JOURNAL OF THE EAST ASIAN SOCIETY OF DIETARY LIFE
Vol. 3, No. 2(1993)

Diallyl Disulfide가 사염화탄소에 의한 마우스 간손상에 미치는 영향

이상일* · 김승희 · 조수열

*계명전문대학 식품영양과
영남대학교 식품영양학과

Protective Effect of Diallyl Disulfide on the Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity in Mice

Sang-il Lee, Sung-hee Kim and Soo-yeul Cho
Dept. of Food and Nutrition, Keimyung Junior College, Taegu 705-037
Dept. of Food and Nutrition, Yeungnam University, Kyungsan 712-749

Abstract

This study was intended to clarify the protective mechanism of diallyl disulfide on the carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in mice. It was observed that a powerfully increment of serum alanine aminotransferase activity and hepatic lipid peroxide content after carbon tetrachloride injection were markedly inhibited by the pretreatment of diallyl disulfide(20mg/kg) for 5 days. It was also observed that hepatic aminopyrine demethylase and xanthine oxidase as free radical generating enzymes as well as superoxide dismutase and catalase activities as free radical scavenging enzymes and hepatic glutathione content were not changed by the pretreatment with diallyl disulfide. But, treatment with diallyl disulfide did signifiantly increase cytosolic glutathione S-transferase activity. However, glutathione S-transferase activity in the presence of diallyl disulfide was not affected *in vitro*. Therefore, it is concluded that mechanism for the observed preventive effect of diallyl disulfide against the carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity can be due to the enhancement of glutathione S-transferase activity.

Key words : Diallyl disulfide, oxygen free radical generating system, oxygen free radical scavenging system, carbon tetrachloride.

서 론

Diallyl disulfide는 마늘성분인 allicin[1,2]의 열분해 산물[3]로 알려져 있는 물질이다. 최근 허 등[4]은 diallyl disulfide가 ethacrynic acid로 유도된 간손상에 예방효과를 나타낸다고 보고하고 있어 관심의 대상이 되고 있다. 그리고 Kagawa 등[5]은 마늘의 ethanol 추출물이 사염화탄소에 의한 간조직 과산화지질의 생성을 억제시킨다고 보고하고 있어 사염화탄소로 유발된 간 손상에도 dial-

lyl disulfide가 유효할 것이라는 예상을 갖게 하고 있으나 확실한 약리작용은 구명되어 있지 않다.

한편 조직손상과 연관되어 있는 과산화지질의 생성은 생체막 구성성분인 다가불포화지방산의 과산화가 그 원인[6~8]으로 지적되고 있는데 여기에는 free radical 생성계[9,10]로 부터 유래된 oxygen free radical [11~13]이 관여하는 것으로 알려져 있으며, 이것은 free radical 해독계[14~18]에 의해 무독화 된다고 한다.

이에 본 연구에서는 diallyl disulfide가 사염화탄소에 의한 간 손상에 어떠한 영향을 미치는지 검토함과 동시에 이의 해독 기전을 구명할 목적으로 diallyl disulfide를 실험동물에 투여하면서 과산화지질의 형성 및 해독에 관여하는 효소들의 활성을 간손상의 정도와 상호 비교 검토코자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 처치

본 대학 동물사에서 일정한 조건으로 사육한 외견상 건강한 25g 내외의 ICR계의 웅성 mouse를 사용하였다. Diallyl disulfide는 허 등[4]의 방법에 따라 체중 kg당 20mg(olive oil로 희석)을 실험동물의 복강내로 1일 1회 5일간 투여하였으며, 급성 간 손상은 diallyl disulfide 마지막 주사 8시간 후에 체중 kg당 50% 사염화탄소(olive oil로 희석) 1mℓ를 복강내로 투여하여 야기 시켰다. 대조군은 동량의 olive oil을 복강내로 주사하였으며, 실험동물은 실험전 16시간 동안 물만주고 금식시켰다.

2. 효소원의 조제

실험 동물은 ether로 마취시킨 다음 복부 정중선을 따라 개복한 후, 하대 정맥으로부터 혈액을 채취하고 생리 식염수로 관류시킨 간장을 적출하였다. 적출한 간장은 여지로 압박, 간내에 남아있는 혈액 및 생리식염수를 제거한 다음, 간조직 1g 당 4배량의 0.1M potassium phosphate buffer(pH7.4)를 가해 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. 이 마쇄균질액을 600×g, 10,000×g, 105,000×g 순으로 원심분리하여 mitochondria 분획, microsome분획 및 cytosol분획을 얻고 이를 효소원으로 사용하였다. 한편, 채취한 혈액은 실온에서 방치, 응고시킨다음 원심분리하여 혈청을 얻고 실험에 사용하였다.

3. 효소 활성 측정

Aminopyrine demethylase의 활성은 Bidlack 등[19]과 Nash[20]의 방법, catalase의 활성은 Abei[21]의 방법, glutathione S-transferase의 활성은 Habig 등[22]의 방법, superoxide dismutase의 활성은 Martin 등[23]의 방법, xanthine oxidase의 활성은 Stirpe 등[24]의 방법에 준하여 측정하였다. 혈청 alanine aminotransferase 활성은 Reitman과 Frankel [25]의 방법에 준하여 측정하였다. 간 조직중 과산화지질의 함량측정은 Ohkawa 등[26]의 방법에 준하였고, 간 조직 glutathione의 함량측정은 Ellman[27]의 방법에 준하였다. 단백질의 함량은 Lowry 등[28]의 방법에 따라 bovine serum albumin을 표준품으로하여 측정하였다.

실험결과의 통계처리는 student's t-test를 이용하여 상호비교 하였다.

결과 및 고찰

1. 사염화탄소 투여에 의한 혈청 alanine aminotransferase의 활성변동에 미치는 diallyl disulfide의 영향

Diallyl disulfide를 5일간 복강내로 주사한 후 사염화탄소를 투여하였을 때, 간조직 손상의 지표로 이용되고 있는 혈청 alanine aminotransferase [29,30]의 활성변동을 관찰한 성적이 Table 1이다.

Olive oil만 투여한 대조군과 diallyl disulfide를 5일간 투여한 실험군 사이에는 효소의 활성차이를 관찰할 수 없었다. 한편 사염화탄소를 투여하였을 때에는 alanine aminotransferase의 활성이 대조군에 비하여 14.4배로 현저하게 증가하였다. 그러나 diallyl disulfide를 전처치한 다음 사염화탄소를 투여한 실험군에서는 사염화탄소만을 투여한 군에 비하여 혈청 alanine amiontransferase의 활성이 유의하게 감소하였다.

Table 1. Effect of diallyl disulfide (DADS) on the activity of serum alanine aminotransferase in carbon tetrachloride-treated mice

Groups	Alanine aminotransferase (Karmen unit/ml of serum)
Control	28.6 ± 4.2
CCl_4	324.1 ± 22.5***a)
DADS	26.3 ± 6.2
DADS+CCl_4	260.9 ± 16.4*b)

Mice were treated with diallyl disulfide(20mg/kg) i.p. daily for 5 days before carbon tetrachloride(50% CCl_4 1mℓ/kg) was injected i.p for 1 day. Mice were killed 16 hours after the injection of carbon tetrachloride.

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are means ± S.E. for 6 animals.

a) ; Significantly different from control, b) ; Significantly different from carbon tetrachloride-treated group. (* ; $p<0.05$, *** ; $p<0.001$).

2. 사염화탄소 투여에 의한 간조직 과산화지질 함량에 미치는 diallyl disulfide의 영향

Diallyl disulfide를 5일간 전 처치 한다음 사염화탄소를 복강내로 주사하였을 때 생체막 손상의 정도를 나타내는 과산화지질[31]의 함량 변동을 관찰한 성적이 Fig. 1이다.

대조군과 diallyl disulfide 투여군의 간조직 과산화지질 함량은 각각 18.3nmoles 및 16.8nmoles/g of tissue로서 별다른 차이를 관찰할 수 없었다.

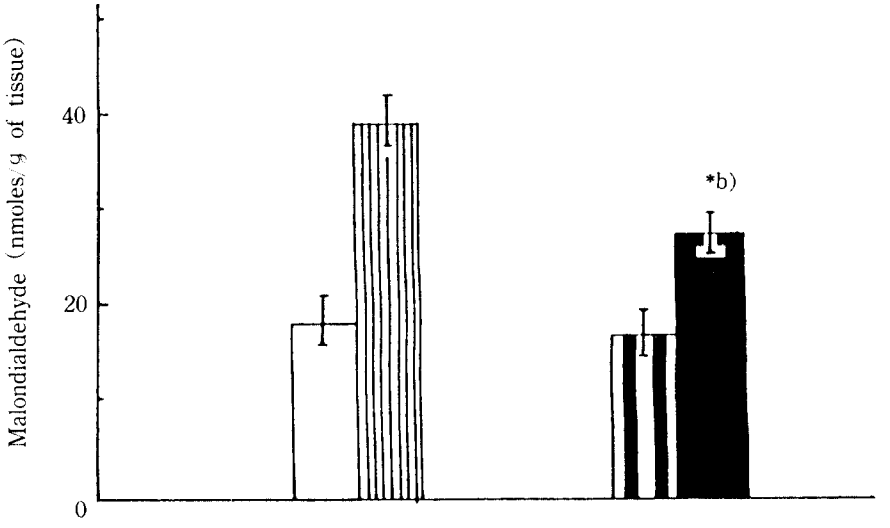

Fig. 1. Effect of diallyl disulfide (DADS) on the level of hepatic lipid peroxide in carbon tetrachloride-treated mice.
The other conditions are the same as described in the Table 1.
□ ; Control, ▥ ; CCl_4, ▩ ; DADS, ■ ; DADS+CCl_4

한편, 사염화탄소를 투여하였을 때에는 39.2 nmoles로 대조군에 비하여 약 2.3배 정도 유의한 증가를 보였다. 그러나 diallyl disulfide를 5일간 전처치한다음 사염화탄소를 투여하였을 때에는 사염화탄소만을 주사한 군에 비하여 약 25% 정도 유의하게 감소되었다.

이상의 실험 성적으로 보아, 체중 kg 당 20㎎의 diallyl disulfide를 5일동안 실험 동물에 투여하였을 때에는 간 조직 세포에는 별다른 손상을 유발시키지 않는 것으로 생각되어지며, diallyl disulfide를 전처치하므로써 사염화탄소에 의해 유도된 간손상을 diallyl disulfide가 억제해주는 작용이 있는 것으로 사료 되어진다.

3. Diallyl disulfide에 의한 free radical 생성계 및 해독계 효소의 활성변동

체외에서 섭취된 xenobiotic에 의한 생체 조직의 손상은 이들의 활성화된 독성중간체(electrophilic compound) 뿐만 아니라 oxygen free radical들도 동시에 관여하는 것[32]으로 알려져 있다. 그러므로 diallyl disulfide를 전처치하므로써 사염화탄소에 의한 독성이 경미하게 나타나는 것이 약물대사 효소의 활성 변동에 기인되어 나타나는 것인지 또는 oxygen free radical의 생성을 감소시킨데 기인된 것인지를 검토할 목적으로 사염화탄소의 독성화에 관여하는 microsome의 약물대사효소 활성과 oxygen free radical 생성계 효소인 xanthine oxidase의 활성 및 oxygen free radical 해독계 효소의 활성을 검토한 성적이 Table 2와 3이다.

Olive oil만 주사한 대조군에 비하여 diallyl disulfide를 주사한 실험군에서는 약물대사 효소인 aminopyrine demethylase의 활성이 약간 증가하는 경향을 보였고, xanthine oxidase의 활성은 약간 감소하는 경향을 보였다. 그러나 모두 유의한 변동은 아니였다. 〈Table 2 참조〉

한편, 간 조직의 free radical 해독계 효소인 mitochondria분획의 catalase, cytosol분획의 superoxide dismutase와 glutathione S-transferase의 활성 및 해독인자인 glutathione의 함량 변동은 olive oil 만을 주사한 대조군과 diallyl disulfide를 주사한 실험군 간에 superoxide dismutase 및 catalase의 활성은 별다른 차이를 볼 수 없었고, glutathione의 함량은 diallyl disulfide를 주사한 실험군에서 증가하는 경향을 보였다. 그러나 glutathione S-transferase의 활성은 diallyl disulfide를 5일간 투여함으로서 대조군에 비하여 유의하게 증가 되었다. 〈Table 3 참조〉

이러한 성적은 타 연구자들의 보고[4]와 유사한 것으로 사염화탄소에 의해 유도된 급성간 손상을 diallyl disulfide가 억제하는것은 해독계 효소인 glutathione S-transferase의 활성변동과 상관성이 있을 것으로 사료되어지며 또한 glutathione S-transferase가 lipid peroxide를 lipid alcohol로 전환시켜 무독화 시키는데 관여하는 glutathione peroxidase의 활성을 가진다고 보고[16,33]되고 있어 diallyl disulfide 전 처치에 의한 과산화지질의 함량 감소를 뒷받침해줄 수 있을 것으로 생각되어진다.

Table 2. Effect of diallyl disulfide on the hepatic microsomal aminopyrine demethylase and cytosolic xanthine oxidase activities in mice

Groups	Aminopyrine demethylase	Xanthine oxidase
	(nmoles/㎎ protein/min)	
Control	2.78 ± 0.26	2.31 ± 0.19
DADS	3.23 ± 0.31	1.99 ± 0.26

The other conditions are the same as described in the Table 1.

Table 3. Effect of diallyl disulfide on the hepatic mitochondiral catalase, cytosolic superoxide dismutase and glutathione S-transferase activities and hepatic glutathione content in mice

Treatment	Control	DADS
Superoxide dismutase[1)]	11.75 ± 2.68	11.09 ± 3.82
Catalase[2)]	3.02 ± 0.28	2.99 ± 0.36
Glutathione S-transferase[3)]	1097.30 ± 63.2	1438.81 ± 102.1*
Glutathione[4)]	4.56 ± 0.29	5.63 ± 0.42

The other conditions are the same as described in the Table 1.
1) ; Unit/㎎ protein, 2) ; μmoles/㎎ protein/min, 3) ; nmoles/㎎ protein/min, 4) ; μmoles/g of tissue.

4. Diallyl disulfide가 시험관 내에서 간 glutathione S-transferase 활성에 미치는 영향

Diallyl disulfide를 5일간 투여하였을 때 간 glutathione S-transferase의 활성이 증가된 것이 diallyl disulfide의 어떤 작용에 기인되어 나타난 것인지를 검토할 목적으로 시험관내에서 diallyl disulfide의 첨가 농도를 증가시켜가면서 간 glutathione S-transferase활성에 어떠한 영향을 주는지 검토한 성적이 Fig. 2이다.

Diallyl disulfide의 첨가 농도를 50μg/㎖까지 증가시켜도 glutathione S-transferase의 활성은 대조치와 별다른 차이를 관찰할 수 없었다.

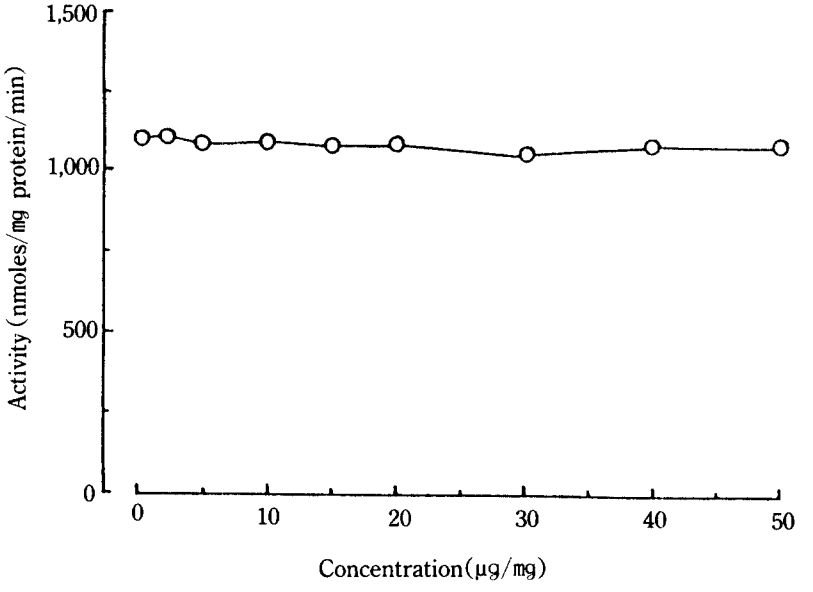

Fig. 2. Effect of diallyl disulfide on the hepatic glutathione S-transferase activity *in vitro*. Values are mean for 3 separate experiments.

이러한 실험 결과로 보아 diallyl disulfide에 의한 간 glutathione S-transferase의 활성증가는 diallyl disulfide가 glutathione S-transferase의 효소단백에 직접영향을 주므로써 나타난 것은 아닐 것으로 사료되어 진다.

이상의 모든 실험 성적들과 문헌상의 지견들을 종합하여 볼 때 diallyl disulfide에 의한 간 조직 손상의 예방효과는 해독계 효소인 glutathione S-transferase 활성증가와 관련되어 나타날 것으로 사료되어진다.

결 론

Diallyl disulfide의 해독작용 기전을 구명할 목적으로 diallyl disulfide(20mg/kg)를 실험동물에 5일간 전처치한 다음 간 독소로 알려져 있는 사염화탄소를 투여하여 급성 간 손상의 정도를 확인함과 동시에 간조직 손상과 관련된 free radical 생성계와 해독계 효소의 활성변동에 미치는 영향을 상호 비교 검토하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

사염화탄소를 투여하였을 때, 혈청 alanine aminotransferase 활성 및 간조직 과산화지질의 함량은 대조군에 비하여 현저하게 증가되었다. 그러나 diallyl disulfide를 전처치하므로써 모두 그 증가 현상이 유의하게 억제되었다. 한편 diallyl disulfide를 실험동물에 5일간 주사하였을 때 free radical 생성계 효소인 aminopyrine demethylase와 xanthine oxidase의 활성 및 free radical 해독계 효소인 superoxide dismutase와 catalase의 활성 그리고 간 glutathione의 함량은 대조군과 별다른 차이를 관찰할 수 없었다. 그러나 해독계 효소인 간 glutathione S-transferase 활성은 유의하게 증가하였다. 시험관 내에서 diallyl disulfide의 첨가량을 증가시켜 가면서 간 glutathione S-transferase의 활성을 측정하였을 때 별다른 변동은 관찰되지 않았다.

이상의 실험결과들을 종합하여 볼 때 diallyl disulfide는 간 glutathione S-transferase의 활성을 조절해줌으로써 사염화탄소에 의한 간 손상을 예방내지는 치료해줄 수 있을 것으로 생각되어진다.

참 고 문 헌

1. Kabelik. Antimicrobial properties of garlic, *Pharmazie*, **25**, 266, 1970.
2. Barone, F. E. and Tansey, M. R.. Isolation, purification, synthesis and kinetics of activity of the anticandidal component of Allium sativum, and a hypothesis for its mode of action, *Mycologia*, **69**, 793, 1977.
3. Brondnitz, M. H., Pascale, J. V. and Derslice, L. V.. Flavor components of garlic extract, *J. Agr. Food Chem.*, **19**, 273, 1971.
4. Huh, K., Lee, S. I. and Song, J. W.. Protective effect of diallyl disulfide on ethacrynic acid-induced toxicity in mice. *Arch. Pharm. Res.*, **10**, 149, 1987.
5. Kagawa, K., Matsutaka, H., Yamaguchi, Y. and Fukuhama, C..Garlic extract inhibits in carbon tetrachloride-induced liver injury, *Japan. J. Pharmacol.*, **42**, 19, 1986.
6. Rao, K. S. and Recknagel, R. O.. Early onset of lipoperoxidation in rat liver after carbon tetrachloride administration, *Exp. Mol. Pathol.*, **9**, 271, 1946.
7. Emerit, I. and Cerutti, P. A.. Tumor promoter phorbor-12-myristate-13-acetate induces chromosomal damage via indirect action, *Nature*, **293**, 144, 1981.
8. Curtis, M. T., Gilfor, D. and Farber, J. L.. Lipid peroxidation increases the molecular order of microsomal membranes, *Arch. Biopchem. Biohys.*, **235**, 644, 1984.
9. Battelli, M. G., Lorenzoni, E. and Stirpe, F.. Milk xanthine oxidase type D(dehydrogenase) and type O(oxidase). : Purification, interconversion and some properties, *Biochem. J.*, **131**, 191, 1973.
10. Granger, D. N. and Parks, D. A.. Role of oxygen radicals in the pathogenesis of intestinal

ischemia, *The Physiologist,* **26,** 159, 1983
11. Nohl, H. and Jordan, W.. The metabolic fate of mitochondrial hydrogen peroxide, *Eur. J. Biochem.,* **111**, 203, 1980.
12. Beauchamp, C. and Fridovich, I.. A mechanism for the production of ethylene from methional. : The generation of the hydroxyl radical by xanthine oxidase, *J. Biol. Chem,* **245**, 4641, 1970.
13. Kellog, E. W. and Fridovich, I.. Liposome oxidation and erythrocyte lysis by enzymatically generated superoxide and hydrogen peroxide, *J. Biol. Chem.,* **252**, 6721, 1977.
14. Fried, R.. Enzymatic and non-enzymatic assay for superoxide dismutase, *Biochemie,* **57**, 657, 1975.
15. Folhe, L., Gunzler, W. A. and Schock, H. H.. Glutathione peroxidase. : A selenonezyme, *FEBS Lett.,* **32**, 132, 1973.
16. Lawrence, R. A. and Burk, R. F.. Glutathion peroxidase activity in selenium-deficient rat liver, *Biochem, Biophys. Res. Commun.,* **71**, 952, 1976.
17. Boyland, E. and Chasseud, L. F.. The role of glutathione and glutathione S-transferase in mercapturic acid biosynthesis, *Adv, Enzymol.,* **32**, 173, 1969.
18. Chasseaud, L. F.. Distribution of enzymes that catalyze reactione of glutathione with α, β-unsaturated compounds, *Biochem. J.,* **131**, 756, 1973.
19. Bidlack. W. R. and Lowery, G. L.. Multiple drug metabolism. : p-nitroanisole reversal of acetone enhanced aniline hydroxylation, *Biochem. Pharmacol.,* **31**, 311, 1982.
20. Nash, T.. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the hantzsch reaction, *J. Biol. Chem.,* **55**, 416, 1953.
21. Aebi, H.. Catalase in "Methods of Enzymatic Analysis" (H. U. Bergmeyer, ed.), Vol. 2, 673, Academic press, New York, 1974.
22. Habig, W. H., Pabist, M. J. and Jakoby, W. B.. Glutathione S-transferases. : The frist enzymatic step in mercapturic acid formation, *J. Biol. Chem.,* **249**, 7130, 1974.
23. Martin, J. P., Dailey, M. and Sugarman, E.. Negative and positive assays of superoxide dismutase based on hematoxylin autoxidation, *Arch. biochem. Biophys.,* **255**, 329, 1987.
24. Stirp, F. and Della Corte, E.. The regulation of rat liver xanthine oxidase. : Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (Type D) to oxidase (Type O), *J. Biol. Chem,* **244**, 3855, 1969.
25. Reitman, S. and Frankel, S.. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminase, *Am. J. Clin. Pathol.,* **28**, 58, 1957.
26. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yaki, K.. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction, *Anal. Biochem.,* **95.**, 351, 1979.
27. Ellman, G. L.. Tissue sulfhydryl group, *Arch. Biochem. Biophys.,* **82**, 70, 1959.
28. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.. Protein Measurement with folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.,* **193**, 265, 1951.
29. Wroblewski, F. and La Due, J. S.. Serum glutamic-pyruvic transaminase in cardiac and hepatic disease, *Proc, Soc. Exp. Biol. Med.,* **91**, 569, 1956.
30. Taketa, Y., Ichihara, A., Tanioka, H. and Inove, H.. The biochemistry of animals cells, the effect of corticosterids on leakage of enzyme from dispersed rat liver cells, *J. Biol. Chem.,* **239,** 3590, 1964.
31. Plaa, G. L. and Witschin, H.. Chemicals, drugs and lipid peroxidation, *Am. Rev. Toxicol. Pharmacol.,* **16**, 125, 1976.
32. Trush, M. A. and Kensler, T. W.. Role of free radicals in carcinogen activation in "Oxi-

dative Stress"(H. Sie, ed.), 277, Academic Press, New York, 1991.
33. Prohaska, J. R. and Ganther, H. E.. Glutathione peroxidase activity of glutathione S-transferases purified from rat liver, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **76**, 437, 1977.