

## 생쥐에 있어서 꾸지뽕 당단백질의 간보호 효과

주현영 · 임계택\*

전남대학교 생명공학연구소

### Protective Effect of Glycoprotein Isolated from *Cudrania tricuspidata* on Liver in CCl<sub>4</sub>-treated A/J Mice

Heon-Yeong Joo and Kye-Taek Lim\*

Molecular Biochemistry Laboratory, Biotechnology Research Institute, Chonnam National University

**Abstract** This study aimed to determine whether or not glycoprotein isolated from *Cudrania tricuspidata* Bureau fruit(CTB glycoprotein) exerts a hepatoprotective effect on liver injury induced by the administration of carbon tetrachloride(CCl<sub>4</sub>, 1.0 mL/kg) to A/J mice. Following the administration of CTB glycoprotein(0-20 mg/kg), the activities of antioxidant enzymes (superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT), and glutathione peroxidase(GPx)), and the quantities of measured thiobarbituric acid reactive substances(TBARS), lactate dehydrogenase(LDH), and nitric oxide(NO) were evaluated from the murine liver tissues and plasma. Additionally, the activity of nuclear factor-kappa B(NF-κB) was assessed after pretreatment with CCl<sub>4</sub>. When the mice were treated with CCl<sub>4</sub> alone, the activities of antioxidative enzymes reduced but amounts of TBARS, LDH, and NO increased. However, the results of treatment with CTB glycoprotein(10 and 20 mg/kg) revealed significantly increased activities of antioxidant enzymes(SOD, CAT, and GPx), as compared with CCl<sub>4</sub> alone. On the other hand, the result showed significant diminutions of the quantities of TBARS, LDH, and NO after treatment with CTB glycoprotein(10 and 20 mg/kg), as compared to CCl<sub>4</sub> alone. The activity of NF-κB also declined after pretreatment with CTB glycoprotein, as compared with CCl<sub>4</sub> treatment alone. Thus, it is suggested that the CTB glycoprotein exerts a protective effect against CCl<sub>4</sub>-induced liver injury in A/J mice.

**Key words:** *Cudrania tricuspidata* Bureau(CTB) glycoprotein, antioxidant enzyme, lactate dehydrogenase, nitric oxide, nuclear factor-kappa B

## 서 론

비정상적인 대사과정이나 물리, 화학적인 외부적 자극에 의한 reactive oxygen species(ROS, 활성산소)의 발생은 노화 및 암화를 촉진하고 신경장애, 지질대사장애 등의 각종 질병을 유발하는 것으로 알려져 있다(1). 하지만, 생명체 내에는 항산화에 관련된 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPx), catalase (CAT) 등을 포함하는 해독 효소 및 비효적인 항산화작용에 관련된 비타민C, glytathione, α-tocopherol 등을 포함하는 해독 물질들이 존재하기 때문에, 일반적으로 대사과정에서 발생하는 ROS를 억제함으로써 생체는 외부적인 어떤 요인에 개입하지 않을 경우 산화-환원의 균형을 유지하고 있다. 최근 들어서 급격한 환경오염, 불규칙한 식사, 스트레스, 피로 및 식습관의 서구화로 인한 영양섭취의 불균형으로 면역력이 저하되고 있고, 특히 약물과 이 물질의 대사과정을 통해 생성되는 독성물질로부터 신체를 보호하는 간의 기능이 손상되어 만성간염, 간경변 및 간암 등이 현대

인들에게 큰 위협이 되고 있다. 간세포를 비롯한 생체 내 조직 손상원인의 주 요인인 유리기(free radicals: O<sup>•2</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, OH<sup>•</sup>)에 의한 지질과산화 생성으로 단백질 파괴, 염색체 이상 및 적혈구 파괴 등의 세포기능저하와 세포괴사를 일으킨다(2). 또한, 산화작용은 생체에서도 끊임없이 일어나는데 호흡에 산소를 이용하는 유기체로서 산소에 의한 산화적 스트레스에 대한 노출은 불가피하다(3). 산화와 더불어 증가되는 각종 환경오염 물질, 흡연, 알코올, 방사선 등은 과도한 반응성이 높은 활성 산소종을 발생하는 원인이 되며, superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, glutathion reductase 등과 같은 인체 내에 존재하는 항산화제의 역할만으로는 방어체계가 초과되어 산화적 스트레스에 의한 세포막과 단백질 분해, DNA 합성 억제 등의 손상이 유발된다(3,4). 생체내외에서의 산화를 방지하기 위하여 수많은 항산화 물질들이 개발 이용되어 왔는데 합성 항산화제의 간 비대, 간장 중 microsomal enzyme 활성증가, 체내 흡수물질의 독성화 혹은 발암 가능성(5) 등의 문제점이 야기되면서 천연물질로부터 항산화 물질을 찾고자 하는 연구가 활발히 진행되고 있으며, 최근 연구대상이 되고 있다(6-8). 이와 같은 원인으로 인하여, 최근 20여 년간 고지혈증, 순환기계 질환, 지방간, 비만 및 당뇨 등 서구화된 식생활에 의한 질환의 발병률 및 사망률이 꾸준히 증가하고 있는 가운데, 다양한 급, 만성 질환의 치료를 위한 대체 보완 요법이 관심의 대상이 되고 있다(9). 이들 세포독성을 일으키는 유리기 생성의 화학적 물질로는 사염화탄소(CCl<sub>4</sub>), 클로르포름, 에탄

\*Corresponding author: Kye-Taek Lim, Molecular Biochemistry Laboratory, Biotechnology Research Institute, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea  
Tel: 82-62-530-2115  
Fax: 82-62-530-0485  
E-mail: ktlim@chonnam.ac.kr  
Received September 12, 2008; revised October 14, 2008;  
accepted October 20, 2008

을, 브로모벤젠 등이 보고되고 있으며, 특히 화합물의 합성이나 혼합물의 분리를 위해 용매로 사용 되고 있는  $CCl_4$ 는 생체 세포에 복합 다기능 산화 자극에 의하여 trichloromethyl radical( $CCl_3$ )을 만들고 이는  $O_2$ 와 결합하여 trichloromethyl peroxy radical( $^{\bullet}OOCCL_3$ )을 생성하며 이들은 세포막의 인지질인 polyenoic fatty acid의 methyl carbon을 공격하여 지질과산화물 야기하여 간세포 괴사를 일으킨다고 보고된다(10). 사염화 탄소(carbon tetrachloride- $CCl_4$ )는 복합적으로 간독성(hepatotoxic)을 유발하여, 간독성 억제와 보호 작용에 관하여 약물연구 모델로써 폭넓게 연구되어 왔다. 그 이유는  $CCl_4$ 의 간독성 작용에 관한 기전은 명확히 규명되어 있지 않지만 알킬기를 지닌 간독성 물질로 규정하는 화학적 세포 파괴설이 대체로 인정되고 있다(11). 특히, 사염화탄소의 간독성 작용은 높은 반응성을 가진 자유잔기(free radical)인 트리클로로메틸 자유잔기(trichloromethyl free radical,  $^{\bullet}CCl_3$ )에 대한 p450 효소계에 의한 환원탈할로겐화(reductive dehalogenation)의 결과로 발생하며 빠르게 산소분자와 결합하여 트리클로로메틸 과옥시 자유잔기(trichloromethyl peroxy free radical,  $^{\bullet}Cl_3COO$ )가 형성되어 불포화된 지방산으로부터 수소 원자가 제거되면 탄소중양지질잔기(carbon centered lipid radical)가 생성된다. 이러한 지질잔기(lipid radical)는 빠르게 산소분자와 결합하여 지질 과옥시잔기(lipid peroxy radical)를 형성하면서 지질 과옥시화(lipid peroxidation) 과정을 시작한다(11). 이러한 기작으로써 사염화탄소는 lipid peroxidation chain reaction 및 미토콘드리아나 DNA, 세포막과 같은 세포구조물에 영향을 미쳐 세포를 손상시킨다고 보고된다(12). 특히,  $CCl_4$ 에 의한 염증반응으로부터 발생된 활성산소종은 세포막의 지질 과산화를 유도하는 것 외에도 간세포, 쿠퍼세포(Kupffer cell), 지방조직에서의 Tumor necrosis factor  $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) 분비를 촉진시킨다. TNF- $\alpha$ 는 단순 지방간에서 지방간염으로 진행하는데 가장 중요한 역할을 하는 사이토카인으로 추측된다(13). TNF- $\alpha$ 는 세포내 신호 전달을 수행하는 핵전사 인자인 nuclear factor-kappa B(NF- $\kappa$ B)의 발현을 증가시켜 염증 유발 관련 경로를 활성화시키고, interleukin-1(IL-1), IL-6, transforming growth factor  $\beta$ (TGF- $\beta$ )등 염증성 사이토카인이 증가하게 된다. 이는 콜라겐을 분비하여 간의 섬유 화를 유발하는 간의 성상세포(stellate cell)를 활성화시키고 성상세포에 의해 콜라겐 합성 증가, 섬유화 촉진, mallory hyaline 형성이 촉진된다. NF- $\kappa$ B의 발현이 증가되면 이는 다시 TNF- $\alpha$  발현을 증가시켜 간의 염증 반응을 가속화한다(14-17). 특히, 염증반응으로부터 발생된 활성 산소종은 산화적 스트레스 전사인자들인 nuclear factor kappa-b(NF- $\kappa$ B)을 활성화시킬 수 있을 뿐만 아니라 중요한 신호 전달자인 inducible nitric oxide synthase(iNOS)와 염증성 유도효소인 cyclooxygenase(COX-2)를 활성화 시킴으로써 염증반응을 촉진시키고, 비정상적인 변이와 암을 유발하게 된다고 한다(18). 일반적으로, 천연물로부터 추출한 당단백질은 특이적인 항산화 능력을 지니고 있고, 또한 이러한 항산화제는 동맥 혈관조직이나 백혈구를 손상시키는 체내에서 발생된 ROS를 제거하여 결과적으로 세포의 손상 및 염증을 억제하는 기능이 있다고 추론할 수 있다. 꾸지뽕나무(*Cudrania tricuspidata*)는 뽕나무과에 속하는 낙엽교목으로 동아시아에 주로 분포하며, 10여종이 알려져 있는데 우리나라에서는 1종만이 전국 각지에서 자생하고 있다(19). 꾸지뽕 나무 잎은 습진 유행성 이차성염, 폐결핵, 만성 요통, 타박상 급성관절염 등의 한방치료에 사용되고 있으며, 또한 민간에서 열매와 수피는 악창, 강장, 중풍, 이뇨, 진해 등의 치료약으로 이용되고 있다(20). 최근 꾸지뽕나무의 생리활성 작용으로서의 뽕잎의 항염증 작용 및 항균작용(21,22), 마우스에서의 지질상승 및 산화 억제 작용(23) 등이 보

고 되었으나, 꾸지뽕나무 열매의 당단백질에 대한 연구는 미비한 실정이다. 당단백질의 효과는 *in vitro* 실험을 통하여 확인된 것으로, 생체조직에서의 간보호 효과에 대한 연구는 아직 부족한 실정이다. 그러므로 본 연구는 꾸지뽕 열매에서 얻어진 당단백질을 A/J 생쥐에 경구투여한 후 사염화탄소( $CCl_4$ )를 주입한 간독성 모델을 통하여 꾸지뽕 당단백질의 간보호 효과를 관찰하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 시약

Ammonium thiocyanate(A7149), catalase(C40), dextran sulfate(D8906), ethylenediaminetetraacetate(EDTA, E5134), ethylene glycol bis(2-aminoethyl ether)-N, N, NN- tetraacetic acid(EGTA, E4378), ferrous chloride(F2130), glucose oxidase(G8135), glutathione peroxidase(GPx, G1637), linoleic acid(L8134), neutral red(N7005), N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride(N5889),  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide( $\beta$ -NADH, N6005), nonidet P-40(NP-40, N0896), olive oil(O1514), sucrose(S8501), sulfanilamide(S9251), superoxide dismutase(S2515), 1,1,1,3-tetraethoxypropane(T9889), trichloroacetic acid(TCA, T9159), trypsin(T4549), 2-thiobarbituric acid(TBA, T5500)는 Sigma(St Louis, MO, USA)사의 제품, carbon tetrachloride( $CCl_4$ , 289116)는 Aldrich(Milwaukee, WI, USA) 제품을 사용하였으며, 모든 시약들은 일급 또는 특급 시약을 사용하였다.

### 꾸지뽕 당단백질의 당과 단백질 함량

정제된 꾸지뽕 당단백질의 단백질과 당 함량은 Lowry 등(24)과 Dubois 등(25)의 방법을 각각 이용하여 측정하였다. 단백질 함량은 Reagent A(2% anhydrous  $Na_2CO_3$  in 0.1N NaOH)와 Reagent B(0.5%  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  in 15% sodium tartate)를 50:1로 혼합한 반응액에 200 mL의 꾸지뽕 당단백질(100 mg/mL)을, 혼합한 후 10분간 정치시켰다. 여기에 100 mL의 Folin-Ciocalteus phenol reagent(10% phenol reagent)를 30분간 처리한 후, 650 nm 파장에서 spectrophotometer(S106; Seoulin Bioscience, Seoul, Korea)로 흡광도를 측정하였다. 한편, 꾸지뽕 당단백질의 당 함량은 50 mL의  $H_2SO_4$ 를 처리하여 실온에서 10분간 반응시킨다. 반응 후, 25°C 항온수조에서 10분간 정치시키고, 490 nm 파장에서 spectrophotometer로 흡광도를 측정하였다.

### 실험동물 및 시료채취

실험동물은 5주령의 수컷 A/J 생쥐로  $25 \pm 3^\circ C$ 로 조절된 사육실에서 상품화된 마우스용 사료와 음용수는 자유롭게 급이하고 사육환경에 적응시킨 후 체중 35-40 g의 생쥐만을 선별하여 사용하였다. 생쥐를 다음과 같이 5그룹으로 분리하고 각 그룹은 5마리씩 실험구로서 설계하였다. 처리군에 있어서, 각 그룹의 생쥐에게는 PBS 100  $\mu$ L에 용해한 꾸지뽕 당단백질을 10 mg/kg(그룹 4)과 20 mg/kg(그룹 2, 5)씩 1일 1회 3일간 일정시간에 카테터를 이용하여 구강섭취시켰으며 대조그룹(1)의 경우 PBS만을 다음과 같이 투여하였다.

- 1) Control (n = 5),
- 2) Control + CTB glycoprotein (20 mg/kg) (n = 5),
- 3)  $CCl_4$  (n = 5),
- 4)  $CCl_4$  + CTB glycoprotein (10 mg/kg) (n = 5),
- 5)  $CCl_4$  + CTB glycoprotein (20 mg/kg) (n = 5).

CCl<sub>4</sub>에 의한 간독성 유발 실험모델은 Long과 Moore(26)의 방법에 따라 CCl<sub>4</sub>를 olive oil과 동량 혼합액으로 체중 100 g 당 0.1 mL를 복강투여로 급성 간에 손상을 유발시켰으며, 정상군은 CCl<sub>4</sub> 주입시 olive oil 만을 복강주사하였다. 꾸지뽕 당단백질 투여군은 10 그리고 20 mg/kg 용량으로 CCl<sub>4</sub>를 주사하기 전에 경구투여로 격일로 3회 전처치하였으며, 정상대조군은 PBS(생리식염수)만을 경구투여하였다. CCl<sub>4</sub> 투여 후 18시간 가량 절식시키고 마취한 후 심장천공법에 의해 혈액을 채취하고 개복하여 간을 적출하였다. 채취한 혈액은 1500 g, 4°C, 20분 동안 원심분리한 후 상층액을 수거하고, 개복하여 적출한 1.5 g의 간조직을 0.25 M sucrose와 1.5% potassium chloride를 함유한 10 mM EDTA(pH 7.4) 완충용액에 넣고 균질기로 분쇄한 후 4°C에서 9,000 g에서 15분 동안 원심분리하였다. 원심분리된 용액 중 상층액 1 mL를 취하여 catalase(CAT)의 활성 측정에 상용하였고, 그 상층액을 다시 15,000 g로 60분 동안 원심분리한 다음 상층액을 각 1 mL씩 취하여 superoxide dismutase(SOD)와 glutathione peroxidase(GPx)의 활성을 측정하였다.

### 해독효소 활성 측정

**1) SOD 활성 측정:** SOD의 활성도는 Beauchamp와 Fridovich(27)의 방법을 이용하였다. 20 µL의 시료에 반응액[0.1 mM NBT, 50 mM sodium carbonate(pH10.2), 0.1 mM EDTA]을 잘 혼합하고, 200 µM riboflavin을 처리하여 최종 부피가 1 mL가 되게 한다. 이후 2개의 40 W의 형광등 30 cm 떨어진 위치에서 15분간 반응시킨 후 560 nm 파장에서 spectrophotometer로 흡광도를 측정하였다.

**2) CAT 활성 측정:** CAT의 활성도는 Thomson 등(28)의 방법에 따라 실험하였다. 먼저 200 µL의 50 mM phosphate buffer (pH7.4)에 20 µL의 시료를 혼합하고 30°C에서 5분간 정치시킨다. 이곳에 200 µL의 100 mM sodium perborate(pH7.4)를 잘 혼합한 후 2분 동안 220 nm의 파장에서 spectrophotometer로 흡광도를 측정하였다.

**3) GPx 활성 측정:** 혈액의 활성도는 Mohandas 등(29)의 방법을 이용하였다. 20 µL의 시료에 반응액(0.05 M phosphate buffer (pH 7.0), 1 mM EDTA, 1 mM sodium oxide, 1 unit glutathione, 0.25 M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)을 잘 혼합하고, 37°C에서 10분간 정치시킨다. 0.2 M의 NADPH 처리한 후 340 nm 파장에서 spectrophotometer로 흡광도를 측정하였다.

### Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) 측정

과산화지질의 정량은 thiobarbituric acid(TBA)와 반응하는 물질(TBARS)을 Buege와 Aust(30)의 방법을 이용하여 측정하였다. 쥐의 혈액을 1500 g, 10분간 원심분리에서 얻은 상층액의 두 배를 TBA 용액으로 처리한다. TBA 용액에는 15% TCA 용액, 0.335%의 TBA 그리고 0.25 N의 HCl 용액을 가하여 잘 섞어 제조한다. 그 다음 혈액의 상층액에 TBA 용액을 두 배 처리한 후 95°C의 수조에서 30분간 가열한 다음 즉시 냉각시켰다. 그 다음 1000 g에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취해 535 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 표준품으로는 1,1,3,3-tetramethoxypropane standard curve를 사용하였다.

### Lactate dehydrogenase(LDH) 활성 측정

LDH 측정은 쥐의 혈청(plasma)에서 Betgmeyer와 Bernte(31) 등

의 방법을 사용하여 측정하였다. 혈청(35 mL)과 여기에다 최종농도가 3.15 mL가 되게 0.6 mM의 pyruvate가 첨가된 48 mM의 potassium phosphate buffer(pH 7.5)를 첨가하여 잘 섞는다. 여기에 0.18 mM의 β-NADH를 첨가하여 340 nm의 흡광도에 2분간 β-NADH와 LDH 활성이 저하되는 정도를 측정하였다.

### 활성산소종 및 nitric oxide(NO) 측정

활성산소종 억제효과의 측정은 Wang과 Joseph(32)의 방법에 따라 실험하였다. 쥐의 혈청을 20 µM의 H2DCF-DA를 30분간 처리 후, 485-530 nm 파장에서 fluorescent microplate reader(Dual scanning SPEC-TRAMax, Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, CA, USA)로 흡광도를 측정하였다. 한편 꾸지뽕 당단백질의 NO 억제효과 측정은 Green 등(33)의 방법을 따랐다. 쥐의 혈청에 Griess reagent(1% sulfanilamide in 2.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% N-(1-naphthyl) ethylene diamine dihydro chloride in 2.5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)를 혼합하고 실온에서 10분간 정치시킨 후, 540 nm 파장에서 microreader(hyperion, Ind, Miami, FL, USA)로 흡광도를 측정하였다.

### Western blot 분석

Western blot 실험을 수행하기 위하여, 간 조직을 lysis buffer (0.6% NP-40, 150 mM NaCl, 10 mM HEPS(pH 7.9), 1 mM EDTA, 그리고 0.5 mM PMSF)에서 균질하여 핵 단백질을 추출하였다. 핵 단백질은 Deryckere와 Gannon(34)의 방법을 참고하여 buffer A(10 mM HEPS; pH 7.9, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 0.1 mM DTT, 0.5 mM PMSF in isopropano, 1.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5% NP-40)와 protease inhibitor cocktail이 포함된 buffer B(20 mM HEPS; pH 7.9, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 25% glycerol, 0.5% NP-40)에서 추출되었다. 이렇게 얻어진 핵단백질을 Lowry 등(24)의 방법으로 단백질 농도를 측정하고, 10% SDS-polyacrylamide gels에 100 V, 30 mA에서 2.5시간 동안 전기영동한 후, 이 gel을 nitrocellulose membranes에 옮겼다. 옮겨진 nitrocellulose membranes을 5% 탈지분유가 함유된 TBS-Tween 용액(25 mM tris-base, 137 mM NaCl, 2.68 mM KCl, 0.05% tween-20, pH 7.5)으로 25°C에서 1시간 동안 반응시킨 다음, 3000배 희석된 primary antibody(NF-κB(p50), AP-1(c-Jun) β-actin)(Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)와 10,000배 희석된 secondary antibody를 적정 시간 동안 순차적으로 처리하고, 발색시약(BCIP/NBT solution)을 넣어 NF-κB(p50), β-actin의 활성도를 Scion Imaging Software(Scion Image Beta 4.02, Scion, Frederick, MD, USA)를 이용하여 나타내었다.

### 통계처리

모든 실험은 5회 반복 실시하였으며, 실험결과는 SPSS program (ver 12.0)의 one-way analysis of variance(ANOVA)을 이용하여 분산 분석한 후 유의적인 차이가 있는 항목에 대해서는 Duncan's multiple range test로 시료간의 유의적인 차이를 검정하였으며, 조군과 비교하여 p값이 5% 미만일 때를 통계학적 유의성이 있다고 판정하였다.

## 결과 및 고찰

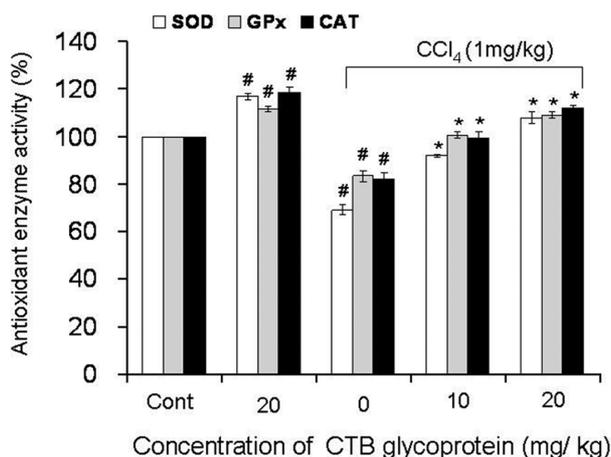
꾸지뽕 당단백질을 7일 동안 경구투여한 A/J 생쥐 체중변화와 간의 무게는 Table 1에 나타내었다. 체중은 아무것도 처리하지 않은 군(Group 1), 꾸지뽕 당단백질(20 mg/kg) 만을 처리한 군(Group

**Table 1. The effects of CTB glycoprotein on body weights and liver weights in CCl<sub>4</sub>-induced A/J mice**

Treatment	Relative weight (%)	
	Body weight	Liver weight
Control	100	5.1±0.1
CTB glycoprotein (20 mg/kg)	99.6±0.7	4.9±0.3
CCl <sub>4</sub> (1.0 mL/kg)	99.8±0.4	5.2±0.1
CCl <sub>4</sub> (1.0 mL/kg) + CTB glycoprotein (10 mg/kg)	99.1±0.9	5.1±0.1
CCl <sub>4</sub> (1.0 mL/kg) + CTB glycoprotein (20 mg/kg)	99.5±0.1	5.0±0.4

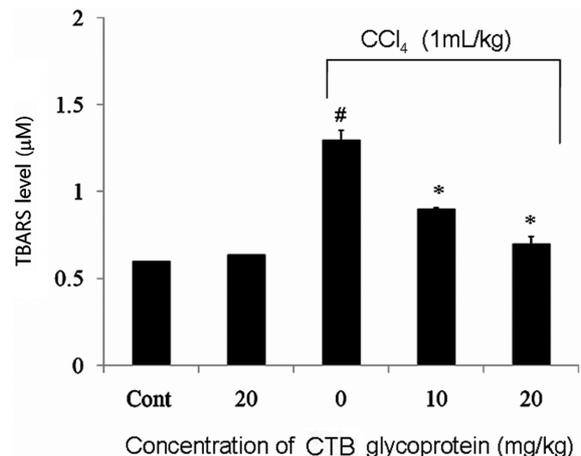
The values are mean ± S.E. from five mice done in triplicates. All values show no significant differences compared to control. CTB glycoprotein (20 mg/kg), CCl<sub>4</sub> (1 mL/kg), CTB glycoprotein (10 mg/kg) + CCl<sub>4</sub> (1 mL/kg), CTB glycoprotein (20 mg/kg) + CCl<sub>4</sub> (1 mL/kg)

2), 그리고 CCl<sub>4</sub> 만을 처리한 군(Group 3), 꾸지뽕 당단백질(10, 20 mg/kg)에 CCl<sub>4</sub>을 함께 처리한 군을 각각 Group 4, 5으로 그룹을 나누었다. Table 1에서 보는 바와 같이 실험 전과 후의 모든 그룹에서 체중의 변화와 체중 100 g당 간의 무게 역시 변화를 보이지 않은 것으로 나타났다. 간 항산화계 해독효소 활성의 변화는 꾸지뽕 당단백질이 CCl<sub>4</sub> 간 손상에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 간 cytosol에서의 SOD, CAT 그리고 GPx의 활성도 측정 결과를 Fig. 1에 나타내었다. SOD 활성도는 아무것도 처리하지 않은 군(Fig. 1 lane1-1), 꾸지뽕 당단백질(20 mg/kg) 만을 처리한 군(Fig. 1 lane1-2), 그리고 CCl<sub>4</sub>만을 처리한 군(Fig. 1 lane1-3), 꾸지뽕 당단백질(10, 20 mg/kg)에 CCl<sub>4</sub>을 함께 처리한 군을 각각(Fig. 1 lane1-4, 5)으로써 각각 100, 107, 69, 92 그리고 108%로 나타났다. SOD는 두 분자의 superoxide anion을 hydrogen peroxide와 oxygen molecule로 전환시켜 superoxide anion radicals에 의해 생기는 산화적 손상에 대한 세포의 방어에 일차적으로 관여한다(35). 본 실험에서는 SOD의 활성 증가가 꾸지뽕 당단백질만 처



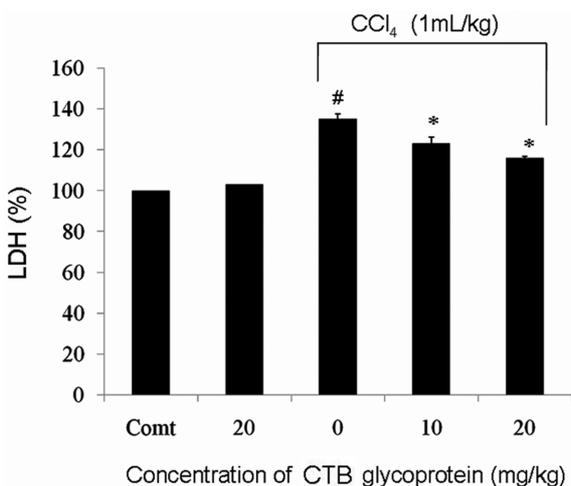
**Fig. 1. Effects of CTB glycoprotein on antioxidant enzyme activities in CCl<sub>4</sub>-treated mice.** The values are mean±S.E. from five mice done in triplicates. # represents a significant difference between CCl<sub>4</sub> and control, #*p*<0.05 \**p*<0.05 compared to control group CTB glycoprotein (20 mg/kg), CCl<sub>4</sub> (1 mL/kg), CTB glycoprotein (10 mg/kg) + CCl<sub>4</sub> (1 mL/kg), CTB glycoprotein (20 mg/kg) + CCl<sub>4</sub> (1 mL/kg) treated group. SOD, superoxide dismutase; CAT, catalase; GPx, glutathione peroxidase.

리한 군에서 control에 비해 유의적으로 증가를 보이다가 CCl<sub>4</sub>만 처리한 군에서 유의적으로 감소하였으나(*p*<0.05), 다시 꾸지뽕 당단백질의 농도에 비례하여 유의적으로 증가를 보였다. 간조직의 cytosol에서의 GPx 활성도 측정결과는 Fig. 1 lane2와 같이 GPx의 활성도는 각각 100, 112, 83, 101 그리고 109%로서 SOD와 유의적으로 비슷한 경향을 보였으며(*p*<0.05), GPx는 과산화수소를 소거하는 peroxide로 많은 조직에 존재하며 NADP<sup>+</sup>를 매개로 하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 제거하면서 환원형 glutathione(GSH)을 산화형 glutathione(GSSG)로 전환시킨다(36). 한편, CAT 활성도는 각각의 그룹에서 100, 118, 82, 100 그리고 112%로 유의적인 증가를 보였다. 특히, CAT는 간에 가장 많이 존재하며 대부분의 호기성 세포에 함유되어 있는 효소로써 체내에서 지방의 자동산화, 유기물의 산화 및 superoxide dismutase에 의해 생성된 hydrogen peroxide를 GPx와 함께 산소와 H<sub>2</sub>O로 전환시키는 작용을 하는 산화 환원 효소의 일종으로(37) GPx에 비해 Km 값이 높기 때문에 과산화수소의 농도가 높을 경우 주로 작용한다. SOD와 CAT 그리고 GPx의 활성에 있어서 PBS와 꾸지뽕 당단백질 20 mg/kg만을 처리한 군에 비하여 CCl<sub>4</sub>만을 처리한 군에서 그 활성이 유의적인 수준으로 감소하다가 10과 20 mg/kg 농도의 꾸지뽕 당단백질과 CCl<sub>4</sub>를 병합처리한 군에서 다시 유의적인 수준에서 그 활성이 증가됨을 알 수 있었다(*p*<0.05). 혈액에서의 지질과산화물 형성을 비교하기 위한 방법으로서 측정된 TBARS는 실험군 간에 역시 유의적인 차이를 보였다(*p*<0.05). 또한, Fig. 2에서 보듯이 CCl<sub>4</sub>만을 처리한 TBARS 수치가 1.3 mM에 비해 꾸지뽕 당단백질 10과 20 mg/kg을 주입한 군의 TBARS 수치가 0.9와 0.7 mM에서 유의적으로 낮아지는 것을 알 수 있었다(*p*<0.05). 지질과산화 반응은 생체조직막의 다가불포화지방산 유리기에 의해 산화적 분해를 일으키는 것으로, 지표로 TBARS 수준을 사용하며 이의 증가는 산화적 스트레스의 증가를 나타낸다. 이는 결과적으로 생체막의 기능저하, 유동성 감소, 항상성 유지장애 등을 초래하여 당뇨병, 동맥경화증, 암과 같은 만성적 성인병을 발생시키는 주요 원인이 되고 있으며 특히 세포의 노화와 관련성이 있다고 보고된다(38). 또한, 여러 가지 독성 화합물이나 약물 또는 질병에 의

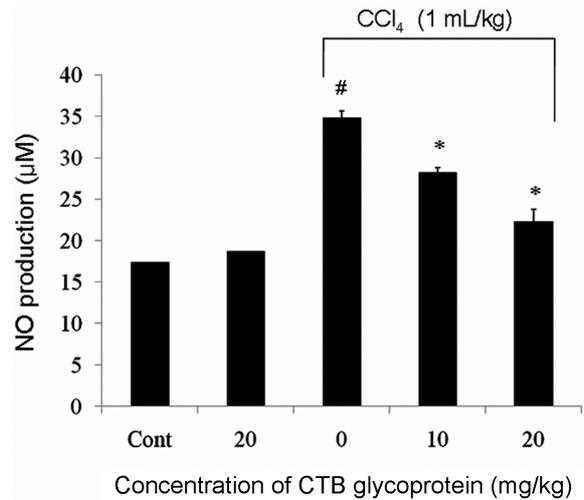


**Fig. 2. Effects of CTB glycoprotein on TBARS formation in CCl<sub>4</sub>-treated A/J mice.** Each bar represents the means±S.E. from pentaplicates experiments (n=5). # represents a significant difference between CCl<sub>4</sub> and control, #*p*<0.05 \**p*<0.05 compared to control group CTB glycoprotein (20 mg/kg), CCl<sub>4</sub> (1 mL/kg), CTB glycoprotein (10 mg/kg) + CCl<sub>4</sub> (1 mL/kg), CTB glycoprotein (20 mg/kg) + CCl<sub>4</sub> (1 mL/kg) treated group.

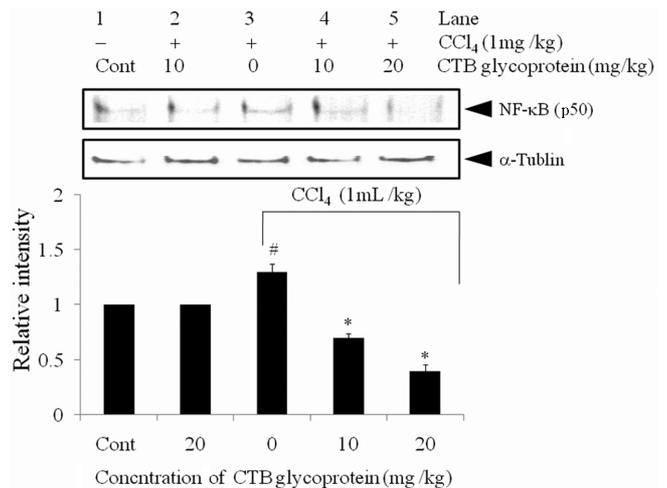
한 생리학적 현상이나 조직의 손상 정도를 나타내는 가장 중요한 기전으로 인정되고 있는데, 이는 조직내 세포의 산화적 스트레스 증가와 생체내 항산화 방어력을 낮추는데 기여한다(39). LDH는 조직에 분포되어 있는 효소로서 pyruvic acid와 lactic acid가 간의 가역적 전환에 관여하여 촉매 작용을 한다. 조직의 산화적 손상, 노화 및 기타 퇴행성 질환 유발의 요인이 되는 과산화지질 함량을 CCl<sub>4</sub>만을 처리한 군과 꾸지뽕 당단백질을 같이 처리한 군의 혈청에서 관찰한 결과, 유의적인 수준으로 감소하는 경향을 보였다. LDH를 내포한 조직이 파괴될 때 혈액 중으로 흘러나와 혈중 LDH가 상승한다. 꾸지뽕의 당단백질에 의한 혈청중의 LDH 활성도 변화는 Fig. 2와 같다. 혈청중의 LDH 활성도는 아무것도 처리하지 않은 군(Fig. 3 lane1-1), 꾸지뽕 당단백질(20 mg/kg)만을 처리한 군(Fig. 3 lane1-2), 그리고 CCl<sub>4</sub>만을 처리한 군(Fig. 1 lane1-3), 꾸지뽕 당단백질(10, 20 mg/kg)에 CCl<sub>4</sub>을 함께 처리한 군을 각각(Fig. 3 lane1-4, 5)로 나타내었으며, 여기서 실험결과 CCl<sub>4</sub>만을 처리한 군에서 LDH가 증가하다가 꾸지뽕 당단백질을 처리한 군에서 농도에 비례하여 유의적인 수준에서 감소하였다( $p < 0.05$ ). NO는 DNA 염기의 deamination 등을 유도함으로써 유전자의 돌연변이화(mutagenesis)로 인한 유전자 독성을 유도할 뿐만 아니라, thiol 및 lipid 등과 반응을 하여 간접적으로 세포독성작용을 유발할 수 있다(40). Fig. 4에서 보는 바와 같이, 꾸지뽕 당단백질의 처리 없이 CCl<sub>4</sub>를 처리하였을 때, 대조군에 비해 쥐의 혈청에서 NO의 농도가 34.8 μM 만큼 증가한 반면, 10 그리고 20 mg/kg 꾸지뽕 당단백질을 처리한 군에서 사염화탄소에 의해 증가된 NO의 농도를 각각 28.2 그리고 22.3 만큼 유의적인 수준으로 감소시켰다( $p < 0.05$ ). 다음으로 간세포 수준에서 꾸지뽕 당단백질의 염증성 신호 전달인자들의 활성을 조절할 수 있는지를 알아보기 위하여, 간 조직을 분획한 후 핵 단백질을 분리하여 NF-κB(p50)을 활성변화를 Western blot 방법을 통하여 조사하였다(Fig. 5). 전사자인 NF-κB는 일반적인 상태에서는 세포질에 존재하며, 보통 NF-κB family인 Rel A(p65), p50, p52, c-Rel, v-Rel 및 Rel-B가 서로 homodimer 또는 heterodimer를 이루면서 IκB라는 inhibitory



**Fig. 3. Inhibitory effect of CTB glycoprotein on LDH activity in CCl<sub>4</sub>-treated A/J mice.** Each bar represents the means±S.E. from pentaplicates experiments (n=5). # represents a significant difference between CCl<sub>4</sub> and control, # $p < 0.05$  \* $p < 0.05$  compared to control group CTB glycoprotein (20 mg/kg), CCl<sub>4</sub> (1 mL/kg), CTB glycoprotein (10 mg/kg) + CCl<sub>4</sub> (1 mL/kg), CTB glycoprotein (20 mg/kg) + CCl<sub>4</sub> (1 mL/kg) treated group.



**Fig. 4. Effects of CTB glycoprotein on NO production in CCl<sub>4</sub>-treated A/J mice.** Each bar represents the means±S.E. from pentaplicates experiments (n=5). # represents a significant difference between CCl<sub>4</sub> and control, # $p < 0.05$  \* $p < 0.05$  compared to control group CTB glycoprotein (20 mg/kg), CCl<sub>4</sub> (1 mL/kg), CTB glycoprotein (10 mg/kg) + CCl<sub>4</sub> (1 mL/kg), CTB glycoprotein (20 mg/kg) + CCl<sub>4</sub> (1 mL/kg) treated group.



**Fig. 5. Effect of CTB glycoprotein on NF-κB p50 activity in CCl<sub>4</sub>-treated mouse liver tissue.** NF-κB (p50) proteins were performed by western blotting using an anti-NF-κB(p50) polyclonal antibodies. The relative intensity was calculated using of the Scion Imaging Software (Scion Image Beta 4.02, Maryland, USA). Each bar represents the means±S.E. from pentaplicates experiments (n=5). # represents a significant difference between CCl<sub>4</sub> and control, # $p < 0.05$  \* $p < 0.05$  compared to control group CTB glycoprotein (20 mg/kg), CCl<sub>4</sub> (1 mL/kg), CTB glycoprotein (10 mg/kg) + CCl<sub>4</sub> (1 mL/kg), CTB glycoprotein (20 mg/kg) + CCl<sub>4</sub> (1 mL/kg) treated group. α-tubulin was used as an internal control.

protein이 결합된 상태로 존재한다. 그러나 CCl<sub>4</sub>와 같은 염증성 자극 인자를 포함해 cytokines, mitogens, bacteria, UV, Oxidant, ionizing radition 그리고 phorbol esters 등의 자극이 오면 IκB가 떨어져 나가면서 분해 된다. 남은 dimer(보통 p50-p65 heterodimer)가 세포질에서 핵으로 이동하여 염증성 신호매개자들 등의 발현에 관여 하는 유전자의 promoter나 enhancer의 κB site에 결합

함으로써 전사를 유도하는 것으로 알려져 있다(41). Fig. 5에서 보는 바와 같이,  $CCl_4$ 만을 처리한 간의 핵 내에서 NF- $\kappa$ B(p50)의 활성은 대조군에 비해 유의적으로 증가했다(Fig. 5 lane 3). 하지만,  $CCl_4$ 와 꾸지뽕 당단백질 10 그리고 20 mg/kg을 병합처리한 군에서는 NF- $\kappa$ B(p50)의 활성은 투여된 꾸지뽕 당단백질의 농도에 비례하여 감소했다(Fig. 5 lane 4, 5). 따라서, 꾸지뽕 당단백질은 핵 내의 전사인자인 NF- $\kappa$ B(p50)의 활성을 억제시킴으로써  $CCl_4$ 가 유도할 수 있는 발암과정이나 돌연변이 과정을 막는 압화 및 독성 억제제로서의 역할을 하는 것으로 여겨진다. 당단백질은 순수한 단백질 및 핵산과는 다르게 선형 및 가지형 구조와 같은 거대한 삼차원적으로 구조적 다양성과 함께 생물학적 잠재력 기능을 지니고 있기 때문에, 특히 동물이나 식물 그리고 미생물에서 체내의 대사나 면역기능이 있고 항상성 유지 등을 위하여 특이적인 기능을 하는 것으로 알려져 있으며 거대 분자들 사이에서 그들만의 정보를 인식하고 교환하는데 있어서 필수적이라고 보고되었다(42,43). 당단백질의 특이한 기능을 위한 당의 기능은, 단백질의 구조에 지지역할을 하여 단백질 부분의 활성면을 보호하여 당단백질 전체 분자의 극성을 증가시켜줌으로써 용해도를 증가시킨다고 보고하였다(44). 실험결과 꾸지뽕 당단백질의 섭취를 증가함에 따라 간에 존재하는 항산화계 해독효소인 SOD, CAT 그리고 GPx의 활성도는 증가함을 알 수 있었다.

## 요 약

꾸지뽕 당단백질이 간의 조직에 존재하는 항산화계 해독효소의 활성을 증가시켜서  $CCl_4$ 로 유도된 간독성화 과정에서 생성된 ROS에 의해 야기되는 산화적 스트레스를 억제하는 scavenger로서 기능을 가지고 있는 것으로 분석된다. 또한 혈청 중 LDH 활성증가는 간 및 기타조직의 질량 및 악성 종양 등에서 나타나는 소견으로 LDH를 내포한 조직이 파괴될 때 혈액으로 흘러나와 혈중 LDH가 상승하며, 혈액 중 지질과산화 반응은 생체조직막의 다가불포화지방산 유리기에 의해 산화적 분해를 일으키는 지표로 사용되는 TBARS의 수치, DNA 염기의 deamination 등을 유도함으로써, 유전자의 돌연변이(mutagenesis)로 인한 세포독성을 일으키는 NO 등의 수치가 유의적인 수준으로 억제될 뿐만 아니라, 염증 매개체 단백질인 NF- $\kappa$ B(p50)을 억제함으로써  $CCl_4$ 에 의한 간독성 과정에서 촉진된 염증 신호전달기전을 억제할 수 있었다. 따라서 꾸지뽕 당단백질은 탁월한 천연 항산화제로서 간의 독성 및 염증 반응을 억제하는 것으로 실험결과 분석된다.

## 감사의 글

이 논문은 2008년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업)으로 학술진흥재단의 지원을 받아 연구되었음(KRF-2008-521-C00167).

## 문 헌

- Harrison DG. Endothelial function and oxidant stress. Clin. Cardiol. 20: 11-17 (1997)
- Moody CS, Hansan HM. Mutagenicity of oxygen free radicals. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 2855-22859 (1982)
- Evance CR, hallivell B, Lunt GG. Free Radicals and Oxidative Stress: Environment, Drug and Food Additives. Ashgate Publishing Co., Alderghot, UK. pp. 1-31 (1995)
- Sozmen EY, Tanyakin T, Onat T, kufay F, Erlacin S. Ethanol-induced oxidative stress and membrane injury in rat erythrocytes. Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 32: 741-744 (1994)
- Kim SM, Cho YS, Kim EJ, Han HP, Lee SH, Sung SK. Effect of water extracts of *Salvia miltorrhiza* Bge. *Prunus persica* Stokes, *Angelica gigas* Nakai and *Pinus strobes* on lipid oxidation. J. Korean Soc Food Sci. Nutr. 27: 339-405 (1998)
- Pazczola De. Desiener food. Food Technol.-Chicago 47: 92-101 (1993)
- Sadaki O. The development of functional foods and materials. Bioindustry 13: 44-50 (1996)
- Elliott MJ. Biological properties of plant flavonoids: An overview. J. Pharmacog. 34: 344-348 (1996)
- Seef LB, Lindsay KL, Bacon BR, Kresina TF, Hoofnagle JH. Complementary and alternative medicine in chronic liver disease. Hepatology 34: 595-603 (2001)
- Cay MC, Lai EK, Poyer JL, Dubose CM, Janzen EG. Oxygen and carbon-centered free radical formation during carbon tetrachloride metabolism. J. Biol. Chem. 259: 2135-2143 (1984)
- Kim DH, Yoon SH. Hepatoprotective effects of sosihotang on  $CCl_4$  induced liver injury in rats. J Korean Soc. Hyg. Sci. 4: 1-6 (1998)
- Weddle CC, Hornbrook KR, McCay PB. Lipid peroxidation and alteration of membrane lipids in isolated hepatocytes exposed to carbon tetrachloride. J. Biol. Chem. 251: 4973-4978 (1976)
- Farrel GC, George J, Hall PLM, McCullough AJ. Fatty liver disease; NASH and related disorders. Geoffrey CF(ed). Blackwell Publishing, Oxford, UK (2004)
- Zawaski K, Gruebele A, Kaplan D, Reddy S, Mortensen A, Novak RF. Evidence for enhanced expression of c-fos, cjun, and the Ca (2+)-activated neutral protease in rat liver following carbon tetrachloride administration. Biochem. Biophys. Res. Co. 197: 585-590 (1993)
- Camandola S, Scavazza A, Leonarduzzi G, Biasi F, Chiarotto E, Azzi A, Poli G. Biogenic 4-hydroxy-2-nonenal activates transcription factor AP-1 but not NF-kappa B in cells of the macrophage lineage. Biofactors 6: 173-179 (1997)
- Wu J, Zern MA. NF-kappa B, liposomes and pathogenesis of hepatic injury and fibrosis. Front. Biosci. 4: D520-D527 (1999)
- Cesaratto L, Vascotto C, Calligaris S, Tell G. The importance of redox state in liver damage. Ann. Hepatol. 3: 86-92 (2004)
- Ohshima H, Tazawa H, Sylla BS, Sawa T. Prevention of human cancer by modulation of chronic inflammatory processes. Mutat. Res. 591: 110-122 (2005)
- Lee CB. *Dehanshikmuldogam* (A field guide to Korean plants). Hyangmoonsha, Seoul, Korea. p.285 (1985)
- Kangjoshinewhakwon : *Jungyakdesajon* (Great dictionary of Chinese medicine). 2nd ed, Sohakkyan, Shanghai, China. p.2383 (1985)
- Kim SH, Kim NJ, Chon JS, Park JC. Determination of flavonoid by HPLC and biological activities from the leaves of *Cudrania tricuspidata* Bureau J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 22: 68-72 (1993)
- Otlersen T, Vance B, Doorenbos NJ, Chang BL, El-Feraly FS. The crystal structure of cudranone, 2,6,3'-trihydroxy-4-methoxy-2'-(3-methoxy-2-buternyl)-I, a new antimicrobial agent from *Cudrania chochinensis*. Acta Chem. Scand B. 31: 434-436 (1977)
- Chang CH, Lin CC, Hattori M, Namba T. Effects of anti-lipid peroxidation of *Cudrania cochinchinensis* var. gerontogea. J. Ethnopharmacol. 44: 179-185 (1994)
- Lowry OH, Rosebrough NT, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275 (1951)
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28: 350-356 (1956)
- Long RM, Moore L. Biochemical evaluation of rat hepatocyte primary cultures as a model for carbon tetrachloride hepatotoxicity: Comparative studies *in vivo* and *in vitro*. Toxicol. Appl. Pharm. 92: 295-306 (1988)
- Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal. Biochem. 44: 276-287 (1971)
- Thomson JF, Nance SL, Tollaksen SL. Spectrophotometric assay of catalase with perborate as substrate. P. Soc. Exp. Biol. Med. 157: 33-35 (1978)

29. Mohandas J, Marshall JJ, Duggin GG, Horvath JS, Tiller DJ. Differential distribution of glutathione-related enzymes in rabbit kidney. Possible implications in analgesic nephropathy. *Biochem. Pharmacol.* 33: 1801-1807 (1984)
30. Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Method Enzymol.* 52: 302-310 (1978)
31. Bergmeyer HU, Bernt E. Lactate dehydrogenase. pp. 574-579. In: *Methods of Enzymatic Analysis*. Bergmeyer HU (ed). 2<sup>nd</sup> ed, Academic Press, New York, NY, USA (1974)
32. Wang H, Joseph JA. Quantifying cellular oxidative stress by dichlorofluorescein assay using microplate reader. *Free Radical Bio. Med.* 27: 612-616 (1999)
33. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* 126: 131-138 (1982)
34. Deryckere F, Gannon F. A one-hour miniprep technique for extraction of DNA-binding proteins from animal tissues. *Biotechniques* 16: 405 (1994)
35. Ho YS, Crapo JD. Isolation and characterization of complementary DNAs encoding human manganese-containing superoxide dismutase. *FEBS Lett.* 229: 256-260 (1988)
36. Jones DP, Eklow L, Thor H, Orrenius S. Metabolism of hydrogen peroxide in isolated hepatocytes: Relative contributions of catalase and glutathione peroxidase in decomposition of endogenously generated H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Arch. Biochem. Biophys.* 210: 505-516 (1981)
37. Deisseroth A, Dounce AL. Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role. *Physiol. Rev.* 50: 319-375 (1970)
38. Thurman RG, Bradford B, Limuro Y, Keecht K, Conner HM, Adachi Y, Wall C, Arteel G, Raleigh J, Forman D, Mason RF. Role of kupffer cells, endotoxin and free radicals in hepatotoxicity due to prolonged alcohol consumption: studies in female and male rats. *J. Nutr.* 127: 903s-906s (1977)
39. Plaa GL, Witschi H. Chemicals, drugs and lipid per-oxidation. *Am. Rev. Toxicol. Pharmacol.* 16: 125-141 (1976)
40. Nguyen T, Brunson D, Crespy CL, Penman BW, Wishnok JS, Tannenbaum SR. DNA damages and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 3030-3034 (1992)
41. Nichols TC, Ficher TH, Deliatyris EN, Baldwin AS Jr. Role of nuclear factor-kb (NFκ-β) in inflammation, periodontitis, and atherogenesis. *Ann. Periodontol.* 6: 20-29 (2001)
42. Dint JL, Hsu JS, Wang MM, Txen JT. Purification and glycosylation analysis of an acidic pectin methyltransferase in jelly fig (*Ricinus awkeotsang*) achenes. *J. Agr. Food Chem.* 50: 2920-2925 (2002)
43. Kimura Y, Miyagi C, Kimura M, Nitoda M, Kawai N, Sugimoto H. Structure features of N-glycans linked to royal jelly glycoprotein: Structure of high-mannose type, hybrid type, and biantennary type glycans. *Biosci. Biotech. Biochem.* 64: 2109-2120 (2000)
44. Hirsch RI, Kellner A. The pathogenesis of hyperlipemia induced by means of surface-active agents. II. Failure of exchange of cholesterol between the plasma and the liver in rabbits given Triton WR 1339. *J. Exp. Med.* 104: 15-24 (1966)