

머위(*Petasites japonicus* Maxim) 첨가 식이가 마우스 혈장 지질 수준 및 항산화 지표에 미치는 영향

오상희 · 양윤형 · 권오윤 · 김미리[†]

충남대학교 식품영양학과

Effects of Diet with Added Butterbur (*Petasites japonicus* Maxim) on the Plasma Lipid Profiles and Antioxidant Index of Mice

Sang-Hee Oh, Yun-Hyung Yang, Oh-Yoon Kwon and Mee Ree Kim[†]

Dept. of Food and Nutrition, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Abstract

We evaluated the effects of butterbur (*Petasites japonicus* Maxim) addition to the diet on lipid profiles and antioxidant biomarkers such as total glutathione, TBARS value, carbonyl value, GPx, GR, SOD and paraoxonase activity in the plasma or liver of mice. The distribution of body fat deposition, total cholesterol (TC) contents, and atherogenic index in the plasma were significantly decreased in the butterbur group. The levels of GSH and the activity of GR and SOD were significantly higher in the liver of the butterbur group than in that of the control group. Lipid oxidation of the liver and kidney and protein oxidation of the liver and heart were decreased in the butterbur group. Additionally, the DNA damage, as determined using the comet assay (single cell gel assay) with alkaline electrophoresis and as quantified by measuring the tail length (TL), was decreased in the butterbur group. The results of the present study showed that a diet with added butterbur exerts degenerative disease-protective effects on oxidative DNA damage and lipid peroxidation.

Key words : Butterbur, mice, lipid peroxidation, antioxidant, comet assay.

서 론

활성 산소는 인체에 해가 되는 superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide(H_2O_2), singlet oxygen(1O_2)와 같은 산소 화합물을 총칭하는 것으로 체내에서 일상적인 대사 과정, 즉 전자 전달계, peroxysome의 지방산 대사 과정, 포식세포(phagocytic cell) 등에서 생성된다(Bengendi *et al* 1999). 식세포나 대식세포 및 호중구 등은 자체적으로 활성 산소를 만들어서 외부 세균의 침입에 방어하기도 하지만 체내 활성 산소의 과잉은 세포 구성 성분인 지질, 단백질, 핵산, 당, DNA 등에 산화적 손상을 일으켜 세포의 정상적인 대사를 저해하기도 하며 이로 인하여 암, 신경계 질환, 동맥경화, 소화기계 질환, 자기 면역 질환 등의 각종 질병과 노화를 일으키는 원인이 된다(Proctor PH 1992). 이러한 활성 산소에 대한 체내 방어 기구로는 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPx) 등의 효소 작용과 저분자 항산화

물질이나 단백질 등이 있다(Nakayama *et al* 1992). 최근 전통적으로 식용 및 약용으로 이용되어온 쑥, 참취, 곰취와 같은 우리나라 고유의 자생 식물이 식이 섬유와 flavonoids를 비롯한 polyphenol이 rhamnose, glucose, rutinose 등의 당과 결합한 배당체 형태로 다량 함유되어 있어 항산화, 중금속 제독 및 지방 대사에 효과적임이 밝혀지고 있다(Park & Kim 1999, Halliwell *et al* 1995).

머위(*Petasites japonicum* Maxim)는 중국, 일본 및 우리나라의 제주도, 울릉도, 남부 지방과 중부 지방의 산야지 특히 햇볕이 잘 드는 산비탈의 숲이나 계곡 주변의 습지에서 자생하는 국화과(Compositae)에 속하는 다년생 초본 식물로 화경과 잎자루는 식용으로 사용하는데 특유한 향기와 쓴맛이 있으며, 한방에서는 꽃봉오리를 관동화라고 하여 한약재로 사용한다(Soka T 1985). 예로부터 어린 잎을 채취하여 쌈과 생채로 이용하거나 엽병은 나물로 이용하고 탕의 재료로 이용한다(Choi OB 2002). 유럽에서는 *Petasites* 종의 뿌리 추출물이 편두통, 위궤양 및 천식 예방을 위해 사용되어왔다(Debrenner & Meier 1998, Brattstrom A 2003). 특히 Pe-

[†] Corresponding author : Mee Ree Kim, Tel : +82-42-821-6837, Fax : +82-42-821-8887, E-mail : mrkim@cnu.ac.kr

tasites formosanus 추출물은 혈압 강하 효과가 있는 S-petasin이 포함되어 있다(Wang *et al* 2001). 그러나 *Petasites* 종 뿌리의 ethyl acetate 추출물에는 pyrrolizidine alkaloids의 함량이 높아 독성이 있다(Hirono *et al* 1997). 반면 *Petasites* 종의 잎에는 pyrrolizidine의 함량이 낮고(Debrenner & Meier 1998) petasinophenol(Iriye *et al* 1992), flavonoid glycosides(Matsuura *et al* 2002, Mizushina *et al* 2003), phenylpropenoyl sulfonic acid(Lin *et al* 2004), fukinolic acid(Hasa & Tazaki 2004)와 같은 매우 다양한 항산화 물질이 함유되어 있다. 그러나 현재 까지 보고된 머위에 대한 약리학적 연구는 *in vitro*에서 RBL-2H3세포로부터 hexosaminidase의 방출 억제 효과를 측정하여 머위의 methanol 추출물이 quercetin 수준의 항알레르기 효과를 갖는다고 보고한 연구(Choi OB 2002)와 머위를 먹인 rat과 mouse의 간을 비롯한 조직의 병리조직학적 관찰을 통해 중독 및 발암성에 대한 연구(Jee & Lee 1996) 등이 있을 뿐이다.

본 연구는 국내에서 자생하는 머위를 식이에 첨가하여 mice에 섭취시켰을 때 간을 비롯한 장기 조직과 혈장의 생화학 지표를 관찰하여 머위의 항산화 효과를 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물의 사육 및 식이

실험에 이용된 동물은 체중 20~25 g 정도의 생후 4 주령 된 ICR mice(수컷) 16마리를 구입하여 1 주일간 적응시켰다. 적응 기간이 끝난 실험동물은 체중에 따른 난괴법(randomized complete block design)으로 각 군당 8마리씩 2군으로 나누어 8주 동안 사육하였다. 사육실의 온도는 23±2℃, 습도 50~60%로 조절하였고, 매일 광주기 및 암주기를 각각 12시간이 되도록 조절하였다. 실험동물은 두 마리씩 stainless steel cage에서 사육하였고, 식이와 먹는 물은 24시간 동안 자유 급식으로 공급하였으며, 무기질의 오염 방지를 위해서 사육실에 필요한 모든 기구는 0.4%의 EDTA로 씻은 후 탈이온 증류수로 헹구어 사용하였다.

본 실험에서 사용한 식이의 구성 성분은 American Institute of Nutrition AIN-76A Rodent Purified Diet(Dyets Inc. Bethlehem, PA, USA)를 기본으로 Table 1과 같이 하였으며 식이 성분으로는 AIN 76 mineral mixture(Dyets Inc), AIN 76 vitamin mixture(Dyets Inc), choline bitartrate(ICN Biomedicals Inc, Costa Mesa, California, USA), casein(Dae Jung Chemicals & Metals Co Ltd, Seoul, Korea), cellulose(Aldrich chemical Co Inc, Milwaukee, WI, USA), DL-methionine(Junsei Chemical Co, Ltd, Tokyo, Japan)을 사용하였다. 머위(국내산, 2004년산)는

Table 1. Composition of experimental diet

	(g/kg diet)	
	Control	Butterbur
Casein	200.0	200.0
DL-methionine	3.0	3.0
Corn starch	150.0	150.0
Sucrose	500.0	422.0
Cellulose	50.0	28.4
Corn oil	20.0	20.0
Lard	30.0	30.0
Mineral mix ¹⁾	35.0	28.0
Vitamin mix ²⁾	10.0	8.0
Choline bitartrate	2.0	2.0
Butterbur powder ³⁾	0.0	200.0
Total weight	1,000.0	1,091.4
Energy density(kcal)	3,862.0	3,862.0

¹⁾ AIN 76 mineral mixture(g/kg, Jungang Lab. Animal Inc., Seoul, Korea) : calcium lactate 620.0, sodium chloride 74.0, potassium phosphate dibasic 220.0, potassium sulfate 52.0, magnesium oxide 23.0, manganous carbonate 3.3, ferric citrate 6.0, zinc carbonate 1.0, cupric carbonate 0.2, potassium iodate 0.01, sodium selenite 0.01, chromium potassium sulfate 0.5, finely powdered to make 1,000 g.

²⁾ AIN 76 vitamin mixture(mg/kg, Jungang Lab. Animal Inc., Seoul, Korea): thiamine-HCl 600, riboflavin 600, pyridoxine-HCl 700, nicotinic acid 3,000, D-calcium pantothenate 1,600, folic acid 200, D-biothoin 20, vit B₁₂ 2.5, vit A 400,000 IU, vit D₃ 100, 000 IU, vit E 7,500 IU, vit K 75, finely powdered to make 1,000 g.

³⁾ Butterbur powder : freeze drying butterber(all parts) powder 20%.

대전 소매상에서 구입하여 3번 수세 후 머위를 전체 부위를 2일간 음건한 후 수분 함량이 10% 이하로 낮추기 위하여 vacuum freeze dryer(SFDSF12, Samwon Freezing Co, Seoul, Korea)를 이용하여 건조하고 마쇄하여 제조한 머위 가루를 총 식이 무게의 20% 수준으로 식이에 섞어 공급하였다(Niccolle *et al* 2004). 각 군의 식이는 매주 한 번씩 만들어 사용하였고 지방의 산패를 방지하기 위해 -70℃ 냉동고에 보관하면서 정해진 시간에 매일 일정량을 급여하였다.

2. 식이 섭취량, 체중 증가량, 식이 효율 및 분변의 양
실험동물의 식이 섭취량은 매일 오후 2시경에 측정하였

으며, 체중 측정은 갑작스런 체중 증가를 막기 위해 1시간 전에 식이 공급을 중단한 후 매주 일정한 시간에 한 번씩 측정하였다. 식이 효율(food efficiency ratio, FER)은 총 체중 증가량을 같은 기간 동안의 총 식이 섭취량으로 나눈 값으로 산출하였다. 분변의 양은 식이 마지막 주, 즉 8주에 3일간 채취하여 동결 건조 후 무게를 측정하였다.

$$\text{Food efficiency ratio(FER)} = \frac{\text{Total weight gain(g)}}{\text{Total food intake(g)}}$$

3. 장기 및 지방조직 채취 및 분석

각 장기는 채혈 직후 즉시 적출하여 0.9% 생리 식염수로 헹구어 여과지로 불기를 제거한 후 중량을 측정하였다. 또한 지방은 장기를 적출한 후 곧바로 복강 뒤(retroperitoneal), 복강 내(mesenteric), 고환 주위(epididymal), 허벅지(inguinal), 비장 주위(spleen)의 5가지 부위에서 떼어내어 중량을 측정하였다.

4. 혈장 지질 분석

1) 시료 채취

실험 종료 후인 4주 경과시에 12시간 동안 절식시킨 실험동물을 ethyl ether로 마취시켰다. 마취 상태에서 개복한 즉시 심장에서 혈액을 채취하였으며 채취한 혈액을 heparin이 담긴 튜브에 담아 굳지 않도록 처리한 다음 2,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 혈장(plasma)을 분리하였다. 분리한 혈장은 -70°C에서 냉동 보관한 후 분석에 사용하였다.

2) 지질 분석

총 지질(total lipid), 총 콜레스테롤(total cholesterol), HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 농도는 효소 Kit(YD Diagnostics Corp, Seoul, Korea) 시약법에 의해 분광 광도계(Model 80-2088-64, Pharmacia Biotech. Co, Cambridge, England)로 이용하여 505 nm에서 흡광도를 측정하였다. 동맥경화지수(AI: Atherogenic Index)는 다음 공식을 이용하여 계산하였다(Kim *et al* 2005).

LDL-cholesterol =

$$\text{Total cholesterol} - \left(\text{HDL} - C + \frac{\text{Total lipid content}}{5} \right)$$

AI(Atherogenic Index) =

$$\frac{(\text{Total cholesterol} - \text{HDL cholesterol})}{\text{HDL cholesterol}}$$

5. 장기 및 혈장의 항산화 물질의 측정

1) Total Glutathione 측정을 위한 시료 제조

Mouse의 혈액은 RBC를 분리하여 pH 7.4 sodium phosphate buffer로 100배 희석하였고, 간조직은 간중량의 19배의 6% metaphosphoric acid로 균질화 한 후 25,000 rpm으로 30분간 원심분리(4°C)하여 얻은 상등액을 당일에 총 glutathione 측정 실험에 사용하였다.

2) Total Glutathione(GSH) 측정

총 glutathione은 Floreani *et al*(1997)의 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 제조한 시료의 상등액 15 μL 를 취해서 500 μL 의 cuvette cell에 0.1 M의 potassium phosphate/0.005 M EDTA buffer(pH 7.4) 400 μL 를 넣고 10 mM의 [5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid), DTNB] 12.5 μL , 5 mM NADPH 40 μL 를 취해서 1 분간 평형을 유지시킨 후에 0.5 unit의 GR(type III Sigma, from bakers yeast, diluted in 0.1 M phosphate buffer pH 7.4)을 넣고 잘 섞은 후 반응이 개시되면 412 nm에서 2분간 지속적으로 흡광도를 측정하였다. 0.04 mM GSH를 제조하여 standard curve를 그린 후 흡광도에 대한 농도를 환산하였다.

3) β -Carotene 측정

혈장 내 β -carotene은 다음 방법으로 추출하였다. 100 μL plasma를 glass vial에 담은 후 500 μL ethanol과 25 μL 의 91 mmol BHT/L methanol을 첨가하여 단백질을 변성시켰다. 그 후 internal standard solution (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 20 μL 를 첨가한 후 3 mL의 hexane을 첨가하였다. 각 시료를 30초간 섞어준 후 다시 물 400 μL 를 섞은 후 30초간 교반한 후 1,500 rpm에서 2분간 원심 분리하여 물층과 용매층을 분리하였다. 상등액을 새로운 시험관에 옮긴 후 질소로 용매를 제거한 후 30 μL isopropanol/acetonitrile (50:50, v/v)에 다시 녹인 후 여과하여 HPLC에 주입하여 분석하였다.

HPLC 조건은 20 μL injection, ODS column, mobile phase(acetonitrile/ isopropanol/ methanol (68:20:12 v/v/v)+0.02% ammonium acetate), flow rate 1.0 mL/min, photodiode array detector at 450 nm이었다.

6. 항산화 효소 활성도 측정

1) 시료 제조

마우스의 조직을 조직 중량 9배의 0.01 M sodium phosphate buffer pH 7.4로 균질한 후 2,500 rpm에서 30분간 원심분리(4°C)한 후 상등액을 얻었다. -70°C 냉장고에 보관하면서 항산화 효소계 효소(GPx, GR, SOD, paraoxonase) 측정

실험에 사용하였다.

2) Glutathione Peroxidase(GPx) 활성 측정

GPx는 Tappel(Tappel AL 1978)의 방법을 사용하여 정량하였다. 1.0 mM EDTA를 함유한 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 7.2)에 catalase의 작용을 억제하기 위해서 1 mM의 azide를 넣은 후 891 μ L를 1 mL cuvette cell에 넣고 cytosol enzyme 50 μ L, 0.25 mM glutathione 20 μ L, 10 mM NADPH 20 μ L, GR (0.5 unit/mL) 10 μ L를 넣고 마지막에 100 mM cumene hydroperoxide 10 μ L를 넣은 후에 340 nm에서 흡광도를 2분간 측정하였다. GPx의 활성도 1 unit는 mg protein당 1분간 산화되는 μ M 수로 정한다.

3) Glutathione Reductase(GR) 활성 측정

간조직의 GR 효소의 활성 측정은 Pinto *et al*(1984)의 방법에 따라 구하였다. 시료 50 μ L, 1 mM EDTA를 함유한 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 8.0) 940 μ L, 0.1 mM GSSG 용액 20 μ L를 함유된 용액에 10 mM NADPH 20 μ L를 첨가한 후 412 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) Superoxide Dismutase(SOD) 활성 측정

SOD 활성은 McCord & Fridovich(1988)의 방법에 따라 정량하였다. 반응은 1 unit xanthine oxidase 4 μ L 정도 넣어 흡광도가 0.021 \pm 0.005이 되도록 농도를 조절한 후 cytosol 시료 40 μ L를 반응시켜서 550 nm에서 2분간 측정을 한다. SOD 1 unit는 cytochrome C를 50% 방해하는 데 필요한 SOD의 양으로 정의하였다.

5) Paraoxonase(PON) 활성 측정

Paraoxonase를 측정하기 위해 arylesterase activity assay를 하였다(Nguyen & Sok 2006). 1 mM CaCl₂가 함유된 20 mM Tris-HCl pH 8.0 buffer 495 μ L에 혈장 5 μ L를 넣은 후 cuvette 안의 농도가 1 mM이 되도록 phenylacetate를 첨가하고 270 nm에서 흡광도를 측정 후 다음의 공식에 의해 activity를 계산하였다.

$$PA(U) = \frac{\text{흡광도} \times \text{cuvette 크기}(\mu\text{L}) \times 1000}{\text{시료양}(\mu\text{L}) \times 1310 \times \text{반응시간}(\text{min})}$$

6) 단백질 정량

GPx, GR, SOD는 mg protein당 unit로 계산하였는데 이때 단백질 정량은 bovine serum albumin(BSA)을 표준 단백질로 사용하여 Bradford 측정법(Bradford MM 1976)에 기초를 둔 Bio-Rad 단백질 정량법에 의한 Bio-Rad protein kit를 사용하여 595 nm에서 측정하여 계산하였다.

7. 지질의 과산화물(TBARS) 측정

1) 시료 제조

마우스의 조직을 조직 중량의 9배의 0.01 M sodium phosphate buffer pH 7.4로 균질한 후 -70°C 냉장고에 보관하면서 TBARS 측정 실험에 사용하였다.

2) TBARS값 측정

혈장, 간, 심장, 신장의 지질 과산화물은 thiobarbituric acid (TBA)방법(Bidlack & Tappel 1973)을 이용하여 생성된 malondialdehyde(MDA) 양을 533 nm에서 흡광도를 측정하였으며, tetramethoxypropane(malonaldehyde bis, TMP)를 표준 물질로 사용하였다.

8. 혈액의 DNA의 손상 정도

1) Alkaline Single-cell Gel Electrophoresis

Mice 혈액 중 DNA 손상 정도를 측정하기 위해 alkaline single-cell gel electrophoresis(comet assay)(Yu *et al* 1997, Rojas *et al* 1999, Andreas *et al* 2004)를 실시하였다. Slide에 0.5% Normal melting agarose(NMA)를 50 μ L와 75 μ L로 2번 코팅한 후 전혈 5 μ L와 0.75% Low melting agarose(LMA) 75 μ L의 현탁액을 골고루 분산시킨 후 cover glass로 덮어 4°C의 냉장 온도에 저장하였다. Gel이 굳으면 그 위에 0.75% LMA 75 μ L도포하였다. 미리 차게 준비해두었던 pH 10 lysis buffer에 DMSO와 TritonX-100을 섞은 시약에 slide를 담귀 한시간 동안 압실에 보관하면서 lysis 과정을 거쳤다. Lysis 과정을 끝낸 slide는 electrophoresis buffer에 40분에 저장하였다가 electrophoresis chamber에 배열하고 25V, 300 mA에서 20분 동안 unwinding 시켰다. 전기 영동이 끝난 slide는 pH 7.5 tris buffer에 5분씩 3회 세척하고 마지막으로 에탄올에 5분 담갔다 건조시켰다.

2) Image Analysis

Comet image 분석을 하기 위해 ethidium bromide(20 μ L/mL)로 nucleotide를 염색하여 형광 현미경에서 관찰하고 카메라를 통해 comet image analyzing system이 설치된 컴퓨터에서 분석하였다. DNA 손상 정도는 핵으로부터 이동한 DNA 파편의 거리(tail length, TL), tail 내 함유된 DNA% (tail DNA%) 그리고 TL값에 tail DNA를 곱해준 tail moment(TM) 값을 측정하였다(Wim *et al* 2001).

9. 단백질의 산화도(Carbonyl Value) 측정

20% TCA를 600 μ L 넣고 14,000 rpm 초고속 원심분리기

에서 10분간 원심분리하고 상등액은 버렸다. 10 mM DNPH 시약을 1 mL씩 가해서 충분히 vortex시킨 후 천천히 다 넣어 50분간 38°C에서 배양시켰다. 매 15분마다 vortex를 시켜 주었고 20%의 TCA를 1 mL씩 넣어 8,000 rpm에서 15분간 원심분리시킨 후 상등액을 버렸다. EtOH/ethyl acetate(EA)를 1 : 1 비율로 혼합하여 각각 1 mL씩 넣고 10분 동안 잘 저은 후 8,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액은 버리고, 상등액이 맑아져서 노란색이 보이지 않을 때까지 5회 정도 반복하여 씻어냈다. 침전물에 6 M guanidine 용액을 1 mL씩 넣고 incubator(38°C)에서 30분간 배양한 후 380 nm에서 흡광도를 측정하였다(Faure & Lafond 1995).

10. 통계 처리

모든 실험 결과는 실험동물 16 마리의 평균치±표준편차로 표시하였으며, 유의성 검증은 Windows SPSS 10(Statistical Package for Social Sciences. SPSS Inc, Chicago IL, USA) software package 프로그램을 이용하여 student *t*-test에 의하여 각 실험군의 평균치간 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 식이 섭취량, 체중 증가량, 식이 효율 및 변의 양

머위가 첨가된 식이의 급여로 인한 mice의 실험기간 동안의 체중 변화, 식이 섭취량, 식이 효율 및 변의 양은 Table 2와 같다. 식이 섭취량은 대조군과 머위 섭취군 사이에 유의적인 차이가 없었으나 체중 증가량 및 식이 효율은 머위 섭취군이 대조군에 비해 유의적으로 낮았다($p<0.05$). 또한 분변량은 머위 섭취군이 2배 정도 유의적으로 높았다. 이는 흰쥐에 한국 산채류 첨가 식이를 급여하였을 때 참취, 곰취, 쑥, 쇠비름과 같은 산채류를 섭취한 군의 분변량이 대조군보다 많았으며, 특히, 곰취와 쇠비름 섭취군의 체중 증가량과 식이 효율이 감소하였다는 연구 결과와 일치하는 결과이며 이는 산채류의 식이섭유의 영향으로 사

Table 2. Effect of butterbur on food intake, body weight gain, food efficiency ratio (FER) and feces weight of mice fed experimental diets for 8 weeks

	Control	Butterbur
Food intake(g/day)	5.2±0.5	5.0±0.5
Body weight gain(g)	15.1±2.2	6.7±0.6*
FER(%)	5.7±0.4	1.4±0.4*
Fecal weight(g/3days)	0.7±0.1	1.3±0.3*

* Significantly different between control and butterbur at $p<0.05$.

료된다(Park & Kim 1999).

2. 장기 무게

머위가 첨가된 식이의 급여가 mice의 간, 심장, 신장의 무게에 미치는 영향은 Table 3과 같다. 간의 무게의 경우 대조군보다 머위 섭취군이 높은 경향을 나타내었으나 유의적인 차이는 없었으며, 심장과 신장의 무게는 대조군과 머위 섭취군에서 유사하게 나타났다. Park & Kim(1999)이 산채류를 흰쥐에 급여하여 보고한 연구 결과에서도 산채류에 급여에 의한 장기 무게에 대한 유의적인 영향은 관찰되지 않았다고 하였다.

3. 부위별 지방 조직의 무게

머위가 첨가된 식이의 급여가 mice의 복강 뒤, 복강 내, 고환 주위, 허벅지, 비장 주위의 지방 무게에 미치는 영향은 Table 4와 같다. 총 지방 조직의 무게는 머위 섭취군이 대조군보다 2배 가량 유의적으로 낮았다($p<0.05$). 이는 비장 주위의 지방 무게를 제외하고 복강 뒤, 복강 내, 고환 주위 및 허벅지의 지방 무게가 모두 유의적으로 낮게 나타났다. 이러한 결과는 Jang & Choi(2003)은 인진쑥 섭취가 비만쥐의 후복강 지방 조직과 부고환 주위 지방조직을 감소시켰다는 보고와 일치하였다.

Table 3. Effect of butterbur on organ weight(g/100 g body weight) of mice fed experimental diets for 8 weeks

	Control	Butterbur
Liver	3.80±0.70	4.30±0.38
Heart	0.42±0.03	0.45±0.05
Kidney	0.01±0.00	0.02±0.01

Table 4. Effect of butterbur on fat pad weight of mice fed experimental diets for 8 weeks

	Control	Butterbur
Total fat pad	9.00±1.69	4.36±1.38*
Retroperitoneal	1.47±0.39	0.57±0.31*
Mesentric	1.72±0.45	0.88±0.19*
Epididymal	3.67±0.70	1.56±0.58*
Ingunnal	1.60±0.42	0.84±0.38*
Spleen	0.55±0.12	0.52±0.12

* Significantly different between control and butterbur at $p<0.05$.

4. 혈장 내 중성 지질, 총 콜레스테롤, 고밀도 지단백질 콜레스테롤, 저밀도 지단백질 콜레스테롤 및 동맥경화지수

머위가 첨가된 식이의 급여가 mice의 혈장 내 중성 지질, 총 콜레스테롤, 고밀도 지단백질 콜레스테롤, 저밀도 지단백질 콜레스테롤 함량에 미치는 영향은 Table 5와 같다. 중성 지질함량, 고밀도 지단백 콜레스테롤 및 저밀도 지단백 콜레스테롤은 대조군과 머위 섭취군 사이에 차이가 없었으나 머위 섭취군의 총 콜레스테롤 함량은 유의적으로 낮았다($p<0.05$). 동맥경화지수는 대조군이 0.315인 반면 머위 섭취군이 0.239으로 낮게 나타났다. Bang *et al*(2005)은 머위 앞에서 고지혈증 억제 효과가 있는 triperpenoid 화합물이 분리되었다고 보고하였다. Park & Kim(1999)이 산채류를 흰쥐에 급여하여 보고한 연구 결과에서도 참취, 곰취, 쇠비름 급여군은 대조군보다 총 콜레스테롤 함량이 낮았다고 하여 본 연구 결과와 일치하였다.

5. 항산화능 지표

1) 항산화 물질의 농도

머위가 첨가된 식이의 급여가 mice의 간 및 혈장에 포함된 GSH, 베타카로틴과 같은 항산화 물질의 함량에 미치는 영향은 Table 6과 같다. 혈장의 GSH 및 베타카로틴 함량은 머위 첨가군과 대조군 사이에 유의적인 차이가 없었으나, 머위 첨가군에서 간의 GSH 함량이 유의적으로 대조군보다 높게 나타났다. 비효소적 항산화제인 GSH는 여러 세포의 endogenous, exogenous 화합물의 해독에 관여하는 물질로서 GSH의 thiol 기에 포함하여 해독화 하여(Parke DV 1993) 단백질이나 DNA 합성, γ -glutamyl amino acid 등과 같은 물질의 이동, 효소 활성의 조절 및 활성 산소나 유리기에 의한 세포 손상 예방 등 생물학적으로 중요한 여러 반응에 관

Table 5. Effect of butterbur on triglyceride, HDL-,LDL-cholesterol and atherogenic index of plasma in mice fed experimental diets for 8 weeks

	Control	Butterbur
Triglyceride	55.80	54.61*
Total cholesterol	177.81	144.72*
HDL	134.82	116.84
LDL	21.82	17.00
AI	0.32	0.24*

* Significantly different between control and butterbur at $p<0.05$.

여한다(Meister & Anderson 1983). 따라서, 머위 첨가 식이 섭취에 의한 간의 GSH 함량의 증가는 머위 섭취가 체내 산화적 손상을 억제하는데 효과적임을 의미한다.

2) 항산화 효소 활성

머위가 첨가된 식이의 급여가 mice의 간 및 혈장 내 항산화 효소에 미치는 영향은 Table 7과 같다. 체내에 존재하는 효소적 방어체인 항산화 효소는 미토콘드리아나 세포질에 많이 존재하면서 생성된 radical을 물과 산소로 분해하여 해가 없는 물질로 전환시킴으로써 조직이나 세포의 과산화적 손상을 방지하는 역할을 한다(Heffer & Repine 1989). SOD는 O_2^- 을 H_2O_2 로 dismutation 하는 것을 촉매하여 O_2^- 을 제거시키는 효소로, 이 때 생성된 H_2O_2 는 catalase나 GPx에 의하여 H_2O 와 O_2 로 전환된다. GPx는 또한 lipid hy-

Table 6. Effect of butterbur on contents of GSH and β -carotene in liver and blood of mice fed experimental diets for 8 weeks

	Control	Butterbur
GSH in liver (mg/mg prot.)	5.37 \pm 1.56	7.79 \pm 1.15*
GSH in RBC (mg/mg prot.)	0.05 \pm 0.01	0.08 \pm 0.02*
β -carotene in plasma (nmole/mL)	0.00 \pm 0.00	0.04 \pm 0.01*

* Significantly different between control and butterbur at $p<0.05$.

Table 7. Effect of butterbur on activity of glutathione peroxidase(GPx), glutathion reductase(GR) and superoxide dismutase(SOD) and paraoxonase in liver and blood of mice fed experimental diets for 8 weeks

	Control	Butterbur
GPx in liver (unit/mg prot.)	3.51 \pm 0.48	3.45 \pm 0.51
GR in liver (unit/mg prot.)	0.46 \pm 0.04	0.77 \pm 0.16*
SOD in liver (unit/mg prot.)	1.73 \pm 0.64	2.39 \pm 0.67*
SOD in RBC (unit/mg prot.)	0.03 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01
Paraoxonase (unit)	0.41 \pm 0.091	0.32 \pm 0.038*

* Significantly different between control and butterbur at $p<0.05$.

droperoxides를 불활성시키는데, 독성이 적은 알코올(OH)로 전환시키는 역할을 한다. 이들 과정에서 glutathione은 GPx의 중요한 기질이다. 환원형 glutathione(GSH)은 free sulfhydryl로 된 tripeptide이며 수 mM 농도로 세포 내 존재한다. H₂O₂나 lipid hydroperoxides를 환원시키는 과정에서 glutathione이 glutathione disulfide(GSSG)로 산화되는데, 이 때 세포 내 대사과정에서 유도된 NADPH의 존재하에 GR은 GSSG를 환원하여 GSH를 재생시킨다. 한편, paraoxonase는 몸 속의 에스테르 화합물을 분해하여 phenolic 물질을 형성시켜준다. 본 연구 결과 머위 섭취군의 간 및 혈장에 포함된 총 항산화 효소 활성은 대조군보다 높게 나타나 머위 섭취가 체내 산화적 손상을 억제하는데 효과적임을 알 수 있었다. 이는 특히, 간에 포함된 GR과 SOD의 활성이 대조군보다 유의적으로 높았기 때문이다.

3) 간 및 심장의 조직과 혈장의 지질 산화물 함량

머위가 첨가된 식이의 급여가 mice의 간 및 심장의 조직과 혈장의 지질 산화물 함량에 미치는 영향은 Table 8과 같다. 머위 섭취군이 대조군보다 총 지질 산화물 함량이 낮아 머위 섭취가 장기 조직 및 혈장 지질의 산화를 효과적으로 억제하였음을 알 수 있다. 혈장 및 심장의 지질 산화물 함량은 머위 섭취군과 대조군 사이에 유의적인 차이가 없었으나, 간과 신장의 지질 산화물 함량에 있어 머위 섭취군이 대조군보다 유의적으로 낮게 나타났다($p<0.05$). 이는 머위에 포함된 많은 항산화 물질 때문으로 사료되며 특히, Lee et al(2000)은 머위에서 분리한 petasiphenol이 DPPH radical 소거능이 뛰어났다고 보고하였다. 또한, 머위 섭취가 장기 및 혈장에 함유된 GSH 및 β -carotene과 같은 항산화 물질의 함량을 증가시키고 GR 및 SOD와 같은 항산화 효소 활성을 증가시켰기 때문으로 사료된다.

4) 간 및 심장의 단백질 산화도

머위가 첨가된 식이의 급여가 mice의 간 및 심장의 단백질 산화도에 미치는 영향은 Table 9와 같다. 머위 섭취군이

대조군보다 간과 심장 모두에서 단백질 산화도인 carbonyl value가 낮은 경향을 나타내 머위 섭취가 지질뿐 아니라 단백질의 산화적 손상까지 억제하였음을 알 수 있었다.

5) 혈장의 DNA 산화적 손상 정도

머위가 첨가된 식이의 급여가 mice의 혈장의 DNA 손상 정도에 미치는 영향을 tail DNA, tail length, olive tail moment를 분석하여 Table 10에 나타냈다. 머위 섭취군이 대조군에 비해 tail DNA 함량과 tail length, olive tail moment가 모두 낮은 경향을 나타내어 대조군 보다 혈장의 DNA가 적게 손상되었음을 알 수 있었다.

요약 및 결론

한국에서 자생하고 있는 머위(*Petasites japonicus* Maxim)를 건조시켜 만든 고품사료를 급여한 mice에서의 장기 및 혈장의 생화학지표를 평가하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다. 대조군과 머위 섭취군 사이에 식이 섭취량은 유의적인 차이가 없었으나 체중 증가량 및 식이 효율은 머위 섭취군이 유의적으로 낮았다. 머위 섭취군에서 비장 주위의 지방 무게를 제외하고 복강 뒤, 복강 내, 고환 주위 및 허벅지의 지방 무게가 모두 유의적으로 낮게 나타났으며 ($p<0.05$), 혈장의 총 콜레스테롤 함량과 동맥경화 지수가 낮게 나타났다. 장기 및 혈장의 항산화 지표를 평가한 결과 머위 섭취군에서 항산화 물질 함량 및 효소 활성이 높게 나타났으며, 지질, 단백질 및 DNA의 산화적 손상도가 적게 나타나 머위가 체내 산화적 방어 능력에 효과적임을 알 수

Table 9. Effect of butterbur on carbonyl value in liver and heart of mice fed experimental diets for 8 weeks

	Control	Butterbur
Liver(μ mole/mL)	0.20	0.16
Heart(μ mole/mL)	0.42	0.41

Table 8. Effect of butterbur on lipid peroxidation value in liver, heart, kidney and plasma of mice fed experimental diets for 8 weeks

	Control	Butterbur
Plasma(ng/mL)	0.12 \pm 0.021	0.12 \pm 0.032
Liver(ng/mL)	1902.00 \pm 400	1592.00 \pm 286*
Heart(ng/mL)	1388.00 \pm 290	1322.00 \pm 178

* Significantly different between control and butterbur at $p<0.05$.

Table 10. Effect of butterbur on single cell gel electrophoresis (Comet assay) of whole blood in mice fed experimental diets for 8 weeks

	Control	Butterbur
Tail DNA(%)	13.82 \pm 2.39	10.04 \pm 1.03*
Olive tail moment	2.66 \pm 0.65	1.89 \pm 0.24*
Tail length(μ m)	28.80 \pm 7.89	21.93 \pm 5.34

* Significantly different between control and butterbur at $p<0.05$.

있었다. 특히, 간의 GSH 함량과 GR 및 SOD의 활성이 높았으며, 간과 신장의 지질 산화물 함량, 간과 심장의 단백질 산화도, 혈장의 DNA 손상 정도가 낮게 나타났다. 따라서 본 연구 결과에서 머위 섭취가 흰쥐의 지방 대사 및 항산화에 효과적이었다고 할 수 있다.

감사의글

이 논문은 2005년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구 조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원(과제번호 : KRF-2005-204-C00105)을 받아 연구되었으며, 되었으며, 지원에 감사드립니다.

문헌

- Andreas H, Martin S, Ulla PH, Phil L, Willi S, Lutz M (2004) Use of the alkaline *in vivo* comet assay for mechanistic genotoxicity investigation. *Mutagenesis* 19: 51-59.
- Bang MH, Park JK, Song MC, Yang HJ, Yoo JS, Ahn EM, Kim DK, Baek NI (2005) Development of biologically active compound from edible plant sources-XV. Isolation of triterpene glycosides from the Leaf of *Petasites japonicus*. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 48: 421-424.
- Bengendi L, Benes L, Durackova Z, Ferencik M (1999) Chemistry physiology and pathology of free radicals. *Life Sci* 65: 1864-1874.
- Bidlack WT, Tappel AL (1973) Damage to microsomal membrane by lipid peroxidation. *Lipids* 8: 177-182.
- Bradford MM (1976) A rapid and serum sensitivities method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-250.
- Brattstrom A (2003) A newly developed extract (Ze 339) from butterbur(*Petasites hybridus* L.) is clinically efficient in allergic rhinitis (hay fever). *Phytomedicine* 10: 50-52.
- Choi OB (2002) Anti-allergic effects of *Petasites japonicus*. *Korean J Food Nutr* 15: 382-385.
- Debrenner B, Meier B (1998) *Petasites hybridus*: a tool for interdisciplinary research in phytotherapy. *Pharm Acta Helv* 72: 359-380.
- Faure P, Lafond JL (1995) Measurement of plasma sulfhydryl and carbonyl groups as a possible indicator of protein oxidation. Analysis of Free Radicals in Biological System Favier et al(eds), pp 243-248.
- Floreani M, Skaper DS, Facci L, Lipartiti M, Giusti P (1997) Melatonin maintains glutathione homeostasis in kainic acid-exposed rat brain tissues. *FASEB J* 11: 1309-1315.
- Halliwell B, Murcia MA, Chirico S, Aruoma OI (1995) Free radicals and antioxidants in food and *in vivo*: what they do and how they work. *Crit Rev Food Sci Nutr* 35: 7-20.
- Hasa Y, Tazaki H (2004) Biosynthesis of fukinolic acid isolated from *Petasites japonicus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 68: 2212-2214.
- Heffer JE, Repine JE (1989) Pulmonary strategies of antioxidant defense. *Am Rev Resp Dis* 140: 531-554.
- Hirono I, Mori H, Yamada K, Hirata Y, Haga M (1997) Carcinogenic activity of petasitenine, a new pyrrolizidine alkaloid isolated from *Petasites japonicus* Maxim. *J Natl Cancer Inst* 58: 1155-1157.
- Iriye R, Furukawa K, Nishida R, Kim C, Fukami H (1992) Isolation and synthesis of a new bio-antimutagen, petasiphenol, from scapes of *Petasites japonicum*. *Biosci Biotechnol Biochem* 56: 1773-1775.
- Jang JY, Choi HJ (2003) Effects of *Artemisia iwayomogi* oligosaccharide on the blood lipids, abdominal adipose tissues and leptin levels in the obese rats. *Korean J Nutr* 36: 437- 445.
- Jee YH, Lee CS (1996) Pathological changes on rats and mice fed with *Petasites japonicus* Maxim. *Korean J Vet Res* 36: 417-428.
- Kim SJ, Bok SH, Lee SK, Kim HJ, Lee MK, Park YB, Choi MS (2005) Anticholesterlemic effect of 3,4-di(OH)-phenylpropionic amides in high-cholesterol fed rats. *Toxicology Applied Pharmacology* 208: 29-36.
- Lee CH, Chung MC, Lee HJ, Kho YH (2000) An apoptosis regulator isolated from *Petasites japonicum*. *Korean J Food Sci Technol* 32: 448-453.
- Lin CH, Li CY, Wu TS (2004) A novel phenylpropenoyl sulfonic acid and a new chlorophyll from the leaves of *Petasites formosanus* Kitamura. *Chem Pharm Bull* 52: 1151-1152.
- Matsuura H, Amano M, Kawabata J, Mizutani J (2002) Isolation and measurement of quercetin glucosides in flower buds of Japanese butterbur(*Petasites japonicus* subsp. *gigantea* Kitam). *Biosci Biotechnol Biochem* 66: 1571-1575.
- McCord JM, Fridovich I (1988) Superoxide dismutase : The first twenty years(1968~1988). *Free Radical Biol Med* 5: 363-369.
- Meister A, Anderson ME (1983) Glutathione. *Ann Rev Biochem*

- 52: 711-760.
- Mizushima Y, Ishidoh T, Kamisuki S, Nakazawa S, Takemura M, Sugawara F, Yoshida H, Sakaguchi K (2003) Flavonoid glycoside: a new inhibitor of eukaryotic DNA polymerase α and a new carrier for inhibitor affinity chromatography. *Biochem Biophys Res Commun* 301: 480-487.
- Nakayama T, Niimi T, Osawa T, Kawakisi S (1992) The protective role of polyphenols in cytotoxicity of hydrogen peroxide. *Mutat Res* 281: 77-80.
- Nguyen SD, Sok DE (2006) Preferable stimulation of PON1 arylesterase activity by phosphatidylcholines with unsaturated acyl chains or oxidized acyl chains at *sn*-2 position. *Biochimica Biophysica Acta* 1758: 499-508.
- Nicolle C, Gueux E, Lab C, Jaffrelo L, Rock E, Mazur A, Amouroux P, Révész C (2004) Lyophilized carrot ingestion lowers lipemia and beneficially affects cholesterol metabolism in cholesterol metabolism in cholesterol-fed C57BL/6J mice. *Eur J Nutr* 43: 237-245.
- Park JA, Kim MK (1999) Effect of Korean native plant diet on lipid metabolism, antioxidative capacity and cadmium detoxification in rats. *Korean J Nutr* 32: 353-368.
- Parke DV (1993) The importance of diet and nutrition in the detoxification of chemicals. In food, nutrition and chemical toxicity. Smith-Gordon, London. pp 1-15.
- Pinto MC, Mata AM, Lopes-Barea J (1984) Reversible inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* glutathione reductase under reducing conditions. *Arch Biochem Biophys* 228: 1-12.
- Proctor PH (1992) Free radicals and human disease. Handbook of free radicals and antioxidants in medicine Vol. I CRC Press, Boca Raton, FL. pp 17-19.
- Rojas E, Lopez MC, Valverde M (1999) Review, single cell gel electrophoresis assay : methodology and applications. *J Chromatography B* 722: 225-254.
- Soka T (1985) In dictionary of Chinese drugs (1st ed) Shanghai Science Technology. Shogakukan Press, Tokyo, Japan.
- Tappel AL (1978) Glutathione peroxidase hydroperoxides. In: Methods in enzymology (Fleischer, S and Packer, L eds). Academic Press New York 52: 506-523.
- Wang GJ, Shum AY, Lin YL, Liao JF, Wu XC, Ren J, Chen CF (2001) Calcium channel blockade in vascular smooth muscle cell is major hypotensive mechanism of S-petasin, a hypotensive sesquiterpene from *Petasites formosanus*. *J Pharmacol Exp Ther* 297: 240-246.
- Wim M, Michel WM-K, Guide RY-D-M, Arnold G-H, Mark M-K (2001) Oxidative DNA damage and repair in experimental atherosclerosis are reversed by dietary lipid lowering. *Circ Res* 88: 733-739.
- Yu FS, Ayako S, Makiko A, Kumiko Y, Emi N, Ying QS, Naonori M, Shuji T (1997) *In vivo* genotoxicity of ortho-phenylphenol, biphenyl, and thiabendazole detected in multiple mouse organs by the alkaline single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research* 395: 189-198.

(2006년 5월 9일 접수, 2006년 7월 18일 채택)