

아세트아미노펜 유도 HepG-2 세포주 손상에 대한 굴 효소 가수분해물의 보호 효과

박시향¹ · 문성실² · Cheng-Liang Xie³ · 정세영⁴ · 최영준³

¹선마린바이오테크, ²선진육가공연구소

³경상대학교 해양식품공학과/해양산업연구소, ⁴경희대학교 약학대학

Protective Effects of Enzymatic Oyster Hydrolysate on Acetaminophen-induced HepG-2 Cell Damage

Si-Hyang Park¹, Sung-Sil Moon², Cheng-Liang Xie³, Se-Young Choung⁴, and Yeung-Joon Choi³

¹Sun Marine Biotech

²Sunjin Meat Research Center

³Department of Seafood Science and Technology, Gyeongsang National University/Institute of Marine Industry

⁴Department of Hygienic Chemistry, College of Pharmacy, Kyung Hee University

ABSTRACT This study investigated the detoxification effects of enzymatic hydrolysate from oyster on acetaminophen-induced toxicity using HepG-2 cells. Oyster hydrolysate was made with 1% Protamex and 1% Neutrase after treatment with transglutaminase (TGPN) or without (PN). Two types of oyster hydrolysate were added to human-derived HepG-2 hepatocytes damaged by acetaminophen, after which the survival rate of HepG-2 cell was measured. In addition, glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) and glutamic pyruvic transaminase (GPT) activities in the culture media were evaluated. The survival rates of HepG-2 cells were $136.2 \pm 1.4\%$ at $100 \mu\text{g/mL}$ of TGPN and $179.6 \pm 3.8\%$ at $200 \mu\text{g/mL}$ of TGPN. These cell survival rates were higher compared to that of the negative control group ($60.7 \pm 3.2\%$) treated only with acetaminophen. GOT activity was 38.3 ± 0.2 Karmen/mL in the negative control group, whereas it was 19.9 ± 0.5 for TGPN ($200 \mu\text{g/mL}$) and 22.0 ± 2.4 Karmen/mL for PN ($200 \mu\text{g/mL}$). GOT and GTP activities were shown to be dependent on TGPN concentration, and significant reduction in activities could be conformed. The detoxification efficacy of TGPN was higher compared to that of PN. These results suggest that oyster hydrolysate has potential as a healthy food or pro-drug for liver protection.

Key words: oyster, hydrolysate, acetaminophen, detoxification of drug, peptide

서 론

아세트아미노펜은 진통 및 해열제로 전 세계에 걸쳐 널리 사용되고 있는 약물로, 과도한 투약은 심각하고 치명적인 간 손상을 유도하고 간세포 괴사의 원인이 된다(1,2). 아세트아미노펜에 의해 유도된 간 손상에 관한 연구에 따르면 아세트아미노펜은 체내에서 시토크롬 P450에 의해 N-acetyl-p-benzoquinone imine(NAPQI)과 같은 높은 반응성의 대사 중간생성물이 되는데 이것이 간 괴사의 원인이다(3). 아세트아미노펜을 투여한 쥐의 간에서 nitrotyrosine의 함량이 증가하였는데(4), nitrotyrosine은 peroxynitrite와 tyrosine에 의해 생성되며 강한 독성을 나타내어 간 손상의

원인이 된다(5). 즉 세포 내 NAPQI의 지속적인 공유결합(3), nitrotyrosine 생성(4), 막 지질의 과산화 및 세포 내 칼슘 균형의 교란 등의 원인이 간세포 손상 혹은 사멸의 원인이다(6,7). 그러나 정상 상태에서 아세트아미노펜은 글루타치온에 의해 무독화되는데(8), 쥐의 간에서 글루타치온은 아세트아미노펜 독성을 억제하는 물질로 작용하고 아세트아미노펜과 글루타치온의 결합 속도 증가는 다른 무독화 경로로 작용할 수 있다(9). 과량의 아세트아미노펜에 노출될 때 간의 글루타치온은 고갈되고 아세트아미노펜은 단백질과 공유결합하여 간독성 물질로 작용하게 된다(10). 그러나 간의 글루타치온의 빠른 공급(8), nitrotyrosine의 생성을 유도하는 iNOS 발현의 감소(4) 및 heat shock protein 70의 생성량이 증가하면 ICR mice에서 아세트아미노펜으로 인한 세포 사멸이 억제된다(2). 최근의 임상연구에서 Buchard 등(11)은 hGSTP*C 변종에 의한 아세트아미노펜 간독성의 억제에 관하여 보고하였다. 한편 간독성 측정을 위한 세포주와 관련하여 간세포 독성에 미치는 식물 성분들

Received 27 March 2014; Accepted 13 May 2014

Corresponding author: Yeung Joon Choi, Department of Seafood Science and Technology, Gyeongsang National University/Institute of Marine Industry, Jinju, Gyeongnam 650-160, Korea
E-mail: yjchoi@gnu.ac.kr, Phone: +82-55-772-9143

의 선별과 영향을 평가하고(12,13) 지질 대사의 변화를 평가하기 위하여 HepG-2 세포를 사용하였다(14).

최근 보조 식품 및 대체 의약으로서 천연물 유래 생물 분자들의 개발과 수행을 위한 요구가 증가하고 있으며 제약 산업 연구를 위한 후보 물질로 사용되고 있다. 특히 천연 자원에서 얻은 이들 새로운 분자들은 일반 식품에서 유래하여 안전하기 때문에 유력한 치료제로 간주되고 있다(15). 이소플라본의 일종인 genistein은 아세트아미노펜 생물 전환을 저해하고 대사와 항산화 효소 활성의 조절을 통해 산화 스트레스에 저항하기 때문에 아세트아미노펜 유도 간독성을 방지하고 간을 보호한다고 보고하였다(16). 한편 기능성 물질로 많은 관심을 받고 있는 식품 성분 중 하나인 단백질 유래의 펩타이드는 혈압 강하, 면역 증강 및 칼슘 흡수 촉진 등의 광범위한 생리활성을 나타낸다(17-19). 그러나 특히 해양생물 단백질 소재에서 유래한 펩타이드의 간 기능 개선에 관한 연구는 거의 수행되어 있지 않다.

본 연구에서는 굴에 다량 함유되어 있는 단백질을 단백질 가수분해 효소로 가수분해하여 저분자의 펩타이드로 제조하였으며, 아세트아미노펜 독성에 대한 간 보호 활성을 조사할 목적으로 아세트아미노펜으로 세포 손상을 유도한 HepG-2 세포주에 미치는 굴 가수분해물의 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

재료

실험에 사용한 참굴(*Crassostrea gigas*, 각장: 5.8 ± 0.4 cm, 각고: 3.2 ± 0.4 cm, 체중: 9.8 ± 2.1 g)은 경남 통영 연안의 양식장에서 2008년에서 2009년에 걸쳐 채취하여 인근의 가공공장에서 알굴의 형태로 급속동결 한 제품으로 가공 후 1~2년 동안 냉동보관 한 제품을 단백질 가수분해 시료로 사용하였다. 가수분해를 위한 단백질 분해 효소는 바이오시스 사(Busan, Korea)에서 구입한 neutral protease (Neutrase)와 subtilisin protease(Protamex)를 사용하였으며, 단백질의 가교결합을 위한 transglutaminase(TGase, TG-S)는 Ajinomoto 사(Tokyo, Japan)에서 구입하였다. HepG-2 세포주는 한국세포주은행(KTCC, Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였다.

굴 가수분해물의 제조

굴 가수분해물의 제조는 Hur 등(20)의 방법으로 제조하였으며 단백질 분해효소인 1% Protamex와 1% Neutrase로 각각 40°C에서 1시간과 50°C에서 1시간 가수분해하였다. 두 가지 단백질 분해효소로 가수분해하기 전에 굴 단백질의 가교결합을 위해 transglutaminase로 전 처리한 가수분해물을 TGPN이라 하고, 전처리를 수행하지 않은 가수분해물을 PN이라 하였다. 실험에 사용한 시료는 굴 가수분해물을 증류수에 일정한 농도로 녹여 사용하였다.

굴 가수분해물의 아미노산 분석

굴 가수분해물의 아미노산 함량은 시료 50 mg을 5 mL의 6 N HCl로 24시간 가수분해한 후 3G-4 glass filter로 여과하여 40°C 이하의 회전진공증발기(N-1, Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan)에서 HCl을 완전히 증발시켜 농축한 다음 citric buffer(pH 2.2)로 25 mL로 정용한 후 아미노산 자동분석기(Biochrom 20, LKB Biochrom Ltd., Cambridge, UK)로 정량 분석하였다.

굴 가수분해물의 분자량 측정

굴 가수분해물의 분자량을 측정하기 위하여 Superdex HR peptide 칼럼(1.0×30 cm)을 장착한 AKTA Purifier (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Rapskatan, Uppsala, Sweden)에 0.20 μm nylon filter로 여과한 시료 50 μL를 loading 하였다. 0.1 N NaCl을 포함하는 20 mM Tris-HCl (pH 7.5) 용액을 0.3 mL/min의 속도로 용출하면서 용출하는 단백질과 펩타이드는 226 nm에서 검출하였다. 분자량은 같은 조건에서 용출한 carbonic anhydrase(분자량 29,000), cytochrome C(분자량 12,400), aprotinin(분자량 6,500), vitamin B₁₂(분자량 1,355) 및 carnosine(분자량 225)으로 작성한 검량곡선에 따라 측정하였다.

세포 독성 시험

인간 간암 세포인 HepG-2 세포는 10%(v/v) Fetal Bovine Serum(FBS), 페니실린(100 U/mL), 스트렙토마이신(100 μg/mL), 1% 비필수 아미노산, 1 mM sodium pyruvate를 첨가한 MEM 배지로 37°C, 5% CO₂가 유지되도록 배양하였다. 아세트아미노펜을 통한 간세포 독성 유도 실험을 실시하기 전에 굴 가수분해물의 독성을 확인하기 위해 HepG-2의 독성 시험을 수행하였다. 즉 96 well plate에 세포농도 2.5×10^5 cells/mL로 분주한 다음 세포부착을 위해 24시간 배양한 후 시료를 농도별로 처리하여 세포의 독성 유무를 확인하였다. 시료의 독성 측정을 위한 세포의 생존율은 Cell Counting Kit-8(CCK-8, Dojindo, Kumamoto, Japan)을 이용하여 측정하였다.

아세트아미노펜 유도 간 손상에 대한 굴 가수분해물의 간 세포 보호 효능

아세트아미노펜의 HepG-2 cell에 대한 독성을 유도하기 위하여 아세트아미노펜을 농도별로 처리한 다음 세포 독성을 측정하는 방법과 동일한 방법으로 세포 생존율을 측정하였다. 아세트아미노펜 처리 시 세포 생존율은 30 mM에서 약 50~60%의 생존율을 보였고 이 농도로 간세포의 손상을 유도하였다. 대조군은 무처리 배지로 배양하고, negative 대조군에는 아세트아미노펜만을 첨가하였으며, 실험군에는 30 mM 아세트아미노펜과 일정한 농도의 굴 가수분해물을 함께 첨가하여 24시간 동안 배양한 후 세포의 생존율을 측정하였다. 세포의 생존율은 독성 시험과 같이 Cell Counting

Kit-8을 이용하여 측정하였다. CCK-8 kit 시약을 처리한 후 ELISA Microplate reader(VersaMax ELISA Microplate Reader, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며 세포의 생존율은 시료를 처리하지 않은 대조군에 대비한 시료 처리군의 흡광도 비의 백분율로 표시하였다.

GOT와 GPT 활성의 측정

아세트아미노펜을 통한 간세포 독성 유도 실험과 같은 방법으로 시료를 처리한 후 배양액을 취해 배양액에 유리된 GOT(glutamic oxaloacetic transaminase) 및 GPT(glutamic pyruvic transaminase) 효소의 활성을 측정하였다. GOT와 GPT의 활성은 아산셋트 GOT, GPT 측정용 시액(아산제약주식회사, 서울, 한국)을 구입하여 사용하였다. GOT 및 GPT 활성은 기질액인 L-aspartic acid 및 DL-alanine 1 mL에 배양액 0.2 mL를 가해 잘 혼합한 후 37°C에서 GOT는 60분, GPT는 30분간 항온하였다. 정색시약 1 mL를 가하고 잘 혼합하여 실온에서 20분간 보관한 후 0.4 N NaOH를 10 mL 첨가하여 10분간 정치하고 505 nm에서 흡광도를 측정하였다. GOT 활성은 표준곡선을 이용하여 Karmen unit으로 나타내었다. GOT와 GPT의 활성 비교를 위하여 시료를 처리하지 않은 대조군에 대비한 시료 처리군의 활성을 비교하여 백분율로 나타내었다.

통계처리

모든 실험 결과는 3회 이상 반복한 실험값의 평균으로 표시하였다. 통계분석은 Student's *t*-test를 이용하였고, 대조군에 대한 통계적 유의성은 $P < 0.05$ 수준에서 각 실험군 평균값 간의 유의성을 검증하였다.

결과 및 고찰

굴 가수분해물의 구성 아미노산 조성

굴 가수분해물의 총 아미노산 조성의 함은 TGPN이 PN에 비하여 다소 높았으나, 조성 비율은 큰 차이를 보이지 않았다(Table 1). 이 같은 결과는 단백질 가교결합을 위해 사용한 TGase가 가수분해에 영향을 미치지 않았음을 제시한다. 가장 함량이 높은 아미노산은 glutamic acid, proline과 aspartic acid였으며, arginine의 함량도 비교적 높아 전형적인 패류 단백질의 특징을 보였다. TGPN과 PN의 조단백질 함량은 각각 49.2%와 43.7%로(20), 총 구성 아미노산의 함량인 36.69 g/100 g-시료와 30.77 g/100 g-시료에 비하여 각각 12.51 g과 12.92 g의 차이를 보였다. 이 같은 차이는 유리아미노산의 함량에 기인하는 것으로 추정된다. Xie 등(21)은 같은 공정으로 제조한 TGPN 분무건조물의 총 구성아미노산은 39.08 g/100 g-시료이고, 유리아미노산의 함량은 17.49 g/100 g-시료라고 보고하여 총 구성아미노산의 함량은 lot에 따라 다소 차이가 있으나 약 37~40

Table 1. The amino acid composition of oyster hydrolysate (g/100 g-sample)

Amino acid	TGPN	PN
Asp	2.92±0.01	2.51±0.14
Thr	1.35±0.05	1.24±0.05
Ser	1.51±0.04	1.42±0.01
Glu	3.94±0.13	3.06±0.49
Pro	3.88±0.04	2.72±0.08
Gly	1.82±0.02	1.49±0.06
Ala	2.50±0.01	2.03±0.10
Cys	0.87±0.02	0.72±0.11
Val	1.97±0.03	1.74±0.11
Met	0.92±0.00	0.74±0.15
Ile	1.54±0.02	1.38±0.19
Leu	2.18±0.08	2.09±0.30
Tyr	1.25±0.00	1.07±0.16
Phe	1.60±0.01	1.30±0.03
His	0.91±0.00	0.75±0.02
Lys	2.81±0.02	2.37±0.04
NH3	2.27±0.00	2.14±0.01
Arg	2.45±0.02	2.03±0.02
Total	36.69±0.06	30.77±0.41
Recovery (%)	104.67±0.18	92.99±1.99

g/100 g-시료의 범위임을 알 수 있었다.

굴 가수분해물의 분자량 측정

TGPN 및 PN 가수분해물은 약 360 Da에 해당하는 di-혹은 tripeptide가 대부분을 차지하였으며, TGPN은 PN에 비하여 void volume에 해당하는 peak의 함량이 줄어든 대신 480 Da에 해당하는 peak가 분명히 해리되어 차이를 보이고 있었다(Fig. 1). 한편 TGPN은 PN에 비하여 360 Da 이하에서 다양한 peak 분포를 보여 분자량 분포에 확실한 차이를 보였다. 이 같은 결과는 두 가지 형태의 가수분해물의 주요 생성 펩타이드는 동일하나 저분자 펩타이드는 TGase에 의한 공유결합의 결과로 절단 부위에 차이가 있으며 아실기 전이반응과 탈아미노 반응의 증거를 제시하는 것으로 추정된다. TGase는 단백질의 Gln 잔기와 Lys 잔기 사이의 ϵ -(γ -glutamyl)lysine 연결을 통해 분자 내 혹은 분자간 가교결합을 형성하고 아실기 전이반응과 탈아미노 반응을 통해 암모니아를 형성한다(22).

굴 가수분해물의 HepG-2 세포에 대한 독성 시험

아세트아미노펜 유도 간세포 생존율 측정에 앞서 HepG-2 세포에 대한 굴 가수분해물의 독성을 확인하였다. TGPN과 PN 굴 가수분해물의 독성 측정은 각각의 가수분해물의 최종 농도가 50, 100 및 200 μ g/mL가 되도록 배지에 녹여 사용하였다. 세포의 독성은 시료를 처리하지 않고 배양한 대조군에 대비한 세포 생존율로 측정하였으며, 굴 가수분해물 TGPN과 PN 모든 가수분해물에서 독성은 나타나지 않았다(Table 2). 이 같은 결과는 100 mg 및 200 mg/kg BW/day를 급이하여 6주 동안 사육한 rat 군에서 치사 혹은 독성

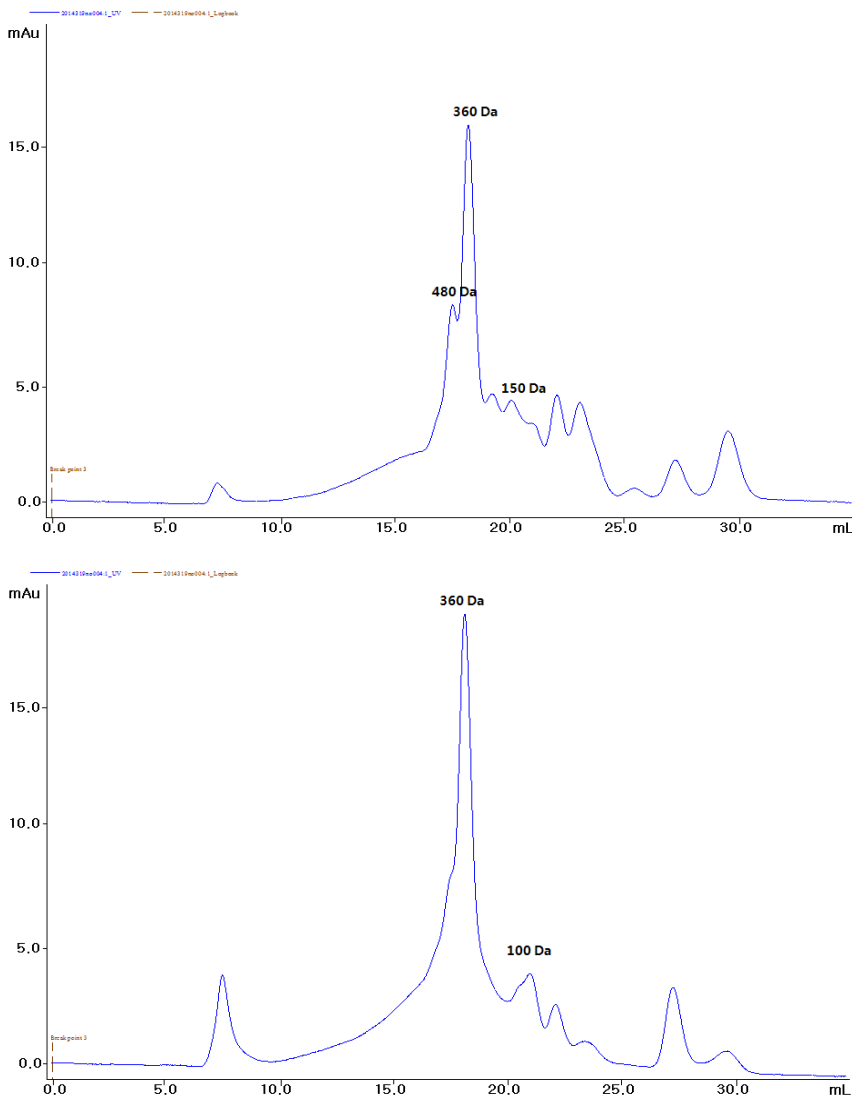


Fig. 1. Distribution of molecular weight of TGPN (A) and PN (B) by Superdex HR peptide column (1.0×30 cm). The peptides were eluted with Tris-HCl (pH 7.5) buffer solution containing 0.1 N HCl at flow rate of 0.3 mL/min, and detected at 226 nm.

Table 2. Cell toxicity of oyster hydrolysate on HepG2 cell

Sample name	Conc. (µg/mL)	Cell viability (%)
Control		100.0±5.2
TGPN	50	103.0±1.3
	100	105.7±2.6
	200	99.0±3.9
PN	50	99.4±4.4
	100	100.7±4.7
	200	99.6±2.7

을 보이지 않은 Choi의 보고(23)와 일치한다.

아세트아미노펜에 의한 간 손상 유도 시의 간세포의 생존율 측정

아세트아미노펜은 예비실험을 통해 세포 생존율이 미처리 대조군에 비해 50~60% 사멸되는 농도가 30 mM임을 확인 하였으며 동일 농도에서 HepG-2 세포의 손상을 유도하였다. 96 well에 분주한 HepG-2 세포에 아세트아미노펜을 30

mM의 농도로 처리하였고, 아세트아미노펜과 함께 굴 효소 가수분해물을 1, 10, 50, 100 및 200 µg/mL의 농도로 배지에 첨가하여 24시간 배양하였으며, 실리비닌은 간질환 및 간경변 보조치료제로 사용되는 약물로 굴 가수분해물의 아세트아미노펜 유도 손상 간세포 생존율과 비교하기 위해 비교 대조군으로 함께 세포 생존율을 측정하였다. TGPN과 PN 굴 가수분해물은 매우 높은 간세포 생존율을 보였다. 시료 무첨가 대조군의 세포 생존율을 100으로 보았을 때 아세트아미노펜만을 처리한 negative 대조군은 60.7±3.2%의 생존율을 보인 반면 TGPN 가수분해물의 경우 각각 50 µg/mL, 100 µg/mL 및 200 µg/mL의 농도에서 92.1±6.7%, 136.2±1.4% 및 179.6±3.8%의 높은 세포 생존율을 보여, 아세트아미노펜으로만 처리한 negative 대조군에 비해 31.4~118.9%의 높은 간세포의 생존율 증가를 보였다 (Table 3). 즉 100 µg/mL 이상의 농도에서는 간 손상은 관측되지 않았고 배양한 세포보다 오히려 세포 증식률이 높은 것에 미루어 높은 간세포 재생 효능을 확인할 수 있었다.

Table 3. The effect of TGPN, PN, and silibinin on cell viability against acetaminophen-induced damage in HepG-2 cell

Sample name	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	Cell viability (%)
Control		100.0 \pm 2.8
Negative control	ACP (only)	60.7 \pm 3.2
TGPN	1	58.7 \pm 3.0
	10	75.1 \pm 7.0*
	50	92.1 \pm 6.7*
	100	136.2 \pm 1.4*
PN	1	68.0 \pm 7.2
	10	62.4 \pm 10.6
	50	72.6 \pm 8.7*
	100	107.9 \pm 8.8*
Silibinin	1	44.1 \pm 2.5*
	10	76.2 \pm 9.4*
	20	97.8 \pm 6.4*
	200	179.6 \pm 3.8*

* P <0.05; compared with negative control.

한편 PN 가수분해물은 100 $\mu\text{g/mL}$ 와 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 각각 107.9 \pm 8.8%와 130.6 \pm 7.6%의 세포 생존율을 보였다.

TGPN 굴 가수분해물 처리군은 PN 가수분해물 처리군에 비하여 간세포 증식률이 크게 증가하는 경향을 보였다. 비교 대조군으로 실험한 실리비닌은 아세트아미노펜과 함께 처리 시 농도가 증가함에 따라 간세포 생존율이 증가하였으나, 20 $\mu\text{g/mL}$ 이상의 농도에서는 오히려 세포 생존율이 감소하였다. 실리비닌 처리군의 경우 아세트아미노펜만을 처리한 negative 군의 생존율에 비해 20 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 세포의 생존율은 37.1%가 증가하였다. 굴 가수분해물의 간세포 생존율과 실리비닌의 세포 생존율을 비교하면 실리비닌 20 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서의 세포 생존율과 유사한 세포 생존율은 TGPN과 PN의 경우 각각 약 50 $\mu\text{g/mL}$ 와 100 $\mu\text{g/mL}$ 이었다. 이 같은 세포 생존율의 결과는 실리비닌 용량의 2/5~1/5에 해당하여 단일 물질인 약물과 비교할 때도 굴 가수분해물의 간세포 재생 효능이 매우 높음을 확인할 수 있었다.

아세트아미노펜 유도 간세포의 GOT와 GPT의 변화

GOT는 생체의 심장, 신장, 뇌 근육 등 여러 장기 세포 내에 존재하는 효소로 건강한 사람의 혈액 중에도 다량 함유되어 있으나 장기의 세포가 손상을 입게 되면 세포 밖으로 유출된다. GPT는 간세포 안에 다량 존재하는 효소로서 간 손상에 의해 세포막이 파괴되면 세포 외로 유출된다. 간세포에 손상이 생기면 배지로 유리되는 이들 효소의 양은 증가하게 되고, 간세포의 손상이 억제되면 이들 효소의 양은 감소한다(24).

본 연구에서는 아세트아미노펜으로 간 손상을 유도하고 굴 가수분해물을 함께 처리하여 HepG-2 세포 배양액에 유출된 GOT와 GPT 효소 활성을 측정하였다. GOT 활성은 아세트아미노펜만을 처리한 negative 대조군에 비해 TGPN

Table 4. The effect of TGPN, PN, and silibinin on GOT activity against acetaminophen (ACP)-induced damage in HepG-2 cell

Sample name	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	GOT activity (Karmen/mL)	Ratio (%)
Control		19.5 \pm 0.7	50.9 \pm 1.8
Negative control	ACP (only)	38.3 \pm 0.2	100.0 \pm 0.5
TGPN	1	32.5 \pm 0.8	84.8 \pm 4.2*
	10	31.3 \pm 6.6	71.8 \pm 3.0*
	50	26.4 \pm 2.3	71.4 \pm 3.4*
	100	24.8 \pm 3.6	61.3 \pm 8.2*
PN	200	19.9 \pm 0.5	51.9 \pm 1.3
	1	38.8 \pm 3.4	101.2 \pm 8.7*
	10	33.1 \pm 4.8	81.7 \pm 10.4*
	50	29.5 \pm 1.5	76.9 \pm 4.0*
Silibinin	100	23.5 \pm 0.7	61.4 \pm 1.8*
	200	22.0 \pm 2.4	54.5 \pm 3.6*
	1	33.2 \pm 11.3	86.6 \pm 10.6
	10	28.8 \pm 3.7	75.2 \pm 9.8*
	20	30.2 \pm 2.1	78.8 \pm 5.4*

* P <0.05; compared with negative control.

과 PN 처리군은 농도가 증가함에 따라 유의적인 감소 효과를 보였다(Table 4). Negative 대조군의 경우에 38.3 \pm 0.2 Karmen/mL이었으며, TGPN(100 $\mu\text{g/mL}$)과 PN(100 $\mu\text{g/mL}$) 농도에서 각각 24.8 \pm 3.6 Karmen/mL와 23.5 \pm 0.7 Karmen/mL로 나타났으며, TGPN(200 $\mu\text{g/mL}$)과 PN(200 $\mu\text{g/mL}$)에서는 19.9 \pm 0.5와 22.0 \pm 2.4 Karmen/mL로 농도에 따라 유의적인 활성 감소를 확인할 수 있었다. 이 같은 결과는 미처리 대조군 19.5 \pm 0.7 Karmen/mL와 거의 유사한 수준까지 활성이 감소되었음을 확인하였다. 실리비닌의 경우에는 10 $\mu\text{g/mL}$ 와 20 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 유의적인 활성 감소를 보였으나 굴 가수분해물보다 감소의 폭은 크지는 않았다.

GPT 활성 측정에서도 GOT와 유사한 결과를 보여주었다(Table 5). 아세트아미노펜만을 처리한 negative 대조군에 비해 TGPN과 PN 처리군은 GOT와 마찬가지로 농도가 증가함에 따라 크게 감소하였다. GOT의 활성은 미처리 대조군의 경우에 18.5 \pm 2.9%이었으며, negative 대조군은 35.3 \pm 1.4 Karmen/mL이었다. TGPN(100 $\mu\text{g/mL}$)과 PN(100 $\mu\text{g/mL}$)에서는 negative 대조군에 비해 32.6%와 19.5%까지 활성이 감소하였다. 더욱이 TGPN(200 $\mu\text{g/mL}$)과 PN(200 $\mu\text{g/mL}$)은 미처리 대조군과 거의 유사한 정도까지 활성이 저하하였다. TGPN과 PN 가수분해물 모두 GOT와 GPT에서 활성이 감소하였고 TGPN이 PN보다 효과적인 것으로 나타났다. 실리비닌의 경우에는 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 유의적인 활성 감소가 인지되었으나 굴 가수분해물의 활성 저하 효능이 더 큰 것으로 나타났다.

N-acetyl cysteine(NAC)은 글루타치온의 전구물질로 투여 시 글루타치온 합성이 증가하고 항염증 및 항산화 작용이 있으나(25,26), 구토, 설사 및 위식도 역류와 같은 부작용을 유발하기도 한다(27). 아세트아미노펜으로 유도한 간 손

Table 5. The effect of TGPN, PN, and silibinin on GPT activity against acetaminophen-induced damage in HepG-2 cell

Sample name	Conc. ($\mu\text{g/mL}$)	GPT activity (Karmen/mL)	Ratio (%)
Control		18.5 \pm 2.9	52.5 \pm 8.2
Negative control	ACP (only)	35.3 \pm 1.4	100.0 \pm 3.9
TGPN	1	32.8 \pm 2.7	92.9 \pm 7.7
	10	28.1 \pm 2.1	79.6 \pm 5.9*
	50	27.2 \pm 3.1	77.1 \pm 8.8*
	100	23.8 \pm 1.4	67.4 \pm 3.9*
	200	19.5 \pm 1.9	55.4 \pm 5.4*
PN	1	32.7 \pm 3.3	92.6 \pm 9.4
	10	33.0 \pm 3.1	93.5 \pm 8.7
	50	28.6 \pm 2.3	81.2 \pm 6.7*
	100	29.9 \pm 1.3	84.9 \pm 3.8*
	200	22.4 \pm 1.2	63.6 \pm 3.4*
Silibinin	1	31.3 \pm 2.8	88.9 \pm 7.9
	10	29.3 \pm 2.5	83.2 \pm 7.1*
	20	32.5 \pm 2.4	92.1 \pm 6.7

* $P < 0.05$; compared with negative control.

상 쥐에 대한 ghrelin의 간 보호 효능 실험에서 ghrelin의 공급은 혈중 ALT, AST뿐만 아니라 TNF- α 의 생성을 억제하였다(28). Ghrelin은 28개의 아미노산으로 이루어진 펩티드 호르몬으로서 항산화 작용 등이 밝혀진 물질이다(29). 그 밖에 만성간염 등의 약물로 사용되고 있는 실리비닌(30), 동물실험에서 간 손상과 지질의 과산화물을 억제한다고 보고한 hispidulin(6-methoxy-5,7,4'-trihydroxy-flavone)(31) 및 indomethacin에 대한 연구(32) 등이 있으나 간 보호 효능을 가지는 천연물질에 관한 연구는 거의 이루어지지 않았다.

과량의 아세트아미노펜에 노출되었을 때 글루타치온이 결핍되어 이로 인해 간 손상이 일어난다(10). 동식물에서 발견되는 유기화합물인 글루타치온은 시스테인의 아민기와 glutamate의 side chain의 카르복실기 간의 감마 펩티드 결합으로 이루어진 트리펩티드로서 프리 라디칼과 페록사이드 등의 활성 산소종을 제거하는 항산화제이다(9). 글루타치온은 L-cysteine, L-glutamic acid와 glycine으로부터 체 내에서 합성되며, cysteine의 thiol기가 양자 공여체로 작용하여 글루타치온의 생리활성에 기여한다. 글루타치온의 구성 요소 중 시스테인은 식품에 상대적으로 적게 함유되어 있어서 글루타치온 합성속도에 매우 중요한 역할을 한다(33). 시스테인은 아세트아미노펜으로 간 손상을 유발한 쥐에게 공급하였을 때 간을 보호하는 효능이 있었고, 동시에 혈중 글루타치온의 함량도 증가하였다(25,34). Davern 등은 아세트아미노펜 섭취 환자에게 시스테인을 같이 투여하였을 때 ALT와 AST의 생성량이 감소하는 것에 미루어 시스테인의 간 보호 효능을 입증하였다(35).

글 가수분해물에 함유된 아미노산 중에서 함황 아미노산인 시스테인의 함량은 TGPN이 0.87 \pm 0.02 g/100 g-시료였고 PN은 0.72 \pm 0.11 g/100 g-시료였으며, 메티오닌의 함

량은 TGPN과 PN이 각각 0.92 \pm 0.00 g/100 g-시료와 0.74 \pm 0.15 g/100 g-시료였다. Cysteine과 methionine의 함황 아미노산의 총량은 TGPN과 PN에서 각각 4.87 g/100-g protein과 4.74 g/100 g-protein으로 필수 아미노산의 기준인 2.5 g/100 g-protein에 비하여 두 배 정도 높은 함량을 보였다. 함황 아미노산은 패류에 대체로 높은 함량으로 함유되어 있으며(36), 굴에 다량 함유하고 있는 글루타치온의 구성 아미노산인 시스테인, 글루탐산 및 글라이신이 글루타치온의 빠른 생성을 유도함으로써 간세포의 손상을 억제하는 것으로 추정된다(33). 특히 글 가수분해물의 높은 활성은 2단 가수분해를 통해 생성된 cysteine 잔기를 함유하는 저분자의 펩티드에 기인하는 것으로 여겨진다. 이외에 펩티드의 저분자화도 세포 내 흡수에 영향을 미쳤을 것으로 판단된다(37). 글 가수분해물에 함유된 다량의 아미노산들이 간세포의 재생을 유도하고, 글 가수분해물의 항산화 효과 등이 아세트아미노펜에 의한 간 손상을 억제한 것으로 추정된다(20).

요 약

본 연구는 글 가수분해물이 아세트아미노펜에 의한 간독성의 무독화 효과를 HepG-2 세포를 사용하여 조사하였다. 글 가수분해물은 글 단백질의 가교연결을 위해 TGase로 전처리하거나(TGPN) 혹은 하지 않고(PN), 1% Protamex와 1% Neutrase 단백질 분해효소로 2단 가수분해하였다. 두 종류의 글 가수분해물은 아세트아미노펜으로 간 손상을 유도한 세포에 각각 처리하여 세포 생존율을 측정하였으며, 세포 배양 시 배양액으로 유출된 GOT와 GPT 활성을 측정하였다. TGPN 가수분해물의 경우 아세트아미노펜만을 처리한 negative 대조군(60.7 \pm 3.2%)에 비하여 100 $\mu\text{g/mL}$ 와 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 각각 136.2 \pm 1.4%와 179.6 \pm 3.8%의 높은 세포 생존율을 보였다. PN 가수분해물은 100 $\mu\text{g/mL}$ 와 200 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 각각 107.9 \pm 8.8%와 130.6 \pm 7.6%의 세포 생존율을 보였다. GOT 활성은 negative 대조군의 경우에 38.3 \pm 0.2 Karmen/mL이었으며, TGPN(200 $\mu\text{g/mL}$)과 PN(200 $\mu\text{g/mL}$)에서는 19.9 \pm 0.5와 22.0 \pm 2.4 Karmen/mL로 농도에 따라 유의적인 활성 감소를 확인할 수 있었다. 그리고 GPT 활성도 GOT와 같은 경향의 활성을 나타내었다. 이 같은 결과에 미루어 글 유래 가수분해물의 간 보호 건강 기능 식품 혹은 약물 개발의 가능성을 확인하였으며 앞으로 가수분해 펩티드 중의 유효성분에 대한 구조 동정과 작용 기전에 관한 연구가 필요할 것으로 보인다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부 2011년도 기술사업화 지원사업(과제번호 81001-3)에 의해 이루어진 것입니다. 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Choi JH, Choi CY, Lee KJ, Hwang YP, Chung YC, Jeong HG. 2009. Hepatoprotective effects of an anthocyanin fraction from purple-fleshed sweet potato against acetaminophen-induced liver damage in mice. *J Med Food* 12: 320-326.
- Williams CD, McGill MR, Farhood A, Jaeschke H. 2013. Fas receptor-deficient *lpr* mice are protected against acetaminophen hepatotoxicity due to higher glutathione synthesis and enhanced detoxification of oxidant stress. *Food Chem Toxicol* 58: 228-235.
- Hinson JA, Reid AB, McCullough SS, James LP. 2004. Acetaminophen-induced hepatotoxicity: role of metabolic activation, reactive oxygen/nitrogen species, and mitochondrial permeability transition. *Drug Metab Rev* 36: 805-822.
- Hinson JA, Pike SL, Pumford NR, Mayeux PR. 1998. Nitrotyrosine-protein adducts in hepatic centrilobular areas following toxic doses of acetaminophen in mice. *Chem Res Toxicol* 11: 604-607.
- Beckman JS, Koppenol WH. 1996. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad and ugly. *Am J Physiol* 271: C1424-1437.
- Nerland DE, Cai J, Pierce WM Jr, Benz FW. 2001. Covalent binding of acrylonitrile to specific rat liver glutathione S-transferases in vivo. *Chem Res Toxicol* 14: 799-806.
- Mitchell JR, Jollow DJ, Potter WZ, Davis DC, Gillette JR, Brodie BB. 1973. Acetaminophen-induced hepatic necrosis. I. Role of drug metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 187: 185-194.
- Saito C, Zwingmann C, Jaeschke H. 2009. Novel mechanisms of protection against acetaminophen hepatotoxicity in mice by glutathione and N-acetylcysteine. *Hepatology* 51: 246-254.
- Allameh A, Vansoun EY, Zarghi A. 1997. Role of glutathione conjugation in protection of weanling rat liver against acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Mech Ageing Dev* 95: 71-79.
- Dragovic S, Venkataraman H, Begheijn S, Vermeulen NP, Commandeur JN. 2014. Effect of human glutathione S-transferase hGSTP1-1 polymorphism on the detoxification of reactive metabolites of clozapine, diclofenac and acetaminophen. *Toxicol Lett* 224: 272-281.
- Buchard A, Eefsen M, Semb S, Andersen SE, Morling N, Bendtsen F, Larsen FS, Dalhoff K. 2012. The role of the glutathione S-transferase genes GSTT1, GSTM1, and GSTP1 in acetaminophen-poisoned patients. *Clin Toxicol (Phila)* 50: 27-33.
- Thabrew MI, Hughes RD, McFarlane IG. 1997. Screening of hepatoprotective plant components using a HepG2 cell cytotoxicity assay. *J Pharm Pharmacol* 49: 1132-1135.
- Lee EG, Kim KB, Jeong JM. 2006. Hepatoprotective effects of poly herbal formulation (Hepa-1000) on t-BHP-induced toxicity in human hepatoma cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 1121-1126.
- Mochizuki Y, Maebuchi M, Kohno M, Hirotsuka M, Wadahama H, Moriyama T, Kawada T, Urade R. 2009. Changes in lipid metabolism by soy β -conglycinin-derived peptides in HepG2 cells. *J Agric Food Chem* 57: 1473-1480.
- Ghosh J, Sil PC. 2013. Arjunolic acid: A new multifunctional therapeutic promise of alternative medicine. *Biochimie* 95: 1098-1109.
- Fan YJ, Rong Y, Li PF, Dong WL, Zhang DY, Zhang L, Cui MJ. 2013. Genistein protection against acetaminophen-induced liver injury via its potential impact on the activation of UDP-glucuronosyltransferase and antioxidant enzymes. *Food Chem Toxicol* 55: 172-181.
- Sharma S, Singh R, Rana S. 2011. Bioactive peptides: a review. *INT J Bioautomation* 15: 223-250.
- Fiat AM, Migliore-Samour D, Jollès P, Drouet L, Bal dit Sollier C, Caen J. 1993. Biologically active peptides from milk proteins with emphasis on two examples concerning antithrombotic and immunomodulating activities. *J Dairy Sci* 76: 301-310.
- Mazoyer E, Lévy-Toledano S, Rendu F, Hermant L, Lu H, Fiat AM, Jollès P, Caen J. 1990. KADS, a new peptide derived from human lactotransferrin, inhibits platelet aggregation and release reaction. *Eur J Biochem* 194: 43-49.
- Hur SI, Park SH, Lee SS, Choung SY, Choi YJ. 2013. Antioxidative effect of oyster hydrolysate on the serum and hepatic homogenate in SD-rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 1940-1948.
- Xie CL, Ha JM, Choung SY, Jin SK, Choi YJ. 2014. Physicochemical properties and stability of the spray-dried oyster hydrolysate with antihypertensive effect by pilot scale processing. *J Aquat Food Prod Technol* (In Press).
- Ashie INA, Lanier TC. 2000. Transglutaminases in seafood processing. In *Seafood Enzymes*. Haard NF, Simpson BK, eds. Marcel Dekker, Inc., Manhattan, NY, USA. p 147-166.
- Choi YJ. 2007. *Production of microbial media and functional peptides using under-utilized oyster*. Ministry of Oceans and Fisheries project No 20040078.
- Kim YK, Kim YH, Kim DH, Lee KT. 2005. Cytoprotective effects of natural flavonoids on carbon tetrachloride-induced toxicity in primary cultures of rat hepatocytes. *Kor J Pharmacogn* 36: 224-228.
- Lauterburg BH, Corcoran GB, Mitchell JR. 1983. Mechanism of action of N-acetylcysteine in the protection against the hepatotoxicity of acetaminophen in rats in vivo. *J Clin Invest* 71: 980-991.
- Tucker JR. 1998. Late-presenting acute acetaminophen toxicity and the role of N-acetylcysteine. *Pediatr Emerg Care* 14: 424-426.
- Adam Algren D. 2008. Review of N-acetylcysteine for the treatment of acetaminophen toxicity in pediatrics. Presented at second meeting of the Subcommittee of the Expert Committee on the Selection and Use of Essential Medicines. Geneva, Switzerland.
- Golestan Jahromi M, Nabavizadeh F, Vahedian J, Nahrevanian H, Dehpour AR, Zare-Mehrjardi A. 2010. Protective effect of ghrelin on acetaminophen-induced liver injury in rat. *Peptides* 31: 2114-2117.
- Kheradmand A, Alirezai M, Birjandi M. 2010. Ghrelin promotes antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in the rat ovary. *Regul Pept* 162: 84-89.
- Pradhan SC, Girish C. 2006. Hepatoprotective herbal drug, silymarin from experimental pharmacology to clinical medicine. *Indian J Med Res* 124: 491-504.
- Ferrándiz ML, Bustos G, Payá M, Gunasegaran R, Alcaraz MJ. 1994. Hispidulin protection against hepatotoxicity induced by bromobenzene in mice. *Life Sci* 55: PL145-150.
- Barriault C, Audet M, Yousef IM, Tuchweber B. 1994. Protection by indomethacin against the lethality and hepatotoxicity of phalloidin in mice. *Toxicol Lett* 71: 257-269.
- Wu G, Fang YZ, Yang S, Lupton JR, Turner ND. 2004. Glutathione metabolism and its implications for health. *J Nutr* 134: 489-492.
- Williamson JM, Boettcher B, Meister A. 1982. Intracellular

- cysteine delivery system that protects against toxicity by promoting glutathione synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 79: 6246-6249.
35. Davern TJ 2nd, James LP, Hinson JA, Polson J, Larson AM, Fontana RJ, Lalani E, Munoz S, Shakil AO, Lee WM. 2006. Measurement of serum acetaminophen-protein adducts in patients with acute liver failure. *Gastroenterology* 130: 687-694.
36. NFRDI. 2009. *Chemical composition of marine products in Korea*. National Fisheries Research and Development Institute, Busan, Korea. p 112.
37. Chung IK, Kim JS, Hur MS. 2006. Improving the functional properties of oyster hydrolysates by two-step enzymatic hydrolysis. *J Kor Fish Soc* 39: 269-277.