

## 홍삼추출물 투여 후 Paraquat가 투여된 생쥐간에서 Glutathione과 Lipid Peroxidation에 미치는 항산화 효과

서해대학 임상병리과

이 화 재<sup>†</sup>

국문초록: 본 연구결과에서 볼 때 paraquat 독성 생존을 실험에서는 ascorbic acid가 우수하였고, 간 조직 내 과산화수소 ( $H_2O_2$ ) 축적해소는 알콜추출물에서 우수하였으며, GPx 활성도 수준은 홍삼지용성추출물과 ascorbic acid에서 우수하였다. 한편 GSH량은 증가되면서 GSSG량이 감소되는 glutathione 환원반응이 우수한 것은 ascorbic acid에서만 확인되었다. 한편 생체 내 MDA량 감소는 홍삼수용성추출물과 ascorbic acid에서만 우수한 효능을 발휘하였다. 이 같은 실험결과들로 미루어 볼 때 ascorbic acid가 항산화 효능이 있는 것은 본 실험에서도 입증되고 있으며, 아울러 홍삼에서도 추출물마다 독특한 항산화 효능이 나타나고 있다.

### 서 론

호기성 대사 동물에서 산소는 생명유지에 필수적인 요소지만, 대사과정에서 superoxide radical ( $\cdot O_2^-$ )나 hydroxyl radical ( $\cdot OH$ ), hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ), singlet oxygen ( $^1O_2$ ), alkoxy radical ( $RO\cdot$ ), peroxy radical ( $ROO\cdot$ ) 등과 같은 유독성을 나타내는 활성기산소 (Oxygen free radical)들은 세포막 인지질이나 불포화지질과 반응성이 강한 것으로 알려지고 있다.<sup>12,23</sup> 이와 같은 활성기산소의 생성은 hemoglobin이나 thiols기 같은 비단백성 대사물질의 자가산화 과정에서나 담배, 오존의 흡입, 감마선 피폭과, adriamycin약제, paraquat,  $CCl_4$  같은 산화제에 의해서도 많이 생성된다.<sup>15</sup>

<sup>20)</sup> Paraquat (1,1'-dimethyl-4,4'-bipyridylium dichloride: methyl viologen)<sup>28</sup>는 생체 내 철로부터 전자를 받아 paraquat radical로 환원된 후 용존산소와 반응하여  $H_2O_2$ 와  $\cdot O_2^-$ 를 많이 생성시키는 것으로 보고되고 있다. 이렇게 생성된 활성기산소는 체내  $Cu^{2+}$ 분자에 의한 Harber-Weiss 반응<sup>31</sup>)이나  $Fe^{+3}$ 분자가  $\cdot O_2^-$ 과 반응하여  $Fe^{+2}$ 로 환원되는 Fenton 반

응<sup>18</sup>)으로  $H_2O_2$ 나  $\cdot OH$ 같은 반응성이 강한 라디칼을 만들고 여러 반응단계를 거치면서  $RO\cdot$ 나  $ROO\cdot$  같은 2차 활성기산소<sup>24,32</sup>)를 만들고 생체 내 효소의 구조적 변화나 DNA, RNA 등 염기서열 변화 및 단백질 thiol기 분자물질의 가교결합이나 절단 등을 통해서 인지질이나 불포화지방산을 포화지질로 전환시키면서 세포노화를 촉진하고 고혈압이나 당뇨병, 동맥경화, 암 등 난치성 질병의 발생빈도를 증가시킨다는 보고가 있다.<sup>24,32</sup> 이 같은 활성기산소 유해작용에 대하여 생체는 자가방어를 위해 superoxide dismutase (SOD), catalase, peroxidase, glutathione peroxidase (GPx) 등과 같은 항산화효소 체계가 있고, 이 외에도 glutathione나 ascorbic acid 같은 항산화물질들이 있어서 활성기산소를 제거 또는 억제하는 것으로 알려지고 있다.<sup>11</sup>) 이 같은 반응을 보다 확실히 하기 위해서 본 연구는 홍삼총사포닌과 수용성추출물, 알코올추출물, 지용성추출물과 이미 항산화 효능이 있는 것으로 알려진 ascorbic acid를 경구 투여 후 paraquat 투여로 간조직 내 활성기산소 종을 극대로 생성시킨 상태에서  $H_2O_2$ 와 glutathione peroxidase 활성, glutathioneGSH와 GSSG<sup>14,29</sup>) 및 지질과산화물인 malondialdehyde (MDA)<sup>10,22</sup>)량을 측정하고, 이들 홍삼추출물질이 MDA (malondialdehyde)를 얼마나 억제시키는지 확인함으로써 홍삼추출물 중

\* 논문접수: 1999년 10월 8일

수정재접수: 2000년 3월 25일

<sup>†</sup> 별책 요청 저자

간의 항산화 효능 여부를 비교 확인하고 그 유효 성분을 확인하였기에 그 결과를 보고한다.

## 재료 및 방법

### 1. 실험재료

#### 1) 실험동물과 실험군 분류

5주령 수컷 생쥐를  $24 \pm 2^\circ\text{C}$ 로 유지 사육실에서 쥐사료와 물을 자유로이 먹이면서 일주일 안정화시킨 후 체중이 23~27 g인 수컷 5마리를 1군으로 대조군 (Control), paraquat (PQ) 투여군, 홍삼총사포닌 투여 후 paraquat 투여군 (TS+PQ), 홍삼수용성추출물 투여 후 paraquat 투여군 (WS+PQ), 홍삼알코올추출물 투여 후 paraquat 투여군 (AS+PQ), 홍삼지용성추출물 투여 후 paraquat 투여군 (LS+PQ) 등과 ascorbic acid 투여 후 paraquat 투여군 (AA+PQ) 등 7개 실험군으로 하였다.

#### 2) 시약

실험에 사용한 sucrose, ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA-2Na), ammonium ferrosulfate, xyrenol orange, cytochrome-c, glutathione reductase, glutathione (reduced form),  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form; NADPH), t-butyl hydroperoxide, sodium dodecyl sulfate (SDS), 1,1,3,3-tetramethoxy propane (TMP), thiobabituric acid [5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB)], ascorbic acid, pyridine, butylated hydroxytoluene, anthraquinone-2-sulphonic acid, sulphanimide, naphthyl ethylenediaminedihydrochloride, hydroxylamine, paraquat, bovine serum albumin 등은 Sigma 제품을 사용하였으며, 기타 시약은 특급시약을 사용하였다. 홍삼총사포닌 (total saponine), 수용성추출물 (water soluble extracts), 알코올추출물 (alcohol soluble extracts) 과 지용성추출물 (lipophilic fraction) 등은 한국담배인삼연초 연구소로부터 제공받아 사용하였다.

#### 3) 분석시료 제조

분석을 위한 시료 준비는 김 등<sup>1)</sup>의 방법을 기초로 한 변형방법을 이용하였다. 생쥐에 홍삼추출물을 5일간 투여 후 paraquat를 투여하고 24시간 후 경추 탈구 후 해부하여 간조직을 적출한 후  $4^\circ\text{C}$  생리식염수로 수세하고 조직무게를 달고, 세절하며 혈액을 제거하였다. 간조직을 sucrose/EDTA (0.25 M/1 mM)에서 균질기로 10% 균질액을 만든 후  $1,000 \times g$ 에서 10분간 원심분리 후 상등액은 hydrogenperoxide, glutathione peroxidase와 MDA를

측정하였고 일부 상등액은  $4^\circ\text{C}$ 에서  $15,000 \times g$ 로 30분간 원심분리한 상등액으로 glutathione GSSG와 GSH의 측정 시료로 사용하였다.

### 2. 실험방법

#### 1) Paraquat (PQ) 생존율 실험

PQ 생존율 실험은 주충노씨 방법을 변형시킨 방법<sup>4)</sup>으로 하였다. 각군은 23~27 g 생쥐 수컷 7마리를 한 군으로 하였고, 정상대조군 (Control), paraquat (PQ)군, 홍삼총사포닌 투여 후 paraquat 투여군 (TS+PQ), 홍삼수용성추출물 투여 후 paraquat 투여군 (WS+PQ), 홍삼알코올추출물 투여 후 paraquat 투여군 (AS+PQ), 홍삼지용성추출물 투여 후 paraquat 투여군 (LS+PQ)과 ascorbic acid 투여 후 paraquat 투여군 (AA+PQ) 등 7개 실험군으로 하였고, 정상대조군을 제외한 6개군에 각각 200 mg/kg BW/0.1ml DW량을 5일간 경구 투여 후 6일째 치사량의 paraquat 100mg/kg BW/0.1ml DW를 복강 내에 투여한 실험결과의 생존율을 Fig. 1과 같이 관찰되었다.

#### 2) $\text{H}_2\text{O}_2$ 함량 측정

시료의  $\text{H}_2\text{O}_2$  양은 Wolff의 분광학적 방법<sup>30)</sup>으로 측정하였다. 100  $\mu\text{M}$  xylenol orange, 250 mM ammonium ferrous sulfate, 100 mM sorbitol 그리고 25 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 가 혼합된 FOX I시약 950  $\mu\text{l}$ 에 시료 50  $\mu\text{l}$ 를 혼합 후 실온에서 30분간 방치 후 원심분리한 상등액을  $\text{H}_2\text{O}_2$  표준액으로 흡광도 560 nm에서 측정하였다.

#### 3) Glutathione peroxidase (GP) 활성도 측정

Glutathione peroxidase 활성도는 Flohe<sup>6)</sup> 방법으로 측정했다. 1 mM EDTA이 함유된 pH 7.0인 0.1 M 인산완충액 500  $\mu\text{l}$ 에 시료 100  $\mu\text{l}$ , 그리고 0.24 U의 glutathione reductase 100  $\mu\text{l}$ 와 GSH 10 mM 100  $\mu\text{l}$ 를 넣고 반응액 농도가 1 mM이 되도록  $\text{NaNO}_3$ 를 가한 후  $37^\circ\text{C}$ 에서 10분간 incubation 한 다음 파장 340 nm에서 3분간 NADPH의 흡광도 변화를 측정 한 후 1.5 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  100  $\mu\text{l}$ 를 가하고, 동일조건에서 5분간 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료 대신 인산완충액을 넣고 동일조건에서 흡광도 변화를 측정하였다. 단백질 1 mg 내 glutathione peroxidase가 분당 NADPH 산화량을 1 unit로 하였다.

#### 4) Glutathione 함량 측정

시료 내 total glutathione (GSH+GSSG)과 산화형 GSSG은 Tietze 방법을 변형한 Griffith 방법<sup>10)</sup>으로 측정하였다. Total glutathione은 0.3 mM NADPH/

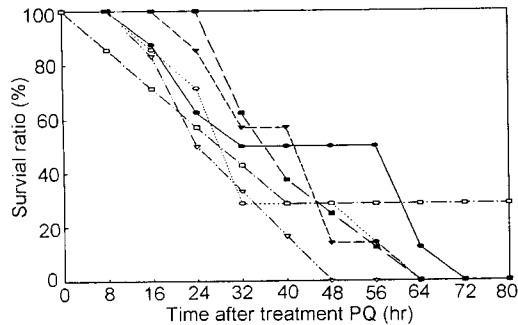


Fig. 1. Effects of Korean red ginseng extract on survival of mouse treated with paraquat.

—●—; PQ group, —○—; ginseng total saponine and PQ group, —▼—; ginseng water extract and PQ group, —▽—; ginseng alcohol extract and PQ group, —■—; ginseng lipophilic fraction and PQ group, —□—; ascorbic acid and PQ group.

0.125 M, 인산완충액에 (6.3 mM EDTA, pH 7.5) 함유 700  $\mu$ l, 6 mM DTNB 100  $\mu$ l에 시료 200  $\mu$ l을 혼합하고, 30 $^{\circ}$ C로 맞춘 thermostated cuvette holder에서 4분간 안정화시킨 후 glutathione reductase (200 kU/l) 5  $\mu$ l를 가하여 412 nm에서 1분간 흡광도를 측정하였다. 한편 GSSG량은 시료에 2-vinylpyridine (2-VP) 혼합 (50:1, v/v)액을 가하고 60분 방치 후 GSH를 제거하고 glutathione reductase (200 kU/l)를 20  $\mu$ l로 첨가 후 total GSH와 동일조건으로 측정하여  $GSH = total [GSH] - 2 \times [GSSG]$ 로 계산하였다.

#### 5) 지질과산화물 (MDA) 수준 측정

간조직 시료 내 지질과산화물은 MDA (malondialdehyde)를 Ohkawa 등<sup>23)</sup> tribabutaric acid (TBA) 법으로 측정하였다. 간조직 10% 균질액 0.1 ml에 8.1% sodium deoxylsulfate액 0.2 ml, 20% acetic acid (pH 3.5) 1.5 ml와 0.8% tribabutaric acid 1.5 ml를 가하고, 95 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 반응시키고 즉시 냉각시켜 n-buthanol과 pyridine 혼합액 (15:1, v/v)을 가하고 격렬하게 흔든 다음 10분간 원심분리 (4,000 rpm)한 상층 유기층을 1,1,3,3,-tetramethoxypropane (TMP)을 표준으로 532 nm에서 측정하였다.

#### 6) 단백질 정량 및 실험결과 유의성 판정

시료 내 항산화 효소활성 량 측정은 bovine serum albumin을 표준으로 하여 mg당 단백질량을 Lowry 등<sup>19)</sup> 방법으로 측정하였다. 한편, 모든 실험 결과는 student's t-test를 이용 통계처리 결과로 유의성 검정하였다.

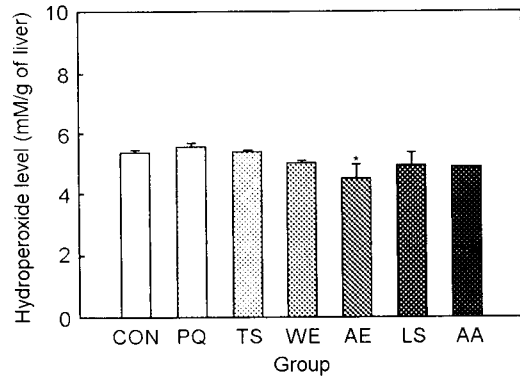


Fig. 2. Effects of red ginseng levels on hepatic hydroperoxide level of mouse treated with paraquat.

□; Normal control group, ▨; PQ control group, ▩; ginseng total saponine and PQ group, ▧; ginseng water extract and PQ group, ▦; ginseng alcohol extract and PQ group, ▥; ginseng lipophilic fraction and PQ group, ▤; ascorbic acid and PQ group. \*p<0.05, \*\*p<0.01: Significantly different from control groups.

## 결 과

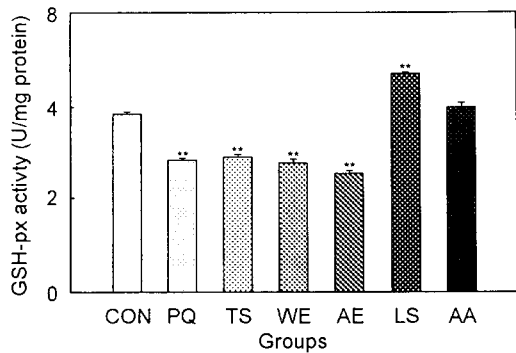
### 1. Paraquat 생존율 실험

생쥐에 홍삼추출물과 ascorbic acid를 각각 경구 투여한 24시간 후 paraquat를 복강 내 투여하고 생쥐의 생존율을 관찰한 결과 대부분의 생쥐들은 paraquat 투여 4시간 후부터 활동력이 둔화된 웅크린 상태가 되면서 식이를 금했고, 2~4일 사이에 생쥐들이 다 죽었으나 ascorbic acid 투여군 내 28.6%만이 사경을 헤매다가 5일 후 paraquat 독에서 벗어나 식욕을 찾고, 6일부터는 왕성한 생동력을 회복한 결과를 Fig. 1과 같이 나타냈다.

### 2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 함량의 변화

생쥐 간에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>량은 Fig. 2에 나타난 바와 같이 정상대조군 생쥐간 1 g당 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 함량은 5.37 $\pm$ 0.07 mM 이었으며, paraquat만을 투여한 생쥐간에서는 5.54 $\pm$ 0.12 mM로 대조군에 비하여 3.2%만이 증가되었다.

그러나 알코올추출물은 정상대조군에 비하여 77.8% (p<0.05) 수준을 보였고, 홍삼지용성추출물에서 88.1%로 11.9%가 감소되었을 뿐 홍삼총사포닌이나 수용성추출물 및 ascorbic acid 투여 군 등에서는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>량의 감소효능이 유의성 변화를 보이지 않았다.



**Fig. 3.** Effects of Korean red ginseng extract activity level of glutathione peroxidase on liver of mouse treated with paraquat. Bar symbols was described as Fig. 2.

### 3. Glutathione peroxidase (GPx) 활성도 변화

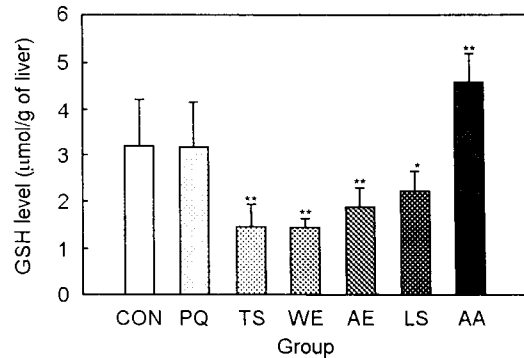
생쥐 간조직 1 g당 glutathione peroxidase의 활성도 변화는 Fig. 3와 같이 나타났다. 대조군의 GPx 활성도는  $3.83 \pm 0.05$  U/mg protein이었으나 paraquat 단독 투여군의 GPx 활성도는  $2.84 \pm 0.03$  U/mg protein로 대조군에 비하여 25.8%가 감소되는 유의성 ( $p < 0.01$ ) 변화를 보였다. 홍삼총사포닌 투여군에서는 대조군에 비하여 24.5%의 GPx 활성도 감소를 보여 paraquat 단독 투여군에 비하여는 1.8%만이 증가됨으로서 유의성 변화를 나타내지 못하였다.

홍삼수용성추출물과 알코올추출물 투여군에서는 GPx 활성도가 paraquat 단독 투여군에 비하여 각각 97.9%와 89.4% 수준의 활성도 감소를 보였다. 그러나 홍삼지용성추출물 투여 후 paraquat 투여 실험군의 GPx는 paraquat 단독 투여군에 비하여 65.5%와 40.5% 이상의 높은 GPx 활성도를 보였고, 정상대조군 보다도 유의성 ( $p < 0.01$ ) 있는 변화로 효소활성도 증가를 보였다 (Fig. 3).

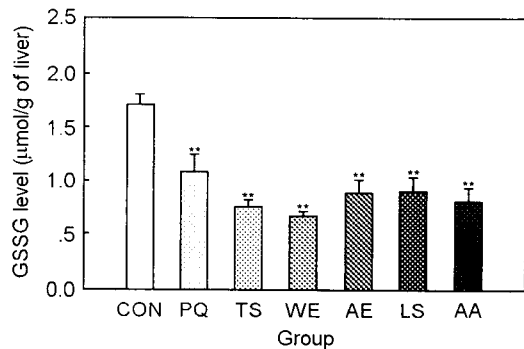
### 4. Glutathione 함량 변화

홍삼추출물에 paraquat 투여한 생쥐 간조직 내 GSH와 GSSG 측정 결과 glutathione의 량 변화는 Fig. 4와 Fig. 5 같이 나타났다. 대조군 간조직 1 g당 total GSH와 GSSG함량은 각각  $3.12 \pm 1.01$   $\mu\text{mol}$ 과  $1.72 \pm 0.10$   $\mu\text{mol}$ 이었고, GSSG/GSH 비율은 55.1% 수준이었다.

그리고 paraquat 단독 투여군에서의 total GSH 함량과 GSSG량은 각각  $3.16 \pm 1.00$   $\mu\text{mol}$ 과  $1.08 \pm$



**Fig. 4.** Effects of red ginseng levels on hepatic GSH level of mouse treated with paraquat. Bar symbols was described as Fig. 2.



**Fig. 5.** Effects of red ginseng levels on hepatic GSSG level of mouse treated with paraquat. Bar symbols was described as Fig. 2.

$0.16$   $\mu\text{mol}$ 로 대조군에 비하여 1.3% 정도 증가 수치를 보여서 glutathione과 paraquat사이에서 물질적 유의성 변화를 찾아볼 수는 없었다.

그러나 ascorbic acid 투여 후 paraquat 투여한 생쥐 간조직 내 total GSH량은 paraquat 단독 투여군에 비하여 현저한 증가변화 ( $p < 0.01$ )를 보였 (Fig. 4)으나 GSSG함량은 대조군에 비하여 47.1%나 감소 (Fig. 5)를 보여서 GSSG/GSH 비는 17.8%로 유의성 ( $p < 0.01$ )이 큰 감소를 나타내었다. 그러나 홍삼추출물 투여군 생쥐 간조직 내 GSH나 GSSG량은 모든 홍삼 투여군들이 한결같이 대조군에 비하여 유의성이 큰 ( $p < 0.01$ ) 감소를 보임으로서 홍삼 내에 glutathione과 관계되는 특수물질이 존재함으로서 paraquat와 강력 반응되어 total glutathione이나 GSSG에서 극심한 감소를 보였다.

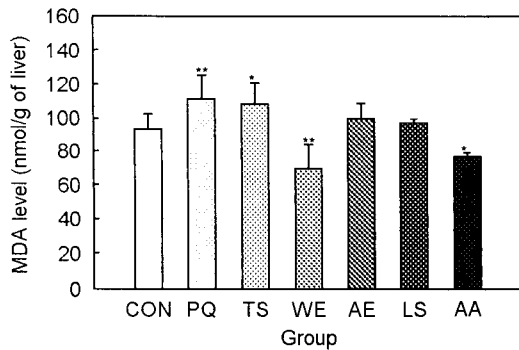


Fig. 6. Effects of red ginseng levels on hepatic MDA level of mouse treated with paraquat. Bar symbols was described as Fig. 2.

#### 6. 지질과산화 (Malondialdehyde: MDA) 수준의 변화

홍삼추출물과 ascorbic acid를 투여 받은 생쥐 간 조직 1 g 내 지질과산화물 (malondialdehyde: MDA) 량 측정결과는 Fig. 6과 같이 나타났다.

정상대조 생쥐군 간조직 1 g 내 MDA 함량은  $93.12 \pm 9.08$  nmol이었고, paraquat 단독 투여군은  $111.10 \pm 14.08$  nmol로 대조군에 비하여 19.3%가 증가된 유의성 있는 변화 ( $p < 0.05$ )로 증가를 보였다. 홍삼수용성추출물 후 paraquat 투여군 생쥐 간조직 내 MDA는 정상대조군에 비하여 73.8%나 낮아진 유의성 ( $p < 0.01$ ) 변화로 감소를 보였을 뿐 다른 홍삼추출물 군에서는 유의성이 없는 변화만을 보였고, 총사포닌 투여군에서의 MDA량은 오히려 유의성 변화 ( $p < 0.05$ )가 인정되는 MDA 상승을 보였다. 항산화제 대조군인 ascorbic acid 투여 후 paraquat를 투여군 간조직 내의 MDA량은 정상대조군에 비하여 유의성 ( $p < 0.05$ ) 있는 감소를 보였다.

#### 고 찰

Superoxide ( $\cdot O_2^-$ )같은 활성기산소 (reactive oxygen species)는 원인미상의 질병이나 스트레스로부터 생성되어  $Fe^{+3}$ 와 반응하여  $Fe^{+2}$ 로 환원되면서  $H_2O_2$ 를 생성하거나 hydrogen oxide ( $\cdot OH$ )를 생성<sup>12,23</sup>시키며,  $\cdot OH$ 는 반응성이 커서 세포막 지질이나 효소구조에 영향을 미치거나 DNA 염기서열에 변화를 주어 암을 발생시키기도 한다고 보고되고 있다.<sup>24,32</sup> 한편 활성기산소를 많이 생성시킨다는 paraquat는 생체 내에서 flavoprotein

NADPH cytochrome P-450 reductase<sup>17</sup>)에 의해 paraquat 라디칼 ( $PQ^{\cdot}$ )로 환원된 후 산소의 존재하에 superoxide ( $\cdot O_2^-$ )을 만들어 내는 물질로 알려져 있다. 이렇게 생성된  $\cdot O_2^-$ 는 glutathione peroxidase와<sup>10,21</sup> glutathione GSH, superoxide dismutase나 catalase 같은 항산화 효소에 의해서  $\cdot O_2^-$ 가 제거되거나 반응성이 다소 약한 과산화수소 ( $H_2O_2$ )를 생성하게 되고, 이  $H_2O_2$ 는  $O_2$ 와  $H_2O$ 로 분해되면서 생체가 건강한 삶을 살 수 있도록 하게 해주는 것으로 알려지고 있다.<sup>24,32</sup> 이 같은 항산화 효능은 ascorbic acid<sup>29</sup>나 tochopherol과 같은 물질에도 있는 것으로 Salovsky<sup>25</sup>)는 보고하고 있다. 근래에 이 같은 효능은 고려인삼에도 존재한다는 보고가 있었고, 특히 관계되는 물질이 2-methyl-3-hydroxy pyrone (maltol) 이라는 보고도 있어 왔다. 실제로  $CCl_4$ 로 유도된 생쥐에서 panaxynol과 panaxydiol, panaxytriol 같은 polyacetylene계 물질이 간을 보호한다는 보고도 있었고, 특히 polyacetylene계 성분 중에서도 panaxynol이 항산화 효능이 우수하다는 보고<sup>13</sup>)도 있었고, 인삼 중에서도 ginsenoside-Rb<sub>2</sub> 성분은 스트레스 받은 노화축진형 생쥐에서 지질과산화를 억제시켰다는 보고<sup>22</sup>)도 있어 왔다. 이들 연구에 기초한 본 연구는 홍삼성분 중 총사포닌과 수용성추출물, 알코올추출물, 지용성추출물 등을 항산화 효능이 우수하다고 알려진 ascorbic acid와 비교하기 위하여 동일조건에서 5일간을 경구에 투여하고, 6일째 치사량의 paraquat 100 mg/kg BW/0.1 ml DW를 생쥐 복강 내에 투여하여 극한상태로 유도시킨 후 간조직 내 hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ )량과 glutathion peroxidase 활성도와 glutathion GSH 및 GSSG량을 측정하고, 이들 물질들이 지질과산화물인 MDA (malondialdehyde)를 얼마나 억제시키는지를 홍삼추출물 종간에 항산화 효능 여부를 비교 확인하였다.

홍삼추출물 200 mg/kg BW/0.1 ml DW를 투여 후 치사량 paraquat (100 mg/kg)를 투여로 스트레스를 준 생쥐의 생존율을 관찰하였던 바 대부분의 실험군에서 2~4일 내 생쥐들이 죽었으나 ascorbic acid군에서 28.6%가 5일째 들면서 식욕을 찾다가 6일째 들면서 왕성한 식욕과 활동을 회복하는 것을 볼 수 있었다. 지용성추출물에서도 ascorbic acid와 비슷한 치사성 지연성을 보였으나 5일째 고비를 극복치 못하고 모두 죽어서 홍삼추출물의 항산화 효능에 의문을 제기하기도 하였다. 그러나 이 같은 생쥐 치사성 결과는 ascorbic acid는 단

순성 물질이지만 홍삼추출물은 많은 무기물이 존재함으로써 paraquat ion이 철 ( $Fe^{2+}$ )와 착화반응 (chelate)<sup>18,31)</sup>을 함으로서 체외 배설이 지연됨으로서 회복력면에서 ascorbic만은 못한 것을 볼 수 있었다. 이 같은 결과에 대하여 한 등<sup>13)</sup>의 실험에서 인삼사포닌 투여 시 담즙이 적을 때를 제외하고는 위장관 내에서 흡수도 잘되고 조직 내 잔류량도 1.3% 밖에 남지 않을 정도로 체외 배설이 잘된다는 보고와는 차이를 보이고 있지만, 이는 paraquat를 처리하였기 때문인 것으로 생각되었다.

한편 과산화수소 (hydrogenperoxide:  $H_2O_2$ )는 산화과정에서  $OH^-$ 기 같은 반응성이 큰 라디칼을 생성하여 세포막 불포화지질을 포화성 지질로 만드는 것을 촉진시키는 것으로 보고되고 있다. 본 실험결과에서 paraquat 단독 처리군 간조직 내  $H_2O_2$ 량은 정상대조군에 비해서 유의성 ( $p<0.005$ ) 있는 증가를 보임으로서 paraquat가  $H_2O_2$ 를 증가시킨다는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 홍삼알코올추출물은 간조직 내  $H_2O_2$ 량 축적농도가 실험군중 가장 낮아진 결과를 보였고, paraquat 단독 투여군이나 정상대조군에 비하여 유의성이 높은 ( $p<0.01$ ) 감소를 볼 수 있어서 홍삼알코올추출물이 생체 내 과산화수소 축적량에 감소 효능이 크다는 것을 확인할 수 있었다.

한편, glutathione peroxidase (GPx)는 glutathione을 기질로 필요로 하는 효소로 분자 내 cysteine에 sulfa (-S)기 대신 selenium (Se)을 갖고 있는 효소로 체내 누적된  $H_2O_2$ 나 과산화지질을 분해하여 알코올과 물을 만들고, 자신은  $NADPH_2$  도움을 받아 selenium 이온으로 전환되는 효소로 알려져 있다.<sup>12,26)</sup> 실험에서 홍삼지용성추출물과 ascorbic acid 투여군에서 각각 유의성 ( $p<0.01$ )이 높은 GPx 활성도도 증가를 보임으로서 항산화반응에 좋은 효능이 있음을 확인할 수 있었고, 홍삼총사포닌이나 알콜추출물, 수용성추출물들에서는 GPx 활성도가 오히려 감소를 보임으로서 GPx에 대하여 상반된 결과를 발견할 수 있었다. Takahashi<sup>29)</sup>는 selenium 이온이 부족할 때는 GPx의 활성도는 낮아진다는 보고를 한 바 있는데, 홍삼지용성추출물이나 ascorbic acid같은 항산화물질은 분자 내에 selenium을 갖고 있어서인지 GPx 활성도가 높은 것을 알 수 있었다. 또 GPx에 대하여 Balveskey<sup>28)</sup> 흰쥐에 일정기간 구리 결핍 식을 시키면 간조직에서 GPx나 Cu, Zn-SOD, catalase 등과 같은 항산화 효소 활성도가 떨어지면서 과산화지질 수준이 증가

된다는 실험결과를 보고한 바 있다.

Glutathione은 분자 내에 thiol (SH)기를 가진 비단백성 물질로서 생체 내에는 환원형 GSH과 산화형 GSSG의 두 형태로 존재한다. 환원형 GSH는 GPx 활성으로 seleno-sulfide기를 공격하면서 alkoxy radical ( $RO^{\cdot}$ )이나 lipoxy radical ( $LO^{\cdot}$ ) 또는  $H_2O_2$ 를 분해<sup>12,26)</sup>를 하면서 지질과산화물을 억제하고, 산화형 GSSG는 glutathione reductase (GRase)의 활성으로 NADPH를 소모시키면서 GSH로 돌아가는 물질로 알려지고 있다. 특히 GSH량 감소는 생체 내 산화과정에서 활성기산소를 축적시키면서 과산화지질을 증가시키는 것으로 알려지고 있다. 이 같은 논리로 볼 때 본 실험결과를 paraquat 단독 투여군 간조직 내 GSH량은 정상대조군 실험결과와 차이를 나타내지 않았다. 이는 아마도 GSH가 paraquat와 특별한 반응을 하지 않은 것으로 생각된다. 그러나 홍삼추출물을 투여시 GSH가 극심한 감소를 보였지만 ascorbic acid 투여 후 paraquat 투여군에서 만든 GSH량이 크게 상승치를 보였으나 GSSG는 크게 감소를 보이는 변화를 보였다. 그러나 대부분의 홍삼추출물중 투여 후 paraquat 투여에서는 GSH 뿐 아니라 GSSG까지도 공통적으로 극도로 낮아지는 변화를 보이는 것은 아마도 홍삼추출물 내 glutathione과 상관되는 특수 무기물이 paraquat와 착화반응을 통해서 생체가 필요로 하는 glutathione량을 감소시킨 것으로 관찰되고 있다. 이 같은 현상에 대하여 김 등은<sup>15)</sup> 인삼 saponine 성분이 간조직 내 glutathione량을 증가시킨다는 주장과는 상반된 결과를 보였다. 그러나 Youn<sup>29)</sup> 등은 약물에 의한 GSH 소모는 과산화지질을 증가시킨다는 보고를 낸 바 있어서 본 실험결과를 뒷받침하였다. 또 Lee 등은<sup>30)</sup> 에탄올을 생쥐에 장기간 투여시키면 간조직 내 total GSH량이 감소되고, GSSG/total GSH 비율은 유의성 있는 상승을 보였다는 결과도 약물투여라는 면에서 본 연구결과를 뒷받침하였다. 이같이 GSH나 GSSG 물질은 홍삼추출물 내 무기물이 paraquat와 착화반응을 통해서 생체 간조직 내 GSH나 GSSG량을 감소시킨 것이 아닌가 판단되었다. 한편 MDA (malondialdehyde)<sup>31)</sup>는 과산화지질 지표물질로서 세포막 인지질이나 불포화지방산 (unsaturated fatty acid)이  $H_2O_2$ 와 반응하여 과산화지질로 전환되는 지표물질이다.

본 실험에서 paraquat 단독 투여군 간조직 내 MDA량은 정상대조군에 비하여 유의성 있는

MDA ( $p < 0.05$ ) 증가를 보여서 paraquat가 지질과 산화를 증가시킨다는 것을 알 수 있었다. 특히 수용성추출물과 ascorbic acid 투여군에서의 MDA량은 paraquat 단독 처리군에 비하여 유의성이 큰 ( $p < 0.01$ ) 감소를 보임으로서 홍삼수용성 성분이나 ascorbic acid<sup>11)</sup>는 불포화지방을 포화지방으로 전환되는 것을 억제 효능이 있음을 확인할 수 있어 주목되었다. 그러나 홍삼총사포닌이나 알코올추출물, 지용성추출물 등에서는 정상대조군에 비하여 유의성 있는 반응을 보이지 못 하였다. 이같은 결과에 대하여 박 등<sup>32)</sup>은 체중 kg당  $4 \times 10^{-5}$  M의 paraquat를 투여하였을 때 NADPH 의존성 지질과 산화가 50%나 억제되었다는 보고가 있었고, 김 등<sup>33)</sup>은 paraquat 투여 생쥐 적혈구에서  $\cdot O_2^-$ 의 생성은 증가시켰으나 지질과산화는 일어나지 않았다는 상반된 보고를 한 바도 있다. 이 같은 결과들로 미루어 볼때 홍삼총사포닌 성분과 홍삼수용성추출물, 알코올추출물 또는 지용성추출물 등 각 추출물들이 항산화 작용에 있어서 각각 조금씩 다르게 나타난다는 것을 알 수 있었고, 이같은 원인 물질규명을 위해서 지속적인 연구가 이어져야 할 것으로 생각되었다.

## 참 고 문 헌

- 1) 김동윤, 장재철 (1998): 홍삼 항산화 활성성분이 감마선 조사 생쥐간에서 항산화물질이 지질 과산화에 미치는 방사선효과. *고려인삼학회지*, **22(4)**: 431.
- 2) 김명철, 박재운, 채기영, 천영욱, 박평심, 차종희 (1991): 백서 적혈구에서 glutathione이 paraquat 독성에 미치는 영향. *조선대학교 의대 논문집*, **16(2)**: 253.
- 3) 박종대 (1996): 고려인삼의 화학성분에 관한 고찰. *고려인삼학회지*, **20(4)**: 389.
- 4) 주충노 (1993): 인삼사포닌류의 체내 동태와 효능에 관한 생화학적 연구현황. *고려인삼학회지*, **17(3)**: 250.
- 5) Balevska PS, Russanov EM and Kassabava TA (1981): Studies on lipid peroxidation in rat liver by copper deficiency. *J Biochem*, **13**: 483.
- 6) Flohe L and Gunzler WA (1984): Assay of glutathione peroxidase. *Method in Enz*, **195**: 114.
- 7) Fridovich I (1989): Superoxide dismutase. *J Biochem*, **264**: 7761.
- 8) Fujimoto S, Kawakami N and Ohara A (1995): Nonenzymatic glycation of transferrin: Decrease of iron binding capacity and increase of oxygen radical production. *Biol Pharm Bull*, **18(3)**: 396.
- 9) Gaetani GF, Galiano S, Canepa L, Ferraris AM and Kirkman HN (1989): Catalase and glutathione peroxidase are equally active in detoxification of hydrogen peroxide in human erythrocytes. *Blood*, **73(1)**: 334.
- 10) Griffith OW (1980): Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinyl pyridine. *Anal Biochem*, **106**: 207.
- 11) Guemouri L, Artur Y, Herbeth B, Jeandel C, Cuny G and Siest G (1991): Biological variability of superoxide dismutase, glutathione peroxidase, and catalase in blood. *Clin Chem*, **37(11)**: 1932.
- 12) Halliwell B and Gutteridge JMC (1989): pp. 1~150., "Free radicals in biology and medicine", 2nd Ed., Oxford Clarendon Press.
- 13) Han BH, Park MH and Han YN (1985): Studies on the antioxidant components of Korean ginseng (V): the mechanism of antioxidant activity of maltol and phenolic acid. *Korean Biochem J*, **18**: 337.
- 14) Harman LS, Carver DK, Schreiber J and Mason RP (1985): One and Two-electron oxidation of reduced glutathione by peroxidase. *Mole Biophys Health Sci*, **20**: 1642.
- 15) Kelner MJ and Alexander NM (1990): Inhibition of erythrocyte superoxide dismutase by diethyl-dithiocarbamate also results in xhemoglobin-catalyzed glutathione depletion and methemoglobin production. *J Biol Chem*, **265(3)**: 1306.
- 16) Kelner MJ and Bagnell R (1990): Alteration of endogenous glutathione peroxidase, manganese superoxide dismutase, and glutathione transferase activity in cells transfected with copper-zinc superoxide dismutase expression. *J Biol Chem*, **265(19)**: 10872.
- 17) Klimek J, Schap AP and Kimura T (1983): Effect of paraquat on cytochrome P-450 dependent lipid peroxidation in bovine adrenal cortex mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, **752**: 127.

- 18) Lee JW (1991): Effects of ethanol administration on glutathione and lipid peroxide levels in rat liver and cerebellum. *J Korean Soc Food Nut*, **20(4)**: 285.
- 19) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951): Protein measurement with the foline phenol reagent. *J Biol Chem*, **193**: 265.
- 20) Misra HP and Fridovich I (1972): The Generation of superoxide radical during the autoxidation of hemoglobin. *J Biol Chem*, **247**: 6960.
- 21) Misra HP and Gorsky LD (1981): Paraquat and NADPH dependent lipid peroxidation in lung microsomes. *J Biol Chem*, **256(19)**: 94.
- 22) Ohkawa H, Ohishi N and Yagi K (1979): Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem*, **95**: 351.
- 23) Packer L (1994): Oxygen radical in biological system. *Method in Enz*, **233**: 2-230.
- 24) Prayer WA (1994): Free radicals and lipid peroxidation: That they are and how theory got that way, pp. 1~24. "Oxidant and antioxidant", Academic press, San Diago, C.A.
- 25) Salovsky P and Shopova V (1993): Synergic lung changes in rats receiving combined exposure to paraquat and ionizing radiation. *Environ Research*, **60**: 44.
- 26) Sato K, Mochizuki M, Saiki Ik, Yoo YCh and Azuma I (1994): Inhibition of tumor angiogenesis and metastasis by a saponium of Panax ginseng, Ginsenoside-Rb<sub>2</sub>. *Biol Pharm Bull*, **17(5)**: 635.
- 27) Takahashi K and Cohen HJ (1986): Selenium dependent glutathione peroxidase protein and activity: Immunological investigations on cellular and plasma enzymes. *Blood*, **68(3)**: 640.
- 28) Thomas C, Glenn FV and Christine CW (1993): The hydrolysis product of ICRF-187 promoters iron-catalysed hydroxyl radical production via the Fenton reaction. *Biochem Pharmacol*, **15**: 1967.
- 29) Wayner DDM, Burton GW and Ingold KU (1986): The antioxidant efficiency of vitamine-C is concentration dependent. *Biochim Biophys Acta*, **884**: 119.
- 30) Wolff SP (1990): Ferrous ion oxidation in presence of ferric ion indicator xylenol orange for measurement of hydroperoxide. *Method in Enz*, **233**: 182-189.
- 31) Yamazaki L, Piette H and Grover TA (1990): Kinetic studies on spintrap ping of superoxide radicals generated in ADPH-cytochrome P-450 paraquat systems. *J Biol Chem*, **265(2)**: 652.
- 32) Younes M and Siengers CP (1983): Formation of ethane in vivo by rat liver homogenates following glutathione depletion in vivo. *Toxicol Leff*, **15**: 213.



**=Abstract=**

**Antioxidative Effects of Korean Red Ginseng Extracts on the Glutathione and Lipid Peroxidation in the Liver of Mouse Treated with Paraquat**

**Hwa-Jae Lee<sup>†</sup>**

*Department of Clinical Pathology, Sohae Collegy, Kunsan, Korea*

The anti-oxidative effects of Korean red ginseng extracts (total saponine, water extracts, alcohol extracts, lipophilic extracts), which were administered with the concentration of 200 mg/kg BW, were investigated after the injection of paraquat (1,1-dimethyl-4,4-bipyrimidinium dichloride: PQ) with dosage of 100 mg/kg BW on the peritoneal cavity to 6 weeks of 23~26 gm ICR male mice. The accumulation of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) on the liver of mouse was lowered only in alcohol extract-treated group (p<0.05). The activity of glutathione peroxidase increased in the mouse treated with lipophilic ginseng extracts. And GSSG level was lowered in all groups, and this might be due to the paraquat ions that might prevent the reaction of GSSG into GSH. But we cannot find any relation between glutathione oxido-reductase activity on Korean ginseng extracts. Finally, the lipid peroxidation (MDA) level was lowest (p<0.01) in the group of mouse treated with water extracts of ginseng.

**Key Words:** Ginseng extract, Parquat, Free radical, Hydrogen peroxide, Glutathion peroxidase

**[Korean J. Biomed. Lab. Sci., 6(1): 45-53, March, 2000]**

---

<sup>†</sup>Corresponding author