

유근피 추출물이 B6C3F1 마우스 신장에서 반응성 산소종의 발생과 제거에 미치는 영향

홍종연 · 송혁환 · 이 찬*
중앙대학교 식품공학과

Effect of the Extract of *Ulmus davidiana* Root on the Activity of Enzymes Related to the Removal of Reactive Oxygens in B6C3F1 Mouse Kidney

Jong Yun, Hong, Hyuk-Hwan Song, and Chan Lee*
Department of Food Science and Technology, Chung-Ang University

Abstract The effect of the extract of *Ulmus davidiana* root on the activity of enzymes related to the removal of reactive oxygen species was investigated in the B6C3F1 mouse kidney. B6C3F1 mice were divided into five groups and fed for 20 weeks. Reduced xanthine oxidase activity was observed in groups 4 (group fed with *U. davidiana* extract after *N,N*-diethylnitrosamine (DEN) treatment) and 5 (group fed with *U. davidiana* extract from the beginning of DEN treatment) compared to group 2 (group treated with DEN). The level of Mn-superoxidase dismutase tended to increase in the groups after DEN treatment. In group 5, the catalase activity increased and the other groups exhibited an unchanged or slightly decreased level of enzyme. Similar effects were found for glutathione peroxidase. A lower degree of TBARS (thiobarbituric acid reactive substance) formation was estimated in groups 4 and 5, compared to that in DEN treated group 2.

Key words: Extract, *Ulmus davidiana* root, reactive oxygens, anti-oxidation

서 론

유근피(root bark of *Ulmus davidiana*)는 느릅나무과에 속하는 당느릅나무 뿌리의 껍질로 독이 없고 대소변을 원활히 하는 생리활성을 지니고 있으며, 위궤양 등의 염증치료작용이 있다고 1575년 명(明)나라 의학자 이연(李橝)이 지은 의학입문(醫學入門)에 알려져 있다. 민간요법에서 유근피는 각종 위장염, 폐결핵, 폐병, 신장염, 대장염, 요도염, 방광염, 변비, 어혈, 신경통, 요통, 관절염, 고혈압, 저혈압, 동맥 경화 등의 치료에 효과가 있다고 하며, 종창약과 살충제로 사용되고 있다.

당느릅나무는 다양한 생리활성을 지닌 물질들을 함유하고 있다. 당느릅나무의 뿌리껍질(유근피)로부터 flavonoid인 (+)-catechin과 그 배당체인 (+)-catechin-5-O-β-D-apiofuranoside가 분리되었으며(1), 나무껍질(수피)로부터 friedelin, epifriedelin, taraxerol 등 3종의 triterpenoid가 보고 되었다(2). 그리고 당느릅나무 줄기에서 네 종류의 lignan xylosides와 두 종류의 neolignan glycosides가 정제되었으며(3), 유근피에는 암의 발생에 관여하는 matrix metalloproteinase-9를 억제하는 물질이 존재하고 있다(4). 최근 Kim 등(5)은 sesquiterpene *o*-naphthoquinones과 davidanones A, B, C 및 이미 알려진 mansonones E, F, H, I 등을 당느릅나무에서 분리

정제하였으며, 신경독성을 일으키는 것을 방어하는 물질인 triterpene esters인 ulmicin이 발표 되었다(6). 한편 당느릅나무 추출액은 흰 쥐의 대식세포에서 nitric oxide synthesis를 저해하는 것으로 알려졌다(7), 세포성장과 matrix metalloproteinase-2 및 9의 활성을 억제하는 물질인 glycoprotein-120이 추출액에서 분리되었다(8). 당느릅나무에 존재하는 당단백질은 superoxide anion을 제거하며, mouse embryonic cell인 NIH/3T3 세포주의 apoptosis를 유발한다고 한다(9).

생체독성을 나타내는 대표적인 free radical로는 nitric oxide(NO), 그 유도체인 반응성 질소종(reactive nitrogen intermediate, RNI)과 superoxide radical을 포함하는 반응성 산소종(reactive oxygen intermediate, ROI) 등이 있다(10). 이 중 반응성 산소종은 superoxide radical(O₂⁻), hydroxyl radical(HO[·]), hydrogen peroxide(H₂O₂) 및 singlet oxygen(¹O₂) 등을 말하며, 생체내 산소대사물질이 4개의 전자 받아들여 불로 환원되는 과정 중 생성된다. 반응성 산소종은 반응성이 크기 때문에 생체를 구성하고 있는 단백질, 지질, 핵산 등과 반응하여 생체분자의 활성을 저하시키거나 기능의 변화를 가져온다. 이 작용은 암, 노화, 뇌졸중, 심근경색, 류마치스성 관절염, 폐기종에서의 조직변화와 손상의 중요한 기전으로 생각되고 있다(11,12).

반응성 산소종인 superoxide radical과 hydrogen peroxide는 호기성세포에서 유해물질에 노출될 때 과다하게 생성되면 세포나 조직에 손상을 주며(13,14), 또한 반응성이 높은 다른 반응성 산소종을 형성시킨다(15). 반응성 산소생성에 관여되는 생물학적 반응으로는 xanthine oxidase(16), NADPH oxidase(17) 등의 효소 촉매 반응과 tetrahydrobiopterin(18) 등 작은 분자들의 자가산화반응이 잘 알려져 있다. Superoxide radical은 자발적 반응(2×10⁵ M⁻¹

*Corresponding author: Chan Lee, Department of Food Science and Technology, BET Research Institute, Chung-Ang University, Ansung, Gyunggi, 456-756, Korea
Tel: 82-31-670-3035
Fax: 82-31-676-8865
E-mail: chanlee@cau.ac.kr
Received April 7, 2006; accepted July 12, 2006

sec^{-1}) 혹은 superoxide dismutase(EC 1.15.1.1. 이하 SOD) 반응($2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ sec}^{-1}$)으로 dismutation되어 hydrogen peroxide와 oxygen으로 전환된다. 그리고 hydrogen peroxide는 catalase(EC 1.11.1.6)나 glutathione peroxidase(EC 1.11.1.9)에 의해 계속 물과 산소로 전환된다.

반응성 산소종을 제거하는 항산화 효과는 최근 기능성 식품의 주요 연구 분야로 등장하고 있으며, 항산화 효과를 통한 항암효과 및 기타 생리활성은 식품의 주요기능으로 자리 잡고 있다. 새로운 건강소재를 개발하는 측면에서 느릅나무 뿌리의 껍질(유근피)은 매우 중요하다. 유근피는 마늘·생강과 더불어 대체의약식품으로 많이 사용하는 천연 신약 중의 하나이며, 우리나라에 자원이 풍부하고 인체에 해를 미치지 않아 구황식물로 많이 이용하기 때문이다. 이와 같은 이유로 본 연구에서는 유근피 추출물의 반응산소종의 발생과 제거에 미치는 항산화효과를 살펴보고, 유근피 추출물의 건강 보조식품 및 암치료제로의 가능성을 알아보고자 하였다. 그리고 반응성 산소종 발생과 제거에 관여하는 효소들의 상호작용이 유근피 복용에 의해 생체에서 어떤 양상으로 나타나는지를 조사하였다.

재료 및 방법

실험재료 및 시약

충청남도 금산에서 양질의 유근피를 채취하여 음지에서 잘 건조한 후 본 연구의 재료로 사용하였다. 유근피 600g을 잘게 썰어 1L 등근바닥 플라스크에 넣고 70% 에탄올 600mL를 첨가한 후 70°C에서 4시간 환류시켰다. 이 과정을 3반복하여 회수된 용액을 감압 농축하고 건조 후 500ppm의 농도로 증류수에 희석하여 식이용 음료로 사용하였다. N,N-Diethylnitrosamine(DEN), superoxide dismutase(SOD), glutathione, glutathione reductase, xanthine, xanthine oxidase, cytochrome C, nitroblue tetrazolium(NBT), thiobarbituric acid, pyridine, 1,1,3,3-tetramethoxypropane 등의 시약은 Sigma사로부터 구입하여 사용하였으며 기타시약은 분석용 고순도 제품이었다.

실험동물의 사육

유근피 추출물의 반응성 산소종 제거효과 확인을 위해서 일본 Air Logistics 사의 4주령 B6C3F1 수컷 마우스(20-22g)를 한국 바이오 제노믹스를 통해 구입하였다. 마우스를 구입하여 1주일간 안정시킨 후, 1군당 10마리씩 5군으로 나누어 실험하였다. 실험적 압 유발 가능성을 가진 화학물질 중의 하나인 N,N-Diethylnitrosamine(DEN)을 체중 kg당 17.5mg 비율로 생리식염수에 녹여 1주일 2회씩 8주간 주사하였다(19). 그리고 주사 후 12주를 더 사육(총 20주)하여 암의 발병을 확인한 후(암유발군, 2군) 경추 탈구법으로 도살하고 신장을 적출하여 histopathologic analysis를 시행하였다. 유근피 암치료군(4군)에게 제 2군과 같은 방법으로 DEN을 8주간 주사하여 암을 발병시킨 후 9주째부터 물대신 500ppm 농도의 유근피 추출물을 12주 더 복용시켜 모두 20주를 사육하였다. 70% ethanol로 추출한 유근피 추출물을 500ppm의 농도로 물에 희석시켜 처음부터 물대신 복용시킨 유근피 암예방군(5군)을 2군과 같은 방법으로 DEN을 8주간 주사하여 암을 발병하고 유근피 추출물을 12주를 더 복용시켜 모두 20주를 사육하였다. 물만 20주간 먹여 사육시킨 군(대조군, 1군)과, 유근피 추출물을 20주간 먹인 군(유근피 복용군, 3군)을 기타군과 비교하였으며, 이때 특별한 식이는 하지 않았다.

신장조직용액의 조제

실험동물로부터 채취한 신장에 각 조직 무게의 약 5배 용량의 0.1mM EDTA를 함유한 50mM 인산염 완충액(pH 7.8)을 가한 후 조직 파쇄기(Ultra-Truax T25)로 균질화 하였다. 균질액을 냉동원심 분리기로 4°C에서 600×g로 10분간 원심분리하여 세포핵 분획을 제거한 후 초음파 파쇄기(Sonics and Materials VC-375)로 50W에서 5분간 처리하여 미토콘드리아를 파괴하였다. 1,000×g에서 원심분리한 후 상등액을 -70°C에 분획하여 보관하였으며, 각 분획을 해동하여 실험에 사용하였다.

Xanthine oxidase의 활성도 측정

Xanthine에서 urate가 생성될 때 tetrazolium염의 환원으로 540nm에서 흡광도가 증가되는 원리를 이용하여 xanthine oxidase의 활성도를 측정하였다(24). 0.1M 인산염 완충액(pH 7.8)에 10mM EDTA, 1% gelatine, 0.2mM phenazine methasulfate, 4mM nitroblue tetrazolium을 혼합한 후 0.2mL 효소액을 넣어 최종부피를 2.0mL로 만들었다. 25°C에서 5분간 방치한 후 xanthine 0.5mL와 인산염 완충액을 0.5mL 혼합하고 540nm에서 10분간 흡광도의 증가를 측정하였다. 이때 1분 동안 nitroblue tetrazolium 1μM을 환원시키는 효소의 양을 1 unit으로 표시하였다.

Superoxide dismutase의 활성도 측정

Superoxide dismutase(SOD)의 활성도를 McCord와 Fridovich(20)의 방법을 이용하여 측정하였다. 세포질에 존재하는 Cu, Zn-SOD의 활성도를 측정하기 위하여 50mM 인산염 완충액(pH 7.8, 0.1mM EDTA) 2.1mL에 xanthine(0.5mM) 0.3mL와 KCN(0.05mM) 0.1mL를 혼합하고, 1% sodium deoxycholate 0.1mL를 첨가하였다. 이 혼합액을 25°C 물중탕에서 온도 평형시킨 다음 0.1mL의 xanthine oxidase, cytochrome C(0.1mM) 0.3mL 그리고 신장파쇄액 효소시료를 넣어 파장 550nm에서 흡광도의 증가 속도를 3분간 측정하였다. 이때 시료를 넣지 않은 경우 흡광도의 1분당 변화가 약 0.020이 되도록 xanthine oxidase의 양을 조절하였다. 미토콘드리아에 존재하는 Mn-SOD의 활성은 상기 혼합액에 KCN(2mM) 0.1mL를 더 가하여 측정하였으며 Cu,Zn-SOD와 같은 방법을 사용하였다(21). 위와 같은 반응 조건에서 cytochrome C의 환원속도를 50% 억제하는 효소의 양을 1 unit으로 하였다.

Catalase의 활성도 측정

Catalase의 활성도는 Aebi(22)의 방법으로 측정하였다. 즉, 인산염 완충액 (50mM, pH 7.0) 2.0mL, 효소액 20μL와 기질인 H₂O₂ 용액(10mM) 1.0mL를 넣고 240nm에서 흡광도의 변화를 2분간 측정하였다. 1분 동안에 1μM의 H₂O₂를 분해하는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

Glutathione peroxidase 활성도 측정

Glutathione peroxidase에 의해 생성된 산화 glutathione(GSSG)을 glutathione reductase가 NADPH를 이용하여 GSH로 환원시킬 때, NADPH가 산화되는 속도를 측정하여 효소 활성도로 결정하였다(23). 0.1M sodium phosphate buffer(pH 7.0, 0.1mM EDTA) 0.5mL, glutathione reductase 0.1mL(0.24 unit), 10mM GSH 0.1mL에 시료액 0.1mL를 가해 37°C에서 10분간 방치시켰다. 이 혼합액에 1.5mM NADPH 용액 0.1mL를 넣고 3분 뒤에 12mM cumene hydroperoxide 0.1mL를 가해 340nm에서 5분간 흡광도의

감소를 측정하였다. 1분 동안 1 μM의 NADPH를 산화시키는 효소의 양을 1 unit로 하였다.

TBARS(thiobarbituric acid reactive substance) 생성에 미치는 영향

Malondialdehyde로 대표되는 thiobarbituric acid와 반응하는 물질 TBARS(thiobarbituric acid reactive substance)을 정량하여 lipid peroxidation의 정도는 측정하였다(25). 즉, 1.15% KCl 용액으로 균질화시킨 신장파쇄액 0.2 mL에 0.2 mL의 sodium dodecyl sulfate (8.1% SDS), 1.5 mL의 20% acetic acid(pH 3.5), 1.5 mL의 thiobarbituric acid 수용액을 가한 후 0.6 mL의 증류수를 더 가하고 최종 부피를 4 mL로 하여 95°C로 60분간 가열하였다. 가열된 시료의 시험관을 흐르는 물에 냉각시킨 후 1 mL의 차가운 증류수와 5 mL의 *n*-butanol-pyridine(15:1)를 첨가하고 1분간 격렬하게 혼합하고 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리하였다. 상층액을 취하여 파장 532 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준물질로는 1,1,3,3-tetramethoxypropane을 사용하였다.

통계분석

대조군과 실험군 혹은 실험군 사이의 통계적인 유의성 검증은 Student's t-test로 양측 검증을 시행하여 *p* 값이 0.05 이하일 때와 0.01 이하일 때를 통계적으로 유의한 것으로 결정하였다.

결과 및 고찰

실험동물 사육

사육된 마우스의 평균몸무게는 1, 2, 3, 4, 5군에서 각각 31.95 ± 0.78 g, 25.35 ± 1.55 g, 32.19 ± 1.63 g, 25.34 ± 1.34 g 그리고 28.33 ± 2.76 g이었다. 암유발을 확인하기 위하여 기간별로 마우스를 희생시킨 후 간조직을 관찰하였으며, 각 군별 clear cell nodule, eosinophilic nodule과 basophilic nodule 생성 비교는 Table 1과 같다. 1군과 3군에서는 기술한 결절들이 관찰되지 않았으며, 2군, 4군, 5군에서 암유발을 확인할 수 있었다. 한편, 본 연구에서는 Kaneko 등(26)이 동물 실험모델로 각종 장기에서 반응성 산소종 생성에 미치는 요인을 연구한 결과를 참조하여 마우스의 신장조직에서 반응성 산소종 생성에 관련된 유근피추출물의 효과를 관찰하였다. Kaneko 등(26)은 각종 장기 중 알루미늄이 신장에서 lipid peroxidation을 변화시켰으며 시간에 따른 변화의 정도가 다

Table 1. Histopathologic analysis of *N,N*-diethylnitrosamine (DEN) induced hepatocarcinogenesis of the B6C3F1 mouse liver

Groups	Histopathologic findings		
	Clear cell nodule	Eosinophilic nodule	Basophilic nodule
Control group without DEN (Group 1) and <i>U. macrocarpa</i> Hance feeding diet group (Group 3)	-	-	-
DEN treatment group (Group 2)	++	+++	+
<i>U. macrocarpa</i> Hance feeding diet group after DEN treatment (Group 4)	++	+++	-
DEN treatment with <i>U. macrocarpa</i> Hance feeding diet group (Group 5)	++	+	-

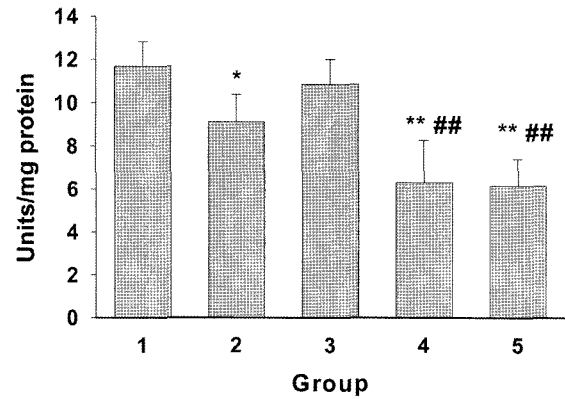


Fig. 1. Activity of xanthine oxidase in the B6C3F1 mouse kidney. Group 1: Feeding water to mice, Group 2: Feeding water while injecting DEN twice a week for 8 weeks, Group 3: Feeding the root bark *U. davidiana* planchon 70% ethanol extract, Group 4: Feeding water while injection DEN twice a week for 8 weeks then feed the root bark *U. davidiana* planchon 70% ethanol extract, Group 5: Feeding the root bark *U. davidiana* planchon 70% ethanol extract while injection DEN twice a week for 8 weeks then feed the root bark *U. davidiana* planchon 70% ethanol extract. *Significantly different from the Group 1 vs experimental Group (*p* < 0.05). **Significantly different from the Group 1 vs experimental Group (*p* < 0.01). ##Significantly different from the Group 3 vs Group 4 or Group 5 (*p* < 0.01).

름을 보고하였다. 이 같은 결과는 신장 조직에서 반응성 산소종의 생성과 제거에 관련된 일련의 변화가 있음을 의미한다.

유근피 추출물이 B6C3F1 마우스 신장조직의 xanthine oxidase 활성도에 미치는 영향

Xanthine oxidase는 superoxide radical 생성의 중요 요소이며 superoxide radical이나 과산화수소 등의 활성 산소종들의 세포 파괴 능력에 의해 항암 활성을 조절하는 기능을 가진다. 본 연구에서 마우스 신장조직의 xanthine oxidase의 활성 정도를 관찰한 결과는 Fig. 1과 같다. 암유발군(9.11 ± 1.15 units/mg protein)에서는 대조군(11.69 ± 1.14 units/mg protein)에 비해 약간 감소된 효소의 활성이 검출되었으며, 유근피 복용군(3군)에서는 대조군과 차이가 매우 적었다(10.86 ± 1.15 units/mg protein). 그러나 암치료군인 4군(5.49 ± 1.75 units/mg protein) 및 암예방군, 5군 (5.26 ± 1.47 units/mg protein)에서 대조군에 비해 유의적(*p* < 0.01)으로 감소된 효소활성을 확인하였다.

Kuppusamy와 Zweir(27)의 연구에 의하면 xanthine oxidase는 superoxide radical의 생성 뿐 아니라 hydroxyl radical을 직접 생성할 수 있다. 이때 생성된 반응성이 높은 hydroxyl radical은 superoxide radical과 함께 조직 손상의 원인이 된다. 또한 superoxide radical이 많을 때는 세포에 독성을 나타내지만, 적게 존재할 때는 신호전달경로 활성 redox-sensitive transcription factor의 활성 및 미토콘드리아 효소의 활성을 조절하는 생리적 역할을 수행하고 있다(28). 산소 분압의 증가나 감소는 xanthine oxidase의 활성도를 조절하며(29), 이는 DEN으로 인한 산소 분압의 증가가 xanthine oxidase의 활성 감소로 이어진 것으로 판단된다.

본 연구에서 유근피 추출물을 복용시킨 쥐의 경우 암유발군(2군)에서 xanthine oxidase의 활성이 감소되었으며, 암을 유발군인 3군보다 암을 유발시키면서 유근피 추출물을 복용시킨 4군과 5군에서 기타 군에 비하여 효소활성이 매우 낮음을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 유근피 추출물의 복용이 쥐의 신장에서 xanthine

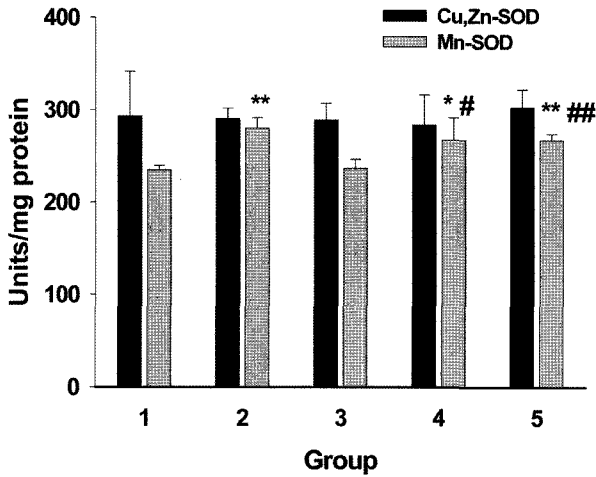


Fig. 2. Activity of superoxide dismutase in the B6C3F1 mouse kidney. Kidney was obtained and homogenized, and its activity of superoxide dismutase was measured. Data are means \pm SD (n = 9). Group 1: Feeding water to mice, Group 2: Feeding water while injecting DEN twice a week for 8 weeks, Group 3: Feeding the root bark *U. davidiana* planchon 70% ethanol extract, Group 4: Feeding water while injection DEN twice a week for 8 weeks then feed the root bark *U. davidiana* planchon 70% ethanol extract, Group 5: Feeding the root bark *U. davidiana* planchon 70% ethanol extract while injection DEN twice a week for 8 weeks then feed the root bark *U. davidiana* planchon 70% ethanol extract .D. (n = 9). *Significantly different from the Group 1 vs experimental Group ($p < 0.05$). **Significantly different from the Group 1 vs experimental Group ($p < 0.01$). #Significantly different from the Group 3 vs Group 4 or 5 ($p < 0.05$). ##Significantly different from the Group 3 vs Group 4 or Group 5 ($p < 0.01$).

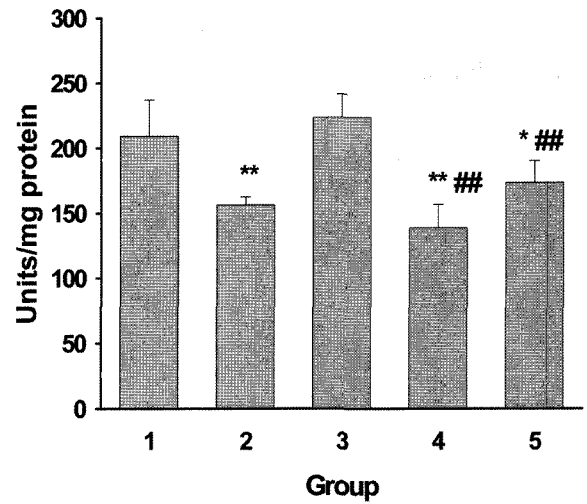


Fig. 3. Activity of catalase in the B6C3F1 mouse kidney. Kidney was obtained and homogenized, and its activity of catalase was measured. Data are means \pm S.D. (n = 9). Group 1: Feeding water to mice, Group 2: Feeding water while injecting DEN twice a week for 8 weeks, Group 3: Feeding the root bark *U. davidiana* planchon 70% ethanol extract, Group 4: Feeding water while injection DEN twice a week for 8 weeks then feed the root bark *U. davidiana* planchon 70% ethanol extract, Group 5: Feeding the root bark *U. davidiana* planchon 70% ethanol extract while injection DEN twice a week for 8 weeks then feed the root bark *U. davidiana* planchon 70% ethanol extract. *Significantly different from the Group 1 vs experimental Group ($p < 0.05$). **Significantly different from the Group 1 vs experimental Group ($p < 0.01$). ##Significantly different from the Group 3 vs Group 4 or Group 5 ($p < 0.01$).

oxidase의 효소활성에 영향을 미쳐 superoxide radical의 발생을 억제시킬 수 있음을 나타낸다(27).

Superoxide dismutase 활성도에 미치는 유근피 추출물의 효과

Superoxide radical을 제거하는 효소인 superoxide dismutase의 활성을 B6C3F1 마우스의 신장조직에서 관찰한 결과는 Fig. 2와 같다. 세포질에 존재하는 Cu,Zn-SOD의 활성도는 유근피 복용군인 3군(288.75 \pm 18.08 units/mg protein)과 대조군인 1군(293.05 \pm 48.4784 units/mg protein)에서 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, 암유발군인 2군(290.10 \pm 11.43 units/mg protein), 유근피 암치료군(4군, 283.33 \pm 32.79 units/mg protein), 유근피 암예방군(5군, 302.74 \pm 19.37 units/mg protein)에서도 유의적인 차이는 발견할 수 없었다. 미토콘드리아에 존재하는 Mn-SOD의 활성도는 대조군(234.71 \pm 5.07 units/mg protein)과 유근피 복용군(3군, 236.74 \pm 9.69 units/mg protein)에서 차이가 없었다. 그러나 암유발군(2군, 280.15 \pm 11.27 units/mg protein)에서는 대조군보다 유의적($p < 0.01$)으로 효소활성이 증가하였고, 4군(267.38 \pm 24.31 units/mg protein)과 5군(267.16 \pm 6.80 units/mg protein)에서도 증가하는 경향을 보였다. 유근피 암치료군(4군)과 유근피 암예방군(5군)에서는 암유발군인 2군보다 효소활성증가폭이 적은 것으로 나타났다. 암환자의 SOD 활성에 관하여 류마티스 관절염 환자의 염증부위에서 SOD 활성이 증가된다는 보고와(30) oral cancer 환자에서 SOD 활성이 감소하는 경향이 있다는 상충된 보고가 있다(31). 특히, hepatocellular carcinoma에 걸린 사람의 간조직에서는 정상 간조직에서보다 낮은 SOD 활성이 보고 되었으며, 이는 간암종의 세포 산화 방지 시스템이 심각하게 손상되면서 발생하는 것으로 추정했다(32). 한

편, carcinogenesis 촉진 단계에서는 Mn-SOD가 매우 감소하는 것으로 나타났다(33). Oberley와 Oberley(34)의 연구에 의하면 대부분의 암조직에서 antioxidant 효소의 활성은 감소하고 있으나 몇몇의 암 중에서는 Mn-SOD만이 활성이 높았다고 한다(34).

2군(암유발군)에서 Mn-SOD의 유의적 증가($p < 0.01$)는 DEN에 의하여 산소 독성이 증가하였으며 이를 제거하기 위하여 효소의 활성이 증가된 것으로 설명될 수 있다. 4군과 5군이 암유발군인 2군보다 효소의 활성이 적은 것은 유근피 추출물의 장기 복용이 DEN의 산소독성을 감소시켜 SOD의 필요성을 감소시킨 결과라고 추측 할 수 있다.

Catalase 활성도에 미치는 유근피 추출물의 영향

세포와 조직의 hydrogen peroxide의 제거에 중요한 역할을 하는 catalase의 활성도를 B6C3F1 마우스의 신장조직에서 조사하였다(Fig. 3). 그림에서 대조군(1군)은 209.23 \pm 27.69(units/mg protein)의 catalase 효소활성을 나타내었으며, 유근피 복용군(3군)은 223.67 \pm 17.79(units/mg protein)의 약간 높은 효소활성을 보였다. 그리고 암유발군인 2군 및 4군 5군의 효소활성은 각각 156.29 \pm 6.19, 138.84 \pm 17.92 그리고 173.48 \pm 16.74(units/mg protein)으로 분석되었다. 암유발군인 2군과 4군은 정상군보다 낮은 효소활성을 나타내었으나, 암유발과 동시에 유근피 추출물을 투여한 실험군(5군)은 암유발군보다 catalase 활성도가 높은 것으로 나타났다. Catalase는 H₂O₂가 H₂O로 변환되는 과정에서 중요한 역할을 하고 있다. 발암물질인 20-methylcholanthrene(MC)을 투여하면 catalase 활성도는 유의적으로 증가하였으나, MC와 함께 quercetin을 투여하면 정상으로 돌아온다는 연구와(35) 발암물질인 p-dimethylaminoazobenzene(DAB)을 장기 투여하여도 catalase 활성도는 증가하였

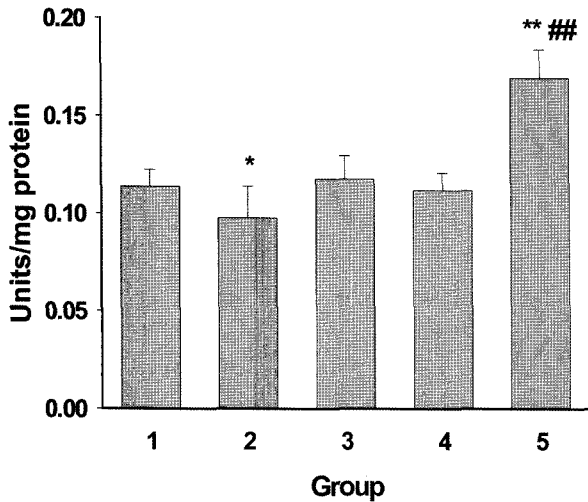


Fig. 4. Activity of glutathione peroxidase in the B6C3F1 mouse kidney. Kidney was obtained and homogenized, and its activity of glutathione peroxidase was measured. Data are means \pm S.D. (n = 9). Group 1: Feeding water to mice, Group 2: Feeding water while injecting DEN twice a week for 8 weeks, Group 3: Feeding the root bark *U. davidiana* planchon 70% ethanol extract, Group 4: Feeding water while injection DEN twice a week for 8 weeks then feed the root bark *U. davidiana* planchon 70% ethanol extract, Group 5: Feeding the root bark *U. davidiana* planchon 70% ethanol extract while injection DEN twice a week for 8 weeks then feed the root bark *U. davidiana* planchon 70% ethanol extract. *Significantly different from the Group 1 vs experimental Group ($p < 0.05$). **Significantly different from the Group 1 vs experimental Group ($p < 0.01$). ##Significantly different from the Group 3 vs Group 4 or Group 5 ($p < 0.01$).

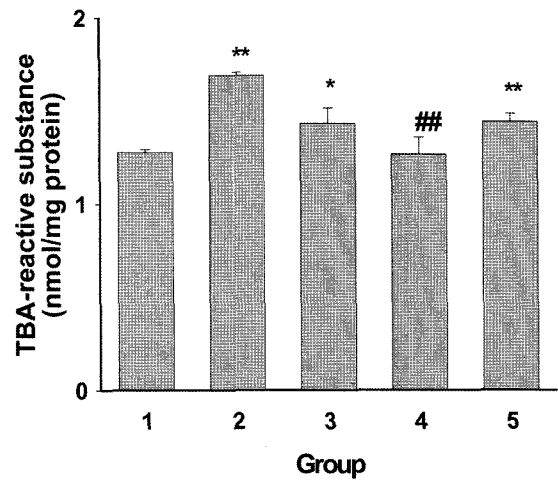


Fig. 5. The level of lipid peroxidation in the B6C3F1 mouse kidney. Kidney was obtained and homogenized, and its activity of lipid peroxidation was measured. Data are means \pm S.D. (n = 9). Group 1: Feeding water to mice, Group 2: Feeding water while injecting DEN twice a week for 8 weeks, Group 3: Feeding the root bark *U. davidiana* planchon 70% ethanol extract, Group 4: Feeding water while injection DEN twice a week for 8 weeks then feed the root bark *U. davidiana* planchon 70% ethanol extract, Group 5: Feeding the root bark *U. davidiana* planchon 70% ethanol extract while injection DEN twice a week for 8 weeks then feed the root bark *U. davidiana* planchon 70% ethanol extract. *Significantly different from the Group 1 vs experimental Group ($p < 0.05$). **Significantly different from the Group 1 vs experimental Group ($p < 0.01$). ##Significantly different from the Group 3 vs Group 4 or Group 5 ($p < 0.01$).

다는 보고가 있다(36). 그러나 Jayashree 등(37)은 마우스에 10,000 개의 lymphoma 세포를 주사한 결과 간장과 신장에서 catalase의 활성이 유의적($p < 0.01$)으로 감소하였다고 보고하였으며, 대부분의 암종에서 catalase 활성이 감소한다는 보고도 발표되었다(34). 본 연구에서 DEN에 의한 암 유발시 catalase의 활성도가 감소되었다. 그리고 8주 동안 발암물질 처리 후에 유근피를 처리한 4군에서 유근피 처리의 효과는 매우 미약하였으나, 발암물질 처리와 동시에 유근피 추출물을 식이시킨 5군의 경우 catalase 효소 활성이 유의적으로 증가한 것으로 나타났다.

유근피 추출물이 glutathione peroxidase 활성도에 미치는 영향

Glutathione peroxidase는 glutathione과 NADPH를 이용하여 hydrogen peroxide를 제거하는 효소로서 항산화에 중요한 역할을 한다(38). 본 연구에서 glutathione peroxidase의 활성도를 B6C3F1 마우스의 신장조직에서 관찰한 결과는 Fig. 4와 같다. 그림에서 대조군(1군)의 효소활성(0.1137 \pm 0.01 units/mg protein)은 유근피 복용군(3군)의 결과(0.1176 \pm 0.01 units/mg protein)와 거의 차이가 없었다. 암유발군(2군, 0.0975 \pm 0.01 units/mg protein)에서는 효소활성이 감소한 것으로 나타났으며, 유근피 암치료군(4군, 0.1117 \pm 0.01 units/mg protein)의 효소 활성은 변하지 않았다. 한편, DEN 처리와 동시에 유근피 추출물을 처리한 5군(0.1693 \pm 0.01 units/mg protein)에서는 1군 및 3군에 비해 효소활성이 매우 증가하는 것으로($p < 0.01$) 나타났다.

Lu 등(39)은 유방암조직에서 glutathione peroxidase 활성도가 증가하였고, 구강암 환자에서 glutathione과 glutathione peroxidase의 활성도도 증가한다고 보고하였다. 그러나 Mitchell 등(40)은 Moto-

neuron 질환(MND)환자에서 glutathione peroxidase 활성이 시간이 경과함에 따라 감소하는 경향이 있다고 발표 하였으며, 종양성 질환에 감염된 실험동물 적혈구에서 glutathione peroxidase 및 glutathione reductase의 활성과 glutathione 함량도 감소한다고 보고 하였다(41). 대부분의 암에서 glutathione peroxidase를 비롯한 대부분의 항산화효소 활성이 감소된다(34). 본 연구에서도 다른 연구자들과 같이 암유발군(2군)에서 glutathione peroxidase의 활성이 낮은 것으로 나타났다. 특히 5군에서의 효소활성이 유의적($p < 0.01$)으로 증가한 것은 유근피 추출물의 암예방을 억제 가능성을 나타낸다.

TBARS 생성에 미치는 유근피 추출물의 효과

Lipid peroxidation은 지방의 oxidative modification에 대한 생화학적 지표(cascade)중 하나이다. 세포막의 lipid peroxidation의 생성에는 α,β -unsaturated aldehydes을 포함하는 여러 카보닐 화합물들이 관여된다. 즉, 4-hydroxy-2,3-trans-alkenal group들이 가장 중요한 역할을 하며, 정량적으로는 4-hydroxynonenal(HNE)가 주 구성성분이다(42).

B6C3F1 마우스 신장 조직의 지질과산화 정도를 thiobarbituric acid 방법을 사용하여 측정하였다(Fig. 5). 그림에서 지질의 과산화도는 대조군(1군, 1.28 \pm 0.02 nmol/mg protein)에 비해 암유발군에서(2군, 1.69 \pm 0.02 nmol/mg protein) 매우 증가하는 것으로 나타났다. 유근피 복용군(3군, 1.43 \pm 0.08 nmol/mg protein)에서도 유의적으로 증가($p < 0.05$)하는 경향을 나타내었으나 유근피 암치료군(4군)과 유근피 암예방군(5군)의 경우 암유발군인 2군보다 지질의 산화도가 낮은 것으로 나타났다. 유근피 추출물의 섭취는 mansonone(43) 등 여러 lipid peroxidation을 증가시키는 물질을 섭

취하는 결과를 초래하여 lipid peroxidation을 증가시키는 것으로 나타났으나, 암이 발생하는 경우는 유근피 추출물의 섭취가 lipid peroxidation의 정도를 감소시키는 것으로 보여지고 있다. DEN(200 mg/kg body weight)을 투여하였을 때 효소적 lipid peroxidation은 증가하는 경향을 보였다는 보고(44)도 본 연구의 결과와 일치하였다. 한편, 구강암 환자의 lipid peroxidation량은 TBARS법을 이용한 측정에서 유의적으로 감소하는 경향을 보였으나(31), N-nitrosobis(2-oxopropyl) anine(BOP)을 투여하여 Syrian hamsters에 체장암을 유발시킨 경우는 lipid peroxidation이 낮은 결과를 나타내었다(45).

Mittal 등(46)은 누드 마우스인 SKH-1의 ultraviolet(UV)로 유발된 피부암 조직에서 포도씨 추출물의 효과를 관찰하였다. UV에 의해서는 암조직에서 lipid peroxidation이 증가하였으나 포도씨에서 추출한 proanthocyanidins를 처리시 lipid peroxidation이 유의적으로 감소한다고 보고하였다. 한편, Kaneko 등(26)은 마우스가 알루미늄을 음용시 동물 실험모델로 각종 장기에서 lipid peroxidation을 변화를 관찰한 결과 신장에서 30일 음용시 유의적인 차이는 없었지만 감소하는 결과를 발표하였다. 이상의 연구결과들은 본 논문의 결과와 유사한 것으로 판단되며, 신장이나 피부조직등 여러 장기에서 동일한 효과를 예측할 수 있다.

감사의 글

이 논문은 2006년도 중앙대학교 일반연구비 지원에 의한 것임.

요 약

유근피 추출물을 20주간 장기 복용한 B6C3F1 마우스의 신장에서 노화 및 생체 독성의 중요한 지표로 알려진 반응성 산소종 발생 및 제거에 관여하는 효소들의 활성 변화를 관찰하였다. 실험군을 1군(대조군), 2군(암유발군-DEN을 주사하여 암유발), 3군(유근피 복용군), 4군(유근피 암치료군-DEN을 주사한 후 유근피 복용), 5군(유근피 암예방군-유근피를 먹이면서 DEN 주사) 등 5개군으로 나누었다. 암을 유발시킨 군에 유근피 추출물을 투여시 4군 및 5군에서 암유발군에 비해 유의적($p < 0.01$)으로 감소된 xanthine oxidase 효소활성을 확인하였다. Cu,Zn-SOD의 활성도는 정상군과 처리군에서 큰 차이는 없으나 Mn-SOD의 활성도는 정상군보다 암유발군에서 유의적으로 증가하는 경향을 보였다. 암유발군(2군)과 유근피 암치료군(4군)은 대조군 보다 catalase 효소가 낮았으며, 유근피 암예방군(5군)에서는 암유발군(2군)보다 catalase 활성도가 높은 것으로 나타났다. 암유발군(2군)에서는 glutathione peroxidase의 활성이 감소하는 것으로 나타났으며, 발암물질 처리와 동시에 유근피 추출물을 처리한 유근피 암예방군(5군)에서는 기타 실험군에 비해 효소활성이 매우 증가하는 것으로 ($p < 0.01$) 나타났다. 대조군(1군)에 비해 암유발군(2군)에서 지질의 과산화도는 매우 증가하는 것으로 나타났으며, 유근피 복용군(3군)에서도 유의적으로 증가($p < 0.05$)하는 경향을 나타내었다. 그러나 암발생 후 유근피 추출물 식이군인 유근피 암치료군(4군)과 암예방군과 동시에 유근피 추출물을 식이한 유근피 암예방군(5군)의 경우 암유발군(2군)보다 지질의 산화도가 낮은 것으로 나타났다.

문 헌

1. Son BH, Park JH, Zee OP. Catechin glycoside from *Ulmus davidiana*. Arch. Pharm. 21: 217-222 (1989)

- Hong ND, Rho YS, Kim NJ, Kim JS. A study on efficacy of Ulmi cortex. Korean J. Pharmacogn. 21: 217-222 (1990)
- Lee MK, Sung SH, Lee HS, Cho JH, Kim YC. Lignan and neolignan glycosides from *Ulmus davidiana* var. *japonica*. Arch. Pharm. Res. 24: 198-201 (2001)
- Han KJ, Lee KS, Kong KH, Cho SH. Separation and purification of substance having matrix metalloproteinase-9 inhibition effect in *Ulmus davidiana* Plancn. var. *japonica* Nakai. Anal. Sci. Technol. 16: 179-184 (2003)
- Kim JP, Kim WG, Koshino H, Jung J, Yoo ID. Sesquiterpene o-naphthoquinones from the root bark of *Ulmus davidiana*. Phytochemistry 43: 425-430 (1996b)
- Lee MK, Kim YC. Five novel neuroprotective triterpene esters of *Ulmus davidiana* var. *japonica*. J. Nat. Prod. 64: 328-331 (2001)
- Jun CD, Pae HO, Kim YC, Jeong SJ, Yoo JC, Lee EJ, Choi BM, Chae SW, Park RK, Chung HT. Inhibition of nitric oxide synthesis by butanol fraction of the methanol extract of *Ulmus davidiana* in murine macrophages. J. Ethnopharmacol. 62: 129-135 (1998)
- Son YO, Lee KY, Choi KC, Chung Y, Kim JG, Jeon YM, Jang YS, Lee JC. Inhibitory effects of glycoprotein-120(G-120) from *Ulmus davidiana* Nakai on cell growth and activation of matrix metalloproteinases. Mol. Cells 18: 163-170 (2004)
- Lee SJ, Heo KS, Oh PS, Lim K, Lim KT. Glycoprotein isolated from *Ulmus davidiana* Nakai inhibits TPA-induced apoptosis through nuclear factor-kappa B in NIH/3T3 cells. Toxicol. Lett. 146: 159-174 (2004)
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Free Radicals in Biology and Medicine. 3rd ed. Oxford University Press, Oxford, UK. pp. 246-350 (1999)
- Mates JM, Perez-Gomez C, Nunez de, CI. Antioxidant enzymes and human diseases. Clin. Biochem. 32: 595-603 (1999)
- Gutteridge JM, Halliwell B. Free radicals and antioxidants in the year 2000. A historical look to the future. Ann. NY. Acad. Sci. 899: 136-147 (2000)
- Simon RH, Scoggin CH, Patterson D. Hydrogen peroxide causes the fatal injury to human fibroblasts exposed to oxygen radicals. J. Biol. Chem. 256: 7181-7186 (1981)
- Moody CS, Hassan HM. Mutagenicity of oxygen free radicals. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 2855-2859 (1982)
- Shingu M, Oribe M, Todoroki T, Tatsukawa K, Tomo-oka K, Yasuda M, Nobunaga M. Serum factors from patients with systemic lupus erythematosus enhancing superoxide generation by normal neutrophils. J. Invest. Dermatol. 81: 212-215 (1983)
- Fridovich I. Quantitative aspects of production of superoxide anion radical by milk xanthine oxidase. J. Biol. Chem. 245: 4053-4057 (1970)
- Goldstein IM, Cerqueira M, Lind S, Kaplan HB. Evidence that the superoxide-generating system of human leukocytes is associated with the cell surface. J. Clin. Invest. 59: 249-254 (1977)
- Fisher DB, Kaufman, S. Tetrahydrobiopterin oxidation without hydroxylation catalyzed by rat liver phenylalanine hydroxylase. J. Biol. Chem. 248: 4300-4305 (1973)
- Kolaja KL, Xu Y, Walborg EF Jr., Stevenson DE, Klaunig JE. Vitamin E modulation of dieldrin-induced hepatic focal lesion growth in mice. J. Toxicol. Environ. Health A. 53: 479-492 (1998)
- McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: Enzymatic function for erythrocyte protein (hematocuprein). J. Biol. Chem. 244: 6049-6055 (1969)
- Salin ML, Day ED Jr., Crapo JD. Isolation and characterization of manganese-containing superoxide dismutase from rat liver. Arch. Biochem. Biophys. 187: 223-228 (1978)
- Aebi H. Catalase pp. 673-684. In: Methods of Enzymatic Analysis, 2nd. Vol. 2, Bergmeyer HU (ed.), Academic Press, New York, USA (1974)
- Flohe L, Gunzler WA. Assays of glutathione peroxidase. Method Enzymol. 105: 114-121 (1984)
- Fried R, Fried LW. Xanthine oxidase (xanthine dehydrogenase). pp. 644-649. In: Methods of Enzymatic Analysis, 2nd Vol. 2, Bergmeyer HU (ed.), Academic Press, New York, USA (1974)
- Ohkawa H, Chishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxidation in

- animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.* 95: 351-358 (1979)
26. Kaneko N, Yasui H, Takada J, Suzuki K, Sakurai H. Orally administrated aluminum-maltolate complex enhances oxidative stress in the organs of mice. *J. Inorganic Biochem.* 98: 2022-2031(2004)
27. Kuppusamy P, Zweier JL. Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. Evidence for hydroxyl radical generation. *J. Biol. Chem.* 264: 9880-9884 (1989)
28. Nulton-Persson AC, Szweda LI. Modulation of mitochondrial function by hydrogen peroxide. *J. Biol. Chem.* 276: 23357-23361 (2001)
29. Terada LS, Guidot DM, Leff JA, Willingham IR, Hanley ME, Piermattei D, Repine JE. Hypoxia injures endothelial cells by increasing endogenous xanthine oxidase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 3362-3366 (1992)
30. Taysi S, Polat F, Gul M, Sari RA, Bakan E. Lipid peroxidation, some extracellular antioxidants, and antioxidant enzymes in serum of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatol. Int.* 21: 200-204 (2002)
31. Nagini S, Manoharan S, Ramachandran CR. Lipid peroxidation and antioxidants in oral squamous cell carcinoma. *Clin. Chim. Acta.* 273: 95-98 (1998)
32. Casaril M, Corso F, Bassi A, Capra F, Gabrielli GB, Stanzial AM, Nicoli N, Corrocher R. Decreased activity of scavenger enzymes in human hepatocellular carcinoma, but not in liver metastases. *Int. J. Clin. Lab. Res.* 24: 94-97 (1994)
33. Borrello S, De Leo ME, Galeotti T. Defective gene expression of Mn-SOD in cancer cells. *Mol. Aspects Med.* 14: 253-258 (1993)
34. Oberley TD, Oberley LW. Antioxidant enzyme levels in cancer. *Histol Histopathol.* 12: 525-535 (1997)
35. De S, Chakraborty J, Chakraborty RN, Das S. Chemopreventive activity of quercetin during carcinogenesis in cervix uteri in mice. *Phytother. Res.* 14: 347-351 (2000)
36. Caballero F, Gerez E, Oliveri L, Falcoff N, Batlle A, Vazquez E. On the promoting action of tamoxifen in a model of hepatocarcinogenesis induced by *p*-dimethylaminoazobenzene in CF1 mice. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 33: 681-690 (2001)
37. Jayashree G, Kurup Muraleedhara G, Sudaralal S. Antioxidant activity of *Centella asiatica* on lymphoma-bearing mice. *Fitoterapia* 74: 431-434 (2003)
38. Pereira B, Bechara EJ, Mendonca JR, Curi R. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in the lymphoid organs and skeletal muscles of rats treated with dexamethasone. *Cell Biochem. Funct.* 17: 15-19 (1999)
39. Lu YP, Lou YR, Yen P, Newmark HL, Mirochnitchenko OC, Inouye M. Enhanced skin carcinogenesis in transgenic mice with high expression of glutathione peroxidase or both glutathione peroxidase and superoxide dismutase. *Cancer Res.* 57: 1468-1474 (1997)
40. Mitchell JD, Gatt JA, Phillips TM, Houghton E, Rostron G, Wignall C. Cu/Zn superoxide dismutase free radicals and motoneuron disease. *Lancet* 342: 1051-1052 (1993)
41. Batko J, Warchol T, Karon H. The activities of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase in erythrocytes of rats with experimental neoplastic disease. *Acta Biochim. Pol.* 43: 403-405 (1996)
42. Esterbauer H. pp. 101-105. In: Free Radicals, Lipid Peroxidation and Cancer. McBrien DCH, Slater TF (eds). Academic press, New York, USA (1982)
43. Kim JP, Kim WG, Koshino H, Jung J, Yoo ID. Sesquiterpene o-naphthoquinones from the root bark of *Ulmus davidiana*. *Phytochemistry* 43: 425-430 (1996b)
44. Sarkar A, Bishayee A, Chatterjee M. Beta-carotene prevents lipid peroxidation and red blood cell membrane protein damage in experimental hepatocarcinogenesis. *Cancer Biochem. Biophys.* 15: 111-125 (1995)
45. Wenger FA, Kilian M, Mautsch I, Jacobi CA, Steiert A, Peter FJ, Guski H, Schimke I, Muller JM. Influence of octreotide on liver metastasis and hepatic lipid peroxidation in BOP-induced pancreatic cancer in Syrian hamsters. *Pancreas* 23: 266-272 (2001)
46. Mittal A, Elmets CA, Katiyar SK. Dietary feeding of proanthocyanidins from grape seeds prevents photocarcinogenesis in SKH-1 hairless mice: relationship to decreased fat and lipid peroxidation. *Carcinogenesis* 24: 1379-1388 (2003)