ISSN : 1225-9918
Journal of Life Science **2012** Vol. 22. No. 1. 117~125 DOI : http://dx.doi.org/10.5352/JLS.2012.22.1.117

Hepatoprotective Effects of Various Enzyme Hydrolysates from Oysters on Tacrine-Induced Toxicity in Human Hepatoma Cells

Hye Jin Park[1], Hyung Joo Do[1], Ok Ju Kim[1], Andre Kim[1] and Jong-Myung Ha[1,2]*

[1]*Department of Bioscience and Biotechnology, Graduate school, Silla University, Busan 617-736, Korea*
[2]*Department of Pharmaceutical Engineering, College of Medical & Life Science, Silla University, Busan 617-736, Korea*

Received December 2, 2011 / Revised December 12, 2011 / Accepted January 19, 2012

This study investigated the potential hepatoprotective benefits of *Crassostrea gigas* oyster hydrolysates. Oysters are known to have many biofunctional properties. In particular, oyster enzymatic hydrolysates produce substances with beneficial functions. The potential hepatoprotective effects of *C. gigas* hydrolysates against damage induced by tacrine were evaluated *in vitro* in HepG2 cells. Peptides were generated from *C. gigas* by enzymatic hydrolysis with Neutrase, Flavourzyme, or Protamex enzyme preparations. Tacrine treatment induced considerable cell damage in HepG2 cells, as shown by significant leakage of glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) and lactate dehydrogenase (LDH). Cells treated with *C. gigas* hydrolysates showed an increased resistance to oxidative challenge compared to control cells, as revealed by higher cell survival against tacrine-induced hepatotoxicity. In addition, treatment with *C. gigas* hydrolysates reduced the leakage of GOT and LDH. These findings indicate that enzyme hydrolysates derived from *C. gigas* may be of benefit for developing hepatoprotective foods and drugs.

Key words : *Crassostrea gigas,* oyster enzyme hydrolysates, tacrine, hepatoprotective, oligopeptide

서 론

간질환은 과도한 스트레스, 음주, 흡연 및 약물복용 등에 의하여 빈번히 일어나고 있는 인체에 치명적인 질병으로 사회적 관심의 대상이 되고 있다[33]. 간은 인체에서 가장 큰 장기(성인 남자: 1~1.3 kg, 성인여자: 0.9~1.1 kg)이며[20], 소화 배설 기능, 영양소 저장, 새로운 물질합성, 해로운 화학 물질을 해독시키는 인체의 중요한 역할을 담당하고 있으며[4,31], 약물대사의 주요 기관이다. 또한 질병의 치료 목적으로 생체 내로 들어온 약물과 같은 외부 물질이 간을 통과함으로써 여타의 장기에 비해 손상될 수 있는 확률이 높다. 현재, 사용 중인 의약품 중 600종 이상이 급성 또는 만성 간 손상을 유발할 수 있다고 보고되어 있어[9], 이 문제에 대한 심각성이 대두되고 있다. 간 독성의 부작용이 알려진 의약품 중에 타크린을 예로 들 수 있는데 타크린(tacrine; 1,2,3,4-tetrahydro-9-aminoacridine hydrochloride)은 아세틸콜린에스테라제(acetylcholinesterase) 저해제로서 알츠하이머 증후군의 치료제로 사용되고 있다. 그러나 이 약물을 복용하는 환자의 30~50% 정도가 가역성 간 손상이 유발되므로 신중한 투여가 요구되어지며[34], 산화적 스트레스가 간 독성 유발 기전 중 하나이다[26].

약물 유발성 간 손상 인 hepatocellular 또는 cytotoxic injury는 대사 또는 면역매개로 발생되는데, 대사성 손상은 약물이나 그 대사체와 세포내 단백질, DNA간 공유결합으로 발생하며, 면역 매개성 세포독성은 외인성 물질의 생체내 변환으로 생성된 hapten이나 부가물이 간세포막으로 이동하여 면역반응을 일으킴으로 발생되게 된다. 타크린의 대사는 앞서 말한 바와 같이 약물 또는 대사체와 세포내 단백질 또는 DNA간 공유결합을 통하여 free radical, reactive oxygen species, electophilic radicals을 형성하여 이온 농도 구배를 혼란 시키거나 세포막, actin, ATP 생성을 저해하여 necrosis 또는 apoptosis를 일으킨다[30].

굴은 바다의 우유라 할 만큼 몸에 좋은 건강식품으로 알려져 있으며, 날 것을 식용하지 않는 서양에서도 생굴은 널리 식용되고 있다[2]. 영양 성분으로는 글리코겐, 타우린, 단백질, 비타민은 물론 다양한 미네랄을 함유하고 있다[13,12,32]. 예로부터 콜레스테롤 감소에 의한 고혈압, 동맥경화, 심장병 예방 등에 효과가 있으며 알칼리성 체질을 만들고 중금속 해독 기능을 갖고 있으며 심장, 간장, 췌장 등 장기의 기능을 높이는 강장 및 스테미너 식품으로 알려져 있다[5,7,11,23,25,36]. 그러나 굴 혹은 굴 효소 가수분해물이 간에 미치는 영향에 관한 연구와 간 기능 개선효과에 대한 연구는 아직 미미한 실정이다.

단백질이 효소에 의해 가수분해되면 free amino acids, oligopeptide 및 저분자 단백질 등이 생성되는데, 가수분해 과정 중 분자량이 감소하고, 분자구조의 변화에 따른 소수성 잔기가 노출되는 등으로 인하여 가수분해산물은 본래의

***Corresponding author**
Tel : +82-51-999-5467, Fax : +82-51-999-5636
E-mail : jmha@silla.ac.kr

단백질과는 다른 물리화학적 특성을 갖게 된다[29]. 단백질 가수분해물은 본래 단백질에 비해 용해성이 높아 식품에서 사용될 때 열변성이 적고, 고농도 용액에서도 점도가 낮아 이유식 등에 응용되고 있다. 또한 적절한 분자량의 peptide는 유화능이 우수하여 젤 형성능이나 수분 및 지방흡수력도 높은 것으로 알려져 있다[15,21]. 특히, 단백질의 효소적 가수분해는 기질 특이성으로 인하여 효소 선택에 따라 생성물을 제어하기 용이하며, 단백질의 종류, 분해조건, 정제방법을 달리하여 단백질을 특정 목적에 맞는 기능성을 부여하기 위한 방법으로 널리 사용되어 왔다[19,27]. 가수분해를 산으로 할 경우 tryptophan과 cystein 같은 아미노산이 분해 소실되고[17], 알칼리로 분해 할 경우 lysinoalanine (N-DL-(amino-2-carbox-yethyl)-L-lysine)과 같은 독성물질이 생성되어 안정성 문제가 대두되는 반면 효소적 가수분해는 영양적으로도 우수하고 산, 알칼리 가수분해에 비해 독성이 거의 없으며, 생성되는 염의 양도 적기 때문에 새로운 식품소재를 제조하는데 좋은 방법이라 할 수 있다[12].

따라서 본 연구는 굴 효소 가수분해 단백질로부터 간 보호활성을 탐색할 목적으로 간에 대한 독성과 *in vitro* 상에서 생체이물 대사에 관한 연구의 좋은 모델로 사용되는 HepG2 세포[18]를 이용하여 타크린으로 독성을 유발한 간 세포 독성에 대한 보호 효과를 탐색하였다.

재료 및 방법

시약 및 기기

참굴(*Crassostrea gigas*, 각장 4.6±2.3 cm, 각중 9.9±3.2 g)은 경남 통영 연안의 양식장에서 채취하여 인근의 가공공장에서 Individual Quick Frozen (IQF)으로 가공한 제품으로서 냉동 보관된 제품을 가수분해 시료로 사용하였다.

굴 효소 가수분해물을 제조하기 위해서 사용한 상업적 효소들 중에서 Neutrase, Flavourzyme, Protamex은 Novozyme 사(Busan, Korea)에서 구입하여 사용하였다.

HepG2 세포 배양에 사용한 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)과 Fetal Bovine Serum (FBS)와 배지용 항생제(Penicillin-Streptomycin Mixture)와 Phosphate Buffered Saline (PBS), Trypsin-Versene (EDTA) Mixture는 Lonza 사(Switzerland)에서, 세포생존율을 측정하기 위한 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 시약은 Sigma에서 구입하였다. Dimethyl sulfoxide (DMSO)와 silymarin 등은 Sigma 사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 기타 일반 시약들은 특급 시약을 사용하였다. 세포배양용 culture dish, 96-well plate, 6-well plate, corning tube는 SPL (Gyeonggido, Korea)을 사용하였다.

효소 가수분해 방법

Jang [6]의 방법을 변형하여 Neutrase, Flavourzyme, Protamex를 이용한 굴 가수분해물을 제조 하였다. 즉, 냉동굴 1,000 g을 1분 동안 끓는 물에 데치고, 수도수를 2배 양을 가한 후 마쇄하였다. 마쇄물의 단백질 농도에 대하여 1%의 농도가 되도록 각각의 효소를 첨가하여 반응 시켰다. Neutrase는 첨가 후 50℃에서, Flavourzyme은 첨가 후 55℃에서, Protamex는 첨가 후 40℃에서 2시간 동안 처리한 후 100℃에서 10분간 가열 처리하여 불활성화 시켰다. 이렇게 재조한 각각의 효소 가수분해물들은 원심분리(Model SUPRA 21K, Hanil science Industrial, Co., Ltd, Korea) 하여 불용성 물질을 제거하였고, 상층액과 잔사를 동결 건조하여 건조 분말을 만든 후 -20℃에서 보관하면서 실험에 사용하였다(Fig. 1).

DPPH radical-scavenging 활성 측정

Brand 등[3]의 방법에 의해 0.1 mM DPPH용액 1.0 ml을 취하여 0.5 ml의 시료와 혼합하고 20분 후 UV spectrophotometer (Mecasys, Optizen 2120UV, Korea)로 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성 대조군으로는 1 ml DPPH에 시료 대신 0.5 ml 증류수를 가한 용액을 사용하였고 양성 대조군으로는 ascorbic acid를 사용하였고 DPPH에 의한 라디칼 소거활성을 다음 공식으로 계산하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = [(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$$

A_0=시료대신 증류수를 첨가한 반응액의 흡광도

A_1=시료를 첨가한 반응액의 흡광도

SOD 활성 측정

각 시료의 SOD 활성은 SOD assay kit-WST (Dojindo,

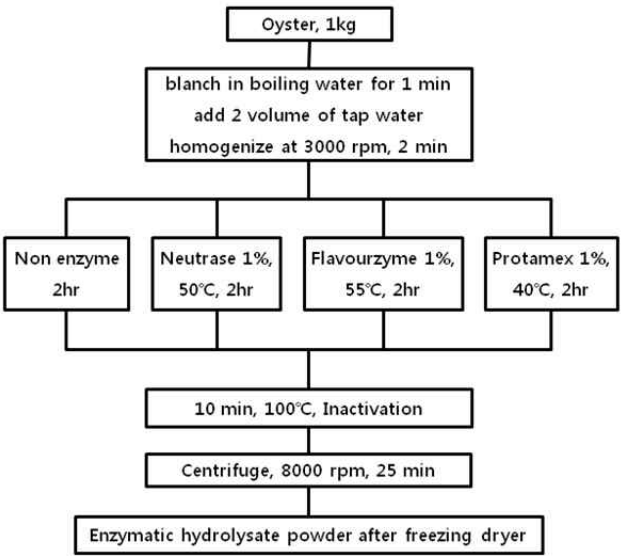

Fig. 1. Procedure for preparation of enzymatic hydrolysate.

Japan)를 사용하였다. 96 well plate를 이용하여 각각의 시료 20 µl를 WST-1 용액 200 µl, enzyme용액 20 µl와 반응시키고, blank는 시료대신 증류수를 첨가하여 37℃에서 20분간 반응시키고 난 후, ELISA reader (Molecular Devices, Spectra MAX 250, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD 활성은 시료 첨가구와 blank의 흡광도 비로 나타내었다.

세포의 배양

실험에 사용한 Human hepatocellular carcinoma인 HepG2 (KCLB, 88065) 세포는 한국 세포주 은행에서 구입하였다. 간암 세포주인 HepG2 세포는 10% FBS가 함유된 DMEM 배지를 사용하여 37℃에서 5% CO_2, 95% O_2가 유지되도록 CO_2 incubator (Galaxy 170S, New Brunswick, UK)에서 배양하였다. 이 때 세포의 오염이나 증식을 억제하기 위해 1% Penicillin-Streptomycin Mixture을 첨가하였다. 세포가 80% 정도 dish를 덮으면 Phosphate Buffered Saline로 2회 세척한 후 Trypsin-Versene (EDTA) Mixture 을 3분 동안 처리하여 세포를 분리시킨 후 계대 배양하였으며 배지는 24시간마다 교환하였다.

시료의 조제

굴 분획물인 Oyster (이하 O)와 식용으로 사용 가능한 효소인 Neutrase, Flavourzyme, Protamex으로 각각 굴을 효소 가수분해하여 만든 분획물(이하 N, F, P)은 phosphate buffered saline (PBS) 용액에 녹여 사용하여 최종농도가 각각 100 µg/ml, 200 µg/ml, 250 µg/ml 및 500 µg/ml 이 되도록 하여 사용하였다. 간 보호 기능이 밝혀진 Silymarin은 최종농도가 20 µg/ml 이 되도록 하여 실험에 사용하였다.

굴 분획물(O) 및 효소별 굴 가수분해물(N, F, P)의 간세포 독성 측정

배양한 인간 간암 세포주인 HepG2 세포를 PBS로 2회 세척한 다음 Trypsin-Versene (EDTA) Mixture를 3분 동안 처리하여 세포를 분리시키고 serum free DMEM로 각 well당 2.5×10^5 cells/ml로 조절하여 100 µl씩 96 well plate에 넣은 다음 37℃에서 5% CO_2, 95% O_2가 유지되는 CO_2 incubator에서 24시간 동안 예비 배양하였다. 배지를 제거한 후 준비된 시료를 농도별로 처리한 serum free DMEM으로 24시간 배양한 후, MTT assay를 실시하였다.

타크린에 의한 간독성 확인

굴 분획물(O) 및 효소별 굴 가수분해물(N, F, P)의 간세포 독성 측정과 동일한 방법으로 예비 배양한 후 타크린에 의한 간독성을 확인하였다. 예비 배양된 배지를 제거한 후 타크린을 PBS에 녹여 농도(0~1.8 mM) 별로 처리한 후 2시간 배양한 후, MTT assay를 실시하였다.

타크린 유발 독성에 대한 간세포 보호활성 검색

굴 분획물(O) 및 효소별 굴 가수분해물(N, F, P)의 간세포 독성 측정과 동일한 방법으로 예비 배양한 후 타크린에 의한 간독성을 확인하였다. 예비 배양된 배지를 제거한 후 농도 별로 희석한 시료 용액인 O, N, F, P을 첨가하여 24시간 배양한 다음, 1.2 mM 타크린을 처리한 후 2시간 배양한 후, MTT assay를 실시하였다.

MTT assay를 이용한 세포 독성 측정

5 mg/ml이 되도록 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide를 PBS에 용해한 MTT용액을 10 µl씩 가하고 37℃에서 5% CO_2, 95% O_2가 유지되는 CO_2 incubator에서 4시간 동안 방치하고 상등액을 제거한 뒤 DMSO 200 µl를 넣고 10분간 실온에서 방치하여 formazan을 용해시키고 ELISA plate reader (Spectra MAX 250, Molecular Devices, USA)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정한다. 양성 대조 약물은 silymarin을 사용하였다.

세포 배양액 내 glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) 활성도 측정

간세포 손상 시 배양액으로 유리되어 나오는 GOT의 양을 측정함으로써 간세포 손상 여부를 확인할 수 있다. 이 측정법의 원리는 기질액인 L-aspartic acid 및 α- ketoglutaric acid가 GOT에 의하여 oxaloacetic acid로 변하여 정색시액인 2,4-dinitrophenyl hydrazine 과 반응하여 Hydrazone이 생성되며 0.4 N NaOH용액을 사용하여 적갈색으로 발색시킨 후 비색을 측정하였다. GOT 활성도 측정을 위해 간세포를 free serum DMEM에 5×10^5 cells/ml로 6 well에 3 ml씩 분주하여 24시간 예비 배양한 다음 굴 분획물(O) 및 효소별 굴 가수분해물(N, F, P)을 처리하여 37℃에서 5% CO_2, 95% O_2가 유지되는 CO_2 incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후 타크린(최종농도 1.2 mM)을 첨가하고 이를 다시 5시간 동안 배양한 다음 각각의 세포 배양액을 2 ml EP tube에 회수하여 1,200 rpm에서 2분간 원심분리(Model SUPRA 21K, Hanil science Industrial, Co., Ltd, Korea)한 후 그 상등액을 취하였다. 회수한 상등액은 아산제약에서 구입한 GOT assay kit (ASAN parm, seoul, Korea)를 이용하여 GOT 활성을 측정하였다. GOT 측정용 기질액인 L-aspartic acid 및 α- ketoglutaric acid 1 ml을 37℃에서 5분간 방치한 다음 배양액 0.2 ml과 잘 혼합하여 37℃에서 60분간 방치한다. 정색시액인 2,4-dinitrophenyl hydrazine을 1 ml 첨가하여 실온에서 20분 방치한 다음, 0.4 N NaOH용액 10 ml과 잘 혼합하여 실온에서 10분간 방치한 다음 505 nm에서 증류수를 대조로 UV/Vis spectrophotometer (Mecasys, Optizen 2120UV, Korea)를 사용하여 흡광도를 측정한다. 양성 대조 약물로는 현재 간 보호 작용이 있는 것으로 알려진 Silymarin을 사용하였다.

세포 배양액 내 lactate dehydrogenase (LDH) 측정

굴 분획물(O) 및 효소별 굴 가수분해물(N, F, P)의 간세포 손상에 대한 영향을 조사하기 위해 배지내의 LDH 활성을 측정하였다. LDH 활성은 GOT 활성 측정과 동일한 방법으로 세포실험을 수행한 후 세포 배양액을 취한 다음 아산제약에서 구입한 LDH assay kit (ASAN parm, seoul, Korea)를 이용하여 LDH 활성을 측정하였다. 이 측정법의 원리는 pyruvic acid와 $NADH_2$가 LDH에 의해 lactic acid가 생성되고 $NADH_2$는 NAD로 될 때, 이 반응에서 소비된 $NADH_2$의 감속속도를 측정하여 LDH를 340 nm에서 UV/Vis spectrophotometer를 사용하여 흡광도를 측정한다. 양성 대조 약물로는 현재 간 보호 작용이 있는 것으로 알려진 Silymarin을 사용하였다.

아미노산 분석

굴 분획물(O) 및 효소별 굴 가수분해물(N, F, P) 0.1 g을 100 ml의 Sodium loding buffer에 녹인 후 1 ml을 취하여 membrane filter 0.20 μm로 여과시켜 Amino Acid Analyzer (Biochrom 30, Biochrom Ltd , UK)를 이용하여 정량 분석하였다.

통계

실험한 결과의 통계처리는 SPSS 12.0 program을 이용하여 각 실험군의 평균과 표준 편차로 나타냈으며, 각 군의 비교는 유의수준은 p<0.001에서 One-way ANOVA test로 나타내었으며, 유의성 검증은 Duncan's multiple range test를 이용하였다.

결과 및 고찰

굴 분획물(O) 및 효소별 굴 가수분해물(N, F, P)의 항산화 활성

DPPH 분자 내 질소는 쉽게 전자를 받아들임으로써 본래의 짙은 자색이 탈색됨으로서 항산화 물질의 전자 공여능을 측정할 수 있는 실험 방법으로 DPPH법이 항산화 활성을 측정하는 유용한 방법으로 잘 알려져 있다[1]. Free radical은 인체 내에서 각종 질병과 노화를 일으키는 원인물질이기 때문에 이들과 반응하여 그 활성을 소거시키는 능력을 지닌 항산화제로 작용할 수 있는 물질을 탐색할 필요성이 있다[8]. SOD는 항산화 효소로서 세포에 해로운 환원 산소를 과산화수소로 전환 시키는 반응($2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$)을 촉매 하는 효소이며, SOD에 의해 생성된 H_2O_2는 peroxidase나 catalase에 의하여 무해한 물분자와 산소분자로 전환되어 산소 상해로부터 생체를 보호하는 역할을 하는 효소이다[22]. 굴 분획물 및 굴 효소 가수분해물의 DPPH radical scavenging 및 SOD 활성 측정 결과는 Table 1에서와 같이 가장 높은 활성을 가지고 있는 것은

Table 1. Effect of O, N, F and P[1] on DPPH[2] radical scavenging and SOD[3] activity

No.	Sample	DPPH radical scavenging activity(%)	SOD activity (%)
1	Ascorbic acid[4]	92.47±0.74[a]	97.64±0.78[a]
2	non enzyme (O)	65.17±0.94[c]	76.02±2.13[b]
3	Neutrase (N)	63.89±1.64[c]	30.49±3.38[d]
4	Flavourzyme (F)	67.10±1.04[b]	30.16±1.85[d]
5	Protamex (P)	69.65±0.53[b]	41.09±2.50[c]

[1]Sample concentration in the reaction system was 2 mg/ml.
[2]1,1-Diphenyl-2-picryl-hydrazil.
[3]Superoxide dismutase.
[4]Positive control.
[5]Values are presented as the means±SE derived from three determinations. Means with alphabet (a, b, c, d) are not significantly different at p<0.001.

Protamex를 이용한 굴 효소 가수분해물이 가장 높은 활성을 가지며, 그 활성은 69.65±0.53%의 활성이었다. Flavourzyme을 이용한 효소 가수분해물 F는 67.10±1.04%의 활성을 나타내었다. 굴 분획물인 O와 Neutrase를 이용한 효소 가수분해물에서는 각각 65.17±0.94%, 63.89±1.64%의 DPPH radical scavenging 활성을 보였다. Ranathunga 등[28]은 단백질이 가수분해 되면 free amino acids와 저분자 peptide가 생성되며 이들의 크기, 함량, 구조나 구성하고 있는 아미노산의 종류, 배열순서 등 복합적인 작용에 의하여 항산화 효과를 나타낸다고 하였고, peptide 크기가 항산화 활성에 영향을 준다는 보고도 있다[14]. 이것으로 보았을 때, 다양한 효소 처리에 의하여 항산화 활성이 높은 peptide가 만들어져 다른 DPPH radical scavenging 활성이 나타난 것이라 생각된다. SOD 활성 측정 결과에서는 굴 분획물인 O의 활성이 76.02±2.13%로 가장 높았으나, 다양한 효소 가수분해물에서는 항산화 활성이 떨어진 결과를 보였다. 이것은 Wu 등[35]도 free amino acids와 small peptides의 크기, 함량, 조성의 변화에 따라 항산화 활성에 영향을 준다고 하였고, Jun 등[10]의 보고에서도 기질, 효소의 종류, 효소 첨가량, 가수분해 시간, 온도 등의 가수분해 조건이 단백질 가수분해물의 항산화활성에 영향을 준다고 보고한 바 있다.

굴 분획물(O) 및 효소별 굴 가수분해물(N, F, P)의 간세포 독성

시료들이 간세포의 손상 및 세포괴사에 대해 보호 효과가 있는지 여부를 관찰하기 위한 실험의 전 단계로의 농도 별 간세포 독성을 관찰하였다. HepG2 세포에 농도 별로 시료를 처리하고 24시간 배양한 다음, MTT assay로 세포 생존율을 측정한 결과, 아무런 처치도 하지 않은 control의 세포 생존율을 100%로 보았을 때 시료들을 최고농도 500 μg/ml 첨가 시 세포 생존율이 대조군인 control에 비해 약 90.10±6.10 ~

96.89±6.85%로 세포 생존율의 감소 현상을 보였지만, 250 μg/ml 이하 농도를 처리한 O, N, F, P 실험군에서는 세포 생존율이 104.86±6.10~122.53±3.80%로 O, N, F, P에 의한 세포 괴사가 일어나지 않는 것으로 보이며, 250 μg/ml 이하의 농도로 O, N, F, P을 전 처리하여도 간세포에 유의성 있는 독성을 나타내지 않았다(Fig. 2).

HepG2 세포에 대한 타크린의 독성효과

타크린은 cholinesterase inhibitor로 알츠하이머 질환자에게 치료제로서 사용되고 있지만 복용한 환자에게서 심각한 간 손상으로 인한 부작용이 종종 보고 되고있다. 타크린에 의한 간 손상의 원인과 기전에 대하여 여러 보고들이 있으며 본 실험에서는 이러한 타크린에 의한 간 손상에 대한 굴 분획물(O) 및 효소별 굴 가수분해물(N, F, P)의 간 보호 효과를 확인하고자 했다. 타크린이 간세포에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 HepG2 세포에 타크린을 처리하여 2시간 후 MTT assay로 세포의 생존율을 비교하였다. 아무런 처치를 하지 않은 control의 세포 생존율을 100%로 보았을 때, 0.2 mM의 독성이 증가 할 때마다 약 10% 정도의 세포 생존율이 감소하였다. 이것으로 미루어 볼 때 타크린은 농도 의존적으로 HepG2 세포의 생존율을 억제시키는 것으로 확인되었다(Fig. 3).

세포 생존율을 통한 굴 분획물(O) 및 효소별 굴 가수분해물(N, F, P)의 간 보호 활성

아무런 처치도 하지 않은 control의 세포 생존율을 100%로 보았을 때, 타크린만을 처리한 negative control에서는 세포 생존율이 51.84±4.25% 로 현저하게 감소하였다. 반면 굴 분획물(O) 및 효소별 굴 가수분해물(N, F, P)를 100~250 μg/ml씩 농도 별로 전 처리한 다음, 타크린을 처리한 실험군에서는 세포 생존율이 대조군인 control 대비 65.45±3.62~88.75±7.56%의 생존율을 보였으며, 간 보호 효과가 알려진 silymarin인 positive control(PC)의 세포 생존율은 76.54±3.61%였다. 굴 분획물(O)과 효소별 굴 가수분해물 중 N, F은 250 μg/ml 농도 이하에서는 농도와 상관없이 타크린으로 유발한 간세포의 독성에 대해 보호 효과를 나타냈으나, P에서는 농도 의존적으로 유의적인 세포 생존율의 증가를 확인할 수 있었는데, 200 μg/ml과 250 μg/ml에서 각각 83.17±4.31%, 88.75±7.86%로 PC보다 높은 세포 생존율을 확인하였다. 같은 250 μg/ml의 굴 분획물(O) 및 효소별 굴 가수분해물(N, F, P)의 농도를 처리하여도 세포 생존율이 각각 달랐는데, 이는 굴 단백질들이 다른 효소들에 의해 가수분해가 일어나 새로운 oligopeptide가 생성되었기 때문이라고 판단된다. 타크린이 세포 내에서 glutathione과 같은 단백질과 결합하여 대사되는데, glutathione과 같은 저분자 peptide가 함유된 굴 효소 가수분해물과 결합하여 타크린 독성을 감소 시킴으로 간 보호 활성을 나타내는

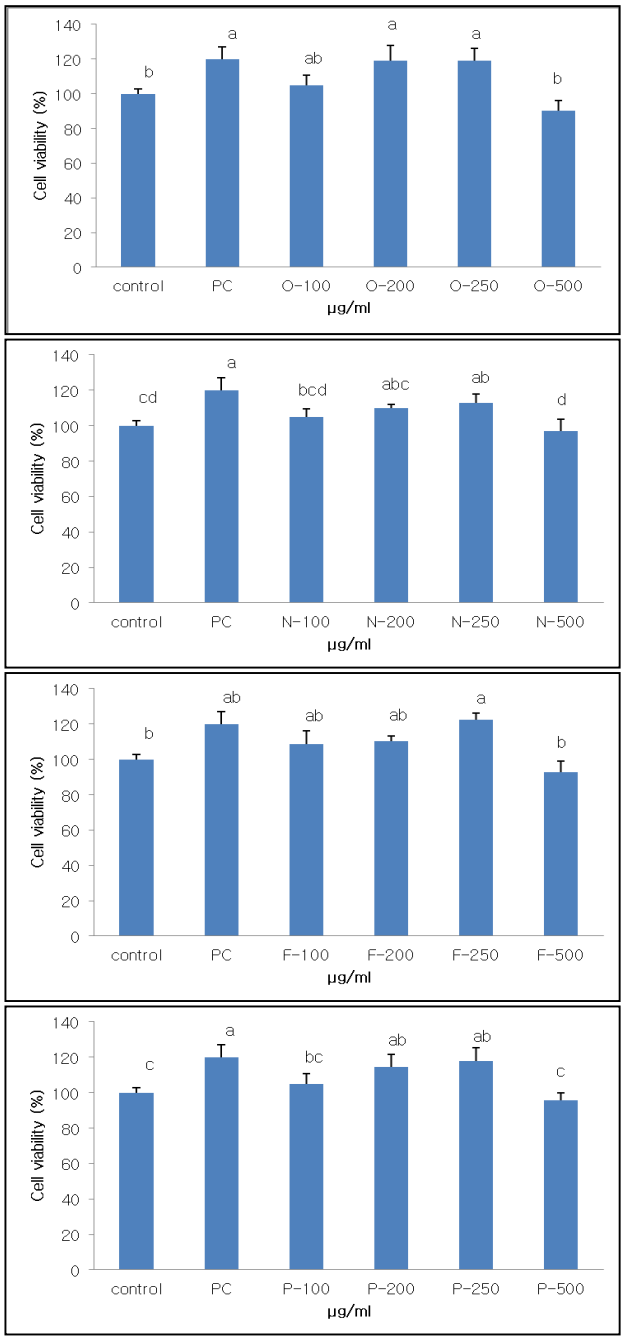

Fig. 2. Cytoprotective effect of various concentrations of O, N, F and P in human hepatoma cell. Hepatoprotective effect of O, N, F and P (100~500 μg/ml) was tested in human hepatoma cells (HepG2). HepG2 cells were incubated with O, N, F and P and the general viability of cultured cells was determined dye MTT assay following 24hrs incubation. Results of MTT assay are expressed as percent of control values. Values are presented as the means±SE derived from three determinations. Means with alphabet (a, b, c, d) are not significantly different at $p<0.001$. Blank means the normal control. Silymarin 20 μg/ml (PC) was used as a positive control.

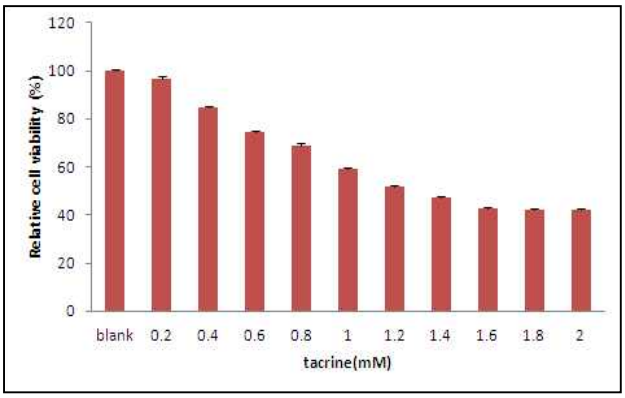

Fig. 3. Tacrine-induced Cytotoxicity in HepG2 Cells. Hepatoprotective effect of Tacrine (0~1.8 mM) was tested in human hepatoma cells (HepG2). HepG2 cells were incubated with Tacrine and the general viability of cultured cells was determined dye MTT assay following 2 hrs incubation.

것이라 생각된다. Protamex로 효소 분해한 가수분해물인 P에서 가장 높은 세포 생존율을 확인하였는데, 이는 Neutrase와 Flavourzyme이 가수분해하지 못했던 단백질을 분해하였기 때문에 세포 생존율의 상승효과가 생긴 것으로 판단되며 아미노산 조성 분석을 통하여 각기 다른 oligopeptide가 생성되었음을 간접적으로 확인하였다(Fig. 4).

혈청학적 지표에 의한 굴 분획물(O) 및 효소별 굴 가수분해물(N, F, P)의 간 보호 효과

GOT는 glutamic oxaloacetic transaminase라는 효소의 약칭으로, 간세포 안에 존재하는 효소로서 간 손상에 의해 세포막이 파괴되면 세포 외로 유출 되어 수치가 상승하게 된다. 간세포에 손상이 생기면 배지 중으로 유리되는 이들 효소의 양이 증가하게 되고, 간세포 보호작용이 있는 약물은 유리된 이들 효소의 양을 감소시킨다[16]. Lactate dehydrogenase (LDH)는 lactate를 pyruvate로 전환하는 효소로 세포에 이상이 있을 경우 세포 외로 유출되어 배지 중에서 증가하게 된다. 본 실험 결과에서는 세포 생존율이 가장 높았던 250 μg/ml에서 O, N, F, P이 간세포에서 타크린에 의해 유도된 손상에 대해 보호 효과가 있는지의 여부를 세포막 손상 시 배양액 내로 유출되는 GOT와 LDH 활성도를 측정하여 조사하였다. GOT 측정에서는 타크린 손상을 준 결과에 비해 25~45%의 저해 효과를 보였고, P에서는 약 45% 저해 효과를 보여 positive control인 Silymarin보다 현저하게 우수한 저해 효과를 나타냈다. LDH에 대한 실험에서 굴 분획물(O) 및 효소별 굴 가수분해물(N, F, P) 처리 시 타크린 손상을 준 결과에 비해 약 8~50%의 저해 효과를 보였고, P에서는 약 50%의 저해 효과를 보이므로, 굴 분획물(O) 및 효소별 굴 가수분해물(N, F, P)이 GOT와 LDH 모두 뚜렷한 저해 효과를 나타내어 간 보호 효과를 확인할 수 있었다(Fig. 5).

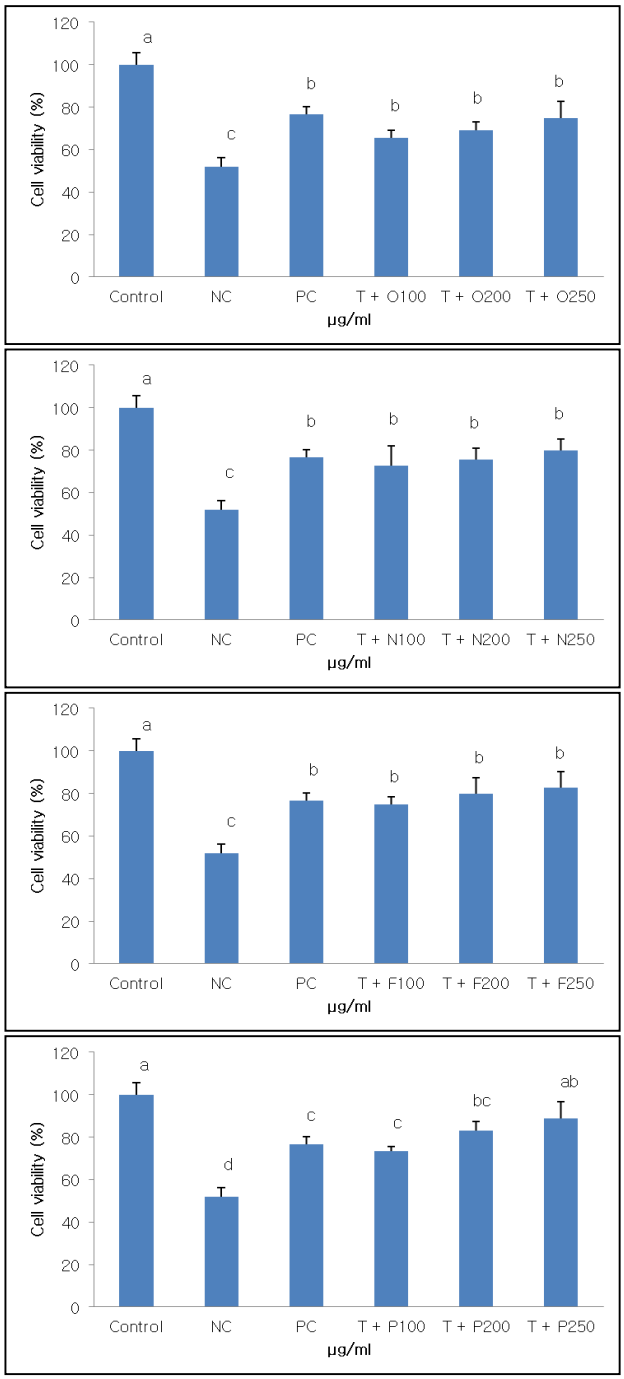

Fig. 4. The hepatoprotective effect of O, N, F and P in HepG2 cells on tacrine-induced cytotoxicity. Hepatoprotective effect of O, N, F and P (100~250 μg/ml) was tested on 1.2 mM tacrine-induced cell death in HepG2 cells as described in Materials and Methods. Values are presented as the means±SE derived from three determinations. Means with alphabet (a, b, c, d) are not significantly different at $p<0.001$. Blank means the normal control and Tacrine 1.2 mM (NC) means tacrine treated group. Silymarin 20 μg/ml (PC) was used as a positive control.

굴 분획물(O) 및 효소별 굴 가수분해물(N, F, P)의 아미노산 분석

단백질 분해 효소로 처리한 굴에 존재하는 아미노산의 조성을 분석한 결과를 Table 2에 나타내었다. O, N, F, P의 구성 아미노산은 20종이 검출되었으며, 총 구성 아미노산은 O, N, F, P에서 각각 85.77 mg/g, 102.07 mg/g, 117.22 mg/g, 183.25 mg/g으로 정량되었다. 굴 분획물인 O에서는 glutamic acid가 11.8 mg/g으로 가장 높은 함량을 나타내었으며 다음으로 alanine, glycine, proline, serine 순으로 높게 나타났다. Cysteine은 0.8 mg/g으로 가장 낮은 함량을 나타내었고, tryptophan도 비교적 낮은 함량이었다.

효소 가수분해물의 함량은 N에서는 phenylalanine이 11.6 mg/g으로 가장 높은 함량을 나타났으며 다음으로 glutamic acid, alanine, tyrosine, serine 순으로 높게 나타냈으며 O와 마찬가지로 cystine이 0.8 mg/g으로 가장 낮은 함량을 나타내었다. F에서는 N과 마찬가지로 phenylalanine이 20.2 mg/g으로 가장 높은 함량을 나타냈고 다음으로 tyrosine, alanine, glutamic acid, leucine 순으로 높게 나타났다. P에서는 다른

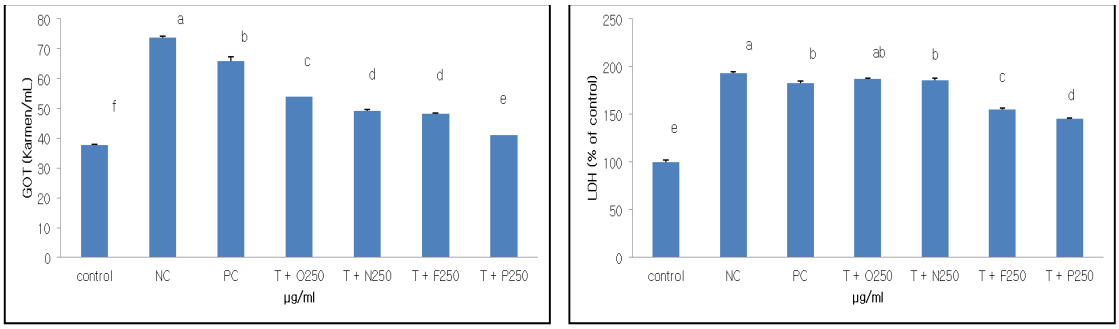

Fig. 5. Liver protective effects of O, N, F and P on tacrine-induced oxidative hepatotoxicity in HepG2 cells. HepG2 cells were exposed to O, N, F and P for 2 hrs with tacrine (1.2 mM). GOT and LDH activities were determined. Each value represents means±SE derived from three determinations. Means with alphabet (a, b, c, d) are not significantly different at $p<0.001$. Blank means the normal control and Tacrine 1.2 mM (NC) means tacrine treated group. Silymarin 20 μg/ml (PC) was used as a positive control.

Table 2. Contents of composition amino acid in enzymatic hydrolysate

Amono acid	Oyster	Neutrase	Flavourzyme	Protamex
	Contents % (w/w) (mg/g)			
Aspartic acid	7.18	5.81	4.83	10.13
Threonine	2.77	2.52	2.31	7.45
Serine	7.29	8.66	6.03	16.29
Glutamic acid[1)]	11.80	9.62	7.97	15.27
Proline	8.00	5.74	5.50	7.41
Glycine	8.17	6.66	5.54	7.55
Alanine	10.71	9.57	8.52	12.29
Cystine	0.77	0.76	2.74	4.27
Valine	2.19	3.11	4.14	9.82
Methionine	1.39	2.24	5.80	6.88
Isoleucine	1.09	2.04	2.66	7.71
Leucine	2.31	6.12	7.85	13.96
Tyrosine	2.30	9.30	12.66	10.77
Phenylalanine	3.78	11.64	20.18	13.51
Histidine	2.13	2.32	3.35	4.33
Lysine	4.92	5.45	6.48	15.94
Tryptophan	0.82	1.52	1.97	2.22
Ammonium chloride	2.50	2.80	2.42	2.70
Arginine	5.65	6.20	6.28	14.76
Total amino acid	85.77	102.07	117.22	183.25

[1)]Glutamin acid plus glutamine

효소 가수분해물과는 다르게 serine이 16.3 mg/g으로 가장 높은 함량을 나타냈으며 lysine, glutamic acid, arginine, leucine 순으로 높은 함량을 나타냈다.

구성 아미노산 중 필수 아미노산의 함량 분포비율은 O, N, F, P에서 각각 22.46%, 33.94%, 43.83%, 42.29%로 F에서 가장 많았다. N과 F에서는 필수 아미노산인 phenylalanine이 가장 높은 함량을 가지고 있었다. 이는 굴 단백질이 다양한 효소에 의해 각기 다른 oligopeptide를 생성시켰음을 나타낸다. 본 연구를 통하여 타크린 독성에 대한 신약, 식품의 기초 자료를 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

References

1. Blois, M. S. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* **26**, 1199-1204.
2. Bouilly, K., B. Gagnaire, M. Bonnard, G. H. Thomas, T. Renault, P. Miram, and S. Lspegue. 2006. Effects of cadmium on aneuploidy and hepocyte paramenters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Aquat. Toxicol.* **78**, 149-156.
3. Brand-Williams, W., M. E. Cuvelier, and C. Berset. 1995. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel Wissenschaftund Technologie* **28**, 25-30.
4. Cho, E. J. and S. H. Yoon. 1999. Protective effect of asiasari radix on rat liver. *J. Korean Soc. Hygienic Sci.* **5**, 85-91.
5. Chobert, J. M., C. Bertrand-Harb, and M. G. Nicolus. 1988. Solubility and emulsifying properties of caseins and whey proteins modified enzymatically by trypsin. *J. Agric. Food Chem.* **36**, 883-892.
6. Jang, Y. B. 2007. Application in foodstuffs and functional characteristics of oyster Hydrolysates. Ph. D. thesis, Pukyoung University, Pusan, Korea.
7. Jeong, B. Y., B. D. Choi, and J. S. Lee. 1998. Protamate composition, cholesterol and α-tocopherol content in 72 species of Korean fish. *J. Korean fish. Sci. Tech.* **1**, 129-146.
8. Jeong, J. H., J. J. Wee, J. Y. Shin, J. H. Cho, and D. H. Jung. 2005. Antioxidative effect of crude saponin fraction prepared from culture product of basidiomycota cultured with fresh ginseng as substrate. *J. Korean Food Sci. Technol.*
9. Jim, L. K. and J. P. Gee. Adverse effects of drugs on the liver. In Young, L. Y. and Koda-Kimble MA (ed.), Applied therapeutics: The clinical use of drugs, 26-1-26-17, Applied Therapeytics, Inc., Vancouver.
10. Jun, S. Y., P. J. Park, and W. K. Jung. 2004. Purification and characterizaion of an antioxidative peptide from enzymatic hydrolysate of yellofin sole (*Limanda aspera*) frame protein. *Eur. Food Res. Technol.* **219**, 20-26.
11. Kang, H. I., S. H. Kim, and J. H. Pyeun. 1974. Evaluation in the utility of the by-products of oyster processing. *J. Korean Fish. Soc.* **7**, 37-40.
12. Kang, K. H., S. Y. Kim, and D. K. Park. 1985. Special Topics in Food Chemistry. pp. 168-172, YUHANSA.
13. Kim, C. Y., J. H. Pyeun, and J. N. Nam. 1981. Decomposition of glycogen and protein in pickled oyster during fermemtation with salt. *J. Korean Fish. Soc.* **14**, 66-71.
14. Kim, S. K., Y. T. Kim, H. G. Byun, K. S. Nam, D. S. Joo, and F. Shahidi. 2001. Isolation and characterization of antioxidative peptidess from gelatin hydrolysate of Alaska pollack skin. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 1984-1989.
15. Kim, S. M. and J. U. Ha. 1995. Utilization of the protein hydrolysates of skipjack tuna viscera. *J. Korean Food Sci. Technol.* **27**, 141-146.
16. Kim, Y. K., Y. H. Kim, D. H. Kim, and K. T. Lee. 2005. Cytoprotective effects of natural flavonoids on carbon tetrachloride-induced toxicity in primary cultures of rat hepatocytes. *J. Korean Pharmacogn.* **36**, 224-228.
17. Kinsella, J. E. and K. J. Shetty. 1976. Functional properties of proteins in foods: A survey. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **7**, 219.
18. Knasmuller, S., W. Parzefall, R. Sanyal, S. Ecker, C. Schwab, M. Uhl, V. Mersch-Sundermann, G. Williamson, G. Hietsch, T. Langer, F. Darroudi, and A. T. Natarajan. 1998. Use of metabolically competent human hepatoma cells for the detection of mutagens and antimutagens. *Mutat. Res.* **402**, 185-202.
19. Lee, C. H. 1992. Application and development of protein sources. *J. Korean Food Sci. Ind.* **25**, 93-100.
20. Lee, E. G., K. B. Kim, and J. M. Jeong. 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.
21. Lu, X., D. Akiyama, and K. Hirabayashi. 1994. Production of silk powder and properties. *J. Seric. Jpn.* **63**, 21-27.
22. McCord, J. M. and I. Fridovich. 1969. Superoxide dismutase: an enzymatic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* **244**, 6049-6055.
23. Ministry of Maritime Affairs and Fisheries. 2004. pp. 146, Fishery Production Survey.
24. National Fisheries Research and Development Agency. 1995. Supplemented Chemical Composition of Marine Products in Korea. pp. 139-143, Yemoon Publishing Co., Seoul.
25. National Fisheries Research Development. 1995. Chemical Composition of Marine Products in Korea. pp. 146.
26. Osseni, R. A., C. Debbasch, M. O. Christen, P. Rat, and J. M. Warnet. 1999. Tacrine-induced reactive oxygen species in a human liver cell line: the role of anethole dithilethione as a scavenger. *Toxicol. In Vitro* **13**, 683-688.
27. Panyam, D. and A. Kilara. 1996. Enhancing the functionality of food proteins by enzymatic modlfication. *Trends Food Sci. Technol.* **7**, 120-125.
28. Ranathunga, S., N. Rajapakes, and S. K. Kim. 2006. Purification and characterization of antioxidative peptide derived from muscle of conger eel (*Conger myriaster*). *Eur. Food Res. Technol.* **222**, 310-315.
29. Rupnow, J. 1994. Proteins: biochemistry and application. Vol. 3, pp. 2182. In Encyclopedia of Food Science and Technology. In Hui, Y. H. (ed). John Willy and Son Inc. NY, USA.
30. Samsumg hospital. http://www.samsunghospital.com/html/boardimg/medi_webzine/pdf/10-07.pdf

31. Sohn, D. H., Y. C. Kim, S. H. Oh, E. J. Park, X. Li, and B. H. Lee. 2003. Hepatoprotective and free radical scavenging effects of *Nelumb nucifera*. *Phytomedicine* **10**, 165-169.
32. Tanaka, K., I. Ikeda, A. Kase, K. Koda, S. Nishizono, T. Aoyama, and K. Imaizumi. 2003. Effects of feeding oyster, *Crassostrea gigas*, on serum and liver lipid levels in rat. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **49**, 100-106.
33. Wang, J. and A. Wendel. 1990. Studies on the hepatotoxicity of galactosamine endotoxin or galatosamine/TNF in the perused mouse liver. *Bioche. Pharmaco.* **39**, 267-270.
34. Watkins, P. B., H. J. Zimmermann, M. J. Knapp, S. I. Gracon, and K. W. Lewis. 1994. Hepatotoxic effects of tacrine administration in patients with alzheimer's disease. *J. A. Med. Assoc.* **271**, 992-998.
35. Wu, C. H., H. M. Chen, and C. Y. Shiau. 2003. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Eur. Food Res. Int.* **36**, 949-957.
36. Yoon, H. D., H. S. Byun, S. J. Chun, S. B. Kim, and Y. H. Park. 1986. Lipid composition of oyster, arkshell and sea-messel. *J. Korean Fish. Soc.* **19**, 321-326.

초록 : 타크린으로 유발한 간세포 독성에 대한 효소별 굴 가수분해물의 보호 효과

박혜진[1] · 도형주[1] · 김옥주[1] · 김안드레[2] · 하종명[1,2]*
([1]신라대학교 대학원 생명공학과, [2]신라대학교 제약공학과)

본 연구는 굴 가수분해물의 간 보호 효과를 확인하는 것을 목표로 하였다. 굴은 많은 기능적 요소를 가지고 있다고 알려져 있으며 특히, 효소에 의해 생산된 가수분해물은 우수한 기능적 물질을 포함한다. 타크린으로 유발한 간세포 독성에 대한 효소별 굴 가수분해물의 보호 효과를 확인하기 위하여 HepG2세포를 이용하여 *in vitro* 상에서 확인하였다. 사용한 샘플은 Neutrase, Flavourzyme, Protamex을 이용하여 효소 가수분해한 것이다. 타크린으로 손상을 유발한 간세포에서는 GOT와 LDH가 증가하게 된다. 굴 효소 가수분해물을 처리한 실험군에서는 아무런 처리를 하지 않은 실험군에 비하여 높은 세포 생존율을 확인할 수 있었다. 또한 GOT와 LDH 역시 감소하는 것을 알 수 있었다. 본 연구를 통하여 타크린 독성에 대한 신약, 식품의 기초 자료를 제공할 수 있을 것으로 기대된다.