

# 인디언구스베리와 님잎 추출물을 함유한 복합 처방의 항산화 및 숙취해소 효과

이수빈 · 주인환 · 박종민 · 한수현 · 위영준<sup>1</sup> · 김동희\*

대전대학교 한의과대학 병리학교실, 1 : 유한회사 한얼

## Antioxidant and Hangover Cure Effects of Compound Prescription Containing *Phyllanthus emblica* and *Azadirachta Indica* Leaf Extract

Su-Bin Lee, In-Hwan Joo, Jong-Min Park, Su-Hyun Han, Young-Joon Wi<sup>1</sup>, Dong-Hee Kim\*

Department of Pathology, College of Korean Medicine, Daejeon University,  
1 : Hanul, Private Company

The purpose of this study was to investigate the antioxidant and hangover cure effects of compound prescription containing *Phyllanthus emblica* and *Azadirachta Indica* leaf extract (CP). In vitro experiments, HepG2 cells were induced oxidative stress by hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and treated with CP at 50, 100, 200 µg/ml concentration. Antioxidant enzyme (superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), glutathione reductase (GR) activity and glutathione (GSH) content were decreased by hydrogen peroxide-induced oxidative stress, but CP was increased that. In vivo experiments, experiment rats were orally administered alcohol 3 g/kg and, after 30 min administered CP 200 mg/kg. After 1 and 3 h of alcohol administration, blood was collected from the tail vein, while after 5 h, blood was collected from the heart. CP modulates alcohol dehydrogenase (ADH) and acetaldehyde level, thereby decreased alcohol level in serum. Also, CP decreased the levels of aspartate aminotransferase (AST) and alkaline phosphatase (ALP). These results suggest that CP has antioxidant effects and alleviates alcohol hangover symptoms.

keywords : Alcohol, Antioxidant, *Azadirachta Indica*, *Phyllanthus emblicand*, Hangover

### 서 론

술은 고대로부터 인류가 의식 및 축제 등에 사용해온 기호식품이며<sup>1)</sup>, 술의 주성분인 알코올은 엔도르핀, 세로토닌 같은 신경전달 물질의 생성을 촉진하여 통증을 감소시키거나 기분을 좋게 한다. 이처럼 적당한 음주는 긍정적인 효과를 나타내지만 지나친 음주는 숙취로 인한 두통, 메스꺼움, 근육통, 피로 등과 같은 증상을 비롯하여 지방간, 간염, 간경화 등 치명적인 간 손상을 야기한다<sup>2)</sup>.

알코올은 체내 알코올 가수분해효소 (ADH: alcohol dehydrogenase)에 의해 아세트알데하이드 (acetaldehyde)와 NADH로 분해되며, 이러한 아세트알데하이드가 축적이 되면 숙취를 초래하고 간의 손상 및 지방축적을 야기한다<sup>3-5)</sup>. 또 다른 분해산물인 NADH는 산화되어 ·OH 및 ·O<sub>2</sub>-와 같은 활성산소를 생성하여 산화적 손상을 유도하고 항산화 체계를 붕괴시킨다<sup>6)</sup>.

본 실험에 사용된 복합 처방 (CP)은 인디언구스베리, 님잎, 지

구자, 갈근, 강황, 매실, 오미자, 갈화, 오리목, 감초, 대조, 생강, 마가목, 계관, 계지, 정향, 숙지황, 필발, 히비스커스, 오크라, 밀크 씨슬로 구성되었으며, 특히, 지구자<sup>7)</sup>, 갈근<sup>8)</sup>, 매실<sup>9)</sup>, 오미자<sup>10)</sup>, 갈화<sup>11)</sup>, 오리목<sup>12)</sup>은 알코올의 분해와 숙취에 관여한다는 연구결과가 보고되어 있다.

대극과 (Euphorbiaceae)의 낙엽 교목인 인디언구스베리 (*Phyllanthus emblica*, Indian goose-berry, Amla)는 인도에서 회춘의 과일로 알려져 있으며, 각종 질병과 노화를 방지하고 미용과 건강에 효과가 있는 과일으로써 인도뿐만 아니라 중국, 영국, 미국 등 많은 나라에서 식품이나 건강보조식품의 형태로 사용되고 있다. 인디언구스베리에는 vitamin C와 phenolic compound, tannins, p-hyllem-belic acid, phyllembelin, rutin, curcuminoids, emblicol 등 다양한 항산화 물질들이 함유되어 있으며<sup>13-15)</sup>, 이에 관해 항산화 활성<sup>16)</sup>, 암 치료 및 예방<sup>17)</sup>, 항당뇨<sup>18)</sup>, 고지혈증 및 지질과산화 억제 효과<sup>19)</sup>가 있다고 보고된 바 있다. 멸구슬나무과 (Meliaceae

\* Corresponding author

Dong-Hee Kim, Department of Pathology, College of Korean Medicine, Daejeon University, Daejeon 300-716, Republic of Korea

·E-mail : dhkim@dju.kr ·Tel : +82-42-280-2623

·Received : 2020/05/27 ·Revised : 2020/08/24 ·Accepted : 2020/09/04

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 <http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2020.10.34.5.229>

Available online at <https://kmpath.jams.or.kr> & <http://jppkm.org>

e)의 상록 교목인 님 (*Azadirachta Indica*)은 인도 문화에서 많은 치료제의 원천으로서 가장 유용한 전통의약 약초이며 열대 및 반열대 국가에서 잘 자란다. 님은 치료 특성을 갖는 다수의 다양한 유형의 성분을 함유한다. 님의 잎에는 nimbin, nimbanene, 6-desacetylnimbin, nimbandiol, nimbolide, ascorbic acid, n-hexacosanol 및 amino acid, 7-desacetyl-7-benzoylazadiradiol, 7-desacetyl-7-benzoylgedunin, 17-hydroxyazadiradione, nimbolide, quercetin과 같은 성분이 들어있다<sup>20,21</sup>. 님잎 추출물은 비독성, 비돌연변이성인 것으로 보고되었으며, 면역 조절, 항염증, 항암성 특성을 갖는 것으로 밝혀졌다<sup>22</sup>. 또한 피부병 치료<sup>23</sup>, 항산화 효과<sup>24</sup> 등의 연구결과가 보고되어 있다.

이에 본 연구에서는 인디언구스베리와 님잎 추출물을 함유한 복합 처방의 항산화 효능을 확인하기 위해 인간 유래 간세포인 HepG2 세포 내 항산화 효소의 활성을 확인하고 숙취해소에 미치는 효과를 확인하고자 한다. Nelson NG등의 연구방법<sup>25</sup>에 따라 알코올을 투여한 실험동물에서의 혈중 알코올과 알코올 대사 관련 효소 수준 변화 및 간 기능에 미치는 영향을 객관적으로 검증하여 항산화 및 숙취해소 효과가 있는 복합 처방으로써 사용가능성을 제고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 1. 시료제작

실험에 사용된 인디언구스베리, 님잎, 오크라, 히비스커스는 인도에서 공급받았으며, 나머지 약재는 (주)에스니허브에서 구입하여 난치성면역질환 동서생명연구센터 (RIC-TBRC)에서 확인 후 사용하였습니다. 이후 Table 1과 같이 구성된 약재들 (이하, CP로 표기)에 증류수 1ℓ를 넣어 3시간동안 환류추출 하였으며, paper filter로 여과하고 rotary vacuum evaporator를 사용하여 감압 농축하였다. 농축된 용액을 freeze dryer로 동결건조하여 얻어낸 13.1 g (수득률 : 15.1%)의 분말은 초저온 냉동고 (-80°C)에서 보관하며 실험에 필요한 농도로 증류수에 희석해 사용하였다.

### 2. 시약 및 기기

본 실험에 사용된 시약은 dulbecco's modified eagle's medium (DMEM : Welgene, Korea), fetal bovine serum (FBS : Welgene, Korea), penicillin-streptomycin (Sigma, U.S.A.), trypsin-EDTA solution(1x) (Welgene, Korea), trypan blue (Sigma, U.S.A.), EZ-Cytox (Daeilab, Korea), dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS : Welgene, Korea), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : Sigma, U.S.A.), glutathione assay kit (Sigma, U.S.A.), glutathione reductase activity colorimetric assay kit (BioVision, U.S.A.), glutathione peroxidase activity colorimetric assay kit (BioVision, U.S.A.), SOD assay kit (Cayman Chemical Company, U.S.A.), catalase activity colorimetric/fluorometric assay kit (BioVision, U.S.A.), ethanol (Merck Millipore, U.S.A.), ethyl ether (Samchun chemicals, Korea), ethanol assay kit (Bioassay

Systems, U.S.A.), acetaldehyde assay kit (Bioassay Systems, U.S.A.), alcohol dehydrogenase assay kit (Bioassay Systems, U.S.A.) 등을 사용하였다.

Table 1. The Formulation Ratio of CP

| Ingredients | scientific name   | combination percentage (g) |
|-------------|---|----------------------------|
| 인디언구스베리     | <i>Phyllanthus emblica</i>                                  | 6                          |
| 님잎          | <i>Azadirachta indica</i>                                   | 5                          |
| 오크라         | <i>Abelmoschus esculentus</i>                               | 4                          |
| 히비스커스       | <i>Hibiscus</i>   | 4                          |
| 매실          | <i>Prunus mume</i>  | 4                          |
| 지구자         | <i>Hovenia dulcis Thunb.</i>                                | 4                          |
| 갈근          | <i>Pueraria lobata Ohwi</i>                                 | 4                          |
| 강황          | <i>Curcuma longa</i>  | 4                          |
| 오미자         | <i>Schisandra chinensis Baillon</i>                         | 4                          |
| 갈화          | <i>Pueraria lobata Ohwi</i>                                 | 4                          |
| 오리목         | <i>Alnus japonica</i>                                       | 4                          |
| 감초          | <i>Glycyrrhiza uralensis Fischer</i>                        | 4                          |
| 대조          | <i>Zizyphus jujuba Miller var. inermis Rehder</i>           | 4                          |
| 생강          | <i>Zingiber officinale Roscoe</i>                           | 4                          |
| 마가목         | <i>Sorbus commixta</i>                                      | 4                          |
| 계관          | <i>Celosia argentea var. cristata</i>                       | 4                          |
| 계지          | <i>Cinnamomum cassia Presl</i>                              | 4                          |
| 정향          | <i>Eugenia caryophyllata Thunb.</i>                         | 4                          |
| 숙지황         | <i>Rehmannia glutinosa (Gaertner) Liboschitz ex Steudel</i> | 4                          |
| 필발          | <i>Piper longum</i>   | 4                          |
| 대계          | <i>Silybum marianum</i>                                     | 4                          |
| 총합          |   | 87                         |

### 3. 세포 배양

HepG2 세포는 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin으로 구성된 DMEM 배지를 사용하였으며 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건이 유지되는 세포 배양기에서 배양하였고 2-3일 주기로 계대 배양하여 실험을 진행하였다.

### 4. 세포생존율 측정

96 well plate에 HepG2 세포를 2×10<sup>4</sup> cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양 하였다 실험을 하기 전에 새로운 배양액으로 교체하였고, CP를 각각 50, 100, 200, 400 µg/ml의 농도로 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 10 µl의 EZ-Cytox 용액을 첨가하여 세포 배양기에서 30분간 반응시켰다. 반응 후 micro plate reader를 통해 450 nm에서 흡광도의 변화를 측정하여 대조군에 대한 세포생존율을 백분율로 나타내었다.

### 5. 세포 내 superoxide dismutase (SOD) 활성 측정

6 well plate에 HepG2 세포를 2×10<sup>5</sup> cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 새로운 배양액으로 교체하였고 CP를 각각 50, 100, 200 µg/ml의 농도로 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 함께 처리하여 다시 24시간 동안 배양하였다. 시료가 처리된 HepG2 세포를 PBS로 1회 세척한 뒤 차가운 HEPES buffer (pH 7.2, containing 1 mM EGTA, 210 mM mannitol, and 70 mM sucrose) 5 ml에 넣은 후 sonication 방법으로 3분 동안 균질화하였다. 균질화된 시료를 1500 g에서 5분 동안 원심 분리하여 상등

액을 제거한 후 남은 pellet을 sample buffer 200  $\mu$ l씩 넣어 녹여 단백질 정량 후 실험에 사용하였다. 96 well plate에 radical detector를 200  $\mu$ l씩 분주한 뒤 시료 10  $\mu$ l와 xanthine oxidase 20  $\mu$ l를 넣은 후 30분 동안 실온에서 shaking하여 반응시킨 후 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. SOD 활성은 superoxide radical을 50% dismutation 하는데 필요한 SOD량을 1 unit으로 하여 활성정도 (U/ml)로 나타내었다.

#### 6. 세포 내 catalase 활성 측정

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 및 CP를 처리한 HepG2 세포를 PBS로 1회 세척한 뒤 assay buffer 150  $\mu$ l를 넣은 후 sonication 방법으로 균질화 시킨 후 10000 g에서 15분 동안 원심 분리하여 얻어낸 상등액을 단백질 정량 후 실험에 사용하였다. 96 well plate에 assay buffer를 68  $\mu$ l씩 분주한 후 상등액을 high control 부분을 포함하여 동일하게 10  $\mu$ l씩 넣어주었다. High control 부분만 stop solution을 10  $\mu$ l씩 넣은 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1 mM)을 상등액과 high control 부분 모두 12  $\mu$ l씩 넣고 실온에서 30분 동안 반응시킨다. High control 부분을 제외한 곳에 stop solution을 10  $\mu$ l씩 넣어준 후 develop mix (assay buffer 46  $\mu$ l, oxired 2  $\mu$ l, HRP 2  $\mu$ l/well)를 50  $\mu$ l씩 넣어주었다. 실온에서 10분 동안 반응시킨 후 570 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. Catalase 활성은 1 nmol의 formaldehyde를 생성하는데 필요한 catalase의 양을 1 nmol로 하여 활성정도 (nmol/ml)를 나타내었다.

#### 7. 세포 내 glutathione peroxidase (GPx) 활성 측정

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 및 CP를 처리한 HepG2 세포에 assay buffer 150  $\mu$ l를 넣은 후 sonication 방법으로 3분 동안 균질화 시킨 후 10000 g, 4°C에서 15분 동안 원심 분리하여 얻어낸 상등액을 단백질 정량하여 실험에 사용하였다. 96 well plate에 assay buffer를 40  $\mu$ l씩 분주한 후 시료 10  $\mu$ l와 reaction mix (Assay buffer 33  $\mu$ l, 40 mM NADPH solution 3  $\mu$ l, GR solution 2  $\mu$ l, GSH solution 2  $\mu$ l/well) 40  $\mu$ l씩 넣고 실온에서 15분 동안 반응시킨 뒤 340 nm 파장에서 흡광도를 1차 측정한다. Cumene hydroperoxide solution을 10  $\mu$ l씩 넣은 후 실온에서 5분 동안 반응 시킨 뒤 340 nm 파장에서 흡광도를 2차 측정한다. GPx의 활성은  $\Delta$ OD 값(2차 측정-1차 측정)으로 kit 상의 NADPH standard 검량선에 따라 계산되었다.

#### 8. 세포 내 glutathione reductase (GR) 활성 측정

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 및 CP를 처리한 HepG2 세포에 assay buffer 150  $\mu$ l를 넣은 후 sonication 방법으로 3분 동안 균질화 시킨 후 10000 g, 4°C에서 15분 동안 원심 분리하여 얻어낸 상등액을 단백질 정량하여 실험에 사용하였다. 시료 100  $\mu$ l에 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 5  $\mu$ l 넣은 후 실온에서 5분 동안 반응시킨 다음 catalase를 5  $\mu$ l 넣고 실온에서 5분 동안 반응시킨다. Assay buffer 30  $\mu$ l를 96well plate에 분주한 후 반응액 20  $\mu$ l와 reaction mix (GR assay buffer 40  $\mu$ l, DTNB solution 2  $\mu$ l, NADPH-GNERATTM solution 2  $\mu$ l, GSSG solution 6  $\mu$ l/well) 50  $\mu$ l를 넣고 405 nm 파장에서 흡광도

를 1차 측정 후 10분 후에 2차 측정하였다. GR의 활성은  $\Delta$ OD 값(2차 측정-1차 측정)으로 kit 상의 TNB standard 검량선에 따라 계산되었다.

#### 9. 세포 내 glutathione (GSH) 함량 측정

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 및 CP를 처리한 HepG2 세포에 5% 5-sulfosalicylic acid (SSA)를 60  $\mu$ l씩 넣어준 후 sonication 방법으로 3분 동안 용해시켰다. 용해시킨 시료를 10000 g에서 10분 동안 원심 분리하여 얻어낸 상등액을 단백질 정량 후 실험에 사용하였다. 96 well plate에 상등액 10  $\mu$ l와 working mix solution 150  $\mu$ l를 넣어주었다. 실온에서 5분 동안 반응시킨 후 NADPH (0.16 mg/ml)를 50  $\mu$ l씩 넣어준 뒤 412 nm 파장에서 5분 동안 1분 간격으로 흡광도를 측정하였다. GSH 농도를 표준용액의 정량곡선을 기준으로 계산하였다.

#### 10. 실험동물 관리

본 실험을 위하여 사용된 5주령의 수컷 SD. rat은 (주)라온바이오 (Korea)에서 분양받아 사용하였다. 실험동물은 2주간의 안정기를 가지면서 순화를 시켰으며, 안정기 및 실험기간에 모든 실험군에는 일반 사료 (Altromin, Germany)와 물을 충분히 공급하였다. 동물 사육실의 조건은 conventional system으로 22±2°C, 1일 중 12시간은 200-300 Lux로 조명하고, 12시간은 모든 빛을 차단하였다. 본 실험은 대전대학교 동물실험윤리 위원회의 승인(승인번호 DJUARB2019-023)을 받아 동물윤리준칙에 의거하여 실험하였다.

#### 11. 알코올 모델 처리

실험동물은 18시간 절식시킨 뒤 대조군과 실험군에 3 g/kg의 알코올을 투여하였으며, 알코올 투여 30분 후에 대조군에는 증류수, 실험군에는 200 mg/kg 농도의 CP를 투여하였다. 시간에 따른 효능을 확인하기 위해 알코올 투여 후 1, 3 시간 후에 실험동물의 꼬리 정맥에서 혈액을 채취하였고 5시간 후에는 심장에서 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액은 상온에서 30분간 굳히고 4°C, 3000 g에서 15분간 원심분리를 통해 혈청으로 분리하였고 초저온 냉동(-80°C) 보관하면서 실험에 사용하였다.

#### 12. 알코올 함량 분석

96 well plate에 2배 희석한 혈청을 100  $\mu$ l씩 넣고 reagent A 100  $\mu$ l를 추가하여 상온에서 30분간 반응시켰다. 반응 시킨 후, stop reagent B 100  $\mu$ l를 추가하고 micro plate reader를 통해 580 nm 파장에서 측정하여 함량을 계산하였다.

#### 13. 알코올 탈수소효소 함량 분석

96 well plate에 혈청을 20  $\mu$ l씩 2 well에 넣고 1 well에는 working reagent 80  $\mu$ l를, 다른 well에는 blank working reagent 80  $\mu$ l를 추가하여 micro plate reader를 통해 565 nm 파장에서 측정하였다. 이후, 상온에서 30분간 반응시킨 후, 다시 한 번 micro plate reader를 통해 565 nm 파장에서 측정하여 함

량을 계산하였다.

#### 14. 아세트알데히드 함량 분석

96 well plate에 혈청을 20  $\mu$ 씩 2 well에 넣고 1 well에는 working reagent 80  $\mu$ 를, 다른 well에는 blank working reagent 80  $\mu$ 를 추가하여 상온에서 30분간 반응시켰다. 반응시킨 후, micro plate reader를 통해 565 nm 파장에서 측정하여 함량을 계산하였다.

#### 15. 간 기능 검사

분리한 혈청 300  $\mu$ 를 biochemistry auto analyser에 주입하고 진단검사 의학적 가이드라인 (clinical and laboratory standards institute, CLSI)를 기준으로 간 기능 지표인 AST (aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase), ALP (alkaline phosphatase) 함량을 분석하였다.

#### 16. 통계처리

실험 결과는 SPSS 21.0를 이용하여 mean $\pm$ standard error of mean으로 나타내었으며, ANOVA를 사용하여 다중 비교하였고 Tukey's HSD test를 통해  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$  및  $p < 0.001$  수준에서 유의성을 검정하였다.

## 결 과

#### 1. 세포생존율

HepG2 세포에서 세포생존율을 측정된 결과, 대조군을 100.00 $\pm$ 0.32%로 나타냈을 때, 50, 100, 200, 400  $\mu$ g/ml 농도에서 각각 100.22 $\pm$ 0.41%, 100.31 $\pm$ 0.86%, 100.92 $\pm$ 1.31%, 79.53 $\pm$ 0.92%로 나타났다(Fig. 1).

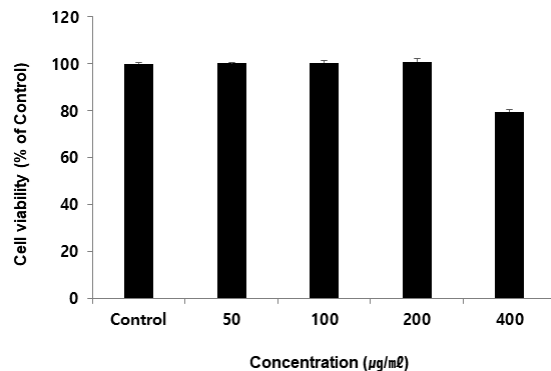


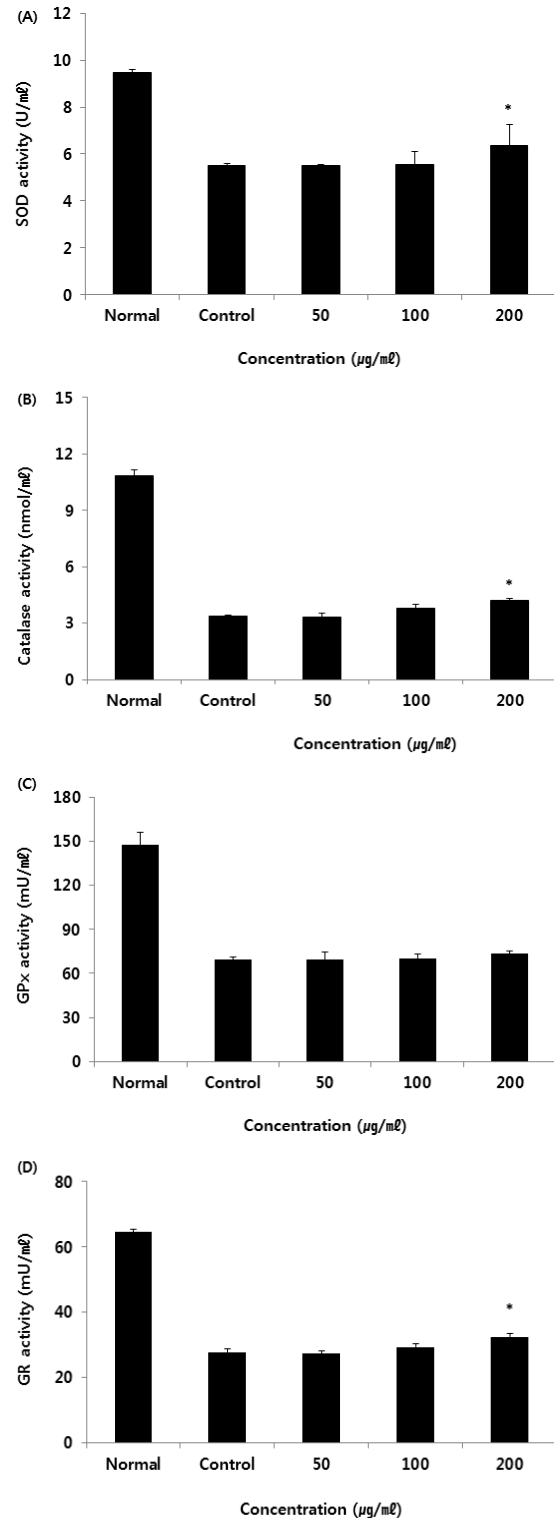
Fig. 1. Cell viability of CP in HepG2 cells. Cell viability were calculated as percentage relative to the control. The result were presented by the mean  $\pm$  S.D from three independent experiments.

#### 2. 세포 내 항산화 효과

세포 내 항산화 효과를 측정된 결과, CP 처리군은 SOD, Catalase, GR과 GSH에서 대조군에 비해 200  $\mu$ g/ml 농도에서 유의성 있는 (\* :  $p < 0.05$ ) 증가를 나타내었으나, GPx에서는 모든 농도에서 유의성이 나타나지 않았다(Table 2)(Fig. 2).

Table 2. Antioxidant Effect of CP in HepG2 Cells

| Group ( $\mu$ g/ml) | SOD (U/ml)       | Catalase (nmol/ml) | GPx (mU/ml)       | GR (mU/ml)        | GSH (nmol/ml)     |
|---------------------|------------------|--------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| Normal              | 9.47 $\pm$ 0.12  | 10.83 $\pm$ 0.33   | 147.34 $\pm$ 8.46 | 64.47 $\pm$ 2.68  | 92.13 $\pm$ 2.80  |
| Control             | 5.49 $\pm$ 0.09  | 3.36 $\pm$ 0.06    | 69.22 $\pm$ 1.78  | 27.81 $\pm$ 2.52  | 33.50 $\pm$ 3.06  |
| 50                  | 5.49 $\pm$ 0.07  | 3.33 $\pm$ 0.22    | 69.72 $\pm$ 4.82  | 27.27 $\pm$ 6.60  | 33.53 $\pm$ 1.27  |
| 100                 | 5.55 $\pm$ 0.55  | 3.79 $\pm$ 0.21    | 70.33 $\pm$ 2.61  | 29.31 $\pm$ 7.84  | 33.73 $\pm$ 0.71  |
| 200                 | 6.35 $\pm$ 0.89* | 4.20 $\pm$ 0.12*   | 73.43 $\pm$ 1.70  | 32.40 $\pm$ 9.58* | 39.54 $\pm$ 0.94* |



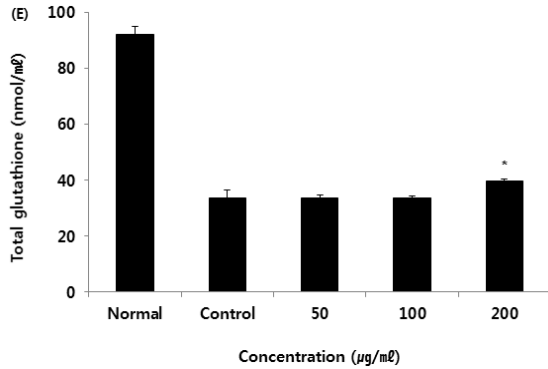


Fig. 2. Effect of CP on antioxidant enzyme activity and content in HepG2 cells. The result were presented by the mean ± S.D from three independent experiments (Significance of results, \* : p<0.05 compare to control).

3. 알코올 함량

혈액 내 알코올 함량을 분석한 결과, CP 투여군은 모든 시간에서 대조군에 비해 유의성 있는 (\*\* : p<0.001) 감소가 나타났다 (Table 3)(Fig. 3).

Table 3. Effect of Alcohol Level in Hangover Rat Model

|         |      | Unit : mg/dL  |              |              |
|---------|------|---------------|--------------|--------------|
| Group   | Time | 1 hour        | 3 hour       | 5 hour       |
| Normal  |      | 20.1±3.2      | 14.1±1.7     | 12.5±2.8     |
| Control |      | 152.4±5.7     | 122.9±4.0    | 89.4±3.5     |
| CP      |      | 100.0±10.2*** | 78.4±15.9*** | 28.0±17.3*** |

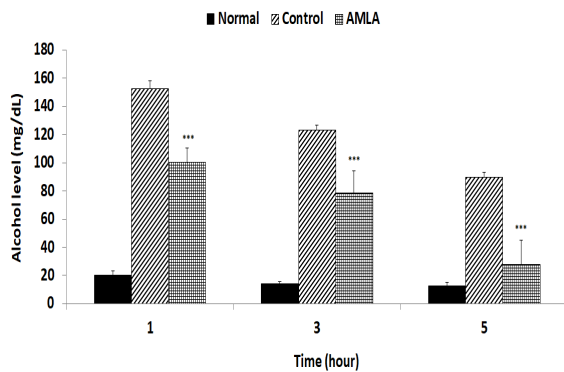


Fig. 3. Effect of alcohol level in hangover rat model. The results were expressed as mean ± S.D.(Significance of results, \*\*\* : p<0.001 compared to control).

4. 알코올 탈수소효소 함량

알코올 탈수소효소는 알코올 대사에 1차적으로 관여하여 알코올을 아세트알데히드로 바꾸는 효소이다.

혈액 내 알코올 탈수소효소 함량을 분석한 결과, CP 투여군은 모든 시간에서 대조군에 비해 유의성 있는 (\* : p<0.05, \*\*\* : p<0.001) 증가가 나타났다(Table 4)(Fig. 4).

5. 아세트알데히드 함량

알코올 대사의 중간 산물인 아세트알데히드는 숙취 증상을 야기하는 것으로 알려져 있다.

혈액 내 아세트알데히드 함량을 분석한 결과, CP 투여군은 3 시간과 5시간 후에서 대조군에 비해 유의성 있는 (\*\* : p<0.01, \*\*\* : p<0.001) 감소가 나타났다(Table 5)(Fig. 5).

Table 4. Effect of Alcohol Dehydrogenase Level in Hangover Rat Model

|         |      | Unit : U/L  |               |            |
|---------|------|-------------|---------------|------------|
| Group   | Time | 1 hour      | 3 hour        | 5 hour     |
| Normal  |      | 19.2±7.1    | 10.0±9.2      | 17.2±3.7   |
| Control |      | 25.3±12.7   | 39.5±10.1     | 45.9±11.7  |
| CP      |      | 79.0±7.1*** | 105.0±11.6*** | 67.1±11.3* |

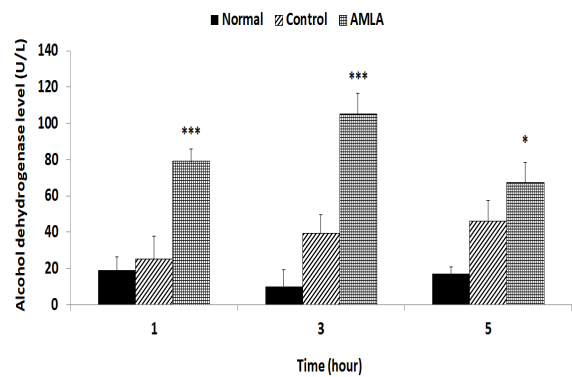


Fig. 4. Effect of alcohol dehydrogenase level in hangover rat model. The results were expressed as mean ± S.D.(Significance of results, \* : p<0.05, \*\*\* : p<0.001 compared to control).

Table 5. Effect of Acetaldehyde Level in Hangover Rat Model

|         |      | Unit : mg/dL |            |             |
|---------|------|--------------|------------|-------------|
| Group   | Time | 1 hour       | 3 hour     | 5 hour      |
| Normal  |      | 10.8±1.6     | 9.7±2.9    | 11.8±3.0    |
| Control |      | 34.0±3.7     | 37.7±4.0   | 48.8±5.6    |
| CP      |      | 47.0±4.5     | 28.0±0.9** | 25.8±1.1*** |

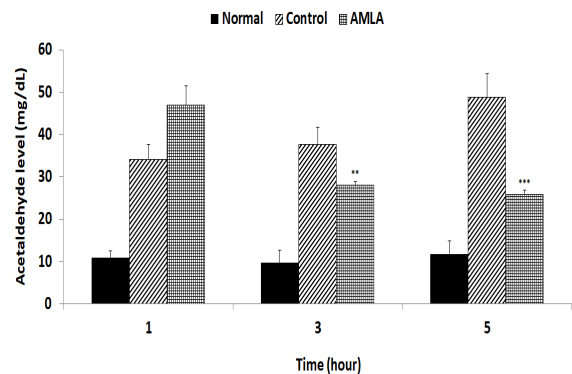


Fig. 5. Effect of acetaldehyde level in hangover rat model. The results were expressed as mean ± S.D.(Significance of results, \*\* : p<0.01, \*\*\* : p<0.001 compared to control).

6. 간 기능 검사

알코올과 CP를 병행하여 섭취 시 나타날 수 있는 간 기능에 미치는 영향을 평가하기 위하여 간 손상의 평가 지표로 이용되고 있는 AST, ALT 및 ALP 수준의 변화를 측정하고자 혈액을 통한 생화학 분석한 결과, CP 투여군은 AST와 ALP에서 대조군에 비해

유의성 있는 (\*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.001$ ) 감소가 나타났으나, ALT에서는 차이가 나타나지 않았다(Table 6)(Fig. 6).

Table 6. Effect of Biochemistry Analysis in Hangover Rat Model

| Group   | Unit : IU/L  |           |               |
|---------|--------------|-----------|---------------|
|         | AST          | ALT       | ALP           |
| Normal  | 188.4±35.4   | 67.5±13.7 | 164.3±24.5    |
| Control | 541.0±53.7   | 66.1±12.0 | 516.0±44.9    |
| CP      | 399.4±69.9** | 66.0±11.3 | 361.4±13.6*** |

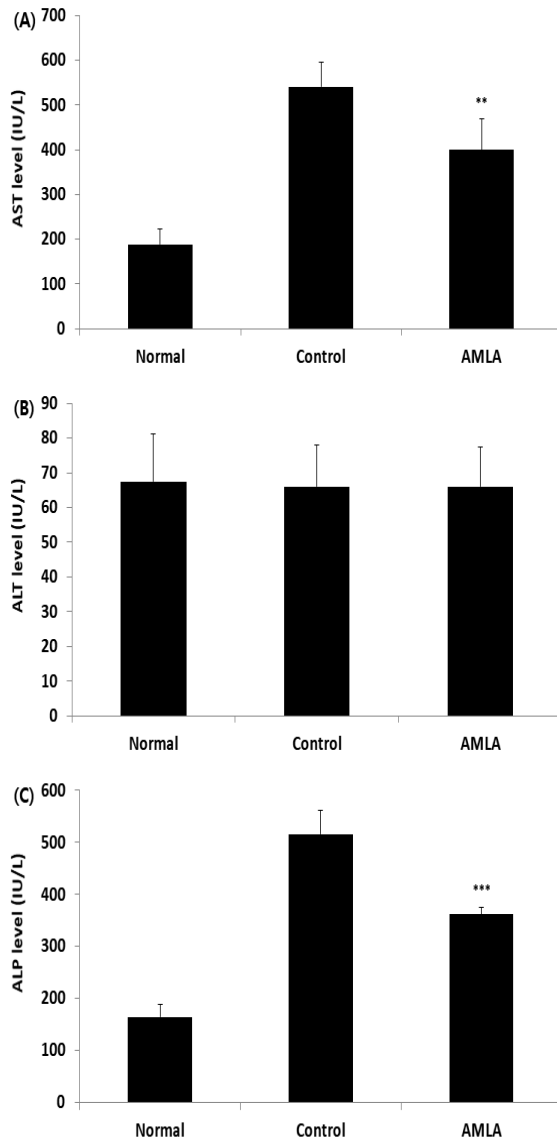


Fig. 6. Effect of biochemistry analysis in hangover rat model. The results were expressed as mean  $\pm$  S.D.(Significance of results, \*\* :  $p < 0.01$ , \*\*\* :  $p < 0.001$  compared to negative control).

## 고찰

본 연구에서는 in vitro에서 인디언구스베리와 님잎 추출물을 포함하는 복합 처방을 인간의 간세포인 HepG2 세포에 처리한 후  $H_2O_2$ 를 처리하여 유발된 산화적 스트레스에 대하여 항산화 효소

활성 및 함량에 미치는 영향을 확인하였다. 다음으로 알코올성 간 손상 동물 모델에 투여하여 시간 경과에 따른 혈중 알코올, 알코올 탈수소 함량, 아세트알데히드 함량을 분석하였다.

체내의 알코올 대사는 alcohol dehydrogenase (ADH), microsomal ethanol oxidation system (MEOS) 및 catalase 등의 효소에 의하여 조절되며 이들에 의한 대사는 free radical을 생성함으로써 항산화 시스템에도 영향을 미친다<sup>26-28</sup>. 알코올에 의한 간조직의 항산화력 저하는 지질과산화뿐 아니라 단백질의 산화적 손상을 증대시켜 알코올성 손상의 원인이라고 보고된 바 있다. 또한 알코올 섭취는 유도하는 CYP2E1 경로의 산화 과정에서 발생하는 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)과 항산화 기전 감소는 알코올성 간 손상의 주요 원인으로 주목 받고 있다<sup>28</sup>. Free radical은 인체 내에서 각종 질병과 노화를 일으키는 원인 물질이기 때문에 이들과 반응하여 그 활성을 소거시키는 능력을 지닌 항산화제로 작용할 수 있는 물질을 탐색할 필요성이 있다<sup>30</sup>. 간세포를 비롯하여 생체 내 세포는 지질과산화물의 체내 축적을 억제시키기 위해 1차 방어기전으로 효소계 산화방어 기전을 보유하고 있는데 superoxide dismutase (SOD), catalase 및 glutathione peroxidase (GPx) 등을 말하며<sup>31-33</sup> SOD는 생체 내 유해한 활성산소를 과산화수소 분자와 산소분자로 전환( $2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$ )시키고, 생성된  $H_2O_2$ 는 GPx나 catalase에 의하여 물 분자와 산소 분자로 전환시키며 세포막과 세포내 여러 부분에서 특이적으로 작용하여 조직의 과산화를 억제하여 생체를 보호하는 것으로 알려져 있다<sup>34,35</sup>. 따라서 본 연구에서 CP를 산화스트레스 상황에 처리하여 간세포의 항산화 효소 활성도를 측정할 결과, Fig. 2에서 보여주듯이 CP를 처리한 군은  $H_2O_2$ 에 의해 감소된 항산화 효소 활성을 유의하게 증가시킴으로써 산화스트레스에 대한 항산화 효과를 객관적으로 확인할 수 있었다.

알코올은 체내에서 alcohol dehydrogenase (ADH)에 의해 acetaldehyde가 되며, 이는 다시 ALDH에 의해 아세트산으로 산화되고  $CO_2$ 와  $H_2O$  등으로 배설된다<sup>36</sup>. 간에서 알코올 대사율은 ADH, ALDH의 활성에 영향을 주는 여러 요인에 의해 조절되는 것으로 알려져 있고<sup>37</sup>, 알코올의 독성은 알코올 자체 뿐 아니라 간에서 알코올이 주로 대사되는 과정에서 생성되는 아세트알데히드에 의한 것으로 알려져 있다. 알코올의 최소 대사산물인 아세트알데히드는 강력한 독성물질로서 알코올에 비해 반응성이 매우 높고 독성이 강한 알코올성 간장해의 주원인 물질이며<sup>38</sup>, 숙취를 유발하는 원인 물질로 혈액 중에 축적될 경우 더 심한 숙취 증상을 유발할 수 있다<sup>39</sup>. 본 연구 결과 혈액 내 알코올, 아세트알데히드 농도는 대조군에 비하여 실험군에서 보다 낮게 나타났고, ADH 농도는 대조군에 비하여 실험군에서 보다 높게 나타났다. 아세트알데히드 함량을 분석한 결과, 실험군은 1시간 후에서 대조군에 비해 높게 나타났는데, 이는 CP 투여시 알코올 투여 후 초기에 알코올 분해가 촉진되면서 대조군에 비해 알코올 대사의 중간 산물인 아세트알데히드 함량이 높게 나타난 것으로 보여진다. 이후 3, 5시간 후에는 아세트알데히드가 감소되었다. 이와 같은 결과를 통해 인디언구스베리와 님잎 추출물을 함유하는 복합 처방이 ADH의 활성을 촉진시켜 혈액 중 알코올 및 아세트알데히드를 효과적으로 감소시킨

으로써 숙취해소에 유용하게 활용될 수 있을 것으로 보인다.

간 세포의 손상됨에 따라 간세포로부터 효소인 aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase(ALT)의 활성이 증가되며 간에서 혈중으로 방출된다. alkaline phosphatase (ALP)는 간 담관 상피 세포, 뼈, 소장, 신장 등 여러 장기에 분포하는 효소로 혈액 내 이 효소의 활성치가 증가하면 확실한 간 손상을 예상할 수 있는 지표로 알려져 있다. 따라서 AST, ALT 및 ALP의 순환계로의 방출은 알코올에 의한 독성화 과정 동안에 간 조직막에 심각한 손상이 있었음을 의미한다<sup>40)</sup>. 본 연구에서는 알코올 투여 후 손상된 간에 대한 인디언구스베리와 님잎 추출물을 함유하는 복합 처방의 영향을 검토하고자 혈액 내 AST, ALT, ALP 활성을 측정된 결과 ALT는 정상군, 대조군, 실험군에서 차이가 나타나지 않았고 AST와 ALP가 대조군에 비해 CP 투여군이 유의성 있는 감소를 나타낸 결과를 통해 간 손상을 억제하는 효과가 있을 것으로 사료된다.

이상의 결과들을 종합해보면 인디언구스베리와 님잎 추출물을 포함하는 복합 처방은 간 세포에서의 항산화 효소의 활성이 확인되었으며, 식품의약품안전평가원에서 발간한 건강기능식품 기능성 평가 가이드-‘간 건강에 도움을 줄 수 있음’<sup>25)</sup>에 준하여 숙취해소 및 알코올 간 보호에 대해 효과가 있음을 실험적으로 확인하였다. 따라서 인디언구스베리와 님잎 추출물을 포함하는 복합 처방이 숙취해소 기능성 식품 소재로서 활용 가능성이 충분할 것이라 사료되며, 아울러 처방 구성 약물 모두 이미 식품으로 등재되어 있어 산업화 가능성이 높을 것으로 보인다.

## 결 론

본 연구는 HepG2 세포에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하여 산화적스트레스를 유도하고 인디언구스베리와 님잎 추출물을 포함하는 복합 처방을 처리했을 때, 감소된 항산화 효소 SOD, catalase, GPx, GR의 활성을 증가시켰고 GSH의 함량을 유의적으로 증가시켰다.

SD. Rat을 이용한 동물 병태 모델에서는 시간(1, 3 및 5시간)에 따라 채취한 혈중 에탄올, alcohol dehydrogenase(ADH) 및 아세트알데히드 농도의 변화를 관찰한 결과 시간 경과에 따라 대조군에 비해 혈중 에탄올과 아세트알데히드 함량은 유의적으로 감소하였고, ADH는 유의적으로 증가한 결과를 통해 본 연구에 사용한 복합 처방의 숙취제거 효능이 인정되었다. 제품의 안정성을 확인하기 위하여 AST, ALT 및 ALP 활성을 측정된 결과, ALT는 정상군, 대조군, 실험군 사이에서 차이가 나타나지 않았고 AST와 ALP는 대조군에 비해 유의성 있는 감소가 나타난 결과로 안정성과 간 손상 억제 효과가 검증되었다.

이상의 결과로 보아 인디언구스베리와 님잎 추출물을 함유한 복합 처방은 숙취해소에 효과적이고 안전하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

## References

1. Lee JS, Kim NY, Lee KH, Kim GS, Park HJ, Choi JW, et

al. Effects of flower of *Pueraria lobata* on lipid peroxidation and activities of alcohol metabolic enzymes in alcohol-treated rats. JOURNAL-KOREAN SOCIETY OF FOOD SCIENCE AND NUTRITION. 2000;29(5):935-42.

2. Swift R, Davidson D. Alcohol hangover: mechanisms and mediators. Alcohol health and research world. 1998;22(1):54.

3. Lin RC, Li TK. Effects of isoflavones on alcohol pharmacokinetics and alcohol-drinking behavior in rats. The American journal of clinical nutrition. 1998;68(6):1512S-5S.

4. Hawkins RD, Kalant H. The metabolism of ethanol and its metabolic effects. Pharmacological Reviews. 1972;24(1):67-157.

5. Lieber CS. Liver adaptation and injury in alcoholism. New England Journal of Medicine. 1973;288(7):356-62.

6. Kärkkäinen P, Mussalo-Rauhamaa H, Poikolainen K, Lehto J. Alcohol intake correlated with serum trace elements. Alcohol and Alcoholism. 1988;23(4):279-82.

7. Kim SM, Seong JR, Kim JH. Alcohol decomposition and liver protection effects of water extract form *Hovenia dulcis* Thunb. The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering: Proceedings of Current Biotechnology and Bioengineering(XII). 2003:605-8.

8. Kim J. Effect of a alcohol detoxification beverage (ADB) contained *Radix puerariae* and *Bambusae caules* in *Liquamen phyllostachyos* on the alcohol administered mouse. Journal of The Korean Society of Food Science and Nutrition. 2004.

9. Hwang JY, Ham JW, Nam SH. Effect of Maesil (*Prunus mume*) juice on the alcohol metabolizing enzyme activities. Korean Journal of Food Science and Technology. 2004;36(2):329-32.

10. Lee JS, Lee SW. Effects of water extracts in fruits of *Omiija* (*Schizandra chinensis* Baillon) on alcohol metabolism. Journal of the Korean Society of Food Culture. 1990;5(2):259-63.

11. Cho SY, Jang JY, Kim MJ. Effects of *Pueraria flos* and *radix* water-extracts on levels of several serum biomarkers in ethanol-treated rats. JOURNAL-KOREAN SOCIETY OF FOOD SCIENCE AND NUTRITION. 2000;30(1):92-6.

12. An SW, Kim YG, Kim MH, Lee BI, Lee SH, Kwon HI, et al. Comparison of Hepatic Detoxification activity and reducing Serum Alcohol concentration of *Hovenia dulcis* THUNB and *Alnus japonica* Steud. Korean Journal of Medicinal Crop Science. 1999;7(4):263-8.

13. Dasaroju S, Gottumukkala KM. Current trends in the

- research of *Emblica officinalis* (CP): A pharmacological perspective. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 2014;24(2):150-9.
14. Kumar KS, Bhowmik D, Dutta A, Yadav AP, Paswan S, Srivastava S, et al. Recent trends in potential traditional Indian herbs *Emblica officinalis* and its medicinal importance. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry.* 2012;1(1):18-28.
  15. Mirunalini S, Krishnaveni M. Therapeutic potential of *Phyllanthus emblica* (CP): the ayurvedic wonder. *Journal of basic and clinical physiology and pharmacology.* 2010;21(1):93-105.
  16. Bhattacharya A, Chatterjee A, Ghosal S, Bhattacharya SK. Antioxidant activity of active tannoid principles of *Emblica officinalis* (CP). 1999.
  17. Baliga MS, Dsouza JJ. CP (*Emblica officinalis* Gaertn), a wonder berry in the treatment and prevention of cancer. *European Journal of Cancer Prevention.* 2011;20(3):225-39.
  18. Akhtar MS, Ramzan A, Ali A, Ahmad M. Effect of CP fruit (*Emblica officinalis* Gaertn.) on blood glucose and lipid profile of normal subjects and type 2 diabetic patients. *International journal of food sciences and nutrition.* 2011;62(6):609-16.
  19. Kim HJ, Yokozawa T, Kim HY, TOHDA C, RAO TP, JUNEJA LR. Influence of CP (*Emblica officinalis* Gaertn.) on hypercholesterolemia and lipid peroxidation in cholesterol-fed rats. *Journal of nutritional science and vitaminology.* 2005;51(6):413-8.
  20. Hossain MA, Shah MD, Sakari M. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of various organic extracts of *Merremia borneensis* from Sabah. *Asian pacific journal of tropical Medicine.* 2011;4(8):637-41.
  21. Kokate C, Purohit A, Gokhale S. *Pharmacognosy: Nirali prakashan* Pune: 2008.
  22. Subapriya R, Nagini S. Medicinal properties of neem leaves: a review. *Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents.* 2005;5(2):149-56.
  23. Thas JJ. Siddha medicine-background and principles and the application for skin diseases. *Clinics in dermatology.* 2008;26(1):62-78.
  24. Manikandan P, Anandan R, Nagini S. Evaluation of *Azadirachta indica* leaf fractions for in vitro antioxidant potential and protective effects against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative damage to pBR322 DNA and red blood cells. *Journal of agricultural and food chemistry.* 2009;57(15):6990-6.
  25. Nelson NG, Suhaidi FA, DeAngelis RS, Liang N-C. Appetite and weight gain suppression effects of alcohol depend on the route and pattern of administration in Long Evans rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior.* 2016;150:124-33.
  26. Das SK, Vasudevan D. Alcohol-induced oxidative stress. *Life sciences.* 2007;81(3):177-87.
  27. Ko BS, Jang JS, Hong SM, Kim DW, Sung SR, Park HR, et al. Effect of new remedies mainly comprised of *Hovenia dulcis* Thunb on alcohol degradation and liver protection in Sprague Dawley male rats. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition.* 2006;35(7):828-34.
  28. Shin JH, Lee SJ, Choi DJ, Kang MJ, Sung NJ. Antioxidant and alcohol dehydrogenase activity of water extracts from abalone containing medicinal plants. *Korean journal of food and cookery science.* 2008;24(2):182-7.
  29. Caro AA, Cederbaum AI. Oxidative stress, toxicology, and pharmacology of CYP2E1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2004;44:27-42.
  30. Jeong JH, Wee JJ, Shin JY, Cho JH, Jung DH. Antioxidative effect of crude saponin fraction prepared from culture product of basidiomycota cultured with fresh ginseng as substrate. *Korean Journal of Food Science and Technology.* 2005;37(1):67-72.
  31. De Duve C, Baudhuin P. Peroxisomes (microbodies and related particles). *Physiological reviews.* 1966;46(2):323-57.
  32. Awasthi Y, Beutler E, Srivastava S. Purification and properties of human erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Biological Chemistry.* 1975;250(13):5144-9.
  33. Kuramoto T. Development and application of food materials from plant extract such as SOD. *Up to date Food Processing.* 1992;27(3):22-3.
  34. Bannister JV, Bannister WH, Rotilio G. Aspects of the structure, function, and applications of superoxide dismutase. *Critical Reviews in Biochemistry.* 1987;22(2):111-80.
  35. MacCord J. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969;244:6049-55.
  36. Lieber CS. Alcohol and the liver: 1994 update. *Gastroenterology.* 1994;106(4):1085-105.
  37. Lebsack M, Gordon ER, Lieber CS. Effect of chronic ethanol consumption on aldehyde dehydrogenase activity in the baboon. *Biochemical pharmacology.* 1981;30(16):2273-7.
  38. Choi JW. Effects of ginsenosides on alcohol metabolism, Master thesis, Yeungnam university. 1983.
  39. Lieber CS. Liver adaptation and injury in alcoholism.



- New England Journal of Medicine. 1973;288(7):356-62.
40. You Y, Yoo S, Yoon HG, Park J, Lee YH, Kim S, et al. In vitro and in vivo hepatoprotective effects of the aqueous extract from *Taraxacum officinale* (dandelion) root against alcohol-induced oxidative stress. *Food and Chemical Toxicology*. 2010;48(6):1632-7.