

생쥐에서 저령 추출물에 의한 Superoxide radical 제거 효과 — The Effects of Inhibited on Superoxide radical to *Grifola umbellata* Extract on Mice —

안산1대학 방사선과 · 원광보건대학 방사선과*

박준철 · 유병규*

— 국문요약 —

본 연구에서는 저령(*Grifola umbellata*)의 균핵을 끓여 추출물을 얻어 이것이 실험용 생쥐에 미치는 영향을 조사하였다. 생쥐에 저령 열수 추출물(100 mg/kg 체중)을 1일 1회 2일간 복강투여 했을 때 암 발생의 원인이 될 수 있는 superoxide radical의 생성은 대조군에 비해 약 22% 가량 억제되었으나, 지방과 산화는 대조군과 별다른 차이를 보이지 않았다. 반면에 항피로능은 대조군에 비해 추출물 투여군의 유효기간이 약 1.8배 가량 증가되어 저령의 열수 추출물에 항피로 효과성분이 있음을 알 수 있었다.

I. 서 론

생물체가 전리방사선에 조사되면 여러 생물학적 장애의 발생빈도가 증가하게 되며 방사선은 생체에서 산소나 물의 대사과정에서 유리기들(free radicals)을 발생시키는 것으로 알려져 있다. 생체조직이 방사선 에너지를 흡수하면 조직의 구성분자(주로 물분자)와 여기, 전리작용에 의해 개시되는 물리화학적 단계에서 hydrogen atom ($\cdot H$), hydrated electron(e_{aq}) 그리고 hydroxyl radical($\cdot OH$)과 같은 일차 유리기들이 형성되며¹⁾, 일차적으로 생성된 유리기들은 용존산소나 철, 구리 등 전이금속의 존재하에 여러 반응단계를 거쳐 2차 유리기들(superoxide radical, hydrogen peroxide, alkoxy radical, peroxy-radical)을 생성하게된다. 이러한 유리기들은 생체내에서 단백질의 SH기나 DNA와 반응하여 화학결합의 절단이나 가교결합의 형성등 생체구성 분자의 구조적 변화를 야기시키고²⁾, 이로 인해 효소활성의 저하와 DNA, 지질 및 단백질 등이 손상될 뿐만 아니라 세포막의 불포화 지방산과 일련의 연쇄반응을 통하여 지질과산화이 유발된다^{3,4)}. 과산화 지질의 증가는 세포에 산화적 손상을 주어 기관의 생리적 기능을 저하시킴으로써 동맥

경화, 간질환, 당뇨병, 심장병 및 암 등의 여러 가지 질병을 초래하며 노화와 유전적 질병의 원인이 되는 것으로 알려져 있다⁵⁾.

생체는 이와같은 유리기들의 유해한 작용을 제거할 수 있는 방어체계를 가지고 있으며 그 방어 기작은 생체내에 항산화활성 물질이 존재하므로써 유리기들의 생성을 억제하거나 생성된 유리기들을 제거하는 것이라고 알려져 있다²⁾. 유리기 생성의 증가 및 항산화적 방어력의 감소로 인하여 야기되는 지질과산화 반응은 항산화 효소의 활성 및 glutathione의 항산화작용과 관련이 있는데, 고선량의 방사선 조사⁶⁾, paraquat 투여⁷⁾, 구리 결핍식이⁸⁾ 등으로 인한 superoxide dismutase(SOD)의 활성 저하는 지질과산화를 촉진시키며, 저선량의 방사선 조사⁹⁾, 인삼 성분의 투여¹⁰⁾로 SOD 활성이 증가되어 지질과산화가 억제되었다는 보고들이 있다. 또한 동물 조직중 non-protein thiol의 대부분을 차지하는 환원형 glutathione(GSH)도 유리기의 scavenger로서 또한 H₂O₂ 및 과산화 지질을 대사시키는 glutathion peroxidase의 기질로서 세포내 항산화제들 중에서 중요한 역할을 담당하고 있는데, 생체내 glutathione(GSH)의 결핍은 지질과산화 반응을 촉진시키며 환원형 GSH, 산화형 GSH(GSSG) 및

GSSG/GSH 비율의 측정은 조직세포내의 redox 및 de-toxification 상태의 평가에 중요하며 GSSG 형성은 활성 산소종 생성의 유용한 정량적 지표가 되기 때문에 지질 과산화 정도나 조직 손상의 유발과 직접적으로 관련되어 있는 것으로 생각되고 있다¹¹⁾. 따라서 생체조직에서 고선량의 방사선 조사로 인한 유리기 생성의 증가는 생체내 항산화효소들의 활성 저하나 glutathione 등의 항산화제 함량 감소를 야기시킴으로써 지질과산화 반응이 촉진되며 이때 항산화제의 첨가는 과산화 지질의 생성을 효과적으로 억제할 수 있기 때문에 전리 방사선으로 인한 장애로부터 생체 방어 능력이 향상될 것으로 사료된다¹²⁾.

그러므로 본 실험은 저령추출물을 투여한 생쥐의 항피로능과 superoxide radical 제거능 및 지방과산화 억제능을 보고자 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 재료

1) 저령의 열수 추출

경동 한약시장으로부터 저령을 구입하고 100 g을 blender(Changshin Co.)로 분쇄한 후 4℃에서 80% methanol에 48시간 동안 침적시키고 침전물을 회수하였다. 침전물을 95℃의 물로 6시간 동안 끓였다. 용액을 여과기(Millipore, pore size 0.22 μm, filter type GS)로 여과한 후 원심분리기(Hanil HM-160)를 사용하여 10,000 × g에서 10분간 원심분리 하였다. 상층액을 냉동건조기(II Sin Engineering Co.)를 사용하여 동결건조 한 후 실험에 사용하였다¹³⁾.

2) 동물의 사육

체중 약 28 g 정도의 ICR 계열 생쥐를 중앙실험동물사(서울)로부터 구입하여 사육실에서 실내 온도 24℃~28℃, 습도 60~65%, 명기와 암기를 각각 12시간씩 한 조건하에서 사육하였다. 사료는 고품사료(삼양사)를 사용하였는데 그 조성은 조 단백질 21%, 조 지방 3.5%, 조 셀룰로오스 5.0%, 무기질 8.0% 등이었다. 급수는 수도물을 사용하였으며 모든 동물은 실험을 수행하는 동안 사료와 물을 충분히 공급하였다.

3) 항피로능

생쥐를 사육실에서 1주간 적응시키고 무작위적으로 대

조군 10마리와 저령 추출물 투여군 10마리로 나누어 추출물 투여군의 경우 식염수(0.9% NaCl)에 녹인 저령 열수 추출물을 0.5 ml씩(100 mg/kg of body weight)을 1일 1회 2일간 복강 투여하고 대조군은 식염수(0.9% NaCl) 0.5 ml을 동일기간 투여하였다.

2. 방법

1) Superoxide radical 제거능

Superoxide radical은 Li 등¹⁴⁾의 방법으로 생성시켰다. 반응액은 3 ml의 16 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0)에 78 μM NADH, 50 μM nitroblue tetrazolium(NTB), 10 μM phenazin methosulfate(PMS)를 포함하였다. 생성된 superoxide radical과 NBT와의 발색반응 생성을 spectrophotometer(Spectronic 2000, Milton Roy Co.)을 사용하여 560 nm 파장에서 측정하였다. 이때 다양한 농도(0, 5, 25, 100 μg/ml)의 저령 열수 추출물을 첨가하여 이들의 superoxide radical 제거능을 조사하였고 reference compound로 Vitamin C를 사용하였다.

2) 지방과산화 억제능

저령 열수 추출물의 지방 과산화능을 조사하기 위해 채취한 간조직을 차가운 0.25 M sucrose 용액에서 glass-teflon homogenizer를 이용하여 1분간 파쇄 하였다. 파쇄된 균등액을 4℃, 12,000×g에서 20분간 원심분리하였다. 상등액을 취하여 4℃, 100,000×g에서 60분간 원심분리하였다. 침전된 microsome을 차가운 0.15 M KCl 용액으로 세척하고 분석할 때까지 -20℃에 보관하였다. 단백질 정량은 Lowry의 방법¹⁵⁾을 사용하였다. Microsome(200 μg/ml)을 다양한 농도의 저령 열수 추출물과 10 μM FeSO₄, 0.1 mM ascorbic acid를 포함하는 1 ml의 0.2 M potassium phosphate buffer(pH 7.4)와 혼합하여 37℃에서 60분간 반응시켰다. 반응의 종료는 1 ml의 20% trichloroacetic acid(TCA)와 1.5 ml의 0.67% 2-thio-barbituric acid(TBA)를 연속적으로 첨가하고 100℃에서 15분간 가열함으로써 이루어졌다. Microsome의 지방과산화로 생긴 산물은 malondialdehyde(MDA)로 생성된 MDA와 TBA간의 반응 산물의 발색정도를 spectrophotometer(Spectronic 2000, Milton Roy Co.)을 사용하여 532 nm 파장에서 측정하였다. 이때 reference compound로 butylated hydroxyanisole을 사용하였다¹⁴⁾.

3) 항피로능 효과

항피로 효과의 측정은 Busnel과 Lehmann의 방법¹⁷⁾에

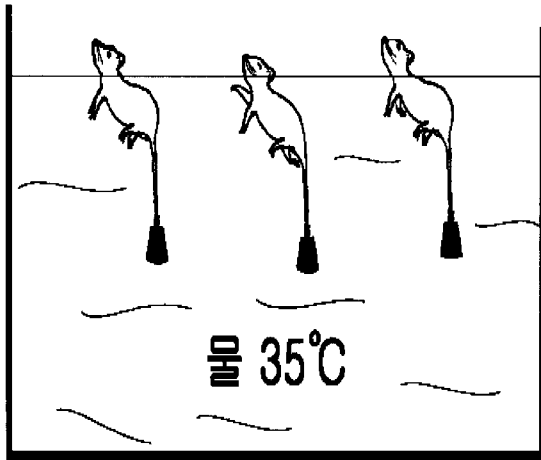


Figure 1. Weight-loaded forced swimming performance test.

따라 weight-loaded forced swimming performance test를 실시하였다. 최종 시료 투여후 24시간만에 생쥐의 꼬리근으로부터 5 cm되는 부위에 (body weight + 2 g) × 0.065 g의 분동을 부착시킨 다음 9개의 방 (15×13×25 cm)으로 분리된 30°C의 항온조에서 강제 수영을 시켰다. 수영시간은 수영 개시 시각으로부터 동물의 전신이 잠기고 10초 이상 나오지 못한 시각까지로 하여 항피로 효과를 평가하였다. 이때 대조약물로 단백 동화 스테로이드제인 oxymetholone(Sigma, USA)을 사용하였다(Fig. 1 참조).

4) 통계처리 분석

본 실험에서 각 실험군 사이의 평균치의 유의성을 분석하기 위하여 Kirk¹⁷⁾에 의하여 약술된 Newman-Keuls 검정법에 따라 Duncan test¹⁸⁾로 처리하여 3집단의 유의성을 검증 비교했다. 그리고 각 자료의 평균치는 표준 편차 또는 표준 오차로 표시했다.

III. 결 과

1. Superoxide radical 제거능

Table 1에서 Superoxide radical을 발생시킨 실험계에 *Grifola umbellata* 열수 추출물을 농도 별로 첨가하였을 때 첨가한 추출물의 농도가 증가함에 따라 superoxide radical 생성이 현저히 억제됨을 확인하였다. 5 µg/ml 농도의 저령 열수추출물 첨가하였을시 형성된 superoxide radical은 대조군에 비해 15.3% 가량 억제되었고 25 µg/ml을 첨가하였을시 49.2%가량 억제되었다. 100 µg/ml

Table 1. Effect of *Grifola umbellata* extract on superoxide radical generation.

Concentrations (µg/ml)	Superoxide radical ^a (A ₆₆₀)	Inhibition ratio (%)
0	0.654 ± 0.007	0
5	0.554 ± 0.017	15.3
25	0.332 ± 0.012	49.2
100	0.143 ± 0.008	78.1

a : The values of superoxide radical generation are mean ± S.D.

Table 2. Effect of *Grifola umbellata* extract on microsomal lipid peroxidation.

Concentrations (µg/ml)	MDA formation ^a (A ₆₃₂)	Inhibition ratio (%)
0	0.510 ± 0.017	0
5	0.504 ± 0.023	1.2
25	0.512 ± 0.032	0
100	0.499 ± 0.028	2.2

a : The values of MDA formation are shown in mean ± S.D.

농도에서는 superoxide radical 생성을 78.1% 가량 억제 하였다.

2. 지방과산화 억제능

지방과산화에 대한 *Grifola umbellata* 열수 추출물의 억제능을 조사한 것인데 *Grifola umbellata* 열수 추출물이 superoxide radical 생성을 현저히 억제한 것과는 달리 지방과산화에는 아무런 영향을 주지 못하였다(Table 2 참조).

3. 항피로능

각 시료 100 mg/kg body weight을 1일 1회 2일간 연속하여 복강 투여하고 최종시료 투여후 24시간만에 mice의 꼬리에 체중에 따른 tail factor를 부착시킨 다음 30°C의 항온 수조에서 강제수영을 시킨 결과를 Table 3에 표시하였다. 저령 열수 추출물 투여군의 경우 유평기간이 평균 1,409초였고 reference로 사용한 단백 동화 스테로이드제인 oxymetholone 투여군의 경우도 이와 비슷한 평균 1,393초로 모두 대조군(평균 789초)에 비해 약 1.8 배 가량 유평기간이 증가되었다 (P<0.01).

Table 3. Effect of *Grifola umbellata* extract on the weight-loaded forced swimming time of mice^a.

Group	Dose ^b	Swimming time (sec)	Significance against control
Control	-	789±62	-
G.umbellata extract	100	1,409±267	P<0.01
Oxymetholone	100	1,393±274	P<0.01

a : Mice were administered intraperitoneally with *Grifola umbellata* extract for 2 consecutive days and swimming times were measured in a water bath 24 hr after the last treatment of samples.

b : mg/kg body weight

IV. 고찰

Superoxide radical을 발생시킨 실험계에 *Grifola umbellata* 열수 추출물을 농도 별로 첨가하였을 때 첨가한 추출물의 농도가 증가함에 따라 superoxide radical 생성이 현저히 억제됨을 확인하였는데 이러한 결과는 버섯 *Ganoderma lucidum*의 자실체 열수추출물과 *Coriolus versicolor*의 균사체 열수추출물이 뛰어난 free radical 제거능을 갖는 결과와 유사하였다¹⁹⁾.

이 결과는 *Pedicularis alashanica*로 부터 추출한 phenylpropanoid glycosides에 의한 free radical 제거 기작이 잘 규명되었는데 phenylpropanoid glycosides가 superoxide radical과 반응하여 하나의 전자를 빼앗음으로써 semiquinones을 형성하는 과정을 거치는 것으로 알려졌다²⁰⁾. 그러나 저령 열수추출물의 free radical 제거 기작이 이와 유사한지는 현재까지는 알 수 없으며 앞으로 더 연구해야 할 것으로 사료된다.

지방과산화에 대한 *Grifola umbellata* 열수 추출물의 억제능에 관한 조사에서는 *Grifola umbellata* 열수 추출물이 superoxide radical 생성을 현저히 억제한 것과는 다르게 *Grifola umbellata* 열수 추출물이 지방과산화에 는 아무런 영향을 주지 못하였다.

지방과산화 반응은 복잡한 과정으로 lipid radical의 형성과 증가, 산소의 흡수, 불포화 지방의 이중결합의 재배열과 이에 따른 갑작스런 막지질의 파괴 등의 일련의 현상을 포함한다²¹⁾. 막지질의 파괴에 의해 microsome에는 malonylaldehyde(MDA)와 같은 산물이 형성되는데 본 실험에서는 저령의 열수 추출물이 이 산물의 형성을 억제하지 못하였으므로 항산화제로써 효과적이지 못함을 시사한다. 홍삼 열수추출물의 경우 생쥐의 지방과산화를 억제하였는데 이는 증가된 superoxide dismutase의 활

성과 연관지어 추정하고 있으나 정확한 기작은 아직 밝혀지지 않았다²²⁾.

항피로능 효과를 보기 위한 실험에서는 저령 열수 추출물 투여군의 경우 유영시간이 평균 1,409초였고 reference로 사용한 단백 동화 스테로이드제인 oxymetholone 투여군의 경우도 이와 비슷한 평균 1,393초로 모두 대조군에 비하여 약 1.8배 가량 유영시간이 증가되었는데 (P<0.01), 이러한 결과는 *Grifola umbellata* 열수 추출물이 스트레스에 대해 억제효과를 나타냄을 암시하며 동시에 뛰어난 항피로 성분을 갖고 있음을 시사한다. 이와 유사한 결과가 눈꽃동충하초의 항피로실험에서도 보고된 바 있는데 이러한 항피로능은 눈꽃동충하초의 면역력 증강효과와 밀접한 관계가 있는 것으로 설명하였다²³⁾.

V. 결론

생쥐에서 *Grifola umbellata* 열수 추출물에 의한 superoxide radical 제거능력을 보기 위한 본 연구에서 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. Superoxide radical을 발생시킨 실험계에 *Grifola umbellata* 열수 추출물을 농도 별로 첨가하였을 때 첨가한 추출물의 농도가 증가함에 따라 superoxide radical 생성이 현저히 억제됨을 확인하였다. *Grifola umbellata* 열수 추출물을 농도 25 µg/ml을 첨가 시 49.2%, 100 µg/ml 농도에서는 superoxide radical 생성을 78.1% 가량 억제하였다.
2. 지방과산화 억제능 실험에서는 *Grifola umbellata* 열수 추출물이 superoxide radical 생성을 현저히 억제 한 것과는 달리 지방과산화에는 아무런 영향을 주지 못하였다.
3. 항피로능에서는 대조군에 비해 약 1.8배 가량 유영 시간이 증가되었다.

참고 문헌

1. Singh, A. and Singh, H. Time-scale and nature of radiation-biological damage : approaches to radiation protection and post-irradiation therapy. *Prog. Biophy. Mol. Biol.* 39 : 69-107, 1982.
2. Fridovich, I. Superoxide dismutase. In : *Methods of Enzymatic Analysis*, edited by Bergmyer.

- Academic Verlag, Berlin*, 58 : 61-97, 1986.
3. Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *J. Biochem.* 219 : 1-14, 1984.
 4. Emerit J. and Chaudiere J. CRC Hand Book of Free Radical and Antioxidants in Biomedicine, Miquel J., Quintailha A. T. and Weber H. (eds.) vol. 1, CRC Press, Florida, pp.177, 1989.
 5. Bowman, P. D. CRC Hand Book of Cell Biology of Aging., Cristofalo, V. J., Adelman, R. C. and Roth, G. S. (eds.), CRC Press, Florida, pp.117, 1986.
 6. Kergonou J. F., Thiriote C., Braquet M., Ducouso R. and Rocquet G. Influence of whole-body gamma-irradiation upon rat erythrocyte : lipid peroxidation and osmotic fragility. *Biochimie*, 68(2) : 311-318, 1986.
 7. Salovsky P. and Shopova V. Synergic lung changes in rats receiving combined exposure to paraquat and ionizing radiation. *Environ. Res.* 60(1) : 44-54, 1993.
 8. Balevska P. S., Russavanov E. M. and Kassabanova T. A. Studies on lipid peroxidation in rat liver by copper deficiency. *Int. J. Biochem.* 13 : 489, 1981.
 9. Yamaoka K., Edamatsu R. and Mori A. Increased SOD activities and decreased lipid peroxide levels induced by low dose x irradiation in rat organs. *Free. Radic. Biol. Med.* 11 : 299-306, 1991.
 10. 오미현, 정해영, 양관석, 김규원, 정한영, 오우라히꼬 끼치, 요코자와다카꼬. *Korean Biochem. J.* 25(5) : 492, 1992.
 11. Vendemiale G., Altomare E., Grattagliano I. and Albano O. Increased plasma levels of glutathions and malonaldehyde after acute ethanol ingestion in humans. *J. Hepatol.* 9 : 359-365, 1989.
 12. Benderitter M., Maingon P., Abadie C., Assem M., Maupoli V., Briot F., Horiot J. C. and Rochette L. Effect of in vivo heart irradiation on the development of antioxidant defenses and cardiac functions in the rat. *Radiat. Res.* 144(1) : 64, 1995.
 13. 윤상홍, 임재현, 김양섭, 김창한, 조준형, 황영수. 장수버섯 자실체의 열탕추출액으로부터 분리한 단백질의 약리적 효과. *한국균학회지*, 26(4) : 511-518, 1998.
 14. Li J., Zheng R. L., Liu Z. M. and Jia Z. J. Scavenging effects of phenylpropanoid glycosides on superoxide and its antioxidant effect. *Acta Pharmacologica Sinica*, 13 : 427-430, 1992.
 15. Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265-275, 1951.
 16. Busnel R. G. and Lehmann A. G. Antagonistic effect of sodium ascorbate on ethanol-induced changes in swimming of mice. *Behavioral Brain Res.* 1 : 351-356, 1980.
 17. Kirk R. E. Experimental Design: Procedures for the behavior sciences, Academic Press, New York, (Seligson, D. ed.) Vol. 2, pp.91, 1959.
 18. Duncan D. B. *Biometrika* 31 : 339, 1975.
 19. Liu F., Ooi V. E. C. and Chang S. T. Free radical scavenging of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sciences*, 60(10) : 763-771, 1996.
 20. Wang H. X., Liu W. K., Ng T. B., Ooi V. E. C. and Chang S. T. Immunomodulatory and antitumor activities of a polysaccharide complex from a mycelial culture of *Tricholoma SP.*, a local edible mushroom. *Life Science*, 57(3) : 269-281, 1995.
 21. Esterbauer, In : Free Radical in Liver Injuri (edited by Poli G., Cheeseman K. H., Dianzani M. U. and Slater T. F.). IRL Press, Oxford, pp.29-48, 1985.
 22. Park Y. S., Kim Y. G., Jae C. C. and Kim D. Y. Radioprotective effects of red ginseng extracts on antioxidants and lipid peroxidation of the liver in γ -irradiated mice. *Korean Biochem. J.* 26(2) : 184-191, 1993.
 23. 유나마. 눈꽃동충하초의 항암효능에 관한 연구. 경희대학교 대학원 석사학위 논문. 1-54, 1999.

• Abstract •

The Effects of Inhibited on Superoxide radical to *Grifola umbellata* Extract on Mice

Joon Chul Park · Beong Gyu Yoo*

Dept. of Radiotechnology, Ansan 1 College

*Dept. of Radiotechnology, Wonkwang Health Science College**

In this study, the inhibited effects on superoxide radical of *Grifola umbellata* hot water extracts (*Gu*-extract) on mice were investigated. The intraperitoneal administration of *Gu*-extract for 2 days increased swimming time by 1.8 fold, indicating that the extract might contained some anti-fatigue compound(s). The extract inhibited superoxide radical formation by 22% as compared to control, but not lipid peroxidation.
