



### 저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



**저작자표시.** 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



**비영리.** 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



**동일조건변경허락.** 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 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](#)

2006年 2月  
博士學位 論文

# 우슬 추출물의 생리활성 연구

*A study on the Biological Activities of  
Achyranthis Radix Ethanol Extract*

朝鮮大學校大學院

食品營養學科

崔 賢 淑

# 우슬 추출물의 생리활성 연구

*A study on the Biological Activities of  
Achyranthis Radix Ethanol Extract*

2006年 2月 日

朝鮮大學校 大學院

食品營養學科

崔 賢 淑

# 우슬 추출물의 생리활성 연구

指導教授 李 明 烈

이 論文을 理學博士學位申請 論文으로 提出함


2005年 10月 日


朝鮮大學校 大學院


食品營養學科


崔 賢 淑


# 崔賢淑의 博士學位 論文을 認准함

委員長 木浦大學校 農學博士 鄭 昇 澤 

委 員 順天大學校 農學博士 金 龍 斗 

委 員 朝鮮大學校 理學博士 金 敬 洙 

委 員 朝鮮大學校 農學博士 張 海 春 

委 員 朝鮮大學校 藥學博士 李 明 烈 

2005年 12月 日

朝鮮大學校 大學院

# 목 차

<i>ABSTRACT</i> .....	x iv
제1장 서 론 .....	1
제2장 재료 및 방법 .....	11
제1절 실험재료 .....	11
제2절 성분분석 .....	11
1. 일반성분 .....	11
2. 유리당 .....	11
3. 아미노산 .....	12
4. 지방산 분석 .....	12
5. 비타민 A 와 비타민 E .....	12
6. 유기산 .....	13
7. 양 · 음이온 .....	13
8. 무기질 .....	13
제3절 시약, 기기 및 시료 추출 .....	18
1. 시약 및 실험기기 .....	18
2. 시료추출 .....	20
가. 우슬 에탄올 추출 .....	20
나. 다용매 분획 .....	20
제4절 항산화 활성 실험 .....	22
1. <i>In vitro</i> 에서 항산화 활성 측정 .....	22
가. DPPH radical 소거 활성 .....	22

나. 항산화지수(active oxygen metho, AOM-Rancimat) .....	22
다. 아질산염 소거능(nitrite scavenging ability, NSA) .....	23
라. 지질과산화 억제효과(thiobarbituric acid value) .....	23
마. Linoleic acid에 대한 항산화 효과 .....	24
2. <i>In vivo</i> 에서 항산화 효능 실험 .....	24
가. 실험동물 사육 .....	24
나. 실험설계 및 실험식이 .....	25
다. 실험동물 처치 .....	25
라. 혈청 중 AST, ALT 및 ALP 활성 측정 .....	27
마. 간 조직 중 효소활성 측정 .....	27
(1) 효소원 조제 .....	27
(2) XO 활성 .....	28
(3) SOD 활성 .....	28
(4) Catalase 활성 .....	28
(5) GSH-Px 활성 .....	29
(6) TBARS 함량 .....	29
(7) GSH 함량 .....	30
(8) 단백질 정량 .....	30
바. 통계처리 .....	30
제5절 고지혈증 억제 효능 실험 .....	31
1. <i>In vitro</i> 에서 고지혈증 억제 효과 측정 .....	31
가. LDL 분리 .....	31
나. LDL 산화 및 측정 .....	31
2. <i>In vivo</i> 에서 고지혈증 억제 효능 실험 .....	32
가. 실험동물 사육 .....	32
나. 실험식이 및 실험설계 .....	32

다. 실험동물의 처치 .....	34
라. 혈청 중 효소 활성 측정 .....	35
마. 혈청 지질 함량 측정 .....	35
바. 조직의 지질 함량 측정 .....	35
사. LPL 활성 측정 .....	36
(1) Heparin-releasable LPL(HR-LPL) 활성 .....	36
(2) Total extractable LPL(TE-LPL) 활성 .....	37
아. LPL mRNA 분석 .....	37
자. 통계처리 .....	38
제6절 항혈전 효능 실험 .....	39
1. <i>In vitro</i> 에서 혈소판 응집 억제능 측정 .....	39
가. Fibrin 용해능(fibrinolytic activity) .....	39
나. 혈장 응고 시간(plasma recalcification time) .....	39
2. <i>In vivo</i> 에서 항혈전 효능 실험 .....	40
가. Collagen 유발 혈전증 .....	40
(1) 실험동물 및 재료 .....	40
(2) 검액 조제 및 실험군 설정 .....	40
나. Endotoxin 유발 혈전증 .....	42
(1) 실험동물 및 재료 .....	42
(2) 검액 조제 및 실험군 설정 .....	42
(3) 채혈 및 혈청 분리 .....	43
(4) PT 측정 .....	43
(5) Fibrinogen 함량 측정 .....	43
(6) APTT 측정 .....	43
(7) 출혈시간(bleeding time) 측정 .....	44
(8) 출혈량(OD value) 측정 .....	44



(9) 혈장 응고시간(plasma recalcification time) 측정 .....	44
(10) 전혈 응고시간(whole blooding time) 측정 .....	45
(11) Hematocrit 측정 .....	45
다. 통계처리 .....	45
<b>제3장 실험결과 및 고찰</b> .....	46
제1절 성분분석 .....	46
1. 일반성분 .....	46
2. 유리당 함량 .....	47
3. 구성아미노산 함량 .....	47
4. 지방산 조성 .....	48
5. 비타민 A 및 E 함량 .....	50
6. 유기산 함량 .....	50
7. 양·음이온의 함량 .....	51
8. 무기질 함량 .....	52
제2절 항산화 효능 .....	53
1. <i>In vitro</i> 에서 항산화 활성 .....	53
가. DPPH radical 소거작용 .....	53
나. 항산화지수(active oxygen method-AOM) .....	54
다. 아질산염 소거작용 .....	54
라. 지질과산화 억제작용 .....	57
마. Linoleic acid에 대한 항산화 작용 .....	58
2. <i>In vivo</i> 에서 항산화 효능 .....	60
가. 체중증가율, 식이효율 및 간무게 .....	60
나. 혈청 ALT, AST 및 ALP 활성 .....	63
다. 간조직의 항산화효소 활성 .....	67

(1) XO 활성 .....	67
(2) 간조직의 SOD, catalase 및 GSH-Px 활성 .....	69
라. 간조직의 과산화지질 함량 .....	74
마. 간 조직 중 GSH 함량 .....	76
제3절 고지혈증 억제 효능 .....	78
1. <i>In vitro</i> 에서 고지혈증 억제 효과 .....	78
가. LDL에 대한 항산화 효과 .....	78
2. <i>In vivo</i> 에서 고지혈증 억제 효능 .....	80
가. 체중증가율, 식이효율, 간장/체중 비율 및 지방조직 무게 .....	80
나. 혈청 중 ALT, AST 및 ALP 활성 .....	85
다. 혈청 중 중성지방, 총콜레스테롤 및 인지질 함량 .....	89
라. 혈청 중 유리 콜레스테롤 함량, 콜레스테릴 에스테르 함량 및 콜레스테릴 에스테르 비율 .....	93
마. 혈청 중 LDL-콜레스테롤 함량, HDL-콜레스테롤 함량, 심혈관 위험지수 및 동맥경화지수 .....	97
바. 간조직 중 총지질, 총콜레스테롤 및 중성지방 함량 .....	103
사. 지방조직 중 총지질, 총콜레스테롤 및 중성지방 함량 .....	107
아. 지방조직 LPL 활성 .....	114
자. 지방조직 LPL mRNA 유전자 발현 .....	120
차. 주요 parameter들 간의 상관관계 .....	123
제4절 항혈전 효능 .....	124
1. <i>In vitro</i> 에서 항혈전 효과 .....	124
가. Fibrin 용해 효과 .....	124
나. 혈장 응고시간 지연 효과 .....	126
2. <i>In vivo</i> 에서 항혈전 효능 .....	127
가. Collagen 유발 혈전증에 대한 효능 .....	127

나. Endotoxin 유발 혈전증에 대한 효능 .....	128
(1) Fibrinogen 함량 .....	128
(2) PT .....	130
(3) APTT .....	130
(4) 출혈시간 (Bleeding time) .....	132
(5) 출혈량(OD Value) .....	133
(6) 혈장응고시간(plasma clotting time) .....	134
(7) 전혈 응고시간(whole blood clotting time) .....	135
(8) Hematocrit치 .....	136
제4장   요   약 .....	137
제5장   참 고 문 헌 .....	141

## *LIST OF TABLES*

Table 1. Operating condition of ion chromatography for free sugars .....	14
Table 2. Operating condition of amino acid autoanalyzer for amino acids ...	14
Table 3. Operating condition of gas chromatography for fatty acids .....	15
Table 4. Operating condition of high performance liquid chromatography for vitamin A and E .....	15
Table 5. Operating condition of ion chromatography for organic acids .....	16
Table 6. Operating condition of ion chromatography for cations .....	16
Table 7. Operating condition of ion chromatography for anions .....	17
Table 8. Operating condition of atomic absorption spectrophotometer for minerals .....	17
Table 9. Yield of <i>Achyranthis radix</i> ethanol extract(AREE) and its solvent fraction from dried <i>Achyranthis radix</i> .....	20
Table 10. Experimental design of antioxidant .....	26
Table 11. Composition of experimental diets containing high cholesterol with AREE for hyperlipidemia .....	33
Table 12. Experimental design of hyperlipidemia .....	34
Table 13. Composition of experimental groups for pulmonary embolism ...	41
Table 14. Composition of experimental groups for endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation. ....	41
Table 15. Proximate compositions of <i>Achyranthis radix</i> .....	46
Table 16. Contents of free sugars in <i>Achyranthis radix</i> .....	47
Table 17. Contents of total amino acids in <i>Achyranthis radix</i> .....	48
Table 18. Composition of fatty acids of <i>Achyranthis radix</i> .....	49

Table 19. Contents of vitamin A and E in <i>Achyranthis radix</i> .....	50
Table 20. Contents of organic acids in <i>Achyranthis radix</i> .....	50
Table 21. Contents of cations in <i>Achyranthis radix</i> .....	51
Table 22. Contents of anions in <i>Achyranthis radix</i> .....	51
Table 23. Contents of minerals in <i>Achyranthis radix</i> .....	52
Table 24. Scavenging effects of AREE fractions on DPPH radical .....	56
Table 25. Antioxidative activities of AREE fractions on soybean oil .....	56
Table 26. Correalation coefficients between blood measurements and LPL activities in fed high-cholesterol diet of rats .....	123
Table 27. Fibrinolytic activities of urokinase and different dose of AREE, as assessed by size of clear zones on fibrin plates .....	124
Table 28. Effect of AREE on plasma recalcification effect <i>in vitro</i> .....	126
Table 29. Effect of AREE on pulmonary embolism model by collagen and epinephrine in mice .....	127
Table 30. Effect of AREE on fibrinogen in endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation rats .....	129
Table 31. Effect of AREE on PT in endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation rats. ....	129
Table 32. Effect of AREE on APTT in endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation rats .....	131
Table 33. Effect of AREE on bleeding time prolongation in endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation rats .....	132
Table 34. Effect of AREE on bleeding time effects O.D. value at 540 nm by bleeding time prolongation effects in endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation rats .....	133
Table 35. Effect of AREE on plasma recalcification effects in endotoxin-induced	

	disseminated intravascular coagulation rats .....	134
Table 36.	Effect of AREE on whole bleeding time effects in endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation rats .....	135
Table 37.	Effect of AREE on hematocrit value in endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation rats .....	136

## *LIST OF FIGURES*

Fig. 1. Procedure for extraction and fractionation of <i>Achyranthis radix</i> by various solvents .....	21
Fig. 2. Nitrite scavenging activity of AREE fractions under different area in pH 1.2, 4.2 and 6.0 conditions .....	55
Fig. 3. TBA value in linoleic acid substrate containing of AREE fractions on during storage at 40°C .....	57
Fig. 4. Autoxidation rate of linoleic acid on added fractions of AREE during incubation at 50°C for 10 days .....	59
Fig. 5. Growth rate in alcohol and/or AREE administered rats .....	61
Fig. 6. FER in alcohol and/or AREE administered rats .....	62
Fig. 7. Activity of ALT in the serum of rats administered alcohol and/or AREE .....	64
Fig. 8. Activity of AST in the serum of rats administered alcohol and/or AREE .....	65
Fig. 9. Activity of ALP in the serum of rats administered alcohol and/or AREE .....	66
Fig. 10. Activity of XO in the liver of rats administered alcohol and/or AREE .....	68
Fig. 11. Activity of SOD in the liver of rats administered alcohol and/or AREE .....	71
Fig. 12. Activity of catalase in the liver of rats administered alcohol and/or AREE .....	72
Fig. 13. Activity of GSH-Px in the liver of rats administered alcohol and/or	

AREE .....	73
Fig. 14. Content of TBARS in the liver of rats administered alcohol and/or AREE .....	75
Fig. 15. Content of GSH in the liver of rats administered alcohol and/or AREE .....	77
Fig. 16. Inhibitory activity on human low density lipoprotein(LDL) oxidation of AREE fractions on LDL oxidation .....	79
Fig. 17. Change of growth rate of the rats fed high cholesterol diet with AREE .....	81
Fig. 18. FER of the rats fed high cholesterol diet with AREE .....	82
Fig. 19. Effect of AREE diets on liver weight of rats fed high cholesterol diet .....	83
Fig. 20. Effect of AREE diets on epididymal and mesenteric adipose tissue weights of rats fed high cholesterol diet .....	84
Fig. 21. Activity of ALT in the serum of rats fed high cholesterol diet with AREE .....	86
Fig. 22. Activity of AST in the serum of rats fed high cholesterol diet with AREE .....	87
Fig. 23. Activity of ALP in the serum of rats fed high cholesterol diet with AREE .....	88
Fig. 24. Content of triglyceride in the rats fed high cholesterol diet with AREE .....	90
Fig. 25. Content of total cholesterol in the rats fed high cholesterol diet with AREE .....	91
Fig. 26. Content of phospholipid in the rats fed high cholesterol diet with AREE .....	92



Fig. 27. Content of free cholesterol in the rats fed high cholesterol diet with AREE .....	94
Fig. 28. Content of cholesteryl ester in the rats fed high cholesterol diet with AREE .....	95
Fig. 29. Ratio of cholesteryl ester in the rats fed high cholesterol diet with AREE .....	96
Fig. 30. Content of LDL-cholesterol in the rats fed high cholesterol diet with AREE .....	99
Fig. 31. Content of HDL-cholesterol in the rats fed high cholesterol diet with AREE .....	100
Fig. 32. Ratio of CRF in the rats fed high cholesterol diet with AREE .....	101
Fig. 33. AI of rats fed high cholesterol diet with AREE .....	102
Fig. 34. Content of total lipid in the liver of rats fed high cholesterol diet with AREE .....	104
Fig. 35. Content of triglyceride in the liver of rats fed high cholesterol diet with AREE .....	105
Fig. 36. Content of total cholesterol in the liver of rats fed high cholesterol diet with AREE .....	106
Fig. 37. Content of total lipid in the epididymal adipose tissue of rats fed high cholesterol diet with AREE .....	108
Fig. 38. Content of triglyceride in the epididymal adipose tissue of rats fed high cholesterol diet with AREE .....	109
Fig. 39. Content of total cholesterol in the epididymal adipose tissue of rats fed high cholesterol diet with AREE .....	110
Fig. 40. Content of total lipid in the mesenteric adipose tissue of rats fed high cholesterol diet with AREE .....	111

Fig. 41. Content of triglyceride in the mesenteric adipose tissue of rats fed high cholesterol diet with AREE .....	112
Fig. 42. Content of total cholesterol in the mesenteric adipose tissue of rats fed high cholesterol diet with AREE .....	113
Fig. 43. Effect of AREE on HR-LPL activity in epididymal adipose tissue of rats fed high-cholesterol diet .....	116
Fig. 44. Effect of AREE on HR-LPL activity in mesenteric adipose tissue of rats fed high-cholesterol diet .....	117
Fig. 45. Effect of AREE on TE-LPL activity in epididymal adipose tissue of rats fed high-cholesterol diet .....	118
Fig. 45. Effect of AREE on TE-LPL activity in mesenteric adipose tissue of rats fed high-cholesterol diet .....	119
Fig. 46. Effect of AREE on LPL mRNA levels in epididymal adipose tissue .....	121
Fig. 47. Effect of AREE on LPL mRNA levels in mesenteric adipose tissue .....	122
Fig. 48. Fibrinolytic activities of urokinase and different doses of AREE, as assessed by size of clear zones on fibrin plates .....	125

# *ABSTRACT*

## *A study on the Biological Activities of Achyranthis Radix Ethanol Extract*

Choi, Hyun-Suk

Advisor : Prof. Lee, Myung-Yul, Ph. D.

Department of Food and Nutrition,

Graduate School of Chosun University

The dried root of *Achyranthes japonica* Leveille et Vaniot (*Amaranthaceae*) is one of the source plants of Achyranthis root. The crude drug is an oriental medicine used for diuretics, tonics and as a remedy for blood stasis such arthralgia. Plant of the genus AREE known to contain phytoecdysones, and rich in oleanolic acid glycosides. This study was performed to investigate the effects of ethanol extract of Achyranthis radix (AREE) on antioxidant capacity, lipid metabolism and antithrombogenic capacity

*The results obtained were as follows :*

### *Experiment 1:*

#### *- Biochemical components of Achyranthis root*

The biochemical components of Achyranthis root were measured. The

crude protein(18.27%), crude fat(2.99%), moisture(16.26%) and carbohydrate (48.48%) were found. Fructose was major in free sugars, lysine in amino acids, linoleic acid in fatty acids, oxalic acid in organic acids, calcium in minerals, potassium ion in cations and chloride ion in anions, respectively.

### ***Experiment 2 :***

#### ***- Antioxidant effect of AREE in vitro and in vivo***

1. AREE was fractionated by the following solvents : n-hexane, chloroform, ethylacetate and n-butanol. *In vitro*, antioxidant index of the n-butanol fraction was the highest among fractions of electron donating activity, Rancimat test and activity of nitrite scavenging were the highest at pH 1.2 and the peroxide value for linoleic acid was increased during the storage.
2. The scavenging effects of oxygen free radicals generated in the ethanol-induced hepatotoxicity in the liver of rats were investigated. Sprague-Dawley weighing 100~150g were divided into 6 groups: normal group(NOR), ethanol (35%) treated group(CON), AREE 200 mg/kg treated group(AR-1), AREE 400 mg/kg treated group(AR-2), AREE 200 mg/kg and alcohol treated group(AR-C1), and AREE 400 mg/kg and alcohol treated group(AR-C2).
  - ① The growth rate of the rat was decreased by ethanol administration, however, was gradually increased to a little lower level than the normal group by administering AREE.
  - ② It was also observed that the activities of xanthin oxidase(XO), superoxide dismutase(SOD), catalase and glutathion peroxidase(GSH-Px)

in liver that were increased by ethanol were markedly decreased in the AREE administered groups as compared with the CON group. The glutathione(GSH) content in liver was decreased by ethanol administration, however, increased after administering AREE. In addition, the value of thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) significantly increased in CON group, on the other hand, the administration of AREE reduced TBARS value in liver.

### ***Experiment 3 :***

#### ***- Effect of AREE on lipid metabolism in vitro and in vivo***

1. Antioxidative activity of AREE against oxidation of LDL was investigated. Oxidation products of LDL were determined by measuring TBARS value. As revealed through TBARS values, n-butanol fraction showed strongest among fractions and decreased LDL oxidation induced by copper ion by 70.6% in comparison with no addition group.
2. AREE(200 mg/kg and 400 mg/kg b.w., p.o.) was administered to rats along with fed high cholesterol diet for 6 weeks and evaluated on lipid metabolism in serum, liver and adipose tissue. We divided into 6 groups: normal group(NOR), high cholesterol diet treated group(CON), AREE 200 mg/kg treated group(AR-1), AREE 400 mg/kg treated group(AR-2), AREE 200 mg/kg and high cholesterol diet treated group(AR-C1), and AREE 400 mg/kg and high cholesterol diet treated group(AR-C2).
  - ① The growth rate of the hyperlipidemic group(CON group) was higher than the normal group, whereas the groups administered AREE were decreased. The feed efficiency ratio(FER) and liver weight in CON group were significantly higher than that of NOR group, but that of

CON group with AREE administration was lower than CON group.

- ② There was a significant increase in the activities of serum alanine aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase(AST) and alkaline phosphatase(ALP) in the CON group. On the other hand, the administration of AREE decreased ALT, AST and ALP activities in serum.
- ③ The CON group was increased serum triglyceride, total cholesterol, free cholesterol and LDL-cholesterol levels, and decreased HDL-cholesterol and phospholipid levels as compared with NOR group. AREE administrated groups were increased HDL-cholesterol and phospholipid levels, and decreased serum triglyceride, total cholesterol, free cholesterol, ratio of cholesteryl ester and LDL-cholesterol levels as compared with CON group. AREE increased HDL-C/T-C ratio and lowered atherogenic index. The hepatic and adipose tissue contents of total lipid, total cholesterol and triglyceride were also lowered in AREE administrated groups than CON group.
- ④ The activities of HR-LPL and TE-LPL in mesenteric and epididymal adipose tissues were increased in CON group as compared with NOR and administrated AREE groups. CON group also showed higher LPL mRNA abundance in both mesenteric and epididymal adipose tissues than NOR and administrated AREE groups.
- ⑤ The LPL activity in adipose tissue was positive correlated with the triglyceride concentration in serum, but negative correlated with HDL-cholesterol concentration in serum.

#### ***Experiment 4 :***

##### ***- Antithrombogenic effects of AREE in vitro and in vivo***

1. AREE was found to have fibrinolytic activity *in vitro*.
2. The antithrombogenic effects of AREE on pulmonary embolism by collagen and epinephrine in mice and coagulation parameters in endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation rats *in vivo* were also investigated.
  - ① AREE administered groups prevented death due to the formation of pulmonary embolism by collagen and epinephrine in mice.
  - ② The prothrombin time, activated partial thromboplastin time and blood clotting time in rats were significantly shortened in AREE administered groups as compared with CON group. AREE administered groups increased fibrinogen level and hematocrit value as compared with CON group in thrombus model induced by endotoxin.

In conclusion, these results suggest that AREE has a possible positive effect on the liver function in hepatotoxicity-induced rats. In addition, AREE is believed to be a possible protective or curative effects for fatty liver and hyperlipidemia-induced by a high cholesterol diet and is also suppressive activity for a blood coagulation system.

## 제1장 서론

우슬(*Achyranthis Radix*)은 비름과(*Amaranthaceae*)에 속하는 다년생 식물로 쇠무릅(*Achyranthes japonica* Leveille et Vaniot)의 뿌리를 지칭하는 생약이다. 우리나라 각지의 들판이나 길가에서 자생되고 있으며 일본과 중국에도 분포하고 있다. 키는 60~150 cm 정도 자라고 줄기는 녹자색으로 모난 4각형을 이루며 그 마디 부위가 특별히 굵고 소의 무릎 같은 형태를 이루고 있다. 또한 꽃은 양성화로 8월 중순경에 가지 끝에 조 이삭 모양으로 피고 종자는 광택이 있는 다갈색의 포과로 타원형이며 꽃받침에 둘러싸여 있다(1).

예로부터 한약제로 진통, 혈압강하(2), 류머티스 및 관절통의 율혈제거, 이뇨 및 간장해 등 민간요법으로 널리 쓰여져 왔으며(3), 어린순은 나물로 먹기도 하였다. 현재 약용식물과 식용식물의 연구는 이들 성분 중 널리 존재하는 페놀성 화합물인 phenolic hydroxyl(OH)기가 단백질 및 기타 고분자들과 쉽게 결합하여, 항산화, 항암 등의 다양한 생리활성을 나타낸다는 결과들이 주목을 이루고 있다. 쇠무릅에 관한 연구로는 이 등(4)이 울릉도산 쇠무릅의 잎과 씨에서 polyphenol과 flavonoids 함량을 조사하여 *in vitro*에서 항산화 효과를 확인하였으며, 그 외 우슬의 성분으로 oleanolic계 및 glycoside계 saponin(5,6)과 caffeic acid, polysaccharides, rubrosterone, K-succinate, K-oxalate,  $\gamma$ -aminobutyric acid, betain hydrate 및 해충 방제에 이용될 수 있는 곤충의 탈피를 촉진하는 호르몬인 nokosterone, ecdysterone, ponasterosied A 등이 보고되었다(7,8). Polyphenolic compound인 caffeic acid는 혈청 중 콜레스테롤 함량을 낮추고 심장병과 발암의 위험도를 감소시키며(9), triterpenoid 화합물인 oleanolic acid는 생물학적 활성 때문에 치료제로 항진균(10), 항염증(11), anti-HIV(12), 이뇨제(13), 혈당저하(14), 항암효과(15) 및 화학적 간손상에 대한 보호효과(16) 등 효능이 보고되었다.



또한 사포닌은 당부(glycone)와 비당부(aglycone)로 구성된 배당체로서 식물계에 널리 분포하고 있고(17), 분자내 친수성과 소수성 부분을 포함하고 있어 강한 계면활성 작용을 일으키며 기포성과 유화성도 강하다. 이 물질은 시험관 내에서는 적혈구에 대한 용혈작용을 일으키지만 경구적으로 투여했을 때는 소화 과정에서 당이 분리되어 용혈성을 잃거나 그대로 배설되기 때문에 실제로 제품을 식용할 경우 별 문제가 없다(18). 최근에는 식물체 내 존재하는 사포닌이 인체내에서 항지혈 작용(19), 항산화 작용(20), 항고콜레스테롤혈증 작용으로 세포 내에서 끊임없이 생성되는 과산화지질의 형성을 억제함으로써 동맥경화증(21)을 비롯한 노화 현상과 노인 치매 예방(22)에도 도움을 주는 것으로 알려졌다.

우슬의 생리 활성에 관한 연구로 *in vitro*에서는 우슬 추출물이 cytochrome P450 약물대사 효소에 대한 억제작용(23), 우슬의 면역 조절작용(24), 항돌연변이(25), 급성 아급성 염증에 대한 항염증효과가 알려져 있으며(26), 치아 및 치주질환에 미치는 영향(27), human cancer colon cell에서의 cisplantin에 의한 세포독성을 증가시켜 항암효과(28), 노인성 치매 등의 발병에 존재하는 cathepsin B에 대한 저해 효과(29)와 *in vivo* 연구에서는 CCl<sub>4</sub>로 유발된 흰쥐의 간세포 보호효과(30), 류머티스 관절염(31)에 관한 연구가 보고되었다. 또한 약리 활성물질과 관련된 연구가 활발하게 진행되어 강한 알레르기 및 항종양 활성이 증명되었으며, *Achyranthoside A* methyl ester는 HCT-116 및 B16-F10에 대해 강한 세포독성 활성(32)을 나타내는 것으로 보고 하였다. 이와 같이 우슬에는 다양한 생리 활성 물질들이 함유되어 있는 것으로 알려져 있으나, 이들 각각의 활성물질들이 인체 내 효능에 대한 연구뿐만 아니라 복용 시 발생할 수 있는 약물상호작용의 가능성에 대한 연구는 아직까지 미흡한 실정이다. 이에 본 연구는 이러한 여러 문헌을 토대로 우슬의 항산화 효과, 고지혈증 예방효과 및 항혈전 효과로 나누어 우슬 에탄올 추출물의 생리활성 효능을 *in vitro*와 *in vivo*를 통해 검토하였다.

최근 경제 성장에 따른 식생활의 변화로 각종 만성퇴행성 질환의 발병과 사망률이 증가하는 추세이다(33). 또한 흡연, 과음 및 스트레스와 같은 간접적 인

자들의 억제 또는 예방 및 치료를 위한 건강기능성식품에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다(34). 그 중 생체 내의 정상적인 대사 과정 및 극심한 운동, 노화, 중금속 오염 등의 요인에 의해 생성될 수 있는 자유기 및 활성산소종 들은 DNA, 단백질 그리고 지질에 산화적 손상을 일으키는데, 이것은 암, 노화 및 심혈관계질환 등과 밀접한 연관이 있다(35).

모든 생물체들은 생체 내에 에너지 생산을 위한 산소이용과정에서 활성산소가 생성된다. 이들 활성산소는 생체 내 superoxide dismutase(SOD), catalase, xanthin oxidase(XO), glutathione peroxidase (GSH-Px) 등의 저분자로서 항산화제 혹은 free radical scavenger 역할을 하는 것으로 vitamin E,  $\beta$ -carotene, vitamin C 및 glutathione 등과 같은 물질에 의한 기작에 의해 대부분이 소멸되지만 과량의 활성산소나 지속적인 활성산소 생성으로 항산화 방어계의 균형이 깨지게 되면 각종 질환을 일으키게 된다. 유해산소로 알려져 있는 활성산소는 가장 안정한 형태인  $^3\text{O}_2$ 가 환원되면서 superoxide radical( $\cdot\text{O}_2$ ), 과산화수소( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), hydroxy radical( $\cdot\text{OH}$ ), 지질 peroxide(ROOH)이나 여기에서 생기는 free radical( $\text{ROO}\cdot$ ,  $\text{RO}\cdot$ ) 등의 과산화지질로서 이러한 활성산소의 과산화지질이 정상적으로 소거되지 않았을 때 free radical로 인한 산화적 스트레스가 생체 내에서 생기게 된다. 이러한 산화적 스트레스는 생체막의 필수 구성성분인 불포화지방산의 탄소사슬을 공격하여 microsome, mitochondria, ribosome의 막을 손상시키고, 이로 인해 과산화물이 생성된다(36,37). 신체는 이러한 산화적 스트레스로부터 세포막과 세포내 물질을 보호하기 위한 항산화 기전이 존재하는데 그 중 하나는 항산화 효소에 의한 효소적 방법이고 나머지는 생체 내 여러 가지 항산화 물질과 식이를 통하여 공급되는 항산화 비타민이나 polyphenol류와 같은 항산화제에 의한 비효소적 방법이다. 그러나 신체가 항산화 방어체계를 구축하여 스스로를 보호하지만 항산화 체계가 약화되거나 산화적 스트레스가 가해질 때 증가되는 활성산소종에 대항하기는 역부족 상태에 놓이게 된다. 따라서 항산화 성분의 섭취나 항산화 효소 활성 증가 등으로 체내 항산화 효능을 증진시키는

것은 누적되는 산화적 손상에 대항하기 위해서 매우 중요한것으로 보고되고 있으며, 더불어 항산화 물질을 함유한 천연 자원에 대한 관심도 증가되고 있다(38-48).

일반적으로 화학물질 및 xenobiotics로 인한 질병과 노화는 세포 내에서 이들 물질의 중간 대사산물과 이들 물질의 trigger 현상으로 생성된 free radical에 의해 야기됨은 주지의 사실이다(49). 인간이 섭취하는 알코올 역시 다른 식품과는 달리 조직 내에 저장되지 못하는 xenobiotics이며, 체내에서 알코올의 중간 대사물에 의하여 세포상해가 초래된다고 보고되어있다(50). 간에서 알코올의 대사는 alcohol dehydrogenase(ADH)와 aldehyd dehydrogenase(ALDH)의 활성화에 영향을 주는 요인들에 의해 조절되며(51), 이 외에도 microsome의 ethanol 산화계와 peroxisome의 catalase에 의해서도 대사되고 있다. 급성이나 소량으로 섭취할 경우에 ADH나 cytochrome P-450 효소계에 의해 대사되어 acetaldehyde를 생성하고, 만성적 혹은 과량으로 섭취하게 되면 microsomal ethanol oxidizing system(MEOS)에 의해 acetaldehyde의 생성량이 증가되어 간세포에 장애를 초래할 뿐만 아니라 다른 중요한 기관인 위장관, 췌장, 뇌신경, 내분비 기관, 조혈 기관 및 면역계에도 치명적인 영향을 미칠 수 있다(52). 또한 이 효소들에 의해  $NAD^+$ (nicotinamide adenine dinucleotide)의 소모가 증가되고 이에 수반하여 NADH(nicotiamide adenine dinucleotide phosphate)의 과잉 생성을 초래하여 지방산의  $\beta$ -oxidation 감소와 2-glycerol phosphate 함량 증가로 중성지방이 축적되고, NADH oxidase 활성화 증가로 인해 과산화수소의 생성량이 증가하여 지질과산화 반응이 촉진된다(53-57). 특히 알코올의 최소 대사산물인 acetaldehyde는 강력한 독성물질로서 알코올에 비해 반응성이 매우 높고 독성이 강한 알코올성 간장해의 주 원인 물질로, 생체 내 활성 아민류들과 축합 반응을 거쳐 tetrahydroisoquinone을 생성하게 되는데 이 물질은 알코올 만성중독을 초래하게 된다(58,59). 또한 acetaldehyde는 XO에 의해 분해되는데 XO는 산소를 전자수용체로 이용하여 부산물로 유리산소를 생성한다. 그러므로 알코올

에 의한 간손상은 알코올이 대사되는 과정에서 생성된 유리산소에 의해 지질과 산화가 촉진되어 간조직의 손상을 유도하거나, acetaldehyde의 축적으로 미토콘드리아의 호흡에 지장을 주어 기능을 저하시킴으로써 유발된다(60).

따라서 본 연구에서는 *in vitro*에서 우슬 에탄올 추출물 분획분에 대한 DPPH radical 소거능, Rancimat test, 아질산염 소거작용, 지질과산화 억제효과, linoleic acid에 대한 항산화 효과 등 다양한 항산화 활성 검토와 *in vivo*에서 6주간 에탄올에 의해 유발된 간독성에 우슬 에탄올 추출물을 경구 투여 후 항산화 효소인 catalase, GSH-Px, SOD와 glutathione 함량 및 간조직의 TBARS를 측정하여 간보호와 관련된 우슬의 기능성을 평가하였다.

생활수준의 향상에 의해 지방질의 과다 섭취는 심장 및 혈관계 질환의 급격한 증가를 가져오게 되었고(61), 삶의 질에 대한 관심이 집중되는 요즘 이들 질환과 관계있는 혈 중 지질 수준과 혈소판 응집과 같은 직접 인자와 예방 및 치료를 위한 건강기능성식품에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다(62,63). 심혈관계 질환의 발생 원인으로는 유전, 흡연, 고혈압, 혈 중 콜레스테롤, 비만 그리고 당뇨병 등 환경적 영향과 동맥의 내벽에 죽종이라는 지질과 결합조직, 평활근 세포의 증식, 혈관내벽 손상, 혈관손상부위에서 혈소판 점착과 응집, 혈관내벽에 지질과 지단백질 축적, 혈전형성, 세포외의 collagen과 glycosaminoglycan의 축적, 혈관내벽에 지질과 지단백질 축적 등의 원인 등으로 인한 동맥경화증의 합병증으로 생긴다(64). 특히 고지혈증의 원인으로는 축적된 저밀도 지단백질(low density lipoprotein, LDL) 내의 콜레스테롤이 적절히 제거되지 않는 죽상경화증으로 발전하게 되는 것과 중성지방 증가, 지단백질 증가, 고밀도 지단백질(high density lipoprotein, HDL)-콜레스테롤 감소 등을 들 수 있으며, 이중 LDL-콜레스테롤의 증가는 동맥경화와 심근경색 발생의 주요 위험인자일지도 모른다는 가정 하에 많은 연구들이 시도되고 있다(65).

체내 콜레스테롤은 주로 LDL-콜레스테롤에 의해 운반되고 있으며, 운반된 LDL-콜레스테롤은 주로 LDL receptor pathway에 의해 체내로 유입된다고 알

려져 있다(66). 이외에도 동맥벽에 존재하는 대식세포를 통한 scavenger pathway에 의해서도 LDL-콜레스테롤이 유입되는데 이 경로는 LDL receptor pathway와는 독립적으로 작용하며, 세포 내의 콜레스테롤 함량이 증가함에도 불구하고 계속적으로 에스테르화된 콜레스테롤을 세포 내로 끌어들이고, 화학적으로 변이된 LDL을 인식하므로 결과적으로 변이된 LDL이 동맥벽 세포내에 과잉으로 축적되게 된다(67,68). 또한 LDL은 내피 세포의 lipoxigenase에 의해 식품을 통하여 들어온 과산화지질에 의하여 산화 LDL로 산화되는 것으로 밝혀졌다(69). 이렇게 산화적 스트레스에 의해 생성된 산화 LDL은 세포 독성이 있는 지질과산화물을 가지고 있으며 세포조직에 확산되어 독성을 나타내고 내피 세포에 염증을 일으켜 동맥경화를 유발한다(70). 즉 산화 LDL은 단핵세포와 macrophage에 의하여 동맥혈관에 쉽게 이행되며 혈관 내에서 콜레스테롤 및 콜레스테릴 에스테르로 축적되어 거품세포(foam cells)를 형성하게 되는 것이다(71,72). 결국 동맥경화의 원인을 예방하기 위해서는 항산화제에 의해 LDL의 산화를 방지해야 하며, 이와 같이 동맥경화를 일으키는 산화 LDL의 생성을 억제하는 물질이 동맥경화를 예방하는 물질이라고 할 수 있다. 생체 내에서는 항산화 효소와 함께 vitamin E, vitamin C, glutathione, ubiquinol, 요산 등과 같은 항산화 영양소 및 항산화 물질이 존재하여 생체를 보호하고 있다(73-75).

또한 혈장 콜레스테롤 함량을 정상으로 유지하는 것은 매우 중요한 일로 이것이 심혈관계질환의 발생위험인자를 감소시키는 주요한 임상학적 지표가 되고 있다. 이와 같이 동맥경화와 이와 관련된 심혈관계질환에 대한 콜레스테롤의 역기능에 관심이 고조되면서(76,77) 콜레스테롤의 함량을 저하시키기 위한 식이요법, 약물요법, 생활요법 등 많은 방법이 개발되고 실용화되어 왔으나 효능과 부작용의 문제가 해결되지 않아 새로운 혈청 콜레스테롤 함량저하 약제 개발의 중요성이 계속 대두되고 있는 실정이다. 인체에 필요한 콜레스테롤은 음식을 통하여 섭취, 흡수되는 외인성과 간장을 비롯한 신체에서 합성되는 내인성 콜레스테롤이 있으며 이중 필요량의 대부분은 체내에서 생합성을 통하여 충당하

고 있고, 이는 섭취되는 콜레스테롤 양이나 열량에 따라 다르며 feedback mechanism에 의해 조절됨으로서 체내 콜레스테롤량은 일정하게 유지된다(78).

동맥경화를 예방하기 위한 바람직한 혈중 지질 수준으로 총콜레스테롤과 중성지방은 200 mg/dL 미만, LDL-콜레스테롤은 130 mg/dL 미만, 그리고 HDL-콜레스테롤은 35 mg/dL 이상을 권장하고 있다. LDL의 경우 그 함량뿐 아니라 크기도 매우 중요하고 입자가 작은 것이 큰 것보다 손상된 혈관에 더 빨리 침착 된다고 보고된다. 또한 동맥경화에 대한 방어효과를 지닌 HDL-콜레스테롤은 간으로 운반하면 간에서 콜레스테롤을 체외로 내보내게 되므로 혈청 콜레스테롤 함량보다 총콜레스테롤에 대한 HDL-콜레스테롤 함량의 비율이나 HDL-콜레스테롤에 대한 LDL-콜레스테롤 함량비가 동맥경화의 발병을 예견할 수 있는 좋은 지표가 된다. 동맥경화와 관련된 연구는 주로 혈액 내 콜레스테롤에 관한 것으로 혈액 내 총콜레스테롤, 중성지방, 인지질 및 총지질 함량에 관한 연구가 주로 이루어져 왔으나, 최근에는 혈액 내 지질함량에 관한 연구보다는 HDL-콜레스테롤이나 LDL-콜레스테롤 같은 지단백질에 관한 연구가 활발해지고 있다.

동맥경화 발병에 lipoprotein lipase(LPL)가 영향을 미치는 것으로 나타나, 최근 토끼와 사람의 동맥 내 동맥경화 병변 부위에서 LPL 활성이 증가됨이 보고되었고, 선천적으로 LPL의 활성이 저하되었거나 결손 시에는 고지단백혈증을 유발하는 것으로 알려졌다(79). LPL은 혈관내피세포에 존재하면서 chylomicron이나 초저밀도 지단백질(very low-density lipoprotein, VLDL)과 같은 중성지방을 대부분 함유한 지단백질의 중성지방을 가수분해하여 monoglyceride와 유리지방산(free fatty acid)을 형성하여, 유리지방산은 지방조직으로 흡수되어 지방 합성을 위해 사용되거나, 심장이나 근육 등으로 흡수되어 에너지원으로 이용되고, 이로 인해 지방조직의 경우 LPL이 지방 축적의 중요 인자로 알려져 있다(81). 혈액 내 순환하고 있는 LDL은 VLDL이 LPL에 의해 가수분해되어진 후 생성

된 최종산물로, 지단백질이 LPL에 의해 가수분해되는 동안 중성지방이 풍부한 지단백질내의 지질이나 apoprotein들이 HDL<sub>3</sub>로 전이되어 동맥경화에 예방효과가 더 크다고 알려진 밀도가 낮은 HDL<sub>2</sub>를 생성하며, 또한 최근에는 고중성지방혈증이 관상동맥질환을 포함한 동맥경화증의 위험인자로 주목받고 있어(82) 이러한 일련의 과정으로 LPL은 지단백질 대사에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 본 연구는 *in vitro*에서 사람의 혈청에서 LDL을 분리 후 우슬 에탄올 추출물의 계통별 분획들이 LDL 산화에 미치는 영향을 조사하였으며, *in vivo*에서는 고콜레스테롤혈증을 유발한 흰쥐에게 우슬 에탄올 추출물을 흰쥐의 체중 당 200 mg/kg과 400 mg/kg 경구 투여하면서 혈청 및 간의 지질 대사 개선효과와 더불어 지방 조직의 LPL활성과 LPL mRNA 유전자발현에 미치는 영향을 구명하였다.

관상동맥질환과 관계가 깊은 혈전은 생체의 손상된 혈관 주변에서 혈액을 응고시켜 과도한 출혈을 방지하고 상처의 복구를 하는 것으로 생체 내 혈액은 응고와 용해작용이 항상 평형을 이루고 있으며 정상적으로 순환하고 있는 동안에는 혈전이 생성되지 않는다. 그러나 여러 가지 원인으로 균형이 깨져 혈전이 형성되면 혈관을 막게 되고 혈액 순환이 방해되어 조직으로의 영양분 및 산소 공급이 중단되게 된다. 혈소판 응집 작용은 상처에 대한 방어기작으로 작용하지만 이처럼 비정상적인 혈소판 응집은 혈관 내 혈전형성을 야기하여 심근경색, 심장발작, 동맥경화 등의 큰 원인이 된다. 이처럼 혈류 중의 fibrinogen이 활성화된 thrombin에 의해서 fibrin으로 전환되어 불용성의 중합체를 형성함으로써 생성되는 혈전이 혈관을 막아 일어나는 병을 통틀어 혈전증이라 한다(83).

특히 생체 내 지질대사와 깊은 관련이 있는 동맥경화증은 심장 및 순환계질환의 대표적인 경우로 혈청 내 지질함량의 증가뿐 아니라 혈관의 기능이 약화되고 유연성도 감소하여 약한 자극에도 쉽게 파열(rupture)될 수 있으며, 평소의 혈소판은 부착성이 없으나 혈관벽이 손상되면 혈관 내벽의 collagen이 fibrin과 혈소판 저장립으로부터 유래된 adenosine diphosphate(ADP), 응집작용

에 의해 생성되는 thrombin 등에 의해 혈액 중의 혈소판이 점착, 활성화, 응집되고 혈액 응고계를 활성화하여 급속한 혈전을 형성하게 된다. 따라서 이들을 예방하기 위해서는 혈중 콜레스테롤 저하, 혈소판 활성화 및 혈액응고 활성의 억제, 혈관 평활근세포의 증식억제성이 요구되고 있다. 따라서 혈관계질환의 높은 발생률과 사망률 때문에 의학적으로 많은 관심과 연구가 진행되고 있으며(84), 혈전성질환의 예방과 치료로 혈전용해제(streptokinase, urokinase, aminocaproic 등), 항혈소판제(aspirin, dipyridamole, ticlopidine 등) 항응고제(heparin, wafarin, dicumarol 등) 등이 보편적으로 쓰이고 있으나, heparin의 경우 출혈이 나타나 용량의 조절과 환자의 국한된 선정이 문제시되고 있다. Urokinase는 혈전이 생성된 부위에만 특이적으로 작용하는 것이 아니므로 전체적인 항상성(hemostasis)에 영향을 줄 수 있어, 소아 혹은 치유 도중인 상처, 외상이나 악성 종양을 가진 환자에게 사용을 금기하는 등의 강한 활성화와 고가의 가격으로 문제가 되고 있다.

최근 이들 질환이 식생활과 연관성이 높다는 가정하에 일상적으로 섭취하고 있는 식품의 항혈전성을 밝히는 많은 연구들이 수행되고 있다(85-87). 본 연구에는 고콜레스테롤식이와 우슬을 용량별로 투여하여 혈청과 간장 중의 지방 함량을 측정된 것을 기초로 하여 우슬 투여 용량을 결정하였고, 실험적 혈전증 유발로 항혈전색전증형성을 유발하는 collagen에 의한 모형과, 파종성혈관내응고증(disseminated intravascular coagulation ; DIC)을 유발하는 병태 모형으로 가장 널리 응용되고 있는 endotoxin 유발 혈전증 모형을 사용하였다(88). Collagen에 의한 인체 혈전형성 기전은 혈관이 손상을 입어 혈관벽의 내피세포가 파괴되고, 노출된 collagen에 혈소판이 부착되어 응집을 일으키며, 또한 부착된 혈소판은 파괴되면서 ADP를 유리시키고, 이 유리된 ADP는 serotonin,  $Ca^{2+}$  및  $K^+$ 와 함께 혈소판 응고 요소가 되는데, 혈액응고과정에서 ADP는 다른 혈소판을 잡아끌어 혈소판 덩어리를 구축하여 지혈마개를 형성하는 역할을 한다. 또한 epinephrine은 혈소판 응집단계에서 혈소판막에 있는  $\alpha$ - 및  $\beta$ -epinephrine type



의 receptor에 작용하여 혈소판 응집을 일으킨다(89). Endotoxin의 경우 gram 음성 세균에서 생성되는 내독소로서 세균의 사멸에 의해 유리되고 주성분은 protein-lipopolysaccharide(LPS)의 복합체로 LPS가 체내로 주입되면 혈장에서 LPS 결합단백질과 함께 백혈구나 내피세포의 CD14 receptor에 부착되어 세포 손상을 초래하며, 이들 세포로 하여금 혈액응고계에 직접 영향을 미쳐 platelet activity factor를 활성화시켜 혈액응고와 prostaglandin, leukotriene 등의 cytokine을 유리시키거나, complement 등의 혈장 단백질을 활성화시키게 되는데 이러한 인자들은 심근 억제, 응고계의 활성화, 혈관확장, 여러 기관의 기능부전 등을 초래하게 된다. 여기에서 LPS에 의해 응고계가 광범위하게 활성화되는 것은 LPS가 내피세포와 혈장 단백구를 자극하여 tissue factor를 유리시킴으로써 외인계를 활성화시키는 것이 주된 기전으로 알려져 있다(90).

따라서 본 연구에서는 흰쥐에서 항혈전 효과를 관찰하고자 *in vitro*에서 fibrin 용해능에 미치는 효과와 혈장응고시간을 측정 한 뒤 *in vivo*에서 collagen 과 epinephrine을 투여하여 혈전 유발에 대한 우슬 에탄올 추출물의 효과와 endotoxin에 의한 prothrombin time(PT), activated partial thromboplastin(APTT), blood clotting time, fibrinogen량 및 hematocrit치를 측정하였으며 이를 통하여 항혈전제로의 개발 가능성을 검토하고자 하였다.

## 제2장 재료 및 방법

### 제1절 실험재료

실험에 사용한 우슬은 2004년 한약재료상에서 건조된 국산을 구입하였다.

### 제2절 성분분석

#### 1. 일반성분

A.O.A.C.(Association of Official Analytical Chemists)방법(91)에 준하여, 수분은 105℃ 상압가열건조법, 조단백질은 micro-kjeldahl법, 조지방은 soxhlet 추출법 및 조회분은 회화법으로 분석하였고, 탄수화물은 100에서 수분, 조단백질, 조지방 및 조회분량을 감하였으며 측정치는 3회 반복하여 측정된 수치의 평균값으로 하였다.

#### 2. 유리당

시료 1 g에 80% ethanol 50 mL를 가하여 heating mantle에서 75℃로 5시간 가열한 다음 Whatman filter paper(No. 2)로 여과하고 여액을 rotary vacuum evaporator에서 감압·농축 후 10 mL로 정용하여 ion chromatography(DX-600, Dionex, USA)로 분석하였으며, 분석조건은 Table 1과 같다.

### 3. 아미노산

분해관에 시료 0.5 g과 6 N HCl 3 mL를 취하여 탈기하고 121°C에서 24시간 가수분해한 다음 여액을 rotary vacuum evaporator로 감압 농축하여 sodium buffer(4종) 10 mL로 정용하였다. 용액 1 mL를 취하고 membrane filter(0.2 μ M)로 여과한 다음 아미노산자동분석기(Biochrom 20, Phamacia UK)로 분석하였으며, 분석조건은 Table 2와 같다.

### 4. 지방산 분석

시료 5 g에 메탄올과 디에틸에테르를 가하여 교반하면서 침출시킨 후 100 mL로 정용하여 얻은 지질 분획을 10 mL 취하여 용매를 완전히 제거한 후 Wungaarden의 방법(92)에 따라 BF<sub>3</sub>-methanol을 이용하여 methyl ester로 조제한 후 분석용 시료로 하였다. 즉, 지방질 시료에 0.5 N methanolic sodium hydroxide 2 mL를 가하고 5분간 환류가열 하였다. 그 후 14% BF<sub>3</sub>-methanol 2 mL를 가해 2분간, 또 n-hexane 4 mL를 가해 2~3분간 가열하고, 여기에 sodium chloride 포화용액을 충분히 가하여 방치한 후, 상층에서 일부를 취하여 무수 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 수분을 제거한 후 gas chromatography로 분석하였다. 분석조건은 Table 3과 같다.

### 5. 비타민 A 와 비타민 E

시료 0.5 g, vitamin C 0.1 g 및 ethanol 5 mL를 취하여 80°C에서 10분간 가열한 후 50% KOH용액 0.25 mL을 첨가하고 20분간 가열한 다음 증류수 24 mL와 5 mL hexane을 가하여 1,150 ×g에서 20분간 원심분리 하였다. 상징액을 분리 후 40 mL hexane을 가하고 원심분리하여 상징액을 분리한 다음 증류수

를 가해 10분간 방치 후 하층을 제거하였다. 이 과정을 3회 반복한 후 전용액을 합하여 무수  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ 로 탈수하고 rotary vacuum evaporator로 hexane을 3 mL까지 감압·농축한 후 high performance liquid chromatography(LC-10AVP, Shimadzu, Japan)로 분석하였으며 분석조건은 Table 4와 같다.

## 6. 유기산

시료 1 g에 증류수 50 mL를 가하여 80°C 수조에서 4시간 가열한 다음 Whatman filter paper (No. 2)로 여과하고, 여액을 rotary vacuum evaporator로 감압·농축한 후 증류수로 10 mL로 정용하여 ion chromatography(DX-600, Dionex, USA)로 분석하였으며, 분석조건은 Table 5와 같다.

## 7. 양·음이온

시료 5 g을 증발접시에 취하여 회화로에서 24시간 회화한 후 30분간 방냉시키고 HCl : 증류수 = 0.5 : 3.5인 용액 4 mL와 증류수 10 mL를 가하여 가온하면서 용해하였다. 상기 용액을 증류수로 100 mL로 정용하여 ion chromatography (DX-600, Dionex, USA)로 분석하였으며, 분석조건은 Table 6, 7과 같다.

## 8. 무기질

시료 0.5 g, 20% 질산 10 mL 및 60%  $\text{HClO}_4$  3 mL를 취하여 투명해 질 때까지 가열한 후 0.5 M 질산으로 50 mL로 정용하였다. 분석항목별 표준용액을 혼합 후 다른 vial에 8 mL씩 취하여 표준용액으로 하였고, 0.5 M 질산을 대조구로 하여 원자흡수분광광도계(AA-6501GS, Shimadzu, Japan)로 분석하였으며, 분석조건은 Table 8과 같다.

*Table 1. Operating condition of ion chromatography for free sugars*

<i>Item</i>	<i>Condition</i>
Instrument	DX-600(Dionex, USA)
Column	Carbo Pac <sup>TM</sup> - PA10 analytical(4 × 250 mm)
Guard	Carbo Pac <sup>TM</sup> - PA10(4 × 50 mm)
Eluent A	200 mM NaOH/1L
Eluent B	18 mM NaOH/1L
Flow rate	1.0 mL/min
Inj. volume	20 μL
Detection	ED 50 intergrated amperometry

*Table 2. Operating condition of amino acid autoanalyzer for amino acids*

<i>Item</i>	<i>Condition</i>
Instrument	Biochrom 20(Phamacia UK)
Buffer solution	Sodium buffer(4종, Phamacia)
Reagent	Ninhydrin(Phamacia)
Inj. volume	20 μL

*Table 3. Operating condition of gas chromatography for fatty acids*

<i>Items</i>	<i>Conditions</i>
Instrument	5890 Series-II GC(Hewlett Packard Co. USA)
Detector	Flame ionization detector(FID)
Column	HP-Inwax(Crosslinked Polyeththlene Glycol) (50m × 0.2mm I.D) HP Part NO. 19091N -205. USA
Carrier gas	N <sub>2</sub>
Oven temp.	180°C (5 min)→2°C/min→220°C (10 min)
Injection temp.	220°C
Detector temp.	250°C
Injection volume	1.0 μl
Split ratio	1 : 50

*Table 4. Operating condition of high perfomance liquid chromatography for vitamin A and E*

<i>Item</i>	<i>Condition</i>
Instrument	LC-10AVP(Shimadzu, Japan)
Column	Shim-pack GLC-ODS(M) 25 cm
Eluent	acetonitrile : isopropanol= 95 : 5
Flow rate	1 mL/min
Inj.volume	10 μL
Detection	Retinol : UV254(SPD-10A, Shimadzu, Japan) Tocopherol : RF-10A(Spectrofluorometric Detector) EX(290 nm), EM(330 nm)

*Table 5. Operating condition of ion chromatography for organic acids*

<i>Item</i>	<i>Condition</i>
Instrument	DX-600(Dionex, USA)
Column	IonPac ICE-AS6 analytical
Eluent	0.4 mM heptafluorobutyric acid/1L
Regenerant	5.0 mM tetrabutylammonium hydroxide/4L
Flow rate	1.0 mL/min
Inj. volume	50 $\mu$ L
Detection	Surpressed conductivity, AMMS-ICE II

*Table 6. Operating condition of ion chromatography for cations*

<i>Item</i>	<i>Condition</i>
Instrument	DX-600 IC system
Column	IonPac CS-12A(4 $\times$ 250 mm)
Guard	IonPac CG-12A(4 $\times$ 50 mm)
Eluent	22mN Sulfuric acid/1L
Flow rate	1.0 mL/min
Inj. volume	20 $\mu$ L
Detection	Surpressed conductivity, CSRS-ultra 4-mm
Analytical Time	25 min/1 sample

**Table 7. Operating condition of ion chromatography for anions**

<i>Item</i>	<i>Condition</i>
Instrument	DX-600 IC system
Column	IonPac AS14 Analytical, 4-mm
Guard	IonPac AG14 Guard, 4-mm
Eluent	3.5 Mm Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> + 1mM NaHCO <sub>3</sub> /1L
Flow rate	1.2 mL/min
Inj. volume	20 uL
Detection	Suppressed Conductivity, ASRS-ULTRA 4-mm
Analytical Time	15 min/1 sample

**Table 8. Operating condition of atomic absorption spectrophotometer for minerals**

<i>Item</i>	<i>Condition</i>								
Instrument	AA-6501GS(Shimadzu, Japan)								
Lamp Item	Ca	Fe	K	Mg	Mn	Cu	Na	Zn	
Wave length(nm)	422.7	248.3	766.5	285.2	279.5	324.8	330.2	213.9	
Current(mA)	10	12	10	8	10	6	10	8	
Slit Width(nm)	0.5	0.2	0.5	0.5	0.2	0.5	0.2	0.5	
Lighting Mode	BGC-D2	BGC-D2	BGC-D2	BGC-D2	BGC-D2	BGC-D2	Non-BGC	BGC-D2	



### 제3절 시약, 기기 및 시료 추출

#### 1. 시약 및 실험기기

본 실험에 사용된 시약은 특급 및 일급 시약으로 xanthine oxidase, xanthine, cytochrome C, glutathione reductase, reduced glutathione(GSH), oxidized glutathione(GSSG) reduced nicotinamide adenine dinucleotide(NADH), nicotinamide adenine dinucleotide(NAD), glycine, sodium pyrophosphate, semicarbazide hydrochloride, sodium azide, reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADPH),  $\alpha$ -1-antitrypsin, perchloric acid, sulfosalicylic acid(SSA), bovine serum albumin, potassium ferricyanide(KCN), ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA), Tris-HCl, sucrose, 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB), sodium phosphate(monobasic, dibasic), phenol reagent,  $\text{NaNO}_2$ , 1.1-diphenyl-2-picrylhydrazyl, sulfanylic acid, naphthylamine, linoleic acid, boric acid, phosphatidyl choline, heparin, glycerol, sucrose dexoycholate, gentamycin sulfate ,fibrinogen, collagen, epinephrine, endotoxin, aspirin, plasmin 등은 Sigma사(Sigma-Aldrich Co., USA),  $^3\text{H}$  triolein은 Amersham사 (Amersham Co., UK), M199(meium M199)는 Gibco사(Gibco BRL, Grand Island, NY), ethanol, n-hexane, chloroform, ethylacetate, heptane 및 n-butanol은 HPLC grade로 Tedia사(Tedia Co., USA) trichloroacetic acid(TCA)는 Aldrich(Sigma-Aldrich Co., USA)사 및 유지(soybean oil)는 Sigma사에서 구입하여 사용하였다.

본 실험에 사용한 실험 기기는 다음과 같다.

- Centrifuge : Eppendorf 5810R, Germany
- Evaporator : Eyela, Rotary vacuum evaporator, Japan
- Spectrophotometer : Shimadzu UV-1601PC, Kyoto, Japan

- Deep freezer : MDF-U52V Sanyo, Japan
- Ultra Turax : IKA MT-25 Janke & Kunkel, Germany
- Shaking water bath : JEIO-TEK SWBO3, Korea
- Rancimat 679 : Metrohm Ltd., CH-9101 Herisau, Switzerland
- Freeze Dryer : ED 8512. Ilshin, Korea.
- Ultrasonic processor : VCX-750, USA
- Coagulation analyzer :Techrom IV, Germany
- Hematology analyzer : MEK-6318, Nihon Khden, Japan
- pH meter : Denver model 15, USA
- Gas Chromatography : GC-10A, Shimadzu, Japan
- Amino acid autoanalyzer : Biochrom 20, Phamacia, UK
- Ion Chromatography : DX-600, Dionex, USA
- High perfomance liquid chromatography : LC-10AVP, Shimadzu, Japan
- Ion chromatography : DX-600, Dionex, USA
- Atomic absorption spectrophotometer : AA-6501GS, Shimadzu, Japan
- Electrophoresis power supply : EPS 301, USA
- CO<sub>2</sub> incubator : MCO-18A/C Sanyo, Japan
- Liquid scintillation counter : Packard Tri-carb 3170TR/SL, USA

## 2. 시료 추출

### 가. 우슬 에탄올 추출

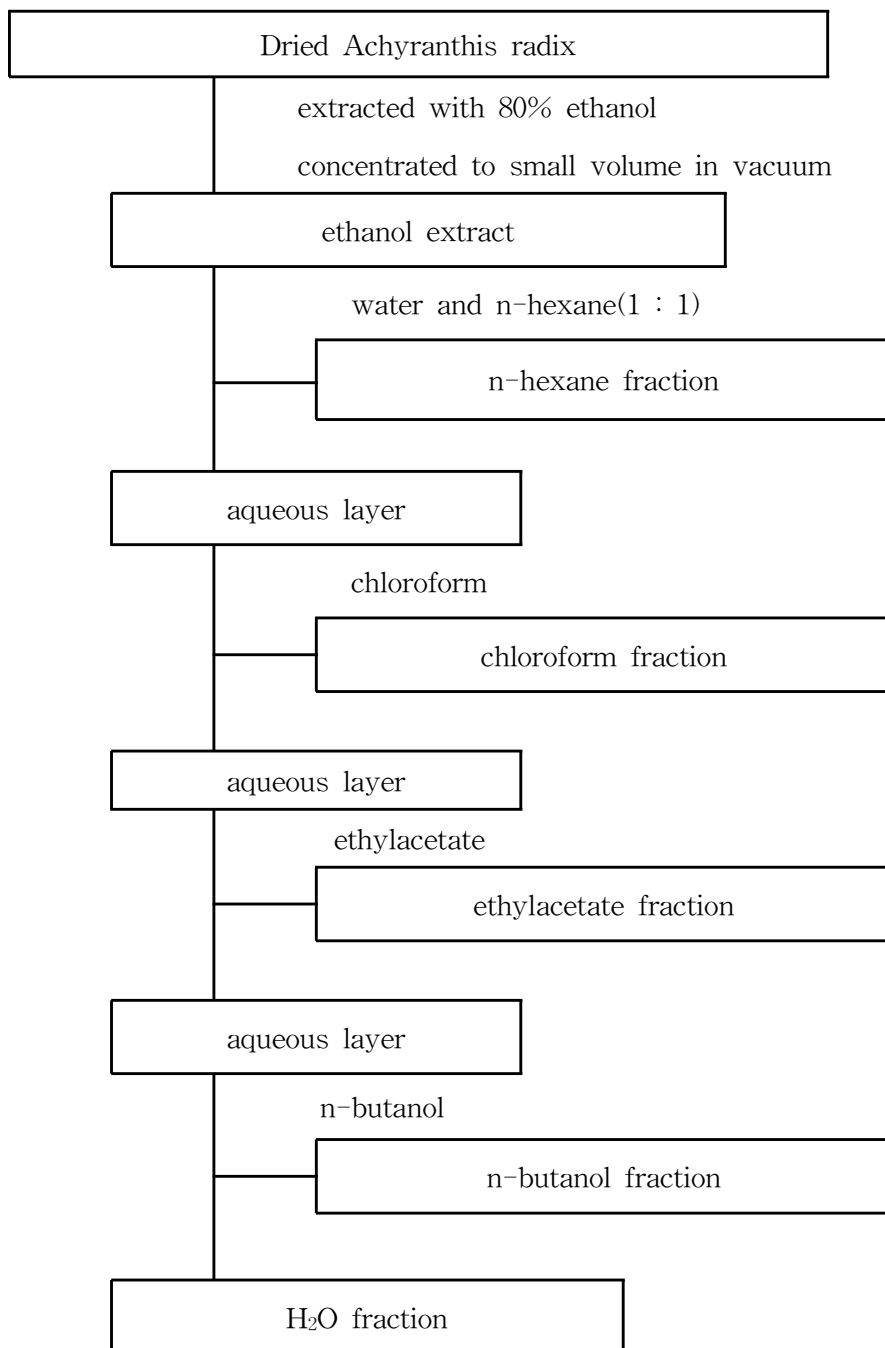
우슬 100 g을 80% 에탄올 500 mL에 넣어 blender(Braun. MR 350 CA)로 조분쇄하고 65°C에서 환류냉각기를 부착하여 3시간씩 3회 추출한 후 Whatman filter paper(No. 2)로 여과하였다. 여액을 40°C 수욕상에서 rotary vacuum evaporator로 용매를 제거하고 감압·농축한 후 시료의 산화방지를 위해 -70°C에 냉동 보관하면서 시료로 사용하였다.

### 나. 다용매 분획

우슬 에탄올 추출물을 Fig. 1과 같이 separating funnel에 의한 용매별 분획으로 n-hexane, chloroform, ethylacetate 및 n-butanol로 연속 추출(93)한 후 각 분획을 농축하여 Table 9와 같이 수율을 계산하고 항산화활성 측정용 시료로 사용하였다.

*Table 9. Yield of Achyranthis radix ethanol extract(AREE) and its solvent fraction from dried Achyranthis radix*

<i>Fraction</i>	<i>Yield(g/100g)</i>	<i>Yield(%)</i>
Ethanol ext.	29.58	-
Hexane	4.81	16.26
Chloroform	3.32	11.23
Ethylacetate	2.14	7.23
Butanol	2.37	8.01
Water	5.83	19.70



*Fig. 1. Procedure for extraction and fractionation of Achyranthis radix by various solvents.*

## 제4절 항산화 활성 실험

### 1. *In vitro* 에서 항산화 활성 측정

#### 가. *DPPH radical* 소거 활성

시료의 전자공여능 측정은 Blois(94)의 방법에 준하여 우슬 에탄올 추출물 분획들과 합성항산화제인 butylated hydroxy toluene(BHT)가 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)에 대한 수소공여 효과로 측정하였다. 즉, 일정 함량의 시료 2 mL에  $2 \times 10^{-4}$  M DPPH 용액(dissolved in 99% ethanol)을 1 mL 가하고, vortex mixing하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 이 반응액을 흡수분광광도계를 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정 하였다. 각 분획의 억제강도는 대조군에 비해 DPPH free radical을 50% 억제 하는데 요구되는 함량(IC<sub>50</sub>)과 비교 하였다. 3회 반복 실험하여 얻은 결과를 평균한 값으로 나타내었다.

#### 나. 항산화지수(*active oxygen metho, AOM-Rancimat*)

각 분획에 포함된 용매를 완전히 제거한 후 각 분획의 함량이 600 ppm이 되도록 soybean oil(Sigma Co., USA)에 첨가하고, 초음파를 이용하여 시료 추출물과 유지가 잘 혼합되도록 하였다. Rancimat의 측정조건은 시료 3.0 g을 반응용기(reaction vessel)에 취하고 증류수 70 mL을 측정용기(measuring vessel)에 넣은 후 110°C에서 air flow rate 20 L/hr로 하여 산화안정성을 비교하였다(95). 항산화지수(antioxidant index, AI)는 분획을 첨가한 실험구의 유도시간을 분획을 첨가하지 않은 대조구의 유도시간으로 나눈 값을 구하였고, 모든 측정치는 3회 반복 시험하여 얻은 값의 평균치로 표시하였다. 기존의 상업용 항산화제인 BHT를 유지에 대해 첨가하여 비교 실험하였다.

#### 다. 아질산염 소거능(*nitrite scavenging ability, NSA*)

Kato 등(96)의 방법에 준하여 1 mM NaNO<sub>2</sub> 용액 2 mL에 분획물 각각의 600 ppm 용액 1 mL를 가하고 0.1 N HCl(pH 1.2), 0.2 M citrate phosphate buffer(pH 4.2, pH 6.0)으로 각각 pH를 보정한 다음 반응액의 부피를 10 mL로 정용하였다. 용액을 37°C에서 1시간 반응시킨 후 1 mL 씩 취하고 2% 초산 5 mL와 30% 초산에 용해한 Griess 시약(1% sulfanylic acid : 1% naphthylamine = 1 : 1) 0.4 mL를 가하여 15분간 방치한 다음 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 증류수 0.4 mL를 가하여 상기와 동일한 방법으로 측정하여 잔존하는 아질산 양을 구하였으며, 아질산염 소거능은 분획을 첨가하기 전과 후의 아질산염 백분율(%)로 표시하였다. 실험결과는 3회 반복 시험하였다.

$$N(\%) = 1 - \frac{(A-C)}{B} \times 100$$

N : Nitrite scavenging ability

A : Absorbance of 1 mM NaNO<sub>2</sub> added sample after standing for 1 hour

B : Absorbance of 1 mM NaNO<sub>2</sub>

C : Absorbance of control

#### 라. 지질과산화 억제효과(*thiobarbituric acid value*)

기질용액은 0.1M phosphate buffer(pH 7.0)와 ethanol을 4 : 1로 혼합한 용매에 linoleic acid를 0.03 M이 되도록 첨가하였다. 이 기질 용액(2 mL)에 0.1M phosphate buffer(pH 7.0) 19.2 mL와 각 분획별 시료가 600 ppm이 되도록 0.8 mL를 첨가한 후 40°C 항온기에서 진탕하면서 경시적으로 혼합액 2.0 mL을 취하여 분석하였다. 위 혼합액 2.0 mL에 35% trichloro acetic acid(TCA) 1.0 mL

와 0.75% thiobarbutric acid(TBA) 2.0 mL를 가한 다음 30초 동안 95°C 진탕수 욕상(shaking water bath)에서 40분 동안 반응 시켰다. 이 반응액을 실온에서 냉각시켜 acetic acid 10 mL와 chloroform 2 mL을 가하여 진탕 시킨 다음 4,500 ×g에서 5분 동안 원심분리하여 상정액의 흡광도를 6일 동안 1일 후, 4일 후, 6일 후에 각각 532 nm에서 측정하였다(97).

### 마. *Linoleic acid*에 대한 항산화 효과

Linoleic acid 1 mL, 에탄올 20 mL, 분획별 추출물 600 ppm이 되도록 0.1 mL 및 0.2 M phosphate buffer(pH 7.4) 25 mL를 취하여 50°C에서 일정 기간 동안(3, 5, 7일) 저장한 후 반응액을 분획여두에 옮겨 chloroform을 가하고 3회 반복 추출하였다. Chloroform추출액에 acetic acid 25 mL 및 포화 KI 용액 1 mL를 가하고 암소에 5분간 방치한 다음 증류수 50 mL를 가한 후 가용성 전분을 지시약으로 하여 0.01 N  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 용액으로 적정하였다(98).

## 2. *In vivo* 에서 항산화 효능 실험

### 가. 실험동물 사육

실험동물은 Sprague Dawley계 5주령 음성 흰쥐 60마리를 조선대학교 실험동물센터에서 1주일 동안 기본식으로 적응시킨 후 평균 체중 80~100 g인 것을 난괴법(randomized block design)에 따라 각 처리 당 10마리씩 6군으로 나누어 플라스틱 케이지에 1마리씩 분리 사육하여 물과 식이는 제한 없이 공급하였고, 사육실 온도는  $18\pm 2^\circ\text{C}$ 로 유지하였으며 조명은 12시간 주기(08:00~20:00)로 조절하였다. 실험기간 중 동물의 상태를 관찰하면서 체중은 1주일 간격으로 측정하였고, 최종 체중에서 실험개시 전의 체중을 감하여 실험개시 전의 체중으로

나누어 체중증가율로 표시하였다. 식이섭취량은 2일 간격으로 측정하였으며, 사육기간의 체중증가량을 동일 기간의 식이섭취량으로 나누어 각 실험군의 식이 효율(feed efficiency ratio, FER)을 구하였다.

## 나. 실험설계 및 실험식이

우슬 에탄올 추출물은 예비 실험을 토대로 흰쥐체중 kg 당 200 mg과 400 mg이 함유되도록 생리식염수에 조제한 시료 1 mL, 알코올은 Fujji 등(99)의 방법에 준하여 조제된 알코올 1 mL 및 정상군은 동일한 양의 생리식염수를 Magen sonde를 이용하여 경구 투여하였다. 실험군은 Table 10과 같이 정상군(NOR), 35% 에탄올 투여 군(CON), 저용량 우슬 에탄올 추출물 투여 군(AR-1), 고용량 우슬 에탄올 추출물 투여군(AR-2), 저용량 우슬 에탄올 추출물 및 알코올 병합 투여군(AR-E1), 고용량 우슬 에탄올 추출물 및 알코올 병합 투여군(AR-E2)을 나누어 실시 하였다.

## 다. 실험동물 처치

실험동물은 처치 전 16시간 동안 절식시킨 후 CO<sub>2</sub>로 가볍게 마취한 다음 회복하여 복부 대동맥에서 채혈하여 실온에서 1시간 이상 방치 후 4,500 ×g에서 20분간 원심분리 후 혈청을 분리하여 혈청 alanine aminotransferase(ALT), aspartate aminotransferase(AST), alkaline phosphatase(ALP)활성 측정에 사용하였으며, 간 적출 하여 0.9% 생리식염수로 남아 있는 혈액 및 기타 부착물질을 제거하고 여지로 수분을 제거한 후 효소 활성 저하를 예방하기 위해 급속 동결하여 -70°C의 deep freezer에 보관하면서 효소 활성 측정에 사용하였다.



**Table 10. Experimental design of antioxidant**

<i>Groups</i>	<i>Diet composition</i>
NOR	Basal diet <sup>1)</sup>
CON	Basal diet + EtOH <sup>2)</sup>
AR-1	Basal diet + ARL <sup>3)</sup>
AR-2	Basal diet + ARH <sup>4)</sup>
AR-E1	Basal diet + EtOH + ARL
AR-E2	Basal diet + EtOH + ARH

<sup>1)</sup> According to AIN-93 diet composition : Casein 200.0, L-methionine 3.0, Beef tallow 100.0, Choline chloride 2.0, Corn starch 448.0, Sucrose 150.0, Cellulose 50.0, Cholic acid 2.0, Mineral Mix 35, Vitamin Mix10

Mineral Mix(AIN-93-MX)(g/kg mixture): Potassium phosphate monobasic(22.76% P, 28.73% K) 250.00, Potassium citrate, Tripotassium monohydrate(36.16% K) 28.00, Sodium sulfate(39.34%, 60.66% Cl) 74.00, Potassium sulfate(44.87%, 18.39% S) 46.60, Magnesium oxide(60.32% Mg) 24.00, Ferric citrate(16.5% Fe) 6.06, Zinc citrate(52.14% Zn) 1.65, Sodium meta-silicate H<sub>2</sub>O(9.88% Si) 1.45, Manganese carbonate(44.79% Mn) 0.63, Cupric carbonate(57.47% Cu) 0.30, Chromium potassium sulfate 2H<sub>2</sub>O(10.42% Cr) 0.275, Boric acid(17.5% B) 0.0815, Sodium fluoride (42.25% F) 0.0635, Nickel carbonate(45% Ni) 0.0318, Lithium chloride(16.83% Li) 0.0174, Sodium selenate anhydrous(41.79% Se) 0.01025, Potassium iodate(59.3% I) 0.010, Ammonium paramolybdate · H<sub>2</sub>O(54.34% Mo) 0.00795, Ammonium vanadate(43.55% V) 0.0066, Powdered sucrose 209.806

Vitamin Mix(AIN-93-VX)(g/kg mixture) : Nicotinic acid 3,000, Capantothenate 1,600, Pyridoxin-HCl 700, Thiamin-HCl600, Riboflavin 600, Folic acid 200, Biotin 20, Vitamin B<sub>12</sub>(cyanocobalamin)(0.1% in manitol) 2,500, Vitamin E(all-rac-tocopheryl acetate)(500 IU/g) 15,000, Vitamin D<sub>3</sub>(cholecalciferol)(400,000 IU/g) 800, Vitamin K(phyloquinone) 75, Powdered sucrose 974.665

<sup>2)</sup> EtOH : 35 % ethanol 10 mL/kg of b.w./day

<sup>3)</sup> ARL : AREE 200 mg/kg of b.w./day

<sup>4)</sup> ARH : AREE 400 mg/kg of b.w./day

## 라. 혈청 중 *AST*, *ALT* 및 *ALP* 활성 측정

Aminotransferase 활성은 Reitman과 Frankel(100)의 방법에 의하여 조제된 혈청 transaminase 측정용 kit(신양화학)를 사용하여 ALT 및 AST 활성을 측정하였고 단위는 혈청 mL당 karmen unit로 표시하였다. ALP 활성은 조제된 kit 시약(영동제약)을 사용하여 측정하였고 단위는 king armstrong unit로 표시하였다.

## 마. 간 조직 중 효소활성 측정

### (1) 효소원 조제

간 조직 1 g당 4배량의 0.25 M sucrose buffer(pH 7.5)를 가하고 병냉하에서 Ultra Turax Homogenizer(Janke & Kunkel, Germany)로 10,000 ×g에서 2분간 마쇄하였다. 마쇄액의 일부는 thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) 함량 측정에 사용하였고, 나머지는 4°C, 600 ×g 에서 10분간 원심분리 하여 핵 및 미마쇄 부분을 제거한 후 상정액을 15,000 ×g에서 20분간 원심분리 하여 얻은 상정액은 XO, SOD, catalase, GSH-Px 활성 측정의 효소원 및 단백질함량 측정에 사용하였다. 또한 간 조직 0.1 g에 5%(W/V) sulfosalicylic acid(SSA) 2 mL를 가하고 마쇄 후 10,000 ×g에서 10분간 원심분리 하여 상정액을 glutathione(GSH)함량 측정에 사용하였다.

## (2) XO 활성

Downey(101)의 방법에 의하여 측정하였다. 50 mM phosphate buffer(pH 7.8) 2.8 mL에 10 mM EDTA(ethylene diamine tetraacetic acid) 0.03 mL, 5 mM xanthine 0.03 mL을 가하여 혼합한 다음 25°C에서 3분간 방치하고 효소원 0.1 mL를 가하여 290 nm에서 3분 동안 변화되는 흡광도를 측정하였다. 효소 활성은 요산의 흡광계수를  $10.03 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  로 간주해 계산하였으며, 효소량 mU/g protein을 1 unit로 표시하였다.

## (3) SOD 활성

Crapo 등(102)의 방법에 의하여 xanthine, XO 및 cytochrome c를 이용하여 측정하였다. 즉 시험관에 100 mM phosphate buffer (pH 7.8) 2.3 mL에 0.5 mM xanthine 0.3 mL와 0.1 mM cytochrome C 0.3 mL를 가하고 혼합하여 흡광도의 증가 속도가 매분 당 0.02이 되도록 XO용액을 첨가한 후 550 nm에서 1분간 변화되는 흡광도를 측정하였다. 효소 활성은 상기 조건에서 효소원을 가하여 증가되는 흡광도를 측정하였고, cytochrome C 환원속도를 50% 억제하는 효소량  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein을 1 unit로 표시하였다

## (4) Catalase 활성

Aebi(103)의 방법에 의하여 소모되는  $\text{H}_2\text{O}_2$ 양으로 측정하였다. 25 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 포함한 50 mM phosphate buffer(pH 7.0) 3.0 mL에 효소원 10  $\mu\text{L}$ 를 가하여 혼합한 후 240 nm에서 60초간 변화되는 흡광도를 측정하였으며, 효소의 활성도는 1분 동안에 1 mM의  $\text{H}_2\text{O}_2$ 를 분해시키는 효소량(decreased  $\text{H}_2\text{O}_2$   $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein)을 1 unit로 표시하였다.

### (5) GSH-Px 활성

Flohe(104) 등의 방법에 의하여 측정하였다. 10 mM phosphate buffer(pH 7.0) 2.5 mL에 3 mM GSH, 20 mM NaN<sub>3</sub>, glutathione reductase 0.72 U, NADPH 0.45 mM과 효소원을 넣고 0.45 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 가하여 340 nm에서 3분간 흡광도의 변화를 측정하였다. 비효소적 반응은 상기와 같은 조건에서 단지 0.45 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 가하지 않고 흡광도의 변화를 측정하였으며, 효소 활성은 비효소적 반응에 의한 흡광도 변화를 제한 값을 다음 식에 의해서 계산하여 효소량 (decreased NADPH  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$  protein)을 1 unit로 표시하였다.

$$A = 0.868( [\text{NADPH}] / [\text{GSH}]_0 t)(V_i / V_s)$$

A : 효소 활성도

[NADPH] : NADPH 함량 변화

[GSH]<sub>0</sub> : GSH의 처음 함량

t : 반응시간

V<sub>i</sub> : 반응액 용량

V<sub>s</sub> : 효소액 용량

### (6) TBARS 함량

TBARS 함량은 Buege와 Aust의 방법(105)에 의하여 측정하였다. TBA 시약 (0.375% TBA in 0.25 N HCl) 1.0 mL에 BHT를 최종함량이 0.01%가 되게 가하고 균질액 1.0 mL를 가하여 잘 혼합한 후 98°C로 15분간 가열하였다. 즉시 냉각시켜 1,500 ×g로 15분간 원심분리하고 535 nm에서 상정액의 흡광도를 측정하였다. Malondialdehyde(MDA)의 몰 흡광계수  $1.56 \times 10^2 \text{ L} \cdot \text{mmol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 를 이용하여 계산하였다.

### (7) GSH 함량

GSH 함량은 Tietze의 방법(106)으로 측정하였다. 시험관에 working buffer 700  $\mu\text{L}$ , 5,5'-dithio-bis-2-nitrobenzoic acid (DTNB) 100  $\mu\text{L}$ , 시료액 20  $\mu\text{L}$  및 증류수 180  $\mu\text{L}$ 를 가하여 30°C에서 3분간 방치한 후 GSSG 5  $\mu\text{L}$ 를 첨가하고 412 nm에서 1분 동안 변화되는 흡광도를 측정하였다. GSH함량은 GSH표준액 1, 2, 3 및 4  $\mu\text{M}$ 을 상기와 같은 방법으로 측정하여 계산하였다.

### (8) 단백질 정량

단백질 정량은 Lowry 등의 방법(107)에 의하여 bovine serum albumin 을 표준물질로 하여 측정하였다. 간세포 획분 20  $\mu\text{L}$ 를 취하고, 여기에 1.0% SDS 용액 16  $\mu\text{L}$ 를 혼합하고, 증류수로 최종 부피가 124  $\mu\text{L}$ 가 되도록 희석한다. 희석된 용액 15 및 20  $\mu\text{L}$ 를 취해 증류수로 80 및 85  $\mu\text{L}$ 넣고 희석시켰다. 여기에 반응시약(0.5% copper sulfate solution : 1.0% sodium tartrate solution : 2.0% sodium carbonate solution = 0.5 : 0.5 : 49, v/v/v)을 1.0 mL 씩 첨가하여 10초간 혼합 후 실온에서 20분간 방치시켰다. 이후 발색시약으로서 1 N Folin 시약 0.1 mL씩 첨가하여 5초간 혼합하고 실온에서 30분간 방치한 다음, 분광광도계를 사용하여 525 nm에서 흡광도를 측정하여 표준 검량선에 의하여 단백질 함량을 정량 하였다.

### 바. 통계처리

본 실험에서 얻은 결과는 SPSS 10.1(Statistical package for the social science)P/C package를 이용하여 실험군당 평균과 표준오차를 계산하였고, 일원 배치 분산분석(one-way ANOVA)를 실시하였으며, 사후검정은 Tukey(T)-test에 의하여 실행하였다. 본 연구에 이용된 통계적 유의성 검증은  $\alpha < 0.05$  수준에서 이루어 졌다.

## 제5절 고지혈증 억제 효능 실험

### 1. *In vitro* 에서 고지혈증 억제 효과 측정

#### 가. LDL 분리

우슬 추출물의 용량별 LDL 산화억제 효과는 사람의 혈장에서 LDL을 분리하여 측정하였다. LDL( $1.019 < d < 1.063$ )은 건강한 사람의 혈액을 4°C에서 3시간 방치 후 450 ×g, 4°C에서 20분간 원심분리 하여 상층부의 혈장을 취한 다음, gentamycin sulfate 1 mg/25 mL을 첨가하여 46,000 ×g에서 24시간 원심분리하여 얻었다. 이를 0.15 M NaCl, 0.01% EDTA가 함유된 0.01M phosphate buffer(pH7.4)에서 20시간 투석하여 LDL을 분리하여 냉동 건조하여 사용하였다 (108).

#### 나. LDL 산화 및 측정

LDL의 산화 유발을 위해 65 µg LDL/mL, 16 µM CuSO<sub>4</sub>에 전체 부피가 1 mL가 되도록 phosphate buffer(pH7.4)를 섞은 뒤, 37°C에서 2시간 동안 반응시킨 후 EDTA(1mM)를 20 µL를 첨가하여 산화를 중지 시켰다. LDL내의 산화지질량(MDA의 양)은 TBARS 함량으로 측정하였다. 각 분획 30 µg/mL에서 2시간 후 TBARS 함량 변화를 측정하여 LDL 산화에 미치는 우슬 분획의 항산화 효과를 실험하였다. EDTA 첨가로 산화가 중지된 LDL용액에 TCA-TBA-HCl 정지액(15% trichloroacetic acid: 0.375% thiobarbituric acid: 0.25N HCl) 3 mL를 가한 후, 95°C에서 30분간 중탕한다. 냉각시킨 뒤 4,500 ×g에서 10분간 원심분리 시킨 후 상등액을 취하여 생성된 MDA 함량을 532 nm에서 측정하였다 (109).

## 2. *In vivo* 에서 고지혈증 억제 효능 실험

### 가. 실험동물 사육

실험동물은 Sprague Dawley계 5주령 웅성 흰쥐 60마리를 조선대학교 실험동물센터에서 1주일 동안 기본식으로 적응시킨 후 평균 체중 80~100 g인 것을 난피법에 따라 각 처리군당 10마리씩 6군으로 나누어 플라스틱 케이지에 1마리씩 분리 사육하여 물과 식이는 제한 없이 공급하였고, 사육실 온도는  $18\pm 2^{\circ}\text{C}$ 로 유지하였으며 조명은 12시간 주기(08:00~20:00)로 조절하였다. 실험기간 중 동물의 상태를 관찰하면서 체중은 1주일 간격으로 측정하고, 최종 체중에서 실험개시 전의 체중을 감하여 실험개시 전의 체중으로 나누어 체중증가율로 표시하였다. 식이섭취량은 2일 간격으로 측정하였고, 사육기간의 체중증가량을 동일기간의 식이섭취량으로 나누어 각 실험군의 식이효율을 구하였다.

### 나. 실험식이 및 실험설계

Table 11과 같이 식이를 조성하였으며, Table 12와 같이 실험군을 나누었다. 식이군은 정상군(NOR), 고콜레스테롤식이급여군(대조군, CON), 저용량 우슬 에탄올 추출물 투여군(AR-1), 고용량 우슬 에탄올 추출물 투여군(AR-2), 저용량 우슬 에탄올 추출물 및 고콜레스테롤식이병합 투여군(AR-C1), 고용량 우슬 에탄올 추출물 및 고콜레스테롤식이병합 투여군(AR-C2)으로 나누어 실시하였다. 고콜레스테롤혈증 유발식은 AIN-93(110)을 기준으로 1% 콜레스테롤과 0.25% sodium cholate을 첨가하여 조제하였다.

**Table 11. Composition of experimental diets containing high cholesterol for hyperlipidemia**

<i>Diet composition</i>	<i>Basal diet</i>	<i>High-cholesterol diet</i>
Casein	200.0	200.0
L-methionine	3.0	3.0
Beef tallow	100.0	100.0
Choline chloride	2.0	2.0
Corn starch	448.0	443.0
Sucrose	150.0	150.0
Cellulose	50.0	50.0
Cholic acid	2.0	2.0
Vitamin mixture(AIN 93) <sup>1)</sup>	10.0	10.0
Mineral mixture (AIN 93) <sup>2)</sup>	35.0	35.0
Cholesterol	0.0	5.0

1) Mineral Mix(AIN-93-MX)(g/kg mixture): Potassium phosphate monobasic(22.76% P, 28.73% K) 250.00, Potassium citrate, Tripotassium monohydrate(36.16% K) 28.00, Sodium sulfate(39.34%, 60.66% Cl) 74.00, Potassium sulfate(44.87%, 18.39% S) 46.60, Magnesium oxide(60.32% Mg) 24.00, Ferric citrate(16.5% Fe) 6.06, Zinc citrate(52.14% Zn) 1.65, Sodium meta-silicate H<sub>2</sub>O(9.88% Si) 1.45, Mammagamous carbonate(44.79% Mn) 0.63, Cupric carbonate(57.47% Cu) 0.30, Chromium potassium sulfate 2H<sub>2</sub>O(10.42% Cr) 0.275, Boric acid(17.5% B) 0.0815, Sodium fluoride (42.25% F) 0.0635, Nickel carbonate(45% Ni) 0.0318, Lithium chloride(16.83% Li) 0.0174, Sodium selenate anhydrous(41.79% Se) 0.01025, Potassium iodate(59.3% I) 0.010, Ammonium paramolybdate · H<sub>2</sub>O(54.34% Mo) 0.00795, Ammonium vanadate(43.55% V) 0.0066, Powdered sucrose 209.806

2) Vitamin Mix(AIN-93-VX)(g/kg mixture) : Nicotinic acid 3,000, Capantothenate 1,600, Pyridoxin-HCl 700, Thiamin-HCl600, Riboflavin 600, Folic acid 200, Biotin 20, Vitamin B<sub>12</sub>(cyanocobalamin)(0.1% in manitol) 2,500, Vitamin E(all-rac-tocopheryl acetate)(500 IU/g) 15,000, Vitamin D<sub>3</sub>(cholecalciferol)(400,000 IU/g) 800, Vitamin K(phyloquinone) 75, Powdered sucrose 974.665



*Table 12. Experimental design of hyperlipidemia*

<i>Groups</i>	<i>Composition</i>
NOR	Basal diet <sup>1)</sup>
CON	High-cholesterol diet <sup>2)</sup>
AR-1	Basal diet + ARL <sup>3)</sup>
AR-2	Basal diet + ARH <sup>4)</sup>
AR-C1	High-cholesterol + ARL
AR-C2	High-cholesterol + ARH

<sup>1), 2)</sup> See the Table 11.

<sup>3)</sup> ARL : AREE 200 mg/kg of b.w./day

<sup>4)</sup> ARH : AREE 400 mg/kg of b.w./day

#### 다. 실험동물의 처치

흰쥐를 16시간 절식시킨 후 CO<sub>2</sub>로 가볍게 마취하고 개복 한 다음 복부대동맥에서 채혈하여 실온에서 30분간 방치하였다. 1,150 ×g에서 20분간 원심분리 후 혈청을 분리하여 혈청 지질 측정용 시료로 사용하였다. 즉시 해부하여 간, 내장지방 및 부고환 지방조직을 분리하였다. 분리한 각각의 지방조직은 적출 후 즉시 냉장 생리 식염수(0.9% NaCl)로 세척하고, 여과지로 표면의 수분을 제거하여 중량을 측정한 후, LPL 활성 측정을 위해서 약 20~50 mg 정도의 지방 무게를 측정한 다음 효소 활성이 떨어지지 않도록 methanol을 함유한 dry ice에 넣어 급속 동결시켜 분석 전까지 혈청과 함께 -70℃에 냉동 보관하였다가 분석에 이용하였다.

## 라. 혈청 중 효소 활성 측정

Aminotransferase 활성은 Reitman과 Frankel(100)의 방법에 의하여 조제된 혈청 transaminase 측정용 kit(신양화학)를 사용하여 ALT 및 AST 활성을 측정하고 단위는 혈청 mL당 karmen unit로 표시하였다. ALP 활성은 조제된 kit 시약(영동제약)을 사용하여 측정하였고 king armstrong unit로 표시하였다.

## 마. 혈청 지질 함량 측정

혈청 중 중성지방 함량은 McGowan 등의 방법(111)에 준하여 조제된 kit(AM157S-K, Asan), 총콜레스테롤 함량은 Richmond의 효소법(112)에 준하여 조제된 kit(AM202-K, Asan), 인지질 함량은 Eng와 Noble(113)의 방법으로 조제된 kit(Wako Co., Japan)를 사용하였고, 유리콜레스테롤 함량은 (G-HH54, Shinyang) kit를 사용하여 측정하였다. HDL-콜레스테롤 함량은 Noma 등의 효소법(114)에 준하여 조제된 kit(AM203-K, Asan), LDL-콜레스테롤 함량은 Friedwald식  $\{ \text{총콜레스테롤} - (\text{HDL-콜레스테롤} + \text{중성지방}/5) \}$ (115)에 의하여 계산하였다. HDL-콜레스테롤의 총콜레스테롤에 대한 비율은 HDL-콜레스테롤을 총콜레스테롤로 나누어 계산하였으며, 콜레스테릴 에스테르 함량은 총콜레스테롤 함량에서 유리콜레스테롤 함량을 감하여 구하였다. 심혈관계질환의 위험도 판정에 이용되는 동맥경화지수(atherogenic index, AI)는  $\{ (\text{총콜레스테롤} - \text{HDL-콜레스테롤}) / \text{HDL-콜레스테롤} \}$ (116) 공식에 의거하여 계산하였다.

## 바. 조직의 지질 함량 측정

간장 및 지방조직(부고환지방 및 내장지방)의 총지질 함량은 Folch법(117)에 준하여 실시하였는데, 적출한 0.5 g 정도의 간과 지방조직에 chloroform

-methanol(2 : 1, v/v)과 H<sub>2</sub>O를 첨가하여 vortex시킨 다음 4,500 ×g에서 20분간 원심분리하여 지질을 추출한 다음 총지질 함량을 계산하였다. 추출한 지질을 이용하여 총콜레스테롤 함량 분석은 Zlatkis와 Zak(118)방법에 의하여 550 nm에서 측정하였고, 중성지방 함량 분석은 Biggs 등(119)의 방법으로 410 nm에서 측정하였다.

## 사. LPL 활성 측정

LPL은 지방조직의 세포내액 및 세포외액 모두에 존재하는 효소이다. 따라서 지방조직 부위별 LPL 활성 및 LPL이 지방조직 내에 어떻게 분포되어 있는지를 알아보기 위하여 다음과 같은 두 가지 방법에 의하여 측정하였다.

### (1) Heparin-releasable LPL(HR-LPL) 활성

세포외액에 존재하는 LPL 활성은 Nilsson-Ehle와 Schotz 방법(120)을 응용한 Fried와 Zechner 방법(121)에 의하여 측정하였다. 지방조직(약 20~40 mg)을 1% BSA와 heparin(10 mU/mL)를 함유한 0.5 mL MI99(Hanks salts)에 넣은 후 진탕 수욕조 24°C에서 45 분간 배양하여 효소분석용 시료를 만들었다. 효소 활성을 위한 기질은 <sup>3</sup>H-triolein에 phosphatidylcholine과 triolein을 넣고 냄새가 없어질 때 까지 질소가스를 용액 표면에 쉰어준 후, glycerol을 첨가하여 6분 정도 sonication시켜 제조했다. 효소반응은 배양시킨 효소분석용 시료 150 μL와 <sup>3</sup>H-triolein emulsion을 기초로 만든 기질 150 μL를 함께 넣은 다음 37°C에서 1시간 동안 배양시켜 수행하였고, 이때 생성된 유리지방산(free fatty acid)의 radioactivity를 β-counter를 이용하여 측정한 다음 HR-LPL 활성을 계산하였다.

## (2) Total extractable LPL(TE-LPL) 활성

지방조직의 LPL은 세포외액 뿐만 아니라 세포내액에도 함유되어 있는데, microsome 안에 있는 잠재적인 LPL을 포함한 총체적인 LPL 활성을 측정하는 것이 TE-LPL 활성 측정 방법이다. TE-LPL 활성 측정은 Iverius와 Brunzell의 방법(122)에 의해 실시하였으며, detergent인 deoxycholate로 LPL을 추출한 다음 측정하였다. 지방조직(약 50 mg)은 0.5% deoxycholate을 함유한 ice-cold buffer(0.5% deoxycholate, 0.2 M Tris, 0.25M sucrose, 1% BSA, 10 U/mL heparin, 0.02% nonidet P40, pH 8.3) 0.2~0.3 mL를 첨가하여 glass homogenizer로 균질화한 후 짧게 sonication시킨 다음 microcentrifuge를 이용하여 18,000 ×g에서 15분간 (4°C) 원심분리 하였다. LDL활성 측정을 위해 하층액을 사용하였으며, 하층액은 deoxycholate를 함유하지 않은 ice-cold buffer와 1:5로 희석하였다. 희석액 150 µL에 효소 활성을 측정하기 위해 제조한 기질 150 µL를 첨가하여 37°C에서 1시간 동안 배양시킨 후 HR-LPL 활성 측정 방법과 동일한 방법으로 radioactivity를 측정하여 계산하였다.

### 아. LPL mRNA 분석

Northern blotting을 이용하여 지방조직의 LPL 유전자 발현량을 측정하였다. 지방조직은 guanidinium isothiocyanate buffer에 넣어 homogenize한 후 3,750 ×g에서 20분간 원심분리 하여 지방부위를 제거시킨 다음 RNA를 추출하였는데 Chomczynski와 Sacchi(123)의 방법을 변형하여 실시하였다. LPL 유전자 발현량을 측정하기 위한 Northern blotting은 6% formaldehyde를 함유한 1% agarose gel에 5 µg RNA를 loading하여 전기영동한 후, nylon membrane에 RNA를 blot시켰다(124). Blot은 42°C에서 8~24시간 동안 prehybridization시킨 다음 Random Primer Method(Amersham사 Kit)를 이용하여 <sup>32</sup>P-deoxycytosine

으로 labelling된 human LPL cDNA를 함유한 hybridization용액에서 42℃에서 20시간 hybridization하였다. 55℃에서 15분간 1% SDS와 1×SSC 용액을 가지고 세 번 정도 blots은 씻어준 후, X-ray film에 blots을 exposure시켰다. 대조구로는 28s ribosomal RNA(rRNA)를 사용하였다.

## 자. 통계처리

본 실험에서 얻은 결과는 SPSS 10.1(statistical package for the social science)P/C package를 이용하여 실험군당 평균과 표준오차를 계산하였고, 일원배치 분산분석(one-way ANOVA)를 실시하였으며, 사후검정은 Tukey(T)-test에 의하여 실행하였다. HDL-콜레스테롤과 중성지방이 LPL과의 상관관계를 보기 위하여 Pearson correlation coefficient를 구하였으며, 본 연구에 이용된 통계적 유의성 검증은  $\alpha < 0.05$ 수준에서 이루어 졌다.

## 제6절 항혈전 효능 실험

### 1. *In vitro* 에서 혈소판 응집 억제능 측정

#### 가. *Fibrin* 용해능(*fibrinolytic activity*)

Fibrin 분해 활성 측정(fibrin plate assay)은 Haverkate-Trass(125)의 fibrin plate 법에 따라 2% gelatin 용액에 녹인 0.7% (w/v) fibrinogen 용액 10 mL와 0.05 N barbital buffer(pH7.5)에 녹인 thrombin(100 units) 50  $\mu$ L을 잘 섞은 후 이를 petri dish에 부어 fibrin 막을 만든 disk를 심고 우슬 에탄올 추출물 200 mg/mL과 400 mg/mL 각각 0.03 mL를 disk위에 점적하였다. 대조구로는 혈전 용해제인 약물대조군 urokinase(40000 units/mL) 60  $\mu$ g/mL로 0.03 mL 사용하였고, urokinase 효소 활성에 우슬 에탄올 추출물이 미치는 효과를 측정하기 위해 urokinase(40000 units/mL) 60  $\mu$ g/mL의 0.03 mL과 우슬 에탄올 추출물 400 mg/mL를 0.03 mL씩 취하여 disk에 가하였다(126). 18시간 동안 37°C에서 배양 방치 후 용해되어 생긴 원의 지름을 측정하여 활성을 비교하였다.

#### 나. 혈장 응고 시간(*plasma recalcification time*)

약물처리 하지 않는 정상쥐를 마취시킨 후 심장에서 혈액을 채취하여, 항응고제(3.13% sodium citrate,  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_6\text{O} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )와의 비율을 9:1로 맞춘 다음, 4,500  $\times$ g에서 25분 동안 원심분리하여 혈장을 얻었다. 플라스틱 시험관을 37.5°C 수욕상에 담그고 혈장 100  $\mu$ L, 시료 50  $\mu$ L를 가하여 섞은 후, 3분 동안 배양하였다. 50 mM  $\text{CaCl}_2$  50  $\mu$ L를 가하여 섞은 후 가만히 흔들어 주면서  $\text{CaCl}_2$ 를 가한 후부터 혈장이 응고(하얀 실타래 모양)되기까지의 시간을 측정하여 평가하였다. 이때 대조군은 생리 식염수 용액을 사용하였다. 시료 투여군의 응고시간을 대조군의 응고시간으로 나누어 지연시간 비율(Tr)을 계산하였다(127).

## 2. *In vivo* 에서 항혈전 효능 실험

### 가. *Collagen* 유발 혈전증

#### (1) 실험동물 및 재료

사용된 실험동물은 몸무게 약 20~25 g 정도의 수컷 ICR 생쥐(mouse)를 사용하였다. 사육환경은 온도  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 습도  $53.3\pm 3\%$  및 밤낮을 12시간씩 조절하여 물과 사료(Samyang Co., Korea)를 충분히 공급하면서 1주간 실험실에 적응시킨 다음 사용하였다.

#### (2) 검액 조제 및 실험군 설정

실험적 혈전 유도는 Dimino(128) 등의 실험 방법에 준하여 Table 13과 같이 실시하였다. 혈전 유발은 혈소판 응집시약인 collagen과 epinephrine을 생쥐 꼬리 정맥에 주사하여 미소혈관 내에 혈전이 생기도록 하였으며, 사용된 응집시약은 15  $\mu\text{g}$  collagen과 400  $\mu\text{M}$  epinephrine이 생리식염수 100  $\mu\text{L}$ 의 용량으로 몸무게 20 g당 200  $\mu\text{L}$  용량을 사용하였다. 우슬 에탄올 추출물의 항혈전 효과를 알아보기 위하여 혈소판 응집시약을 정맥주사하기 1시간 전에 우슬 에탄올 추출물 200 mg/kg과 400 mg/kg 두 용량으로 생쥐에 경구 투여하였고, 대조군으로는 생리식염수를 동일 용량으로 투여했으며, 양성 대조약물로는 aspirin 100 mg/kg을 경구투여 하였다. 항혈전 효과는 혈소판 응집시약의 주사로 인하여 발생하는 생쥐 뒷다리의 마비나 죽음으로부터 보호된 실험동물의 숫자를 백분율로 계산하였으며, 여기서 마비는 15분 이상 뒷다리의 기능을 상실하거나 떨림의 상태가 지속될 때를 기준으로 하였다.

**Table 13. Composition of experimental groups for pulmonary embolism**

<b>Groups</b>	<b>Composition</b>
NOR	Saline treated group
CON	15 µg collagen and 400 µM epinephrine i.v. treated group (negative control)
ASP	Administration of aspirin 100 mg/kg/mL after 15 µg collagen and 400 µM epinephrine i.v. treated group(positive control)
AR-A1	Administration of AREE 200 mg/kg/mL after 15 µg collagen and 400 µM epinephrine i.v. treated group
AR-A2	Administration AREE 400 mg/kg/mL after 15 µg collagen and 400 µM epinephrine i.v. treated group

**Table 14. Composition of experimental groups for endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation**

<b>Groups</b>	<b>Composition</b>
NOR	Saline treated group
CON	Saline treated group after endotoxin 0.5 mg/kg/mL i.v. treated group(negative control)
URO	Urokinase(40000 U/kg) 60 µg/kg/mL i.v. treated group after endotoxin 0.5 mg/kg/mL i.v. treated group(positive control)
AR-D1	Administration of AREE 200 mg/kg/mL treated group after endotoxin 0.5 mg/kg/mL i.v. treated group
AR-D2	Administration of AREE 400 mg/kg/mL treated group after endotoxin 0.5 mg/kg/mL i.v. treated group



## 나. *Endotoxin* 유발 혈전증

### (1) 실험동물 및 재료

실험동물은 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley)를 분양 받아 온도  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 습도  $53.3\pm 3\%$  및 밤낮을 12시간씩 조절하여 물과 사료(Samyang Co., Korea)를 충분히 공급하면서 1주간 실험실에 적응시킨 다음 체중 200~220 g을 선정하여 사용하였다.

### (2) 검액 조제 및 실험군 설정

흰쥐 5마리를 1군으로 정상군(NOR), 대조군(CON), 약물 양성 대조군(URO), 우슬 저함량 실험군(AR-D1), 우슬 고함량 실험군(AR-D2)으로 각각 나누어 Table 14와 같이 실시하였다. 정상군은 8일간 생리식염수 1 mL를 1일 1회 경구투여 하였으며, 최종 투여 후 12시간 절식시킨 다음 생리식염수 0.2 mL를 미정맥내 투여하고 4시간 후에 채혈하였으며, 대조군(CON)은 혈전증 병태 모형으로 8일간 증류수 1 mL를 1일 1회 경구투여 하였으며, 최종 투여 후 12시간 절식시킨 후 Westphal(129)법에 의하여 정제한 endotoxin(*Lipopolysaccharide escherichia coli* serotype 055, B5 Sigma Co.)을 Schoendorf 등(130)의 방법에 준하여 투여량이 0.5 mg/kg/mL이 되도록 생리식염수로 용해한 액 0.2 mL를 미정맥내 투여하고 4시간 후에 채혈하였다. 약물 양성대조군(URO)은 8일간 생리식염수 1 mL를 최종 투여 후 12시간 절식시킨 다음 urokinase(40000 U/kg)60 µg/kg/mL를 미정맥내 투여하고 1시간 후 대조군과 같은 처치를 하였다. 우슬 저함량 투여군(AR-D1)은 8일간 우슬 에탄올 추출물 200 mg/kg을 1일 1회 각각 경구투여 하였고, 우슬 고함량 투여군(AR-D2)은 8일간 우슬 에탄올 추출물 400 mg/kg을 1일 1회 경구투여 하였으며, 최종 투여 후에는 대조군과 같은 처치를 하였다. 검액의 투여량은 체중비로 계산하여 흰쥐용 zonde로 경구투여 하였다.

### (3) 채혈 및 혈청 분리

채혈은 endotoxin을 주사하고서 4시간 경과한 후 CO<sub>2</sub>로 가볍게 마취하고 1회용 주사기(23Gx1 $\frac{1}{2}$ , Samwoo Co, Korea)로 심장 천자하여 6~7 mL의 혈액을 취하였다. EDTA-2K tube에 분주하여 전혈응고 측정 및 hematocrit치 측정에 이용하였고, 3 mL는 0.38%의 sodium citrate 0.3 mL가 들어있는 centrifuge tube에 넣어 4,500 ×g으로 15분간 원심분리 한 다음 상층의 혈청을 serum separator(녹십자)에 취한 후 fibrinogen 함량과 자동 혈액응고 측정기(Techrom, Germany)를 이용하여 prothrombin time(PT), actived partial thromboplastine time(APTT)을 측정하였다.

### (4) PT 측정

PT(prothrombin time) 측정은 PT kit를 Coatron IV Plus(Teco Co., Germany)로 사용하여 측정하였다.

### (5) Fibrinogen 함량 측정

혈장내의 fibrinogen 함량 측정은 임상병리검사법 중 fibrinogen 측정법을 사용하여, 완충액으로 10배 희석한 혈장 검체를 0.2 mL 취하고, 37°C에서 3분간 가온 한 후 thrombin 시약 0.1 mL를 가하여 응고하는데 걸리는 시간을 측정하였으며, 표준 검량선을 작성하여 fibrinogen 함량을 계산하였다(131).

### (6) APTT 측정

APTT(activated partial thromboplastine time)측정은 APPT Kit인 Coatron IV Plus(Teco co., Germany)로 사용하여 측정하였다.

### (7) 출혈시간(*bleeding time*) 측정

출혈시간은 Hornstra 방법(132)에 따라서 측정하였다. Sprague-Dawley 수컷 흰쥐에게 1일 1회 연속 8일간 우슬 에탄올 추출물을 200 mg/kg과 400 mg/kg의 용량으로 경구투여하였다. 다음날 마취 후 꼬리부분에서 5 mm되는 곳을 잘라 꼬리의 5 cm되는 곳까지 37.5°C로 유지된 생리식염수 용액에 넣은 후 지혈될 때까지의 시간(sec)을 측정했다. 출혈시간은 꼬리를 자른 직후부터 지혈될 때까지의 시간(sec)을 측정하여 평가하였다.

### (8) 출혈량(*OD value*) 측정

출혈시간을 측정 하는 동안 37.5°C로 유지된 생리식염수액이 담긴 용기에 모여진 혈액의 양을 측정하였다. 출혈이 멈춘 직후 꼬리를 뺀 후 시험관의 식염수와 혈액을 vortex로 5초간 섞어준 후 UV-spectrophotometer(Simadzu, Japan)를 사용하여 540 nm에서 혈액에 담긴 시험관의 흡광도를 측정하였다. 이때 대조군은 37.5°C로 유지된 식염수액으로 하였다. 흡광도 값의 증가는 출혈량의 증가를 의미하는 것으로 판정하였다(133).

### (9) 혈장 응고시간(*plasma recalcification time*) 측정

출혈량 증가 측정 실험에서 얻은 혈액 일부를 4,500 ×g에서 25분 동안 원심 분리 하여 혈장을 얻었다. 각 군의 혈장 100 μL과 50 mM CaCl<sub>2</sub> 50 μL를 가하여 섞은 후 가만히 들어 주면서 CaCl<sub>2</sub> 가한 후부터 혈장이 응고(하얀 실타래 모양)되기까지의 시간(sec)를 측정하여 평가하였다(134).

### (10) 전혈 응고시간(*whole bleeding time*) 측정

흰쥐를 마취시키고 0.38% sodium citrate 0.5 mL를 미리 넣은 플라스틱 주사기로 채취한 혈액 1 mL을 유리시험관에 넣고 1.7%  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  200  $\mu\text{L}$ 를 가하여 실온에서 서서히 흔들며 주면서 혈액 응고물(red thrombus)이 생길 때까지 시간(sec)을 측정하였다(135).

### (11) Hematocrit 측정

채취한 전혈을 Hematology Analyzer(Nihon Khden, Japan)을 이용하여 hematocrit치를 측정하였다.

## 다. 통계처리

본 실험에서 얻은 결과는 SPSS 10.1(Statistical package for the social science)P/C package를 이용하여 실험군당 평균과 표준오차를 계산하였고, 일원배치 분산분석(one-way, ANOVA)를 실시하였으며, 사후검정은 Tukey(T)-test에 의하여 실행하였다. 본 연구에 이용된 통계적 유의성 검증은  $\alpha < 0.05$  수준에서 이루어졌다.

## 제3장 실험결과 및 고찰

### 제1절 성분분석

#### 1. 일반성분

본 실험에 사용된 우슬에 함유된 일반성분 함량은 Tabel 15와 같다. 우슬의 각 일반성분 함량은 수분 16.26%, 조단백 18.27%, 조지방 2.99%, 조회분 14.01% 및 탄수화물은 48.48%였다. 이(30) 등도 우슬의 일반성분이 조회분 7.63%, 조단백 9.84%, 조지방 1.32% 및 탄수화물 20.65%로 보고하였다.

*Table 15. Proximate compositions of Achyranthis radix*

(%, dry basis)

<i>Items</i>	<i>Contents</i>
Moisture	16.26
Crude protein	18.27
Crude fat	2.99
Crud ash	14.01
Carbohydrate	48.48

## 2. 유리당 함량

우슬에 함유된 유리당 함량은 Table 16과 같이, fructose 0.935 mg%와 mannose 0.558 mg%의 함량이 많았고, glucose, manitol, galactose 순으로 소량의 당이 검출되었다.

*Table 16. Contents of free sugars in Achyranthis radix*

(mg%)

<b>Free sugar</b>	<b>Content</b>
Manitol	0.029
Fucose	-
Rhamnose	-
Galactose	0.004
Glucose	0.540
Mannose	0.558
Fructose	0.935
Ribose	-

## 3. 구성아미노산 함량

우슬의 아미노산 조성은 Table 17과 같다. 16종의 아미노산이 검출되었으며, 총 아미노산 함량은 8,908.27 mg%였다. 구성 아미노산의 경우 lysine, aspartic acid, glutamic acid, arginine, tyrosine 및 methionine 순으로 검출되었다. 필수 아미노산 함량은 lysine, arginine, methionine isoleucine threonine, histidine, valine 순으로 총 아미노산에 대한 필수아미노산의 비율은 45.75%였다.

*Table 17. Contents of total amino acids in Achyranthis radix*

(mg%)

<i>Amino acids</i>	<i>Content</i>
Aspartic acid	954.37
Threonine	456.19
Serine	605.38
Glutamic acid	841.36
Proline	526.18
Glycine	200.61
Alanine	81.76
Valine	25.66
Methionine	717.27
Isoleucine	559.05
Leucine	646.05
Tyrosine	723.06
Phenylalanine	420.95
Histidine	398.08
Lysine	989.08
Arginine	763.22
Total A.A.	8,908.27
Total E.A.A.	4232.61
E.A.A. %	45.75

#### 4. 지방산 조성

우슬의 지방산 조성은 Table 18과 같이 포화지방산량은 palmitic acid(C16:0) 43.12%로 가장 높았고, Stearic acid (C18:0) 40.73%, Oleic acid (C18:1n9c) 12.22%, myristoleic acid (C14:1) 0.65% 불포화지방산은 linoleic acid (C18:2n6c) 2.39%로 가장 많았다.

**Table 18. Composition of fatty acids of *Achyranthis radix***

<i>Fatty acid</i>	<i>Composition (%)</i>
Butyric Acid Methyl Ester(C4:0)	0.00
Caproic Acid Methyl Ester(C6:0)	0.00
Capric acid (C10:0)	0.00
Undecanoic acid (C11:0)	0.00
Lauric acid (C12:0)	0.00
Tridecanoic acid (C13:0)	0.00
Myristic acid (C14:0)	0.00
Pentadecanoic acid (C15:0)	0.00
Palmitic acid (C16:0)	43.12
Heptadecanoic acid (C17:0)	0.00
Stearic acid (C18:0)	40.73
Arachidic acid (C20:0)	0.00
Heneicosanoic acid (C21:0)	0.00
Behenic acid (C22:0)	0.00
Tricosanoic acid (C23:0)	0.00
<b><i>Lignoceric acid (C24:0)</i></b>	<b>0.00</b>
Saturates	83.85
Myristoleic acid (C14:1)	0.65
cis-10-Pentadecenoic acid (C15:1)	0.00
Palmitoleic acid (C16:1)	0.00
cis-10-Heptadecenoic acid (C17:1)	0.00
Elaidic acid (C18:1n9t)	0.00
Oleic acid (C18:1n9c)	12.22
cis-11-Eicosenoic acid (C20:1)	0.00
Erucic acid (C22:1n9)	0.00
<b><i>Nervonic acid (C24:1)</i></b>	<b>0.00</b>
Monoenes	12.87
Linolelaidic acid (C18:2n6t)	0.00
Linoleic acid (C18:2n6c)	2.39
cis-11,14-Eicosadienoic acid (C20:2)	0.00
cis-13,16-Docosadienoic acid (C22:2)	0.00
r-Linolenic acid (C18:3n6)	0.00
Linolenic acid (C18:3n3)	0.89
cis-8,11,14-Eicosatrienoic acid(C20:3n6)	0.00
cis-11,14-Eicosatienoic acid (C20:3n3)	0.00
Arachidonic acid (C20:4n6)	0.00
EPA (C20:5n3)	0.00
<b><i>DHA (C22:6n3)</i></b>	<b>0.00</b>
<b><i>Polyenes</i></b>	<b>3.28</b>
Total	100.00



## 5. 비타민 A 및 E 함량

우슬의 비타민 A와 비타민 E는 Table 19에 나타난 바와 같이 비타민 A 함량은 0.0187 mg%과 비타민 E 함량은 0.0004 mg%였다.

*Table 19. Contents of vitamin A and E in Achyranthis radix*

(mg%)

<i>Vitamin</i>	<i>Content</i>
A	0.0187
E	0.0004

## 6. 유기산 함량

우슬의 유기산 함량은 Table 20과 같이, oxalic acid가 1.049 mg%로 가장 많았고, malic acid는 0.058 mg%였으며 tartaric acid 와 citric acid는 검출되지 않았다.

*Table 20. Contents of organic acids in Achyranthis radix*

(mg%)

<i>Organic Acid</i>	<i>Content</i>
Oxalic acid	1.049
Malic acid	0.058
Formic acid	0.002
Succinic acid	0.001
Furmaric acid	0.001

## 7. 양 · 음이온의 함량

우슬의 양 · 음이온 함량은 나타낸 결과는 Table 21과 22와 같이, 양이온의 경우 potassium( $K^+$ ) 0.613 mg%로 가장 많았으며, sodium( $Na^+$ ) 0.031 mg% 많았다. 음이온의 경우 nitrate( $NO_3^-$ )가 0.613 mg%로 가장 높았고, sulfate( $SO_4^{2-}$ ), phosphate( $PO_4^{3-}$ ), chloride( $Cl^-$ ) 순이었으며 fluoride( $F^-$ )는 검출되지 않았다.

*Table 21. Contents of cations in Achyranthis radix*

(mg%)

<i>Cation</i>	<i>Content</i>
Lithium( $Li^+$ )	0.001
Sodium( $Na^+$ )	0.031
Ammonium( $NH_4^+$ )	0.003
Potassium( $K^+$ )	0.613
Magnesium( $Mg^{2+}$ )	0.001
Calcium( $Ca^{2+}$ )	0.001

*Table 22. Contents of anions in Achyranthis radix*

(mg%)

<i>Anion</i>	<i>Content</i>
Fluoride( $F^-$ )	-
Bromine( $Br^-$ )	0.002
Chloride( $Cl^-$ )	0.065
Nitrite( $NO_2^-$ )	0.005
Nitrate( $NO_3^-$ )	0.343
Phosphate( $PO_4^{3-}$ )	0.148
Sulfate( $SO_4^{2-}$ )	0.259

## 8. 무기질 함량

우슬의 무기질 함량은 Table 23과 같이, K의 함량이 가장 높았고 Mg, Ca 순이었다. 이(30) 등의 연구와 유사하게 무기질 중 K이 가장 많이 함유되어 있었으며, Ca 과 P 순이 였으나 본 조사에서는 P은 검출되지 않았고, 미량의 원소로 Al과 Na, Br 순으로 함유되어 있다고 보고되어 있다. 김(136) 등이 보고한 바에 의하면 사양토보다는 양토에서, 무피복 재배보다는 흑색비닐 피복재배에서, 수확시기가 빠른 것보다 12월 중순 정도로 늦어질수록, 재배 연수가 1년보다는 2년 재배 시 무기질 함량이 더 높게 나타난다는 보고가 있다. 이에 본 실험에서 사용한 우슬의 무기질 함량과는 다소 차이가 있는데 재배조건에 따라 차이가 있는 것으로 생각되어진다.

*Table 23. Contents of minerals in Achyranthis radix*

(mg%)

<i>Mineral</i>	<i>Content</i>
Ca	275.26
Fe	119.44
K	2588.00
Mg	281.30
Mn	10.43
Cu	0.75
Na	37.75
Zn	3.11

## 제2절 항산화 효능

### 1. *In vitro*에서 항산화 활성

#### 가. DPPH radical 소거작용

DPPH에 의한 항산화 활성 측정은 화합물이 DPPH radical에 전자를 공여함으로써 자유기를 소거하는 활성을 측정한 것으로(94) 우슬 에탄올 추출물의 분획별 소거능을 BHT를 600 ppm의 함량으로 비교하여 측정 결과는 Table 24와 같다. DPPH는 자신이 가지고 있는 홀수 전자 때문에 518 nm에서 강한 흡수 band를 보이나 phenolic 화합물과 같이 수소에 전자를 제공해주는 전자공여체와 반응을 하게 되면 전자나 hydrogen radical을 받아 phenoxy radical을 생성하게 된다. 따라서 흡수 band도 사라지게 되고 안정된 분자가 된다. 또한 공여된 전자는 비가역적으로 결합하여 그 수에 비례하여 진보라색의 DPPH의 색깔은 점점 없어지게 되고 흡광도도 감소하게 된다.

본 실험의 DPPH radical 소거능  $IC_{50}$ 은 n-butanol 분획이 31.09  $\mu\text{g/mL}$ , ethylacetate 분획이 55.61  $\mu\text{g/mL}$ , chloroform분획이 83.13  $\mu\text{g/mL}$ 로 특히, n-butanol 분획이 가장 뛰어난 것으로 나타났다. 유(137)의 연구에서 우슬의 n-butanol 분획은 silica gel column chromatography로 활성성분을 분리한 결과 oleanolic acid계 saponin인 chikusetsusaponin I Va을 동정되었다. 인삼을 비롯한 대두, 팥 등에 다량 함유된 saponin은 항산화 효과가 뛰어난 물질로 알려져 있다(20). 따라서 우슬의 n-butanol 분획이 항산화 효과가 가장 뛰어난 것으로 생각되어 진다. 그러나 n-hexane 분획과 water 분획은 DPPH free radical 소거능이 100  $\mu\text{g/mL}$  이상의 높은 농도에서도 소거능이 거의 없는 것으로 나타났다. 활성산소는 인체내에서 질병과 노화를 일으키는 원인물질로서, 활성산소의 항산화력 및 노화억제 작용의 척도로 평가할 수 있는데(138), 우슬 분획별 추출물의

DPPH free radical 소거 활성은 n-butanol과 ethylacetate 분획에 의한 것임을 알 수 있으며 그 활성 성분들은 비교적 극성이 큰 화합물임을 추정할 수 있다

#### 나. 항산화지수(*active oxygen method-AOM*)

우슬 에탄올 추출물 분획의 농도가 600 ppm이 되도록 soybean oil(sigma Co.)에 가하고 공기에 의한 지질 산패도를 측정하는 Rancimat(Metrohm model 679)으로 항산화지수를 측정한 결과는 Table 25와 같다. 각 시료를 첨가한 실험군에서 유지의 복잡한 산화과정 중 유도기간 마지막에 상당량의 저 분자량 휘발성 카보닐산이 유리되는 양을 측정한 것으로(139), 유도기간이 n-butanol 분획이 10.03시간 이었으며, AI는 1.43 이었다. 유도기간이 ethylacetate 분획은 8.59시간, chloroform 분획은 7.33시간 순으로 DPPH free radical 소거능과 비슷한 경향을 나타내었으며 따라서 n-butanol 분획에 항산화물질이 많이 이행된 것으로 생각된다.

#### 다. 아질산염 소거작용

산도를 pH 1.2, 4.2, 6.0으로 달리하여 우슬 분획 600 ppm 투여군과 대조군의 아질산염 소거작용을 측정하였는데 대조군으로는 합성항산화제인 BHT 600 ppm를 사용하였으며 결과는 Fig. 2와 같다.

각각의 pH 조건에서 아질산염 소거능은 전반적으로 비극성 용매의 추출물 보다는 극성 용매인 n-butanol 분획과 ethylacetate 분획에서 높았다. pH 1.2에서 대조군에 비해 n-butanol 분획은 48.66%로 높은 소거능을 나타내었다. 이는 합성 항산화제인 BHT와 비슷한 결과였다. pH 증가에 따라 각 분획의 소거능이 감소하였는데, 이는 nitrosamine 생성은 pH 의존적이며 아질산염 소거능 역시 강산성에서 높으며 pH가 높아질수록 감소하는 것으로 보인다는 보고와 유사한

경향 이었다(140,141). 실험에 제시된 pH 범위는 인체 내 위의 pH 변화를 고려한 것이다. 이는 식품 중에 존재하는 amine류와 반응하여 발암물질인 nitrosamine을 생성하는데 이 과정은 pH가 낮은 조건에서 쉽게 일어나는 것으로 알려져 있으며(142), 니트로화에 영향을 주는 nitrite는 nitrous acid(HNO<sub>2</sub>)를 형성하기 위해서 산성화되고 HNO<sub>2</sub>는 H<sub>2</sub>NO<sub>2</sub><sup>+</sup>으로 proton화되어 선택적으로 amide와 반응하여 nitrosamine를 형성한다. 이러한 산성화 과정 때문에 니트로화반응은 주로 생체 내 위에서 발생한다. 연구 결과에 의하면 아질산염 소거능이 인체의 위내 pH 조건과 비슷한 pH 1.2에서 가장 우수한 것으로 측정되어 우슬 n-butanol 분획은 생체 내에서도 효과적인 아질산염 소거작용을 통해 nitrosamine 생성을 억제 할 것으로 생각되어지며, 이상의 결과를 통해 아질산염이 많은 채소류와 가공식품을 함께 섭취함으로써 체내 니트로사민 생성을 감소시킬 수 있으리라 사료된다(143).

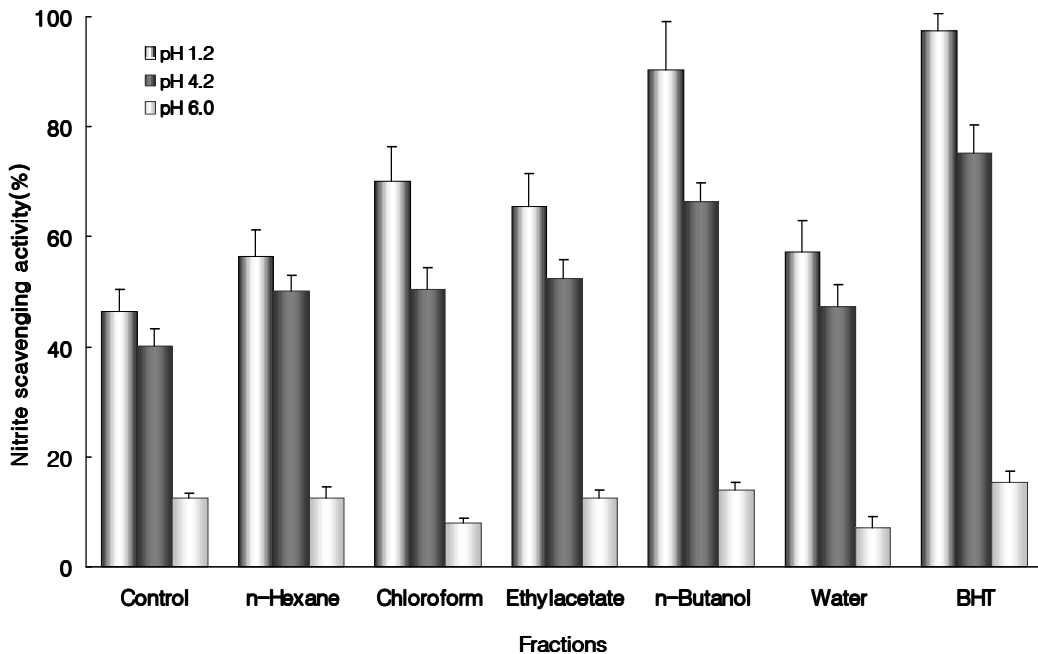


Fig. 2. Nitrite scavenging activity of AREE fractions under different area in pH 1.2, 4.2 and 6.0 conditions

**Table 24. Scavenging effects of AREE fractions on DPPH radical**

<b>Fraction</b>	<b>IC<sub>50</sub>(µg/ml) <sup>1)</sup></b>
Control	0.00
n-Hexane	>100
Chloroform	83.13
Ethylacetate	55.61
n-Butanol	31.09
Water	>100
BHT <sup>2)</sup>	15.38

<sup>1)</sup> Inhibitory activity was expressed as the mean of 50% inhibitory concentration of triplicate determines, obtained by interpolation of concentration-inhibition curve.

<sup>2)</sup> BHT: butylated hydroxytoluene

**Table 25. Antioxidative activities of AREE fractions on soybean oil**

<b>Fraction<sup>1)</sup></b>	<b>IP<sup>2)</sup></b>	<b>AI<sup>3)</sup></b>
Control	7.01	1.00
n-Hexane	7.13	1.02
Chloroform	7.33	1.05
Ethylacetate	8.59	1.26
n-Butanol	10.03	1.43
Water	7.21	1.03
BHT	12.11	1.70

<sup>1)</sup> Fractions were separated by separatory funnel.

<sup>2)</sup> Induction period(IP) of oil was determined by Rancimat's test at 110°C.

<sup>3)</sup> Aantioxidant index(AI) was expressed as IP of oil containing various fraction/IP of soybean oil.

## 라. 지질과산화 억제작용

우슬 에탄올 추출물 분획 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 대조군인 BHT 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 지질과산화물에 대한 억제작용은 Fig. 3과 같다. Linoleic acid에 각각의 분획을 40°C에서 6일간 첨가한 후 TBA값 변화를 532 nm에서 측정하였다. 대조구는 4일과 6일에 0.532와 0.554이었고, 합성 항산화제인 BHT 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 은 0.121와 0.123으로 대조구에 비해 각각 77.25%와 77.79% 감소함을 알 수 있었다. 우슬 분획의 함량을 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 첨가하였을 때 전자공여능에서 가장 좋은 소거능을 보여주었던 n-butanol 분획의 경우 4일과 6일 후 0.301과 0.445로 다른 분획과 비교시 지질과산화억제효과는 나타났으나, BHT에 비해서는 훨씬 떨어지는 것으로 나타났다. 이는 전자 공여능이 크다고 해서 반드시 지질과산화억제 활성이 높지 않음을 의미하는데, 이는 정(144) 등의 연구 결과와 일치하였다.

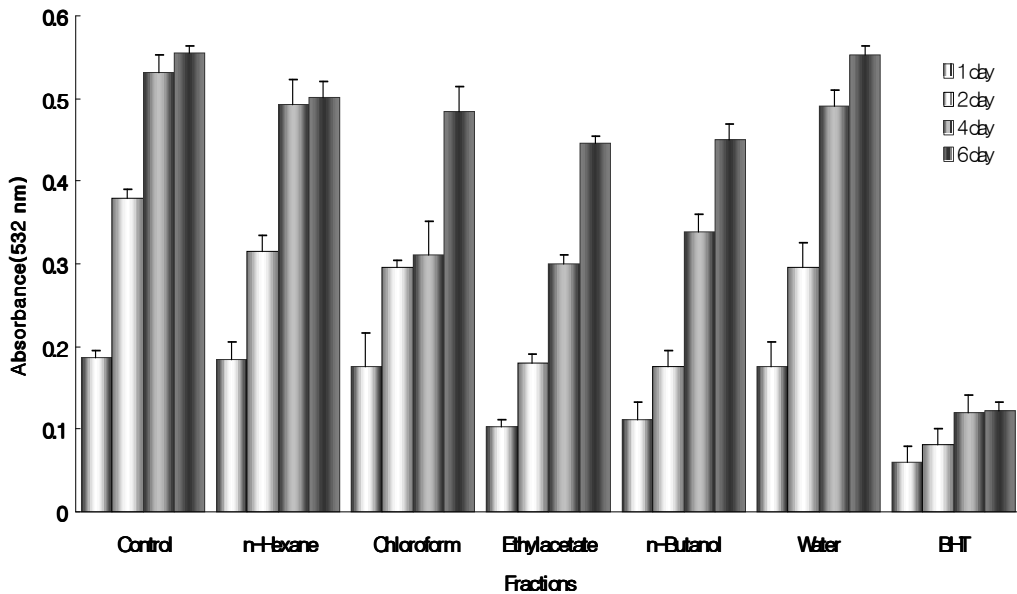


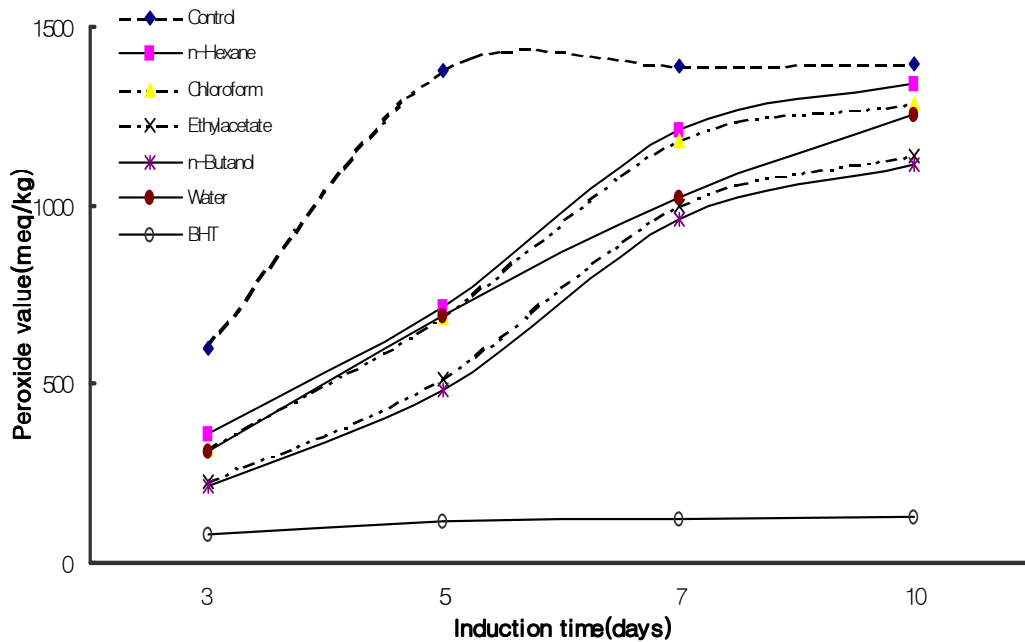
Fig. 3. TBA value in linoleic acid substrate containing of AREE fractions on during storage at 40°C



## 마. *Linoleic acid*에 대한 항산화 작용

우슬 분획을 600 ppm 첨가하여 *linoleic acid* 50°C에서 일정기간 동안(3, 5, 7, 10일) 저장시킨 후 생성된 과산화물가(peroxide value, POV)를 측정헌 결과는 Fig. 4와 같다. 인체에서 불포화지방산이 산화되면 과산화물이 생성되고, 이 과산화물은 자동산화기구를 촉진하여 반응성이 큰 free radical을 생성하는데 영향을 미친다(145). 생약 추출물에 의한 합성 항산화제의 대체 가능성을 제시하기 위해서는 시료에 함유된 복잡하고 다양한 성분들의 상호작용이나 항산화 활성의 발현은 여러 반응계의 서로 다른 조건의 영향에 따라 변화 될 것으로 예상되기 때문에 기질의 종류 및 불포화도에 따른 적절한 항산화제 등의 다양한 조건의 항산화 활성 측정법을 병행하면서 평가해야 한다.

*Linoleic acid*를 기질로 한 항산화 활성을 측정한 결과 3일간 저장한 우슬 에탄올 추출물 분획의 과산화물가는 n-butanol 분획은 214 meq/kg, ethylacetate 분획은 224 meq/kg, water 분획은 320 meq/kg이었다. 5일, 7일 10일간 저장한 경우에는 분획별 과산화물가 생성 순위는 3일간 저장한 경우와 유사한 경향을 보였다. 이러한 결과는 본 실험의 측정 방법이 다른 DPPH radical 소거작용에서도 동일하게 나타냈으며, DPPH radical 소거 활성이 강할수록 항산화 효과가 높다는 이전의 연구결과 들과도 유사한 결과였다(146, 147).



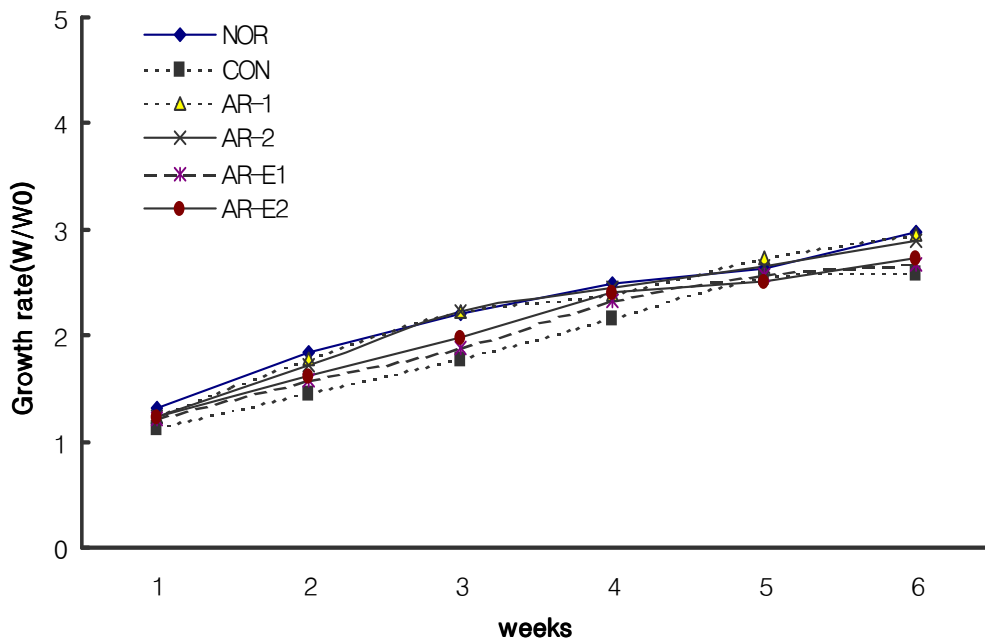
*Fig. 4. Autoxidation rate of linoleic acid on added fractions of AREE during incubation at 50°C for 10 days*

## 2. *In vivo* 에서 항산화 효능

### 가. 체중증가율, 식이효율 및 간무게

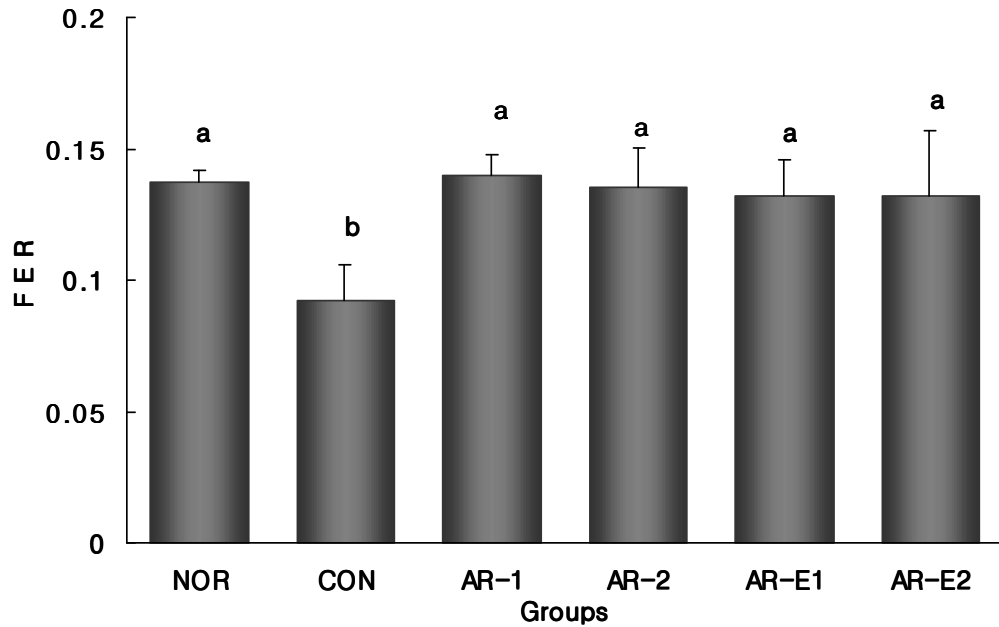
우슬 에탄올 추출물과 알코올을 6주간 경구투여하여 측정된 흰쥐의 체중증가율 및 식이효율은 Fig. 5, 6과 같다.

6주간의 체중증가율은 대조군이 정상군에 비하여 현저히 감소되었고, 알코올과 우슬 에탄올 소량(200 mg/kg) 및 다량 병합 투여군(400 mg/kg)은 알코올투여로 감소된 체중을 정상군에 근접토록 유의하게 증가시켰으나 투여량에 따른 변화는 나타나지 않았다. 식이효율은 대조군이  $0.092 \pm 0.014$ 로 정상군  $0.137 \pm 0.005$ 에 비하여 유의적으로 저하되었으나, 우슬 에탄올 단독 혹은 병합 투여한 군들은 정상군의 식이효율에 유사하게 증가되었다. 그러나 우슬 에탄올 추출물 용량별 병합 투여 시 알코올 단독투여로 인한 식이섭취의 감소와 체중증가 감소 영향을 완화시킴을 알 수 있었다. 이러한 결과는 쥐에게 7% 알코올을 음용수에 첨가시켜 섭취시킨 결과 체중이 대조군에 비해 유의하게 감소하였다고 한 Rothwell과 Stock(148)의 연구 결과와 다량의 알코올을 만성적으로 섭취한 환자를 대상으로 한 실험에서 알코올 섭취 시식이 섭취량의 감소와 여러 영양소의 흡수장애로 체중감소를 초래했다는 Liber와 Decarli(149)의 보고와도 일치하였다. 또한 알코올군의 체중감소는 식이 섭취량의 감소뿐만 아니라 알코올 자체의 독성효과로 인한 소화율 감소, 영양소의 흡수 장애, 그리고 고농도의 에탄올 섭취로 인한 에너지 소모가 증가했기 때문인 것으로 사료된다(150).



*Fig. 5. Growth rate in alcohol and/or AREE administered rats*

Abbreviations : Growth rate ( $W_1/W_0$ ) : ratio of the body weight ( $W_1$ ) to initial body weight ( $W_0$ ). See the legend of Table 10.



*Fig. 6. FER in alcohol and/or AREE administered rats*

Abbreviations: FER(feed efficiency ratio) : the total amount of weight increased/the total intake of food. See the legend of Table 10. Values are mean  $\pm$  S. E of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey(T)-test.

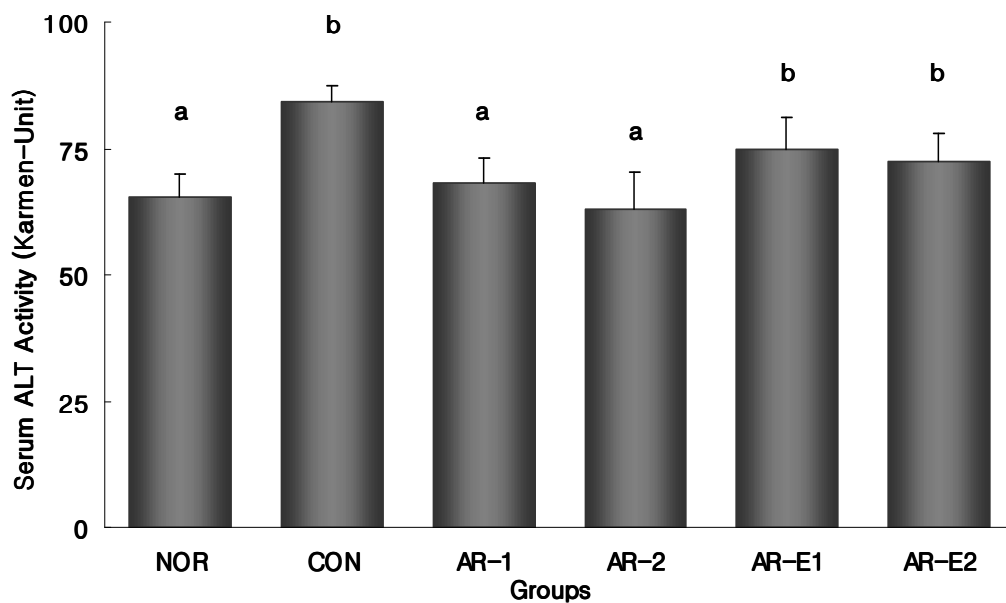
## 나. 혈청 ALT, AST 및 ALP 활성

각 실험군의 혈청 ALT 활성 변화는 Fig. 7과 같다. 혈청 ALT 활성은 우슬 에탄올 추출물 단독 투여군인 AR-1군과 AR-2군은 정상군과 비교시 차이가 없었으나, 에탄올 단독 투여한 대조군은 정상군에 비해 77.34% 증가 하였다. 에탄올과 우슬 에탄올 추출물의 병합 투여한 군은 대조군에 비하여 혈청 ALT 활성은 감소하는 경향을 나타냈으나 유의적인 차이는 없었다.

혈청 AST 활성은 Fig. 8에 나타난 바와 같이 대조군( $167.28 \pm 12.59$ )은 정상군( $123.56 \pm 11.08$ )에 비해 26% 증가되었고, 우슬 에탄올 추출물을 병합 투여 한 AR-E1군( $145.28 \pm 16.08$ )과 AR-E2군( $139.32 \pm 15.09$ )은 대조군에 비해 각각 13%와 16.7% 감소되었다. 특히 우슬 에탄올 고용량 투여군에서 유의적으로 저하되어 용량별 차이를 알 수 있었다.

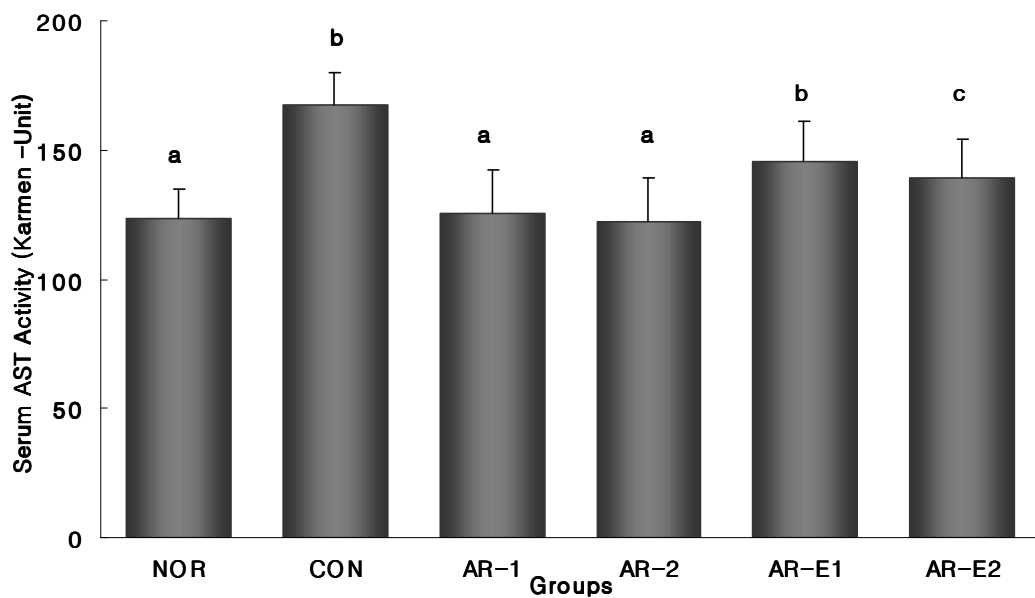
ALP 활성은 Fig. 9와 같이 대조군은 정상군에 비해 22.07% 증가되었으며, AR-E1군과 AR-E2군은 대조군에 비하여 각각 9.4%와 11.24% 감소되었다.

간조직 손상의 지표로 이용되고(151) 있는 혈청 중 AST, ALT 및 ALP 활성이 에탄올 단독 투여로 정상군에 비하여 활성 증가를 나타낸 결과는 안(152) 등의 연구 결과와 동일하며, 이 결과는 에탄올이 간의 대사과정에 작용하여 대사 이상을 초래함으로써 간세포 손상이 증가되었음을 알 수 있으며, 에탄올에 의한 간세포 손상이 우슬 에탄올 추출물 투여로 점차 회복되어 가는 것으로 생각되어진다.



*Fig. 7. Activity of ALT in the serum of rats administered alcohol and/or AREE*

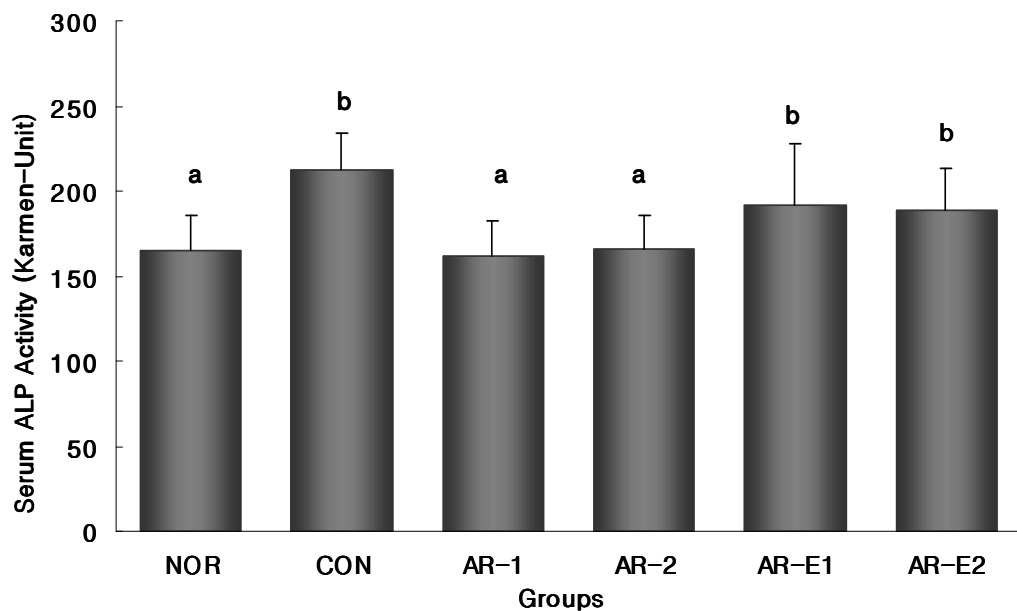
Abbreviations: See the legend of Table 10. Values are mean  $\pm$  S. E. of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey(T)-test.



*Fig. 8. Activity of AST in the serum of rats administered alcohol and/or AREE*

Abbreviations: See the legend of Table 10. Values are mean  $\pm$  S. E. of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey(T)-test.





*Fig. 9. Activity of ALP in the serum of rats administered alcohol and/or AREE*

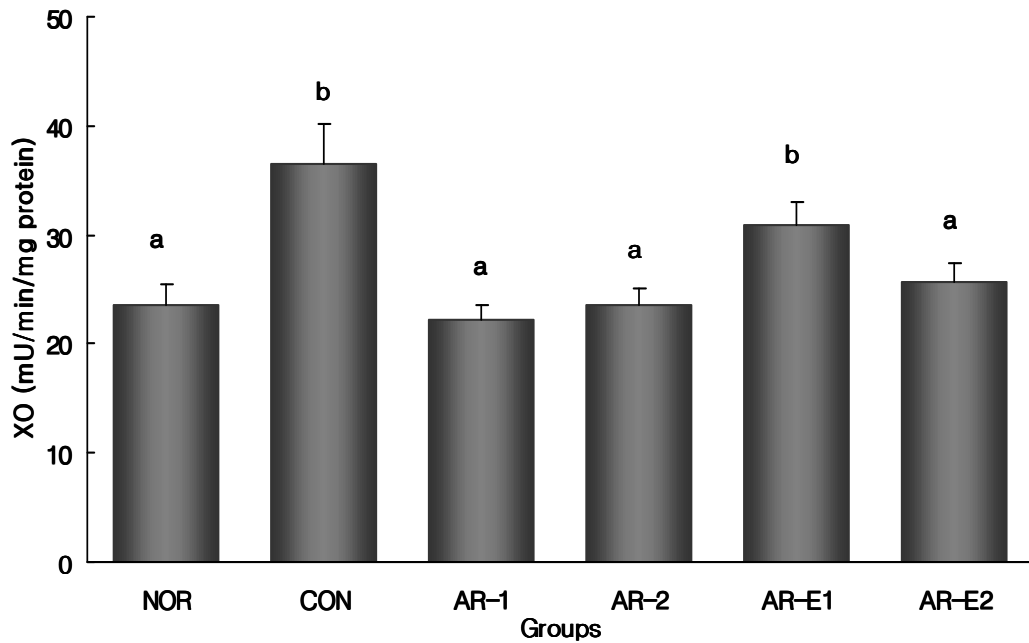
Abbreviations: See the legend of Table 10. Values are mean  $\pm$  S. E. of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey(T)-test.

## 다. 간조직의 항산화효소 활성

### (1) XO 활성

Xanthine을 기질로 하여 요산을 생성하는 과정에서 superoxide radical을 생성하는 효소로 알려진 XO 활성을 간조직에서 측정한 결과는 Fig. 10과 같다.

XO는 생체내에서 퓨린대사에 관여하는 효소로서 xanthine 또는 hypoxanthin 으로부터 요산을 형성하며, 요산이 혈장내 증가되면 골절에 축적되므로 통증을 동반하는 통풍을 일으키는 효소로 잘 알려져 있다(153,154). 간조직 XO 활성은 알코올을 단독 투여한 대조군( $36.41 \pm 3.69$ )이 정상군( $23.55 \pm 1.65$ )과 우슬만을 단독 투여한 군인 AR-1군( $22.11 \pm 1.44$ ) 및 AR-2군( $23.52 \pm 1.63$ )에 비해 XO 활성이 64.68% 정도 증가되는 경향을 보였으며, 이는 에탄올을 실험동물에 만성적으로 투여 시 XO 활성이 증가된다는 보고와 일치하였다(155). 또한 대조군의 알코올 투여로 증가된 XO 활성은 알코올과 우슬 병합 투여 후 감소되는 경향을 보였으며, 특히 우슬 고용량 투여군인 AR-E2군에서 대조군에 비해 29.7%의 유의적인 활성 감소가 있었다. 이는 알코올을 실험동물에 만성적으로 섭취시킬 때 XO 활성의 증가로 oxygen free radical 생성되었으며, 우슬 에탄올 추출물 투여 후 free radical의 생성을 감소시킨 것으로 생각된다.



*Fig. 10. Activity of XO in the liver of rats administered alcohol and/or AREE*

Abbreviations : See the legend of Table 10. Values are mean  $\pm$  S. E. of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey(T)-test.

## (2) 간조직의 SOD, catalase 및 GSH-Px 활성

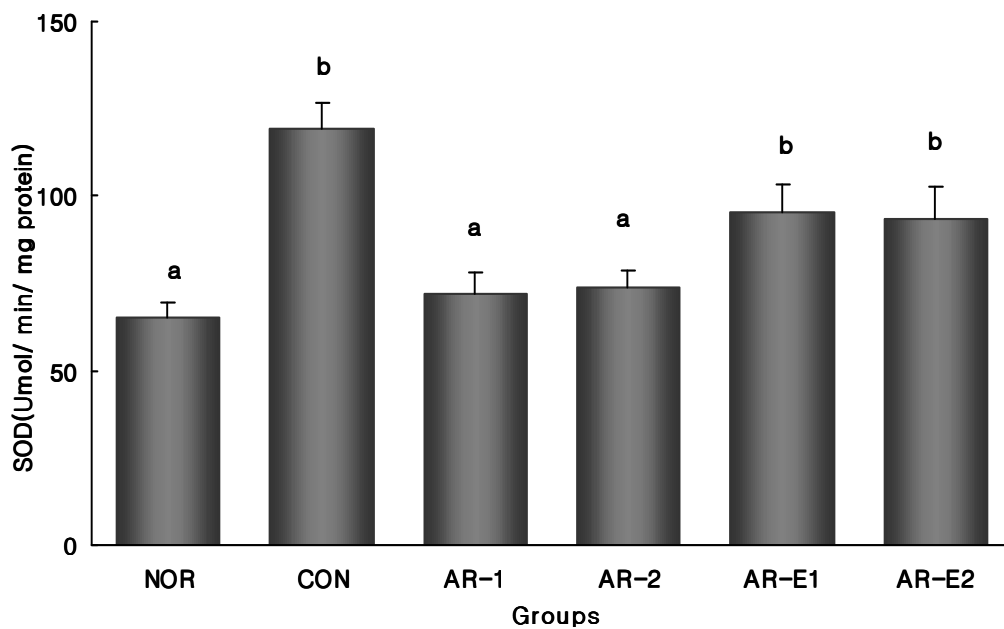
우슬 에탄올 추출물이 유해산소 해독에 관여하는 생체 내 항산화체계 효소인 SOD, catalase 및 GSH-pX 활성을 측정된 결과는 Fig. 11-13과 같다. 생체 내 항산화 방어기구인 항산화체계 효소들은 hydrogen ion과 superoxide radical을  $H_2O_2$ 로 전환되는 반응을 촉매하며 산소독 으로부터 생체를 보호한다(156-160). 간조직의 SOD은 정상군( $65.23 \pm 4.51$  units/mg protein)에 비해 대조군( $118.96 \pm 10.42$  units/mg protein)은 알코올 투여로 인하여 54.83% 증가되었다. 대조군에 비해 우슬 에탄올 추출물을 병합 투여시 SOD 활성이 감소되었으나 유의적인 차이는 없었다. 에탄올 투여시 체내 SOD는 구성성분인 Cu, Mn 및 Zn 등 미량원소의 고갈에 의해 활성이 감소된다는 연구 결과도 있지만(161), 에탄올을 급성 또는 만성 투여 후 mitochondria superoxide의 증가로 인하여 SOD 활성이 증가된 것으로 사료된다(162). 이는 SOD가 활성산소( $O_2^-$ )를  $H_2O_2$ 와  $O_2$ 로 전환시켜 활성산소에 의해 생긴 산화적 손상을 일차적 방어에 관여하며 비정상적으로 증가된 활성산소를 제거하기 위해 그 활성도가 높아진다는 Crapo(163,164) 등의 보고와 일치 하였다.

조직의 catalase는 대사과정 중 발생하는 활성산소종의 유리기를 제거할 뿐만 아니라, 이들 활성산소에 의해 그 활성이 비가역적으로 불활성화 될 수 있다고 알려져 있다(165). Catalase는 세포내 소포체에서 합성되며, 골지체로 이동 부착되어 세포내 peroxisome에 존재하고, 체내에서 지방의 자동산화 및 유기물의 산화로 생성된  $H_2O_2$ 를 분해 및 소거하여 무독화 시키는 효소로  $H_2O_2$ 의 농도가 높을 때 주로 작용하며 SOD에 비해 산화적 손상에 다소 민감하게 반응하는 것으로 보고되어 있다. Catalase 활성은 알코올을 단독 투여한 대조군( $402.30 \pm 21.45$  units/mg protein)이 정상군( $241.03 \pm 18.56$  units/mg protein)에 비해 59.9% 증가되었으며, 이는 SOD의 작용에 의해 생성된  $H_2O_2$ 를 분해하기 위해 catalase의 활성이 증가된 것으로 생각된다(21). 우슬 에탄올 추출물의 병합 투

여한 군인 AR-E1군( $381.45 \pm 19.21$  units/mg protein)과 AR-E2군( $366.25 \pm 16.01$  units/mg protein)은 감소되었으나 유의적인 차이는 보이지 않았다.

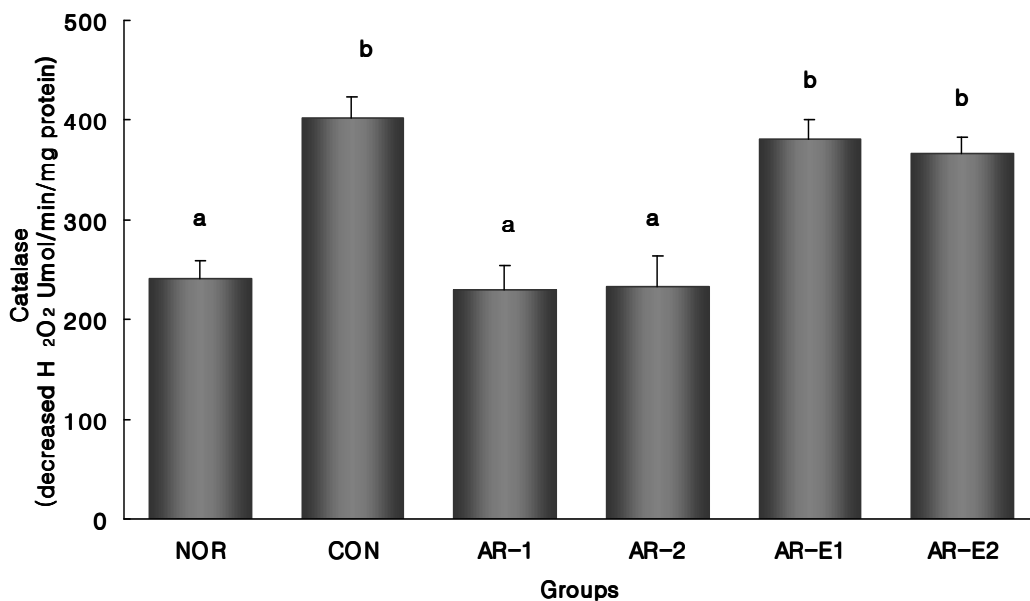
GSH-Px는  $H_2O_2$ 와 환원형 GSH의 반응에 관여하여 산화형 GSSG을 생성하며 이 GSSG는 GSSG reductase의 도움으로 NADPH에 의해 다시 GSH로 환원되는데 catalase와 기능은 비슷하지만 생체내 분포 부위가 다르다(166,167). 간조직 중  $H_2O_2$  농도가 낮을 때에도 작용하며, Se를 함유하는 항산화 효소로 비타민 E와 함께 과산화물을 제거함으로써 세포막의 손실을 방어한다. 간조직의 GSH-Px 활성(168)은 대조군이  $130.56 \pm 15.82$  units로 정상군의  $88.61 \pm 10.23$  units에 비하여 64.49% 증가 되었고, 우슬 에탄올 추출물을 단독 투여한 AR-E1군은  $121.04 \pm 14.27$  units, AR-E2군은  $97.31 \pm 13.20$  units 대조군에 비해 감소하였다. 특히 고용량 투여군은 25.5%로 유의적인 감소를 나타내었다. 이러한 결과는 일반적으로 만성 에탄올 투여시 GSH-Px 활성이 증가된다는 고 등의(169) 연구와 같으며, 이는 GSH-Px가 체내 물질 대사 중 발생하는 과산화물을 환원하는 항산화 효소로서 에탄올의 산화작용으로 인해 증가되는 산화물들을 환원하기 위한 것으로 보고 되어있으며(170), 이러한 결과는 알코올의 섭취가 간조직 내 GSH의 단백질 양을 감소시키고, 이차적으로 free radical 생성에 의한 지질과산화 반응을 일으킨다는 보고(171-173)와 관련됨을 보여준다. 따라서 간조직 내 과산화물 생성이 감소되는 것으로 확인되었으며 우슬 에탄올 추출물이 체내 산화적 손상을 예방하는 항산화 효과를 갖을 것이라 사료된다.

알코올 투여시 산화적 스트레스에 의한 free radical 발생이 증가함에 따라 세포의 환경을 보호하기 위하여 각 효소들 활성이 증가되었다고 사료되며, 증가된 효소의 활성이 우슬을 병합 투여한 군들인 AR-E1군과 AR-E2군은 대조군에 비하여 유의적 감소효과를 나타내어 항산화제로의 활용성과 간보호 기능으로서의 가능성을 기대해 본다.



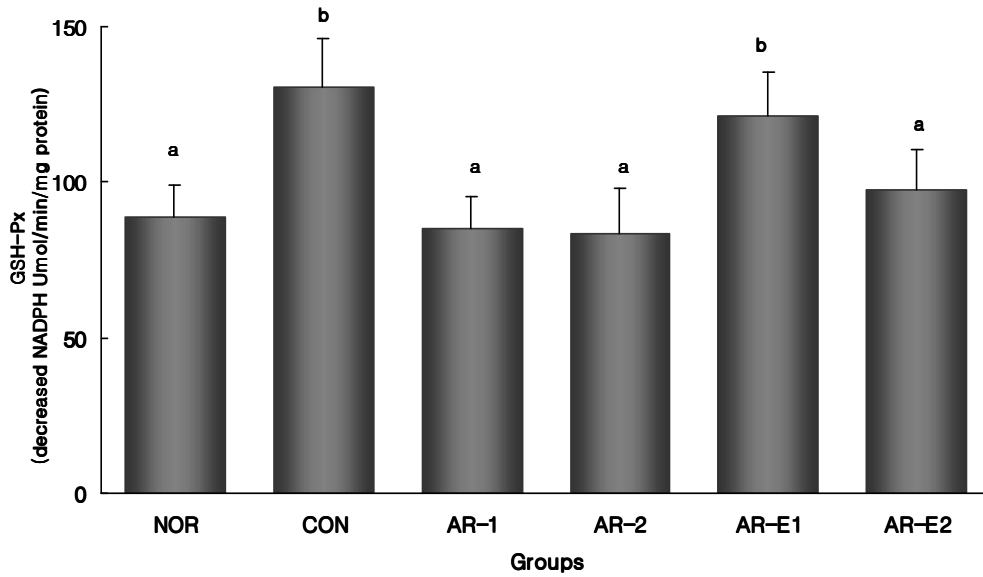
*Fig. 11. Activity of SOD in the liver of rats administered alcohol and/or AREE*

Abbreviations : See the legend of Table 10. Values are mean  $\pm$  S. E. of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey(T)-test.



*Fig. 12. Activity of catalase in the liver of rats administered alcohol and/or AREE*

Abbreviations: See the legend of Table 10. Values are mean  $\pm$  S.E of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey(T)-test.



*Fig. 13. Activity of GSH-Px in the liver of rats administered alcohol and/or AREE*

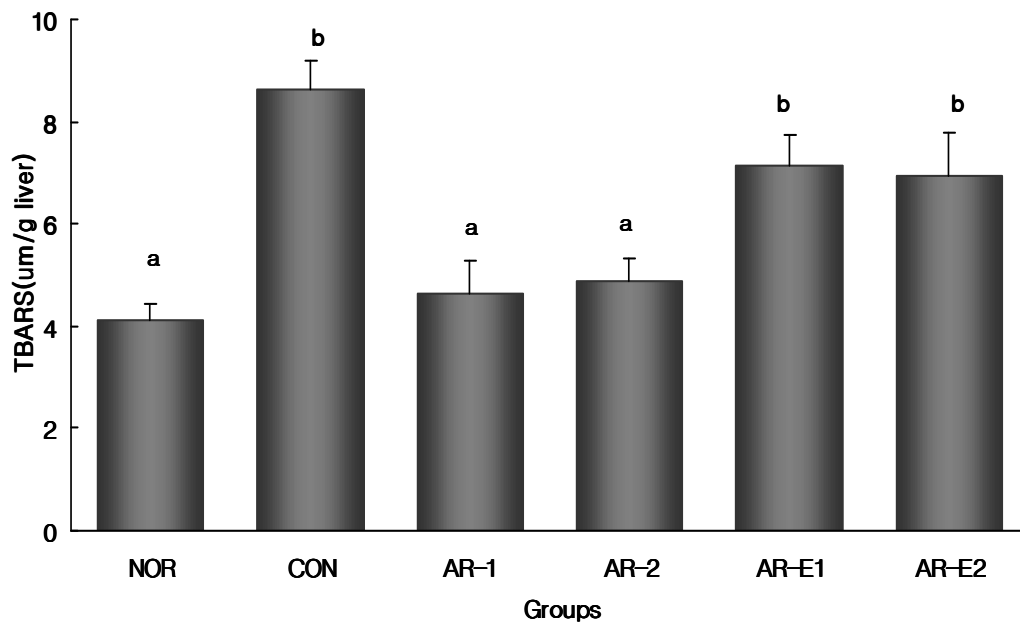
Abbreviations: See the legend of Table 10. Values are mean  $\pm$  S.E of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey(T)-test.



## 라. 간조직의 과산화지질 함량

우슬 에탄올 추출물 200 mg/kg과 400 mg/kg 및 알코올을 6주간 단독 혹은 병합 투여 후 흰 쥐 간조직의 과산화지질 함량은 Fig. 14와 같다.

지질과산화 반응은 생리 조건이 정상인 상태에서는 방어체계의 조절에 의하여 free radical의 생성과 억제의 균형이 유지되어 지질과산화 반응으로 기인된 손상은 일어나지 않지만(174), 세포내 산화적 자극이 증가하여 free radical의 생성 증가나 항산화 방어체계 능력의 감소가 일어났을 때는 생체에 심각한 독성을 나타내게 된다. 일반적으로 지질과산화물의 생성은 병태생리 현상이나 조직의 손상 정도를 나타내는 지표로 생체막 구성 성분인 인지질의 불포화지방산은 활성 산소종과 같은 free radical에 의해 과산화반응이 시작되어 연쇄적으로 진행되며, 지질과산화 반응은 세포막의 투과성을 항진시킬 뿐만 아니라 전반적인 세포독성을 나타내며 노화 현상이나 이에 따른 여러 가지 질환의 병리 현상을 초래하는 것으로 알려져 있으며 해독 기구의 작용으로 무독화 된다고 한다. 본 실험에서 지질과산화 반응 물질인 MDA를 나타내는 TBARS함량은 알코올 단독 투여한 대조군( $10.06 \pm 0.57 \mu\text{m/g liver}$ )이 정상군( $6.36 \pm 0.32 \mu\text{m/g liver}$ )에 비하여 40% 증가되었다. 또한 우슬 에탄올 추출물 고용량 투여군은 ( $8.95 \pm 0.62 \mu\text{m/g liver}$ )로 알코올 투여로 증가된 간조직 중의 과산화지질 함량을 대조군에 비해 11% 감소시켰다. 이는 급성 혹은 만성적인 알코올 투여로 알코올 부산물인 acetaldehyde와 다양한 free radical 생성 증가에 의한 것으로 acetaldehyde가 세포질내에서 XO와 작용하여 부산물로 superoxide 생성을 증가시키고 증가된 superoxide가 세포막의 불포화지방산과 결합하여 지질과산화물이 증가한다는 보고(175,176)와 일치하였다. Yoon과 Rhee(177)는 체내 항산화 물질인 GSH 함량이 증가되는 등 방어기구가 강화되어 과산화지질 함량은 감소된다고 하였으며 본 연구에서도 에탄올과 우슬 병합 투여군이 에탄올 단독 투여군보다 과산화지질 함량이 감소되었다.



*Fig. 14. Content of TBARS in the liver of rats administered alcohol and/or AREE*

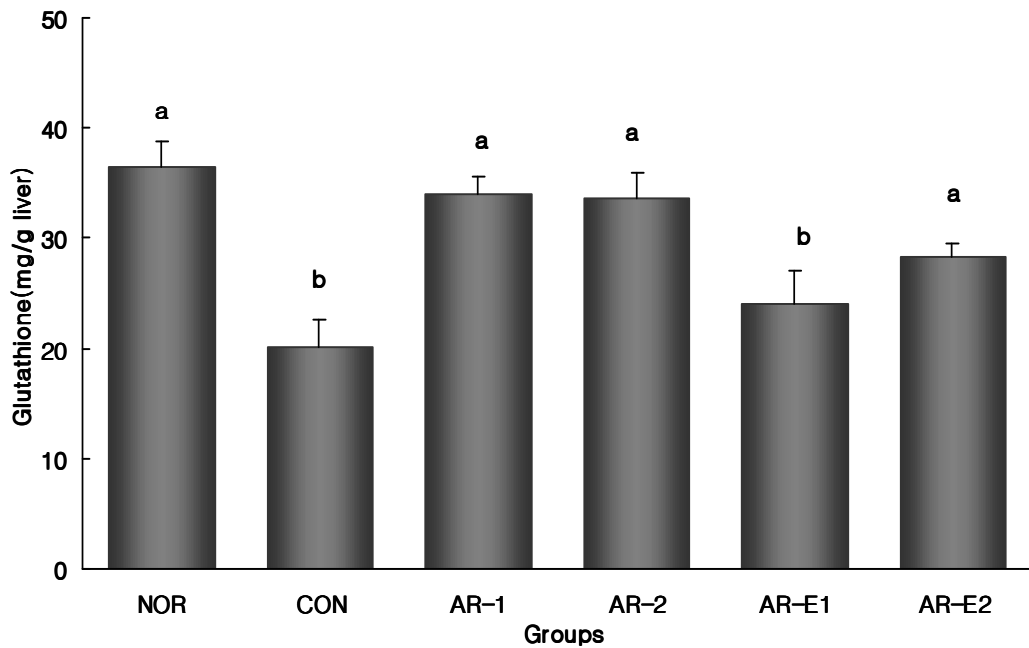
Abbreviations: See the legend of Table 10. Values are mean  $\pm$  S.E of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey(T)-test.

## 마. 간 조직 중 GSH 함량

GSH는 cytochrome c의 환원 속도를 저하시켜  $O_2^-$ 에 대하여 소거효과를 발현하며, nonprotein thiols의 대부분을 차지하며, 비교적 안정한 thiol radical( $GS^-$ )을 생성시켜서 유리기를 제거하는 외에도 이물질과의 포합형성, 과산화지질 형성 과정 중 생성되는 hydroperoxide의 제거 작용을 한다(178). Free radical의 scavenger로 GSH-Px의 기질이 되며, 많은 세포에서 높은 함량으로 존재함으로써 방어에 도움을 주고 높은 산소 농도에 노출이 됨으로써 활성이 없어지는 효소를 재생시킬 수 있는 것으로 세포내 항산화제들 중에서도 가장 중요한 역할을 담당하고 있다. 또한 조직이 과량의  $H_2O_2$  또는 hydroxyl radical에 노출되면 GSH/GSSG의 비율이 정상적인 높은 수치를 유지하지 못하고 GSSG가 축적된다. GSSG는 많은 효소들의 -SH와 결합하여 효소들을 불활성화 시키게 된다(179).

에탄올을 투여한 간조직의 GSH 함량은 Fig. 15와 같이, 대조군이  $20.14 \pm 2.47$  nmole/mg protein에 비해 정상군의  $36.482 \pm 2.35$  nmole/mg protein과 시료 단독 투여군인 AR-1군의  $34.04 \pm 2.47$  nmole/mg protein과 AR-2군의  $33.71 \pm 1.58$  nmole/mg protein에 비해 44.79% 감소되었다. 에탄올은 epinephrine, corticosteroid, glucagon 등의 호르몬 분비를 촉진하여 간으로부터 GSH의 유출을 증가시키므로 조직 내 GSH 감소가 일어나며, 이차적으로는 free radical에 의한 지질과산화 반응을 유도하는 것으로 알려져 있다(180). Speisky 등(171)의 연구에 의하면 간조직 중에서 GSH 고갈이 가능한 기전으로는 항산화 작용으로 소모되는 것 이외에도 acetaldehyde와 GSH가 결합한다고 설명하였다. 에탄올과 우슬 에탄올 추출물을 병합 투여한 군들인 AR-E1군( $24.02 \pm 3.01$  nmole/mg protein)과 AR-E2군( $28.33 \pm 1.22$  nmole/mg protein)은 대조군에 비해 각각 16.15%와 28.90% 증가되었다. 본 실험결과 GSH 함량은 에탄올 투여로 감소되어지고 간조직의 GSH-Px 활성은 가장 높았는데 간손상 시 GSH-Px 활성이 증가하여 GSH의

방출이 많이 지므로 조직의 GSH 함량이 감소한다는 Lee 등의(181) 보고와 일치한다. 또한 에탄올 단독 투여군보다 에탄올과 우슬 병합 투여군인 AR-E1군과 AR-E2군의 GSH 함량이 증가된 것은 우슬 에탄올 추출물 투여가 에탄올에 의해 생성된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 등의 free radical(182)을 소거하여 GSH-Px 소모가 줄어들었으므로 GSH 소모량도 줄어들어 나타난 결과로 사료되어지며(183-185), 이는 간조직의 보호에 도움을 줄 수 있는 가능성을 제시해 준다.



*Fig. 15. Content of GSH in the liver of rats administered alcohol and/or AREE*

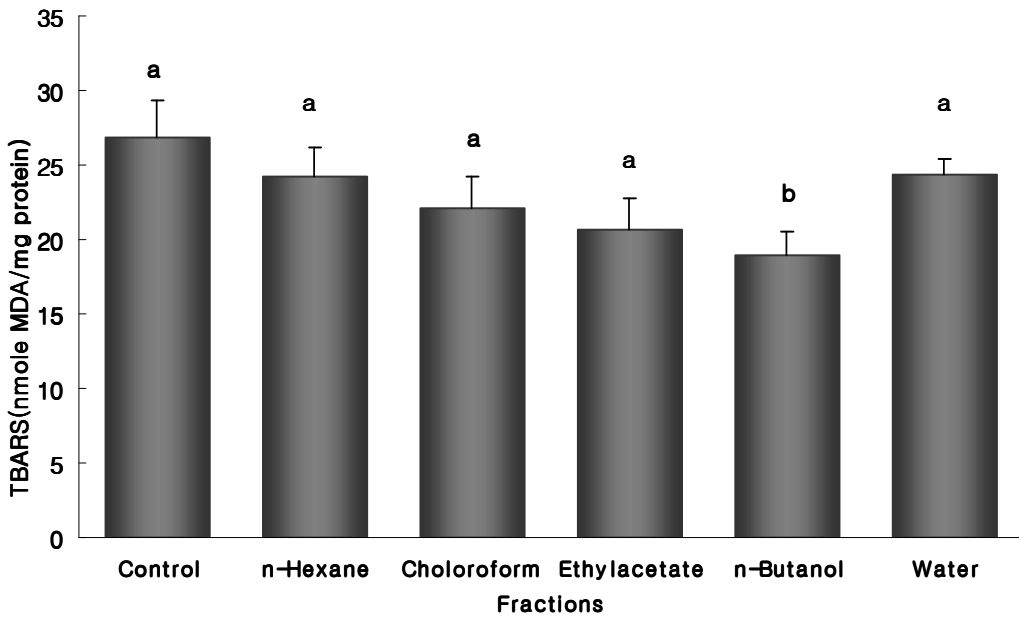
Abbreviations: See the legend of Table 10. Values are mean  $\pm$  S.E of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey(T)-test.

### 제3절 고지혈증 억제 효능

#### 1. *In vitro* 에서 고지혈증 억제 효과

##### 가. LDL에 대한 항산화 효과

산화된 LDL(oxidized LDL)에 대한 우슬 에탄올 추출물 분획별 항산화 효과는 Fig. 16과 같다. 산화된 LDL에 대한 항산화 효능은 TBARS 함량 측정을 통해 실시하였다. TBARS 함량은 대조군이 26.8 nmole MDA/mg protein였으며, 우슬 에탄올 추출물 계통별 분획들은 n-hexane 분획은 24.2 nmole MDA/mg protein, chloroform 분획은 22.1 nmole MDA/mg protein, ethylacetate 분획은 20.6 nmole MDA/mg protein, n-butanol 분획은 18.94 nmole MDA/mg protein 및 water 분획은 24.37 nmole MDA/mg protein으로 대조군에 비해 저하되었다. 분획 중 n-butanol 분획의 TBARS 함량은 대조군에 비해 26.82% 억제되었다. 혈장의 산화된 LDL과 같은 지질과산화물은 혈관 내피 세포를 손상시키고 그에 따라 유리되는 여러 인자들에 의해 혈소판이 활성화 되는 것으로, 본 실험에서 우슬 에탄올 추출물의 계통별 분획의 항산화 활성이 산화된 LDL 내의 지질과산화 물질의 축적으로 일어나는 각종 연쇄반응을 억제함으로써 세포 의존성 동맥경화의 초기단계를 예방할 수 있는 기능성 물질로 이용할 수 있음을 시사해 주고 있다.



*Fig. 16. Inhibitory activity on human low density lipoprotein(LDL) oxidation of AREE fractions on LDL oxidation*

LDL was incubated with 16  $\mu\text{M}$   $\text{Cu}^{2+}$  at 37°C under air for 2 hrs in the presence of 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  concentrations of fractions of AREE. The reaction mixture was stopped by adding 3 mL of TBA-TCA-HCl solution, and then the solution was heated at 95°C for 30 min. After centrifugation to clarify the solution, the peak absorbance at 532 nm was used to calculate TBARS using and is expressed as nmol malondialdehyde equivalents/mL. Values are mean  $\pm$  S. E. of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey(T)-test.

## 2. *In vivo* 에서 고지혈증 억제 효능

### 가. 체중증가율, 식이효율, 간장/체중 비율 및 지방조직 무게

고콜레스테롤 식이로 유도된 고지혈증 흰쥐에게 우슬 에탄올 추출물의 용량 별 차이를 두어 6주간 투여한 후 체중증가량, 식이효율, 간장 및 체중 비율과 지방조직 무게를 비교한 결과는 Fig. 17~19와 같다.

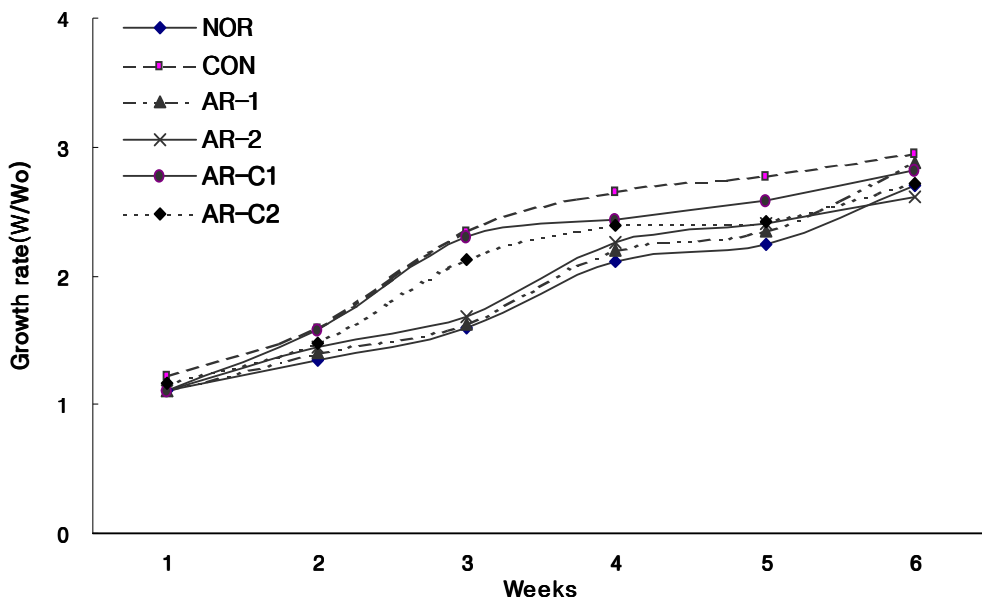
체중증가량은 고지혈증 유발식이를 급여한 대조군( $345.9 \pm 8.91$  g)은 정상군( $203.8 \pm 7.83$  g)에 비해 현저히 체중이 증가되었다. 우슬을 단독 투여한 AR-1군과 AR-2군은 정상군과 비교 시 체중증가량의 차이가 없었다. 고콜레스테롤식이와 우슬을 병합 투여 한 AR-C1군과 AR-C2군은 실험 개시 후 4주까지는 고콜레스테롤만을 단독 급여한 대조군과 체중증가율이 비슷하였지만 4주 후부터는 대조군에 비해 체중증가율이 억제됨을 확인하였다. 특히 5주부터는 우슬 고용량 병합 투여 한 AR-C2군은 정상군과 비슷한 체중증가 현상을 보였다.

식이섭취량은 고지혈증 유발 식이군인 대조군이 가장 높았으며, 우슬 병합 투여한 AR-C1군과 AR-C2군은 대조군과 비교 시 유의적인 차이는 보이지 않았지만 다소 낮은 경향이였다. 고콜레스테롤과 우슬 에탄올 추출물을 병합 투여 한 AR-C1군과 AR-C2군은 실험기간이 경과할수록 식이효율이 낮아지는 경향을 보였는데 이는 고콜레스테롤 식이에 대한 적응으로 사료된다.

체중 당 간조직의 무게 비는 대조군이 다른 실험군에 비해 가장 높았는데, 이는 체중증가량을 반영한 것으로 생각되어 진다. 식이로 섭취한 과량의 콜레스테롤은 체외로 정상적으로 배출되지 못하고 간장 내에 축적되어 간장이 비대해 진다고 한다(186). 이처럼 과량의 콜레스테롤을 식이에 첨가하였을 때 흰쥐 장기 무게에 영향을 미친다는 보고가(187) 다양하게 수행되었는데, Turley 등(188)도 고콜레스테롤을 장기간 급여 시 간비대증을 유발한다고 하였다. 본 연구에서도 장기간 고지혈증을 유도하기 위해 식이에 첨가한 고콜레스테롤로 인

하여 체중과 간장의 무게가 증가되었고, 간 무게가 체중에 차지하는 비율을 비교 시 간비대 현상이 나타났다. 체중 당 간조직 무게 비는 대조군에 비해 우슬을 고용량 병합 투여 한 AR-C2군에서 유의적으로 감소되었고, 이와 같이 대조군에 비해 AR-C1군과 AR-C2군의 간 무게가 감소된 것은 우슬 에탄올 추출물 병합 투여로 간조직으로의 지방축적이 억제되었을 것으로 생각되어 진다.

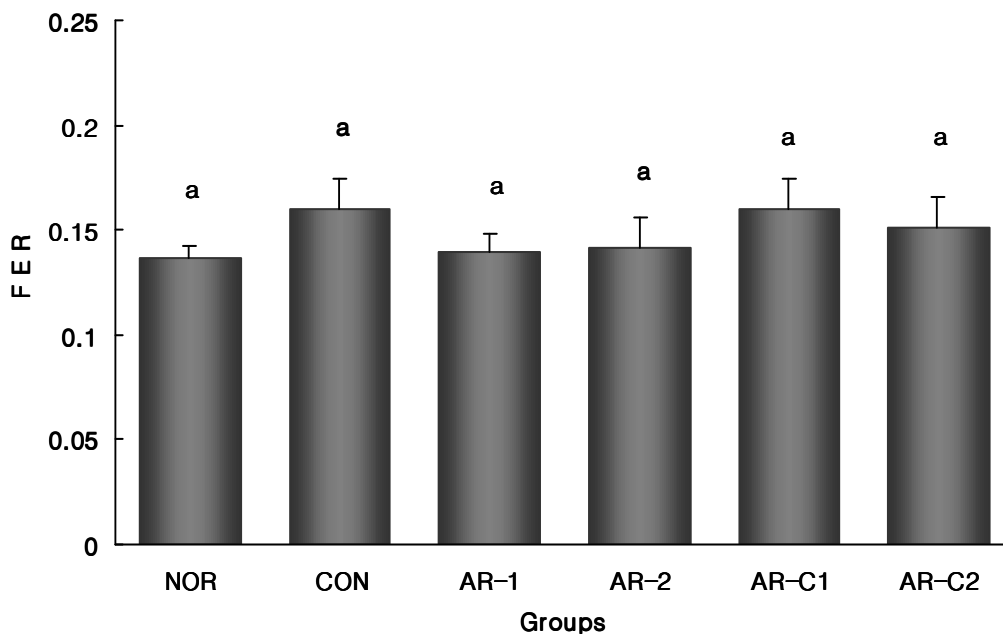
부고환 지방 및 내장지방조직 무게도 간조직의 무게와 마찬가지로 고지혈증 유발 식이를 급여한 대조군이 정상군에 비해 증가되었으며, 우슬 에탄올 추출물 병합 투여한 AR-C1군과 AR-C2군은 대조군에 비해 저하되었다. 지방조직 무게도 간조직 무게와 마찬가지로 체중증가량이 반영되어 전 실험기간 동안 체중증가량이 가장 높았던 대조군이 지방조직의 무게도 가장 많이 증가하였다.



*Fig. 17. Change of growth rate of the rats fed high cholesterol diet with AREE*

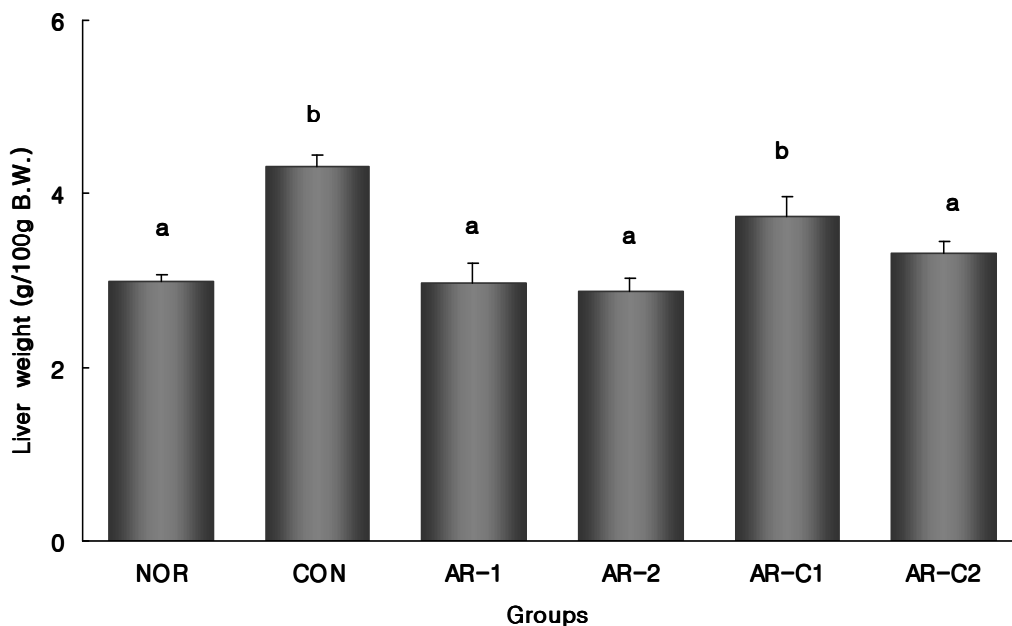
Abbreviations: Growth rate ( $W_1/W_0$ ) : Ratio of the body weight ( $W_1$ ) to initial body weight ( $W_0$ ). See the legend of Table 12.





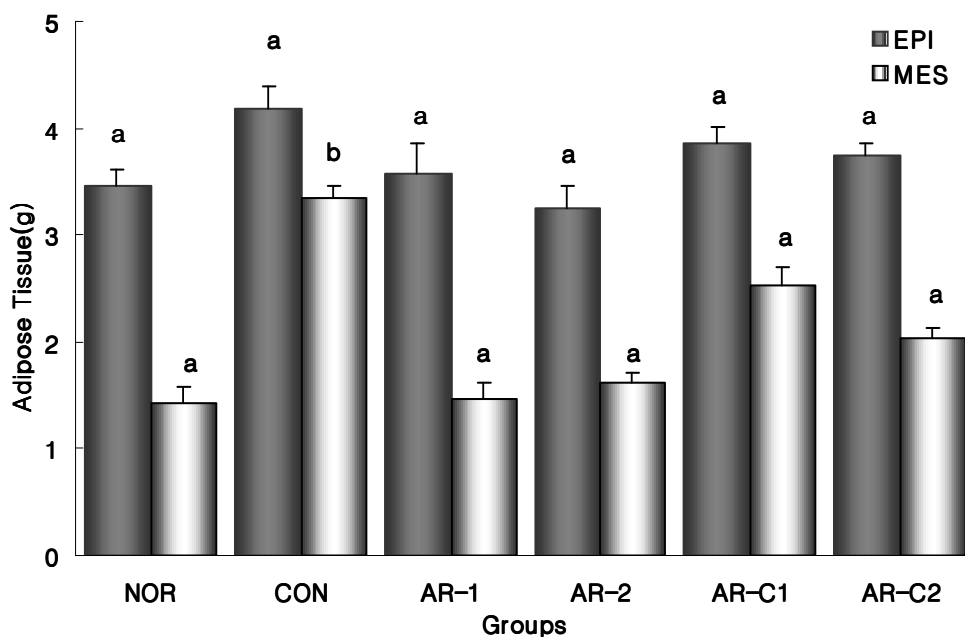
**Fig. 18. FER of the rats fed high cholesterol diet with AREE**

Abbreviations: FER(feed efficiency ratio) : The total amount of weight increased/the total intake of food. See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S. E. of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey(T)-test.



*Fig. 19. Effect of AREE diets on liver weight of rats fed high cholesterol diet*

Abbreviations: Liver weight : Liver of weight /Body weight. See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S. E. of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey(T)-test.



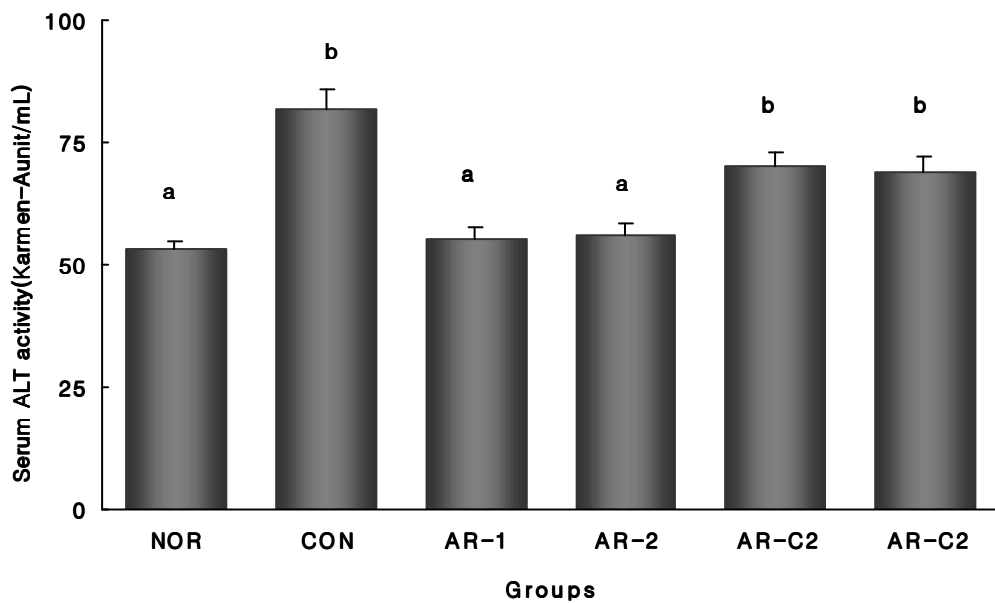
*Fig. 20. Effect of AREE diets on epididymal and mesenteric adipose tissue weights of rats fed high cholesterol diet*

Abbreviations: See the legend of Table 12. EPI: Epididymal adipose tissue, MES: mesenteric adipose tissue. Values are mean  $\pm$  S. E. of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey(T)-test.

## 나. 혈청 중 ALT, AST 및 ALP 활성

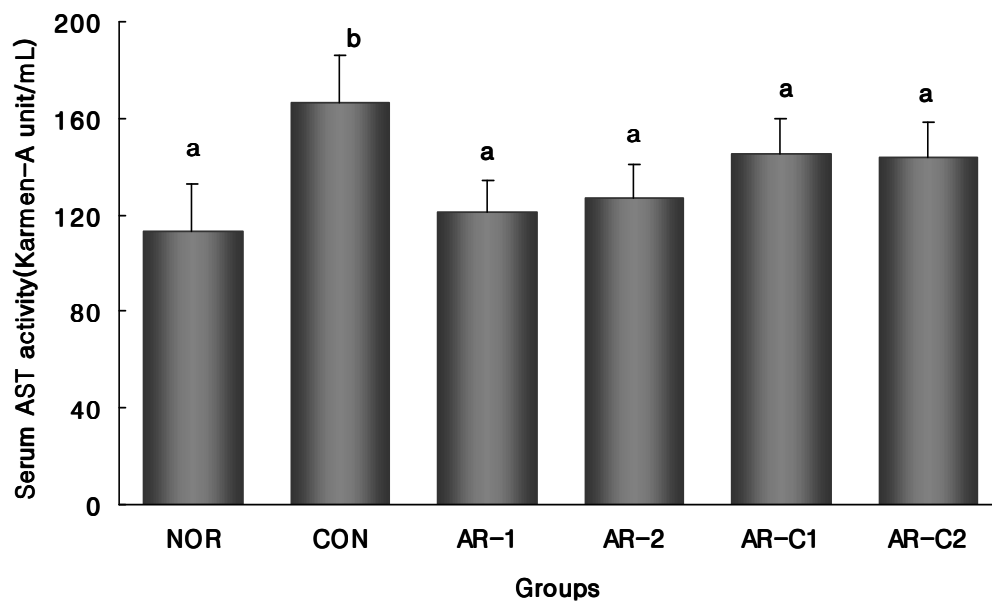
우슬 에탄올 추출물을 고콜레스테롤 식이를 급여한 흰쥐에게 6주간 투여 후 혈청 ALT, AST 및 ALP 활성을 측정 한 결과는 Fig. 21~23과 같다.

고지혈증을 유발시킨 대조군은 정상군에 비하여 혈청 ALT 활성이 유의하게 증가하였다. 대조군의 혈청 ALT 활성은  $81.73 \pm 9.53$  units로 우슬 에탄올 병합 투여 한 AR-C1군의  $70.33 \pm 3.49$  units와 AR-C2군의  $69.04 \pm 3.82$  units와 비교 시 각각 13%와 15%로 유의적인 차이는 없었으나 약간 증가되었다. 혈청 AST 활성도 대조군의 경우  $166.08 \pm 14.02$  units로 활성이 가장 높았으나 우슬 에탄올 추출물 병합 투여한 AR-C1군은  $145.28 \pm 13.08$  units와 AR-C2군은  $144.01 \pm 11.38$  units로 대조군에 비해 각각 13% 정도 씩 감소되었다. 그러나 우슬 병합 혹은 단독 투여 시 용량 간 차이는 볼 수 없었다. 혈청 ALP 활성도 정상군 ( $18.05 \pm 1.8$  units)에 비하여 대조군( $30.32 \pm 4.56$  units)이 유의하게 증가 하였으며, 특히 우슬을 고용량 병합 투여 한 AR-C2군의 경우  $23.33 \pm 2.39$  units로 대조군에 비해 약 30% 정도 유의하게 감소하였다. Plaa 등(189)의 의하면 혈청 AST와 ALT 활성 증가는 간세포의 괴사와 간조직의 파괴가 진행됨을 의미하며 고지방식이, 고콜레스테롤식이, 알코올 등으로 간세포의 독성이 생기면 간 실질세포의 장애가 발생하여 간세포가 파괴되고 혈 중으로 이들 효소의 방출이 항진되어 활성이 증가한다고 하였다. 혈청 ALP(190)은 신체 각 조직에 존재하는 효소로 간염, 간경변증 등의 진단과 예후를 관찰하는데 이용되어지는데 특히 담도계 폐색 또는 간질환 등에 의해 ALP 활성 수치가 증가되어 진다. 급성 신부전증, 고지혈증, 폐경색증이 있을 때 간세포 장애가 고도로 진행되면 혈청 ALT, AST 및 ALP 활성 수치가 동시에 높아져 간장의 담즙산 배설장애가 생기고 이로 인해 혈청 콜레스테롤 함량이 상승되는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서 고콜레스테롤식으로 증가된 AST, AST 및 ALT 활성은 우슬 투여로 저하되었음은 우슬이 간세포 손상과 예방 치료에 이용 가능성을 보여주었다.



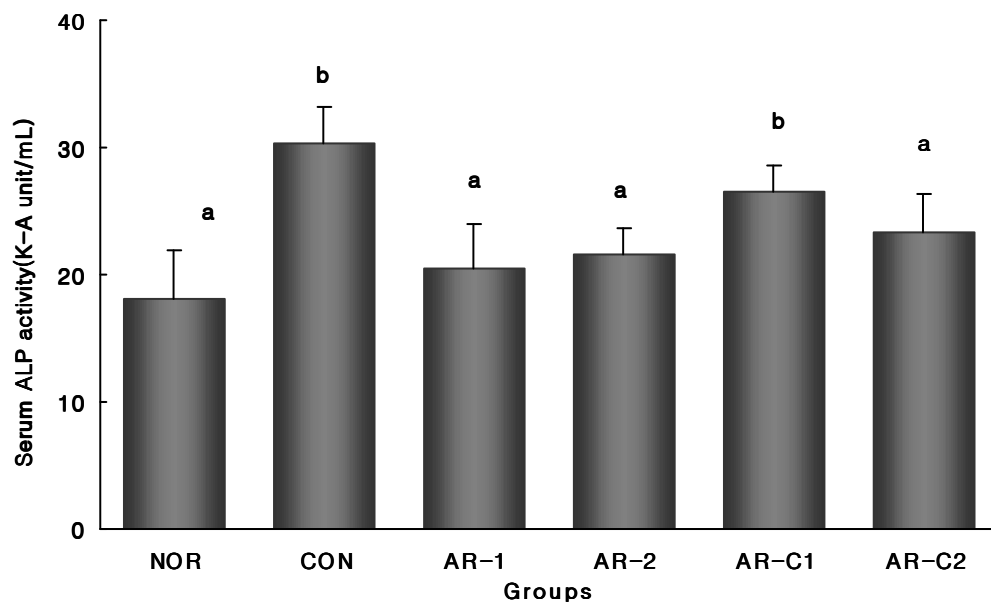
*Fig. 21. Activity of ALT in the serum of rats fed high cholesterol diet with AREE*

Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S. E. of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey(T)-test.



*Fig. 22. Activity of AST in the serum of rats fed high cholesterol diet with AREE*

Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S. E. of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey(T)-test.



*Fig. 23. Activity of ALP in the serum of rats fed high cholesterol diet with AREE*

Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S. E. of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey(T)-test.

#### 다. 혈청 중 중성지방, 총콜레스테롤 및 인지질 함량

고콜레스테롤식이와 우슬 에탄올 추출물의 용량을 달리하여 6주간 투여한 흰 쥐의 혈청 중성지방, 총콜레스테롤 및 인지질 함량 변화는 Fig. 24~26과 같다.

혈청 중성지방 함량은 대조군은  $152.47 \pm 8.36$  mg/dL로 정상군의  $85.61 \pm 6.21$  mg/dL에 비해 56% 정도 높았다. AR-C1군은  $122.12 \pm 12.3$  mg/dL 이었고, AR-C2군은  $111.04 \pm 5.63$  mg/dL으로 대조군에 비해 우슬 에탄올 병합 투여 시 혈청 중성지방 함량은 각각 20%와 25% 감소하였다. 우슬 에탄올 추출물의 용량별 단독 혹은 병합 투여에 따른 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 우슬 투여로 혈청 중성지방 함량의 감소는 모세혈관 벽의 LPL에 의해 중성지방의 주요 운반체 지단백질인 chylomicron과 VLDL의 분해가 촉진되어 나타난 결과로 생각되어진다(192). 따라서 본 연구는 LPL 활성 측정이 중요하기 때문에 LPL 활성도 측정하여 뒤에 그 결과를 나타내었다.

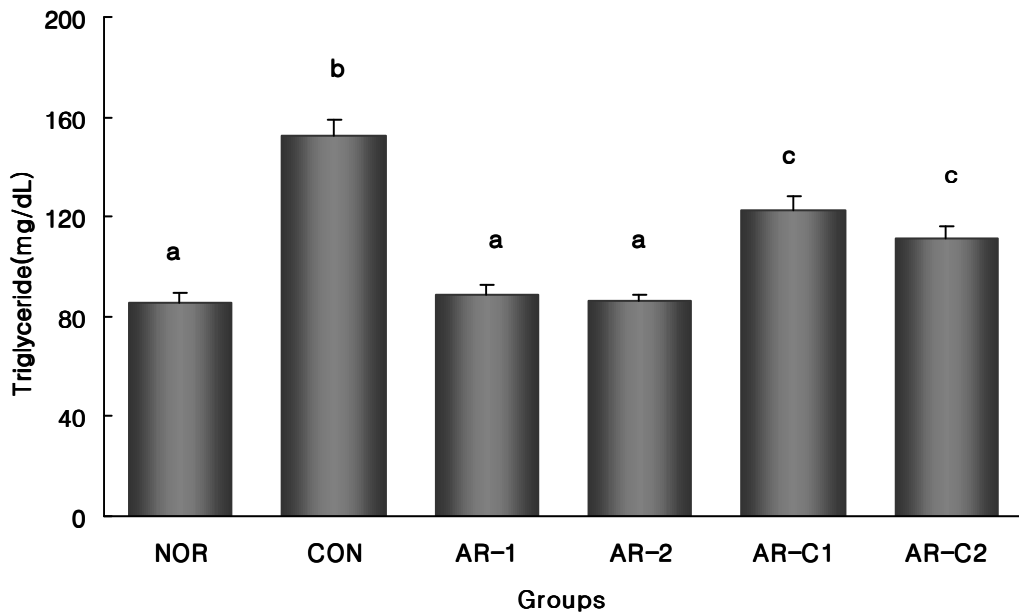
혈청 총콜레스테롤 함량은 대조군이 정상군의 비해 39% 증가되었다. 고콜레스테롤 식이에 의해 증가된 혈청 총콜레스테롤 함량은 우슬 에탄올 추출물 병합 투여(AR-C1군과 AR-C2군)로 감소되었으나 유의적인 차이는 보이지 않았다. 고콜레스테롤식이 급여군의 혈청 총콜레스테롤 함량이 정상군에 비해 현저히 높은 것은 식이 콜레스테롤에 의한 간장 내 유리콜레스테롤 및 콜레스테롤 에스테르 축적이 일어났기 때문으로 보여진다(192).

고지방식이로 인한 지방간 발병의 주된 원인은 인지질 합성의 감소로 보고되었는데(193), 혈청 인지질 함량은 고콜레스테롤 급여로 대조군이 정상군에 비해 37% 감소되었다. 고콜레스테롤식이와 우슬 고용량 병합 투여 한 AR-C2군은 대조군에 비해 22% 증가하였다. 우슬 투여 시 혈청 인지질 함량 증가는 우슬이 알코올성 지방간 진행을 억제할 뿐만 아니라 예방 할 수 있는 가능성도 제시하였다.

혈액 내 콜레스테롤과 중성지방 함량이 증가하고 인지질 함량이 저하되면 고

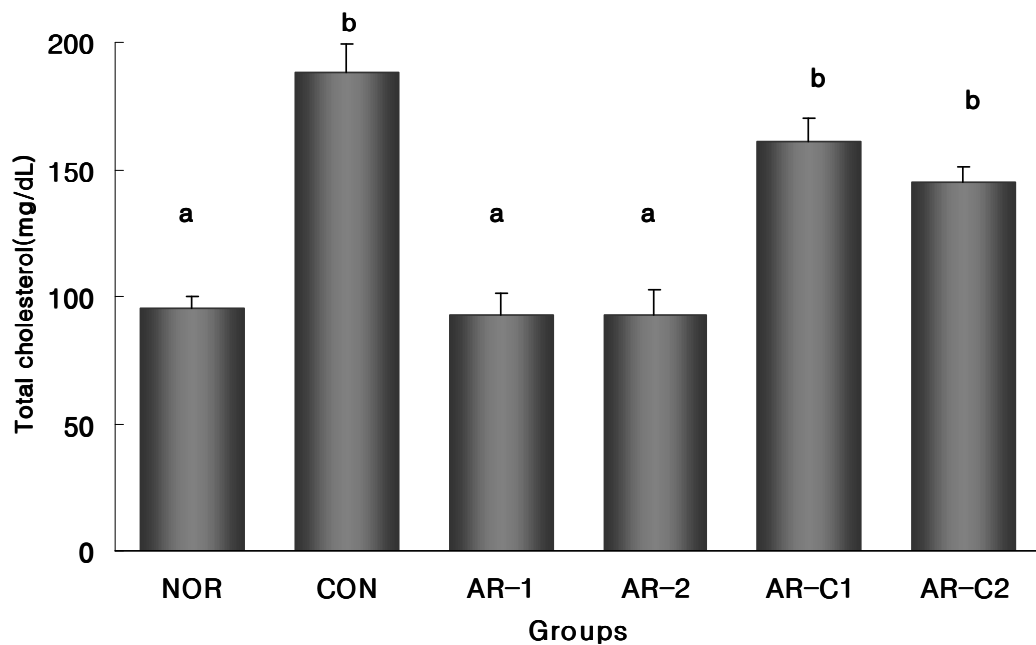


지혈증 및 동맥경화증 유발의 원인이 된다(194). 고콜레스테롤식으로 증가된 혈중 콜레스테롤과 중성지방 함량과 감소된 인지질 함량은 우슬 투여로 콜레스테롤과 중성지방 함량은 저하되었고 인지질 함량은 증가되었다. 따라서 고중성지방혈증이 많은 우리나라 실정을 고려해 볼 때 우슬 투여로 혈중 지질 개선효과를 기대할 수 있을 것으로 본다.



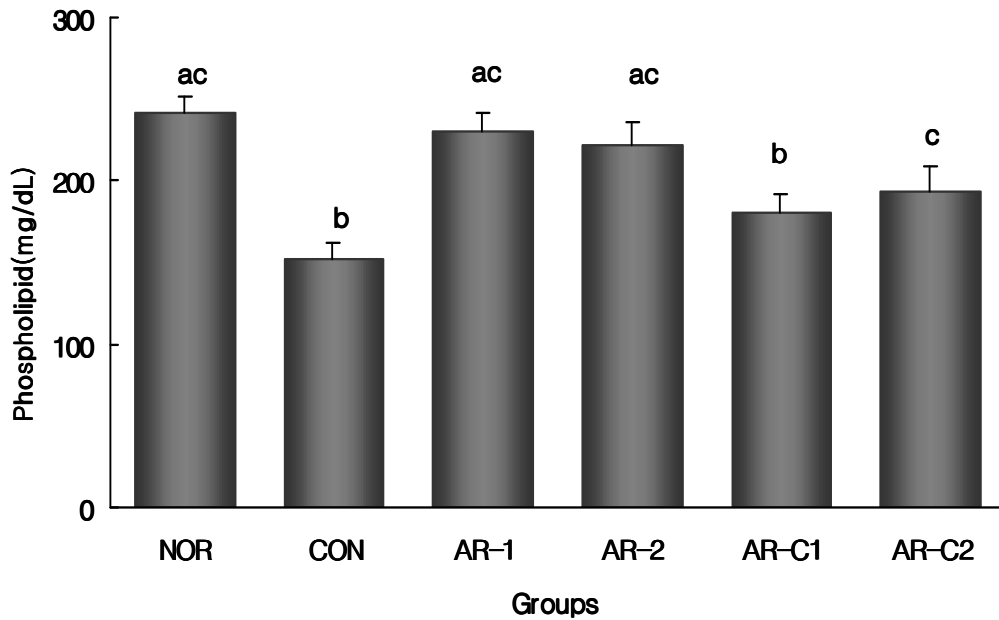
*Fig. 24. Content of triglyceride in the rats fed high cholesterol diet with AREE*

Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S. E. of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey(T)-test.



*Fig. 25. Content of total cholesterol in the rats fed high cholesterol diet with AREE*

Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S. E. of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey(T)-test.



*Fig. 26. Content of phospholipid in the rats fed high cholesterol diet with AREE*

Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S. E. of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey(T)-test.

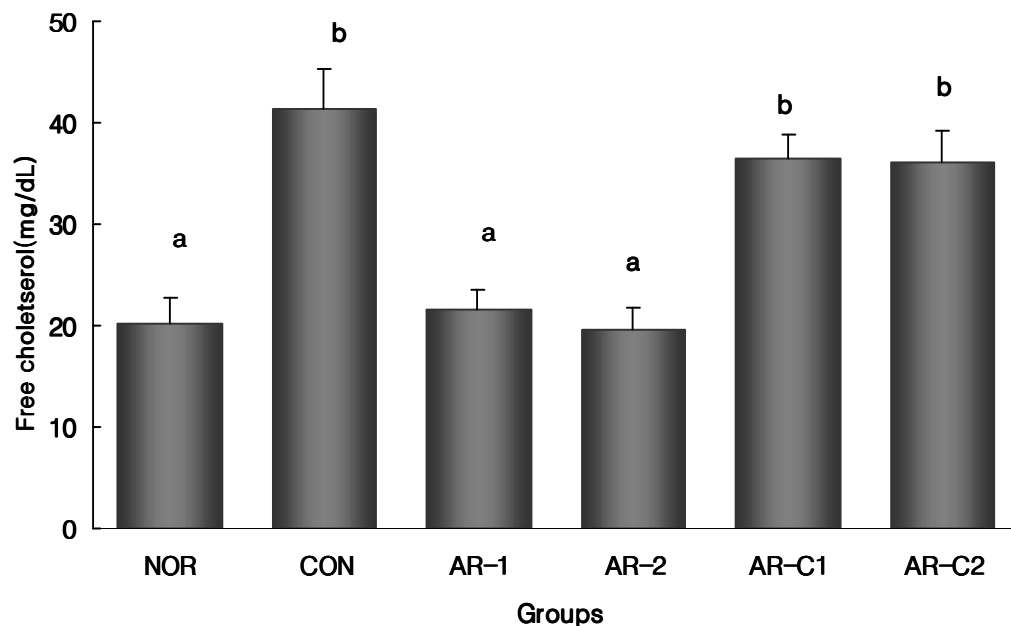
## 라. 혈청 중 유리 콜레스테롤 함량, 콜레스테릴 에스테르 함량 및 콜레스테릴 에스테르 비율

고콜레스테롤식이와 우슬의 함량을 달리하여 투여한 흰쥐의 혈청 유리콜레스테롤 함량, 콜레스테릴 에스테르 함량 및 콜레스테릴 에스테르의 비율을 측정 한 결과는 Fig. 27~29과 같다.

혈청 유리 콜레스테롤 함량은 대조군은  $41.44 \pm 4.33$  mg/dL로 정상군의  $20.13 \pm 2.82$  mg/dL에 비해 51% 증가되었으며, 우슬 에탄올 추출물 병합 투여한 AR-C1군과 AR-C2군의 유리콜레스테롤 함량은 각각  $36.56 \pm 3.01$  mg/dL와  $36.14 \pm 2.15$  mg/dL로 고콜레스테롤 식이만을 급여한 대조군에 비하여 각각 11%로 감소되었다.

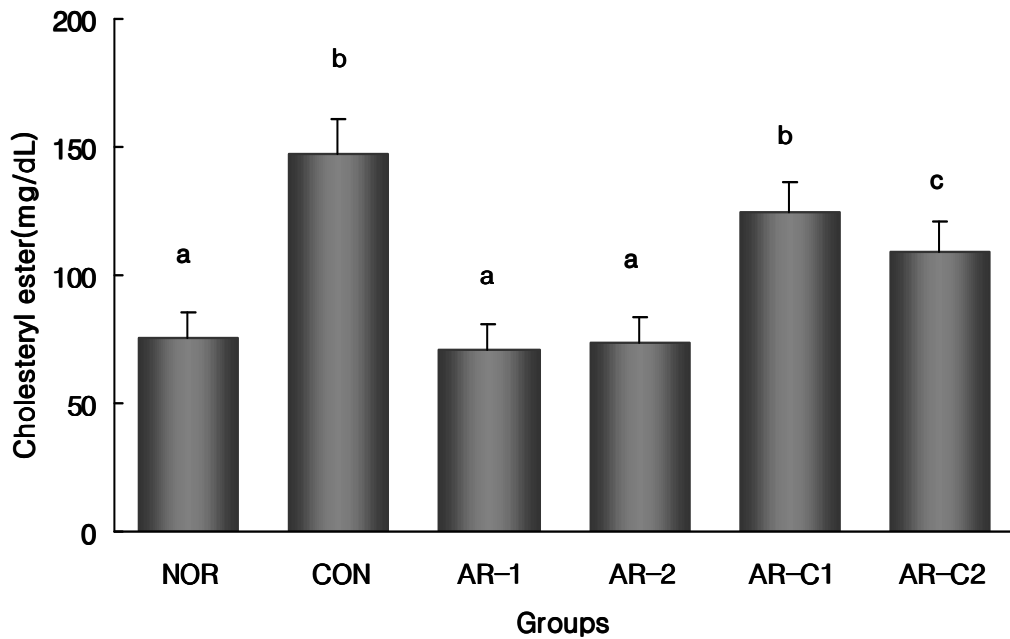
혈청 콜레스테릴 에스테르 함량은 정상군에 비해 대조군이 48% 증가하였다. 고콜레스테롤 식이로 증가된 대조군의 혈청 콜레스테릴 에스테르 함량은 우슬 에탄올 추출물 병합 투여한 AR-C1군과 AR-C2군은 대조군에 비해 각각 15%와 25% 감소하였다. 우슬 에탄올 추출물을 단독 혹은 병합 투여 시 혈청 콜레스테릴 에스테르 함량에는 용량별 유의적 차이는 없었다.

콜레스테롤은 인지질과 함께 세포막의 주요 성분으로 혈 중에는 지방산과 에스테르결합을 한 콜레스테롤 에스테르형이 70%이고 나머지 30%는 유리형으로 존재한다. 사람의 경우 총콜레스테롤에 대한 콜레스테릴 에스테르 비는 약 70% 전후가 정상적이고 콜레스테롤 에스테르 비의 저하는 간질환 진단의 지표이며 고콜레스테롤혈증일 때 상승되는 것으로 알려져 있다(195). 콜레스테롤의 흡수는 소장 상부에서 일어나며 콜레스테롤 에스테르의 형태로 점막세포로 들어가게 되는데 외인성 콜레스테롤은 혈중 유리 콜레스테롤 및 콜레스테롤 에스테르 함량을 상승시킨다고 보고되어 있다. 따라서 고콜레스테롤을 급여한 대조군은 콜레스테롤 에스테르 함량비가 높게 나타났으나, 우슬 투여로 저하되었다. 이상의 결과 우슬 에탄올 추출물은 식이로 혈 중 유리 콜레스테롤 및 콜레스테롤 에스테르 함량 저하 효과가 있는 것으로 보여 진다.



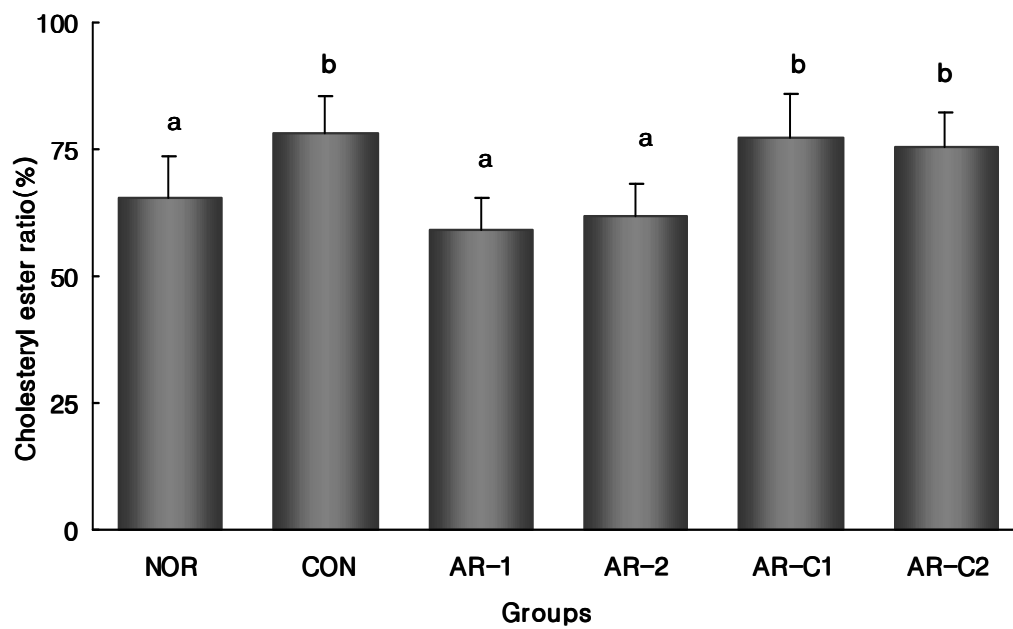
*Fig. 27. Content of free cholesterol in the rats fed high cholesterol diet with AREE*

Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S. E. of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey(T)-test.



*Fig. 28. Content of cholesteryl ester in the rats fed high cholesterol diet with AREE*

Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S. E. of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey(T)-test.



*Fig. 29. Ratio of cholesteryl ester in the rats fed high cholesterol diet with AREE*

Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S. E. of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey(T)-test.

## 마. 혈청 중 LDL-콜레스테롤 함량, HDL-콜레스테롤 함량, 심혈관 위험지수 및 동맥경화지수

우슬 에탄올 추출물과 고지혈증 유발식이를 흰쥐에게 6주간 급여 후 혈청의 LDL-콜레스테롤 함량, HDL-콜레스테롤 함량, 심혈관 위험지수 및 동맥경화지수에 미치는 영향을 나타낸 결과는 Fig. 30~33과 같다.

고콜레스테롤식이를 급여한 대조군의 혈청 LDL-콜레스테롤 함량은  $127.66 \pm 12.66$  mg/dL로 정상군에 비해 56% 증가하였다. 우슬 고용량 병합 투여군(AR-C2)은 대조군에 비해 32% 정도 유의적인 감소효과를 나타내었다.

혈청 내인성 콜레스테롤을 주 구성성분으로 하는 LDL-콜레스테롤은 콜레스테롤의 주된 운반형으로 동맥벽이나 말초조직으로 콜레스테롤을 운반하는데 이들 함량이 혈액 내 정상치 보다 증가하게 되면 동맥 평활근에 축적되어 동맥경화를 촉진시키는 인자로 보고되어 있다(196). LDL-콜레스테롤 함량 증가는 혈액으로부터 LDL-콜레스테롤 제거 속도의 감소뿐만 아니라 혈액 내 intermediate density lipoprotein(IDL) 함량이 증가함으로써 더 많은 IDL이 LDL로 전환되기 때문이라는 보고가 있다(197).

고콜레스테롤식으로 콜레스테롤의 섭취량이 많아지면 LDL-콜레스테롤이 혈관 내에서 순환되는 시간이 길어지므로 혈관 내피세포에서 산화적 스트레스를 받을 기회가 많아지게 된다. 이때 산화된 LDL은 죽상동맥경화증의 초기 변형인 fatty streak을 일으켜 혈관 내피세포를 손상시키고 혈소판을 응집하게 된다. 그러므로 혈중 LDL 함량과 LDL 산화는 죽상동맥경화 유발의 주요 지표가 된다. 따라서 혈중 LDL 산화를 예방하는 것이 매우 중요한데 *in vitro* 연구를 통해 이미 우슬 투여로 혈장 LDL 산화가 억제되었음도 확인하였다. 본 실험 결과 우슬 투여 시 *in vivo* 에서는 혈청 LDL-콜레스테롤 함량을 저하시키고 *in vitro* 에서는 LDL-콜레스테롤 산화를 억제하였다.

동맥경화 예방 효과가 있다고 알려진 혈청 HDL-콜레스테롤 함량은 정상군

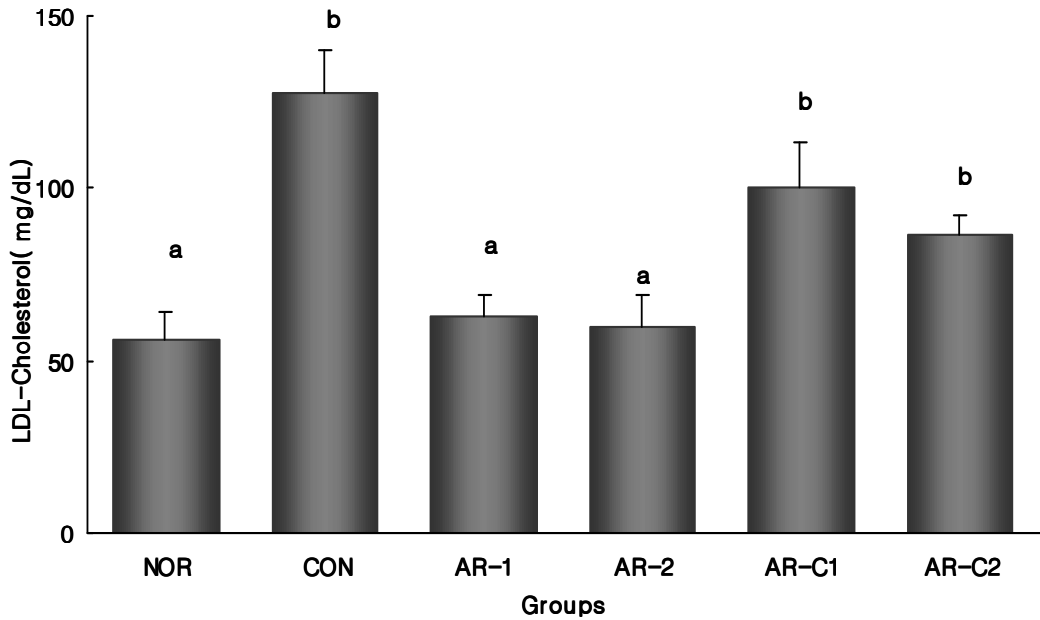


의  $42.56 \pm 3.48$  mg/dL에 비해 대조군이  $30.12 \pm 3.88$  mg/dL로 29% 정도 감소하였다. 우슬을 병합 투여 한 AR-C1군과 AR-C2군의 함량은  $34.23 \pm 1.32$  mg/dL과  $38.52 \pm 3.63$  mg/dL으로 대조군에 비해 HDL-콜레스테롤 함량이 높았으나 유의차는 없었다. 고콜레스테롤식을 섭취한 동물은 식이콜레스테롤의 장내 이용률 감소로 인해 이화작용과 배설을 위해 말초조직으로부터 간으로 운반이 촉진되어 혈 중 총콜레스테롤 함량은 증가하고 HDL-콜레스테롤 함량은 감소하는 것으로 보고되어 있다(198). HDL-콜레스테롤은 말초조직의 콜레스테롤을 간으로 운반하고 간에서 콜레스테롤로부터 담즙산이 합성되어 지고 장으로 배설시키기 때문에 HDL-콜레스테롤은 동맥경화 예방효과가 있다(199).

심혈관 위험지수는 HDL-콜레스테롤에 대한 총콜레스테롤의 함량비를 대표하는 값으로 동맥경화지수와 더불어 심혈관계 질환에 대한 위험 신호로 사용되고 있으며, 임상에서는 7.0 이상의 수치를 나타낼 때 위험 신호로 인지된다(200). 심혈관 위험지수는 대조군( $6.25 \pm 1.07$ )이 정상군( $2.71 \pm 0.84$ )에 비해 43% 증가하였다. 우슬 에탄올 추출물을 병합 투여 한 AR-C1군( $4.69 \pm 0.49$ )과 AR-C2군( $3.97 \pm 0.95$ )의 심혈관 위험지수는 대조군에 비해 유의하게 저하하였다. 특히 우슬 고용량 병합 투여군(AR-C2)에서 심혈관 위험지수가 유의적으로 감소하였다.

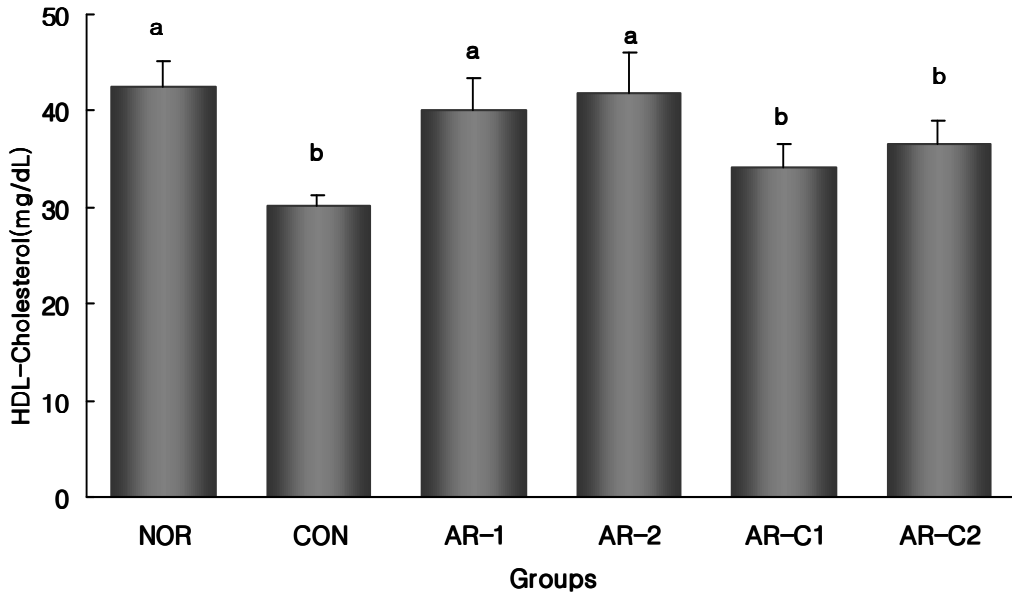
동맥경화지수는 체내 HDL-콜레스테롤에 대한 중성지방의 함량비를 대표하는 값으로 미국의 National Institute of Health Consensus Development Conference(NIH)의 기준에 따르면 임상에서 3.0 이상의 값을 나타낼 때 동맥경화에 대한 위험 신호로서 사용하고 있다(201). 고지혈증 유도식을 급여 한 대조군의 동맥경화지수는  $5.25 \pm 1.01$ 로 동맥경화의 위험성이 매우 높은 상태임을 알 수 있었다. 우슬 에탄올 추출물을 병합 투여 한 AR-C1군( $3.96 \pm 0.47$ )과 AR-C2군( $2.97 \pm 0.061$ )은 동맥경화지수가 대조군에 비해 현저히 저하되었다. 따라서 우슬 에탄올 추출물 투여 시 동맥경화 위험도를 낮추는 것으로 판단되어진다.

이상의 결과 우슬 투여로 LDL-콜레스테롤 함량, 심혈관 위험지수 및 동맥경화지수가 감소되었고, HDL-콜레스테롤 함량은 증가되어진 것으로 보아 우슬이 동맥경화 예방 및 치료에 도움을 줄 것으로 생각된다.



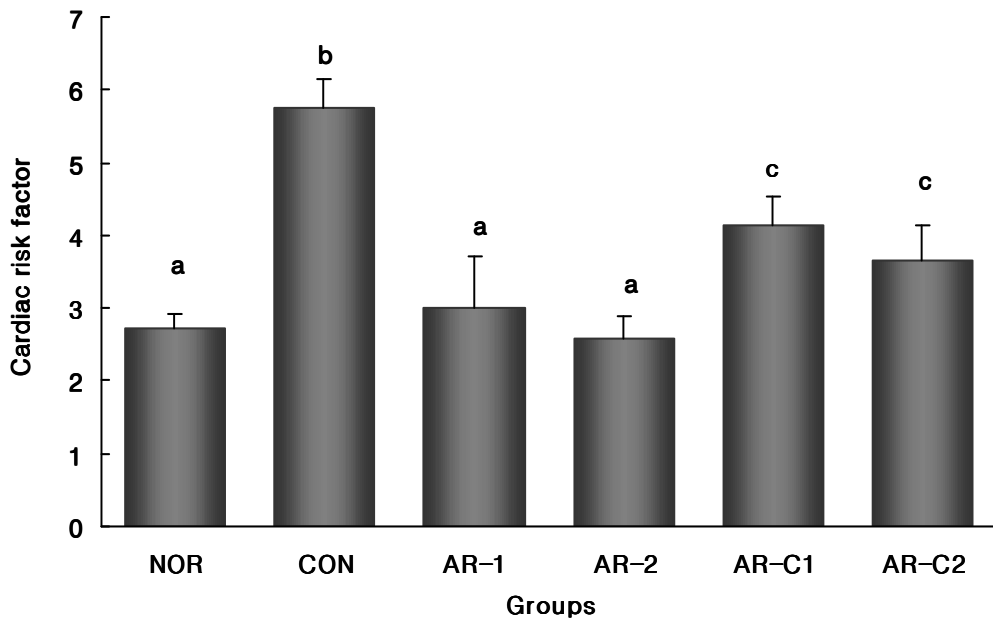
*Fig. 30. Content of LDL-cholesterol in the rats fed high cholesterol diet with AREE*

Abbreviations : LDL-cholesterol :  $TC - (HDL - Chol. + TG/5)$ . See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S. E. of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey(T)-test.



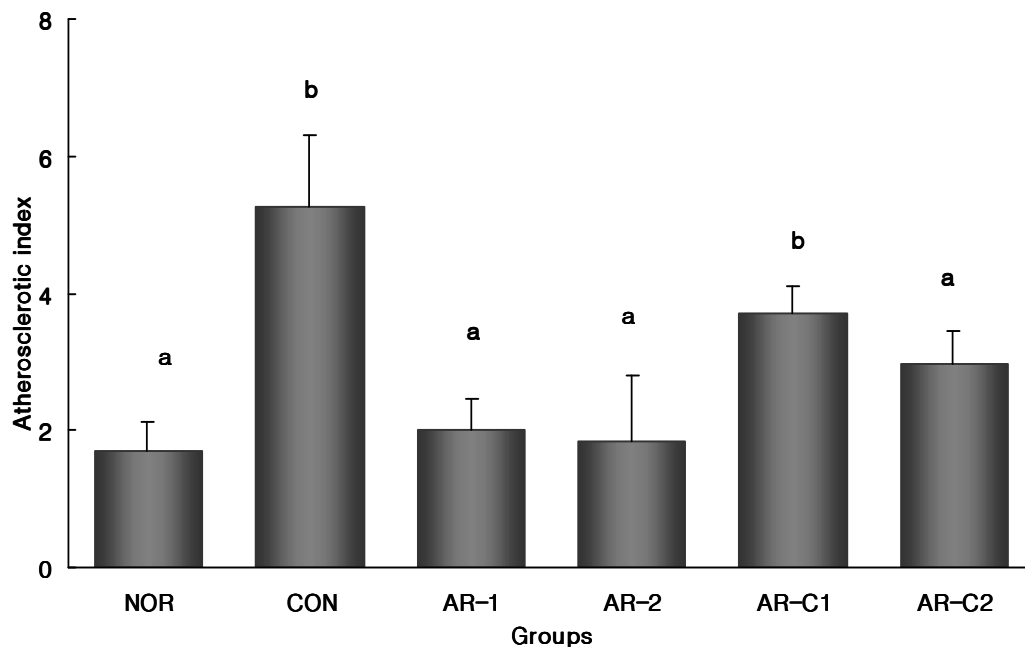
*Fig. 31. Content of HDL-cholesterol in the rats fed high cholesterol diet with AREE*

Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S. E. of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey(T)-test.



*Fig. 32. Ratio of CRF in the rats fed high cholesterol diet with AREE*

Abbreviations: TC/HDL-C=total cholesterol/HDL-cholesterol. See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S. E of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey(T)-test.



**Fig. 33. AI of rats fed high cholesterol diet with AREE**

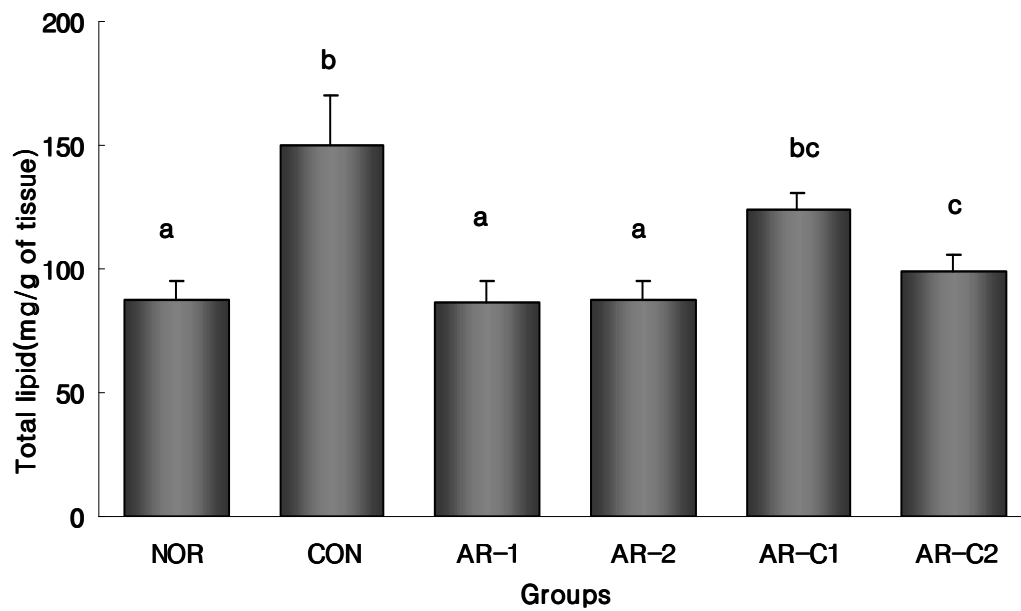
Abbreviations: AI = (total chol. - HDL-chol.) / HDL-chol. See the legend of Table 12. Values are mean ± S. E of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey(T)-test.

## 바. 간조직 중 총지질, 총콜레스테롤 및 중성지방 함량

고콜레스테롤식이와 우슬 함량을 달리하여 투여한 흰쥐 간조직의 총지질, 총콜레스테롤 및 중성지방 함량은 Fig. 34~36과 같다.

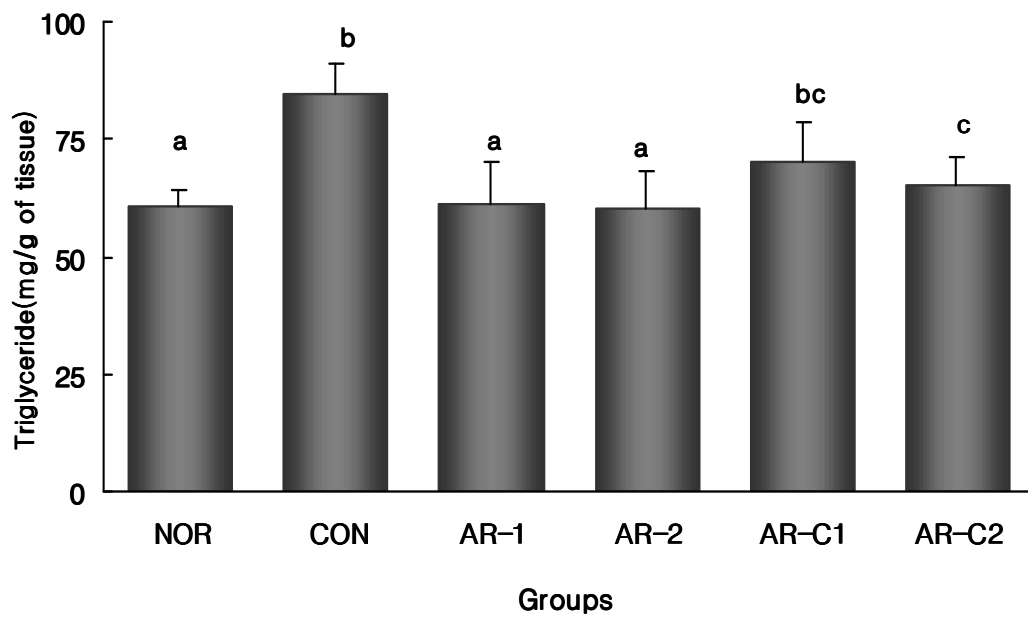
간장의 총지질 함량은 대조군( $150.18 \pm 20.41$  mg/g)이 정상군( $87.98 \pm 6.98$  mg/g)에 비해 약 58% 증가되었다. 우슬을 단독 투여 한 AR-1군( $86.96 \pm 20.41$  mg/g)과 AR-2군( $87.36 \pm 7.44$  mg/g)은 정상군과 비교 시 간조직의 총지질 함량은 유의차가 없었다. 우슬을 병합 투여 한 AR-C1군( $124.12 \pm 6.95$  mg/g)과 AR-C2군( $98.65 \pm 7.11$  mg/g)은 대조군에 비해 각각 17%와 34%로 간조직의 총지질 함량이 감소되었다. 이는 우슬 에탄올 추출물이 간으로의 지질 축적을 어느 정도 예방할 수 있으며, 이로 인한 지방간 유발도 어느 정도 억제 할 수 있을 것으로 여겨진다.

간장의 총콜레스테롤의 함량은 대조군이 정상군에 비하여 45% 증가하였으며, 우슬을 고용량 병합 투여 한 AR-C2군이 대조군에 비해 27% 감소효과를 보았으나, 저용량 투여한 AR-C1군에서는 증가된 콜레스테롤 함량을 감소시키지 못했다. 간장의 중성지방 함량은 대조군( $84.36 \pm 6.51$  mg/g)에 비하여 우슬을 병합 투여 한 AR-C1군( $70.35 \pm 8.13$ mg/g)과 AR-C2군( $67.44 \pm 5.69$ mg/g)은 감소되었으나 유의적인 차이는 없었다. 중성지방은 총콜레스테롤 함량에 영향을 받으며, 체내 총콜레스테롤 함량을 증가시켰을 때 간에서 지방산의 *de novo* 합성과 함께 중성지방의 합성을 증가시키는 반면, 지방산의  $\beta$ -oxidation은 현저히 감소시켰다는 보고가 있다(202-204). 강 등(205)은 고콜레스테롤을 급여한 흰쥐의 경우 혈장 내 중성지방과 콜레스테롤 함량이 증가하면 간의 중성지방과 콜레스테롤 함량도 증가하는 경향을 보였는데 이는 본 연구 결과와 일치하였다. 우슬 에탄올 추출물은 고콜레스테롤식이와 병합 투여 시 간조직의 총지질, 총콜레스테롤 및 중성지방 함량을 저하시켰다. 따라서 우슬 투여 시 간조직의 지질대사에 영향을 미치는 것을 알 수 있었으며, 간조직의 중성지방이나 콜레스테롤 함량을 낮추어 고질혈증이나 허혈성 심장질환 개선에 도움을 줄 것으로 추정한다.



*Fig. 34. Content of total lipid in the liver of rats fed high cholesterol diet with AREE*

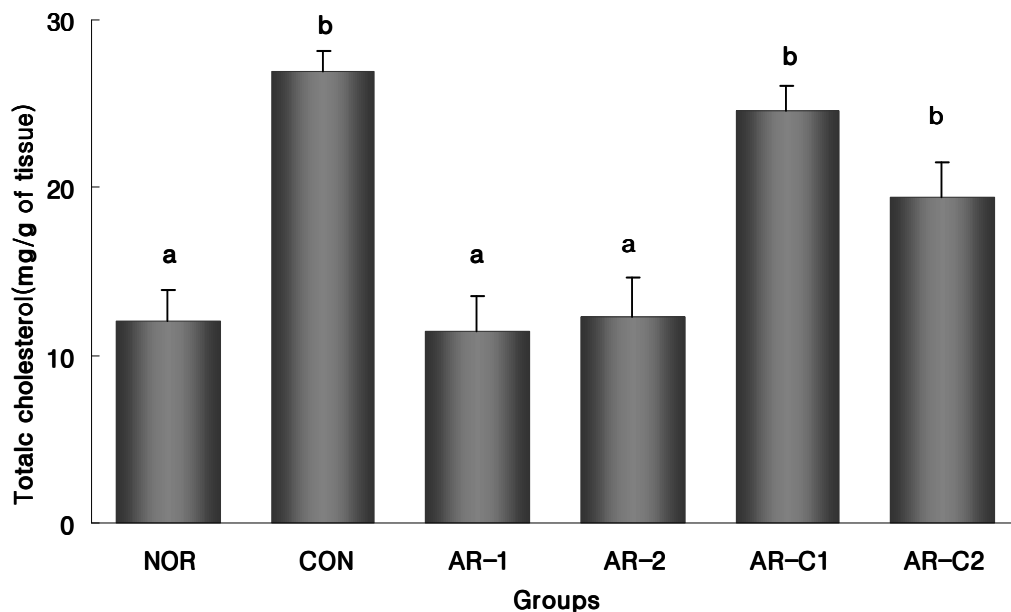
Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S.E of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey(T)-test.



*Fig. 35. Content of triglyceride in the liver of rats fed high cholesterol diet with AREE*

Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S. E. of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey(T)-test.





*Fig. 36. Content of total cholesterol in the liver of rats fed high cholesterol diet with AREE*

Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S.E of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey(T)-test.

## 사. 지방조직 중 총지질, 총콜레스테롤 및 중성지방 함량

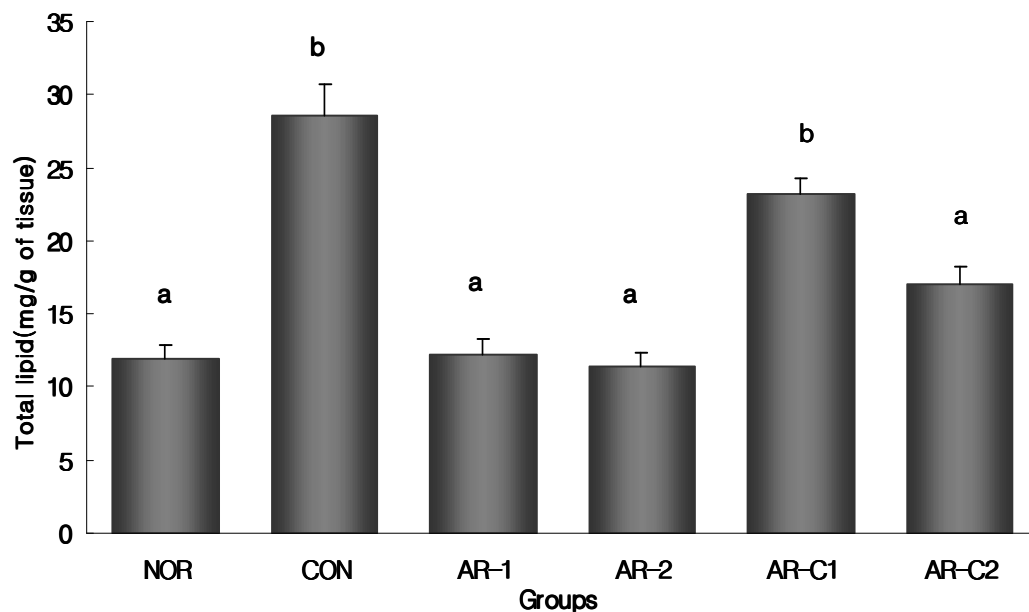
고콜레스테롤식이와 우슬의 용량별 수준을 달리하여 6주간 투여 후 측정된 흰쥐의 부고환과 내장지방조직의 총지질, 총콜레스테롤 및 중성지방 함량을 측정한 결과는 Fig. 37~42와 같다.

지방조직 부위에 따라 지질대사가 다르다는 연구 결과가 있어 두 군데 지방조직인 부고환과 내장지방조직의 지질 함량을 측정하였다(206,207). 특히 내장지방이 많을수록 인슐린 저항성 및 동맥경화의 위험이 높아지며 심혈관질환의 이환율에 직접 영향을 끼친다고 한다(208). 따라서 고지혈증과 같은 심혈관질환은 간, 혈액 및 지방조직의 지방 함량뿐만 아니라 복부 내 지방분포에 따라서도 영향을 받는 것으로 보여 진다.

부고환지방조직의 총지질 함량은 고지혈증 유발식을 급여한 대조군은 정상군에 비해 유의적으로 증가하였다. 고지혈증식이와 우슬 병합 투여 한 AR-C1군과 AR-C2군은 대조군에 비하여 부고환지방조직의 총지질 함량이 감소되었다. 부고환지방조직의 총콜레스테롤과 중성지방의 함량도 총지질과 유사한 경향을 보여 대조군이 다른 실험군에 비해 유의하게 높은 경향이였다.

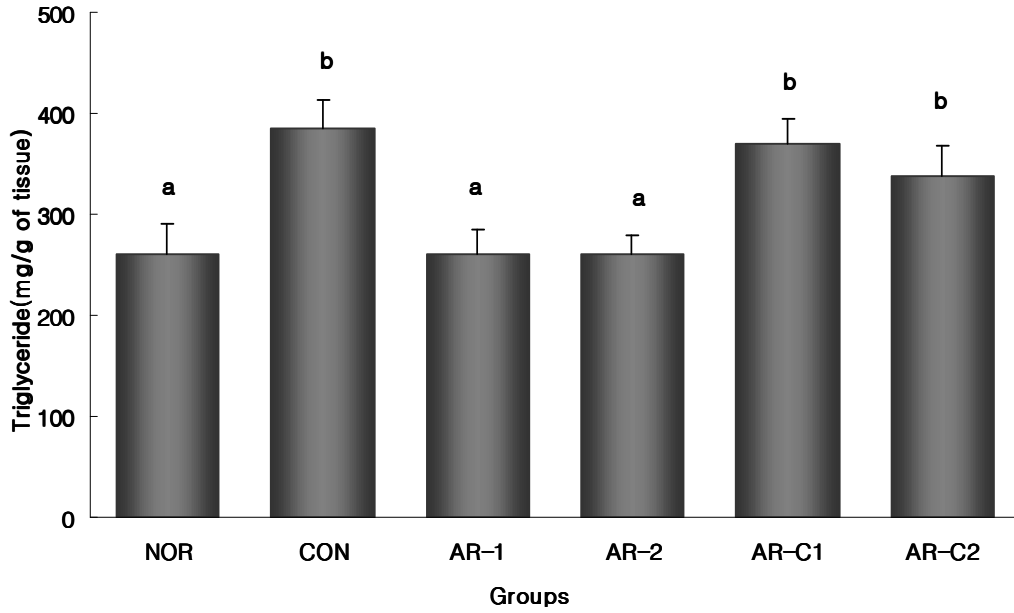
각 실험군의 내장지방조직의 총지질, 총콜레스테롤 및 중성지방 함량도 부고환지방조직과 유사한 경향을 보여 고콜레스테롤을 급여 한 대조군이 다른 실험군에 비해 유의하게 높았다. 이상과 같이 고콜레스테롤식을 급여한 대조군의 증가된 총지질, 총콜레스테롤 및 중성지방 함량은(206) 우슬 병합 투여로 현저하게 감소되어 짐을 알 수 있었다.

이상의 결과 부고환과 내장지방조직의 중성지방과 콜레스테롤 함량은 우슬 투여로 저하되었으며 혈중 중성지방 및 콜레스테롤 함량과는 정의 상관관계를 나타내었다.



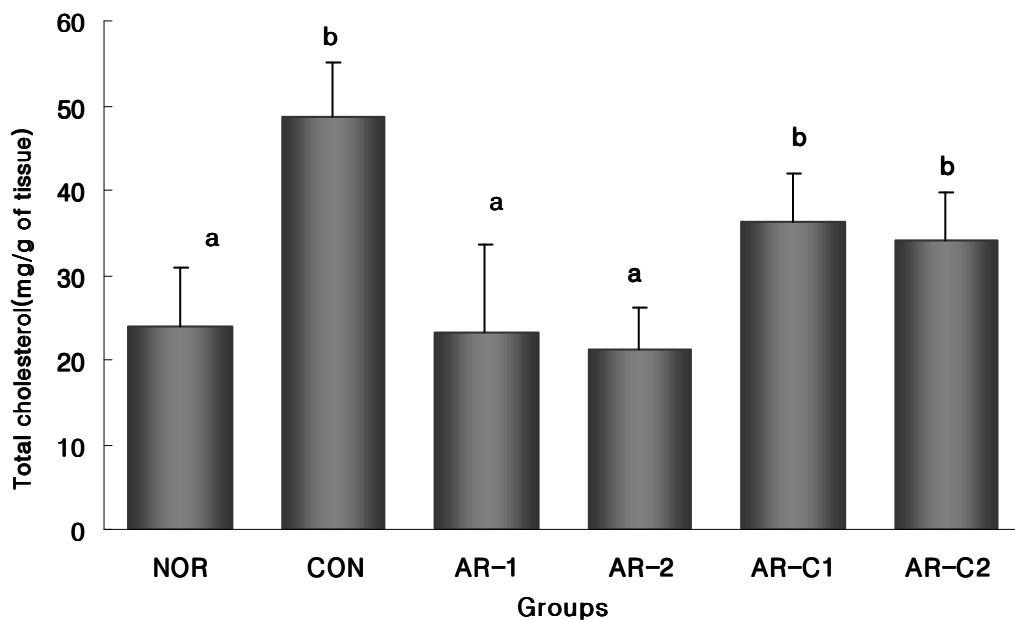
*Fig. 37. Content of total lipid in the epididymal adipose tissue of rats fed high cholesterol diet with AREE*

Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S. E. of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey(T)-test.



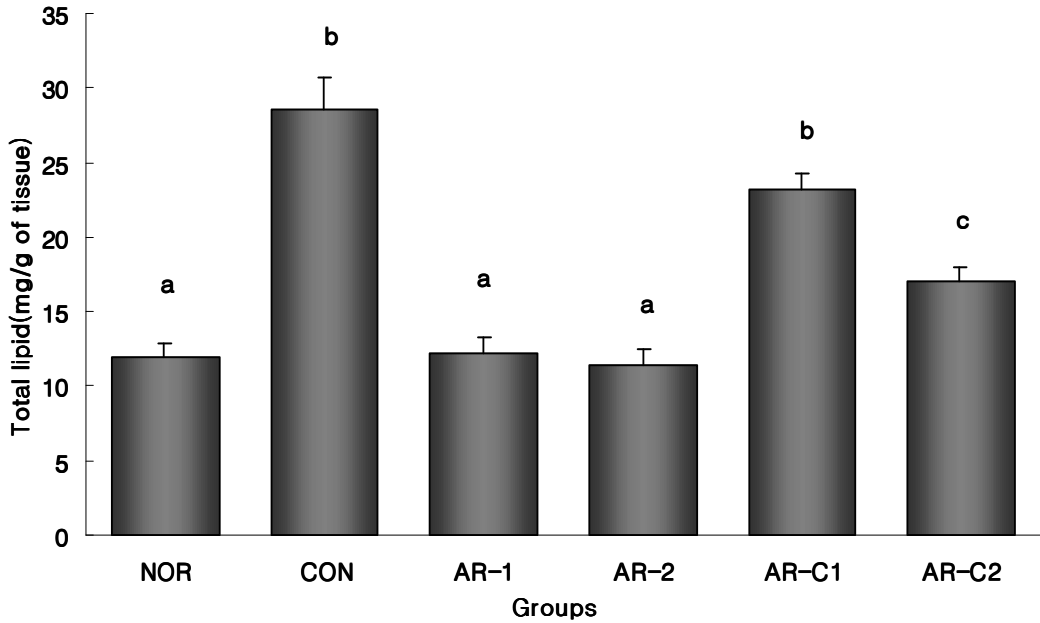
*Fig. 38. Content of triglyceride in the epididymal adipose tissue of rats fed high cholesterol diet with AREE*

Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S. E. of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey(T)-test.



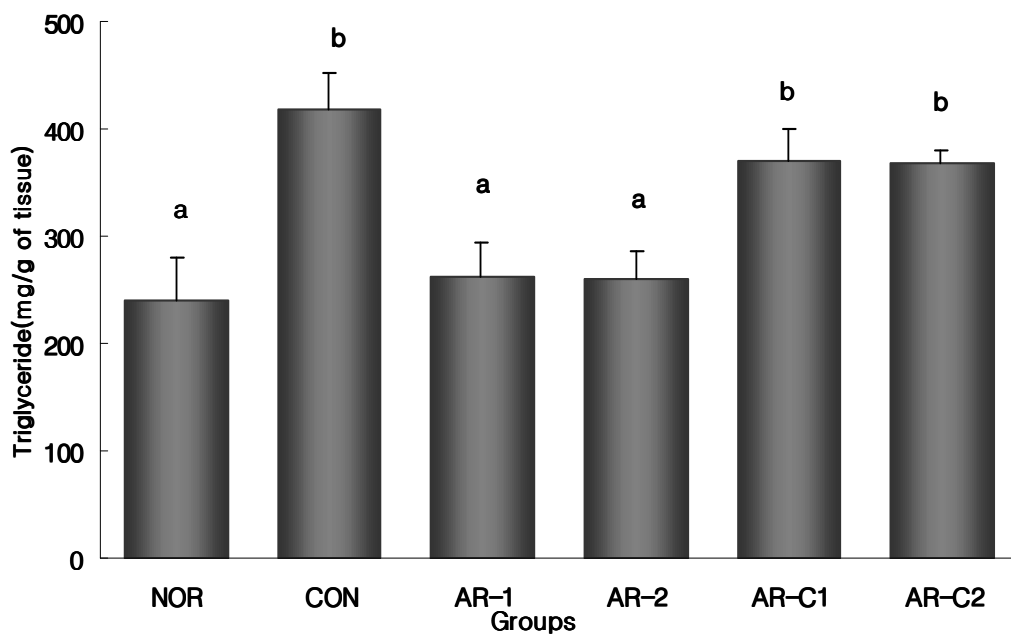
*Fig. 39. Content of total cholesterol in the epididymal adipose tissue of rats fed high cholesterol diet with AREE*

Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S.E of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey(T)-test.



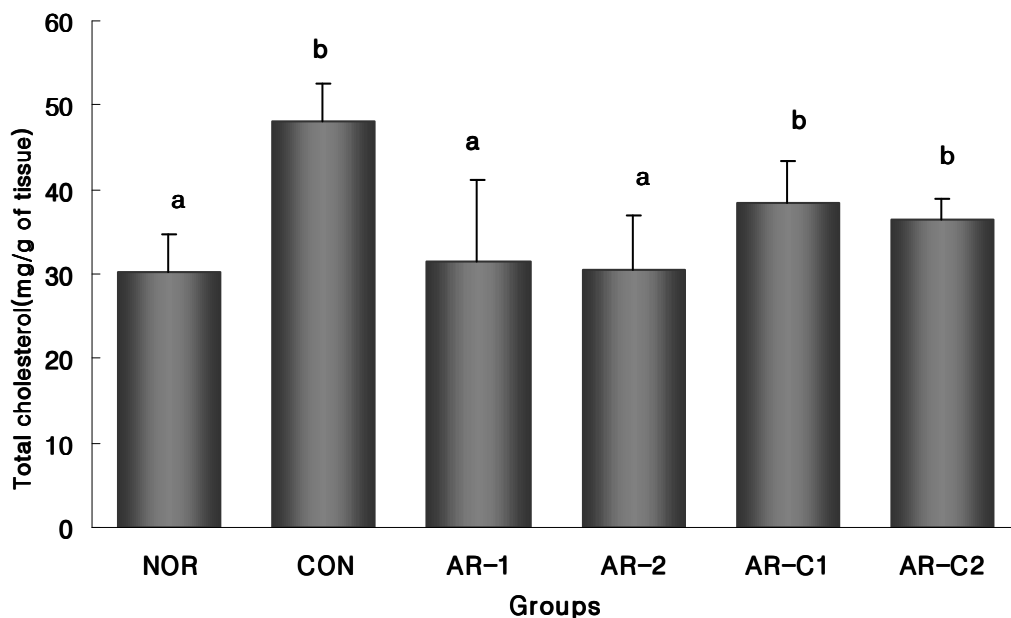
*Fig. 40. Content of total lipid in the mesenteric adipose tissue of rats fed high cholesterol diet with AREE*

Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S. E. of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey(T)-test.



*Fig. 41. Content of triglyceride in the mesenteric adipose tissue of rats fed high cholesterol diet with AREE*

Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S. E. of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey(T)-test.



*Fig. 42. Content of total cholesterol in the mesenteric adipose tissue of rats fed high cholesterol diet with AREE*

Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S. E. of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey(T)-test.



## 아. 지방조직 *LPL* 활성

우슬 에탄올 추출물이 부고환 및 내장지방조직의 HR-LPL과 TE-LPL 활성에 미치는 영향은 Table 26, 27과 같다.

LPL은 중성지방이 풍부한 lipoprotein을 monoacylglycerol과 지방산으로 가수분해하는 주된 효소로 지방세포에서 합성되고 분비되어 모세혈관의 내피세포로 수송되어 중성지방을 가수분해 한다. LPL 활성은식이섭취 후 증가하여, 지방의 대사에 관여하며 과잉의 에너지를 지방세포에 중성지방의 형태로 저장하게 된다(209). 또한 LPL은 동맥내벽 세포에서 LDL receptor 결합력과 콜레스테롤 흡수를 촉진한다고 알려졌다(210). LPL 결핍에 의한 지단백질의 가수분해가 저하되어 VLDL을 증가시키고 HDL을 감소시킴으로써 동맥경화증을 유발한다는 사실로 미루어 보아(211) 간 및 혈청 내 콜레스테롤 함량과 더불어 LPL 활성 측정은 고지혈증 및 고콜레스테롤혈증과 관련한 중요한 기초 자료를 제공해 줄 수 있다.

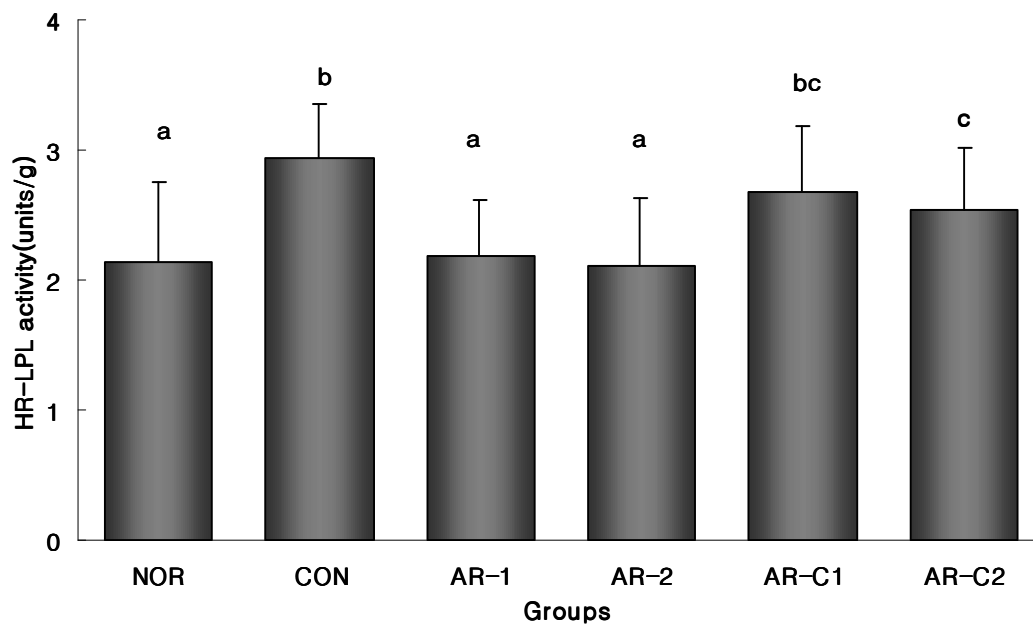
부고환지방조직의 HR-LPL 활성은 우슬 단독으로 투여한 AR-1군과 AR-2군은 정상군과 비슷한 활성을 보였으며, 고지혈증유발식을 급여한 대조군은 정상군에 비해 27% 증가 되었다. 고콜레스테롤 식이와 함께 우슬을 병합 투여한 AR-C1군과 AR-C2군은 각각 12%와 16%로 대조군에 비해 감소되었으며 용량별 차이는 없었다. 내장지방조직의 HR-LPL 활성 역시 대조군이 정상군에 비해 29% 증가되었으며, 우슬을 병합 투여 한 AR-C1군과 AR-C2군은 대조군에 비해 7%와 25%로 각각 감소되었으나, AR-C2군 만이 유의하게 감소하였다.

부고환지방조직의 TE-LPL 활성은 정상군에 비해 고지혈증 식이를 급여한 대조군이 27% 증가하였으며, 대조군에 비해 우슬을 병합 투여 한 AR-C1군은 12%와 AR-C2군은 16%로 각각 감소되었다. 내장지방조직도 마찬가지로 우슬을 단독 투여 한 AR-1군과 AR-C군은 정상군과 비슷한 TE-LPL 활성을 나타내었다. 대조군은 정상군에 비해 TE-LPL 활성이 31% 증가 되었으며, 대조

군에 비해 AR-C1군과 AR-C2군은 각각 7%와 14%로 TE-LPL 활성이 감소되었다.

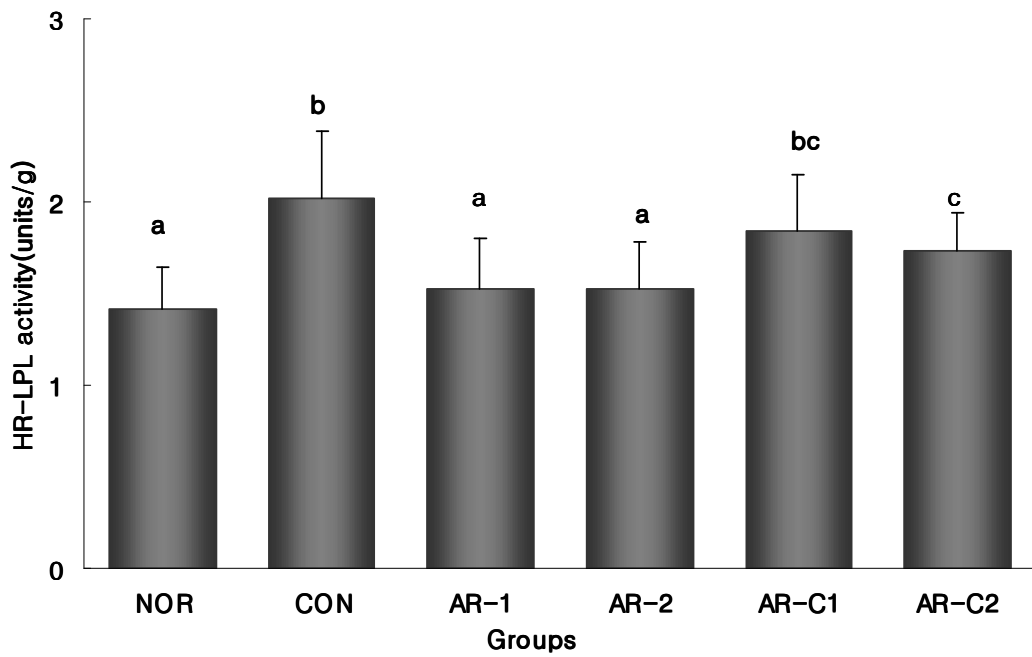
이와 같이 간 및 혈청 내 콜레스테롤 함량이 높았던 고콜레스테롤을 급여한 대조군이 우슬 병합 투여군(AR-C1군과 AR-C2군)들에 비해 부고환 및 내장지방조직의 HR-LPL 및 TE-LPL 활성이 모두 높게 나타났으며, 우슬을 단독 투여한 군들은 정상군과 비슷한 LPL 활성을 보여 고지혈증과 동맥경화 예방효과의 가능성을 제시하였다.

또한 지방부위에 따라 LPL 활성이 다르기 때문에(211,212) 지방부위에 따른 활성도의 차이를 조사하였는데, 부고환지방조직이 내장지방조직에 비해 HR-LPL 활성뿐만 아니라 TE-LPL 활성도 높았다. 사람을 비롯한 실험동물의 경우에도 지방조직의 부위에 따라서 LPL 대사가 다르게 나타나는 것으로 알려졌다(211,212), 흰쥐의 경우 부고환과 등지방조직 같은 내부지방조직은 피하지방조직보다 LPL 활성이 높고, 내장지방조직은 내부지방조직과 피하지방조직 사이의 중간 정도의 LPL 활성을 가지고 있다고 한다(211). 이들 지방조직 부위별 LPL 대사 조절 기전이 다른 이유는 지방세포의 크기, 지방조직의 insulin 민감도, glucocorticoid 혹은 estrogen receptor 수의 차이에 의해 기인된다는 여러 연구결과가 있다(213). 특히 피하지방조직은 부고환지방조직보다 glucocorticoid receptor 수가 적다고 보고되었다(214). 그러나 본 연구는 이들 조사항목에 관한 연구가 수행되지 않았기 때문에 부고환지방조직과 내방지방조직 부위에 따라 LPL 활성이 어떤 기전의 의해 차이가 나타나는지는 알 수 없었다.



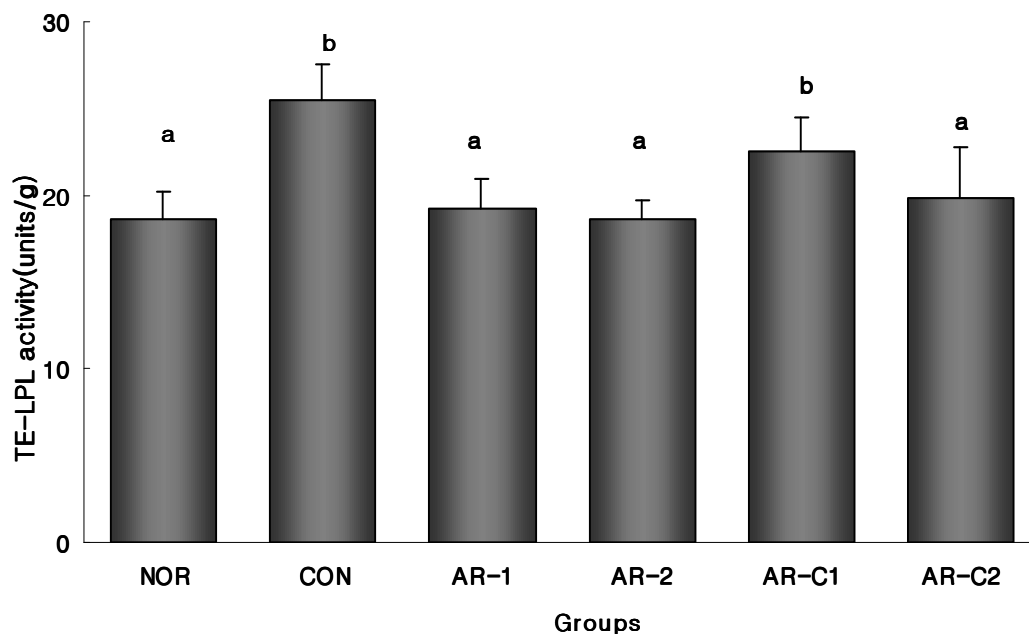
*Fig. 43. Effect of AREE on HR-LPL activity in epididymal adipose tissue of rats fed high-cholesterol diet*

Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S. E. of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey(T)-test.



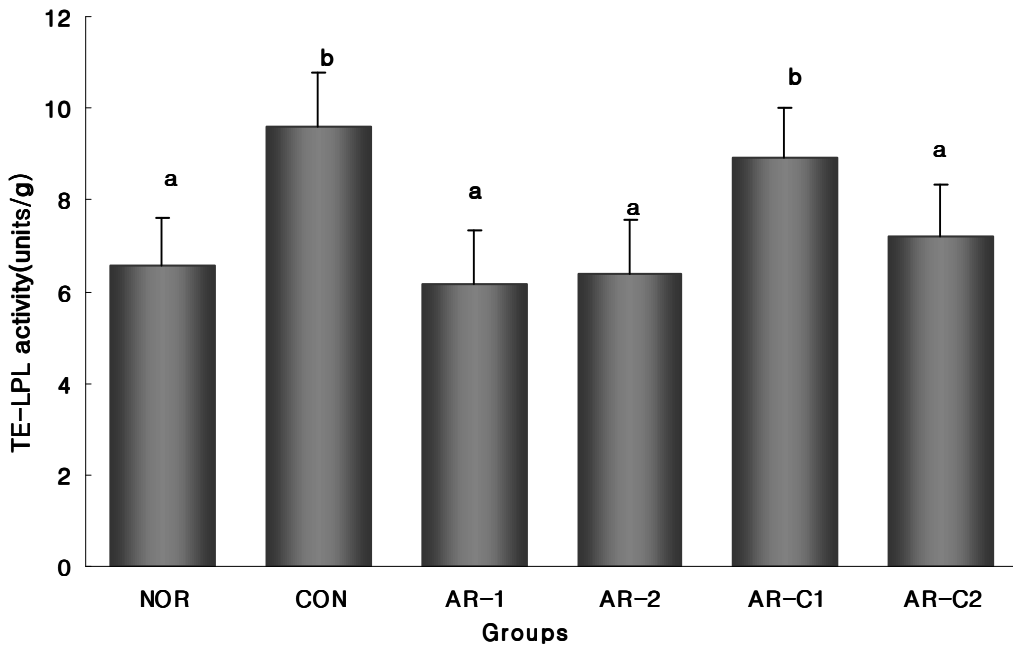
*Fig. 44. Effect of AREE on HR-LPL activity in mesenteric adipose tissue of rats fed high-cholesterol diet*

Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S. E. of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey(T)-test.



*Fig. 45. Effect of AREE on TE-LPL activity in epididymal adipose tissue of rats fed high-cholesterol diet*

Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S. E. of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey(T)-test.



*Fig. 45. Effect of AREE on TE-LPL activity in mesenteric adipose tissue of rats fed high-cholesterol diet*

Abbreviations: See the legend of Table 12. Values are mean  $\pm$  S. E. of 10 rats per each group and different superscript letters indicate significant differences at  $p < 0.05$  by Tukey(T)-test.

## 자. 지방조직 *LPL mRNA* 유전자 발현

대조군에 비해 우슬 병합 투여군(AR-C1군과 AR-C2군)이 부고환 및 내장지방 조직 내 HR-LPL 과 TE-LPL 활성 감소효과를 보였기에 LPL 유전자 발현 감소로 기인되는지를 알아보기 위해 Fig. 46, 47와 같이 부고환 및 내장지방조직의 LPL mRNA 발현양을 조사하였다. 부고환지방조직의 LPL mRNA 수준은 우슬을 단독 투여 한 AR-1군과 AR-2군은 정상군과 마찬가지로 비슷한 경향이였다. 고콜레스테롤을 단독으로 급여한 대조군은 정상군에 비해 LPL mRNA 수준이 현저하게 증가되었다. 우슬을 저용량 병합 투여 한 AR-C1군은 대조군과 유사한 LPL mRNA 수준을 보였으나, 고용량 병합 투여 한 AR-C2군은 대조군에 비해 mRNA 수준이 저하되었다.

내장지방조직의 LPL mRNA 수준도 부고환 지방조직과 유사하게 대조군이 다른 실험군에 비해 유의하게 증가하였다. 우슬을 단독(AR-1군과 AR-2군) 혹은 병합(AR-C1군과 AR-C2군) 투여한 군들은 모두 정상군과 비슷한 mRNA 수준을 보였다.

이와 같이 우슬 투여로 인한 지방조직의 LPL 활성 저하는 LPL mRNA 유전자 발현 저하로 기인되는 것으로 사료된다. 우슬 투여는 고콜레스테롤식으로 증가되어진 혈청 및 지방조직의 중성지방 및 콜레스테롤 함량 감소와 더불어 지방조직 LPL 활성 및 LPL mRNA 수준도 감소시켰다. 즉 우슬은 혈청 및 지방조직의 지질조성을 개선시키고 지방조직의 LPL 활성을 조절시켜 고콜레스테롤식으로 인한 고지혈증 및 고콜레스테롤혈증, 비만 등의 예방 및 지질대사 개선에 이용 가능성이 기대된다.

### 차. 주요 *parameter*들 간의 상관관계

본 실험의 주요 *parameter*들 간의 상호관련성은 Table 26과 같다. 지단백질 중 chylomicron과 VLDL에 함유된 대부분 중성지방은 LPL에 의해 가수분해되어 지면서 지단백질 및 apoprotein의 구성 성분의 일부가 방출되어 HDL-콜레스테롤로 전이된다(215). 지방조직 LPL 활성은 혈액 중성지방 함량뿐만 아니라 HDL-콜레스테롤 함량에도 영향을 미치는 것으로 알려졌다(216). 따라서 지방조직 LPL 활성과 혈청 중성지방 및 HDL-콜레스테롤 함량간의 상관관계를 조사하였다. 혈청 중성지방 함량과 지방조직 LPL 활성간에는 유의적인 정의 상관관계를 보였다. 이러한 결과는 우슬 투여로 인한 LPL 활성 저하로 지방조직으로 유입되는 유리지방산 양이 감소되었기 때문으로 사료되며, Cruz와 Williamson(217)의 *in vivo*와 *in vitro*에서도 혈청 중성지방 함량과 지방조직 LPL 활성과는 정의 상관관계를 나타내었다. 혈청 HDL-콜레스테롤 함량과 지방조직 LPL 활성간에는 HDL-콜레스테롤 함량이 높을수록 LPL 활성은 낮아지는 유의적인 음의 상관관계를 보였다. 혈청 중성지방 함량과 지방조직 HDL-콜레스테롤 함량간의 상관관계도 조사하였는데 유의적인 음의 상관관계를 나타내었다. 이는 혈청 중성지방 함량과 HDL-콜레스테롤 함량간에는 서로 상반되는 경향을 보인다는 Despres 등(216)의 연구 결과와도 일치한다.

**Table 26. Correalation coefficients between blood measurements and LPL activities in fed high-cholesterol diet of rats**

Variations	HDL-C	Triglyceride
Triglyceride	-0.987***	
HR-LPL		
epididymal fat fads	-0.991***	0.987***
mesenteric fat fads	-0.992***	0.983***
TE-LPL		
epididymal fat fads	-0.993***	0.996***
mesenteric fat fads	-0.959*	0.961*



## 제4절 항혈전 효능

### 1. *In vitro* 에서 항혈전 효과

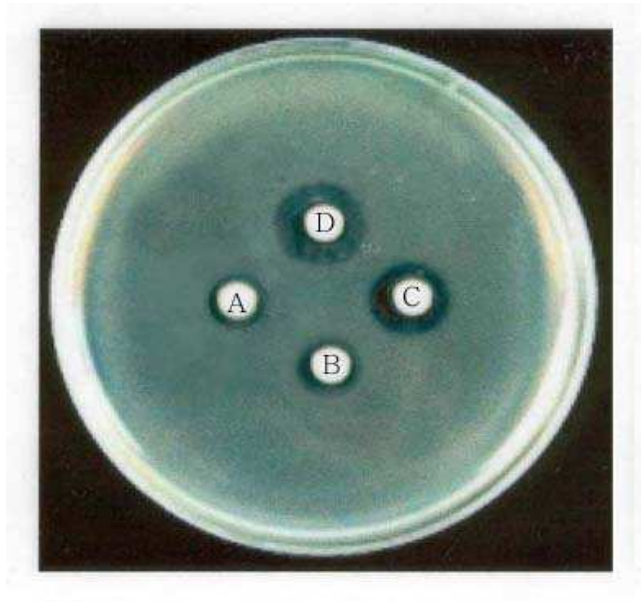
#### 가. *Fibrin* 용해 효과

혈액응고에 의해 생긴 fibrin에 대한 용해능은 fibrin plate를 용해시키는 반경으로 측정하였는데 결과는 Table 27과 Fig. 48과 같다.

Urokinase는 plasminogen을 plasmin으로 변환시켜 fibrin을 용해하여 혈전을 용해하는 물질로 현재 급성심근경색 등 응급질환에 사용되고 있다(219,220). 대조군은 혈전용해제인 urokinase를 사용하였으며 실험군은 우슬 추출물로 200 mg/kg/mL 과 400 mg/kg/mL으로 용량을 달리하였다. 혈액응고에 의해 생긴 fibrin에 대한 용해능은 용해되어진 whole well의 크기로 측정한 결과 우슬 에탄올 추출물 점적 시 용량별 간에는 유의적 차이가 없었으며, urokinase를 점적한 대조군에선 0.9 cm, urokinase와 고용량 우슬 에탄올 추출물(400 mg/kg)을 함께 점적한 군은 1.1 cm 정도로 혈전을 용해 시켰다. 이는 우슬 에탄올 추출물이 체내 존재하는 urokinase 활성을 증가시켜서 혈관 내 혈전생성 억제 및 생성된 혈전의 제거 효과가 있을 것으로 사료된다.

*Table 27. Fibrinolytic activities of urokinase and different dose of AREE, as assessed by size of clear zones on fibrin plates*

<i>Groups</i>	<i>Concentration</i>	<i>Fibrinolysis size per Dilutions(mm)</i>
AR-200(A)	200 mg/kg/mL	2
AR-400(B)	400 mg/kg/mL	2
Urokinase(C)	60 µg/kg/mL	9
AR-400 + URO(D)		11



*Fig. 48. Fibrinolytic activities of urokinase and different doses of AREE, as assessed by size of clear zones on fibrin plates.*

Ten mL of 0.7% fibrinogen solution in a fibrin plate buffer was poured into sterile petri-dish and 50  $\mu$ L of thrombin solution was slowly mixed in dish. the mixture as let to solidify of 1 hr at room temperature. 0.3 mL of test sample was dropped onto the fibrin plate and the plate was incubated for 17 hr at 37°C. Diameter of hydrolyzed clear zone was measured. A: 200 mg/kg/mL of AREE, B: 400 mg/kg/mL of AREE, C: Urokinase(40000 units/mL) 60  $\mu$ g/kg/mL, D: 400 mg/mL AREE + Urokinase(40000 units/mL) 60  $\mu$ g/kg/mL

## 나. 혈장 응고시간 지연 효과

우슬 추출물이 *in vitro* 에서 혈장응고 지연 시간을 측정한 결과는 Table 28 과 같다. 우슬 추출물 200 mg/mL과 400 mg/mL을 생리식염수로 희석하여 50  $\mu$ L를 넣어 혈장응고 시간을 측정한 결과 생리식염수만을 넣은 대조군은 105.7 $\pm$ 19.2(sec), 약물 대조군은 134.5 $\pm$ 10.5(sec), 우슬 에탄올 추출물 저용량 투여군인 AR-200군은 117.3 $\pm$ 15.7(sec), 우슬 에탄올 추출물 고용량 투여군 AR-400군은 117.9 $\pm$ 17.3(sec)로 처리군 간에 유의적 차이가 없었으나 대조군에 비해 우슬 에탄올 추출물 투여군이 혈장응고 시간이 지연되었으며, urokinase를 약물 대조군으로 사용 한 군이 가장 긴 혈장응고 지연 시간을 보여주었다.

**Table 28. Effect of AREE on plasma recalcification effect *in vitro***

<i>Groups</i>	<i>Recalcification Time(sec)</i>	<i>Tr<sup>1)</sup></i>
Control	105.7 $\pm$ 19.2	0
Urokinase(40000 U/kg)60 $\mu$ g/mL	134.5 $\pm$ 10.5	1.27
AR-200	117.3 $\pm$ 11.7	1.11
AR-400	118.9 $\pm$ 11.3	1.11

<sup>1)</sup> Tr = Clotting time ratio of sample(Ts) versus control(Tc)

## 2. *In vivo* 에서 항혈전 효능

### 가. *Collagen* 유발 혈전증에 대한 효능

생쥐에게 collagen과 epinephrine을 병용 투여하여 폐색전을 유발시킨 다음 항혈전 효과를 본 실험 결과는 Table 29와 같다. 혈소판 응집작용을 하는 collagen은 혈소판에서 ADP를 유출시켜 응집을 일으키고, epinephrine은 혈소판 응집단계에서 혈소판 막에 있는  $\alpha$ - 및  $\beta$ -epinephrine type의 receptor에 작용하여 혈소판 응집을 일으킨다. 이렇게 급격한 혈소판 전색이 발생될 경우 혈액 순환 장애로 인한 경련이나 사망 등의 증상이 나타난다(218). 우슬 에탄올 추출물과 대조군으로 aspirin 100mg/kg을 경구투여 한 후 생쥐 뒷다리가 5분 이상 마비나 죽음으로부터 보호된 생쥐의 숫자를 백분율로 하여 항혈전 효과를 살펴본 결과 대조군은 혈전증이 유도되어 5마리 중 4마리가 죽거나 5분 이상 마비가 지속되었는데 비하여 aspirin을 투여 한 대조군은 100% 보호효과를 나타내었다. 우슬 에탄올 추출물 투여군의 경우 용량별간 유의차가 없었으며, AR-200군과 AR-400군에서 모두 5마리 중 3마리 죽어 40%의 보호효과를 나타내었다.

**Table 29. Effect of AREE on pulmonary embolism model by collagen and epinephrine in mice**

<i>Group</i>	<i>Dose</i>	<i>No. of killed or paralyzed/ No. of animal tested</i>	<i>Protection(%)</i>
Control	Saline	5/5	0
Aspirin	100 mg/kg	1/5	80.0
AR-200	200 mg/kg	3/5	40.0
AR-400	400 mg/kg	3/5	40.0

Abbreviations: See the legend of Table 13.

## 나. *Endotoxin* 유발 혈전증에 대한 효능

### (1) *Fibrinogen* 함량

흰쥐에게 우슬 에탄올 추출물을 경구 투여한 후 *endotoxin*에 의해 혈전증을 유발시킨 다음 혈장 *fibrinogen* 함량을 측정된 결과는 Table 30과 같다. 혈장의 *fibrinogen* 함량은 정상군이  $257 \pm 15.9$ (mg/dL)로 대조군의  $113.5 \pm 11.8$ (mg/dL)에 비해 43% 감소되었다. 우슬 에탄올 추출물을 투여한 AR-D1군( $161.9 \pm 9.6$ mg/dL)과 AR-D2군( $177.5 \pm 11.9$ mg/dL)은 대조군에 비하여 증가되었다. *Endotoxin*에 의해 감소된 *fibrinogen* 함량이 우슬 에탄올 추출물 투여로 증가하였으며, 특히 AR-D2군은 양성 약물 대조군인 urokinase( $185.1 \pm 10.8$ mg/dL)에 근접한 *fibrinogen* 함량 증가현상을 보였다.

혈액 내 *fibrinogen*은 혈액 응고과정의 최종단계에 중요한 인자로 간에서 생성되고 혈중으로 방출되어 혈장 중에 존재하는 응고 인자로 thrombin에 의해 분해되어 fibrin으로 전환되어 지혈인자 또는 창상국소의 fibrin matrix의 재료가 된다. 이는 염증, 악성종양, 신장질환, 당뇨병 등과 같은 질환에서 증가하는 경우가 많으며, 선천성 무 및 저 *fibrinogen*, 혈 중 다중성혈관내응고증을 포함 전신성 또는 장기 혈관내 응고 전후군, 거대혈전증, 대량출혈, *fibrinogen* 생성 장애를 보이는 중증 간장해 발병 시 감소한다(221). 따라서 *fibrinogen*은 심근경색, 간질환, 괴저성 손상 및 출혈증과 같은 질병의 예측 및 치료에 유용하게 응용되고 있다.

**Table 30. Effect of AREE on fibrinogen in endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation rats**

<i>Groups</i>	<i>Dose(mg/kg)</i>	<i>No. of animals</i>	<i>Fibrinogen(mg/dL)</i>
Normal	Saline/kg/mL	5	252.7±15.9 <sup>a)</sup>
Control	Endotoxin 0.5 mg/kg/0.2mL	5	113.5±11.8 <sup>b)</sup>
URO	Urokinase(40000 U/mg)60 µg/kg/mL	5	185.1±10.8 <sup>c)</sup>
AR-D1	200 mg/kg/mL	5	161.9± 9.6 <sup>cd)</sup>
AR-D2	400 mg/kg/mL	5	177.5±11.9 <sup>cd)</sup>

Abbreviations: See the legend of Table 14.

**Table 31. Effect of AREE on PT in endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation rats**

<i>Groups<sup>1)</sup></i>	<i>Dose(mg/kg)</i>	<i>No. of animals</i>	<i>PT(sec)</i>
Normal	Saline/kg/mL	5	15.52±0.71 <sup>a)</sup>
Control	Endotoxin 0.5 mg/kg/mL	5	19.41±1.71 <sup>b)</sup>
URO	Urokinase(40000 U/mg)60 µg/kg/mL	5	17.94±1.30 <sup>b)</sup>
AR-D1	200 mg/kg/mL	5	17.02±0.81 <sup>b)</sup>
AR-D2	400 mg/kg/mL	5	16.80±0.92 <sup>ab)</sup>

Abbreviations: See the legend of Table 14.

## (2) PT

PT는 혈장에 조직 thromboplastin과 calcium을 첨가하면 fibrin으로 석출될 때까지의 시간을 말하는 것으로, 혈액 응고계의 외인계 및 공통 경로의 이상을 평가하는 방법이다. 따라서 우슬 에탄올 추출물이 endotoxin에 의해 혈전증이 유발된 흰쥐의 혈장 내 PT에 미치는 영향을 연구한 결과는 Table 31과 같다.

혈장 PT는 정상군이  $15.52 \pm 0.71(\text{sec})$ 로 대조군의  $19.41 \pm 1.71(\text{sec})$ 에 비해 연장되었으나, urokinase를 투여한 양성 대조군은  $17.94 \pm 1.30(\text{sec})$ 로 PT가 단축되었다. 이에 비해 우슬 에탄올 추출물 병합 투여한 AR-D1과 AR-D2군은 각각  $17.02 \pm 0.81(\text{sec})$ 와  $16.80 \pm 0.92(\text{sec})$ 로 대조군에 비하여 PT가 단축되었다.

PT의 단축은 임상적으로 의미가 없으며, 외인계 인자의 생산 저하나 질적 이상, 소비항진 및 외인성 응고과정에 대한 병적인 inhibitor의 출현 등으로 초래되는 PT의 연장이 임상적으로 의미가 있다. 그러므로 PT 측정은 각종 출혈성 질환의 진단 및 치료에 있어서 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 간장해의 종류 및 정도, 활달의 감별 진단, vitamin K 부족 또는 흡수장애의 유무 판정 등에 적용되어 최근 항응혈약 요법의 약제 투여량의 조절에도 유용하게 활용되고 있다(222).

## (3) APTT

우슬 에탄올 추출물이 endotoxin에 의해 혈전증이 유발된 흰쥐의 혈장 내 APTT에 미치는 영향을 연구한 결과는 Table 32와 같다. APTT의 결과는 PT의 결과와 유사한 경향을 보여 정상군의 APTT는  $29.94 \pm 2.17(\text{sec})$ 인데 비하여 대조군은  $37.64 \pm 3.46(\text{sec})$ 로 연장되었고, urokinase 투여군은  $27.72 \pm 1.13(\text{sec})$ 로 감소되었다. AR-D1군은  $33.98 \pm 2.14(\text{sec})$ 였고, AR-D2군은  $31.64 \pm 3.04(\text{sec})$ 로 우슬의 고용량 투여군은 저용량 투여군보다 APTT 연장 억제 효과가 확인되었다.

혈장 내의 APTT는 혈액 응고계의 내인계 및 공통 경로 이상을 평가하는데 사용하는 검사 항목으로 혈장 내 인지질을 첨가하여 응고시간을 측정하는 것이다(223). 또한 혈우병에서와 같이 선천적으로 단일 응고인자가 결핍되거나 또는 간장 질환, vitamin K 결핍증 등 후천적으로 여러 응고 인자가 결핍되었을 때 증가된다. 본 연구에서 PT 및 APTT가 정상군에 비해서 endotoxin을 투여한 대조군 및 실험군에서 정상군에 비해 연장 된 것은 endotoxin에 의한 파종성혈관내응고증 기전으로 인해 공통경로 응고 인자인 fibrinogen의 소모성 감소가 초래되어 나타난 결과로 사료된다. 또한 유의적인 차이는 없었으나 우슬 에탄올 추출물 투여군에서 대조군에 비해 PT 및 APTT의 연장 억제가 나타난 것은 우슬 에탄올 추출물군에서 fibrinogen 함량이 대조군에 비해 증가되었기에 나타난 결과라고 사료된다.

**Table 32. Effect of AREE on APTT in endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation rats**

<i>Groups</i>	<i>Dose (mg/kg)</i>	<i>No. of animals</i>	<i>APPT(sec)</i>
Normal	Saline/kg/mL	5	29.94±2.17 <sup>a)</sup>
Control	Endotoxin 0.5 mg/kg/mL	5	37.64±3.46 <sup>b)</sup>
URO	Urokinase(40000 U/mg)60 µg/kg/mL	5	29.72±1.13 <sup>a)</sup>
AR-D1	200 mg/kg/mL	5	33.98±2.14 <sup>ac)</sup>
AR-D2	400 mg/kg/mL	5	31.64±3.04 <sup>ac)</sup>

Abbreviations: See the legend of Table 14.



#### (4) 출혈시간 (*Bleeding time*)

시료의 출혈시간 측정은 혈액응고와 관련한 항혈전 작용 연구에 있어서 하나의 측정 변수가 되고 있으며 출혈 시간이 길다는 것은 혈액이 맑고 깨끗함을 나타내는 것이다. 따라서 우슬 에탄올 추출물을 경구 투여하였을 때 흰쥐의 출혈시간 지연에 효과가 있는지를 관찰하기 위하여 실시하였는데 그 결과는 Table 33과 같다. 출혈시간은 대조군이 정상군에 비해 51% 단축되었으며, 우슬 에탄올 추출물인 AR-D1과 AR-D2군은 대조군에 비해 각각 8%와 19%의 지연 효과를 보였다. 이러한 결과는 우슬 에탄올 추출물이 혈 중 혈액 응고를 방지할 수 있을 것으로 사료된다.

**Table 33. Effect of AREE on bleeding time prolongation in endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation rats**

<i>Groups</i>	<i>Dose(mg/kg)</i>	<i>No. of animals</i>	<i>Bleeding time(sec)</i>
Normal	Saline/kg/mL	5	117±10.94 <sup>a)</sup>
Control	Endotoxin 0.5 mg/kg/mL	5	57± 6.98 <sup>b)</sup>
URO	Urokinase(40000 U/mg)60 µg/kg/mL	5	98±10.04 <sup>a)</sup>
AR-D1	200 mg/kg/mL	5	62± 7.88 <sup>b)</sup>
AR-D2	400 mg/kg/mL	5	71± 5.96 <sup>b)</sup>

Abbreviations: See the legend of Table 14.

### (5) 출혈량(OD Value)

우슬이 출혈에 미치는 효과를 측정하기 위한 또 다른 방법은 UV spectrometer를 이용하여 540 nm에서 흡광도(optical density, OD)값을 측정하는 것으로 출혈시간이 길어질수록 출혈량이 증가된다. 이는 출혈량 측정법이 출혈시간 지연효과를 측정하는데 있어서 효과적인 방법임을 시사하는 것으로 본 실험에 적용하였는데 결과는 Table 34와 같다. 출혈량은 대조군이 다른 실험군에 비해 가장 적었으며, 우슬 에탄올 추출물을 투여 한 AR-D1군과 AR-D2군은 대조군에 비해 증가하였다.

*Table 34. Effect of AREE on bleeding time effects O.D. value at 540 nm by bleeding time prolongation effects in endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation rats*

<i>Groups</i>	<i>Dose (mg/kg)</i>	<i>No. of animals</i>	<i>OD value</i>
Normal	Saline/kg/mL	5	0.42
Control	Endotoxin 0.5 mg/kg/mL	5	0.20
URO	Urokinase(40000 U/mg)60 µg/kg/mL	5	0.36
AR-D1	200 mg/kg/mL	5	0.26
AR-D2	400 mg/kg/mL	5	0.26

Abbreviations: See the legend of Table 14.

(6) 혈장응고시간(plasma clotting time)

혈장응고 지연시간의 측정은 prothrombin을 thrombin으로 전환시키는 과정에서 작용하는  $Ca^{++}$ 이온의 저해효과를 혈장 응고시간으로 측정한 것이다. 우슬 에탄올 추출물이 혈장 응고 지연시간에 미치는 영향은 Table 35와 같다. 혈장 응고 시간은 정상군이  $184.5 \pm 19.3$ (sec)로 대조군의  $105.7 \pm 19.2$ (sec)에 비해 43% 감소하였다. 우슬 에탄올 추출물을 투여한 AR-D1군은  $167.3 \pm 15.7$ (sec)고, AR-D2군은  $169.9 \pm 17.3$ (sec)로 약물 대조군인 urokinase 투여군의  $173.1 \pm 10.5$ (sec) 정도까지 혈장 응고 지연시간을 회복시키는 효과가 있는 것으로 확인되었다.

**Table 35. Effect of AREE on plasma recalcification effects in endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation rats**

<i>Groups</i> <sup>1)</sup>	<i>Dose (mg/kg)</i>	<i>No. of animals</i>	<i>Recalcification Time(sec)</i>	<i>Tr</i> <sup>2)</sup>
Normal	Saline/kg/mL	5	$184.5 \pm 19.3^a$	1.75
Control	Endotoxin 0.5 mg/kg/mL	5	$105.7 \pm 19.2^b$	0
URO	Urokinase(40000U/mg)60 $\mu$ g/kg/mL	5	$173.1 \pm 10.5^a$	1.64
AR-D1	200 mg/kg/mL	5	$167.3 \pm 15.7^a$	1.58
AR-D2	400 mg/kg/mL	5	$169.9 \pm 17.3^a$	1.61

Abbreviations: See the table 14, Tr = Clotting time ratio of sample(Ts) versus control(Tc)

(7) 전혈 응고시간(*whole bleeding time*)

출혈시간은 혈관, 혈소판 및 혈액응고계의 항혈전 작용효과를 모두 관찰 할 수 있으며 전혈 응고 시간은 혈소판과 혈액응고계의 항혈전 작용효과를 관찰할 수 있다. 전혈 응고 시간을 측정한 결과는 Table 36과 같다. 전혈 응고 시간은 대조군은 98.1±9.63(sec), AR-D1군은 109.3±9.41(sec), AR-D2군은 112.5±8.93(sec)로 대조군에 비해 우슬 에탄올 추출물을 투여 시 증가하였으며, 약물 대조군인 urokinase에서는 123.5±8.96(sec)로 나타났다.

*Table 36. Effect of AREE on whole bleeding time effects in endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation rats*

<i>Groups<sup>1)</sup></i>	<i>Dose (mg/kg)</i>	<i>No. of animals</i>	<i>Whole bleeding time(sec)</i>
Normal	Saline/kg/mL	5	137.8±10.53 <sup>a)</sup>
Control	endotoxin 0.5 mg/kg/mL	5	98.1± 9.63 <sup>b)</sup>
URO	Urokinase(40000 U/mg)60 µg/kg/mL	5	123.5± 8.96 <sup>a)</sup>
AR-D1	200 mg/kg/mL	5	109.3± 9.41 <sup>b)</sup>
AR-D2	400 mg/kg/mL	5	112.5± 8.93 <sup>b)</sup>

Abbreviations: See the legend of Table 14.

### (8) Hematocrit치

우슬 투여가 hematocrit치에 미치는 효과는 Table 37과 같다. Hematocrit치는 정상군이  $36.9 \pm 5.0\%$ 인데 비하여 대조군은  $31.8 \pm 1.42\%$ 로 감소되었으며, 우슬 추출물을 투여 한 AR-D1군과 AR-D2군은 각각  $34.6 \pm 2.07\%$ 와  $34.8 \pm 1.13\%$ 로 대조군에 비하여 증가하였으나 유의차는 없었다.

*Table 37. Effect of AREE on hematocrit value in endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation rats*

<i>Groups<sup>1)</sup></i>	<i>Dose (mg/kg)</i>	<i>No. of animals</i>	<i>Hematocrit value(%)</i>
Normal	Saline/kg/mL	5	$38.2 \pm 1.78^a)$
Control	Endotoxin 0.5 mg/kg/mL	5	$31.8 \pm 1.42^b)$
URO	Urokinase(40000 U/mg)20 µg/kg/mL	5	$36.1 \pm 1.34^a)$
AR-D1	200 mg/kg/mL	5	$34.6 \pm 2.07^b)$
AR-D2	400 mg/kg/mL	5	$34.8 \pm 1.13^b)$

Abbreviations: See the legend of Table 14.

## 제4장 요약

우슬의 생리활성 효과를 구명하기 위하여 첫째, 우슬의 일반 및 영양성분을 분석하였고, 둘째, 항산화 효과를 보기 위해 *in vitro* 에서 우슬 각 분획별 항산화력을 측정하였고, *in vivo*에서 에탄올에 의한 간의 산화적 세포 손상에 작용하는 활성산소의 소거효과를 보았고, 셋째, 고지혈증 예방효과를 보기 위해 *in vitro* 에서 LDL 산화 억제능을 측정하였고, *in vivo* 에서는 고콜레스테롤식으로 유발된 고지혈증 억제 효능에 관하여 연구하였고, 넷째, 항혈전 효과를 보기 위해 *in vitro* 에서 fibrin 용해능과 혈장 응고 연장시간을 측정하였고, *in vivo* 에서는 endotoxin에 의해 유발된 혈전증의 예방효과를 연구하였다. 우슬의 생리활성 효과를 측정하여 검토한 결과는 다음과 같다.

1. 우슬의 아미노산은 lysine, 유기산은 oxalic acid 함량이 가장 많았고, 무기질은 K, 양이온은  $K^+$ 이 많았으며, 음이온은  $NO_3^{2-}$ 가 검출되었다.
2. *In vitro* 에서 우슬 에탄올 추출물을 계통 분획하여 DPPH radical에 대한 자유기 소거능, Rancimat로 측정한 항산화지수, 아질산염 소거능, 지질과산화물 생성 억제와 linoleic acid에 대한 효과 등을 측정한 결과 분획 중 n-butanol의 항산화력이 가장 우수하였고 아질산염 소거능은 pH 1.2에서 우수하였으며 과산화물가는 저장기간이 경과함에 따라 많이 증가하였다.
3. *In vivo* 에서 알코올에 의한 간의 산화적 세포손상에 작용하는 oxygen free radical의 소거효과에서
  - ① 6주간의 체중 증가율과 식이효율은 대조군이 정상군에 비하여 현저히 감소되었으나 우슬 에탄올 추출물과 알코올 병합 투여군은 알코올 투여로 감소된 체중을 정상군에 근접토록 유의하게 증가시켰으며 우슬 투여량에 따른 유의차가 보였다.

② 유리기 생성계인 간조직의 XO 활성은 대조군이 정상군에 비하여 유의하게 증가되었고 우슬 에탄올 추출물 투여 시 알코올 투여로 증가된 활성을 감소시켰다. 우슬이 간조직의 유리기 해독계 효소들의 활성에 미치는 영향은 SOD 활성은 대조군이 정상군에 비하여 현저히 증가되었으며 이는 알코올 투여로 생성된 활성산소를 소거하려는 생리 적응 현상이었으며, 우슬 에탄올 추출물 투여로 그 활성은 유의적으로 감소되었다. Catalase 활성은 알코올 투여로 정상군에 비하여 많이 증가되었으나 우슬 에탄올 추출물 투여로 증가된 활성을 유의적으로 감소시켰다. GSH-Px 활성은 알코올 투여로 정상군에 비하여 증가되었으나 우슬 에탄올 추출물 투여로 증가된 활성을 유의적으로 감소시켰다.

③ 간조직 중 과산화지질 함량은, 대조군이 정상군에 비하여 유의하게 증가되었다. 우슬 에탄올 추출물 소량 투여군은 알코올 투여로 증가된 간조직 중의 과산화지질 함량을 대조군에 비해 감소시켰으며 다량 투여군의 경우 소량 투여군에 비하여 더 효과가 컸다. GSH 함량은 우슬 에탄올 추출물만을 투여한 군은 정상군에 비하여 큰 변화를 나타내지 않았으나, 알코올 투여한 대조군의 GSH 함량은 정상군에 비하여 유의적으로 감소되었다. 그러나 우슬 에탄올 추출물 다량 투여군은 알코올 투여로 감소된 GSH 함량을 정상군에 근접토록 증가시켰다.

4. *In vivo* 에서 LDL 산화 억제 효과를 측정한 결과 우슬 분획 중 n-butanol에서 그 효과가 가장 우수하였다.

5. *In vivo* 에서 고콜레스테롤 식이로 유발된 고지혈증 억제 효과는

① 고콜레스테롤식이만을 급여한 군(대조군)은 정상군에 비하여 높은 체중증가율을 보였다. 우슬 에탄올 추출물 병합 투여 시 대조군에 비하여 감소되는 경향이었으나 특히 우슬 에탄올 추출물 다량 투여군의 체중증가율이 대조군에 비하여 유의적으로 감소되었다. 간장/체중 비율은 대조군은 정상군에 비하여 유의하게 증가되었다.

- ② 우슬 에탄올 추출물 투여는 고콜레스테롤식이 섭취로 증가된 혈청 AST, ALT 및 ALP 활성을 감소시켰다.
- ③ 혈청 중 지질 함량은 대조군이 정상군에 비하여 혈청 중성지방과 총콜레스테롤 함량이 유의하게 증가되었으나, 고콜레스테롤식이와 우슬 에탄올 추출물을 병합 투여한군은 중성지방 함량은 대조군에 비하여 유의적으로 감소하였으며, 총콜레스테롤 함량은 정상군보다는 높았으나 고콜레스테롤 식이로 증가된 콜레스테롤 함량을 유의하게 감소시켰다. 혈청 인지질 함량도 고콜레스테롤식이를 급여한 대조군은 정상군에 비해 감소되었으나 우슬 에탄올 추출물 병합 투여한 군은 정상군에 근접하도록 증가되었다.
- ④ 혈청 중 유리콜레스테롤 함량은 우슬 에탄올 추출물 투여군이 정상군에 비해 감소하였으나 유의적인 효과는 나타나지 않았으나, 콜레스테롤 에스테르 함량은 현저하게 감소하였다. 특히 우슬 에탄올 추출물 다량 투여군은 대조군에 비하여 약 36% 정도 감소되었다.
- ⑤ 우슬 에탄올 추출물 투여한 군들은 HDL-콜레스테롤 함량이 대조군에 비하여 증가하였으며 HDL-C/TC의 비도 유의적으로 증가하였다. 또한 동맥경화 발병 위험을 나타내는 동맥경화지수는 우슬 에탄올 추출물 투여한 군들은 고콜레스테롤식이를 급여한 대조군에 비해 감소되었다.
- ⑥ 부고환과 내장 지방조직의 HR-LPL 및 TE-LPL 활성은 정상군에 비해 고콜레스테롤식이를 급여한 군이 증가하였고, 우슬 추출물 병합 투여한 군들은 대조군에 비해 감소되었다. 부고환과 내장지방 조직의LPL 유전자 발현 역시 우슬 추출물 병합 투여로 감소되었다.
- ⑦ 간 및 지방조직 총콜레스테롤과 중성지방 함량은 고콜레스테롤식을 급여한 대조군이 정상군에 비하여 증가되었으나 유의차는 없었다.
6. *In vitro* 에서 우슬이 fibrin 용해능에 미치는 효과는 urokinase처럼 유의하게 혈전 용해능을 보이지는 않았으나, urokinase 활성 증가에 도움을 주었다.



## 7. *In vivo* 에서 항혈전능 연구 결과는

- ① Collagen과 epinephrine에 의해 유도된 폐색전이 연구에서 대조군에 비해 우슬 에탄올 추출물 투여 시 우슬 에탄올 추출물 함량이 증가함에 따라 폐색전 예방 효과를 보였다.
- ② Endotoxin에 의해 유도된 혈전증은 fibrinogen 함량, PT, APTT, 출혈시간, 혈장응고 지연시간, 전혈응고 시간 및 hematocrit치 모두 대조군에 비해 우슬 에탄올 추출물 투여로 항혈전 효과를 나타내었으며, 우슬 투여 용량별 차이가 있었다.

이상의 연구 결과 우슬의 항산화 작용은 유리기 해독계 효소인 SOD와 catalase 활성을 억제시키고, 비효소적 항산화 작용을 나타내는 GSH 함량을 증가시켜 그로 인한 지질과산화물에 대한 방어력이 증가되어 나타나는 것으로 판단되어진다. 또한 우슬 투여는 고콜레스테롤식을 급여로 증가된 혈청 총콜레스테롤, LDL-콜레스테롤 및 중성지방 함량을 감소시켰으며, 감소되어진 HDL-콜레스테롤 및 인지질 함량은 증가시켰으며, 간과 지방조직의 총지질, 총콜레스테롤과 중성지방 함량도 우슬 투여로 감소되었다. 또한 고콜레스테롤식으로 증가된 지방조직의 LPL 활성과 LPL mRNA 수준도 저하되었다. 아울러 폐색전 및 혈전유발 연구에서 우슬 투여로 항혈전 효과를 보였다. 따라서 우슬의 항산화, 고지혈증 예방 및 항혈전 효과를 통해 지질대사 개선효과를 보았고 이로 인해 지방간 및 동맥경화의 예방과 치료의 가능성을 제시하였다.

## 제5장 참 고 문 헌

1. 육창수. 1989. 원색한국 약용 식물도감, 아카데미서적, 서울.p 175.
2. Sun SP, Li KH, Sun SS. 1985. Pharmacological studies on *Achyranthes bidentata*. *Hanan Trade Chin Med* 47: 39-40.
3. 이승택, 채영암. 1996. 양용작물재배. 향문사. 서울. p159-165.
4. Lee SO, Lee HJ, Yu MH, Im HG, Lee IS. 2005. Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extracts from vegetables produced in Ullung island. *Korean J Food Sci Technol* 37: 233-240.
5. Hahn DR, Lee WM. 1991. Studies on the constituents of *Achyranthis Radix*( I ) oleanolic acid bisdesmoxide from the roots. *Yakhak Hoeji* 35: 457-460.
6. Takabe S, Tadahiro T, Ying JC, Yukio O. 1985. Triterpenoid glycosides from the root of tetrapanax papyrifera K. Koch. III structure of four new saponins. *J Chem Pharm Bull* 33: 4701-4708.
7. Ogawa S, Nishimoto N, Okamoto N, Takemoto T. 1971. Studies on the constituents of *Achyranthis radix* (VIII). The insect-moulting substances in *Achyranthes* genus. *Yakugaku Zasshi* 91: 916-920.
8. Son KH, Hwang JH, Lee SH, Park JH. 1999. Isolation and quantitative determination of 20-hydroxyecdysone from *Achyranthis radix*. *Kor J Pharmacogn* 30: 335-339.
9. Sung JH, Chang CC, C YS. 2004. The effect of caffeine on the antioxidative activities of mouse liver. *Korean J Food and Nutr.* 17: 442-449.
10. Tang HQ, Hu J, Tang L, Tan RX. 2000. Terpenoids and flavonoids from *Artemisia* species. *Planta Med* 66: 391-393.

11. Jeong TS, Hwang EI, Bok SH, Kim SU. 1999. Chitin synthase II inhibitory activity of ursolic acid, isolated from *Crataegus pinnaifida*. *Planta Med* 65: 261-263.
12. Kashiwada Y, Nagao T, Hashimoto A, Ikeshiro Y, Okabe H, Cosentino LM, Lee KA. 2000. Anti AIDS agents 38. Anti-HIV activity of 3-O-acyl uroslic and derivatives. *J Nat Product* 36: 1619-1622.
13. Alvarez ME, Maria AO, Saad JR. 2002. Diuretic activity of fabiana patagonica in rats. *Phytotherapy Reasearch* 16: 71-73.
14. Yoshikawa M, Matsuda H. 2000. Antidiabctogenic activity of oleanolic acid gloysides form medicinal foodstuffs. *Biofactors* 13: 231-237.
15. Li Y, Mastuda H, Yoshikawa M. 1999. Effects of oleanolic acid glycosides on gastrointestinal transit and ileus in mice. *Bioorganic Medicinal Chem* 7: 1201-1205.
16. Jeong HG. 1999. Inhibition of cytochrome P450 2E1 expression by oleanolic acid : hepatoprotective effects against carbon tetrachloride-induced hepatic injury. *Toxicol Lett* 105: 215-222.
17. Jeong HJ, Wee JJ, Shin JY, Cho JH, Jung DH. 2005. Antioxidative effect of crude saponin fraction prepared from culture product of basidiomycota cultured with fresh ginseng as substrate. *Korean J Food Sci Technol* 37: 67-72.
18. 홍윤호. 2003. 기능성 식품학. 전남대학교 출판부. p79.
19. Park YH, Song MJ, Kim NS. 1998. Studies on platelet activation of aikosaponin isolated from *Bupleuri Radix*. *J Fd Hyg Safety* 13: 355-359.
20. Kim JD, Seong KS, Ki DW, Ko SR, Chang CC. 2004. Antioxidative effects of red ginseng saponin on paraquat-induced oxidative stress. *J*

*Genseng Res* 28: 5-10.

21. Park MH, Son GM, Bae MJ. 1995. Effect of platycodi radix and platycodi radix saponin on liver lipid in rats on fed high fat diet. *Korean J Food Nutr* 8: 222-229.
22. 조영수, 차재영. 2003. 기능성 식품학. 동아대학교 출판부. P 85-86.
23. Kim KA, Park HJ, Lee JS, Kim JW, Kim CJ, Shin IS, Han SM, Lim SB. 2003. The inhibitory effect of *Achyranthis bidentata radix* extract on cytochrome p450-catalyzed reactions in human liver microsomes. *J Korean Oriental Med* 24: 40-46.
24. Li AK, Li DD, 1997. The immunomodulatory effect of *Achyranthes bidentata* polysaccharides. *Yau Xue Bao* 32(12): 881-887.
25. Yen GC, Chen HY, Peng HH. 2001. Evaluation of the cytotoxicity, mutagenicity and antimutagenicity of emerging edible plants. *Food Chem Toxicol* 39: 1045-1053.
26. Rajnarayana K, Sripal RM, Chaluvadi MR. 2001. Bioflavonoids classification. Pharmacological biochemical effects and therapeutic potential. *Indian J Pharmacol* 33: 2-16.
27. Im SI. 1998. The effect of *Achyranthis Bidentatae Radix*(ABR) on dental caries and periodontal adigease. *MS Thesis*. Daejen University.
28. Ratra PS, Misra KC. 1970. Seasonal variation in chemical composition of *Achyranthes aspera* and *A. Bidentata*. *Indian Forester* 96: 372-375.
29. Lee KS, Lee JI, Lee Jk, Lee J, Kim GD, Oh MJ. 2005. Inhibition effect of *Achyranthes japonia* N. Root extract on cathepsin B. *Korean J Food Preserv* 12: 275-281.
30. Kiso Y, Suzuki Y, Konno C, Hikino H, Hashimoto I, Tagi Y. 1982. Liver-protective drugs. 3. The validity of the oriental medicines. 38.

- Application of carbon tetrachloride-induced liver lesion in mice for screening of liver protective crude drugs. *Shoyakugaku Zasshi* 36: 238-244.
31. Lee SD, Kim KS. 1999. The effect of *Achyranthis Radix* and apitoxin aqua-acupuncture on cellular immune responses to LPS-included arthritis in mice. *J Kor Accupuncture on Moxibustion Society* 16(3): 287-315.
  32. Kim MS. 2003. A Study on the Investigation of Optimal Cultivation Conditions for the Production of Some Medicinal Chemicals in *Achyranthes japonica* NAKAI. *phD Thesis*. Chonnam University
  33. Summary Report of the Cause of Death Statistics. 2002. *Korean National Statistical Office*.
  34. Kim JS. 2000. The current status of Koreans coronary heart disease. In Diagnosis and treatment in hyperlipidemia association of hyperlipidemic therapy. Haneuyhak, Seoul, p 64-74.
  35. Ames BN. 1989. Endogenous oxidative DNA damage, aging, and cancer. *Free radical Res Commun* 7: 121-128.
  36. Cha BC, Lee W, Choi MY. 1998. Antioxidative and antimicrobial effects of nut species. *Kor J Pharmacogn* 29: 28-34.
  37. Shin CH. 2001. Studies on the antioxidative character in the ethyl acetate extractions of *Rumex crispus*. *Korean J Biotechnol Bioeng* 16: 592-602.
  38. Jeong SJ, Lee H, Song NH, Lee SE, Baeg I. 2004. Natural products chemistry : screening for antioxidant activity of plant medicinal extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 28-33.
  39. Chang SS, Biserka OM, Oliver AL, Huang CL. 1977. Natural antioxidants from rosemary and sage. *J Food Science*. 42:1102-1106.
  40. Kim EJ, Ahn MS. 1993. Antioxidative effect of Ginger extracts. *Korean*

*J Soc Food Sci* 9: 37-42.

41. Lee CJ. 1999. A study on the antioxidative effects on the oils and identification of antioxidative substances from as *Astragalus membrabaceus* Bunge extracts. *PhD Thesis*. Sungshin Women's University.
42. Choi U, Shin DH, Chang YS, Shin JI. 1992. Antioxidant activity of ethanol extract from *Rhus javanica* Linne on edible oil. *Korean J Food Sci Technol* 24: 320-325.
43. Jung GT, Ju IO, Choi JS, Hong JS. 2000. The antioxidative, antimicrobial and nitrite scavenging effects of *Schizandra chinensis* RUPRECHT(Omija) seed. *Korean J Food Sci Technol* 32: 928-935.
44. Woo N, Ahn MS, Lee KY. 1995. Antioxidative effect of aloe(*Aloe arborescences*) extracts on linoleic acid and soybean oil. *Korean J Soc Food Sci* 11: 536-541.
45. Park SW, Woo CJ, Chung SK, Chung KT. 1994. Antimicrobial and antioxidative activities of solvent fraction from *Humulus japonicus*. *Korean J Food Sci Technol* 26: 464-470.
46. Lim DK, Choi U, Shin DH. 1996. Antioxidative activity of ethanol extract from Korean medicinal plants. *Korean J Food Sci Technol* 28: 83-89.
47. Cho SY, You BJ, Chang MH, Lee SJ, Sung NJ, Lee EH. 1994. Screening for the antioxidants in unused marine resources by the polarographic method. *Korean J Food Sci Technol* 26: 417-421.
48. Park JH, Kang KC, Baek SB, Lee YH, Rhee KS. 1991. Separation of antioxidant compounds from edible marine algae. *Korean J Food Sci Technol* 23: 256-261.

49. Pryor WA. 1977. Free radical in biology. In involvement of radical reactions in aging and carcinogenesis in medicine chemistry. *Elsevier Amsterdam* 331-361.
50. Emanuee A. 2002. Serial Review : Alcohol, oxidative stress and cell injury, Free radical mechanisms in immune reactions associated with alcoholic liver disease. *Ree Radical Med* 32(2): 110-114.
51. Mckilop IH, Schrum LW. 2005. Alcohol and liver cancer. *Alcohol* 35: 195-203.
52. Watzel B, Watson PR. 1992. Role of alcohol abuse in nutritional immunosuppression. *J Nutr* 12: 2733-2737.
53. Liber CS. 1994. Alcohol and the liver : Update. *Gastroenterology* 106: 1085-1090.
54. Liber CS. 2004. Alcoholic fatty liver : its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol* 34: 9-19.
55. Lieber CS. 2001. Orginal article : Alcoholic liver injury. Pathogenesis and therapy in 2001. *Pathol Biol* 49: 738-752.
56. Victory RP, Junko A, Migiwa A, Michael K, David M, Onni Niemela SP, Alistair GP, Timothy P, Rajkumar R, Helmut S, Yasuhiro U, Simon W. 2002. Serial Review: alcohol, oxidative stress, and cell injury: Free radicals in alcoholic myopathy: indices of damage and preventive studies. *Free radical Biology and Medicine* 32(8): 683-687.
57. Zhi Z, Lemasters JJ. 2004. Role of free radicals in failure of fatty liver grafts caused by ethanol. *Alcohol* 34: 49-58.
58. Paek SC. 1999. Ethanol oxidation is accelerated by argumentation of malate-asparate shuttle with asparate. *Korean J Biochem* 25: 137-143.
59. Paek CI. 1999. Cause and effect of hangover. *Food Und Nutr* 4: 26-30.

60. Skrzdewska LW. 2004. Antioxidant properties of black tea in alcohol intoxication. *Food Chemical Toxicol* 42: 2045-2051.
61. Kaviarasan K, Arjunan M, Pugalendi KV. 2005. Lipid profile, oxidant - antioxidant status and glycoprotein components in hyperlipidemic patients with/without diabetes. *Clinica Chimica Acta* 362: 49-56
62. Lorenz JP, Doormen V, Orlebeke KF. 1982. Stress, personality and serum cholesterol level. *J Human Stress* 8: 24-36.
63. Block E. 1986. Antithrombotic organosulfur compounds from garlic. *J Am Soc* 108: 1045-1050.
64. Truswell AS. 1978. Diet and plasm lipids a reappraisal. *Amer J Clin Nutr* 31: 997-989.
65. Steinberg D, Parthasarathy S. 1989. Beyond cholesterol. Modifications of low-density lipoprotein that increase its atherogenicity. *N Eng J Med* 320: 915-921.
66. Fogelman AM, Shechter I, Sigenger J, Hook M, Child JS, Edward PA. 1980. Malondialdehyde alteration of low density lipoprotein leads to cholesteryl ester accumulation in human monocyte-macrophages. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 2214-2218.
67. Esterbauer H, Gebicki J, Pohl H, Jurgens G. 1992. The role of lipid peroxidation and antioxidants in oxidative modification of LDL. *Free Radic Biol Med* 13: 341-390.
68. Shikawa Y, Inadera H, Shiral K, Hashimoto H, Fukamachi I, Saito Y, Yoshida S. 1992. Moderate oxidation of hypertriglyceridemic LDL causes apolipoprotein-B epitope change and enhances its uptake by macrophages. *Biochem Biophys Acta* 1129: 60-64.
69. Mohammad M, Zafar HB, Jahangir I. 2005. Hypolipidemic and



- antioxidant properties of tocotrienol rich fraction isolated from rice bran oil in experimentally induced hyperlipidemic rats. *Food Chemical Toxicol* 43: 747-753.
70. Morel DW, Hessler JR, Chisolm GM. 1983. Low density lipoprotein cytotoxicity induced by free radical peroxidation of lipid. *J Lipid Res* 24: 1070-1076.
71. Henriksen T, Mahoney EM, Steinberg D. 1983. Enhanced macrophage degradation of biologically modified low density lipoprotein. *Atherosclerosis* 3: 149-159.
72. More DW, Docorleto PE, Chisolm GM. 1984. Endothelial and smooth muscle alter low density lipoprotein in vitro by free radical oxidation. *Atherosclerosis* 4: 357-364.
73. Esterbauer H, Streigel G, Phul H, Oberreither S, Rothermeder M, Urgens G. 1989. The role of vitamin E and carotenoids in preventing oxidation of low density lipoproteins. *Ann N Y Acad Sci* 570: 254-267.
74. Manigiapane H, Thomson J, Salter A, Brown S, Bell GD, White DA. 1992. The inhibition of the oxidation of low density lipoprotein by (+)-catechin, a naturally occurring flavonoid. *Biochem Pharmacol* 43: 445-450.
75. De Whalley CV, Rankin SM, Hoult JRS, Jessup W, Leake DS. 1990. Flavonoids inhibit macrophage. *Biochem Pharmacol* 39: 1473-1750.
76. Grag ML, Thomson BR, Clandinin MT. 1988. Effect of dietary cholesterol and/or  $\omega$ -3-fatty acid on lipid composition and  $\Delta^5$ -desaturase activity of rat liver microsome. *J Nutr* 118: 661-668.
77. Keys A. 1984. Serum cholesterol response to dietary cholesterol. *Amer J Clin Nutr* 40: 351-359.

78. Brown MS, Goldstein JL. 1980. Multivalent feedback regulation of HMG-CoA reductase, a control mechanism coordinating isoprenoid synthesis and cell growth. *J Lipid Res* 21: 505-512.
79. Ye P, Pei L, Wang S. 1996. Polymorphisms of the human lipoprotein lipase gene: possible association with lipid levels in patients with coronary heart disease in Beijing area. *Med Sci J* 11: 157-161.
80. Eckel RH. 1989. Lipoprotein lipase: A multi functional enzyme relevant to common metabolic diseases. *N Engl J Med* 320: 1060-1068.
81. Grune R, Hietanen E, Greenwood MR. 1978. Increased adipose tissue lipoprotein lipase activity during the development of the genetically obese rat (fa/fa) metabolism. *27*: 1955-1966.
82. Grundy SM. 1998. Hypertriglyceridemia. Atherogenic dyslipidemia, and the metabolic syndrome. *Am J Cardiol* 81: 18B-25B.
83. Alordmann R, Riberre C, Rouah H. 1990. Ethanol induced lipid peroxidation and oxidative stress in extrahepatic tissue. *Alcohol* 25: 231-237.
84. Morimitsu Y, Kawakish S. 1990. Inhibitors of platelet aggregation from onion. *Phytochemistry* 29: 3435-3439.
85. Yotsumoto H, Yanagita T, Yamamoto K, Ogawa Y, Cha JY, Mori Y. 1997. Inhibitory effect of *Oren Gedoku* to and its components on cholesteryl ester synthesis in cultured human hepatocyte HepG2 cells evidence from the cultured HepG2 cells and in vitro assay of ACAT. *Planta Med* 63: 141-145.
86. Kim BK, Shin GK, Jeon BS, Bae DW, Cha JY. 2001. Cholesterol lowering effect of mushroom powder in hyperlipidemic rats. *J. Kor Soc Food Sci Nutr* 30: 510-515.

87. McGill BC. 1988. The pathogenesis of atherosclerosis. *Clin Chem* 34: B33-39.
88. Jung HS, Kim HJ, Seo YB. 2001. Antithrombogenic effects of doingang on endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation in rats. *The J Oriental Gynecol* 14: 133-145.
89. kim MS. 2003. Study on the effect of Heechumsan(HCS) on Thrombosis. *MS Thesis*. Daeheon University
90. Salat A. 1999. Endotoxin enhances *in vitro* platelet aggregability in whole blood. *Thrombosis Res* 93: 145-148
91. A.O.A.C. 1995. Official methods of analysis (16th Edition). Association of official analytical chemists. Washington, D.C.
92. Wungaarden DV. 1967. Modified rapid preparation fatty acid esters from liquid for gas chromatographic analysis. *Analytical Chem* 39: 848~850
93. 우원식. 1997. 천연물 화학 연구. 서울: 서울대학교 출판부, p14-15.
94. Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 26: 1199-1744.
95. Esquivel MM, Ribeiro MA, BermardoGil MG. 1999. Supercritical extraction of savory oil : study of antioxidant activity and extract characterization. *Journal Supercritical Fluids* 14: 129-138.
96. Kato H, Lee C, Kim NV, Hayase SB. 1987. Inhibition of nitrosamine formation by nondialyzable melanoidins. *Agric Bio Chem* 51: 1333-1338.
97. Kim YJ, Kim CK, Kwon YJ. 1997. Isolation of antioxidative components of *Perilla semen*. *Korean J Food Sci Technol* 29: 38-43.
98. Oswa T, Namiki M. 1981. A novel type of antioxidant isolated from leaf wax of Eucalyptus leaves. *Biol Chem* 45: 735-739.
99. Fujji H, Ohmachi T, Sagami I, Watanabe M. 1985. Liver microsomal

- drug metabolism in ethanol-treated hamsters. *Biochem Pharmacol* 34: 3881-3884.
100. Reitman S, Frankel S. 1957. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic determination and glutamic pyruvic transaminase. *Am J Clin Pathol* 28: 56-63.
  101. Downey JM, Miura Y, Eddy LJ, Chambers DE, Mellert T, Hearse DJ, Yellon DM. 1987. Xanthine oxidase is not a source of free radicals in the ischemic rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol* 19: 1053-1060.
  102. Crapo JD, McCord JM, Fridovich I. 1978. Preparation and assay of superoxide dismutase. *Methods enzymol.* ed. Fleischer S and Packer L., Academic press, New York 53: 382-393.
  103. Aebi H. 1974. Catalase, in *methods of Enzymetic Analysis*, Bergmeyer HU, Bergmeyer, J and Grabi, M., eds. 3rd ed., Verlag chemie 2: 673-684.
  104. Flohe L, Wolfngng A, Gunzler WA. 1984. Assay of glutathione peroxidase. In *Methods Enzymol* 105: 114-130.
  105. Buege JA, Aust SD. 1978. The thiobarbituric acid assay. *Methods in enzymology* 52: 306-307.
  106. Tietze F. 1969. Enzymatic methods for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione. *Anal Biochem* 27: 502-522.
  107. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
  108. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. 1985. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 34: 1345-1353.

109. Choe M, Kin HS. 2002. Effects of Korean wheat on LDL oxidation and atherosclerosis in cholesterol-fed rabbit. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 104-108.
110. PG Reeves, FH Nielson, GC. Fahey Jr. 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123: 1939 - 1951.
111. McGowan MW, Artiss JD, Strandbergh DR. 1983. A peroxidase-coupled method for the colorimetric determination of serum triglycerides. *Clin Chem* 29: 538-542.
112. Richmond W. 1976. Use of cholesterol oxidase for assay of total and free cholesterol in serum by continuous flow analysis. *Clin Chem* 22: 1579-1588.
113. Eng LF, Noble EP. 1957. The maturation of rat brain myelin. *Lipids* 3: 157-162.
114. Noma A, Nakayama KN, Kota M, Okabe H. 1978. Simultaneous determination of serum cholesterol in high and low density lipoprotein with use of heparin, Ca<sup>2+</sup> and an anion exchange resin. *Clin Chem* 24: 1504-1580.
115. Friedwald WT, Levy RL, Fredrickson DS. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18: 499-502.
116. Fiordaliso M, Kok N, Desager KP, Goethals F, Deboyser D. 1977. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma. *Am J Clin Nutr* 30: 170-176.
117. Folch J, Lees M, Sloane-Stanly GH. 1957. A sample method for the

- isolation and purification of total from animal tissue. *J Biol Chem* 226: 497-509.
118. Zlatkis A, Zak B. 1969. Study of a new cholesterol reagent. *Anal Biochem* 29: 143-148.
  119. Biggs HG, Erikson TM, Moorehead WR. 1975. A manual colorimetric assay of triglyceride in serum. *Clinical Chem* 21: 437-441.
  120. Nilsson-Ehle P, Schotz MC. 1976. A stable radioactive substrate emulsion for assay of lipoprotein lipase. *J Lipid Res* 17: 536-541.
  121. Fried SK, Zechner R. 1989. Cachectin/tumor necrosis factor decreases human adipose tissue lipoprotein lipase mRNA levels, synthesis and activity. *J Lipid Res* 30: 1917-1923.
  122. Iverius PH, Brunzell JD. 1985. Human adipose tissue lipoprotein lipase: change with feeding and relation to postheparin plasma enzyme. *Am J Physiol* 249: E107-E114.
  123. Chomczynski P, Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159.
  124. Fried SK, Zechner R. 1989. Effects of catechin/tumor necrosis factor on human adipose tissue lipoprotein lipase activity, mRNA levels, and biosynthesis. *J Lipid Res* 30: 1917-1923
  125. Kimura M, Terasawa K. 1983. Effects of Anti-Oketsu Drug on blood coagulation and fibrinolysis. *Yakugaku zasshi* 103: 313-318.
  126. Choi HS, Kim MK, Park HS, Kim JS, Kim SJ. 2005. Effect of various plant extracts on the mycelium growth fibrinolytic activity of *Armillaria mellea*. *Kor J Mycol* 33(1): 11-17.

127. Lee SK. 2003. Studies on the anticoagulant components of *Loranthus yadoriki*. *MS Thesis*. Sungsin Womens's University.
128. Dimino G, Silver MJ. 1983. Mouse antihrombotic assay; A simple method for the evaluation of antithrombotic agents *in vivo*. Potentiation of antithrombotic activity by ethanol. *J Pharmacol Exp Ther* 57: 255-260.
129. Hardaman JG, Gilman AG, Lee EL. 1996. *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 9th Ed.
130. Schoendorf TH, Rosenberg M, Beller FK. 1971. Endotoxin-induced disseminated intravascular coagulation in non-pregnant rats. *Am J Pathol* 65: 51-58.
131. Lee SY, Chung YS. 1994. The test of clinical pathology. The College of Medicine in Yonsei University.
132. Hornstra G, Christ-Hazelhof E, Haddem E . 1981. Fish oil feeding lowers thromboxane and prostacyclin production by rat platelet and aorta and dose not result in the formation of prostaglandin I<sub>3</sub>. *Prostaglandins* 21: 727-734.
133. Lee SK. 2003. Studies on the anticoagulant components of *Loranthus yadoriki*. *MS Thesis*. Sungsin Women's University.
134. Yun YP, Kang WS and Lee MY. 1996. The antithrombotic effects of green tea catechins. *J Fd Hyg Safety* 11: 77-82.
135. Han YH, Baik SK, Kim TH, Han BH. 1987. Assays for antithrombotic activity. *Arch Pharm Res* 10: 115-120.
136. Kim MS. 2003. A study on optimal cultivation conditions of medicinal components in Native *Achyranthes japonica* N. *PhD Thesis*. Chonnam National University.

137. Yoo HH. 2001. Studies on cell growth inhibitory compound of *Achyranthis radix*. *MS Thesis*: Seoul National University
138. Harman D. 1987. The free radical theory of aging. In modern biological theories of aging. Warner HR, Butler RN, Sprott RL, Schneider EL, eds. Raven Press NY p89
139. Cha GS, Choi CU. 1990. Determination of oxidation stability of perilla oil by the rancimat method. *Korean J Food Sci Technol* 22: 61-65.
140. Kang YH, Park YK, OH SR, Moon KD. 1995. Studies on the physiological functionality of pine meddle and mugwort extracts. *Korean J Food Sci Technol* 27: 978-984.
141. Kytopoulos SA. 1987. Ascorbic acid and formation of N-nitroso compounds: possible role of ascorbic acid in cancer prevention. *Am J Clin Nutr* 45: 1344-1350.
142. Gray JI, Dugan Jr. 1975. Inhibition of N-nitrosamine formation in model food systems. *J Food Sci* 40: 981-984.
143. Greenblat, M, Mirvish S, So BT. 1971. Nitrosamine studied: Induction of lung adenomas by concurrent administration of sodium nitrite and secondary amines in Swiss mice. *J Nat Cancer Inst* 46: 1029-1034.
144. Jeong HJ, Wee JJ, Shin JY, Cho JH, Jung DH. 2005. Antioxidative effect of crude saponin fraction prepared from culture product of basidiomycete cultured with fresh ginseng as substrate. *Korean J Food Sci Technol* 37: 67-72.
145. Fang YZ, Yang S, Wu G. 2002. Free radicals antioxidants and nutrition. *Nutrition* 18: 872-879.
- 146 Pyo YH, Lee TC, Logendra L, Rosdo RT. 2004. Antioxidant activity and phenolic compounds of swiss chard(*Beta vulgaris* subspecies *cycla*



- extracts). *Food Chemistry* 85: 19-26.
147. Robards KPD, Tucker PG, Swatsitang WG. 1999. Phenolic compounds and their role in oxidative process in fruits. *Food Chemistry* 66: 401-436.
148. Rothwell NJ, Stock MJ. 1984. Influence of alcohol and sucrose consumption on energy balance and brown fat activity in the rat. *Metabolism* 33: 768-771.
149. Shaw S, Lieber CS. 1983. Nutrition and alcohol. A clinical perspective, In : *Weininger J. Briggs GM, eds. Nutrition Update John Wiley & Sons, New York, 1: 79-104.*
150. Ray SY, Kim JH. 1995. Effect of chronic alcohol feeding and 20 acetylaminofluoren treatment on hepatic mitochondrial ATPase activity and membrane lipid composition in rat. *J Korean Soc Food Nutr* 24: 867-873.
151. Lim SS, Kim MH, Lee JH. 1997. Effect of *Artemisia princeps* var *orientalis* and *Cirsium japonicum* var *ussuriense* on liver function body lipid and bile acid of hyperlipidemic rat. *J Korean Nutr Society* 30: 797-802.
152. Ahn YT, Bae JS, Kim YH, Lim KS, Huh CS. 2005. Effects of fermented milk intake on hepatic antioxidative systems in alcohol treated rats. *Korean J Food Sci Technol* 37: 631-635.
153. Cotran RS, Kurma V, Collin T. 1999. Cellular pathology I, In Robbins pathologic Basis of Disease. 6th ed. W. B. Saunders Company, Philadelphia p1-29.
154. Yoon CG, Lee MK, Lee SL. 1998. Effect of growth on the enzyme activities of oxygen free radical generating and scavenging system in CCl<sub>4</sub> treated rats. *Kor J Gerontol* 8: 35-42.
155. Oei HH, Stroo WE, Burton KP, Schaffer SW. 1982. Xanthin oxidase in

- producing oxidative stress in the heart of chronically ethanol treated rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 38: 453-461.
156. Chow CK, Tapplle AL. 1974. Response of glutathione peroxidase to dietary selenium in rat. *J Nutr* 104: 444-451.
157. Leibiovitz BE, Siegel BV. 1980. Aspects of free radical reaction in biological system. *Aging J Gerontol* 35: 45-56.
158. Wheeler MD, Nakagami M, Bradford BU, Uesugi T, Mason RP, Connor HD, Dikalova A, Kadiska M, Thurman RG. 2001. Over expression of manganese superoxide dismutase prevents alcohol-induced liver injury in the rat. *J Biol Chem* 276: 36664-36672.
159. Abdellah M, Demelliers C, Amsellem S, Pessayre D, Fromenty B. 2001. Acute ethanol administration oxidatively damages and depletes mitochondrial DNA in mouse liver, brain heart and skeletal muscles; protective effects of antioxidants. *J Pharmacol Exp Ther* 298: 737-743.
160. Marco D, Paolo C, Gianluigi V, Ignazio G, Bruno N, Monia DA, Bruno, Franco T, Antonino C, Emanuele A, Maurio N. 2001. Food depravation exacerbates mitochondrial oxidative stress in rat liver exposed to ischemia-reperfusion injury. *J Nutr* 131: 105-110.
161. Karkkainen P, Mussalo-Rauhamaa H, Poikolainen K, Lehto J. 1988. Alcohol intake correlated with serum trace elements. *Alcohol* 23: 279-282.
162. Kim MJ, Park EM, Cho SY. 1997. Effect of methionine and selenium levels on alcohol metabolic enzyme system in rats. *J Korena Soc Food Sci Nutr* 26: 319-326.
163. Crapo HC, McCord MJ, Fridovich I. 1978. Preparation and assay of superoxide dismutase: In *Methods in enzymology*, Fleixher S and

- Packer, I.(eds). *Academic Press, New York*. 52: 382-393.
164. Chang NS, Ryu SM. 2001. Antioxidative effects of green tea powder diet against ethanol-induced oxidative damage in rat brain region. *Kor J Nutr* 34: 525-531.
165. Johansson LH, Borg LA. 1988. A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue sample. *Analytical Biochemistry* 174: 331-336.
166. Paglia DE, Valentine WN. 1967. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70: 158-169.
167. Folch L, Gunzler WA. 1984. Assays of glutathione peroxidase. *In Methods in enzymology*. Ed. by Loxensterin, Academic Press Inc. New York. vol. 105, p114-126.
168. Bompart GJ, Prevot DS, Bascabds JL. 1990. Rapid automated analysis of glutathione reductase, peroxidase and S-transferase activity: application to cisplatin-induced toxicity. *Clin Biochem* 23: 501-504.
169. Ko MS, Shin KM, Lee MY. 2002. Effects of *Hijikia fusiforme* ethanol extract on antioxidative enzymes in ethanol-induced hepatotoxicity of rat liver. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 31: 87-91.
170. Cho SY, Jang JY, Kim MJ. 2001. Effects of Pueraria flos and radix water-extracts on levels of several serum biomarkers in ethanol-treated rats. *Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 92-96.
171. Speisky H, Kera Y, Penttila KE, Israel Y, Lindros KO. 1988. Depletion of hepatic glutathione by ethanol occurs independently of ethanol metabolism. *Alcohol Clin Exp Res* 12: 224-228.
172. Hur SK, Kim SS, Heo YH, Ahn SM, Lee BG, Lee SK. 2001. Effect of

- the grapevine shoot extract on free radical scavenger activity and inhibition of pro-inflammatory mediator production in raw 264.7 macrophages. *J Applied Pharmacology* 9: 188-193.
173. Roberforid M, Calderon PB. 1995. Free radicals and oxidation phenomena in biological system. Marcel Dekker, Inc., New York.
174. Thurman RG, Bradford B, Imuro Y, Knecht K, Connor H, Adachi T, Wall C, Arteel G, Releigh J, Forman D, Mason RP. 1997. Role of kupffer cells endotoxin and free radicals in hepatotoxicity due to prolonged alcohol consumption: Studies in female and male rats. *J Nutr* 127: 903-906.
175. Nordmann R, Ribierc CM, Rouach H. 1992. Implication of free radical mechanisms in ethanol-induced cellular injury. *Free radic Bio Med* 12: 219-248.
176. Rulido R, Bravo L. Saura-Calixto F. 2000. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by modified ferric reducing antioxidant power assay. *J Agric Food Chem* 48: 3396-3402.
177. Yoon TH, Rhee SJ. 1994. Effects of Korean green tea, oolong tea and black tea beverage on the antioxidative detoxification in rat poisoned with cadmium. *Kor J Nutr.* 27: 1007-1017.
178. Meister A, Anderson ME. 1983. Glutathione. *Annu Rev Biochem* 52: 711-716.
179. Ahn JM. 2001. Preventive effect of leek extract on diabetic atherosclerosis and identification of active principles. *phD Thesis*. Pusan National University.
180. Aykac G, Uysal M, Yalcin S, Kocak-Toker N, Sivas A, Oz H. 1985. The effect of chronic ethanol ingestion on hepatic lipid peroxide, glutathione, glutathione peroxidase and glutathione transferase in rats.

*Toxicol* 36: 71-76.

181. Lee JS, Kim ES, Kim SW. 1999. Effects of extract of *Pueraria radix* on peroxidation in ethanol-administered rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 28: 901-906.
182. Speisky H, Kera Y, Penttila KE, Israel Y, Lindros KO. 1998. Depletion of hepatic glutathione by ethanol occurs independently of ethanol metabolism. *Alcohol Clin Exp Res* 12: 224-228.
183. Oh SI, Kim CI, Chun HJ, Park SC. 1998. Chronic ethanol consumption affects glutathione status in rat liver. *J Nutr* 128: 758-763.
184. Lieber CS. 1980. Increased loss and decreased synthesis of hepatic glutathione after acute alcohol administration. *Pharmacol Biochem Behav* 13: 17-21.
185. Park PS, Lee BR, Lee MY. 1994. Effects of onion juice on ethanol-induced hepatic lipid peroxidation in rats. *J Korean Soc Food Nutr* 23:750-756.
186. Wursch P. 1979. Influence of tannin-rich Carob pod fiber on the cholesterol metabolism in the rat. *J Nutr* 109: 685-670.
187. Rhee SJ, Park HK. 1984. Changes of lipid content and histochemical observation in liver of rats fed high fat diet. *Korean J Nutr* 17: 113-125.
188. Turley E, Armstrong NC, Wallace JMW, Gilore WS, Mckelvey-Martin JV, Allen TM, Strain JJ. 1999. Effect of cholesterol feeding on DNA damage in male and female syrian hamsters. *Ann Nutr Metab* 43: 47-51.
189. Plaa GL, Charbonneau M. 1994. Detection and evaluation of chemically induced liver injury. In Principles and Methods of Toxicology(Hayes, A. W., ed), Raven Press. New York. p839-870.

190. Lim SS, Kim MH, Lee JH. 1997. Effect of *Artemisia princeps* var *orientalis* and *Cirsium japonicum* var *ussuriense* on liver function body lipid and bile acid of hyperlipidemic rat. *J Korean Nutr Society* 30: 797-802.
191. Kim KH. 1980. A translation : The clinical application of the results of the test. Ko-Moon Sa. Korea. p. 164-176.
192. Kim SY, Kim HS, Kim SH, Su IS, Chung SY. 2003. Effects of the feeding *Platycodon grandiflorum* and *Codonopsis ianceolata* on the fatty acid composition of serum and liver in rats. *J Korean Soc Food Nutr* 27: 1211-1216.
193. Oda T, Shikata T, Natio C, Suzuki H, Kanetaka T. 1970. Phospholipid fatty liver: a report of three cases with a new type of fatty liver. *Jpn J Exp Med* 40: 127-140.
194. Tajahashi R, Manku MS, Horrobin DF. 1987. Impaired platelet aggregation and thromboxane generation in EFA deficient rats. *J Nutr* 117: 1520-1256.
195. Odman DS. 1964. The turnover of plasma cholesterol in man. *Physiol Rev* 45: 747-760.
196. Steinberg D. 1983. Lipoproteins and atherosclerosis : a look back and look ahead. *Atherosclerosis* 3: 283-3013.
197. Kinnuen PKJ, Virtanen JA, Vainio P. 1983. Lipoprotein lipase and hepatic endothelial lipase. *Atherosclerosis Rev* 11: 65-71.
198. Wooller, LA, Spady DK, Dietschy JM. 1992. Saturated and unsaturated fatty acids independently regulate low density lipoprotein receptor activity and production rate. *J Lipid Res* 33: 77-88.
199. Gilliard SE, Nelson CR, Maxwell C. 1985. Assimilation of cholesterol by

- Lactobacillus acidophilus*. *Appl Environ Microbiol* 49: 377-381.
200. Yun YP, Kang WS, Lee MY, 1996. The antithrombotic effects of green tea catechins. *J Food Hyg Safety* 11: 77-82.
201. Rosenfeld L. 1989. Lipoprotein analysis. *Arch Pathol Lab Med* 113: 1101-1110.
202. Kang SM, Shin JY, Hwang SJ, Hong SG, Jang HE, Park MH. 2003. Effects of Saengshik supplementation on health improvement in diet-induced hypercholesterolemic rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 906-912.
203. Spady DK, Eidtschy JM. 1998. Interaction of dietary cholesterol and triglyceride in the hamster. *J. Clin. Invest.* 81: 300-309.
204. Chi MS, Koh ET, Stewart TJ. 1982. Effects of garlic on lipid metabolism in rats fed cholesterol of lard. *J Nutr* 112: 241-248.
205. Kang JA, Kang JS. 1997. Effect of garlic and onion on plasma and liver cholesterol and triacylglycerol and platelet aggregation in rats fed basal or cholesterol supplemented diets. *Korean J Nutr* 30: 132-138.
206. Deshaies Y, Begin F, Savoie L, Vachon C. 1990. Attenuation of meal-induced increase in plasma lipids and adipose tissue lipoprotein lipase by guar gum in rat. *J Nutr* 12: 64-70.
207. Despres JP. 1998. The insulin resistance-dyslipidemic syndrom of visceral obesity: effect of on patients' risk. *Obe Res* 6: 8S-17S.
208. Lee JJ, Chun CS, Kin JG, Choi BD. 2000. Effect of fasting refeeding on rat adipose tissue lipoprotein lipase activity and lipogenesis: Influence of food restriction during refeeding. *J Kor Soc Food Sci Nutr* 29: 471-478.
209. O'Brien KD, Gordon D, Deeb S, Ferguson M, Chait A. 1992.

- Lipoprotein lipase is synthesized by macrophage-derived foam cells in human coronary atherosclerotic plaques. *J Clin Invest* 89: 1544-1550.
210. Semenkovich CF, Coleman T, Daugherty A. 1998. Effects of heterozygous lipoprotein lipase deficiency on diet-induced atherosclerosis in mice. *J Lipid Res* 39: 1141-1148.
211. Fried SK, Kral JG. 1987. Sex differences in regional distribution of fat cell size and lipoprotein lipase in morbidly obese patients. *Int J Obes* 11: 129-140.
212. Braun JEA, Severson DL. 1992. Regulation of the synthesis, processing and translocation of lipoprotein lipase. *Biochem J* 287: 337-342.
213. Pedersen SB, Borglum JD, Moller-Pedersen T, Richelsen B. 1992. Characterization of nuclear corticosteroid receptors in rat adipocytes. Regional variations and modulatory effects of hormones. *Biochim Biophys Acta* 1134: 303-308.
214. Rebuffe-Scrive M, Walsh UA, McEwen B, Rodin DS. 1992. Effect of chronic stresses and exogenous glucocorticoids on regional fat distribution and metabolism. *Physiol Behav* 52:583-590.
215. Shimada M, Shimano H, Gotoda T, Yamamoto K, Kawamura M, Inabe T, Yamada N. 1993. Overexpression of human lipoprotein in transgenic mice. *J Biol Chem* 268: 17942-17948.
216. Despres JP, Moorjani S, Lupien PJ, Tremblay A, Nadeau A. and Bouchard C. 1990. Regional distribution of body fat, plasma lipoproteins and cardiovascular disease. *Arteriosclerosis* 10: 497-452.
217. Cruz ML, Williamson DH. 1992. Refeeding meal-fed rats increase lipoprotein lipase activity and deposition of dietary [ $^{14}\text{C}$ ] lipid in white adipose tissue and decrease oxidation to  $^{14}\text{CO}_2$ . *Biochem J* 285: 771-777.



218. Lee SJ. 2004. Study for thrombogenesis by collagen and its inhibitory effect. *MS Thesis*. Inje University.
219. Dulli DA, Luzzio CC, Williams EC, Schutta HS. 1996. Cerebral venous thrombosis and activated protein C resistance. *Stroke* 27 : 1731-1733.
220. Gresele P, Zoja C. 1983. Dipyridamole inhibits platelet aggregation in whole blood. *Thrombo Hemostasis*. 50.: 852-856.
221. Kang JK. 2001. Antiplatelet aggregation activity and anti-thromboembolic activity of the extract of Chungpesagan-tang and its constituted herbs. *Ph D Thesis*. Kyung Hee University.
222. Kim YS. 2000. Study on the effects of *Angelicae sinensis* Radix on thrombosis. *Kor J Herbology* 15: 53-57.
223. Song GY, Park BJ, Kim SH. 2002. Antithrombotic effect of *Galla Rhois*. *Kor J Pharmacogn* 33: 120-123.