

뇌 조직에서 알코올 투여에 대한 녹차 건분의 항산화 효과*

장 남 수[§] · 류 선 미

이화여자대학교 가정과학대학 식품영양학과

Antioxidative Effects of Green Tea Powder Diet Against Ethanol-Induced Oxidative Damage in Rat Brain Regions*

Chang, Namsoo[§] · Ryu, Sun Mi

Department of Food and Nutrition, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

ABSTRACT

The present study investigated the protective effects of green tea against acute ethanol-induced lipid peroxidation and the change of antioxidative enzyme activities in various regions of rat brain: cortex, cerebellum, striatum and hippocampus. The following parameters were examined: malondialdehyde(MDA) levels and activities of superoxide dismutase(SOD), catalase and glutathione peroxidase(GSH-Px). Male Sprague-Dawley rats were given the experimental containing 1% green tea powder or control diet for 4 weeks, and at the end of feeding diet group received acute ethanol(5g/kg body weight) or equicaloric sucrose solution intragastrically. Green tea powder significantly decreased MDA levels in the striatum compared to control-non alcohol treated group to 1% green tea-non alcohol treated group without altering the antioxidative enzyme activities. Green tea resulted in a significant increase in GSH-Px activities in the hippocampus compared to either control-non alcohol treated group(0.043units/mg protein) or 1% green tea-non alcohol treated group(0.071units/mg protein). In conclusion, these results suggest that moderate consumption of green tea leaves can exert protective effects against ethanol-induced oxidative stress in brain regions, by reducing MDA concentrations in the striatum and enhancing GSH-Px activities in the hippocampus. (*Korean J Nutrition* 34(5) : 525~531, 2001)

KEY WORDS: green tea, antioxidative enzymes, malondialdehyde, rat brain regions.

서 론

뇌는 다른 조직에 비해 산소 소비량이 월등하게 많고 불포화 지방산의 함량이 높아서¹⁾ 산화적 손상을 입기 쉬운 특징을 지니고 있다. 또, 뇌 조직의 항산화 효소활성은 혈액이나 간 조직에 비해 낮기 때문에 뇌에서는 산화적 손상의 폐해가 일어나기 더욱 쉽다.²⁾ 알코올은 뇌독성을 지니는 물질로 이미 잘 알려져 있는데 최근에 그 주요 기전으로 산화적 손상이 거론되고 있다. 알코올의 대사물인 아세트아세테이트는 혈액뇌관문(blood brain barrier)을 통과하여 뇌에서 산화적 손상을 일으키고 과산화물의 축적을 증가시킬 수 있는 것으로 밝혀지고 있다.^{3,4)}

녹차에는 (-)epicatechin, (-)epigallocatechin, ep-

icatechin gallate, epigallocatechin 등 polyphenol 함량이 건본 중량의 20~35%나 되며,⁵⁾ 이러한 성분들이 혈청지질 과산화를 억제시키거나 항산화능을 증가시키는 것으로 보고되었다.^{6,7)} Serafini et al⁸⁾은 아침 공복에 녹차 300ml를 마신 사람의 TRAP(Total plasma antioxidative capacity)이 음용 후 30분에 대조군에 비해 최고 40%까지 증가하였고, 총항산화능 역시 대조군에 비해 유의적으로 높았다고 보고한 바 있다.

녹차에는 침출수보다 잎 자체에 폴리페놀 함량이 월등하게 높고, 항산화 비타민 함량 역시 높기 때문에 항산화 효과도 더 큰 것으로 보고되었다.¹¹⁾ 최근에는 녹차를 음용할 뿐 아니라 차잎을 그대로 또는 가루로 빻아서 만든 국수, 떡, 나물 등 식품들이 개발¹²⁾되어 식용으로 잘 수용되고 있는데 음용이 아닌 녹차잎를 그대로 식용했을 때의 뇌조직 항산화 활성에 대한 연구는 많지 않다. 이제까지 녹차의 뇌 조직 항산화 효과를 규명한 실험이 대부분 추출물이나 한 가지 폴리페놀 화합물을 사용하는 *in vitro* 실험이었다.^{13,14)} 동물을 이용한 *in vivo* 실험들 역시 대부분 녹차의 폴리페놀 성분이

접수일: 2001년 6월 1일

채택일: 2001년 7월 11일

*This research was supported by grants from Korea Research Foundation.

[§]To whom correspondence should be addressed.

나 추출물을 음료의 형태로¹⁵⁾ 또는, 복강내 주사로 투여하여¹⁶⁾ 뇌신경세포 손상 감소 효과를 살펴보는 연구로써 녹차를 분쇄하여 일상 식이로도 쉽게 섭취할 수 있는 양을 먹인 후 뇌 조직에서의 항산화 효과를 관찰한 연구는 없었다.

따라서, 본 연구에서는 녹차 분말 첨가 식이가 급성 알코올 투여에 의해 산화적 스트레스를 받은 뇌 조직의 항산화 효소와 과산화물 수준에 어떤 영향을 미치는지 살펴보았다.

재료 및 방법

1. 실험 동물 및 식이

실험 동물은 생후 4주령, 평균체중 168g의 Sprague-Dawley종 수컷 32마리였다. 이들을 실험시작 전 1주일간 고형배합사료(삼양사료)로 적응시킨 후, 난괴법으로 녹차 군과 대조군의 두 군으로 나누어 실험식이와 물을 제한없이 공급하였다. 실험 동물은 한 마리씩 stainless steel cage에서 사육되었고, 사육장의 명암은 12시간 주기, 온도는 22~25℃, 습도는 40~50%로 유지하였다.

실험에 사용된 녹차군과 대조군의 식이는 Table 1과 같이 제조되었다. 식이의 탄수화물 급원은 옥수수전분(corn starch, 신동방)을, 지방 급원은 대두유(soybean oil, 백선표)를 사용하였으며, 단백질 급원은 casein(edible acid casein, Murry Goulburn Co-operative Co., Australia)을 사용하였다. 무기질과 비타민은 시약급을 사용하여 혼합한 것을 각각 식이 무게의 3.5%, 1.0% 수준으로 식이에 섞어 공급하였다. 녹차군에게는 경동시장에서 구입된 건조 상태의 녹차잎을 ball-mill을 이용하여 분말화하여, 식이 중량의 1%가 되도록 섞어 제조된 실험식이를 공급하였다. 실험 식이의 녹차 건분 함량(1%)은 사람의 녹차 섭취량을 토대로 하여 생리적으로 섭취 가능한 범위로 조절하여 결정되었다. 녹차 건분의 총 폴리페놀 함량은 건조중량 당 30~35%, 플라보노이드 함량은 1g 당 31.3mg이며, 실험동물의 하루 식이 섭취량은 20~25g으로 1% 녹차 건분 식이로 인한 동물의 하루 플라보노이드 섭취량은 6mg이 된다. 이러한 섭취 수준을 체중 60~70kg의 성인에게 적용하면 한 잔당 플라보노이드 함량이 평균 200mg 인 녹차를 6~10잔 섭취하는 것에 해당된다.

실험 식이로 4주간 사육한 후, 희생 12시간 전에 녹차군과 대조군을 다시 난괴법으로 각각 두 군으로 나누어, 한 군에는 알코올을, 나머지 한 군에는 설탕물을 gastric intubation 방법으로 투여하였다. 알코올 투여군에게는 20%의 ethanol 용액을 5g/kg body weight로 공급하였으며, 대조군에게는 설탕물을 공급하여 두 군의 열량섭취량을 동

Table 1. Composition of experimental diets

Ingredients	Diet group ¹⁾	
	Control	Green tea
Corn starch	560.0	550.0
Sugar	100.0	100.0
Casein	150.0	150.0
Soybean oil	100.0	100.0
Salt mixture ²⁾	35.0	35.0
Vitamin mixture ³⁾	10.0	10.0
Choline chloride	2.0	2.0
DL-Methionine	3.0	3.0
Fiber	40.0	40.0
Green tea powder	0.0	10.0

1): Control: Control group, 0% green tea powder in diet

Green Tea: 1.00% green tea powder in the diet

2): AIN salt mixture(g/kg mixture): Calcium phosphate, dibasic (CaHPO₄·2H₂O) 500, Sodium chloride(NaCl) 74, Potassium citrate, monohydrate(K₃C₆H₅O₇·H₂O) 220, Potassium sulfate(K₂SO₄) 52, Magnesium oxide(MgO) 24, Manganous carbonate(45-48%, Mn) 3.5, Ferric citrate(16-17% Fe) 6, Zinc carbonate (70% ZnO) 1.6, Cupric carbonate(53-55% Cu) 0.3, Potassium iodate(KIO₃) 0.01, Sodium selenite(Na₂SeO₃·5H₂O) 0.01, Chromium potassium sulfate(CrK(SO₄)₂·12H₂O) 0.55, Sucrose finely powdered, to make 1,000 gram

3): AIN vitamin mixture(mg/kg mixture): Thiamine HCl 600, Riboflavin 600, Pyridoxine HCl 700, Nicotinic acid 3000, D-Calcium Pantothenate 1600, Folic acid 200, D-Biotin 20, Cyanocobalamin(vitamin B₁₂) 1, Retinyl palmitate(vitamin A) 120,000 retinol equivalents, DL- α -Tocopheryl acetate(vitamin E) 5,000IU vitamin E activity, Cholecalciferol 2.5(100,000 IU, powder form), Menadione(vitamin K) 5.0, Sucrose finely powdered, to make 1,000 gram

일하게 맞추었다. 알코올과 설탕물 투여 후 모든 동물은 금식되었으며, 물을 제한없이 공급하였다.

2. 실험 동물의 희생 및 조직의 채취

모든 실험 동물은 아침 9~11시의 동일한 시간대에, 에테르로 가볍게 마취한 후 단두에 의하여 희생되었다. 단두 직후 뇌 조직을 적출하고, 대뇌(cortex), 소뇌(cerebellum), 선조체(striatum), 해마(hippocampus)의 4개의 부위로 분리한 후 즉시 -70℃로 얼렸다.

3. 시료의 생화학적 분석

1) Malondialdehyde(MDA) 측정

뇌 조직의 malondialdehyde(MDA) 함량 측정은 Rehncrona et al¹⁷⁾방법을 변형하여 사용하였다. 뇌 부위 조직에 ice cold 0.1M sodium phosphate buffer(pH 7.4)를 1:10(w/v)의 비율로 가하여 균질화시킨 후에 0.5ml씩 duplicate로 취하여 50mM FeSO₄ 30 μ l, 0.5mM butylated hydroxytoluene(BHT) in ethanol 30 μ l, 50mM ascor-

bic acid 30μl를 넣고 37℃에서 30분간 shaking 하면서 incubation 하였다. 여기에 20% ice cold trichloroacetic acid(TCA) 0.1ml를 첨가하여 13,000×g에서 5분간 원심 분리(Micro 17TR, Hanil Science Industrial Co.) 한 후 상층액 0.9ml를 취한 후, 0.67% thiobarbituric acid (TBA) reagent in 0.026M Tris-HCl buffer(pH7.0) 0.9ml를 첨가하고 10분간 boiling 한 다음 실온에서 30분간 방냉하여 spectrophotometer(Spectronic 601, Milton Roy)로 532nm에서 비색정량하였다.

2) Superoxide Dismutase(SOD) 활성

SOD의 활성은 Pattichis et al¹⁹의 방법을 사용하여 측정하였다. 각 조직을 0.25M ice cold sucrose 용액을 1 : 10의 비율로 넣어 균질화 시킨 후 12,000×g, 4℃에서 30분간 원심분리 시킨 상층액 10μl에, 65mM potassium phosphate buffer(pH7.8) 1,490μl, 15mM xanthine (Sigma Aldrich) in 0.1M NaOH 100μl, 10mM hydroxylammonium chloride 100μl를 넣은 다음, xanthine oxidase(grade III from butter milk, Sigma Aldrich) in 65mM potassium phosphate buffer(pH7.8) 300μl(40μg protein/300μl)를 첨가하여 25℃에서 20분간 incubation 하였다. Incubation 종료 후 배양액 500μl를 취하고 0.03 mM sulfanilic acid(SO₂HC₆H₄NH₂) in 25% glacial acetic acid 500μl를 첨가하여 실온에서 5분간 어두운 곳에 방치하였다. 방치 후 0.1 mM naphthylamine(Sigma Aldrich) in 25% glacial acetic acid solution 500μl를 첨가하면서 바로 530nm에서 spectrophotometer로 30초 간격으로 180초까지 측정하여 SOD 활성을 계산하였다.

3) Catalase 활성

Catalase 활성의 측정은 Johansson and Burg¹⁹과 Hos-sain et al²⁰의 방법을 사용하여 측정하였다. 뇌 조직을 0.25M ice cold sucrose 용액을 1 : 10(w/v)을 비율로 넣어 균질화 시킨 후 1,000×g, 4℃에서 5분간 원심분리 한 상층액을 적절하게 희석한 효소원 600μl에 250mM KH₂PO₄-NaOH buffer(pH 7.0) 300μl, methanol 300μl, 0.27% hydrogen peroxide(H₂O₂) 60μl를 test tube에 넣고 20℃ water bath에서 shaking(100rpm)하면서 20분간 반응시켰다. 여기에 7.8M potassium hydroxide(KOH) 300μl를 가하여 반응을 종결한 다음, 34.2mM purpald(4-Amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole, Sigma Aldrich) in 480mM HCl 600μl 첨가한 후 20℃ water bath에서 10분간 shaking 하면서 반응 후, potassium periodate

(KIO₄) in 470mM KOH 300μl를 가하였다. 발색물을 10,000×g에서 10분간 원심 분리하여 상층액을 취하여 spectrophotometer로 550nm에서 정량하였다.

4) Glutathione Peroxidase(GSH-Px) 분석

GSH-Px의 활성은 Prohaska and Ganther의 방법²¹을 사용하여 측정하였다. 각 조직을 0.25M ice cold sucrose 용액을 1 : 10의 비율로 넣어 균질화 시킨 후 12,000×g, 4℃에서 30분간 원심분리 시킨 상층액 50μl에, 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.0)-3mM EDTA 540μl, 1mM glutathione(GSH, reduced form, Sigma Aldrich) 100μl, 1unit of glutathione reductase(GSHR, from baker's yeast, Sigma Aldrich) in 0.1M potassium phosphate buffer(pH 7.0)-3mM EDTA 100μl(1 unit/100μl), 1mM sodium azide(NaN₃) 10μl를 첨가하고, 여기에 0.11mM NADPH(Sigma Aldrich) in 0.1% Sodium bicarbonate(NaHCO₃) 100μl를 첨가하여 25℃에서 5분간 incubation하였다. Incubation 종료 후 100μM H₂O₂ 100μl를 첨가하면서 340nm에서 UV spectrophotometer(Hewlett Packard 8415, USA)로 흡광도를 30초 간격으로 5분까지 측정하여 GSH-Px의 활성을 계산하였다.

5) 효소원의 Protein 농도

모든 효소 시료의 단백질 농도는 Lowry법²²으로 측정하였다.

4. 통계분석

본 연구의 모든 결과는 실험군당 평균과 표준오차를 계산하였고, α = 0.05 수준에서 일원배치분산분석(one way analysis of variance, ANOVA)과 Student's t-test를 실시하여 실험군간의 유의적인 차이를 검증하였다. 모든 통계처리는 SAS 통계프로그램을 사용하였다.

결과 및 고찰

1. 신체 성장 및 장기 중량

실험군의 식이섭취량, 식이효율 및 체중증가량에는 유의적인 차이가 없었고 간, 신장, 비장 등 장기중량에서도 유의적인 차이가 없었다. 급성 알코올 투여는 뇌 부위별 무게에 아무런 영향을 미치지 않은 것으로 확인되었으므로 실험군을 대조군과 녹차군의 두 그룹으로 나누어 녹차 투여 여부에 따른 뇌 부위별 무게를 비교하였다. 그 결과 Table 2와 같이 녹차군(729mg)의 cortex 무게가 대조군(622mg)에

비해 유의적으로 높았다($p < 0.05$). 하지만 Cortex를 제외한 cerebellum, striatum, hippocampus의 중량은 두 실험군 간에 유의적인 차이가 없었다. 녹차 섭취에 의해 cortex 무게가 증가한다는 사실은 본 실험에서 처음 관찰되었으며 이를 재현하기 위한 실험이 다른 연구자들에 의해 수행되어야 할 것이라고 사려된다. 한편 동일한 연령의 동일 종 쥐에게 녹차 건분과 에탄올 추출물을 식이의 5%씩 공급한 김의 연구¹¹⁾ 결과에서는 대조군에 비해 녹차군의 식이 섭취량이 다르지 않았지만 체중증가량과 식이효율은 녹차군에서 유의적으로 높게 나타났다. 식이의 녹차 건분 함량이 1%로 일상식에서 충분히 섭취 가능한 범위의 녹차를 투여했던 본 실험에서는 체중 증가량이나 식이 효율에 아무런 차이가 없었고 따라서 뇌 조직의 항산화 효소 활성화에 나타난 변화는 식이 섭취량이나 성장에 미친 효과와는 무관한

것으로 사려된다.

2. 뇌 부위별 MDA 함량 및 항산화 효소의 활성

각 실험군의 뇌 부위별 MDA 함량과 항산화 효소 SOD, catalase, GSH-Px 활성을 cortex와 cerebellum은 Table 3, striatum은 Table 4, hippocampus는 Table 5에 제시하였다.

Cortex와 cerebellum의 MDA 함량과 SOD, catalase, GSH-Px 활성에는 녹차 투여나 급성 알코올 투여 여부에 관계없이 실험군 간에 서로 유의적인 차이가 없었다(Table 3).

Striatum에서는 녹차군의 MDA 함량과 녹차-알코올 투여군의 MDA 함량이 Table 4에 나타난 바와 같이 각각 44.50nmol/g, 63.85nmol/g으로 대조군(150.32nmol/g)에 비하여 유의적으로 낮았다. 또한 녹차군의 striatum 내

Table 2. Effects of green tea powder diet on the weight of brain regions in rats

Group	Cortex	Cerebellum	Striatum	Hippocampus
Control	622.62 ± 32.48	309.32 ± 9.89	121.67 ± 9.12	113.03 ± 7.28
Green tea	729.94 ± 32.00*	325.36 ± 10.25	127.93 ± 12.54	104.56 ± 7.45

Values are expressed as mean ± S.E. (n = 12)

*: significantly different from control group at $p < 0.05$

Table 3. Effects of green tea powder diet and ethanol-induced lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in the cortex and cerebellum

Group	Lipid peroxidation (nmols MDA/g tissue)	Superoxide dismutase (units/mg protein)	Catalase (units/mg protein)	Glutathione peroxidase (units × 10 ² /mg protein)
Cortex				
Control	50.62 ± 7.88	13.05 ± 1.82	0.17 ± 0.02	10.02 ± 0.78
Control + ethanol treated	62.67 ± 8.56	13.42 ± 1.51	0.16 ± 0.02	9.66 ± 1.58
Green tea	53.47 ± 5.01	13.02 ± 1.19	0.18 ± 0.01	11.80 ± 2.79
Green tea + ethanol treated	55.20 ± 6.73	15.65 ± 2.04	0.17 ± 0.01	9.27 ± 1.38
Cerebellum				
Control	237.57 ± 21.04	16.70 ± 1.98	0.45 ± 0.04	10.82 ± 1.52
Control + ethanol treated	255.49 ± 19.53	20.11 ± 1.98	0.52 ± 0.05	11.42 ± 0.81
Green tea	236.11 ± 15.63	19.23 ± 2.56	0.50 ± 0.05	11.32 ± 0.92
Green tea+ethanol treated	205.62 ± 24.33	19.01 ± 2.27	0.51 ± 0.04	10.69 ± 0.54

Values are expressed as mean ± S.E. (n = 6)

Table 4. Effects of green tea powder diet and ethanol-induced lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in the striatum

Group	Lipid peroxidation (nmols MDA/g tissue)	Superoxide dismutase (units/mg protein)	Catalase (units/mg protein)	Glutathione peroxidase (units × 10 ² /mg protein)
Control	150.32 ± 31.75	15.73 ± 1.67	0.18 ± 0.03	10.30 ± 1.45
Control + ethanol treated	99.72 ± 17.55	14.79 ± 1.67	0.18 ± 0.02	9.91 ± 0.52
Green tea	44.50 ± 7.38 ^{a,b*}	20.10 ± 3.41	0.24 ± 0.03	10.66 ± 0.81
Green tea + ethanol treated	63.85 ± 11.91 ^a	14.54 ± 1.24	0.21 ± 0.02	10.03 ± 1.09

Values are expressed as mean ± S.E. (n = 6)

a: significantly different from control group at $p < 0.05$

a*: significantly different from control group at $p < 0.01$

b*: significantly different from control + ethanol treated group at $p < 0.01$

MDA 함량은 비녹차-알코올 투여군(Control + ethanol treated)의 99.72nmol/g에 비교했을 때도 유의적으로 낮았다($p < 0.01$). 그 원인에 대해서는 잘 알 수 없으나, 본 실험에서 비녹차-비알코올군의 MDA 함량이 비녹차-알코올 투여군 보다 유의적이지는 않았으나 감소한 결과를 보였다. 이를 제외한 striatum 내의 SOD, catalase, GSH-Px 활성은 녹차군의 경우 약간 높은 경향을 보이기는 했으나 실험군 간에 유의적 차이가 없었다.

Hippocampus의 경우 녹차군의 MDA 수준이 가장 낮기는 했으나 편차가 심해서 유의적 차이는 나타나지 않았으며 항산화 효소 중 SOD와 GSH-Px의 활성에 각 실험군 간에 차이가 나타났다(Table 5). 녹차-알코올 투여군의 SOD 활성은 17.42 units/mg protein으로 대조군의 13.43units/mg protein에 비하여 유의적으로 높았다. Hippocampus 내 GSH-Px의 활성은 녹차군이 0.0707units/mg protein으로 대조군의 0.043units/mg protein보다 유의적으로 높았으며($p < 0.01$), 비녹차-알코올 투여군의 0.0512units/mg protein에 비교했을 때도 유의적으로 높았다($p < 0.05$).

본 실험의 결과를 종합하여 보면, 흰 쥐에게 1% 녹차 건분 식이를 공급하였을 때 striatum 내 MDA 함량이 유의적으로 낮았고, hippocampus 내 GSH-Px 활성이 유의적으로 높은 결과를 보였다.

많은 연구들에 의하여 녹차의 생체내 항산화 기능이 보고되고 있으며 이를 설명하는 대표적인 기전이 녹차의 polyphenolic compound 들이다. 녹차에 존재하는 polyphenol 성분에는 epicatechin, epigallo catechin등의 성분을 포함하는 catechins류가 대표적으로 알려져 있으며, 그 외에도 ascorbic acid, gallic acid, quinic acid, carotenoids의 항산화 성분들도 포함하고 있다.

과산화 지질물인 MDA는 산화적 스트레스시 뇌의 각 영역에서 증가하는 것으로 알려져 있으며, 축적시 DNA와 복합물을 형성하는 등 조직에 산화적 손상을 가져온다. Pal et al 연구²³⁾에 의하면 cadmium, ethanol, 그리고 돌을

동시 투여하여 산화적 stress를 가하였을 때, cortex와 striatum 내의 MDA 함량이 유의적으로 증가하였다. 그 외의 많은 연구에서도 stress, ethanol과 exercise²⁴⁾ 등의 산화적 스트레스를 가하였을 때, 다양한 뇌 부위에서 MDA 함량이 매우 증가하는 동일한 결과를 보였다.

이에 대하여 식이내 항산화 물질의 공급에 의한 조직 내 산화적 활성의 감소는 뇌 조직내 MDA 함량을 낮추거나 혹은 산화적 손상에 의한 MDA 함량의 증가를 감소하는 결과를 유도한다. 5~7주령의 수컷 ICR mice에게 Vietnam ginseng saponin과 majonoside를 투여하고 일정 간격의 전기적 충격으로 스트레스를 가한 후 전체 뇌의 MDA 함량을 측정된 Yobimoto의 실험²⁵⁾ 결과에 의하면, stress를 받지 않은 실험군의 뇌 MDA 함량은 saponin이나 majonoside의 투여에 의하여 유의적인 영향을 받지 않았지만, stress를 받은 실험군에서의 뇌 MDA 함량은 대조군에 대하여 유의적으로 증가하면서도 saponin이나 majonoside의 투여에 의하여 유의적으로 감소하였다. 녹차 건분을 공급하고 알코올로 스트레스를 가한 본 연구에서 1% 녹차 건분을 섭취한 실험군의 striatum 내 MDA 함량이 유의적으로 감소하여 위의 연구들과 동일한 결과를 보였다. Striatum 이외의 다른 부위인 cortex, cerebellum, hippocampus의 MDA 함량에는 녹차 건분이나 알코올 공급에 의하여 유의적인 차이를 보이지 않는 것으로 보아서, 알코올에 의한 산화적 손상의 기전이 뇌 부위별로 매우 특정적으로 작용하며 녹차의 항산화 작용도 다름을 의미한다.

체내의 항산화 체계는 효소적 체계와 비효소적 체계로 나누어져 있으며, SOD, catalase, GSH-Px가 효소적 항산화 체계의 주요 기능을 담당하고 있다.²⁶⁾ 체내 주요 항산화 효소 세 가지 중 SOD가 가장 일차적으로 작용하여 매우 높은 산화적 활성을 지니는 $O_2^{\cdot -}$ 를 H_2O_2 로 만들고 이를 다시 catalase, glutathione peroxidase가 분해하여 H_2O 나 O_2 로 만들어 체내 활성 산소종을 제거한다. 항산화 효소의 활성은 산화적 자극원의 종류와 조직에 따라 개별적으로 반응하며, 산화적 자극원의 종류와 조직에 따라 항산화 체제

Table 5. Effects of green tea powder diet and ethanol-induced lipid peroxidation and antioxidative enzyme activities in the hippocampus

Group	Lipid peroxidation (nmols MDA/g tissue)	Superoxide dismutase (units/mg protein)	Catalase (units/mg protein)	Glutathione peroxidase (units $\times 10^{-2}$ /mg protein)
Control	148.56 \pm 15.57	13.43 \pm 1.22	0.17 \pm 0.02	4.30 \pm 0.29
Control + ethanol treated	146.34 \pm 14.65	17.46 \pm 2.85	0.17 \pm 0.01	5.12 \pm 0.62
Green tea	115.14 \pm 21.56	17.56 \pm 2.76	0.21 \pm 0.02	7.07 \pm 0.54 ^{a,b}
Green tea + ethanol treated	131.43 \pm 17.78	17.42 \pm 0.83 ^a	0.17 \pm 0.02	6.15 \pm 1.00

Values are expressed as mean \pm S.E. (n = 6)

a: significantly different from control group at $p < 0.05$

a*: significantly different from control group at $p < 0.01$

b: significantly different from control + ethanol treated group at $p < 0.05$

에서 나타나는 반응이 달라진다. 또한 항산화 체계의 작용에 있어 효소 하나 하나의 활성과 함께 산화성 물질과의 균형, 효소간의 균형 등도 매우 중요하다. 하나의 예로 SOD의 활성이 높고 $O_2^{\cdot -}$ 가 낮을 경우, 전체적인 항산화 효소 체계는 억제되는 것으로 보고되었다.²⁶⁾ 따라서 모든 산화적 물질에 대하여 모든 항산화 효소들의 활성이 감소하지는 않는 결과를 보이며, 이러한 항산화 효소들의 biphasic 반응은 매우 일반적이다. 대표적으로 신경계에 산화적 손상을 일으키는 것으로 알려진 quinoloic acid (QUIN)를 투여한 쥐의 항산화 체계 변화 연구에 의하면, QUIN이 striatum 내 MDA와 산화형 glutathione(GSSG)의 함량을 유의적으로 증가시킨 반면, Mn-SOD 활성은 감소시키지 않았고 Cu-Zn SOD 활성은 유의적으로 감소시켰다.²⁶⁾

알코올에 의한 중추신경계의 손상과 항산화 물질에 의한 보호 효과는 많은 연구들에 의하여 보고되고 있다. Renis et al의 연구²⁷⁾에 의하면, 수컷 Wistar rat에게 5g/kg의 ethanol을 급성으로 투여한 군과 5% ethanol 식이를 만성으로 공급한 군 모두에게서 혈청 내 GSH-Px의 활성이 감소하였고, 체내 항산화 기능에 중요 기능 담당하는 SH기 역시 대조군에 비하여 유의적으로 감소되었다. 동일한 실험에서 손상된 DNA의 양을 살펴보면 알코올을 투여한 경우 모두 손상된 DNA의 양이 증가하였으며, 급성 투여군의 hippocampus와 cerebellum 내에서의 손상된 DNA 증가가 더욱 크게 나타났다.

신경계 세포에 속하는 astrocyte 배양 실험에 의하면, alcohol에 의해 acetaldehyde가 축적되었으며 장기 투여한 군에서 급성 투여한 경우보다 더 많은 양의 acetaldehyde가 축적된 것으로 보고되었다.^{13,28)} 또한 만성 알코올 투여군의 GSH-Px와 SOD의 활성도 유의적으로 증가하였으며, 이와 동시에 환원형 GSH가 유의적으로 감소되었다.

Hippocampus cell에 ethanol을 투여하여 배양한 Mitchell et al의 실험²⁹⁾결과에 의하면, ethanol 투여량에 의하여 dose dependent manner로 세포의 배양이 감소하였으며, 여기에 vitamin E나 β -carotene을 같이 공급한 배양군에서는 ethanol만 투여한 군보다 유의적으로 증가한 결과를 보고하였다. 이는 ethanol에 의한 세포독성을 vitamin E나 β -carotene과 같은 항산화 물질이 유의적으로 감소시켰음을 의미한다. 그 외 quercetin,³⁾ docosahexaenoic acid,²⁰⁾ green tea polyphenols epigallocatechin gallate^{13,30-32)} 등과 다양한 항산화 물질의 공급에 의하여 산화적 손상이 감소되는 결과를 보였다.

녹차의 항산화 효과는 사람을 대상으로 한 실험에서도 보고되고 있다. Serafini et al¹⁰⁾의 연구결과에서 녹차 300ml

을 섭취한 성인의 혈청 총항산화력(TRAP)이 녹차 섭취 30분 후에 40%의 증가를 보이며 peak를 이루었으며, 홍차는 섭취 50분 후에 50%의 증가를 보였다.

본 연구결과들을 종합하여 볼 때, 1% 녹차 건분 공급은 흰쥐의 striatum 내 과산화지질물을 낮추고 항산화 효소 활성에는 아무런 영향을 끼치지 않았으며, hippocampus 내에서는 MDA 수준에는 유의적인 영향을 끼치지 않고 SOD, GSH-Px 등 항산화효소 활성을 증가시켰다는 점과 연관지어 볼 때, 녹차의 항산화 효과에 대한 기전이 뇌 부위에 따라 다를 수 있을 것으로 예측된다. 녹차의 뇌조직 항산화 효과의 기전을 규명하기 위하여 녹차와 더불어 항산화 비타민 투여군을 포함한 후속 실험을 진행하고 있다.

요약 및 결론

본 연구에서는 녹차건분 식이가 뇌조직에서 알코올에 의한 산화적 스트레스 감소효과를 나타내는지를 규명하고자, 생후 1개월령 Sprague-Dawley에게 1% 녹차 건분식이를 4주간 공급하고 희생 12시간 전에 급성으로 알코올을 투여한 후 뇌 조직을 cortex, cerebellum, striatum, hippocampus로 나누어 malondialdehyde(MDA)의 함량과 catalase, superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GSH-Px)의 활성을 측정하였다. 본 실험 결과를 종합하여 볼 때, 1% 녹차 건분 식이의 공급은 striatum 내 MDA 함량을 유의적으로 낮추고 hippocampus 내 GSH-Px 활성을 증가시킨 것으로 나타났다. 이러한 결과는 녹차 건분의 공급이 알코올로 산화적 stress를 가한 동물에서 일부 뇌 조직의 지질 산화를 억제하는 효과가 있음을 시사한다고 본다.

Literature cited

- 1) Reitter RJ. Oxidative damage in the central nervous system: protection by melatonin. *Prog Neurobiol* 56: 359-384, 1998
- 2) Yobimoto K, Matsumoto K, Huang N, Kasai R, Yamasaki K, Watanabe H. Suppressive effects of vietnamese ginseng saponin and its major component majonoside-R2 on psychological stress-induced enhancement of lipid peroxidation in the mouse brain. *Pharmacol Biochem Behav* 66(3): 661-665, 2000
- 3) Shutenko Z, Henry Y, Pinard E, Seylaz J, Potier P, Berthet F, Girard P, Sercombe R. Influence of the antioxidant quercetin in vivo on the level of nitric oxide determined by electron paramagnetic resonance in rat brain during global ischemia and reperfusion. *Biochem Pharmacol* 57: 199-208, 1999
- 4) Ikeda Y, Long DM. The molecular basis of brain injury and brain edema: the role of oxygen free radicals. *J Neurosurg* 27(1): 1-11, 1990
- 5) Bravo L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nu-

- tritional significance. *Nutr Rev* 56(11): 317-333, 1998
- 6) Park CO, Jin SH and Ryu BH. Antioxidant activity of green tea extracts toward human low density lipoprotein. *Korean J Food Sci Technol* 28(5): 850-858, 1996
 - 7) Suganuma M, Okabe S, Sueoka E, Matsuyama S, Imai K, Nakachi K, Fujiki H. Green tea and cancer chemoprevention. *Mutation Res* 428: 339-344, 1999
 - 8) Vinson JA, Dabbagh YA. Effect of green tea and black tea supplementation on lipid, lipid oxidation and fibrinogen in the hamster: mechanisms for the epidemiological benefits of tea drinking. *FEBS Lett* 433: 44-46, 1998
 - 9) Wiseman SA. Antioxidants in tea. *Critical Rev Food Sci Nutr* 37(8): 705-718, 1997
 - 10) Serafini M, Ghiselli A, Cerro A. In vivo antioxidant effect of green and black tea in man. *Eur J Clin Nutr* 50: 28-32, 1996
 - 11) Kim ES, Kim MK. Effects of dried leaf powders and ethanol extracts of persimmon, green tea and pine needle on lipid metabolism and antioxidative capacity in rats. *Korean J Nutr* 32: 337-352, 1999
 - 12) Oh JE, Park YJ, Lee JM. Development of elderly diet using plant of anti-aging action-optimization for preparing barley porridge with green tea. *Korean J Dietary Culture* 16: 2001(in press)
 - 13) Soliman KFA, Mazzi EA. In vitro attenuation of nitric oxide production in C6 astrocyte cell culture by various dietary compounds. *PSEBM* 218: 390-397, 1998
 - 14) Komatsu M, Hiramatsu M. The efficacy of an antioxidant cocktail on lipid peroxide level and superoxide dismutase activity in aged rat brain and DNA damage in iron-induced epileptogenic foci. *Toxicol* 148: 143-148, 2000
 - 15) Lee SR, Suh SI, Kim SP. Protective effects of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin gallate against hippocampal neuronal damage after transient global ischemia in gerbils. *Neurosci Lett* 287: 191-194, 2000
 - 16) Hong JT, Ryu SR, Kim HJ, Lee JK, Lee SH, Kim DB, Yun YP, Ryu JH, Lee BM, Kim PY. Neuroprotective effect of green tea extract in experimental ischemia-reperfusion brain injury. *Brain Res Bull* 53: 743-749, 2000
 - 17) Rehncrona S, Smith DS, Akesson B, Westerberg E, Siesjo BK. Peroxidative changes in brain cortical fatty acids and phospholipids, as characterized during Fe²⁺ and ascorbic acid stimulated lipid peroxidation in vitro. *J Neurochem* 34(6): 1630-1638, 1980
 - 18) Pattichis K, Louca LL, Glover V. Quantitation of soluble superoxide dismutase in rat stria, based on the inhibition of nitrite formation from hydroxylammonium chloride. *Anal Biochem* 221: 428-431, 1994
 - 19) Johansson LH and Borg LAH. A spectrophotometric method for de-termination of catalase activity in small tissue samples. *Anal Biochem* 174: 331-336, 1988
 - 20) Hossain S, Hashimoto M, Gamoh S, Masumura S. Antioxidative effects of docosahexaenoic acid in the cerebrum versus cerebellum and brainstem of aged hypercholesterolemic rats. *J Neurochem* 72: 1133-1138, 1999
 - 21) Prohaska JR and Ganther HE. Selenium and glutathione peroxidase in developing rat brain. *J Neurochem* 27: 1379-1387, 1976
 - 22) Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with Folin's phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275, 1951
 - 23) Pal R, Nath RM, Gill KD. Lipid peroxidation and antioxidant defense enzymes in various regions of adult rat brain after co-exposure to cadmium and ethanol. *Pharmacol Toxicol* 73: 209-214, 1993
 - 24) Somani SM, Husain K, Diaz L, Lanzotti DY, Kareti KR, Trammell GL. Interaction of exercise and ethanol on antioxidant enzymes in brain regions of the rat. *Alcohol* 13(6): 603-610, 1996
 - 25) Mates JM, Perez C, Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 32(8): 595-603, 1999
 - 26) Rodriguez E, Camacho A, Maldonado PD, Pedraza J, Santamaria D, Galvan S, Santamaria A. Effect of quinolinic acid on endogenous antioxidants in rat corpus striatum. *Brain Res* 858: 436-439, 2000
 - 27) Renis M, Calabrese V, Calderone RA, Barcellona ML, Rizza V. Nuclear DNA strand breaks during ethanol-induced oxidative stress in rat brain. *FEBS Lett* 390: 153-156, 1996
 - 28) Eysseric H, Gonthier B, Soubeyran A, Richard MJ, Daveloose D, Barret L. Effects of chronic ethanol exposure on acetaldehyde and free radical production by astrocytes in culture. *Alcohol* 21: 117-125, 2000
 - 29) Mitchell JJ, Paiva Michael, Heaton MB. The antioxidants vitamins E and β -carotene protect against ethanol-induced neurotoxicity in embryonic rat hippocampal cultures. *Alcohol* 17(2): 163-168, 1999
 - 30) Terao J, Piskula M, Yao Q. Protective effect of epicatechin, epicatechin gallate, and quercetin on lipid peroxidation in phospholipid bilayers. *Arch Biochem Biophys* 308(1): 278-284, 1994
 - 31) Vermeer ITM, Moonen EJC, Dallinga JW, Kleinjans JCS, Maanen JMS. Effect of ascorbic acid and green tea on endogenous formation of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosopiperidine in humans. *Mutation Res* 428: 353-361, 1999
 - 32) Yoneda T, Hiramatsu M, Sakamoto K, Togasaki K, Komatsu M, Yamaguchi K. Antioxidant effects of "β-catechin". *Biochem Mol Biol Intl* 35(5): 995-1008
 - 33) Graham HL. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. *Prev Med* 21: 334-350, 1992