

Hesperidin과 Hesperetin의 간 손상 동물모델에서 산화적 스트레스에 대한 간 보호 효과

김지현 · 이어¹ · 김미숙² · 조은주¹ · 김현영 · 최진상³

경상국립대학교 식품영양학과, ¹부산대학교 식품영양학과, ²경상국립대학교 식품과학과, ³경상국립대학교 식품공학과

Hesperidin and Hesperetin Protect against Oxidative Stress on Hepatic Toxicity in Rats

Ji Hyun Kim, Li Li¹, Mi Suk Kim², Eun Ju Cho¹, Hyun Young Kim, Jine Shang Choi³

Department of Food Science and Nutrition, Gyeongsang National University, ¹Department of Food Science and Nutrition, Pusan National University, ²Department of Food Science, Gyeongsang National University, ³Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University

Received: April 26, 2022

Revised: June 1, 2022

Accepted: June 8, 2022

Correspondence to: Hyun Young Kim
Department of Food Science and Nutrition, Gyeongsang National University, 33 Dongjin-ro, Jinju 52725, Korea
Tel: +82-55-772-3277
Fax: +82-55-772-3279
E-mail: hyunyoung.kim@gnu.ac.kr

Correspondence to: Jine Shang Choi
Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, 33 Dongjin-ro, Jinju 52725, Korea
Tel: +82-55-772-3275
Fax: +82-55-772-3279
E-mail: choijs@gnu.ac.kr

Copyright © 2022 by The Society of Korean Medicine for Obesity Research

Objectives: To investigate the protective effect of hesperidin and hesperetin against oxidative stress in 2,2'-azobis (2-aminopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced liver toxicity in rats.

Methods: Hesperidin or hesperetin (200 mg/kg/day, respectively) was orally administered for 7 days once daily in rats. Subsequently, AAPH (50 mg/kg/day) was administered intraperitoneally. Lipid peroxidation, nitric oxide production, catalase activity, and protein expressions of nuclear factor- κ B (NF- κ B) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in the liver tissues were measured.

Results: Administration of hesperidin and hesperetin significantly decreased serum aspartate transaminase and alanine transaminase levels in AAPH-induced oxidative stress liver tissues compared with control group. Lipid peroxidation and nitric oxide (NO) production were also significantly reduced by hesperidin and hesperetin in AAPH-induced oxidative stress liver tissues. In particular, lipid peroxidation levels of hesperetin-administered group significantly decreased to 5.02 nmole/mg protein in oxidative stress rats. Hesperidin and hesperetin significantly increased antioxidant activity, such as that of catalase. Furthermore, administration of hesperidin and hesperetin substantially down-regulated the expression of NF- κ B and iNOS in liver tissues. Administration of hesperidin reduced NO levels and iNOS expression more than in the hesperetin-administered group.

Conclusions: Administration of hesperidin and hesperetin led to a reduction in AAPH-induced liver toxicity by regulating oxidative stress.

Key Words: Oxidative stress, Hesperidin, Hesperetin, Catalase, Nitric oxide

서론

산화적 스트레스는 reactive oxygen species (ROS) 및 reactive nitrogen species (RNS) 등의 radical이 과다하게 생성되면서 체내 산화/항산화 체계가 파괴되어 발생한다¹⁾. Superoxide, hydroxyl radicals, hydrogen peroxide 등과 같이

산소 분자를 매개로 하는 ROS와 nitric oxide (NO), peroxynitrite 등과 같이 질소 분자를 매개로 하는 RNS는 인체의 정상적인 신호 전달 경로에 의해 생성되는 물질이다^{1,2)}. 그러나 이들이 과량으로 생성될 경우 체내 지질과산화 반응을 유도하여 DNA, RNA, 세포막 등 다양한 생체 분자를 손상시키는 것으로 보고되었다²⁾. 반면 체내에 존재하는

superoxide dismutase (SOD), catalase와 같은 항산화 효소는 정상적인 대사과정에서 생성된 ROS 및 RNS를 제거하여 체 내 산화/항산화 체계를 유지하고 있다³⁾. 그러나 항산화 효소 작용이 억제되어 ROS 및 RNS가 적절히 제거되지 못할 경우에 산화/항산화 체계가 파괴되어 산화적 스트레스가 유도된다^{1,3)}.

산화적 스트레스는 알코올성 간질환, 비알코올성 지방간염, 만성 바이러스성 간염 등의 주요 간 질환 발병에 중요한 병리학적 기전으로 알려져 있으며 알코올, 바이러스, 약물, 비만, 당뇨 등과 같은 위험 요소들은 간에서 산화적 스트레스를 유도하는 것으로 보고되었다⁴⁾. 특히 간 조직 내 주요 소기관인 간질세포, 쿠퍼세포, 간성상세포 등은 산화적 스트레스와 관련된 분자들에 많이 노출되기 때문에 간 조직은 산화적 스트레스에 취약한 주요 기관으로 알려져 있다⁵⁾. 간 조직이 산화적 스트레스를 받게 되면 염증반응, 미토콘드리아 기능 손실, 지질과산화 반응, DNA 손상 등을 유도하고, 간 조직의 정상적인 기능을 잃게 된다⁴⁾. 따라서 산화적 스트레스가 간 손상에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었기 때문에 국내외에서 항산화 활성을 나타내는 천연물 소재를 통한 간 보호 효능에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다^{7,8)}.

Hesperidin ($C_{18}H_{34}O_{15}$, Molecular weight: 610.57)은 플라보노이드 계열에 속하는 flavanone 배당체로 감귤류, 유자, 레몬 등 citrus계 식품에 풍부하게 들어있으며 특히 진피류 한약재의 주요 지표물질로 알려져 있다^{9,10)}. Hesperidin의 아글리콘 형태인 hesperetin ($C_{16}H_{14}O_6$, Molecular weight: 302.27)은 감귤류 껍질에서 처음 분리된 물질로 항암, 항염증, 심혈관질환 개선 효능 등 다양한 체 내 생리활성을 나타내어 bioflavonoid 소재로 알려져 있다¹¹⁻¹⁴⁾. 최근 이들을 건강기능성 소재로 활용하기 위해 국외에서 hesperidin과 hesperetin의 항산화, 항염증, 항암, 항당뇨 효능 비교에 관한 연구가 활발히 이루어지고 있다¹³⁻¹⁶⁾. 사전 연구를 통해 hesperidin과 hesperetin은 in vitro에서 radical 소거능을 통한 항산화 효능이 있음을 확인하였으며, 산화적 스트레스를 유도한 LLC-PK₁ 세포에서 세포 생존율 개선 효능을 통해 산화적 손상에 대한 보호 효과를 확인하였다^{17,18)}. 이외에도 간 손상을 유도한 모델에서 hesperidin 또는 hesperetin 각각의 간 보호 효과가 보고된 바 있으나^{19,20)}, hesperidin과 hesperetin의 in vivo에서 항산화 활성 조절을 통한 간 보호 효능 비교에 관한 연구는 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 2,2'-azobis (2-aminopropane) dihydrochloride (AAPH)로 간 조직의 산화적 스트레스를 유도한 동물 모델에서 hesperidin과 hesperetin을 투여한 뒤 간 조직에서 산화적 스트레스 관련 지표를 측정하여 hesperidin과 hesperetin의 산화적 스트레스에 대한 간 보호 효능을 비교하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

본 실험에 사용한 AAPH, hesperetin, hesperidin, malondialdehyde (MDA), bicinchoninic acid (BCA) assay kit 및 skim milk는 Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. Griess reagent는 Invitrogen Co. (Carlsbad, CA, USA)에서 구입하였고, aspartate aminotransferase (AST) 및 alanine aminotransferase (ALT) 분석에 사용된 정량용 kit는 아산제약(Seoul, Korea)에서 구입하였으며, *n*-butanol, NaNO₂ 및 H₂O₂는 Wako Pure Chemical Industries Ltd. (Osaka, Japan)에서 구입하여 실험에 사용하였다. 단백질 발현 분석 시 1차 항체로 사용한 nuclear factor-kappa B (NF- κ B; Cat. No. sc-8008), inducible nitric oxide synthase (iNOS; Cat. No. sc-7271), β -actin (Cat. No. sc-47778)은 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)사에서 구입하였다.

2. 실험동물 및 실험군 설정

Sprague-Dawley (SD)계 rat (5주령, 수컷, 150 g 전후)은 중앙실험동물(Seoul, Korea)에서 구입하였다. 사육 기간 온도는 23±2°C로, 상대습도 60±5%로, 12시간 간격으로 light-dark cycle을 일정하게 유지하였다. 식이와 물을 자유롭게 섭취하도록 하였고, 체중은 이틀에 한번씩 측정하였다. 일주일간 사육 환경에 적응시킨 뒤 rat의 체중에 따라 난피법에 의해 각 군당 6마리씩 총 4개의 군으로 나누었다. Normal군과 control군은 0.5% carboxyl methyl cellulose (CMC)를, hesperidin군과 hesperetin군은 hesperidin과 hesperetin을 각각 0.5% CMC에 200 mg/kg body weight의 농도로 용해시킨 solution을 7일간 위 내 투여하였다. 그 뒤, normal군에는 생리식염수를, 나머지 군에 해당되는 control군, hesperidin군 및 hesperetin군은 AAPH를 생리식염수에 용해시킨 solution (50 mg/kg body weight)을 복강투여하여 산화적 스트레스를 유발하였다. 24시간 뒤 혈액 및 간 조직을 채

취하여 실험에 사용하였다.

3. 혈중 ALT 및 AST 농도 측정

채취한 혈액은 4°C에서 3,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 혈청을 분리하였으며, 혈청은 -80°C에서 냉동 보관하여 실험에 사용하였다. 혈청 중 ALT 및 AST 활성은 효소법에 의한 정량용 kit (Cat. No. AM102, AM103; 아산제약)를 이용하여 측정하였다. ALT 및 AST기질액과 혈청을 반응시킨 뒤 정색시약을 넣고 505 nm에서 증류수를 대조로 흡광도를 측정하였다. ALT 및 AST는 표준액을 이용하여 표준곡선을 그려 ALT 및 AST 함량을 산출하였다.

4. 조직 내 지질과산화 함량 측정

간 조직을 생리 식염수로 균질화시킨 후 조직 균질액과 1% 인산 그리고 0.67% thiobarbituric acid와 혼합하여 95°C에서 45분간 boiling한 후 cooling시킨 뒤 *n*-butanol을 첨가하여 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하였다. 그 뒤, 상층액을 535 nm, 520 nm에서 흡광도를 측정하고 생성된 지질과산화물은 MDA의 양으로 환산하여 산출하였다. 조직 내 단백질 함량은 bovine serum albumin로 정량하였고, 표준곡선은 MDA를 농도별로 조제하여 그려 MDA 함량을 산출하였다²¹⁾.

5. 조직 내 NO 생성량 측정

간 조직을 생리 식염수로 균질화시킨 뒤 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리한 후 상층액 150 µL과 증류수 130 µL을 혼합하였다. 그 뒤, 혼합물에 Griess reagent를 넣어 실온에서 30분간 반응시킨 뒤 540 nm에서 흡광도를 측정하였고, 생성된 NO 함량은 NaNO₂의 양으로 환산하여 산출하였다. NaNO₂는 농도별로 조제하여 표준곡선을 그려 NO 함량을 산출하였다²²⁾.

6. 조직 내 catalase 효소 활성 측정

간 조직을 1% Triton X-100로 균질화시킨 뒤 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리한 후 상층액 100 µL에 50 mM phosphate buffer 2 ml을 첨가하였다. 그 뒤, 반응물에 30 mM H₂O₂ 용액을 첨가하여 240 nm에서 단위 시간 내 흡광도 변화를 측정하여 catalase 활성을 측정하였다²³⁾.

7. 조직 내 염증 단백질 발현 측정

간 조직은 lysis buffer로 균질화시킨 후 원심분리기를 이용하여 조직 내 잔사를 분리시키고 조직 내 단백질을 추출하였다. BCA assay kit를 이용하여 단백질 농도를 정량하였으며, 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 전기영동으로 분리한 후 분리된 단백질을 함유한 acrylamide gel을 nitrocellulose membrane으로 electro blotting에 의해 전이시켰다. 이 후 membrane을 5% skim milk를 함유한 PBS-T (0.1% tween 20 in phosphate buffer)에 1시간 동안 incubation하면서 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하였다. 그 뒤 NF-κB, iNOS 및 β-actin 항체를 각각 membrane에 적용시켜 항원 항체 반응을 일으킨 후 PBS-T로 씻어내고 이차 항체 반응을 유도한 후 enhanced chemiluminescence 용액을 적용한 다음 X-ray film에 감광시켜 각 단백질 발현을 분석하였다. 각 단백질 발현 값은 Image J® software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 이용하여 산출하였다.

8. 통계 분석

모든 실험 결과는 평균±표준편차로 나타내었다(n=6). 군 사이의 유의성을 검증하기 위해 일원배치분산분석(one-way analysis of variance)을 실시하고, P<0.05 수준에서 SAS (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) 통계 분석 프로그램을 이용하여 Duncan's multiple range test를 통해 각 구간 통계적 유의성을 분석하였다.

결과

1. 체중 및 간 조직 무게에 미치는 효과

각 군별 초기 체중, 실험 종료 전 체중, 체중 증가량, 간 조직 무게 측정된 결과를 Table 1에 나타내었다. 먼저 초기 체중, 실험 종료 전 체중 및 체중 증가량은 모든 군에서 유의한 차이를 나타내지 않았다. 간 조직 측정 결과, normal군은 12.2±0.6 g인 반면 AAPH를 처리한 control군의 경우 9.2±0.3 g을 나타내어 normal군에 비해 유의적으로 간 조직 무게가 감소된 것을 알 수 있었다. 반면 hesperidin 및 hesperetin을 각각 투여한 군의 경우 각각 9.5±0.3 g 및 9.6±0.4 g의 수치를 나타내어 control군에 비해 간 조직 무게가 증가하였으나 control군에 대한 통계적 유의성은 나타나지 않았다.

Table 1. Effects of Hesperidin and Hesperetin on Body and Liver Weights in AAPH-Induced Rats

Group	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Weight gain (g)	Liver weight (g)
Normal	166.86±5.58 ^{NS}	185.23±6.58 ^{NS}	18.37±1.51 ^{NS}	12.2±0.6 ^a
Control	166.20±6.06	186.22±6.57	20.02±3.31	9.2±0.3 ^b
Hesperidin	166.46±5.32	187.67±4.80	21.21±4.54	9.5±0.3 ^b
Hesperetin	166.42±5.91	186.13±9.28	19.71±4.18	9.6±0.4 ^b

Values are mean±standard deviation.

AAPH: 2,2'-azobis (2-aminopropane) dihydrochloride.

^{NS}Means not significant by statistical analysis. Different letters (a-b) are significantly different (P<0.05) among groups by Duncan's multiple range test.

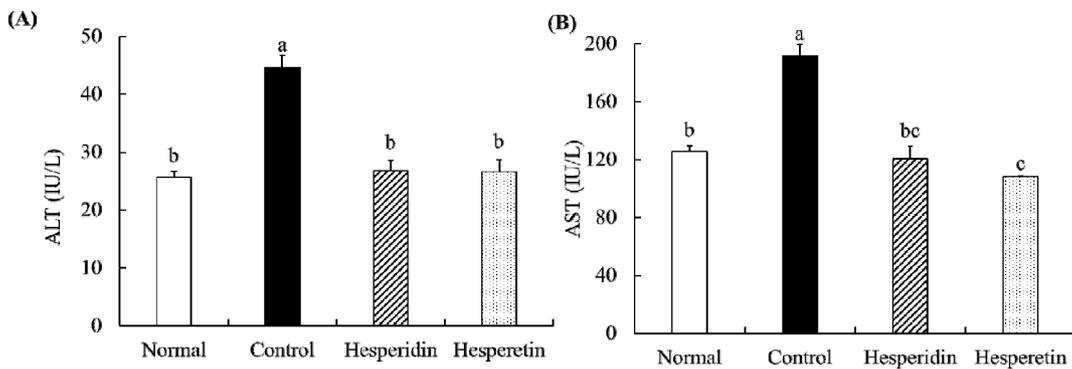


Fig. 1. Effects of hesperidin and hesperetin on serum ALT (A) and AST (B) levels in AAPH-induced rats. Values are mean±standard deviation. Different letters (a-c) are significantly different (P<0.05) among groups by Duncan's multiple range test. ALT: alanine aminotransferase, AST: aspartate aminotransferase, AAPH: 2,2'-azobis (2-aminopropane) dihydrochloride.

2. 혈중 ALT 및 AST 농도에 미치는 효과

각 군별 혈중 ALT 및 AST 농도 측정 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 먼저 ALT 측정 결과, normal군의 경우 25.63±1.07 IU/L의 수치를 나타내었으나 AAPH로 간 손상을 유도한 control군의 경우 44.63±2.08 IU/L의 수치를 나타내어 ALT 수치가 유의적으로 증가하였다. 반면 hesperidin과 hesperetin을 투여한 경우 각각 26.77±1.88 IU/L 및 26.61±2.09 IU/L의 수치를 나타내어 control군에 비해 유의적으로 낮은 ALT 수치를 나타내었다. AST 측정 결과, normal군의 경우 125.43±4.11 IU/L 수치를 나타낸 반면 AAPH로 간 손상을 유도한 control군은 191.64±8.24 IU/L 수치를 나타내어 유의적으로 AST 수치가 증가함을 확인하였다. 반면 hesperidin과 hesperetin을 투여한 경우 각각 120.21±9.12 IU/L 및 108.23±0.83 IU/L의 수치를 나타내어 control군에 비해 AST 수치가 감소함을 확인하였다.

3. 지질과산화 함량에 미치는 효과

간 조직에서 지질과산화 함량을 측정한 결과(Fig. 2), AAPH를 투여한 control군은 9.45±0.50 nmole/mg protein의

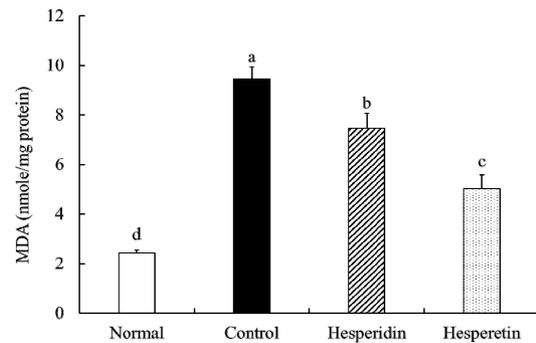


Fig. 2. Effects of hesperidin and hesperetin on lipid peroxidation in liver of AAPH-induced rats. Values are mean±standard deviation. Different letters (a-d) are significantly different (P<0.05) among groups by Duncan's multiple range test. MDA: malondialdehyde, AAPH: 2,2'-azobis (2-aminopropane) dihydrochloride.

MDA 수치를 나타내어 normal군 2.42±0.13 nmole/mg protein에 비해 유의적으로 지질과산화 함량이 증가한 것을 알 수 있었다. 반면 hesperidin과 hesperetin을 투여한 군의 경우 각각 7.45±0.63 nmole/mg protein 및 5.02±0.56 nmole/mg protein의 수치를 나타내어 control군에 비해 유의적으로 지질과산화 함량이 감소함을 확인하였다. 특히 hesperetin투여군이 hesperidin 투여군에 비해 유의적으로 더 낮은 지질과

산화 함량을 나타내었다.

4. NO 생성량에 미치는 효과

실험동물의 간 조직에서 NO 생성량을 측정된 결과(Fig. 3), AAPH를 투여하지 않은 normal군은 23.25±3.09 μmole/mg protein의 NO 수치를 나타낸 반면 AAPH를 투여한 control군은 67.46±12.27 μmole/mg protein의 수치를 나타내어 control군에서 normal군에 비해 유의적으로 NO 수치가 증가한 것을 알 수 있었다. 반면 hesperidin과 hesperetin을 투여한 군의 경우 각각 42.97±7.57 μmole/mg protein 및 51.55±3.67 μmole/mg protein의 수치를 나타내어 control군에 비해 낮은 NO 생성량을 확인하였다.

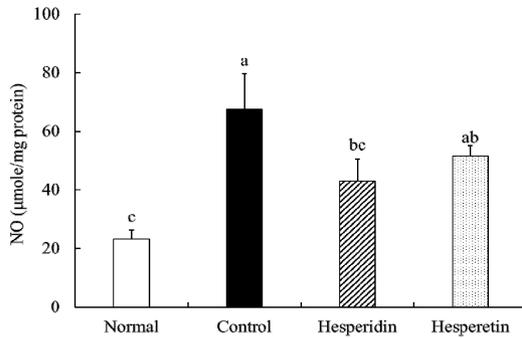


Fig. 3. Effects of hesperidin and hesperetin on NO production in liver of AAPH-induced rats. Values are mean±standard deviation. Different letters (a-c) are significantly different ($P<0.05$) among groups by Duncan's multiple range test. NO: nitric oxide, AAPH: 2,2'-azobis (2-aminopropane) dihydrochloride.

5. Catalase 효소 활성에 미치는 효과

실험동물의 간 조직에서 catalase 활성을 측정된 결과(Fig. 4), AAPH로 간 손상을 유도한 control군의 경우 normal군 100.00±2.56% 대비 81.70±2.55%로 감소하여 catalase 활성이 감소된 것을 알 수 있었다. 반면 hesperidin과 hesperetin을 각각 투여한 군의 경우 91.90±2.55% 및 92.50±2.57%의 catalase 활성을 나타내어 AAPH로 간 손상을 유도한 control군에 비해 catalase 효소 활성이 증가한 것을 알 수 있었다.

6. 간 조직 내 단백질 발현 분석

간 조직에서 NF-κB 및 iNOS 단백질 발현을 측정된 결과를 Fig. 5에 나타내었다. 간에서 NF-κB 측정 결과, AAPH

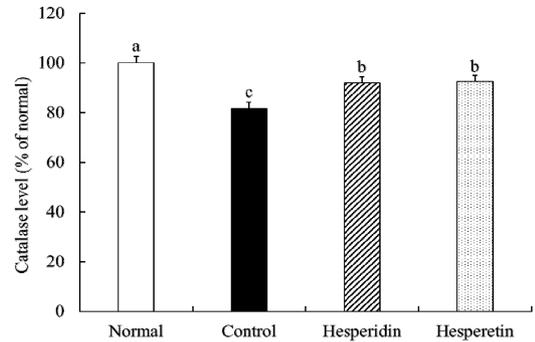


Fig. 4. Effects of hesperidin and hesperetin on catalase activity in liver of AAPH-induced rats. Values are mean±standard deviation. Different letters (a-c) are significantly different ($P<0.05$) among groups by Duncan's multiple range test. AAPH: 2,2'-azobis (2-aminopropane) dihydrochloride.

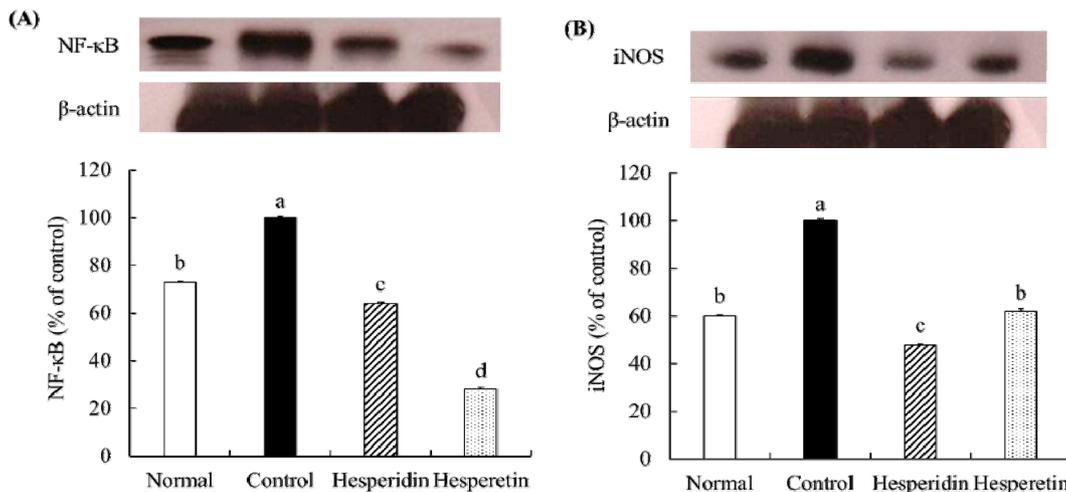


Fig. 5. Effects of hesperidin and hesperetin on protein expressions of NF-κB (A) and iNOS (B) in liver of AAPH-induced rats. Values are mean±standard deviation. Different letters (a-d) are significantly different ($P<0.05$) among groups by Duncan's multiple range test. NF-κB: nuclear factor-kappa B, iNOS: inducible nitric oxide synthase, AAPH: 2,2'-azobis (2-aminopropane) dihydrochloride.

를 투여한 control군은 normal군에 비해 유의적으로 NF- κ B 발현이 증가한 것을 알 수 있었다. 반면 hesperidin과 hesperetin을 투여한 군의 경우 control군 100.00 \pm 0.50% 대비 각각 64.21 \pm 0.82% 및 28.65 \pm 0.61%의 수치를 나타내어 유의적으로 NF- κ B 발현이 감소한 것을 알 수 있었으며, 특히 hesperetin 투여군에서 더 낮은 NF- κ B 발현량을 나타내었다. 간 조직에서 iNOS 단백질 발현 측정 결과, AAPH를 투여하지 않은 normal군은 control군 100.00 \pm 0.91% 대비 60.04 \pm 0.50% 수치를 나타내어 유의적으로 iNOS 단백질 발현이 감소한 것을 알 수 있었다. 반면 hesperidin 및 hesperetin을 투여한 군의 경우 control군 100.00 \pm 0.90% 대비 각각 48% \pm 0.51%, 62% \pm 1.02%로 control군에 비해 iNOS 단백질 발현이 유의적으로 감소하였으며, 특히 hesperidin 투여군에서 더 낮은 iNOS 발현량을 나타내었다.

고찰

AAPH는 산화적 손상을 일으키는 대표적인 물질로써, 체 내에서 carbon radical과 질소 분자로 분해된다²⁴. 특히 생성된 carbon radical은 체내 산소와 반응하여 ROS를 형성하게 되고 이는 체내 생체 분자인 단백질, 지질, DNA 등에 산화적 손상을 일으키는 것으로 보고되었다²⁴. 이전 연구에서 실험동물에 AAPH를 복강투여 시 간 조직에 산화적 손상을 유도하는 것으로 보고되었다²⁵. 진피류 한약재의 주요 활성물질인 hesperidin과 아글리콘 형태인 hesperetin의 항산화 활성 관련 연구가 보고된 바 있으나, AAPH로 산화적 손상이 유도된 모델에서의 간 보호 효과와 관련 연구는 전무한 실정이다. 뿐만 아니라 hesperidin과 hesperetin 각각의 항산화 활성 관련 연구는 다수 보고되었으나, 이들 화합물의 항산화 효능 및 기전을 비교한 연구는 미흡한 실정이다^{19,20}. 따라서 본 연구에서 AAPH로 간 손상을 유도한 *in vivo* 동물 모델에서 hesperidin과 hesperetin의 산화적 스트레스 보호 효능을 확인하고, 이들의 항산화 효능 및 기전을 비교하고자 하였다.

AST는 aspartic acid의 아미노기를 a-ketoglutaric acid에 전이하여 glutamic acid를 생성하는 효소이며, ALT는 alanine의 아미노기를 a-ketoglutaric acid에 전이하여 glutaric acid를 생성하는 효소이다²⁶. AST 및 ALT는 심장, 골격근 등에 분포되어 있지만, 특히 간 조직에 많이 분포되어 있는 효소로 간 조직의 손상이 유도되었을 때 이들 효소가

혈액 중으로 방출되는 것으로 알려져 있다^{26,27}. 따라서 혈중 AST 및 ALT 효소는 간 독성 검사의 주요 지표로 사용하고 있다²⁷. 본 연구에서 AAPH로 손상을 유도한 control군 대비 hesperidin 및 hesperetin을 각각 투여한 군에서 유의적으로 AST 및 ALT 효소 활성이 감소되었음을 알 수 있었다. 특히 ALT 효소 활성은 hesperidin 및 hesperetin 투여군 모두 유의한 수준으로 억제한 반면 AST 효소 활성은 hesperidin 투여군에 비해 hesperetin 투여군에서 더 낮은 수치를 나타내었다. 따라서 hesperidin 및 hesperetin의 투여는 AAPH로 인한 간 조직의 산화적 손상에 대해 ALT 및 AST 효소 활성 조절을 통해 간 독성 보호 효과를 나타냄을 확인할 수 있었으며, hesperetin 투여군에서 AST 효소 활성 억제 효과가 더 높음을 확인하였다.

체 내에서 과산화지질은 단백질, DNA, RNA 등의 생체 내 분자와 반응하는 것으로 알려져 있다²⁸. 특히 MDA는 지질과산화물의 최종 부산물로 산화적 손상의 대표적인 지표물질로 알려져 있다²⁹. 다양한 산화적 손상 동물 모델에서 MDA 생성량 측정을 통해 산화적 손상에 대한 보호 효과가 보고되었다. 본 연구에서도 AAPH로 산화적 손상을 유도한 동물모델에 hesperidin과 hesperetin의 지질과산화 개선 효과를 비교하기 위해 간 조직에서 MDA 생성량을 측정하였다. AAPH를 투여한 control군은 AAPH를 투여하지 않은 normal군에 비해 유의적으로 MDA 생성량이 증가하여 간 조직 내 산화적 손상이 유도되었음을 확인하였다. 반면 hesperidin과 hesperetin을 각각 투여한 결과, control군에 비해 유의적으로 낮은 MDA 수치를 나타내어 간 조직 내 지질과산화 생성 억제를 통한 산화적 스트레스 개선 효과를 알 수 있었다. 특히 동일한 용량을 투여했을 때 hesperetin 투여군이 hesperidin 투여군에 비해 유의적으로 더 낮은 MDA 수치를 나타내어 hesperetin이 hesperidin에 비해 산화적 손상이 유도된 간에서 지질과산화 생성 억제 효능이 더 높은 것으로 생각된다. 반면 이전 연구에서 AAPH로 산화적 손상을 유도한 동물모델에서 hesperidin 투여군이 hesperetin 투여군에 비해 유의적으로 신장에서의 MDA 함량이 낮은 것으로 보고되었다³⁰. 따라서 AAPH로 산화적 손상을 유도한 동물모델에서 hesperidin 투여는 신장 보호 효과가 우수한 반면, 본 연구에서는 hesperetin 투여가 hesperidin 투여에 비해 간 보호 효과가 우수함을 알 수 있었다.

NO는 NOS에 의해 합성되는 물질로써 정상적인 상태

에서 체내 신경전달기능, 혈압 조절, 면역 기능 등의 다양한 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다³¹⁾. 그러나 외부 자극에 의해 NO가 과다하게 생성될 경우 산화적 스트레스, 염증반응, 혈관 확장 등을 통해 조직의 손상을 일으키는 것으로 보고되었다³²⁾. 뿐만 아니라 NO는 체내 free radical과 반응하여 산화적 손상을 더욱 악화시키기 때문에 NO 조절을 통한 산화적 스트레스 개선 효능에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다^{4,32)}. 본 연구에서 간 조직 내 NO 생성량을 측정된 결과, normal군에 비해 control군의 NO 생성이 증가하여 간 조직의 산화적 스트레스가 유도됨을 확인하였다. 또한 hesperidin과 hesperetin의 NO 소거 효과를 확인한 결과, AAPH를 투여한 control군에 비해 hesperidin과 hesperetin 투여군에서 유의적으로 낮은 NO 생성량을 나타내어 NO 생성 억제를 통한 간 조직의 산화적 손상에 대한 보호 효과를 확인할 수 있었다. 특히 hesperetin 투여군에 비해 hesperidin 투여군이 유의적으로 낮은 NO 수치를 나타내어 hesperidin이 hesperetin에 비해 우수한 NO 소거 효과를 나타내는 것으로 생각된다.

체 내에는 SOD, glutathione, catalase와 같은 항산화 효소를 보유하고 있다³²⁾. 특히 catalase는 H₂O₂를 H₂O로 환원시켜 체내 과산화물이 축적되지 않도록 하는 역할을 수행하며, 대표적인 항산화 효소로 알려져 있다^{33,34)}. 산화적 손상에 대한 보호 효과를 나타내는 천연물 유래 소재를 개발하기 위한 연구에서 catalase 효소 활성 조절을 통한 천연물 유래 소재 개발 연구가 활발히 이루어지고 있다^{33,34)}. 본 연구에서도 hesperidin과 hesperetin의 항산화 효소 활성을 확인하기 위해 간 조직에서 catalase 효소 활성을 측정된 결과, control군에 비해 hesperidin 및 hesperetin 투여군은 control군에 비해 유의적으로 catalase 효소 활성이 증가하였으며, 이들은 유사한 수치를 나타내었다. 따라서 본 결과를 통해 hesperidin 및 hesperetin은 간 조직에서 H₂O₂ 생성을 억제시키는 catalase 효소 활성 증가를 통해 간 조직 내 산화적 손상에 대한 보호 효과를 나타냄을 알 수 있었다. 체 내에서는 catalase 외에도 SOD, glutathione과 같은 항산화 효소 및 nuclear factor E2-related factor 2 (Nrf-2) signaling을 매개로 발현되는 heme oxygenase-1 (HO-1), NADPH quinone oxidoreductase-1 등의 항산화 인자들이 체내 산화/항산화 체계의 균형을 유지하고 있다^{33,35)}. 이전 연구에 의하면 산화적 손상이 유도된 근육세포에서 hesperidin 처리군이 hesperetin 처리군에 비해 유의적으로 높

은 glutathione 효소 활성을 나타냄이 보고된 바 있으며, 이 외에도 hesperidin과 hesperetin을 각각 처리 시 SOD, glutathione 등 항산화 효소 활성을 증가시켜 항산화 효능을 나타내는 것으로 보고된 바 있다³⁶⁻³⁸⁾. 또한 산화적 손상이 유도된 동물 모델에서 hesperidin 및 hesperetin 처리는 Nrf-2/HO-1 pathway 활성화를 통해 항산화 활성을 나타냄이 보고되었으나 추후 hesperidin 및 hesperetin 두가지 화합물의 Nrf-2 signaling 조절 효능 비교에 관한 연구가 필요할 것으로 생각된다^{38,39)}.

NF-κB는 대표적인 핵 내의 redox sensitive 전사인자로서 체내 산화적 스트레스 또는 염증 반응에 활성화된다⁴⁰⁾. NF-κB가 활성화되면 iNOS, cyclooxygenase-2와 같은 염증매개인자를 유도하며, 이는 interleukin (IL)-1β, IL-6, tumor necrosis factor-α 등의 다양한 염증성 cytokines를 방출한다^{40,41)}. 특히 이와 같은 NF-κB pathway 활성화는 노화, 암, 동맥경화와 같은 각종 질환을 유도하는 것으로 보고되었다⁴¹⁾. 본 연구에서 NF-κB 발현량 측정 결과, normal군에 비해 control군의 NF-κB 발현이 증가하여 NF-κB가 활성화되어 염증반응이 유도되었음을 알 수 있었으며, 반면 hesperidin 및 hesperetin 투여군은 NF-κB 단백질 발현이 유의적으로 감소되어 NF-κB 활성을 억제시킨 것으로 생각된다. 특히 hesperetin 투여군은 hesperidin 투여군에 비해 유의적으로 낮은 NF-κB 발현량을 나타내어 hesperetin 투여는 NF-κB 활성을 우수하게 억제하여 간 조직의 산화적 스트레스 보호 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

NF-κB pathway 활성화로 발현되는 대표적인 염증매개인자인 iNOS는 L-arginine과 산소분자로부터 과다하게 NO 생성을 증가시킨다^{40,42)}. 본 연구에서 hesperidin 및 hesperetin 투여군은 control군에 비해 유의적으로 iNOS 단백질 발현이 감소되어 iNOS 단백질 발현 억제를 통한 간 손상 보호 효과를 나타내는 것으로 생각된다. 특히 hesperidin 투여군이 hesperetin 투여군에 비해 우수하게 iNOS 단백질 발현을 억제시켰는데 이는 간 조직 내 NO 생성 억제 효과와 동일한 효과를 나타낸 것으로 보인다. AAPH로 유도된 산화적 손상 동물모델에서 신장 보호 효능을 규명한 이전 연구에서 hesperetin 투여군이 hesperidin 투여군에 비해 유의적으로 iNOS 발현을 억제시켜 hesperetin 투여는 신장 보호 효과가 우수한 반면, 본 연구를 통해 hesperidin 투여는 간 보호 효과가 우수함을 알 수 있었다³⁰⁾. 이 외에도 기존 국내외 연구의 경우 hesperidin과 hesperetin 각각의 산화

적 스트레스 보호 효능과 관련 기전 연구가 주로 보고된 반면 본 연구는 두 화합물의 산화적 스트레스 개선 효능을 비교한 연구로써 hesperidin의 투여는 hesperetin 투여에 비해 iNOS 단백질 발현 억제를 통해 NO 소거 효과가 높은 것을 알 수 있었다. 뿐만 아니라 hesperetin 투여군은 hesperidin 투여군에 비해 지질과산화 억제 효능과 NF-κB 단백질 발현을 더욱 억제시키는 것을 확인할 수 있었다. 본 연구를 통해 hesperidin과 아글리론 형태인 hesperetin이 함유되어 있는 진피류 한약재의 산화적 스트레스로 유도되는 간 질환 개선 효능을 나타내는 소재로써 활용될 수 있을 것으로 생각한다. 그러나 본 연구에서 hesperidin과 hesperetin의 Nrf-2 signaling에 미치는 영향, 다른 항산화 효소 활성화에 미치는 효과, 체내 흡수 및 대사에 의한 항산화 활성 등 각 화합물의 추가적인 조절 기전 규명과 비교에 관한 연구가 필요할 것으로 생각한다.

결론

본 연구는 AAPH로 간 조직의 산화적 손상을 유도한 동물모델에서 hesperidin과 hesperetin의 간 보호 효과에 대해 비교하였다. Hesperidin과 hesperetin 투여군은 간 조직에서 지질과산화 및 NO 생성량을 유의적으로 억제시켰으며 항산화 효소인 catalase 활성을 증가시켜 산화적 손상에 대한 보호 효과를 나타내었다. 특히 hesperidin투여군은 iNOS 단백질 발현을, hesperetin 투여군은 NF-κB 단백질 발현을 억제시켜 AAPH로 유도된 산화적 손상에 대한 간 보호 효과를 나타내는 것으로 생각한다.

References

1. Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol.* 2004 ; 55 : 373-99.
2. Weidinger A, Kozlov AV. Biological activities of reactive oxygen and nitrogen species: oxidative stress versus signal transduction. *Biomolecules.* 2015 ; 5 : 472-84.
3. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007 ; 39 : 44-84.
4. Li S, Tan HY, Wang N, Zhang ZJ, Lao L, Wong CW, et al. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *Int J Mol Sci.* 2015 ; 16 : 26087-124.
5. Sanchez-Valle V, Chavez-Tapia NC, Uribe M, Mendez-Sanchez N. Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review. *Curr Med Chem.* 2012 ; 19 : 4850-60.
6. Sakaguchi S, Takahashi S, Sasaki T, Kumagai T, Nagata K. Progression of alcoholic and non-alcoholic steatohepatitis: Common metabolic aspects of innate immune system and oxidative stress. *Drug Metab Pharmacokinet.* 2011 ; 26 : 30-46.
7. Li AN, Li S, Zhang YJ, Xu XR, Chen YM, Li HB. Resources and biological activities of natural polyphenols. *Nutrients.* 2014 ; 6 : 6020-47.
8. Cho AR, Kim DG, Kang JR, Kang MJ, Shin JH. Antioxidant and liver protective activity of combined extracts of medicinal herbs. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 2019 ; 48 : 1195-204.
9. Lee SH, Lee MS. The study of physiological and antimicrobial activities on the Citrus Junos extracts with its textures and skin. *Journal of the Korea Academia-Industrial cooperation Society.* 2017 ; 18 : 67-74.
10. Ham I, Jung ED, Lee K, Lee JH, Bu Y, Kim H, et al. Analysis of the content of hesperidin and essential oils from the peels of various Citrus species. *Kor J Herbology.* 2008 ; 23 : 159-70.
11. Garg A, Garg S, Zaneveld LJ, Singla AK. Chemistry and pharmacology of the Citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytother Res.* 2001 ; 15 : 655-69.
12. Roohbakhsh A, Parhiz H, Soltani F, Rezaee R, Iranshahi M. Molecular mechanisms behind the biological effects of hesperidin and hesperetin for the prevention of cancer and cardiovascular diseases. *Life Sci.* 2015 ; 124 : 64-74.
13. Parhiz H, Roohbakhsh A, Soltani F, Rezaee R, Iranshahi M. Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models. *Phytother Res.* 2015 ; 29 : 323-31.
14. Roohbakhsh A, Parhiz H, Soltani F, Rezaee R, Iranshahi M. Neuropharmacological properties and pharmacokinetics of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin. *Phytother Res.* 2015 ; 29 : 323-31.

- etin--a mini-review. *Life Sci.* 2014 ; 113 : 1-6.
15. Ferreira de Oliveira J, Santos C, Fernandes E. Therapeutic potential of hesperidin and its aglycone hesperetin: cell cycle regulation and apoptosis induction in cancer models. *Phytomedicine.* 2020 ; 73 : 152887.
 16. Dhanya R, Jayamurthy P. In vitro evaluation of anti-diabetic potential of hesperidin and its aglycone hesperetin under oxidative stress in skeletal muscle cell line. *Cell Biochem Funct.* 2020 ; 38 : 419-27.
 17. Kim HY, Li L, Cho EJ. Antioxidative effects of hesperidin and hesperetin under in vitro. *Cancer Prev Res.* 2010; 15 : 333-9.
 18. Cho EJ, Li L, Yamabe N, Kim HY. Antioxidative effects of hesperidin and hesperetin under cellular system. *Korean J Agric Sci.* 2011; 38 : 717-22.
 19. Wan J, Kuang G, Zhang L, Jiang R, Chen Y, He Z, et al. Hesperetin attenuated acetaminophen-induced hepatotoxicity by inhibiting hepatocyte necrosis and apoptosis, oxidative stress and inflammatory response via upregulation of heme oxygenase-1 expression. *Int Immunopharmacol.* 2020 ; 83 : 106435.
 20. Li S, Qin Q, Luo D, Pan W, Wei Y, Xu Y, et al. Hesperidin ameliorates liver ischemia/reperfusion injury via activation of the Akt pathway. *Mol Med Rep.* 2020 ; 22 : 4519-30.
 21. Mihara M, Uchiyama M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem.* 1978 ; 86 : 271-8.
 22. Hevel JM, Marletta MA. Nitric-oxide synthase assays. *Meth Enzymol.* 1994 ; 233 : 250-8.
 23. Hugo A. Catalase in vitro. *Meth Enzymol.* 1984 ; 105 : 121-6.
 24. Terao K, Niki E. Damage to biological tissues induced by radical initiator 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride and its inhibition by chain-breaking antioxidants. *J Free Radic Biol Med.* 1986 ; 2 : 193-201.
 25. Han KH, Jeon YJ, Athukorala Y, Choi KD, Kim CJ, Cho JK, et al. A water extract of *Artemisia capillaris* prevents 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride-induced liver damage in rats. *J Med Food.* 2006 ; 9 : 342-7.
 26. Thapa BR, Walia A. Liver function tests and their interpretation. *Indian J Pediatr.* 2007 ; 74 : 663-71.
 27. Giannini E, Botta F, Fasoli A, Ceppa P, Risso D, Lantieri PB, et al. Progressive liver functional impairment is associated with an increase in AST/ALT ratio. *Dig Dis Sci.* 1999 ; 44 : 1249-53.
 28. Bartsch H, Nair J. Chronic inflammation and oxidative stress in the genesis and perpetuation of cancer: role of lipid peroxidation, DNA damage, and repair. *Langenbecks Arch Surg.* 2006 ; 391 : 499-510.
 29. Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges. *Anal Biochem.* 2017 ; 524 : 13-30.
 30. Kim JH, Li L, Kim MS, Cho EJ, Kim HY. Protective effects of hesperidin and hesperetin on kidney toxicity by regulation of antioxidant activity in AAPH-induced rats. *J Agri Life Sci.* 2022 ; 56 : 111-6.
 31. Galla HJ. Nitric oxide, NO, an intercellular messenger. *Angew Chem Int Ed.* 1993 ; 32 : 378-80.
 32. Papi S, Ahmadizar F, Hasanvand A. The role of nitric oxide in inflammation and oxidative stress. *Immunopathol Persa.* 2019 ; 5 : e08.
 33. Matés JM, Pérez-Gómez C, De Castro IN. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem.* 1999 ; 32 : 595-603.
 34. Kaushal J, Mehandia S, Singh G, Raina A, Arya SK. Catalase enzyme: application in bioremediation and food industry. *Biocatal Agric Biotechnol.* 2018 ; 16 : 192-9.
 35. Zhang X, Yu Y, Lei H, Cai Y, Shen J, Zhu P, et al. The Nrf-2/HO-1 signaling axis: a ray of hope in cardiovascular diseases. *Cardiol Res Pract.* 2020 ; 2020 : 5695723.
 36. Dhanya R, Jayamurthy P. In vitro evaluation of anti-diabetic potential of hesperidin and its aglycone hesperetin under oxidative stress in skeletal muscle cell line. *Cell Biochem Funct.* 2020 ; 38 : 419-27.
 37. Park HK, Kang SW, Park MS. Hesperidin ameliorates hepatic ischemia-reperfusion injury in sprague-dawley rats. *Transplant Proc.* 2019 ; 51 : 2828-32.
 38. Li J, Wang T, Liu P, Yang F, Wang W, Zheng W, et al. Hesperetin ameliorates hepatic oxidative stress and inflammation via the PI3K/AKT-Nrf2-ARE pathway in oleic acid-induced HepG2 cells and a rat model of high-fat diet-induced NAFLD. *Food Funct.* 2021 ; 12 : 3898-918.

39. Heo SD, Kim J, Choi Y, Ekanayake P, Ahn M, Shin T. Hesperidin improves motor disability in rat spinal cord injury through anti-inflammatory and antioxidant mechanism via Nrf-2/HO-1 pathway. *Neurosci Lett.* 2020 ; 715 : 134619.
40. Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009 ; 1 : a001651.
41. Cildir G, Low KC, Tergaonkar V. Noncanonical NF- κ B signaling in health and disease. *Trends Mol Med.* 2016 ; 22 : 414-29.
42. Cinelli MA, Do HT, Miley GP, Silverman RB. Inducible nitric oxide synthase: regulation, structure, and inhibition. *Med Res Rev.* 2020 ; 40 : 158-89.