

*Opuntia ficus-indica*가 Glutathione 및 항산화 효소에 미치는 보호효과

전흥기¹ · 정영기² · 하배진[†]

¹부산대학교 생명과학부
²동의대학교 생명응용과학과
[†]신라대학교 생명공학과

Protective effects of *Opuntia ficus-indica* on Glutathione and Antioxidative Enzyme

Hong-Ki Jun¹, Young-Kee Jeong² and Bae-Jin Ha[†]

¹Division of Biological Sciences, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

²Department of Life Science and Biotechnology, Dong-Eui University, Busan 614-714, Korea

[†]Department of Bioscience and Biotechnology, Silla University, Busan 617-736, Korea

Abstract

The effects of *Opuntia ficus-indica* (OF) administration on the biochemical parameters of function in liver tissue and serum of CCl₄ treated rats were investigated. *Opuntia ficus-indica* (200 mg/kg) was administered into rats intraperitoneally for two weeks. 3.3 ml of CCl₄ (50% CCl₄ : Olive oil = 1 : 1) was treated to rats on the 14th day and 15th day and they were operated on 15th day. We examined the antioxidative enzymatic activity by measuring the level of AST (Aspartate aminotransferase), ALT (Alanine aminotransferase), GSH (Glutathione reduced form), GSSG (Glutathione oxidized form), GPx (GSH-peroxidase), SOD (Superoxide dismutase) and CAT (Catalase) in serum and liver tissue of rats. OFC administered group showed 24.8% of inhibitory effect in AST activity compared to CCl₄-treated abnormal group (CTA). ALT level of OF administered group was decreased by 60.7% to the level of CTA. GSH, GSSG and GPx of OFC administered group were significantly higher than those of CTA group. SOD and CAT in OFC administered group were increased by 28.3% and by 16.9% respectively compared to those of CTA group.

Key words – *Opuntia ficus-indica*, Hepatotoxicity, Antioxidative enzyme, Glutathione

서 론

손바닥 선인장 (*Opuntia ficus-indica* L. var *saboten* Makino, 제주도 기념물 35호)은 열대성식물로서 항염증[7], 혈당강

하[11], 위궤양 억제[3], 항산화작용[6], 면역기능 증강[10] 등의 효능이 있는 것으로 알려지면서 관상용뿐만 아니라 제주도 농가에서 특용작물로 많이 재배되고 있다. 우리나라에서는 오래 전부터 선인장의 열매 및 줄기를 변비치료, 이뇨효과, 장운동의 활성화 및 식용증진의 목적으로 사용하여 왔고, 특히 줄기는 피부질환, 류마티스 및 화상치료에 민간요법으로 사용되고 있다. 현재까지 손바닥 선인장의

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : +82-51-309-5466, Fax : +82-51-309-5684
E-mail : bjha@silla.ac.kr

성분으로는 anhalinin, indicaxanthin, isoberain, betain, saponin 등이 보고되고 있다[2].

선인장의 성분 중 Flavonoid 성분은 항산화 작용이 강하여 혈액순환을 원활하게 하며 노화억제 효과가 대단히 높다. 모노아민 산화효소에 대한 저해 작용이 강하여 아드레날린의 분해를 억제시키므로 강장 효과가 크며 당뇨병 환자에게 혈당치와 콜레스테롤 수치를 감소시키는 작용을 한다.

현재 산업의 급속한 변화에 따른 결과로 유해 공해물질의 인체 폭로가 심각한 상태에 있다. 특히 이들 공해물질 중 간독성 물질에 의한 간손상은 오래전부터 많은 관심의 대상이 되어 왔으며, 이에 대한 연구가 많이 수행되어지고 있다. Toxic chemical의 일종인 CCl₄는 간독소의 일종으로 독성 그 자체보다는 조직의 endoplasmic reticulum에서 생성되는 대사 산물인 trichloromethyl free radical이 산소와 반응하여 trichloromethyl peroxy radical을 생성하여 생성된 oxygen free radical은 매우 강한 독성으로 생체막 손상이 초래된다.[8]

이러한 환경에 노출된 생명체는 활성 산소종에 의한 조직 손상으로부터 스스로 보호하기 위한 방어체계를 갖추고 있다. 그 방어기전은 항산화 활성효소 (catalase, glutathione peroxidase (GPx), peroxidase) 및 glutathione (GSH), tocopherol 등의 항산화 물질인데 이중 GSH는 동물 조직 중에서 nonprotein thiol의 대부분을 차지하며 활성 산소의 scavenger로서 H₂O₂ 및 과산화지질을 대사시키는 GPx의 기질로 세포내 항산화제 중에서 가장 중요한 역할을 담당하고 있다.

본 연구에서는 rat에게 손바닥 선인장을 투여했을 때, AST, ALT, SOD, catalase, GPx의 활성도 및 GSH, GSSG의 함량에 미치는 영향을 검토하여 항산화 효소 활성의 영향 및 독성 억제 효과를 조사하고자 한다.

재료 및 방법

재료

시판되고 있는 제주도 손바닥 선인장 분말을 산 및 염기와 당 가수분해효소로 가수분해한 후 클로로포름 (CHCl₃)으로 추출하여 사용하였다.

실험동물 및 식이

실험동물 (rat)은 체중 150 g 내외의 female을 대구 효창 사이언스로부터 제공받았고 7일 동안 적응시켰다. 실험동물은 cage에 각각 분리시키고 사료와 물을 자유롭게 섭취하도록 했다. 실험동안 동물들은 22±1°C의 온도와 60±5°C 상대습도로 유지시켰다. 총 30 마리의 rat를 다음의 Table 1에 따라서 나누어 투여하였다.

CTA 군은 0.9% saline을, OFC 군은 손바닥 선인장 200 mg/kg을 복강 내에 2주간 매일 투여했다.

실험동물의 간 손상의 유도는 사염화탄소를 olive oil에 1:1 비율로 용해시켜 체중 1 kg 당 3.3 ml의 용량을 복강으로 해부하기 24시간 전에 반을 투여, 12시간 전에 나머지 반을 투여하여 각각 간 독성을 유발시켰다. 그 후 10시간 동안 절식 후 혈액과 간을 채취하여 실험에 임하였다.

혈액 및 간 채취

실험동물을 ether 마취 하에서 개복한 후 심장에서 채혈하여 30분 안에 800×g에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였으며, 간은 적출하여 0.9% 생리 식염수로 세척하여 vial에 담아 -70°C Deep freezer에 보관하여 사용하였다.

혈청 중의 효소 활성 측정

혈청 중의 AST (Aspartate aminotransferase)와 ALT (Alanine aminotransferase)는 Reitman-Frankel법에 따라 조제된 kit 시액 (AST Kit no. BC101-O, ALT Kit no. BC101-P, 영동제약)을 사용하여 측정하였다.

AST substrate 1.0 ml를 시험관에 취하여 37°C 수조에서

Table 1. Experimental design of CCl₄-treated rats

Experimental Groups	n*	1st~14th	14, 15th
NCT	10	0.9% saline	
CTA	10	0.9% saline	
OFC	10	<i>Opuntia ficus-indica</i> (200 mg/kg)	3.3 ml of 50% CCl ₄ **/kg

NCT : Non CCl₄-treated group.

CTA : CCl₄-treated abnormal group.

OFC : *Opuntia ficus-indica* (200 mg/kg) + CCl₄-treated group.

*n : number of experimental animals.

**50% CCl₄ : Olive oil = 1 : 1.

2~3분간 가온한 후 0.2 ml의 혈청을 가하고 37°C 수조에서 60분간 반응시켰다. 여기에 1.0 ml의 발색액을 가하여 혼합한 후 실온에서 20분간 방치하고 0.4 N-NaOH 10.0 ml를 가하여 충분히 혼합한 후 증류수를 대조로 하여 505 nm에서 흡광도를 측정하였다.

AST와 실험방법은 동일하나, ALT의 측정은 ALT substrate 1.0 ml를 사용하고 37°C 수조에서 30분간 반응시킨 후 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

간 조직 중 GSH (Glutathione reduced form), GSSG (Glutathione oxidized form)의 정량

1) GSH

Homogenate에 25% HPO₃를 혼합하여 (4:1) 4°C, 8000×g에서 10 분간 원심 분리하여 96 well에 상등액과 phosphate buffer (1 mM EDTA 함유, pH 7.4)와 OPT (o-phthalaldehyde) 를 넣어 15분 shaking한 후 360 nm에서 형광 측정했다.

2) GSSG

Homogenate에 25% HPO₃를 혼합하여 4°C, 8000×g에서 10분간 원심 분리하여 microtube에 상등액에 NEM (N-ethylmaleimide) 를 섞은 후 20분 방치하고 0.1 N NaOH를 가하여 혼합한 후 96 well에 앞에서 혼합한 sample 200 μl와 OPT 10 μl를 섞어 15분간 shaking 후 360 nm에서 형광 측정했다.

간 조직 중 GPX (GSH-peroxidase)의 활성 측정

0.1 M PB (4 mM EDTA) 400 μl + 0.01 M NaN₃ 70 μl + 0.01 M GSH 70 μl + 1.5 mM NADPH 70 μl + H₂O 360 μl + GSSG-reductase (1.8 u/ml) 20 μl + sample (20% H 원액) 10 μl를 혼합하여 상온에서 1분간 방치한 후 2 mM의 H₂O 100 μl를 가해 잘 섞은 후 340 nm에서 1분 30초간 흡광도 감소 측정을 하였다.

간 조직 중의 SOD (Superoxide Dismutase) 효소활성 측정

0.2 M K-Phosphate buffer (pH 7.4)를 672 μl, 1 mM Xanthine 67 μl, 1% Sodiuime Deoxychlorate (DOC) 10 μl, 1.5 mM KCN 10 μl, 0.2 mM cytochrome C 50 μl를 넣은

mixture에 sample 3 μl를 넣고, XOD (Xanthine Oxidase) 원액을 3 μl를 넣어 mixing한 후 550 nm에서의 흡광도 변화를 2분 동안 측정하였다. sample의 효소 활성도를 알아보기 위한 표준액으로서는 Sigma사의 superoxide dismutase standard를 사용하였다.

간 조직 중 CAT (Catalase)의 활성 측정

Phosphate buffer (0.05 M pH 7.0) 1.9 ml에 sample (간 homogenate) 를 800×g에서 20분간 원심분리한 상등액 100 μl를 buffer로 80배 희석) 0.1 ml와 과산화수소 용액 1 ml를 혼합하여 240 nm에서 1분 30 초 동안 흡광도 감소를 측정하였다.

간 조직 중의 Protein Assay

단백질의 정량은 Lowry 법[11]에 의해서 750 nm에서 흡광도를 측정하고 표준 단백 시료를 Bovine Serum Albumin (BSA) 으로 하여 같은 방법으로 측정하여 단백질량을 정량하였다.

결과 및 고찰

혈청 중 Aspartateaminotransferase (AST) 및 Alanineaminotransferase (ALT) 활성도 변화

Aminotransferase는 α-amino acid에서 α-keto acid까지 α-amino group의 전달에 촉매 작용을 한다. 또한, transaminase라고 불리는 이 효소는 일반적으로 NH₄⁺로 전환하기 위해 여러 가지 아미노산에서 α-ketoglutarate까지 α-amino group들을 보낸다. Aspartate aminotransferase는 이 효소들 중에서 α-ketoglutarate에 aspartate의 amino group을 전달하는 촉매작용을 한다. Alanine aminotransferase는 α-ketoglutarate에 alanine의 아미노기를 전달하는 촉매 작용을 한다.[5]

Table 2는 혈청 중 AST 및 ALT 활성정도를 나타낸 것이다. NCT 군에 비하여 CCl₄를 투여한 군 (CTA)에서 혈청 AST, ALT 활성이 증가하는 경향을 볼 수 있는데 이는 CCl₄에 의한 간 손상 유발물질이 간의 대사이상을 초래하여 간세포손상이 초래되는 것으로 사료된다. 이는 Takaharu 등[12]의 결과논문에서도 같은 경향을 보였다.

본 실험의 AST, ALT의 활성은 AST 활성의 경우, CTA

군이 NCT 군에 비해 CCl_4 의 간 장애 유발로 인해 효소 활성이 증가하는 경향을 보였으며, 손바닥 선인장의 투여 (OFC)로 24.8% 감소하는 경향도 볼 수 있었다.

ALT 활성에 있어서는, CTA 군의 효소 활성이 NCT 군에 대해 약 8배정도 증가하여 간 장애 유발이 확인되었다. 또한 CTA 군에 비해 OFC 군은 60.7%로 더 감소하는 것으로 관찰되었다. 2주간 이상 손바닥 선인장을 투여할 시 ASL, ALT 활성이 더 감소할 것으로 기대된다.

간 조직 중 GSH (glutathione reduced form), GSSG (glutathione oxidized form)의 정량 및 GPx (GSH-peroxidase)의 활성도 변화

Glutathione은 산화적인 손상으로부터 red cell을 보호한다. 그것은 Disulfide bond에 의해서 연결된 두 개의 tripeptide에 의해서 환원된 형태 (GSH)와 산화된 형태 (GSSG) 사이를 순환한다. GSSG는 전자 근원과 같은 NADPH를 사용하는 flavoprotein인 Glutathione reductase에 의해서 GSH로 환원된다. Glutathione은 aerobic life에서 해로운 부산물인 hydrogen peroxide와 organic peroxide와 함께 반응함으로써 해독 작용에서 중요한 역할을 수행한다. 이 반응에서 촉매 효소인 Glutathione peroxidase는 selenium (Se) 원자에 부착되어 공유적으로 결합하는 것이 주목할 만 하다. Total glutathione은 환원된 형태 (GSH)와 산화된 형태 (GSSG)로 구성되어 있다. Glutathione peroxidase (GPx)와 Glutathione reductase는 Glutathione에 의해서 H_2O_2 와 lipid peroxide와 같은 peroxides의 다양한 종류들을 조절한다[9].

Table 3에서 보면 간 조직 중의 CTA 군은 total glutathione 양이 NCT 군에 비해서 33.6% 높게 나타났다. 손바닥 선인장 투여 군 (OFC)에서 total glutathione 양은

CTA 군에 비해서 3.7%의 상승작용의 효과를 보였다. 간독성 모델 흰쥐의 간 조직에서 GSH가 전체 glutathione 양에 비하여 감소하는 것으로 나타나고 반면 GSSG 양이 증가하였으나, OFC 군에서는 GSH 양이 증가하였으며 GSSG 양은 감소하였다.

Table 3에서 보면 GPx 활성은 간 조직 중에서 보면 OFC 군은 CAT 군에 비하여 21.8% 증가되는 경향을 보였다.

간 조직 중 SOD (Superoxide dismutase), CAT (Catalase) 효소활성 측정

우리 몸에 활성 산소가 너무 많으면 암을 발생시키거나 노화를 촉진하는 등 나쁜 영향을 미친다. 이런 활성 산소는 과식을 하거나 과도한 스트레스, 지나친 흡연, 지나친 운동으로 인한 과호흡 등에 의해 그 양이 증가하는데, 이러한 활성산소를 분해시키는 역할을 하는 효소가 바로 SOD이다. SOD 효소는 25세까지는 우리 몸에서 자연적으로 생성되므로 별 문제가 없지만 25세 이후부터는 SOD 발생량이 줄어들어서 신체는 점점 노화되어 간다. 생체내의 항산화 방어기구 중에서 효소적 방어 계의 하나로 superoxide radical을 환원시켜 H_2O_2 로 전환시켜 산소 독으로부터 생체를 보호한다고 Rosen이 보고하였다[13]. 간 조직 중의 SOD의 활성변화를 관찰한 결과는 Table 4와 같다. 간 조직에서의 SOD 활성정도는 CTA군의 효소활성이 NCT 군에 비해서 15.0% 정도로 낮게 나타났다. 손바닥 선인장 투여 군(OFC)에서의 SOD 활성수치는 CTA 군보다 28.3% 높게 나왔다.

CAT는 microsome에서 합성되며 골지체로 이동 부착되어 세포내 peroxisome에 존재하는 내인적으로 생성된 H_2O_2 를 H_2O 와 O_2 로 바꾸는 촉매역할을 한다[13].

CAT는 SOD에 비해 산화적 손상에 다소 민감한 것으로

Table 2. Effect of OF on ASL and ALT values in rat serum

	NCT	CTA	OFC
AST (nmol/mg protein)	29.20±11.43	348.00±10.39	269.00±12.73*
ALT (nmol/mg protein)	16.00±3.21	300.40±17.49	127.67±6.35*

All values are mean±SD.

Significantly different from the value of CTA group at $p < 0.001$, respectively.*

NCT : Non CCl_4 -treated group.

CTA : CCl_4 -treated abnormal group.

OFC : *Opuntia ficus-indica* (200 mg/kg) + CCl_4 -treated group.

Table 3. Effect of OF on GSH, GSSG, GSH-peroxidase values in rat liver homogenate

	NCT	CTA	OFC
GSH (reduced-glutathione) (mole/mg protein)AST (nmol/mg protein)	41.55±0.01	30.10±0.00	71.93±0.01*
GSSG (oxidized-glutathione) (mole/mg protein)	32.13±0.00	80.80±0.03	43.23±0.01*
GSH+GSSG (mole/mg protein)	73.69±0.01	110.90±0.03	115.15±0.02*
GPX (mU/mg protein)	56.19±0.00	53.91±0.00	65.68±0.00*

All values are mean±SD.

Significantly different from the value of CTA group at p<0.001, respectively.*

NCT : Non CCl₄-treated group.

CTA : CCl₄-treated abnormal group.

OFC : *Opuntia ficus-indica* (200 mg/kg) + CCl₄-treated group.

사료되며, 항산화제 효소들은 대사과정 중 발생하는 활성 산소종에 의해 그 활성이 비가역적으로 불활성화될 수 있으며, 또한 지방산화에 의해 생성된 유리기도 제거하는 능력이 있다고 Von, Fridovich 등이 보고하고 있다[14,1].

Table 5에서 보면 CTA 군에서의 CAT 활성치는 NCT 군과 비교했을 때 62.5% 감소를 보였다. 즉, CTA 군에서의

CAT activity는 NCT 군에서보다 상당히 낮게 나타났다. OFC 군에서의 CAT activity는 CTA 군에서보다 16.9% 높게 나왔다.

결론 및 요약

손바닥 선인장이 사염화탄소에 의해 간손상을 유도한 흰쥐의 혈청 및 항산화제에 미치는 영향을 알아보기 위하여 정상군 (NCT), CCl₄ 투여군 (CTA), 손바닥 선인장 투여군 (OFC)으로 나누어 2주일간 사육하고 물질을 투여한 후, CCl₄로 간독성을 유발한 후 AST 및 ALT의 활성도, 항산화 효소인 SOD, CAT 등의 활성도를 측정함으로써 항산화제의 변화 및 생리활성 변화를 살펴보았다. 혈청 중 ALT, AST의 변화는 정상군에 비하여 CCl₄ 단독 투여군에서는 약 8배 정도 급격히 상승하여 나타났으나 OFC 군에서, AST에서는 24.8% 정도 감소되었으며 ALT에서는 60.7%의 감소효과를 보였다. 간 조직 중 glutathione의 함량은 CTA 군이 NCT 군보다 33.6% 높게 나타났고, 손바닥 선인장 투여로 간 조직 중 총 glutathione량이 3.7% 높게 나타났다. 간 조직 중 reduced-glutathione (GSH) 함량 또한 손바닥 선인장의 투여로 3.7배 유의적으로 증가됨을 보였는데, 이 또한 손바닥 선인장의 투여로 인해 체내 free radical 생성이 감소되어, GSH 소모가 감소된 결과로 보여진다. 그리고 GPx의 활성 수치도 손바닥 선인장 투여로 5.2배 증가되는 유의한 변화를 나타냈다. 총 glutathione량에 대한 oxidized-glutathione (GSSG)의 비율 또한 OFC 군이 77.2% 억제되는 경향으로 나타났다. 간 조직 중 SOD와 CAT 활

Table 4. Effect of OF on SOD values in rat liver homogenate

	NCT	CTA	OFC
SOD (unit/mg protein)	35.55±0.71	30.21±0.67	42.13±1.40*

All values are mean±SD.

Significantly different from the value of CTA group at p<0.001, respectively.*

NCT : Non CCl₄-treated group.

CTA : CCl₄-treated abnormal group.

OFC : *Opuntia ficus-indica* (200 mg/kg) + CCl₄-treated group.

Table 5. Effect of OF on CAT values in rat liver homogenate, mitochondria

	NCT	CTA	OFC
CAT (mu/mg protein)	3.92±0.15	1.47±0	1.77±0.17*

All values are mean±SD.

Significantly different from the value of CTA group at p<0.01, respectively.*

NCT : Non CCl₄-treated group.

CTA : CCl₄-treated abnormal group.

OFC : *Opuntia ficus-indica* (200 mg/kg) + CCl₄-treated group.

성도는 OFC 군이 CTA 군 보다 각각 28.3%, 16.9% 증가하였다. 위 결과를 살펴보면, 이는 손바닥 선인장이 세포막의 소기관들을 과산화로부터 보호함으로써 효소활성의 최적 구조를 유지시켜 주는데 기여하기 때문으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Fridovich, I. 1986. Biologic effects of the superoxide radicals. *Arch. Biochem. Biophys.* **247**, 1-15.
2. Kahnsah, E., P. Kopsombut, M. A. Malque and A. Brossi. 1993. The effects of mescaline and some of its analogs on cholinergic neuromuscular transmission. *Neuropharmacology* **32**, 169-172.
3. Lee, H. J., Y. W. Lee and J. H. Kim. 1998. A study on antiulcer effects of *Opuntia dillenii* Haw. on stomach ulcer induced by water-immersion stress in rats. *J. Food Hyg. Safty* **13**, 53-56.
4. Lowry, O. H., N.J. Rosenbrough, A.S. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein Measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 256-260.
5. McPhalen, C. A., M. G. Vincent and J. N. Jansonius. 1992. X-ray structure refinement and comparison of three forms of mitochondrial aspartate aminotransferase. *J. Mol. Biol.* **225**, 495-517.
6. Paik, S. 1998. Effects of *Opuntia ficus-indica* fruit on the passive avoidance and anti-oxidation in the senescence-accelerated mouse. Cheju National University, Graduate School. MS thesis.
7. Park, E.H., J. H. Kahng and E. A. Paek. 1998. Studies on the pharmacological action of cactus : identification of its anti-inflammatory effect. *Arch. Pharm. Res.* **21**, 30-34.
8. Recknagel, R. O. 1967. Carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pharmacol. Review* **19**, 145-160.
9. Rosen, D. R., etal. 1993. Mutations with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Natuer* **362**, 59-62.
10. Shin, T., S. Kim and S. Lee. 1998. Effects of *Opuntia ficus-indica* extract on the activation of immune cells with special reference to autoimmune disease models. *Kor. J. Vet. Pathol.* **2**, 31-33.
11. Shin, T., S. Kim, C. Moon, M. Wie and B. Hyun. 1999. *Opuntia ficus-indica* ethanol extract ameliorates streptozotocin-induced hyperglycemia in rats. *Kor.*
12. Takaharu Nomura and Kiyonori Yamaoka. 1999. LOW-DOSE γ -RAY IRRADIATION REDUCES OXIDATIVE DAMAGE INDUCED BY CCl₄ IN MOUSE LIVER. *Free Radical Biology & Medicine.* **27(11/12)**, 1324-1333.
13. Tainer, J. A., E. D. Getzoff, J. S. Richardson and D. C. Richardson. 1983. Structure and mechanism of Cu, Zn, superoxide dismutase, *Nature.* **306**, 274-287.
14. Von, Sonntag. 1987. In "The Chemical Basis of Radiation of biology" Tylor and Francis.(ed.). London. pp. 31.

(Received July 29, 2003; Accepted November 17, 2003)