

일당귀 n-hexane분획이 에탄올을 투여한 흰쥐의 항산화계 및 지질과산화에 미치는 영향

추명희 · 최현숙 · 서영남 · 이명렬[†]
조선대학교 식품영양학과

Effects of n-Hexane Fraction of *Angelica acutiloba* on Antioxidative System and Lipid peroxidation in Ethanol-Induced Hepatotoxicity of rats

Myung-Hi Choo, Hyun-Suk Choi, Young-Nam Seo and Myung-Yul Lee[†]
Dept. of Food and Nutrition, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea

Abstract

To investigate antioxidative effects of n-hexane fraction of *Angelica acutiloba* on the ethanol-induced hepatotoxicity of rats, Sprague-Dawley rats weighing 100 ± 20 g were divided into 5 groups ; normal group(NOR), ethanol(10 mL/kg, 35%) treated group(CON), n-hexane fraction of *Angelica acutiloba* 70 mg/kg treated group(A1), n-hexane fraction of *Angelica acutiloba* 70 mg/kg and ethanol treated group(A2) and n-hexane fraction of *Angelica acutiloba* 140 mg/kg and ethanol treated group(A3), respectively. The antioxidative activities of ethanol extract of *Angelica acutiloba* in vitro were decreased in order of n-hexane > ethylacetate > chloroform > n-butanol > water fraction. The growth rate and feed efficiency rate decreased by ethanol were gradually increased to the adjacent level of the normal group by administering n-hexane fraction of *Angelica acutiloba*. It was also observed that the activities of SOD of liver, ALT and AST of serum increased by ethanol were markedly decreased in n-hexane fraction of *Angelica acutiloba* administered group, and not in activities of XO, catalase, as compared with the control group. The depleted content of GSH by ethanol was increased adjacent to normal level by administering n-hexane fraction of *Angelica acutiloba*. as a dose-dependent manner. These results suggested that n-hexane fraction of *Angelica acutiloba* has a possible protective effect on the ethanol-induced hepatotoxicity of rats.

Key words : protective effect, hepatotoxicity, TBA-reactants, antioxidative activities

서 론

당귀(當歸)는 산형과(일명 미나리과, *Umbelliferae*)에 속하는 다년생 초본으로 <신농본초경(神農本草經)>의 중품(中品)에 수재되어 있는 약용식물이며, 보혈강장, 활혈정혈(活血精血) 및 어혈소산(瘀血消散)의 효능이 있어 빈혈치료와 혈액순환 장애로 인한 어혈증과 혈전증, 반신불수 등에 사용되는 중요한 한약재이다. 당귀는 고려때 '목귀초(目貴草)', '당적(當赤)', '공채(攻菜)' 등의 속명(俗名)이 있었고 조선조 초기에는 '승암초(僧庵草)'로 불리웠으며 <동의보감(東醫寶鑑)>에서 '승암초불회'로 한글화되었다. 현재의 당귀라는 명

칭은 <단방신편(單方新編)>에서부터 연유되었다(1).

당귀의 기원식물로 「중국약전」에는 *Angelica sinensis* Diels (중국당귀), 「일본약전」에는 *Angelica acutiloba* Kitagawa 및 *Angelica acutiloba* Kit. var. *sugiyamae* Hikino(일당귀)가 정품으로 수록되어 있으나, 한국에서는 기원이 다른 *Angelica gigas* Nakai(한국당귀, 참당귀 혹은 토당귀)의 뿌리를 당귀라는 이름으로 사용하고 있다(2). 우리나라에서 많이 재배되고 있는 품종은 한국당귀와 일당귀이며, 한국당귀는 국내 한방에서 주로 소비되고 일당귀는 중남부지역에서 수출용으로 재배되고 있다. 그러나 중국당귀는 농가를 보호하기 위한 수입금지품목으로 시중에서는 볼 수 없지만 현재 경희대학교 본초원과 강원도 평창 산채시험장에서 시험재배중이다.

한국당귀의 성분으로 유 등(3)은 coumarin계의 decursin, decursinol 및 decursinol angelate를, 윤 등(4)은 α -pinene와 15

[†]Corresponding author. E-mail : mylee@mail.chosun.ac.kr, Phone : 82-62-230-7722, Fax : 82-62-225-7726

여종의 정유성분과 β -sitosterol의 수종의 steroid 성분을 분리·보고하였다.

효능연구로 지 등(5)은 decursin, decursinol에 대한 약리 작용, 가토의 적출장관, 개구리 적출심장, 가토의 혈압 및 호흡, 가토 적출 자궁에 대한 작용을 보고한바 있으며, 우 등(6)은 decursin, decursinol의 생쥐에 대한 수면효과를 보고하였다.

일당귀와 중국당귀의 성분은 함량의 차이는 있지만 동일하거나 유사한 것으로 보고되었다. 일당귀의 경우, Mitsuhashi 등(7)은 phthalide계인 ligustilide, butylidenephthalide, butylphthalide 및 sedanonic acid lactone 등을, Tanaka 등(8)은 polyacetylene유도체인 falcariol, falcariindiol., falcariolone 등과 coumarin계인 copoletin, umbelliferone 등을, Kobayashi 등(9)은 α -terpinene, ρ -cymene 등 40여종의 정유성분을 분리·보고하였다. 또한 Yamada 등(10)은 수종의 polysaccharides 성분을, Okuyama 등(11)은 pyranocoumarin계의 acutilobin, decusin을 분리·보고하였다.

약효 및 약리작용으로는 진통작용(polyacetylene계), 항염증 작용(β -sitosterol-D-glucoside)(12), 항 acetylcholin작용(phthalide계), 진경작용, 혈압강화작용, 해열작용, 수면 연장작용, 혈소판 응집 억제작용(13)(adenosine, ligustilide, butylphthalide)이 보고되었으며, 최근에는 polysaccharides성분(14)에서 anti-complementary activity, interferon-producing activity 및 mitogenic activity 등이 연구보고 되었으며, Yamada 등(15)은 antitumor-promoter activity, antitumor activity(acutilobin, decusin)를 보고한바 있다. 이외에 자궁 및 생식기능에 대한 효과(16), 간에서 핵산 및 glycogen 증가 등(17) 많은 연구결과가 보고되었다.

이와 같이 같은 속(屬)식물이지만 한국당귀의 지표물질은 coumarin계의 decursin, decursinol 등이며 일당귀 및 중국당귀는 phthalide계의 ligustilide, butylidene phthalide, butyl phthalide 등으로 주성분과 약효가 다르다(18). 또한 성미면을 보면 중국당귀가 감미신온(甘微辛溫), 일당귀는 감신온(甘辛溫) 및 한국당귀가 신고온(辛苦溫)으로 甘味の 차이가 있다. 조혈작용에 필수성분인 비타민 B12 함량도 중국당귀와 일당귀에는 풍부하나 한국당귀는 매우 적은 것으로 보고되고 있다. 이와같이 한국당귀와 일당귀 및 중국당귀의 성분 및 약효가 다르므로 임상에서 일당귀와 중국당귀는 보혈강장에, 한국당귀는 활혈거어(活血去瘀)에 주로 사용되어야 한다. 그러나 전국의 농가에서도 한국당귀를 당귀로 혼돈하여 재배하고 있고 실제 한의원이나 한약국의 임상에서도 혼돈하여 사용하고 있는 실정이므로 이에 대한 구체적인 검토가 이루어져야 한다고 지적되고 있다(19).

당귀의 식품학적 연구로는 황과 양이(20) 한국당귀의 뿌리에서 정유성분을, 진부지역에서 생산된 당귀 추출물의 제조 및 이화학적 특성(21), RAPD 분석과 뿌리의 내부구조 비교를 통한 당귀류의 감별(22), coumarin에 대한 연구(23)가 이루어졌고 지(24)는 과실에서 imperatorin과 decursinol을, 유

등(25)은 pyranocoumarin인 decursin, decursinol을, 강 등(24)은 한국당귀 및 일당귀의 주성분을 분리하여 동정하였다.

최근에 구기자, 오미자, 당귀 등 한방이나 민가에서 성인병 예방 및 치료에 사용되었던 약용식물들을 이용하여 새로운 식품신소재 및 의약품원료의 개발에 대한 필요성이 증대되고 있다. 그러나 천연식품을 식품재료화하여 기능성식품의 신소재로 개발하기 위해서는 체계적인 생리활성 실험 및 식품학적 접근이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 일당귀의 항산화활성을 구명하기 위하여, 천연 기능성 물질을 추출하고 in vitro에서 항산화력을 검색하여 천연항산화제로서의 개발가능성을 제시하고, 또한 in vivo에서 에탄올로 유발된 흰쥐 간의 세포적 손상에 미치는 영향을 검토하여 성인병 치료의 보조요법이나 예방을 위한 기능성 식품으로 개발하기 위한 기초자료로 활용코자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

일당귀(*A. acutiloba*)는 신선한 것을 구입하여 음건 후 시료로 사용하였다. 시료를 에탄올로 추출 후 여과하고 여액을 농축하여 n-hexane, chloroform, ethylacetate 및 n-butanol로 계통분획·분리하였다(26). 각 분획을 45°C 수욕상에서 rotary vacuum evaporator로 용매를 제거 후 감압농축하고 건조시켜 Rancimat 676(Metrohm, Swiss)로 항산화력을 측정하여 상호 비교하였다. 항산화활성이 가장 높은 n-hexane 분획을 시료로 사용하였다. Antioxidant index(AI)는 각 분획을 첨가한 실험구의 유도기간을 대조구의 유도기간으로 나눈 값으로 구하였다.

실험동물 및 처치

체중 100 ± 20 g의 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐를 1주일간 고형배합사료(삼양사료)로 적응시키고, 난괴법(randomized complete block design)으로 한 군당 10마리씩 선별하여 정상군(NOR), 일당귀 n-hexane 분획 70 mg/kg투여군(A1), 알코올투여군(35% ethanol 10 mL/kg, b.w./day, CON), 알코올(35% ethanol 10 mL/kg, b.w./day) 및 일당귀 n-hexane분획 70 mg/kg 병합투여군과 알코올(35% ethanol 10 mL/kg, b.w./day)(A2) 및 일당귀 n-hexane 분획 140 mg/kg 병합투여군(A3)의 5군으로 나누어 6주간 사육하였다(Table 1). 알코올 투여는 Fujii 등(27)의 방법에 따라 35% 에탄올을 10 mL/kg, b.w./day의 수준으로, 일당귀 n-hexane 분획은 예비실험을 토대로 하여 체중 kg 당 70 mg 및 140 mg이 함유되도록 생리식염수에 용해시키고 0.5% CMC로 현탁시켜 멸균 후 6주간 경구투여하였다. 실험기간 중 동물의 상태를 관찰하면서 체중은 1주일

간격으로, 식이섭취량은 2일 간격으로 측정하였으며, 사육기간의 체중증가량을 동일기간의 식이섭취량으로 나누어 각 실험군의 식이효율(feed efficiency ratio, FER)을 계산하였다. 실험동물은 처치 전 16시간 절식 후 에테르 마취하에 경동맥으로부터 혈액을 채취하였으며, 간은 적출하여 0.9 % 생리식염수로 남아 있는 혈액 및 기타 물질을 제거하고 무게를 측정 후 -70℃의 deep freezer에 보관하면서 효소 활성 측정에 사용하였다. 실험기간동안 고형사료 및 물은 자유로히 섭취토록 하였다.

Table 1. Composition of experimental diet

| Group | Diet Composition |
|-------------------|---------------------------------------|
| NOR ²⁾ | basal diet ¹⁾ |
| CON | basal diet + EtOH ⁴⁾ |
| A1 | basal diet + AAL ³⁾ |
| A2 | basal diet + AAL + EtOH |
| A3 | basal diet + AAH ⁵⁾ + EtOH |

- ¹⁾ According to AIN-93 diet composition.
- ²⁾ NOR : normal group.
- ³⁾ AAL : n-hexane fraction of Angelica acutiloba ethanol extract (70 mg/kg, b.w/day, p.o.) treated group.
- ⁴⁾ EtOH : ethanol 35% (10 mL/kg, b.w/day, p.o.) treated group.
- ⁵⁾ AAH : n-hexane fraction of Angelica acutiloba ethanol extract (140 mg/kg, b.w/day, p.o.) treated group.

효소원조제

간 조직 1 g당 4배량의 0.25 M sucrose buffer(pH 7.5)를 가하여 빙냉하에서 ultra turax homogenizer(10,000 × g, 2분)로 마쇄하였다. 이 마쇄액의 일부는 thiobarbituric acid-reactants (TBARS)량 측정에 사용하고 나머지는 4℃, 600 × g 에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄 부분을 제거한 후 상정액을 15,000 ×g에서 20분간 원심분리하여 superoxide dismutase (SOD), catalase, xanthine oxidase 및 glutathione peroxidase (GSH-Px)활성측정의 효소원으로 사용하였다. 혈청은 분리하여 alanine aminotranferase(ALT) 및 asparate amino transferase (AST)활성을 측정하였다.

효소활성 측정

간조직 중 xanthine oxidase 활성은 Downey 등(28)의 방법, SOD활성은 Crapo 등(29)의 방법, catalase활성은 Aebi(30)의 방법, GSH-Px활성은 Flohe 등(31)의 방법으로 측정하였다. 과산화지질 함량은 malondialdehyde량을 thiobarbituric acid로 비색정량하는 Buege 와 Aust의 방법(32), glutathione(GSH)함량은 Tietze의 방법(33)으로 측정하였다. 혈청중의 ALT 및 AST활성은 Reitman- Frankel 방법(34)에 의하여 조제된 아산

제약 kit를 사용하여 측정하였다.

단백질 정량 및 실험결과의 통계처리

단백질의 정량은 Lowry등의 방법(35)에 준하여 bovine serum albumin(Sigma Fr.v)을 표준품으로 하여 측정하였으며, 실험결과는 SPSS 통계 package를 이용하여 실험군당 평균 ± 표준오차로 표시하였으며 통계적 유의성 검정은 일원배치 분산분석(one-way analysis of variance)을 한 후 p<0.05 수준에서 Tukey(T) test를 이용하여 상호 검정하였다.

결과 및 고찰

각 분획의 항산화력 측정

일당귀 에탄올추출물 분획의 농도가 600 ppm이 되도록 유지(soybean oil)에 가하고 Rancimat로 항산화활성을 측정한 결과는 Table 2와 같다.

Table 2. Antioxidative activities of fractions of A. acutiloba ethanol extract on soybean oil

| Fraction | IP ¹⁾ | AI ²⁾ |
|--------------|------------------|------------------|
| control | 6.83 h | 1.00 |
| n-hexane | 11.85 h | 1.73 |
| chloroform | 9.75 h | 1.42 |
| ethylacetate | 11.00 h | 1.61 |
| n-butanol | 7.06 h | 1.03 |
| water | 7.02 h | 1.02 |
| BHT | 13.45 h | 1.97 |

- ¹⁾ Induction period(IP.hr.min) of oil was determined by Rancimat at 110 ℃.
- ²⁾ AI(antioxidant index) was expressed as IP of oil containing various fraction/IP of control oil.

항산화지수(AI : antioxidant index)는 n-hexane이 1.73, ethylacetate가 1.61, chloroform이 1.42, n-butanol이 1.03 및 water가 1.02 로 대조구보다 높은 항산화활성을 나타냈으며, 특히 n-hexane 분획의 활성이 가장 높았다. 이는 일당귀 성분 중 항산화작용을 나타내는 물질이 n-hexane분획으로 다량 이행되었기 때문으로 판단된다. 합성 항산화제는 높은 항산화력과 저렴한 가격 때문에 아직도 사용되고 있으나 장기간 사용하면 인체독성 등 부작용을 나타낼 수 있으므로 사용에 규제를 받고 있기 때문에 최근에는 천연물중에 존재하는 물질로 항산화력이 우수하면서도 안전성과 경제성이 있는 항산화제 개발에 대한 관심이 매우 고조되고 있다. 본 실험에서 일당귀 에탄올추출물의 전 분획에서 대조구보다 높은 항

산화활성을 나타냈는데 이는 일당귀 에탄올추출물에 항산화 활성을 나타내는 물질이 다량 함유되어 있는 것으로 판단되며 우수한 항산화제로 개발이 기대된다.

체중증가율과 식이효율

흰쥐에 일당귀 n-hexane 분획과 알코올을 6주간 투여하여 측정된 체중증가율 및 식이효율은 Fig. 1 및 2와 같다.

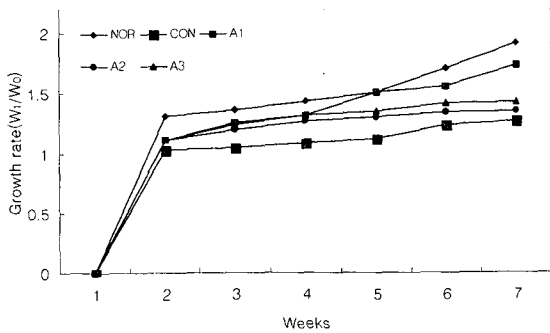


Fig. 1. The growth rate in alcohol and/or n-hexane fraction of *A. acutiloba* ethanol extract administered rats.

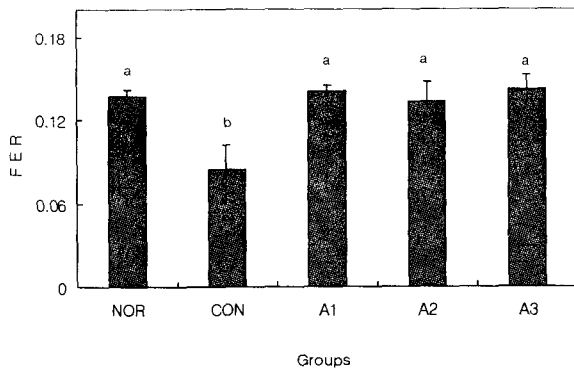


Fig. 2. FER of alcohol and/or n-hexane fraction of *A. acutiloba* ethanol extract administered rats. Values with different superscripts in the same row are significantly different ($p < 0.05$) between groups by Tukey(T) test.

알코올만을 투여한 군(CON)은 6주동안 정상군(NOR)과 일당귀 n-hexane 분획만을 투여한 군(A1)에 비하여 유의하게 체중증가율이 둔화되었다. 일당귀 n-hexane 분획과 알코올을 병합 투여한 군(A2와 A3)의 경우 2주까지는 CON에 비하여 유의적인 체중증가율을 나타냈으나 그 이후 증가는 되었으나 유의적인 변화는 아니었다. 식이효율에서 CON은 0.084 ± 0.018 으로 NOR 0.137 ± 0.005 에 비하여 유의적으로 저하됐으나 타군들은 NOR의 효율에 유사하게 증가되었다. 본 실험에서 알코올투여군의 체중증가율이 정상군에 비하여

유의적으로 둔화되었는데, 이 원인은 Shaw 등(36)의 보고처럼 알코올 다량 섭취시 장점막 손상으로 인한 영양소 흡수를 저하, 고열량 공급으로 인한 식사량 감소, 알코올 섭취로 인한 산소 소비량 증가 및 알코올 산화에너지의 비효율적인 이용 등 복합적인 요인에 의한 것으로 생각된다(37).

본 실험에서 일당귀 n-hexane 분획이 알코올 투여로 저하된 흰쥐의 체중증가율과 식이효율을 정상군에 근접하도록 증가시켰는데, 이 결과에서 일당귀가 알코올에 의한 간세포 독성의 해독 및 완화에 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

혈청중 ALT 및 AST활성

흰쥐에 일당귀 n-hexane 분획과 알코올을 6주간 투여하여 간 기능의 지표로 이용되는 ALT 및 AST활성을 측정된 결과는 Table 3과 같다. ALT활성에서, 일당귀 n-hexane 분획만을 투여한 A1(32.24 ± 5.94)은 NOR(30.09 ± 4.00)과 유사했으나 알코올만을 투여한 CON은 55.34 ± 3.23 로 NOR에 비하여 유의한 증가를 나타냈다. 그러나 일당귀 n-hexane 분획과 알코올을 병합투여하여(A2 43.08 ± 1.93 과 A3 42.72 ± 4.61) 알코올 투여로 상승된 ALT활성이 감소되었는데, 특히 대량투여군인 A3는 CON에 비하여 유의성 있는 감소를 나타냈다. AST활성도 ALT활성 변화와 유사한 경향을 나타냈다. 혈청중 ALT와 AST활성의 상승은 지질대사 장애로 간세포의 괴사 및 파괴가 진행됨에 따라 간중의 aminotransferase가 혈중으로 유출되어 나타나는 것으로 보고되었다(38). 본 실험에서 일당귀 n-hexane 분획을 투여하여 혈청중 ALT 및 AST 활성이 정상군에 비하여 차이를 나타내지 않았는데, 이는 본 실험에서 투여한 양과 기간내에서는 간독성이 유발되지 않는 것으로 여겨지고, 알코올 투여로 상승된 ALT 및 AST활성이 일당귀 n-hexane 분획을 투여하여 정상군에 근접되도록 저하되었음은 일당귀가 알코올 투여로 손상된 간세포 기능을 점차 회복시킬 수 있을 것으로 생각된다.

Table 3. The activities of ALT and AST in serum of rats administered alcohol and/or n-hexane fraction of *A. acutiloba* ethanol extract

| Enzyme activities | 6 weeks | | | | |
|-------------------|-----------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|
| | NOR ¹⁾ | CON | A1 | A2 | A3 |
| ALT ²⁾ | 30.09 ± 4.00^{ab} | 55.34 ± 3.23^c | 32.24 ± 5.94^a | 43.08 ± 1.93^{bc} | 42.72 ± 4.61^{ab} |
| AST ²⁾ | 107.57 ± 7.46^a | 162.17 ± 6.59^b | 110.12 ± 7.38^a | 143.37 ± 13.82^b | 115.86 ± 11.59^a |

¹⁾ See the legend of Table 9.
²⁾ Karmen unit/mL of serum Values are mean \pm S.E. of 10 rats per each group.
³⁾ Values with different superscripts in the same row are significantly different ($p < 0.05$) between groups by Tukey(T) test.

간조직중 항산화효소활성

흰쥐에 일당귀 n-hexane 분획과 알코올을 6주간 투여하여 유리기 생성에 관여하는 효소인 XO활성과 해독에 관여하는 효소인 SOD, catalase 및 GSH-Px활성을 측정한 결과는 Table 4와 같다.

Table 4. Activities of XO, catalase, SOD, and GSH-Px in liver of rats administered alcohol and/or n-hexane fraction of *A. acutiloba* ethanol extract

| Enzyme activity | 6 weeks | | | |
|-------------------|----------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | XO ¹⁾ | Catalase ²⁾ | SOD ³⁾ | GSH-Px ⁵⁾ |
| NOR ¹⁾ | 32.88±2.44 ^{ab6)} | 108.69±16.82 ^a | 78.92±4.09 ^a | 92.85±9.14 ^a |
| CON | 51.64±3.22 ^a | 131.25±13.62 ^a | 116.54±8.40 ^b | 131.2±15.23 ^b |
| A1 | 31.57±2.45 ^b | 106.33±15.30 ^a | 84.42±5.26 ^a | 88.43±11.95 ^a |
| A2 | 48.21±8.69 ^{ab} | 127.63±21.66 ^a | 89.81±6.88 ^a | 127.5±26.70 ^b |
| A3 | 40.59±4.95 ^{ab} | 113.63±27.84 ^a | 93.54±7.45 ^a | 110.2±19.67 ^a |

¹⁾ See the legend of Table 9, ²⁾ mU/g protein,

³⁾ decreased H₂O₂ μ mol/min/mg protein, ⁴⁾ μ mol/min/mg protein,

⁵⁾ decreased NADPH μ mol/min/mg protein Values are mean±S.E. of 10 rats per each group.

⁶⁾ Values with different superscripts in the same row are significantly different (p<0.05) between groups by Tukey(T) test.

유해물질이나 약물 등에 폭로되었을 때나 혹은 병적 상태에서는 세포내에 superoxide radical(O₂), hydroxyl radical(OH[•]) 및 hydrogen peroxide(H₂O₂)가 다량 생성되어 조직에 치명적인 손상을 입힐 수 있다(39). 일반적으로 oxygen free radical에 의한 조직 손상은 oxygen free radical의 생성계와 해독계의 불균형에 의하여 야기되어 진다(40,41).

유리기 생성계 효소인 XO활성에서, A1(31.57±2.45)는 NOR(32.88±2.44)과 큰 차이가 없었으나 알코올투여로(CON, 51.64±3.22) 유의하게 상승되었고 상승된 XO활성이 일당귀 n-hexane 분획 투여로(A2 48.25±8.69, A3 40.59±4.95) 감소되었으나 유의성있는 변화는 나타내지 못했다. XO는 xanthine 혹은 hypoxanthine과 반응하여 노산을 생성하고 이때 생성된 노산이 체내에서 항산화작용을 나타내는데, 만일 다량의 노산이 생산되어 관절에 축적이 되면 통풍이 유발되고 심한 통증이 동반된다(42). 본 실험에서 알코올 투여로 XO 활성이 NOR에 비하여 유의하게 상승되었음은 알코올을 흰쥐에 만성적으로 투여시 XO 활성이 상승된다는 보고(43)와 일치하나 알코올 투여로 상승된 XO활성을 일당귀 n-hexane 분획이 CON에 비하여 유의하게 저하시키지 못했음은 일당귀 n-hexane 분획이 유리라디칼의 생성 억제와 더불어 XO활성 저해작용에 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다.

유리기 해독계 효소활성에서, catalase 활성은 CON(131.25±

13.62)이 NOR (108.69±16.82)에 비하여 상승되었으나 유의성 있는 변화는 아니었고, 일당귀 n-hexane 분획과 알코올을 병합 투여한군(A2 127.63±21.66, A3 113.63±27.84)은 CON에 비하여 활성을 크게 저하시켰다. Catalase는 대부분 조직의 peroxisome(44)에서 H₂O₂를 H₂O로 환원시켜 H₂O₂ 증가에 따른 조직 손상을 방어하는 효과가(45)있으며 GSH-Px에 비해 Km값이 높기 때문에 H₂O₂의 농도가 높을 때 주로 작용한다고 보고되었다(46).

SOD활성은 CON(116.54±8.40)이 NOR(78.92±4.09)에 비하여 유의적으로 상승되었고 A2와 A3(89.81±6.88, 93.54±7.45)는 CON에 비하여 유의성 있게 저하 되었다. SOD는 metalloenzyme으로서 함유된 금속이온(Cu, Zn, Mn 및 Fe)의 종류에 따라 구분되며, O₂가 한 개의 전자를 받아들여 불안전 산화된 superoxide anion(O₂⁻)를 hydrogen peroxide(H₂O₂)로 전환시키는 O₂· 소거효소다(47). 본 실험에서 CON의 활성이 NOR에 비하여 현저히 상승된 것은 알코올 투여로 증가된 oxygen free radical를 소거하려는 생리적응 현상으로 생각되며 증가된 효소활성은 일당귀 n-hexane 분획 투여로 현저히 감소되었다.

GSH-Px의 활성은 CON(131.2±15.23)이 NOR(92.85±9.14)에 비하여 상승되었으며 일당귀 n-hexane 분획은(A2 : 127.5± 26.70, A3 : 110.2±19.67)은 알코올 투여로 상승된 GSH-Px 활성을 정상군에 근접하게 저하시켰다. 알코올 투여군의 GSH-Px 활성이 높게 나타나는 것은 알코올의 산화로 증가되는 산화물들을 환원시키기 위한 생리작용에 의한 것으로 판단된다. GSH-Px는 세포질과 사립체내에 존재하기에 사립체내에서 생성된 H₂O₂의 소거에 일차적으로 작용하고 Km 값이 낮기 때문에 H₂O₂의 농도가 낮을 때에도 작용한다. 또한 selenium (Se)을 함유하는 항산화계 효소로서 체내에서 NADPH를 전자수용체로 하여 GSH를 GSSG과 물 그리고 기타 과산화물을 생성하는 반응을 촉매 함으로써 조직의 과산화적 손상을 방지하고 산소독을 해독하는 효소이다(48). 본 연구에서 CON이 NOR에 비하여 GSH-Px활성이 유의하게 상승된 것은 알코올 투여로 증가된 H₂O₂를 소거하기 위하여 나타난 결과로 생각된다.

간조직중 과산화지질 함량

흰쥐에 일당귀 n-hexane 분획 및 알코올을 6주간 투여 후 간조직중에 생성된 과산화지질 함량을 측정한 결과는 Table 5와 같다.

일당귀 n-hexane 분획만을 투여할 경우(A1, 4.19±0.32) 과산화지질함량이 NOR(4.21±0.48)에 비하여 낮았으며 알코올 투여(CON, 6.36±0.32)로 NOR에 비하여 유의하게 증가되었으나 일당귀 n-hexane 분획(A2, 4.63±0.68, A3, 4.28±0.34)투여로 CON에 비하여 감소되었으며, 특히 A3 에서는 유의적

로 감소되었다. 알코올 섭취시 oxygen free radical생성이 증가되는 것은 과량의 알코올이 산화되는 과정에서 미크로솜 분획의 cytochrome P450 mixed function oxidase(MFO)체제 특히, cytochrome P-450II E1이 가동되는 과정과 세포질에서 molybdo-flavoenzyme인 XO나 aldehyde oxidase 및 미토콘드리아 호흡사슬의 이용 등에 의한 것으로 보고되고 있다(49). 지질 과산화 반응은 여러 가지 독성화합물이나 약물에 의한 간 손상 발생의 가장 중요한 기전으로 이러한 기전은 세포 내 산화적 스트레스의 증가, 즉 free radical 생성 증가 및 항산화적 방어력의 감소에 기인한 것으로 보고되고 있다(50).

본 실험에서 알코올 투여로 간조직의 과산화지질 함량이 NOR에 비해 현저하게 증가된 것은 xenobiotics의 대사시 생성된 free radical들이 지질과산화물을 증가시킨다는 보고와도 일치한다(51). 과량의 알코올 섭취 후 생성된 acetaldehyde는 tubulin과 반응하여 polymerization 반응을 방해하고 세포 내에서 단백질 이동을 억제하기 때문에 알코올섭취로 간손상이 유발되면 간세포내에 이상 단백질이 축적되므로서 간세포의 손상 및 괴사가 초래되며(52), 특히 acetaldehyde가 low km상태의 acetaldehyde dehydrogenase에 의하여 산화작용을 받게 되면 유리 산소기가 함유된 더욱더 반응적인 물질이 생성됨으로서 지질과산화 작용이 촉진된다고 보고되었다(53).

Table 5. Contents of TBA - reactants in liver of rats administered alcohol and/or n-hexane fraction of *A. acutiloba* ethanol extract.

| Group | Content | TBA - reactants (µm/g liver) |
|-------------------|---------|------------------------------|
| NOR ¹⁾ | | 4.21±0.48 ^{a,2)} |
| CON | | 6.36±0.32 ^b |
| A1 | | 4.19±0.32 ^a |
| A2 | | 4.63±0.68 ^{ab} |
| A3 | | 4.28±0.34 ^a |

¹⁾ See the legend of Table 9

Values are mean ± S.E. of 10 rats per each group.

²⁾ Values with different superscripts in the same row are significantly different(p<0.05) between groups by Tukey(T) test.

간조직중 GSH함량

흰쥐에 알코올 및 일당귀 n-hexane 분획을 6주간 투여 후 간 조직중 GSH함량을 측정된 결과는 Table 6과 같다.

알코올 투여로 GSH함량이 16.11±1.19으로 NOR(25.68±1.88)에 비하여 유의하게 감소되었는데 이 결과는 GSH를 기질로 과산화수소를 제거하는 GSH-Px활성이 증가되어 GSH가 소모됨으로서 감소된 것으로 여겨지며, 일당귀 n-hexane 분획과 알코올 병합 투여군(A2, 19.69±1.92, A3, 18.48±1.49)이 알코올만을 투여한 군보다 GSH함량이 증가된 것은 일당

귀 n-hexane 분획이 알코올에 의해 생성된 H2O2 등 free radical을 소거하여 GSH-Px의 소모가 줄어들어서 GSH의 소모량이 감소되어 나타난 결과로 여겨진다. GSH는 GSH-Px에 의해 생성된 GSSG를 NADPH를 사용하여 GSH로 환원시키는 역할을 한다(54). 본 연구에서 알코올의 장기 섭취가 지질과산화를 초래하고 이로부터 파생된 4-hydroxy-2-nonenal (HNE)의 생성이 증가되며 glutathione-6-phosphate dehydrogenase를 불활성화함으로써 전체적인 활성이 감소되었던 것으로 생각되어진다(55). 이와 같이 glutathione-6-phosphate dehydrogenase의 활성이 감소하면 NADPH 공급이 제한되므로 결국 glutathione reductase에 의한 GSSG의 환원율이 상대적으로 줄어들고 세포막을 보호하는 능력이 감소되어 산화적 손상을 쉽게 받을 것으로 판단된다.

Table 6. Contents of GSH in liver of rats administered alcohol and/or n-hexane fraction of *A. acutiloba* ethanol extract.

| Group | Content | GSH(mg/g liver) |
|-------------------|---------|-------------------------|
| NOR ¹⁾ | | 25.68±1.88 ^a |
| CON | | 13.11±1.19 ^b |
| A1 | | 21.53±1.25 ^a |
| A2 | | 19.69±1.92 ^c |
| A3 | | 23.48±1.49 ^a |

¹⁾ See the legend of Table 9

Values are mean ± S.E. of 10 rats per each group.

²⁾ Values with different superscripts in the same row are significantly different (p<0.05) between groups by Tukey(T).

요 약

일당귀의 n-hexane분획이 흰쥐에서 에탄올투여로 생성된 oxygen free radical대사와 지질과산화작용에 미치는 영향을 검토하기 위하여 실험동물을 정상군, 일당귀 n-hexane 분획 70 mg/kg투여군, 알코올투여군(35% ethanol 10 mL/kg, b.w./day), 알코올(35% ethanol 10 mL/kg, b.w./day) 및 일당귀 n-hexane 분획 70 mg/kg 병합투여군과 알코올(35% ethanol 10 mL/kg, b.w./day) 및 일당귀 n-hexane 분획 140 mg/kg 병합투여군의 5군으로 나누어 6주간 사육하여 체중증가율, 식이효율 및 혈청중 ALT, AST 측정과 간손상 억제효과를 검토하기 위하여 간조직중 유리기 생성계 효소인 XO활성, 유리기해독계 효소인 SOD, calase 및 GSH-Px활성과 지질과산화물인 TBARS 및 GSH함량을 측정된 결과는 다음과 같다.

각 분획의 항산화력은 n-hexane, ethylacetate, chloroform, n-butanol 및 water 분획순으로, n-hexane 분획의 항산화력이

가장 우수하였다.

6주간의 체중증가율과 식이효율은 알코올투여로 정상군에 비하여 유의적으로 저하되었으나 일당귀 n-hexane 분획투여로 정상군에 근접하게 상승되었고, 알코올투여로 상승된 ALT 및 AST활성도 유의하게 저하되었다.

간 조직중 XO활성은 알코올투여로 정상군보다 상승되었으며 일당귀 n-hexane 분획 투여로 저하는 되었지만 유의성 있는 변화는 아니었다. 알코올 투여로 상승된 SOD활성은 일당귀 n-hexane 분획 투여로 정상군에 비하여 유의하게 저하되었으나 catalase와 GSH-Px활성은 유의적인 변화를 나타내지 않았다.

TBA 반응성 산물량은 정상군과 일당귀 n-hexane 분획 투여군간에 차이는 없었고 알코올투여로 정상군보다 많은 증가를 나타냈으나 일당귀 n-hexane 분획투여로 정상군에 근접하게 감소되었다. 알코올투여로 감소된 GSH 함량은 일당귀 n-hexane분획을 투여하여 용량의존적으로 증가되었다.

이상의 실험결과에서 일당귀의 항산화작용은 유리기 해독제 효소인 SOD활성억제와 비효소적 항산화작용을 나타내는 GSH량을 증가시킴으로서 지질과산화물에 대한 방어력이 증강되어 나타난 결과로 판단되어지며, 또한 혈청중 ALT 및 AST활성을 유의성있게 감소시키므로써 일당귀가 알코올성 간질환에서 손상된 간기능을 회복시킬 수 있을 것으로 추정되었다.

참고문헌

1. 강승수 (1991) 본초학, 영림사, 서울, p. 12-591.
2. 유강수 (1985) 현대 생약학, 동명사, 서울, p.54
3. Ryu, K.S., Hong, N.D., Kim, N.J. and Kong, Y.Y. (1990) Studies on the coumarin constituents of the root of *Angelica gigas* Nakai isolation of decusinol angelate and assay of decursinol angelate and decusin. Kor. J. Pharmacognosy 21, 64-68
4. Yoon, H.R. and Yook, C.S. (1995) Studies on the constituents of *Angelica gigas* Nakai.. Bull. Kyung Hee Pharma, Sci., 23, 55-71
5. Chi, H.J. and Kim, H.S. (1970) Studies on the components of Umbelliferae plants in korea phamacological study of decusin, decucinol, and nodakenin. Kor. J. Pharmacognosy, 1, 25-32
6. Woo, W.S., Shin, K.H. and Ryu, K.S. (1982) Annual report of natural products research institute. Seoul National Univ., 21, 59-64
7. Mitsuhashi, H., Nagai, U., Muramatsu, T. and Tashiro, H. (1967) Studies on the constituents of Umbelliferae plants
8. Tanaka, S., Hoshino, C., Ikeshiro, Y., Tabata, M. and Konoshima, M. (1977) Studies on antinociceptive activities of aqueous extracts from differents varieties of Toki. Yakugaku Zasshi, 97, 14-17
9. Kobayashi, M. (1992) Chemical evaluation of *Angelica Radix*. J. Traditional Sino-Japanese Medicine, 13, 95-100
10. Yamada, H., Kiyohara, H., Cyong, J.C., Kojima, Y., Kumazawa, Y. and Otsuka, Y. (1984) Studies on polysaccharides from *Angelicae Radix*(III) Chemical properties and biological activities of polysaccharides from *Angelicae Radix* produced in the different area. Shoyakagaku Zasshi, 38, 111-117
11. Okuyama, T., Takata, M., Nishino, H., Nishino, A., Takayasu, J. and Iwashima, A. (1990) Studies on the antitumor-promoting activity of naturally occurring substances III. Structure of a new coumarin and antitumor-promoter activity of coumarins from *Angelicae Radix*. Shoyakagaku Zasshi, 44, 346-348
12. Cho, S., Takahashi, M., Toita, S. and Cyong, J.C. (1982) Suppression of adjuvant arthritis on rat by oriental herb (I). Shoyakagaku Zasshi, 36, 78-81
13. Shimizu, M., Matsuzawa, T., Suzuki, S., Yoshisaki, M. and Morita, N. (1991) Evaluation of *Angelicae Radix* by the inhibitory effects on platelet aggregation. Chem. Pharm. Bull., 39, 2046-2048
14. Yamada, H., Kiyohara, H., Cyong, J.C., Kojima, Y., Kumazawa Y. and Otsuka, Y. (1984) Studies on polysaccharides from *Angelica acutiloba* Part I. Fraction and biological properties of polysaccharides. Planta Med., 50, 163-167
15. Yamada, H., Komiyama, K., Kiyohara, H., Cyong, J.C., Hirakawa, Y. and Otsuka, Y. (1990) Structural characterization and antitumor activity of a pectic polysaccharides from the root of *Angelica acutiloba*. Planta. Med., 56, 182-186
16. Harda, M., Suzuki, M. and Ozaki, Y. (1984) Effects of Japanese *Angelica* root and peony root on uterine contraction in the rabbit in situ. J. Pharm. Dyn., 7, 304-311
17. Yamada, H. (1992). Phamacological and clinical effects of *Angelica Radix*. J. Traditional Sino-Japanese Medicine, 13, 102-109
18. Kang, C.K, Chang, S.Y., and Yook, C.S. (1998) Chemotaxonomic studies on the Umbelliferous plants. Bull. K.H. Pharma. Sci., 26, 1-30
19. 보건복지부(1998) 한약재 품질관리에 관한 조사 연구, p. 66.

20. Hwang, J.B. and Yang, M.O. (1997) Comparison of chemical components of *Angelica gigas* Nakai and *Angelica acutiloba* Kitagawa. Korean J. Food Sci. Technol., 29, 1113-1118
21. Lee, W.J., Yoon, J.R., Kim, E.K. and Ahn, K.T. (2000) Preparation and physicochemical properties of extracts from *Angelica gigantis* Radix of Jin Bu area. J. Coastal Research, 11, 13-22
22. Lee, M.Y., Im, S.H., Ju Y.S., Han, K.S., Jeong, G.J. An, D.G., Kang, H. C and Ko, B.S. (2000) Discrimination of the three *Angelica* species using the RAPDs and Internal Root Structure. Korean J. Medicinal Crop Sci., 8, 243-249
23. 유경수 · 육창수 (1961) 참당귀의 성분연구, 대한약학회 총회 및 학술대회 요지
24. Yook, C.S., Kim, C.W., Kim, C.M. and Ryu, K.S. (1973) A study on the constituents of the fruits of *Angelica gigas* Nakai. Kor. J. Pharmacog, 4, 189-190
25. Yook, C.S., Kim, C.W., Kim, C.M., and Ryu, K.S. (1974) Coumarin components in the fruits of *Angelica gigas* Nakai. Kor. J. Pharmacog., 5, 139-145
26. 우원식 (1997) 천연물 화학 연구, 서울대학교 출판부, p.14
27. Fujji, M., Ohmachi, T., Sagami, I., and Watanabe, M.(1985) Liver microsomal drug metabolism in ethanol treated hamsters. Biochem. Pharmacol., 34, 3881
28. Downey, J. M., Miura, Y., Eddy, L. J., Chambers, D. E., Mellert, T., Hearse, D. J. and Yellon, D. M. (1987) Xanthine oxidase is not a source of free radicals in the ischemic rabbit heart. J. Mol. Cell Cardiol., 19, 1053-1060
29. Crapo, C. H., McCord, J. M. and Fridovich, I. (1978) Preparation and assay of superoxide dismutase. Methods enzymol. ed. Fleischer S and Packer L., Academic press, New York, p.382-422
30. Aebi, H. (1974) Catalase, Methods of enzymatic analysis. Bergmeyer HU, Bergmeyer, J and Grabi, M., eds. 3rd ed., Verlag. chemie., 2, 673-689
31. Flohe, L., Wolfgng, A. and Gunzler, W. A. (1984) Assay of glutathine peroxidase. In Methods in enzymatic analysis. Packer. L. eds. New York, Academic Press, Inc. p.673-684
32. Buege, J.A. and Aust, S.D. (1969) Microsomal lipid peroxidation. In "Methods in enzymoogy". Packer, L. (ed.), Academic Press, New York. p.502-520
33. Tietze, F. (1969) Enzymatic methods for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. Anal. Biochem. 27, 502-522
34. Reitman, S. and Frankel, S. (1957) A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic determination and glutamic pyruvic transaminase. Am. J. Clin. Pathol., 28, 56-63
35. Lowry, C. H. Rsenbrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 193 : 256-257
36. Shaw S and Lieber CS. (1983) Nutrition and alcohol, A clinical perspective. In : Weininger J. Briggs GM, eds. Nutrition Update John Wiley & Sons, New York p.79-104
37. Mitchell, M.C. and Herlong, H.F. (1986) Alcohol and nutritional: caloric value, bioenergetics, and relationship to liver damage, Ann. Rev. Nutr., 6, 457-164
38. Koo, B.K., Chung, J.M. and Lee, H.S. (1998) Biochemical evaluation of nutritional status of protein and lipid in patients with alcoholic liver disease. Korean J. Food Sci. Nutr., 27, 1236-1243
39. Goldberg, B. and Stern, A. (1977) The role of the superoxide anion as a toxic species in the erythrocyte. Arch. Biochem. Biophys., 178, 218-225
40. Yoon, C.G., Jeon, T.W., Oh, M.J., Lee, G.H. and Jung, J.H. (2000) Effect of the ethanol extract of *Lycium chinense* on the oxygen free radical and alcohol metabolizing enzyme ativities in rats. Korean J. Food Sci. Nutr., 29, 268-273
41. Harris ED. (1992) Regulation of antioxidant enzymes, J. Nutr. 122:625-626
42. Storch, J. and Ferber, E. (1988) Detergent-amplified chemiluminescence of lucigenin for determination of superoxide anion production by NADPH oxidase and xanthine oxidase. Anal. Biochem., 169, 262-276
43. Oei. H.H, Stroo. W.E., Burton. K.P. and Schaffer. S.W.(1982) A possible role of xanthine oxidase in producing oxidative stress in the heart of chronically ethanol treated rats. Res. Commun Chem. Pathol Pharmacol., 38, 454-461
44. Chance, B., Sies, H. and Boveris, A. (1979) Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. Physiol, Rev., 59:527-605
45. Frank, L. and Massaro, D. (1980) Oxygen toxicity. Am, J. Med., 69, 117-126
46. Tubaro, E., Banci, F., Lotti. B. and Gorce, C. (1976) Xanthine oxidase activation in animal liver during infectious processes. Arzneimittel- Forschung., 26, 2185-2193
47. McCord, J. M. and Fridovich, I. (1969) Superoxide dismutase an enzymatic function for erythrocyte(hemocuprin). J. Biol. Chem., 244, 6049-6059
48. Fred, J., Yost, J. and Fridovich, I. (1976) Superoxide and hydrogen peroxide in oxygen damage. Arch. Biochem. Biophys., 175, 514-520

49. Reitz R.C. (1975). A possible mechanism for the peroxidation of lipid due to chronic ethanol ingestion. *Biochem Biophys Acta*, 380, 145-154
50. Plaa, G.L. and Witschi, H. (1976) Chemical drugs and lipid peroxidation. *Annu. Rev. Pharmacol Toxicol.*, 16, 125-133
51. Nanji. A.A. and Zakim. D. (1995) Alcoholic liver disease. In *Hepatology*. 3rd ed., Zakim.D. and Boyer.T. ed Saunders. Philadelphia. p.891-936
52. Saunders JB and Williams R. (1983) The genetics of alcoholism. *Alcohol*, p.189-200
53. Sevanian A and Hochstein P. (1985) Mechanism and consequences of lipid peroxidation in biological system. *Ann. Rev. Nutr.*, 5, 365-377
54. Recknagel, R. O., Glende, E. A. and Hruszkewycz, A. M. (1977) Chemical mechanisms in carbon tetrachloride toxicity. in "Free radicals in biology". Pryor, W. A. (ed.), Academic Press, New York, p.97
55. Szweda LI, Uchida K, Tasi L. and Stadtman ER. (1993) Inactivation of glucose-6 phosphate dehydrogenase by 4-hydroxy-2-nonenal. *J. Biol. Chem.*, 268, 3342-3347

(접수 2004년 8월 3일, 채택 2004년 9월 3일)