

순무의 d-galactosamine 유발 간장해 보호효과

최혁재 · 한명주¹ · 백남인² · 김동현³ · 정해곤⁴ · 김남재*

경희대학교 동서의학연구소, ¹식품영양학과, ²생명공학원 및 식물대사센터, ³약학대학, ⁴강화농업기술센터

Hepatoprotective Effects of *Brassica rapa* (Turnip) on d-Galactosamine Induced Liver Injured Rats

Hyuck Jae Choi, Myung Joo Han¹, Nam In Baek², Dong Hyun Kim³, Hae Gon Jung⁴, and Nam Jae Kim*

East-West Medical Research Institute, Kyung Hee University, Seoul 130-702, Korea

¹Department of Food and Nutrition, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

²Graduate School of Biotechnology and Plant Metabolism Research Center, Kyung Hee University, Suwon 449-701, Korea

³College of Pharmacy, Kyung Hee University, Seoul 130-701, Korea

⁴Ganghwa Agricultural R&D Center, Incheon 417-800, Korea

Abstract – *Brassica rapa* L. (Turnip) which is one of the specialized crops in Ganghwa island, has been used for diuretic, digestive, and curative for jaundice, etc. In this study, the antioxidative effects and hepatoprotective effects of turnip *in vitro* and *in vivo* were investigated in order to evaluate the possibility as hepatoprotective agents. Ethanol extract of turnip potently showed the scavenging effect on DPPH and inhibitory effect on lipid peroxidation. Oral administration of turnip extract to d-galactosamine-induced experimental liver injured rats was significantly reduced the serum AST, ALT and LDH enzyme activities. And the decrease of catalase and SOD activities in liver microsomal cytosol was significantly improved by the treatment of turnip. Based on these findings, it is presumed that ethanol extract of turnip may have the hepatoprotective effect on d-galactosamine-induced hepatotoxicity rat.

Key words – *Brassica rapa*, Turnip, antioxidative activity, hepatoprotective effects, transaminase activities, SOD, catalase

순무 (*Brassica rapa* L., Cruciferae)는 원산지가 중앙아시아와 유럽 남부지방으로 두해살이 풀로서 뿌리와 잎을 사용하는 채소로 널리 이용되고 있고,¹⁾ 한방에서는 뿌리를 蔓菁 또는 蕪菁, 종자는 蔓菁子 또는 蕪菁子라 하여 名醫別錄에 처음으로 기록되었고, 본초강목, 동의보감 등 본초서에 수재되어 있다.^{2,3)}

우리나라에서 순무는 고려시대 향약구급방에 종자가 기록되어 있는 것으로 미루어 보아 1000년 전부터 재배된 것으로 알려져 있으며, 강화도 특화작목의 하나이다.⁴⁾ 순무는 비교적 종류가 다양한 편이며, 뿌리 모양과 걸색갈도 다양하나 각 종류마다 공통적으로 팽이 같은 모양에 적자색을 띠고 있다.¹⁾

순무는 동의보감에 ‘蔓菁甘溫利五臟下氣消息治疸恙(오장에 이로우며, 이뇨와 소화를 돕고 종기를 치료)’라 기록되어

있으며, 주로 황달 등 간질환의 치료와 이뇨 등의 목적으로 이용되고 있다.^{3,5)}

순무에 관한 연구로는 유산균 발효액의 제조,⁶⁾ 젖산발효,⁷⁾ 순무의 가용성 및 불용성 식이섬유의 함량,⁸⁾ 순무잎의 플라보노이드 성분의 분석,⁹⁾ 순무씨앗 껍질부위의 탄수화물, 폴리페놀, 리그닌 함량,¹⁰⁾ 순무 알콜불용성 고형물의 가용성 펙틴,¹¹⁾ 순무의 이화학적 및 기능적 특성 등에 관한 연구⁴⁾ 등이 있다. 활성연구로는 순무잎으로부터 휘발성 isothiocyanate의 연구,¹²⁾ 순무씨앗에서 glucosinolate의 분리 및 동정에 관한 연구,¹³⁾ 순무의 myrosinase 활성에 관한 연구,¹⁴⁾ glutathione S-transferase 활성에 관한 연구¹⁵⁾ 및 순무뿌리의 화학적 성분에 관한 연구¹⁶⁾ 등이 있다.

따라서, 강화특화작목인 순무의 기능성 재료로서 유용성을 추구하고자 하는 연구의 일환으로 항산화활성과 d-galactosamine 유발 간장해 현위에서 순무의 간장해 보호효과를 검토한 결과를 보고하고자 한다.

*교신저자(E-mail) : njkim@khmc.or.kr
(FAX) : 02-958-9531

재료 및 방법

실험재료 - 본 실험에 사용한 순무는 강화군으로부터 분양받은 것으로 순무의 80% 에탄올 추출물은 경희대학교 백남인 교수로부터 제공받아 실험에 사용하였다.

실험동물 - 본 실험에서 사용한 실험동물은 (주)오리엔트 바이오에서 구입한 250 g 전후의 SD계 웅성 흰쥐를 사용하였고, 물은 상수를 사용하여 충분히 공급하면서 실험실 환경에서 2주간 순응시킨 후 사용하였다. 특별히 명시하지 않는 한 실험은 $24 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 60%의 항온, 항습장치가 되어 있는 실험실내에서 실시하였다.

시약 및 기구 - Galactosamine, Trizma Base, SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), 1,1,3,3-Tetraethoxypropane은 Sigma Co.(미국), mannitol, sucrose, EDTA-2Na는 Yakuri Pure Chemicals Co.(일본), 단백질 정량 시약은 Bio-Rad Protein Assay reagent(미국), 혈중 AST, ALT, Alkaline phosphatase, LDH 효소활성측정용 kit와 total cholesterol, triglyceride의 함량 측정용 kit는 Asan Pharm. Co.(한국) 제품을 사용하였고, 기타 분석용 시약은 1급 시약을 사용하였다. 기구로는 Prime Automatic Clinical Chemistry Analyzer (BPC Biosed, 이탈리아), 분광광도계(UV-160A, Shimadzu Co. 일본), 원심분리기(VS-6000CFN, Vision Scientific Co., 한국), 초원심분리기(Ultracentrifuge, Beckman Co., 미국) 등을 사용하였다.

항산화 활성 - Free radical scavenging 작용은 비교적 안정한 free radical인 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)를 이용한 Blois의 방법¹⁷⁾을 이용하였고, 지질과산화형성 저해 활성은 흰쥐 간 homogenate를 이용한 Yokozawa의 방법¹⁸⁾에 준하였다.

Galactosamine 유발 간장해에 미치는 영향 - 흰쥐 1군을 6마리로 하여 검액 50 mg/kg 및 100 mg/kg과 양성대조 약물인 silymarin 25 mg/kg을 3일간 경구투여한 후, 24시간 절식시켰다. 4일째 검액을 투여한 뒤, 3시간 후에 생리식염수에 용해시킨 5% galactosamine 1.0 ml/100 g을 경구 투여하였다.^{19,20)} Galactosamine 투여 후 24시간 동안 계속 절식시킨 다음, 심장채혈하여 상온에서 60분간 방치하고 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 혈청 중 transaminase (ALT & AST), alkaline phosphatase (ALP) 및 lactic dehydrogenase (LDH) 효소활성도를 아래의 방법에 따라 측정하였다. 그리고, 채혈 직후 상법에 따라 간을 적출하여 일부는 지질과산화물 측정용으로 하여 아래의 방법에 준하여 측정하며, 또한 ultracentrifuge를 이용하여 간을 mitochondria 분획을 얻고 이를 다시 cytosol로 분획하여 superoxide dismutase (SOD) 및 catalase 효소활성도를 아래의 방법에 따라 측정하여 비교관찰하였다.

간조직내 과산화지질 (MDA)의 정량 - 적출한 간조직 5 g

을 16배 용량의 A 용액(0.21 M Mannitol, 0.1 M EDTA-2Na, 0.07 M Sucrose, 0.01 M Trizma base) 80 ml를 가한 다음 homogenizer로 균질화하였다. 균질액을 다시 3,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 liver homogenate로 하여 실험에 사용하였다. Homogenate 1 ml에 10% SDS 0.4 ml를 가하여 30분간 37°C 에서 incubation한 뒤, 흐르는 물로 식힌 다음 1% phosphate buffer 3 ml와 0.6% TBA 1 ml를 가하였다. 45분간 100°C 수욕상에서 가열하여 발색시킨 다음 흐르는 물로 식히고 n-butanol 4 ml를 가하여 혼합한 뒤, 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 정량용 검액으로 사용하였다. MDA 측정을 위한 검량선은 1,1,3,3-tetraethoxypropane으로 검액을 만들어 535 nm에서 흡광도를 측정하여 작성하였다.²¹⁾

혈청 중 ALT, AST, ALP 및 LDH 활성도 측정 - 실험 종료 15시간 전에 절식시킨 다음 심장채혈하여 혈청을 분리한 뒤, AST와 ALT는 UV-Rate법²²⁾에 따라, ALP는 p-니트로페닐인산 기질법,²³⁾ LDH는 UV-Rate법²⁴⁾을 이용하여 측정용 kit 시약 (Asan Pharm. Co.)를 사용하여 Prime automatic clinical chemistry analyzer로 측정하였다.

혈청 중 total cholesterol 및 triglyceride의 정량 - 실험 종료 15시간 전에 절식시킨 다음 심장채혈하여 혈청을 분리한 뒤, 혈청 중 total cholesterol과 triglyceride 함량 측정은 효소법^{25,26)}에 준하여 측정용 kit 시약 (Asan Pharm. Co.)를 사용하여 Prime automatic clinical chemistry analyzer로 측정하였다.

Catalase 활성 측정 - Hydrogen peroxide의 분해에 따라 감소하는 흡광도를 측정하는 Aebi의 방법²⁷⁾을 이용하였다. 50 mM phosphate buffer(pH 7.0) 100 ml당 30% H_2O_2 를 넣어 10 mM substrate solution ($A_{240}=0.5$)을 만들었다. 이 substrate solution 3 ml에 각 sample 100 μl 를 가한 후, $43.6 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 의 extinction coefficient를 사용하여 분광광도계로 240 nm에서 phosphate buffer를 blank로 하고 2분 동안 absorbance를 측정하고, 분당 흡광도 변화를 평균으로 하여 다음 식에 의해 효소 활성을 계산하였다. 효소활성은 비활성 (Specific activity=Unit/min/mg of protein)으로 나타내었다. Catalase 1 unit는 단백질 1 mg이 1분 동안에 반응하여 분해시킨 H_2O_2 량으로 나타낸 것이다.

$$\text{Specific activity} = \frac{\Delta A / \text{min} \times 100}{43.6}$$

$\Delta A / \text{min}$ = 1분당 흡광도 변화

43.6 = H_2O_2 의 molar extinction coefficient ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

100 = dilution factor

SOD 활성 측정 - Pyrogallol autoxidation의 저해를 관찰하는 Marklund의 방법²⁸⁾을 사용하였다. 50 mM tris-acetate

buffer (pH 8.20) 0.1 ml에 2 mM pyrogallol stock solution 을 0.9 ml를 가하여 standard absorbance로 사용하였다. 이 substrate 용액에 각 sample 0.1 ml를 가하고 분광광도계를 사용해 420 nm에서 tris-acetate buffer를 blank로 하고 3분 동안 absorbance를 측정하고, 분당 흡광도 변화를 평균내어 다음 식에 의해 효소 활성을 계산하였다. 효소활성은 비활성 (Specific activity=Unit/min/mg of protein)으로 나타내었다. SOD 1 Unit는 pyrogallol autoxidation rate를 50%까지 억제하는 SOD의 양으로 하였다.

$$\text{SOD activity} = \frac{(a-b)}{0.5 \times a}$$

a=standard의 분당 평균 흡광도 변화
b=sample의 분당 평균 흡광도 변화

통계처리 - 모든 실험결과는 평균치와 표준편차 또는 표준오차를 사용하여 나타내었고, 각 군 간의 비교는 Student's t-test를 사용하였으며, 대조군과 비교하여 p 값이 5% 미만 일 때를 통계학적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결 과

항산화활성 - *In vitro*에서 순무의 항산화활성을 측정 한 결과, Table I에 나타낸 바와 같이 비교적 안정한 free radical 인 DPPH에 대한 소거활성은 ED₅₀가 0.110 mg/ml, 사업화 탄소로 유발된 흰쥐의 지질과산화물 생성에 대한 저해활성은 IC₅₀ 22.5 mg/ml로 나타나 양성대조약물로 사용된 sodium ascorbate의 각각 활성 0.004 mg/ml와 12.5 mg/ml에 비해 다소 떨어지나 양호한 항산화 활성을 관찰할 수 있었다.

Transaminase (AST & ALT) 활성도에 대한 효과 - d-Galactosamine 투여로 유발된 간장애 흰쥐의 혈청 중 transaminase활성도에 미치는 검역 순무의 효과를 Table II에 제시

Table I. Antioxidative effects of *Brassica rapa* on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) radical scavenging and TBA-Rs formation in rat liver homogenate

Groups	ED ₅₀ (mg/mL)	
	DPPH ^{a)}	TBA-Rs ^{b)}
Turnip	0.110	22.2
Sodium ascorbate	0.004	12.5

Each data represents mean of 3 experiments.
a)Concentration required for a 50% reduction in absorbance of DPPH radical at 520 nm.
b)Concentration required for a 50% reduction in absorbance of TBA-Rs at 535 nm.

하였다. 흰쥐에 d-galactosamine를 처치하면 혈중의 aspartate aminotransferase (AST) 활성은 1,773.3±124.7 IU/L로 d-galactosamine 비처치 정상군의 혈청중 AST활성은 206.7±23.8 IU/L에 비하여 p<0.001의 유의한 AST활성의 증가를 보였다. 순무 100 mg/kg 투여군에서도 980.0±21.9 IU/L로 대조군에 비하여 p<0.001의 유의한 혈청 중 AST 효소활성의 상승억제효과를 보였다. 또한 저농도 처치군에서도 유의한 혈청 중 AST 효소활성의 상승억제효과를 보여 검역의 용량의존적임을 알 수 있었다.

혈청중 alanine tansaminase (ALT)활성은 d-galactosamine 비처치군 정상군의 40.4±5.7 IU/L에 비하여 d-galactosamine 처치 대조군은 840.0±60.1 IU/L로 p<0.001의 유의한 ALT 활성의 상승효과를 보였다. 순무 100 mg/kg 투여군에서도 523.3±27.4 IU/L로 대조군에 비하여 p<0.001의 유의한 혈청 중 ALT 효소활성의 상승억제효과를 보였다. 또한 저농도 처치군에서도 유의한 혈청 중 ALT 효소활성의 상승억제효과를 보였다(Table II). 그리고 양성대조약물 silymarin 25 mg/kg 투여군에서도 혈청 중 AST 및 ALT 효소활성도는 대조군에 비하여 유의하게 상승억제시킴을 관찰할 수 있었다.

Table II. Effects of *Brassica rapa* on serum transaminase activities (AST & ALT) in d-galactosamine-induced experimental liver injured rat

Groups	Dose (mg/kg, p.o.)	No. of animals	Transaminase activities (IU/L)	
			AST	ALT
Normal	-	6	206.7±23.8 ^{a)} (-)	40.0±5.7 ^{a)} (-)
Control	-	6	1,773.3±124.7 ^{###} (758.1)	840.0±60.1 ^{###} (2,000)
Turnip	50	6	1,213.3±89.0 ^{**} (35.7)	560.0±38.0 ^{**} (35.9)
Turnip	100	6	980.0±21.9 ^{***} (50.6)	523.3±27.4 ^{**} (40.8)
Silymarin	25	6	1,423.3±87.0 [*] (22.3)	653.3±23.1 ^{**} (23.3)

^{a)} ; Mean±Standard error.
[#] ; Statistically significant compared with normal data (^{###}:p<0.001)
^{*} ; Statistically significant compared with control data (^{*}:p<0.05, ^{**}:p<0.01 and ^{***}:p<0.001)
Parenthesis values are % of protection that is calculated as 100 (values of d-galactosamine control-values of sample)/(values of d-galactosamine control-values of normal)

Table III. Effects of *Brassica rapa* on serum alkaline phosphatase (ALP) and lactic dehydrogenase (LDH) in d-galactosamine-induced experimental liver injured rat

Groups	Dose (mg/kg, p.o.)	No. of animals	Enzyme activities (IU/L)	
			ALP	LDH
Normal	-	6	576.7±51.8 ^{a)} (-)	746.7±39.1 ^{a)} (-)
Control	-	6	730.0±47.9 [#] (26.6)	2,036.7±185.2 ^{###} (172.8)
Turnip	50	6	710.0±57.6 (13.0)	1,376.7±108.3* (51.2)
Turnip	100	6	663.3±19.1 (43.5)	936.7±116.4*** (85.3)
Silymarin	25	6	700.0±49.6 (19.6)	843.3±53.8*** (92.5)

^{a)} ; Mean±Standard error.

[#] ; Statistically significant compared with normal data ([#]:*p*<0.05 and ^{###}:*p*<0.001)

* ; Statistically significant compared with control data (*:*p*<0.05 and ***:*p*<0.001)

Parenthesis values are % of protection that is calculated as 100(values of d-galactosamine control-values of sample)/(values of d-galactosamine control-values of normal)

혈청 중 ALP 및 LDH 활성도에 미치는 효과 - d-Galactosamine 투여로 유발된 간장해 흰쥐의 혈청중 alkaline phosphatase (ALP) 및 latic dehydrogenase (LDH) 효소활성에 미치는 검액의 효과를 Table III에 제시하였다. d-Galactosamine로 처치한 대조군의 혈청중 ALP 효소활성도는 730.0±47.9 IU/L로 비처리 정상군 576.7±51.8 IU/L에 비하여 *p*<0.05의 유의한 ALP 효소활성도의 증가를 관찰할 수 있었다. 순무 100 mg/kg 투여군에서도 663.3±19.1 IU/L로 대조군에 비하여 다소 억제시키는 경향을 보이거나 유의차는 없었다.

혈청중 LDH 활성은 d-galactosamine 비처리군 정상군의 746.7±39.1 IU/L에 비하여 대조군은 2,036.7±185.2 IU/L로 *p*<0.001의 유의한 LDH 효소활성의 상승효과를 보였다. 순무 100 mg/kg 투여군에서도 936.7±116.4 IU/L로 대조군에 비하여 *p*<0.001의 유의한 혈청 중 LDH 효소활성의 상승 억제효과를 보였고, 저농도 투여군에서도 유의한 상승억제 효과를 관찰할 수 있었다. 그리고 양성대조약물 silymarin 25 mg/kg 투여군에서도 혈청 중 LDH 효소활성도는 대조군에 비하여 유의한 상승억제효과가 인정되었다.

혈청 중 Total cholesterol 및 Triglyceride 함량에 대한 효과 - d-Galactosamine 투여로 유발된 간장해 흰쥐의 혈청 중 total cholesterol (TC) 및 triglyceride (TG) 함량에 미치는 검액의 효과를 Table IV에 제시하였다. 흰쥐에 d-galactosamine 만을 처치하면 혈중 TC 함량은 55.7±4.58 mg/dL로 d-galactosamine 비처리 정상군의 TC 함량 73.0±8.89 mg/dL에 비하여 낮아지는 경향을 보이고, 순무 100 mg/kg 처치군에서도 다소 억제시키는 경향을 보이거나 유의차는 없었다.

혈청 중 TG 함량은 d-galactosamine 처치 대조군에서는 75.3±3.48 mg/dL로 정상군 53.3±2.87 mg/dL에 비하여 *p*<0.001의 유의한 상승을 나타내었다. 순무 100 mg/kg 투여군에서는 54.8±3.28로 대조군에 비하여 *p*<0.001의 유의한 혈청 중 TG 함량의 상승억제효과를 보였고, 저농도 처치군에서도 유의한 혈청 중 TG 함량의 상승억제효과를 관찰할 수 있었다(Table IV). 그리고 양성대조약물 silymarin 25 mg/kg 투여군에서도 혈청 중 TG 함량은 대조군에 비하여 유의하게 상승억제시킴을 관찰할 수 있었다.

간조직의 과산화지질 (MDA) 함량에 대한 효과 - d-

Table IV. Effects of *Brassica rapa* on serum total cholesterol (TC) and triglyceride (TG) in d-galactosamine-induced experimental liver injured rat

Groups	Dose (mg/kg, p.o.)	No. of animals	Serum levels (mg/dL)	
			Total cholesterol	Triglyceride
Normal	-	6	73.0±8.89 ^{a)} (-)	53.3±2.87 ^{a)} (-)
Control	-	6	55.7±4.58 (23.7)	75.3±3.48 ^{###} (41.3)
Turnip	50	6	62.8±3.54 (41.3)	57.8±3.08** (79.5)
Turnip	100	6	67.2±3.72 (66.3)	54.8±3.28*** (93.2)
Silymarin	25	6	65.7±4.58 (57.7)	54.7±7.87** (93.9)

^{a)} ; Mean±Standard error.

[#] ; Statistically significant compared with normal data ([#]:*p*<0.05 and ^{###}:*p*<0.001)

* ; Statistically significant compared with control data (*:*p*<0.05 and ***:*p*<0.001)

Parenthesis values are % of protection that is calculated as 100(values of d-galactosamine control-values of sample)/(values of d-galactosamine control-values of normal)

Table V. Effects of *Brassica rapa* on liver cytosol lipid peroxidation contents in d-galactosamine-induced experimental liver injured rat

Groups	Dose (mg/kg, p.o.)	No. of animals	Malonyldialdehyde contents	
			µg/mg	Therapeutic ratio (%)
Normal	-	6	1.24±0.13 ^{a)}	-
Control	-	6	1.78±0.09 ^{##}	43.6
Turnip	50	6	1.61±0.05	31.2
Turnip	100	6	1.43±0.12 ^{**}	64.7
Silymarin	25	6	1.31±0.12 ^{**}	87.8

^{a)} ; Mean±Standard error.

[#] ; Statistically significant compared with normal data (^{##}: $p<0.01$)

^{*} ; Statistically significant compared with control data (^{*}: $p<0.05$, ^{**}: $p<0.01$ and ^{***}: $p<0.001$)

Therapeutic ratio are % of protection that is calculated as $100(\text{values of d-galactosamine control-values of sample})/(\text{values of d-galactosamine control-values of normal})$

Galactosamine 투여로 유발된 간장해 흰쥐의 간 중 과산화지질량을 malondialdehyde (MDA)량으로 정량한 결과를 Table V에 제시하였다. 그 결과 d-galactosamine 처치 대조군의 MDA량은 $1.78\pm 0.09 \mu\text{g/mg protein}$ 으로 d-galactosamine 비처치 정상군 $1.24\pm 0.13 \mu\text{g/mg protein}$ 에 비하여 $p<0.01$ 의 유의한 증가가 관찰되었다. 순무 100 mg/kg 투여군에서는 $1.43\pm 0.12 \mu\text{g/mg protein}$ 으로 대조군에 비하여 $p<0.01$ 의 유의한 지질과산화물질 형성저해효과를 보였고, 저농도 투여군에서는 다소 억제시키는 경향을 보였다. 양성비교약물 silymarin 25 mg/kg투여군에서는 $1.31\pm 0.12 \mu\text{g/mg protein}$ 으로 $p<0.01$ 의 유의한 지질과산화형성 저해효과가 인정되었다.

간조직의 Catalase 및 Superoxide dismutase(SOD) 효소활성에 대한 효과 - d-Galactosamine 투여로 유발된 간장해 흰쥐의 간 cytosol 분획 중 catalase 및 SOD 효소활성도에 미치는 검액의 효과를 Table VI에 나타내었다. 우선 d-galactosamine 처치 대조군의 catalase 효소활성도는 $147.5\pm 5.77 \text{ U/mg protein}$ 으로 d-dalactosamine 비처치 정상군

$212.6\pm 14.2 \text{ U/mg protein}$ 에 비하여 $p<0.001$ 의 유의한 감소를 관찰할 수 있었다. 순무 100 mg/kg 처치군은 $192.9\pm 8.25 \text{ U/mg protein}$ 으로 대조군에 비하여 $p<0.05$ 의 유의한 catalase 효소활성도의 감소억제를 보였다. 또한 저농도 50 mg/kg 처치군에서도 유의한 catalase 효소활성도의 감소억제효과를 나타내었고, 검액의 용량 의존적임을 알 수 있었다. 양성비교약물 silymarin 25 mg/kg투여군에서는 $211.8\pm 19.1 \text{ U/mg protein}$ 으로 $p<0.01$ 의 유의한 간 cytosol 분획 중 catalase 효소활성 저해억제효과가 인정되었다.

그리고, d-galactosamine 처치 대조군의 SOD 효소활성도는 $1,691.6\pm 95.3 \text{ U/mg protein}$ 으로 d-dalactosamine 비처치 정상군 $2,259.2\pm 111.6 \text{ U/mg protein}$ 에 비하여 $p<0.001$ 의 유의한 감소를 관찰할 수 있었다. 순무 100 mg/kg 처치군은 $2,032.3\pm 134.3 \text{ U/mg protein}$ 으로 대조군에 비하여 $p<0.05$ 의 유의한 SOD 효소활성도의 감소억제를 보였다. 또한 저농도 50 mg/kg 처치군에서는 다소 억제시키는 경향을 보이거나 통계적으로 유의차는 인정되지 않았다. 양성비교약물 silymarin

Table VI. Effects of *Brassica rapa* on liver cytosol catalase and superoxide dismutase (SOD) activities in d-galactosamine-induced experimental liver injured rat

Groups	Dose (mg/kg, p.o.)	No. of animals	Liver cytosol enzyme activities (U/mg protein)	
			Catalase	SOD
Normal	-	6	212.6±14.2 ^{a)} (-)	2,259.2±111.6 ^{a)} (-)
Control	-	6	147.5±5.77 ^{###} (30.6)	1,691.6±95.3 ^{###} (25.1)
Turnip	50	6	188.8±20.5 [*] (63.5)	1,948.8±115.7 (45.3)
Turnip	100	6	192.9±8.25 [*] (69.8)	2,032.3±134.3 [*] (60.0)
Silymarin	25	6	211.8±19.1 ^{**} (98.9)	2,131.2±160.0 ^{**} (77.4)

^{a)} ; Mean±Standard error.

Catalase unit : $\text{H}_2\text{O}_2 \mu\text{mol/min/mg protein}$, SOD unit : Pyrogallol $\mu\text{mol/min/mg protein}$.

[#] ; Statistically significant compared with normal data (^{###}: $p<0.001$)

^{*} ; Statistically significant compared with control data (^{*}: $p<0.05$ and ^{**}: $p<0.01$)

Parenthesis values are % of protection that is calculated as $100(\text{values of d-galactosamine control-values of sample})/(\text{values of d-galactosamine control-values of normal})$

25 mg/kg 투여군에서는 $2,131.2 \pm 190.0$ U/mg protein으로 $p < 0.01$ 의 유의한 간 중 SOD 효소활성 저해억제화성이 인정되었다.

고 찰

삶의 질에 대한 관심이 높아가고 있음에 따라 자연친화적인 천연소재 중에서 식용 식물성 소재에 대한 관심이 높아지고 있다. 특히 천연물은 기후, 토양 등 지형적 특성에 의하여 지역의 특산식물이 있으며, 순무는 우리나라의 순화작물로서 강화도에서만 재배되고 있는 강화특화작물 중의 하나이다. 따라서, 강화 특용작물인 순무의 효능을 추구하고자 하는 연구의 일환으로 *in vitro*에서 DPPH 소거활성, 지질과산화형성 저해효과 및 *in vivo*에서 d-galactosamine 유발 간장해 보호효과를 검토하였다.

항산화활성을 검토하기 위해서 비교적 안정한 free radical인 DPPH에 의하여 발색되는 자색을 퇴색되는 정도를 지표로 하여 측정된 결과 순무 에탄올 추출물의 ED₅₀이 0.110 mg/mL이고, 간 homogenate 중 지질과산화물 형성 저해활성 ED₅₀ 22.2 mg/dL로 양성대조약물 ascorbate에 비하여 다소 약하나 양호한 항산화활성이 인정되었다.

*In vivo*에서 순무의 간장해보호효과를 검토하기 위해서 간장해 유발물질로 d-galactosamine를 이용하여 평가하였다. d-Galactosamine은 기능과 형태에서 있어서 바이러스성 간염과 유사한 간독성을 일으키는 것으로 알려져 있다.^{29,30)} 특히, d-galactosamine은 간세포괴사 및 실질세포와 문맥 등의 염증을 유발하고 급성 중독시 glucose 항상성을 유지시키기 위하여 대사장애가 일어나 간 괴사가 일어나게 되며 만성 중독시 간경변과 세포성 종양이 일어나는 것으로 보고되어 있다.³¹⁾

따라서, 흰쥐에 d-galactosamine를 복강내에 주사하여 유발된 간장해 병태모델을 이용하여 순무 에탄올 추출물을 4일간 전 처치한 후 간장해의 지표로 혈청 중 transaminase (AST & ALT), alkaline phosphatase (ALP), lactic dehydrogenase (LDH)의 효소활성도와 total cholesterol 및 triglyceride 함량에 미치는 영향을 평가하였다.

손상된 간으로부터 혈액에 방출된 간의 효소활성도 측정은 간기능 측정의 유용한 방법 중의 하나로 d-galactosamine 등 유독물질에 의한 간세포의 괴사와 간조직의 파괴가 진행됨에 따라 transaminase가 혈중으로 유리되어 AST, ALT의 효소활성도가 현저하게 증가된다.³²⁾ 본 연구에서도 d-galactosamine 처리한 대조군에서의 transaminase 효소활성도는 비처치 정상군에 비하여 유의한 상승을 보여 간독성이 유발됨을 알 수 있었다. 따라서, d-galactosamine 처리 전에 검액 순무 에탄올 추출물을 경구투여하여 d-galactosamine 간독성 예방효과를 검토한 바 검액 100 mg/kg 투여군에서

는 대조군에 비하여 AST 및 ALT 효소활성도는 각각 50.6%와 40.8%의 유의한 치료효과가 인정되었고, 저농도 처치군에서도 유의한 개선효과가 인정되었다.

ALP는 담즙 울체시 간 유래 ALP의 담즙 증으로 배설장애와 담관 내압 항진에 의한 간에서의 생성증가로 혈중 ALP 활성도가 현저히 증가하는 것으로 알려져 있으며,³³⁾ 본 연구에서도 d-galactosamine 처리로 유발된 간장해 흰쥐의 혈청 중 ALP 효소활성도는 비처치 정상군에 비하여 약 1.3배의 유의한 증가가 인정되었다. 한편 검액 100 mg/kg 처치군에서는 다소 ALP 효소활성도의 상승을 억제하는 경향을 나타내나 통계적으로 유의차는 인정되지 않았다. 그리고, LDH는 간, 심장, 신장, 근육 등 생체내에 널리 분포하며 transaminase와 함께 간세포 장애시에 혈중에 증가하는 이탈효소이나 체내 분포가 광범위하기 때문에 장기특이성이 낮지만,³³⁾ d-galactosamine로 유발된 간장해 흰쥐의 혈청 증으로 이탈한 LDH 효소활성도는 비처치 정상군에 비하여 약 2.7배 정도 증가하였다. 한편, 검액 100 mg/kg 투여군은 대조군에 비하여 85.3%의 유의한 치료효과가 인정되었다.

그리고, d-galactosamine 처리로 유발된 간장해 흰쥐의 혈청 중 triglyceride 함량은 정상군에 비하여 약 41%의 상승이 인정되었고, 검액 100 mg/kg 투여군은 대조군에 비하여 93.2%의 유의한 개선효과를 보였다. 반면에 혈청 중 total cholesterol 함량에 대해서는 별다른 변화를 관찰할 수 없었다. 양성비교약물로 사용한 silymarin 200 mg/kg 투여군에서는 각종 간세포의 변성, 괴사를 반영하는 이탈효소에서 d-galactosamine 처치 대조군에 비하여 유의한 간보호효과가 인정되었다.

d-Galactosamine 등 독성물질을 생체내 투여하여 생성되는 oxygen radical은 세포막 구성성분의 하나인 불포화지방산을 산화적 반응에 의하여 불포화지방산의 radical이 되고 산소와 결합하여 hydroxyperoxide를 생성하며 triene 이상의 불포화지방산은 hydroxyperoxide, endoperoxide, polyperoxide 등 지질과산화물이 생성되어 malondialdehyde (MDA)로 분해된다.^{34,35)} 따라서, 간 중에 생성된 지질과산화물을 TBA법을 이용하여 측정된 결과 d-galactosamine 처치 대조군은 비처치 정상군에 비하여 약 44%의 유의한 지질과산화물 형성 촉진효과가 관찰되었다. 이어서 검액 100 mg/kg 투여군에서는 대조군에 비하여 64.7%의 유의한 지질과산화물 형성촉진 억제효과가 인정되었다.

산소를 이용하는 생물체는 정상적인 대사과정에서도 superoxide radical anion, hydrogen peroxide, hydroxyl radical 등과 같은 반응성이 큰 reactive oxygen species (ROS)를 지속적으로 생성하고 이들은 UV, ozone, 공기오염, 사염화탄소 등과 같은 외부의 자극에 의해서도 생성된다.³⁶⁻³⁸⁾ 따라서, oxygen species를 제거하거나 발생을 억제시키는 생체내 mechanism으로서 작동하는 효소로서 superoxide dismutase

(SOD), catalase, glutathione peroxidase (GPX), glutathione S-transferase (GST) 등이 알려져 있다.³⁹⁾ 이들 효소는 oxygen species를 불활성화시키거나 제거함으로써 항산화작용을 하게 된다.

본 연구에서는 간 cytosol에서의 SOD 효소활성도를 pyro-mgallol autoxidation의 저해를 지표로 측정하였다.²⁸⁾ SOD는 O_2^- 을 H_2O_2 로 전환시키는 효소로서 d-galactosamine 처치 대조군에서의 SOD 효소활성도는 비처리 정상군에 비하여 25.1%의 유의한 감소를 보였다. 검액 순무 에탄올 추출물 100 mg/kg 처치군에서는 대조군에 비하여 60.0%의 유의한 SOD 효소활성도 저하억제효과가 인정되었다.

한편, superoxide (O_2^-) radical은 hydroxyl radical에 비하여 반응성이 적으며 superoxide dismutase에 의하여 과산화수소로 전환되며, 생성된 과산화수소는 catalase에 의하여 물과 산소로 분해된다.⁴⁰⁾ 따라서, 이들 효소들은 superoxide radical과 과산화수소 증가에 따른 조직손상을 방어하는 효능이 있는 것으로 알려져 있다.^{41,42)} 그러므로 간 cytosol 중의 catalase 효소활성을 측정하여 검액의 영향을 검토하였다. 그 결과 d-galactosamine 처치 대조군은 비처리 정상군에 비하여 30.6%의 유의한 catalase 효소활성의 감소가 인정되었으며, 검액 100 mg/kg 투여군에서는 대조군에 비하여 69.8%의 유의한 catalase 효소활성 저하를 억제시키는 것으로 인정되었다.

이상의 결과로 미루어 보아 d-galactosamine 처치로 유발된 간장해에 대한 순무의 간보호효과의 일부는 산화적 stress에 대한 방어적 작용에 기인하는 것으로 사료된다.

결 론

강화특화작목으로부터 식의약품 신소재를 탐색 및 개발 연구의 일환으로 *in vitro*에서 항산화활성과 *in vivo*에서 d-galactosamine 유발 간장해 병태모델 흰쥐를 사용하여 순무 지하부의 간장해보호효과를 평가하였다. 그 결과 d-galactosamine 처치로 유발된 간장해 흰쥐에서 혈청 중 transaminase (AST & ALT) 및 lactic dehydrogenase 효소활성도에 대하여 유의한 상승억제효과가 인정되었다. 또한 간 cytosol 중 항산화효소인 superoxide dismutase 및 catalase 효소활성도를 유의하게 개선시키는 효과가 인정되었다. 그리고, *in vitro*에서 DPPH 라디칼 소거활성과 지질과산화물질 형성저해활성이 인정되었다. 따라서 순무 지하부의 에탄올 추출물은 간장해 보호효과가 있는 것으로 사료되며, 간장해 보호 기능성 물질로 기대된다.

사 사

본 연구는 강화농업기술센터의 강화특화작목의 식 의약

품 소재개발 연구 지원비 (2005)에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. 강인희 (1991) 한국식생활사(제2판). 197, 삼영사, 서울.
2. 上海科學技術出版社 小學館 編 (1985) 中藥大辭典. 2319-2320, 凸板印刷株式會社, 東京.
3. 東醫學研究所 編(허준 저) (1994) 東醫寶鑑. 2697-2698, 驪江出版社, 서울.
4. Park, Y. K., Kim, H. M., Park, M. W., Kim, S. R. and Choi, I. W. (1999) Physicochemical and Functional Properties of Turnip. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **28**: 333-341.
5. 육창수 (1981) 한국약품식물자원도감. 120, 진명출판사, 서울.
6. Yamani, M. (1993) Fermentation of brined turnip roots using *Lactobacillus plantarum* and *Leuconostoc mesenteroides* starter cultures. *World J. Micro. and Biotech.*, **9**: 176-179.
7. Miyao, S. and Aoki, M. (1979) Quality and behaviour of microorganisms in pickles. II. Lactic acid fermentation of turnips. *J. Japan Food Sci. Tech.*, **26**: 444-446.
8. Mongeau, R. and Brassard, R. (1993) Enzymatic-gravimetric determination in foods of dietary fiber as sum of insoluble and soluble fiber fractions: summary of collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **76**: 923-925.
9. Hertog, M. G. L., Hollman, P. C. H. and Katan, M. B. (1992) Content of potentially anticarcinogenic flavonoids of 28 vegetables and 9 fruits commonly consumed in the Netherlands. *J. Agric. Food Chem.*, **40**: 2379-2383.
10. Theander, O., Aman, P., Miksche, G. and Yasuda, S. (1977) Carbohydrates, polyphenols, and lignin in seed hulls of different colors from turnip rape seed. *J. Agric. Food Chem.*, **25**: 270-273.
11. Kawabata, A. and Sawayama, S. (1973) A study on the content of pectic substance in vegetables. *J. Japan Nutr.*, **31**: 32-36.
12. Itoh, H., Yoshida, R., Mizuno, T., Kudo, M., Nikuni, S. and Karki, T. (1984) Study on the contents of volatile isothiocyanate of cultivars of Brassica vegetables. *Report of the National Food Research Institute*, **45**: 33-41.
13. Ju, H., Chong, C., Mullin, W. and Bible, B. (1982) Volatile isothiocyanates and nitriles from glucosinolates in rutabaga and turnip. *J. Am. Soc. Horticultural Sci.*, **107**: 1050-1054.
14. Wilkinson, A., Rhodes, M. and Fenwick, R. (1984) Myrosinase activity of cruciferous vegetables. *J. Sci. Food Agric.*, **35**: 543-552.
15. Kim, M. R., Lee, K. J., Kim, H. Y., Kim, J. H., Kim, Y. B. and Sok, D. E. (1999) Effect of various kimchi extracts on the hepatic glutathione S-transferase activity of mice. *Food Research International*, **31**: 389-394.
16. Kim, J. S., Choi, Y. H., Seo, J. H., Lee, J. W., Kim, Y. S., Ryu, S. Y., Kang, J. S., Kim, Y. K. and Kim, S. H. (2004)

- Chemical constituents from the root of *Brassica campestris* ssp. *rapa*. *Kor. J. Pharmacogn.*, **35**: 259-263.
17. Blois, M.S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, *Nature*, **181**: 1199-1200.
 18. Yokozawa, T., Dong E., Wu L.Z., Oura, H. and Nishioka I. (1996) Antioxidant activity of Wen-Pi-Tang *in vitro*. *Natural Medicines*, **50**: 243-246.
 19. Vimal, V. and Devaki, T. (2004) Hepatoprotective effect of allicin on tissue defense system in galactosamine/endotoxin challenged rats, *J. of Ethnopharm.*, **90**: 151-154
 20. Lin, C. C., Shieh, D. E. and Yen, M. H. (1997) Hepatoprotective effect of the fractions of Ban-zhi-lian on experimental liver injuries in rats. *J. of Ethnopharm.*, **56**: 193-200.
 21. Mertens, K., Rogiers, V. and Vercruyssen, A. (1993) Measurement of malondialdehyde in cultures of adult rat hepatocytes. *Toxic. in Vitro*, **7**(4): 439-441.
 22. Reitman, S. and Frankel, S. (1957) A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic acid and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin. Pathol.*, **28**: 56-63.
 23. Anh, D. J., Eden, A. and Farley, J. R. (2001) Quantitation of soluble and skeletal alkaline phosphatase, and insoluble alkaline phosphatase anchor-hydrolase activities in human serum. *Clinica. Chimica. Acta*, **311**: 137-148.
 24. Wroblewski, F. and J. S. LaDue (1955) Lactic dehydrogenase activity in blood. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **90**: 210-213.
 25. Haglund, O., Luostarinen, R., Wallin, R., Wibell, L. and Saldeen, T. (1991) The effects of fish oil on triglycerides, cholesterol, fibrinogen and malondialdehyde in humans supplemented with Vitamin E. *J. Nutr.*, **121**: 165-169.
 26. Vishwanath, M. S. and Joan, A. M. (1968) The determination of triglycerides in plasma and tissues. *Clin. Chem.*, **14**: 156-161.
 27. Abei, H. (1984) Catalase *in vitro*. *Methods in Enzymology*, **105**: 93-127.
 28. Stefan, M. and Gudrun, M. (1974) Involvement of the superoxide anion radical in the autooxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.*, **47**: 469-474.
 29. Keppler, D. and Decker, K. (1969) Studies on the mechanism of galactosamine hepatitis; Accumulation of galactosamine-1-phosphate and its inhibition of UDP-glucose pyrophosphorylase. *Eur. J. Biochem.*, **10**: 219-225.
 30. Decker, K., Keppler, D. and Pausch, J. (1973) The regulation of pyridine nucleotide level and its role in experimental hepatitis. *Adv. Enzyme Regul.*, **11**: 205-230.
 31. Farber, J. L., Gill, G. and Konishi, Y. (1973) Prevention of galactosamine-induced liver cell necrosis by uridine. *Am. J. Pathol.*, **72**: 53-62.
 32. Hayes (1982) Principles and Method of Toxicology., 407-445, Gabriel L. Plaa and William R. Hewitt., Raben Press. New York.
 33. 金井 泉, 金井正光 編著(高文社 편집부 역) (1983) 臨床検査法提要. 760-765, 고문사, 서울.
 34. Johansson, I. and Ingelman-Sundberg, M. (1985) Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation dependent on an ethanol-inducible form of rabbit liver microsomal cytochrome P-450. *FEBS Letters*, **183**: 265-269.
 35. 임화경, 김학성, 최종원 (2000) Bergenin 및 acetylbergenin의 사염화탄소 유발 간독성에 대한 치료효과 I. 응용약물학회지, **8**: 293-298.
 36. Terry, D. Oberley, Janice L. Schultz, Ning Li and Larry W. Oberley (1995) Antioxidant enzyme levels as a function of growth state in cell culture. *Free Radical Biol Med.*, **19**: 53-65.
 37. Shindo, Y. and Hashimoto, T. (1997) Time course of changes in antioxidant enzymes in human skin fibroblasts after UV irradiation. *J. Dermatol Sci.*, **14**: 225-232.
 38. 김안근, 김지현 (2001) 산화적 스트레스 및 항산화체가 항산화효소 활성화에 미치는 영향. 응용약물학회지. **9**: 249-257.
 39. Zoltn Gregus and Curtis D. Klaassen (1996) Mechanisms of toxicity. In Casarett and Doull's Toxicology. 39-43. McGraw-Hill Com. New York.
 40. Gutteridge, J. M. C. (1986) Antioxidant properties of the proteins ceruloplasmin, albumin and transferrin. A study of their activity in serum and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis. *Biochem. Biophys. Acta*, **869**: 119-127.
 41. Braugher, J. M., Chase, R. L. and Pregonzer, J. F. (1987) Oxidation of ferrous iron during peroxidation of various lipid substance. *Biochem. Biophys. Acta*, **921**: 457-467.
 42. Yosjikawa, T., Murakami, M., Yoshida, N., Seto, O. and Kondo, M. (1983) Effects of superoxide dismutase and catalase on disseminated intravascular coagulation in rats. *Thromb. Haemostas.* **50**: 869-872.

(2006년 9월 1일 접수)