



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 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](#)

이 학 석 사 학 위 논 문

투스정 추출물의 사염화탄소로 유발된
SD Rat의 간 손상 억제작용



2011 년 8 월

부경대학교 대학원

식품생명과학과

한 선 옥

이 학 석 사 학 위 논 문

톳 주정 추출물의 사염화탄소로 유발된
SD Rat의 간 손상 억제작용

지도교수 남 태 정

이 논문을 이학석사 학위논문으로 제출함.



2011 년 8 월

부경대학교 일반대학원

식품생명과학과

한 선 옥

한선옥의 이학석사 학위논문을 인준함.

2011년 8월 26일



주 심 약학박사 최 재 수



위 원 이학박사 류 은 순



위 원 농학박사 남 태 정



목 차

ABSTRACT	V
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	5
1. 재료	5
가. 시약 및 재료	5
2. 실험 방법	6
가. 톱 주정 추출물의 제조	6
나. 실험 동물 및 실험군	8
다. 혈액 및 간조직 회수	10
라. GOT/ GPT 활성 측정	10
마. 항산화 효소 SOD 활성 측정	10
바. 항산화 효소 CAT 활성 측정	11
사. 혈청 및 간조직의 GSH 량 측정	12
아. 간조직에서의 Caspase-3, -8 활성 측정	12
자. DNA 단편화	13
차. 통계자료	13
III. 결과 및 고찰	14
1. HFE의 제조 및 일반 성분 분석	14
2. HFE의 섭취가 CCl ₄ 로 유도된 급성 간독성에 미치는 영향 ..	16
가. 간 중량에 미치는 영향	16
나. 간조직 관찰	18

3. CCl ₄ 및 HFE의 투여가 혈청 효소 활성화에 미치는 영향	20
가. CCl ₄ 및 HFE의 투여가 혈청 GOT 수준에 미치는 영향	20
나. CCl ₄ 및 HFE의 투여가 혈청 GPT 수준에 미치는 영향	22
4. CCl ₄ 및 HFE의 투여가 간조직 중의 항산화 효소 활성화에 미치는 영향	24
가. 간 SOD의 활성 변화	24
나. Catalase의 활성 변화	26
다. 혈청과 간 조직 중의 GSH 활성 변화	28
5. Caspase 활성화와 DNA 분절화	31
가. 간조직에서의 Caspase-3, Caspase-8의 활성 측정	31
나. DNA 분절화에 미치는 영향	34
IV. 요약 및 결론	36
1. HFE 정제	37
2. <i>in vivo</i> assay	38
가. 간 중량과 조직에 미치는 영향	38
나. CCl ₄ 및 HFE의 투여가 혈청 효소 활성화도에 미치는 영향	38
다. CCl ₄ 및 HFE의 투여가 간조직 중의 항산화 효소 활성화에 미치는 영향	38
라. 간 조직중의 caspase 활성화 및 DNA 단편화에 미치는 영향	39
V. 참고문헌	39

List of Tables

- <Table 1> Proximate composition of *Hizikia fusiforme* and HFE 15
- <Table 2> Changes of body weight, liver weight, liver weight/
body weight ratio on acute hepatotoxicity by CCl₄. 17



List of Figures

<Figure 1> Extraction procedures of HFE from <i>Hizikia fusiforme</i> ·	7
<Figure 2> Procedures of rat experiment.	9
<Figure 3> Photographs of liver after CCl ₄ or CCl ₄ with HFE.	19
<Figure 4> Effect of HFE in GOT level.	21
<Figure 5> The level of serum GPT in the experimental Rats. ...	23
<Figure 6> Effect of HFE on SOD Activity.	25
<Figure 7> Effect of HFE on CAT Activity.	27
<Figure 8> Effect of HFE on GSH content in Liver tissue.	29
<Figure 9> Effect of HFE on GSH content in serum.	30
<Figure 10> Effect of HFE on caspase-3 activity from SD rats treated with CCl ₄	32
<Figure 11> Effect of HFE on caspase-8 activity from SD rats treated with CCl ₄	33
<Figure 12> Effect of HFE on CCl ₄ - induced liver damage.	35

Inhibition mechanism of *Hizikia fusiforme* Extracts by Carbon Tetrachloride-induced liver damage in SD Rats

Seon-Ok Han

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

Abstract

Hizikia fusiforme grows mainly in the northwest Pacific including Korea, Japan, and China, that has been widely used as food in Korea. *H. fusiforme* is a kind of brown seaweed that contains highly nutritious such as calcium, iron, iodine, vitamin A and various biological matters. *H. fusiforme* has been known to exert physiological character, diet food, antioxidant, anti-hypertension, anti-inflammatory, anti-coagulate, anti-cancer, this experiment has examined effect of *H. fusiforme* extracts by carbon tetrachloride-induced liver damage in SD rats.

To investigate the effects of *H. fusiformis* extracts (HFE) on the damaged liver of CCl₄-treated rats, Sprague-Dawley (SD) male rats weighing about 160g, were divided into 4 groups ; normal group (NOR), alone CCl₄-treated group (CON), HFE150mg/kg BW and CCl₄-treated group (HFE150), HFE300mg/kg BW and CCl₄-treated group (HFE300).

On 10 days and 11days, all groups except for the NOR group abdominal injection with CCl₄ (CCl₄: olive oil ; 1 : 1 v/v; 1 ml/kg BW).

One day later, blood and liver samples were collected to analyze bio-markers. Each group were examined for the liver weight to body weight, the activities of glutamate oxaloacetate transamine (GOT), glutamate pyruvate transamine (GPT) in serum and contents of glutathione (GSH) , activities of antioxidative enzymes and caspase-3, 8 activity, DNA fragmentation in tissues.

The liver weight, liver weight to body weight ratio(%) in NOR group, HFE groups were low compared to the CON group and also were not found to be significantly different among the HFE groups.

In the CON group, the GOT, GPT activities increased significantly when compared with the NOR group. In contrast, the HFE groups decreased compared with CON group. The SOD and CAT activities were significantly increased in the liver tissue of rats in the HFE groups compared with the CON group. Restoration of SOD activity indicated that HFE can help in cellular defense mechanisms by preventing cell membrane oxidation. Increase in the CAT activity indicates in scavenging hydrogen peroxide. The GSH levels were not found significantly decrease in the liver tissue of rats in the HFE groups, NOR group compared with the CON group. But, the GSH levels were significantly decreased in the serum of rats in the HFE groups and NOR group compared with the CON group. An decrease in GSH content indicated that HFE also help in the restoration of vital molecules such as NAD, cytochrome and glutathione. The caspase-3, -8 activities were significantly decreased HFE groups and NOR group compared to CON group.

Finally, the results indicate that the inhibition effects of HFE by carbon tetrachloride-induced liver damage in SD rats.



I. 서론

3면이 바다인 우리나라에서는 예로부터 해조류를 식용으로 널리 섭취해 왔다. 우리나라의 해조류는 약 400여종 이상이 알려져 있으며 식용으로 50여종이 이용되고 있다. 해조류는 영양학적으로 열량이 매우 낮으면서 무기질인 칼슘, 철, 요오드와 비타민 A가 풍부하고, 단백질이 10% 정도 포함되어 있으며 당질의 점질 다당류가 주성분으로 30~40%정도 함유되어 있다. 녹조류인 파래 및 청각 등에는 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 갈조류에는 알긴산, 셀룰로오스, 홍조류에는 한천, 갈락제닌, 만난 등이 들어 있어 해조류의 종류에 따라 다당류의 종류와 함량이 다른 것으로 알려져 있다. 최근에는 이렇게 추출된 점성다당류들이 식품의 물성 계량제, 동물의 사료용, 의약품, 비료용 등 다양한 용도로 이용되고 있다. 특히, 해조류의 비소화성 다당류가 식생활 변화로식이섬유처럼 중요한 생리 기능적인 역할을 함으로써 다양한 영양성분과 우수한 생리기능특성을 가진 건강 기능성 식품 소재로 해조 성분 활용에 관한 관심을 증가시키고 있다.

툇 (*Hizikia fusiformis*)은 Heterokontophyta (갈조식물문), Phaeophyceae (갈조식물강), Fucales (모자반목), Sargassaceae (모자반과), *Hizikia* (툇속)에 속하며 원주상의 줄기는 체장 20~100 cm까지 성장하는 다년생 해조류이다 (Watanabe *et al.*, 1979). 식용으로 이용되며 칼슘, 철분, 요오드 등의 무기염류가 많이 포함되어 있어 혈관경화를 예방하고, 상용으로 먹으면 치아가 건강해지며 머리털이 윤택해지고, 임산부인 경우에는 태아의 뼈를 튼튼하게 해 주는 등 예로부터 기호식품의 하나로서 이용되어 왔다 (Li *et al.*, 2006). 최근에 툇의 다양한 이용과 생리활성 물질의 추출로 그 연구 분야가 넓어지고 있다. 지금까지 툇의 연구분야로는 *E. coli*와 *B.subtilis*에

대한 뚜렷한 항균효과 (Kim *et al.*, 1994), 유리기 제거기능을 통한 항산화 효과 (Yan *et al.*, 1998; Kwak *et al.*, 2005), 톳 아세톤 추출물에서 fucoxanthin의 유리기 제거 활성화 (Yan *et al.*, 1999), 톳 에탄올 추출 다당류가 인간의 임파구에서 면역능력 증가 (Shan *et al.*, 1999), fucoidan을 분리 추출하여 혈액 항응고 활성화 (Kim *et al.*, 1998; Shin, *et al.*, 2002), 종양 세포의 성장 저해 효과 (Cho *et al.*, 1990; Yoon *et al.*, 2000; Kim, *et al.*, 2005), 톳 자숙액 에탄올 추출물의 라디칼 소거능 (Park *et al.*, 2005), 항돌연변이 및 인체 암세포 증식 억제 효과 (Choi 2006), 항균 항염 증효과 (Park *et al.*, 2009), 고혈압 억제 활성화 (Cha *et al.*, 2006) 등 여러 분야에서 많은 연구가 이루어지고 있다.

간은 내인성 및 외인성 물질의 대사와 해독, 독소의 여과, 담즙생산 및 분비, 단백질 합성, 영양분의 항상성 유지, 빌리루빈 생성과 생체방어 기능 등 다양한 기능을 수행한다. 특히 간은 소화 및 해독에 관련된 효소들을 이용하여 외부로부터 유입된 다양한 영양성분이나 화학물질을 대사시키는 과정에서 독성원인 물질이나 대사적 활성화를 통해 독성을 발현하는 물질에 직접 반응함으로써 각종 간질환에서 간세포는 쉽게 손상을 입게 되어 간 기능 장애의 원인이 된다 (Klaassen, 2001). 독성물질이 생체에 유입되면 간 기능 장애가 일어나고, 백혈구의 호중구 및 림프구등은 민감한 반응을 한다. 또한 아미노기 전이효소 및 유산염 탈수소효소 등의 혈청효소들의 활성치도 상당한 변화를 나타내는 것으로 알려져 있다 (Rabson *et al.*, 2005). 인체는 독작용을 일으키는 활성대사 물질로 전환할 수 있는 수많은 환경 오염물질과 화학물질, 약물, 음식, 박테리아로부터 생성된 독소, 방부제, 체내의 대사산물, 식품첨가물에 노출되어 있다. 이러한 활성대사물질들에 손상된 간은 간 조직 대부분이 손상되기 전까지 별 증상을 나타내지 않

다가 최종적으로 만성 간염이나 간암, 간경화로 나타난다.

혈액 내의 ALT (alanine transferase)와 AST (aspartate transferase)의 급격한 증가와 담관폐쇄에 의한 γ -GTP (γ -glutamyltranspeptidase)가 상승은 간 손상의 지표로 간기능 평가에 이용되고 있다 (Wilco *et al.*, 1995).

사염화탄소(carbon tetrachloride, CCl_4)는 대사 활성화를 통해 화학적인 간 손상을 유도하는 대표적인 화합물로 간에서 단백질 합성의 저해, K^+ 축적의 저해, 간세포의 괴사, microsomal enzymes의 억제 등을 통해 독성을 나타내는 물질로 투여방법, 경로, 횟수에 따라 급성간염, 지방간, 간 경변 등의 간질환의 유발이 가능하여 초기의 투여물질의 효과를 밝히는데 많이 이용하고 있다. 사염화탄소는 간의 형질내세망에서 CCl_3 free radical로 대사되며 세포막 인지질의 methyl carbon을 공격해서 지질과산화물을 일으켜 간독성을 나타내며, hepatic lipid의 alkyl기 또는 간세포 핵의 DNA와 공유결합을 하여 괴사를 일으킨다고 알려져 있다 (Gomez and Castro, 1980 ; Hruszkewycz *et al.*, 1987). 이들 독성 대사체는 GSH이나 cysteine 등의 sulfhydryl (-SH) groups과 반응하여 해독되기도 하지만 과량으로 생성될 경우에는 이들 항산화 물질들을 고갈시키고 중요한 기능성 세포 단백질에 공유결합함으로써 지질과산화반응을 일으켜 결국 세포괴사를 초래한다 (Recknagel *et al.*, 1989).고 알려져 있다. 이러한 공격으로부터 생체를 보호하는 직접 반응성 산소 대사물을 제거하는 일차 방어인자인 비효소적 방어인자와 이미 손상받은 거대분자를 복구하는 효소적 이차 방어인자가 있다. 비효소적 방어인자는 carotenoids (vitamin A), α -tocopherol (vitamin E), ascorbic acid (vitamin C) 등이 있고, 효소방어 기전으로서 superoxide dismutase (SOD), catalase(CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), NADH peroxidase, cytochrome c peroxidase 등이 있다 (Halliwell and

Gutteridge, 1985). CCl_4 로 유발된 간손상에 대한 치료법으로는 항산화제와 자유 라디칼 소거능이 효과가 있다고 하며 그 외에 cysteine, 함황 화합물, furan 화합물, 단백질 A 등의 이용도 알려져 있다 (Burk *et al.*, 1986).

툇은 현대인에게 가장 결핍되기 쉬우며 인체 생명과 건강유지에 미량이지만 절대 부족해서는 안 되는 칼슘과 요오드, 철분 등 무기질과 비타민A를 함유하고 있다. 특히 황을 함유한 화합물로 주된 항산화물질인 fucoxanthin은 여러 가지 생리활성물질로 작용하는 것으로 알려져 있다.

따라서 툇의 영양학적인 장점들을 바탕으로 본 연구에서는 CCl_4 로 유도된 급성 간독성에 대한 툇 주정추출물의 효소적 방어에 어떠한 영향을 미치는지 살펴보았다.



II. 재료 및 실험 방법

1. 재료

가. 시약 및 재료

본 실험에 사용된 톳은 전라남도 완도에서 생톳 (*Hizikia Fusiforme*) 을 구입하여 세척한 뒤 동결건조하여 분말화 한 것을 사용하였다.

시약은 간독성을 유발하기위해 사용한 carbon tetrachloride (CCl_4) 는 (Junsei Chemical Co. Ltd.;Japan) 을 사용하였고, 혈청중 GOT, GPT 정량 검사용 시약으로 (Asan pharm. CO. Ltd;Korea) 를, catalase assay kit (CAT)와

superoxide dismutase assay kit (SOD)는 Cayman(Cayman chemical Company, USA)를, glutathione assay kit는 Sigma (Sigma-aldrich chemical GmbH P.O, Germany)을 사용하였다. caspase-3는 CaspACETM assay system 을 Promega에서 구입하였고 DEVO-PNA substrate는 R&D Minneapolis에서, Caspase-8의 Granzyme B Substrate 1 는 Calbiochem, USA에서 구입하였다. 전기영동용 Agarose는 Seakem LF agarose BMA, USA에서, 100bp DNA ladder는 Bioneer Co., Korea에서, 그 외 DNA실험 용 시약들은 molecular biology 용으로 Sigma에서 구입하였다.

2. 실험방법

가. 톳 주정추출물의 제조

전라남도 완도군에서 구입한 생톳을 수세하여 염분과 불순물을 제거하고 동결건조기로 건조하여 분쇄기로 분말화하여 밀봉하여 -20℃에서 냉동보관하면서 시료로 사용하였다.

시료의 주정 추출물을 얻기 위해 건조 시료 40g에 증류수 1L를 첨가하고 (380rpm, 3hr, 100℃) 교반하여 추출한 후 원심분리기로 원심분리 (5000 rpm, 30min)하여 상층액을 회수하였다. 회수한 상층액의 2배 부피의 95% 주정을 처리하여 저온실에 방치시킨 후 감압 여과하여 그 잔사를 회수하였다. 잔사는 50℃에서 열풍 건조하여 분말화 한 후에 실험에 사용하였다. 톳 주정추출물을 *Hizikia Fusiforme* Extract (HFE)로 명명하였다.

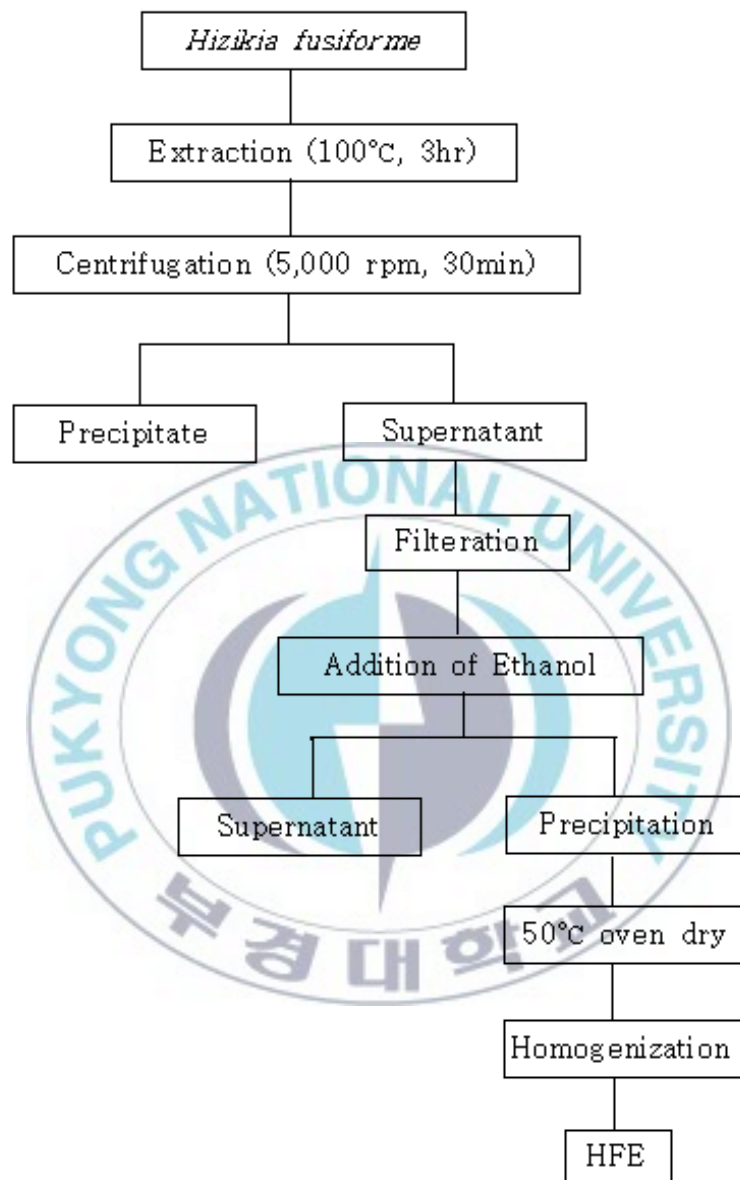


Fig. 1 Extraction procedures of HFE from *Hizikia fusiforme*

나. 실험동물 및 실험군

본 실험에서는 체중 160~170 g (5주령) 된 Sprague-Dawley계 수컷 흰쥐를 (주) 샘타코 (Samtoco. Korea)에서 구입하여 사용하였다. 실험식은 일주일간 샘타코의 흰쥐용 고형사료로 적응시켰으며, 4군으로 분리하여 실험에 사용하였다. 실험사육실의 온도는 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $50\pm 10\%$, 12시간 명암주기로 조절하였다.

일주일간의 예비사육 후 10마리씩 4개의 실험군으로 나누어 급성 간독성 실험을 진행하였다. 4개의 실험군은 정상군 normal group (NOR)과 대조군 control group (CON; CCl_4 -treated group)은 증류수를 경구 투여하였고, 톡 150mg군 (HFE150; $\text{HFE}150\text{mg/kgB.W} + \text{CCl}_4$ -treated group) 과 톡 300mg군 (HFE300; $\text{HFE}300\text{mg/kgB.W} + \text{CCl}_4$ -treated group) 은 톡 주정 추출물을 10 일 동안 1.5 ml씩 동일한 시간에 sondae로 경구 투여하였다. 일반사료와 물은 자유롭게 먹을 수 있도록 하였다. 10일과 11일째 되는 날에 대조군과 HFE 투여군에 간 손상을 유도하기 위해 CCl_4 (50% in olive oil) 1.5 ml/kgB.W을 2회 복강주사하고, 정상군에는 olive oil 1.5 ml/kgB.W을 복강 주사하였다.

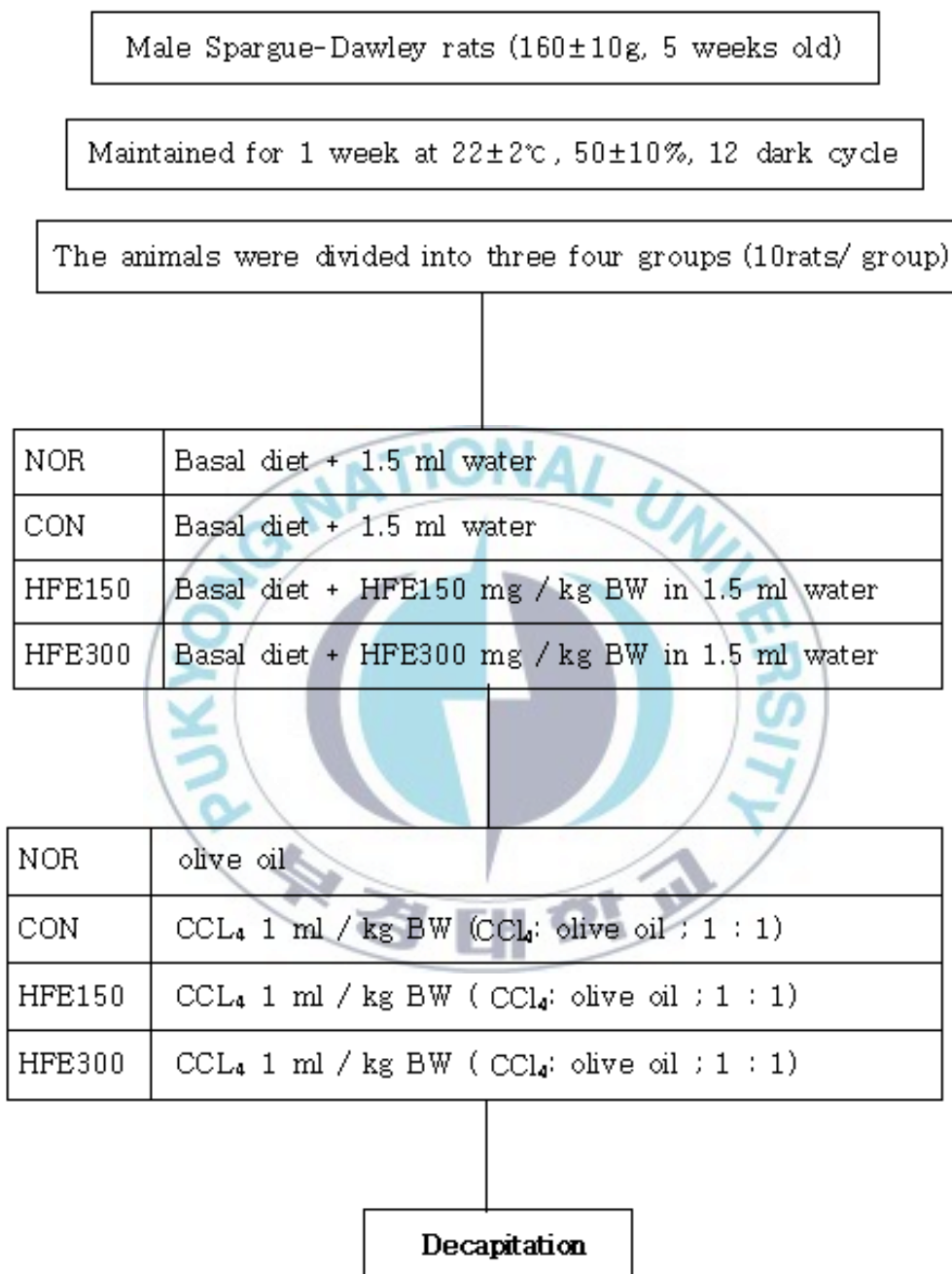


Fig. 2 Procedures of rat experiment.

다. 혈액 및 간조직 회수

CCl_4 를 투여하고 18시간 절식시킨 후에 ether로 마취하고 단두한 뒤 채혈하여, 얼음에서 1시간 방치 후에 원심분리 (3000 rpm, 15 min, 4°C)하여 상층액을 취해 냉동실(-70°C)에 보관하여 실험에 사용하였다. 간은 적출하여 생리식염수로 씻은 후, 그 무게를 칭량하고 액체질소로 급속 냉동시켜 냉동실 (-70°C)에 보관하여 실험에 사용하였다.

라. GOT/ GPT 활성 측정

혈청중의 Glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), Glutamic pyruvic transaminase (GPT) 활성은 Reitman-Frankel (Reitman and Frankel, 1957)의 방법에 따라 측정하였다.

즉, 기질액 100 μl 을 시험관에 첨가하고 37°C에서 5분간 방치한 후 혈청 10 μl 을 넣어 잘 혼합한 다음 37°C에서 GOT는 60분, GPT는 30분간 방치한 후 각각의 정색시약 100 μl 을 넣어 실온에서 20분, 0.4 NaOH 용액 1 ml를 첨가하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 분광광도계 (Ultraspec 2001 pro. Amersham Pharmacia biotech, England)로 505 nm에서 흡광도를 측정하였다. standard를 이용하여 GOT가 $y=0.001x+0.357$, GPT는 $y=0.001x+0.363$ 의 식을 찾아 x값에 흡광도를 대입하여 계산하였다.

마. 항산화 효소 SOD 활성 측정

SOD는 superoxide dismutase assay kit를 이용하여 측정하였다. SOD는 cold 20 mM HEPES buffer (1 mM EGTA, 210 mM mannitol, 70mM sucrose, pH 7.2) 1 ml에 간조직 1g을 homogenizer로 균질화한 뒤 원심분

리 (1,500 g, 5min, 4℃)하여 상층액을 회수하여 사용하였다. 96-well plate에 상층액과 SOD standard solution (20 ul bovine erythrocyte, sample buffer (50 mM Tris-HCl, pH8.0)) 을 각각 10 ul씩 분주한 후에 radical detector (50 ul tetrazolium salt solution, assay buffer (50mM Tris- HCl, pH 8.0, 0.1 mM diethylenetriaminepentaacetic acid (DTPA), 0.1mMhypoxanthine) 200ul를 첨가하고 xanthine oxidase (50 ul xanthine oxidase, sample buffer (50 mM Tris-HCl, pH8.0)) 20 ul를 넣어 20분간 실온에 반응시킨 후 450 nm 흡광도로 측정하였다. standard에서 추세선 $y=0.761x+0.190$ 을 얻어 $SOD (U/ml) = \{LR (standard \text{ 평균} / OD \text{ 값})\} - y \text{절편} / 기울기 * 회석배수$ 식을 이용하여 SOD값을 구하였다.

바. 항산화 효소 CAT 활성 측정

CAT는 Catalase Assay Kit를 이용하여 측정하였다

CAT는 0.1g의 간조직에 buffer (50 mM potassium phosphate , pH 7.0, 1mM EDTA가 포함) 1 ml을 첨가한 후 균질화하여 원심분리 (1,000 g, 15min, 4℃)한 상층액, 4.25mM formaldehyde standard, positive control, sample을 각각 20 ul 씩 96-well plate에 분주하고 1X assay buffer (100mM potassium phosphate, pH 7.0) 100 ul, % MeOH 30 ul 를 첨가한 후 hydrogen peroxide (8.82 M Hydrogen Peroxide) 20 ul를 넣고 실온에서 20분간 반응시킨 뒤 potassium hydroxide (10 M potssum hydroxide(KOH)) 30 ul을 첨가후 purpald (0.5M hydrochloric acid) 첨가하여 실온에서 10분 반응시킨 후에potassium periodate (0.5 M Potassium Hydroxide) 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

standard에서 추세선 $y = 0.254x - 0.161$ 을 얻어 formaldehyde (uM)값을

계산하였다. CAT Activity (nmol/min/ml) = $\frac{\mu\text{M sample}}{20\text{min}} \times \text{sample 희석도}$ 로 계산되었다.

사. 혈청 및 간조직의 GSH 량 측정

GSH는 glutathion assay kit (Moron et al., 1979)를 이용하여 측정하였다. 간조직과 5%의 sulfosalicylic acid (SSA) 용액을 첨가하고 homogenizer로 균질화시켜 액체질소와 37°C water bath를 이용하여 동결과 해동을 2회 반복하였다. 4°C에서 5분간 방치한 후 5,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 취한 상층액을 사용하였다. 혈청 및 상층액, Blank 을 96-well plate에 취하고 working mixture ()를 첨가하여 실온에서 5분간 반응시킨 후 0.2 mM NADPH를 넣고 피펫으로 혼합한 후 ELISA plate reader로 412nm에서 1분간격으로 5분간 흡광도를 측정하였다.

아. 간조직에서 Caspase-3, 8 활성 측정

Caspase-3, 8 활성은 CaspACE Assay System을 실험에 사용하였다. 간조직을 lysis buffer (25mM HEPES, 5mM EDTA, 2mM DTT, 0.1% CHAPS, pH7.5)에 균질화 시켜 원심분리(12,000rpm, 5min, 4°C)하여 상층액을 사용하였다. 상층액은 BCA protein Assay kit (PIERCE, USA)로 단백질 농도를 측정하여 단백질을 50mg씩 동일하게 취하여 96-well plate에 caspase-3 에서는 DEVD-pNA substrate를 첨가하여 37°C, 2시간 30분 동안 반응시켜 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Caspase-8활성 측정시 Granzyme B substrate I을 첨가하여 37°C, 2시간 30분 동안 반응시켜 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

자. DNA 단편화

간조직을 취해 TE buffer (10 mM Tris, 1 mM EDTA)와 함께 homogenizer로 균질화시켜 원심분리 (2000 rpm, 5min)하여 상층액을 버리고 pellet을 70%의 ethanol로 세척하고 건조시켜 TEbuffer에 녹여 260nm 흡광도를 측정하여 정량한 뒤 1% agarose gel에 70V에서 2시간 30분간 전기영동하였다. 전기 영동이 끝난 후 1X Redsafe (Nucleic Acid Staining Solution)로 염색하여 자외선관찰기에서 관찰하고 디지털 카메라로 촬영하였다.

차. 통계처리

실험의 분석결과는 각각의 군별로 평균과 표준편차 (mean±S.D)를 사용하여 표기하였으며, 모든 자료는 window용 SPSS 10.0 프로그램 (Statistical Package for Social Science, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 처리하였고, 반복측정에 의한 ANOVA test와 Duncan's multiple range test를 적용하였다. 모든 통계적 유의도 수준은 $p < 0.05$ 에서 살펴보았다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. HFE의 제조 및 일반 성분 분석

툇분말을 사용하여 툇 주정추출물(HFE)을 추출하였다.

툇으로부터 툇 주정 추출물을 제조하는 과정은 Fig.1에 제시하였다. 툇 분말 600g으로 최종 추출물 100g을 얻을 수 있었고 수율은 16.7(%)였다. 툇 분말의 일반성분을 분석한 결과 수분 $3.77 \pm 0.04(\%)$, 조단백질 $13.97 \pm 0.05(\%)$, 조지방 $1.46 \pm 0.05(\%)$, 조회분 $26.33 \pm 0.26(\%)$, 탄수화물 54.47(%)로 탄수화물이 가장 높은 비율을 차지하는 것을 확인하였다. 동결건조하여 물로 추출한 툇의 원심분리후의 supernatant에서 수분 함량이 3.9(%), 회분 57.8(%), 조단백질 8.7(%), 지질 2.1(%), 탄수화물 27.5(%) (Kang *et al.*)로 나타나 동결 건조하여 분말화한 툇에서는 회분과 탄수화물에서 차이가 났다. 툇 주정추출물의 일반성분은 수분이 $11.59 \pm 0.02(\%)$, 조단백질 $5.02 \pm 0.06(\%)$, 조지방 $0.15 \pm 0.03(\%)$, 조회분 $22.17 \pm 0.11(\%)$, 탄수화물 61.07(%)로 탄수화물이 가장 높은 비율로 확인되었다.

Table 1. Proximate composition of *Hizikia fusiforme* and HFE

(%)

	Moisture	Crude protein	Crude lipid	Crude ash	Carbohydrate
<i>Hizikia fusiforme</i>	3.77±0.04	13.97±0.05	1.46±0.05	27.32±0.26	53.47
HFE	11.59±0.02	5.02±0.06	0.15±0.03	22.17±0.11	61.07

$$\text{Carbohydrate} = 100 - (\text{Moisture} + \text{Crude protein} + \text{Crude lipid} + \text{Crude ash})$$

2. HFE의 섭취가 CCl₄로 유도된 급성 간독성에 미치는 영향

가. 간 중량에 미치는 영향

투스정추출물을 경구투여로 10일간 희생 2일전에 CCl₄를 처리하여 급성간독성을 유도한 Rat의 간 중량을 측정하였다. 각 실험군별 간 중량은 NOR군은 $7.34 \pm 0.1(g)$, CON군은 $10.51 \pm 0.5(g)$, HFE150군과 HFE300군은 $9.7 \pm 0.4(g)$, $9.7 \pm 0.5(g)$ 으로 CCl₄ 투여에 의한 간 비대가 나타났다. 체중에 대한 간 중량 비는 NOR군은 $3.14 \pm 0.11(\%)$, CON군은 $4.33 \pm 0.23(\%)$, HFE150군은 $3.96 \pm 0.11(\%)$, HFE300군은 $4.01 \pm 0.25(\%)$ 로 나타나 NOR에 비해 CCl₄ 단독 투여군에서 유의적인 증가로 나타났으며, HFE투여군에서 NOR에는 미치지 못하지만 CCl₄ 단독투여군에 비해 감소되었다. CCl₄에 의해 간독성이 유발된 CON군, HFE150군, HFE300군에서는 NOR에 비해 간의 비대와 간 중량 백분율이 유의적으로 증가하여, CCl₄로 급성 간독성이 유발된 CON군에서 NOR군보다 간무게/체중의 비가 더 높게 나타났다는 보고 (Jin *et al.*, 2008; Kwon and Nam, 2006)와 일치함을 보였다. CCl₄로 유도된 간독성의 체중에 대한 간 중량 백분율은 HFE150군과 HFE300군 간의 농도 의존적인 차이는 없었지만 CON군에 비해 유의적 감소를 보이는 것으로 보아 HFE의 투여로 간 손상을 일부 저지시킨 것으로 생각된다.

Table 2. Changes of body weight, liver weight, liver weight/ body weight ratio on acute hepatotoxicity by CCL₄.

experimental group	Body Weight(g)	Liver Weight(g)	liver weight/ body weight ratio (%)
NOR	234±8.3	7.34±0.1	3.14±0.11 ^a
CON	242±5.2	10.51±0.5	4.33±0.23 ^c
HFE150	246±8.7	9.7±0.4	3.96±0.11 ^b
HFE300	241±6.4	9.7±0.5	4.01±0.25 ^b

Groups are the same as in Fig.2.

Values are mean±S.D of 10 rats per each group by duncan's multiple range test.

나. 간조직 관찰

CCl_4 유도로 인한 간 손상에 톡 주정추출물이 어떠한 영향을 미치는지 해부 후 간조직을 식염수로 세척하여 디지털 카메라로 촬영하여 간 손상에 따른 간의 크기, 형태, 색깔 등 육안으로 관찰되는 것들을 비교하였다. NOR군의 간은 크기($7.34 \pm 0.1\text{g}$)가 작고 탄력이 있어 보이며 검붉은 색으로 광택이 나며 결표면은 매끈하였다. CCl_4 를 투여하면 간의 세포막 손상으로 투과성이 증가하여 부종이 일어나고 간에 지질성분이 축적되어 간장 비대를 보고 (Manson, *et al.*, 1968)한 바와 같이 CON군의 간은 CCl_4 로 인한 용혈로 인해 선홍색을 띠고 간이 비대하였으며 스펀지처럼 퍼석한 느낌을 가지고 있으며 간의 경계면이 고르지 않았다. HFE군들은 CCl_4 로 인해 간의 경계면이 고르지 않고 간 조직이 섬유화로 추정되는 부위가 관찰되었으나 간의 크기나 색깔이 NOR군과 비슷하였고 농도에 의한 차이도 관찰되지 않았다. 이러한 결과를 바탕으로 CCl_4 로 인한 간 손상을 톡 주정추출물이 일부 보호해주는 것으로 보인다.



Fig. 3. Photographs of liver after CCl_4 or CCl_4 with HFE.
Groups are the same as in Fig.2.

3. CCl₄ 및 HFE의 투여가 혈청 효소 활성도에 미치는 영향

가. CCl₄ 및 HFE의 투여가 혈청 Glutamate Oxaloacetate Transaminase (GOT) 수준에 미치는 영향

혈청 중의 GOT는 심장과 간 조직에서 발견되는 아미노기 전이 효소로서 간이 손상되면 이 효소의 혈청 농도가 상승한다. CCl₄로 유도된 간 손상으로 HFE 투여시 혈중으로 방출되는 효소를 살펴 본 실험에서 GOT, GPT 효소 활성에서 CCl₄를 처리하면 대사에 의해 CCl₄의 free radical이 생성되고 이들 free radical이 membrane을 파괴하고 세포내에 존재하는 이들 효소가 혈중으로 방출되어 이들 효소의 활성이 항진된다(Glande *et al.*, 1976; Reaknagel *et al.*, 1989).

본 실험에서 NOR군에서 226.43±16.82(U/L), CON군에서 282.57±2.48(U/L), HFE150군에서 264.29±17.71(U/L), HFE300군에서 266.43±28.22(U/L)로 나타나 NOR군보다 CON군에서 유의적으로 높게 나타났으며 HFE군과 CON군과는 서로 유의적인 차이는 없었지만 CCl₄의 복강주사에 의해 간 손상이 일어났음을 알 수 있었다. 이는 CCl₄로 유도된 간 손상에서 HFE투여가 GOT 활성을 억제시키지는 못한 것으로 나타났다 (Fig. 4). 그러나 Rat의 CCl₄ 유도 간 손상에 대한 표고버섯균사체의 효과 (Jang *et al.*, 2010)와 비교해본 CCl₄투여량에서 본 실험에서 제시한 1 ml/ kgBW가 간 손상을 회복하기 힘들 정도로 많이 투여한 결과로 GOT의 혈청 유출이 증가한 것으로 보인다.



Fig. 4 Effect of HFE in GOT level.

Groups are the same as in Fig.2.

Values are mean±S.D of 10 rats per each group by duncan's multiple range test.

나. CCl_4 및 HFE의 투여가 혈청 Glutamate Pyruvate Transaminase (GPT) 수준에 미치는 영향

혈청 중의 GPT는 주로 간에 존재하는 아미노기 전이효소로 간 손상 때 혈액으로 유출되어 간 손상의 지표로 이용된다. CCl_4 투여로 CCl_4 의 free radical이 막 단백질과 반응하여 membrane을 파괴하고 세포내에 존재하는 GPT가 혈중으로 방출되어 혈중 GPT가 상승된다 (Glende *et al.*, 1976). 이와 같이 본 실험에서 GPT활성은 NOR군에서 $18.44 \pm 12.51(\text{U/L})$, CON군이 $113.57 \pm 11.81(\text{U/L})$, HFE150군에서 $94.71 \pm 41.94(\text{U/L})$, HFE300군에서 $100.57 \pm 33.42(\text{U/L})$ 로 나타나 NOR군과 비교할 때 CON군, HFE군에서 유의적 증가를 보여 CCl_4 에 의한 간 손상이 유발되었음을 알 수 있었다. 그러나 HFE군에서는 증가된 GPT활성을 유의적 수준으로 감소시키지는 못하여 HFE투여가 GPT활성억제 작용에는 미치지 못하는 것으로 보여진다 (Fig. 5).

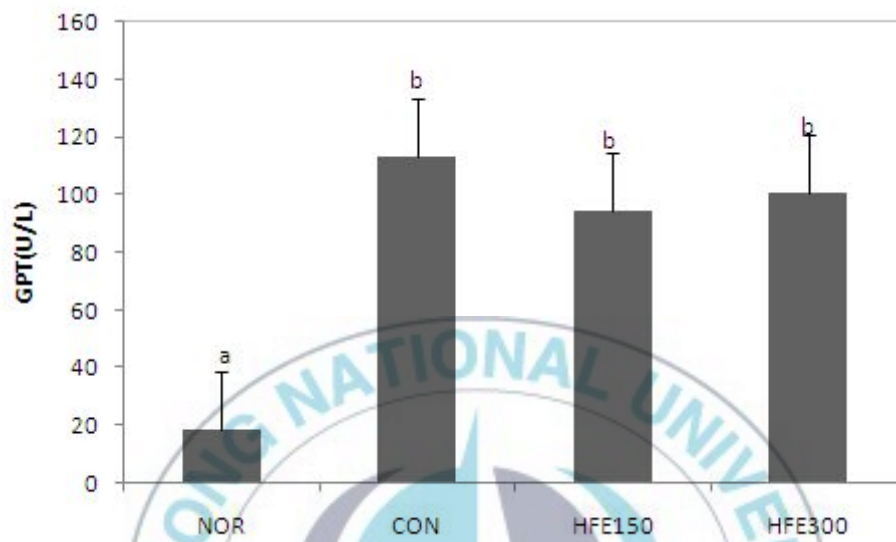


Fig. 5 The level of serum GPT in the experimental Rats.

Groups are the same as in Fig.2.

Values are mean $\pm$ S.D of 10 rats per each group by duncan's multiple range test.

4. CCl₄ 및 HFE의 투여가 간조직 중의 항산화 효소 활성화에 미치는 영향

가. 간 SOD의 활성 변화

Superoxide dismutase(SOD)는 생체내 효소적 항산화 방어기구 중의 하나로 주로 mitochondria에 존재하며 활성산소(O_2^-)나 과산화물과 직접 반응하여 H_2O_2 와 O_2 로 전환시켜 이들의 활성을 줄임으로써 산화적 손상의 일차적 방어에 관여하는 것으로 알려져 있다 (Rosen *et. al.*, 1993).

본 실험 결과 NOR군의 24.06 ± 1.49 (U/ml)에 비해 CON군의 14.95 ± 2.41 (U/ml)에서 유의적인 감소를 나타냈으며, HFE150군 17.77 ± 1.54 (U/ml)과 HFE300군 18.93 ± 2.24 (U/ml)로 NOR군에는 미치지 못하지만 CON군에 비해 유의적인 증가를 보였다. 항산화활성과 free radical 생성 억제에 CCl₄로부터 손상된 간을 보호한다(Borek, 2001)는 보고와 같이 HFE150과 HFE300의 SOD 활성 증가가 NOR군에는 못 미치지만 활성이 증가하는 것을 볼 때 이들 HFE투여에는 CCl₄에 의해 생성된 활성산소 (O_2^-)를 억제하는 작용이 있음을 알 수 있었다 (Fig. 6).

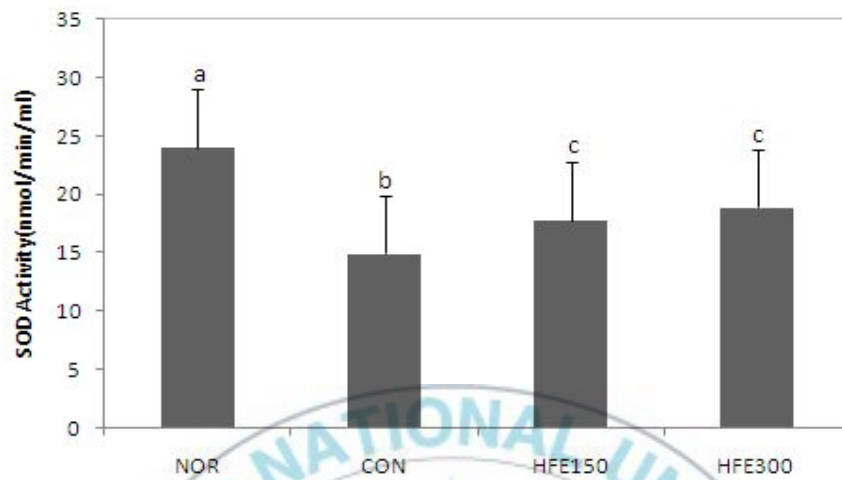


Fig. 6. Effect of HFE on SOD Activity.

Groups are the same as in Fig.2.

Values are mean $\pm$ S.D of 10 rats per each group by duncan's multiple range test.

나. Catalase의 활성 변화

Catalase는 대부분 호기적 세포에 존재하고 편재하는 항산화효소로 인체 내 대부분 과산화물 분해를 담당하는 간, 신장, 적혈구에서 높은 수준으로 발견된다 (Johansson and Borg, 1988 ; Wheeler et al., 1990). catalase는 체내에서 지방의 자동산화, 유기물의 산화, Superoxide dismutase 에 의해 생성된 H_2O_2 을 O_2 나 $2H_2O$ 로 분해, 배설시키는 산화, 환원 효소로 다수의 H_2O_2 생성효소들과 복합체를 형성하여 peroxisome에 주로 분포 하고 H_2O_2 증가에 따른 조직손상을 방어하는 효과가 있다 (Gutteridge *et. al.*, 1983)고 알려져 있으며 H_2O_2 농도가 높을 때 주로 작용한다고 보고 되었다 (Dolphin *et al.*, 1971).

본 실험에서는 CAT의 활성이 CON군의 2.74 ± 0.19 (nmol/min/ml)은 NOR군의 3.44 ± 0.57 (nmol/min/ml)과 HFE150군의 3.25 ± 0.42 (nmol/min/ml), HFE300군의 3.27 ± 0.48 (nmol/min/ml)과 유의적으로 감소한 것을 볼 때 다량의 H_2O_2 가 생성되어 CAT의 소모가 일어나 감소한 것으로 생각되어지며 CCl_4 에 의해 간 손상이 일어난 것으로 보인다. CAT Activity가 HFE150군과 HFE300군에서 NOR군에 근접하게 활성이 증가한 것은 HFE의 투여가 과산화물 생성을 억제함으로써 간 손상을 억제시킨 것으로 여겨진다(Fig. 8).

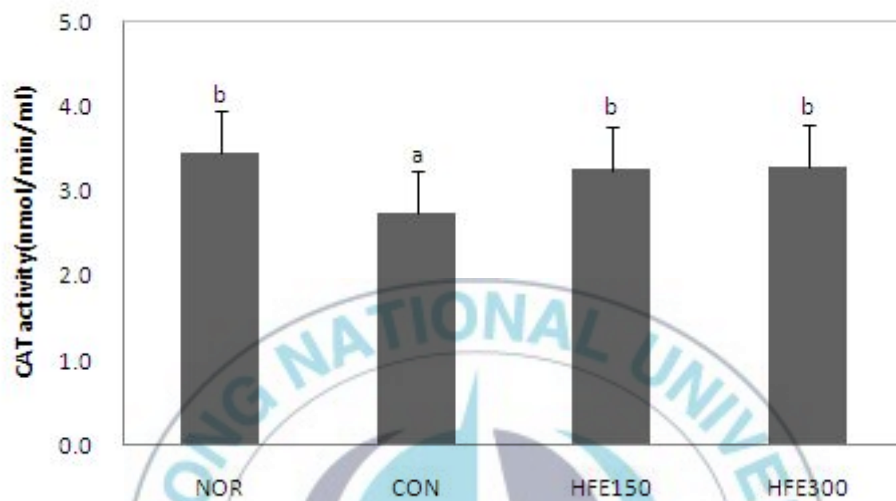


Fig. 7 Effect of HFE on CAT Activity.

Groups are the same as in Fig.2.

Values are mean $\pm$ S.D of 10 rats per each group by duncan's multiple range test.

다. 혈청과 간 조직 중의 GSH 활성 변화

GSH은 체내의 독성물질을 해독시키며 단백질이나 DNA의 합성, 아미노산기의 이동, 효소활성의 조절, 활성산소나 유리기에 의한 세포 손상을 예방하는 등 체내의 중요한 반응에 관여한다 (Parke 1993; Meister and Andrewson, 1983). GSH는 H_2O_2 와 과산화지질을 대사시키는 glutathione peroxidase의 기질이 됨으로써 세포내 항산화제들 중에서도 가장 중요한 역할을 담당하고 있다. GSH가 혈액으로 유출될때 간 세포괴사가 시작되고 미토콘드리아의 GSH가 방출됨으로써 GSH 포함으로 CCl_4 의 독성을 줄인다. 본 실험에서 사염화탄소 투여로 GSH 함량이 유의적인 차이는 없지만 CON군의 $83.25 \pm 21.82(\%)$ 에서 NOR군의 $100 \pm 18.2(\%)$ 보다 감소된 것은 GSH를 기질로 하여 H_2O_2 를 제거하는 GSH-Px의 활성 증가로 GSH가 소모된 것으로 보여지며, HFE150군의 $112.48 \pm 16.02(\%)$ 와 HFE300군의 $114.82 \pm 38.87(\%)$ 이 NOR군보다 상승한 것은 HFE의 투여로 free radicals을 소거하는 GSH-Px의 소모가 줄어들므로써 GSH의 소모량이 감소한 결과로 보여진다(Fig. 9).

간의 세포 괴사가 시작될 때 간에서 GSH가 혈액으로 유출된다. 혈액으로 유출된 GSH 량을 보면 NOR에서 $100 \pm 29.48(\%)$, CON에서 $198.7 \pm 13.46(\%)$, HFE150에서 $169.13 \pm 18.25(\%)$, HFE300에서 $170.43 \pm 21.66(\%)$ 으로 CON에서 가장 많이 방출되었고 NOR에서 가장 낮았다. HFE150과 HFE300에서는 농도적 유의성은 없었으나 NOR군 수준보다는 증가하였고 CON군보다는 유의적으로 감소하여 CCl_4 로 손상된 간이 HFE 투여로 간 세포의 괴사에 의한 GSH의 유출을 어느 정도 억제하는 작용이 있는 것으로 생각된다 (Fig. 6).

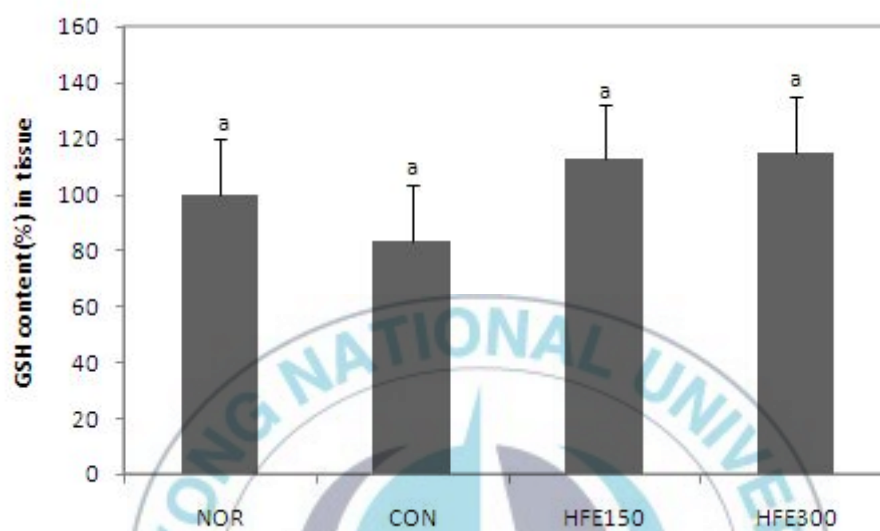


Fig. 8. Effect of HFE on GSH content in Liver tissue.

Groups are the same as in Fig.2.

Values are mean±S.D of 10 rats per each group by duncan's multiple range test.

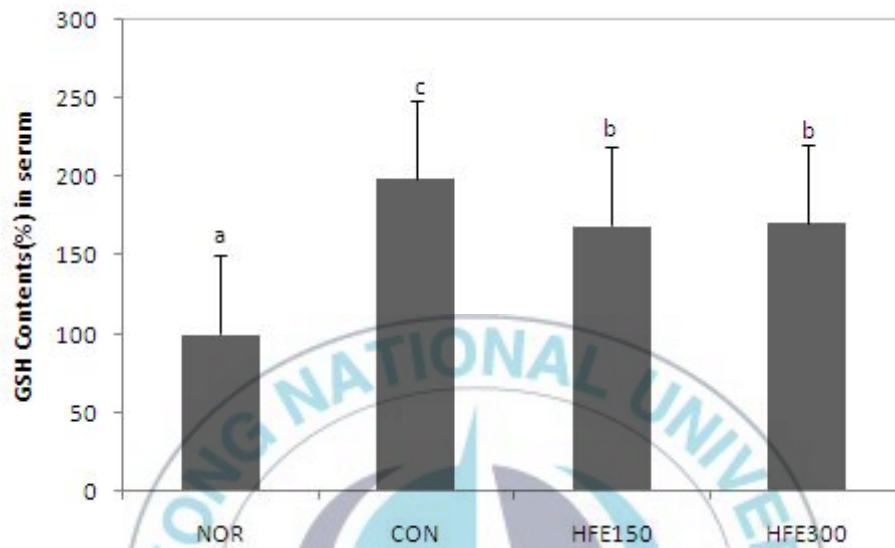


Fig. 9. Effect of HFE on GSH content in serum.

Groups are the same as in Fig.2.

Values are mean $\pm$ S.D of 10 rats per each group by duncan's multiple range test.

5. Caspase 활성화와 DNA 분절화

가. 간조직에서의 Caspase-3, Caspase-8의 활성화 측정

세포사멸은 세포내부에 프로그램된 신호를 따라 여러 유전자들이 발현됨으로써 일어나는 과정(Choi 2001)으로 caspase-3, caspase-8를 통해 세포 기질을 쪼개는 caspase가 활성화되어, 세포사멸의 생화학적, 형태학적 변화를 유발한다 (Igney and Krammer, 2002). 활성화된 caspase-8은 다른 caspase-3을 활성화 시킴으로써 세포사멸을 유도한다 (Lim 2006). 이러한 caspase의 활성화는 간 손상에 있어서 세포사멸에 필수적이다(Yin and Ding, 2003)

본 실험의 caspase-3에서 NOR군이 $100 \pm 12.92(\%)$ 로 CON군의 $132.1 \pm 8.16(\%)$ 과 HFE150군의 $108.53 \pm 10.84(\%)$ 와 HFE300군의 $115.19 \pm 6.16(\%)$ 보다 유의적으로 낮아서 간 손상이 일어나지 않은 것으로 나타났고, HFE150군은 HFE300군과 활성화 정도에서 농도 의존적인 수준은 아니었지만 NOR군 수준으로 활성화가 감소되었다. CCl₄단독 투여군인 CON군보다 HFE150군과 HFE300군이 유의적으로 감소되어서 HFE가 세포사멸을 억제하는 효과가 있을 것으로 생각된다(Fig. 11).

caspase-8에서 CON군의 활성화가 $153.55 \pm 12.17(\%)$ 로 NOR군의 $100 \pm 5.94(\%)$ 와 HFE150군의 $120.51 \pm 9.5(\%)$, HFE300군의 $123.62 \pm 8.04(\%)$ 보다 유의적으로 높았으며 HFE군은 NOR군보다는 높았으나 CON군보다는 유의적으로 감소했다. HFE150군과 HFE300군은 농도 의존적 차이는 없었다. CCl₄에 의해 유도된 급성 간 손상에서 HFE가 세포사멸에 관여하는 caspase-8 활성화 억제를 통해 간 손상을 억제하는 것으로 여겨진다(Fig. 10)

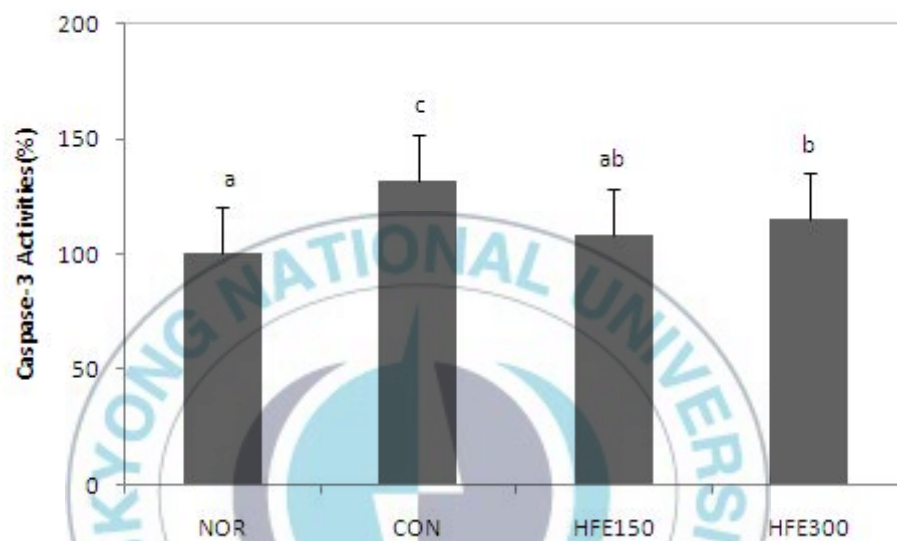


Fig. 10. Effect of HFE on caspase-3 activity from SD rats treated with CCl_4

Animals were treated as materials and method and collected liver tissues.

Groups are the same as in Fig.2.

Values are mean $\pm$ S.D of 10 rats per each group by duncan's multiple range test.

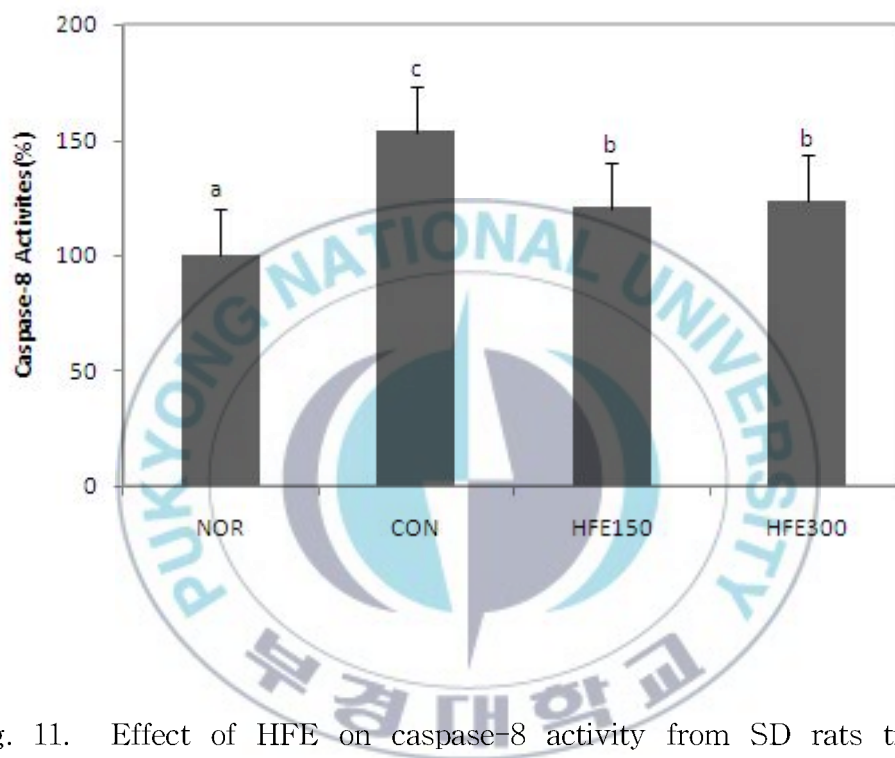


Fig. 11. Effect of HFE on caspase-8 activity from SD rats treated with CCl_4 .

Animals were treated as materials and method and collected liver tissues.

Groups are the same as in Fig.2.

Values are mean $\pm$ S.D of 10 rats per each group by duncan's multiple range test.

나. DNA 단편화

CCl_4 에 의해 세포사멸이 유도된 세포에서 HFE의 세포보호에 대한 생화학적 변화를 DNA 단편화를 통해 확인하기 위해 간조직 중의 DNA를 추출해 단편화 패턴을 관찰하였다. 그 결과 NOR군에서는 DNA 단편화가 일어나지 않았고 CCl_4 를 투여한 모든 군에서 DNA 단편화가 관찰되었다. CCl_4 단독군인 CON군의 단편화가 더 많이 관찰되었고 HFE군에서 DNA 단편화는 CON에 비해 회복되는 것으로 관찰되어 HFE 투여가 DNA 단편화에 영향을 미친 것으로 나타났다.



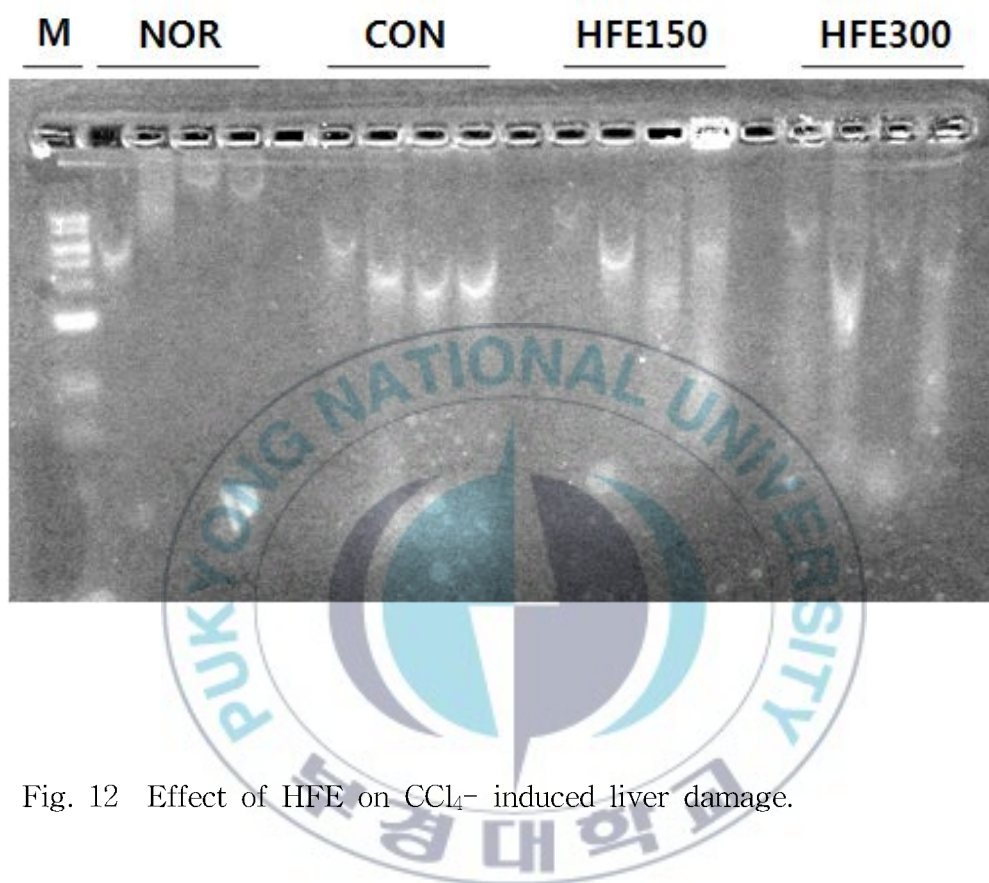


Fig. 12 Effect of HFE on CCl_4 - induced liver damage.

IV. 요약 및 결론

최근 해조류의 다양한 영양 성분과 우수한 생리 기능 특성이 밝혀지면서 다이어트 식품, 항고혈압, 항암, 항염증, 항균, 항혈액응고 활성 등 여러 분야에서 연구가 이어지고 있으며 해조류의 생리활성 물질에 대한 건강 기능 식품의 개발이 진행되고 있다. 미역, 다시마, 김, 파래와 함께 대량 생산되는 톳은 대부분 식용으로 사용되어왔다. 톳에는 칼슘, 요오드, 철분 등의 무기질과 비타민 A, 가용성 식이섬유 등이 풍부하기 때문에 현대인들에게 부족하기 쉬운 영양소들을 고루 갖추고 있어 해조류의 연구개발에 발맞춰 톳의 건강기능성 식품의 개발이 이루어지고 있다. 본 연구에서는 톳 주정 추출물이 CCl_4 로 유도된 간 손상 억제 작용을 알아보기 위해 체중이 약 160g 정도의 SD계 rat를 정상군 (NOR), CCl_4 단독투여군 (CON), 톳 주정 추출물 150mg과 CCl_4 투여군(HFE150), 톳 주정추출물 300mg과 CCl_4 투여군 (HFE300)의 4개군으로 나누어 12일간 사육하였다. 간중량, 체중에 대한 간의 비, 혈청중 GOT, GPT, GSH, 간 조직 중의 항산화 효소인 SOD, CAT와 GSH량을 측정하였고, 간 손상에 의한 세포 사멸을 유도하는 caspase-3, 8의 활성과 DNA fragmentation을 측정하여 톳 주정 추출물의 급성 간 독성 억제효과를 확인하였다.

1. HFE 정제

톳 당을 실험물질로 선택하여 열수추출 후에 주정으로 침전시켜 HFE를 얻었다. HFE의 성분 분석 결과 수분이 $11.59 \pm 0.02\%$, 조단백질 $5.02 \pm 0.06\%$, 조지방 $0.15 \pm 0.03\%$, 조회분 $22.17 \pm 0.11\%$, 탄수화물이 61.07% 로 탄수화물이 가장 높게 나타났다.

2. *in vivo* assay

가. 간 중량과 조직에 미치는 영향

간 표면에 대한 육안적인 소견은 CCL₄ 투여로 인해 간의 비대와 간 중량의 증가로 확인되었는데 HFE투여군은 CON군보다 간의 크기가 육안으로 보아도 작았다. 간 중량에서도 HEF군이 유의적으로 낮아 HFE군간의 농도 의존적인 차이는 없었지만 CCL₄로 인한 간 손상에서 HFE투여가 일부 간 손상을 억제하였다.

나. CCL₄ 및 HFE의 투여가 혈청 효소 활성도에 미치는 영향

본 실험의 GOT, GTP에서 HFE에 대한 농도 의존적 차이는 없었지만 CON군과는 유의적 차이로 높게 나타났으며, CON군과 HFE군과의 유의적인 차이는 보이지 않았다. 혈청 중의 GSH량에서도 CON군이 유의성 있게 증가하여 CCL₄에 의한 간 손상을 확인 할 수 있었으며 HFE투여로 유의성 있게 감소한 것으로 나타나 HFE의 투여가 혈청 중의 효소 활성에서는 간 손상을 억제하는 데 간여할 것으로 보여진다.

다. CCL₄ 및 HFE의 투여가 간조직 중의 항산화 효소 활성화에 미치는 영향

SOD 와 CAT의 효소의 활성화는 CON군이 NOR군보다 유의성있게 감소하여 간 손상을 확인 할 수 있었고 HFE군에서 농도적 차이는 보이지 않았지만 CON보다 HFE 투여군의 항산화 활성이 유의적으로 증가한 것으로 보아 톡 주정추출물에서 항산화 효소의 활성 증가가 간 손상을 억제하는 것을 알 수 있었다.

라. 간 조직중의 caspase 활성 및 DNA 분절화에 미치는 영향

CCl₄로 CON군에서 높은 활성으로 간 손상이 확인되었고 HFE 투여군에서는 NOR군에 근접하게 활성이 감소된 것으로 나타나 caspase의 활성에 관여한 것으로 보여지며 DNA 단편화에서 HFE의 효과는 단편화를 회복시키는 것으로 여겨진다.

CCl₄에 의해 유도된 간 손상에서 톳 주정 추출물의 간 손상 억제작용에 있어서 앞의 결과를 종합해 볼 때 톳 주정추출물의 간 손상 억제작용은 항산화 효소인 SOD, CAT 활성 감소와 세포 사멸과 연관된 caspase-3, 8의 활성 억제에 의해 작용할 것으로 생각되며 결론적으로 톳 주정추출물이 간 손상 억제에 있어 큰 작용을 할 것으로 보이며 간 손상 억제를 위한 기능성 제품 개발의 가능성이 있음을 시사하는 바이다.

V. 참고 문헌

- Jin, Y. X. Yoo, Y. S. Han, E. K. Kang, I. J. Chung, C. K. (2008).
Arterisia capillaris and Paecilomyces japonica Stimulate Lipid
Metabolism and Reduce Hepatotoxicity Induced by Carbon
Tetrachloride in rats. *J. korean Soc. Food Sci Nutr.* 37(5),
548-554.
- Borek C.(2001). Antioxidant health effects of aged garlic extraction *J.*
Nutr 131: 1010-1015.
- Cha, S. H., Ahn, G. N., Heo, S. J., Kim, K. N., Lee, K. W.(2006),
Screening of Extracts from Marine green and Brown Algae in Jeju
for Potential Marine Angiotensin-1 Converting Enzyme (ACE)
Inhibitory Activity. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 35(3), 307-317
- C. s. Jeong, K. W. Jung, and J. S. jeong (1999), Hepatoprotective effect
of Subfractions of Carthamus tinctorius L. Semen on the Reversal
of Biotransformation Xnzyme Activities in CCl4-induced
Hepatotoxic Rats, *J. Fd Hyg. Safety* 14(2), 172-178.
- Cho, M. H. (2004), The base of toxicology, *Toung Chi* (ed.), 116-120.
- Choi, E. J (2001), Apoptotic signaling pathways, *Exp Mol Med.* 33;
85-95.
- Choi, H. J., Kil, J. H., Bak, S. S., Kong, C. S., Park, K. Y. (2006).
Inhibitory Effects of Solvnt Extacts from Seven Brown Algae on
Mutagenicity and Growth of Human Cancer Cells. *Journal of Life*
Science 16(7), 1080-1086.

- Deisseroth, A. and Dounce, A. L.(1970), Catalase physical and chemical properties, mechanism of catalysis and physiological role. *Physiol. Rev.*, 50, 3-24.
- Dolphin D, Forman A, Berg DC, Fajce J, Felton RH (1971). Compounds I of catalase and horseradish peroxidase. *Proc Natl Acad Sci USA* 68: 614-619.
- Gabriel L. Plaa and William R. Hewitt (1982), Hayes: Principles and Methods of Toxicology, *Raben, Press*, 407-445.
- Glende, E. A., A. M. Hruszkewycz, and R. O. Recknagel. 1976. Critical role of lipid peroxidation in carbon tetrachloride-induced loss of aminopyrine demethylase, cytochrome P-450 and glucose 6-phosphatase. *Biochem. Pharmacol.* 25, 2163-2170.
- Gomez MI & Mareani JA (1980). Covalent binding of carbon tetrachloride metabolite to liver nuclear DNA. Proteins and lipid. *Toxicol Appl Pharmacol* 56, 199-266.
- Gutteridge, J. M. c., Beard, A. P. C., and G. J. Quinlan (1983), Superoxide-dependent lipid peroxidation. Problem with the use of catalase as a specific probe for Fenton-derived hydroxyl radicals, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 117, 901-907
- Halliwell B and Gutteridge M.(1985). The importance of free radicals and catalytic metal ions in human diseases. *Mol Aspects Med*: 8(2). 89-193.
- Hayes. (1983). Principles and Methods of Toxicology. *Raben Press*: 407.
- Heo, S. J., Lee, K. W., Song, C. B., Jeon, Y. J. (2003). Antioxidant

- activity of enzymatic extracts from brown seaweeds. *Algae* 18: 71-81.
- Hidaka I. Hino K. Korenaga M. Gondo T. Nishima S. Ando M. Okuda M and Sakaid 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.
- Hruszkewycz AM, Glende EA & Reckangel RO (1987) Destruction of microsomal cytochrome P-450 and glucose-6-phosphate by lipids extracted from peroxidized microsomes. *Toxicol Appl Pharmacol* 46, 695-702.
- Ignéy FH and Krammer PH(2002), Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis, *Nat Rev Cancer*. 2: 227-288.
- Jang, W.J. Kim, Y. S. Ha, Y. L. Park, C. W. Ha, Y. K. Kim, J. O.(2010). Optimal level for the Protection of Carbon Tetrachloride-induced Sprague-Dawley Rat Liver Damage by Mycelial Cultures of *Lentinus edodes*. *Journal of Life Science* 20(5):782-788.
- Johansson, L.H. and Borg, L. A. H. (1988) A spectrophotometric method for determination of catalase activity in small samples. *Anal. Biochem.* 174, 331-336.
- Jones, D. P., Eklow, L., Thor, H. and Orrenius, S. (1981), Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes relative contributions of catalase and glutathione peroxidase in decomposition of endogenously generated H₂O₂. *Arch. Biochem. Biophys.*, 210, 505-516.

- Jung, B. M., Ahn, C. B., Kang, S. J., Park, J. H., Chung, D. H.(2001). Effects of *Hizikia fusiforme* Extracts on Lipid Metabolism and Liver Antioxidative Enzyme Activities in Triton-Induced Hyperlipidemic Rats. *J. korean Soc. Food Sci. Nutr.* 30(4), 1184-1189.
- Jung, K., E. Ha, Y. Uhm, H. Park, M. J. Kim, H. Kim, H. Baik, M. Hong, J. Yang, and S. V. Yim(2007), Suppressive effect by *Hizikia fusiforme* on the production of tumor necrosis factor in BV2 marine microglial cells. *Neurol. Res.* 29, S88-92.
- Kang, Y. J., Ryu, K. T., Kim, H. S.(1996) Preparation of Cellular Liquid from Brown Seaweeds for Functional Tonic Products. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 25(1), 94~103
- Kim, B. M., Jun, J. Y., Park, Y. B., Jeong, I. H. (2006). Antioxidative Activity of Methanolic Extracts from Seaweeds. *J. Korean soc. food Sci. Nutr.* 35(8), 1097-1101.
- Kim, K. I., Seo, H. D., Lee, H. S., Jo, H. Y. and yang, H. C. (1998). Studies on the blood anticoagulant polysaccharide isolated from hot water extracts on *Hizikia fusiforme*. *J. korean Soc. Food Sci. Nutr.* 27. 1204-1210.
- Kim, S, A., M. K. Woo, C. S. Kwak and M. S. Lee. (2005). Antimutagenicity and cytotoxic effects of ethanol extracts from five kinds of seaweeds. *J. kor. Soc. Food sci. Nutr.* 34, 1143-1150.
- Klaassen CD (2001), Casarett & Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons (6th ed). *McGraw-Hill, New York.* 107-132, 471-489, 887.

- Ko, M. S. and Shin, K. M. and Lee, M. S. (2002), Effects of *Hizikia fusiforme* Ethanol-induced Hepatotoxicity of Rat Liver, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 31(1), 87-91.
- Krinsky, N. I. (1993). Micronutrients and their influence on mutagenicity and malignant transformation. *Ann. New York Acad. Sci.* 686, 229-234.
- Kwak, C. S., Kim, S. E., Lee, M. S. (2005). The Correlation of Antioxidative Effects of 5 Korean Common Edible Seaweeds and Total Polyphenol Content. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 34(8), 1143-1150.
- Kwon, M. J. Nam, T. J. (2006). Protective effects of Mesangi on Hepatotoxicity in Carbon Tetrachloride-Intoxicated Rats. *Journal of Science* 16(5). 734-739.
- Lee, J. H. and V. J. sun (1980), The contents of minerals in algae, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 9, 51-58.
- Li, B., X. J. Wei, J. L. Sun, and S. Y. Xu (2006), Structural investigation of a fucoidan containing a fucose-free core from the brown seaweed, *Hizikia fusiforme*. *Carbohydr. Res.* 341, 1135-1146.
- Menson, I. S., Kendal, R. Y., Dewar, H. A. and Newell, D. J (1968): Effect of oniones on blood fibrinolytic activity. *Brit. Med. J.*, 3, 351.
- Park, C., Choi, Y. H. (2009). *Hizikia fusiform* Inhibits Cyclooxygenase-2 Expression and Prostaglandin E2 Production by PMA through Inactivation of NF- κ B. *Journal of Life Science* 29(10). 1396-1402.
- Parke, D. V (1993), The importance of diet and nutrition in the

- detoxication of chemicals, In Food, Nutrition and Chemical Toxicity, *Smith-Gordon, London*. 1-15.
- Rabson, A., I. M. Roitt, and P. J. Delves. (2005). Really essential medical immunology. *Blackwell Publishing Ltd, Oxford*. 1-14.
- Recknagel RO, Glende EA, Jr & Britton RS (1991), Free radical damage and lipid peroxidation. In Hepatotoxicology. *CRC Press, Florida*. 401-436.
- Recknagel RO, Glende EA, Jr, Dolack JA & Waller RL (1989), Mechanisms of carbon tetrachloride toxicity. *Pharmacol Therapeut* 43: 139-154.
- Reitman S, Frankel S. A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxalacetic and glutamic pyruvic transaminase (1957). *Am, J, Clin, Pathol*, 28; 56- 63
- Rosen, D. R., et al. (1993), Mutations with familial amyotrophic lateral sclerosis, *Nature* 306, 274-287.
- Watanabe, T., T. Hirayama, T. Takhashi, T. Kokubo, and M. Ikeda (1979), Toxicological evaluation of arsenic in edible seaweed, *Hizikia* species. *Toxicology* 14, 1-22.
- Wheeler, C. R., Salzman, J. A., Elsayed, N. M., et al. (1990) Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity. *Anal. Biocom*. 184, 193-199
- Wilco CA, Snel K, Pang S & Mulder GJ (1995). Glutathion conjugation of bromosulfophthalein in relation to hepatic glutathioncontent in the rat in *vivo* and in the perfused rat liver. *Hepatology* 21: 1387-1394.

- Williams AT & Burk RF (1990), Carbon tetrachloride hepatotoxicity: an example of free radical-mediated injury. *Sem Liver Dis* 10: 279-284.
- Wong, C. K., Ooi, V. E., Anq, P. O. (2000). Protective effects of seaweeds against liver injury caused by carbon tetrachloride in rats. *Chemosphere* 41: 173-176.
- Yan, X., Y. Chuda, M. Suzuki and T. Nagata. (1999). Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hizikia fusiformis*, a common edible seaweed. *Biosci. Biotechnol.* 63, 605-607.
- Yoshikawa, T., Murakami, M., Yoshida, N., Seto, O., and M. Kondo (1983), Effects of superoxide dismutase and catalase on disseminated intravascular coagulation in rats, *Thromb. Haemostas* 50, 869-872.

