방사선 유도 돌연변이체 블랙베리로 제조한 발효음료의 간 손상 회복 효과

조병옥 · 소양강 · 이창욱 · 조정근 · 우현심 · 진창현 · 정일윤*

한국원자력연구원 첨단방사선연구소

Effect of Fermented Blackberry Drinks Formed from Radiation-induced Mutant on Liver Repair Capacity in Rats

Byoung Ok Cho, Yangkang So, Chang Wook Lee, Jung Keun Cho, Hyun Sim Woo, Chang Hyun Jin and Il Yun Jeong*

Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongeup 580-185, Korea

Abstract - This study was conducted to investigate the effect of fermented blackberry drinks (BD) on carbon tetrachloride (CCl_4)-induced liver injury in rats. Male Sprague-Dawley rats were randomly divided into four groups with 6 rats per group: control, CCl_4, CCl_4 plus BD 3 ml kg^{-1}, and CCl_4 plus BD 6 ml kg^{-1}. We found that the levels of serum aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) were significantly increased and the activity of antioxidant enzyme glutathione peroxidase (GPx) in the liver was decreased in rats treated with CCl_4 alone when compared with the control group. However, the administration of BD attenuated the levels of serum AST and ALT in CCl_4-treated rats. Moreover, the administration of BD significantly increased the activity of GPx in CCl_4-treated rat livers. Taken together, these results suggest that BD could protect the liver from CCl_4-induced hepatic damage.

Key words : Blackberry drinks, CCl_4, AST, ALT, Glutathione peroxidase

서 론

Superoxide anion, hydroxyl radical, hydrogen peroxide, singlet oxygen, peroxyl radicals, peroxynitrite 등과 같은 reactive oxygen species (ROS)는 화학적으로 매우 불안정하고 반응성이 강한 물질이며, 생체 내 대사과정에서 생성되어 산화적 스트레스를 유발한다. ROS에 의해 유발된 산화적 스트레스는 체내에서 세포와 조직의 비가역적 손상을 초래하고 지질과산화, 단백질 변성, DNA 산화 및 기능의 변형을 일으킨다. 산화적 스트레스는 당뇨병, 간염, 백내장, 신장염, 위염 등 만성질환의 원인이며, 만성질환을 예방하기 위해서는 산화적 스트레스를 유발하는 ROS를 감소시켜야 한다. 이러한 ROS는 polyphenilic 화합물과 같은 항산화 물질에 의해 감소된다고 알려져 있다 (Choi *et al.* 2006; Sathuvan *et al.* 2012).

블랙베리 (*Rubus fruticosus* sp.)는 쌍떡잎식물 장미목 장

* Corresponding author: Il Yun Jeong, Tel. +82-63-570-3150, Fax. +82-63-570-3159, E-mail. iyjeong@kaeri.re.kr

미과 딸기속에 속하는 식물군으로서 아시아를 비롯한 유럽, 아프리카, 아메리카에 널리 분포하며 (Shin *et al.* 2005), 비타민 C와 K, 식이섬유, 엽산, 망간 같은 필수 미량요소 뿐만 아니라 ellagic acid, tannic acid, quercetin, gallic acid, anthocyanidins, cyanidins와 같은 polyphenolic 화합물이 다량 함유되어 있어 항산화, 함암, 항균 및 심혈관계 질환 예방 등의 효과를 가지고 있는 것으로 알려져 있다 (Halvorsen *et al.* 2006; Cha *et al.* 2007).

사염화탄소 (carbon tetrachloride, CCl_4)는 환경공해물질로서 간 손상을 일으키는 대표적인 물질이다 (Jeon and Park 2002). CCl_4는 활면소포체에 존재하는 cytochrome P450 monooxygenase와 반응하여 trichloromethyl peroxyl radical로 활성화되고 이는 간독성을 유발한다. 생성된 free radical은 소포체 막의 지질과산화를 유도 시키며, 생성된 분해산물은 소포체 막을 손상시킨다. 그 결과 간에서의 효소활성저하 및 단백질 합성 저해 등을 일으켜 지방간 변성을 유발하며, 혈중 aspartate aminotransferase (AST) 및 alanine aminotransferase (ALT)가 이탈되며, 조직학적으로는 간세포 괴사 및 섬유화 등을 일으키는 것으로 알려져 있다 (Kim and Han 1998; Lee *et al.* 2012).

따라서 본 연구에서는 방사선 돌연변이 육종기술로 얻어진 신품종 블랙베리 메이플 (Ryu *et al.* 2012)을 이용하여 제조된 블랙베리 발효음료가 CCl_4에 의해 유발된 간 독성 동물모델에서 간 기능 개선 효과를 나타내는지 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 재료

본 실험에서 사용한 블랙베리는 방사선에 의해 돌연변이된 신품종이며, 2011년에 전북 완주에서 생산된 것을 구입하여 실험에 사용하였다.

2. 블랙베리 발효음료의 제조

블랙베리 발효음료는 신품종 블랙베리 메이플을 주원료로 하여 식초발효원액을 제조한 후 식이섬유, 벌꿀, 사과농축액, 구연산, 비타민, 정제수 등을 첨가하여 제조하였다.

3. 실험동물 및 CCl_4를 이용한 급성 독성 유발

실험동물은 5주령 180～200 g의 Sprague-Dawley (SD) 계 수컷 흰쥐 (orientbio, Korea) 24마리를 구입하여 1주간 적응시킨 뒤 실험에 사용하였다. 첨단방사선연구소 동물사육실에서 항온항습 (온도 23±2°C, 습도 50±5%) 및 12시간 간격의 명암주기 조건하에서 사육하여 사용하였다. 적응 후 쥐들은 난괴법에 의하여 군당 6마리씩 4군으로 나누었다. 실험 군은 대조군, CCl_4 처리군, CCl_4+블랙베리 발효음료 (BD) 3 ml kg^{-1}처리군, CCl_4+블랙베리 발효음료 (BD) 6 ml kg^{-1} 처리군으로 나누어 CCl_4+블랙베리 발효음료 (BD)에 15일 동안 매일 블랙베리 발효음료를 경구투여 하였다. 대조군과 CCl_4 처리군은 블랙베리 발효음료 (BD) 투여군과 동일하게 식염수를 15일 동안 하루에 한번 구강으로 투여하였다. 50% CCl_4는 올리브 오일 (olive oil, Sigma)에서 제조되었으며 (CCl_4 : olive oil, 1 : 1), 블랙베리 발효음료 마지막 처리 3시간 후에 50% CCl_4 1.5 ml kg^{-1}를 복강투여하고 18시간 절식한 뒤 희생하였다.

4. 혈청 및 간 채취

CCl_4 처리 후 실험동물을 18시간 금식시킨 후 ethyl ether 마취 하에서 복부대정맥으로부터 채혈하였다. 채취된 혈액은 원심분리용 tube (BD Vacutainer, New jersey, USA)에 넣고 60분 이내에 원심분리기에 2000 rpm, 4°C에서 15분간 원심분리하여 혈청을 얻었다. 분리된 혈청은 사용 전까지 −40°C에 보관하였다가 간 기능 지표효소인 AST, ALT 측정에 사용하였다. 혈액 채혈 후 즉시 간을 적출하였고, 생리식염수에 혈액을 제거한 후 −80°C에 보관하였다.

5. AST와 ALT 측정

혈청의 AST 및 ALT 농도는 clinical biochemistry automatic analyzer (Hitachi model 7180, Japan)를 사용하여 측정하였다.

6. GPx 활성 측정

Glutathione peroxidasse (GPx) 활성은 Cayman chemical (Ann arbor, Michigan, USA)에서 구매한 kit를 사용하여 측정하였다. Tissue homogenate는 kit에 명시된 방법에 의해서 간으로부터 획득하였다.

7. 통계분석

모든 실험결과는 평균±표준편차로 나타내었고, 대조군과 실험군간의 통계적 유의성에 대한 검증은 student's t-test를 이용하여, $p < 0.05$ 일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판단하였다.

결과 및 논의

1. 혈청 중 AST 및 ALT 활성 변화

CCl_4는 산화스트레스로 인한 간 손상을 연구하기 위해 널리 사용되는 물질이며 cytochrome P450에 의해 간에서 대사되어 trichloromethyl free radical ($\cdot CCl_3$)을 형성하거나 혹은 O_2와 반응하여 trichloromethyl peroxy radical (Cl_3COO^-)로 산화되어 간 손상을 유발하는 것으로 알려져 있다 (Manibusan *et al.* 2007; Akindele *et al.* 2010; Ozturk *et al*. 2010). 또한, 혈청 AST와 ALT는 급성 간 손상 지표로서 널리 사용되어져 왔다 (Adesanoye and Farombi 2010; Ranawat *et al.* 2010). 이에 본 연구에서는 CCl_4에 의한 간 손상에서 블랙베리 발효음료의 간 기능 보호 효능을 확인하기 위하여 혈청 AST와 ALT 활성을 측정하였다. Fig. 1에서 나타난 바와 같이, rat에 CCl_4를 투여할 경우 AST와 ALT의 혈중 농도가 급격히 증가하였다 ($p < 0.001$). 하지만, CCl_4를 투여하기 이전에 블랙베리 발효음료를 경구 투여한 rat의 경우 혈중 AST와 ALT 효소 활성이 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다. 이 연구 결과는 CCl_4에 의해 유발된 간 손상에서 한약재 조성물이 AST와 ALT의 증가를 억제한다는 보고와 일치하였다 (Yang *et al.* 2004). 따라서 블랙베리 발효음료는 CCl_4에 의해 유발된 간 손상을 매우 효과적으로 회복시키는 것으로 판단되며, 간 기능 보호 효과를 가진 기능성 음료로서의 가능성을 보여준다고 할 수 있겠다.

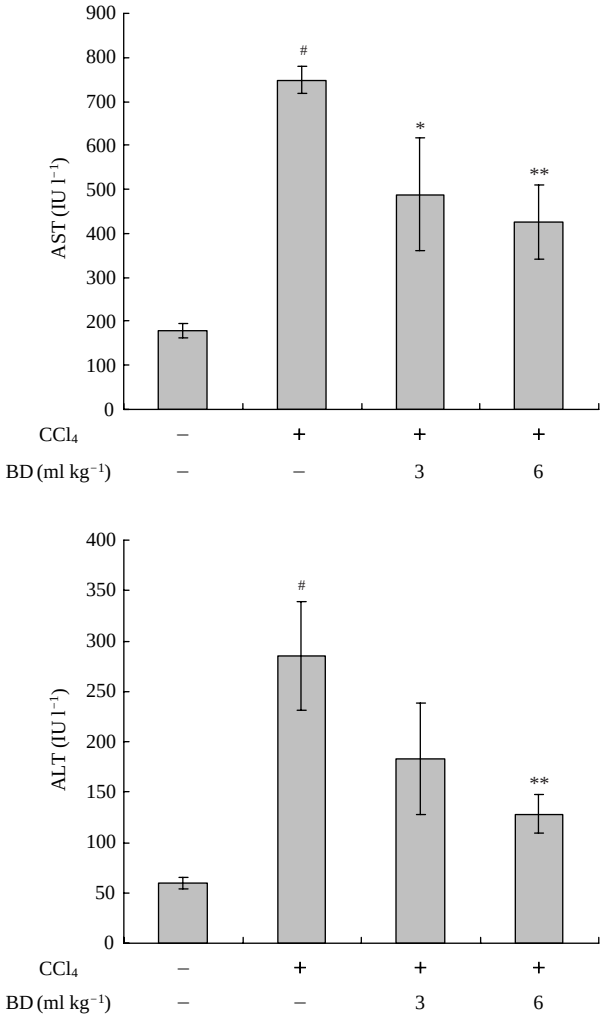

Fig. 1. Effect of BD on serum AST and ALT levels in CCl_4-treated rats. Blood samples were prepared from rats and tested for AST and ALT levels. Data are presented as the mean ± SD of six rats. $^{\#}p < 0.001$ vs. control, $^{*}p < 0.05$ vs. CCl_4, $^{**}p < 0.01$ vs. CCl_4.

2. 간조직의 GPx 활성 변화

생명체는 산화스트레스에 대한 자가 방어기능을 수행하기 위하여 항산화방어체계를 가지고 있으며, 항산화물질인 glutathione, uric acid, 비타민 C, 비타민 E 등의 화합물과 초과산화이온을 제거하는 SOD (superoxide dismutase)와 과산화수소를 제거하는 catalase와 glutathione peroxidase (GPx) 같은 효소가 존재하여 산화스트레스에 의해 생성되는 ROS를 즉시 제거한다. 그 중에서도 GPx는 glutathione을 이용하여 체내에서 생성되는 과산화수소를 물과 산소로 전환하는 효소로 알려져 있다 (Issa *et al.* 2006; Mohammadi and Yazdanparast 2009). Rat에 사

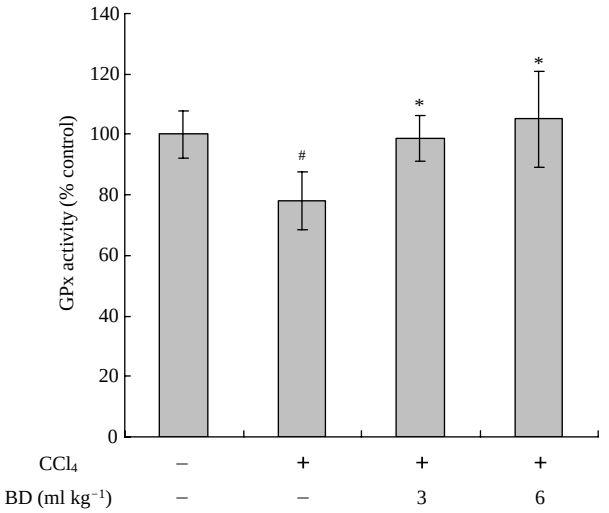

Fig. 2. Effect of BD on GPx activity in rat liver. Tissue homogenates were prepared from rat liver and tested for GPx activity. Data are presented as the mean ± SD of six rats. $^{\#}p < 0.05$ vs. control, $^{*}p < 0.05$ vs. CCl_4.

염화탄소(CCl_4)를 투여하여 간 손상을 유발할 경우 항산화 효소 GPx의 효소 활성이 감소하며, 식물 추출물을 섭취할 경우 CCl_4에 의한 간 손상 시 감소한 GPx의 효소 활성을 증가시키는 것으로 보고되었다(Kim 2001; Ilavarasan *et al*. 2003). 이에 CCl_4로 유발된 산화스트레스에 블랙베리 발효음료의 보호 효능을 확인하기 위하여 항산화 효소의 일종인 GPx의 효소 활성을 측정하였다. Fig. 2에서 나타난 바와 같이, SD rat에 CCl_4를 투여할 경우 GPx의 활성이 CCl_4를 투여하지 않은 대조군과 비교하여 약 78% 수준의 효소 활성을 보였다($p < 0.05$). 하지만, CCl_4를 투여하기 이전에 블랙베리 발효음료를 경구 투여한 rat의 경우 GPx 효소 활성이 농도 의존적으로 증가하였으며($p < 0.05$), 대조군과 거의 같은 수준의 효소 활성을 나타내었다. 이러한 결과들은 블랙베리 발효음료가 GPx같은 항산화 효소를 활성화시킴으로서 CCl_4에 의한 간 손상을 보호함을 시사하고 있다.

결 론

본 연구에서는 블랙베리 발효음료가 CCl_4에 의해 유발된 급성 간 독성에 보호 효능을 나타내는지 알아보고자 실시하였다. CCl_4 투여된 rat에서는 혈중 AST, ALT 활성이 급격히 증가하고 항산화 효소인 GPx의 효소 활성이 감소하였지만, 블랙베리 발효음료를 경구 투여한 rat에서는 혈중 AST, ALT 활성이 감소하였고 GPx 항산화 효소 활성이 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다. 따라서 블랙베리 발효음료는 CCl_4로 인해 유발된 간 손상을 매우 효과적으로 보호할 수 있을 것으로 사료되며, 간 기능 개선 효능을 가진 건강기능성 음료로서의 가능성을 제시하였다.

사 사

본 연구는 미래창조과학부 방사선기술개발사업의 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

Adesanoye OA and Farombi EO. 2010. Hepatoprotective effects of *Vernonia amygdalina* (astereaceae) in rats treated with carbon tetrachloride. *Exp. Toxicol. Pathol*. **62**:197-206.

Akindele AJ, Ezenwanebe KO, Anunobi CC and Adeyemi OO. 2010. Hepatoprotective and *in vivo* antioxidant effects of *Byrsocarpus coccineus* Schum. and Thonn. (Connaraceae). *J. Ethnopharmacol*. **129**:46-52.

Cha HS, Youn AR, Park PJ, Choi HR and Kim BS. 2007. Comparison of Physiological Activities of Rubus coreanus Miquel during Maturation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*. **36**(6): 683-688.

Choi JM, Han J, Yoon BS, Chung JH, Shin DB, Lee SK, Hwang JK and Ryang R. 2006. Antioxidant properties of tannic acid and its inhibitory effects on paraquat-induced oxidative stress in mice. *Food Sci. Biotechnol*. **15**:728-734.

Halvorsen BL, Carlsen MH, Phillips KM, Bøhn SK, Holte K, Jacobs DR Jr and Blomhoff R. 2006. Content of redox-active compounds (ie, antioxidants) in foods consumed in the United States. *Am. J. Clin. Nutr*. **84**:95-135.

Ilavarasan R, Vasudevan M, Anbazhagan S and Venkataraman S. 2003. Antioxidant activity of *Thespesia populnea* bark extracts against carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *J. Ethnopharmacol*. **87**:227-230.

Issa AY, Volate SR and Wargovich MJ. 2006. The role of phytochemicals in inhibition of cancer and inflammation: New directions and perspectives. *J. Food Compost. Anal*. **19**:405-419.

Jeon JR and Park JR. 2002. Effect of *Eucommia ulmoids* leaf water extract on hepatotoxicity of carbon tetrachloride-induced rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*. **31**(1):124-130.

Kim GH and Han HK. 1998. The effect of mushroom extract on carbon tetrachloride- induced hepatotoxicity in rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*. **27**(2):326-332.

Kim OK. 2001. Protective effects of extracts of *Hovenia dulcis* Thunb on hepatotoxicity in carbon tetrachloride intoxicated rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*. **30**:1260-1265.

Lee HJ, Hwang YI, Park EJ and Choi SU. 2011. Antihepatotoxicity and antigenotoxic effects of herb tea composed of *chrysanthemum morifolium* ramat. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*. **40**(1):78-83.

Manibusan MK, Odin M and Eastmond DA. 2007. Postulated carbon tetrachloride mode of action: a review. *J. Environ. Sci. Health C Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev*. **25**:185-209.

Mohammadi M and Yazdanparast R. 2009. Methoxy VO-salen complex: In vitro antioxidant activity, cytotoxicity evaluation and protective effect on CCl_4-induced oxidative stress in rats. *Food Chem. Toxicol*. **47**:716-721.

Ozturk IC, Ozturk F, Gul M, Ates B and Cetin A. 2009. Protective effects of ascorbic acid on hepatotoxicity and oxidative stress caused by carbon tetrachloride in the liver of Wistar rats. *Cell Biochem. Funct*. **27**:309-315.

Ranawat L, Bhatt J and Patel J. 2010. Hepatoprotective activity

of ethanolic extracts of bark of *Zanthoxylum armatum* DC in CCl_4 induced hepatic damage in rats. *J. Ethnopharmacol*. **127**:777-780.

Ryu J, Kim DS, Ha BK, Kim JB, Kim SH, Jeong IY, Jo HJ, Kim EY and Kang SY. 2012. Growth characteristics and morphological variation analysis of mutant lines derived from gamma-ray and chemical mutagen treatments in *Rubus fructicosus* L. *J. Radi. Indus*. **5**:347-352.

Sathuvan M, Vignesh A, Thangam R, Palani P, Rengasamy R and Murugesan K. 2012. In Vitro Antioxidant and Anticancer potential of Bark of Costus pictus D.DON. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* S741-S749.

Shin JS, Sim OK, Lee JC, Cho HJ, Kim EY and Lee KS. (2005) Plant Regeneration via Multiple Shoots Formation from Sucker Explants of *Rubus fruticosus* L. *Korean J. Plant Res*. **18**(3):456-461.

Yang DS, Hong SG, Choi SM, Kim BN, Sung HJ and Yoon Y. 2004. Effect of an oriental herbal composition, Jang Baek Union (JBU), on alcohol-induced hangover and CCl_4-induced liver injury in rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*. **33**:78-82.

Manuscript Received: July 10, 2013
Revised: August 1, 2013
Revision Accepted: August 1, 2013