

Rhodiola rosea Root의 抗酸化 효능에 대한 연구

이영종*

가천대학교 한의과대학 본초학교실

A Study on the Anti-oxidative Activities of *Rhodiola rosea* Root

Young-Jong Lee*

Dept. of Herbology, College of Oriental Medicine, Gachon University Seongnam 461-701, Korea

ABSTRACT

Objectives : *Rhodiola rosea* L. (Crassulaceae) is a plant living at the areas of high-altitude mountain, and *Rhodiolae Radix*(the root of *R. rosea*) has been used as a traditional medicine to decrease the symptoms of mental- or physical-stress in Asia and Europe. To examine the efficacy of *Rhodiolae Radix* on the oxidative stress, the anti-oxidative effects of the radix were examined,

Methods : The effects of *Rhodiolae Radix* on several oxidative factors were examined *in vitro*, and also the effects were tested in the liver of rats which were treated with a high dose of alcohol during 2 weeks.

Results : The extract of *Rhodiolae Radix* *in vitro* scavenged some oxidants, such as DPPH, Superoxide anion radical and LDL, and the extract also inhibited the oxidative capacity of linoleic acid, significantly. Meanwhile, in the *in vivo* test, the methanol-extract decreased some oxidation parameters, such as relative liver weight, TBARS and SOD activities, and also increased catalase activity in the liver of alcohol-loaded rats. But, the extract had no effects on GSH content and GSH-px activity in the rats.

Conclusion : The root of *Rhodiola rosea* has a strong anti-oxidative capacity, and also has some preventive properties against the alcoholic stress.

Key words : *Rhodiola rosea* L., anti-oxidative effect, alcohol-treatment.

서 론

紅景天은 중국약전¹⁾에 돌나물과(景天科)의 大花紅景天 *Rhodiola crenulata* H. Ohba의 뿌리 및 근경으로 되어 있고, 중화본초²⁾에는 돌나물과(景天科)의 庫頁紅景天 *Rhodiola sachalinensis* A. Bor., 聖地紅景天 *Rhodiola sacra* S. H. Fu 및 唐古特紅景天 *Rhodiola allgida* Fish, et Mey. var. *tangutica* S. H. Fu의 전초로 되어 있어 기원식물과 약용부위가 다르다. 홍경천의 효능에 대하여 중국약전¹⁾에는 홍경천이 益氣活血, 通脈平喘의 효능이 있어서 氣虛血瘀, 胸痺心痛, 中風偏癱, 倦怠氣喘 등을 치료한다고 하였으며, 吉林藥材圖志³⁾에는 홍경천에 扶正固本の 효능이 있어 노년성 心筋衰弱과 陰痿, 産後와 病後 虛弱, 貧血, 糖尿病, 低血壓, 健忘症 등을 치료한다고 되어 있다.

홍경천 식물종(*Rhodiola spp.*)들은 산소가 희박하고 일교

차가 크며 한랭건조한 기후 등 일반식물들이 자라기에는 환경이 매우 열악한 해발 2,000m 이상의 고지대에 서식한다^{4,5)}. 이런 특성 때문에 한랭건조한 지역이 넓은 러시아에서 군사의학, 항공우주의학 및 스포츠의학적 필요성으로 러시아에 널리 서식하는 *Rhodiola* 속을 기원으로 하는 홍경천에 대한 연구가 활발히 이루어져, 허탈상태, 피로손상, 신경장애, 근무력증, 산소결핍증 등 심신허약 증상에 대한 홍경천의 효능검증이 시도되었으며, 이후 여러 연구팀들에 의하여 홍경천에는 근육기능 향상, 항산화, 기억력향상, 면역증진, 항균, 항암, 항비만 등 효능이 있음이 보고되었다^{4,5)}. 이와같이 홍경천이 근육기능 향상, 기억력 향상 등 심신을 강화시키는 약리작용을 구명하기 위한 여러 시도가 있었고, 가장 연구가 많이 이루어진 부분은 항산화효능 분야이다. 이는 여러 연구자들이 홍경천의 심신을 강화시키는 약리작용 가운데 항산화효능이 가장 핵심적인 기능을 할 것이라고 인식하고 있음을 시사한

*교신저자 : 이영종, 경기도 성남시 수정구 성남대로 1342. 가천대학교 한의과대학 본초학교실
· Tel : 031-750-5415 · E-mail : garak@gachon.ac.kr
· 접수 : 2012년 9월 3일 · 수정 : 2012년 11월 3일 · 채택 : 2012년 11월 6일

다. *R. rosea*의 항산화효능에 대해서는 Qian 등⁶⁾이 적혈구, Huang 등⁷⁾이 수영하는 흰쥐, Qu 등⁸⁾이 당뇨유발 쥐, Schriener 등⁹⁾이 초파리 등을 대상으로 실험하여 그 효능을 보고한 바 있으며, 국내에서는 배¹⁰⁾가 높은산돌꽃 *R. sachalinensis* 추출물의 항산화효능을 보고한 바 있다.

*R. rosea*는 러시아에서는 golden root, rose root 등으로 불리며 중앙아시아, 룩산맥, 알프스, 피레네 산맥, 스칸디나비아, 아이슬란드, 영국, 에이레 등지에 분포한다^{4,5)}. 이에 저자는 *R. rosea*의 항산화 효과를 검증하기 위하여, *R. rosea* 뿌리의 추출물을 준비하여, *in vitro*에서 추출물의 산화반응 억제효과를 검사하는 한편, 알콜섭취로 산화적 스트레스를 유발한 흰쥐에 추출물을 투여하여 항산화효과를 검사한 결과, 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

실험에 사용한 *Rhodiola rosea*의 뿌리줄기(이하 '홍경천'이라 함. *Rhodiola Radix et Rhizoma*)는 러시아 고르노알타이 공화국에서 자생하는 식물의 뿌리와 뿌리줄기를 구입하여, 가천대학교 한의과대학 본초학교실에서 감정한 후 50℃ 건조기에서 건조시킨 다음 사용하였다.

2) 검액의 조제

건조된 홍경천의 물 추출물은 건조된 홍경천 중량의 10배량의 증류수를 가해 상온에서 24 시간 진탕 추출하고, 추출한 것을 여과한 후, 다시 10배량의 증류수를 가해 상온에서 24 시간 진탕추출한 다음, 1차 추출액과 2차 추출액을 혼합하여 동결건조기에서 건조하였다. 메탄올 추출물은 Accelerated Solvent Extractor (ASE300 : Dionex cooperation, USA)를 이용하여 건조시료 중량의 5 배량의 100% 메탄올을 넣고, 추출온도 50℃, 추출시간은 5 분씩 3회, 추출압력은 1,500 psi에서 1차 추출액을 얻고, 다시 건조시료 중량의 5 배량의 100% 메탄올을 넣고, 환류냉각추출장치를 이용하여 50℃에서 2 시간 추출하고 여과하여 2차 추출액을 얻은 다음, 1차 추출액과 2차 추출액을 혼합하여 감압농축장치를 이용하여 용매를 제거 후 추출물을 얻었다. 최종 물추출물과 메탄올 추출물은 홍경천 100 g에서 건조분말 22 g과 33 g을 각각 얻었다.

2. *in vitro* 항산화 실험

1) Superoxide anion radical (H₂O₂) 소거능

Nishikimi 등¹¹⁾의 방법에 의해 다음과 같이 실험하였다. 200, 100, 50, 10, 5 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 각 시료 0.5 ml을 0.1 M Tris-HCl 완충용액(pH 8.5) 0.1 ml, 100 μM PMS 0.2 ml, 500 μM NBT 0.2 ml 및 500 μM NADH 0.4 ml를 가해 560 nm에서 흡광도 측정하였으며 결과는 소거능(%)으로 나타내었다.

2) α, α -diphenyl- β -picrylhydrazyl (DPPH) 소거능

Bloi¹²⁾의 방법에 준해 1.5×10^{-4} M DPPH 용액 2.97 ml를

일정농도의 추출물 0.03 ml와 함께 혼합하고 3분 후 517 nm에서 흡광도를 측정된 후 대조군에 대한 소거능(%)을 산출하였다.

3) Low density lipoprotein (LDL) 산화저해

Miller 등¹³⁾의 방법을 변형하여 다음과 같이 실험하였다. 50~100 μg 의 protein을 함유하도록 조제한 human LDL을 일정 농도의 추출물 0.02 ml, 10 mM phosphate-buffered saline(PBS) 0.115 ml, 0.25 mM CuSO₄ 0.04 ml와 함께 37℃에서 3시간 동안 반응시켰다. 이 반응액에 20% TCA 1 ml를 가해 반응을 중단시킨 후 0.05 N NaOH에 녹인 0.67% TBA 1 ml를 가하고 95℃에서 15 분간 가열, 냉각을 순차적으로 행하였다. 이 반응액을 3,000 rpm에서 15 분간 원심분리하여 분리된 상등액 중에 함유된 malondialdehyde(MDA)의 양을 540 nm에서 측정하여 대조군에 대한 저해율(%)로서 결과를 나타내었다.

4) Linoleic acid 과산화저해

Haraguchi 등¹⁴⁾의 방법에 따라 에탄올에 녹인 2.51% linoleic acid 0.4 ml, 0.04 M phosphate buffer (pH 7.0) 0.8 ml, 증류수 0.77 ml 그리고 추출물 0.03 ml로 반응액을 조성, 40℃의 암소에서 반응시켰다. 24시간 후 이 반응액 0.1 ml을 취해 75% ethanol 2.7 ml, 30% ammonium thiocyanate 0.1 ml, 3.5% HCl에 녹인 0.02 M ferrous chloride 0.1 ml와 혼합한 후 500 nm에서 흡광도를 측정하여 산화정도를 관찰하였고 결과는 대조군에 대한 저해율(%)로서 나타내었다.

5) 총페놀 함량

항산화 활성에 영향을 미치는 페놀화합물의 양을 비교하기 위해 Kim 등¹⁵⁾의 방법에 준하여 일정 농도의 추출물 0.1 ml와 2% Na₂CO₃ 2 ml을 혼합하고 2분 후 50% Folin-Ciocalteu reagent 0.1 ml를 첨가하였다. 상온에서 30분간 방치한 후 750 nm에서 측정된 흡광도를 tannic acid를 표준물질로 사용한 검량선식($r=0.9973$)에 대입하여 총페놀 함량을 산출하였다.

3. *in vivo* 항산화 실험

1) 실험 동물, 식이조성

체중 160~180 g의 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐를 도입하여, 식이군별로 8마리씩 난괴법에 따라 배정하여 1주일간 예비사육한 후 실험에 사용하였다. 표 1 과 같이, 정상군, 음성대조군, 양성대조군 및 실험군으로 나누어 2주간 본 사육을 행하였으며, 본 사육 2주일 동안 매일 40% 에탄올을 경구투여함으로써(40% ethanol 10g/kg body wt/day) 산화적 스트레스를 유발하였다. 양성대조군에는 강력한 항산화제인 silymarin(1g/kg body wt/day)을, 3개의 실험군에는 홍경천메탄올추출물을 각각 0.02, 0.6 및 1g(extract g/kg body wt/day)을 병행하여 투여하였다. 고형사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였고 매일 각 동물들의 체중 변화를 기록하였고 사육 환경은 온도 22 \pm 2℃, 습도 55%, 명암 주기 12시간으로 유지하였다.

Table 1. Experiment design for in vivo tests, n=8

	Normal	(-) control	(+) control	Tests (n=8 x 3 groups)
Treatment (with)	Water	Water	silymarin ^{b)}	methanol-ext ^{c)}
EtOH(40%)–treatment ^{a)}	No	Yes	Yes	Yes

EtOH(40%)–treatment^{a)} : 40% ethanol 10g/kg body wt/day; during 2 weeks
 silymarin–treatment^{b)} : 1g/kg body wt/day
 methanol–ext^{c)} : (0,02, 0,6 or 1)g of methanol extract/kg body wt/day

2) 장기 적출 및 효소액 조제

간장은 0.9%의 식염수로 관류한 후 적출하여 세척하고 여과지로 닦은 다음 중량을 기록하였고 -70℃의 냉동고에 보관하면서 조직 균질액 및 효소액 조제에 사용하였다(Fig. 1).

Liver tissue

↓ Add 10 vol of 0.1M phosphate buffer

Homogenize on ice

↓

Liver homogenate (Collect a part for TBARS- or GSH-assay)

↓

Centrifuge (600×g, 15min) and collect sup.

↓

Re-centrifuge sup.(8,000×g, 10min), and collect ppt for catalase assay

↓

Re-centrifuge the sup.(105,000×g, 60min)

↓

Collect sup. for SOD- or GSH-px assay)

Fig. 1. Preparation of tissue homogenate and enzyme solution.

3) Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) 함량 측정

간장의 TBARS 함량은 Botsoglou 등¹⁶⁾의 방법에 준해 간 균질액 2 ml, 10 % aqueous TCA 2 ml, 0.8 % BHT (butylated hydroxy toluene) 함유 hexane 2 ml을 혼합한 후 600×g에서 10 분간 원심분리하고 상층을 제거하였다. 상등액 중 2ml을 취해 5 % TCA 2 ml 가한 후 원심분리하여 얻어진 상등액 0.5 ml을 5 % TCA 0.5 ml, 0.8 % TBA 1 ml와 혼합하고 끓는 물에서 15분간 반응시킨 후 급냉하였다. 이 반응액의 흡광도를 521.5 nm에서 측정하였으며, 표준물질로 동일하게 처리하여 흡광도 측정하고 시료의 MDA 함량을 TEP (1,1,3,3-tetraethoxypropane)로부터 조제된 MDA에 의해 작성된 검량선 식에 근거하여 함량을 산출하였다.

4) Glutathione(GSH) 함량 측정

GSH 함량은 Ellman의 방법¹⁷⁾에 준해 간장의 TBARS정량에 사용된 전처리과정과 동일한 과정으로 얻어진 균질액에 disulfide reagent (5,5'-dithiobis (2-nitro benzoic acid 39.636 mg in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH8.0 1 L) 2.7 ml를 가하여 청색 화합물을 얻었다. 이 청색 화합물을 421 nm에서 측정한 값을 GSH standard를 사용한 검량선

에 대입하여 산출하고 조직 1 g당 glutathione (μg)으로 나타내었다.

5) 간장 중 superoxide dismutase (SOD) 활성 측정

SOD 활성 (unit/mg protein)은 Oh 등¹⁸⁾의 방법에 따라 75 mM sodium xanthine 50 μl와 10 mM hydroxylamine hydrochloride 50 μl, 원심분리한 조직 상등액 500 μl 그리고 증류수 200 μl를 혼합한 후 37℃에서 10 분간 예비 배양하였다. 여기에 xanthine oxidase (0.1 U/ml) 200 μl를 가하고 다시 37 °C에서 20 분간 배양한 다음 1 % sulfanilamide 1 ml, 0.02 % N-(1-naphthyl)ethylenediamine 1 ml를 가한 후 실온에서 20 분간 방치한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그리고 SOD standard에 대하여 동일한 과정을 행한 후 검량선을 얻었으며, 이 검량선으로부터 총 SOD값을 구한 후 이 값에서 Mn-SOD의 값을 뺀 것을 Cu, Zn-SOD로 하였다. 또한 Mn-SOD 활성은 반응액 중에서 증류수 대신에 4 mM KCN을 가하는 것만을 달리하여 Cu, Zn-SOD와 같은 실험과정에 의해 분석하였고, 얻어진 흡광도를 SOD standard 검량선에 대입하여 활성(unit/mg protein)을 나타내었다.

6) 간장 중 glutathione peroxidase (GSH-px) 활성 측정

GSH-px의 활성은 Flohe¹⁹⁾의 방법에 따라 측정하였다. 1×10⁻³ M sodium azide와 1 mM EDTA를 함유하는 0.1 M potassium phosphate buffer (pH7.0) 500 μl, 효소액 100 μl, GSH reductase (2.768 U/ml) 100 μl, 1×10⁻² M GSH 100 μl를 혼합, 37 °C에서 10 분 동안 예비 배양한 후 이 반응액에 0.1 % NaHCO₃에 녹인 1.5×10⁻³ M NADPH 100 μl를 가해 1분간 그리고 1.5×10⁻³M H₂O₂ 100 μl를 가한 후 다시 1 분간 340 nm에서 흡광도를 측정하였다. 결과는 흡광도와 NADPH의 molecular extinction coefficient (E= 6.22×10⁶ cm²)로부터 효소액과 blank의 1 분간의 NADPH 농도의 변화 (Δ[NADPH]/min)를 산출하고, 이 효소액의 수치에서 blank의 수치와 GSH-px와 관련없는 인자에 의해 나타나는 Δ[NADPH]/min를 빼준 값을 다음의 식에 대입하여 GSH-px의 활성 (U_k/mg protein)을 산출하였다.

$$U_k = 0.868(\Delta [NADPH]/[GSH_0]) \times t \times (V_i/V_s)$$

V_i/V_s : 희석배수,

V_i : incubation volume,

V_s : initial sample volume,

GSH₀ : glutathione의 초기 농도

7) 간장 중 catalase 활성 측정

Catalase 활성 (k/mg protein)은 Abei²⁰⁾의 방법에 따라 0.1 ml의 원심분리한 상등액, 기질인 10.5 mM H₂O₂ 그리고 50 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)를 합하여 3 ml이 되게 한 후 25 °C에서 30 초 동안 반응시켰으며, 이 반응액을 240 nm에서 H₂O₂의 흡광도 변화로 효소 활성을 측정하였다. 효소활성(k/mg protein)은 1분간 1μM H₂O₂를 분해시키는 데 요구되는 효소양으로 나타내었다.

8) 단백질 함량 측정

조직의 단백질 함량은 Bradford(21)의 방법에 준해 10~100 µg의 단백질을 함유하는 용액과 단백질시약을 혼합, 595 nm에서 흡광도를 측정하여 구하였으며 검량선 작성을 위해 bovine serum albumin을 표준물질로 사용하였다.

4. 통계분석

in vivo 실험의 유의성은 Statistical analysis systems(SAS)을 이용하여 p<0.05 이하의 수준에서 one way ANOVA test 및 Duncan's multiple range test로 검정하였다. 통계분석에는 8 개체씩 사용된 각 실험군에서 다른 개체들과 실험치가 많이 벗어나는 2 개는 제외하고 6 개체씩의 실험치를 사용하였다.

결 과

1. *in vitro* 항산화 실험

1) Superoxide anion radical 소거능

홍경천으로부터 얻은 메탄올 추출물과 물 추출물은 모두 50 ppm의 농도 이상에서 항산화능을 보였고, 100 ppm의 농도에서는 70% 이상의 superoxide anion radical 소거능을 보였다. 함께 비교된 강력한 항산화제인 정제 ascorbic acid 투여군의 경우에 50 ppm이 투여되었을 때 라디칼 소거능이 미미한 점을 고려할 때, 홍경천추출물의 superoxide anion radical 소거능은 강력하다고 판단되었다. 홍경천 추출물은 100 ppm 이상의 농도에서는 물 추출물이 메탄올 추출물보다 상대적으로 더 높은 소거능을 보였으나, 50 ppm 이하의 농도에서는 메탄올 추출물의 소거능이 물 추출물보다 더 강한 라디칼 소거 경향성을 보였다(Fig. 2).

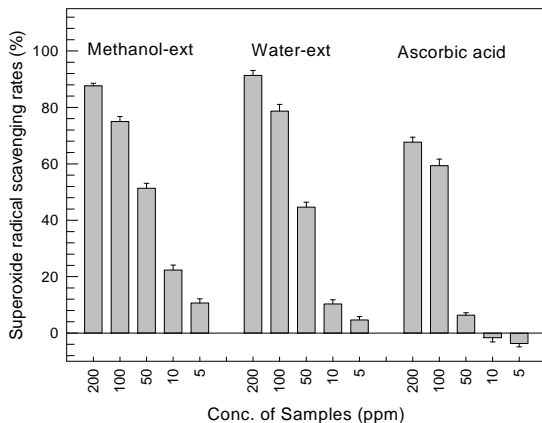


Fig. 2. Superoxide radical-scavenging activity of the extracts obtained from Rhodiola Radix.

2) α,α -diphenyl-β -picrylhydrazyl (DPPH) 소거능

홍경천 추출물의 DPPH 라디칼 소거능을 실험한 결과는 그림 3과 같았다. 메탄올 추출물과 물 추출물은 모두 10 ppm 이상의 농도에서 강력한 DPPH 소거능을 보였고 두 추출물은 비슷한 소거능을 나타내었다. 홍경천 추출물의 DPPH 소거능은 강력한 항산화제로 알려진 α -토코페롤(vitamin E)

과 비교할 때도 10 ppm 이상의 농도에서는 대등한 소거능을 보였다(Fig. 3).

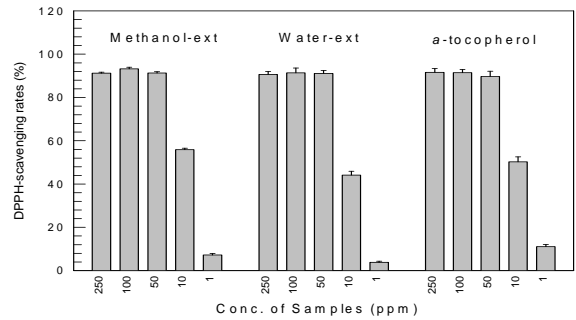


Fig. 3. DPPH-scavenging effects of the methanol- or water-extract obtained from Rhodiola Radix. The effects was compared with that of α -tocopherol(vitamin E).

3) Low density lipoprotein (LDL) 산화 저해

사람의 혈청 중 저밀도지단백(LDL)의 산화에 대한 홍경천의 저해활성을 분석하였다. 홍경천의 물 추출물은 1 ppm의 농도에서 46%의 저해능을 보였고, 첨가되는 양이 증가할수록 저해능은 유의하게 증가하였으며, 그 저해능은 α -토코페롤을 동일 농도로 첨가한 경우들보다도 더 강하였다. 메탄올 추출물의 경우에는 메탄올 추출물을 1 ppm의 농도로 첨가하였을 때는 82 %의 LDL 산화저해능을 보였으나, 5, 10, 50 및 100 ppm의 농도로 첨가된 경우에는 각각 30, 24, 50, 63%의 저해능을 보이는 등 10 ppm 이상으로 첨가된 경우에만 첨가된 량과 비례하는 경향성을 보였다(Fig. 4).

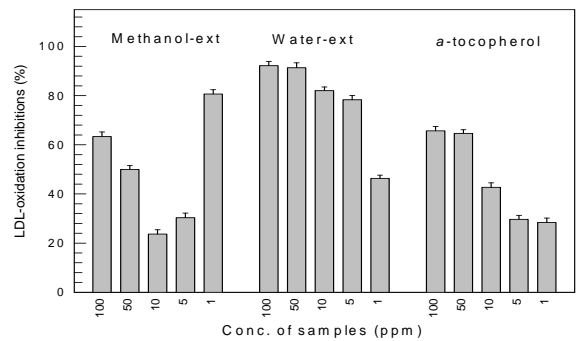


Fig. 4. Inhibitory activity on LDL oxidation of the methanol- or water-extract obtained from Rhodiola Radix.

4) Linoleic acid 제거능

홍경천 추출물의 linoleic acid 제거능을 분석한 결과는 그림 5와 같았다. 메탄올 추출물 및 물 추출물은 50 ppm 이상으로 첨가되었을 때 60% 이상의 강력한 linoleic acid 제거능을 보였으며, 메탄올 추출물이 물 추출물보다 그 효과가 더 강한 경향성을 보였다. 그 제거효과는 50 ppm 이상에서는 α -토코페롤의 효과에 거의 대등하였으나, 10 ppm의 첨가된 경우에는 α -토코페롤보다 그 효과가 다소 적었다(Fig. 5).

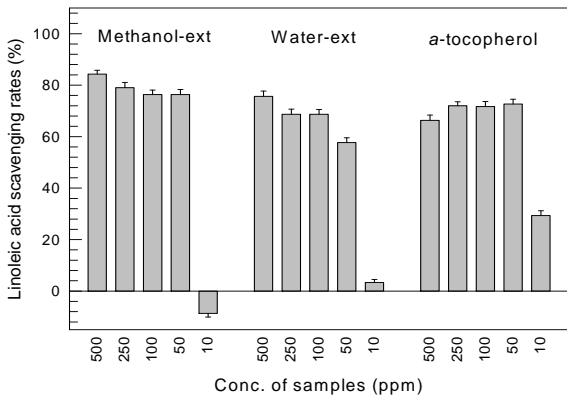


Fig. 5. The effects of methanol- or water-extract obtained from Rhodiola Radix on linoleic acid oxidation.

5) 총페놀 함량

항산화활성에 정적인 상관성을 나타내는 페놀성분의 함량 차이를 비교하기 위해 홍경천 추출물의 총페놀 함량을 실험하였다. 그 결과 메탄올 추출물에는 무게대비 18.12%, 물 추출물은 16.44%의 함량의 페놀성분이 함유되어 있었다(Table 2).

Table 2. Total phenol content of the extract obtained from Rhodiola Radix.

Extracts from Rhodiola Radix	total phenol (%: wt/wt)
Methanol extract	18.12 ± 0.29
Water extract	16.44 ± 0.37

2. *in vivo* 실험

홍경천의 흰쥐 간장 중에서 작용하는 홍경천의 영향을 검사하는 *in vivo* 실험을 위해서 흰쥐에 과도한 알콜을 투여하여 간손상을 유발하는 동시에 홍경천을 투여함으로써 홍경천의 영향을 조사 하였다. 알콜만을 투여한 음성대조군(N-cont)을 비교기준으로 하여, 알콜과 홍경천을 병행투여한 실험군, 그리고 알콜과 강력한 항산화제인 silymarin을 병행투여한 양성대조군(P-cont)을 상호비교하여 홍경천의 항산화능을 검사하였다. 상기 *in vitro* 실험결과에서 언급한 바와 같이, 홍경천에서 얻은 물 추출물과 메탄올 추출물의 *in vitro* 상에서의 항산화 효과는 50 ppm 이상의 농도에서는 거의 대등하나, 메탄올 추출물의 총페놀함량이 물 추출물보다 다소 높았기 때문에 *in vivo* 실험에서 홍경천 검액으로는 메탄올 추출물을 사용하였다.

1) 상대간장중량 (relative liver weights)

음성대조군(N-Cont)의 간장중량은 정상군(Nor)에 비하여 증가된 경향성을 보였으나, 그 증가정도가 유의수준은 아니었다. 홍경천투여군(Rr)은 3 실험군 모두 음성대조군에 비하여 유의하게 중량이 감소하였다(p<0.05). Silymarin이 투여된 양성대조군(P-Cont)의 상대간장중량 또한 음성대조군에 비하여 유의하게 중량이 감소하였으나(p<0.05), 그 감소폭은 홍경천투여군보다 다소 작은 경향성을 보였다(Fig. 6).

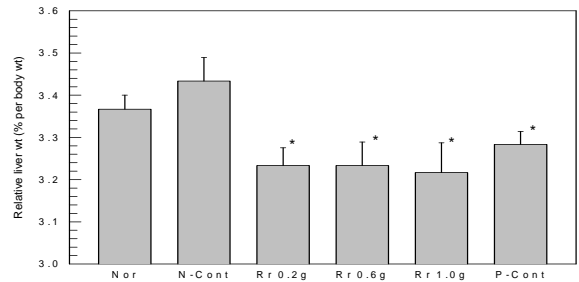


Fig. 6. Liver weights of the rat which was treated with alcohol during 2 weeks. Nor(normal); N-Cont(negative control, alcohol-treated); Rr(alcohol-treated and administrated with Rr); P-Cont(alcohol-treated and administrated with silymarin); Rr(methanol-extract from Rhodiola Radix); *(p<0.05 compared with N-Cont); **(p<0.01 compared with N-Cont)

2) Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) 함량

홍경천의 흰쥐 간장 중의 TBARS 생성에 대한 저해효과를 확인한 결과는 그림 6과 같았다. 음성대조군(N-cont)의 TBARS 함량은 정상군보다 유의하게 상승하여(p<0.01) 알콜 투여로 간장이 심하게 손상되었음을 시사하였다. 홍경천 투여군(Rr)은 0.2 및 0.6 g(g/kg body weight/day)의 경우에는 음성대조군에 비하여 TBARS 함량이 다소 저하되었으나 유의성은 없었으나, 1.0 g 투여군은 그 함량이 유의하게 저하되었다(p<0.05). 산화제인 silymarin이 병행투여된 양성대조군(P-cont)의 TBARS 함량은 음성대조군에 비하여 그 함량이 현저하게(p<0.01) 저하되었다(Fig. 7).

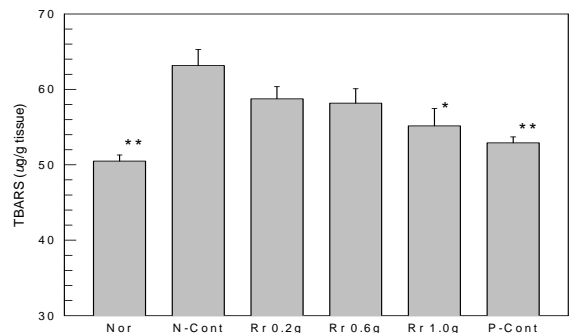


Fig. 7. TBARS contents in the liver of rats which was treated with alcohol during 2 weeks. Nor(normal); N-Cont(negative control, alcohol-treated); Rr(alcohol-treated and administrated with Rr); P-Cont(alcohol-treated and administrated with silymarin); Rr(methanol-extract from Rhodiola Radix); *(p<0.05 compared with N-Cont); **(p<0.01 compared with N-Cont)

3) Glutathione (GSH) 함량

흰쥐 간장에 잔존하는 항산화물질인 GSH 함량을 분석하였다. 정상군에 비하여 음성대조군(N-Cont)의 GSH 함량은 상대적으로 높은 수준이었으나 그 차이가 유의한 수준은 아니었다. 음성대조군과 비교하였을 때 홍경천투여군(0.2, 0.6 and 1.0 g)의 GSH 함량은 모두 유의한 함량차이를 보이지 않았다. Silymarin이 병행투여된 양성대조군(P-cont)의 GSH 함량 또한 음성대조군과 유의한 차이가 없었다(Fig. 8).

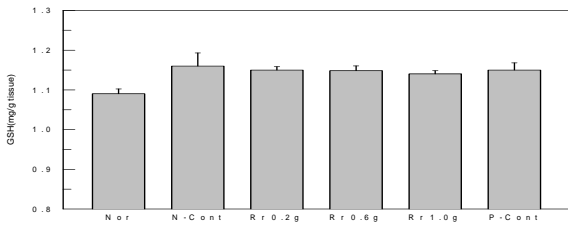


Fig. 8. Glutathione contents in the livers of rat which was treated with alcohol during 2 weeks. Nor(normal); N-Cont(negative control, alcohol-treated); Rr(alcohol-treated and administrated with Rr); P-Cont(alcohol-treated and administrated with silymarin); Rr(methanol-extract from Rhodiola Radix)

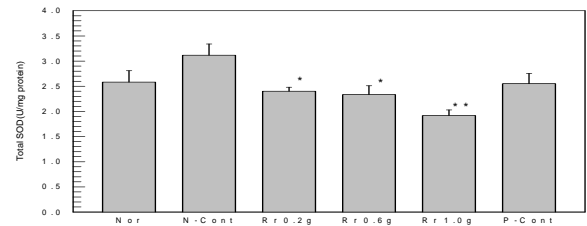


Fig. 10. Total superoxide dismutase activities in the livers of rat which was treated with alcohol during 2 weeks. Nor(normal); N-Cont(negative control, alcohol-treated); Rr(alcohol-treated and administrated with Rr); P-Cont(alcohol-treated and administrated with silymarin); Rr(methanol-extract from Rhodiola Radix); *(p<0.05 compared with N-Cont); **(p<0.01 compared with N-Cont)

4) Glutathione peroxidase (GSH-px) 활성

음성대조군의 GSH-px 활성은 정상군의 활성에 비하여 상대적으로 다소 낮았으나 그 격차는 유의성이 없었다. 흥경천을 투여한 3 실험군의 GSH-px의 활성은 모두 음성대조군과 비교하여 유의한 차이가 없었으며, silymarin이 병행투여된 양성대조군의 GSH-px 활성 또한 음성대조군과 유의한 차이를 보이지 않았다(Fig. 9).

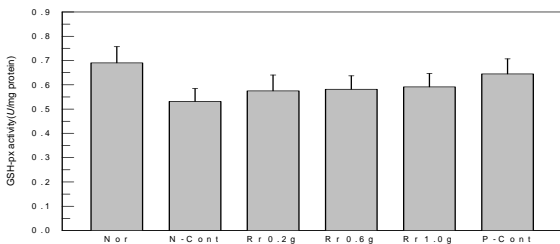


Fig. 9. Glutathione peroxidase activities in the livers of rat which was treated with alcohol during 2 weeks. Nor(normal); N-Cont(negative control, alcohol-treated); Rr(alcohol-treated and administrated with Rr); P-Cont(alcohol-treated & administrated with silymarin); Rr(methanol-extract from Rhodiola Radix); *(p<0.05 compared with N-Cont); **(p<0.01 compared with N-Cont)

5) Superoxide dismutase (SOD) 활성

음성대조군(N-Cont)의 total SOD 활성은 정상군에 비하여 상승하는 경향성을 보였으나 유의한 정도는 아니었다. 흥경천투여군은 0.2 및 0.6 g(g=g/kg body weight/ day)의 경우 둘 다 total SOD 활성이 유의하게 저하되었으며(p<0.05), 1.0 g이 투여된 경우에는 그 활성이 현저하게 저하되었고(p<0.01), 투여된 흥경천의 양이 증가함에 따라 그 활성이 저하되는 경향성을 보였다. Silymarin이 병행투여된 양성대조군(P-cont)의 total SOD 활성은 음성대조군에 비하여 저하되었으나 그 정도가 유의수준은 아니었다(Fig. 10).

음성대조군(N-Cont)의 Mn-SOD 활성은 정상군(Nor)에 비하여 유의하게 상승하였으며(p<0.05), 흥경천투여군은 0.2, 0.6 및 1.0 g(g=g/kg body weight/ day)의 경우 모두 음성대조군에 비하여 Mn-SOD 활성이 현저하게 저하되었으며(p<0.01) 투여된 흥경천의 양이 증가함에 따라 그 활성이 저하되는 경향성을 보였다. 양성대조군(P-cont)의 Mn-SOD 활성은 음성대조군에 비하여 유의하게 저하되었으나(p<0.05), 그 저하정도는 흥경천투여군들에 비하여 작았다(Fig. 11).

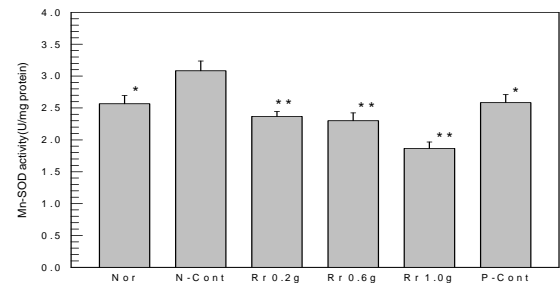


Fig. 11. Mn-SOD activities in the liver of rats which was treated with alcohol during 2 weeks. Nor(normal); N-Cont(negative control, alcohol-treated); Rr(alcohol-treated and administrated with Rr); P-Cont(alcohol-treated and administrated with silymarin); Rr(methanol-extract from Rhodiola Radix); *(p<0.05 compared with N-Cont); **(p<0.01 compared with N-Cont)

6) Catalase 활성

음성대조군의 catalase 활성은 정상군의 활성보다 유의하게 저하되었으며(p<0.05), 이는 알콜투여에 의하여 그 활성이 감소되었음을 시사하였다. 0.2g 및 1.0 g의 농도로 투여된 흥경천투여군의 catalase 활성은 음성대조군에 비하여 유의하게 높았고(p<0.05), 흥경천 0.6 g 투여군의 활성 상승폭은 현저하였다(p<0.01). Silymarin 투여군(P-Cont)의 catalase 활성은 음성대조군에 비하여 다소 저하된 경향성을 보였으나 그 저하폭이 유의한 수준은 아니었다(Fig. 11).

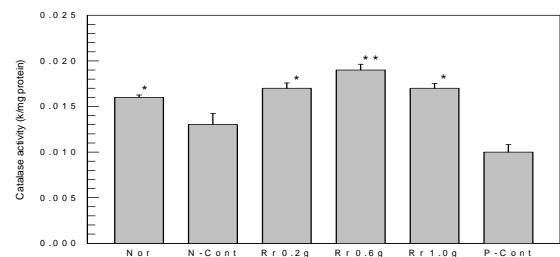


Fig. 11. Catalase activities in the liver of rats which was treat with alcohol during 2 weeks. Nor(normal); N-Cont(negative control, alcohol-treated); Rr(alcohol-treated and administrated with Rr); P-Cont(alcohol-treated and administrated with silymarin); Rr(methanol-extract from Rhodiola Radix); *(p<0.05 compared with N-Cont); **(p<0.01 compared with N-Cont)

고찰

Superoxide anion radical은 세포가 산화되는 초기에 생성되어 hydroxyl radical로 전환되어 거대분자의 산화적 손상을 유도한다고 보고된 바 있으며, DPPH는 안정적인 구조의 자유 라디칼로서 환원 또는 다른 물질로의 전환이 잘 되지 않고 산화적 스트레스의 큰 요인이 되기 때문에, DPPH 소거능은 항산화제의 주요 평가항목이다. 한편, LDL이 정상적인 대사경로를 벗어나 산화되면 macrophage와 결합하여 동맥경화를 촉진시킬 수도 있기 때문에, 본 LDL-산화저해능은 항산화제로서의 주요한 한 조건이다. 또한 linoleic acid는 arachidonic acid로 전환되어 조직의 산화를 유발하는 주요한 요인이 될 수 있기 때문에 linoleic acid 제거능은 항산화능을 발현하는데 매우 중요하다. *in vitro* 실험 결과에서 기술한 바와 같이, 홍경천추출물은 10 ppm 이상의 농도에서 강력한 DPPH 소거능 및 LDL 산화저해능을 보였고, 홍경천추출물은 50 ppm의 농도 이상에서 superoxide anion radical 소거능 및 linoleic acid 제거능이 강력하였으며, 그 활성은 항산화제로 널리 이용되고 있는 ascorbic acid 및 α -토코페롤 등에 못지 않은 항산화능을 보였다.

한편, 만성적인 알콜을 섭취시킨 쥐(rat)를 대상으로 한 *in vivo* 실험에서도 홍경천의 투여로 유의한 항산화효과를 보였다. 알콜과다 섭취로 인한 간손상으로 상승되는 상대적 간장중량(relative liver weights)은 홍경천투여로 감소되었다. 만성적인 알콜 섭취는 상대적 간장중량을 증가시키며, 항산화물질은 알콜의 여러 부작용을 감소시키므로서 정상 수준의 상대적 간장중량을 유지시키는 점을 고려할 때, 홍경천이 알콜섭취로 인한 간손상 예방에 유효함을 시사하였다. 또한 홍경천투여로 Mn-SOD 활성 및 TBARS 함량은 저하되었다. 알콜의 과도한 투여로 생성되는 라디칼들이 생체 내에서 항산화효소인 Mn-SOD의 활성을 증가시키며, 라디칼을 적절히 제거할 수 있는 항산화물질이 존재하면 그 활성은 증가하지 않는 점을²²⁾ 고려할 때, 이러한 결과는 홍경천이 알콜로 인한 라디칼증가를 억제하는 효과가 있음을 시사하였다. 이와 더불어, catalase 활성은 상승하였으며, 이는 홍경천이 항산화효소인 catalase의 활성을 상승시킴을 시사하였으며, catalase 활성 상승이 홍경천 투여량과 비례하지 않은 점은 catalase가 항산화효소로서 뿐만 아니라 알콜분해에도 관여하기 때문이거나 또는 홍경천 성분이 catalase 활성증가에 간접적으로 관여할 가능성이 있음을 시사하였다. 이러한 결과는 홍경천 메탄올추출물이 과도한 알콜섭취로 인한 간손상을 완화시키거나 예방하는 효능이 있다고 사료되었다.

홍경천추출물의 LDL 산화저해에 대한 *in vitro* 실험에서, 물추출물의 경우에는 첨가된 양에 비례하여 저해능이 강해지는 경향성을 보였으나, 메탄올추출물의 경우에는 그렇지 않았다. 그림 4에서 보는 바와 같이, 메탄올추출물이 10-100 ppm 범위에서 첨가된 경우에는 첨가량과 저해능이 비례하는 경향성을 보였으나, 1 및 5 ppm의 농도로 첨가된 경우에는 10 ppm의 농도로 첨가되었을 때보다도 더 강한 저해능을 보였다(Fig. 4). 이 결과에서 메탄올추출물이 10-100 ppm 범위에서 첨가된 경우에는 첨가량과 저해능이 비례하는 경향성을 보이는 점으로 보아 메탄올추출물의 저해성이 인정되었다. 1 및 5 ppm의 농도로 첨가된 경우에는 10 ppm의 농도로 첨

가되었을 때보다도 더 강한 저해능을 보인 점은 메탄올추출물은 LDL 산화저해반응에 영향을 주는 물질이 한 가지 성분이 아니라 여러 가지 성분일 수도 있고, 그 성분들이 상호작용하여 LDL 산화저해효과에 영향을 줄 수도 있음을 시사하였으며, 이에 대해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론

홍경천의 항산화활성을 검증하기 위해 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 실시한 결과, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 홍경천으로부터 얻은 메탄올추출물 및 물추출물의 항산화활성을 *in vitro* 에서 실험한 결과,
 - 1) 홍경천추출물은 10 ppm 이상의 농도에서 강력한 DPPH 소거능을 보였다.
 - 2) 홍경천추출물은 50 ppm의 농도 이상에서 superoxide anion radical 소거능 및 linoleic acid 제거능이 강력하였다.
 - 3) 물추출물은 1 ppm의 농도 이상에서 강력한 LDL 산화저해능을 보였으나, 메탄올추출물은 10 ppm 이상의 농도에서만 LDL 산화저해능을 보였다.
2. 흰쥐에 알콜을 투여하여 간손상을 유발함과 병행하여 홍경천의 메탄올추출물을 투여하여 간장에 대한 영향을 *in vivo* 에서 실험한 결과,
 - 1) 간손상으로 상승되는 relative liver weights는 감소되었다.
 - 2) TBARS 함량은 유의하게 저하되었다.
 - 3) Total SOD 및 Mn-SOD 활성은 저하되었다.
 - 4) Catalase 활성은 상승하였다.
 - 5) GSH 함량 및 GSH-px의 활성에는 유의한 영향이 없었다.

이상의 결과에서 홍경천에는 강력한 항산화 효능이 있으며, 과도한 알콜섭취로 인한 간손상 예방에도 유효할 가능성이 인정되었다.

감사의 글

이 논문은 2012년도 가천대학교 연구비 지원을 받았기에 감사드립니다.

참고문헌

1. The Chinese Pharmacopoeia Commission, Pharmacopoeia of the People's Republic of China 2010, Beijing : China Medical Science and Technology Press, 2010 : 144.
2. State Administration of Traditional Chinese medicine of the People's Republic of China, Zhonghuabencao, Vol. 3, Shanghai : Shanghai Scientific and Technical Publishers, 1999 : 763-4.
3. Duan YH, The Jilin illustrated herbs book, Ancient

- Chinese medicine Press, 1987 : 83-5.
4. Hung SK, Perry R, Ernst E. The effectiveness and efficacy of *Rhodiola rosea* L. a systematic review of randomized clinical trials. *Phytomedicine*. 2011 ; 18(4) : 235-44.
 5. Panossian A, Wikman G, Sarris J. *Rosenroot (Rhodiola rosea)*: traditional use, chemical composition, pharmacology and clinical efficacy. *Phytomedicine*. 2010 ; 17(7) : 481-93.
 6. Qian EW, Ge DT, Kong SK. Salidroside promotes erythropoiesis and protects erythroblasts against oxidative stress by up-regulating glutathione peroxidase and thioredoxin. *J Ethnopharmacol*. 2010 ; 133(2) : 308-14.
 7. Huang SC, Lee FT, Kuo TY, Yang JH, Chien CT. Attenuation of long-term *Rhodiola rosea* supplementation on exhaustive swimming-evoked oxidative stress in the rat. *Chin J Physiol*. 2009 ; 52(5) : 316-24.
 8. Qu ZQ, Zhou Y, Zeng YS, Li Y, Chung P. Pretreatment with *Rhodiola rosea* extract reduces cognitive impairment induced by intracerebroventricular streptozotocin in rats: implication of anti-oxidative and neuroprotective effects. *Biomed Environ Sci*. 2009 ; 22(4) : 318-26.
 9. Schriener SE, Avanesian A, Liu Y, Luesch H, Jafari M. Protection of human cultured cells against oxidative stress by *Rhodiola rosea* without activation of antioxidant defenses. *Free Radic Biol Med*. 2009 ; 47(5) : 577-84.
 10. Bae SJ. Anticarcinogenic and Antioxidant effects of *Rhodiola sachalinensis*. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2005 ; 34(9) : 1302-7.
 11. Nishikimi M, Rao NA, Yagi K. The occurrence of superoxide anion in the reaction of reduced phenazine methosulfate and molecular oxygen. *Biochem, Biophys Res Commun*. 1972 ; 46 : 849-54.
 12. Bloi MS. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*. 1958 ; 181 : 1199-200.
 13. Miller CP, Jirkovsky I, Hayhurst DA, Adelman SJ. In vitro antioxidant effects of estrogens with a hindered 3-OH function on the copper-induced oxidation of low density lipoprotein. *Steroids*. 1996 ; 61 : 305-8.
 14. Haraguchi H, Hashimoto K, Yagi A. Antioxidative substances in leaves of *Polygonum hydropiper*. *J Agric Food Chem*. 1992 ; 40 : 1349-51.
 15. Kim NM, Sung HS, Kim WJ. Effect of solvents and some extraction conditions on antioxidant activity in cinnamon extracts. *Korean J Food Sci Technol*. 1993 ; 25 : 204-9.
 16. Botsoglou NA, Fletouris DJ, Parageorgiou GE, Vassilopoulos VN, Mantis AJ, Trakatellis AG. Rapid, sensitive and specific thiobarbituric acid methods for measuring lipid peroxidation in animal tissues, food and feedstuff samples. *J Agric Food Chem*. 1994 ; 42 : 1931-7.
 17. Ellman, GL. Tissue sulfhydryl group. *Arch Biochem Biophys*. 1959 ; 82 : 70-2.
 18. Oh MH, Chung HY, Yong HS, Kim KW, Chung HY, Oura H, Yokozawa, T Effects of ginsenoside Rb2 on the antioxidants in SAM-R/1 mice. *Korean Biochem J*. 1992 ; 25 : 492-7.
 19. Flohe', L. Determination of glutathione peroxidase. In *Handbook of Free Radicals and Antioxidants in Biomedicine*, Vol. III. CRC Press. 1989 : 283-4.
 20. Abei, H. Catalase in vitro. In *Methods in Enzymology*, Vol. 5, Academic Press. 1984 : 121-6.
 21. 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 : 248-54.
 22. Koch O, Farre S, De Leo ME, Palozza P, Palazzotti B, Borrelo S, Palombini G, Cravero A, Galeotti T. Regulation of manganese superoxide dismutase (MnSOD) in chronic experimental alcoholism: effects of vitamin E-supplemented and -deficient diets. *Alcohol Alcohol*. 2000 ; 35 : 156-63.