

[6]-Gingerol Attenuates Autophagy and Increases Activities of Antioxidative Defense Enzymes in Mice with Cerulein-induced Acute Pancreatitis

Sung Ok Kim¹ and Yung Hyun Choi^{2*}

¹Team for Scientification of Korean Medical Intervention (BK21 Plus) & Department of Herbal Pharmacology, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University, Daegu 706-828, Korea

²Department of Biochemistry, Dongeui University College of Oriental Medicine, Busan 614-052, and Anti-Aging Research Center & Blue-Bio Industry RIC, Dongeui University, Busan 614-714, Korea

Received September 24, 2013 / Revised October 15, 2013 / Accepted October 24, 2013

The current study investigated the effects of [6]-gingerol, a ginger phytochemical, on the expression of autophagy-related genes and the activation of antioxidative enzymes in the pancreas of mice with cerulein-induced acute pancreatitis. The following were studied: pancreatic edema, α -amylase activity in serum, expression of autophagy genes, activities of antioxidative defense enzymes, such as superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-Px), and the production of lipid peroxidation (LPO). The results revealed that cerulein-induced edema in the pancreas and α -amylase activity in the cerulein group significantly increased compared with that of the control. However, that of the [6]-gingerol pretreated group was significantly decreased compared with that of the cerulein-alone injected group (positive control). There was no significant difference compared with that of control. The expression of autophagy-related proteins, including Beclin-1 and cleaved microtubule-associated protein 1 light chain 3, were significantly increased in the positive control but significantly decreased in the [6]-gingerol-pretreated group. Furthermore, the activities of SOD and GSH-Px in the positive control were decreased compared with those of the control. However, those of the [6]-gingerol pretreated group were significantly increased compared with those of the cerulein-alone group. The mRNA levels and antioxidant enzyme activities were similar. The production of LPO in the cerulein with and without [6]-gingerol groups was increased by 133.1% and 26.3%, respectively, compared with that of the control, whereas that of the [6]-gingerol-pretreated group was significantly decreased by 48.5% compared with that of the positive control. Therefore, [6]-gingerol may be a strong candidate in reducing autophagy and LPO production and in enhancing antioxidative enzyme activities to help prevent acute and chronic pancreatitis.

Key words : Antioxidant enzyme, autophagy, cerulein, [6]-gingerol, pancreatitis

서 론

생강(*Zingiber officinale* Roscoe)은 생강과(Zingiberaceae)에 속하는 아열대 아시아 원산의 다년생 초본으로, 그 근경을 식용으로 이용하며 특유의 매운 맛과 향기를 가지고 있어 기원전 3세기부터 세계적으로 기호성이 좋은 향신료로 널리 사용되어오고 있다[17, 25]. 생강은 약용과 화장품 소재뿐 만 아니라, 최근 정유 성분을 이용한 향기요법에 사용되기도 한다. 정유성분 중 비휘발성 매운 맛의 주성분인 [6]-gingerol (5-Hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3-decanone)은 강

력한 항산화[33]작용이 있는 것으로 알려져 있으며, 그 외에도 항균[12], 항염증 및 항혈전작용[4] 등이 보고되고 있다. [6]-gingerol은 생강에 0.1~0.3% 함유되어 있는 분자량 294인 항산화 물질이며, 그 외에 생강에는 shogaol, zerumbone 등의 유효성분이 포함되어 있다[17]. 한의학적 효능으로 생강은 해표산한(解表散寒), 온중지구(溫中止嘔)의 효능이 있으며, 생강은 소화기계, 간 기능, 항구토, 중추신경계, 심혈관계 등에 대한 약리효과가 보고되어 있다[25].

당뇨병 발병에는 다양한 원인이 있지만 급·만성적 췌장염은 당뇨병의 원인 뿐만 아니라 췌장암을 초래하는데, 우리나라 췌장염의 유병률은 10만 명 당 약 12명 정도이다[10]. 초기 급성췌장염은 국소적 췌장 손상과 부종을 일으키며, 이러한 염증반응은 전신적 염증 반응이 될 수 있고, 췌장 설포세포나 췌장 효소(α -amylase, trypsinogen 및 zymogen) 분비자극으로 세포의 파괴와 췌장조직의 자가소화를 일으킨다[6, 23, 30]. 한편 cerulein은 10개의 아미노산의 펩타이드로 결합된 올리고 펩타이드이며 평활근을 자극하여 위액, 담즙, 혈액 등

*Corresponding author

Tel : +82-51-850-7413, Fax : +82-51-853-4036

E-mail : choiyh@deu.ac.kr

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

의 소화액 분비자극을 증가시키며, 실험적 동물모델에서 체장염 유도에 사용된다[28, 34].

세포 자가분해(autophagy)는 세포본연의 성질 유지, 세포 성장, 분화에 중요한 역할을 하며, 산화적 스트레스 등으로 인한 세포 내 손상과 세포물질의 재사용과 분해를 위해 lysosome으로 이동시켜 분해하는 과정으로 다양한 질병의 병리적 과정, 악성 암종의 생성, 성장 및 치료에 중요한 조절인자로 관심이 모이고 있다[7, 19, 21]. 세포 자가분해의 표적 유전자 중의 하나인 Beclin-1은 포유류 세포에서 자가포식소체(autophagosome) 형성 동안 중요하게 작용하며, microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3)-I은 LC3-II로 나누어지고 이것은 자가분해의 특징인 자가포식체 형성과 관련이 있다고 보고되었다[16]. 그러나 강력한 항산화 물질로 알려진 생강의 비휘발성 성분인 [6]-gingerol 투여가 cerulein 유도 급성 췌장염 발생 동안 자가분해 조절과 세포신호전달 기전에 대한 연구는 현재까지 보고된 바가 없다.

한편 내인적 혹은 외인적 산화적 스트레스의 증가는 체내에서 free radical 과다 생성을 유도하거나 항산화계의 활성을 감소시킴으로 증가된 활성산소기를 억제하거나 감소시키면 체내 세포 손상을 감소시킬 수 있는 것으로 알려져 있다[1, 3]. 활성산소기는 세포호흡과정에서 필연적으로 발생하는 물질로서, 세포 내 catalase, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase 등과 같은 항산화효소를 통하여 중화되어야 하는데 감소된 항산화 방어계 효소의 활성은 활성산소기를 무독화하지 못하여 세포에 상해를 초래하며[13, 18, 29], 특히 세포막의 다불포화지방산에 작용하여 지질과산화물을 생성시켜 세포의 기능을 손상하여 노화 및 다양한 질병의 원인이 될 수 있다[9, 20, 32]. 활성산소기 제거자(reactive oxygen species scavenger)인 생리적 항산화 방어계 효소는 SOD, glutathione peroxidase (GSH-Px) 등이 있으며 저분자 항산화제 혹은 free radical scavenger 역할을 하는 것으로는 토코페롤, 베타카로틴, 아스코르빈산 및 글루타치온 등이 알려져 있다[5, 22]. 여러 요인에 의해 항산화계의 항상성 불균형이 초래될 때 조직은 과산화적 손상을 받으며 이러한 과산화로부터 생체 조직이 보호받기 위해서 생체 내 항산화 방어계의 강화는 매우 중요하다. 최근 천연물을 이용한 항산화 방어계 강화 후보 물질 검색에 대한 많은 연구가 진행되고 있으나 그 중에서도 오랜 세월 기호성 향신료로 널리 이용되고 있는 천연 식물소재인 생강의 유효성분 중 우수한 항산화력을 가진 [6]-gingerol을 이용한 항산화기능에 대한 연구는 거의 없으며, 특히 급성췌장염 조직에서의 항산화 방어계에 미치는 [6]-gingerol의 영향에 대한 연구는 보고된 바 없다. 따라서 본 연구에서는 cerulein 유도 급성췌장염 마우스 모델에서 생강의 유효성분 중 항산화력이 우수한 [6]-gingerol이 급성췌장염에서 자가분해 조절과 항산화 효소활성에 미치는 영향을 확인하고자 한다.

재료 및 방법

실험동물 사육 및 [6]-gingerol 투여

10주령 Swiss Webster 마우스 암컷(n=5/group)을 기본고형사료(Samyang Corp., Jeollabuk-do, Korea)로 일정한 조건(온도 22±2°C, 습도 45~55%, 명암: 12시간 light/dark cycle)에서 일주일간 적응시킨 후, 완전 임의배치 방법으로 대조군, cerulein 투여군, cerulein과 [6]-gingerol 투여군으로 나누었다. Cerulein 유도 급성췌장염 유발 전 4일 동안 [6]-gingerol (0.1 mg/day, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 0.9% 생리식염수에 녹여 하루에 한번 경구 투여하였다. 선행 실험에서 실험동물 사료 100 g 당 0.002%를 초과하는 경우 동물의 체중과 식이섭취량에 영향을 미치는 결과(not shown data)를 보여 본 실험에서 [6]-gingerol이 사료 100 g 당 0.002% (w/w)를 초과하지 않는 량으로 실험동물 체중 20 g 당 0.1 mg 용량으로 하루에 한번 경구투여 하였다. 대조군에는 동량의 0.9% 생리식염수를 경구투여 하였다.

급성췌장염 유발 및 혈청분리

실험동물에 50 µg/kg cerulein (Sigma-Aldrich)을 복강주사하여 급성췌장염을 유발하였으며 실험 대조군에 동량의 0.9% 생리식염수를 복강 투여하였다. 실험동물은 첫 번째 주사 후 10시간제에 희생시켜 혈액을 채취하여 1,500× g (4°C), 20분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 실험동물의 췌장조직을 적출하여 조직의 무게를 측정하고 액체질소로 급속 동결하여 -80°C에 보관하여 실험에 사용하였다.

α-amylase 활성 측정

실험동물에서 채혈 분리한 혈청 α-amylase 활성은 amylase 활성 측정용 kit (Phadebas kit, Magle Life Sciences, Sweden)를 사용하여 흡광도 540 nm에서 효소활성을 측정하였다.

SOD 활성 측정

세포 내의 산화적 스트레스에 의해 생성되는 활성산소종을 무독화시키는 항산화 효소인 SOD 활성도 측정은 SOD Assay Kit-WST (Sigma-Aldrich)로 흡광도 450 nm에서 측정하여 superoxide radical을 50% 저해활성 하는데 필요한 SOD량을 효소활성의 1 단위로 나타내었다.

GSH-Px 활성 측정

GSH-Px는 체내 대사 산물이나 산화적 스트레스로 생성된 활성산소종의 하나인 과산화수소(H₂O₂)와 phospholipid hydroperoxide 등을 분해하는 체내 항산화기전의 중요한 효소인 GSH-Px 활성 측정은 Glutathione Peroxidase Cellular Activity Assay Kit (Sigma-Aldrich)에 의해 흡광도 340 nm에서 측정하였다. 1 unit는 GSH-Px가 1분 동안 NADPH를 NADP⁺로 산화

시키는 양을 기준으로 아래와 같이 계산되었다.

Activity per extract (mmol/min/ml=Units/ml)=(DA340* dilution factor)/(6.22*V)

DA₃₄₀=A₃₄₀/min(blank) - A₃₄₀/min(sample); 6.22 = ϵ^{mM} for NADPH; V = sample volume in ml)

Lipid peroxidation (LPO) 생성 측정

세포나 조직에서 산화적 스트레스의 지표로 사용되는 지질 과산화물(Lipid peroxidation, LPO) 생성은 TBARS Assay Kit (Cayman, MI, USA)에 의하여 흡광도 530~540 nm에서 측정하였다. 즉 지질과산화로 생성된 malondialdehyde (MDA)와 thiobarbituric acid (TBA)의 반응으로 생성된 thiobarbituric acid reactive substrate (TBARS)를 측정하여 MDA 표준곡선에 의하여 계산된 수치를 단백질 1 mg 당 nmol/l/mg으로 나타내었다.

RNA 분리 및 역전사 중합효소연쇄반응

[6]-gingerol이 산화스트레스성 cerulein 유도 급성췌장염에서 췌장세포 방어기전으로 효소계 산화방어 기전인 SOD 및 GSH-Px의 전사량에 미치는 영향을 알아보기 위하여 췌장조직에서 RNA를 분리하여 역전사 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 수행하였다. 실험동물에서 적출한 췌장은 즉시 RNA 안정화 용액인 RNAlater (Quagen, CA, USA)에 처리 후 Trizol reagent (Invitrogen, CA, USA) 용액을 가하여 RNA를 추출하고, UV spectrophotometer (Lambda 35, Perkin Elmer, USA)로 260 nm에서 흡광도를 조사하여 총 RNA를 정량하였다. 총 RNA를 분리한 후 cDNA 합성 Kit (Invitrogen)로 역전사(reverse transcription, RT)를 수행하여 cDNA를 합성하였다. 만들어진 RT product (template cDNA)에 2.5 mM dNTP, 10× buffer, DEPC water, premixed primer (GenoTech, Korea) 및 Taq DNA polymerase를 넣고 Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 PCR 방법으로 증폭하였다. 사용한 primer의 서열은 SOD (Forward: 5'-GTGTGCGTGCTGAAGGGCGA-3'; reverse: 5'-CACCTTTGCCCAAGTCATCT-3') 및 GSH-Px (Forward: 5'-TATGTCTGCTGCTCGGCTCT-3'; reverse: 5'-TCTGCGCATTGGAACACCGT-3')이다. PCR 반응은 94°C에서 1분간 1 cycle 반응 후 94°C 45초, 58°C 45초간, 72°C 1분간 40회 반복 반응시켰으며, 72°C에서 10분간 extension을 시행한 후 반응을 완료하여 증폭된 산물은 1.5% agarose gel에 전기영동하고 ethidium bromide (Et-Br, Sigma-Aldrich)로 염색한 후, Gel Doc (Vilber Lourmet, Marne-la-Vallée Cedex, France)을 이용하여 DNA band를 확인하였다. mRNA발현양은 L Process (Version 2.01, Fujifilm, Stamford, CT, USA)와 Multi Gauge software (Version 2.01, Fujifilm)를 이용하여 정량하였다.

분자면역단백질분석(Western blot analysis)

분리한 췌장조직에 차가운 단백질 lysis RIPA buffer를 첨가하여 균질화시켜 4°C에서 30분간 반응시킨 후 원심 분리하여 그 상층액의 단백질 농도를 Bio-Rad 단백질 정량 시약 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)으로 정량하여 단백질 시료를 만든 후 전기영동을 하였다. 분리된 단백질을 함유한 gel을 nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)에 전이시킨 후, 상온에서 5% (w/v) nonfat dry milk를 함유한 TBS-T (0.1% Tween 20 in TBS)에서 1시간 incubation하여 비특이적인 단백질들에 대한 blocking을 실시하고 TBS-T로 15분 세척하였다. 준비된 막에 1차 항체[beclin-1, LCI/II (PharMingen, San Diego CA, USA) 및 β -actin (Sigma-Aldrich)]를 각각 처리하여 4°C에서 overnight 시킨 다음 TBS-T로 세척하고 처리된 1차 항체에 맞는 2차 항체를 사용하여 상온에서 1시간 반응시켰다. 다시 TBS-T로 세척하고 enhanced chemiluminescence (ECL) 용액(Amersham Life Science Corp. Arlington Heights, IL, USA)을 처리하여 암실에서 X-ray film에 감광시켜 특정 단백질의 양을 분석하였다. 단백질 발현양은 L Process (Version 2.01, Fujifilm, Stamford, CT, USA)와 Multi Gauge software (Version 2.01, Fujifilm)를 이용하여 정량하였다.

통계분석

모든 실험결과에 대한 통계처리는 GraphPad Prism 5 program (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)를 사용하여 $p < 0.05$ 수준에서 Student's t-test를 실시하여 대조군에 대한 유의성을 검정하였다. 본 실험은 독립적으로 3번 이상 실시하였다.

결 과

[6]-gingerol 투여가 급성췌장염 유발 마우스에서 췌장 무게와 α -amylase 활성에 미치는 영향

실험동물에 [6]-gingerol을 경구투여로 전처리 후 cerulein 유도 급성췌장염 모델에서 췌장염 유발을 확인하기 위해 췌장조직의 부종 유발을 육안으로 확인하고 조직의 무게를 측정한다. 결과는 Fig. 1A에 나타난 바와 같이, 대조군에 비해 양성대조군인 cerulein 단독 투여군에서 췌장 조직의 심각한 부종을 확인하였으며 조직의 무게도 유의적($p < 0.05$)으로 증가되었다. [6]-gingerol 전처리군에서는 췌장 조직의 부종이 육안으로는 대조군과 비교해 그 차이를 볼 수 없었으며, 조직 무게도 약간 증가하였지만 유의적 차이는 없었다. 양성대조군과 비교해보면 조직 무게는 유의적($p < 0.05$)으로 감소하였다. 이상의 결과로 50 μ g/kg cerulein의 복강투여에 의한 급성췌장염의 유발을 확인할 수 있었다. 이러한 조직 부종 유발의 생화학적 지표로써 혈청 α -amylase 활성 측정 또한 췌장염 유발지표 중의

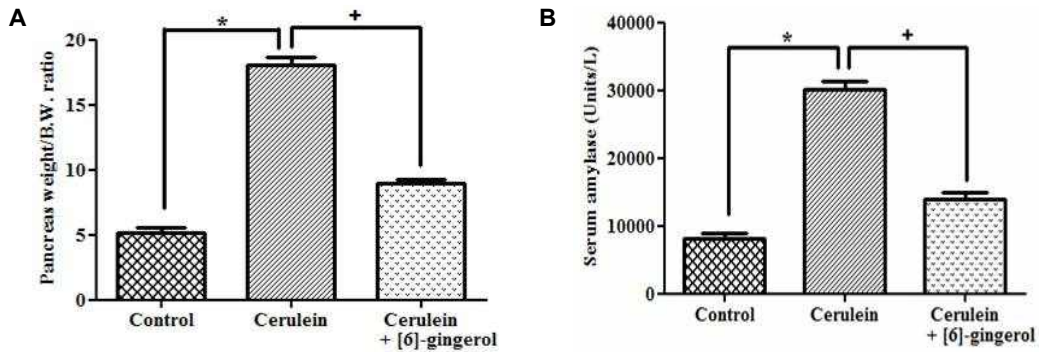


Fig. 1. Effects of [6]-gingerol on pancreas tissue weights and activity of α -amylase in cerulein-induced acute pancreatitis. (A) Wet weights of pancreases; (B) Activity of α -amylase in blood serum. This study groups were treated as indicated in the experiment method. Results were expressed as the means \pm S.E. of three independent experiments. Student's t-test was performed using GraphPad Prism 5 program. * $p < 0.05$, control vs cerulein; + $p < 0.05$, cerulein vs cerulein + [6]-gingerol.

하나이다. Fig. 1B의 결과처럼 대조군에 비해 cerulein 단독 투여군에서 유의적($p < 0.05$) 증가를 보였지만 [6]-gingerol 전처리군에서는 양성대조군에 비해 유의적($p < 0.05$)으로 감소하여 대조군과 유의적 차이가 없었다. 따라서 cerulein 유도 급성췌장염에서 [6]-gingerol의 췌장 부종과 혈청 α -amylase 활성억제는 급/만성 췌장염의 예방과 치료에 유용할 것으로 사료된다.

[6]-gingerol 투여가 급성췌장염 유발 마우스에서 자가분해 지표 유전자 발현에 미치는 영향

Cerulein 유도 급성췌장염은 국부적으로 췌장 조직의 염증 유발 상태이므로 세포 내 항상성 유지를 위한 세포 자가분해 반응 관련 유전자인 Beclin-1과 LC3-I에서 분절된 LC3-II의 발현량을 조사하였다. 그 결과(Fig. 2), Beclin-1과 cleaved LC3-II 발현이 대조군에 비해 양성대조군인 cerulein 단독 투여군에서 유의적($p < 0.05$)으로 증가하였으며, [6]-gingerol 전처리군에

서는 양성대조군에 비해 유의적($p < 0.05$)으로 그 발현이 감소하여 대조군과 유의적 차이가 없었다. 이러한 결과는 급성췌장염 상태에서 증가된 자가분해 반응의 촉발을 [6]-gingerol이 감소시키므로 췌장 조직의 초기 염증작용을 억제할 수 있을 것으로 사료된다.

[6]-gingerol 투여가 급성췌장염 유발 마우스 췌장 조직에서 항산화 효소 활성에 미치는 영향

생체 내 항산화 방어기구 중 효소적 방어계의 하나로 superoxide redical를 환원시켜 과산화수소로 전환시켜 무독화하여 세포를 보호하는 SOD의 활성은 Fig. 3A에서 나타난 바와 같이 대조군에 비해 cerulein 단독 투여군과 [6]-gingerol 전처리군에서 52% 및 11.6% 씩 각각 감소하였으며, [6]-gingerol 전처리군은 양성대조군에 비해 76%의 유의적($p < 0.05$) 증가로 대조군과 비슷한 수준으로 회복하였다. Selenium을 함유하는 항산화 효소로 항산화물질과 함께 생체 내 과산화물을

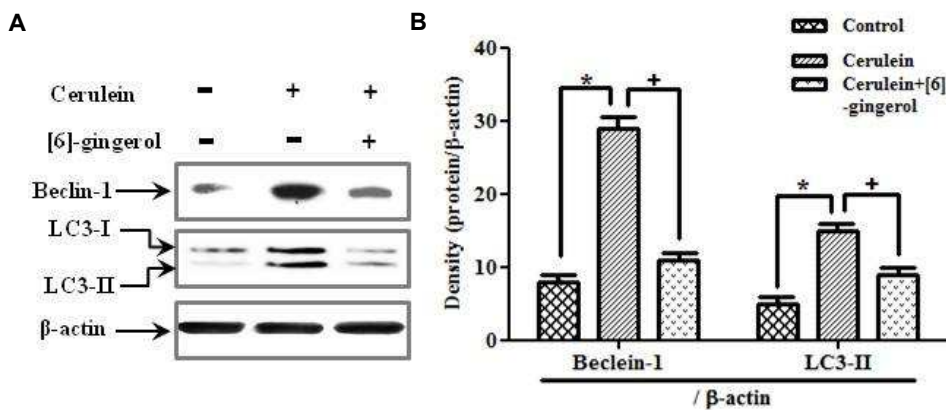


Fig. 2. Effects of [6]-gingerol on expressions of autophagy proteins, Beclin-1 and cleaved LC3-II, in cerulein-induced acute pancreatitis. (A) This study groups were treated as indicated in the experiment method. Results were expressed as the means \pm S.E. of five animal were shown. Student's t-test was performed using GraphPad Prism 5 program. (B) Densitometry was performed using L Process and Multi Gauge software (Version 2.01, Fujifilm). * $p < 0.05$, control vs cerulein, cerulein + [6]-gingerol; + $p < 0.05$, cerulein vs cerulein + [6]-gingerol.

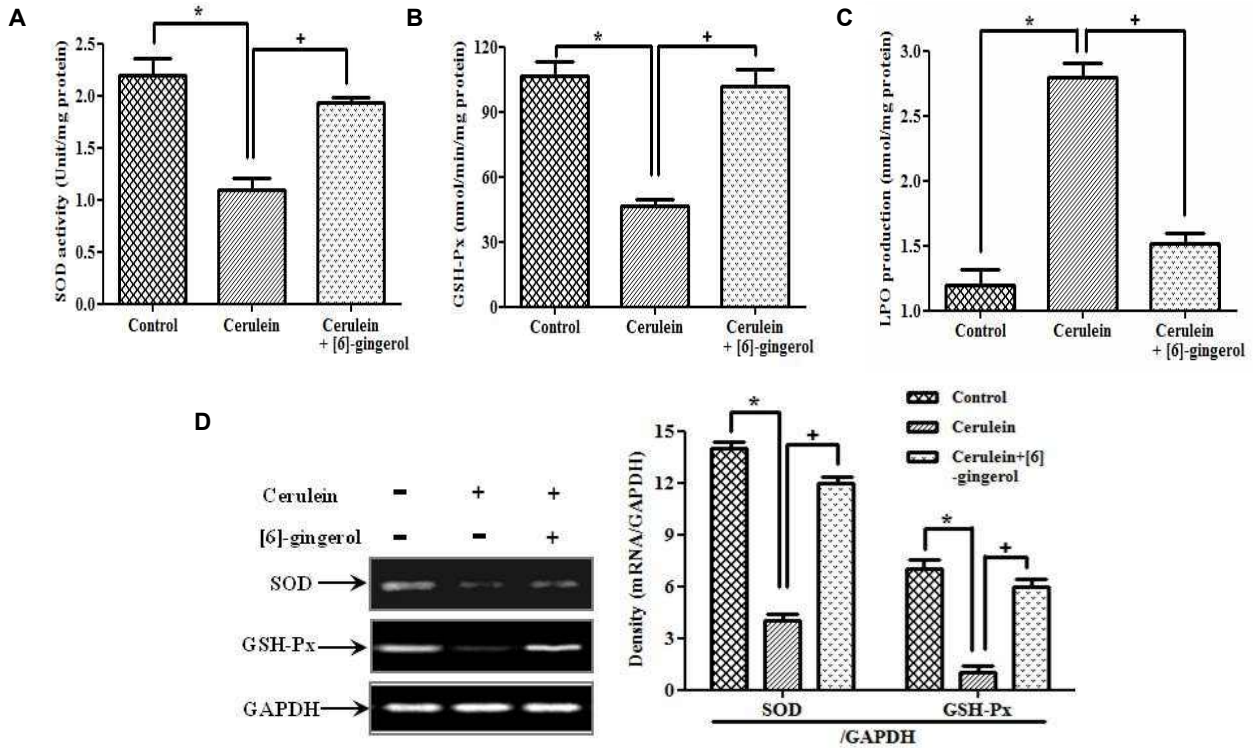


Fig. 3. Effects of [6]-gingerol on activities of antioxidative defense enzymes, production of lipid peroxidation, and levels of SOD and GSH-Px mRNA in cerulein-induced acute pancreatitis. (A-C) SOD, GSH-Px activities and lipid peroxidation, (D) levels of SOD and GSH-Px mRNA. This study groups were treated as indicated in the experiment method. Results were expressed as the means \pm S.E. of three independent experiments. Student's t-test was performed using GraphPad Prism 5 program. Densitometry was performed using L Process and Multi Gauge software. * $p < 0.05$, control vs cerulein, cerulein + [6]-gingerol; + < 0.05 , cerulein vs cerulein + [6]-gingerol.

제거하므로써 세포막의 손상을 방지하는 GSH-Px 활성 결과는 Fig. 2B와 같다. 즉 대조군에 비해 cerulein 단독 투여군과 [6]-gingerol 전처리군에서 56.3% 및 4.4% 씩 각각 감소하였으며, [6]-gingerol 전처리군은 양성대조군에 비해 118.6%의 유의적($p < 0.05$) 증가로 GSH-Px 활성이 대조군 수준으로 회복하였다. 생체조직의 과산화적 손상의 지표로서 성인병, 염증 및 발암의 요인물질로 알려진 지질과산화물을 측정된 결과는 Fig. 3C에 나타낸 바와 같이 총과산화물 생성 정도는 대조군에 비해 cerulein 단독 투여군과 [6]-gingerol 전처리군에서 133.1% 및 26.3% 씩 각각 증가하였으며 [6]-gingerol 전처리군은 양성대조군에 비해 48.5%의 유의적($p < 0.05$) 감소를 보여 정상 수준으로 회복되었다. 이러한 결과를 분자수준에서 확인하기 위해 항산화 효소인 SOD 및 GSH-Px의 mRNA 수준을 조사하였다. 그 결과 Fig. 3D에 나타낸 바와 같이 항산화 효소 활성 측정 결과와 유사한 경향을 보였다. 따라서 [6]-gingerol은 cerulein 유도 급성췌장염으로 인해 생성된 free radical의 무독화와 췌장 조직의 과산화적 손상 예방을 위한 항산화 방어계를 강화시킬 수 있다고 사료된다.

고찰

본 연구는 cerulein 유도 급성췌장염 마우스 모델에서 [6]-gingerol 투여가 과산화적 스트레스 상태에서 증가된 자가분해 단백질인 Beclin-1 및 LC3-II 발현 조절과, cerulein 투여가 췌장 선세포 자극으로 소화효소와 췌액분비를 자극하여 급성부종성 췌장염 유도로 췌장 내 높아진 free radical 제거를 위한 항산화효소의 활성을 조사하여 [6]-gingerol의 항산화기능 효과를 확인하기 위하여 수행되었다.

세포의 항상성 유지, 세포성장 및 분화에 중요한 역할을 하는 세포 자가분해는 분해된 세포 내 물질을 포함하는 막성소포를 형성하는 특별한 세포 내 현상으로 다양한 인간의 질병(신경퇴행질환, 암, 췌장염 등)으로부터 생체를 보호하는 기능을 하는 것으로 보고되고 있다[15, 27]. 최근 Hashimoto et al. [7]과 Fortunato et al. [8]은 세포의 자가분해는 트립시노겐 활성화와 선세포의 사멸 원인이 되는 급성췌장염에서 나타난다고 보고한 바 있다. Qu et al. [26]은 Beclin-1 결손 마우스에서 다양한 암종의 발생이 빈번함을 보고하였고, Takabayashi와 Harada [31]는 강력한 항산화력을 가진 (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG)를 포함하는 녹차의 섭취가 산화적 스트레스

를 억제하여 cerulein으로 유도된 심각한 급성 췌장염을 줄일 수 있다고 보고하였다. 따라서 cholecystokinin의 구조와 기능이 비슷한 cerulein은 췌장의 췌액분비 자극하여 세포의 자가분해를 증가시키지만 생강의 유효성분인 [6]-gingerol은 아스코르빈산과 비교하여 95% 정도의 항산화력[17]을 가지므로 췌장세포의 자가분해를 유의적으로 억제하여 급만성 췌장염의 예방과 치료에 유효할 것으로 생각된다.

항산화효소는 생체 내에서 생성된 superoxide radical과 같은 free radical을 SOD 활성으로 과산화수소로 전환시키고 과산화수소는 catalase와 GSH-Px에 의해서 무독한 물로 전환되며 이 과정에서 세포를 산소독으로부터 보호하는 중대한 역할을 수행한다. 이러한 항산화효소의 활성 변화는 항산화 반응에서 주요한 생체지표로 간주할 수 있다[5, 24]. 그러므로 스트레스 상황에서 적절한 농도의 항산화 효소 활성 유지는 세포의 생존에 필수적이다. Dabrowski et al. [2]은 랫드에서 cerulein 유도 췌장염이 췌장 조직에서 지질과산화 MDA 증가와 SOD의 유의적 감소를 보고하였다. Takabayashi와 Harada [31]는 EGCG를 포함하는 녹차의 섭취가 산화적 스트레스를 억제하여 cerulein으로 유도된 심각한 급성 췌장염을 줄일 수 있다고 보고한 바 있다. 또한 Kim et al. [14]은 cerulein 유도 급성췌장염의 과산화적 스트레스 억제에 EGCG의 항산화작용이 영향을 미친다고 보고하여 본 실험에서 사용한 생강의 비휘발성 매운성분인 [6]-gingerol은 다른 gingerol 유도체에 비해 항산화력이 가장 뛰어나다고 보고되고 있다[11]. 따라서 우수한 항산화 물질인 [6]-gingerol은 cerulein 유도 급성췌장염 유발로 항산화효소계의 불균형 발생과 조직의 지질과산화 생성에서 생체 내 항산화 방어기구인 SOD와 GSH-Px 활성의 증가와 LPO 생성을 감소시키므로 생체 내 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는 효과를 가짐을 의미하므로 향후 [6]-gingerol에 의한 항산화력의 체내대사 기전에 대한 더 많은 연구가 필요하다고 생각 된다. 이상의 결과로 생강의 유효성분 중의 하나인 [6]-gingerol이 cerulein 유도 급성췌장염 모델의 산화적 스트레스 상태를 회복시키고 자가분해 관련 유전자의 발현을 조절함으로써 급성췌장염의 예방과 치료에 기능성 천연물질로 활용 할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부 및 한국산업기술평가관리원의 항노화 산업 제품화 기술개발사업의 일환으로 수행하였음(10040391, 노화성 근기능 저하 방지를 위한 기능성식품소재 및 기기 개발).

References

- Chance, B., Sies, H. and Boveris, A. 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* **59**, 527-605.
- Dabrowski, A., Gabryelewicz, A., Wereszczyńska-Siemiatkowska, U. and Chyczewski, L. 1998. Oxygen-derived free radicals in cerulein-induced acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* **23**, 1245-1249.
- Devy, C. and Gautier, R. 1990. New perspectives on the biochemistry of superoxide anion and the efficiency of superoxide dismutase. *Biochem Pharmacol* **39**, 399-405.
- Dugasani, S., Pichika, M. R., Nadarajah, V. D., Balijepalli, M. K., Tandra, S. and Korlakunta, J. N. 2010. Comparative antioxidant and anti-inflammatory effects of [6]-gingerol, [8]-gingerol, [10]-gingerol and [6]-shogaol. *J Ethnopharmacol* **127**, 515-520.
- Duthie, G. G., Duthie, S. J. and Kyle, J. A. 2000. Plant polyphenols in cancer and heart disease: implications as nutritional antioxidants. *Nutr Res Rev* **13**, 79-106.
- Esrefoglu, M. 2012. Oxidative stress and benefits of antioxidant agents in acute and chronic hepatitis. *Hepat Mon* **12**, 160-167.
- Fortunato, F., Bürgers, H., Bergmann, F., Rieger, P., Büchler, M. W., Kroemer, G. and Werner, J. 2009. Impaired autolysosome formation correlates with Lamp-2 depletion: role of apoptosis, autophagy and necrosis in pancreatitis. *Gastroenterology* **137**, 350-360.
- Hashimoto, D., Ohmuraya, M., Hirota, M., Yamamoto, A., Suyama, K., Ida, S., Okumura, Y., Takahashi, E., Kido, H., Araki, K., Baba, H., Mizushima, N. and Yamamura, K. 2008. Involvement of autophagy in trypsinogen activation within the pancreatic acinar cells. *J Cell Biol* **181**, 1065-1072.
- Horton, A. A. and Fairhurst, S. 1987. Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. *Crit Rev Toxicol* **18**, 27-79.
- Jung, K. W., Won, Y. J., Kong, H. J., Oh, C. M., Seo, H. G. and Lee, J. S. 2013. Cancer statistics in Korea: incidence, mortality, survival and prevalence in 2010. *Cancer Res Treat* **45**, 1-14.
- Katiyar, S. K., Agarwal, R. and Mukhtar, H. 1996. Inhibition of tumor promotion in SENCAR mouse skin by ethanol extract of *Zingiber officinale* rhizome. *Cancer Res* **56**, 1023-1030.
- Kiuchi, F., Shibuya, M. and Sankawa, U. 1982. Inhibitors of prostaglandin biosynthesis from ginger. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* **30**, 754-757.
- Kim, E. H., Sohn, S., Kwon, H. J., Kim, S. U., Kim, M. J., Lee, S. J. and Choi, K. S. 2007. Sodium selenite induces superoxide-mediated mitochondrial damage and subsequent autophagic cell death in malignant 21 glioma cells. *Cancer Res* **67**, 6314-6324.
- Kim, S. O. and Choe, W. K. 2011. Effect of EGCG on expression of neurogenin 3 via the MAP kinase signaling pathway in AR42J cells, a rat pancreatic tumor cell line. *Korean J Nutr* **44**, 196-202.
- Kim, S. O., Kim, M. R. and Choe, W. K. 2012. Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate regulated autophagy in cerulein-induced acute pancreatitis via inhibition of MAP kinase pathway. *Cancer Prev Res* **17**, 232-238.
- Kondo, Y., Kanzawa, T., Sawaya, R. and Kondo, S. 2005. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat Rev Cancer* **5**, 726-734.
- Lee, B. S., Ko, M. S., Kim, H. J., Kwak, I. S., Kim, D. H.

- and Chung, B. W. 2006. Separation of 6-gingerol from ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and antioxidative activity. *Korean J Biotechnol Bioeng* **21**, 484-488.
18. Liu, Y., Borchert, G. L., Donald, S. P., Surazynski, A., Hu, C. A., Weydert, C. J., Oberley, L. W. and Phang, J. M. 2005. MnSOD inhibits proline oxidase-induced apoptosis in colorectal cancer cells. *Carcinogenesis* **26**, 1335-1342.
 19. Levine, B. and Kroemer, G. 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* **132**, 27-42.
 20. Melov, S. 2009. Mitochondrial oxidative stress. Physiologic consequences and potential for a role in aging. *Ann N Y Acad Sci* **908**, 219-225.
 21. Mizushima, N., Yoshimori, T. and Levine, B. 2010. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* **140**, 313-326.
 22. Morimitsu, Y., Nakagawa, Y., Hayashi, K., Fujii, H., Kumagai, T., Nakamura, Y., Osawa, T., Horio, F., Itoh, K., Iida, K., Yamamoto, M. and Uchida, K. A. 2002. Sulforaphane analogue that potently activates the Nrf2-dependent detoxification pathway. *J Biol Chem* **277**, 3456-3463.
 23. Paterniti, I., Mazon, E., Riccardi, L., Galuppo, M., Impellizzeri, D., Esposito, E., Bramanti, P., Cappellani, A. and Cuzzocrea, S. 2012. Peroxisome proliferator-activated receptor β/δ agonist GW0742 ameliorates cerulein- and tauracholate-induced acute pancreatitis in mice. *Surgery* **152**, 90-106.
 24. Patlolla, A. K., Barnes, C., Hackett, D. and Tchounwou, P. B. 2009. Potassium dichromate induced cytotoxicity, genotoxicity and oxidative stress in human liver carcinoma (HepG2) cells. *Int J Environ Res Public Health* **6**, 643-653.
 25. Pharmacology of Oriental Medicine Textbook Editing Committee. 2010. *Pharmacology of Oriental medicine*, pp. 594, 3rd ed., Shinilbooks, Yungdongfor-gu, Seoul, Republic of Korea.
 26. Qu, X., Yu, J., Bhagat, G., Furuya, N., Hibshoosh, H., Troxel, A., Rosen, J., Eskelinen, E. L., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Cattoretti, G. and Levine, B. 2003. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest* **112**, 1809-1920.
 27. Rosenfeldt, M. T. and Ryan, K. M. 2009. The role of autophagy in tumour development and cancer therapy. *Expert Rev Mol Med* **11**, 1-20.
 28. Shanmugam, M. K. and Bhatia, M. 2010. The role of pro-inflammatory molecules and pharmacological agents in acute pancreatitis and sepsis. *Inflamm Allergy Drug Targets* **9**, 20-31.
 29. Spencer, S. R., Xue, L. A., Klentz, E. M. and Talalay, P. 1991. The potency of inducers of NAD(P)H: (quinone-acceptor) oxidoreductase parallels their efficiency as substrates for glutathione transferases. Structural and electronic correlations. *Biochem J* **273**, 711-717.
 30. Steinberg, W. and Tenner, S. 1994. Acute pancreatitis. *N Engl J Med* **330**, 1198-1210.
 31. Takabayashi, F. and Harada, N. 1997. Effects of green tea catechins (polyphenon 100) on cerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Pancreas* **14**, 276-279.
 32. Takahashi, M., Shibata, M. and Niki, E. 2001. Estimation of lipid peroxidation of live cells using fluorescent probe. *Free Radic Biol Med* **31**, 164-174.
 33. Thomson, M., Al-Qattan, K. K., Al-Sawan, S. M., Alnaqeeb, M. A., Khan, I. and Ali, M. 2002. The use of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) as a potential anti-inflammatory and antithrombotic agent. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **67**, 475-478.
 34. Zaninovic, V., Gukovskaya, A. S., Gukovsky, I., Mouria, M. and Pandol, S. J. 2000. Cerulein upregulates ICAM-1 in pancreatic acinar cells, which mediates neutrophil adhesion to these cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **279**, G666-G676.

초록 : Cerulein 유도 급성췌장염 마우스모델에서 자가분해 조절과 항산화 활성화에 미치는 [6]-gingerol의 영향

김성옥¹ · 최영현^{2*}

(¹BK21 Plus Team & 대구한의대학교 한의과대학 본초약리학교실, ²동의대학교 한의과대학 생화학교실, 항노화연구소 및 블루바이오소재개발센터)

열대아시아 원산의 다년생 초본 생강의 주성분인 [6]-gingerol은 항산화 및 항염증 등의 특성이 잘 알려져 있지만 cerulein 유도 급성췌장염에서의 자가분해 관련 유전자 발현 조절과 항산화 효소 활성화에 대한 연구는 거의 없다. 본 연구에서는 cerulein 유도 급성췌장염 동물모델에서 [6]-gingerol의 자가분해 조절과 항산화 작용을 조사하였다. 급성췌장염 유발 전 4일 동안 [6]-gingerol (0.1 mg/20 g mouse/day)을 경구투여 한 후 50 µg/kg cerulein을 복강주사로 급성 췌장염을 유도하였다. 그 결과 혈중 α-amylase 활성, 자가분해 표적 유전자(Beclin-1 및 cleaved LC3-II)의 발현, 지질과산화는 [6]-gingerol 투여군에서 유의적으로 감소하였으며, 항산화지표 효소인 SOD와 GSH-Px 활성은 [6]-gingerol 투여군에서 유의적으로 증가하였다. 이상의 결과들은 천연식물소재 생강의 유효성분 중 하나인 [6]-gingerol이 cerulein 유도 급성 췌장염에서 자가분해 조절과 감소된 항산화효소 활성을 강화하는 효과를 나타내므로 생강이 급성췌장염의 예방과 치료에 대한 기능성 식품소재로 그 활용이 매우 높을 것으로 사료된다.