

셀레늄 강화 시금치가 고지방 및 고콜레스테롤 식이 흰쥐의 항산화 효소활성 및 산화적 손상에 미치는 영향

송원영 · 최정화*

한국국제대학교 식품영양학과

Effects of Selenium-Treated *Spinacia oleracea* L. on Antioxidative Enzyme Activities and Oxidative Damage in Rats Fed High-Fat and High-Cholesterol Diets

Won-Yeong Song, Jeong-Hwa Choi*

Department of Food and Nutrition, International University of Korea, Jinju, Korea

(Received April 15, 2019/Revised May 8, 2019/Accepted June 15, 2019)

ABSTRACT - The object of the present study was to examine the effect of selenium-treated *Spinacia oleracea* L. on antioxidative defense system and oxidative damage in rats fed high-fat and high-cholesterol diets. Experimental rats were divided into six groups which were composed of normal diet group (N), high-fat and high-cholesterol diet group (HF), high-fat and high-cholesterol diet with 5% or 10% non-treated spinach supplemented group (SPA or SPB) and high-fat and high-cholesterol diet with 5% or 10% selenium-treated spinach-supplemented group (SSA or SSB). In the antioxidant enzyme activities of hepatic glutathione peroxidase and superoxide dismutase, activities increased in supplementation of non-treated or selenium-treated spinach groups compared to HF group. However, there was no significant difference in the activity of hepatic catalase among all experimental groups. The microsomal superoxide radical content of the SSB group was significantly reduced compared to the HF group. The mitochondrial carbonyl values of the SSB group were significantly reduced compared to the HF group. Thiobarbituric acid reaction substance (TBARS) values in RBC and liver were also reduced in non-treated or selenium-treated spinach-supplemented groups compared to the HF group. The hepatic TBARS values of the supplementation of selenium-treated spinach groups significantly decreased compared to the supplementation of non-treated spinach groups. These results suggest that selenium-treated spinach may reduce oxidative damage by the activation of antioxidative defense system in rats fed high-fat and high-cholesterol diets.

Key words : Antioxidative system, Free radical, Oxidative damage, Selenium, *Spinacia oleracea* L.

우리나라의 경제발전은 인간의 수명을 증가시키고 국민들의 건강에 대한 관심을 더욱 증대시키고 있으나 고지방 및 고콜레스테롤 섭취와 같은 서구화된 식생활은 여러 대사성질환을 증가시키고 있다. 이러한 식사습관은 체내 항산화방어계(antioxidative system)에도 영향을 끼치게 되는데, 특히 고지방 식이는 체내 조직의 산화적 손상을 초래할 뿐만 아니라 지방질의 과산화물을 축적시켜 체내 대

사과정 중에 생성되는 활성산소와 결합하여 여러 질환을 유발시킨다^{1,2)}. 고콜레스테롤 식이 또한 산화적 스트레스를 촉진시켜 자유라디칼을 제거하는 항산화방어계에 불균형을 가지고 오게 되어 암, 심혈관질환, 면역체계 이상 및 노화 등 산화적 질환을 일으킨다고 알려져 있다^{3,5)}. 체내에는 superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-px) 및 catalase (CAT) 등⁶⁾의 산화방지효소를 가지고 있지만, 급격히 증가되는 산화물들은 모두 방어하기가 힘들기 때문에 항산화 물질의 보충이 필요하다⁷⁾. 그리하여 최근에는 식품 중에 존재하는 천연유래 소재의 항산화 물질에 대한 여러 연구가 진행되고 있다^{8,9)}.

시금치는(*Spinacia oleracea* L.)는 명아주과에 속하는 일

*Correspondence to: Jeong-Hwa Choi, Department of Food and Nutrition, International University of Korea, Jinju 52833, Korea
Tel: 82-55-8326, Fax: 82-55-751-8205
E-mail: jhappychoi@hanmail.net

년생 저온성 작물로 대표적인 녹색채소이다. 일반 재배 작물들 속에서도 항산화능이 높은 시금치는 비타민 A의 전구체인 carotene과 ascorbic acid, 무기질, 엽산과 엽록소가 다량 함유되어 있어 항암효과뿐만 아니라 동맥경화, 빈혈 등을 예방하는 효과가 있다고 알려졌다^{10,11}. 특히 시금치에는 항산화 작용이 큰 클로로필 성분이 다량 함유되어 있으며 사포닌 및 식이섬유소가 풍부해 변비에도 탁월하다^{12,13}.

인간에게 있어 필수 미량원소인 셀레늄(selenium, Se)은 항암효과뿐만 아니라 여러 질병을 예방하는 미네랄로 알려져 있는데, 이는 활성산소로부터 selenomethione 및 selenocysteine의 유기화합물의 형태로 전환되면서 항산화 활성을 띠게 된다¹⁴. 특히 selenoproteind는 GSH-px와 같은 생체 내 항산화효소를 도와준다고 알려져 있는데, 이 효소에는 셀레늄이 함유되어 있으며, 셀레늄이 부족하게 되면 GSH-px의 생산 및 활성도가 감소된다¹⁵. 이러한 셀레늄이 부족하게 되면 체내 여러 질병들의 원인이 되므로 최근에는 셀레늄을 처리한 다양한 재배식물들이 연구되어지고 있다. Molan 등¹⁶의 연구에 의하면 셀레늄을 처리한 녹차는 무처리군에 비해 활성산소의 소거능이 증가되었고, Schwarz 등¹⁷의 연구에서도 셀레늄을 첨가하여 발아시킨 새싹 내 셀레늄 함량이 증가되어 항산화 활성이 증가되었다고 보고하였다.

셀레늄을 강화시킨 시금치의 항산화 효능을 *in vitro* 실험으로 선행연구를 통해 증명한 결과를 토대로 셀레늄 강화 시금치를 이용하여 *in vivo* 수준에서 또한 항산화 활성을 증명하기 위하여 주요 항산화효소의 함량변화와 활성산소 생성 및 제거에 미치는 영향을 관찰하고자 하였다.

Materials and Methods

셀레늄 시금치 파우더 제조

본 실험에 사용된 시금치 중 남해 시금치(사계절 시금치, 겨울)는 남해군에서 재배한 생체를 직접 구입하여 각종 실험에 사용하였으며, 셀레늄 강화 남해 시금치는 시범포장에서 (남해군 서면 서호리 571-2번지, 912 m²)셀레늄 농도 2,000 mg/kg의 원비를 1,000배 희석하여 월 1~2회 엽면 시비하여 재배된 것을 채취하여 동결건조 (Ilshin Bio Base, Dongduchoen, Korea) 하였다. 건조된 시금치는 분쇄기(대성파워 믹서/분쇄기 DA-280G, Seoul, Korea)를 사용하여 60 mesh로 조제하여 사용하였다.

실험동물 사육 및 식이

본 실험에 사용된 동물은 체중 150±10 g 내외의 Sprague-Dawley 중 5주령의 수컷을 (주)바이오 제노믹스사(Bio genomics, Inc., Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

Table 1. Diet compositions of experimental groups

Ingredient	Groups ¹⁾					
	N	HF	SPA	SPB	SSA	SSB
Corn starch	539	429	428	427	424	423
Casein	200	200	200	200	200	200
Sucrose	100	100	100	100	100	100
Cellulose	50	50	50	50	50	50
Mineral mixture	35	35	35	35	35	35
Vitamin mixture	10	10	10	10	10	10
DL-methionine	3	3	3	3	3	3
Choline chloride	3	3	3	3	3	3
Corn oil	60	60	60	60	60	60
Cholesterol	10	10	10	10	10	10
Lard	-	100	100	100	100	100
Non-treated spinach	-	-	50	100	-	-
Selenium-treated spinach	-	-	-	-	50	100
Total	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

¹⁾N: Normal diet.

HF: High-fat and high-cholesterol diet.

SPA: High-fat and high-cholesterol diet+5% of non-treated spinach.

SPB: High-fat and high-cholesterol diet+10% of non-treated spinach.

SSA: High-fat and high-cholesterol diet+5% of selenium-treated spinach.

SSB: High-fat and high-cholesterol diet+10% of selenium-treated spinach.

실험식이 시작 전 일주일간 일반배합사료 5L79 (Purina Co., Seoul, Korea)로 예비 사육한 후 평균체중이 유사하도록 난괴법(randomized complete block design)에 의해 대조군과 실험군으로 나눈 후 4주간 사육하였다. 실험 기간 중 식이는 4°C에서 보관하였다. 사육실의 온도는 22±2°C, 상대습도 50±10%를 유지하였다. 식이 groups은 정상군(N group)과 1% 고지방 및 고콜레스테롤 식이 실험군으로 나눈 후 고지방 및 고콜레스테롤 실험군은 고지방 및 고콜레스테롤 대조군(HF group), 고지방 및 고콜레스테롤+5% 무처리 시금치 파우더 공급군(SPA group), 고지방 및 고콜레스테롤+10% 무처리 시금치 공급군(SPB group), 고지방 및 고콜레스테롤+5% 셀레늄 강화 시금치 공급군(SSA group), 고지방 및 고콜레스테롤+10% 셀레늄 강화 시금치 공급군(SSB group)으로 총 6군으로 나누어 사육하였다. 본 실험에 사용한 기본식이는 AIN-93¹⁸⁾ 식이조성에 준하여 Table 1을 토대로 각각의 식이재료를 직접 배합하여 100 mesh 체로 3회 걸러 조제하였다(Table 1). 고지방 및 고콜레스테롤 군은 10% 고지방 및 1% 고콜레스테롤이 공급 되도록 라드와 콜레스테롤을 정상식이에 첨가하였다. 식이 및 식수는 자유 섭식하게 하였다. 본 동물실험은 한국국제대학교 동물실험 윤리위원회의 승인(NVRQS AEC2)을 거쳐 진행하였다.

혈액 및 장기의 채취

사육기간 완료 후 실험동물을 12시간 절식시키고 가벼운 ether 마취 하에서 복부대동맥으로부터 혈액을 채취한 후 즉시 간장을 적출하여 생리식염수로 행군 후 가제로 수분을 제거하고 무게를 측정하였다(Ohaus Corp., Pine Brook, NJ, USA). 간 조직은 실험에 사용하기 전까지 무게를 측정한 후 액체 질소로 급속 동결시켜 -80°C에 보관하였다(Thermo Fisher Scientific Inc. Corp., Waltham, MA, USA).

분석 시료의 전처리

간장을 각 간엽에서 고르게 일정량을 취하여 Potter Elvehjem homogenizer (Fisher Scientific, Schwerte, Germany)를 사용하여 0.25 M sucrose (Sigma, St. Louis, MO, USA)/0.5 mM ethylene diamine teraacetic acid (Sigma)/5 mM N-2-hydroxyethyl-piperazine-N-2-ethane sulfonic acid (Sigma)용액으로써 10%(w/v) 마쇄 액을 만들었다. 마쇄 액의 일부를 8,000×g에서 20분간 원심분리 (Gyrozen Co., Daejeon, Korea) 하여 그 상층 액을 과산화지질 정량에 사용하였고, 나머지는 10,000×g에서 30분간 원심분리 하여 그 상층액 중 일정량을 취하여 0.4배량의 ethanol:chloroform 냉혼합액(5:3)을 가하고 2분간 진탕한 다음 10,000×g에서 30분간 원심분리 하여 얻은 상층 액을 세 포질 SOD원액으로 사용하였다. 또 10,000×g 상층 액의 일부는 다시 105,000×g에서 30분간 원심분리 하여 얻은 cytosol

은 GSH-px의 활성도를 측정하였다. 모든 실험 조건은 4°C를 유지하면서 행하였다.

SOD, GSH-px, catalase 활성 측정

SOD 활성은 알칼리 상태에서 pyrogallol의 자동산화에 의한 발색을 이용한 Marklund와 Marklund¹⁹⁾의 방법에 따라 측정하였다. GSH-px활성은 산화형 glutathione (GSSG)이 glutathione reductase와 NADPH에 의해 환원될 때 340 nm에서 NADPH의 흡광도가 감소하는 것을 이용한 Lawrence와 Burk²⁰⁾의 방법에 따라 측정하였다. 간 조직의 CAT 활성은 Aebi 등²¹⁾의 방법으로 측정하였다. 즉 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0, Sigma) 2.89 mL에 기질인 30 mM H₂O₂를 100 µL를 넣어 25°C에서 5분간 반응시켰다(JSR Co., Tokyo, Japan). 여기에 시료 10 µL를 가하여 3.0 mL가 되도록 하고 25°C, 240 nm에서 5분간 흡광도를 측정하였다(Thermo Fisher Scientific). H₂O₂의 흡광도 변화와 H₂O₂의 몰 흡광계수로 H₂O₂의 농도를 구하여 효소 활성도를 계산하였다.

Superoxide radical(O₂⁻)함량 측정

간 조직 중의 O₂⁻함량을 측정하기 위하여 1 g의 간 조직을 0.25 M sucrose 용액으로 균질화 시킨 후 8,000×g에서 원심분리(Gyrozen)하여 mitochondria 분획을 얻은 후 다시 105,000×g에서 원심분리 하여 microsome분획을 얻었다. O₂⁻함량 측정은 Azzi 등²²⁾의 방법에 준해 실시하였다.

Carbonyl 함량 측정

간 조직의 microsome 및 mitochondria 중의 산화된 단백질의 함량은 Levine 등²³⁾의 방법에 따라 측정하였다. 분획한 microsome 또는 mitochondria 0.1 mL의 시료에 trichloroacetic acid (TCA, Sigma) 0.5 mL를 혼합한 후 1,500×g에서 10분간 원심분리(Gyrozen) 하여 얻어진 상층 액을 제거한 뒤 잔사에 다시 10 mM dinitrophenylhydrazine (DNPH, Sigma) 0.5 mL 가하여 15분마다 교반하면서 1시간 동안 실온에 방치한 후 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 이때 얻어진 상층 액을 제거한 후 잔사에 ethanol/ethyl acetate (1:1, v/v) 3 mL를 첨가하여 실온에서 10분간 방치한 다음 다시 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 후 얻어진 잔사를 6 M guanidine[20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.3, Sigma)에 용해] 1.0 mL를 첨가하여 혼합한 후 37°C에서 15분간 가온(JSR)한 후 3,500 rpm에서 10분간 원심분리 하여 상층액을 얻었다. 이때 carbonyl value의 양은 360 nm 흡광도의 파장(Thermo Fisher Scientific)에서 분자흡광계수(ε=22,000)를 이용하여 계산하였다.

Thiobarbituric acid reaction substance (TBARS) 정량

적혈구의 과산화지질 측정은 동량의 H₂O로 용혈시킨 적

혈구(haemolysate)를 10배 희석하여 시료로 사용하였으며 측정방법은 Yagi²⁴⁾의 방법을 이용하였다. 간 조직에서의 과산화지질 정량은 간 조직의 마쇄 액을 8,000×g에서 처리(Gyrozen)하여 얻은 상층액과 TCA용액(Sigma)을 섞은 후, 실온에서 10분간 방치한 다음 0.05 M 황산으로 세척한 후 그 침전물과 thiobarbituric acid (TBA, Sigma)와 반응하여 생성되는 malondialdehyde를 측정하는 Satho²⁵⁾법을 이용하였다.

단백질 정량

각 시료의 단백질량은 Lowry 등²⁶⁾의 방법으로 하였으며, bovin serum albumin (Sigma)을 표준 품으로 사용하였다.

통계처리

모든 실험결과에 대한 통계처리는 각 실험군의 평균값의 차이가 있는가를 검증하기 위해 분산분석(ANOVA 검증)을 수행하였으며 분산분석결과 유의성이 발견된 경우 Tukey's HSD test²⁷⁾에 의해 군 간의 유의도를 분석하였다.

Results and Discussion

체중, 식이량 및 간 무게 측정

셀레늄 처리 및 무처리 시금치의 공급으로 인한 체중, 식이량 변화 및 간 무게를 관찰한 결과는 Table 2와 같다. 4주 동안의 사육기간 동안 각각의 식이 공급이 실험동물에 미치는 영향을 보기 위해 체중 및 식이량 변화를 측정 한 결과 각각의 실험군에서 차이가 나타나지 않았으며, 또한 실험군들의 간 무게에서도 차이를 나타내지 않았다. 이러한 점을 미루어 셀레늄 강화 시금치는 실험동물의 체중 및 간 조직에 영향을 주지 않았다고 사료된다.

간 조직 중의 SOD 및 GSH-px, CAT 활성

항산화 효소는 세포막의 지질과산화 손상 sulfhydryl 함 유효소의 불활성화 및 구성단백질의 교차결합 등을 일으키는 활성산소종을 제거함으로써 항산화작용을 한다. 생체 내 항산화 방어기구 중 효소적방어계의 하나로서 superoxide radical을 H₂O₂로 환원시킴으로써 산소 독으로부터 생체를 보호하는 SOD 활성을 간에서 관찰한 결과는 Table 3과 같다. HF군에 비해 무처리 시금치를 공급군(SPA,

Table 2. Changes in body weight, food intake and liver weight in experimental rats

Groups ¹⁾	Body weight (g)	Food intake(g)	Liver weight (g)
N	188.8±3.38 ^{c2)}	19.14±1.08 ^{NS3)}	8.848±1.04 ^b
HF	203.3±2.45 ^{ab}	19.44±1.58	13.96±2.19 ^a
SPA	198.3±2.08 ^b	18.45±1.05	12.23±1.13 ^a
SPB	203.3±2.89 ^{ab}	18.48±0.98	12.22±2.14 ^{ab}
SSA	198.8±2.32 ^b	19.38±1.12	13.68±2.04 ^a
SSB	205.5±1.92 ^a	18.68±0.95	11.67±0.90 ^a

¹⁾Groups are the same as in Table 1.

²⁾All values are mean±SE (n=10).

³⁾NS: not significantly different among groups.

^{a-c}Values with a column with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's test.

Table 3. Effects of non-treated spinach and selenium-treated spinach on hepatic superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-px) and catalase activities in rats fed high fat and high cholesterol diets

Groups ¹⁾	SOD (unit/mg protein/min)	GSH-px (nmol NADPH/min/mg protein)	Catalase (nmol/mg protein/min)
N	9.433±1.12 ^{a2)}	368.0±15.3 ^a	11.58±1.36 ^{NS3)}
HF	4.817±1.75 ^b	251.5±12.8 ^b	8.772±1.98
SPA	5.764±0.87 ^b	257.0±19.2 ^b	8.891±2.47
SPB	5.993±1.33 ^b	274.9±19.1 ^b	10.80±1.81
SSA	6.330±1.72 ^{ab}	266.0±19.0 ^b	9.947±0.99
SSB	6.596±0.67 ^b	282.2±28.3 ^b	11.52±2.29

¹⁾Groups are the same as in Table 1.

²⁾All values are mean±SE (n=10).

³⁾NS: not significantly different among groups.

^{a,b}Values with a column with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's test.

SPB group) 및 셀레늄 강화 시금치 공급군(SSA, SSB group)에서 각각 19.7%, 24.4% 및 31.4%, 36.9%씩 증가되었지만 군별 유의성은 관찰되지 않았다. SOD 유사활성을 나타내는 항산화물질로는 ascorbic acid, catechin, glutathione과 flavonoid 등이 알려져 있다²⁸⁾. Lee 등²⁹⁾의 연구에서는 시금치 잎 부위의 ascorbic acid 함량이 50~64%로 보고되었으며, 또 다른 연구에서 시금치에는 75.1 mg/g의 flavonoid를 함유한다고 보고하였다. 또한 선행연구의 결과 무처리 셀레늄 시금치의 셀레늄 함량은 61.19 µg/kg, 2000 mg/kg 원비 셀레늄을 1000배 희석하여 처리한, 본 연구에도 사용된 시금치의 셀레늄 함량은 239.0 µg/kg로 약 3.9배 무처리군 보다 높았으며, 무처리 군에 비해 셀레늄 강화 시금치에서 *in vitro* 항산화 실험결과 활성이 유의적으로 증가되었다³⁰⁾. 상기 결과로 미루어 항산화 효소의 필수적인 보조인자인 셀레늄³¹⁾과 시금치 내 함유된 생리활성 성분들은 SOD의 활성을 높이는 데 기여할 수 있으리라 사료된다. 항산화효과로 과산화물을 제거함으로써 세포막의 손실을 방어하는 GSH-px의 활성을 관찰한 결과 (Table 3), SSA 및 SSB군에서 각각 5.8% 및 12.2% 증가하였으나 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 셀레늄이 산화적 스트레스로부터 GSH-px와 같은 항산화효소를 생성하는 데 관여하여 인체방어기능을 한다고 알려져 있는데¹⁴⁾, GSH-px 활성도의 유의적인 결과를 보기 위해서 셀레늄의 농도를 더욱 증가시켜 볼 필요가 있다고 생각된다. Catalase는 과산화수소를 무독성의 물로 환원시킴으로써 과산화수소에 의한 세포의 손상을 방지하는 항산화효소로 알려져 있다³²⁾. 간 조직의 catalase 활성변화를 관찰한 결과(Table 3), 정상군에 비해 고지방 및 고콜레스테롤 식이 군에서 감소되었으며 시금치를 함께 공급한 군에서 증가되었으나 군 간의 유의적인 차이는 없었다. 상기 결과들로 미루어 시금치의 항산화 성분들은 산소 대사과정에서 생성된 활성산소로부터 세포를 지키는 항산화효소의 조절에 작용할 수 있으리라 사료되어진다.

Superoxide radical (O₂⁻) 함량

유해산소들은 DNA에도 손상을 주어 돌연변이를 일으킬 수 있고 나아가서는 종양이나 암의 원인이 될 수 있는 매우 불안정한 상태로 존재하는 데, 특히 O₂⁻은 활성산소종 생성의 주요한 원인으로 세포막의 다가불포화지방산에 작용하여 지질과산화물을 생성하고 이로 인해 세포의 기능을 손상 시키는 것으로 알려져 있다³³⁾. 간 조직의 microsome과 mitochondria에서 O₂⁻함량을 측정된 결과는 Table 4와 같다. 간 조직의 microsome에서는 정상군에 비해 HF군에서 유의적인 증가를 나타내었으나 시금치의 공급으로 감소하는 경향을 나타내었으며, 특히 10%의 셀레늄 강화 시금치를 공급한 SSB군에서는 HF군에 비해 54.8% 유의적으로 감소하였고, 무처리 시금치 10% 공급군 SPB

Table 4. Effects of non-treated spinach and selenium-treated spinach on hepatic superoxide radical contents in rats fed high fat and high cholesterol diets

Groups ¹⁾	Microsome	Mitochondria
	(nmol/mg protein/min)	
N	10.10±3.14 ^{bc2)}	15.32±2.37 ^b
HF	18.86±2.86 ^a	29.60±5.67 ^a
SPA	15.51±5.24 ^{ab}	26.92±5.48 ^a
SPB	12.06±3.35 ^{abc}	25.80±1.05 ^a
SSA	14.69±1.25 ^{ab}	20.88±6.58 ^{ab}
SSB	8.520±2.02 ^c	20.66±5.42 ^{ab}

¹⁾Groups are the same as in Table 1.

²⁾All values are mean±SE (n=10).

^{a-c}Values with a column with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's test.

군에 비해 29.4% 감소하였다. Mitochondria에서는 고지방 및 고콜레스테롤 식이로 인해 증가된 O₂⁻가 셀레늄 강화 시금치를 공급으로 감소하였다. Zekovic³⁴⁾등의 연구에서 셀레늄의 함량이 더 높은 버섯에서 O₂⁻의 소거활성이 증가된다고 보고하였으며, 선행연구로 셀레늄 강화시금치에서 DPPH, ABTS 및 NO radical과 같은 여러 활성산소들이 무처리군에 비해 모두 유의적으로 감소되어지는 결과를 관찰하였다³⁵⁾. 이러한 셀레늄 강화시금치의 *in vitro*에 대한 항산화 실험결과는 본 연구의 *in vivo* 결과와도 일치하는 결과를 나타내었다. 이러한 결과를 미루어 셀레늄이 강화된 시금치는 산소 대사과정에서 생성된 free radicals의 제거에 적극적으로 작용하였으리라 사료된다.

간 조직의 carbonyl value 함량

지질과 단백질은 생체막에 같이 존재하므로 주된 발생장소인 생체막에서 단백질이 활성산소에 의해 쉽게 공격받는다³⁰⁾. 이러한 산화적손상의 지표로 삼고 있는 산화단백질의 생성지표인 carbonyl value 함량을 간 조직에서 측정된 결과는 Fig. 1과 같다. 간 조직의 microsome에서의 산화단백질 함량은 정상군에 비해 HF 군에서 60.5%로 유의적으로 증가 되었으나 시금치의 공급으로 유의적으로 감소하였다. Mitochondria에서는 정상군에 비해 유의적으로 증가된 HF군의 carbonyl value 함량이 셀레늄 강화 시금치를 10% 공급한 SSB군에서 23.1%로 유의적인 감소를 나타내었다. 또한 SSB군은 무처리 시금치 10% 공급군 SPB군에 비해 10% 감소하였다. 이러한 결과는 시금치에 항산화력 지표가 되는 페놀성물질 및 flavonoid 물질이 체내 흡수되어 조직의 산화적 손상을 감소시켰으리라 사료된다. Nogales³⁶⁾의 보고에서는 셀레늄이 결핍된 쥐의 간 조직에서 산화단백질 함량이 정상군 및 셀레늄을 추가로 공급한 군에 비해 유의적으로 높게 나타났다. 이러한 결

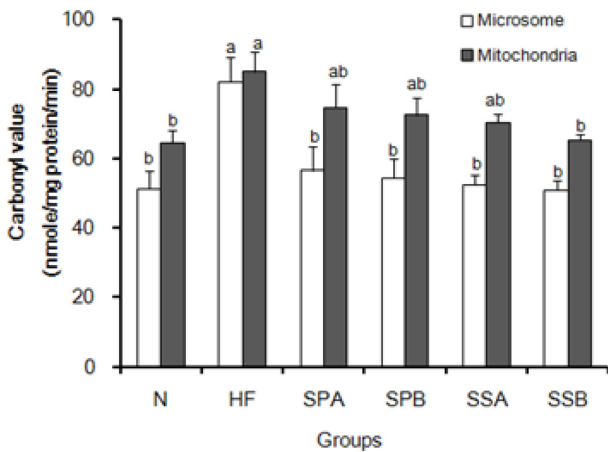


Fig. 1. Effects of non-treated spinach and selenium-treated spinach on hepatic carbonyl values in rats fed high fat and high cholesterol diets. Experimental conditions are same as Table 1. All values are the means \pm SE (n=10). ^{a,b}Those with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's test.

과로 미루어 셀레늄은 조직 내 산화단백질의 감소에 도움을 준다고 사료된다.

적혈구 및 간 조직의 과산화지질(TBARS) 정량

여러 가지 독성화합물이나 약물 또는 질병에 의한 병태 생리학적 현상이나 조직의 손상정도를 나타내는 가장 중요한 기전인 과산화지질의 함량을 적혈구에서 관찰한 결과는 Fig. 2A와 같다. 정상군에 비해 HF 군에서 유의적으로 증가하였고 시금치를 공급한 군에서 모두 감소하는 경향을 나타내었다. 특히 10% 무처리 시금치 공급군 및 10% 셀레늄 강화 공급군에서는 28.84% 및 27.51%로 각각 유의적으로 감소되었다. 과산화지질의 함량을 간 조직에서 관찰한 결과(Fig. 2B), 정상군에 비해 HF군에서 유의적으로 증가하였는데, 이러한 결과는 Song과 Chyun³⁷⁾의 보고에서 지방식이의 공급으로 간 조직의 TBARS가 증가하였다는 이전의 보고와 유사한 경향을 보였다. 또한 고지

방 및 고콜레스테롤 식이로 인해 증가된 과산화지질은 시금치를 공급한 모든 군에서 유의적인 감소를 나타내었다. 특히 5% 및 10%의 각각의 농도에서 무처리 시금치 공급군에 비해 셀레늄 강화 시금치 공급군에서 18.6% 및 22.9%로 유의적인 과산화지질의 감소가 나타났다. 이러한 결과는 Ko 등³⁸⁾의 보고에서 고지방 및 고콜레스테롤 식이로 유도된 고지방혈증의 쥐에서 5%의 시금치 파우더의 공급이 간 조직에서 TBARS를 유의적으로 감소시켰다는 결과와 일치하였다. 지질과산화반응은 세포 내 산화적 스트레스로 인한 free radical 생성의 증가 및 항산화 방어능력의 감소로 인해 일어나는 것으로, 상기 결과로 미루어 시금치의 풍부한 항산화 성분들과 셀레늄이 생체 내 지질 과산화반응을 억제시킨 것으로 사료된다.

국문요약

본 연구에서는 고지방 및 고콜레스테롤 식이 흰쥐에 셀레늄 강화 시금치를 공급하여 간 조직의 항산화방어계와 지질과산화에 미치는 영향을 관찰하였다. 실험동물은 체중 150 \pm 10 g 내외의 Sprague-Dawley종 수컷 흰쥐를 사용하였으며, 정상식이 대조군(N), 고지방 및 고콜레스테롤 공급군(HF), 고지방 및 고콜레스테롤 공급군에 무처리 시금치 5% 공급군(SPA) 및 10% 공급군(SPB), 고지방 및 고콜레스테롤 공급군에 셀레늄 강화 처리 시금치 5% 공급군(SSA) 및 10% 공급군(SSB)으로 총 6군으로 나누었다. 식이 및 식수는 자유섭취하게 하였으며 4주간 사육한 후 희생시켰다. 간 조직 중의 항산화 효소계인 SOD 활성은 HF군에 비해 셀레늄 시금치 공급군 SSA 및 SSB군에서 각각 31.4% 및 36.9% 증가하였으나 유의적인 차이는 아니었다. GSH-px 활성은 또한 SSA 및 SSB군에서 각각 5.8% 및 12.2% 증가하였으나 유의적인 차이를 나타내지 않았고, catalase 함량은 전체 군에서 유의적인 차이를 볼 수 없었다. 유리기를 소거하는 지표인 간 조직의 superoxide radical 함량은 microsome에서 정상군에 비해 HF군에서

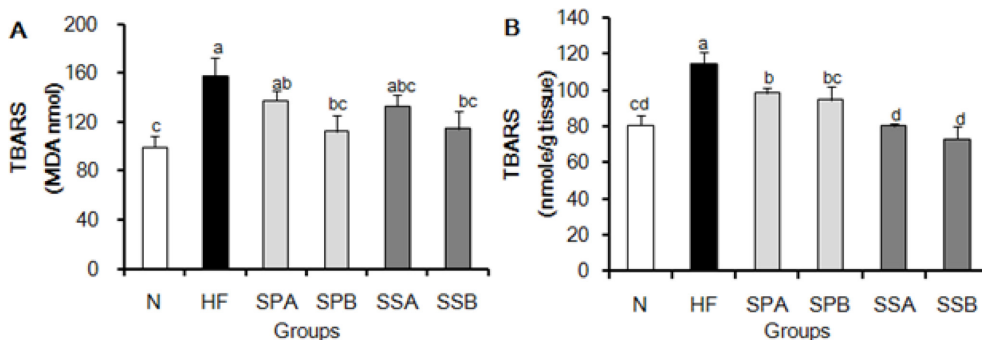


Fig. 2. Effects of non-treated spinach and selenium-treated spinach on RBC (A) and hepatic (B) thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) values in rats fed high fat and high cholesterol diets. Experimental conditions are same as Table 1. All values are the means \pm SE (n=10). ^{a-d}Those with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by Tukey's test.

86.7%의 유의적인 증가를 나타내었으나 10%의 셀레늄 강화 시금치를 공급한 SSB군에서는 HF군에 비해 54.8%로 유의적으로 감소하였다. 간 조직의 microsome에서의 산화 단백질 함량은 정상군에 비해 HF 군에서 60.5%로 유의적으로 증가 되었으나 시금치의 공급으로 유의적으로 감소하였다. Mitochondria에서는 정상군에 비해 유의적으로 증가된 HF군의 carbonyl value 함량이 셀레늄 강화 시금치를 10% 공급한 SSB군에서 23.1%로 유의적으로 감소하였다. 과산화지질의 함량을 적혈구에서 관찰한 결과 정상군에 비해 HF 군에서 59.0%로 유의적으로 증가하였고 10% 무처리 시금치 공급군 및 10% 셀레늄 강화 공급군에서는 각각 유의적으로 감소하였다. 과산화지질의 함량을 간 조직에서 관찰 한 결과, 정상군에 비해 HF군에서 42.6%로 유의적으로 증가하였고, 또한 고지방 및 고콜레스테롤 식이로 인해 증가된 과산화지질은 시금치를 공급한 모든 군에서 유의적인 감소를 나타내었다. 특히 무처리 시금치 군에 비해 셀레늄 강화 시금치에서 유의적으로 더 높은 과산화지질이 감소하였다. 이러한 결과는 시금치에 함유된 여러 항산화 성분이 효과적으로 활성산소종의 소거에 관여함으로써 산화적 손상을 완화시킨 결과로 보이며, 특히 시금치에 셀레늄의 처리는 항산화능의 상승효과에 기여했으리라 사료된다.

References

- Bidchol, A.M., Wilfred, A., Abhijna, P., Harish, R.: Free radical scavenging activity of aqueous and ethanolic extract of *Brassica oleracea* L. var. italica. *Food Bioprocess Tech.*, **4**, 1137-1143 (2011).
- Smith, E.B.: The relationship between plasma and plasma and tissue lipid in human atherosclerosis. *Adv. Lipid Res.*, **11**, 1-7 (1974).
- Boccio, G.D., Lapenna, D., Porreca, E., Pennelli, A., Savini, F., Feliciiani, P., Ricci, G., Cuccurullo, F.: Aortic antioxidant defence mechanism: time-related changes in cholesterol fed rabbits. *Atherosclerosis*, **81**, 127-135 (1990).
- Balkan, J., Kanbagli, O., Hatipoglu, A., Kucuk, M., Cevikbas, U., Aykac-Toker, G., Uysal, M. Improving effect of dietary taurine supplementation on the oxidative stress and lipid levels in the plasma, liver and aorta of rabbits fed on a high-cholesterol diet. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 1755-1758 (2002).
- Naito, M., Wu, X., Nomura, H., Kodama, M., Kato, Y., Osawa, T.: The protective effects of tetra hydro curruin on oxidative stress in cholesterol-fed rabbits. *J. Atheroscler. Thromb.*, **9**, 243-250 (2002).
- Trackshel, G., Maines, M. D.: Characterization of glutathione S-transferase in rat kidney. *Biochem. J.*, **253**, 127-136 (1988).
- Simic, M.G.: Mechanisms of inhibition of free radical processes in mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat. Res.*, **202**, 386-399 (1988).
- Song, J.C., Park, H.S., Hur, M.H., Baek, N.I.: Examination and isolation of natural anti oxidants from Korean medicinal plants. *Korean J. Med. Vrip Sci.*, **8**, 94-101 (2002).
- Kim, E.Y., Baik, I.H., Kim, J.H., Kim, S.R., Rhyu, M.R.: Screening of the antioxidant activity of some medicinal plants. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **26**, 333-338 (2004).
- Lim, S.J.: Retention of ascorbic acid in vegetable as influenced by various blanching methods. *Korean J. Soc. Food Sci.*, **8**, 411-419 (1992).
- Maeda, N., Hada, T., Murakami-Nakai, C., Kuriyama, I., Ichikawa, H., Fukumory, Y., Hiratsuka, J., Yoshida, H., Sakaguchi, K., Mizushina, Y.: Effects of DNA polymerase inhibitory and antitumor activities of lipase-hydrolyzed glycolipid fractions from spinach. *J. Nutr. Biochem.*, **16**, 121-128 (2005).
- Matsubara, K., Matsumoto, H., Mizushina, Y., Mori, M., Nakajima, N., Fuchigami, M., Yoshida, H., Hada, T.: Inhibitory effect of glycolipids from spinach on in vitamin a and ex vivo angiogenesis. *Oncol. Rep.*, **14**, 157-161 (2005).
- Park, C.H., Kim, K.H., Tae, M.H., Kim, N.Y., Yook, H.S.: Cooking process for spinach and their effects on antioxidant and antimicrobial activities. *Korean J. Food Nutr.*, **27**, 147-155 (2014).
- Ellis D.R., Salt, D.E.: Plants selenium and human health. *Cur. Opin. Plant Biol.*, **6**, 273-279 (2003).
- Moriarty, P.M., Picciano, M.F., Beard, J.L., Reddy, C.C.: Classical selenium-dependent glutathione peroxidase expression is decreased secondary to iron deficiency in rats. *J. Nutr.*, **125**, 293-301 (1995).
- Molan, A.L., Flanagan, J., Wei, W., Moughan, P.J.: Selenium-containing green tea has higher antioxidant and prebiotic activities than regular green tea. *Food Chem.*, **114**, 829-835 (2009).
- Schwarz, K., Mertz, W.: Chromium (III) and the glucose tolerance factor. *Arch. Biochem. Biophys.*, **85**, 292-295 (1959).
- Philip, G.R., Forrest, N.H., George, C.F.: AIN-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the american institute of nutrition AdHoc Writing committee on the reformulation of the AIN76 A rodent diet. *J. Nutr.*, **123**, 1939-1951 (1993).
- Marklund, S., Marklund, G.: Involvement of the superoxide anion radical in the antioxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. Biochem.*, **47**, 469-474 (1974).
- Lawrence, R.A., Burk, R. F.: Glutathione peroxidase activity in selenium-deficient rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **71**, 952-958 (1976).
- Abei, H., Wyss, S.R., Scherz, B., Skvaril, F.: Heterogeneity of erythrocyte catalase II. isolation and characterization of normal and variant erythrocyte catalase and their subunits. *Eur. J. Biochem.*, **48**, 137-145 (1974).
- Azzi, A., Montecucco, C., Richter, C.: The use of acetylated ferri cytochrome c for the detection of superoxide radicals produced in biological membrane. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **65**, 597-603 (1975).

23. Levin, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., Stadtman, E.R.: Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.*, **186**, 464-478 (1990).
24. Yagi, K.: Simple fluorometric assay for lipoperoxide in blood plasma. *Biochem. Med.*, **15**, 212-216 (1976).
25. Satho, K.: Serum lipid peroxide in cerebrovascular disorders determined by a new metric method. *Clin. Chem. Acta.*, **90**, 37-43 (1978).
26. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275 (1951).
27. Sreel, R.G.D., Torrie, J.H.: Principles and procedures of statistics. McGraw Hill, New York, NY, USA (1990).
28. Kang, Y.H., Park, Y.K., Oh, S.R., Moon, K.D.: Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort extract. *Korean J. Food Sci. Technol.*, **27**, 978-984 (1995).
29. Lee, M.H., Han, J.S., Kozukue, N., Minamide, T.: Physico-chemical characteristics of commercial spinach produced in autumn. *J. East. Asian Soc. Dietary Life.*, **15**, 306-314 (2005).
30. Song, W.Y., Chun, S.S., Choi, J.H.: Antioxidant activities of selenium-treated *Spinacia oleracea* L. *J. Food Hyg. Saf.*, **33**, 510-515 (2018).
31. Kiełczykowska, M., Kocot, J., Paździor, M., Musik, I.: Selenium-a fascinating antioxidant of protective properties. *Adv. Clin. Exp. Med.*, **27**, 245-255 (2018).
32. Johansson, L.H., Borg, L.A.: A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small tissue sample. *Anal. Biochem.*, **174**, 331-336 (1988).
33. Bus, J.S., Aust, S.D., Gibson, J.E.: Lipid peroxidation a possible mechanism for paraquat toxicity. *Res. Common Chem. Pathol. Pharmacol.*, **11**, 31-38 (1975).
34. Zekovic, Z., Vidovic, S., Mujic, I.: Selenium and zinc content and radical scavenging capacity of edible mushrooms *Armillaria mellea* and *Lycoperdon saccharum*. *Croat. J. Food Sci. Technol.*, **2**, 16-21 (2010).
35. Fridovich I.: Superoxide dismutase. An adaptation to paramagnetic gas. *J. Biol. Chem.*, **264**, 7761-7764 (1989).
36. Nogales, F., Ojeda, M.L., Fenutría, M., Murillo, M.L., Carreras, O.: Role of selenium and glutathione peroxidase on development, growth, and oxidative balance in rat offspring. *Soc. Reproduction and Fertility.*, **146**, 659-667 (2013).
37. Song, Y.O., Chyun, J. H.: Effect of β -carotene supplementation on lipid peroxides and antioxidative enzyme activities in hyperlipidemic rats. *Korean J. Nutr.*, **37**, 771-779 (2004).
38. Ko, S.H., Park, J.H., Kim, S.Y., Lee, S.W., Chun, S.S., Park, E.J.: Antioxidant effects of spinach (*Spinacia oleracea* L.) supplementation in hyperlipidemic rats. *Prev. Nutr. Food Sci.*, **19**, 19-26 (2014).