

## Lipopolysaccharide/D-Galactosamine에 의해 유도된 급성 간 손상 생쥐모델에서 굴가수분해물의 간 보호 효과

류지현<sup>1,2</sup> · 김은진<sup>1,2</sup> · Chengliang Xie<sup>3</sup> · Marie Merci Nyiramana<sup>1,4</sup> · Adrian S. Siregar<sup>1,4</sup>  
박시향<sup>5</sup> · 조수범<sup>6</sup> · 송대현<sup>2,7</sup> · 김남길<sup>8</sup> · 최영준<sup>9</sup> · 강상수<sup>2,3,4</sup> · 강다원<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>경상대학교 의과대학 생리학교실, <sup>2</sup>건강과학연구원, <sup>3</sup>경상대학교 의과대학 해부학교실  
<sup>4</sup>경상대학교 융합의과학과, <sup>5</sup>선마린바이오테크, <sup>6</sup>경상대학교 창원병원 영상의학과  
<sup>7</sup>경상대학교 의과대학 병리학교실, <sup>8</sup>경상대학교 해양과학대학 해양생명과학과  
<sup>9</sup>경상대학교 해양과학대학 해양식품공학과

## Hepatoprotective Effects of Oyster Hydrolysate on Lipopolysaccharide/ D-Galactosamine-Induced Acute Liver Injury in Mice

Ji Hyeon Ryu<sup>1,2</sup>, Eun-Jin Kim<sup>1,2</sup>, Chengliang Xie<sup>3</sup>, Marie Merci Nyiramana<sup>1,4</sup>, Adrian S. Siregar<sup>1,4</sup>,  
Si-Hyang Park<sup>5</sup>, Soo Buem Cho<sup>6</sup>, Dae Hyun Song<sup>2,7</sup>, Nam-Gil Kim<sup>8</sup>,  
Yeung Joon Choi<sup>9</sup>, Sang Soo Kang<sup>2,3,4</sup>, and Dawon Kang<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiology, College of Medicine, <sup>2</sup>Institute of Health Sciences, College of Medicine,

<sup>3</sup>Department of Anatomy, College of Medicine, <sup>4</sup>Department of Convergence Medical Science,

<sup>7</sup>Department of Pathology, College of Medicine, <sup>8</sup>Department of Marine Biology and  
Aquaculture and Institute of Marine Industry, and <sup>9</sup>Department of Seafood Science and  
Technology and Institute of Marine Industry, Gyeongsang National University

<sup>5</sup>Sun Marine Biotech Co.

<sup>6</sup>Department of Radiology, Gyeongsang National University Changwon Hospital

**ABSTRACT** Oxidative stress and inflammation are key factors responsible for progression of liver injury. A variety of functions of oyster hydrolysate (OH) are affected by their antioxidant and anti-inflammatory activities. However, little is known regarding the effects of OH on a liver injury model. This study was performed to evaluate the effects of OH on acute liver injury induced by lipopolysaccharide/D-galactosamine (LPS/D-GalN) in mice. Experimental groups were divided into six groups as follows (each group, n=10): control (saline), LPS/D-GalN, LPS/D-GalN+OH (100 mg/kg), LPS/D-GalN+OH (200 mg/kg), LPS/D-GalN+OH (400 mg/kg), and LPS/D-GalN+silymarin (25 mg/kg, positive control). The experimental acute liver injury model was induced with LPS (1 µg/kg) and D-GalN (400 mg/kg). We first analyzed antioxidant and anti-inflammatory activities in OH. OH showed high DPPH and ABTS radical scavenging activities and reduced ROS generation in Chang cells in a dose-dependent manner. In addition, OH showed anti-inflammatory activities, such as inhibition of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase. Treatment with OH down-regulated tumor necrosis factor (TNF)-α, interleukin (IL)-6, and IL-1α expression levels in LPS-stimulated RAW264.7 cells. OH significantly reduced LPS/D-GalN-induced increases in the concentrations of alanine transaminase and aspartate aminotransferase in serum. In the LPS/D-GalN group, liver tissues exhibited apoptosis of hepatocytes with hemorrhages. These pathological alterations were ameliorated by OH treatment. Consistently, hepatic catalase activity was low in the LPS/D-GalN group compared to the control group, and catalase activity was significantly restored by OH treatment ( $P<0.05$ ). Furthermore, OH markedly reduced the LPS/D-GalN-induced increase in TNF-α, IL-1β, and IL-6 levels in liver tissue. Taken together, these results show that OH has hepatoprotective effects on LPS/D-GalN-induced acute liver injury via inhibition of oxidative stress and inflammation, suggesting that OH could be used as a health functional food and potential therapeutic agent for acute liver injury.

**Key words:** oyster hydrolysate, acute liver injury, antioxidant, anti-inflammatory, apoptosis

Received 29 March 2017; Accepted 19 May 2017

Corresponding author: Dawon Kang, Department of Physiology,  
College of Medicine, Gyeongsang National University, Jinju,  
Gyeongnam 52727, Korea

E-mail: dawon@gnu.ac.kr, Phone: +82-55-772-8044

## 서 론

간은 영양소의 대사, 해독 및 순환 조절 등의 중요한 기능을 담당하며, 독소, 약물 및 간염 바이러스 등의 표적장기로 다양한 인자에 의해 손상될 수 있다. 특히 전격성 간염이라 불리는 급성 간 손상은 간질환의 병력이 없는 환자에서 갑작스러운 간 기능 악화로 간부전이 나타나는 것을 말하며, 사망률이 매우 높고 예후가 좋지 않다(1). 임상적으로 간 기능 소실, 비정상적 간의 생화학적 수치, 응고 장애, 간성뇌증 등이 나타나고, 간성뇌증이 심해져 여러 기관의 기능 부전이 동반되게 되면 사망률은 50%에 이르게 된다(2-4). 급성 간 손상의 원인으로는 바이러스와 약물(아세트아미노펜)이 대표적이고, 그 외 허혈성 간 손상, 대사 장애, 그리고 원인을 알지 못하는 경우가 많다(5). 실제로 1998년에서 2007년까지 미국에서 급성 간 손상 환자 1,147명을 대상으로 시행한 조사에 따르면 아세트아미노펜 과다복용(46%)이 가장 많았고, 다음으로 불명확한 원인(14%), 마약 관련 급성 간 손상(11%), B형 간염(7%), 자가면역 간염(5%), 허혈성 간염(4%), A형 간염(3%), 윌슨병(2%)이 있었다(6). 최근 수년간 급성 간 손상의 치료와 약물개발에 관한 연구가 광범위하게 진행되어 왔지만, 간이식을 제외하고는 여전히 유효한 치료법 및 약물이 없다.

간독성 약물에 의한 급성 간 손상은 주로 그람음성균 박테리아 내독소와 관련 있으며(3), 그람음성균 박테리아의 주병원성분인 lipopolysaccharide(LPS)는 내독성 손상의 개시 단계에서 중요한 역할을 하고 염증성 사이토카인을 활성화시켜 간 조직 손상을 유발한다. 또한, 간 특이적 독소인 D-galactosamine(D-GalN)은 LPS와 같은 내독소의 민감도를 증가시켜 수 시간 내에 간 독성을 유발하며, 간세포에서 유리된 뉴클레오티드(nucleotide)를 선택적으로 고갈시켜서 mRNA 및 단백질 합성을 억제한다(7). 따라서 LPS와 D-GalN에 의한 급성 간 손상 모델은 간 손상의 발병기전 및 약물개발과 관련된 연구에 널리 이용되고 있으며, 이 모델은 전형적인 간세포 괴사 및 세포자멸사를 유도한다(8). LPS/D-GalN 처리에 의해 증가한 활성산소(reactive oxygen species, ROS)는 간 조직의 대식세포를 활성화시키고, 종양괴사인자-알파(tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ), 인터류킨-6(interleukin-6, IL-6) 및 인터류킨-1(interleukin-1, IL-1) 등의 염증성 사이토카인을 생성시킨다(9,10). 염증성 사이토카인은 간세포의 괴사를 유도하고 항산화 효소의 활성을 감소시킨다(11). 염증을 자극하는 신호에 의해 유도된 사이클로옥시게나제-2(cyclooxygenase-2, COX-2)는 염증 촉진물질인 프로스타글란딘 E<sub>2</sub>(prostaglandin E<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>)를 생성하며(12), TNF- $\alpha$ 는 세포자멸사에 기여한다(13). 따라서 활성산소 및 염증성 사이토카인의 억제는 LPS/D-GalN에 의한 급성 간 손상의 예방 및 치료를 위한 하나의 중요한 전략이 될 수 있다.

굴(*Crassostrea gigas*)은 바다에 사는 굴과의 연체동물

로 예로부터 전 세계 사람들이 즐겨 먹고 있는 영양이 풍부한 수산식품이다(14). 굴은 단백질 함량은 높고 지방 함량은 낮으며 여러 가지 비타민과 무기질을 풍부하게 함유하고 있어, 항산화 활성을 비롯한 다양한 생리활성이 있는 것으로 알려져 있다. 굴에 다량 함유된 단백질을 효소로 가수분해하여 얻은 굴가수분해물은 유리아미노산 및 저분자의 펩티드가 다량 함유되어 있어(15), 높은 생리활성을 보인다. 굴가수분해물의 기능으로는 항산화(15-18), 항염증(19), 항암(20), 항고혈압(15,21-23), 고지방 식이를 급이한 쥐의 혈청 및 간의 지질 개선(24), 섬유아세포에 대한 주름 개선(25) 및 HepG2 인체 간암세포에서 아세트아미노펜에 의한 독성으로부터 보호 효과(26) 등이 알려져 있으나, 실험동물을 이용한 LPS/D-GalN에 의한 급성 간 손상에 있어서 간 보호 효과에 대한 연구는 전무하다.

본 연구에서는 LPS/D-GalN에 의해 유도된 급성 간 손상 생쥐 모델에서 굴가수분해물의 효과를 확인하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

실험에 사용한 참굴(각장 5.8±0.4 cm; 각고 3.2±0.4 cm; 체중 9.8±2.1 g)은 경남 통영 연안의 양식장에서 2015~2016년에 걸쳐 채취하여 인근의 가공공장에서 알굴의 형태로 급속동결 제품으로 가공하여 1~2년 동안 냉동 보관한 제품을 시료로 사용하였다. 가수분해를 위한 Neutrase와 Protamex는 Biosis 사(Busan, Korea)에서 구입하였으며, 트랜스글루탐산분해효소(transglutaminase)는 Ajinomoto Co.(Tokyo, Japan)에서 구입하여 사용하였다. 본 연구에 사용된 시약 및 배양액은 다른 표시가 없는 경우 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다.

### 굴가수분해물의 제조

굴가수분해물(oyster hydrolysate, OH)의 제조는 Hur 등(24)의 방법을 변형하여 제조하였다. 냉동상태의 굴을 수돗물로 해동하고 충분히 수세한 후, 어취와 염을 제거하기 위해 30분 동안 100°C의 끓는 물에 데쳤다. 직경 5 mm hole plate를 장착한 욕 마쇄기(M-12S, Hankook Fujee Industry, Hwaseong, Korea)로 마쇄하고, 2배량의 수돗물을 넣어 현탁시켰다. 단백질 가교결합을 형성하기 위해 트랜스글루탐산분해효소(Ajinomoto Co.)를 첨가하고 30°C에서 교반하면서 반응시켰다. 마쇄물 무게의 1%(w/w) Protamex를 첨가하여 40°C에서 1시간 동안 가수분해하고, 다시 1% Neutrase를 첨가하여 50°C에서 1시간 동안 교반하면서 가수분해하였다. 효소의 불활성화를 위해 100°C에서 30분간 가열하여 효소의 작용을 불활성화시키고, 200 mesh 여과체로 여과하였다. 여과물을 30 Brix까지 농축한 다음 동결건조 하여 밀폐 저장하고 필요 시 사용하였다.

**라디칼 소거 활성 측정**

굴가수분해물의 항산화 활성은 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH) 및 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)(ABTS) 라디칼에 대한 소거 활성을 측정하였다. DPPH 라디칼 소거 활성은 Blois(27)의 방법을 변형하여 수행하였다. DPPH 용액(5 mg/100 mL methanol)에 동량의 시료액(굴가수분해물)을 혼합하여 실온에서 20분간 반응시킨 후 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS 라디칼 소거 활성은 Re 등(28)의 방법을 변형하여 수행하였다. 7 mM ABTS 용액에 과황화칼륨(potassium persulfate, K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>)을 2.4 mM이 되도록 용해시킨 다음 암실에서 12시간 동안 반응시켜 이를 414 nm에서 흡광도가 1.5가 되도록 증류수로 조정하여 사용하였다. ABTS 용액에 시료를 첨가하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 414 nm에서 흡광도를 측정하였다. 라디칼 소거 활성은 시료 첨가구와 무첨가구의 흡광도 비(%)로 나타내었다.

**COX-2 억제 활성 측정**

COX-2 억제 활성은 Reddy 등(29)의 방법을 변형하여 수행하였다. 즉 100 mM Tris-HCl buffer(pH 8.0) 450 µL, 150 mM hematin 100 µL, 30 µM EDTA 100 µL, 40 U/mL의 COX-2 200 µL 및 시료 200 µL를 혼합하여 실온에서 15분간 반응시켰다. 20 mM arachidonic acid 20 µL와 10 mM N,N,N',N'-tetramethyl-p-phenylenediamine(TMPD) 25 µL를 첨가하여 5분간 반응시킨 후 590 nm에서 흡광도를 측정하였다. 양성 대조군으로 epigallocatechin gallate(EGCG)를 사용하였으며, COX-2 억제율은 다음 식을 사용하여 계산하였다.

$$\text{억제율(\%)} = \frac{\text{EGCG의 흡광도} - \text{실험군의 흡광도}}{\text{EGCG의 흡광도}} \times 100$$

**5-Lipoxygenase(5-LOX) 억제 활성 측정**

5-LOX 억제 활성은 Lyckander와 Malterud(30)의 방법을 변형하여 측정하였다. 즉 0.2 M 붕산완충용액(boric acid buffer, pH 9.0)에 용해한 5-LOX(160 U/mL) 200 µL와 동일한 용액에 용해한 시료 50 µL를 혼합하여 실온에서 3분간 반응시켰다. 기질 용액인 100 µM linoleic acid 250 µL를 첨가하여 반응을 개시하고 2분간 234 nm에서 흡광도를 측정하였다. Boric acid 및 EGCG는 각각 음성 및 양성 대조군으로 사용하였으며, 5-LOX 억제율은 COX-2에 사용된 식에 따라 계산하였다.

**세포배양 및 세포독성 측정**

인체 정상 간세포주인 Chang Liver(Chang), 간암세포주인 HepG2 및 생쥐 대식세포인 RAW264.7는 American Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA, USA)으로부터 구입하였으며, 10% fetal bovine serum(FBS) 및 penicillin(100 U/mL)과 streptomycin(100 µg/mL)이 포

함된 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건하에서 배양하였다. 세포 독성 및 세포의 생존율을 측정하기 위해 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT, Duchefa, Haarlem, The Netherlands) 방법을 이용하였다(31). 세포 배양용 96-well plate에 1×10<sup>4</sup> cells/mL로 세포를 분주하고 시료를 각 well에 처리하였다. 24시간 후 5 mg/mL의 MTT 용액을 처리한 후 37°C에서 4시간 배양하여 반응을 유도하였으며, 100 µL의 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 첨가하여 형성된 formazan을 용해하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**활성산소 측정**

Chang Liver 세포에서 활성산소에 대한 굴가수분해물의 항산화 효과는 5 µM 2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate(H<sub>2</sub>DCFDA, Calbiochem, San Diego, CA, USA)를 암실에서 30분간 배양한 후 측정하였다. Imaging dish에 세포를 5×10<sup>4</sup> cells/mL로 분주하여 배양하고 활성산소는 산화스트레스 유도제의 일종인 과산화수소(100 µM)를 처리하여 유도하였다(32). H<sub>2</sub>DCFDA로 염색한 세포는 PBS로 세 번 수세한 후 공초점현미경(IX-81 Fluoview, Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 형광의 강도를 분석하였다. 녹색형광은 488 nm와 518 nm 레이저 파장대에서 측정하였으며, Fluoview 프로그램(version 2.0, Olympus, Tokyo, Japan)을 이용하여 분석하였다.

**역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)**

RAW264.7 세포에서 분리된 total RNA로부터 cDNA 합성키트(DiaStart<sup>TM</sup> RT kit, SolGent, Daejeon, Korea)를 사용하여 first-strand cDNAs를 합성하였으며, 이를 PCR 증폭을 위한 template로 사용하였다. 생쥐용 TNF-α, IL-6 및 IL-1α 선택적 프라이머(primer, Table 1)와 Taq polymerase(G-Taq, Cosmo Genetech, Seoul, Korea)를 사용하여 PCR을 수행하였으며, 94°C에서 5분간 변성(denaturation)시킨 후, 94°C에서 30초간, 55°C에서 30초간, 72°C에서 30초간의 반응을 25~28회 반복 실시하였고, 최종적으로 72°C에서 5분간 신장(extension)시켰다. 반응물은 ethidium bromide가 첨가된 1.5% 아가로오스겔을 이용하여 전기영동시킨 후 자외선광으로 유전자 발현 정도를 비교하였다.

**실험동물**

실험동물은 6주령의 수컷 C57BL/6 생쥐(20~22 g)를 (주)샘타코(Osan, Korea)로부터 분양받았다. 사육기간 동안 물과 식이는 자유급이 하였으며, 온도(22±2°C), 습도(50±5%) 및 명암주기(12시간, 07:00~19:00)가 자동 설정된 동물사육실에서 1주간 적응시켰다. 실험동물의 사육관리 및 동물실험은 경상대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 거쳐 진행하였다(GNU-151208-M0068).

**Table 1.** Primer sequences used for RT-PCR

Gene name	GenBank Acc. No.	Primer sequences (5'-3')	Expected size (bp)
TNF- $\alpha$	D84199	Sense: CAGCCTCTTCTCATTCCTGCT Antisense: TGTCCCTTGAAGAGAACCTGG	339
IL-6	NM_031168	Sense: CTCACAAGTCCGGAGAGGAG Antisense: TGGTCTTGGTCCTTAGCCACT	489
IL-1 $\alpha$	NM_010554	Sense: GGAGAGCCGGGTGACAGTAT Antisense: GGGCTGGTCTTCTCCTTGAG	364
GAPDH	GU214026	Sense: CTAAAGGGCATCTGGGC Antisense: TTAICTCTTGGAGGCCAT	201

### 급성 간 손상 동물 모델

급성 간 손상 생쥐모델은 LPS(1  $\mu$ g/kg)와 D-GalN(400 mg/kg)을 0.9% 생리식염수에 용해하여 100  $\mu$ L씩 복강투여하여 제작하였다. 실험군은 6군으로 분류하였다; 정상군(Saline), 간 손상군(LPS/D-GalN), 간 손상+ 저농도 글카수분해물 투여군(LPS/D-GalN+ OH 100 mg/kg), 간 손상+ 중농도 글카수분해물 투여군(LPS/D-GalN+ OH 200 mg/kg), 간 손상+ 고농도 글카수분해물 투여군(LPS/D-GalN+ OH 400 mg/kg) 및 간 손상+ silymarin 투여군(LPS/D-GalN+ silymarin 25 mg/kg). 글카수분해물과 silymarin은 수술 전 10일 동안 오전 9:00~10:00에 100  $\mu$ L씩 경구투여하였다. 수술 당일 LPS/D-GalN을 투여하고, 6시간 후 에테르로 마취시킨 다음 심장에서 혈액을 채취하고 간을 적출하였다.

### 간 효소 정량

실험동물의 혈청에서 간독성 지표인 알라닌 아미노전이효소(alanine aminotransferase, ALT)와 아스파르테이트 아미노전이효소(aspartate aminotransferase, AST)를 정량적으로 측정하기 위해 국제연방임상화학(The International Federation of Clinical Chemistry, IFCC) 표준방법을 이용하였으며 피리독살 포스페이트(pyridoxal phosphate)를 첨가하지 않은 조건에서 효소비색법으로 분석하였다. 시험관에 기질액(ALT,  $\alpha$ -ketoglutarate 2 mmol/L와 aspartate 200 mmol/L; ALT,  $\alpha$ -ketoglutarate 2 mmol/L와 alanine 200 mmol/L) 1 mL, 혈청 0.2 mL를 넣어 37°C에서 ALT는 30분, AST는 1시간 동안 반응시켰다. 반응 종료 직후 발색액(2,4-dinitrophenyl hydrazine, 1 mmol/L)을 1 mL 첨가하여 실온에서 20분간 방치한 후 0.4 N NaOH 10 mL를 첨가하여 증류수를 대조액으로 520 nm에서 흡광도를 측정하였다(Modular Analytics, Roche, Germany).

### 조직학적 분석

간 조직의 병리학적 변화를 관찰하기 위하여 hematoxylin과 eosin을 이용하여 염색을 실시하였다. 간 조직을 4% 중성 포르말린 용액에서 12시간 고정시킨 후 흐르는 물에 수세한 다음 탈수(에탄올 70%, 80%, 95% 및 100%)하고

포매하여 5  $\mu$ m 두께의 절편을 제작하였으며 탈 파라핀 후 염색을 실시하였다. Hematoxylin 용액에서 5분간 핵을 염색한 후 흐르는 물에 수세하고 1% HCl-alcohol 용액에 3회 침적 후 충분히 수세한 뒤, eosin 용액에서 3분간 세포질을 염색하였다. 80% 에탄올로 옮겨 95% 및 100% 에탄올을 사용하여 탈수한 후 permount로 조직을 고정시켜 슬라이드 스캐너(VS120-S5-E whole-slide imaging system, Olympus)로 관찰하였다.

### 세포자멸사 분석

간 조직에서 세포자멸사를 확인하기 위해 ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit(Millipore, Temecula, CA, USA)을 이용하여 염색을 실시하였다. 조직 절편은 탈 파라핀 후 단백질 소화를 위해 proteinase K를 처리하여 실온에서 15분간 배양 후 물로 2분씩 2회 수세하였다. 3% 과산화수소를 실온에서 5분 동안 처리하여 내인성 peroxidase의 활성을 억제한 후 PBS로 5분씩 2회 수세하였다. 평형완충용액으로 실온에서 10초간 평형을 유도한 후 TdT 반응 혼합물을 처리하여 37°C에서 60분간 배양하였으며, 반응을 정지시키기 위해 stop/wash 용액에 10분간 침수시켰다. 음성대조군은 TdT 반응 혼합물 처리과정을 생략하였고, 양성대조군은 DNase를 5분간 처리하여 제작하였다. Anti-digoxigenin conjugate를 실온에서 30분간 처리하고 PBS로 2분씩 4회 수세한 후 diaminobenzidine(DAB)을 처리하고 핵 염색을 위해 hematoxylin 염색을 수행하였다. PBS 용액으로 5분씩 3번 수세한 후 탈수과정을 거쳐 permount로 조직을 고정시켜 슬라이드 스캐너(VS120-S5-E whole-slide imaging system, Olympus)로 세포자멸사를 관찰하였다.

### 간 조직 내 catalase 활성 측정

간 조직은 0.25 M sucrose와 1 mM EDTA를 포함하는 50 mM 인산 완충액(pH 7.4)에 넣어 4°C 조건에서 마쇄하여 간 균질액을 제조하였다. 이를 1,100 $\times$ g에서 10분간 원심분리 하고 상층액은 12,000 $\times$ g에서 20분간 다시 원심분리 하였다. 침전물에 상기의 인산 완충액을 가하여 12,000 $\times$ g에서 20분간 원심분리 한 후 남아있는 침전물을 실험에

사용하였다. Catalase 활성은 Abei(33)의 방법에 따라 1 μM의 과산화수소를 1분간 분해시키는 데 소요되는 효소량을 1 unit으로 정하였다. 50 mM 인산 완충액 2.89 mL와 간 균질액 10 μL를 혼합하여 25°C에서 5분간 반응시켰다. 1 μM의 과산화수소 100 μL를 첨가하여 잘 혼합한 다음 240 nm에서 흡광도(OD-1)를 측정하였다. 이를 다시 25°C에서 5분간 반응시킨 후 240 nm에서 흡광도(OD-2)를 재측정하였으며, catalase 활성은 OD-2에서 OD-1을 감한 값으로 계산하였다.

### 간 조직의 염증성 사이토카인 함량 측정

간 조직(60 mg)을 1 mL PBS로 4°C 조건에서 마쇄하여 이를 770×g에서 10분간 원심분리 한 후 상층액을 실험에 사용하였다. 간 조직 내 TNF-α, IL-1β 및 IL-6의 함량은 ELISA assay kit(R&D System, Minneapolis, MN, USA)을 사용하여 측정하였다. Anti-mouse TNF-α, IL-1β 및 IL-6 항체가 각각 코팅된 96-well plate에 50 μL의 assay diluent, 간 균질액 및 표준시약을 넣고 실온에서 2시간 배양하였다. 배양한 plate를 완충용액으로 3회 세척한 후 100 μL의 streptavidin-HRP 용액을 첨가하여 30분간 실온에서 배양하였다. 각 well에 100 μL의 TMB 기질용액을 첨가해 30분간 암실에서 배양한 후 stop 용액으로 반응을 정지시켰으며, 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 통계학적 분석

실험 결과의 통계처리는 Kruskal-Wallis test를 이용하여 처리구 간의 유의성을 검정하였고( $P < 0.05$ ), 결과들은 평균±표준편차로 표시하였다.

## 결과 및 고찰

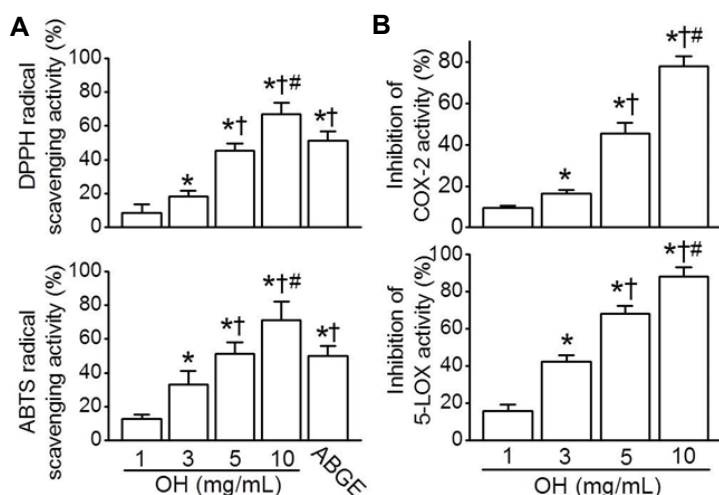
### 굴가수분해물의 항산화, 항염증 활성

굴가수분해물의 항산화 활성을 평가하기 위하여 DPPH

및 ABTS 라디칼에 대한 소거 활성을 측정하였다. DPPH 라디칼 소거 활성은 첨가된 굴가수분해물의 농도가 증가함에 따라 유의적으로 상승하여 1, 3, 5 및 10 mg/mL의 농도에서 각각  $8.68 \pm 4.85\%$ ,  $18.31 \pm 3.54\%$ ,  $45.50 \pm 4.29\%$  및  $67.09 \pm 6.84\%$ 의 활성을 보였다( $n=5$ ,  $P < 0.05$ , Fig. 1A). ABTS 라디칼 소거 활성능 역시 DPPH와 유사한 경향을 보여 1, 3, 5 및 10 mg/mL의 농도일 때 각각  $12.61 \pm 2.75\%$ ,  $33.15 \pm 8.05\%$ ,  $51.25 \pm 6.88\%$  및  $71.05 \pm 11.16\%$ 로 굴가수분해물의 농도에 의존적으로 증가하였다( $n=5$ ,  $P < 0.05$ , Fig. 1A). DPPH 및 ABTS 라디칼에 대한 양성 대조물질로 항산화 활성이 보고된 흑마늘 추출물(aged black garlic extracts, ABGE)을 사용하였으며(34), 5 mg/mL의 굴가수분해물은 100 μg/mL 흑마늘 추출물과 유사한 라디칼 소거 활성을 보였다.

굴가수분해물의 생리활성 중 항산화 활성은 비교적 잘 알려져 있다. Kim 등(25)은 DPPH와 ABTS 라디칼 소거 활성에 대한 굴가수분해물의 IC<sub>50</sub> 값은 11.1과 6.1 mg/mL로 아스코르빈산보다 활성이 낮으나 굴가수분해물의 분자량별 분획물 중 10~30 kDa이 높은 항산화 활성을 보였다고 보고하였다. 또한, 굴 유래 정제 펩티드는 불포화지방산 산화에 있어서 항산화제인 토코페롤보다 더 높은 항산화 활성을 가지며, DNA 손상에 의한 자유라디칼을 유의적으로 감소시켰다(18). Alcalase, Flavourzyme, Neutrase, Protamex, pepsin 및 trypsin 등의 효소 중 Protamex를 이용한 굴가수분해물이 가장 높은 항산화 활성을 보였으며, 효소의 종류에 따른 항산화 활성 차이는 효소의 기질특성에 의해 생성된 펩티드의 아미노산 조성(15) 및 길이(35)에 의해 기인하는 것으로 알려져 있다.

굴가수분해물의 항염증 활성을 평가하기 위해 COX-2 및 5-LOX의 억제 활성을 측정하였다. 굴가수분해물 1, 3, 5 및 10 mg/mL의 농도에서 COX-2 억제 활성은 각각  $9.36 \pm 1.09\%$ ,  $16.4 \pm 11.91\%$ ,  $45.42 \pm 5.30\%$  및  $78.01 \pm 4.70\%$ 로 굴가수분해물 농도에 의존적으로 증가하였다( $n=5$ ,  $P < 0.05$ ,



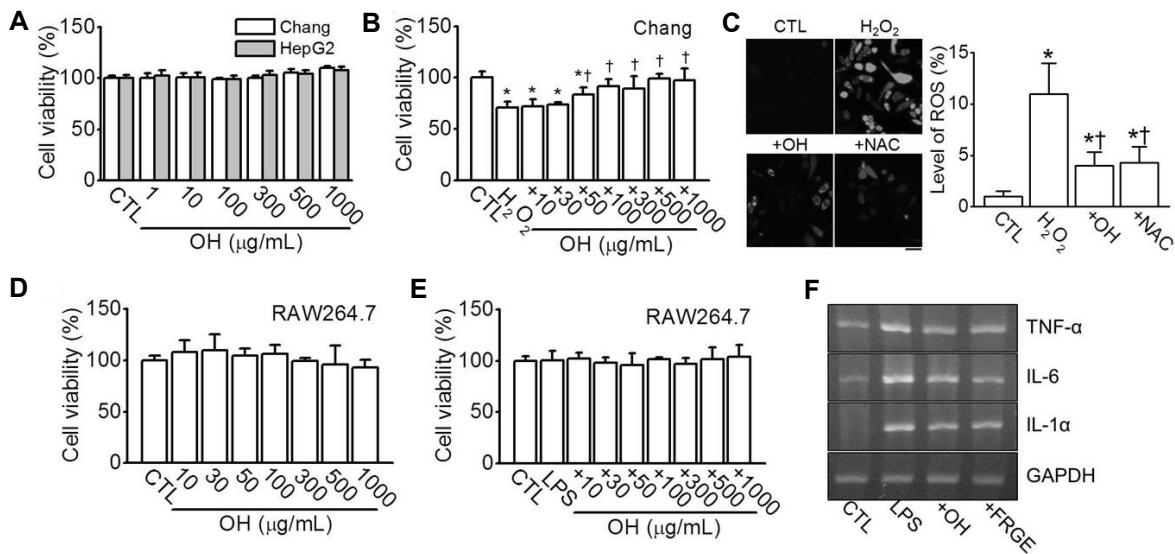
**Fig. 1.** Antioxidant and anti-inflammatory activities of oyster hydrolysate (OH). (A) DPPH and ABTS radical scavenging activities of OH. Aged black garlic extract (ABGE, 100 μg/mL) was used as a positive control. Data were shown as the mean±SD ( $n=5$ ). \* $P < 0.05$  compared to OH (1 mg/mL). † $P < 0.05$  compared to OH (3 mg/mL). # $P < 0.05$  compared to OH (5 mg/mL). (B) Inhibition of COX-2 and 5-LOX activities by OH. The activities of OH were calculated by measuring absorbance. Data were shown as the mean±SD ( $n=5$ ). \* $P < 0.05$  compared to OH (1 mg/mL). † $P < 0.05$  compared to OH (3 mg/mL). # $P < 0.05$  compared to OH (5 mg/mL).

Fig. 1B). 양성 대조물질로 사용한 EGCG는 10 µg/mL의 농도에서 80%의 COX-2 억제 활성을 보였다. 5-LOX 억제 활성은 1, 3, 5 및 10 mg/mL 농도의 굴가수분해물에서 각각 15.89±3.21%, 42.22±3.49%, 68.32±4.06% 및 87.96±5.07%의 활성을 보였다(n=5, P<0.05, Fig. 1B).

염증 치료를 위한 스테로이드 및 비스테로이드 소염제의 부작용을 경감시킬 수 있는 약물 개발에 있어 COX-2와 5-LOX의 이중 억제제는 효과적인 전략이 될 수 있다(36). 염증 자극에 반응하여 나타나는 아라키돈산의 프로스타글란딘, 류코트리엔 및 트롬복산의 에이코사노이드로의 대사는 COX-2와 5-LOX 작용에 의해 발생된다(37). Horrillo 등(38)은 사염화탄소에 의한 간 손상 생쥐 모델에서 COX-2 및 5-LOX 억제제인 SC-236 및 CJ-13610을 단독 투여한 결과 간 섬유화는 감소하였지만 간 조직의 피사염증에는 영향을 미치지 않았다. 그러나 SC-236과 CJ-13610을 병합 투여할 경우 피사염증 및 섬유화 모두가 감소되는 결과를 보였다. 이러한 결과는 간 손상 치료에 COX-2와 5-LOX의 이중 억제제가 효과적이라는 것을 보여준다.

**굴가수분해물의 세포 내 항산화, 항염증 효과**

굴가수분해물의 간세포 독성 여부를 확인하기 위하여 인간 정상 간세포주인 Chang과 간암세포주인 HepG2에 굴가수분해물을 처리한 후 세포생존율을 조사하였다. 실험에 사용한 굴가수분해물의 농도(1~1,000 µg/mL)는 Chang과 HepG2 세포에 독성을 나타내지 않았다(n=5, P<0.05, Fig. 2A). 간세포에 100 µM의 과산화수소를 처리한 결과 세포 생존율(70.95±5.86%)은 대조군에 비해 약 29% 감소하였다. 그러나 과산화수소와 굴가수분해물을 병합처리 시에는 50 µg/mL 이상의 농도부터 과산화수소에 의해 유도된 세포 사멸이 유의적으로 증가하여(n=4, P<0.05, Fig. 2B), 간세포 재생효능을 보였다. Park 등(26)의 보고에 따르면 굴가수분해물은 HepG2 세포에 대해 독성이 없었으며, 아세트아미노펜에 의해 감소한 세포 생존율을 회복시켜 간세포 재생효능을 보였다. 그 외에도 굴가수분해물은 인간 피부 섬유아세포주인 CCD986sk(25), 인간 태아 폐 섬유아세포주인 MRC-5 및 생쥐 대식세포인 RAW264.7(18) 등에도 세포독성을 보이지 않았으므로 세포주는 다르지만 본 연구 결과와 일치하였다. 반면 Cheong 등(20)은 굴 유래 정제 펩티드가 정상 간세포에는 세포독성이 없었지만, 전립선암, 유방암 및



**Fig. 2.** *In vitro* antioxidant and anti-inflammatory effects of OH. (A) Effect of OH on viability of Chang and HepG2 cells. Different concentrations of OH were treated to cells for 24 h. Data were shown as the mean±SD (n=5). (B) Protective effect of OH on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death. Cells were pretreated for 2 h with OH before being stimulated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (100 µM) for 24 h. The plus sign (+) represents combination of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and OH. Data were shown as the mean±SD (n=4). \*P<0.05 compared to control (CTL). †P<0.05 compared to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. (C) Effect of OH on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced ROS generation in Chang cells. Cells were treated with 100 µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 100 µg/mL OH or 3 mM NAC and then stained with H<sub>2</sub>DCFDA to evaluate ROS generation. The ROS levels in the cells were quantified using fluorescence microscopy after 3 h of treatment with the OH. The plus sign (+) represents conditions co-treated with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. The scale bar represents 50 µm. Data were shown as the mean±SD (n=5). \*P<0.05 compared to CTL. †P<0.05 compared to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment. (D) Effect of OH on viability of RAW264.7 cells. Different concentrations of OH were treated to cells for 24 h. Data were shown as the mean±SD (n=5). (E) No effect of OH on LPS activated cells. Cells were pretreated for 2 h with OH before being stimulated with LPS (1 µg/mL) for 24 h. The plus sign (+) represents combination of LPS and OH. Data were shown as the mean±SD (n=4). There is (F) inhibitory effect of OH on the LPS-induced TNF-α, IL-6, and IL-1α expression. Fresh raw garlic extract (FRGE, 1 mg/mL) was used as a positive control. Cells were pretreated for 1 h with 100 µg/mL OH before being stimulated with 1 µg/mL LPS for 16 h. First-strand cDNAs were synthesized from 3 µg of total RNA isolated from the RAW264.7 cells. The same concentration of cDNA was used as the template for PCR in each treatment. GAPDH was used as a loading control for the mRNA expression levels. The plus sign (+) represents conditions co-treated with LPS.

폐암세포 등 암세포에 특이적으로 독성을 나타냈다고 하였다.

굴가수분해물이 과산화수소에 의해 유도된 Chang 세포 내 활성산소를 감소시키는지 확인하고자 세포에 독성을 나타내지 않은 농도인 100 µg/mL의 굴가수분해물을 과산화수소와 병합처리 하였다. 처리된 세포에서 활성산소 발생 정도는 H<sub>2</sub>DCFDA 형광 정도로 분석하였는데, 과산화수소는 유의적으로 활성산소 발생률을 증가시켰으며, 굴가수분해물의 병합은 과산화수소에 의해 증가한 활성산소를 유의적으로 감소시켰다. 이러한 결과는 활성산소 억제제인 N-acetyl-L-cysteine(NAC, 3 mM)의 활성과 유사하였다(n=5, P<0.05, Fig. 2C). Qian 등(18)은 굴에서 분리한 활성 펩티드는 RAW264.7 세포에서 과산화수소에 의한 활성산소를 농도와 시간에 의존적으로 감소시켰다고 보고하여 사용한 세포주는 다르지만 본 연구의 실험 결과와 일치하였다.

굴가수분해물이 LPS 처리로 염증상태에 노출된 RAW 264.7 세포에서 항염증 효과를 가지는지 확인하기 위해 역전사 중합효소 연쇄반응을 이용하여 염증성 사이토카인의 발현 변화를 관찰하였다. RAW264.7 세포에 대한 굴가수분해물의 세포독성을 확인한 결과 본 연구에 사용된 농도 1~1,000 µg/mL까지의 굴가수분해물은 세포의 생존율에 영향을 미치지 않으며(n=5, P<0.05, Fig. 2D), 1 µg/mL LPS 단독 또는 굴가수분해물과의 병합처리 또한 세포의 생존율에 영향을 미치지 않았다(n=4, P<0.05, Fig. 2E). LPS 처리에 의해 염증성 사이토카인인 TNF-α, IL-6 및 IL-1α의 발현이 증가하였고, 굴가수분해물의 병합처리에 의해 감소하였다(Fig. 2F). 양성 대조물질로는 항염증 효과가 알려진 생마늘추출물(fresh raw garlic extract, FRGE)을 사용하였다(34).

8가지의 단백질 가수분해효소(Alcalase, Flavourzyme, Neutrase, Protamex, papain, pepsin, trypsin 및 α-chymotrypsin) 중 Protamex를 이용한 굴가수분해물이 RAW 264.7 세포에서 가장 높은 항염증 효과를 보였으며, 이것의 분자량별 분획물 중에서는 10~30 kDa이 항염증 효과가 가장 높았다(19). 본 연구에서 사용한 굴가수분해물 역시 Protamex가 처리된 가수분해물이다. 그리고 항산화 및 항염증 효과를 보이고 있다. Protamex를 이용한 굴가수분해물은 dextran sulfate sodium(DSS)에 의해 유도된 대장염 생쥐에서 혈청 IgE를 감소시키고 비장의 CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> 수치를 증가시킨다는 보고가 있지만(19), 항염증 효과에 관한 연구는 많지 않다. 한편 굴에서 분리한 조다당체가 LPS를 복강투여하여 면역 스트레스를 유도한 피글렛 모델에서 염증성 사이토카인 생성 및 peroxisome proliferator-activated receptor gamma(PPAR<sub>γ</sub>)의 발현을 감소시키는 등의 항염증 효과를 보였다(39). Lee 등(40)은 굴 껍질 추출물이 LPS로 자극한 RAW264.7 세포에서 ROS 생성을 감소시키고 항산화 효소의 활성을 증가시킬 뿐만 아니라 inducible nitric oxide synthase(iNOS), COX-2 및 nuclear factor-kappaB

(NF-κB)의 발현을 감소시킴으로써 항염증 효과를 나타낸다고 보고하였다. Protamex와 Neutrase를 이용하여 제작된 굴가수분해물의 항산화, 항염증 활성을 통해 Chang 세포와 RAW264.7 세포에서 항산화, 항염증 효과를 나타내는 것으로 생각된다.

### 간 효소의 농도 변화

간의 실질세포가 손상되면 세포질에 존재하는 알라닌 아미노전이효소(ALT)와 아스파르테이트 아미노전이효소(AST)는 혈중으로 유리되어 그 농도가 증가하므로(41), 이 두 효소의 활성을 측정하는 것은 간 손상의 정도를 알 수 있는 중요한 지표가 된다. LPS/D-GalN에 의한 급성 간 손상 모델에서 ALT와 AST의 농도 변화를 측정하여 굴가수분해물의 간 보호 효과를 확인하였다.

Table 2에서 보는 바와 같이 정상군에 비해 LPS/D-GalN처리군은 ALT 농도가 약 13배 증가하였으며, 굴가수분해물 100, 200 및 400 mg/kg 병합 투여군은 LPS/D-GalN 간 손상군에 비해 유의적으로 감소하였다(P<0.05). 고농도 굴가수분해물의 효과는 간 보호 효능이 이미 알려진 실리마린과 유사하였다(42). AST 농도 역시 정상군보다 LPS/D-GalN 처리군에서 약 11배 정도 증가하였다. 굴가수분해물 100, 200 및 400 mg/kg 투여군은 LPS/D-GalN 간 손상군에 비해 유의적으로 감소하여 정상군의 AST 농도 수준 정도로 회복되었으며, 굴가수분해물의 농도에 따른 유의한 차이는 없었다(n=10, P<0.05, Table 2).

Zhou 등(43)은 사염화탄소 투여에 의한 간섬유증 흰쥐 모델에서 굴 단백질 추출물의 ALT, AST 및 알칼리성 인산분해효소(alkaline phosphatase, ALP)의 활성이 대조군(사염화탄소 단독 투여군)에 비해 유의적으로 그 활성이 감소하였다고 보고하였다. 또한, 굴에서 분리한 다당체는 사염화탄소에 의한 급·만성 간 손상 생쥐 모델에서 혈청 ALT, AST 및 말론디알데히드(malondialdehyde, MDA) 농도를 감소시키고, 항산화 효소인 과산화물제거효소(superoxide dismutase, SOD)의 활성을 증가시켰다(44). 또한, 굴 추출물은 알코올성 간질환 흰쥐 모델에서 혈청 ALT, AST, 중성지방, 총콜레스테롤, 말론디알데히드, 글루타치온(glutathione,

**Table 2.** Reduction in LPS/D-GalN-induced increased serum ALT and AST by OH

Groups	ALT (U/L)	AST (U/L)
Saline	24±5 <sup>a1)</sup>	99±40 <sup>a</sup>
LPS/D-GalN	320±103 <sup>b</sup>	1,045±771 <sup>b</sup>
(1 µg/kg+400 mg/kg)		
LPS/D-GalN+OH 100 mg/kg	46±28 <sup>a</sup>	147±145 <sup>a</sup>
LPS/D-GalN+OH 200 mg/kg	32±7 <sup>a</sup>	136±73 <sup>a</sup>
LPS/D-GalN+OH 400 mg/kg	35±19 <sup>a</sup>	124±61 <sup>a</sup>
LPS/D-GalN+silymarin 25 mg/kg	32±22 <sup>a</sup>	105±81 <sup>a</sup>

Data were shown as the mean±SD (n=10 in each group).  
<sup>1)</sup>Values with different letters within each column are significantly different (P<0.05).

GSH)뿐만 아니라 TNF- $\alpha$  함량까지 감소시켰다(45). 이러한 보고들은 간 손상 동물모델에서 글카수분해물 및 글 추출물이 항산화 및 항염증 효과를 나타낼 수 있음을 보여주고 있다.

**간 조직의 형태학적 변화**

LPS와 D-GalN에 의한 급성 간 손상 모델은 전형적인 간세포 괴사 및 세포자멸사를 형성하고(8), 여러 장기의 기능 장애를 유발하는 것으로 알려져 있다(46). 글카수분해물의 간 손상 모델에서 나타나는 간 조직의 형태학적 변화에 있어서 영향을 확인하기 위해 H&E 염색을 수행한 결과, LPS/D-GalN 간 손상군의 간 조직은 정상군에 비해 출혈과 함께 간세포의 사멸이 확인되었다. 핵염색질의 응축, 핵의 분절 및 세포질의 위축과 같은 전형적인 세포자멸사의 특징이 나타났다. 그러나 글카수분해물 100, 200 및 400 mg/kg 병합투여군은 LPS/D-GalN 간 손상군에 비해 간세포의 형태학적 변화가 감소하였다(n=10, Fig. 3A).

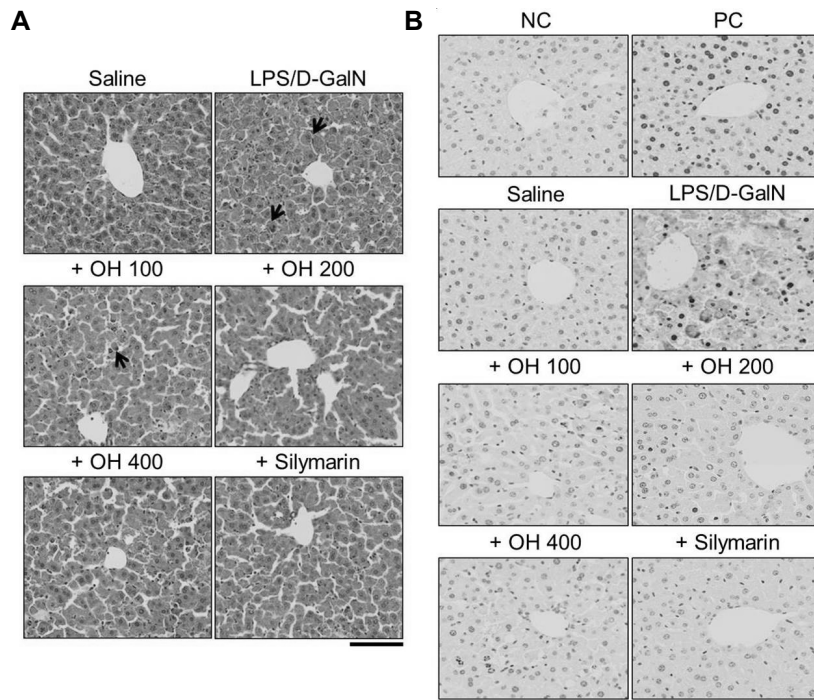
세포자멸사만을 보이는 세포를 정확히 분석하기 위해 ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit (Millipore)을 이용하여 세포자멸사를 확인하였다. 정상군의

간 조직에서는 세포자멸사가 거의 확인되지 않았지만, LPS/D-GalN 간 손상군은 자멸사한 세포의 수가 현저히 증가하였다. 반면 글카수분해물 100, 200 및 400 mg/kg 병합투여군은 LPS/D-GalN 간 손상군에 비해 간세포의 자멸사가 감소하였다. 특히 고농도의 글카수분해물(400 mg/kg) 투여군에서는 자멸사한 세포가 거의 보이지 않았다(n=10, Fig. 3B).

LPS/D-GalN 투여 6, 12, 24, 48 및 72시간 후 간세포의 자멸사를 조사한 연구에서 세포자멸사는 LPS/D-GalN 투여 6시간부터 나타나기 시작하여 12시간과 24시간에 세포자멸사 비율이 증가하였다. 그러나 48시간 이후는 세포자멸사의 비율이 감소하였다. 또한, 간, 가슴샘, 심장 및 신장 등의 장기 중 오직 간에서만 세포자멸사가 확인되었다고 보고하였다(47). 본 연구에서 세포자멸사는 LPS/D-GalN 투여 6시간 후 분리된 간에서 확인된 결과로 급성 간 손상 6시간에 세포자멸사가 나타남을 선행연구와 일치하게 보고한다.

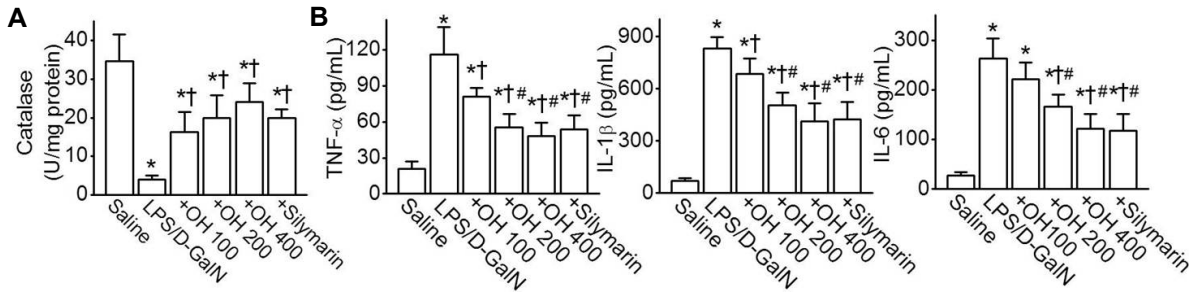
**항산화 효소 및 염증성 사이토카인의 변화에 있어 글카수분해물의 효과**

LPS/D-GalN 간 손상군으로부터 얻어진 간 조직에서 catalase 활성 변화를 조사하였다. LPS/D-GalN 간 손상군



**Fig. 3.** Inhibitory effect of OH on histopathological changes and apoptosis in liver tissue obtained from acute liver injury mice. The liver sections were obtained from saline-, LPS/D-GalN-, LPS/D-GalN+OH 100 mg/kg, LPS/D-GalN+OH 200 mg/kg, LPS/D-GalN+OH 400 mg/kg, and LPS/D-GalN+silymarin 25 mg/kg-treated mice. (A) Attenuation in LPS/D-GalN-induced pathological alterations by OH. Representative images of hematoxylin & eosin (H&E) staining of liver tissue. Remarkable increase in hemorrhage, nuclear chromatin condensation, nuclear fragmentation, and cytoplasmic shrinkage (arrow sign) in LPS/D-GalN group were not observed in the LPS/D-GalN+OH and LPS/D-GalN+silymarin groups. The scale bar represents 100  $\mu$ m. (B) Reduction of LPS/D-GalN-induced apoptosis by OH treatment. Representative images of apoptotic hepatocyte in LPS/D-GalN group. Liver tissues were subjected to peroxidase staining. Apoptosis was assessed using an ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit. Remarkable increase in hepatocyte apoptosis in LPS/D-GalN group was not observed in the LPS/D-GalN+OH and LPS/D-GalN+silymarin groups. The scale bar represents 200  $\mu$ m. The plus sign (+) represents conditions co-treated with LPS/D-GalN.





**Fig. 4.** Effects of OH on activity of catalase and pro-inflammatory cytokines in liver tissue. Liver homogenate was prepared, and cytokines were measured in the homogenate by ELISA kit. (A) The LPS/D-GalN-induced decrease in catalase activity in liver was recovered by OH. Data were shown as the mean±SD (n=8 in each group). \**P*<0.05 compared to saline. †*P*<0.05 compared to LPS/D-GalN. (B) The LPS/D-GalN-induced increases in pro-inflammatory cytokine levels in liver were reduced by OH. Data were shown as the mean±SD (n=8 in each group). \**P*<0.05 compared to saline. †*P*<0.05 compared to LPS/D-GalN. #*P*<0.05 compared to LPS/D-GalN+OH 100.

에서 catalase 활성은 유의적으로 감소하였다(*P*<0.05, 정상군, 34.7±7.0 U/mg; LPS/D-GalN, 3.9±1.0 U/mg). 굴가수분해물 100, 200 및 400 mg/kg 병합투여군에서는 catalase 활성이 각각 16.3±5.2, 20.0±5.9 및 24.1±4.9 U/mg으로 LPS/D-GalN 간 손상군에 비해 유의적으로 증가하였다(n=8, *P*<0.05, Fig. 4A). 굴가수분해물의 농도 증가에 따른 catalase 활성은 증가하는 경향을 보였으나 유의성은 확인되지 않았다. 이와 같은 결과는 굴가수분해물의 라디칼 소거능 및 과산화수소에 의한 활성산소 감소 효과 등에 기인한 조직 내의 변화로 생각된다.

LPS/D-GalN 간 손상군에서 굴가수분해물의 항염증 효과를 확인하기 위해 간 조직 내의 염증성 사이토카인 함량을 ELISA 방법으로 측정하였다. 간 조직 내 TNF-α와 IL-1β의 함량은 정상군에 비해 LPS/D-GalN 간 손상군에서 각각 약 6배와 12배 증가하였으며 굴가수분해물의 병합투여는 그 증가를 유의적으로 감소시켰다. 특히 굴가수분해물 200 및 400 mg/kg 투여는 100 mg/kg 투여에 비해 TNF-α 및 IL-1β 함량을 많이 감소시켰다. 이는 실리마린 투여군과 유사한 수준이었다. 간 조직의 IL-6는 정상군에 비해 LPS/D-GalN 간 손상군에서 약 9배 증가하였다. 굴가수분해물 100 mg/kg 병용투여군은 증가한 IL-6를 감소시키지 않았지만 200 및 400 mg/kg 투여군은 유의적으로 감소시켜 실리마린 투여군과 유사한 효과를 보였다(n=8, *P*<0.05, Fig. 4B).

임상적 선행(시험) 연구(48)에서 음주습관이 있고 혈청 감마-글루타밀전달효소( $\gamma$ -glutamyltransferase, GGT) 수치가 약간 높은 성인을 대상으로 음주에 의한 간 기능 변화에 있어서 굴 추출물 함유식이 보충제의 영향을 조사하였다. 굴 추출물 함유식이 보충제를 섭취한 그룹은 위약군에 비해 실험 12주째에 혈청 GGT 수치가 유의적으로 감소하였으므로, 굴 추출물이 알코올성 간질환과 관련된 위험인자를 줄이는 데 도움이 된다고 보고하였다. Hur 등(24)은 굴가수분해물이 첨가된 고지방 식이를 급이한 흰쥐는 대조군에 비해 혈청 및 간 균질의 과산화물 제거효소와 catalase 활성

이 증가하였는데, 이는 증가한 히드록실 라디칼을 소거하기 위해 항산화 효소의 활성이 증가한 것으로 추정하였다. Zhou 등(43)은 굴 단백질 추출물이 사염화탄소에 의해 유도된 간섬유증 모델의 간 조직에서 connective tissue growth factor(CTGF), transforming growth factor  $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1) 및 NF- $\kappa$ B 발현을 감소시켰으므로써 간 보호 효과를 나타냈다고 하였다. LPS를 투여한 피글렛의 혈청에는 IL-1 $\beta$ , IL-6 및 TNF- $\alpha$  등의 염증성 사이토카인 함량이 증가하였는데 이는 굴 조다당체 급이에 의해 유의적으로 감소하였으며, 이러한 결과는 LPS에 의해 유도된 면역스트레스에 있어서 굴 조다당체 항염증 효과에 의한 것으로 보고된 바 있다(39). Park 등(26)은 굴가수분해물이 아세트아미노펜 유도 HepG2 세포주 손상에 있어서 간세포 재생 및 세포 배양액에 유출된 ALT 및 AST 활성 감소 등의 간 보호 효과를 가진다고 하였다. 또한, 굴가수분해물은 tacrine 유도 HepG2 세포의 사멸을 감소시키는 효과를 보였다(49). 선행연구 결과들에서 보는 바와 같이 굴가수분해물은 간세포에서 독성 효과를 감소시키고, 고지방식이 동물의 혈청 및 간균질물에서 항산화 효과를 보였다. 이러한 연구 결과는 본 연구의 결과에서 보여준 굴가수분해물이 항산화 효과 및 간 손상 억제 효과를 가진다는 것과 유사하다. 그러나 본 연구에서 다루어졌던 LPS/D-GalN에 의한 염증 및 산화스트레스에 의해 유도된 간 손상 동물모델에서 간 손상 보호 효과를 보이는 연구 결과는 없다. 굴가수분해물의 높은 항산화 및 항염증 활성은 LPS/D-GalN 유도 간 손상 모델에서 간 보호 효과에 기여하는 것으로 생각된다. 굴의 주요 아미노산인 타우린(50)은 알코올성 간질환 흰쥐 모델(51) 및 고지방/콜레스테롤 식이를 급이한 햄스터 모델(52)에서 간지방증의 발병을 억제하였다. 또한, 타우린은 편두통의 치료에 주로 사용되는 약물인 트립탄(triptan)에 의한 간세포의 산화스트레스를 억제하고, 감소한 글루타치온 함량을 증가시켜 간세포를 보호하였다(53). 타우린과 커큐민의 병합투여는 diethyl nitrosamine에 의해 유도된 간암 흰쥐 모델에서 혈청 IL-2 및 interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ ) 함량을 증가시키고  $\alpha$ -feto-

protein(AFP) 및  $\alpha$ -L-fucosidase(AFU)를 감소시켰을 뿐만 아니라 간 조직의 형태학적 변화를 정상군과 유사한 수준으로 회복시켰다(54). 본 연구를 포함한 이상의 연구 결과들은 충분히 굴 추출물 및 굴가수분해물이 항산화 및 항염증 효과를 나타낼 수 있음을 제시한다.

가수분해물은 분자의 크기, 소수성 및 극성 등에 영향을 받는데(55), 이러한 특성은 식품성분으로서 기능적 특성에 직접적으로 영향을 미친다. 여러 가지 단백질 가수분해효소 중 Protamex를 이용한 굴가수분해물이 가장 높은 항산화(15) 및 항염증(19) 활성을 보인다는 연구 결과로 미루어 볼 때 굴 단백질의 가수분해 조건이 항산화 및 항염증 활성, 나아가 간 보호 효과에도 지대한 영향을 미칠 것으로 생각된다. 이는 가수분해물을 구성하는 펩티드의 구조에 기인하는 것으로 해석된다. 굴가수분해물의 간 보호 효과 또한 굴가수분해물 내의 활성펩티드에 의해 유도될 수 있을 것이다.

본 연구에서는 굴가수분해물의 항산화 및 항염증 활성을 확인하고, 세포 및 간 손상 동물모델에서 굴가수분해물의 간 보호 효과를 간 효소 수치, 세포자멸사, 간 조직 내 항산화 효소 및 염증성 사이토카인의 변화를 분석함으로써 증명하였다. 굴가수분해물의 항산화 및 항염증의 활성이 LPS/D-GalN에 의해 유도된 급성 간 손상 생쥐 모델에서 간 보호 효과를 나타내는 것으로 유추되나 아직 정확한 그 기전은 분석되지 않았다. 또한, 추출물 및 가수분해물의 한계를 극복하기 위해 유효 펩티드의 구조동정 연구가 절실히 필요한 실정이다. 기전분석 및 유효성분의 동정은 추후 연구에서 수행되어야 할 것이다. 굴가수분해물은 간 보호를 위한 건강 기능식품 및 급성 간 손상의 치료제 개발에 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

## 요 약

산화스트레스와 염증은 간 손상의 진행과정에 중요한 인자로 작용한다. 굴가수분해물의 항산화 및 항염증 활성은 지질 대사, 혈압 및 혈당, 면역기능의 조절과 같은 다양한 기능에 관여한다. 그러나 급성 간 손상 모델에서 굴가수분해물의 효과를 확인한 연구 결과는 아직 확인된 바 없다. 본 연구는 LPS/D-GalN에 의해 유도된 급성 간 손상 생쥐 모델에서 굴가수분해물의 효과를 확인하기 위해 수행되었다. 실험군은 대조군(생리식염수), LPS/D-GalN 간 손상군, LPS/D-GalN과 굴가수분해물(100 mg/kg, 200 mg/kg, 400 mg/kg)의 병합투여군 및 LPS/D-GalN과 silymarin(25 mg/kg) 병합투여군으로 나누었다. 급성 간 손상 모델은 1  $\mu$ g/kg의 LPS와 400 mg/kg의 D-GalN으로 유도되었다. 먼저 시료의 항산화 및 항염증 활성을 분석한 결과 굴가수분해물은 농도 의존적으로 높은 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거 활성을 보였으며, 인간 정상 간세포주(Chang)에서 과산화수소에 의한 세포 내 활성산소의 생성을 유의적으로 감소시켰다. 또한, 굴가수분해물은 농도 의존적으로 높은 COX-2 및

5-LOX 억제능을 보였으며, LPS에 의해 활성화된 생쥐 대식세포주 RAW264.7에서 발현되는 TNF- $\alpha$ , IL-6 및 IL-1 $\alpha$ 의 염증성 사이토카인의 mRNA 발현률을 감소시켰다. 굴가수분해물 투여는 LPS/D-GalN에 의한 혈청 ALT 및 AST 증가를 유의적으로 감소시켰으며, 간 조직의 출혈 및 간세포의 자멸사를 감소시켰다. 또한, 간 균질의 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  및 IL-6 함량을 감소시켰으며, 감소한 catalase의 활성을 유의적으로 증가시켰다. 이상의 결과로부터 굴가수분해물은 간 보호 효과를 가지는 것으로 판단되며, 급성 간 손상의 예방 및 치료에 도움이 될 수 있는 시료로 활용될 수 있을 것으로 기대된다.

## 감사의 글

본 연구는 해양수산부의 재원으로 해양생명공학기술개발사업(과제번호 PJT200671) 연구개발비 지원에 의해 수행되었습니다.

## REFERENCES

- Bernal W, Wendon J. 2013. Acute liver failure. *N Engl J Med* 369: 2525-2534.
- Escorsell A, Mas A, de la Mata M. 2007. Acute liver failure in Spain: analysis of 267 cases. *Liver Transpl* 13: 1389-1395.
- Bower WA, Johns M, Margolis HS, Williams IT, Bell BP. 2007. Population-based surveillance for acute liver failure. *Am J Gastroenterol* 102: 2459-2463.
- Kumar R, Shalimar, Bhatia V, Khanal S, Sreenivas V, Gupta SD, Panda SK, Acharya SK. 2010. Antituberculosis therapy-induced acute liver failure: magnitude, profile, prognosis, and predictors of outcome. *Hepatology* 51: 1665-1674.
- Ichai P, Samuel D. 2008. Etiology and prognosis of fulminant hepatitis in adults. *Liver Transpl* 14: S67-S79.
- Lee WM, Squires RH Jr, Nyberg SL, Doo E, Hoofnagle JH. 2008. Acute liver failure: Summary of a workshop. *Hepatology* 47: 1401-1415.
- Galanos C, Freudenberg MA, Reutter W. 1979. Galactosamine-induced sensitization to the lethal effects of endotoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76: 5939-5943.
- Eipel C, Kidess E, Abshagen K, LeMinh K, Menger MD, Burkhardt H, Vollmar B. 2007. Antileukoproteinase protects against hepatic inflammation, but not apoptosis in the response of D-galactosamine-sensitized mice to lipopolysaccharide. *Br Pharmacol* 151: 406-413.
- Neihörster M, Inoue M, Wendel A. 1992. A link between extracellular reactive oxygen and endotoxin-induced release of tumour necrosis factor  $\alpha$  in vivo. *Biochem Pharmacol* 43: 1151-1154.
- Mayer AM, Spitzer JA. 1993. Modulation of superoxide anion generation by manoalide, arachidonic acid and staurosporine in liver infiltrated neutrophils in a rat model of endotoxemia. *J Pharmacol Exp Ther* 267: 400-409.
- Yang F, Li X, Wang LK, Wang LW, Han XQ, Zhang H, Gong ZJ. 2014. Inhibitions of NF- $\kappa$ B and TNF- $\alpha$  result in differential effects in rats with acute on chronic liver failure induced by d-Gal and LPS. *Inflammation* 37: 848-857.
- Jung SH, Kim SJ, Jun BG, Lee KT, Hong SP, Oh MS, Jang

- DS, Choi JH. 2013.  $\alpha$ -Cyperone, isolated from the rhizomes of *Cyperus rotundus*, inhibits LPS-induced COX-2 expression and PGE2 production through the negative regulation of NF $\kappa$ B signalling in RAW 264.7 cells. *J Ethnopharmacol* 147: 208-214.
13. Streetz K, Leifeld L, Grundmann D, Ramakers J, Eckert K, Spengler U, Brenner D, Manns M, Trautwein C. 2000. Tumor necrosis factor  $\alpha$  in the pathogenesis of human and murine fulminant hepatic failure. *Gastroenterology* 119: 446-460.
  14. You TJ. 1993. *Source book of food*. Seo-Woo, Seoul, Korea. p 168-169.
  15. Chung IK, Kim HS, Kang KT, Choi YJ, Choi JD, Kim JS, Heu MS. 2006. Preparation and functional properties of enzymatic oyster hydrolysates. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 919-925.
  16. Wang Q, Li W, He Y, Ren D, Kow F, Song L, Yu X. 2014. Novel antioxidative peptides from the protein hydrolysate of oysters (*Crassostrea talienwhanensis*). *Food Chem* 145: 991-996.
  17. Umayaparvathi S, Meenakshi S, Vimalraj V, Arumugam M, Balasubramanian T. 2014. Isolation and structural elucidation of antioxidant peptides from oyster (*Saccostrea cucullata*) protein hydrolysate. *Protein Pept Lett* 21: 1073-1083.
  18. Qian ZJ, Jung WK, Byun HG, Kim SK. 2008. Protective effect of an antioxidative peptide purified from gastrointestinal digests of oyster, *Crassostrea gigas* against free radical induced DNA damage. *Bioresour Technol* 99: 3365-3371.
  19. Hwang JW, Lee SJ, Kim YS, Kim EK, Ahn CB, Jeon YJ, Moon SH, Jeon BT, Park PJ. 2012. Purification and characterization of a novel peptide with inhibitory effects on colitis induced mice by dextran sulfate sodium from enzymatic hydrolysates of *Crassostrea gigas*. *Fish Shellfish Immunol* 33: 993-999.
  20. Cheong SH, Kim EK, Hwang JW, Kim YS, Lee JS, Moon SH, Jeon BT, Park PJ. 2013. Purification of a novel peptide derived from a shellfish, *Crassostrea gigas*, and evaluation of its anticancer property. *J Agric Food Chem* 61: 11442-11446.
  21. Shiozaki K, Shiozaki M, Masuda J, Yamauchi A, Ohwada S, Nakano T, Yamaguchi T, Saito T, Muramoto K, Sato M. 2010. Identification of oyster-derived hypotensive peptide acting as angiotensin- I -converting enzyme inhibitor. *Fish Sci* 76: 865-872.
  22. Xie CL, Kim JS, Ha JM, Choung SY, Choi YJ. 2014. Angiotensin I -converting enzyme inhibitor derived from cross-linked oyster protein. *Biomed Res Int* 2014: 379234.
  23. Wang J, Hu J, Cui J, Bai X, Du Y, Miyaguchi Y, Lin B. 2008. Purification and identification of a ACE inhibitory peptide from oyster proteins hydrolysate and the antihypertensive effect of hydrolysate in spontaneously hypertensive rats. *Food Chem* 111: 302-308.
  24. 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.
  25. Kim HA, Park SH, Lee SS, Choi YJ. 2015. Anti-wrinkle effects of enzymatic oyster hydrolysate and its fractions on human fibroblasts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44: 1645-1652.
  26. Park SH, Moon SS, Xie CL, Choung SY, Choi YJ. 2014. Protective effects of enzymatic oyster hydrolysate on acetaminophen-induced HepG-2 cell damage. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 1166-1173.
  27. Blois MS. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
  28. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* 26: 1231-1237.
  29. Reddy CM, Bhat VB, Kiranmai G, Reddy MN, Reddanna P, Madyastha KM. 2000. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 by C-phycocyanin, a biliprotein from *Spirulina platensis*. *Biochem Biophys Res Commun* 277: 599-603.
  30. Lyckander IM, Malterud KE. 1992. Lipophilic flavonoids from *Orthosiphon spicatus* as inhibitors of 15-lipoxygenase. *Acta Pharm Nord* 4: 159-166.
  31. Park HJ, Jeon BT, Kim HC, Roh GS, Shin JH, Sung NJ, Han J, Kang D. 2012. Aged red garlic extract reduces lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages and acute pulmonary inflammation through haeme oxygenase-1 induction. *Acta Physiol* 205: 61-70.
  32. Gough DR, Cotter TG. 2011. Hydrogen peroxide: a Jekyll and Hyde signalling molecule. *Cell Death Dis* 2: e213.
  33. Aebi H. 1984. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* 105: 121-126.
  34. Jeong YY, Ryu JH, Shin JH, Kang MJ, Kang JR, Han J, Kang D. 2016. Comparison of anti-oxidant and anti-inflammatory effects between fresh and aged black garlic extracts. *Molecules* 21: 430.
  35. Kim SB, Yeum DM, Yeo SG, Ji CI, Lee YW, Park YH. 1989. Antioxidative effects of food protein hydrolysates by protease. *Korean J Food Sci Technol* 21: 492-497.
  36. Bertolini A, Ottani A, Sandrini M. 2001. Dual acting anti-inflammatory drugs: a reappraisal. *Pharmacol Res* 44: 437-450.
  37. Santos CMM, Ribeiro D, Silva AMS, Fernandes E. 2017. 2,3-Diaryl-xanthenes as potential inhibitors of arachidonic acid metabolic pathways. *Inflammation* 40: 956-964.
  38. Horrillo R, Planagumà A, González-Pérez A, Ferré N, Titos E, Miquel R, López-Parra M, Masferrer JL, Arroyo V, Clària J. 2007. Comparative protection against liver inflammation and fibrosis by a selective cyclooxygenase-2 inhibitor and a nonredox-type 5-lipoxygenase inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* 323: 778-786.
  39. Yin G, Huang J, Ma M, Suo X, Huang Z. 2016. Oyster crude polysaccharides attenuates lipopolysaccharide-induced cytokines production and PPAR $\gamma$  expression in weanling piglets. *Springerplus* 5: 677.
  40. Lee SY, Kim HJ, Han JS. 2013. Anti-inflammatory effect of oyster shell extract in LPS-stimulated Raw 264.7 cells. *Prev Nutr Food Sci* 18: 23-29.
  41. Chung K, Cho SH, Sin EN, Choi KH, Choi YS. 1988. Effects of alcohol consumption and fat content in diet on chemical composition and morphology of liver in rat. *Korean J Nutr* 21: 154-163.
  42. Reddy MK, Reddy AG, Kumar BK, Madhuri D, Boobalan G, Reddy MA. 2017. Protective effect of rutin in comparison to silymarin against induced hepatotoxicity in rats. *Vet World* 10: 74-80.
  43. Zhou J, Liang Y, Pan JX, Wang FF, Lin XM, Ma RJ, Qu F, Fang JQ. 2015. Protein extracts of *Crassostrea gigas* alleviate CCl $_4$ -induced hepatic fibrosis in rats by reducing the expression of CTGF, TGF- $\beta$ 1 and NF- $\kappa$ B in liver tissues. *Mol Med Rep* 11: 2913-2920.
  44. Shi X, Ma H, Tong C, Qu M, Jin Q, Li W. 2015. Hepatoprotective effect of a polysaccharide from *Crassostrea gigas*

- on acute and chronic models of liver injury. *Int J Biol Macromol* 78: 142-148.
45. Zhang C, Li X, Jing X, Zhang B, Zhang Q, Niu Q, Wang J, Tian Z. 2014. Protective effects of oyster extract against hepatic tissue injury in alcoholic liver diseases *J Ocean Univ China* 13: 262-270.
  46. Bhaduri BR, Mieli-Vergani G. 1996. Fulminant hepatic failure: pediatric aspects. *Semin Liver Dis* 16: 349-355.
  47. Kwak SD, Kim CS, Kang CB, Koh PO, Seo DL, Yang JH. 2000. Apoptosis of livers induced by D-galactosamine and lipopolysaccharide in mice. *Korean J Vet Res* 40: 213-220.
  48. Osaki K, Shimizu Y, Yamamoto T, Miyake F, Kondo S, Yamaguchi H. 2015. Improvement of liver function by the administration of oyster extract as a dietary supplement to habitual alcohol drinkers: A pilot study. *Exp Ther Med* 10: 705-710.
  49. Park HJ, Do HJ, Kim OJ, Kim A, Ha JM. 2012. Hepatoprotective effects of various enzyme hydrolysates from oysters on taurine-induced toxicity in human hepatoma cells. *J Life Sci* 22: 117-125.
  50. Moon PD, Kim MH, Lim HS, Oh HA, Nam SY, Han NR, Kim MJ, Jeong HJ, Kim HM. 2015. Taurine, a major amino acid of oyster, enhances linear bone growth in a mouse model of protein malnutrition. *Biofactors* 41: 190-197.
  51. Wu G, Yang J, Sun C, Luan X, Shi J, Hu J. 2009. Effect of taurine on alcoholic liver disease in rats. *Adv Exp Med Biol* 643: 313-322.
  52. Chang YY, Chou CH, Chiu CH, Yang KT, Lin YL, Weng WL, Chen YC. 2010. Preventive effects of taurine on development of hepatic steatosis induced by a high-fat/cholesterol dietary habit. *J Agric Food Chem* 59: 450-457.
  53. Fard JK, Hamzeiy H, Sattari M, Eghbal MA. 2016. Protective roles of N-acetyl cysteine and/or taurine against sumatriptan-induced hepatotoxicity. *Adv Pharm Bull* 6: 627-637.
  54. El-Houseini ME, El-Agoza IA, Sakr MM, El-Malky GM. 2017. Novel protective role of curcumin and taurine combination against experimental hepatocarcinogenesis. *Exp Ther Med* 13: 29-36.
  55. Kristinsson HG, Rasco BA. 2000. Fish protein hydrolysates: production, biochemical, and functional properties. *Crit Rev Food Sci Nutr* 40: 43-81.