

The Effect of Antioxidant-complex on Oxygen Free Radical Generating and Scavenging System in Rats

Seong Tak Doh[†] and Sang Il Lee¹

Department of Clinical Pathology, Daegu Health College, Daegu 702-260, Korea.

¹*Department of Food, Nutrition & Cookery, Keimyung College, Daegu 704-703, Korea*

To elucidate the effect of antioxidant complex containing β -carotene, vitamin E, vitamin C, Ginkgo Biloba leaf extract and selenium on oxygen free radical production and detoxification system, rats were fed normal diet and normal diet with antioxidant complex 0.1%, 0.3% and 0.5% for 3 weeks. Feed efficiency ratio, changes in body weight, weight gain and amounts of feces of rat are similar in four groups. Liver weight per body weight and hepatic lipid peroxide weight increased in 0.5% group. However, hepatic glutathione contents in all antioxidant complex added groups were significantly increased compare with normal control group. On the other hand, the activity of xanthine oxidase was a little increased due to the amounts of antioxidant complex. Superoxide dismutase and glutathione peroxidase activity of 0.1% antioxidant complex added group were increased about 10~20% in comparison to normal control group. These results suggest that the supplementation of antioxidant complex 0.1% to basal diet may reduce the hepatic damage caused by free radicals.

Key Words: Antioxidant complex, Oxygen free radical, Superoxide dismutase, Glutathione peroxidase

서 론

노화는 생리적 반응의 진행성 감소를 의미한다. 세포가 노화하면 우리 몸의 생리적 반응을 느리게 만들고, 이러한 현상이 회복되지 않고 악화된다. 노화방지란 노화에 따른 각종 질병을 예방, 치료하고 개개인의 생리적 기능을 최적으로 유지할 수 있도록 하는 처방이다.

노화이론은 선천적인 유전자가설 (genetic theory)과 후천적인 오류축적가설 (damage-accumulation)로 나눌 수 있다. 선천적인 유전자가설에 의하면 노화라는 시계는 우리가 부모에게서 물려받은 유전자 속에 결정되어 있어서 어떤 사람이 출생하면 몇 살에 어느 정도의 노화가 생길 것이라는 것, 몇 살까지 살 수 있다는 것을 예측할 수 있다고 한다. 그에 반해, 후천적인 오류 축적설 (Orgel, 1963; Gershon et al., 1970)은 사람이 살아가면서 여러 가지 노화를 일으킬 수 있는 요인 때문에 세포의 오류들이 축적되고 이것이 노화 현상의 원인이 된다는 것이다. 노화는 이 이론들 중 어느 한가지만으로 설명되지는 않는다. 선천적인 요인은 노화의 30~40% 정

도를 설명하지만 출생 시에 결정되어 버리기 때문에 조절이 불가능하다는 단점이 있다. 후천적인 요인들을 조절할 수 있다면 노화를 느리게 하고 예방하는 것이 가능해진다.

여러 가지 노화요인이 있지만 후천적 요인, 특히 프리라디칼 (free radical)가설 (Haman, 1998; Beckman et al., 1988)이 노화방지에 주요한 가설이다. 프리라디칼, 활성산소, 유해산소 등의 여러 가지 이름으로 불리는 산소유리기 (oxygen free radical)는 사람의 대사 중 파생된 여러 가지 산소화합물들을 총칭하는 것으로, 주위의 화합물들과 쉽게 반응하려는 특징을 갖고 있다. 노화 유발물질인 유해산소축에 노출을 줄이고 항산화제를 충분히 섭취하는 것이 질병을 예방하고 건강을 유지하는 방법이다.

항산화 작용이 확인된 베타카로틴, 비타민 C, 토코페롤, 세레늄 및 리보플라빈 (Dziczak, 1986)과 혈행 개선효과가 있는 은행잎 추출물을 혼합하여 복합제를 만들고, 이 복합제의 항산화 작용을 확인하기 위하여 산소유리기의 생성계와 해독계의 활성에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

항산화물 복합제의 항산화효과를 검증하기 위하여 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐 40마리에 정상식이에 복합제가 0.1%, 0.3%, 0.5% 포함된 실험식으로 3주간 사육한 후 희생시켰다.

*논문 접수: 2006년 1월 18일

수정재접수: 2006년 2월 15일

[†]교신저자: 도성탁 (우) 702-260 대구광역시 북구 태전동 산 7번지, 대구보건대학 임상병리과

Tel: 053-320-1310, e-mail: dohst@mail.dhc.ac.kr

산화환원효소계의 활성변화를 조사하기 위해 간을 적출하고, 간에 포함된 여러 산화환원효소계의 활성을 조사하여 항산화효과를 확인하고자 하였다.

1. 복합항산화제의 제조

항산화효과가 알려진 베타카로틴, 비타민 C, 토코페롤, 세레늄 및 리보플라빈과 혈행개선 효과가 있다고 알려진 은행잎 추출물을 혼합하여 복합제를 만들었다. 원료배합 시의 함량은 식품의약품안전청의 영양보충제품의 최대함량 기준을 기초로 하여 결정하였다. 베타카로틴은 Roche 제품의 10% 분말을, 토코페롤도 Roche 제품의 DL-알파토코페롤초산염 50% 분말을, 세레늄 공급원으로는 아셀렌산나트륨을 사용하였다. 베타카로틴 10% 분말 4.2 g, 비타민 C 400 g, DL-알파토코페롤초산염 50% 분말 100 g, 리보플라빈 10 g, 은행잎 추출물 7 g, 아셀렌산나트륨 5 mg을 혼합기에 넣고 30분간 혼합하여 복합제를 만들었다. 이 복합제를 '항산화제 복합의 노화방지제 조성물'로 특허출원 (출원번호: 10-2005-0029300)하였다.

2. 실험식이

실험에 사용한 4개 군의 식이 즉 정상, 0.1%, 0.3%, 0.5% 식이의 조성은 Table 1과 같다.

3. 실험동물 및 사육방법

실험동물은 평균 체중이 190±5 g되는 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 각 실험군마다 5마리씩 실험에 사용하였다. 환경에 적응시키기 위해 일반 배합사료 (Purina Co., Seoul, Korea)로 1주일간 예비사육한 후 Table 1에 따라 조제한 실험식으로 성장시켰다. 실험식사와 물은 자유로이 공급하였으며, 실험식은 1주일에 한번 씩 제조하여 4°C에 냉장보관하면서 매일 신선한 식이를 공급하였다. 사육장은 stainless steel 장을 사용하였고, 온도 및 습도는 23±2°C, 60±5%로 조정하였고, 명암은 6:00 Am~6:00 Pm으로 dark-light cycle을 유지하였다.

4. 효소원의 조제

실험종료 후 음용수만 공급하고 16시간 금식시킨 흰쥐를 ether로 마취 하에서 개복한 다음, 복부대동맥으로 채혈하고, 병냉의 생리식염수로 간을 관류하여 간 내에 남아있는 혈액을 제거시키고 간장을 적출하여 무게를 측정하였다. 적출한 간 일정량에 4배 량의 냉 25% sucrose 용액을 가하여 균질화한 다음 10,000 ×g에서 20분간 원심분리하여 얻은 post-mitochondrial fraction (PMF)을 이하실험의 효소원으로 하였다.

1) Glutathione peroxidase의 활성 측정

0.1M Tris·HCl buffer (pH 7.2) 일정량에 효소원, 기질인

Table 1. Compositions of experimental diets

Ingredients	(g/kg diet)			
	Normal	0.1% diet	0.3% diet	0.5% diet
Corn starch	350	350	350	350
Sucrose	240	240	240	240
Casein	200	200	200	200
DL-Methionine	3	3	3	3
Corn oil	50	50	50	50
Lard	100	100	100	100
AIN mineral mixture ¹⁾	35	35	35	35
AIN vitamin mixture ²⁾	10	10	10	10
Choline bitartrate	2	2	2	2
Cellulose	10	-	-	-
Sample	-	10	30	50
Total	1,000	1,000	1,020	1,040

¹⁾ AIN mineral mixture (g/kg): calcium lactate 620.0, sodium chloride 74.0, potassium phosphate di-basic 220.0, potassium sulfate 52.0, magnesium oxide 23.0, manganous carbonate 3.3, ferric citrate 6.0, zinc carbonate 1.0, cupric carbonate 0.2, potassium iodate 0.01, sodium selenite 0.01, chromium potassium sulfate 0.5, finely powdered to make 1,000 g.

²⁾ AIN vitamin mixture (mg/kg): thiamin-HCl 600, riboflavin 600, pyridoxine-HCl 700, nicotinic acid 3,000, D-calcium pantothenate 1,600, folic acid 200, D-biotin 20, vitamin B12 2.5, vitamin A 400,000 IU, vitamin D3 100,000 IU, vitamin E 7,500 IU, vitamin K 75, finely powdered to make 1,000 g

H₂O₂와 환원형 glutathione 및 NADPH를 가해 25°C에서 반응시키는 동안 생성된 NADP를 다시 glutathione reductase 존재 하에서 생성된 NADPH의 함량을 340 nm에서 측정하였다 (Paglia et al., 1967). 효소의 활성은 분당 단백질 1 mg이 생성시킨 NADPH의 함량을 nmoles로 나타내었다.

2) Superoxide dismutase (SOD) 활성

0.1 mM EDTA 함유 50 mM phosphate 완충용액 (pH 7.5) 일정량에 효소원인 PMF와 5 mM hematoxylin을 첨가, 25°C에서 5분간 반응시켜 560 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다 (Martin et al., 1987). 이때 대조군은 효소원을 첨가하지 않고 반응시킨 것으로 하였다. 효소활성은 대조군 흡광도의 50%를 억제하는 것을 1 unit로 하였으며, 단백질 mg당 unit로 표시하였다.

3) Xanthine oxidase (XOD) 활성

간조직의 XOD 활성도 측정은 xanthine을 기질로 하여 30°C에서 10분간 반응시켜 생성된 uric acid를 292 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Stirpe et al., 1969). 효소활성은 간조직 단백질 1 mg이 1분 동안 반응하여 기질로부터 생성시킨 uric acid량을 nmol 농도로 표시하였다.

4) Glutathione 함량

마취균질액 일정량에 4% sulfosalicylic acid를 가해 계단백

Table 2. Changes in body weight, weight gain, FER and amounts of feces of rat during feeding of vitamin

Parameters/Groups	Normal	0.1% diet	0.3% diet	0.5% diet
Initial body weight (g)	144.0±4.3	146.7±14.7	144.2±3.7	139.6±4.6
Final body weight (g)	243.6±14.2	261.8±24.2	251.7±9.7	247.9±9.6
Weight gain (g/week)	33.2±5.8	38.4±8.1	35.8±3.9	36.1±4.3
Feed intakes (g/week)	138.9±8.9	142.5±7.0	137.9±7.6	141.1±9.7
FER ¹⁾	0.24±0.06	0.27±0.04	0.26±0.02	0.25±0.02
Feces (g/week)	4.6±0.4	4.4±0.6	4.4±0.4	4.5±0.2

Values are mean ± SD for 5 animals, ¹⁾FER (feed efficiency ratio): weight gain/feed intakes

Table 3. Weight of internal organs of rat fed for 3 weeks with vitamin

Parameters/Groups	Normal	0.1% diet	0.3% diet	0.5% diet
Final body weight (BW)	243.6±14.2	261.8±24.2	251.7±9.7	247.9±9.6
Liver weight/BW (%)	3.51±0.42	3.67±0.38	3.46±0.27	4.33±0.45 ^{a)}
Hepatic cytosolic protein (mg/mL)	16.5±1.6	17.7±1.9	18.9±3.8	15.8±2.6
Hepatic glutathione (μmoles/g tissue)	4.32±0.54	5.63±0.30 ^{a)}	5.67±0.24 ^{b)}	5.67±0.68 ^{a)}
Hepatic lipidperoxide (nmoles/g tissue)	13.95±3.80	10.37±1.14	16.09±3.32	16.30±3.55
Kidney weight/BW (%)	0.83±0.03	0.87±0.06	0.84±0.05	0.82±0.02

Values are mean ± SD for 5 animals

a; significantly different from normal group ($P<0.05$), b; Significantly different from normal group ($P<0.01$)

한 다음 원심분리하여 나온 상정액 일정량에 2-nitrobenzoic acid를 가해 생성되는 thiophenol을 412 nm에서 흡광도를 읽고 표준 검량선에 준해 그 함량을 산출하였다 (Ellman, 1959). 환원형 glutathione의 함량은 간조직 g당 μmole로 나타내었다.

5) 과산화지질의 함량

간조직 마쇄액 일정량에 thiobarbituric acid (TBA) 용액을 가해 boiling water bath 내에서 15분 동안 반응시킨 다음 냉각시켜 n-butanol을 가해 혼합하여 n-butanol층으로 이행되는 홍색의 TBA-reactive substance를 532 nm에서 흡광도를 읽고 표준검량선에 준해 그 함량을 산출하였다 (Ohkawa et al., 1979). 과산화지질의 함량은 간조직 g당 n mole로 나타내었다.

6) 단백질의 함량

Bovine serum albumin을 표준품으로 하여 측정하였다 (Lowry et al., 1951). 실험결과의 통계 처리는 student t-test를 이용하였다.

결과 및 고찰

1. 체중변동, 식이효율 및 체중 당 장기무게 변동

실험식이 첨가량에 따른 실험동물의 증체량과 식이섭취량, 식이효율, 체중당 장기 무게, 간조직 glutathione 및 과산화지질의 함량 변동을 관찰한 성적이 Table 2 및 3이다. 식이섭취량과 식이효율, 증체량 및 배변량은 실험식이의 첨가

Table 4. Changes of oxygen free radical generating and scavenging system in rat fed for 3 weeks with vitamin

Groups	XOD ¹⁾	SOD ²⁾	GPx ³⁾
Normal	2.28±0.43	7.09±0.93	51.2±5.41
0.1% diet	2.42±0.58	7.85±0.76	61.9±4.87 ^{a)}
0.3% diet	2.79±0.46	7.41±0.68	43.1±4.50
0.5% diet	2.89±0.67	7.11±1.04	28.4±9.45 ^{b)}

The assay procedure was described in the experimental methods. Values are mean ± SD for 5 animals.

1; uric acid formed nmoles/mg protein/min

2; unit/mg protein

3; NADPH formed nmoles/mg protein/min

a; significantly different from normal group ($P<0.05$)

b; Significantly different from normal group ($P<0.01$)

농도에 관계없이 모든 실험군에서 유사하게 나타났다.

한편, 체중 당 간 무게는 0.1% 및 0.3% 실험식이 첨가군의 경우에는 대조군과 유사하였으나, 0.5% 실험식이 첨가군에서는 약 23% 정도 증가하였다. 간조직의 단백질 함량은 0.1% 및 0.3% 실험식이 첨가군에서는 첨가 농도에 비례하여 증가하는 경향을 보였으나, 0.5% 실험식이 첨가군에서는 감소하는 경향을 나타내었다. 그리고 간조직 glutathione의 함량은 대조군에 비해 모든 실험식이 첨가군에서 약 30% 이상 유의하게 증가하였다. 과산화지질의 함량은 대조군에 비해 0.1% 실험식이 첨가군에서는 약 25% 감소하였으나 0.3% 이상의 실험식이를 첨가시킨 실험군에서는 약 15% 이상 증가하였다. 체중 당 신장의 무게는 식이조건에 관계없이 모든

실험식이군에서 유사하게 나타났다.

2. Oxygen free radical 생성계 및 해독계 효소의 활성 변동

실험동물에 실험식이를 투여한 다음 oxygen free radical 생성계 및 해독계의 활성 변동을 관찰한 성적이 Table 4이다. Oxygen free radical 생성계 효소인 XOD의 활성은 대조군에 비해 실험식이 첨가 농도를 증가시킬수록 비례하여 증가하는 경향을 보였다. 한편 oxygen free radical 해독계 효소인 SOD의 활성은 0.1% 실험식이 첨가군에서 약 10% 증가하였고 그 이상의 첨가 농도에서는 증가율이 감소하였다. 그리고 glutathione peroxidase의 활성은 0.1% 실험식이 첨가군에서 대조군에 비해 약 20% 정도 증가하였으나, 0.3% 및 0.5% 실험식이 첨가군에서는 이와는 반대로 각각 약 15% 및 약 45% 정도 감소하였다.

이상의 모든 실험성적들과 문헌상의 지견들을 종합해 볼 때, 적당량의 항산화물질 복합체를 투여하여 성장시킨 실험동물에서는 glutathione peroxidase 및 glutathione의 함량이 증가됨으로서 oxygen free radical에 의한 조직의 손상을 예방할 수 있을 것으로 생각되나 과잉의 항산화성 물질의 투여는 오히려 glutathione peroxidase의 활성을 억제시켜 체내에서 생성된 oxygen free radical을 적절하게 제거시키지 못하여 이들에 의한 조직의 손상을 유발할 수도 있다는 것을 확인할 수가 있다. 그러나 이점에 대해서는 추후 계속적인 연구가 행해져야 할 것이다.

REFERENCES

Beckman K, Ames B. The free radical theory of aging matures.

Physiol Rev. 1998. 78: 548-581.

Dziedzic JD. Antioxidants. Food Technol. 1986. 40: 94-102.

Ellman GL. Tissue sulfhydryl group. Arch Biochem Biophys. 1959. 82: 70-77.

Gershon H, Gershon D. Detection of inactive enzyme molecules in aging organisms. Nature 1970. 227: 1214-1217.

Harman D. Aging: Phenomena and theories. Ann NY Acad Sci. 1998. 854: 1-7.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randal RL. Protein measurement with folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951. 193: 265-275.

Martin JP, Dailey M, Sugarman E. Negative and positive assays of superoxide dismutase based on hematoxylin auto-oxidation Arch Biophys. 1987. 255: 329-336.

Ohkawa H, Ohish N, Yaki K. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Annu Biochem. 1979. 95: 351-355.

Orgel LE. The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance to ageing. 1963. Proc Natl Acad Sci USA. 49: 517-521.

Paglia ED, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. 1967. J Lab Clin Med. 70: 158-169.

Stripe F, Della Corte E. The regulation of rat liver xanthine oxidase J Biol Chem. 1969. 244: 855-863.