

감마선을 조사한 생쥐 간에서 발효인삼이 Glutathione 함량에 미치는 영향

제주한라대학 방사선과

고 인 호

목적: ⁶⁰Co γ 선을 생쥐에 전신조사로 유도된 생쥐 간의 장애에 대한 발효인삼의 방사선방호효과를 방호제인 glutathione (GSH) 함량 변화를 통하여 실험적 연구를 하였다.

대상 및 방법: ICR종 수컷 생쥐를 발효인삼 투여군, 백삼 투여군, 방사선 조사군, 대조군으로 각각 분류하여 발효인삼 투여군 (FG+Rad), 백삼 투여군(WG+Rad)은 ⁶⁰Co γ 선 조사 전에 백삼과 발효인삼을 7일간(150 mg/kg/day) 경구 투여하였고, 방사선 조사군(Rad)은 ⁶⁰Co γ 선을 5 Gy (1.01 Gy/min) 선량으로 조사하였으며, 대조군(Co)은 0.1 mL의 생리적 식염수를 투여하였다. 각각의 실험군을 통하여 생쥐 간 조직에서의 환원형 glutathione와 산화형 glutathione (GSSG)의 함량 변화를 조사한 결과 아래와 같다.

결과: 1. 발효인삼 투여군과 백삼 투여군에서 방사선 조사군보다 유의성 있게 glutathione함량이 증가하였고 산화형 glutathione (GSSG)의 함량은 유의성 있게 감소하였다. 2. 발효인삼투여군과 백삼투여군에서 방사선 조사군보다 산화형 glutathione (GSSG)의 함량과 총 glutathione함량 비율은 유의성 있게 감소하였다.

결론: 발효인삼투여군이 백삼투여군보다 glutathione함량을 증가시킴으로서 효율적으로 생쥐간의 방사선 방호효과를 증진시킬 수 있다.

핵심용어: 감마선, 발효인삼, glutathione

서 론

산소호흡을 통하여 생리적 대사를 하는 모든 호기성 생물체에서는 산소의 대사과정 중에 반응성이 매우 큰 superoxide radical ($\cdot O_2^-$), hydroxyl radical ($\cdot HO$), hydrogen peroxide (H_2O_2), singlet oxygen (1O_2) 등이 생성되거나, 지방산과 반응하는 alkoxy radical ($RO\cdot$), peroxy radical ($ROO\cdot$) 등과 같은 반응성이 큰 라디칼을 생성하여⁴⁾ 생체 내의 세포에 손상을 가져오는데 이를 free radical 또는 활성산소(active oxygen)라고 한다.⁷⁾ 인간을 비롯한 호기성 생물들의 생존을 위하여 필수적인 산소가 노화의 주 원인이라는 활성산소설은 1956년 Harman에 의해 처음으로 제안되었다.

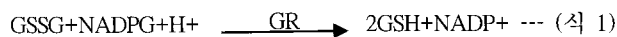
이러한 활성산소들은 극심한 운동, paraquat와 아세트아미노펜(acetaminophen) 등과 같은 화학물질의 체내 유입, 생체 물질의 자가 산화, 노화, 자외선 및 방사선과 같은 물리적, 화학적, 환경적인 자극에 의하여 부수적으로 생성이 촉진된

다.⁸⁾

이들 활성산소는 세포구성 성분들인 지질, 단백질, 당, DNA 등에 대하여 비선택적, 비가역적인 파괴작용을 함으로써 노화는 물론 암을 비롯하여 뇌졸중, 파킨슨병 등의 뇌질환, 심장질환, 허혈, 동맥경화, 피부질환, 소화기질환, 염증 및 자가면역질환 등의 각종 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다.⁸⁾

또한, 이들 활성산소에 의한 세포막의 불포화 지방산과 일련의 연쇄반응을 통하여 지질과산화의 유발을 촉진하고, 그 결과로 생성되는 지질과산화물을 비롯하여 여러 가지 체내 과산화물의 함량을 증가시켜 세포의 산화적 손상이 생리적 기능을 저하시킴으로 노화와 유전적 장애의 원인이 되기도 한다.⁶⁾

생체 내의 활성산소 소거제로 알려진 항산화물질인 환원형 글루타치온(GSH)은 GPx에 의해 과산화수소를 제거하면서 산화형 glutathione (GSSG)으로 전환되고, GSSG는 glutathione reductase에 의하여 NADPH를 소모하면서 다시 GSH로 환원되어 활성산소로부터세포를 보호하는데 중요한 역할을 한다(식 1).



이 논문은 2006년 1월 10일 접수하여 2006년 2월 15일 채택되었음.
책임저자: 고인호, 제주한라대학 방사선과
Tel: 064)741-7673, Fax: 064)747-3989
E-mail: kih1000@kornet.net

동물조직 중에 대표적인 항산화물질인 GSH은 glutamine 산, cysteine 및 glycine이 결합한 tripeptide로서 동물과 식물에 광범위하게 들어있으며, 이 중에서 cysteine 성분 중에 황 성분이 유리기를 제거하는 기전을 나타낸다.

이러한 GSH가 생체 내에 결핍이 되면 지질과산화 반응을 촉진시키며, GSSG/total GSH 비율은 조직세포 내의 산화환원반응과 해독작용 상태의 평가에 중요하다. GSSG 형성은 활성산소 생성의 유용한 정량적 지표가 되기 때문에 지질과산화 정도나 조직 손상의 유발과 직접적으로 관련되어 있는 것으로 알려져 있다.⁶⁾ 이러한 이론적 배경을 근거로 하여 본 연구에서는 감마선을 생쥐에 전신조사 한 후에 간에서 발생하는 활성산소종을 소거제로서 작용하는 항산화물질인 GSH 함량 변화에 발효인삼이 얼마만큼의 영향을 미치는가를 2주간의 실험을 토대로 하여 데이터로 고찰해 보았다.

대상 및 방법

1. 실험재료

1) 실험동물

실험동물은 Shizuoka 실험동물센터(Shizuoka, Japan)에서 분양받은 4주령의 ICR계 수컷 생쥐로서 실온이 20±2°C, 습도가 50±5%, 12시간 명암주기의 사육실에서 사육되는 생쥐용 사료와 물을 자유롭게 먹게 하였으며, 이와 같은 조건에서 1주일간 적응시킨 후 체중이 25~30 g의 생쥐만을 선별하고 각 실험군으로 분류하여 사용하였다.

2) 시약

실험에 사용한 시약은 glutathione (reduced), β-NADPH, 1,1,3,3-tetramethoxy propanol 등은 Sigma 제품을 사용하였고, Na₂CO₃ 등 기타 시약들은 일반 특급시약을 사용하였다. 또한, 백삼과 발효인삼은 원광제약(주) 생약발효연구소로부터 분양을 받아 사용하였다.

3) 실험기기

실험기기로는 원심분리기(Beckman J2-2401PC, USA), 마쇄기(Wheaton, USA), 분광광도계(Shimadzu UV-2401PC, Japan), 초저온 냉동기(Ilsin DF9007, Korea), 증류수 제조기(Millipore Milli-Q, USA), 제빙기(Brema HB802), 저울(Mettler AT201, USA), 초음파 마쇄기(Branson 3210) 및 항온수조(Eyela SB-9, Japan) 등을 사용하였다.

4) 실험동물 처리

방사선 보호효과를 검토하기 위하여 Table 1과 같이 실험동물인 생쥐 5마리를 1군으로 하여 대조군(Co), 방사선조사군(Rad), 백삼(WG+Rad) 투여군, 발효인삼(FG+Rad) 투여군 등 총 4개 군으로 분류하였다.

Table 1. Classification of experimental group

Group	Treatment		
	Fermented ginseng (mg/kg/day)	White ginseng (mg/kg/day)	Radiation (Gy/whole body)
Control	—	—	—
Rad	—	—	5
FG+Rad	150	—	5
WG+Rad	—	150	5

Control: saline (0.1 mL) was orally administrated, Rad: saline was orally administrated for 7 days before γ-irradiation, FG+Rad: fermented ginseng (150 mg/kg/0.1 mL) was orally administrated for 7 days before-irradiation, WG+Rad: white ginseng (150 mg/kg/0.1 mL) was orally administrated for 7 days before-irradiation.

대조군, 방사선조사군은 증류수 0.1 mL/day를 경구 투여하였고, 발효인삼투여군은 방사선조사 전에 7일 동안 150 mg/kg/day을 쥐에 경구 투여하였다.

또한, 백삼투여군은 방사선조사 전에 7일 동안 150 mg/kg/day을 쥐에 경구 투여하였다. 방사선조사는 ⁶⁰Co 감마 선원을 이용하여 5.0 Gy (1.01 Gy/min)의 선량을 1회 전신조사하였다.

5) 분석시료 제조

분석하기 16시간 전에 절식시킨 생쥐를 경추 탈구시킨 후, 간 조직을 적출하여 차가운 생리식염수로 세척한 다음 무게를 측정하였다.

간 조직은 얼음결정 상태의 생리식염수에 넣어 세절하고 3회 수세하여 혈액을 제거하였으며, sucrose/ EDTA (0.25 M/1 mM) 용액을 넣고 마쇄기(glass teflon homogenizer)로 분쇄하여 10% 균질액을 만들었다.

이 균질액을 원심분리(900 g, 15분)하여 상정액을 취한 다음 2차 원심분리(24,000 g, 10분)하였다. 얻어진 상정액(cytosolic fraction)을 글루타치온 및 산화형 글루타치온, 단백질 함량의 측정시료로 사용하였다.

2. 실험방법

1) Glutathione (GSH) 함량 측정

간 조직에서의 total glutathione (GSH+GSSG)와 GSSG 함량은 Tietze의 방법을 변형한 Griffiths의 방법에 의해 측정하였다. Total glutathione의 정량은 0.3 mM NADPH/0.125 M 인산완충용액(6.3 mM EDTA, pH 7.5) 700 μL, 6 mM DTNB

용액 100 μ L, 200 μ L의 측정시료를 혼합한 반응액을 30°C로 조절되는 cuvette holder에서 4분간 안정화시킨 다음 412 nm에서 흡광도 변화를 1분간 측정하였다. GSSG의 정량은 GSH를 제거하기 위해 측정시료와 acrylonitrile을 혼합하여 60분간 방치한 다음 total GSH와 같은 조건에서 glutathione reductase (200 kU/L) 용액을 20 μ L로 증가하여 반응시켜 흡광도의 변화를 측정하였다. GSH의 함량은 다음 식에 의하여 계산하였다(식 2).

$$\text{GSH 농도} = \text{total GSH 농도} - 2 \times [\text{GSSG}] \text{ ----- (식 2)}$$

결 과

1. 발효인삼이 GSH성분에 미치는 효과

1) Glutathione (GSH)의 함량 변화

방사선조사로 인해 생성된 활성산소에 대한 백삼과 발효인

삼의 방호효과를 알아보기 위하여 인삼을 전처리한 다음 방사선을 조사한 후 GSH의 함량을 측정된 결과, Table 2와 Fig. 1에서 보는 바와 같이 방사선조사군의 GSH 함량이 대조군에 비해 유의성($P < 0.01$)있게 감소하였다. 또한, 백삼과 발효인삼 투여군의 경우 4시간째를 제외한 1일, 7일 및 14일째에 모든 투여군에서 대조군에 비하여 그 함량이 유의성($P < 0.01$)있게 감소하였으나, 방사선조사군을 대조군으로 하여 인삼 투여군의 상호 유의성은 모든 투여군에서 방사선조사군에 비하여 GSH의 함량이 유의성($P < 0.01$) 있게 증가하였다. 인삼 투여군 사이의 GSH 함량에서 모두 상호 유의성 있는 결과는 보이지 않았다. 이러한 결과를 종합하여 볼 때 백삼과 발효인삼은 방사선조사로 GSH의 함량 감소를 유의성 있게 억제하여 생체 내에 보호작용을 원활하게 할 것으로 판단된다.

Table 2. Effects of ginseng pretreatment on hepatic GSH contents of γ -irradiated mice

Period Group	GSH content (μ mole/g liver)			
	4 hr	1 day	7 day	14 day
Control	5.35 \pm 0.43	5.28 \pm 0.35	5.22 \pm 0.37	5.22 \pm 0.37
Rad	4.48 \pm 0.08	4.22 \pm 0.26	3.16 \pm 0.14	3.33 \pm 0.14
FG+Rad	5.12 \pm 0.29	4.81 \pm 0.27	4.55 \pm 0.24	4.94 \pm 0.26
WG+Rad	5.06 \pm 0.38	4.68 \pm 0.30	4.49 \pm 0.48	4.78 \pm 0.31

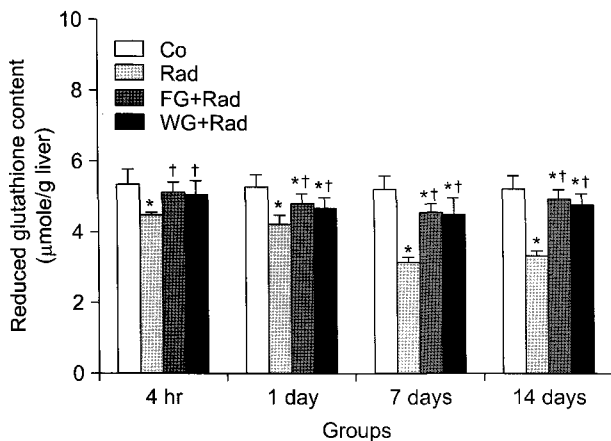


Fig. 1. Time-dependent change of GSH contents affected white ginseng, fermented ginseng and post-irradiation. The values represent mean \pm S.D. * $P < 0.01$: significantly different from control (Co) group. $^\dagger P < 0.01$: significantly different from radiation.

Table 3. Effects of ginseng pretreatment on hepatic GSSG contents of γ -irradiated mice

Period Group	GSSG content (μ mole/g liver)			
	4 hr	1 day	7 day	14 day
Contro	10.44 \pm 0.05	0.45 \pm 0.04	0.46 \pm 0.04	0.44 \pm 0.04
Rad	0.46 \pm 0.05	0.49 \pm 0.05	0.53 \pm 0.05	0.56 \pm 0.06
FG+Rad	0.44 \pm 0.06	0.47 \pm 0.07	0.49 \pm 0.07	0.47 \pm 0.07
WG+Rad	0.44 \pm 0.07	0.46 \pm 0.07	0.51 \pm 0.08	0.49 \pm 0.07

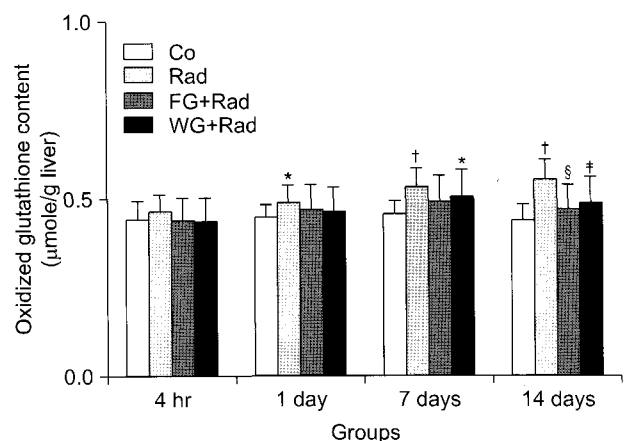


Fig. 2. Time-dependent change of GSSG contents affected white ginseng, fermented ginseng and post-irradiation. The values represent mean \pm S.D. * $P < 0.05$ and $^\dagger P < 0.01$: significantly different from control (Co) group. $^\ddagger P < 0.05$ and $^\S P < 0.01$: Significantly different from radiation.

Table 4. Effects of ginseng pretreatment on hepatic GSSG/total GSH ratios of γ -irradiated mice

Period Group	GSSG/total GSH ratio level (%)			
	4 hr	1 day	7 day	14 day
Control	8.28±0.78	8.53±0.80	8.85±1.16	8.49±1.19
Rad	10.40±1.16	11.61±1.25	16.86±1.68	16.69±1.66
FG+Rad	8.85±1.54	10.10±1.76	10.90±0.95	9.60±0.84
WG+Rad	8.93±1.59	10.27±1.10	12.17±1.74	10.81±1.55

2) 산화형 glutathione (GSSG)의 함량 변화

GSH는 방사선조사로 생성된 유해한 과산화수소나 유기과산화물과 반응하여 황산화작용에 중요한 역할을 한다. 이 반응을 촉매하는 효소인 GPx (glutathione peroxidase)가 2분자의 GSH와 공유결합 할 수 있도록 유도하여 1분자의 GSSG가 생성하게 한다. 백삼과 발효인삼을 방사선조사 전에 경구투여 할 경우 과산화수소로부터 생체 내에 조직을 보호하는 인삼의 방사선 보호효과 등을 검토하기 위하여 GSSG의 함량변화를 측정하였다. Table 3과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 백삼과 발효인삼을 방사선조사 전에 경구투여 하여 GSSG의 함량변화를 측정할 결과, 방사선조사군(Rad)의 GSSG의 함량변화는 1일, 7일 및 14일째 모두 대조군에 비하여 증가하였다. 또한, 백삼과 발효인삼 투여군의 경우 4시간째에는 대조군과 거의 비슷한 함량 수준을 보였으며, 1일째에는 GSSG의 함량이 대조군에 비하여 증가하였으며, 특히 7일째에는 백삼투여군만 유의성(P<0.05) 있게 함량 증가를 보였다. 14일째에는 7일째에 비해 함량 수준이 감소하였다. 방사선조사군(Rad)을 대조군으로 하여 인삼 투여군의 상호 유의성을 조사한 결과 4시간, 1일 및 7일째에는 GSSG의 함량 수준이 방사선조사군보다 감소하였으나 유의성은 없었으며, 14일째에는 유의성(P<0.01) 있게 감소하였다. 인삼 투여군 사이의 상호 유의성은 없었다.

3) 산화형 glutathione (GSSG)/total GSH의 비율 변화

GSSG/total GSH 비율은 방사선조사에 의해 생성된 유해한 과산화수소나 유기과산화물과 같은 지질과산화의 정도와 조직세포의 장해에 직접 관련이 있으며, 생물체의 조직세포 내 산화환원반응에 따른 해독작용 체계를 평가하는데 중요한 지표가 된다. 그리고 활성산소 생성의 정량적인 측정에 이용된다.

백삼과 발효인삼을 방사선조사 전에 경구투여 할 경우 활성산소로부터 생체조직을 보호하는 인삼의 방사선 보호효과를 검토하기 위하여 GSSG/total GSH의 비율 변화를 측정하

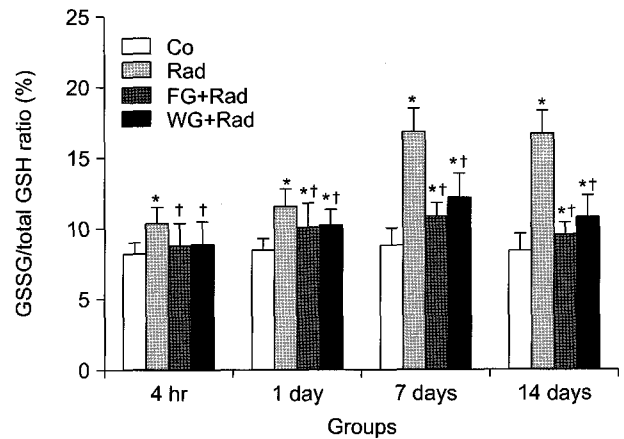


Fig. 3. Time-dependent change of GSSG/total ratios affected white ginseng, fermented ginseng and post-irradiation. The values represent mean±S.D. *P<0.01: significantly different from control (Co) group. †P<0.01: significantly different from Rad group.

였다. Table 4와 Fig. 3에서 보는 바와 같이 백삼과 발효인삼을 방사선조사 전에 경구투여 하여 GSSG/total GSH의 비율 변화를 측정할 결과, 방사선조사군(Rad)의 비율은 모든 군에서 대조군에 비하여 유의성(P<0.01) 있게 증가하였다. 백삼과 발효인삼 투여군의 경우 4시간째에 대조군에 비하여 비율이 약간 증가하였다가 1일, 7일 및 14일째 대조군에 비하여 유의성(P<0.01) 있게 비율이 증가하였다. 방사선조사군(Rad)을 대조군으로 하여 인삼투여군의 상호 유의성을 조사한 결과 모든 투여군에서 방사선조사군에 비하여 그 비율이 유의성(P<0.01) 있게 감소함을 보였다. 또한, 인삼투여군 사이의 상호 유의성을 조사한 결과 백삼투여군이 1일, 7일 및 14일째 발효인삼투여군에 비하여 비율이 증가함을 보였으나 유의성은 없었다. 이러한 결과를 종합하여 볼 때 인삼투여군은 방사선조사군에 비하여 모두 GSSG/total GSH의 비율을 감소시켰으며, 백삼과 발효인삼의 투여군 사이의 상호 유의성은 없었다.

결론 및 고찰

Hazleton 등³⁾이 노화에 따른 생쥐의 GSH 함량변화를 측정할 결과 간, 신장, 심장 등에서 점차 감소한다고 하였다. Speisky 등⁵⁾은 간 조직 중에서 GSH의 고갈이 가능한 기전으로 항산화적 작용으로 소모 외에도 acetaldehyde와 GSH 결합, GSH의 간 내의 합성저하, 담즙으로 배설 증가, 혈액으로 유출 증가의 원인이라고 하였다. 동물조직 중에 nonprotein thiol의 대부분을 차지하고 환원형 글루타치온(GSH)은 생체

내의 활성산소 소거제로 잘 알려져 있다. GPx에 의해 과산화수소를 제거하면서 산화형(GSSG)으로 전환되고, GSSG는 glutathione reductase에 의하여 NADPH를 소모하면서 다시 GSH로 환원되어 활성산소로부터 세포를 보호하는데 중요한 역할을 한다.

Vendemiale 등⁶⁾은 생체조직 중에 GSH의 결핍은 지질과산화 반응을 촉진시키며, GSSG/total GSH 비율은 조직세포 내의 산화환원반응과 해독작용 상태의 평가에 중요하며, GSSG 형성은 활성산소 생성의 유용한 정량적 지표가 되기 때문에 지질과산화 정도나 조직 손상의 유발과 직접적으로 관련되어 있다고 하였다. 방사선 유도에 의한 간 손상에 대하여 GSH는 GPx 항산화효소의 기질로 이용되면서 간 손상을 방어하는 아주 중요한 생체 내의 항산화물질로서 인삼이 GSH 생합성에 관여하는 효능을 조사한 결과, 대조군에 비하여 방사선조사군은 GSH의 함량이 감소한 반면 GSSG 함량은 증가하였다. 그러나 인삼 투여군은 방사선조사군에 비하여 GSH 함량을 증가시켰으며, GSSG 함량은 감소시킨다고 하였다.

성 등¹⁰⁾은 GSH 및 GSSG/total GSH 비율의 증가에 대하여 홍삼 성분이 GSH 생합성을 촉진하고, γ -glutamylcysteine synthetase 효소의 활성화 증대 및 glutathione reductase에 의해 다시 GSH로 원활하게 환원시키며, GPx의 활성증대로 생성된 GSSG는 담즙이나 혈액으로 배출시킬 것이라고 하였다. 그러나 이 등¹¹⁾은 glutathione reductase의 활성이 홍삼의 전후 투여로 증가되었으나, γ -glutamylcysteine synthetase의 활성에는 별다른 영향이 없었다고 하였다. 또한, 팍 등⁹⁾은 ethanol에 중독된 흰쥐에서 담즙울체가 간의 GST, GR, GPx 활성변화에 미치는 실험에서 급성 및 만성 ethanol 중독시 간에 담즙울체만 야기시켰을 때보다 그 활성이 감소하였으며, 간의 세포질 분획의 GST는 GPx 활성이 증가하였다고 하였다.

이러한 결과를 종합하여 볼 때 GSH의 함량 증가는 인삼의 활성성분이 GSH의 생합성효소의 활성을 증가시키기보다 glutathione reductase 효소를 활성화함으로써 GSSG가 GSH로 환원되어 효능을 나타내었기 때문이라고 여겨진다.

참고문헌

1. Flohe L, Gunzler WA: Methods in enzymology, assays of glutathione peroxidase. Academic Press, 1984;105, 114
2. Griffith OW: Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. Analytical Biochem 1980;106:207
3. Hazelton GA, Lang CA: Glutathione contents of tissues in the aging mouse. Biochem J 1980;188:25
4. Packer L: Methods in enzymology, oxygen radical in biological system. Academic Press, 1994;2, 233
5. Speisky H, Macdonald A, Giles G, Orrego H, Israel Y: Increased loss and decreased synthesis of hepatic glutathione after acute ethanol administration. J Biochem 1985;225:565
6. Vendemiale G, Altomare E, Grattagliano I, Albano O: Increased plasma levels of glutathione and malondialdehyde after acute ethanol ingestion in humans. J Hepatol 1989;9:359
7. Singh A, Singh H: Time-scale and nature of radiation-biological damage: approaches to radiation protection and post-irradiation therapy. Prog Biophys Mol Biol 1982;39:66-107
8. Hassan HM, Fridovich I: Intracellular production of superoxide radicals and H₂O₂ by redox active compounds. Arch Biochem Biophys 1979b;176:385-395
9. 팍춘식, 김여희, 조준승: Ethanol 중독흰쥐에서 담즙울체가 간의 glutathione, GST, GPx 활성변화에 미치는 영향. Korean Biochem J 1990;23:2
10. 성금수, 진 철, 권용훈, 장재철: 홍삼 활성성분이 생쥐 간 조직에서 glutathione 및 지질과산화에 미치는 항산화 효과. 고려인삼학회지 2000;24:29-34
11. 이화재, 김동윤, 장재철: Paraquat 투여 생쥐 간에서 홍삼추출물의 항산화효과. 고려인삼학회지 1999;23:3

Abstract

Effect of Glutathione (GSH/GSSG) Contents of Fermented Ginseng on the γ -irradiated Liver of Mice

In Ho Ko

Department of Radiological Technology, Cheju Halla College, Jeju, Korea

Purpose: The radioprotective effects of white and fermented ginseng on liver damage induced by ^{60}Co γ -ray were investigated.

Materials and Methods: To one group of ICR male mice were given white (150 mg/kg/day for 7 days, orally) and fermented ginseng (150 mg/kg/day for 7 days, orally) before ^{60}Co γ -ray irradiation. To another group were irradiated by 5 Gy (1.01 Gy/min) dose of ^{60}Co γ -ray. Contrast group were given with saline (0.1 mL). The levels of reduced (GSH) and oxidized (GSSG) glutathione in liver tissue were measured.

Results: In the fermented (150 mg/kg) and white ginseng(150 mg/kg) groups than irradiation group, the GSH levels were significantly increased, but the GSSG levels were significantly decreased. The ratio of GSSG/total GSH was significantly decreased in the fermented (150 mg/kg) and white ginseng (150 mg/kg) groups than irradiation group.

Conclusion: In the fermented (150 mg/kg) groups than white ginseng (150 mg/kg) groups the GSH levels were significantly increased. The radioprotective effects of fermented (150mg/kg) groups than white ginseng (150 mg/kg) groups were increased.

Key words: ^{60}Co γ -ray, fermented ginseng, glutathione