

고지방식이 흰쥐에서 산초나무 Butanol 및 Methylene Chloride분획의 항혈전 및 항염증 작용*

장현서** · 이순재** · 우미희*** · 조성희***

대구가톨릭대학교 식품영양학과, ** 대구가톨릭대학교 약학과***

Anti-Thrombogenic and Anti-Inflammatory Effects of Solvent Fractions from Leaves of *Zanthoxylum Schinifolium* (Sancho Namu) in Rats Fed High Fat Diet*

Jang, Hyun-Seo** · Rhee, Soon-Jae** · Woo, Mi-Hee*** · Cho, Sung-Hee**§

Department of Food Science and Nutrition, ** Catholic University of Daegu, Gyeongsan 712-702, Korea

Department of Pharmacy, *** Catholic University of Daegu, Gyeongsan 712-702, Korea

ABSTRACT

This study was performed to investigate anti-thrombogenic, anti-inflammatory effects of *n*-BuOH (B) and CH₂Cl₂ (MC) fractions extracted from Sancho (*Zanthoxylum. schinifolium*) leaves in rats fed high fat diets. The experimental animal groups were consisted of eight including one 5% fat (N) and one 20% fat (H) without the test materials in diets and six H groups of feeding three levels (50, 100 and 150 mg/day) of the B and the MC fractions from *Z. schinifolium*, respectively. Plasma activated partial thromboplastin times and thrombin times of H group were decreased compared to the N group, but they were increased by feeding the MC fraction of 50 mg and over. Polymorphonuclear leukocyte 5'-lipoxygenase activities and leukocyte leukotriene B₄ contents of the H group were significantly increased compared to the N group, but they were decreased in the 100 mg and 150 mg of B fraction or the 150 mg of MC fraction fed groups. Liver cytochrome P₄₅₀, O₂⁻, H₂O₂ and GSSG contents were increased by the high fat diet but decreased by feeding the B fraction or the MC fraction, while GSH content and glutathione S-transferase activity lowered by high fat diet were increased by feeding the two solvent fractions. The effects of the solvent fractions were evident at the level of 100 mg/day and over. The present results confirmed that two solvent fractions from the leaves of *Z. schinifolium* have enhancing effects on anti-thrombosis and anti-inflammation partly by antioxidant action and partly by direct modulation of the respective processes. In conclusion, the *n*-BuOH and CH₂Cl₂ fractions from leaves of *Z. schinifolium* can be utilized as the proper ingredients of functional foods for preventing chronic degenerative disease. (*Korean J Nutr* 2007; 40 (7): 606~615)

KEY WORDS : anti-thrombosis, anti-inflammation, *Zanthoxylum schinifolium*, high fat diet.

서 론

산초나무는 운향과 (芸香科; *Rutaceae*)의 *Citrus* 속 (屬), *Zanthoxylum* 중 (種), 낙엽관목으로 방향성 식물자원으로 산야에 자생하며, 그늘진 곳에서 잘 자라고 추위에도 잘 견디나 뿌리는 깊게 내리지 않는다.¹⁾ 산초나무의 잎, 종자 및 과

피 등이 중국에서 향신료로 많이 사용되며 일본에서도 '산쇼가루'라 하여 '산쇼양념'을 개발하여 미국, 유럽, 호주 및 캐나다 등의 고급 호텔용으로 수출하기도 한다. 우리나라에서 동속인 초피나무의 과피분말, 즉, 채피가루를 향신료로 사용하는 반면 산초나무는 잎 자체를 국이나 전 등에 사용하였고, 열매로부터 난대기름을 짜서 식용, 또는 머릿기름으로 사용해 왔다. 한방에서는 산초나무 열매껍질을 야초 (野椒)라는 약재로 사용하며 치통, 신경통, 저혈압증, 냉증, 담석증, 요로결석, 지사제, 진해제 및 증풍에 효과가 있다고 알려졌다.²⁾ Xiong 등³⁾은 산초나무에서 'hua jiao'라는 약제를 조제하였으며, 이는 장내 기생충 감염에서 오는 오한, 구토, 설사와 복통 증상을 완화시켜 주고 습진 외용약으로 효과가 있다고 하였으며 Kim 등⁴⁾에 의하여도 유사한 결과가 보고되

접수일 : 2007년 8월 10일

채택일 : 2007년 10월 9일

*This study was supported by Technology Development Program (No. 203008-3) for Agricultural and Forestry, Republic of Korea.

§To whom correspondence should be addressed.

E-mail : shcho@cu.ac.kr

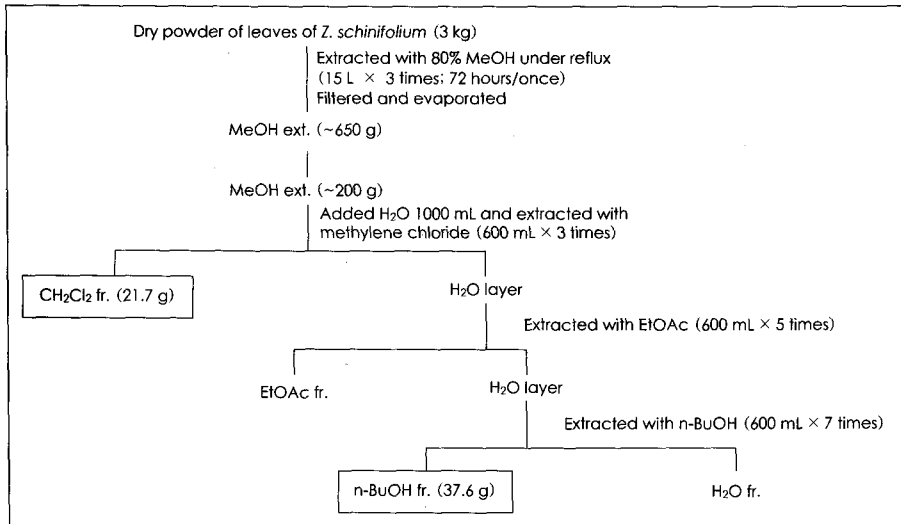


Fig. 1. Schematic procedures for preparation of extraction and solvent fractionation from leaves of *Z. schinifolium* and *Z. piperitum*.

었다. 산초나무를 이용한 성분 및 생리활성 연구에서 Chen 등⁵⁾은 껍질로부터 6종의 coumarin을 분리하여 *in vitro*에서 혈소판응집 억제작용을 확인하였고, Jo 등⁶⁾은 줄기의 coumarin 성분인 lacinartin 성분이 monoamine oxidase 활성을 억제한다고 보고하였다. 국내산 산초를 이용한 연구들은 주로 산초 열매를 이용한 것으로 산초 종피 메탄올 추출물의 혈청 지질 강하 효과⁷⁾와 분말 섭취에 의하여 당뇨쥐의 혈당 상승이 억제되었다는⁸⁾ 보고들이 있다. 본 연구진에서도 *in vitro* 활성을 조사한 전보⁹⁾를 통하여 산초나무의 잎, 줄기, 뿌리의 methylene chloride 분획 및 n-butanol 분획에서 항응고 활성이 우수함을 보여 주었으나 부위별로는 잎에서 활성이 가장 높음을 보고한 바 있다. 산초나무 잎 용매분획의 항산화 활성도는 *in vitro* 시험방법에 따라서는 분획에 따른 차이가 있었으나 *in vivo*에서는 두 분획 모두 효과가 있었음¹⁰⁾을 보고한 바 있다. 본 논문에서는 산초나무 잎의 *in vivo* 항혈전 및 항염증 작용을 조사하였기에 이에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

산초나무 잎의 Butanol 분획 및 methylene chloride 분획의 제조

산초나무의 잎은 2004년 7월 경북 경산시 용성면 동아임장에서 구입하여, 동결 건조 후 분쇄한 후 Fig. 1에 나타난 바와 같은 방법으로 추출하고 실험에 사용할 용매분획을 제조하였다. 건조된 산초나무 잎 분말 3 kg을 상온에서 80% 메탄올 (15 L x 3회, 1회에 72시간씩 추출)로 추출한 후 rotary vacuum evaporator로 농축하여 초기 메탄올 추출물 약 650 g을 얻었다. 이를 증류수 1,000 mL에 분산시켜

Table 1. Diet compositions for normal and high fat fed groups of rat

Ingredients	Groups	Normal diet group (N)	High fat diet groups (H)
Corn starch		150	100
Casein		200	240
Sucrose		100	340
Mineral mixture ¹⁾		35	42
Vitamin mixture ²⁾		10	12
Corn oil		50	200
Cellulose		50	60
DL-methionine		3	3.6
Choline-chloride		2	2.4

1) AIN-93 mineral mixture (g/kg mixture). 2) AIN-93 vitamin mixture (mg/kg mixture)

methylene chloride (600 mL x 3회)로 추출한 후 농축하여 methylene chloride분획 21.7 g을 얻었다. 남은 수층을 ethyl acetate (600 mL x 3회)로 추출한 후 다시 n-butanol (600 mL x 8회)로 추출, 농축하여 butanol 분획 37.6 g을 얻었다.

동물사육

실험동물은 바이오 제노믹스 사 (Bio Genomics, INC., Seoul, Korea)에서 체중 80 ± 10 g 내외의 Sprague-Dawley 중 수컷 흰쥐를 구입하여 환경에 적응시키기 위해 온도 22 ± 1°C, 습도 50 ± 10%의 조건에서 일반 배합사료 (Purina Co., Seoul, Korea)로 예비 사육하여 체중이 200 g 전후가 되었을 때 본식이실험을 시행하였다. 쥐들을 크게 대조군인 정상식이군 (N)과 비교군인 고지방식이군 (H)으로 나누었으며 식이 조성은 Table 1과 같이 AIN-93¹¹⁾에 준하였다. 고지방식이군은 산초나무 잎의 butanol 및 methylene chloride분획의 공급 수준에 따라 세분화하였다. 즉, 두 분획

을 공급하지 않은 H군, 산초나무 잎의 butanol (B)과 methylene chloride (MC) 두 분획을 각각 50 (L), 100 (M), 150 mg (H)을 공급하는데 따라서 HBL군, HBM군, HBH군, HMCL군, HMCM군 및 HMCH군으로 나누었다. 이 공급량은 산초 종피 추출물을 사용한 Mun의 연구⁸⁾에서 식이의 0.5~1%를 참고하였다. 본 연구에서는 산초잎 추출물을 경구투여를 하였으므로 식이 내 함량이 0.5%을 기준으로 할 경우 200 g 정도의 체중을 가진 동물이 1일 섭취할 양이 100 mg으로 산정되었다. 따라서 이 양을 중심으로 하여 50 mg과 150 mg 투여군을 결정하였다. 각 군당 10마리씩 사육하였고 산초나무 잎의 butanol 및 methylene chloride 분획은 적당한 농도로 증류수에 분산시켜 상기 용량에 맞게 주사기 (18G-3" curved feeding needle, Braintree Scientific Inc., MA, USA)로 매일 4주간 경구 투여하였다. H군에는 시료와 같은 양의 증류수 (약 0.2 ml)를 투여하였다. 실험기간 동안 동물의 체중증가량은 3일에 한 번씩 측정하였고 식이섭취량은 매일 측정하였다.

혈장 및 간 조직시료의 준비

사육 종료 후 실험동물을 12시간 절식 시킨 다음 가벼운 ether 마취 하에서 복부 대동맥으로부터 혈액을 heparin으로 처리한 주사기로 채취하고 간조직을 절제하였다. 채취한 혈액은 3,000 × rpm에서 10분간 원심 분리하여 혈장을 얻었다. 간 조직은 혈액 채취 후 즉시 적출하여 가아제로 피를 제거한 뒤 무게를 측정하였다. 각 간엽에서 일정량의 간조직을 취하여 일부는 즉시 동결하여 보관하였고 일부는 10배의 280 mM sucrose/10 mM potassium chloride (KCl)/10 mM HEPES 용액을 첨가하여 Potter-Elvehjem homogenizer를 사용하여 마쇄하였다. 간 마쇄액을 3,000 × g에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 9,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 mitochondria 침전을 얻었고 상층액을 다시 105,000 × g에서 1시간 원심분리하여 microsome 침전과 cytosol 상등액 시료를 얻었다.¹²⁾ 모든 실험 조건은 4°C를 유지하면서 행하였으며, 실험에 즉시 사용하지 않은 시료는 소량의 0.25 M sucrose 용액을 가하여 -80°C에 보관하였다.

혈장 Activated partial thromboplastin time (APTT) 및 thrombin time (APTT) 측정

혈액응고 판정의 지표가 되는 APTT 및 TT의 측정은 각각의 kit 시약 (Sigma Diagnostics, No. A1801/A1926 과 No. A8713)을 사용하였으며 Amelung Kcia micro (Sigma Diagnostics, Germany)를 이용하여 응고시간을 측정하였다.

다형핵 백혈구 5'-lipoxygenase 활성 및 leukotriene B₄ (LTB₄) 함량 측정

평균한 2% casein/Krebs-Ringer 용액을 흰쥐의 복강내에 주사에 약 20 mL 정도 투여하고 15시간 후에 복강 세척액을 채취하고 원심분리 (50 × g, 3 min, 4°C)하여 얻은 다형핵 백혈구 (PMNL) pellet를 Ca²⁺ free PBS로 2~3회 세척하였다. 세척한 PMNL pellet을 다시 PBS로 분산시켜 그 일부를 0.1% trypan blue를 가하여 viable 세포의 수를 세었다.

5'-Lipoxygenase는 Min 등의 방법¹³⁾을 이용하여 측정하였다. 즉, PMNL pellet를 incubation buffer (50 mM phosphate buffer + 1 mM EDTA + 0.1% gelatin)에 현탁 (1.0 × 10⁷ cell/mL) 시킨 후 homogenizer를 이용하여 homogenate를 만들고 원심분리 (10,000 × g, 10 min, 4°C)하여 얻은 상층액은 5'-lipoxygenase 활성 측정 시료로 하였다. 효소시료 1.8 mL에 CaCl₂를 최종농도가 1 × 10⁻³M 되게, 기질인 arachidonic acid/ethanol 용액은 50 μM이 되게 추가하여 총용량을 2.0 mL가 되도록 하여 37°C에서 반응을 진행시켰다. 냉각하여 반응을 정지시킨 후 생성된 leukotriene B₄ 양을 HPLC (column: Nucleosil C₁₈ (4.6 × 150 mm), 이동상: CH₃CN: MeOH: H₂O: AcOH = 33.6 : 5.4 : 61.1 : 1.0, pH 5.6)로 정량하였고 internal standard로 prostaglandin B₁을 사용하였다. 채취한 PMNL 내에 존재하는 leukotriene B₄ 함량은 Amersham RIA Kit (TRK 940)를 사용하여 liquid scintillation counter (LSC)를 이용하여 상층액의 동위원소 활성을 측정하였다.

간조직 Cytochrome P₄₅₀ 함량 측정

간조직 cytochrome P₄₅₀의 함량 측정은 microsome을 시료로 하여 Omura와 Sato¹⁴⁾의 방법으로 측정하였다. 즉, microsome 용액 1 mL를 0.1 mM phosphate (pH 7.4) 6 mL로 희석하여 단백질 함량이 1 mg/mL가 되게 한 다음, 3~5분 후 sodium dithionate를 30 mg가하여, 분광광도계의 흡광도를 영점 조정하였다. 영점 조정 후 450 nm와 490 nm에서 흡광도 차이를 측정하여 함량을 계산하였다. 이 때, 분자 흡광계수는 91 mM⁻¹cm⁻¹로 하였다.

간조직 Superoxide radical (O₂⁻) 및 Hydrogen peroxide (H₂O₂) 함량 측정

간조직 O₂⁻ 함량 측정은 Azzi 등¹⁵⁾의 방법에 따라 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.5)에 기질인 90 mM succinate, 150 mM KCl, 30 mM KCN, 0.3 mM cytochrome c 및 분석시료인 미토콘드리아 현탁액 (1 mg 단백질/mL) 200 μL 첨가하여 최종 반응액이 3 mL이 되게 하

었다. 이 반응액을 37°C에서 2분간 반응시키면서 550 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 O₂⁻의 함량을 산정하였다. O₂⁻ 함량은 1 mg의 단백질이 1분간 생성시킨 reduced cytochrome c의 양을 nmole로 나타내었다. H₂O₂ 함량은 Gay 등¹⁶의 방법에 따라, xylenol orange를 이용하여 560 nm에서의 H₂O₂ 생성 정도를 흡광도 증가로 측정하였다. Mitochondria (100~200 µg protein)에 FOX 용액 (0.1 M xylenol orange, 0.25 mM ammonium ferrous sulfate, 100 mM sorbitol, 25 mM H₂SO₄)을 섞어 상온에서 30분간 반응시키고 25°C, 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준용액 0~5 µM 범위의 H₂O₂ 흡광도를 측정하여 H₂O₂ 표준곡선으로 하였다.

간조직 Glutathione S-transferase (GST) 활성 측정

GST 활성도 측정은 Habig¹⁷의 방법에 따라 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (DCNB)와 GSH를 기질로 하여 25°C에서 20분간 반응하는 동안에 생성된 GSH-DCNB conjugate를 340 nm에서 측정하였다. 효소 시료인 cytosol 0.1 mL에 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.5) 2.0 mL에 0.04 M GSH 0.075 mL를 넣고 25°C에서 5분간 preincubation 시킨 후, 20% trichloroacetic acid 0.5 mL를 가하여 반응을 정지시켰다. 반응액을 1,100 × g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 340 nm에서 흡광도를 측정 한 후, 생성물의 분자 흡광계수 (E²³⁰/340 nm = 9.6 nM⁻¹ cm⁻¹)를 이용하였다. 이 효소활성의 단위는 1분간 1 mg의 단백질이 반응하여 생성한 conjugated DCNB를 nmole로 나타내었다. 각 효소의 단백질 정량은 Lowry 법¹⁸에 따라 표준품으로 bovine serum albumin을 사용하여 측정 하였다.

간조직 Glutathione 함량 측정

간조직 중의 glutathione 함량의 측정은 Bernt와 Bergmeyer의 방법¹⁹에 따라서 측정하였다. 즉 간조직 약 1 g을 1 M perchloric acid 3 mL를 가하여 산추출물을 얻고 이 산추출액을 다시 4 M K₂CO₃로 중화하여 분석시료로 사용하였다. 산화형 glutathione (GSSG)은 glutathione reductase 반응을 이용하였으며, 이 반응에서 소모된 NADPH양을 340 nm에서 측정하여 정량 하였으며, 환원형 glutathione (GSH)은 glyoxalase 반응을 이용하여 생성된 S-lactosyl-GSH를 240 nm에서 측정하여 정량 하였다.

통계처리

본 연구의 실험 결과는 각 군의 평균과 표준오차를 계산하였고 군간의 차이를 분산분석법 (one-way analysis of

variance)으로 조사하고 Tukey's test에 의하여 차이의 유의성을 p < 0.05 수준에서 검증하였다.

결 과

체중증가량, 식이섭취량 및 식이효율

실험동물에게 체중 증가는 전보¹⁰에서 보고된 바와 같이 정상식이군 (N)에 비해 고지방식이군 (H)에서 34% 정도 증가 하였다. 산초나무 잎의 butanol 및 methylene chloride분획 공급군에서는 이 증체량이 감소하는 경향이 보였다. 그러나 산초나무 잎의 용매 분획 섭취군들은 식이섭취량의 감소가 있었으므로 식이효율에는 군 간에 차이가 없었다.

혈장 APTT와 TT

산초나무 잎의 butanol 및 methylene chloride분획의 공급에 의한 체내 항혈전 작용을 알아보기 위해 혈장에서 APTT 및 TT를 측정 한 결과는 Fig. 2와 같다. APTT는 정상식이군은 (N) 76.5 ± 3.6초, 고지방식이군 (H)은 53.5 ± 2.5초로 정상식이군에 비해 고지방식이군에서 30% 정도 감소하여 유의적 (p < 0.05)인 차이를 나타내었고, 고지방식이에 butanol 분획을 공급한 군들 (HBL, HBM, HBH)에서는 변화가 없었으나 methylene chloride분획 공급군들에서는 유의적으로, 농도 의존적으로 증가하는 경향을 보였다. 즉, HMCL, HMCM 및 HMCH은 H군에 비해 각각 25%, 28% 및 32%씩 증가하여 HMCM와 HMCH군은 정상식이군 수준이었다. TT도 이와 유사한 경향으로 정상식이군은 (N) 67.4 ± 1.3초, 고지방식이군 (H)은 45.5 ± 3.5초로 정상식이군에 비해 고지방식이군에서 32% 정도가 증가하였고 butanol 분획의 영향은 거의 없었으나 methylene chloride분획을 공급하였을 때는 유의적으로 응고시간이 증가하였다.

다형핵 백혈구 5'-lipoxygenase 활성 및 leukotriene B₄ 함량

산초나무 잎의 butanol 및 methylene chloride분획의 공급에 의한 체내 항염증 작용을 알아보기 위해 염증반응과 관련된 5'-lipoxygenase 활성 및 염증반응 대사산물인 leukotriene B₄ 함량을 다형핵 백혈구에서 측정 한 결과는 Fig. 3과 같다. 5'-Lipoxygenase 활성은 정상식이군은 (N) 64.34 ± 3.73 ng/10⁷ cells/min, 고지방식이군 (H)은 91.48 ± 4.78 ng/10⁷ cells/min로 정상식이군에 비해 고지방식이군에서 42% 정도 증가하였다. 고지방식이군에 butanol 및 methylene chloride분획의 공급에 의해 농도 의존적으로 감소하는 경향을 나타내었으며, butanol 및 methylene chloride 분획 100 mg 이상 공급군 (HBM, HBH, HMCM 및 HMCH)

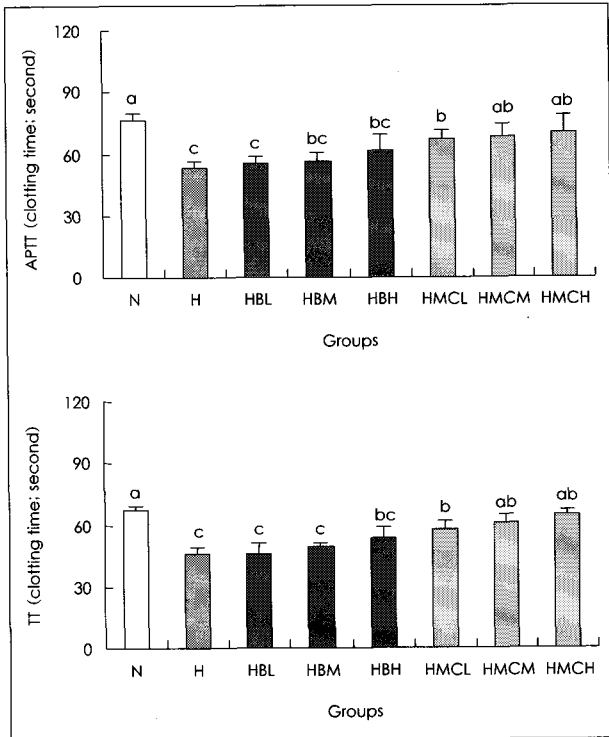


Fig. 2. Effects of the n-BuOH and CH₂Cl₂ fractions from leaves of *Z. schinifolium* on the APTT and TT in rats fed high fat diet. N: normal diet group, H: high fat diet group, HBL, HBM, and HBH: high fat diet with 50, 100 and 150 mg/day administration of n-BuOH fraction and HMCL, HMCM, and HMCH with 50, 100 and 150 mg/day administration of methylene chloride fraction from leaves of *Z. schinifolium*. All values are mean \pm SE (n = 10). ^{a-c}Values not sharing a common letter are significantly different among groups at p < 0.05 by Tukey's test.

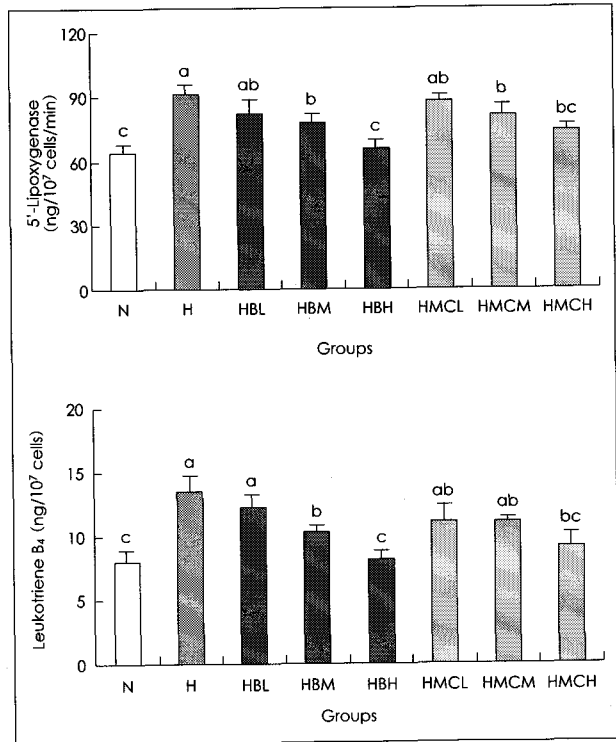


Fig. 3. Effects of the n-BuOH and CH₂Cl₂ fractions from leaves of *Z. schinifolium* on the polymorphonuclear leukocyte 5-lipoxygenase activities and leukotriene B₄ contents in rats fed high fat diet. N: normal diet group, H: high fat diet group, HBL, HBM, and HBH: high fat diet with 50, 100 and 150 mg/day administration of n-BuOH fraction and HMCL, HMCM, and HMCH with 50, 100 and 150 mg/day administration of methylene chloride fraction from leaves of *Z. schinifolium*. All values are mean \pm SE (n = 10). ^{a-c}Values not sharing a common letter are significantly different among groups at p < 0.05 by Tukey's test.

은 고지방식이군에 비해 각각 15%, 28%, 11% 및 19%씩 감소하여 유의적인 차이를 나타내었으며, butanol 및 methylene chloride분획을 가장 높은 농도인 150 mg을 공급한 군 (HBH 및 HMCH)은 정상식이군 수준이었다. Leukotriene B₄ 함량도 이와 유사한 경향으로 정상식이군 (N)에 비해 고지방식이군 (H)에서 유의적으로 증가되었으며 산초잎의 두 용매분획의 공급에 의해 농도 의존적으로 감소하는 경향을 나타내었다. Butanol 분획 100 mg 이상 공급군 (HBM 및 HBH)과 methylene chloride분획 150 mg 공급군 (HMCH)은 고지방식이군에 비해 각각 24%, 39% 및 33%씩 감소하여 유의적인 차이를 나타내었으며, 두 분획을 가장 높은 농도인 150 mg을 공급 시에는 정상식이군 수준이었다.

간조직 Cytochrome P₄₅₀ 및 O₂⁻와 H₂O₂ 함량

산초나무 잎의 butanol 및 methylene chloride분획의 공급에 의한 간조직의 cytochrome P₄₅₀ 함량 변화를 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. 정상식이군은 (N) 0.11 \pm 0.04 nmol/mg protein, 고지방식이군 (H)은 0.25 \pm 0.04 nmol/mg

protein으로 정상식이군에 비해 고지방식이군에서 127% 정도 증가하였고, 고지방식이군에 butanol 및 methylene chloride분획의 공급에 의해 농도 의존적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나 유의적인 감소는 150 mg의 butanol 분획 공급군 (HBH)에서만 볼 수 있었다. 간조직의 O₂⁻ 및 H₂O₂ 함량 변화도 cytochrome P₄₅₀ 함량 변화와 유사하였다 (Fig. 5). 즉, 고지방식으로 증가된 O₂⁻ 및 H₂O₂ 함량은 산초의 두 용매분획의 섭취량이 증가할수록 감소하는 경향으로 O₂⁻ 함량 감소는 butanol 분획에 의하여 100 mg 투여량 부터 나타났고 (HBM과 HBH) methylene chloride 분획에 의하여는 150 mg (HMCH)에서만 볼 수 있었다. H₂O₂ 함량 변화에 대한 효과는 methylene chloride 분획이 butanol 분획보다 더 나타나는 것으로 보였다.

간조직 GST 활성 및 glutathione 함량

산초나무 잎의 butanol 및 methylene chloride분획의 공급에 의한 간조직 glutathione-S transferase (GST) 활성을 조사한 결과는 Fig. 6과 같다. 정상식이군은 (N) 153.87 \pm

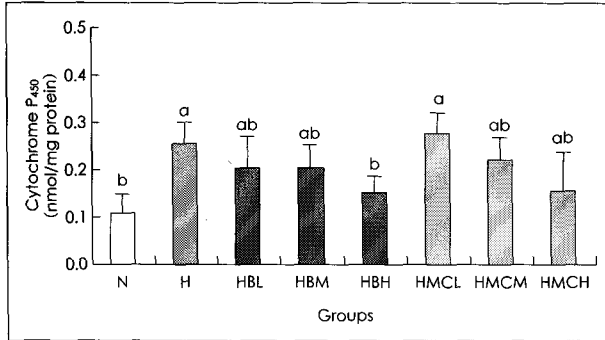


Fig. 4. Effects of the n-BuOH and CH₂Cl₂ fractions from leaves of *Z. schinifolium* on the liver microsomal cytochrome P₄₅₀ content in rats fed high fat diet. N: normal diet group, H: high fat diet group, HBL, HBM, and HBH: high fat diet with 50, 100 and 150 mg/day administration of n-BuOH fraction and HMCL, HMCM, and HMCH with 50, 100 and 150 mg/day administration of methylene chloride fraction from leaves of *Z. schinifolium*. All values are mean ± SE (n = 10). ^{abc}Values not sharing a common letter are significantly different among groups at p < 0.05 by Tukey's test.

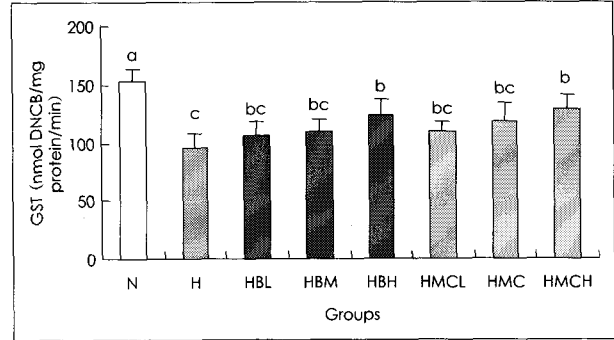


Fig. 6. Effects of the n-BuOH and CH₂Cl₂ fractions from leaves of *Z. schinifolium* on the liver GST activities in rats fed high fat diet. N: normal diet group, H: high fat diet group, HBL, HBM, and HBH: high fat diet with 50, 100 and 150 mg/day administration of n-BuOH fraction and HMCL, HMCM, and HMCH with 50, 100 and 150 mg/day administration of methylene chloride fraction from leaves of *Z. schinifolium*. All values are mean ± SE (n = 10). ^{abc}Values not sharing a common letter are significantly different among groups at p < 0.05 by Tukey's test.

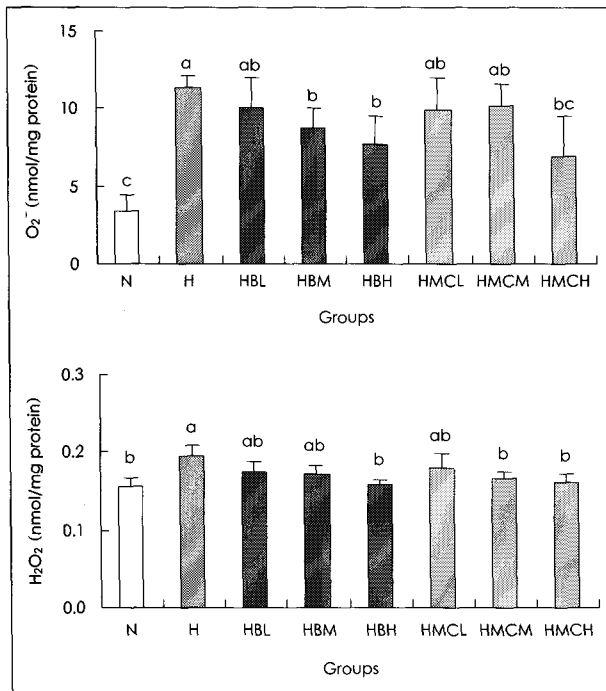


Fig. 5. Effects of the n-BuOH and CH₂Cl₂ fractions from leaves of *Z. schinifolium* on the liver O₂⁻ and H₂O₂ contents in rats fed high fat diet. N: normal diet group, H: high fat diet group, HBL, HBM, and HBH: high fat diet with 50, 100 and 150 mg/day administration of n-BuOH fraction and HMCL, HMCM, and HMCH with 50, 100 and 150 mg/day administration of methylene chloride fraction from leaves of *Z. schinifolium*. All values are mean ± SE (n = 10). ^{abc}Values not sharing a common letter are significantly different among groups at p < 0.05 by Tukey's test.

Table 2. Effects of the n-BuOH and CH₂Cl₂ fractions from leaves of *Z. schinifolium* on the liver glutathione contents in rats fed high fat diet

Groups ¹⁾	GSH / GSSG (mol/g wet tissue)		GSH/GSSG ratio
	GSH	GSSG	
N	5.11 ± 0.79 ^{2)ab3)}	1.64 ± 0.07 ^c	3.11 ± 0.37 ^a
H	2.88 ± 0.52 ^c	2.38 ± 0.14 ^a	1.21 ± 0.21 ^c
HBL	3.47 ± 0.18 ^{bc}	2.27 ± 0.04 ^{ab}	1.53 ± 0.08 ^{bc}
HBM	4.01 ± 0.58 ^{ab}	2.02 ± 0.17 ^b	2.00 ± 0.27 ^b
HBH	4.15 ± 0.22 ^b	1.69 ± 0.06 ^c	2.45 ± 0.39 ^{ab}
HMCL	3.28 ± 0.22 ^c	2.16 ± 0.06 ^b	1.52 ± 0.09 ^{bc}
HMCM	3.38 ± 0.13 ^c	1.85 ± 0.15 ^{bc}	1.84 ± 0.18 ^b
HMCH	4.10 ± 0.38 ^{ab}	1.61 ± 0.08 ^c	2.54 ± 0.21 ^b

¹⁾ N: normal diet group, H: high fat diet group, HBL, HBM, and HBH: high fat diet with 50, 100 and 150 mg/day administration of n-BuOH fraction and HMCL, HMCM, and HMCH with 50, 100 and 150 mg/day administration of methylene chloride fraction from leaves of *Z. schinifolium*. All values are mean ± SE (n = 10). ^{abc}Values not sharing a common letter are significantly different among groups at p < 0.05 by Tukey's test

9.40 nmol DNCB/mg protein/min, 고지방식이군 (H)은 95.29 ± 12.32 nmol DNCB/mg protein/min로 정상식이군에 비해 고지방식이군에서 38% 정도 감소하여 유의적 (p < 0.05)인 차이를 나타내었다. 고지방식이군에 butanol 및 me-

thylene chloride분획의 공급량의 증가에 따라 효소활성이 증가하는 경향을 나타냈으나 butanol 및 methylene chloride 분획을 고용량인 150 mg (HBH 및 HMCH) 투여한 경우에만 고지방식이군에 비해 각각 30% 및 34%씩 유의적으로 증가하였다. 한편 간조직 glutathione 함량은 Table 2에 나타난 바와 같이 고지방식이 (H)로 감소한 환원형 glutathione (GSH)가 butanol 용매 분획을 50 mg으로 저용량 투여했을 때부터 (HBL) 유의적으로 증가하였고 HBM, HBH군에서는 정상군 (N)의 80% 정도로 증가하였다. 반면 methylene chloride 투여군에서는 150 mg을 투여한 HMCH군에서만 유의적인 증가를 볼 수 있었다. 산화형 glutathione (GSSG)의 변화는 대체로 GSH의 결과에 반대였으며 종합적으로 GSH/

GSSG의 비율에서는 두 용매 분획의 투여 용량별 효과는 같았다.

고 찰

본 연구에서는 산초나무 잎의 용매추출물의 항염증, 항혈전 효과를 *in vivo*에서 보다 명확히 볼 수 있도록 고지방식이로 동물을 사육하였다. 고지방식은 체내의 고지혈증을 유발하고 산화스트레스를 높이며^{20,21} 체내 염증 작용²²⁻²⁴과 혈전 생성²⁵을 항진시키는 것으로 보고되었다. 본 연구에서도 정상식의 지방함량을 5%에서 20%로 증가시켰을 때 혈전 생성 속도가 빨라지고 염증관련 효소 활성이 증가되고 leukotriene B₄가 증가하므로써 염증작용도 항진될 것임을 보여 주었다. 산초나무 잎의 butanol 분획 및 methylene chloride 분획을 경구로 투여하여 체내에 흡수되었을 때 이 과정을 억제할 수 있었다는 점은 *in vitro*에서 검색한 효능을 확인시켜 주었다는데 본 연구 결과에 큰 의의가 있다.

고지방식이 및 고지혈증에서 혈관조직,^{22,26} 소장²³ 및 뇌 조직 등²⁴의 염증 증가 주요 원인 중의 하나가 체내 산화스트레스 증가라고 알려졌다. 대표적인 기전으로 산화스트레스가 높아짐에 따라 생성량이 많아진 superoxide와 같은 활성산소종이 NO의 농도를 감소시키는 것이 염증^{26,27} 및 혈전^{28,29}형성에 주요인으로 지적되고 있다. 따라서 산화스트레스를 완화시키는 물질들로 염증 억제 효과를 시험하였으며 녹차의 Epigallocatechin-3-gallate³⁰를 비롯한 천연 및 합성물질들^{22,31}의 효과가 보고된 바 있다. 본 연구진의 전보에서 보고된 산초나무 잎의 용매분획들의 항산화기능도 이와 같은 맥락에서 염증 억제에 일조하였으리라고 판단된다. 본 실험에서 산초나무 잎의 butanol 분획이 methylene chloride 분획 보다 다소 효과가 높은 경향을 보인 것이 전보⁹에서 보고한 DPPH 소거능이 높은 것과 관련이 있는 것으로 보인다. 한편 Jin 등³²은 *Ailanthus altissima* (tree of heaven) 잎의 추출물이 항염증 효과가 있다고 보고하였으며 이 작용이 IL-4와 IL-3의 생성을 감소에서 기인한다고 하였다. 이와 같이 염증 억제에 관련된 인자들은 다양하며³³ 본 결과에서는 염증에 직접적인 인자로 작용하는 leukotriene의 합성에 관련된 효소 활성이 억제됨을 보여 주어 산초 잎의 기본적인 항산화작용과 별개의 항염증작용이 있는 것으로 판단된다. 혈전의 형성 억제에 관한 산초나무 용매분획의 효과도 기본적으로 항산화작용에 의한 것도 있겠지만 혈액 응고 자체를 억제하는 성분에 의한 것으로 생각된다. Chen 등⁵과 Jo 등⁶이 산초나무 껍질 및 줄기에서 분리한 coumarin계 화합물이 산초나무 잎 methylene 용매분획에 존재함이 본 연구팀에

의하여 밝혀졌다.³⁴ 이 용매분획의 *in vitro* 항혈전 효과의 주요 성분이라고 판단되었던 coumarin 계통의 bergapten (C₁₂H₈O₄)이 본 결과의 *in vivo*에서도 효능에 있음이 확인되었다. 그러나 methylene chloride 분획에는 bergapten 외에 세 화합물이 존재 하며 이들은 β -sitosterol 및 lupeol, lupeone 등이다.³⁴ 이들의 steroid 구조를 고려할 때 bergapten과 같은 항응고 작용을 기대하기는 어렵지만 따로 조사해 볼 여지는 있다고 보겠다. 한편 butanol 분획에서 분리된 화합물들은 주로 propanoid 및 terpenoid의 배당체여서 본 연구에서 coumarin을 함유한 methylene chloride 분획과 같은 수준의 항혈전 효과를 보지 못한 것으로 추론된다. 그러나 산초나무 잎의 butanol 분획도 *in vitro*에서는 항혈전 작용이 있었으며⁹ 이들의 생리학적 의의에 대하여 재확인 필요하다고 생각된다. 식품성분으로 항혈전 효과를 가졌다고 알려진 물질 중 대표적인 것은 마늘의 allicin³⁵을 들 수 있으며 Shin과 Kim³⁶은 allicin 보다 섬유소와 polyphenol류가 많은 마늘 껍질의 추출물도 항혈전 효과가 있다고 보고한 바 있다. 따라서 항혈전 효과는 다양한 성분에 의하여 여러 기전에 의하여 나타날 수 있다고 보여 진다. 산초의 용매추출물의 혈전 생성 억제 작용은 산초 잎 추출물에서 보여 준 혈청 지질상태 개선 효과³⁷와 협력하여 동맥경화 예방에 우수한 효능을 나타낼 것이라고 생각한다.

이와 같이 산초나무잎 용매분획의 항염증 및 항혈증 작용은 용매 분획 내의 존재하는 개별 성분에 의하여 특이적으로 작용하기도 하지만 총괄적인 항산화 작용이 큰 부분을 차지하고 있다고 생각한다. 따라서 본 연구에서는 산화스트레스와 연관되어 전보에는 주로 항산화 효소 활성을 보고하였지만 이번에는 산화스트레스를 유발하는 시스템인 cytochrome P₄₅₀과 산화상태의 지표가 되는 glutathine계를 조사하였다. 고지방식은 식후의 혈중 지방함량을 높이며 (postprandial hypertriglyceridemia) 이는 산화스트레스로 작용한다고 알려졌다^{20,21} 이 작용이 체내에서 과산화물을 생성하는 cytochrome P₄₅₀계와의 관련성에 대하여 조사된 바가 적다. 폐와 같은 조직에서 산화스트레스에 의한 염증 증가가 cytochrome P₄₅₀을 down-regulation하는 것으로 알려져 있지만 이것도 P₄₅₀의 종류별로 반응이 다르다고 보고되고 있다.³⁸ 또한 이러한 down-regulation이 여러 종류의 cytokine에 의하여 매개되는 즉각적인 과정³⁹으로 장기간의 식이변화의 영향과 다른 양상으로 사료된다. 본 결과에서는 고지방식으로 cytochrome P₄₅₀의 함량이 증가하였으며 이에 맞추어 O₂⁻ 및 H₂O₂ 함량도 증가하였다. Tan 등⁴⁰은 고지방식을 한 당뇨쥐에 혈당강하제 metform을 투여하였을 경우 간조직의 cytochrome P₄₅₀의 함량 조절도 당뇨증상 개선에 관련되어

있음을 보여 주었다. 또한 이들의 연구⁴⁰⁾에서 *Averrhoa bilimbi* 잎의 추출물도 cytochrome P₄₅₀ 감소시키는 경향을 보였고 감초의 에탄올 추출물을 인체 간 조직세포에 *in vitro*로 첨가하였을 때도 수종의 cytochrome P₄₅₀ isoform이 감소함을 보여 주었다.⁴¹⁾ 본 실험 결과도 이러한 식물 유래 성분 효과와 유사하였다. 따라서 본 연구의 실험물질인 산초나무 잎의 butanol 및 methylene chloride분획은 고지방식이 상태에서 cytochrome P₄₅₀의 함량을 감소시킴으로써 체내 산화스트레스를 억제시키는 효과가 있다고 생각된다. GSH는 체내에서 산화스트레스에 대처하는 대표적인 생리적 항산화제이며 GST는 GSH 생성 및 해독작용에 중요한 효소다. 고지방식이에 의한 GST 활성의 감소는 Damori 등⁴²⁾의 결과와 일치하며 GSH의 감소는 Yang 등⁴³⁾의 결과와 일치한다. 고지방식에 의한 항산화효소, superoxide dismutase, glutathione peroxidase 및 catalase 활성 감소는 전보¹⁰⁾에서 보고된 있으며 다른 연구자들^{42,43)}에 의하여도 확인된 바 있다. 이러한 상황은 산화스트레스 증가에 따른 염증 생성을 촉진시키는 원인으로 작용함을 알 수 있으며 천식에서 GST 활성이 염증 생성과 관련이 높다는 것이 보고된 바 있다.³⁹⁾ 따라서 고지방식이 흰쥐에게 산초나무 잎의 butanol 및 methylene chloride분획에 의한 GST 활성과 GSH 함량의 증가가 체내의 항산화상태를 개선시키는 주요인 중의 하나로 생각된다. 산초 잎의 두 용매분획이 다 함유된 에탄올 추출물을 투여한 쥐에서 혈청 GOT와 GPT의 상승이 없었다.³⁷⁾ 이것은 산초 잎 용매 분획들에 의한 항산화 상태 개선과 간조직 산화스트레스 감소에 의한 결과로 여겨진다.

요 약

본 연구에서는 *in vitro*에서 검색된 산초나무 잎의 용매분획의 항혈전 및 항염증작용을 *in vivo*에서 확인하고자 고지방식을 섭취한 흰쥐에게 n-butanol 분획과 methylene chloride 분획을 1일 50, 100, 150 mg을 4주간 경구투여하였다. 혈장 APTT 및 TT는 정상식이군에 비해 고지방식이군에서 유의적으로 감소되었으며, 고지방식이군에 methylene chloride분획 50 mg 이상 공급군은 유의적으로 증가되어 100 mg 이상 공급군은 정상식이군 수준이었다. 다형핵 백혈구 5'-lipoxygenase 활성과 leukotriene B₄ 함량이 정상식이군에 비해 고지방식이군에서 증가되었으며, 5'-lipoxygenase 활성은 두 용매 분획을 100 mg 이상 공급한 군들이 모두 감소하였다. 백혈구의 leukotriene B₄ 함량은 n-butanol 분획에 의하여 역시 100 mg 이상 공급으로 감소하였으나 methylene chloride 분획에 의하여는 150 mg 공

급군에서만 감소하였다. 간 조직 마이크로솜의 cytochrome P₄₅₀ 함량은 정상식이군에 비해 고지방식이군에서 유의적으로 증가되었으며, 두 용매분획의 투여로 감소하는 경향이었으나 butanol 분획 150 mg 투여군에서만 유의적으로 감소하였다. 간 조직 O₂⁻의 함량과 H₂O₂ 함량도 정상식이군에 비해 고지방식이군에서 증가되었으며, butanol 분획 100 mg 이상 투여로 O₂⁻의 함량이 감소하고 methylene chloride분획 100 mg 이상에서 H₂O₂ 함량이 감소하였고 두 용매 분획을 150 gm 이상 투여하였을 때는 O₂⁻와 H₂O₂ 함량이 모두 감소하였다. 간 조직 GST 활성과 GSH 함량 및 GSG/GSSG 비율은 정상식이군에 비해 고지방식이군에서 감소되었으며, 두 용매 분획 150 mg 투여로 유의적으로 증가되었으나 GSG/GSSG 비율은 100 mg 이상 투여로 증가하였다.

결론적으로, 산초나무 잎의 methylene chloride분획은 고지방식이 흰쥐에서 혈행 장애와 염증 반응을 완화시키고, 간 조직에서의 자유라디칼 생성계를 약화시킬 뿐만 아니라, glutathione계의 환원상태를 유지시킴으로서 신체를 보호하는 효과가 있으며 butanol 분획은 항혈전 효과를 제외한 항염증 및 항산화작용에 의한 신체 보호 작용은 기대된다. 이러한 활성을 이용하면 날로 증가되는 지방섭취량에 의한 만성퇴행성질환을 억제하는데 우수한 기능성식품 소재로써 활용할 수 있다고 생각된다.

■ 감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업 (관리번호 203008-3)의 지원에 의해 이루어진 것이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

Literature cited

- 1) Ro YD, Shin MK, Song HJ. A herbolgical study on the plants of Rutaceae grown in Korea. *J Herbology* 1997; 12: 135-164
- 2) Lee SJ. Korean Folk Medicine-Monographs Series. No. 3. Publishing Center of Seoul National University, Seoul, Korea; 1966. p.88
- 3) Xiong QB, Shi DW. Morphological and histological studies of Chinese traditional drug "hua jiao" (*pericarpium zantholyli*) and its allied drugs. *Yao Hsueh Hsueh Pao* 1991; 26: 938-947
- 4) Kim KW, Baek JK, Kim JS. Isolation of Herbicidal Compounds from the Fruit of *Zanthoxylum schinifolium* S. et. Z. *Kor J Weed Sci* 2005; 25: 194-201
- 5) Chen IS, Lin Y, Tsai IL, Teng CM, Ko FN, Ishikawa T, Ishii H. Coumarins and anti-platelet aggregation constituents from *Zanthoxylum schinifolium*. *Phytochemistry* 1995; 39: 1091-1097
- 6) Jo YS, Huong DTL, Bae KH, Lee MK, Kim YH. Monoamine oxidase inhibitory coumarin from *Zanthoxylum schinifolium*.

- Planta Medica* 2000; 68: 84-85.
- 7) Mun SI. Effects of *Zanthoxylum schinifolium* and its active principle on serum lipid levels in carbon tetrachloride-treated mice. *Korean J Food Nutr* 2000; 13: 249-254
 - 8) Lim SJ, Han HK, Ko JH. Effects of edible and medicinal plants intake on blood glucose, glycogen and protein levels in streptozotocin induced diabetic rats. *Korean J Nutr* 2003; 36: 981-989
 - 9) Jang MJ, Rhee SJ, Cho SH, Woo MH, Choi JH. A study on the antioxidative, anti-inflammatory and anti-thrombogenic effects of *Zanthoxylum piperitum* DC. extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 2006; 35: 21-27
 - 10) Jang MJ, Woo MH, Rhee SJ, Cho SH. Antioxidative and anti-aging effects of sancho (*Zanthoxylum schinifolium*) extract in rats fed high fat diet. *Nutritional Sciences* 2006; 9: 159-166
 - 11) Reeves PG, Nielsen FH, Fahey Jr GC. AIN-93 Purified diets for laboratory rodents: Final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 1993; 123: 1939-1951
 - 12) Hogeboom GH. Fractionation of cell components of animal tissues in *Methods Enzymol* (Bergmeyer HU ed. Academic Press, New York) 1955; 1: 16-19
 - 13) Min KR, Shin JM, Chang YS, Kim YS. The activity of 5-lipoxygenase and the inhibitor of leukotriene B4 biosynthesis. *Yakhak Hoeji* 1989; 33: 319-323
 - 14) Omura T, Sato R. The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes. *J Biol Chem* 1964; 239: 2379-2385
 - 15) Azzi A, Montecucco C, Richter C. The use of acetylated ferricytochrome c for the detection of superoxide radicals produced in biological membrane. *Biochem Biophys Res Commun* 1975; 65: 597-603
 - 16) Gay C, Gebicki JM. A critical evaluation of the effect of sorbitol on the ferric-xylenol orange hydroperoxide assay. *Anal Biochem* 2000; 284: 217-220
 - 17) Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferase: the first enzymatic steps in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974; 249: 7130-7139
 - 18) Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Bio Chem* 1951; 193: 265-275
 - 19) Bernt E, Beugmeyer HU. Methods of enzymatic analysis: Glutathione. 2nd English Ed. Academic Press 1974; 444: 1641
 - 20) Bae JH, Bassenge E, Kim KB. Postprandial hypertriglyceridemia impairs endothelial function by enhanced oxidant stress. *Atherosclerosis* 2001; 155: 517-523
 - 21) Anderson RA, Evans ML, Ellis GRI. The relationships between postprandial lipemia, endothelial function and oxidative stress in healthy individuals and type 2 diabetes. *Atherosclerosis* 2001; 154: 475-483
 - 22) Amir JG, Hontecillas R, Si H, Liu D, Bassaganya-Riera J. Dietary abscisic acid ameliorates glucose tolerance and obesity-related inflammation in db/db mice fed high-fat diets. *Clinical Nutrition* 2007; 26: 107-116
 - 23) Luyer MD, Jacobs JA, Hadfoune M, Vreugdenhil AC, Dejong CH, Buurman CH, Greve JAM. Effect of high-fat enteral nutrition on inflammation and gut barrier function in rats after hemorrhagic shock. *Gastroenterology* 2003; 124: A339
 - 24) Zhang X, Dong F, Ren J, Driscoll MJ, Culver B. High dietary fat induces NADPH oxidase-associated oxidative stress and inflammation in rat cerebral cortex. *Experimental Neurology* 2005; 191: 318-325
 - 25) Elmas F, Kalsch T, Suvajac N, Leweling H, Neumaier M, Dempfle CF, Borggreffe M. Activation of coagulation during alimentary lipemia under real-life conditions. *Int'l J Cardiol* 2007; 114: 172-175
 - 26) Stokes KY, Cooper D, Tailor A, Grange DN. Hypercholesterolemia promotes inflammation and microvascular dysfunction: role of nitric oxide and superoxide. *Free Radical Biology Medicine* 2002; 33: 1026-1036
 - 27) Zhang L, Zalewski A, Liu Y. Diabetes-induced oxidative stress and low-grade inflammation in porcine coronary artery. *Arteriosclerosis* 2000; 150: 245-253
 - 28) Krotz F, Sohn HY, Pohl U. Reactive oxygen species: players in the platelet game. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004; 24: 1988-1996
 - 29) Begonja AJ, Teichmann L, Geiger J, Gambaryan S, Walter U. Platelet regulation by NO/cGMP signaling and NAD (P)H oxidase-generated ROS. *Blood cells Mol Dis* 2006; 36: 166-170
 - 30) Kim SH, Park HJ, Lee CM, Choi IW, Moon DO, Roh HJ, Lee HK, Park YM. Epigallocatechin-3-gallate protects toluene diisocyanate-induced airway inflammation in a murine model of asthma. *FEBS Letters* 2006; 580: 1883-1890
 - 31) Park KK, Park JH, Jung YJ, Chung WY. Inhibitory effects of chlorophyllin, hemin and tetrakis (4-benzoic acid) porphyrin on oxidative DNA damage and mouse skin inflammation induced by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate as a possible anti-tumor promoting mechanism. *Mutation Res/Genetic Toxicology Environmental Mutagenesis* 2003; 542: 89-97
 - 32) Jin MH, Yook JM, Lee EK, Lin CX, Quan ZJ, Son KH, Bae KH, Kim HP, Kang SS, Chang HW. Anti-inflammatory activity of *Ailanthus altissima* in ovalbumin-induced lung inflammation. *Biol Pharm Bull* 2006; 29: 884-888
 - 33) Sarkar D, Fisher PB. Molecular mechanisms of aging-associated inflammation. *Cancer Lett* 2006; 236: 13-23
 - 34) Zhe F. Bioactive constituents from the leaves of *Zanthoxylum schinifolium*, MS thesis. Catholic Univ of Daegu; 2006
 - 35) Steiner M, Li W. Aged garlic extract a modulator of cardiovascular risk factors: a dose-finding study on the effects of AGE on platelet functions. *J Nutr* 2001; 131: 980S-984S
 - 36) Shin SH, Mim MK. Effect of dried powders or ethanol extracts of garlic flesh and peel on lipid metabolism and antithrombogenic capacity in 16-month-old rats. *Korean J Nutrition* 2004; 37: 515-525
 - 37) Jang HS. Study on the bio-activities related to antioxidant and lipid modulating functions of various parts of *Zanthoxylum schinifolium* in rats fed high fat diet. Ph. D thesis. Catholic Univ of Daegu; 2007
 - 38) Stoilov I, Krueger W, Mankowski D, Guernsey L, Kaur A, Glynn J, Thrall RS. The cytochromes P₄₅₀ (CYP) response to allergic inflammation of the lung. *Arch Biochem Biophys* 2006; 456: 30-38
 - 39) Haag M, Frossard N, Pons F. Cytochromes P₄₅₀ et glutathione S-transferases pulmonaires: des liens possibles avec l'inflammation et l'asthme? Cytochromes P₄₅₀ et glutathione S-transferases: any association with inflammation and asthma? *Rev Fran Allerg Im*

- munol Clin* 2001; 41: 579-586
- 40) Tan BKH, Tan CH, Pushparajc PN. Anti-diabetic activity of the semi-purified fractions of *Averrhoa bilimbi* in high fat diet fed-streptozotocin-induced diabetic rats. *Life Sci* 2005; 76: 2827-2839
- 41) JH, Park JY, Ju YS. Inhibitory effect of licorice ethanol extracts on cytochrome P₄₅₀ drug-metabolizing enzymes in human liver micrososome. *Kor J Herbiology* 2004; 19: 47-54
- 42) Demori I, Voci A, Fugassa E, Burlando B. Combined effects of high-fat diet and ethanol induce oxidative stress in rat liver. *Alcohol* 2006; 40: 185-191
- 43) Yang R, Le G, Li A, Zheng J, Shi Y. Effect of antioxidant capacity on blood lipid metabolism and lipoprotein lipase activity of rats fed a high-fat diet. *Nutrition* 2006; 22: 1185-1191