

배무채 에탄올층의 D-galactosamine 간손상에 대한 보호효과

이연희 · 이은옥 · 이효정 · 심범상 · 안규석 · 최종원¹ · 이수성² · 윤병수³ · 김성훈*

경희대학교 한의과대학, 1: 경성대학교 약학과, 2: 중앙대학교 바이오브리딩 연구소, 3: 경기대학교 생물학과

Hepatoprotective Effect of Ethanol Extract of *xBrassicaraphanus* on Liver Injury in Rats Treated by D-galactosamine

Yun Hee Rhee, Eun-ok Lee, Hyo-Jung Lee, Bum-Sang Shim, Kyoo Seok Ahn, Jong Won Choi¹, Soo-Seong Lee², Byong Su Yoon³, Sung Hoon Kim*

Oriental Medical College, Kyunghee University, 1: College of Pharmacy, Kyongsung University, 2: Biobreeding Institute Chungang University, 3: Department of Biology, Kyonggi University

The protective effect of *xBrassicoraphanus* (BR) on liver injury was evaluated in the rats with liver injury induced by i.p. injection of D-galactosamine (GalN) following 2 week oral treatment of ethanol extract of *xBrassicoraphanus* (EBR). EBR (200 mg/kg) significantly suppressed the levels of ALT, AST, SDH, γ -GT, ALP, LDH and lipid peroxidation compared with GalN treated control, while EBR at 100 mg/kg significantly suppressed AST and γ -GT. Similarly, EBR at 200 mg/kg significantly attenuated the levels of Phase I enzymes such as XO, AO, AH and AD as well as significantly increased the levels of Phase II enzymes such as SOD, catalase and GSH-Px in the GalN treated rats. Taken together, these results indicate that the ethanol extract of *xBrassicoraphanus* may have a hepatoprotective effect against GalN induced liver injury, suggesting the ethanol extract of *xBrassicoraphanus* can be applied as hepatoprotective functional food. However, its mechanism should be further studied in molecular and cellular view points.

Key words : *xBrassicoraphanus*, galactosamine, liver injury, hepatoprotective effect

서 론

배무채(*xBrassicaraphanus*)는 무와 배추의 교배와 약배양을 통해 육성된 새로운 속간식물이다. '배무채'는 배추와 무의 염색체를 모두 가지고 있고, 90일 이상 재배하면 배추와 같이 통이 얇으며 속잎이 노랑고 소형무 정도 비대한 뿌리를 가지는 특성이 있다. '배무채'는 저온 장일에서 꽃눈이 형성되고 고온 장일에서 추대되므로 봄과 여름에는 성숙식물체 재배가 어려우나 열무와 같이 이용할 경우 재배가 가능하여 무가온 시설이나 노지에서 겨울을 제외한 연중재배가 가능하다. 또한 '배무채'의 맛은 무, 배추와 다른 매운 맛이 나며 김치를 담그면 중류 부분에 수분함량이 많아 시원하면서 아삭아삭하여 김치재료로 사용이 가능하다고 알려져 있다¹⁾. 배추(*Brassica campestris* L)는 한약명이 菘菜(송채)로서 맛이 달고 “消食下氣 清利腸胃 去胸中熱 除消渴 解

酒毒”라 하여 소화작용이 있고 위장과 가슴의 소모성 열을 제거하며, 갈증과 주독(酒毒)을 풀어주는 효과²⁾ 또한 있다고 알려져 있고, 십자화과(Cruciferous vegetable)의 대표적 식물로써 우리나라에서 김치의 형태로써 가장 많이 섭취되고 있다³⁾.

배추의 효능에 대한 연구로는 항암⁴⁾, 항혈전 및 항산화⁵⁾ 효과가 주로 보고되고 있다. 무(*Raphanus sativus* L)는 삼국시대 이래 재배되어 왔는데, 이집트의 파라오부터 비타민을 돕는 디아스타제와 무기염류 및 섬유질이 있고 특히 항암성이 있는 isothiocyanate의 매운 맛을 가지고 있는 기능성 채소로 많이 활용되고 있는데⁶⁾, 실험적으로도 간보호작용⁷⁾, 항암⁸⁾ 및 항산화효과⁹⁾ 등이 보고된 바 있다. 이에 배추와 무의 자연교잡종인 배무채도 보다 효과적인 보간 효과가 기대 되지만 이를 확인하는 연구는 아직 이루어 지지 못하였다. 이에 배무채의 보간효과를 평가하기 위하여 D-galactosamine으로 간 독성을 유발한 흰쥐의 in vivo 실험에서, 혈청중의 ALT, AST, SDH, γ -GT, ALP, LDH, 간 조직의 lipid peroxide 및 phase I, II 해독효소 등의 활성을 평가하여 유의한 결과를 얻어 보고하는 바이다.

* 교신저자 : 김성훈, 서울시 동대문구 회기동 1, 경희대학교 한의과대학

· E-mail : sungkim7@khu.ac.kr, · Tel : 02-961-9233

· 접수 : 2007/11/22 · 채택 : 2007/11/22

재료 및 방법

1. 검액의 제조

본 시험에 사용된 배무채 (*x Brassicoraphanus*; BR)는 중앙대학교 Biobreed Institute에서 공급받아 에탄올로 실온에서 추출하여 여과하고, rotary evaporator로 농축하였다. 배무채 시료는 10% Tween 80에 용해한 후 생리식염수로 희석하여 실험동물에 100, 200 mg/kg을 투여하였다. 대조군은 동일량의 상기의 용매를 사용하였다.

2. 시약 및 기기

시약중 NAD, NADH, NADPH, aminopyrine, aniline HCl, D-galactosamine, silymarin 및 bovine serum albumin은 Sigma제, malondialdehyde는 Aldrich제, reduced glutathione, oxidized glutathione은 Fluka제, p-aminophenol, 및 thiobarbituric acid는 Katayama제, 또한 kit 시약 중 aminotransferase, γ -glutamyltransferase는 영동제약제, sorbitol dehydrogenase, lactate dehydrogenase는 Sigma제를 사용하였으며, 그외 시약은 특급 및 일급을 사용하였다.

실험에 사용한 기구는 생화학 분석장비 (Hitachi 7600-110), 혈액분석기(Coulter GEN-S), UV-spectrophotometer(Shimadzu, UV-240), refrigerated centrifuge(Beckman J2-21), ultracentrifuge(Hitachi, 65-P7) 및 cold laboratory chamber(Korean manhattan, KMC-8512) 등이었다.

3. 실험동물

(주) BioLink로부터 분양받아 동물사내의 명암 (12시간 light/dark cycle), 습도 (55~60%) 및 온도 (24±2℃)는 자동으로 조절되는 Environmental controlled rearing system (대중기기)을 사용하여 2주 가량 충분히 적응시켜 사육한 체중 20±2 g의 ICR계 웅성 생쥐 및 체중 200±10 g의 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐를 사용하였고, 실험 시간 전 24시간 동안 물만 주고 절식하였다. 이때 효소 활성의 일중 변동을 고려하여 실험동물을 일정 시간 (오전 10:00-12:00) 내에서 처치하였다.

4. 간질환 모델 동물

D-galactosamine 간염 - 실험동물에 생리식염수로 용해시킨 D-galactosamine · HCl (GalN)을 400 mg/kg씩 복강내로 투여하고 24시간 경과후 채혈하여 원심분리후 혈청을 취하여 ALT, AST, γ -GT, SDH 및 LDH의 활성을 측정하였다. 각시험 물질은 GalN 투여하기전 2주일전에 10% tween 80용액에 용해시켜 경구투여하였다.

5. 채혈 및 혈청 분리

동물을 CO₂ gas로 가볍게 마취시킨 후, 복부 정중선을 따라 개방하고 복부 대동맥에서 혈액을 채취한 전혈을 실온에서 30분간 방치하여 응고시킨 다음, 원심분리기로 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 분리시켜 실험에 사용하였다.

6. 혈청중 효소활성의 측정

1) Aminotransferase (AST, ALT)의 측정

Reitman과 Frankel의 방법에 준하여 조제된 kit를 사용하여 alanine transaminase(100 ml 당 DL-alanine 1,780 mg 및 α -ketoglutaric acid 29.2 mg 함유), aspartate transaminase(100 ml 당 L-aspartic acid 2,660 mg 및 α -ketoglutaric acid 29.2 mg 함유) 기질액 1.0 ml를 37℃에서 5분간 preincubation 시킨후 혈청 0.2 ml를 넣어 37℃에서 alanine transaminase는 30분, aspartate transaminase는 60분간 반응 시킨후 정색시액 (2,4-dinitrophenylhydrazine, 19.8 mg/100 ml 함유) 1.0 ml를 첨가하고 0.4N-NaOH 용액 1.0 ml를 가하여 혼합한 후 10분간 실온에서 방치하고 파장 505 nm에서 흡광도를 측정하여 활성도를 표준검량선에 준하여 혈청 1 ml당 Karmen unit로 표시하였다.

2) Sorbitol dehydrogenase (SDH)의 측정

0.2 triethanolamine HCl buffer (pH 7.4), 12 mM NADH (in 1% NaHCO₃) 및 혈청 0.25 ml를 첨가하여 25℃에서 30분간 반응시키고, 즉시 4 M fructose를 넣어 파장 340 nm에서 흡광도를 읽고 이 반응액을 다시 25℃에서 3분간 방치후의 흡광도 차이를 측정한후 NADH가 3분 동안 fructose에 의해 NAD로 산화된 감소량을 ml당 mU로 표시하였다.

3) γ -Glutamyltransferase (γ -GT)의 측정

40 mmol glycylglycine을 함유하는 완충액 (pH 8.2)의 반응액에 효소원을 가하여 405 nm에서 흡광도를 측정하여 p-nitroaniline 형성율을 관찰하여 효소활성을 측정하였다.

4) Alkaline phosphatase (ALP)의 측정

Kind와 King의 방법에 따라 kit시약으로 측정하였다. 즉 기질인 phenyl phosphate가 함유된 0.05 M carbonate buffer(pH 10.0) 2.0 ml를 37℃에서 3분간 preincubation한 후 혈청 0.05 ml를 가한 후 37℃에서 15분간 반응시킨 후 발색 및 반응 종료의 목적으로 발색시약을 첨가하고서 500 nm에서 흡광도를 읽고 표준검량선에 준하여 효소의 활성도를 산정하였다.

5) Lactate dehydrogenase (LDH)의 측정

Berga와 Boida의 방법에 따라 조제된 kit를 사용하였다. 즉 기질액 (100 ml당 lithium lactate 2.31 g 및 tris (hydroxymethyl) aminomethane 2.42 g 함유)과 정색시액 (100 ml당 NAD 574 mg 및 1-methylphenassium metalsulfate 3.4 ml 함유)을 1:1로 혼합하여 37℃에서 5분간 preincubation후에 시료를 가하여 잘 혼합하고 37℃에서 10분간 방치하여 염산으로 반응을 종료시켜 파장 570 nm에서 흡광도를 읽고 표준곡선에 준해 그 활성도를 측정하였다.

7. 간조직중 지질과산화물의 함량 측정

간 조직 1 g당 9배량의 생리식염수를 가해 마쇄하고 이 마쇄액에 8.1% sodium dodecyl sulfate와 20% acetate buffer (pH 3.5) 및 발색의 목적으로 0.8% thiobarbituric acid를 가한후 95℃에서 1시간 동안 반응 시킨후 실온에서 냉각시켜 n-BuOH: Pyridine(15:1)을 첨가하여 15분간 원심분리 시킨후 홍색의 n-BuOH : pyridine층을 취하여 파장 532 nm에서 그 흡광도를 측정하여 표준곡선에서 그 함량을 표시하였다.

8. 간장 효소원의 분리

실험동물을 CO₂ gas로 가볍게 마취시킨 후, 복부 대동맥에서 채혈하여 실험사 시키고 간장을 생리식염수로 관류시켜 조직 내 혈액을 제거하고 간장을 적출하여 생리식염수로 씻은 다음 여지로 간에 남아 있는 혈액 및 기타 이물질을 제거한 다음 건조적 1 g 당 4배 양의 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4)를 가하여 병냉상에서 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. 이 마쇄액을 냉장 원심분리기로 600 xg에서 10분간 원심분리하여 핵 및 미마쇄 부분을 제거한 상정액을 고속 원심분리기로 10,000 xg에서 20분간 원심분리한 후, 그 침전물은 동량의 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4) 용액을 가하여 현탁시킨 시료액을 다시 10,000 xg에서 30분간 원심분리한 상정액은 다시 105,000 xg에서 60분간 초고속 원심분리하여 얻은 상정액을 cytosolic 분획으로 하여 효소활성 측정용으로 사용하였으며, 다시 그 침전물에 동량의 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.4) 용액을 가하여 현탁시킨 시료액을 다시 105,000 xg에서 60분간 재 원심분리하여 microsomal 분획으로 하여 aniline hydroxylase의 활성 측정용 효소원으로 사용하였다.

9. 간조직중 glutathione 및 효소활성 측정

1) glutathione (GSH)정량

10% 간조직 1 ml에 1 mM EDTA가 함유된 5% trichloroacetic acid를 가하여 원심분리한 후 상등액 0.5 ml를 취하여 0.5 ml ninhydrin 시약을 가한후 10분간 가열하여 냉수에 냉각하고서 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이곳에서 non-protein-SH에서 cysteine을 재한값을 glutathione의 양으로하였다.

2) γ -Glutamylcystein synthetase (γ -GCS)의 활성 측정

Meister와 Richman의 방법에 준하여 반응액 3.5 ml중 0.1 M tris HCl buffer(pH 8.0), 8.9 mM L-glutamic acid, 0.94 mM EDTA, 3.2 mM MgCl₂, 1.35 mM ATP와 효소액 (100-300 μ g 단백질)을 가하여 37°C 에서 10분 반응시킨 후 spectrophotometer를 이용하여 흡광도 600 nm에서 효소의 활성을 측정하였다.

3) Glutathione reductase (GR)의 활성 측정

반응액 3.0 ml중 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 7.5), 0.94 mM EDTA, 4.6 mM oxidized glutathione, 0.16 mM NADPH 및 효소액(400-600 μ g 단백질)을 가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 340 nm에서 NADPH의 감소되는 양을 측정하였다.

4) Xanthine oxidase (XO)활성

0.1 M KP buffer (pH 7.5)에 효소액을 가하고 기질로서 sodium xanthine을 가한후 반응시키고 20% TCA로 제단백한 후 생성된 uric acid를 292 nm에서 측정하고 표준검량선에 준하여 활성도를 산정하였다.

5) Aminopyrine demethylase (AD)의 활성 측정

반응액 2 ml중 0.1 M Na⁺/K⁺ phosphate buffer (pH 7.5)에 2 mM aminopyrine . HCl, 0.5 mM NADPH, 10 mM MgCl₂, 150 mM KCl, 1 mM semicarbazide 및 효소액 (30-400 μ g의 단백질)을 가해 이 반응액을 37°C에서 30분간 반응시킨 다음 15% ZnSO₄와 포화 Ba(OH)₂를 가하여 반응을 종료 시키고 5분간 방

치후 10분간 원심분리하여 여기서 얻은 상등액 5 ml에 발색의 목적으로 Nash reagent를 첨가하고 60°C에서 30분간 반응 시킨 후 다시 원심분리하여 상정액을 취하여 파장 415 nm에서 그 흡광도를 측정하고 표준곡선에 준하여 활성도를 산정하였다.

6) Aniline hydroxylase (AH)의 활성 측정

반응액 2 ml중 10 mM MgCl₂와 150 mM KCl이 함유된 50 mM Tris. HCl 완충액 (pH 7.4)에 기질인 1 mM aniline HCl, 0.5 mM NADPH 및 효소액 (300-400 μ g의 단백질)을 가하여 이액을 37°C에서 20분간 반응 시킨 다음 반응을 종료시킬 목적으로 20% trichloroacetic acid를 가한후 10분간 원심분리 하여 상정액에 발색의 목적으로 10% Na₂CO₃와 0.2 N-NaOH (2% phenol 함유)를 넣고 37°C에서 30분간 반응 시킨 후 파장 640 nm에서 그 흡광도를 읽고 표준곡선에서 활성도를 산정하였다.

7) Glutathione S-transferase (GST)의 활성 측정

반응액 3.5 ml에 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.5)에 1 mM glutathione, 1 mM 1-chloro 2,4-dinitrobenzene 및 0.1 ml 효소액을 가하여 25°C에서 2분간 반응 시킨 후 이때 생성되는 thioether를 340 nm에서 흡광도의 변화를 읽고 흡광계수 9.6 mM⁻¹cm⁻¹을 이용하여 효소의 활성도를 산정하였다.

8) Superoxide dismutase (SOD)의 활성 측정

SOD 는 가장 중요한 항산화효소의 하나로 superoxide anion 을 hydrogen peroxide 와 산소분자로 변화 시키는 작용을 하는 효소로 알려져 있다. 우선 nitrite 생성 mixture는 15 mM xanthine, 10 mM hydroxylammonium chloride, 65 mM phosphate buffer (pH 7.8), distilled water와 xanthine oxidase를 혼합하여 사용하였다. 2차 조직 분획 100 μ l에 mixture solution 를 100 μ l를 혼합한 후에 25°C에서 20분간 인큐베이션 하였다. 0.5 ml의 sulfanilic acid (3.3 mg/ml)과 0.5 ml α -naphthylamine (1 mg/ml)을 넣고 20분간 상온에서 인큐베이션 했다. 530 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 표준품을 사용하여 검량표준곡선을 작성하고, 이를 이용하여 피조직내 SOD의 활성을 계산하였다.

9) Catalase 의 활성 측정

Catalase는 SOD에 의해서 발생하는 과산화수소(H₂O₂)를 제거하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이를 측정하기 위해서 2차 조직 분획 100 μ l에 1 mM EDTA를 함유한 50 mM potassium phosphate buffer (pH7.0) 100 μ l를 넣고 10,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상정액을 취하여 샘플을 준비 하였다. 준비된 샘플 10 μ l에 30 μ l 메탄올과 100 μ l의 100 mM potassium phosphate (pH 7.0)를 첨가 한 후에 다시 20 μ l의 hydroxide peroxide (3.25 M)를 multichannel auto pipette을 이용하여 첨가 하고 상온에서 20분간 인큐베이션 시켰다. 그후 10 M potassium hydroxide (KOH) 30 μ l를 첨가 한후에 30 μ l의 purpald solution을 넣고 상온에서 10분간 흔들여 주었다. 그 후에 potassium periodate 10 μ l를 넣어주고 상온에서 5분 동안 인큐베이션 후에 540 nm에서 흡광도를 측정하여 catalase의 활성을 측정 하였다. Catalase 표준품을 사용하여 검량표준곡선을 작성하고, 이를 이용하여 피조직내 catalase의 양을 계산하였다.

10) Glutathione peroxidase (GSH-Px)의 활성 측정

GSH-Px는 과산화수소를 glutathione의 존재 하에 물로 대사시켜 산화형 glutathione을 생성한다. 2차 조직 분획 100 μ l에 assay buffer (50 mM potassium phosphate buffer pH 7.0, in 0.4 mM PMSF, 0.1% TritonX-100) 300 μ l를 넣고, 10,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 그 상층액을 취했다. 그리고 reaction mixture solution은 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)에 1 mM EDTA, 1 mM sodium azide, 1 U/ml oxidase GSH reductase, 1 mM oxidase GSH와 0.2 mM NADPH를 첨가하여 mixture solution을 만들었다. 상층액 100 μ l에 reaction mixture 800 μ l을 넣고, 20°C에서 5분간 인큐베이션 하였다. 그리고 2.2 mM의 H₂O₂를 100 μ l를 첨가 하였다. 즉시 340 nm에서 3분간 흡광도를 측정하였다. 활성도는 보정계수 6.33 \times 10⁻³로 환산하여 나타내었다.

10. 단백질 정량

단백질의 함량은 Lowry^등10)의 방법에 준하여 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 측정하였다.

11. 통계처리

모든 데이터는 평균 \pm S.D.로 표시하였고, ANOVA test를 통하여 통계적 유의성은 Duncan's multiple rage test로서 검정하였으며, p<0.05일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

1. 배무채 에탄올층이 혈청의 효소활성에 미치는 영향

배무채 에탄올층이 간손상 보호효과가 있는지 평가하기위해 D-galactosamine (GalN)으로 흰쥐에 간독성을 유발하였다. 이후 혈청을 분리하여 효소활성을 측정한 결과, ALT, SDH, ALP와 LDH는 배무채 에탄올층 200 mg/kg 처리군에서 GalN 처리대조군과 비교하여 유의적으로 저해활성을 나타내었고, ASL와 γ -GT는 배무채 에탄올층 100과 200 mg/kg 처리군 모두에서 유의적으로 저해활성을 나타내었다(Fig. 1).

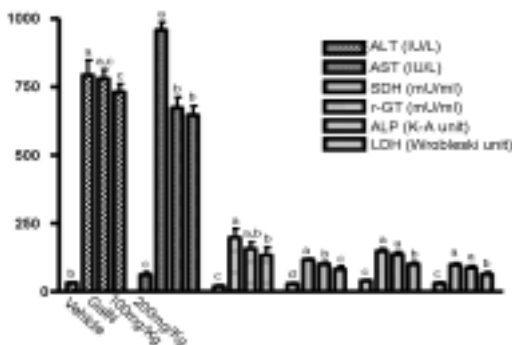


Fig. 1. Effect of pretreated of *xBrassicaraphanus* on the serum enzyme activities in D-galactosamine - induced hepatitis rats. Rats were orally peradministered *xBrassicaraphanus* daily for unsecutive two weeks and then intraperitoneally injected D-galactosamine (GalN 400 mg/kg) for once a days. Rats were decapitated 24 h after the last treated of DWP-04. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean \pm S.D. for eight experiments. Data followed by different superscript are statistically significant by Duncan's new multiple range test (p<0.05).

2. 배무채 에탄올층이 과산화지질 함량에 미치는 영향

정상군의 간조직중의 MDA함량은 20.8 \pm 3.76로 나타났고, GalN 처리대조군에서는 119.5 \pm 21.5로 정상군에 비해 유의하게 증가하였으나, 배무채 200 mg/kg 처리군에서는 GalN 처리대조군에 비해 80.2 \pm 9.37으로 유의적으로 억제되었다(Fig. 2).

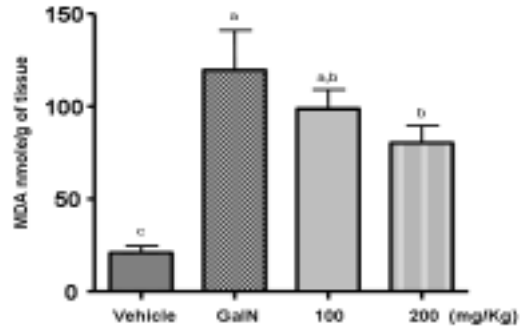


Fig. 2. Effect of *xBrassicaraphanus* on the hepatic lipid peroxide in D-galactosamine -intoxicated rats. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean \pm S.D. for eight experiments. Data followed by different superscript are statistically significant by Duncan's multiple range test (p<0.05).

3. 배무채 에탄올층이 glutathione함량 및 γ -GCS과 GR효소 활성에 미치는 영향

간조직으로 효소원을 분리하고, glutathione함량 및 γ -GCS과 GR효소 활성을 측정하였다. 결과 Fig. 3에서 보듯이 GalN 처리대조군과 배무채 에탄올 처리군간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다(Fig. 3).

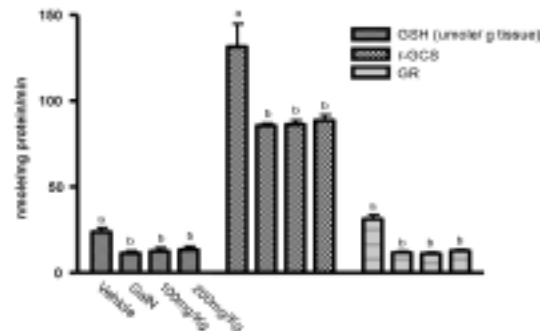


Fig. 3. Effect of *xBrassicaraphanus* on the glutathione content and glutathione synthesis D-galactosamine-intoxicated rats. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean \pm S.D. for eight experiments. Data followed by different superscript are statistically significant by Duncan's multiple range test (p<0.05).

4. 배무채 에탄올층이 간조직중에 phase I 해독화 효소 활성에 미치는 영향

GalN으로 간독성을 유발한 흰쥐에서 간조직의 효소원을 분리하여 phase I 해독화 효소 활성에 미치는 영향을 평가하였다. GalN 처리대조군은 XO, AO, AH, AD효소가 각각 13.30 \pm 3.42, 56.78 \pm 7.03, 3.87 \pm 0.13, 9.26 \pm 0.58로 정상군에 비해 유의적으로 증가하였고, 이는 배무채 에탄올층 200 mg/kg을 처리하였을 때 각각 9.6 \pm 2.16, 43.27 \pm 6.11, 3.46 \pm 0.21, 8.12 \pm 0.68로 GalN 처리대조군

에 비해 유의적으로 저해함을 확인하였다(Fig. 4).

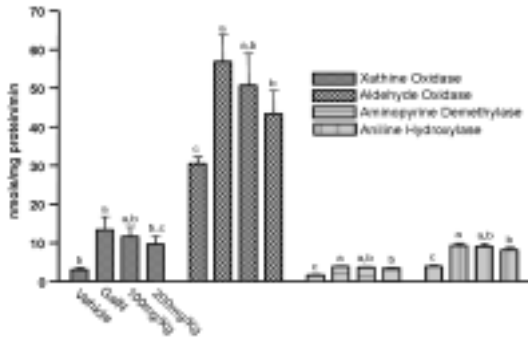


Fig. 4. Effect of *xBrassicaraphanus* on phase I enzyme system activities in D-galactosamine-intoxicated rats. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean \pm S.D. for eight experiments. Data followed by different superscript are statistically significant by Duncan's multiple range test ($p < 0.05$).

5. 배무채 에탄올층이 간조직중에 phase II 해독화 효소 활성에 미치는 영향

GalN으로 간독성을 유발한 흰쥐에서 간조직의 효소원을 분리하여 phase II 해독화 효소 활성에 미치는 영향을 평가하였다. GalN 처리대조군은 SOD, catalase, GSH-Px 효소가 각각 2.23 ± 0.77 , 18.40 ± 3.17 , 5.28 ± 0.24 로 정상군에 비해 유의적으로 감소하였는데, 배무채 에탄올층 200 mg/kg을 처리하였을 때 각각 43.75 ± 0.49 , 27.75 ± 1.45 , 7.96 ± 0.55 로 GalN 처리대조군에 비해 유의하게 증가되었다. GST 효소활성은 GalN 처리대조군과 배무채 처리군과는 아무런 유의적인 차이를 나타내지 않았다(Fig. 5).

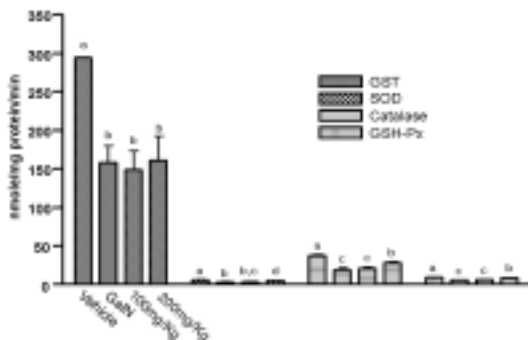


Fig. 5. Effect of *xBrassicaraphanus* on phase II enzyme system activities in D-galactosamine-intoxicated rats. The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean \pm S.D. for eight experiments. Data followed by different superscript are statistically significant by Duncan's multiple range test from normal ($p < 0.05$).

고찰

간질환은 음주, 흡연, 스트레스, 약물 등 여러 가지 요인에 의해 야기되며, 간과 관련된 질환의 발병률은 우리나라에서 높게 나타나고 있고, 이를 극복할 목적으로 천연물을 이용한 연구가 많이 진행되고 있다¹¹⁻¹³). 본 연구에서는 무와 배추의 교배와 약배양을 통해 육성된 새로운 속간식물인 배무채를 이용하여 간독성

에 대한 보호효과를 살펴보았다.

Galactosamine (GalN)은 galactose 대사장애를 통해 간세포의 지방변화, 염증세포 침윤 및 간세포의 괴사 등의 간염과 유사한 간독성을 유발한다¹⁴⁻¹⁶). 이는 GalN 처리대조군에서 ALT, AST, SDH, γ -GT, ALP와 LDH가 모두 정상군에 비해 유의적으로 증가하여 GalN이 간독성을 유발함을 확인하였다. 반면 배무채를 전처리한 군에서는 GalN로 유발된 간독성을 현저히 감소시킴을 확인하였다(Fig. 1). Fig. 2에서 보듯 GalN은 정상군에 비해 지질과산화산물인 MDA의 형성을 유도하는데, 이 지질과산화산물은 oxygen radical과 반응하여 형성된 것으로 결국은 세포를 손상시켜 기능을 저하시키고 조직손상, 노화, 염증 및 발암 등 여러 가지 병리적인 현상을 야기한다¹⁷⁻²⁰). 본 연구결과에서는 배무채가 GalN으로 유도된 지질과산화물의 함량을 현저히 감소시킴을 확인하여 세포의 손상보호에 효과적이라 사료된다(Fig. 2). 또한 배무채가 지질과산화물 생성을 감소시키는 기전을 연구하기 위해 생체방어기전인 phase I, II 해독화 효소와 항산화효소에 관하여 평가하였다. Phase I 해독화 효소인 XO, AO, AD와 AH는 정상군에 비해 GalN에 의해 활성이 증가하였고, 이를 배무채가 감소시킴을 확인하였다(Fig. 4). 또한 phase II 해독화 효소인 GST, SOD, catalase와 GSH-Px는 항산화효소로 잘 알려져 있는데, 이 효소들은 GalN에 의해 활성이 정상군보다 감소하였으며, 배무채는 SOD, catalase와 GSH-Px의 효소활성을 현저히 증가시켰다. 이상의 결과로써 배무채가 phase I과 II에 관여하는 해독화 효소들의 활성을 조절함으로써 지질과산화물의 생성을 저해함을 알 수 있었다. 따라서 배무채는 GalN으로 유도된 간독성을 감소시켜 보간효능이 있음을 확인하였다.

결론

배무채 에탄올층이 간손상 보호효과가 있는지 평가하기 위해 배무채 에탄올 추출액을 2주간 경구투여하고 D-galactosamine (GalN)으로 흰쥐에 간독성을 유발하였다. 이후 혈청을 분리하여 간기능 수치를 측정된 결과, GalN은 정상군에 비해 유의하게 모든 간기능검사 수치를 증가시켜 간독성을 유발함을 확인하였다. 이에 ALT, SDH, ALP와 LDH는 배무채 에탄올층 200 mg/kg 처리군에서 GalN 처리대조군과 비교하여 유의적으로 저해활성을 나타내었고, ASL와 γ -GT는 배무채 에탄올층 100과 200 mg/kg 처리군 모두에서 유의적으로 저해활성을 나타내었다. 정상군에 비해 GalN 처리대조군에서 지질과산화물의 함량이 유의적으로 증가하였고, 이는 배무채 200 mg/kg 처리군에서 GalN 처리대조군에 비해 80.2 ± 9.37 로 유의적으로 억제되었다. 간조직으로 효소원을 분리하고, glutathione함량 및 γ -GCS과 GR효소 활성을 측정된 결과 GalN 처리대조군과 배무채 에탄올 처리군에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 간조직의 효소원을 분리하여 phase I 해독화 효소 활성에 미치는 영향을 평가하였다. GalN 처리대조군은 XO, AO, AH, AD효소가 모두 정상군에 비해 유의적으로 증가하였고, 이는 배무채 에탄올층 200 mg/kg을 처리하였을 때 각각 9.6 ± 2.16 , 43.27 ± 6.11 , 3.46 ± 0.21 , 8.12 ± 0.68 로 GalN 처

리대조군에 비해 유의적으로 저해함을 확인하였다. 또한 간조직의 효소원에서 phase II 해독화 효소 활성에 미치는 영향을 평가한 결과 GalN 처리대조군은 SOD, catalase, GSH-Px효소가 각각 2.23 ± 0.77 , 18.40 ± 3.17 , 5.28 ± 0.24 로 정상군에 비해 유의적으로 감소하였는데, 배무채 에탄올층 200 mg/kg을 처리하였을 때 각각 43.75 ± 0.49 , 27.75 ± 1.45 , 7.96 ± 0.55 로 GalN 처리대조군에 비해 유의하게 증가되었다. 한편 GST효소활성은 GalN 처리대조군과 배무채 처리군과는 아무런 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 이상의 결과로 보아 배무채 에탄올층의 전처치는 GalN으로 야기한 간손상에 대해 유의한 보호효과가 인정되어 향후 보건 기능성 소재로 활용될 수 있을 것으로 보이나, 보다 심도 있는 연구가 지속되어야 할 것으로 사료된다.

감사의 글

본 과제는 Biogreen 21, 보건복지부의 연구비 지원에 의해 수행되었는 바 감사드립니다.

참고문헌

1. Lee, S.S. Breeding a fertile intergeneric allotetraploid plant between heading Chinese cabbage and korean radish. Kor. J. Hort. Sci. Technol. 10: 653, 1999.
2. 염태환 역편. 방약합편, 의약사, p 163, 1973.
3. Lee, J.M. Vegetable Horticultures. Hynagmunsa. pp 324-347, 2003.
4. Tan, W., Lin, D.X., Xiao, Y., Kadlubar, F., Chen, J.S. Chemoprevention of 2-amino-1-methyl-6-phenyl-midazo 4,5-b pyridine-induced carcinogen-DNA adducts by Chinese cabbage in rats. World J. Gastroenterol. 5(2):138-142, 1999.
5. Morimitsu, Y., Hayashi, K., Nakagawa, Y., Horio, F., Uchida, K., Osawa, T. Antiplatelet and anticancer isothiocyanates in Japanese domestic horseradish, wasabi. Biofactors. 13(1-4):271-276, 2000.
6. Gutiérrez, R.M., Perez, R.L. Raphanus sativus (Radish): their chemistry and biology. Scientific World J. 4: 811-837, 2004.
7. Chaturvedi, P., George, S., Machacha, C.N. Protective role of Raphanus sativus root extract on paracetamol-induced hepatotoxicity in albino rats. Int. J. Vitam. Nutr. Res. 77(1):41-45, 2007.
8. Hanlon, P.R., Webber, D.M., Barnes, D.M. Aqueous extract from Spanish black radish (*Raphanus sativus* L. Var. niger) induces detoxification enzymes in the HepG2 human hepatoma cell line. J. Agric. Food Chem. 55(16):6439-6446, 2007.
9. Takaya, Y., Kondo, Y., Furukawa, T., Niwa, M. Antioxidant constituents of radish sprout (*Kaiware-daikon*), *Raphanus sativus* L. J. Agric. Food Chem. 51(27):8061-8066, 2003.
10. Lowry, O.H., Rodebrough, N.J. Farr, A.L., Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem.. 193: 265, 1951.
11. 하배진, 이상현. 합초의 간독성에 대한 보호효과. 생명과학회지 16(1):95-100, 2006.
12. 이정규, 김나영, 한용남, 최종원. 홍삼의 전처리에 의한 사염화탄소 및 갈락토사민 유발 간독성에 대한 보호효과. 고려인삼학회지 27(1):1-10, 2003.
13. 이효정, 김관형, 이은옥, 최종원, 강경선, 윤병수, 김성훈. Chinese cabbage 잎과 뿌리가 메탄올층의 bromobenzene 간손상에 대한 보호효과. 동의생리병리학회지 17(5):1177-1181, 2003.
14. Decker, K., Keppler, D. 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, 1974
15. Wang, J., Wendel, A. Studies on the hepatotoxicity of galactosamine endotoxin or galactosamine/TNF in the perfused mouse liver. Biochem. Pharmacol. 39: 267-270, 1990.
16. El-Mofty, S.K., Scrutton, M.C., Serroni, A., Nicolini, C., Farber K.L. Early, reversible plasma membrane injury in galctosamine-induced liver cell death. Am. J. Pathol. 79: 579-595, 1975.
17. Spitteller, G. The important role of lipid peroxidation processes in aging and age dependent diseases. Mol. Biotechnol. 37(1):5-12, 2007.
18. Luczaj, W., Skrzydlewska, E. The present-day look at lipid peroxidation. Postepy Biochem. 52(2):173-179, 2006.
19. Katayama, S. Oxidative stress marker. Nippon Rinsho. 64(S) 6: 142-146, 2006.
20. Niki, E., Yoshida, Y., Saito, Y., Noguchi, N. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition, and biological effects. Biochem. Biophys. Res. Commun. 338(1):668-676, 2005.