

포공영 추출물이 흰쥐 간 Xanthine Oxidase 활성에 미치는 영향

이상일⁺ · 이영순 · 윤종국*

계명전문대학 식품영양과

*계명대학교 자연과학대학 공중보건학과

Effect of *Taraxacum herba* Extract on the Hepatic Xanthine Oxidase Activity in Rats

Sang-Il Lee, Young-Soon Lee and Chong-Guk Yoon*

Dept. of Food and Nutrition, Keimyung Junior College, Taegu

*Dept. of public Health, College of Natural Science, Keimyung Uni.

ABSTRACT

This study was undertaken to investigate the effect of *Taraxacum herba* extract on the hepatic xanthine oxidase activity as a oxygen free radical generating enzyme *in vitro* and *in vivo*.

It was observed that partial purified hepatic xanthine oxidase (type O) activity was strongly inhibited by the addition of *Taraxacum herba* n-butanol extract *in vitro*. The K_m value of xanthine oxidase without affecting the V_{max} value for xanthine was significantly increased by the addition of *Taraxacum herba* n-butanol extract (200 μ g/ml) *in vitro*. It was also observed that hepatic xanthine oxidase (type O) activity was significantly inhibited by the treatment of *Taraxacum herba* n-butanol extract for 5 days (over 40mg/kg, i.p.), whereas, xanthine oxidase (type D) activity was not changed by the injection of *Taraxacum herba* n-butanol extract. Meanwhile, liver weight/body weight(%), serum alanine aminotransferase activity and hepatic lipid peroxide content in *Taraxacum herba* n-butanol extract-treated rat were not changed.

These findings led us to conclude that *Taraxacum herba* n-butanol extract may regulate the hepatic xanthine oxidase type O activity to prevent toxic effect of oxidative stress by the oxygen free radicals.

Key words: Oxygen free radical generating enzyme, *Taraxacum herba*, Xanthine oxidase (type D, type O).

I. 서 론

포공영 (*Taraxacum herba cum Radix*)은 우리나라의 산야에서 널리 자생하는 국화과에 속하는 다년생 초본이며 민들레로 불리워지고 있는 것으로, 한 방에서는 항균, 소염 및 간염의 치료에 이용¹⁾되는 중요한 생약제이다.

포공영의 성분은 taraxasterol, taraxin, taraxerol, caffeic acid 및 고미질인 taraxacin 등²⁾이 밝혀져 있으나, 그 약리작용에 대한 체계적인 연구보고는 거의 없는 실정이다.

한편 xanthine oxidase는 모든 생물종에 분포³⁻⁵⁾하며, 동물조직에서는 간과 소장의 세포질에 주로 존재하는 것^{6, 7)}으로, purine 염기의 최종대사 과정에서 hypoxanthine을 xanthine을 거쳐 uric acid까지 산화시키는 데 관여하는 효소⁸⁻¹⁰⁾이다. 이 효소는 촉매과정에서 요구되는 전자수용체의 종류에 따라 NAD⁺를 이용하는 NAD⁺-dependent xanthine dehydrogenase (type D)와 분자상의 산소를 이용하는 oxygen-dependent xanthine oxidase (type O)로 나누어진다^{6, 7)}. 정상적인 상태의 생체내에서는 이 효소가 주로 type D로 존재하지만, 병적인 상태하에서는 superoxide anion을 생성시키는 type O로의 형전환이 야기되는 것으로 보고^{6, 7, 11-14)}되고 있으며, superoxide anion과 같은 oxygen free radical들은 조직 병변의 직접적인 원인¹⁵⁻²⁰⁾으로 알려져 있어 xanthine oxidase (type O)의 생체내 역할이 많은 관심의 대상이 되고 있다.

그러므로 본 실험에서는 포공영의 해독기전을 구명코자, 여러단계를 거쳐 포공영의 성분을 추출한 다음, *in vitro*와 *in vivo*에서 oxygen free radical의 생성에 관여하는 것으로 알려져 있는 간 xanthine oxidase의 활성에 미치는 영향을 상호 비교 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 포공영 성분의 추출

시중에서 구입한 포공영을 세척, 음건한 다음,

Shibata 등²¹⁾의 방법에 준해 methanol로 3회 추출, 여과, 감압 농축하여 methanol 추출물을 얻었다. 이 추출물을 소량의 증류수에 용해시킨 후, 증류수를 포화시킨 ethyl ether를 가해 지용성 성분을 제거한 다음, 다시 증류수를 포화시킨 n-butanol을 수층에 첨가하여 교반, 정치시켜 물층과 n-butanol층을 분리, 감압하에서 각각 증발 건조시켜 물 추출분획 (이하 물 추출물이라 표시)과 n-butanol 추출분획 (이하 n-butanol 추출물로 표시)을 얻었다.

2. 동물의 처치

본 대학 동물사에서 일정한 조건으로 사육한 외관상 건강한 250g 내외의 웅성 SD계 rat를 사용하였다.

포공영 n-butanol 추출 분획은 0.9% 생리식염수에 용해시킨 다음 체중 kg당 20, 40 및 80mg을 1일 1회 복강내로 5일간 투여하였으며, 대조군은 동량의 생리식염수를 복강내로 투여하였다. 실험동물은 희생전 24시간 동안 물만 주고 금식시켰다.

3. 효소원의 조제

실험동물을 ether로 마취시킨 다음 복부 정중선을 따라 개복한 후 복부 대동맥으로부터 채혈하고, 0.9% 생리식염수로 관류시킨 간장을 적출하여 생리식염수에 씻은 다음 여지로 압박, 간에 남아 있는 혈액 및 생리식염수를 제거한 후, 간조직 1g당 4배량의 0.1M potassium phosphate buffer (pH 7.4) 용액을 가해 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. 이 마쇄균질액을 10,000 × g에서 20분간 원심분리하여 미마쇄부분과 핵 및 mitochondria분획을 제거하였다. Mitochondria분획을 제거시킨 상정액을 105,000 × g에서 1시간 동안 초원심분리하여 cytosolic fraction을 분리하여 xanthine oxidase 활성측정의 효소원으로 사용하였다. 한편 채취한 혈액은 원심분리하여 혈청을 취하여 aminotransferase 활성측정의 효소원으로 사용하였다.

4. 간 xanthine oxidase의 부분정제

Row 등²²⁾의 방법에 준해 흰쥐 간의 cytosolic fraction을 60℃에서 2분간 열처리 후, 10,000 × g

에서 30분간 원심분리하여 열변성된 단백질을 제거시켜 상정액을 얻은 다음, ammonium sulfate로 30% 포화시켜 다시 10,000 × g에서 30분간 원심분리하여 침전물을 제거한 상정액을 얻었다. 이 상정액에 다시 ammonium sulfate를 가해 60% 포화시켜 10,000 × g에서 30분간 원심분리하여 침전물을 취해 소량의 0.1M potassium phosphate buffer (pH 7.4)에 용해시킨 후, 병냉의 acetone을 가해 50% 포화시켰다. 50% acetone 포화용액을 다시 10,000 × g에서 30분간 원심분리하여 침전물을 얻었다. 이 침전물을 다시 소량의 0.1M potassium phosphate buffer (pH 7.4)에 용해시켜 투석막에 넣어 동일한 buffer로 12시간동안 투석시킨 것을 부분정제된 간 xanthine oxidase의 효소원으로 사용하였다. 이상의 모든 조작은 따로 규정이 없는 한 4℃이하에서 행하였다.

5. 효소활성 측정 및 과산화지질의 함량 측정

Stirpe 등⁶⁾의 방법에 따라 xanthine oxidase의 활성 (type O)은 0.1M potassium phosphate buffer (pH 7.4)에 기질인 xanthine 60 μ M 및 효소액을 가하여 37℃에서 반응시키는 동안에 생성된 uric acid의 양을 파장 292 nm에서 측정해 표준검량선에 준해 활성도를 산정하였으며, xanthine dehydrogenase의 활성 (type D)은 type O의 활성 측정 반응액에 100mM의 NAD⁺를 첨가해 동일하게 반응시켜 나온 총활성 (total type)에서 type O의 활성을 감한 값으로 하였다. 효소의 활성도는 1분당 1mg의 단백질이 생성시킨 uric acid의 양을 n mole로 나타내었다. 혈청중 alanine aminotransferase의 활성은 Reitman과 Frankel의 방법²³⁾에 따라 조제된 Kit 시약으로 측정하였다. 과산화 지질의 함량은 Ohkawa 등²⁴⁾의 방법에 준하여 간 조직 마쇄액 일정량에 sodium dodecylsulfate, 20% acetate buffer (pH 3.5) 및 thiobarbituric acid를 넣고 95℃에서 1시간 동안 가열해 나온 홍색의 반응 생성물을 파장 532 nm에서 측정하였으며, 함량은 간조직 1g당 malondialdehyde n mole로 표시하였다. 단백질의 함량은 Lowry 등²⁵⁾ 방법에 준하여 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 측정하였다.

한편 실험결과와 통계처리는 student's t-test를 이용하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 시험관 내에서 간 xanthine oxidase의 활성에 미치는 포공영 추출물의 영향

탈지단계를 거쳐 얻어진 수용성의 포공영 성분분획을 다시 n-butanol층과 물층으로 분리 추출한 다음 농축하여 얻어진 물 분획과 n-butanol 분획의 시험관내 첨가량을 달리하면서 부분 정제된 흰쥐 간 xanthine oxidase의 활성에 미치는 영향을 관찰한 성적이 Fig. 1이다.

시험관내 포공영 n-butanol 추출물의 첨가량을 증가시키기에 따라 xanthine oxidase의 활성은 현저히 억제되었으며, 100 μ g/ml의 첨가량에서는 약 50% 정도의 활성 억제를 관찰할 수가 있다. 한편 자료로는 제시하지 않았으나 포공영 물분획 추출물의 경우에도 첨가량에 따라 약간의 간 xanthine oxidase 활성을 억제시켰으나, 그 억제도는 대단히 높은 농도인 1mg/ml에서도 약 25% 정도로 경미하게

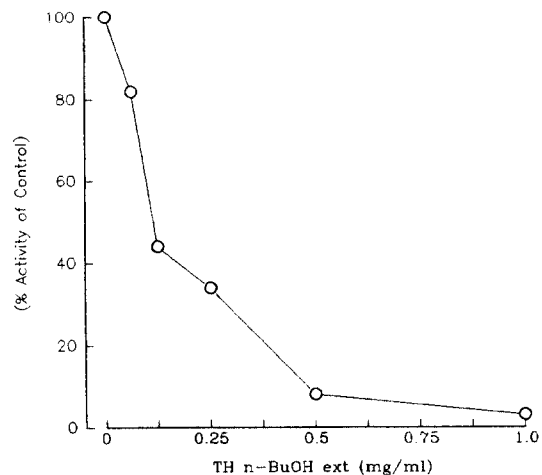


Fig. 1. Effect of *Taraxacum herba* (TH) n-butanol extract on the partial purified hepatic xanthine oxidase activity *in vitro*.

The assay procedure was descr.bed in the experimental methods.

Values are mean for 3 separate experiments.

나타났다.

이러한 결과로 보아 포공영 성분중에는 간 xanthine oxidase의 활성을 억제시키는 물질이 함유되어 있는 것을 확인할 수가 있으며, 또한 그 성분은 수용성이고, n-butanol에 이행되는 물질일 것으로 사료되어진다. 그러므로 이하의 실험에서는 간 xanthine oxidase의 활성을 강하게 억제시키는 n-butanol 추출물을 대상으로 하여 이하의 실험을 행하였다.

2. 간 xanthine oxidase의 활성에 미치는 포공영 n-butanol 추출물의 영향

포공영 n-butanol 추출물의 투여 기간과 투여 용량에 따른 휘취간 xanthine oxidase의 활성 변동을 관찰한 성적이 Fig. 2와 3이다.

포공영 n-butanol 추출물의 투여 용량을 달리하여 복강내로 5일간 투여한 다음 간 xanthine oxi-

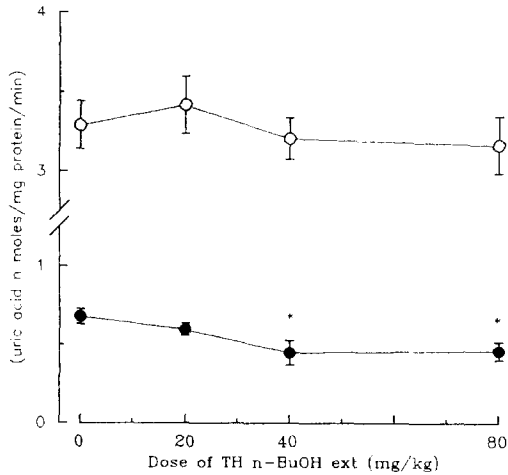


Fig. 2. Dose response for TH n-butanol extract on the hepatic xanthine oxidase activity in rats. Rats were injected TH n-butanol extract i. p. daily for 5 days, and killed 24 hr after the last dose. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean \pm S. E. for 6 rats. $-\circ-$; Total activity (Type D + Type O). $-●-$; Type O activity. *: Significantly different from control ($p < 0.05$).

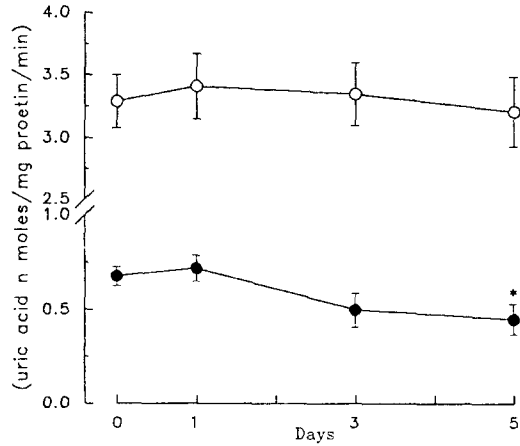


Fig. 3. Change of the hepatic xanthine oxidase activity in rat after scheduled-administration of TH n-butanol extract.

Rats were injected i. p. daily with TH n-butanol extract (40 mg/kg) for 1, 3 and 5 days, and killed 24 hr after the last dose. The other conditions are the same as described in the Fig. 2.

dase의 활성변동을 관찰하였을 때, 모든 실험군에서 총 xanthine oxidase의 활성은 생리식염수만 주사한 대조군과 유사하였으나, type O의 활성은 포공영 n-butanol 추출물 투여량에 반비례하여 억제되었다. 또한 총활성에 대한 type O 활성의 비도 type O의 활성에 병행하여 감소되었다 (Fig. 2 참조).

한편 포공영 n-butanol 추출물 (40mg/kg)의 투여 기간을 달리하여 주사한 다음 간 xanthine oxidase의 활성 변동을 관찰하였을 때, 총활성은 전실험기간에서 별다른 변동을 나타내지 않았으나, type O의 활성은 5일 이상 투여군에서 대조군에 비해 현저하게 그 활성이 억제되었다 (Fig. 3 참조).

이러한 실험 결과로 보아 포공영 n-butanol 추출물은 *in vitro*에서 뿐만 아니라 생체 내에서도 투여 용량과 투여기간에 따라 간 xanthine oxidase의 O type 활성을 억제시키는 것을 알 수가 있다.

3. 간 xanthine oxidase의 반응속도에 미치는 포공영 n-butanol 추출물의 영향

포공영 n-butanol 추출물에 의한 간 xanthine oxidase의 활성억제 현상이 어떠한 작용에 의해 나타나는지를 검토하기 위하여 흰쥐 간으로부터 부분 정제한 xanthine oxidase를 이용하여 효소와 기질 간의 반응속도를 검토한 성적이 Fig. 4이다.

기질인 xanthine의 농도를 변화시켜 가면서 활성을 측정하였을 때, 포공영 n-butanol 추출물 100 μ g/ml를 첨가한 실험구와 추출물을 첨가하지 않은 대조구의 V_{max} 치는 별다른 차이를 관찰할 수가 없다. 그러나, K_m 치는 대조구의 경우는 약 14.3 μ M인데 비해 실험구의 경우는 약 40 μ M로 현저하게 증가되었다.

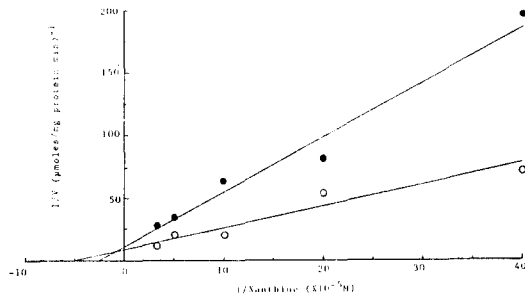


Fig. 4. Double reciprocal plot of partial purified rat hepatic xanthine oxidase *in vitro*. Values are mean for 3 separate experiments. —○—; Control, —●—; TH n-butanol extract (100 μ g/ml).

이러한 결과는 포공영 n-butanol 추출물이 xanthine oxidase 효소단백과 기질간의 친화력을 저해하므로써 간 xanthine oxidase의 활성을 억제시킴을 암시하고 있다.

4. 체중당 간 무게와 혈청 alanine aminotransferase 활성 및 간 조직 과산화지질의 함량변동에 미치는 포공영 n-butanol 추출물의 영향

포공영 n-butanol 추출물의 투여용량을 달리하여 1일 1회 5일간 흰쥐의 복강내로 주사한 다음 도살하여 체중당 간의 무게 및 혈청 alanine aminotransferase의 활성과 간조직 과산화지질의 함량변동을 관찰한 성적이 Table 1이다.

실험에서 측정된 체중당 간 중량은 모든 실험군에서 대조군과 별다른 차이를 관찰할 수 없었으며, 간조직 손상의 지표로 이용되는 혈청중 alanine aminotransferase의 활성^{26, 27)}과 생체막손상의 지표로 이용되는 과산화지질²⁸⁾의 함량 또한 대조군과 실험군 사이에 차이가 없었다.

이러한 실험 결과로 보아 본 실험에서 투여한 포공영 n-butanol 추출물 함량과 기간에서는 간장에 별다른 손상을 야기시키지는 않을 것으로 생각된다.

이상의 실험 성적들과 문헌상의 지견들을 종합하여 볼 때, 포공영 n-butanol 추출물은 생체내에서 oxygen free radical을 생성시키는 것으로 알려져 있는 type O의 xanthine oxidase 활성을 억제시키지만, oxygen free radical 생성과는 무관한 type D의 활성은 변화시키지 않으므로 purine체의 정상적

Table 1. Effect of *Taxaracum herba* n-butanol extract on the liver weight/body weight (%), serum alanine aminotransferase activity and hepatic lipid peroxide content in rats

Treatment	Liver/body wt(%)	Serum ALT ¹⁾	LPO ²⁾
Control	2.69 \pm 0.03	23.1 \pm 2.4	8.44 \pm 1.05
T.H. (20mg/kg)	2.80 \pm 0.09	25.5 \pm 4.2	8.94 \pm 1.48
T.H. (40mg/kg)	2.71 \pm 0.06	20.6 \pm 3.1	9.23 \pm 1.90
T.H. (80mg/kg)	2.73 \pm 0.03	22.7 \pm 3.6	7.24 \pm 0.86

Rats were treated with *Taxaracum herba* n-butanol extract i.p. daily for 5 days, and killed 24 hours after the last dose. Values are the mean \pm S.E. for 6 rats.

¹⁾ Alanine aminotransferase; Karmen unit/ml of serum,

²⁾ Lipidperoxide; Malondialdehyde n moles/g of tissue

인 대사는 유지시키면서도 조직의 손상은 억제시킬 수 있을 것으로 생각되나, 포공영의 어떠한 성분에 의해 나타난 결과인지에 대해서는 추후 계속적인 연구검토가 행해져야할 것으로 사료되어진다.

IV. 요약

포공영의 해독작용 기전을 구명할 목적으로 *in vitro*와 *in vivo*에서 oxygen free radical 생성계 효소인 간 xanthine oxidase의 활성에 미치는 포공영 n-butanol 추출물의 영향을 검토하여 다음과 같은 성적을 얻었다.

포공영 n-butanol 추출물은 *in vitro*에서 간 xanthine oxidase의 활성을 현저히 억제시켰으며, 반응 속도 상수를 측정하였을 때는 V_{max} 치는 별다른 변동이 없었으나 K_m 치는 포공영 n-butanol 추출물을 첨가하므로써 약 3배 가까이 증가하였다. 한편 포공영 n-butanol 추출물을 실험동물의 복강내로 5일간 투여하였을 때, 체중당 간 무게와 혈청 alanine aminotransferase의 활성 및 간조직 과산화 지질의 함량은 변동이 없었다. 이러한 실험 조건 하에서 간 xanthine oxidase의 총활성은 별다른 변동이 없었으나, type O의 활성은 투여량을 증가시킬수록 오히려 감소되었다.

이러한 실험결과로 보아 포공영 n-butanol 추출물은 oxygen free radical의 생성계 효소인 xanthine oxidase의 활성을 조절해 주므로써 해독 작용을 나타낼 수 있을 것으로 사료되어진다.

V. 참고문헌

1. 陳存仁 : 圖說漢方醫藥大事典 (中國醫藥大典), Vol. 1, pp. 294-297, 도서출판 송악, 1988.
2. 한덕룡 : 현대 생약학, p. 176, 한국학습교재사, 서울, 1983.
3. Morgan, E. J.: The distribution of xanthine oxidase. *Biochem. J.*, 20, 1282, 1926.
4. Al Khalidi, U. A. E. and Chaglassian, T. H.: The species distribution of xanthine oxidase. *Biochem. J.*, 97, 318, 1965.
5. Woolfolk, C. A. and Downard, J. S.: Distribution of xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase specific types among bacteria. *J. Bacteriol.*, 130, 1175, 1977.
6. Stirpe, F. and Della Corte, E.: The regulation of rat liver xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, 244, 3855, 1969.
7. Battelli, M. G., Della Corte, E. and Stirpe, F.: Xanthine oxidase type D (dehydrogenase) in the intestine and other organs of the rat. *Biochem. J.*, 126, 747, 1972.
8. Feigelson, P., Davision, J. D. and Robins, R. K.: Pyrazolopyrimidines as inhibitors and substrates of xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, 226, 993, 1957.
9. Ramboer, C. R. H.: A sensitive and nonradioactive assay for serum and tissue xanthine oxidase. *J. Lab. Clin. Med.*, 74, 828, 1969.
10. Duke, E. J., Toyce, P. and Ryan, J. P.: Characterization of alternative molecular forms of xanthine oxidase in the mouse. *Biochem. J.*, 131, 187, 1973.
11. Mccord, J. M. and Fridovich, I.: The reduction of cytochrome C by milk xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, 243, 5753, 1968.
12. Ziegler, D. W., Huntchinson, H. D. and Kissling, R. E.: Induction of xanthine oxidase by virus infections in newborn mice. *Infect. Immun.*, 3, 237, 1971.
13. Tubaro, E., Banci, F., Lotti, B. and Croce, C.: Xanthine oxidase activation in animal liver during infectious processes. *Arzneim Forsch.*, (Drug. Res.), 26, 2185, 1976.
14. Tubaro, E., Lotti, B., Croce, C., Caballo, G. and Borelli, G.: Liver xanthine oxidase increase in mice in three pathological models. *Biochem. Pharmacol.*, 29, 1939, 1980.
15. McCord, J. M. and Fridovich, I.: The biology and pathology oxygen radicals. *Am.*

- Intern. Med., 89, 122, 1978.
16. McCord, J. M. and Roys, R. S. : The pathophysiology of superoxide. : Roles in inflammation and ischemia. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 60, 1346, 1982.
 17. Kleinsky, T. A., Tulle, J. V., Cattau, E. L. and Wang, P. : A comparison of the distribution and electron acceptor specificities of xanthine oxidase and aldehyde oxidase. *Comp. Biochem. Physiol.*, 498, 687, 1974.
 18. Schoutsen, B., De Jong, J. W., Harmsen, E., De Tombe, P. P. and Achterberg, P. W. : Myocardial xanthine oxidase/dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Acta*, 762, 519, 1983.
 19. Jarasch, E. D., Bruder, G. and Heid, H. W. : Significance of xanthine oxidase in capillary endothelial cells. *Acta physiol. Scand. (Suppl.)*, 548, 39, 1986.
 20. Periannan, K. and Jay, L. Z. : Characterization of free radical generation by xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, 264, 9880, 1989.
 21. Shibata, S., Ando, T. and Tanaka, O. : Chemical studies on the oriental plant drugs XV II : The prosapogenin of the ginseng saponins (Ginsenosides-Rb₁, -Rb₂, and -Rc). *Chem. Pharm. Bull.*, 4, 1157, 1966.
 22. Rowe, P. B. and Wyngaarden, J. B. : The mechanism of dietary alterations in rat hepatic xanthine oxidase levels. *J. Biol. Chem.*, 241, 5571, 1966.
 23. Reitman, S. and Frankel, S. : A colorimetric method for the determination of serum oxalacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin. Pathol.*, 28, 58, 1957.
 24. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yaki, K. : Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal. Biochem.*, 95, 351, 1979.
 25. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, 265, 1951.
 26. Wroblewski, F. and La Due, J. S. : Serum glutamic pyruvic transaminase in cardiac and hepatic disease. *Proc. Exp. Biol. Med.*, 91, 569, 1956.
 27. Takeda, Y., Ichihara, A., Tanioka, H. and Inoue, H. : The biochemistry of animal cells. : The effect of corticosteroids on leakage of enzyme from dispersed rat liver cells. *J. Biol. Chem.*, 239, 3590, 1964.
 28. Plaa, G. L. and Witschin, H. : Chemicals, drugs and lipid peroxidation. *Am. Rev. Toxicol. Pharmacol.*, 16, 125, 1976.