



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](#)

이학박사 학위논문

김단백질에 의한 *acetaminophen* 간독성
억제작용기전



2007년 2월

부경대학교 대학원

식품생명과학과

황 혜 정

이학박사 학위논문

김단백질에 의한 *acetaminophen* 간독성
억제작용기전

지도교수 남택정

이 논문을 이학박사 학위논문으로 제출함

2007년 2월

부경대학교 대학원

식품생명과학과

황혜정

목 차

LIST OF TABLES	i
LIST OF FIGURES	ii
ABBREVIATIONS	v
ABSTRACT	1
I. 서론	8
II. 재료 및 방법	14
1. 재료	14
1) 시약 및 재료	14
2. 실험방법	15
1) 시료의 조제	15
김으로부터 단백질 추출	15
김단백질 가수분해물 및 합성물 제조	15
2) 세포배양	15
3) 효소저해제 처리	16
4) MTS assay	17
5) Western blot	17
(1) Total cell lysate 추출	17
(2) 핵 단백질 추출	18
(3) Western blotting	18
6) Immunoprecipitation	19
7) DNA 단편화	20
8) 세포염색 (Hoechst 33342 & PI염색)	20

9) Flow cytometry	21
10) 세포에서의 GSH assay	21
11) 세포에서 caspase-3 활성 측정	21
12) 동물사육	22
(1) 혈청중의 GOT/GPT 측정	22
(2) 간장조직염색	23
(3) 간장조직중의 GSH 활성 측정	23
(4) 간장조직중의 caspase-3 활성 관찰	23
13) 통계처리	24
III. 결과 및 고찰	25
1. Acetaminophen의 간 세포 사멸 기전	25
1) 세포증식에 미치는 AAP의 영향	25
2) 세포형태에 미치는 AAP의 영향	26
3) 세포사멸 기전에 미치는 AAP의 영향	27
(1) 세포사멸기전에 미치는 AAP의 영향	28
(2) 산화적 손상기전에 미치는 AAP의 영향	44
2. Insulin-like growth factor- I (IGF-1)이 AAP 독성에 미치는 영향	50
1) Acetaminophen과 IGF-I 병행 처리 시 세포증식에 미치는 영향	50
2) Acetaminophen 독성에 대한 IGF-I의 억제 작용과 ERK 인산화	52
3. 해조류인 김으로부터 단백질 추출	58
4. Acetaminophen에 의한 Sprague Dawley rat의 간손상 및 해조류 추출물인 김단백질의 AAP 간독성 억제 효과	62
1) Acetaminophen 단독/김단백질 병행투여가 체중변화와 간 무게에 미치는 영향	63

2) Acetaminophen 및 김단백질 투여가 간손상에 미치는 영향 ..	64
3) Acetaminophen 및 김단백질 투여가 혈청중의 GOT/GPT 변화에 미치는 영향	67
4) Acetaminophen 및 김단백질 투여가 간조직 중의 GSH 함량 변화에 미치는 영향	69
5) Acetaminophen 및 김단백질 투여가 간조직 중의 caspase-3 활성 및 DNA 단편화에 미치는 영향	71
5. 김단백질이 AAP 독성에 미치는 영향	76
1) 김단백질 독성확인	76
2) 김단백질의 AAP처리로 인한 세포독성에 미치는 영향	78
3) 김단백질의 AAP에 의한 세포사멸기전에 미치는 영향	86
4) 김단백질 가수분해물과 합성물 제조 및 AAP 독성 억제 효과	96
6. 김단백질의 IGF-I 신호전달경로와 관련한 억제기전	100
1) IGF-IR 인산화	101
2) IRS-1 인산화	102
3) PI3-kinase 신호전달경로	104
4) MAP kinase 신호전달 경로	107
IV. 요약 및 결론	119
V. 참고문헌	124
감사의 글	141

LIST OF TABLES

Table 1. Effects of acetaminophen on sub-G1 phase

Table 2. GSH levels in treatment of AAP

Table 3. Body and liver weight following AAP or AAP + PYP
co-treatment

Table 4. Effects of *Porphyra yezoensis* protein on sub-G1 phase

Table 5. The amino acid sequence of PYP



LIST OF FIGURES

- Fig. 1. Effect of AAP on cell viability.
- Fig. 2. Effect of AAP on cell morphology.
- Fig. 3. Sequence of events leading to AAP-induced hepatotoxicity.
- Fig. 4. Caspase-3 activity (A) and PARP cleavage (B) after AAP treatment in Chang liver cells.
- Fig. 5. Caspase-3 activity (A) and PARP cleavage (B) after AAP treatment in HepG2 cells.
- Fig. 6. Caspase-3 activity and cell viability in AAP or AAP and caspase-3 inhibitor(D) co-treatment in Chang liver cells.
- Fig. 7. Caspase-3 activity and cell viability in AAP or AAP and caspase-3 inhibitor(D) co-treatment in HepG2 cells.
- Fig. 8. Effect of AAP on DNA fragmentation.
- Fig. 9. Effect of AAP on cell cycle in Chang liver cells.
- Fig. 10. Effect of AAP on cell cycle in HepG2 cells.
- Fig. 11. Effects of AAP treatment on oxidative stress-related protein expression by western blotting in Chang liver cells and HepG2 cells.
- Fig. 12. Effects of MEK inhibitor, PD98059, on AAP cytotoxicity in Chang liver cells and HepG2 cells.
- Fig. 13. Chemoprotective effect of Growth factors against AAP cytotoxicity.
- Fig. 14. IGF-1 protection effects of Chang liver cells from AAP-induced cell death.
- Fig. 15. Effects of IGF-I on cell proliferation and glutathione depletion.
- Fig. 16. IGF-1 protection effects of HepG2 cells from AAP-induced cell death.
- Fig. 17. Effects of IGF-I on cell proliferation and glutathione depletion.
- Fig. 18. Purification of protein from *Porphyra yezoensis* on Sepadex G-75 column chromatography (A), HPLC of fraction containing

protein from Sephadex G-75 on a reverse phase Asahi-Pak C4P-50 C4 column (B).

- Fig. 19. SDS-PAGE bands of *Porphyra yezoensis*' protein.
- Fig. 20. Photographs of liver. An arrow appears liver Damage
- Fig. 21. Representative H & E-stained liver sections.
- Fig. 22. Effect of *Porphyra yezoensis* protein (PYP) on GOT/GPT level of rats($n=10$) exposed to AAP.
- Fig. 23. Effect of *Porphyra yezoensis* protein (PYP) on GSH of rats ($n=10$) exposed AAP.
- Fig. 24. Effect of *Porphyra yezoensis* protein (PYP) on caspase-3 activity of rats ($n=10$) exposed AAP.
- Fig. 25. DNA fragmentation of liver tissue.
- Fig. 26. *Porphyra yezoensis* protein (PYP)'s cytotoxicity.
- Fig. 27. Chemoprotective effect of *Porphyra yezoensis* protein (PYP) against AAP cytotoxicity.
- Fig. 28. Hoechst 33342 staining of Chang liver cell treated with AAP and *Porphyra yezoensis* protein (PYP)
- Fig. 29. Hoechst 33342 staining of HepG2 cell treated with AAP and *Porphyra yezoensis* protein (PYP).
- Fig. 30. Effects of AAP and *Porphyra yezoensis* protein (PYP) co-treatment on Chang cells' cycle
- Fig. 31. Effects of AAP and *Porphyra yezoensis* protein (PYP) co-treatment on HepG2 cells' cycle
- Fig. 32. Effect of PYP on caspase-3 activity and PARP cleavage in Chang liver cells.
- Fig. 33. Effect of PYP on caspase-3 activity and PARP cleavage in HepG2 cells.
- Fig. 34. GSH level in AAP alone or AAP and *Porphyra yezoensis* protein(PYP) co-treatment.
- Fig. 35. Effect of PYP on oxidative stress related-protein expression in Chang liver cells.

- Fig. 36. Effect of PYP on oxidative stress related-protein expression in HepG2 cells
- Fig. 37. Effect of hydrolysate and synthetic molecules (Pep21) on AAP cytotoxicity in Chang liver cells.
- Fig. 38. Effect of hydrolysate and synthetic molecules (Pep21) on AAP cytotoxicity in HepG2 cells.
- Fig. 39. Effects of AAP or AAP+PYP treatment on IGF-IR phosphorylation in Chang liver cells.
- Fig. 40. Effects of AAP or AAP+PYP treatment on IRS-1 phosphorylation in Chang liver cells.
- Fig. 41. Effects of AAP or AAP+PYP treatment on binding p85/p110 complex to IRS-1 in Chang liver cells.
- Fig. 42. Effects of AAP or AAP+PYP treatment on Shc phosphorylation and Shc/Grb2 complex formation in Chang liver cells.
- Fig. 43. Effects of AAP or AAP+PYP treatment on IGF-IR phosphorylation in HepG2 cells.
- Fig. 44. Effects of AAP or AAP+PYP treatment on IRS-1 phosphorylation and binding p85 to IRS-1 in HepG2 cells
- Fig. 45. Effects of AAP or AAP+PYP treatment on Shc phosphorylation and binding Grb2 to Shc in HepG2 cells.
- Fig. 46. The proposed model of PYP's protection mechanism on IGF-I signaling pathway in Chang liver and HepG2 cells

ABBREBIATIONS

AAP : acetaminophen

EGF : epidermal growth factor

ECL : enhanced chemiluminescence

ERK : extracellular-signal-regulated kinase

FBS : fetal bovine serum

GOT : Glutamic oxaloacetic transaminase

GPT : Glutamic pyruvic transaminase

Grb2 : growth-factor-receptor-bound protein-2

GSH : glutathione

HGF : hepatocyte growth factor

IGF-I : insulin-like growth factor

IGF-IR : insulin-like growth factor receptor

IGF-BP : insulin-like growth factor binding protein

IRS : insuline receptor substrate

JNK : c-jun amino-terminal kinase

kDa : kilodalton

MAPK : mitogen-activated protein kinase

MEK : MAP kinase/Erk kinase

MEM : minimun essential medium

MTS: (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt)

PAGE : polyacrylamide gel electrophoresis

PBS : phosphate buffered saline

PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase

PMSF : phenylmethylsulphonylfluoride

PYP : *Porphyra yezoensis* protein

RT : room temperature

SDS : sodium dodecyl sulfate

SH2 domain : Src-homology domain-2



*Chemoprotective mechanisms of a protein from the
Laver(*Porphyra yezoensis*) on acetaminophen-induced
liver injury*

Hye-Jung Hwang

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

Abstract

Seaweeds have received increasing attention because these traditional food sources can both contribute to the maintenance of good health by providing nutritional benefits and be used to treat disease. Some seaweeds contain high amounts of proteins, vitamins, and minerals, and several polysaccharides found in seaweeds have diverse biological activities, including effects on the immune system and cancer. Some marine algae, for example, contain large amounts of polysaccharides, such as alginate, fucoidan, carrageenan, and agarose. Porphyran, a polysaccharide produced by the red alga *Porphyra umbilicalis*, is produced in large amounts in South Korea and has been shown to decrease cholesterol levels and to have antibiotic and anticancer effects, while fucoidan is known for its anticoagulant and antioxidant effects. In this study, we extracted a 14-kDa protein from the marine alga *Porphyra yezoensis* and examined its biological effects *in vitro* and *in vivo*.

Acetaminophen (AAP) is a safe and effective analgesic when used at therapeutic levels. An overdose of AAP, however, can induce severe hepatotoxicity in experimental animals and in humans. Recent advances suggest that reactive metabolite formation, glutathione depletion, and alkylation of proteins, particularly mitochondrial proteins, are key initiating events in AAP toxicity. As in other types of liver injury, the roles of oncotic necrosis and apoptosis in AAP-induced liver damage have been debated. When AAP causes extensive ATP depletion, ATP depletion-dependent necrotic cell death results. However, when fructose and glycine are used to prevent ATP depletion, necrosis is blocked and caspase-dependent apoptosis increases. MPT occurs under both fructose and glycine-deficient and sufficient conditions. The addition of cyclosporin A decreases necrosis and apoptosis. Thus, AAP toxicity is an example of "necroapoptosis," in which necrosis and apoptosis represent alternate outcomes of the same mitochondrial death pathway.

We cultured Chang liver and HepG2 cells in Eagle's minimum essential medium (MEM) containing glycine (0.0075g/L) to block necrotic cell death. AAP treatment and caspase-3 activation induced DNA fragmentation, indicating that the cells underwent apoptosis. However, DNA fragment results were not consistent with DNA laddering, a characteristic of apoptosis, although some DNA smearing, a feature of necrosis, was observed. Thus, we concluded that the mode of AAP-induced cell death was necroapoptosis because both necrosis and apoptosis apparently occur.

Oxidative stress-induced cell death is a mitochondria-independent pathway of AAP cytotoxicity. Early investigations into the mechanism of oxidative stress-induced cell death identified glutathione (GSH) as a critical factor in the detoxification of the reactive metabolite of AAP. While this initial breakthrough resulted in novel therapeutic strategies in the clinic, the mechanism of cell injury and liver failure is still not completely understood. In particular, the role of reactive oxygen species (ROS) in the pathophysiology of liver damage continues to be debated, despite three decades of research.

Studies using a variety of experimental models have established that severe hepatocellular injury can lead to intracellular, mitochondria-derived oxidant stress. Elevated hepatic and mitochondrial GSSG levels are indicators of mitochondrial ROS formation, and AAP-induced cell death may be a result of oxidative cytotoxicity. Recent studies have shown that both endogenously produced and exogenously added ROS can regulate the activity of mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways that may be involved in cellular responses, such as proliferation, differentiation, and apoptosis. Three major MAPK kinase types exist: extracellular signal-regulated kinases (ERKs), p38 kinases, and c-Jun N-terminal kinases (JNKs). These kinases have several isoforms generated by alternative splicing of pre-mRNA. ERKs are generally activated by mitogenic and proliferative stimuli, such as growth factors involved in cellular proliferation and differentiation. JNKs and p38 kinases are primarily activated by extracellular stresses, such as UV irradiation, inflammatory cytokines, heat, and arsenic trioxide. Activation of these protein kinases causes a variety of cellular responses, depending on

the cell type. In our experimental system, AAP induced ERK activation, but not JNK or p38 kinase activation. Thus, AAP-induced oxidative stress involves ERK activation.

To further examine AAP-induced oxidative stress, we evaluated glutathione levels in a hepatocyte culture model of AAP-induced injury and in Sprague - Dawley rats. The results clearly demonstrated that AAP acted to decrease GSH levels, suggesting that AAP-induced injury involves oxidative stress. We also examined whether a protein from *P. yezoensis* (PYP) could protect against AAP-induced injury. Our results indicate that co-treatment with PYP and AAP caused cells to recover from AAP-induced injury *in vivo*. Specifically, AAP increased caspase-3 activity and DNA fragmentation, decreased GSH level in liver tissue, and increased GOT/GPT levels in serum. However, when PYP was coadministered, caspase3 activity recovered, and DNA fragmentation, GSH levels, and GOT/GPT levels did not differ from those of the controls. Thus, PYP protected cells against AAP-induced liver injury. Furthermore, in the hepatocyte models, using Chang liver and HepG2 cells, AAP administration induced sub-G1 cell cycle arrest and decreased cell proliferation and GSH levels, while increasing caspase-3 activity, DNA fragmentation, and poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage. This AAP-induced liver injury was reversed by the coadministration of AAP and PYP. That is, AAP plus PYP co-treatment induced cell proliferation, increased GSH levels, and inhibited PARP cleavage induced by AAP treatment.

Insulin-like growth factors (IGFs) are synthesized in both fetal and adult hepatocytes and secreted into the extracellular fluid. Their interactions with the type-I IGF receptor (IGF-IR) play pivotal roles in the proliferation of a variety of cell types, control of the cell cycle progression in G1, regulation of the early phases of tumorigenicity, maintenance of the tumorigenic phenotype, and prevention of apoptosis. The variety of ways in which apoptosis can be induced suggests that wild-type IGF-IR and its ligands have widespread anti-apoptotic effects on several death signals.

The binding of IGF-I to the IGF-IR activates multiple signal transduction cascades. One of these involves the MAPKs, a family of serine/threonine protein kinases activated by many stimuli, including IGF-IR. A key MAPK pathway contains ERK1/2. Upon IGF-IR autophosphorylation, the protein Shc is recruited to the receptor and becomes phosphorylated on tyrosine residues. Activated Shc then binds the adaptor protein Grb2 in an IRS-1-independent manner, leading to activation of the Ras - ERK pathway. This IGF-IR signaling pathway is most closely associated with cell differentiation and migration, but can also regulate the machinery of apoptosis in some cases, as in the detachment-induced death, or anoikis, of fibroblasts.

Among the two dominant IGF-I signaling pathways, PI3-K and MAPK, members of the MAPK family, which include the ERK, JNK, and p38 kinase subgroups, play important roles in cell proliferation, apoptosis, and differentiation. Interestingly, these three family members also have roles in oxidative stress. Signaling through JNK is a proximal component of the cell death pathway and oxidative stress also activates JNK signaling, while the ERK pathway regulates cell

growth and differentiation. Oxidative stress-induced ERK activation has been reported to function as an anti-apoptotic signal in homeostasis. Treatment with AAP induced ERK1/2 activation, and the addition of IGF-I to AAP-treated cells resulted in enhanced ERK1/2 activation. Nevertheless, IGF-I protected cells against AAP-induced cell death, as shown by the results of the MTS assay and PARP cleavage levels. We propose that ERK activation is pivotal in inducing the protective effect of IGF-I. Further study is required to clarify the mechanism.

Both IGF-IR and PYP protected cells against AAP cytotoxicity. We hypothesized that PYP affected the IGF-IR signaling pathway and thus appeared to provide protective effects against AAP cytotoxicity. In Chang liver cells, AAP decreased IGF-IR phosphorylation, while PYP and AAP co-treatment reversed it. Furthermore, AAP decreased the electrophoretic mobility of IRS-1, IRS-1 protein expression, and binding of the p85/p110 complex to IRS-1. In contrast, these changes were reversed after AAP and PYP co-treatment. Furthermore, PYP heightened the decrease in Shc phosphorylation and binding of Grb2 to Shc by AAP. Thus, PYP inhibited AAP cytotoxicity through two IGF-I signaling pathways: activation of the PI3K pathway and the MAPK pathway. In HepG2 cells, AAP treatment slightly inhibited IGF-I and IRS-1 phosphorylation. Furthermore, binding of IRS-1 and p85 markedly decreased after AAP treatment. AAP blocked the PI3K pathway, leading to cell death. In contrast, PYP heightened the decrease in phosphorylation of IGF-I and IRS-I, and binding of p85 to IRS-1 by AAP. Furthermore, PYP enhanced the binding of Grb2 to Shc. Thus,

PYP apparently inhibited AAP cytotoxicity via the PI3K and MAPK pathways in Chang liver and HepG2 cells.

Finally, to mimic the metabolic process in the body, we hydrolyzed the 14-kDaPYP with pepsin. In amino acid sequencing, we detected a sequence of 21 amino acids that had high homology with the cytochrome *c* sequence in *P. umbilicalis* and synthesized a peptide with this sequence (Pep21). We measured the effects of the pepsin hydrolysate and Pep21 on AAP cytotoxicity using the MTS assay in which both the hydrolysate and Pep21 protected against AAP cytotoxicity.

Taken together, these results suggest that AAP induces liver injury via oxidative stress *in vitro* and *in vivo*. AAP and PYP co-treatment inhibited AAP cytotoxicity *in vivo*, as shown by the recovery in caspase-3 activity, and glutathione, GOT/GPT, and DNA fragmentation levels similar to those of the controls. *In vitro*, co-treatment with AAP and PYP resulted in increased glutathione levels, cell viability, and PARP cleavage. We also demonstrated that growth factors inhibited AAP cytotoxicity. For example, IGF-I protected against AAP cytotoxicity, apparently via ERK activation. The protective effect of PYP also involved the ERK pathway. Our findings suggest that a protein extracted from the marine alga *P. yezoensis* (PYP) may be effective in protecting against AAP-induced liver injury.

I. 서 론

최근 해조류의 다양한 생리화학적 효과가 검증되면서 해조류로부터 분리한 생리활성물질에 관심이 고조되었고, 이에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(Kim *et al.*, 2005; Kwon *et al.*, 2006). 우리나라 해조류 중 가장 많이 양식되고 있는 것은 김, 미역, 다시마 등이며, 김은 일명 해태(海苔)라고도 하며 홍조식물 보라털목 보라털과의 해조류로 길이 14~25 cm, 나비 5~12 cm의 긴 타원모양 또는 줄처럼 생긴 달걀모양을 하고 있다. 김의 종류로는 참김(*Porphyra tenera*), 방사무늬 돌김(*P. yezoensis*), 둥근 돌김(*P. suborbiculata*) 등이 있으며, 그 중 우리나라에서 양식하는 김의 주종을 이루는 것이 방사무늬 돌김이다. 현재 국내에서 유통되고 있는 김제품들은 건조김과 조미김 제품으로 극히 제한되어 있어 그 가공이나 이용방법이 단순성을 벗어나지 못하고 있는 실정이므로 김의 활용도를 높이기 위해서는 각종 유용성분의 응용을 위한 연구가 필요하다. 최근 생명공학관련 과학기술이 빠르게 발전하면서 김에 함유된 생리기능성분을 활용한 고부가가치 기능성식품 소재화 기술개발에 관심을 가지게 되었고 이에 대한 연구가 활발히 진행되고 있지만, 다당류인 포피란의 구조와 기능에 관한 연구(Morrice *et al.*, 1983; Matosuo *et al.*, 1993; Kayama *et al.*, 1983)가 거의 대부분이다. 포피란은 콜레스테롤 저하작용, 항균효과 및 항암효과(Hong *et al.*, 1997; Koo *et al.*, 1995) 등의 생리효과를 가진다는 사실이 밝혀지면서 김의 생리활성물질 탐색에 많은 관심이 모아졌다. 김에는 포피란 이외에도 항산화물질인 폴리페놀이 함유되어 있으며(Lee *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2002), Han *et al.*(2004)은 김추출물이 콜라겐 합성 및 성숙가교인 pyridinoline생성을 회복시킨다고 하였고, 그 외에 Yashizawa *et al.* (1995)은 김으로부터 추출한 다당류가 대식세포 촉진작용을 나타낸다고 하였다. 이상에서 언급한 바와 같이, 김에서 다당류를 추출하여 그 추출물의 효과를 살펴본 연구들이 대부분이었다. 그렇지만 김

은 약 36%의 많은 단백질을 함유하고 있으며, 단백질에 대한 기능성을 연구한 보고는 거의 없는 실정이다. 포피란을 추출하기 위해 열수로 추출물을 만든 후 알코올로 당류를 제거하고 남은 여액에서 ammonium sulfate를 이용하여 단백질을 침전시켰을 때, 유용한 단백질이 회수되었기에 이들 단백질이 어떤 기능을 가질 것이라는 가정 하에 생리기능효과를 검토하였다.

Acetaminophen은 가장 많이 사용되고 있는 진통제로, 과량 복용시 심각한 간 손상을 야기하게 된다. 실제로 미국과 영국에서는 약물에 의한 간질환 원인 중에서 가장 우위를 차지하고 있는 것이 AAP에 의한 간손상이라고 한다(Lee, 2004). 따라서 Acetaminophen에 의해 야기되는 간손상 메커니즘을 규명하고, 간손상을 예방, 혹은 회복하기 위한 여러 연구들이 진행되어 왔다. Cathleen *et al.*(2005)은 마우스에 AAP 투여시의 세포사멸 현상 중 하나인 PARP 활성이 나타난다고 보고하였으며, Tamara *et al.*(2003)은 AAP가 간에서 지질과산화물을 일으켜 간손상을 야기한다고 보고하였다(Tamara *et al.*, 2003). Sidhartha *et al.*(1999)은 마우스에서 포도씨추출물인 proanthocyanidin을 경구투여하였을 때 AAP에 의한 간세포사멸을 예방한다고 보고하였으며, Francisco *et al.*(2005)은 남미에서 민간요법으로 오랫동안 사용되어온 protium heptaphyllum 추출액을 투여한 결과, AAP에 의한 간손상을 예방할 수 있다고 보고하였다. 이상과 같이 AAP에 의한 간손상을 억제, 예방하고자 하는 노력이 계속되어왔는데, 본 연구에서는 홍조류인 김의 열수추출물로부터 분리한 단백질을 이용하여 AAP에 의한 간손상 억제 메커니즘을 세포수준에서 관찰하고자 하였으며, 마찬가지로 흰쥐에 경구투여하였을 때 그 효과를 증명하고자 하였다. 본 연구에서는 1954년 Chang에 의해 정상 간조직으로부터 구축된 정상 간세포주인 Chang liver 세포와 hepatocyte에서 유래한 HepG2 세포를 사용하였다. 임상에서 질병치료를 위해 여러 가지 약물을 사용하다보면 흔하게 발생하는 문제가 질병이 발생한 조직이외의 정상조직에 영향을 주어 부작용

용을 야기하게 되는 것이다(Benner *et al.*, 1997; Rao *et al.*, 1997). 이미 약물에 대해 내성이 생긴 환자에게는 고농도의 약물을 투여하는 것이 일반적인 치료방법이며, 한 가지 혹은 그 이상의 약물치료 시 정상조직에 손상을 일으키기도 한다(Benner *et al.*, 1997 ; Rao *et al.*, 1997 ; Shea, 1999). 따라서 어떤 새로운 약물을 개발할 때는 정상조직의 손상을 최소로 하는 치료물질의 개발이 절실히 필요하다. 이러한 관점에서 본 논문에서는 정상간세포주인 Chang liver 세포를이용하여 앞서 추출한 김단백질의 독성여부를 확인하였다.

Acetaminophen에 의한 간손상 메카니즘으로 지금까지 크게 두 가지 기전이 밝혀져 있다. 미토콘드리아 기능장애를 통한 세포사멸과 미토콘드리아와는 무관하게 일어나는 산화적 손상이 그것이다. Acetaminophen은 세포내 cytochrome P450에 의해 N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI)으로 대사되어 세포내 GSH와 반응하고 그 결과 GSH농도를 감소시킴으로써 산화적 손상을 일으키거나, 혹은 세포내 단백질, 그중에서도 특히 미토콘드리아 단백질과 반응하여 미토콘드리아막 투과성을 변화 (mitochondrial permeability transition ; MPT)시켜 미토콘드리아내부물질이 세포질로 분비됨으로써 간세포손상을 일으키는 것이다.

Acetaminophen에 의한 간손상 메카니즘이 apoptosis나 혹은 necrosis나에 관한 논란이 아직까지도 분분하다. 왜냐하면 Bax, tBid의 미토콘드리아로의 이동, 미토콘드리아로부터 cytochrome *c* 분비, PARP 분해, DNA 분해 등과 같은 apoptosis와 necrosis사이에 중복되는 신호전달과정이 존재하기 때문이다 (Zhang *et al.*, 2000 ; Jaeschke and Bajt, 2005). Acetaminophen에 의한 세포사멸에 관해 연구한 논문들을 살펴보면, 쥐에 AAP를 투여한 후 그 간조직을 가지고 실시한 TUNEL labeling과 DNA laddering결과에서 apoptosis를 나타내었다는 보고(Ray *et al.*, 1996 ; El *et al.*, 2003)가 있었던 반면, AAP에 의한 간세포 사멸 시 apoptosis는 매우 드물게 발생하며 주로 necrosis에 의한 사멸이 대부분이라는 보고도

있었다(Gujral *et al.*, 2002). Kon *et al.*(2004)은 AAP에 의한 세포사멸은 apoptosis와 necrosis에 의해 일어난다고 보고하였다. Acetaminophen은 ATP를 감소시켜서 necrosis를 일으킨다. 그러나 fructose와 glycine을 사용하면 ATP가 감소되지 않으므로 necrosis가 일어나지 않고 caspase에 의한 apoptosis가 증가하게 된다. 따라서 AAP에 의한 세포사멸은 necrosis와 apoptosis의 특징을 모두 가지는 necrapoptosis에 의해 일어난다고 할 수 있다(Malhi *et al.*, 2006). 본 연구에서는 0.0075 g/l glycine이 함유된 minimum essential medium eagle(MEM)를 사용하였으며, 이와 같은 조건하에서는 어떤 형태의 세포사멸이 일어나는지를 살펴보았다.

Acetaminophen 세포독성의 또 다른 기전 중의 하나가 GSH 감소에 의한 산화적 손상이다. 초기 메카니즘 연구에서는 AAP 반응생성물에 의한 독작용을 억제시키는데 GSH가 결정적인 역할을 한다는 것이 대부분이었다. 많은 연구모델들을 통해 심각한 간손상 시 세포내 산화적 스트레스가 야기된다는 사실은 이미 잘 알려진 사실이다(Jaeschke and Mitchell, 1989). Acetaminophen 투여 4시간 이후에 활성산소 형성지표인 GSSG 농도가 증가(Jaeschke, 1990; Knight *et al.*, 2001)되므로 산화적 스트레스는 간손상의 원인이라기보다는 결과라 하였다(Rogers *et al.*, 2000). 최근 발표된 논문들에서는 내인성·외인성 활성산소종(reactive oxygen species ; ROS)이 세포증식, 분화, 사멸 등에 관여하는 mitogen-activated protein kinases (MAPKs) pathways를 조절한다고 보고하였다(Sano *et al.*, 2001; Jang *et al.*, 2002). Mitogen-activated protein kinases에는 extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38 kinase와 c-Jun N-terminal kinase (JNK)가 있다. 그 중 ERK는 세포분열과 증식에 작용하는 성장인자들에 의해 활성화되며 세포증식과 분화에 관여한다. 한편, JNK와 p38 kinase는 주로 UV조사, 염증, cytokines 등의 세포외 자극에 의해 활성화된다(Kyriakis and Avruch, 2001; Chung *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2003). 이

들 단백질이 활성화되면 세포에 따라 다양한 세포내 반응들이 나타난다. 본 연구에서는 위에서 설명한 AAP에 의한 세포사멸 경로를 확인하기 위해 두가지 세포모델(Chang liver 및 HepG2 세포)을 가지고 그 세포독작용을 관찰함과 동시에, S.D.계 흰쥐에 AAP를 투여한 후 혈중 GOT/GPT 수준과 간조직내 GSH 농도 및 caspase-3 활성측정을 통해 간손상 정도를 살펴보았다.

Insulin-like growth factors (IGFs)는 adult hepatocytes와 infetal hepatocytes에서 합성, 분비되며, 분비된 IGF-I이 type-I IGF receptor (IGF-IR)와 결합하게 되면 다양한 세포들에서 세포증식과 세포주기 진행 및 초기 종양생성에 관여하며 그 외에도 세포사멸 억제작용을 나타내게 된다. 세포사멸 과정을 살펴보면 wild-type IGF-IR와 그 리간드가 결합한 후 많은 세포사멸신호들에 대해 세포사멸 억제효과를 나타내는 것을 알 수 있다. Catherine *et al.* (2004)은 doxorubicin이라는 약물을 HepG2 세포에 처리했을 때 apoptosis가 유도되었으며 이때 IGF-I을 처리함으로써 약물에 의한 apoptosis가 완전히 억제되었다고 보고하였다. 또한 이들은 doxorubicin에 의한 세포사멸에 ERK1/2가 관여한다고 하였다. Ryoji *et al.* (2006)은 몇 가지 성장인자들(IGF-I, IGF-II, hepatocyte growth factor, and epidermal growth factor)을 SV40-transformed human corneal epithelial 세포에 처리하였을 때 세포증식과 세포사멸 억제효과에 대해 보고하면서, 이들 성장인자들을 세 가지 그룹으로 분류하기도 하였다. 그 중에서 IGF-I은 세포증식을 촉진시키고 sodium nitroprusside에 의한 세포사멸을 억제, Akt 활성화를 유도한다. IGF-I이 IGF-IR와 결합하면 다양한 신호전달체계가 활성화된다. 그중 하나가 serine - threonine protein kinases 일종인 MAPKs로 다양한 세포들에서 세포사멸을 조절한다(Dews *et al.*, 2000). IGF-IR가 활성화되면, Shc이 IGF-IR에 모이게 되면서 tyrosine 잔기들이 인산화된다. 인산화된 Shc는 IRS-1 비의존성으로

adaptor protein인 Grb2와 결합하여 Ras - ERK pathway를 활성화시키게 되는 것이다. 이 IGF-IR 신호전달경로는 세포분화/분열과 밀접한 관련이 있지만, fibroblast의 경우 세포부유로 인한 세포사멸 등을 조절하기도 한다. 두 가지 중요한 IGF-I 신호전달경로 (PI3-K 및 MAPK pathway) 중 하나인 MAPK pathway에는 ERK, JNK, p38 subgroups이 관여하는데 이들 세 가지 인자들은 세포증식, 사멸, 분화에 중요하게 작용한다. 흥미롭게도 위에서 언급한 것과 같이 이들 세 가지 인자들은 산화적 손상 시에도 관여하는 인자들이다. JNK는 세포사멸에 주로 작용하는데 산화적 손상시 활성화된다. 반면, ERK는 세포성장, 분화를 조절하게 되며, 산화적 손상에 의해 활성화되고, 항상성유지를 위해 세포사멸억제신호로 작용하게 된다 (Nair *et al.*, 2004). 이번 연구에서는 AAP에 의한 산화적 손상에 ERK-1/-2 활성화가 관여하는지에 초점을 맞춰 살펴보았고, IGF-I 처리로 AAP 독성이 억제되는데 ERK-1/-2 활성화가 어떻게 작용하는지에 관해 살펴보려고 하였다.

김단백질과 IGF-I이 모두 AAP 독작용을 억제시키므로 김단백질의 AAP 간독성 억제효과가 IGF-IR 신호전달경로와 관련이 있을 것이라는 가설을 세웠다. Acetaminophen 단독, 혹은 AAP와 김단백질 병행처리 시 IGF-IR 신호전달경로가 어떻게 변화되는지를 관찰하여 김단백질의 AAP 간독성 억제효과를 IGF-IR 신호전달경로에 근거하여 그 기전을 살펴보았다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 시약 및 재료

본 실험에 사용된 김은 전라남도 완도 김양식장에서 구입한 방사무늬 돌김(*P. yezoensis*)을 사용하였다. Chang liver 및 HepG2 세포 배양에 사용한 Fetal bovine serum (FBS)은 Gibco BRL (Life Technologies, Gibco BRL., Gaithersburg, MD., USA) 제품을 사용하였으며, Minimum Essential Medium Eagle(MEM), sodium bicarbonate, 배지용 항생제, bovine serum albumin(BSA), trypsin, protease inhibitor, detergent, MAPK, PD98059, LY294002, Z-VAD-FMK, IGF-I, HGF, EGF는 Sigma Chemical Co.(USA)에서 구입하였다. Western blot에 사용된 protein standard marker는 rainbow high, low molecular marker (Amersham Pharmacia bioscience, England ; RPN756, RPN755, RPN800)를 사용하였고 detection reagent로는 SuperSignal West Pico Luminol/Enhancer Solution과 SuperSignal West Pico Stable Peroxide Solution과 세포단백 질농도를 측정하기위한 BCA Protein Assay Kit (PIERCE, USA)를 사용하였다. Western blot과 immunoprecipitation에 사용한 antibody들은 Santa Cruz (USA)와 Cell Signaling(USA)제품을 사용하였다. 세포생존율을 측정하기위한 MTS/PMS solution (CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay Kit)은 Promega에서 구입하였다. Cell cytotoxicity 측정을 위해 Cytotoxicity Detection Kit (Roche, Mannheim, Germany)를 사용하였다. 미토콘드리아 단백질과 세포질 단백질을 분리하기 위해 Mitochondria Isolation Kit (PIERCE)를 구입해서 사용하였다. Caspase-3 활성을 측정하기 위해 CaspACETM Assay System (Promega)를 구입해서 사용하였다. 세포배양용 culture dish, 6-/12-/96-

well plate, corning tube, scrapper는 Corning (USA)와 Falcon (Becton Dickinson Labware, USA)제품을 사용하였고, 전기영동용 agarose는 SeaKem LF agarose (BMA, USA)를 사용하였다. 100 bp DNA ladder는 Bioneer (Bioneer Co., Korea)에서 구입하였으며, 그 외 DNA 실험용 시약들은 molecular biology용으로 Sigma에서 구입 사용하였다. Flow cytometry 측정에 사용한 Cycle TEST PLUS kit, Annexin V kit, mesh filter는 Becton Dickinson에서 구입하였다.

2. 실험방법

1) 시료의 조제

김으로부터 단백질 추출

2005년 1월에 전라남도 완도 김양식장에서 구입한 마른 김(*P. yezoensis*)을 분쇄하여 60 메시로 거른 다음, 김분말(수분 3.9%, 단백질 36.1%) 80 g을 취해 3구 플라스크에 넣고 증류수 2 L에 침지하였다. 80℃에서 3시간동안 교반하면서 추출한 다음, 감압하여 뷰후너 깔대기로 여과하였다. 여액에 3배 부피의 에탄올을 첨가하여 침전된 당을 뷰후너 깔대기로 제거하고 여액을 취해 감압농축하였다. 여기에 최종농도 80%가 되도록 ammonium sulfate를 첨가한 후 4℃에서 24시간 교반하면서 단백질을 흡착시켰다. 4℃, 8,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층을 제거하고, 단백질이 흡착된 ammonium sulfate를 약 20 ml의 탈이온수에 녹인 다음 냉탈이온수에서 투석하였다(Spectra/Por membrnae MWCO 3,500). 투석 후, 시료는 sephadex G-75로 충전된 칼럼에 로딩하여 PBS로 용출시킨 다음 280 nm에서 흡광도를 측정하여 최대값을 나타내는 피크를 확인(Fig. 18)하고 확인된 획분은 진공농축하여 0.1% Trifluoroacetic acid (TFA)가 함유된 탈이온수에 녹여 HPLC로 정제하였다. HPLC로 사용한 칼럼은 Reverse-phase Asahi-Pak C4P column (4.6 mm × 250 mm, 5

μm particle size, Asahi Chemical Inc., Japan)이며, 280 nm에서 나타나는 단백질 피크를 확인한 후, 0.1% TFA내 acetonitrile농도를 0~50%까지 변화를 주어 0.8 ml/min 유속으로 30분간 용출시켰다 (Fig. 18).

위에서 나온 시료의 분자량 및 정제도는 12.5% SDS-PAGE로 전기영동한 후, 밴드를 Commassie blue staining과 Silver staining으로 확인하였다.

김단백질 가수분해물 및 합성물 제조

김단백질 가수분해물을 제조하기 위해, 위에서 나온 14 kDa의 김단백질을 체내 대사과정을 고려하여 단백질분해효소인 pepsin으로 분해하였다. 그리고 pepsin : PYP = 1 :10의 비율로 섞은 후, 37°C에서 4시간 반응을 시킨 후 1 M NaOH를 50 ul/ml농도로 첨가하고 100°C에서 10분간 가열하였다. 4°C, 12,000 rpm으로 3분간 원심분리하여 상층을 취해 560 nm에서 그 농도를 측정 후 AAP 독성에 대한 효과를 검토하였다.

14 kDa 김단백질의 염기서열 분석결과, 김의 cytochrome *c*와 동일한 염기서열을 확인하였으며, 그 염기서열 (Pep21 sequence ; R.LVDEIDIE-DAANYVLSQSEK.G)을 합성하여 AAP 독성에 대한 효과를 관찰하였다.

2) 세포배양

인간의 정상 간조직에서 유래된 Chang liver 세포와 간암세포주인 HepG2 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, USA)에서 구입하였다. 두 세포 모두 10% FBS가 함유된 MEM배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂가 유지되도록 배양하였다. 이때 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 계대배양하였

으며 배지는 48시간마다 교환하였다.

3) 효소저해제 처리

세포는 10% FBS를 함유하는 MEM 배지에서 confluent monolayer가 될 때까지 배양한 다음 serum free MEM 배지로 교환하여 24시간 배양하였다. 24시간 경과 후, 새로운 serum free MEM 배지에 효소저해제 (PD98059, Z-VAD-FMK)를 20 μ M의 농도로 처리하여 1시간동안 배양하고 IGF-I 및 AAP를 24시간 동안 처리하여 신속하게 cell lysate를 회수하였다.

4) MTS assay

Acetaminophen, growth factor, 김단백질이 간세포의 증식에 미치는 영향을 알아보기 위해 96-well plate에 5×10^4 cells/well로 세포를 분주한 후 세포부착을 위해 24시간 배양하고, Phenol red free-MEM 배지로 24시간 더 배양한 다음 AAP, growth factor, 김단백질을 표시된 농도/시간 대별로 배양하였다. MTS/PMS solution (Promega Co., USA)를 첨가하고 37°C에서 1시간 반응시킨 후 ELISA plate reader로 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) Western blot

(1) Total cell lysate 추출

Acetaminophen, 김단백질, IGF-I이 세포내 단백질발현에 미치는 영향을 알아보기 위해 우선 total cell lysate를 취하였다. 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℃, 12,000 rpm로 원심분리시킨다. 상층액을 취해 BCA protein assay kit로 단백질 농도를 측정하였다.

(2) 핵단백질추출

세포를 PBS로 세척한 후 trypsin처리하여 모은 다음, 2,500 rpm에서 5분간 원심분리시킨 후 다시 PBS로 세포를 세척하였다. 2,500 rpm에서 5분간 원심분리하여 남은 pellet에 lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 0.05% (v/v) Triton X-100)를 첨가하여 세포를 부유시켰다. 4℃에서 12,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 남은 pellet의 부피와 동일한 양의 pH 7.4, 10 mM Tris-HCl /5 mM MgCl₂를 첨가해서 pellet을 부유시켰다. 여기에 동일한 양의 1 M NaCl/10 mM Tris-HCl(pH 7.4)/4 mM MgCl₂를 첨가한 다음 얼음위에서 30분간 방치하였다. 4℃에서 12,000 rpm로 15분간 원심분리시킨 다음 나온 상층액을 취해 80% glycerol을 최종농도 20%가 되도록 첨가하였다. 단백질농도 측정 후 Western blot을 실시하였다.

(3) Western blotting

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 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℃에서 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 Solution 과 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.

6) Immunoprecipitation

Acetaminophen, AAP+PYP를 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 또는 anti-IRS-1 항체를 처리하여 (1:300) 4℃에서 하룻밤 반응시킨 후, protein A-Sepharose (Sigma Co., USA)를 넣어 4℃에서 1시간 방치하고 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 항체와 결합한 IGF-IR와 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 7.5% gel에 전기영동하고 membrane으로 옮겼다. Membrane을 anti-phosphotyrosine 항체(1:500, mouse monoclonal antibody)로 4℃에서 하룻밤 반응시킨 후, 2차 항체로는 anti-mouse IgG-conjugated horseradish peroxidase (1:10,000)를 사용하여 실온에서 1시간 반응시켰다. TBS-T로 세척 후, chemiluminescence substrate을 사용하여 X-ray 필름에 감광시키고 현상하여 IGF-IR의

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℃에서 30분간 stripping한 다음, anti-IGF-IR β -항체(1:500)로 4℃에서 하룻밤 반응시킨 후, ECL western blot 방법으로 IGF-IR의 단백질 발현 수준을 밴드로 확인하였다.

7) DNA 단편화

실험물질의 세포증식억제효과가 세포사멸(apoptosis)에 의한 것인지를 알아보기 위해 DNA 단편화를 관찰하였다. PBS-EDTA로 2회 세척한 세포를 취해 2,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 남은 pellet에 extraction buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM EDTA, 1% Nonidet P-40)을 넣고 4℃에서 2시간동안 추출하였다. 그 후 sodium dodecyl sulfate (SDS)를 1%가 되도록 넣고 4℃에서 2시간, 0.55 mg/ml의 proteinase K를 넣고 42℃에서 2시간 incubation하였다. 동량의 phenol-chloroform-isoamylalcohol (25:24:1)을 넣고 잘 섞은 후 원심분리하여 DNA가 포함되어 있는 상층액을 얻었다. DNA를 포함한 상층액에 0.1배의 3 M 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.

8) 세포염색

6-well에 배양한 세포를 조건별로 물질을 처리한 후 PBS로 2회 세척하였다. 10% formaldehyde용액으로 실온에서 10분간 고정하고 PBS로 2회 세척하였다. 0.2% Triton X-100으로 실온에서 10분간 방치한 다음 다

시 PBS로 2회 세척하였다. 2 µg/ml Hoechst 33342 첨가 후 호일을 씌우고 실온에서 30분간 방치하였다. PBS로 2회 세척한 후, 5ug/ml propidium iodide(PI)첨가 후 실온에서 10분간 방치한 후 PBS로 2회 세척하였다. 100% EtOH로 탈수한 다음 형광현미경으로 관찰하였다.

9) *Flow cytometry*

세포주기분포도에 미치는 AAP와 김단백질의 영향을 알아보기 위해 Cycle TEST PLUS kit (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 사용하였다. 물질을 처리한 세포들을 trypsin처리한 다음 PBS로 부유시켰다. 4℃, 3,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 남은 pellet을 kit에 포함된 buffer solution으로 세척하였다. Cycle TEST PLUS solution A 및 B를 실온에서 각각 10분씩 처리한 다음 Cycle TEST PLUS solution C를 첨가하여 4℃에서 30분 동안 염색하였다. 이를 nylon mesh로 세포를 하나씩 분리시킨 후 DNA flow cytometry (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)에 적용시켜 형광 반응에 따른 histogram을 ModiFit LT (Becton Dickinson, USA) 프로그램으로 분석하였다.

10) 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℃ water bath를 이용하여 동결, 해동을 2회 반복하였다. 4℃에서 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 5분

간격으로 흡광도를 측정하였다.

11) 세포에서 *caspase-3* 활성 측정

Caspase-3 활성을 측정하기 위해 CaspACE™ Assay System를 이용하였다. 96-well에 2×10^4 cells/well로 세포를 분주한 후 실험물질을 처리하고 표시된 농도/시간별 처리가 끝난 다음 PBS로 세척하였다. 모든 well에 kit내에 포함되어있는 DEVD-pNA substrate를 넣고 37℃, 4시간동안 반응시켜 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

12) 동물사육

실험동물은 효창사이언스에서 분양받은 4주령의 Sprague Dawley계 숫쥐 (체중, 100 ± 10 g)를 사용하였다. 각각 10마리씩 세 그룹 (control, AAP군, AAP+김단백질군)으로 나누어 연립식 사육케이지에 넣고 7일간의 순치예비사육을 하였다. 이때 사육실온도 ($22 \pm 1^\circ\text{C}$), 습도 ($50 \pm 10\%$) 및 명암 (12시간, 08:00~18:00)을 엄격히 조절하였다. 순치 예비사육을 거친 후, 일반사료와 물은 자유롭게 먹을 수 있도록 하면서, 2주간 saline (control군과 AAP군)과 김단백질 (100 mg/kg)을 경구투여하였다. DMSO에 녹인 700 mg/kg AAP를 복강으로 투여한 후, 24시간 뒤 단두하여 채혈하였고, 각 혈액시료는 빙수 중에 1시간 방치한 후에 원심분리 (3,000 rpm, 15 min, 4°C)하여 취한 혈청을 저온 (-70°C)에 보관하면서 실험에 사용하였다. 그리고 간장을 적출하여 생리식염수로 세척한 다음 그 무게를 칭량하고 그중 일부를 취해 Bouin용액 (picric acid : formalin : glacial acetate = 15 : 5 : 1)에 고정하였다.

(1) 혈청중의 *GOT/GPT* 측정

Reitman-Frankel의 방법에 따라 제조된 Glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) 및 Glutamic pyruvic transaminase (GPT) 활성측정용 혈청 transaminase 측정용 kit (신양화학, Korea)를 써서 분광광도계 (Ultraspec 2001 pro. Amersham Pharmacia biotech, England)로 505 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(2) 간장조직 염색

각 실험군 별로 사육한 흰쥐의 간장조직을 떼어내어 생리식염수로 가볍게 씻어 혈액을 제거하였다. 간장조직의 일부를 절단하여 0.5 cm 두께로 잘라 Bouin 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 알콜에 탈수하고 xylene으로 투명화시켰다. Embedding center에서 tissue capsule에 paraffin을 침투시켜 포매(embedding)하여 block으로 만들었다. Rotary microtome으로 block을 5 μ m 두께로 박절하여 부유 항온수조에서 충분히 퍼지도록 둔 후 깨끗한 slide glass에 부착시켰다. 그런 다음, slide glass와 조직절편을 단단히 접착시켜주기 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 광학현미경으로 관찰하였다.

(3) 간장조직 중의 GSH 활성 측정

간장조직을 5% SSA용액으로 균질화시킨 후, 액체질소로 동결, 37℃ 항온수조에 해동을 2회 반복 실시하였다. 4℃에서 5분간 방치시킨 후 4℃, 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취했다. 상층액과 GSH assay kit내 standard solution을 96-well plate에 각각 분주한 다음 여기

에 working mixture를 첨가하여 실온에서 5분간 반응시킨 후 NADPH를 넣고 피펫으로 혼합하고 412 nm에서 5분 간격으로 흡광도를 측정하였다.

(4) 간장조직 중의 *caspase-3* 활성 측정

간장조직을 protease inhibitor가 포함된 lysis buffer (25 mM HEPES, pH 7.5, 5 mM EDTA, 2mM DTT, 0.1% CHAPS)로 균질화시킨 다음 4℃, 12,000 rpm으로 원심분리시켰다. 상층액을 취해 BCA protein assay kit로 단백질 농도를 측정하여 80 ug의 단백질을 96-well에 넣고 여기에 DEVD-pNA substrate를 넣은 후 37℃, 4시간동안 반응시켜 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

14) 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 test와 Duncan's multiple range test를 적용하였다. 이때, 모든 통계적 유의도 수준은 $p < 0.05$ 에서 살펴보았다.

III. 결과 및 고찰

Acetaminophen은 전 세계적으로 많이 사용되고 있는 진통제로, 처방용량대로 복용했을 때는 효과적인 통증억제작용을 나타내지만, 과량으로 복용했을 때 심각한 간 손상을 야기하게 된다. 따라서 Acetaminophen에 의해 야기되는 간손상 메카니즘을 규명하고, 그로인한 간손상을 예방, 혹은 회복하기 위한 여러 연구들이 진행되어 왔다(Cathleen *et al.*, 2005; Tamara *et al.*, 2003; Sidhartha *et al.*, 1999; Francisco *et al.*, 2005). 따라서, 본 연구에서는 먼저 AAP에 의한 간손상 메카니즘을 검토하고, 김의열수추출물로부터 분리한 단백질을 이용하여 AAP에 의한 간손상 억제 메카니즘을 세포수준에서 관찰하였으며, 또한 흰쥐에 AAP와 김단백질을 경구투여시켜 그 효과를 증명하였기에 각각 순서대로 서술하고자 한다.

1. Acetaminophen의 간세포 사멸 기전

1) 세포증식에 미치는 AAP의 영향

본 실험에 사용한 간세포는 인체 정상 간조직에서 유래한 Chang liver 세포와 인체간암유래 HepG2 세포를 사용하였으며, AAP를 각각 0, 5, 10 및 20 mM 농도로 24시간 및 48시간 처리한 후 tetrazolium compound인 MTS를 투여하고 일정시간동안 배양하였다. 배양하는 동안 MTS는 세포 내 미토콘드리아에서 생산되는 succinate dehydrogenase에 의해 수용성의 formazan으로 변하고 이렇게 생성된 formazan의 양을 490 nm에서의 광학농도로 측정하여 세포의 증식을 확인하였다.

MTS 분석 결과(Figure 1), Chang liver 세포와 HepG2 세포 모두에서 AAP 농도 의존적으로 세포 생존율이 감소되는 것으로 나타났으며, 24시간 처리만으로도 두 가지 세포 모두에 60%의 세포생존율을 보여주었다.

본 실험에서는 60% 생존율을 나타내는 AAP의 농도를 기준으로 Chang liver 세포에는 10mM (60.88 ± 0.09 %), HepG2 세포에는 20mM ($59.1 \pm 10.1\%$)를 24시간동안 처리하여 이후 실험을 진행하였다.

2) 세포형태에 미치는 AAP의 영향

Figure 2는 Chang liver 세포와 HepG2 세포에 AAP를 농도별로 24시간 처리했을 때 세포형태를 Hoechst 33342로 염색하여 형광현미경에서 관찰한 것이다. 그림에서 보는 바와 같이, Chang liver 세포와 HepG2 세포 모두에서 AAP 처리 시 농도 의존적으로 세포형태가 변형되었으며, 세포 수 또한 감소하는 것으로 나타났다. 이는 앞에서 살펴보았던 MTS assay결과와 일치하는 것이다.

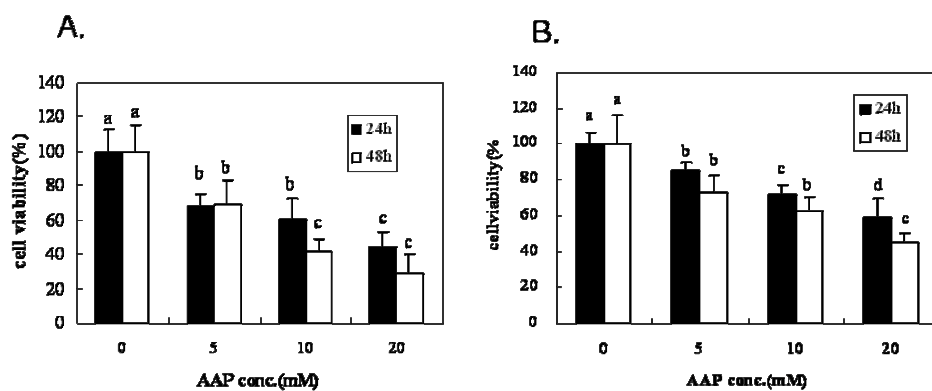
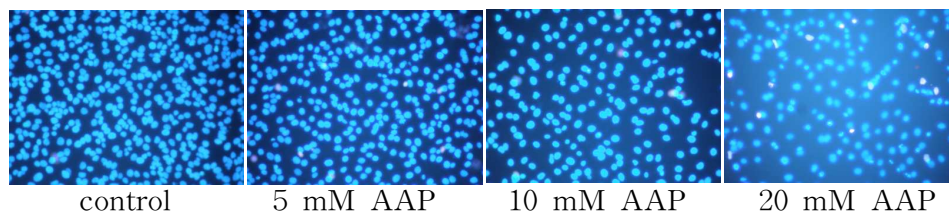


Fig. 1. Effect of AAP on cell viability.

Chang liver(A) and HepG2(B) cells were incubated with AAP in the indicated concentrations for 24 hrs and 48 hrs. The results indicated mean $\pm$ S.D. in three independent experiments.

A.



B.

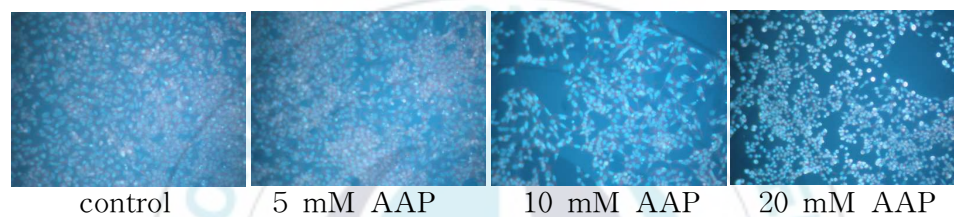


Fig. 2. Effect of acetaminophen on cell morphology.

Chang liver(A) and HepG2(B) cells were incubated with AAP in the indicated concentrations for 24hr and stained with Hoechst 33342($\times 200$).

3) 세포사멸 기전에 미치는 AAP의 영향

서론에서 언급한 것처럼, AAP에 의한 세포사멸 유형에 관해 많은 논문들이 발표되었으나, 현재까지도 apoptosis와 necrosis사이에서 의견이 분분하다. Figure 3은 지금까지 밝혀진 AAP에 의한 간세포 손상기전이며 (Harmmeet *et al.*, 2006), AAP에 의한 간세포 독성기전은 세포내 glutathion 농도를 감소시켜 세포에 치명적인 산화적 손상을 일으키는 것과, AAP의 대사 생성물인 N-acetyl-p-benzoquinone imine(NAPQI)의 작용에 의해 미토콘드리아의 기능이 파괴됨으로써 일어나는 세포사멸경로가 있으며, 이 두 가지 경로가 완전히 분리된 것은 아니다. 치료농도의 AAP를 복용하면 세포내 glucuronyltransferase에 의해 glucuronic acid와 AAP가 결합하여 담즙이나 혈관으로 이동하거나, 혹은 sulfotransferase에 의해 sulfate와 AAP가 결합하여 담즙 또는 혈관으로 이동하여 작용을 나타내지만, 과다복용 시 체내 p450에 의해 NAPQI가 생성되는 것이다. NAPQI는 세포내 GSH와 반응하여 GSH 농도를 감소시키게 된다. GSH가 감소되고 나면 남은 NAPQI가 세포내 단백질과 결합하여 그림에서와 같이 미토콘드리아기능 장애를 일으키는 것이다. 남은 과잉의 NAPQI가 세포내 단백질, 그중에서도 특히 미토콘드리아단백질과 결합하여 미토콘드리아막 투과성을 변화(mitochondrial membrane permeability transition ; MPT)시키게 된다(Jollow *et al.*, 1973). 미토콘드리아막 투과성전으로 미토콘드리아로부터 세포질로 1,500 dalton이하의 용질의 이동이 일어나게 되는데 그 대표적인 것이 cytochrome *c*와 Ca^{2+} 이다. 그중 cytochrome *c*는 caspase-3를 활성화하여 apoptosis를 유도하고, Ca^{2+} 는 Ca^{2+} -independent protease들을 활성화시켜 세포사멸을 유도하게 된다 (Ray *et al.*, 1990). 이러한 선행연구에 기초하여, 본 연구에서는 그 중 미토콘드리아 기능장애에 의해 세포가 사멸하는 경로를 먼저 살펴보고자 하였다.

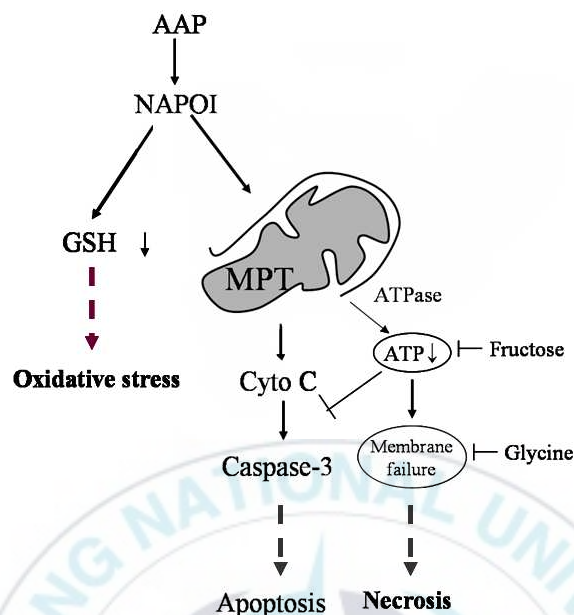


Fig. 3. Sequence of events leading to AAP-induced

hepatotoxicity. MPT, mitochondrial membrane permeability transition ; GSH, reduced glutathione ; cyto c , cytochrome c . NAPQI (N-acetyl-p-benzoquinone imine) converges on mitochondria to induce membrane permeabilization. After membrane permeabilization, cytochrome c is released to the cytosol and activates caspase-3. With severe and pervasive mitochondrial dysfunction, ATP decreases in part due to activation of the mitochondrial uncoupler-stimulated ATPase. With ATP depletion, caspase activation is blocked, and necrosis occurs instead. Fructose, an ATP-generating glycolytic substrate, and glycine, a cytoprotective amino acid, prevent membrane failure and necrotic cell death.

Reproduced from Harmeet *et al.* (2006), *Hepatology* 43, 31-44.

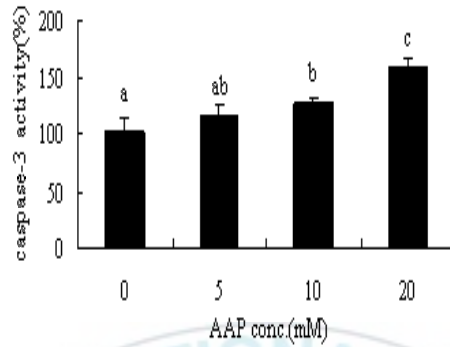
(1) 세포사멸기전에 미치는 AAP의 영향

① *Caspase-3* 활성화와 *PARP* 단백질의 분해 유발

Chang liver 세포와 HepG2 세포에 각각 10 mM과 20 mM의 AAP를 24시간 처리한 후 미토콘드리아를 통한 세포사멸 과정에 관여하는 대표적인 단백질인 caspase-3의 활성화와 PARP 분해정도를 측정하였다. Chang liver 세포의 경우, Figure 4에 나타난 것과 같이, caspase-3 활성화가 AAP에 의해 농도 의존적으로 증가되었다. Caspase-3의 대표적인 기질인 PARP 분해정도를 살펴본 결과(Figure 4B), AAP 농도 의존적으로 PARP 분해가 일어나는 것으로 관찰되었다. HepG2 세포의 경우도 Figure 4의 결과에서처럼 caspase-3 활성화가 AAP 농도 의존적으로 증가되었으며 PARP 분해도 같은 경향을 나타내었다(Figure 5B). 그렇다면 AAP에 의한 세포사멸이 caspase-3 의존성 세포사멸인지를 확인하기 위해 caspase-3 inhibitor인 Z-VAD-fmk를 AAP와 함께 처리하여 AAP독성에 어떤 영향을 미치는지를 살펴본 결과, Figure 6에서와 같이 Chang liver 세포에서 AAP 처리로 $127.4 \pm 5.18\%$ 까지 증가되었던 caspase-3 활성화가 caspase-3 inhibitor (D) 처리로 $65.8 \pm 7.7\%$ 로 감소되었으나, 세포증식에는 caspase-3 inhibitor ($58.0 \pm 2.3\%$)가 AAP처리에 의한 세포증식($54.4 \pm 3.6\%$) 효과를 억제시키지 않는 것으로 나타났다. 또한 HepG2 세포에서도 AAP 처리 시 증가한 caspase-3 활성화 ($136.5 \pm 4.1\%$)가 caspase-3 inhibitor 처리로 $91.3 \pm 3.0\%$ 의 caspase-3 활성화가 나타났다. 그러나, Chang liver 세포와는 달리, HepG2 세포에서는 caspase-3 inhibitor ($90 \pm 6.6\%$)가 AAP의 세포사멸작용($81.9 \pm 4.5\%$)을 부분적으로 억제시키는 것으로 나타났다. 본 실험에서 사용한 두가지 세포에서의 Caspase-3 활성화와 PARP 분해양상이 다르게 나타났으며, 이는 세포에 따른 차이일 것으로 생각된다. Caspase-3 활성화와 PARP 분해, 그리고 세포사멸에 대해 의존성, 혹은 비의존성에 대한 논문들이 보고되었다. 세포분화, 증식, 성장억제, apoptosis

등 다양한 생리기능을 가진 cytokine인 TGF- β 에 관한 연구 (Derynck and Balmain, 2001; Massagu *et al.*, 2000; Schuster and Krieglstein, 2002)에서 TGF- β 에 의한 apoptosis시 caspase-3 의존성/비의존성 PARP 분해가 일어나며, DNA 단편화에 caspase-3가 영향을 미치지 않는다고 하였다(Yang *et al.*, 2004). 또한 Boleth lymphoblastoid 세포에서 카드뮴에 의해 apoptosis가 진행되며 이때 caspase-3/-8 inhibitor를 첨가하더라도 세포사멸이 억제되지 않았으므로, 카드뮴에 의한 apoptosis는 caspase-3 의존성/비의존성 경로에 의해 일어난다고 하였다(Coutant *et al.*, 2006). HepG2 세포에서는 AAP 처리시 caspase-3 활성이 AAP 농도 의존적으로 증가되었으며, caspase-3 inhibitor가 AAP에 의한 세포사멸을 부분적으로 억제시킨 반면, Chang liver 세포에서는 AAP 처리로 caspase-3 활성이 AAP 농도 의존적으로 증가되었으나, caspase-3 inhibitor를 처리하였을 때 AAP에 의한 세포사멸이 억제되지 않았다. 그러므로 HepG2 세포에서는 AAP에 의한 세포사멸과정에 caspase-3가 관여하는 반면 Chang liver세포에서는 caspase-3 의존성/비의존성 세포사멸 경로가 존재할 것으로 생각된다.

A.



B.

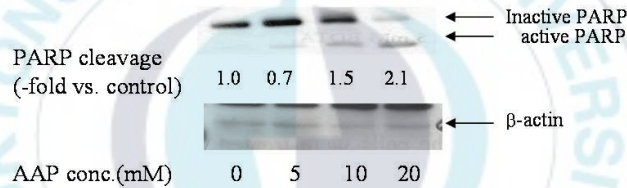
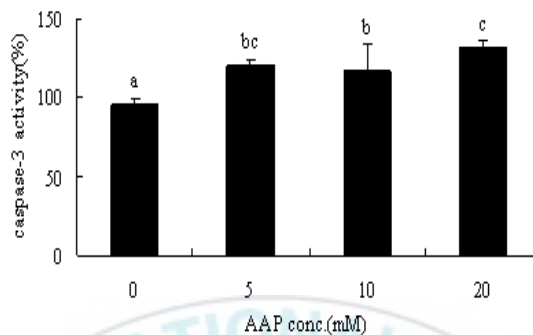


Fig.4. Caspase-3 activity (A) and PARP cleavage (B) after AAP treatment in Chang liver cells.

Cells were treated with AAP for 24 hrs and collected for enzyme activity(A) and western blotting(B). Caspase-3 activity were measured as described in materials and methods, and data shown are mean $\pm$ S.D. expressed and came from at least three independent experiments. Samples significantly different from control ; ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$. PARP cleavage were presented one representative gel from three separate experiments and the quantitative analysis based on densitometry of each.

A.



B.

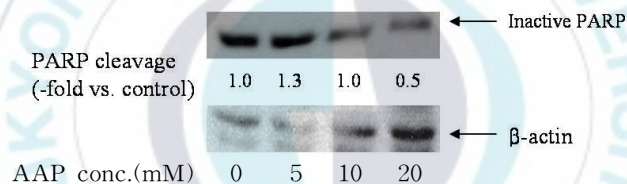


Fig. 5. Caspase-3 activity (A) and PARP cleavage (B) after AAP treatment in HepG2 cells.

Cells were treated with AAP for 24 hr and collected for enzyme activity(A) and western blotting(B). Caspase-3 activity were measured as described in materials and methods, and data shown are mean $\pm$ S.D. expressed and came from at least three independent experiments. Samples significantly different from control ; ^a $p < 0.05$, ^b $p < 0.01$. PARP cleavage were presented one representative gel from three separate experiments and the quantitative analysis based on densitometry of each.

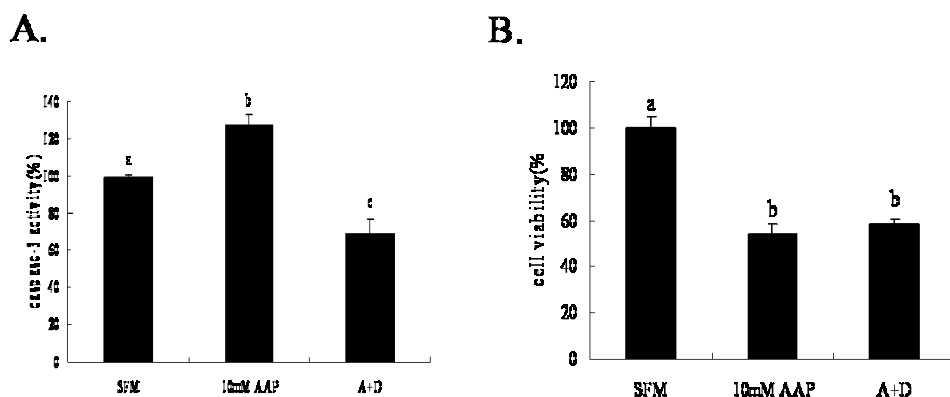


Fig. 6. Caspase-3 activity and cell viability after AAP or AAP and caspase-3 inhibitor (D) co-treatment in Chang liver cells.

A. Cells were treated 10 mM AAP alone or AAP and caspase-3 inhibitor (D) for 24 hrs, and collected for caspase activity assay. B. Cells were seeded on 96 well plate and incubated for 24 hrs. Then, media was changed with serum free media. After 24 hrs incubation, cell were treated with sample, and incubated for 24 hrs. Cells were measured by MTS assay as described in material and methods.

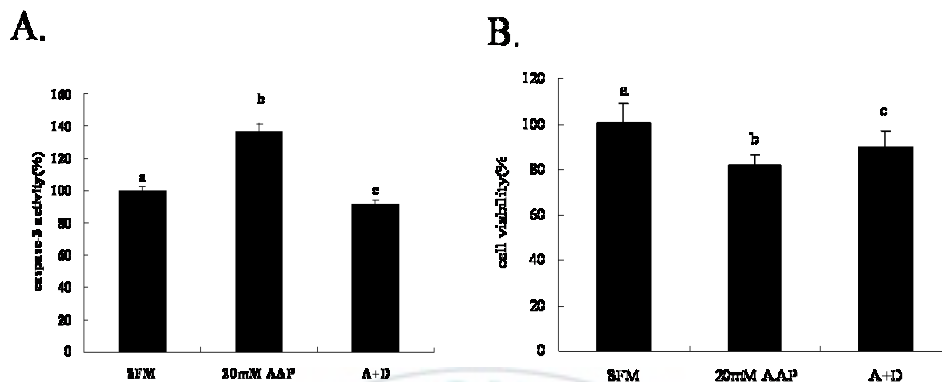


Fig. 7. Caspase-3 activity and cell viability after AAP or AAP and caspase-3 inhibitor(D) co-treatment in HepG2 cells.

A. Cells were treated 10 mM AAP alone or AAP and caspase-3 inhibitor (D) for 24 hrs, and collected for caspase activity assay. B. Cells were seeded on 96 well plate and incubated for 24 hrs. Then, media was changed with serum free media. After 24 hrs incubation, cell were treated with sample, and incubated for 24 hrs. Cells were measured by MTS assay as described in material and methods.

② DNA 단편화에 대한 AAP의 영향

Acetaminophen에 의한 세포사멸모드가 apoptosis인지 necrosis인지를 확인하기 위해 DNA 단편화를 살펴보았다. Figure 8에 나타낸 결과에서 알 수 있듯이, Chang liver 세포와 HepG2 세포 모두에서 AAP 농도 의존적으로 DNA 단편화가 일어나는 것으로 관찰되었다. 그러나 관찰된 DNA 단편화는 apoptosis 진행시 일어나는 laddering이 아닌 smearing으로 necrosis의 특징을 나타내었다. Bax 및 tBid의 미토콘드리아로의 이동, 미토콘드리아로부터 cytochrome *c* 분비, PARP 분해, DNA 분해 등과 같은 apoptosis와 necrosis 사이에 중복되는 신호전달과정이 존재하므로 apoptosis와 necrosis를 구분하여 정확하게 정의하기는 어렵다 (Zhang *et al.*, 2000 ; Jaeschke and Bajt, 2005). 위에 AAP를 투여한 후 그 간조직을 가지고 실시한 TUNEL labeling과 DNA laddering결과에서 apoptosis를 나타내었다는 보고가 있었던 반면 (Ray *et al.*, 1996 ; El *et al.*, 2003), AAP에 의한 간세포 사멸 시 apoptosis는 매우 드물게 발생하며 주로 necrosis에 의한 사멸이 대부분이라는 보고도 있었다 (Gujral *et al.*, 2002). Kon *et al.*(2004)은 AAP에 의한 세포사멸은 apoptosis와 necrosis에 의해 일어난다고 보고하였다. Acetaminophen은 ATP를 감소시켜서 energy가 필요한 apoptosis를 억제, 그 결과 에너지가 없이 일어나는 necrosis를 일으킨다. 그러나 fructose와 glycine을 사용하면 ATP가 감소되지 않으므로 necrosis가 일어나지 않고 caspase에 의한 apoptosis가 증가하게 된다. 따라서 AAP에 의한 세포사멸은 necrosis와 apoptosis의 특징을 모두 가지는 necrapoptosis에 의해 일어난다고 할 수 있다(Malhi *et al.*, 2006). 본 연구에서는 0.0075 g/l glycine이 함유된 MEM를 사용하였으며, 그 결과 AAP 처리후 apoptosis의 특징인 caspase-3 활성화와 DNA 단편화를 관찰할 수 있었다. 그러나 우리가 관찰한 DNA 단편들은 DNA laddering이 아닌 smearing으로 관찰되었으므로, DNA 단편화 측정

결과에서는 necrosis로 나타났다. 따라서 본 연구에서는 AAP에 의한 세포사멸모드를 앞서 설명한 대로 apoptosis와 necrosis의 특징을 모두 가진 necrapoptosis라고 생각된다.



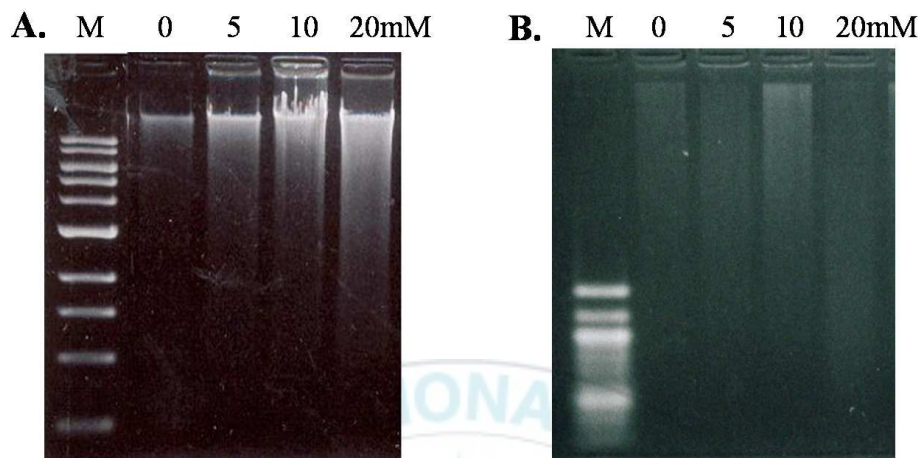


Fig. 8. Effect of AAP on DNA fragmentation.

Chang liver(A) and HepG2(B) cells were incubated with AAP in the indicated concentrations for 24hrs and extracted DNA as described in materials and methods. The extracted DNA was loaded on 1.8% agarose gel. M is DNA marker.

③ 세포주기에 대한 AAP의 영향

DNA binding dye인 PI 염색을 통해 세포주기를 관찰하였다. Figure 9에 나타난 바와 같이, AAP는 sub-G1 arrest를 일으키는 것으로 나타났다. Sub-G1 peak는 DNA 단편화가 일어나서 만드는 peak이며, 이 결과는 DNA 단편화 결과(Figure 8)와 일치하였다. Sub-G1 arrest 정도를 table 1에 나타내었다. Chang liver 세포와 HepG2 세포에서 각각 10 mM과 20 mM의 AAP를 처리한 결과, Chang liver 세포에서는 4.85% (control)에서 11.9% (10 mM AAP)로, HepG2 세포에서는 9.91% (control)에서 16.4% (20 mM AAP)로 sub-G1기가 증가되었다.

이상의 결과들을 종합해 볼 때, AAP에 의한 세포사멸 시 Chang liver 세포와 HepG2 세포에서는 조금 다른 양상의 사멸 패턴을 나타내었다. HepG2 세포에서는 caspase-3 활성화나 PARP 분해가 일어났으며 caspase-3 inhibitor 처리로 AAP에 의한 세포사멸이 부분적으로 억제되었으나, Chang liver 세포에서는 caspase-3 inhibitor 처리로 AAP에 의한 세포사멸이 전혀 억제되지 않았으므로, 앞서 언급했던 두 가지 AAP 독성 기전중 하나인 미토콘드리아기능 장애를 통한 세포손상 메카니즘 이외에 미토콘드리아와는 무관한 다른 메카니즘의 존재 가능성을 제시할 수 있다. 두가지 세포에서 apoptosis 지표중의 하나인 caspase-3 활성화가 AAP 처리로 유도되었으나, DNA 단편화패턴이 necrosis 모드를 나타내었으므로, apoptosis와 necrosis 두 가지 특징을 모두 갖춘, necrapoptosis에 의한 세포사멸이 일어났음을 확인하였다.

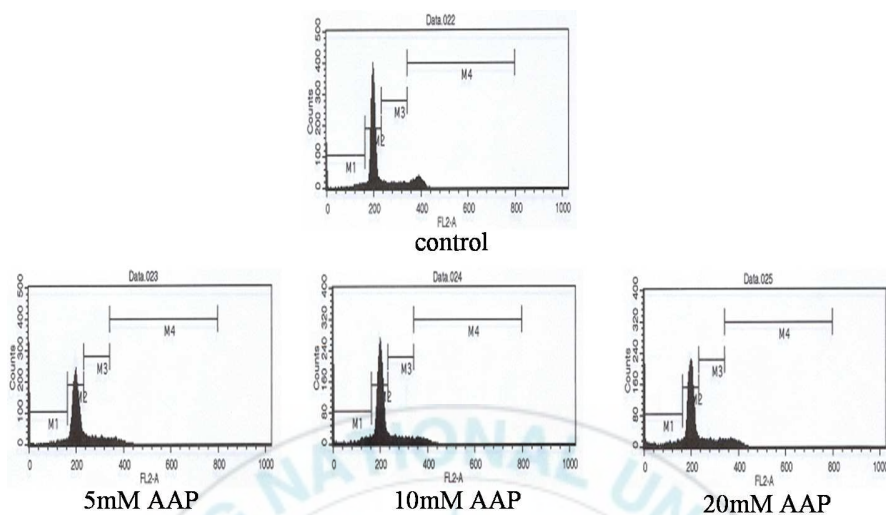


Fig. 9. Effect of AAP on cell cycle in Chang liver cells.

Cells were treated AAP in the indicated concentrations for 24hrs, and analyzed cell cycle as indicated in the material and methods.

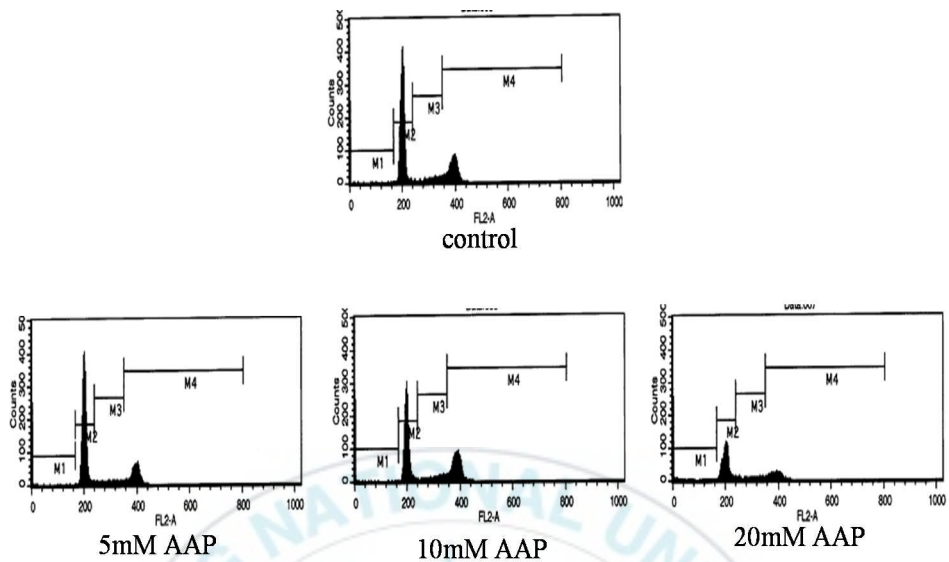
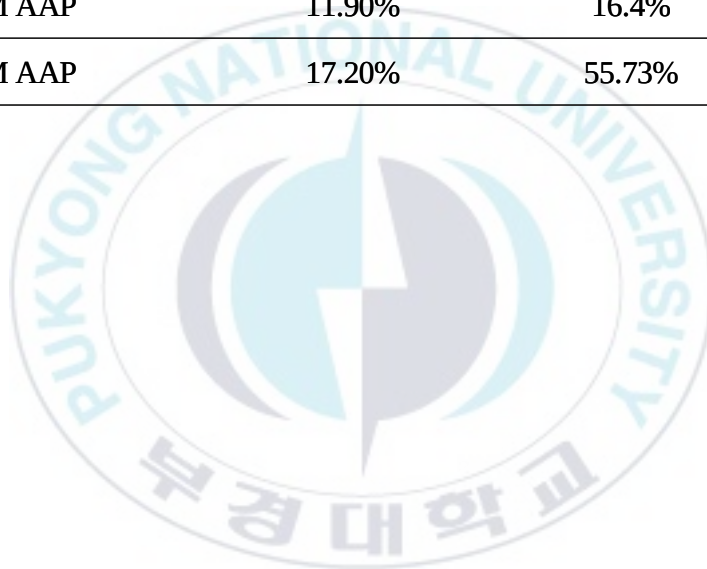


Fig. 10. Effect of AAP on cell cycle in HepG2 cells.

Cells were treated AAP in the indicated concentrations for 24hrs, and analyzed cell cycle as indicated in the material and methods.

Table 1. Increase of sub-G1 cell population by AAP treatment in Chang liver and HepG2 cells

	subG1	
	Chang cell	HepG2 cell
SFM	4.85%	9.91%
5mM AAP	8.51%	17.13%
10mM AAP	11.90%	16.4%
20mM AAP	17.20%	55.73%



(2) 산화적 손상기전에 미치는 AAP의 영향

Acetaminophen에 의한 간 조직 손상은 산화적 스트레스에 의한다는 것은 이미 잘 알려진 사실이다(Nelson, 1990 ; Mitchell *et al.*, 1973). Figure 3은 AAP에 의한 산화적 손상의 대사 생성물인 NAPQI가 간세포 손상을 일으키는 기전을 도식화한 것이다. Acetaminophen은 과량이 아닌 치료 농도로 섭취했을 때에는 glucuronyltransferase에 의해 glucuronic acid와 결합하여 glucuronied AAP가 생성(Nelson, 1990)되고 이것은 Mrp2에 의해 담즙으로 분비되거나(Xiong *et al.*, 2000), Mrp3에 의해 혈관으로 이동한다(Zamek-Gliszczynski *et al.*, 2005). 그러나 과잉의 AAP를 섭취했을 때에는 CYP2E1에 의해 NAPQI가 생성되고(Nelson, 1990), Figure 3에 나타난 바와 같이 GSH와 반응하여, 세포 내 GSH 농도를 감소시킨다(Mitchell *et al.*, 1973). Acetaminophen을 과잉으로 복용하고 나면 미토콘드리아 내 peroxynitrite가 생성되어 세포내 산화적 손상을 일으키는데 GSH가 이 peroxynitrite를 제거하는 역할을 한다. 즉 AAP 과다복용으로 세포내 peroxynitrite가 증가됨과 동시에 GSH 농도가 감소되므로 산화적 손상이 일어나는 것이다(Jaeschke and Bajt, 2005).

① 세포내 GSH 농도에 미치는 AAP의 영향

Acetaminophen에 의한 세포의 산화적 손상을 확인하기 위해 세포 내 GSH 농도를 측정하였다(Table 3). 그 결과 Chang liver 세포에서는 AAP 처리로 GSH 농도가 감소되는 것으로 나타났으나, HepG2 세포의 경우, 세포내 GSH 농도에 변화가 없었다. 이것은 HepG2 세포에 처리한 AAP 농도(5~20 mM)로는 GSH 농도를 변화시키지 않을 정도의 저농도를 사용한 결과일 가능성을 제시할 수 있다.

Table 2. GSH levels in Chang liver cells treated AAP

AAP conc.(mM)	GSH levels(%)
5	116.7 ± 1.7 ^a
10	75.7 ± 7.74 ^b
20	58.1 ± 1.47 ^c

Data were represented % of control(100%). Values are the mean±S.D. Values different alphabet are significantly ($p<0.05$) among the group by Duncan's multiple range test ($a>c>b$).

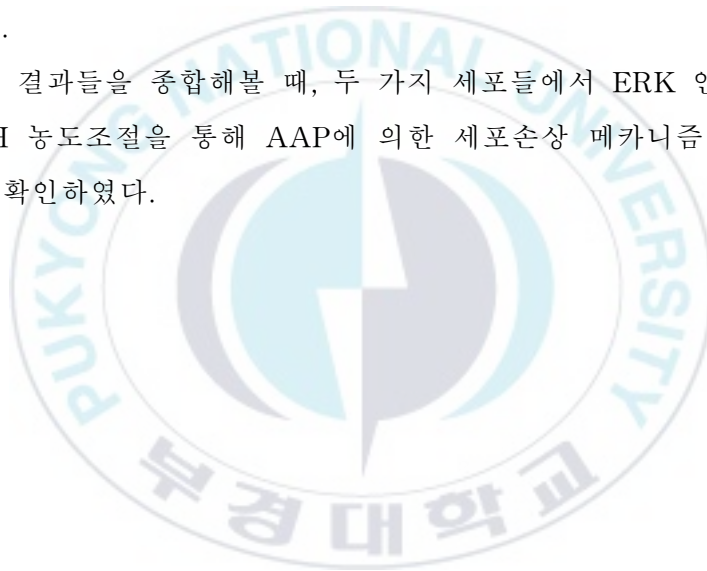


② *Mitogen-activated protein kinase* 신호전달경로에 미치는 AAP의 영향

최근 연구들에서 산화적 손상에 의한 세포사멸에 MAPKs pathway가 작용한다는 사실이 밝혀졌다. 이 MAPK pathway는 세포증식, 분화, apoptosis에 관련되어있다(Sano *et al.*, 2001 ; Jang *et al.*, 2002). Mitogen-activated protein kinase pathway에 3가지 kinase들, 즉 extracellular signal-regulated kinase (ERK), p38 kinase, c-Jun N-terminal kinase (JNK)가 있으며 이중 ERK는 다양한 성장인자들에 대한 세포분열이나 증식에 관여하고 JNK와 p38은 UV, 열 등의 세포외 스트레스에 대해 활성화된다(Kyriakis and Avruch, 2001 ; Chung *et al.*, 2003 ; Kang *et al.*, 2003). 이 효소들이 활성화되면 세포에 따라 다양한 반응들이 나타나는데, JNK의 경우, apoptosis, transformation, 면역반응에 관여하는 신호전달경로에 작용한다. 따라서 본 실험에서는 AAP가 산화적 손상을 일으켜 세포사멸을 유도한다는 사실을 확인했으므로 산화적 손상과 관련된 세포내 단백질인 ERK, p38, JNK의 발현정도를 살펴보았다. Chang liver 세포와 HepG2 세포에서, 각각 10 mM과 20 mM의 AAP 처리로 p38과 pJNK는 변화가 없었으나, pERK가 증가되었다. 즉 실험에 사용한 두 세포모델에서 공통적으로 AAP에 의한 간세포 손상시 ERK 인산화가 일어나는 것을 확인하였다. ERK는 세포생존에 관여하는 것으로 알려져 있으나, 최근 발표된 몇 편의 논문들에서 ERK 인산화로 세포사멸이 유도된다는 보고들이 있었다. Bhat *et al.* (1999)은 MEK inhibitor인 PD98059로 ERK 인산화를 억제시켰더니, H₂O₂에 의한 세포사멸이 억제되었다고 하였다. 즉 H₂O₂에 의한 세포사멸에 ERK 인산화가 관여한다는 것이다. Wang *et al.* (2000), Lesuisse *et al.* (2002), Pavlovic *et al.* (2000)도 각각 Hela cell, cortical neurons, primary β -cell에서 이와 같은 결과를 확인하였다고 보고하였다. 따라서 본 실험에서도 AAP에 의한 세

포사멸에 ERK 인산화가 관여하는지를 확실하게 확인하기 위해 MEK inhibitor인 PD98059를 사용하여 pERK 발현정도와 GSH 생성정도를 살펴보았다(Figure 11 및 12). 그 결과, Chang liver 세포에서는 PD98059 처리로 pERK 발현이 감소되었으며, 이와 더불어 세포내 GSH 농도는 대조군수준으로 회복되었다. 반면, HepG2 세포에서는 앞선 결과와 같이, AAP 처리에 의해 세포내 GSH 농도에 변화가 없었으며, 여기에 ERK inhibitor를 처리하면, Chang liver 세포와 마찬가지로 GSH 농도가 증가하는 것으로 나타나 ERK가 세포 내 GSH 농도 조절에 관여함을 확인할 수 있었다.

이상의 결과들을 종합해볼 때, 두 가지 세포들에서 ERK 인산화가 세포내 GSH 농도조절을 통해 AAP에 의한 세포손상 메카니즘에 중요하게 작용함을 확인하였다.



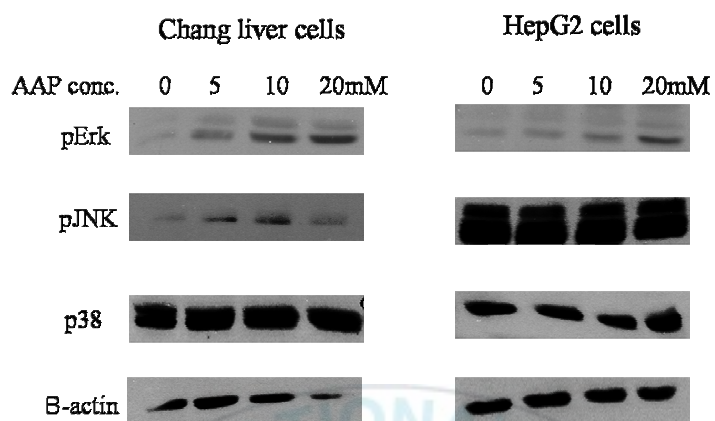


Fig. 11. Effects of AAP treatment on oxidative stress-related protein expression by western blotting in Chang liver cells and HepG2 cells.

Cells were treated with AAP for 24hrs and lysated for western blot. Data were presented one representative gel from three separate experiments.

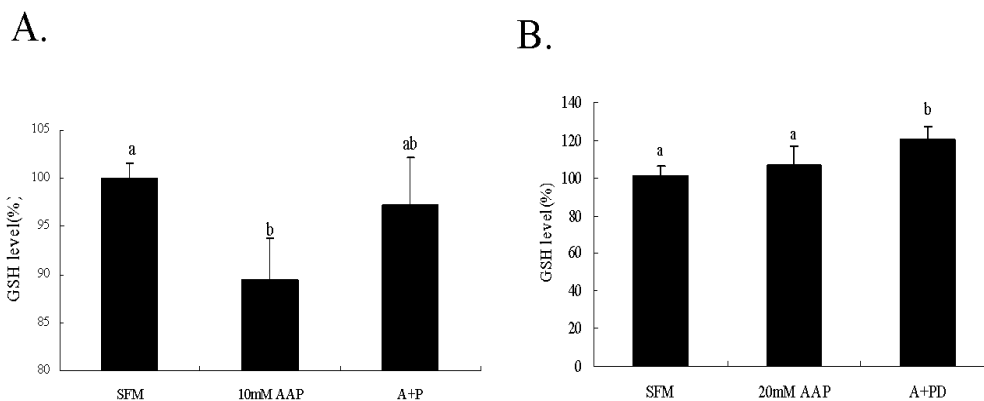


Fig. 12. Effects of MEK inhibitor, PD98059, on AAP cytotoxicity in Chang liver (A) and HepG2 (B) cells.

Cells were treated with SFM, 10mM AAP, and AAP and PD98059 for 24 hrs. After 24 hrs, 5×10^8 cells were collected and assayed as indicated in material 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.

4. *Insulin-like growth factor-I (IGF-I)*이 AAP 독성에 미치는 영향

1) *Acetaminophen*과 *IGF-I* 병행처리 시 세포증식에 미치는 영향

Acetaminophen에 의한 간세포 사멸을 억제시키기 위해 endothelial growth factor (EGF), IGF-I, hepatocyte growth factor (HGF)를 AAP와 병행 처리하여 MTS 분석으로 세포증식에 미치는 영향을 살펴보았다 (Figure 13). 본 실험에 사용한 Chang liver 세포와 HepG2 세포 모두에서 세 가지 growth factor들이 모두 세포증식을 증가시켰으며, 그 중에서 특히 정상 간세포인 Chang liver 세포에서 AAP 독성 억제효과가 큰 것으로 나타난 IGF-I (100 ng/ml)으로 이후 실험을 실시하였다 (Figure 13).

IGF system은 외부의 스트레스, 혹은 질병이 발생하면 세포사멸을 억제하는 유력한 인자로 알려져 있다. 이 IGF가 어떻게 세포생존을 유도하는지에 관한 연구를 통해 IGF의 질병 치료효과를 기대할 수 있을 것이다. 예를 들어, IGF-I은 근위축성측삭경화증(amyotrophic lateral sclerosis) 진행초기에 이를 예방하는 효과가 있는 것으로 보고되었다(Vincent and Feldman, 2002). Alexia *et al.* (2004)은 doxorubicin을 HepG2 세포에 처리하여 apoptosis가 유도되었으며 이때 IGF-I을 처리하면 약물에 의한 apoptosis가 완전히 억제되었다고 하였다. Ryoji *et al.* (2006)은 몇 가지 성장인자들을 처리한 SV40-transformed human corneal epithelial 세포에서의 세포증식 유도과 사멸 억제효과에 대해 보고하였다. 그러나 암세포가 아닌 정상조직 혹은 정상세포에서의 IGF-I의 치료효과에 대한 연구가 희박한 실정이다. 따라서 본 실험에서는 정상 간조직에서 유래한 Chang liver 세포와 hepatocyte인 HepG2 세포를 이용하여 AAP에 의한 세포손상 시 IGF-I의 억제효과를 알아보려고 하였다.

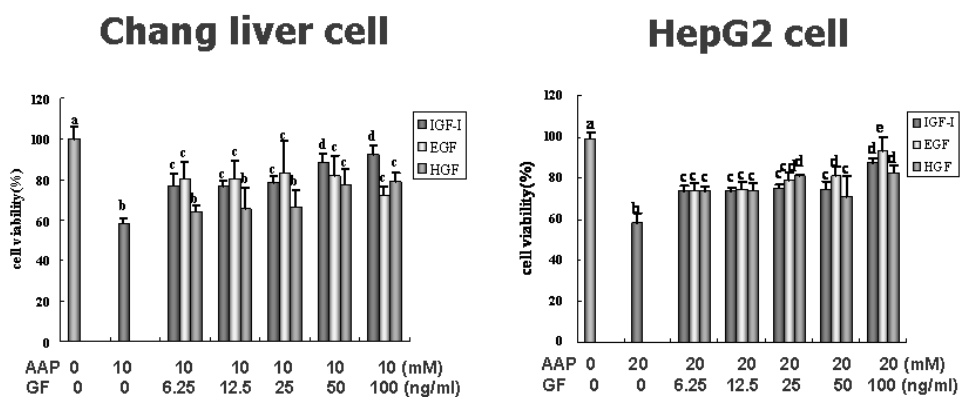


Fig. 13. Chemoprotective effect of growth factors against AAP cytotoxicity.

Cells were incubated with AAP and growth factors(GF) at the indicated concentrations for 24 hrs and analysed by MTS assay. Data were represented % of control(100%). Values are the mean±S.D. Values different alphabet are significantly ($p<0.05$) among the group by Duncan's multiple range test.

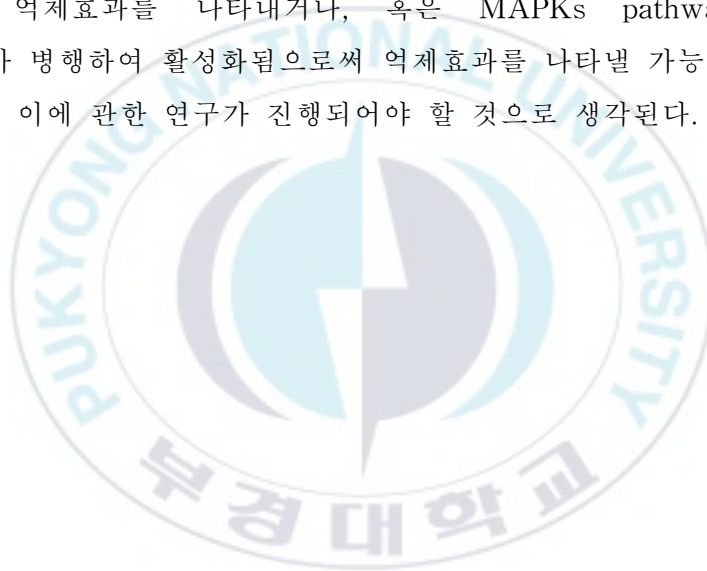
2) *Acetaminophen* 독성에 대한 *IGF-I*의 억제 작용과 *ERK* 인산화

앞서 GSH 감소에 의한 산화적 손상 시 MAPKs pathway가 관여한다고 하였으며, 세 가지 MAPKs 중 ERK 인산화가 AAP에 의해 증가되는 것을 확인하였다. 이것은 ERK-1/-2 signaling이 HepG2 세포와 Huh-7 세포에서 약인성 apoptosis가 진행될 때 관여한다고 한 Catherine *et al.*(2004)의 결과와 일치한다. IGF-I 신호전달경로는 크게 두 가지 (PI3-K pathway 및 MAPK pathway)를 들 수 있는데, 그중에서 ERK, JNK, p38과 같은 MAPK들이 관여하는 MAPK pathway가 세포증식, apoptosis, 분화에 관여하는 것으로 알려져 있다. JNK에 의한 신호전달은 세포사멸과 관련하여 작용하며 산화적 손상 시 JNK signaling이 활성화된다. 반면, ERK pathway는 세포성장과 분화를 조절하게 되는데 산화적 손상 시 ERK가 활성화되면 이후에는 항상성을 유지하기 위해 anti-apoptotic signal로 작용하는 것으로 알려져 있다(Nair *et al.*, 2004).

본 논문에서는 AAP 처리로 ERK 인산화가 유도되었으므로 여기에 IGF-I (100 ng/ml)을 병행처리 하였을 때 ERK 인산화가 세포증식과 산화적 스트레스에 미치는 영향을 살펴보았다. Figure 14 (Chang liver cells)와 Figure 15 (HepG2 cells)에 나타낸 바와 같이, 두 가지 세포 모두에서 AAP 단독처리로 ERK1/2 인산화가 유도되었으며, 여기에 IGF-I을 병행처리 했을 때 ERK1/2 인산화가 더욱 증가되는 것으로 나타났다. 또한 PARP 분해는 IGF-I 병행처리로 감소되었고 이것은 앞선 MTS 결과와 일치하는 결과이다. 이로써 IGF-I의 AAP 독성 억제작용에 ERK 인산화가 관여한다고 볼 수 있다. Sinha *et al.* (2004)는 마우스의 renal epithelial cell에서 성장인자를 결핍시키면 ERK 인산화가 유도되고, ERK 인산화를 억제시키면 세포생존이 유도되므로, 이 경우에는 ERK 인산화가 세포사멸을 유도하는 것이다. 반면, Alexia *et al.* (2004)는 HepG2 세포와 Huh-7 세포에 doxorubicin을 처리했을 때 ERK 인산화가 유도되며 여기에 IGF-I을 처리함으로써 ERK 인산화가 더욱 증가되어 doxorubicin에 의한 세포손상이 회복된다고 하였다. 이것은 본 논문의 결과와 일치하는

것으로써, 약물에 의해 ERK 인산화가 유도되었다가 IGF-1처리로 ERK 인산화가 더욱 증가됨으로써 세포생존이 유도되는, 즉 AAP 처리 시에는 세포사멸에 작용하던 ERK가 IGF-1을 처리함으로써 세포생존을 유도하는 것을 알 수 있다. 이렇게 ERK는 세포생존과 사멸이라는 두 가지 정반대의 현상을 유도하는 양면성을 가진다.

IGF-I이 그 수용체와 결합하면 다양한 신호전달과정이 일어나므로, ERK 인산화 증가 이외에 또 다른 pathway가 IGF-I의 억제작용에 관여할 가능성도 제시될 수 있다. 즉 예를 들어, PI3K pathway가 활성화되어 IGF-I의 억제효과를 나타내거나, 혹은 MAPKs pathway와 PI3K pathway가 병행하여 활성화됨으로써 억제효과를 나타낼 가능성도 제시할 수 있으며 이에 관한 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.



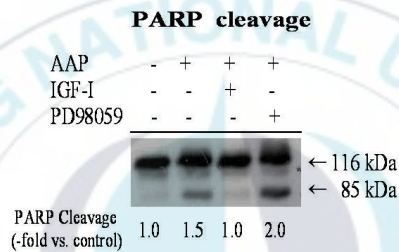
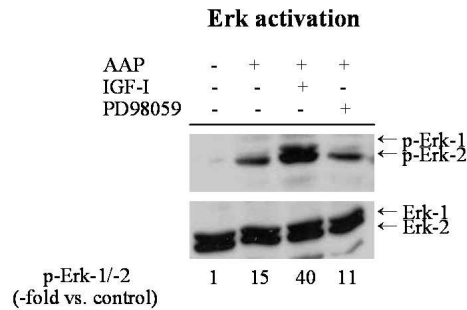


Fig. 14. IGF-1 protection effects of Chang liver cells from AAP-induced cell death.

Monolayers of cells were untreated (control) or treated with 10mM AAP, AAP + IGF-I (100 ng/ml), or AAP + PD98059 (20uM). Whole-cell extracts were prepared and analyzed by Western blotting using anti-PARP, anti-phospho-ERK1/2, and anti-pan ERK antibodies. One representative gel from three separate experiments is resented and the quantitative analysis based on densitometry of each.

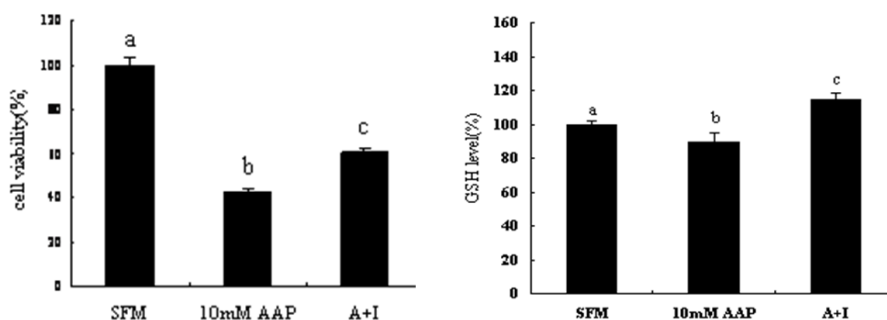


Fig. 15. Effects of IGF-I on cell proliferation and glutathione depletion in Chang liver cells.

Cells were treated with 10mM AAP or AAP + IGF-I (100 ng/ml), and cell proliferation and the GSH level were measured as described in the materials and methods section. The GSH reading was normalized to the protein concentration. The data shown represent four separate experiments.

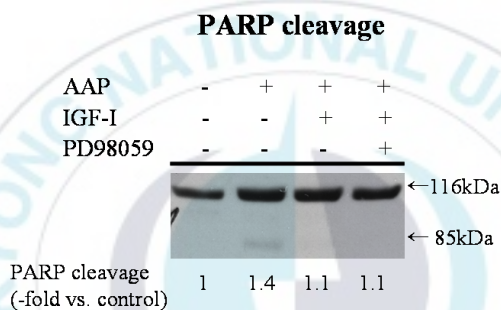
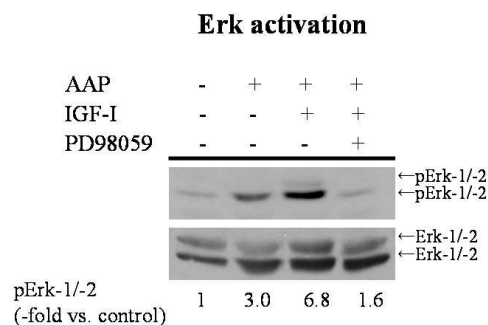


Fig. 16. IGF-1 protection effects of HepG2 cells from AAP-induced cell death.

Monolayers of cells were untreated (control) or treated with 20 mM AAP, AAP + IGF-I (100 ng/ml), or AAP + PD98059 (20uM). Whole-cell extracts were prepared and analyzed by Western blotting using anti-PARP, anti-phospho-ERK1/2, and anti-pan ERK antibodies. One representative gel from three separate experiments is resented and the quantitative analysis based on densitometry of each.

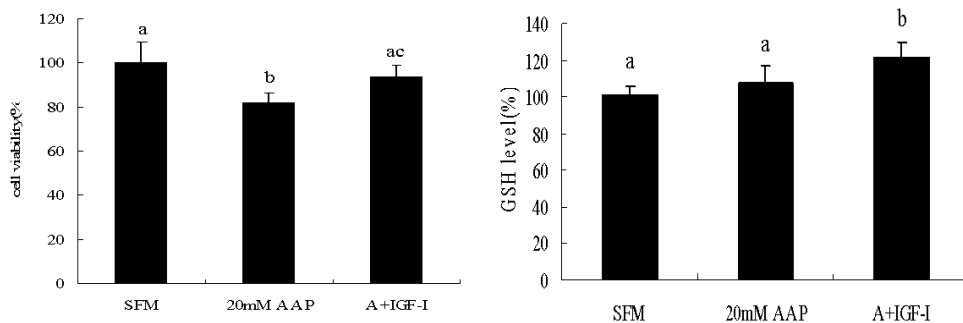


Fig. 17. Effects of IGF-I on cell proliferation and glutathione depletion in HepG2 cells.

Cells were treated with 20 mM AAP or AAP + IGF-I (100 ng/ml), and cell proliferation and the GSH level were measured as described in the materials and methods section. The GSH reading was normalized to the protein concentration. The data shown represent four separate experiments.

3. 해조류인 김으로부터 단백질 추출

최근 생명공학관련 과학기술이 빠르게 발전하면서 김에 함유된 생리기능성분을 활용한 고부가가치 기능성식품 소재화 기술개발에 관심이 증대되었고 이에 대한 연구(Morrice *et al.*, 1983; Matosuo *et al.*, 1993; Kayama *et al.*, 1983)가 활발히 진행되고 있으나, 그 대부분이 김에 함유된 다당류나 폴리페놀에 관한 논문이 대부분이다(Lee *et al.*, 1996; Lee *et al.*, 2002). 따라서 본 연구에서는 김의 고부가가치 활용을 위한 시도로서 김에 함유된 다당류가 아닌 14kDa 분자량을 가진 단백질을 김의 열수추출물로부터 추출하여 그 추출물이 어떤 효과를 나타내는지를 살펴보았다.

앞서 AAP에 의해 야기되는 간손상 메커니즘을 살펴보았고, 아올러 IGF-I의 AAP 독성 억제효과를 살펴보았다. 최근 이 AAP 독작용을 억제하기 위해 여러 논문들이 발표되었다. Cathleen *et al.*(2005)은 마우스에 AAP 투여시의 세포사멸 현상 중 하나인 PARP 활성이 나타난다고 보고하였으며, Tamara *et al.*(2003)은 AAP가 간에서 지질과산화를 일으켜 간손상을 야기한다고 보고하였다(Tamara *et al.*, 2003). Sidhartha *et al.*(1999)은 마우스에서 포도씨추출물인 proanthocyanidin을 경구투여하였을 때 AAP에 의한 간세포사멸을 예방한다고 보고하였으며, Francisco *et al.*(2005)은 남미에서 민간요법으로 오랫동안 사용되어온 protium heptaphyllum 추출액을 투여한 결과, AAP에 의한 간손상을 예방할 수 있다고 보고하였다. 이에 본 연구에서는 김의 열수추출물로부터 추출한 14 kDa 분자량을 가진 단백질을 AAP와 함께 병행처리한 결과 AAP독성을 저해시킴을 확인하였으므로 그 억제효과와 작용 메커니즘을 검토하고자 하였다.

1) 김으로부터 단백질 추출

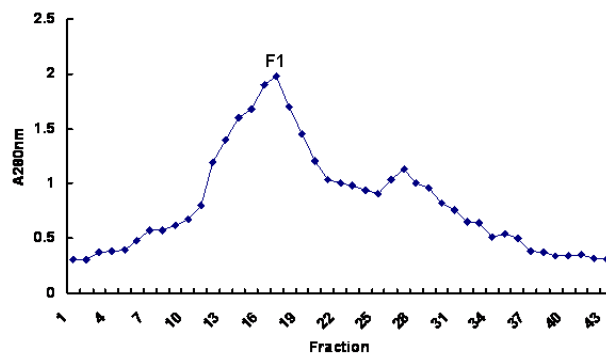
김의 일반성분을 분석한 결과, 마른 김분말의 수분은 3.9%, 단백질은 36.1%를 함유하고 있었다. 열수추출 후 감압하여 뷰후너 깔대기로 여과한

여액에 3배 부피의 에탄올을 첨가하여 침전된 당을 제거하고 남은 상층액을 취해 감압농축한 다음, ammonium sulfate를 첨가하여 흡착시킨 단백질을 투석하고 얻은 투석액(수분 98%) 중의 단백질은 1.72%(건물에 대해 86%)였으며, 이것을 Sephadex G-75 칼럼과 HPLC로 정제하여 그 피크를 확인한 것이 Figure 18이다. 최종으로 나온 시료의 순도를 BCA 단백질 정량시약으로 확인한 결과 약 87%의 단백질과 8%의 당, 그리고 5% 정도의 미지의 물질로 나타났다.

위에서 나온 시료의 분자량은 12.5% SDS-PAGE로 전기영동한 후, 밴드를 Commassie blue staining과 Silver staining으로 확인한 결과, 약 14 kDa 위치에 단일밴드를 확인하였으며, 본 연구에 사용된 단백질이다.



A.



B.

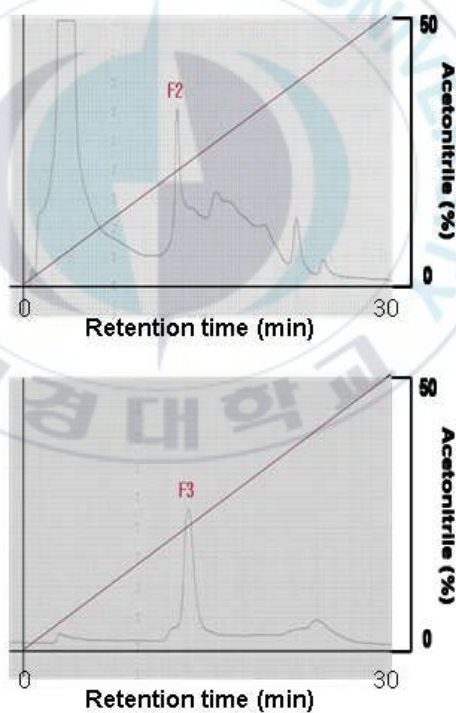


Fig. 18. Purification of protein from *P. yezoensis* on Sepadex G-75 column chromatography (A), HPLC of fraction containing protein from Sephadex G-75 on a reverse phase Asahi-Pak C4P-50 C4 column (B).

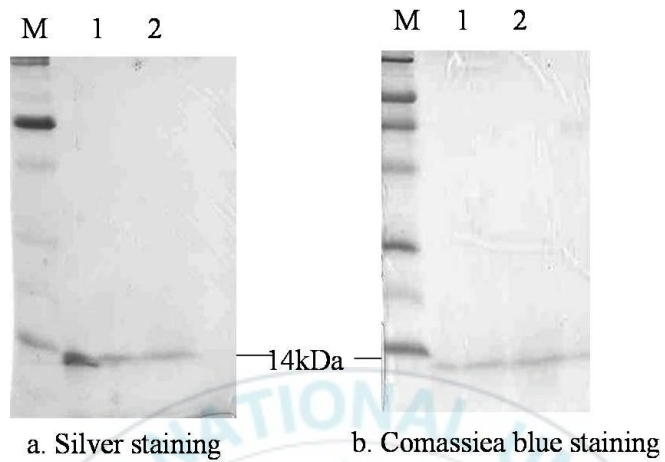


Fig. 19. SDS-PAGE bands of *P. yezoensis'* protein.

Extract was loading with SDS-PAGE, and then stained with comassica blue staining and silver staining. M is marker, 1 and 2 lane is band of *Porphyra yezoensis'* protein.

4. Acetaminophen에 의한 *Sparague Dawley rat*의 간 손상 및 해조류추출물인 김단백질의 AAP 간독성 억제효과

1) Acetaminophen 단독/김단백질 병행투여가 체중 변화와 간 무게에 미치는 영향

Acetaminophen 독성과 김단백질의 효과를 관찰하기 위해 흰쥐를 대조군, AAP 단독 투여군, AAP와 김 단백질(PYP)을 병행 투여한 김 단백질 병행 투여군으로 각각 10마리씩 나누어 사육하였다. 처음 1주간은 순치사육을 실시하였고, 이후 2주간 대조군과 AAP 단독 투여군에는 saline을 주고, 김 단백질 병행 투여군에는 매일 100 mg/kg의 김 단백질을 saline에 녹여 경구 투여하였다. 해부하기 24시간 전에, 700 mg/kg의 AAP를 복강으로 주사하고 24시간 뒤 흰쥐의 체중을 측정한다. 다음, 단두·해부한 후 간을 적출하여 간 무게를 측정하였다. Table 3에 나타낸 바와 같이, AAP 단독 투여로 인한 체중 변화나 간 무게에 실험군 간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다. Valentovic *et al.* (2004)은 C57BL/6 마우스에 500 mg/kg의 AAP를 투여하고 4시간 이내에 체중은 변화가 없었으나 간무게가 증가되었던 것이 AAP 투여 15분전에 S-adenosylmeth ionine (SAM)을 투여한 후, 간 무게가 다시 정상으로 회복되었다고 하였다. Lee *et al.* (1998)은 SD계 흰쥐에 3,000 mg/kg의 AAP를 투여한 후 간, 신장, 비장의 무게를 측정한 결과 간 무게가 약간 증가하긴 하였으나 유의적인 수준으로 증가하지는 않았으며, 신장 및 비장의 경우에는 아무런 변화가 없었다고 하였다. Acetaminophen과 마찬가지로 AAP와 김 단백질 병행 투여군의 경우에도 체중 변화와 간 무게가 대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았으므로, 김 단백질 자체의 독성은 없는 것으로 추정하고 이후 실험을 실시하였다.

Table. 3. Body and liver weight following AAP or AAP + PYP co-treatment

	Control	AAP	AAP + PYP.
Initial body weight(g)	92±4.4	87±9.1	94±4.8
Final body weight(g)	294±4.2	299±14.9	281±15.5
Body weight changes(g)	194.81±7.1	205.07±14.7	186.87±15.5
Liver weight(g)	9.41±0.6	10.86±0.9	9.5±0.9

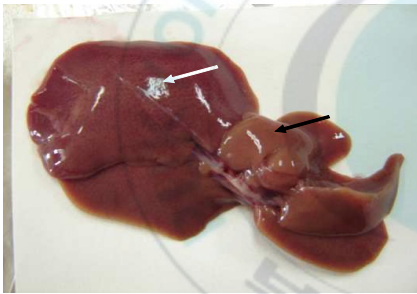
Values represent mean ± S.D. with $n=10$ per group.

2) *Acetaminopen* 단독 및 김단백질 병행투여로 인한 간손상에 미치는 영향

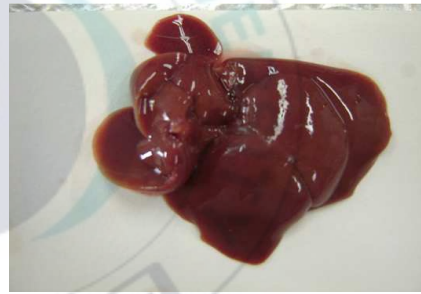
Figure 20은 AAP 복강투여로 인한 간 손상 정도를 육안으로 관찰한 것이다. 그림에서와 같이 대조군에 비해 AAP 단독 투여군에서 간 조직이 밝은 갈색으로 되어 이를 AAP 투여로 인한 간 손상으로 추정하였다 (Figure 20). 조직내부를 자세히 관찰하기 위해 H&E 염색을 실시하여 광학현미경으로 관찰한 결과(Figure 21), 대조군에 비해 AAP 단독투여군에서는 central vein 주위의 핵 분해가 다수 관찰되었으며, 그 외 세포가 없어서 비어있는 현상을 관찰할 수 있었다. 이는 AAP 독성에 의한 간 세포사멸을 의미하며, 김 단백질 병행 투여군에서는 이러한 현상이 감소되는 것을 확인할 수 있었으며, AAP 단독 투여군이 대조군이나 김 단백질 병행 투여군에 비해 열게 염색된 것을 확인하였다. 즉, AAP로 인해 간 조직이 손상되었음을 확인하였다(Figure 21).



control



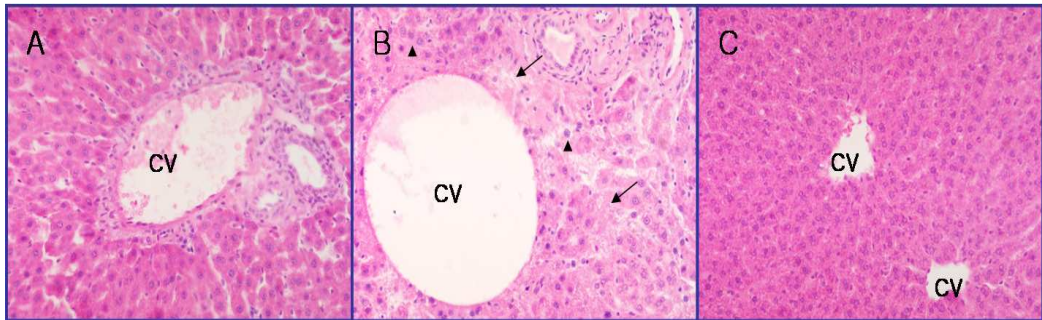
AAP



AAP+PYP

Fig. 20. Photographs of liver after AAP alone or co-treatment with AAP and PYP.

Arrows appear liver Damage : its color changes into light brown, compared to control. In contrast, AAP+PYP co-treatment group was not detected any change.



*Fig. 21. Representative H & E-stained liver sections of controls (A), animals treated with 700 mg/kg of AAP (B), or AAP+ *Porphyrin yexoensis* protein (C) ($\times 200$).*

A , control ; The liver was histologically normal with no change in the lobular architecture. B, AAP treatment ; Nuclei in these hepatocytes were either in an DNA fragmentation (arrowhead) or completely absent (arrow). C, AAP and PYP co-treatment ; the liver was appeared as control.

3) *Acetaminophen* 단독 및 김단백질 병행투여가 혈청 중의 *GOT/GPT* 변화에 미치는 영향

혈청 GOT와 GPT는 간 세포의 변성 및 괴사를 반영하는 효소로 간 조직 손상 시 혈중으로 다량 유출된다고 알려져 있다. 본 실험에서는 AAP 단독, 혹은 김단백질 병행투여로 인한 간 손상정도를 살펴보고자, 혈청중의 GOT/GPT 수준을 확인하였고, 그중 GOT 결과를 보면 대조군의 경우 158.97 ± 13.4 karmen, AAP 단독투여군의 경우 187.95 ± 20.7 karmen, AAP+김단백질 병행 투여군의 경우 148.41 ± 6.7 karmen으로 나타나, 대조군에 비해 AAP 단독투여시 GOT가 유의적으로 증가 ($p < 0.05$)했으며, 김단백질에 의해 GOT치의 감소가 대조군 이하로 감소됨을 알 수 있다. 한편, GPT의 경우 대조군은 28.83 ± 7.9 karmen, AAP군은 44.83 ± 11.7 karmen, 김단백질 병행 처리군은 30.22 ± 6.6 karmen으로 GOT 결과와 유사한 경향을 나타내었다(Figure 22). 즉, GPT 결과에서도 김단백질이 AAP에 의한 간손상을 대조군수준으로 감소시킴을 알 수 있다. 사염화탄소를 이용한 간 손상 시 혈청중의 GOT/GPT수치가 급격히 증가되었다는 보고가 있었다 (Cho *et al.*, 2004 ; Cho *et al.*, 2003 ; Kim *et al.*, 2003). 그 외에도 AAP 투여로 인한 간 손상 시 혈청중의 GOT/GPT 증가에 대한 보고가 있었다 (Lee *et al.*, 1998 ; Gujral *et al.*, 2002). 따라서, 김단백질이 AAP 투여로 인한 간손상을 보호하여 GOT/GPT 농도를 증가시키는데도 효과가 있음을 확인하였다.

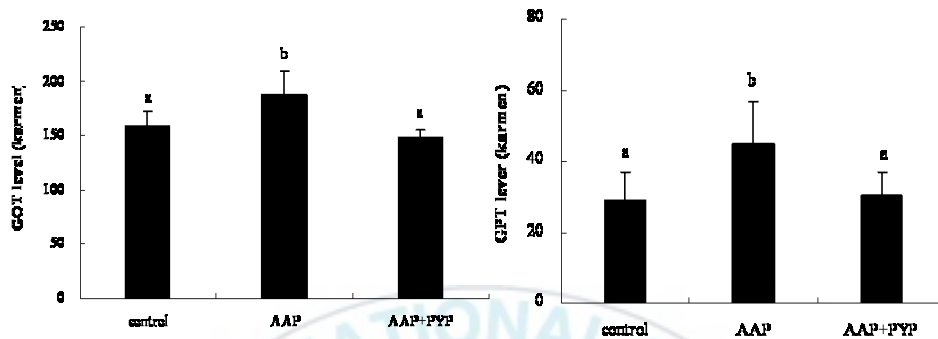


Fig. 22. Effect of *P. yezensis* protein (PYP) on GOT/GPT level of rats ($n=10$) exposed to AAP.

Animals were fed with 100 mg/kg PYP for 2 weeks and administrated AAP(700mg/kg). After 24hrs, blood and liver tissue were collected. The rats serum GOT/GPT were determined as indicated with materials and methods. Values are the mean $\pm$ S.D. b ; significantly different from control, $p<0.05$.

4) Acetaminophen 단독 및 김단백질 병행투여가 간 조직 중의 GSH 함량 변화에 미치는 영향

Acetaminophen 세포독작용 기전 중의 하나가 GSH 감소에 의한 산화적 손상이다. 진통제로 사용하고 있는 AAP는 간에서 대사되어 그 대사산물로 NAPQI가 생성된다. 이 대사산물은 적정량의 AAP를 복용하여, GSH가 충분한 경우에는 담즙이나 뇨로 배설되지만 AAP 과다 복용으로 생성된 NAPQI는 GSH와 반응하여 GSH-adduct를 형성한 뒤 담즙으로 분비되므로 AAP를 과다 복용한 경우 GSH가 감소되며, 또한 세포내 단백질, 그중에서도 특히 미토콘드리아 단백질과 결합하여 미토콘드리아기능 장애를 일으키게 된다(Mitchell *et al.*, 1973, Hartmut *et al.*, 2003). 세포내 GSH가 감소되면 glutathione disulfide(GSSG)농도가 증가하게 된다. Acetaminophen 투여 4시간이후에 활성산소 형성지표인 GSSG농도가 증가(Jaeschke, 1990 ; Knight *et al.*, 2001)되므로 산화적 스트레스는 간 손상의 원인이라기보다는 결과라고 하였다(Rogers *et al.*, 2000). 흥미롭게도, 담즙으로 분비되는 GSSG를 관찰할 수 없으며, 대부분의 GSSG는 미토콘드리아에서 형성된다. 실제로 AAP투여한 실험동물의 미토콘드리아를 추출하여 GSSG농도를 측정해보면 그 농도가 매우 높게 나타나며, 이것이 세포내에 존재하는 GSSG의 전부는 아니지만 대부분이라는 보고가 있다(Jaeschke, 1990 ; Knight *et al.*, 2001). 즉, AAP는 미토콘드리아에서의 산화적 손상을 유도한다고 할 수 있다. 실험동물에 GSH를 정맥으로 투여하였을 때 AAP에 의한 간손상이 억제되었으며, 세포주기 활성화를 촉진시킨다는 보고가 있었다(Knight *et al.*, 2002). 산화적 손상과 관련하여 이를 억제 또는 예방하기 위한 연구를 살펴보면, IGF-I(Jaeschke *et al.*, 2006), demethylsulfoxide(DMSO)(Yoon *et al.*, 2006), melatonin(Matsura *et al.*, 2006), silymarin(Nenchini *et al.*, 2006), 등과 같은 물질들이 대부분이다. 그중에서, IGF-I, silymarin, DMSO 등은 GSH농도를 감소시킴으로써 AAP 독성을 억제시키는 반면, melatonin은 GSH농도에는 아무런

영향을 주지 않는다고 하였다. 따라서 본 연구에서는 AAP 투여시 간조직 중의 GSH 함량과 김단백질 병행투여시 어떠한 영향을 미치는지를 알아보기 위해 조직중의 GSH 함량을 측정하였다(Fig. 23). GSH 함량은 대조군 (100%)에 비해, AAP 단독투여군 ($85.4 \pm 4.8\%$)에서 유의적인 감소를 나타내었으며 이는 AAP 투여시 조직중의 GSH, 또는 GSH/GSSG비, GST를 살펴본 여러 논문들의 결과와 일치하였다(Lee *et al.*, 1998 ; Jaeschke *et al.*, 1990). 그러나 AAP 단독 투여군에 비해, AAP와 김단백질을 병행 투여한 경우에는 다시 $92.16 \pm 6.36\%$ 로 증가되는 것으로 나타났다. 즉 AAP에 의해 감소되었던 GSH 함량이 김단백질에 의해 증가됨을 확인하였다.



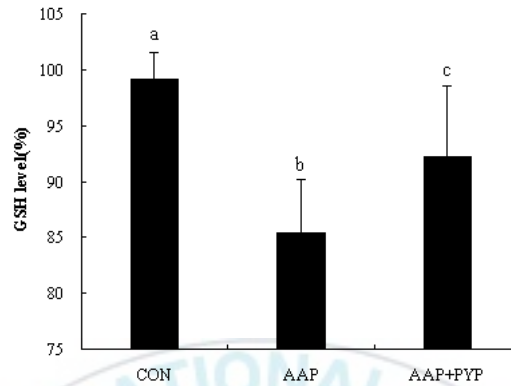


Fig. 23. *Effect of *P. yezoensis* protein (PYP) on GSH of rats (n=10) exposed AAP.*

Animals were treated with saline or 100 mg/kg PYP for 2 weeks, and administrated with 700 mg/kg AAP. After 24hrs, liver tissue was collected and measure GSH level as indicated in material and methods. Values are the mean $\pm$ S.D. Values different alphabet are significantly ($p < 0.05$) among the group by Duncan's multiple range test ($a > c > b$).

4) Acetaminophen과 김단백질 투여가 간 조직 중의 caspase-3 활성 및 DNA 단편화에 미치는 영향

Apoptosis 유도를 결정하는 인자들에는 여러 가지가 있으며, 그 중 caspase-3는 apoptosis의 결정적인 신호 전달물질로 apoptosis 진행시 활성화된다. 따라서 본 실험에서는 AAP에 의한 간 손상시 세포사멸을 확인하기 위해 caspase-3 활성을 측정하였다. 그 결과, AAP 투여군은 대조군(100%)에 비해 $143.38 \pm 10.25\%$ 로 caspase-3 활성이 증가되었으며, 이는 김단백질 처리로 $112.21 \pm 11.52\%$ 로 감소되었다 (Figure 24). 이는 AAP 투여시 caspase-3가 활성화되지 않아 AAP에 의한 세포사멸모드가 apoptosis가 아닌 necrosis라고 주장한 다른 논문들 (Lawson *et al.*, 1999 ; Gujral *et al.*, 2002)과는 정반대의 결과를 보여 주었다. 그러나, 이들의 결과는 모두 caspase 활성이 아닌 Western blot에서 나온 밴드 결과만을 가지고 caspase 활성화가 일어나지 않았다고 주장하였다. 따라서 AAP에 의한 간조직손상시 사멸모드가 apoptosis라는 사실을 뒷받침하기 위해, 간 조직 중의 DNA를 추출해 단편화패턴을 살펴보고자 하였다(Figure 25). 그 결과, 대조군에 비해 AAP 단독 투여군에서 확실한 DNA 단편화를 관찰할 수 있었고, 반면, AAP+김단백질 병행처리군에서는 DNA 단편화가 억제되는 것으로 나타났다. 그러나 이 DNA 단편화 패턴을 보면 laddering이 아닌, smearing으로 necrosis의 특징을 보여주었다. Acetaminophen에 의한 간 손상 시 그 사멸모드에 대한 의견이 분분한 가운데(Cohen and Khairallah, 1997 ; Pumford *et al.*, 1997), 최근에 발표된 논문들에서는 apoptosis에 의한 것이라는 결과들이 많이 나오고 있다 (Ferret *et al.*, 2001 ; Kanno *et al.*, 2000 ; Ray *et al.*, 1996 ; Zhang *et al.*, 2000). 그들은 간세포의 40% 이상이 apoptosis에 의한 사멸을 일으킬 것이라 가정하였다(Ray *et al.*, 1996 ; Ray and Jena, 2000). Ray *et al.* (1993)은 *in vivo* 실험에서 apoptotic cell death의 특징인 DNA 단편화시 DNA laddering, 그리고 PARP 분해가 일어난다고 보고하였으며 그 외에

도 TUNEL assay에서 DNA 나선이 분해된 것을 관찰하기도 하였다 (Lawson *et al.*, 1999). 그리고 Ray *et al.* (1996)과 Ray and Jena (2000)는 전자현미경 관찰에서 apoptosis의 특징을 가진 간세포사진을 제시하기도 하였다. 반면 Gujral *et al.* (2002)은 AAP 투여시 apoptosis는 소수 일어나며 대부분이 necrosis가 진행된다고 하였다. Malhi *et al.* (2006)은 AAP가 ATP를 감소시킴으로써 necrosis를 일으키게 되지만, 세포실험에서 배지에 fructose와 glycine을 첨가하면 ATP가 감소되지 않으므로 necrosis가 억제되고 반면 caspase에 의한 apoptosis가 증가하게 된다고 하였다. 따라서 AAP에 의한 세포사멸은 necrosis와 apoptosis의 특징을 모두 가지는 necrapoptosis에 의해 일어난다고 볼 수 있다(Malhi *et al.*, 2006). 본 연구에서는 여러 가지 apoptosis나 necrosis 현상들 중에서도 대표적인 특징인 caspase-3 활성화와 DNA 단편화를 살펴봄으로써 AAP가 어떤 사멸모드를 통해 독성을 나타내는지를 알아보았다. 앞서 실시한 세포실험에서 0.0075 g/l glycine이 함유된 MEM을 사용하였으며, 그 결과 AAP처리후 apoptosis의 특징인 caspase-3 활성화가 일어났고, DNA 단편화 패턴이 DNA laddering이 아닌 smearing으로 관찰되었으므로, DNA 단편화 결과에서는 necrosis로 나타났다. 따라서 본 논문에서는 AAP에 의한 세포사멸모드를 앞서 설명한 대로 apoptosis와 necrosis의 특징을 모두 가진 necrapoptosis라고 하였다. 이것은 *in vivo* 실험에서도 동일한 결과가 나타났으므로 앞서 실시한 세포실험 결과를 뒷받침하고 있다.

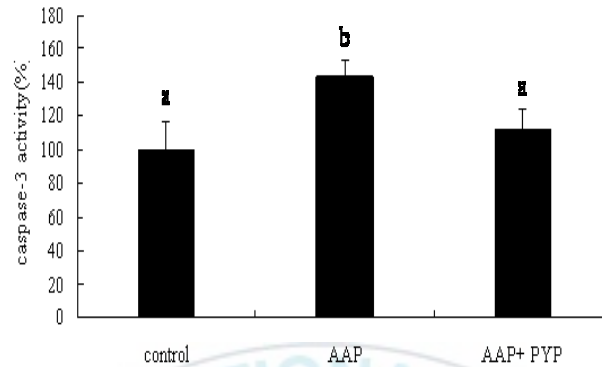


Fig. 24. *Effect of *P. yezoensis* protein (PYP) on caspase-3 activity of rats (n=10) exposed AAP.*

Animals were treated with saline or 100 mg/kg PYP for 2 weeks, and administrated with 700 mg/kg AAP. After 24hrs, liver tissue was collected and measure caspase-3 activity as indicated in material and methods. Values are the mean±S.D. Values different alphabet are significantly ($p<0.05$) among the group by Duncan's multiple range test ($a>c>b$).

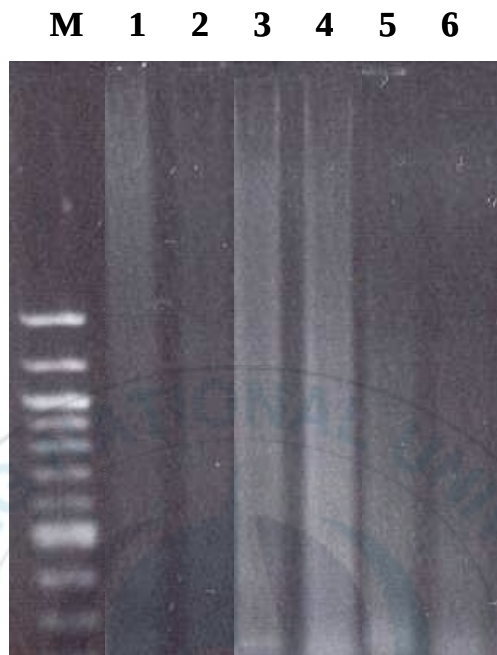


Fig. 25. DNA fragmentation after AAP alone or co-treatment with AAP and PYP co-treatment.

Animals were treated with saline or 100 mg/kg PYP for 2 weeks, and administrated with 700 mg/kg AAP. After 24hrs, liver tissue was collected and measure DNA fragmentation as indicated in material and methods. Results from liver tissue treated with 1~2 lane ; control, 3~4 lane ; 700mg/kg AAP, 5~6 lane ; AAP + PYP co-treatment. M is marker.

5. 김단백질이 AAP 독성에 미치는 영향

1) 김단백질 독성 확인

임상에서 질병치료를 위해 여러 가지 약물을 투여하다보면 흔하게 발생하는 문제가 질병이 발생한 조직이외에 정상조직에 영향을 주어 부작용을 야기하게 되는 것이다(Benner *et al.*, 1997 ; Rao *et al.*, 1997). 약물치료 시 발생하는 독성 메카니즘 중의 하나가 프리라디칼에 의한 독작용인데, 이를 적절히 조절하지 않으면 치명적이다(Benner *et al.*, 1997). 이미 약물에 대해 내성이 생긴 환자에게는 고농도의 약물을 투여하는 것이 일반적인 치료방법이며, 한 가지 혹은 한 가지 이상의 약물치료 시 정상조직에 손상을 일으키기도 한다(Benner *et al.*, 1997 ; Rao *et al.*, 1997 ; Shea, 1999). 따라서 어떤 새로운 약물을 개발할 때는 정상조직의 손상을 최소로 하는 치료물질의 개발이 절실히 필요하다. 이러한 관점에서 본 논문에서는 정상 간세포주인 Chang liver 세포를 이용하여 앞서 추출한 김 단백질의 독성여부를 확인하였으며, 그 외에도 hepatocyte이긴 하지만 정상간세포의 특징을 가진 HepG2 세포에서도 김단백질의 세포증식에 미치는 영향을 살펴보았다. MTS 분석결과 (Figure 26), 본 실험에 사용한 농도 (6.25~100 μ g/ml)의 김 단백질에 의해서는 세포생존이 변화하지는 않는 것으로 나타났으므로 세포독성이 없는 것으로 간주하여 실험을 계속 진행하였다.

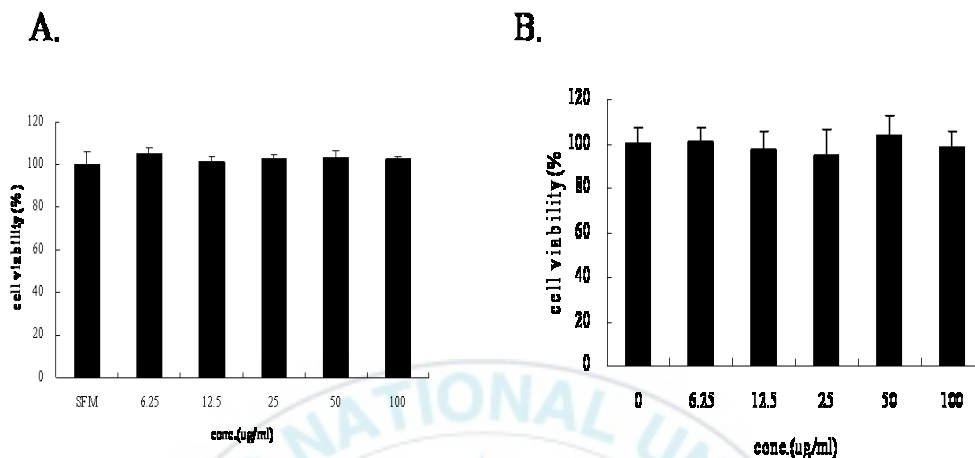


Fig. 26. Effect of *P. protein* (PYP) treatment on the cell viability in Chang liver (A) and HepG2 cells.

Cells were seeded in 96-well plate and incubated for 24 hrs and media was changed with SFM for 24 hrs. Cells were treated with PYP at the indicated concentrations for 24 hrs. and measured cell viability with MTS assay kit as manufacturer's instruction. Data were represented % of control (100%). Values are the mean±S.D. Values different alphabet are significantly ($p < 0.05$) among the group by Duncan's multiple range test ($a > c > b$).

2) *Acetaminophen*에 의한 세포독성에 미치는 김 단백질의 영향

Figure 27은 Chang liver 세포와 HepG2 세포에 김단백질을 농도별 (6.25, 12.5, 24, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)로 각각 10 mM과 20 mM AAP를 동시에 처리한 후 세포독성에 어떤 영향을 미치는지를 살펴본 것이다. 그림에 나타난 바와 같이, Chang liver 세포에서는 김단백질 처리로 AAP에 의해 감소되었던 세포증식($37.45 \pm 1.28\%$)이 저농도(6.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$; $56.62 \pm 3.69\%$)에서도 회복되는 것으로 나타났으며, 최대 농도 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서는 $76.30 \pm 2.91\%$ 로 세포증식이 증가되었다. 반면, HepG2 세포에서는 고농도인 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도에서 $69.8 \pm 4.1\%$ 로 나타나, Chang liver 세포에 비해 고농도의 김단백질이 AAP의 독성을 억제시킬 수 있는 것으로 나타났다.

김단백질이 AAP 처리한 세포의 형태에 미치는 영향

Figure 28, 29와 30은 각각 Chang liver 세포와 HepG2 세포에서 AAP와 김단백질 처리 시 세포증식과 세포형태를 관찰한 것이다. 그림과 같이, AAP에 의해 세포생존율이 감소되었으며, 세포수도 감소, 핵응축 또한 관찰할 수 있었다. 그러나 김단백질을 동시에 처리한 결과, 세포수가 증가되었고 핵응축도 감소되었다. 이상에서 김단백질이 간 세포에서 AAP에 의한 간 손상을 억제시킴을 확인하였으며, 이러한 현상이 어떻게 일어나게 되는지에 관해 좀 더 자세히 살펴보려고 하였다.

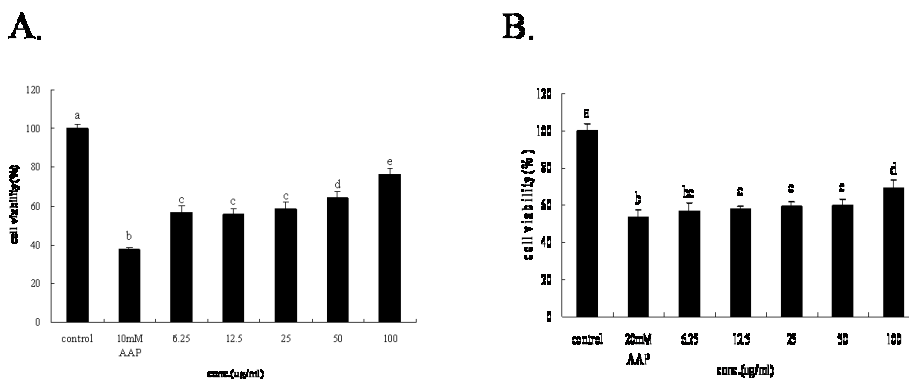


Fig. 27. Effect of *P. yezoensis* protein (PYP) on the cytotoxicity by AAP in Chang liver (A) and HepG2 (B) cells.

Cells were seeded in 96-well plate and incubated for 24 hrs. and media was changed with SFM for 24 hrs. Cells were treated with SFM, AAP, or AAP+PYP at the indicated concentrations for 24 hrs. and measured cell viability with MTS assay kit as manufacturer's instruction. Data were represented % of control(100%). Values are the mean±S.D. Values defferent alphabet are significantly ($p<0.05$) among the group by Duncan's multiple range test ($a>c>b$).

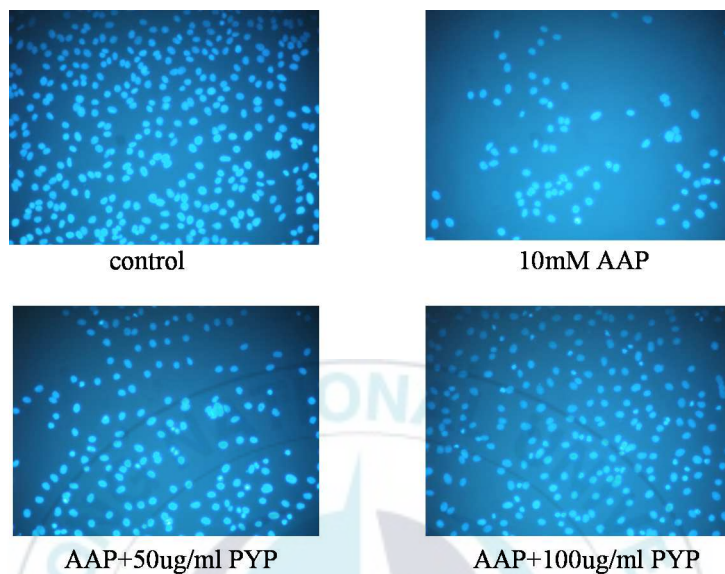


Fig. 28. Hoechst 33342 staining of Chang liver cell treated with AAP and *P. yezoensis* protein (PYP)

Cells were treated with SFM for 24 hrs. Cells were treated with AAP or AAP+PYP at the indicated concentrations for 24 hrs. and stained with Hoechst 33342 as described in materials and methods.

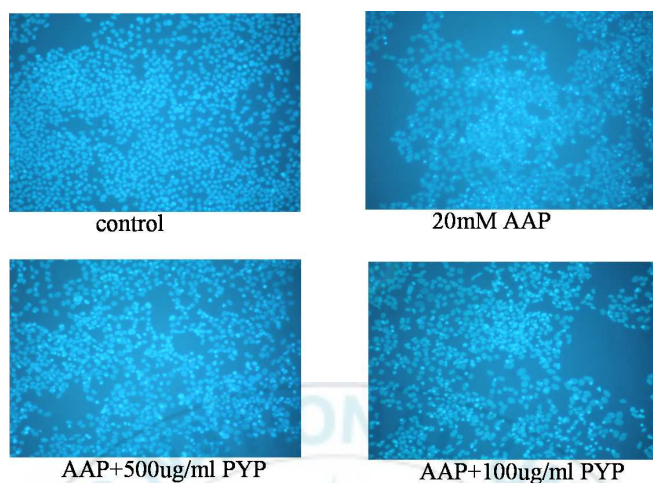


Fig. 29. Hoechst 33342 staining of HepG2 cell treated with AAP and *P. yezoensis* protein (PYP).

Cells were treated with SFM for 24 hrs. Cells were treated with AAP or AAP+PYP at the indicated concentrations for 24 hrs. and stained with Hoechst 33342 as described in materials and methods

김단백질이 AAP처리한 세포의 세포주기에 미치는 영향

세포가 성장하고 분열하기 위해서는 세포주기를 거치게 된다. 앞선 결과에서 김단백질 단독으로는 세포생존에 영향을 주지는 않았으나, AAP와 함께 병행처리함으로써 AAP에 의한 세포사멸을 저해하는 것으로 나타났으므로, 김단백질 병행투여가 세포주기에 어떤 영향을 미치는지를 DNA 염색물질인 PI 염색을 실시하여 각 세포에 존재하는 DNA양을 측정함으로써 그 주기를 확인하는 FACS 분석을 실시하였다(Figure 30 및 31). 앞서 AAP처리에 의한 세포주기 분석 결과에서 AAP가 세포주기에 영향을 주기보다는 sub-G1기를 증가시키는 것으로 나타났다. 김단백질을 처리했을 때에도 역시, 그림에 나타난 바와 같이, Chang liver 세포와 HepG2 세포 모두에서 세포주기에 영향을 주기보다는 sub-G1 arrest를 나타내는 것으로 나타났으며, 이를 Table 4에 나타내었다. 표에 나타난 바와 같이, Chang liver 세포에서는 저농도(6.25 g/ml, 6.97%)에서부터 세포사멸을 억제시키는 것으로 나타났으며, HepG2 세포에서는 비교적 저농도인 12.5 μ g/ml (19.3%)에서 감소되기 시작하여 100 μ g/ml에서 10.39%의 감소를 나타내었다. 이는 앞서 실시한 MTS 결과와 유사한 경향을 나타내므로, 김단백질의 AAP 독성억제효과를 더 확인할 수 있었다.

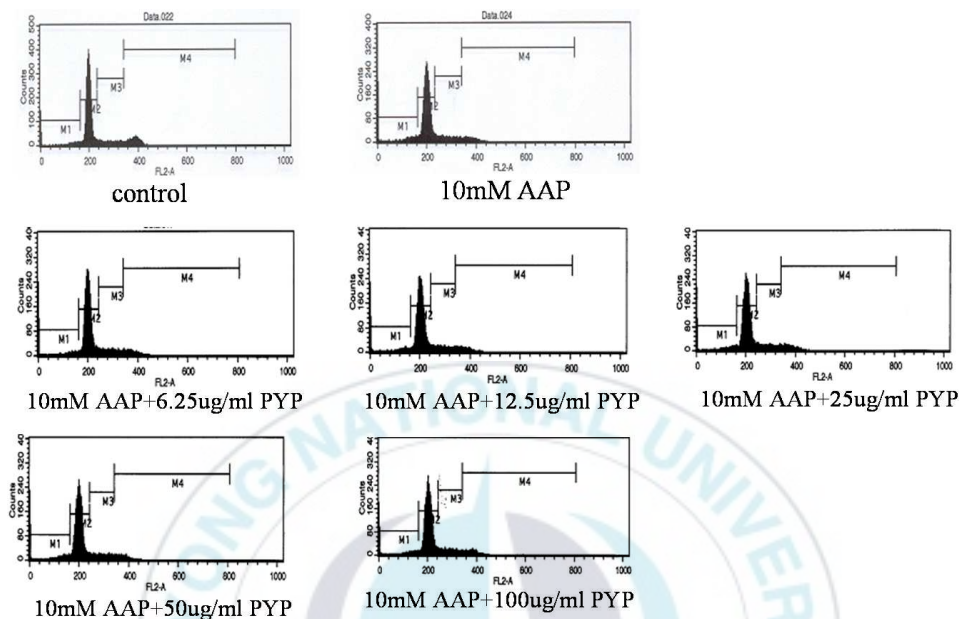


Fig. 30. Effects of acetaminophen(AAP) and *Porphyra yezoensis* protein (PYP) co-treatment on Chang cells' cycle

Cells were treated with SFM for 24 hrs. Cells were treated with SFM, AAP or AAP+PYP at the indicated concentrations for 24 hrs and stained with propidium iodide (PI) for cell cycle assay.

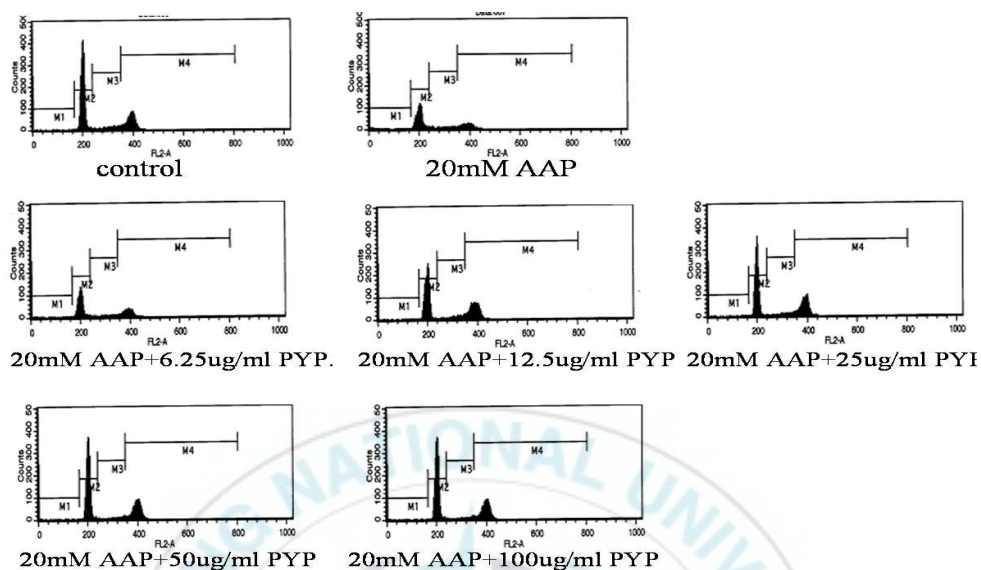


Fig. 31. Effects of acetaminophen(AAP) and *Porphyra yezoensis* protein (PYP) co-treatment on HepG2 cells' cycle

Cells were treated with SFM for 24 hrs. Cells were treated with SFM, AAP or AAP+PYP at the indicated concentrations for 24 hrs and stained with propidium iodide (PI) for cell cycle assay.

Table. 4. Inhibitory effect of P. yezoensis protein (PYP) on the increase sub-G1 cell population by AAP treatment in Chang liver and HepG2 cells

	subG1	
	Chang cells	HepG2 cells
control	4.85%	9.91%
AAP	10.77% ^a	55.73% ^b
+ 6.25ug/ml PYP	6.97%	57.69%
+ 12.5ug/ml PYP	7.12%	19.30%
+ 25ug/ml PYP	7.74%	15.78%
+ 50ug/ml PYP	8.54%	12.42%
+ 100ug/ml PYP.	7.41%	10.39%

^a is 10mM AAP treatment, ^b is 20mM AAP treatment

3) 김단백질이 AAP에 의한 세포사멸기전에 미치는 영향

(1) 김단백질이 AAP에 의한 세포사멸기전에 미치는 영향

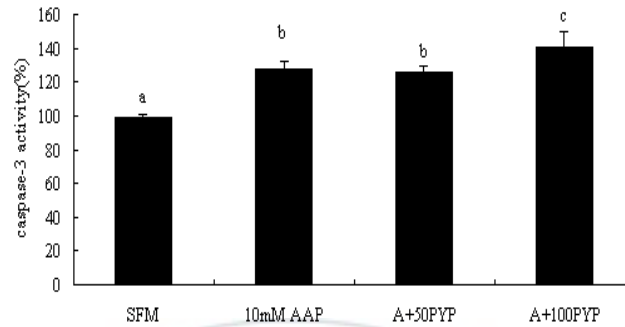
김단백질이 AAP의 간 손상 메카니즘 중 미토콘드리아 기능 장애를 통한 세포사멸 기전에 어떠한 영향을 미치는지 Chang liver 세포와 HepG2 세포에서 caspase-3 활성과 PARP 분해정도를 살펴보았다(Figure 32 및 33). Figure 33에 나타낸 것처럼 Chang liver 세포에서는 AAP에 의해 증가되었던 caspase-3 활성이 100 $\mu\text{g/ml}$ 김 단백질을 처리하였을 때 $147.4 \pm 8.9\%$ 로 더욱 증가하는 것으로 나타났다. 흥미로운 것은 Chang liver 세포에서 김 단백질이 caspase-3 활성을 증가시켰음에도 불구하고, caspase-3의 주된 기질인 PARP는 AAP에 의해 분해되었다가 김 단백질 처리 시 대조군 수준으로 농도 의존적 감소를 나타내었다. 이것은 김 단백질 처리 시 caspase-3 활성은 증가되었으나, PARP를 기질로 하는 세포내 다른 분해효소들의 작용을 억제시켰을 것으로 생각된다. 앞서 AAP 처리 시 농도 의존적으로 caspase-3 활성이 증가되므로 AAP 세포독작용에 caspase-3 활성화가 관여한다고 하였으나, caspase-3 inhibitor 처리에도 불구하고 AAP에 의한 세포사멸이 억제되지 않았으므로 AAP 세포독작용에 caspase-3 의존성/비의존성 경로가 있을 것이다. 김단백질에 의해 caspase-3 활성은 증가되었으나, 그 기질인 PARP 분해는 감소되었고, AAP에 의한 세포사멸도 억제되었다. 이것은 AML-12 세포에서 TGF- β 1에 의한 apoptosis 진행시 일어나는 PARP 분해가 caspase-3와는 무관하게 일어난다고 한 Yang *et al.*의 결과와 일치한다 (Yang *et al.*, 2004). Yang *et al.*은 TGF- β 1에 의한 apoptosis 진행 시 caspase-3/-7에만 특이적으로 반응하는 효소저해제인 Z-VAD-fmk와 모든 caspase에 대해 반응하는 효소저해제인 BD-fmk를 처리하면, Z-VAD-fmk에 대해서는 TGF- β 1에 의한 세포사멸이 부분적으로 억제되지만, PARP 분해는 변화가 없으며, BD-fmk에 대해서는 TGF- β 1에 의한 세포사멸은 완전히 억제되었으나 PARP분해는 Z-VAD-fmk와 마찬가지로 변화가 없었다고 하였다.

한편, Coutant et al. (2006)은 lymphoblastoid cell에서 카드뮴에 의한 apoptosis시 caspase 의존성/비의존성 사멸경로를 제시하였다. 그들은 caspase-3와 caspase-8에 대한 효소저해제를 처리하면 PARP 분해는 억제되지만, 카드뮴에 의한 세포사멸은 변화가 없었다고 하였다.

이상의 결과들을 종합해보면, AAP처리 시 농도 의존적으로 caspase-3 활성이 증가되므로 AAP 세포독작용에 caspase-3 활성화가 관여하지만, caspase-3 inhibitor를 처리함에도 불구하고 AAP에 의한 세포사멸이 억제되지 않았다. 또한 김 단백질 병행처리에 의해 caspase-3 활성은 증가되었으나, 그 기질인 PARP 분해는 감소되었고, AAP에 의한 세포사멸 또한 억제되었다. 따라서, PARP 분해와 AAP에 의한 세포사멸은 밀접한 관련이 있긴 하지만, caspase-3 활성화는 AAP에 의한 세포독작용에 크게 영향을 주지 않는 것으로 생각된다. 또한 AAP, 혹은 AAP + PYP 병행처리 시 나타나는 PARP 분해 작용도 caspase-3와는 무관한 것으로 생각된다.

반면, HepG2 세포에서는 AAP에 의해 증가되었던 caspase-3 활성 ($136.5 \pm 5.1\%$)이 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 김단백질처리로 각각 $126.1 \pm 1.9\%$, $131.0 \pm 4.2\%$ 로 약간씩 감소되었다. Caspase-3의 대표적인 기질인 PARP 결과에서 cleaved form을 관찰할 수가 없었으나, 그 intact form으로 미루어보아, AAP 처리 이후 caspase-3 활성화에 의해 분해되었던 PARP가 김 단백질 처리로 intact band가 증가되었으므로 PARP 분해가 억제되었음을 알 수 있다. 따라서 본 논문에서 사용한 두 가지 세포모델 중 Chang liver 세포에서는 김단백질의 AAP 세포독작용 억제효과는 caspase-3와는 무관하게 일어나며, 이와는 다르게 HepG2 세포에서는 김단백질이 AAP에 의한 세포손상 억제작용에 caspase-3가 부분적으로 연관성이 있는 것으로 생각된다.

A.



B.

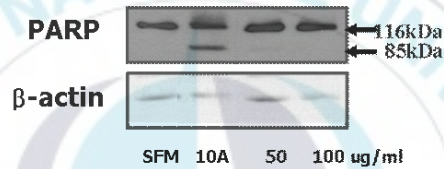
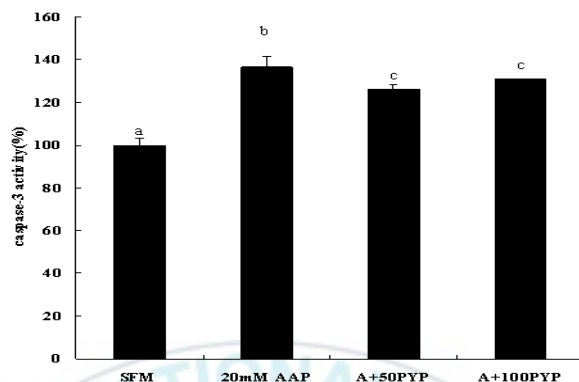


Fig. 32. *Effect of PYP on caspase-3 activity and PARP cleavage induced by AAP in Chang liver cells.*

Cells were treated with 10 mM AAP, or AAP and PYP at indicated concentrations (ug/ml). (A) ; caspase-3 activity, (B) ; PARP cleavage. Whole-cell extracts were prepared and analyzed by Western blotting using anti-PARP. One representative gel from three separate experiments is presented.

A.



B.

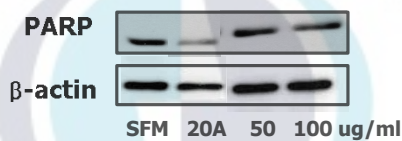


Fig. 33. Effect of PYP on caspase-3 activity and PARP cleavage induced by AAP in HepG2 cells.

Cells were treated with 10 mM AAP, or AAP and PYP at indicated concentrations (ug/ml). (A) ; caspase-3 activity, (B) ; PARP cleavage. Whole-cell extracts were prepared and analyzed by Western blotting using anti-PARP. One representative gel from three separate experiments is presented.

(2) 김단백질이 AAP에 의한 산화적 손상에 미치는 영향

다음으로 AAP 처리 시 세포 내 GSH 감소로 인한 산화적 손상과 관련하여 김단백질의 억제 작용을 살펴보았다. Figure 34의 GSH 결과를 보면, Chang liver 세포의 경우, AAP에 의해 감소되었던 GSH ($89.42 \pm 5.4\%$)를 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도의 김단백질 병행처리로 각각, $98.64 \pm 3.2\%$ 와 $134.54 \pm 7.0\%$ 로 증가되었다. 이 결과로 김단백질의 AAP 독성 억제효과의 주된 원인은 GSH 농도증가에 있는 것으로 추측된다. 반면, HepG2 세포의 경우, AAP 처리($107.16 \pm 9.7\%$)에 의해 GSH 농도가 감소되지 않았으나, 김단백질 병행처리로 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 $107.84 \pm 12.8\%$, $120.94 \pm 8.9\%$ 로 100 $\mu\text{g/ml}$ 에서 유의적으로 증가하였다. 산화적 스트레스에 의한 apoptosis pathway에 관한 연구가 최근 몇 년 동안 집중되어왔다. Shen *et al.* (2001)은 HepG2 세포에서 superoxide radical이 apoptosis를 유도한다고 하였으며, Mates and Sanchez-Jimenez (2000)은 apoptosis시 ROS가 중요하게 작용한다고 보고하였다. 반면, Sakon *et al.* (2003)은 tumor necrosis factor (TNF)에 의한 necrotic cell death에 의해 ROS가 생성된다고 하였다. 산화적 손상 시 세포증식, 분화, apoptosis에 작용하는 MAPK pathway가 관여한다 (Sano *et al.*, 2001 ; Jang *et al.*, 2002). 김단백질 병행처리로 AAP에 의해 감소되었던 GSH 농도가 증가되었으므로, 김단백질이 산화적 손상과 관련된 단백질의 발현에 어떤 영향을 미치는지를 살펴보기로 하였다. Figure 35과 36에 나타난 것처럼 Chang liver 세포에서는 AAP 처리로 MAPK들 중 p38과 JNK 인산화는 변화가 없었으나 ERK 인산화정도가 대조군에 비해 증가하는 것으로 나타났다. 이는 산화적 손상에 의한 현상이라 할 수 있다. 그러나 여기에 김단백질을 첨가하면 pERK는 김단백질에 의해 증가하는 반면, pJNK와 pp38은 감소되는 것으로 나타났다. HepG2 세포에서는 AAP에 의해 ERK 인산화는 증가되었으며, p38이나 JNK 인산화에는 변화가 없었으며, 여기에 김단백질 병행처리로 ERK 인산화가 증가되었다. 두가지 세

포에서 공통적으로 AAP 독작용시 ERK 인산화가 증가되었으며 이것은 산화적 스트레스에 의한 것이다. 김단백질 병행처리에 의해 pERK는 더욱 인산화가 증가되었는데 이때 증가된 ERK 인산화는 IGF-I병행처리의 경우와 마찬가지로 세포생존을 유도하는데 작용할 것이며, 이때 GSH가 관여할 것으로 생각된다. 반면에 pp38과 pJNK는 인산화가 감소됨으로써 세포사멸이 아닌 생존으로 방향이 바뀔 것이라 할 수 있다.

최근 pERK가 세포생존과 사멸, 이 두 가지 상반된 과정에 모두 관여한다는 보고들이 나오고 있다. 세포사멸을 유도한다는 보고들은 대부분이 ERK inhibitor를 써서 세포생존을 유도시킨 것이다(Alessi *et al.*, 1995 ; Favata *et al.*, 1998). 최근 Kim *et al.* (2005)은 신장내피세포를 이용하여 ERK pathway가 세포사멸을 유도한다고 하였다. 그들은 active MEK를 transfection시킨 세포에서 H₂O₂에 의한 apoptosis가 증가된 반면, dominant-negative MEK를 transfection시킨 세포에서는 세포사멸이 억제되었다고 하였다. 즉 H₂O₂에 의한 apoptosis 시 ERK가 인산화가 중요하게 작용한다는 말이다. Goillot *et al.* (1997)은 dominant negative MEK1을 transfection시켰을 때 MEK pathway가 차단되어 death receptor인 Fas를 통한 apoptosis가 억제되었다고 하였다. 이상에서 예를 든 논문들은 pERK가 apoptosis진행시 중요하게 작용한다는 것을 증명한 논문들이다. 이것은 본 실험에서 사용한 Chang liver 세포와 HepG2 세포에서 AAP가 세포사멸을 유도하는데 pERK인산화가 증가되었다는 우리의 결과와 일치하는 부분이다.

그러나, 이와는 반대로, pERK가 세포생존을 유도한다는 보고 또한 많다. Irving *et al.* (2000)과 Namura *et al.* (2001)은 각각 ischemic injury가 있는 rat와 focal cerebral ischemia가 있는 mouse에서 neuron생존에 ERK-1/2 인산화가 증가되었다고 하였다. 즉 pERK-1/2 인산화증가로 세포생존이 유도되었다는 것이다. pERK의 apoptosis 억제기능에 관해, Gonzalez-Zulueta *et al.* (2000)은 cortical neuron에서 ischemic tolerance를

나타내는데 Ras/ERK cascade 활성화가 중요하게 작용한다고 하였다. 따라서 본 연구에 사용한 김단백질 병행처리로 Chang liver 세포와 HepG2 세포에서 pERK 인산화가 증가되었고, AAP에 의해 감소되었던 GSH농도도 증가시켰다는 것은 김단백질의 AAP 독성억제작용에 pERK 인산화가 관련된다고 할 수 있다. 이렇게 ERK 인산화증가에 의해 세포사멸, 혹은 세포생존이라는 전혀 다른 두 가지 결과가 나온 것은 사용한 실험모델이나 물질의 차이로 인한 결과로 보여진다.



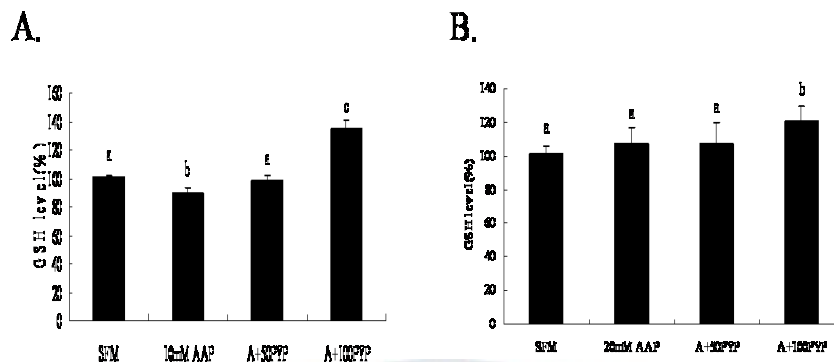


Fig. 34. GSH levels in AAP alone or AAP and *P. yezoensis* protein(PYP) co-treatment in Chang liver (A) and HepG2 cells.

Cells were treated with AAP alone or AAP and *P. yezoensis* protein(PYP) co-treatment. After 24hrs, 5×10^8 cells were collected and measured GSH levels as described in material and methods. Values are the mean $\pm$ S.D. Values different alphabet are significantly ($p < 0.05$) among the group by Duncan's multiple range test ($a > c > b$).

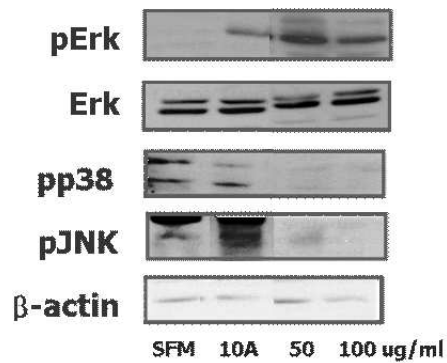


Fig. 35. Effect of PYP on MAPK pathway regulators expression in Chang liver cells.

Cells were treated with 10mM AAP, or AAP and PYP at indicated concentrations (ug/ml) for 24hrs. Whole-cell extracts were prepared and analyzed by Western blotting using anti-phospho-ERK1/2, anti-pan ERK, anti-phospho p38, anti-phospho JNK, and anti-actin antibodies. One representative gel from three separate experiments is presented.

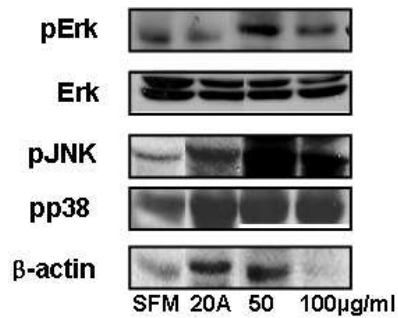


Fig. 36. Effect of PYP on MAPK pathway regulators expression in HepG2 cells.

Cells were treated with 10mM AAP, or AAP and PYP at indicated concentrations (ug/ml) for 24hrs. Whole-cell extracts were prepared and analyzed by Western blotting using anti-phospho-ERK1/2, anti-pan ERK, anti-phospho p38, anti-phospho JNK, and anti-actin antibodies. One representative gel from three separate experiments is presented.

4) 김단백질 가수분해물과 합성물 제조 및 AAP 독성 억제 효과

지금까지 14 kDa의 김단백질이 AAP 독작용에 어떤 영향을 미치는지에 관해 그 기전을 살펴보았는데, 실제로 체내에서 대사되어 간세포에 전달되기까지의 과정을 고려하여, 앞서 사용하였던 김 단백질은 pepsin으로 분해하였다. Pepsin : PYP = 1 :10의 비율로 섞은 후, 37℃에서 4시간 반응을 시킨다. 4시간 후 1 M NaOH를 50 ul/ml농도로 첨가하고 100℃, 10분간 가열한다. 4℃, 12,000 rpm으로 3분간 원심분리하여 상층을 취해 560nm에서 그 농도를 측정 한 후 실험에 사용하였다.

14kDa 김 단백질의 염기서열분석결과에서 나온 10개 피크의 펩티드를 나타내었다 (Table 5). 그 중, 김의 cytochrome *c*와 상동성이 높은 21개의 아미노산으로 된 염기서열을 확인하였고, 그 염기서열(R.LVDEIDED AAN YVLSQSEK.G)을 합성하여 Pep21이라 명명한 후 AAP 독성에 대한 효과를 관찰하였다.

김단백질 가수분해물(hydrolysate)과 합성물(Pep21)의 AAP 독작용에 대한 영향을 MTS 분석으로 검토하였다(Figure 37). 가수분해물 그 자체의 작용인지를 확인하기위해 앞서 가수분해반응에 첨가하였던 pepsin에 pepsin, bovine serum albumin (BSA), 가수분해물을 각각 혼합한 후, 농도별로 배지에 녹여 24시간 처리하여 세포생존율을 살펴본 결과, 분해산물이나 합성물 모두에서 AAP 독작용을 억제하는 것으로 나타났다.

이상에서 14kDa의 김단백질이 AAP 독작용을 억제시키는 효과를 가지며, 그 메카니즘에 대해 증명하였다. 또한, 그 효소분해물과 합성물에서도 AAP 독작용에 대한 억제효과가 있음을 확인하였다. 효소분해물과 합성물이 어떤 메카니즘을 통해 AAP 독작용을 억제시키는지에 관해서는 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

Table 5. The amino acid sequence of PYP

Hit	Protein	Peptide
1	gil117931	R.LVDEDEDIAANYVLSQSEK.G
2	gil89201741	K.VVASLTIMGGALFSTESLNVK.A
3	gil89343072	K.IVDGPMAGLLGRAVVVVDGDGK.V
4	gil6531520	R.QAPGXGLEWVAVISHDGRGA,F
5	gil71157534	R.ALTSTNPLLAVAGDLLDLAGGR.V
6	gil73600097	R.ALMSSNMQRQAVPLSQSEK.C
7	gil61806033	K.VIIIDEADNTTDDVQLLLR.A
8	gil61806330	K.VLIIDEADNTTPDVQLLLR.A
9	gil39576025	R.LVIEDNLGNVTRQIPVTEK.K
10	gil91079979	K.NPDFPLEASTLP SHIDEKK.A

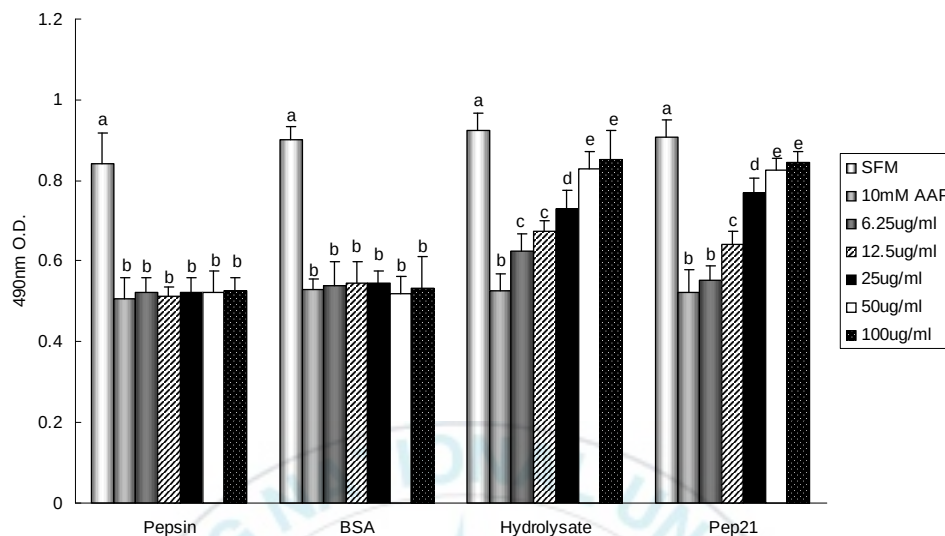


Fig. 37. Effect of hydrolysate and synthetic molecules (Pep21) on AAP cytotoxicity in Chang liver cells.

Cells were treated with pepsin, pepsin and bovine serum albumin (BSA), hydrolysate of *Porphyra yezoensis* protein (PYP) and synthetic molecule (Pep21). After 24 hr incubation, effects of molecules on cell proliferation were measured by MTS assay. Values are the mean±S.D. Values different alphabet are significantly ($p < 0.05$) among the group by Duncan's multiple range test ($a > c > b$).

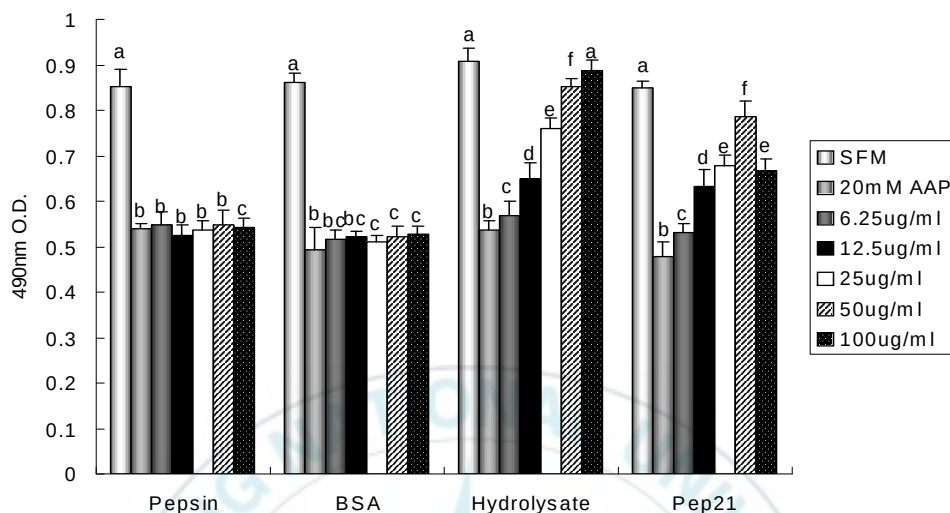


Fig. 38. Effect of hydrolysate and synthetic molecules (Pep21) on AAP cytotoxicity in HepG2 cells..

Cells were treated with pepsin, pepsin and bovine serum albumin (BSA), hydrolysate of *Porphyra yezoensis* protein (PYP) and synthetic molecule (Pep21). After 24 hr incubation, effects of molecules on cell proliferation were measured by MTS assay. Values are the mean±S.D. Values different alphabet are significantly ($p < 0.05$) among the group by Duncan's multiple range test ($a > c > b$).

6. 김단백질의 IGF-I signaling pathway와 관련한 억제 기전

Insulin-like growth factor-I (IGF-I)은 성장호르몬의 자극에 의해 간을 비롯한 생체의 거의 모든 조직에서 발현되어 내분비 혹은 국소호르몬 형태로 작용하여 전자의 성장촉진 작용을 매개하는 펩타이드형 성장인자이다. IGF-I은 대개 그 수용체(IGF-I receptor, IGF-IR)와 6개의 결합단백질(IGF binding proteins, IGFBPs)에 의해 조절되는데, IGF-IR에 IGF-I이 적절하게 결합하게 되면 IGF-IR내 tyrosine 잔기에서 자동인산화가 일어나면서 활성화가 이루어지게 된다. 이 수용체의 인산화는 연이어 IRS-1의 활성화를 초래하게 되고, 이를 통해 두 가지 대표적인 신호전달 경로인 PI3-kinase (PI3K)와 MAP kinase (MAPK) 경로를 거쳐 세포증식 및 분화, 세포이동, 세포사멸 억제작용 등과 같은 생물학적 작용이 일어나게 된다. 특히 세포사멸 과정을 살펴보면, wild-type IGF-IR와 IGF-I과의 결합은 대부분의 세포사멸과 관련된 신호전달 경로를 차단하게 된다. Alexia *et al.* (2004)은 doxorubicin이라는 약물을 HepG2 세포에 처리했을 때 세포사멸이 유도되었으나, IGF-I을 처리함으로써 이 약물에 의한 세포사멸이 완전히 억제되었을 뿐만 아니라 이때, IGF-I에 의한 ERK 인산화가 관여한다고 보고하였다. 이 외에도 간세포의 독성과 관련하여 IGF-I과 같은 성장인자에 의한 PI3K 혹은 MAPK 활성화가 관여한다고 보고된 바가 있으나(Alexia *et al.*, 2004), 성장인자와 관련하여 AAP에 의한 세포독성을 억제시키는 데에 관여하는 신호전달 경로는 알려진 바가 없다. 앞서 규명한 바와 같이, 김 단백질과 IGF-I을 두 가지 간세포에 동시처리하였을 경우, IGF-I에 의한 ERK 인산화를 통해서 AAP의 세포독성을 부분적으로 억제하였다. 따라서 본 논문에서는 IGF-I이 AAP의 작용을 조절함에 따라, AAP 처리유무에 따른 IGF-I의 신호전달 경로를 살펴보고, 이와 동시에 김단백질은 AAP에 의해 손상된 IGF-I의 신호전달 경로를 어떠한 기전을 통해 억제시키는지 살펴보았다.

1) IGF-IR 인산화

IGFs에 의한 생물학적 작용은 그 수용체를 통해 활성화되어 나타나며, 원칙적으로 IGF-I은 IGF-I 수용체와 반응하고, IGF-II는 IGF-II 수용체 (IGF-IIR)와 반응하지만(Centrella *et al.*, 1990; McCathy *et al.*, 1992), 많은 세포내에서 이들 리간드와 수용체와의 결합이 부분적으로 교차가 일어난다(Centrella *et al.*, 1990; LeRoith *et al.*, 1995).

IGF-II 수용체는 IGF-I 수용체보다 500~1,000배 정도의 높은 친화력으로 IGF-II와 선택적으로 결합하고, 인슐린과는 결합하지 않는 반면에 IGF-I 수용체는 IGF-II 뿐만 아니라 인슐린과도 결합할 수 있지만 IGF-II와의 친화력은 2~15배, 인슐린과의 친화력은 1000배 정도로 낮기 때문에 세포 내 대사와 관련된 IGF의 작용은 주로 IGF-I 수용체를 통해 개시된다(Mottola and Czech, 1984; Furlanetto *et al.*, 1987; Ullrich and Schlessinger, 1990; Jones and Clemmons, 1995; Torres *et al.*, 1995; Khandwala *et al.*, 2000).

IGF-IR는 2개의 리간드 결합 α -단위소체와 세포막에 걸친 β -단위소체를 포함하는 transmembrane heterotetrameric 단백질 복합체로서 리간드인 IGF-I과의 결합에 의해 인산화되며(Steele-Perkins *et al.*, 1990; Kato *et al.*, 1994) 활성화된 IGF-IR에 의해 IRS-1의 인산화가 유도되어 일련의 세포내 신호전달 cascade가 개시된다(Beato, 1989; Blakesley *et al.*, 1996). 먼저 AAP 처리에 의한 IGF-I 신호전달 경로를 파악하기 위해서 IGF-IR 인산화 수준을 살펴보고, 김단백질과 AAP의 병행 처리 시 김단백질이 AAP에 의한 IGF-IR 인산화를 어떻게 변화시키는지 살펴보았다. 약 90% confluent된 Chang liver 세포와 HepG2 세포에 각각 5 mM과 10 mM의 AAP를 24시간 처리함으로써, AAP에 의한 세포독성을 유도한 다음, 시간별로 IGF-I을 투여하여 IGF-IR의 인산화수준을 살펴보았다(Figure 39 및 43). SFM 처리 시에는 IGF-I 투여 후 5분이 경과했을 때에 IGF-IR 인산화가 시작되어, IGF-I 투여 후 20분이 경과할 때까지 지

속되었다. 그러나, AAP 처리 시에는 IGF-I에 의한 IGF-IR 인산화가 SFM 처리에 비해 감소되었다. AAP에 의해 감소된 IGF-IR 인산화는 김단백질 병행처리로 인해 대조군과 비슷한 수준으로 회복되어 IGF-I 투여 후 5분이 경과했을 때 인산화 반응이 나타나기 시작하여 20분이 경과한 후에도 지속되었다. 즉, Chang liver 세포에서 AAP는 IGF-I에 의한 IGF-IR 인산화를 초기에 감소시키는 반면, 김단백질은 AAP에 의해 감소된 IGF-IR 수준을 대조군과 비슷한 수준으로 증가시켰다.

반면 HepG2 세포에서는 chang liver 세포와 마찬가지로 SFM 처리 시 IGF-I 투여 후 5분이 경과하였을 때에 IGF-I에 의한 IGF-IR 인산화가 시작되어 20분이 경과될 때까지 지속되었다(Figure 43). AAP 처리 시에도 IGF-I 투여 후 5분이 경과했을 때에 IGF-IR 인산화가 시작되었으나 시간이 지남에 따라 IGF-I에 의한 IGF-IR 인산화가 서서히 감소되었다. 이와는 달리 김단백질과 AAP 병행처리 시에는 IGF-I 투여 후 10분이 경과했을 때에도 AAP에 의해 감소된 IGF-IR 인산화 수준이 지속됨에 따라, 김단백질이 AAP에 의한 IGF-IR 탈인산화를 억제시키는 것으로 생각된다.

2) IRS-1 인산화

IRS-1은 인슐린 수용체 기질(insulin receptor substrate)로서 인슐린과 인슐린 수용체의 결합에 의한 인산화로 활성화되지만, 인슐린 신호전달 이외에 여러 다른 신호 전달계와도 관련되어 있다. 따라서, IRS-1에 존재하는 tyrosine 잔기의 인산화는 인슐린 수용체 뿐만 아니라 IGF-IR, EGF 및 PDGF와 같은 다양한 성장인자들의 수용체를 통해서도 이루어진다(Johnston *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 1995; Yin *et al.*, 1995; Platanias *et al.*, 1996). 인산화 된 IRS-1은 SH2 도메인을 포함한 신호전달 관련단백질들과 결합한다(Pawson and Gish, 1992; White and Kahn, 1994). 인산화된 IRS-1에 PI3K의 p85 regulatory subunit이 SH2 도메인을 통해

결합하게 되면 하부 신호전달자로서 AKT 또는 PDK 등을 활성화시킴으로써 PI3-kinase 신호전달계가 활성화되고, Grb2의 SH2 도메인과 결합하게 되면 p21 Ras가 활성화되어 G 단백질을 매개로하는 MAP kinase 신호전달계가 활성화된다(Luo *et al.*, 1999; Ogawa *et al.*, 1998; Whitehead *et al.*, 2000). 앞서 두 종류의 간세포인 Chang liver 세포와 HepG2 세포에서 24시간동안 AAP를 첨가하여 반응시켰을때, IGF-I에 의한 IGF-IR의 인산화가 감소되고, IGF-I 투여후 20분이 경과될때까지 지속되지 않았다. 반면에 김단백질과 AAP를 병행처리한 경우는, AAP에 의해 손상된 IGF-IR 인산화가 회복되면서, IGF-I 투여후 20분이 경과될때까지 지속되어 대조군의 수준에 이르는 것을 확인할 수 있었다. 그 결과, AAP 혹은 AAP와 김단백질 병행처리에 따라 IGF-I에 의한 IGF-IR 인산화 수준이 회복되면서 AAP에 의해 손상된 IGF-IR 신호전달 체계를 김단백질과 병행함으로써 회복시킬 수 있는 가능성을 제시하였다. 따라서, 다음으로 두가지 간세포에 AAP 혹은 김단백질과 AAP 병행처리 후에 IGF-IR 활성화에 따른 IRS-1 인산화의 변화를 살펴보았다. 먼저, Chang liver 세포에서 SFM 처리시에는 IGF-IR 활성화와 동일한 패턴으로 하부 신호전달 관련 단백질인 IRS-1이 IGF-I 투여후 20분이 경과할 때까지 지속되었다(Figure 40). 그러나, AAP 처리시에는 SFM을 처리한 세포와 동일하게 IGF-I 투여후 5분이 경과하였을때에 IRS-1 인산화가 나타난 반면 10분, 20분이 경과하면서 점차적으로 감소하였다. 뿐만 아니라, IRS-1 단백질 수준의 감소와 더불어 IRS-1 인산화 밴드가 위로 이동한 것을 볼 수 있었다. 반면 김단백질과 AAP 병행처리시에는 AAP 처리로 인해 이동했던 밴드가 SFM 처리시와 동일한 위치로 다시 이동하였으며, IRS-1 인산화 또한 IGF-I 투여후 시간이 경과함에 따라 증가하였다. 신호전달과 관련된 단백질은 tyrosine 뿐만 아니라 serine/threonine 등의 잔기를 포함하고 있어 리간드의 결합을 통해 주로 tyrosine 인산화가 일어나 활성이 증가되는 반면, serine/threonine 잔기에서 인산화가 일어나는 경우는 대부분 신호전달 경

로가 손상된다. 예를 들면, 인슐린에 의한 인슐린 수용체의 인산화는 IRS-1 인산화를 초래하게 되는데, 본 실험에서 나타난 결과와 마찬가지로 IRS-1의 구조내 tyrosien 인산화가 감소하고 band shift가 나타나면 대개 serine 잔기의 인산화로 치환되었음을 알 수 있다. 뿐만 아니라 인슐린의 생물학적 작용과 관련된 신호전달 경로 중 대표적인 단백질인 mTor은 serine 인산화를 통해 과도한 tyrosine 잔기의 인산화를 차단함으로써 단백질 수준 미치 작용을 조절하기도 한다(Greene *et al.*, 2006). 이처럼 AAP에 의한 IRS-1의 인산화 및 단백질 수준의 감소는 AAP 존재하에서는 IRS-1의 serine 인산화가 유도되어, IGF-I과 관련된 신호전달이 억제된 반면 김단백질과 병행처리시에는 IGF-I/IGF-IR에 의한 IRS-1 인산화를 정상화시킴으로써 AAP에 의해 손상된 신호전달 경로를 회복시키는 것으로 생각된다.

한편, HepG2 세포에서는 AAP 혹은 김단백질과 AAP 병행처리 시 IGF-I 투여에 의한 IRS-1 인산화 경향이 앞서 Figure 44에서 나타난 IGF-IR 인산화 패턴과 동일한 경향을 나타내었다. 즉 대조군에서 IRS-I 인산화가 5분부터 증가하기 시작하여 20분까지 지속된 반면, AAP 처리 시 5분에 증가했다가 이후에는 감소되었고, 김 단백질 처리로 대조군과 같이 20분까지 계속해서 유지되는 것으로 나타났다. 즉, AAP에 의해 IGF-IR인산화가 감소되고 그 하부신호전달물질인 IRS-1인산화가 감소된 것이며, 김 단백질 처리 시 마찬가지로 IGF-IR 인산화가 증가되면서 그 하부 신호전달물질인 IRS-1인산화가 증가된 것으로 생각된다.

3) *PI3-kinase* 신호전달경로

IGF-I을 포함한 성장인자가 각각의 수용체에 결합하면서 활성화가 일어나게 되면, 이를 통해 두 가지 대표적인 신호전달 경로인 PI3K와 MAPK 활성화로 세포에 다양한 영향을 미친다. 특히, PI3K는 두가지 subunits (p85 regulatory subunit와 p110 catalytic subunit)으로 이루어져

있는데, IGF-I/IGF-IR에 의한 PI3K 활성화는 IRS-1과 p85 regulatory subunit이 결합하여 p110 catalytic subunit이 PI3K의 실질적인 활성을 나타내면서 Akt의 활성화를 유도하게 된다. 즉, IRS-1에는 p85 regulatory subunit과 결합할 수 있는 도메인이 존재할 뿐만 아니라 tyrosine 인산화가 일어나게 되면, p85 regulatory subunit의 SH2 도메인을 통해 결합하게 된다. 그러나 명칭에서 나타난 바와 같이 PI3K의 두 가지 subunits 중 p85 regulatory subunit은 PI3K의 활성을 조절해주는 반면 p85와 p110의 결합에 의해 실제 PI3K 활성은 p110 catalytic subunit이 발휘하게 된다 (Dew *et al.*, 2000 ; White, 1998). 그러므로, PI3K가 활성화되기 위해서는 두 가지 subunits의 결합(p85와 p110)과 p85 regulatory subunit에 의한 이 결합체의 이동이 필요하며, IGF-I에 의한 PI3K 활성화는 인산화된 IRS-1에 p85/p110의 결합정도에 따라 결정된다.

앞서 제시한 바와 같이, IGF-I에 의해 인산화된 IGF-IR와 IRS-1은 AAP 처리에 의해 감소되었으나, 김단백질과의 병행처리로 정상화되었다. 즉, IGF-I 투여에 의해 하부 관련 단백질의 tyrosine 인산화가 AAP 혹은 김단백질과 AAP 병행처리에 의해 조절되므로, 이들 변화가 세포질 내 대표적인 하부 경로인 PI3K의 활성화와 관련하여 결합체 형성(complex formation)에는 어떠한 영향을 미치는지 살펴보았다. 앞서 설명한 바와 같이, PI3K가 활성을 나타내기 위해서는 세포질 내에서 p85/p110 결합체가 형성되어야 하며, 이 결합체는 p85 regulatory subunit에 의해 인산화된 IRS-1으로 이동해야만 p110 catalytic subunit이 효소적 활성이 발휘된다. 그러므로, 아무리 p85/p110이 결합하였다 하더라도 인산화된 IRS-1으로 이동하지 않으면, 실제 p110 catalytic subunit은 PI3K의 활성을 나타내지 못한다. 따라서 두가지 간세포에서 AAP 혹은 김단백질과 AAP 병행처리 시 p85/p110 결합체가 인산화된 IRS-1으로 이동하는 데에 어떠한 영향을 미치는지 살펴보기 위해, IRS-1과 p85 regulatory subunit의 결합정도를 실험하였다. Figure 41에 나타난 바와 같이, AAP 혹은 김단백질과 AAP 병행처리 시 IGF-I에 의한 IRS-1 인산화가 조절됨에도 불구하고, 모든

실험군에서 인산화된 IRS-1과 p85 regulatory subunit이 거의 동일하게 결합하여 변화가 없었다.

p85 regulatory subunit은 구조 내에 SH2 도메인뿐만 아니라 tyrosine 잔기가 함유되어 있기 때문에 p110이 결합하지 않은 상태, 즉 PI3K가 활성을 나타내지 못하는 조건에서도 단독으로 SH2 도메인을 통해 인산화된 단백질에 결합함에 따라 상대적으로 p85/p110 결합체의 결합을 방해하여 PI3K 활성을 억제시키기도 한다. 이것은 당뇨병, 비만환자의 경우 IRS-1의 serine인산화가 증가하고, 동시에 p85 subunit이 증가되면서 p85 subunit monomer와 p110 subunit복합체가 IRS-1에 결합하기보다는 p85 subunit monomer가 IRS-1에 결합함으로써 PI3K signaling pathway가 억제된다고 한 Draznin (2006)의 결과와 일치한다. Draznin (2006)은 미토콘드리아 기능 장애로 인해 serine kinases활성이 증가되어 IRS-1의 serine인산화가 일어나며, 그 외에도 JNK, PKC, IKK β , TNF α 등이 IRS-1의 serine인산화를 유도한다고 하였다. 그 중에서 JNK는 유리지방산, 스트레스, 염증, 등에 의해 활성화되어 IRS-1의 serine인산화를 유도하는 것으로 알려져 있다(Hirosimi *et al.*, 2002 ; Gao *et al.*, 2004 ; Nguyen *et al.*, 2005 ; Bandyopadhyay *et al.*, 2005). 이때 JNK활성화를 억제시킴으로써 유리지방산에 의한 세포손상이 억제된다(Gao *et al.*, 2004). 뿐만 아니라, JNK-1 knockout mice의 경우 식이성 비만이나 인슐린내성이 억제되었다는 보고가 있다(Hirosimi *et al.*, 2002).

그러므로, 실험조건을 달리하였을 때에 Chang liver 세포에서는 IRS-1와 p85 regulatory subunit의 결합정도에 아무런 변화가 없었기 때문에, p85/p110 결합과 IRS-1/p110의 결합정도를 살펴봄으로써 AAP 혹은 김단백질과 AAP 병행처리 시에 p85/p110 결합체가 인산화된 IRS-1으로 이동하는 데에 영향을 미치는지를 살펴보았다. 그 결과, IRS-1과 p85/p110복합체의 결합이 AAP처리로 감소되었으며, 김단백질이 이를 억제시키는 것으로 나타났다. 따라서 AAP는 IRS-1인산화를 감소시킬 뿐만 아니라, 그 인산화 위치 또한 serine으로 유도함으로써 이후 신호전달물질인 PI3K

pathway를 손상시킴을 확인하였다.

HepG2 세포에서는 SFM 처리 시 IGF-I 투여 후 5분이 경과했을 때에 약하게 결합체 형성이 이루어져, 10분이 경과하면서는 IGF-I에 의한 IRS-1/p85 결합정도가 증가하였다. 그러나, AAP 처리 시에는 SFM 처리 시 IGF-I에 의한 IRS-1/p85의 증가와는 달리 IGF-I 투여후 시간이 경과함에 따라 IRS-1/p85의 결합이 증가하지 않았으며 그 결합정도 또한 현저히 감소하였다(Figure 44). 이와는 달리, 김단백질과 AAP 병행처리시에는 SFM 처리시에 동일한 경향으로 IGF-I 투여후 5분이 경과했을때에 IRS-1/p85 결합이 나타나 시간이 지날수록 증가하여, AAP에 의한 결합체의 해리 혹은 분해가 김단백질 병행처리에 의해 감소됨을 알 수 있었다.

이들 결과를 통해, 두가지 간세포에 AAP 처리로 세포독성을 유도하면, IGF-I에 의한 IRS-1/p85 혹은 p85/p110, IRS-1/p110 등과 같은 결합체 형성이 억제되는 반면, 김단백질과 병행처리 시에는 IGF-I 투여에 의한 결합체 형성이 증가함에 따라 IGF-I에 의한 정상적인 신호전달 경로가 활성화 되는 것으로 생각된다.

4) MAP kinase 신호전달 경로

IGF-I에 의한 세포 내 kinase cascade 중 IGF-IR의 하부에 존재하는 MAP kinase 경로는 IGF-I의 세포 증식 작용에 있어서 중요한 신호전달 체계로서 3종류의 MAP kinase subfamily가 존재한다. 앞서 언급했듯이, ERK는 주로 세포 증식 및 세포 사멸 방어기전과 관련이 있는 반면에, JNK와 p38은 세포사멸의 유도와 관련되어 있다(Graves *et al.*, 1996; Kawasaki *et al.*, 1995; Xia *et al.*, 1995). 앞의 결과(Figure 14~17)에서, AAP 처리에 의한 ERK활성화가 IGF-I 첨가로 인해 증가하여 AAP에 의한 세포독성이 저하됨을 확인함에 따라 AAP 혹은 김단백질 병합처리 시 IGF-I에 의한 Erk 활성화를 시간별로 살펴봄으로써, AAP의 세포독성 및 독성저

해 효과와 관련된 IGF-I 신호전달 경로를 규명하고자 한다.

① *Shc*인산화와 *Grb2* 결합

IGF-I의 투여로 인해 IGF-IR를 포함한 신호전달 과정을 살펴보면, IGF-IR의 cytoplasmic tail에서 IGF-I에 의한 tyrosine 인산화의 시작으로 IRS-1이나 Shc, Grb2 등과 같은 docking protein에 의해 연속적인 신호전달이 나타난다. IGF-IR에 의한 MAPK 경로는 IGF-IR가 Shc 단백질과 직접 결합하여 하부 신호전달 물질인 Grb2와의 결합을 유도함으로써 활성화시키거나, IGF-IR/Shc 결합이 아닌 IRS-1/Grb2 결합을 통해 MAPK 경로를 활성화 시킬 수도 있다. Shc 단백질은 IGF-I을 포함한 다양한 성장인자와 사이토카인 수용체에 의해 tyrosine 인산화 반응의 기질로 작용한다(Pelicci *et al.*, 1992 ; Rozakis *et al.*, 1992). 리간드 결합으로 인해 Shc 단백질이 인산화되면, IRS-1이나 PI3K p85 regulatory subunit과 마찬가지로 SH2 도메인을 포함한 단백질과 결합하게 되는데, 그 대표적인 단백질이 Grb2이다(Matuoka *et al.*, 1992). 그러나, Shc 단백질 내에는 스스로가 인산화될 뿐 아니라 SH2 도메인을 포함하여 인산화된 다른 단백질과도 결합이 가능하며, Shc의 SH3 도메인이 Ras나 SOS 등의 proline-rich motif에 결합함에 따라 세포내 작용을 촉진시키기도 하고 저해하기도 한다(Aronheim *et al.*, 1994). 예를들면, Kim *et al.* (2005)의 연구결과에서 나타낸 바와 같이 종양을 이식한 nude mice에서 Shc/Grb2의 상호결합을 저해시킴으로써 종양의 성장이 억제되는 것으로 보아, Shc과 Grb2 상호결합은 리간드 수용체의 tyrosine kinase와 결합하는 중요한 물질로써 Ras와 같은 G 단백질체와 MAPK cascade에 관여함을 알 수 있다(Songyang *et al.*, 1994 ; Downward, 1994).

앞서 Chang liver 세포에 AAP를 처리함에 따라 IGF-IR 인산화 감소되었음에도 불구하고 ERK1/2의 인산화는 증가시켰으며, 김단백질과 병행 처리 시에는 AAP를 함께 처리했음에도 불구하고 IGF-I에 의한 IGF-IR

인산화가 회복되어 지속되었으며, 그에 따른 최종경로인 ERK1/2의 인산화를 또한 증가시켰으므로, 중간 매개 신호전달 물질인 Shc 단백질의 인산화와 Shc/Grb2 상호결합 정도를 살펴보았다(Figure 42). 그 결과, Chang liver 세포에서는 SFM 처리 시에는 IGF-I첨가 5분후부터 Shc에 결합한 Grb2가 증가하기 시작하여 그 이후부터 감소하였으며 AAP 처리 시에는 Shc/Grb2 상호결합이 20분에 감소를 나타내었다. 김단백질 병행처리 시에는 5분부터 증가하기 시작하여 10분에 급격히 증가되다가 그 이후부터 감소를 보였으므로, AAP 자체는 Shc/Grb2 상호결합에 영향을 주지 않지만, 김단백질이 Shc/Grb2 결합을 증가시키는 것으로 나타났다(Figure 42).

한편 HepG2 세포에서는 AAP 혹은 김단백질과 병행처리 시 IGF-I에 의한 IGF-IR와 IRS-1의 인산화가 감소 혹은 증가되었으나 이에 비해 Shc 인산화는 현저히 변화되었다. 즉, SFM이나 김단백질 병행처리 시 IGF-I 투여 후 5분이 경과하였을 때 Shc 인산화가 증가되기 시작해서 10분이 경과할 때에도 지속되었다. 그러나 이와는 달리 AAP 처리 시에는 IGF-I 투여 5분 후 Shc 인산화가 개시되었으나 10분이 경과했을 때에는 약하게 감소하기 시작했다(Figure 45).

HepG2 세포에서 AAP 혹은 김단백질 병행처리에 따라 IGF-I에 의한 Shc 인산화의 변화를 살펴보았으므로, 인산화된 Shc 단백질과 Grb2 단백질과의 상호결합 또한 Shc 인산화와 관련하여 작용하는지를 살펴보았다. Figure 42에 나타난 바와 같이, AAP 처리 시 IGF-I에 의한 Shc/Grb2 상호결합이 다소 감소한 듯 보이나, Shc 인산화의 변화와는 다르게 모든 실험조건에서 IGF-I에 의한 Shc/Grb2 상호결합이 이루어졌다. 본 실험에서는 24시간동안 무혈청배지와 AAP 단독 혹은 김단백질 병행처리 후, anti-Shc 항체와 SH3 도메인을 인지하는 anti-Grb2 항체와 반응시킨 것이다. 그러므로, AAP 단독 혹은 김단백질과 병행처리 시 IGF-I에 의한 Shc/Grb2 상호결합이 아무런 변화를 나타내지 않은 것으로 보아, 이들 결

합이 Src이나 Shc 등과 같은 tyrosine kinase 인산화와는 무관하며 Grb2의 SH3 도메인은 AAP 혹은 김단백질 병행처리 시 Shc 인산화가 조절된다 할지라도 IGF-I 신호전달 체계에 결정적인 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다.

Chang liver 세포와 HepG2 세포에 대해 Figure 46에 이상에서 나온 결과들을 바탕으로 김단백질이 IGF-I 신호전달체계와 관련하여 AAP독성을 억제시키는 메카니즘을 도식화 하였다. 즉 Chang liver 세포에서는 AAP에 의해 IGF-IR 인산화에 변화가 없었고 이후 신호전달물질인 IRS-1의 인산화수준이 감소되었을 뿐만 아니라 serine인산화가 유도되면서 IRS-1하부 신호전달과정이 손상되는 것으로 나타났다. 또한 Chang liver 세포에서는 AAP처리가 Shc/Grb2 상호결합에 영향을 주지 않았지만, 김단백질이 Shc/Grb2 결합을 증가시키는 것으로 나타났다. 앞서 김단백질의 AAP독성 억제작용에 ERK인산화가 관여한다는 사실을 확인하였으므로 그 상위신호전달물질인 Shc/Grb2 결합 증가에 의해 ERK인산화가 증가되었을 것이라 생각된다.

반면, HepG2 세포의 경우는 AAP 처리로 IGF-IR 인산화가 감소되었으며 김단백질 처리로 IGF-IR인산화가 AAP에 의한 인산화 억제를 지연시키는 것으로 나타났다. IRS-1 인산화 역시 IGF-IR와 유사한 경향을 나타내었으므로 AAP에 의해 IGF-IR 인산화부터 감소된 것이 IRS-1에 영향을 미친 것으로 생각된다. IRS-1 하부신호전달물질인 PI3K p85 subunit과 IRS-1과의 결합이 AAP에 의해 급격히 감소되었으므로 AAP에 의해 이후 신호전달과정인 PI3K 신호전달경로가 손상됨으로써 세포사멸을 유도 하는 것으로 생각된다. Acetaminophen 처리 시 IGF-IR 인산화 감소와 ERK 인산화 증가를 연결하기위해 살펴보았던 Shc 인산화는 AAP 처리로 감소되었으며, 반면 Shc/Grb2 결합은 AAP에 영향을 받지 않는 것으로 나타났으므로, IGF-IR 신호전달체계에 결정적인 영향을 미치지 않는 것으로 생각된다.

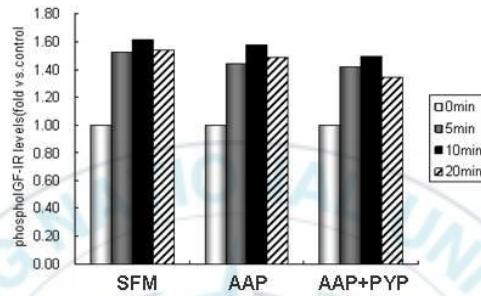
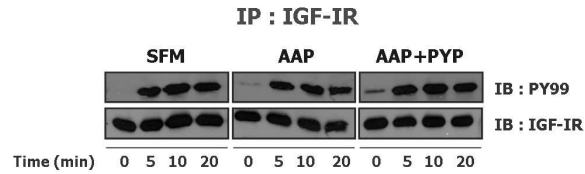


Fig. 39. Effects of AAP or AAP+PYP treatment on IGF-IR phosphorylation in Chang liver cells.

Cells were cultured for 24hr in SFM, 5 mM AAP, or AAP+100 ug/ml PYP after preincubation with SFM for 24hr. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-IGF-IR antibody, and the immune complexes were then analyzed by electrophoresis and immunoblotting with anti-phosphotyrosine, or anti-IGF-IR antibody.

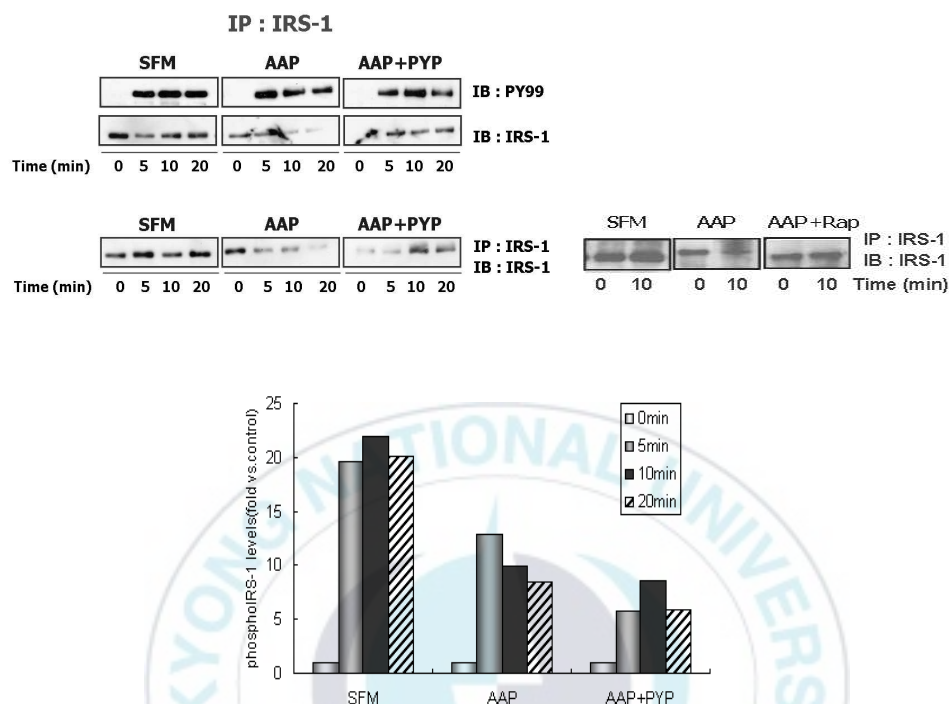


Fig. 40. Effects of AAP or AAP+PYP treatment on IRS-1 phosphorylation in Chang liver cells.

Cells were cultured for 24hr in SFM, 5 mM AAP, AAP+100 ug/ml PYP or AAP+rapamycin after preincubation with SFM for 24hr. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-IRS-1 antibody, and the immune complexes were then analyzed by electrophoresis and immunoblotting with anti-phosphotyrosine, or anti-IRS-1 antibody.

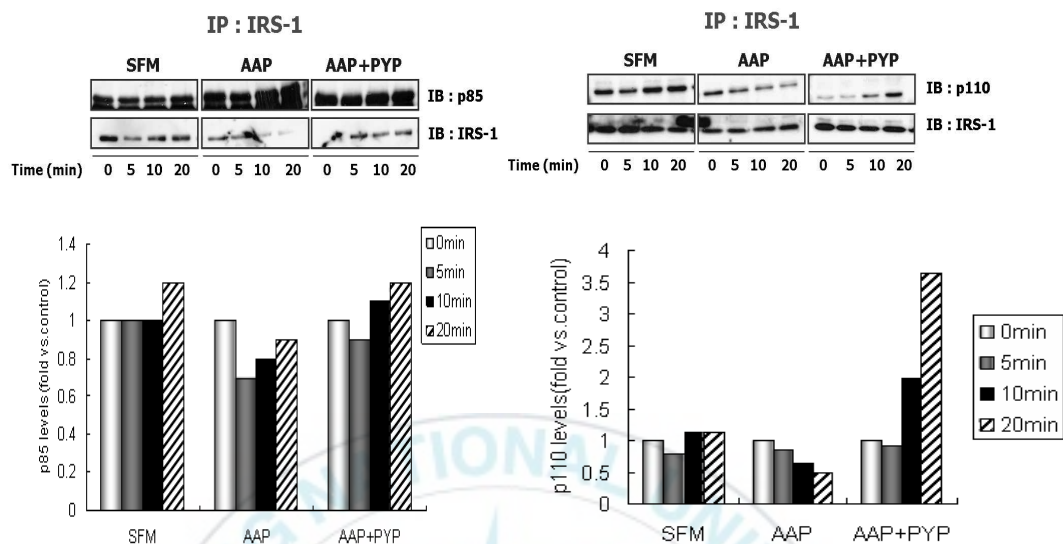


Fig. 41. Effects of AAP or AAP+PYP treatment on binding p85/p110 complex to IRS-1 in Chang liver cells.

Cells were cultured for 24hr in SFM, 5 mM AAP or AAP+100 ug/ml PYP after preincubation with SFM for 24hr. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-IRS-1 antibody, and the immune complexes were then analyzed by electrophoresis and immunoblotting with anti-p85, anti-p110 or anti-IRS-1 antibody.

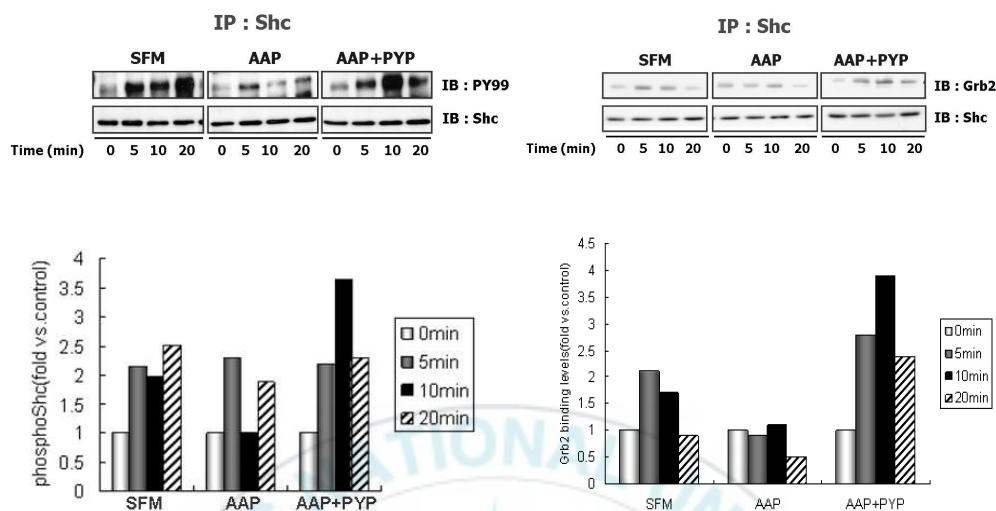


Fig. 42. Effects of AAP or AAP+PYP treatment on Shc phosphorylation and Shc/Grb2 complex formation in Chang liver cells.

Cells were cultured for 24hr in SFM, 5 mM AAP, or AAP+100 ug/ml PYP after preincubation with SFM for 24hr. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-Shc antibody, and the immune complexes were then analyzed by electrophoresis and immunoblotting with anti-phosphotyrosine, anti-Shc or anti-Grb2 antibody.

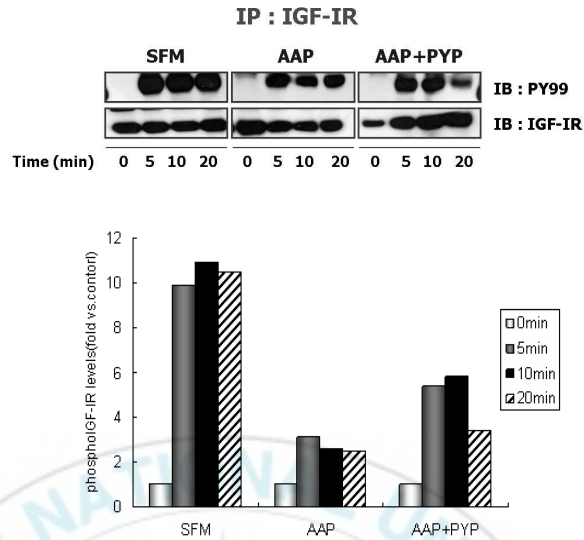


Fig. 43. Effects of AAP or AAP+PYP treatment on IGF-IR phosphorylation in HepG2 cells.

Cells were cultured for 24hr in SFM, 10 mM AAP, or AAP+100 ug/ml PYP after preincubation with SFM for 24hr. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-IGF-IR antibody, and the immune complexes were then analyzed by electrophoresis and immunoblotting with anti-phosphotyrosine, or anti-IGF-IR antibody.

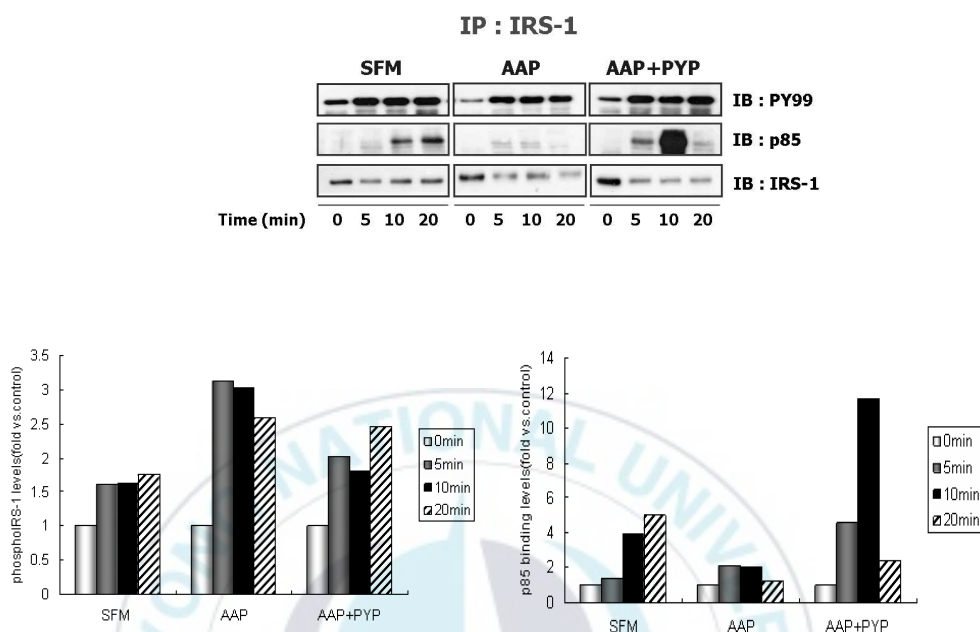


Fig. 44. *Effects of AAP or AAP+PYP treatment on IRS-1 phosphorylation and binding p85 to IRS-1 in HepG2 cells.*

Cells were cultured for 24hr in SFM, 10 mM AAP or AAP+100 ug/ml PYP after preincubation with SFM for 24 hr. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-IRS-1 antibody, and the immune complexes were then analyzed by electrophoresis and immunoblotting with anti-phosphotyrosine, anti-IRS-1 or anti-p85 antibody.

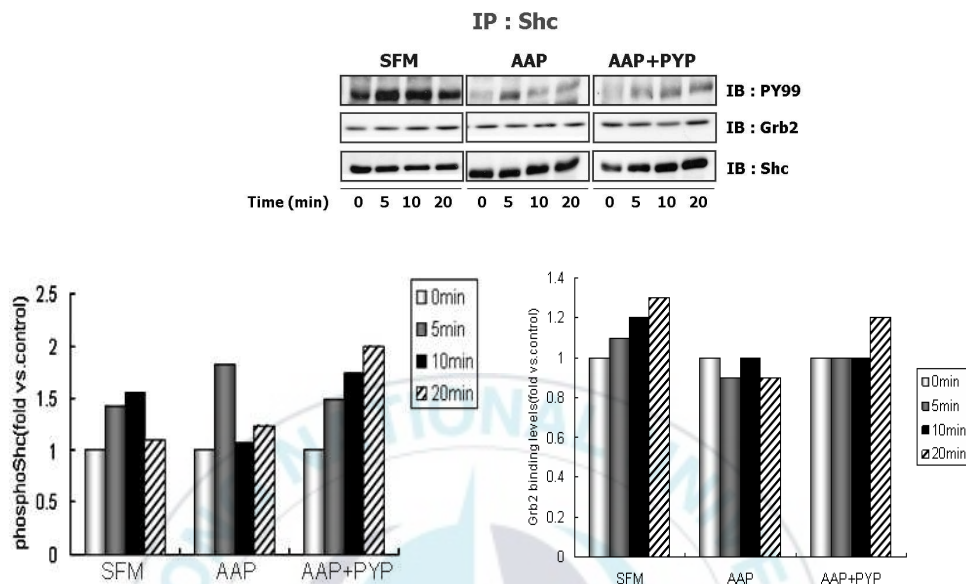


Fig. 45. Effects of AAP or AAP+PYP treatment on Shc phosphorylation and binding Grb2 to Shc in HepG2 cells. Cells were cultured for 24hr in SFM, 10 mM AAP, AAP+100 ug/ml or AAP+rapamycin PYP after preincubation with SFM for 24hr. Cell lysates were immunoprecipitated with anti-Shc antibody, and the immune complexes were then analyzed by electrophoresis and immunoblotting with anti-phosphotyrosine, anti-Grb2 or anti-Shc antibody.

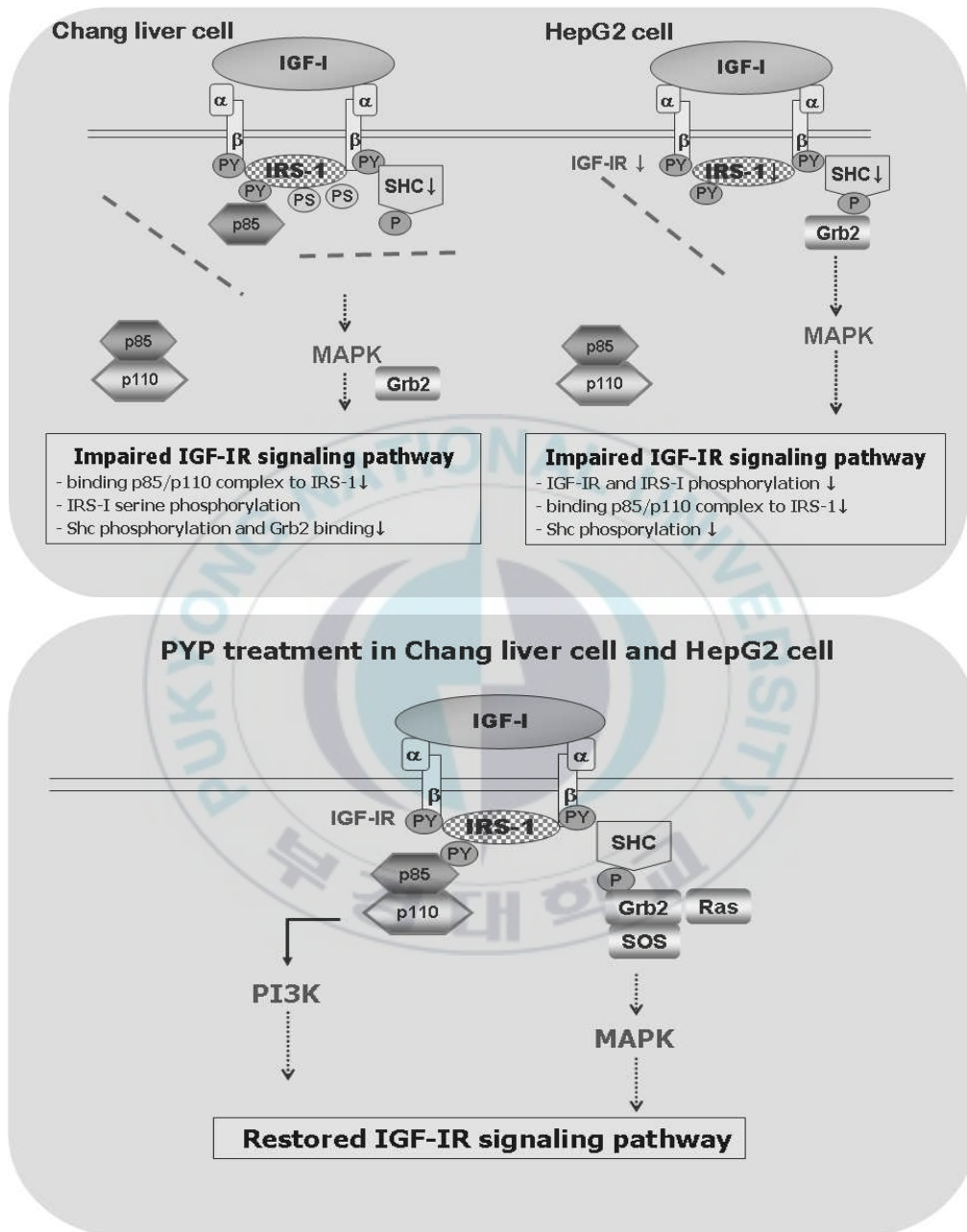


Fig. 46. The proposed model of PYP's protection mechanism on IGF-I signaling pathway in Chang liver and HepG2 cells

VI. 요약 및 결론

우리나라 해조류 중 가장 양식 생산량이 많고 식단에 자주 등장하는 김은 그 영양가치 뿐만 아니라 콜레스테롤 저하작용, 항균효과 및 항암효과 등 다양한 생리효과를 가진다는 사실이 밝혀지면서 많은 관심의 대상이 되고 있다. 김의 종류로는 참김(*Porphyra tenera*), 방사무늬 돌김(*P. yezoensis*), 둥근 돌김(*P. suborbiculata*) 등이 있으며, 그 중 우리나라에서 양식하는 김의 주종을 이루는 것이 방사무늬 돌김이다. 지금까지 연구들은 주로 김에서 추출한 포피란과 같은 다당류를 대상으로 그 생리적 효과를 관찰한 논문이 대부분이었으나, 본 연구에서는 김에서 단백질을 추출하여, 이 단백질이 약물, 특히 간독성이 강한 AAP에 대해 방어효과가 뛰어나다는 사실을 증명하고자 하였으며, 그 억제효과가 간에서 주로 생성, 분비되는 대표적인 growth factor인 IGF-I의 signaling pathway와 관련해서 그 기전을 밝히고자 하였다.

1. 간 세포 모델로 Chang liver 세포와 HepG2 세포를 이용하여 AAP의 간세포 사멸효과를 MTS assay를 통해 살펴본 결과, AAP는 두 가지 세포모두에서 농도·시간 의존적으로 세포사멸을 유도하였다.

AAP에 의한 간세포 독성은 크게 세포내 GSH 농도를 감소시켜 세포에 치명적인 산화적 손상을 일으키는 것과, AAP의 대사생성물인 NAPQI의 작용에 의해 미토콘드리아의 기능이 파괴됨으로써 일어나는 세포사멸을 들 수 있다. 그 중 미토콘드리아 기능장애에 의해 세포가 사멸하는 경로를 살펴본 결과, caspase-3 활성화와 caspase-3의 대표적인 기질인 PARP분해가 AAP 농도 의존적으로 일어나는 것으로 나타나 AAP에 의한 세포사멸유형이 apoptosis인 것으로 나타났으나, DNA 단편화 결과 necrotic pattern을 보여 최종적으로 AAP에 의한 세포사멸을 apoptosis와 necrosis의 특징을 모두 갖춘 necrapoptosis라는 결론을 내렸다. 세포주기를 관찰한 결과, Chang liver 세포에서는 10 mM AAP처리 시 4.85%에서 11.9%로, HepG2 세포에서는 20 mM AAP 처리시 9.91%에서 16.4%로 subG1기가 증가되었다. Sub-G1 peak는 DNA 단편화가 일어나서 만드는 peak이므로 이 결과는 DNA 단편화 결과와 일치하였다. 이상의 결과들로

부터 AAP에 의한 미토콘드리아기능 장애로 간세포가 손상되는 경로를 확인하였다.

2. AAP에 의한 간조직 손상의 두 번째 경로인 산화적 스트레스에 의한 손상경로를 살펴본 결과에서, Chang liver 세포에서는 GSH 농도가 AAP 농도 의존적으로 감소된 반면, HepG2 세포에서는 GSH 농도가 감소되지 않았다. 따라서 Chang liver 세포에서 AAP 처리 시 GSH 농도감소를 통한 산화적 손상경로에 의해 세포사멸이 일어나는 것으로 생각된다. 산화적 손상과 관련이 있는 것으로 밝혀진 MAPK 신호전달경로에 작용하는 세포내 단백질인 ERK, p38, JNK의 발현 정도를 살펴본 결과에서는 Chang liver 세포와 HepG2 세포에서 AAP에 의한 간세포 손상작용에 pERK가 관여한다는 사실을 확인하였다.

3. IGF system은 외부의 스트레스 혹은 질병이 발생하면 세포사멸을 억제하므로 AAP에 의한 세포손상 시 IGF-I의 방어효과를 ERK 인산화에 초점을 맞추어 살펴보았다. Chang liver 세포와 HepG2 세포 모두에서 AAP 단독처리로 ERK/2 활성화가 유도되었으며, 여기에 IGF-I을 병행 처리했을 때 ERK1/2 활성이 더욱 증가되는 것으로 나타났으며, PARP cleavage는 IGF-I 병행처리로 감소되었고, 이것은 MTS 결과와 일치하므로, IGF-I의 AAP 독성 억제 작용에 ERK 인산화가 관여한다. MEK inhibitor인 PD98059를 사용하여 GSH assay와 MTS assay를 실시한 결과, Chang liver 세포에서는 PD98059 처리시 산화적 손상은 억제되는 것으로 나타났고, 반면 HepG2 세포에서는 AAP에 의한 GSH 농도는 변화가 없었으나, IGF-I 첨가로 GSH 농도가 증가되는 것으로 나타났다. 따라서 Chang liver 세포에서는 ERK 인산화가 IGF-I의 AAP 독성 억제작용 시 GSH 농도를 변화시키는데 관여하지만, HepG2 세포의 경우 GSH 농도변화가 아닌 다른 경로에 작용하여 IGF-I의 독성 억제작용에 관여하는 것으로 판단된다. IGF-I이 그 수용체와 결합하면 다양한 신호전달과정이 일어나므로 ERK 활성화 이외에 PI3K 신호전달경로가 활성화되어 IGF-I의 억제효과를 나타낼 수도 있으며, 혹은 MAPKs 신호전달경로와 PI3K 신호전달경로가 병행하여 활성화됨으로써 억제효과를 나타내는지에

관해서는 더 많은 연구가 있어야 할 것이다.

4. 김 단백질의 AAP에 의한 간손상 저해효과를 *in vivo* 실험을 통해 살펴본 결과에서, 혈청중의 GOT/GPT, 간조직중의 caspase-3 활성 및 DNA 단편화가 AAP 투여군에서 증가되었고, 간조직중의 GSH 농도는 감소되었다. 이에 반해, 김단백질 병행 투여군에서는 AAP 투여군과는 달리 혈청중의 GOT/GPT, 간조직 중의 GSH 농도, caspase-3 활성 및 DNA 단편화 정도가 대조군 수준으로 감소되는 것으로 나타났다. 이로써 고농도의 AAP가 간 손상을 일으키며, 김단백질이 이를 예방한다는 사실을 본 연구를 통해 확인할 수 있었다. 이 결과는 해조류가 개발 가능한 고부가가치의 기능성 식품 소재임을 확인한 것이며, 어떤 메카니즘을 통해 김단백질이 AAP에 의한 간 손상을 예방하는 지에 대해 알아보기 위해 다음과 같이 세포수준에서 그 기전을 살펴보았다.

5. Chang liver 세포에서 김 단백질 처리로 AAP에 의해 감소되었던 세포 증식($37.45 \pm 1.28\%$)이 저농도(6.25 ug/ml ; $56.62 \pm 3.69\%$)에서도 증가되는 것으로 나타났으며, 최대농도 100 ug/ml 에서는 76.30 ± 2.91 로 세포증식이 크게 증가되었다. 반면, HepG2 세포에서는 고농도인 100 ug/ml 농도에서 $69.8 \pm 4.1\%$ 로 나타나, Chang liver 세포에 비해 고농도의 김단백질이 AAP의 독성을 억제시킬 수 있는 것으로 나타났다. 김단백질이 어떻게 AAP에 의한 간손상을 억제시키는지에 관해 좀 더 자세히 검토하기 위해 살펴본 세포주기 결과에서는 Chang liver 세포와 HepG2 세포 모두에서 세포주기에 영향을 주기보다는 sub-G1기에 arrest를 나타내었다. 이는 앞서 실시한 MTS결과와 유사한 경향을 나타내므로, 김단백질의 AAP 독성에 대한 억제효과를 더 확실하게 확인할 수 있었다.

6. Chang liver 세포와 HepG2 세포 모두에서 김단백질 처리로 AAP에 의해 증가되었던 caspase-3 활성을 약간씩 증가, 혹은 감소시켰으나 큰 영향을 미치지 않는 않았다. 그러나, caspase-3의 주된 기질인 PARP 분해는 대조군 수준으로 농도 의존적 감소를 나타내었으므로, PARP를 기질로 하는 세포내 다른 분해효소들의 작용을 억제시켰을 것으로 생각된다. GSH

결과에서는, AAP에 의해 감소되었던 GSH($89.42 \pm 5.4\%$)를 50 ug/ml, 100 ug/ml 농도의 김단백질 처리로 각각, $98.64 \pm 3.2\%$ 와 $134.54 \pm 7.0\%$ 로 증가되었다. 이 결과로 김단백질의 AAP 독성에 대한 억제효과의 주된 원인은 GSH 농도 증가에 있는 것으로 생각된다. Chang liver 세포와 HepG2 세포에서 AAP가 p38이나 JNK 인산화에는 영향을 주지 않았으나, AAP 처리로 ERK 인산화가 증가되었고 김 단백질 병행처리로 더욱 증가되었으므로, ERK 인산화가 산화적 손상에 의해 증가되었다가 김단백질 처리로 다시 anti-apoptotic factor로 작용함을 확인할 수 있었다.

7. 지금까지 14kDa의 김단백질이 AAP 독작용에 어떤 영향을 미치는지에 관해 그 기전을 살펴보았다. 논문의 처음 부분에 *in vivo* 실험에서 AAP에 의한 간세포 손상과 김단백질에 의한 억제를 증명하긴 하였으나, 실제로 체내에서 대사되어 간세포에 전달되기까지의 과정을 고려하여, 앞서 사용하였던 김단백질을 pepsin으로 분해하여 얻은 분해산물(hydrolysate)과 14kDa 단백질아미노산배열 분석 결과에서 가장 유력할 것으로 생각되는 구조만을 합성하여 만든 21개의 아미노산으로 구성된 peptide(pep21)를 사용하여 AAP독작용에 어떤 영향을 주는지를 MTS assay로 검토하였다. 그 결과, 분해산물이나 합성물 모두에서 AAP 독작용을 억제하는 것으로 나타났다. 분해산물이나 합성물이 어떤 메커니즘을 통해 AAP에 의한 간 손상을 억제시키는지에 관해서는 더 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

8. 이상에서 김단백질과 IGF-I이 모두 AAP 독작용을 억제시키는 것으로 나타났으므로 김단백질의 억제작용이 IGF-I signaling pathway과 어떤 관련이 있는지를 살펴본 결과에서는 본 연구에서 사용한 두가지 세포, Chang liver 세포와 HepG2 세포에서 다른 양상을 나타내었다. Chang liver 세포의 경우, AAP 처리로 IRS-1의 인산화수준이 증가함으로써 PI3K pathway를 차단하는 것으로 나타났으며, 반면 HepG2 세포의 경우는 IGF-IR 인산화부터 감소시키기 시작하여 그 하부 신호전달물질인 IRS-I의 인산화도 감소시켰으며, 결정적으로 IRS-I과 PI3K p85 regulatory subunit의 결합을 억제시킴으로써 PI3K pathway를 억제시키

는 것으로 나타났다. 또 다른 docking protein인 Shc의 인산화는, Chang liver 세포의 경우 그 인산화가 감소되면서 Shc과 Grb2와의 결합이 감소되었고, HepG2 세포에서는 Shc인산화는 감소되었으나 Grb2와의 결합에는 AAP에 의해 아무런 변화가 없는 것으로 나타났다. 김단백질은 두가지 세포에서 AAP에 의한 인산화나 결합감소를 억제시키는 것으로 나타났다. 따라서 김단백질이 AAP에 의한 IGF-I signaling pathway손상을 다시 복구시킴으로써 AAP에 의한 세포독성을 억제시킨다고 생각된다.



V. 참 고 문 헌

- Adams, M. L., Pierce, R. H., Vail, M. E., White, C. C., Tonge, R. P., Kavanagh, T. J., Fausto, N., Nelson, S. D. and Bruschi, S. A. (2001) Enhanced acetaminophen hepatotoxicity in transgenic mice overexpressing Bcl-2. *Mol. Pharmacol.* 60, 907-915.
- Alessi, D. R., Andjelkovic, M., Caudwell, B., Cron, P., Morrice, N., Cohen, P., and Hemmings, B. (1996) Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-I. *EMBO J.* 15, 6541-6551.
- Alexia, C., Fallot G., Lasfer M., Schweizer-Groyer G and Groyer (2004) An evaluation of the role of insulin-like growth factors (IGF) and of type-I IGF receptor signaling hepatocarcinogenesis and in the resistance of hepatocarcinoma cells against drug-induced apoptosis. *Biochemical Pharmacology* 68, 1003-1015.
- Andjelkovic, M., Jakubowicz, T., Cron, P., Ming, X-F., Han, J-W., and Hemmings, B. (1996) Activation and phosphorylation of a pleckstrin homology domain containing protein kinase (RAC-PK/PKB) promoted by serum and protein phosphatase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5699-5704.
- Aronheim, A., Engelberg, D., Li, N., Al-Alwi, N., Schlessinger, J., Karin, M. (1994) Membrane targeting of the nucleotide exchange factor Sos is sufficient for activating the Ras signaling pathway. *Cell* 78, 949-961.
- Bajt, M. L., Knight, T. R., and Jaeschke, H. (2003) Scavenging peroxynitrite with glutathione enhances survival and promotes regeneration after acetaminophen overdose in mice : role of IL-6. *Toxicol. Sci.* 72 (Suppl. 1), 197.
- Bajt, M. L., Lawson, J. A., Vonderfecht, S. L., Gujral, J. S., and Jaeschke, H. (2000) Protection against Fas receptor-mediated apoptosis in hepatocytes and nonparenchymal cells by a caspase-8 inhibitor *in vivo* : evidence for post-mitochondrial processing of caspase-8. *Toxicol. Sci.* 58, 109-117.
- Bandyopadhyay, G. K., Yu, J. G., Ofrecio, J., Olefsky, J. M. (2005) Increased p85/55/50 expression and decreased phosphatidylinositol 3-kinase activity in insulin-resistant human skeletal

- muscle. *Diabetes* 54, 2351-2359.
- Baserga, R., Hongo, A., Rubini, M., Prisco, M., and Valentinis, B. (1997) The IGF- I receptor in cell growth, transformation and apoptosis. *Biochem. Biophys. Acta.* 1332, F105-126.
- Benner, E., Bishop, M. R., Agarwal, N., Iversen, P., Joshe, S. S. (1997) Combination of antisense oligonucleotide and low-dose chemotherapy in hematological malignancies. *J. Pharm. Tox. Methods* 37, 229-235.
- Bhat, N. R. and Zhang P. (1999) Hydrogen peroxide activation of multiple mitogen-activated protein kinases in an oligodendrocyte cell line : role of extracellular signal-regulated kinase in hydrogen peroxide-induced cell death. *J. Neurochem.* 72 : 112-119.
- Burgering, B. M., and Coffey, P. J. (1995) Protein kinase B (c-Act) in phosphatidylinositol-3-OH kinase signal transduction. *Nature* 376, 599-602.
- Campbell, R. A., Bhat-Nakshatri, P., Patel, N. M., Constantiniou, D., Ali, S., and Nakshatri, H. (2001) Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT-mediated activation of estrogen receptor alpha : a new model for anti-estrogen resistance. *J. Biol. Chem.* 276, 9817-9824.
- Cathleen C., Peter F., Tamara R., Knight, Andrea F., Anwar F., Michael T., and Hartmut J. 2005. Pathophysiological role of poly (ADP-Ribose) polymerase (PARP) activation during acetaminophen-induced liver cell necrosis in mice. *Toxicological Sciences* 84, 201-208.
- Centrella, M., McCarthy, T. L., and Canalis, E. (1990) Receptors for insulin-like growth factor-I and -II in osteoblast-enriched cultures from fetal rat bone. *Endocrinology* 126, 39-44.
- Cheng, J. Q., Altomare, D. A., Klein, M. A., Lee, W. C., Lissy, N. A., and Testa, J. R. (1997) Transforming activity and mitosis-related expression of the AKT2 oncogene : evidence suggesting a link between cell cycle regulation and oncogenesis. *Oncogene* 14, 2793-2801.
- Cho, J. H., Sin, J. S., Kim, E. J., Shin, S. H., Jang, J. Y., Shin, K. S., Kim, Y. B., Kang, J. K., and Hwang, S. Y. (2004) Protective effect of *Lycii fructus* extract against hepatotoxicity induced by carbon tetrachloride. *The Korean Journal of Laboratory Animal*

- Science* 20, 187-193.
- Cho, K. J., Lee, Y. S., and Ryu, B. H. (1990) Anti-tumor effect and immunological activity of seaweeds toward sarcoma-180. *Bull. Korean Fish Soc.* 23, 345-352.
- Cho, Y. J., Kim, H. A., Bang, M. A., Oh, Y. B., Jeong, B. H., Moon, Y. H., and Jeong, W. J. (2003) Protective effect of purple sweet potato (*Ipomoea batatas*) on hepatotoxicity rats induced by carbon tetrachloride. *Korean J. Food Culture* 18, 202-210.
- 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.
- Chung, H. S., Park, S. R., Choi, E. K., Park, H. J., Griffin, R. J., Song, C. W., and Park, H. (2003) Role of sphingomyelin-MAPKs pathway in heat-induced apoptosis. *Exp. Mol. Med.* 35, 181-188.
- Chung, S. R., So, M. S., and Jeune, K. H. (1991) Studies on bioactive marine natural substance, lectins. Marine animal lectins (XII). Invited lecture of international congress of new drug development, *Pharm. Soc. Kor.* 345.
- Clark, A. S., West, K., Streicher, S., and Dennis, P. A. (2002) Constitutive and inducible Akt activity promotes resistance to chemotherapy, trastuzumab, or tamoxifen in breast cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 1, 707-717.
- Cohen, G. M. (1997) Caspase : The executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 326, 1-6.
- Cohen, S. D., and Khairallah, E. A. (1997) Selective protein arylation and acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab. Rev.* 29, 59-77.
- Cover, C., Fickert, P., Knight, T. R., Fuchsbichler, A., Farhood, A., Trauner, M., and Jaeschke, H. (2005) Pathophysiological role of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) activation during acetaminophen-induced liver cell necrosis in mice. *Toxicol. Sci.* 84, 201-208.
- Dews, M., Prisco, M., Peruzzi, F., Romano, G., Morrione, A., and Baserga, R. (2000) Domains of the insulin-like growth factor I receptor required for the activation of extracellular signal-regulated kinases. *Endocrinology* 141, 1289-1300.

- Downward, J. (1994) The GRB2/Sem-5 adaptor protein. *FEBS Letters* 338, 113-117.
- Du, K., and Tsichlis, P. N. (2005) Regulation of the Akt kinase by interacting proteins. *Oncogene* 24, 7401-7409.
- Eck, M.J., Paganon, S.D., Trub, T., Nolte, R.T., Shoelson, S.E. (1996) Structure of the IRS-1 PTB domain bound to the juxtamembrane region of the insulin receptor. *Cell* 85, 695-705.
- El Hassan H., Anwar K., Macanas-Pirard P., Crabtree M., Chow S.C., Johnson V. L. (2003) Involvement of mitochondria in acetaminophen-induced apoptosis and hepatic injury : roles of cytochrome c, Bax, Bid, and caspases. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 191, 118-129.
- Ferret, P. J., Hammoud, R., Tulliez, M., Tran, A., Trebeden, H., Jaffray, P., Malassagene, B., Calmus, Y., Weill, B., and Batteux, F. (2001) Detoxification of reactive oxygen species by a nonpeptidyl mimic of superoxide dismutases cures acetaminophen-induced acute liver failure in the mouse. *Hepatology* 33, 1173-1180.
- Fleming, J. M., Desury, G., Polanco, T. A., and Cohick, W. S. (2006) IGF-I and epidermal growth factor receptors recruit distinct upstream signaling molecules to enhance AKT activation in mammary epithelial cells. *Endocrinology* 147, 6027-6035.
- Francavilla A., Azzarone, A., Carrieri, G., Cillo, U., Thiel, D. V., Subbottin, V., Starzl, T. E. (1993) Administration of Hepatic stimulatory substance alone or with other liver growth factors does not ameliorate acetaminophen-induced liver failure. *Hepatology* 17, 429-433.
- Francisco A. O., Mariana H. C., Fernanda R. C. A., Roberto C. P. L., Regilane M. S., Juliana L. M., Gerly A., Flavia A. S., Vietla S. R. 2005. Protective effect of α - and β -amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 98, 103-108.
- Franke, T., Yang, S., Chan, T. O., Datta, K., Kazlauskas, A., Morrison, D. K., Kaplan, D. R., and Tsichlis, P. N. (1995) The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* 81, 727-736.
- Fruman, D. A., Meyers, R. E., Cantley, L. C. (1998) Phosphoinositide

- kinases. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 481-507.
- Furlanetto, R. W., DiCarlo, J. N., and Wisehart. (1987) The type II insulin-like growth receptor does not mediate deoxyribonucleic acid synthesis in human fibroblasts. *J. Clin. Endocrin. Metabol.* 64, 1142-1149.
- Gao, Z., Zhang, X., Zuberi, A., Hwang, D., Quon, M. J., Lefevre, M., Ye, J. (2004) Inhibition of insulin sensitivity by free fatty acids requires activation of multiple serine kinases in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Endocrinol* 18, 2024-2034.
- Gardner, C. R., Heck, D. E., Yang, C. S., Thomas, P. E., Zhang, X. J., DeGeorge G. L., Laskin, J. D., and Laskin, D. L. (1998) Role of nitric oxide in acetaminophen-induced hepatotoxicity in the rat. *Hepatology* 26, 748-754.
- Greene, M.W., Ruhoff, M.S., Roth, R.A., Kim, J.A., Quon, M.J., Krause, J.A. (2006) PKC δ -mediated IRS-1 Ser24 phosphorylation negatively regulates IRS-1 function. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 349, 976-986.
- Gujral, J. S., Bucci, T. J., Farhood, A., and Jaeschke, H. (2001) Mechanism of cell death during hepatic ischemia-reperfusion in rats : Apoptosis or necrosis? *Hepatology* 33, 397-405.
- Gujral, J. S., Knight, T. R., Farhood, A., Bajt, M. L., and Jaeschke, H. (2002) Mode of cell death after acetaminophen overdose in mice : apoptosis or oncotic necrosis? *Toxicol. Sci.* 67, 322-328.
- Han, H. S., Bae, S. J., Kim, M. H. (2004) Effects of *Porphra tenera* extracts on formation of collagen cross-link in ovariectomized rats. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 33, 324-330.
- Hartmut, J., Tamara, R. K., and Mary, L. B. (2003) The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicology Letters* 144, 279-288.
- Hemmings, B. A. (1997) PtdIns (3,4,5)P3 gets its message across. *Science* 275, 628-630.
- Heo, S. J., and Jeon, Y. J. (2005) Antioxidant effect and protecting effect against cell damage by enzymatic hydrolysates from marine algae. *Food Industry and Nutrition* 10, 31-41.
- Hinson, J. A., Pike, S. L., Pumford, N. R., and Mayeux, P. R. (1998) Nitrotyrosine-protein adducts in hepatic centrilobular areas following toxic doses of acetaminophen in mice. *Chem. Res. Toxicol.* 11, 604-607.

- Hirosumi, J., Tuncman, G., Chang, L., Gorzun, C. Z., Uysal, K. T., Maeda, K., Karin, M., Hotamisligil, G. S. (2002) A central role for JNK in obesity and insulin resistance. *Nature* 420, 333-336.
- Hong, S. P., Koo, J. K., Jo, K. S., and Kim, D. S. (1997) Physicochemical characteristics of water of alcohol soluble extracts from laver, *Porphyra yezoensis*. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 26, 10-16.
- Jaeschke, H. (1990) Glutathione disulfide formation and oxidant stress during acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice *in vivo* : the protective effect of allopurinol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 255, 935-941.
- Jaeschke, H., Farhood, A., Smith, C. W. (1990) Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver *in vivo*. *FASEB J.* 4, 3355-3359.
- Jaeschke, H., Knight, T. R., and Bajt, M. L. (2003) The role of oxidant stress and reactive nitrogen species in acetaminophen hepatotoxicity. *Toxicol. Letters.* (2003) 279-288.
- Jaeschke, H., Mitchell, J. R. (1989) Mitochondria and xanthine oxidase both generate reactive oxygen species after hypoxic damage in isolated perfused rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 160, 140-147.
- Jang, J. H., and Surh, Y. J. (2002) Beta-amyloid induces oxidative DNA damage and cell death through activation of c-Jun N terminal kinase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 973, 228-236.
- Jeong, C. S., and Jung, K. H. (2002) Protective effects of *Angelica tenuissima* nakai on hepatotoxicity by carbon tetrachloride in rats. *The J. Applied Pharmacology* 10, 211-217.
- Johnston, J. A., Wang, L. M., Hanson, E. P., Sun, X. J., White, M. F., Oakes, S. A., Pierce, J. H., and O'Shea, J. J. (1995) Interleukins 2,4,7, and 15 stimulate tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrates 1 and 2 in T cells. Potential role of JAK kinases. *J. Biol. Chem.* 270, 28527-28530.
- Jones, J. I., and Clemmons, D. R. (1995) Insulin-like growth receptor and their binding proteins : biological actions. *Endocrine Rev.* 16, 3-34.
- Jordan, N. J. Gee, J. M., Barrow, D., Wakeling, A. E., Nicholson, R. I. (2004) Increased constitutive activity of PKB/Akt in tamoxifen resistant breast cancer MCF-7 cells. *Breast Cancer Res. Treat.*

87, 167-180.

- Jorissen, R. N., Walker, F., Pouliot, N., Garrett, T. P., Ward, C. W., and Burgess, A. W. (2003) Epidermal growth factor receptor : mechanisms of activation and signaling. *Exp. Cell Res.* 284, 31-53.
- Kang, S. H., Song, J. H., Kang, H. K., Kang, J. H., Kim, S. J. Kang, H. W., Lee, Y. K., and Park, D. B. (2003) Arsenic trioxide-induced apoptosis is independent of stress-responsive signaling pathways but sensitive to inhibition of inducible nitric oxide synthase in HepG2 cells. *Exp. Mol. Med.* 35, 83-90.
- Kanno, S., Ishikawa, M., Takayanagi, M., Takayanagi, Y., and Sasaki, K. (2000) Potentiation of acetaminophen hepatotoxicity by doxapram in mouse primary cultured hepatocytes. *Biol. Pharm. Bull.* 23, 446-550.
- Kato, H., Faria, T. N., Stannard, B., Roberts, C. T. Jr, and LeRoith, D. (1994) Essential role of tyrosine residues 1131, 1135, and 1136 of the insulin-like growth factor- I (IGF- I) receptor in IGF- I action. *Mol. Endocrinol.* 8, 40-50.
- Kauppinen, T. M., Chan, W. Y., Suh, S. W., Wiggins, A. K., Huang, E. J., and Swanson, R. A. (2006) Direct phosphorylation and regulation of poly (ADP-ribose) polymerase-1 by extracellular signal-regulation kinases 1/2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 7193-7141.
- Kayama M., Imayoshi J., Araki S., Ogawa H., Cofusa T., Ueno T., Saito M., 1983. Changes in the lipids of dried laver "Nori" at different water activities. *Nippon Suisan Gakkaishi* 49, 787-793.
- Khandwala, H. M., McCutcheon, I. E., Flyvbjerg, A., and Friend, K. E. (2000) The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth. *Endocr. Rev.* 21, 215-244.
- Kim, D. S., Lee, D. S., Cho, D. M., Kim, H. R., and Pyeun, J. H. (1999) Trace components and functional saccharides in marine algae 2. dietary fiber contents and distribution of the algal polysaccharides. *Bull. Korean Fish Soc.* 28, 270-278.
- Kim, H. K., Jeong, M. J., Kong, M. Y., Han, M. Y., Son, K. H., Kim, H. M., Hong, S. H., Kwon, B. M. (2005) Inhibition of Shc/Grb2 protein-protein interaction suppresses growth of B104-1-1 tumors xenografted in nude mice. *Life Science* 78, 321-328.
- Kim, O. K. (2002) Protective effects of *Houttuynia cordata* thunb on

- carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. *Kor. J. Pharmacogn.* 33, 324-331.
- Kim, O. K. (2003) Protective effects of *Alnus japonica* steude on hepatic injury induced by carbon tetrachloride in rats. *Kor. J. Pharmacogn.* 34, 172-178.
- Kim, S. A., Kim, J., Woo, M. K., Kwak, C. S., and Lee, M. S. (2005) Antimutagenic and cytotoxic effects of ethanol extracts from five kinds of seaweeds. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 34, 451-459.
- Klippel, A., Reinhard, C., Kavanaugh, W. M., Apell, G., Escobedo, M. A., and Williams, L. T. (1996) Membrane localization of phosphatidylinositol 3-kinase is sufficient to activate multiple signal-transducing kinase pathways. *Mol. Cell. Biol.* 16, 4117-4127.
- Knight, T. R., Kurtz, A., Bajt, M. L., Hinson, J. A., and Jaeschke, H. (2001b) Vascular and hepatocellular peroxynitrite formation during acetaminophen toxicity : Role of mitochondrial oxidant stress. *Toxicol. Sci.* 62, 212-220.
- Knight, T. R., Ho, Y. S., Farhood, A., and Jaeschke, H. (2002) Peroxynitrite is a critical mediator of acetaminophen hepatotoxicity in murine livers : protection by glutathione. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303, 468-475.
- Kolch, W. (2005) Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 827-837.
- Konishi, H., Matsuzaki, H., Tanaka, M., Ono, Y., Tokunaga, C., Kuroda, S., Kikkawa, U., and Andjekovic, M. (1996) Activation of RAC-protein kinase by heat shock and hyperosmolarity stress through a pathway independent of phosphatidylinositol 3-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 7639-7643.
- Kon K., Kim J.S., Jaeschke H., Lemasters J.J. (2004) Mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced necrosis and poptosis of cultured mouse hepatocytes. *Hepatology* 40, 1170-1179.
- Koo, J. G., Chang, S. H., Kim, J. B., and Cho, K. S. (1997) Chemical characteristics of fucoidan extracted from the Korean brown seaweed. *Food Sci. Indust.* 30, 157-163.
- Koo, J. K., Jo, K. S., Do, J. R., Park, J. H., and Yang, C. B. (1995) Chemical properties of fucoidans from *Hizikia fusiformis* and

- Sargassum fulvellum*. *Bull. Korean Fish Soc.* 28, 659-666.
- Krasilnikov, M. A. (2000) Phosphatidylinositol-3 kinase dependent pathways : the role in control of cell growth, survival, and malignant transformation. *Biochemistry* 65, 59-67.
- Kucab, J. E., Lee, C., Chen, C. S., Zhu, J., Gilks, C. B., Cheang, M., Huntsman, D., Yorida, E., Emerman, J., Pollak, M., and Dunn, S. E. (2005) Celecoxib analogues disrupt Akt signaling, which is commonly activated in primary breast tumors. *Breast Cancer Res.* 7, R796-807.
- 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., and Avruch, J. (2001) Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol. Rev.* 81, 807-869.
- Lawson, J. A., Fisher, M. A., Simmons, C. A., Farhood, A., and Jaeschke, H. (1999) Inhibition of Fas receptor (CD95)-induced hepatic caspase activation and apoptosis by acetaminophen in mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 156, 179-186.
- Lee, B. H., and Choi, B. W. (1996) Extraction of water soluble antioxidants from seaweeds. *J. Korean Ind. & Eng. Chemistry* 7, 1069-1077.
- Lee, N. H., and Oh, K.I. (2002) Screening of radical scavenging effects from marine algae. *J. Life Science* 3, 95-101.
- Lee, W. M. (2004) Acetaminophen and the U.S. Acute Liver Failure Study group : Lowering the risks of hepatic failure. *Hepatology* 40, 6-9.
- Lee, E. K., Jung, K. H., and Jeong, C. S. (1998) Effect of calcium channel blocker on acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats and histopathologic examination. *J. Fd Hyg. Safety* 13, 258-267.
- Lee, Y. S., Kim, D. S., Ryu, B. H., and Lee, S. H. (1992) Antitumor and immunomodulating effects of seaweeds toward sarcoma-180 cell. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 21, 544-550.
- LeRoith, D., Werner, D., Beitner-Johnson, D., and Roberts, C. T. Jr. (1995) Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor-I receptor. *Endocrine Rev.* 16, 143-163.
- Lesuisse C and Martin LJ(2002) Immature and mature cortical neurons

- engage different apoptotic mechanisms involving caspase-3 and the mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 22, 935-950.
- Li, X., Li, Y., Jeong, J. H., Lee, K. T., Choi, H. D., and Son, B. W. (2003) Screening of tyrosinase inhibiting activity from the marine-derived fungus. *Kor. J. Pharmacogn.* 34, 138-141.
- 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.
- Luo, R. Z., Beniac, D. R., Fernandes, A., Yip, C. C., and Ottensmeyer, F. P. (1999) Quaternary structure factors activate estrogen receptor to control the growth and differentiation in unloaded rats. *Endocrinology* 134, 1031-1038.
- Masubuchi Y., Suda C., Horie T. (2005) Involvement of mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced liver injury in mice. *J. Hepatol.* 42, 110-116.
- Mates, J. M., and Sanchez-Jimenez, F. M. (2000) Role of reactive oxygen species in apoptosis : implications for cancer therapy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 32, 157-170.
- Matosuo M., Takano, R., Kamei-Hayashi, K., Hara, S. (1993) A novel regioselective desulfation of polysaccharide sulfates. *Carbohydrate Research* 241, 209-215.
- Matuoka, K., Shibata, M., Yamakawa, A., Takenawa, T. (1992) Cloning of ASH, a ubiquitous protein composed of one Src homology region (SH) 2 and two SH3 domains, from human and rat cDNA libraries. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89, 9015-9019.
- McCathy, T. L., Centrella, M., and Canalis, E. (1992) Constitutive synthesis of insulin-like growth factor-II by primary osteoblast enriched cultures fetal rat calvariae. *Endocrinology* 130, 1303-1308.
- Mitchell, J. R., Jollow, D. J., Potter, W. Z., Gillete, J. R., and Brodie, B.B. (1973) Acetaminophen-induced hepatic necrosis. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 187, 211-217.
- Mitchell, J. R., Jollow, D. J., Potter, W. Z., Davis, D. C., Gillette, J. R., and Brodie, B. B. (1973) Acetaminophen-induced hepatic

- necrosis. I. Role of drug metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 187, 185-194.
- Morrice L.M., MacLean, M.W., Long, W.F., Williamson, F.B., 1983. Porphyrin primary structure. *European Journal of Biochemistry* 133, 673-684.
- Mottola, C., Czech, M.P. (1984) The type II insulin-like growth receptor does not mediate increased DNA synthesis in H-35 hepatoma cell. *J. Biol. Chem.* 259, 12705-12713.
- Myers, T. G., Dietz, E. C., Anderson, N. L., Khairallah, E. A., Cohen, S. D., and Nelson, S. D. (1995) A comparative study of mouse liver proteins arylated by reactive metabolites of acetaminophen and its nonhepatotoxic regioisomer, 3'-hydroxyacetanilide. *Chem. Res. Toxicol.* 8, 403-413.
- Nair, V. D., Yuen, T., Olanow, C. W., and Sealfon, S. C. (2004) Early single cell bifurcation of pro- and antiapoptotic states during oxidative stress. *J. Biol. Chem.* 279, 27494-27501.
- Nelson, S. D. (1990) Molecular mechanisms of the hepatotoxicity caused by acetaminophen. *Semin. Liver Dis.* 10, 267-278.
- Nguyen M. T. A., Satoh, H., Favelyukis, S., Babendure, J. L., Imamura, T., Sbodio, J. I., Zalevsky, J., Dahiyat, B., Chi, N-W., Olefsky, J. M. (2005) JNK and tumor necrosis factor mediate free fatty acid-induced insulin resistance in 3T3-L1 adipocyte. *J. Biol. Chem.* 280, 35361-35371.
- Nishino, T., Aizu, Y., and Nagumo, T. (1991) Antithrombin activity of a fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia Kurome*. *Thromb. Res.* 62, 765-773.
- Ogawa, W., Matozaki, T. Kasuga, M. (1998) Role of binding proteins to IRS-1 in insulin signaling. *Mol. Cell Biochem.* 182, 13-22.
- Pavlovic D., Anderson N.A., Mandrup-Poulsen T. and Eizirik D.L. (2000) Activation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 contributes to cytokine-induced apoptosis in purified rat pancreatic β -cells. *Eur. Cytokine. Netw.* 11, 267-274.
- Pawson, T., Gish, G. D. (1992) SH2 and SH3 domain : from structure to function. *Cell* 71, 359-362.
- Pellicci, G., Lanfrancone, L., Grignani, F., McGlade, J., Cavallo, F., Forni, G., Nicoletti, I., Pawson, T., Pellicci, P. G. (1992) A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated

- in mitogenic signal transduction. *Cell* 70, 93-104.
- Platanias, L. C., Uddin, S., Yetter, A., Sun, X. J., and White, M. F. (1996) The type I interferon receptor mediates tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate 2. *J. Biol. Chem.* 271, 278-282.
- Pumford, N. R., Halmes, N. C., and Hison, J. A. (1997) Covalent binding of xenobiotics to specific proteins in the liver. *Drug Metab. Rev.* 29, 39-57.
- Qiu, Y., Benet, L. Z., and Burlingame, A. L. (1998) Identification of the hepatic protein targets of reactive metabolites of acetaminophen *in vivo* in mice using two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. *J. Biol. Chem.* 273, 17940-17953.
- Rao, A.K., Kuszynski, C.A., Benner, E., Bishop, M.R., Jackson, J.D., Iversen, P.L., Joshi, S.S. (1997) Increased growth inhibition of human chronic myelogenous leukemic cells by a combination of c-myc antisense oligonucleotide and 4-hydroxyperoxycyclophosphamide *in vitro*. *Int. J. Oncol.* 11, 281-287.
- Ray, S. D., and Jena, N. (2000) A hepatotoxic dose of acetaminophen modulates expression of BCL-2, BCL-X(L), BCL-X(S) during apoptotic and necrotic death of mouse liver cells *in vivo*. *Arch. Toxicol.* 73, 594-606.
- Ray, S. D., Kamendulis, L. M., Gurule, M. W., Yorkin, R. D., and Corcoran, G. B. (1993) Ca^{2+} antagonists inhibit DNA fragmentation and toxic cell death induced by acetaminophen. *FASEB J.* 7, 453-463.
- Ray, S. D., Mumaw, V. R., Raje, R. R., and Fariss, M. W. (1996) Protection of acetaminophen-induced hepatocellular apoptosis and necrosis by cholesteryl hemsuccinate pretreatment. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 279, 1470-1483.
- Ray, S. D., Kumar, M. A., and Bagchi, D. (1999) A novel poocanthocyanidin IH636 garpe seed extract increases *in vivo* Bcl-XL expression and prevents acetaminophen-induced programmed and unprogrammed cell death in mouse liver. *Arch. Biochem. Biophys.* 369, 42-58.
- Rosfjord, E. C., and Dickson, R. B. (1999) Growth factors, apoptosis, and survival of mammary epithelial cells. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 4, 229-237.
- Rozakis-Adcock, M., McGlade, J., Mbanalu, G., Pelicci, G., Daly, R., Li,

- W., Batzer, A., Thomas, S., Brugge, J., Pelicci, P. G., Schlessinger, J., Pawson, T. (1992) Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases. *Nature* 360, 689-692.
- Ruppova, K., Wsolova, L., Sedlak, J., Horvathova, M., and Urbancikova, M. (1999) Detection of apoptotic changes in HeLa cells after treatment with paracetamol and sodium fluoride. *Gen. Physiol. Biophys.* 18, 140-146.
- Sakon, S., Xue, X., Takekawa, M., Sasazuki, T., Okazaki, T., Kojima, Y., Piao, J. H., Yagita, H., Lkumura, K., Doi, T., and Nakano, H. (2003) NF-kappa B inhibits TNS-induced accumulation of ROS that mediate prolonged MAPK activation and necrotic cell death. *EMBO J.* 22, 3898-399.
- Sano, M., Fukuda, K., Sato, T., Kawaguchi, H., Suematsu, M., Matsuda, S., Koyasu, S., Matsui, H., Yamauchi-Takahara, K., Harada, M., Saito, Y., and Ogawa, S. (2001) ERK and p38 MAPK, but not NF-kappaB, are critically involved in reactive oxygen species-mediated induction of IL-6 by angiotensin II in cardiac fibroblasts. *Circ. Res.* 89, 661-669.
- Shea, T. C. (1999) Current issues in high dose chemotherapy and stem cell support. *Bone Marrow Transplant* 23, 1-5.
- Shen, H., Yang, C., Ding, W., Liu, J., and Ong, C. (2001) Superoxide radical-initiated apoptotic signalling pathway in selenite-treated HepG2 cell : Mitochondria serve as the main target. *Free Radical Biology and Medicine* 30, 9-21.
- Shen, W., Kamendulis, L. M., Ray, S. D., and Corcoran, G. B. (1991) Acetaminophen-induced cytotoxicity in cultured mouse hepatocytes : Correlation of nuclear Ca^{2+} accumulation and early DNA fragmentation with cell death. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 111, 242-254.
- Shtil, A. A., Mandlekar, S., Yu, R., Walter, R. J., Hagen, K., Tan, T. H., Roninson, I. B., Kong, A. N. (1999) Differential regulation of mitogen-activated protein kinases by microtubule-binding agents in human breast cancer cells. *Oncogene* 18, 377-384.
- Sidhartha D.R., M. Arun K., and D. Bagchi. (1999) A novel proanthocyanidin IH636 grape seed extract increases in vivo Bcl-xL expression and prevents acetaminophen-induced programmed and unprogrammed cell death in mouse liver.

Archives of Biochemistry and Biophysics 369, 42–58.

- Sinha M., Bannergjee S., Schwartz J.H., Lieberthal W. and Levine J.S.(2004) Inhibition of ligand-independent ERK1/2 activity in kidney proximal tubular cells deprived of soluble survival factors up-regulates Akt and prevents apoptosis. *J. Biol. Chem.* 279, 10962–10972.
- Sivaprasad, U., Fleming, J., Verma, P. S., Hogan, K. A., Desury, G., and Cohick, W. S. (2004) Stimulation of insulin-like growth factor (IGF) binding protein-3 synthesis by IGF- I and transforming growth factor-alpha is mediated by both phosphatidylinositol-3 kinase and mitogen-activated protein kinase pathways in mammary epithelial cells. *Endocrinology* 145, 4213–4221.
- Songyang, Z., Shoelson, S. E., McGlade, J., Olivier, P., Pawson, T., Bustelo, X. R., Barbacid, M., Sabe, H., Hanafusa, H., Yi, T., Ren, R., Baltimore, D., Ratnofsky, S., Feldman, R. A., Cantley, L. C. (1994) Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, GRB-2, HCP, SHC, Syk, and Vav. *Molecular and Cell Biology* 14, 2777–2785.
- Steele-Perkins, G., and Roth, R. A. (1990) Monoclonal antibody α -IR-3 inhibits the ability of insulin-like growth receptor II to stimulate a signal from the type I receptor without inhibiting its binding. *Biochem. Biophysic. Res. Commun.* 171, 1244–1251.
- Strange, K. S., Willinson, D., Edin, G., and Emerman, J. T. (2004) Mitogenic properties of insulin-like growth factors I and II, insulin-like growth factor binding protein-3 and epidermal growth factor on human breast stromal cells in primary culture. *Breast Cancer Res. Treat.* 84, 77–84.
- Strange, K. S., Wilkinson, D., and Emerman, J. T. (2002) Mitogenic properties of insulin-like growth factors I and II, insulin-like growth factor binding protein-3 and epidermal growth factor on human breast epithelial cells in primary culture. *Breast Cancer Res. Treat.* 75, 203–212.
- Stull, M. A., Richert, M. M., Loladze, A. V., and Wood, T. L. (2002) Requirement for IGF- I in epidermal growth factor-mediated cell cycle progression of mammary epithelial cells. *Endocrinology* 143, 1872–1879.
- Takashi, N., and Terukazu, N. (1991) The sulfate-content dependence

- of the anticoagulant activity of a fucan sulfate from the brown seaweed *Ecklonia Kurome*. *Carbohydr. Res.* 214, 193-197.
- Tamara R. K., Marc W. F., Anwar F., and Hartmut J. 2003. Role of lipid peroxidation as a mechanism of liver injury after acetaminophen overdose in mice. *Toxicological Science* 76, 229-236.
- Thomas, S. H. L. (1993) Paracetamol (acetaminophen) poisoning. *Pharmacol. Ther.* 60, 91-120.
- Torres, A. M., Forbes, B. E., Aplin, S. E., Wallace, J. C., Francis, G. L., and Norton, R. S. (1995) Solution structure of human insulin-like growth factor II. Relationship to receptor and binding protein interactions. *J. Mol. Biol.* 248, 385-401.
- Ullrich, A., and Schlessinger, J. (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinases activity. *Cell* 61, 203-212.
- Valentovic, M., Terneus, M., Harmon, R. C., and Carpenter, A. B. (2004) *S*-Adenosylmethionine (SAdMe) attenuates acetaminophen hepatotoxicity in C57BL/6 mice. *Toxicology Letters* 154, 165-174.
- Vincent, A. M. and Foldman, E. L. (2002) Control of cell survival by IGF signaling pathways. *Growth Horm. IGF Res.* 12, 193-197.
- Wang, L. M., Michieli, P., Lie, W. R., Liu, F., Lee, C. C., Minty, A., Sun, X. J., Levine, A., White, M. F., and Pierce, J. H. (1995) The insulin receptor substrate-1-related 4PS substrate but not the interleukin-2R gamma chain is involved in interleukin-13-mediated signal transduction. *Blood* 86, 4218-4227.
- Wang X., Martindale J. L. and Holbrook N. J. (2000) Requirement for ERK activation in cisplatin-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* 275, 39435-39443.
- White, M. F. (1998) The IRS-signalling system : a network of docking proteins that mediate insulin action. *Mol. Cell Biochem.* 182, 3-11.
- White, M. F. (1998) The IRS-signalling system : a network of docking proteins that mediate insulin and cytokine action. *Recent Prog. Horm. Res.* 53, 119-138.
- White, M. F., and Kahn, C. R. (1994) The insulin signaling system. *J. Biol. Chem.* 269, 1-4.
- Whitehead, J. P., Clark, S. F., Urso, B., and James, D. E. (2000)

- Signaling through the insulin receptor. *Opin. Cell Biol.* 12, 222-228.
- Wiger, R., Finstad, H. S., Hongslo, J. K., Haug, K., and Holme, J. A. (1997) Paracetamol inhibits cell cycling and induces apoptosis in HL-60 cells. *Pharmacol. Toxicol.* 81, 285-293.
- Yakes, F. M., Chinratanalab, W., Ritter, C. A., King, W., Seelig, S., and Arteaga, C. L. (2002) Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action. *Cancer. Res.* 62, 4132-4141.
- Yamai, R., Yamada, N., Inui, M., and Nishida, T. (2006) Correlation of proliferative and anti-apoptotic effects of HGF, insulin, IGF- I , IGF- II, and HGF in SV40-transformed human corneal epithelial cells. *Exp. Eye Res.* 83, 76-83.
- Yashizawa Y, Ametani, A., Tsunehiro, J., Numura, K., Itoh, M., Fukui, F., Kaminogawa, S., 1995. Macrophage stimulation activity of the polysaccharide fraction from a marine algae (*Porphyra yezoensis*). *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 59, 1862-1866.
- Yee, D. (2006) Targeting insulin-like growth factor pathways. *Br. J. Cancer* 94, 465-468.
- Yin, T., Keller, S. R., Quelle, F. W., Witthuhn, B. A., Tsang, M. L. S., Lienhard, G. E., Ihle, J. N., and Yang, Y. C. (1995) Interleukin-9 induces tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate-1 via JAK tyrosine kinases. *J. Biol. Chem.* 270, 233-239.
- Yoo, Y. C., Wabababe, R., Koilke, Y., Mitobe, M., Shimazaki, K., Watanabe, S., and Azuma, I. (1997) Apoptosis in human leukemic cells induced by lactoferricin, a bovine milk protein-derived peptide : involvement of reactive oxygen species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 237, 624-628.
- Yu, R., Shtil, A., Tan, T-H., Roninson, I. B., and Kong, A. N. (1996) Adriamycin activates c-Jun N-terminal kinase in human leukemic cells : a relevance to apoptosis. *Cancer Lett.* 107, 73-81.
- 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, H., Cook, J., Nicke., J., Yu, R., Stecker, K., Myers, K., and Dean, N. M. (2000) Reduction of liver Fas expression by and antisense oligonucleotide protects mice from fulminant hepatitis. *Nat. Biotechnol.* 18, 862-867.
- Zhang, Y. C., Wang, X. P., Zhang, L. Y., Song, A. L., Kou, Z. M., and Li, X. S. (2006) Effect of blocking IGF- I receptor on growth of human hepatocellular carcinoma cells. *World, J. Gastroenterol.* 12, 3977-3982.



감사의 글

박사과정을 보내면서 많은 일을 했습니다. 결혼, 두 번의 출산을 모두 너그럽게 봐주시며 격려를 아끼지 않으셨던 남택정 교수님께 깊은 존경과 감사를 드립니다. 관심 어린 눈길로 지켜봐 주시고 부족한 논문을 다듬어 주신 최진호 교수님, 류홍수 교수님, 변대석 교수님, 그리고 매번 실험을 부탁드릴 때마다 반갑게 맞아 주셨던 최영현 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 가까이 모시지는 못하지만 가슴속에 진정한 선생님상을 심어주신 변재형 교수님, 학부부터 박사과정까지 관심과 지도를 아끼지 않으셨던 최재수 교수님, 그리고 학문적 성숙이 있기까지 자상한 마음으로 성원을 보내주셨던 김형락 교수님과 류은순 교수님께 깊은 감사를 드립니다.

감사의 글을 적다보니 고마운 사람들이 너무 많습니다. 먼저 선배로써 많은 도움을 주었던 미진이와 지영선배, 후배이지만 선배같이 격려와 응원을 아끼지 않았던 인혜, 싫은 내색 한번 없이 도움을 주었던 든든한 기현이에게 깊은 감사를 드립니다. 늘 닳고 싶은 선배이신 시향언니, 든든한 후원자인 혜진언니와 해점언니, 짧은 기간이지만 정이 듬뿍 들었던 명원, 현명한 인선, 그리고 마음을 따뜻하게 해준 대익이, 지영 내외에게도 감사를 드립니다. 그리고 바쁘다는 핑계로 신경을 쓰지 못했던 우리 실험실 식구들, 섹시한 경력, 예쁜 웃음 짓기가 특기인 혜정, 새침때기 창은, 철없는 경은, 성숙한 은순, 차분한 하영, 한결같은 정욱, 이쁜 회연, 연정, 항상 밝은 히로애, 착한 은진, 든든한 인태에게도 감사를 전합니다.

그리고 무엇보다 지금까지 공부를 할 수 있도록 항상 격려와 사랑으로 대해주시고 든든한 후원자가 되어 용기를 북돋워 주신 시부모님과 친정부모님, 애들에게 항상 사랑으로 대해주신 아가씨, 도련님께 깊은 존경과 감사를 드립니다. 마지막으로 엄마로써 옆에 있어주지 못해 항상 미안하고, 사랑스런 현창이, 현승이 그리고 이 세상에 하나밖에 없는 영원한 내편이며, 사랑하는 남편 효만씨에게 감사의 뜻을 전합니다.