



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2020년 8월
박사학위논문

황칠나무 잎 추출물의
에탄올-유도 간독성 예방 및
항고요산혈증 효과

조선대학교 대학원

의 과 학 과

양 선 아

황칠나무 잎 추출물의
에탄올-유도 간독성 예방 및
항고요산혈증 효과

Preventive effect against ethanol-induced
hepatotoxicity and anti-hyperuricemic effect
of *Dendropanax morbifera* leaf extracts

2020년 8월 28일

조선대학교 대학원

의과학과

양선아

황칠나무 잎 추출물의
에탄올-유도 간독성 예방 및
항고요산혈증 효과

지도교수 최 철 희

이 논문을 이학 박사학위신청 논문으로 제출함

2020년 5월

조선대학교 대학원

의 과 학 과

양 선 아

양선아의 박사학위논문을 인준함

위원장 동신대학교 교수 김 선 민 (인)

위 원 조선대학교 교수 한 송 이 (인)

위 원 조선대학교 교수 임 성 철 (인)

위 원 남원시 책임연구원 이 태 범 (인)

화장품산업지원센터

위 원 조선대학교 교수 최 철 희 (인)

2020년 7월

조선대학교 대학원

목 차

LIST OF TABLES	i
LIST OF FIGURES	ii
ABBREVIATIONS	iii
ABSTRACT	v
제1장 서론	1
제2장 재료 및 방법	5
제1절 재료	5
1. 식물 재료	5
2. 세포 배양	5
제2절 실험 방법	5
1. 추출	5
2. 성분 분석	6
3. 항산화 활성	9
가. DPPH 라디칼 소거 활성 측정	9
나. 세포 내 ROS 소거 활성 측정	9
4. 세포 독성 및 에탄올에 의한 간독성 예방 효과	10
가. 세포 독성	10
나. 에탄올 유도 간독성 예방 효과	10
5. 흰쥐의 혈중 에탄올 및 아세트알데히드 농도 측정	11
가. 실험동물의 사육 및 처리	11
나. 혈중 에탄올 농도 측정	11

다. 혈중 아세트알데히드 농도 측정	12
6. Xanthine oxidase 억제 활성	13
7. 고요산혈증 유발 흰쥐에서 황칠나무 잎 추출물의 요산	
저하 효능	13
가. 실험동물의 사육 및 처치	13
나. 요산 농도 측정	14
다. Xanthine oxidase activity 측정	14
8. 통계처리	15
제3장 결과 및 고찰	16
제1절 추출 수율 및 성분 함량	16
1. 추출 수율	16
2. 성분 함량	17
제2절 황칠나무 잎 추출물의 항산화 효과	19
1. DPPH 라디칼 소거 효능	19
2. DCFH-DA 측정법을 이용한 ROS 소거 효능	21
제3절 황칠나무 잎 추출물의 세포독성 및 에탄올 유도	
간독성 예방 효과	23
1. MTT assay를 이용한 Hep3B 세포 생존율	23
2. 황칠나무 잎 추출물의 에탄올 유도 간독성 예방 효과	25
가. 에탄올 처리 농도에 따른 세포독성	25
나. 에탄올 유도 간독성 예방 효과	26
3. 에탄올 투여 흰쥐에서 황칠나무 잎 추출물의 혈중	
에탄올 및 아세트알데히드 농도 변화	28
가. 흰쥐의 혈중 에탄올 농도	28
나. 흰쥐의 혈중 아세트알데히드 농도	30

제4절 황칠나무 잎 추출물의 고요산혈증 예방 효과	32
1. Xanthine oxidase 저해 활성	32
2. 고요산혈증 유발 흰쥐의 고요산혈증 예방 효과	34
가. 흰쥐의 혈청 및 소변 내 요산 농도	34
나. 흰쥐의 혈청 및 간 xanthine oxidase activity	36
제4장 요약	38
감사의 글	40
참고문헌	41

LIST OF TABLES

Table 1. MRM conditions	6
Table 2. MS parameters	7
Table 3. LC-MS/MS analysis condition for compound in extract from the <i>Dendropanax morbifera</i> leaf extracts	8
Table 4. Yields of <i>Dendropanax morbifera</i> leaf extracts	16
Table 5. Chlorogenic acid and rutin contents in <i>Dendropanax morbifera</i> leaf extracts	18
Table 6. DPPH radical-scavenging ability of <i>Dendropanax morbifera</i> leaf extracts and its active compounds	20
Table 7. Effect of <i>Dendropanax morbifera</i> leaf extracts on Hep3B cell viability	24
Table 8. Xanthine oxidase inhibition activity of <i>Dendropanax morbifera</i> leaf extracts and its active compounds	33
Table 9. Effect of <i>Dendropanax morbifera</i> leaf extracts on uric acid levels in serum and urine in the hyperuricemia rat model	35
Table 10. Effect of <i>Dendropanax morbifera</i> leaf extracts on xanthine oxidase activity in serum and liver in the hyperuricemia rat model	37

LIST OF FIGURES

Fig. 1. Metabolism of ethanol in liver	1
Fig. 2. Uric acid formation process	2
Fig. 3. Standard curves of ethanol [A] and acetaldehyde [B] by colorimetric method for determination of ethanol and acetaldehyde levels in serum	12
Fig. 4. Time schedule of experiment of anti-hyperuricemic effects <i>in vivo</i>	14
Fig. 5. ROS-scavenging ability of <i>Dendropanax morbifera</i> leaf extracts and its active compounds	22
Fig. 6. Hep3B cell viabilities as a function of different concentrations of ethanol	25
Fig. 7. Preventive effect of <i>Dendropanax morbifera</i> leaf extracts on ethanol-induced hepatotoxicity	27
Fig. 8. Effects of <i>Dendropanax morbifera</i> leaf extract on ethanol levels in plasma of ethanol-treated rats	29
Fig. 9. Effects of <i>Dendropanax morbifera</i> leaf extract on acetaldehyde levels in plasma of ethanol-treated rats	31

ABBREVIATIONS

ADH	Alcohol dehydrogenase
AHS	Allopurinol hypersensitivity syndrome
ALDH	Acetaldehyde dehydrogenase
ALT	Alanine aminotransferase
AST	Aspartate aminotransferase
CGA	Chlorogenic acid
DCF	2',7'-Dichlorodihydro-fluorescein
DCFH-DA	2',7'-Dichlorodihydro-fluorescein diacetate
DL	Desolvation line
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DNA	Deoxyribonucleic acid
DMLE	<i>Dendropanax morbifera</i> leaf extract
DPPH	2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl
FBS	Fetal bovine serum
GC-MS	Gas chromatography-mass spectrometry
HDL-C	High-density lipoprotein cholesterol
IL-6	Interleukin 6
LC-MS/MS	Liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry
LDL-C	Low-density lipoprotein cholesterol
MRM	Multiple reaction monitoring
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide
PBS	Phosphate buffered saline
PPB	Potassium phosphate buffer
ROS	Reactive oxygen species
SD rat	Sprague-Dawley rat
TC	Total cholesterol
TG	Triglyceride
TNF- α	Tumor necrosis factor- α

URAT1	Urate transporter 1
Vit C	L-Ascorbic acid
XO	Xanthine oxidase
+ESI	Positive electro-spray ionization

ABSTRACT

Preventive effect against ethanol-induced
hepatotoxicity and anti-hyperuricemic effect
of *Dendropanax morbifera* leaf extracts

Yang Sun A

Advisor: Prof. Choi Cheol-Hee Ph.D.

Department of Biomedical Sciences,

Graduate School of Chosun University

Preventive effect against ethanol-induced hepatotoxicity and anti-hyperuricemic effect of *Dendropanax morbifera* leaf extracts (DMLEs) were investigated after extraction using water and ethanol (30%, 50% and 70%).

The yield of DMLEs ranged from 19.66% to 24.14%, in which water DMLE showing the highest yield. Chlorogenic acid and rutin contents in DMLEs ranged from 6.4 to 21.4 mg/g and 10.4 to 29.5 mg/g, respectively, and positively correlated with increasing ethanol concentration in the extraction solvent. Antioxidant effect of DMLEs was examined. Among DMLEs, the 70% ethanol DMLE indicated the strongest DPPH radical-scavenging activity with the IC₅₀ value of 78.9 µg/mL by DPPH radical-scavenging assay. The intracellular reactive oxygen species (ROS)-scavenging assay using dichlorodihydro-fluorescein diacetate showed that the most effective DMLEs were the 50% ethanol DMLE, followed in order by 30% ethanol, water and 70% ethanol DMLEs. The cytotoxic effects of the DMLEs were compared by the MTT assay. The IC₅₀ values of the DMLEs ranged between 2.08 to 1.11 mg/mL in Hep3B cells.

Hep3B cells were pretreated with the DMLEs (50–200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 30 mins and then ethanol was added and incubated further for 24 hours. The results showed that the 30% and 50% ethanol DMLEs significantly prevented ethanol-induced hepatotoxicity. In addition, the rats were administered the water DMLE for 30 mins prior to administration of ethanol (3 g/kg) and then the plasma levels of ethanol and acetaldehyde was determined at 1, 3 and 5 hours after ethanol administration. The water DMLE effectively decreased the plasma ethanol levels during 5 hours but increased the plasma acetaldehyde levels until 3 hours and then significantly decreased at 5 hours, as compared with the control. IC_{50} values of DMLEs for inhibition of xanthine oxidase (XO) were 69 to 527 $\mu\text{g}/\text{mL}$. On the basis of these results, the 30% ethanol DMLE was chosen to test anti-hyperuricemic effect. After oral administration of the 30% ethanol DMLE in potassium oxonate (uricase inhibitor) induced hyperuricemia rats models, uric acid concentration in serum and urine and XO activity in serum and liver were determined to evaluate the anti-hyperuricemic effects. In hyperuricemia rats, the 30% ethanol DMLE decreased uric acid concentration in serum and urine through inhibition of XO activity in liver but not in serum.

These results indicate that the DMLEs show antioxidant and preventive effects on ethanol-induced hepatotoxicity *in vitro* as well as anti-hyperuricemic effects through inhibition of XO activity *in vivo*. Therefore 30% ethanol DMLE could be a optimal candidate for the functional products when considering the cost-effectiveness.

제 1장 서 론

술은 오랜 기간 인류와 함께해온 음료로 일반적으로 에탄올을 의미하며, 고대시대에는 여러 약물의 부형제로 이용되거나 제사, 주술에 사용되어 왔다. 우리나라는 삼국시대 이전부터 술을 제조하여 마셨으며, 1980년대 이후 경제성장과 함께 스트레스 해소를 위한 기호식품, 사교의 수단으로 활용되며 알코올 소비량이 급증하였다(Chae, 2009; Ko *et al.*, 2006; Wrase *et al.*, 2002).

알코올은 1 g당 7.1 kcal의 열량을 발생시키는 에너지원이지만 무기질, 비타민 등의 필수 영양소가 없어서 빈 열량(empty calories)원으로도 불리며 섭취 시 체내에서 포도당이나 글리코젠으로 변하지 않는다(Yang, 2001). 섭취한 알코올은 소장과 위에서 즉시 흡수되며, 대부분 간에서 대사(Fig. 1)되고 일부가 땀과 소변 등을 통해 배설되게 된다(Becker *et al.*, 1991). 알코올은 일차적으로 alcohol dehydrogenase (ADH)에 의해 아세트알데히드로 대사되며, 아세트알데히드는 acetaldehyde dehydrogenase (ALDH)에 의해 acetate로 산화된다(Chae, 2009).

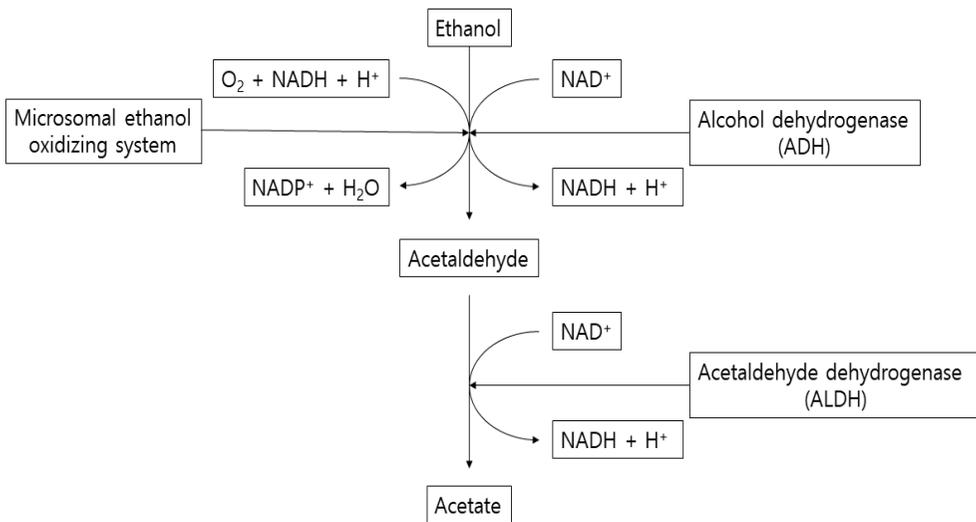


Fig. 1. Metabolism of ethanol in liver.

알코올의 적당한 섭취는 스트레스 해소, 수면유도, 식욕증진, 원활한 혈액순환, 관상심장질환 예방 등의 긍정적인 기능이 있다(Jacques *et al.*, 1989; Lee and Kim,

1991). 하지만 과량의 알코올 섭취는 여러 가지 대사 장애를 일으켜 신체 주요기관에 악영향을 미치게 되는데, 특히 알코올의 대사가 일어나는 간세포의 장애를 유발하여 간질환의 원인이 되기도 한다(Halsted, 1980; Liber, 1994). 음주 후 음주자들이 느끼는 메스꺼움, 구토 두통 등의 증상을 숙취라고 하는데 (Swift and Davidson, 1998), 숙취를 일으키는 대표적인 원인물질은 알코올 대사산물인 아세트알데히드이다(Kim, 1999). 알코올에 의한 간손상 유발인자이기도 한 아세트알데히드는 혈액을 통해 간조직의 외부로 이동하여 에너지 대사에 이용되기도 하지만 대부분이 간에서 지방산 합성에 이용되어 지방간의 원인이 되며(Keshavarzian *et al.*, 1994), 반응성이 높아 불포화 지방산 산화, 원형질막 지질 성분의 변화를 유발하기도 한다(Lieber, 1990; Teschke *et al.*, 1976).

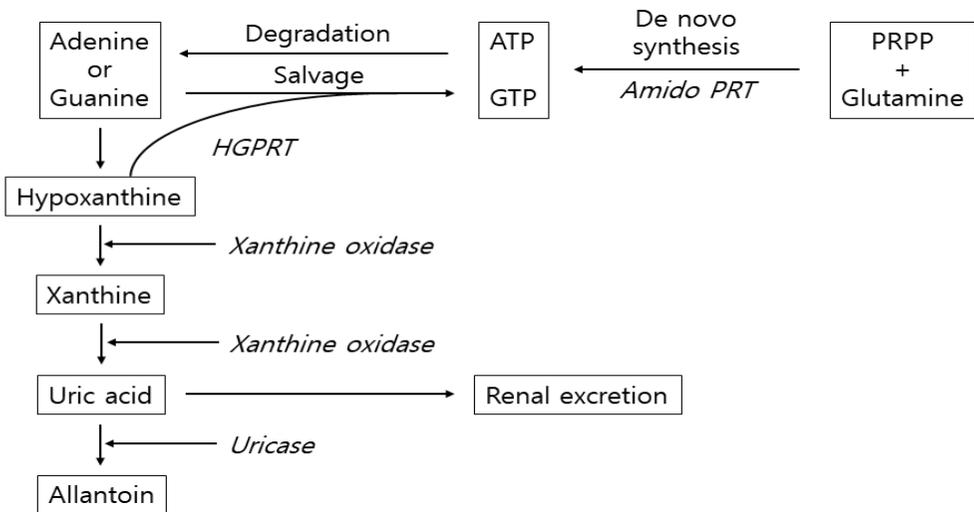


Fig. 2. Uric acid formation process.

요산($C_5H_4N_4O_3$, uric acid)은 인체에서 구아닌(guanine)과 아데닌(adenine)을 기반으로 한 퓨린(purine) 복합체 대사의 최종산물로서(Fig. 2) 소변으로 배출되거나 혈액 속에 잔류하게 되는데(Becker, 1993), 요산이 과잉 생산되거나, 요산의 배설이 감소하게 되어 혈중의 요산수치가 정상수치보다 높은 상태를 고요산혈증이라 정의하고 있다. 고요산혈증은 대사질환, 고혈압, 심혈관 질환의 위험요인으로 알려져 있으며(Gagliardi *et al.*, 2009), 요산 결정(urate crystal)이 관절의 주위조직, 연골, 관절막 등에 침착되면서 염증반응을 유발하는 통풍과 소화 과정 중 요산, 칼슘 등의

물질이 소변으로 배출되지 않고 결정화되어 요관을 막는 요로결석(신장결석, 요관결석)의 원인으로 알려져 있다(Gustafsson and Unwin, 2013; Park, 2011). 고요산혈증을 치료하기 위한 약물은 요산배설촉진제와 xanthine oxidase (XO) 억제제가 있다. 신장의 근위세뇨관에서 요산의 재흡수(URAT1 transporter)를 저해하여 요산배설을 촉진하는 약물은 프로베네시드(probenecid), 벤즈브로마론(benzbromarone) 등이 있다. 프로베네시드의 경우 신장기능에 이상이 있는 경우 효과가 미비하여 선택적으로 사용하여야 하고, 프로베네시드보다는 강력한 효과를 가진 벤즈브로마론의 경우 심한 간독성이 알려져 있다(Arai *et al.*, 2002; Zürcher *et al.*, 1994). 대표적인 XO 억제제인 알로퓨리놀(allopurinol)은 요산저하 효과는 우수하지만 발진, 발열, 과민반응(allopurinol hypersensitivity syndrome, AHS), 신부전 등의 부작용을 일으킨다(Dalbeth and Stamp, 2007; Pluim *et al.*, 1998). 이러한 부작용을 줄이고 요산수치를 감소시키기 위해 천연물을 이용한 고요산혈증 치료제 개발에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다(Jang *et al.*, 2019; Kang *et al.*, 2016; Kang *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2014). 또한 음주빈도에 따라 요산농도가 증가한다는 연구 결과(Huang *et al.*, 2013)뿐만 아니라 음주로 인해 요산의 전구물질의 분해 증가로 요산을 증가시키며, 에탄올이 젯산으로 전환되면서 요산배출을 억제하여 혈중 요산수치를 증가시킨다는 연구 결과(Ryu *et al.*, 2012) 등을 감안할 때 음주와 고요산혈증의 상관성은 높은 편이다.

황칠나무(*Dendropanax morbifera*, DM)는 한국에서 최고의 약재들로 손꼽히는 인삼(*Panax ginseng*), 가시오갈피(*Eleutherococcus senticosus*) 등의 약용식물과 같은 두릅나무과에 속하는 식물로 겨울에도 낙엽이 지지 않는 상록교목이다(Bae, 2010; Choi, 1996). 과거에는 서남해안 및 도서 지역을 포함하는 난온대의 넓은 지역에 분포하였으나, 도시화와 무분별한 개발로 대부분의 자생지가 파괴되어 일부 지역에만 국한적으로 생육하고 있는 특산 수종이다(Lee *et al.*, 2013). 관상수로 이용되는 경우도 많은 황칠나무의 잎은 광택이 있으며, 수피에 상처를 내면 황색의 수지액이 나오는데 이를 황칠이라 하며 금색을 띄는 공예품에 고급도료로 주로 사용되어왔다(An, 2014; Kim and Chung, 2000). 황칠나무의 학명은 목본(dendro), 전능약(panax)이라는 의미가 있어 예로부터 모든 병을 치료하는 만병통치 나무라고 불려왔으며, 황칠나무 잎에는 수분 70.2%, 지방 2.7%, 단백질 1.2%, 회분 1.7%, 수용성 탄닌이 746 mg% 함유되어 있고, GC-MS를 이용하여 32종류의 물질을 확인한 결과 sesquiterpene에 속하는 β -selinene과 capnellane-8-one이 많이 함유되어

있다고 알려져 있다(Lee *et al.*, 2013). 또한 황칠나무의 독특한 방향성분은 신경계에 대한 진정작용과 강장작용을 나타내는 안식향산을 함유한다(Lee *et al.*, 2002). 최근에 황칠나무의 인공재배 성공으로 약재의 확보 및 활용이 수월해져서 연구가 활발히 이루어지고 있는데 선행연구 결과들을 살펴보면 황칠나무 잎으로부터 분리된 polyacetylene 화합물은 항보체 활성을 나타내며(Chung *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2004), 황칠나무 잎 에탄올 추출물은 B세포와 T세포의 생장을 촉진하고 T세포 cytokines (IL-6, TNF- α)가 증가하는 등 면역 증진 효과도 있는 것으로 보고되었다(Lee *et al.*, 2002). 또한 황칠 수액과 잎 추출물의 ethyl acetate 분획도 항산화 및 tyrosinase 저해활성, melanin 생성 억제 활성 등을 가지고 있다고 알려져 있다(Park *et al.*, 2013). 또한 황칠나무 꽃에서 얻은 정유 성분은 Wistar rats 모델에서 혈청 total cholesterol (TC), triglyceride (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) 함량은 감소시키고 high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) 함량은 증가시키며, 황칠나무 추출물은 비알콜성 지방간 (non-alcoholic fatty liver)을 가진 비만 대학생들을 대상으로 진행한 연구에서 aspartate aminotransferase (AST)와 alanine aminotransferase (ALT) 감소에 효과가 있다는 연구 결과도 나왔다(Chung *et al.*, 2009; Kim, 2012). 그 외에도 황칠나무 잎 추출물의 항암, 항당뇨, 간세포 및 신경조직세포 재생효과, 항균작용 등에 관한 연구 결과도 보고되었다(An *et al.*, 2014; Hyun *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2002; Lee *et al.*, 2015a, b; Moon, 2011).

보건복지부에서 발표한 2018년도 국민건강영양조사 결과에 따르면 우리나라 연간 음주 소비량은 지속적으로 증가하는 추세이다. 또한 고요산혈증으로 인해 발생하는 통풍도 세계적으로 유병률이 증가하는 추세이고(Wallace *et al.*, 2004), 국내에서도 최근 통풍으로 치료를 받은 환자가 5년 사이 49% 증가하였다는 2018년 건강보험심사평가원의 보고도 있었다. 이에 여러 가지 생리활성을 가지고 있는 황칠나무 잎 추출물의 숙취해소 및 알코올에 의한 간독성 및 고요산혈증 예방 효과를 확인함으로써 새로운 천연물 소재 개발을 목표로 연구를 진행하였다.

제 2장 재료 및 방법

제1절 재료

1. 식물 재료

실험에 사용된 황칠나무의 잎은 2018년 11월에 무안의 곡우농장에서 재배한 황칠나무에서 획득한 것으로 수세, 정선 및 분쇄과정을 거쳐 40℃에서 건조시킨 후 -5℃ 이하로 냉동보관하며 실험에 사용하였다.

2. 세포 배양

실험에 사용한 간암세포주인 Hep3B 세포와 백혈병세포 AML-2의 doxorubicin 내성세포주인 AML-2/DX100 세포는 37℃, 5% CO₂ 조건의 습윤화된 배양기를 이용하여 배양하였다. Hep3B 세포의 배양액은 RPMI 배지를, AML-2/DX100 세포는 α -MEM 배지를 이용하였으며, 두 배지 모두 열처리하여 불활성화된 fetal bovine serum (FBS) 10% 및 항생제를 함유하였다.

제2절 실험 방법

1. 추출

분쇄 후 건조한 황칠나무의 잎을 30%, 50%, 70% 에탄올 및 증류수를 추출 용매로 하여 환류냉각추출법을 이용해 80℃에서 2시간씩 2회 반복해서 추출하였다. 추출액을 감압식 회전농축기를 이용하여 농축 후 동결건조하여 -5℃ 이하로 냉동보관하며 실험에 사용하였다.

2. 성분 분석

Chlorogenic acid (CGA), rutin 분석을 위해 다른 연구에서 사용되었던 방법을 응용하였으며(Kim *et al.*, 2010; Shin *et al.*, 2007), LC-30A (Shimadzu, Japan) 액체크로마토그래피와 연동된 LCMS-8050 (Shimadzu, Japan) 삼중사중극자 질량분석기를 사용하였다. Positive electro-spray ionization (+ESI) 장치로 시료를 이온화시킨 후 multiple reaction monitoring (MRM) mode에서 분석을 실시하였다. Column으로 Kinetex C18 (2.1 × 150 mm, 2.6 μm, Phenomenex)을 사용하였으며, 시료 주입량은 2 μL, column oven은 40°C를 유지하였다. 이동상으로 5 mM ammonium acetate와 0.1% formic acid가 혼합된 water (A)와 2.5 mM ammonium acetate를 함유한 methanol (B)을 사용하여 초기 5% B에서 시작하여 100% B까지 13분간 순차적으로 변화시킨 후 다시 5% B로 낮춰서 3분 동안 유지하여 총 18분간 분석을 실시하였으며, 유속은 0.3 mL/min으로 유지하였다(Table 1, 2, 3).

Table 1. MRM conditions

Compounds	Retention time (min)	Quantified MRM (<i>m/z</i>)	Qualified MRM (<i>m/z</i>)
Chlorogenic acid	5.16	355.00 → 163.00	355.00 → 145.15
Rutin	7.49	611.00 → 302.95	611.00 → 465.10

Table 2. MS parameters

Nebulizing gas flow	2.8 mL/min
Heating gas flow	8 L/min
Drying gas flow	8 L/min
Interface temperature	340°C
DL temperature	200°C
Heat block temperature	380°C

Table 3. LC-MS/MS analysis condition for compound in the *Dendropanax morbifera* leaf extracts

Instrument	LC-30A (Shimadzu, Japan)
Detector	LCMS-8050 (Shimadzu, Japan)
Column	Kinetex C18 (2.1 × 150 mm, 2.6 μm, Phenomenex)
Ionization mode	Electro-spray ionization (ESI)
Scan type	Multiple reaction monitoring (MRM)
Polarity	Positive
Column Temp.	40°C
Flow rate	0.3 mL/min
Injection volume	2 μL
Mobile phase	Gradient method
A : 5 mM ammonium acetate + 0.1% formic acid in water	0.00 min - A : B = 95 : 5 13.00 min - A : B = 0 : 100
B : 2.5 mM ammonium acetate in methanol	15.00 min - A : B = 95 : 5 18.00 min - stop

3. 항산화 활성

가. DPPH 라디칼 소거 활성 측정

DPPH 라디칼 소거 활성 측정은 시료의 항산화 활성을 확인하는데 널리 이용되는 실험으로, 안정한 라디칼을 가지며 자색을 띠는 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)이 항산화 활성을 가진 물질과 반응하여 라디칼이 소거되면서 자색이 탈색되며 흡광도가 감소하는 원리를 이용한다(Kim *et al.*, 2003). 시료와 DPPH는 DMSO를 이용하여 녹인 후, methanol을 이용하여 희석하여 사용하였다. 100 μ M DPPH 90 μ L와 200~5 μ g/mL로 희석된 시료액 10 μ L를 96 well-plate에 넣어 암실에서 10분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도 값을 바탕으로 하여 50%의 라디칼을 소거하는데 필요한 시료량(SC₅₀)을 계산하였다. 양성대조군으로는 L-ascorbic acid (Vit C)를 사용하였다.

나. 세포 내 ROS 소거 활성 측정

DCFH-DA 측정법은 세포 내의 활성산소종(Reactive oxygen species, ROS)의 양을 측정하거나 시료의 세포 내의 ROS 소거능을 측정할 때 이용하는 방법으로 세포투과가 가능한 probe인 2',7'-dichlorodihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA)가 세포 내의 ROS와 반응하여 형광을 띠는 2',7'-dichlorodihydro-fluorescein (DCF)로 바뀌는 원리를 이용한 시험법이다(Lebel *et al.*, 1992; Tsuchiya *et al.*, 1994). 백혈병세포 AML-2의 doxorubicin 내성세포주인 AML-2/DX100 세포를 이용하여 시료의 세포 내 ROS 소거능을 확인하였다 (Kim, 1997). AML-2/DX100 세포를 PBS로 2번 세척한 후 1×10^5 cells/mL의 농도로 96-well plate에 각 well당 200 μ L씩 분주 하고, 분주한 세포에 농도 별로 시료를 미리 넣고, DCFH-DA가 1 μ M, H₂O₂가 4 mM이 되도록 넣어 활성산소를 유발시킨 후, 5% CO₂, 37°C 조건에서 30분간 반응시킨 후 형광의 정도를(excitation 485 nm 및 emission wavelength 530 nm) 측정하였다. 세포 내 ROS 소거능의 표현은 H₂O₂에 의해 증가된 형광 값을 100으로 하였을 때 시료에 의해 소거시킨 형광값을 백분율로 계산하였다.

4. 세포 독성 및 에탄올 유도 간독성 예방 효과

가. 세포 독성

간암세포주인 Hep3B 세포에 대한 황칠나무 잎 추출물의 세포독성을 확인하기 위해서 MTT assay (Shin *et al.*, 2003)를 이용하여 세포생존율을 측정하였다. 간암 세포주인 Hep3B 세포를 96-well plate에 1×10^6 cell/mL의 농도로 분주하여 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양기에서 배양한 후 농도별로 희석한 시료를 처리하여 3일간 배양하였다. 72시간 경과 후 MTT 시약을 10 µL씩 처리하여 4시간 동안 반응시킨 후 well의 바닥에 형성된 formazan이 흡여지지 않도록 상등액을 제거하고 DMSO 100 µL를 가하여 30분간 방치한 뒤 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 넣지 않은 blank의 흡광도를 100%로 하여 상대적인 세포생존율 및 50%의 세포생존율을 보여주는 샘플의 농도(IC₅₀)를 구하였다.

나. 에탄올 유도 간독성 예방 효과

황칠나무 잎 추출물의 알코올에 의한 간독성 예방효과를 확인하기 위하여 간암세포주인 Hep3B 세포에 에탄올을 처리한 후 3-day MTT assay를 수행하였다 (Neuman *et al.*, 1993; Shin *et al.*, 2003). Hep3B 세포를 96-well plate에 1×10^6 cell/mL의 농도로 분주 후 24시간 동안 37°C, 5% CO₂ 조건으로 배양기에서 배양한 후 농도별로 희석한 시료를 처리하였다. 시료 처리 30분 후 에탄올 함량이 5%가 되도록 처리하여 72시간 배양한 후 MTT 시약을 10 µL씩 처리하여 4시간 동안 반응시킨 후 상등액을 제거하고 DMSO 100 µL를 가하여 30분간 방치하여 바닥에 형성된 formazan을 충분히 녹여낸 뒤 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 넣지 않은 blank의 흡광도를 100%로 하여 상대적인 세포생존율을 구하였다.

5. 흰쥐의 혈중 에탄올 및 아세트알데히드 농도 측정

가. 실험동물의 사육 및 처치

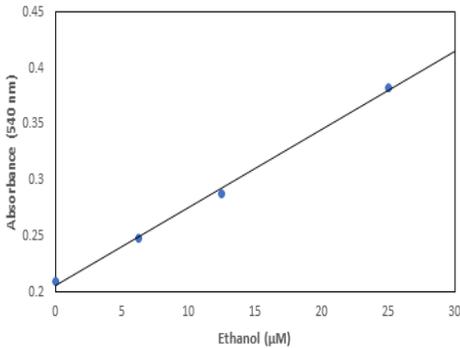
5주령의 수컷 Sprague-Dawley rat (SD rat)을 오리엔트바이오(주)로부터 구입하여, 12시간 간격의 명암주기 및 150~300 Lux의 조도를 유지하며, 습도 50±5%, 온도 25±2℃를 유지할 수 있는 자동조절 항온항습기가 설치된 장소에서 1주일간 사육환경에 적응시켰다. 적응기간이 끝난 후 에탄올 대조군 그룹, 황칠 열수 추출물 투여그룹, 황칠나무 잎 추출물 함유 시제품 투여 그룹으로 나누어서 실험을 수행하였다. 에탄올 투여 전 18시간 동안 절식하여 사료 섭취로 인해서 에탄올의 흡수 방해를 예방하였다. 황칠나무 잎 추출물 함유 시제품과 황칠 열수 추출물은 동결건조한 분말을 생리식염수에 10 mg/mL의 농도로 제조하여 경구 투여 하였으며, 에탄올 대조군 그룹은 생리식염수를 경구 투여 하였다. 생리식염수, 황칠나무 잎 열수 추출물 및 황칠나무 잎 추출물 함유 시제품을 투여하고 30분이 경과한 후 40% 에탄올을 이용하여 3 g/kg씩 경구 투여 하였다. 에탄올을 경구 투여 직전과 투여 후 1, 3, 5시간이 경과한 시점에 대퇴정맥에서 혈액을 채취한 후 헤파린 용기에 넣어 4℃, 3000 rpm에서 10분간 원심분리를 하여 혈장을 획득하였다. 획득한 혈장은 -80℃에서 보관하며 실험에 사용하였다. 본 연구는 조선대학교 동물실험윤리위원회의 승인 하에 실험동물의 사육 및 처치를 수행하였다(CIACUC2018 - S0050).

나. 혈중 에탄올 농도 측정

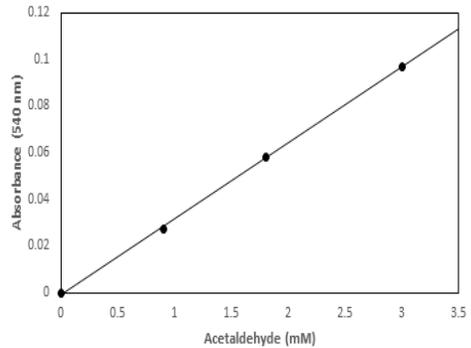
에탄올 섭취 후 시간별로 채취한 혈장의 에탄올 농도는 alcohol assay kit (Cell biolabs, INC., USA)를 이용하여 분석하였다(Bucher and Redetzki, 1951). 혈장 10 µL와 증류수, assay buffer, 효소 및 발색시약을 혼합한 시약 90 µL를 혼합한 후 37℃에서 30분간 빛을 차단한 상태에서 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 혈장 대신 여러 농도로 희석한 에탄올을 이용하여 검량선을 작성하였으며, 에탄올 농도와 540 nm에서 흡광도 간의 회귀방정식은 $y=0.0055x+ 0.227$ (y 는 540 nm에서의 흡광도 이며, x 는 에탄올 농도, $r^2=0.998$)이었다. 혈장의 에탄올 농도는 검량선을 이용하여 µM로 나타내었으며, 에탄올 투여 전 혈액을 이용하여 보정하였다.

다. 혈중 아세트알데히드 농도 측정

Lundquist 방법의 acetaldehyde assay kit (BioAssay Systems, USA)를 이용하여 혈장의 아세트알데히드 농도를 확인하였다(Lundquist, 1974). 혈장 20 μL 와 assay buffer, NAD/MTT solution 및 효소 A와 B (A: NAD, B: ALDH)를 혼합한 반응액을 80 μL 혼합하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때, 효소 A를 첨가하지 않은 반응액과 혈장을 혼합한 시험액을 이용하여 보정한 후 농도별 아세트알데히드를 이용하여 검량선을 작성하여 혈중 아세트알데히드 농도를 계산하였으며, 에탄올 투여 전 혈액을 이용하여 보정하였다. 아세트알데히드 농도와 540 nm에서 흡광도 간의 회귀방정식은 $y=0.0325x-0.0009$ (y 는 540 nm에서의 흡광도 이며, x 는 아세트알데히드 농도, $r^2=0.999$)이었다.



[A]



[B]

Fig. 3. Standard curves of ethanol [A] and acetaldehyde [B] by colorimetric method for determination of ethanol and acetaldehyde levels in serum.

6. Xanthine oxidase 억제 활성

황칠나무 잎 추출물의 xanthine oxidase (XO) 억제 활성은 반응생성물인 요산을 분광광도계로 측정하는 방법을 이용하여 확인하였다(Stripe and Della, 1969). 여러 농도로 제조된 시료 50 μL 와 2 mM xanthine 100 μL , PPB (Potassium phosphate buffer) 300 μL 를 혼합한 후 37 $^{\circ}\text{C}$ 수욕 상에서 30분간 방치하였다. 30분이 경과한 후 0.2 unit/mL로 제조된 XO 50 μL 를 첨가하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 수욕 상에서 10분간 방치한 후 1N HCl 500 μL 를 첨가하여 반응을 종료시켰다. 반응이 종료된 시험액 800 μL 를 석영 셀에 옮겨 290 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도를 이용하여 50%의 XO를 저해하는데 필요한 시료량(IC₅₀)을 계산하였다. 양성 대조군으로 통풍 치료에 사용되는 allopurinol을 사용하였으며, 황칠나무 잎 추출물의 XO 저해활성을 allopurinol에 대한 상대적 활성으로도 비교하였다.

7. 고요산혈증 유발 흰쥐에서 황칠나무 잎 추출물의 요산 저하 효능

가. 실험동물의 사육 및 처치

5주령의 수컷 SD rat을 오리엔트바이오(주)로부터 구입하여, 온도 23 \pm 3 $^{\circ}\text{C}$, 습도 55 \pm 15%, 12시간 간격의 명암주기 및 150~300 Lux의 조도를 유지하며, 1주일간 사육환경에 적응시켰다. 적응기간 종료 후 각 군의 평균 체중이 최대한 균일하도록 무작위법으로 분배하여 8마리씩 정상군, 고요산혈증 유발 대조군, allopurinol 투여군, 황칠나무 잎 추출물 50, 100, 200 mg/kg 투여군으로 나누어 실험을 진행하였다. Potassium oxonate (0.5% sodium carboxymethyl cellulose with 0.1 M sodium acetate, pH 5) 250 mg/kg를 Day 1, 3, 5 및 7에 복강 내 투여하여 고요산혈증을 유발하였다. 황칠나무 잎 추출물과 allopurinol은 3차 증류수를 이용하여 조제한 후 1회/일, 7일간 경구 투여하였으며, 유발물질을 투여하는 날에는 유발물질 투여 1시간 후 투여하였다. 정상군과 고요산혈증 유발 대조군은 황칠나무 잎 추출물과 allopurinol 제조시 사용하였던 3차 증류수를 황칠나무 잎 추출물 및 allopurinol 투여군과 동일한 방법으로 경구 투여하였다(Fig 3). 실험 마지막 날인 Day 7에 시험

물질 투여 후 2시간 동안 소변을 수집하고, 후대정맥에서 채혈을 실시하였으며, saline으로 관류를 실시하여 간과 신장을 적출하였다. 소변, 혈청 및 간과 신장 조직은 -80°C 에서 보관하며 실험에 사용하였다. 본 연구는 (주)캠온의 실험동물운영위원회의 승인 하에 실험동물의 사육 및 처치를 수행하였다(심의번호:2019-10-001).

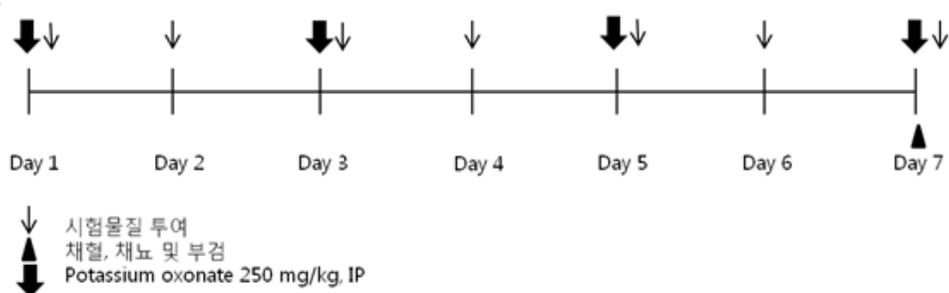


Fig. 4. Time schedule of experiment of anti-hyperuricemic effects *in vivo*.

나. 요산 농도 측정

소변과 혈청의 요산 농도는 Uric Acid Colorimetric/Fluorometric Assay Kit (BioVision, USA)를 이용하여 분석하였다. 시료 20 μL , assay buffer 46 μL , uric acid probe 2 μL 및 uric acid enzyme mix 2 μL 를 혼합하여 37°C 에서 30분간 빛을 차단한 상태에서 반응시킨 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 소변과 혈청 내의 요산 농도가 40 nM이 초과하지 않도록 assay buffer를 이용하여 희석하여 사용하였다.

다. Xanthine oxidase activity 측정

부검 시 적출한 간 조직 및 혈청으로 Xanthine Oxidase Activity Assay Kit (Sigma-Aldrich, USA)를 이용하여 XO 활성을 측정하였다. 시료 50 μL , assay buffer 44 μL , XO substrate mix 2 μL , XO enzyme mix 2 μL 및 fluorescent peroxidase substrate 2 μL 를 혼합한 후 570 nm에서 1차 흡광도를 측정한 후 25°C 에서 5분간 방치 후 570 nm에서 2차 흡광도를 측정하였다. 간 조직액과 혈청은 assay buffer를 이용하여 적절한 농도로 희석하여 사용하였다.

8. 통계처리

실험 결과는 3회 이상 반복하여 측정된 결과의 평균값과 표준편차(mean \pm SD)로 나타내며 각 그룹 간의 통계학적 분석은 SPSS 12.0 (SPSS Inc, USA)을 사용하였으며, one-way analysis of variance (ANOVA)를 이용하여 각 군 간의 측정치를 비교하여, $p < 0.05$ 인 경우 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

제 3장 결과 및 고찰

제1절 추출 수율 및 성분 함량

1. 추출 수율

용매별 황칠나무 잎 추출물의 수율을 비교한 결과를 Table 5에 나타내었다. 황칠나무 잎 열수 추출물의 수율이 24.14%로 황칠나무 잎 추출물들 중 가장 높은 것으로 확인되었으며, 추출 용매의 에탄올 함량이 증가함에 따라 추출 수율이 감소하는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 은행잎을 이용한 이 등 (2006)의 연구결과와 유사한 양상이었다.

Table 4. Yields of *Dendropanax morbifera* leaf extracts

Samples	Yield (%)
DMWE	24.14
DM30EE	23.24
DM50EE	21.02
DM70EE	19.66

DMWE, water DMLE; DM30EE, DM50EE and DM70EE, 30%, 50%, and 70% ethanol DMLEs, respectively.

2. 성분 함량

Chlorogenic acid (CGA)는 식물의 2차 대사산물 중 하나로서 천연 자원 식물에 광범위하게 존재하는 무색의 폴리페놀계 화합물로 항균, 항산화, 항당뇨, 심혈관계 질환 예방 등 다양한 활성을 가지고 있다고 알려져 있다(Azuma *et al.*, 2000; Chenet *et al.*, 2008; Kang *et al.*, 2006; Kim, 2005; Kwon *et al.*, 2010; Ochiai *et al.*, 2004; Sayed *et al.*, 2008). 한편, rutin은 C₆-C₃-C₆의 기본구조를 가지는 대표적인 플라보놀 배당체로서 메틸에서 최초로 분리되었으며, 항산화, 항염증 등의 생리활성을 가진다고 보고되어 있다(Choi *et al.*, 1996; Yoon *et al.*, 2012).

황칠나무 잎 추출물의 유효성분 함량을 확인하기 위하여 LC-MS/MS를 이용하여 CGA와 rutin의 함량을 분석한 결과를 Table 6에 나타내었다. 황칠나무 잎 70% 에탄올 추출물의 CGA 함량은 21.46 mg/g, rutin의 함량은 29.54 mg/g으로 다른 황칠나무 잎 추출물들 보다 높은 함량을 나타내었다. 특히, 황칠나무 잎 열수 추출물과 비교하였을 때 CGA와 rutin의 함량이 약 3배 정도 높은 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 최 등 (2018)의 연구 결과와 유사하게 추출 용매 중 에탄올의 함량이 감소함에 따라 CGA와 rutin 함량도 감소하는 경향을 보였다.

Table 5. Chlorogenic acid and rutin contents in *Dendropanax morbifera* leaf extracts

Samples	Chlorogenic acid (mg/g)	Rutin (mg/g)
DMWE	6.42 ± 0.02 ^d	10.39 ± 0.06 ^d
DM30EE	13.25 ± 0.24 ^c	16.39 ± 0.22 ^c
DM50EE	17.42 ± 0.30 ^b	23.74 ± 0.31 ^b
DM70EE	21.46 ± 0.12 ^a	29.52 ± 0.13 ^a

DMWE, water DMLE; DM30EE, DM50EE and DM70EE, 30%, 50%, and 70% ethanol DMLEs, respectively. All values are mean±SD (n=3). Different superscript letters in same concentration show significant differences at $p < 0.05$ by one-way ANOVA.

제2절 황칠나무 잎 추출물의 항산화 효과

1. DPPH 라디칼 소거 효능

에탄올이 인체 내에서 분해하는 과정 중 발생하는 활성산소종(ROS)로 인해 산화 스트레스에 노출되며 방어기전으로 항산화 물질을 분비하지만 과도한 음주로 인해 항산화 방어기전의 균형이 깨지면 세포의 노화 및 여러 질병이 발생할 수 있다. 에탄올에 의한 산화 스트레스를 최소화하기 위해 항산화 물질을 섭취하는 것이 중요하며, 합성 항산화제의 부작용을 최소화할 수 있는 천연물 유래의 항산화 물질을 찾기 위한 연구가 꾸준히 이어지고 있다(Albano, 2006; Choi *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2006). 항산화 물질의 전자공여능 또는 free radical 소거능을 측정하는데 많이 이용되고 있는 DPPH를 이용하여 황칠나무 잎 추출물 및 황칠 유효성분의 항산화 활성을 확인하여 50%의 DPPH 라디칼을 소거하는데 필요한 시료의 농도(SC₅₀)로 나타내었다(Table 7). 황칠나무 잎 추출물의 경우 추출용매인 에탄올의 함량이 증가할수록 항산화 활성이 증가하는 경향을 보여주었으며, 황칠의 유효성분 중 하나인 CGA의 경우 양성대조군으로 사용한 Vit C와 통계적으로 같은 활성을 나타낼 정도로 높은 활성을 보여주었다. 천연물의 항산화 활성이 식물에 함유되어 있는 유효성분의 추출방법에 따라 차이가 난다고 알려져 있는 점을 미루어 볼 때(Kang *et al.*, 1996), 추출용매인 에탄올 함량이 증가할수록 CGA의 함량이 증가하여 항산화 효능이 증가한 것으로 판단되어진다. 하지만 DPPH 라디칼 소거 활성을 양성대조군에 대한 상대적 활성으로 비교하면, 황칠나무 잎 추출물의 경우 5~6%로 Vit C보다 낮은 활성을 보여주었다. 황칠의 유효성분 중 하나인 rutin은 약 15%로 Vit C보다 낮은 활성을 보여주었지만, CGA의 경우 약 140%로 양성대조군인 Vit C보다 높은 활성을 보여주었다.

Table 6. DPPH radical-scavenging ability of *Dendropanax morbifera* leaf extracts and its active compounds

Samples	SC ₅₀ (µg/mL)	Relative activity (%)
DMWE	102.53 ± 3.59 ^e	5.36
DM30EE	89.23 ± 2.36 ^d	6.16
DM50EE	85.13 ± 3.13 ^d	6.46
DM70EE	78.93 ± 0.58 ^c	6.97
CGA	3.94 ± 0.05 ^a	139.48
Rutin	37.60 ± 3.42 ^b	14.63
Vit C	5.50 ± 0.40 ^a	100.00

DMWE, water DMLE; DM30EE, DM50EE and DM70EE, 30%, 50%, and 70% ethanol DMLEs, respectively. CGA, chlorogenic acid; Vit C, ascorbic acid. All values are mean±SD (n=3). ¹⁾ SC₅₀ value is concentration of each samples for activity scavenging 50% of DPPH radical. ²⁾ Relative activity: a ratio of SC₅₀ value compared to ascorbic acid used as positive control. Different superscript letters in same concentration show significant differences at $p < 0.05$ by one-way ANOVA.

2. DCFH-DA 측정법을 이용한 ROS 소거 효능

유산소 호흡을 하는 생명체의 경우 호기성 물질대사 과정 중 전자전달계의 부산물로 산소유래의 화학적 반응성이 큰 superoxide, hydroxyl radical, 과산화수소, nitric oxide 등의 ROS를 생성하게 된다(Lee *et al.*, 2000). 비정상적인 대사 혹은 외부자극에 의해 항산화 기전에 불균형을 야기되어 산화 스트레스가 발생하면 DNA 변성, 세포막 지방, 단백질의 산화와 변성 및 대사 장애와 각종 질병을 유발하게 된다(Frilich and Riederer, 1995; Mattia *et al.*, 1993; Shacter *et al.*, 1988; Zelman *et al.*, 1988). 세포 내로 확산해 들어가서 H₂O₂ 및 hydroxyl radical에 의해 형광물질로 전환되는 DCFH-DA를 이용하여 세포 내 ROS를 정량한 결과를 Fig. 5에 나타내었다(Rothe and Valet, 1990). 시료를 50 µg/mL 처리하였을 때 모든 실험군에서 50% 이하의 ROS 소거능을 보였으나 이는 양성대조군인 Vit C와 비슷한 활성으로 평가되었다. 고농도(100 µg/mL)로 시료를 처리하였을 때, DPPH 라디칼 소거 활성 평가 결과와 다르게 50% 에탄올을 추출용매로 사용한 황칠나무 잎 추출물의 ROS 소거능이 84.86%로 가장 높았으며, 황칠나무 잎 70% 에탄올 추출물은 57.69%로 시료 가운데 가장 낮은 ROS 소거능을 보였다. 황칠의 유효성분인 CGA와 rutin은 각각 64.85%, 66.37%로 황칠나무 잎 50% 에탄올 추출물보다 낮은 ROS 소거활성을 보였지만 56.53%의 ROS 소거능을 보여준 Vit C보다는 높은 활성으로 확인되었다. 이러한 결과는 황칠나무 잎 추출물에서 세포 내 ROS를 소거하는 활성성분을 효과적으로 추출하기 위해서는 50% 이하의 에탄올을 이용하는 것이 바람직하다고 판단되었으며, 현재 항산화제로 널리 이용되는 Vit C보다 높은 활성을 확인하였으므로 구체적인 유효성분 및 항산화 메커니즘을 규명함으로써 황칠나무 잎 추출물을 새로운 천연 항산화 소재로 개발할 수 있을 것으로 판단되었다.

황칠나무 잎 추출물의 추출 수율, 유효성분의 함량 및 항산화 효과를 확인한 결과와 생산과정 중에 에탄올의 100% 회수가 불가능하며 대용량 추출을 수행하는 과정에서 에탄올 함량이 증가하면 위험성이 증가할 수 있다는 점 등을 고려하였을 때, 30% 에탄올을 추출용매로 사용한 황칠나무 잎 추출물을 사용하는 것이 황칠 함유 기능성 제품을 산업화하기에 가장 합리적일 것으로 판단되어진다.

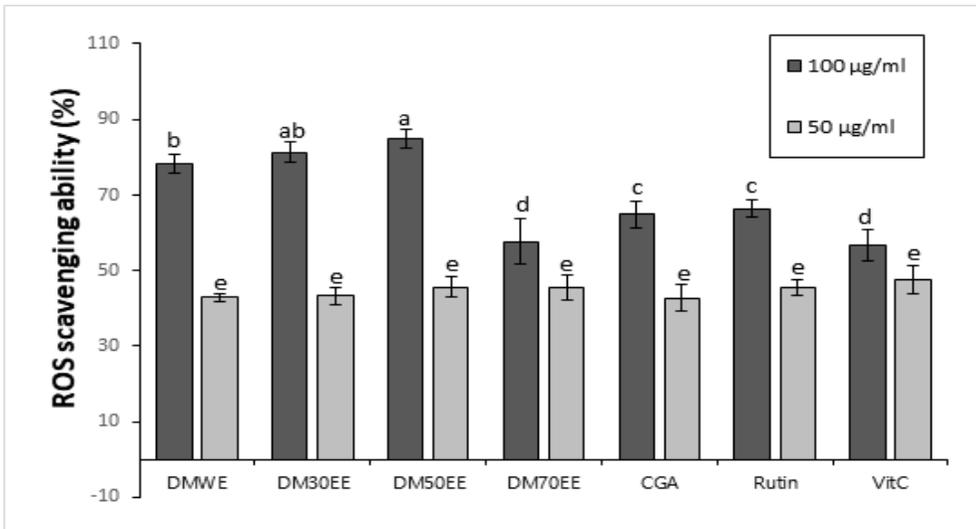


Fig. 5. ROS-scavenging activities of *Dendropanax morbifera* leaf extracts and its active compounds. DMWE, water DMLE; DM30EE, DM50EE and DM70EE, 30%, 50%, and 70% ethanol DMLEs, respectively. CGA, chlorogenic acid; Vit C, ascorbic acid. All values are mean±SD (n=3). Different superscript letters in same concentration show significant differences at $p < 0.05$ by one-way ANOVA.

제3절 황칠나무 잎 추출물의 세포독성 및 에탄올 유도 간독성 예방 효과

1. MTT assay를 이용한 Hep3B 세포 생존율

황칠나무 잎 추출물에 대한 세포 독성을 확인하기 위해 간암세포주인 Hep3B 세포를 대상으로 MTT assay를 이용하여 세포 생존율을 확인하였다. 시료를 5~0.5 mg/mL의 농도로 처리하여 50%의 세포 생존율을 나타내는데 필요한 시료의 농도를 산출한 IC_{50} 값은 Table 7에 나타내었다. 황칠나무 잎 열수 추출물의 IC_{50} 값이 2.08 mg/mL로 황칠나무 잎 에탄올 추출물들 보다 낮은 세포 독성을 보였다. 황칠나무 에탄올 추출물들의 경우 추출용매로 사용한 에탄올의 함량이 높아질수록 세포독성이 높아지는 경향을 보였으나 통계적 유의는 확인할 수 없었다. 하지만 모든 황칠나무 잎 추출물의 IC_{50} 값이 1 mg/mL 이상의 값을 보여줌으로써 우려할 만한 독성은 없는 것으로 확인되었다.

Table 7. Effect of *Dendropanax morbifera* leaf extracts on Hep3B cell viability

Samples	IC ₅₀ (mg/mL) ¹⁾		
DMWE	2.08	±	0.16 ^a
DM30EE	1.23	±	0.00 ^b
DM50EE	1.19	±	0.02 ^b
DM70EE	1.11	±	0.01 ^b

DMWE, water DMLE; DM30EE, DM50EE and DM70EE, 30%, 50%, and 70% ethanol DMLEs, respectively. All values are mean±SD (n=3). ¹⁾IC₅₀ value is concentration of each samples for inhibition 50% of cell viabilities. Different superscript letters in same concentration show significant differences at $p < 0.05$ by one-way ANOVA.

2. 황칠나무 잎 추출물의 에탄올 유도 간독성 예방 효과

가. 에탄올 처리 농도에 따른 세포독성

황칠나무 잎 추출물 함유 시제품의 에탄올에 의한 간독성 예방 효과를 확인하기 위한 시험의 적정 에탄올 농도를 결정하기 위하여 간암세포주인 Hep3B 세포에 여러 농도의 에탄올을 처리하여 세포독성을 확인한 결과(Fig. 6), Neuman 등 (1993)의 연구 결과와 유사하게 농도 의존적으로 세포생존율이 낮아지는 것을 확인할 수 있었으며, 세포생존율의 추이를 살펴본 결과 2.5%에서 5%로 에탄올의 농도가 증가하는 구간의 기울기가 가장 큰 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 토대로 에탄올에 의한 간독성 예방 효과를 비교하기에 적절한 에탄올 농도는 5%로 판단되었다.

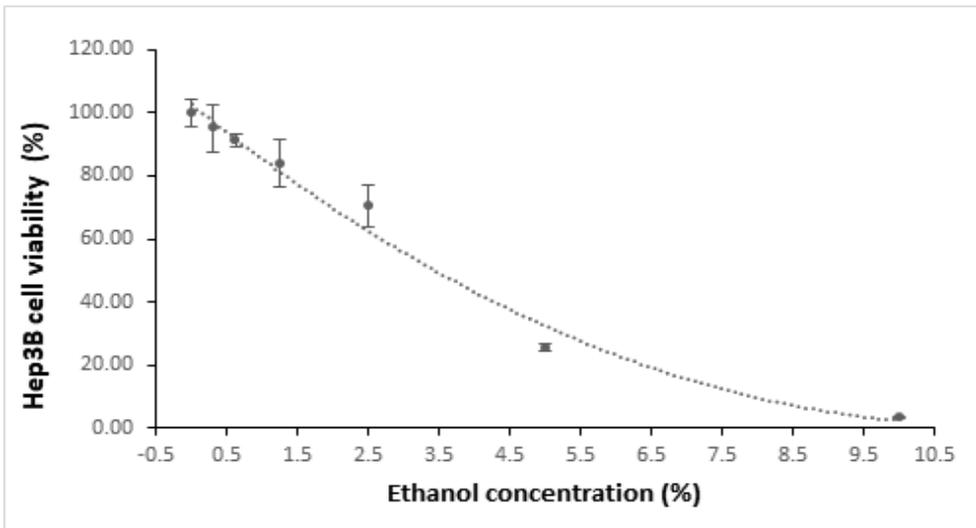


Fig. 5. Hep3B cell viabilities as a function of different concentrations of ethanol. All values are mean±SD (n=5).

나. 에탄올 유도 간독성 예방 효과

에탄올은 아세트알데히드, 산화스트레스, 항산화 억제, 지방축적 등의 작용을 통해 간손상을 일으킨다. 대표적인 간독성 물질로 알려진 아세트알데히드는 에탄올이 간에서 분해되는 과정에서 생성되는 물질로 반응성이 강하여 세포손상을 유발하며, 과량의 에탄올 섭취는 과량의 ROS를 생성함으로써 산화스트레스를 유발하게 된다(Lieber, 1990; Matysiak-Budnik *et al.*, 1996; Teschke *et al.*, 1976). 또한 과도한 음주 시 체내 항산화제로 알려진 글루타치온과 결합하여 항산화 작용을 억제할 뿐만 아니라 에탄올 대사과정 중 일부가 지방산으로 전환되어 중성지방의 형태로 간에 축적되어 지방간이 발생하며, 여러 가지 간질환을 유발한다(Keshavarzian *et al.*, 1994; Park, 2008).

황칠나무 잎 추출물의 에탄올에 의한 간독성 예방 효과를 확인하기 위해 간암 세포주인 Hep3B 세포에 30분 전에 시료를 전처리한 후 5% 에탄올을 처리하고 시료와 에탄올 대신 PBS를 처리하였을 때의 흡광도를 100%로 하여 상대적인 세포생존율을 계산한 결과(Fig. 7), 50 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 황칠나무 잎 추출물들을 처리하였을 때에는 에탄올 유도 간독성 보호효과를 확인할 수 없었다. 하지만 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 시료를 처리하였을 때, 실험에 사용된 모든 황칠나무 잎 추출물에서 에탄올 유도 간독성 보호효과를 확인할 수 있었다. 특히 황칠나무 잎 30%와 50% 에탄올 추출물들의 세포 생존율은 각각 56.94%, 61.49%로 에탄올만 처리한 실험군(28.32%)보다 2배 이상 높은 세포 생존율을 보였다.

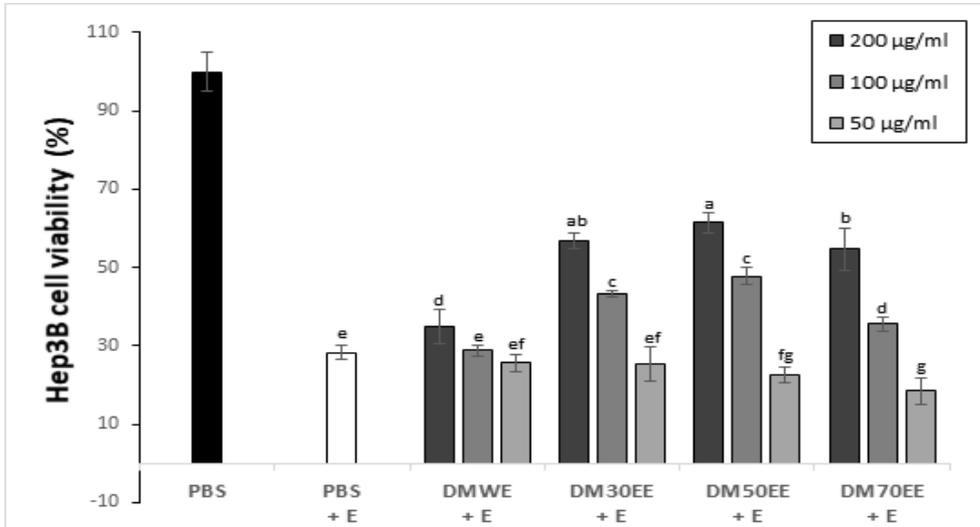


Fig. 7. Preventive effect of *Dendropanax morbifera* leaf extracts on ethanol-induced hepatotoxicity. DMWE, water DMLE; DM30EE, DM50EE and DM70EE, 30%, 50%, and 70% ethanol DMLEs, respectively. + E, exposed to 5% ethanol. All values are mean±SD (n=3). Different superscript letters in same concentration show significant differences at $p < 0.05$ by one-way ANOVA.

3. 에탄올 투여 흰쥐에서 황칠나무 잎 추출물의 혈중 에탄올 및 아세트알데히드 농도 변화

가. 흰쥐의 혈중 에탄올 농도

황칠나무 잎 추출물 함유 시제품과 황칠나무 잎 열수 추출물의 혈중 에탄올 농도 변화를 살펴보기 위해 S.D. rat를 대상으로 시료를 경구 투여하고 30분이 경과한 후 3 g/kg의 용량으로 에탄올을 경구 투여하여 1시간, 3시간, 5시간이 지난 후 혈중 에탄올 농도를 측정하였다. 에탄올 대조군 그룹보다 황칠나무 잎 열수 추출물과 황칠나무 잎 추출물 함유 시제품을 경구 투여한 그룹의 혈중 에탄올 농도가 현저하게 낮아졌다. 또한 에탄올 대조군 그룹의 경우 5시간까지 혈중 에탄올 농도가 증가하였다. 이러한 결과는 Shumate 등 (1967)의 연구에서 알코올을 경구 투여하고 시간이 경과함에 따라 알코올 농도가 달라지며, 경구 투여 후 60~90분에 최고치를 기록한다는 보고와는 다른 경향을 보여주었지만, 알코올 경구 투여 후 5시간까지 혈중 에탄올의 농도가 계속해서 증가한다는 Kim (2015)의 연구와는 유사한 결과이다. 황칠나무 잎 열수 추출물과 황칠나무 잎 추출물 함유 시제품을 경구 투여한 그룹의 혈중 에탄올 농도는 3시간 후에 최대값을 보였고, 5시간 후에는 에탄올 농도가 낮아졌다(Fig. 8). 이와 같은 결과는 황칠나무 잎 추출물이 에탄올의 흡수를 억제하는 기능도 수행하고, 체내에 흡수된 에탄올의 분해를 촉진하는 기능도 가지고 있는 것으로 해석된다.

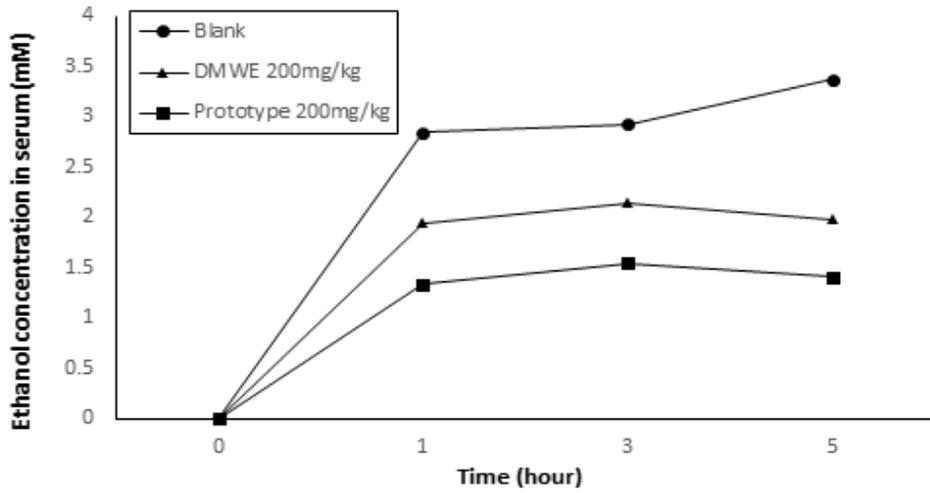


Fig. 8. Effects of *Dendropanax morbifera* leaf extract on ethanol levels in plasma of ethanol-treated rats. DMWE, water DMLE; Prototype, product contain with ratio 7:3 of the 30% ethanol DMLE and the water extract from pedicel of *Hovenia dulcis*.

나. 흰쥐의 혈중 아세트알데히드 농도

알코올을 과다하게 섭취할 경우, 두통, 설사, 구토 등의 신체적 증상을 숙취라 한다. 숙취의 발현 기전은 현재까지 많은 연구를 통하여 제시되었지만, 정설은 알콜 대사과정 중에 생성되는 아세트알데히드에 의한 것이라는 이론이 받아들여지고 있다. 혈중 아세트알데히드 농도가 높을 경우 아세트알데히드는 간세포에 잔류하면서 미토콘드리아의 기능을 저해하며, 중추신경계에 유해한 영향을 미친다고 알려져 있다(Harburg *et al.*, 1993; Mezey, 1980; Lieber and Decarli, 1970; Wiese *et al.*, 2000).

흰쥐의 혈중 아세트알데히드 농도를 측정한 결과(Fig. 9), 에탄올 대조군 그룹의 혈중 아세트알데히드의 농도는 혈중 에탄올 농도의 결과와 비슷하게 시간경과와 더불어 농도가 계속 증가하는 것으로 확인되었다. 그러나 황칠나무 잎 열수 추출물과 황칠나무 잎 추출물 함유 시제품을 경구 투여한 그룹의 경우 1~3시간 동안 에탄올 대조군 그룹보다 오히려 높은 혈중 아세트알데히드 농도를 보였으며, 3시간에서 최대값을 나타내었다. 그러나 5시간이 경과한 후에는 혈중 아세트알데히드의 농도가 현저하게 낮아지는 것을 확인할 수 있었다. 이 같은 결과는 황칠나무 잎 추출물이 알콜 섭취 후 3시간까지는 에탄올을 아세트알데히드로 전환시켜 혈중 아세트알데히드 농도가 약간 증가하지만 3시간이 경과한 이후에는 아세트알데히드의 분해를 촉진시켜서 혈중 아세트알데히드 농도가 감소하는 것으로 생각된다.

CCL₄로 유도한 흰쥐 간 섬유화 모델에서 황칠나무 잎 30% 에탄올 투여군이 식품의약품안전처에서 간기능 개선 기능성 식품원료로 인증한 밀크씨슬 추출물의 주성분인 실리마린 투여군보다 혈청 내 AST와 ALT를 효과적으로 감소시킨다는 김 (2018)의 연구 결과와 황칠나무 잎 추출물이 에탄올 유도 간독성 예방 효과를 가지며 알콜 섭취 후 혈중 에탄올을 현저하게 감소시킬 뿐만 아니라 대표적인 간독성 물질인 아세트알데히드의 혈중농도 또한 감소시킨다는 결과를 연관지어볼 때 황칠나무 잎 추출물을 이용한 간기능 개선 효과를 갖는 기능성 제품 개발 가능성을 확인할 수 있었다.

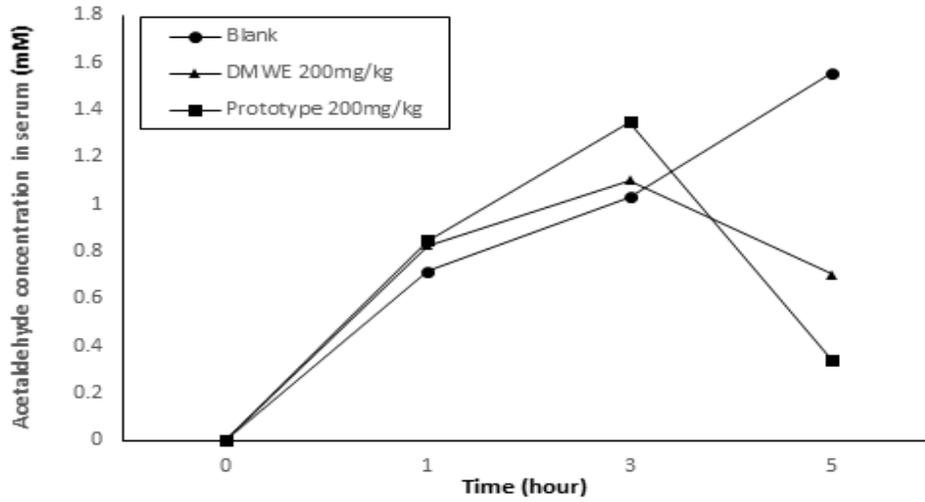


Fig. 9. Effects of *Dendropanax morbifera* leaf extract on acetaldehyde levels in plasma of ethanol-treated rats. DMWE, water DMLE; Prototype, product contain with ratio 7:3 of the 30% ethanol DMLE and the water extract from pedicel of *Hovenia dulcis*.

제4절 황칠나무 잎 추출물의 고요산혈증 예방 효과

1. Xanthine oxidase 저해 활성

Xanthine oxidase (XO)는 다양한 생명체에서 존재하며 퓨린 대사에 관여하는 효소로서, 퓨린계 물질인 xanthine과 hypoxanthine을 산화시켜 요산을 생성하며, 이 과정에서 산소분자를 수소 수용체로 이용하여 ROS를 생성하게 된다(Kim *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2017). 또한 요산이 체내에 과잉 축적되어 야기되는 고요산혈증의 원인 효소로 알려져 있다.

황칠나무 잎 추출물 및 유효성분의 XO 저해 활성을 살펴본 결과를 Table 9에 나타내었다. 황칠 열수 추출물과 농도별 에탄올 추출물을 비교한 결과, 에탄올의 농도가 높아질수록 XO 저해 활성이 높아졌으며, 이러한 결과는 김 등 (2007)의 결과와 유사한 경향이였다. 또한 황칠나무 잎 추출물의 유효성분 가운데 CGA는 69.07 µg/mL의 IC₅₀값을 나타냄으로써, 양성대조군 보다는 낮지만 분석 대상 시료 가운데는 가장 높은 활성을 보였다. 하지만 rutin은 IC₅₀이 1000 µg/mL 이상의 값을 가지는 것으로 확인됨으로써 XO 저해 활성이 거의 없다고 판단하였다.

황칠나무 잎 추출물과 유효성분의 XO 저해 활성을 XO 억제제로 현재 널리 사용중인 allopurinol에 대한 상대적인 활성으로 비교하면, CGA가 14.85%로 가장 높은 활성을 나타냈으며, 황칠나무 잎 에탄올 추출물의 경우 에탄올의 농도가 높을수록 활성도 높아지는 것으로 확인되었다. 이러한 결과를 종합하여볼 때, 황칠나무 잎 추출물의 CGA의 함량이 XO 저해 활성과 밀접한 관련이 있음을 확인할 수 있었다.

Table 8. Xanthine oxidase inhibition activity of *Dendropanax morbifera* leaf extracts and its active compounds

Samples	IC ₅₀ (µg/mL) ¹⁾	Relative activity (%) ²⁾
DMWE	527.07 ± 10.25 ^f	1.95
DM30EE	441.90 ± 5.15 ^e	2.32
DM50EE	324.29 ± 1.08 ^d	3.16
DM70EE	216.98 ± 7.41 ^c	4.73
CGA	69.07 ± 2.85 ^b	14.85
Rutin	> 1000	- ³⁾
Allopurinol	10.25 ± 0.26 ^a	100.00

DMWE, water DMLE; DM30EE, DM50EE and DM70EE, 30%, 50%, and 70% ethanol DMLEs, respectively. CGA, chlorogenic acid. All values are mean±SD (n=3). ¹⁾ IC₅₀ value is concentration of each samples for activity inhibition 50% of xanthine oxidase. ²⁾ Relative activity: a ratio of IC₅₀ value compared to allopurinol used as positive control. ³⁾ Not identified. Different superscript letters in same concentration show significant differences at $p < 0.05$ by one-way ANOVA.

2. 고요산혈증 유발 흰쥐의 고요산혈증 예방 효과

가. 흰쥐의 혈청 및 소변 내 요산 농도

황칠나무 잎 30% 에탄올 추출물이 potassium oxonate를 이용하여 고요산혈증을 유발한 흰쥐의 요산 농도에 미치는 영향을 알아본 결과를 Table 10에 나타내었다. 정상군과 고요산혈증 유발 대조군을 비교한 결과 통계적으로 유의하게 혈청 내에서는 요산 농도가 증가하였으며, 소변에서는 감소하는 경향을 보여주었다 ($p < 0.05$).

혈청 내 요산 농도의 경우, 황칠나무 잎 30% 에탄올 추출물 투여군이 고요산혈증 유발 대조군보다 통계적으로 유의하게 요산 농도가 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 50 mg/kg 투여군과 100 mg/kg 투여군에서는 각각 3.20 mg/dL, 3.22 mg/dL의 혈청 내 요산 농도를 나타냄으로써 농도 차이가 거의 없었지만, 200 mg/kg 투여군에서는 3.06 mg/dL로 요산 농도가 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 현재 통풍치료제로 사용하는 allopurinol 투여군의 경우 정상군보다도 낮은 혈청 내 요산 농도를 나타내었다.

소변 내 요산 농도도 혈청 내 요산 농도의 결과와 비슷하게 통계적으로 유의하게 고요산혈증 유발 대조군보다 소변 내 요산 농도가 낮아지는 것을 확인할 수 있었다. 황칠나무 잎 30% 에탄올 추출물 50 mg/kg 투여군과 100 mg/kg 투여군에서 각각 1.32 mg/dL, 1.31 mg/dL의 소변 내 요산 농도를 나타냄으로써 혈청 내 요산 농도 결과와 비슷하게 큰 차이를 확인할 수 없었다. 하지만 황칠나무 잎 30% 에탄올 추출물을 고용량(200 mg/kg)으로 투여하였을 때 소변 내 요산 농도는 2.00 mg/dL로 혈청 내 요산 농도 결과와는 반대로 소변 내 요산 농도는 증가하는 경향을 보여주었으나 농도에 따른 통계적 유의는 확인할 수 없었다.

위와 같은 결과로부터 고용량의 황칠나무 잎 추출물은 혈액 내의 요산 농도를 감소시키며, 소변으로의 요산 배출은 증가시키는 두 가지 작용을 통해 고요산혈증을 완화시킬 수 있는 가능성이 있음을 확인할 수 있었다.

Table 9. Effect of *Dendropanax morbifera* leaf extracts on uric acid levels in serum and urine in the hyperuricemia rat model

unit : mg/dL

Samples	Serum	Urine
NC	1.99 ± 0.31 [*]	8.56 ± 2.60 [*]
VC	3.98 ± 0.56 ^c	3.75 ± 2.55 ^b
DM-50 mg/kg	3.20 ± 0.26 ^b	1.32 ± 0.61 ^a
DM-100 mg/kg	3.22 ± 0.35 ^b	1.31 ± 0.60 ^a
DM-200 mg/kg	3.06 ± 0.36 ^b	2.00 ± 1.21 ^a
Allopurinol	0.52 ± 0.16 ^a	0.81 ± 0.24 ^a

NC, normal control group; VC, vehicle control group; DM, group to administer 30% ethanol DMLE. All values are mean±SD (n=3). *, significantly different from VC, $p < 0.05$. Different superscript letters in same concentration show significant differences at $p < 0.05$ by one-way ANOVA.

나. 흰쥐의 혈청 및 간 xanthine oxidase activity

고요산혈증을 유발한 흰쥐에 황칠나무 잎 30% 에탄올 추출물을 투여하였을 때 혈청 및 간 내 XO activity를 측정한 결과를 Table 11에 나타내었다. 혈청과 간 조직액에서의 XO activity의 경우 정상군과 고요산혈증 유발 대조군을 비교하였을 때, XO activity의 변화는 없는 것으로 확인되었다.

혈청에서 XO activity는 XO 저해제로 사용되는 allopurinol 투여군이 0.35 mg/dL로 가장 높은 활성을 보였으나, 나머지 그룹의 XO activity는 고요산혈증 유발 대조군과 비교하였을 때 통계적으로 유의한 변화를 확인할 수 없었다.

황칠나무 잎 30% 에탄올 추출물 투여군에서 고요산혈증 유발 대조군보다 XO activity가 감소하는 것을 확인하였으며, 200 mg/kg 투여군은 저용량 투여군과 비교하였을 때 통계적으로 유의하게 XO activity를 감소시키는 것으로 확인되었다. 따라서 황칠나무 잎 30% 에탄올 추출물이 간 내 XO activity를 저해하여 혈액 내의 요산 농도를 저하시키는 것으로 생각되었다.

Table 10. Effect of *Dendropanax morbifera* leaf extracts on xanthine oxidase activity in serum and liver in the hyperuricemia rat model

Samples	Serum (mg/dL)	Liver (mU/mg protein)
NC	1.03 ± 0.05	0.049 ± 0.003
VC	0.96 ± 0.06 ^b	0.046 ± 0.005 ^d
DM-50 mg/kg	1.00 ± 0.04 ^b	0.043 ± 0.002 ^c
DM-100 mg/kg	0.94 ± 0.03 ^b	0.043 ± 0.002 ^c
DM-200 mg/kg	0.94 ± 0.07 ^b	0.037 ± 0.002 ^b
Allopurinol	0.35 ± 0.01 ^a	0.024 ± 0.001 ^a

NC, normal control group; VC, vehicle control group; DM, group to administer 30% ethanol DMLE. All values are mean±SD (n=3). Different superscript letters in same concentration show significant differences at $p < 0.05$ by one-way ANOVA.

제 4장 요약

30%, 50%, 70% 에탄올 및 증류수를 추출용매로 사용하여 획득한 황칠나무 잎 추출물(DMLE)의 에탄올 유도 간독성 및 고요산혈증 예방 효과를 확인하였다.

DMLEs의 수율은 19.66%~24.14%로, 이 중 열수 DMLE의 수율이 가장 높았으며, 에탄올의 함량이 높아질수록 DMLEs의 CGA와 rutin의 함량이 높아지는 것으로 확인되었다. DMLEs의 항산화 효과를 비교하기 위하여 DPPH 라디칼 소거 효능과 세포 내 활성산소종 (ROS) 소거 활성을 측정하였다. 70% 에탄올 DMLE가 78.9 μ g/mL의 IC₅₀ 값을 보이며 추출물들 중 가장 높은 DPPH 라디칼 소거 효능을 나타냈다. DCFH-DA 분석법을 이용하여 확인한 세포 내 ROS 소거 활성은 50% 에탄올 DMLE가 84.9%의 소거율로 가장 높은 활성을 나타냈고, 이어서 30% 에탄올, 열수, 70% 에탄올 DMLEs 순으로 확인되었다. MTT assay를 이용하여 Hep3B 세포에서 세포독성을 확인한 결과, DMLEs의 IC₅₀ 값이 2.08~1.11 mg/mL로 우려할 만한 독성은 없는 것으로 확인되었다. 에탄올 유도 간독성 예방 효과를 확인하기 위해 Hep3B 세포에 DMLEs를 50~200 μ g/mL의 농도로 30분 전에 전처리 후 에탄올을 5%로 처리하여 24시간 배양하였다. 30% 및 50% 에탄올 DMLEs 처리군이 높은 세포 생존율을 나타냄으로써 에탄올 유도 간독성 예방 효과를 확인하였다. 또한 30분 전에 열수 DMLE를 전처리한 후 3 g/kg으로 에탄올을 투여한 흰쥐에서 에탄올 투여하고 1, 3 및 5 시간 경과한 시점에서 혈장 에탄올과 아세트알데히드의 농도를 측정하였다. 열수 DMLE 투여군은 에탄올 대조군 그룹과 비교시 5시간 동안 에탄올 농도가 낮은 것으로 확인되었으며, 아세트알데히드의 농도는 3시간까지는 에탄올 대조군 그룹보다 높았으나, 5시간 경과한 시점에는 열수 DMLE 투여군의 혈중 아세트알데히드 농도가 현저하게 감소되었다. DMLEs의 xanthine oxidase (XO)를 50% 저해하는 농도는 60~527 μ g/mL로 확인되었다. 이러한 결과에 기초하여 30% 에탄올 DMLE를 선택하여 potassium oxonate를 투여하여 고요산혈증을 유발한 흰쥐에서 고요산혈증 예방 효과를 확인하였다. 30% 에탄올 DMLE 투여군은 고요산혈증 유발 대조군보다 혈청 및 소변에서 요산 농도가 감소하였으며, 간의 XO activity를 억제하였다. 하지만 혈청 XO activity에는 거의 영향을 미치지 못하였다.

이상의 결과를 종합하면, DMLEs는 *in vitro*에서 항산화 활성 및 에탄올 유도 간

독성 보호효과를 나타내고 *in vivo*에서 간의 XO 활성을 억제하여 고요산혈증 예방 효과를 보였으며, DMLE 중 비용·효능성을 고려할 때 30% 에탄올 DMLE가 기능성 제품 개발에 적합한 후보물질로 생각된다.

감사의 글

설레임과 두려움을 안고 시작한 학위과정에서 많은 분들의 도움과 관심 속에 졸업논문이라는 작은 성과를 내놓을 수 있게 됨을 짧은 글으로나마 감사의 마음을 전합니다.

박사과정 동안 많은 가르침을 주시고 아낌없는 격려를 해주신 지도 교수 최 철희 교수님께 진심으로 감사드립니다. 그리고 본 논문이 완성되기까지 세심한 지도와 애정 어린 조언을 아끼지 않으셨던 김 선민 교수님, 바쁘신 와중에도 제 학위논문의 심사위원을 맡아주시고 지도편달을 해주신 한 송이 교수님, 임 성철 교수님, 이 태범 박사님께 진심으로 감사드립니다. 또한 본 연구를 위하여 실험 과정 중 많은 도움을 주신 휴림황칠(주)의 조 창수 사장님과 임직원 분들, 동신대학교 BIO 센터 표 병식 교수님, 이 경인 팀장님과 선후배님 그리고 약리학교실의 이 영주 선생님을 비롯한 여러 선생님들에게 감사함을 전해드리고 싶습니다.

오늘이 있기까지 사랑과 희생으로 길러주시고 부족한 자식을 믿어주며 한결같이 지지하고 응원과 지원을 해주신 부모님의 사랑에 깊은 감사를 드립니다. 또한 부족함이 많은 언니이자 누나인 저에게 격려와 성원을 아끼지 않은 동생들에게도 진심으로 고마움을 전하며 서로가 서로를 보듬으며 부모님의 사랑과 희생을 조금이나마 갚으며 살 수 있게 열심히 노력하겠습니다.

자신이 맡은 분야에서 끊임없는 노력을 통해 사회에 이바지할 수 있는 사람이 되는 것이 저의 목표입니다. 비행기는 목적지를 도착하기 위하여 수없이 정해진 항로를 벗어나기도 하지만 결국은 목적지에 도착합니다. 저 역시 가끔은 다른 길을 갔다 돌아오기도 하고 잠시 멈춰 서서 반성을 하는 시간을 가지기도 하겠지만 저의 목표를 위해 한 걸음 한 걸음 앞으로 나아가는 발걸음이 될 수 있도록 끊임없이 노력하며 살겠습니다.

참 고 문 헌

Albano, E. (2006). Alcohol, oxidative stress and free radical damage. *Proceedings of the Nutrition Society* 65(3), 278-290.

An, N.Y. (2014). Antidiabetic and antioxidative effects of *Dendropanax morbifera* in streptozotocin-induced diabetic rats. Pusan National University, Busan, Korea Master's Thesis.

An, N.Y., Kim, J.E., Hwang, D. and Ryu, H.K. (2014). Anti-diabetic effects of aqueous and ethanol extract of *Dendropanax morbifera* Lev. in streptozotocin-induced diabetes model. *Journal of Nutrition and Health* 47(6), 394-402.

Arai, M., Yokosuka, O. and Fujiwara, K. (2002). Fulminant hepatic failure associated with benzbromarone treatment: a case report. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 17(5), 625-626.

Azuma, K., Ippoushi, K., Nakayama, M., Ito, H., Higashio, H. and Terao, J. (2000). Absorption of chlorogenic acid and caffeic acid in rats after oral administration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48(11), 5496-5500.

Bae, K.H. (2010). Induction and in vitro proliferation of adventitious roots in *Dendropanax morbifera* Lev. *The Plant Resources Society of Korea* p.19

Becker, B.F. (1993). Towards the physiological function of uric acid. *Free Radical Biology & Medicine* 14(6), 615-631.

Becker, U., Gluud, C., Farholt, S., Bennett, P., Micic, S., Svenstrup, B. and Hardt, F. (1991). Menopausal age and sex hormones in postmenopausal women with alcoholic and non-alcoholic liver disease. *Journal of Hepatology* 13(1), 25-32.

Bucher, T. and Redetzki, H. (1951). Specific photometric determination of ethyl alcohol based on an enzymatic reaction. *Klinische Wochenschrift* 29, 615-616.

Chae, H.B. (2009). Alcoholic liver disease. *The Korean Journal of Gastroenterology* 53(5), 275-282.

Chen, N., Chiu, P.Y. and Ko, K.M. (2008). Schisandrin B enhances cerebral mitochondrial antioxidant status and structural integrity, and protects against cerebral ischemia/reperfusion injury in rats. *Biological & pharmaceutical Bulletin* 31(7), 1387-1391.

Choi, B.H., Kim, S.L. and Kim, S.K. (1996). Rutin and functional ingredients of buckwheat and their variations. *Korean Journal of Crop Science* 41(1), 69-93.

Choi, H.J., Park, D.H., Song, S.H., Yoon, I.S. and Cho, S.S. (2018). Development and validation of a HPLC-UV method for extraction optimization and biological evaluation of hot-water and ethanolic extracts of *Dendropanax morbifera* Leaves. *Molecules a Journal of Synthetic Chemistry and Natural Product Chemistry* 23(3), 650.

Choi, S.K. (1996). Growth characteristics and native environment of *Dendropanax morbifera* Lev. in Wando, Korea. *Korean Journal of Medicinal Crop Science* 4(1), 1-6.

Choi, Y.H., Kim, M.J., Lee, H.S., Hu, C. and Kwak, S.S. (1997). Antioxidants in leaves of *Rosa rugosae*. *Korean Journal of Pharmacognosy* 28(4), 179-198.

Chung, I.M., Kim, M.Y., Park, W.H. and Moon, H.I. (2009). Antiatherogenic activity of *Dendropanax morbifera* essential oil in rats. *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences* 64(8), 547-549.

Chung, I.M., Song, H.K., Kim, S.J. and Moon, H.I. (2011). Anticomplement activity of polyacetylenes from leaves of *Dendropanax morbifera* Lev. *Phytotherapy Research* 25(5), 784-786.

Frlich, L. and Riederer, P. (1995). Free radical mechanisms in dementia of Alzheimer type and the potential for antioxidative treatment. *Arzneimittel Forschung-Drug Research* 45(3A), 443-446.

Gagliardi, A.C., Miname, M.H. and Santos, R.D. (2009). Uric acid: a marker of increased cardiovascular risk. *Atherosclerosis* 202(1), 11-17.

Gustafsson, D. and Unwin, R. (2013). The pathophysiology of hyperuricaemia and its possible relationship to cardiovascular disease, morbidity and mortality. *BMC Nephrology* 14(1), 164.

Halsted, C.H. (1980). Alcoholism and malnutrition introduction to the

symposium. The American Journal of Clinical Nutrition 33(12), 2705-2708.

Harburg, E., Gunn, R., Gleiberman, L., DiFranceisco, W. and Schork, A. (1993). Psychosocial factors, alcohol use, and hangover signs among social drinkers: a reappraisal. Journal of Clinical Epidemiology 46(5), 413-422.

Huang, C., Niu, K., Kobayashi, Y., Guan, L., Momma, H., Cui, Y. and Tadaura, H. (2013). An inverted J-shaped association of serum uric acid with muscle strength among Japanese adult men: a cross-sectional study. BMC Musculoskeletal Disorders 14(1), 258.

Hyun, T.K., Kim, M.O., Lee, H., Kim, Y., Kim, E. and Kim, J.S. (2013). Evaluation of anti-oxidant and anti-cancer properties of *Dendropanax morbifera* Lev. Food Chemical 141(3), 1947-1955.

Jang, M.G., Song, H., Lee J.Y., Ko, H.C., Hur, S.P. and Kim, S.J. (2019). Protective effects of *Sasa quepaertensis* Leaf Residue Extract against Potassium Oxonate-induced Hyperuricemia in Mice. Journal of Life Science 29(1), 37-44.

Jacques, P.F., Sulsky, S., Hartz, S.C. and Russell, R.M. (1989). Moderate alcohol intake and nutritional status in nonalcoholic elderly subject. The American Journal of Clinical Nutrition 50(4), 875-883.

Kang, D.H., Han, E.H., Jin, C.B. and Kim H.J. (2016). Inhibitory effects of ethanolic extracts from *Aster glehni* on xanthine oxidase and content determination of bioactive components using HPLC-UV. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition 45(11), 1610-1616.

Kang, H.J., Kim, U.K., Choi, J.G. and Chung, S.H. (2003). Hypouricemic activity of *Actinidia polygama*. Yakhakhoeji 47(5), 307-310.

Keshavarzian, A., Fields, J.Z., Vaeth, J. and Holmes, E.W. (1994). The differing effects of acute and chronic alcohol on gastric and intestinal permeability. The American Journal of Gastroenterology 89(12), 2205-2211.

Kang, T.H., Oh, H.R., Jung, S.M., Ryu, J.H., Park, M.W., Park, Y.K. and Kim, S.Y. (2006). Enhancement of neuroprotection of mulberry leaves (*Morus alba* L.) prepared by the anaerobic treatment against ischemic damage. Biological & Pharmaceutical Bulletin 29(2), 270-274.

Kang, Y.H., Park, Y.K. and Lee, G.D. (1996). The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. *Korean Journal of Food Science and Technology* 28(2), 232-239.

Kim, C.I. (1999). Cause and effect of hangover. *Food Industry and Nutrition* 4(1), 26-30.

Kim, D. (2012). *Dendropanax* tree extract for 12 weeks having drunk non-alcoholis fatty liver(NAFLD) effects of obesity college students. *Journal of the Korea Entertainment Industry Association* 6(3), 142-146.

Kim, H. (2005). Neuroprotective herbs for stroke therapy in traditional eastern medicine. *Neurological Research* 27(3), 287-301.

Kim, H.R. and Chung, H.J. (2000). Chemical characteristics of the leaves and the seeds of Korea *Dendropanax*(*Dendropanax morbifera* Lev.). *Journal of the Korean Society of Agricultural Chemistry and Biotechnology* 43(1), 63-66.

Kim, H.W., Kim, J.B., Chu, S.M., Kim, S.Y., Kim, S.N., Cho, Y.S., Cho, S.M., Baek, H.J., Kim, J.H., Park, H.J., Lee, D.J., Hiba, A.A. and Derek, S. (2010). Analysis of anthocyanin composition and content contained from grains of the Korean purple rice varieties by liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization/mass spectrometry (LC-DAD-ESI/MS). *The Journal of the Korean Society of International Agriculture* 22(3), 267-272.

Kim, J.G., Kang, Y.M., Eum, G.S., Ko, Y.M. and Kim, T.Y. (2003). Antioxidative activity and anti-microbial activity of extracts from medicinal plants (*Akebia quinata* Decaisn, *Scirus fluviatilis* A. Gray, *Gardenia jasminoides* for. Grandiflora Makino). *Journal of Agricultural and Life Science* 37, 69-75.

Kim, J.H. (1997). Isolation and characterization of doxorubicin-resistant AML sublines. Chosun University, Gwangju, Korea Doctor's Thesis.

Kim, M.H., Kang, W.W., Lee, N.H., Kwoen, D.J. and Choi, U.K. (2007). Antioxidant activities of extract with water and ethanol of *Perilla frutescens* var. *acuta kudo* leaf. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 50(4), 327-333.

Kim, M.J. (2015). Effects of *Oenanthe javamica* extract on hangover and liver functionality. An-Dong university, Gyeongsangbukdo, Korea. Mater thesis.

Kim, S.H., Lee, K.H., Shin, D.L., Kim, D.H. and Choi, J.W. (1996). Effect of water extract from *Fugu xanthopterus* on the Hhyperuricemia in alcohol-treated rats. The Korean Society of Food Science and Nutrition 25(1), 46-52.

Kim, S.J. (2018). Inhibitory activity of *Dendropanax morbiferum* extracts against liver fibrosis. Chosun University, Gwangju, Korea Doctor's Thesis.

Ko, B.S., Jang, J.S., Hong, S.M., Kim, D.W., Sung, S.R., Park, H.R., Lee, J.E., Jeon, W.K. and Park, S.M. (2006). Effect of new remedies mainly comprised *Hovenia dulcis* Thunb on alcohol degradation and liver protection in SD male rats. Journal of Food Science and Nutrition 35(7), 828-834.

Kwon, S.H., Lee, H.K., Kim, J.A., Hong, S.I., Kim, H.C., Jo, T.H., Park, Y.I., Lee, C.K., Kim, Y.B., Lee, S.Y. and Jang, C.G. (2010). Neuroprotective effects of chlorogenic acid on scopolamine-induced amnesia via anti-acetylcholinesterase and anti-oxidative activities in mice. European Journal of Pharmacology 649(1-3), 210-217.

Lebel, C.P., Ischiropoulos, H. and Bondy, S.C. (1992). Evaluation of the probe 2', 7'-Dichlorofluorescein as an indicator of reactive oxygen species formation and oxidative stress. Chemical Research in Toxicology 5(2), 227-231.

Lee, J.J., Park, S.Y., Lee, Y.M. and Lee, M.Y. (2006). Protective effects of Lotus root(*Nelumbo nucifera* G.) extracts on hepatic injury induced by alcohol in rats. Korean Journal of Food Preservation 13(6), 774-782.

Lee, I.H., Shim, Y., Choi, S.H., Park, J.Y., Han S.W., Song, J.Y. and Yoon, S.J. (2006). A Study on the Antimicrobial Effect of *Ginkgo biloba* Leaves Extracts according to Concentrations of Ethanol for *staphylococcus aureus*. Korean Journal of Biotechnology and Bioengineering 21(4), 312-316.

Lee, M.K., Lee, I.S. and Lee, J.S. (2013). For the utilization of Native plant resources as high-value materials; Evaluation on demelanizing activity of *Dendropanax morbifera* Bogildo. Journal of Korean Island 25(4), 227-240.

Lee, S.G., Lee, S.H. and Park E.J. (2015a). Antimicrobial and antioxidant activities of ethanol leaf extract of *Dendropanax morbifera* Lev. Korean Journal of Food and Cookery Science 31(5), 515-523.

Lee, S.H., Lee, H.S., Park, Y.S., Hwang, B., Kim, J.H. and Lee, H.Y. (2002). Screening of immune activation activities in the leaves of *Dendropanax morbifera* Lev. Korean Journal of Medicinal Crop Science 10(2), 109-115.

Lee, S.E., Ju, E.M. and Kim, J.H. (2000). Protective effect of natural medicinal plants against oxidative damage induced by reactive oxygen species. Journal of Environmental Toxicology 15(4), 147 - 155.

Lee, S.H. and Kim, W.Y. (1991). Relationship of habitual alcohol consumption the nutritional status in middle age men. The Korean Journal of Nutrition 24(1), 58-65.

Lee, S.I., Lee, Y.K., Kim, S.D., Seung, J.H., Yang, S.h. and Suh, J.W. (2014). Xanthine and aldehyde oxidase inhibitory activities, and antihyperuricemic effects of fermented *Smilax china* L. Leaf extracts and fractions. Journal of Applied Biological Chemistry 57(1), 53-59.

Lee, S.Y., Choi, E.J., Bae, D.H., Lee, D.W. and Kim, S. (2015b). Effects of 1-tetradecanol and β -sitosterol isolated from *Dendropanax morbifera* Lev. on skin whitening, moisturizing and preventing hair loss. Journal of the Society of Cosmetic Scientists of Korea 41(1), 73-83.

Lee, Y.B., Ham, Y.M., Yoon, S.A., Oh, D.J., Song, S.M., Hong, I.C., Lee, S.T., Hyun, H.B., Kim, C.S. and Yoon, W.J. (2017). Antioxidant and anti-inflammatory activities of crude extract and solvent fractions of *Allium hookeri*. Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition 46(1), 18-25.

Lieber, C.S. (1990). Interaction of ethanol with drugs, hepatotoxic agents, carcinogens and vitamins. Alcoholism 25(2-3), 157-176.

Lieber, C.S. and Decarli, L.M. (1970). Hepatic microsomal ethanol-oxidizing system in vitro characteristics and adaptive properties in vivo. The Journal of Biological Chemistry 245(10), 2505-2512.

Lundquist, F. (1974). Determination with aldehyde dehydrogenase. In Methods of Enzymology. Lowenstein JM, ed. Academic Press, New York, NY, USA 3, 1509-1513.

Mattia, C.J., Adams, J.D. and Bondy S.C. (1993). Free radical induction in the brain and liver by products of toluene catabolism. *Biochemical Pharmacology* 46(1), 103-110.

Matysiak-Budnik, T., Jokelainen, K., Kärkkäinen, P., Mäkisalo, H., Ohisalo, J. and Salaspuro, M. (1996). Hepatotoxicity and absorption of extrahepatic acetaldehyde in rats. *The Journal of Pathology* 178(4), 469-74.

Mezey, E. (1980). Alcoholic liver disease: roles of alcohol and malnutrition. *The American Journal of Clinical Nutrition* 33(12), 2709-2718.

Mikuls, T.R., Farrar, J.T., Bilker, W.B., Fernandes, S., Schumacher, H.R. and Saag, K.G. (2005). Gout epidemiology: results from the UK general practice research database, 1990-1999. *Annals of the Rheumatic Diseases: The Official Journal* 64(2), 267-272.

Moon, H.I. (2011). Antidiabetic effects of dendropanoxide from leaves of *Dendropanax morbifera* Lev. in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Human & Experimental Toxicology* 30(8), 870-875.

Neuman M.G., Koren G. and Tiribelli C. (1993). In vitro assessment of the ethanol-induced hepatotoxicity on HepG2 cell line. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 197(2), 932-941.

Ochiai, R., Jokura, H., Suzuki, A., Tokimitsu, I., Ohishi, M., Komai, N., Rakugi, H. and Ogihara, T. (2004). Green coffee bean extract improves human vasoreactivity. *Hypertension Research* 27(10), 731-737.

Park, B.Y, min, B.S., Oh, S.R., Kim, J.H., kim, T.J., kim, D.H., kim, H.B. and Lee, H.K. (2004). Isolation and anticomplement activity of compounds from *Dendropanax morbifera*. *Journal of Ethnopharmacol* 90(2-3), 403-408.

Park, S.A., Park, J., Park, C.I., Jie, Y.J., Hwang, Y.C., Kim, Y.H., Jeon, S.H., Lee, M.h., Ha, H.J., Kim, K.J. and Park, S.N. (2013). Cellular antioxidant activity and whitening effects of *Dendropanax morbifera* leaf extracts. *Korea Journal of Microbiology and Biotechnology* 41(4), 407-415.

Park, S.H. (2008). Nonalcoholic steatohepatitis: Pathogenesis and treatment. *The Korean Journal of Hepatology* 14(1), 12-27.

Park, W. (2011). Recent progress in the management of gouty arthritis and hyperuricemia. *The Korean Journal of Medicine* 80(3), 260-268.

Rothe G. and Valet G. (1990). Flow cytometric analysis of respiratory burst activity in phagocytes with hydroethidine and 2',7'-dichlorofluorescein. *Journal of Leukocyte Biology* 47(5), 440-448.

Ryu, S., Chang, Y., Zhang, Y., Kim, S.G., Cho, J., Son, H.J. and Guallar, E. (2012). A cohort study of hyperuricemia in middle-aged South Korean men. *American Journal of Epidemiology* 175(2), 133-143.

Sayed, H.M., Mohamed, M.H., Farag, S.F., Mohamed, G.A., Omobuwajo, O.R. and Proksch, P. (2008). Fructose-amino acid conjugate and other constituents from *Cyperus rotundus* L. *Natural Product Research* 22(17), 1487-1497.

Shacter, E., Beecham, E.J., Covey, J.M., Kohn, K.W. and potter, M. (1988). Activated neutrophils induce prolonged DNA damage in neighboring cells. *Carcinogenesis* 9(12), 2297-2304.

Shin, K.M., Park, Y.M., Kim, I.T., Hong, S.P., Hong, J.P. and Lee, K.T. (2003). In vitro antiinflammatory activity of amygdalin in murine macrophage Raw 264.7 cells. *Korean Journal of Pharmacognosy* 34(3), 223-227.

Shin, S.O., Shin, S.H., Lim, S.G., Lee, J.H., Kang, N.S., Suh, D.Y., Park, K.Y. and Ha, T.J. (2007). Isolation and identification of new anthocyanins from the Black Seed Coat of Soybean (*Glycine max* L.) by HPLC-DAD - ESI/MS analysis. *Korean Soybean Digest* 24(1), 23-33.

Shumate, R.P., Crowther, R.F. and Zeraafshan, H. (1967). A study of the metabolism rates of alcohol in the human body. *Journal of Forensic Medicine* 14(3), 83-100.

Swift, R. and Davidson, D. (1998). Alcohol hangover, mechanisms and mediators. *Alcohol Health and Research World* 22(1), 54-60.

Teschke, R., Hasumura, Y. and Lieber, C.S. (1976). Hepatic ethanol metabolism: Respective roles of alcohol dehydrogenase, the microsomal ethanol oxidizing system and catalase. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 175(2), 635-643.

Tsuchiya, M., Suematsu, M. and Suzuki, H. (1994). In vivo visualization of

oxygen radical-dependent photoemission. *Methods in Enzymology* 233, 128-140.

Wallace, K.L., Riedel, A.A., Joseph-Ridge, N. and Wortmann, R. (2004). Increasing prevalence of gout and hyperuricemia over 10 years among older adults in a managed care population. *The Journal of Rheumatology* 31(8), 1582-1587.

Wiese, J.G., Shlipak, M.G. and Browner, W.S. (2000). The alcohol hangover. *Annals of Internal Medicine* 132(11), 897-902.

Wrase, J., Grusser, S.M., Klein, S., Diener, C., Herman, D., Flor, H., Mann, K., Braus, D.F. and Heinz, A. (2002). Development of alcohol-associated cues and cue-induced brain activation in alcoholics. *European Psychiatry* 17(5), 287-291.

Yang, J.M. (2001). Extrahepatic manifestation of alcoholic injury. *Clinical and Molecular Hepatology* 7(4), 491-493.

Yoon, B.R., Cho, B.J., Lee, H.K., Kim, D.J., Hee, S.K., Hong, H.D., Kim, K.T., Cho, C.W., Choi, H.S., Lee, B.Y. and Lee, O.H. (2012). Antioxidant and anti-adipogenic effects of ethanolic extracts from tartary and common buckwheats. *Korean Journal of Food Preservation* 19(1), 123-130.

Zelman, F.A., Thienhaus, O.J., and Bosmann, H.B. (1988). Superoxide dismutase activity in Alzheimer's disease: possible mechanism for paired helical filament formation. *Brain Research* 476(1), 160-162.