

감두탕이 지질과산화에 미치는 영향

生藥科

김 장희·양기숙·윤원용

The Effect of Gamdootang on Lipid Peroxidation

Division of Herb Drug

Jang Hee Kim, Ki Sook Yang and Won Yong Yoon

= Abstract =

The effect of Gamdootang extract (GDE) on the lipid peroxidation induced by B(a)P was examined. Experimental group was administered various doses of GDE 200mg/kg, 500mg/kg, 1000mg/kg and B(p)P 50 μ g/kg/day by p.o. for four days. The administration of 1000mg/kg was significantly shown to inhibit lipid peroxidation comparing with control group in vivo.

서론

감두탕은 解百藥解百毒이라 하여 모든 약과 모든 독물의 독을 해독시킨다¹⁾고 되어 있으며 金²⁾ 등은 감두추출액이 유기인 중독에 대해 방어효과가 있음을 보고하였고 박³⁾ 등은 부자독소에 대한 中和作用을 研究하였다.

有毒化合物의 代謝過程에서 생성된 반응성 대사체들은 생체막 지질의 연쇄반응을 통하여 지질과산화에 관여하거나 DNA 혹은 단백질과 같은 세포구성 분자와 결합하여 遺傳情報系의 변이 및 기능적 변성을 유발한다^{4,5)}. 이들 활성대사체에 대한 최근의 연구동향은 활성기의 항산화성을 갖는 생리 활성물질을 檢索하는 방향으로 진행되고 있다.

본 연구에서는 감두탕이 지질과산화에 미치는 效果를 연구하기 위하여 감두탕의 물액스와 陽性對照藥物로 항산화효과와 항암효과가 있다고 보고된 dl- α -tocopherol acetate(Vit. E)⁶⁾, 식품에 첨가하는 항산화제로 널리

쓰이고 있는 BHT를 사용하였고 WHO에서 環境性 發癌指標物質로 규정하고 있는 benzo(a)pyrene⁷⁾을 병태모델약물로 사용하여 thiobarbituric acid test로 실험한 결과 약간의 지견을 얻었기에 報告하고자 한다.

재료 및 방법

1. 실험 재료

1) 실험동물

체중 200-250g의 sprague-dawley계 웅성 흰쥐를 고형사료와 상수를 충분히 공급하여 일주일 동안 실험실 환경에 적응하여 사용하였다.

2) 기기

Shaking incubator (Geo. tech), refrigerated centrifuge (Vision scientific co), spectrophotometer (Beckman), water bath (Büchi), vortex mixer (Chang sin chemical), refrigerator (Sam sung), stirrer/hot plate (Corning), homogenizer (Je il chemical),

sonicator (Branson ultrasonic) 등의 기기를 사용하였고 기타 유리기구는 cleaning solution에 1일 이상 담근 후 증류수로 세척 건조시켜 사용하였다.

3) 시약

Trichloro acetic acid, thiobarbituric acid, ferrous sulfate (FeSO_4), ascorbic acid, benzo(a)pyrene, dimethyl sulfoxide, dl- α -tocopherol acetate (Vit. E), dibutylhydroxytoluene (BHT) 등은 미국 Sigma Chemical Co. 제품을 사용하였고 disodium hydrogen phosphate, sodium dihydrogen phosphate는 일본 Wako Pure Chemical Industry 제품을 사용하였다. hydrochloric acid는 Avondale Laboratories 제품을 사용하였으며 기타 시약은 특급시약을 사용하였다.

2. 실험방법

1) 시료의 조제

시중 전자 한약방에서 구입한 감초와 흑두를 동의보감의 처방에 따라 동량씩 취하여 열탕으로 추출하고 감압 농축하여 시료로 하였다(감두탕 액스 : 이하 GDE로 약함).

2) 시액의 조제

(1) 시료용액의 조제

시료를 증류수에 녹여 0.1mg/ml, 1mg/ml, 2.5mg/ml, 5mg/ml, 10mg/ml 되도록 조제한다.

(2) TBA 시액의 조제

0.25% HCl 용액중에 0.375% thiobarbituric acid 및 1.5% trichloro acetic acid가 함유되도록 조제한다.

(3) 0.2M sodium phosphate buffer (pH 7.4)

0.2M sodium dihydrogen phosphate 60ml에 0.2M disodium hydrogen phosphate 440ml를 가하여 500ml가 되도록 한다.

(4) 0.01M FeSO_4 soln.

3차 증류수에 FeSO_4 278.01mg을 넣어 용해하여 100ml가 되도록 한다.

(5) 0.01M ascorbic acid soln.

3차 증류수에 ascorbic acid 176.01mg을 넣어 용해하여 100ml가 되도록 한다.

(6) 10nM 1.1.3.3. tetra-ethoxy propane 용액 (MDA 표준용액)

1.1.3.3. tetra-ethoxy propane 110mg을 3차 증류수 50ml에 용해하여 이 액을 1000배 희석하여 MDA 표준 용액을 만든다.

(7) benzo(a)pyrene 용액의 조제
benzo(a)pyrene을 dimethylsulfoxide에 녹여 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 가 되도록 조제한다.

3. 실험

1) 약물투여방법

시료액 투여군은 시료를 물에 용해하여 각각 200mg/kg, 500mg/kg, 1000mg/kg의 용량별로 투여하였으며 간에 손상을 유발시키기 위하여 B(a)P 50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{day}$, 양성대조약물로 Vit. E 및 BHT를 각각 1 μM , 10 μM , 100 $\mu\text{M}/\text{kg}/\text{day}$ 를 투여하였다. 대조군은 물 또는 corn oil을 사용하였으며 모든 약물은 4일간 경구투여하였고 약물 투여후 24시간 동안은 절식시켰다.

2) S9의 조제

약 200-250g의 Sprague-dawley계 웅성 흰쥐에 약물을 투여하고 5일 후 간 문맥을 통하여 0.15M KCl 용액으로 관류하여 간 내의 혈액을 제거하고 간을 적출하였다. 세척한 간을 간 무게의 3배량의 0.15M KCl 용액을 가하여 Potter-elvehje형 homogenizer로 빙수 냉각하에서 균질화하였다. 이 균질화된 액을 0°C를 유지하면서 냉동원심분리기에서 9000g로 30분간 원심분리하여 상등 분획 (S9)을 취하였다.

3) 실험과정

(1) System 1.

S9 200 μl 과 0.02M phosphate buffer 400 μl 를 공전 시험관에 취하고 3차 증류수 300 μl , 시료용액 100 μl 를 순서대로 가하여 혼합하고 30분동안 진탕하면서 배양시킨 후 생성된 과산화지질에 TBA 시액 3ml 가하여 100°C의 수육상에서 15분간 끓여 malondialdehyde-TBA 복합체를 반색시킨 후 3000rpm으로 15분간 원심 분리하여 얻은 상등액을 535nm에서 흡광도를 측정하였다 (Scheme 1).

(2) System 2.

S9 200 μl 과 0.02M phosphate buffer 400 μl 를 공전 시험관에 취한 후 system 1에서의 증류수 300 μl , 시험용액 100 μl 를 가하는 대신에 본 system에서는 증류수 100 μl 0.01M FeSO_4 solution, 0.01M ascorbic acid solution 100 μl , 시험용액 100 μl 를 순서대로 가하여 동일 조작을 행하였다.

4) 흰쥐의 S9에 대한 감두탕의 항지질과산화 작용

감두탕의 농도변화에 따른 지질과산화 억제작용을 *in vitro*에서 system 1 및 system 2를 적용하여 관찰하였

다.

5) B(a)P을 투여한 흰쥐의 S9에 대한 감두탕의 항지질과산화작용

B(a)P을 50 μ g/kg/day로 5일간 투여하여 간의 지질과산화 반응을 촉진시킨 S9을 사용하여 감두탕의 농도변화에 따른 지질과산화작용을 *in vitro*에서 system 1 및 system 2를 적용하여 관찰하였다.

6) 감두탕 GDE, Vit. E, BHT의 투여에 따른 항지질과산화작용

대조군 흰쥐와 비교하여 흰쥐에 감두탕, Vit. E, BHT를 투여한 후 그 흰쥐의 S9을 사용하여 지질과산화도를 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 脂質過酸化에 미치는 영향

Lipid Peroxidation은 과거에는 식품에 포함된 불포화지방산이 산소의 존재하에 과산화를 거쳐 산패되는現像으로만 인식되어 왔으나 최근에는 생체내에서의 lipid peroxidation의 심각한 유해성으로 인해 관심이 집중되고 있다⁸⁾. 불포화지방산은 생체막의 주요 구성성분인 인지질에 풍부하게 존재한다.

S9 200 μ l

0.02M phosphate buffer soln. 400 μ l
sample 100 μ l, H₂O 100 μ l

Incubation at 37°C

for 30 minutes & shaking

Reaction mixture

+TBA reagent 3ml
0.375% thiobarbituric acid
0.25N HCl
1.5% trichloroacetic acid

Heating at 95°C
for 15 minutes

centrifugation
(3000RPM, 15 minutes)

Spectrophotometer
Optical density at 535nm

Scheme 1. TBA determination procedure.

생체내에서 생성된 OH⁻ (hydroxy radical)이나 HO₂⁻ (peroxy radical) 같은 free radical은 불포화지방산과 반응하여 과산화지질을 형성하여 DNA, 酶素 또는 단백질과 반응하여 생체조직의 損傷, 病變, 機能의 변화를 일으켜⁹⁾ 動脈硬化, 老化, 糖尿病 등을 일으키며 발암성, 변이와도 관계가 있다고 보고되어 있다¹⁰⁻¹³⁾.

지질과산화의 정도를 측정하는 방법으로는 생성된 malondialdehyde(MDA)의 양을 측정하거나 hydroperoxide의 양을 iodometry로 측정하는 방법 등 다양하나 TBA assay를 이용한 MDA 측정법이 가장 널리 사용되고 있다⁹⁾. 이 방법의 원리는 과산화지질의 分解에 의해 생성되는 malondialdehyde의 nM로 표현하는 것이다. 산화반응 내에서 O₂⁻와 H₂O₂는 생체내 표적물질과의 反應速度가 매우 느리기 때문에 그 자체로서는 조직에 별 피해를 주지 못하나 redox cycling을 할 수 있는 ligated metal ion 특히 철이 존재할 때는 hydroxy free radical을 생성하고 지질과산화 등 여러가지 반응을 야기시킨다. TBA Assay에서의 철의 역할이나 反應 메카니즘은 아직 규명되지 않았으나 일반적으로 TBA assay에서의 반응에 있어서 과산화지질이 aldehyde로 분해되는 것을 觸媒하는 것으로 추측되고 있다. 소량의 H₂O₂나 ascorbic acid는 이들의 산화 또는 환원작용으로 Fe²⁺와 Fe³⁺의 비율을 적절한 값으로 유지시켜 지질과산화를 促進시키는 역할을 한다^{9,16)}.

이러한 이론을 根據로 본 실험에서는 Fe²⁺/ascorbic acid system에 의해 誘發된 lipid peroxidation에 대한 감두탕의 항지질과산화효과를 觀察하였다.

1) 흰쥐의 S9에 대한 영향

GDE의 농도 변화에 따른 *in vitro*상의 지질과산화 억제도는 Fig. 1과 같다. GDE의 지질과산화 억제효과는 농도증가에 따른 의존성을 찾아내기 어려웠으며 일정한 임계농도에서 급격히 증가하였다. 0에서 10.0mg/ml의 농도사이에서 농도단계를 세분화하여 실험한 결과에서도 동일한 형태의 급격한 변화를 나타내었다.

2) B(a)P을 투여한 흰쥐의 S9에 대한 영향

B(a)P을 50 μ g/kg 투여하여 과산화반응을 촉진시킨 S9에 *in vitro*에서 GDE를 가하여 농도 변화에 따른 지질과산화 억제도를 측정한 결과는 Fig. 2와 같다.

3) GDE, Vit. E, BHT의 투여에 의한 영향

대조군과 비교하여 GDE, Vit. E와 B.H.T.를 투여한 후 S9을 사용하여 system 1을 적용하여 지질과산화도를 측정한 결과는 Table 1과 같다.

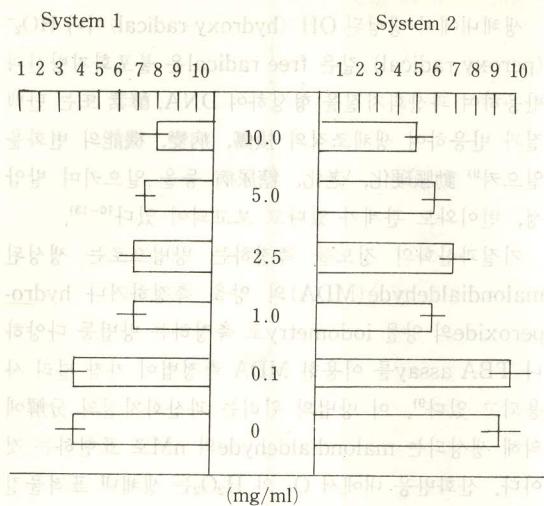


Fig. 1. Effect of Gamdoottang Ex. on lipid peroxidation of normal S9.

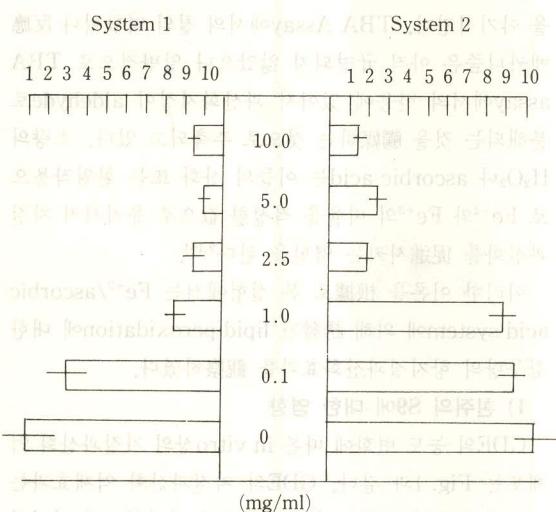


Fig. 2. Effect of Gamdoottang Ex. on lipid peroxidation of B(a)P treatment S9.

GDE를 투여한 군과 잘 알려진 항산화제인 Vit. E와 BHT를 투여한 군을 비교하면 GDE의 경우 1000mg/kg을 투여했을 때 현저한 과산화반응 억제효과를 보여주며 GDE 농도 200mg/kg, 500mg/kg일 때 대조군에 비하여 약간 감소하는 경향을 보여주었다. Vit. E와 BHT를 투여한 군에서는 모두 100μM/kg을 투여하였을 때 가장 현저한 지질과산화 억제 반응을 보여주고 있다.

Table 1. Inhibitory actions of Gamdoottang Ex., Vit. E and BHT on Lipid Peroxidation.

Sample	Dose	용 MDA (nM/ml)
Control		10.46±0.64
Gamdoottang Ex.	1000	4.91±0.54**
	500	7.24±0.67*
	200	8.75±1.41
Vit. E	100	2.44±0.95***
	10	9.78±1.53
BHT	100	8.46±0.76
	10	5.20±0.45**
	1	11.84±0.83
		10.45±1.21

Lipid Peroxide MDA nM/ml = $(f/F) \times 10 \text{ nM/ml}$ S9

F=Concentration of standard

f=Optical density of sample

a) Dose unit of Gamdoottang Ex. is mg/kg and dose unit of Vit. E and BHT are μM/kg.

b) Gamdoottang Ex., Benzo(a)pyrene, Vit. E and BHT were administered P.O. for 5 days before sensitization.

c) Each value is mean±S.E.

d) Significantly different from control.

*($P < 0.05$), **($P < 0.01$), ***($P < 0.001$)

결 론

감두팅은 예로부터 민간에서 유독물질의 해독제로 사용되어 왔다. 이에 감두팅 액스를 이용하여 지질과산화에 미치는 효과를 검토하고자 in vitro와 in vivo에서 지질과산화 억제작용을 연구한 결과 in vivo에서는 1000mg/kg을 투여한 군에서 유의성 있는 억제작용을 보여주었고 in vitro에서는 감두팅 액스 농도 증가에 따른 의존성을 보이지 않고 일정한 농도 이상에서 급격하게 증가하였다.

참 고 문 헌

- 육창수 : 현대방약합편, 계축문화사 p. 132(1976).
- 김학등, 임국환 : Preventive efficacy of gam doo extract against dichloro intoxication in mouse. Kor. J. Env. Health. Soci., 15(2) : 75 (1989).
- 박호제 : 부자독소에 의한 조직변화와 감두팅 및 황련 해독팅의 중화에 관한 연구, 원광대학교 대학원 학위

- 논문집(1985).
4. B. Demple and J.D. Levin: Repair systems for radical-damaged DNA Oxidative stress: Oxidant and antioxidants. Academic press LTD. London San-diego New York, p. 156 (1991).
 5. G. Minotti and S.D. Aust: The requirement for iron in the initiation of lipid peroxidation by iron (II) and hydrogen peroxide, *J. Biol. Chem.* 262 : 1098 (1987).
 6. Jaime Miquel Alexandre T, Quintanilha Hans Weber: Handbook of free radicals and antioxidants in biomedicine p. 120, 192 (1989).
 7. A. Borgen, H. Davey, N. Castagnoli, T.T. Crocker, R.E. Rasmussen and I.Y. Wang: Metabolic conversion of Benzo (a)pyrene by syrian hamster liver microsome and binding of metabolites to deoxy ribonucleic acid. *J. Med. Chem.* 16 : 502 (1973).
 8. K. Snell and B. Mullok: Biochemical toxicology a practical approach IRL Press, p. 127 (1987).
 9. 한석규: 지질과산화에서 철의 역할. *파루마콘* 21 : 126(1991).
 10. J. Glavind: Studies on the role of lipoperoxide in human pathology II *Acta. Pathol. Microb. Scand.* 30 : 1 (1952).
 11. 강승호: 지질대사와 동맥경화증, *최신의학.* 3 : 9 (1960).
 12. 左背祐浩: 당뇨병과 과산화지질, *최신의학.* 33 : 715(1978).
 13. B. Chance, H. Sies, A. Boveris: Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.* 59 : 527 (1979).
 14. Byung Hoon Han, Shi Yong Yoo, Myung Whan Park, Hye Jung Lee: Antioxidant activity screening on crude drugs, *Kor. J. Pharmacog.*, 10 : 108 (1979).
 15. 金田尚志: 과산화지질 실험법, *의치약출판주식회사*, p. 85(1990).
 16. J.M. Braughler, L.A. Duncan and R.L. Chase: The involvement of iron in lipid peroxidation, *J. Biol. Chem.* 261 : 10282 (1986).