

만성적인 에탄올 섭취와 천연물 투여가 흰쥐의 항산화계와 에탄올 산화계에 미치는 영향

김목경 · 현선희 · 정세영[#]

경희대학교 약학대학 위생화학교실

(Received July 14, 2006; Revised August 23, 2006)

Effect of Chronic Ethanol Consumption and Herbal Extracts Administration on the Antioxidant System and Ethanol Oxidation System in Rats

Mok Kyung Kim, Sun Hee Hyun and Se Young Choung[#]

Department of Hygienic Chemistry, College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

Abstract — This study had been done for the investigation of the effect of *Vitis vinifera* extract (V), *Schisandra chinensis* extract (S), *Taraxacum officinale* extract (T), *Gardenia jasminoides* extract (G), *Angelica acutiloba* extract (A) and *Paeonia japonica* extract (P), and their mixtures on the antioxidant and ethanol oxidation system which was induced by Lieber-DeCarli ethanol liquid diet. Male Sprague-Dawley rats were randomly divided into eight groups: ethanol diet (ED), normal diet (ND), ED+V (100 mg/kg/day), ED+S, ED+T, ED+G, ED+A and ED+P (300 mg/kg/day). We studied the effects on alcohol dehydrogenase (ADH) and acetaldehyde dehydrogenase (ALDH) after herbal extracts administration for 6 weeks in rats induced by Lieber-DeCarli ethanol liquid diet. The differences in ADH and ALDH activity of the rats treated with herbal extracts and ED group were not significant. Phase I enzyme activity was found to be significantly higher in the ED+V than the ED group. Phase II enzymes (glutathione-S-transferase, phenol sulfatransferase) activities were found to be higher in the herbal extracts than the ED group. Herbal extracts not only reduced ethanol-induced elevation of level malondialdehyde, but also protected against ethanol-induced decrease of reduced glutathione, glutathione reductase, glutathione peroxidase, catalase and superoxide dismutase activities. Therefore, they can be utilized as a health functional food or new drug candidate for fatty liver and hepatotoxicity which was induced by chronic alcohol consumption.

Keywords □ *Vitis vinifera*, *Schisandra chinensis*, *Taraxacum officinale*, *Gardenia jasminoides*, *Angelica acutiloba*, *Paeonia japonica*, ethanol liquid diet, antioxidant

만성적인 에탄올 섭취는 신체의 주요 기관에 치명적인 영향을 미칠 수 있으며, 특히 대사에 중추적 역할을 담당하는 간세포에 장애를 초래하고, 알코올성 간염, 지방간 및 간경변의 원인이 되고 있다.¹⁾

생체가 에탄올을 급성 혹은 소량으로 섭취할 경우 alcohol dehydrogenase(ADH)나 cytochrome P450에 의해서 대사되지만 만성 혹은 과량일 경우에는 섭취된 에탄올의 1/2~2/3 이상이 microsomal ethanol oxidizing system(MEOS)에 의해서 대사된다.^{1,2)}

에탄올 대사의 첫번째 경로인 ADH와 acetaldehyde dehydrogenase(ALDH)에 의한 대사 과정에서 알코올은 각각 acetaldehyde와 acetate로 산화되며, acetate는 acetyl-CoA로 전환되어 TCA 회로를 거쳐 에너지를 발생하거나 또는 콜레스테롤과 지방산을 합성하는데 이용된다. Julkunen³⁾은 경구적으로 투여한 에탄올의 상당한 양이 전신순환으로 들어가지 않고 위 점막 내에 존재하는 ADH에 의해 주로 대사된다는 에탄올의 first pass metabolism을 발견하였고, Caballeria 등⁴⁾은 사람에게서 에탄올의 first pass metabolism이 주로 위에 존재하므로 에탄올을 대사하는 위점막의 능력에 따라 에탄올의 생물학적 이용도 및 독성이 결정될 수 있다고 했다.

두번째 대사과정인 MEOS 산화효소계는 소포체의 일부로 주로 존재하지만, 어떤 것은 미토콘드리아에도 있다. MEOS는 대

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 02-961-0372 (팩스) 02-961-0372
(E-mail) sychoung@khu.ac.kr

사되는 에탄올의 10~20% 정도를 처리하는 것으로 알려져 있으며, 만성적인 알코올 섭취자의 경우에서 처럼 체내 알코올 농도가 높을 때 활성을 가진다.

MEOS에 존재하는 cytochrom P450(P450) 산화효소는 이 반응계의 중심적인 역할을 하며, 여기서는 ATP를 생성하는 대신 오히려 NADPH를 소모하게 된다. Nordmann 등⁵⁾은 P450이 에탄올 산화에 특이적인 활성도를 보이며 이 활성도가 증가될 경우 산소필요량의 증대로 acetaldehyde와 free radicals 형성을 증가시킨다고 하였다. 이 때 O₂, H₂O₂, ·OH와 같은 free radicals 이 정상적인 생리 조건에서 보다 4~8배 정도 높게 생성되어 지질과산화 반응이 촉진되게 된다.¹⁾

에탄올에 의한 free radicals 생성의 또 다른 경로는 간 미토콘드리아 내에서 NADH/NAD⁺비의 증가로 인한 O₂의 생성 증가, peroxisome에서 β-oxidation을 통한 H₂O₂ 생성, cytosol에서 acetaldehyde와 xanthine oxidase와의 반응을 통한 O₂와 alkane의 생성 등이 있다.

에탄올 대사의 세번째 과정으로는 peroxisome에서 H₂O₂ 생성계의 존재 하에서 에탄올을 산화시키는 catalase(CAT)에 의한 대사과정이 있다.⁶⁾

현재까지의 연구 모델에서는 동물에게 알코올성 지방간 또는 간염을 유도하기 위해 CCl₄⁷⁾나 ethanol⁸⁾을 한, 두 번에 과량 투여하는 급성 독성 모델이 사용되어 왔으나, 이것은 사람에게 있어서의 알코올성 지방간 또는 간염 모델과는 상이하므로 본 실험에서는 만성적으로 지방간을 유도할 수 있는 방법 중 하나인 Lieber-DeCarli liquid diet를 사용하였다.

본 연구팀은 각종 문헌, 정보검색을 통하여 간 보호 효과가 우수하다고 인정되고 있는 천연물 중 *Vitis vinifera* extract, *Schisandra chinensis* extract, *Taraxacum officinale* extract, *Gardenia jasminoides* extract, *Angelica acutiloba* extract, *Paeonia japonica* extract과 그들의 혼합물을 이용하여 에탄올로 만성독성을 유도한 쥐에서 혈청과 간에서의 지질함량을 감소시킨다는 보고를 이미 한 바 있다.⁹⁾ 이에 본 실험에서는 천연물들이 만성적인 간독성에 미치는 기전을 에탄올 대사 효소계와 항산화 효소계를 통해 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

시료 조제

건조된 오미자(*Schisandra chinensis*, S), 포공영(*Taraxacum officinale*, T), 차자(*Gardenia jasminoides*, G), 당귀(*Angelica acutiloba*, A), 작약(*Paeonia japonica*, P)은 경동시장에서 구입하여 각각의 시료에 증류수 10배를 가한 다음 가열 맨틀에서 G는 60°C에서 5시간, 나머지 천연물은 90°C에서 4시간씩 2회 추출한 후 여과하여 진공회전증발기(rotaroy vacuum evaporator)로 감

압 농축하고 동결 건조하여 시료를 조제 하였다.

포도씨 추출물(Catechin 25%, V)은 (주)한약마을에서 구입하였다.

실험동물 및 실험식이

실험동물은 5주령, 140~150 g의 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 Orient Inc.(Seoul, Korea)에서 구입하였으며, 24±2°C, 습도 60%의 항온, 항습 장치가 되어 있는 실험실 환경에서 고행사료로 1주간 순응시킨 후 사용하였다. 실험군은 총 12군(N=8)으로 6주간 실험 식이를 급여하여 간독성을 유도하면서 동시에 각각의 시료를 경구투여 하였고 대조군은 알코올이 첨가되지 않은 식이를 급여하며 투여 용량에 해당하는 증류수를 경구 투여하였다. 실험군과 투여 용량은 다음과 같다.

Normal liquid diet (ND)

Ethanol liquid diet (ED)

ED+*Vitis vinifera* (V, 100 mg/kg/day)

ED+*Schisandra chinensis* (S, 300 mg/kg/day)

ED+*Taraxacum officinale* (T, 300 mg/kg/day)

ED+*Gardenia jasminoides* (G, 300 mg/kg/day)

ED+*Angelica acutiloba* (A, 300 mg/kg/day)

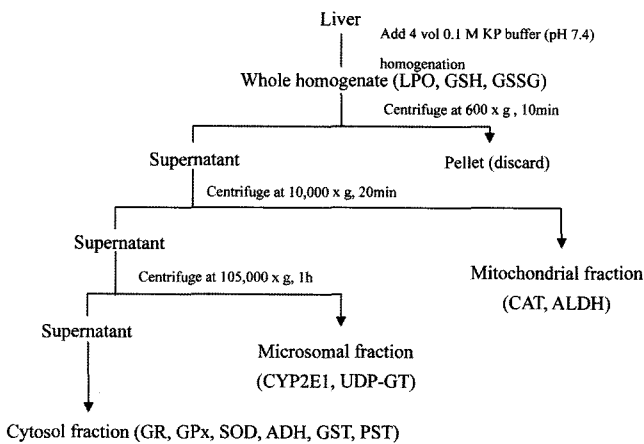
ED+*Paeonia japonica* (P, 300 mg/kg/day)

Table I - Composition of Lieber-DeCarli liquid diet

Ingredients	Normal diet (g/l)	Ethanol diet (g/l)
Casein	41.4	41.4
L-cystein	0.50	0.50
DL-methionine	0.30	0.30
Corn oil	8.50	8.50
Olive oil	31.10	31.10
Safflower oil	2.70	2.70
Dextrin maltose	115.20	25.60
Cellulose	10.00	10.00
Choline bitartrate	0.53	0.53
Xantan gum	3.00	3.00
Vitamin mix ^{a)}	2.55	2.55
Mineral mix ^{b)}	8.75	8.75
Ethanol	-	54.51

^{a)}AIN-76A Vitamin mix provided the following g/kg mix: thiamine HCl, 0.6; riboflavin, 0.6; pyridoxine HCl, 0.7; niacin, 3; calcium pantothenate, 1.6; folic acid, 0.2; biotin, 0.02, Vitamin B12 (0.1%), 1; Vitamin A palmitate (500000 IU/g), 0.8; Vitamin D3 (400000 IU/g), 0.25; Vitamin E acetate (500 IU/g), 10; menadione sodium isulfite, 0.08; sucrose, finely powdered, 981.15; Dyets, Bethlchem, Pennsylvania, U.S.A.

^{b)}AIN-76 Mineral mix provided the following g/kg mix : calcium phosphate, dibasic, 500; codium chloride, 74; potassium citrate-H₂O, 220; potassium sulfate, 52; magnesium oxide, 24; manganous carbonate, 3.5; ferric citrate, 6; zinc carbonate, 1.6; cupric carbonate, 0.3; potassium iodate, 0.01; sodium selenite, 0.01; chromium K sulfate, 12H₂O, 0.5; sucrose, finely powdered, 118.03; Dyets, Bethlchem, Pennsylvania, U.S.A.



Scheme 1 - Fractionation of cellular organelle from liver tissue.

실험식은 Lieber-DeCarli Rat liquid diet¹⁰를 수정하여 사용하였고 매일 식이 공급 직전에 조제하였으며 그 조성은 Table I과 같다. 이때 식이는 1m²/당 1 kcal 열량을 공급할 수 있도록 조제하였다. 칼로리를 기준으로하여 에탄올 식이(ethanol diet, ED)는 지방 35%, 당질 11%, 단백질 18%, 에탄올 36%로 구성되었고, 정상 대조 식이(normal diet, ND)는 지방 35%, 당질 47%, 단백질 18%로 구성되었다. 에탄올 투여군은 총 열량 중 에탄올로부터 공급받는 열량이 36%이며, 정상 대조군은 이에 해당하는 열량만큼 maltosedextrin으로 대체하였다. 식이량은 매일, 체중은 일주일에 2번 일정한 시간에 측정하였다.

위점막과 간 분획

위 점막은 위 절제 후 차가운 생리식염수로 세척한 후, 유리판(MARIENFELD, 75×25 mm)으로 끊어서 -70°C에 보관하였다. 간으로부터의 세포 분획 분리 과정은 Scheme 1과 같다.

위 점막과 간 내의 알코올 대사 효소들의 활성 측정

ADH의 활성은 Bergmyer's method¹¹, ALDH의 활성도는 Koivula and Lindros¹²을 modification하여 사용하였다.

간 내의 Phase I, II 대사 효소들의 활성 측정

Phase I 대사 효소 중 간 내의 p-nitrophenol hydroxylase (CYP2E1)는 Koop¹³의 방법으로 측정하였다.

Phase II 대사 효소 중 glutathione-S-transferase(GST)의 활성은 Habig 등¹⁴의 방법, phenol sulfatransferase(PST)의 활성은 Sekura와 Jakoby¹⁵의 방법, uridine diphosphate-glucuronyltransferase(UDP-GT)의 활성은 Isselbacher 등¹⁶의 방법에 준하여 측정하였다.

간 내의 GSH, GSSG 함량 측정

간 내의 reduced glutathione(GSH)과 oxidized glutathione

(GSSG)의 측정은 Sedlak과 Lindsay¹⁷의 방법으로 측정하였다.

간 내의 항산화 효소들의 활성 측정

간 내의 glutathione reductase(GR)의 활성은 Carlberg와 Mannervik¹⁸의 방법, glutathione peroxidase(GPx)의 활성은 Paglia Valentine¹⁹의 방법, catalase(CAT)의 활성은 Aebi²⁰의 방법, superoxide dismutase(SOD)의 활성은 Marklund와 Marklund²¹의 방법으로 측정하였다.

간 내의 지질과산화물의 생성량 측정

간 내 지질과산화물인 MDA의 측정은 Ohkawa 등²²의 방법으로 측정하였다.

단백질 정량

간 내 단백질의 정량은 Bradford 법²³으로 Bio-Rad protein assay kit(Bio-Rad Laboratories, USA)를 사용하여 측정하였다.

통계처리

각 측정값은 평균±표준편차로 표현하였다. 그룹간의 통계적 유의성은 SAS package를 이용하여 p<0.05 수준에서 Duncan의 다중비교법에 의해 분석하였다.

결 과

위 점막 내의 알코올 대사 효소들의 활성

위 점막 내의 ADH를 측정한 결과는 Fig. 1과 같다.

ED군은 ND군에 비하여 증가하는 경향을 보였다. 대부분의 천연물 투여군에서 에탄올의 투여로 증가한 ADH의 활성이 ED군보다 더 증가한 경향을 보였다. 특히 당귀 투여군은 ED군에 비

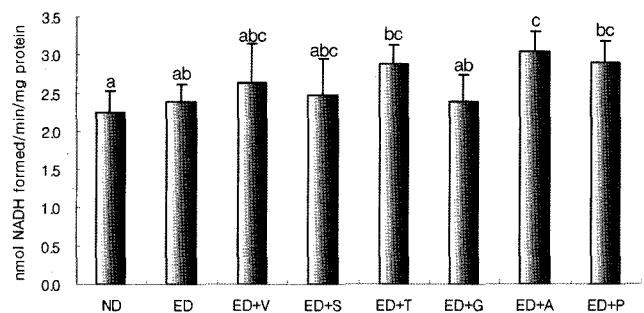


Fig. 1 - Effect of herbal extracts on gastric ADH activity in ethanol-administered rats. Values are mean±S.D. Letters with different superscripts in a column are significantly different (p<0.05) among the groups by Duncan's multiple range test. V: *Vitis vinifera*, S: *Schisandra chinensis*, T: *Taraxacum officinale*, G: *Gardenia jasminoides*, A: *Angelica acutiloba*, P: *Paeonia japonica*.

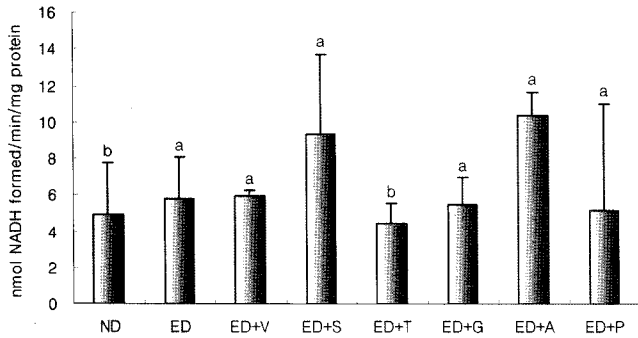


Fig. 2 – Effect of herbal extracts on gastric ALDH activity in ethanol-administered rats. Values are mean±S.D. Letters with different superscripts in a column are significantly different ($p < 0.05$) among the groups by Duncan's multiple range test. ND: normal diet, ED: ethanol diet, V: *Vitis vinifera*, S: *Schisandra chinensis*, T: *Taraxacum officinale*, G: *Gardenia jasminoides*, A: *Angelica acutiloba*, P: *Paeonia japonica*.

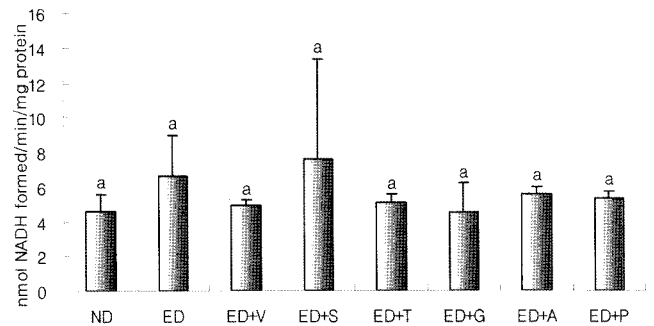


Fig. 4 – Effect of herbal extracts on hepatic ALDH activity in ethanol-administered rats. Values are mean±S.D. Letters with different superscripts in a column are significantly different ($p < 0.05$) among the groups by Duncan's multiple range test. ND: normal diet, ED: ethanol diet, V: *Vitis vinifera*, S: *Schisandra chinensis*, T: *Taraxacum officinale*, G: *Gardenia jasminoides*, A: *Angelica acutiloba*, P: *Paeonia japonica*.

해 유의성 있게 증가하였다($P < 0.05$).

위 점막 내의 ALDH를 측정할 결과는 ADH와 마찬가지로 ED 군이 ND군에 비하여 증가하는 경향을 보였으며, 천연물 투여군 중 당귀 투여군이 ED군에 비해 유의성 있게 증가하였다(Fig. 2, $P < 0.05$).

간 내의 알코올 대사 효소들의 활성

간 조직에서의 ADH의 활성은 위 점막내의 ADH, ALDH와 마찬가지로 ED군이 ND군보다 그 활성이 증가하였다(Fig. 3). ED군에 비해 천연물 투여군에서 증가하는 경향을 나타내었다.

ALDH의 경우 ED군이 ND군에 비해 약 44% 증가하였고, 오미자 투여군의 경우 ED군 보다 약 14% 증가되는 경향을 보였다(Fig. 4).

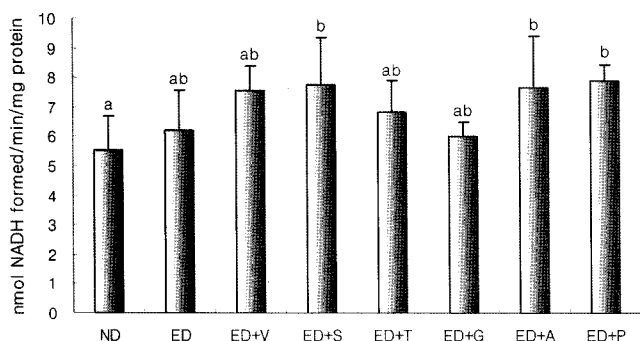


Fig. 3 – Effect of herbal extracts on hepatic ADH activity in ethanol-administered rats. Values are mean±S.D. Letters with different superscripts in a column are significantly different ($p < 0.05$) among the groups by Duncan's multiple range test. ND: normal diet, ED: ethanol diet, V: *Vitis vinifera*, S: *Schisandra chinensis*, T: *Taraxacum officinale*, G: *Gardenia jasminoides*, A: *Angelica acutiloba*, P: *Paeonia japonica*.

간 내의 Phase I, II 대사 효소들의 활성

알코올로 인해 유도되는 P450 효소중 2E1의 활성은 에탄올의 공급으로 ED군이 ND군에 비해 약 43% 증가하였고, 천연물들의 투여로 ED군보다 그 활성이 증가하였다(Fig. 5). 특히 포도씨 투여군은 ED군보다 통계적으로 유의성 있게 증가하였다($P < 0.05$).

막에 결합된 지질과산화물을 효과적으로 제거시켜서 생체막을 보호하는 GST의 활성은 에탄올 장기 투여에 의해 에탄올만을 투여한 ED군의 활성이 정상 대조 군인 ND군에 비해 약 25% 감소하였다(Fig. 6).

천연물들의 투여로, 만성적인 에탄올 투여에 의해 감소된 GST의 활성이 증가되었음을 알 수 있었으며, 특히 백작약 투여군에서 통계적으로 유의성 있게 증가하였다($P < 0.05$).

Sulfation을 촉매하는 PST의 활성에 있어 ED군이 ND군보다

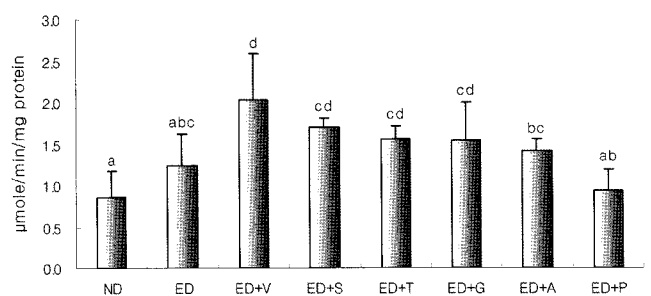


Fig. 5 – Effect of herbal extracts on hepatic p-nitrophenol hydroxylase activity in ethanol-administered rats. Values are mean±S.D. Letters with different superscripts in a column are significantly different ($p < 0.05$) among the groups by Duncan's multiple range test. ND: normal diet, ED: ethanol diet, V: *Vitis vinifera*, S: *Schisandra chinensis*, T: *Taraxacum officinale*, G: *Gardenia jasminoides*, A: *Angelica acutiloba*, P: *Paeonia japonica*.

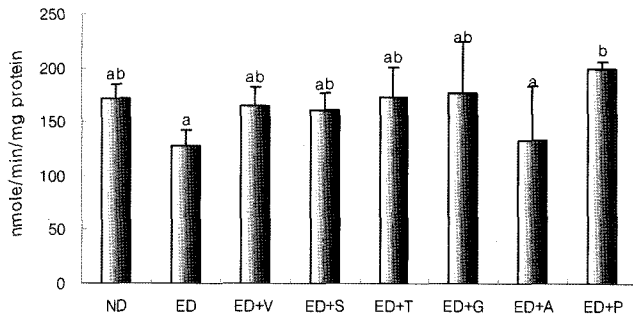


Fig. 6 – Effect of herbal extracts on hepatic GST activity in ethanol-administered rats. Values are mean±S.D. Letters with different superscripts in a column are significantly different ($p < 0.05$) among the groups by Duncan's multiple range test. ND: normal diet, ED: ethanol diet, V: *Vitis vinifera*, S: *Schisandra chinensis*, T: *Taraxacum officinale*, G: *Gardenia jasminoides*, A: *Angelica acutiloba*, P: *Paeonia japonica*.

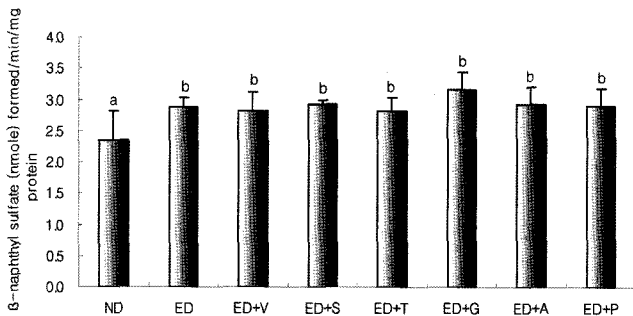


Fig. 7 – Effect of herbal extracts on hepatic PST activity in ethanol-administered rats. Values are mean±S.D. Letters with different superscripts in a column are significantly different ($p < 0.05$) among the groups by Duncan's multiple range test. ND: normal diet, ED: ethanol diet, V: *Vitis vinifera*, S: *Schisandra chinensis*, T: *Taraxacum officinale*, G: *Gardenia jasminoides*, A: *Angelica acutiloba*, P: *Paeonia japonica*.

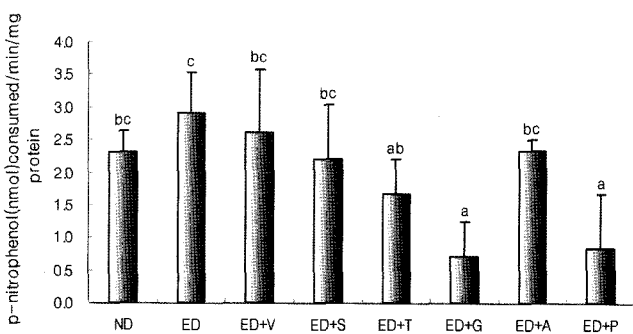


Fig. 8 – Effect of herbal extracts on hepatic UDP-GT activity in ethanol-administered rats. Values are mean±S.D. Letters with different superscripts in a column are significantly different ($p < 0.05$) among the groups by Duncan's multiple range test. ND: normal diet, ED: ethanol diet, V: *Vitis vinifera*, S: *Schisandra chinensis*, T: *Taraxacum officinale*, G: *Gardenia jasminoides*, A: *Angelica acutiloba*, P: *Paeonia japonica*.

Table II – Effects of herbal extracts on hepatic GSH and GSSG levels in ethanol-administered rats

	GSH		GSH/GSSG
	(μmole/mg protein)		
ND	6.68±1.10 ^b	0.32±0.09	21.71±4.88 ^{abc}
ED	2.69±0.99 ^a	0.21±0.07	14.32±8.83 ^a
ED+V	5.71±1.19 ^b	0.22±0.04	27.16±7.57 ^{bc}
ED+S	6.63±1.94 ^b	0.37±0.10	19.18±8.22 ^{abc}
ED+T	7.42±0.56 ^{bcd}	0.25±0.03	29.41±1.91 ^c
ED+G	6.97±1.44 ^{bc}	0.31±0.03	22.16±3.11 ^{abc}
ED+A	6.7±1.83 ^b	0.36±0.12	22.32±15.33 ^{abc}
ED+P	9.22±1.48 ^{cdef}	0.40±0.07	23.70±4.43 ^{abc}

Values are mean±S.D. Letters with different superscripts in a column are significantly different ($p < 0.05$) among the groups by Duncan's multiple range test.

ND: normal diet, ED: ethanol diet, V: *Vitis vinifera*, S: *Schisandra chinensis*, T: *Taraxacum officinale*, G: *Gardenia jasminoides*, A: *Angelica acutiloba*, P: *Paeonia japonica*.

유의성 있게 증가하였다($P < 0.05$). 천연물 투여는 ED군에 의해 증가된 PST의 활성에 별다른 영향을 미치지 않았다(Fig. 7).

Glucuronidation을 촉매하는 UDP-GT의 활성은 ED군이 ND군보다 약 26% 정도 증가되게 나타났다. 그러나 천연물 투여군 모두에게 있어 ED군보다 낮은 활성을 나타냈다(Fig. 8).

특히 포공영, 치자, 백작약 투여군은 ED군보다 유의성 있게 감소하였다($P < 0.05$).

간 내의 GSH, GSSG 함량

여러 가지 천연 추출물의 알코올 투여로 생성된 oxygen free radical 제거 효과를 알아보기 위해 흰쥐에 알코올 및 추출물을 6주간 투여 후 간 조직 중 GSH 함량에 미치는 영향을 Table II에 나타내었다.

에탄올의 투여로 ED군의 GSH 함량은 ND군에 비해 약 60% 감소하였다.

에탄올의 공급으로 감소된 GSH 함량은 모든 천연물군에 있어 ED군에 비해 통계적으로 유의성 있게 증가하였다($P < 0.05$).

간 내의 GSSG의 경우 ED군보다 ND군과 천연물 투여군에서 높은 경향을 나타냈으나, 단순히 GSSG의 양적인 변화를 가지고 효과를 판단하기는 어려우므로 환원형과 산화형 glutathione의 비를 구하였다. GSH/GSSG를 보면 ED군이 ND군보다 34% 감소하여 에탄올의 공급으로 환원형 glutathione이 상당 부분 산화형으로 전환되었음을 알 수 있었다.

천연물 투여군에 있어 ED군보다 환원형과 산화형 glutathione의 비율이 증가하였으며, 특히 포도씨와 포공영 투여군에서 통계적으로 유의성 있게 증가하였다($P < 0.05$).

간 내의 항산화 효소들의 활성

간에서의 glutathione 포함반응을 촉매하는 GR의 활성도는

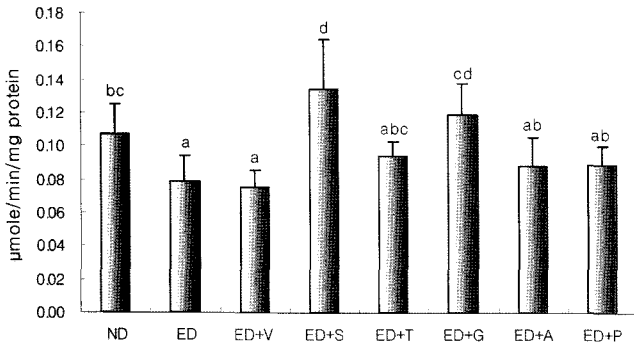


Fig. 9 – Effect of herbal extracts on hepatic GR activity in ethanol-administered rats. Values are mean±S.D. Letters with different superscripts in a column are significantly different ($p < 0.05$) among the groups by Duncan's multiple range test. ND: normal diet, ED: ethanol diet, V: *Vitis vinifera*, S: *Schisandra chinensis*, T: *Taraxacum officinale*, G: *Gardenia jasminoides*, A: *Angelica acutiloba*, P: *Paeonia japonica*.

Fig. 9와 같다.

에탄올만을 공급받은 ED군이 ND군보다 활성이 낮았으며 천연물들의 투여로 만성적인 에탄올의 공급으로 낮아져 있는 GR의 활성이 증가하는 경향을 보였다. 특히 오미자와 치자 단독군에서 유의적인 증가를 보였다($P < 0.05$).

H_2O_2 가 세포막을 손상하기 전에 이를 처리하는 GPx의 활성도에 있어서는 ED군이 ND군에 비해 유의성 있게 감소하였다 ($P < 0.05$, Fig. 10). ED군에 비해 오미자, 치자, 백작약 투여군이 증가하는 경향을 나타냈으며, 특히 백작약 투여군은 유의성 있게 증가하였다($P < 0.05$).

CAT는 ED군이 ND군에 비해 유의성 있게 감소하였다. 천연물의 투여는 CAT의 활성을 증가시켰으며 ED군에 비해 모든 천연물들 투여군에 있어 통계적으로 유의성 있게 증가하였다 ($P < 0.05$, Fig. 11).

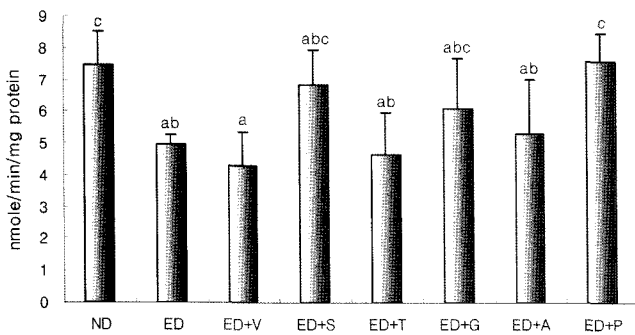


Fig. 10 – Effect of herbal extracts on hepatic GPx activity in ethanol-administered rats. Values are mean±S.D. Letters with different superscripts in a column are significantly different ($p < 0.05$) among the groups by Duncan's multiple range test. ND: normal diet, ED: ethanol diet, V: *Vitis vinifera*, S: *Schisandra chinensis*, T: *Taraxacum officinale*, G: *Gardenia jasminoides*, A: *Angelica acutiloba*, P: *Paeonia japonica*.

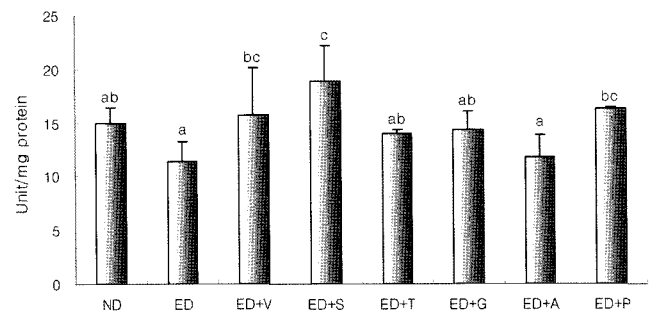


Fig. 12 – Effect of herbal extracts on hepatic SOD activity in ethanol-administered rats. Values are mean±S.D. Letters with different superscripts in a column are significantly different ($p < 0.05$) among the groups by Duncan's multiple range test. ND: normal diet, ED: ethanol diet, V: *Vitis vinifera*, S: *Schisandra chinensis*, T: *Taraxacum officinale*, G: *Gardenia jasminoides*, A: *Angelica acutiloba*, P: *Paeonia japonica*.

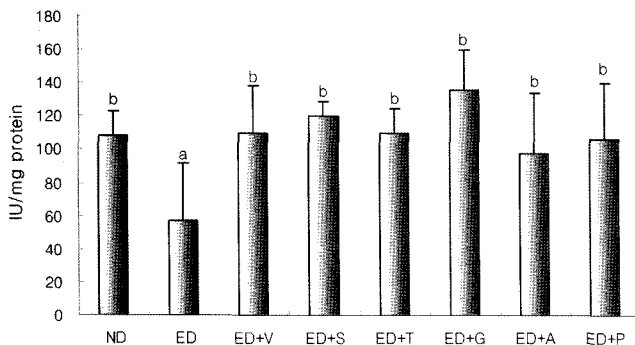


Fig. 11 – Effect of herbal extracts on hepatic CAT activity in ethanol-administered rats. Values are mean±S.D. Letters with different superscripts in a column are significantly different ($p < 0.05$) among the groups by Duncan's multiple range test. ND: normal diet, ED: ethanol diet, V: *Vitis vinifera*, S: *Schisandra chinensis*, T: *Taraxacum officinale*, G: *Gardenia jasminoides*, A: *Angelica acutiloba*, P: *Paeonia japonica*.

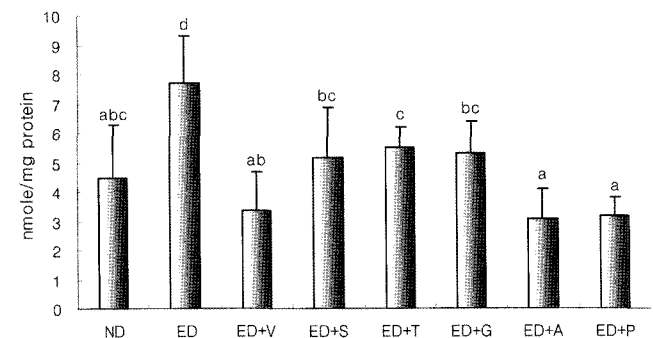


Fig. 13 – Effect of herbal extracts on hepatic LPO level in ethanol-administered rats. Values are mean±S.D. Letters with different superscripts in a column are significantly different ($p < 0.05$) among the groups by Duncan's multiple range test. ND: normal diet, ED: ethanol diet, V: *Vitis vinifera*, S: *Schisandra chinensis*, T: *Taraxacum officinale*, G: *Gardenia jasminoides*, A: *Angelica acutiloba*, P: *Paeonia japonica*.

SOD의 경우 ED군이 ND군에 비해 유의성 있게 낮았으며, 천연물 투여시 에탄올로 인해 낮아진 SOD의 활성이 증가되었다(Fig. 12). 특히 포도씨, 오미자, 백작약에서 통계적으로 유의성 있게 증가하였다.

간 내의 지질과산화물의 생성량

만성적인 에탄올의 공급으로 ND군에 비해 ED군에서 지질과산화물의 양이 약 72% 증가하였다(Fig. 13). 또한, 에탄올 투여로 유발된 지질과산화물의 증가는 모든 천연물들의 투여로 인해 통계적으로 유의성 있게 감소하였다.

고 찰

본 실험에서는 만성적인 알코올 식이 섭취로 흰 쥐에게 지방간과 간독성을 유도하면서, 동시에 지방간에 대한 여러 가지 천연물 추출물의 항산화제와 에탄올 산화제의 작용 기전을 알아 보았다.

위점막과 간에서 측정된 ADH, ALDH의 경우 에탄올의 투여로 정상군보다 활성이 증가하는 경향을 보였으며, 천연물 투여로 인해 통계적으로 유의성 있게 증가하거나 감소하지는 않았다. ADH와 ALDH의 활성 변화가 뚜렷하지 않은 것으로 보아서 에탄올을 무독화하는 과정에서 다른 해독 관련 효소가 영향을 미쳤을 것으로 여겨진다.

일반적으로 간장에서 일어나는 해독작용은 간세포의 smooth endoplasmic reticulum에 존재하는 산화효소계에 의하여 무독 또는 불활성화되어 체외로 배출되는 phase I 반응과 포합반응으로 이루어지는 phase II 반응으로 나눌 수 있다.

Phase I 효소 중 에탄올이 대표적인 inducer로 작용하는 P450 2E1의 활성은 에탄올의 투여로 증가하였으며, 천연물들의 투여로 더욱 증가하였다.

이는 만성적인 에탄올 섭취자에서 에탄올 대사가 증가하는 것은 ADH가 아닌 MEOS를 포함한 다른 알코올 대사 효소 활성의 증가에 의한 것이라는 보고²⁴⁾와 일치하였다.

Phase II 반응은 phase I 반응을 거친 약물이나 내인성 및 외인성 물질에 GSH나 glucuronic acid 또는 sulfate를 결합시키는 과정으로서 이 반응의 촉매 효소로서 GST, PST, UDP-GT 등이 있다. GST는 에탄올 유도로 생성된 free radicals과 GSH의 결합을 촉매하는 생체내 항산화 효소이다.²⁵⁾

만성적인 에탄올 공급은 GST 활성을 저해하여 해독기능을 저하시켰으나, 대부분의 천연물 투여군은 저하된 GST의 활성을 증가시켜 에탄올의 공급으로 유도되는 간독성을 완화시켰다.²⁶⁾

GST 이외의 Phase II 대사 효소인 PST는 sulfation을 촉매하는 효소이며, UDP-GT는 glucuronidation을 촉매한다.²⁶⁾

PST와 UDP-GT의 경우 ED군에서 체내로 들어온 에탄올을

대사시키기 위하여 그 활성이 증가한 경향을 나타낸 것으로 사료되며, 천연물 투여군에서는 PST의 경우 통계적으로 유의성을 보이지 않았지만 증가하는 경향을 보였고, UDP-GT의 경우 낮아졌다. 이러한 경향은 GST, PST, UDP-GT 등 Phase II에 관련된 대사 효소들이 간에서 서로 상보적인 역할을 담당하고 있음을 의미한다. 이는 아세트아미노펜으로 간독성을 유도한 mice에서 포도씨 추출물 중 류코시아니딘 성분을 투여함으로써 GST와 PST의 활성은 증가하였으나, UDP-GT의 활성은 감소했다는 Jung²⁷⁾ 등의 연구 보고와 일치하였다.

에탄올은 미토콘드리아에서 주로 free radicals을 형성시켜서 특이적인 독성을 보이며 이 부위에 저장된 GSH의 고갈은 에탄올 독성에 의한 세포의 생존 능력을 감소시킬 수 있다.²⁴⁾

Rosenblum²⁸⁾은 전체 식이 칼로리 중 36%가 에탄올로 이루어진 액체식을 공급시켰을 때 쥐 고환에서 지질과산화물 증가와 함께 GSH 함량이 감소되었다고 보고하였다. 에탄올과 GSH의 상호반응은 acetaldehyde와 GSH의 직접적 반응 혹은 GSH의 합성전구체인 cysteine이나 lysine과의 간접적 결합 그리고 에탄올 산화 생성물인 지질과산화물과의 반응에 의해서 GSH 함량이 감소된다.^{24,29)} 본 실험에서도 에탄올을 단독 투여한 ED군에서 GSH의 양이 감소하였으나 천연물 투여로 인해 증가하였다.

GR은 glutathione peroxidase에 의해 생성된 산화형 GSSG를 NADPH를 사용하여 환원형 GSH으로 환원시키는 역할을 담당한다.³⁰⁾ 에탄올을 단독 투여한 ED군은 ND군에 비해 활성이 낮았으며, 대부분의 천연물 투여군에서 높은 활성을 나타냈다. 이는 xenobiotics와 포합반응을 하는 GSH와의 양적인 결과와 일치함으로써 에탄올의 투여로 GR의 활성이 낮아진 반면, 천연물 투여군에서 활성이 높아져 간독성을 완화시켰다고 사료된다.

에탄올 섭취가 산소라디칼 생성과 관련된 기전으로는, 과량의 에탄올이 산화되는 과정에서 마이크로솜 분획의 cytochrome P-450 mixed function oxidase(MFO)체계, 특히 cytochrome P450 2E1이 가동되는 과정^{24,31)}과 에탄올 대사과정에서 과량의 산소라디칼이 생성되어 조직 내 산화 스트레스가 증가되면 세포막의 주 구성성분인 불포화지방산의 과산화가 일어나고 그에 따른 심근 조직의 산화적 손상이 야기되어 생체막의 손상을 초래하게 될 것이라는 두 가지 과정이 있다.³²⁾

에탄올 대사과정에서 발생하는 hydrogen peroxide는 그 자체가 세포독성의 원인이 되고 강력한 hydroxyl radical원으로 제공되는데 이 hydrogen peroxide의 해독이 GPx와 CAT에 의해 이루어지며, hydrogen peroxide에 대한 catalase의 Km은 1 mM이고 GPx의 Km은 약 1 μM 정도이므로 과량의 hydrogen peroxide이 발생했을 경우, GPx보다 CAT가 더 유리하게 작용한다.³³⁾

또한 H₂O₂를 O₂로 만드는 이차항산화 효소인 GPx 활성도는 다른 효소에 비해 에탄올에 민감한 반응을 보이는 것으로 보고되고 있는데 쥐에게 체중 1 kg당 5g의 에탄올을 급여한 군과 5%

에탄올 액체식이를 만성적으로 공급한 모든 군에서 혈청내 GPx 활성이 감소되었다고 보고하였다.³⁴⁾

본 실험에서는 에탄올의 공급으로 낮아진 ED군의 GPx와 CAT의 활성이 천연물들의 투여로 높아진 것을 알 수 있었고, 특히 CAT의 활성에 더 효과적인 것을 알 수 있었다. 천연물 투여군의 GPx의 활성이 높게 나타나는 것은 알코올의 산화로 증가되는 산화물들을 환원시키기 위한 생리작용에 의한 것으로 판단된다.

SOD는 metalloenzyme로서 O₂를 H₂O₂로 전환시켜 에탄올 대사시 생성되는 oxygen radical의 축적을 막는다.³⁵⁾

본 실험에서 지질과산화물 함량이 높은 투여군에서 낮은 활성을 보인 것은 에탄올 액체 식이를 섭취시켰을 때 시간이 경과함에 따라 생성된 O₂ 대사에 SOD가 소모되어 그 활성이 저하되었다는 보고와 일치하였다.³⁶⁾

에탄올 섭취에 의한 지질과산화반응의 유도는 에탄올의 섭취 방법이나 농도, 스트레스 등 많은 변수들이 작용하여 나타나며³⁷⁾ 신체 내 산화적 스트레스로 인한 radical 생성의 증가 및 항산화적 방어능력의 감소로 인해 일어난다.^{38,39)}

본 실험에서도 에탄올의 장기 투여는 지질과산화물의 생성을 초래하였으며, 천연물 투여시 생성된 지질과산화물을 각종 효소계 및 생리활성 물질 생성계를 활성화하여 효과적으로 제거함을 알 수 있었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때, 본 실험에서 사용한 천연물들은 사람에게 있어서의 알코올성 간질환과 가장 유사한 동물 모델인 Lieber-DeCarli liquid diet 실험계에서 만성적인 알코올 섭취 후, 당귀는 에탄올 대사 효소계의 활성에 의해, 작약은 에탄올 대사 효소계의 활성증가, phase I, II 대사 효소계의 활성증가, 항산화계 효소의 활성에 의해 간을 보호하였다. 포공영은 에탄올 대사 효소계의 활성증가와 phase II 대사 효소계의 활성증가에 의해 간을 보호하였으며 치자는 phase II 대사 효소계의 활성과 항산화계 효소 활성에 의해, 오미자와 포도씨는 항산화계 활성에 의해 간을 보호하는 것으로 사료된다.

문 헌

- 1) Lieber, C. S. : Alcohol and the liver: 1994 update. *Gastroenterology* **106**, 1085 (1994).
- 2) Sherlock, S. : Disease of the Liver and Biliary System. *Oxford, Blackwell* **8th**, 370 (1993).
- 3) Julkunen, R. J. : First pass metabolism of ethanol-a gastrointestinal barrier against the systemic toxicity of ethanol. *Life Sci.* **37**, 576 (1985).
- 4) Caballeria, J. and Freezza, M. : Gastric origin of first pass metabolism of ethanol in humans; Effect of gastectomy. *Gastroenterology* **97**, 1205 (1989).
- 5) Nordmann, R., Ribiere, C. and Rouach, H. : Implication of free

- radical mechanisms in ethanol-induced cellular injury. *Free Rad. Bio. Med.* **12**, 219 (1992).
- 6) Ribiere, C., Hininger, I., Rouach, H. and Nordmann, R. : Effects of chronic ethanol administration on free radical defense in rat myocardium. *Biochem. Pharmacol.* **44**, 1495 (1992).
- 7) Lin, K. J., Chen, J. C., Tsauer, W., Lin, C. C., Lin, J. G. and Tsai, C. C. : Prophylactic effect of four prescriptions of traditional Chinese medicine on alpha-naphthylisothiocyanate and carbon tetrachloride induced toxicity in rats. *Acta. Pharmacol. Sin.* **22**(12), 1159 (2001).
- 8) Schlorff, E. C., Husain, K. and Somani, S. M. : Dose- and time-dependent effects of ethanol on plasma antioxidant system in rat. *Alcohol.* **17**(2), 97 (1999).
- 9) Kim, M. K., Lee, Y. H. and Choung, S. Y. : Effects of herbal extracts on serum and liver lipid levels in chronic ethanol administered rats. *Yakhak Hoeji* **49**, 477 (2006).
- 10) Lieber, C. S. and DeCarli, L. M. : The feeding of alcohol in liquid diets: two decades of applications and 1982 update. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* **6**, 523 (1982).
- 11) Bergmyer, H. U. : Methods of enzymatic analysis. *Academic press*, New York, 28 (1974).
- 12) Koivula, T. and Lindros, K. O. : Effects of long-term ethanol treatment on aldehyde and alcohol dehydrogenase activities in rat liver. *Biochem. Pharmacol.* **24**, 1937 (1975).
- 13) Koop, D. R. : Hydroxylation of p-nitrophenol by rabbit ethanol-inducible cytochrome P-450 isozyme 3a. *Molecular Pharmacology* **29**, 339 (1986).
- 14) Habig, W., Pabst, M. and Jakoby, W. : Glutathione S-transferase; The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal Biological Chemistry* **249**, 7130 (1974).
- 15) Sekura, R. D. and Jakoby, W. B. : Phenol sulfotransferases. *J. Biol. Chem.* **254**(13), 5658 (1979).
- 16) Isselbacher, K. J., Chrabas, M. F. and Quinn, R. C. : The solubilization and partial purification of a glucuronyl transferase from rabbit liver microsomes. *J. Biol. Chem.* **237**, 3033 (1962).
- 17) Sedlak, J. and Lindsay, R. H. : Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl group in tissue with Ellman's reagent. *Analytical of Biochemistry* **25**, 192 (1968).
- 18) Carlberg, I. and Mannervik, B. : Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* **250**(14), 5475 (1975).
- 19) Paglia, D. E. and Valentine, W. N. : Glutathione peroxidase and selenoprotein activity in various tissue. *J. Biol. Chem.* **145**, 233 (1967).
- 20) Aebi, H. : Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* **105**, 121 (1984).
- 21) Marklund, S. and Marklund, G. : Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.*

- 47, 469 (1974).
- 22) Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. : Assay for lipid peroxides in animals and tissue by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry* **95**, 351 (1979).
- 23) Bradford, M. M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248 (1976).
- 24) Lieber, C. S. and DeCarli, L. M. : Ethanol oxidation by hepatic microsomes adaptive increase after feeding. *Science* **162**, 917 (1968).
- 25) Pierson, J. L. and Mitchell, M. C. : Increased hepatic efflux of glutathione after chronic ethanol feeding. *Biochem. Pharmacol.* **35**, 1533 (1986).
- 26) Khan, S. G., Katiyar, S. K., Agarwal, R. and Mukhtar, H. : Enhancement of antioxidant and phase II enzymes by oral feeding of green tea polyphenols in drinking water to SKH-1 hairless mice: possible role in cancer chemoprevention. *Cancer Res.* **52**, 4050 (1992).
- 27) Jung, S. Y. : Effects of Leucocyanidin on acetaminophen-induced hepatotoxicity and the mechanism. Master's thesis (2000).
- 28) Rosenblum, E. R., Gavaler, J. S. and Van Thiel, D. H. : Vitamin A at pharmacologic doses ameliorates the membrane lipid peroxidation injury and testicular atrophy that occurs with chronic alcohol feeding in rats. *Alcohol. and Alcoholism.* **22**, 241 (1987).
- 29) Videlia, L. A., Femanded, V., Valenzuela, A. and Ugarte, G. : The effects of chronic alcohol on glutathione concentration in isolated hepatocytes. *Biochem. J.* **188**, 549 (1980).
- 30) Recknagel, R. O., Glende, E. A. and Hruszkewycz, A. M. : Chemical mechanisms in carbon tetrachloride toxicity in "Free radicals in biology". Pryor, W. A. (ed.), Academic Press, New York, p. 97 (1977).
- 31) Reitz, R. C. : A possible mechanism for the peroxidation of lipids due to chronic ethanol ingestion. *Biochem. Biophys. Acta.* **380**, 145 (1975).
- 32) Comporti, M. : Lipid peroxidation : An overview. In : Poli, G., albino, E., Dianzani, M. U., ets. Free Radicals : From Basic Science to Medicine (Molecular and cell Biology updates). Birkhauser Verlag, Basel, Switzerland, pp. 65 (1993).
- 33) Misra, H. P. : Generation of superoxide free radicals during the autoxidation of thiols. *J. Biol. Chem.* **249**, 2151 (1974).
- 34) Aykac, G., Uauai, M., Yalcin, S., Kocak-toker, N., Suvas, A. and Oz, H. : The effect of chronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats. *Toxicology* **36**, 70 (1985).
- 35) Schisler, N. J. and Singh, S. M. : Effect of ethanol *in vivo* on enzymes which detoxify oxygen free radicals. *Free Rad. Biol. Med.* **7**, 117 (1989).
- 36) Nadkarni, G. D. and D'Souza, N. B. : Antioxidant and free radical scavenging enzymes in chronically ethanol-consuming rats: controversy over hepatic lipid peroxidation. *Drug Alcohol. Depend* **22**, 161 (1988).
- 37) Cedirbaum, A. I. : Role of lipid peroxidation and oxidative stress in alcohol toxicity. *Free Rad. Biol. and Med.* **7**, 537 (1989).
- 38) Howard, J. A. : Absolute rate contents for reaction of oxygen radicals. *Adv. Free Radical Chem.* **4**, 49 (1972).
- 39) Thurman, R. G., Bradford, B., Iimuro, Y., Knecht, K., Connor, H., Adachi, Y., Wall, C., Arteel, G., Releigh, J., Forman, D. and Mason, R. P. : Role of kupffer cells, endotoxin and free radicals in hepatotoxicity due to prolonged alcohol consumption : studies in female and male rate. *J. Nutr.* **127**, 903 (1997).