

고콜레스테롤 식이로 유발된 동맥경화병태흰쥐의 혈관조직내 지질과산화 및 산화스트레스에 대한 삼칠근의 영향

김종구 · 박선동¹ · 박원환*

동국대학교 한의과대학 진단학교실 및 심혈관계질환 천연물연구개발센터, 1: 동국대학교 한의과대학 방제학교실

Influence of *Panax notoginseng* on the Atherosclerosis Induced by High-cholesterol Feed in Rats

Jong Goo Kim, Sun Dong Park¹, Won Hwan Park*

Department of Diagnostics, College of Korean Medicine & Cardiovascular Medical Research Center, Dongguk University,
1: Department of Prescription, College of Korean Medicine, Dongguk University

Panax notoginseng exhibit several beneficial effects including anti-oxidant effects. *P. notoginseng* is used as a therapeutic agent to stop haemorrhages and a tonic to promoted health in Korean and Chinese medicine. The pharmacokinetic profiles of the main *P. notoginseng* are still not accurately investigated. The exact mechanism of the anti-oxidant activities of water extracts of *P. notoginseng*, however, has not been determined. In present study, I examined the effects of water extracts of *P. notoginseng* on high cholesterol diet atherosclerosis-induced rats in serum and abdominal aorta. A total of 3-week old 9 male rats of Sprague-Dawley were divided into 3 groups and fed with the basal diet (normal group), high cholesterol diet (atherosclerosis induced group) for 8 weeks, high cholesterol diet supplemented with water extracts of *P. notoginseng* (*P. notoginseng* group) for 4 weeks. And rats were sacrificed, serum lipid level, abdominal aortic anti-oxidant activities and lipid peroxide were measured. These results indicated that serum total cholesterol, LDL-cholesterol, triglycerides concentration significantly lowered in *P. notoginseng* group than high cholesterol diet group. But HDL-cholesterol concentration significantly higher in *P. notoginseng* group than high cholesterol feed group. And abdominal aortic xanthine oxidase activity was significantly reduced by dietary water extracts of *P. notoginseng* supplementation ($p < 0.05$). Also abdominal aortic superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase activities were significantly increased by dietary water extracts of *P. notoginseng* supplementation ($p < 0.05$). Especially, abdominal aortic level of lipid peroxide tended to increase in high cholesterol feed group, but water extract of *P. notoginseng* intake reduced the value ($p < 0.05$).

Key words : *Panax notoginseng*, anti-oxidant, high cholesterol diet, atherosclerosis

서 론

심혈관계질환의 대표적인 동맥경화증은 동맥혈관 자체의 약화나 감염으로 인한 손상, hemodynamic stress에 의한 영향 및 lipoprotein으로 인한 cholesterol의 축적 등 여러 내인적, 외인적 요인으로 발생되는 것으로 알려져 있다¹⁾.

동맥경화의 발생 원인으로는 동맥벽에 가해지는 손상으로

여겨진다. 동맥내막에 물리적 또는 생물학적 손상이 반복적으로 가해지면 내막층이 갈라지거나 얇아져서 혈액속의 monocytes, lymphocytes 등이 내막의 틈으로 들어가게 된다. 조직내로 들어간 이 세포들은 지방분을 잡아먹는 phagocytosis로 세포질속에 많은 기름기의 함유와 증식인자의 분비로 smooth muscle cells와 결합조직세포의 증식이 일어나 동맥벽이 두꺼워진다. 이런 동맥벽의 변화는 특히 혈류의 자극을 많이 받는 동맥의 굴곡부위 또는 분기하는 부위에 주로 생기게 되어 혈류장애를 일으키게 된다. 또한 동맥벽의 손상과 변성을 일으키는 복합적인 요인들도 있지만 고혈압, 고지혈증, 흡연은 독립적으로 동맥경화를 야기시

* 교신저자 : 박원환, 경북 경주시 석장동 707, 동국대학교 한의과대학
· E-mail : diapwh@dongguk.ac.kr, · Tel : 054-770-2373
· 접수 : 2006/07/20 · 수정 : 2006/08/29 · 채택 : 2006/09/21

킨다. 특히 동물성 지방의 과다섭취로 인한 혈액속의 cholesterol 수치가 높은 hyperlipidemia인 경우, 동맥내막과 근육층 사이에 자리잡은 phagocytes는 더 많은 기름기를 세포질속에 함유하게 되어, 동맥벽에 지방 축적이 형성되게된다^{2,3)}.

고콜레스테롤혈증이나 당뇨병에서는 LDL이 산화되어 동맥 혈관벽의 내피세포를 손상시키고, 혈소판 등이 내벽에 들러붙어 동맥경화증을 유발시킨다는 free radical과 lipid peroxide에 의한 조직의 상해설이 주목되고 있으며, 이러한 산화적 스트레스의 증가에 의한 조직손상이 만성합병증을 유발시키는 주된 원인으로 여겨지고 있다. 세포내 산화 스트레스의 주원인인 활성산소는 주로 세포내 과립 및 세포질의 액상부분에서 생성된다. 따라서 세포내 mitochondria에서 oxygen free radical의 연쇄적인 생성은 불안정한 상태의 산소가 세포의 변형과 손상을 야기시켜 조직을 파괴시켜며 산소 이용능력의 효율성이 떨어진다. 이러한 lipid peroxidation은 oxygen free radical이 체내 단백질의 SH기나 DNA와 화학결합의 절단이나 가교결합의 형성 등으로 생체구성 분자의 구조적 변화를 일으킨다⁴⁾. 또한 세포막의 불포화 지방산과 일련의 연쇄반응을 통하여 lipid peroxidation 유발을 촉진하고, lipid peroxidation의 최종 산물인 malondialdehyde의 함량이 증가되어 세포에 미치는 산화적 손상이 생리적 기능을 저하시키므로 간질환 등의 여러 가지 질병을 초래하며 노화와 유전적 장애의 원인이 된다⁵⁾. 또한, Mantha등⁶⁾과 Del Boccio⁷⁾의 연구에서는 고지방식이나 고콜레스테롤 식이와 같은 고열량 식이 지방이나 cholesterol 섭취는 체내 조직의 산화적 손상을 초래한다고 보고되어있다.

최근의 보고에 의하면 고콜레스테롤 상태에서 oxidative stress가 촉진된다는 여러 보고⁸⁾에서 다양한 항산화 방어기전의 활성 변화를 관찰하였다. Bok 등⁹⁾은 고콜레스테롤 상태에서는 superoxide dismutase, glutathione peroxidase 및 catalase 등과 같은 항산화계 효소의 양은 감소되고 malondialdehyde 함량이 증가되는 것을 입증하였으며, 고콜레스테롤 상태에서 oxidative stress를 방어하기에는 항산화 효소의 양과 활성이 불충분하고 항산화 방어계의 불균형이 중요한 병인으로 작용하며 특히 심혈관질환 유발과 관련있다는 보고도 있다⁹⁾.

*Panax notoginseng*은 만성간질환의 치료와 출혈성 질환에 다용되며, 혈액순환제 및 강장제로 사용되어지고 있다. 또한 *P. notoginseng*의 항산화 작용에 대한 보고로는 *P. notoginseng* 열수추출물의 농도 의존적인 방식으로 chronic ethanol-induced hepatotoxicity 실험쥐의 간조직의 지질과산화물 억제한다는 보고¹⁰⁾가 있으며, 최근에 *P. notoginseng*의 생물학적, 약물학적인 특성으로 향상된 혈액순환¹¹⁾, 증가된 관상혈류량¹²⁾등이 나타나 *P. notoginseng*의 항산화 효능의 증거 자료로 뒷받침되고 있다. 하지만, *P. notoginseng*의 항산화 효능에 대한 정확한 기작에 대해서는 더 많은 연구가 요구되고 있다.

이 연구에서는 in vitro상에서의 농도별 *P. notoginseng* 열수추출물의 항산화 효능에 대해서 알아보았으며, In vivo상에서는 실험쥐를 일반 사료를 먹인 정상군, 고콜레스테롤식을 섭취시켜 동맥경화를 유발시킨 고콜레스테롤 식이 섭취군, 고콜레스테

롤식을 섭취시킨 후 *P. notoginseng* 열수추출 농축액을 투여한 *P. notoginseng* 투여군으로 나누어서 혈청내 지질함량과 복부 대동맥 혈관조직내의 lipid peroxides 함량 및 oxidative stress 관련 실험을 실시하여 *P. notoginseng* 열수추출물이 고콜레스테롤 식이로 유발된 동맥경화에 미치는 영향에 대하여 알아보았다.

재료 및 방법

1. 시약 및 기기

혈청내 지질함량 측정에는 (주)영동제약(kit)의 제품을, cholesterol은 덕산사(Korea), L-glutahtione reduced, glutathione reductase, β -Nicotinamide adenin dinucleotide phosphate (NADPH), Xanthine, Xanthine Oxidase 등은 Sigma 사(USA)의 제품을 사용하였으며 그 외 일반 시약들은 특급품을 사용하였다. 실험기기는 homogenizer, UV spectrophotometer, centrifuge, Rotary vaccum evaporator, incubator 및 실험실에서 사용하는 일반 기기를 사용하였다.

2. *Panax notoginseng*의 제조

삼철근(*Panax notoginseng*) 87.5 g을 1 l의 물에 넣고 가열 맨틀에서 3시간 진탕 후 1 mm-pore-size filter를 통해 감압여과한 후, 불용성 물질들은 제거하였다. 상층액은 Rotary vaccum evaporator를 이용하여 약 50% 정도로 감압농축하였다.

또한, in vitro에서 *P. notoginseng*의 항산화 측정용으로는 *P. notoginseng* 농축액 (100 ml)을 freeze drying하여 *P. notoginseng* 동결건조분말을 얻었다 (수율 15%).

3. 실험동물

실험동물은 체중 3주령 50~70 g의 외견상 건강한 Sprague-Dawley 종 웅성 흰쥐를 효창 사이언스(Korea)로부터 구입 후, 사육실(온도 25℃, 상대습도 60%)에 1주일 동안 적응시켜 실험에 사용하였다. 각 실험군은 정상 대조군(normal), 동맥경화 유발을 위한 고콜레스테롤 식이 투여군(cholesterol), 동맥경화 유발 후 *P. notoginseng* 열수추출 농축액 투여군(*P. notoginseng*)으로 나누었으며, 각 3마리씩 분리 수용하였다.

실험기간동안 물과 사료(효창 사이언스, Korea)의 양은 제한 없이 공급하였다. Cholesterol 식이는 olive oil과 4:1 비율로 제조한 혼합액을 8주간 투여하여 동맥경화를 유도하였다.

P. notoginseng 열수추출 농축액 투여군은 고콜레스테롤 식이 섭취군과 같은 방법으로 동맥경화를 유도한 후, *P. notoginseng* 열수추출 농축액과 물을 3:7 비율로 희석하여 4주간 투여하였다. 모든 실험군은 처치 24시간 전부터 물만 공급하고 금식시켰다. 동물의 처치는 ether 마취 하에 개복한 후 abdominal aorta로부터 채혈하여 실험사 시키고 일정량의 복부 대동맥 혈관조직을 적출하였다. 적출한 복부 대동맥 혈관조직은 생리식염수로 씻은 후 여과지로 압박하여 장기내에 남아있는 생리식염수를 제거한 다음 무게를 측정하여 antioxidation 및 oxidative stress 관련 실험 측정용 시료로 사용하기 위해 -80℃ 냉동보관 하였다. 채취한

혈액은 실온에서 30분간 방치한 다음 3,000×rpm에서 15분간 원심분리한 혈청을 지질 함량 측정용 시료로 사용하였다.

4. 효소시료의 조제

복부 대동맥 혈관조직의 일정량을 4배량의 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4) 용액을 넣고 homogenizer를 이용하여 마쇄 균질액을 제조하였다. 마쇄 균질액을 600×g에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄부분을 제거한 후, 상층액을 10,000×g에서 20분간 원심분리한 상층액을 -80℃ 냉동보관 하였다. 복부 대동맥 혈관조직 마쇄 균질액은 lipid peroxidation 및 xanthine oxidase, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase 활성도 측정용 시료로 사용하였다.

5. In vitro에서 삼철근 열수추출물의 항산화 활성 측정

1) DPPH radical 소거효과

DPPH (2,2-Diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical의 소거 활성은 Blois (1958)¹³⁾의 방법을 수정하여 측정하였다. 농도별(0.01, 0.05, 0.1, 0.5 그리고 1%)에 따라 증류수에 녹인 *P. notoginseng* 동결건조분말 2 ml에 0.2 mM DPPH 용액 1 ml를 첨가한다. 10초간 혼합 후 30분간 실온에서 반응시킨다. 전자공여능(EDA)은 시료 첨가군과 무첨가군(대조군)의 흡광도 차이를 백분율로 나타낸다. 대조군은 시료대신 증류수로 측정하고, positive control로 α -tocopherol (1%)를 이용하여 비교한다. 파장 517 nm에서 흡광도 변화를 측정한다.

2) Hydrogen peroxide 소거효과

Hydrogen peroxide 소거능은 Duh (1999)¹⁴⁾ 등의 방법에 준하여 측정하였다. phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4) 으로 제조한 1 mM H₂O₂ 용액 0.6 ml와 시료 용액 1 ml를 30℃에서 10분간 반응 시킨 뒤 230 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 Blank는 H₂O₂ 없이 PBS 용액만으로, 대조군은 시료 용액없이 H₂O₂-PBS 용액으로 사용하였다.

6. 복부 대동맥 혈관조직내 지질과산화 함량 측정

복부 대동맥 혈관조직내 lipid peroxidation 함량은 thiobarbituric acid (TBA)와 반응하여 생성된 TBA-reacting substances의 함량으로 Ohkawa (1979)¹⁵⁾ 방법을 응용하여 측정하였다. 각 실험군의 복부 대동맥 혈관조직 1 g과 0.05 M phosphate butter (pH 7.4) 5 ml를 반씩 나누어 넣어 마쇄시킨다. 0.5 ml의 마쇄 균질액과 7% sodium dodecyl sulfate (SDS) 1 ml를 혼합시킨 후 37℃ water bath에서 30분간 반응시킨다. 이 반응물에 0.67% thiobarbituric acid (TBA)와 acetic acid를 동량으로 혼합한 2 ml를 넣고 잘 섞은 후, 98℃ water bath에 50분간 가열한 후 급냉시켜 n-butanol 5 ml를 넣고 centrifuge 3,000 × rpm에서 10분간 원심분리한다. 이 후 TBA 반응물이 존재하는 n-butanol층을 취하여 535 nm에서 흡광도를 측정하였다. MDA 함량은 조직 g당 nmole로 표시하였다

7. 복부 대동맥 혈관조직내 산화 스트레스 관련 실험

1) 유해 활성산소 생성계 효소 활성도에 미치는 영향

(1) Xanthine Oxidase 활성의 저해효과

복부 대동맥 혈관조직내 Xanthine Oxidase 활성은 Stirpe and Corte (1969)¹⁶⁾의 방법을 수정하여 측정하였다. 0.1 M potassium phosphate buffer에 2 mM xanthine을 녹인 1 ml과 Xanthine Oxidase 0.1 ml, 복부 대동맥 혈관조직 마쇄 균질액 0.1 ml를 넣고 37℃에서 5분간 반응시킨다. 대조군으로는 시료 대신 증류수를 동량 넣는다. 20% trichloroacetic acid (TCA) 1 ml를 가하여 반응을 종료시킨다. 반응액 중에 생성된 uric acid를 파장 292 nm에서 흡광도를 측정한다. XO 활성도 단위는 효소 반응액 중에 함유된 단백질 mg이 1분간 반응하여 xanthine으로부터 생성된 uric acid의 양을 nmole로 표시하였다.

2) 유해 활성산소 제거계 효소 활성도에 미치는 영향

(1) Superoxide Dismutase 활성

복부 대동맥 혈관조직내 Superoxide Dismutase 활성은 McCord와 Fridovich (1969)¹⁷⁾의 방법을 수정하여 측정하였다. 0.2 M sodium phosphate buffer (pH 7.4) 672 μ l, 1 mM xanthine 100 μ l, 1% Sodium Deoxychlorate (DOC) 30 μ l, 1.5 mM Potassium Cyanide (KCN) 30 μ l, 0.2 mM cytochrome C 150 μ l를 넣은 혼합물에 복부 대동맥 혈관조직 마쇄 균질액 5 μ l를 넣고 Xanthine Oxidase 10 μ l를 넣어 혼합한 후 파장 550 nm에서의 흡광도 변화를 1분 30초동안 측정한다. SOD 활성도 단위는 효소 반응액 중에 함유된 단백질 mg이 1분 30초 동안 반응하여 O₂가 한 개의 전자를 받아들여 불안전 산화된 O₂를 H₂O₂로 전환된 양을 의미하며, specific activity는 1 mg protein에 해당하는 enzyme unit로 환산하여 나타내었다.

(2) Catalase 활성

복부 대동맥 혈관조직내 catalase 활성은 Aebi (1974)¹⁸⁾의 방법을 수정하여 측정하였다. 복부 대동맥 혈관조직 마쇄 균질액 0.01 ml를 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4) 2.89 ml와 혼합한 후, 300 mM H₂O₂ 0.1 ml을 넣어 반응을 개시한 다음 파장 240 nm에서 5분 동안 감소하는 흡광도의 양을 측정한다. Catalase 활성도 단위는 효소 반응액 중에 함유된 단백질 mg이 5분간 소실되는 H₂O₂의 양 (nmol)으로 나타내었다.

(3) Glutathione peroxidase 활성

복부 대동맥 혈관조직내 glutathione peroxidase 활성은 Lawrence (1976)¹⁹⁾의 방법을 수정하여 측정하였다. 복부 대동맥 혈관조직 마쇄 균질액 0.1 ml을 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) 2.6 ml에 가하고, 30 mM glutathione 0.1 ml, 6 mM NADPH 0.1 ml, 그리고 1 unit의 glutathione reductase를 첨가하여 혼합한 후, 25℃에서 5분간 방치한다. 여기에 7.5 mM H₂O₂ 0.1 ml를 첨가하여 반응을 개시한 후 파장 340 nm에서 2분간 감소되는 흡광도를 측정한다. GSH-Px 활성도 단위는 효소 반응액 중에 함유된 단백질 mg이 2분간 산화되는 NADPH의 양 (nmol)으로 나타내었다.

8. 통계분석

모든 실험결과는 평균±표준편차를 계산하였고, 각 실험군간

즉, 정상군, 동맥경화유발군인 고콜레스테롤 식이 섭취군, 동맥경화유발 후 *P. notoginseng* 열수추출물 농축액 투여군에 의한 효과의 유의성은 one-way analysis of variance (ANOVA)를 실시하여 검증하였고, $p < 0.05$ 수준에서 유의성이 관찰된 경우 각 실험군간의 평균값의 차이에 대한 유의성은 Duncan's multiple range test를 이용하여 $p < 0.05$ 수준에서 평가하였다.

결 과

1. *In vitro*에서 *P. notoginseng* 열수추출물 농도별 항산화 활성 측정

1) *P. notoginseng* 열수추출물 농도별에 따른 DPPH radical 소거 효과

Lipid peroxidation의 연쇄반응에 관여하는 산화성 free radical을 제거하여 antioxidase로 작용하는 물질은 free radical인 DPPH (2,2-diphenyl-2-picrylhydrazyl)를 hydrazine 형태로 환원시키는 능력을 조사함으로써 검색할 수 있다.

DPPH는 자신이 가지고 있는 흡수의 전자 때문에 517 nm에서 강한 흡수 band를 보이나 phenolic compound와 같이 수소에 전자를 제공해주는 전자공여체와 반응을 하게 되면 전자나 hydrogen radical을 받아 phenoxy radical을 생성하게 된다. 따라서 흡수 band도 사라지게 되고 안정한 분자가 된다. 또한 공여된 전자는 비가역적으로 결합하며 그 수에 비례하여 진보라색의 DPPH의 색깔은 점점 옅어지게 되고 흡광도도 감소하게 된다. *P. notoginseng* 열수추출물 농도별 free radical 소거 활성을 DPPH에 대한 electron donating ability (EDA)으로 측정하였다. *P. notoginseng* 열수추출물 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1% 농도에 대한 DPPH radical 소거효과에 대하여 파장 517 nm에서 흡광도를 측정하여 electron donating ability(EDA)를 측정하였다. *P. notoginseng* 열수추출물 농도가 0.01%일 때 33.96±3.75%, 0.05%일 때 44±3.96%, 0.1%일 때 73.3±4.57%, 0.5%일 때 86±4.46%, 1%일 때 92.66±4.87% 소거 활성을 나타내었다(Fig. 1). 한편, 천연항산화제로 널리 알려진 1% α -tocopherol (79.41% 소거율)을 positive control로 비교하였으며, Electron donating ability 수치는 다음과 같은 공식을 사용하여 산출하였다. $EDA (\%) = [100 - \{(시료\ 첨가군\ O.D / 시료\ 무첨가군\ O.D) \times 100\}]$

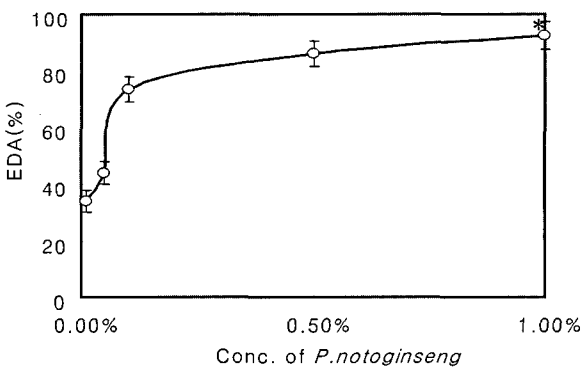


Fig. 1. Effect of various concentration of *P. notoginseng* water-extracts on DPPH radical scavenging activity. * positive control : 1% α -tocopherol = 79.41%, * key : (*) significantly different from 1% α -tocopherol

2) *P. notoginseng* 열수추출물 농도별에 따른 Hydrogen peroxide 소거효과

P. notoginseng 열수추출물 농도별 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1%에 대한 Hydrogen peroxide 소거효과에 대하여 파장 240 nm에서 흡광도를 측정하여 저해율(%)을 나타내었다.

P. notoginseng 열수추출물 농도가 0.01%일 때 27.36±3.86%, 0.05%일 때 42.9±3.57%, 0.1%일 때 57.09±4.25%, 0.5%일 때 73.65±4.19%, 1%일 때 88.51±4.28% hydrogen peroxide 저해율을 나타내었다. 저해율 수치는 다음과 같은 공식을 사용하여 산출하였다. $Inhibition (\%) = [100 - \{(시료\ 첨가군\ O.D / 시료\ 무첨가군\ O.D) \times 100\}]$ (Fig. 2).

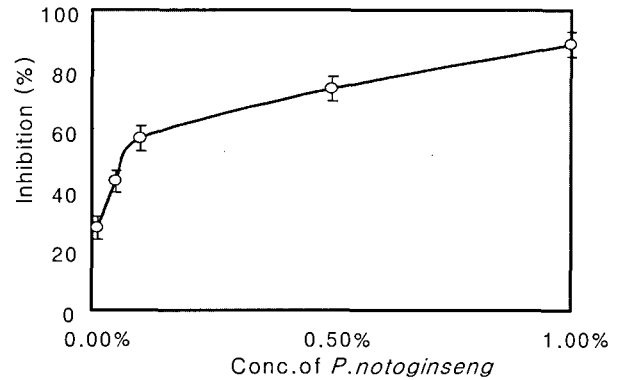


Fig. 2. Effect of various concentration of *P. notoginseng* water-extracts on Hydrogen peroxide scavenging activity.

2. 복부 대동맥 혈관조직내 지질과산화 함량 측정

1) 고콜레스테롤 식이 섭취군과 *P. notoginseng* 열수추출물 농축액 투여군이 복부 대동맥 혈관조직내 지질과산화에 미치는 영향

조직의 산화적 손상은 생체내 과잉의 free radical이 축적될 때에 일어난다. 정상적인 생리상태에서는 free radical의 제거계인 항산화 방어계와 생성계가 균형을 이루고 있으므로 free radical의 제거가 원만히 이루어진다. 그러나 질병상태에서나 oxidative stress 및 기타 여러 가지 요인에 의해 항산화 방어계와 생성계 사이에 그 균형이 깨뜨려졌을 때 free radical 생성이 촉진되고 나아가 조직은 과산화적 손상을 입게 된다.

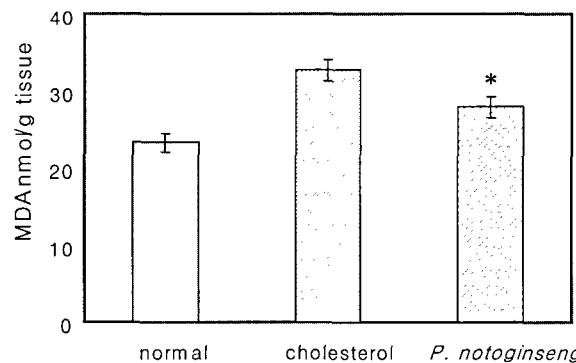


Fig. 3. Effect of high-cholesterol feed group and *P. notoginseng* water-extracts group on the level of abdominal aortic lipid peroxide in rat. * Each Values are mean ± S.E. of 3 rats, * key : (*) significantly different ($p < 0.05$) from cholesterol group.

실험군은 Sprague-Dawley 종 웅성 흰쥐 각 3마리씩 정상군, 동맥경화 유도를 위한 고콜레스테롤 식이 섭취군, 고콜레스테롤 섭취 후 *P. notoginseng* 열수추출 농축액 투여군으로 나누어 처리하였다. 각 실험군의 복부 대동맥 혈관조직을 homogenize 시켜 butanol 및 다른 화합물과의 지질과산화 반응의 이용하여 반응산물로 생성되는 지질과산화물 MDA를 추출하고 이를 파장 535 nm에서 흡광도를 측정한다. 복부 대동맥 혈관조직내 lipid peroxidation의 분해산물인 malondialdehyde (MDA) 함량은 고콜레스테롤 식이 섭취군이 32.7±1.33 nmol/g tissue, *P. notoginseng* 열수추출 농축액 투여군은 27.9±1.41 nmol/g tissue으로 고콜레스테롤 식이 섭취군보다 15% 가량 유의적인 감소 경향을 보였다(Fig. 3).

3. 복부 대동맥 혈관조직내 산화 스트레스 관련 실험

1) 유해 활성산소 생성계 효소 활성도에 미치는 영향

(1) 복부 대동맥 혈관조직내 Xanthine Oxidase 활성에 대한 고콜레스테롤 식이 섭취군과 *P. notoginseng* 열수추출 농축액 투여군의 저해효과

Xanthine Oxidase (Xanthine oxygen oxidoreductase, XO)는 체내 유리기 생성계의 비특이적인 효소로, 주로 purine체의 대사산물인 hypoxanthine을 xanthine으로 xanthine을 다시 산화시켜 uric acid를 생성하는 과정에서 유리기인 superoxide radical을 생성하는 효소이다¹⁰⁾. 실험군은 Sprague-Dawley 종 웅성 흰쥐 각 3마리씩 정상군, 동맥경화 유도를 위한 고콜레스테롤 식이 섭취군, 고콜레스테롤 섭취 후 *P. notoginseng* 열수추출 농축액 투여군으로 나누어 처리하였다. 반응액 중에 생성된 uric acid를 흡광도 292 nm에서 측정하여 XO 활성을 나타내었다. 복부 대동맥 혈관조직내 XO 활성은 고콜레스테롤 식이 섭취군(2.91±0.14 nmol/mg protein)에 비해 *P. notoginseng* 열수추출 농축액 투여군(2.23±0.2 nmol/mg protein)에서 24% 가량 유의적으로 감소하였다(Fig. 4).

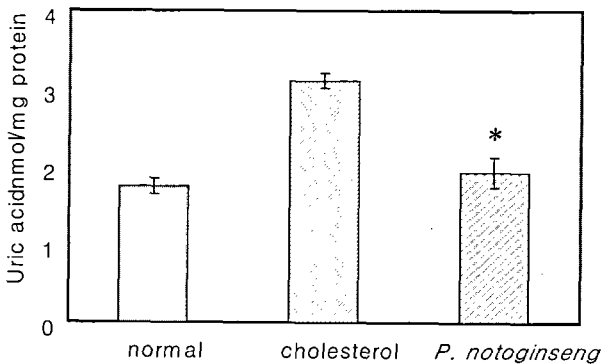


Fig. 4. Inhibitory effect of high-cholesterol feed group and *P. notoginseng* water-extracts group on the level of abdominal aortic Xanthine Oxidase activity in rat. * Each Values are mean ± S.E. of 3 rats * key : (*) significantly different (p < 0.05) from cholesterol group.

2) 유해 활성산소 제거계 효소 활성도에 미치는 영향

(1) 복부 대동맥 혈관조직내 Superoxide Dismutase 활성에 대

한 고콜레스테롤 식이 섭취군과 *P. notoginseng* 열수추출 농축액 투여군의 효과

Oxygen free radical은 불안정한 분자구조로 산소 이용능력에 효율성이 떨어지며 보다 안정된 상태를 유지하기 위해, 이 oxygen free radical이 전자를 얻기 위해 체내의 각 조직이나 기관에 무수히 침투하여 전자를 뺏아오는 과정에서 각 세포의 변형과 손상을 야기한다. Superoxide dismutase (SOD)는 2개의 superoxide radical (superoxide, O₂⁻)를 제거하여 체내 축적을 막아준다. 1개의 superoxide radical은 산화하여 전자(e⁻)가 방출되고 나머지 superoxide radical은 환원되어 과산화수소로 변화시키므로써 항산화 기능을 하는 제 1 항산화제이다. 2개의 superoxide radical이 1개의 과산화수소로 바뀌는 속도는 SOD가 있을 때 무려 1만 배 정도로 빨라지게 된다. SOD 활성 측정방법을 살펴보면, xanthine은 기질로 사용되고 cytochrome C는 O₂ 생성을 방지하는 역할을 하며, KCN은 발색액, DOC는 xanthine을 hypoxanthine으로 만드는 산화제로 사용된다. Hypoxanthine은 SOD의 활성지리에 초산화물인 O₂⁻를 반응시킬수 있도록 유도한다. 실험군은 Sprague-Dawley 종 웅성 흰쥐 각 3마리씩 정상군, 동맥경화 유도를 위한 고콜레스테롤 식이 섭취군, 고콜레스테롤 섭취 후 *P. notoginseng* 열수추출 농축액 투여군으로 나누어 처리하였다. Superoxide를 H₂O₂로 전환시키는 SOD 작용을 550 nm 파장에서 1분 30초간 scanning하여 SOD 활성을 측정하였다. 복부 대동맥 혈관조직내 SOD 활성은 고콜레스테롤 식이 섭취군(8.7±0.6 unit/mg protein)이 *P. notoginseng* 열수추출 농축액 투여군(12.1±0.7 unit/mg protein)에서는 28.1% 가량 유의적인 증가 경향을 나타내었다(Fig. 5).

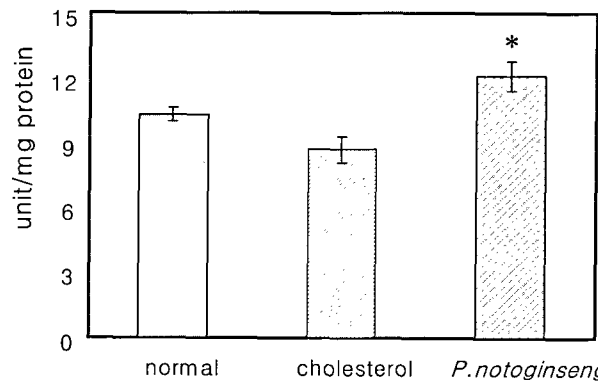


Fig. 5. Effect of high-cholesterol feed group and *P. notoginseng* water-extracts group on the level of abdominal aortic Superoxide Dismutase activity in rat. * Each Values are mean ± S.E. of 3 rats. * key : (*) significantly different (p < 0.05) from cholesterol group.

(2) 복부 대동맥 혈관조직내 Catalase 활성에 대한 고콜레스테롤 식이 섭취군과 *P. notoginseng* 열수추출 농축액 투여군의 효과

세포방어를 하는 제 2 항산화제 catalase는 H₂O₂를 물과 산소로 분해시켜 oxygen radical 생성을 제어하는 강력한 효소이다. H₂O₂를 분해하는 힘은 catalase 1분자가 1분에 500만개의 H₂O₂를 분해하는데 H₂O₂의 농도가 낮을 때에는 매우 느리게, 반대로 농도가 높을 때에는 매우 빠르게 제거한다. 제 1 항산화제

SOD와 제 2 항산화제 catalase는 서로 균형을 이루면서 상호협력한다. 이 균형이 깨져서 H₂O₂를 제거하는 catalase에 비해 H₂O₂를 산물로 만들어 내는 SOD 작용이 더 크면 세포 손상이 커져 여러 질병을 야기시킨다. 실험군은 Sprague-Dawley 종 웅성 흰쥐 각 3마리씩 정상군, 동맥경화 유도를 위한 고콜레스테롤식이 섭취군, 고콜레스테롤 섭취 후 *P. notoginseng* 열수추출 농축액 투여군으로 나누어 처리하였다. Catalase 활성도 단위는 효소 반응액 중에 함유된 단백질 mg이 5분간 소실되는 H₂O₂의 양 (nmol)으로 나타내었다. Catalase의 활성은 *P. notoginseng* 열수추출 농축액 투여군(22.55±1.68 nmol/mg protein/min)에서는 고콜레스테롤식이 섭취군(15.7±1.56 nmol/mg protein/min)보다 30.3% 가량 유의적인 증가 경향을 보였다(Fig. 6).

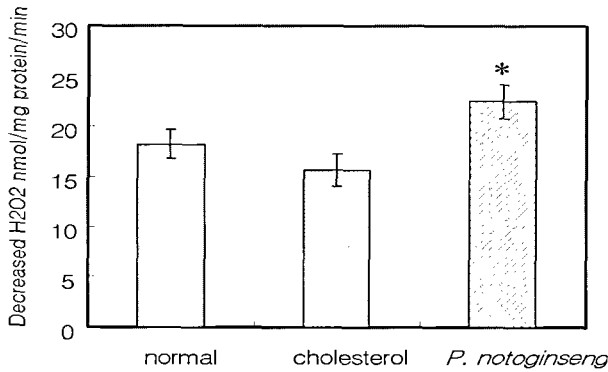


Fig. 6. Effect of high-cholesterol feed group and *P. notoginseng* water-extracts group on the level of abdominal aortic Catalase activity in rat. * Each Values are mean ± S.E. of 3 rats, * key : (*) significantly different (p < 0.05) from cholesterol group.

(3) 복부 대동맥 혈관조직내 Glutathione peroxidase 활성에 대한 고콜레스테롤식이 섭취군과 *P. notoginseng* 열수추출 농축액 투여군의 효과

Glutathione peroxidase (GSH-Px)는 외부의 산화적 세포 손상에 대한 방어작용을 나타내는 효소의 기질이며 항산화 물질인 glutathione을 사용하여 H₂O₂와 organic hydroperoxides를 제거시키고 이때 생성된 oxidized glutathione (GSSG, 산화형 glutathione)는 glutathione reductase에 의해 다시 glutathione(환원형 glutathione)에 의존하는 산화-환원반응을 통해 세포막을 보호한다. 환원형 glutathione과 제 3 항산화제로 불리는 GSH-Px는 세포질안과 mitochondria내에 자리를 잡고서 H₂O₂ 제거, 이미 손상된 세포를 원래 상태로 수리하며 해독작용을 하는 등 아주 다양한 역할을 한다. 예를 들어 free radical 중에서도 독성이 강한 hydroxy radical의 공격을 받아 손상된 DNA를 복구시킬 수 있다. 대표적인 환경 유해물질인 benzene은 환원형 glutathione과 만나면 좀 더 안전한 물질로 바뀌게 된다. 실험군은 Sprague-Dawley 종 웅성 흰쥐 각 3마리씩 정상군, 동맥경화 유도를 위한 고콜레스테롤식이 섭취군, 고콜레스테롤 섭취 후 *P. notoginseng* 열수추출 농축액 투여군으로 나누어 처리하였다. Oxidized glutathione의 형성에 따른 NADPH의 흡광도가 감소되는 속도를 340 nm에서 2분간 측정하였다.

복부 대동맥 혈관조직내 GSH-Px 활성은 고콜레스테롤식이 섭취군이 3.7±0.64 nmoles/mg protein/min, *P. notoginseng* 열수추출 농축액 투여군 5.7±0.3 nmoles/mg protein/min으로 고콜레스테롤식이 섭취군보다 35% 가량 유의적인 증가 경향을 보였다(Fig. 7).

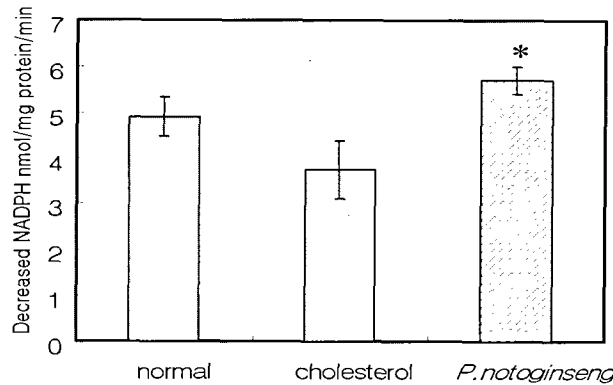


Fig. 7. Effect of high-cholesterol feed group and *P. notoginseng* water-extracts group on the level of abdominal aortic Glutathione peroxidase activity in rat. * Each Values are mean ± S.E. of 3 rats, * key : (*) significantly different (p < 0.05) from cholesterol group.

고찰 및 결론

동맥경화증은 low density lipoprotein (LDL) 입자가 동맥내강을 빠져 나와 혈관내피세포하에 체류하여 염증을 일으키며 동맥벽이 굳어져서 탄력성이 감소하고, 동맥내면에 지방을 누적시켜 이상조직이 증식하여 동맥내경의 협착을 일으키는 질병이다²⁰.

Cholesterol은 세포막과 myelin의 주요 성분으로 대부분 체내에서 부신 피질과 스테로이드 호르몬과 비타민 D, 그리고 간에서 생성되는 담즙산의 전구체로 아세틸-CoA로부터 합성이 되고, 10%만이 동물성 식품을 통해 섭취된다. 보통 유리상태와 에스테르의 형태로 존재하는데, 소화관에서는 cholesterol 그대로 직접 흡수되고 배설된다.

소수성인 cholesterol은 그 자체로는 혈장내에서 존재할 수 없으므로 혈액내에서 apoprotein과 결합하여 lipoprotein 상태로 운반된다. High Density Lipoprotein (HDL), Low Density Lipoprotein (LDL)와 Very Low Density Lipoprotein (VLDL)으로 분류되며, cholesterol은 LDL 및 HDL에 주로 함유되어 있고, triglycerides는 주로 VLDL에 함유되어 있다. 전체 cholesterol의 20~30% 가량은 HDL 형태로, 나머지 대부분은 LDL의 형태로 구성된다.

*Panax notoginseng*은 혈액순환을 향상시키는 한약재로 널리 알려져 왔으며, 관상혈류량¹³⁾을 증가시키므로 angina pectoris를 치료하는데 사용되어지고 있다. 특히, *P. notoginseng*의 뿌리도 널리 알려졌는데, 연구가 많이 진행된 *P. ginseng*²¹⁾과 거의 유사하다고 한다. Ginseng group의 모든 *P. notoginseng*은 비록 화학적인 구성의 농도, 특이성 그리고 활성화가²²⁾ 다르다 할지라도 유사한 성분을 가진다는 보고가 있다.

동맥경화증의 위험인자들이 세포내 oxidative stress를 증가시키고, 혈관 염증 반응을 조절하는 유전자 발현을 변화시켜 동

맥경화증을 발생시킬 것이라는 가설이 제시되면서 oxidative stress가 동맥경화증의 발생에 관여할 것이라는 많은 연구 결과들이 보고되고 있다. 또한, 최근에는 동맥경화증의 만성 염증성 변화들이 oxidative stress에 의한 혈관 내막 세포들의 redox state의 변화에 기인할 가능성이 주목을 받고 있다.

세포내 oxidative stress의 주원인인 oxygen free radical은 체내에 섭취되는 산소의 약 2~3%정도가 원자배열에서 짝지어지지 않은 전자를 가진 free radical로 매우 불안정하고 반응성이 강하여, 주변의 분자로부터 전자를 얻어 전자쌍을 이룸으로 안정성을 가진다. 그러나 free radical과 반응한 물질(전자를 빼앗긴)이 다시 전자의 불균형으로 또 다른 불안정한 free radical이 되는 연쇄적인 전자전달 반응이 일어나는 과정에서 세포의 파괴작용을 초래한다.

산소를 이용하는 생체는 반응성이 크므로 조직내 독성을 가지는 superoxide (O_2^- , superoxide radical)를 제거하는 제 1 항산화제인 superoxide dismutase (SOD)를 가지고 있어 superoxide에 의한 조직 손상으로부터 보호되고 있다. SOD는 oxidative stress에 대한 세포의 방어에 일차적으로 관여하는 metalloenzyme 으로서 금속이온(Cu, Zn, Mn 및 Fe)의 종류에 따라 구분되며, O_2 가 한 개의 전자를 받아들여 불완전 산화된 superoxide anion (O_2^-)를 hydrogen peroxide (H_2O_2)로 전화시키는 유리기(O_2)제거 효소이다²³⁾. 두 개의 superoxide radical을 H_2O_2 로 변화시키는데, H_2O_2 도 반응 산소종으로 SOD에 손상을 주거나, 철이나 구리 이온과 접촉하게 되면 체내에 독성을 주는 해로운 hydroxy radical (OH·)이 생성된다. 따라서 superoxide radical을 제거하는 반응과 균형을 이루도록 밀접하게 연결이 되어 있다.

H_2O_2 를 제거하는 세포방어 제 2 항산화제 catalase는 H_2O_2 를 물과 산소로 분해시켜 oxygen radical 생성을 방지하는 강력한 항산화 효소이다. 대사과정 중 발생하는 활성산소종의 유리기를 제거할 뿐만 아니라 이들 oxygen free radical에 비해 비가역적으로 불활성화될 수도 있으며, 지방산화에 의해 생성된 유리기도 제거하는 것으로 보고²⁴⁾되고 있다.

SOD와 catalase는 서로 균형을 이루면서 상호협력한다. 이 균형이 깨져서 H_2O_2 를 제거하는 catalase에 비해 H_2O_2 를 산물로 만들어 내는 SOD 작용이 더 크면 세포 손상이 커진다. 또 이들 간의 불균형이 여러 질병과도 관련이 있다.

Catalase와 함께 H_2O_2 를 제거하는 제 3 항산화제 Glutathione peroxidase (GSH-Px)는 모든 포유동물의 세포질안과 mitochondria내에서 발견되며 glutathione을 기질로 사용하여 H_2O_2 와 organic hydroperoxides를 제거시키고 이때 생성된 oxidized glutathione은 glutathione reductase에 의해 다시 glutathione (환원형 glutathione)에 의존하는 산화환원반응을 통해 세포막을 보호한다. 환원형 glutathione과 GSH-Px는 H_2O_2 의 제거뿐만 아니라 이미 손상된 세포를 원래 상태로 수리하며 해독작용도 하는 등 다양한 작용을 가진다.

반면에, 생체내 유해 유리기 생성계 Xanthine oxidase (Xanthine oxygen oxidoreductase, XO)는 purine, pyrimidine, pteridine, aldehyde류 및 heterocyclic compound등의 대사에 관

여하는 비특이적 효소로서, 주로 purine체의 대사산물인 hypoxanthine을 xanthine으로 다시 산화시켜 uric acid를 생성하는 반응의 촉매로 작용하며 이런 과정에서 superoxide radical을 생성하는 효소이다²⁵⁾.

본 실험에서는 유해 유리기 생성에 관여하는 효소인 XO 활성과 유해 유리기 제거에 관여하는 효소인 SOD, catalase 및 GSH-Px 활성을 측정하였다. 복부 대동맥 혈관조직내 XO 활성을 보면, 고콜레스테롤 식이 섭취군보다 *P. notoginseng* 열수추출 농축액 투여군의 XO 활성이 유의적으로 감소하는 경향을 나타내었다. XO는 바이러스, 세균 감염, 이물질에 의해 체내 조직이 손상될 경우 활성이 증가되는 것으로 알려져 있다²⁵⁾. XO 활성 연구에서 식물계에 존재하는 flavonoid component 중 분자내 hydroxyl group의 위치에 따라 그 저해효과가 다르며²⁶⁾, gallate기를 함유한 flavonoid compound은 경쟁적으로 저해한다고 보고되어 있다²⁷⁾. 본 실험에서 *P. notoginseng* 열수추출 농축액 투여군에서 유의적으로 감소한 것은 XO에 대해 강한 저해작용을 가지는 *P. notoginseng*의 component인 polyphenolic compound이 체내 유해 활성산소 생성기인 XO 저해작용을 야기시킨 것으로 사료된다.

복부 대동맥 혈관조직내의 SOD와 Catalase 활성은 고콜레스테롤 식이 섭취군에 비해 *P. notoginseng* 열수추출 농축액 투여군의 SOD 활성의 유의적인 증가경향은 고콜레스테롤의 과잉 섭취로 인한 동맥경화의 유발로 생성이 증가된 oxygen free radical을 소거하려는 생리적 적응현상으로 oxygen free radical의 제거 효소인 SOD가 활성화된 것으로 사료된다.

또한, 고콜레스테롤 식이 섭취군 보다 *P. notoginseng* 열수추출 농축액 투여군의 유의적인 catalase 활성 증가는 지방의 자동산화 및 유기물의 산화로 생긴 H_2O_2 를 분해하기 위하여 catalase 활성이 높아진 것으로 생각된다. 또한, flavonoid compound는 항산화 효소의 활성에 영향을 미쳐 유해 유리기에 의한 조직 손상을 감소시킨다는 보고²⁸⁾가 있다.

복부 대동맥 혈관조직내 제 3 항산화제인 Glutathione peroxidase 활성은 Yoshida 등²⁹⁾이 조직이 손상을 받을 때 보상작용으로 glutathione 합성능력을 높여 GSH-Px 활성을 증진시키고 glutathione의 turnover rate가 증가되어 혈중으로의 glutathione의 방출이 증가된다고 설명하고 있다. 본 실험에서 *P. notoginseng* 열수추출 농축액 투여군의 GSH-Px 활성이 유의적으로 증가한 것은 고콜레스테롤 섭취로 유발된 동맥경화유발에 의한 복부 대동맥 혈관조직의 산화적 세포 손상의 방어와 과산화수소가 축적되는 것을 예방하기 위하여 GSH-Px 활성이 상대적으로 증가된 것으로 사료된다. 이는 Hermenegido 등³⁰⁾이 STZ로 당뇨를 유발했을 경우 GSH-Px의 활성 증가는 손상된 신장조직에 대한 보상반응이라는 kinalski 등³¹⁾의 보고와 Yoshida 등²⁹⁾의 보고가 뒷받침된다.

세포내 oxidative stress는 조직내의 lipid peroxidation을 일으키는 주요한 원인이 된다. Lipid peroxidation은 여러 가지 독성 화합물이나 약물에 의한 조직 손상의 가장 중요한 기전으로 암, 동맥경화와 노화의 원인이 되기도 한다. 세포내 oxidative

stress로 인한 free radical 생성 증가 및 항산화적 방어력 약화로 malondialdehyde이 축적되는데, Yoon과 Rhee³²⁾는 glutathione 함량이 증가되는 등 방어기구가 강화되면 malondialdehyde 함량은 감소한다고 설명하였다. 또한, phenolic compounds는 -OH기가 유리기의 수용체로서 이들 유리기들과 안정된 공명혼성물을 형성함으로써 산화 억제작용을 하며, lipid peroxidation을 자극하는 H₂O₂의 생성을 억제하는 것으로 알려져 있다.

북부 대동맥 혈관조직내 malondialdehyde 함량 결과는 고콜레스테롤 식이 섭취군보다 *P. notoginseng* 열수추출 농축액 투여군의 malondialdehyde 함량의 유의적인 감소 경향으로 gallic acid, digallic acid, propyl gallate등과 같은 polyphenolic compound인 *P. notoginseng* 열수추출 농축액이 lipid peroxidation을 발생시키는 H₂O₂의 생성을 억제한 것으로 생각된다. 즉, *P. notoginseng* 열수추출 농축액의 투여가 동맥경화유발을 억제시켜 북부 대동맥 혈관조직내 lipid peroxidation을 효과적으로 저해시켜 malondialdehyde 수준을 감소시켰다고 여겨지며, oxidative stress의 예방과 개선 및 항산화 효과의 가능성을 확인할 수 있다.

*In vitro*상에서 lipid peroxidation의 연쇄반응에 관여하는 산화성 free radical을 소거함으로써 antioxidase로 작용하는 물질은 free radical인 DPPH를 hydrazine 형태로 환원시키는 능력을 측정하여 검색할 수 있다. *P. notoginseng* 열수추출물 농도별 free radical 소거 활성을 DPPH에 대한 전자공여능 (electron donating ability)으로 측정하였다. *P. notoginseng* 열수추출물의 농도가 증가할수록 free radical 소거활성의 증가를 보여 *P. notoginseng* 열수추출물 농도 의존적인 효과가 있음을 알 수 있다. 또한, 천연항산화제로 널리 알려진 1% α-tocopherol (79.41%) 과 free radical 소거활성을 비교했을 때 같은 농도의 1% *P. notoginseng* 열수추출물의 free radical 소거활성이 유의적인 증가 경향을 보였다.

또한, *P. notoginseng* 열수추출물의 농도별에 따른 hydrogen peroxide 저해율(%)을 측정하였다. *P. notoginseng* 열수추출물의 농도가 증가할수록 유의적으로 hydrogen peroxide 저해율이 증가하여 농도 의존적인 효과를 나타내었다. 이러한 결과로써 *P. notoginseng* 열수추출물의 항산화 효과는 강력한 free radical 소거활성과 함께 lipid peroxidation 억제 활성에 기인됨을 유추할 수 있다. 따라서 lipide peroxides의 생성은 병리현상이나 조직손상 정도를 나타내는 지표이기 때문에 *P. notoginseng* 열수추출물의 생리활성에 대한 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각되어진다.

본 실험 결과로 *P. notoginseng*은 고콜레스테롤 식이로 인한 동맥경화의 치료제로써 臨床實驗의 應用價値가 매우 높은 것으로 思料된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술부/한국과학재단 기초과학연구센터육성사업의 지원으로 수행되었음(과제번호 : R13-2005-013-01000-0).

참고문헌

1. Yong-Wook Lee, Woo-Sup Roh, Jong-Gyu Kim and Pan-Gyi Kim. Effects of Aloe Vera on the Cholesterol and Vitamin D2-induced Atherosclerosis in Rats, J. Fd Hyg. Safety 11(4):243-259, 1996.
2. Witztum, J.L. Role of oxidized low density lipoprotein in atherosclerosis, Br Heart J 69(supple) s:12, 1993.
3. 오구택, 형질전환모델동물을 이용한 동맥경화증의 연구 및 치료제 개발, 한국생화학분자생물학회, 생화학 뉴스 22(1):12-21, 2002.
4. Von, sonntag, 'The Chemical Basis of Radiation of biology' Tylor and Francis. (eds), London, 31, 1987.
5. Schraufstatter, I., Hyslop, P.A., Jackson, J.H. and Chchrane, C.G. J. Clin. Invest., 82:1040, 1988.
6. Mantha, S.V., Kalra, J., Prasad, K. Effect of probucol on hypercholesterolemia-induced changes in man, Am J Clin Nutr 17(5):281-286, 1965.
7. Del Boccio, G., Lapenna, D., Porreca, E., Penelli, A., Savini, F., Feliciani, P., Ricci, G., Cuccunillo, F. Aortic antioxidant defence mechanisms time-related changes in cholesterol-fed rabbits, Atherosclerosis 81(2):127-135, 1990.
8. Balkan, J., Kanbagli, O., Hatipoglu, A., Kucuk, M., Cevikbas, U., Aykac-Toker, G., Uysal, M. Improving effect of dietary taurine supplementation on the oxidative stress and lipid levels in the plasma, liver and aorta of rabbits fed on a high-cholesterol diet, Biosci Biotechnol Biochem 66(8):1755-1758, 2002.
9. Bok, S.H., Park, S.Y., Park, Y.B., Lee, M.K., Jeon, S.M., Jeong, T.S., Choi, M.S. Quercetin dihydrate and gallate supplements lower plasma and hepatic lipids and change activities of hepatic antioxidant enzymes in high cholesterol-fed rats, Int Vitam Nutr Res 72(3):161-169, 2002.
10. Duke, E.J., Joyce, P. and Ryan, J.P. Characterization of alternative molecular forms of xanthine oxidase in the mouse, J, Biochem, 131, 1973.
11. Cardiovascular Division. Treatment of angina pectoris and animal experiments of Panax notoginseng (Burk) FH Chen. 1974 National Coronary Heart Diseases Conference. People's Health Publishing House, china, Wuhan Medical College, 262, 1974.
12. Cardiovascular Division. Pharmacological effects of Panax notoginseng (Burk) FH Chen on coronary blood flow. 1973. National Coronary Heart Diseases Conference. People's Health Publishing House, China, Dhinase Army 244 Branch, 261, 1974.
13. Blois, M.S. Anthioxidant determination by the use of a

- stable free radical. *Nature*, 181:1199-1201, 1958.
14. Duh, P.D., Tu, Y.Y. and Yen, G.C. Antioxidant activity of water extract of Hwang Jyur (*chrysanthemum morifolium* Ramat), *Lebensm.-Wiss.u.-Technol.*, 32:269-277, 1999.
 15. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yagi, K. *Analytical Biochem.*, 95:351, 1979.
 16. Stripe, F. and Corie, E.D. The regulation of rat liver Xanthine Oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogen (Type D) to oxidase (type O), *J. Biol. Chem.*, 244:3855, 1969.
 17. McCord, J.M. and Fridovich, I. An enzymic function of erythrocyte(Hemocuprein) *J. Biol. Chem.* 244:6049-6055, 1969.
 18. Aebi, H. Catalase. In *Methods of enzymatic analysis*. Bergmeyer HU, ed. Academic press, New York. 2:673-684, 1974.
 19. Lawrence, R.A., Burk, R.F. Glutathione peroxidase activity in selenium deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 71(4):952-958, 1976.
 20. Hong Keun Cho, Yang Soo Jang, Small Dense LDL and Atherosclerosis, *한국지질동맥경화학회지*, 13(2):333-338, 2003.
 21. Ngan, F., Shaw, P., But, P., Wang, J. Molecular authentication of Panax species, *Phytochemistry* 50:787-791, 1999.
 22. Bruneton, J. *Parmacognosie, Phytochimie, Plantes Medicinales*, 3rd edn, Edition Medicales Internationales, cachan, France, 707-710, 1999.
 23. Wolff, S.P., Jiang, Z.Y., Hunt, J.V. Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and aging, *Free Radic Biol Med* 10:339-352, 1991.
 24. Fritche, K., Johnston, P.V. Rapid autoxidation of fish oil in diets without added antioxidants, *J Nutr* 118:425-426, 1988.
 25. Cho, S.Y., Oh, Y.J., Park, J.Y., Lee, M.K. and Kim, M.J. Effect of dandelion (*Taraxacum Officinale*) leaf extract on hepatic antioxidative system in rats fed high cholesterol diet, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*, 32(3):458-463, 2003.
 26. Yoshida, M., Fukunga, T., Lwami, K. and Yasumoto, K. Variation of glutathione level and synthesis activity in chick liver due to selenium and vitamin E deficiency, *J. Biochem*, 96:1391-1397, 1984.
 27. Hermenegildo, C., Raya, A., Roman, J., Romero, F.J. Decreased Glutathione peroxidase activity in sciatic nerve of alloxan-induced diabetic mice and its correlation with blood glucose levels, *Neurochem Res* 18:893-896, 1993.
 28. Kinalski, M., Sledziewski, A., Telejko, B., Zarzycki, W., Kinalski, I. Lipid peroxidation and scavenging enzyme in streptozotocin-induced diabetes, *Acta Diabetol* 37:179-183, 2000.
 29. Yoon, Y.H. and Rhee, S.J. Effects of Korean green tea, oolong tea and black tea beverage on the antioxidative detoxification in rat poisoned with cadmium, *Kor. J. Nutr*, 27:1007-1017, 1994.
 30. Tsutomu, N., Hiramitsu, M., Osawa, T., Kawakishi, S. The protective of gallic acid ester in bacterial cytotoxicity and SOS responses induced hydrogen peroxide, *Mutation Res* 303:29-34, 1993.
 31. Hayashi, T., Sawa, K., Kawaski, M., Arisawa, M., Shimizu, M., Morita, M. Inhibition of cow's milk xanthine oxidase by flavonoids, *J Natural Products* 51:345-348, 1988.
 32. Hatano, T., Yashimura, T., Yoshihara, R., Okuda, T. Inhibitory effects of galloylated flavonoids on xanthine oxidase, *Plant Med* 57:83-84, 1988.