

방사선 돌연변이 블랙베리 추출물의 사염화탄소(Carbon Tetrachloride, CCl₄) 투여에 의한 흰쥐의 간 손상에 대한 보호 효과

조병옥¹ · 이창욱^{1,2} · 소양강¹ · 진창현¹ · 육홍선² · 변명우³ · 정용욱⁴ · 박종천⁴ · 정일윤^{1*}

¹한국원자력연구원 첨단방사선연구소, ²충남대학교 식품영양학과
³우송대학교 외식조리영양학부, ⁴서남대학교 의과대학 미생물학교실

Protective Effects of Radiation-induced Blackberry Mutant Extract on Carbon Tetrachloride (CCl₄)-induced Liver Injury in Sprague-Dawley Rats

Byoung Ok Cho¹, Chang-Wook Lee^{1,2}, Yangkang So¹, Chang-Hyun Jin¹, Hong-Sun Yook²,
Myung-Woo Byun³, Yong-Wook Jeong⁴, Jong Chun Park⁴, and Il-Yun Jeong^{1*}

¹Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic & Energy Research Institute, Jeonbuk 580-185, Korea

²Dept. of Food and Nutrition, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

³Dept. of Culinary Nutrition, Woosong University, Daejeon 300-718, Korea

⁴Dept. of Microbiology, College of Medicine, Seonam University, Jeonbuk 590-711 Korea

ABSTRACT The objective of the present study was to investigate the protective effects of anthocyanin-enriched extract from radiation-induced blackberry (*Rubus fruticosus* L.) mutant (γ -B201) against carbon tetrachloride (CCl₄)-induced liver injury in Sprague-Dawley (SD) rats. The *in vivo* results show that γ -B201 attenuated the levels of serum aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, and liver lipid peroxidation in CCl₄-treated SD rats. Histopathological examination of rat livers showed that γ -B201 reduced the incidence of liver lesions induced by CCl₄. Moreover, γ -B201 prevented DNA damage in CCl₄-treated SD rats. Furthermore, administration of γ -B201 significantly increased the activity of antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx), and glutathione reductase (GR), in CCl₄-treated rat livers. In conclusion, the present study suggests that γ -B201 blackberry extract protects the liver from CCl₄-induced hepatic damage through an antioxidant mechanism. Therefore, γ -B201 blackberry may be functional food material for human health.

Key words: blackberry, carbon tetrachloride, lipid peroxidation, DNA damage, antioxidant enzyme

서 론

나무딸기류에는 블랙베리(blackberry, *Rubus fruticosus* L.), 복분자(*Rubus coreanus*), 명석딸기(*Rubus parvifolius*) 등이 있으며, 블랙베리 중에 가시 없는 블랙베리는 가시가 없기 때문에 수확 시 편리하며, 열매는 기존 복분자보다 3~4배 크고 맛 또한 복분자와 차이가 있는 것으로 알려져 있다(1). 블랙베리, 포도, 양배추, 라즈베리, 복분자 등은 붉은색을 나타내는 안토시아닌계 색소인 cyanidin-3-O-glucoside(C3G)가 다량으로 존재하고 있다(2).

모든 생물체는 미토콘드리아에서 에너지 대사를 통해 ATP를 생성한다. 이러한 에너지 대사과정 중 ATP를 형성하는 산화 인산화 과정 중에 반응성이 강한 free radical이 생성되며 대표적인 것들로는 reactive nitrogen species

(RNS)와 reactive oxygen species(ROS)가 있다(3). ROS는 높은 산화력을 갖는 산소종으로써 superoxide anion radical($\cdot O_2^-$), hydroxylradical($\cdot OH$)과 같은 산소 중심의 라디칼뿐만 아니라 hydrogen peroxide(H₂O₂), single-toxygen(¹O₂)과 같은 비라디칼 종이 존재하며, 이들이 생체 성분과 반응하여 생성된 peroxy radical(ROO \cdot), alkoxy radical(RO \cdot) 등이 포함된다(4,5). 이러한 ROS는 반응성이 강하여 생체 내에 존재하는 여러 생체물질과 쉽게 화학반응을 일으킴으로써 조직 및 세포에 손상을 일으키며 염증을 유발한다(6). 산화적 스트레스와 ROS는 다양한 기전을 통하여 고혈압, 동맥경화, 심부전, 류마티스 관절염, 알레르기, 암, 노화, 당뇨병 등의 여러 가지 질병의 발생과 진행에 관여한다고 보고되었다(7). 산화적 스트레스에 의해 생성된 ROS는 복분자에 의해 함유되어 있는 C3G에 의해 불활성화하여 제거함으로써 발병되는 심혈관계 질환 및 노화, 간 질환 등에 개선 효과가 있다고 보고되었다(8). 특히 안토시아닌계 색소인 C3G를 다량으로 함유하고 있는 블랙베리는 항암, 항당뇨, 항염증, 항산화 등 다양한 생리활성을 가지고 있어

Received 5 February 2014; Accepted 8 April 2014

*Corresponding author.

E-mail: iyjeong@kaeri.re.kr, Phone: +82-63-570-3150

산화적 스트레스에 의해 생성된 ROS를 불활성화한다고 보고되었다(9-12).

따라서 본 연구에서는 안토시아닌 색소인 C3G가 다량으로 함유되어 있는 돌연변이 블랙베리 γ -B201 추출물을 이용하여 산화적 스트레스를 유발하는 CCl_4 를 처리한 Sprague-Dawley(SD) rats에 대한 γ -B201 추출물의 간 보호 효과 및 항산화 효소 활성을 검증함으로써 간 기능 개선 효과를 확인하였다.

재료 및 방법

재료

본 실험에 사용된 블랙베리는 원품종(블랙베리 메이플) V-9계통의 기내배양체에 ^{60}Co 감마선을 80 Gy 선량으로 조사하여 돌연변이를 발생시킨 후 육성하였으며, 원품종보다 개화기가 빠르고 당도와 C3G 함량이 10% 이상 증가한 돌연변이 블랙베리 γ -B201 품종을 한국원자력연구원 방사선육종연구팀 김동섭 박사로부터 제공받아 실험에 사용하였다.

용매 추출

돌연변이 블랙베리 γ -B201 건조중량 1 g에 추출용매 (EtOH:HCl = 99:1) 10 mL를 가하여 암실에서 4°C, 3일간 냉장 추출하였으며 추출액은 0.45 μm membrane filter로 여과하였다. 이 과정을 3회 반복하였다.

실험동물

γ -B201 추출물의 간 기능 조절에 대한 실험을 위하여 실험동물은 생후 5주령의 수컷 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 Orient Bio(Iksan, Korea)에서 구입하여 첨단방사선연구소 동물 사육실에서 식이 및 일정한 조건(23±2°C, 습도 50±5%, 명암 12시간)으로 1주일간 환경 적응을 시켰다. 1주의 적응기간 후 난괴법에 따라 군당 6마리씩 3군으로 나누었다. 실험군은 대조군, carbon tetrachloride(CCl_4) 처리군, CCl_4 + γ -B201 추출물 200 mg/kg 처리군으로 나누어 일정한 시간에 γ -B201 추출물을 1일 1회 총 7회 경구 투여하였다. γ -B201 추출물의 농도는 이전에 보고한 원품종 V-9의 농도와 비교하여 결정하였다(13). 대조군 및 CCl_4 처리군은 동일한 용량의 증류수를 동일한 기간 동안 동일한 방법으로 경구 투여하였다. 올리브 오일에 희석한 50% CCl_4 를 γ -B201 추출물 마지막 투여 1시간 후 2 mL/kg의 농도로 복강 투여하였고 18시간 절식시킨 뒤 희생하였다.

과산화지질 측정

Malondyaldehyde(MDA)는 OxiSelect™ MDA ELISA kit(Cell Biolabs, Inc., San Diego, CA, USA)를 이용하였으며, 제조사에서 권장하는 실험방법에 따라서 측정하였다.

항산화 효소 활성 측정

Superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT), glutathione peroxidase(GPx), glutathione reductase(GR) 효소 활성은 SOD, CAT, GPx, GR assay kit를 Cayman Chemical(Ann Arbor, MI, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 제조사에서 권장하는 실험방법에 따라서 측정하였다.

AST, ALT 농도 측정

Aspartate aminotransferase(AST) 및 alanine aminotransferase(ALT)의 농도는 Biovision(Milpitas, CA, USA)사의 AST 및 ALT activity colorimetric assay kit를 이용하여 제조사에서 권장하는 실험방법에 따라서 측정하였다.

Comet assay

실험동물의 CCl_4 처리에 따른 DNA 손상 정도를 확인하기 위하여 적출된 간장을 PBS로 2회 세척한 후 lysis buffer(20 mM EDTA, 10% DMSO)를 첨가하여 잘게 자른다. 잘게 자른 간장을 filter로 여과한 후 실온 15,000 rpm에서 2분간 원심분리 한다. 상층액을 분리한 후 얻어진 세포를 comet buffer로 resuspension 시킨 후 준비된 세포와 0.8%의 low melting agarose(LMA)와 섞은 뒤, 0.5% normal melting-point agarose(NMA)가 pre-coating된 microscope slide 위에 골고루 분산되게 분주하였다. 이후 즉시 cover glass로 덮어 얼음 위에서 gel을 굳힌 다음 cover glass를 제거하였다. 여기에 0.8% LMA를 분주한 후 cover glass를 덮어 다시 굳혔다. Gel이 굳은 후 cover glass를 제거하고 cold TAE lysis buffer(40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA pH 8.0, 0.1% SDS)에 담가 4°C에서 1시간 동안 세포를 용해시켰다. 세포 용해가 끝난 후, slide를 electrophoresis tank에 올려놓고 TAE buffer를 채워 4 V, 21 mA에서 25분 동안 전기영동을 시행하였다. 전기영동이 끝난 후 slide를 증류수에서 세척하고 실온에서 건조하였다. 이후 slide를 10 mg/mL의 propidium iodide에 담가 10분 동안 염색한 후 증류수로 조심히 세척하였다. 이상의 모든 과정은 빛에 의한 추가적인 DNA 손상을 막기 위해 어두운 조명상태에서 수행하였다. CCD 카메라가 부착된 형광현미경(Leica DM2500, Wetzlar, Germany)을 사용하여 관찰하였으며, 세포의 DNA 손상 정도는 Comet 5.5 이미지분석 프로그램(Kinetic Imaging Ltd, Liverpool, UK)을 통해 각 시료마다 준비된 2개의 slide에서 100개의 세포를 무작위로 선택하여 측정하였다.

실험동물 간 조직 염색

조직염색은 H&E stain(Hematoxylin & Eosin)으로 실시하였다. 적출한 간장을 10% 포르말린에 18시간 동안 고정 후 흐르는 물에 12시간 동안 수세하였다. Ethanol 70%, 80%, 90%, 95% 순으로 한 시간씩 담그고, 95%에서 overnight 한 후 다시 100%에 3회에 걸쳐 각각 한

시간씩 담가 탈수 과정을 하였다. Xylene에 3회에 걸쳐 각각 한 시간씩 담가 투명과정을 마친 후 xylene : paraffin = 2:1, xylene : paraffin = 1:1, xylene : paraffin = 1:2, only paraffin에 한 시간씩 담그고, only paraffin에 12시간 담가 파라핀을 침투시킨 뒤 포매과정을 통해 paraffin block을 제조하였다. 포매된 paraffin block을 6 μm 의 두께로 삭정한 뒤 60°C dry oven에 1시간 동안 넣은 후 xylene에 10분간 3번 탈 paraffin 과정을 거치고, ethanol 100%, 95%, 90%, 80%, 70%에 각각 15번씩 담근 후 흐르는 물에 10분간 수세하였다. Hematoxylin에 1분 20초 염색하고 다시 흐르는 물에 10분간 수세한 뒤 Eosin에 1분간 염색하여 흐르는 물에 2번 행구었다. 95%, 100%에 2번씩 담근 뒤 xylene에 5분씩 3번 담그고 mount solution과 xylene을 1:1로 혼합한 뒤 염색이 끝난 조직에 혼합용액을 35 μL 를 떨어뜨리고 cover glass로 씌워 봉입한 후 형광현미경($\times 200$, ECLIPSE TE2000-E, Nikon, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

결과 분석

모든 실험결과는 평균 \pm 표준편차로 나타내었으며, 통계적 유의성에 대한 검증은 SAS(Statistical Analysis System V9.3, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 프로그램을 이용하여 분산분석(ANOVA)으로 검증한 후, $P < 0.05$ 수준에서 통계적으로 유의적인 차이가 보일 때 평균값 간의 차이를 Duncan의 다중범위 검정으로 비교 분석하여 각 군 간의 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

혈청 AST, ALT 농도 억제 효과

실험동물에 CCl_4 처리 시 급성 간 손상이 유발되어 간 손상 지표성분인 혈청 AST, ALT 농도가 증가되는 것으로 알려져 있다(14). 따라서 본 실험에서는 CCl_4 를 처리하여 급성 간 손상이 유발된 실험동물의 혈청 AST, ALT의 농도를 측정하여 γ -B201 추출물에 대한 간 기능 조절 효과를 확인하였다. CCl_4 처리에 의하여 방출된 혈청 AST, ALT에 대한 γ -B201 추출물의 혈청 AST, ALT 농도의 방출 억제 효과는 Fig. 1과 같다. CCl_4 를 처리하여 간 독성을 유발시킨 SD rat의 혈청 AST, ALT 농도는 각각 약 337%와 약 326%였으나 γ -B201 추출물을 경구 투여한 군에서 AST 농도는 약 208%로 유의적으로 감소하였고(Fig. 1A), ALT 농도 역시 약 110%로 유의적으로 감소하였다(Fig. 1B). Ou 등(15)의 발표에 따르면 LPS를 처리하여 간 손상을 유발시킨 SD rat에 mulberry 추출물 0.5 g/kg과 1 g/kg을 투여할 경우 농도 의존적으로 혈청 AST와 ALT의 농도가 감소한 것을 알 수 있으며, Valcheva-Kuzmanova 등(16)의 연구에서는 CCl_4 를 처리하여 간 손상을 유발시킨 SD rat에 블랙초코베리 추출물을 5, 10, 20 mL/kg 투여군에서 농도 의존적으로 혈청 AST와 ALT 농도가 감소된 것으로 확인되었다. 본 실험

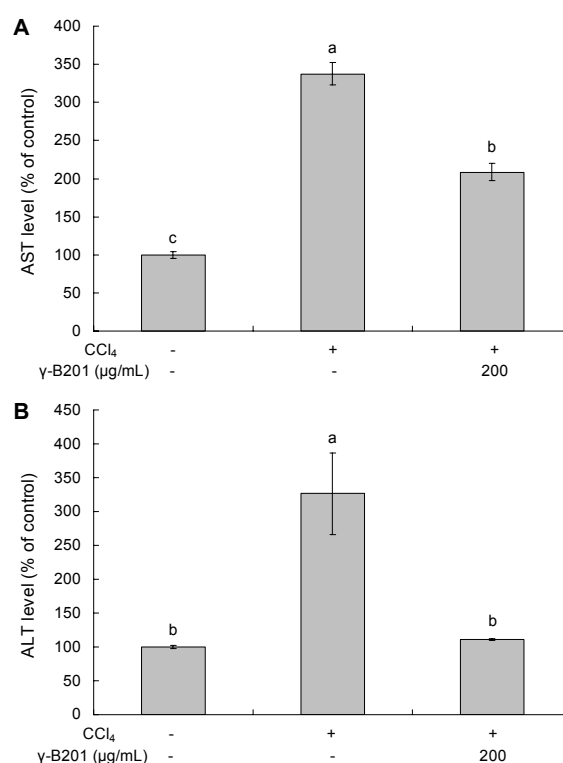


Fig. 1. Effect of γ -B201 blackberry extract on AST (A) and ALT (B) levels in CCl_4 -treated SD rats. Data are presented as the mean \pm SD of six SD rats. Means with same alphabet (a-c) are not significantly different at $P < 0.05$.

결과는 Cho 등(13)이 보고한 선행 연구 결과와 비교하였을 때, 블랙베리 메이플 원품종의 ALT 억제 농도보다 더 낮은 농도에서 신품종 블랙베리 γ -B201 추출물이 간 손상을 억제하는 것으로 나타났다. 따라서 CCl_4 처리에 의하여 유발된 급성 간 손상에 의해 방출되는 혈청 AST 및 ALT 농도는 γ -B201 추출물의 경구 투여로 인해 감소되는 것으로 보아 γ -B201 추출물이 간 손상을 억제시키는 것으로 확인되었으며, γ -B201 추출물은 간 기능 조절 효과에 관여한다고 사료되고 원품종보다 더 나은 효능을 나타낼 것으로 생각된다.

MDA 농도 억제 및 간 조직 보호 효과

MDA는 산화적 스트레스에 의해 생성된 free radical의 작용에 의한 간 조직 손상의 부산물로서 과산화지질 반응의 지표성분이다(17). 실험동물에 CCl_4 처리 시 급성 간 손상이 유발되어 MDA 농도가 증가할 뿐만 아니라 간 조직 손상이 일어난다고 보고되었다(18). CCl_4 를 처리하여 급성 간 손상을 유발시키고 간 조직의 지질과산화 반응에 대한 γ -B201 추출물의 지질과산화 반응의 억제 정도를 확인하기 위하여 MDA 농도를 측정하였다(Fig. 2A). CCl_4 처리에 의해 유발된 급성 간 손상으로 인한 과산화지질 반응의 대사산물인 MDA 농도가 약 152%로 증가했으나 γ -B201 추출물을 경구 투여한 군에서의 MDA 농도는 약 105%로 유의적으로

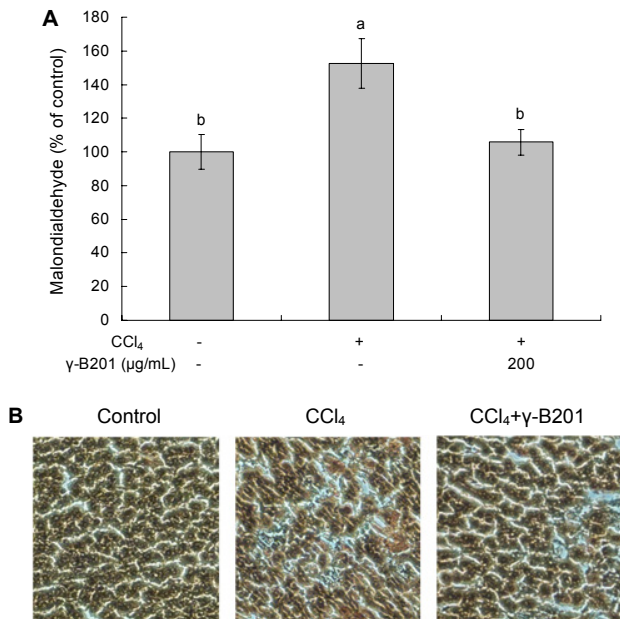


Fig. 2. Effect of γ -B201 blackberry extract on the lipid peroxidation and histological changes in CCl₄-treated SD rats liver. (A) The levels of MDA. Tissue homogenates were prepared from liver and tested for levels of lipid peroxidation. Data are presented as the mean \pm SD of six SD rats. Means with same alphabet (a,b) are not significantly different at $P<0.05$. (B) The levels of histopathological changes. Liver sections were stained with hematoxylin and eosin. All sections were photographed with an inverted microscope (200 \times magnification).

감소하였다. 또한 H&E staining을 통해 CCl₄ 처리로 인하여 간 조직이 손상되는 것을 확인하였다. Control 군은 간 구조와 형태가 잘 유지되어 있고 세포질과 원형의 핵이 모두 뚜렷하며, 세포의 괴사를 찾아볼 수 없는 정상적인 간 조직을 보였다. CCl₄ 처리군은 괴사된 간세포를 확인할 수 있으며 경미한 fibrin으로 형태를 유지하고 염증세포의 출현이 뚜렷하게 관찰되었다. γ -B201 추출물을 경구 투여한 군은 CCl₄ 처리군에 비해 국소괴사의 범위가 좁아졌으며 괴사나 apoptosis 등이 많이 줄어든 정상적 구조 형태를 보였다. γ -B201 추출물을 경구 투여한 군에서는 간세포 손상이 CCl₄ 처리군에 비해 뚜렷하게 보호되는 양상을 나타내었다 (Fig. 2B). Sautebin 등(19)과 Rossi 등(20)의 발표에 의하면 폐 손상이 유발된 실험동물에서 과산화지질 반응의 부산물인 MDA의 농도가 상승하였고 안토시아닌이 풍부한 블랙베리 추출물에 의하여 감소되었다고 보고하였으며, 본 실험 결과는 블랙베리 원품종을 이용한 Cho 등(13)의 결과와 비교하여 동일한 농도에서 지질과산화 반응을 억제하는 효과를 보였다. 따라서 γ -B201 추출물은 CCl₄ 처리로 인하여 유발된 급성 간 손상에 의한 과산화지질 반응 및 간 조직 손상을 억제하여 간 기능 조절에 효과를 가진 것으로 판단된다.

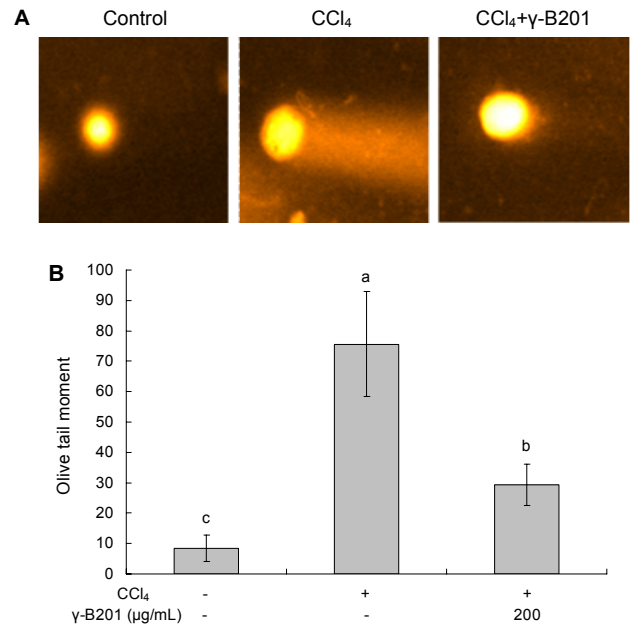


Fig. 3. Effect of γ -B201 blackberry extract on DNA damage in CCl₄-treated SD rats liver. Representative images (A) and the percentage of DNA damage (B) in CCl₄-treated SD rats detected by the comet assay. Data are presented as the mean \pm SD of 100 comets in each group. Means with same alphabet (a-c) are not significantly different at $P<0.05$.

산화적 DNA damage 억제 효과

SD rat에 CCl₄ 처리에 의하여 간 조직의 산화적 DNA 손상에 대한 γ -B201 추출물의 DNA 보호 효과를 확인하기 위하여 comet assay를 실시하였으며 실험 결과는 Fig. 3과 같다. CCl₄를 처리한 군에서의 tail length와 olive tail moment를 측정된 결과 크게 증가한 것을 보였으나, γ -B201 추출물을 경구 투여한 군에서는 손상된 DNA 움직임이 유의적으로 감소하였으며(Fig. 3A), olive tail moment 역시 γ -B201 추출물을 경구 투여한 군에서 감소되었다(Fig. 3B). Aiyer 등(21)은 호르몬 17 β -estradiol에 의해 산화적 DNA 손상이 유발된 ACI rat liver의 DNA damage를 측정된 결과, 산화적 DNA 손상이 블루베리, 베리류 혼합물, ellagic acid 투여로 인하여 감소되는 것으로 보고하였다. 또한 Zepeda 등(22)은 rat에 산화적 스트레스를 유발하여 유도된 산화적 DNA 손상을 블루베리 추출물에 의해 보호되어 손상이 억제되는 것으로 보고하였다. 이는 본 실험 결과와 유사한 경향을 보였으며, CCl₄ 처리에 의해 유도된 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상은 γ -B201 추출물에 의해 억제되는 것으로 판단된다.

항산화 효소 활성화에 대한 효과

실험동물에 CCl₄를 처리하게 되면 급성 간 손상이 유발되어 산화적 스트레스에 의해 항산화 효소 활성이 저하된다고 보고되었다(23). CCl₄ 처리에 의해 생성된 과도한 free radical은 SOD가 H₂O₂로 전환하여 CAT에 의해 H₂O와 O₂

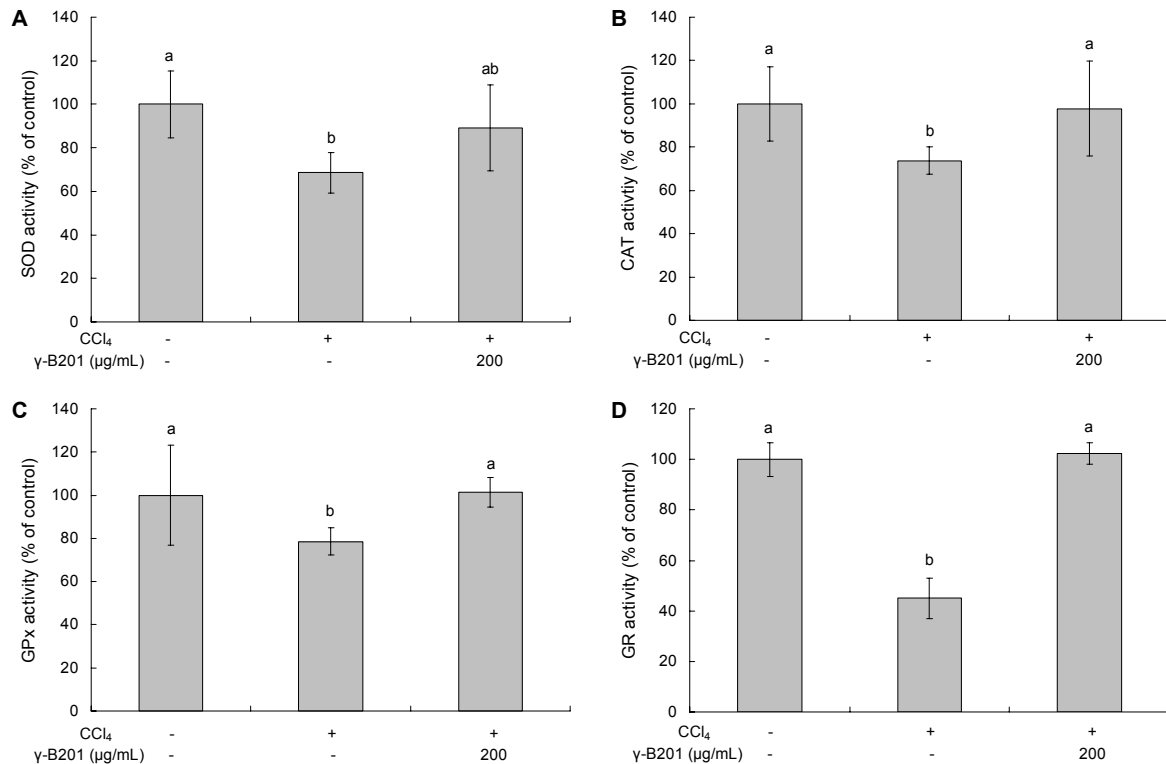


Fig. 4. Effect of γ -B201 blackberry extract on the SOD (A), CAT (B), GPx (C), GR (D) activity in CCl₄-treated SD rats liver. Data are presented as the mean \pm SD of six SD rats. Means with same alphabet (a,b) are not significantly different at $P < 0.05$.

로 분해되어 배출되고 GPx와 GR에 의해 H₂O로 배출된다. 항산화 효소 활성은 서로 간의 작용에 따라 효과적인 항산화 시스템을 구축하여 free radical로부터 생체를 보호한다. 따라서 CCl₄ 처리에 의해 유발된 간 손상에 대한 γ -B201 추출물의 간 보호 기전을 확인하기 위하여 항산화 효소계 물질인 SOD, CAT, GPx, GR의 활성을 측정하였다. γ -B201 추출물에 대한 항산화 효소의 활성은 Fig. 4와 같다. SOD 활성 측정 결과(Fig. 4A), CCl₄를 처리한 군에서는 대조군과 비교하여 SOD 활성이 약 68%로 감소하였으나 γ -B201 추출물을 경구 투여한 군에서의 SOD 활성은 약 91%로 증가하였다. CAT(Fig. 4B) 활성 역시 CCl₄ 처리군에서 약 73%까지 감소하였으나 γ -B201 추출물을 경구 투여한 군에서는 약 97%로 증가하였다. GPx(Fig. 4C)는 CCl₄ 처리에 의해 약 79%로 감소한 것을 γ -B201 추출물 투여군은 약 102%로 증가하였고 GR(Fig. 4D)은 CCl₄ 처리에 의해 약 45%로 감소한 것을 γ -B201 추출물 투여군에서는 약 102%로 증가하였다. SOD, CAT, GPx, GR과 같은 항산화 효소 활성은 CCl₄에 의해 생성된 free radical을 효과적으로 제거한다고 보고되었다. Ozturk 등(24)은 ascorbic acid가 CCl₄ 처리로 인해 저하된 항산화 효소 활성을 증가시킨다고 보고하였으며, Ilavarasan 등(25) 역시 CCl₄ 처리로 인하여 저하된 항산화 효소 활성을 *Thespesia populnea* 추출물에 의해 항산화 효소 활성이 증가된다고 보고하였다. 또한 Wang 등(26)은 간 섬유증이 유발된 rat에 블루베리 과즙을 식이로 투여한

경우 SOD 활성을 증가시켜 간 섬유증을 회복한다고 보고하였다. 또한 Cho 등(13)은 CCl₄를 투여한 SD rats에서 감소된 항산화 활성을 블랙베리 원품중 추출물을 400 mg/kg을 투여하였을 때 대조군 수준으로 회복시키는 것으로 보고하였지만, 본 실험은 2배 낮은 농도인 200 mg/kg에서 대조군 수준까지 회복시키는 효능을 나타내었다. 따라서 γ -B201 추출물은 CCl₄ 처리에 의해 저하된 항산화 효소 활성을 회복시키고 회복된 항산화 효소에 의해 간 손상을 보호하며 간 기능 조절 효과를 갖는 것으로 판단된다. 블랙베리는 안토시아닌 색소를 다량으로 함유하고 있으며, 주성분은 C3G로 간 기능 보호 및 항산화 효능이 뛰어난 것으로 알려져 있다(2). 하지만 야생종과 재배종의 항산화 효능 및 폴리페놀과 안토시아닌 함량은 상이한 것으로 보고되었다(27,28). 본 실험의 효능 차이 또한 돌연변이 블랙베리와 원품중 간에 포함된 성분의 함량 차이 때문인지 향후 연구가 필요할 것으로 생각된다.

요 약

본 연구에서는 흰쥐 SD rats에서 CCl₄로 유도된 간 손상에 미치는 방사선 돌연변이 블랙베리 γ -B201 추출물의 간 기능 개선 효과에 대하여 알아보고자 하였다. γ -B201 추출물을 경구 투여 시 SD rats에 CCl₄ 처리로 인해 증가된 혈청 AST, ALT 농도를 억제함을 확인하였다. 나아가 지질과산

화 대사산물인 MDA의 농도를 억제함을 확인하였고, 조직 염색 관찰 결과 손상된 간 조직을 γ -B201 추출물에 의해 회복되는 것을 확인하였다. Comet assay를 통해 DNA 손상 정도를 분석한 결과, CCl₄로 인해 유발된 산화적 스트레스에 의한 DNA 손상을 γ -B201 추출물의 경구 투여로 인하여 유의적으로 감소시켰다. CCl₄ 처리로 인해 감소된 SOD, CAT, GPx, GR의 항산화 효소 활성이 증가함을 확인하였다. 이러한 결과로 볼 때 방사선 돌연변이 γ -B201 추출물은 항산화 효소 활성을 증가시킴으로써 CCl₄에 의해 손상된 SD rat의 간 조직을 보호하는 것으로 판단되며, 방사선 돌연변이 γ -B201은 간 손상 보호 및 간 기능 개선 효과를 갖는 기능성 소재로 활용되어질 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 미래창조과학부 지원 방사선기술개발사업에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Shin JS, Sim OK, Lee JC, Cho HJ, Kim EY, Lee KS. 2005. Plant regeneration via multiple shoots formation from sucker explants of *Rubus fruticosus* L. *Korean J Plant Res* 18: 456-461.
- Ding M, Feng R, Wang SY, Bowman L, Lu Y, Qian Y, Castranova V, Jiang BH, Shi X. 2006. Cyanidin-3-glucoside, a natural product derived from blackberry, exhibits chemopreventive and chemotherapeutic activity. *J Biol Chem* 281: 17359-17368.
- Kim SS, Son SM. 2008. Oxidative stress and cell dysfunction in diabetes: Role of ROS produced by mitochondria and NAD(P)H oxidase. *J Korean Diabetes* 32: 389-398.
- Han SB, Gu HA, Kim SJ, Kim HJ, Kwon SS, Kim HS, Jeon SH, Hwang JP, Park SN. 2013. Comparative study on antioxidative activity of *Glycyrrhiza uralensis* and *Glycyrrhiza glabra* extracts by country of origin. *J Soc Cosmet Scientists Korea* 39: 1-8.
- Rhie GE, Shin MH, Seo JY, Choi WW, Cho KH, Kim KH, Park KC, Eun HC, Chung JH. 2001. Aging- and photo-aging-dependent changes of enzymic and nonenzymic antioxidants in the epidermis and dermis of human skin *in vivo*. *J Invest Dermatol* 117: 1212-1217.
- Bak JW, Gim SB, Kim EA, Jun JA, Lee KM, Kim DH. 2012. Study of KMSMT on anti-inflammatory effect. *Korea Journal of Oriental Medicine* 20: 17-27.
- Cross CE, Halliwell B, Borish ET, Pryor WA, Ames BN, Saul RL, McCord JM, Harman D. 1987. Oxygen radicals and human disease. *Ann Intern Med* 107: 526-545.
- Cho YJ, Chun SS, Kwon HJ, Kim JH, Yoon SJ, Lee KH. 2005. Comparison of physiological activities between hot-water and ethanol extracts of Bokbunja (*Rubus coreanum* F.). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 790-796.
- Chen PN, Chu SC, Chiou HL, Chiang CL, Yang SF, Hsieh YS. 2005. Cyanidin 3-glucoside and peonidin 3-glucoside inhibit tumor cell growth and induce apoptosis *in vitro* and suppress tumor growth *in vivo*. *Nutr Cancer* 53: 232-243.
- Serra D, Paixao J, Nunes C, Dinis TC, Almeida LM. 2013. Cyanidin-3-glucoside suppresses cytokine-induced inflammatory response in human intestinal cells: comparison with 5-aminosalicylic acid. *PLoS One* 8: e73001.
- Min SW, Ryu SN, Kim DH. 2010. Anti-inflammatory effects of black rice, cyaniding-3-O- β -d-glycoside, and its metabolites, cyanidin and protocatechuic acid. *Int Immunopharmacol* 10: 959-966.
- Noda Y, Kaneyuki T, Mori A, Packer L. 2002. Antioxidant activities of pomegranate fruit extract and its anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, and pelargonidin. *J Agric Food Chem* 50: 166-171.
- Cho BO, Ryu HW, Jin CH, Choi DS, Kang SY, Kim DS, Byun MW, Jeong IY. 2011. Blackberry extract attenuates oxidative stress through up-regulation of Nrf2-dependent antioxidant enzymes in carbon tetrachloride-treated rats. *J Agric Food Chem* 59: 11442-11448.
- Bezenjani SN, Pouraboli I, Afshar RM, Mohammadi G. 2012. Hepatoprotective effect of *Otostegia persica* Boiss. shoot extract on carbon tetrachloride-induced acute liver damage in rats. *Iran J Pharm Res* 11: 1235-1241.
- Ou TT, Kuo CY, Chyau CC, Lee HJ, Penga JS, Wanga CJ. 2012. Improvement of lipopolysaccharide-induced hepatic injuries and inflammation with mulberry extracts. *J Sci Food Agric* 93: 1880-1886.
- Valcheva-Kuzmanova S, Borisova P, Galunska B, Krasnaliev I, Belcheva A. 2004. Hepatoprotective effect of the natural fruit juice from *Aronia melanocarpa* on carbon tetrachloride-induced acute liver damage in rats. *Exp Toxicol Pathol* 56: 195-201.
- Siddiqui MA, Ahnad J, Farshori NN, Saquib Q, Jahan S, Kashyap MP, Ahamed M, Musarrat J, Al-Khedhairi AA. 2013. Rotenone-induced oxidative stress and apoptosis in human liver HepG2 cells. *Mol Cell Biochem* 384: 59-69.
- Reyes-Gordillo K, Segovia J, Shibayama M, Vergara P, Moreno MG, Muriel P. 2007. Curcumin protects against acute liver damage in the rat by inhibiting NF- κ B, proinflammatory cytokines production and oxidative stress. *Biochim Biophys Acta* 1770: 989-996.
- Sautebin L, Rossi A, Serraino I, Dugo P, Di Paola R, Mondello L, Genovess T, Britti D, Peli A, Dugo G, Caputi AP, Cuzzocrea S. 2004. Effect of anthocyanins contained in a blackberry extract on the circulatory failure and multiple organ dysfunction caused by endotoxin in the rat. *Planta Med* 70: 745-752.
- Rossi A, Serraino I, Dugo P, Di Paola R, Mondello L, Genovess T, Morabito D, Dugo G, Sautebin L, Caputi AP, Cuzzocrea S. 2003. Protective effects of anthocyanins from blackberry in a rat model of acute lung inflammation. *Free Radic Res* 37: 891-900.
- Aiyer HS, Kichambare S, Gupta RC. 2008. Prevention of oxidative DNA damage by bioactive berry components. *Nutr Cancer* 1: 36-42.
- Zepeda A, Aguayo LG, Fuentealba J, Figueroa C, Acevedo A, Salgado P, Calaf GM, Farias J. 2012. Blueberry extracts protect testis from hypobaric hypoxia induced oxidative stress in rats. *Oxid Med Cell Longev* 2012: Article ID 975870 (doi:10.1155/2012/975870).
- Mahmud ZA, Bachar SC, Qais N. 2012. Antioxidant and hepatoprotective activities of ethanolic extracts of leaves of *Premna esculenta* Roxb. against carbon tetrachloride-induced liver damage in rats. *J Young Pharm* 4: 228-234.
- Ozturk IC, Ozturk F, Gul M, Ates B, Cetin A. 2009. Protective effects of ascorbic acid on hepatotoxicity and oxidative stress caused by carbon tetrachloride in the liver of Wistar rats. *Cell Biochem Funct* 27: 309-315.

25. Ilavarasan R, Vasudevan M, Anbazhangan S, Venkataraman S. 2003. Antioxidant activity of *Thespesia populnea* bark extracts against carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *J Ethnopharmacol* 87: 227-230.
26. Wang Y, Cheng M, Zhang B, Nie F, Jiang H. 2013. Dietary supplementation of blueberry juice enhances hepatic expression of metallothionein and attenuates liver fibrosis in rats. *PLoS One* 8: e58659.
27. Cuevas-Rodriguez EO, Dia VP, Yousef GG, Garcia-Saucedo PA, Lopez-Medina J, Paredes-Lopez O, Gonzalez de Mejia E, Lila MA. 2010. Inhibition of pro-inflammatory responses and antioxidant capacity of Mexican blackberries (*Rubus* spp.) extracts. *J Agric Food Chem* 58: 9542-9548.
28. Koka I, Karadeniz B. 2009. Antioxidant properties of blackberry and blueberry fruits grown in the Black Sea Region of Turkey. *Sci Hortic* 121: 447-450.