한국생물공학회지 제19권 제2호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 19, No. 2, 138-142(2004)

흡연 시 인삼, 쑥, 솔잎 추출물이 폐 세포의 구조와 항산화 효소에 미치는 영향

정 혁 · 김 상 기 · 김 상 국 · 성 미 영 · 김 현 정 · 김 범 학 · †김 유 영
경북대학교 자연과학대학 생화학과
(접수 : 2004. 1. 9., 게재승인 : 2004. 4. 20.)

The Effects of Extracts from *Ginseng*, *Wormwood* and *Pine needle* in Pulmonary Structure and Anti-oxidant Enzyme in Smoking

Hyuk Jung, Sang Gi Kim, Sang Kook Kim, Mi Yeong Seong, Hyun Jung Kim, Jin Fan Xue, and You Young Kim†
Department of Biochemistry, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea
(Received : 2004. 1. 9., Accepted : 2004. 4. 20.)

Cigarette smoke causes atypical structure of pulmonary (cell structural) and oxidative damage. Therefore, we carried out to determine if exposure to cigarette smoke alters pulmonary structure and anti-oxidant related enzyme in a ICR mice model, when natural product extracts using by manual sprayer. The mice were divided into five groups ; control group, sham-treated group (Sham), natural product extracts-treated group (NPE), natural product extracts-treated with smoke-exposed group (NPE-SM) and smoke-exposed (SM) group. All groups are similar to control group in weight, but SM group is lower than the other groups. Microscopic image of the pulmonary structure in SM group showed deleterious alterations in the morphology, but the other groups are maintained in original structure. In anti-oxidant related enzyme, SOD (superoxide dismutase) and catalase, SM group represents the lowest enzyme activity among all groups. These results indicate that the natural product extracts is an efficient tissue protective agent against smoke-induced lung injury.

Key Words : Ginseng, wormwood, pine needle, pulmonary, smoking, morphology, anti-oxidant

서 론

폐는 혈액에 산소의 공급과 이산화탄소의 제거 등 여러 가지 기능을 가지며 유해물질이 유입될 경우 폐 질환을 일으킬 뿐 아니라 혈액의 산소 농도 유지에도 영향을 미치게 된다(1-4). 대기 중의 아황산가스, 먼지, 황사, 담배연기 등은 여러 기작을 통해 폐의 기능을 손상시키고 혈액을 산성화하여 질병을 발생시킨다(5, 6). 담배연기 속에는 약 4,000여종의 화학물질이 들어 있으며 이중에는 돌연변이를 유발하는 발암물질도 포함되어 있고, 특히 타르, 니코틴, 일산화탄소는 해로운 성분으로 알려져 있다. 타르 속에는 약 43종의 발암물질을 비롯하여 여러 가지 독성물질이 함유되어 있고, 니코틴은 뇌신경에 작용해서 각성효과를 가져오며, 기체성분 속에 들어 있는 일산화탄소는 혈액의 산소운반능력을 저하시켜 저산소증을 가져오게 된다(7). 따라서 흡연을 하게 되면 담배 연기 속에 있는 화학물질이 호흡기관에 일차적으로 피해를 주며, 폐에서 흡수된 화학물질은 체내를 순환하면서 생체내의 모든 장기에 암을 포함한 각종 질병을 일으킬 뿐 아니라 모든 조직, 세포에 노화현상을 유발시키게 된다(8, 9). 일반적으로 흡연에 의해 발생되는 질병으로는 폐암, 심장마비, 관상동맥질환, 뇌졸중, 동맥경화증, 불임증, 성 기능 장애, 치주 질환, 구강암, 방광암, 소화성 궤양, 골다공증 등이 있으며, 임산부의 경우 선천성 기형아, 미숙아 출산 등의 가능성이 매우 높은 것으로 밝혀져 있다(10, 11). 특히 흡연 시에는 혈액의 산소운반 기능의 저하뿐만 아니라 면역기능의 저하를 가져오며(12, 13), 폐 세포의 구조가 변하고, 폐의 표면장력을 조절하는 surfactant protein의 변화를 가져오게 된다(14, 15). 또한 흡연 시 발생하는 활성 산소종 (reactive oxygen species)으로 인하여 폐세포의 지방이 과산화되는 반응을 일으킬 뿐만 아니라 활성 산소종을 제거하는 반응에 사용되는 SOD

† Corresponding Author : Department of Biochemistry College of Natural Sciences, Kyungpook National University, 1370 Sangyeok-dong, Buk-gu, Daegu 702-701, Korea
Tel : +82-53-950-6354, Fax : +82-53-943-2762
E-mail : yykim@knu.ac.kr

(superoxide dismutase), catalase, G6PDH (glucose-6-phosphate dehydrogenase) 등 여러 효소에 영향을 미치게 된다(16, 17). 인삼의 사포닌 (ginsenoside)은 혈관 내벽에 노폐물이 집착되어 발생하는 각종 혈관계 질환 (동맥경화, 고혈압), 심장질환 (협심증, 심근경색), 뇌질환 (뇌졸증, 뇌출혈, 뇌경색), 간장질환 등을 예방, 치유하고, 인체조직에 축적된 다이옥신과 같은 독극물이나 노폐물을 세척해 인체의 전체적인 신진대사 기능을 정상화한다. 또한 혈관의 이완작용을 하는 아세틸콜린과 유사하게 수축된 폐 혈관을 이완하며, 활성 산소종에 대한 폐혈관 보호작용을 하는 것으로 보고되어져 있다(18-20). 쑥의 테르펜계열은 항산화 효과가 있고 그 외 항암효과 및 돌연변이 억제효과를 가지고 있으며(21), 솔잎에 함유되어 있는 루틴 (rutin)은 활성 산소종을 제거하는 항산화 효과뿐만 아니라 중풍, 동맥경화, 고혈압, 당뇨와 같은 노화관련 질환에도 효과가 있음이 알려져 있다(22).

본 연구에서는 흡연 시의 이러한 영향에 대해 여러 종류의 saponin을 포함하고 있는 인삼과 sesquiterpene, cineol 등이 포함된 쑥, 그리고 rutin, 비타민 등을 함유하고 있는 솔잎을 메탄올을 용매로 하여 추출한 후 각각의 추출물을 일정비율로 혼합하여 수동분무기를 이용하여 실험쥐에 투입함으로써 질병의 예방 뿐만 아니라 폐 기능의 보호 및 향상 특히, 흡연으로 인한 폐 세포의 구조 변화와 활성 산소종으로 인한 세포손상에 대한 항산화 효소에 어떠한 영향을 미치는지를 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

천연물 재료

본 연구에 사용된 천연물질은 충청남도 금산에서 재배한 4년근 백삼 (*Panax Ginseng* C. A. Meyer)과 경상북도 청송에서 채취한 솔잎 (*Pinus densiflora*)과 백령도에서 채취한 쑥 (*Artemisia princeps var. orientalis*)을 각각 그늘에서 말린 후 분말화하여 실험에 사용하였다.

추출과정

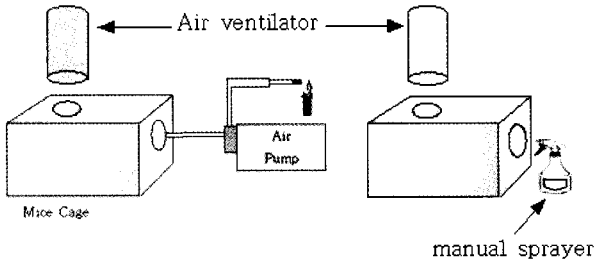
각각의 천연물 1 ㎏을 80% 메탄올 (MERCK, Germany) 15 ℓ에 혼합한 후 40℃에서 24시간 동안 환류 추출한 다음, 175 ㎛ 체 (sieve)를 사용하여 일차적으로 여과하였다. 각각 추출물의 여과액을 4℃, 3,000 rpm에서 30분 동안 원심분리한 후 상층액을 회전진공농축기 (Laborota 4000, Heidolph, Japan)를 이용하여 메탄올과 수분을 최대한 제거하였다. 농축된 추출물은 액체질소를 사용하여 급속 냉동시킨 후 동결건조기 (Neocool, Yamato, Japan)를 사용하여 용매로 사용한 메탄올과 수분을 완전히 제거하여 분말화한 후, 3차 증류수로 희석하여 실험에 사용하였다.

실험동물

실험동물은 8주령된 ICR 수컷 흰쥐 (29 g ± 3)로 실험 시작 전 일반고형사료 (삼양사)와 물로 자유 식이를 하였고, 폴리프로필렌 상자 (453 × 293 × 247 (H) mm, 19 ℓ)에서 1주일간(20~24℃, 습도 60~80%)의 예비사육으로 적응기간을 두었다.

실험군 및 실험조건

실험동물군은 대조군 (control 군), 증류수 처리군 (Sham 군), 3 가지 천연물 혼합추출물 처리군 (NPE 군), 흡연 후 혼합추출물 처리군 (NPE-SM 군) 그리고 흡연군 (SM 군) 등의 5가지로 나누었다. 각 군에는 7마리의 쥐를 사용하였으며, 하루 24시간을 각각 12시간씩 명, 암 상태로 나누어 유지하였다. 수동분무기를 이용하여 세 가지 추출물 성분이 각 0.1% 혼합된 희석액 (전체 0.3%) 50 ㎖를 명 상태 12시간 동안 상자에 투입하여 실험쥐가 흡입할 수 있도록 하였으며, 암 상태 12시간 동안은 추출물을 투입하지 않았다. SM group과 NPE-SM group은 명 상태 동안 10개피 담배 (THIS, KT&G, Korea, 타르 7.0 ㎎, 니코틴 0.75 ㎎/20개피)를 사용하여 각 상자에 일정하게 투입하였다. 또한 모든 실험은 암 상태일 때와 7일 중 하루는 실험을 하지 않고 실험쥐가 안정을 취하도록 배려하였으며 4주째, 8주째 실험 시에는 실험 전 24시간 동안 회복시간을 두었다. 실험에 사용한 흡연과 추출물 흡입시스템에 관한 모식도를 Fig. 1에 나타내었다.



A B

Figure 1. Schematic view of smoking and inhalation system (A : Cigarette smoking, B: Manual sprayer system).

폐의 채취 및 분리

사육한 쥐에서 폐를 적출하여 PBS (phosphate buffer saline)로 혈액을 최대한 제거한 후, 가위로 잘게 자르고 sonication buffer (50 mM Tris- HCl (pH 7.5), 20 mM (N-[2-Hydroxyethyl]piperazin- N'-[2-ethanesulfonic] acid (HEPES), 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 2 mM phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF), 1% Triton-X 100)에 옮겨 담았다. 그 다음 4℃에서 1시간 동안 반응시킨 후 초음파분쇄기로 조직을 분리하여 단백질을 얻었고, 그 중 일부는 원심분리 없이 일정량을 취한 후 단백질을 정량하여 지질과산화 측정용으로 사용하고, 나머지는 15,000 rpm, 4℃에서 15분간 원심분리하여 다른 실험에 사용하였다.

Hematoxylin and Eosin stain (H&E stain)

경추 탈구법으로 실험동물을 희생시켜 폐를 적출한 후 10 % formaldehyde에 넣어 하루 동안 고정시킨 다음, 1 ㎣ 크기로 잘라 자동침투기에서 12시간 침투시킨 후 paraffin block을 만들고, 박절기를 사용하여 4 ㎛ 두께로 잘랐다. 그 후 H&E stain 조건에 따라 염색하였다. 판독 및 사진은 광학현미경을 사용하여 100배, 400배에서 시행하였다.

지질과산화 측정

1 volume 반응액 (sample)에 2 volume의 TBA-trichloroacetic acid-HCl 용액 (0.25 N HCl에 0375% TBA /15% TCA 녹임)을 가한다. 이 용액을 끓는 물에 15분 동안 중탕 후 식힌 다음, 12,000 g에서 10분 동안 원심분리하여 그 상층액을 취한 후 UV spectrophotometer (UV-2401PC, Shimadzu, Japan)로 535 nm에서 흡광도를 측정하였다.

효소활성측정

SOD 활성측정 Tris-DE용액 (50 mM Tris-HCl (pH 8.2)에 1 mM diethylenetriaminepentaacetic acid)과 0.1 M EDTA, 그리고 pyrogallol stock (10 mM HCl에 20 mM pyrogallol)을 혼합한 후 폐 조직에서 추출한 단백질을 첨가하여 420 nm에서 1분간 활성을 측정한다.

Catalase 활성측정

0.01 M sodium phosphate buffer (pH 7.0)에 0.015 M H_2O_2를 혼합하고 폐 조직에서 추출한 단백질을 첨가하여 240 nm에서 1분간 흡광도 감소를 측정하였다.

결과 및 고찰

체중의 변화

Fig. 2에서 보는 바와 같이 각각의 실험군에서 체중의 차이는 확인할 수 없었으나, control 군에 비해 SM 군에서는 유의할 만한 감소가 보였다. 이는 천연물로부터 추출한 물질에 의해 체중이 증가하지는 않으며, 흡연으로 인한 체중의 감소가 있음을 알 수 있었다.

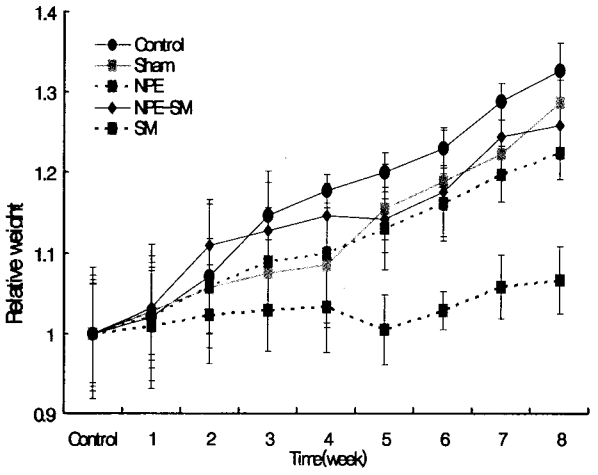


Figure 2. Relative weight of each group.

폐 조직의 변화

폐 조직상에서 일정한 구조를 유지하고 있는 control 군에 비해 SM 군은 각 세포의 형태가 불규칙하고 서로 부착되어 있으며 폐포가 커다란 공기주머니로 융합되어 졌음을 관찰할 수 있었다. 그 외에 Sham 군, NPE 군은 control 군과 비슷한 구조로 원형을 그대로 유지하고 있으며, NPE-SM 군은 세포막이 약간 두꺼워졌을 뿐 control 군과 비슷하였다. 4 주째와 8 주째 실험결과에서 SM 군에서만 구조의 불규칙성이 더 심해졌을 뿐 나머지 군에 대한 구조적 차이는 나타나지 않았다. 이들 결과에서 추출물의 처리가 세포의 구조를 외부자극(흡연으로 인한 유해물질)으로부터 보호하며, 그 자체로는 세포내에 해로운 영향을 주지 않음을 알 수 있다.

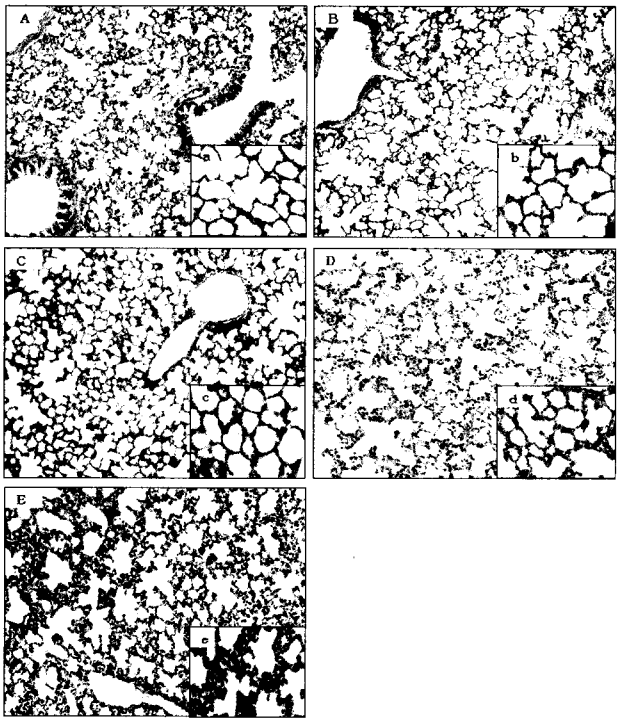


Figure 3. The H&E stain of pulmonary structure during 4 week. A, a : control group, B, b : SH group, C, c : NPE group, D, d : NPE-SM group and E, e : SM group. capital letter : 100×, minuscule : 400×.

지질과산화 정도

세포를 둘러싸고 있는 세포막을 구성하는 주된 성분인 인지질은 산화손상에 의해 지질과산화물을 생성하며 이는 생체내 산화손상의 지표가 된다. 대부분의 세포막은 과산화 되는 동안 free malondi -aldehyde (MDA)를 형성하며 TBA와 반응하여 착화합물을 형성한다. 이를 UV spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정하고 그 상대적인 값을 Fig. 4에 나타내었다. 그래프에서 보여지듯이 control 군에 비해 SM 군에서 3배 이상의 증가를 나타냈다. 이는 세포막의 인지질이 SM 군에서 더 많은 지질과산화가 일어남을 의미한다. 또한 4 주째와 마찬가지로 8주째에도 비슷한 증가를 보였다. Sham 군에서는 control group과 비슷한 흡광도를 보였으며 4, 8주째는 비슷한 경향을 나타냈다. NPE 군과 NPE-SM 군의 경우 4주째에는 control 군에 비해 약간의 증가가 있었으나 8주째에는 감소함을 보여 주었다. 이는 추출물을 처리함으로써 지질과산화 작용에 대한 예방 효과 및 흡연으로 인한 손상으로부터 세포막을 보호한다는 것을 알 수 있다.

효소활성측정

생체 내에는 각종 요인에 의해 생성된 유해 라디칼을 효과적으로 제거하기 위해 여러 항산화 효소 및 항산화제가 존재

한다. 생체 내 항산화 방어계는 일차적으로 효소들의 광범위한 분포 및 유기적인 관련성에 의해 유지되고 있다.

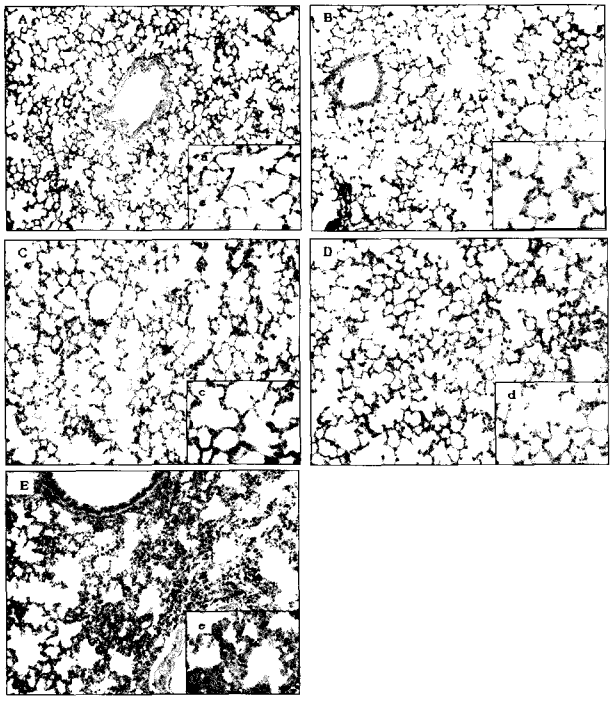


Figure 4. The H&E stain of pulmonary structure during 8 week. A, a : control group, B, b : SH group, C, c : NPE group, D, d : NPE-SM group and E, e : SM group. capital letter : 100×, minuscule : 400×.

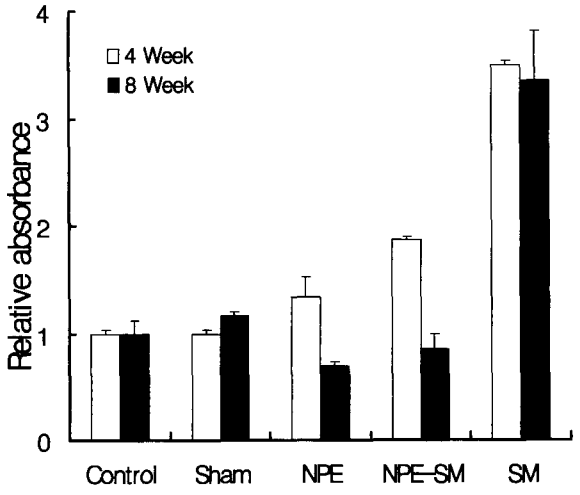


Figure 5. Relative absorbance of each group in lipid peroxidation.

SOD 활성

여러 요인으로 생성된 유해 라디칼은 생체 내에 존재하는 항산화 효소에 의하여 아래의 과정에 따라 제거된다.

$$O_2^- + O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

Fig. 6에서 보는 바와 같이 control 군과 Sham 군에서는 4, 8주째 모두 비슷한 활성을 보였으며, NPE 군에서는 약간의 증가를 보이는 반면 NPE-SM 군에서는 감소를 보였다. 하지만 SM 군에서는 그 활성이 절반으로 감소하였다. 이로써 천연물에서 추출한 물질이 항산화 효소의 활성에 영향을 미침을 알 수 있다.

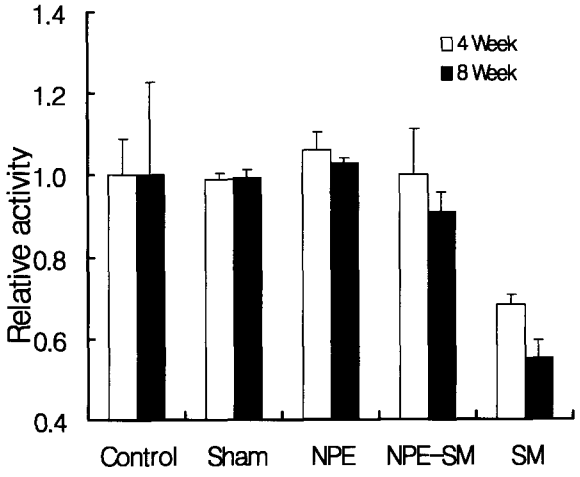


Figure 6. Relative activity of each group in SOD.

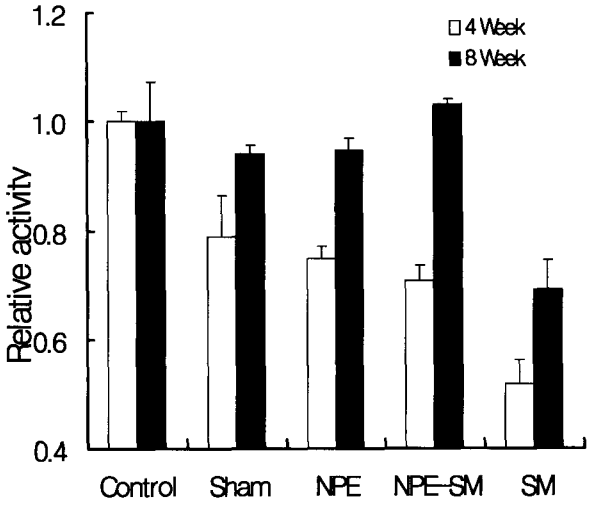


Figure 7. Relative activity of each group in catalase.

Catalase 활성

항산화 효소의 작용에 의하여 만들어진 H_2O_2은 catalase에 의해 물로 변환된다.

$$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$$

Fig. 7에서 보는 바와 같이 4주째 실험 결과에서 control 군에 비해 각각의 군에서 그 활성이 줄어들고, 특히 SM 군에서는 절반으로 감소함을 보였으며 다른 군에서의 감소는 실험동물의 차이로 생기는 결과로 사료된다. 또한 NPE-SM 군은 SM 군에 비해 catalase 활성의 감소 차이가 적었으며, 이러한 결과는 추출물이 catalase 활성에 영향을 미침을 나타

내며 그 정도는 8주째 실험결과에서 두드러졌다. 4주째 실험에서 감소하였던 NPE, NPE-SM 군에서의 활성이 control 군과 비슷한 활성을 나타냈으며 특히 NPE-SM 군에서의 활성은 control 군에 비해 약간의 증가를 나타냈다. 하지만 4주째 실험결과와 마찬가지로 8주째 실험결과에서도 SM 군은 control 군보다 활성이 감소함을 보였다. 이로써 추출물이 catalase의 활성에도 영향을 미침을 알 수 있다.

요 약

본 실험에서 메탄올을 추출 용매로 한 인삼, 쑥, 그리고 솔잎 추출물을 수동분무기를 이용하여 호흡을 통해 직접 실험동물에게 투여하였을 경우 그 효과가 폐의 구조를 유지하는데 도움을 줄뿐만 아니라 항산화 효소에도 길항적인 효과를 나타냄을 알 수 있었다. 즉, 추출물을 흡입시킴으로서 세포막의 지질과산화를 억제하여 세포의 구조와 기능을 유지함으로써 흡연으로 인한 세포의 파괴 및 불규칙적인 구조 이상을 줄일 뿐만 아니라 추출물에 포함되어 있는 인삼의 saponin, 쑥의 sesquiterpene과 cineol, 솔잎의 rutin 등의 항산화제의 작용에 의해 흡연으로 생긴 유해 라디칼의 분해를 촉진시키거나 항산화 효소의 활성을 증가시킴으로써 폐의 정상적인 기능에 도움을 주는 것으로 생각된다. 특히, 지금까지 연구되어진 *in vitro*나 *in vivo*에서의 경구투여나 주사를 통한 방법이 아니라 호흡을 통해 직접 폐에 투입함으로써 그 결과가 빠르게 나타날 수 있을 것으로 생각된다.

REFERENCES

1. Burton, B. T. (2003), Toxicologic considerations in workplace exposures, *Immunol. Allergy. Clin. North Am.* **23**, 177-191.
2. Bernstein, D. I. (2003), Occupational asthma caused by exposure to low-molecular-weight chemicals, *Immunol. Allergy. Clin. North Am.* **23**, 221-234.
3. Caputi, M., V. Esposito., A. Mancini, and A. Giordano. (2002), Air pollution and respiratory pathology: lung cancer, *Monaldi Arch Chest Dis.* **57**, 177-179.
4. Bardana, E. J. Jr. (2001), Indoor pollution and its impact on respiratory health, *Ann. Allergy Asthma. Immunol.* **87**, 33-40.
5. Ricciardi, L., R. Fedele, S. Saitta, V. Tigano, L. Mazzeo, O. Fogliani, D. Barber, and S. Isola (2003), Occupational asthma due to exposure to iroko wood dust, *Ann. Allergy. Asthma. Immunol.* **91**, 393-397.
6. Chen, J., X. Wang, J. Lou, and Z. Liu (2003), Relationship of jute dust to interstitial fibrosis in rat lung, *Arch. Environ. Health* **58**, 151-155.
7. Hecht, S. S. (2002), Cigarette smoking and lung cancer: chemical mechanisms and approaches to prevention, *Lancet. Oncol.* **3**, 461-469.
8. Flora, S. D., F. D'A, R. Balansky, A. Camoirano., C. Bennicelli, M. Bagnasco, C. Cartiglia, E. Tampa, M. G. Longobardi, R. A. Lubet, and A. Izzotti (2003), Modulation of cigarette smoke-related end-points in mutagenesis and carcinogenesis, *Mutation Research* **41**, 523-524.
9. Finch, G. L., K. J. Nikula, S. A. Belinsky, E. B. Barr, G. D. Stoner, and J. F. Lechner (1996), Failure of cigarette smoke to induce or promote lung cancer in the A/J mouse, *Cancer letter* **99**, 161-167.
10. Bol, P. (1999), Smoking and pregnancy, *Ned. Tijdschr. Tandheelkd.* **106**, 404-407.
11. Blakeg, J. and P. M. ridker (2002), Inflammatory bio-markers and cardiovascular risk prediction, *J. Inte. Medicine* **252**, 283-294.
12. McDonough, P., and R. J. Moffatt (1999), Smoking-induced elevations in blood carboxyhaemo-globin levels. Effect on maximal oxygen uptake, *Sports Med.* **27**, 275-283.
13. Ofulue, A., and M. K. Felix (1999), Effects of depletion of Effects of depletion of neutrophils or macrophages on development of cigarette smoke-induced emphysema, *Am. J. Physiol.* 277(*Lung Cell. Mol. Physiol.* **21**, L97-L105.
14. Gaworski, C. L., M. M. Dozier, L. M. Gerhart, N. Ralendran, L. H. Brennec., C. Aranyi, and J. D. Heck (1997), 13-Week Inhalation toxicity study of menthol cigarette smoke, *Food. Chemical. Toxicology* **35**, 683-692.
15. Subramaniam, S., J. A. Whitsett, W. Hull., and C. G. Gairola (1996), Alteration of pulmonary surfactant proteins in rats chronically exposed to cigarette smoke, *Toxicology. Appl. Phamacol* **140**, 274-280.
16. Vlie, A. V. D. and E. Carroll (2000), Oxidants, Nitrosants, and the Lung, *Am. J. Med.* **109**, 398-421.
17. Rahman, I. and W. I. Macnee (1999), Lung glutathione and oxidative stress: implications in cigarette smoke-induced airway disease, *Am. J. Physiol.* **277**, L1067-L1088.
18. Yeul, N. K. (2002), Clinical application and efficacy of korea ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer), *J. Ginseng Res.* **26**, 111-131.
19. Shin, J. Y., E. H. Choi., and J. J. Wee (2001), The difference ginsenoside compositions according to the conditions of extraction and fractionation of crude ginseng saponins, *Kor. J. Food Sci. Technol.* **33**, 282-287.
20. Lee, D. W., H. B. Sohn., H. B. Lim., and Y. G. Lee (1995), Antioxidant action of ginseng: an hypot.hesis, *Kor. J. Ginseng Sci.* **19**, 31-38.
21. Hwnag, Y. K., D. C. Kim., W. I. Hwang., and Y. B. Han. (1998), Inhibition effect of *artemisia princeps Pampan.* extract on growth of cancer cell line, *The Korean Nutrition Society* **31**, 799-808.
22. Kim, S. M. and Y. S. Cho (1999), Effect of pine needle extract on Fe ion and active oxygen related lipid oxidation in oil emulsion, *Kor. J. Postharvest Sci. Technol.* **6**, 115-120.