

Opuntia ficus-indica 다당 A-1의 특성 및 알코올유도 간 산화스트레스의 보호 효과

류일환¹, 권지웅¹, 이어진¹, 윤용갑², 권태오¹
¹원광대학교 생명자원과학대학, ²원광대학교 한의과대학 방제학교실

ABSTRACT

Characterization of polysaccharide A-1 from *Opuntia ficus-indica* and its protection effect on alcoholic induced hepatic oxidative stress

Il-Hwan Ryu¹, Ji-Wung Kwon¹, Eoh-Jin Lee¹, Young-Gab Yun², Tae-Oh Kwon¹

¹College of Life Science and Natural Resources, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

²Department of Oriental medical prescription, Wonkwang University, Iksan 570-749, Korea

Reactive oxygen species(ROS) can induce hepatotoxicity and trigger apoptosis in the liver. In this study, we investigated the sulfated polysaccharide A-1 from *Opuntia ficus-indica* against alcoholic oxidative stress in human liver Hep G2 cell. An antioxidant substance A-1 obtained from the enzymatic extract of *Opuntia ficus-indica* fruit was purified by DEAE-cellulose ion exchange and sephadex G-100 gel permeation chromatography. The purification yield and molecular weight were 14.3% and 1.8 KDa, respectively. The A-1 predominately contained arabinose, galactose, rhamnase and also sulfate group. The structure of A-1 was investigated by

-
- 교신저자 : 권태오
 - 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 생명자원과학대학
 - Tel : 063-850-6681 E-mail : agrokto@wonkwang.ac.kr
 - 접수 : 2009/ 12/ 05 채택 : 2009/ 12/ 09

periodate oxidation, FT-IR spectroscopy, $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy. The A-1 mainly composed of alternating unit of $\rightarrow 4\text{-}\alpha\text{-L-Rapp-2-SO}_3^-\alpha\text{-L-Galp-(1}\rightarrow$ and branched linkage of $\beta\text{-D-Arpbp-(5}\rightarrow$. The antioxidative activity was measured using the SOD, CAT activity and GSH assay, respectively. The expression of Nrf2 protein was analyzed by western blotting. The viable cell count analyzed by autofluorescence. Oxidative stress induced by ethanol(1 M) were dramatically reduced by A-1 treatment. A-1 also prevented cell death induced by oxidative stress. It also increased expression Nrf2 protein level. We concluded that sulfated polysaccharide A-1 from *Opuntia ficus-indica* effectively protect Hep G2 liver cell from alcoholic oxidative stress.

Key word : *Opuntia ficus-indica*, Alcoholic oxidative stress, Hepatotoxicity, Hep G2

1. 서론

알코올의 과도한 소비로 인한 만성적 간질환 (Chronic alcoholic liver disease, ALD) 및 알콜중독(Alcoholism)은 건강상의 문제뿐만 아니라 심각한 사회적 문제를 야기 할 수 있다. 섭취한 에탄올은 거의 대부분 산화과정에 포함된 효소에 의해 대사된다. 대사과정 중에 축적되는 acetaldehyde의 제거 속도는 ADH(alcohol dehydrogenase)과 ALDH(aldehyde dehydrogenase)의 활성에 의해 결정되고, 이 대사산물의 축적은 간과 기타 조직에 lipid와 lipid peroxide의 축적을 유발 한다¹⁾. 알코올 및 알코올 대사 중간체는 prooxidant로 작용하여 간세포의 자동산화를 유발하고 간독성을 일으킨다²⁾. Prooxidant는 mitochondria에서 전자전달계에 작용하여 부산물로 O_2^- , OH^- , H_2O_2 같은 활성산소종(Reactive Oxygen Species, ROS)을 생성 한다^{3,4)}. 이 ROS는 세포내 거대분자(핵산, 단백질, 지질)와 반응하여 necrosis나 apoptosis에 의한 세포사멸을 유발 한다^{5,6)}. Ethanol은 ROS 생성과 apoptosis를

유발 한다^{7,8)}. ROS는 glutathion peroxidase, adeny cyclase와 같은 vital protein을 불활성화 시키고, DNA strand를 파괴하고 세포막지질을 과산화 시킨다⁹⁾. 지질의 과산화와 항산화효소 발현을 저해하는 산화스트레스에 의해 알콜성 간 질환이 발생 된다¹⁰⁾. 알코올 독성에 직접 관련이 있는 산화스트레스의 증가를 막기 위하여, 천연물 기원의 항산화물질의 개발에 관심이 증가되고 있다. 천연물 기원의 항산화제는 다양한 식물종으로 부터 보고 되어 있으나 이들의 거의 대부분은 페놀화합물, 질소화합물 및 카로티노이드이다¹¹⁻¹⁵⁾. 최근 산성다당류에 대한 관심이 증가하고 있으며, 주로 해초류에서 추출 되고 있는 이 산성 다당류는 세포의 외피와 세포벽사이의 matrix를 채우고 있는 점질성의 다가 음이온성 물질이다. 최근 fucoidan을 비롯한 산성 다당류의 항산화효과가 주목되고 있으나 육상의 식물에서 보고된 예는 *Pueraria lobata* (Mill)의 (1 \rightarrow 6)- $\alpha\text{-d-Glcp}$ 로 구성된 수용성 glucan¹⁶⁾, lacquer tree(*Rhus verniciflua*)의 황화다당¹⁷⁾을 제외하고 그 예를 찾기가 어렵다.

본 연구에 사용한 *Opuntia ficus-indica*는 육상 약용식물로 항염증¹⁸⁾, 혈당강하, 위계약 억제, 항산화작용, 면역증강효과가 있는 것으로 알려졌다¹⁹⁾. *Opuntia ficus-indica*는 69.2% 당류를 포함하고 있으며, 급성 간 손상 개선효과²⁰⁾, 통증감소효과²¹⁾, 혈당강하효과²²⁾ 등 다양한 결과가 보고되고 있으나 산화스트레스에 대한 실험적 연구는 아직 이루어지지 않은 상태이다.

본 연구는 *Opuntia ficus-indica*를 효소적 분해 및 일련의 정제방법에 의해 활성 다당을 분리하고, 알코올에 의한 산화적 스트레스를 받은 세포의 손상 개선 효과를 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. A-1의 효소적 추출 및 정제

전남 신안 소재의 (주)황토와 백년초에서 구입한 *Opuntia ficus-indica* (1 Kg)에 동량의 0.25 M citrate buffer(pH 4.5)를 가하고 grinder를 사용하여 분쇄하였다. 분쇄물에 10 mL 효소 혼합물 (cellulase : pectinase = 5 : 5)을 첨가하여 40°C에서 10시간 동안 분해하고 여과하여 상등액을 분리하였다. Bo 등²³⁾의 방법에 의해 항산화활성을 갖는 다당 분획을 분리하였다. 분리된 분획을 동결건조 하여 -20°C에서 보관하면서 사용하였다. 건조 다당 분획을 Cl⁻ form으로 처리된 DEAE-cellulose를 column(3 × 50 cm)에 충전 하고 48 mL/hr의 유속으로 4 mL씩 분획하여 용출하였다. 이로부터 A를 얻었으며, NaCl(0→0.4 M) gradient elution을 행하여 B와 C를 각각 얻었다. 각 분획의 당은 phenol-sulfuric acid법으로 분석하였으며, 분획 A, B, C의 수율은 23.1%, 7.3%, 33.2%이었다. 활성분획 A를 Sevage method를 사용하여 free protein을 제거하였다. Sephadex G-100을 column (3 × 50 cm)에 충전하고, 증류수를 사용하여 40 mL/hr의 유속으로 용출하여 4 mL씩 분획하였다.

이때 void volume는 blue dextran(M.W. 2,000,000)으로 결정하였다. 항산화활성을 나타내는 분획 A-1을 분리하였다(14.3%). 정제도는 TLC를 행하여 단일 spot을 확인하였다. 분자량 측정은 극한 점도로부터 분자량을 추정할 수 있는 Sakurada-Houink식에 의하여 계산하였으며 극한점도의 추정을 위한 A-1의 용매계는 0.2 M acetic acid + 0.1 M NaCl + 4.0 M urea를 사용하였으며, 본 용매계에 각 농도별로 용해시킨 A-1의 상대 점도로부터 비점도 및 환원점도를 구한 다음 환원점도와 농도간의 곡선에서 포외법으로 극한 점도를 구하였다.

2. 구성 성분의 정량

전당은 phenol-sulfuric acid법으로 비색 정량 하였다. A-1 시료 1 mL와 5% phenol 1 mL가 든 시험관에 5 mL의 c-H₂SO₄를 가하고 30분간 교반 후 490 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선으로부터 당의 양을 측정하였다. A-1을 100°C, 5시간동안 산가수분해(5.0 M trifluoroacetic acid) sulfate는 BaCl₂/gelatine method²⁴⁾로 측정하였다.

Hexoses와 deoxyhexose의 구성성분은 Sawardeker의 방법²⁵⁾에 따라 행하였다. 시료 2 mg에 2 M TFA(1 mL trifluoroacetic acid) 1 mL를 첨가하고 120°C에서 60분간 가수분해 한 후 가수분해물을 alditol acetate 유도체로 합성하여 LC분석을 행하였다.

3. Periodate oxidation

구성당의 결합 패턴을 조사하기 위하여 A-1 10 mg을 10 mM sodium metaperiodate periodate 100 mL에 첨가하고 4°C 암냉소에서 7일간 반응시키며 일정 간격으로 시료를 취하여 periodate(IO₄⁻)의 소비를 분광학적 방법으로 측정하였다. 동시에 0.5% phenolphthalein가 포함된 1 mM NaOH용액으로 적정하면서 formic acid의 생성을 측정하였

다²⁶⁾. 0.1 g sodium borohydride와 12 시간 반응 후 과량의 reagent는 0.1 N HCl로 중화 후 24시간 투석 후 생성된 formic acid를 아래의 식에 의해 환산하였다.

The production of formic acid (Mole)

$$= \frac{A \times B \times C}{D \times 1,000}$$

A: The amount of consumed alkali (mL)

B: The concentration of alkali used (N)

C: Total amount of sample (mL)

D: The amount of sample used (mL)

4. Infrared(FT-IR) 와 nuclear magnetic resonance (NMR) spectra

FT-IR spectrum은 KBr pellets을 사용하여 IR-700(JASCO, Japan)로 측정하였으며, ¹H-NMR spectra는 A-1을 D₂O(99.9%)에 용해시키고 JEOL FX-100 NMR spectrometer (500MHz) 로 측정하였다.

5. 세포의 배양과 산화스트레스의 유도

Hep G2 (human hepatocarcinoma)(ATCC # HB-8065)은 1 mM sodium pyruvate가 보강된 10% fetal bovine serum, 50 units/ml penicilline과 50 µg/ml streptomycine이 포함된 minimum essential medium (Gibco BRL, USA)에 접종하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 monolayer로 배양하였다. cell-line이 5×10⁴ cells/ml이 되면 96-well plate (1×10⁴ cell/well)에 분주하고 1 M의 ethanol을 첨가하여 산화스트레스를 유발하였다. 배양 후 원심 분리 하여 세포를 분리, 세척한 후 분리 다당 A-1을 배양액에 0.1%, 0.5%, 1.0%, 2.0% 첨가하여 20 시간 동안 배양하였다.

6. GSH 정량

GSH는 Sedlak 등²⁷⁾의 방법에 따라 비단백-SH를 측정하였다. 1 M의 ethanol을 첨가하여 산화스

트레스를 유발 후 원심분리 하여 세포를 분리, 세척한 후 분리 다당 A-1을 배양액에 첨가하여 20 시간 동안 배양한 세포 homogenate에 25% HPO₃를 4 : 1 비율로 혼합하여 4°C, 8000×g에서 10분간 원심분리 하여 96 well에 상등액과 0.4 M Tris buffer(0.02 mM EDTA, pH 8.9) 2 ml, 0.01 M 5,5'-DITHIO-bis(2-nitrobenzoic acid) 50 µl를 가하여 15 분간 반응 후 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도의 측정 후 GSH 함량의 계산식은 다음과 같다.

$$\text{GSH content} = \text{O.D} / 13100(\text{mol/L})$$

7. SOD 활성 측정

SOD의 활성은 Fridovich의 방법²⁸⁾에 준하여 측정하였다. 50 mM potassium phosphate buffer(0.1 mM EDTA, pH 7.9) 1 ml, 0.5M xanthine 67 µl, 1% sodium deoxychlorate (DOC) 10 µl, 1.5 mM KCN 10 µl, 0.2 mM cytochrome C 50 µl를 넣은 mixture에 세포 homogenate 상등액 3 µl, xanthine oxidase 3 µl를 넣고 혼합 후 550nm에서 흡광도의 변화를 2분 동안 측정하였다. 이때 표준액으로 superoxide dismutase standard(Sigma Co.)를 사용하였다.

8. CAT(Catalase) 활성 측정

0.05 M potassium phosphate buffer(0.1 mM EDTA, pH 7.4) 1.9 ml에 세포 homogenate를 800×g 20분간 원심분리한 상등액 100 µl를 동일 buffer로 80배 희석한 용액 0.1 ml와 H₂O₂ 1 ml를 혼합하여 1분 30초간 흡광도의 감소를 측정하였다.

9. Western blotting

세포의 cytosolic 분획 단백질은 Bio-Rad protein assay를 이용하여 측정하였다. SDS-PAGE electrophoresis 후 gel의 단백질을 immobile membrane(PVDF;

Milopore)에 transfer buffer(25 mM Tris-HCl(pH 8.9), 192 mM glycine, 20% methanol)를 사용하여 transfer하였다. membrane을 0.05% Tween 20이 포함된 Tris-buffered saline(10 mM Tris, 150 mM NaCl)(TBST)으로 세척 후 5% nonfat dried milk로 blocking 하였다. membrane을 primary antibody Nrf2(1 : 2000)과 β -actin(1 : 5000)으로 4°C, overnight하면서 hybridization 시킨 후 TBST로 3회 세척 후 실온에서 peroxidase-labeled secondary antibody로 45분간 반응시켰다. TBST로 3회 세척 후 chemiluminescence western blotting reagent (Amersham Pharmacia Biotech)로 최종 detection을 행하였다.

10. Autofluorescence에 의한 cell viability 측정

Hep G2 (human hepatocarcinoma)(ATCC # HB-8065)은 1 mM sodium pyruvate가 보강된 10% fetal bovine serum, 50 units/ml penicilline과 50 μ g/ml streptomycine이 포함된 minimum essential medium(Gibco BRL, USA)에 접종하고 37°C, 5% CO₂ incubator에서 monolayer로 배양한 세포를 모으고 PBS + 2% FBS에서 재현탁 시켰다. 세포를 2회 세척 후 1~2 \times 10⁶ cells/ml로 조절하였다. FITC monoclonal antibodies로 염색 후 1 ml staining buffer로 재현탁 시키고, OLYMPUS VANOX fluorescence microscope를 이용하여 autofluorescence signals로 cell viability 측정 하였다²⁹⁾.

III. 결과 및 고찰

1. A-1의 효소적 추출 및 정제

Opuntia ficus-indica 세포벽을 pectinase, cellulase 복합 효소를 사용하여 분해하였다. 이 효소 분해 과정에서 세포벽의 분해로 인해 *Opuntia ficus-indica* fruit 내부의 항산화 활성을 갖는 polysaccharide, protein, phenolic compounds의 추출이 증가하였다.

효소 추출한 분획물을 DEAE-cellulose(Cl⁻ form) ion exchange chromatography한 결과는 Fig. 1과 같다. A-1는 비흡착구로부터 A를, 흡착구로부터 B와 C를 각각 얻었다. 활성 분획으로 다가 음이온적 성질을 갖는 산성당류 C의 생산량은 14.27 g/L였으며, 수율은 33.2%였다. 반면 음이온적 성질이 낮은 B분획과 증류수로 용출한 중성의 분획에서는 항산화 활성이 나타나지 않았다. 활성 분획 C를 sephadex G-100 gel permeation chromatography한 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 a, b, c, d의 4개의 당 분획을 나타내어 분자량이 서로 다른 4종의 혼합물로 구성이 되어 있음을 알 수 있었다. 이 분획들 중 항산화 활성이 우수한 b를 분리하고 동결 건조하여 A-1이라 명명하고 다음 실험을 행하였다. 최종 수율은 14.3%이었고, 정제도를 단일 spot을 확인하였으며, 분자량은 1.8 KDa이었다.

*Opuntia ficus-indica*에서 분리한 A-1의 구성 성분은 45.4% neutral sugars, 8.9% uronic acids, 4.2% sulfate로 비교적 높은 sulfate ester 함량을 가지고 있는 것으로 나타났다. A-1의 높은 negative charge density는 sulfate/total sugar molar ratio에 기인하는 것으로 판단된다.

Uronic acid의 경우 Matushiro 등³⁰⁾은 *Opuntia ficus-indica*의 점질물의 수용성 및 불용성 당의 uronic acid의 함량이 각각 15.6%, 28.0%라고 보고한 반면, Habibi 등³¹⁾은 uronic acid가 존재하지 않는다고 보고하였다.

또한 A-1을 구성하는 구성 당의 조성은 arabinose, galactose, rhamnose가 각각 20.03%, 10.35%, 10.57%였다. 이결과는 arabinose : rhamnose : xylose : galactose의 비율이 1.0 : 1.7 : 2.5 : 4.1라고 보고한 Matushiro 등³⁰⁾의 결과 및 Habibi 등³²⁾의 *Opuntia ficus-indica* pectic polysaccharide가 arabinose, galactose, rhamnose로 구성되었다는 보고와 유사하였으나, arabinose, galactose로 구성되었다는 Matushiro 등³⁰⁾의 결과와 차이를 나타내었다. 또한 *Opuntia ficus-indica*의 sulfate 함량에

관한 예는 찾아보기 어렵다. 이결과는 *F. vesiculosus*의 fucoidan 성분이 48% neutral sugars, 9% uronic acids, and 12% sulfates였다는 Rupérez 등³³⁾의 보고 및 37% neutral sugars, 17% uronic acids, 39% sulfates라는 Mabeau 등³⁴⁾의 보고와 유사하였으나 이들 결과에 비해 낮은 sulfated ester 함량을 나타내었다. 중성 당의 glycoside 결합의 분해에 의해 oxygen free radical과 우선적으로 반응하여 환원에 의해 radical을 제거하는 것으로 알려져 있다. 이때 분자량의 크기는 항산화 활성의 중요한 요소로 작용한다. 즉, 고분자 sulfated polysaccharide보다 저분자의 항산화활성이 높은 것으로 알려져 있다³⁵⁾.

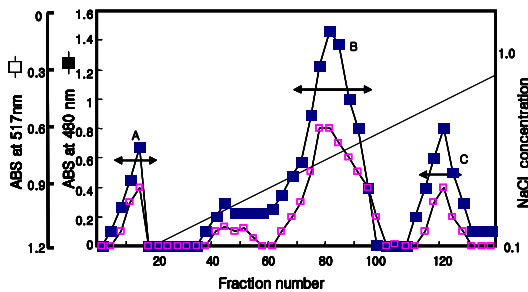


Fig. 1. Purification of the A-1 from *Opuntia ficus* by DEAE-Sephadex CL-6B column chromatography.

The crude polysaccharide from *Opuntia ficus* (58.3 g) was purified using a DEAE-Sephadex CL-6B column. Fractions were checked by the phenol- H_2SO_4 (■) and the DPPH radical (□) scavenging reaction, and by the NaCl concentration (-). Further details are described in 'Materials and Methods'.

2. Periodate oxidation

A-1의 결합 양상을 과요드산 산화에 의하여 측정된 결과 Fig. 3과 같이 NCS은 IO_4^- 를 소비함과 동시에 formic acid를 생성하였으며, 반응 2일 후에 일정한 값에 도달하였다. 그림의 기울기로부터 외삽하여 IO_4^- 소비량과 formic acid 생성량을 몰비로 환산한 결과, 몰비는 약 3.5 : 1이었다. 류 등³⁶⁾,

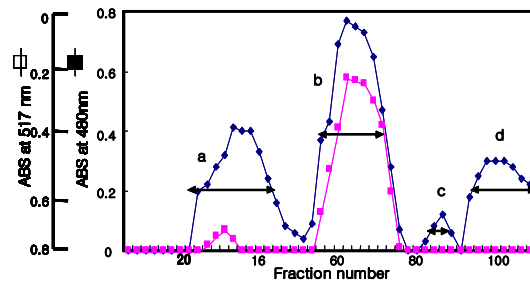


Fig. 2. Purification of the A-1 from *Opuntia ficus* by Sephadex G-100 column chromatography.

The fraction C by ion exchange chromatography was purified using a Sephadex G-100 column. Fractions were checked by the phenol- H_2SO_4 (■) and DPPH radical (□) scavenging reaction. Further details are described in 'Materials and Methods'.

McAnall 등³⁷⁾, 이 등³⁸⁾의 보고에서 과요드산 이온은 hydroxyl group, carbonyl group, 일차 아미노기들은 두 개가 인접한 탄소원자들 사이에 결합되어 있을 때 두 탄소 원자들 사이를 특이하게 산화시킨다. 산화물이 1,4-glucan이고 1,5 분지일 경우에는 IO_4^- 소비량과 $HCOOH$ 의 생성량의 몰비가 2 : 1이다. 분지가 없는 경우에도 비환원 말단과 환원 말단이 산화되어 IO_4^- 소비량과 $HCOOH$ 를 5 : 3의 몰비로 생성하고 주 chain은 산화되지 않는다. 또한 1,4-glucan인 경우에는 환원말단과 비환원말단이 산화하여 IO_4^- 를 소비함과 동시에 $HCOOH$ 를 생성하지만 backbone은 산화되어 IO_4^- 가 소비되나, $HCOOH$ 는 생성되지 않는다. 비환원 말단에서는 2 M의 IO_4^- 를 소비하고, 1 M의 $HCOOH$ 를 생성한다. 환원말단에서는 3 M의 IO_4^- 를 소비하고, 2 M의 $HCOOH$ 를 생성한다. 1,5 잔기를 가진 1,4-glucan의 경우도 산화되어 IO_4^- 를 소비하지만 $HCOOH$ 는 생성하지 않는다. 이상의 결과로부터 A-1은 α -1,5 분지를 포함한 α -1,4 glucan인 것으로 판단되었다.

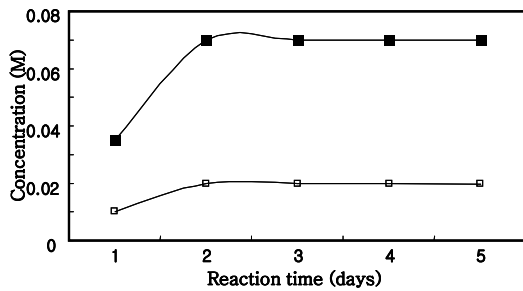


Fig. 3. Periodate oxidation of the A-1 from *Opuntia ficus*

Determination of the amount of periodates consumed and the amount of formic acid released during the oxidation of A-1 from *Opuntia ficus*. A-1 was oxidized with 100 mL of 10 mM sodium metaperiodate at 4°C for 7 days. The periodate consumption (□) was calculated from the change of absorption at 223 nm. The formic acid production (■) was measured by titration with 0.01 M NaOH, as were formic acid production and IO_4^- consumption

3. 구조해석

A-1의 구조를 해석하기 위하여 KBr pellet법을 이용하여 FT-IR 흡수 spectrum을 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. spectrum에서 당류의 특이적 흡수 대인 3400 cm^{-1} 에서 O-H group, 2900 cm^{-1} 에서 당의 환원 말단의 aldehyde C-H group bending variation, 1633 과 1055 cm^{-1} 에서 C=O stretching band와 C-O stretching band가 나타나고 있었으며, 1055 cm^{-1} 과 611 cm^{-1} 에서 S-O 와 S-OR ester variation이 확인되어 sulfate ester 결합을 가지는 당임을 확인하였다.

A-1의 $^1\text{H-NMR}$ 분석을 행한 결과, Fig. 5에 나타내었다. spectrum에서 보는 바와 같이 측정된 값들은 각각 δ -3.62-3.73에서 β -D-Arbp-(5→와 →4)- α -L-Rapp-2- SO_3^- -(1→의 잔기 H-1, H-2, H-3, H-4, H-5, H-6의 chemical shift가 4.96, 4.82, 4.73, 4.65, 4.79, 1.22에 나타나고 있으며, →4)- α -L-Galp-(1→의 chemical shift가 δ -3.60에서 나타내었다. 이 값은 standard reporter group data와 비교하였다³⁹⁻⁴³. 이 결과로부터 A-1의 구조는 →

4)- α -L-Rapp-2- SO_3^- - α -L-Galp-(1→의 backbone에 β -D-Arbp-(5→가 분지되어있는 구조를 가지고 있는 것으로 판명되었다. 이 결과는 Habibi 등³²의 결과와 일치하였다.

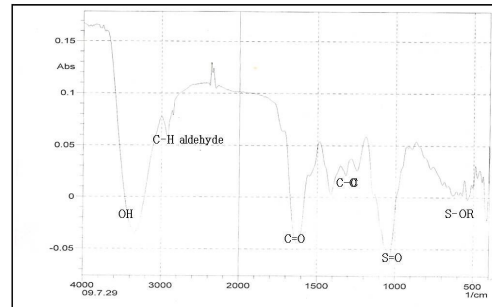


Fig. 4. FT-IR spectrum of the A-1 from *Opuntia ficus*

In the third region of interest($4000 - 500\text{ cm}^{-1}$), A-1 from *Opuntia ficus* exhibit absorption bands. The strong bands at 1055 cm^{-1} and 611 cm^{-1} were the S-O and S-OR ester variation band, respectively.

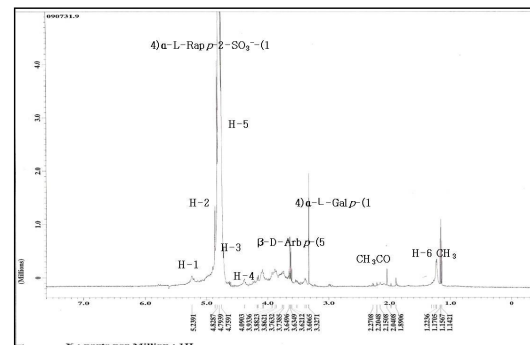


Fig. 5. $^1\text{H NMR}$ spectrum of the A-1 from *Opuntia ficus*

The spectra were recorded for samples in D_2O solution at 60°C . Chemical shifts are relative to internal and external trimethyl silypropionic acid at 0 ppm. The HOD signal was suppressed by presentation. The 4.9 to 3.5 ppm region is shown in the square.

4. GSH의 변화 및 SOD, CAT 활성 측정

Minimum essential medium(Gibco BRL, USA)에서 배양한 Hep G2(human hepatocarcinoma)

(ATCC # HB-8065)세포에 1 M의 ethanol을 첨가하여 산화스트레스를 유발 후 원심분리 하여 세포를 분리, 세척한 후 분리 다당 A-1을 배양액에 첨가하여 37°C, 20시간동안 배양한 세포 파쇄물의 GSH함량 및 SOD, CAT 활성 변화를 측정된 결과는 Table 1과 같다. hepatic antioxidant enzyme인 SOD, CAT 및 glutathion 함량 모두에서 유의적인 증가를 나타내었다. *Opuntia ficus-indica* sulfated 다당인 A-1을 1% 투여시 control에 비해 SOD와 CAT 활성은 각각 83%와 10% 증가하였고, GSH의 함량은 73% 증가하였다. 반면 2% 첨가시 1% 첨가시보다 활성이 감소하는 경향을 보였다. 이는 고농도의 당의 첨가시 점도의 변화에 의해 활성 성분의 세포내 유입이 차단되는 것으로 판단된다.

GSH는 활성산소에 대해 세포를 보호하는 항산화물질로 미호소계 항산화 시스템에 있어서 중요한 역할을 한다. glutathion은 disulfide bond로 연결된 tripeptide에 의해 순환되는 환원형(GSH)과

산화형(GSSG)이 있다. 산화형 GSSG는 glutathion reductase에 의해 GSH로 환원되고 hydrogen peroxide와 organic peroxide와 반응하여 해독작용에 중요한 역할을 한다⁴⁴⁾. 이것은 뇌와 간의 노화 및 손상에 의해 감소하는 것으로 알려져 있다.

Opuntia ficus-indica 다당 A-1이 간세포의 손상시 감소하는 GSH를 증가시키는 작용을 하는 것으로 판단된다. SOD는 호소계 항산화 시스템 중 superoxide anion을 과산화수소로 변화시켜 산소독으로부터 세포를 보호하는 역할을 담당하는 효소로, 연령이 증가함에 따라 SOD의 발생량이 감소하여 신체를 노화 시킨다⁴⁴⁾. CAT는 microsome에서 생성되며 골지체로 이동 부착되어 내인적으로 생성된 과산화수소를 물과 산소로 변환하는 촉매 역할을 한다. 이상의 결과를 종합해 볼 때 본 연구에서 분리정제한 *Opuntia ficus-indica* sulfated polysaccharide A-1은 GSH 함량을 증가시키고 CTA활성을 증가시키므로 알코올에 의해 유도된 산화스트레스의 감소에 관여하는 것으로 판단된다.

Table 1. Effect of the A-1 from *Opuntia ficus* on hepatic antioxidant enzyme activity for Hep G2 liver cell with ethanol

A-1 (%)	Total SOD nM/(min. mg protein)	GSH μM/(min. mg protein)	CAT μM/(min. mg protein)
control	22.1 ± 4.2	20.1 ± 3.5	21.3 ± 0.2
0.1	23.6 ± 3.1	23.1 ± 1.9	13.6 ± 3.7
0.5	33.7 ± 1.8	29.5 ± 4.5	16.5 ± 2.3
1.0	40.5 ± 3.3	34.7 ± 4.1	23.4 ± 4.4
2.0	38.9 ± 2.9	34.1 ± 2.2	18.8 ± 1.6

Values are means ± SD

5. Nrf2 단백질의 발현

ARE enhancer sequence를 인식하는 DNA-binding 단백질인 Nrf2는 항산화와 관련된 phase II enzyme gene을 발현시키는 중요한 단백질이다⁴⁵⁾. *Opuntia ficus-indica* sulfated polysaccharide A-1에 의한 Nrf2의 발현을 확인하기 위하여 immunoblotting을

행한 결과 Fig. 6과 같이 첨가 농도가 높아질수록 발현정도가 커짐을 확인하였다. 이 결과로부터 *Opuntia ficus-indica* sulfated polysaccharide A-1에 의한 항산화 gene의 유도는 Nrf2 pathway에 포함되며 항산화활성을 증가시킴을 확인하였다.

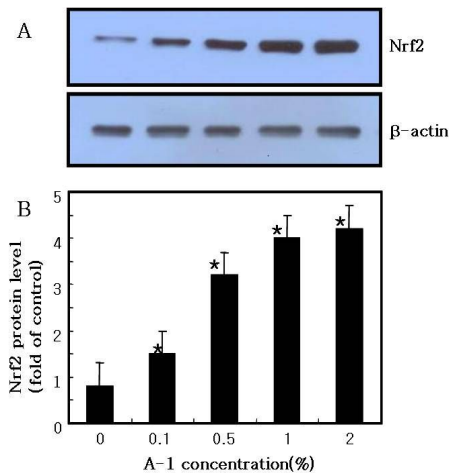


Fig. 6. Expression of Nrf2 protein human liver cell Hep G2.

Cytosol protein (50 μ g) were electrophoresis on a 12% polyacrylamide gel. The upper part of the figure indicate an original blot(A), the lower part represents the results of densitometric analysis(B). Value are means \pm SD, n=3. * $P < 0.05$.

6. Autofluorescence에 의한 viable cell count

Hep G2(human hepatocarcinoma)세포를 FITC monoclonal antibodies로 염색 후 OLYMPUS VANOX fluorescence microscope를 이용하여 auto fluorescence signals로 viable cell을 계수한 결과 Fig. 7에서 보는 바 같이 *Opuntia ficus-indica* sulfated polysaccharide A-1의 첨가시 세포 생존율이 증가하였다.

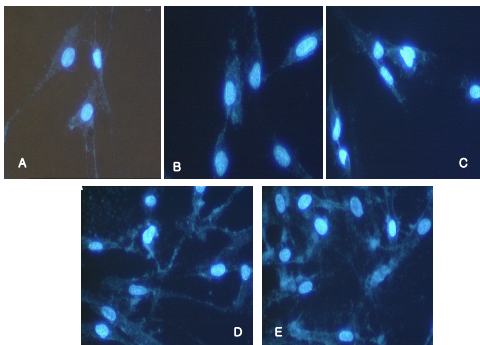


Fig. 7. Cellular autofluorescence visualized in the fluorescence microscope

Additional concentration of sulfated polysaccharide A-1 : A : control, B : 0.1%, C : 0.5%, D : 1.0%, E : 2.0%

IV. 결 론

*Opuntia ficus-indica*가 에탄올에 의해 손상을 유도한 human liver cell Hep G2의 항산화제 및 세포생존에 미치는 영향을 검토하기 위하여 *Opuntia ficus-indica*를 효소 분해하고 활성 sulfated polysaccharide A-1를 분리 정제하여 구조해석을 행하고 알코올로 손상시킨 세포에 투여하여 SOD, GHT, ATS 활성도를 측정하였고, Nrf2 발현 및 viable cell을 측정함으로써 항산화제의 변화 및 생리 활성 변화를 살펴보았다. 먼저, *Opuntia ficus-indica* 효소 추출 분획물을 DEAE-cellulose ion exchange, sephadex G-100 gel permeation chromatography 하여 A-1을 분리하였다. 최종 수율은 14.3%이었으며, 분자량은 1.8 KDa이었다. A-1은 arabinose, galactose, rhamnose로 구성되었고, sulfate를 포함한다. A-1의 구조를 periodate oxidation, FT-IR spectroscopy, $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy를 행한 결과 $\rightarrow 4$)- α -L-Rapp-2-SO₃⁻- α -L-Galp-(1 \rightarrow 의 backbone chain에 β -D-Arhp-(5 \rightarrow 가 분지되어 있었다. A-1의 항산화 활성은 GSH, SOD, CAT 활성을 증가시키고, Nrf2 단백질 발현은 첨가 농도가 높아질수록 발현정도가 커졌다. 또한 A-1 첨가시 세포의 생존율이 증가되었다.

감사의 글

이 논문은 2007년도 원광대학교의 교비지원에 의하여 수행됨

참고문헌

1. Lee HC, Lee HS, Jung SH, Yi SY, Jung HK,

- Yoon JH and Kim CY. Association between polymorphism of ethanol-metabolizing enzyme and susceptibility to alcoholic cirrhosis in Korean male population. *J. Korean Med. Sci.* 2001;16:745-50.
- Crawford DW and Blankenhorn DH. Arterial wall oxygenation, oxyradicals and atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 1991;89:97-108.
 - Kaplowita N and Tsukamoto H. Oxidative stress and liver disease. *Pro. liver Dis.* 1996;14:131-59.
 - McCord JM. The evolution of free radical and oxidative stress. *Am. J. med.* 2000;108:652-659.
 - Lennon SV, Martin SJ and Cotter TG. Dose-dependent induction of apoptosis in human tumor cell line by widely diverging stimuli. *Cell Prolif.* 1991;24:203-14.
 - Sato N, Iwata S, Nakamura K, Hori T, Mori K and Yodoi J. Thiol-mediated redox regulation of apoptosis. *J. Immunol.* 1995;154:3194-203.
 - Lieber CS. Alcohol and the liver. *update gastroenterology.* 1994;106:1085-105.
 - Seitz HK, Poschl G and Simanowski UA. Alcohol and cancer. *Recent Dev. Alcohol.* 1998;14:67-95.
 - Nah HY, Lee WS, Joo YE, Kim HS, Choi SK, Rew JS, Kim SJ, Jung BW, Ahn BW, Park JS and Shin BA. Resverastol protects Hep G2 and Chang liver cell from oxidative stress. *Chonam Med. J.* 2005;41:243-52.
 - Unnot D. Nutrition and metabolic effect of alcoholism :there relationship with alcoholic liver disease. *Nutrition.* 1999;15:583-9.
 - Shon MY, Kim TH and Sung NJ. Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii*(*Phellinus* of Hymenochaetaceae) extracts. *Food Chem.* 2003;82:593-7.
 - Ramarathnam N, Osawa T, Ochi H and Kawakishi S. The contribution of plant food antioxidants to human health. *Trends in Food Science and Technology.* 1995;6:75-82.
 - Wangensteen H, Samuelsen AB and Malterud KE. Antioxidant activity in extracts from coriander. *Food Chemistry.* 2004;88:293-7.
 - Kinsella JE, Frankel E, German B and Kanner J. Possible mechanisms for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. *Food Technology.* 1993:85-9.
 - Velioglu YS, Mazza G, Gao YL and Oomah BD. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. *J. Agric. Food Chem.* 1998;46:4113-7.
 - Cui H, Liu Q, Tao Y, Zhang H, Zhang L and Ding K. Structure and chain conformation of a (1→6)- α -D-glucan from the root of *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi and the antioxidant activity of its sulfated derivative. *Carbohydrate polymers.* 2008;74:771-8.
 - Zou C, Du Y, Li Y, Yang J, Feng T, Zhang L and Kennedy JF. Preparation of lacquer polysaccharide sulfates and their antioxidant activity in vitro *Carbohydrate polymers.* 2008;73:322-31.
 - Park EH, Kahng JH and Paek EA. Studies on the pharmacological action of cactus: identification of its anti-inflammatory effect. *Arch. Pharm. Res.* 1998;21:30-4.
 - Jun HK, Jeong YK and Ha BJ. Protective effect of *Opuntia indica* on glutathion and antioxidant enzyme. *Kor. J. Life Sci.* 2003;13:911-6.
 - Yu N, Zeng F and Rao L. Effect of polysaccharide from *Opuntia dillenii* Haw on acute liver injury in mice. *Chinese journal of biochemical pharmaceutics.* 2009;30:255-7.

21. Trombetta D, Puglia C and Perri D Effect of polysaccharides from *Opuntia ficus-indica*(L.) cladodes on the healing of dermal wounds in the rat. *Phytomedicine. inter. j. phytotherapy phytopharm.* 2006;13:352-8.
22. Alarcon-Aguilar FJ, Valdes-Arzate A and Xolalpa-Molina S. Hypoglycemic activity of two polysaccharides isolated from *Opuntia ficus-indica* and *O. streptacantha*. *Proceedings of the Western Pharmacology Societ.* 2003;46:139-42.
23. Bo L, Wei XJ, Sun JL and Xu SY. Structural investigation of a fucoidan containing a fucose-free core from the brown seaweed, *Hizikia fusiforme*. *Carbohydrate research. internet press.* 2006.
24. Vieira RP, Mulloy B, Diniz JA and Moura PAS. Structure of a fucose-branched chondroitin sulfate from sea cucumber. *J. Biol. Chem.* 1991;266:13530-6.
25. Sawardeker JS, Sloneker JH and Jeanes AR. Quantitative determination of monosaccharides as their alditol acetates by gas-liquid chromatography. *Analyt. Chem.* 1965;37:1602-4.
26. Whistler RL. Iodimetric determination of amylose. In Gilbert, G. A. and Spragg, S. P. (ed.): *Method in carbohydrate chemistry.* New York :Academicpress. 1960:168-75.
27. Sedlak J and Lindsay RH. Estimation of total protein bound and non bound sulfhydryl group in tissue with Ellman's reagent. *Anal. Biochem.* 1968;25:192-6.
28. Fridovich L. Biologic effect of the superoxide radical. *Arch. Biochem. Biophys.* 1986;247:1-15.
29. Aubin JE. Autofluorescence of viable cultured mammalian cells. *J. Histochem. Cytochem.* 1979 ;27:36-43.
30. Matauhiro B, Lillo LE, Saenz C, Urzur CC and Zarata O. Chemical characterization of the mucilage from of *Opuntia indica*. *Carbohydrate Polymer.* 2006;63:263-7.
31. Habibi Y, Mahrouz M, Marais MF, and Vignon MR. *Carbohydrate Reserch.* 2004;339:1201-5.
32. Habibi Y, Mahrouz M, Marais MF, and Vignon MR. *Carbohydrate Reserch.* 2004;339:1119-27.
33. Rupérez P, Ahrazem O and Leal JA. Potential antioxidant capacity of sulphated polysaccharides from edible brown seaweed, *Fucus vesiculosus*. *J. Agri. Food Chem.* 2002;50:840-5.
34. Mabeau S, Kloareg B, Joseleau JP. Fractionation and analysis of fucans from brown algae. *Phytochemistry.* 1990;29:2441-5.
35. Xue Z, Xue CH and Li BF. Study of antioxidant activities of sulfated polysaccharides from *Laminaria japonica*. *J. Appl. Phycol.* 2007;19 :1-7.
36. Ryu IH, Kim SS, Lee KS. Purification and Properties of Non-Cariogenicity Sugar Produced by *Alkalophilic Bacillus* sp. S-1013. *J. Microbiol. Biotechnol.* 2004;14:751-8.
37. Lee SY, Ryu IH, Shim CS. purification and characterization of bioactivity compound acemannan from *Aloe vera*. *Kor. J. Phamacogn.* 1997;28: 65-71.
38. McAnally BH and Manna S. Determination of position of O-acetylgroupina β -(1 \rightarrow 4) mannan from *Aloe barbardensis* miller. *Carbohydr. Res.* 1993;241:317-9.
39. Andrei AS, Olga NY, Alexander SS, Vladimir MM and Nikolay EN. Synthesis of Neu5Ac- and Neu5Gc- α -(2 \rightarrow 6')-lactodamine 3- aminopropyl glycosides. *Carbohydr. Research.* 2001;330:445-58.
40. Chaplin MF and Kennedy JFK. *Carbohydrate analysis. The practical Approach series co.* 1994 :242-93.
41. Johanes VP, Lambertus D, Marinus D, Cornelis

- HH, Johnnis PK and Johannes FGV. Transfer of sialic acid in α -2-6 linkage to monnose in Man β -4GlcNAc and Man β 1-4GlcNA_n by the action of Gal β 1-4GlcNAc α 2-6 sialyltransferase. FEB. 1989;256:179-84.
42. MacMurry J. Organicchemistry. fifthed. Brooks/Cole. 1999.
43. Skoog DA, Holler FJ and Nieman TA. Principle of Instrumental analysis. fifthed. Harcourt Brace & Company. 1998:47-56
44. Rosen DR. Mutation with familial amyotrophic letral sclerosis. Natuer. 1993;362:59-62.
45. Katsuoka F, Motohashi H, Engel JD and Yamamoto M. Nrf2 transcriptional activities the mrfG gene through an antioxidant response element. J. Bio Chem. 2005;280:4483-90.