

고콜레스테롤 식이 섭취 흰쥐에 대한 적송잎 추출물의 항산화 효과

강성림¹ · 신미옥¹ · 김성구² · 이상현³ · 김미향^{1*}

¹신라대학교 식품영양학과

²(주)바이오포트코리아

³신라대학교 생명공학과

Antioxidative Activity of Pine (*Pinus densiflora*) Needle Extracts in Rats Fed High-Cholesterol Diet

Sung Rim Kang¹, Mee-Ok Shin¹, Sung Gu Kim², Sang-Hyeon Lee³, and Mihyang Kim^{1*}

¹Dept. of Food and Nutrition, Silla University, Busan 617-736, Korea

²Bioport Korea Co., Busan 617-736, Korea

³Dept. of Biotechnology, Silla University, Busan 617-736, Korea

Abstract

This study was conducted to investigate the effects of pine (*Pinus densiflora*) needle extracts on hepatic antioxidative system in rats fed high-cholesterol diet. Eight-week old Sprague Dawley rats were divided into four groups: normal diet group (CON), 0.5% cholesterol diet group (0.5% CHOL), 0.5% cholesterol diet and pine needle extracts prepared by using hot water group (HOT water), and 0.5% cholesterol diet and pine needle extracts prepared by using sub-supercritical CO₂ group (Sub-supercritical). The serum ALP, AST, and ALT activities were increased by 0.5% cholesterol diet supplementation, but treatment with pine needle extracts showed decrease compared with 0.5% CHOL group. The SOD activity in liver at 0.5% cholesterol diet group was more decreased than control group while Sub-supercritical group had significantly higher SOD activity than 0.5% CHOL group. Moreover, groups with pine needle extracts supplementation had higher level of GPx in liver than 0.5% cholesterol diet group. These results suggest that pine needle extracts increased antioxidative activities.

Key words: pine needle, antioxidative activity, SOD, GPx

서 론

사람과 동물에는 산화적 손상을 예방하거나 복구하는 체계를 가지고 있으며 그 종류로는 superoxide dismutase (SOD), 환원형 glutathione(GSH), glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione S-transferase(GST), catalase(CAT) 등이 있다(1). 이러한 항산화 체계는 체내에서 발생하는 산화적 손상을 완전히 예방 또는 복구하는데 충분하지 않기 때문에(2) 식품을 통해 섭취하는 항산화 물질들은 체내 산화적 손상을 낮추어 주는데 도움이 된다(3,4). 노화와 성인병 질환의 원인이 활성산소에 기인된 것이라는 학설이 점차 인정되어짐에 따라 이를 조절할 수 있는 물질로 알려진 항산화제의 개발연구가 활발히 진행되고 있다. 즉, SOD, GPx, CAT와 같은 산화효소의 생체 내에서의 역할이 심도 있게 연구되고 있으며, 더불어 tocopherol, vitamin C, carotenoid 등의 천연 항산화제와 BHA 및 BHT를 필두로 많은 합성 항산화제들이 개발·사용되고 있다(5,6). 합성 항산화제는

탁월한 효과와 경제성 때문에 폭넓게 사용되고 있으나 이들의 인체에 대한 안전성에 문제가 있을 수 있으며(7,8), 천연 항산화제는 안전하기는 하나 단독으로는 산화연쇄반응 저지 능력이 낮고(9) 가격이 비싸다는 단점이 있다. 따라서 보다 안전하고 효과가 뛰어난 천연물이나 식품으로부터 항산화작용을 기대하는 많은 연구가 활발히 이루어지고 있다. 최근 건강식품의 수요 증대로 인해 천연식물자원을 이용한 기능성식품의 개발에 활기를 띄고 있고 나아가 의약분야에 실용화를 시도하고 있으며, 이들을 유용하게 사용하기 위해서는 그 효능에 관한 과학적인 근거의 제시가 절실히 요구되고 있다.

소나무(*pinus densiflora*)는 상록성 침엽교목으로서 우리나라를 비롯하여 만주, 일본 등지에 널리 분포하고 있다. 한 방에서는 솔잎을 약술 형태로 복용하는 경우가 많으며, 맛이 쓰고 따뜻하여 체내조직에서 이루어지는 산화환원과정의 촉진작용과 소염작용에 관여하는 것으로 알려져 있다. 솔잎을 비롯한 송실, 송지, 송피, 송로 등 소나무의 부위별 효용가

*Corresponding author. E-mail: mihkim@silla.ac.kr
Phone: 82-51-999-5620, Fax: 82-51-999-5687

치는 '동의보감'에 잘 언급되어 있다. 또한 솔잎에는 양질의 단백질, 비타민, 철분 등이 함유되어 있어서 동맥경화, 고혈압 등의 성인병에도 약효를 내는 것으로 알려져 있다(10). 여러 선행 연구(11,12)에서 고지방식이나 고콜레스테롤 식이와 같은 과량의 식이 지방이나 콜레스테롤 섭취는 체내 조직의 산화적 손상을 초래한다고 보고하였으며, 고콜레스테롤 상태에서는 SOD, GPx 등과 같은 항산화계 효소의 양은 감소되고 지질과산화물 함량은 증가되는 반면 항산화계의 보강에 의해 이들 값이 개선되었음이 보고되었다(12).

활성산소는 산화력이 매우 강하기 때문에 인체 내에서 제거되지 못하면 산화적 스트레스를 유발하게 되며(13), 이러한 산화적 스트레스는 지질과산화를 유도하고 단백질, 세포막 및 DNA 등을 손상시켜 암을 비롯한 다양한 성인병을 유발하는 것으로 알려져 있다(14). 이로 인하여 활성산소의 생성을 억제하는 것이 중요한 과제로 대두되고 있으며, 이에 따라 노화억제에 대한 항산화물질에 대한 활발한 연구(15-17)뿐만 아니라, 항산화 효과를 가지는 식품의 섭취를 통해 노화를 지연시키고 성인병을 예방, 치료하고자 하는 노력이 증가하고 있는 실정이다. 인체의 노화를 억제하려면 외부로부터 항산화 효소의 생성을 촉진하거나 항산화 작용을 하는 성분을 섭취할 필요가 있다. 솔잎은 체질에 별로 구애를 받지 않아 누구나 쉽게 먹을 수 있으며 각종 질병의 치료와 예방뿐 아니라 강정 효과도 우수하다. 본 연구는 선행연구(18)에서 적송잎의 열수 및 아임계 추출물의 항산화 활성이 높게 나타났으므로, 이러한 *in vitro* 실험의 결과를 *in vivo* 실험을 통하여 입증하고자 하였다. 따라서 천연물 중 항산화효과가 기대되는 적송잎 열수 및 아임계 추출물과 고콜레스테롤 식이와 함께 실험동물에 투여하여 항산화 효과와 동시에 간 손상에 대한 회복효과를 검토하였다.

재료 및 방법

추출물의 제조

본 실험에 사용한 적송잎은 2007년 7월경 지리산에서 채취하여 60°C에서 열풍건조한 후 믹서로 분말화시켜 Fig. 1에

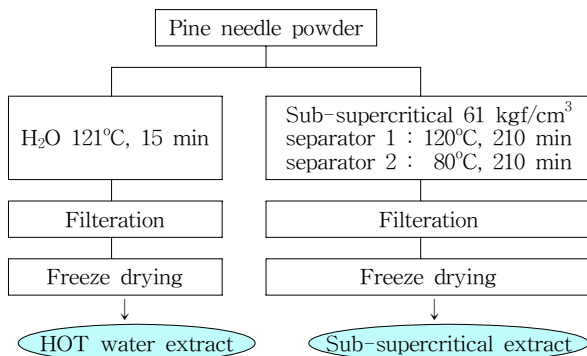


Fig. 1. Schematic diagram of the extraction processes of pine needle.

서와 같이 열수 추출과 아임계 추출을 하였다.

열수 추출은 일반적으로 알려진 추출 방법으로 적송잎 분말 743 g에 물 4,500 mL을 첨가하여 121°C에서 15분간 추출한 후 여과한 액을 동결건조 하여 제조하였다.

아임계 영역은 임계점보다도 온도 및 압력이 낮은 과열영역으로 아임계 상태에서 과열된 수증기는 성분추출에 우수한 작용을 하는 것으로 알려져 있어, 적송잎 분말 232 g에 60 kgf/cm³의 CO₂ 가스를 이용하여 separator 1은 120°C로, separator 2는 80°C로 설정하여 210분간 추출을 행한 후 여과하여 추출액을 얻은 후 동결건조 하여 제조하였다.

실험동물, 사육조건 및 식이조성

실험동물은 180~200 g의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐(오리엔트사)를 구입하여 1주간 적응시킨 뒤 실험에 사용하였다. 적응 후 쥐들은 난피법에 의해 4군으로 나누어 3주간 사육하였다. 온도 23±2°C, 습도 50±5%, 12시간 조명주기의 조건하에서 계속적으로 사육하여 사용하였다. 본 실험의 식이조성은 Table 1과 같으며, 실험군은 정상식이(CON)군, 0.5%콜레스테롤 첨가 식이(CHOL)군, 0.5%콜레스테롤 첨가 식이에 적송잎 열수추출물 50 mg/kg body weight 투여(Hot water)군 및 0.5%콜레스테롤 첨가 식이에 아임계 추출물 50 mg/kg body weight 투여(Sub-supercritical)군으로 구성하였다(Table 1). 실험동물은 각 군마다 7마리씩 나누고, 실험 식이와 탈이온수는 자유 섭취방법(*ad libitum*)으로 급여하였고, 적송잎 추출물을 매일 1 mL씩 3주간 경구투여하였으며, 대조군은 동일용량의 생리식염수를 경구투여하였다. 식이섭취량은 매일 일정한 시간에 측정하였고, 체중은 이틀에 한번 씩 정기적으로 측정하였다. 식이효율(Food Efficiency Ratio, FER)은 전 체중증가량을 같은 기간 동안의 식이섭취량으로 나누어 계산하였다.

Table 1. Composition of experimental diets (%)

Ingredients	CON ¹⁾	CHOL ²⁾	HOT water ³⁾	Sub-supercritical ⁴⁾
Casein	20.0	20.0	20.0	20.0
α-Corn starch	15.0	15.0	15.0	15.0
Palm oil	10.0	10.0	10.0	10.0
Cellulose	5.0	5.0	5.0	5.0
Mineral mixture	4.0	4.0	4.0	4.0
Vitamin mixture	1.0	1.0	1.0	1.0
L-Methionine	0.3	0.3	0.3	0.3
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2	0.2
Cholesterol	—	0.5	0.5	0.5
Sodium cholate	—	0.125	0.125	0.125
Sucrose	to make 100			

¹⁾CON: basal diet.

²⁾CHOL: basal diet+0.5% cholesterol diet.

³⁾HOT water: basal diet+0.5% cholesterol diet+HOT water extracts 50 mg/kg body weight.

⁴⁾Sub-supercritical: basal diet+0.5% cholesterol diet+sub-supercritical CO₂ extracts 50 mg/kg body weight.

혈액 및 장기 채취

실험종료 전 실험동물을 하룻밤 절식시킨 후 ethyl ether 마취 하에서 복부대동맥으로부터 채혈하였다. 채취된 혈액은 $3,000 \times g$ 에서 10분간 원심분리 하였고, 분리된 혈청은 -70°C 에서 냉동보관하면서 분석에 사용하였다. 혈액채취 후 0.9% 생리식염수로 관류하여 조직 중의 혈액을 제거한 후 즉시 간장을 적출하였고, 부착되어 있는 지방이나 근육을 깨끗이 제거한 다음 여과지로 물기를 없애고 무게를 측정 한 후 -70°C 에 보관하면서 실험에 사용하였다.

혈청 중의 간 기능 지표효소 활성도 측정

원심분리 하여 얻은 혈청은 자동혈액생화학분석기인 Dry Chem 3500i(Fujifilm, Japan)를 이용하여 alkaline phosphatase(ALP), aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase(ALT)를 측정하였다.

간 조직 중의 단백질 정량

단백질의 정량은 Lowry 등의 방법(19)에 의해서 750 nm에서 흡광도를 측정하고 표준 단백시료를 bovine serum albumin(BSA)으로 정량하였다.

간 조직 중 항산화 효소활성 측정

SOD 활성 측정은 Fridovich법을 변형하여 측정하였다(20). Potassium phosphate buffer(100 mM K_2HPO_4 , 100 mM KH_2PO_4 , 200 mM KCl, 10 mM EDTA, pH 7.4) 용액과 1 mM xanthine, 1% deoxycholate(DOC), 1.5 mM potassium cyanate(KCN), 0.2 mM cytochrome C를 혼합한 후 미토콘드리아 분획에 첨가하고, 마지막으로 xanthine oxidase(XOD)를 첨가하여 550 nm의 파장에서 2분간 효소활성을 측정하였다. 간 조직 중 CAT의 활성은 Aebi의 방법(21)을 이용하여 측정하였다. 즉, phosphate buffer(0.05 M pH7.0) 1.9 mL에 시료 간 조직 획분을 $800 \times g$ 에서 20분간 원심분리하고 난 뒤 상등액을 100 μL 취해서 과산화수소 용액 1 mL를 혼합하여 240 nm에서 90초 동안 흡광도 감소를 측정하여 분석하였다. 간 조직 중 GPx의 활성은 Lawrence와 Burk의 방법(17)에 준하여 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 0.1 M phosphate buffer(4 mM EDTA) 400 μL , 0.01 M NaN_3 70 μL , 0.01 M GSH 70 μL , 1.5 mM NADPH 70 μL , H_2O 360 μL , GSSG-reductase(1.8 U/mL)

20 μL 및 간 조직 획분 10 μL 를 혼합하여 상온에서 1분간 방치한 후 5 mM H_2O_2 100 μL 를 가해 잘 혼합한 후 340 nm에서 90초 동안 흡광도 감소를 측정하여 분석하였다.

통계처리

실험 결과는 SPSS(Statistical Package for Social Science Version 14.0) 통계프로그램을 이용하여 각 실험군의 평균 \pm 표준편차로 표시하였고, 일원배치분산분석으로 비교하였으며 Duncan's multiple range test에 의해 각 실험군 간에 유의성을 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

실험동물의 체중변화, 식이효율 및 간 중량

실험동물은 일반 식이를 대조군으로 하여 콜레스테롤식이와 콜레스테롤식이에 적송잎 열수 추출물 또는 아임계 추출물을 3주간 투여하였고, 실험기간 중의 체중변화와 식이효율은 Table 2와 같다. 체중증가량은 콜레스테롤식을 투여한 CHOL군이 일반 대조식이군인 CON군보다 유의적으로 증가하는 결과가 나타났다($p < 0.05$). 이는 고지방 섭취 시 체중이 증가하여 과체중 내지는 비만을 유발한다는(22-25) 선행연구 결과와 유사하였다. 한편 적송잎의 열수 및 아임계 추출물을 투여한 군에서는 CHOL군보다 감소하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 없었다. 식이섭취량은 CHOL군이 CON군보다 감소하였는데, 이는 식이지방이 체내에서 gastric emptying을 지연시켜 식이섭취량을 감소시킨다는 선행연구 결과와 유사함을 나타내었다(24-26). 식이섭취에 대한 체중증가량을 나타내는 식이효율 또한 CHOL군이 가장 높은 결과를 나타내었다. 따라서 콜레스테롤식이 투여 시 식이섭취량은 일반식이군에 비하여 감소하였으나 식이효율은 유의적으로 증가하였고, 적송잎 추출물을 투여하였을 경우 체중증가량은 감소하였으나 유의차가 없었으므로 적송잎 추출물이 콜레스테롤 식이로 인한 체중 증가에는 별다른 영향을 주지 않는 것으로 나타났다.

간은 담즙을 분비하여 소화를 도와주고 체내의 독소나 독성물질을 해독시키며, 단백질, 탄수화물, 지방의 신진대사를 담당하는 장기로서 간장이 손상을 입게 되면 소화, 해독 대사기능에 장애를 초래하게 된다(27). Lim 등(28)과 Sung 등

Table 2. Body weight gain, food intake, FER, and liver weight during experimental periods

Group ¹⁾	Body weight gain	Food intake	FER ²⁾	Liver weight
CON	3.56 \pm 0.48 ^{3)a4)}	21.26 \pm 1.39 ^a	0.17 \pm 0.01 ^a	3.53 \pm 0.6 ^a
CHOL	4.13 \pm 0.53 ^b	18.75 \pm 1.98 ^b	0.22 \pm 0.01 ^b	4.76 \pm 2.5 ^b
HOT water	3.73 \pm 0.29 ^{ab}	20.38 \pm 1.08 ^{ab}	0.18 \pm 0.02 ^{ab}	4.52 \pm 2.1 ^b
Sub-supercritical	3.68 \pm 0.38 ^{ab}	21.08 \pm 2.21 ^{ab}	0.17 \pm 0.01 ^a	4.39 \pm 0.75 ^b

¹⁾See the legend of Table 1.

²⁾FER: food efficiency ratio; body weight gain/ food intake.

³⁾Values are means \pm SD (n=7).

⁴⁾The same superscripts in the same column are not significantly at 5% level by Duncan's multiple test.

(29)은 콜레스테롤식이를 투여한 흰쥐에서는 간장 중에 중성지질 및 콜레스테롤 등이 축적되어 간 중량의 증가를 초래하며, 과량의 콜레스테롤이 간장으로 유입될 경우 지질 수용체와 결합하여 lipoprotein의 형태로 배출되지 못하면 간에 축적되어 지방간을 유발시킬 수 있다고 하였다.

본 실험에서 간조직의 중량은 CON군에 비하여 CHOL군에서 약 1.4배 증가하였다. 이는 식이 중 콜레스테롤 첨가로 간장 중 콜레스테롤 및 중성지질 등이 축적되어 간의 무게가 증가된 것으로 추측되며 콜레스테롤식이에 의해 간의 무게가 증가하였다는 선행연구(30-33) 결과와 유사하였다. 한편, 적송잎 추출물 투여 시 콜레스테롤식이에 의해 증가된 간조직의 무게는 유의적이지는 않지만 감소하는 경향을 나타내었다. 외견상으로 CON군을 제외한 모든 군에서 간의 색깔이 누런색을 띄었고 부어있는 현상 또한 관찰되었으며, Seo(34)는 동물의 식이에 콜레스테롤을 첨가한 군에서 간의 색깔이 대조군에 비해 누런색을 띄면서 부어 있었다고 보고하여, 본 실험과 유사한 현상을 나타내었다.

혈청 중 AST, ALT 및 ALP 활성

혈청 중의 AST, ALT 및 ALP 활성을 Table 3에 나타내었다. AST 및 ALT는 amino acid와 α -keto acid와의 사이에 amino기 전이반응을 촉매 하는 효소로서 체내에 널리 분포되어 있다. 이들은 간 손상의 지표로 널리 사용되는 효소로서 그 유출 과정은 세포내의 에너지 공급이 감소된 결과에 의해 세포내의 K^+ 이온이 세포외로 유출되면 Na^+ , Ca^{2+} 및 수분이 세포내로 유입이 된다. 그 결과 세포는 팽창되고, 세포막이 늘어나게 되어 세포질에 존재하는 AST와 ALT가 유출된다. 그러므로 혈청 중 AST와 ALT 등의 증가는 간독성으로 인한 간세포의 괴사와 간조직의 파괴가 진행됨을 의미하므로 이들 효소의 혈청 유리정도를 측정하여 간독성 연구에 이용하고 있다(7). Table 3에 나타난 바와 같이 CHOL군은 CON군에 비하여 혈청 중 ALT 및 AST 활성이 증가되었으나 적송잎 추출물의 투여로 인하여 감소하는 경향을 나타내었다. 특히 열수 추출물보다 아임계 추출물에서 AST는 유의적으로 낮게 나타났으며, ALT는 유의성은 없었으나 CHOL군보다 활성이 낮게 나타났다. 혈청 ALP는 담도계 폐색 또는 간질환의 경우 그 활성이 증가되는 효소로서, 급성 신부전증, 고지혈증, 폐경색증과 같이 간세포 장애가 고

Table 3. Effects of pine needle extracts on AST, ALT, and ALP levels in rats

Group ¹⁾	AST (U/L)	ALT (U/L)	ALP (U/L)
CON	86.9 ± 3.1 ^{2)a3)}	24.43 ± 1.99 ^a	687 ± 254 ^a
CHOL	142.3 ± 6.4 ^b	35.57 ± 5.50 ^b	1166 ± 180 ^b
HOT water	135.7 ± 5.5 ^{ab}	34.29 ± 7.15 ^b	1133 ± 54 ^b
Sub-supercritical	103.9 ± 3.1 ^a	32.85 ± 8.60 ^b	1107 ± 376 ^b

¹⁾See the legend of Table 1.

²⁾The results are mean ± SE for 7 rats in each group.

³⁾The same superscripts in the same column are not significantly at 5% level by Duncan's multiple test.

도로 진행되면 ALP 활성이 높아지며 이에 따라 간장에서 담즙산 배설장으로 혈청 콜레스테롤 농도가 상승되는 것으로 알려져 있다(35). 혈청 중 ALP 활성은 CON군에 비하여 CHOL군에서 증가되었으나, 적송잎 추출물 투여에 의해 ALP 활성이 낮아지는 경향이 나타났다. 급성 신부전증, 고지혈증, 폐경색증이 있을 때 간세포 장애가 고도로 진행되면 AST, ALT 및 ALP 활성이 동시에 높아진다(35).

본 실험 결과 콜레스테롤식이로 증가된 AST, ALT 및 ALP 활성이 적송잎 추출물의 투여로 대부분 감소하는 경향을 보였으나 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 따라서 적송잎의 간세포 장애를 지연시키는 효과에서 그 지표로 활용하기 위해서는 적송잎 추출물의 투여기간을 늘려 구체적인 검토가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

간 조직 중의 SOD 활성

산소를 이용하는 생물체는 superoxide를 제거하는 효소인 SOD를 가지고 있어 생체는 superoxide에 의한 손상으로부터 보호되고 있다(36). Superoxide anion은 호기적 대사과정에서 여러 가지 생화학적 반응으로 생성되며, 이것으로부터 생성되는 hydroxyl radical은 조직 및 거대분자를 파괴하거나 기능을 상실케 한다(7). 미토콘드리아에서의 MnSOD를 포함하여 세포질의 Cu · ZnSOD는 O_2^- 불균화반응을 촉매하여 과산화수소로 빠르게 전환시켜 산소 독성을 방어하는 중요한 기능을 가진다(37). 본 연구에서 콜레스테롤 식이를 투여한 CHOL군의 간 조직에서의 SOD 활성정도는 일반식이 투여군인 CON군에 비해 유의적으로 낮게 나타났다(Fig. 2). 이에 반해 적송잎 열수 추출물 및 아임계 추출물 투여군은 CHOL군에 비해 SOD 활성이 각각 1.8배, 3.5배 상승하여 추출물 투여에 의한 효과가 나타났다. SOD는 지질 과산화 유도반응을 저해하거나 지질과산화의 증폭반응을 정지시켜 일종의 radical 소거제로 작용하는 항산화제이며(38), SOD 유사활성을 나타내는 항산화물질로 ascorbic acid, catechin, glutathione과 flavonoid중 quercetin, myri-

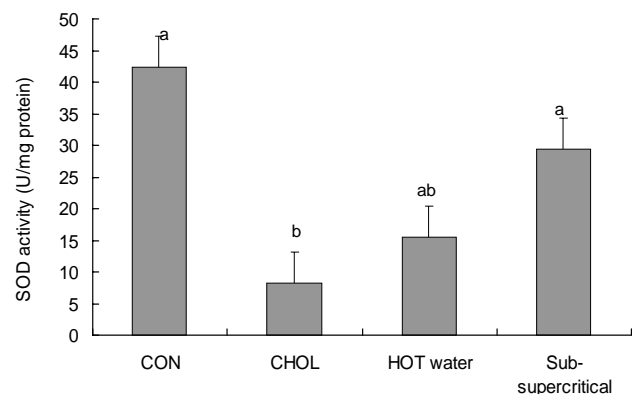


Fig. 2. Effects of pine needle extracts on superoxide dismutase activities in mitochondrial fraction. The same superscripts in the same column are not significantly at 5% level by Duncan's multiple test.

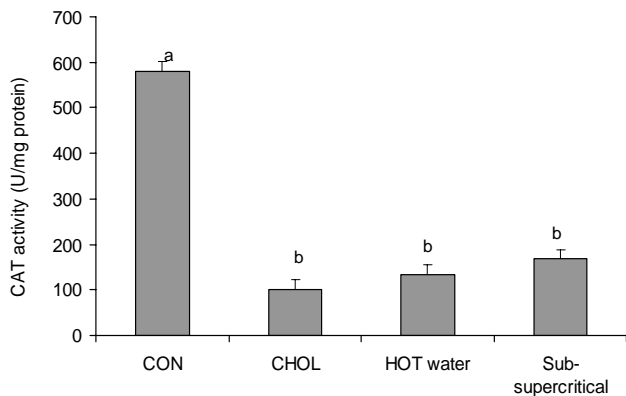


Fig. 3. Effects of pine needle extracts on catalase activities in mitochondrial fraction. The same superscripts in the same column are not significantly at 5% level by Duncan's multiple test.

etin 등이 알려져 있다(39). 따라서 적송잎의 아임계 추출물의 SOD 유사활성은 proanthocyanidin 등 플라보노이드의 함량에 의한 것으로 판단된다. 콜레스테롤 첨가 식이를 투여하여 간장 중의 지질이 증가한 상태에서 적송잎의 열수 및 아임계 추출물을 콜레스테롤과 병합 투여하여 SOD활성도를 측정된 결과, SOD 활성도가 증가한 이상의 결과에 의해 적송잎이 활성산소의 생성을 억제하여 산소독성을 감소시킴으로써 손상된 간조직의 기능을 회복시킨 것으로 추측할 수 있다.

간 조직 중의 CAT 활성

CAT는 과산화수소를 무독성의 물로 환원시킴으로써 과산화수소에 의한 세포의 손상을 방지하는 항산화 효소로 알려져 있으며, 대사과정 중 발생하는 활성산소종의 유리기를 제거할 뿐만 아니라, 이들 활성산소에 의해 그 활성이 비가역적으로 불활성화될 수 있다고 알려져 있다(40). 항산화 효소인 CAT의 활성을 간 미토콘드리아 분획물을 이용하여 측정하였다(Fig. 3). 그 결과 CHOL군의 경우 CON군에 비해 그 활성이 유의적으로 감소하였으나 적송잎 추출물 투여에 의한 효과는 나타나지 않았다. 일반적으로 스트레스에 의해 각종 대사가 증진되어 활성산소가 생성되고 이로 인해 SOD 활성이 증가될 경우 CAT 활성도 함께 증가하는 것으로 알려져 있으나(41), 간 조직에서의 CAT 활성은 적송잎의 열수 추출물 보다 아임계 추출물에서 활성이 증가한 경향을 나타낼 뿐 유의적인 차이는 없었다.

간 조직 내의 GPx 활성

GPx는 일종의 peroxidase로 NADP⁺를 전자수용체로 하여 H₂O₂를 제거하면서 환원형 glutathione(GSH)을 산화형 glutathione(GSSG)으로 전환시키는 효소로 알려져 있다(42).

본 실험에서의 간 조직 내의 GPx활성은 CON군과 CHOL군을 비교하였을 때 CON보다 CHOL군에서 GPx의 활성도가 낮게 나타났다(Fig. 4). 한편, 적송잎의 열수 및 아임계 추출물을 투여하였을 때 CHOL군과 비교하여 그 활성이 유

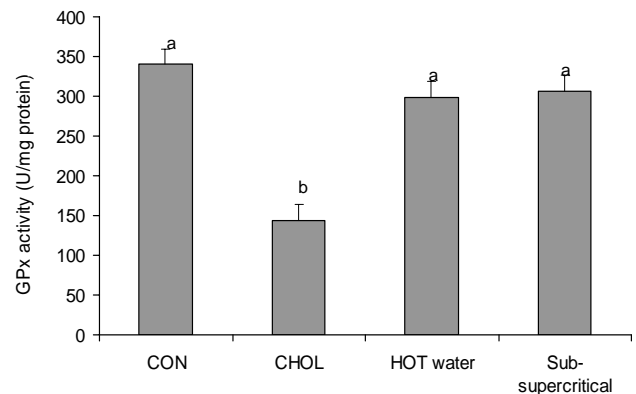


Fig. 4. Effects of pine needle extracts on glutathione peroxidase activities in mitochondrial fraction. The same superscripts in the same column are not significantly at 5% level by Duncan's multiple test.

의하게 증가하였고, 아임계 추출물 투여군의 경우 CON군 수준으로 활성이 회복되어 적송잎 추출물이 콜레스테롤로 인한 간 손상을 억제함을 추측할 수 있었다. GPx는 GSSG를 생성하고, 이 GSSG는 GR의 촉매작용으로 NADPH에 의해 다시 GSH로 환원 되는 기전을 통해 항산화 효소 시스템이 활성화되는 것으로 알려져 있으며, Meister는 H₂O₂를 H₂O로 전환시키는데 관여하는 GPx와 CAT중에서 GPx가 더 효과적이라 하였으며(43), 본 연구 결과 또한 GPx 활성이 CAT 활성보다 높은 것으로 나타나, 적송잎 추출물이 체내 항산화능 개선에 효과가 있을 것으로 기대된다.

요 약

본 연구는 선행연구에서 적송잎 열수추출물의 항산화 활성이 높았으며 아임계 추출물 중에 항산화 활성이 높은 proanthocyanidin 함량이 높은 것으로 나타났으므로, 이러한 *in vitro* 실험의 결과를 *in vivo* 실험을 통하여 입증하고자 하였다. 적송잎의 열수추출물과 아임계 추출물이 콜레스테롤 식이를 투여한 흰쥐의 체내 항산화능에 미치는 영향을 검토하기 위하여 혈청 중의 AST, ALT, ALP 및 간장중의 항산화 효소인 SOD, CAT, GPx의 활성을 측정하였다. 체중 증가량은 콜레스테롤 식이를 투여한 CHOL군이 일반 대조식이군인 CON군보다 유의적으로 증가하는 결과가 나타났다. 콜레스테롤 식이 투여 시 식이섭취량은 일반식이군에 비하여 감소하였으나 식이효율은 유의적으로 증가하였다 ($p < 0.05$). 적송잎 추출물을 투여하였을 경우 체중증가량은 감소하였으나 유의차가 없었으므로 적송잎 추출물이 콜레스테롤 식이로 인한 체중증가에는 별다른 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. 혈청 중의 ALT 및 AST 활성은 콜레스테롤 식이를 투여한 CHOL군이 CON군에 비하여 활성이 증가되었으나 적송잎 추출물의 투여로 인하여 감소하는 경향을 나타내었다. 특히 열수 추출물보다 아임계 추출물에서 AST의 활성은 유의적으로 낮게 나타났으며, ALT는 유의성은

없었으나 CHOL군보다 활성이 낮게 나타났다. 간 조직 중의 항산화 효소 결과에서 SOD 유사활성은 CHOL군에서 대조군에 비해 유의적으로 감소하였으나 적송잎 아임계추출물 투여에 의해 증가하는 결과가 나타났다. GPx활성은 CON군에 비해 CHOL군에서 유의적으로 감소하였으나 적송잎 추출물 투여에 의해 CHOL군에 비해 현저하게 높은 결과로 나타나, 콜레스테롤식이 투여로 인한 효소활성 저하가 적송잎에 의해 회복됨을 알 수 있었다. 이상의 결과, 고콜레스테롤 유발 흰쥐에게 적송잎 추출물의 급여는 체내 항산화효소의 활성에 영향을 미치는 것으로 나타나 적송잎 추출물이 체내 항산화능 개선에 효과가 있을 것으로 기대된다.

감사의 글

본 연구는 교육과학기술부와 한국산업기술재단의 지역혁신인력양성사업으로 수행된 연구결과이며 이에 감사드립니다.

문헌

- Trackshel G, Maines MD. 1988. Characterization of glutathione S-transferase in rat kidney. *Biochem J* 252: 127-136.
- Simic MG. 1988. Mechanisms of inhibition of free radical processed in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res* 202: 386-399.
- Lin MY, Yen CL. 1999. Inhibition of lipid peroxidation by *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium longum*. *J Agric Food Chem* 47: 3661-3664.
- Ito M, Ohishi K, Yoshida Y, Yokoi W, Sawada H. 2003. Antioxidative effects of lactic and bacteria on the colonic mucosa of iron-overloaded mice. *J Agric Food Chem* 51: 4456-4460.
- Wursch P. 1979. Influence of tannin-rich carob pod fiber on the cholesterol metabolism in the rat. *J Nutr* 109: 685-692.
- Yoon SO, Yoo SJ, Oh S. 1997. A study on the pharmacological and nutritional values of needles of *Pinus densiflora* S. *Research Bulletin of the Experiment Foresta* 5: 63-81.
- Plaa GL, Charbonneau M. 1994. Detection and evaluation of chemically induced liver injury. In *Principles and methods of toxicology*. Hayes AW, ed. Taylor & Francis, Philadelphia, USA. p 839-870.
- Umemura T, Kodama Y, Nishikawa A, Nomura T, Kanki K, Kuroiwa Y, Ishii Y, Kurokawa Y, Hirose M. 2006. Nine-week detection of six genotoxic lung carcinogens using the rasH2/BHT mouse model. *Cancer Lett* 231: 314-318.
- Cort WM. 1984. Antioxidant activity of tocopherols and ascorbyl palmitate and ascorbic acid and their mode of action. *J Am Oil Chem Soc* 51: 321-325.
- Hong TG, Lee YL, Im MH, Hong JN. 2004. Studies on the physiological functionality and antimicrobial activity of pine needle fermentation extract. *Korean J Food Preserv* 11: 94-99.
- Mantha SV, Kalra J, Prasad K. 1996. Effects of probucol on hypercholesterolemia-induced changes in antioxidant enzymes. *Life Sci* 58: 503-509.
- Jeon SM, Bok SH, Jang MK, Lee MK, Nam KT, Park YB, Rhee SJ, Choi MS. 2001. Antioxidative activity of naringin and lovastatin in high cholesterol-fed rabbits. *Life Sci* 69: 2855-2866.
- Pryor WA. 1977. Involvement of radical reaction in aging and carcinogenesis in medicine chemistry. In *Free radical in biology*. Elsevier, Amsterdam. p 331-361.
- Hur SK, Kim SS, Heo YH, Ahn SM, Lee BG, Lee SK. 2001. Effect of the grapevine shoot extract on free radical scavenger activity and inhibition of pro-inflammatory mediator production in raw macrophages. *J Appl Pharmacol* 9: 188-193.
- Jae JU. 1989. Isolation and identification of constituents from antioxidant and hematopoietic fractions of *Panax ginseng* C.A. Mayer. *PhD Dissertation*. Seoul University, Seoul.
- Sang DJ, Kim H, Hoon IO. 1981. Antioxidant activity of panax ginseng browning products. *J Korean Agric Chem Soc* 24: 161-166.
- Lawrence RA, Burk RF. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 71: 952-958.
- Lee OH, Kim KY, Jang MK, Yu KH, Kim SG, Kim MH, Lee SH. 2008. Evaluation of proanthocyanidin contents in total polyphenolic compounds of pine (*Pinus densiflora*) needle extracts and their antioxidative activities. *Korea J Life Sci* 18: 213-219.
- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AS, Randall RJ. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 256-261.
- Fridovich I. 1986. Biologic effects of the superoxide radicals. *Arch Biochem Biophys* 247: 1-15.
- Aebi H. 1984. Catalase *in vitro* methods. *Enzymology* 105: 121-126.
- Ahmed AE. 1979. Activities of enzymes of the pancreas and the lumens and mucosa of the small in growing broiler cockerels for on tannin-containing diet. *J Nutr* 65: 189-192.
- Barry TN, Manley TR, Duncan SJ. 1986. The role of condensed tannins in the nutritional value of *Lotus pedunculatus* for sheep. *Br J Nutr* 55: 123-128.
- Dodge JA. 1994. Dietary fats and gastrointestinal function. *Eur J Clin Nutr* 48: S8-16.
- Mehansho H, Hagerman A, Clerments S, Butler L, Rogler J, Mearlson D. 1983. Dualation of proline-rich peotin biosynthesis in rat paroids glands by sorghum with high tannin levels. *Proc Natl Acad Sci USA* 80: 3948-3956.
- Martijn BK, Peter LZ, Ronald PM. 1994. Effect of fats and fatty acids on blood lipid in humans: an overview. *Am J Clin Nutr* 60: 1017S.
- Shin CS. 2006. Effect of powder of small water dropwort (*Oenanthe javanica* DC) and brewer's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) on the liver function and serum lipid metabolism in alcohol-consumed rats. *MS Thesis*. Chung-Ang University, Chungnam.
- Lim SS, Jung HO, Jung BM. 1997. Effect of *Ixeris sonchifolia* H. on serum lipid metabolism in hyperlipidemic rats. *Korean J Nutr* 30: 889-894.
- Sung NJ, Lee SJ, Shin JH, Chung MJ, Lim SS. 1998. Effects of *Houttuynia cordata* Thunb powder and juice on lipid consumption of liver, brain and kidney in dietary hypercholesterolemic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 1230-1235.
- Kwon MJ, Song YS, Song YO. 2003. Antioxidative effect of *kimchi* ingredients on rabbits fed cholesterol diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 1189-1196.
- Chung EJ, Um YS, Nam HW, Park T. 2003. Changes in

- lipid peroxidation level and antioxidant enzyme activities of rats supplemented with dietary cholesterol and/or taurine. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 1310-1317.
32. Kim KR, Choi JH, Lee SK, Woo MH, Choi SW. 2006. Effect of enzymatic hydrolysate of hamcho (*Salicornia herbacea*) on antioxidative defense system in rats fed high cholesterol diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 1356-1362.
 33. Lee JJ, Choi MH, Lee MY. 2006. Effect of *Pimpinella brachycarpa* extract on lipid metabolism in rats fed high cholesterol diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 1151-1158.
 34. Seo JA. 1997. Effects of plasma cholesterol metabolism and organization change of rabbit high cholesterol diet. *MS Thesis*. Kyungpook National University, Daegu.
 35. Lim SS, Kim MH, Lee JH. 1997. Effect of *Artemisia princeps* var *orientalis* and *Cirsium japonicum* var *ussuriense* on liver function body lipid and bile acid of hyperlipidemic rat. *Korean J Nutr* 30: 797-802.
 36. Kang YH, Park YK, Ha TY, Moon KD. 1996. Effects of pine needle extracts on enzyme activities of serum and liver and liver morphology in rats fed high fat diet. *J Korean Soc Food Nutr* 25: 374-378.
 37. Freeman BA, Crapo JD. 1982. Biology of disease free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47: 412-236.
 38. Tappel AL. 1980. Vitamin E and selenium protection from *in vivo* lipid peroxidation. *Ann New York Sa* 355: 18-24.
 39. Kang YH, Park YK, Oh SR, Moon KD. 1995. Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort extract. *Korea J Food Sci Technol* 27: 978-984.
 40. Johansson LH, Borg LA. 1988. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue samples. *Anal Biochem* 174: 331-336.
 41. Vergmeyer HU, Aebi H. 1974. *Catalase in methods of enzymatic analysis*. Academic press, New York. Vol 2, p 673-684.
 42. Jones DP, Eklow L, Orrenius S. 1981. Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes: relative contribution of catalase and glutathione peroxidase in decomposition of endogenously generated H₂O₂. *Arch Biochem Biophys* 210: 505-516.
 43. Meister A. 1994. Glutathione-ascorbic acid antioxidant system in animals. *J Biol Chem* 269: 9337-9400.

(2009년 2월 9일 접수; 2009년 3월 11일 채택)