

알코올성 산화적 손상에 대한 발효울금의 간세포 보호 효과

성혜미¹ · 이유현² · 전주진¹

¹전남대학교 식품영양학과

²수원대학교 식품영양학과

In Vitro Hepatoprotective Effects of Fermented *Curcuma longa* L. by *Aspergillus oryzae* against Alcohol-Induced Oxidative Stress

Heami Sung¹, Yoo-Hyun Lee², and Woojin Jun¹

¹Division of Food and Nutrition, Chonnam National University

²Department of Food and Nutrition, Suwon University

ABSTRACT Protective effects of fermented *Curcuma longa* L. (CL) against alcoholic liver damage were investigated in HepG2/2E1 cells. Fermented CL was extracted by cold water (FCC), hot water, 80% ethanol, and methanol. Of the four extracts, the strongest hepatoprotective effect against ethanol-induced oxidative stress was observed in FCC. Pretreatment with FCC also reduced intracellular reactive oxygen species formation compared to ethanol-alone treated cells. FCC also enhanced catalase, glutathione-S-transferase, glutathione reductase, glutathione peroxidase, and superoxide dismutase, and non-enzymatic antioxidative activities such as glutathione compared to alcohol-treated HepG2/2E1 cells. Our findings suggest that FCC might be considered as a useful agent in the prevention of liver damage induced by oxidative stress by increasing the antioxidant defense mechanism.

Key words: alcohol, oxidative damage, hepatoprotective effect, HepG2/2E1, *Curcuma longa* L.

서 론

체내에서 알코올은 알코올 탈수소효소인 alcohol dehydrogenase(ADH)에 의해 간에서 산화되어 아세트알데히드가 되고 다시 aldehyde dehydrogenase(ALDH)에 의해 산화되어 acetic acid로 되며 일부는 노나 CO₂로 배설된다(1,2). 알코올의 간에서의 대사과정은 주로 ADH, cytochrome P450 2E1(CYP2E1), catalase(CAT) 3가지 효소계에 의한 산화경로를 통해 이루어진다(3,4). 이런 알코올 대사는 CYP2E1, aldehyde oxidase 등을 유도하며 생체 내 reactive oxygen species(ROS)를 생성함으로써 생체 내 산화적 스트레스를 유발한다(5). 유발된 산화스트레스는 면역반응을 유도하거나 간 내 여러 세포에서 염증반응을 유발하여 간 손상을 초래하며 항산화 방어계의 균형이 깨져 각종 질환이 발생하게 된다(6,7)

이런 활성산소를 제거하기 위해 세포 내에서는 CAT, glutathione peroxidase(GPx), superoxide dismutase(SOD), glutathione reductase(GR) 등의 항산화 효소와 glutathione(GSH) 등과 같은 비효소적 항산화 물질들이 작

용한다. 이러한 항산화 물질들은 활성산소에 의한 산화적 손상을 보호한다. 그중 SOD는 산소분자가 환원되어 생기는 superoxide anion radical을 제거하고 H₂O₂를 생성시킨다. 이 메커니즘은 첫 번째 방어 메커니즘으로 가장 독성이 강한 hydroxy radical의 생성을 예방하는 작용을 한다.

GPx의 환원형 GSH는 산화형인 glutathione(GSSG)으로 산화시키면서 H₂O₂를 제거한다. GSSG는 glutathione reductase에 의해 다시 GSH로 환원되어 인체 내에서 균형을 이루면서 존재하게 된다(8,9).

최근 한국의 기후 환경 변화에 따라 난대성 작물을 대상으로 하는 기능성 소재를 발굴하는 연구가 꾸준히 이루어지고 있다. 난대성 작물 중의 하나인 울금은 생강과(Zingiberaceae)의 강황속(*Curcuma*)으로 분류되는 속근성 다년생 식물로 향신료, 염료 등으로 사용되고 있으며 인도에서는 타박상, 염좌, 지혈약 등의 의학적 치료제로 이용되고 있다(10). 울금의 대표적인 생리활성 성분으로 항암, 항돌연변이성, 항바이러스, 항염증, 간 보호 기능, 항산화, 항알레르기 등으로 알려진 curcumin이 있다(11). 울금에 대한 연구로는 인지능 개선 효과(12), 항균 및 항산화 효과(13), 항산화 효과(14), 간 보호 효과(15), 면역조절능(16) 등이 선행 보고된 바 있고, 최근 가공법 및 추출법을 달리하여 울금의 기능성을 증진하기 위한 연구가 계속되고 있다. 하지만 이와 같은 다양한 생리활성에도 불구하고 낮은 용해도와 생체이

Received 23 February 2016; Accepted 9 May 2016

Corresponding author: Woojin Jun, Division of Food and Nutrition, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea
E-mail: wjjun@chonnam.ac.kr, Phone: +82-62-530-1337

용량(17)로 문제가 되고 울금 특유의 쓴맛과 이취로 인해 기호성 결여(18)로 기능성 소재로 이용하는 데 어려움이 많다. 따라서 본 연구에서는 발효를 통해 울금의 기호도를 상승시키고 용해도 및 생체이용률을 높이고자 한다. 또한, 울금의 산업적 실용화를 극대화하고 문제점들을 개선하기 위해 *Aspergillus oryzae*를 이용하여 산업적 규격에서 생산된 발효울금 추출물들의 알코올로 유발된 산화적 스트레스에 대한 간세포 손상에 대한 보호 효과를 검토하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료 및 추출물의 제조

본 연구에서 사용한 발효울금은 전라남도 진도군에서 재배 및 수확된 울금을 세척 후 멸균하고, 2% *Aspergillus oryzae*를 접종하여 발효하고 멸균 후 건조한 것으로 한국인스팜(주)(Hwasun, Korea)로부터 제공받았다. 발효울금의 추출물은 분말시료 50 g에 1 L 용매(물, 80% 에탄올, 메탄올)를 넣고 250°C에서 3시간 동안 환류냉각 또는 냉수로 stirring 하여 추출하였다. 추출한 용액은 여과지(Whatman No. 6, GE Healthcare, Maidstone, UK)를 사용하여 여과하고, 여액을 40°C에서 rotary vacuum evaporator(Eyela, Tokyo, Japan)로 감압 농축한 후 동결건조기(Ilshin Lab, Seoul, Korea)를 이용하여 완전 동결 건조하여 -70°C에 냉동 보관하면서 사용하였다.

시약

세포배양에 사용된 minimum essential medium(MEM), fetal bovine serum(FBS), trypsin-EDTA 및 antibiotics는 Gibco BRL(Grand Island, NY, USA)에서 구입하였으며, XTT-phenazine methosulfate(PMS), xanthine, xanthine oxidase, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene(CDNB), 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)(DTNB), thiobarbituric acid(TBA), 과산화수소 및 2',7'-dichlorofluoresceindiacetate(DCF-DA)는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다.

세포배양

본 실험에 이용한 HepG2/2E1 세포는 인간 간암세포주 HepG2 세포에 CYP2E1(origin: human)을 transfection 시켜 만들었다. 세포배양은 10% fetal bovine serum(FBS)과 0.5%(V/V)의 antibiotics(100 U/mL of penicillin A and 100 U/mL of streptomycin)를 첨가한 MEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂, 95% humid air로 조절된 배양기에서 배양하였다.

세포독성

HepG2/2E1 세포에 대한 발효울금 추출물의 세포독성은 XTT assay(19)로 측정하였다. 24 well plate에 1×10^5

cell/mL로 분주하여 24시간 동안 배양한 후 배지를 제거하고 3일 동안 발효울금 추출물 각각을 0~1,000 µg/mL 농도로 처리하였다. 3일간 추출물 처리 후 배지를 제거하고 PBS로 세척하였다. 세척 후 각각의 세포에 PMS 용액(1 mg XTT-10 µg PMS/mL) 250 µL를 첨가하여 37°C에서 2시간 배양한 다음 생성된 formazan을 microplate reader (Bio-Tek, Winooski, VT, USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

간세포 보호 활성

HepG2/2E1 세포를 24 well plate에 5×10^4 cell/mL로 분주한 후 16시간 동안 배양하였다. 배양 후 3% FBS를 함유한 배지에 각각의 추출물을 함께 처리하고 30분 후에 200 mM 알코올을 처리하여 24시간 배양하였다. 3일간 같은 방법으로 세포에 추출물과 알코올을 처리한 후 세포생존율을 XTT 방법(위의 방법과 동일)으로 평가하였다.

ROS 측정

세포에 독성으로 작용하여 세포 손상을 가져오는 ROS를 측정하기 위하여 DCF-DA 형광염료를 이용하였다. HepG2/2E1 세포를 5×10^4 cell/mL로 24 well plate에 24시간 배양하고 FBS가 없는 배지에 추출물을 첨가하여 배지를 교환한 후 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 200 mM 알코올을 2시간 동안 처리하였다. PBS로 세척 후 30 µM DCF-DA를 배양액에 첨가하여 37°C에서 30분 동안 처리하였다. DCF-DA 제거 및 PBS로 세척 후 Fluorescence reader(Thermo Electron, Waltham, MA, USA)를 사용하여 형광의 발광 정도(excitation 485 nm와 emission 530 nm)를 측정하였다.

항산화 효소 활성 측정

CAT 활성은 20 mM 과산화수소를 기질로 균질액 내의 CAT에 의해 감소하는 과산화수소량을 측정하는 방법(20), SOD 활성은 xanthine과 xanthine oxidase의 반응에서 형성된 superoxide anion radical이 tetrazolium blue와 formazan을 형성하는 원리를 이용한 방법(21), glutathione-S-transferase(GST)의 활성은 reduced glutathione이 CDNB와 반응하는 원리를 이용한 방법(22)으로 측정하였고, GPx는 Paglia와 Valentine(23)의 방법을 이용하여 측정하였다. GR은 Carlberg와 Mannervik(24)의 방법을 사용하여 측정하였으며, 각 효소 활성도는 unit/mg protein으로 나타내었다.

Glutathione과 malondialdehyde 함량 측정

Reduced glutathione(GSH)은 DTNB와 NADPH가 반응하는 원리를 이용한 방법으로 측정하였다(25). 지질과산화물인 malondialdehyde(MDA)의 함량은 지질과산화물이 TBA와 반응하는 원리를 이용하여 측정된 흡광도 값을

MDA 검량 표준곡선에 의거하여 계산하였다(26). 각 농도는 moles/mg protein으로 나타내었다.

통계처리

본 실험 결과는 평균(mean)±표준편차(standard deviation, SD)로 나타내었으며 실험군 간의 결과 비교 및 유의성 검정은 Student t-test와 Duncan's multiple range test를 이용하여 통계처리한 후 $P < 0.05$ 수준에서 유의성 여부를 검증하였다.

결과 및 고찰

세포독성

HepG2/2E1 세포에 대한 발효율금 추출물의 생존율은 Fig. 1A에 나타내었다. 발효율금 냉수 추출물은 모든 농도(0~1,000 $\mu\text{g/mL}$)에서 세포독성이 나타나지 않았다. 발효율금 열수 추출물은 1,000 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 유의적으로 낮은 세포생존율을 보여 세포독성이 나타났으며 발효율금 80% 에탄올 추출물은 750 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 세포독성을 나타냈고 발효율금 메탄올 추출물은 100 $\mu\text{g/mL}$ 농도에서 세포독

성을 나타냈다. 이상의 결과를 토대로 추후 실험에는 모든 추출물에서 세포독성이 나타나지 않는 각각의 농도(냉수와 열수 추출물 500 $\mu\text{g/mL}$, 80% 에탄올 추출물 100 $\mu\text{g/mL}$ 및 메탄올 추출물 50 $\mu\text{g/mL}$)를 사용하였다.

알코올에 대한 간 보호 효과

CYP2E1은 간 조직에 가장 높은 농도로 존재하는 효소(27)로써 알코올에 의해 쉽게 유도되며 이렇게 유도된 CYP2E1은 다량의 활성산소종을 생성한다. 이러한 활성산소종은 미토콘드리아의 세포막을 변화시키거나 하이드록시라디칼, 하이드록시에틸라디칼 등을 생성하여 세포독성을 일으킨다(28).

따라서 본 연구에서는 HepG2/2E1 세포에 200 mM 에탄올을 처리하여 유도되는 산화적 스트레스에 대한 발효율금 추출물의 간세포 보호 효과를 측정하였다. 그 결과 알코올만 처리한 군은 무처리군(100%)보다 세포생존율(72.8%)이 유의적으로 감소하였다(Fig. 1B). 반면 발효율금 추출물 중 냉수 추출물 처리군에서 가장 높은 세포생존율(86.1%)을 나타내며 에탄올만 처리한 군보다 유의적으로 높은 간 보호 효과를 나타내었다. 그러나 열수 추출물, 80% 에탄올 추출물 및 메탄올 추출물에서는 알코올에 의한 간 손상에 대한 보호 효과가 나타나지 않았다. 이러한 결과는 앞서 실험을 통해 확인한 독성 결과에 따라 간 보호 효과에서 처리된 추출물의 농도가 각각 다르고 냉수 추출물(처리농도 500 $\mu\text{g/mL}$)이 열수(처리농도 500 $\mu\text{g/mL}$), 80% 에탄올(처리농도 100 $\mu\text{g/mL}$) 및 메탄올(처리농도 50 $\mu\text{g/mL}$) 추출물보다 더 많은 추출물이 처리되어 보호 효과를 나타낸 것으로 판단된다. 또한 냉수 추출물에서 유기용매 추출물보다 극성 성분이 더 많이 추출되어 대식세포에서 ROS 생성 억제능이 높다는 연구 결과가 보고(29)된 바 있다. 본 연구에서도 냉수 추출물 때문에 유기용매 추출보다 극성 성분의 추출효율을 증가시키고 유기용매나 열수 추출물보다 더 많이 유용성분이 세포에 처리되어 알코올에 대한 활성산소종의 제거능이 증가하여 간 보호 효과능이 높아진 것으로 판단된다. 따라서 HepG2/2E1에서 알코올성 간 손상 보호 효과능이 가장 높은 발효율금 냉수 추출물의 세포 내 ROS 생성 억제능을 확인하였다.

세포 내 ROS 생성 억제능

세포 내 ROS의 양은 DCF-DA를 사용하여 측정하였다. DCF-DA는 세포 밖에서는 형광을 띠고 있지 않지만 지용성이 높아 세포 내 침투가 쉬우며 침투 후에는 esterase 또는 산화적 가수분해를 받아 DCFH를 형성하여 세포 내에 머무르게 된다. DCFH는 세포 내 생성된 peroxide류와 반응하여 형광이 강한 물질인 DCF를 형성하며 형성된 DCF는 형광측정의 관찰이 용이하다(30)

발효율금 냉수 추출물이 HepG2/2E1의 세포 내 ROS에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 200 mM 에탄올과 추출물을 세포에 처리 후 ROS level을 측정하였다. 발효율금 냉

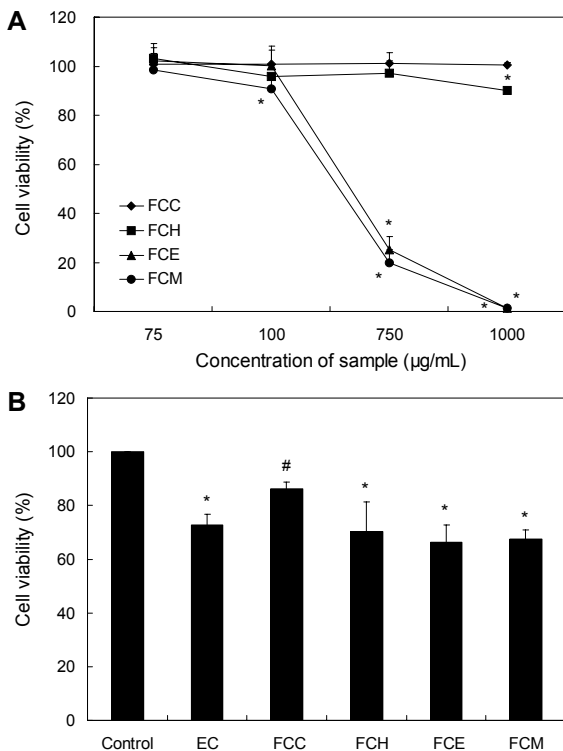


Fig. 1. Cytotoxicities (A) and cell viability (%) (B) of fermented extracts from *Curcuma longa* L. in HepG2/2E1 cells. Control: normal control, EC: 200 mM ethanol, FCC: 200 mM ethanol plus cold water extract from FC 250 $\mu\text{g/mL}$, FCH: 200 mM ethanol plus hot water extract from FC 500 $\mu\text{g/mL}$, FCE: 200 mM ethanol plus 80% ethanol extract from FC 100 $\mu\text{g/mL}$, FCM: 200 mM ethanol plus methanol extract from FC 50 $\mu\text{g/mL}$. Data express the mean \pm SD. * $P < 0.05$ compared to the Control and # $P < 0.05$ compared to the treated with EC.

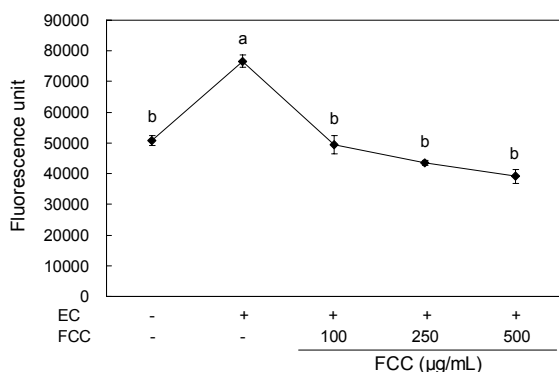


Fig. 2. Effects of cold water extract from fermented *Curcuma longa* L. (FCC) on intracellular ROS level in ethanol treated HepG2/2E1 cells. EC: 200 mM ethanol, FCC: 200 mM ethanol plus cold water extract from FC 100 µg/mL, 250 µg/mL, and 500 µg/mL. Data are presented as the mean±SD. Different letters show significant differences at $P<0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

수 추출물의 처리농도는 100 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL로 처리하였다. 실험 결과 에탄올만 처리한 군은 무처리군에 비해 ROS level이 현저히 증가하였다(Fig. 2). 반면 발효율금 냉수 추출물 처리군에서는 에탄올만 처리한 군에 비해 유의적인 차이를 보이며 ROS level을 감소시켰다. 또한, 무처리군과 유의적으로 같은 수준의 ROS level을 보이며 세포 내 ROS 생성을 억제하였다.

세포 내 ROS 생성 억제능에 대한 연구는 황칠 추출물과 민들레 추출물이 알코올의 간 손상에 대해 ROS 생성을 억제하고 항산화 지표를 증가시켜 간 보호 효과가 증가(31,32)하였다고 보고하였다. Kim 등(33)의 연구에서는 꾸지뽕나무 추출물을 알코올과 함께 처리하여 세포생존율을 평가한 결과 알코올만 처리한 군보다 꾸지뽕 추출물을 함유한 처리군의 세포생존율이 유의하게 증가하며 간 보호 효과를 나타냈다고 하였다. 이런 간세포 보호 효과는 HepG2/2E1 세포에서 알코올이 대사되는 동안 생성된 자유라디칼이 꾸지뽕나무 추출물에 의해 제거되었다고 보고하였다. 이러한 결과는 발효율금 냉수 추출물에서 확인한 ROS 생성 억제능 결과와 일치한다.

따라서 발효율금 냉수 추출물의 세포 내 ROS 생성 억제능은 항산화 지표의 증가로 인해 알코올로 유도되는 ROS 생성

을 억제한 것으로 판단된다. 이와 같은 결과를 토대로 ROS 생성과 항산화 지표의 상관관계를 확인하였다.

항산화 지표 및 지질과산화물 함량

에탄올의 대사 과정 중 발생하는 활성산소종은 높은 산화력으로 인해 체내에 산화적 스트레스를 유발하여 여러 가지 질병을 유발하는 것으로 알려져 있다. 이러한 활성산소를 억제하는 방어체계로 SOD, CAT 등의 효소적 방어체계와 GSH 등과 같은 비효소적 방어체계로 구분되는 항산화 시스템으로 이루어져 있다(34,35). 본 연구에서는 HepG2/2E1 cell에서 항산화 시스템에 대한 발효율금 냉수 추출물의 영향을 평가하기 위해 CAT, GST, SOD, GPx, GR의 효소와 GSH 함량 및 지질과산화물 함량을 확인하였다.

발효율금 냉수 추출물이 HepG2/2E1의 항산화 효소에 영향을 미치는지 알아보기 위하여 200 mM 에탄올과 추출물을 세포에 처리 후 CAT, GST, SOD, GPx 및 GR 효소 활성을 측정하였다. Group은 추출물 무처리군(control), 에탄올 200 mM 처리군(EC), 발효율금 냉수 추출물 250 µg/mL (FCL), 500 µg/mL(FCH)로 나누어 처리하였다. 발효율금 냉수 추출물의 처리농도는 농도 의존적으로 유의적인 결과를 보이는지 확인하기 위하여 설정하였으며 ROS 실험 결과에서 본 발효율금 추출물 100 µg/mL 처리농도는 무처리군과 실험 결과가 차이가 없어 표기하지 않았다. 실험 결과 CAT 효소 활성에서는 에탄올만 처리한 군(1.71 mU/mg protein)이 무처리군(2.34 mU/mg protein)에 비해 유의적으로 감소하였다(Table 1). CAT 효소의 감소 원인은 알코올에 의해 유도된 세포 내 라디칼에 의하여 효소 활성이 억제되거나 효소 활성능 이상의 과생산된 라디칼 때문으로 추정된다. 반면 발효율금 냉수 추출물 250 µg/mL 처리군(2.12 mU/mg protein)에서는 에탄올만 처리한 군에 비해 유의적인 차이를 보이지 않지만, 500 µg/mL 처리군(2.31 mU/mg protein)에서는 에탄올만 처리한 군에 비해 유의적인 차이를 보이며 CAT 효소 활성 감소를 억제했다. GST 효소 활성에서는 에탄올만 처리한 군(7.86 µU/mg protein)은 무처리군(8.60 µU/mg protein)에 비해 유의적으로 감소하였다. 반면 발효율금 냉수 추출물 250 µg/mL(8.72 µU/mg protein), 500 µg/mL(8.73 µU/mg protein) 처리군에서는 에탄올만 처리한 군에 비해 현저히 GST 효소 활성 감소

Table 1. Effect of extracts from cold water extract from fermented *Curcuma longa* L. on hepatic antioxidant activities

Group	CAT (mU/mg protein)	GST (µU/mg protein)	SOD (mU/mg protein)	GPx (µU/mg protein)	GR (mU/mg protein)
Control	2.34±0.18 ^a	8.60±0.63 ^a	2.55±0.21 ^a	27.95±2.92 ^a	5.32±2.16 ^a
EC	1.71±0.48 ^b	7.86±0.76 ^b	2.33±0.23 ^b	18.71±1.01 ^b	2.71±0.99 ^b
FCL	2.12±0.30 ^{ab}	8.72±0.52 ^a	2.62±0.09 ^a	29.73±1.14 ^a	5.18±2.02 ^a
FCH	2.31±0.43 ^a	8.73±0.51 ^a	2.71±0.26 ^a	29.16±2.31 ^a	5.06±2.56 ^a

Data express the mean±SD.

Different letters in a column are significantly different by Duncan's multiple range test ($P<0.05$).

Control: non-treated control, EC: 200 mM of ethanol control, FCL: 200 mM of ethanol plus 250 µg/mL of fermented turmeric extract, FCH: 200 mM of ethanol plus 500 µg/mL of fermented turmeric extract.

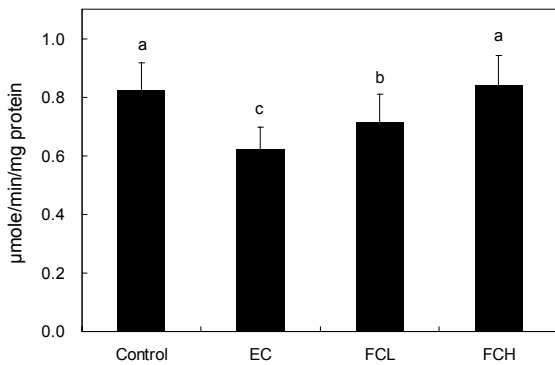


Fig. 3. GSH levels in HepG2/2E1 cells. Control: normal control, EC: 200 mM of ethanol control, FCL: 200 mM of ethanol plus 250 μg/mL of fermented turmeric extract, FCH: 200 mM of ethanol plus 500 μg/mL of fermented turmeric extract. Data are presented as the mean±SD. Different letters show significant differences at $P<0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

를 억제했으며 무처리군과 유의적인 차이를 보이지 않았다. 또한, SOD, GPx 및 GR 효소 활성에서도 GST와 비슷한 경향의 결과를 보이며 알코올만 처리군에 비해 발효율금 냉수 추출물 처리군이 유의적으로 효소 활성 감소를 억제했다.

GSH는 항산화 시스템 중 비효소적 방어체계로 인체의 비단백 thiol로써 산화적 손상 유발 시에 방어체계에서 중요한 역할을 담당한다. GSH의 주요 역할로는 redox 반응 및 해독작용을 통하여 정상 세포들의 구조 및 기능을 유지해준다(36). GSH 함량 측정 결과에서는 알코올만 처리한 군(0.62 μmole/min/mg protein)이 무처리군(0.82 μmole/min/mg protein)에 비하여 약 25% 감소하였다(Fig. 3). 반면 발효율금 냉수 추출물 250 μg/mL(0.71 μmole/min/mg protein), 500 μg/mL(0.84 μmole/min/mg protein) 처리군에서는 에탄올만 처리한 군에 비해 두 농도군 모두 현저히 GSH 함량 감소를 억제했으며 농도 의존적으로 GSH 함량 감소 억제능을 보였다.

지질과산화는 활성산소종들에 의해 매개된 기작으로서 여러 동물 및 인체실험들을 통하여 다양한 종류의 간 손상을 일으키는 것으로 알려져 있다(37). MDA는 지질과산화 과정 중 생성되는 대표적 활성 알데히드로 조직 내 알코올에 의해 유도된 지질과산화물의 함량은 MDA 양으로 측정될 수 있다. MDA 함량 측정 결과에서는 알코올만 처리한 군(0.31 mmole/mg protein)이 무처리군(0.23 mmole/mg protein)에 비하여 약 34% 증가하였다(Fig. 4). 반면 발효율금 냉수 추출물 500 μg/mL 처리군(0.23 mmole/mg protein)에서는 에탄올만 처리한 군에 비해 현저히 MDA 함량 증가를 억제했으며 무처리군과 유의적인 차이를 보이지 않았다. 따라서 알코올에 의해 유도된 지질과산화 과정에서 발효율금 냉수 추출물이 효과적으로 지질과산화를 억제하는 것을 확인하였다.

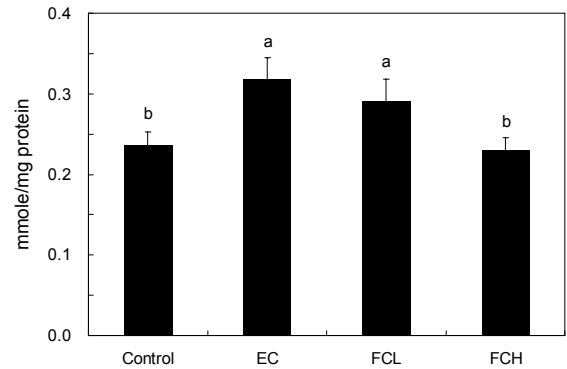


Fig. 4. Changes in MDA levels in HepG2/2E1 cells. Control: normal control, EC: 200 mM of ethanol control, FCL: 200 mM of ethanol plus 250 μg/mL of fermented turmeric extract, FCH: 200 mM of ethanol plus 500 μg/mL of fermented turmeric extract. Data are presented as the mean±SD. Different letters show significant differences at $P<0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.

이러한 연구 결과들에 대한 보고로는 말채나무 추출물의 항산화 효소 활성능 증가 효과(38)와 지구자 추출물의 항산화 효소 활성능 억제 감소 효과(39) 및 갈근탕의 간세포 독성에 대한 억제 효과(40)에 대해 보고하였다. Kim 등(14)의 연구에서는 울금 추출물을 SD rat에 알코올과 함께 처리하여 항산화 효소 활성을 평가한 결과 알코올만 처리한 군보다 울금 추출물을 함께 처리한 군에서 항산화 효소 활성 억제 감소능을 유의하게 증가시켰다고 하였다. 이런 항산화 효소 활성 억제 감소능 증가의 원인은 총 폴리페놀과 커큐민 때문이라고 보고하였다.

이상의 결과들로부터 HepG2/2E1 세포에서 알코올 처리에 의한 세포의 CAT, GST, SOD, GPx, GR, GSH 함량의 감소 및 지질과산화물의 증가는 알코올 처리에 의한 자유라디칼의 급격한 증가에 의한 것으로 생각되며 발효율금 냉수 추출물은 이러한 자유라디칼을 제거하는 항산화 효소들을 효과적으로 활성화하고 GSH 함량을 증가 및 지질과산화물의 증가를 감소시킴으로써 알코올성 산화스트레스로부터 간 보호 효과가 있는 것으로 확인되었다.

요 약

본 연구는 발효율금 추출물에서 알코올로 유발된 산화적 스트레스에 대한 간세포 손상에 대한 보호 효과를 평가하기 위해 발효율금을 열수 추출, 냉수 추출, 80% 에탄올 추출 및 메탄올 추출하여 HepG2/2E1 세포에서 알코올과 추출물을 함께 처리 후 세포생존율을 평가하고 세포생존율이 가장 높은 냉수 추출물에서 reactive oxygen species(ROS) 함량, 항산화 지표와 malondialdehyde(MDA) 함량을 측정하였다. 알코올에 대한 간 보호 효과에서는 알코올만 처리한 군의 세포생존율이 72.8%로 감소하였으나 발효율금 냉수 추출물을 함께 처리 시에 세포생존율이 86.1%로 유의적

로 증가하며 간 보호 효과를 확인하였다. 또한, 발효율금 냉수 추출물에서 세포 내 ROS 생성 억제능은 에탄올만 처리한 군에서 무처리군에 비해 유의적으로 ROS 생성이 증가하였으나 발효율금 냉수 추출물 100 µg/mL, 250 µg/mL, 500 µg/mL 농도 처리군 모두 알코올만 처리한 군과 비교 시 유의적인 차이를 보이며 ROS level을 감소시켰다. 항산화 지표에서 효소적 항산화인 catalase, glutathione-S-transferase, superoxide dismutase, glutathione peroxidase 및 glutathione reductase는 알코올만 처리한 군에서 무처리군보다 감소하였으나 발효율금 냉수 추출물 500 µg/mL 농도 처리군에서는 알코올만 처리한 군에 비해 유의적인 차이를 보이며 항산화 효소의 감소를 억제하였다. GSH 함량은 에탄올만 처리한 군에서 무처리군보다 유의적으로 함량이 감소하였으나 발효율금 냉수 추출물 250 µg/mL, 500 µg/mL 농도 처리군 모두 에탄올만 처리한 군에 비해 GSH 함량의 감소를 억제하였다. MDA 함량은 알코올만 처리한 군에서 무처리군에 비해 유의적으로 증가하였으나 발효율금 냉수 추출물 고농도 처리군(500 µg/mL)에서는 알코올만 처리한 군에 비해 유의적인 차이를 보이며 MDA 함량을 감소시켰다. 이상의 결과로부터 발효율금 추출물 중 냉수 추출물에서 알코올성 간 손상에 대한 간 보호 효과가 높게 나타나는 것을 확인하였다. 결과적으로 본 연구를 통해 발효율금을 냉수 추출하는 것은 발효율금의 알코올성 간 손상에 대한 간 보호 효과를 증대시키고 ROS 생성을 억제, 항산화 효소와 GSH 함량의 감소 억제 및 MDA 함량의 증가 억제 효과를 높이는 것으로 확인되었다. 이에 발효율금을 냉수로 처리하여 추출하는 것이 간 보호 효과를 증대시킬 수 있는 효과적인 방법이며, 이러한 방법을 통해 얻은 발효율금 냉수 추출물은 알코올로 유발된 산화적 스트레스에 대한 간세포 손상에 대한 보호 효과가 있는 기능성 소재로 활용될 수 있을 것으로 생각한다.

감사의 글

본 연구는 농림수산식품부의 기술사업화지원사업에 의해 이루어진 것으로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Hwang JY, Ham JW, Nam SH. 2004. Effect of Maesil (*Prunus mume*) juice on the alcohol metabolizing enzyme activities. *Korean J Food Sci Technol* 36: 329-332.
- Lin RC, Li TK. 1998. Effects of isoflavones on alcohol pharmacokinetics and alcohol-drinking behavior in rats. *Am J Clin Nutr* 68: 1512S-1515S.
- Hawkins RD, Kalant H. 1972. The metabolism of ethanol and its metabolic effects. *Pharmacol Rev* 24: 67-157.
- Chung YI, Bae IY, Lee JY, Chun HS, Lee HG. 2009. Protective effects of branched-chain amino acid (BCAA)-enriched corn gluten hydrolysates on ethanol-induced hepatic injury in rats. *Korean J Food Sci Technol* 41: 706-711.
- Zakhari S. 2006. Overview: how is alcohol metabolized by the body?. *Alcohol Res Health* 29: 245-254.
- Rouach H, Fataccioli V, Gentil M, French SW, Morimoto M, Nordmann R. 1997. Effect of chronic ethanol feeding on lipid peroxidation and protein oxidation in relation to liver pathology. *Hepatology* 25: 351-355.
- French SW, Wong K, Jui L, Albano E, Hagbjork AL, Ingelman-Sundberg M. 1993. Effect of ethanol on cytochrome P450 2E1 (CYP2E1), lipid peroxidation, and serum protein adduct formation in relation to liver pathology pathogenesis. *Exp Mol Pathol* 58: 61-75.
- Zelko IN, Mariani TJ, Folz RJ. 2002. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD3) gene structures, evolution, and expression. *Free Radic Biol Med* 33: 337-349.
- Chang P, Cheng E, Brooke S, Sapolsky R. 2005. Marked differences in the efficacy of post-insult gene therapy with catalase versus glutathione peroxidase. *Brain Res* 1063: 27-31.
- Kang SK. 2007. Changes in proximate composition, free amino acid, free sugar and vitamin of *Curcuma longa* L. and *Curcuma atomatica* Salib according to picking time. *Korean J Food Preserv* 14: 624-632.
- Jung SH, Chang KS, Ko KH. 2004. Physiological effects of curcumin extracted by supercritical fluid from turmeric (*Curcuma longa* L.). *Korean J Food Sci Technol* 36: 317-320.
- Eun CS. 2015. A study on the memory and cognitive enhancing effect of fermented turmeric. *MS Thesis*. Keimyung University, Daegu, Korea.
- Kim HJ, Lee JW, Kim YD. 2011. Antimicrobial activity and antioxidant effect of *Curcuma longa*, *Curcuma aromatica* and *Curcuma zedoaria*. *Korean J Food Preserv* 18: 219-225.
- Kim MS, Chun SS, Choi JH. 2013. Effects of turmeric (*Curcuma longa* L.) on antioxidative systems and oxidative damage in rats fed a high fat and cholesterol diet. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 570-576.
- Kim Y, You Y, Jun W. 2012. Hepatoprotective activity of fermented *Curcuma longa* L. on galactosamine-intoxicated rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 790-795.
- Ha Y, Kim OK, Nam DE, Kim Y, Kim E, Jun W, Lee J. 2015. Effects of *Curcuma longa* L. extracts on natural killer cells and T cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44: 307-313.
- Shehzad A, Ul-Islam M, Wahid F, Lee YS. 2014. Multifunctional polymeric nanocurcumin for cancer therapy. *J Nanosci Nanotechnol* 14: 803-814.
- Kang SK, Hyun KH. 2007. Optimization of curcumin extraction and removal of bitter substance from *Curcuma longa* L.. *Korean J Food Preserv* 14: 722-726.
- Lim YM, Kim BR, Hong KY. 2008. Antioxidant effect of Crataegi Fructus extract on the oxidative stress of reactive oxygen species in cultured human skin fibroblast. *Korean J Orient Physiol Pathol* 22: 115-119.
- Aebi H. 1984. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* 105: 121-126.
- McCord JM, Fridovich I. 1969. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein. *J Biol Chem* 244: 6049-6055.
- Habig WH, Jakoby WB. 1981. Assays for differentiation of glutathione S-transferases. *Methods Enzymol* 77: 398-405.
- Paglia DE, Valentine WN. 1967. Studies on the quantitative

- and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 70: 158-169.
24. Carlberg I, Mannervik B. 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J Biol Chem* 250: 5475-5480.
 25. Akerboom TPM, Sies H. 1981. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol* 77: 373-382.
 26. Draper HH, Hadley M. 1990. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 186: 421-431.
 27. Eliasson E, Johansson I, Ingelman-Sundberg M. 1988. Ligand-dependent maintenance of ethanol-inducible cytochrome P-450 in primary rat hepatocyte cell cultures. *Biochem Biophys Res Commun* 150: 436-443.
 28. Yang MX, Cederbaum AI. 1997. Glycerol increases content and activity of human cytochrome P-450E1 in a transduced HepG2 cell line by protein stabilization. *Alcohol Clin Exp Res* 21: 340-347.
 29. Lee GH, Yoo DY. 2012. Evaluation of anti-inflammatory effects of Yukmijihwangtang and individual drug substances based on the extraction methods. *J Orient Obstet Gynecol* 25: 89-107.
 30. Jang JH, Lee C, Kim SC, Chung JW, Park CI. 2010. Protective effect of marine natural products against UVB-induced damages in human skin fibroblast via antioxidant mechanism. *J Soc Cosmet Sci Korea* 36: 79-87.
 31. Bae D, Kim J, Lee SY, Choi EJ, Jung MA, Jeong CS, Na JR, Kim JJ, Kim S. 2015. Hepatoprotective effects of aqueous extracts from leaves of *Dendropanax morbifera* Leveille against alcohol-induced hepatotoxicity in rats and *in vitro* anti-oxidant effects. *Food Sci Biotechnol* 24: 1495-1503.
 32. Yoo Y, Yoo S, Yoon HG, Park J, Lee YH, Kim S, Oh KT, Lee J, Cho HY, Jun W. 2010. *In vitro* and *in vivo* hepatoprotective effects of the aqueous extract from *Taraxacum officinale* (dandelion) root against alcohol-induced oxidative stress. *Food Chem Toxicol* 48: 1632-1637.
 33. Kim OK, Ho JN, Nam DE, Jun W, Hwang KT, Kang JE, Chae OS, Lee J. 2012. Hepatoprotective effect of *Curdrania tricuspidata* extracts against oxidative damage. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 7-13.
 34. Hong S, Seo W, Jung H, Kang S. 1998. Protecting effects by rooibos tea against immobilization stress-induced cellular damage in rat. *Korean J Food Sci Technol* 30: 1222-1228.
 35. Kang DG, Yun CK, Lee HS. 2003. Screening and comparison of antioxidant activity of solvent extracts of herbal medicines used in Korea. *J Ethnopharmacol* 87: 231-236.
 36. Ahn TH, Yang YS, Lee JC, Moon CJ, Kim SH, Jun W, Park SC, Kim JC. 2007. Ameliorative effects of pycnogenol[®] on carbon tetrachloride-induced hepatic oxidative damage in rats. *Phytother Res* 21: 1015-1019.
 37. Paradis V, Kollinger M, Fabre M, Holstege A, Poynard T, Bedossa P. 1997. *In situ* detection of lipid peroxidation by-products in chronic liver diseases. *Hepatology* 26: 135-142.
 38. Yeon SH, Ham H, Sung J, Kim Y, Namkoong S, Jeong HS, Lee J. 2013. Antioxidant activities of hot water extract from *Cornus walteri* Wanger against oxidative stress induced by *tert*-butyl hydroperoxide in HepG2 cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 1525-1532.
 39. You Y, Jung KY, Lee YH, Jun W, Lee BY. 2009. Hepatoprotective effects of *Hovenia dulcis* fruit on ethanol-induced liver damage *in vitro* and *in vivo*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 154-159.
 40. Oh SY, Seo SH, Lee JH, Lee JS, Ma JY. 2011. Protective effect of Galgeun-tang against CCl₄ induced hepatotoxicity. *Korean J Orient Physiol Pathol* 25: 663-668.