



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

이학석사 학위논문

투스 당에 의한 에탄올 위 손상 및
IEC-6 세포의 세포사멸
억제작용기전



2009년 2월

부경대학교 대학원

식품생명과학과

최은영

이학석사 학위논문

투스 당에 의한 에탄올 위 손상 및
IEC-6 세포의 세포사멸

억제작용기전

지도교수 남택정

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함.

2009년 2월

부경대학교 대학원

식품생명과학과

최은영

최은영의 이학석사 학위논문을
인준함.

2009 년 2 월 25 일



주 심 공학박사 류 홍 수 (인)

위 원 농학박사 남 택 정 (인)

위 원 이학박사 류 은 순 (인)

목 차

ABSTRACT	iii
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	5
1. 재료	5
가. 시약 및 재료	5
2. 실험방법	6
가. 시료의 조제	6
(1) 톳으로부터 다당 추출 및 단백질 제거	6
(2) Agarose gel electrophoresis	9
나. 세포배양	9
다. MTS assay	9
라. Western blot	10
마. Immunoprecipitation	11
바. 세포에서의 GSH assay	12
사. 동물사육	12
(1) 위 조직 염색	13
(2) 위 조직 중의 GSH 활성 측정	13
(3) 위 조직 중의 DNA 단편화	14
(4) 위 조직 중의 western blot	14
자. 통계처리	15

III. 결과 및 고찰	16
1. 해조류인 톳으로부터 다당 추출 및 정제	16
2. 에탄올의 소화관 정상세포인 IEC-6에 대한 독성 및 Hf-PS-1의 에탄 올 독성 저해 효과	19
가. 에탄올 및 Hf-PS-1 처리가 세포증식 및 세포형태에 미치는 영향	19
나. 에탄올 및 Hf-PS-1 처리가 세포형태에 미치는 영향	23
3. 에탄올의 세포독성에 대한 Hf-PS-1의 저해 기전	25
가. Hf-PS-1의 IGF-I 신호전달경로와 관련한 억제기전	25
나. Hf-PS-1의 MAP kinase 신호전달 경로와 관련한 억제기전	30
다. 에탄올로 인한 산화적 스트레스에 대한 Hf-PS-1의 저해 효과	33
4. 에탄올에 의한 Sparague Dawely rat의 위 손상 및 Hf-PS-1의 에탄올 위 손상 억제 효과	37
가. 에탄올 및 Hf-PS-1 투여가 위 무게에 미치는 영향	39
나. 에탄올 및 Hf-PS-1 투여가 위 표면손상에 미치는 영향	41
다. 에탄올 및 Hf-PS-1 투여가 위 조직 중의 caspase 활성화 및 DNA 단편화에 미치는 영향	44
라. 에탄올 및 Hf-PS-1 투여가 위 조직 중의 산화적 스트레스에 미치는 영향	47
IV. 요약 및 결론	53
V. 참고문헌	58
감사의 글	68

Protective effect of a polysaccharide from *Hizikia fusiformis* against ethanol-induced gastric injury in rats and IEC-6 cell.

Eun-Young Choi

*Department of Food and Life Science, Graduate School,
Pukyong National University*

Abstract

Gastrointestinal disorders are important causes of human morbidity in non-industrialized countries. Many pharmaceutical products have been developed for the treatment of gastrointestinal symptoms. However, despite recent pharmaceutical advances, many pharmaceutical products are relatively expensive and are associated with various medical problems. Drugs that relieve pain, heal ulcers, delay ulcer recurrences, and even cure disease have been developed, but they generally have important side effects.

Marine algae have provided great biological diversity for sampling in the discovery-phase of drug development. Some seaweeds contain high amounts of polysaccharides such as alginate, agarose, carrageenan and fucoidan. Various seaweed polysaccharides have diverse biological activities, including effects on the elicit a wide range of anti-tumor, anti-complimentary, anti-inflammatory, immunological and anti-viral activities. Among the various seaweeds, *Hizikia fusiformis* (*Hf*) is one of the blown algae consumed widely in Korea, China and Japanese. Brown seaweeds contain a various soluble polysaccharides as alginates, fucans and laminarins together with the insoluble fibers made of cellulose. This algae possesses a number of potential compounds, including antioxidants (Siriwardhana et al., 2004) and anticoagulants (Kim et al., 1998). It also contains inorganic arsenic, which is carcinogenic to humans (Watanabe et

al., 1979; Nakamura et al., 2008). But the health effect of dietary *Hf* remains scientifically unclear. Especially, the mechanisms responsible for protective effect of *Hf* against ethanol-induced peptic injury is unparalleled. In this study, we extracted and purified polysaccharide from the marine alga *Hizikia fusiformis* (*Hf-PS-1*) and examined its biological effects against ethanol-induced gastrointestinal injury, using *in vitro* and *in vivo* assay.

In vitro assay, using a rat small intestine IEC-6 cells, we've destroyed the gut by ethanol, which is most frequently abused agent, and found that 5% ethanol treatment for 1 hr inhibited cell proliferation by 50% compared with untreated group. Since co-treatment of *Hf-PS-1* and ethanol protect the ethanol-induced cell death, and we examined which signaling pathway is related with the effect of *Hf-PS-1*, focusing on IGF-IR signaling pathway, which is involved in cell growth, differentiation, etc. The *Hf-PS-1* inhibited Ethanol cytotoxicity through two IGF-IR signaling pathways: activation of the PI3K pathway and the MAPK pathway. The ethanol treatment induced IGF-IR and IRS-1 phosphorylation slightly. Furthermore, binding of IRS-1 and p85, and the phosphorylation of Akt markedly increased after Ethanol treatment. In contrast, co-treatment of *Hf-PS-1* further phosphorylated IGF-IR, but decreased IRS-I phosphorylation and binding of p85 to IRS-1. Based on Western blotting analysis, treatment with ethanol alone induced an increase of Akt activation, whereas *Hf-PS-1* co-treatment decreased it. The Akt is generally activated by proliferative stimuli, such as growth factors, but in our system, Akt phosphorylation is induced ethanol treatment but decreased *Hf-PS-1* co-treatment, which induced cell proliferation. Therefore, we suggest the Akt activation during the oxidative stress by Ethanol is induced to sustain cell survival. Furthermore, we examined the another pathway of IGF-IR signaling pathway, MAPK signaling pathway. Ethanol inhibited Shc activation and the its binding with Grb2. On the contrary, *Hf-PS-1* co-treatment increased Shc activation and the binding of Grb2 to Shc. So we observed ERK, JNK, p38 activation, the downstream of Shc-Grb2 signaling. Ethanol

induced phosphorylation of JNK compared control, but co-treated Hf-PS-1 is decreased. MAPKs mediate apoptosis and cell growth. Specially, JNK is activated by oxidative stress and one of the mitochondrial apoptosis pathway. Although p38 activation is not detected, ERK phosphorylation is increased in both of ethanol only or co-treatment of ethanol and Hf-PS-1. Therefore, the effect of Hf-PS-1 against ethanol-induced damage is related with JNK phosphorylation.

In the results of *in vivo* assay, ethanol treatment induced gastric bleeding, surface epithelial cell destruction and loss of the surface mucosa layer compared to the control group, but co-treatment with Hf-PS-1 inhibited these damages. Ethanol treatment resulted in significant activation of caspases 3, 8, and 9, and DNA fragmentation, indicators of apoptosis, and co-treatment with Hf-PS-1 inhibited it. Furthermore, we examined GSH, which plays a major protective role as a scavenger of free radicals that combine with non-protein thiols at the GSH reactive center to abolish free radical toxicity. In the present study, GSH levels decreased by 34% in the ethanol-only group relative to the control group (100%), whereas they increased to 103.9% in the ethanol +Hf-PS-1 group. Based on Western blotting analysis, JNK activation in the ethanol-only group. Co-treatment with Hf-PS-1 and ethanol decreased JNK activation, but phospho-ERK levels were not significantly different among the three groups. These results suggested that the protective effect of Hf-PS-1 was primarily associated with the inhibition of JNK phosphorylation. These results are agreement with that of *in vitro* assay. Therefore, we suggest that Hf-PS-1 could provide a new, natural treatment option for gastric ulcers in humans.

I. 서 론

우리나라는 옛 부터 고유의 식생활 습관으로 인해 많은 사람들이 위장 질환 또는 증세를 경험하였다. 최근 경제적 수준의 향상과 식생활의 서구화, 과식 및 과음, 고도의 산업화와 경쟁사회의 도래로 인한 스트레스, 카페인의 섭취, 아스피린, 부신피질호르몬제, 소염제 같은 약물(NSAID)의 섭취 증가로 인해 과거에는 잘 나타나지 않았던 위장질환까지 증가하고 있다. 특별히 위암은 한국인의 사망원인 중 가장 많이 발생하는 질환이며 암으로 인한 사망원인 중 가장 많은 빈도를 차지하고 있다.

위장질환 중 위궤양(gastric ulcer)은 세계인구 중 4~5%가 일생 중 한번 이상 겪는 질환으로 위산과 pepsin, secretin 그리고 정신적인 스트레스 같은 위장질환유발인자들이 prostaglandin이나 epidermal growth factors (EGFs) 같은 방어인자들보다 강하게 작용하여 위 점막을 손상시킴으로써 발생하는 소화성궤양(peptic ulcer disease) 이다(Jainu M and Devi CS, 2006).

위궤양으로 인한 위출혈이나 위천공 같은 병을 치료하기 위한 약들이 진통과 궤양치료 및 재발방지를 위해 많이 개발되었으나(Higham et al., 2000) 이러한 약들은 일반적으로 비싸고 다양한 부작용을 나타낸다. 그래서 천연물질 중에서 생리활성물질들을 분리하여 부작용이 없으면서 약리 효능을 가진 물질을 찾기위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 월계수 씨앗(Afifi et al, 1997), *Anchusa strigosa* 의 뿌리(Disi et al, 1998), 차나무(Maity et al, 1995), 호황련(Banerjee et al, 2008) 등이 바로 그 예다.

최근 천연물 중에서도 해조류의 다양한 생리기능효과가 밝혀지면서 해조류로부터 분리한 생리활성물질에 관한 연구가 활발히 진행되고 있으며

(Kwon et al, 2006; Munro et al, 1987) 그 기능을 고부가가치로 발전시키고 이용하려는 움직임이 활발해지고 있다. 해조류의 구성성분으로 단백질, 비타민, 미네랄 뿐 아니라 다당류 그리고 당단백질들은 항바이러스와 항암 효과 및 면역활성을 가지고 있다고 보고되었다(Von Vaupel Klein J.C, 1987; Yamamoto et al, 1987; Sheu et al, 1996).

그 중 홍조류인 김으로부터 추출한 포피란은 콜레스테롤 저하작용, 항균 효과, 항암효과 및 아세트아미노펜에 의한 간독성과 세포독성을 저해하는 효과가 있다고 알려져 있고(Hong et al, 1997; Hwang et al, 2007) 녹조류인 매생이의 메탄올 추출물은 지질과산화물을 억제하고 에탄올 추출물은 멜라닌 생성을 억제하는 효과가 있으며 매생이 자체는 중성지방과 콜레스테롤을 저하하는 효과가 있다고 보고되었다(Mun et al, 2005; Park et al, 1997; Kwon et al, 2006; Yang et al, 2005). 갈조류에는 특히 alginate, fucan, fucoidan 그리고 laminaran 같은 생리활성이 우수한 수용성 다당류와 함께 cellulose 같은 불용성 다당류를 포함한다고 알려져 있는데(Mabeau & Kloareg, 1987; Lahaye & Kaeffer, 1997) 그 중 알긴산은 노화 억제 효과를 가진다고 하였고(Choi et al, 1992) 푸코이단은 항암, 항바이러스, 항 혈액응고작용 등의 생리효과를 가지고 있으며 여기에 황산기의 함량을 증가시킬 경우 그 효과를 향상시킨다는 보고가 있어 산업적인 이용가치를 높일 것으로 기대되고 있다(Teruya et al, 2007; Zemani et al, 2005; Liu et al, 2005).

한편, 갈조식물문 모자반과에 속하는 툇은 한국, 중국, 일본의 해안에서 많이 소비되는 해조류 중 하나로 칼슘, 비타민 A 및 식이섬유 함량이 풍부하여 당뇨병, 고혈압 예방, 대장암 및 변비 등에 효과가 있고 요오드 함량이 많아 갑상선 암 및 각기병 예방에 효과가 있다고 알려져 있다(Ko et al, 2002). 일본에서는 툇의 효능을 높이 사서 툇의 날을 따로 만들어 섭취

를 권장하고 있으나 우리나라에서는 생산되고 있는 톳의 80% 이상이 일본으로 수출되어왔기 때문에 잘 알려지지 않았고 섭취도 많지 않았다.

지금까지 밝혀진 톳의 생리 활성능력으로는 톳에서 추출·정제한 푸코이단의 항 혈액응고활성, 톳 열수추출물의 흰 쥐의 고형암 성장 저지, 톳에서 분리한 fucoxantin의 DPPH radical 소거 능, 톳의 에탄올 추출물이 인간 임파구의 면역능력 증가효과를 가진다는 연구(Koo et al, 2001; 1990; Shan et al, 1999; Ryu et al, 2007) 등이 있으나 아직까지 미미한 실정이다. 따라서 톳 구성성분 중 많은 양을 차지하는 다당 부분을 추출하여 어떤 기능을 가질 것이라는 가정 하에 생리기능효과를 검토하였다.

에탄올은 대표적인 질병유발요인으로 과량 섭취된 에탄올이 대사되면서 acetaldehyde를 생성하게 되고 이로 인해 free radical이 생성되어 지질과산화물을 형성하여 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)를 인체 내에 생성하게 되어 산화적 스트레스(oxidative stress)를 유발하게 된다 (Pryor, 1977). 이러한 산화적 스트레스로부터 세포막과 세포내 물질을 보호하고 생체 내 균형을 맞추기 위해 우리 몸에서는 free radical scavenger로 항산화 효소인 glutathione peroxidase (GSH-Px), xanthine oxidase(XO), catalase, superoxide dismutase(SOD) 등 과 항산화 물질인 vitamin C, vitamin E, β -carotene, lipoic acid, uric acid, selenium(Se), glutathione (GSH) 등이 존재하여 활성산소들을 제거하지만 과량의 에탄올을 지속적으로 섭취할 경우 소화성 궤양이 발생하게 된다(Cho et al, 2007; Sung et al, 2000).

에탄올에 의한 손상 저해에는 갈근(Radix puerariae)과 죽력(Bambusae caules in liquamen phyllostachyos), 헛개나무 열매 추출물 등이 효과를 가진다고 알려져 있으며(Park et al, 2006; Kim, 2004) 해조류 중에서는 매생이, 해마토코쿠스, 모자반 등이 효과가 있다고 보고되어 있으나(Hwang et

al, 2008; Raghavendran et al, 2004; Kamath et al, 2008) 아직까지 톳에 관한 연구는 없었다.

따라서 본 실험에서는 에탄올에 의한 산화적 스트레스와 관련하여 위 손상을 유도하는 것과 세포 독성을 나타내는 것에 대해 톳의 구성성분 중 다당이 어떤 영향을 주는 지 확인하고자 *in vivo*와 *in vitro* 실험을 통해 각각 살펴보았다.



II. 재료 및 방법

1. 재료

가. 시약 및 재료

본 실험에 사용된 톳은 전라남도 완도의 톳 양식장에서 구입한 톳을 사용하였다.

IEC-6 세포 배양에 사용한 Fetal bovine serum (FBS)은 Gibco BRL (Life Technologies, Gibco BRL, Gaithersburg, MD, USA) 제품을 사용하였으며, Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM), sodium bicarbonate, 배지용 항생제, bovine serum albumin(BSA), trypsin, protease inhibitor, detergent, SP600125 는 Sigma Chemical Co.(USA)에서 구입하였으며, 톳의 단백질을 제거하기 위해 Pronase (Roche, Mannheim, Germany) 를 사용하였다.

Western blot에 사용된 protein standard marker는 dual color marker (BIO-RAD, USA)를 사용하였고 detection reagent로는 SuperSignal West Pico Luminol/Enhancer Solution과 SuperSignal West Pico Stable Peroxide Solution과 세포단백질농도를 측정하기 위한 BCA Protein Assay Kit (Pierce, USA)를 사용하였다. Western blot와 immunoprecipitation에 사용한 antibody들은 Santa Cruz (USA)와 Cell Signaling(USA) 제품을 사용하였다. 세포생존율을 측정하기 위한 MTS/PMS solution (CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Kit)은 Promega에

서 구입하였다. Caspase-3, -8 활성을 측정하기 위해 CaspACETM Assay System(Promega)를 구입해서 사용하였다. 세포배양용 culture dish, 6-/96- well plate, corning tube, scrapper는 Corning (USA)와 Falcon (Becton Dicknson Labware, USA) 제품을 사용하였고, 전기영동용 agarose는 SeaKen LF agarose (BMA, USA)를 사용하였다. 100bp DNA ladder는 Bioneer (Bioneer Co, Korea)에서 구입하였으며, 그 외 DNA 실험용 시약들은 molecular biology용으로 Sigma에서 구입 사용하였다.

2. 실험방법

가. 시료의 조제

(1) 톳으로부터 다당 추출 및 단백질 제거

2007년 3월에 전라남도 완도 톳 양식장에서 구입한 생 톳(*Hizikia fusiformis*)을 수세하여 염분기를 제거하고 50℃ 열풍 건조 후 분쇄한 다음, 톳 분말 40g을 취해 3구 플라스크에 넣고 증류수 1L에 침지하였다. 100℃에서 6시간동안 교반하면서 추출한 다음, 감압하여 뷰후너 깔대기로 여과하고 4℃, 2500rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액에 3배 부피의 에탄올을 첨가하고 침전된 당을 뷰후너 깔대기로 거른 뒤 50℃ 열풍 건조하여 톳 당(Hf-PS)를 얻었다. Hf-PS를 0.1M Tris buffer(pH7.5)에 0.5% SDS가 첨가된 용액에 1%로 녹이고 당과 pronase가 10:1이 되도록 pronase를 첨가하였다. 이 혼합물을 37℃에서 20hr 동안 shacking incubation 한 뒤 100℃에서 10분간 가열하여 효소 활성을 제거한 다음

4℃에서 O/N 하여 잔사가 가라앉게 하였다. 4℃, 2500rpm에서 20분간 원심분리 후 상층액을 취하여 3배 부피의 에탄올을 첨가하고 부후너 깔대기로 여과한 뒤 아세톤을 처리하여 수분을 제거하고 50℃에서 열풍건조하여 분쇄한 뒤 (Hf-PS-1) (Figure 1.) -70℃에서 보관하고 에탄올에 의한 손상에 대한 저해 효과를 검토하였다. 위에서 나온 시료의 정제도는 BCA Kit를 통해 측정하였다.



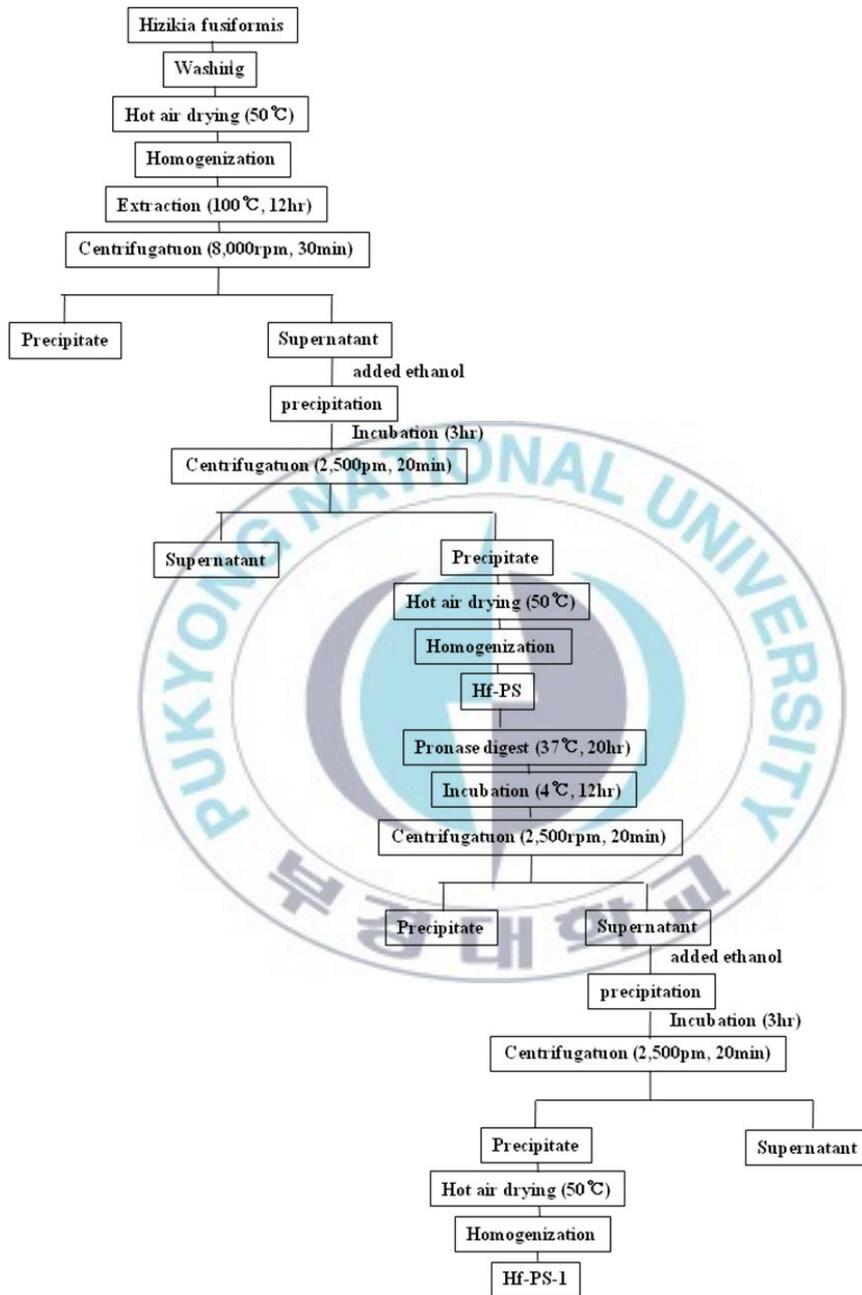


Figure 1. Purification procedures of *Hf-PS-1* from *Hizikia fusiformis*.

(2) Agarose gel electrophoresis

Agarose gel 전기영동은 Dietrich CP & Dietrich SMC 와 Leite et al. (1998) 의 방법으로 실험하였다. 즉, 0.05M 1, 3 diaminopropane/acetate buffer (pH 9.0)을 사용하여 0.6% agarose gel을 만들어 100V에서 1시간 동안 전기영동 하였다. Gel은 3% acetic acid : ethanol : water(0.1: 5 : 4.9, v/v) 에 toluidine blue를 0.1%로 첨가한 염색약에 15분간 염색하고 toluidine blue만 뺀 용액에 탈색하여 밴드를 확인하였다(Leite et al, 1998 ; Silva et al, 2005).

나. 세포배양

Rat의 정상 소화관에서 유래된 IEC-6 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 구입하였다. 세포는 10% FBS가 함유된 DMEM배지를 사용하여 37℃와 5% CO₂가 유지되도록 배양하였다. 이 때 미생물의 오염이나 증식을 억제하기 위해 penicillin(100 units/ml)과 streptomycin(100 ug/ml)을 배지에 첨가하였다. 세포가 80% 정도 dish를 덮으면 phosphated-buffered saline-EDTA (PBS-EDTA)로 세척한 후 trypsin처리하여 계대배양 하였으며 배지는 48시간마다 교환하였다.

다. MTS assay

Ethanol, Hf-PS-1이 IEC-6 세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 96-well plate에 2×10⁴ cells/well로 세포를 분주한 후 세포부착을 위해 24시간 배양하고, phenol red free-MEM 배지로 12시간 더 배양한 다음

Hf-PS-1을 표시된 농도/시간대별로 배양한 뒤 ethanol을 배지의 5%로 1시간 처리하였다. MTS/PMS solution (Promega Co, USA)를 첨가하고 37°C에서 1시간 반응시킨 후 ELISA plate reader로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

라. Western blot

먼저 total cell lysate를 취하기 위해 PBS로 2회 세척한 세포를, protease inhibitor(1 mg/ml aprotinin, 1 mg/ml leupeptin, 1 mg/ml pepstatin A, 200 mM Na_3VO_4 , 500 mM NaF, 100 mM Pphenylmethylsulphonylfluoride)가 든 RIPA lysis buffer(1% NP40, 0.25% sodium deoxycholate, 1 mM EGTA, 150 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH7.5)로 세포를 취한 다음 4°C, 12,000 rpm으로 원심분리시킨다. 상층액을 취해 BCA protein assay kit로 단백질 농도를 측정하였다.

단백질 농도를 50 $\mu\text{g}/\text{lane}$ 으로 동일하게 취하여 SDS-PAGE로 전기영동한 다음 PVDF membrane(Millipore, USA)으로 옮겼다. 이때 표준분자량은 rainbow molecular marker를 사용하였다. 분리된 단백질은 Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate(PIERCE, Biotechnology, Inc, USA)를 이용하여 단백질 발현을 확인하였다. 0.1% bovine serum albumine(BSA)과 Tween 20이 든 Tris-buffered Saline(10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5)에서 2시간동안 blocking시킨 다음 TBS-T (Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20)로 15분간 2회 세척하였다. 세척한 membrane에 1차 항체를 TBS-T에 1:500으로 희석하여 4°C에서 하룻밤 반응시켰다. TBS-T로 15분간 2회 세척시킨 membrane을 2차 항체(1:10,000)로 2시간 반응시킨 후, 다시 TBS-T로 15분간 2회 세척한다.

Super Signal West Pico Stable Peroxide Solution과 Super Signal West Pico Luminol/ Enhancer solution을 사용하여 KODAK X-ray 필름에 감광시켰다. X-ray 필름을 현상한 후 scanning하여 나온 밴드의 강도를 Science Lab 2005(Fujifilm, Japan)을 이용하여 비교분석하였다.

마. Immunoprecipitation

Control, Ethanol, Ethanol + Hf-PS-1을 처리한 세포를 PBS-EDTA로 2회 세척하고 RIPA buffer를 넣어 얼음 위에서 신속하게 cell lysate를 회수하였다. 회수한 cell lysate는 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 다시 회수하고 단백질 농도를 측정하였다. 각 처리별로 농도를 일정하게 맞춘 cell lysate에 anti-IGF-IR β -항체, anti-IRS-1 항체 또는 anti-Shc 항체를 처리하여(1:300) 4°C에서 하룻밤 반응시킨 후, protein A-Sepharose (Sigma Co, USA)를 넣어 4°C에서 1시간 방치하고 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 항체와 결합한 IGF-IR과 IRS-1 단백질을 A-Sepharose와 함께 침전시켰다. Protein A-Sepharose는 RIPA buffer로 3번 반복하여 세척하고 0.1 M DTT를 함유하는 1×Laemmli sample buffer를 넣고 10분간 끓인 후, sample buffer만 조심스럽게 회수하여 IGF-IR과 IRS-1 sample은 6% gel에 전기영동하고 Shc sample은 12.5% gel에 전기영동한 뒤 membrane으로 옮겼다. Membrane을 anti-phosphotyrosine 항체(1:1000, mouse monoclonal antibody)로 4°C에서 하룻밤 반응시킨 후, 2차 항체로는 anti-mouse IgG-conjugated horseradish peroxidase(1:10,000)를 사용하여 실온에서 2시간 반응시켰다. TBS-T로 세척 후, chemiluminescence substrate을 사용하여 X-ray 필름에 감광시키고 현상하여 IGF-IR, IRS-1, Shc의 protein 인산화 정도를 확인하였다. 인산화를 살펴본 membrane은

stripping하여 IGF-IR의 protein 수준 검토에 사용하기 위하여 stripping buffer(100 mM 2-mercaptoethanol, 2% sodium dodecyl sulphate, 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.7)로 50°C에서 30분간 stripping한 다음, anti-IGF-IR β -항체, IRS-1 항체, Shc 항체(1:1000)로 4°C에서 하룻밤 반응시킨 후, ECL western blot 방법으로 IGF-IR, IRS-1, Shc의 단백질 발현 수준을 밴드로 확인하였다.

바. 세포에서의 GSH assay

GSH 농도는 glutathion assay kit(Sigma, USA)를 이용하여 측정하였다. 먼저 세포를 PBS로 2회 세척한 후, 5×10^8 cells을 1.5 ml tube에 취하였다. 원심분리하여 남은 세포 pellet에 5% sulfosalicylic acid(SSA) 용액을 첨가하고 액체질소와 37°C water bath를 이용하여 동결, 해동을 2회 반복하였다. 4°C에서 5분간 방치 후 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하고 상층액을 취해 GSH 농도를 측정하였다. 상층액을 96-well plate에 취하고 여기에 assay kit내 포함된 working mixture를 첨가하여 실온에서 5분간 반응시켰다. 5분후 NADPH를 넣고 피펫으로 혼합한 후 412 nm에서 5분간격으로 흡광도를 측정하였다.

사. 동물사육

실험동물은 샘타코에서 분양받은 8주령의 Sparague Dawley 계 숫쥐(체중, 200 ± 10 g)를 사용하였다. 각각 10마리씩 세 그룹(control군, Ethanol군, Ethanol + Hf-PS-1군)으로 나누어 연립식 사육케이지에 넣고 7일간의 순치예비사육을 하였다. 이 때 사육실온도($22 \pm 1^\circ\text{C}$), 습도($50 \pm$

10%) 및 명암(12시간, 08:00 ~ 20:00)을 엄격히 조절하였다.

순치 예비사육을 거친 후, 일반사료와 물은 자유롭게 먹을 수 있도록 하였고, 8일 째 되는 날 ddH₂O(control군과 Ethanol군)와 Hf-PS-1 (300mg/kg)을 경구 투여하였고 2시간 후 ddH₂O(control군)와 ethanol (40%, 8ml/kg; Ethanol군, Ethanol + Hf-PS-1군)을 경구 투여하였다. 1시간 후 Ether로 마취하고 단두하여 채혈하였고, 각 혈액시료는 빙수 중에 1시간 방치한 후에 원심분리(2,500rpm, 20min, 4℃)하여 취한 혈청을 저온(-70℃)에 보관하면서 실험에 사용하였다. 그리고 위를 적출하여 생리식염수로 세척한 다음 그 무게를 칭량하고 그 중 일부를 취해 Bounin용액(picric acid : formalin : glacial acetate = 15 : 5 : 1)에 고정하였다.

(1) 위 조직염색

각 실험군 별로 사육한 흰쥐의 위 조직을 떼어내어 생리식염수로 가볍게 씻어 혈액과 위액을 제거하였다. 위 조직의 일부를 절단하여 0.5 cm 두께로 잘라 Bounin 고정용액(picric acid : formalin : glacial acetate = 15 : 5 : 1)에 고정하고, 동일 고정액을 사용하여 24시간 안에 tissue capsule에 넣어 재고정하였다. 이를 수세하여 자동 침투기(autotechnicon)에 넣어 순차 농도 에탄올에 탈수하고 xylene으로 투명화시켰다. Embedding center에서 tissue capsule에 paraffin을 침투시켜 포매(embedding)하여 block으로 만들었다. Rotary microtome으로 block을 5 μ m두께로 박절하여 부유 항온수조에서 충분히 퍼지도록 둔 후 깨끗한 slide glass에 부착시켰다. 그런 다음, slide glass와 조직절편을 단단히 접촉시켜주기 위해서 60℃ 정도의 온도를 유지하는 slide warmer에 방치하였다. 마지막으로 세포의 배열과 형태학적 변화를 보기 위해 모든 조직절편을 핵과 세포질을 구분해서 볼 수 있는

Hematoxylin & Eosin 염색 후 광학 현미경으로 관찰하였다.

(2) 위 조직 중의 GSH 활성 측정

위 조직을 5% SSA 용액으로 균질화시킨 후, 액체질소로 동결, 37°C 향 온 수조에 해동을 2회 반복 실시하였다. 4°C에서 5분간 방치시킨 후 4°C, 14,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취했다. 상층액과 GSH assay kit내 standard solution을 96-well plate에 각각 분주한 다음 여기에 working mixture를 첨가하여 실온에서 5분간 반응시킨 후 NADPH를 넣고 피펫으로 혼합하고 412nm에서 5분 간격으로 흡광도를 측정하였다.

(3) 위 조직 중의 DNA 단편화

위 조직을 extraction buffer(50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM EDTA, 1% Nonidet P-40)에 넣고 균질화시킨 후 4°C에서 2시간동안 추출하였다. 그 후 sodium dodecyl sulfate(SDS)를 1%가 되도록 넣고 4°C에서 2시간, 0.55 mg/ml의 proteinase K를 넣고 42°C에서 2시간 incubation하였다. 동량의 phenol-chloroform- isoamylethanol(25:24:1)을 넣고 잘 섞은 후 원심분리하여 DNA가 포함되어 있는 상층액을 얻었다. DNA를 포함한 상층액에 0.1배의 3M sodium acetate와 2.5배의 100% ethanol을 넣어 DNA pellet을 침전시킨 후 70% ethanol로 세척하고 건조시켰다. 건조된 작은 알갱이를 Tris-EDTA(TE) buffer(20 mM Tris, 1 mM EDTA)에 녹여 260 nm에서 흡광도를 측정하여 정량한 뒤, 1% agarose gel에 전기영동하였다. 전기영동이 끝난 gel은 EtBr로 염색하여 자외선등을 이용하여 관찰하였다.

(4) 위 조직 Western blot

단백질 농도를 50 µg/lane으로 동일하게 취하여 SDS-PAGE로 전기영동한 다음 PVDF membrane(Millipore, USA)으로 옮겼다. 이때 표준분자량은 rainbow molecular marker를 사용하였다. 분리된 단백질은 Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate(PIERCE, Biotechnology, Inc, USA) 를 이용하여 단백질 발현을 확인하였다. 0.1% bovine serum albumine(BSA)과 Tween 20이 든 Tris-buffered Saline (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5)에서 1시간동안 blocking시킨 다음 TBS-T(Tris-buffered saline containing 0.1% Tween 20)로 15분간 2회 세척하였다. 세척한 membrane에 1차 항체를 TBS-T에 1:1000으로 희석하여 4°C에서 하룻밤 반응시켰다. TBS-T로 15분간 2회 세척시킨 membrane을 2차 항체(1:10,000)로 2시간 반응시킨 후, 다시 TBS-T로 15분간 2회 세척한다. Super Signal West Pico Stable Peroxide Solution과 Super Signal West Pico Luminol/ Enhancer solution을 사용하여 KODAK X-ray 필름에 감광시켰다. X-ray필름을 현상한 후 scanning하여 나온 밴드의 강도를 Science Lab 2005(Fujifilm, Japan)를 이용하여 비교분석하였다.

자. 통계처리

실험의 분석결과는 각각의 군별로 평균과 표준편차(mean±S.D.)를 사용하여 표기하였으며, 모든 자료는 Window용 SPSS 프로그램 (Statistical Package for Social Science, SPSS Inc, Chicago, IL, USA)을 이용하여 처리하였고, 반복측정에 의한 ANOVA test를 한 후 Duncan's multiple range test로 유의성 검증을 실시하였다. 이때, 모든 통계적 유의도 수준은 $p < 0.05$ 에서 살펴보았다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 해조류인 톳으로부터 당 추출 및 정제

톳의 일반성분을 Association of Analytical Communities(AOAC) 방법에 의해 분석한 결과 수분이 $6.66\pm 0.01\%$, 조단백질이 $11.75\pm 0.04\%$, 조지방이 $1.79\pm 0.25\%$, 조회분이 $35.12\pm 0.05\%$, 염분이 $17.47\pm 0.02\%$ 그리고 탄수화물이 $27.21\pm 0.02\%$ 로 탄수화물, 단백질, 지방 중 가장 많은 양을 차지하는 것을 확인하였다(Table 1). 50°C 열풍 건조 후 7.054g의 톳 당(Hf-PS)를 얻었다. 이렇게 얻은 톳 당(Hf-PS)중의 단백질 함량을 측정한 결과 0.36%의 단백질이 포함된 것을 확인하였다. 더 정제된 당을 얻기 위해 단백질분해 효소인 pronase를 처리하여 Hf-PS-1을 준비하였다. Hf-PS-1중의 단백질 함량은 0.05%로 pronase처리에 의해 감소한 것을 확인하였다. 당임을 확인하기 위해 0.6% agarose gel을 사용하여 전기영동한 결과, 단백질 제거 후 밴드가 이동한 것을 확인할 수 있었고 이는 단백질제거에 의한 변화라고 생각된다. 이렇게 정제된 당을 Hf-PS-1이라 명명하고 이후 실험에 사용하였다(Table 2, Figure 2).

Table 1. Proximate composition of dried *H.fusiformis*.

(%)				
Moisture	Crude lipid	Crude protein	Crude ash	Carbo- hydrate* ¹
4.27	1.76 (1.84)	12.94 (13.52)	19.17 (20.03)	61.86 (64.12)

¹100 - (Moisture + Crude lipid + Crude protein + Crude ash)

() = Dry base

Table 2. Proximate composition of dried Hf-PS-1.

					(%)
Moisture	Crude lipid	Crude protein	Crude ash	Carbo- hydrate* ¹	
7.34	trace (trace)	trace (trace)	16.54 (17.85)	76.12 (82.15)	

¹100 - (Moisture + Crude lipid + Crude protein + Crude ash)

() = Dry base

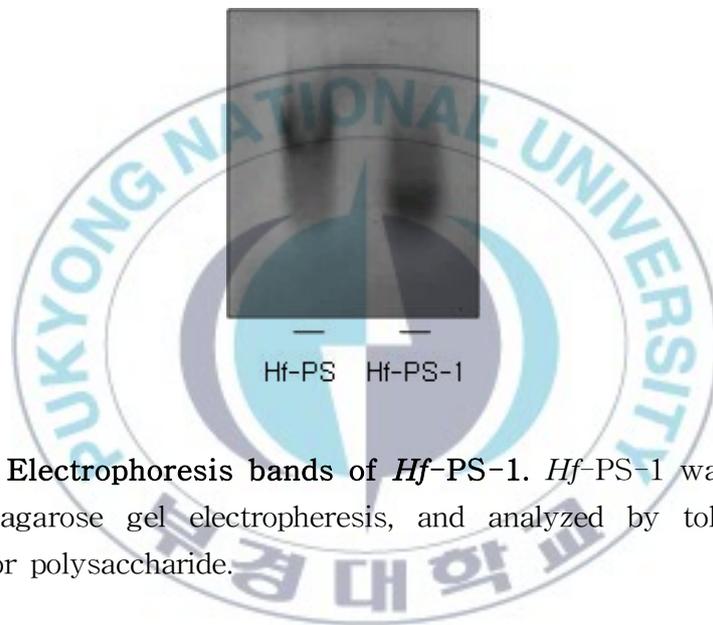


Figure 2. Electrophoresis bands of *Hf*-PS-1. *Hf*-PS-1 was separated by 0.6% agarose gel electrophoresis, and analyzed by toluidine blue staining for polysaccharide.

2. 에탄올의 소화관 정상세포인 IEC-6에 대한 독성 및 Hf-PS-1의 에탄올 독성 저해 효과

가. 에탄올 및 정제 Hf-PS-1 처리가 세포증식에 미치는 영향

본 실험에서 사용된 소화관 세포는 rat의 정상 소화관 조직에서 유래한 IEC-6 세포를 사용하였고, Hf-PS-1은 500 μ g/ml로 24시간 처리한 후 ethanol을 5% 농도로 1시간 처리하였다. 여기에 tetrazolium compound인 MTS를 투여하고 일정시간동안 배양하여 MTS가 세포 내 미토콘드리아에서 생산되는 succinate dehydrogenase에 의해 수용성 formazan으로 만들어진 것을 490nm에서 광학농도를 측정하여 formazan의 생성된 양으로 세포의 증식을 확인하였다.

먼저 Hf-PS-1 이 IEC-6 세포에 대하여 독성을 나타내는 지 확인하기 위해 100, 200, 300, 500 ug/ml로 24시간 처리한 후 MTS assay를 한 결과 Figure 3에서 보이는 것과 같이 독성이 나타나지 않음을 확인 할 수 있었다. 일반적으로 에탄올은 여러가지 기관에 있어서 손상을 주고 특히 세포에 대해서는 독성을 나타낸다. Venugopal et al.(2007)은 간세포인 VL-17A 세포의 경우 에탄올을 10%로 처리 시 MAPK cascade로 인해 염증과 세포사멸이 유도된다고 하였고, Zhang et al.(2007)은 흰쥐의 초대배양 간세포에 에탄올을 처리시 산화적 스트레스와 MAPK, 그리고 타이로신 인산화를 통해 세포사멸을 유도한다고 하였으며, Villegas et al.(2006)은 신경세포인 B92 glial 세포에서 에탄올에 의한 산화적 스트레스가 MAPK에 영향을 주어 세포사멸을 유도한다고 발표하였다. 이렇게 에탄올이 세포사멸을

유도한다는 보고처럼 본 실험에서도 에탄올을 5%로 1시간 처리하였을 때 Figure 4에서 보이는 바와 같이 IEC-6 세포의 세포증식이 약 50% 감소하는 것으로 보아 에탄올이 세포사멸을 유도하는 것으로 보여진다. 에탄올 유도 세포사멸에 대해 톳 당의 저해 효과를 확인하기 위해 Hf-PS를 pronase로 단백질을 제거한 것(Hf-PS-1)과 제거하기 전의 것(Hf-PS)으로 실험한 결과 단백질을 제거하였을 때가 에탄올에 의한 세포사멸을 저해하는 효과가 있음을 확인할 수 있었다(Figure 4A). 그래서 효과가 있는 Hf-PS-1의 조건을 확인하기 위해 시간별, 농도별로 실험한 결과 농도별로 24시간 처리 시 농도 의존적으로 효과가 있음을 확인할 수 있었고 Hf-PS-1을 3, 6, 12, 24 시간 처리 시 시간 의존적으로도 효과를 확인하였으며(Figure 4B) 그 중 Hf-PS-1 500 μ g/ml을 24시간 처리하는 조건으로 고정으로 하여 실험을 진행하였다.

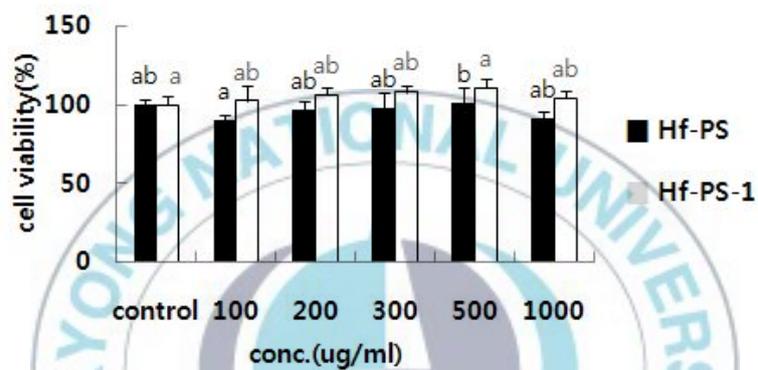


Figure 3. Effect of Hf-PS and Hf-PS-1 on cell viability. IEC-6 cells were incubated with Hf-PS or Hf-PS-1 in the indicated concentrations for 24hrs. The results indicated mean \pm S.D. in three independent experiments.

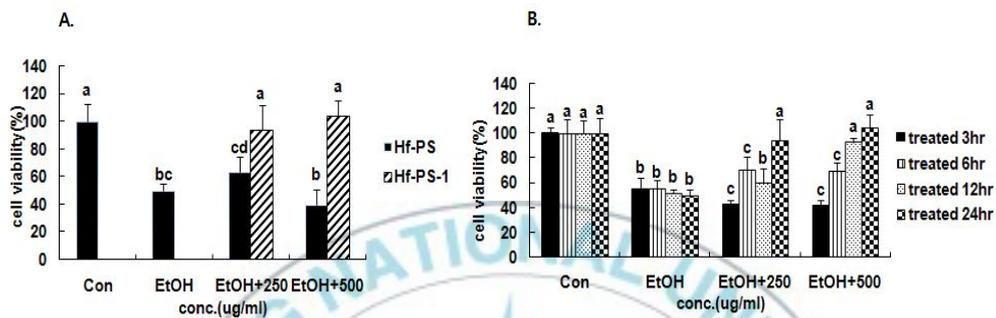


Figure 4. Protect effect of Hf-PS-1 on ethanol induced damage.

Cells were seeded in 96-well plate and incubated for 24hrs and media was changed with SFM for 12hrs. Cells were treated Ethanol for 1hr after SFM, Hf-PS, Hf-PS-1 at the indicated concentrations for 24hrs except control. And cells were incubated SFM, Hf-PS-1 at the indicated concentrations and times, after that treated Ethanol for 1hr. Cell viability was measured with MTS assay kit as manufacturer's instruction. Data were represented % of control(100%). Values are the mean \pm S.D. Values different alphabet are significantly ($p < 0.05$) among the group by Duncan's multiple range test.

나. 에탄올 및 Hf-PS-1 처리가 세포형태에 미치는 영향

Figure 5는 IEC-6 세포에 에탄올을 처리한 것과 Hf-PS-1과 에탄올을 처리했을 때 세포형태를 현미경에서 관찰한 것이다. 그림에서 보여지는 바와 같이, IEC-6 세포에 에탄올을 처리 시 세포가 수축하였으며, 세포 수 또한 감소하는 것으로 나타났다. 반면에 Hf-PS-1을 24시간 처리 후 에탄올을 처리하였을 때 농도가 높아질수록 세포의 형태가 대조군과 비슷하게 보호되는 것으로 나타났다. 이는 앞에서 살펴보았던 MTS assay 결과와 일치하는 것이다.



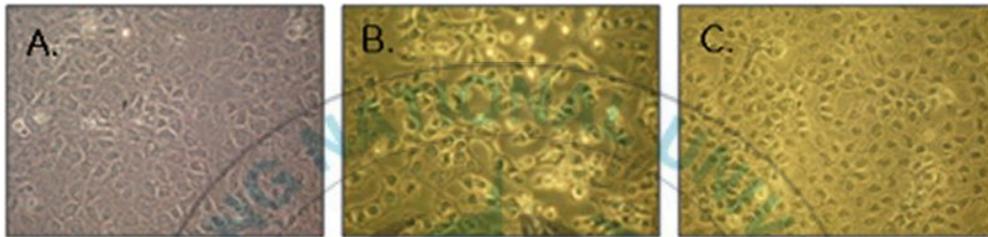


Figure 5. *H.fusiformis* Polysaccharide-1 protects ethanol-induced damage of IEC-6 cells and morphology(x400).

Cells were treated with SFM for 12hrs. Cells were treated Ethanol(5%, 1hr) after treated SFM or Hf-PS-1(500 μ g/ml) for 24hrs A is control. B is treated only Ethanol. C is treated Ethanol (5%, 1hr) after *Hf*-PS-1 (500 μ g/ml) pretreatment.

3. 에탄올의 세포독성에 대한 Hf-PS-1의 저해 기전

가. Hf-PS-1의 IGF-I 신호전달경로와 관련한 억제기전

Insulin-like growth factors (IGFs) 는 세포 대사, 성장, 분화를 조절하는 중요한 peptide로 adult hepatocytes와 infetal hepatocytes에서 합성, 분비된다고 알려져 왔으나 우리 몸의 대부분에서 발견되고 암세포에서도 발현이 되는 것이 알려지게 되었다. IGF-I은 growth hormone에 의해 조절되고 생체 내의 성장과 발육에 영향을 주게 된다. 분비된 IGF-I은 DNA 합성에 필요한 G1기에서 S기로 진행되는데 필요한 인자로 IGF-IR (type-I IGF receptor)과 결합하여 세포의 증식과 세포주기 진행 및 분화, 대사에 관여하고 초기 종양생성에 관여하며 세포사멸 억제작용을 나타낸다 (Baserga et al, 1993). IGF-I이 IGF-IR과 결합하게 되면 다양한 신호전달이 활성화되게 되는데 tyrosine 인산화(PY)로 인해 IGF-IR이 활성화되면 IRS-1(insulin receptor substrate-1)을 인산화시키게 되고 PI3K(phosphatidyl inositol-3 kinase)의 substrate인 p85를 인산화하여 AKT의 인산화에 영향을 주게 된다. 또한 IGF-IR의 인산화는 Shc을 인산화하게 되고 IRS-1 비의존성으로 Grb 2(growth factor receptor bound protein 2)와 결합하여 Ras-MEK 경로를 활성화하게 되고 MAPKs(mitogen-activated protein kinases)에 연관되게 된다. 본 연구에서는 에탄올이 소화관세포인 IEC-6의 세포사멸을 유도하고 Hf-PS-1을 병행 투여하였을 때 세포사멸을 저해하였는데 그 유도과정이 IGF-IR 신호전달에 있어서 어떻게 연관되고 작용하였는지를 살펴보았다. IP로 IGF-IR을

사용하고 IB로 PY99를 써서 tyrosine 인산화를 확인하였는데 에탄올만 처리하였을 때 IGF-IR이 대조군에 비해 $20.7 \pm 5.1\%$ 인산화 되었으며 Hf-PS-1을 병행 투여한 군은 에탄올 처리 군만큼($25.6 \pm 8.8\%$) 인산화 된 것을 확인할 수 있었다. 세포는 스트레스를 받으면 항상성을 유지하기 위해 스트레스 저항력이 증가하게 되는데 이 때 IGF-I 분비를 증가시키게 된다. 에탄올은 일시적인 세포 스트레스 저항성에 영향이 있다고 보고되고 있으므로 IGF-IR이 세포증식에 관여하는 IGF-I과 결합해서 자동 인산화를 유도하게 되고 그로 인하여 대조군에 비해 IGF-IR의 인산화가 증가한 것이라고 보여진다 (Lee et al, 2007 ; Oh et al, 2008). 또한 Hf-PS-1을 투여하였을 때 유의적인 차이는 없었지만 Densidometer로 확인 시 더 진해진 것을 확인할 수 있었는데 이는 Hf-PS-1의 보호효과로 인해 스트레스 저항력이 더욱 증가해 IGF-1 분비를 증가시켜서이기 때문이라고 보여진다. IGF-IR의 downstream인 IRS-1의 tyrosine 인산화를 확인하기 위해 IP로 IRS-1을, IB로 PY99를 붙였을 때 에탄올만 처리하였을 때 IRS-1이 대조군에 비해 $29.0 \pm 1.6\%$ 인산화 되었으며 Hf-PS-1을 병행 투여한 군은 다시 대조군 만큼 인산화가 감소되었다. 다음으로 IRS-1에 결합하는 PI3K p85의 양을 확인하기 위해 IP IRS-1에 IB PI3K p85를 붙였을 때 대조군에 비해 에탄올 처리 군에서 단백질 발현이 증가하였고 Hf-PS-1을 병행투여 시에는 다시 감소하였는데 유의적인 차이는 없었다. Hf-PS-1을 병행하여 처리한 군에서 다시 단백질이 대조군만큼 줄어들었다. AKT역시 western으로 확인하였을 때 AKT의 단백질에는 변화가 없었으나 phospho AKT는 에탄올 처리 군에서 다른 군보다 많이 발현되었다가 Hf-PS-1 병행 처리 군에서 대조군보다는 발현되었으나 에탄올 군 보다 감소되었다 (Figure 6).

Zhou et al.(2005)은 소장상피세포인 RIE-1에 H₂O₂를 처리하였을 때 본 실험과 같이 산화적 스트레스로 인한 세포의 사멸을 방어하기 위해서 대조군보다 H₂O₂처리군이 AKT의 인산화가 더 많이 일어난다고 발표하였으며 Kim et al.(2008)과 Kuwabara et al.(2008)은 세포가 산화적 손상시 산화·환원 조절의 균형이 깨짐으로 인해 세포가 사멸할 때 균형을 유지하기 위해 AKT의 인산화가 일시적으로 증가한다고 하였으며 이 현상을 homeostasis적인 반응이라고 하였다. 또한 항산화 효과가 있는 Lutein과 N-acetylcystein(NAC)을 H₂O₂와 함께 처리하였을 때 AKT의 인산화가 저해된다고 보고하여 본 실험과 같은 경향을 보였다. 아직 이 현상에 대한 정확한 보고는 나와있지 않았으며 이에 대한 연구가 더욱 진행되어야 할 것이라 생각된다. Shc의 경우 IP는 Shc, IB는 PY99를 붙여 Shc의 tyrosine 인산화를 확인하였는데 대조군에 비해 에탄올 군에서 29.6±4.9% 감소되었다가 Hf-PS-1을 병행 처리하였을 때 에탄올 군에 비해 32.1±11.2% 다시 증가하였다. Shc에 붙는 Grb 2를 보기위해 IP Shc에 IB로 Grb 2를 붙였더니 대조군에 비해 에탄올 군에서 Grb 2의 발현량이 20.7±0.4% 감소하였으나 Hf-PS-1 병행처리 군에서 다시 에탄올 군에 비해 발현량이 40.6±3.4% 증가한 것을 확인할 수 있었다(Figure 7). 즉, 에탄올이 IEC-6 세포에 산화적 스트레스를 유도하게 되는데 이를 방어하기 위해서 IGF-IR의 tyrosine 인산화가 증가하게 되고 Hf-PS-1을 병행처리하였을 때는 IGF-IR의 인산화가 에탄올만 처리했을 때 보다 더 많이 일어나 산화적 스트레스로부터 보호하게 되어 그 downstream인 Shc과 Grb2를 통해 생존으로 가는 것으로 보여진다.

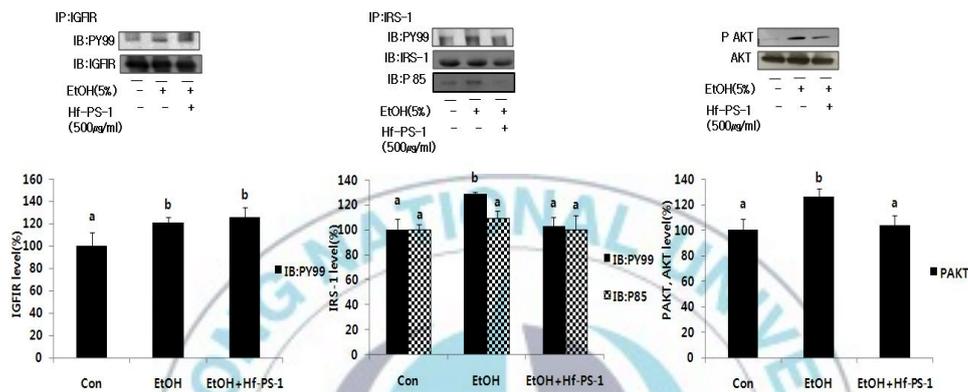


Figure 6. Effect of Hf-PS-1 on IGF-IR pathway regulators expression in IEC-6 cells.

Cells were treated with Ethanol(5%, 1hr) or Ethanol(5%, 1hr) + Hf-PS-1(500 μ g/ml) after preincubation with SFM for 12hrs. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-IGFIR, IRS-1 antibody and the immune complexes were then analyzed by electrophoresis and immunoblotting with anti-phosphotyrosine, or anti-IGF-IR, IRS-1, p85 antibody. And whole cell extracts were prepared and analyzed by western blotting using anti-phospho-AKT, anti-AKT antibodies.

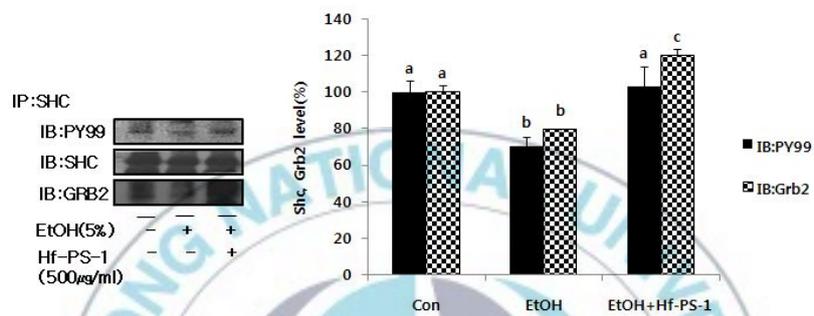


Figure 7. Effect of Hf-PS-1 on Shc phosphorylation and Shc/Grb2 complex formation in IEC-6 cells.

Cells were treated with Ethanol(5%, 1hr) or Ethanol(5%, 1hr) + Hf-PS-1(500 μ g/ml) after preincubation with SFM for 12hrs. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-Shc antibody and the immune complexes were then analyzed by electrophoresis and immunoblotting with anti-phosphotyrosine, or anti-Shc, Grb2 antibody.

나. Hf-PS-1의 MAP kinase 신호전달 경로와 관련한 억제기전

에탄올에 의한 산화적손상과 관련된 세포 내 신호전달경로로는 MAPK (Mitogen-activated protein kinases) 신호 전달을 들 수있다. MAPK family 로는 extracellular signal-regulated kinase (ERK 1/2), c-Jun N-terminal kinase (JNK), p38이 있다 (Zhang Y et al, 2007 Lee YJ and Shukla SD, 2005). Yu et al.(2007)은 ROS에 의해 이들이 활성화 되면서 세포 생존에 영향을 준다고 하였다. ERK는 세포생존과 연관된 반면 p38MAPK과 JNK는 세포의 죽음과 연관되어 있다고 알려져 있고 이 들 사이의 균형이 세포의 생존과 죽음을 결정한다고 하였다(Yoon et al, 2002). 그래서 JNK의 저해제를 사용해서 JNK의 활성을 저해하면 세포사멸을 막을 수 있다(Conde et al, 2008). 본 실험에서는 에탄올이 MAPKs에 미치는 영향과 그에 대한 Hf-PS-1의 산화적 손상 저해가 어떻게 이루어 지는지 western blotting을 통해 확인하였다. 하지만 p38 MAPK의 경우 밴드를 확인할 수 없었다(Figure 8). ERK1/2는 에탄올 처리 시 인산화가 $42.8 \pm 3.5\%$ 증가하였으며 Hf-PS-1 병행 투여 군에서도 동일하게 대조군에 비해 인산화가 $42.4 \pm 4.7\%$ 증가하였다. 그에 반해 JNK의 경우는 에탄올 처리 시 인산화가 $32.8 \pm 3.2\%$ 증가하였다가 Hf-PS-1 병행 투여 시 활성이 $61.8 \pm 9.1\%$ 줄어들었다. Lee et al.(2007)은 간세포에 200mM 에탄올을 30 분간 처리 했을 때 일시적으로 p42/44 MAPK가 활성화되고 IGF-1 발현이 증가한다고 발표하여 본 실험과 비슷한 경향을 보였는데 이는 간세포에서 에탄올에 의해 ROS가 축적되고 hydrogen-peroxide에 의해 일시적인 세포 스트레스에 대한 저항력이 생기면서 p42/44 MAPK가 활성화되기 때문이

라고 하였다. (Aroor AR & Shukla SD. 2004 ; Lee YJ & Shukla SD. 2005).

Zhou et al (2005) 은 소장상피세포인 RIE-1 에 H₂O₂를 처리하였을 때 ERK1/2의 인산화가 일어난다고 하였으며 ERK1/2의 upstream인 MEK1의 저해제를 H₂O₂와 함께 처리시 세포사멸의 지표인 DNA fragmentation이 일어나는 정도가 H₂O₂만을 처리했을 때보다 감소하는 것을 확인할 수 있었다고 하였다. 보통 ERK 1/2는 세포 생존과 연관이 있다고 알려져 있으나 ERK 1/2는 세포 생존과 죽음 모두 관련이 있으며 여러 논문에서 H₂O₂에 의한 ERK1/2의 인산화가 signal transduction, 세포성장, 유전자 발현, 암 촉진인자로 작용하는 PKC(protein kinase C) 의존성과 비의존성 신호 전달에 의해 조절된다고 하였으며 RIE-1 세포에서는 H₂O₂에 의한 ERK1/2의 인산화가 PKC 비의존성 경로라고 발표하였다(Song et al, 2005 ; Zhang et al, 1998).

MAPKs 중 하나인 JNK는 산화적 스트레스원인 에탄올, Methamphetamine(METH), H₂O₂ 등에 의해 활성화되고 세포의 사멸을 유도하게 된다. Weston 과 Davis는 (2007) JNK가 세포사멸에 있어 중요한 지표로서 사용된다고 하였다. Villegas et al.(2006)은 신경교세포인 B92 에 에탄올 처리 시 세포사멸이 JNK의 인산화를 통해서 유도된다고 하였으며, Wang et al.(2008)은 인간의 신경아세포인 SH-SY5Y에 METH로 산화적 스트레스 유도시 JNK 경로가 활성화 되었으며 이로 인해 caspase-3가 활성화되어 세포사멸을 유도한다고 하여 본 실험과 비슷한 경향을 보였다. p38 MAPK의 경우 본 실험에서는 어떠한 밴드도 나타나지 않았는데 Zhang et al.(2007)의 실험에서 간세포에 에탄올을 50mM로 처리시 p38의

활성이 대조군과 유의적인 차이가 없었으나 100mM로 처리시 대조군에 비해 유의적으로 활성화됨을 보고하였다. 본 실험은 에탄올을 50mM로 처리하였기 때문에 p38 MAPK의 밴드를 확인할 수 없었다고 생각된다.



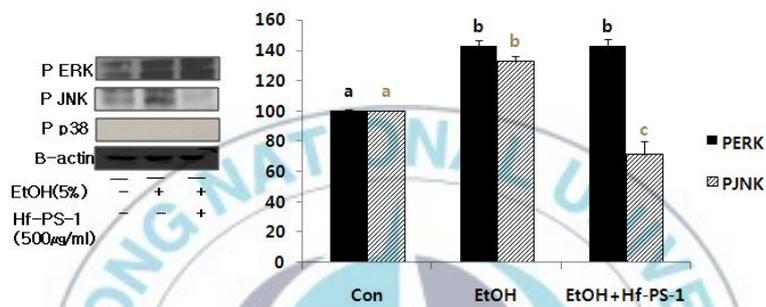


Figure 8. Effects of Hf-PS-1 on MAPK pathway regulators expression in IEC-6 cells.

Cells were treated with Ethanol(5%, 1hr) or Ethanol(5%, 1hr) + Hf-PS-1(500 μ g/ml) after preincubation with SFM for 12hrs. Whole cell extracts were prepared and analyzed by western blotting using anti-phospho-ERK1/2, anti-phospho-JNK, anti-phospho p38 and anti- β -actin antibodies.

다. 에탄올의 산화적 스트레스에 대한 Hf-PS-1의 저해 효과

에탄올에 의해서 JNK가 인산화 됨에 따라 JNK가 산화적 스트레스에 대한 결정적인 역할을 한다고 가정하여 JNK 저해제인 SP600125를 에탄올과 함께 처리 후 Hf-PS-1의 효과가 어느 정도인지 western blot과 GSH로 확인하였다.

에탄올은 산화적 스트레스의 대표적인 요인 중 하나로 에탄올이 대사되면서 에탄올 dehydrogenase와 cytochrome p450 2E1에 의해 acetaldehyde를 생성하게 되고 이로 인해 free radical이 생성되어 지질과산화물을 형성하여 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)를 인체 내에 생성하게 되어 산화적 스트레스(oxidative stress)를 유발하게 된다 (Pryor, 1977). 이때 GSH가 이들과 반응하여 제거하는 역할을 하고 세포 내 GSH 농도가 감소되어 산화적인 손상이 발생하게 된다(Cohen et al, 1983).

본 연구에서는 에탄올로 인한 GSH의 손실은 대조군에 비해 감소 ($72.72 \pm 14.84\%$) 하였는데 반해 Hf-PS-1을 먼저 처리하였을 때 에는 GSH가 에탄올 군보다 증가한 것 ($118.18 \pm 10.49\%$) 을 확인할 수 있었는데 이는 저해제 처리시 ($95.45 \pm 9.09\%$) 보다 더 높은 수치로 Hf-PS-1이 에탄올에 의한 산화적 스트레스를 저해한다고 볼 수 있다(Figure 9A). JNK의 인산화는 Hf-PS-1이 JNK inhibitor를 처리한 만큼 효과가 있음을 확인하였다(Figure 9B).

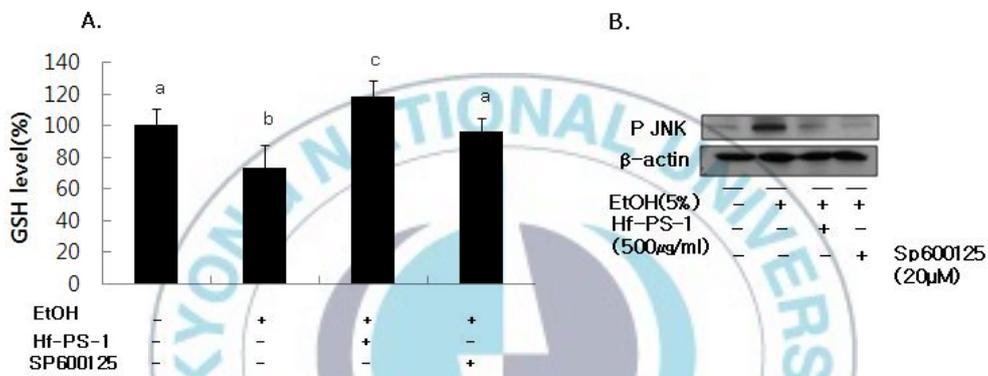


Figure 9. Effect of Hf-PS-1 on ethanol-induced damage

A. Cells were treated with Ethanol, Ethanol + Hf-PS-1 or Ethanol + SP600125(JNK inhibitor) and cell GSH level were measured as described in the materials and methods. Data were represented % of control(100%). Values are the mean \pm S.D. Values different alphabet are significantly ($p < 0.05$) among the group by Duncan's multiple range test .B. Whole cell extracts were prepared and analyzed by western blotting using anti-phospho-JNK, and anti- β -actin antibodies.

이상의 실험들로 에탄올과 에탄올에 의한IEC-6세포의 세포사멸을 억제하는 Hf-PS-1의 영향을 기전으로 표시하면 다음과 같다(Figure 10A, 10B)



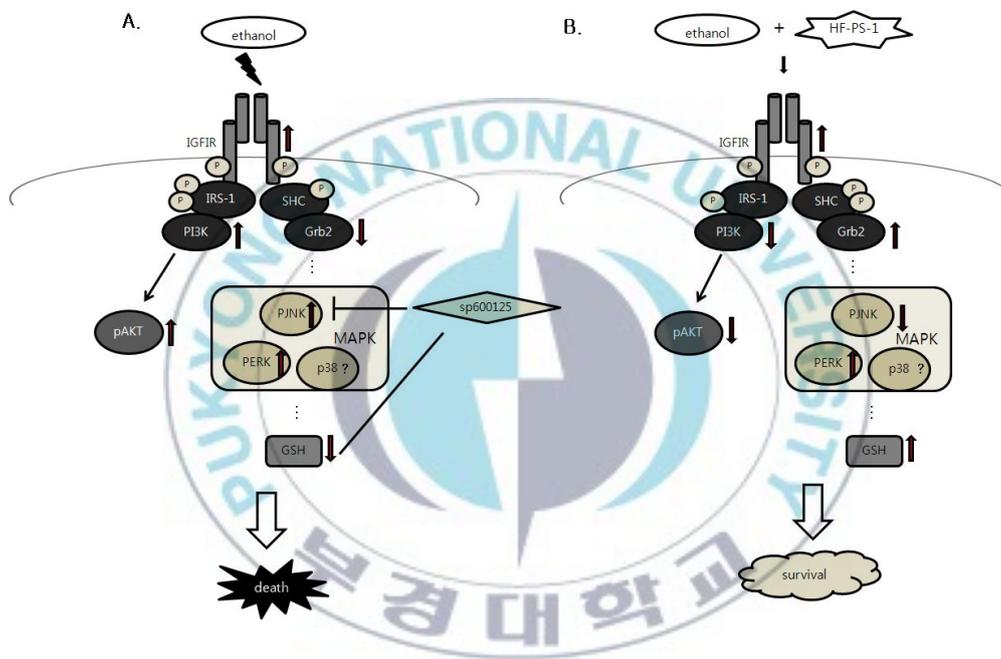


Figure 10. The proposed model of Hf-PS-1's protective mechanism on ethanol induced damage in IEC-6 cells.

4. 에탄올에 의한 Sparague Dawley rat의 위 손상 및 Hf-PS-1의 Ethanol 위 손상 억제 효과

소화관 상피세포인 IEC-6에서 에탄올로 인한 세포사멸과 Hf-PS-1의 저해효과를 확인하였으므로 *in vivo* 형태로서 Sparague Dawley rat의 위 손상 및 Hf-PS-1의 Ethanol 위 손상 억제 효과를 확인하였다. 에탄올이 위 장관에 손상을 준다는 연구가 다수 발표되었는데(Hernandez-Munoz R et al, 2000; Birdane FM et al, 2007) 에탄올의 위 손상유도에 따른 Hf-PS-1의 보호 효과를 관찰하기 위해 8주령 된 Sparague -Dawley rat를 대조군, 에탄올 단독 투여군, 에탄올과 Hf-PS-1을 투여한 Hf-PS-1 병행 투여 군으로 각각 10마리씩 나누어 실험하였다. 1주일간의 순치사육을 실시하였고, 그 이후 단기로 대조군과 에탄올 단독 투여 군에는 ddH₂O를, Hf-PS-1 병행 투여군에는 300mg/kg의 Hf-PS-1을 ddH₂O에 녹여 경구 투여하였다. 2시간 후 대조군은 ddH₂O를, 에탄올 단독 투여 군과 Hf-PS-1 병행 투여군에는 40% 에탄올을 8ml/kg로 경구 투여하였다. 다시 1시간 뒤 에테르로 마취하고 단두 및 해부하였다(Figure 10).

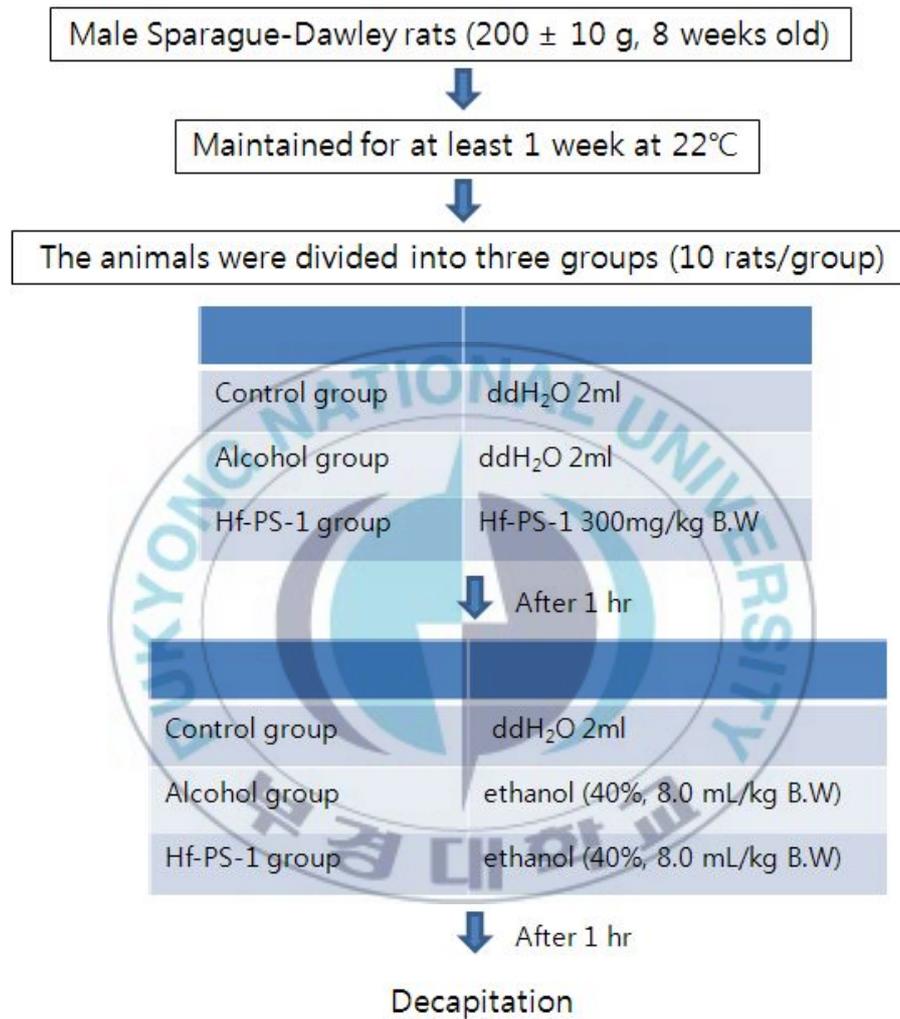


Figure 10. Procedures of rat experiment.

가. 에탄올 및 Hf-PS-1 투여가 위 무게에 미치는 영향

대조군, 에탄올 단독 투여군, Hf-PS-1 병행 투여군의 간, 위를 적출하고 무게를 측정하였는데 간 무게는 3군 간에 차이가 없었고 위는 에탄올을 먹인 두 군은 위액이 나와 부풀어 있었고 무게도 대조군보다 유의적($P<0.05$)으로 높게 나타났다. 그러나 안의 내용물을 모두 제거한 뒤 확인 하였을 때는 차이가 없었다. 3주 정도의 장기실험에서는 에탄올을 먹인 쥐의 식이 효율이 대조군에 비해 감소하였다는 보고가 있었는데 이는 소화율과 흡수율 그리고 열량효율이 감소하였기 때문이라고 설명하였다(Lieber et al, 1998; Ko et al, 2002). 하지만 본 연구와 같이 단회 투여 실험의 경우 장기무게에는 유의적인 차이가 없었다(Park et al, 2008 ; Kim et al, 2004; Park et al, 2005) (Table 2).

Table 2. Liver and Stomach weight following ethanol or ethanol + Hf-PS-1 co-treatment.

Experimental animal group ^{*1}	(Mean ± S.D.)		
	Control	Ethanol	Ethanol + Hf-PS-1300mg/kg
Liver(g)	10.15±0.96 ^a	9.62±0.77 ^a	9.74±0.60 ^a
Stomach(g)	1.85±0.22 ^a	3.3±1.09 ^b	2.86±0.51 ^b

Values represent mean ± S.D. with n=10 per group.

나. 에탄올 및 Hf-PS-1 투여가 위 표면손상에 미치는 영향

에탄올의 섭취는 위 염증, 위궤양 같은 병리학적인 상태를 유발시킨다 (Hernandez et al, 2000 Franke et al, 2005; Taylor et al, 2005). 본 연구에서는 대조군과 에탄올 단독 투여군, 톡당 병행 투여군 모두를 해부하여 각 위 내부 표면의 상태를 확인하였다(Figure 11). 위 내부표면에 대한 육안적인 소견은 에탄올 투여 시 위 출혈이 일어난 것을 확인할 수 있었고 Hf-PS-1을 먹인 군에서는 위출혈이 저해된 것을 확인할 수 있었다.

위 표면 상피세포들은 에탄올, NSAID 그리고 다른 위 손상 요소로부터 위를 보호하기 위해 점액질을 만들어 낸다(Hingson and Ito, 1971; Allen et al, 1986). 일반적으로 위 점막 손상은 상피세포들이 괴사상태일 경우 재생을 돕기 때문에 위궤양과 직접적으로 관련되지 않는다(Morris and Wallace, 1981; Lacy and Ito, 1984). 하지만 Allen et al. (1986) 은 표면상피점액이 에탄올이나 아스피린으로 인한 손상에는 보호역할을 하지 못한다고 발표하였다. 본 실험에서는 위 표면사진 뿐 아니라 에탄올 및 Hf-PS-1의 경구투여에 따른 흰쥐의 위 조직을 조직학적으로 살펴보기 위해 H&E로 염색 처리한 후 광학현미경으로 관찰하였다(Figure 12). 에탄올 군의 위는 대조군의 위에 비해 표면상피가 파괴되어 떨어져 나가 있는 것을 확인할 수 있었고 표면 점막이 손실된 것을 관찰할 수 있었으나 Hf-PS-1 병행투여 군에서는 표면상피가 에탄올에 의해 약간 수축된 상태를 보였지만 거의 대조군에 가깝게 보호해 주는 것을 확인할 수 있었다.

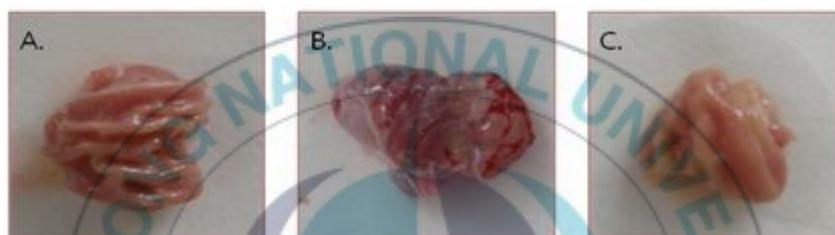


Figure 11. Photography of stomach after ethanol or ethanol + Hf-PS-1.

Hf-PS-1 protects against ethanol-induced hemorrhage on the inner surface of stomach. A is control group. B is treated only Ethanol (40%, 8.0 mL/kg B.W.). C is treated Ethanol (40%, 8.0 mL/kg B.W.) after *Hf*-PS-1 (300 mg/kg B.W.) pretreatment.

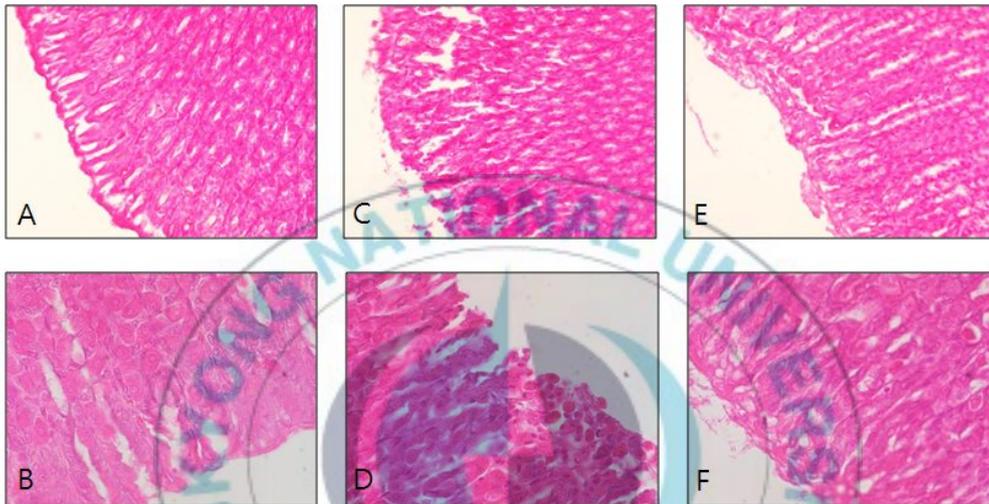


Figure 12. Photographs on epithelium of stomach by H-E staining.
 A, B ; control group (x200, 400) ; C, D ; ethanol treatment group (40%, 8.0 mL/kg B.W. ; x200, 400) induced some loss of surface mucosa layer E, F Ethanol (40%, 8.0 mL/kg B.W.) and Hf-PS-1 co-treatment group (300 mg/kg B.W. ; x200, 400) appeared a complete surface mucosa layer.

다. 에탄올 및 Hf-PS-1 투여가 위 조직 중의 caspase 활성화 및 DNA 단편화에 미치는 영향

위 조직의 표면 상피세포의 손실을 확인하였는데 이 손실이 에탄올로 인한 세포사멸에 의한 것인지를 확인하기 위해 세포사멸의 지표인 caspase -3, -8, -9 활성을 확인하였다. 본 실험에서 확인한 결과 에탄올을 경구 투여하였을 때(40%, 80ml/kg B.W.) caspase -3, -8, -9가 활성화된 것을 확인하였으며, Hf-PS-1 병행 투여 시에는 에탄올 투여 군보다 활성이 저해되는 것으로 나타났다. 또한 에탄올 처리 군에서 caspase -3의 기질인 PARP가 분해되었다(Figure 13). 앞에서 설명한 세포사멸에 관한 이해를 바탕으로 보았을 때 에탄올은 미토콘드리아와 관련된 사멸과 미토콘드리아와 관련되지 않은 사멸 모두를 유도하는 것으로 보여지며 핵에도 영향을 미치는 것으로 보여진다. 에탄올은 산화반응을 일으키고 그로 인해 DNA fragmentation을 일으킨다(Sehirli et al, 2008). 본 실험에서도 에탄올 투여로 인해 쥐의 위 조직에서 DNA fragmentation을 일으켰으며 Hf-PS-1 병행 투여 군에서는 대조군만큼 보호되었다(Figure 14).

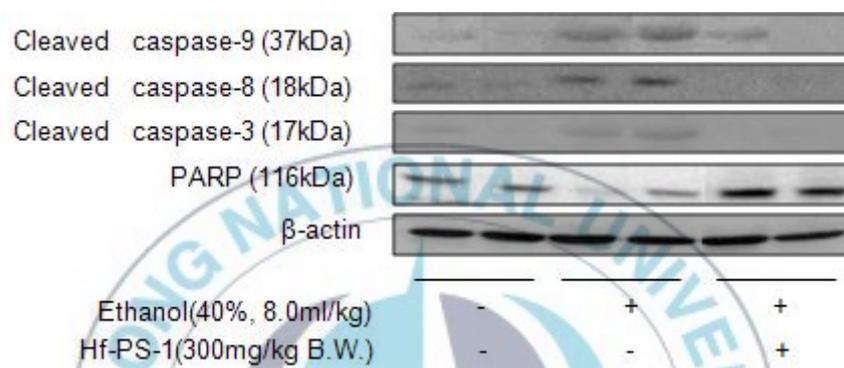


Figure 13. Effects of *Hf*-PS-1 on ethanol-induced gastric damage. Animals were treated as materials and methods and collected gastric tissues. Protein of tissues was extracted with lysis buffer and analyzed the expression of caspases, PARP and β -actin proteins by Westernblot analysis. β -actin was the loading control. Each lane represents a sample from an individual rat.

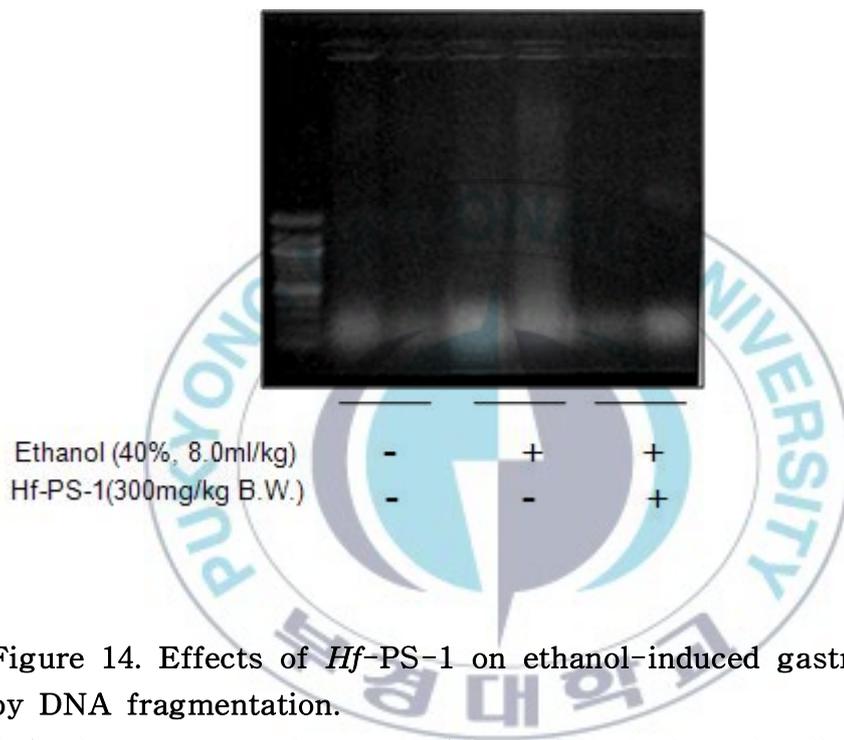


Figure 14. Effects of *Hf-PS-1* on ethanol-induced gastric damage by DNA fragmentation.

Animals were treated as materials and methods and collected gastric tissues. DNA of tissues was extracted with 10 mM Tris - HCl (pH 7.4), 10 mM EDTA, and 1% Triton X-100 and electrophoresis in 1% agarose gels, and visualized by ethidium bromide staining with a UV transilluminator. Each lane represents a sample from an individual rat.

라. 에탄올 및 Hf-PS-1 투여가 위 조직 중의 산화적 스트레스에 미치는 영향

앞에서 설명한 바와 같이 에탄올은 산화적 스트레스의 대표적인 요인 중 하나로 GSH가 이들과 반응하여 제거하는 역할을 하고 세포 내 GSH 농도가 감소되어 산화적인 손상이 발생하게 된다(Cohen, 1983). GSH는 많은 동물조직에서 tripeptide 형태로 존재하며 자유 radical의 scavenger로부터 보호하는 역할을 하므로 에탄올, H₂O₂ 그리고 다른 여러 독성물질로 인한 손상과 질병으로부터 몸을 보호하는 항산화 작용을 하게된다. 본 연구에서는 위 조직중의 GSH를 측정하여 에탄올의 산화적 스트레스에 대한 Hf-PS-1의 보호효과를 확인하였다. 그 결과 에탄올만을 처리하였을 때 위 조직 내 GSH가 에탄올 처리 군은 대조 군(100%)에 비해 65.8±22.9%로 감소하였으며 Hf-PS-1 병행 처리 군에서는 다시 증가하였다(103.9±22.0%) (Figure 15).

앞에서 말한 바와 같이 에탄올에 의한 산화적손상은 MAPK (Mitogen-activated protein kinases) 신호 전달과 연관되는데, Yu et al. (2007)은 ROS에 의해 이들이 활성화 된다고 하였다. ERK는 세포생존과 연관된 반면 JNK와 p38MAPK는 세포의 죽음과 연관되어 있다고 알려져 있고 이 들 사이의 균형이 세포의 생존과 죽음을 결정한다고 하였다(Yoon et al, 2002). 본 실험에서는 에탄올에 의한 위 조직손상이 MAPKs와 관련이 있는지와 그에 대한 Hf-PS-1의 산화적 손상 저해가 어떻게 이루어지는지 western blotting을 통해 확인하였다. ERK1/2는 세 군간에 변화가 없었으나 JNK의 경우는 에탄올 처리 시 인산화가 증가하였다가 Hf-PS-1

병행 투여 시 활성이 줄어들었고 p38 MAPK는 ERK와 같은 경향을 보였다(Fig. 16).



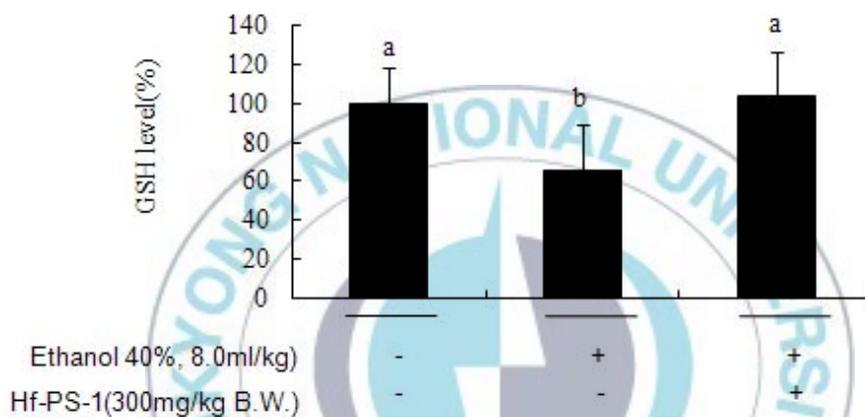


Figure 15. Effects of *Hf*-PS-1 on ethanol-induced oxidative damage.

Animals were treated as materials and methods and collected gastric tissues. One gram of tissues was used to measure GSH levels. The GSH level was analyzed as manufacture's instruction. Each value represents the mean±S.D. of 10 rats. Different alphabets are significantly among the group by Duncan's multiple range test.

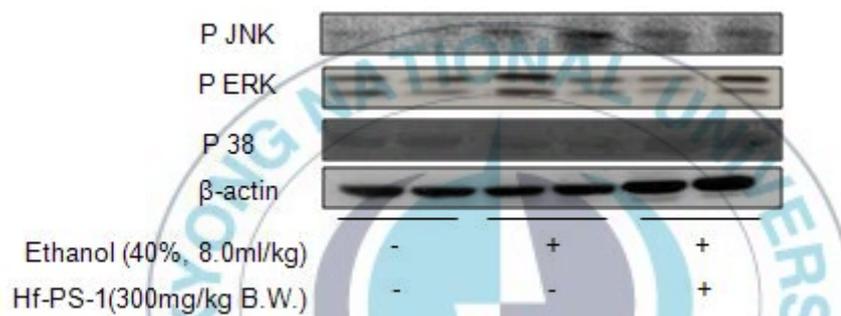


Figure 16. Effects of *Hf* -PS-1 on MAPKs proteins expression. Animals were treated as materials and methods and collected gastric tissues. Protein of tissues was extracted with lysis buffer and analyzed MAPK proteins expression by Westernblot analysis. β -actin was the loading control. Each lane represents a sample from an individual rat.

IV. 요약 및 결론

옛 부터 이어져온 우리나라 고유의 식생활 습관과 최근 식생활의 서구화, 과식, 과음, 스트레스, 카페인의 섭취 및 아스피린, 부신피질호르몬제, 소염제 같은 약물(NSAID)의 섭취 증가로 인해 위장질환 또는 증세가 증가하고 있다. 위궤양으로 인한 위출혈이나 위천공 같은 병을 치료하기 위한 약들이 많이 개발되었으나 비싸고 다양한 부작용을 가지고 있어서 식물 중 생리 화학적 물질들을 분리하여 부작용 없는 여러 가지 효능을 확인하는 연구가 진행되어지고 있다.

갈조류의 대표적인 종인 톳은 최근생리활성에 대한 연구가 활발하게 이루어지고 있으나 위 손상에 대한 생리활성 연구는 잘 알려지지 않았다. 에탄올 섭취는 공격인자의 대표적인 요인으로 인체 내 산화적 스트레스(oxidative stress)를 유발하게 된다.

본 연구에서는 에탄올의 산화적 스트레스로 인한 위 손상 및 세포 독성에 대해 톳의 구성성분 중 가장 많은 탄수화물을 선택하여 정제한 Hf-PS-1의 생리활성 효과를 *in vivo*와 *in vitro* 실험을 통해 각각 살펴보았다.

1. Hf-PS-1 정제

톳의 일반 성분을 분석한 결과 수분이 6.66±0.01%, 조단백질이 11.75±0.04%, 조지방이 1.79±0.25%, 조회분이 35.12±0.05%, 염분이 17.47±0.02% 그리고 탄수화물이 27.21±0.02%로 가장 많은 양을 차지하는

것을 확인하였다. 그래서 톳 성분 중 당을 실험물질로 선택하여 열수추출 후 에탄올로 침전시켜 Hf-PS를 분리하였고 당에 붙어있는 단백질을 제거하기 위해 pronase를 반응시켜서 Hf-PS-1을 정제하였다.

2. *In vitro* assay

소화관 세포인 IEC-6를 모델로 이용하여 MTS assay를 통해 Hf-PS-1이 독성을 나타내지 않음을 확인하였고, 에탄올이 IEC-6의 세포사멸을 유도하는 것을 확인하였다. Hf-PS는 효과가 없었으나 단백질을 제거한 Hf-PS-1 처리 시에 에탄올에 의한 세포사멸을 시간 및 농도 의존적으로 저해하였다.

가. 에탄올에 의한 산화적 스트레스와 Hf-PS-1의 저해효과

에탄올 대사 시 산화적 스트레스(oxidative stress)로 세포 내의 GSH가 이들과 반응하여 제거함으로써 GSH level이 감소하였으나 Hf-PS-1 처리 시 에탄올에 의한 GSH 감소를 JNK inhibitor를 처리했을 때인 22.7% 보다 더 많은 45.4%로 증가시킴으로서 산화적 스트레스를 저해하였다.

나. 에탄올의 세포독성에 대한 Hf-PS-1의 저해 기전

(1) IEC-6 세포에 에탄올만 단독 처리했을 때와 Hf-PS-1을 함께 처

리시 IGF-IR의 Tyrosine 인산화가 유도되었으나 그 하부 신호전달물질인 IRS-1 Tyrosine 인산화와 IRS-1과 PI3K p85 regulatory subunit 결합 그리고 phosphor AKT 는 에탄올 처리시 발현량이 대조군에 비해 증가하였고 Hf-PS-1을 함께 처리하였을 때 다시 발현량이 감소하였다. 이는 에탄올에 의한 산화적 스트레스로 인해 세포가 항상성 유지를 위하여 저항력이 증가한 것으로 보여진다.

(2) IRS-1과 비 의존적으로 Shc과 Shc-Grb2 regulatory subunit 결합에서는 에탄올 단독 처리시 Shc의 Tyrosine 인산화와 Shc-Grb2 regulatory subunit 결합이 대조군에 비해 감소되었고 Hf-PS-1을 함께 처리시 다시 증가하였다. 이는 에탄올에 의한 산화적 스트레스로 인해 Shc의 인산화를 감소시키고 Shc-Grb2 regulatory subunit 결합을 억제시킴으로 인해 세포사멸을 유도하였다가 Hf-PS-1 처리시 Shc-Grb2 pathway를 진행시킴으로서 세포사멸을 억제하는 것으로 보여진다.

(3) Shc-Grb2 신호전달경로의 downstream인 MAPK pathway는 산화적 손상에 관여하므로 3가지 MAPKs를 살펴본 결과 에탄올처리시 ERK 1/2와 JNK의 인산화가 활성화 하였으며 Hf-PS-1 처리시 ERK는 변화가 없었으나 JNK의 경우 감소하였다. 이로서 산화적 손상에 의해 ERK와 JNK가 활성화 되었으나 Hf-PS-1이 JNK에 영향을 주어 산화적 손상을 저해하는 것을 확인할 수 있었다.

3. *In vivo* assay

S.D계 흰쥐를 기초식이로 1주간 순치한 후에 대조 군, 에탄올 단독 투여 군, Hf-PS-1 병행 투여 군으로 나누어 단기로 실험한 결과는 다음과 같다.

가. 위 표면과 조직에 미치는 영향

위 내부표면에 대한 육안적인 소견은 에탄올 투여가 위 출혈을 일으켰으나 Hf-PS-1 병행 투여 군에서는 대조군과 비슷하게 출혈을 저해하는 것으로 나타났다. 흰쥐의 위 조직을 H&E로 염색 처리 후 광학현미경으로 관찰한 결과 에탄올 군의 위는 대조군에 비해 표면상피가 파괴되어 떨어지고 표면 점막이 손실되었으나 Hf-PS-1 병행투여 군에서는 표면상피가 에탄올에 의해 약간 수축된 상태를 보였지만 거의 대조군에 가깝게 보호해 주는 것을 확인 할 수 있었다.

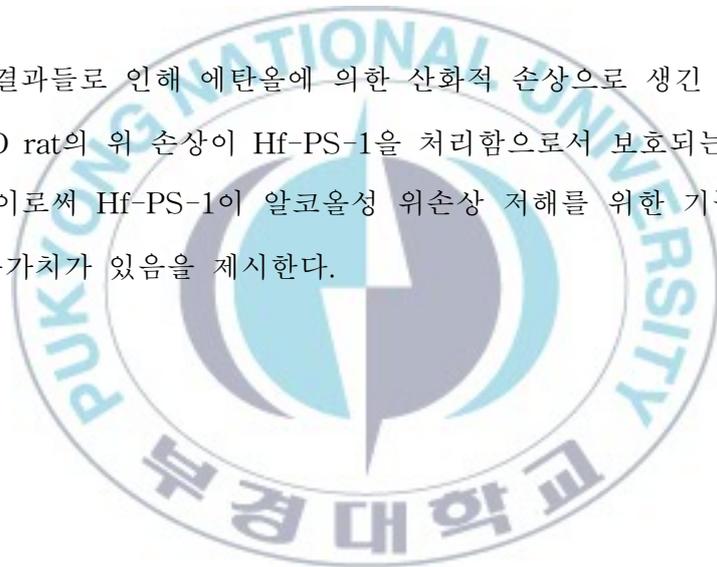
나. 위 조직 중의 caspase 활성화 및 DNA 단편화에 미치는 영향

에탄올 단독 처리군의 위 조직에서 caspase-3, -8, -9의 활성화 및 PARP의 분해, DNA 단편화가 일어나 위 상피세포의 손실이 세포사멸에 의한 것임을 확인하였으나 Hf-PS-1 병행 처리군 에서 대조군만큼 보호됨을 확인하였다.

다. 위 조직 중의 산화적 스트레스에 미치는 영향

여러 독성물질로 인한 손상과 질병으로부터 몸을 보호하는 항산화 역할을 하는 GSH는 에탄올만을 처리하였을 때 위 조직 내 GSH가 대조군에 비해 감소하였으나($65.8 \pm 22.9\%$) Hf-PS-1 병행 처리 군에서는 다시 증가하였다($103.9 \pm 22.0\%$). 또한 산화손상과 관련된 MAPK(Mitogen-activated protein kinases) 신호 전달에서는 ERK1/2는 세 군 간에 변화가 없었으나 JNK의 경우는 에탄올 처리 시 인산화가 증가하였다가 Hf-PS-1 병행 투여 시 활성이 줄어들었고 p38 MAPK은 ERK와 같은 경향을 보였다.

이상의 결과들로 인해 에탄올에 의한 산화적 손상으로 생긴 IEC-6 세포 사멸과 S.D rat의 위 손상이 Hf-PS-1을 처리함으로써 보호되는 것을 확인하였으며 이로써 Hf-PS-1이 알코올성 위손상 저해를 위한 기능성 신소재로 그 이용가치가 있음을 제시한다.



V. 참고문헌

- Afif, F. U., Khalil, E., Tarnimi, S. O., Disi, A. (1997) Evaluation of the gastroprotective effect of *Laurus nobilis* seeds on ethanol induced gastric ulcer in rats. *J. Ethnopharmacol.* 58, 9 - 14.
- Aroor, A. R. and Shukla, S. D. (2004) MAPkinase signaling in diverse effects of ethanol. *Life science.* 74(19), 2339-2364.
- Banerjee, D., Maity, B., Nag, S. K., Bandyopadhyay, S. K., Chattopadhyay, S. (2008) Healing potential of *Picrorhiza kurroa* (Scrophulariaceae) rhizomes against indomethacin-induced gastric ulceration: a mechanistic exploration. *BMC Complement Altern Med.* 31, 8:3.
- Baserga, R., Rubin R. (1993) Cell cycle and growth control. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 3, 47-61.
- Birdane, F. M., Cemek, M., Birdane, Y. O., Gülçin, I., Büyükkuroğlu, M. E. (2007) Beneficial effects of *Foeniculum vulgare* on ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats. *Journal of Gastroenterology and Hepatology.* 23, 976-984.
- Cho, H. Y., Lee, H. J., Kong, K. H. (2007) A Phi Class Glutathione S-transferase from *Oryza sativa* (OsGSTF5): Molecular Cloning, Expression and Biochemical Characteristics. *Biochemistry and Molecular Biology Reports.* 40(4), 511~516.
- Choi, J. H., Kim, I. S., Kim, J. I., and Yoon, T. H. (1992) Studies on anti-aging action of brown algae (*Undaria pinnatifida*) 2. dose

- effect of alginic acid as a modulator of anti-aging action in liver membranes. *Bull. Korean Fish Soc.* 25, 181-188.
- Cohen, G. (1983) The pathobiology of Parkinson's disease: Biochemical aspects of dopamine neuron senescence. *J Neural Transm Suppl.* 19, 89-103.
- Conde de la Rosa, L., Moshage, H., Nieto, N. (2008) Hepatocyte oxidant stress and alcoholic liver disease. *Rev Esp Enferm Dig.* 100(3), 156-63.
- Disi, A. M., Tanmimi, S. O., Abuereish, G. M., (1998) Effects of *Anchusa strigosa* root aqueous extract on gastric ethanol-induced ulcer in laboratory animals. *J. Ethnopharmacol.* 60, 189 - 198.
- He, J., de la Monte, S., Wands, J. R. (2007) Acute ethanol exposure inhibits insulin signaling in the liver. *Hepatology.* 46(6), 1791-800.
- Hernandez-Munoz, R., Montiel-Ruiz, C., Vazquez-Martinez, O. (2000) Gastric mucosal cell proliferation in ethanol-induced chronic mucosal injury is related to oxidative stress and lipid peroxidation in rats. *Laboratory Invest.* 80, 1161 - 1169.
- Higham, J., Kang, J., Y., Majeed, A. (2002) Recent trends in admissions and mortality due to peptic ulcer in England: increasing frequency of haemorrhage among older subjects. *Gut* 50, 460 - 464.
- Hong, S. P., Koo, J. K., Kim, D. S., (1997) Physicochemical characteristics of water or alcohol soluble extracts from laver, *Porphyra yezoensis*. *J. Korean. Soc. Food Sci. Nutr.* 26(1),10-16.

- Hwang, H. J., Kwon, M. J., Nam, T. J. (2007) Chemoprotective effect of insulin-like growth factor I against acetaminophen-induced cell death in Chang liver cells via ERK1/2 activation. *Toxicology*. 230(1), 76-82.
- Hwang, H. J., Kwon, M. J., Kim, I. H., Nam, T. J. (2008) The effect of polysaccharide extracted from the marine alga *Capsosiphon fulvescens* on ethanol administration. *Food Chem Toxicol*. 46(8), 2653-2657.
- Jainu, M., Devi, C. S. (2006) Gastroprotective action of *Cissus quadrangularis* extract against NSAID induced gastric ulcer: role of proinflammatory cytokines and oxidative damage. *Chem Biol Interact*. 161(3), 262-70.
- Kamath, B. S., Srikanta, B. M., Dharmesh, S. M., Sarada, R, Ravishankar, G. A. (2008) Ulcer preventive and antioxidative properties of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Eur J Pharmacol*. 590(1-3), 387-395.
- Kaufmann, S. H. and Earnshaw, W. C. (2000) Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res*. 256(1), 42-9.
- Kim, D. S., Lee, D. S, Cho, D. M., Kim, H. R., Pyeun, J. H. (1995) Trace Components and Functional Saccharides in Marine Algae: 2. Dietary Fiber Contents and Distribution of the Algal Polysaccharides. *J. Korean Fish. Soc*. 28(3), 270-278.
- Kim, J. H., Na, H. J., Kim, C. K., Kim, J. Y., Ha, K. S., Lee, H. S., Chung, T. H., Kwon, Y. G., Kim, Y. M. (2008) The non-provitamin A carotenoid, lutein, inhibits NF- κ B-dependent

gene expression through redox-based regulation of the phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/Akt and NF- κ B-inducing kinase pathways: Role of H₂O₂ in NF- κ B activation. *Free radical biology & Medicine*. 45, 885-896.

Kim, J. S. (2004) Ethanol of a Alcohol Detoxification Beverage(ADB) contained *Radix puerariae* and *Bambusae caules in Liquamen Phyllostachyos* on the alcohol administered mouse. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 33(2), 318-323.

Ko, M. S., Shin, K. M., Lee, M. Y. (2002) Effects of Hijikia fusiforme Ethanol Extract on Antioxidative Enzymes in Ethanol-induced Hepatotoxicity of Rat Liver. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*. 31(1), 87-91.

Koo, J. G., Choi, Y. S., Kwak, J. K. (2001) Blood - Anticoagulant Activity of Fucoidans from Sporophylls of Undaria pinnatifida, Laminaria religiosa, Hizikia fusiforme and Sargassum fulvellum in Korea. *J. Korean Fish Soc*. 34(5), 512-520.

Kuwabara, M., Asanuma, T., Niwa, K., Inanami, O. (2008) Regulation of cell survival and death signals induced by oxidative stress. *J. Clin. Biochem. Nutr*. 43, 51-57.

Kwon, M. J., and Nam, T. J. (2006) Effects of Mesangi (*Capsosiphon fulvecens*) powder on lipid metabolism in high cholesterol fed rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr*. 35, 530-535.

Kyriakis, J. M., Avruch, J. (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Rev* .81(2), 807-69.

- Lahaye, M. and Kaeffer, B. (1997) Seaweed dietary fibers: structure, physiochemical and biological properties relevant to intestinal physiology. *Sci. Aliments*. 17, 563-584.
- Lee, S. M., Alam, R., Ho, C. J., Kim, J. H., Kang, C. W., Park, J. H., Lee, M. S. (2007) Involvement of p42/44 MAPK in the effects of ethanol on secretion of insulin-like growth factor (IGF)-I and insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-1 in primary cultured rat hepatocytes. *Int J Neurosci*. 117(2), 187-201.
- Lee, Y. J. & Shukla, S. D. (2005) Pro- and anti-apoptotic roles of c-Jun N-terminal kinase (JNK) in ethanol and acetaldehyde exposed rat hepatocytes. *European Journal of Pharmacology*. 508, 31-45.
- Lieber, C. S. (1990) Mechanism of ethanol induced hepatic injury. *Pharmacology & Therapeutics*. 46(1), 1-41.
- Liu, H., Geng, M., Xin, X., Li, F., Zhang, Z., Li, J., and Ding, J. (2005) Multiple and multivalent interactions of novel anti-AIDS drug candidates, sulfated polymannuronate (SPMG)-derived oligosaccharides, with gp120 and their anti-HIV activities. *Glycobiology* 15, 501-510.
- Mabeau, S. and Kloareg, B. (1987) Isolation and analysis of the cell of brown algae: *Fucus spiralis*, *F. ceranodites*, *F. serratus*, *Bifurcaria bifurcata* and *Laminaria digita*. *J. Exp. Bot.* 194, 1573-1580.
- Maitly, S., Vedasiromoni, J. R., Ganguly, D. K., (1995) Anti-ulcer effect

- of the hot water extract of black tea (*Camellia sinensis*). *J. Ethnopharmacol.* 46, 167 - 174.
- Mun, Y. J., Yoo, H. J., Lee, K. E., Kim, J. H., Pyo, H. B., Woo, W. H. (2005) Inhibitory effect on the melanogenesis of *Capsosiphon fulvescens*. *Yakhak Hoeji* 49(5), 375-379.
- Munro, M.H.G., Luibrand, R.T., Blunt, J.W., 1987. The search for antiviral and anticancer compounds from marine organisms. *In: Scheuer, P.J. (Ed.), Bioorganic Marine Chemistry, Vol. 1. Verlag Chemie, Berlin.*
- Oh, Y. I., Kim, J. H., Kang, C. W. (2008) Effects of ethanol on insulin-like growth factor-I system in primary cultured rat hepatocytes : Implications of JNK1/2 and alcoholdehydrogenase. *World J Gastroenterology.* 14(27), 4324-4331.
- Park, J. C., Choi, J. S., Song, S. H., Choi, M. R., Kim, K. Y., Choi, J.W. (1997) Hepatoprotective effect of extracts and phenolic compound from marine algae in bromobenzene-treated rats. *Korean J Pharmacogn.* 28(4), 239-246.
- Park, E. M., Ye, E. J., Kim, S. J., Choi, H. I., Bae, M. J. (2006) Eliminatory effect of health drink containing *Hovenia Dulcis Thunb* extract on ethanol-induced hangover in rats. *Korean J. Food Culture.* 21(1), 71-75.
- Pryor, G. T., Larsen, F. F., Carr, J. D., Braude, M. C., (1977) Interactions of delta9-tetrahydrocannabinol with phenobarbital, ethanol and chlordiazepoxide. *Pharmacol Biochem Behav.* 7(4), 331-345.

- Raghavendran, H. R., Sathivel, A., Devaki, T. (2004) Efficacy of brown seaweed hot water extract against HCl-ethanol induced gastric mucosal injury in rats. *Arch Pharm Res.* 27(4), 449-53.
- Ryu, H. S., Kim, J. H., Kim, H. S. (2007) Effects of a Plant Water Extract Mixture(Ixeris sonchifolia Hance, Oenanthe javanica, Fagopyrum esculentum Moench, Hizikia fusiforme, Zingiber officinale Roscoe) on Mouse Immune Cell Activation. *Korean J. Food & Nutr.* 20(1), 74-78.
- Sell, C., Dumenil, G., Deveaud, C., Miura, M., Coppola, D., DeAngelis, T., Rubin, R., Efstratiadis, A., Baserga, R. (1994) Effect of a null mutation of the insulin-like growth factor I receptor gene on growth and transformation of mouse embryofibroblasts. *Mol Cell Biol.* 14, 3604-3612.
- Shan, B. E., Yoshida, Y., Kuroda, E., Yamashita, U. (1999) Immunomodulating activity of seaweed extract on human lymphocytes in vitro. *International Journal of Immunopharmacology* 21, 59-70.
- Sheu, J. R., Hung, W. C., Lee, Y. M., Yen, M. H. (1996) Mechanism of inhibition of platelet aggregation by rutaecarpine, an alkaloid isolated from Evodia rutaecarpa. *Eur J Pharmacol.* 318(2-3), 469-75.
- Song, H. J., Lee, T. S., Jeong, J. H., Min, Y. S., Shin, C.Y., Sohn, U. D. (2005) Hydrogen peroxideinduced extracellular signal-regulated kinase activation in cultured feline ileal smooth

- muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 312, 391 - 398.
- Sung, K. S., Chun, C., Kwon, Y. H., Chang, C. C. (2000) Effects of red ginseng component administration on glutathione and lipid peroxidation levels in mice liver. *J. Ginseng Res.* 24(4), 176-182.
- Teruya, H., Higa, F., Akamine, M., Ishikawa, C., Okudaira, T., Tomimori, K., Mukaida, N., Tateyama, M., Heuner, K., Fujita, J., Mori, N. (2007) Mechanisms of *Legionella pneumophila*-induced interleukin-8 expression in human lung epithelial cells. *BMC Microbiol.* 22;7:102.
- Venugopal, S. K., Chen, J., Zhang, Y., Clemens, D., Follenzi, A., Zern, M. A. (2007) Role of MAPK phosphatase-1 in sustained activation of JNK during ethanol-induced apoptosis in hepatocyte-like VL-17A cells. *J Biol Chem.* 282(44), 31900-8.
- Villegas, S. N., Njaine, B., Linden, R., Carri, N. G. (2006) Glial-derived neurotrophic factor (GDNF) prevents ethanol (EtOH) induced B92 glial cell death by both PI3K/AKT and MEK/ERK signaling pathways. *Brain Res Bull.* 71(1-3), 116-26.
- Von Vaupel Klein J.C., 1987. In Scheuer, P.J. (Ed.), *Bioorganic Marine Chemistry. Voll,* 93.
- Wang, S. F., Yen, J. C., Yin, P. H., Chi, C. W., Lee, H. C. (2008) Involvement of oxidative stress-activated JNK signaling in the methamphetamine-induced cell death of human SH-SY5Y cells. *Toxicology.* 246, 234-241.
- Weston, C. R. and Davis, R. J. (2007) The JNK signal transduction

- pathway. *Curr. Opin. cell Biol.* 19, 142-149.
- Yamamoto, I., Maruyama, H., Moriguchi, M. (1987) The effect of dietary seaweeds on 7,12-dimethyl-benz[a]anthracene-induced mammary tumorigenesis in rats. *Cancer Lett.* 35, 109-118.
- Yang, H. C., Jung, K. M., Gang, K. S., Song, B. J., Lim, H. C., Na, H. S., Mun, H. and Heo, N. C. (2005) Physicochemical composition of seaweed fulvescens (*Capsosiphon fulvescens*). *KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL*, 37(6), 912-917.
- Yoon, S. O., Yun, C. H., Chung, A. S. (2002) Dose effect of oxidative stress on signal transduction in aging. *Mech Ageing Dev.* 123(12), 1597-1604.
- Yu, G., Peng, T., Feng, Q., Tyml, K. (2007) Abrupt reoxygenation of microvascular endothelial cells after hypoxia activates ERK 1/2 and JNK1, leading to NADPH oxidase-dependent production. *Microcirculation.* 14(2), 125-136.
- Zemani, F., Benisvy, D., Galy-Fauronx, I., Lokajczyk, A., Collic-Jouault, S., Uzan, G., Fisher, A. M., and Boisson-Vidal, C. (2005) Low molecular weight fucoidan enhances the proangiogenic phenotypes of endothelial progenitor cells. *Biochem. Pharmacol.* 70, 1167-1175.
- Zhang, J., Jin, N., Liu, Y., Rhoades, R. A. (1998) Hydrogen peroxide stimulates extracellular signal-regulated protein kinases in pulmonary arterial smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 19, 324-332.
- Zhang, Y., Venugopal, S. K., He, S., Liu, P., Wu, J., Zern, M. A.

(2007) Ethanol induces apoptosis in hepatocytes by a pathway involving novel protein kinase C isoforms. *Cell Signal*. 19(11), 2339-2350.

Zhou, Y., Wang, Q., Evers, B. M., Chung, D. H. (2005) Signal transduction pathways involved in oxidative stress-induced intestinal epithelial cell apoptosis. *Pediatr Res*. 58(6), 1192-7.



감사의 글

끝나지 않을 것 같던 2년의 석사과정을 끝내고 무사히 논문을 완성하게 되어 기쁘고 감사합니다.

먼저 ‘여호와 이레’ 어느 길로 가든지 인도하겠다고 하셨으며 모든 것을 예비하여 주신 하나님께 감사드립니다. 끊임없는 절망과 원망에도 포기하지 않으시고 완벽함을 주지 않으셔서 늘 기도하게 하심에, 그래서 스스로 할 수 없음을 깨닫게 해주심에 더욱 감사합니다. 그리고 아무것도 모른 채 들어와 많은 실수를 했음에도 물심양면으로 끝까지 책임져 주시고 지도해 주셨던 남택정 교수님께 사랑과 존경, 감사를 드립니다. 무뚝뚝하신 것 같지만 논문의 실수를 확인해 주시고 직접 지도해 주신 류홍수 교수님 마지막에 왕 도장까지 찍어주신 것 모두 감사합니다. 지도교수님처럼 논문의 토시 하나까지 살펴주시고 고쳐주셨으며 졸업 후까지 걱정해 주신 류은순 교수님 감동했습니다. 감사합니다. 수업을 열정적으로 해주시고 하나라도 더 가르쳐 주시려고 애쓰셨던 변대석 교수님과 최재수 교수님, 학문적으로 성숙할 수 있도록 관심으로 지켜봐 주신 김형락 교수님과 지금은 계시지 않지만 최진호 교수님께도 감사를 드립니다.

이렇게 논문이 나오기까지 실험실 식구들의 도움이 참 많았습니다. 어린 아이처럼 아무것도 모르는 저를 인내하고 하나부터 열까지 가르쳐 주셨던 황혜정 선생님 정말 감사합니다. 그리고 처음 실험실에 들어왔을 때부터 신경 써 주시고 실험에 관한 노하우를 가르쳐 주신 인혜언니, 멀리서 한번씩 오실 때마다 격려해주시고 조언해주신 권미진 선생님, 실험실에 적응할 수 있도록 힘이 되 주신 은진언니, 때로는 언니처럼, 때로는 친구처럼 나와 함께해 준 히로애 언니 감사합니다. 후배로 들어와서 적응하기도 힘들텐데 섬겨준 은순이, 지치고 힘들 때 위로해 주었고 실험기구를 잘 세척 해줘서 무리 없이 실험하게 해준 연정이, 해연이, 정욱선배, 아라, 김송이, 황송이, 경화 그리고 희경아 모두모두 고맙고 또 고맙다.

진학할 수 있도록 조언해주신 박상훈 목사님과 동역자로서 내 힘이 되어 준 효영이, 하나님에 대한 시선이 왜곡되지 않도록 도와주시고 바른 직업관을 갖게 해주신 강경숙 간사님 감사합니다. 신앙의 선배로서는 물론이고 친 언니처럼 사랑으로 대해주신 정수미 간사님과 민영이 언니, 시간 없음에 늘 참여하지 못함에도 함께함을 기뻐해주신 수영간사님과 서문교회 찬양국 및 여러 지체들께도 모두모두 감사드립니다. 또한 저의 신앙의 기초를 마련해 주어 버틸 수 있게 해준 IVF 선후배들께도 감사의 마음을 전합니다.

마지막으로 처음에 반대하셨지만 제 버팀목이 되어주시고 힘들어하는 모든 부분을 용납해주신 사랑하는 엄마 전운자 여사께 감사합니다. 또한 어떠한 상황에서도 말없이 기다려 주고 물심양면으로 도움을 준 언니와 새로운 가족이 된 형부께도 감사합니다.