 SOD 활성의 측정은 Oyanagui의 방법[5]에 따라 정량하였다. 혈청을 potassium phosphate buffer로 100배 희석

하여 그 중의 100 μ l를 시험관에 넣고 여기에 증류수 500 μ l, 시약 A (3 mM hydroxylamine / 3 mM hypoxanthine) 200 μ l 및 시약 B [7.5 mU/ml xanthine oxidase (XOD) with 0.1 mM EDTA-2NA] 200 μ l를 넣고 잘 혼합하였다. 그 다음 37°C water bath에서 40분간 정치한 후 반응액에 시약 C (300 mg of sulfanilic acid / 5.0 mg N-naphthyl-ethylenediamine in 500 ml of 16.7% acetic acid) 2.0 ml를 넣어 잘 혼합하였다. 실온에서 20분 동안 정치한 다음 550 nm에서 흡광도를 측정하여 표준 검량선에 근거한 혈청 중의 SOD활성을 측정하였다.

간 조직 중 지질과산화물 함량의 측정

Ohkawa 등의 방법[6]을 변경하여 간 조직 1 g당 4배량의 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4)를 가해 마쇄한 후 같은 양의 buffer를 가하여 3시간 preincubation시킨 후 8.1% sodium dodecyl sulfate와 20% acetate buffer (pH 3.5) 및 발색의 목적으로 0.8% thiobarbituric acid를 가한 후 95°C에서 1시간 동안 반응시켜 실온에서 냉각 후에 n-BuOH:Pyridine (15:1)을 첨가하여 15분간 원심분리하여 생성된 홍색의 n-BuOH : Pyridine 층을 취하여 파장 532 nm에서 그 흡광도를 측정하여 표준곡선에서 그 함량을 간 조직 1 g당 존재하는 malondialdehyde양을 nmole로 표시하였다.

간 조직의 glutathione 함량의 측정

간 조직 중 glutathione 함량 측정은 Ellman의 방법[7]에 준하여 간 조직 homogenate 0.5 ml에 4% sulfosalicylic acid 0.5 ml를 가하고 2500 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액 0.3 ml를 취하여 disulfide reagent 2.7 ml를 넣고 20분간 방치 후 412 nm에서 흡광도를 측정하고 표준 검량선에 근거하여 산정하였다.

효소활성의 측정

Xanthine oxidase 활성의 측정

Stirpe과 Della의 방법[8]에 준하여 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5) 3.0 ml에 효소액 0.4 ml를 가하고 기질인 60 μ M의 xanthine sodium 0.1 ml를 가하여 37°C에서 반응시켰다. 여기에 20% trichloroacetic acid를 가하여 단백질을 침전시키고 상층액을 취한 후 생성된 uric acid를 파장 292 nm에서 흡광도를 측정하고 표준 검량선에 근거하여 활성도를 산출하였다. 효소활성의 단위는 1분당 1 mg protein이 생성하는 uric acid의 양을 nmole로 나타내었다.

Aldehyde oxidase 활성의 측정

Rajagopalan 등의 방법[9]에 준하여 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5) 3.0 ml에 효소액 0.4 ml를 가하고 기질인 60 μ M의 N-nicotinamide 0.1 ml를 가하여 37°C에서 반응시킨 후 20% trichloroacetic acid를 가하여 단백질을 침전시키고 상층액을 취한 후 생성된 2-pyridone을 파장 300 nm에

서 흡광도를 측정하고 표준검량선에 근거하여 활성도를 산출하였다. 효소활성의 단위는 1분당 1 mg protein이 생성하는 2-pyridone의 양을 nmole로 나타내었다.

Glutathione S-transferase 활성의 측정

Habig 등의 방법[10]에 준하여 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.5)에 40 mM reduced glutathione 75 μ l를 가한 후 효소액 10 μ l를 넣고 25°C에서 5분간 preincubation한 뒤 기질로서 2,4-dinitrochlorobenzene 25 μ l를 가하여 2분간 반응시켰다. 여기에 20% trichloroacetic acid를 가하여 반응을 완료시키고 시료를 원심분리하여 얻은 상층액을 파장 340 nm에서 흡광도를 측정하고 2,4-dinitrochlorobenzene의 mole 흡광계수 9.6 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 를 이용하여 활성도를 산정하였다.

γ -Glutamylcystein synthetase 활성의 측정

Meister와 Richman의 방법[11]에 준하여 0.1 M tris HCl buffer (pH 8.0) 1 ml에 8.9 mM L-glutamic acid, 0.94 mM EDTA, 3.2 mM MgCl_2 , 1.35 mM ATP 및 1mM L- α -Aminobutylic acid를 포함하는 반응액에 효소액 (100-200 μ g protein)을 가한 후 37°C에서 10분간 반응시킨 후 10% trichloroacetic acid로 반응을 완료시켰다. 이 용액을 원심분리한 뒤 상층액에 molybdic acid와 aminonaphthol sulfonic acid를 가하여 생성되는 황색의 생성물을 파장 600 nm에서 흡광도를 측정하고 표준검량선에서 그 양을 산정하였다. 효소의 활성 단위는 1분당 1 mg protein이 생성한 P_i 의 양을 nmole로 표시하였다.

Glutathione reductase 활성의 측정

Mize와 Langdon의 방법[12]에 준해 10 μ mole EDTA, 1.63 μ mole GSSG, 0.1 μ mole NADPH 가 함유된 300 μ mole tris buffer (pH 7.5)중에 효소액을 첨가하여 22°C, 파장 340 nm에서 흡광도의 변화를 읽고 분자 흡광계수 6.22 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 을 이용하여 활성도를 환산하였다. 효소 활성의 단위는 1분당 1 mg protein이 분해하는 NADPH의 양을 nmole로 표시하였다.

Catalase 활성의 측정

Aebi의 방법[13]에 준하여 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)중에 기질인 10 mM H_2O_2 의 환원되는 정도를 파장 240 nm에서 흡광도의 변화를 읽고 분자 흡광계수 0.041 $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 을 이용하여 활성도를 산정하였다. 효소활성의 단위는 1분당 1 mg protein이 생성하는 hydrogen peroxide의 양을 μ mole로 표시하였다.

Aminopyrine N-demethylase 활성 측정

Nash의 방법[14]을 약간 변경하여 반응액 2.0 ml중에 0.1

M Na^+/K^+ phosphate buffer (pH 7.5)에 2 mM aminopyrine HCl, 0.5 mM NADPH, 10 mM MgCl_2 , 150 mM KCl, 1 mM semicarbazide 및 효소액(300-400 μ g protein)을 가하였다. 이 반응액을 37°C에서 30분간 반응시킨 후 15% ZnSO_4 2.0 ml와 포화 $\text{Ba}(\text{OH})_2$ 2.0 ml를 가하여 반응을 종료시키고 5분간 방치한 다음 10분간 원심분리하였다. 여기서 얻은 상층액 5.0 ml에 발색의 목적으로 Nash reagent 2.0 ml를 첨가하고 60°C에서 30분간 반응시킨 후 다시 원심분리하여 상층액을 취하였다. 이 상층액을 파장 415nm에서 흡광도를 측정하고 표준검량선에 근거하여 활성도를 산정하였다. 효소활성의 단위는 1분당 1 mg protein이 생성하는 formaldehyde의 양을 nmole로서 표시하였다.

Aniline hydroxylase 활성 측정

Bidlack과 Lowery 방법[15]에 준하여 반응액 2.0 ml중에 10 mM MgCl_2 와 150 mM KCl이 함유된 50 mM tris HCl buffer (pH 7.4)에 1 mM aniline HCl, 0.5 mM NADPH 및 효소액 (300-400 μ g protein)을 가하였다. 이 반응액을 37°C에서 20분간 반응시킨 후 반응을 종결할 목적으로 20% trichloroacetic acid 2.0 ml를 가한 다음 10분간 원심분리하였다. 상층액 2.0 ml를 취하여 발색의 목적으로 10% Na_2CO_3 1.0 ml와 0.2 N-NaOH (2% Phenol 함유) 2.0 ml를 넣고 37°C에서 30분간 반응시켰다. 그 다음 파장 640 nm에서 흡광도를 측정하고 표준검량선에 근거하여 활성도를 산정하였다. 효소활성의 단위는 1분당 1 mg protein이 생성하는 ρ -aminophenol nmole로서 표시하였다.

단백질 정량 및 통계처리

단백질의 함량은 Lowry 등의 방법[16]에 준하여 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 측정하였다. 본 실험에서 얻어진 결과는 평균치 \pm 표준편차로 표시하였고, 통계적 유의성 검증은 Duncan's multiple range test를 이용하였다.

결과 및 고찰

혈청 중 AST와 ALT 등의 효소 활성도의 상승은 간 독성으로 인한 간세포의 괴사와 간 조직의 파괴가 진행됨에 따라 효소가 혈중으로 유리되어 나타나므로 간 독성 연구에 이용되고 있다[17]. 간 손상의 지표로 사용되는 AST, ALT 활성을 측정된 결과를 Table 1에 나타내었다. AST의 경우 정상군의 함량은 55.87 ± 3.58 IU/L인데 반해 매일 300 mg/kg의 용량으로 1주간 시료 투여한 군은 88.33 ± 7.70 IU/L, 같은 용량으로 2주간 시료 투여한 군은 117.54 ± 3.50 IU/L로 각각 58.10%, 110.38% 증가하는 결과를 나타내었다. 또한 ALT의 경우도 매일 300 mg/kg의 용량으로 2주간 시료를 투여한 군의 함량이 정상군보다 2배정도 증가하는 결과를 나타내어 자가 추출물이 간 세포에 심한 독성을 나타냄을 보였다.

Table 1. Effect of *Terminalia chebula* on serum AST, ALT activities and LD₅₀ in rats*

Treatment	Dose (mg/kg)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	LD ₅₀ (P.O)
Normal		55.87±3.58 ^e	11.77±0.51 ^c	390 mg/kg>
TCW (1 week)	200	67.20±3.95 ^d	15.83±0.51 ^b	
TCW (1 week)	300	88.23±7.70 ^c	17.40±1.96 ^b	
TCW (2 weeks)	200	102.23±1.24 ^b	22.98±1.30 ^a	
TCW (2 weeks)	300	117.54±3.50 ^a	24.13±1.91 ^a	

*Rats orally administered various concentration of water extract of *Terminalia chebula* daily during one week, and two weeks. (200, 300 mg/kg, P.O.)

¹⁾Values are mean±S.D. for five experiments.

²⁾Data followed by different superscript are statistically significant from normal (P<0.05) by Duncan s new multiple range test.

지질과산화는 생체에서 자연적으로 발생할 수 있는 superoxide anion radical로부터 유래하는 각종의 free radical에 의해 세포막의 다가 불포화지방산이 과산화되는 현상을 지칭한다. 불포화지방산은 과산화 과정을 통해 분해되어 MDA를 생성하므로 이를 지질과산화를 측정하는 지표로 삼는다[18]. 이에 가자 추출물에 의한 간장 독성을 보고자 간 조직 중 지질과산화물 함량에 미치는 영향에 대해 관찰한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 정상군의 함량은 4.60±1.14 nmole/g인데 반해 1주 동안 매일 200 mg/kg, 300 mg/kg의 용량으로 가자 추출물을 투여한 군의 지질과산화 함량은 각각 7.06±1.06 nmole/g, 8.68±1.08 nmole/g으로 약 53.48%, 88.70% 정도 증가하는 경향을 나타내었다. 2주간 매일 200 mg/kg, 300 mg/kg의 용량으로 시료 투여한 군의 지질과산화 함량은 10.83±0.61 nmole/g, 12.60±0.95 nmole/g로 정상군에 비해 135.43%, 173.91% 정도 증가하는 결과를 나타내었다.

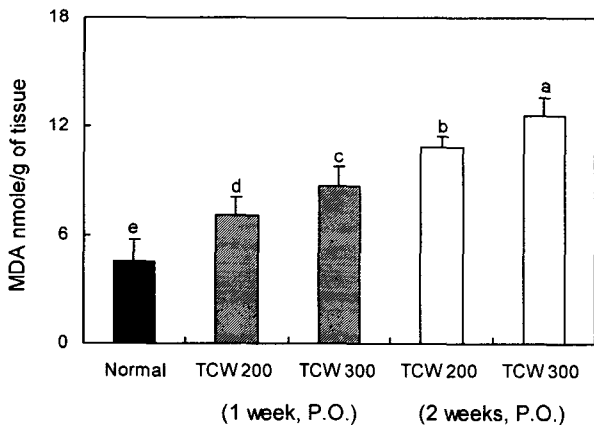


Fig. 1. Effect of *Terminalia chebula* on the hepatic lipid peroxidation in rats.*

*Rats orally administered various concentration of water extract of *Terminalia chebula* daily during one week, and two weeks. (200, 300 mg/kg, P.O.)

1) Values are mean±S.D. for five experiments.

2) Data followed by different superscript are statistically significant from normal (P<0.05) by Duncan s new multiple range test.

Fig. 1에서 나타난 간 조직 중의 지질과산화물 함량의 변동 원인을 알아보기로 하자 간장의 cytosolic enzyme system에 미치는 가자 추출물의 영향에 대해 관찰한 결과를 Table 2에 나타내었다. XO의 경우 정상군은 0.061±0.003 nmole/mg/min으로 나타났고, 2주 동안 매일 300 mg/kg의 용량으로 가자 추출물을 투여한 군의 XO의 활성은 0.102±0.004 nmole/mg/min으로 정상군에 비해 67.21% 증가하는 경향을 나타냈다. 또한 AO의 활성에서도 정상군은 0.077±0.021 nmole/mg/min의 결과를 보였고, 2주 동안 매일 300 mg/kg의 용량으로 가자 추출물을 투여한 군의 활성은 0.148±0.004 nmole/mg/min의 활성을 보여 정상군에 비해 약 92.20% 증가를 나타내었다. 이 효소들은 cytosol 분획에 존재하는 molybden 함유 산화 효소로서 반응을 촉매하는 과정에서 산소 분자를 전자 수용체로 활용하고 있으므로 superoxide anion, hydrogen peroxide 및 최종적으로 hydroxyl radical을 생성한다[19]. 그러므로 가자 추출물은 이러한 효소의 활성을 증가시켜 간 조직중 지질과산화물 함량을 증가시킨 결과로 생각된다.

Table 2. Effects of *Terminalia chebula* on the hepatic cytosolic enzyme system activity in rats*

Treatment	Dose (mg/kg)	XO	AO
		uric acid nmole / mg protein / min	2 pyridone nmole / mg protein / min
Normal		0.061±0.003 ^e	0.077±0.021 ^d
TCW fr (1 week)	200	0.072±0.003 ^d	0.110±0.006 ^c
TCW fr (1 week)	300	0.102±0.004 ^c	0.124±0.005 ^b
TCW fr (2 weeks)	200	0.116±0.004 ^b	0.137±0.003 ^{ab}
TCW fr (2 weeks)	300	0.139±0.004 ^a	0.148±0.004 ^a

*Rats orally administered various concentration of water extract of *Terminalia chebula* daily during one week, and two weeks. (200, 300 mg/kg, P.O.)

1) Values are mean±S.D. for five experiments.

2) Data followed by different superscript are statistically significant from normal (P<0.05) by Duncan s new multiple range test.

간 조직의 microsomal enzyme으로서 간장의 지질과산화 생성 대사 효소계에 영향을 미치는 AD, AH 효소의 활성에 대해 측정된 결과를 Fig. 3에 나타내었다. AH의 경우 매일 300 mg/kg의 용량으로 1주간 가자 추출물을 투여한 군의 효소활성은 1.06 ± 0.13 nmole/mg/min, 2주간 같은 용량으로 투여한 군의 효소활성은 0.83 ± 0.03 nmole/mg/min으로, 정상군과 비교할 때 약간의 감소를 나타내 별다른 유의성이 없음을 나타내었다. 또한 AD의 경우에서도 같은 경향을 나타

내고 있음을 볼 수 있었다.

친전자성 물질들과 활성 산소 및 과산화물의 최종적 무독화 과정에서는 필연적으로 glutathione이 요구되는데 이 물질의 함량에 따라 독성 발현의 유무를 판단할 수 있다[20]. 가자 추출물에 의한 간장 독성을 보고자 간 조직중 glutathione 농도에 미치는 영향에 대해 관찰한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 정상군의 함량은 26.24 ± 6.38 μ mole/g인데 반해 1주 동안 매일 200 mg/kg, 300 mg/kg의 용량으로 가자 추출물을 투여한 군의 glutathione 농도는 각각 23.14 ± 2.68 μ mole/g, 21.56 ± 2.10 μ mole/g으로 각각 11.81%배, 17.84% 정도 감소하는 경향을 나타내었으며, 2주 동안 매일 같은 용량으로 투여한 군의 glutathione 농도는 9.23 ± 0.77 , 6.56 ± 0.68 로 정상군에 비해 약 64.82%, 75% 정도 감소하는 것으로 나타났다.

glutathione의 세포내 함량 유지에는 glutathione 합성에 관계하는 glutathione 합성계 효소와 해독 반응 후 생성되는 oxidized glutathione을 환원시켜 reduced glutathione을 형성하는 glutathione 환원계 효소가 관여한다[21]. 가자 추출물 투여 후 glutathione의 함량 감소를 경감시키는 기전을 알아볼 목적으로 glutathione 합성에 관여하는 γ -GCS의 활성과 산화형 glutathione을 환원형 glutathione으로 환원시키는 GR의 활성을 관찰하였다. 가자 추출물에 의한 간장 독성에 대하여 알아보하고자 glutathione 생성계에 관여하는 여러 가지 효소 활성에 대해 관찰한 결과를 Table 3에 나타내었다.

GR, GST, γ -GCS 세 가지 효소 활성은 정상군의 경우 각각 0.063 ± 0.003 nmole/mg/min, $2,290 \pm 0.061$ nmole/mg/min, $32,615 \pm 0.730$ nmole/mg/min이며, 2주간 매일 300 mg/kg의 용량으로 시료 투여한 군의 활성은 0.028 ± 0.004 nmole/

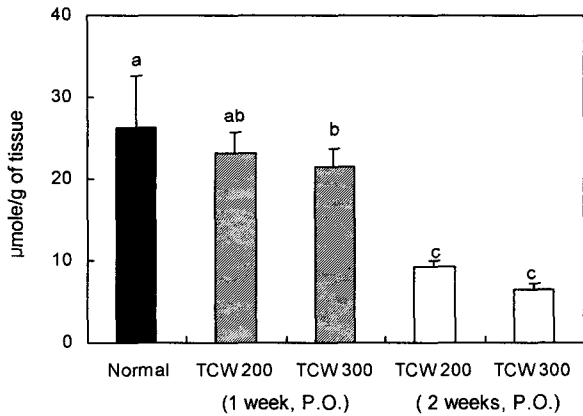


Fig. 2. Effect of *Terminalia chebula* on the hepatic glutathione in rats.*

*Rats orally administered various concentration of water extract of *Terminalia chebula* daily during one week, and two weeks. (200, 300 mg/kg, P.O.)

- 1) Values are mean \pm S.D. for five experiments.
- 2) Data followed by different superscript are statistically significant from normal ($P < 0.05$) by Duncan's new multiple range test.

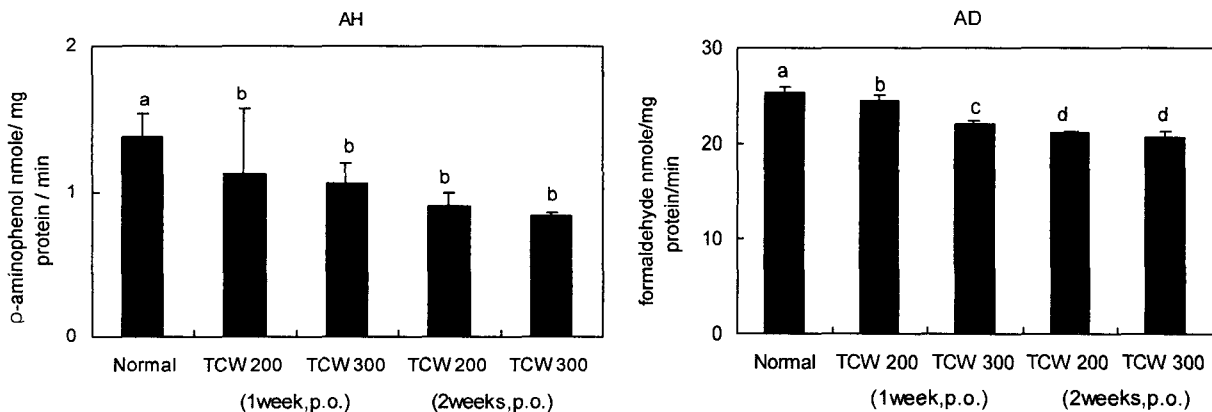


Fig. 3. Effects of *Terminalia chebula* on the hepatic microsomal enzyme system in rats*.

*Rats orally administered various concentration of water extract of *Terminalia chebula* daily during one week, and two weeks. (200, 300 mg/kg, P.O.)

- 1) Values are mean \pm S.D. for five experiments.
- 2) Data followed by different superscript are statistically significant from normal ($P < 0.05$) by Duncan's new multiple range test. units **Aniline hydroxylase : ρ -aminophenol nmole / mg protein / min, ***Aminopyrine N-demethylase HCHO nmole / mg protein / min.

Table 3. Effects of *Terminalia chebula* on the glutathione biosynthesis enzyme system in rats*

Treatment	Dose (mg/kg)	GR**	γ -GCS***	GST****
Normal		0.063±0.003 ^a	32.615±0.730 ^a	2.290±0.061 ^a
TCW fr (1 week)	200	0.054±0.004 ^b	31.250±0.367 ^{ab}	0.950±0.040 ^b
TCW fr (1 week)	300	0.045±0.003 ^c	31.116±1.480 ^b	0.723±0.017 ^c
TCW fr (2 weeks)	200	0.039±0.003 ^d	30.233±1.370 ^b	0.578±0.011 ^d
TCW fr (2 weeks)	300	0.028±0.004 ^e	30.015±1.087 ^b	0.432±0.052 ^e

*Rats orally administered various concentration of water extract of *Terminalia chebula* daily during one week, and two weeks. (200, 300 mg/kg, P.O.)

1) Values are mean±S.D. for five experiments.

2) Data followed by different superscript are statistically significant from normal (P<0.05) by Duncan's new multiple range test.

Units: **glutathione nmole/mg protein/min, ***Pi nmole/mg protein/min and ****conjugated 1,2-dinitro-4-nitrobenzene nmole / mg protein/min.

Table 4. Effects of *Terminalia chebula* on the antioxidant enzyme activities and serum superoxide dismutase activity in rats*

Treatment	Dose (mg/kg)	SOD**	GP***	Catalase****
Normal		0.06±0.001 ^e	0.14±0.001 ^a	0.04±0.006 ^a
TCW fr (1 week)	200	0.09±0.007 ^d	0.12±0.008 ^b	0.03±0.003 ^b
TCW fr (1 week)	300	1.22±0.001 ^c	0.11±0.005 ^c	0.02±0.001 ^b
TCW fr (2 weeks)	200	1.45±0.005 ^b	0.08±0.009 ^d	0.01±0.002 ^c
TCW fr (2 weeks)	300	1.87±0.001 ^a	0.05±0.003 ^c	0.01±0.005 ^d

*Rats were orally administered various concentration of water extract of *Terminalia chebula* daily for one week, two weeks. (200, 300 mg/kg)

1) Values are mean±S.D. for five experiments.

2) Data followed by different superscript are statistically significant from normal (P<0.05) by Duncan's new multiple range t-test.

unit: **SOD: 1 unit of superoxide dismutase activity was defined as the which inhibited the reduction of alkaline DMSO-mediated cytochrome C by 50%, ***GP: oxidized NADPH nmole / mg protein / min and ****catalase: H₂O₂ decreased μ mole / mg protein / min.

mg/min, 0.432±0.052, nmole/mg/min, 30.015±1.087 nmole/mg/min의 활성을 나타내었다. 이 결과는 정상군에 비해 GR은 56.6%, GST는 81.1%, 그리고 γ -GCS가 6.7% 감소했다는 것을 나타내는 것이다. 이러한 결과로 보아 가자 추출물에 의한 간 독성은 GR의 활성 감소로 인하여 산화형 glutathione의 이용률이 저하되고 이에 따라 환원형 glutathione 함량 감소에 의한 것으로 보이며, 또한 이로 인해 해독계 반응에 작용하는 GST의 활성 감소 현상도 나타나는 것으로 생각된다.

SOD는 생체 이물질로 인하여 생성된 O₂를 H₂O₂로 변환시키며, catalase는 H₂O₂를 H₂O와 O₂로 분해하며, GP 역시 생성된 활성산소를 H₂O로 변환시켜 체외로 배설시키는 해독계 효소들이다[22,23].

가자 추출물이 지질과산화반응의 해독계에 미치는 영향을 관찰할 목적으로 catalase, GP 및 SOD의 활성을 측정한 결과를 Table 4에 나타내었다. catalase, GP의 활성을 보면 정상군은 0.04±0.006 μ mole/mg/min, 0.14±0.001 nmole/mg/min의 결과를 보이는 반면에 매일 300 mg/kg의 용량으로 2주간 시료를 투여한 군은 0.009±0.001 μ mole/mg/min, 0.05±0.003 nmole/mg/min으로 각각 77.5%, 64.29% 정도 감소

하는 결과를 나타냈다. 또한 SOD의 활성은 정상군은 0.632±0.0095인데 비해 매일 300 mg/kg의 용량으로 2주간 시료 투여한 군의 활성은 1.872±0.110으로 3배정도 증가함을 나타내었다. 즉 지질과산화물의 생성 증가 현상이 활성산소를 제거하는 효소계인 catalase, GP 및 SOD의 활성을 선택적으로 저해하여 나타나는 결과로 생각된다.

요 약

가자 추출물을 흰쥐에 일정량 투여한 후 간장에 미치는 영향을 관찰할 목적으로 여러 가지 효소량의 변동을 검토하였다. 간 손상의 지표로 사용되는 AST, ALT 활성을 측정된 결과 AST, ALT 모두에서 정상군보다 300 mg/kg의 용량으로 2주 시료 투여한 군의 함량이 2배 이상 증가되는 것으로 나타났다. 가자 추출물이 지질과산화물 생성에 미치는 효과를 관찰한 결과, 300 mg/kg의 용량으로 2주 시료 투여한 군 함량이 정상군에 비해 135.43%, 173.9% 정도 증가하는 결과를 나타내었다. 간 조직의 지질과산화물 반응에 관여하는 것으로 알려진 XO, AO, AD 및 AH 활성에 대한 효과를 관찰한 결과 마이크로솜 분획에 존재하는 AD, AH의 활성은 저

해 효과가 없었고, 세포질 효소인 XO, AO의 활성은 300 mg/kg의 용량으로 2주 시료 투여한 군 함량이 정상군에 비해 약 2배 증가됨을 볼 수 있었다.

가자 추출물에 의한 간 조직중 glutathione 농도에 미치는 영향에 대해 관찰한 결과 2주 동안 300 mg/kg의 용량으로 투여한 군의 glutathione 농도는 정상군에 비해 약 75% 감소하는 것으로 나타났다. 가자 추출물 투여 후 glutathione의 함량 감소를 경감시키는 기전을 알아볼 목적으로 glutathione 합성에 관여하는 γ -GCS의 활성과 산화형 glutathione을 환원형 glutathione으로 환원시키는 GR의 활성을 관찰한 결과 정상군에 비해 GR이 56.6%, γ -GCS가 6.7% 정도 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 glutathione의 함량 변동은 산화형 glutathione을 환원형 glutathione으로 환원시키는 GR의 활성에 영향을 주어 나타나는 결과로 생각된다. 가자 추출물이 지질과산화의 해독제에 미치는 영향을 관찰할 목적으로 catalase, GP 및 SOD의 활성을 측정 한 결과 catalase, GP의 활성은 각각 77.5%, 64.3% 감소하는 결과를 나타냈으며, SOD의 활성은 정상군에 비해 약 3배 증가하는 것으로 나타났다.

참 고 문 헌

- Aebi, H. 1974. Catalase. In "Methods of enzymatic analysis" Vergmeyer, M. U., Academic Press, New York., 2, 673.
- Bidlack, W. R. and G. L. Lowry. 1982. Multiple drug metabolism : ρ -nitroanisole reversal of acetone enhanced aniline hydroxylation. *Biochem. Pharmacol.* **31**, 311-317.
- Ellman, G. L. 1959. Tissue sulfhydryl group. *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70-77.
- Habig, W. H., M. J. Pabist and W. B. Jakoby. 1974. Glutathione S-transferase : The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J. Biol. Chem.*, **249**, 7130.
- Halliwell, B. and J. M. C. Gutteridge. 1984. Lipid peroxidation, Free radicals, cell damage and antioxidant therapy. *Lancet*, **1**, 1396.
- Hur, B. H. and S. J. Joo. 2003. Natural Products pp. 2-3, In Chang, I. M., etc(eds.), *Treatise on Asian Herbal Medicines*, Vol. I , Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul.
- Hur, B. H. and S. J. Joo. 2003. Natural Products pp. 19-20, In Chang, I. M., etc (eds.), *Treatise on Asian Herbal Medicines*, Vol. II, Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul.
- Little, C. and P. J. O'Brine. 1968. An intracellular GSH-peroxidase with lipid peroxide substrate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **31**, 145.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Rendall 1951. Protein Measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
- McCord, J. M. 1974. Free radical and inflammation : Protection of synovial fluid by superoxide dismutase. *Science*, **185**, 529-531.
- Meister, A. and P. G. Richman. 1975. Regulation of γ -glutamylcysteine synthesis by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J. Biol. Chem.*, **250**, 1422.
- Mize, C. E. and R. G. Langdon. 1962. Hepatic glutathione reductase : purification and general kinetic properties. *J. Biol. Chem.*, **237**, 1589-1595.
- Nashi, T. 1953. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the herisch reaction. *J. Biol. Chem.* **55**, 412-416.
- Ohkawa, H., N. Ohishi. and K. Yaki. 1979. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, **95**, 351-358.
- Oyanagui, Y. 1984. Reevaluation of assay methods and establishment of kit for superoxide dismutase activity. *Anal. Biochem.*, **42**, 290.
- Park, J. O. and S. O. Lee. 1992. M. S. thesis of Kyung Sung University.
- Rajagopalan, K. V., I. Fridovich and P. Handler. 1962. Hepatic aldehyde oxidase. In : Purification and properties. *J. Biol. Chem.*, **237**, 922-928.
- Reitman, S, S. A. Frankel. 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin Pathol.*, **28**, 56-63.
- Ress, D., I. Cotgreave and P. Moldeus. 1985. The interaction of reduced glutathione with active oxygen species generated by xanthine oxidase catalyzed metabolism of xanthine. *Biochem. Biophys. Acta.*, **341**, 278.
- Stirpe, F. and C. E. Della. 1969. The regulation of rat liver xanthine oxidase : Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (Type D) to oxidase (Type O). *J. Biol. Chem.*, **244**, 3855-3963.
- Reddy, C. C., C.P.D. Burgess, C. Y. Scholz and E. J. Massaro. 1981. Evidence for the occurrence of selenium-independent glutathione peroxidase activity in rat liver microsome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **101**, 970.
- Todorovic, T. and D. Vujanovic. 2002. The influence of magnesium on the activity of some enzymes (AST, ALT, ALP) and lead content in some tissues. *Magnesium research*, **15**, 173-177.
- Torres, A. M., J. V. Kodriguez and M. M. Elias. 1989. Vulnerability of the medullary thick ascending limb to glutathione depletion in rat kidney, effects of diuretics and indomethacine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **25**, 247.