

ORIGINAL ARTICLE

소장상피세포에 있어서 느릅나무 당단백질이 톨루엔에 의해 유도된 환경독성 기작에 미치는 효과

김도완[#] · 김지윤[#] · 박문기^{*} · 이세중^{*}

대구한의대학교 제약공학과

Effects of a Glycoprotein Isolated from *Ulmus davidiana* Nakai on Toluene-Induced Ecotoxicity and its Mechanism in Human Intestinal Epithelial Cells

Do-Wan Kim[#], Ji-Yun Kim[#], Moon-Ki Park^{*}, Sei-Jung Lee^{*}

Department of Pharmaceutical Engineering, Daegu Haany University, Gyeongsan 38610, Korea

Abstract

Ulmus davidiana Nakai (UDN) has been traditionally used as a herbal medicine to treat inflammatory diseases in Korea. In the present study, we investigated the anti-ecotoxic potential of a 116 kDa glycoprotein isolated from UDN (UDN glycoprotein) in human intestinal epithelial INT-407 cells. We demonstrated that UDN glycoprotein (20 µg/mL) could inhibit the production of lactate dehydrogenase (LDH) induced by toluene, an ecotoxic substance. Additionally, we found that the toluene-induced intestinal cytotoxicity was mediated by the phosphorylation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) via the production of intracellular Reactive Oxygen Species (ROS). The UDN glycoprotein significantly decreased the levels of ROS production and p38 MAPK activation in toluene-stimulated INT-407 cells. Moreover, the UDN glycoprotein inhibits the phosphorylation of nuclear factor-kappa B (NF-κB), which is responsible for the production of LDH, in toluene-stimulated INT-407 cells. Collectively, our data indicate that UDN glycoprotein is a natural antioxidant and a modulator of ecotoxicity signaling pathways in human intestinal epithelial cells.

Keywords : *Ulmus davidiana* Nakai (UDN) glycoprotein, Intestinal epithelial cells, Reactive oxygen species, NF-κB, Toluene

1. 서론

방향족 탄화수소인 톨루엔(Toluene)은 자일렌(Xylene)

과 함께 도료, 잉크, 페인트, 고무, 접착제 및 화학공업 제품 원료 등으로 널리 사용되고 있는 휘발성 유기화합물 (Volatile organic compounds) 중 하나로서 대기중에서

Received 18 January, 2019; Revised 10 February, 2019;
Accepted 12 February, 2019

*Corresponding author : Sei-Jung Lee, Ph.D., Biopharmaceutical Engineering Lab., Department of Pharmaceutical Engineering, Daegu Haany University, Gyeongsan 38610, Korea
Phone : +82-53-819-1806
E-mail : sjlee@dhu.ac.kr

Moon-Ki Park, Ph.D., Biopharmaceutical Engineering Lab., Department of Pharmaceutical Engineering, Daegu Haany University, Gyeongsan 38610, Korea
Phone : +82-53-819-1420
E-mail : moonki@dhu.ac.kr

[#] These authors contributed equally to this work.

© The Korean Environmental Sciences Society. All rights reserved.
© 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.

2차 오염물질을 생성하여 환경독성을 유도하거나, 인체 건강에 치매, 안구 운동 장애 및 불안증과 같은 심각한 부작용을 일으킬 수 있다 (Morvai et al., 1976; Filley et al., 2004). 특히 인체에 있어서 톨루엔은 급성의 경우 신경 독성을 유발할 뿐만 아니라, 만성적으로는 호흡기 및 신경 독성을 야기시키고 새집증후군을 일으키는 물질로서 대표적인 환경적 인체 독성물질 중에 하나이다 (Lolin, 1989; Foo et al., 1990; Yoshida et al., 2011).

톨루엔이 인체로 유입되면 비이상적으로 활성산소종 (Reactive Oxygen Species, ROS)의 생산을 유도한다 (Mattia et al., 1991; Sarma et al., 2011). 일반적으로 대부분 생물체의 정상적인 대사과정에서 불가피하게 발생하는 활성산소종은 생체내에 존재한 여러 항산화 효소에 의해 소멸되지만, 비이상적으로 과잉 생산된 활성산소종은 세포내 잠재적인 신호전달 물질로서 작용하여 산화적 인산화와 관련된 세포 단백질의 활성화를 유도하고, 스트레스성 유전자 발현을 위한 전사인자를 활성화시켜 다양한 세포독성 및 질환발생을 야기하는 것으로 보고되었다 (Yamaguchi et al., 1999; Csete, 2005). 따라서 톨루엔이 유도한 세포독성 신호전달 기작을 알아보고, 이 결과를 바탕으로 톨루엔의 제어방법을 연구하는 것은 환경독성 기작을 제어하는 최소한의 방법을 제시할 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 아직까지 톨루엔이 유도한 세포독성의 메커니즘을 이해하고 알아내는 연구가 미흡한 실정이며, 이러한 환경독성효과를 제어하는 물질을 탐구하는 연구 또한 매우 부족하다.

느릅나무(*Ulmus davidiana* Nakai, UDN)는 한국에 널리 퍼져 있으며 부종, 유방염, 위궤양 및 위암 등에 효과를 가진 전통약재로 사용되어 왔다 (Lee et al., 2013b). 최근 느릅나무의 효능에 대한 연구 결과를 종합해 보면, 느릅나무 추출물은 항산화 작용, 항염증 작용 및 항고지혈증 등의 효능을 가지고 있다고 보고되었다 (Lee and Lim, 2009; Lee et al., 2013a; Um et al., 2013). 따라서 느릅나무에는 생리활성 물질이 함유되어 있으며, 이것의 탁월한 약리학적 효과는 환경독성물질 및 활성산소종이 유도한 세포독성을 제어하는데 사용될 수 있음을 시사한다. 최근 본 연구실에서는 천연물로부터 생리활성물질을 탐색하고, 이로부터 당단백질만을 분리하여 그에 대한 생물학적인 이용성을 연구하였던 결과, 느릅나무로부터 추출된 116 kDa의 식물성 당단백질(UDN

glycoprotein)은 탁월한 생체 방어적 조절자로서 강력한 항산화 효과 및 면역기능 조절효과 그리고 항암 효과를 가지고 있는 것을 알았다 (Lee et al., 2004). 따라서, 본 연구에서는 환경독성 물질인 톨루엔이 소장상피세포의 활성산소종 발생 및 환경독성 신호전달기전을 촉진시킬 수 있는지 알아보고, 이때 느릅나무 당단백질이 톨루엔이 유도한 환경독성 메커니즘을 조절할 수 있는지를 밝히고자 한다.

2. 재료 및 실험방법

2.1. 시약

본 실험에 사용된 시약 중, Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) 배지와 소태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS)은 GE Healthcare Life Sciences (Morningside, Queensland, Australia)에서 구입하였으며, p38 MAPK, phospho - p38 MAPK, NF- κ Bp65, phospho - NF- κ Bp65 및 β -actin은 Santa Cruz Biotechnology (Paso Robles, CA, USA)에서 구입하였다. N-acetyl-L-cysteine (NAC)은 Tocris (KOMA Biotech, Seoul, Korea)에서 구입하였고, SB203580과 Bay11-7082는 MedChemExpress (Monmouth Junction, NJ, USA)에서 구입하였다. 이외의 모든 시약은 Sigma 사(St. Louis, MO, USA)의 제품을 구입하여 사용하였고, 사용된 시약은 순도가 높은 (순도 99% 이상) 등급을 구입하여 사용하였다.

2.2. 소장상피세포 배양

소장상피세포(INT-407 cells)는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)에서 구입하였으며, DMEM 배지에 10% FBS, 100 U/mL penicillin 및 100 μ g/mL streptomycin을 혼합한 후 37°C의 5% CO₂ 조건의 incubator에서 배양하였다.

2.3. 느릅나무 당단백질 분리 및 정제

Ulmus davidiana Nakai (UDN, 느릅나무)는 전라남도 나주에서 자생한 것을 채취하여 작은 크기로 잘라서 ddH₂O에서 침지 하였다. 용해된 느릅나무 추출물은 Whatman 여과지로 여과하여 불순물을 제거한 후, 여과된 용액에 80% ammonium sulfate 첨가하여 침전시키고 침전물을 투석 반투막(Spectra/por MWCO 6,000 -

8,000, CAL., USA)을 이용하여 4°C의 20 mM Tris - HCl (pH 7.4) 용액에서 12시간 투석하였으며 동결건조기를 이용하여 건조시켰고 -70°C에서 보관하였다. 이후 시료는 0.1% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)가 포함된 10% polyacrylamide gel에서 2시간 30분 동안 110 V, 30mA로 전기영동기(Mini-PROTEIN II, Bio-Rad, CA, USA)를 이용하여 분리한 후 당단백질을 Schiff's reagent로 염색하여 (Neville and Glossmann, 1974), 116 kDa의 분자량을 가진 당단백질을 electro-eluter (Mini Whole Gel Eluter, Bio-Rad, CA, USA)로 용출하였고, 이후 이것들을 동결건조해서 사용하였다.

2.4. 세포내 활성 산소량 측정

세포내 활성 산소량은 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (CM-H₂ DCFDA)를 이용해 측정하였다. 소장 상피세포에 톨루엔과 느릅나무 당단백질을 동시에 처리한 후, 10 mM의 CM-H₂ DCFDA를 30분 동안 처리하고 어두운 곳에서 배양하였다. 대조군의 경우 Phosphate Buffered Solution (PBS)만 처리하였다. 세포내 활성 산소량을 정량하기 위해 fluorescent microplate reader (SPARK, Seestrasse, Männedorf, Switzerland)를 이용하여 495 ~ 530 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였으며, 공초점 레이저 현미경(Olympus Fluoview 300 confocal microscope, Tokyo, Japan)을 이용해 100배 배율로 세포내 발생하는 활성 산소량을 관찰하였다.

2.5. Western blot 분석

Western blot 실험을 수행하기 위해 소장상피세포에 톨루엔과 느릅나무 당단백질을 동시에 처리하고, PBS로 1회 세척한 후 세포 단백질을 추출하였다. 세포 단백질은 단백질 분해 억제제가 포함된 RIPA lysis buffer (20 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% IGEPAL CA-630, 0.1% SDS, 0.5% Sodium deoxycholate)에서 추출되었고, BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용하여 단백질의 농도를 확인하였다. 정량된 단백질들을 0.1% Sodium Dodecyl Sulfate (SDS)가 포함된 10% polyacrylamide gel에 105 V, 30 mA에서 3시간 동안 전기영동기 (LPS solution, Daejeon, Korea; major science, Saratoga, CA, USA)를 이용하여 분리하였고, 이를 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane에 transfer 시킨 후, 5% 탈지분유가 함유된

TBS-Tween 용액(50 mM Tris base, 137 mM NaCl, 0.1 % Tween-20)으로 25°C에서 30분 동안 반응시켰다. 3,000배 희석된 primary antibody와 함께 4°C에서 12시간동안 반응 시킨 후 TBS-Tween 용액으로 세척하고 10,000배 희석된 secondary antibody를 2시간동안 25°C에서 처리하였다. 각 단백질의 발현은 Bio-rad Chemi Doc™ XRS+ System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용해 확인하였고, Scion imaging 소프트웨어 (Scion Image Beta 4.02, Frederick, MD, USA)를 사용하여 단백질 발현 결과를 상대 강도값으로 계산하였다.

2.6. Lactate dehydrogenase (LDH) 분석

소장상피세포에 환경독성물질인 톨루엔과 느릅나무 당단백질을 동시 처리한 후 lactate dehydrogenase (LDH) cytotoxicity assay kit (Thermo Scientific, MA, USA)를 이용하여 세포막 손상 정도를 측정하였다. 약 50 µL의 세포 배양액에 50 µL의 LDH 기질 혼합물을 넣고 30분동안 상온에서 차광하여 반응시킨 후 바탕값인 490 nm와 680 nm에서 fluorescent microplate reader (SPARK, Seestrasse, Männedorf, Switzerland)로 흡광도를 측정하였으며, 측정값 (LDH cytotoxicity)은 [(maximum LDH activity - spontaneous LDH activity)/(compound-treated LDH activity - spontaneous LDH activity)×100]을 이용해 구하였다.

2.7. 통계처리

모든 실험은 3회 반복 실시하였으며, 실험결과는 평균 ± 표준 오차(S.E.)로 나타냈다. 통계적 유의적 차이는 one-way analysis of variance (ANOVA) 이용하여 결정하였으며, p-values < 0.05의 값들을 유의적인 결과로 고려하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 느릅나무 당단백질의 환경독성 제어효과

느릅나무로부터 분리된 116 kDa 느릅나무 당단백질의 세포적 생리활성 능력을 알아보기 위해 환경독성물질 중 하나인 톨루엔(Toluene)을 소장상피세포(INT-407 cells)에 처리하여 느릅나무 당단백질의 환경독성 제어 효과를 알아보았다. 방향족 탄화수소인 톨루엔은 휘발성 유기화합물의 한 종류로서 대기오염물질을 생성하여

환경독성을 유도하거나, 인체 건강에 심각한 부작용을 일으킬 수 있는 것으로 알려져 있다(Morvai et al., 1976). 특히 톨루엔은 1 mM 농도에서도 미토콘드리아 호흡을 억제하여 세포 생존 능력을 감소시킨다는 보고가 있었다(Revilla et al., 2007). Fig. 1A에서 보는 바와 같이, 1 mM의 톨루엔을 소장상피세포에 처리하였을 때 세포막 손상으로 인한 세포독성 지표인 LDH (lactate dehydrogenase) 방출이 시간에 따라 증가함을 관찰할 수 있었다. 특히 톨루엔 처리 후, 4시간째 LDH 방출 수준은 대조군과 비교하여 208% 만큼 유의적으로 증가한 것을 확인할 수 있었다. 흥미롭게도 느릅나무 당단백질 10, 20 및 50 µg/mL를 톨루엔과 4시간 동안 함께 처리하였을 때, LDH 방출 수준을 각각 73, 150 및 183% 만큼 억제되는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1B). 따라서 이와 같은 결과는 톨루엔은 세포막을 손상시켜서 세포독성을 유발한 결과물로서 세포질에 존재하고 있는 LDH를

밖으로 방출시키지만, 느릅나무 당단백질의 경우 특이적인 신호전달 기작을 통해 간접적으로 톨루엔이 유도하는 세포독성 기작을 막고 세포에 활력을 유지시키는 능력을 가지고 있다는 것을 제시한다. 최근에 톨루엔과 동일한 방향족 탄화수소의 한 종류인 벤젠의 경우, 세포에서 LDH 방출을 유도하여 세포독성을 유도한다는 결과가 보고 되었으며 (Dere and Ari, 2009) 이와 정반대로 느릅나무 당단백질의 경우, 섬유아세포 뿐만 아니라 장 상피세포에서도 독성효과를 나타내지 않고 세포를 보호하는 효과가 있다는 결과가 밝혀졌다 (Lee et al., 2004). 따라서 이러한 연구결과들은 방향족 탄화수소가 세포에 미치는 독성효과의 특성과 이를 제어하는 느릅나무 당단백질의 생리활성 능력을 동시에 뒷받침해주고 있음을 시사한다.

3.2. 활성산소종 생성 억제를 통한 느릅나무 당단백질의 환경독성 제어효과

톨루엔이 유도한 세포독성 신호전달 기작을 알아보기 위해 환경독성물질의 일차적 표적인 reactive oxygen species (활성산소종) 발생에 미치는 영향을 알아보았다. 활성산소종은 세포의 일시적 산화적 스트레스 표지자로서, 세포질내의 다양한 단백질의 활성을 조절하여 질환 발생에 영향을 미치는 대표적인 신호전달 물질로 알려져 있다 (Stadtman, 2001). Fig. 2A에서 보는 바와 같이, 1 mM의 톨루엔을 소장상피세포에 처리하였을 때, 세포내 활성산소 발생 수준은 대조군과 비교하여 15분째 일시적으로 49% 만큼 유의적 수준으로 증가한 것을 확인할 수 있었다. 그러나 느릅나무 당단백질 20 µg/mL을 톨루엔과 15분 동안 함께 처리 하였을 때, 세포내 활성산소 방출 수준이 45% 만큼 유의적으로 감소되는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 2B). Fig. 2C는 톨루엔에 의해 유도된 활성산소발생을 억제하는 느릅나무 당단백질의 항산화적 효과를 형광현미경으로 관찰한 결과이다. 최근에 톨루엔과 더불어 많은 문헌에서 환경독성 물질은 활성산소종 발생을 자극함을 통해 세포 손상을 유도한다는 결과가 보고 되었다(Yamaguchi et al., 1999; Simon et al., 2000). 따라서 이와 같은 결과는 느릅나무 당단백질은 세포내 항산화 작용을 촉진함을 통해 환경독성 물질이 유도하는 활성산소종 발생을 제거하여 세포독성을 막는 것을 시사한다.

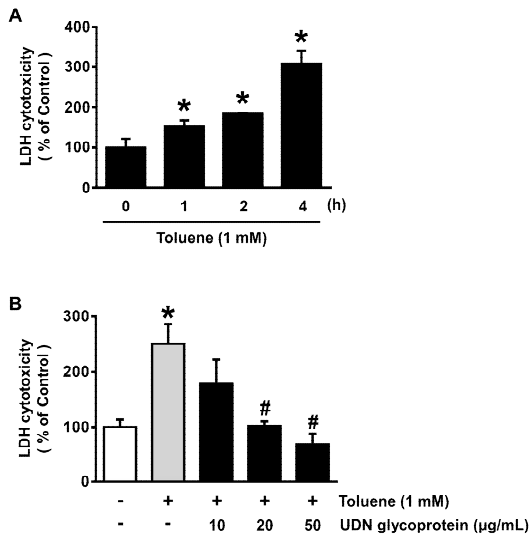


Fig. 1. Inhibitory effect of UDN glycoprotein on the production of LDH in toluene-stimulated INT-407 cells.

(A) Time responses of LDH cytotoxicity in INT-407 cells treated with toluene (1 mM) is shown. Data represent the means \pm S.E. $n = 3$. * $p < 0.05$ versus control. (B) Cells were treated with UDN glycoprotein in the presence of toluene for 4 h. Error bars represent the means \pm S.E. $n = 3$. * $p < 0.05$ versus control. # $p < 0.05$ versus toluene alone.

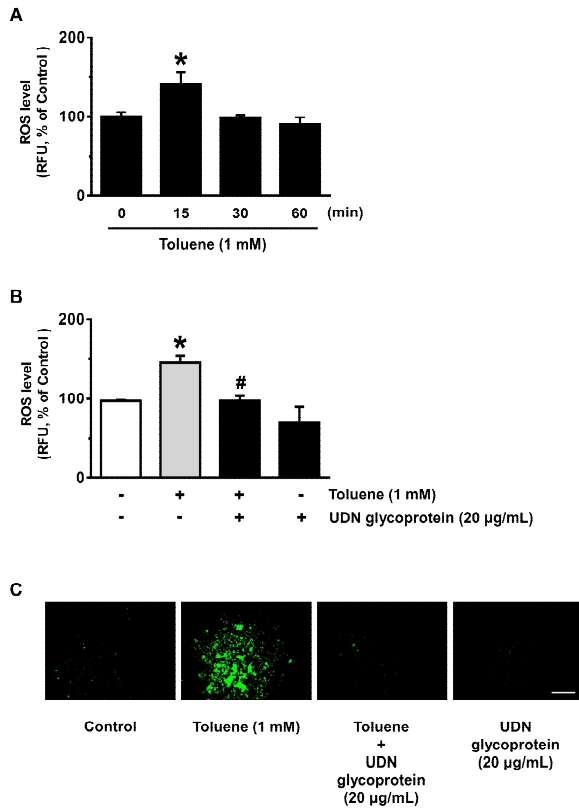


Fig. 2. UDN glycoprotein reduces the production of ROS in toluene-stimulated INT-407 cells. (A) Time responses of ROS production in cells treated with toluene is shown. Data represent the means \pm S.E. $n = 3$. * $p < 0.05$ versus 0 min. (B) Cells were treated with UDN glycoprotein (20 $\mu\text{g/mL}$) in the presence of toluene for 15 min. Data represent the mean \pm S.E. $n = 3$. * $p < 0.05$ versus control. # $p < 0.05$ versus toluene alone. (C) ROS production (green) was visualized by confocal microscopy. Scale bars, 100 μm (magnification $\times 100$). $n = 3$. RFU, relative fluorescence.

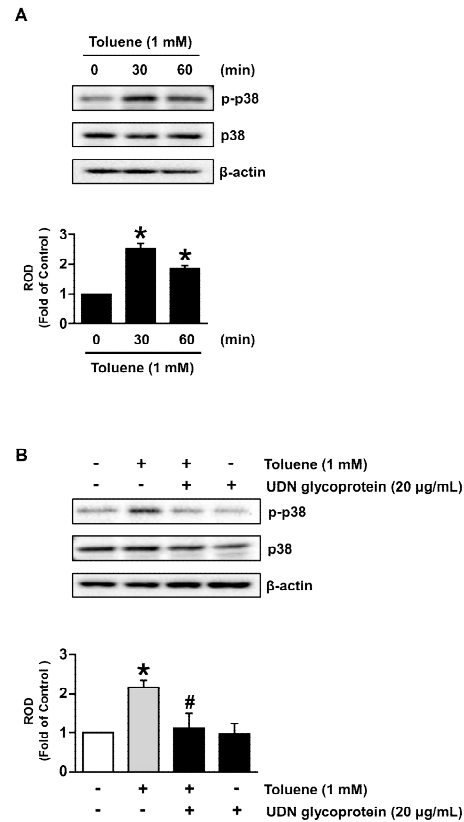


Fig. 3. UDN glycoprotein inhibits the phosphorylation of p38 MAPK in toluene-stimulated INT-407 cells. (A) Time responses of p38 MAPK phosphorylation in cells treated with toluene is shown. Data represent the means \pm S.E. $n = 3$. * $P < 0.01$ versus control. (B) Cells were treated with UDN glycoprotein in the presence of toluene for 30 min. Data represent the means \pm S.E. $n = 3$. * $P < 0.01$ versus control, # $P < 0.01$ versus toluene alone. ROD, relative optical density.

3.3. p38 MAPK의 인산화 억제를 통한 느릅나무 당단백질의 환경독성 제어효과

활성산소종의 대표적인 세포내 하위신호전달인자는 mitogen-activated protein kinase (MPAKs)로 알려져 있으며(Son et al., 2013), MAPKs의 한 종류인 p38 MAPK는 일반적으로 세포가 스트레스를 받는 상황에서 인산화(활성)되는 세포내 신호전달 단백질로서 보고 되

었다(Liu et al., 1995; Raingeaud et al., 1995; Beyaert et al., 1996). Fig. 3A에서 보는 바와 같이, 1 mM의 톨루엔을 소장상피세포에 처리하였을 때, p38 MAPK 단백질 인산화 수준은 대조군과 비교하여 30분째 유의적으로 가장 증가한 것을 확인할 수 있었다. 그러나 느릅나무 당단백질 20 $\mu\text{g/mL}$ 을 톨루엔과 30분 동안 함께 처리하였을 때, p38 MAPK 단백질 활성 수준이 현저하게 감소

되는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 3B). 최근에 p38 MAPK는 pro-inflammatory cytokines 및 자외선 등과 반응하여 인산화되는 것 뿐만 아니라, 환경독성물질과 같은 산화적 자극 등에 의해 활성화 되는 것으로 보고 되었다(Liu et al., 1995; Raingeaud et al., 1995; Beyaert et al., 1996). 따라서 이와 같은 결과는 느릅나무 당단백질은 톨루엔이 유도한 산화적 활성산소종의 발생을 제거함을 통해 p38 MAPK 단백질 인산화 수준을 억제함으로써 세포독성을 막는다는 것을 시사한다.

3.4. NF- κ B의 인산화 억제를 통한 느릅나무 당단백질의 환경독성 제어효과

세포 핵내에 전사인자인 nuclear factor kappa B (NF- κ B)는 p38 MAPK의 대표적인 하위신호전달자로 알려져 있으며, 세포내에서 다양한 스트레스성 유전자 발현조절에 관여하는 것으로 보고 되었다 (Saha et al., 2007). Fig. 4A에서 보는 바와 같이, 1 mM의 톨루엔을 소장상피세포에 처리하였을 때, NF- κ B 단백질 인산화 수준은 대조군과 비교하여 1시간 동안 유의적으로 점차 증가한 것을 확인할 수 있었다. 그러나 느릅나무 당단백질 20 μ g/mL을 톨루엔과 1시간 동안 함께 처리 하였을 때, NF- κ B 단백질 활성 수준이 현저하게 감소되는 것을 관찰할 수 있었다 (Fig. 4B). NF- κ B는 일반적인 상태에서는 세포질에 존재하며, 보통 NF- κ B family인 Rel A(p65), p50, p52, c-Rel, v-Rel 및 Rel B가 서로 homodimer 또는 heterodimer를 이루면서 I κ B라는 inhibitory protein이 결합된 상태로 존재하고 있다가, 톨루엔과 같은 환경독성인자의 자극으로 인하여 NF- κ B가 인산화가 되면 I κ B가 떨어져 나가고, 인산화된 NF- κ B는 핵내로 이동하게 되어 다양한 스트레스성 유전자 발현 조절에 관여하는 것으로 알려져 있다(Birkedal-Hansen, 1993). 이와 같은 결과는 느릅나무 당단백질은 톨루엔이 유도한 p38 MAPK 인산화 억제를 통해 NF- κ B 활성을 제어하고, 핵내로의 이동을 억제함으로써 세포독성을 막는다는 것을 말해준다. 최근에 환경독성물질의 또 다른 종류인 bisphenol A (BPA)의 경우, 세포내 NF- κ B를 활성을 유도하여 세포독성을 유도한다는 결과가 보고 되었으며(Shim et al., 2007), 이와 정반대로 느릅나무 당단백질의 경우, 장 상피세포 뿐만 아니라 간세포에서도 NF- κ B의 활성을 억제하여 세포를 보호하는 효

과가 있다는 결과가 밝혀졌다(Ko et al., 2005). 따라서 이러한 연구결과들은 환경독성물질이 세포에 미치는 독성 신호전달 기작의 특성과 이를 제어하는 느릅나무 당단백질의 생리활성 능력을 동시에 뒷받침해주고 있음을 시사한다.

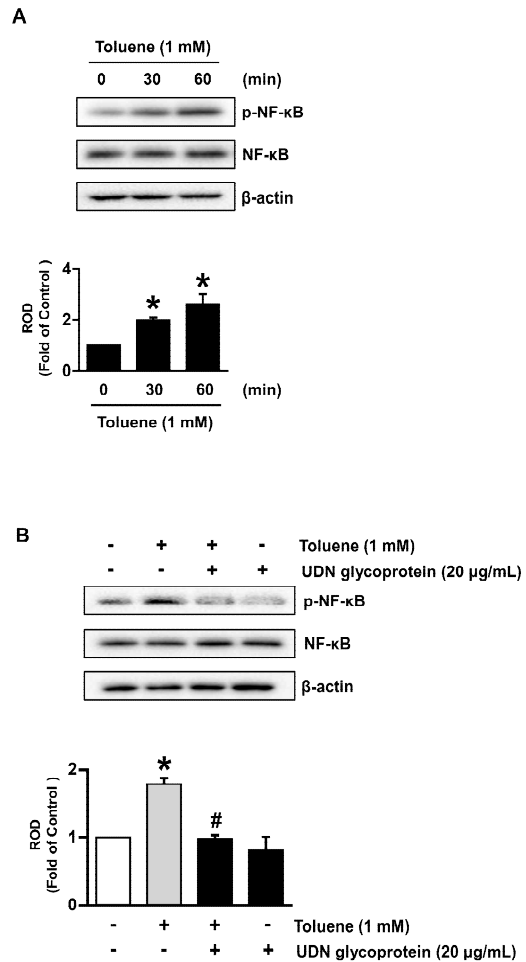


Fig. 4. UDN glycoprotein inhibits the activation of NF- κ B in toluene-stimulated INT-407 cells.

(A) Time responses of NF- κ B phosphorylation in cells treated with toluene is shown. Data represent means \pm S.E. n = 3. *P < 0.05 versus control. (B) Cells were treated with UDN glycoprotein in the presence of toluene for 60 min. Data represent the means \pm S.E. n=3. *P < 0.05 versus control, #P < 0.05 versus toluene alone.

3.5. 느릅나무 당단백질의 환경독성 세포신호전달 기전 제어효과

마지막으로 톨루엔에 의해 유도된 환경독성의 세포 신호전달기전을 확인하기 위해 상기에서 밝혀진 환경독성 신호전달 표적인자의 억제제들을 처리하여, 세포독성 지표인 LDH 방출 수준을 측정하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이, 1 mM의 톨루엔을 소장상피세포에 처리하였을 때, LDH 방출 수준은 대조군과 비교하여 4시간 동안 유의적으로 185% 만큼 증가한 것을 확인할 수 있었다. 그러나 활성산소종의 저해제인 N-acetylcysteine (NAC), p38 MAPK의 저해제인 SB203580 그리고 NF-κB의 저해제인 Bay 11-7082를 톨루엔과 4시간 동안 함께 처리 하였을 때, 세포적 LDH 방출 수준이 각각 140%, 226% 그리고 205% 만큼 현저하게 감소되는 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 이와 같은 결과는, 환경독성물질인 톨루엔은 활성산소종 발생을 통해, p38 MAPK 그리고 NF-κB의 활성을 조절함으로써 세포손상을 일으켜 LDH 방출을 촉진하며, 느릅나무 당단백질의 경우 강력한 항산화력을 바탕으로 톨루엔의 세포적 신호전달기전을 억제하는 환경독성 억제 물질이라는 것을 시사한다.

지금까지의 연구를 종합해 볼 때, 느릅나무로부터 분리된 116 kDa 느릅나무 당단백질은 환경독성물질인 톨루엔이 유도한 소장상피세포의 산화적 스트레스를 억제

함을 통해, 세포내 활성산소종을 소거하고, p38 MAPK 및 NF-κB의 인산화 억제를 통해 다양한 환경독성 연관 유전자 발현을 조절하여 환경독성 세포신호전달 기전을 차단하는 탁월한 약리학적 기능을 가지고 있음을 알 수 있다. 향후 느릅나무 당단백질의 환경독성 세포신호전달 기전에 대한 분자생물학적인 연구로서, 환경독성물질의 수용체 작용기전에 대한 실험이 더 필요하며, 환경독성에 의한 상피세포 유해 메커니즘을 더욱 이해하는 연구가 수행되어야 할 것이다.

4. 결론

느릅나무(*Ulmus davidiana* Nakai, UDN)는 예로부터 부종, 유방염, 위궤양 및 위암 등에 효과를 가진 전통 약재로 사용되어 왔다. 본 연구에서는 느릅나무로부터 추출된 116 kDa의 식물성 당단백질(UDN glycoprotein)을 이용하여 휘발성 유기화합물인 톨루엔(Toluene)이 유도하는 환경독성 메커니즘을 제어하는 효과를 알아보았다. 느릅나무 당단백질은 소장상피세포(INT-407 cells)에서 환경독성 방향족 탄화수소인 톨루엔이 유도한 lactate dehydrogenase (LDH) 방출을 유의적으로 억제하는 능력을 가지고 있었다. 이러한 느릅나무 당단백질의 환경독성 제어효과는 톨루엔의 일차적 생체표지자인 세포내 활성산소종(reactive oxygen species) 발생을 억제하는 항산화 효과와 관련이 있었다. 느릅나무 당단백질은 톨루엔이 유도한 세포독성 신호전달물질인 p38 mitogen-activated protein kinase (MPAKs)의 인산화 및 산화적 스트레스성 전사인자인 nuclear factor-kappa B (NF-κB)의 활성을 통해 유도되는 환경독성 세포 신호전달기전을 차단하는 약리학적 효과를 보여 주었다. 이러한 결과를 종합해 보면 느릅나무 당단백질은 강력한 항산화 효과를 바탕으로 톨루엔이 유도한 장 상피세포의 산화적 스트레스를 억제함으로써 활성산소종을 저해할 뿐만 아니라, p38 MAPK와 NF-κB의 활성을 억제함으로써 소장상피세포의 환경독성 신호전달기전을 막는 효과적인 환경독성 신호전달기전 제어제라고 요약할 수 있다.

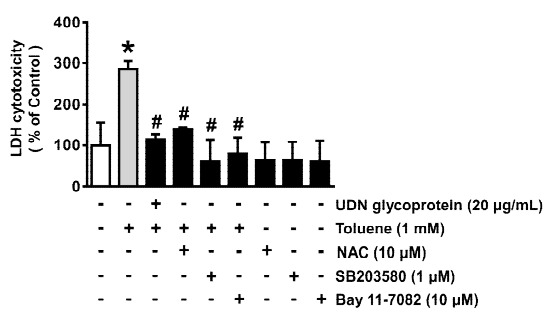


Fig. 5. UDN glycoprotein inhibits ecotoxic signaling pathway in toluene-stimulated INT-407 cells. Cells were pretreated with NAC (10 μM), SB203580 (1 μM), and Bay 11-7082 (10 μM) for 30 min and then exposure to UDN glycoprotein and toluene for 4 h. The cytotoxicity of cell was determined by LDH cytotoxicity assay. Data represent the means ± S.E. n=3. *P < 0.01 versus control, #P < 0.01 versus toluene alone.

감사의 글

이 논문은 경산시가 지원한 경산시 메디 챌린저 육성 사업 (과제번호 : 2018040049) 으로 지원을 받아 수행

된 연구 결과입니다.

REFERENCE

- Beyaert, R., Cuenda, A., Vanden Berghe, W., Plaisance, S., Lee, J. C., Haegeman, G., Cohen, P., Fiers, W., 1996, The p38/RK mitogen-activated protein kinase pathway regulates interleukin-6 synthesis response to tumor necrosis factor, *EMBO J.*, 15, 1914-1923.
- Birkedal-Hansen, H., 1993, Role of cytokines and inflammatory mediators in tissue destruction, *J. Periodontal Res.*, 28, 500-510.
- Csete, M., 2005, Oxygen in the cultivation of stem cells, *Ann. N Y Acad Sci.*, 1049, 1-8.
- Dere, E., Ari, F., 2009, Effect of benzene on liver functions in rats (*Rattus norvegicus*), *Environ Monit Assess*, 154, 23-27.
- Filley, C. M., Halliday, W., Kleinschmidt-DeMasters, B. K., 2004, The effects of toluene on the central nervous system, *J Neuropathol Exp Neurol*, 63, 1-12.
- Foo, S. C., Jeyaratnam, J., Koh, D., 1990, Chronic neurobehavioural effects of toluene, *Br J Ind Med.*, 47, 480-84.
- Ko, J. H., Lee, S. J., Lim, K. T., 2005, 116 kDa glycoprotein isolated from *Ulmus davidiana* Nakai (UDN) inhibits glucose/glucose oxidase (G/GO)-induced apoptosis in BNL CL.2 cells, *J Ethnopharmacol*, 100, 339-346.
- Lee, E. H., Park, C. W., Jung, Y. J., 2013a, Anti-inflammatory and immune-modulating effect of *Ulmus davidiana* var. *japonica* Nakai extract on a macrophage cell line and immune cells in the mouse small intestine, *J Ethnopharmacol*, 146, 608-613.
- Lee, H. S., Jang, M. S., Kim, J. H., Hong, C. P., Lee, E. J., Jeun, E. J., Kim, C., Kim, E. K., Ahn, K. S., Yang, B. G., Ahn, K. S., Jang, Y. P., Ahn, K. S., Kim, Y. M., Jang, M. H., 2013b, *Ulmus davidiana* var. *japonica* Nakai upregulates eosinophils and suppresses Th1 and Th17 cells in the small intestine, *PLoS One*, 8, e76716.
- Lee, S. J., Heo, K. S., Oh, P. S., Lim, K., Lim, K. T., 2004, Glycoprotein isolated from *Ulmus davidiana* Nakai inhibits TPA-induced apoptosis through NF- κ B in NIH/3T3 cells, *Toxicol Lett*, 146, 159-174.
- Lee, S. J., Lim, K. T., 2009, Glycine- and proline-rich glycoprotein regulates the balance between cell proliferation and apoptosis for ACF formation in 1,2-dimethylhydrazine-treated A/J mice, *Mol Cell Biochem*, 325, 187-197.
- Liu, Y., Gorospe, M., Yang, C., Holbrook, N. J., 1995, Role of MAPK phosphatase during the cellular response to genotoxic stress. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase activity and AP-1-dependent gene activation, *J Biol Chem*, 270, 8377-8380.
- Lolin, Y., 1989, Chronic neurological toxicity associated with exposure to volatile substances, *Hum. Toxicol*, 8, 293-300.
- Mattia, C. J., LeBel, C. P., Bondy, S. C., 1991, Effects of toluene and its metabolites on cerebral reactive oxygen species generation, *Biochem Pharm*, 42, 879-882.
- Morvai, V., Hudak, A., Ungvary, G., Varga, B., 1976, ECG changes in benzene, toluene and xylene poisoned rats, *Acta Med Acad Sci Hung*, 33, 275-286.
- Neville, D. M., Jr., Glossmann, H., 1974, Molecular weight determination of membrane protein and glycoprotein subunits by discontinuous gel electrophoresis in dodecyl sulfate, *Methods Enzymol*, 32, 92-102.
- Raingaud, J., Gupta, S., Rogers, J. S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R. J., Davis, R. J., 1995, Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 MAPK activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine, *J Biol Chem*, 270, 7420-7426.
- Revilla, A. S., Pestana, C. R., Pardo-Andreu, G. L., Santos, A. C., Uyemura, S. A., Gonzales, M. E., Curti, C., 2007, Potential toxicity of toluene and xylene evoked by mitochondrial uncoupling, *Toxicol In Vitro*, 21, 782-788.
- Saha, R. N., Jana, M., Pahan, K., 2007, MAPK p38 regulates transcriptional activity of NF- κ B in primary human astrocytes via acetylation of p65, *J Immunol*, 179, 7101-7109.
- Sarma, S. N., Kim, Y. J., Song, M., Ryu, J. C., 2011, Induction of apoptosis in human leukemia cells through the production of reactive oxygen species and activation of HMOX1 and Noxa by benzene, toluene, and o-xylene, *Toxicology*, 280, 109-117.
- Shim, J. U., Lee, S. J., Oh, P. S., Lim, K. T., 2007, Glycoprotein isolated from *morus indica* linne has an antioxidative activity and inhibits signal factors induced by bisphenol A in Raw 264.7 Cells, *Korean J*

- Food Sci Technol, 39, 209-216.
- Simon, H. U., Haj-Yehia, A., Levi-Schaffer, F., 2000, Role of reactive oxygen species in apoptosis induction, *Apoptosis*, 5, 415-418.
- Son, Y., Kim, S., Chung, H. T., Pae, H. O., 2013, Reactive oxygen species in the activation of MAPK, *Methods Enzymol*, 528, 27-48.
- Stadtman, E. R., 2001, Protein oxidation in aging and age-related diseases, *Ann. N Y Acad Sci.*, 928, 22-38.
- Um, M. Y., Choi, W. H., Ahn, J. Y., Ha, T. Y., 2013, Effects of ethanolic extract of *Ulmus davidiana* root on lipid metabolism in high-fat diet fed mice, *Korean J Food Nut*, 26, 8-14.
- Yamaguchi, F., Yoshimura, Y., Nakazawa, H., Ariga, T., 1999, Free radical scavenging activity of grape seed extract and antioxidants by electron spin resonance spectrometry in an H₂O₂/NaOH/DMSO system, *J Agric Food Chem*, 47, 2544-2548.
- Yoshida, T., Ogawa, M., Goto, H., Ohshita, A., Kurose, N., Yokosawa, F., Hirata, M., Endo, Y., 2011, Clinical findings of the patients with sick building syndrome and the results of environmental measurement, *Sangyo Eiseigaku Zasshi*, 53, 25-32.
-
- 김도완, 대구한의대학교 제약공학과 학부생
sosr200211@gmail.com
 - 김지윤, 대구한의대학교 제약공학과 대학원생
gksmf6355@gmail.com
 - 박문기, 대구한의대학교 제약공학과 교수
moonki@dhu.ac.kr
 - 이세중, 대구한의대학교 제약공학과 교수
sjlee@dhu.ac.kr