천연색소 Brazilin 및 Hematoxylin 의 항지질 과산화활성에 관한 연구(I)

문창규* · 하배진** · 이수환* · 목명수*

*서울대학교 약학대학 **부산여자대학 식품영양학과

A Study on the Antilipidperoxidative Effects of Brazilin and Hematoxylin(I)

Chang-Kiu Moon*, Bae-Jin Ha, Soo-Hwan Lee* and Myung-Soo Mock***

** College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151, Korea*

*** Department of Food and Nutrition, Pusan Women's College, Pusan, 608 Korea*

ABSTRACT-The antilipidperoxidative effects of Brazilin and Hematoxylin were investigated at the levels of liver-total homogenates, -microsomal fraction, -mitochondrial fraction and the sera of SD-rats intoxicated with CCl_4 and ethanol. Both natural dyes markedly inhibited the lipidperoxidation induced by CCl_4 and ethanol. Brazilin and Hematoxylin showed the inhibitory effects on the both enzymatic (NADPH-dependent) and nonenzymatic (Ascorbate-induced) lipidperoxidation pathways, but it is supposed that the antilipidperoxidative powers of them mainly result from the inhibition of the nonenzymatic lipidperoxidation.

Keywords □ Antilipidperoxidative effects, Brazilin, Hematoxylin, Enzymatic, Nonenzymatic

생체내에서 형성되는 과산화 지질은 각종 효소나 lipoprotein을 변성시키고 세포막을 파괴하여 급성 조직 장애를 일으키거나 lipofuscin으로 축적되어 세포노화를 유도하며 혈소판에서의 Thromboxane A_2 생성을 촉진하여 혈소판 응집과 혈관 폐색을 유발하는 등[1-3] 많은 병태반응들을 일으키는 것으로 알려져 있다. 따라서 이와 같은 지질과산화에 의한 장애들을 예방 치료할 수 있는 물질을 탐색하는 것은 매우 의의 있는 일이라 할 수 있으며 그 시도의 일환으로 식용색소 등의 첨가물[4]로도 사용되어온 천연색소 Brazilin과 그 유도체 Hematoxylin이 그 구조적 특성으로 보아 효과적인 지질과산화 억제활성을 나타낼 것으로 추정하고 본 실험에 착수하였다. Brazilin과 Hematoxylin은 건조지방에 대한 항산화 활성[5], 自發性 고혈압 쥐에서의 지질대사개선[6], 간독성 보호작용[7] 및 혈소판 응집능 억제작용[8] 등 생체내 지질과산화 현상과 밀접한 상관성을 가지고 있을 것으로 사료되는 일련의 생리활성이 확인된 바 있으나, 이들의 지질과산화 억제활성을 세포하 수준에서 검토한 연구는 아직 보고된 바 없다. 본 실험에서는 CCl_4와 Ethanol을 지질과산화 유도제로 선택하여, 그에 대한 억제활성을 肝-homogenate, 肝-mitochondria, 肝-microsome 및 plasma 수준에서 확인하고, 그 억제기전을 검토하였기에, 이에 그 결과를 보고하고자 한다.

Received for publication 5 March; 1987
Reprint requests; Dr. C.K. Moon at the above address

재료 및 방법

실험동물—서울대학교 실험동물 사육장에서 180g 전후의 웅성 SD rat를 공급받아 최소한 2 주간 적응시키고 실험에 사용하였다. 사육장의 조명은 명암을 각각 12시간으로 하여 조절하였으며 온도는 22±2℃, 습도는 55±5%로 조절하였다. 사료는 소동물 고형사료(삼양유지공업주식회사)를 사용하였고 물은 수도수를 자유롭게 섭취하도록 하였다.

시 약—Brazilin은 Aldrich chemical company에서, Hematoxylin은 Sigma사에서, 2-Thiobarbituric acid, CCl_4, Ethanol, Ascorbic acid는 Merck사에서, 그리고 NADPH와 1, 1, 3, 3, -tetraethoxy propane은 Wako pure chem.에서 구입하였으며 기타의 시약은 1 급 이상의 것을 사용하였다.

지질과산화의 유도와 시료의 투여—Brazilin과 Hematoxylin은 생리식염수에 현탁시켜 100 mg/kg에 해당하는 량을 2 일간 복강내 주사하였고 대조군, CCl_4 처리군 그리고 Ethanol 처리군에는 식염수를 복강내 투여하였다. 시료 투여후 3 시간 동안 사료공급을 중단한 뒤 50% Ethanol과 50% CCl_4 용액을 경구투여 하였다. 대조군에는 생리식염수를 투여하였다. 지질과산화 유도 12시간 후 간과 혈장을 분리하여 과산화지질을 측정하였다.

간 Homogenate, Microsome 분획, Mitochondria 분획 및 혈장시료의 조제—Ether로 마취시키고 간을 생리식염수로 perfusion한 후 적출하고 간 무게의 5 배 용량의 1/20 M phosphate buffer (pH 7.4)를 가하여 Homogenation하였다.

Mitochondria와 microsome 분획은 B.R. Rokesh 등[9]의 방법에 따라 조제하였으며 혈장시료는 Cardiac puncture로 채혈후 2 m*l*를 0.9% 생리식염수 1 m*l*에 섞고 3,000 rpm에서 원심분리하여 얻었다.

Microsome에서의 효소적 또는 비효소적 지질과산화의 유도—위의 방법과 동일하게 microsomal fraction을 얻었으며 J. Hogberg 등[10]의 방법을 변형하여 microsome의 지질과산화를 유도하였다. microsomal fraction에 0.4 mM NADPH를 가하여 효소적 지질과산화를 유도하였으며, 비효소적 지질과산화는 microsomal fraction을 수욕상에서 가열한 다음 0.4 mM Ascorbate를 가하여 유도하였다.

과산화지질의 측정—본 실험에서는 TBA 변법으로서 Masugi 등[11]의 가용화법으로 과산화지질량을 측정하였으며 혈장과산화지질 측정은 Yagi 방법[12]에 따라 행하였다. 표준품으로서는 Tetraethoxypropane을 사용하였다.

단백정량—Liver homogenate, mitochondria, microsome의 단백함량은 표준품으로서 Bovine serum albumin을 사용하여 Lowry 법[13]에 준하여 측정하였다.

통계분석—각 군 상호간의 상관성은 student's t -test에 의하여 통계적으로 분석하였다.

결과 및 고찰

CCl_4와 Ethanol에 의한 간 homogenate와 혈장의 과산화지질 생성에 미치는 Brazilin과 Hematoxylin의 영향—CCl_4와 ethanol에 의한 과산화지질 생성에 미치는 Brazilin와 Hematoxylin의 영향은 Table 1에 나타낸 바와 같다. CCl_4 처리군의 경우, Brazilin과 Hematoxylin은 간에서의 과산

Table 1. Inhibitory activities of Brazilin and Hematoxylin on the lipidperoxidation by CCl_4 and ethanol in liver and plasma of SD rats.

GROUP	MDA CONTENTS[a]	
	liver homogenate	blood plasma
Normal Control	0.841 ± 0.013	1.225 ± 0.287
CCl_4 Control	6.042 ± 0.170	2.414 ± 0.304
Brazilin-CCl_4	1.341 ± 0.084[b]	1.871 ± 0.189[b]
Hematoxylin-CCl_4	1.179 ± 0.154[b]	1.601 ± 0.202[b]
Ethanol Control	4.654 ± 0.416	2.171 ± 0.254
Brazilin-Ethanol	1.110 ± 0.182[c]	1.835 ± 0.161[c]
Hemtoxylin-Ethanol	0.845 ± 0.048[c]	1.411 ± 0.143[c]

a: mean±SD(nmol/mg protein in liver homogenate, nmol/m*l* plasma in plasma)
b,c: $p<0.01$ compared to CCl_4 and ethanol control, respectively, n=6 rat/group

화지질 생성을 각각 90% 및 94% 억제하였으며 plasma 중의 과산화지질 함량은 total liver homogenate 경우와는 상이한 내용으로 검출되고 있다. 우선 CCl_4 단독 처리군의 혈장 과산화지질량은 Control 군에 비해 약 2 배 정도로 liver homogenate의 7 배의 경우와 비견되며, Brazilin과 Hematoxylin 투여군의 경우도 예상밖으로 서로 그 차가 현저한 각각 37%와 68%가 감소된 과산화지질이 검출되고 있다.

혈장지질량은 CCl_4 처리에 의해 심한 간실질손상을 받았을때 정상수준보다 현저하게 감소하며 이는 간세포의 기능저하 때문에 합성된 중성지방이 혈중으로 잘 방출되지 않는데 그 원인이 있는 것으로 보고되고 있으나[14-15] 혈중 과산화지질치는 이같은 경우에도 상승하는 것으로 보고되어 있어 과산화지질과 일반지질의 성분의 거동은 상호간 정상관의 관계가 성립되지 않는다고 보고되어 있다.

본 실험의 결과에도 혈장 과산화지질치가 control 군에서 보다 CCl_4 투여군에서 더 높은 수치를 보이고 있어 기성문헌의 결과와 그 경향이 일치하고 있으며[16,17] CCl_4 처리군의 간장 과산화지질치가 대조군에 비해 약 7 배로 늘어난데 비해 혈장 과산화지질치는 2 배 정도에 그친것은 간장 과산화와 지질치가 혈장 과산화지질치와 정량적인 상관관계를 반영하고 있지 않다는 것을 입증하고 있다.

간 세포중에서 유사한 과산화지질 유도억제 효과를 나타내고 있는 Brazilin과 Hematoxylin이 혈장 과산화지질치에서는 현저한 차를 보이고 있는 점은 Brazilin과 Hematoxylin이 과산화지질 생성억제에서는 유사한 수준의 활성을 나타내고 있으나 Brazilin과 Hematoxylin 양자 모두가 간으로부터 혈액중으로의 지질의 방출을 촉진하는 활성에 차가 있거나 순환지질기질의 보호작용에 의한 지질과산화 억제효과에 차가 있거나 혹은 두가지 인자의 복합적인 작용에 의한 것으로 추정해 볼 수 있다.

Ethanol을 지질과산화 유도제로 사용할 경우도 CCl_4를 사용했을 경우와 유사한 경향으로 지질과산화 현상이 관찰되었다. SD-Rat에 ethanol 1.5 m*l*/100g만을 급성적으로 경구투여한 군에서는 정상대조군에 비해 약 5.5배 이상의 과산화지질이 검출되었으나 혈장 과산화지질의 경우는 ethanol 처리군에서 정상대조군보다 약 1.8배 정도 많은 과산화지질이 검출됨으로써 역시 간장 과산화지질과 혈장 과산화지질간에는 정량적인 상관관계가 성립되지 않고 있음을 재 확인해 주고있다.

Brazilin과 Hematoxylin은 ethanol에 의한 간장과산화지질 생성을 각각93%와 99.8%까지 억제하고 있는 것으로 관찰되었다.

또한 Brazilin과 Hematoxylin을 처리한 군의 혈액중에서는 57%와 20%의 과산화지질이 검출되었는데 이는 ethanol 투여시 발생하는 간세포로부터 혈액중으로의 지질성분의 방출억제가 hematoxylin과 Brazilin에 의해서 부분적으로 해소되어 이때 간장에 생성된 과산화지질이 일부 혈액중으로 방출되고 이와 같은 활성이 Hematoxylin에 비해 Brazilin이 현저히 강하기 때문이 아닌가 사료된다.

CCl_4와 Ethanol에 의한 간의 mitochondria와 microsome에서의 과산화지질 생성에 미치는 Brazilin과 Hematoxylin의 영향—세포소기관 수준에서의 항산화 활성을 탐색할 목적으로 특히 생체이물의 대사적 활성화 및 불활성화에 중요한 역할을 하는 microsome 분획과 물질 및 energy 대사의 중추가 되는 mitochondria 분획을 대상으로

Table 2. Inhibitory activities of Brazilin and Hematoxylin on the lipidperoxidation by CCl_4 and ethanol in the liver mitochondria and microsome of SD rats.

GROUP	MDA CONTENTS[a] (nmole/mg protein)	
	mitochondria	microsome
Normal Control	1.176 ± 0.061	1.404 ± 0.111
CCl_4 Control	4.307 ± 0.260	6.783 ± 0.335
Brazilin-CCl_4	2.179 ± 0.201[b]	3.270 ± 0.201[b]
Hematoxylin-CCl_4	1.745 ± 0.118[b]	2.451 ± 0.217[b]
Ethanol Control	2.903 ± 0.146	4.869 ± 0.224
Brazilin-Ethanol	1.624 ± 0.051[c]	2.421 ± 0.119[c]
Hemtoxylin-Ethanol	1.119 ± 0.129[c]	1.599 ± 0.136[c]

a: mean±SD
b,c: $p<0.01$ compared to CCl_4 and ethanol control, respectively, n=6 rat/group

지질과산화 억제효과를 검토한 결과는 Table 2와 같다.

mitochondria와 microsome 분획들의 경우 total homogenate의 경우에 비해 비교적 과산화 지질이 높이 검출되고 있는 것은 mitochondria와 microsome이 비교적 고도불포화 지방산을 많이 함유하고 있는 인지질의 함량이 풍부하기 때문으로 사료된다[18].

CCl_4에 의한 지질과산화 유도시 microsome 분획의 경우 CCl_4 군에서는 정상대조군보다 4.8배의 과산화지질이 검출되고 있으며 mitochondria 분획에서는 3.6배로써 CCl_4 처리군은 microsome 분획의 경우가 mitochondria 분획에 비해 과산화 지질 유도가 많은 것으로 나타나 있다.

이와 같은 사실은 두 분획중의 지질의 양과 질 뿐만이 아니라 microsome이 생체이물의 대사적 활성화에 관여하는 부위로 CCl_4로부터 free radical 생성이 initiation되는 곳이라는 점도 함께 고려될 수 있으리라고 사료된다. 과산화지질 유도 방지를 위해 Brazilin과 Hematoxylin을 투여했을 경우 mitochondria에서는 68%와 82% microsome의 경우는 65%와 81%로 유사한 수준의 지질과산화 억제효과를 나타내고 있다.

Ethanol 투여에 의한 과산화지질 생성 기전은 명확하지 않으나 ethanol이 acetaldehyde로의 산화과정에 생기는 극히 불안정한 ethoxy radical이 관여할 가능성이 있다고 보고된 바 있고 또한 ethanol을 급성적으로 투여하면 특히 hepatocyte중의 항산화제 함량이 현저히 저하된다고[19] 보고된 점 등을 감안할 때 ethanol 투여에 의한 지질과산화 현상은 생체에 항산화 활성 물질의 감소와 일부 불안정한 ethoxy radical에 의한 복합적인 작용에 의해 유도될 것으로 추정해 볼 수 있다. Ethanol 투여시 세포 소기관에서의 과산화 지질 생성을 검토한 결과 microsome 분획이 mitochondria보다 지질과산화 유도가 더 잘되는 것으로 관찰되었으며 이는 ethanol induced lipid peroxidation이 microsomal NADPH-linked -oxidation과 연계되어 있으리라고 발표된 내용과 관련이 있을 것으로 사료된다[20-21].

과산화지질 억제제로 투여한 Brazilin과 Hematoxylin은 mitochondria에서는 74%와 98%, microsome 분획에서는 70.6%와 94.3%의 억제효과를 나타내고 있어 Hematoxylin이 Braziiin보다 더 좋은 효과를 나타내고 있다.

Table 3. Inhibitory effects of Brazilin and Hematoxylin on the NADPH-mediated enzymatic and Ascorbate-mediated nonenzymatic lipidperoxidation of rat liver mitochondrial fraction *in vitro*.

GROUP	MDA CONTENTS IN THE LIVER MICROSOMAL FRACTION(nmole/mg protein)[a]
enzymatic reaction	
NADPH Control	2.005 ± 0.079
Brazilin-NADPH	0.229 ± 0.013[b]
Hematoxylin-NADPH	0.179 ± 0.013[b]
nonenzymatic reaction	
Ascorbate Control	3.011 ± 0.290
Brazilin-Ascorbate	0.731 ± 0.133[c]
Hematoxylin-Ascorbate	0.545 ± 0.066[c]

a: mean±SD
b,c: $p<0.01$ compared to control, n=10

이와 같은 차이는 Brazilin과 Hematoxylin의 항산화활성 이외의 다른 활성, 예컨대 membrane lipid 보호작용 등이 작용하고 있을 가능성을 제시해 주고 있다.

Microsome에서의 효소적, 비효소적 지질 과산화에 미치는 Brazilin과 Hematoxylin의 영향—간 microsome 분획을 이용하여 Brazilin 및 Hematoxylin이 효소적 지질과산화 반응인 NADPH 유도 지질과산화 반응에 미치는 영향을 검토한 결과 Table 3에서 보는 바와 같이 Brazilin의 경우 88.5%, Hematoxylin의 경우 91.0% 억제효과를 나타냄으로써 효소적 지질과산화 반응을 효과적으로 억제하고 있는 것으로 밝혀졌으며 Brazilin과 Hematoxylin이, 대사를 받지 않은 상태에서 지질과산화 현상에 어떤 영향을 미치는가를 알아보기 위해서, 즉 Brazilin과 Hematoxylin 자체의 항과산화 효과를 확인하기 위하여 열처리로 약물대사 효소가 불활성화된 microsome 분획중에서 ascorbate를 이용하여 지질과산화를 유도하였다.

이 실험에서도 Brazilin과 Hematoxylin은 각각 75.7%와 81.9%의 지질과산화 억제효과를 나

타냄으로써 이 두 물질은 효소적 및 비효소적 지질과산화 현상에 억제적으로 작용한다는 사실이 밝혀졌다.

NADPH와 ascorbate에 의해 유도되는 지질과산화 억제효과를 직접 비교할 때 두 system에서 약 10% 전후의 차가 생겨 Brazilin과 Hematoxylin의 지질과산화 억제효과는 주로 자체의 항산화력에 의하며, 물질대사효소계에 대한 영향도 일부 관여하는 것으로 추정된다.

국문 요약

생체내 부정적 영향을 미치는 물질로 알려진 과산화지질의 생성을 억제하는 물질로서 지질대사 개선작용, 간보호작용, 혈소판응집능 억제작용 등 생체내 지질과산화 현상과 밀접한 상관성을 가지고 있을 것으로 사료되는 일련의 생리활성이 확인되었으나 아직 항 과산화지질 활성이 검토 보고된 바 없는 Brazilin 및 그 hydroxy 유도체인 hematoxylin을 대상으로 생체내 지질과산화 유도제로 CCl_4와 ethanol을 사용하여 지질과산화 억제효능 및 *in vitro* 에서의 효소적, 비효소적 지질과산화에 대한 억제효능을 검토하였다.

Brazilin 및 hematoxylin이 CCl_4로 유도된 과산화지질의 억제효과를 보면 간 homogenate에서 각각 90%, 94%, mitochondria 분획에서 각각 68%, 82%, microsome 분획에서 각각 65%, 81%의 억제효과를 보였다. 이에 반해 혈장에서의 억제효과는 각각 37%, 68%로 간에서 보다 낮은 억제효과를 나타내었으나 이 두 물질은 간 뿐만 아니라 혈장에서도 과산화지질 억제효과가 유의성 있게 나타났다. Ethanol로 유도된 과산화지질의 억제효과를 보면 간 homogenate에서 각각 93%, 99.8%, mitochondria 분획에서 각각 74%, 98%, microsome 분획의 경우 각각 70%, 94%의 효과를 보였다. 이에 반해 혈장에서의 억제효과는 Brazilin 및 Hematoxylin이 각각 43%, 80%로 나타났다.

간조직중에서는 Brazilin과 Hematoxylin이 유사한 수준의 지질과산화 억제활성을 나타내고 있으나 혈장 과산화지질치는 현저한 차이를 나타내고 있어 Brazilin과 Hematoxylin은 간으로부터 혈액중으로의 지질의 방출에 상이한 정도로 영향을 미치거나 순환지질 기질의 보호에 의한 지질과산화 억제효과에 차가 있거나 혹은 두 가지 인자의 복합적인 작용에 의한 것으로 추정할 수 있다.

세포하수준에서의 항 지질과산화 활성을 알아보기 위해 실시한 간 misosome 및 mitochondria 분획에 대해 검토해 본 결과 양분획 모두에서 Hematoxylin이 Brazilin보다 강한 항산화 활성을 나타내었고 저지율은 양분획에서 유사한 수준이였다.

Brazilin 및 hematoxylin이 효소적 지질과산화 반응인 NADPH 유도 지질과산화 반응에 미치는 영향을 검토한 결과 Brazilin의 경우 88.5%, Hematoxylin의 경우 91.0% 억제효과를 나타내었고 비효소적 지질과산화 반응인 ascorbate 유도 지질과산화 반응에서도 Brazilin이 75.7%, Hematoxylin이 81.9%의 지질과산화 억제효과를 나타내었다.

위의 결과에서 지질과산화의 억제효과는 주로 자체의 항산화 작용에 의하나 microsome 약물대사활성에 의한 효소적 과산화 현상에도 억제작용이 있는 것으로 추정된다.

참고문헌

1. Tappel, A.L.: Lipid peroxidation damage to cell components. *Fed. Proc.* **32**, 1870(1973).
2. Roubal, W.T., and Tappel, A.L.: Damage to proteins, enzymes, and amino acids by peroxidizing lipids. *Arch. Biochem. Biophys.* **113**, 5(1966).
3. Wills, E.D.: Effects of lipid peroxidation on membrane-bound enzymes of the endoplasmic reticulum. *Biochem. J.* **123**, 983(1971).
4. Yuichiro, S, and Fimiko, O.: Stabilization of brazilin for food coloring. *Jpn. Tokyo. Koho.* **79**, 24415(1979).
5. Lea, C.: Experiment on the use of antioxidants in dry edible fats. *J. Soc. Chem. Ind.* **63**, 107(1944).
6. Moon, C.K., Kang, N.Y., and Chung, J.H.: Effect of brazilin on the plasma lipid levels in SHR rat. *Fett. Seifen. Anstrchmittel.* **87**, 74(1985).
7. Moon, C.K., and Ha, B.J.: Studies on the antilipidperoxidative effects of brazlin and hematoxylin. *Arch. Pharm. Res.* **7**, 63(1984).
8. Moon, C.K., and Whang, K.S.: Effects of brazilin and hematoxylin on the platelet

functions. unpublished.

9. Lokesh, B.R., Mathur, S.N., and Sector. A. A.: Effect of fatty acid saturation on NADPH -dependent lipid peroxidation in rat liver microsomes. *J. Lipid. Res.* **22**, 905(1981).
10. Hogberg, J., Gergstrand, A., and Jakobsson, S.V.: Lipid peroxidation of rat liver microsomes; its effect on the microsomal membrane and some membrane bound microsomal enzymes. *Eur. J. Biochem.* **37**, 51(1973).
11. Masugi, F., and Nakamura, T.: Measurement of thiobarbituric acid value in liver homogenate solubilized with sodium dodecyl sulfate and variation of the values affected by vitamin E and drugs. *Vitamin.* **51**, 21(1977).
12. Yagi, K.: Micro-determination of lipidperoxide in blood plasma and serum. *Vitamin.* **49**, 403(1975).
13. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275(1951).
14. Hoyumba, A.M.: Fatty liver; biochemical and chemical considerations. *Digest. Dis.* **20**, 1142(1975).
15. Lombardi, B.: Consideration on the pathogenesis of fatty liver. *Lab. Invest.* **15**, 1(1966).
16. Comporti, M.: Effect of carbon tetrachloride in microsome and mitochondria on lipidperoxidation of rat liver homogenates and subcellular fractions. *Enzymologia.* **29**, 185(1965).
17. Gallagher, C.H.: The effect of antioxidants on poisoning by carbon tetrachloride. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **40** 241(1962).
18. Jain, M.K. and Wagner, R.C.: Introduction to biological membranes. Wiley(1980).
19. Spencer, S., Elizabeth, J., and Lieber, C.S.: The effect of chronic alcohol feeding on lipidperoxidation in microsomes. Lack of relationship to hydroxyl radical generation. *Biochem. Biophysic. Res. Commun.* **118**, 133(1984).
20. Videla, L.A., Fernandez, J., Ugarte, G., and Valenzuela, A.: Effect of acute alcohol intoxication on the content of reduced GSH of the liver in relation to its lipidperoxidative capacity in the rat. *FEBS Letter.* **111**, 6(1980).
21. Di Lucio, N.R.: Pyrazole inhibition of ethanol, allyl alcohol, and aryl formate-induced hepatic injury. *J. Agric. Food.* **20**, 486(1972).