

## 식이성 고지혈증 흰쥐에 대한 와송 플라보노이드 분획물의 효과

김세건 · 최종원<sup>1</sup> · 박희준<sup>2</sup> · 이상명<sup>3</sup> · 정현주\*

원광대학교 약학대학 한약학과 및 원광한약연구소, <sup>1</sup>경성대학교 약학대학, <sup>2</sup>상지대학교 제약공학과, <sup>3</sup>KT&G 중앙연구원

### Anti-hyperlipidemic Effects of the Flavonoid-rich Fraction from the Methanol Extract of *Orostachy japonicus* in Rats

Sei-Gun Kim, Jongwon Choi<sup>1</sup>, Hee-Juhn Park<sup>2</sup>, Sang-Myung Lee<sup>3</sup> and Hyun-Ju Jung\*

Department of Oriental Pharmacy and Wonkwang-Oriental Medicines Research Institute, Wonkwang University, Sinyong-Dong, Iksan, 570-749, Korea

<sup>1</sup>College of Pharmacy, Kyungsung University, Daeyeon-Dong, Busan 608-736, Korea

<sup>2</sup>Department of Pharmaceutical Engineering, Sangji University, Woosan-Dong, Wonju 220-702, Korea

<sup>3</sup>KT&G Central Research Institute, Shinseong-Dong, Yuseong-Gu Daejeon 302 305-805, Korea

**Abstract** – The anti-hyperlipidemic effects of an ethyl acetate fraction from *Orostachy japonicus* in a high lipid diet-induced hyperlipidemic rat model were assessed. The fraction, which contained kaempferol, astragalol, and isoquercitrin, was associated with significant weight loss and reduction of lipid contents in serum and liver tissues. The fraction, which contains mainly flavonoids, diminished the levels of malondialdehyde and hydroxyl radical, and increased the anti-oxidative enzyme activities of superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase. Reduced bleeding and plasma clotting times resulting from the administration of the ethyl acetate fraction may reduce cardiovascular disease associated with hyperlipidemia.

**Key words** – *Orostachys japonicus*, Crassulaceae, Flavonoid, Hyperlipidemic effect, Oxidative stress.

급속한 경제성장과 생활방식의 변화에 따라 우리사회는 식습관이나 생활방식에 많은 변화가 생겼으며 바쁜 일상 생활로 인한 각종 스트레스, 운동부족, 체력저하, 고열량의 패스트푸드 소비 증가 등으로 점차 비만을 비롯한 각종 성인병이 증가되고 있다.<sup>1)</sup> 그 중에서도 우리나라 비만 인구는 약 31.8%로 지난 10여 년 동안 약 1.6배 증가 (여자 1.3배, 남자 2배 증가) 하였으며, 현재는 성인뿐 아니라 어린이나 청소년들에서도 비만이 나타나고 있어 최근 3년 사이 초등학생의 비만 비율은 약 2배 정도 증가한 추세라고 한다.<sup>2)</sup>

비만은 뇌 및 심혈관질환, 당뇨병, 골관절염, 가성 뇌종양 (pseudotumor cerebri), 수면 무호흡증 (sleep apnea) 등 각종 질환의 원인이 되거나 또는 활동성의 저하로 많은 문제를 야기 시키고 있으므로, 비만에 대한 체중감소를 위한 노력이 여러 분야에서 시도되어 왔다.<sup>3)</sup> 특히, 현재 사용되고 있는 비만치료 약물들은 식욕억제제, 소화흡수 저해제, 지방

흡수 억제제, 대사촉진제 등이 있으나, 이들 약물은 의존성, 내성, 우울증과 불안장애, 불면증을 일으킬 위험이 있으며 또한 약을 끊으면 바로 요요현상이 나타나는 경우가 대부분인 것으로 알려져 있다.<sup>4)</sup>

저자들은 와송 (*Orostachys japonicus* A. Berger, Crassulaceae) 이 다양한 생리활성이 있음에도 불구하고 항암효능에만 제한적으로 사용되고 있는 것을 우려하여, 와송의 생리활성을 다양하게 관찰하여 왔다.<sup>5)</sup> 와송은 항암 효능 외에도 우수한 항체양 효능을 나타내어 이를 보고하였으며,<sup>6)</sup> 또한 분획물 수준에서도 식이성 고지혈증 동물모델에 매우 우수한 항고지혈증 효능을 나타내었기에 이를 보고하고자 한다. 와송의 주 성분은 seco-A-tritpene mixture, glutinone, friedelin,  $\beta$ -amyrin, glutinol, epifriedelanol 등의 triterpenes,<sup>6)</sup>  $\beta$ -sitosterol, campesterol,  $\beta$ -sitosterol  $\beta$ -D-glucopyranoside, and campesterol  $\beta$ -D-glucopyranoside, 등의 sterols,<sup>7)</sup> 그리고 kaempferol, quercetin, afzelin, astragalol, isoquercitrin, cynaroside, 7-O-glucosyl-3-O-rhamnosyl kaempferol, 3,7-di-O-glucosyl kaempferol 등의 flavonoids로 알려져 있다.<sup>7)</sup> 실험재료로 사용된 와송의 MeOH 추출물은  $\text{CHCl}_3$ , EtOAc,

\*교신저자 (E-mail): hyun104@wku.ac.kr  
(Tel): +82-63-850-6814

n-BuOH 및 H<sub>2</sub>O 분획물로 나누어 사용하였으며 Silica gel 과 ODS 컬럼 크로마토그래피로 성분을 확인한 결과 CHCl<sub>3</sub> 에는 terpenes가 EtOAc에는 flavonoids 그리고 n-BuOH에는 주로 당류가 주성분으로 함유되어 있었다.

### 재료 및 방법

**식물재료** - 와송 전초는 원주시에 소재한 천일약업사에서 구입하여 충남대학교 약학대학 배기환 교수님의 검증을 받아 사용하였다.

**추출 및 분획** - 와송 3.6 kg을 MeOH 3 l로 2시간씩 3회 추출하고 그 여액을 농축하여 MeOH 추출물 250 g을 얻었다. MeOH 추출물은 2 l의 증류수에 현탁하고 CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, n-BuOH로 차례로 용매 분획하여 각각 112 g, 16 g, 65 g의 추출물 및 물 층 52 g을 수득하였다.

**실험동물 및 사육환경** - 실험에 사용한 SPF Sprague Dawley (SD)계 흰쥐는 효창 사이언스(대구)로부터 4주령의 수컷을 구입한 후 1주일 간 검역과 순화, 사육을 거쳐 건강한 동물만을 실험에 이용하였다. 사육환경은 온도 22±3°C, 상대습도 50±10%, 조명시간 12시간 (07:00~19:00)로 설정된 경성대학교 약학대학 실험동물 사육실 (TECNIPLAST, Italy)에서 실시되었다. 사료는 실험동물용 고행사료 (중앙실험동물, 서울)를 음수는 상수도를 자유 섭취시켰다. 실험 시간 전 24 시간 동안 물만 주고 절식하였고, 효소 활성의 일중 변동을 고려하여 실험동물을 일정시간 (오전 10:00-12:00) 내에서 처치하였다.

**검액의 투여** - 와송의 각 추출물과 분획물 (MeOH, CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, n-BuOH, H<sub>2</sub>O)을 생리식염수로 용해한 4% tween 80을 사용하여 100 mg/kg을 oral jonde를 사용하여 경구로 실험동물에 4주간 투여하였다.

**고지혈증유발** - 식이성 고지혈증의 유발은 beef tallow를 첨가한 조제사료를 6주간 사육하여 고지혈증을 유발하였다 (Table 1).

**체중 변화 측정** - 체중변화는 실험개시일로부터 1주일마다 측정하였다.

**혈청, 조직분리 및 효소원의 조제** - 사료의 투입이 끝난 실험동물에 sodium phenobarbital 200 mg/kg을 복강주사하여 마취시킨 후 bleeding time을 측정하였다. 측정 후 CO<sub>2</sub> 로 가볍게 마취시키고 복부 대동맥으로부터 혈액을 채취하였고 간장은 0.9% 생리식염수로 관류시켜 조직 내 혈액을 제거하고 간장을 적출하여 생리식염수에 씻은 후 여지로 가볍게 압박하여 남아 있는 혈액 및 생리식염수를 제거하였다.

채취한 혈액의 일부는 30분간 방치한 후 3000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 분리하고 지질함량의 측정, lipid peroxide, hydroxyl radical 함량 및 superoxide dismutase 활성의 측정에 사용하였고 나머지는 3.13% sodium citrate

**Table 1.** Composition of basal and hyperlipidemic diet

Ingredient	Basal Diet (%)	Hyperlipidemic Diet (%)
Casein	20.0	20.0
DL-Methionine	0.3	0.3
Corn Starch	15.0	15.0
Sucrose	50.0	34.5
Fiber <sup>1)</sup>	5.0	5.0
Corn oil	5.0	-
AIN-mineral Mixture <sup>2)</sup>	3.5	3.5
AIN-vitamin Mixture <sup>3)</sup>	1.0	1.0
Choline Bitartrate	0.2	0.2
Beef Tallow	-	20.5

<sup>1)</sup>Cellulose: Sigma Co. LTD., USA.

<sup>2)</sup>Mineral mixture based on the pattern of Rogers and Haper(1965) contain the following(g/kg diet): calcium phosphate dibasic 500.0, sodium chloride 74.0, potassium citrate monohydrate 220.0, potassium sulfate 52.0, magnesium oxide 24.0, magnesium carbonate 3.5, ferric citrate 6.0, zinc carbonate 1.6, cupric carbonate 0.3, potassium iodate 0.01, chromium potassium sulfate 0.55, sucrose, finely powered make 1,000.

<sup>3)</sup>Vitamin mixture(g/kg diet): thiamine HCl 0.6, biotin 0.02, riboflavin 0.6, cyanocobalamine 0.001, pyridoxine HCl 0.7, retinyl acetate 0.8, nicotinic acid 3.0, DL-tocopherol 3.8, Ca-pantothenate 1.6, 7-dehydrocholesterol 0.0025, folic acid 0.2, methionine 0.005, sucrose, finely powered make 1,000.

용액이 혈액의 1/10이 되도록 하여 2500 rpm에서 10분간 원심 분리한 후 혈장(citrated plasma)을 분리하여 plasma clotting time, tissue factor activity 의 측정에 사용하였다.

간장은 생리식염수로 관류시켜 조직 내 혈액을 제거하고 간장을 적출하여 생리식염수로 씻은 다음 여지로 조직에 남아 있는 혈액 및 기타 이물질을 제거한 다음 간조직은 1g 당 4배량의 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.4)를 가하고 냉장상에서 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. 이 마쇄액은 homogenate 분획으로 하였으며, 이 분획을 냉장 원심분리기로 600×g에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄 부분을 제거한 상정액을 고속 원심분리기로 10000×g에서 20분간 원심분리한 후, 간조직의 침전물은 동량의 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.4)용액을 가하고 신장과 폐 조직의 침전물은 동량의 0.1Msodium phosphate buffer(pH 7.4) 용액을 가하여 현탁시킨 시료액을 다시 10000×g에서 30분간 재원심분리하여 mitochondria 분획을 얻었으며, 상정액은 다시 105000×g에서 60분간 초원심분리하여 얻은 상정액을 cytosolic 분획으로 그 침전물에 동일한 양의 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.4)와 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.4)을 각각 가하여 현탁시킨 시료액을 다시 105,000×g에서 60분간 재원심분리하여 microsomal 분

획으로 하였다. 이렇게 얻어진 homogenate 분획에서는 lipid peroxide 함량을 측정하였고, cytosol 분획에서 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 활성의 측정의 효소원으로 사용하였다.

### 지질 함량

**Phospholipid 함량** – Ven Gent, C.M. 등의 효소법<sup>8)</sup>에 의하여 조제된 kit(Iatron Chem. Co.)를 사용하여 실험하였다. 즉, 병냉상에서 효소시약(phospholipase 3.9U, choline oxidase 5.6U, peroxidase 3.6U, 4-aminoantipyrine 0.3252 mg 함유)을 효소시약 용해액[tris(hydroxy- methyl)-aminomethane 6.057mg 함유]에 용해한 후 시료 20 µl에 조제한 효소시액 3.0 µl을 첨가한 후 37°C에서 20분간 incubation하여 시약 blank를 대조로 파장 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 검량선에 준해 그 함량을 mg/dl로 표시하였다.

**Triglyceride 함량** – McGowan 등의 방법<sup>9)</sup>에 준하여 조제된 kit (AM 157S-K, Asan)를 사용하여 실험하였다. 즉, 병냉상에서 효소시약(lipoprotein lipase 10800U, glycerol kinase 5.4U, peroxidase 135000U, L-α-glycero phosphooxidase 160U 함유)을 효소시약 용해액 [N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminomethane sulfonic acid 0.427 g/dl 함유]에 용해한 후 시료 20 µl에 조제한 효소시액 3.0 µl 을 첨가한 후 37°C 에서 10분간 incubation하여 시약 blank를 대조로 파장 550 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 표준 검량선에 준해 혈중 함량은 mg/dl로 표시하였다.

**Cholesterol 함량** – Richmond 등의 효소법<sup>10)</sup>에 의하여 조제된 kit(AM 202-K, Asan)를 사용하여 실험하였다. 즉, 병냉상에서 효소시약(cholesterol esterase 20.5U/l, cholesterol oxidase 10.7U/l, sodium hydroxide 1.81 g/l함유)을 효소시약 용해액(potassium phosphate monobasic 13.6 g/l, phenol 1.88 g/l 함유)에 용해한 후 시료 20 µl 에 조제한 효소시액 3.0 µl 을 첨가한 후 37°C 에서 5분간 incubation하여 시약 blank를 대조로 파장 500 nm 에서 흡광도를 측정하였다. 표준검량선에 준해 혈중 함량은 mg/dl로 표시하였다.

**Lipid peroxide 함량** – Yagi 등<sup>11)</sup>의 방법에 따라 혈청 20 µl에 1/12N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4.0 ml를 가하여 혼합하고 10% phosphotungstic acid 0.5 ml를 가하여 실온에서 5분간 방치한 후 원심분리하여 침전물인 혈청단백질만 취해서 다시 1/12N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2.0 ml와 10% phosphotungstic acid 0.3 ml를 가하여 원심 분리하였다. 침전물만을 취하여 증류수 4.0 ml 와 0.67% thiobarbituric acid와 acetic acid를 1:1로 혼합한 용액을 1.0 ml를 가하고 95°C에서 60분간 반응시켜 실온에서 냉각 후 n-BuOH을 5.0 ml를 첨가하여 3000 rpm에서 15 분간 원심분리한 후 생성된 홍색의 n-BuOH을 취해 spectrofluorometer를 사용하여(Ex:515 nm, Em:553 nm) 흡광도를 측정하였다. 표준용액으로 tetraethoxypropane 0.5 nmole

을 같은 방법으로 반응시켜 흡광도를 측정하고 다음의 식에 의해 혈청 lipid peroxide 함량을 산출하였다.

$$\text{Serum lipid peroxide(nmole/ml serum)} \\ = 0.5 \times (\text{sample의 흡광도} / \text{표준용액의 흡광도}) \times 1.0/0.02$$

**Hydroxyl radical 함량** – Kobatake 등의<sup>12)</sup> 방법에 따라 혈청 34.8 µl에 0.54 M NaCl, 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 7.4), 10 mM NaN<sub>3</sub>, 7 mM deoxyribose, 5 mM ferrous ammonium sulfate 및 증류수로서 333.3 µl 가 되도록 첨가하여 vortex에서 잘 혼합하여 37°C 에서 15분간 정치한다. 혈청 67 µl 를 취하고 여기에 8.1% sodium dodecyl sulfate 75 µl, 20% acetic acid 500 µl 및 재증류수 25 µl를 넣어 혼합한 다음, 여기에 다시 1.2% thiobarbituric acid 333 µl 를 가하여 water bath(100°C)에서 30분간 가열한 후 실온에서 냉각한 다음 700×g 에서 5분간 원심분리하여 얻은 상층액을 파장 532 nm 에서 흡광도를 측정하여 표준 검량선에 의하여 hydroxyl radical(nmole/mg protein)의 함량을 정량하였다.

**Superoxide dismutase(SOD) 활성** – Gatecki의 방법<sup>13)</sup>에 따라 정량하였다. 즉 혈청을 일정량 반응액[1 mmol/L adrenalin(pH 2), 50 mmol/L glycine(pH 10.2)]에 첨가하고서 30°C에서 3분간 반응을 하고서 480 nm에서 생성되는 adrenochrome의 생성량을 측정하였다. 효소의 활성도는 superoxide dismutase의 U/g protein으로 표시하였다. SOD의 1 Unit는 50% 억제되는 adrenochrome의 생성을로서 산출하였다.

### 간장에서의 항산화효소 활성

**Superoxide dismutase(SOD) 활성** – Oyanagui의 방법<sup>14)</sup>에 준하여 Cytochrome c, 2 µM xanthine sodium, 50mM sodium phosphate buffer의 기질액에 효소액을 넣고 안정화시킨후 xanthine oxidase 50 µl를 넣고 흡광도를 사용하여 550 nm에서 2분간의 흡광도를 측정하였다. Xanthine/xanthine oxidase 반응으로 생성된 superoxide anion에 의해 cytochrome c가 환원되는 것을 측정하는데, SOD에 의해 superoxide anion의 양이 감소하여 cytochrome c의 변화 속도를 이용하여 SOD의 활성을 측정하였다. Cytochrome C의 환원을 50% 억제하는 양을 SOD의 1 unit로 정의 하였다.

**Glutathione peroxidase(GPx) 활성** – Berenice 등의 방법<sup>15)</sup>에 준해 hydrogen peroxide, glutathione 및 NADPH가 함유된 0.1 mM Tris buffer(pH 7.2)중에서 효소액을 가하여 파장 340 nm에서 흡광도를 측정하고 표준검량선에 준하여 활성도를 산정하였다. 효소 활성의 단위는 1분간 1 µM NADPH를 산화시키는 효소의 양으로 정의 하였다. 당 1 mg protein이 생성하는 NADP의 양을 nmole로 표시하였다.

**Catalase 활성** - Aebi의 방법<sup>16)</sup>에 준하여 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)중에 기질인 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 환원되는 정도를 파장 240 nm에서 흡광도의 변화를 읽고 분자흡광계수 0.041 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>을 이용하여 활성도를 산정하였다. 효소활성의 단위는 1분당 1 mg protein이 분해하는 hydrogen peroxide의 양을  $\mu$ mole로 표시하였다.

**Bleeding time** - Han 등의 방법<sup>17)</sup>에 의하여 마취된 실험 동물을 꼬리 끝에서 0.3 cm 자른 후 곧 37.5°C saline 용액에 꼬리를 5 cm 담그고 지혈될 때까지의 시간을 측정하였다.

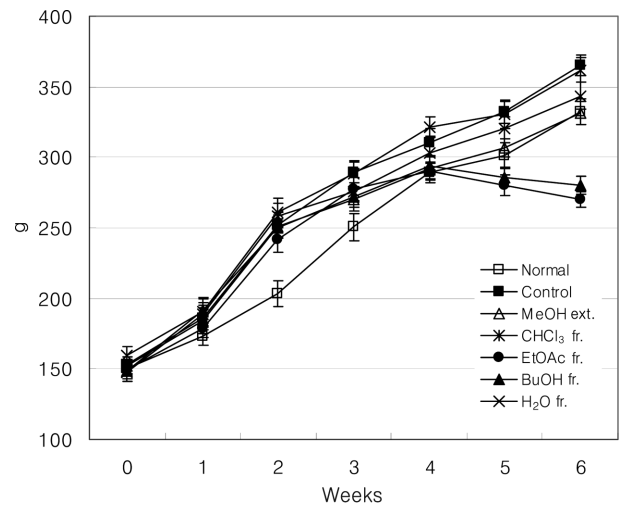
**Plasma clotting time** - 플라스틱 시험관을 37°C의 수욕상에 담그고 혈장 100  $\mu$ l, saline(0.15M NaCl) 100  $\mu$ l, 25 mM CaCl<sub>2</sub> 100  $\mu$ l를 가하고 섞은 후 가만히 흔들며 주면서 CaCl<sub>2</sub>를 가한 후부터 혈장이 응고하기까지의 시간을 측정하였다.

**Tissue factor** - Surprenant 등의 방법<sup>18)</sup>에 준하여 플라스틱 시험관을 37°C 수욕상에 담그고 plasma 100  $\mu$ l, TF solution을 saline 용액으로 희석한 것 100  $\mu$ l(blank는 saline 100  $\mu$ l)를 가하고 25 mM CaCl<sub>2</sub> 100  $\mu$ l를 넣고 섞은 후 시험관을 수욕상에서 꺼내어 가만히 기울여 보고 다시 담그고 하면서 CaCl<sub>2</sub>를 첨가한 후부터 응고 할 때까지의 시간을 측정하였으며 2회 반복하였다. 생리식염수를 넣지 않고 TF solution만 넣었을 때의 응고시간을 100% TF로 정하고, TF solution을 넣지 않고 생리식염수만을 넣은 혈장의 응고시간을 0%로 하여 농도를 log scale로 x축, 활성의 %를 y축에 표시하여 표준곡선을 그렸으며 이 graph에서 50% TF activity가 있는 TF의 양을 lunit로 정하여 tissue factor 활성을 표시하였다.

**단백질 정량 및 통계처리** - 단백질의 함량은 Lowry 등의 방법<sup>19)</sup>에 준하여 bovine serum albumin(Sigma, Fr. V)을 표준품으로 하여 측정하였다. 본 실험에서 얻어진 결과는 평균치 $\pm$ 표준편차로 표시하였고, 통계적 유의성 검증은 Duncan's multiple range test로 그 유의성을 나타내었다.

## 결과 및 고찰

**고지혈증 유발 및 체중변화** - 식이성고지혈증은 일반 식이에 비하여 beef tallow를 과량으로 함유한 먹이를 (Table I) 6주간 투여하여 유발하였으며 외송 추출물은 4주간 경구 투여하고, 1주일 마다 체중 변화를 측정하였다. 고지방 식이를 한 흰쥐의 체중은 5주에 331.9 $\pm$ 7.5 g, 6주에는 365.4 $\pm$ 7.4 g으로, 일반식이를 한 흰쥐에 비하여 (5주: 301.4 $\pm$ 8.6 g, 6주: 332.3 $\pm$ 9.3 g) 약 9% 정도 무게가 증가한 비만 쥐가 되는 것으로 나타났다. 고지혈증 흰쥐에 외송 추출물을 투여한 결과 flavonoids를 다량 함유한 EtOAc 분획물에서 가장 우수한 체중감소 효과를 나타내었으며, 5주와 6주에 더욱 뚜렷한 체중감소 현상이 관찰되었다. 5주에 외송의 EtOAc 분획물을 투여한 흰쥐의 무게는 280.6 $\pm$ 7.3 g, 6주에는 270.3 $\pm$ 5.4 g



**Fig. 1.** Effect of *O. japonicus* extract (100mg/kg) on the body weight in rats fed a normal and hyperlipidemic diet. Rats were rendered obese by high fat diet for 6 weeks and orally administered *O. japonicus* extract for onsecutive 4 weeks, and killed 24hr after the last feeding of *O. japonicus* extract. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean $\pm$ S.D. for six experiments. Values followed by the same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ).

인 것으로 확인 되었고 (Fig. 1) 이는 일반 식이를 한 흰쥐보다 오히려 체중이 더욱 감소한 것으로 관찰되었다.

1일 음식 섭취량과 1일 체중 변화를 확인한 결과 (Table II), EtOAc 분획물을 투여한 실험군은 고지혈증비만쥐에 비하여 1일 음식섭취량이 22.4 $\pm$ 1.86 g/day (control)에서 13.5 $\pm$ 1.67 g/day로 크게 감소하였으며, 1일 체중 증가량은 2.70 $\pm$ 0.38 g/day에서 0.25 $\pm$ 0.004 g/day로 매우 유의적인 감소현상을 나타내었다. BuOH 분획물을 투여한 실험군에서도 1일 음식섭취량이 16.8 $\pm$ 2.45 g/day 1일 체중 증가량은 0.31 $\pm$ 0.009 g/day로 각각 감소하였다. FER (Food Efficiency Ratio, body weight gain / food intake)를 계산하였을 때 고지혈증쥐는 음식섭취량에 비하여 체중증가가 크게 나타난 반면 (normal: 0.096 $\pm$ 0.019 g/day, control: 0.121 $\pm$ 0.013 g/day), EtOAc 분획물이나 BuOH 분획물을 투여한 동물군에서는 FER이 0.019 $\pm$ 0.0005 및 0.018 $\pm$ 0.0015 g/day로 각각 나타나 외송 유효 분획물의 투여에 의하여 음식섭취량에 의한 체중증가 비율이 정상쥐보다도 오히려 더 크게 감소한다는 사실을 확인하였다.

**혈액에서의 지질함량** - 고지혈증 흰쥐의 혈중 지질양은 일반식이를 한 흰쥐에 비하여 phospholipid 23%, triglyceride 127.5%로 특히 중성지질의 증가 비율이 높은 것을 확인할 수 있었다 (Table III). 그러나, 외송의 EtOAc 분획물을 투여한 실험군에서는 인지질이 121.5 $\pm$ 13.0 mg/dl로 고지혈증으로 증가한 인지질양을 약 93.8% 정도 크게 감소시켰으

**Table II.** Daily food intake, body weight gain and FER of rats fed *O. japonicus* extract for 4 weeks

Treatment	Dose (mg/kg)	Food Intake	Body weight gain	FER
		(g/day)	(g/day)	
Normal		29.3±2.17 <sup>a</sup>	2.81±0.43 <sup>a</sup>	0.096±0.019 <sup>b</sup>
Control		22.4±1.86 <sup>b</sup>	2.70±0.38 <sup>ab</sup>	0.121±0.013 <sup>a</sup>
MeOH ext.	100	25.8±2.05 <sup>ab</sup>	2.18±0.29 <sup>b</sup>	0.084±0.0010 <sup>c</sup>
CHCl <sub>3</sub> fr.	100	22.9±2.01 <sup>b</sup>	2.61±0.40 <sup>ab</sup>	0.114±0.0014 <sup>a</sup>
EtOAc fr.	100	13.5±1.67 <sup>c</sup>	0.25±0.004 <sup>c</sup>	0.019±0.0005 <sup>c</sup>
BuOH fr.	100	16.8±2.45 <sup>c</sup>	0.31±0.009 <sup>c</sup>	0.018±0.0015 <sup>c</sup>
H <sub>2</sub> O fr.	100	24.9±1.83 <sup>b</sup>	2.43±0.33 <sup>ab</sup>	0.098±0.0013 <sup>b</sup>

FER: Food Efficiency Ratio = body weight gain/food intake.

Values are represent mean±S.D.(n=6). Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

**Table III.** Effect of *O. japonicus* extract on the concentration of serum lipids in rats fed a hyperlipidemic rats

Treatment	Dose (mg/kg)	Total lipid	Phospholipid	Triglyceride
		mg/dl		
Normal		200.4±23.5 <sup>c</sup>	119.8±15.8 <sup>b</sup>	67.9±9.24 <sup>d</sup>
Control		383.8±37.8 <sup>a</sup>	147.6±16.4 <sup>a</sup>	154.5±6.25 <sup>a</sup>
MeOH ext.	100	376.7±30.6 <sup>a</sup>	153.9±9.5 <sup>a</sup>	140.7±8.57 <sup>ab</sup>
CHCl <sub>3</sub> fr.	100	380.6±20.4 <sup>a</sup>	151.7±10.6 <sup>a</sup>	150.6±14.7 <sup>a</sup>
EtOAc fr.	100	327.9±23.9 <sup>b</sup>	121.5±13.0 <sup>b</sup>	114.9±6.23 <sup>c</sup>
BuOH fr.	100	341.8±20.6 <sup>ab</sup>	131.7±11.1 <sup>ab</sup>	123.5±9.43 <sup>bc</sup>
H <sub>2</sub> O fr.	100	385.6±19.7 <sup>a</sup>	140.2±12.1 <sup>ab</sup>	151.6±11.6 <sup>a</sup>

Values are represent mean±S.D.(n=6). Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other(p<0.05) by Duncan's multiple range test.

**Table IV.** Effect of *O. japonicus* extract on the hepatic lipid concentration on rat fed a hyperlipidemic diet.

Treatment	Dose (mg/kg)	Total lipid	Triglyceride	Cholesterol
		mg/g of tissue		
Normal		12.7±1.07 <sup>c</sup>	9.13±0.72 <sup>d</sup>	2.50±0.27 <sup>d</sup>
Control		28.9±2.33 <sup>ab</sup>	19.6±1.48 <sup>ab</sup>	5.27±0.49 <sup>a</sup>
MeOH ext.	100	31.7±2.10 <sup>a</sup>	21.3±2.47 <sup>a</sup>	4.86±0.36 <sup>ab</sup>
CHCl <sub>3</sub> fr.	100	27.4±1.33 <sup>bc</sup>	18.7±1.96 <sup>abc</sup>	5.28±0.27 <sup>a</sup>
EtOAc fr.	100	23.2±1.45 <sup>d</sup>	16.2±1.30 <sup>c</sup>	4.27±0.31 <sup>c</sup>
BuOH fr.	100	25.8±1.88 <sup>cd</sup>	17.6±1.36 <sup>bc</sup>	4.63±0.24 <sup>bc</sup>
H <sub>2</sub> O fr.	100	29.0±1.47 <sup>ab</sup>	19.8±1.42 <sup>ab</sup>	5.19±0.33 <sup>ab</sup>

Values are represent mean ± S.D.(n=6). Values sharing the same superscript letter are not significantly different each other (p<0.05) by Duncan,s multiple range test.

며, 중성지질 함량도 114.9±6.23 mg/dl로 약 45.7% 감소시키는데 것으로 확인 되었다. 외송의 BuOH 분획물 실험군에서도 EtOAc 분획물과 유사한 효과를 나타내어 인지질이 131.7±11.1 mg/dl로 약57.1% 감소하였고, 중성지질 함량도 123.5±9.43 mg/dl로 약 35.8% 감소하였다.

간에서의 지질양을 측정된 결과 (Table IV), 고지혈증 흰 쥐는 중성지질이 19.6±1.48 mg/g로 정상쥐에 비하여 약 114.6% 증가하였고 콜레스테롤은 5.27±0.49 mg/g로 약 110.8% 증가한 것을 알 수 있었다. 고지혈증 쥐에 EtOAc 분획물의 투여는 고지혈증으로 증가한 중성지질과 콜레스

**Table V.** Effect of fractions of *O. japonicus* on the blood lipid peroxide in rats fed a hyperlipidemic diet

Treatment	Dose (mg/kg)	Content	
		MDA	nmole/ml of serum
Normal			23.3±1.17 <sup>e</sup>
Control			42.9±2.03 <sup>a</sup>
MeOH ext.	100		38.1±1.45 <sup>bc</sup>
CHCl <sub>3</sub> fr.	100		41.6±1.53 <sup>a</sup>
EtOAc fr.	100		32.9±2.19 <sup>d</sup>
BuOH fr.	100		35.4±1.82 <sup>cd</sup>
H <sub>2</sub> O fr.	100		40.9±1.66 <sup>ab</sup>

테롤 함량을 각각 32.4% (16.2±1.30 mg/g) 및 36.1% (4.27±0.31 mg/g) 감소시켰으며, BuOH 분획물에 의해서도 중성지질 및 콜레스테롤이 각각 19.1%, 23.1% 감소하였다.

**혈중 lipid peroxide 함량** - 생리조건이 정상인지 병적상태인지의 척도가 되는 혈중 과산화 지질의 양을 MDA (malondialdehyde)의 양으로 측정하였다. (Table V) 고지혈증 유발에 의하여 MDA는 정상쥐의 것보다 (23.3±1.17 nmol/ml of serum) 84.1%가 증가하여 42.9±2.03 nmol/ml of serum을 나타내었으나 와송의 EtOAc 분획물을 투여하였을 때 32.9±2.19 nmol/ml of serum으로 고지혈증에 의해 증가한 MDA 양을 약 51.02% 감소시켰고, BuOH 분획물에 의해서도 MDA는 35.4±1.82 nmol/ml of serum으로 약 38.2%가 감소한 것을 확인하였다.

**혈중 Hydroxyl radical 함량 및 Superoxide dismutase (SOD) 활성** - 고지혈증에 의한 비정상적인 생리상태에서 hydroxyl radical은 2.56±0.09 nmol/mg protein에서 5.87±0.09 nmol/mg protein으로 radical양이 증가한 반면, superoxide radical을 제거해 주는 SOD 효소의 활성은 3.09±0.18 nmol/mg protein에서 1.99±0.13 nmol/mg protein으로 활성이 크게 감소한 것을 확인할 수 있었다 (Table VI). 그러나 EtOAc 분획물과 BuOH 분획물의 투여에 의하여 hydroxyl radical은 3.97±0.15 nmol/mg protein, 4.23±0.21 nmol/mg protein으로 크게 감소하였으며, SOD의 활성은 두 분획물의 투여에 의하여 각각 2.69±0.15 nmol/mg protein, 2.46±0.16 nmol/mg protein으로 유의적으로 증가한 것이 관찰되었다.

**간장에서의 항산화효소 활성** - 비만에 의하여 증가된 oxygen radical, 지질과산화물 등은 최종적으로 간장의 phase II 반응을 거쳐 대사되는 경우가 대부분이며 제2상 반응에서도 SOD, glutathione peroxidase, catalase가 크게 관여하는 것으로 알려져 있다. 고지혈증에 의하여 간장의 항산화효소는 각각 2.21±0.23 U/mg protein, 14.7±0.87 activity, 111.6±8.93 activity에서 1.18±0.151 U/mg protein, 6.05±0.98 activity, 60.3±5.47 activity로 약 46.6%, 58.8%, 45.9% 크게

**Table VI.** Effect of fraction of *O. japonicus* on the serum hydroxyl radical and superoxide dismutase activities in rat fed a hyperlipidemic diet.

Treatment	Dose (mg/kg)	Hydroxyl radical	SOD Activity
		nmole/mg protein	U/g protein
Normal		2.56±0.09 <sup>e</sup>	3.09±0.18 <sup>a</sup>
Control		5.87±0.19 <sup>a</sup>	1.99±0.13 <sup>d</sup>
MeOH ext.	100	4.85±0.26 <sup>c</sup>	2.27±0.13 <sup>cd</sup>
CHCl <sub>3</sub> fr.	100	5.42±0.32 <sup>b</sup>	2.03±0.17 <sup>d</sup>
EtOAc fr.	100	3.97±0.15 <sup>d</sup>	2.69±0.15 <sup>b</sup>
BuOH fr.	100	4.23±0.21 <sup>d</sup>	2.46±0.16 <sup>bc</sup>
H <sub>2</sub> O fr.	100	5.58±0.28 <sup>ab</sup>	3.82±0.22 <sup>ab</sup>

SOD 1 Unit : Defined as the amount of enzyme that inhibits the rate of adrenochrome formation to 50%.

감소된 것으로 확인되었다. (Table VII) 그러나 와송의 EtOAc 분획물의 투여에 의하여 간의 항산화효소인 SOD, glutathione peroxidase, catalase는 각각 1.75±0.20 U/mg protein, 10.2±0.74 activity, 90.5±9.60 activity로 고지혈증으로 감소되었던 활성이 약 25% 이상 증가한 것을 확인하였다. BuOH 분획물의 투여에 의해서도 간의 항산화효소의 활성이 약 20% 이상 이 증가하는 것으로 관찰되었다.

**Bleeding time 및 Plasma clotting time** - 고지혈증에 의하여 흰쥐의 bleeding time은 267.5±30.4 Sec에서 115.4±25.6 Sec으로 약 56.8% 시간이 감소되었으며 clotting time도 234.6±29.8 Sec에서 90.4±15.9 Sec으로 크게 감소되었다. (Table VIII) 이것은 손상된 혈관에 출혈이 있을 경우 과출혈을 극소화시키는 작용은 있으나, 혈병 (clot)에 의한 혈전증을 비롯한 각종 심혈관질환의 원인이 될 수 있으므로 고지혈증에 의해 파생될 수 있는 합병증의 원인인자로 간주가 된다. 그러나 와송의 EtOAc 분획물에 의하여 bleeding time과 clotting time은 각각 210.3±29.8 Sec 및 178.8±25.5Sec으로 증가하여 고지혈증에 의하여 감소한 출혈시간 및 혈액응고 시간을 각각 62.4%, 61.3% 증가시키는 것으로 확인되었다. 이것은 BuOH 분획물을 투여할 때도 48.7% 및 31.0% 정도 출혈 및 혈액응고 시간을 각각 연장시키는 것으로 관찰되었다.

**Tissue factor** - Tissue factor는 조직의 혈관내피세포에 존재하며 혈관 손상 시 지혈반응에 필수적 인자로 작용하는 lipoprotein으로 알려져 있다. 특히, 뇌와 폐에 존재하는 tissue factor는 고지혈증 쥐에서 활성이 약 2~3배 증가하여 혈액응고를 촉진시키나, 와송의 EtOAc 분획물과 BuOH 분획물의 투여에 의하여 유의적으로 활성이 감소하는 것으로 확인되었다. (Table IX)

**Table VII.** Effect of fraction of *O. japonicus* on hepatic antioxidant enzymes activities of rats fed hyperlipidemic diet

Treatment	Dose (mg/kg)	SOD	GSH-Px	Catalase
		U/mg protein	Activity	
Normal		2.21±0.23 <sup>a</sup>	14.7±0.87 <sup>a</sup>	111.6±8.93 <sup>a</sup>
Control		1.18±0.151 <sup>e</sup>	6.05±0.98 <sup>e</sup>	60.3±5.47 <sup>c</sup>
MeOH ext.	100	1.50±0.12 <sup>bcd</sup>	8.27±0.81 <sup>cd</sup>	71.6±4.49 <sup>c</sup>
CHCl <sub>3</sub> fr.	100	1.32±0.14 <sup>de</sup>	7.39±0.63 <sup>de</sup>	62.7±3.67 <sup>c</sup>
EtOAc fr.	100	1.75±0.20 <sup>b</sup>	10.2±0.74 <sup>b</sup>	90.5±9.60 <sup>b</sup>
BuOH fr.	100	1.64±0.19 <sup>bc</sup>	9.35±0.85 <sup>bc</sup>	83.6±6.56 <sup>b</sup>
H <sub>2</sub> O fr.	100	1.38±0.18 <sup>cde</sup>	6.92±0.71 <sup>de</sup>	65.4±5.11 <sup>c</sup>

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for six experiments. Values followed by the same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ).

SOD: superoxide dismutase; one unit of SOD was defined as the which inhibited the reduced of alkaline DMSO-mediated cytochrome C by 50%.

GSH-Px: glutathione peroxidase; oxidized NADPH nmole/mg protein/min.

Catalase: decreased hydrogen peroxide  $\mu$ mole/mg protein.

**Table VIII.** Effect of fraction of *O. japonicus* on the bleeding time and plasma clotting time in rats fed a hyperlipidemic diet.

Treatment	Dose (mg/kg)	Bleeding Time	Clotting Time
		Sec	Sec
Normal		267.5±30.4 <sup>a</sup>	234.6±29.8 <sup>a</sup>
Control		115.4±25.6 <sup>d</sup>	90.4±15.9 <sup>d</sup>
MeOH ext.	100	179.3±21.0 <sup>bc</sup>	123.7±19.3 <sup>cd</sup>
CHCl <sub>3</sub> fr.	100	128.2±28.1 <sup>d</sup>	114.3±20.1 <sup>cd</sup>
EtOAc fr.	100	210.3±29.8 <sup>b</sup>	178.8±25.5 <sup>b</sup>
BuOH fr.	100	189.5±23.7 <sup>b</sup>	135.2±21.7 <sup>c</sup>
H <sub>2</sub> O fr.	100	133.75±30.2 <sup>cd</sup>	105.9±19.4 <sup>cd</sup>

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean±S.D. for six experiments. Values followed by the same letter are not significantly different ( $p < 0.05$ ).

**Table IX.** Effect of fraction of *O. japonicus* on the tissue factor activity in rat fed a hyperlipidemic diet

Treatment	Dose (mg/kg)	Brain	Lung
		Unit/mg protein	
Normal		3.17±0.56 <sup>e</sup>	8.63±0.62 <sup>d</sup>
Control		7.43±0.49 <sup>a</sup>	23.6±2.56 <sup>a</sup>
MeOH ext.	100	6.69±0.21 <sup>bed</sup>	20.3±0.91 <sup>bc</sup>
CHCl <sub>3</sub> fr.	100	7.16±0.22 <sup>ab</sup>	22.6±1.01 <sup>ab</sup>
EtOAc fr.	100	6.13±0.40 <sup>d</sup>	18.6±0.87 <sup>c</sup>
BuOH fr.	100	6.48±0.29 <sup>cd</sup>	19.2±1.27 <sup>c</sup>
H <sub>2</sub> O fr.	100	7.02±0.19 <sup>abc</sup>	24.1±0.96 <sup>a</sup>

## 결론

와송의 추출물을 CHCl<sub>3</sub>, EtOAc, n-BuOH 및 물분획물로 나누어, 각 분획물의 주성분을 TLC 및 column chromatography에 의해 확인한 결과, CHCl<sub>3</sub> 분획물에서 friedelin,  $\beta$ -sitosterol 등의 terpenes와 sterols, EtOAc 분획물에서는 kaempferol, astrgalin, isoquercitrin 등의 flavonoids와 소량의 sterols 그리고 BuOH 분획물에서는 dextrose 등의 당이 확인되었다. 와송은 항암효과가 뛰어나다는 이유로 독성이 매우 클 것으로 간주하여 일반 건강보조식품에서는 사용을 제한하는 경우가 다수이나 본 연구자들에 의하여 와송의 MeOH 추출물을 500 mg/kg 및 2 g/kg을 rats에 2주간 투여한 아급성 독성실험 결과, 심장, 간, 비장, 신장, 폐 등 각 조직의 무게 변화 및 형태학적 독성은 관찰되지 않았다.

Flavonoids를 주성분으로 함유한 와송의 EtOAc 분획물의 항고지혈증 효과가 가장 우수하게 관찰되었으며, 체중감소 효과, 1일 음식섭취량 감소, 1일 체중 증가량 감소 등 체중 증가와 관련된 비만인자에 매우 직접적인 효과를 나타내었다. 또한 고지혈증으로 나타난 혈액 및 간에서의 인지질, 중성지질, 콜레스테롤의 양을 매우 유의적으로 감소시켜 고지혈증으로 나타나는 지방양 감소에도 크게 연관되어 있음을 확인하였다.

고지혈증에 의한 비정상적인 생리조건이 형성되면 혈중에 oxygen radical 및 각종 radical이 증가하고, 이들은 과산화지질 및 세포 내 상해를 가져와 결국 병적 생리현상을 일으키는 것으로 보고되어 있다<sup>20</sup>. 이것은 radical의 하나인 hydroxyl radical의 함량, 그리고 oxygen radical과 불포화지방산이 반응하여 생성된 지질과산화물의 최종 분해산물인 MDA의 양으로 확인하였다. 와송은 혈중 MDA 및 hydroxyl

radical의 양을 크게 감소시켰으며, radical 소거능력이 있는 혈중 SOD 및 간에 함유된 항산화효소인 SOD, glutathione peroxidase, catalase의 활성은 크게 증가시키는 것으로 확인되었다. 이것은 와송 분획물들이 고지혈증에 의해 증가된 radical을 직간접적으로 감소시켜, radical에 의해 나타나는 고지혈증의 각종 합병증을 크게 완화 시킬 것으로 추정되었다.

특히 와송분획물은 bleeding time, clotting time, tissue factor를 감소시킴으로써 고지혈증 시 흔히 수반되는 혈전증을 비롯한 각종 순환기계 질환에도 매우 유의할 것으로 확인되었다.

## 사 사

이 논문은 2004년 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국 학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구임. (KRF-2004-050-E00006)

## 인용문헌

- Jung, H. J., Nam, J. H., Park, H. J., Lee, K. T., Park, K. K., Kim, W. B. and Choi, J. (2007) The MeOH extract of *Pleurostachyum kamschaticum* and its active component budlejasaponin inhibits intrinsic and extrinsic hyperlipidemia and hypercholesterolemia in the rat. *J. Ethnopharmacol.* **112**: 255-261.
- 특허청 (2008) 살빼는 약도 천연물 이용 활발, *Patent*.
- Park, H. J., Nam, J. H., Jung, H. J., Lee, M. S., Lee, K. T., Jung, M. H. and Choi, J. W. (2005) Inhibitory effect of euscaphic acid and tormentic acid from the Roots of *Rosa urugosa* on high fat diet induced obesity. *Kor. J. Pharmacogn.* **36**: 324-331.
- Moon, H. S., Lee, H. G., Choi, Y. J., Kim, T. G. and Cho, C. S. (2007) Proposed mechanism of (-)-epigallocatechin-3-gallate for anti-obesity. *Chem. Biol. Interact.* **167**: 85-98.
- Jung, H. J., Choi, J., Nam, J. H., Park, H. J. (2007) Anti-ulcerogenic effects of the flavonoid-rich fraction from the extract of *Orostachys japonicus* in mice. *J. Med. Food* **10**: 702-706.
- Park, H. J., Moon, S. H., Kim, J. O., Lee, S. H. and Choi, J. S. (1991) A study on the chemical constituents of *Orostachys japonicus* A Berger. *Kor. J. Pharmacogn* **22**: 78-84.
- Park, H. J., Young, H. S., Park, K. Y., Rhee, S. H., Chung, H. Y. and Choi J. S. (1991) Flavonoids from the Whole Plants of *Orostachys japonicus*, *Arch. Pharm. Res.* **14**: 167-171.
- Ven Gent, C. M. and Roseleur, O. J. (1974) Quantitative determination of phospholipids in blood serum or plasma by a nondestructive method, *Clin. Chim. Acta.* **57**: 197-203.
- McGowan, M. W., Artiss, J. D. and Strandbergh, D. R. (1983) A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. *Clin. Chem.* **29**: 538-542.
- Richard, W. (1976) Use of cholesterol oxidase for assay of total and free cholesterol in serum by continuous flow analysis. *Clin. Chem.* **22**: 1579-1588.
- Yagi, K. (1987) Lipid peroxides and human diseases. *Chem. Phys. Lipids.* **45**: 337-351.
- Kobatake, Y., Saito, M., Kurda, K., Kobayashi, S. and Innami, S. (1987) Influence of fish consumption on serum lipid and lipid peroxide concentrations in middle aged subjects. *J. Japan Soc. Nutr. & Food Sci.* **40**: 103-107.
- Gatecki, P., Pietras, T. and Florkowki, A. (2005) Pro- and antioxidant processes in schizophrenics with tardive dyskinesia. *Psychiatr Pol.* **39**: 1131-1141.
- Oyanagui, Y. (1984) Reevaluation of assay methods and establishment of Kit for superoxide dismutase activity. *Anal. Biochem.* **42**: 290-296.
- Berence, C. W., Michel, V., Allain, F., Catherine, G., Veronique, K., Josianne, A. and Marie, J. R. (1992) Selenium, glutathione peroxidase and lipid peroxidation products before and after selenium supplementation. *Clin. Chim. Acta.* **207**: 137-142.
- Aebi, H. (1974) Catalase in method of enzymatic analysis. Academic press (New York) **2**: 673-675.
- Han, Y. N., Baik, S. K., Kim, T. H. and Han, B. H. (1987) Antithrombotic Activities of Saponins from *Ilex pubescens*. *Arch. Pharm. Res.* **10**: 115-120.
- Surprenant, Y. M. and Zuckerman, S. H. (1989) A novel microtiter plate assay for the quantitation of procoagulant activity on adherent monocytes, macrophages and endothelial cells. *Thromb. Res.* **53**: 339-346.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Rendall, R. J. (1951) Protein Measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **256**: 9994-9998.
- Jo, H. S. (2004) Protective Mechanism of Flavonoid Isolated from *Rhus verniciflua* Stokes on the Paraquat Toxicity and Hyperlipidemic Diet in Rats. Ph. D. Thesis in Department of Pharmacy Graduate School Kyungshung University, 54-64.

(2009년 2월 10일)