J Korean Soc Food Sci Nutr
42(10), 1560~1566(2013)

한국식품영양과학회지
http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2013.42.10.1560

에탄올 투여 랫트에서 인진쑥 열수 추출물이 간 독성 저하에 미치는 영향

유근형[1] · 이선엽[1] · 양현모[1] · 함영안[1] · 이수응[1] · 채승완[2] · 이용진[1†]

[1](재)춘천바이오산업진흥원 기술개발실
[2]성균관대학교 의과대학 강북삼성병원 병리과

Effects of the *Artemisia capillaris* Extract on the Hepatotoxicity in Ethanol-induced Rats

Keun-Hyung Yu[1], Sun-Yeop Lee[1], Hyun-Mo Yang[1], Young-Ahn Ham[1], Soo-Ung Lee[1], Seoung-Wan Chae[2], and Yong-Jin Lee[1†]

[1]Dept. of Technical Development, Chuncheon Bioindustry Foundation, Gangwon 200-957, Korea
[2]Dept. of Pathology, Kangbuk Samsung Hospital, Sungkyunkwan University School of Medicine, Seoul 110-746, Korea

ABSTRACT This study was conducted to find out the effects of aqueous extract from the leaves of *Artemisia capillaris* (AA) on the reduction of hepatotoxicity induced by ethanol in rats. In this experiment, Sprague Dawley rats were used in the experimental groups, which were divided into 5 groups; normal group, ethanol+UDCA (ursodeoxycholic acid)-treated group (positive control), ethanol-treated group (control), ethanol+*Artemisia capillaris* aqueous extract-treated group (200 mg/kg of BW) and ethanol+*Artemisia capillaris* aqueous extract-treated group (400 mg/kg of BW). AST (aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase), GGT (gamma(γ)-glutamyl transferase) and LDH (lactate dehydrogenase) activities of the ethanol+*Artemisia capillaris* aqueous extract-treated group (400 mg/kg of BW) were significantly decreased compared to that of the ethanol-treated group (P<0.05). The triglyceride level of the ethanol-treated group was significantly increased and the HDL-cholesterol level was significantly decreased compared to the normal group (P<0.05). On the other hand, the triglyceride level was significantly decreased (P<0.05) and the HDL-cholesterol level was significantly increased (P<0.05) in the ethanol+*Artemisia capillaris* aqueous extract-treated groups. Superoxide dismutase (SOD) activity was enhanced significantly (P<0.05) in the ethanol+*Artemisia capillaris* aqueous extract-treated groups. Also, malondialdehyde contents were decreased in this group (P<0.05). Histologically, in the control group, there was a mild degenerative change around central venule. The AA treated group showed well preserved lobular architectures with no evidence of steatosis or liver damage in aqueous extract from the leaves of *Artemisia capillaris* treated group (H&E, ×20). As the results of this study, it is thought that *Artemisia capillaris* aqueous extract may have effects on the improvement of hepatic damage by ethanol.

Key words: *Artemisia capillaris*, ethanol, hepatotoxicity, hepatoprotective effect

서 론

최근 사회가 복잡해지고 급변함에 따라 스트레스 해소를 위해 술의 소비가 급증하고 있다. 지나친 음주는 개인, 가정 및 사회에 부정적인 영향을 초래함으로써 사회경제적 손해를 초래하고 있으며, 만성적인 음주 섭취로 인해 췌장염, 심근경색, 신경장애, 결핵 등의 장애요소가 되고 나아가 간조직의 구조 및 기능에 치명적 손상을 초래하고 있다(1-6). 알코올은 주로 간에서 alcohol dehydrogenase(ADH), cytochrome P450 2E1, catalase 등 3가지 효소계에 의해 acetaldehyde로 대사되지만(7) 과량의 알코올 섭취 시 microsomal ethanol oxidizing system(MEOS)에 의하여 acetaldehyde로 대사된다. 만성적인 알코올의 섭취는 간세포 내 NADH/NAD^+의 비율을 증가시켜 지방의 합성을 증가시키고 reactive oxygen species(ROS)를 생성시켜 간세포에 손상을 유발하며, 각종 질환의 발생 및 노화를 촉진하는 것으로 보고되고 있다(7-12).

산화적 스트레스로 인해 생성된 ROS를 제거하기 위해서는 인체 내 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione S-transferase(GST), glutathione peroxidase (GSH-px) 등과 같은 항산화효소의 활성을 증가시키고 식이를 통해 비타민이나 polyphenol류와 같은 항산화제를 공급함으로써 세포의 산화적 손상을 막을 수 있다(13,14).

인진(*Artemisia capillaris*)은 국화과(Compositae)의 다년생 초본으로 한국, 일본, 중국, 타이완, 만주, 필리핀 등지에 분포하며, 인진쑥, 애탕쑥, 면인진, 인진호, 인진(茵蔯),

Received 17 June 2013; Accepted 2 July 2013
†Corresponding author.
E-mail: yjlee67123@cbf.or.kr, Phone: 82-33-258-6163

자화열당, 황화열당, 초조용, 생당쑥, 댕강쑥, 인진초라 불린다. 지상부로 봄에 채취한 것을 '면인진(綿茵蔯)'이라 하고, 가을에 채취한 것을 '인진호(茵蔯蒿)'라 하며, 초본형 낙엽관목으로 겨울에 죽지 않고 이듬해 줄기에서 다시 싹이 나온다고 하여 사철쑥(*Artemisia capillaris* Thunberg), 더위지기(*Artemisia iwayomogi*)라 불리기도 하며, 제비쑥(*Artemisia angustssia*), 털산쑥(*Artemisia sacrorum* subsp. *manshuric K.*) 등으로 분류되고 있다(15). 약 200여종의 *Artemisia* 속에 속하는 쑥들은 식용 및 약용으로 널리 이용되고 있으며, 생리활성 물질로서 scoparone, capilartemisin A와 B, cirsimaritin, genkwanin, rhamnocitrin 등의 flavonoids를 함유하고 있어 항산화, 항염증 및 진통효과, 항균작용, 과산화지질에 대한 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 특히 간 손상에 효과적이어서 간염, 간암, 간 경변 등과 같은 간 질환 개선에 효능이 있다고 알려져 있다(16-18). Nam 등(19)과 Lim과 Lee(20)는 쑥 추출물이 항산화계 효소인 SOD, catalase, GST의 활성을 증가시킨다고 하였으며, 또한 고지혈증 흰쥐에서 혈중 지질 및 간지질 수준을 저하시켜 지질대사 개선 효과도 있는 것으로 보고되고 있다. 따라서 본 연구에서는 알코올을 투여한 rat에서 인진쑥 열수 추출물을 투여하여 간 독성 저하효과를 살펴보고 간 기능개선 건강기능식품 개발 가능성을 알아보고자 연구하였다.

재료 및 방법

시료 제조

강원도 양구군 소재 ㈜영동기능식품으로부터 인진쑥(*Artemisia capillaris*) 분말을 공급받아 속슬렛 추출장치(MS-EAM, MISUNG, Yangju, Korea)를 이용하여 시료에 10배의 증류수를 가하고 80°C에서 8시간씩 환류냉각 추출하였으며, 추출한 시료는 감압농축(N-1110, EYELA, Tokyo, Japan) 후 동결건조(PVTF20R, ILSHINBIOBASE, Dongduchun, Korea)하여 실험재료로 사용하였다.

실험동물 사육 및 식이

생후 6주령의 Sprague Dawley(SD, male) rat을 (주)코아텍(Pyeongtaek, Korea)으로부터 분양 받아 일정한 조건(온도 22±1°C, 습도 55±3%, 명암주기 12시간) 하에서 일주일간 적응기간을 거친 후 각 군당 6마리씩 정상식이군(normal), 대조군(control), 양성대조군(UDCA, ursodeoxycholic acid), 인진쑥 열수 추출물 저농도 및 고농도 투여군으로 구분하여 구분하여 4주간 사육하였다. 시작 일부터 2주간 오전에 양성대조군(UDCA) 600 μg/kg BW(body weight), 인진쑥 열수 추출물 200 mg/kg BW 및 400 mg/kg BW 농도가 되도록 saline에 현탁 후 zonde를 이용하여 경구투여 하였으며, 같은 날 오후에 25% ethanol을 2 mL/kg BW로 zonde를 이용하여 경구투여 하였다. 물과 식이는 무제한 급이하였으며(*ad libitum*), 식이의 조성은 Table 1과 같다. 본 동물실험은 (재)춘천바이오산업진흥원 동물실험윤리위원회의 승인을 거쳐 진행하였다(CBF IACUC No. 2012-004).

Table 1. Chemical compositions of diet

Compositions	Concentration (%)
Protein	≥20.0
Lipid	≥4.5
Fiber	≤6.0
Ash	≤7.0
Ca	≥0.5
P	≤1.0

시료 채취 및 분석

실험 마지막 날 시료 및 ethanol 경구투여 후 18시간 동안 절식시키고 마취제로 zoletil(25 mg/kg)과 xylazine(5 mg/kg)를 혼합 사용 마취하였으며, 마취 후 개복하여 심장에서 혈액을 채혈하고 경추를 절단하여 간 조직을 적출하였다. 분리한 혈액은 원심분리기(Eppendorf, centrifuge 5810R, Hamburg, Germany)를 이용하여 4°C, 3,200×*g*에서 20분간 원심분리 하여 혈청을 분리하고 -80°C deep freezer에 보관 후 사용하였으며, 간 조직은 혈액 제거 후 2~3개로 절편하여 액체질소에 급냉시키고 효소활성 측정 전까지 -80°C deep freezer에 보관 후 실험에 사용하였다.

체중 및 간 무게 변화 측정

실험기간 동안 체중 측정은 2일 간격으로 일정시간에 측정하였으며, 식이섭취로 인해 체중 변화 오차를 줄이고자 체중 측정 1시간 전에 사료를 제거하여 측정하였다. 간 조직은 혈액 채취 후 즉시 적출하여 멸균된 생리식염수로 세척하고 여과지로 표면의 수분을 제거한 후 무게를 측정하였다.

혈청분석

채혈한 전혈(whole blood)로부터 혈청을 분리 후 혈청 중 간 기능효소 및 지질분석은 생화학분석기(Konelab 20B, Thermo, Vantaa, Finland)를 이용하여 간 주요지표 효소인 AST(aspartate aminotransferase), ALT(alanine aminotransferase), GGT(gamma(γ)-glutamyl transferase), LDH(lactate dehydrogenase), triglyceride, total cholesterol, HDL(high density lipoprotein)-cholesterol, LDL(low density lipoprotein)-cholesterol 수치를 측정하였다. 또한 심혈관계질환의 위험도 판정에 사용되는 동맥경화지수(AI, atherogenic index) 및 HTR(high density lipoprotein cholesterol by total cholesterol ratio)은 Han 등(6)과 같이 다음 식으로 계산하였다.

Atherogenic index (AI)=
(total cholesterol−HDL cholesterol)/ HDL cholesterol
HTR=HDL cholesterol/ total cholesterol

간 조직의 항산화효소 활성 및 과산화지질 함량 측정

혈액을 제거한 간 조직 1 g에 5배의 RIPA buffer(20 mM tris-HCl(pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na_2EDTA, 1 mM EGTA, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM beta-glycerophosphate, 1 mM Na_3VO_4, 1 μg/mL leupeptin, Cell Signaling, Danvers, CO, USA)를 가하여 간 조직을 homogenizer(HS-30E, DAIHAN, Seoul, Korea)로 4°C에서 10분간 균질하고 균질한 조직을 10,000×*g*에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 회수하였다. 회수한 상등액을 4°C에서 20,000×*g*에서 20분간 원심분리 하여 cytosol을 분리하였다.

Cytosol에 존재하는 SOD의 활성도는 McCord와 Fridovich(21)의 방법을 변형하여 측정하였다. Xanthine이 xanthine oxidase 반응으로 생성된 superoxide anion에 의해 cytochrome c의 변화속도가 감소하는 것으로 SOD 활성을 측정하였다. 2 mL의 혼합용액(5 μmol xanthine, 2 μmol cytochrome c, 0.1 mM EDTA, 50 mM tris-HCl buffer, pH 7.8)을 cuvette에 넣은 후 20 μL의 cytosol을 첨가하고 0.2 U/mL의 xanthine oxidase를 첨가하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 과산화지질 함량은 Troncoso Brindeiro 등(22)의 방법에 따라 균질한 간조직에 TBA reagent(Cell Biolabs, San Diego, CA, USA)를 첨가하고 95°C에서 60분간 열처리하였다. 열처리 후 얼음에서 냉각하고 20,000×*g*에서 15분간 원심분리 하여 상등액을 회수하였으며, 회수한 상등액을 micro-tube에 300 μL씩 분주하고 동량의 n-butanol을 첨가하여 교반하였다. 교반 후 20,000×*g*에서 5분간 원심분리 하여 n-butanol 층을 회수하고 회수한 n-butanol 층을 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

간 조직 병리학적 분석 방법

부검을 통하여 간의 좌우엽에서 각각 2개의 절편을 떼어내고 10% 포르말린에 고정을 한 후 함수-탈수 처리를 거쳐 파라핀 블록을 제작하여 4 μm 두께의 미세절편을 만들어 슬라이드글라스에 부착시켰다. 제작된 슬라이드는 hematoxylin and eosin(H&E) 염색과 Masson's trichrome (MT) 염색을 시행하여 광학현미경으로 관찰하였다. 위의 모든 실험방법은 (주)레퍼런스바이오랩(Reference Bio-Labs, Seoul, Korea, http://www.rbiolabs.com)의 병리조직 분석팀에 위탁하여 조직을 위탁 염색하여 관찰하였다. 간 조직의 병리소견 정도를 정량적으로 나타내기 위하여 병리학적 score 채점 방식을 이용하였다(23). 조직 염색판독은 H&E 염색슬라이드에서 지방증(steatosis), 염증(inflammation) 및 세포괴사(necrosis) 여부를 관찰하였으며, MT 염색슬라이드로 섬유증(fibrosis) 여부를 파악하였다. 조직학적 검경은 각 군당 조직샘플 2개를 무작위로 선택하여 이중 맹검으로 평가하였다.

단백질 정량 및 통계처리

단백질의 함량은 Lowry 등(24)의 방법에 따라 bovine serum albumin(BSA)을 이용하여 정량하였다. 실험결과는 실험군당 평균(mean)과 표준편차(SD)로 나타내었고, GraphPad prism 4를 이용하여 일원배치 분산분석(one-way analysis of variance)을 실시한 후 $P<0.05$ 수준에서 Tukey's multiple comparison test에 의해 각 실험군 평균치간의 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

체중 증가 및 간 무게 변화에 미치는 영향

실험기간 동안 실험동물의 체중 증가량 및 간 무게는 Table 2에서 보는 바와 같이 체중 증가량의 경우 처리군간 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 그러나 간 무게의 경우 에탄올을 단독 투여한 대조군에서 유의하게 증가하는 것으로 나타나 에탄올 투여로 인한 중성지방 증가와 관련이 있을 것으로 사료된다. 그러나 UDCA 처리한 양성대조군 및 인진쑥 열수 추출물 투여군의 경우 체중 증가 및 간 무게에 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

간 기능 효소에 미치는 영향

에탄올 및 인진쑥 열수 추출물 투여 후 혈청 중 AST, ALT, GGT 및 LDH 활성을 분석한 결과는 아래 Table 3과 같다. 에탄올을 단독 투여한 대조군(control)의 경우 혈청 내 AST, ALT 및 GGT 활성은 정상 식이군(normal)에 비해 각각 61.86%, 148.34% 및 45.97%로 유의하게 증가하였다. LDH의 경우 정상 식이군에 비해 32.56% 증가하는 것으로 나타났으나 통계적으로 유의적인 차이는 없었다. 인진쑥 열수 추출물(200 mg/kg BW) 투여군은 ALT 및 GGT가 52.63% 및 29.90% 유의하게 감소하였고, AST 및 LDH의 경우 감소하는 것으로 나타났으나 통계적으로 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다. 인진쑥 열수 추출물(400 mg/kg BW) 투여군의 경우 AST, ALT, GGT 및 LDH가 각각

Table 2. Changes in body weight gain and liver weight of ethanol-induced rats

Group[1)]	Body weight gain (g/day)	Liver weight (g)
Normal	4.29±1.59[2)NS3)]	7.65±0.44[a4)]
Control	4.19±0.54	7.85±0.42[b]
UDCA	4.69±0.57	7.60±0.32[a]
AA-200	4.43±0.75	7.67±0.54[a]
AA-400	4.41±0.51	7.27±0.63[a]

[1)]Control, only ethanol treated; UDCA, ursodeoxycholic acid (positive control); AA-200, aqueous extracts of *Artemisia capillaris*-200 mg/kg BW; AA-400, aqueous extracts of *Artemisia capillaris*-400 mg/kg BW.
[2)]Mean±SD.
[3)]Not significant.
[4)]Values with all common superscripts within the same column are not significantly different ($P<0.05$).

Table 3. Effects of aqueous extracts from leaves of *Artemisia capillaris* on the AST, ALT, GGT and LDH activity in serum of ethanol-induced rats (U/L)

Group[1)]	AST	ALT	GGT	LDH
Normal	241.88±62.52[2)a3)]	63.50±12.06[a]	11.18±0.97[ab]	2576.1±681.34[ab]
Control	391.53±63.29[b]	157.70±32.13[b]	16.32±2.29[c]	3415.1±398.20[bc]
UDCA	255.99±63.12[a]	61.28±8.97[a]	15.48±2.52[bc]	3939.0±841.25[c]
AA-200	284.83±65.80[ab]	74.70±14.55[a]	11.44±1.80[a]	2498.4±180.55[ab]
AA-400	228.41±56.75[a]	50.24±11.74[a]	11.30±1.11[a]	2131.6±550.03[a]

[1)]Refer to Table 1. [2)]Mean±SD.
[3)]Values with all common superscripts within the same column are not significantly different (P<0.05).

41.66%, 68.14%, 30.76% 및 37.58% 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. 일반적으로 AST, ALT 활성은 간 질환 시 증가하며 고지방식, 알코올 등으로 지방간이 유발되거나 간에 유해물질이 존재할 때 간세포가 손상되어 혈액 속으로 AST, ALT 유리가 증가되어 효소활성도가 높아지는 것으로 알려져 있다(25-27). Han 등(6)은 식이에 인진쑥과 눈꽃동충하초의 투여로 ALT의 활성이 대조군에 비해 저하되었으며, 6% 인진쑥 투여군, 4% 인진쑥 및 2% 눈꽃동충하초 병행투여군에서는 유의하게 감소되었다고 보고하였고, Kimura 등(28)은 흰쥐에서 지질대사 장애 시 70% 아세톤 인진쑥 추출물이 AST 및 ALT 활성을 감소시킨다고 하였으며, Nam 등(29)도 간 손상 흰쥐에서 인진쑥 에탄올 추출물이 혈중 AST, ALT 및 ALP 활성을 감소시킨다고 보고하였다. 본 실험에서 인진쑥 열수 추출물이 AST, ALT 및 GGT 활성을 유의하게 감소시키는 것으로 보아 인진쑥 열수 추출물이 간세포의 손상을 억제함으로써 간을 보호하는 것으로 사료된다.

혈청지질 성분에 미치는 영향

혈청 내 중성지방(triglyceride), 총 콜레스테롤(total-cholesterol), HDL-콜레스테롤(HDL-cholesterol) 및 LDL-콜레스테롤(LDL-cholesterol)을 분석한 결과는 아래 Table 4와 같다. 에탄올을 단독 투여한 처리군(control)의 경우 정상식이군(normal)에 비하여 중성지방 함량이 유의하게 증가하였으며, HDL-콜레스테롤 함량이 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. 인진쑥 열수 추출물 투여군에서는 중성지방 함량이 대조군에 비하여 유의하게 감소하였으며, HDL-콜레스테롤의 경우 함량이 유의하게 증가하는 것으로 나타났고 총 콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤이 감소하는 것으로 나타났으나 통계적으로 유의한 차이가 없는 것으로 나타났다.

이와 같은 쥐 실험 결과를 다른 연구자들과 비교해 볼 때 알코올 섭취 시 중성지방을 5배까지 증가시킨다고 보고하였으며(30), 이와 같은 현상에 대해서 Nestel 등(31)은 알코올 섭취로 인해 간에서 중성지방의 합성이 증가하기 때문에 중성지방이 증가한다고 보고하였고, Han 등(6)의 경우 식이에 4% 인진쑥과 2% 눈꽃동충하초 병행투여군 및 3% 인진쑥과 3% 눈꽃동충하초 병행투여군에서 대조군에 비해 총 콜레스테롤 및 중성지방 농도 유의적으로 감소한다고 보고하였다. 본 실험 결과에서도 마찬가지로 알코올을 투여한 쥐의 중성지방이 유의하게 증가하였고 인진쑥 열수 추출물을 투여한 군에서는 중성지방이 유의하게 감소하는 것으로 나타나 인진쑥 열수 추출물이 알코올 섭취로 인한 중성지방의 증가를 억제시키는 것으로 나타났다.

또한 본 연구 결과는 사철쑥 추출물과 분말첨가가 총 콜레스테롤 수치를 감소시키고 HDL-콜레스테롤 수치를 증가시킨다고 보고한 Lee와 Park (32)의 연구결과와 일치함을 알 수 있었다.

한편 에탄올을 투여한 대조군의 경우 정상식이군과 비교하여 동맥경화지수(AI)가 2.2배 증가하는 것으로 나타났으며, HTR 값이 감소하는 것으로 나타났다(Table 4). 그러나 인진쑥 열수 추출물을 투여한 처리군의 경우 동맥경화지수가 정상식이군 수준으로 회복되었고, HTR 값은 증가하는 것으로 나타나 인진쑥 열수 추출물이 알코올 섭취로 인한

Table 4. Effect of aqueous extracts from leaves of *Artemisia capillaris* on the concentration of serum lipids of ethanol-induced rats (mg/dL)

Group[1)]	Triglyceride	Total-cholesterol	HDL-cholesterol	LDL-cholesterol	AI[2)]	HTR[3)]
Normal	49.27±4.50[4)a5)]	98.86±3.12[NS6)]	80.49±4.01[a]	27.78±2.69[NS]	0.29±0.07[2)a3)]	0.77±0.04[a]
Control	67.77±9.03[bc]	102.90±6.98	63.39±7.19[c]	29.24±4.73	0.63±0.18[b]	0.63±0.07[b]
UDCA	62.20±4.63[c]	95.69±7.59	78.58±0.00[ab]	25.18±4.17	0.26±0.12[a]	0.82±0.08[a]
AA-200	42.56±2.70[a]	93.92±6.32	75.03±0.00[abc]	26.06±3.86	0.23±0.14[a]	0.80±0.06[a]
AA-400	43.83±4.29[a]	91.17±11.68	74.69±9.39[ab]	25.08±4.70	0.23±0.14[a]	0.87±0.09[a]

[1)]Refer to Table 1.
[2)]Atherogenic index (AI)=(total cholesterol－HDL cholesterol)/ HDL cholesterol.
[3)]HTR=HDL cholesterol/ total cholesterol.
[4)]Mean±SD. [5)]Values with all common superscripts within the same column are not significantly different (P<0.05).
[6)]Not significant.

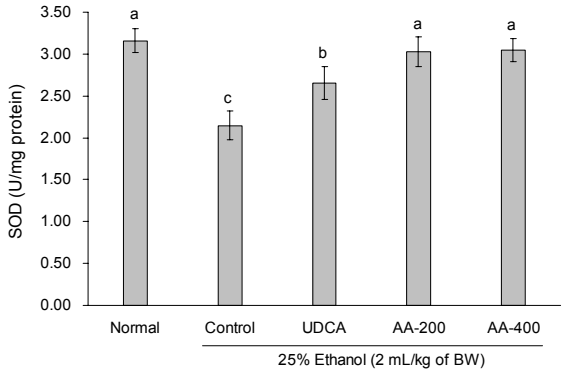

Fig. 1. Effects of aqueous extract from leaves of *Artemisia capillaris* (AA) on the SOD activity in liver tissue of ethanol-induced rats. Values with the different letters above bargraphs are significantly different (P<0.05).

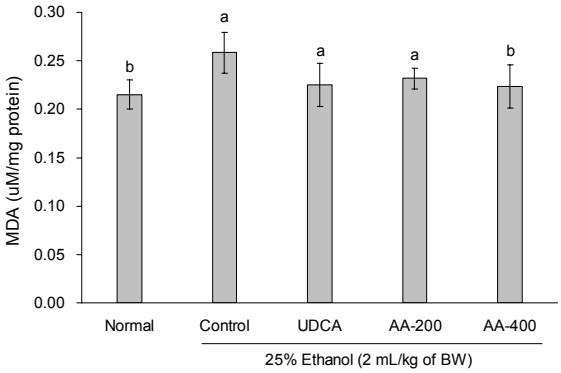

Fig. 2. Effects of aqueous extract from leaves of *Artemisia capillaris* (AA) on MDA contents in liver tissue of ethanol-induced rats. Values with the different letters above bargraphs are significantly different (P<0.05).

혈청지질 대사를 개선시키는데 기여했을 것으로 사료된다.

항산화효소 및 과산화지질에 미치는 영향

만성적인 알코올 섭취는 알코올 대사과정 중 산화적 스트레스를 유발하여 ROS(reactive oxygen species)를 생성하며, NADH의 전자전달체계 방해로 인해 미토콘드리아 내에 생성된 ROS는 지질산화를 일으켜 malondialdehyde (MDA)를 생성하고 간세포 내 염증반응을 유발하여 간 손상을 초래하는 것으로 알려져 있다(33,34). 산화적 스트레스로 인해 생성되는 ROS는 생체 내 superoxide dismutase (SOD), catalase, xathine oxidase(XO), glutathione peroxidase(GSH-Px) 등의 항산화효소들에 의해 대부분 소거되지만, 과량의 ROS 생성으로 인해 항산화 방어계의 균형이 깨지면 각종 질환의 발생 및 노화가 촉진된다. 따라서 항산화 효소의 활성이 증가하게 되면 세포손상을 막아 질환의 발생과 노화 촉진을 억제할 수 있다고 보고되어 왔다(35-37).

본 인진쑥 열수 추출물을 실험동물에 투여하였을 때 SOD 활성변화를 나타낸 결과는 Fig. 1과 같다. 에탄올을 단독 투여한 대조군의 경우 정상식이군과 비교하여 SOD 활성이 유의하게 감소하는 것으로 나타났으며, 인진쑥 열수 추출물 투여군에서는 SOD 활성이 유의하게 증가하는 것으로 나타났다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 간 조직 내 과산화지질의 분해산물인 MDA 함량을 측정한 결과 에탄올을 단독 투여한 대조군에서 MDA 함량이 가장 높게 나타났다. 그러나 인진쑥 열수 추출물을 투여한 처리군에서는 대조군과 비교하여 MDA 함량이 감소하는 것으로 나타났으며, 인진쑥 열수 추출물을 400 mg/kg BW 투여군에서 MDA 함량이 유의적으로 감소하였다(P<0.05). 에탄올을 투여한 대조군의 경우 정상식이군과 비교하여 동맥경화지수(AI)가 유의하게 증가하였으며, HTR이 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. 그러나 인진쑥 열수 추출물을 투여한 처리군의 경우 동맥경화지수가 정상식이군 수준으로 다시 회복되었고, HTR 값은 증가하는 것으로 나타났다.

간 조직 병리학적 분석 결과

간을 적출하여 육안으로 관찰한 결과 인진쑥 열수 추출물(AA) 비 투여군 및 투여군은 표면에 병리학적인 육안소견 변화는 없었다(data not shown). 간세포를 염색하고자 일반적인 H&E 염색과 콜라겐 침착정도를 확인하기 위하여 MT 염색을 실시하여 간 섬유증(hepatic fibrosis), 지방증 변화(steatosis: fatty change), 염증(inflammation) 및 세포괴사(necrosis) 혹은 세포사멸(apoptosis)를 관찰하였다(Table 5).

Table 5. A histological score[1)] on the ethanol-induced liver damage in H&E and MT staining patterns on SD rats (n=3)

	25% EtOH (2 mL/kg of BW)	Fibrosis	Fatty change (steatosis)	Inflammation	Necrosis
Normal	non-treated	0	0	0	0
Control	treated	0	0	0	1
UDCA[2)]	treated	0	0	0	0
AA-200[3)]	treated	0	0	0	0
AA-400[4)]	treated	0	0	0	0

[1)]A histological score was blindly calculated on liver sections as follows: 0～3 for fibrosis; 0～3 for inflammatory infiltrate; 0～3 for extent of necrosis; 0～3 for extent of steatosis; and 0=no involvement; 1=mild; 2=moderate; and 3=severe for each of the four parameters, as previously described.
[2)]UDCA: Ursodeoxycholic acid (600 μg/kg BW, oral administration).
[3,4)]AA: Aqueous extracts from leaves of *Artemisia capillaris* Thunberg (200, 400 mg/kg BW, oral administration).

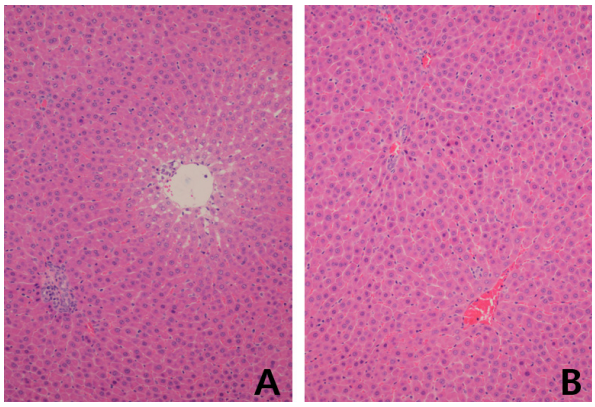

Fig. 3. (A) Mildly degenerative change around central venule is noted in control group (H&E, ×20). (B) Section shows well preserved lobular architectures with no evidence of liver damage in aqueous extract from leaves of *Artemisia capillaris* treated group (H&E, ×20).

그 결과, 정상군, 대조군(양성대조군 포함) 및 인진쑥 처리군 모두에서 일부 중심정맥주변에 약간의 콜라겐 침착이 관찰되었으나 간세포 파괴, 섬유화 혹은 염증 소견을 관찰할 수 없었다. 알코올을 투여한 대조군에서 미세공포와 풍선모양세포변성이 중심정맥주변이 미약하게 관찰되었으며(Fig. 3A), 인진쑥 추출물을 처리한 경우에는 거의 정상군와 유사한 정상 간조직 형태를 보였다(Fig. 3B). 세포괴사 혹은 세포사멸 현상의 경우 대조군에서 세포사멸 현상을 국소적으로 관찰하였으나, 알코올과 관련이 없는 비특이적인 소견으로 판단하였다. 인진쑥 추출물을 처리한 경우 세포괴사 혹은 세포사멸 현상은 관찰되지 않았다.

요 약

본 연구는 에탄올을 투여한 랫트에서 인진쑥 열수 추출물이 간 기능 개선 및 혈청지질의 변화에 미치는 효과를 검증하고 향후 간 기능개선 건강기능식품 개발 원료로써의 가능성을 확인하고자 하였다. 인진쑥 열수 추출물을 알코올로 간 독성 유발한 실험쥐에게 경구투여한 후 정상식이군, 양성대조군, 에탄올 투여군, 인진쑥 열수 추출물 저농도(200 mg/kg BW) 및 고농도(400 mg/kg BW) 투여군으로 나눠 실험하였다. 실험 결과 실험기간 동안 실험동물의 체중 증가량 및 간 무게 변화에는 통계적으로 처리군 간 유의적인 차이는 없었다. 실험종료 후 혈청과 간 조직을 사용하여 분석한 결과, 간 기능의 주요 지표인 AST, ALT 및 GGT 효소 활성 측정 결과 정상식이군에 비해 알코올 투여군에서 각 효소 활성이 유의하게 증가하였으며, LDH의 경우 정상식이군에 비해 증가하는 것으로 나타났으나 처리군 간 유의성은 없었다. 인진쑥 열수 추출물 저농도 투여군의 경우 ALT 및 GGT 활성이 대조군에 비해 유의하게 감소하였으며, 고농도 투여군에서는 AST 및 LDH 활성도 유의하게 감소함을 알 수 있었다. 또한 에탄올을 단독 투여한 처리군의 경우 정상식이군에 비하여 중성지방 함량이 유의하게 증가하였으며, HDL-콜레스테롤 함량이 유의하게 감소하는 것으로 나타났다. 인진쑥 열수 추출물 투여군에서는 중성지방 함량이 대조군에 비하여 유의하게 감소하였으며, HDL-콜레스테롤의 경우 함량이 유의하게 증가하는 것으로 나타났다. 간 조직에서 항산화효소 활성 및 과산화지질 함량을 알아보고자 SOD 활성 측정 결과 에탄올을 단독 투여한 대조군에서는 정상식이군과 비교하여 SOD 활성이 유의하게 감소하였으며, 인진쑥 열수 추출물 투여군에서는 SOD 활성이 유의하게 증가함을 알 수 있었다. 간 조직 내 과산화지질의 분해산물인 malondialdehyde(MDA) 함량을 측정한 결과 에탄올을 단독 투여한 대조군에서 MDA 함량이 가장 높게 나타났고 인진쑥 열수 추출물 투여군에서 MDA 함량이 감소하는 것으로 나타났다. 간 조직 염색결과 알코올을 투여한 대조군에서 미세공포와 풍선모양세포변성이 중심정맥 주변이 미약하게 관찰되었으며, 인진쑥 추출물을 처리한 경우에는 거의 정상군와 유사한 정상 간 조직 형태를 보였다. 이상의 결과로 보아 인진쑥 열수 추출물이 rat의 간 기능개선 및 혈청의 지질대사를 개선하고 항산화효소의 활성을 증가시켜 알코올 섭취로 인한 간 손상을 완화시키는데 효과적일 것으로 사료되며, 향후 간 기능 개선 개별인정형 건강기능식품 소재로 활용 가능할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2010년도 지식경제부 지역산업기술개발사업(과제번호 70011318)의 지원을 받아 수행된 연구결과의 일부로서 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Tsukamoto S, Kanegae T, Uchigasaki S, Kitazawa M, Fujioka T, Fujioka S, Imamura Y, Nagoya T, Shimamura M, Mieda Y. 1993. Changes in free and bound alcohol metabolites in the urine during ethanol oxidation. *Arukoru Kenkyuto Yakubutsu Ison* 28: 441-452.
2. Lieber CS, Garro A, Leo MA, Mak KM, Wornor T. 1986. Alcohol and cancer. *Hepatology* 6: 1005-1019.
3. Lieber CS. 1994. Alcohol and liver update: 1997 update. *Gastroenterology* 106: 1085-1090.
4. Lieber CS. 1995. Medical disorders of alcoholism. *N Engl J Med* 333: 1058-1065.
5. Lieber CS. 2004. The unexpected outcomes of medical research: serendipity and the microsomal ethanol oxidizing system. *J Hepatol* 40: 198-202.
6. Han EK, Jin YX, Yoo YS, Jung EJ, Lee JY, Chung CK. 2009. Effect of *Artemisia capillaris* and *Paecilomyces japonica* on the reduction of hepatotoxicity and lipid metabolism induced by ethanol. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 1016-1023.
7. Zakhari S. 2006. Overview: how is alcohol metabolized by the body? *Alcohol Res & Health* 29: 245-254.
8. Lieber CS. 1970. New pathway of ethanol metabolism in the liver. *Gastroenterology* 59: 930-937.

9. Bleich HL, Boro ES. 1977. Metabolic and hepatic effects of alcohol. *N Engl J Med* 296: 612-616.
10. Gramenzi A, Caputo F, Biselli M, Kuria F, Loggi E, Andreone P, Bernardi M. 2006. Review article: alcoholic liver disease－pathophysiological aspects and risk factors. *Aliment Pharmacol Ther* 24: 1151-1161.
11. Das SK, Vasudevan DM. 2007. Alcohol-induced oxidative stress. *Life Sci* 81: 177-187.
12. Nagata K, Suzuki H, Sakaguchi S. 2007. Common pathogenic mechanism in development progression of liver injury caused by non-alcoholic or alcoholic steatohepatitis. *J Toxicol Sci* 32: 453-468.
13. Byers T, Perry G. 1992. Dietary carotenes, vitamin C, and vitamin E as protective antioxidants in human cancers. *Ann Rev Nutr* 12: 135-159.
14. Lawrence RA, Burk RF. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 71: 952-958.
15. Lee HJ, Hwang EH, Yu HH, Song IS, Kim CM, Kim MC, Hong JH, Kim DS, Han SB, Kang KJ, Lee EJ, Chung HW. 2002. The analysis of nutrients in *Artemisia capillaries* Thunberg. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 361-366.
16. Bae JH. 2003. Effect of *Artemisia capillaries* extract on the growth of food-borne pathogens. *Korean J Nutr* 36: 147-153.
17. Lee SD, Park HH, Kim DW, Bang BH. 2000. Bioactive constituents and utilities of *Artemisia* sp. as medicinal herb and foodstuff. *Korean J Food & Nutr* 13: 490-505.
18. Lee WY, Lee SD, Son SI, Chang HS, Kim YH, Oh TH, Eom KD, Chang KH, Park SC, Yamato O, Maede Y, Lee KW. 2003. The effect of *Artemisia capillaries* crude juice extract on CCl_4 induced liver damage in dogs. *J Vet Clin* 20: 389-395.
19. Nam SM, Ham SS, Oh DH, Kang IJ, Lee SY, Chung CK. 1998. Effects of *Artemisia iwayomogi* Kitamura ethanol extracts on lowering serum and liver lipids in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 338-343.
20. Lim SS, Lee JH. 1997. Effect of *Artemisia princeps var orientalis* and *Circium japonicum var ussuriense* on serum lipid of hyperlipidemic rat. *Korean J Nutr* 30: 12-18.
21. McCord JM, Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem* 244: 6049-6055.
22. Troncoso Brindeiro CM, Lane PH, Carmines PK. 2012. Tempol prevents altered K^+ channel regulation of afferent arteriolar tone in diabetic rat kidney. *Hypertension* 59: 657-664.
23. Gove ME, Rhodes DH, Pini M, van Baal JW, Sennello JA, Fayad R, Cabay RJ, Myers MG Jr, Fantuzzi G. 2009. Role of leptin receptor-induced STAT3 signaling in modulation of intestinal and hepatic inflammation in mice. *J Leukoc Biol* 85: 491-496.
24. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
25. Kang IJ, Kim HK, Chung CK, Kim SJ, Oh DH. 2000. Effects of *Protaetia Orientalis* (Gory et Perchlon) larva on the lipid metabolism in ethanol administered rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 479-484.
26. Choi HS, Cha SS, Na MS, Shin KM, Lee MY. 2001. Effect of the ethanol extract of *Cassia tora* L. on antioxidative compounds and lipid metabolism in hepatotoxicity of rats-induced by ethanol. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 1177-1183.
27. Seo BI, Gu DK, Park JH, Kwon SJ. 2003. Effects of water extracts from *Fugu rubripes rubripes* with several herbs on hyperlipiderma and liver damage induced by alcohol. *Kor J Herbology* 18: 301-308.
28. Kimura Y, Okuda H, Okuda T, Hatano T, Agata I, Arichi S. 1985. Studies on the activities of tannins and related compounds from medicinal plants and drugs. VII. Effects of extracts of leaves of *Artemisia* species, and caffeic acid and chlorogenic acid on lipid metabolic injury in rats fed peroxidized oil. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 33: 2028-2034.
29. Nam SM, Kim JG, Ham SS, Kim SJ, Chung ME, Chung CK. 1999. Effects of *Artemisia iwayomogi* extracts on antioxidant enzymes in rats administered benzo(α)pyrene. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28: 199-204.
30. Karsenty C, Chanussot F, Ulmer M, Debry G. 1985. Influence of chronic ethanol intake on obesity, liver steatosis and hyperlipidemia in the Zucker *fa/fa* rat. *Br J Nutr* 54: 5-13.
31. Nestel PJ, Hirsch EZ. 1965. Clinical and experimental mechanism of alcohol-induced hypertriglycemia. *J Lab Clin Med* 65: 357-365.
32. Lee SD, Park HH. 2000. Effects of feeding basal diet supplemented with mugwort powder on the serum components in rat. *Korean J Food & Nutr* 13: 446-452.
33. Thurman RG, Bradford BU, Iimuro Y, Knecht KT, Connor HD, Adachi Y, Wall C, Arteel GE, Raleigh JA, Forman DT, Mason RP. 1997. Role of Kupffer cells, endotoxin and free radicals in hepatotoxicity due to prolonged alcohol consumption: Studies in female and male rats. *J Nutr* 127: 903S-906S.
34. Nordmann R, Ribiere C, Rouach H. 1992. Implication of free radical mechanisms in ethanol-induced cellular injury. *Free Radic Biol Med* 12: 219-240.
35. 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.
36. Moon SH, Lee MK, Chae KS. 2001. Inhibitory effects of the solvent fractions from persimmon leaves on xanthine oxidase activity. *Korean J Food & Nutr* 14: 120-125.
37. De Haan JB, Cristiano F, Iannello RC, Kola I. 1995. Cu/Zn-superoxide dismutase and glutathione peroxidase during aging. *Biochem Mol Biol Int* 35: 1281-1297.