韓國營養學會誌 40(2) : 111~117, 2007

흰쥐 간조직의 활성산소 및 제거효소에 미치는 목초액의 영향

조 원 기[*§] · 최 진 호[**]

조아제약 양병학종합연구소,[*] 부경대학교 생화학교실[**]

Effect of Pyroligneous Liquor on Oxygen Radicals and Their Scavenger Enzymes in Liver of CD Rats

Cho, Weon-Ki[*§] · Choi, Jin-Ho[**]

Clinical Dualism Research Institute,[*] Choa Pharmacy Co. Ltd, Seoul 150-992, Korea
Laboratory of Biochemistry,[**] Faculty of Food Science and Biotechnology, Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

ABSTRACT

This study was designed to investigate the effects of pyroligneous liquor on oxygen radicals and their scavenger enzymes in the liver of Cri/Bgi CD rats (7 rats per group). Male rats were fed a basic diet prepared in our Lab., PL-0 (Control), PL-1, PL-25, PL-50 and PL-75 groups were prepared to be 0%, 1%, 25%, 50% and 75%with distilled water using pyroligneous liquor (35% of Choa Co. Ltd.), and were administrated orally for 8 weeks. Superoxide radical contents in liver mitochondria and microsomes were significantly decreased to 12-14%, 11-15%, respectively, in these PL-25 and PL-50 groups compared with the control group. Hydroxyl radical content in mitochondria and microsomes were markedly decreased to 12-20% and 17%, respectively, in these PL-25 and PL-50% groups compared with the control group. Hydrogen peroxide content in mitochondria and microsomes were significantly decreased about 15-12% and 22-20% in liver of PL-25 and PL-50 groups compared with the control group. Mn-SOD and Cu/Zn-SOD activities in liver of PL-25 and PL-50 groups were remarkably increased to 15-25%, 11-16%, respectively, compared with the control group. GPx activities in mitochondria and microsomes were significantly increased in the liver of PL-25 and PL-50 groups compared with the control group. CAT activities in mitochondria and cytosol were significantly increased to 12-14%, 15-27%, respectively, in the liver of PL-25 and PL-50 groups compared with the control group. These results suggest that long term administration orally of 25 and 50% pyroligneous liquor may effectively inhibit the formation of oxygen free radicals, and also scavenger enzyme activities significantly increase through the administration orally. (*Korean J Nutrition* 40(2) : 111~117, 2007)

KEY WORDS : pyroligneous liquor, superoxide radical, hydroxyl radical superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), catalase (CAT).

서 론

주로 민간요법으로 사용된 것이 17세기라는 기록에서 볼 때 목초액의 역사가 거의 400년이나 된다. 이집트에서는 향수나무의 일종인 콘미포라 가타후를 태워서 나오는 연기를 항아리 물속을 통과시켜 만든 수연 (水煙)을 즐겨 마셨다는 기록이 있는가 하면 우리나라서도 지리산 계곡에서 자생하는 고로쇠나무의 수액을 채취해서 마셨듯이 캐나다나 일본에서도 나무의 수액을 건강음료 또는 질병치료의 민간요법으로 활용한 기록이 있다. 옛날 중국의 민간요법 중에 죽력요법이 있다. 푸른 대나무를 불에 구워서 받은 진액을 죽력이라 하고, 이것은 성질이 차서 열담 (熱痰)이나 번갈 (煩渴)을 고치는 약제로서 널리 민간요법으로 사용했다는 기록이 목초액의 시초가 아닌가 생각된다.[1)]

노화에 대한 연구로서 나이의 증가에 따라 활성산소가 세포막을 공격하여 지질과의 산화반응에 의한 과산화지질이라는 산화적 스트레스가 성인병을 유발할 뿐만 아니라 노화를 촉진한다.[1)]

여러 가지 환경적 요인이나 대사과정 중에 생성된 활성산

접수일 : 2006년 8월 7일
채택일 : 2007년 1월 19일
[§]To whom correspondence should be addressed.
E-mail : byunmi@hanmail.net

© 2007 The Korean Nutrition Society

소가 노화과정에서 유해인자로 작용하는 혈관관련질병, 노인성 치매, 암과 같은 악성 신생 질환 등을 유발하는 것으로 밝혀지고 있다. 칼로리 제한이 활성산소의 생성을 효과적으로 억제하여 노화를 지연시키기 때문에 40%의 칼로리 제한은 평균수명을 거의 50%까지 연장한다는 사실이 구명되어 있다.[2-4)]

노화 (aging)에 관련된 학설로서 산화스트레스 학설이 각광을 받기 시작하면서, 이 가설로서 칼로리 제한의 평균수명의 연장효과를 설명하고 있다.[8-10)]

활성산소는 조직세포의 지질뿐만 아니라 단백질과 DNA같은 핵산까지 공격의 대상이 되면서 산화적 스트레스의 결과로서 과산화지질, 산화단백질 및 변이를 유발하여 노화를 촉진한다.[11-14)]

노화에 관련된 학설로서 산화스트레스 학설이 각광을 받기 시작하면서, 이 가설로써 칼로리 제한이 수명의 연장효과를 설명하고 있다. 활성산소는 조직세포의 지질뿐만 아니라 단백질과 DNA같은 핵산까지 공격의 대상이 되면서 산화적 스트레스의 결과로서 과산화지질, 산화단백질 및 변이를 유발하면서 노화를 촉진하는 것으로 밝혀지고 있다.

최근들어 버드나무 껍질에서 아스피린을 개발하였고, 주목에서 택솔이란 유방암치료약을 개발하고 있다. 또한 고로쇠라는 수액을 비롯하여 목초액에 대한 관심이 높아지고 있다. 결국 식품이나 생약을 포함한 식물이 인간을 포함한 동물의 질병을 치료하고 수명을 연장할 수 있을 것으로 믿고 있다.

따라서 본 연구에서는 질병이나 노화의 원인으로 작용하는 활성산소와 산화적 스트레스에 미치는 목초액의 영향을 평가하는 것은 매우 의미가 있다는 판단에서 간장 중의 활성산소 및 그 제거효소의 활성에 미치는 목초액의 영향을 평가하기로 하였다.

조아제약에서 개발한 조아목초액 A (35%의 원액)를 증류수에 각각 0%, 1.0%, 25.0%, 50.0%, 75.0%가 되도록 조제한 다음, Cri/Bgi CD계 rats에 8주 동안 조제사료와 함께 자유 음용케 하여 간장 중의 활성산소 및 그 제거효소에 미치는 영향을 분석 · 평가하여 유의적인 결과를 얻었기에 보고한다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 사육조건

바이오제노믹스 (BioGenomics Inc., Seoul)에서 구입한 SPF/VAF Cri/Bgi CD계 수컷 흰쥐 (150 ± 10 g)를 구입하여 본 대학 동물사육실에서 2주 동안 실험용 조제사료로써 예비 사육한 다음, 7마리씩 5그룹으로 나누었다. 전보[15)]에 따라 참나무 원목에서 추출 정제하여 특허출원한 조아목초액을 사용하여 이 목초액 35%에 D-솔비톨, 매실엑기스, 베타인 등을 정제수에 첨가하여 생산한 시판 조아목초액 A를 음용수에 각각 0%, 1.0%, 25.0%, 50.0%, 75.0%가 되도록 조제 (Control, PL-1, PL-25, PL-50, PL-75 groups)한 다음, 조제사료와 함께 8주동안 자유 음용시킨 다음 (평균 20 ml/day), 12시간 절식, 에테르 마취 후 단두하여 간장을 절취하여 완충용액에 넣어 −70℃의 냉동고에 저장하면서 실험에 사용하였다 (Table 1).

동물사육실은 항온항습 (22 ± 2℃, 65 ± 2% RH)하에서 12시간 싸이클 (06 : 00~18 : 00)로 명암이 자동 조절되었다.

상기와 같은 방법으로 조제한 목초액 (Control, PL-1, PL-25, PL-50, PL-75 groups)사용하여 실험용 조제사료와 함께 8주동안 자유 음용시킨 다음, 12시간 절식 후 혈청 중의 목초액의 활성산소 및 제거효소에 미치는 실험에 사용하였다 (Table 1). 동물사육실은 항온항습 (22 ± 2℃, 65 ± 2% RH)하에서 12시간 싸이클 (06 : 00~18 : 00)로 명암이 자동 조절된다.

또한 본 목초액의 화학적 조성을 비교하여 보면 한국보건산업연구원이 분석한 Table 1과 같이 수분이 95.430%로서 수용상으로서 초산이 3.110%로 갑장 많고 그 다음이 무기질이 0.012%, 비타민은 0.007%로 되어 있고, 그밖에도 카르보닐화합물이 4.90 ppm이고 methyl alcohol이 3.50 ppm으로 구성되어 있음을 알 수 있었다.

2. 동물사료의 조성 및 시약

동물실험용 사료조성은 탄수화물 58.3% (α-corn starch 45.0% + sucrose 13.3%)을 기준으로 하여 단백질 18.0% (sodium-free casein), 지질 15.0% (lard/corn oil: 2/1, w/w)를 영양원으로 하였다. 비타민과 무기질 (AIN-76 mix-

Table 1. Chemical compositions of Choa pyroligneous liquor purified

Components	Unit	Standard	Results
Moisture	%	-	95.430
Acetic acid	%	2-20	3.110
Minerals	%	-	0.012
Vitamins	%	-	0.007
Heavy metal	ppm	< 4	ND
Lead	ppm	< 2	ND
Phenol	%	<16	ND
Ethyl ether	ppm	<20	ND
Benzopyrene	ppm	< 0.002	0
Methyl alcohol	ppm	<50	3.50
Carbonyls	ppm	2-25	4.70

Certified by Korea Health Industry Development Institute (2003)

ture) 각각 1.0%, 3.5%, 그리고 섬유질 3.0%, DL-methionine 0.3%, choline chloride 0.2%를 첨가하였고, 여기에 cholesterol 0.5% 및 sodium chloride 0.2%를 첨가하여 고콜레스테롤혈증을 유도하도록 동물실험용 사료를 조제하여 사용하였다.[16]

또한 분석시약은 모두 시그마제 (Sigma Co., USA)의 특급시약 및 1급 시약을 구입하여 사용하였다.

3. 간장조직의 분획

간장의 분획은 Laganiere와 Burk의 방법[16,17]에 따라 HEPES완충용액 (10 mM HEPES, 10 mM KCl, 280 mM sucrose, pH 7.4)을 사용하여 간장의 10배량으로 균질기로 균질화하여 600 × g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 다시 9,000 × g에서 15분간 저온 원심분리하여 잔사를 세척한 다음, 균질용 완충액으로서 정용하여 미토콘드리아획분으로 하고, 또다시 상층액을 40,000 × g에서 60분간 원심분리하여 잔사를 세척한 다음, 균질용 완충액으로서 정용하여 마이크로솜획분으로 하고 그 상층액을 시토졸획분으로 하여 ROS 및 제거효소 실험에 사용하였다. 이들 획분 중의 단백질의 함량은 Lowry 등[18]의 방법에 따라 측정하였다.

4. 활성산소의 생성량 측정

히드록시 라디칼 ($\cdot OH$)의 함량은 Halliwell과 Gutteridge[19]의 방법에 따라 측정하였다. 간장획분 중의 수퍼옥시드 라디칼 ($O_2^{\cdot -}$)의 생성량은 McCord와 Fridovch[20]의 방법에 따라 측정하였다. 0.1 mM EDTA를 함유한 인산완충용액 (pH 7.8) 420 μl에 cyanide의 농도가 50 μM이 되도록 20 mM cyanide 용액을 가한 후 37℃에서 10분간 가온하였다. 이 용액에 시토졸 300 μl와 0.1 mM 시토크롬 C 50 μl를 넣어 분광광도계를 사용 550 nm에서 흡광도를 시간에 따라 측정하였다. 이 때 시토크롬 C의 양은 분자흡광계수 19,500 M^{-1} cm^{-1}로 계산하였다.

5. 제거효소의 활성 측정

Oyanagui[21]의 방법에 따라 수퍼옥시드 디스무타아제의 활성은 간장의 미토콘드리아 및 시토졸 획분을 사용하여 측정하였고, 글루타치온 퍼옥시다아제의 활성은 Lawrence와 Burk[17]의 방법에 따라 340 nm에서 NADPH의 감소를 측정하기 위한 방법으로 간장의 시토졸 획분에서 측정하였다.

6. 분석결과의 통계처리

본 연구의 모든 실험결과는 통계 처리하여 평균치와 표준편차를 계산하였으며, 각 실험군간의 유의성 검정은 Student's t-test[21]로 실시하였다.

결과 및 고찰

1. 활성산소에 미치는 영향

1) 수퍼옥시드 라디칼에 미치는 영향

삼중항산소가 일중항산소 ($^1O_2$)로 변화하거나 아니면 직접 전자를 받아들여 $O_2 + e^- \rightarrow O_2^{\cdot -}$에 따라 수퍼옥시드 라디칼 ($O_2^{\cdot -}$)이 생성되는데, 이것이 다시 전자를 받아들여 과산화수소로 되고, 이것이 다시 $Fe^{2+} \rightarrow Fe^{3+}$로 될 때 생성되는 전자를 받아들여 히드록시 라디칼 ($\cdot OH$)을 생성하기 때문에 프리 라디칼 장애 중의 초기단계에서 가장 강력한 활성산소로서 수퍼옥시드 라디칼이 보고되어 있다.

따라서 체내에서 $O_2^{\cdot -}$의 생성은 가장 강력한 $\cdot OH$의 생성을 유발하여 체 단백질의 여러 아미노산 잔기에 작용하여 카르보닐기를 생성하기 때문에 가교결합에 의한 노화가 촉진된다.

목초액의 용량별 투여에 의한 간조직 획분 중의 미토콘드리아, 마이크로솜 및 시토졸획분에서 $O_2^{\cdot -}$의 생성량을 비교하여 보면 Table 2에서 보는 바와 같다. 간조직의 미토콘드리아에서 $O_2^{\cdot -}$의 생성량은 모든 투여군에서 $O_2^{\cdot -}$의 생성량을 용량 의존적으로 억제하는 경향을 나타내고 있었다.

특히 목초액 PL-25 및 PL-50 투여군의 미토콘드리아획분에서 $O_2^{\cdot -}$의 생성량은 각각 7.45 ± 0.56 및 7.26 ± 0.48 nmol/mg protein으로서 대조군의 $O_2^{\cdot -}$의 생성량 (8.42 ± 0.54 nmol/mg protein) 대비 각각 12% 및 14%의 $O_2^{\cdot -}$생성 억제효과가 나타났다 ($p < 0.01$).

또한 간조직의 마이크로솜획분에서는 $O_2^{\cdot -}$의 생성량에 미치는 목초액 투여군의 영향을 비교하여 보면 간조직 미토콘드리아획분의 $O_2^{\cdot -}$의 생성량과 거의 유사한 결과를 나타내고 있었다.

간조직 마이크로솜획분에서 목초액의 투여에 따라 모든 투여군에서 대조군에 비하여 $O_2^{\cdot -}$의 생성량이 억제되고 있었다. 목초액 PL-25 및 PL-50 투여군의 $O_2^{\cdot -}$의 생성량은 4.65 ± 0.15 및 4.85 ± 0.39 nmol/mg protein으로서 대조군의 $O_2^{\cdot -}$ (5.45 ± 0.34 nmol/mg protein) 대비 각각 15% 및 11.0%의 $O_2^{\cdot -}$의 생성량 억제효과가 인정되었다 ($p < 0.01$). 이러한 사실은 목초액의 아질산염 제거 및 항산화활성과 잘 일치하였고,[24] 목초액의 DPPH제거활성도 일치하고 있었다.[25]

따라서 목초원액을 적당한 용량으로 희석하여 음용하게 될 경우 활성산소의 생성반응 초기단계부터 여러 가지 활성산소의 생성을 효과적으로 억제할 수 있을 것으로 기대된다.

2) 히드록시 라디칼에 미치는 영향

목초액의 용량별 투여에 의한 간조직 획분에서 히드록시

라디칼 (·OH)의 생성량을 비교하여 보면 Table 2와 같다. 간조직 중 미토콘드리아획분에서는 ·OH 생성량이 목초액 PL-25 및 PL-50 투여군에서 현저한 ·OH의 억제효과가 나타났다 ($p < 0.01$). PL-25 투여군은 ·OH 생성량이 3.92 ± 0.26 nmol/mg protein으로서 대조군의 ·OH (4.81 ± 0.19 nmol/mg protein) 대비 20%의 유의적인 억제효과가 나타났다 ($p < 0.001$).

마찬가지로 PL-50 투여군의 ·OH 생성량도 4.24 ± 0.14 nmol/mg protein으로 대조군의 ·OH 생성량 대비 12%의 ·OH의 생성 억제효과가 인정되었다 ($p < 0.01$). 그러나 목초액 PL-25 및 PL-50 투여군을 제외한 다른 목초액 투여군에서는 대조군과 비교하여 유의적인 차이를 인정할 수 없었다.

또한 간조직 중의 마이크로솜획분에서는 미토콘드리아획분과 ·OH의 생성량 억제효과를 비교하여 보면 목초액 PL-50, PL-25, PL-75, PL-1 투여군의 순으로 ·OH의 생성 억제효과를 나타내고 있었다.

PL-50 투여군의 ·OH의 생성량은 4.59 ± 0.45 nmol/mg protein으로서 대조군의 ·OH의 생성량 (5.76 ± 0.81 nmol/mg protein) 대비 20%의 유의적인 ·OH의 생성 억제효과가 나타났으며 ($p < 0.001$), PL-25 투여군의 ·OH의 생성량은 4.78 ± 0.63 nmol/mg protein으로서 대조군의 ·OH의 생성량 대비 17%의 ·OH의 생성 억제효과가 인정되었으나 ($p < 0.001$), 미토콘드리아획분과 마찬가지로 그 외의 목초액 투여군 PL-1 및 PL-75 투여군은 대조군과 비교하여 유의적인 차이를 인정할 수 없었다.

3) 과산화수소에 미치는 영향

간조직 획분에서 과산화수소의 생성에 미치는 목초액 투여효과를 살펴본 결과는 Table 2에 나타낸 것과 같다.

간조직의 획분 중에서는 목초액 투여에 의해 과산화수소의 생성 억제효과가 나타났다. 먼저 미토콘드리아획분의 과산화수소의 생성량을 비교하여 보면 목초액 PL-25 및 PL-50 투여군은 각각 1.05 ± 0.08 및 1.09 ± 0.06 nmol/mg protein으로서 대조군의 과산화수소의 생성량 (1.24 ± 0.04 nmol/mg protien) 대비 각각 15%, 12%의 상당히 유의적인 과산화수소의 생성 억제효과가 나타났다 ($p < 0.05$~$p < 0.01$).

반면 간조직 마이크로솜획분의 과산화수소의 생성량을 비교하여 보면, 목초액 PL-25 투여군의 과산화수소의 생성량은 1.95 ± 0.14 nmol/mg protien으로서 대조군의 과산화수소의 생성량 (2.51 ± 0.10 nmol/mg protien) 대비 22%의 매우 유의적인 과산화수소의 생성 억제효과가 나타났고 ($p < 0.001$), 목초액 PL-50 투여군의 과산화수소의 생성량도 1.97 ± 0.11 nmol/mg protien으로서 대조군의 과산화수소의 생성량 대비 20%이상의 현저한 과산화수소의 생성 억제효과가 나타났다 ($p < 0.001$).

Table 2. Effects of pyroligneous liquor on superoxide radical, hydroxyl radical and hydrogen peroxide contents in rat liver for 8 weeks

Groups	Superoxide radical (nmol/mg protein)	Hydroxyl radical (nmol/mg protein)	Hydrogen peroxide (nmol/mg protein)
Mitochondria			
Control	8.42 ± 0.54[a]	4.81 ± 0.19[a]	1.24 ± 0.0.4[a]
PL-1	8.25 ± 0.64	4.54 ± 0.17	1.12 ± 0.09*
PL-25	7.45 ± 0.56*	3.92 ± 0.26**	1.05 ± 0.08**
PL-50	7.26 ± 0.48**	4.24 ± 0.14*	1.09 ± 0.06**
PL-75	8.24 ± 0.25	4.53 ± 0.16	1.15 ± 0.10
Microsome			
Control	5.45 ± 0.34	5.76 ± 0.81	2.51 ± 0.10[a]
PL-1	5.26 ± 0.25	5.64 ± 0.31	2.38 ± 0.08
PL-25	4.65 ± 0.15**	4.78 ± 0.63***	1.95 ± 0.14***
PL-50	4.85 ± 0.39*	4.59 ± 0.45***	1.97 ± 0.11***
PL-75	5.24 ± 0.34	5.60 ± 0.20	2.14 ± 0.14**

PL-1, PL-25, PL-50, PL-75 and PL-100. 1%, 25%, 50% and 75% of pyroligneous liquor. [a]Mean ± SD with 7 rats per group. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, **: $p < 0.01$ compared with control group

또한 목초액 PL-75 투여군은 과산화수소의 생성량이 2.14 ± 0.14 nmol/mg protien으로서 대조군의 과산화수소의 생성량에 비하여 15%의 과산화수소의 생성 억제효과가 나타났었다 ($p < 0.01$).

따라서 간조직 획분에서의 과산화수소의 생성 억제효과를 평가하여 보면 과산화수소 생성 억제효과에 대한 목초액 투여효과는 PL-25 및 PL-50 그룹에서 매우 유의적인 생성 억제효과가 인정되었는데, 이러한 사실은 체내 활성산소를 효과적으로 무독화시켜서 체외로 배출하는데 크게 작용할 것으로 기대된다.

흥미로운 사실은 PL-75군이 다른 목초액 투여군에 비하여 활성산소의 함량이 높게 나타났는데. 이것은 과량 섭취에 따른 역작용일 가능성을 배제할 수 없다.

2. 방어시스템에 미치는 영향

1) 수퍼옥시드 디스무타아제의 활성 평가

수퍼옥시드 디스무타아제 (SOD)는 산소대사의 유해작용에 대하여 가장 강력한 방어효소의 하나로 알려져 있다. 그래서 피부 노화를 방지하기 위해 최고급 화장품에 첨가하고 있다. SOD효소는 $O_2^{\cdot -}$의 제거효소 로서 작용하기 때문에 산소를 사용하는 동물들은 SOD 및 그에 상응하는 방어기구 없이는 살아갈 수가 없다.

Table 3. Effects of pyroligneous liquor on superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase activities in rat liver for 8 weeks

Groups	Superoxide dismutase (unit/mg protein)	Glutathione peroxidase (IU/g protein)	Catalase (μmol/min/mg protein)
Mn-SOD activity			
Control	15.69 ± 0.75	24.21 ± 2.21[a]	42.25 ± 3.26[a]
PL-1	16.96 ± 1.00	25.15 ± 1.85	43.56 ± 3.84
PL-25	19.58 ± 1.18***	26.47 ± 1.69*	48.25 ± 4.25**
PL-50	18.11 ± 1.31**	28.31 ± 2.01**	47.21 ± 3.95*
PL-75	16.76 ± 1.73	25.62 ± 1.56	44.24 ± 2.56
Cu/Zn-SOD activity			
Control	30.75 ± 2.27	45.49 ± 4.31	80.24 ± 5.91[a]
PL-1	32.43 ± 1.87	48.60 ± 2.45	86.79 ± 6.46
PL-25	34.03 ± 2.25*	50.89 ± 0.04*	102.25 ± 5.72**
PL-50	35.76 ± 0.91**	52.62 ± 1.15**	92.42 ± 2.41*
PL-75	32.01 ± 3.10	47.19 ± 1.60	83.06 ± 7.07

PL-1, PL-25, PL-50, PL-75 and PL-100. 1%, 25%, 50% and 75% of pyroligneous liquor. [a]Mean ± SD with 7 rats per group. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$ compared with control group

SOD 활성에 미치는 목초액의 투여 효과를 비교하여 보면 Table 3과 같다. 간조직 획분에서 Mn-SOD 및 Cu/Zn-SOD 활성에 미치는 목초액의 투여효과를 비교하여 보면 목초액 PL-25 및 PL-50 투여군은 대조군에 비하여 SOD 활성을 효과적으로 증가하고 있었다.

간조직 미토콘드리아획분의 Mn-SOD 활성을 비교하여 보면 목초액 PL-25 투여군의 Mn-SOD 활성은 19.58 ± 1.18 unit/mg protein으로서 대조군의 Mn-SOD 활성 (15.69 ± 0.75 unit/mg protein) 대비 25%의 매우 유의적인 Mn-SOD 활성 증가효과가 나타났다 ($p < 0.001$). 그 다음으로는 목초액 PL-50 투여군으로서 Mn-SOD 활성은 18.11 ± 1.31 unit/mg protein으로서 대조군에 비하여 15%의 활성 증가 효과가 인정되었다 ($p < 0.01$). 그 밖의 목초액 투여군으로서 PL-1.0, PL-75 및 PL-100 투여군의 Mn-SOD 활성은 대조군 대비 유의적 효과를 발견할 수가 없었다.

한편 간조직의 시토졸획분의 Cu/Zn-SOD 활성을 비교하여 보면 목초액 PL-50 투여군의 Cu/Zn-SOD 활성은 35.76 ± 0.91 unit/mg protein으로서 대조군의 Cu/Zn-SOD 활성 (30.75 ± 2.27 unit/mg protein)과 비교하여 볼 때 16%의 유의적인 Cu/Zn-SOD 활성 증가효과가 나타났다 ($p < 0.01$).

또한 목초액 PL-25 투여군의 Cu/Zn-SOD 활성은 34.03 ± 2.25 unit/mg protein으로서 대조군의 Cu/Zn-SOD 활성 대비 11%의 활성 증가효과가 나타났다 ($p < 0.05$). 그밖의 목초액 투여군에서는 Cu/Zn-SOD 활성의 유의적 차이를 발견할 수 없었다.

목초액 투여는 간조직 중의 SOD 활성을 효과적으로 증가하지만, 목초액의 투여량에 상당한 영향을 받고 있다는 사실이 확인되었다. 이런 이유로서 목초액의 음용농도를 결정하는데 상당한 과학적인 근거를 제시할 수 있을 것으로 기대된다.

2) 글루타치온 퍼옥시다아제의 활성 평가

글루타치온 퍼옥시다아제 (GPx)도 활성산소 제거효소의 하나로서 H_2O_2가 $\cdot OH$로의 변화를 무독화하여 활성산소를 제거하는 역할을 한다.

목초액 투여에 의한 간조직의 미토콘드리아획분 중의 GPx의 활성을 비교하여 보면 Table 3에서 보는 바와 같이 목초액 PL-25 및 PL-50 투여군의 GPx 활성은 26.47 ± 1.69 및 28.31 ± 2.01 IU/g protein으로서 대조군의 GPx 활성 (24.21 ± 2.21 IU/g protein) 대비 각각 10% 및 17%의 상당한 GPx 활성 증가효과가 나타났다 ($p < 0.05$~$p < 0.01$).

또한 간조직 시토졸획분 중의 GPx 활성을 비교하여 보면, 목초액 PL-25 및 PL-50 투여군의 GPx 활성은 50.89 ± 0.04, 52.62 ± 1.15 IU/g protein으로서 대조군의 GPx 활성 (45.49 ± 4.31 IU/g protein) 대비 12% 및 16%의 상당히 유의적인 GPx활성 증가효과가 나타났다. 그렇지만, 그 밖의 투여군에서는 뚜렷한 GPx의 증가효과를 기대할 수 없었다.

따라서 목초액 투여는 간조직의 GPx 활성을 상당히 효과적으로 증가하여 활성산소 중 과산화수소 → 히드록시 라디칼의 변화를 효과적으로 억제하여 활성산소에 의한 성인병이나 노화 등의 생리적 변화에 긍정적으로 작용할 것으로 기대된다.

3) 카탈라아제의 활성 평가

활성산소 제거효소인 카탈라아제 (CAT) 활성에 대한 목초액의 투여효과를 비교하여 보면 Table 3에서 보는 바와 같이 간조직 미토콘드리아획분에서의 CAT 활성을 비교하여 보면 모든 목초액 투여군에서 CAT 활성이 증가하는 경향을 나타내고 있었지만, 그 중에서도 목초액 PL-25 및 PL-50 투여군에서 상당히 유의적인 CAT 활성 증가효과가 나타났다.

간조직 미토콘드리아획분 중의 CAT 활성을 비교하여 보면 목초액 PL-25 및 PL-50 투여군의 CAT 활성은 48.25 ± 4.25 및 47.21 ± 3.95 μmol/min/mg protein으로서 대조군의 CAT 활성 (42.25 ± 3.26 μmol/min/mg protein) 대비 각각 14% 및 12%의 유의적인 CAT 활성 증가효과가 나

타났다 ($p < 0.05 \sim p < 0.01$).

또한 간조직의 시토졸획분 중의 CAT 활성도 비교하여 보면 목초액 PL-25 및 PL-50 투여군의 CAT 활성은 102.25 ± 5.72 및 92.42 ± 2.41 μmol/min/mg protein으로서 대조군의 CAT 활성 (80.24 ± 5.91 μmol/min/mg protein) 대비 각각 27% 및 15%의 매우 효과적인 CAT 활성 증가효과가 인정되었다 ($p < 0.01 \sim p < 0.001$).

그밖의 농도에서는 미토콘드리아 및 시토졸획분에서 다같이 CAT 활성의 유의적인 증가효과를 기대할 수 없었다.

이상의 실험결과를 종합적으로 고찰하여 보면 활성산소로서 수퍼옥시드 라디칼 ($O_2^{\cdot -}$), 히드록시 라디칼 (·OH) 및 과산화수소 등의 활성산소 억제효과는 이미 목초액의 아질산염 제거 및 항산화활성과 거의 유사한 경향을 나타냈고,[24] 목초액의 DPPH제거활성과도 거의 유사한 경향을 나타내고 있음을 알 수 있었다.[25]

또한 이들 $O_2^{\cdot -}$, ·OH 및 H_2O_2 등의 활성산소의 억제효과 및 Mn-SOD, Cu/Zn-SOD, GPx 및 CAT 같은 생체 방어효소의 활성은 저자 등이 이미 발표했던 솔잎 추출물, 솔잎 부탄올 (BuOH) 및 에틸아세테이트 (EtOAc) 획분의 혈청, 간장 및 뇌조직 획분의 활성산소의 생성 억제 및 활성산소 제거효소의 활성 증가와 거의 비슷한 경향을 나타내고 있었다.[26-28]

참나무와 마찬가지로 소나무도 목초액의 재료라는 사실에서 볼 때 이들 목재 중에 활성산소의 생성을 억제하고 생체방어효소의 활성을 증가시켜 성인병을 예방하고 노화를 방지할 가능성이 있다고 생각된다.

활성산소에 미치는 영향과 마찬가지로 PL-75군이 다른 목초액 투여군에 비하여 제거효소의 활성이 상대적으로 낮게 나타났는데. 이러한 사실도 활성산소와 마찬가지로 과량섭취에 따른 역작용일 가능성을 배제할 수 없다.

요 약

시판 목초액 A (원액 35%)을 사용하여 음용수에 0%, 1.0%, 25.0%, 50.0%, 75.0%가 되도록 조제한 다음, CD계 수컷 흰쥐 (150 ± 10 g)에 2개월 동안 조제사료와 함께 자유 음용케 하여 간조직 중의 활성산소로서 수퍼옥시드 라디칼 ($O_2^{\cdot -}$), 히드록시 라디칼, 과산화수소 및 제거효소로서 수퍼옥시드 디스무타아제 (SOD), 글루타치온 퍼옥시다아제 (GPx) 및 카탈라아제 (CAT)에 미치는 영향을 평가하였다.

목초액 PL-25 및 PL-50 투여군의 간조직의 미토콘드리아 획분에서는 $O_2^{\cdot -}$의 생성량은 대조군 대비 12~14%의 $O_2^{\cdot -}$의 생성량 억제효과가 나타났고, 간조직의 마이크로솜획분에서는 대조군 대비 각각 11.0~15.0%의 $O_2^{\cdot -}$의 생성량 억제효과가 나타났다. 간조직 미토콘드리아획분에서 ·OH 생성량이 목초액 PL-25 및 PL-50 투여군에서 대조군 대비 12~20%의 ·OH 생성 억제효과가 나타났고, 간조직의 마이크로솜획분에서는 대조군 대비 17~20%의 ·OH 생성 억제효과가 나타났다. 목초액 PL-25 및 PL-50 투여군의 간조직의 미토콘드리아획분에서는 대조군 대비 12~15%의 유의적인 H_2O_2의 생성 억제효과가 나타났고, 간조직의 마이크로솜획분에서는 대조군 대비 20~22%의 상당히 유의적인 H_2O_2의 생성 억제효과가 나타났다.

목초액 PL-25 및 PL-50 투여군의 간조직의 Mn-SOD 활성은 대조군 대비 15~25%나 유의적인 활성 증가효과가 인정되었고, 간조직의 Cu/Zn-SOD 활성은 대조군 대비 11~16%의 유의적인 SOD활성 증가효과가 인정되었다. 목초액 PL-25 및 PL-50 투여군의 간조직의 미토콘드리아획분의 GPx 활성은 대조군 대비 10~17%의 GPx 활성 증가효과가 인정되었고, 간조직의 마이크로솜획분의 GPx 활성은 대조군 대비 10~14%의 유의적인 GPx 활성 증가효과가 인정되었다. 목초액 PL-25 및 PL-50 투여군의 간조직의 미토콘드리아획분의 CAT 활성은 대조군 대비 12~14%의 유의적인 CAT 활성 증가효과가 나타났고, 간조직의 시토졸 1 획분에서는 대조군 대비 15~27%의 CAT 활성 증가효과가 인정되었다.

이상의 결과에서 목초액의 장기간 투여는 간조직 중의 활성산소의 억제효과뿐만 아니라 방어시스템으로서 활성산소 제거효소의 역할도 충실히 수행하여 노화를 효과적으로 예방하고 억제할 수 있을 것으로 기대된다.

Literature cited

1) Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals, ageing, and disease. In: Free Radicals in Biology and Medicine (2nd eds) *Clarendon Press* (Oxford), pp.444-445, 1989
2) MaCay CM, Crowell LA, Maynard J. The effect of retarded growth upon the length of lifespan and upon the ultimate body size. *J Nutr* 10: 63-79, 1935
3) Yu BP, Masoro EJ, McMahan F. Nutritional influences on aging of fisher 344 rats: I. Physical, metabolic, and longevity characteristics. *J Gerontology* 40(6): 657-670, 1985
4) Yu BP. Moduration of aging processes by dietary restriction. *CRC Press*, Boca Raton, FL, 1994
5) Yu BP. Cellular defenses against from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 74: 139-162, 1994
6) Yu BP. Aging and oxidstive stress: Modulation by dietary restriction. *Free Rad Biol Med* 21: 651-668, 1996
7) Yu BP, Yang R. Critical evaluation of free radical theory of aging: A proposal of oxidative stress hypothesis. *Ann N Y Acad Sci* 786:

1-11, 1996
8) Choi JH, Yu BP. The Effect of food restriction on kidney membrane structures of aging rats. *Age* 2: 133-136, 1989
9) Choi JH, Yu BP. Unsuitability of TBA test as a lipid peroxidation marker due to prostaglandin synthesis. In The Aging Kidney. *Age* 13: 61-64, 1990
10) Choi JH. Lipid peroxidation, aging and food restriction. *Kor J Biochem* 23(1) : 61-70, 1991
11) Freeman BA, Crapo JD. Biology of disease: Free radical and tissue injury. *Lav Invest* 47: 412-426, 1982
12) Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RA, McCord JM, Harman D. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 107: 526-545, 1987
13) Southorn PA, Powis G. Free radical's in medicine. II. Involvement in human disease. *Mayo Clin Proc* 63: 390-408, 1988
14) Yu BP. Oxidative damage by free radicals and lipid peroxidation in aging. In: Yu, B. P. ed. *Free Radicals In Aging.* Boca Taton, CRC Press, pp.57-88, 1993
15) Cho WK, Choi JH. Effect of pyroligneous liquor on lipid metabolism in serum of CD rats. *Korean J Nutrition* 40(1) : 24-30, 2007
16) Laganiere S, Yu BP. Anti-lipoperoxidation action of food restriction. *Biochem Biophys Res Commn* 145: 1185-1191, 1987
17) Lawrence RA, Burk RF. Species, tissue and subcellular distribution of non Se-dependent glutathione peroxidase activity. *Lipid* 19: 444-452, 1978
18) Lowry OH, Roseborough NJ, Farr LA, Randall RJ. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951
19) Halliwell B, Gutteridge GMC. Formation of a thiobarbituric acid-reactive substance from deoxyribose in the persence of iron salts. *FEBS Lett* 128: 347-350, 1981
20) McCord JM, Fridovch I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J B Chem* 244(22) : 6049-6055, 1969
21) Oyanagui Y. Revaluation of assay methods and establishment of Kit for superoxide dismutase activity. *Anal Biochem* 42: 290-296, 1984
22) Steel RGD, Torrie JH. Principles and procedures of statistics. McGrawhill, New York, 1960
23) Choi JH, Yu BP. The effects of dietary restriction on age-related changes in rat serum prostaglandins. *Age Nutr* 10(1) : 47-51, 1999
24) Jeong CH, Shim KH. Nitrite-scavenging and antioxidant activities of wood vineger. *Korean J Food Preservation* 9(3) : 351-355, 2002
25) Lee KM, Jeung KT, Park DH. Study of antimicrobial and DPPH radical scavenger activity of wood vineger. *Korean J Biotechnol Bioeng* 19(5) : 381-384, 2004
26) Choi JH, Kim DW, Kim JH, Kim KS, Lee JS. The effect of pine needle extract (PNE) on physiological activity in SD rats. I. Feeding effect of PNE on the metabolism of lipid and oxygen radicals. *Kor J Life Sci* 7(4) : 371-376, 1997
27) Choi JH, Kim DI, Park SH, Kim DW, Lee JS, Kim HS. The effect of pine needle extract (PNE) on oxygen free radicals and scavenger enzymes in rat liver. *Kor J Life Sci* 9(4) : 466-472, 1999
28) Choi JH, Kim DI, Park SH, Kim CM, Kim HS. The effect of ethyl acetate fraction with pine needle extract (PNE) on oxygen free radicals and scavenger enzymes in rat liver. *Kor J Geronto* 11(2) : 14-20, 2001