

석류 껍질 추출물이 고지방 고콜레스테롤 식이 급여 C57BL/6J 마우스의 항산화 지표 및 DNA 보호에 미치는 영향

오상희¹ · 양윤형¹ · 석대은² · 김미리^{1*}

¹충남대학교 식품영양학과, ²충남대학교 약학대학

Effects of Pomegranate Peel (*Granati pericarpium*) Extracts on the Antioxidant Biomarkers in C57BL/6J Mice Fed a High Fat and Cholesterol Diet

Sang-Hee Oh¹, Yun-Hyoung Yang¹, Dai-Eun Sok² and Mee Ree Kim^{1*}

¹Dept. of Food and Nutrition, ²College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Abstract

The present study evaluated the effects of pomegranate peel (*Granati pericarpium*) extract on the lipid profiles and antioxidant biomarkers in mice fed a high fat and cholesterol diet: the measured biomarkers included the TBARS value, GPx, GR, SOD and GST activities. Body fat depositions were significantly decreased in the group that received pomegranate peel. In addition, the activities of GPx, GST and SOD were significantly higher in the liver and plasma of the pomegranate peel group than in the control group. Also, the pomegranate peel diet decreased lipid peroxidation of the liver and kidney. Alkaline single-cell gel electrophoresis (comet assay) showed that the DNA damage in the plasma of the pomegranate peel group was decreased compared to that of control. The present results show that a diet with added pomegranate peel exerts protective effects against oxidative DNA damage and lipid peroxidation possibly via effects on the free radical levels in mice fed a high fat and cholesterol diet.

Key words : Pomegranate peel, mice, lipid peroxidation, antioxidant, comet assay.

서 론

석류(Pomegranate, *Punica granatum* L.)는 석류과에 속한 낙엽소목으로서 예로부터 열매와 줄기 껍질과 뿌리의 껍질을 건조하여 한약재로 많이 쓰여 왔으며, 아시아 서남부 및 인도의 북서부가 자생지이다(Kim *et al* 2005a). 현재는 아열대 및 열대 각지에 널리 퍼져 있는 식물로써 천연 녹차 또는 홍차나 적포주에 함유된 항산화제 성분 함량이 4배 이상 함유되어 있음이 확인되었다(Schubert *et al* 1999). 석류의 약효에 있어서 주요한 유효 성분은 alkaloid인 isopelletierine이며, 그 외 tannin인 punicalin, punicalagin 등과 inuline, manitol, sorbitol, malic acid 등이 알려져 있으며 나무 껍질 및 그 부위에 따라 각각의 양이 다르다. 석류는 일찍이 강장제, 촌충의 구제, 설사, 이질, 구내염, 장출혈에 효과가 있는 것으로 알려져 왔으며, 동의치료에서는 tannin이 많아 수렴성 건위약으로 쓰여 왔다(Gil *et al* 2000). 최근에는 새로운 암 예방제, 노화 방지제, 항 동맥경화제, 소염제, 항 당뇨병 및

그 치료제, 폐경기 여성 호르몬 대용 치료제 등으로 이용되고 있다(Singh *et al* 2002). 사람이나 마우스 실험에서 석류즙을 매일 복용할 경우에는 동맥경화가 예방되었다는 보고(Aviram *et al* 2000, Kaplan *et al* 2001)와 석류 추출물이 암세포의 증식을 억제하였다는 보고(Shim *et al* 2001)가 알려져 있다.

최근 석류의 부위에 따른 항산화 물질 및 항산화 효능에 관한 연구 결과에 의하면 씨나 과육에 비해 껍질에 total phenolics, flavonoids, prothocyanidins과 같은 천연 항산화 물질이 풍부하고 FRAP, DPPH, β -carotene linoleate, CuSO₄⁻에 의한 LDL산화법 등의 *in vitro* 항산화능 평가 실험에서 씨나 과육보다 껍질에서 뛰어난 항산화 효과를 보였다고 보고하였다(Guo *et al* 2003, Li *et al* 2006). 또한 석류 껍질이 항산화 효과 및 항 돌연변이 효과가 뛰어난이 보고되어 있다(Negi *et al* 2003). 석류 껍질의 기능성의 유효 성분은 ellagic tannin, ellagic acid, galic acid와 같은 페놀 화합물로 보고(Nasr *et al* 1996, Gil *et al* 2000)되어 있으며 이 중 tannin은 석류 껍질에 58~60 g/kg의 함량이 들어있으며 이들은 punicalagin(80~85% w/w), ellagic acid(1.3% w/w)와 배당체들로

* Corresponding author : Mee Ree Kim, Tel : +82-42-821-6837, Fax : +82-42-821-8887, E-mail : mrkim@cnu.ac.kr

이루어졌다고 보고되었다(Seeram *et al* 2005, Kwak *et al* 2005).

따라서 본 연구는 석류의 biomass 중 가장 많은 부분을 차지하고 항산화 물질이 풍부한 껍질 추출물을 고지방 고콜레스테롤 식이 급여 마우스에 투여하여 혈장 및 조직에서의 항산화 biomarker 및 DNA 보호 효과를 관찰하였다.

재료 및 방법

1. 실험 동물 및 사육

실험에 이용된 동물은 체중 19~23 g 정도의 생후 6 주령 된 C57BL/6J 마우스(수컷) 16마리를 구입하여 실험 시작 전 AIN 93G diet(Dyets Inc, Bethlehem, PA, USA)로 1 주일간 적응시켰다. 적응 기간이 끝난 실험 동물은 체중에 따른 난괴법(randomized complete block design)으로 각 군당 8마리씩 2군으로 나누어 4주 동안 사육하였다. 사육실의 온도는 23±2℃, 습도 50~60%로 조절하였고, 매일 광주기 및 암주기를 각각 12시간이 되도록 조절하였다. 실험 동물은 두 마리씩 stainless steel cage에서 사육하였고, 식이와 먹는 물은 24시간 동안 자유 급식으로 공급하였으며, 무기질의 오염 방지를 위해서 사육실에 필요한 모든 기구는 0.4%의 EDTA로 씻은 후 탈이온 증류수로 헹구어 사용하였다.

본 실험에서 사용한 식이의 구성 성분은 American Institute of Nutrition AIN-93G Diet(Dyets Inc)를 기본으로 Table 1과 같이 하였으며 고지방 고콜레스테롤 식이를 위해 총 식이 무게의 20%를 옥수수유와 lard로 공급하였고 1%의 콜레스테롤을 첨가하였다. 식이 성분으로는 AIN 93 mineral mixture(Dyets Inc), AIN 93 vitamin mixture(Dyets Inc), choline bitartrate(ICN Biomedicals Inc, Costa Mesa, California, USA), casein(Dae Jung Chemicals & Metals Co Ltd, Seoul, Korea), cellulose(Aldrich Chemical Co Inc, Milwaukee, WI, USA), DL-methionine(Junsei Chemical Co, Ltd, Tokyo, Japan)을 사용하였다. 대전 도매상에서 석류를 구입하여 껍질을 분쇄 후 70% ethanol로 추출하고 진공 농축하여 시료로 사용하였으며 식이 제조시 총 식이 무게의 0.3% 함량으로 첨가하였다. 각 군의 식이는 매주 한 번씩 만들어 사용하였고 지방의 산패를 방지하기 위해 -70℃ 냉동고에 보관하면서 정해진 시간에 매일 일정량을 급여하였다.

2. 식이 섭취량, 체중 증가량, 식이 효율 및 분변의 양

실험 동물의 식이 섭취량은 매일 오후 2시경에 측정하였으며, 체중 측정은 갑작스런 체중 증가를 막기 위해 1시간 전에 식이 공급을 중단한 후 매주 일정한 시간에 한 번씩 측정하였다. 식이 효율(Food Efficiency Ratio: FER)은 총 체중

Table 1. Composition of experimental diet (g/kg diet)

	Control	Pomegranate peel
Casein	200.0	200.0
Corn starch	388.0	385.0
Sucrose	100.0	100.0
Cellulose	50.0	50.0
Corn oil	20.0	20.0
Lard	180.0	180.0
Mineral mixture ¹⁾	35.0	35.0
Vitamin mixture ²⁾	10.0	10.0
L-cystine	3.0	3.0
Choline bitartrate	4.0	4.0
Cholesterol	10.0	10.0
Pomegranate peel extract	0.0	3.0
Total	1000.0	1000.0
Protein	200.0	200.0
Lipid	200.0	200.0
Carbohydrate	488.0	485.0
Energy density(kcal)	4,552.0	4,540.0

¹⁾ AIN 93 mineral mixture(g/kg, Jungang Lab. Animal Inc., Seoul, Korea) : Calcium carbonate 357.00, potassium phosphate (monobasic) 196.00, potassium citrate H₂O 70.78, sodium chloride 74.00, potassium sulfate 46.60, magnesium oxide 24.00, ferric citrate, U.S.P. 6.06, zinc carbonate 1.65, manganous carbonate 0.63, cupric carbonate 0.30, potassium iodate 0.01, sodium selenate 0.01025, ammonium paramolybdate 4H₂O 0.00795, sodium metasilicate 9H₂O 1.45, chromium potassium sulfate 12H₂O 0.275, lithium chloride 0.0174, boric acid 0.0815, sodium fluoride 0.0635, nickel carbonate 0.0318, ammonium vanadate 0.0066, sucrose finely powdered 221.026.

²⁾ AIN 93 vitamin mixture(g/kg, Jungang Lab. Animal Inc., Seoul, Korea) : niacin 3.00, calcium pantothenate 1.60, pyridoxine HCl 0.70, thiamine HCl 0.60, riboflavin 0.60, folic acid 0.20, biotin 0.02, vitamin E acetate(500 IU/g) 15.00, vitamin B₁₂ (0.1%) 2.50, vitamin A palmitate(500,000 IU/g) 0.80, vitamin D₃(400,000 IU/g) 0.25, vitamin K₁/dextrose mix(10 mg/g) 7.50, sucrose 967.23.

증가량을 같은 기간 동안의 총 식이 섭취량으로 나눈 값으로 산출하였다.

$$\text{식이효율} = \text{총 체중 증가량 (g)} / \text{총 식이 섭취량 (g)}$$

3. 장기 및 지방조직 채취 및 분석

각 장기는 채혈 직후 즉시 적출하여 0.9% 생리 식염수로 헹구어 여과지로 물기를 제거한 후 중량을 측정하였다. 또한 지방은 장기를 적출한 후 곧바로 복강 뒤(retroperitoneal), 복강 내(mesenteric), 고환 주위(epididymal), 허벅지(inguinal), 비장 주위(spleen)의 5가지 부위에서 떼어내어 중량을 측정하였다.

4. 혈장 지질 분석

1) 시료 채취

실험 종료 후인 4주 경과시에 12시간 동안 절식시킨 실험 동물을 ethylester로 마취시켰다. 마취 상태에서 개복한 즉시 심장에서 혈액을 채취하였으며 채취한 혈액을 heparin이 담긴 tube에 담아 굳지 않도록 처리한 다음 2,000 rpm에서 5분 동안 원심분리하여 혈장(plasma)을 분리하였다. 분리한 혈장은 -70℃에서 냉동 보관한 후 분석에 사용하였다.

2) 지질 분석

총 중성 지질(triglyceride), 총 콜레스테롤(total cholesterol), HDL-콜레스테롤 농도는 효소 Kit(영동제약) 시약법에 의해 분광광도계(Model 80-2088-64, Pharmacia Biotech Co, Cambridge, England)을 이용하여 각각 546, 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 동맥경화지수(AI: Atherogenic Index)는 다음 공식을 이용하여 계산하였다(Kim *et al* 2005b).

$$\text{LDL-cholesterol} = \text{Total cholesterol} - \left(\text{HDL-C} + \frac{\text{Total triglyceride content}}{5} \right)$$

$$\text{AI(Atherogenic Index)} = \frac{\text{Total cholesterol} - \text{HDL-C}}{\text{HDL-C}}$$

5. 항산화 효소 활성 측정

1) 시료 제조

마우스의 조직을 조직 중량의 9배의 0.01 M sodium phosphate buffer(pH 7.4)로 균질한 후 25,000 rpm에서 30분간 원심분리(4℃)한 후 상층액을 얻었다. -70℃ 냉장고에 보관하면서 항산화 효소계 효소(GPx, GR, SOD, GST) 측정 실험에 사용하였다.

2) Glutathione Peroxidase(GPx) 활성 측정

GPx는 Tappel(Tappel AL 1978)의 방법을 사용하여 정량하였다. 1.0 mM EDTA를 함유한 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.2)에 catalase의 작용을 억제하기 위해서 1 mM의 azide를 넣은 후 891 μL 를 1 mL cuvette cell에 넣고 cytosol enzyme 50 μL , 0.25 mM glutathione 20 μL , 10 mM NADPH 20 μL , GR(0.5 unit/mL) 10 mL를 넣고 마지막에 100 mM cumene hydroperoxide 10 μL 를 넣은 후에 340 nm에서 흡광도를 2분간 측정하였다. GPx의 활성도 1 unit는 mg protein 당 1분간 산화되는 μM 수로 정한다.

3) Glutathione Reductase(GR) 활성 측정

간조직의 GR 효소의 활성 측정은 Pinto *et al*(1984)에 따라 구하였다. 시료 50 μL , 1mM EDTA를 함유한 0.1 M Tris-HCl buffer(pH 8.0) 940 μL , 0.1 mM GSSG 용액 20 μL 를 함유된 용액에 10 mM NADPH 20 μL 를 첨가한 후 412 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4) Superoxide Dismutase(SOD) 활성 측정

SOD 활성은 McCord & Fridovich(1988)의 방법에 따라 정량하였다. 반응은 1 unit xanthine oxidase 4 μL 정도 넣어 흡광도가 0.021±0.005이 되도록 농도를 조절한 후 cytosol 시료 40 μL 를 반응시켜서 550 nm에서 2분간 측정하였다. SOD 1 unit는 cytochrome C를 50% 방해하는 데 필요한 SOD의 양으로 정의하였다.

5) Glutathione S Transferase(GST) 활성 측정

1 mM GSH 1mL와 25℃에서 2분간 고정된 1 mM CDNB 1 mM이 담긴 tube에 0.1 M potassium phosphate buffer(pH 6.5) 480 μL 와 시료 20 μL 를 첨가한 후 340 nm에서 흡광도를 측정하였다.

6. 지질의 과산화도(TBARS Value) 측정

1) 시료 제조

마우스의 조직을 조직 중량의 9배의 0.01 M sodium phosphate buffer(pH 7.4)로 균질한 후 -70℃에 보관하면서 TBARS 측정 실험에 사용하였다.

2) TBARS

혈장, 간, 심장, 신장의 지질 과산화도는 thiobarbituric acid (TBA)방법(Bidlack & Tappel 1973)을 이용하여 생성된 malondialdehyde(MDA) 양을 533 nm에서 흡광도를 측정하였으며, tetramethoxypropane (malonaldehyde bis, TMP)를 표준 물질로 사용하였다.

7. 혈액의 DNA의 손상 정도

DNA 손상 정도를 측정하기 위해 alkalin single-cell gel electrophoresis(comet assay)를 실시하였다. Slide에 0.5% normal melting agarose(NMA)를 50 μ L와 75 μ L로 2번 코팅한 후 시료 5 μ L와 0.75% low melting agarose(LMA) 75 μ L의 현탁액을 골고루 분산시킨 후 cover glass로 덮어 4°C의 냉장온도에 저장하였다. Gel이 굳으면 그 위에 0.75% LMA 75 μ L를 도포하였다. 미리 차게 준비해 두었던 pH 10 lysis buffer에 DMSO와 TritonX-100을 섞은 시약에 slide를 담구어 한 시간동안 암실에 보관하면서 lysis 과정을 거쳤다. Lysis 과정을 끝낸 slide는 electrophoresis buffer에 40분에 저장하였다가 electrophoresis chamber에 배열하고 25V, 300 mA에서 20분 동안 unwinding시켰다. 전기 영동이 끝난 slide는 pH 7.5 tris buffer에 5분씩 3회 세척하고 마지막으로 에탄올에 5분 담갔다가 건조시켰다.

처리가 끝난 시료의 comet image 분석을 하기 위해 ethidium bromide(20 μ L/mL)로 nucleotide를 염색하여 형광현미경에서 관찰하고 카메라를 통해 comet image analyzing system이 설치된 컴퓨터에서 분석하였다. DNA 손상 정도는 핵으로부터 이동한 DNA 파편의 거리(tail length), tail 내 함유된 DNA% (tail DNA%) 그리고 tail length 값에 tail DNA %를 곱해준 tail moment 값과 tail extent moment의 값을 측정하였다. 그리고 추가로 핵의 DNA 함유량인 head DNA (%)를 측정하였다.

8. 통계 처리

모든 실험 결과는 실험 동물 16마리의 평균치±표준편차로 표시하였으며, 유의성 검증은 Windows SPSS 10.0(Statistical Package for Social Sciences. SPSS Inc, Chicago IL, USA) software package 프로그램을 이용하여 student t-test에 의하여 대조군과 석류 껍질 섭취군의 평균치간 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

1. 식이 섭취량, 체중 증가량, 식이 효율 및 변의 양, 장기무게

석류 껍질이 고지방 고콜레스테롤 식이 급여 마우스의

실험 기간 동안의 체중 변화, 식이 섭취량, 식이 효율 및 변의 양에 미치는 영향은 Table 2와 같다. 식이 섭취량, 체중 증가량 및 식이 효율은 석류 껍질 섭취군이 대조군에 비해 높게 나타났다.

2. 장기 및 부위별 지방 조직의 무게

Table 3과 같이 석류 껍질 섭취군과 대조군의 간, 심장, 신장의 무게는 거의 유사하여 석류 껍질 섭취에 의한 장기 무게의 변화는 없는 것으로 나타났다. 그러나 Table 4와 같이 석류 껍질 섭취군의 복강 뒤, 복강 내, 고환 주위, 허벅지, 비장 주위의 지방 무게는 대조군보다 유의적으로 낮게 나타났다($p<0.05$).

3. 혈장 중성 지질 및 콜레스테롤

Table 2. Effect of pomegranate peel extract on food intake, body weight gain and food efficiency ratio (FER) of C57BL/6J mice fed experimental diets for 4 weeks (Mean±SD.)

	Food intake (g/day)	Body weight gain (g)	FER (%)
Control	20.6±0.42 ^{NS}	0.5±0.12 ^{NS}	2.6±0.31 ^{NS}
Pomegranate peel	22.1±0.51	0.8±0.21	3.5±0.44

^{NS}: Not significant between control and pomegranate peel group at $p<0.05$ by t-test.

Table 3. Effect of pomegranate peel extract on organ weight (g/100 g body weight) of C57BL/6J mice fed experimental diets for 4 weeks (Mean±SD.)

	Liver	Heart	Brain	Kidney
Control	3.74±0.81 ^{NS}	0.39±0.05 ^{NS}	1.12±0.09 ^{NS}	1.20±0.12 ^{NS}
Pomegranate peel	3.89±0.72	0.40±0.06	1.09±0.08	1.13±0.11

^{NS}: Not significant between control and pomegranate peel group at $p<0.05$ by t-test.

Table 4. Effect of pomegranate peel extract on fat pad weight (g) of mice fed experimental diets for 4 weeks (Mean±SD.)

	Total fat fad	Retroperitoneal	Mesentric	Epididymal	Inguinal	Spleen
Control	5.19±0.28	0.72±0.14	0.84 ±0.23	2.04±0.18	1.06±0.31	0.53±0.25
Pomegranate peel	3.92±0.34*	0.50±0.22*	0.624±0.25	1.55±0.21*	0.78±0.29*	0.46±0.18

* Significantly different between control and pomegranate peel at $p<0.05$ by t-test.

석류 껍질이 고지방 고콜레스테롤 식이 급여 마우스의 혈장 내 중성 지질 및 콜레스테롤 구성에 미치는 영향은 Table 5에 나타났다. 석류 껍질 섭취군과 대조군의 혈장 내 지질 구성비는 거의 유사하여 석류 껍질에 의한 영향은 없는 것으로 나타났다.

4. 항산화능 지표

1) 항산화계 효소 활성 평가

석류 껍질이 고지방 고콜레스테롤 식이 급여 마우스의 간과 혈장내 항산화 효소 활성에 미치는 영향은 Table 6과 같다. 본 연구 결과 석류 껍질 섭취군의 간의 GPx, SOD 및 GST와 혈장의 SOD의 활성이 및 혈장에 포함된 총 항산화 효소 활성은 대조군보다 유의적으로 높게 나타나 석류 껍질 섭취가 체내 산화적 손상을 억제하는데 효과적임을 알 수 있었다($p<0.05$). 활성 산소는 인체에 해가 되는 superoxide anion radical($O_2^- \cdot$), hydrogen peroxide (H_2O_2), singlet oxygen(1O_2)와 같은 산소 화합물을 총칭하는 것으로 체내에서 일상적인 대사 과정, 즉 전자 전달계, peroxysome의 지방산 대사 과정, 포식 세포(phagocytic cell) 등에서 생성된다(Proctor PH 1992). 식세포나 대식 세포 및 호중구 등은 자체적으로 활성 산소를 만들어서 외부 세균의 침입에 방어하기도 하지만 체내 활성 산소의 과잉은 세포 구성 성분인 지질, 단백질, 핵산, 당, DNA 등에 산화적 손상을 일으켜 세포의 정상적인 대사를 저해하기도 하며 이로 인하여 암, 신경질환, 동맥경화, 소화기 질환, 자기 면역 질환 등의 각종 질병과 노

화를 일으키는 원인이 된다(Ames *et al* 1993). 인체는 이러한 산화 반응으로부터 세포를 보호하기 위한 방어 기전을 갖추고 있는데 이는 superoxide dismutase(SOD), catalase, glutathione peroxidase(GPx)와 같은 항산화계 효소이다(Halliwell *et al* 1995). 따라서 이러한 체내의 항산화계 효소의 활성이 높으면 활성 산소에 의한 조직 및 혈장의 지질, 단백질 및 DNA의 산화를 억제하여 암, 자기 면역 질환, 동맥경화와 같은 각종 질병과 노화를 억제할 수 있다.

2) 조직 및 혈장내 지질 과산화도(TBARS Value)

석류 껍질이 고지방 고콜레스테롤 식이 급여 마우스의 혈장, 간, 심장 및 신장의 지질 과산화도에 미치는 영향은 Table 7과 같다. 혈장, 간, 심장 및 신장의 지질 과산화도 모두 석류 껍질 섭취군이 대조군보다 유의적으로 감소하여 ($p<0.05$) 석류 껍질이 효과적으로 조직 및 혈장의 지질 산화를 억제하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 *in vitro*에서 석류 껍질이 지질 산화 억제 효과가 뛰어났다는 여러 연구 보고(Guo *et al* 2003, Li *et al* 2006, Negi *et al* 2003)와 일치하는 결과이다. 이러한 석류 껍질의 항산화 효과는 punicalagin, ellagic acid와 같은 tannin 성분이 많이 함유되어 있기 때문으로 알려져 있다(Seeram *et al* 2005, Kwak *et al* 2005). 또한 Table 6에 나타난 항산화계 효소 활성의 증가가 지질 산화를 억제하는데 도움을 주었을 것이다.

3) 혈장 및 간의 DNA 손상 정도 평가

석류 껍질이 고지방 고콜레스테롤 식이 급여 마우스의

Table 5. Effect of pomegranate peel extract on triglyceride, total cholesterol, HDL- and LDL cholesterol of plasma in C57BL/6J mice fed experimental diets for 4 weeks
(Mean±SD.)

	Triglyceride (mg/dL)	Total cholesterol (mg/dL)	HDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)
Control	12.5±0.23 ^{NS}	117.5±18.21 ^{NS}	68.1±2.56 ^{NS}	9.3±0.87 ^{NS}
Pomegranate peel	12.0±0.31	119.3±15.30	70.3±1.39	10.8±1.03

^{NS} : Not significant between control and pomegranate peel group at $p<0.05$ by *t*-test.

Table 6. Effect of pomegranate peel extract on activity of glutathione peroxidase(GPx, unit/mL), glutathione reductase(GR, unit/mL) and superoxide dismutase(SOD, unit/mL) and GST(nmole/min) in liver and plasma of C57BL/6J mice fed experimental diets for 4 weeks
(Mean±SD.)

	GPx-Liver (unit/mL)	GR-Liver (unit/mL)	SOD-Liver (unit/mL)	SOD-Plasma (unit/mL)	GST-Liver (umole/mL)
Control	16.63±2.67	4.55±0.70	5.47±1.49	5.89±0.50	15.9±1.61
Pomegranate peel	19.89±1.82*	4.41±0.69	7.06±1.52*	6.84±2.00*	19.9±2.64*

* Significantly different between control and pomegranate peel at $p<0.05$ by *t*-test.

Table 7. Effect of pomegranate peel extract on TBARS value in plasma, liver, heart and kidney of C57BL/6J mice fed experimental diets for 4 weeks (Mean±SD.)

	Plasma(ug/mL)	Liver(ug/mL)	Heart(ug/mL)	Kidney(ug/mL)
Control	7.08±0.52	6.11±0.80	9.30±0.87	10.58±0.83
Pomegranate peel	5.54±0.98*	4.77±1.15*	7.65±0.41*	9.35±1.10*

* Significantly different between control and pomegranate peel at $p<0.05$ by *t*-test.

Table 8. Effect of pomegranate peel extract on single cell gel electrophoresis (comet assay) of plasma in mice fed experimental diets for 4 weeks (Mean±SD.)

	Head DNA (%)	Tail DNA (%)	Tail Extent Moment	Olive Tail Moment	Tail Length (μ m)
Control	87.93±1.49	12.07±1.49	4.02±1.17	2.39±0.42	29.94±7.56
Pomegranate peel	90.04±2.51*	9.97±2.51*	2.82±1.92*	1.79±0.74*	21.69±9.46*

* Significantly different between control and pomegranate peel at $p<0.05$ by *t*-test.

혈장 및 간의 DNA 손상에 미치는 영향은 Table 8과 같다. 체내에서 생성된 활성 산소는 체내 DNA 손상을 일으켜 산화적 스트레스와 연관된 질병을 야기한다. 따라서 체내 항산화 체계를 강화하고 DNA 손상을 억제하는 것이 중요하다. 세포내 DNA 손상 정도를 측정하는 방법으로 이제까지 사용되었던 chromosomal aberration, sister chromatid exchanges, micronuclei, 8-OHdG 분석법보다 간편하고 신속하며 민감한 방법으로 COMET(single-cell gel electrophoresis) assay가 최근 소개되고 있으며 이미 *in vitro* 연구, *in vivo* 연구뿐 아니라 DNA 손상 측정을 위한 human monitoring 방법으로서 분자 역학적으로 광범위하게 사용되고 있다(Park & Kang 2002). 혈장에서는 석류 껍질 섭취군이 대조군에 비해 tail DNA 함량과 tail length, olive tail moment, tail extent moment가 모두 유의적으로 낮아($p<0.05$) 대조군보다 혈장의 DNA 손상이 적었음을 알 수 있었다.

요약 및 결론

석류 껍질이 고지방 고콜레스테롤 식이 급여 마우스의 혈장 및 조직의 생화학적 지표에 미치는 영향을 관찰하여 석류 껍질의 항산화 효과를 평가하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다. 식이 섭취량, 체중 증가량 및 식이 효율은 석류 껍질 섭취군이 대조군에 비해 높게 나타났으나 간, 심장, 신장의 무게는 거의 유사하였다. 석류 껍질 섭취군의 복강 뒤, 복강 내, 고환 주위, 허벅지, 비장 주위의 지방 무게는 대조군보다 유의적으로 낮게 나타났다($p<0.05$). 석류 껍질 섭취군과 대조군의 혈장 내 지질 구성비는 거의 유사하여 석

류 껍질에 의한 영향은 없는 것으로 나타났다.

석류 껍질 섭취군의 간 및 혈장의 GPx, SOD 및 GST의 활성이 대조군에 비해 유의적으로 높게 나타났으며 혈장, 간, 심장 및 신장의 지질 산화도 모두 석류 껍질 섭취군이 대조군보다 유의적으로 낮게 나타났다. 혈장에서는 석류 껍질 섭취군이 대조군에 비해 tail DNA 함량과 tail length, olive tail moment, tail extent moment가 모두 유의적으로 낮게 나타났다. 따라서 석류 껍질 섭취는 고지방식이 mice의 조직 및 혈장의 항산화계 효소체계를 향상시켰으며 지질과 DNA의 산화적 손상을 억제하였다.

감사의 글

이 논문은 2005년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구 조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원(과제번호 : KRF-2005-204-C00105)을 받아 연구되었으며, 지원에 감사드립니다.

문헌

- Ames BM, Shigena MK, Hagen TM (1993) Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci* 90: 7915-7922.
- Aviram M, Dornfeld L, Rosenblat M, Volkova N, Kaplan M, Coleman R, Hayek T, Presser D, Fuhman B (2000) Pomegranate juice consumption reduces oxidative stress atherogenic modifications to LDL, and platelet aggregation: studies in humans and in atherosclerotic apolipoprotein E deficient

- mice. *Am J Clin Nutr* 71: 1062-1076.
- Bidlack WT, Tappel AL (1973) Damage to microsomal membrane by lipid peroxidation. *Lipids* 8: 177-182.
- Gil MI, Tomás-Bárberan FA, Hess-Pierce B, Holcroft DM, Kader AA (2000) Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J Agric Food Chem* 48: 4581-4589.
- Guo CJ, Yang JJ, Wei Y, Li YF, Xu J, Jiang YG (2003) Antioxidant activities of peel pulp and seed fractions of common fruits as determined by FRAP assay. *Nutr Research* 23: 1719-1726.
- Halliwell B, Murcia MA, Chirico S, Aruoma OI (1995) Free radicals and antioxidants in food and vivo: what they do and how they work. *Crit Rev Food Sci Nutr* 35: 7-20.
- Kaplan M, Hayek T, Raz A, Coleman R, Domfeld L, Vaya M (2001) Pomegranate juice supplementation to atherosclerotic mice reduces macrophage lipid peroxidation, cellular cholesterol accumulation and development of atherosclerosis. *J Nutr* 131: 2082-2089.
- Kim SH, Kim IH, Kang BH, Cha TY, Lee JY, Lee JH, Rim SO, Song KS, Song BH, Kim JG, Lee JM (2005a) Analysis of extraction characteristics of phytoestrogen components from *Punica granatum* L. *J Korean Soc Appl Bio Chem* 48: 352-357.
- Kim SJ, Bok SH, Lee SK, Kim HJ, Lee MK, Park YB, Choi MS (2005b) Anticholesterlemic effect of 3,4-di(OH)-phenylpropionic amides in high-cholesterol fed rats. *Toxicology Applied Pharmacology* 208: 29-36.
- Kwak HM, Jeong HH, Sohng BH, Kim JG, Lee JM, Hur JM, Song KS (2005) Quantitative analysis of antioxidants in korean pomegranate peel(*Granati pericarpium*) cultivated in different site. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 48: 431-434.
- Li Y, Guo C, Yang J, Wei J, Xu J, Cheng S (2006) Evaluation of antioxidant properties of pomegranate peel extract in comparison with pomegranate pulp extract. *Food Chem* 96: 254-260.
- McCord JM, Fridovich I (1988) Superoxide dismutase : The first twenty years (1968 - 1988). *Free Radical Biol Med* 5: 363-369.
- Nasr CB, Ayed N, Metche M (1996) Quantitative determination of the polyphenolic content of pomegranate peel. *Zeitschrift Fur Lebensmittel Untersuchung Und Forschung* 203: 374-378.
- Negi PS, Jayaprakasha GK, Jena BS (2003) Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts. *Food Chem* 80: 393-397.
- Park EJ, Kang MH (2002) Application of the alkaline comet assay for detecting oxidative DNA damage in human biomonitoring. *Korean J Nutr* 35: 213-222.
- Pinto MC, Mata AM, Lopes-Barea J (1984) Reversible inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* glutathione reductase under reducing conditions. *Arch Biochem Biophys* 228: 1-12.
- Proctor PH (1992) Free radicals and human disease. In handbook of free radicals and antioxidants in medicine. Vol 1, CRC Press, Boca Raton, FL pp 17.
- Schubert SY, Lansky EP, Neeman I (1999) Antioxidant and eicosanoid enzyme inhibition properties of pomegranate seed oil and fermented juice flavonoids. *J Ethnopharmacol* 66: 11-17.
- Seeram N, Lee R, Hardy M, Heber D (2005) Rapid large scale purification of ellagitannins from pomegranate peel, a by product of the commercial juice industry. *Separ Purif Technol* 41: 49-55.
- Shim SM, Choi SW, Bae SJ (2001) Effects of *Punica granatum* L. fractions on quinone reductase induction and growth inhibition on several cancer cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 30: 80-85.
- Singh R, Murthy KC, Jayaprakasha G (2002) Studies on the antioxidant activity of pomegranate(*P. granatum*) peel and seed extract using *in vitro* models. *Agric Food Chem* 50: 81-86.
- Tappel AL (1978) Glutathione peroxidase hydroperoxides. In: Methods in enzymology(Fleischer S & Packer L eds). Academic Press New York 52: 506-523.

(2006년 5월 23일 접수, 2006년 8월 9일 채택)