

랫드 간세포 일차배양에서 양파 추출물이 수은에 의해 유도된 독성 및 지질과산화에 미치는 영향

임태진* · 임상철

상지대학교 생명자원과학대학 환경바이오시스템학부
(2005년 4월 15일 접수, 2005년 6월 13일 수리)

The Effects of Onion Extracts on Mercury-Induced Toxicity and Lipid Peroxidation in Rat Hepatocyte Primary Culture

Tae-Jin Rhim* and Sang-Cheol Lim (Division of Environment and Biosystem, College of Life Science and Natural Resources, Sangji University, Wonju 220-702, Korea)

ABSTRACT: The objective of present study was to investigate the effects of onion extracts on mercury-induced cytotoxicity, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in primary monolayer cultures of rat hepatocytes. Primary cultures of rat hepatocytes were incubated for 6 hr in the presence of various concentrations (0, 1, 5, 10, 30 or 50 ppm) of HgCl₂. Cytotoxicity and cell viability were determined by measuring glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) activity, lactate dehydrogenase (LDH) activity and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) value. Lipid peroxidation was evaluated using thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) assay. Effects of onion extracts on antioxidant system were determined by measuring catalase, glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione reductase (GSH-Rd) activities as well as DPPH free radical scavenging activity. HgCl₂ at the concentration of 10 ppm increased GOT activity and TBARS concentration but decreased %MTT reduction, whereas HgCl₂ at the concentration of 30 ppm increased LDH activity, representing that HgCl₂ caused cytotoxicity and lipid peroxidation in dose-dependent manner. HgCl₂ at the concentration of 30 ppm significantly decreased catalase, GSH-Px and GSH-Rd activities. When primary cultures of rat hepatocytes were incubated with various concentrations (0, 0.01, 0.05, 0.1 or 0.3 mg/ml) of onion extracts for 6 hr in the presence of 30 ppm of HgCl₂, onion extracts at the concentration of 0.05 mg/ml decreased GOT activity, but increased %MTT reduction by 30 ppm of HgCl₂. HgCl₂-induced LDH activity and TBARS concentration were decreased by onion extract at the concentration of 0.01 mg/ml. Taken together, onion extracts prevented HgCl₂-induced hepatocyte injury and lipid peroxidation. Onion extracts at the concentration of 0.1 mg/ml almost or completely inhibited HgCl₂-induced catalase and GSH-Px activities. GSH-Rd activity, however, was not affected by onion extract. Free radical scavenging activity was increased as concentration of onion extract increased. Onion extract at the concentration of 5 mg/ml possessed more than 93% scavenging activity comparing to 100% radical scavenging activity by pyrogallol solution as a reference. These results demonstrate that onion extracts suppressed mercury-induced cytotoxicity and lipid peroxidation by scavenging free radical and increasing catalase and GSH-Px activities.

Key Words: onion extracts, cytotoxicity, lipid peroxidation, antioxidant enzymes, DPPH, rat hepatocyte

서 론

수은은 수질환경보전법과 대기환경보전법에서 각각 규정한 특정수질유해물질 및 특정대기유해물질에 모두 해당된다.

수은은 체내 다양한 부위에서 독성을 나타내고¹⁾ 세포사와 피사를 유발시켜^{2,3)} 조직 장애를 초래한다고⁴⁾ 보고되고 있다. 이러한 수은 독성은 지방산화물질의 축적⁵⁾, glutathione 함량 감소^{6,7)}, DNA 손상^{8,9)} 및 reactive oxygen species 생성¹⁰⁻¹²⁾ 등과 관련이 있는 것으로 여겨진다.

*연락처:

Tel: +82-33-730-0544 Fax: +82-33-730-0503
E-mail: tjrhim@sangji.ac.kr

Catalase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase (GSH-Px), glutathione reductase(GSH-Rd)와 같은 항산화효

소들은 산화스트레스하에서 생성된 reactive oxygen species 를 소거함으로써 oxygen radical 손상에 대해 세포내 방어에 중요한 역할을 한다^{13,14}). 지금까지 수행된 in vivo 연구¹⁵⁻¹⁸) 및 in vitro 연구¹⁹)에 의하면 수은은 이들 항산화효소의 활성을 증가, 감소 또는 영향을 주지 않는 것으로 상반되게 보고되고 있다.

항산화제가 암 등을 포함한 많은 질병의 원인이 되는 free radical 손상에 대한 보호효과는 많은 관심을 일으키고 있다. 플라보노이드는 폴리페놀의 일종인 항산화제로써 다양한 구조를 가지며 식물계에 널리 분포하고 있다. 양파(*Allium cepa*)는 우리나라를 포함하여 많은 나라에서 식이 플라보노이드의 주된 공급원으로 이용되고 있다. 양파 섭취는 암 발생, 동맥경화증 또는 혈전증 등을 감소시킨다고²⁰⁻²²) 보고되고 있다. 양파의 radical 소거 효과와 항산화 효과는 주로 quercetin과 kaempferol 등의 플라보노이드에 기인하며²³⁻²⁵) 특히, quercetin은 표피 바로아래에 가장 많이 분포하고 있다고^{25,26}) 알려져 있다.

수은의 독성 및 산화에 미치는 효과에 관해 많은 연구들이 수행되어 왔지만, 양파 추출물이 수은에 의해 유도된 간독성, 산화 및 항산화 방어시스템에 대한 효과는 거의 보고된 바 없다. 간세포 일차배양은 독성물질들에 의해 유발되는 다양한 생물학적 효과들과 항산화 효과 등을 연구하는데 유용한 실험 방법이다. 따라서, 수은 중독에 대한 양파추출물의 간보호 효과를 이해하기 위해서 본 연구에서는 간세포 일차배양을 통해 양파 추출물이 HgCl₂에 의한 간세포 독성, 지질과산화 및 항산화효소 활성에 미치는 영향과 양파추출물의 free radical 소거 활성을 조사하였다.

재료 및 방법

시약

Fetal bovine serum은 Cambrex사에서 구입하였고, Hank's Balanced Salt Solution(HBSS), Williams' Medium E(WME) 및 L-glutamine은 GIBCO사에서 구입하였으며 기타 세포배양에 필요한 시약들과 생화학적 분석에 필요한 시약들은 Sigma Chemical사에서 구입하여 사용하였다.

실험동물

(주)대한바이오링크로부터 구입한 체중 180~200 g의 Sprague-Dawley 수컷 랫드를 실험동물로 사용하였다. 본 실험실에서 사료와 물은 무제한 공급하였고 1주일의 적응기간을 거친 다음 간을 적출하여 간세포배양을 실시하였다.

양파 추출

전라남도 무안군에서 생산되는 양파(천주황)를 구입하여 시료로 사용하였다. 가장 바깥쪽의 주황색을 띤 표피를 제거하여 음지에서 통풍건조한 뒤 세절하였다. 분쇄한 양파표피

15 g을 methanol(HPLC-grade)로 1시간 정도 교반한 뒤 20분 동안 ultrasonication시켰다. Methanol 추출을 2번 더 실시하여 상등액을 모두 수거하였고 여과후 evaporation시켜 최종적으로 0.8 g을 얻었다. Methanol 양파추출물은 50 mg/ml의 농도로 dimethyl sulfoxide에 녹여 실온에서 보관하였다.

1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) Scavenging Assay

DPPH free radical 소거활성은 Malterud 등²⁷)의 방법에 따라 측정하였다. DPPH 용액(45 µg/ml methanol)을 methanol-양파추출물과 혼합한 다음 5분동안 흡광도의 감소를 측정하였다. Free radical 소거활성은 pyrogallol 용액(125 µg/ml)의 흡광도 감소를 100%로 기준하여 표시하였다.

간세포배양

간세포 일차배양은 Seglen²⁸)의 collagenase perfusion 방법을 기초로 하여 다음과 같이 실시하였다. 실험동물에 urethane (1 g/kg BW)을 복강주사하여 마취시킨 뒤 37°C로 가온된 collagenase-free, Ca²⁺·Mg²⁺-free HBSS buffer를 이용하여 관류에 의해 혈액을 간으로부터 유출시킨 후 간세포를 분리하였다. 세포 생존율과 세포수를 측정된 후 세포수를 5×10⁵ cells/ml이 되도록 fetal bovine serum(10%)이 포함된 WME 배양액으로 희석하였다. Cell suspension을 6-well culture plate 또는 100-mm culture dish에 분주한 후 CO₂ incubator에 넣고 37°C에서 4시간 배양하였다. Serum-free WME 배양액으로 2번 세척한 뒤 처리용액(HgCl₂, 양파추출물)을 포함한 새로운 WME 배양액을 첨가하여 CO₂ incubator에 넣고 37°C에서 6시간 동안 배양하였다.

3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT) assay

간세포의 생존 및 증식은 MTT값에 의해 결정하였다. 배양액을 제거한 후 Mosmann²⁹)의 방법에 따라 MTT assay를 실시하였다. 처리군의 MTT값은 대조구를 100%로 기준하여 %MTT 감소로 표시하였다.

Thiobarbituric Acid Reactive Substances(TBARS) assay

지질과산화는 배양액의 TBARS 농도를 측정함으로써 결정하였다. 배양후 배양액을 채취하여 4°C에서 3,000 rpm으로 5분간 원심분리하였고, 상등액을 취하여 측정시까지 -20°C에서 보관하였다. TBARS 농도는 Uchiyama와 Mihara³⁰)의 방법을 수정한 Sunderman 등³¹)의 방법에 따라 처리군별 4반복하여 측정하였다. TBARS 농도는 532 nm에서 흡광도를 측정하여 표준용액으로 사용한 malondialdehyde 농도로 표기하였다.

효소 분석

배양후 배양액을 채취하여 4°C에서 3,000 rpm으로 5분간 원심분리하였고, 상등액을 취하여 측정시까지 -20°C에서 보관하였다. Glutamic oxaloacetic transaminase(GOT) 활성과 lactate dehydrogenase(LDH) 활성은 각각 Reitman과 Frankel³²⁾의 방법 및 Vassault³³⁾의 방법에 따라 처리군별 4반복하여 측정하였다.

Catalase, GSH-Px 및 GSH-Rd 활성을 측정하기 위해 culture dish에 부착되어 있는 세포를 PBS용액으로 세척한 다음 policeman을 사용하여 분리하였다. 수거한 세포는 균질용액(20 mM MOPS, 300 mM sucrose, 0.1 mM EDTA, pH 7.2)으로 균질한 후 원심분리에 의해 세포질 상등액을 채취하여 측정시까지 -85°C에 보관하였다. Catalase 활성은 Aebi³⁴⁾의 방법에 따라 측정하였고, 효소활성은 분당 소비되는 H₂O₂ μmol로 계산하였다. GSH-Px 활성은 Flohe와 Gunzler³⁵⁾의 방법에 따라 측정하였고, 효소활성은 분당 산화되는 NADPH nmol로 계산하였다. GSH-Rd 활성은 Carlberg와 Mannervick³⁶⁾의 방법에 따라 측정하였고, 효소활성은 분당 산화되는 NADPH nmol로 계산하였다. Catalase, GSH-Px 및 GSH-Rd 활성은 각각 처리군별 4반복하여 측정하였으며, mg 단백질당 표기하였다.

단백질 정량

단백질 함량은 bovine serum albumin(BSA)을 표준시약으로 사용하여 Bradford³⁷⁾의 방법에 따라 측정하였다.

자료분석 및 통계처리

처리군별 %MTT 감소, TBARS 농도, 효소 활성 및 free radical 소거 활성들은 일원 분산분석을 사용하여 조사하였으며, 처리효과가 인정되는 경우 처리군별 평균값의 차이는 Student-Newman-Keuls' test³⁸⁾를 사용하여 p<0.05에서 유의성을 조사하였다.

결과 및 고찰

HgCl₂의 간세포 독성 및 산화효과를 조사하기 위해 0, 1, 5, 10, 30 및 50 ppm 농도의 HgCl₂로 6시간 동안 간세포를 배양하였다. 다양한 농도의 HgCl₂가 간세포 손상 및 지질과산화에 미치는 효과는 Table 1과 같았다. 10 ppm의 HgCl₂ 농도로 처리하였을 경우 GOT 활성은 현저히 증가되어 간손상이 유발되었음을 알 수 있었으며, HgCl₂ 농도가 증가할수록 GOT 활성은 더욱 더 증가하였다. 30 ppm의 HgCl₂ 농도로 처리하였을 경우 LDH 활성은 현저히 증가되어 세포막 손상이 유발되었음을 알 수 있었으며, HgCl₂ 농도가 증가함에 따라 LDH 활성은 더욱 더 증가하였다. 5 ppm의 HgCl₂ 농도로 처리하였을 경우 MTT 감소가 억제되었다. HgCl₂ 농도가 증가할수록 MTT 감소를 현저히 억제시켜 농도 의존적으로 세포 손상을 증가시켰음을 알 수 있었다. 10 ppm의 HgCl₂ 농도로 처리하였을 경우 TBARS 농도는 현저히 증가되어 지질과산화가 증가되었음을 알 수 있었으며, HgCl₂ 농도가 증가할수록 TBARS 농도는 더욱 더 증가하였다. 따라서, HgCl₂는 농도 의존적으로 간세포 손상과 지질과산화를 촉진시켰다. 6시간 동안 간세포 배양에서 HgCl₂ 처리에 따른 LDH 활성과 TBARS 농도간 및 MTT 감소와 TBARS 농도간의 상관분석을 실시한 결과 각각 세포 생존율과 지질과산화간 매우 밀접한 상관관계(Pearson 상관계수=0.980 및 -0.960, p<0.01)가 있음이 나타났다. 수은이 간세포 독성을 증가시킨 본 연구결과는 간세포 suspension culture를 이용한 in vitro 연구^{19,39)}에서 methyl mercury가 세포생존율을 감소시켰고 GOT 활성을 증가시켰으며 지질과산화를 증가시켰다는 연구결과와도 일치하였다. 또한 랫드를 이용한 in vivo 연구^{16,17)}에서도 HgCl₂ 투여는 신장내 지질과산화를 증가시켰다. 이와 같이 수은에 의한 간세포 독성 효과는 수은에 의한 미토콘드리아 H₂O₂ 형성 증가⁷⁾에 따른 지질과산화에 기인하는 것으로 사료된다.

Table 1에서의 결과에 따라 30 ppm 농도의 HgCl₂ 존재

Table 1. Effects of mercury on GOT and LDH activities, MTT reduction and TBARS concentration in primary cultures of rat hepatocytes

Groups	GOT	LDH	MTT	TBARS
HgCl ₂ (ppm)	(U/ℓ)	(nmol NADH consumed/min)	(% reduction)	(μM)
0	8.4±0.80 ^a	183.9±9.46 ^a	100.0±5.38 ^a	2.9±0.13 ^a
1	9.7±0.87 ^a	181.2±8.27 ^a	95.4±1.34 ^{a,b}	2.6±0.39 ^a
5	13.9±1.21 ^a	205.8±11.41 ^a	89.8±3.16 ^b	3.7±0.25 ^{a,b}
10	26.0±3.84 ^b	317.2±33.79 ^a	69.8±1.74 ^c	4.8±0.31 ^b
30	58.8±6.54 ^c	758.2±75.11 ^b	5.3±1.80 ^d	12.5±0.45 ^c
50	78.7±4.90 ^d	1102.6±25.09 ^c	1.7±0.12 ^d	15.2±0.83 ^d

Hepatocytes were cultured for 6 hr in the presence of HgCl₂. Values are presented as the means±SE derived from four determinations.

^{a,b,c,d} Values in the same column with different superscripts are significantly different (p<0.05).

하에 간세포를 다양한 농도의 양파추출물과 함께 6시간 배양하여, 양파추출물이 수은에 의한 세포독성과 지질과산화에 미치는 효과(Table 2)를 조사하였다. 0.05 mg/ml 농도의 양파추출물 첨가는 30 ppm 농도의 수은에 의해 증가된 GOT 활성을 감소시켰으며, 0.1 mg/ml 이상 농도의 양파추출물은 수은 무첨가(Control) 수준으로 GOT 활성을 감소시켜 간손상을 억제시켰음을 알 수 있었다. 수은에 의해 증가된 LDH 활성도 0.01 mg/ml 농도의 양파추출물에 의해 유의적으로 감소하였으며, 0.1 mg/ml 이상 농도의 양파추출물은 LDH 활성을 수은 무첨가 수준으로 감소시켜 세포 손상을 억제시켰다. 양파추출물의 첨가 농도가 증가함에 따라 수은에 의해 억제된 MTT 감소는 증가하였으나, 0.3 mg/ml 농도의 양파추출물 첨가로도 MTT 감소는 수은 무첨가 수준의 60%에 미치지 못하였다. 수은에 의해 증가된 TBARS 농도는 0.01 mg/ml 농도의 양파추출물 첨가에 의해 감소하였다. MTT 감소의 경우와 유사하게 양파추출물의 농도가 증가함에 따라 TBARS 농도는 감소하였으나, 최대 첨가 농도인

0.3 mg/ml의 양파추출물은 TBARS 농도를 수은 무첨가 수준까지 감소시키지 못하여 지질과산화를 완전히 억제시키지는 못하였다.

항산화 방어기전을 수행하는 효소계 항산화물질 중 catalase는 산화인자(oxidizing agent)인 hydrogen peroxide를 물과 산소로 분해하고, GSH-Px는 환원형태의 glutathione을 이용하여 hydrogen peroxide를 물로 전환시킴으로써 세포의 hydroperoxide 수준을 조절한다^{40,41}. 반면에 GSH-Rd는 산화형태의 glutathione을 환원형태의 glutathione으로 환원시킴으로써 항산화물질인 환원형태의 glutathione 수준을 유지한다^{42,43}. 따라서, 이러한 항산화효소들은 세포손상, 조직의 기능장애 등으로부터 보호하는 작용을 하게 된다. 다양한 농도의 양파추출물이 수은에 의해 유발된 간세포의 catalase, GSH-Px 및 GSH-Rd 활성에 미치는 효과는 Table 3과 같다. 6시간 동안 30 ppm 농도의 HgCl₂로 간세포를 일차배양한 결과, 간세포의 catalase, GSH-Px 및 GSH-Rd 활성은 수은 무첨가군에 비해 각각 현저히 감소하였다(80.6 vs 16.9

Table 2. Effects of onion extracts on GOT and LDH activities, MTT reduction and TBARS concentration in primary cultures of rat hepatocytes exposed to 30 ppm of mercury

Groups	GOT (U/ℓ)	LDH (nmol NADH consumed/min)	MTT (% reduction)	TBARS (μM)
Onion Extract (mg/ml)				
Control	9.0±1.16 ^a	189.2±13.95 ^a	100.0±4.57 ^a	2.7±0.56 ^a
0	51.7±5.52 ^b	993.9±104.18 ^b	4.7±0.99 ^b	12.3±0.43 ^b
0.01	47.3±4.41 ^b	784.5±84.69 ^c	9.8±4.00 ^b	10.4±0.53 ^c
0.05	28.1±2.75 ^c	508.7±30.98 ^d	36.6±1.06 ^c	8.0±0.40 ^d
0.1	13.2±0.97 ^a	272.0±22.01 ^a	61.7±5.46 ^d	5.6±0.31 ^e
0.3	11.6±0.96 ^a	248.4±28.62 ^a	57.5±1.88 ^d	5.1±0.50 ^e

Hepatocytes were cultured for 6 hr in the presence of 30 ppm of HgCl₂ and various concentrations of onion extracts except in control group where hepatocytes were maintained in the absence of mercury and onion extract. Values are presented as the means±SE derived from four determinations.

^{a,b,c,d,e}Values in the same column with different superscripts are significantly different (p < 0.05).

Table 3. Effects of onion extracts on catalase, GSH-Px and GSH-Rd activities in primary cultures of rat hepatocytes exposed to 30 ppm of mercury

Groups	Catalase (μmole H ₂ O ₂ consumed /min/mg protein)	GSH-Px (nmol NADHP oxidized /min/mg protein)	GSH-Rd (nmol NADHP oxidized /min/mg protein)
Onion Extract (mg/ml)			
Control	80.6±6.86 ^a	46.4±3.64 ^a	273.3±20.81 ^a
0	16.9±2.27 ^b	14.9±1.78 ^b	93.3±20.25 ^b
0.01	22.8±0.91 ^{b,c}	13.0±1.29 ^b	118.7±16.64 ^b
0.05	36.4±5.20 ^c	22.4±1.67 ^b	117.3±14.28 ^b
0.1	61.3±6.78 ^d	36.5±4.01 ^a	146.7±25.06 ^b
0.3	66.0±6.07 ^{a,d}	37.3±5.72 ^a	173.3±18.67 ^b

Hepatocytes were cultured for 6 hr in the presence of 30 ppm of HgCl₂ and various concentrations of onion extracts except in control group where hepatocytes were maintained in the absence of mercury and onion extracts. Values are presented as the means±SE derived from four determinations.

^{a,b,c,d}Values in the same column with different superscripts are significantly different (p < 0.05).

for catalase; 46.4 vs 14.9 for GSH-Px; 273.3 vs 93.3 for GSH-Rd). 현재까지 수행된 연구들은 수은이 항산화효소 활성을 증가, 감소 또는 영향을 주지 않는 것 등 상이한 결과를 보고하고 있다. 마우스를 이용한 실험에서 Hussain 등¹⁸⁾은 2주 동안 1 mg/kg/day HgCl₂ 급여가 간의 catalase와 GSH-Px 활성을 증가시켰으나 GSH-Rd 활성에는 영향을 미치지 못한 반면, Mahboob 등⁴⁴⁾은 2주 동안 8 ug/kg/day HgCl₂ 급여가 간 GSH-Px와 GSH-RD 활성에 영향을 미치지 못하였다고 보고하였다. 그러나 랫드를 이용한 *in vivo* 실험에서 Gstraunthaler 등¹⁶⁾은 mercury chloride 피하주사 투여가 신장의 catalase 및 GSH-Px 등의 항산화효소 활성을 감소시켰다고 보고하였다. 흰쥐 간세포를 이용한 suspension culture에서 Ashour 등¹⁹⁾은 120분 동안 100 ppm 농도의 methyl mercury 처리가 GSH-Rd 활성을 감소시켰으나 GSH-Px 활성에는 아무런 영향을 미치지 못하였다고 보고하였다. 이와 같이 수은에 의해 항산화효소 활성이 억제되지 못하고 오히려 증가 또는 변화가 없는 이유는 실험설계 또는 처리 시간 및 농도에 따라 수은에 의해 생성되는 free radical의 양이 항산화효소 활성을 능가하기 때문인 것으로¹⁸⁾ 사료된다. 30 ppm 농도의 HgCl₂ 존재하에 0.05 mg/ml 농도의 양파추출물 첨가는 수은에 의해 억제된 catalase 활성을 증가시켰으며, 양파추출물의 첨가 농도가 증가할수록 catalase 활성은 증가되어, 0.3 mg/ml 농도의 양파추출물은 catalase 활성을 수은 무첨가 수준까지 증가시켰다. 수은에 의해 억제된 GSH-Px 활성은 0.1 mg/ml 농도 이상의 양파추출물에 의해 증가하였으며, 수은 무첨가 수준과 비교하여 유의적으로 차이가 없었다. 양파추출물의 첨가 농도가 증가함에 따라 수은에 의해 억제된 GSH-Rd 활성이 증가하는 추세를 보였으나 유의적으로 증가시키지는 못하였다.

양파추출물 농도별 DPPH free radical 소거활성은 Fig. 1

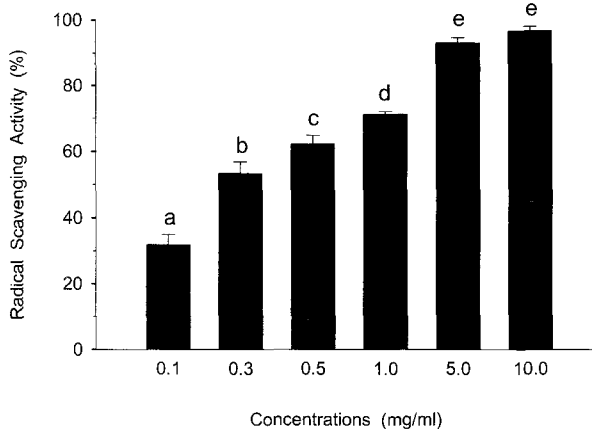


Fig. 1. DPPH free radical scavenging activities of various concentrations of onion extracts. Each bar represents the means±SE derived from four determinations. ^{a,b,c,d,e}Values with different letters are significantly different ($p < 0.05$).

에 나타나 있다. Pyrogallol 용액(125 ug/ml)에 의한 흡광도 감소를 100%로 기준하였을 때 0.1 mg/ml의 양파추출물은 31.8% 감소시켰으며 양파추출물의 농도가 증가할수록 free radical 소거활성은 증가하여 5 mg/ml 농도의 양파추출물은 93% 이상의 소거활성을 나타내었다. 이러한 양파 추출물의 탁월한 radical 소거 활성은 기존에 발표된 연구결과²⁵⁾와도 일치하고 있다.

이상과 같이 간세포 일차배양에서 수은은 간독성 증가, 간세포 생존율 저하, 지질과산화 촉진 및 catalase, GSH-Px, GSH-Rd 등의 항산화효소 활성 감소를 유발시켰으며, 양파추출물은 catalase와 GSH-Px의 활성을 증가시키고 free radical을 소거시켜 수은에 의해 유발된 독성 및 지질과산화를 억제함으로써 항산화 및 간보호 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

요 약

본 연구의 목적은 랫드 간세포 일차배양에서 양파추출물이 수은에 의해 유발된 세포독성, 지질과산화 및 항산화효소 활성에 미치는 효과를 조사하기 위함이다. 수은 농도별 효과를 조사하기 위해 0, 1, 5, 10, 30 및 50 ppm의 다양한 농도의 HgCl₂로 6시간 동안 간세포를 일차배양하였다. 간세포 독성과 생존율은 배양액의 GOT와 LDH 활성 및 MTT 값으로 결정하였고, 지질과산화는 TBARS 농도로 측정하였다. 항산화에 미치는 효과는 catalase, GSH-Px, GSH-Rd 활성 및 DPPH free radical 소거활성으로 결정하였다. 10 ppm 이상의 HgCl₂ 농도는 GOT 활성을 증가시켰고 %MTT 감소를 현저히 억제시켰으며 TBARS 농도를 증가시켰다. 또한 30 ppm 이상의 HgCl₂ 농도는 LDH 활성을 증가시켜 수은 농도 의존적으로 간세포 손상과 지질과산화를 촉진시켰다. 6시간 동안 30 ppm 농도의 HgCl₂ 처리는 간세포의 catalase, GSH-Px 및 GSH-Rd 활성을 현저히 감소시켰다. 수은 독성에 대한 양파추출물의 효과를 조사하기 위해 30 ppm의 수은 존재하에 0, 0.01, 0.05, 0.1 및 0.3 mg/ml의 다양한 농도의 양파추출물로 6시간 동안 간세포를 일차배양하였다. 0.05 mg/ml 이상 농도의 양파추출물 첨가는 30 ppm 농도의 수은에 의해 증가된 GOT 활성을 감소시켰으며 MTT 감소를 증가시켰다. 또한 0.01 mg/ml 이상 농도의 양파추출물은 수은에 의해 증가된 LDH 활성과 TBARS 농도를 감소시켜 양파추출물이 수은에 의해 유발된 간손상과 지질과산화를 억제시켰음을 알 수 있었다. 0.05 mg/ml와 0.01 mg/ml 이상 농도의 양파추출물 첨가는 수은에 의해 각각 억제된 catalase와 GSH-Px 활성을 증가시켰으나 GSH-Rd 활성에는 영향을 미치지 못하였다. 양파추출물의 농도가 증가할수록 free radical 소거활성은 증가하여 5 mg/ml 농도의 양파추출물은 pyrogallol 용액의 흡광도 감소를 100%로 기준하였을 때 93% 이상의 소거 활성을 나타내었다. 이상과 같이 간세포 일차배양에서 수은은 간독성 증가, 간세포 생존율 감소, 지질과산화 촉진

및 catalase, GSH-Px, GSH-Rd 등의 항산화효소 활성 감소를 유발시켰으며, 양과추출물은 catalase와 GSH-Px의 활성을 증가시키고 free radical을 소거시켜 수은에 의해 유발된 독성 및 지질과산화를 억제함으로써 항산화 및 간보호 효과를 나타내는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2003년도 상지대학교 교내 연구비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

1. Stohs, S. J. and Bagchi, D. (1995) Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions, *Free Radic. Biol. Med.* 18, 321-336.
2. Duncan-Achanzar, K. B., Jones, J. T., Burke, M. F., Carter, D. E. and Laird, H. E. (1996) Inorganic mercury chloride-induced apoptosis in the cultured porcine renal cell line LLCC-PK1, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 277, 1726-1732.
3. Homma-Takeda, S., Kugenuma, Y., Iwamuro, T., Kumagai, Y. and Shimajo, N. (2001) Impairment of spermatogenesis in rats by methylmercury: involvement of stage- and cell-specific germ cell apoptosis, *Toxicology*, 169, 25-35.
4. Rao, M. V. (1989) Histophysiological changes of sex organs in methylmercury intoxicated mice, *Endocrinol. Exper.* 23, 55-62.
5. Yonaha, M., Itoh, E., Ohbayashi, Y. and Uchiyama, M. (1980) Induction of lipid peroxidation in rats by mercuric chloride, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 28, 105-112.
6. Sarafian, T. and Verity, M. A. (1991) Oxidative mechanisms underlying methyl mercury neurotoxicity, *Int. J. Dev. Neurosci.* 9, 147-153.
7. Lund, B. O., Miller, D. M. and Woods, J. S. (1993) Studies on Hg(II)-induced H₂O₂ formation and oxidative stress in vivo and in vitro in rat kidney mitochondria, *Biochem. Pharmacol.* 45, 2017-2024.
8. Stacey, N. H. and Kappus, H. (1982) Cellular toxicity and lipid peroxidation in response to mercury, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 63, 29-35.
9. Karniski, L. P. (1992) Hg²⁺ and Cu⁺ are ionophores, mediating Cl⁻/OH⁻ exchange in liposomes and rabbit renal brush border membranes, *J. Biol. Chem.* 267, 19218-19225.
10. Lund, B. O., Miller, D. M. and Woods, J. S. (1991) Mercury-induced H₂O₂ production and lipid peroxidation in vitro in rat kidney mitochondria, *Biochem. Pharmacol.* 42, S181-187.
11. Nath, K. A., Croatt, A. J., Likely, S., Behrens, T. W. and Warden, D. (1996) Renal oxidant injury and oxidant response induced by mercury, *Kidney Int.* 50, 1032-1043.
12. Hussain, S., Rodgers, D. A., Duhart, H. M. and Ali, S. F. (1997) Mercuric chloride-induced reactive oxygen species and its effect on antioxidant enzymes in different regions of rat brain, *J. Environ. Sci. Health B*, 32, 395-409.
13. Fridovich, I. (1983) Superoxide radical: an endogenous toxicant, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 23, 239-57.
14. Harris, E. D. (1992) Regulation of antioxidant enzymes, *FASEB J.* 6, 2675-2683.
15. Chung, A. S., Maines, M. D. and Reynolds, W. A. (1982) Inhibition of the enzymes of glutathione metabolism by mercuric chloride in the rat kidney: reversal by selenium, *Biochem. Pharmacol.* 31, 3093-3100.
16. Gstraunthaler, G., Pfaller, W. and Kotanko, P. (1983) Glutathione depletion and in vitro lipid peroxidation in mercury or maleate induced acute renal failure, *Biochem. Pharmacol.* 32, 2969-2972.
17. Girardi, G. and Elias, M. M. (1995) Mercuric chloride effects on rat renal redox enzymes activities: SOD protection, *Free Radic. Biol. Med.* 18, 61-66.
18. Hussain, S., Atkinson, A., Thompson, S. J. and Khan, A.T. (1999) Accumulation of mercury and its effect on antioxidant enzymes in brain, liver, and kidneys of mice, *J. Environ. Sci. Health. B*, 34, 645-660.
19. Ashour, H., Abdel-Rahman, M. and Khodair, A. (1993) The mechanism of methyl mercury toxicity in isolated rat hepatocytes, *Toxicol. Lett.* 69, 87-96.
20. Srivastava, K. C. (1986) Onion exerts antiaggregatory effects by altering arachidonic acid metabolism in platelets, *Prostaglandins Leukot. Med.* 24, 43-50.
21. Kandler, B. S. (1987) Garlic (*Allium sativum*) and onion (*Allium cepa*): a review of their relationship to cardiovascular disease, *Prev. Med.* 16, 670-685.
22. Dorant, E., van den Brandt, P. A., Goldbohm, R. A. and Sturmans, F. (1996) Consumption of onions and a reduced risk of stomach carcinoma, *Gastroenterology* 110, 12-20.

23. Price, K. R. and Rhodes, M. J. C. (1997) Analysis of the major flavonol glycosides present in four varieties of onion (*Allium cepa*) and changes in composition resulting from autolysis, *J. Sci. Food Agri.* 74, 331-339.
24. Chu, Y.-H., Chang, C.-L. and Hsu, H.-F. (2000) Flavonoid content of several vegetables and their antioxidant activity, *J. Agric. Food Chem.* 44, 3426-3431.
25. Nuutila, A. M., Puupponen-Pimia, R., Aarni, M. and Oksman-Caldentey, K.-M. (2003) Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity, *Food Chem.* 81, 485-493.
26. Patil, B. S. and Pike, L. M. (1995) Distribution of quercetin content in different rings of various coloured onion (*Allium cepa* L.) cultivars, *J. Horticult. Sci.* 70, 643-650.
27. Malterud, K. E., Farbrot, T. L., Huse, A. E. and Sund, R. B. (1993) Antioxidant and radical scavenging effects of anthraquinones and anthrones, *Pharmacology* 47, 77-85.
28. Seglen, P. O. (1976) Preparation of isolated rat liver cells, *Methods Cell Biol.* 13, 29-83.
29. Mosmann, T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65, 55-63.
30. Uchiyama, M. and Mihara, M. (1978) Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thio-barbituric acid test, *Anal. Biochem.* 86, 271-278.
31. Sunderman, F. W. Jr., Marzouk, A., Hopfer, S., Zaharia, O. and Reid, M. C. (1985) Increased lipid peroxidation in tissues of nickel chloride-treated rats, *Ann. Clin. Lab. Sci.* 15, 229-236.
32. Reitman, S. and Frankel, S. (1957) A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminases, *Am. J. Clin. Pathol.* 28, 56-63.
33. Vassault, A. (1983) *Lactate dehydrogenase: UV-method with pyruvate and NADH.* In: Bergmeyer, H. U., Bergmeyer, J. and Grassl, M.(eds), "Methods of Enzymatic Analysis. III. Enzymes 1: Oxidoreductases, Transferases", Verlag-Chemie, Weinheim, p.118-126.
34. Aebi, H. (1984) Catalase in vitro, *Methods Enzymol.* 105, 121-126.
35. Flohe, L. and Gunzler, W. A. (1984) Assays of glutathione peroxidase, *Methods Enzymol.* 105, 114-121.
36. Carlberg, I. and Mannervik, B. (1955) Glutathione reductase, *Methods Enzymol.* 113, 484-490.
37. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
38. Steel, R. G. D. and Torre, J. H. (1980) *Principles and Procedures of Statistics*, 2nd ed, McGraw-Hill, New York, p.186-187.
39. Stacey, N. H. and Klaassen, C. D. (1981) Comparison of the effects of metals on cellular injury and lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes, *J. Toxicol. Environ. Health* 7, 139-147.
40. Fridovich, I. (1978) The biology of oxygen radicals, *Science* 201, 875-879.
41. Fridovich, I. and Frreman, B. (1986) Antioxidant defenses in the lung, *Ann. Rev. Physiol.* 48, 693-702.
42. Rall, T. W. and Lehninger, A. L. (1952) Glutathione reductase of animal tissues, *J. Biol. Chem.* 194, 119-130.
43. Guillemette, J., Marion, M., Denizeau, F., Fournier, M. and Brousseau, P. (1993) Characterization of the in vitro hepatocyte model for toxicological evaluation: repeated growth stimulation and glutathione response, *Biochem. Cell Biol.* 71, 7-13.
44. Mahboob, M., Shireen, K. F., Atkinson, A. and Khan, A. T. (2001) Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activity in different organs of mice exposed to low level of mercury, *J. Environ. Sci. Health B.* 36, 687-697.