

D-Galactosamine으로 유발된 간손상에 대한 민들레 열수추출물의 예방효과

박지영 · 박충무 · 김진주 · 송영선[†]

인제대학교 의생명공학대학 식품생명과학부, 식품과학연구소 및 바이오헬스 소재 연구센터

Hepatoprotective Activity of Dandelion (*Taraxacum officinale*) Water Extract against D-Galactosamine-Induced Hepatitis in Rats

Ji-Young Park, Chung-Mu Park, Jin-Ju Kim, and Young-Sun Song[†]

School of Food and Life Science, Food Science Institute, Biohealth Products Research Center, Inje University, Gimhae 621-749, Korea

Abstract

This study aimed to investigate the protective effect of dandelion water extract (DWE) on liver injury induced by D-galactosamine (GalN) in Sprague-Dawley rats. Fifty rats were divided into 5 groups; normal control (C), DWE-control (DWE-C: saline injection after feeding 3% DWE diet), GalN-control (GalN-C: GalN injection after normal diet), DWE I (GalN injection after feeding 1.5% DWE diet), and DWE II (GalN injection after feeding 3% DWE diet). After 2 weeks, the acute hepatitis was induced by GalN (650 mg/kg, i.p.) and 24 hrs later, all rats were sacrificed. The DWE supplement ameliorated the serum alanine and aspartate aminotransferase (AST, ALT) as well as alkaline phosphatase (ALP) and tumor necrosis factor- α (TNF- α). Hepatic antioxidative enzyme activities, such as catalase, GSH peroxidase, GSH reductase, and Mn-superoxide dismutase (SOD) were slightly or significantly elevated by the treatment of DWE. Moreover, the histological examination corresponded with these biochemical observations. According to these findings, dandelion could be used as a potential therapeutic material for treating chemically induced acute hepatitis.

Key words: dandelion water extract, D-galactosamine, hepatitis, antioxidative enzymes

서 론

현대인들에게는 불규칙한 식사, 스트레스, 과도한 음주 및 흡연 등으로 인하여 간기능이 손상되거나, 심하면 간질환으로 발전하는 경우가 빈번하게 일어나고 있다. 이와 같은 간기능의 손상 및 간질환은 인체에 치명적인 영향을 미치며 또한 회복하기도 어렵다(1). 간 질환은 일반적으로 간염에서 간 섬유화, 간 경변, 간암으로 진행되는 일련의 진행과정으로 이해되고 있다(2). 그 원인으로는 바이러스로 인한 간질환, 과음으로 인한 알코올성 간질환, 약물로 인한 독성 간질환, 간에 지방이 축적되는 지방간, 인체 면역계통의 이상으로 인한 자가면역성 간질환 및 독성 물질이 과다하게 쌓여서 생기는 대사성 간질환 등이 있으며, 이들로 인한 반복되는 염증반응이 다음 단계로의 진행을 유도한다. 따라서 초기반응을 저해할 수 있는 간 보호활성물질이나 간염 치료제의 개발이 요구되고 있다. 현재 임상적으로 사용되고 있는 대표적인 간장치료제인 silymarin의 경우 국화과 식물인 마리아 영경귀 *Silybum marianum*의 열매에서 분리되었으며(3) 최근 개발된 dimethyl dimethoxy biphenylate(DDB)는 오미자

의 성분인 schizandrin과 유사한 합성물질로 간독성 치료 효과가 보고된 바 있다(4). 그러나 이들 질환의 심각성과 빈도수를 고려해 천연물로부터 간손상 예방 효과가 있는 소재를 개발하는 것은 그 의의가 매우 크다고 사료된다.

Aminosulfate의 한 종류인 D-galactosamine(GalN)은 galactose의 대사 장애를 통해 uridine triphosphate(UTP), uridine diphosphate(UDP) 및 uridine monophosphate(UMP) 등의 농도 감소로 RNA의 합성을 저해하고 지질의 축적을 유도하며 세포막 성분 중 탄수화물의 조성과 세포내 Ca^{++} 농도를 변화시켜 간조직의 손상을 유발한다(5-7). GalN의 투여는 전소엽성 국소 간세포 괴사, 염증세포의 침윤, 대식세포의 증가 등 사람의 바이러스성 간염과 유사한 증상을 초래한다고 보고되었으며(8), GalN의 급성 중독시에는 간괴사, 만성중독의 경우에는 간경변과 세포성 종양을 일으키는 것으로 보고되고 있다(9).

민들레(*Taraxacum officinale*)는 한방에서 강장, 해열, 이뇨, 건위, 거담, 해독 등에 이용되어 왔다(10). 서양에서는 담즙분비 촉진, 향류마티스, 이뇨 등에 약재로 사용되고 있으며(11), 특히 폴리페놀화합물 중 플라보노이드, 루테올린,

[†]Corresponding author. E-mail: fdsnsong@inje.ac.kr
Phone: 82-55-320-3235, Fax: 82-55-321-0691

시나믹산, 쿠마린, 타락사스테롤 등의 성분 및 엽록소와 비타민 C가 많이 함유되어 있다(12). 이에 본 연구에서는 실험 동물에 민들레 열수추출물 식이를 2주 동안 급여하고, GalN으로 간 손상을 유발한 후 혈액 중의 간기능 지표물질의 변화 및 간조직의 조직학적 관찰을 통해서 민들레 추출물이 GalN 유발 간독성에 미치는 효과를 규명하고자 하였다.

재료 및 방법

민들레 물 추출물 및 식이 제조

민들레(*Taraxacum officinale*)는 경남 의령군에 소재한 민들레식물에서 구입하였으며 민들레 숙성전의 분쇄시료 1 kg에 10배 분량의 3차 증류수를 넣고 환류하면서 4시간 동안 열수추출하고 원심 분리하여 여과(Whatman No. 4)한 후 동결 건조하여 실험 식이에 사용하였다. 민들레 열수추출물의 회수율은 30%였으며, 민들레 추출물 1.5% diet와 3% 함유 diet를 제조하는데 있어 diet 1 kg에 각각 15 g, 30 g의 추출물을 첨가하여 제조하였으며 식이조성은 Table 1과 같다.

실험동물의 사육 및 관리

실험동물은 생후 5주된 수컷 흰쥐(Sprague-Dawley rat) 50마리를 효창사이언스(Daegu, Korea)로부터 구입하여 실내온도 20~22°C, 명암주기 12시간 cycle 조건의 사육실에서 표준사료와 탈이온수를 완전 자유급식(*ad libitum*)으로 2주간 공급하여 환경에 적응시킨 후, 7주령 되어 평균체중이 약 200 g이 되었을 때 그룹 당 10마리씩 나누어 사육하였으며, 식이 섭취량과 체중은 각각 1주일에 3회와 1회씩 정기적으로 측정하였다. 실험식은 AIN(American Institute of Nutrition)-76(ICN biomedical, Cleveland, OH, USA)의 정제식이 조성을 따랐으며 고콜레스테롤혈증을 유발한 흰쥐에 민들레 열수 추출물을 급여한 후 항산화효소의 유의적인 변화를 관찰한 연구(13)를 근거로 하여 정상 식이후 식염수투여군(C), 3% 민들레 열수 추출물 식이를 먹

인 후 식염수를 투여한 군(DWE-C), 정상식이 후 갈락토사민 투여군(GalN-C), 1.5% 민들레 열수 추출물 식이를 먹인 후 갈락토사민을 투여한 군(DWE-I), 3.0% 민들레 열수 추출물 식이를 먹인 후 갈락토사민을 투여한 군(DWE-II)의 5그룹으로 분류하여 2주 동안 식이하였다. 마지막 날 식이를 제거하고 30분 후 실험군에는 D-galactosamine(GalN) 650 mg/kg, 대조군에는 동량의 생리식염수를 복강 내로 투여하였다. 실험 종료 전 하룻밤 동안 절식시키고 이산화탄소로 마취시킨 후, 복부 정중선을 따라 개복하고 복부 대동맥에서 혈액을 채취한 다음 실온에서 30분간 방치한 후 원심분리기로 700×g에서 15분간 원심 분리하여 분리된 혈장을 -20°C에서 냉동 보관하면서 분석에 사용하였다. 간은 생리식염수로 관류시켜 혈액을 제거하고 부착되어 있는 지방이나 근육을 깨끗이 제거한 후 여과지로 물기를 제거하여 일부는 조직학적 관찰을 위해 사용하였고 나머지는 -70°C에서 보관하며 지질과산화농도와 항산화 효소계 활성 측정에 이용하였다.

AST, ALT 및 ALP의 활성 측정

혈장의 aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase(ALT) 및 alkaline phosphatase(ALP)의 활성은 효소법에 의한 정량용 kit시약(YD diagnostics, Yongin, Korea)으로 측정하였다.

Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)의 측정

TNF- α 의 함량 측정을 위해 Enzyme Linked Immunosorbent Assay(ELISA) 방법으로 측정(R&D Systems Inc., Minnesota, MN, USA)하였다. Polyclonal antibody가 코팅된 하나의 미세평판마다 표준 조정 혈장과 실험 반응액을 넣고 덮개판을 덮은 후 실온에서 2시간 동안 반응시킨 후 wash buffer로 4번씩 씻어주었다. 다음 단계로 미세평판에 conjugated concentrate 100 μ L를 첨가하여, 덮개판을 씌우고 실온에서 30분 동안 반응시켰다. 반응액에 빛이 들어가지 않도록 주의하여 측정 직전에 정지 용액(1 N NaOH) 50 μ L

Table 1. Composition of experimental diet

(g/kg diet)

Ingredients	Group ¹⁾				
	CON	DWE-C	GalN ²⁾ -C	DWE I	DWE II
Casein purified high nitrogen	200.0	200.0	200.0	200.0	200.0
Sucrose	130.0	130.0	130.0	130.0	130.0
Corn starch	520.0	490.0	520.0	505.0	490.0
Corn oil	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
Alphacel	50.0	50.0	50.0	50.0	50.0
AIN-76 ³⁾ vitamin mixture	10.0	10.0	10.0	10.0	10.0
AIN-76 mineral mixture	35.0	35.0	35.0	35.0	35.0
DL-methionine	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0
Choline bitartrate	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Dandelion water extracts	-	30	-	15	30

¹⁾CON group: normal control group fed normal semipurified diet, DWE-C group: DWE-control group saline injection after feeding 3% DWE diet, GalN-C group: GalN-control group GalN injection after normal diet, DWE I group: GalN injection after feeding 1.5% DWE diet, DWE II group: GalN injection after feeding 3% DWE diet.

²⁾D-galactosamine. ³⁾AIN mixture: ICN biomedical.

을 첨가하여 모든 반응을 중지시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정하여 농도로 환산하였다.

혈장의 지질과산화물 함량

혈장의 thiobarbituric acid reactive substance(TBARS) 측정은 Buege와 Aust에 의한 방법(14)을 다소 수정하여 측정하였다. 즉, 0.4% thiobarbituric acid(TBA), 15% trichloroacetic acid(TCA), 그리고 2.5% HCl을 혼합한 TBARS 용액을 만든 후, 혈장 20 μ L에 180 μ L의 증류수를 혼합하여 전체 부피를 200 μ L로 조정하고 여기에 TBARS 용액을 400 μ L를 가하여 혼합하였다. 이것을 95°C에서 20분간 가열하고 식힌 후 1,000 \times g에서 10분간 원심분리하고, 그 상층액을 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 표준으로는 1,1,3,3-tetramethoxypropane(TMP)을 사용하며 측정된 값을 표준곡선에 대입시켜 malondialdehyde(MDA)의 양으로 환산하였다.

간조직의 지질과산화물 함량

간의 지질과산화물의 측정은 Ohkawa 등의 방법(15)을 다소 수정하여 측정하였다. 간 0.1 g을 125 mM KCl이 함유된 50 mM HEPES buffer 1 mL로 균질화시킨 후 시료 150 μ L와 50 μ L의 증류수 혼합용액을 37°C에서 60분간 반응시키고 0.4% TBA, 15% TCA, 그리고 2.5% HCl을 혼합한 TBARS 용액을 400 μ L 가한 후 95°C 수조에서 60분간 반응시킨 다음 1,000 \times g에서 10분간 원심분리하고, 분리된 상층액을 취하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 표준으로는 TMP를 사용하며 측정된 값을 표준곡선에 대입시켜 MDA의 양으로 환산하였다.

항산화 효소계 활성 측정

간조직의 Catalase의 측정은 Aebi 법(16)으로 측정하였다. Glutathione peroxidase(GSH-px)와 glutathione reductase 활성은 Lawrence와 Burk의 방법(17)과 Inger와 Bengt의 방법(18)으로 각각 측정하였다. 또한 Mn-superoxide dismutase(SOD) 활성은 Marklund와 Marklund 방법(19)으로 측정하였다. 그리고 효소의 비활성 측정을 위한 단백질 농도는 Bradford 법으로 측정하였다.

조직학적 관찰

간 조직은 10% formalin으로 관류 고정하고 ethanol 처리

를 하여 탈수시킨 후 paraffin으로 embedding 과정을 거쳐 5 μ m의 절편으로 만들고 hematoxylin/eosin으로 염색하여 광학현미경으로 관찰하였다.

통계처리

모든 실험결과는 SPSS/PC+ package를 사용하여 분석하여 평균 \pm 표준편차로 표시하였으며 일원배치분산분석으로 비교하여 Duncan 다중범위 분석에 의해 각 실험 군 간의 유의성을 $p < 0.05$ 수준에서 검정하였다.

결과 및 고찰

식이섭취량, 몸무게, 식이효율에 미치는 영향

민들레 열수추출물을 2주간 식이시킨 후 GalN을 투여하여 간독성을 유발한 동물의 식이섭취량, 체중증가량 및 식이효율은 Table 2와 같다. 민들레는 이노작용이 있어 체내 과잉수분을 제거하여 체중조절의 효과가 있음이 입증되었다(20). 그러나 본 실험에서 DWE I 군은 가장 많은 양의 식이섭취를 하였고 DWE-C와 DWE-II 군은 대조군보다 적은 양의 식이섭취량을 기록하였으나 체중증가량이 높아 유의적으로 높은 식이효율을 보였다. 이것은 민들레에 포함되어 있는 단백질, 아미노산, 유리당, 지방산 등의 섭취가 3% 추출물 급여군에서 상대적으로 높았기 때문인 것으로 사료된다.

혈청 AST, ALT 및 ALP의 활성에 미치는 영향

혈청 AST, ALT 및 ALP의 활성은 Fig. 1, 2와 같다. GalN-C군의 AST와 ALT가 각각 369.9 \pm 66.2 IU/L와 239.5 \pm 24.9 IU/L로 정상식이군의 AST 26.78 \pm 5.1 IU/L와 ALT 19.26 \pm 6.5 IU/L에 비해 유의한 증가를 보였고, 이는 Lim 등(21)이 GalN 투여로 AST와 ALT 활성이 증가하였다는 보고와 일치하였다. DWE-C군의 경우 정상식이군과 비슷한 수치를 나타내어 민들레 열수추출물이 단독으로 AST와 ALT의 활성에 영향을 미치지 않음을 알 수 있었으며 DWE-I, II 군은 정상식이군에는 미치지 못하였으나 GalN-C군에 비해 유의한 간 기능 개선효과가 있음을 보였다. 혈청 ALP 활성은 GalN-C군에서 213.6 \pm 25.1 IU/L로 정상식이군의 156.6 \pm 23.9 IU/L에 비해 유의한 증가를 보여 Lee 등(22)과 동일한 결과를 보였다. DWE-C군의 경우 정상식이군과 비슷한 수치를 나타내어 민들레 물 추출물이 단독으로

Table 2. Food intake, food efficiency ratio and body weight gain of rats fed experimental diets

	Group ¹⁾				
	CON	DWE-C	GalN-C	DWE I	DWE II
Food intake (g/day)	21.21 \pm 4.91 ^{ab2)}	19.08 \pm 3.05 ^a	21.27 \pm 3.28 ^{ab}	24.34 \pm 3.64 ^b	19.69 \pm 1.92 ^a
Weight gain (g/day)	5.71 \pm 0.97 ^{NS3)}	6.04 \pm 1.03	5.93 \pm 1.26	5.81 \pm 0.87	5.81 \pm 0.93
FER ⁴⁾	0.24 \pm 0.06 ^a	0.32 \pm 0.05 ^b	0.24 \pm 0.03 ^a	0.27 \pm 0.06 ^{ab}	0.32 \pm 0.08 ^b

¹⁾Refer to Table 1.

²⁾Data represent the means \pm SD. A value sharing same superscript within a row is not significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple comparison. ³⁾Not significant.

⁴⁾FER (Food Efficiency Ratio)=Body weight gain for experimental period/ Diet intake for experiment period.

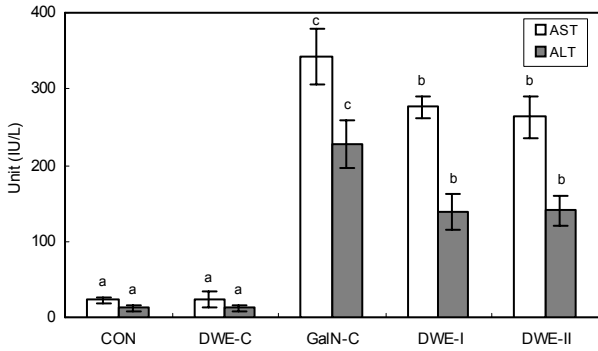


Fig. 1. Effect of dandelion water extract on the serum aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) activities in D-GalN-intoxicated rats. Groups are the same as in Table 1. Values sharing the same superscript are not significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

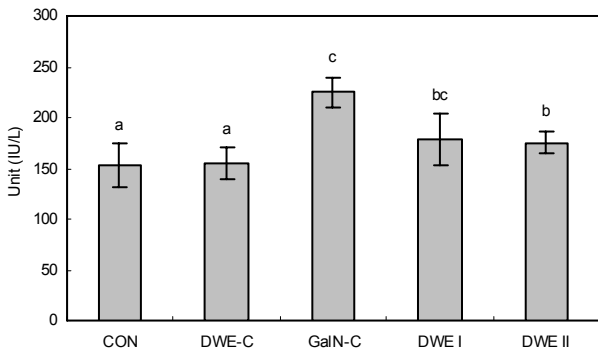


Fig. 2. Effect of dandelion water extract on the serum alkaline phosphatase in D-GalN-intoxicated rats. Groups are the same as in Table 1. Values sharing the same superscript are not significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

로 ALP의 활성에 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다. DWE-I, II군은 정상식이군 수준에는 미치지 못하였으나 GalN-C군에 비해 유의적인 감소를 보였고 군간의 차이는 보이지 않았다. Transaminase는 아미노기 전이반응을 촉매하는 효소의 총칭으로 임상에서 가장 많이 이용되고 있으며 AST와 ALT가 있다. 이들 효소는 amino acid와 α -keto acid 사이의 아미노기 전이반응을 촉매하는 것으로 체내에 널리 분포되어 있으며 간 손상 시 세포 밖으로 유출된다. 이러한 과정은 세포내의 에너지 공급이 감소되어 세포내의 K^+ 이온이 세포외로 유출되고 Na^+ , Ca^{++} 및 수분이 세포내로 유입이 되면서 세포는 팽창되고, 세포막이 늘어나게 되어 세포질에 존재하는 AST와 ALT가 유출된다. 세포 밖으로 빠져나간 AST 및 ALT는 순환 혈액 중으로 빠르게 유입되어 간 질환 시 정상치보다 현저히 증가됨으로써 간 기능 검사에 이용되고 있다. 간세포의 모세관담맥 용모, 담관상피 등에 주로 존재하고 골격 내에서는 석회화를 촉진시키고 장내에서는 인 흡수 등에 관여하는 효소인 ALP는 골질환이나 특히 간이나

담도질환, 임신 및 악성 종양 등에서 활성치가 상승한다(23). 본 실험의 결과 민들레 물 추출물의 섭취는 AST, ALT, ALP의 활성을 억제함으로써 간 조직을 안정화하여 간을 보호하는 것으로 사료된다.

혈청 TNF- α 농도에 미치는 영향

염증반응시에 TNF- α , interleukine(IL)- 1β , IL-6, and interferon(IFN)- γ 와 같은 사이토카인은 간과 여러 장기의 손상시 중요한 역할을 하며(24) 이 중 monokine인 TNF- α 는 여러 면역 활성을 증대하는 단백질로서 활성화된 대식세포에 의해 주로 분비될 뿐만 아니라 괴사 진행 과정의 주요 인자로 TNF- α 를 억제하는 것이 항염증 치료에서 중요하게 여겨지고 있다(25). 본 연구에서는 GalN의 투여에 의해 TNF- α 의 발현이 촉진되는지에 대하여 알아보기 위해 ELISA를 통하여 정량하였다. 그 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 GalN-C군의 농도는 36.7 ± 1.95 pg/mL으로 정상식이군의 31.0 ± 2.36 pg/mL에 비해 유의한 증가를 보여 GalN에 의해 TNF- α 가 유도되었음을 알 수 있었다. DWE-C군의 경우 정상식이군과 비슷한 수치를 나타내어 민들레 물 추출물이 TNF- α 의 활성에 영향을 미치지 않음을 확인하였다. DWE-I, II군의 TNF- α 농도는 각각 32.9 ± 1.89 pg/mL, 30.7 ± 2.56 pg/mL으로 GalN-C군에 비해 감소하는 경향을 나타냈으며 군 간의 차이는 보이지 않았다. Kim 등(26)의 연구에서는 정상세포에 Substance P와 lipopolysaccharide (LPS)에 의해 유도된 염증반응 시 민들레추출물이 TNF- α 의 분비를 억제하는 것으로 보고되기도 하였다. 이러한 결과로 볼 때 민들레 열수추출물은 GalN에 의해 유도된 염증반응에서 TNF- α 의 분비를 억제시켜 염증반응을 예방하는 것으로 생각된다.

항산화효소 활성에 미치는 영향

항산화효소 활성도 변화를 살펴보기 위해 catalase, GSH-px, GSH-reductase 및 Mn-SOD의 활성도를 측정한다

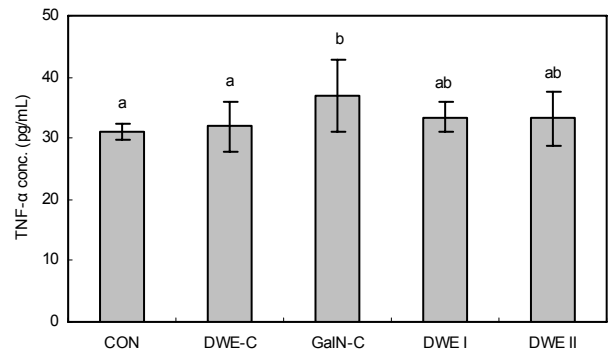


Fig. 3. Effect of dandelion water extract on serum TNF- α concentration in D-GalN-intoxicated rats. Groups are the same as in Table 1. Values sharing the same superscript are not significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

Table 3. Effect of dandelion water extract on antioxidative enzyme activities in GalN-intoxicated rats

	Group ¹⁾				
	CON	DWE-C	GalN-C	DWE I	DWE II
Catalase ($\mu\text{mol}/\text{mg protein}/\text{min}$)	$0.47 \pm 0.0^{\text{ab}2)}$	$0.49 \pm 0.1^{\text{b}}$	$0.42 \pm 0.0^{\text{a}}$	$0.57 \pm 0.0^{\text{c}}$	$0.57 \pm 0.1^{\text{c}}$
GSH-px ⁴⁾ (units/mg protein)	$8.30 \pm 0.8^{\text{NS}3)}$	8.37 ± 0.6	7.82 ± 0.7	8.06 ± 0.2	8.44 ± 0.5
GSH-reductase ⁵⁾ (units/mg protein)	$24.69 \pm 3.6^{\text{ab}}$	$26.01 \pm 4.5^{\text{b}}$	$20.99 \pm 2.0^{\text{a}}$	$23.40 \pm 3.9^{\text{ab}}$	$25.52 \pm 3.1^{\text{b}}$
Mn-SOD ⁶⁾ (NU · g tissue/mg protein)	$2.96 \pm 0.2^{\text{ab}}$	$3.02 \pm 0.3^{\text{ab}}$	$2.56 \pm 0.1^{\text{a}}$	$3.21 \pm 0.5^{\text{b}}$	$3.03 \pm 0.0^{\text{ab}}$

¹⁾Refer to Table 1.

²⁾Data represent the mean \pm SD. A value sharing same superscript within a row is not significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple comparison. ³⁾Not significant.

⁴⁾Glutathione peroxidase. ⁵⁾Glutathione reductase. ⁶⁾Superoxide dismutase.

결과는 Table 3에 나타내었다. Catalase, GSH-px와 Mn-SOD활성은 정상식이군에 비해 GalN-C군에서 활성이 감소되었고 GalN-C군은 정상식이군보다 높은 수치를 보였으며 DWE- I, II군은 정상식이군 수준에는 미치지 못했으나 GalN-C군에 비해 회복되는 경향을 보였다. GSH-px의 활성은 정상식이군과 비교하여 GalN-C군에서 감소하였고 DWE- I, II군은 GalN-C군에 비해 증가하였으나 통계적 유의성은 관찰할 수 없었다. Reactive oxygen species(ROS)나 자유라디칼로부터 생체물질이나 식품성분을 보호할 수 있는 항산화 물질 및 항산화 방어망은 활성산소 라디칼의 발생을 미연에 방지하는 시스템과 생성된 라디칼을 포착·제거하는 시스템, 손상된 조직의 회복과 신생 기전에 관여하는 시스템으로 분류할 수 있다(27). 또한 ROS를 제거하기 위한 생체 방어시스템은 SOD, glutathione peroxidase, catalase 등의 효소계에 의한 효소적 방어체계와 ROS나 자유라디칼의 연쇄반응을 중단 또는 종결시키는 비효소적 방어체제로 크게 구별된다(28). 산소를 이용하는 생물은 superoxide를 제거하는 효소인 SOD를 가지고 있어 xenobiotics로 인하여 생성된 superoxide anion을 H_2O_2 로 전환시켜 생체내 손상으로부터 보호되고 있다. Catalase는 체내에서 지방의 자동 산화 및 유기물의 산화로 생기는 과산화수소를 물과 산소로 분해하여 무독화시키는 radical scavenging enzyme으로 생성된 활성 산소를 물로 변환시켜 체외로 배출시킨다(29). 또한 대사과정 중 발생하는 활성산소종의 유리기를 제거할 뿐만 아니라 이들 활성산소에 의해 비가역적으로 불활성화 될 수도 있으며, 지방산화에 의해 생성된 유리기도 제거하는 것으로 보고되어 있다(30). Glutathione peroxidase 또한 catalase와 같은 기능을 수행하는 효소로 glutathione을 기질로 하여 유리기를 물로 변환시켜 생성된 활성산소를 체외로 배설시키며 glutathione reductase는 이 과정에서 산화된 기질을 환원형으로 만드는 과정을 돕는 효소이다.

이상의 결과로 볼 때 민들레 열수 추출물의 투여가 catalase, SOD의 활성을 증가시켜 GalN에 의한 oxygen free radical의 생성을 억제시키고, GSH를 기질로 하여 지질과산화를 억제하는 GSH-px와 산화형 GSH를 환원형으로 만드는 GSH-red의 활성 또한 증가시켜 간 손상을 완화하는 것으로 사료된다.

지질과산화에 미치는 영향

간조직의 지질과산화 함량을 관찰한 결과는 Fig. 4에 나타난 바와 같다. GalN-C군은 86.56 ± 8.1 nmole MDA/g tissue로 정상식이군의 67.58 ± 11.2 nmole MDA/g tissue에 비하여 지질과산화 함량을 유의적으로 증가시키는 것으로 나타났다. DWE- I 군은 86.14 ± 7.6 nmole MDA/g tissue로 GalN-C군과의 차이를 보이지 않았으나, DWE-II군은 78.12 ± 5.6 nmole MDA/g tissue로 GalN-C군에 비해 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다. 세포의 불포화지방산에 활성산소가 첨가되어 과산화된 지질을 지질과산화라고 한다. 이 과정은 외적인 요인뿐만 아니라 내적인 요인에 의하여 생성된 oxygen free radical들로 인해 야기되며, 세포의 성분이나 기질, 특히 불포화지방산이 다량 존재하는 세포막에 산화적 손상을 입힌다. Free radical generating system과 scavenging system 사이의 불균형으로 초래된 여러 독작용으로 인해 생성된 oxygen radical과 반응한 불포화 지방산은 불포화지방산의 radical이 된다(31). 이 radical은 산소와 결합하여 hydroxyepoxide를 생성하며, triene 이상의 불포화 지방산은 hydroperoxide, endoperoxide 및 polyepoxide 등과 같은 지질과산화물로 되어 MDA로 분해된다(32). 지질과산화는 병태생리현상이나 조직의 손상 정도를 나타내는 지표로 불포화지방산 구성성분이 많고 인지질의 함량이 풍부한 미토콘드리아, 적혈구 및 혈소판 등의 막에서 쉽게 일어날

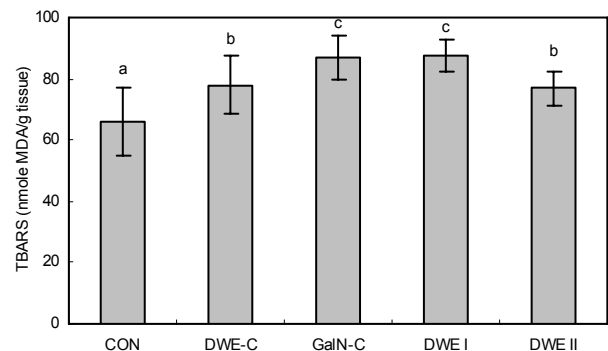


Fig. 4. Effect of dandelion water extract on hepatic lipid peroxide production in GalN-intoxicated rats.

Groups are the same as in Table 1. Values sharing the same superscript are not significantly different at $p < 0.05$ by Duncan's multiple range test.

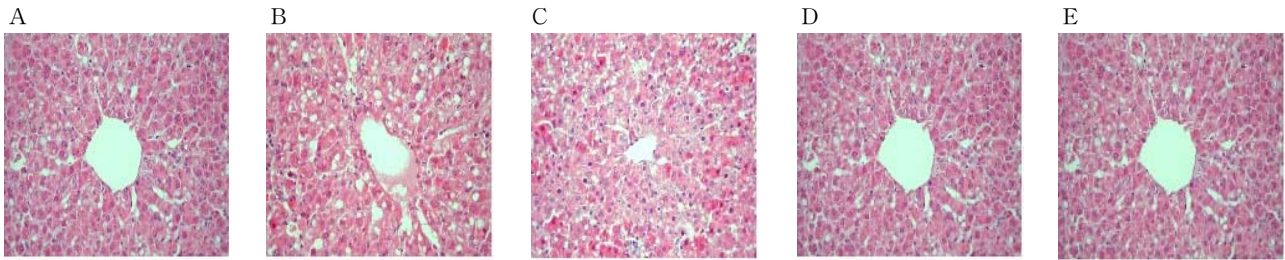


Fig. 5. Histology of samples from normal control (A), DWE-C (B), GalN-C (C), DWE I (D), and DWE II (E).

Tissues were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, sectioned at 4~5 μm , and stained with hematoxylin and eosin. Magnification was 200 \times .

수 있다. 이는 세포막의 투과성을 향진시키고 전반적인 세포 독성을 초래하며 세포기능을 저하시켜 괴사에 관여하거나 이에 따른 여러 가지 질환의 병리현상을 유발하는 것으로 보고되었다(33). 지질산화를 억제하기 위한 방법의 하나로 항산화제의 사용을 들 수 있는데 천연물에서 비타민 E, 비타민 C, 카로티노이드와 클로로필, 함황아미노산 및 아미노산 유도체, 글루타치온, 갈변물질과 플라보노이드를 비롯한 페놀성 화합물 등의 물질들이 항산화효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(34). 민들레에는 비타민 C, 카로티노이드 성분인 taraxol, taraxasterol 및 choline, 폴리페놀 화합물인 flavonoid, hydroxycinnamic acids, chicoric acid, monocaffeoyltartaric acid, chlorogenic acid와 같은 다양한 항산화 물질을 함유되어 있어(12,13) GalN으로 인한 free radical 생성을 억제하거나 소거하여 지질과산화물을 막은 것으로 사료되며 DWE-II군에서 유의적인 감소를 보인 것도 이러한 항산화 물질의 농도 차이 때문인 것으로 생각된다.

간 미세구조에 미치는 영향

GalN 투여로 인한 간조직의 미세구조 변화는 Fig. 5에 나타낸 것과 같다. 정상식이군과 DWE-C군에서는 어떠한 조직학적 이상도 관찰되지 않았으나 GalN-C군에서는 광범위한 간세포의 괴사(hepatocyte necrosis)와 변성(degeneration), 지방변성(fatty change), 염증세포 침윤(inflammatory cell infiltration) 및 간세포의 세포질 공포화(cytoplasmic vacuolation of hepatocyte)가 심한 정도로 관찰되었다. 이는 Wills와 Asha(35)가 GalN으로 유도한 간 손상과 같은 소견이었다. DWE-I, II군에서도 상기한 소견들이 관찰되었으나 GalN-C군과 비교할 때 그 정도는 다소 감소하였음을 확인할 수 있었다. 본 형태학적 관찰을 통해 민들레 열수 추출물이 GalN에 의해 유도되는 간염을 예방하는 효과가 있는 것으로 생각된다.

요 약

본 연구에서는 실험동물에 민들레 열수추출물 식이를 급여한 후, GalN으로 간손상을 유발함으로써 그 예방효과를

혈액중의 생화학적 변화 및 간조직의 효소적인 변동을 통해서 규명하고자 하였다. GalN의 투여로 현저히 증가하였던 AST, ALT의 활성은 민들레 열수추출물 투여로 억제되었으나 군간의 차이는 보이지 않았고 ALP의 활성과 TBARS 함량은 3%의 추출물을 급여한 군에서 유의적인 감소를 보였다. GalN의 투여로 현격하게 높아졌던 혈중 TNF- α 의 농도 또한 감소하는 경향을 확인하였으나 유의적인 차이는 보이지 않았다. GalN의 투여로 억제되었던 catalase, GSH-reductase, Mn-SOD의 활성은 민들레 추출물 투여로 유의적인 회복이 관찰되었으나 GSH-px의 활성은 그 경향만을 확인할 수 있었다. 조직 검경을 통해 민들레 열수추출물의 간염 예방효과를 확인한 결과 GalN으로 인해 유발된 광범위한 간세포의 괴사와 변성, 지방변성 등이 민들레 열수추출물 식이로 다소 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 이상의 결과로 민들레 열수추출물은 AST, ALT와 ALP의 활성 및 산화적 스트레스를 감소시키고 활성산소 해독계에 관여하는 효소의 활성을 증가시킴으로써 GalN으로 인한 간 손상을 예방하는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 산업자원부 및 한국산업기술평가원 사업비의 지원으로 이루어진 결과이며 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Lim HK, Kim HS, Choi HS, Choi JW. 1999. Protective and therapeutic effects of *Malloti cortex* extract on carbon tetrachloride- and galactosamine-induced hepatotoxicity in rats. *J Appl Pharmacol* 7: 35-43.
2. Murakmi T, Kim T, Nakamura H. 1998. Hepatitis, cirrhosis and hepatoma. *J Magn Reson Imaging* 8: 346-358.
3. Ramakrishnan G, Augustine TA, Jagan S, Vinodhkumar R, Devaki T. 2007. Effect of silymarin on N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis in rats. *Exp Oncol* 29: 39-44.
4. El-Beshbishy HA. 2005. The effect of dimethyl dimethoxy biphenyl dicarboxylate (DDB) against tamoxifen-induced liver injury in rats: DDB use in curative or protective. *J Biochem Mol Biol* 38: 300-306.

5. Decker K, Keppler D. 1974. Galactosamine hepatitis: key role of the nucleotide deficiency period in the pathogenesis of cell injury and cell death. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 71: 77-106.
6. Wang J, Wendel A. 1990. Studies on the hepatotoxicity of galactosamine endotoxin or galactosamine/TNF in the perfused mouse liver. *Biochem Pharmacol* 39: 267-270.
7. EI-Mofty SK, Scrutton MC, Serroni A, Nicolini C, Farber JL. 1975. Early, reversible plasma membrane injury in galactosamine-induced liver cell death. *Am J Pathol* 79: 579-595.
8. Keppler D, Lesch R, Reutter W, Decker K. 1968. Experimental hepatitis induced by D-galactosamine. *Exp Mol Pathol* 9: 279-290.
9. Farber JL, Gill G, Konishi Y. 1973. Prevention of galactosamine-induced liver cell necrosis by uridine. *Am J Pathol* 72: 53-62.
10. Kil HY, Oh WS, Hong KH, Song DK. 2000. Effect of fentanyl on the TNF- α and IL-1 β level during global ischemia/reperfusion in rats. *J Korean Anesthesiology* 38: 546-558.
11. 홍석화. 1990. 한국의 토종 101가지. 웅진출판사, 서울. p 18-19.
12. Yang KS, Jeon CM. 1996. Effect of *Taraxacum coreanum Nakai* on low density lipoprotein oxidation. *Korean J Pharmacogn* 27: 267-273.
13. Williams CA, Goldstone F, Greenham J. 1996. Flavonoids, cinnamic acids and coumarins from the different tissues and medicinal preparations of *Taraxacum officinale*. *Phytochemistry* 42: 121-127.
13. Cho SY, Oh YJ, Park JY, Lee MK, Kim MJ. 2003. Effect of dandelion (*Taraxacum officinale*) leaf extracts on hepatic antioxidative system in rats fed high cholesterol diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 458-463.
14. Buege JA, Aust SD. 1978. Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*. Fleischer S, Packer L, eds. Academic Press, New York. Vol 52, p 302-306.
15. Ohkawa H, Ohishi N, Yaki K. 1979. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358.
16. Aebi H. 1984. Catalase *in vitro*. In *Method in Enzymology*. Packer L, ed. Academic Press, New York, USA. Vol 105, p 121-126.
17. Lawrence RA, Burk RF. 1976. Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 71: 952-958.
18. Inger C, Bengt M. 1985. Glutathione reductase. In *Methods in Enzymology*. Fleischer S, Packer L, eds. Academic press, New York, USA. Vol 113, p 484-490.
19. Marklund S, Marklund G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in antioxidant of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur J Biochem* 47: 469-474.
20. Rácz-Kotilla E, Rácz G, Solomon A. 1974. The action of *Taraxacum officinale* extracts on the body weight and diuresis of laboratory animals. *Planta Med* 26: 212-217.
21. Lim HK, Kim HS, Choi JW. 2000. Therapeutic effects of bergenin and acetylbergenin on galactosamine-induced hepatotoxicity in rats. *Kor J Pharmacogn* 31: 351-356.
22. Lee JH, Chi SC, Kim SH, Shin YH, Choi JW. 2005. Protective effect of DWP-04 against hepatotoxicity induced by D-galactosamine. *J Life Science* 15: 461-467.
23. Zieve L, Anderson WR, Dozeman R. 1988. Hepatic regenerative enzyme activity after diffuse injury with galactosamine, relationship to histologic alterations. *J Lab Clin Med* 115: 575-582.
24. Sakaguchi T, Nakamura S, Suzuki S, Oda T, Ichiyama A, Baba S, Okamoto T. 1999. Participation of platelet-activating factor in the lipopolysaccharide-induced liver injury in partially hepatectomized rats. *Hepatology* 30: 959-967.
25. Suzuki S, Nakamura S, Serizawa A, Sakaguchi T, Konno H, Muro H, Kosugi I, Baba S. 1996. Role of Kupffer cells and the spleen in modulation of endotoxin-induced liver injury after partial hepatectomy. *Hepatology* 24: 219-225.
26. Kim HM, Shin HY, Lim KH, Ryu ST, Shin TY, Chae HJ, Kim HR, Lyu YS, An NH, Lim KS. 2000. *Taraxacum officinale* inhibits tumor necrosis factor- α production from rat astrocytes. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 22: 519-530.
27. Halliwell B, Gutteridge JMC. 1999. *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed. Oxford University Press, New York.
28. Hong SH. 1998. Antioxidant activity of melatonin and melatonin related indoleamines. *MS Thesis*. Yonsei University, Korea.
29. Kang YH, Park YK, Ha TY, Moon KD. 1996. Effects of pine needle extracts on enzyme activities of serum and liver and liver morphology in rats fed high fat diet. *J Korean Soc Food Nutr* 25: 374-378.
30. Fritche K, Johnston PV. 1988. Rapid autooxidation of fish oil in diets without added antioxidants. *J Nutr* 118: 425-426.
31. Halliwell B. 1978. Biochemical mechanism accounting for the toxic action of oxygen on living organisms: The key role of superoxide dismutase. *Cell Biol Int Rep* 2: 113-128.
32. Schenkman JB, Remmer H, Estabrook RW. 1967. Spectral studies of drug interaction with hepatic microsomal cytochrome. *Mol Pharmacol* 3: 113-123.
33. Ahokas JT, Davies C, Ravenscroft PJ, Emmerxon BT. 1984. Inhibition of soluble glutathione S-transferase by diuretic drugs. *Biochem Pharmacol* 33: 1929-1932.
34. Kang MJ, Kim KS. 2001. Current trends of research and biological activities of dandelion. *Food Industry and Nutrition* 6: 60-67.
35. Wills PJ, Asha VV. 2006. Protective effect of *Lygodium flexuosum* (L.) Sw. (Lygodiaceae) against D-galactosamine induced liver injury in rats. *J Ethnopharmacol* 108: 116-123.

(2007년 11월 5일 접수; 2008년 1월 22일 채택)