천연색소 Brazilin의 항지질 과산화 활성에 관한 연구(II)

문창규·하배진*
서울대학교 약학대학, *부산여자대학교 화학과

A Study on the Antilipidperoxidative Effects of Brazilin(II)

Chang-Kiu Moon and Bae-Jin Ha*
College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151, Korea
**Department of Chemistry, Pusan Women's College, Pusan 608, Korea*

ABSTRACT-A great deal of attention has been directed recently at the roles played by lipidperoxides in the mediation of pathogenesis and complications of various disease. In view of the strong inhibitory activity of Brazilin on the lipidperoxidation, we examined the effect of Brazilin on the lipidperoxidation in diabetic states. Brazilin inhibited the lipidperoxidation of liver mitochondrial and microsomal fraction in alloxan-induced diabetic ICR mice in the dose and time dependent manner. In the light of the present results, further elucidation of the inhibitory activities of Brazilin on the liver and blood plasma is warrented.

Keywords□Brazilin, Lipidperoxidation, Alloxan-induced diabetic mice

생체내에서 생성되는 과산화 지질은 각종 효소나 lipoprotein을 변성시키고 세포막을 파괴하여 급성조직 장애를 일으키거나 lipofusin으로 축적되어 세포노화를 유도하며 혈소판에서의 Thromboxane A_2 생성을 촉진하여 혈소판 응집과 혈관폐색을 일으키는 등 많은 병태반응을 일으키는 것으로 알려져 있다[1-3]. 실제, 임상적으로 동맥경화, 간질환, 당뇨병, 호흡기질환, 뇌혈관 장애 등의 성인병 환자에 있어서, 혈청과산화지질 농도가 정상인보다 높은 것으로 보고되어 있다[4-9]. 따라서, 이와 같은 지질과산화에 의한 장애들을 예방할 수 있는 물질의 탐색은 매우 의의 있는 일이라 할 수 있으며, 그 시도의 일환으로 본 연구자들은 식용색소로 사용되어온 천연색소 Brazilin의 과산화지질 활성 억제 및 그 기전에 관하여 이미 보고한 바 있다[10]. 본 연구에서는 천연색소 Brazilin의 실험적 당뇨병 상태하에서의 항지질과산화 활성에 대하여 검토하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

Received for publication 22 February, 1988
Reprint requests; Dr. C.K. Moon at the above address

재료 및 방법

실험동물－웅성 ICR mice(15-20g)를 서울대학교 동물사육장으로부터 공급받아 실험시작전 2주간 적응시킨 후 사용하였으며, 기타 사육조건은 전보와 동일하였다.

시약－Brazilin은 Aldrich Chem. Co.에서 2-Thiobarbituric acid는 Merck사에서 Alloxan 및 NADPH, 1, 1, 3, 3-tetraethoxypropane은 Sigma사에서 구입하였으며 기타의 시약은 1급 이상의 것을 사용하였다.

실험적 당뇨병의 유도－ICR mice(20-25g)를 24시간 절식시킨 후 식염수에 용해시킨 alloxan(185 mg/kg)을 mouse 10g당 0.1 m*l*씩 복강내로 주사하였다. 대조군에는 동량의 식염수를 같은 방법

으로 주사하였고 alloxan 용액은 사용직전에 조제하였다. alloxan 투여 48시간 후 혈당을 Glucose oxidase method로 측정하여 혈당치가 300-350 mg/dl되는 mice를 실험에 사용하였다.

시료의 투여—실험동물을 대조군, diabetes 대조군과 diabetic brazilin 처리군으로 구분하여 20일간 brazilin 10 mg/kg, 50 mg/kg과 100 mg/kg을 용량별로 투여하였고, brazilin 100 mg/kg을 5일간, 20일간과 30일간의 기간별로 투여하였다. 대조군에는 시험군의 투여 시료의 양과 동량의 식염수를 투여하였고 투여기간중 충분한 물과 사료를 공급하였다.

간의 Subcellular fraction의 분리—실험동물을 경추탈골시킨 후 개복하여 간을 신속히 적출하여 냉식염수로 세척후 약 2g을 정확히 평취하였다. 간무게의 10배 용량의 혼합용액(10 mM Tris, 0.21 M Mannitol, 0.07 M Sucrose, 0.1 mM EDTA)을 가하여 Homogenation한 다음 600g, 10분간 원심분리하여 얻은 침전을 mitochondrial fraction으로 하였고, 그 상층을 10,000g로 10분간 원심분리시켜 얻은 상층을 다시 105,000g로 60분간 원심분리시켜 얻은 침전을 microsomal fraction으로 하였다. 이 모든 조작은 4℃ 이하에서 실시하였다.

과산화지질의 측정—분리된 fraction을 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4) 7 ml에 현탁시킨 후, 2 ml를 취하여 공전시험관에 넣고, 7% SDS 0.4 ml와 0.67% TBA 시약 2 ml를 가하여 95℃ 수욕상에서 50분간 가온후 급냉시켜 *n*-butanol 5 ml로 충분히 추출하고 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층을 535 nm에서 흡광도 측정하였다[11].

단백질 정량—단백 정량은 표준품으로 Bovine serum albumin을 사용하여 Lowry법에 의하여 실시하였다[12].

통계분석—각군 상호간의 상관성은 Student's t-test에 의하여 통계적으로 분석하였다.

결과 및 고찰

Nakakimura 등은 alloxan으로 당뇨를 유발시킨 ddy mice의 간과 신장 및 혈장에서 과산화지질치가 증가하는 것으로 보고한 바 있다[13]. 따라서, alloxan 유도 당뇨의 경우는 alloxan 자체의 산화력에 의한 지질과산화현상이 복합적으로 작용하여 지질과산화 현상이 보다 현저하게 나타날 것으로 예측할 수 있는데, 이와 같은 사실은 Table 1, 2에 나타난 결과와 일치하고 있음을 알 수 있다.

Table 1. Dose dependent inhibition of the liver mitochondrial and microsomal fraction in Alloxan induced diabetic ICR mice by Brazilin

GROUP	MDA CONTENTS (nmole/mg protein)[a]	
	mitochondria	microsome
Normal Control	1.623 ± 0.091	1.839 ± 0.078
Diabetic Control	2.951 ± 0.091	4.023 ± 0.351
Brazilin-Diabetes(10mg/kg)	2.757 ± 0.157[b]	3.218 ± 0.177[c]
Brazilin-Diabetes(50mg/kg)	2.535 ± 0.181[b]	2.877 ± 0.221[c]
Brazilin-Diabetes(100mg/kg)	2.198 ± 0.197[b]	2.530 ± 0.091[c]

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

Table 2. Time dependent inhibition of the liver mitochondrial and microsomal fraction in Alloxan induced diabetic ICR mice by Brazilin

GROUP	MDA CONTENTS (nmole/mg protein)[a]	
	mitochondria	microsome
5 DAYS		
Normal Control	1.267 ± 0.146	1.380 ± 0.167
Diabetic Control	1.617 ± 0.158	1.724 ± 0.163
Brazilin-Diabetes	1.508 ± 0.127[b]	1.518 ± 0.161[e]
20 DAYS		
Normal Control	1.529 ± 0.140	1.746 ± 0.138
Diabetic Control	2.811 ± 0.159	3.842 ± 0.301
Brazilin-Diabetes	1.970 ± 0.182[c]	2.339 ± 0.125[f]
30 DAYS		
Normal Control	1.657 ± 0.123	1.941 ± 0.155
Diabetic Control	2.910 ± 1.193	3.932 ± 0.213
Brazilin-Diabetes	2.080 ± 0.232[d]	2.452 ± 0.130[g]

a: mean ± SD, Brazilin: 100mg/kg, ip.
b,e: $p < 0.05$ compared to diabetic control,
c,d,f,g: $p < 0.01$ compared to diabetic control
c vs *d,f* vs *g*: nonsignificant, n = 10 mice/group,

지질과산화 억제효과의 용량반응의 관계를 알아보기 위하여 Brazilin을 10 mg/ kg, 50 mg/ kg, 100 mg/ kg씩 투여한 군들의 간 microsome 및 mitochondria중의 과산화 지질물을 측정한 결과, Table 1에서 보는 바와 같이 microsome에서는 용량별로 36.7%, 52.5%, 68.4%의 억제효과를 보였고 mitochondria에서는 14.6%, 31.3% 및 56.7%의 지질과산화억제효과를 나타냄으로써 용량반응관계는 거의 직선적임을 알 수 있었다.

Brazilin 투여시 지질과산화 억제작용의 경시변화를 알아보기 위하여 Brazilin 100 mg/ kg씩을 매일 투여하면서 투여개시 5일, 20일, 30일 후 각각 간 microsome 및 mitochondria중의 과산화지질을 측정한 결과는 Table 2에서 보는 바와 같이, 양분획에서 모두 20일, 30일 처리군의 경우가 5일 처리군보다 더 높은 지질과산화 억제율을 보임으로써 투여기간에 비례하여 지질과산화 억제 활성이 증가되는 것으로 확인되었다.

이 결과중, 5일째의 과산화지질치는 alloxan 자체산화력에 의한 지질과산화의 영향을 비교적 많이 받고 있는 시기로, 이 시기의 억제효과는 주로 alloxan에 의한 직접적인 지질과산화 억제에 의한 것으로 설명이 될 수 있으며, 20일, 30일의 경우는 당뇨병태 자체의 요인으로 일어나는 지질과산화가 주로 관여하며, alloxan의 강력한 산화활성은 많이 배제가 된 시기로, 지질과산화 억제효과는 직접적인 항산화활성이외의 다른 요인이 작용한 것으로 추측된다.

이러한 사실은, 천연색소 Brazilin의 생리활성, 특히 항고혈당작용 및 당뇨병상태에서의 Lens aldose reductase 활성 억제작용 등의 합병증 개선작용 등과 함께 고려해 볼 때[14,15] 충분히 뒷받침될 수 있다 하겠다.

이상의 결과는 천연색소 Brazilin이 당뇨병 등의 성인질환에서의 지질과산화물들에 의한 병변들을 완화시킬 수 있다는 가능성을 제시하는 것으로, 좀 더 진전된 연구를 통하여 위의 가능성을 확인하는 작업이 필요하리라 사료된다.

국문요약

Alloxan으로 유도된 당뇨병상태에서 Brazilin 투여시 mitochondria 분획 및 microsome 분획에서 용량의존적으로 억제효과가 증가하였으며 Brazilin 100 mg/ kg을 투여시는 mitochondria 분획에서 56.7% 억제를, microsome 분획에서는 68.4%의 억제효과를 보였다. 또한 Brazilin 100 mg/ kg을 시간별 투여시 시간의존적으로 억제효과가 증가하였으며 30일간 투여시에 mitochondria 분획에서 66.2%, microsome 분획에서는 74.3%의 억제효과를 보였다.

참고 문헌

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. Harland, W.A.: Lipids of human atheroma. V. The occurence of a new group of polar esters in various stages of human atherosclerosis. *Atherosclerosis,* **13,** 239(1971).
5. Billins, B.H.: Serum and liver lipids in patients with and without liver disease. *J. Lab. Clin. Med.* **45,** 363(1955).
6. Suematsu, T.: Serum lipidperoxides level in patients suffering from liver disease. *Clin. Chim. Acta.,* **79,** 267(1977).
7. 内山照雄：肺組織のmicrosomeおよびmitochondria 分劃のin vitroにおける 脂質過酸化反應に対する Tinordineの影響. 藥理と治療, **5,** 33(1977).
8. Bilenko, M.: Role of lipidperoxidation in path-

ogenesis of changes in ischemia and preserved organs. Methods of antioxidant therapy. *Eur. Surg. Res.*, **9**, 82(1977).

9. 五島雄一郎：脂質代謝異常の臨床, 南山堂(1977).
10. Moon, C.K., Ha, B.J., Lee, S.H. and Mock, M.S.: A study on the Antilipidperoxidative effect of brazilin and hematoxylin(I), *Kor. J. Food Hygiene*, **2**, 35(1987).
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. 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(1951).
13. Nakakimura, H.: Studies on lipidperoxidation in biological systems. II. Hyperlipoperoxidemia in mice induced by alloxan. *Chem. Pharm. Bull.* **28**, 2207(1980).
14. Moon, C.K., Yun, Y.P., Lee, J.H., Wagner, H. and Shin, Y.S.: Inhibition of Lens aldose reductase activity by brazilin and hematoxylin. *Planta Medica*, 66(1985).
15. 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).