

교 육 학 석 사 학 위 논 문

사염화탄소로 유도된 흰쥐의 간 손상에
대한 다시마 추출물의 보호 효과



2011년 8월

부경대학교 교육대학원

영양교육 전공

김 미 경

교 육 학 석 사 학 위 논 문

사염화탄소로 유도된 흰쥐의 간 손상에
대한 다시마 추출물의 보호 효과

지도교수 남 택 정

이 논문을 교육학석사 학위논문으로 제출함



2011년 8월

부경대학교 교육대학원

영양교육 전공

김 미 경

김미경의 교육학석사 학위논문을
인준함



주 심 공학박사 류 홍 수 (인)

위 원 이학박사 류 은 순 (인)

위 원 농학박사 남 택 정 (인)

목 차

ABSTRACT	iii
I. 서 론	1
II. 재료 및 방법	7
1. 실험 재료	7
가. 실험동물	7
나. 시약 및 재료	7
2. 실험방법	8
가. 시료의 조제	8
(1) 다시마 추출물의 제조	8
(2) 실험동물의 사육	11
(3) 처치 및 시료의 채취	13
나. 혈청 중의 GOT/ GPT 측정	13
다. 간 조직의 항산화 효소 활성	13
(1) 간 조직의 GSH 함량 측정	13
(2) 간 조직의 SOD 활성 측정	14
(3) 간 조직의 CAT 활성 측정	14
라. 간 조직 단백질 발현 및 분석 (Western blot analysis)	15
마. 통계 처리	15
III. 결과 및 고찰	17
1. 다시마 추출물의 일반성분	17
2. 간 조직의 관찰	19

3. 혈청 중의 GOT/GPT 변화	21
4. 간 조직의 GSH 함량 변화	25
5. 간 조직의 SOD 활성 변화	28
6. 간 조직의 CAT 활성 변화	31
7. 간 조직 내 사멸화 정도 측정	33
IV. 결론 및 요약	36
VI. 참고 문헌	39



Protective Effect of *Laminaria japonica* Extract Supplement on Carbon Tetrachloride-Induced Hepatotoxicity in Rats

Mi-Kyung Kim

Graduate School of Education

Pukyong National University

Abstract

Laminaria japonica is a category of large seaweed plants that can grow to more than 200 feet in length in underwater forests. The brown algae contains several vitamins and minerals with many nutritional benefits and has been widely used in native diets in many countries. The liver is an organ that plays a major role in metabolizing endogenous and exogenous materials. CCl₄ is a well known potent hepatotoxicant and has primarily been used as a chemical to assess hepatotoxicity in animal experiments. This study was investigated the changes in various biochemical markers related to hepatotoxicity in groups pretreated with *Laminaria japonica* extract(LJE) following CCl₄ administration to assess the protective effect of LJE against CCl₄ induced acute liver injury in rats.

Experimental animals were divided into 4 groups, control, CCl₄ and CCl₄+ LJE 150, 300 mg/kg treatment group, with 5 rats in each group. The rats were administered orally with doses of 150, 300 mg/kg LJE for 10 days. 3 hour after the final treatment, all groups except for the control group were

subjected to intraperitoneal injection with CCl₄. One day later, blood and liver samples were collected to analyze biomarkers. For this study measured not only the activity of serum enzymes(GOT, GPT), which are used as indicators of hepatic injury, but also the antioxidant enzyme activities of liver tissue such as GSH content, SOD and CAT activities. In addition, EGFR expression and CCl₄-induced apoptosis of the liver by oxidative stress involving changes in MAPKs were analyzed by Western blot.

The following results was obtained from this experiment. The activities of GOT and GPT were significantly higher than that of the control group, indicating the damage of liver tissue by CCl₄-induced. But, in the LJE groups, the increase of GOT and GPT activities were markedly decreased. The hepatic SOD activity of the group that received CCl₄ alone was significantly increased. And hepatic GSH content and CAT activity of the CCl₄ group were lower than in the control group, resulting in liver damage. On the other hand, the SOD activities of the LJE pretreatment groups was significantly decreased compared to the CCl₄ group. GSH and CAT level of the LJE groups were significantly increased. Therefore, The increase of antioxidant activities in the LJE groups reduced oxidative stress by their scavenging effect on the ROS. EGFR responds to a diverse array of ligands, and plays important role in various cellular proliferation and invasion. MAPKs signaling cascade represents one of the intracellular signaling pathways by growth factors and oxidative stress. Western blot analysis also revealed LJE attenuated CCl₄-induced EGFR and MAPKs activities in livers.

In conclusion, it is identified that LJE has a protective effect against CCl₄-induced hepatotoxicity.

I. 서 론

오랫동안 늙지 않고 건강하게 사는 것은 인간의 오랜 꿈이다. 최근 경제적 수준의 향상과 의료기술의 발달로 평균 수명은 늘어났으나, 서구화와 더불어 식생활 패턴의 변화로 인한 영양섭취의 불균형이나 스트레스 또는 환경오염 등에 의해서 체내 활성산소 (Reactive Oxygen Species, ROS)이 과다하게 생성되고 있다.

활성산소는 분자 구조적으로 매우 불안정하기 때문에 고분자의 세포성분들을 공격하여 산화적 스트레스 (oxidative stress) 상태를 유발하게 된다. 활성산소에 의한 DNA, 단백질, 지질 및 세포내 작은 분자들의 산화적 손상은 현대 사회에서 빈번히 발생하는 암이나 뇌·혈관질환, 심장질환 등 순환기계 질환과 같은 만성 퇴행성 질환의 발병 및 진행에 많이 관여하고 있는 것으로 알려져 있다 (Debashis et al. 1997; Muramatsu et al., 1995; Leanderson et al. 1997; Sussman and Bulkley 1990; Vajragupta et al. 2000; Willcox et al. 2004; Witztum 1993). 또한 활성산소에 의한 산화적 손상은 광노화, 방사선 독성, 백내장 형성 및 반점 형성 등과 관련이 있고, 몇몇 면역관련 세포의 기능에도 심각한 영향을 초래하는 것으로 밝혀지고 있다 (Borek, 2001). 따라서 이와 같은 질환에 기인하는 활성산소의 가능성을 간과 할 수 없으며, 발병 전 예방과 건강증진에 초점을 두게 되었다.

최근 생리 활성 물질이 풍부하게 함유되어 있는 식품인 다시마, 미역과 같은 해조류에 대한 관심이 부각되고 있다 (Kim et al., 1970). 그 중 다

시마의 수용성 추출물이 항산화 활성을 통해서 Streptozotocin로 유도된 당뇨 쥐에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며 (Cho and Bang, 2004), 다시마 효소 가수 분해물에서 항산화 활성이 높은 것으로 보고되고 있다 (Park, 2008).

다시마 (*Laminaria japonica*: sea tangle)는 다시마과에 속하는 갈조류로서, 분포지역은 한국, 일본, 캄차카 반도 등의 태평양 연안으로 우리나라에서는 거제도, 제주도, 흑산도 등이다. 다시마는 뿌리, 줄기, 잎의 구별이 확실치 않아 뿌리 부분으로만 나누어지고, 길이 1.5~3.5 m, 넓이 25~40 cm 정도로 두껍고 거죽이 미끄러우며 약간 쭈글쭈글한 무늬가 있는 것이 특징이며, 대개 짧고 굵은 줄기로 암초에 서식한다. 다년생 조류로써 일반적으로 수명은 주로 2년생이며, 양식의 경우 1년생을 수확한다. 품질이 가장 좋은 시기는 7월 중순부터 9월 상순이 최적기이며, 빛깔이 검고한 장썩 흐트러지지 않게 겹쳐서 말린 것으로 두꺼운 것일수록 품질이 높은 것이라고 한다 (Koh and Choi, 1999).

일찍이 동의보감에서는 곤포라 하여 신체의 저항성을 높여주고 노폐물의 배설을 촉진하며, 고혈압, 동맥경화, 갑상선종, 신장염에 효과가 있을 뿐만 아니라 암세포의 증식을 억제하고, 노화를 예방하는 건강장수식품이라고 기록하고 있다 (Hur, 1999).

실제로 다시마는 미네랄의 보고라 불리기도 하는데, 칼륨, 나트륨, 칼슘, 마그네슘 등 다양한 신체의 생리 활성에 관여하는 무기질을 다량 함유하며 다른 해조류에 비해 특히 4,000 ppm 이상의 요오드를 함유하고 있는 훌륭한 무기질 공급원이다. 뿐만 아니라, 탄수화물 중 인체의 소화효소에 의해 분해되지 않는 식이섬유소 알긴산, fucoidan 및 laminaran 등의 함량이 높다 (Haroun-Bouhedja et al., 2000; Lee et al., 1998). 알긴산은 다시

마 점질물의 주요 성분으로 β -1,4결합의 β -D-mannuronic acid와 α -L-gluronicacid이 연결되어 형성된 복합다당류이다. 혈청 콜레스테롤 저하작용, 유해 중금속의 체내 흡수 방지 및 배출 기능 뿐 아니라 면역력 증가, 혈당 및 혈청지질 저하 등의 생리 활성을 갖는 것으로 알려져 있다 (Nishino et al., 1989; Nishino et al., 1991; So et al. 2007). Fucoidan은 모든 갈조류에 존재하는 수용성 다당류로 혈액 중에 존재하는 함황 산성 다당인 heparin과 생리적 특성이 유사하여 항 혈액응고 작용 및 항암작용 등 다양한 생리적 기능을 한다 (Collic et al., 1991; Do et al. 2005; Hang et al, 2005). 또한 다시마 중에 함유된 저분자 질소화합물 중 하나인 laminarin은 혈당 강하 작용이 있는 것으로 보고되어 있다. 그리고 다시마의 단백질 함량은 낮은 편이지만, 맛과 관련이 깊은 glutamic acid, aspartic acid, alanine 등의 아미노산이 풍부하다 (Penman and Sanderson, 1972; Kim and Kang, 1998; Kim et al., 2000). 이와 같이 영양적인 면과 기능성을 고루 갖춘 다시마의 무한한 잠재력에 관한 연구가 활발히 행해지고 있다.

간은 인체의 모든 대사기능의 중심이 되며, 외부로부터 투여되거나 체내에서 생성된 여러 가지 물질을 대사시켜 해독하는 역할을 수행하고 있는 장기인데, 이 과정에서 독성물질의 축적 등으로 인해 간세포가 손상을 입으면 결국 인체기능의 치명적인 손상을 가져오게 된다 (Grub et al., 2000).

대표적인 간 독성 물질 중 하나인 사염화탄소 (Carbon tetrachloride, CCl_4)는 유기용매의 하나로 널리 사용되어 왔으며 무색의 액체로서, 공업용으로는 고무, 수지 등이 산업용제로 산업현장에서 사용되고 있다 (Anita and James, 1989). 실험적으로 동물에게 경구 및 복강 내로 투여

시 생체막의 불포화 지방산을 공격하여 지질의 산화, 단백질의 변성 등을 초래하여 급성 독성작용을 유발한다고 알려져 있다 (Robbins, 1987).

사염화탄소는 간세포의 microsome에서 NADPH-cytochrome P-450 electron transport chain에 의해 대사되어 carbon-chlorine 결합이 trichloromethyl radical ($\text{CCl}_3\bullet$) 와 chlorine radical ($\text{Cl}\cdot$) 과 같은 활성산소종을 생성한다. $\text{CCl}_3\bullet$ 는 산소분자와 반응하여 trichloromethyl peroxy radical ($\text{CCl}_3\text{OO}\cdot$)로 산화되고, 이는 세포막의 인지질인 polyenoic fatty acid의 methyl carbon을 공격하여 지질과산화물을 야기한다 (Recknagel, 1976). 이때 지질과산화물의 분해산물들이 endoplasmic reticulum의 구조와 기능 저하, 단백질 합성 저해 등을 일으켜 지방간 변성을 유발하게 되고, 최종적으로 간세포 괴사로 이어지는 독성기전을 가지고 있다 (Halliwell and Gutteridge, 1985).

사염화탄소의 대사과정 중 그 치명적인 결과에 반하여 해독 경로는 trichloromethyl radical의 세포내 GSH 포함과 연관이 있다. GSH는 모든 조직에 존재하지만 특히 간에 많이 존재하며, 산화제 및 다양한 형태의 독성 및 병태 생리학적 스트레스에 대한 세포 방어 기전에 중요한 인자이다 (Vendemiale et al 1989). GSH는 세포내 환원제로서 촉매 및 물질대사를 포함한 세포내 수송, disulfide exchange 반응 촉진, 외인성물질의 대사과정 중에 생기는 활성산소와 친전자성 대사물질들의 무독화 등의 기능이 있다 (Kaplowitz et al., 1985).

이와 같이 생체는 사염화탄소에 의해 전환된 활성산소에 대한 방어 기전을 갖추고 있으며, 산화를 억제하거나 지연시키는 물질을 항산화제 (antioxidant)라고 한다. superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX), NADPH peroxidase, cytochrome C

peroxidase 등과 같은 내인성 항산화 효소나 ascorbic acid (vitamin C), tocopherol (vitamin E) 등과 같은 항산화 물질들이 조직 내에서 생성되는 활성산소를 제거하여 지질의 연속적인 산화를 방지한다 (Davis, 1986; Moskaug et al., 2005; Wayner et al., 1986).

인체 내의 다양한 경로에 의해 유발되는 산화적 스트레스는 생체 안에 존재하는 항산화계에 의해 제거되지만, 산화적 스트레스가 항산화계의 수준을 초과하여 제거되지 못하면 DNA 변형과 기능상실에 의하여 간세포 손상 및 사멸과정에 관여하게 된다 (Fridovich, 1978).

간은 부분절제, 외상, 독성 간 손상 후, 재생에 있어 다른 조직에 비해 현저한 회복능력을 보이며, 간세포의 성장조절에는 여러 가지 hepatotrophic factor가 관여하는 것으로 알려져 있다. 간의 재생에는 췌장에서 분비되는 insulin이나 glucagon 등의 호르몬과, hepatocyte growth factor (HGF), transforming growth factor (TGF)- α , epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor (TGF)- β 등 여러 가지 성장인자들이 작용하는 것으로 알려져 있다 (Noda et al., 1988; Taki et al., 1990). 이들 성장인자들 중 TGF- α 나 HGF는 세포주기 중에서도 G₁기에서 S기로의 transition 동안에 작용하며 (Fausto and Webber, 1993), EGF의 경우는 이들보다 훨씬 앞선 간세포 재생의 가장 초기에 (immediate-early phase 동안) 발현이 현저히 증가하여 G₀에서 G₁기의 신호전달에 있어서 그 중요성이 주목되고 있다 (Ebergard, 1995).

Epidermal growth factor receptor (EGFR)는 막 단백질로 extracellular ligand-binding과 transmembrane domain, intracellular tyrosine kinase domain으로 구성되며, EGF 이외에도 EGF family인 heparin binding EGF like growth factor나 TGF- β 등과도 결합하여 tyrosine specific

protein kinase가 활성화된다. 세포의 성장, 분화, 세포 사멸, 이동 및 전이 등을 조절하는 EGF family로서 4가지 종류의 단백질 EGFR/ ErbB1/ HER1, ErbB2/HER2/neu, ErbB3/HER3 그리고 ErbB4/HER4이 포함한다. 특히 간세포의 표면에 있는 EGFR의 세포질 내 tyrosine kinase domain 이 autophosphorylation되고 transcriptional regulator의 활성을 조절하여 상피세포의 증식과 분화에 작용한다 (Raper et al., 1987).

세포사멸은 세포 내부에 프로그램된 신호를 따라 여러 유전자들이 발현 됨으로써 일어나는 과정이다 (Choi, 2001). Mitogen activated protein kinase (MAPK) signaling pathway를 거쳐 세포증식 및 분화, 세포이동, 세포사멸 억제작용 등과 같은 생물학적 작용이 일어나게 된다. MAPK signaling pathway에는 일반적으로 p44/42 MAPK, extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminalkinase (JNK) 및 p38 kinase 등으로 나누어지며, 이들 중 간세포의 사멸에는 ERK, p38, JNK 등이 산화적 손상시 관여하는 인자들로 주요한 역할을 하는 것으로 보고 되고 있다 (Lin et al, 2007; Suzuki and Tsukamoto, 2006). ERK는 세포 성장 및 분화를 조절하며 산화적 손상에 의해 활성화되고 항상성 유지를 위해 세포사멸 억제신호로 작용한다. JNK와 p38은 UV, 열 등의 세포외 스트레스에 대해 활성화되면 apoptosis, transformation, 면역반응에 관여 하는 신호전달기전에 작용한다 (Nair et al., 2004).

이에 본 실험에서는 다시마의 간 보호와 함께 그와 관련된 활성산소로부터 우리 몸의 세포를 보호하는 항산화 기능을 활용하기 위한 연구로서, 다시마추출물이 사염화탄소에 의해 유발되는 급성 간독성에 미치는 혈액학적 및 간 조직 내 생화학적인 항산화 효과와 이와 관련된 신호전달계 단백질 발현에 대해 알아보았다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

가. 실험동물

실험동물로 5주령 된 체중 150 g의 S.D. (Sprague Dawley)계 웅성 흰쥐를 SAMTAKO (Korea)에서 구입하여, 7일간 예비 사육하여 환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였다. 실험동물은 온도 $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$, 12시간 명암주기의 사육실에서 stainless cage에 분리하여 사육하였으며, 식이는 일반 고형사료와 물과 함께 공급하여 자유로이 섭취하도록 하였다.

나. 시약 및 재료

본 연구에 사용한 다시마는 2010년 1월 부산광역시 기장군 대변항 다시마 양식장에서 채취한 다시마를 구입하여 재료로 사용하였다.

실험에 사용한 GOT, GPT 성분 정량 검사용 시약은 아산제약주식회사 (Korea) 제품을 사용하였고, Glutathione Assay Kit와 SOD assay kit는 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, U.S.A) 제품을 사용하였다. Catalase assay kit는 Cayman Chemical Co. 제품을 사용하였다.

Western blot 실험에 BCA protein Assay Kit (Pierce, USA)를 사용하였으며, Protein standard marker로 dual color marker (BIO-RAD, CA, USA)를 사용하였다. antibody는 Santa Cruz Biotechnology inc. (Santa Cruz, CA, USA)제품을 구입하였고, detection reagent로 SuperSignal West Pico Luminol/Enhancer Solution과 SuperSignal West Pico Stable Peroxide Solution (Pierce)를 이용하여 KODAK BioMax XAR Film (Rochester, NY, USA)로 확인하였다.

2. 실험방법

가. 시료의 조제

(1) 다시마 추출물의 제조

2010년 1월 부산광역시 기장군 대변항에서 채취한 다시마를 3~4회 수세하여 염분과 불순물을 제거하고 수세, 정전 및 탈수과정을 거쳐 동결 건조기로 건조 하였다. 건조된 다시마는 식품분쇄기로 분말화하여 사용하였다.

3구 플라스크에 7 L 증류수와 280 g의 다시마 분말을 침지 시켜 상온에서 3시간 동안 교반하여 추출한 다음 원심분리 (3,000 rpm, 4°C, 30 min)하여 상층액을 분리하였다. 상층액에 약 3배 부피의 에탄올을 처리하여 저온에서 24시간 동안 반응시켰다. 그런 다음 감압 여과하여 여과액을 감압 농축하였다. 원심분리 후 얻어진 잔사는 같은 방법으로 한번 더 추

출을 시행하였으며, 이것을 최소한의 증류수에 녹여 동결건조기로 건조하여 실험에 사용하였다.



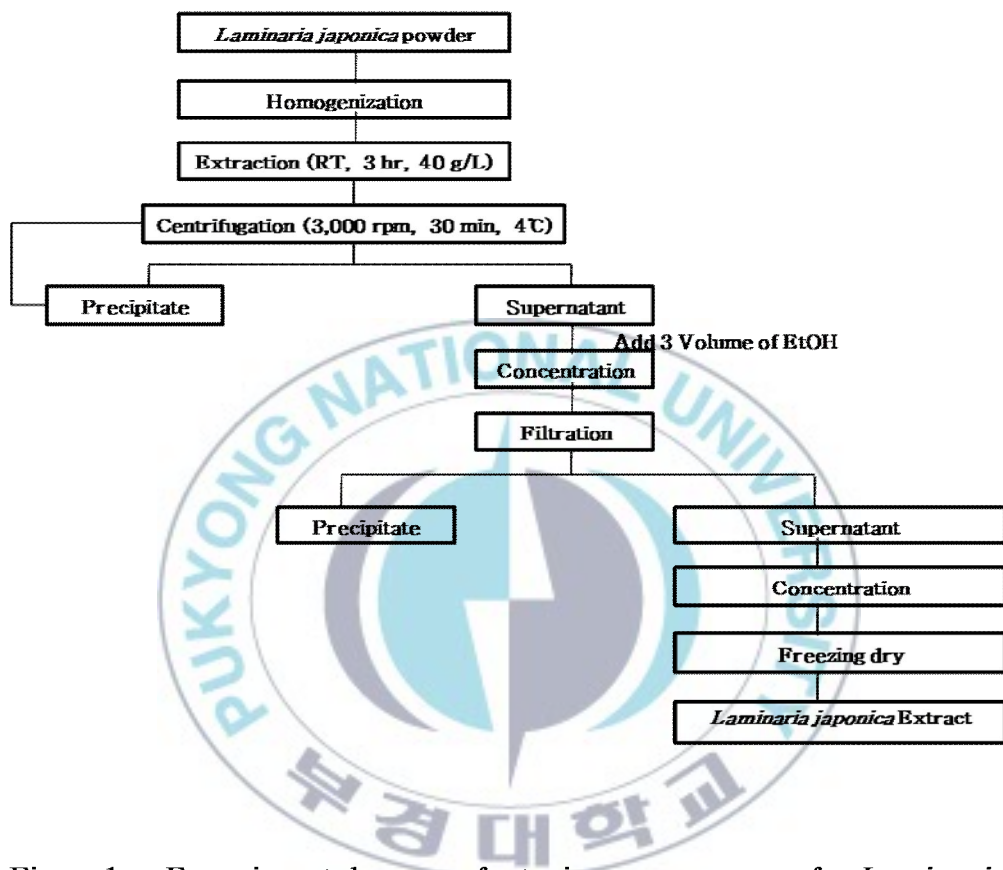


Fig. 1. Experimental manufacturing process of *Laminaria japonica* Extract

(2) 실험동물의 사육

사염화탄소 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO)의 유도 간독성에 대한 보호효과를 연구하기 위해서 총 20마리의 랫드를 정상 대조군, 사염화탄소 투여군, 다시마 추출물 150 mg/kg, 다시마 추출물 300 mg/kg 투여군으로 각 5마리씩 분류하였다.

모든 실험군에 정상 식이와 음용수를 매일 공급하였다. 대조군과 사염화탄소 투여군은 생리 식염수 1.5 mL/rat, 다시마 추출물 투여군은 다시마 추출물 건조분말을 150 mg/kg와 300 mg/kg 용량으로 생리 식염수에 용해하여 각각 1일 1회 10일간 경구 투여하였다. 시료의 최종 투여 3시간 후, 대조군을 제외한 실험군은 사염화탄소 및 olive oil을 1:1의 비율로 희석하여 체중 kg당 1 mL의 용량으로 1회 복강 투여하여 간 손상을 유발하였다.

정상 대조군 (Control group, n=5)

: 증류수

사염화탄소 투여군 (CCl₄ group, n=5)

: 증류수 + CCl₄

다시마추출물 150 mg/kg 투여군 (LJE 150 mg/kg group, n=5)

: 다시마추출물 150 mg/kg + CCl₄

다시마추출물 300 mg/kg 투여군 (LJE 300 mg/kg group, n=5)

: 다시마추출물 300 mg/kg + CCl₄

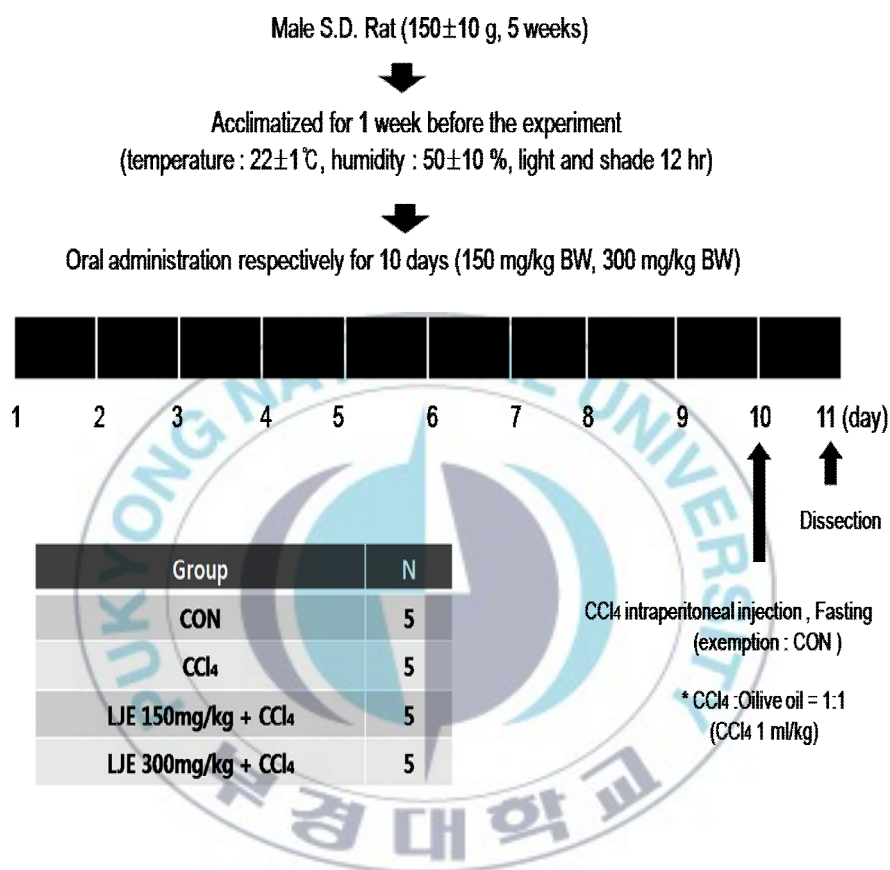


Fig. 2. Experimental design of rats

(3) 처치 및 시료의 채취

실험동물을 실험종료 12시간 전부터 절식시킨 후 ethyl ether로 흡입 마취하에 단두한 뒤 채혈하여 실온에서 30분 간 방치 후에 원심분리 (2,500 rpm, 4°C 20 min)한 다음 혈청은 시료로 사용하였다. 간 조직은 척출하여 생리식염수로 씻어내고 수분을 여과지로 제거한 후 사진을 촬영한 즉시 액체질소로 동결시켜 -70°C에 보관하면서 간 조직 시료로 사용하였다.

나. 혈청 중의 GOT/ GPT 측정

CCl₄에 의해 유도된 간 독성에 미치는 혈액 생화학적 지표인 GOT 및 GPT 활성을 Reitman-Frankel의 방법에 따라 측정하였다. GOT와 GPT 기질액 100 μ L을 시험관에 넣고 37°C에서 5분간 방치한 뒤 혈청 10 μ L을 넣어 잘 혼합한 다음, 37°C에서 GOT는 60분, GPT는 30분간 방치한다. 정색시약 100 μ L을 첨가하여 실온에서 20분 방치하고 0.4 NaOH용액 1 mL를 가하여 실온에서 10분간 방치한 후에 분광광도계 (Ultraspec 2001 pro. Amersham Pharmacia biotech, England)로 505 nm에서 흡광도를 측정하였다.

다. 간 조직의 항산화 효소 활성

(1) 간 조직의 GSH 함량 측정

GSH 함량을 측정하기 위해 먼저 간조직의 1/2를 얼음 위의 Dish에서 세절한 뒤 0.5 g을 5% SSA 용액으로 homogenizer를 이용하여 4°C에서 균질화 하였다. 이 균질액을 4°C에서 5분간 방치 후 10,000 g에서 15분간

원심분리하여 얻은 상층액을 GSH 농도를 측정하기 위한 효소원으로 이용하였다. 상층액과 GSH assay kit내 Standard solution을 96-well에 각각 분주한 다음 working mixture를 첨가하고 실온에서 5분간 반응시킨 후 NADPH를 넣고 ELISA plate reader로 412 nm에서 5분간 방치 후 5분 간격으로 흡광도를 측정하였다.

(2) 간 조직의 SOD 활성 측정

SOD 활성은 xanthine oxidase와 hypoxanthine에 의해 생성되는 superoxide radical detection을 이용하여 측정하였다.

채취한 간 조직을 세절한 다음 균질액을 얻기 위하여 0.3 g을 3 mL SOD buffer로 균질화 시킨 후 1,500 g, 4°C, 5분간 원심분리하여 얻은 상층액을 효소원으로 사용하였다. 96-well에 Sample과 SOD Standard를 각각 10 µL씩 분주하고 희석시킨 radical detector 200 µL를 첨가한 다음 xanthine oxidase 20 µL를 넣는다. 실온에서 20분간 반응 시킨 후 450 nm에서 흡광도를 측정 하여 SOD 활성도를 계산하였다.

(3) 간 조직의 CAT 활성 측정

Catalase 효소 활성도 측정은 catalase와 methanol 그리고 H₂O₂의 반응으로 생성된 formaldehyde를 측정하는 방법이다.

Rat의 간을 획득한 후 세절하여 buffer에 넣고 균질화 시킨 다음, 10,000 g, 4°C, 15 min 원심분리하여 상층액을 사용하였다. 상층액, Formaldehyde standard, Positive control을 각각 20 µL씩 분주하고, 1X assay buffer 100 µL, MeOH 30 µL를 첨가 후 hydrogen peroxide 20 µL를 넣고 실온에서 20분 방치한다. 거기에 Potassium hydroxide 30 µL를

첨가한 다음 purpald 30 μ L 분주하여 실온에서 10분 방치 한 뒤 Potassium periodate 10 μ L를 첨가하고 실온에서 5분 반응시킨 뒤 540 nm에서 흡광도를 나타내었다.

라. 간 조직 단백질 발현 및 분석 (Western blot analysis)

간 조직을 0.1 mg 취하여 RIPA lysis buffer (2 μ g/mL pepstatin, 2 μ g/mL Na₃VO₄, 2 μ g/mL NaF, 1 μ g/mL aprotinin, 5 μ g/mL leupeptin, 10 μ g/mL phenylmethanesulphonylfluoride) 속에서 homogenizer한 다음 원심분리 (12,000 rpm, 4°C, 20 min)하여 상층액을 회수하였다. 단백질 농도는 BCA protein assay kit로 측정하고, 단백질 양을 50 μ g/lane으로 동일하게 취하여 3X sample buffer와 섞은 후 끓이고 10% SDS-PAGE gel에 Western blot을 실시하였다. 이때 표준분자량은 dual color marker를 사용하였다. PVDF membrane (Millipore, USA) 위에 옮겼다. Membrane은 0.1% bovine serum albumine (BSA)로 blocking 한 후, 일차 항체에서 하룻밤 동안 4°C에서 반응시키고, 이차 항체에서 2시간 반응시켰다. Super Signal West Pico Stable Peroxide Solution과 Super Signal West Pico Luminol/Enhancer Solution을 사용하여 KODAK X-ray film에 감광시켜 현상한 후 scanning하여 나온 밴드로 protein expression 수준을 확인하였다.

마. 통계 처리

자료의 통계처리는 각각의 군별로 평균과 표준편차를 Window용 SPSS

10.0 프로그램 (Statistical Package for Social Science, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 처리하여 분석하였다. 대조군과 실험군의 차이를 평가하기 위해서 Oneway-ANOVA를 이용하였고, 각 집단 간의 유의성 검증은 Duncan's multiple range test로 분석하였다. 이때, 모든 통계적 유의도 수준은 $p < 0.05$ 에서 살펴보았다.



Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 다시마 추출물의 일반 성분

다시마 원말로부터 다시마 추출물의 제조 과정은 Fig. 1 에 제시하였으며, 이를 *Laminaria Japonica* Extract (LJE)로 명명하였다. 측정한 LJE의 수율 (yield rate)은 총 40.03% 로 나타났다.

다시마 건조분말과 다시마 추출물 분말의 일반성분을 Association of Analytical Communities (AOAC) 방법에 의해 분석한 결과는 Table 1.과 같다.

다시마 건조 분말의 일반성분은 수분 6.30%, 조단백질 10.70%, 조지방질 1.09%, 회분 15.18%, 탄수화물 66.73%으로 나타났으며, 다시마 추출물의 일반성분은 수분 2.18%, 조단백질 9.15%, 회분 27.79% 탄수화물 60.25% 로 수분함량과 조 지방 감소하였고, 조 단백질은 거의 일정하게 유지 되었고, 추출물의 대부분은 탄수화물이 차지하였다.

다시마의 일반성분은 종류에 따라 약간의 차이는 있으나, 대체로 수분이 16.0%, 단백질이 7.0%, 지방질이 1.5%, 탄수화물이 49.0%, 무기질이 26.5% 정도 함유되어 있는데, 탄수화물 중 5~10%는 섬유소이며 나머지는 알긴산을 주체로 한 라미나린, 푸코이단 등의 다당류이다.

Table 1. Proximate composition of dried *Laminaria Japonica* powder and *Laminaria Japonica* Extract

(unit: %)

	Moisture	Crude protein	Crude lipid	Crude ash	Carbo-hydrate ^{*1}
<i>Laminaria japonica</i>	6.30±0.13	10.70± 0.08	1.09±0.03	15.18± 0.12	66.73
<i>Laminaria japonica</i> extract	2.18± 0.06	9.15 ±0.18	–	27.79 ±0.15	60.25

^{*1}The content of carbohydrate was calculated by $100 - (\text{Moisture} + \text{Crude protein} + \text{Crude lipid} + \text{Crude ash})$

2. 간조직의 관찰

간 조직에서의 조직학적 변화를 Fig. 3.에서 살펴보면, 대조군은 무처리 군으로써 정상적인 간으로 볼 수 있는데 육안적으로 붉은 색조로 표면은 윤기를 띄고 있었다. CCl_4 투여군에서는 간의 크기가 커졌으며, 약간의 노란 색조로 간 조직의 색 변화가 일어났고 섬유화성 변화도 관찰되었다. 이에 비해 LJE 투여군에서 사염화탄소에 의한 간 손상으로 추정되는 현상이 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 이로써 다시마가 보호 효과를 가지는 것으로 보인다.



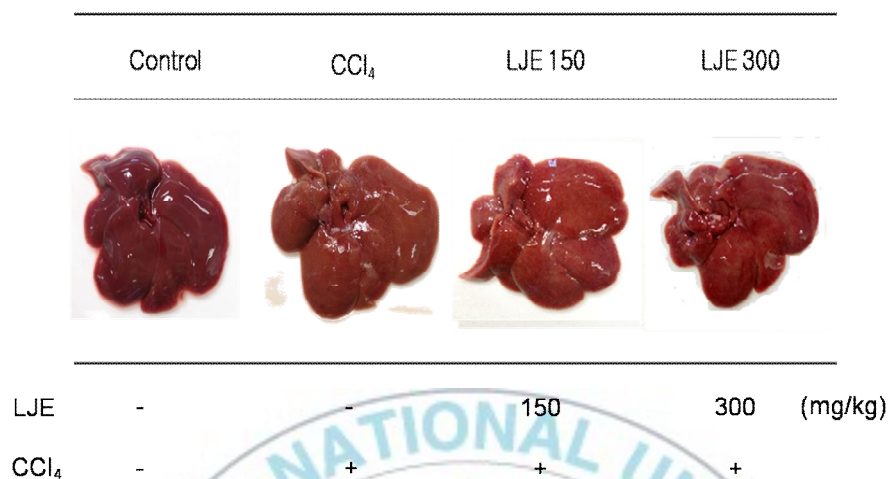


Fig. 3. Effects of LJE on histopathological changes by CCl₄

CON is control group without CCl₄ administration. CCl₄ (Distilled water 1.5 mL/1 rat) and LJE 150, 300 (LJE 150, 300 mg/kg, i.g) group were oral administrated to rat for 10 days before CCl₄ treatment.

3. 혈청 중의 GOT/ GPT 변화

사염화탄소 투여에 따른 간세포 손상의 정도는 GOT와 GPT의 양을 측정하여 혈청 mL 당 Karmen unit로 Fig. 4. 와 Fig. 5.에 나타내었다. GOT 활성도는 대조군과 비교하여 볼 때 사염화탄소 단독 투여군은 유의성 있게 증가하였으며, LJE 150 mg/kg, 300 mg/kg은 CCl₄군에 비하여 농도 의존적으로 감소하였다. GPT의 활성 측정 결과는 대조군에 비하여 CCl₄군은 유의적으로 증가하였고, LJE 150mg/kg, 300mg/kg은 CCl₄군에 비하여 GPT의 활성이 낮아졌다.

GOT와 GPT는 생체 내 TCA 회로에 있어 대사산물과 아미노산 사이에서 아미노기 전이를 조절하는 효소이다. GOT는 aspartic acid의 아미노기를 α -ketoglutaric acid로 전이시켜주는 효소로 아미노기가 전이되면 α -ketoglutaric acid는 glutamic acid이 되고, aspartic acid은 oxaloacetic acid이 된다. GPT는 alanine의 아미노기를 α -ketoglutaric acid으로 전이시켜주는 효소로 아미노기가 전이되면 α -ketoglutaric acid은 glutamic acid이 되고 alanine은 pyruvic acid이 된다 (McPhalen et al., 1992). 이들 효소는 간장, 신장, 심장 등에 많이 분포되어 있는 반면, 혈중에서는 활성치가 낮은 것으로 알려져 있다 (Gabriel et al. 1982). 또한 carbon tetrachloride, thioacetamide, dimetyl nitrosamin 및 ally alcohol 등 간독성 물질의 급성투여로 인해 간질환이 유발되는 경우 간 손상으로 인한 간세포의 괴사와 간조직의 파괴가 진행됨에 따라 혈중으로 aminotransferase가 유리되어 높은 활성치가 나타낸다 (Balaze et al. 1961; Reitman and Flankel, 1957)

갈파래로부터 추출된 푸코이단 (ULF)의 간 독성 보호효과를 검토하기 위한 GOT와 GPT 측정결과에서 CCl₄ 군의 경우 대조군에 비하여 간 장

에 유발로 인해 GOT와 GPT 효소 활성이 약 3.3배, 3.7배 증가하였고, 시료군인 ULF군은 대조군과 비교 하였을 때 29.8%, 48.15% 감소하는 것으로 나타났다 (Nam et al. 2007).

본 연구에서도 CCL₄군에서 혈청 GOT 및 GPT 활성이 대조군과 비교하여 볼 때 GOT 및 GPT 활성치보다 급상승이 크다는 사실을 관찰 하였다. 이는 사염화탄소 투여로 급성 간장 장애 가 유도되었음을 나타내었다. 그리고 150 mg/kg, 300 mg/kg의 다시마 추출물과 사염화탄소를 함께 투여한 실험군은 사염화탄소 단독 투여군에 비해서 GOT, GPT 효소 활성이 회복되어 간 손상에 대하여 보호 효과를 나타내는 것으로 확인되었다.



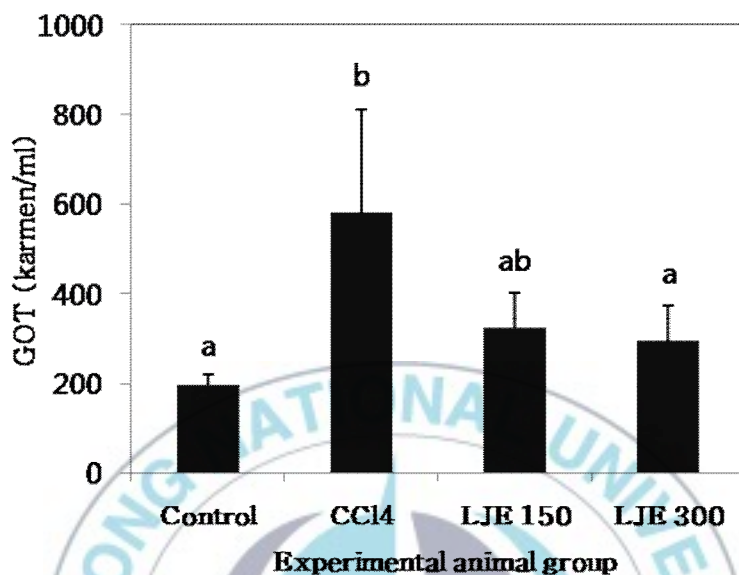


Fig. 4. Effects of LJE on serum GOT activities in CCl₄-induced rat

CON is control group without CCl₄ administration. CCl₄ (Distilled water 1.5 mL/1 rat) and LJE 150, 300 (LJE 150, 300 mg/kg, i.g) group were oral administrated to rat for 10 days before CCl₄ treatment.

Values are means $\pm$ SD of five experiments. Values with different superscripts are significantly different by ANOVA and Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

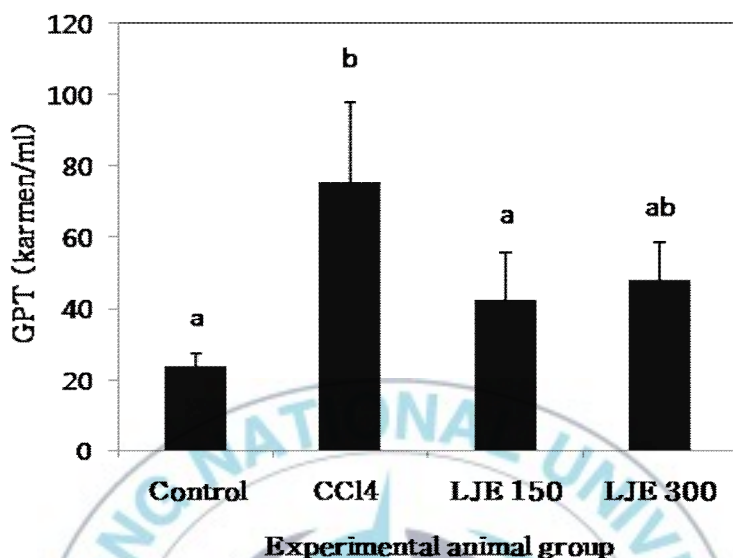


Fig. 5. Effects of LJE on serum GPT activities in CCl₄-induced rat

CON is control group without CCl₄ administration. CCl₄ (Distilled water 1.5 mL/1 rat) and LJE 150, 300 (LJE 150, 300 mg/kg, i.g) group were oral administrated to rat for 10 days before CCl₄ treatment.

Values are means $\pm$ SD of five experiments. Values with different superscripts are significantly different by ANOVA and Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

4. 간 조직의 GSH 함량 변화

간 조직 내 GSH 함량을 측정한 결과(Fig. 6.), 사염화탄소 투여군에서 대조군보다 통계적으로 유의성 있게 감소하였으며, 150, 300 mg/kg의 다시마 추출물 투여군에서는 CCl_4 로 유발된 간 손상에 의해 감소된 GSH 함량이 농도 의존적으로 유의하게 증가되었다.

GSH는 Glutathione peroxidase (GPX) 및 Glutathione S-transferase (GST) 항산화 효소의 기질로 이용되면서 반응성이 큰 유독한 대사물질을 제거하는데 상당한 역할을 한다는 것이 알려져 있다 (Hayes et al 2000). 생체 내 활성소거제로 GSH는 GPX에 의해 과산화수소를 제거하면서 GSSG는 glutathione reductase에 의해서 NADPH를 소모하며 다시 GSH로 환원되어 항산화 효소의 기질로 이용되면서 세포를 보호한다. 동물조직 중 비단백질 thio의 대부분을 차지하는 GSH의 결핍은 지질 과산화 반응을 촉진시키고, GSSG 형성은 지질 과산화 정도나 조직 손상의 유발과 직접 관련이 있는 것으로 알려져 있다 (Vendemiale et al. 1989).

특히 GSH가 혈액으로 유출될 때 간의 세포괴사가 시작되고 산화적 스트레스가 있는 조건에서 미토콘드리아의 GSH 방출은 세포의 생사와 관련하여 중요한 결정요인이 된다 (Hidaka et al., 2007). 따라서 GSH는 CCl_4 에 의해 유도된 간독성 대사물질을 줄이는데 특히 요구되어진다.

Chlorella vulgaris 추출물 (CVE)이 사염화탄소로 간 손상이 유발된 쥐에서 가지는 보호작용에서 CVE의 투여가 사염화탄소로 유발된 쥐에서 간손상을 현저히 감소시켰다고 확인였다 (Kim, 2009).

이에 간 손상을 방어하는 아주 중요한 생체 내 항산화 물질인 GSH 함량을 조사한 결과, 대조군에 비해 CCl_4 군에서 산화적 스트레스로 의한 간 세포사멸의 증가가 GSH 함량의 감소를 통해 나타났다. LJE 150, 300

mg/kg 군에서 GSH 활성이 사염화탄소 단독 투여군에 비해 높게 나타난 것은 다시마 추출물의 전처리로 간세포 내 존재하는 GSH의 함량이 회복된 것으로 간주되며, GSH 활성이 대조군에 비해 높게 나타난 것은 사염화탄소 투여로 다량의 H_2O_2 가 생성되고 이를 소거하기 위한 작용의 결과로 보여 진다.



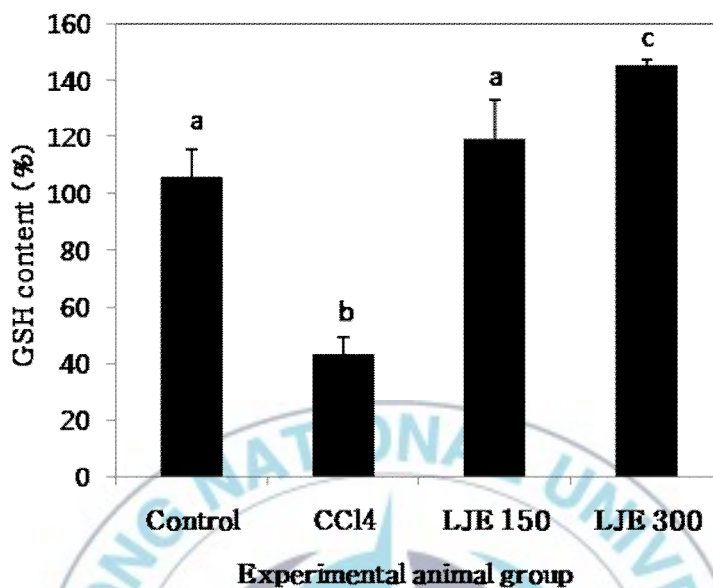


Fig. 6. Effects of LJE on hepatic GSH content in CCl₄-induced rat

CON is control group without CCl₄ administration. CCl₄ (Distilled water 1.5 mL/1 rat) and LJE 150, 300 (LJE 150, 300 mg/kg, i.g) group were oral administrated to rat for 10 days before CCl₄ treatment.

Values are means $\pm$ SD of five experiments. Values with different superscripts are significantly different by ANOVA and Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

5. 간 조직의 SOD 활성 변화

Superoxide radical ($O_2\cdot^-$) 소거 효소인 SOD의 활성도 변화를 측정하였다. Fig. 7에서 간 조직에서의 SOD 활성의 상호 유의성을 비교하여 보면, 사염화탄소 투여군은 대조군에 비하여 유의성 있게 증가함을 보였고, 150, 300 mg/kg의 다시마 추출물 투여군의 활성은 사염화탄소 단독 투여군에서 증가된 SOD에 비하여 감소함을 나타냈다.

SOD는 mitochondria에 존재하며 superoxide radical을 보다 반응성이 약한 과산화수소 (hydrogen peroxide, H_2O_2)로 전환시키는 생체 내의 항산화 방어기구 중 하나이다(Crapo et al., 1978).

항산화 효소는 활성 산소의 과다 생성에 의해 고갈될 수 있는 한편 화학물질에 의해 합성이 유도되기도 하므로 독성물질의 처치량, 기간 및 기타의 실험조건에 의하여 다양한 결과를 보일 수 있다 (Cao and Li, 2004; Kono et al., 2002).

Jung 등의 보고와 같이 SOD 효소의 활성은 감소하는 경우도 있는 반면 (Jung et al., 2004), 사염화탄소 처리 후 증가하는 경향도 있다. 사염화탄소를 투여하여 간 손상 모델로 하고서 오미자 schizandrin C 유도체 DDB 복합물 DWP-04의 효능을 검토한 연구에서 SOD가 사염화탄소의 투여로 다소 증가되었으나, DWP-04 혼합제 투여로 정상군과 비슷한 경향을 나타내었다 (Park et al., 2005). 또 부추녹즙에 항산화 및 항미생물질의 효과를 입증하기 위한 실험에서도 SOD의 활성이 사염화탄소 투여로 대조군에 비하여 증가되었으나, 부추녹즙과 사염화탄소 병합투여로 SOD 활성은 사염화탄소 투여군에 비하여 유의한 감소효과를 나타내었다 (Lee, 2001).

본 연구결과에서 대조군에 비하여 사염화탄소 투여로 간세포에 손상이

유발되어 SOD 효소이 활성이 증가되었음을 알 수 있었다. 이는 사염화탄소 투여로 증가된 활성산소를 소거하려는 생리적 적응 현상으로 사료된다. 150, 300 mg/kg 다시마 추출물 투여군의 SOD 활성이 사염화탄소 투여군에 비하여 농도 의존적으로 유의성 있게 감소하는 것은 다시마 추출물이 활성 산소의 생성을 억제할 수 있는 생리활성물질을 가지고 있는 것으로 추정된다.



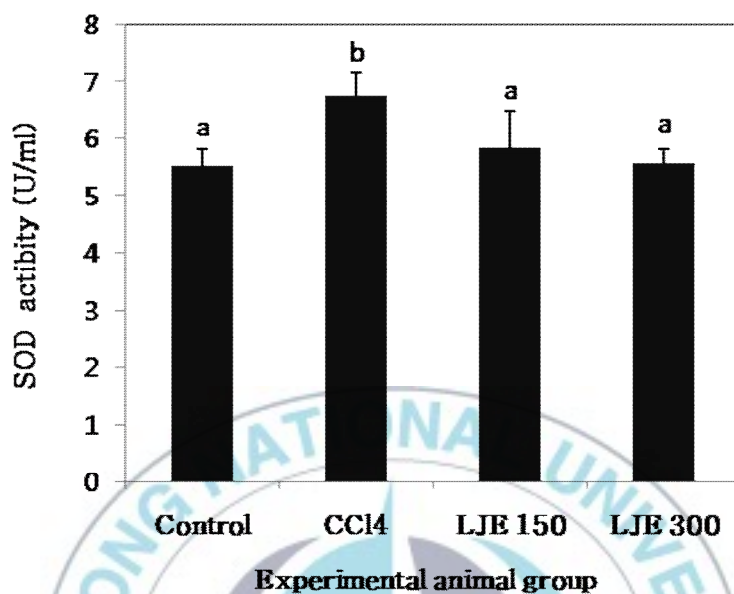


Fig. 7. Effects of LJE on hepatic SOD activities in CCl₄-induced rat

CON is control group without CCl₄ administration. CCl₄ (Distilled water 1.5 mL/1 rat) and LJE 150, 300 (LJE 150, 300 mg/kg, i.g) group were oral administrated to rat for 10 days before CCl₄ treatment.

Values are means $\pm$ SD of five experiments. Values with different superscripts are significantly different by ANOVA and Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

6. 간 조직의 CAT 활성 변화

과산화수소로부터 간 조직을 보호하는 다시마 추출물의 사염화탄소 독성 보호 효과를 검토하기 위해서 CAT 효소 활성을 조사하였다. Fig. 8.에서 보는 바와 같이 사염화탄소 투여군에서 대조군에 비해 유의성 있게 감소하였으며, 150 mg/kg 다시마 추출물 투여군에서 가장 높은 활성을 보이며 통계적인 유의성이 나타났고, 300 mg/kg 다시마 추출물 투여군은 사염화탄소 투여군에 비해 증가됨을 확인하였다.

CAT는 세포내 peroxisome에 주로 분포되어 있으며 체내에서 지방의 자동산화 및 유기물의 산화로 생성된 과산화수소 (hydrogen peroxide, H_2O_2)를 물 (H_2O)과 산소 (O_2)로 분해하여 무독화 시키는 효소이다 (Sunde and Hoektra, 1990).

간장 조직의 항산화능 관련 연구결과에서 CAT 활성치는 CCl_4 군이 대조군에 비하여 유의하게 낮았고, 마늘을 투여한 실험군에서는 CCl_4 군에 비하여 높게 나타났다 (Lee, 2010).

이러한 결과를 종합하여 보면 다시마 추출물이 유의성 있게 CAT 효소를 활성화시켜 사염화탄소에 의한 항산화효과로 과산화수소의 함량을 감소하며 생체 내 조직을 보호하는 것으로 보여 진다.

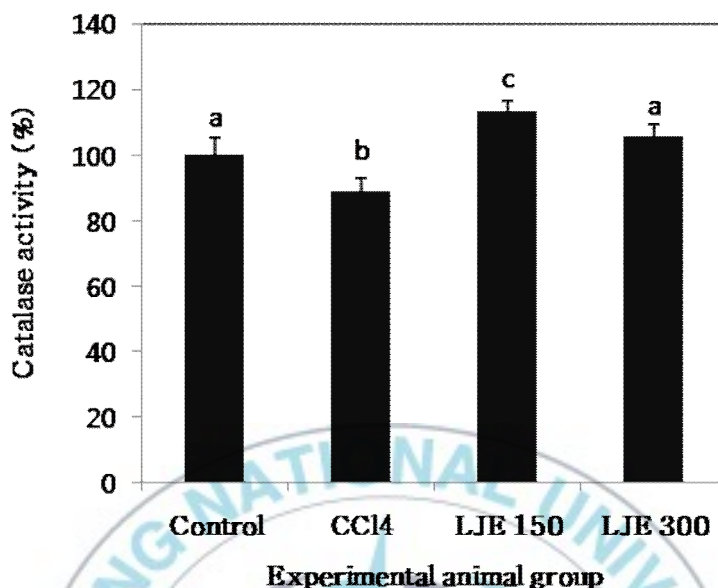


Fig. 8. Effects of LJE on hepatic CAT activities in CCl₄-induced rat

CON is control group without CCl₄ administration. CCl₄ (Distilled water 1.5 mL/1 rat) and LJE 150, 300 (LJE 150, 300 mg/kg, i.g) group were oral administrated to rat for 10 days before CCl₄ treatment.

Values are means $\pm$ SD of five experiments. Values with different superscripts are significantly different by ANOVA and Duncan's multiple range test at $p < 0.05$.

7. 간 조직 내 사멸화 정도 측정

세포 증식과 사멸을 조절하는 이와 같은 관련된 단백질 발현 정도를 Western blotting으로 측정한 결과를 분석해 보면, EGFR의 발현은 사염화탄소 군에서 감소율을 보였고, 사염화탄소성 간 손상에서 LJE 투여에서 증가율을 보였다. P-ERK의 경우는 사염화탄소 투여군에서 대조군 보다 감소된 발현 정도가 LJE의 투여시 증가됨이 관찰되었다. 반면, P-JNK 및 P-p38의 활성화는 대조군에 비해 사염화탄소 투여군에서 증가되었고, 이러한 증가는 LJE의 투여군에서는 감소되는 것으로 나타났다 (Fig. 9.).

사염화탄소로 유도된 간 독성의 발현은 세포 증식 작용에 있어서 중요한 신호전달 체계로 EGFR와 같은 Growth factor에 반응하여 증폭 조절되어 신호화되며, 산화적 손상에 의한 세포사멸에 MAPKs pathway가 작용한다는 사실이 밝혀졌다.

EGFR은 ligand의 자극에 의해서 활성화 되는데 EGF, TGF- α , amphiregulin, heparin-binding EGF, betacellulin, epiregulin이 ligand로서 작용한다 (Hynes and Lane, 2005; Schlessinger 2002). 그리고 ligand중 상당수가 hepatocytes를 위한 mitogen의 능력을 가지고 있다 (Fausto et al., 2006). EGFR은 Ras 와 Rho 패밀리의 GTPase 조절, MAP kinase, phospholipase Cr 과 여러 PKC isoforms, PI-3 kinase와 PKB/Akt, Src 의 tyrosine kinase, FAK 와 JAK 패밀리, transcription factors STAT1, STAT3, STAT5 등 다양한 신호전달 pathway 의 활성화와 깊은 관련이 있다고 알려져 있다 (Jorissen et al., 2003) 이어서 세포 내 합입과 일련의 RNA와 DNA 합성 등의 순서로 세포 분열을 자극한다 (Cohen et al., 1980).

활성산소종이 세포증식, 분화, 사멸 등에 관여하는 MAPKs pathways를

조절한다고 보고하였다 (Sano et al., 2001; Jang et al., 2002). MAPKs pathways에 3가지 kinase들, 즉 ERK, JNK 및 p38 kinase으로 구성되어 있으며, 이 효소들이 활성화되면 세포에 다양한 반응들이 나타난다. ERK는 다양한 성장인자들에 대한 세포의 분열이나 증식에 관련이 있는 반면에, JNK 및 p38는 세포사멸의 유도과 관련되어 있다 (Gujral et al., 2001; Kyriakis and Avruch, 2001; Kolch, 2005).

다시마 추출물이 투여했을 때 EGFR과 P-ERK의 인산화가 증가된 것은 세포생존을 유도하는데 작용한 것으로 생각되며, P-p38과 P-JNK는 인산화가 감소됨으로써 세포사멸이 억제에 관여하는 것으로 사료된다.

이와 같이 다시마 추출물이 EGF 수용체와 세포 신호전달의 대표적 단백질인 MAPKs를 활성을 조절함으로써 간세포 apoptosis를 억제의 결과로 보여진다.



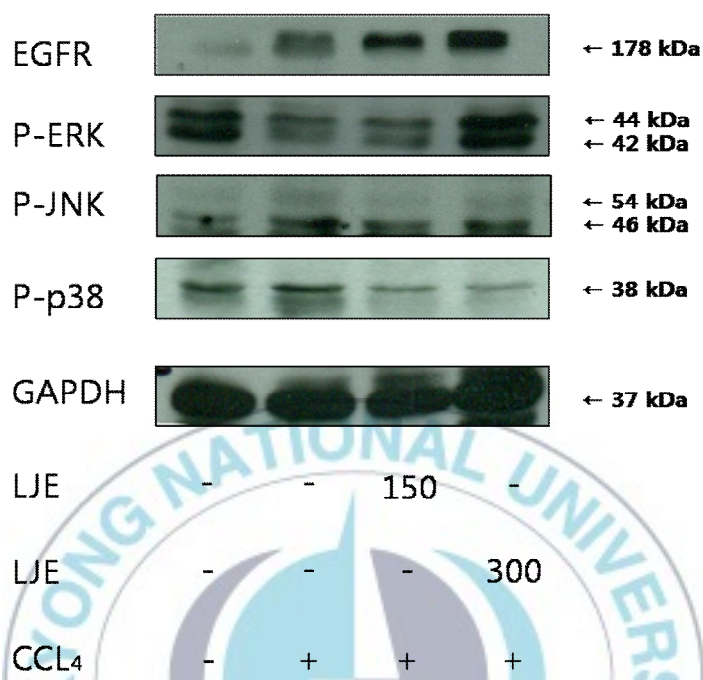


Fig. 9. Western blot analysis of hepatic microsomal EGFR, MAPKs expression CCl₄-induced rat

Distilled water (1.5 mL/1 rat) and LJE (150, 300 mg/kg, i.g) were pretreated to rat for 10 days before CCl₄ administration. Three hour after final treatment, the rats were administered CCl₄. The rats were anesthetized with ethyl ether and a microsomal fraction was prepared from the livers.

IV. 결론 및 요약

독성물질로부터 간 손상을 방지하여 간을 보호할 수 있는 천연물이나 천연소재 개발을 위한 다양한 연구가 수행되고 있다 (Han et al., 1995; Park et al., 1991).

우리나라는 지리적 특성상 해조류 자원이 풍부하다. 해조류는 비소화성 다당류가 다량 함유되어 있어 열량소로서 큰 각광을 받지 못하여 왔으나, 근래에 들어서 식단의 불균형을 개선하는 바람직한 소재로 해조류가 각광받고 있다 (Ebihara and Kiriya, 1990; Kim and Lee, 1995). 그 중 다시마는 영양학적으로 매우 우수할 뿐만 아니라, 정미성분이 풍부하여 생식이나 국수, 우동 등과 같은 각종 국물을 우려내는 조미재로 이용되고 (Kim and Kang, 1998), 독특한 맛과 향으로 기호성이 양호하여 기능성 소재나 건강식품으로 많이 이용되고 있다 (Cui et al., 2002).

본 논문에서는 다시마 추출물의 간 보호 효과를 사염화탄소로 유도된 간 손상 흰쥐에서 검토하였다. 간 손상의 지표로 사용되는 혈청 GOT와 GPT 효소 활성도는 대조군과 비교하여 볼 때 사염화탄소군에서 각각 효소활성이 급격히 증가되었으며, 다시마 추출물의 투여로 인해 효소 활성의 증가가 억제됨을 보였다. 이 결과로 사염화탄소군에서 대조군에 비하여 뚜렷한 간 독성이 있음을 확인하였고, 다시마 추출물 투여군에서는 GOT와 GPT 효소 활성이 낮아 간 보호에 대한 효과를 알 수 있었다.

많은 연구모델들을 통해 간 손상시 세포내 산화적 스트레스가 야기된다는 사실은 이미 잘 알려져 있다 (Sano et al., 2001). 세포 내에서 산화적 스트레스로 인하여 활성산소의 생성이 증가되고 항산화 능력이 감소되면 지질과산화는 생성되는데 이러한 지질과산화는 사염화탄소에 의해 유도된

간 손상의 주된 요인 중 하나이다 (Basu S, 2003). 따라서 항산화 활성과 자유 라디칼 생성 억제는 사염화탄소로부터 유도된 간 손상으로부터 간을 보호하는 중요한 요건이 된다.

산화적 스트레스에 의한 세포사멸의 증가는 GSH 함량의 감소를 통해 나타나며, 항산화 효소 GSH 및 SOD와 CAT를 측정함으로써 체내활성산소와 간 손상과의 연관성을 유추해 볼 수 있다. 생체 내 SOD 항산화 효소가 superoxide radical을 과산화수소로 전환시켜 활성산소로부터 세포를 보호하고, 이 과정에서 생성되는 유해한 과산화수소는 다시 GSH와 CAT 등의 항산화 효소에 의해서 물과 산소로 전환됨으로서 제거된다 (Kim et al., 2004).

이를 확인하기 위해 간 조직에서의 GSH 함량을 측정한 결과, 대조군에 비하여 CCl₄군에서 감소를 보였으며, LEJ 투여군은 간 손상 유도에 의해 감소된 GSH 함량보다 유의하게 증가되었다. 또한 SOD 활성도는 대조군에 비하여 사염화탄소 투여로 효소 활성이 증가된 반면 LEJ 투여군의 활성은 낮게 조절되었다. CAT 활성도는 CCl₄군에서 대조군에 비하여 효소 활성이 감소하였으며, LEJ 투여군의 경우는 고용량 투여군에서 대조군과 비슷한 수준으로 나타났다. 이상의 결과를 통하여 다시마 추출물은 사염화탄소 투여로 인한 급성 산화적 간 손상에 대하여 간에서 항산화 효소의 합성을 유도하거나 항산화 효소의 활성을 촉매하여 생체 내에서 생성되는 활성 산소를 효율적으로 소거하는 항산화 작용을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

간세포의 손상 및 사멸과정에는 다양한 신호전달계가 관여한다. EGFR은 인산화를 초래하여 세포증식 및 분화에 관여하고 (Raper et al., 1987), 산화적 스트레스는 MAPKs pathways의 활성화 경로를 거쳐 간세포의 사멸을 유도과정에 영향을 미친다고 알려져 있다 (Heo, 2005; Jang and

Surh, 2002). 이러한 보고들은 사염화탄소에 의한 간세포의 작용기전에 EGFR과 ERK, p38, JNK 등의 활성이 관여 할 수 있음을 말해 주고 있다.

본 실험을 통해 사염화탄소가 산화적 손상을 일으킨다는 사실을 확인하였으며, EGFR와 산화적 스트레스와 관련된 단백질인 ERK, JNK, p38의 발현정도를 살펴보았다. 사염화탄소 처리 시 EGFR과 P-ERK 발현 억제로 간세포 성장은 억제 되었고, JNK 및 p38 MAPKs 활성의 증가로 세포 사멸 작용을 확인되었다. 이러한 연관관계는 사염화탄소가 간세포에서 EGFR과 ERK, JNK 및 p38 활성을 경유하여 간세포 사멸을 유도되는 것을 알 수 있었다. 반면, 다시마 추출물의 투여는 이들의 증가 또는 감소에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 사염화탄소 투여시 감소되었던 EGFR과 P-ERK의 발현은 LEJ 투여로 발현이 증가되었으며, P-JNK 및 P-p38는 사염화탄소만 투여한 군보다 LEJ 투여시 그 증가 정도가 감소되는 것으로 나타났다. 따라서 다시마 추출물이 사염화탄소로 유도된 간세포 성장 및 분화와 간세포의 세포사멸에 미치는 단백질 발현의 조절을 통하여 간 보호 효과가 있음을 확인하였다.

이상으로 확인된 결과들을 종합해 보면, 다시마 추출물이 혈청과 간조직의 생화학적 변화 등에 탁월한 보호 효과를 나타냈으며, 간 기능 개선을 위한 우수한 효과가 있는 것으로 추론할 수 있었다.

앞으로 다시마의 투여 용량 및 성분별 효능 연구도 추가적으로 필요할 것이며, 정확한 관련기전을 밝히기 위해서는 세포주기관련 단백질의 발현 정도를 측정하는 후속 연구가 필요할 것으로 사료된다.

VI. 참고 문헌

- Anita, K.C. and James, R.T. (1989) Interaction of hypoxia and carbon tetrachloride toxicity in hepatocyte monolayer. *Experimental and Molecular Pathology* 50: 183-189.
- Balaze, T., T.K. Murray, J.M. McLaughlan, and H.C. Grice. (1961) Hepatic tests in toxicity studies on rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 3: 71-79.
- Basu S. (2003) Carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation: eicosanoid formation and their regulation by antioxidant nutrients, *Toxicology*, 189: 113-127.
- Borek, C. 2001. Antioxidant health effects of aged garlic extract. *J. Nutr.*, 131, 1010-1015.
- Cao, Z. and Y. Li. (2004) The chemical inducibility of mouse cardiac antioxidant and phase 2 enzymes in vivo., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 317: 1080-1088.
- Cho Young-ja and Bang Mi-Ae (2004) Hypoglycemic and Antioxidative Effects of Dietary Sea-Tangle Extracts Supplementation in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats., *Korean J. Food Culture*, Vol. 19. No. 4., 419-428.
- Choi, E. J. (2001) Apoptosis signaling pathways. *Exp. Mol. Med.* 33: 85-95.
- Cohen S., Carpenter G. and King L.E. (1980). Epidermal growth factor receptor-protein kinase interactions. *J. Biol. Chem.* 255,

4834-4842.

- Collic S., Fisher AM., Tapon-Brethaudiere H., Biosson C., Durand P. and Jozefonvicz J. (1991) Anticoagulant of a fucoidan fraction. *Thromb Res.* 64: 143-154.
- Crapo, H.C., McCord, M. J. and Fridovich, I. (1978): Preparation and assay of superoxide dismutase. In *Methods in enzymology*, Fleischer, S. and Packer, I. (eds.), Academic Press, New York, Vol. 52., 382-393.
- Cui, C.B., E.Y. Lee, D.S Lee and S.S. Han. (2002) Antimutagenic and anticancer effect of ethanol extract from korean traditional Doenjang added sea tangle. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 31, 322-328.
- Davis, K.K.A. (1986) Intracellular proteolytic systems may function as secondary antioxidant defenses: a hypothesis. *J. Free Rad. Biol. Med.*, 2, 155-173.
- Debashis, D.D., Bhattacharjee, B.M. and Banerjee, R.K. (1997) Hydroxyl radicals is the major causative factor in stress-induced gastric ulceration. *Free Rad. Biol. Med.* 23, 8-18.
- Do, Hang, Choi, H. S., Kang, S. C., Kim, K. R., Sohn, E. S. and Kim, M. H. (2005) Effects of Fucoidan on NO Production and Phagocytosis of Macrophages and the Proliferation of Neuron Cells. *J. Food Sci. Nutr.* 10, 344-348.
- Ebergard Passarge. (1995) *Color Atlas of Genetics*. Thieme. 261.
- Ebihara K. and Kiriyaama S. (1990) Physiochemical property and physiological function of dietary fiber. *Nippon Shokuhin Kohyo*

Gakkaishi. 37:916-925.

Fausto N. and Webber EM (1993) Transforming growth factor- α expression during liver regeneration after partial hepatectomy and toxic injury, and potential interactions between transforming growth factor- α and hepatocyte growth factor. *Hepatology* 18(6) : 1422.

Fausto, N., Campbell, JS. and Riehle, KJ., (2006) Liver regeneration, *Hepatology.* Feb;43(2 Suppl 1):S45-53.

Fridovich, I (1978) The biology of oxygen radical. *Science* 201, 875-880

Gabriel LP. and William RH. (1982) Principles and methods of toxicity. Raban Press, New York. 407-445.

Grub S., Persohn E., Trommer WE. and Wolf. (2000) Mechanisms of cyclosporine A-induced apoptosis in rat hepatocyte primary cultures. *Toxicol. Appl. pharmacol.* 163:209-220.

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.

Halliwell, B. and J. M Gutteridge. (1985) The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol. Aspects Med.* 8:89-193.

Han, S. H., Kim, J. B., Min, S. G. and Lee C. H. (1995) The effects of Puerariae Radix catechins administration on liver function in carbon tetrachloride-treated rats. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 24, 713-719.

Hang, D., H. S. Choi., S. C. Kang., K. R. Kim., E. S. Sohn and M. H.

- Kim. (2005) Effects of Fucoidan on NO Production and Phagocytosis of Macrophages and the Proliferation of Neuron Cells. *J. Food Sci. Nutr.* 10, 344-348.
- Haroun-Bouhedja, F., M. Ellouali, C. Siquin and C. Boisson-Vidal. (2000) Relationship between sulfate groups and biological activities of fucans. *Thrombosis Res.* 100, 453-459.
- Hayes, J. D. and Strange, R. C. (2000) Glutathione S-transferase polymorphisms and their biological consequences. *Pharmacology*, 61(3), 154-166.
- Heo, Youn-Jeong (2005) Molecular role of HBx and AFT2 on ROS-induced apoptosis in human liver cells. Department of Molecular Biology Graduate School of Pusan National University, Busan National University. Busan, Korea.
- Hidaka I., Hino K., Korenaga M., Gondo T., Nishina S., Ando M., Okuda M. and Sakaida I., (2007) Stronger Neo-minophagen C, aglycyrrhizin-containing preparation, protects liver against carbon tetrachloride-induced oxidative stress in transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein. *liver Int.* ;27:845-853.
- Hur, J. (1999) Dong-ui-bo-gam. Bupin Publishing Co., Seoul.
- Hynes, NE and Lane, HA (2005) ErbB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat. Rev. Cancer*, 5:341.
- 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.

- Jorissen, R.N., Walker, F., Pouliot, N., Garrett, T.P.J., Ward, C.W. and Burgess, A.W., (2003) Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Exp. Cell Res.* 284, 31-53.
- Jung, Sang-Hoon, Lee, Yeon-Sil, Lim, Soon-Sung, Lee, Sang-Hyun, Shin, Kuk-Hyun and Kim, Yeong-Shik (2004) Antioxidant Activities of Isoflavones from the Rhizomes of *Belamcanda chinensis* on Carbon Tetrachloride-Induced Hepatic Injury in Rats., *Arch. Pharm. Res.* Vol 27, No 2, 184-188.
- Kaplowitz N., Aw TY. and Ockhtens M. (1985) The regulation of hepatic glutathione, *Ann. Rev. Pharmacol.* 25. 715-744.
- Kim, D. J., Seong, K. S., Kim, D.W., Ko, S.R. and Chang, C.C. (2004) Antioxidative effects of red ginseng saponins on paraquat-induced oxidative stress. *J. Ginseng Res.* 28(1), 5-10.
- Kim, Hyun-Kyung (2008) Protective mechanism of *Chlorella vulgaris* Extract on carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice. *Food science and biotechnology.* v.18. no.5., 1186-1192.
- Kim, J. S. and Kang, K. J. (1998) Effect of Laminaria addition on the shelf-life and of bread. *J. Korean Fod Nutr.* 11, 556-560.
- Kim, S.A., Lee, K.H. and Park, D.K. (1970) Pigment stsbilization of fresh *Undaria pinnatifida* when treatmentwith ashes. *Bull. Kor. Fish Soc.* 3, 120-128.
- Kim, Y. H. and Lee, S. S. (1995) The effect of diet containing different fiber sources. *Korean J. Nutr.* 28(9), 825-833.
- Kim, Y. Y., Lee, K. W., Kim, G. B. and Cho, Y. J. (2000) Studies on

- physicochemical and biological properties of depolymerized alginate from sea tangle, *laminaria japonicus* by thermal decomposition. *J. Kor. Fish Soc.* 33: 393-398.
- Koh, J. B. and Choi, M. A. (1999) Effects of tea fungus/kombucha on lipid metabolism in streptozotocin-induced diabetic male rats. *J. Korean. Soc. Food. Sci. Nutr.* 28, 613-618.
- Kolch, W. (2005) Coordinating ERK/MAPK signalling through scaffolds and inhibitors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 827-837.
- Kono, Y., Okada, S., Tazawa, Y., Kanzaki, S., Mura, T., Ueta, E., Nanba, E. and Y. Otsuka. (2002) Response of antioxidant enzymes mRNA in the neonatal rat liver exposed to 1,2,3,4-tetrachlorobenzo-p-dioxin via lactation., *Pediatr. Int.* 44: 481-487.
- 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.
- Leanderson, P., Faresjo, A.O. and Tagesson, C., (1997) Green tea polyphenols inhibits oxidant-induced DNA strand breakage in cultured lung cells. *Free Rad. Biol. Med.* 23, 235-242.
- Lee, D. S., Kim, H. R., Cho, D. M., Nam T. J. and Pyeun, J. H. (1998) Uronate compositions of alginates from the edible brown algaer. *J. Korean Fish. Soc.* 31(1) 1-7, 31(1):1-7.
- Lee, Myung-Yul (2001) Inhibitory Effect of Leek Green Juice on CCl₄-induced Hepatotoxicity in Rats, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 30(1), 102-106.

- Lee, Tae-Jong (2010) A Study on Liver Function and Histological Changes After Medication of Allium Sativum Water Extract in CCl₄ Liver-Damaged Rats, Department of Public Health Graduate School Keimyung University, Daegu, Korea.
- Lin, H. H., J. H. Chen, W.H. Kuo, and C. J. Wang. (2007) Chemopreventive properties of Hibiscus sabdariffa L. on human gastric carcinoma cells through apoptosis induction and JNK/p38 MAPK signaling activation. *Chem. Biol. Interact.* 165, 59-75.
- McPhalen, C. A. Vincent, M. G., and J. N. Jansonius (1992), X-ray structure refinement and comparison of three forms of mitochondrial aminotransferase., *J. Mol. Biol.* 225, 495-517.
- Moskaug JO, Carlsen H, Myhrstad MC, Blomhoff R. (2005) Polyphenols and glutathione synthesis regulation. *Am. J. Clin. Nutr.* 81: 277S-283S.
- Muramatsu, H., Kogawa, K., Tanaka, M., Okumura, K., Nishihori, Y., Koike K., Kuga, T. and Niitsu, Y. (1995) Superoxide anion dismutase in SAS human tongue carcinoma cell line is a factor defining invasiveness and cell motility. *Cancer Res.* 55, 6210-6214.
- 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.
- Nam, Chun-Suk, Kang, Kum-Suk and Ha, Bae-Jin (2007) Ulva lactuca Fucoidan Extract and its Protective Effects on CCl₄-induced

- Liver Dysfunction. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* Vol. 22, No. 2., 73-77.
- Nishino T., Alzu Y. and Nagumo T. (1991) The relation between the molecular weight and the anticoagulant of fucan sulfates from *Ecklonia kurome*. *Agriculture and Biological Chemistry* 55: 791-797.
- Nishino T., Yokoyama G., Dobashi K., Fugihara M. and Nagumo T. (1989) Isolation, purification and characterization of fructose-containing sulfated polysaccharides from the brown seaweed *Ecklonia kurome* and their blood-anticoagulant activities. *Carbohydrate Res.* 186: 119-129.
- Noda C., Yakiyama M., Nakamura T. and Ichihara A. (1988) Requirements of both glucocorticoids and glucagon as co-inducers for activation of the serine dehydrogenase gene in cultured rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 263:14764.
- Park, Hee-Juhn, Choi, Sang-Cheol, Lee, Kyung-Tae, Shin, Young-Ho and Choi, Jong-Won (2005) Evaluation of a Schizandrin C Derivative DDB-mixed Preparation(DWP-04) on Acetaminophen Detoxification Enzyme System in the Animal Model., *Kor. J. Pharmacogn.* 36(2), 81-87.
- Park, P. S., Lee, B. L. and Lee, M. Y. (1991) Effect of onion diet on carbon tetrachloride toxicity of rats. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 20. 121-125.
- Park, Seon-Yeong (2008) Antioxidant activity of enzymatic hydrolysates of sea tangle, Major in Nutrition Education Graduate School of

- Education Chonnam National University, Daejeon, Korea.
- Park, Y. J., (2004) Effects of hot-water extracts from *Laminaria japonicus* on production of melanin and inflammatory mediators. MS Thesis, Chungang University.
- Penman A. and Sanderson GR. (1972) A method for the determination of uronic acid sequence in alginates. *Carbohydrate Res.* 25: 273-282.
- Raper, SE, Burwrwen, SJ, Barker, ME and Jones, AL (1987) Translocation of epidermal growth factor to the hepatocytenucleus during rat liver regeneration. *Gastroenterology*, 92:1243.
- Recknagel RO. (1976) Carbon tetrachloride hepatotoxicity. *Pharmacol. Rev.* 19 : 145-164.
- Reitman S. and Flankel S. (1957) A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin. pathol.* 28: 56-63.
- Robbins, B. (1987) The absorption, distribution and excretion of carbon tetrachloride in dogs under various conditions. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 37: 203-216.
- Sano, M., Fukuda, K., Sato, T., Kawaguchi, H., Suematsu, M., Matsuda, S., Koyasu, S., Matsui, H., Yamauchi-Takihara, 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 angiotensinII in cardiac fibroblasts. *Circ. Res.* 89, 661-669.
- Schlessinger, J. (2002) Ligand-induced, receptor-mediated dimerization

- and activation of EGF receptor, *Cell.*, Sep 20., 110(6): 669-72.
- So, M. J., Kim, B. K., Choi, M. J., Kim, K. Y., Rhee, S. H. and Cho, E. J. (2007) Protective activity of fucoidan and alginic acid against free radical-induced oxidative stress under invitro and cellular system. *J. Food Sci. Nutr.* 12, 191-196.
- Sunde, R.A. and Hoektra, W.G. (1990): Structure, synthesis and function of glutathione peroxidase., *Nutr., Rev.* 38., 269-280.
- Sussman, M.S. and Bulkley, G.B. (1990) Oxygen-derived free radicals in reperfusion injury. *Methods Enzymol.* 186, 711-723.
- Suzuki, T. and Tsukamoto, I. (2006) Arsenite induces apoptosis in hepatocytes through an enhancement of the activation of Jun N-terminalkinase and p38 mitogen-activated protein kinase caused by partial hepatectomy. *Toxicol. Lett.* 165, 257-264.
- Taki Y., Morimoto T. and Tanaka A. (1990) Biological significance of enhanced mitichondrial ketogenesis during the early stages after 70% hepatectomy in rats. *J. Surg. Res.* 48: 56.
- Vajragupta, O., Boonchoong, P. and Wongkrajang, Y. (2000) Comparative quantitative structure-activity study of radical scavengers. *Bioorg. Med. Chem.* 8, 2617-2628.
- Vendemiale, G., Altomare, E., Grattagliano, I. and Albano, O. (1989) Increased plasma levels of glutathione malondialdehyde after acute ethanol ingestion in humans. *J. Hepatol.* 9(3), 359-365.
- Wayner, D. D. M., Burton, G. W. and Ingold, K. U. (1986) The antioxidant efficiency of vitamin C is concentratiom-dependent. *Biochem. Biochem. Biophys. Acta.* 884(1), 119-123.

- Willcox JK, Ash SL and Catignani GL. (2004) Antioxidants and prevention of chronic disease. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44: 275-295.
- Witztum, J.L. (1993) The role of oxidized low density lipoproteins in atherogenesis. *Br. Heart J.* 69, 12-14.

