J. Fd Hyg. Safety
Vol. 26, No. 2, pp. 107~113 (2011)

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

차전초 추출물을 투여한 랫드에서의 Fe-NTA 유발 산화스트레스에 대한 신장보호 효과

홍충의 · 홍승택 · 구윤창 · 양성용 · 이지영 · 이얀회이 · 하영민 · 이광원*
고려대학교 생명과학대학 식품공학부

Protective Effect of *Plantago asiatica* L. Extract Against Ferric Nitrilotriacetate (Fe-NTA) Induced Renal Oxidative Stress in Wistar Rats

Chung-Oui Hong, Seung-Teak Hong, Yun-Chang Koo, Sung-Yong Yang, Ji-Young Lee, Yanhouy Lee, Young-Min Ha, and Kwang-Won Lee*
Division of Food Bioscience & Technology, College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University
(Received March 23, 2011/Revised April 13, 2011/Accepted April 28, 2011)

ABSTRACT - *Plantago asiatica* L. (PA), which is widely distributed in Korea, Japan and China, has traditionally been used as a popular folk medicine for the treatment of liver diseases. A variety of activities of PA was reported, that is hepatoprotective, anti-inflammatory, anti-glycation and anti-oxidant effect. Ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) is a potent nephrotoxic agent and has been reported to induce renal proximal tubular necrosis. In the present study, pre-treatment with PA extract (PAE) in Wistar rat followed by Fe-NTA i.p. treatment (13.5 mg Fe/kg body weight) was performed to detect the renal protective effect of PAE. Only Fe-NTA treated group showed increases in the level of serum blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine (Cr), and renal tissue malondialdehyde (MDA), product of lipid peroxidation. Moreover, the level of biomarkers indicate the antioxidants status, reduced glutathione (GSH), glutathione-S-transferase (GST) and glutathione reductase (GR) were decreased. However, PAE pre-treated group showed decreases in the levels of serum BUN, serum Cr and renal tissue MDA in concentration dependent manner and increases in the level of GSH, GST and GR. These results are significantly different ($p < 0.05$) to the other groups. Our data suggest that PAE may be used as an chemopreventive material against Fe-NTA-mediated renal oxidative stress.

Key words: *Plantago asiatica*, kidney, Ferric-nitrilotriacetate, oxidative stress, protective effect

현대사회는 환경이나 식습관, 또는 생활방식에 의해 여러 종류의 산화스트레스에 노출되어 있다. 이러한 산화스트레스는 환경에서 유출되는 많은 종류의 공해물질, 지방성분이 많거나 과도한 조리 조건에 의해 생성되는 식품 조리 부산물들, 그리고 사회생활을 통한 정신적 스트레스들에 의해서 발생한다. 산화스트레스에 의해 생체내에서 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 또는 자유라디컬(free radical)이라고 불리는 반응성이 큰 물질들이 과도하게 생성되고, 이렇게 생성된 ROS는 독성, 즉 산화적 손상(oxidative stress)을 야기하게 된다. ROS는 단백질이나 DNA 손상을 유발하여 산화적 세포손상을 초래하고[1], 그로 인해 파킨슨병[2], 알츠하이머병[3], 2형 당뇨병[4] 등을 유발한다. 또한 Hata 등[5]은 식품 소비를 통해 체내 철 이온의 농도가 증가하고, 증가된 철 이온은 Fenton reaction을 통해 ROS를 생성한다고 보고하였으며, Kubo[6]는 ROS가 신장질환의 병리학적 과정에 중요한 역할을 한다고 보고 하였다. Ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA)는 철 이온과 NTA의 복합체로 NTA는 산업체에서 킬레이트 화합물로 사용하거나 희토류금속을 분리할 때 등 많은 분야에서 쓰이고 있으며, 병원 또는 일반 가정에서 사용하는 세제 속에 많이 포함되어 상수도 오염의 주범이 된다[7]. 이런 NTA는 물에 잘 녹을 뿐 아니라 중성의 pH에서 여러 금속이온들과 반응하여 다양한 복합체를 형성한다. 특히 철 복합체인 Fe-NTA는 신장독성 물질로서 마우스와 랫드에서 복강 주사시 선암의 특징을 갖는 근위세뇨관의 급성 또는 아급성 괴사가 유발되는 보고 등, 신장관련 질병과 연관이 되어있다는 많은 보고들이 나오고 있다[8,9].

차전초(*Plantago asiatica*)는 차전초과에 속하는 다년생

*Correspondence to: Kwang-Won Lee, Division of Food Bioscience & Technology, College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, 1, 5-ga, Anam-dong, Sungbuk-gu, Seoul 136-701, Korea
E-mail: kwangwon@korea.ac.kr

식물로 한국이나 중국, 일본 등지에 자생하며 오래전부터 민간요법으로 많이 이용되어 왔다. 차전초는 간보호, 항염증[10], 항산화 활성[11,12]이 보고되었으며, 차전초부터 분리된 plantamajoside의 항산화와 항글라이케이션 효과에 대해서도 본 연구진에 의해서 보고되었다[12]. 차전초에서 분리된 활성물질로는 plantamajoside[12,13], phenylethanoids[14], plantaginin[15], acetoside, flavonoid[16] 등이 있으며, 차전초의 안전성은 본 연구진이 단회와 14일, 90일 반복투여 독성시험을 통한 일반독성과 복귀돌연변이 및 염색체 이상시험을 통한 유전독성 평가를 실시하여 안전성을 확인하였다[17~19].

차전초는 현대 한방에서도 꾸준히 이용이 되며 오래전부터 각종 민간요법 등으로 이용이 되어왔고, 안전성이 확인되어 있음에도 아직 기능성에 대한 연구는 많이 미흡한 실정이다. 이에 본 연구진은 항산화 효과가 뛰어난 차전초 추출물을 랫드에 투여하고 Fe-NTA로 산화스트레스를 유발하였을 때 차전초 추출물이 신장 기능에 미치는 보호효과를 규명하여 차전초 추출물의 기능성 소재 가능성을 연구하였다.

재료 및 방법

시험물질

다 자란 차전초 잎은 충청북도 제천산을 (주) 약초장터를 통하여 구매하였으며, 1차 동결건조된 차전초 잎을 분쇄하여 주정에탄올에서 3시간 동안 3반복 환류 냉각 추출과 원심분리(7000 rpm, 15 min, 4ºC) 한 후, 재차 상등액을 whatman No. 42로 여과하였다. 여과된 상등액을 추출용매를 완전히 제거하기 위해 감압증류한 다음 동결건조를 하여 주정에탄올 추출물 분말을 얻었다. 차전초 잎의 주정에탄올 추출물은 차광 상태로 −70ºC 냉동 보관하여 사용하였으며, 각 투여군의 농도에 따라 멸균 정제수에 현탁하여 사용하였다.

시험 동물 및 사육환경

본 시험에서는 (주) 샘타코로부터 구입한 7~8 주령의 Wistar rat을 사용하였다. 1주일간의 검역 및 순화를 거친 뒤 건강하다고 판정된 것 중 체중이 260 ± 5 g의 것을 시험에 사용하였다. 실험동물은 온도 23 ± 3ºC, 상대습도 50 ± 10%, 환기회수 10~20 회/hr, 조명 시간 12시간(08:00 점등~20:00 소등), 조도 150~300 Lux로 설정된 환경에서 랫드 사육상자(225 W × 200 L × 180 H mm) 당 1마리를 사육하였다. 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다.

Ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA) 용액의 준비

Fe-NTA 용액은 Khan and Sultana[9] 방법을 이용, 신선하게 준비하여 시험에 즉시 사용하였다. Ferric nitrate (0.24 mmol/kg body weight (b.w.)) 용액은 농도가 4배 높은 NTA (0.96 mmole/kg b.w.) 용액과 혼합 후 sodium bicarbonate로 pH를 7.4로 보정하여 사용하였다.

실험그룹과 투여물질

실험 그룹은 아무것도 처리하지 않은 대조군 그룹, 오직 산화스트레스만 유발한 음성대조군인 Fe-NTA 그룹, 차전초 추출물을 농도별(1, 2, 4 g/kg b.w.)로 투여 후 Fe-NTA를 처리한 3그룹으로, 총 5그룹으로 나누고 각 그룹의 랫드 배정은 무작위적으로 배정하였다. 차전초 주정에탄올 추출물은 임상적용경로를 따라 경구로 투여하였으며, 1일 1회 7일간 일정시간에 차전초 추출물 1, 2, 4 g/kg b.w.을 경구투여한 후, 마지막 7일째 되는 날 Fe-NTA (13.5 mg Fe/kg b.w.)를 복강 주사하여 급성 신장 독성을 유발하였다. 대조군은 Fe-NTA 대신 생리식염수를 복강 주사하였다. 복강 주사한지 18시간 후, CO_2로 마취시켜 혈액학적 분석을 위하여 복대정맥으로부터 채혈하였다. 신장 조직은 생화학적 분석을 위해서 액체 질소로 급속 냉동 후 −70ºC에 저장하였다. 채취한 혈액은 3000 rpm, 4ºC에서 15분간 원심 분리하여 혈청과 분리하고 장기와 혈액시료는 분석 전까지 −70ºC에 보관하였다.

혈청생화학적 수치 검사

혈액 샘플을 진공 채혈관에 수거한 후 원심분리하여 혈장만을 모아 혈액학적 수치를 측정하였다. 혈액학적 수치는 Bayer (USA)사의 blood urea nitrogen (BUN) reagent kit와 creatinine (Cr) reagent kit를 ADVIA (Japan) 분석기를 사용하여 측정하였다.

지질과산화물 (Thiobarbituric acid reactive substance, TBARs) 평가

균질기를 이용하여 신장 조직을 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4, 1.17% KCl)에서 잘 마쇄 한 다음, 그 상등액에 trichloroacetic acid (TCA) buffer (0.25 N HCl, 15% trichloroacetic acid, 0.375% thiobarbituric acid, 0.01% butyl hydroxytoluene) 0.5 ml을 첨가하여 잘 혼합한 후 95ºC 수조에서 30분 동안 끓인 후 상온으로 식혔다. 원심분리(1000 rpm, 10 min) 후 상층액을 분광광도계를 이용하여 535 nm에서 측정하였다. TBARs는 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP)의 산에 의한 가수분해로 얻어진 malondialdehyde (MDA) equivalent의 표준곡선을 작성한 다음, 이에 의거한 측정치를 MDA 농도(μmol/g protein)로 표기하였다.

Reduced glutathion (GSH) 평가

TBARs와 같은 조직분쇄 상등액에 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4)을 더한 후 100 mM 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB)를 잘 혼합하고 5분후에 분광광도계를 이용하여 412 nm에서 측정하였다. 이때 상등액 대신 GSH 표

준품을 농도별로 측정하여 얻어낸 검량곡선을 이용하여 샘플의 GSH 함량을 측정하였다

Glutathione-S-transferase (GST) 평가

GST 시험액은 GSH 시험액에 사용한 동일한 상등액에 0.1 M PB (pH 6.5)와 1 M GSH, 1 M 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB)를 혼합 후 분광광도계를 이용하여 340 nm에서 5분 동안 측정하였다.

Glutathione reductase (GR) 평가

GR 시험액은 GSH에 사용한 상등액에 0.1 M PB (pH 7.4)에 5 mM EDTA, 10 mM oxidized GSH (GSSG), 1 mM β-NADPH, 1% BSA를 혼합 후 5분 동안 분광광도계를 이용하여 340 nm에서 측정한다.

통계처리

모든 실험 결과는 평균 ± 표준편차로 나타내었으며 SigmaStat (Systat Software Inc., Point Richmond, CA, USA)을 사용하여 t-test와 one-way ANOVA로 유의차 검정을 실시하여 $p < 0.05$ 이상의 경우에만 그룹 간 유의차가 있는 것으로 인정하였다.

결과 및 고찰

혈청생화학적 수치 검사

혈청 중 BUN과 Cr은 신장 대사에 의해 조절되는 항목들로 신장 독성으로 인한 신장세포의 괴사와 신장 조직의 파괴가 진행됨에 따라 BUN과 Cr이 혈중으로 유리되어 높은 농도를 나타내는 것으로 신장 손상의 지표로 사용되었다.

BUN과 Cr의 두 바이오 마커들은 신장이상의 결정적인 지표로 Table 1에서 보는 바와 같이 Fe-NTA 투여군(116.82 ± 5.20 mg/dL, 2.70 ± 0.20 mg/dL)은 대조군(18.54 ± 1.29 mg/dL, 0.52 ± 0.04 mg/dL)에 비해 6.3배 및 5.2배의 증가를 나타냈다. 이는 Fe-NTA가 유발한 산화스트레스에 의해 심각한 신장 손상을 입었다는 것을 직접적으로 나타내고 있으며, Fe-NTA에 의한 손상으로 신장의 기능이 저하되어 신장에서 제대로 대사 되어야 할 BUN과 Cr이 혈중으로 유리된 결과를 나타내었다. 반면에 차전초 추출물을 투여한 그룹은 1 g/kg b.w. 군에서 BUN 및 Cr의 활성이 각각 95.76 ± 7.89 mg/dL과 2.16 ± 0.34 mg/dL, 2 g/kg b.w. 군에서는 89.34 ± 26.93 mg/dL과 2.20 ± 0.51mg/dL, 4 g/kg b.w. 군에서는 39.54 ± 21.93 mg/dL과 1.16 ± 0.55 mg/dL으로 감소되는 결과를 보였다. Fe-NTA의 산화 스트레스에 의해 증가된 신장손상 지표인 BUN과 Cr이 차전초 추출물 투여로 감소하는 결과를 보임으로써 차전초 추출물이 신장 손상에 대해 보호 효과가 있는 것을 혈액학적 수준에서 관찰하였다. 또한 차전초 추출물의 농도를 높일수록 BUN과 Cr의 수치가 유의적으로($^{*}p < 0.05$) 감소하는 것으로 보아 차전초 추출물이 농도 의존적으로 신장손상을 억제시킴으로써 보호 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

이와 같은 BUN과 Cr의 결과는 같은 산화스트레스 방법을 적용하고 soy iosoflavone을 투여한 Khan and Sultana[9]의 결과에서도 똑같은 신장 보호 경향을 보였다.

Reduced glutathion (GSH) 평가

GSH는 glutathione sulfhydryl의 일반적인 명칭이며 글리신(glycine), 글루타민(glutamine), 시스테인(cystein) 세 가지 아미노산이 결합되어 만든 형태의 트리펩타이드(tripeptide)로 체내에서 자연적으로 생성된다[20]. GSH는 온몸의 세포에서 만들어지며 외부로부터 들어온 독성 물질이나 몸 안에서 생성되는 산화물질인 라디컬들을 인체 내에서 안정화시키거나 체외로 배출 시키는 작용을 하는 매우 중요한 항산화 물질 중 하나이다. 이 작용은 GSH가 관여하는 효소 시스템에 의해서 일어난다[21].

Fe-NTA만 처리한 그룹(59.45 ± 12.32 mmol GSH/g tissue)은 대조군 그룹(142.82 ± 16.51 mmol GSH/g tissue)에 비해 GSH가 58.4% 정도 감소하였으며, 이는 Fe-NTA에 의한 산화스트레스에 의해 항산화지표인 GSH가 많이 소실되어 있는 결과를 보이고 있다(Table 2). 하지만 차전초 추출물을 처리한 그룹에서는 농도 의존적으로 GSH 수치가 증가하고 있으며 2 g/kg b.w. 이상의 농도 투여군 부터는 유의적 차이($^{**}P < 0.01$)를 보이며 GSH 생성을 회복시키는 것을 나타

Table 1. Effects of pre-treatment with *Plantago asiatica* extract (PAE) on Fe-NTA-mediated accretion of renal serum blood urea nitrogen (BUN) and serum creatinine content in rat

Treatment groups	BUN (mg/dL)	Creatinine (mg/dL)
Saline (control)	$18.54 \pm 1.29^{b**}$	$0.52 \pm 0.04^{b**}$
Fe-NTA (13.5 mg Fe/kg body weight)	116.82 ± 5.20^{a}	2.70 ± 0.20^{a}
PAE (1 g/kg body weight) + Fe-NTA (13.5 mg Fe/kg body weight)	$95.76 \pm 7.89^{c**}$	$2.16 \pm 0.34^{c*}$
PAE (2 g/kg body weight) + Fe-NTA (13.5 mg Fe/kg body weight)	89.34 ± 26.93^{ac}	$2.20 \pm 0.51^{ac*}$
PAE (4 g/kg body weight) + Fe-NTA (13.5 mg Fe/kg body weight)	$39.54 \pm 21.93^{d**}$	$1.16 \pm 0.55^{d**}$

Values are expressed as mean ± SD (n = 5), $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ compared with rat treated with Fe-NTA alone.

Table 2. Effects of pre-treatment with *Plantago asiatica* extract (PAE) on Fe-NTA-mediated depletion of renal glutathione content and decrease in the activities of glutathione metabolizing enzymes, glutathione-S-transferase and glutathione reductase in rat

Treatment groups	Reduced glutathione (mmol GSH/g tissue)	Glutathione-S-transferase (Units/g tissue)	Glutathione reductase (Units/g tissue)
Saline (control)	$142.82 \pm 16.51^{b**}$	$124.69 \pm 13.07^{b**}$	$107.31 \pm 8.70^{b**}$
Fe-NTA (13.5 mg Fe/kg body weight)	59.45 ± 12.32^{a}	49.88 ± 4.55^{a}	56.70 ± 5.40^{a}
PAE (1 g/kg body weight) + Fe-NTA (13.5 mg Fe/kg body weight)	77.86 ± 12.62^{ac}	$66.59 \pm 5.01^{ad*}$	67.37 ± 8.66^{c}
PAE (2 g/kg body weight) + Fe-NTA (13.5 mg Fe/kg body weight)	$123.11 \pm 12.72^{b**}$	$83.25 \pm 8.38^{cd**}$	$80.34 \pm 6.06^{cd**}$
PAE (4 g/kg body weight) + Fe-NTA (13.5 mg Fe/kg body weight)	$147.97 \pm 26.27^{b**}$	$124.68 \pm 13.67^{b**}$	$98.67 \pm 10.11^{bd**}$

Values are expressed as mean ± SD (n=3), $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ compared with rat treated with Fe-NTA alone.

내고 있다. Table 2에서 보는 바와 같이 차전초 추출물 1, 2, 4 g/kg b.w. 투여한 그룹은 77.86 ± 12.62, 123.11 ± 12.72, 147.97 ± 26.27 mmol GSH/g tissue로 Fe-NTA 그룹에 비해 약 1.3배, 2.1배, 2.5배 증가한 것으로 나타나 GSH 생성을 월등히 증가시켜 Fe-NTA의 산화스트레스로 유발되는 GSH 감소에 의한 신장 손상에 대한 보호 효과가 있음을 확인할 수 있었다. 이는 차전초 추출물이 생체 내에서 항산화물질로 작용하는 GSH 함량을 증가시켜 산화스트레스에 대한 방어 효과를 나타내는 것으로 추정할 수 있다. Khan and Sultana[9]도 식물유래 물질을 투여 후 Fe-NTA로 산화스트레스를 유발 하였을 때 신장에서 GSH 함량을 측정한 결과 우리와 같은 증가 결과를 나타내 신장 보호효과를 증명한 바 있다. 또한 본 연구에서는 차전초 추출물 4 g/kg b.w. 투여 그룹은 아무것도 처리하지 않은 정상상태의 대조군 그룹과 유의적 차이를 나타내지 않으며 비슷한 GSH 함량을 나타내, 항산화 효과를 바탕으로 한 신장 보호 효과가 월등히 높음을 확인 할 수 있었다.

Glutathione-S-transferase (GST) 평가

GST는 사이토졸, 미토콘드리아, 마이크로좀 등의 세포기관 내에 존재하는 단백질 효소로 진핵과 원핵생물 모두에 있으며 발암성 또는 독성물질, 산화스트레스 유발물질, 약물 등 다양한 범주에서 이들을 안전한 형태로 변환 또는 억제하는 효소중의 하나로, 이들을 해독 또는 제거하는데 중요한 역할을 하는 효소이다. 특히 GST는 -SH를 이용한 GSH 결합을 촉매하는 효소로 생체내에서 유용한 작용을 한다.

Khan and Sultana[9]은 Fe-NTA에 의한 산화스트레스에 의해 GST가 감소하는 것을 보였으며, 이에 isoflavone을 투여하였을 시 다시 회복이 되는 결과를 보였다. 본 연구에서도 랫드의 신장에서 Fe-NTA에 의해 GST가 대조군(124.69 ± 13.07 Units/g tissue)에 비해 60% 감소(49.88 ± 4.55 Units/g tissue)한 결과를 보였다. 그러나 여기에 차전초 추출물을 1, 2, 4 g/kg b.w. 투여한 그룹에서는 각각 66.59 ± 5.01, 83.25 ± 8.38, 124.68 ± 13.67 Units/g tissue로 Fe-NTA 그룹과 유의적 차이($^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$)를 보이며 증가한 양상을 보였다. 차전초 추출물은 우리 몸에서 항산화 작용과 외부로부터 유입된 독성물질을 제거하는데 관여하는 phase II 효소인 GST를 증진시켜 Fe-NTA에 의해 유발되는 산화스트레스를 억제하여 주는 결과를 보였다(Table 2). 이는 GSH 측정실험의 결과와 같은 경향으로 차전초 추출물은 생체에서 생성되는 항산화 물질을 증진시키거나 항산화 작용과 직접적으로 연결되는 효소를 활성화시켜 산화스트레스에 대한 보호 효과를 보인다. 특히 Fe-NTA로 유발된 산화스트레스에 의해 신장의 기능이 저하되지만, 차전초 추출물이 GST 활성을 증진시켜 신장 기능을 회복시킴은 물론 4 g/kg b.w.의 투여군은 정상 상태로 회복 시켰다.

Glutathione reductase (GR) 평가

GR은 생체내 여러 조직에 분포하고 있으며, oxidized glutathione (GSSG)을 GSH로 환원시키는 작용을 촉매하는 효소이다. GSH는 peroxide를 제거하는 작용을 하는 glutathione peroxidase와 조직으로부터 외인성 물질의 결합과 제거 작용을 하는 GST의 기질로 쓰인다[21]. 이처럼 GR은 우리 몸에서 중요한 항산화 물질로 작용하는 GSH의 생산에 관여하며, 직접적으로 유리라디컬 또는 조직내 peroxide와 반응하여 제거하는 생체 내에서 중요한 항산화 효소이다.

Fe-NTA에 의해 신장에 산화스트레스가 유발된 그룹은 56.70 ± 5.40 Units/g tissue로 아무것도 처리하지 않은 대조군(107.31 ± 8.70 Units/g tissue)에 비해 GR 수치가 47.2%가 감소하여 Fe-NTA에 의한 신장에서의 산화적 손상이 관찰되었다. 그러나 Table 2에서 보는 바와 같이 차전초 추출물의 농도를 달리하여(1, 2, 4 g/kg b.w.) 투여한 각각의 그룹에서는 67.37 ± 8.66, 80.34 ± 6.06, 98.67 ± 10.11 Units/g tissue로 GR의 수준이 농도 의존적으로 회복이 되어 Fe-NTA에 의한 산화적 손상이 차전초 추출물의 투여에 의해 억제 되는 것을 확인 하였다. 더구나 4 g/kg b.w.의 차전초 추출물 투

여군에서는 대조군과 유의적 차이를 보이지 않으며 비슷한 수준을 보이는 것을 보아 높은 농도로 차전초 추출물을 투여할수록 산화적 손상을 대부분 막아주는 것으로 보인다.

Fe-NTA에 의한 신장의 산화적 손상으로부터 차전초 추출물이 GR의 수준을 회복시킴으로서 신장기능 보호 효과를 보임과 동시에 회복된 GR의 수준은 이에 영향을 받는 GSH의 수준을 회복시키고, 회복된 GSH는 역시 GST의 수준을 회복시키는 것을 관찰하였다. 이러한 결과들을 통해서 차전초 추출물이 생체내에서 산화적 스트레스에 의한 손상을 억제하는 기작은 항산화 바이오 마커들(GSH, GST, GR 등)을 대조군 수준으로 회복시킴으로써 나타난다는 것을 알 수 있었다. 위 결과를 통해 차전초 추출물 처리군이 Fe-NTA군에 비해 신장에서 산화적 스트레스를 억제해 주었음을 보여주었고, 신장의 직접적인 작용에 의해 나타나는 BUN과 Cr의 수치가 대조군 수준으로 회복된 결과를 통해 신장기능이 회복되었다는 것을 검증하여 차전초 추출물이 신장기능 보호 효과를 나타낸다는 것을 밝혔다.

지질과산화물 (Thiobarbituric acid reactive substance, TBARS) 평가

이 시험은 조직 손상 정도와 관련된 것으로, 조직 내 ROS가 발생하면 인지질 막에 다량 함유되어 있는 불포화지방산 수소원자를 제거하여 지질과산화(lipid peroxidation)의 연쇄반응이 유발되고, 최종적으로 MDA 등의 aldehyde를 생성한다. 이렇게 생성된 지질과산화물은 세포막의 투과성을 증가시키고 체액의 손실 및 단백질 변화를 유발하여 암이나 동맥경화, 고혈압 등의 각종 질병을 일으킬 수 있다.

Fe-NTA는 iron-induced oxidative stress로 인해 신장독성에 관여되어 있다고 보고되는 물질로 시험 결과 Fe-NTA만 처리한, 즉 산화스트레스만 유발한 그룹은 215.70 ± 49.73 μmol/g tissue로 대조군 그룹의 46.20 ± 10.65 μmol/g tissue보다 지질과산화를 많이 일으켜 4.7배 많은 MDA를 생성하였지만, 차전초 추출물을 투여한 그룹에서는 농도 의존적으로 MDA의 생성이 감소하는 경향을 보이며 2 g/kg 이상의 농도 투여군 부터는 Fe-NTA군과 유의적 차이($^*P < 0.05$)를 보이며 MDA 생성을 감소시킨 것을 나타내고 있다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 차전초 추출물을 1, 2, 4 g/kg 투여한 그룹은 MDA의 생성량이 141.74 ± 10.79, 116.11 ± 9.19, 86.52 ± 22.30 μmol/g tissue로 Fe-NTA군에 비해 약 34.3%, 46.2%, 59.9% 감소한 것으로 나타나 MDA 생성을 월등히 줄여줌으로써 Fe-NTA의 산화스트레스로 유발되는 지질과산화물에 대한 신장보호 효과가 있음을 확인할 수 있다.

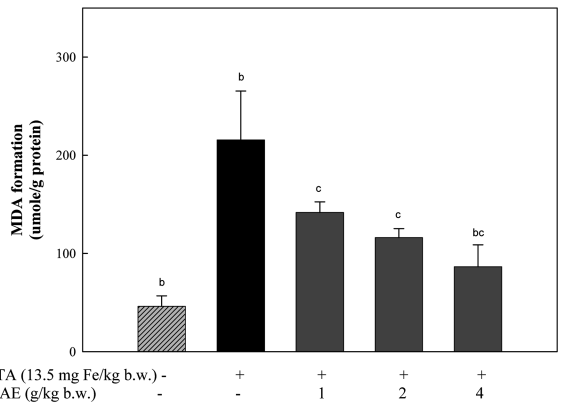

Fig. 1. Effects of pre-treatment with *Plantago asiatica* extract (PAE) on Fe-NTA-mediated accretion of renal malondialdehyde in rat. Values are expressed as mean ± SD (n = 3), Significant difference is $P < 0.01$.

본 실험을 통해 신장에서 Fe-NTA에 의한 산화스트레스로 지질과산화물의 생성이 급격히 증가하지만 차전초 추출물 투여로 지질과산화물의 생성을 유의적으로 줄여줌으로써 지질과산화물 생성 억제에 의한 신장 보호효과를 증명하였으며, 이는 앞선 항산화물질이나 항산화 효소 등의 바이오 마커들과 연관되어 차전초 추출물의 항산화 효과를 바탕으로 한 신장보호 효과가 있음을 확인할 수 있다.

요 약

현대사회는 생활습관, 공해, 오염, 독성물질 등 여러 종류의 산화스트레스를 받는 환경에 노출되어 있으며, 이런 산화스트레스들은 인간에게 있어 여러 질병을 야기한다는 많은 증거들이 나오고 있다. Ferric Nitrilotriacetate (Fe-NTA)는 iron-induced oxidative stress로 인해 신장독성에 관여되어 있다고 보고된 물질이다. 이에 본 연구진은 랫드에 항산화 효과가 있는 차전초(*Plantago asiatica*) 추출물을 투여하고 Fe-NTA를 복강 주사하여 신장에서 iron-induced oxidative stress를 유발한 후, 산화스트레스를 얼마나 억제하여 주는지를 혈액에서 신장기능 지표인 blood urea nitrogen (BUN)과 creatinine (Cr)을 측정하고, 신장조직에서는 항산화 바이오마커들인 reduced glutathione (GSH), glutathione-S-transferase (GST), glutathione reductase (GR) 및 지질과산화물(lipid peroxide)인 malondialdehyde (MDA)를 측정하였다.

신장기능 이상시 증가되는 BUN 및 Cr은 Fe-NTA에 의해 산화스트레스만 유발한 그룹에서는 116.82 ± 5.20 mg/dL과 2.70 ± 0.20 mg/dL로 아무것도 처리하지 않은 대조군의 18.54 ± 1.29 mg/dL, 0.52 ± 0.04 mg/dL에 비해 약 6.3배 및 5.2배의 증가를 나타냈다. 반면 차전초를 투여한 1 g/kg b.w. 군에서 BUN 및 Cr의 활성이 각각 95.76 ± 7.89 mg/dL과 2.16 ± 0.34 mg/dL, 2 g/kg b.w. 군에서는 89.34 ± 26.93 mg/dL과 2.20 ± 0.51mg/dL, 4 g/kg b.w. 군에서는 39.54 ± 21.93 mg/dL과 1.16 ± 0.55 mg/dL으로 농도 의존적으로 유의적($^*p < 0.05$) 차이를 보이며 감소하는 결과를 보였다. 항산화의 바이오마커로 작용하는 GSH, GST 및 GR은 Fe-NTA에 의해 산화스트레스만 유발한 그룹에서는 각각 59.45 ± 12.32 mmol GSH/g tissue, 49.88 ± 4.55 Units/g tissue, 56.70 ± 5.40 Units/

g tissue로 아무것도 처리하지 않은 정상그룹의 142.82 ± 16.51 mmol GSH/g tissue, 124.69 ± 13.07 Units/g tissue, 107.31 ± 8.70 Units/g tissue에 비해 58.4%, 60.0%, 47.2%로 현저하게 감소하였다. 반면 차전초 추출물을 1, 2, 4 g/kg b.w.으로 투여한 그룹에서의 GSH는 77.86 ± 12.62, 123.11 ± 12.72, 147.97 ± 26.27 mmol GSH/g tissue로 Fe-NTA만 처리한 그룹에 비해 약 1.3배, 2.1배, 2.5배 증가하였으며, GST는 66.59 ± 5.01, 83.25 ± 8.38, 124.68 ± 13.67 Units/g tissue로 1.3배, 1.7배, 2.5배 증가, GR은 67.37 ± 8.66, 80.34 ± 6.06, 98.67 ± 10.11 Units/g tissue로 1.2배, 1.4배, 1.7배 증가하였다. 산화스트레스로 유발되는 지질과산화물을 신장에서 측정 하였을 때 Fe-NTA에 의해 산화스트레스만 유발한 그룹은 215.70 ± 49.73 μmol/g tissue로 대조군 그룹의 46.20 ± 10.65 μmol/g tissue보다 지질과산화를 많이 일으켜 4.7배 많은 MDA를 생성한 것을 나타냈지만, 차전초 추출물 1, 2, 4 g/kg b.w. 투여한 그룹은 MDA의 생성량이 141.74 ± 10.79, 116.11 ± 9.19, 86.52 ± 22.30 μmol/g tissue로 약 34.3%, 46.2%, 59.9% 감소한 것을 확인하였다. 신장에서 iron-induced oxidative stress에 의해 독성을 유발하는 Fe-NTA를 처리하였을 시 신장손상 지표인 BUN과 Cr은 증가하고, 항산화 지표인 GSH와 GST, GR은 감소함과 동시에 지질과산화물인 MDA는 증가하였다. 그러나 차전초 추출물을 농도를 달리하여 투여한 후 Fe-NTA로 산화스트레스를 유발한 그룹은 농도 의존적으로 BUN과 Cr은 감소하고, 항산화 지표들은 증가함과 동시에 MDA는 감소하는 경향을 보였으며 Fe-NTA만 처리한 그룹과 유의적 차이를 보였다.

위 결과들을 종합하면 Fe-NTA는 산화스트레스에 의해 신장에 심각한 손상을 줄 수 있으며, 차전초 추출물은 항산화 효과를 바탕으로 하여 Fe-NTA에 의한 신장 손상에 대한 보호 또는 개선 효과가 있음을 확인 하였다.

감사의 말

본 연구는 농림수산식품기획평가원 (과제번호:109140-03-SB010)의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Fridovich, I.: Biological effect of the superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.*, **247**, 1-15 (1986).
2. Farooqui, T. and Farooqui, A.A.: Lipid-mediated oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Parkinson Dis.*, in process (2011).
3. Jomova, K., Vondrakova, D., Lawson, M. and Valko M.: Metals, oxidative stress and neurodegenerative disorders. *Cell Biochem.*, **345**, 91-104 (2010).
4. Garcia-Bailo, B., El-Sohemy, A., Haddad, P.S., Arora, P., Benzaied, F., Karmali, M. and Badawi, A.: Vitamins D, C, and E in the prevention of type 2 diabetes mellitus: modulation of inflammation and oxidative stress. *Biologics*, **5**, 7-19 (2011).
5. Hata, Y., Kawabe, T., Hiraishi, H., Ota, S., Terano, A. and Ivey, K.J.: Hydrogen peroxide-mediated cytotoxicity to cultured colonic epithelial cells. *Life Sciences* **60**, 2221-2230 (1997).
6. Kubo, K., Saito, T., Tadocoro, T. and Maekawa, A.: Changes in susceptibility of tissue to lipid peroxidation after ingestion of various levels of docosahexanoic acid and vitamin E. *Br. J. Nutr.*, **78**, 655-669 (1997).
7. Anderson, R.L., Bishop, W.E. and Campbell, R.L.: A review of the environmental and mammalian toxicology of nitrilotriacetic acid. *Crit. Rev. Toxicol.,* **15**, 1-102 (1985).
8. Kawabata, T., Ma, Y., Yamador, I. and Okada, S.: Iron-induced apoptosis in mouse renal proximal tubules after an injection of a renal carcinogen, iron-nitrilotriacetate. *Carcinogenesis*, **18**, 1389-1394 (1997).
9. Khan, N. and Sultana, S.: Induced of renal oxidative stress and cell proliferation response by ferric nitrilotriacetate (Fe-NTA): diminution by soy isoflavones. *Chemico-Biological Interactions*, **149**, 23-35 (2004).
10. Turel, I., Ozebek, H., Erten, R., Oner, A.C., Cengiz, N. and Yilmaz, O.: Hepatoprotective and anti-inflammatory of *Plantago major* L. *Indian J. Pharma.*, **41**(3), 120-124 (2009).
11. Yin, J.N., Nie, S.P., Zhou, C. and Xie MY.: Chemical characteristics and antioxidant activities of polysaccharide purified from the seed of plantago asiatica L. *J. Sci. Food Agric.*, **90**(2), 210-217. (2010).
12. Choi, S.Y., Jung, S.H., Lee, H.S., Park, K.W., Yun, B.S. and Lee, K.W.: Glycation inhibitory activity and the identification of an active compound in *Plantago asiatica* extract. *Phytother. Res.*, **22**, 323-329 (2008).
13. Komoda, Y., Chujo, H., Ishihara, S. and Uchida, M.: HPLC quantitative analysis of plantaginin in Shazenso(*Plantago asiatica* L.) extracts and isolation of plantamajoside. *Tokyo Ika Shika Daigaku Iuo Kizai Kenkuisho Hokoku*, **23**, 81-85 (1989).
14. Murai, M. Tamayama, Y. and Nishibe, S.: Phenylethanoids in the herb of *Plantago lanceolata* and inhibitory effect on arachidonic acid-induced mouse ear edema. *Planta Med.*, **61**, 479-480 (1995).
15. Aritomi, M.: Homoplantaginin, a new flavonoid glycoside in leaves of *plantago asiatica* L. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **15**, 432-434 (1967).
16. Nishibe, S.: The plant origins of herbal medicines and their quality evaluation. *Yakugaku Zasshi*, **122**, 363-379 (2002).
17. Park, B.G., Lee, H.S., Jung, S.H., Koo, Y.C., Hong, C.O., Lee, S.J. and Lee, K.W.: Single & 14-day repeated oral toxicity study and genotoxicological safety estimate of plantamajoside isolated from *Plantago asiatica*. *J. Toxicol. Pub. Health*, **23**(1), 79-86 (2007).
18. Park, B.G., Lee, H.S., Jung, S.H., Hong, C.O., Won, H.J., Park, H.Y., Ryu, R.S., Lee, S.J., Kim, K.H., Park, K.W. and Lee, K.W.: A 90 day repeated oral toxicity study on plantamajoside concentrate from *Plantago asiatica*. *Phytother.*

Res., **21**, 1118-1123 (2007).
19. Koo, Y.C., Jung, S.H., Yang, J.H., Ryu, Y.S., Kim, E.J. and Lee, K.W.: Cytogenetic investigation of chromosomal abrerrations in cells treated with plantamajoside from *Plantago asiatica*. *Phytother. Res.*, **23**, 1479-1481 (2009).
20. Akerboom, T.P. and Sies, H.: Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfide in biological samples. *Methods enzymolo.*, **77**, 373-382 (1981).
21. Dolphin, D., Poulson, R. and Avramovic, O.: (eds.), in glutathione: Chemicals, Biochemical and Metabolic Aspects, Vols. A and B, *J. Wiley and Sons*.