

## 참당귀(*Angelica gigas*)의 DPPH Radical 소거 활성과 항산화 효과

강순아<sup>1</sup> · 한진아<sup>2</sup> · 장기효<sup>3</sup> · 조여원<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>건국대학교 분자생명공학과 생명분자정보학센터

<sup>2</sup>경희대학교 동서의학대학원 임상영양학전공

<sup>3</sup>삼척대학교 식품영양학과

### DPPH Radical Scavenger Activity and Antioxidant Effects of Cham-Dang-Gui (*Angelica gigas*)

Soon Ah Kang<sup>1</sup>, Jin A Han<sup>2</sup>, Ki-Hyo Jang<sup>3</sup> and Ryowon Choue<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Molecular Biotechnology, BMIC, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

<sup>2</sup>Dept. of Medical Nutrition, Graduate School of East-West Medical Science, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

<sup>3</sup>Dept. of Food and Nutrition, Samcheok University, Samcheok 245-711, Korea

#### Abstract

This study was carried out to evaluate the free radical scavenging effect and antioxidant effect of Cham-Dang-Gui (*Angelica gigas*) on cyclophosphamide (CYP) injected rats. Rats were divided into five groups: CON (normal group), ANS (CYP-injected and normal diet group), AND (CYP-injected and normal diet and Cham-Dang-Gui-treated group), ALS (CYP-injected and low iron diet group), and ALD (CYP-injected and low iron diet and Cham-Dang-Gui-treated group). CYP (30 mg/kg) was intraperitoneally injected to rats for early 3 days. Saline or Cham-Dang-Gui was administrated orally for entire experimental period. DPPH radical scavenger activity was measured by DPPH method, it was shown higher in methanol extract (81.5%) than in water extract (66.3%) of Cham-Dang-Gui. We observed the preventive effects of Cham-Dang-Gui on lipid oxidation of liver and protein oxidation of plasma. Hepatic SOD and catalase activities were significantly higher in CYP-injected group (ANS) than CON group, but SOD activity was slightly lowered in Cham-Dang-Gui treated group than CYP-injected group (ANS). These results suggest that extract of Cham-Dang-Gui could be useful for functional materials to reduce the oxidation of lipids and protein induced by free radicals.

**Key words:** Cham-Dang-Gui, antioxidant effect, DPPH radical scavenger activity, MDA

#### 서 론

의학의 발달로 각 질환의 치료방법은 급속도로 발전하여 혈액과 관련된 제반질환의 치료도 진일보된 상태이지만 빈혈 및 백혈병 등의 혈액질환은 아직 완전한 치료방법을 찾지 못하고 있는 것이 현실이다. 특히 빈혈은 적혈구 수, 헤모글로빈의 농도가 정상수준 이하로 감소되었을 때를 말하며, 신체발육부진, 활동능력 감소, 면역기능 등 생리적 현상을 가져온다(1).

Cyclophosphamide(CYP)는 일반적으로 항암제로 사용되는 약제로써 투여 후 백혈구 감소증, 황달, 대장염, 신우내의 출혈 등의 부작용을 유발하고(2), 빈혈증상을 악화시키며(3), 활성산소의 생성으로 산화적 스트레스를 유도한다고 보고되었다(4). 산화적 스트레스를 완화하고자 비타민 E, C와 같은 항산화 비타민을 투여했을 때 malondialdehyde(MDA) 감소

와 항산화 효소의 활성도 증가를 보였다(4,5). CYP 투여에 의한 과산화반응을 억제하고자 melatonin을 투여한 결과 과산화반응의 지표물질인 MDA의 감소와 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GP) 효소의 활성도가 증가하는 것으로 자유기의 포획으로 과산화 반응의 방어적인 역할을 하였다고 하였다(6).

항암치료시 부작용으로 나타난 빈혈의 치료는 합성된 recombinant erythropoietin(r-HuEPO)이 사용되고 있는데(7, 8) 혈구증가는 볼 수 있으나 그 효과가 일시적이다(9,10). 한 방에서는 조혈촉진 생약으로 숙지황, 백작약, 당귀, 천궁 등을 처방하는데(11,12) Bradley 등(13)의 연구에 의하면 혈액 투석 환자들에게 중국 당귀(*Angelica sinensis*)와 백작약을 일주일에 한번씩 차로 끓여 마시도록 했을 때 환자의 혈액학적 상태가 향상되었다고 보고하였다(14,15). 한국당귀 즉 참당귀(*Angelica gigas*)는 냉증, 빈혈과 같은 부인과 질환에

\*Corresponding author. E-mail: rwcho@khu.ac.kr  
Phone: 82-2-961-0769, Fax: 82-2-965-8904

주로 쓰이며 혈행을 수월하게 하며(16), 조혈 및 혈류개선에 사용되고 있다.

Han 등(17)의 선행연구에 의하면 참당귀 투여는 화학요법 부작용으로 발생하는 체중감소를 완화시키고 감소된 혈액학적 빈혈지표를 높였으나 조혈성장인자로 신장에서 생성되어 골수에서 조혈세포의 증식을 촉진시키는 호르몬인 erythropoietin(EPO)의 mRNA 발현을 측정할 결과 참당귀추출물의 투여에 의해 EPO 발현에 유의적인 차이를 보이지 않아 혈액 수치를 향상시킨 요인이 EPO 발현이 아닌 것으로 생각되었다. 그러나, Kim과 Lim(18)은 CYP를 투여한 흰쥐의 골수세포에서 TPO 유전자 발현을 조사한 결과 대조군에 비해 당귀, 천궁, 보혈당을 처리한 군에서 조혈인자인 TPO 유전자 발현이 증가하였음을 보고하였다. 참당귀추출물의 투여로 인해 혈액학적 빈혈 수치를 향상시킨 요인이라 가정되는 두번째 요인은 CYP 투여로 인해 CYP가 간에서 활성화하면서 생긴 free radical이 조직에 손상을 주어 부작용이 발생하게 되므로(19), 참당귀추출물로 인해 혈액학적 빈혈수치가 향상된 것은 참당귀추출물의 투여가 EPO 발현에 의한 조혈효과보다는 CYP 투여로 생성된 free radical의 감소효과일 가능성을 제시하였다. 이에 본 연구에서는 CYP로 유도된 산화성 손상의 피해를 개선하는 기전을 살펴보고자 자유기를 포착하는 항산화 능력을 측정할 수 있는 DPPH free radical scavenging 효과와 참당귀 열수 추출물의 투여가 혈액과 간조직에서의 지질, 단백질 산화 억제 능력, 간조직의 항산화 효소 활성에 미치는 영향을 살펴보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 추출방법

참당귀(*Angelica gigas*)는 강원도 평창군 진부면산을 강원 약초 영농조합법인 생산약초공장에서 구입하여 참당귀 500 g을 20배의 물에 2시간동안 진탕기로 열탕추출하여 감압여과하고 rotary vacuum evaporator(EYELA, Japan)를 사용하여 감압농축한 후 동결건조하여 사용하였다. 또한, 참당귀를 분쇄하여 24시간 동안 70% 메탄올로 3회 추출한 후, 추출액을 evaporator로 농축한 후 동결 건조 사용하였다.

### 실험동물의 사육 및 식이

4주령의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 (주)샘타코에서 구입하여, 적응기간 1주 동안 일반고형사료를 공급하고, 실험군은 cyclophosphamide(500 mg, 중의제약)를 30 mg/kg BW/day로 3회 복강 투여하여 빈혈을 유도하였다. 빈혈유발군은 정상식이군(ferric citrate 6 g/kg diet)과 철분결핍식이군(ferric citrate 2 g/kg diet)으로 분류하여 식이를 제공하였으며, 참당귀추출물을 1 g/kg BW/day로 14일 동안 경구 투여하였다. 정상식은 AIN-76A diet(Dytes Inc., Bethlehem, PA., USA)를 사용하였다. 저철분 식이에 의한 빈혈효과와 CYP 투여에 의하여 상승효과를 주어 체내 철분의 영양상태

를 저하시킨 상태를 유지하고자 하였다. 정상군(CON, 8마리), CYP-정상식이-식염수군(ANS, 8마리), CYP-정상식이-참당귀추출물 투여군(AND, 8마리), CYP-저철분식이-식염수군(ALS, 8마리), CYP-저철분식이-참당귀추출물 투여군(ALD, 8마리)으로 나누었다. 모든 실험동물의 식이는 자유섭취방법으로 공급하였다. 실험시작 14일 후에 희생하여 혈액을 채취하고, 간조직을 분리 -70°C 냉동 보관하였다.

### Free radical 소거활성 측정

DPPH에 의한 항산화 활성은 화합물이 DPPH radical에 전자를 공여함으로써 자유기를 소거하는 활성을 측정하는 것으로 DPPH(1-diphenyl-2-picryl hydrazyl)를 에탄올에 희석하여 희석배수에 따라 540 nm에서 흡광도를 측정하여 0.96~0.97이 되는 농도를 선택하였다. Free radical 활성측정은 96-well microtiter plate reader(20)를 사용하여 시료 10%를 에탄올에 처리한 후 동량의 1 mM DPPH를 가한 후 상온에서 30분을 두었다가 540 nm에서 흡광도를 측정하였다(21). DPPH radical scavenging activity(%)는 시료첨가구와 비첨가구의 흡광도차를 백분율로 표시하였다.

$$\text{DPPH scavenging activity (\%)} = (1 - \text{시료첨가구 OD} / \text{비첨가구 OD}) \times 100$$

### 혈장과 간조직내 지질과산화물 농도 측정

Thiobarbituric acid를 이용한 Sinnbuber와 Yu의 방법(22) 및 Lee의 방법(23)을 이용하여 간조직 내 지질과산화물과 Buege와 Aust(24)의 방법으로 혈장 내 지질과산화물의 농도를 나타내는 thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) 농도를 측정하였다. TBARS는 조직이나 세포내 소기관 부유액의 malondialdehyde(MDA)와의 반응물로 추정되며 지질과산화물의 수준을 평가하는데 이용된다. 일정량의 간조직에 10 mM phosphate buffer(pH 7.4)를 10배(w/v)가 되도록 가하여 균질화한 후 sonication하여 세포막을 파괴하였다. 이 균질액을 1 mL씩 duplicate로 취하여 17.5% trichloroacetic acid(TCA) 1 mL와 0.6% thiobarbituric acid(TBA, in double-DW, pH 2.0) 1 mL를 첨가하여 혼합한 후 15분간 진탕 가열하여 냉각시키고, 70% TCA 용액 1 mL를 첨가하여 20분간 상온에서 방치시킨 후 3,000×g에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상층액 내 MDA 함량은 회귀방정식으로 산출한 표준용액 1,1,3,3-tetramethoxy propane(TMP)의 직진 방정식에 대입하여 지질과산화물(MDA) 농도를 구하였다. 지질과산화물 측정에 사용된 간조직의 단백질 함량은 Bradford reagent(Sigma, USA)를 이용하여 측정하고 ng/mg protein으로 나타내었다.

### 혈장과 간조직내 단백질 산화의 측정

혈장과 간의 단백질 산화정도는 단백질 carbonyl 함량을 DNPH(2,4-dinitrophenyl hydrazine)을 이용한 Oliver 등(25)의 방법에 의하여 측정하였다. 침전된 단백질에 2,4-DNPH 시약과 반응시킨 후 에탄올과 에틸아세테이트의 혼합액으로

세척하고 6 M guanidine-HCl 용액으로 용해하여 370 nm에서 흡광도의 차이를 측정하고 흡광계수는 ( $22 \times 10^{-5} \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )를 이용하여 환산하였다.

#### 간조직내 항산화효소 활성도 측정

**Superoxide dismutase(SOD) 활성도 측정** : Superoxide dismutase 활성도 측정은 pyrogallol법(26)과 자동산화에 의한 발색을 이용한 Marklund와 Marklund의 방법(27)을 이용하였다. SOD의 활성도를 측정하기 위해 일정량의 간조직에 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.4)를 10배(w/v) 가하여 균질화시킨 후 ice bath에서 25초간 sonication하여 세포막을 파괴하고, 이 균질액을 4°C,  $20,000 \times g$ 에서 30분간 원심 분리하여 얻은 상층액을 효소 시액으로 사용하였다. 이 효소 시액은 sodium phosphate buffer(pH 7.4)로 희석하여 100  $\mu\text{L}$ 를 취하고, 25°C에서 1시간 동안 vibrating시킨 50 mM tris-acetate buffer(1 mM diethylenetriamin-pentaacetic acid; DPTA, pH 8.2) 9.8 mL와 25 mM pyrogallol(in 10 mM degasing acetic acid) 100  $\mu\text{L}$ 를 넣어 25°C를 유지하면서 420 nm에서 3분 동안의 흡광도 변화를 측정하였다. SOD 활성도 측정에 사용된 효소 시액의 단백질 농도를 Bradford reagent (Sigma, USA)를 이용하여 측정하고 ng/mg protein으로 나타내었다. SOD 1 unit는 1분 동안 pyrogallol의 자동산화를 50%까지 억제하는데 요구되는 효소의 양으로 하였다.

**Catalase 활성도 측정** : Catalase 활성도 측정은 Aebi(28)와 Claiborne(29)의 방법을 이용하여 측정하였다. 자외선 범위에서  $\text{H}_2\text{O}_2$ 는 파장이 감소함에 따라 흡광도가 지속적으로 증가되고, catalase에 의해  $\text{H}_2\text{O}_2$ 가 물( $\text{H}_2\text{O}$ )과 산소( $\text{O}_2$ )로 분해됨에 따라 240 nm 파장에서 감소되는 흡광도를 측정하였다. 이 때의 분당 흡광도( $\Delta A_{240}/\text{min}$ ) 감소차를 catalase 활성도로 나타내었다. Catalase 활성도 측정을 위해 일정량의 간조직에 10 mM sodium phosphate buffer(pH 7.4)를 10배(w/v) 가하여 균질화시킨 후 sonication하여 세포막을 파괴하였다. 이 균질액에 다시 10 mM sodium phosphate buffer(pH 7.4)로 적당량을 가하여 희석한 후 세포내 효소를 추출하기 위하여 시료 1 mL에 10% Triton X-100 100  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 4°C,  $15,000 \times g$ 에서 15분간 원심 분리하여 얻은 상층액을 sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 적당량 희석하여 50  $\mu\text{L}$ 를 취한 후, 19 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ (in sodium phosphate buffer, pH 7.0) 1 mL를 첨가하여 2분간 240 nm에서 흡광도의 변화를 3회 반복 측정하였다. 효소 시료의 catalase 활성도는 catalase standard(EC 1.11.1.6, Sigma, USA)를 이용하여 흡광도와 unit 간의 방정식을 구한 후, 측정된 시료의 흡광도의 차이가 방정식에 대입하여 활성도를 구하였다. 효소의 활성은 1분 동안 1  $\mu\text{mol}$ 의  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 분해시키는 효소의 양을 1 unit로 하였다. Catalase 활성도 측정에 사용된 효소 시액의 단백질 함량을 Bradford reagent(Sigma, USA)를 이용하여 측정하고 ng/mg protein으로 나타내었다.

#### 통계분석

모든 실험결과는 Statistic Analysis System(SAS, Ver 8.0) program을 이용하여 분석하였으며, 그 결과는 평균(mean)  $\pm$  표준편차(standard deviation, SD)로 표시하였다. 각 실험군의 평균의 차이는 general linear model(GLM)의 Duncan's multiple range test를 이용하여  $p < 0.05$  유의수준에서 검증하였다. 또한 CYP 투여에 의한 효과는 general linear model(GLM)의 Duncan's multiple range test를 이용하여  $p < 0.05$  유의수준에서 검증하였고, 식이에 의한 효과는 정상식이군과 저철분식이군 사이의 students' t-test를 이용하여 검증하였으며 참당귀추출물 투여에 의한 효과는 CYP만 투여한 군과 CYP 투여후 참당귀추출물을 투여한 군 사이의 students' t-test를 이용하여 검증하였다.

#### 결과 및 고찰

##### Free radical 소거 효과

Free radical로서 비교적 안정한 DPPH(1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)를 이용하여 참당귀 메탄올추출물과 열수추출물을 농도별로 free radical 소거 효과를 측정하여 Fig. 1에 나타내었다.

참당귀추출물을 농도별로 1 mM DPPH(1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 용액에 첨가하여 free radical을 소거하는 능력을 측정된 결과 참당귀의 열수추출물의 DPPH free radical 소거 효과는 0.125, 0.25, 0.5, 1(mg/mL)의 농도에서  $27.1 \pm 4.9$ ,  $38.5 \pm 4.3$ ,  $47.1 \pm 5.7$ ,  $66.3 \pm 4.1$ (%)로 나타났고, 메탄올추출물에서는 0.125, 0.25, 0.5, 1(mg/mL)의 농도에서  $22.3 \pm 0.8$ ,

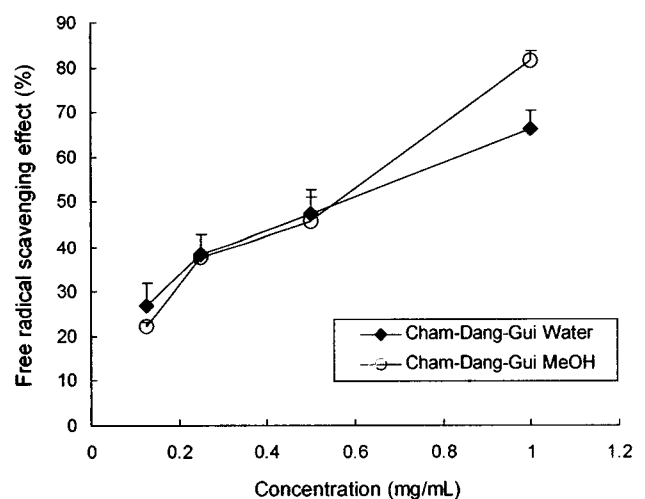


Fig. 1. Effect of Cham-Dang-Gui (*Angelica gigas*) on DPPH free radical scavenging activity.

Value are mean  $\pm$  SD.

DPPH free radical scavenging activity for test sample was determined with 1 mM DPPH ethanolic solution. Concentration of Cham-Dang-Gui water and MeOH extracts was 1, 0.5, 0.25, 0.125 (mg/mL).

DPPH scavenging activity (%) =  $(1 - \text{sample Abs}/\text{con Abs}) \times 100$ .

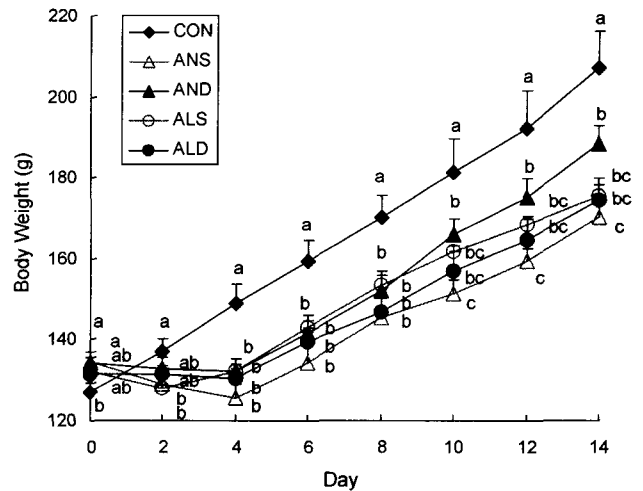
37.8±5.0, 45.6±5.4, 81.5±2.4(%)의 DPPH free radical 소거 효과를 보였다. 본 연구결과 참당귀추출물 1 mg/mL의 농도에서 열수추출물의 free radical 소거 효과는 메탄올추출물보다 높게 나타났으며 농도 의존적으로 자유기를 소거하는 능력이 상승하는 것을 관찰하였고 메탄올추출물은 합성 항산화제인 BHA 100 ppm 농도의 DPPH radical 소거 활성 88.1%와 흡사한 수치를 보였다. 이는 참당귀추출물이 자유기 소거능력이 있으며 가공과정에 쓰이는 메탄올추출물보다 다류에 응용할 수 있는 열수추출물의 효과가 높다는 것도 의미가 있었다. 선행연구(17)에서 참당귀추출물로 인해 혈액학적 빈혈수치가 향상된 것은 CYP 투여로 생성된 free radical을 소거함으로써 실험동물의 독성을 감소시켜 혈액학적 빈혈지표가 더 감소되는 것을 막았다고 사료된다.

활성산소는 인체 내에서 질병과 노화를 일으키는 원인 물질로서(30) 항산화 능력에 의하여 인체의 질병과 노화를 방지하는 능력을 평가하는데 Kim 등(31)의 연구에서 당귀미의 전자공여능 효과가 28.83%로 단삼, 솔잎보다 낮았지만 효과가 높게 나타났고 본 연구에서는 자유기 소거하는 능력이 농도에 의존적으로 증가하는 것을 볼 수 있었다. 또한 Choi 등(32)에 의하면 70% 이상의 전자 공여능의 효과를 보이는 다류 제품인 현미녹차(92.08%), 홍차(91.52%), 녹차(91.24%), 허브티(90.74%), 동규자차(72.72%)의 효과보다는 낮은 수치를 보였으나 두충차(38.7%), 감잎차(48.66%)보다는 높은 수치를 보임으로써 항산화력을 지닌 당귀를 이용한 다류의 개발에도 관심을 가질 수 있다.

**체중증가량 및 식이효율**

실험기간동안의 체중변화를 Fig. 2에 나타내었다. 정상군인 CON군은 체중이 계속 증가했으나, 3일 동안 CYP를 투여한 군인 ANS, AND, ALS, ALD군에서는 4일 동안 체중감소를 나타내었다. 또한 4일 이후에는 체중이 점차 증가하기 시작했다. 실험기간 최종체중은 정상식이군에서 CYP를 투여한 ANS군이 정상대조군인 CON군에 비해 유의적으로 낮았으며(p<0.05) 정상식이군에서 CYP 투여 후 참당귀추출물을 투여한 AND군은 ANS군에 비해 체중이 유의적으로 높았다(p<0.05).

선행연구(17)에 의하면 체중증가량은 CYP 투여한 정상식이 섭취군에서 참당귀추출물을 투여한 AND군이 ANS군에 비해 유의적으로 높았고, 저철분식이 군에서는 CYP 투여 후 참당귀추출물을 투여한 ALD군이 ALS군에 비해 유의적인 차이가 없었다. 또한, 식이 섭취량은 정상대조군인 CON군에 비해 CYP를 투여 후 정상식이나 저철분식을 섭취한 군인 ANS군과 ALS군이 유의적으로 낮게 섭취하였다. 정상식이군에서 CYP 투여 후 참당귀추출물의 투여에 의해서 식이섭취량의 차이가 나지 않았고, 저철분식이군에서 CYP 투여 후 참당귀추출물을 투여한 ALD군은 ALS군에 비해 유의적으로 높았다(p<0.05). 식이효율은 참당귀 추출물을 투여한 AND군이 CON군에 비해 높았으나, 저철분식이군에서는 참



**Fig. 2. Body weight change in experimental period.** CON: normal group. ANS: injection of CYP (30 mg/kg BW, i.p.). AND: injection of CYP (30 mg/kg BW, i.p.) and oral administration of Cham-Dang-Gui extract (1 g/kg BW). ALS: injection of CYP (30 mg/kg BW, i.p.) and low iron diet. ALD: injection of CYP (30 mg/kg BW, i.p.) and oral administration of Cham-Dang-Gui extract (1 g/kg BW) and low iron diet. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range test. abc: Values within the same row with different alphabets are significantly different (p<0.05) among group.

당귀 투여한 ALD군이 ALS군에 비해 유의적으로 식이효율이 낮았다(p<0.05). 체중에 대한 식이효율이 높았다는 것은 체중이 식이섭취량 때문에 증가된 것이 아니라 참당귀추출물의 투여로 체중감소 효과를 적게 함으로써 체중증가를 유도한 것이라고 볼 수 있었다.

**간과 혈장내 지질과산화물 농도**

혈장에서의 지질과산화 평가는 지질과산화 반응물인 malondialdehyde(MDA) 함량으로 나타내는데 정상대조군인 CON군에 비하여 CYP를 투여한 군과 CYP를 투여하고 저철분식을 공급한 군에서 유의적으로 높았다(p<0.05)(Table 1). CYP를 투여하고 참당귀를 투여한 AND군(30.8±1.8 ng/mg protein)은 CYP만 투여한 ANS군(38.5±2.7 ng/mg protein)에 비하여 유의하게 감소함을 보이면서 참당귀 투여에 의한 지질 과산화를 억제하는 항산화 효과를 보였다. 그러나 저철분식이 공급 후 참당귀 투여군에서는 유의적인 차이가 없었으나 감소하는 경향을 보였다.

간조직의 지질 과산화물 농도는 정상대조군인 CON군은 26.1±1.6(ng/mg protein)이었고, CYP를 투여한 후 정상식이를 섭취한 ANS군은 45.3±1.8(ng/mg protein)로 CON군에 비해 유의적으로 높았다(p<0.05). 또한 CYP를 투여한 정상식이군에서 참당귀추출물을 투여한 AND군은 34.8±4.9 (ng/mg protein)로 ANS군에 비해 유의적으로 낮았다(p<0.05). 반면, CYP를 투여한 후 저철분식을 섭취한 군인 ALS군과 CYP를 투여한 저철분식이군에서 참당귀추출물을 투여한 ALD군은 정상대조군인 CON군과 차이가 없었다. 결론

Table 1. TBARS<sup>1)</sup> values of plasma and liver

(ng MDA/mg protein)

	Group <sup>2)</sup>					p value		
	CON	ANS	AND	ALS	ALD	CYP	Diet	Dang Gui
Plasma	21.3±3.2 <sup>3)c4)</sup>	38.5±2.7 <sup>a</sup>	30.8±1.8 <sup>b</sup>	39.2±2.1 <sup>a</sup>	31.5±3.1 <sup>ab</sup>	0.001	NS <sup>5)</sup>	0.05
Liver	26.1±1.6 <sup>c</sup>	45.3±1.8 <sup>a</sup>	34.8±4.9 <sup>bc</sup>	36.4±2.7 <sup>bc</sup>	28.3±2.8 <sup>bc</sup>	0.001	0.02	0.01

<sup>1)</sup>TBARS: thiobarbituric acid reactive substances<sup>2)</sup>CON: control group. ANS: injection of CYP (30 mg/kg BW, i.p.). AND: injection of CYP (30 mg/kg BW, i.p.) and oral administration of Cham-Dang-Gui extract (1 g/kg BW). ALS: injection of CYP (30 mg/kg BW, i.p.) and low iron diet. ALD: injection of CYP (30 mg/kg BW, i.p.) and oral administration of Cham-Dang-Gui (1 g/kg BW) extract and low iron diet.<sup>3)</sup>Values are mean±SD.<sup>4)</sup>Values within the same row with different alphabets are significantly different at p<0.05 levels.<sup>5)</sup>Not significant.

적으로 TBARS 생성 수준은 CYP 투여 여부에 따라, 정상식이와 저철분식이 섭취에 따라, CYP투여 후 참당귀추출물의 투여 여부에 따라 유의적으로 높게 나타났다(p<0.05).

생체내 지질과산화물질의 증가는 성인병 및 만성퇴행성 질환인 동맥경화, 심장병의 원인이 되는데 지질과산화 반응물인 MDA(malondialdehyde)를 나타내는 TBARS(thiobarbituric acid reactive substances)의 반응은 CYP를 투여한 정상식이군의 경우 정상대조군에 비해 유의적으로 높았고, 저철분식이군도 정상대조군에 비해 유의적인 차이는 없었으나 높았다. 이는 CYP로 인해 지질과산화물질이 유도되어 MDA가 증가했다는 Kaya 등의 연구와 일치했으며(4,5,33), 또한 참당귀추출물을 투여한 AND군은 CYP만 투여한 ANS군에 비해 TBARS 생성 수준이 유의적으로 감소해 참당귀추출물이 CYP에 의한 지질과산화물 생성을 낮췄다고 사료된다. 또한 Kim 등(34)의 연구에 의하면 당귀열수추출물이 aorta ring을 이용한 혈관이완 실험에서 유의적인 혈관이완 효과를 가져왔고 NO의 증가를 보임으로써 지질과산화물 생성을 억제하는 효과를 보였다. 지질과산화 반응에 의한 질환 즉, 뇌손상 및 심혈관계질환, 고지혈증 등을 당귀 투여에 의하여 과산화물 생성의 억제로 개선할 수 있었다는 결과(35)와 흡사하였다.

#### 간과 혈장내 단백질 산화물 농도

혈장에서의 단백질산화물 즉 carbonyl 농도는 생체내 대사과정에서 생성된 자유기에 의한 단백질의 손상을 측정하는 지표로서 정상대조군인 CON군에 비하여 CYP를 투여한 군과 CYP를 투여하고 저철분식을 공급한 군에서 유의적으로 높았다(p<0.05)(Table 2). CYP를 투여하고 참당귀를

투여한 AND군(77.5±10.7 nmol/mg protein)은 CYP만 투여한 ANS군(128.3±3.1 nmol/mg protein)에 비하여 유의하게 감소함을 보이면서 참당귀 투여에 의한 단백질 산화를 유의적으로 억제하는 항산화 효과를 보였다. 또한 저철분식이 공급 후 참당귀 투여군에서도 유의적인 차이가 보임으로써 저철분 식이에 의한 단백질 산화정도를 억제하였다. 간의 단백질 산화 정도는 CYP의 투여에 의하여 증가하였으나 저철분 식이에 의해서는 유의적인 차이가 없었고 참당귀의 투여에 의해서는 유의적인(p<0.05) 감소를 보임으로써 참당귀의 단백질 산화억제 효과를 알 수 있었다.

#### 간조직내 항산화효소 활성도

참당귀 섭취에 의한 항산화 효소 활성도의 변화를 관찰한 결과는 Table 3에서 보는 바와 같이 SOD(superoxide dismutase)에서 정상대조군인 CON군은 31.3±3.1(unit/mg protein)이었고, CYP를 투여한 ANS군에서 42.7±2.3(unit/mg protein)로 CON군에 비해 유의적으로 증가했다(p<0.05). CYP를 투여 후 참당귀추출물을 투여한 AND군은 39.2±2.2(unit/mg protein)로 CON군에 비해 유의적으로 증가했으나(p<0.05) ANS군과는 유의적인 차이를 보이지는 않았고 감소하는 경향성을 보였다. CYP를 투여한 저철분식이군인 ALS군과 저철분식이군에서 참당귀추출물을 투여한 ALD군은 정상대조군인 CON군과 비교해 차이가 나지 않았다. 또한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 분해하여 조직의 손상을 방지하는 catalase 활성도 CYP를 투여한 정상식이군인 ANS군이 정상대조군인 CON에 비해 유의적으로 증가했으나 참당귀를 투여한 AND군과는 유의적인 차이가 없었고, SOD의 결과와 같이 catalase에서도 저철분식이에서는 CON군과 차이가 없었다.

Table 2. Protein carbonyl values of plasma and liver

(nmol carbonyls/mg protein)

	Group <sup>1)</sup>					p value		
	CON	ANS	AND	ALS	ALD	CYP	Diet	Dang Gui
Plasma	91.4±12.4 <sup>2)b3)</sup>	128.3±3.1 <sup>a</sup>	77.5±10.7 <sup>c</sup>	115.4±5.9 <sup>a</sup>	90.4±11.8 <sup>b</sup>	0.01	NS <sup>4)</sup>	0.01
Liver	90.3±15.8 <sup>b</sup>	109.2±7.7 <sup>a</sup>	84.3±14.2 <sup>bc</sup>	95.9±9.4 <sup>ab</sup>	74.9±15.7 <sup>c</sup>	NS	NS	0.05

<sup>1)</sup>See the legend of Table 1.<sup>2)</sup>Values are mean±SD.<sup>3)</sup>Values within the same row with different alphabets are significantly different at p<0.05 levels.<sup>4)</sup>Not significant.

**Table 3. Hepatic antioxidant enzyme activities**

	Group <sup>1)</sup>					p value		
	CON	ANS	AND	ALS	ALD	CYP	Diet	Dang Gui
SOD <sup>2)</sup> (unit/mg protein)	31.3±3.1 <sup>3)4)</sup>	42.7±2.3 <sup>a</sup>	39.2±2.2 <sup>a</sup>	37.0±2.3 <sup>ab</sup>	35.1±2.3 <sup>ab</sup>	0.04	0.03	NS <sup>5)</sup>
Catalase (unit/mg protein)	1053.1±45.9 <sup>b</sup>	1267.7±41.9 <sup>a</sup>	1269.7±55.9 <sup>a</sup>	1184.6±93.4 <sup>ab</sup>	1163.2±68.4 <sup>ab</sup>	NS	NS	NS

<sup>1)</sup>See the legend of Table 1.

<sup>2)</sup>SOD: superoxide dismutase

<sup>3)</sup>Values are mean±SD.

<sup>4)</sup>Values within the same row with different alphabets are significantly different at p<0.05 levels.

<sup>5)</sup>Not Significant.

Free radical, 특히 ROS(reactive oxygen species)는 세포 내의 DNA, RNA, 단백질에 작용하여 산화적 스트레스를 가함으로써 각종 유전자 변화 및 질환을 야기시키는 중요한 인자이기도 하다(36). 그러나 ROS는 끊임없이 생성되지만 정상적인 사람의 경우 ROS와 항산화제가 균형을 이루어 건강을 유지하게 된다. 항산화 물질들은 이러한 ROS의 손상으로부터 신체를 보호하며, 활성산소를 변형시키는 SOD, 과산화물을 분해하는 catalase, GSH-Px, GST등의 항산화효소와 비타민 E, carotenoids, albumin, bilirubin과 같은 radical scavenging antioxidants로 분류할 수 있다(37).

SOD는 hydrogen ion과 superoxide radical이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>로 전환되는 반응을 촉매하며, 이때 생성된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 catalase, GSH-Px에 의해 O<sub>2</sub>와 H<sub>2</sub>O로 분해됨으로써 superoxide radical과 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 조직손상을 방어한다(38). 본 실험 결과에서 SOD는 CYP를 투여한 정상식이군과 비교하여 유의적으로 높았고, 저철분식이군도 정상대조군에 비해 유의적인 차이는 아니었으나 수치 증가를 보였다. 이는 산화 스트레스에 의한 자유기의 발생이 증가함에 따라 세포의 환경을 보호하기 위하여 활성이 증가하였다고 사료된다. 또한 SOD가 ROS를 제거한 후 생성된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 분해함으로써 조직의 손상을 방어하는 catalase도 CYP를 투여한 정상식이군의 경우 정상대조군에 비해 유의적으로 높았고, 저철분식이군도 정상대조군에 비해 유의적인 차이는 아니었으나 높은 경향을 보였다. 이는 Rekha 등(39)의 연구에서 CYP(25 mg/kg BW)를 10일동안 투여한 후 마우스의 조직에서 SOD와 catalase가 증가한다는 결과와 같았다.

이상과 같은 결과로 CYP투여로 인해 CYP가 간에서 활성화하면서 생긴 free radical이 조직에 손상을 주어 부작용이 발생하게 되므로, 참당귀추출물로 인해 혈액학적 빈혈수치가 향상된 것은 참당귀추출물의 투여가 EPO발현에 의한 조절 효과보다는 CYP를 투여로 생성된 free radical을 감소시킴으로써 free radical로 인한 실험동물의 독성을 감소시킴으로써 혈액학적 빈혈지표가 더 감소되는 것을 막았다고 사료된다.

**요 약**

본 연구의 결과를 요약하면 참당귀추출물 1 mg/mL의 농도에서 열수추출물의 free radical 소거 효과는 메탄올추출

물보다 높게 나타났으며 농도 의존적으로 DPPH free radical 소거 효과가 상승하는 것을 관찰하였다. 또한 참당귀 투여에 의하여 화학요법으로 발생된 지질과산화물의 생성을 감소시켰으며, 단백질 산화를 유의적으로 억제함으로써 참당귀추출물은 CYP를 투여로 생성된 free radical을 감소시킴으로써 독성을 감소시켜, 혈액학적 빈혈지표가 더 감소되는 것을 막았다고 사료되며, 항산화제로서의 가능성이 있는 한약재로서 활용성이 높을 것으로 사료된다. 항산화효소인 SOD 활성은 CYP 투여에 의하여 활성이 증가하였으며 참당귀추출물의 투여에 의한 효과가 나타나지 않았으나 감소하는 경향을 보였고 catalase 활성은 CYP 투여에 의하여 활성이 증가하였으나 참당귀의 효과는 차이가 없었다. 결론적으로 참당귀추출물은 free radical 소거능을 갖고, 화학요법으로 발생된 지질과산화물의 생성을 낮춰 화학요법에 의한 부작용으로 발생하는 혈액학적 수치의 감소를 막음으로써 항산화제로서의 활용성을 기대해본다.

**감사의 글**

본 연구는 학술진흥재단에서 시행한 Brain Korea 21 Project 지원에 의하여 수행되었으므로, 이에 감사드립니다.

**문 헌**

1. Medical college of Seoul University. 1993. *Hematology*. Seoul National Univ Publish., Seoul.
2. Ma JY, Ha CS, Sung HJ, Zee OP. 2000. Hemopoietic effects of *Rhizoma Rehmanniae Preparata* on Cyclophosphamide-induced pernicious anemia in rats. *Kor J Pharmacogn* 31: 325-334.
3. Tas F, Eralp Y, Basaran M, Sakar B, Alici S, Argon A, Bulutlar G, Camlica H, Aydinler A, Topuz E. 2002. Anemia in oncology practice: relation to diseases and their therapies. *Am J Clin Oncol* 25: 371-379.
4. Das UB, Mallick M, Debnath JM, Ghosh D. 2002. Protective effect of ascorbic acid on cyclophosphamide-induced testicular gametogenic and androgenic disorders in male rats. *Asian J Androl* 4: 201-207.
5. Ghosh D, Das UB, Misro M. 2002. Protective role of alpha-tocopherol-succinate (provitamin E) in cyclophosphamide-induced testicular gametogenic and steroidogenic disorders: a correlative approach to oxidative stress. *Free Radic Res* 36: 1209-1218.
6. Kaya H, Oral B, Ozguner F, Tahan V, Babar Y, Delibas N.

1999. The effect of melatonin application on lipid peroxidation during cyclophosphamide therapy in female rats. *Zentralbl Gynakol* 121: 499-502.
7. Feusner J, Hastings C. 2002. Recombinant human erythropoietin in pediatric oncology: a review. *Med Pediatr Oncol* 39: 463-468.
  8. Valley AW. 2002. Overview of cancer-related anemia: focus on the potential role of *Darbepoetin alfa*. *Pharmacotherapy* 22 (9 Pt 2): 150S-159S.
  9. Kim DU, Jin JL, Lee JU, Han CH, Min SS, Kim HG, Park JW, Kim CC, Kim DI. 1992. Remedy of mixed immune in aplastic anemia patient. *Korean J Hematology* 27: 233-237.
  10. Cha BH, Oh SH, Yu CJ, Yang CY, Kim GY. 1992. Recombinant human granulocyte colony stimulation factor treatment of aplastic agranulocytosis: 2 Case Report. *Korean J Hematology* 27: 325-329.
  11. Lee SI, Ahn DG, Shin MG, No SH, Lee YJ, Kim KH. 1982. *Clinical Applied of Herb*. Seung-Bo publishing company, Seoul. p 266-384.
  12. Liu XL. 1984. Twelve cases of aplastic anemia treated mainly by ready Chinese drugs. *Cung/ TSA Chih* 25: 759-760.
  13. Bradley RR, Cunniff PJ, Pereira BJ, Jaber BL. 1999. Hematopoietic effect of Radix angelicae sinensis in a hemodialysis patient. *Am J Kidney Dis* 34: 349-354.
  14. Kim HS, Heu IH, Lee SJ, Ahn HS. 1989. Immunologic characteristic on extract of old anter. *Kor J Pharmacogn* 38: 806-813.
  15. Park KJ, Hong SB, Kim EH, Ma JY, Eun YA, Kim HS. 1998. Hemopoietic effects of deer blood on cyclophosphamide induced pernicious anemia. *Kor J Pharmacogn* 29: 283-292.
  16. Han DS. 1988. *Herbology*. Dong-Myoung publishing company, Seoul. p 201-202.
  17. Han JA, Jang KH, Kang SA, Choue R. 2003. Hematological Effects of water extracts of Cham-Dang-Gui on cyclophosphamide induced anemic rat. *Korean J Nutrition* 36: 1013-1021.
  18. Kim SH, Lim JS. 1999. Effect of Korean traditional medicine on murine hematopoiesis (I) - Regulation of hematopoietic cytokine expression. *Korean J Immunol* 21: 165-174.
  19. Colvin M. 1982. The alkylating agents. In *Pharmacological principles of cancer treatment*. Chabner B, ed. Saunders, Philadelphia. p 276.
  20. Mortensen SR, Chanda SM, Hooper MJ, Padilla S. 1996. Maturation differences in chlorophyllase activity may contribute to age-related sensitivity to chlorophyllase. *J Biochem Toxicol* 11: 279-287.
  21. Lim JP, Song YC, Kim JW, Ku CH, Eun JS, Leem KH, Kim DK. 2002. Free radical scavengers from the heartwood of *Juniperus chinensis*. *Arch Pharm Res* 25: 449-452.
  22. Shinnburber RO, Yu TC. 1958. Characterization of the red pigment formed in 2-thiobarbituric acid determination of oxidation rancibility. *Food Res* 23: 620-625.
  23. Lee YK. 2000. Effects of dietary fatty acids and protein sources on lipid metabolism and DMBA induced mammary tumors in rats. *PhD Dissertation*. HanYang University.
  24. Buege JA, Aust SD. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Method Enzymol* 52: 302-306.
  25. Oliver CN, Ahn B, Moerman EJ, Goldstein S, Stadtman ER. 1987. Age-related changes in oxidized proteins. *J Biol Chem* 262: 5483-5492.
  26. Marklund S. 1984. Pyrogallol antioxidant. In *CRC handbook of methods for oxygen radical research*. CRC Press, New York. p 243.
  27. Marklund S, Marklund G. 1974. Involvement of superoxide anion radical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47: 468-471.
  28. Aebi HE. 1984. Catalase. In *Methods in enzymatic analysis*. 3rd ed. Verlag Chemie, Weinheim NY. Vol 3, p 273-285.
  29. Claiborne A. 1984. Catalase activity. In *CRC handbook of methods for oxygen radical research*. CRC Press, New York. p 283.
  30. Harman D. 1987. The free radical theory of aging. In *Modern biological theories of aging*. Warner HR, Butler RN, Sprott RL, Schneider EL, eds. Raven Press, NY. p 89.
  31. Kim SM, Cho YS, Kim EJ, Bae MJ, Han JP, Lee SH, Sung SK. 1998. Effect of hot water extracts of *Salvia miltiorrhiza* Bge., *Prunus persica* Stokes, *Angelica gigas* Nakai and *Pinus strobus* on lipid oxidation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 399-405.
  32. Choi Y, Kim M, Shin JJ, Park JM, Lee J. 2003. The antioxidant activities of the some commercial teas. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 723-727.
  33. Kaya H, Oral B, Ozguner F, Tahan V, Babar Y, Delibas N. 1999. The effect of melatonin application on lipid peroxidation during cyclophosphamide therapy in female rats. *Zentralbl Gynakol* 121: 499-502.
  34. Kim SJ, Song BG, Lee EJ, Kim HG, Kim JG. 2000. The effect of *Angelica gigas* on the relaxation of vascular smooth muscle and the expression of iNOS. *Korean J Immunol* 20: 60-67.
  35. Kang SY, Lee KY, Park MJ, Kim YC, Markelonis GJ, Oh TH, Kim YC. 2003. Decursin from *Angelica gigas* mitigates amnesia induced by scopolamine in mice. *Neurobiol Learn Mem* 79: 11-18.
  36. Hur SK, Kim SS, Heo YH, Ahn SM, Lee BG, Lee SK. 2001. Effect of the grapevine shoot extract on free radical scavenging activity and inhibition of pro-inflammatory mediator production in raw 264.7 macrophages. *J Applied Pharmacology* 9: 188-193.
  37. Roberforid M, Calderon PB. 1995. *Free radicals and oxidation phenomena in biological system*. Marcel Dekker, Inc, New York.
  38. Chang NS, Ryu SM. 2001. Antioxidative effects of green tea powder diet against ethanol-induced oxidative damage in rat brain region. *Kor J Nutr* 34: 525-531.
  39. Rekha PS, Kuttan G, Kuttan R. 2001. Effect of Brahma Rasayana on antioxidant systems and cytokine levels in mice during cyclophosphamide administration. *J Exp Clin Cancer Res* 20: 219-223.

(2004년 3월 30일 접수; 2004년 7월 28일 채택)