

覆盆子が 遊離酸素 代謝酵素 活性에 미치는 영향

이광규 · 최 훈¹ · 임종필^{1*}

우석대학교 한의과대학, 1:우석대학교 한약학과

Effects of Rubi Fructus Water Extract On Oxygen Free Radical Metabolizing Enzyme Activites

Kwang Gyu Lee, Xun Cui¹, Jong Pil Lim^{1*}

College of Oriental Medicine, 1:Department of Oriental pharmacy, Woosuk University

Rubi Fructus (fruit of *Rubus coreanus* Miq.), oriental medicine, has been used for remedy of the liver diseases and for tonic. In order to investigate the oxygen free radical, a harmful factor of aging, in liver of rats fed diets supplemented with the Rubi Fructus water extract(RX), Sprague-Dawley male rats have been fed a diet supplemented with 3% or 5% RX for a month. In rats fed 3% RX supplemented diet, hepatic cytochrome P-450 contents appeared to be increased, and catalase and superoxide dismutase activities were significantly increased compared with the control. There was no difference in glutathione peroxide and glutathione-S-transferase activities between the rats fed RX supplemented diets and the control diet. In conclusion, it is likely that rats fed a diet supplemented with RX may have the oxygen free radicals detoxication potential.

Key words : Rubi Fructus(覆盆子), oxygen free radical, metabolizing enzyme

서 론

覆盆子(*Rubus coreanus* Miq.)는 薔薇科(Rosaceae)에 속하는 복분자딸기의 채 익지 않은 열매를 채취하여 햇볕에 말려 약용으로 한다. 우리나라 황해도 이남 산기슭의 양지에서 자라며 중국에도 분포하고 있다. 東醫寶鑑¹⁾에는 療男子腎精虛弱女人無子主丈夫陰痿能令堅長補肝明이라 하였고, 方藥合編²⁾에는 甘益腎精續嗣烏鬚目可明이라 하였으며, 性味는 甘, 酸, 平, 無毒으로 肝, 腎에 귀경하여 補肝腎, 縮尿, 明目的 효능이 있어 精力減退, 遺精, 頻尿에 사용하고, 성분으로는 malic acid, citric acid, fructose, glucose, vitamin C, A, nigaichigoside F1, F2, coreanoside F1 등이 있으며, 민간에서는 익은 열매로 술을 만들어서 이용하고 있다^{3,5)}. 현대인들은 복잡한 생활과 환경 속에서 각종 유해물질인 화학물질, 환경호르몬, 방사선 등에 노출되어 여러 질병에 시달리며 이때 생성되는 활성을 가진 유리산소가 생체 내에서 세포 상해를 유발시켜 노화의 원인이 되는 것으로 알려져 있다⁶⁾. 따라서 이러한 유리산소를 해독시키는 효소에 관한 연구가 활발히

진행되고 있다. 이러한 유리산소를 해독시키는 한약재에 대한 연구로는 Yoon 등⁷⁾이 구기자 추출물 함유 알콜을 실험동물에 응용시켰을 때 알콜에 의하여 생성된 유리산소와 acetaldehyde를 해독시키는 효소 활성이 증가됨을 보고한 바 있다.

이에 상기 원전과 민간적 활용방법으로 미루어 볼 때 복분자 물 추출물이 유리산소의 해독에 긍정적인 작용을 나타낼 것으로 사료되어 동물실험을 통하여 연구하였다.

재료 및 방법

1. 시료조제

본 실험에 사용한 복분자는 고창 지역에서 아직 익지 않은 열매를 구입하여 정선한 것을 건조한 후 세절하여 1,000g에 약 3배수의 증류수를 가한 후 환류장치를 사용하여 100℃로 3시간동안 2회 추출하여 감압 여과 농축 후 동결 건조하여 시료(Water Extract of Rubi Fructus : RX)로 사용하였다(수득율: 9.3%).

2. 동물의 사육 및 처치

실험동물은 대한실험동물센터에서 구입한 체중 180g 내외의 건강한 Sprague-Dawley계의 수컷 흰쥐를 실험실 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 또한 복분자 물 추출물은 상용량을 고려하여

* 교신저자 : 임종필, 전북 완주군 삼례읍 후정리 490, 우석대학교 한약학과

E-mail : limjp@woosuk.ac.kr, Tel : 063-290-1571

· 접수: 2002/07/05 · 수정: 2002/08/30 · 채택: 2002/09/19

시판사료 100g당 3% 및 5% 함유시킨 사료로 1개월간 사육하였다. 실험군은 대조군, 3% 복분자 추출물 첨가식이군(3% RX), 5% 복분자 추출물 첨가식이군(5% RX)으로 나누었다. 각 실험군은 실험동물 10마리를 사용하였다. 처치 전 24시간동안 절식시켰으며 동물의 처치는 효소활성의 시간에 따른 변동을 고려하여 일정시간에 실시할 수 있도록 시간을 조절하였다. 동물은 ether마취시킨 다음 복부 정중선을 따라 개복한 후 복부 대동맥으로부터 채혈하여 실험사시킨 후 4℃ 생리식염수로 간을 관류시켜 간 조직 내에 남아있는 혈액을 제거한 다음 적출하였다.

3. 효소시료의 조제

적출한 간조직을 절편으로 만들고 일정량을 칭량한 후 4배량의 0.25M sucrose용액을 가하여 빙냉하에서 glass teflon homogenizer로 마쇄하였다. 이 균질액을 600×g에서 10분간 원심 분리하여 핵 및 미미체 부분을 제거한 상층액을 10,000×g에서 20분간 원심 분리하여 mitochondria분획을 얻었다. 한편 mitochondria분획을 제거시킨 상층액을 105,000×g에서 1시간 동안 초원심 분리하여 cytosol분획과 microsomal분획을 분리하였다. Cytosol 분획은 xanthine oxidase(XO), glutathione peroxidase(GPX), glutathione-S-transferase(GST), superoxide dismutase(SOD) 활성 측정에 사용하였으며, mitochondria 분획은 catalase(CAT) 활성측정에, microsomal 분획은 cytochrome P-450(P450) 함량 측정에 사용하였다.

4. 효소활성도 측정

XO활성 측정은 Stirpe와 Della Corte의 방법⁸⁾으로 측정하였다. Cytochrome P-450(P450)함량 측정은 Omura와 Sato의 방법⁹⁾에 준하여 시험관에 microsomal suspension(4mg protein/ml)을 넣고 needle을 통해 1분간 CO gas를 통기시킨 후 환원제로 sodium dithionite (Na₂S₂O₃) 30mg을 넣어 잘 혼합한 다음, 1분간 CO gas를 통기시켰다. 이상의 조작은 24℃에서 행하였다. CO gas의 통기가 끝난 후 spectrophotometer를 이용하여 400-500nm에서 microsomal suspension에 CO bound microsomal의 difference spectrum을 그렸다. 450-490nm에서 흡광도의 차이를 P450 complex의 분자흡광계수 ($\epsilon = 91\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)로 P450의 양을 계산하였다. Microsomal의 P450의 양은 단백질 1mg당 nmole로 표시하였다. SOD활성 측정은 hematoxylin 자동산화의 억제 정도를 관찰하는 Martin 등의 방법¹⁰⁾에 의하여 측정하였으며 hematoxylin 및 효소액을 가해 25℃에서 반응시켜 생성된 hematein을 560nm에서 측정하여 효소의 활성도를 산정하였다. 활성도 단위는 hematoxylin의 자동산화를 50% 억제하는 정도를 1unit로 나타냈다. CAT활성측정은 Aebi의 방법¹¹⁾에 준하였으며, GPX활성측정은 Paglia와 Valentine의 방법¹²⁾, GST는 Habig의 방법¹³⁾으로 측정하였다.

5. 통계학적 분석

실험성적의 통계처리는 student's t-test로 하였으며 유의수준은 0.05이하로 하였다

결 과

1. 급성독성

복분자 물 추출물을 체중 kg당 1,000mg으로부터 시작하여 투여량을 등차적으로 3,000mg까지 증량한 후 72시간 관찰하였으나 별다른 병변을 관찰할 수 없었다.

2. 유리산소 생성효소 활성

본 실험 결과 복분자 추출물 3% 및 5% 함유시킨 식이로 성장시킨 흰쥐에 있어서 XO 활성은 대조군과 별다른 차이를 볼 수 없었으며, 간 조직 중 microsomal cytochrom P-450 함량은 3% 및 5%의 복분자 추출물을 함유시킨 실험군에 있어서 각각 30%와 23% 증가되었으나 유의성은 없었다(Table 1).

Table 1. Effect of Rubi Fructus water extract(RX) on the activities of hepatic xanthine oxidase(XO) and cytochrom P-450 (P450) contents in rats.

Enzyme activities	Control	3% RX	5% RX
XO	3.28±0.37	3.12±0.21	2.92±0.15
P450	0.40±0.01	0.52±0.08	0.49±0.01

Each value represents the mean±SE of 10rats. XO : Hepatic xanthine oxidase ; nmoles uric acid/mg protein/min. P450 : Cytochrome P-450 ; nmoles cytochrome P-450/mg protein.

3. 유리 산소의 해독효소 활성

본 실험조건에서 유리산소 해독에 관여하는 효소 및 생리활성물질을 측정된 것이 Table 2와 같다. 3% 및 5% 복분자 추출물 첨가 식이로 성장시킨 흰쥐에 있어서 superoxide 해독에 관여하는 간 SOD활성은 대조군에 비하여 각기 약 26%와 37%의 유의한(p<0.05) 증가를 보였다. 특히 H₂O₂의 해독에 관여하는 간조직 중 catalase 활성은 3% 및 5%복분자 추출물 첨가식이로 성장시킨 흰쥐에 있어서 대조군에 비하여 각각 약 79%와 87%의 유의한 (p<0.05) 증가를 보였다.

Table 2. Effect of Rubi Fructus water extract(RX) on the activities of super oxide dismutase(SOD) and catalase(CAT) contents in rats.

Enzyme activities	Control	3% RX	5% RX
SOD	11.16±0.45	14.11±0.35*	15.31±0.22*
CAT	116.21±19.21	208.12±19.01*	218.01±12.20*

Each value represents the mean±SE of 10rats. SOD: Superoxide dismutase ; Unit/mg protein(*50% inhibition of autooxidation of hematoxylin). CAT: Catalase ; Reduced H₂O₂ nmoles/mg protein/min. *Significantly different from the control (p<0.05).

그러나 유리산소 해독에 관여하는 효소인 GPX와 GST 활성은 복분자 식이군과 대조군간에 별다른 차이를 볼수 없었다(Table 3).

Table 3. Effect of Rubi Fructus water extract(RX) on the activities of glutathione peroxidase(GPX) and glutathione-S-transferase(GST) contents in rats.

Enzyme activities	Control	3% RX	5% RX
GPX	8.01±0.66	7.59±0.28	8.33±0.24
GST	378.12±11.07	399.28±15.78	404.18±12.21

Each value represents the mean±SE of 10rats. GPX : glutathione peroxidase ; NADPH oxidized nmoles/mg protein/min. GST : glutathione-S-transferase ; 2,4-dinitrobenzene-glutathione conjugate nmoles/mg protein/min.

고찰

유리산소는 방사선, 공해물질, 독성 화학물질 등에 의하여 생성되어 생체 내에서 세포 노화의 원인이 되며 세포상해를 유발시키는 것으로 알려져 있는데, xanthine oxidase(XO)와 microsomal cytochrome P-450(P450) 함량은 이러한 유리산소 생성과 관계있는 것으로 알려져 있다¹⁴⁾. Ethanol을 실험동물에 만성 투여시 XO활성이 증가된다는 보고¹⁵⁾가 있으며, CCl₄, toluene 및 bromobenzen 등을 실험동물에 투여 시에도 본 효소활성이 증가된다고 하였다¹⁶⁾. 그러나 Table 1에서 보는 바와 같이 복분자는 유리산소 생성에는 별다른 관련성이 없다고 생각된다.

현재까지 유리산소에 의한 조직 손상은 유리산소의 생성계와 해독계의 불균형에 의하여 초래되는 것으로 알려져 있다^{6,17)}. 그러므로 유리산소에 의한 조직세포의 상해는 유리산소의 생성계 뿐만아니라 해독계에 의해서도 영향을 받는데, 본 실험을 종합해 볼 때 복분자는 SOD, catalase 활성을 유도함으로써 활성산소의 해독에 관여한다고 생각된다.

이처럼 東醫寶鑑¹⁾의 補肝, 方藥合編²⁾의 益腎精이나 또한 最新中藥藥理與臨床應用¹⁸⁾에서 蔡永敏이 복분자가 淋巴腺細胞의 增殖 및 高환의 Leydig세포에 직접 작용하여 高환의 생식능력을 촉진시키는 기능을 가지고 있다고 하였는데, 이는 복분자가 활성산소의 해독으로 인하여 간세포의 부활, 임파선 세포 증식 및 정세포 활성화 등에 관여하고 있는 것으로 해석된다

결론

흰쥐에 있어서 복분자 추출물 첨가 식이가 간 조직의 유리산소 대사 기구에 어떠한 효과가 있는지를 알아보기 위하여 복분자 물 추출물을 사료에 3% 및 5%를 첨가시켜 1개월간 사육한 후 처치하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

간 조직의 xanthine oxidase활성은 복분자 첨가 식이군과 대조군 간에는 별다른 차이를 볼 수 없었으며, cytochrome P-450 함량은 3% 및 5% 복분자 추출물을 첨가 식이군이 대조군보다 높게 나타나는 경향을 보였다. 그리고 간 조직의 catalase와 superoxide dismutase 활성은 3% 및 5% 복분자 추출물 첨가 식이군 모두 대조군보다 유의한 (p<0.05) 증가를 보였으나 두 실험군 간에는 큰 차이는 볼 수 없었다. 그러나 glutathione peroxidase 및 glutathione-S-transferase 활성은 복분자 추출물 첨가 식이군과 대조군 간에 별다른 차이를 볼 수 없었다. 이상 실험 결과에서 식이 중 복분자 물 추출물 첨가는 유리산소의 해독효과가 있음을 시사해 주고 있다.

감사의 글

이 논문은 우석대학교 교내 학술연구비 지원에 의하여 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 허준, 동의보감, p 711, 남산당, 1983.
2. 황필수, 방약합편, p 271, 남산당, 1984.
3. 생약학회, 현대생약학, p 231, 학창사, 2000.
4. 한국생약학교수협의회, 본초학, p 863, 아카데미서적, 2001.
5. 신민교, 원색 임상본초학, p 208, 남산당, 1986.
6. Cotran, R.S., Kurma, V. and Collin, T. : Cellar pathology I. In Robins Pathologic Basis of Disease. 6th ed. W.B., pp 1-29, Saunders Company, Philadelphia, 1999.
7. Yoon C.G., Jeon T.W., Oh, M.J., Lee, G.H., Jeon, J.H. : Effect of the ethanol extract of Lycium chinense on the oxygen free radical and alcohol metabolizing enzyme activities in rats. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 29:268-273, 2000.
8. Stirpe, F., Della Corte, E. : The regulation of rat liver xanthine oxidase; Conversion in vitro of the enzyme activities from dehydrogenase (Type D) to oxidase (Type O). J. Biol. Chem. 244, 3855-3863, 1969.
9. Omura, T., Sato, R.: The carbon monoxide binding pigment of liver microsomes : Evidence for its hemoprotein nature. J. Biol. Chem. 239, 2370-2378, 1964.
10. Martin, J.P. Jr., Dailey, M. and Sugarman, E. : Negative and positive assays of superoxide dismutase based on hematoxylin autooxidation. Arch. Biochem. Biophys. 255, 329-336, 1987.
11. Aebi, H. : Catalase; In Methods of Enzymatic Analysis. Etgmeyer, H.U.(ed), pp 673-684, Academic Press, New York, Vol. 2, 1974.
12. Pagilia E.D., Valentine W.N. : Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocytes glutathione peroxidase. J. Lab. Clin. Med. 70:158-169, 1967.
13. Habig, E.H., Pabist, M.J. and Jakoby, W.B. : Glutathione S-transferase; The first enzymatic step in mercapturic and formation. J. Boil. Chem. 249, 7130-7139, 1974.
14. Oyanagui, Y. : SOD and active oxygen modulators, pp 17-36, Nihn Igakukan, Tokyo, 1989.
15. Oei, H. H., Stroo, E. E., Burton, K.P. and Schaffer, S.W. : A possible role of xanthine oxidase in producing oxidative stress in the heart of chronically ethanol treated rats. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 38, 453-461, 1982.
16. Yoon C.G., Lim Y.S. : Effect of ethanol pretreatment on the serum and liver xanthine oxidase activity in bromobenzene treated rats. J. East Asian of Dietary Life, 7, 21-27, 1997.
17. Leibovitz, B.E., Siegel, B.V. : Aspects of free radical reaction in biological systems: aging. J. Gerontol. 35, 45-56, 1980.
18. 蔡永敏, 最新中藥藥理與臨床應用, p529, 華夏出版社, 1998.