

Effects of the *Hovenia dulcis* THUMBER var. *Koreana* Nakai Extracts on Hepatoprotective Activities and Improvement of Hepatofunction

Hyun-Ik Hwang, In-Soon Lee¹, Hee-Jun Chae and Hae-Yeon Moon[†]

Division of Food, Biological and Chemical Engineering, ¹Phytochemical Co., Ltd. Business Incubating Center, Daegu University, Gyeongbuk 712-714, Korea

The *Hovenia* extracts showed a significant hepato-protective activity against alcohol and CCl₄-induced hepatotoxicity. Injection of CCl₄ and alcohol induced liver injury and increased serum GOT (glutamic oxaloacetic transaminase) and GPT (glutamic pyruvic transaminase) levels in injured rats. The ADH (alcohol dehydrogenase)-like and ALDH (aldehyde dehydrogenase)-like activities in the *Hovenia* extracts were studied. Their activities in the extracts of *Hovenia* wood were higher than the extracts of other parts of *Hovenia*. And then *Hovenia* wood extracts have high effects on the alcohol and acetaldehyde degradation. The *Hovenia* extracts were decreased concentration of fusel oil. The ADH-like and ALDH-like activities in the *Hovenia* wood extract were 1.14 unit/ μ l, 0.33 unit/ μ l respectively.

Key Words: *Hovenia dulcis*, ADH, ALDH, GOT, GPT, alcohol

서 론

간(肝)은 우리 몸에서 가장 큰 장기로 위상복부에 존재하며, 우리 몸에 필요로 하는 각종 영양분의 대사는 물론 뇌에 필요한 에너지를 공급하고, 독성물질들을 결합하고 또 해독시키는 종합적인 화학공장이다. 한편 담즙산을 분비하여 지방산의 분해 및 흡수를 돕고, 여분의 탄수화물, 비타민들을 저장하고, 혈액의 단백질을 합성하고, 생체막 구성에 필요한 콜레스테롤을 합성한다. 이러한 다양한 기능을 갖고 있는 간에 이상이 있으면 곧 황달, 빈혈을 수반한 여러 가지 부작용이 나타난다. 간의 이상 원인으로는 술이 가장 큰 부분을 차지하며 주성분인 ethyl alcohol 이외에 몸에 해로운 미량의 methyl alcohol, aldehyde 및 fusel oil류 등의 성분이 포함되어 있으며, 이들 미량 성분들이 주로 중추신경의 마비, 두통, 속쓰림 등 숙취현상을 유발하는 요인으로 밝혀지고 있다 (McDonald 1973). 우리나라의 간 경변증 환자의 20%는 사망 시 간암이 합병되어 있고 간암 환자의 80%는 간 경변이 같이 발병되어 나타난다. 간 경변의 원인은 간암의 환경적 요인과 같이 바이러스, 영양장애, 간 독성물질, 음주 등 모두가 환경과 관련이 있는 것들로 알려져 있으나 정확한 상

관관계는 아직 밝혀진 것이 없다 (Kim et al., 2001; Choung et al., 2002; Roh et al., 2002).

기존에 사용되는 인공합성 항암제의 경우 부작용으로 인하여 많은 문제가 야기되고 있어 이를 대체할 물질로서 천연의 생리활성물질로서 간 기능 개선 작용을 갖는 기능성 물질을 찾아내어 치료제로 개발하고자 하는 연구가 활발하게 이루어지고 있다 (Kennedy et al., 1990; Kwak et al., 1999). 따라서, 본 연구는 천연물 중 숙취해소와 간 기능 개선, 간의 독성물질 제거효능이 있는 것으로 알려진 헛개나무 (*Hovenia dulcis* THUNBER var. *koreana* Nakai)를 이용하여 간 기능 개선 및 간 보호효과를 검증하여 생약으로써의 개발 가능성을 타진하였다. 헛개나무는 중국과 일본, 우리나라에 주로 분포하고 있는 갈매나무과의 낙엽교목으로서 우리나라는 주로 강원도 및 황해도 이남, 중부지방에 분포하고 있는 수종으로 매우 드물게 군락을 형성하고 있다. 헛개나무의 약리적인 기능에 대한 기록들을 살펴보면 간장의 기능을 좋게 하고 간에 쌓인 독을 풀어 주는 효과가 있어 음주 후에 나타나는 두통, 어지러움, 속 불편함, 구취, 소갈 등의 다양한 숙취증상을 해소하는 기능과 위장병, 대장염 등 음주로 인하여 생긴 병을 고치는데 효능이 있는 것으로 알려져 있다 (Kim, 1996). 이러한 헛개나무의 효능을 검증하기 위해 각 부위별로 추출물을 얻은 다음 alcohol과 acetaldehyde, fusel oil류의 분해에 미치는 생화학적 효과에 대하여 연구 하였으며, 또한 간 기능에 대한 효능을 알아보기 위해 간 조직에 미치는 생리 생화학적 효과에 대해서도 확인하였다.

* 논문 접수: 2005년 5월 11일

수정재접수: 2005년 6월 7일

[†] 문혜연, (우) 712-714 경상북도 경산시 진량읍 대구대학교 공과대학 식품·생명·화학공학부
Tel: 053-850-6552, Fax: 053-850-6559
e-mail: moonhy@Daegu.ac.kr

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용한 헛개나무 (*Hovenia dulcis* THUNBER var. *koreana* Nakai)는 5년생 이상을 재배 농가로부터 구입하여 잎과 가지, 수피, 목부 부분으로 나눈 다음 각 각을 잘게 썰어 건조 후 조직 100 g 당 추출용매 1:10 (w/v)의 비율로 하여 추출하였다. 실험동물은 SD (Sprague-Dawley)계 웅성 6주령의 랫트를 한국실험동물협회로부터 구입하여 사용하였다.

2. Alcohol 분해 효과 검증

150 mM semicarbazide 50 μ l와 50 mM sodium pyrophosphat (pH 9.6) 750 μ l에 30 mM NAD⁺ 50 μ l, 3 M ethanol 50 μ l, 증류수 1.5 ml의 reaction mixture에 헛개나무 각 조직별 추출물을 50 mg (dry weight) 첨가하여 37°C에서 30 min 동안 반응한 다음 생성된 NADH를 340 nm에서 흡광도를 측정하여 산출하였다. 대조구는 Sigma사에서 구입한 ADH 300 unit가 생성하는 NADH의 값으로 하였다.

3. 숙취해소 효과 검증

Aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity 측정: 0.8 mM EDTA 100 μ l와 0.8 mM mercaptoethanol 30 μ l, 180 mM sodium pyrophosphate (pH 9.0) 750 μ l에 30 mM NAD 50 μ l, 15 mM pyrazole 50 μ l, 30 mM acetaldehyde 50 μ l가 혼합된 reaction mixture에 헛개나무 각 조직별 추출물을 50 mg 첨가하여 37°C에서 30 min 동안 반응한 다음 생성되는 NADH를 340 nm에서 흡광도를 측정하여 산출하였다. 대조구는 Sigma사에서 구입한 ALDH 10 unit가 생성하는 NADH의 값으로 하였다 (Lee et al., 1993). Fusel oil류에 대한 분해 효과: 150 mM semicarbazide 50 μ l와 50 mM sodium pyrophosphat (pH 9.6) 750 μ l에 30 mM NAD 50 μ l, 3 M fusel oil류 50 μ l, 증류수 1.5

ml과 헛개나무 각 조직별 추출물을 50 mg 첨가하여 37°C에서 30 min 동안 반응하여 생성된 NADH를 340 nm에서 흡광도를 측정하여 산출하였다. 대조구로는 ethanol을 분해하는 ADH 300 unit가 가지는 효율을 백분율로 산출하여 환산하였다.

4. CCl₄를 이용한 간 손상 유도과 치료

CCl₄와 olive oil을 1:1로 혼합한 후 랫트 중량 100 g당 0.166 ml의 CCl₄ 혼합물을 1일 1회 2일간 경구 투여하여 간 조직 손상을 유도하였다. 손상된 간 조직의 치료를 위해 랫트 중량 100 g당 0.2 ml의 헛개나무 각 조직별 추출물을 1일 2회 3일간 경구 투여한 후 해부를 통하여 간 조직의 손상 및 치료 유무를 육안으로 확인하고 간 동맥으로부터 채혈한 혈액으로부터 혈장만 회수하여 간 기능 지수를 분석하였다. 실험동물 중 대조구는 CCl₄ 혼합물 대신 동일량의 증류수를 투여하였다

5. Alcohol을 이용한 간 손상 유도과 치료

60 kg의 성인이 소주 한 병을 섭취하는 것을 기준으로 하여 랫트 중량 100 g당 1.2 ml의 alcohol을 경구 투여된 1시간 경과 후 치료를 위하여 랫트 중량 100 g당 헛개나무 각 조직별 추출물을 0.2 ml를 경구 투여하여 3일간 치료를 유도하였다. 이 과정에서 혈중 alcohol 농도의 변화를 알아보기 위해 1시간 간격으로 48시간 동안 랫트의 꼬리동맥으로부터 혈액을 채취하여 혈중 alcohol 농도를 측정하였으며, 간 기능 손상과 회복 유무는 해부를 통하여 육안으로 관찰하였고 간 기능 지수와 혈중 alcohol 농도를 측정하였다. 실험동물 중 대조구는 alcohol 대신 동일량의 증류수를 경구 투여하였다.

6. 간 기능 지수의 측정

간 기능 개선 효과를 진단하기 위해 GOT (glutamic oxa-

Table 1. The effect of the *Hovenia* extracts on the alcohol degradation *in vitro*. The control was calculated to effect of alcohol analyzed by 300 unit/ml ADH

	Control ¹⁾	Leaf extract	Bark extract	Branch extract	Wood extract
23% Alcohol	300	192±6.2 ^a	345±23.4	462±12.1	564±24.5 ^a
15% Alcohol	300	201±12.5 ^b	360±25.3	474±8.6 ^b	570±25.0

1) alcohol dehydrogenase 300 unit/ml, a, b, ab Values followed by different letters are significantly different ($P<0.05$)

Table 2. The effect of the *Hovenia* extracts on the acetaldehyde degradation *in vitro*. The control was calculated to effect of acetaldehyde degradation analyzed 10 unit ALDH per ml

	Control ¹⁾	Leaf extract	Bark extract	Branch extract	Wood extract
Acetaldehyde 30 mM	10	5.82±1.2 ^b	16.17±2.1	17.42±1.6 ^b	18.14±2.5

1) Aldehyde dehydrogenase (ALDH), a, b, ab Values followed by different letters are significantly different ($P<0.05$)

loacetic transaminase), GPT (glutamic pyuvic transaminase)와 total cholesterol, triglycerides 수치를 측정하여 비교하였다. 진단용 kit는 아산제약에서 생산된 것을 사용하였다 (Chung et al., 1982; Bickel et al., 1991).

7. 혈중 alcohol 농도 측정

150 mM semicarbazide 50 μ l와 50 mM sodium pyrophosphat (pH 9.6) 750 μ l에 30 mM NAD 50 μ l, 증류수 1.5 ml과 ADH (alcohol dehydrogenase) 10 unit가 포함된 reaction mixture에 채혈로 얻은 serum 0.1 ml을 첨가하여 37°C에서 30 min 동안 반응한 다음 생성된 NADH를 340 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다. 표준 alcohol 농도는 위의 reaction mixture에 헛개나무 각 조직별 추출물 50, 100, 300, 500, 800, 1,000 mg를 각각 첨가하여 반응을 유도한 다음 340 nm에서 측정된 흡광도를 표준 alcohol 농도로 환산하여 이용하였다.

결과 및 고찰

헛개나무 추출물의 alcohol 분해효과를 검증하기 위해 시판 중인 주정 중 소주와 청주를 기준으로 하여 23%와 15%로 적용하였으며 각각의 alcohol 농도에 대한 분해효과를 검증하였다. Alcohol 분해에 대한 효과는 alcohol dehydrogenase의 생리활성에 준하여 NAD⁺가 NADH로 변화되는 농도를 측정하여 산출하였다. 헛개나무 조직별 alcohol 분해효과를 비교했을 때 목부추출물의 alcohol 분해효과가 가장 탁월한 것으로 나타났으며, 가지와 수피 또한 alcohol 분해효과가

높은 것을 확인되었지만, 잎 추출물의 경우 다소 미약한 것으로 나타났다 (Table 1). 이는 alcohol 분해효소인 ADH 300 unit의 활성과 비교한 실험에서도 잎 추출물은 97 unit로 다른 조직에 비해 현저하게 효소적 활성이 떨어지는 것으로 보아 헛개나무 추출물 중 alcohol 분해효능이 있는 물질이 헛개나무 수령이 늘어남에 따라 잎보다는 가지나 목부쪽으로 약리성 성분이 축적되는 것으로 판단된다.

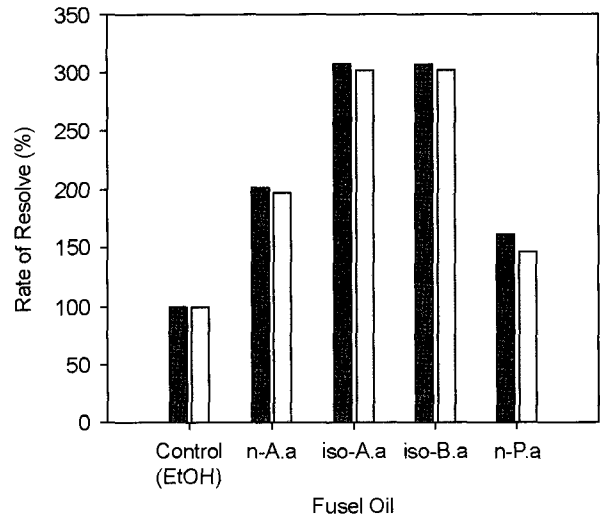


Fig. 1. The effect of the Hovenia branch extracts on the fusel oils degradation. The control was calculated to effect of alcohol analyzed by 300 unit/ml ADH.

□ : 23% alcohol ■ : 15% alcohol

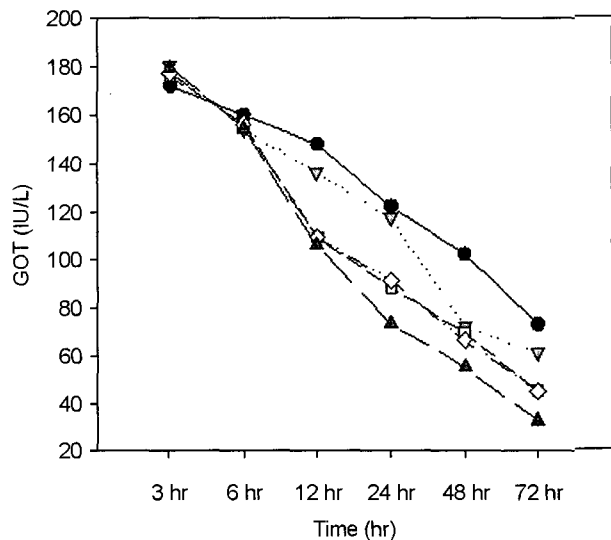
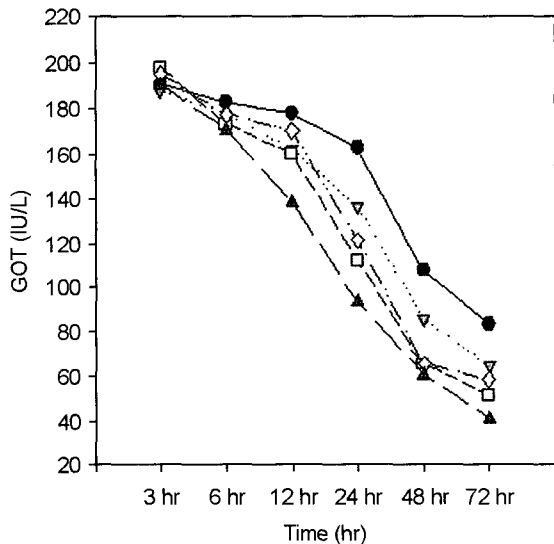


Fig. 2. The effect of the Hovenia extracts on the GOT and GPT level in the CCl₄-treated rats. The GOT and GPT level of CCl₄-treated rats decreased significantly ($P < 0.05$). GOT: Glutamate oxaloacetate transaminase, GPT: Glutamate pyruvate transaminase

● : Control, ▽ : Leaf, □ : Bark, ◇ : Branch, ▲ : Wood

Acetaldehyde 분해효소인 ALDH 10 unit와 헛개나무 조직별 추출물을 비교한 결과, 목부 추출물의 경우 ALDH 활성보다 약 2배 정도의 높은 분해효과를 확인할 수 있었으며 (Table 2), 잎 추출물의 경우 ADH의 결과와 동일하게 낮은 활성값으로 나타났다. 이는 alcohol 분해효과와 유사한 결과로 헛개나무 추출물에 포함된 성분이 alcohol 분해효능 뿐만 아니라 acetaldehyde 분해활성도 가지고 있으며 alcohol 섭취로 인해 발생하는 생리적 현상인 숙취를 해소하는 약리적 성분을 포함하고 있음을 시사하는 것이다. Fusel oil은 alcohol 발효시 생성되는 부산물로서 체내 흡수 시 두통, 메스꺼움을 유발하는 숙취의 원인물질로 알려져 있다. 이들 fusel oil에 대한 헛개나무 조직별 추출물의 분해효과를 검증하기 위해 ADH 300 unit와 비교한 결과 가지 추출물이 가장 분해효과가 우수한 것으로 나타났으며, isobutanol에 대한 분해효율이 가장 높은 것으로 판명되었다 (Fig. 1). 이는 헛개나무 추출물이 숙취현상을 해소하는데 탁월한 효능이 있음을 보여주는 것이며 옛 의서의 기록을 과학적으로 뒷받침해 주는 중요한 결과로 판단된다.

CCl₄의 간 독성 기작은 간 세포의 과산화 지질반응을 일으켜 간 독성을 나타내는 것으로 알려져 있다. CCl₄에 의하여 간 손상이 유도된 랫트에 헛개나무 조직별 추출물을 경구

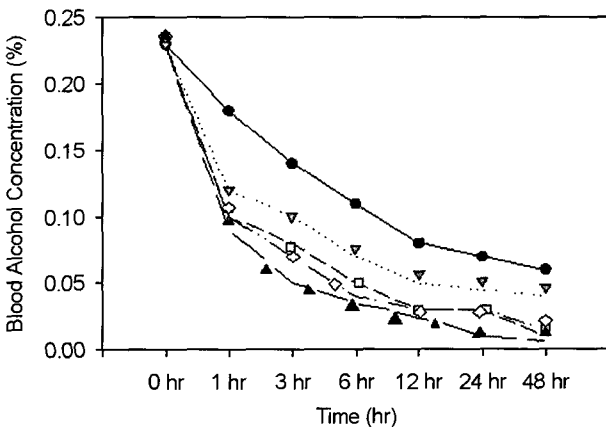


Fig. 3. The effect of the Hovenia extracts on the concentration of blood alcohol.

● : Control, ▽ : Leaf, □ : Bark, ◇ : Branch, ▲ : Wood

투여하여 치료를 유도한 경우와 헛개나무 추출물로 치료하지 않은 랫트의 간을 간 기능 지수인 GOT, GPT 수치를 통하여 비교하였다. GOT 수치에 의하여 손상된 간에 헛개나무 목부 추출물을 투여한 결과 48시간 경과시 정상치로 회복되는 것을 확인하였으며, GPT 또한 48시간 경과 후 정상수치로 기능이 회복되었다 (Fig. 2). 간의 지방대사 효과를 확인할 수 있는 척도인 총콜레스테롤함량과 중성지질의 수치를 측정하여 간 기능의 정상 유무를 확인한 결과 목부 추출물을 투여한 실험구에서는 회복율이 빠른 것으로 나타났다 (Table 3). 이러한 결과로서 헛개나무 추출물은 간 기능 개선 및 간 세포재생에 효과가 있는 것으로 확인되었으며 헛개나무 조직 중 목부> 가지> 수피> 잎의 순서로 간 기능 개선 효능이 우수한 것으로 생각된다.

헛개나무 추출물의 알코올 분해효과를 확인하기 위하여 실험동물인 랫트에 주정인 소주를 경구 투여한 다음 헛개나무 각 조직별 추출물로 처리한 결과 1시간 경과 후부터 혈중 알코올 농도가 현저하게 감소하는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3). 헛개나무 추출물로 치료하지 않은 대조구와 비교 시 혈중 알코올 농도가 약 50% 정도 빠르게 감소하는 것을 관찰하였다. 이는 헛개나무 추출물이 알코올을 신속하게 분해할 수 있는 ADH 활성을 가지고 있음을 시사하고 있으며, 간 기능 지수를 나타내는 GOT, GPT 수치는 48시간 경과 후부터 모두 정상으로 회복되는 것을 확인하였다 (Fig. 4). 총콜레스테롤과 중성지질의 수치 회복율은 목부 추출물에서 가장 좋은 결과로 나타났다 (Table 4). 이 결과는 CCl₄에 의한 실험결과와 동일한 것으로 헛개나무 추출물 중 목부 조직의 추출물이 수술면에서는 낮은 반면 약리적인 활성은 가장 우수한 것으로 확인되었다.

이들 결과를 종합해 보면 헛개나무 추출물은 간 기능 개선 및 생리적 현상 회복에 우수한 효능이 있는 것으로 판단되며 헛개나무 조직 중 목부, 가지, 수피, 잎의 순서로 간 기능 개선 효과가 높은 것으로 확인하였다. 이는 다른 천연물을 이용한 간 기능개선 연구결과와 비교시 약 30% 정도 더 높은 회복율을 나타내는 것이다 (Jeong, 2000). 이러한 결과를 토대로 헛개나무 목부 조직 추출물에 다른 유기용매 등을 이용하여 분획화하여 추출한 다음, 각 추출액으로부터 간암 유발 독성물질 제거효과를 조사하고 더 나아가 간암 세포에

Table 3. The effect of the Hovenia extracts to concentration of cholesterol in blood plasma of rats¹⁾ treated with CCl₄

	Control ²⁾	Leaf extract	Bark extract	Branch extract	Wood extract
TG	92.5±16.1 ^a	62.1±28.3	58.9±13.9	60.8±10.6	51.5±13.8 ^a
TC	166.4±3.5 ^{ab}	124.2±2.4 ^b	119.4±2.4	121.3±1.6 ^b	118.0±1.0

1) Mean ± S.D (n=8), 2) No treatment Hovenia extract

a, ab Values followed by different letters are significantly different (P<0.05)

TG: Triglycerides (normal value: male 50~155 mg/dl female 40~115 mg/dl)

TC: Total cholesterol (normal value: 130~250 mg/dl)

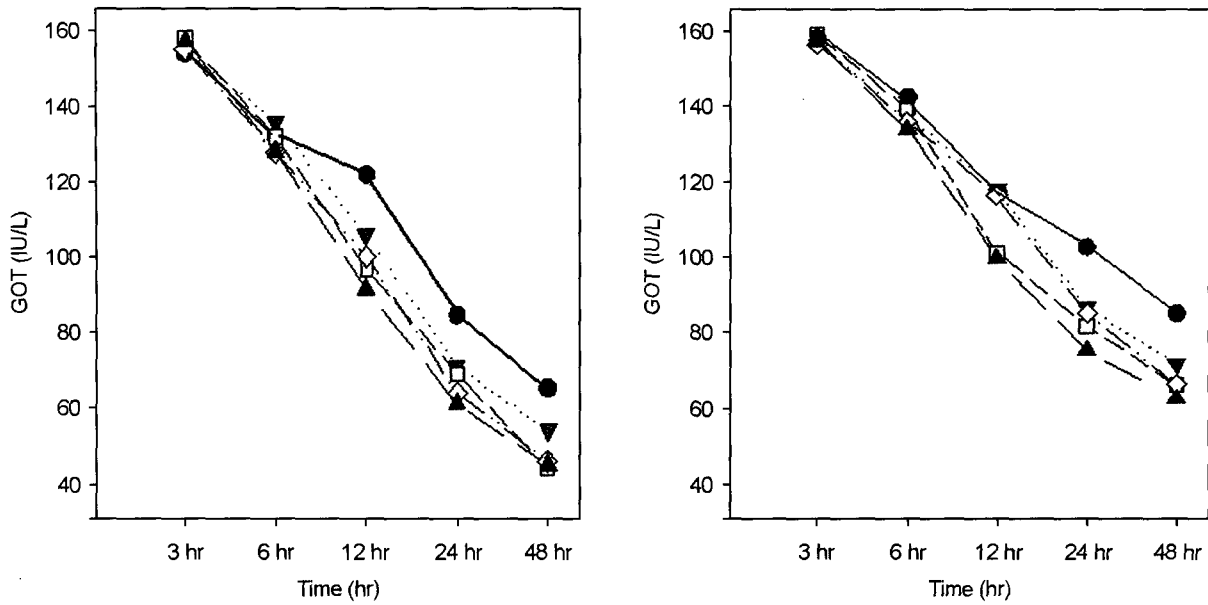


Fig. 4. The effect of the Hovenia extracts on the GOT and GPT level in the alcohol-treated rats. The GOT and GPT level of alcohol-treated rats decreased significantly ($P<0.01$).

● : Control, ▼ : Leaf, □ : Bark, ◇ : Branch, ▲ : Wood

Table 4. The effect of the Hovenia extracts to concentration of cholesterol in blood plasma of rats¹⁾ treated with alcohol

	control	Leaf extract	Bark extract	Branch extract	Wood extract
TG	86.3±12.1	86.1±22.1	60.9±10.3	60.7±19.4	54.1±14.0
TC	171.0±2.9	122.7±4.9	120.1±1.7	122.0±6.1	119.1±2.4

1) Mean ± S.D (n=8), 2) No treatment Hovenia extract

a, ab Values followed by different letters are significantly different ($P<0.05$)

TG: Triglycerides (normal value: male 50~155 mg/dl female 40~115 mg/dl)

TC: Total cholesterol (normal value: 130~250 mg/dl)

대한 세포분열 억제효과 등의 항암 작용에 관해서 연구할 필요가 있다.

감사의 말씀

이 논문은 2003 학년도 대구대학교 학술연구비 지원에 의해 수행된 논문으로, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- An SY, Kim YK, Kim MH, Lee BI. Comparison of hepatic detoxification activity and reducing serum alcohol concentration of hovenia dulcis and alnus japonica. Korean J Med Crop Sci. 1999. 7: 263-268.
- Bae SK, Kim JH, Lee WP. The clinical significance of SGOT/SGPT ratio in patients with primary liver cancer. Korean J Gastroenterol. 1982. 14. 167-170.
- Back HS, Park SK, Yim CY. SGOT/SGPT ratios in various histologic types of hepatoma confirmed by needle biopsy. Korean J Gastroenterol. 1981. 13. 77-82.
- Behrens MJ, Hoerner M, Lasker JM, Liber CS. Formation of acetaldehyde adducts with ethanol-inducible P-450IIE1 *in vitro*. Biochem Biophys Res Commun. 1988. 154. 584-591.
- Bickel M, Bader E, Brocks DG, Engelbart K, Gunzler V, Schmidts HL, Vagel GH. Beneficial effects of prolyl 4-hydroxylase in CCl4-induced fibroses of the liver in rats. J Hepatol. 1991. 13. 526-534.
- Blomstrand R, Kager L, Lantto O. The combustion of triolein-1-¹⁴C and its inhibition by alcohol in man. Life Sci. 1973. 13. 1131-1139.
- Brodie NN, Maickel RP. Role of the sympathetic nervous system in drug-induced fatty liver. Ann New York Acad Sci. 1963. 104. 1049-1053.

- Chung WK. Environmental factors in the development of liver cancer. *Korean J Gastroenterol.* 1980. 12. 101-105.
- Chung WJ, Lee CH, Moon DK, Chun KS, Choi JD, Kim KM. SGOT/SGPT ratio and clinical study on histopathologically. *Korean J Gastroenterol.* 1980. 14. 149-158.
- Hase KH, Kwon OH. Relationship of hepatic triglyceride accumulation by ethanol to activities of lipogenic enzymes in rat liver. *Korean Biochem J.* 1992. 25. 499-508.
- Jeong CH, Bae YI, Shim KH. Physicochemical properties of hovenia dulcis leaf tea. *Korean J Postharvest Sci Technol.* 2000. 7. 117-123.
- Jeong CH, Shim KH. Some functional properties of extracts from leaf and fruit stalk of hovenia dulcis. *Korean J Postharvest Sci Technol.* 2000. 7. 291-296.
- Jeong JY, Lee YS. Inhibition effect of retinoic acid on the proliferation of pre-neoplastic and hepatoma cells in rat liver. *Korean J Vet Publ Health.* 1998. 3. 293-304.
- Jones DP, Losowsky MS, Davidson CS. Effects of ethanol on plasma lipids in man. *J Lab Clin Med.* 1963. 62. 675-682.
- Kennedy NP, Kipton KF. Ethanol metabolism and alcoholic liver disease. *Essays Biochem.* 1990. 25. 137-146.
- Kim MH, Kwon OH. Relationship of hepatic triglyceride accumulation by ethanol to activities of lipogenic enzymes in rats liver. *Korean Biochem J.* 1992. 25. 499-509.
- Kwak SD, Knag CB, Koh PO, Kim CS. Histological effect of cyclophosphamide on diethylnitrosamine induced hepatic tumors in rats. *Korean J Vet Res.* 1999. 39. 593-601.
- Lee JY, Hwang WI, Kim ST. Effect of platycodon grandiflorum DC extract on the growth of cancer cell lines. *Korean J Food Sci Technol.* 1998. 30. 13-21.
- Liber SC, Decarli LM, Schmid R. Effect of ethanol on fatty acid metabolism in liver slices. *Biochem Biophys Res Comm.* 1959. 82. 141-149.
- Liber CS, Schmid R. The effects of ethanol on fatty acid metabolism; stimulation of hepatic fatty acid synthesis *in vitro*. *J Clin Invest.* 1961. 40. 394-405.
- Liber CS, Jones DP, Mendelson J, DeCarli LM. Fatter liver hyperlipemia and hyperuricemia produced by prolonged alcohol consumption despite adequate dietary intake. *Trans Assoc Am physicians.* 1963. 76. 289-297.
- Liber CS. Alcohol and the liver. *J Hepatol.* 1984. 4. 1243-1256.
- Liber CS. Alcohol and liver : Metabolism of ethanol, metabolism effects and pathogenesis of injury. *Acta Med Scan Suppl.* 1985. 703. 11-24.
- Liber CS. Metabolism effects of acetaldehyde. *Biochem Soc Trans* 1988. 16. 241-254.