흰쥐에서 민들레 추출물이 사염화탄소에 의한 산화적 스트레스의 경감기전

김성훈[1] · 최종원*

경성대학교 약학대학, 1 : 경희대학교 한의과대학

Taraxacum Mongolicum H. Suppress Hepatoprotective Activity by Increasing Liver Antioxidant Enzyme in Carbon Tetrachloride(CCl_4)-induced Hepatotoxicity in Rats

Sung Hoon Kim[1], Jongwon Choi*

College of Pharmacy, Kyungsung University, 1 : College of Oriental Medicine, Kyunghee University

Pretreatment with *Taraxacum Mongolicum* H(TMH) prior to the administration of on CCl_4 significantly prevented the increased serum enzymatic activity of aminotransferase(ALT, AST), gamma-glutamyl transpeptidase(GGT) and bilirubin concentration in dose-dependent manner. In addition, pretreatment with TMH also significantly restored the elevation of hepatic malondialdehyde formation and the depletion of reduced glutathione content in the liver CCl_4-intoxicated rats. The restoration of microsomal aniline hydroxylase and aminopyrine N-demethylase activities indicated the improvement in functional status of endoplasmic reticulum. CCl_4-induced hepatotoxicity was also essentially prevented, as indicated by a liver histopathologic study. TMH showed antioxidant effects in $FeCl_2$-ascorbate-induced lipid peroxidation in rat liver homogenate and in superoxide radical scavenging activity. Our results suggest that the protective effect of TMH against CCl_4-induced hepatotoxicity possibly involve mechanisms related to its ability to block p450-mediated CCl_4 bioactivation and free radical scavenging effects.

Key words : *Taraxacum mongolicum* H(TMH), carbon tetrachroride, hepatotoxicity

서 론

질병의 원인 중의 하나로 알려지게 된 자유기(free radical)는 현대인의 건강에 위해요인으로 알려져 있으며, 이는 세포막의 파괴, 단백질 분해, 지질산화, DNA 변성을 초래하여 세포의 기능 장해를 초래하여 암등의 각종 성인병을 유발하는 원인으로 지목되고 있다. 활성산소에 의해 초래되는 지질 과산화물은 산화적 파괴로 인한 기능 장해를 야기함으로서 노화와 질병의 원인이 되기도 한다[1]. 그중 malondialdehyde(MDA)는 활성산소가 세포막의 구성 성분인 불포화지방산을 공격하여 생성되는 반응생성물로 MDA가 축적되면 세포막에서 교차결합, 중합 및 병변이 일어나 이온수송, 효소활성 및 세포표면의 부착상태를 변성시키며 DNA의 염기와 반응하여 돌연변이성 변병을 일으킨다고 알려져 있다[2].

정상적인 세포에서도 어느 정도의 자유기와 과산화물은 생성되고 있으며 이에 생체 내에서는 이들의 방어 기구로서 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase등의 항산화 효소와 tocopherol, ascorbic acid 및 glutathione과 같은 항산화 물질이 존재하여 스스로 보호하고 있으나[3], 생체방어 기구에 이상이 초래, 각종 물리적, 화학적 요인에 의하여 활성산소의 생성이 생체 방어계의 해독기능을 초과함으로서 산화적 스트레스가 야기된다[4]. 이와 같이 활성 산소의 제거하기위한 항산화제의 중요성이 부각되고 있으며, 우리 생활주변에 천연자원으로 부터의 많은 항산화제의 자원물질이 많이 발견되고 있으며 또한 식용으로 가능한 물질로부터 유용 활성 물질을 찾는 일환으로 본 연구를 시행하였다.

민들레(*Taraxacum mongolicum* H)는 국화과(Composite)에

* 교신저자 : 최종원, 부산시 남구 대연동 314-79, 경성대학교 약학대학
· E-mail : jwchoi@ks.ac.kr, · Tel : 051-663-4883
· 접수 : 2010/04/05 · 수정 : 2010/04/30 · 채택 : 2010/06/08

속하는 다년생초본으로 한방에서는 포공영이라는 약물로 봄 및 여름에 꽃이 피기 전, 후에 채취하여 전초를 건조하여 청열해독, 소염, 이뇨의 목적으로 사용하였으며[5], 식품공전에는 어린순, 어린잎, 뿌리부위를 식품의 주원료로 이용할 수 있다고 수록하고 있다[6]. 민들레는 신수본초에 수재되어 있으며, 화한약백과도감에는 소염, 항균, 이뇨 및 적출 심장에서는 소량에는 흥분, 다량에는 억제작용이 나타나는 것으로 기록[7]되어 있으며 그 외에도 지금까지의 연구에서항암효과 및 항바이러스 효과 등의 다양한 약리작용을 보고하고 있다[8-10]. 이에 본 연구에서는 천연물로부터 활성 산소의 제거능에 어떠한 영향을 주는가를 관찰함으로서 경우에 따라 다양하게 활용할 수 있는 천연물 신약 및 건강기능식품의 소재를 개발하고자 시도하였다.

재료 및 방법

1. 동물 및 처치

동물은 효창 science(대구)로 부터 분양 받아 본 대학 동물사에서 일정한 조건(온도 : 22±0.5℃, 습도 : 46-60%, 명암 : 12시간 light/dark cycle)으로 1주 동안 고형 사료로 적응시킨 체중 180±10 g의 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐를 사용하였다. 민들레는 부산의 부산진 시장 소재 한약제의 도매상에서 구입하여 사용하였고, 상지대학교 박 희준교수님께 의뢰하여 확인 하였으며 시료의 일부는 (주)천호식품(부산) 표본실에 보관하였다. 구입한 민들레를 선별, 정선하여 세척하고 이를 동결 건조 한 후 분말화하여 건조분말 150 g을 증류수 2 L에 넣어 초음파 세포 파쇄기 내에서 3회 반복 추출 하였다. 총 추출액을 여과지(Whatman No. 2)로 여과한 후 80℃의 감압증발기에서 감압농축 후 동결건조하여 약 15 g의 농축액을 얻었다. 이 농축액을 매일 체중을 측정하여 예비실험을 통하여 용량을 계산한 후 생리식염수에 용해하여 2주간 경구 투여 하였으며, 민들레 추출물을 마지막 투여 3일 전 부터 사염화탄소(20 mg/kg, Sigma, USA)를 올리브 오일에 희석하여 복강 내로 주사하였으며 마지막 사염화탄소 투여 24시간 후에 치사하였다. 정상 대조군은 동량의 생리식염수와 올리브 오일을 투여하였다.

2. 시료의 채취

실험 마지막 날에 CO_2로 가볍게 마취시키고 복부 대동맥으로부터 혈액을 채취하였고 간장은 0.9% 생리식염수로 관류시켜 조직 내 혈액을 제거하고 적출하여 생리식염수에 씻은 후 여지로 가볍게 압박하여 남아 있는 혈액 및 생리식염수를 제거하였다. 채취한 혈액은 실온에서 30분 이상 방치해 두었다가 3000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 얻어 분석 시까지 냉동보관 하였다. 간장조직은 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.4)를 가하여 빙냉 하에서 glass teflon homogenizer를 사용하여 10% 마쇄액을 만들었다. 이 마쇄액을 homogenate 분획으로 하였으며 이 분획을 계통 분리하여 cytosol, microsome 및 mitochondria 분획으로 분리하였다. 마쇄액은 lipid peroxide 및 glutathione 함량 측정에, cytosol 분획은 glutathione reductase 및 glutathione S-transferase 활성의 측정에 사용하였으며, microsomal 분획에서는 aniline hydroxylase 및 aminopyrine N-demethylase의 활성 측정, mitochondria 분획은 catalase 활성 측정의 효소원으로 사용하였다.

3. 혈청 중 간 기능 검사

Aminotransferase(AST, ALT)의 측정은 Reitman과 Frankel의 방법 및 총 bilirubin 함량의 측정은 Malloy-Evelyn법에 준하여 조제된 kit(아산제약)를 사용하였다. Bromosufophthalein(BSP)의 혈중 저류 측정은 BSP(40 mg/kg)을 생리식염수에 용해하여 대퇴부 정맥으로 주입한 후 60분후 혈액을 채취하였다. 채취한 혈장(50 µl)을 0.1 N NaOH를 가하여 알칼리로 만든 후 580 nm에서 측정하였다. ɣ-Glutamyltransferase(GGT)의 측정은 Martin등의 방법[11]에 준하여 40 mmol glycylglycine을 함유하는 완충액(pH 8.2)의 반응액에 효소원을 가하여 405 nm에서 흡광도를 측정하여 p-nitroaniline 형성율을 관찰하여 효소활성을 측정하였다.

4. 간 조직 지질과산화 및 glutathione 함량

지질과산화의 함량 측정은 Ohkawa 등의 방법[12]을 변경하여 간장 조직 1 g당 10배량의 0.1 M sodium phosphate buffer(pH 7.4)를 가해 마쇄하고 이 10% 마쇄액에 동일한 buffer를 동량 가하여 3시간 preincubation 시킨 후 8.1% sodium dodecyl sulfate와 20% acetate buffer(pH 3.5) 및 발색의 목적으로 0.8% thiobarbituric acid를 가한 후 95℃에서 1시간 동안 반응시켜 실온에서 냉각 후에 n-BuOH : pyridine(15:1)을 첨가하여 15분간 원심 분리하여 생성된 홍색의 n-BuOH : pyridine 층을 취하여 파장 532 nm에서 그 흡광도를 측정하여 표준 곡선에서 그 함량을 간장 조직 1 g 당 malondialdehyde nmole로 표시하였다.

Glutathione의 정량은 Saville법[13]에 의하여 간장 균질액을 10% TCA로 제단백 한 후 상징액에 0.01 M $NaNO_2$와 0.2 N H_2SO_4를 가하여 0.5% sulfamic acid ammonium 수용액과 1% $HgCl_2$와 3.4% sulfanilamide/0.4 N HCl을 가하였다. 이곳에 발색제로 0.1% N-1-naphthylenediamine을 가한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준용액으로 125 µM glutathione 용액을 사용하였다.

5. 효소활성의 측정

Aminopyrine N-demethylase의 활성 측정은 Nash등의 방법[14]을 약간 변경하여 반응액 2 ml중 0.1M Na^+/K^+ phosphate buffer(pH 7.5)에 2 mM aminopyrine . HCl, 0.5 mM NADPH, 10 mM $MgCl_2$, 150 mM KCl, 1 mM semicarbaizide 및 효소액(30-400 µg의 단백질)을 가해 이 반응액을 37℃에서 30분간 반응시킨 다음 15% $ZnSO_4$와 포화 $Ba(OH)_2$를 가하여 반응을 종료 시키고 5분간 방치 후 10분간 원심분리하여 여기서 얻은 상징액 5 ml에 발색의 목적으로 Nash reagent를 첨가하고 60℃에서 30분간 반응 시킨후 다시 원심분리하여 상징액을 취하여 파장 415 nm에서 그 흡광도를 측정하고 표준곡선에 준하여 활성도를 산정 하였다. Aniline hydroxylase의 활성 측정은 Bidlack등의 방법

[15]에 준하여 반응액 2 ml중 10 mM $MgCl_2$와 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 μg의 단백질)을 가하여 이액을 37℃에서 20분간 반응 시킨 다음 반응을 종료시킬 목적으로 20% trichloroacetic acid를 가한 후 10분간 원심분리 하여 상징액에 발색의 목적으로 10% Na_2CO_3와 0.2 N-NaOH(2% phenol 함유)를 넣고 37℃에서 30분간 반응 시킨 후 파장 640 nm에서 그 흡광도를 읽고 표준곡선에서 활성도를 산정하였다. Glutathione S-transferase 활성 측정은 Habig등의 방법[16]에 준하여 반응액 3.5 ml에 0.1 M potassiume phosphate buffer(pH 6.5)에 1 mM glutathione, 1 mM 1-chloro 2,4-dinitrobenzene및 0.1 ml 효소액을 가하여 25℃에서 2분간 반응 시킨 후 이때 생성되는 thioether를 340 nm에서 흡광도의 변화를 읽고 흡광계수 9.6 mM-1 cm-1을 이용하여 효소의 활성도를 산정하였다.

6. $FeCl_2$-vitamin C유도 지질과산화 및 활성 상소 소거능 측정

시험관에 일정량의 간 조직을 150 mM KCl-Tris HCl 완충액(pH 7.2)에 마쇄한 마쇄액에 0.1 mM vitamin C, 4 mM $FeCl_2$와 민들레 추출물을 용량별로 시험관내에 첨가하여 MDA의 량을 측정 하였다. Tetraethoxypropan을 사용하여 표준곡선에서 함량을 측정하였다. 활성산소기의 소거능 시험은 100 μM xanthine, 0.02 U xanthine oxidase와 민들레 추출물을 용량별로 시험관내에 첨가하고 220 nm에서 nitroblue tetrazolium의 소거능을 측정하였다. 대조물질로 100 U/ml의 superoxide dismutase를 사용하였다.

7. 단백질 정량 및 통계처리

단백질의 함량은 Lowry 등의 방법[17]에 준하여 bovine serum albumin(Sigma, Fr. V)을 표준품으로 하여 측정하였다. 본 실험에서 얻어진 결과는 평균치±표준편차로 표시하였고, 통계적 유의성 검증은 Duncan's multiple range test를 이용하였다.

결 과

1. 민들레 추출물의 간독성 저해 효과

민들레 추출물을 2주간 전처리 하고 사염화탄소의 투여로 유발된 간장해 흰쥐의 혈중 tansaminase(AST, ALT) 및 GGT의 활성에 미치는 영향을 관찰한 성적이 Table 1이다.

흰쥐에 사염화탄소를 처치하면 혈중의 aspartate transaminase의 활성이 정상군(31.7±4.53 U/L)에 비하여 현저히 증가(1811.0±210.6 U/L) 되던 것이 민들레 추출물(100, 200 mg/kg)을 2주간 전처리함으로서 정상군에는 미치지 못하나 각각 963.8±49.5, 237.9±57 U/L로 현저히 억제 되었다. 한편 민들레 추출물 자체를 정상 동물에 투여한 군에서는 별다른 영향이 없었다. 이러한 결과는 alanine transaminase 및 γ-glutamyl transferase의 활성 변화와 유사 하였다. 혈중 bilirubin의 측정에 있어서는 정상군(0.4±0.08 mg%)에 비하여 사염화탄소를 처리함으로서 1,24 ± 0.12 mg%로 약 3배정도 증가 되던 것이 민들레 추출물의 전처리로 각각 0.9±0.10 mg% 및 1,7±0.09 mg%로 정상군에는 미치지 않으나 현저히 억제되었다. 한편 BSP의 농도도 bilirubin에 미치는 영향과 유사 하였다(Fig. 1).

Table 1. Dose-dependent at pretreatment of rats with Taraxacum mongolicum on CCl_4-induced hepatotoxicity

Treatment	Dose (mg/kg)	AST (IU/L)	ALT (IU/L)	GGT (mu/ml)
Normal		31.7 ± 4.53^d	58.3 ± 10.6^d	5.47 ± 1.39^d
TMC	200	33.8 ± 3.27^d	61.4 ± 9.53^d	5.87 ± 1.57^d
CCl_4		1811.0 ± 210.6^a	2947.5 ± 300.7^a	210.5 ± 39.8^a
CCl_4+TMH	100	963.8 ± 49.5^b	1346.2 ± 180.5^b	153.2 ± 26.4^b
CCl_4+TMH	200	237.9 ± 57.8^c	450.6 ± 92.9^c	93.6 ± 13.5^c

Rats were orally administered with Taraxacum mongolicum H.(TMH) extract for two weeks and intraperitoneally injection of carbon tetrachloride(CCl_4, 20 mg/kg) for 3 times of 3 days after supplementation of extract. Values are mean and standard deviation for 6 experiments. Data followed by different superscript are significant by Duncan new multiple range test from normal($p<0.05$).

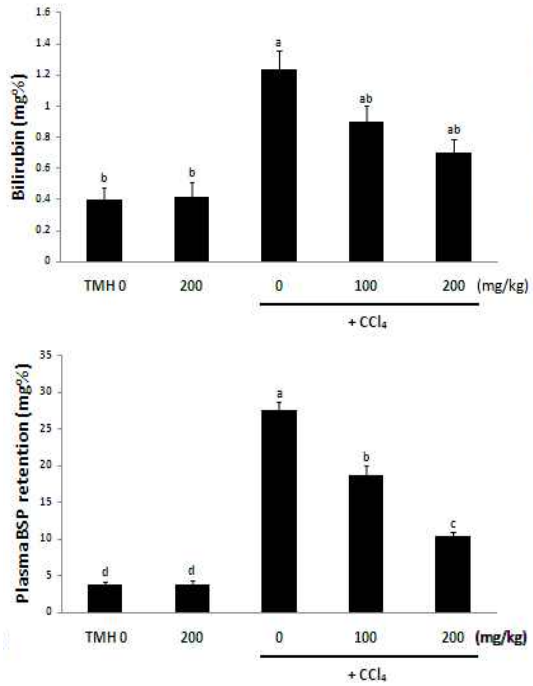

Fig. 1. Effect of *Taraxacum mongolicum* on blood bilirubin concentration and retention of bromosulfophthalein(BSP) against CCl_4-intoxicated rats. Values are mean ± SD(n=6). Data followed by different superscript are significant by Duncan new multiple range test from normal($p<0.05$).

2. 간조직중 지질 과산화 함량에 미치는 효과

민들레 추출물을 2주간 전처리 하고 사염화탄소의 투여로 유발된 간 장해 흰쥐의 간조직중 지질과산화의 함량을 측정한 성적이 Fig. 2이다. 사염화탄소의 투여로 유발된 간 장해 흰쥐의 간 과신화지질량(MDA) 함량은 11.4±1.31 nmole/g liver로 정상군 3.8±0.73 nmole/g liver에 비하여 약 2배 유의성($p<0.05$) 있게 증가됨이 관찰되었다. 민들레 추출물 200 mg/kg 투여군에서는 5.97±0.83 nmole/g liver로 사염화탄소를 투여한 대조군에 비하여 유의한 지질과산화물질 형성저해효과를 보였다.

3. 간 조직 중 glutathione의 함량에 미치는 효과

민들레 추출물을 2주간 전처리 하고 사염화탄소의 투여로 유발된 간 장해 흰쥐의 간조직중 glutathione의 함량을 측정한 성적이 Fig. 3이다. 사염화탄소의 투여로 유발된 간 장해 흰쥐의 간 glutathione의 함량은 2.4±0.36 μmole/g liver로 정상군 6.5±0.97 μmole/g liver에 비하여 약 2.5배 유의성($p<0.05$) 있게 억제됨이 관찰되었다. 한편 민들레 추출물 100, 200 mg/kg 투여군에서는 각각 2.9±0.47 μmole/g liver 및 3.6±0.50 μmole/g liver로 사염화탄소를 투여로 대조군에 비하여 간 조직 중 glutathione의 함량이 억제화된 것이 증가하는 경향을 보였다.

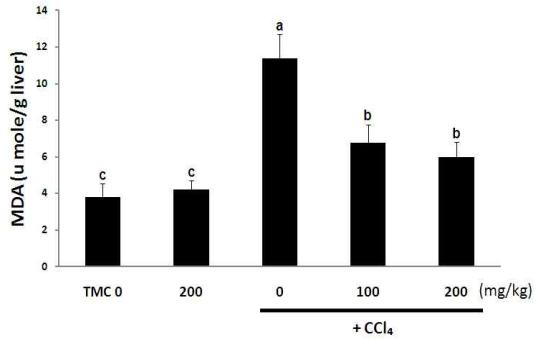

Fig. 2. Effect of *Taraxacum mongolicum* on hepatic lipid peroxidation in CCl_4-intoxicated rats. Values are mean ± SD(n=6). Data followed by different superscript are significant by Duncan new multiple range test from normal($p<0.05$).

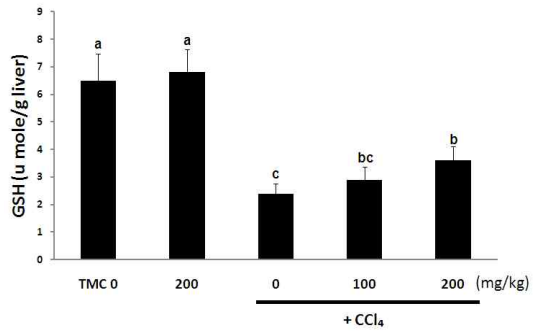

Fig. 3. The effect of *Taraxacum mongolicum* on hepatic glutathione content in CCl_4-intoxicated rats. Values are mean ± SD(n=6). Data followed by different superscript are significant by Duncan new multiple range test from normal($p<0.05$).

4. 활성산소의 생성 및 해독계에 미치는 효과

Fig. 2 에서 실험동물에 사염화탄소의 투여로 간 조직 중 지질과산화 함량의 증가되던 것이 민들레 추출물의 전처리로 억제되는 기전을 검색할 목적으로 대사 과정 중 microsomal 효소계 및 glutathione S-transferase의 활성에 미치는 영향을 관찰한 성적이 Table 2이다.

정상동물에 사염화탄소를 투여한 군에서는 간장 조직의 microsomal enzyme으로서 간장의 지질과산화 생성 대사 효소계에 영향을 미치는 aminopyrine N-demethylase(AD)와 aniline hydroxylase(AH) 효소 활성에 대해 측정한 결과, 정상쥐에 비하여 사염화탄소를 투여함으로서 현저히 증가 되던 것이 민들레추출물의 전처리로 사염화탄소 단독 투여군 보다 억제되는 경향을 보였다. 한편, 해독과정의 하나인 glutathione S-transferase의 활성에서는 정상군에 비하여 사염화탄소를 투여함으로서 현저히 억제 되던 것이 민들레 추출물을 2주간 전처리 하고 사염화탄소를 투여한 군에서는 사염화탄소 단독 투여군과 별다른 영향이 없었다.

Table 2 The effect of *Taraxacum mongolicum* on liver microsomal enzyme and glutathione S-transferase activities in CCl_4-terated rats

Treatment	Dose (mg/kg)	AH	AD	GST
		PAP nmol/ mg protein/min	HCHO nmol/mg protein/min	CDNB nmol/mg protein/min
Normal		1.58 ± 0.17^{c}	3.86 ± 0.33^{d}	284.9 ± 55.6^{b}
TMH	200	1.60 ± 0.21^{c}	3.97 ± 0.42^{d}	293.7 ± 41.7^{a}
CCl_4		2.89 ± 0.13^{a}	9.94 ± 0.59^{a}	107.4 ±2 9.8^{c}
CCl_4+TMH	100	2.43 ± 0.18^{b}	7.27 ± 0.39^{b}	139.7 ± 31.4^{c}
CCl_4+TMH	200	2.19 ± 0.15^{b}	6.17 ± 0.43^{c}	157.7 ± 48.9^{cd}

Values are mean ± SD(n=6). Data followed by different superscript are significant by Duncan new multiple range test from normal($p<0.05$). AH(aniline hydroxylase): p-aminophenol(PAP) nmole/mg protein/min AD(aminopyrine N-demethylase): formaldehyde(HCHO) nmole/mg protein/min GST(glutathione S-transferase): CDNB(1-chloro 2,4-dinitrobenzene) nmole/mg protein/min

5. 시험관 내에서 지질과산화 함량 및 활성산소 소거능

시험관 내에 민들레 추출물을 용량별로 첨가 하고 간 조직 및 $FeCl_2$와 vitamin C를 첨가하고서 지질과산화의 함량 및 활성산소 소거능을 관찰한 성적이 Table 3이다. 간 조직에 $FeCl_2$와 vitamin C를 첨가하여 지질과산화의 함량을 증가 시킨 후 민들레 추출물을 용량별(0.1, 1, 5, 10 mg/ml)로 첨가 하고서 지질과산화의 함량 저해율이 용량 의존적으로 억제 되었다. 이러한 결과는 초과산화물의 소거능 (superoxide scavenging activity) 측정에도 유사한 결과를 얻었다.

Table 3. Inhibitory effect of *Taraxacum mongolicum* on $FeCl_2$-Vc stimulated lipid peroxidation and superoxide scavenging activity

Treatment	Dose (mg/ml)	Lipid Peroxidation[a]	Scavenging activity[b]
		%	%
TMH	0.1	14.9 ± 1.38^{d}	16.4 ± 1.48^{d}
	1	23.6 ± 3.17^{c}	21.8 ± 2.42^{c}
	5	57.4 ± 4.29^{b}	40.7 ± 5.17^{b}
	10	73.5 ± 2.48^{a}	62.3 ± 4.29^{a}

a: Rat liver homogenate were stimulated with FeCl2-ascorbic acid in the presence or absence of TMH and lipid peroxidation was measured as described in material and method. b: Superoxide was generated by oxidation of xanthine/xanthine oxidase in the presence or absence of TMH and scavenging activity was measured as described in material and method. values are presented as the mean of the percentage inhibition ± S.D, for three independent experiments, performed in triplicate.

고 찰

산소를 이용하는 생물체는 정상적인 대사과정에서도 지속적으로 superoxide radical anion(O_2-), hydrogen peroxide(H_2O_2), hydroxyl radical(OH-)등과 같은 반응성이 큰 reactive oygen species(ROS)를 생성하고[18], 이들은 UV, ozone, 공기오염 등과 같은 외부 자극에 의해서 생성된다[19]. 이런 ROS는 다양한 기전을 통하여 암, 노화, 심장질환, 염증 및 radiation injury등의 여러 가지 질병과 관련이 있는 것으로 알려져 있다[20,21]. 이에 본 연구에서는 실험동물에 산화적 스트레스를 일으킬 목적으로 사염화탄소를 사용하여 간독성을 유발시킨 후 이러한 산화적 스트레스

에 대해 민들레 추출물이 어떠한 기전에 의하여 사염화탄소로 유도하는 산화적 스트레스를 방어하는지를 세포내에서 항산화 효소의 활성 변화를 관찰하였다.

간 경변에서 혈청의 aspartate transaminase (AST), alaline transaminase (ALT), γ-glutamyl- transferase (GGT) 및 total bilirubin등이 증가 되고 있는 것으로 알려져 있다[22]. Transaminase는 amino기 전이반응을 촉매하는 효소의 총칭[23]으로 임상적으로 가장 많이 이용되고 있는 AST와 ALT가 있는데 이들 효소들은 amino산과 α-keto acid와의 사이에 amino기 전이반응을 촉매하는 것으로 체내에 널리 분포되어 있다. 이들은 간 손상의 지표로 널리 이용되는 것은 간세포가 손상이 되면 세포 밖으로 유출되는 유출효소로서 이과정은 세포내의 energy공급이 감소된 결과로 세포내의 K^+이온이 세포외로 유출되고 Na^+, Ca^{++} 및 수분이 세포내로 유입이 된다. 그 결과 세포는 팽창되고, 세포막이 늘어나게 되어 세포질에 존재하는 AST와 ALT가 유출된다. 세포 밖으로 빠져나간 AST 및 ALT는 순환 혈액 중으로 빠르게 유출되어 간 손상 시 정상치 보다는 현저히 증가됨으로서 간 기능 검사에 이용되고 있으며, GGT[24]는 γ-glutamyl기를 다른 peptide나 1-amino acid를 전이하는 전이 효소로서 간 특이효소로 간장 질환에서 ALP와 유사하나 더 민감하게 반응하는 효소로 알려져 있다. 이 효소 또한 간조직의 손상 시 혈중으로 유출이 증가되므로 간 기능의 지표 검사에 많이 이용되고 있다. 본 실험에서는 민들레 추출물을 2주간 전처리하고 사염화탄소를 3일간 하루에 한 번씩 투여한 결과 혈중 AST, ALT 및 GGT의 활성이 사염화탄소의 투여로 현저히 증가되던 것이 민들레 추출물의 투여로 억제되었다. 이에 민들레 추출물의 투여는 사염화탄소로 야기되는 간독성을 경감 시키는 작용이 있음을 확인하였다.

한편 혈청 총 bilirubin은 포합 도는 비포합의 형태로 혈청에 순환되며, 간질환을 의미하는 하나의 지표로 사용하고 있다. 본 실험에서 혈청 총 bilirubin은 사염화탄소를 투여한 군에서 정상군에 비하여 유의성 있게 증가하는 반면 민들레 추출물의 전처리로 용량 의존적으로 억제되었다. 이러한 간 경변시 민들레 추출물의 저해 효과를 확인할 목적으로 혈액중의 BSP의 저류 농도를 측정하였던 봐 사염화탄소를 투여한 대조군이 27.6 ± 1.19%인데 비하여 민들레 추출물을 투여함으로서 각각 18.8 ± 1.23% 및 10.5 ± 0.57%로 유의성 있게 억제되었다.

일반적으로 생체조직 세포막의 손상은 세포막 구성성분인 polyunsaturated fatty acid의 과산화가 그 한 가지 요인으로 지적되고 있는데, 지질과산화의 생체 외적인 요인뿐만 아니라 내적인 요인에 의하여 생성된 oxygen free radical들 대문에 야기되며, 세포의 성분이나 기질, 특히 불포화지방산이 다량 존재하는 세포막에 연쇄적인 과산화적 손상을 입힌다. 또한 생체는 free radical의 독작용을 저지시켜주는 free radical scavenging system이 존재하고 있고 여러 가지 손상으로부터 보호받고 있다. 그러나 어떠한 원인에 의해 free radical generating system과 scavenging system 사이의 불균형이 초래되어 질 때에는 조직의 손상, 발암, 염증, 성인병 및 노화등과 같이 여러 가지 독작용을 유발한다고 한다[25].

지질과산화는 세포의 지질성분인 불포화 지방산에 활성산소가 첨가되어 과산화된 지질을 지질과산화라고 한다. 특히 생체내에서 과산화 현상은 세포막의 주요 구성 성분인 인지질을 구성하는 불포화 지방산이 활성 산소와 결합하여 생기게 되는데 이러한 현상은 불포화 지방산 구성성분이 많고 인지질의 함량이 풍부한 mitochondria, microsome, erythrocyte 및 platelet등의 막에서 쉽게 일어날 수 있다. 이러한 지질성분의 과산화 작용 결과 결국은 생체 내에서 정상적인 작용을 상실하게 되고 또한 세포괴사 등을 일으키는 것으로 알려져 있다[26]. 즉 독성물질 등 여러 가지 인자에 의하여 생성된 oxygen radical과 반응한 불포화 지방산은 불포화지방산의 radical이 되고 산소와 결합하여 hydroxyepoxide를 생성하며 trien 이상의 불포화지방산은 hydroperoxide, endoper--oxide 및 polyepoxide등과 같은 지질과산화물이 생성되어 malondialdehyde로 분해된다[27]. 과산화지질을 유도하는 물질은 그 물질이 세포내에서 직접 radical로 변화하거나 또한 대사부산물로서 oxygen radical을 생성시켜서 이들이 세포내 recycling 반응에 관여하여 계속적으로 radical을 생성하여 지질과산화의 생성을 증가시켜 간 손상을 초래하는 것으로 알려져 있다. 사염화탄소의 투여로 간 조직 중 위 지질과산화 함량이 현저히 증가 되던 것이 민들레 추출물의 투여로 현저히 억제되었다. 이러한 억제 현상의 기전을 추구할 간 microsomal에서 활성산소의 생성계를 측정한 결과 효소의 활성계가 억제되는 경향을 보였다. 사염화탄소에 의한 간독성 기전은 생체막의 활면소포체에 존재하는 cytochrome P450 system에 의하여 활성대사물인 trichloromethyl free radical($\cdot CCl_3$)로 대사 되거나, ($\cdot CCl_3$)가 O_2분자와 결합하여 trichloromethyl peroxy radical ($\cdot OOCCl_3$)로되어 세포막의 불포화지방산을 과산화 시킴으로서 막의 구조와 기능을 파괴한다고 하였다. 한편 이러한 반응성이 높은 radical들은 cytochrome P450 자체와도 결합하여 소포체내의 이들 효소들을 파괴시킨다[28,29].

간장의 해독기전은 간세포의 smooth endoplasmic reticulum에 존재하는 대사 효소계에 의하여 해독 또는 불활성화되어 체외로 배출되는 산화, 환원 및 가수분해 시키는 1상 반응과 활성산소를 포합하여 체외로 배설 시키는 2상 반응으로 나눌 수 있다[30]. 그 중 1상 반응에 관여하는 cytochrome P-450은 mixed function oxidase로써 약물이 결합하는 형태 및 존재조직에 따라 서로 다른 spectrum을 나타내는데, aminopyrine을 기질로 하여 formaldehyde를 생성하는 Type Ⅰ과 aniline을 기질로 하여 p-aminophenol을 생성하는 TypeⅡ로 분류하고 있으며 이는 microsomal계의 활성산소 생성에 관여하고 있다[31]. 체내에 투여되어진 약물 및 독성물질의 대사과정은 1상 반응과 2상 반응으로 나눌 수 있으며, 지질과산화 함량의 증가가 어떠한 기전에 의하여 나타나는 가를 검토할 목적으로 1상 반응인 microsomal 효소인 aminopyrine N-demethylase 및 anilline hydroxylase의 효소계를 측정하여 본 결과 정상군에 비하여 사염화탄소의 처리로 현저히 증가 되던 것이 민들레추출물의 전처리로 억제되었다. 1상 반응을 거쳐서 생성된 친전자성 물질을 친핵성 물질인 glutathione과 포합시켜 mercapturic acid를 생성하여 배설을 하

는 2상 과정에 관여하는 효소[32,33]인 glutathione s-transferase(GST)의 활성에 미치는 영향을 관찰하였던 바, 간 조직중의 glutathione의 농도 및 GST의 활성에는 별다른 영향이 없었다. 한편, 시험관내에서 $FeCl_2$-ascorbic acid로 유도한 간 조직의 지질과산화의 함량 및 xanthine/xanthine oxidase계를 사용한 초과산화물의 소거능의 실험에서 민들레 추출물을 용량별로 첨가하였을 때 용량의존적으로 억제되는 경향을 보였다.

이상의 결과를 추론하여 볼 때 사염화탄소로 유도한 흰쥐의 산화적 스트레스를 민들레 추출물의 전처리로 제어하는 효과가 있었으며 제어기전은 활성 산소의 생성계인 microsomal 효소계를 조절하여 사염화탄소의 대사에 의해 생성되는 trichloromethyl기를 억제하는 결과로 추론되며 앞으로 더욱 많은 연구가 이루어 져야 할 것으로 사료된다.

결 론

민들레는 한방에서는 포공영이라 하며 임상에서는 청열해독, 소염, 이뇨의 목적으로 사용하는 자원으로 산화적 스트레스에 미치는 영향을 관찰하고자 사염화탄소를 실험동물에 투여하여 실험을 한 결과 사염화탄소의 투여로 혈중 AST, ALT, GGT의 활성, bilirubin의 농도 및 BSP의 저류 시간이 현저히 증가되던 것이 민들레 추출물을 용량별로 2주간 전처리함으로서 유의성 있게 억제되었다. 간조직중 지질과산화 함량의 지표인 MDA의 함량도 현저히 사염화탄소에 의한 산화적 스트레스 상태에서 증가되던 것이 억제되었으며, 활성산소의 생성계인 aniline hydroxylase 및 aminopyrine N-demethylase의 활성이 민들레 추출물의 전처리로 유의성 있게 억제 되었다. 한편 간조직중의 glutathione 농도와 glutathione S-transferase의 활성은 사염화탄소의 투여로 현저히 억제되었으나 민들레추출물의 전처리로는 별다른 영향이 없었다. 시험관내 실험에서 $FeCl_2$-ascorbate로 유도되는 지질과산화의 함량 및 xanthine/xanthine oxidase에 의한 초과산화물의 소거능에 민들레 추출물의 첨가로 억제 되었다.

이상의 결과로 보아 천연자원 물질인 민들레에는 체외에서 야기되는 여러 가지 산화적 스트레스를 방어하는 작용이 있을 것으로 향후 기능성 물질의 소재로 활용할 수 있는 가치가 있다고 생각된다.

감사의 글

이 논문은 2010학년도 경성대학교 학술연구비지원에 의하여 연구되었음

참고문헌

1. Valko, M., Leibfritz, D., Cronin, M.T.D., Mazur, M., Telser, J. Free radicals and antioxidant in normal physiological functions and human disease. Intern. J. Cell Biol. 39: 44-84, 2007.
2. Fridorich, I. Biological effects of the superoxide radical. Arch. Biophys. 247: 1-11, 1986.
3. Nirmal, C.K., Carl, M.P. Catalase, superoxide dismutase, glutathione reductase and thiobarbituric acid-reactive products in normal and dystrophic human muscle. Clin. Chim. Acta. 94: 277-280, 1979.
4. Vitaly, A.R., Hartmut, B.S. Ascorbyl radical as natural indicator of oxidative stress: quantitative regularities. Free Radical Biol. Med. 17(2):93-103, 1994.
5. Mun, K.S. Asteraceta(Compositae). In: Components and uses of medical plants. Ilweolseogak. Seoul, Korea. pp 750-751, 1999.
6. 한국식품공업협회. 식품공전. 문영사, 서울, pp 25-34, 2001.
7. Namba, T. The encyclopedia of Waken-Yaku with color pictures. Hoikusha, Osaka, Japan. 1: 68-71, 1993.
8. Chen, Z. Clinical study of 96 cases with chronic hepatitis B treated with jiedu yanggan gao by double-blind method. Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi. 2: 71-74, 1990.
9. Zheng, M. Experimental study of 472 herbs with antiviral action against the herpes simplex virus. Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi. 1: 39-41, 1990.
10. Liu, X.R., Han, W.Q., Sun, D.R. Treatment of intestinal metaplasia and atypical hyperplasia by gastric mucosa with xiao wei yan powder Zhongguo. Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi. 10: 602-603, 1992.
11. Martin, M.I., Gonzalez, J., Muñoz, J.M., Alonso, L., Esteller, A., Fermoso, J. Changes in hepatic and serum γ-glutamyltransferase activities following chronic ethanol intake in rats. Drug Alcohol Dependence, 21(1):19-23, 1988.
12. Ohkawa, H., Ohishi, N. and Yaki, K. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. Anal. Biochem. 95: 351-358, 1979.
13. Saville, A. Scheme for the colorimetric determination of microgram amounts of thiols, Analyst, 83: 670-672, 1958.
14. Nash, T. The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the hentisch reaction. J. Biol. Chem. 55: 412-416, 1953.
15. Bidlack, W.R., Lowry, G.L. Multiple drug metabolism: p-Nitroanisole reversal of acetone enhanced aniline hydroxylation. Biochem. Pharmacol. 31: 311-317, 1982.
16. Habig, W.H., Pabist, M.J., Jakoby, W.B. Glutathione S-transferase: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. J. Biol. Chem. 249: 7130-1739, 1974.
17. Lowry, O.H., Rodebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275, 1951.
18. Shull, S., Heintz, N.H., Periasamy, M., Manohar, M., Janssen, Y.M., Marsh, J.P., Mossman, B.T. Differential

regulation of antioxidant enzymes in response to oxidants. J. Biol. Chem. 266(36):24398-24403, 1991.

19. Iizawa, O., Kato, T., Tagami, H., Akamatsu, H., Niwa, Y. Long-term follow-up study of changes in lipid peroxide levels and the activity of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in mouse skin after acute and chronic UV irradiation. Arch. Dermatol. Res. 286(1):47-52, 1994.
20. Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metalytic ions in human disease: an overview. Methods in Enzymology. 186: 1-85, 1990.
21. Freman, B.A., Crapo, J.D. Biology of disease : Free radicals and tissue injury. Lab. Invest. 47: 412-426, 1982.
22. Bauer, J.D. Clinical laboratory methods. St. Louis: C.V. Mosby Co. pp 578-579, 700-703, 1995.
23. Sarkar, N.K. Alanine and aspartate aminotransferase activities in serum and various subcellular fractions from the livers of different species. Inter. J. Biochem. 5(4):375-381, 1974.
24. Mitchell, J.S., Daniel, S.M., Marshall, M.K. ɣ-Glutamyl transpeptidase activity in liver disease: serum elevation is independent of hepatic GGTP activity. Clin. Chim. Acta, 125(3):283-290, 1982.
25. Irani, K., Xia, Y., Zweier, J.L., Sollott, S.J., Der, C.J., Fearon, E.R., Sundaresan, M., Finkel, T., Goldschmidt-clermont, P.J. Mitogenic signaling mediated by oxidants in Rastransformed fibroblasts. Science, 275: 1649-1652, 1997.
26. McCord, J.M. Oxygen derived free radicals in postischemic tissue injury. N. Engl. J. Med. 312: 159-163, 1985.
27. Ip, C., Lisk, D.J. Modulation of phase I and phase II xenobiotic- metabolizing enzymes by selenium-enriched garlic in rats. Nutri. Can. 28: 184-188, 1997.
28. Castro, J.A., De Ferreyra, E.C., De Castro, C.R., De Fenos, O.M., Sasame, H., Gillette, J.R. Prevention of carbon tetrachloride-induced necrosis by inhibitors of drug metabolism--further studies on their mechanism of action. Biochem. Pharmacol. 23(2):295-302, 1974.
29. Al-Shabanah, O.A., Alam, K., Nagi, M.N., Al-Rikabi, A.C., Al-Bekairi, A.M. Protective effect of aminoguanidine, a nitric oxide synthase inhibitor, against carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in mice. Life Sci. 66(3):265-270, 2000.
30. Iqbal, S., Vickers, C., Elias, E. Drug metabolism in end-stage liver disease : In vitro activities of some phase I and phase II enzymes. J. Hepatol. 11(1):37-42, 1990.
31. Mary, J.V., Clifford, R.E., John, J.L. The effect of various types of inducing agents on hepatic microsomal monooxygenase activity in rainbow trout. Toxicol. App. Pharmacol. 59(2):364-374, 1981.
32. Rama, S.D., Thomas, P., Raymond, F.N. Xenobiotic-modulated expression of hepatic glutathione S-transferase genes in primary rat hepatocyte culture. Biochim. Biophy. Acta, 1174(1):43-53, 1993.
33. Claudio, J., Helmut, S., Theodorus, P.M.A. Hepatic mercapturic acid formation: involvement of cytosolic cysteinylglycine S-conjugate dipeptidase activity. Biochem. Pharmacol. 56(6):763-771, 1988.