

Aloe속 식물의 고분자물질 분획이 알콜대사에 미치는 효과

신국현*, 한용남, 정하숙, 임순성, 이상현, 심창섭¹

서울대학교 천연물과학연구소, ¹(주) 김정문알로에 중앙연구소

Effects of High Molecular Weight Fractions of *Aloe* spp. on Alcohol Metabolism

Kuk Hyun Shin*, Yong Nam Han, Ha Sook Chung, Soon Sung Lim,
Sang Hyun Lee and Chang Sub Shim

Natural Products Research Institute, Seoul National University, Seoul 110-460 and
¹R & D Center, Kim Jeong Moon Aloe Co., LTD., Korea

Abstract - For the purpose of evaluating protective components against alcohol-induced toxicity, the active components enhancing alcohol metabolism was pursued from water soluble fraction by ethanol precipitation and DEAE-cellulose chromatographic technique. As a result, various high molecular weight fractions from *Aloe vera* and *Aloe arborescens*, on a single oral administration in rats were found to cause a significant decrease in the blood ethanol concentration as well as enhancement of liver cytosolic ADH and ALDH activities and among which, a strong acidic high molecular weight fraction was demonstrated to exhibit the most potent enhancing activity on ethanol metabolism.

Key words - *Aloe* spp.: enhancement of ethanol methabolism; ADH; c-ALDH; m-ALDH; high molecular weight fraction.

알콜의 섭취로 말미암아 유발되는 간 기능의 이상은 증가 일로에 있으며^{1,2)} 이로 말미암아 나타나는 여러 가지의 간 질환의 예방 또는 치유는 중요한 연구 과제의 하나임은 주지의 사실이다. 연구자 등은 수종의 생약추출물이나 Aloe속 식물의 일종인 *Aloe ferox*가 현저한 혈 중 알콜 농도의 감소 효과를 나타낸다는 보고^{3,4)}에 착안하여 Aloe속 식물로부터 알콜 대사 촉진 내지는 간 보호작용성을 추적하기 위한 일차적인 시도로서 우리 나라에서 가장 많이 재배 이용되고 있는 *Aloe vera*의 추출물들이 알콜 대사에 미치는 작용을 검색한 결과 수용성 고분자물질 분획 에서는 알콜 대사 촉진작용이, methanol

이용성 저분자물질 분획에서는 대사억제작용이 나타나는 분획에 따라 그 작용이 상반된다는 사실을 입증하여 보고⁵⁾ 한 바 있다.

본 보고에서는 Aloe의 수용성 고분자물질 분획의 알콜대사 촉진성분을 구명하기 위한 목적의 일환으로 ethanol 침전법 및 DEAE-cellulose chromatography를 구사하여 알콜대사 촉진성분상을 추적한 결과를 보고한다.

재료 및 방법

실험재료 - *Aloe vera*는 잎으로부터 피질을 제거한 육질부를 건조 분말화하거나 생 잎을 압착하여 얻은 즙을, *Aloe arborescens*는 성숙한 잎을 선별

*교신저자 : Fax 02-742-9951, 02-762-8322

채취하여 열풍 건조한 것을 (주)김정문 알로에로부터 제공받아 실험재료로 하였다.

추출 및 분획-Aloe 시료들을 3시간씩 3회 methanol로 수욕상에서 환류 추출하여 methanol 가용부와 불용부로 분획하고 고분자물질 군으로 추정되는 methanol 불용부(AVD, AAD)를 상법에 따라 ethanol 침전법, DEAE-cellulose chromatography 법을 구사하여 정제를 실시하였다.

실험동물 및 시료의 처치-체중 200~250 g의 Sprague-Dawley계 웅성 rat를 실험동물로 하고 고형사료와 식수를 공급하면서 2주 이상 사육한 다음 실험을 실시하였으며 실험 전 24시간 절식시키고 물만을 공급하였다. Rat를 urethane 500 mg/kg 씩 복강내 투여하여 마취시키고 시료를 0.5%CMC 또는 5 g/L의 arabia gum에 현탁 시켜서 경구 투여하였다. 1시간 후 ethanol을 3 g/kg씩 경구투여하고 ethanol 투여 후 1시간만에 안와정맥으로부터 채혈하고 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리 한 다음 ethanol oxidase 측정 kit를 이용하여 혈청 내 ethanol 함량을 분석하였다. 채혈이 끝난 후 즉시 간을 적출하고 4에서 0.25 M sucrose 액(2 mM mercaptoethanol 및 10 mM sodium phosphate, pH 7.4)으로 세척하고 sucrose 용액 7배 액을 가하여 homogenization하였다. 이 homogenate를 600×g에서 10분간, 10,000×g에서 10분간 원심분리 하여 그 상층액을 cytosolic-ALDH 측정 효소원으로 하였고 10,000×g 상층 액을 105,000×g에서 다시 1시간 원심분리 하여 그 상층 액을 ADH 효소원으로 하였다.

10,000×g의 pellet을 sucrose 용액 15 ml로 2회 세척하고 1 mM sodium phosphate(pH 7.4, 2 mM mercaptoethanol, 0.2% sodium deoxycholate)를 간의 습 중량 g당 1 ml의 부피로 첨가하여 homogenization하고 이 homogenate를 40,000×g에서 1시간 원심분리 한 후 상층액을 mitochondrial ALDH 효소원으로 하였다.

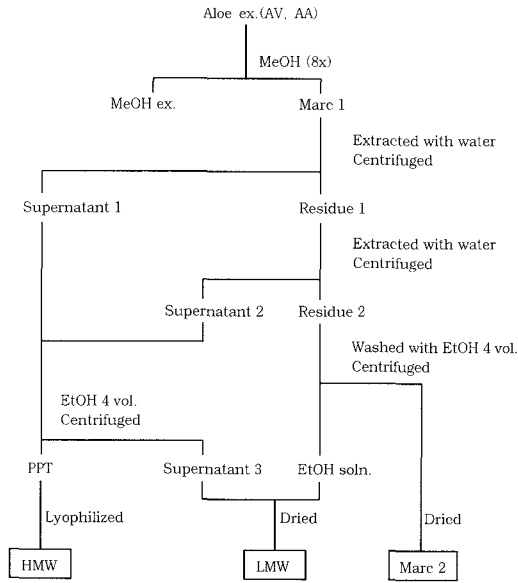
효소활성의 측정-모든 효소활성의 측정은 Lebsack 등의 방법⁶⁾에 준하여 340 nm에서 NADH 생성속도를 지표로 실시하였다. ADH 활성은 37°C, ALDH 활성은 25°C에서 기질을 가하여 반응을 개시하였으며 1분당 1 uM의 coenzyme 형성량을 1 unit로 하여 U/mg protein의 비활성으로 나타내었다.

반응 액의 조성은 ALDH의 경우는 propionaldehyde를 기질로 하여 0.2 M-tris-HCl buffer(pH 8.3) 1.25 ml, 1 M KCl 0.1 ml, 0.1 M pyrazole 0.02 ml, 1 M 2-mercaptoethanol 0.02 ml, 0.1 M propionaldehyde 0.06 ml, 0.1 M NAD(in 0.01 M HCl) 0.1 ml 및 enzyme source 0.1 ml를 가하고 inhibitor를 첨가하여 총 2.5 ml가 되도록 조절한 후 반응시켰다.

ADH의 경우는 ethanol을 기질로 하여 0.1 M tris-HCl buffer(pH 8.5) 2.6 ml, 0.2 M ethanol 0.1 ml, 0.05 M semicarbazide HCl 0.1 ml, 0.1 M NAD(in 0.01 M HCl) 0.02 ml의 혼합액과 효소원 0.1 ml을 넣고 inhibitor를 첨가하여 총 3 ml가 되도록 조절한 후 반응을 실시하였다. 기질만을 제거한 공시험군의 측정치를 제한 값을 효소활성으로 하였다. 효소 단백질의 정량은 Lowry법⁷⁾에 의하여 실시하였다.

결과 및 고찰

고분자물질분획의 정제-Aloe vera(AV)와 Aloe arborescens(AA)엑스의 methanol가용성 분획을 제거한 marc를 소량의 증류수에 현탁시키고 원심분리 하여 셀룰로스 및 리그닌과 같은 침전물을 제거하고 상등액에 4배 량의 ethanol을 가하여 80% ethanol 가용부(LMW)와 불용부(HMW)를 얻었으며 저분자 분획인 LMW는 AV 및 AA 각각 15.4%와 9.8%, 고분자 분획인 HMW는 각각 34.9%와 32%를 나타내었다(Scheme 1). DEAE-cellulose column chromatography에 의하여 Aloe 분말의 methanol 가용성 분획을 제거한 잔사(AVD)와 신선한 Aloe vera의 마쇄 액(AVF)을 시료로 하여 먼저 저분자성물질을 제거하기 위하여 분자량 12,000 이하의 투석막으로 투석하여 제거한 다음 투석내액을 DEAE-cellulose column에 충전하고 Fig. 1~3에 표시한 바와 같이 hexose, uronic acid를 비색법으로 monitoring 하면서 분획하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 AVD의 경우 비흡착성 부분 즉, 중성부분(AVD-1)에서 대부분의 hexose가 검출되었고 약산성(AVD-2) 및 강산성(AVD-3) 분획순으로 hexose 량이 감소하였다. Uronic acid는 비흡착성 부분과 강산성 분획에서 검출되었



Scheme 1. Preparation of Aloe polysaccharide fraction by ethanol precipitation method. HMW, high-molecular weight fraction; LMW, low-molecular weight fraction. AV, *Aloe vera* ex.; AA, *Aloe arborescens* ex.

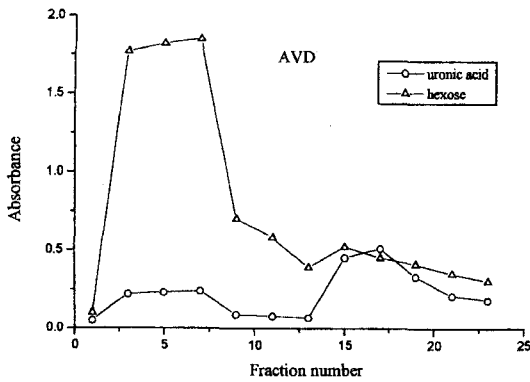


Fig. 1. Ion exchange chromatography of AVD fraction of *Aloe vera* extract on a DEAE-cellulose column. Eight grams of the AVD fraction was suspended into 160 ml of water. The suspension was stirred at 4°C overnight and centrifuged at 2,500 rpm for 30 min. The supernatant (8130 ml) was dialyzed against water and 20 mM NH_4HCO_3 solution. The dialysate (150 ml) was applied on the column (size 2.8×12 cm) which was eluted with 100 ml of 20 mM NH_4HCO_3 and 200 ml of 20 mM NH_4HCO_3 plus 1 M NaCl. The eluates were collected into 20 ml/tube, and monitored by analyzing hexose and uronic acid. Three fractions (AVD-1, tube No. 1-8; AVD-2, tube No. 9-12; AVD-3, tube No. 13-23) were dialyzed and lyophilized.

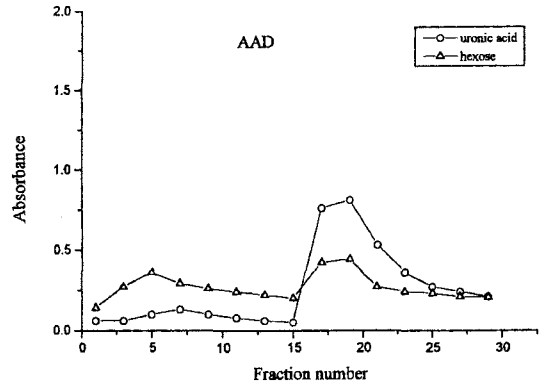


Fig. 2. Ion exchange chromatography of AAD fraction of *Aloe arborescens* extract on the DEAE-cellulose column. Extraction and chromatography were carried out as described in the legend of Fig. 1. Two fractions (AAD-1, tube No. 1-14; AAD-2, tube No. 17-26) were dialyzed and lyophilized.

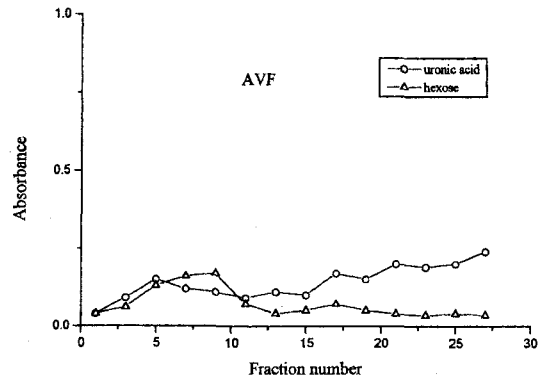


Fig. 3. Ion exchange chromatography of a homogenate of the fresh leaves of *Aloe vera* on the DEAE-cellulose column. The homogenate (AVF, 80 g) was suspended into the 80 ml of water. The suspension was stirred at room temperature for 1 hr and then centrifuged at 2,500 rpm for 30 min. The supernatant (135 ml) was dialyzed against water and 20 mM NH_4HCO_3 solution. The dialysate (135 ml) was applied on the column. Chromatography were carried out as described in the legend of Fig. 1. Two fractions (AVF-1, tube No. 2-13; AVF-2, tube No. 14-27) were dialyzed and lyophilized.

다. AA의 경우는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 증성과 강산성분획으로 비교적 명확히 분획되었으며 hexose는 양쪽 분획에서, uronic acid는 주로 강산성 분획에서 검출되었다. 한편 신선한 AVF의 chromatogram은 동결 건조한 AVD의 그것과는 현저

히 다른 pattern을 보여 중성과 강산성 분획으로 나누어졌다(Fig. 3). 그 수를 보면 Table I에서 보는 바와 같이 비흡착성 분획의 양이 AVF의 경우 AVD에 비하여 현저히 감소된 것을 알 수 있는데 이는 분획 과정에서 Aloe의 점액성 물질로부터 hexose 양성인 물질이 효소분해에 의해 많이 생성된 때문이 아닌가 추정된다.

고분자 다당체 분획들이 알콜 대사 효소에 미치는 효과 - Methanol 추출 잔사를 ethanol 침전 법에 의하여 분획 한 고분자물질 분획들을 당량씩 rat에

경구투여하고 1시간 후 ethanol 3 g/kg씩 경구 투여 한 다음 1시간만에 채혈하여 혈청 ethanol 농도, 간의 ADH, c-ALDH 및 m-ALDH활성을 측정 한 결과를 Table II에 종합하여 표시하였다.

혈청 ethanol 농도는 AV 및 AA를 불문하고 HMW 투여군에서 대조군에 비하여 유의성 있게 감소함을 알 수 있으며 이에 부합되게 ADH 활성도 대조군에 비하여 유의성 있게 증가함을 관찰하였다. AV의 경우는 LMW 에서도 ADH 활성의 증가를 보였다. 한편 c-ALDH활성은 모든 분획에서 통계적인 유의성은 없으나 대조 군에 비하여 21~35% 증가 하는 경향을 보였다.

이상의 결과를 토대로 DEAE cellulose chromatography에 의하여 분획 한 중성, 약산성 및 강산성 다당체 분획물에 대하여 알콜 대사에 미치는 효과를 검토한 결과 Table III, IV에서 보는 바와 같이 각 분획물들의 수득률에 대응하는 당량을 rat에 경구투여하고 혈청중 ethanol 및 간의 효소활성에 미치는 효과를 검토한 결과 AA의 경우 강산성 다당체(AAD-3) 투여군에서 대조군에 비하여 약 42%의

Table I. Yield of various polysaccharide fractions prepared by ion exchange chromatography on DEAE-cellulose column

Fractions	AVD (16 g)	AAD (16 g)	AVF (80 g)
Neutral	AVD-1 (1.11 g)	AAD-1 (0.12 g)	AVF-1 (0.08 g)
Weak acidic	AVD-2 (0.21 g)	-	-
Strong acidic	AVD-3 (0.09 g)	AAD-3 (0.22 g)	AVF-3 (trace)

Table II. Effect of high molecular weight fractions of Aloe spp. on serum ethanol concentration and hepatic ADH and ALDH activities in rats

Treatment	Dose (mg/kg. p.o)	Ethanol (mM)	ADH	c-ALDH	m-ALDH
				(nmoles/min/mg prot.)	
Control	-	83.10±2.70	84.30±2.15	19.40±2.36	39.60±2.47
AA(LMW)	67.8	76.14±2.32	90.02±4.50	25.46±3.47	36.97±2.23
AA(HMW)	221.4	72.45±2.04*	91.82±4.86	25.80±3.54	40.52±3.38
AV(LMW)	107.2	74.22±1.87*	109.19±5.64*	23.52±1.59	45.38±3.41
AV(HMW)	242.8	69.41±3.87**	98.91±2.90**	26.14±2.85	33.88±4.51

Rats were treated with test materials 1hr prior to the administration of ethanol (3 g/kg, p.o.) and ethanol concentration in the serum and ADH, c-ALDH and m-ALDH activities in the liver were estimated 1hr after ethanol treatment. Significantly different from the control: *p<0.05, **p<0.01.

Table III. Effect of polysaccharide fractions from AAD on serum ethanol concentrations and hepatic ADH, c-ALDH, m-ALDH activity in rats

Treatment	Dose (mg/kg. p.o.)	Ethanol concentration (mM)	Enzyme activity(nmole NADH/min/mg prot.)		
			ADH	c-ALDH	m-ALDH
Control(Gum arabic)	-	39.2±3.3	15.25±1.33	5.36±1.22	8.27±1.39
AAD-1	60	43.6±4.9	14.16±2.29(-7.1)	6.93±0.86(29.3)	9.10±1.81(10.0)
AAD-3	110	22.8±2.9**	21.10±2.37(38.4)*	10.25±1.47(91.2)**	8.37±0.59(1.3)

Rat were administered orally with equivalent dose of various polysaccharide fractions (AAD-1, neutral; AAD-3, strong acidic) 1hr prior to ethanol and 1hr later, the animals were sacrificed and ethanol concentrations in serum and liver cytosolic ADH, ALDH, mitochondrial activity were estimated. Figures in parentheses indicate % increase relative to those of the control values. Each value represents the mean±S.E. (n=4~5). Significantly different from the control: **p<0.01, *p<0.05.

Table IV. Effect of polysaccharide fractions from AVD on serum ethanol concentrations and hepatic ADH, c-ALDH, m-ALDH activity in rats

Treatment	Dose (mg/kg. p.o.)	Ethanol concentration (mM)	Enzyme activity (nmole NADH/min/mg prot.)		
			ADH	c-ALDH	m-ALDH
Control(Gum arabic)	~	39.3±3.3	5.33±0.89	6.26±0.67	11.90±1.30
AVD-1	555	22.9±2.0***	7.90±0.61(48.2)**	8.63±0.93(37.8)*	14.06±0.96(18.1)
AVD-2	105	21.8±2.6***	6.17±0.73(15.7)	7.52±0.94(20.1)	13.20±0.93(10.9)
AVD-3	45	19.0±4.1***	5.95±2.02(11.6)	8.80±1.04(39.7)*	11.12±1.39(-6.5)

Rat were administered orally with equivalent dose of various polysaccharide fractions (AVD-1, neutral; AVD-2, weak acidic; AVD-3, strong acidic) 1hr prior to ethanol and 1 hr later, the animals were sacrificed and ethanol concentrations in serum and liver cytosolic ADH, ALDH, mitochondrial activity were estimated. Figures in parentheses indicate % increase relative to those of the control values. Each value represents the mean±S.E. (n=4~5). Significantly different from the control: ***p<0.01, **p<0.05, *p<0.1

ethanol 함량 감소효과를 나타내었으며 이에 부합되게 간의 ADH활성도 강산성 다당체 투여군에서 대조군에 비하여 38.4% 증가됨을 관찰하였다. 한편 c-ALDH 또한 강산성 다당체 투여군에서 91.2% 증가됨을 관찰하였다. 약산성 다당체 분획은 그 yield가 낮아서 동물실험 data를 얻을 수 없었다. 한편 AV의 경우 다당체 분획 모두에서 대조군에 비하여 유의성 있는 혈중 ethanol 농도 감소효과를 보였다. 그 투여량으로 비교할 때 역시 강산성 다당체 류가 가장 강한 효과를 보였으며 약산성 및 중성의 순으로 혈중농도 감소효과가 약화됨을 알 수 있었다. 간 c-ALDH 활성도 대조군에 비하여 유의성 있게 증가하였으며 ADH의 경우는 통계적으로 유의성은 없으나 증가하는 경향을 보였다. m-ALDH 활성도 AA의 경우와 유사하게 대조군에 비하여 유의성 있는 활성의 증가를 관찰 할 수 없었다.

이상의 실험 결과들을 종합하면 알로에의 저분자 물질 분획에서는 알콜대사 촉진작용을 관찰할 수 없으나 고분자물질 분획에서 관찰할 수 있었다. 고분자물질 분획을 이온교환 크로마토그래피를 실시하였을 때 얻은 고분자 다당체 중 AV의 경우는 중성, 약산성 및 강산성 분획 모두에서, AA의 경우는 강산성 분획에서만 알콜대사 촉진작용을 나타냄을 알았다. 따라서 알로에의 주 알콜대사 촉진작용 물질은 강산성 다당체류로 추정되며 그 구체적인 화학구조는 앞으로 밝혀야 할 과제로 사료된다.

- Gabuzda, G. J. (1958) Fatty liver in man and the role of lipotropic factors. *Am. J. Clin. Nutr.* 6: 280-297.
- Rubin, E. and Lieben, C. S. (1968) Hepatic microsomal enzymes in man and rats: Induction and inhibition by ethanol. *Science* 162: 690-691.
- Sasaki, K., Yamane, T., Saitoh, Y., Ikawa, C. and Nishihata, T. (1987) Effect of water extracts of crude drugs in decreasing blood ethanol concentration in rats. *Chem. Pharm. Bull.* 35: 4597-4604.
- Sasaki, K., Saitoh, Y., Ikawa, C. and Nishihata, T. (1989) Effect of water extracts of aloe and some herbs in decreasing blood ethanol concentration in rats(II). *Chem. Pharm. Bull.* 37: 155-159.
- Shin, K. H., Woo, W. S., Song, Y. J., Chung, H. S., Lee, J. M. and Shim, C. S. (1995) Studies on the effect of Aloe spp. on ethanol metabolism (I). Effect of *Aloe vera* on serum ethanol level and hepatic ADH activity. *Kor. J. Pharmacogn.* 26: 148-153.
- Lebsack, M. E., Petersen, D. R. and Collus, A. C. (1976) Preferential inhibition of the low Km aldehyde dehydrogenase activity by pargyline. *Biochem. Pharmacol.* 26: 1151-1154.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. L. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-276.