

지부자 활성성분이 D-Galactosamine 투여에 의한 흰쥐의 간손상에 미치는 영향

김나영¹ · 이정숙^{2*} · 박명주¹ · 이경희¹ · 김석환¹ · 최종원³ · 박희준⁴

¹동아대학교 식품영양학과, ²고신대학교 식품영양학과
³경성대학교 약학과, ⁴상지대학교 응용식물과학부

The Hepatoprotective Effect of Active Compounds of *Kochiae fructus* on D-Galactosamine-Intoxicated Rats

Na-Young Kim¹, Jeong-Sook Lee^{2*}, Myoung-Ju Park¹, Kyung-Hee Lee¹,
Seok-Hwan Kim¹, Jong-Won Choi³ and Hee-Juhn Park⁴

¹Dept. of Food and Nutrition, Dong-A University, Busan 604-714, Korea

²Dept. of Food and Nutrition, Kosin University, Busan 606-701, Korea

³Dept. of Pharmacy, Kyungsung University, Busan 608-736, Korea

⁴Dept. of Botanical Resources, Sangji University, Wonju 220-701, Korea

Abstract

This study was conducted to investigate the biological activity and hepatoprotective effect of various fractions and isolated compounds from *Kochiae fructus* (KF) extract on D-galactosamine (GalN)-intoxicated rats. Male Sprague-Dawley rats were divided into control, GalN treated group (GalN), GalN plus KF methanol extract treated group (KFM 200-GalN), GalN plus KF butanol extract treated group (KFB 200-GalN), GalN plus momordin Ic treated group (Momordin Ic 30-GalN) and GalN plus oleanolic acid treated group (Oleanolic acid 30-GalN). KFM (200 mg/kg BW), KFB (200 mg/kg BW), momordin Ic (30 mg/kg BW) and oleanolic acid (30 mg/kg BW) were orally administered once a day for 14 days. GalN (400 mg/kg BW) was injected at 30 minutes after the final administration of the compounds. The activities of serum aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase were increased in the GalN group compared to the control group and significantly lower in the KFB 200-GalN, momordin Ic 30-GalN and oleanolic acid 30-GalN group than in the GalN group. Hepatic lipid peroxide level was increased in the GalN group compared to the control group and was lower in the KFM 200-GalN, KFB 200-GalN, momordin Ic 30-GalN and oleanolic acid 30-GalN group than in the GalN group. Activities of xanthine oxidase and aldehyde oxidase in liver were higher in the GalN group than in the control group and were significantly decreased in the KFB 200-GalN, momordin Ic 30-GalN and oleanolic acid 30-GalN group compared to the GalN group. Hepatic glutathione, γ -glutamylcysteine synthetase and catalase activities were decreased in the GalN group compared to the control group and were higher in the KFB 200-GalN, momordin Ic 30-GalN and oleanolic acid 30-GalN group than in the GalN group. Activities of hepatic glutathione reductase, glutathione S-transferase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase were lower in the GalN group than in the control group and were improved in the KFM 200-GalN, KFB 200-GalN, momordin Ic 30-GalN and oleanolic acid 30-GalN group compared to the GalN group. Therefore, the current results indicate that momordin Ic administration alleviated the GalN-induced adverse effect through enhancing the antioxidant enzyme activities.

Key words: *Kochiae fructus*, momordin Ic, oleanolic acid, D-galactosamine, hepatoprotective effect

서 론

'2002년 사망원인 통계조사'(1) 결과에 따르면 한국인의 사망원인의 1위가 암이며, 뇌혈관질환, 심장질환, 당뇨병, 만성 하기도질환과 간질환 순이다. 특히 40대 남자의 간질환 사망률이 여자보다 9.1배 높으며, 사망원인의 2위를 차지하고 있다. 간질환은 원인에 따라 바이러스로 인한 간질환, 과음으로 인한 알코올성 간질환, 약물로 인한 독성 간질환, 간

에 지방이 축적되는 지방간, 인체 면역계통의 이상으로 인한 자가면역성 간질환 및 독성 물질이 과다하게 쌓여서 생기는 대사성 간질환 등으로 구분된다. 인체는 알코올, 약물, 화학 물질 및 여러 가지 환경오염 물질 등이 유입되면 이들을 이 물질로 인식하여 체외로 배출시킴으로서 무독화 하려는 방어체계를 가동하는데 간은 무독화 변환과정이 일어나는 주요기관이다. 과도한 스트레스나 음주, 흡연 및 약물로 인해 간기능의 손상이 점차 빈번하게 일어나고 인체에 치명적인

*Corresponding author. E-mail: jslee@kosin.ac.kr
Phone: 82-51-990-2328. Fax: 82-51-403-3760

위험을 가하고 있어 사회적으로 지대한 관심의 대상이 되고 있다.

명아주과에 속하는 땃싸리(*Kochia scoparia*)의 성숙과실을 가을에 채취하여 건조시킨 것을 지부자(*Kochiae fructus*, 地膚子)(2,3)라 한다. 지부자(4)는 이뇨(利尿), 해독(解毒), 청습열작용(淸濕熱作用)이 있어 임질(淋疾), 소변불리(小便不利), 수종(水腫), 각기(脚氣), 습창(濕瘡), 개선(疥癬) 등의 양병치료에 응용되고 있다. 민간에서는 뇨붕증(尿崩症), 소변불리(小便不利), 소변불통(小便不通), 임질 등의 치료목적으로 사용되고 있고 이담작용과 간보호작용이 있어 전염성 간염, 신장염, 및 간경화로 인하여 나타나는 황달과 부종에 활용하면 효과적인 것으로 알려져 있으나 아직까지 체계적이고 학술적인 연구가 미흡한 실정이다. Yoshikawa 등(5)은 지부자에서 사포닌 성분으로 kochianosides I, II, III, IV의 성분과 scoparianosides A, B, C 성분을 분리하고 구조를 결정하였다. 지부자의 momordin Ic와 momordin Ic 2-O-β-D-glucopyranoside는 기능성 식품의 유효한 사포닌으로서 경구투여로 과부하한 혈중 포도당을 감소시키며 에탄올 흡수를 억제 효과가 있는 것으로 밝혀졌다(6).

아미노당인 D-galactosamine(GaIN)은 galactose의 대사 장애를 통한 uridine triphosphate(UTP), uridine diphosphate(UDP) 및 uridine monophosphate(UMP) 등의 농도 감소로 mRNA의 합성과 단백질 합성을 억제함으로써 간손상을 일으킨다고 알려져 있다(7,8). 또한 세포막 성분 중 탄수화물의 조성과 세포내 Ca⁺⁺ 농도를 변화시켜 간조직의 손상을 유발한다(9). Keppler 등(10)은 GaIN의 투여로 panlobular focal hepatocyte necrosis, 염증세포의 침윤, macrophages의 증가 등 사람의 viral 간염과 유사한 형태를 나타낸다고 보고하였고, GaIN의 급성 중독시에는 간괴사, 만성중독의 경우에는 간경변과 세포성 종양을 일으키는 것으로 보고되고 있다(11,12).

이에 본 연구에서는 실험동물에 지부자 추출물을 경구투여한 후, GaIN으로 간손상 유발하고 혈액과 간조직의 생화학적 변화를 관찰하여 지부자의 활성성분이 GaIN 투여에 의한 간손상에 미치는 효과를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

시료의 추출 및 분획

지부자는 원주시 우산동에 소재한 천일약업사에서 구입하여 상지대학교 자원식물학과에서 Fig. 1에 나타낸 바와 같이 2.5 kg을 환류 하에서 3회에서 걸쳐 methanol(MeOH)로 추출하였다. 추출물을 여과하여 진공농축기에서 증발시킨 후 동결건조하여 고체상의 MeOH 추출물(KFM)을 얻었다(243 g). KFM을 용매의 극성을 증가시켜 계통분획법에 의해 chloroform(CHCl₃) 분획(KFC) 50 g, ethyl acetate(EtOAc) 분획(KFE) 9 g과 butanol(BuOH) 분획(KFB) 21 g을 얻었다.

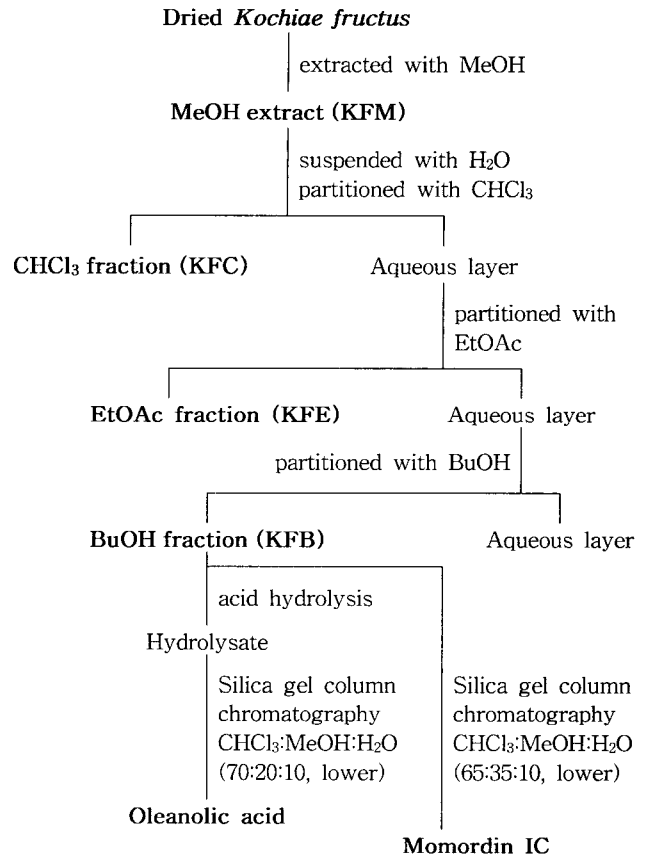


Fig. 1. Scheme of fractionation of *Kochiae fructus*.

KFB에서 momordin Ic와 oleanolic acid를 분리 동정하였다(5,6).

실험동물 및 계획

예비실험에서 지부자의 각 분획을 200 mg/kg BW씩 2주간 투여한 후 GaIN 400 mg/kg 투여로 간손상을 일으켜 혈청 aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase의 활성을 실험한 결과 KFM과 KFB를 투여했을 때 유의적으로 감소하였으나, KFC와 KFE에서는 유의성 있는 차이가 보이지 않았다. 따라서 본 연구에서는 KFM과 KFB 및 KFB에서 분리 동정한 momordin Ic와 oleanolic acid를 선택하여 실험하였다. 실험동물은 (주)대한 바이오 링크로부터 분양 받아 일정한 조건(온도 22±1°C, 습도 55±3%, 명암 12시간 light/dark cycle)으로 1주 동안 적응시킨 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐(평균체중 200±10 g)를 그룹 당 5마리씩 나누어 Table 1과 같이 사육하였다. 대조군과 GaIN 단독투여군은 생리식염수를 1일 1회 2주간 경구투여하고, 지부자 추출물 투여군은 지부자 추출물을 1일 1회 2주간 경구투여하였다. 이때 KFM 200-GaIN군은 지부자메탄올추출물 200 mg/kg, KFB 200-GaIN군은 지부자부탄올추출물 200 mg/kg, momordin Ic 30-GaIN군은 momordin Ic 30 mg/kg, oleanolic acid 30-GaIN군은 oleanolic acid 30 mg/kg씩을 각각 투여하였다. 마지막 날 지부자 추출물 투여 30분 후 GaIN 단독투

Table 1. Experimental design

Group ¹⁾	Dose (mg/kg body weight)	GaIN (mg/kg body weight)
Control	-	-
GaIN	-	400
KFM 200-GaIN	200	400
KFB 200-GaIN	200	400
Momordin Ic 30-GaIN	30	400
Oleanolic acid 30-GaIN	30	400

¹⁾GaIN: GaIN injection.

KFM 200-GaIN: GaIN injection after treatment of MeOH fraction from *Kochiae fructus*.

KFB 200-GaIN: GaIN injection after treatment of BuOH fraction from *Kochiae fructus*.

Momordin Ic 30-GaIN: GaIN injection after treatment of momordin Ic from *Kochiae fructus*.

Oleanolic acid 30-GaIN: GaIN injection after treatment of oleanolic acid from *Kochiae fructus*.

여균과 지부자 추출물 투여군에 GaIN을 생리식염수에 용해시켜 400 mg/kg씩 복강내로 투여하였다.

시료의 채취 및 효소원의 제조

실험동물을 CO₂ gas로 가법계 마취시킨 후, 복부 정중선을 따라 개복하고 복부 대동맥에서 혈액을 채취한 다음 실온에서 30분간 방치한 후 원심분리기로 700×g에서 15분간 원심분리하여 혈청을 분리시켜 즉시 사용하였다. 혈청에서 Reitman과 Frankel의 방법(13)에 준하여 조제된 kit(아산제약)를 사용하여 aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase 활성을 측정하였다. 간장은 생리식염수로 관류시켜 조직내 혈액을 제거하고 적출하여 생리식염수로 씻고 여지로 조직에 남아 있는 혈액 및 기타 이물질 제거하였다. 간조직 g 당 4배의 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.4)를 가하여 병냉상에서 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. 이 마쇄액을 homogenate 분획으로 하였다. 마쇄액은 600×g에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄 부분을 제거하고 다시 10,000×g에서 20분간 원심분리하여 그 침전물에 동량의 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.4) 용액을 가하고 현탁시켜 mitochondria 분획으로 하고, 상등액을 다시 105,000×g에서 1시간 초원심분리하여 얻은 상등액을 cytosol 분획으로 하였다. Homogenate 분획에서 Ohkawa 등의 방법(14)을 변경하여 지질과산화 함량과 Ellman의 방법(15)에 따라 glutathione 함량을 측정하였다. Mitochondria 분획에서는 Aebi의 방법(16)에 준하여 catalase 활성을 측정하였다. Cytosol 분획에서 Mize와 Langdon의 방법(17)에 따라 glutathione reductase 활성을 Paglia와 Valentine의 방법(18)으로 glutathione peroxidase 활성을 측정하였다. γ -Glutamylcysteine synthetase의 활성은 Meister와 Richman의 방법(19)에 준하였고, Habig 등의 방법(20)에 따라 glutathione S-transferase 활성과 Marklund와 Marklund의 방법(21)에 따라 superoxide dismutase의 활성을 측정하였다. Stirre과 Della의 방법(22)으로 xanthine oxidase 활성과

Rajagopalan 등의 방법(23)에 따라 aldehyde oxidase 활성을 측정하였다. 단백질의 함량은 Lowry 등의 방법(24)에 준하여 bovine serum albumin(Sigma)을 표준품으로 하여 측정하였다. 이상의 모든 조작을 따로 규정이 없는 한 4°C에서 행하였고, 효소원은 사용 전까지 -70°C에서 보관하였다.

통계처리

본 실험에서 얻어진 결과는 평균치±표준편차로 표시하였고, 통계적 유의성은 5% 수준에서 Duncan's multiple range test로 검정하였다.

결과 및 고찰

혈청 aminotransferase에 미치는 영향

혈청 aspartate aminotransferase(AST)와 alanine aminotransferase(ALT)의 활성은 Fig. 2와 같다. GaIN 단독투여군의 AST와 ALT가 각각 271.11±36.50 karman unit와 220.87±18.00 karman unit로 대조군의 AST 30.55±5.52 karman unit와 ALT 28.62±4.65 karman unit에 비해 유의한 증가를 보였고, 이는 Lim 등(25)이 GaIN 투여로 AST와 ALT 활성이 증가하였다는 보고와 일치하였다. KFB 200-GaIN군, momordin Ic 30-GaIN군과 oleanolic acid 30-GaIN군은 대조군 수준에는 미치지 못하였으나 GaIN 단독투여군에 비해 유의한 개선을 보였고, KFM 200-GaIN군의 AST와 ALT는 GaIN 단독투여군보다 감소하였으나 유의성은 없었다.

Aminotransferase는 아미노기 전이반응을 촉매하는 효소의 총칭으로 AST와 ALT(26)가 임상적으로 가장 많이 이용

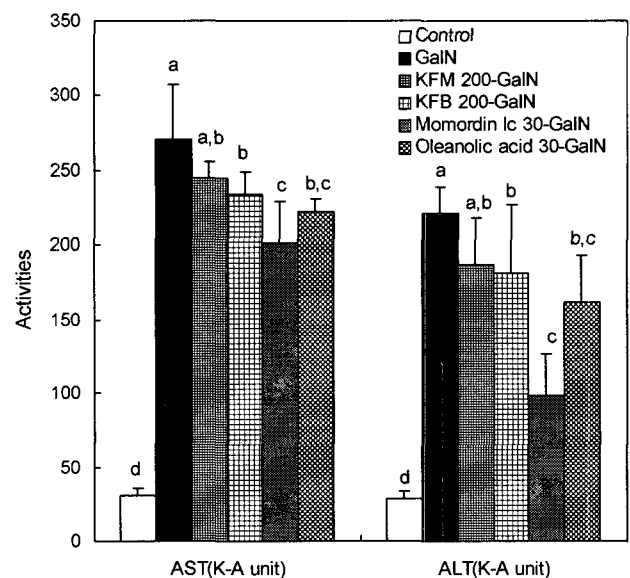


Fig. 2. Effect of *Kochiae fructus* on the serum aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase activities (mean±SD) in D-galactosamine-intoxicated rats. The means sharing a common letter are not significantly different ($p < 0.05$) between groups.

되고 있다. 세포내의 에너지 공급이 감소되면 세포내의 K⁺이온이 세포외로 유출되고 Na⁺, Ca⁺⁺ 및 수분이 세포내로 유입이 된다. 그 결과 세포는 팽창되고, 세포막이 늘어나게 되어 세포질에 존재하는 AST와 ALT가 유출된다. 세포 밖으로 빠져나간 AST 및 ALT는 순환 혈액 중으로 빠르게 유출되어 간손상 시 정상치보다는 현저히 증가됨으로서 간기능 검사에 이용되고 있다. 본 실험의 결과 KFB, oleanolic acid와 momordin Ic 투여가 간조직을 안정화하여 GaIN에 의한 간손상을 억제시켜 간을 보호하는 것으로 생각된다.

지질과산화 함량에 미치는 영향

간조직 중의 지질과산화 함량은 Fig. 3에서와 같이 GaIN 단독투여군은 117.40±9.39 nmole/g tissue로 대조군의 16.28±1.26 nmole/g tissue에 비하여 유의적 증가를 보였는데, 이는 GaIN의 처리로 지질과산화 함량이 대조군에 비해 유의적으로 증가한다는 보고(27)와 일치하였다. KFM 200-GaIN군, KFB 200-GaIN군, momordin Ic 30-GaIN군과 oleanolic acid 30-GaIN군의 지질과산화 함량이 각각 98.80±4.75 nmole/g tissue, 81.85±15.98 nmole/g tissue, 55.88±5.55 nmole/g tissue와 66.62±8.07 nmole/g tissue로 대조군 수준에는 미치지 못하였으나 GaIN 단독투여군에 비해 현저히 낮아졌음이 관찰되었다.

세포의 지질성분인 불포화 지방산에 활성산소가 첨가되어 과산화된 지질을 지질과산화라고 한다. 특히 생체내에서 과산화 현상은 세포막의 주요 구성 성분인 인지질을 구성하는 불포화 지방산이 활성 산소와 결합하여 생기게 된다. 즉, 독성물질 등 여러 가지 인자에 의하여 생성된 oxygen radical과 반응한 불포화 지방산은 불포화지방산의 radical이 된다. 이 radical은 산소와 결합하여 hydroxyepoxide를 생성하며, triene 이상의 불포화지방산은 hydroperoxide, endoperoxide 및 polyepoxide 등과 같은 지질과산화물로 되어 malondialdehyde(MDA)로 분해된다(28). 일반적으로 과산화지질을 유도하는 물질은 그 물질이 세포내에서 직접 radical로 변화하거나 대사부산물로서 oxygen radical을 생성시킨다. 이들이 세포내 recycling 반응에 관여하여 계속적으로 radical을 생성하여 지질과산화의 생성을 증가시켜 결국은 연쇄적인 조

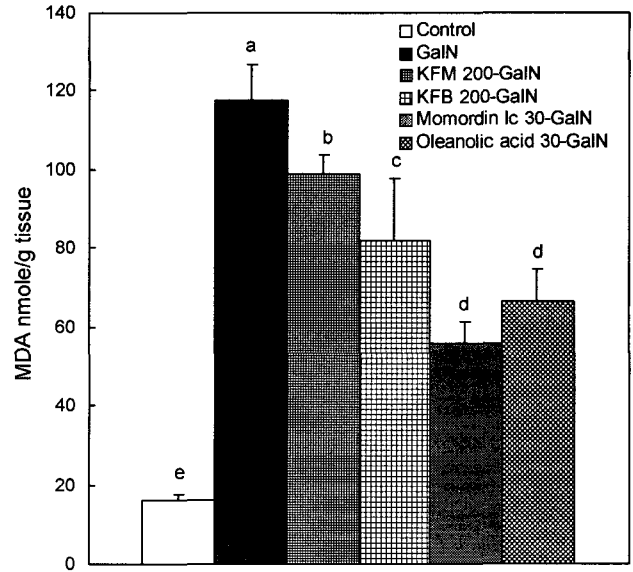


Fig. 3. Effect of *Kochiae fructus* on the hepatic lipid peroxide (mean±SD) in D-galactosamine-intoxicated rats. The means sharing a common letter are not significantly different (p<0.05) between groups.

직의 피사를 초래한다(29).

본 실험의 결과를 볼 때 지부자 추출물의 투여가 GaIN 투여로 생성되는 free radical의 생성을 억제하거나 소거하여 흰쥐 간조직의 지질과산화반응을 억제시켜 간을 보호하는 것으로 사료된다.

Xanthine oxidase와 aldehyde oxidase 활성에 미치는 영향

Xanthine oxidase(XO)와 aldehyde oxidase(AO)의 활성에 미치는 영향은 Table 2에 나타내었다. GaIN 단독투여군의 XO와 AO의 활성이 대조군에 비하여 증가하였고, KFB 200-GaIN군, momordin Ic 30-GaIN군과 oleanolic acid 30-GaIN군의 XO와 AO의 활성은 대조군 수준에는 미치지 못하였으나 GaIN 단독투여군에 비하여 낮게 나타났다. KFM 200-GaIN군은 GaIN 단독투여군보다 감소하였으나 통계적 유의성은 없었다.

Table 2. Effect of *Kochiae fructus* on the activities of hepatic xanthine oxidase (XO) and aldehyde oxidase (AO) in D-galactosamine-intoxicated rats

Group	XO		AO
	uric acid nmole/mg protein/min		2-pyridone nmole/mg protein/min
Control	2.93±0.64 ¹⁾²⁾		29.41±1.74 ^d
GaIN	12.30±2.41 ^a		54.43±7.03 ^a
KFM 200-GaIN	10.27±1.52 ^a		48.43±7.12 ^{ab}
KFB 200-GaIN	7.98±1.75 ^b		46.01±8.19 ^b
Momordin Ic 30-GaIN	3.40±0.38 ^d		29.18±3.61 ^d
Oleanolic acid 30-GaIN	5.72±1.74 ^c		37.22±2.92 ^c

¹⁾Values are mean±SD of 5 rats for each group.

²⁾Data followed by different superscript are significantly different by Duncan's new multiple range test (p<0.05).

XO는 모든 생물종에 분포(30,31)하며, 동물조직에서는 간과 소장의 세포질에 주로 존재하는 것(32,33)으로 purine과 pyrimidine을 산화시키고, hypoxanthine을 산화시켜 xanthine을 만들며 xanthine로부터 uric acid 생성에 관여한다(34). 이때 생성된 oxygen free radical은 과산화지질을 유도하는 것으로 알려져 있다(35-37). AO도 XO와 물리화학적인 구조나 성질이 유사하며, XO와 마찬가지로 oxygen free radical을 생성시키는 효소이다(38). 본 실험의 결과 GaIN 투여로 인해 XO, AO의 활성이 증가되어 superoxide anion, hydroxyl radical 및 H₂O₂와 같은 oxygen free radical이 생성이 증가되는 것을 지부자의 추출물이 저지시켜 지질과산화반응을 억제시키는 것으로 생각된다.

Glutathione 농도와 glutathione 생성계에 미치는 영향

Glutathione(GSH) 농도와 glutathione 생성계를 측정된 결과를 Table 3에 나타내었다. GaIN 단독투여군의 GSH 농도가 10.88±1.39 μmole/g tissue로 대조군의 22.56±2.40 μmole/g tissue와 비교하여 유의적으로 감소하였는데, 이는 GaIN 투여 시 간조직의 GSH 함량이 감소된다는 Rikans와 Kosanke(39)의 보고와 유사하였다. KFB 200-GaIN군과 oleanolic acid 30-GaIN군은 GaIN 단독투여군보다 유의하게 개선되었고, 특히 momordin Ic 30-GaIN군의 GSH 함량은 20.63±0.79 μmole/g tissue로 대조군에 가깝게 회복되었다. KFM 200-GaIN군은 GaIN 단독투여군에 비해 증가하였으나 유의성은 관찰할 수 없었다.

GSH는 glutathione peroxidase(GSH-Px)를 통하여 지질과산화반응에서 생성된 과산화물을 무독한 물질로 전환시키거나 지질과산화물과 결합물을 형성해 이를 체외로 배설시킴으로써 생체내 과산화에 대해 보호작용을 하는 세포내 항산화제이다(40). 또한 생체내의 GSH 결핍은 지질과산화반응을 촉진시킨다(41).

γ-Glutamylcysteine synthetase(γ-GCS) 활성은 대조군에 비해 GaIN 단독투여군은 현저히 감소하였고, KFM 200-GaIN, KFB 200-GaIN과 oleanolic acid 30-GaIN군에서는 GaIN 단독투여군에 비해 다소 증가하였으나 유의한 차이가 없었다. Momordin Ic 30-GaIN군은 대조군 수준에는 미치지 못하였으나 GaIN 단독투여군과 비교하여 현저히 회복되

었다. 또한 glutathione reductase(GR)의 활성은 GaIN 단독투여군이 대조군에 비하여 유의한 감소를 보였고, KFM 200-GaIN군, KFB 200-GaIN군, momordin Ic 30-GaIN군과 oleanolic acid 30-GaIN군은 대조군 수준에는 미치지 못하였으나 GaIN 단독투여군에 비해 개선되었다. Free radical, 활성산소와 지질과산화의 최종 무독화과정에 필연적으로 GSH를 필요로 한다. GSH의 세포내 함량유지에는 GSH 합성 효소인 γ-GCS(42)와 해독반응 후 생성되는 산화형 GSH의 재활원 효소인 GR(43)이 관여한다.

이러한 결과로 볼 때 지부자의 momordin Ic 투여가 γ-GCS의 활성을 증가시키고, KFM, KFB, momordin Ic와 oleanolic acid가 GR 활성을 원활히 하여 GSH 농도를 증가시켜 GaIN 투여로 인한 지질과산화반응을 억제시키는 것으로 사료된다.

Glutathione S-transferase 활성에 미치는 영향

Glutathione S-transferase(GST) 활성은 Fig. 4와 같다.

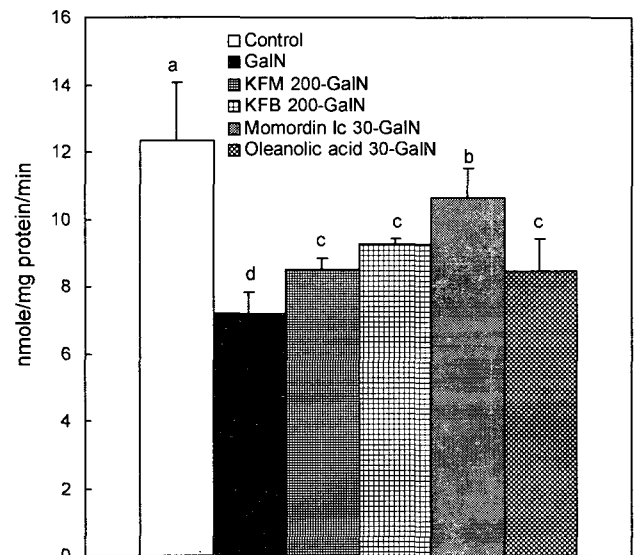


Fig. 4. Effect of *Kochiae fructus* on the hepatic glutathione S-transferase activity (mean±SD) in D-galactosamine-intoxicated rats. The means sharing a common letter are not significantly different (p<0.05) between groups.

Table 3. Effect of *Kochiae fructus* on the hepatic glutathione content, γ-glutamyl-cysteine synthetase (γ-GCS) activity and glutathione reductase (GR) activity in D-galactosamine-intoxicated rats

Group	GSH		γ-GCS		GR	
	μmole/g tissue		Pi nmole/mg protein/min		glutathione nmole/mg protein/min	
Control	22.57±2.40 ¹⁾²⁾		129.11±14.5 ^a		31.12±3.47 ^a	
GaIN	10.81±1.39 ^c		81.33±1.11 ^c		11.45±0.81 ^e	
KFM 200-GaIN	12.85±1.58 ^c		84.94±1.49 ^{b,c}		17.71±0.61 ^d	
KFB 200-GaIN	16.36±1.97 ^b		88.31±1.67 ^{b,c}		18.39±0.64 ^d	
Momordin Ic 30-GaIN	20.63±1.14 ^a		90.79±1.18 ^b		26.76±1.45 ^b	
Oleanolic acid 30-GaIN	15.34±1.14 ^b		84.83±1.91 ^{b,c}		22.33±0.91 ^c	

¹⁾Values are mean±SD of 5 rats for each group.

²⁾Data followed by different superscript are significantly different by Duncan's new multiple range test (p<0.05).

Table 4. Effect of *Kochiae fructus* on the hepatic antioxidation enzyme system activities in D-galactosamine-intoxicated rats

Group	SOD	Catalase	GSH-Px
	unit [#]	Decreased H ₂ O ₂ nmole /mg protein/min	oxidized NADPH nmole
Control	5.51 ± 1.05 ^{1)a2)}	35.94 ± 4.86 ^a	8.99 ± 0.32 ^a
GaIN	2.18 ± 0.83 ^d	18.38 ± 3.61 ^e	5.20 ± 0.19 ^d
KFM 200-GaIN	3.15 ± 0.59 ^c	21.10 ± 0.43 ^{d,e}	6.15 ± 0.13 ^c
KFB 200-GaIN	3.99 ± 0.09 ^{b,c}	22.96 ± 1.33 ^{c,d}	6.40 ± 0.39 ^{b,c}
Momordin Ic 30-GaIN	4.75 ± 0.77 ^{a,b}	30.54 ± 1.10 ^b	8.32 ± 1.30 ^a
Oleanolic acid 30-GaIN	3.77 ± 0.15 ^c	25.60 ± 2.19 ^c	7.11 ± 0.78 ^b

¹⁾Values are mean ± SD of 5 rats for each group.

²⁾Data followed by different superscript are significantly different by Duncan's new multiple range test (p < 0.05).

[#]One unit superoxide dismutase activity was defined as the which inhibited the reduce of alkaline DMSO-mediated cytochrome C by 50%.

GaIN 단독투여군의 GST 활성이 7.21 ± 0.62 nmole/mg protein/min로 대조군의 12.34 ± 1.73 nmole/mg protein/min보다 유의한 감소를 보였고, 이는 GaIN 투여 시 GST 활성이 감소되었다는 Lim 등(44)의 연구 보고와 일치하였다. KFM 200-GaIN군, KFB 200-GaIN군, momordin Ic 30-GaIN군과 oleanolic acid 30-GaIN군은 대조군 수준에는 미치지 못하였으나 GaIN 단독투여군에 비해 유의하게 개선되었다.

GST는 간의 세포질에 주로 존재하는 가용성 단백질로 생체내 이물질의 대사과 배설에 중요한 역할을 하는 효소이다(45). GST는 여러 가지 해독반응 중 체내에서 일차적으로 산화된 대사물을 포함하는 과정에서 내인성 반응체인 GSH를 이용하여 체내의 독성물질을 전이 분해시키는 역할을 한다(46).

본 실험 결과로 보아 KFM, KFB, momordin Ic와 oleanolic acid 투여로 인한 GST의 증가는 GaIN 투여로 인해 야기되는 free radical과 지질과산화의 생성을 억제시키는 것으로 여겨진다.

활성산소의 해독계에 미치는 영향

활성산소의 해독계 효소인 superoxide dismutase(SOD), catalase와 GSH-Px의 활성은 Table 4에 나타내었다. GaIN 단독투여군은 대조군보다 SOD, catalase의 활성이 감소하였으며, KFB와 oleanolic acid의 투여군은 대조군 수준에는 미치지 못했으나 GaIN 단독투여에 비해 회복되었다. 특히 momordin Ic 30-GaIN군의 SOD 활성은 대조군에 가깝게 증가하였고, KFM 200-GaIN군의 catalase의 활성은 GaIN 단독투여군에 비해 증가하였으나 통계적 유의성은 관찰할 수 없었다. GSH-Px 활성은 대조군과 비교하여 GaIN 단독투여군에서 유의적인 감소를 보였고, KFM 200-GaIN군, KFB 200-GaIN군과 oleanolic acid 30-GaIN군은 대조군 수준에는 미치지 못했으나 GaIN 단독투여군에 비해 현저히 증가하였고, 특히 momordin Ic 30-GaIN군은 대조군에 가깝게 회복되었다.

생체에는 oxidative stress에 의해 생성된 free radical이나 peroxide의 독작용을 저지하는 free radical scavenging

system이 존재하고 있어(47) 여러 가지 손상으로부터 생체를 보호할 수 있다. 그러나 어떠한 원인에 의해 free radical generating system과 scavenging system 사이의 불균형이 초래되어 질 때에는 조직의 손상, 발암, 염증, 성인병 및 노화 등과 같이 여러 가지 독작용을 유발한다고 한다(48). Free radical scavenging system 중 SOD는 생체이물질로 인하여 생성된 superoxide anion을 H₂O₂로 전환시키는 효소로 생체 내 해독과정에 관여하는 효소중 하나이다. 또한 catalase는 체내에서 지방의 자동산화 및 유기물의 산화로 생기는 H₂O₂를 H₂O와 O₂로 분해하여 무독화시키는 radical scavenging enzyme(49)이다.

GSH-Px는 cytosol과 mitochondria 내에 존재하는 효소로서 지질과산화와 H₂O₂가 일으키는 산화적 손상에 방어하는 일차적인 역할을 수행한다. GSH-Px는 catalase와는 달리 세포내에서 H₂O₂뿐만 아니라 지질과산화의 분해를 촉매하여 손상된 세포막 보호에 중요한 역할을 한다(50).

이상의 결과로 볼 때 KFM, KFB와 oleanolic acid 및 특히 momordin Ic의 투여가 SOD와 catalase 활성을 증가시켜 oxygen free radical의 생성을 억제시키고, 증가된 GSH를 기질로 하여 GSH-Px가 H₂O₂와 지질과산화를 억제함으로써 간손상을 완화시켜 간을 보호하는 것으로 사료된다.

요 약

지부자(*Kochiae Fructus*)의 생리활성물질 검색 및 간손상에 미치는 영향을 연구할 목적으로 실험동물에 지부자 추출물을 경구투여한 후 GaIN으로 간손상을 유발하여 혈액 및 간조직의 생화학적 변화를 관찰하고 free radical의 생성계와 해독계의 활성에 미치는 영향을 검토한 결과는 다음과 같다. GaIN 단독투여군은 대조군에 비하여 AST와 ALT가 증가하였으나, KFB, oleanolic acid, momordin Ic 투여군에서는 GaIN 단독투여군에 비해 유의적 감소를 보였다. 간조직의 지질과산화 함량은 GaIN 단독투여군이 대조군과 비교하여 증가하였고, KFM 200-GaIN군, KFB 200-GaIN군, momordin Ic 30-GaIN군과 oleanolic acid 30-GaIN군은 대

조군에는 미치지 못하였으나 GaIN 단독투여군에 비해 현저히 감소하였다. XO, AO의 활성은 대조군보다 GaIN 단독투여군에서 유의적으로 증가하였으며, KFB 200-GaIN군, momordin Ic 30-GaIN군과 oleanolic acid 30-GaIN군의 XO와 AO의 활성은 GaIN 단독투여군보다 낮게 나타났다. 간조직 중의 GSH 농도는 GaIN 단독투여군이 대조군에 비해 현저히 감소하였고, KFB 200-GaIN군과 oleanolic acid 30-GaIN군은 GaIN 단독투여군과 비교시 증가를 보였고, momordin Ic 30-GaIN군은 대조군에 가깝게 회복되었다. GaIN 단독투여군의 γ -GCS와 GR의 활성은 대조군에 비하여 유의한 감소를 보였고, momordin Ic 30-GaIN군의 γ -GCS의 활성은 대조군에는 미치지 못하였지만 GaIN 단독투여군에 비해 유의하게 개선되었다. KFM 200-GaIN군, KFB 200-GaIN군, momordin Ic 30-GaIN군과 oleanolic acid 30-GaIN군의 GR 활성은 GaIN 단독투여군보다 유의한 증가를 보였다. GST 활성은 GaIN 단독투여군이 대조군에 비하여 현저한 감소를 나타내었고, KFM 200-GaIN군, KFB 200-GaIN군, momordin Ic 30-GaIN군과 oleanolic acid 30-GaIN군은 대조군 수준에는 못미쳤으나 GaIN 단독투여군보다 통계적으로 유의한 증가를 관찰할 수 있었다. SOD, catalase 및 GSH-Px의 활성은 대조군에 비하여 GaIN 단독투여군에서 감소를 보였고, SOD와 catalase 활성은 KFM, KFB와 oleanolic acid의 투여로 GaIN 단독투여군보다 높게 나타났다. 특히 momordin Ic 30-GaIN군의 SOD 활성은 대조군에 가깝게 개선되었다. GSH-Px의 활성은 KFM 200-GaIN군, KFB 200-GaIN군과 oleanolic acid 30-GaIN군은 대조군 수준에는 미치지 못하였으나 GaIN 단독투여군에 비해 현저히 증가하였고, 특히 momordin Ic 30-GaIN군은 대조군에 가깝게 증가되었다. 이상의 결과를 종합하여 볼 때 지부자로부터 분리한 momordin Ic가 GSH 농도를 증가시키고 활성산소 해독계에 관여하는 효소의 활성을 증가시킴으로서 GaIN으로 인한 간손상을 완화시키는 것으로 사료되어진다.

문 헌

1. Korea National Statistical Office. 2003, Annual report on the cause of death statistics. p 4-8.
2. Jang GY. 1980. *Mt. Changbai plant directory*. Jilin Publishing Co., Changchun. p 313.
3. Ahn HS. 1965. *Korea plant directory*. Beomhaksa, Seoul. p 32.
4. Jin JI. 1984. *Chinese medicine dictionary*. Dongdo munwhasa, Seoul. p 361.
5. Yoshikawa M, Dai Y, Shimada H, Morikawa T, Matsumura N, Yoshizumi H, Matsuda H, Kubo M. 1997. Studies on *Kochia fructus*. II. On the saponin constituents from the fruit of Chinese *Kochia scoparia* (Chenopodiaceae): Chemical structures of Kochianosides I, II, III, and IV. *Chem Pharm Bull* 45: 1052-1055.
6. Yoshikawa M, Shimada H, Morikawa T, Yoshizumi S, Matsumura N, Murakami T, Matsuda H, Hori K, Yamahara J. 1997. Medicinal foodstuffs. VII. On the saponin constituents with glucose and alcohol absorption-inhibitory activity from a food garnish "Tonburi", the fruit of Japanese *Kochia scoparia* (L.) Schrad.: structures of scopariosides A, B, and C. *Chem Pharm Bull* 45: 1300-1305.
7. Decker K, Keppler D. 1974. Galactosamine hepatitis: key role of the nucleotide deficiency period in the pathogenesis of cell injury and cell death. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 71: 77-106.
8. Wang J, Wendel A. 1990. Studies on the hepatotoxicity of galactosamine endotoxin or galactosamine/TNF in the perfused mouse liver. *Biochem Pharmacol* 39: 267-270.
9. El-Mofty SK, Scrutton MC, Serroni A, Nicolini C, Farber JL. 1975. Early, reversible plasma membrane injury in galactosamine-induced liver cell death. *Am J Pathol* 79: 579-595.
10. Keppler D, Lesch R, Reutter W, Decker K. 1968. Experimental hepatitis induced by D-galactosamine. *Exp Mol Pathol* 9: 279-290.
11. Farber JL, Gill G, Konishi Y. 1973. Prevention of galactosamine-induced liver cell necrosis by uridine. *Am J Pathol* 72: 53-62.
12. Lesch R, Reutter W, Keppler D, Decker K. 1969. Liver restitution after acute galactosamine hepatitis: Autoradiographic and biochemical studies in rats. *Exp Mol Pathol* 12: 58-69.
13. Reitman S, Frankel SK. 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am J Clin Pathol* 28: 8-14.
14. Ohkawa H, Ohishi N, Yaki K. 1979. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358.
15. Ellman GL. 1959. Tissue sulfhydryl group. *Arch Biochem Biophys* 82: 70-73.
16. Aebi H. 1974. Catalase. In *Method of enzymatic analysis*. Bergmeyer MU, ed. Academic Press, New York. Vol 2, p 673-698.
17. Mize CE, Langdon RG. 1962. Hepatic glutathione reductase: I. Purification and general kinetic properties. *J Biol Chem* 237: 1589-1595.
18. Pagila ED, Valentine WN. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70: 158-169.
19. Meister A, Richman PG. 1975. Regulation of γ -glutamyl-cysteine synthesis by nonallosteric feedback inhibition by glutathione. *J Biol Chem* 250: 1422-1429.
20. Habig WH, Pabist MJ, Jakoby WB. 1974. Glutathione S-transferase: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249: 7130-7139.
21. Marklund S, Marklund G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47: 469-473.
22. Stirpe F, Della CE. 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: 3855-3863.
23. Rajagopalan KV, Fridovich I, Handler P. 1962. Hepatic aldehyde oxidase. In *Purification and properties*. *J Biol Chem* 237: 922-928.
24. Lowry OH, Rodebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
25. Lim HK, Kim HS, Choi JW. 2000. Therapeutic effects of bergenin and acetylbergenin on galactosamine-induced hepatotoxicity in rats. *Kor J Pharmacogn* 31: 351-356.
26. Yi KN, Kim JQ. 1988. *Clinical Chemistry*. Euihakmunawhasa, Seoul. p 301-309.

27. Lee CK, Kim NY, Han YN, Choi JW. 2003. Effects of pre-treated Korean red ginseng on carbon tetrachloride and galactosamine-induced hepatotoxicity in rats. *J Ginseng Res* 27: 1-10.
28. Schenkman JB, Remmer H, Estabrook RW. 1967. Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. *Mol Pharmacol* 3: 113-123.
29. Adzharov D, Donchev N, Kerimova M, Naidenova E, Borov B. 1989. Effects of preliminary fasting on the development of D-galactosamine-induced acute lesion of the liver in rats. *Biull Eksp Biol Med* 107: 33-36.
30. Al-Khalidi UAS, Nasrallah S, Khachadurian AK, Shammaa MH. 1965. A sensitive method for the determination of xanthine oxidase activity. *Clin Chim Acta* 11: 72-77.
31. Woolfolk CA, Downard JS. 1977. Distribution of xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase specificity types among bacteria. *J Bacteriol* 130: 1175-1191.
32. Stirpe F, Della Corte E. 1969. The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J Biol Chem* 244: 3855-3863.
33. Battelli MG, Della Corte E, Stirpe F. 1972. Xanthine oxidase type D (dehydrogenase) in the intestine and other organs of the rat. *Biochem J* 126: 747-749.
34. Mccord JM, Fridovich I. 1968. The reduction of cytochrome C by milk xanthine oxidase. *J Biol Chem* 243: 5753-5760.
35. McCord JM, Fridovich I. 1978. The biology and pathology oxygen radicals. *Ann Intern Med* 89: 122-127.
36. Kleinsky TA, Tulle JV, Cattau EL, Wang P. 1974. A comparison of the distribution and electron acceptor specificities of xanthine oxidase and aldehyde oxidase. *Comp Biochem Physiol* 498: 687-703.
37. Schoutsen B, De Jong JW, Harmsen E, De Tombe PP, Achterberg PW. 1983. Myocardial xanthine oxidase/dehydrogenase. *Biochem Biophys Acta* 762: 519-524.
38. Wolpert MK, Althaus JR, Johns DG. 1973. Nitroreductase activity of mammalian liver aldehyde oxidase. *J Pharmacol Exp Ther* 185: 202-213.
39. Rikans LE, Kosanke SD. 1984. Effect of aging on liver glutathione levels and hepatocellular injury from carbon tetrachloride, allyl alcohol or galactosamine. *Drug Chem Toxicol* 7: 595-604.
40. Wendel A, Feuerstein S. 1981. Drug-induced lipid peroxidation in mice-I. Modulation by monooxygenase activity, glutathione and selenium status. *Biochem Pharmacol* 30: 2513-2520.
41. Meister A, Anderson ME. 1983. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52: 711-760.
42. Ahokas JT, Davies C, Ravenscroft PJ, Emmerson BT. 1984. Inhibition of soluble glutathione S-transferase by diuretic drugs. *Biochem Pharmacol* 33: 1929-1932.
43. Dodds MG, Foord RD. 1970. Enhancement by potent diuretics of renal tubular necrosis induced by cephaloridine. *Br J Pharmacol* 40: 227-236.
44. Lim HK, Kim HS, Choi HS, Oh SW, Jang CG, Choi JW, Kim SH, Chang MJ. 2000. Effects of acetylberginin against D-galactosamine-induced hepatotoxicity in rats. *Pharmacol Res* 42: 471-474.
45. Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 249: 7130-7139.
46. Vos RM, Van Bladeren PJ. 1990. Glutathione S-transferases in relation to their role in the biotransformation of xenobiotics. *Chem Biol Interact* 75: 241-265.
47. Halliwell B. 1978. Biochemical mechanism accounting for the toxic action of oxygen on living organisms: The key role of superoxide dismutase. *Cell Biol Int Rep* 2: 113-128.
48. Bolt HM, Laib RJ, Filser JG. 1982. Reactive metabolites and carcinogenicity of halogenated ethylenes. *Biochem Pharmacol* 31: 1-4.
49. Chow CK. 1979. Nutritional influence on cellular antioxidation defence systems. *Am J Clin Nutr* 32: 1066-1081.
50. Awasthi YC, Beutler E, Srivastava SK. 1975. Purification and properties of human erythrocyte glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 250: 5144-5149.

(2004년 7월 2일 접수; 2004년 10월 1일 채택)