

사염화탄소 유발 급성 간독성 생쥐모델에서 산양삼 에탄올 추출물의 간 보호 효과

이수민* · 박선영* · 장기석** · 이선영*§

충남대학교 생활과학대학 식품영양학과, * (주)보린**

The Protective Effects of Ethanol Extract of Wild Simulated Ginseng on Carbon Tetrachloride Induced Acute Hepatic Injury in Mouse

Lee, Soo Min* · Park, Sun Young* · Jang, Gi Seuk** · Ly, Sun Yung*§

Department of Food and Nutrition, * Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea
Borin Corp., ** Cheongju 361-805, Korea

ABSTRACT

The wild simulated ginseng (WSG) has been effectively used in folk medicine as a remedy against hepatic disease, hypertension and arthritic disease. However, there is still lack of scientific proof about its antioxidant capability. The present study has been conducted to evaluate the protective role of the WSG ethanol extract in the CCl₄-induced oxidative stress and resultant hepatic dysfunction in ICR mice. The electron donating abilities and IC₅₀ of WSG ethanol extract were 76.86 ± 1.06% and 33.3 ug/mL (that of ascorbic acid was 16.5 ug/mL), respectively. Total antioxidant status of WSG extract was 2.13 ± 0.06 mmol/mg, while the values of ascorbic acid and BHT were 3.63 ± 0.06 and 3.12 ± 0.02, respectively. ICR mice (aged 3 weeks) were fed for 4 weeks on AIN-93M diet and had free access to food and water. The animals were divided into three groups: normal group (intraperitoneally (i.p) injected with PBS at 100 μL/mouse), group C; CCl₄-induced and without any treatment. (i.p injected only PBS, 100 μL/mice), group G; CCl₄-induced and treated with WSG (i.p injected with 5 mg WSG extract per mouse, suspended in 100 μL phosphate buffer). After the i.p. injection of WSG or PBS (5 times for 7 weeks), all mice were administered CCl₄ in olive oil at the last day of the experiment, except for normal group. The normal group was administered only olive oil. Determination of plasma triglyceride, total cholesterol, fasting glucose and GPT activity was performed using automatic blood analyzer. To evaluate the protective effect against the oxidative stress, DNA fragmentation and TBARS were determined in blood leucocytes and RBC and hepatocyte, respectively. Body and organs weights and food intake did not show significant differences among the groups. Blood total cholesterol of group G was similar to that of normal group, which was the lowest in group C. The fasting blood glucose level was the highest in normal group (205.20 ± 135.24), which were decreased in group C (134.2 ± 79.31) and group G (126.48 ± 77.05). TBARS values in a red blood cell and hepatic tissue homogenate were lower in group G comparing to the group C. DNA% in tail, tail length (TL) and tail moment (TM) of blood leucocytes showed the highest values in group C (20.11 ± 2.47, 17.36 ± 2.58, 94.11 ± 12.29) and they were significantly diminished in group G (9.63 ± 1.19, 7.04 ± 1.50, 38.64 ± 7.60). In conclusion, wild simulated ginseng might be a protective agent against the oxidative stress. (Korean J Nutr 2008; 41(8): 701~710)

KEY WORDS : wild simulated ginseng, CCL4 induced hepatic injury, blood lipids, TBARS, DNA fragmentation.

서 론

산양삼은 야생상태에서 자연 발아하여 성장한 천연산삼의

종자나 묘삼을 인위적으로 산삼의 생육환경에 가능한 가깝게 깊은 산속 박달나무, 옻나무 등에 그늘지고 습기가 많은 곳에 뿌려두고 자연 환경에 그대로 방치해 두었다가 수십 년이 경과한 후에야 캐내는 삼을 말한다. 그러므로 산양삼은 희귀해지고 있는 산삼 유전자원의 보존 대책 중 하나가 될 수 있으며 WTO 출범에 대비하여 국내 농업의 경쟁력을 확보할 수 있는 수단이 되고 있다.

산양삼은 항암,¹⁾ 혈압강하,²⁾ 항산화,³⁾ 간독성,⁴⁾ 지질강하⁵⁾

접수일 : 2008년 11월 18일 / 수정일 : 2008년 12월 10일

채택일 : 2008년 12월 15일

§To whom correspondence should be addressed.

E-mail : sunly@cnu.ac.kr

등에 효능이 있는 것으로 밝혀지고 있으며 약리 활성 면에서 천연 산삼 다음으로 효능을 인정받고 있다.⁶⁾ 그러나 삼은 기를 보하는 대표적인 한약재로 인삼의 효능에 대한 다각적인 연구에 반하여 산양삼과 산삼에 대한 연구는 미진한 것이 현실이다. 이러한 이유는 시료가 고가이고, 믿을 만한 산삼을 구하기가 힘들며, 정성적인 평가가 어려울 뿐만 아니라, 검증된 데이터의 부재 등 연구에 적합하지 않은 조건 때문으로 보고 있다.

한편, 노화와 각종 질병의 원인 중의 하나로 알려지게 된 자유기 (free radical)는 현대인들의 건강 위협요인으로 지목되고 있다. 자유기는 세포막 파괴, 단백질 분해, 지질 산화, DNA 변성 등을 초래하여 세포의 기능 장애를 유발하고 암을 비롯한 뇌질환과 심장질환, 동맥경화, 염증, 노화, 면역질환 등의 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다. 특히 활성산소에 의해 초래되는 지질 과산화물은 산화적 파괴로 인한 각종 기능장애를 야기시킴으로서 노화와 질병의 원인이 되기도 한다.⁷⁾ 그 중 malondialdehyde (MDA)는 활성산소가 세포막의 구성성분인 불포화지방산을 공격하여 발생하는 반응의 산물로서, 이를 측정함으로써 세포의 산화적 스트레스 및 과산화 정도를 파악할 수 있다. MDA가 축적되면 세포막에서 교차결합, 중합, 및 변형이 일어나 이온수송, 효소활성, 및 세포표면 부착상태를 변성시키고, 또한 DNA의 염기와 반응하여 돌연변이성 병변을 일으킨다고 알려져 있다.⁸⁾

인체 내에는 이러한 산화적 스트레스에 대항하기 위하여 항산화시스템을 갖추고 있는데 내인성 항산화 효소인 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) 등과 같은 항산화 물질이 스스로를 보호하고 있다. 그럼에도 불구하고 과도한 스트레스에 노출되어 있는 현대인의 생활 속에서 더욱 효과적이고 안전한 식이성 항산화제에 대한 요구가 절실해지고 있다. 그간 효능과 경제성의 문제로 인공합성 항산화제가 널리 이용되어 왔으나 인공합성 화합물의 안정성에 대한 논란에 따라 그 사용이 제한되고 있다. 이로 인해 천연물로부터 추출한 자연 항산화제에 관한 연구가 지속되고 있으며, 특히 인삼과 같이 식물체에서 추출 분리한 항산화 물질에 대한 관심이 높아지고 있다.

고가의 산삼에 비하여 상대적으로 쉽게 연구재료로 사용할 수 있었던 인삼의 항산화효과에 대한 연구는 어느 정도 진행되어 인삼의 물 추출물을 장기 투여하였을 때 항산화능이 증가되었다는 Han 등⁹⁾의 연구보고와 인삼의 부위에 따라 다양한 항산화능이 있음을 보고한 Lee 등¹⁰⁾의 연구 보고가 있다. 그러나 인삼에서 분리한 순수 사포닌에 대해서

는 항산화 효과가 나타나지 않거나 미약한 것으로 보고되어 있어 인삼의 항산화 작용들은 사포닌보다는 페놀 성분에 의한 것으로 인식되고 있다.¹¹⁾ 한편, 인삼과 산삼의 효능을 비교 연구한 장 등의 연구¹²⁾에 의하면 산양삼은 인삼에 비하여 DPPH (*α-α*-Diphenyl- β -picrylhydrazyl) 소거능, 지질과산화 억제능, 활성산소종 (reactive oxygen species) 억제능 등이 높았으며 산삼과도 비슷한 수준이었다. 또한 총항산화능 (total antioxidant capacity), oxygen radical absorbance capacity (ORAC)와 페놀 함량은 인삼이나 산삼에 비하여 산양삼이 높았다. 그러나 그 외 산양삼의 항산화성에 대한 in vivo 연구는 거의 없는 실정이다.

일반적으로 기능성 식품의 간보호 효과를 검토하기 위한 동물모델로 알코올이나 사염화탄소 유발 간독성 모델을 많이 사용하는데 사염화탄소는 자유기를 발생하여 조직 손상을 일으키는 독성물질로 cytochrome P450에 의해 대사되어 생기는 $\text{CCl}_3\cdot$ 와 $\text{CCl}_3\text{O}_2\cdot$ 등의 자유기들이 세포막의 불포화지방에 작용하여 지질과산화를 일으키는 것으로 보고되어 있다.¹³⁾

따라서 본 연구에서는 DPPH에 의한 자유기 소거능과 ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzenothiazolin-6-sulfonic acid) radical을 이용한 총항산화능 (total antioxidant capacity: TAC) 측정 방법으로 항산화성을 확인한 산양삼 에탄올 추출물을 5일간 복강투여한 생쥐에 사염화탄소를 투여하여 간독성을 유발시킨 후 혈청지질, TBARS, 항산화효소 활성, DNA fragmentation 등의 생체지표를 측정하여 산양삼 추출물의 항산화 및 간기능 보호효과를 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

산양삼 추출

본 연구에 사용된 산양삼은 경상북도 상주에서 농약을 쓰지 않고 (건국대 인증 센터에서 검사) 생산한 12년생 산양삼의 뇌두와 뿌리를 선별, 정선하여 세척하고 이를 동결건조 한 후 분말화하여 사용하였다. 산양삼 동결 건조 분말 126 g을 80%에탄올 2L에 넣어 초음파 세포 파쇄기 (sonicator, Nihonseiki, Japan)내에서 3회 반복 추출하였다. 총 추출액을 여과지 (Whatman No.2)로 여과한 후 75°C의 진공증발기에서 감압 농축시켜 산양삼 농축액을 얻었다.

실험 동물 및 처치

생후 7주령 된 mouse (ICR) 수컷 24마리를 오리엔트바이오(주)에서 구입하여 온도 $23 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$, 12

시간 dark/light cycle 조건을 유지한 개별환경사육장치 (micro ventilation cage system)에서 분말식으로 일주일간 적응시킨 후 체중이 32.7 ± 2.9 g이 되었을 때 평균 체중이 비슷하게 임의로 분배하여 8마리씩 3군으로 나누었다. 실험군은 생리적 식염수만을 5일간 투여한 정상 대조군인 N군, 5일간 생리적 식염수를 투여하고 사염화탄소를 투여한 C군, 5일간 산양삼 추출물을 투여한 후 희생 하루 전 사염화탄소를 투여한 G군으로 분류하였다. 사육 기간 동안 실험 식이와 물은 무제한 급여하여 자유롭게 섭취하도록 하였다. 식이섭취량은 매일 일정 시간에 측정하였고 체중은 이틀에 한번 측정하였다.

식은 AIN-93M 식이¹⁴⁾를 제조하여 공급하였다. 일주일의 적응기간 후 체중 1 kg당 0.2에서 2 g까지 장뇌삼 추출물을 투여하였던 선행연구^{6,12)}들을 참고하여 생리식염수 (0.9%) 0.1 mL에 체중 30 g당 5 mg의 산양삼 추출물을 희석하여 G군에 5일간 매일 일정한 시간에 1일 1회 복강투여 하였고, 정상 대조군 (N)과 사염화탄소 투여 대조군 (C군)에는 동량의 생리식염수를 복강투여 하였다. 산양삼 추출액을 마지막으로 투여하고 24시간 경과 후 사염화탄소 (Sigma, USA)를 올리브 오일에 1 : 1로 희석하여 실험군인 G군과 C군에 0.5 mL/kg (CCl_4 0.4 mg/kg)의 용량으로 1회 복강투여 하였다. 정상 대조군인 N군에는 동량의 올리브 오일을 복강 투여하였다.

시료수집 및 전처리

실험동물은 사염화탄소 투여 후 18시간 절식시켜 최종 체중을 측정 후 diethyl ether로 가볍게 마취하고 해파린 처리한 주사기를 이용하여 심장에서 채혈하였다. 채혈 후 일부 전혈은 alkaline comet assay에 사용하였고, 나머지 혈액은 혈장과 혈구를 분리하여 혈장은 -20°C 에서 냉동 보관하였다가 혈장 성분 분석에 사용하였다. 혈구는 동량의 phosphate buffered solution (PBS, pH 7.4)로 3회 세척 후 다시 동량의 PBS를 넣어 RBC 현탁액을 제조하였고 과산화지질과 항산화 효소 활성 측정시까지 -70°C 에 보관하였다. 채혈 후 간, 신장, 비장 등의 장기를 떼어 차가운 생리식염수에 세척하고 혈액과 지방을 제거한 뒤 무게를 측정하였다. 간은 일부를 세절한 후 조직 무게의 9배의 0.1% sodium phosphate buffer (pH 7.4), 0.1 mM EDTA를 넣고 얼음 내에서 6,000 rpm으로 균질화하였다. 균질액을 $600 \times g$ 에서 10분간 원심 분리하여 얻은 상층액의 일부는 TBARS 및 단백질 정량에 사용하였고, 나머지 시료는 항산화효소의 측정에 사용하고자 소분하여 질소충전 후 급속냉동 (-70°C)하였다.

산양삼 추출물의 DPPH와 총항산화능

산양삼 추출물의 항산화력 측정을 위하여 먼저 DPPH에 의하여 발생한 radical의 제거능을 측정하였으며¹⁵⁾ 산양삼의 에탄올 추출물을 메탄올로 20배 희석하여 24시간 재추출한 용액을 시료로 사용하였다. 이 시료용액 1 mL와 0.2 mM DPPH용액 동량을 혼합하여 발색정도를 분광광도계 (Ultrospec 4,300 pro uv/visible spectrophotometer, Pharmacia, Sweden)를 이용하여 517 nm에서 측정하였다. 양성대조군으로 BHT와 아스코르브산을 사용하여 같은 방법으로 항산화 효과를 측정하여 비교분석하였으며 수소공여능은 계산식, $[1 - (\text{시료첨가구의 흡광도} / \text{무첨가구의 흡광도})] \times 100$ 에 의하여 산출하였다. 또한 아스코르브산과 산양삼 추출물의 농도에 따른 DPPH 라디칼 소거능을 측정하여 IC₅₀값을 산출하였다. IC₅₀값은 DPPH radicals의 50%를 소거하는 시료의 농도이다.

또한 산양삼 추출물의 총항산화능을 측정을 위하여 ABTS radical 소거활성을 측정하였다. McCusker와 Fitzgerald의 방법¹⁶⁾에 기초하여 ABTS radical 생성을 억제하는 정도를 측정하는 원리에 의하여 제조된 RADOX사의 kit 시약으로 산양삼 추출물을 처리한 후 분광광도계 (Ultrospec 4,300 pro uv/visible spectrophotometer, Pharmacia, Sweden)를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성대조군으로는 BHT와 아스코르브산을 사용하여 비교 분석하였다.

혈장 GPT 활성, 혈장 지질 및 혈당

혈장의 총 콜레스테롤 (total cholesterol; TC), 트리글리세리드 (triglyceride; TG), 공복식 혈당, glutamate pyruvate transaminase (GPT)는 kit 시약 (Stanbio Laboratory Inc., USA)을 사용하여 혈액 자동분석기 (ARCO, Biotechnical사, Italy)에서 측정하였다.

적혈구 및 간조직의 항산화 효소 활성

조직의 항산화 활성은 SOD와 GPx를 측정하였다. 조직의 SOD 활성은 McCord와 Fridovich¹⁷⁾의 방법으로 측정하였으며 이 방법은 xanthine/xanthine oxidase system에 의해 생성된 superoxide를 제거하는 시료의 SOD활성을 cytochrome C로 측정하는 원리이다. SOD 활성을 측정 한 조직은 적혈구와 간조직으로 적혈구내의 SOD 활성도는 적혈구 현탁액을 증류수로 10배 희석한 시료를 사용하여 측정하였으며 간조직의 SOD활성도는 간 균질 상등액에 0.4 배의 에탄올 : 클로로포름 혼합액 (5 : 3)을 넣어 혼합한 후 $15,000 \times g$, 4°C 에서 30분간 원심 분리하여 얻은 상층액을 시료로 사용하였다. 적혈구의 SOD 활성도는 헤모글로빈 단

위중량당 (mg) 당, 간조직의 SOD 활성도는 조직 단백질 단위중량 (mg)당 cytochrome C 환원속도를 50% 억제하는 효소 활성을 1 unit로 표시하였다.

조직의 GPx 활성은 시료내 GPx에 의하여 Cummen-OOH가 Cummen-OH로 환원되는 정도를 NADPH의 감소 비율로부터 간접적으로 측정하는 방법¹⁸⁾을 사용하여 측정하였다. 적혈구 현탁액은 PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1 mM Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.4)로 10 배 희석하여 효소활성 측정에 사용하였고, 간균질액은 15,000 × g에서 30분간 원심분리하여 상층액을 시료로 사용하였다. GPx 효소활성 1 unit는 적혈구에서는 헤모글로빈 1 mg 당, 간 조직에서는 단백질 1 mg 당, 1분 동안 산화되는 NADPH의 μmol 수로 표시하였다. 적혈구의 헤모글로빈 함량 측정은 동량의 증류수로 용혈시킨 적혈구에 대하여 아산제약의 kit 시약을 사용하여 540 nm에서 비색 정량하였다. 간 조직의 단백질 함량은 Bradford 방법¹⁹⁾에 따라 제조된 Bio-Rad사의 단백질 측정용 kit시약 (Commassie brilliant blue G-250, Bio-Rad, USA)을 사용하여 발색시키고 595 nm에서 분광광도계 (Ultrospec 4,300 pro uv/visible spectrophotometer, Pharmacia, Sweden)를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 간조직의 균질액은 상층액을 취하여 35배 희석하여 실험에 사용하였다.

적혈구 및 간의 지질과산화

적혈구의 과산화지질의 측정은 thiobarbituric acid를 이용한 Sinnbuber와 Yu²⁰⁾의 방법과 Lee²¹⁾의 방법을 이용하여 측정하였다. 적혈구 현탁액을 PBS (pH 7.4)로 20배 희석하여 200 μL 를 취한 후 17.5% trichloroacetic acid (TCA) 200 μL 와 0.6% thiobarbituric acid (TBA, in double-DW, pH 2.0) 200 μL 을 첨가하여 혼합한 후 15분간 진탕 가열한 후 급속 냉각하였다. 여기에 79% TCA 200 μL 를 첨가하여 20분간 상온에서 방치한 후 3,000 × g에서 10분간 원심 분리한 후 상층액에서 MDA-TBA 결합체의 흡광도를 534 nm에서 측정하였다. 시료의 MDA 함량은 회귀방정식으로 산출한 표준 1,1,3,3-tetramethoxy propane의 직선 방정식에 대입하여 지질과산화물 농도를 구하였다. 간조직의 지질과산화는 Ohkawa 등²²⁾의 방법을 이용하여 측정하였다. 측정방법은 조직 균질액 200 μL 에 8.1% SDS 200 μL 와 400 μL 의 20% acetic acid를 혼합한 후 200 μL 의 0.8%의 TBA를 넣고 100°C로 맞춘 항온수조에서 30분간 가열하고 냉각하였다. 간조직의 경우 지방층을 제거하기 위하여 N-butanol: pyridine의 혼합액(15 : 1) 300 μL 를 넣었다.

30초간 격렬히 혼합한 후에 2,500 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 532nm에서 흡광도를 측정하였다. 1,1,1,3-tetraethoxypropane을 표준용액으로 사용하였고 지질과산화물은 MDA nmol로 표기하였다.

혈액 백혈구의 DNA fragmentation 측정

혈액 백혈구의 DNA fragmentation을 측정하기 위하여 선행연구²³⁾에서 기술한 방법대로 alkaline comet assay를 실시하였다. 세포핵의 이미지는 Komet 5.5 image analyzing system (Andor, UK)을 이용하여 분석하였다. DNA 손상정도는 핵으로부터 이동한 DNA편의 거리 (tail length, TL)와 tail 내의 DNA 파편 함량 (%), 그리고 tail 길이와 tail내 DNA 파편 (fragment)의 곱으로 표시한 tail moment (TM)로 나타내었다. 각 시료마다 준비된 2개의 slide에서 각각 50개씩 총 100개의 세포핵을 무작위로 선택하여 측정하였다.

통계처리

실험결과는 SPSS/Windows 12.0을 이용하여 통계 처리하였고, 평균 \pm 표준편차를 구하였다. 세 군 간의 평균값의 차이를 검증하기 위하여 일원배치 분산분석 (one-way ANOVA)을 한 후, Duncan's multiple range test로 변인 간의 차이를 검증하였다. 모든 통계적인 유의성은 $\alpha = 0.05$ 수준에서 실시하였다.

결 과

산양삼 추출물의 총항산화능

산양삼의 DPPH radical 소거 효과가 있는지의 여부를 관찰하기 위하여 인공 항산화제인 BHT 및 천연항산화제인 아스코르브산과의 수소 공여능을 비교 분석하였다. Table 1에서와 같이 산양삼의 수소 공여능은 $76.85 \pm 1.06\%$ 로 BHT ($95.40 \pm 0.71\%$)와 아스코르브산 ($96.45 \pm 0.07\%$)보다는 낮았지만 천연물질로써는 높은 수준을 보였다. IC₅₀값을

Table 1. Electron donating ability and the half maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of the ethanol extract from wild simulated ginseng (WSG)

Sample	EDA (Electron donating ability, %)	IC ₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)
Ascorbic acid	$96.45 \pm 0.07^{1)2)}$	16.5
BHT	95.40 ± 0.71^b	—
WSG ³⁾	76.85 ± 1.06^a	33.3
p-value	0.000	

¹⁾All values are mean \pm SD of triplicate determinations

²⁾Different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

³⁾Wild simulated ginseng

비교하여보면 아스코르브산은 16.5 $\mu\text{g/mL}$, 산양삼은 33.3 $\mu\text{g/mL}$ 로 산양삼은 아스코르브산의 약 50%의 수준에 있었다. 또한 Table 2에 제시한 바와 같이 산양삼은 $2.13 \pm 0.06 \text{ mmol/mg}$, 아스코르브산은 $3.63 \pm 0.06 \text{ mmol/mg}$, BHT는 $3.12 \pm 0.02 \text{ mmol/mg}$ 로서 산양삼의 총항산화능은 아스코르브산과 BHT의 각각 58.68%와 68.27% 수준이었다.

체중 및 장기 무게, 간조직의 단백질 함량

희생 시 체중과 장기무게 및 간조직의 단백질 함량은 Table 3과 같다. 산양삼 추출물을 투여하는 동안 체중은 모든 군에서 복강투여의 스트레스로 인해 감소하는 경향을 보였으나 각 군 간에 통계적인 유의성은 없었다. 장기의 무게는 모든 군 간에 유의적인 차이는 없었으나 체중대비 간과 신장의 무게는 사염화탄소 단독투여군 (C)이 가장 높은 경향을 보였으며 다음으로 산양삼 추출물 투여군 (G), 정상

대조군 (N)의 순이었다. 비장의 무게는 세군 간에 유의적인 차이가 없었다. 사염화탄소를 투여한 두 실험군 (C와 G군)에서 간조직의 단백질 함량은 정상대조군에 비해 유의적으로 감소되었으며 산양삼 추출물의 투여에 의한 변화는 없었다.

혈장 지질, 공복 혈당, GPT 활성

혈장 성분에 대한 분석 결과는 Table 4에 나타내었다. 혈장 총콜레스테롤 농도는 사염화탄소단독투여군 ($84.5 \pm 23.0 \text{ mg/dL}$)이 정상 대조군 ($140.6 \pm 30.3 \text{ mg/dL}$)에 비하여 66.4% 감소하였으며 산양삼 추출물 투여군 (G)의 총 콜레스테롤 치는 C군에 비해 유의하게 증가하여 정상대조군 (N)에 가까운 수치를 보여주었다. 혈장 트리글리세리드 농도는 사염화탄소단독투여군 (C)이 정상대조군 (N)에 비하여 유의하게 감소하였으나 산양삼 추출물 투여에 의한 차이는 볼 수 없었다. 공복시 혈당은 C군과 G군 모두 N군에 비하여 유의하게 낮았으며 산양삼 추출물의 효과는 확인할 수 없었다. 혈장의 GPT 활성의 경우 정상대조군 (N)의 수치에 비해 사염화탄소투여군 (C)에서 GPT의 수치가 유의하게 낮았으며 산양삼 추출물 투여군 (G)에서는 C군과 큰 차이가 없었다.

Table 2. Total antioxidant capacity (TAC) of WSG

Sample	TAC (mmol/mg)
Ascorbic acid	$3.63 \pm 0.06^{1(c2)}$
BHT	3.12 ± 0.02^b
WSG	2.13 ± 0.06^a
p-value	0.000

¹⁾All values are mean \pm SD of triplicate determinations

²⁾Different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

적혈구와 간조직에서의 지질과산화와 항산화 효소 활성

적혈구와 간조직의 지질과산화와 항산화 효소 활성 분석 결과는 Table 5와 같다. 사염화탄소 투여군 (C)의 간조직

Table 3. Body and organ weights and hepatic protein level of mouse injected with CCl₄ after intraperitoneally administration with wild simulated ginseng extract

Group ¹⁾	BW (g)	Organ weight (g/100 g BW)			Hepatic protein (mg/mL)
		Liver	Kidney	Spleen	
N	$33.35 \pm 3.6^{2)}$	3.84 ± 0.29	1.39 ± 0.08	0.28 ± 0.04	$110.05 \pm 13.17^{2)b3)}$
C	33.20 ± 2.9	4.25 ± 0.56	1.55 ± 0.15	0.27 ± 0.05	74.87 ± 10.16^a
G	33.38 ± 3.0	4.06 ± 0.15	$1.45. \pm 0.06$	0.32 ± 0.04	75.37 ± 11.08^a
p-value	0.117	0.115	0.303	0.310	0.000

¹⁾N: Normal group intraperitoneally (i.p.) injected with PBS at 100 μL /mouse

C: Hepatic injury induced group injected with CCl₄ and without any treatment (i.p. injected with only 100 μL phosphate buffer per mouse)

G: Group i.p. administered with WSG (5 mg extract of wild simulated ginseng per mouse) before injection of CCl₄

²⁾All values are mean \pm SD (n = 8)

³⁾Different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

Table 4. Effect of wild simulated ginseng extract on blood triglyceride, total cholesterol, fasting glucose and activity of GPT in mouse injected with CCl₄ after i.p. administration with wild simulated ginseng extract

Group	Total-cholesterol (mg/dL)	Triglyceride (mg/dL)	Fasting glucose (mg/dL)	GPT (U/L)
N	$140.63 \pm 30.25^{1)b2)}$	84.08 ± 42.52^b	272.50 ± 62.17^b	29.41 ± 13.08^b
C	84.53 ± 23.03^a	38.61 ± 13.23^a	171.86 ± 61.77^a	7.86 ± 2.27^a
G	130.68 ± 31.33^b	45.98 ± 18.70^a	167.83 ± 10.07^a	10.59 ± 4.71^a
p-value	0.001	0.006	0.000	0.000

¹⁾All values are mean \pm SD (n = 8).

²⁾Different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test

Table 5. Effect of wild simulated ginseng extract on lipid peroxidation and activities of superoxide dismutase and GPx in RBC and liver of mouse injected with CCl₄

Group	TBARS		SOD activities		GPx activities	
	RBC (nmol/ml Hb)	Liver (nmol/mg protein)	RBC (unit/mg Hb)	Liver (unit/mg protein)	RBC (Unit/mg Hb)	Liver (Unit/mg protein)
N	3.27 ± 0.31 ¹⁾	9.83 ± 1.50 ^{a2)}	1.08 ± 0.33	0.135 ± 0.016 ^a	3.98 ± 0.52 ^a	3.39 ± 0.84
C	2.91 ± 0.68	12.64 ± 1.45 ^b	0.92 ± 0.26	0.134 ± 0.037 ^a	3.14 ± 0.65 ^b	2.76 ± 0.93
G	2.99 ± 0.55	9.88 ± 1.06 ^a	0.97 ± 0.18	0.189 ± 0.047 ^b	3.98 ± 0.59 ^a	3.83 ± 0.96
p-value	0.473	0.000	0.482	0.008	0.009	0.073

¹⁾All values are mean ± SD (n = 8)

²⁾Different superscripts are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple range test

에서 TBARS는 28.64% 증가하였으나 산양삼 추출물을 투여한 군에서는 정상대조군 (N)과 차이가 없었다 (p < 0.01). 적혈구내의 TBARS는 세 군간에 유의한 차이가 없었다. 사염화탄소 투여시 간의 SOD 활성은 정상 대조군과 차이가 없었으나 산양삼 추출물 투여군에서 유의하게 증가하였다. 그러나 적혈구내의 SOD 활성도는 각 군간의 유의적인 차이를 보이지 않았다. 적혈구내의 GPx 활성도는 정상대조군에 비하여 사염화탄소 단독투여군 (C)에서 20.1% 감소하였으며 산양삼 추출액 투여군 (G)은 정상대조군과 같은 수준을 보여 주었다 (p < 0.01). 간 조직의 GPx 활성은 적혈구에서와 비슷한 경향을 보여주었으나 (p = 0.073) 각 군의 평균값 간의 유의한 차이를 볼 수는 없었다.

산화적 스트레스에 의한 DNA 손상정도

사염화탄소 단독 처치군 (C)에서 혈장 백혈구의 tail DNA, tail length, tail moment 모든 값은 정상대조군 (N)에 비하여 유의적으로 증가하였고, 산양삼 투여군 (G)에서는 모든 수치가 유의적으로 감소하였다. 즉, tail DNA 함량은 C군 (20.11 ± 2.47%)이 N군 (11.45 ± 2.44%)에 비해서 84.4% 증가하였으며, G군 (9.63 ± 1.19%)에서는 유의하게 감소하였다. Tail length의 경우 N군 (42.3 ± 17.1 μm)에 비해 C군 (94.1 ± 12.3 μm)에서 98.8% 유의적으로 증가하였으며, G군 (38.6 ± 7.6 μm)은 N군과 차이가 없었다. Tail DNA와 tail length의 곱으로 표시되는 tail moment의 값은 C군 (17.4 ± 2.6)이 N군 (7.8 ± 2.7)에 비해 123.7% 유의하게 증가하였으며, G군 (7.1 ± 1.5)은 N군과 차이가 없었다 (Table 6).

고 찰

본 연구는 산양삼 추출물이 사염화탄소를 투여한 mouse의 간기능에 대한 보호효과가 있는지 알아보고자 수행하였다. 본 연구에서는 우선 시료로 사용한 산양삼 추출물의 항산화능을 측정하기 위하여 in vitro와 in vivo 실험을 수행

Table 6. Protective effect of wild simulated ginseng extract on CCl₄-induced DNA damage in blood leucocytes of mouse

Group	Tail-DNA (%)	Tail length (μm)	Tail moment
N	11.45 ± 2.44 ^{1)a}	42.27 ± 17.14 ^{a2)}	7.81 ± 2.68 ^a
C	20.11 ± 2.47 ^b	94.11 ± 12.29 ^b	17.36 ± 2.58 ^b
G	9.63 ± 1.19 ^a	38.64 ± 7.60 ^a	7.05 ± 1.50 ^a
p-value	0.000	0.000	0.000

¹⁾All values are mean ± SD (n = 8)

²⁾Different superscripts are significantly different at p < 0.05 by Duncan's multiple range test

하였다. 전자공여능과 ABTS radicals을 사용한 총 항산화능 측정 결과, 양성대조군으로 사용하였던 아스코르브산과 BHT에 비하여 크게 떨어지지 않는 수치를 보였으며 이는 장의 실험¹²⁾에서 산양삼추출물이 16.7 mg/mL 농도에서 최고 전자공여능 86.7%의 활성을 보인 것과 Suh²⁴⁾가 국내 산 인삼과 장뇌삼의 생리활성을 측정한 연구에서 최대 67%의 전자공여능을 보인 인삼에 비해서도 높은 수준이며 단일 물질인 BHT와 아스코르브산의 DPPH 소거능의 80%에 해당하는 수준으로 우수한 항산화능을 보이는 것을 알 수 있었다. 또한 산삼, 산양삼 및 인삼추출물의 총항산화능을 비교한 장의 연구¹²⁾에서 산양삼의 총 항산화능이 가장 높게 나타났듯이 산양삼은 천연삼에 비하여 떨어지지 않는 항산화능을 가지고 있는 것으로 사료된다. 이러한 삼들의 항산화능은 삼 추출물 내에 존재하는 진세노사이드와 폴리페놀 화합물로부터 비롯된다는 연구 보고들이 있으나 인삼에서 분리한 순수한 사포닌에 대해서는 항산화 효과가 미약한 것으로 나타난²⁵⁾ 반면, 각종 페놀산의 항산화 효능에 대한 연구 보고는 다수 발표되어있다. 백삼의 10여개 이상의 페놀 성분을 대상으로 in vitro 연구를 진행하였을 때 항산화능이 강한 것으로 알려진 성분은 ferulic acid, coumaric acid, caffeic acid 등^{26,27)}으로 보고되어있으나 생체에 투여하여 성분별로 항산화능을 비교 검토한 연구는 아직 진행되어있지 않다.

Mouse에 사염화탄소를 장기간 투여했을 경우, 체중의 감소에도 불구하고 간의 중량은 큰 폭으로 증가되는 것으로

알려져 있다. 이는 간 세포막 손상으로 투과성이 증가하여 부종이 일어나고 지방변성이 일어나 간에 지질성분 및 수분이 대량 축적됨으로써 간장이 비대해지기 때문으로 보고²⁸⁾ 되고 있다. 본 연구에서는 사염화탄소 투여 후 18시간 경과된 다음에 희생하였으므로, 반복 혹은 장기투여의 경우와 같이 뚜렷한 간 비대 증세는 보이지 않았으나 간의 중량이 증가하기 시작하여 간 부종 현상의 초기 증세로 사료된다. 또한 간조직의 단백질 함량 저하 결과는 사염화탄소가 간 세포막 손상을 일으키고 단백질 합성을 억제하여 간조직중의 총단백의 양이 감소된다는 보고²⁹⁾와 일치한다. 사염화탄소는 RNA의 methylation을 감소시켜 단백질 합성을 저해하는 것으로 알려져 있다.³⁰⁾ 그러나 본 연구에서 산양삼 추출물의 투여는 이러한 사염화탄소의 독성에 대하여 간조직을 보호하는 효과를 보이지 않았는데 그 이유는 산양삼 추출물이 항산화능을 갖기는 하지만 단백질 합성을 감소시키는 CCl₄의 급성 독성 기전에 대한 차단 효과까지는 보이지 않는 것으로 생각된다. 또한 간 단백질 농도를 감소시켰으나 지방의 축적이 시작됨으로서 최종 간의 무게는 차이를 보이지 않은 것으로 사료된다.

본 연구 결과 혈청 지질 수준이 감소한 것은 사염화탄소의 독성에 의한 간 조직의 손상으로 인하여 지질대사 이상을 초래한 때문으로 볼 수 있다. Honma와 Suda의 보고²⁸⁾에 의하면 사염화탄소 투여 8시간 이후부터 간 조직 내 트리글리세리드와 콜레스테롤이 증가하는 반면 혈중 농도는 감소한다고 하였다. Paik³¹⁾은 대두 (Glycine max (L.))의 조사포닌에 대한 효과를 시험한 연구에서 사염화탄소 단독투여군 (C)에서는 혈중 총 콜레스테롤치가 유의적으로 낮아졌으며 조사포닌의 투여는 콜레스테롤치를 개선시키는 경향을 보여 주었다. 사염화탄소에 의한 간지질과 혈중지질의 농도에 대한 연구 보고는 아직도 상반된 결과들이 보고되고 있는데 김 등의 연구³²⁾에서는 흰쥐에 3일 간격으로 2주간 사염화탄소 투여하였을 때 간의 콜레스테롤이 증가하고 혈중 콜레스테롤과 트리글리세리드가 증가함을 보고하였으며 이 등³³⁾은 사염화탄소의 투여로 인해 혈청지질이 감소하였으며 감소율은 저단백식이에 비하여 고단백식이 시 더 높다고 하여 체내 단백질의 수준에 따른 차이도 보고하였다. 이와 같이 사염화탄소의 독성은 투여량, 노출시간, 동물의 주령 등에 따라 다르게 나타나고 회복능도 다르게 나타나는 것으로 보고되고 있어³⁰⁾ 여러 연구의 결과들을 쉽게 비교할 수 없는 제한점을 안고 있다.

간에서의 당대사 역시 사염화탄소의 투여로 인하여 감소하였으나 산양삼 추출물에 의한 차이는 볼 수 없었다. 즉, 사염화탄소에 의한 간 실질 조직의 손상에 대하여 5일간의

산양삼 추출물 투여에 의한 보호효과는 간의 콜레스테롤 대사에서만 확인할 수 있었는데 다른 지표에서 일관성있는 차이를 보이지는 않은 이유는 산양삼 투여기간이 짧았기 때문으로 볼 수 있다.

과산화지질량은 세포 내 산화적 스트레스의 증가, 즉 자유기 생성의 증가 및 항산화적 방어력의 감소로 인하여 증가되는데 이 반응은 여러 가지 독성 화합물이나 약물에 의한 간 손상 발생의 가장 중요한 기전의 하나로 인정되고 있다. 본 연구 결과 사염화탄소를 투여한 생쥐의 간 조직에서 산양삼 추출물이 자유기 생성을 억제하거나 소거하여 간손상에 대해 특이적인 보호효과가 있는 것을 확인할 수 있었다. 이는 산양삼 추출물 자체의 항산화 성분이나 간 조직의 산화적 손상을 방어하는 항산화기전이 활성화되어 과산화지질 생성이 감소된 것으로 생각된다. Kim³⁴⁾은 생쥐에 백삼, 발효홍삼, 홍삼을 각각 100 mg/kg/day의 용량으로 14일간 경구투여 한 후 사염화탄소를 투여하여 간손상을 유도하였을 때 홍삼 추출물 투여가 사염화탄소로 인한 MDA 증가를 억제할 수 있었다고 하여 본 연구와 비슷한 결과를 보고하고 있었다. 또한 당뇨병으로 고혈당을 보이는 쥐에게 산삼 잎 추출물의 투여 시 산삼 잎에 함유되어있는 페놀 화합물에 의하여 TBARS 수준이 낮아졌다는 연구³⁵⁾와 금속이온에 의하여 유도된 지질 과산화에 대하여 인삼 추출물이 강한 산화억제 효능을 보였다는 연구³⁶⁾ 등은 모두 본 연구결과와 일치한다. 그러나 적혈구내의 TBARS에는 유의한 차이가 보이지 않았는데, 이는 급성 간 손상을 유도한 결과, 적혈구에서까지 유의한 변화를 보기에는 처치 시간이 짧았기 때문으로 사료된다.

자유기에 노출되었을 때 생체는 자신을 스스로 보호할 수 있는 기능을 가지고 있는데, 그 방어기전은 활성 산소의 발생을 억제하는 기능과 생성된 활성 산소들을 제거하는 기능, 두 가지가 있다. Catalase나 GPx는 지질 과산화이나 과산화수소를 분해시킴으로써 지질과산화를 유도하는 활성 산소의 생성을 억제시키는³⁷⁾ 반면, SOD는 세포내에 생성된 자유기인 superoxide anion radical을 과산화수소로 전환시킴으로써 간세포의 손상으로부터 스스로를 보호하고 있으며¹⁷⁾ 이 효소들의 활성도를 측정함으로써 생체의 항산화능을 평가할 수 있는 것으로 보고되어 있다. 본 연구에서는 기전을 달리하는 두 가지 항산화 효소, SOD와 GPx의 활성을 간세포와 적혈구에서 측정하여 비교 분석하였다. SOD 활성은 적혈구에서는 변화를 보이지 않았으나 사염화탄소를 처치한 간세포에 비하여 산양삼 투여군에서 효소활성이 유의하게 높았으며, GPx활성은 사염화탄소 투여군 (C)의 적혈구에서 효소활성이 감소한 반면 산양삼 투여군에서는 정

상대조군 수준으로 유지되고 있었고 이러한 효과는 통계적인 유의성이 없었으나 간세포에서도 비슷한 경향을 보여주었다. 두 효소의 활성이 적혈구와 간세포에서 모두 일관된 결과를 보여주지는 않았으므로 이 연구 결과를 토대로 산양삼 추출액의 농도나 투여 기간 등을 달리하는 보다 폭넓은 연구가 필요로 된다. 간조직의 TBARS 농도와 SOD 활성에 대한 본 연구 결과는 paraquat으로 급성 간독성을 유발 시킨 후 홍삼 추출물을 투여한 쥐의 간 조직내의 SOD와 catalase의 활성을 조사한 결과 홍삼 추출물이 항산화 효소의 활성을 촉진시켜 생체내의 활성산소의 함량이 유의하게 감소하였다는 연구보고³⁸⁾와 유사한 결과라 볼 수 있다. 그러나 SOD 활성을 증진시킬 수 있는 능력이 인삼추출물의 diol계 사포닌에서 월등히 높기 나타났다는 보고³⁹⁾를 고려해볼 때, SOD의 활성이 산양삼의 사포닌 성분들에 의한 효과인지는 검증되어야 할 문제로 남아있다.

DNA 손상은 산화적 스트레스를 평가하는 가장 민감한 생물지표중 하나로 이를 감지하는 정확하고 민감한 형광현미경 방법인 DNA fragmentation assay는 시험물질의 유전독성을 평가하기 위해 광범위하게 이용되고 있다.⁴⁰⁾ 이 방법의 이론은 입자의 분자량에 따라 그 이동속도가 반비례되는 전기영동의 원리에 기초하고 있다. 즉 산화적 손상을 입은 세포의 DNA를 용해 (lysis)시켜 전기영동을 하게 되면 DNA 분자량의 크기가 작을수록 핵으로부터 멀리 이동되므로 손상되어 잘려진 DNA 가닥이 많을수록 혜성 꼬리처럼 긴 모양이 생긴다. 본 연구실의 선행연구⁴¹⁾에서 방사선 조사 식품의 산화적 스트레스 측정 시 생쥐의 혈장 백혈구, 간, 신장, 장의 면역기구인 Peyer's Patch 중 혈장 백혈구에서 DNA 손상이 가장 예민하게 감지되었으므로 본 실험에서도 혈장 백혈구에서 alkaline comet assay를 실시하였다. 위의 결과를 볼 때 5일 정도 복강투여한 산양삼 추출물은 사염화탄소와 같은 유독물질의 투여 시에도 간세포를 보호할 수 있는 특이적인 효과가 있음을 확인할 수 있었다. H₂O₂와 FeCl₂로 유도한 자유기에 의한 세균의 DNA 손상에 대해 홍삼 추출물이 DNA strand break를 억제하였다는 연구결과⁴²⁾와 유사한 결과로 볼 수 있다. 또한 관련된 연구로 운동을 통한 훈련과 인삼의 투여가 운동에 의한 스트레스에 대하여 DNA 손상을 감소시킬 수 있다는 연구 보고⁴³⁾가 있었으나 순수하게 삼 추출물의 투여에 의한 효과만을 검토한 것이 아니므로 본 연구 결과와 비교하기에 제한이 있다. DNA strand break를 생체지표로 하여 생체에 주어진 유해한 스트레스를 감지하는 기술은 위해요인이나 이에 대한 예방 및 치료 효과를 민감하게 감지할 수 있는 실험 기술로서 주로 산화적 스트레스에 대한 생리활성

을 검증하거나 식품의 위해요인을 감지하는 연구에 이용되어져 왔다. 그러나 인삼이나 산삼의 항산화능과 관련하여 이 실험기술을 활용한 연구는 거의 찾아볼 수 없었다.

이상과 같이 사염화탄소 투여 전 5일간 산양삼 에탄올 추출물 투여는 사염화탄소에 의한 급성 간 손상으로부터 mouse의 지질 대사를 유지하거나 개선시키고, 지질 과산화를 효과적으로 억제함으로써, 간에서 항산화 효소의 활성을 촉매하여 생체 내에서 생성되는 활성산소를 효율적으로 소거하는 소거제로서의 역할 뿐 아니라, 산화적 손상으로부터 DNA를 보호하는 등의 생리활성이 확인되었다. 그러나 이런 산양삼의 항산화 활성성분 및 그 기전에 대하여 현재까지 확실히 규명되어 있지 않아 후후 보다 세부적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

요 약

본 연구에서는 총항산화능 및 DPPH radicals 소거활성을 통하여 항산화능을 확인한 산양삼 에탄올 추출물이 사염화탄소 투여로 급성 손상이 유도된 생쥐의 간에 대하여 보호 효능이 있는지를 확인하고자 하였다. 생리적 지표물질로 혈장 지질, GPT 활성, 혈장과 간의 TBARS 및 항산화효소 활성, 혈액 백혈구의 DNA fragmentation 등을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다. 산양삼의 DPPH radicals 소거능은 $76.85 \pm 1.06\%$, IC₅₀은 $33.3 \mu\text{g/mL}$ 였으며 총항산화능은 $2.13 \pm 0.06 \text{ mmol/mg}$ 으로 양성대조군으로 사용한 아스코르브산 ($96.45 \pm 0.07\%$, IC₅₀ = $16.5 \mu\text{g/mL}$, $3.63 \pm 0.06 \text{ mmol/mg}$)과 BHT ($95.40 \pm 0.71\%$, $3.12 \pm 0.02 \text{ mmol/mg}$) 보다는 낮았지만 천연물질로서는 높은 수준을 보였다. 장기 무게 및 식이 섭취량은 산양삼 추출물 투여 및 사염화탄소 처치 여부에 따라서 어떤 차이도 보이지 않았다. 혈장의 GPT와 혈중 트리글리세리드의 경우 정상대조군에 비해 사염화탄소단독투여군에서 유의하게 낮았으며, 산양삼 추출물 투여군에서는 큰 차이를 보이지 않았다. 혈청 총콜레스테롤 농도는 사염화탄소단독투여군 ($84.5 \pm 23.0 \text{ mg/dL}$)이 정상 대조군 ($140.6 \pm 30.3 \text{ mg/dL}$)에 비하여 유의하게 감소하였으며, 산양삼 추출물 투여군 ($130.68 \pm 31.33 \text{ mg/dL}$)은 정상대조군과 같은 수준이었다 ($p < 0.001$). 사염화탄소 단독투여군의 간 조직에서 TBARS는 정상대조군 (N)에 비해 28.64% 유의하게 증가하였으며 산양삼 추출물 투여군은 정상대조군과 비슷한 수치를 보였으나 ($p < 0.001$) 적혈구내의 TBARS는 세 군간의 유의한 차이가 없었다. 간조직의 SOD의 활성은 산양삼 추출물 투여군에서 유의하게 증가하였으며, 적

혈구에서는 이러한 차이를 보이지 않았다. 그리고 적혈구내 GPx 활성은 사염화탄소 투여에 의해 20.1% 유의한 감소를 보였으며, 산양삼 추출액을 투여받은 군은 정상대조군의 수준을 유지하였다. 사염화탄소 투여군에서 혈장 백혈구의 tail DNA, tail length, tail moment 모든 값은 정상대조군에 비하여 각각 84.4%, 98.8%, 123.7% 증가하였으며, 산양삼 투여군에서는 이 모든 수치가 대조군의 수준으로 감소하였다 ($p < 0.001$). 이상의 결과를 종합해 보면 5일간 산양삼 에탄올 추출물을 미리 투여한 후 사염화탄소로 급성 간 손상을 유도하였을 때 혈 중 콜레스테롤 대사를 개선하고, 간의 지질 과산화를 효과적으로 억제하였으며 간의 SOD와 적혈구 GPx의 효소 활성을 대조군 이상으로 유지시키고, 산화적 손상으로부터 DNA를 보호하는 등의 일부 생리 활성을 확인하였다. 그러나 이런 산양삼의 항산화 활성의 작용 기전에 대하여 확실히 규명되어 있지 않아 추후 보다 세부적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

Literature cited

- 1) Kim SJ, Shin SS, Seo BI, Ji SY. Effect of Mountain Grown Ginseng Radix, Mountain Cultivated Ginseng Radix, and Cultivated Ginseng Radix on apoptosis of HL-60 cells. *Kor J Herbology* 2004; 19(2): 41-50
- 2) Hong MH, Lim HK, Park J, Jun NJ, Lee YJ, Cho M, Cho SK. The antihypertensive and vasodilating effects of adventitious root extracts of wild ginseng. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 2008; 51(2): 102-107
- 3) Kim JH, Kim JK. Antioxidant Activity and Functional Component Analysis of Korean Mountain Ginseng's Different Sections. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2006; 35(10): 1315-1321
- 4) Kwon KR, Cho AL, Lee SG. The study on acute and subacute toxicity and anti-cancer effects of cultivated wild ginseng herbal acupuncture. *J Kor Inst Herb Acupunc* 2003; 6(2): 7-27
- 5) Yun SN, Moon SJ, Ko SK, Im BO, Chung SH. Wild ginseng prevents the on set of high-fat diet induced hyperglycemia and obesity in ICR mice. *Arch Pharm Res* 2004; 27(7): 790-796
- 6) Kim YJ. Protective effects of cultivated ginseng, cultivated wild ginseng of Korean and Chinese against CC14 and t-BHP acute hepatotoxicity in ICR Mice [Master's thesis]. Wonju: Sangji University; 2007
- 7) Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidant in normal physiological functions and human disease. *Intern J Cell Biol* 2007; 39: 44-84
- 8) Fridorich I. Biological effects of the superoxide radical. *Arch Bio-phys* 1986; 247: 1-11
- 9) Han BH, Park MH, Han YN. Studies on the antioxidant components of Korean Ginseng (V): The mechanism of antioxidant activity of maltol and phenolic acid. *Korean Biochem J* 1985; 18: 337-340
- 10) Lee SE, Lee SW, Bang JK, Yu YJ, Seong NS. Antioxidant Acti-

vities of Leaf, Stem and Root of Panax ginseng C. A. Meyer. *Korean J Medicinal Crop Sci* 2004; 12(3): 237-242

- 11) Choi C, Kim K, Hong H, Choi S, Lee Y, Kim K, Rho J, Kim S, Kim Y. Phenolic acid composition and antioxidative activity of white ginseng. *J Ginseng Res* 2006; 30(1): 22-30
- 12) Jang HY, Park HS, Kwon KR, Rhim TJ. A study on the comparison of antioxidant effects among wild ginseng, cultivated wild ginseng, and cultivated ginseng extracts. *J Kor Inst Herb Acupunc* 2008; 11(3): 67-78
- 13) Alam K, Nagi MN, Bardary OA, Al-Shabanah OA, Al-Rikabi AC, Al-Bekairi AM. The protective action of thymol against carbon tetrachloride hepatotoxicity in mice. *Pharmacol Res* 1999; 40: 159-163
- 14) Reves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the american institute of nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *Am Inst Nutr* 1993; 123: 1939-1951
- 15) Malterud KE, Farbrot TL, Huse AE, Sund RB. Antioxidant and radical scavenging effects of anthraquinones and anthrones. *Pharmacology* 1993; 47: 77-85
- 16) McCusker CA, Fitzgerald SP. Measurement of total antioxidant status in beverages using a rapid automated method. Crumlin: Randox Laboratory Ltd.; 1996
- 17) McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein). *J Biol Chem* 1969; 244: 6049-6055
- 18) Tappel AL. Glutathione peroxidase and hydroperoxidase. *Method Enzymol* 1978; 52: 506-513
- 19) Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254
- 20) Shinniburter RO, Yu TC. Characterization of the red pigment formed in 2-thiobarbituric acid determination of oxidation rancibility. *Food Res* 1958; 23: 620
- 21) Lee EK. Effects of dietary fatty acids and protein sources on lipid metabolism and DMBA induced mammary tumors in rats. [dissertation]. Seoul: Hanyang University; 2000
- 22) Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351-358
- 23) Park SY, Seo DY, Suh KS, Ly SY. Oxidative stress of mouse fed with γ -Irradiated soybean diet. *Korean J Nutr* 2007; 40(2): 138-146
- 24) Suh DS. Establishment of classified system between Korean cultivated wild ginseng and chinese cultivated wild ginseng and studies on its property. Report of Ministry of Agriculture; 2007
- 25) Han BH, Park MH, Man YN, Shin CS. Studies on the antioxidant components of Korean ginseng (IV) Antifatigue active components. *Yakhak Hoeji* 1984; 28: 231-235
- 26) Zhou K, Yin JJ, Yu L. ESR determination of the reaction between selected phenolic acids and free radicals or transition metals. *Food Chem* 2006; 95: 446-457
- 27) Choi CS, Kim KI, Hong HD, Choi SY, Lee YC, Kim KT, Rho JH, Kim SS, Kim YC. Phenolic acid composition and antioxidative activity of white ginseng (Panax ginseng, C. A. Meyer). *J Ginseng Res* 2006; 30(1): 22-30

- 28) Hashimoto H. Studies on metabolic characteristics of cirrhotic rat hepatocytes using primary culture. *Nippon Shokakibyō Gakkai Zasshi* 1990; 87: 1392-1400
- 29) Honma T, Suda M. Changes in plasma lipoproteins as toxicity markers for carbon tetrachloride, chloroform, and dichloromethane. *Ind Health* 1997; 35 (4) : 519-531
- 30) Doull J. Carbon tetrachloride In: Casarett and Doull's editor. Toxicology. New York: Macmillan publishing Co.; 1984. p.472-474
- 31) Weber LW, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol* 2003; 33 (2) : 105-136
- 32) Baik HJ. Antioxidant effects of crude saponin isolated from glycine max (L.) on CCl4-induced acute liver injury model [dissertation]. Seoul: Hanyang University; 2000
- 33) Kim YS, Yoo YS, Han EK, Kang IJ, Chung CK. Artemisia capillaris and paecilomyces japonica stimulate lipid metabolism and reduce hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2008; 37 (5) : 548-554
- 34) Lee HJ, Yoon CG, Lee SI. Effects of dietary protein on the changes of lipoprotein fractions in carbon tetrachloride-treated rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 1993; 22 (2) : 127-131
- 35) Kim DW. Protective effect of fermented red ginseng on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in the liver of mouse. [dissertation]. Gunsan: Gunsan National University; 2007
- 36) Park SN, Choi SW, Boo YC, Kim CK, Lee TY. Effects of flavonoids of ginseng leaves on erythrocyte membranes against singlet oxygen caused damage. *Korean J Ginseng Sci* 1990; 14: 191-199
- 37) Zhang D, Yasuda T, Yu Y, Zheng P, Kawabata T, Ma Y, Okada S. Ginseng extract scavenges hydroxyl radical and protects unsaturated fatty acids from decomposition caused by iron-mediated lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med* 1996; 20: 145-150
- 38) Greenwald RA, Cohen G. Oxygen radicals and their scavenger system. New York: Elsevier Science Publishing Co.; 1983. p.173
- 39) Kim DJ. Effect of red ginseng saponins on antioxidative enzymes and materials in the liver of mice treated with paraquat [dissertation]. Gunsan: Gunsan National University; 2000
- 40) Kim KH, Sung KS, Chang CC. Effects of the antioxidative components to ginsenoside in the liver of 40-week-old mice. *J Ginseng Res* 2000; 24 (4) : 162-167
- 41) Olive PL, Banath JP. Sizing highly fragmented DNA in individual apoptotic cells using the comet assay and a DNA cross-linking agent. *Exp Cell Res* 1995; 221: 19-26
- 42) Seo DY, Park SY, Kang MH, Suh KS, Ly SY. Oxidative stress of mouse fed irradiated diet containing high unsaturated fatty acid. *Korean J Nutr* 2006; 39 (7) : 599-609
- 43) Lim YS. Effect of Phellinus Inteus and red ginseng on the DNA damage by the reactive oxygen species. [Master's thesis]. Chuncheon: Hallym University; 2005
- 44) Hwang HJ, Kwak YS, Yoon GA, Kang MH, Park JH, Lee BK, Kim SJ, Um SY, Kim YM. Combined effects of swim training and ginseng supplementation on exercise performance time, ROS, lymphocyte proliferation, and DNA damage following exhaustive exercise stress. *Int J Vitam Nutr Res* 2007; 77 (4) : 289-296