

<https://doi.org/10.15433/ksmb.2022.14.2.061>

ISSN 2383-5400 (Online)

비스페놀A 유도 간 손상 마우스에서 해삼(*Stichopus japonicas*) 추출물 및 가수분해물의 간 기능 개선 효과

Extracts and Enzymatic Hydrolysates Derived from Sea Cucumber *Stichopus japonicas* Ameliorate Hepatic Injury in BisphenolA-treated Mice

김세정¹, 조윤호², 박비오³, 유대석⁴, 김두호⁵, 김민정⁶, 곽연길⁷, 김진성^{8*}Sejeong Kim¹, Yun-Ho Jo², Bi-Oh Park³, Dae-Seok Yoo⁴, Doo-Ho Kim⁵, Min-Jung Kim⁶, Youn-Gil Kwak⁷, Jin-Seong Kim^{8*}^{1, 2, 3}연구원, 금산인삼약초산업진흥원, 충청남도, 32724, 대한민국⁴선임연구원, 금산인삼약초산업진흥원, 충청남도, 32724, 대한민국⁵차장, 휴온스푸드인스 기업부설연구소, 충청남도, 32724, 대한민국⁶대리, 휴온스푸드인스 기업부설연구소, 충청남도, 32724, 대한민국⁷이사, 휴온스푸드인스 기업부설연구소, 충청남도, 32724, 대한민국⁸선임연구원, 금산인삼약초산업진흥원, 충청남도, 32724, 대한민국^{1, 2, 3, 4, 8}Geumsan Ginseng and Herb Development Agency, Geumsan, 32724, Republic of Korea^{5, 6, 7}R&D Center, HuonsFoodience, Geumsan, 32742, Republic of Korea

(Received 29 April 2022, Revised 29 June 2022, Accepted 6 July 2022)

Abstract This study aimed to investigate the hepatoprotective activities of the sea cucumber products, including extracts and hydrolysates, *in vitro* and *in vivo*. Dried sea cucumber, produced on the western coast of Korea, was boiled in water or 70% ethanol at 85°C or 100°C for 18 or 24 h, respectively, to extract bioactive compounds. The enzymatic hydrolysates were prepared by reacting the dried sea cucumber with pepsin or neutral protease (PNL) under optimal enzyme conditions. The anti-inflammatory effect of the samples was investigated using RAW 264.7 cells treated with lipopolysaccharide (LPS). The amount of nitric oxide (NO) was produced from the cells treated with LPS and each sample was compared. Therefore, the pepsin hydrolysate treatment decreased NO production compared to LPS sole treatment. Furthermore, the effects of the samples on cell injury in the hepatic cell line and bisphenolA-induced hepatic injury mouse model were investigated. The water extracts and the pepsin hydrolysates of sea cucumber significantly inhibited cell injury generated in the hepatocytes without cytotoxicity ($p < 0.05$), whereas the ethanol extracts were cytotoxic. However, these results indicate that the extracts and the enzymatic hydrolysates derived from sea cucumber can be used as beneficial materials for inhibiting liver damage.

Keywords : *Stichopus japonicas*; Extraction; Enzymatic hydrolysis; Anti-inflammation; Liver damage

* Corresponding author

Phone: +82) 41-750-1650 Fax: +82) 41-750-1649

E-mail: chiseikjs@gghda.kr

This is an open-access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

서론

최근 평균수명 연장과 인구 노령화 사회로 각종 퇴행성질환, 심혈관질환, 치매, 암 등의 발생이 증가하고 있으며, 이러한 질환의 발생은 염증·면역반응과 밀접한 상관성이 있다고 보고되어 염증반응의 기전 및 역할에 대한 관심이 급격히 증가하였다. 일상생활 속 신체적·정신적 다양한 원인에 의해 체내의 염증성단백질이 증가하게 되는 ‘만성염증’은 알리지, 천식, 관절염, 퇴행성 뇌질환, 심혈관질환, 신장병, 당뇨, 암, 염증성 장질환 등 다양한 만성질환을 유발할 수 있다 [1, 2, 3]. 또한, 간염(hepatitis)은 간세포 및 간조직의 염증을 의미하는 것으로 주요 원인으로서는 바이러스, 알코올, 또는 약물 등에 의한 간손상이 있다 [4]. 급성 및 만성 간 질환은 전 세계적 관심사가 되고 있으며, 이에 따라 간 장애 치료를 위한 보완 및 대체 의약품의 개발에도 많은 관심이 있어 왔다 [5, 6].

질환의 치료 및 만성염증의 억제와 개선을 위해서, 우수한 항산화 및 항염증 활성을 나타내는 천연물 유래 기능성 소재 개발 연구가 활발하게 진행되고 있다. 특히, 최근에는 해양 생물자원에의 관심이 증가하여 해양 생물자원을 이용한 다양한 기능성에 대한 연구 역시 활발히 이루어지고 있다. 예를 들어, 갈조류인 큰열매모자반의 추출물은 염증성 사이토카인의 생산을 저해하여 항염증 활성 갖는다고 보고되었으며 [7], 톳 유래 다당체는 에이팜토시스를 조절함으로써 에탄올-유도 위장질환을 저해하는 활성이 있다고 밝혀진 바 있다 [8]. 이외에도, 해양생물로부터 인지기능개선 효과를 갖는 기능성 소재 개발, 전복 소화분해시스템을 활용한 천연 항알리지 제품 개발 등 해양 자원 유래의 소재부터 제품 개발까지 그 연구 및 활용 범위가 점차 확대되고 있는 추세이다.

해삼(*Stichopus japonicas*)은 유망한 해양 자원 중 하나로, 항노화, 항관절염 등의 효과를 갖는 collagen과 chondroitin sulfate 성분을 각각 약 12%, 13% 이상 함유하고 있다 [9]. 현재까지 다양한 형태의 해삼 유래 추출물, 효소 가수분해물의 생리활성이 연구되어 항균 [10], 항산화 [11], 항암 [12], 항응고 혈관과 형성억제, 항신경염, 면역조절과 파골세포 분화억제 효과[13] 등의 질병개선을 위한 효능이 보고되었다

[14]. 해삼의 간 보호 활성에 대해서는 흑해삼으로 분류되는 *Holothuria atra*의 효능에 대해 연구된 바가 있으나 [15, 16], 생리 활성 성분은 해삼의 종에 따라 다양하며 [17], 또한 그 함유량은 가공(추출, 분해) 조건에 따라서 변화한다 [14].

따라서, 본 연구에서는 해삼(*Stichopus japonicas*)의 유효성분을 포함할 수 있는 추출물과 가수분해물을 제조하고 항염·항산화 활성 및 간독성 간세포 보호 효과 등을 규명하여 해삼 유래 물질의 기능성 소재로서의 활용 가능성을 확인하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 해삼 추출물 및 가수분해물의 제조

건해삼은 2020년 10월-12월에 서해안에서 채취한 청해삼을 건조 가공한 것을 구매(구매처: 보령해삼영어조합법인)하여 사용하였다. 먼저, 해삼 추출물은 분쇄한 건해삼 30 g을 포에 담아 준비한 뒤, 추출 용기에 담긴 용매 1차증류수 또는 70% 에탄올 등으로 10배수 비율로 85℃ 또는 100℃ 에서 6시간씩 3회 또는 24시간으로 추출하였고, 여과지(Advec filter paper)를 이용해 거른 뒤 감압농축기(COSMOS - 660, Kyungseo E&P, Incheon, Korea)를 이용하여 농축 후, 획득된 추출물을 동결건조(Martin Christ, Osterode, Germany)하여 분말의 형태로 -20℃에서 보관하였다. 해삼 가수분해물은 분쇄된 건해삼(< 1.4 mm)을 0.1 N 수산화나트륨 용액에 넣은 후 4℃에서 24시간 동안 처리하였다. 시료를 세척하여 잔존하는 수산화나트륨을 제거한 뒤, PNL (Neutral protease enzyme) 또는 pepsin 용액을 첨가하고, 최적 온도 및 pH 조건에서 24시간동안 반응하였다. 80~95℃에서 15분간 가열하여 효소를 불활성화한 뒤, 원심분리 후 상등액을 취하여 동결건조하였다.

2. 일반염증세포(RAW 264.7)를 이용한 세포실험

2.1. 세포배양

RAW264.7 세포는 mouse macrophage 세포주로서 American type culture collection (ATCC; Manassas, VA, USA)에서 분양 받아 사용하였다. 세포는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 10% heat inactivated fetal bovine serum 과 100 U/mL pen-

icillin 및 100 µg/mL streptomycin을 첨가한 배지에, 37°C, 5% CO₂ 환경에서 2 일 간격으로 배양하였다.

2.2. 염증 유도 및 시료 처리

RAW264.7 세포를 96-well plate에 5×10^4 cells/well 밀도로 분주하여 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin이 포함된 DMEM에 24시간 동안 안정화하였다. 각 원료를 배지에 일정한 농도로 희석하여 세포에 처리한 후, lipopolysaccharide (LPS)를 100 ng/mL 농도로 첨가하여 염증을 유도하고 5% CO₂, 37°C incubator에서 24시간 배양하였다. 해삼가수분해물은 시료의 용해도를 고려해 농도를 달리하여 처리하였다(Pepsin 가수분해물; 3,000 - 5,000 µg/mL, PNL 가수분해물; 1,000 - 2,000 µg/mL).

2.3. 세포 생존율 측정 (MTT assay)

염증 유도 및 시료를 처리한 세포 배양액에 MTT 용액(2 mg/mL) 50 µL를 첨가하고 5% CO₂, 37°C incubator에서 1시간 동안 반응시킨 뒤 DMSO를 150-µL 처리, 실온에서 20분간 반응시켰다. 생성된 불용성의 formazan 결정을 용해하여 microplate reader (BIO-RAD 450; California, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도 측정하였다.

2.4. Nitric oxide (NO) 생성량 측정

NO 생성량은 Griess reagent kit (Promega; Madison, WI, USA)를 이용하여 측정하였다. 시료를 처리한 세포 배양액의 상층액 50 µL를 조심스럽게 채취한 뒤 새로운 96-well plate에 옮겨 시약 A (sulfanilamide)를 첨가하고, 암실 및 상온에서 5~10 분간 반응하였다. 이후 시약 B (N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride; NED)를 첨가하여 암실 및 상온에서 5~10분간 반응시킨 뒤, microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도 값을 표준곡선을 이용해 NO 생성량으로 환산하여 사용하였다.

2.5. Reactive oxygen species (ROS) 생성량 측정

염증 유도 및 시료를 처리한 세포 배양액에 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)를 10 µM 농도로 첨가한 뒤, 37°C incubator에서 40분간 반응 후 microplate reader를 이용하여 Ex 485, Em 530 nm에서 흡광도를 측정하였다.

3. 간세포(HepG2)를 이용한 세포실험

3.1. 세포배양

HepG2 세포는 human hepatoblastoma 세포주로서 한국세포주은행(Seoul, Korea)에서 분양 받아 사용하였다. 세포는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에 10% heat inactivated fetal bovine serum과 100 U/mL penicillin 및 100 µg/mL streptomycin을 첨가한 배지에, 37°C, 5% CO₂ 환경에서 2 일 간격으로 배양하였다.

3.2. 지방축적량 측정

HepG2 세포를 6-well plate에 5×10^4 cells/well 밀도로 분주하고 300 µM palmitate를 함유한 DMEM으로 24 시간 배양하여 지방축적을 유도하였다. 실험군에는 각 추출물을 1,000 - 3,000 µg/mL 농도로 함께 처리하였다. 지방축적이 유도된 간세포를 2% formalin으로 실온에서 30 분간 고정된 뒤, 60% isopropanol과 증류수로 세척 후 60% isopropanol에 용해시킨 Oil Red O 용액에 37°C에서 20분 동안 반응시켰다. 지방축적량을 측정하기 위해 Oil Red O 염색부위를 100% isopropanol로 용해한 뒤, microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하고 정량화하였다.

3.3. 세포손상 측정

HepG2 세포를 96-well plate에 1×10^4 cells/well 밀도로 분주하고, bisphenolA (BPA)를 200 µM 농도로 함유한 DMEM-high glucose 배지에 24시간 배양하여 세포손상(세포독성)을 유도하였다. 실험군에는 각 추출물을 1,000 - 3,000 µg/mL 농도로 함께 처리하였다. 24시간 후 MTT 용액(2 mg/mL) 50 µL를 첨가하고 5% CO₂, 37°C incubator에서 1시간 동안 반응시킨 뒤 DMSO를 150 µL 처리, 실온에서 20분간 반응시켰다. 생성된 불용성의 formazan 결정을 용해하여 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도 측정하였다.

4. 동물실험

4.1. 경구투여

동물 실험은 (재)금산인삼약초산업진흥원 동물실험 윤리위원회 규정에 따라 심의를 받은 후 진행하였다(승인 번호 GGHDA 2022-A01). 실험 동물 ICR mice(6주령, 수컷 25 g - 30 g)은 다물사이언스(Daejeon, Korea)에서 구입하였다. 사료와 물은 자유

롭게 섭취하도록 하였으며, 1 주간 적응기간을 거친 후 실험을 실시하였다. 순화된 마우스를 그룹별 체중을 측정하여 평균 무게에 따라 8 마리씩 6 군으로 나누었다(정상군; BPA; 실리마린; 해삼추출물-저, 해삼추출물-고, 펩신가수분해물). 먼저, BPA (20 mg/kg)를 정상군을 제외한 모든 군에 복강 주사(1회) 하여 마우스의 간에 독성을 유발하고, 24시간 경과 후에는 시료별로 1 주간 경구투여를 실시하였다(실리마린: 80 mg/kg, 해삼추출물-저: 1 g/kg, 고: 2 g/kg, 펩신가수분해물: 5 g/kg). 경구투여 완료 후 마우스를 희생하였으며, 혈액은 채취하여 blood collection tube에 옮긴 뒤 원심분리(1,000 rpm, 10 분, 4°C)후 상층액(혈청)만을 새로운 microcentrifuge tube에 옮겨 -70°C에 보관하였다. 간 조직은 적출하여 생리식염수로 세척 한 후 균질화하여 조직염색에 사용하였다.

4.2. Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) 측정

Reitman-Frankel 방법에 따라, 혈청 분석용 kit (Asan Pharmaceutical, Seoul, Korea)를 사용하여 혈청 ALT, AST 수준을 측정하였다. Microplate reader를 이용하여 505 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4.3. 병리조직학적 관찰

희생 후 적출된 간조직은 고정액(4% paraformaldehyde 용액)에서 7일간 고정한 후 통상적인 방법에 따라 파라핀 포매하였다. 이 후, 조직 표본을 5µm (HM 315; Microm, Walldorf, Germany) 두께로 절삭하고, 절삭된 조직 절편을 매 5 장마다 1 장씩 무작위로 취하여 Hematoxylin-eosin 염색하였다. 조직계측학적 관찰에 의한 간 조직 내 중심정맥, 염증세포, 섬유성 경화 등이 포함된 모든 이미지를 광학현미경 (DMR, Leica, Nussloch, Germany)으로 관찰하였다.

5. 통계분석

본 연구에 대한 실험결과는 통계분석 SAS 8.2를 이용하여 Two-way ANOVA (Analysis of variation) 검정을 실시한 후, Bonferroni post tests의 다중범위검정과 two-tailed Student's t test로 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검증하였다. 모든 실험군은 3회 이상 반복하여 동일한 실험결과로 사용하였으며 정량적 결과는 대조군에 대한 백분율로 평균 ± 표준편차로 나타냈다.

결과 및 고찰

본 실험에서 사용된 해삼 추출물은 총 6종, 해삼 가수분해물은 총 2종으로 시료 종류와 시료별 제조 조건은 Table 1와 같다.

Table 1. List of samples (extracts and hydrolysates) derived from *Stichopus japonicus* used in this study

Labeling	Method		Yield
	Solution (Enzyme)	Extraction time	
Extracts			
85-Dw	Water	6 h x 3	23.0%
85-EtOH	Ethanol	6 h x 3	13.6%
100-Dw	Water	6 h x 3	48.3%
100-EtOH	Ethanol	6 h x 3	24.4%
85-Dw-24h	Water	24 h	60.2%
85-EtOH-24h	Ethanol	24 h	25.5%
Hydrolysates			
Pep-L	Pepsin	24 h	54.4%
PNL-L	PNL(Neutral protease enzyme)	24 h	62.0%

일반염증세포(RAW264.7)에 대한 항염 활성 일반염증세포에서 해삼 추출물과 가수분해물의 항염, 항산화 활성을 조사하기 위해 RAW264.7세포에 LPS를 처리하여 염증, 산화 스트레스를 유도하고 각 시료를 처리하여 NO 및 ROS 생성 억제 정도를 측정하였다. 그 결과, 해삼 추출물 중 85-EtOH 에서 NO 생성이 LPS 단독 처리군에 비해 낮아지는 것을 확인하였다($p < 0.01$). 하지만, 세포독성 실험에서 85-EtOH 추출물에 의한 세포 생존률 저하가 관찰되었기 때문에($p < 0.01$), NO 생성의 감소는 85-EtOH 추출물의 세포독성에 의해 나타나는 것으로 판단되었다(Fig. 1a and 1b). 또한, 모든 추출물에서 ROS 생성 억제 활성은 나타나지 않았다(Fig. 1c).

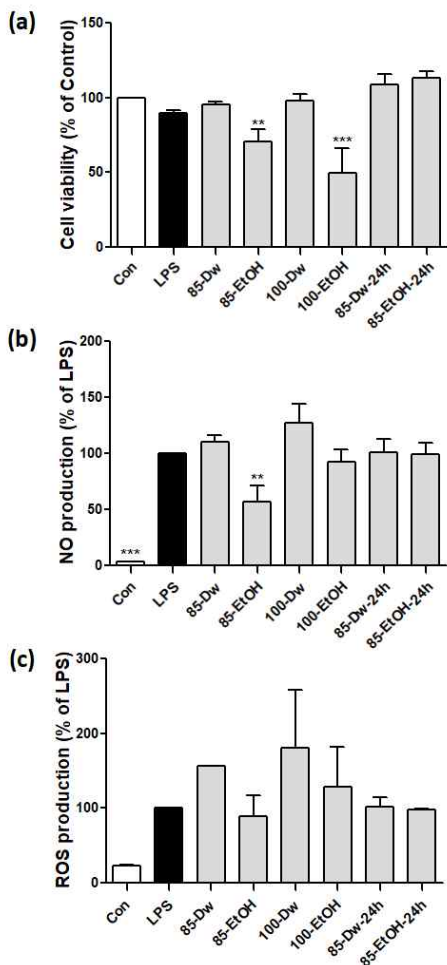


Fig. 1. Cytotoxicity (a), NO production (b), and ROS production (c) in RAW 264.7 treated with sea cucumber extracts (3,000 µg/mL). *: means significantly decreased compared to control or LPS ($p < 0.05^*$, 0.01^{**} , 0.001^{***}). Con; control, LPS; treated with lipopolysaccharide 100 ng/mL.

해삼 가수분해물을 이용한 결과에서는 PNL 처리 가수분해물(PNL-L)에서는 NO 생성 및 ROS 생성 억제 효과가 나타나지 않은 반면, 펩신 처리 가수분해물(Pep-L)에서는 NO 생성이 LPS 단독 처리군의 78% 수준으로 현저히 감소한($p < 0.001$) 것을 확인할 수 있었다(Fig 2a - 2c). 이러한 연구 결과는 Pep-L이 항염 활성을 갖으며, 펩신 처리를 통한 건해삼의 가수분해로 인해 항염 활성을 갖는 성분의 증가가 있었다는 것을 의미한다. 유사한 연구 결과로, Zhu 등 [18]은 해삼 세포벽에 펩신을 처리한 가수분해물인 ‘펩신-용해 콜라겐’이 우수한 항산화 활성을 갖으며, 이는 가수분해로 생성된 콜라겐으로 인한 효과일 것

으로 유추하였다. 본 연구와의 활성 차이(항염 vs 항산화)는 펩신 처리 조건에 따른 가수분해 생성물 조성의 차이에 의한 것으로 판단된다.

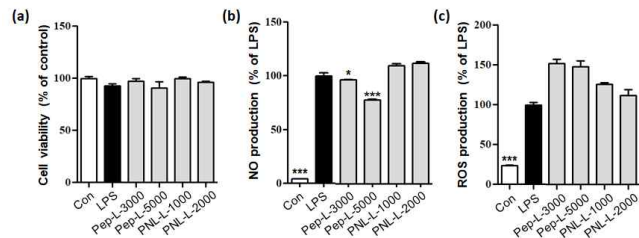


Fig. 2. Cytotoxicity (a), NO production (b), and ROS production (c) in RAW 264.7 treated with sea cucumber hydrolysates. *: means significantly decreased compared to control or LPS ($p < 0.05^*$, 0.01^{**} , 0.001^{***}). Con; control, LPS; treated with lipopolysaccharide 100 ng/mL, pep-L; 3,000 and 5,000 µg/mL, PNL-L; 1,000 and 2,000 µg/mL.

간세포(HepG2) 지방 축적 억제 및 세포 손상 보호 효과 일반염증세포에서 항염·항산화 효과가 나타나지 않았던 해삼 추출물을 이용하여 간세포(HepG2)에서의 지방 축적 및 세포 손상 억제 효과를 확인하였다. HepG2에 대한 해삼 추출물 자체의 세포독성을 확인한 결과에서 85-EtOH와 85-EtOH-24h는 세포 생존율을 유의적으로 감소시켰다(Fig. 3a). HepG2에 PA (300 µM)를 처리하였을 때 지방 축적이 유도되었으며, 해삼 추출물 중 85-Dw를 함께 처리하였을 경우, PA 단독 처리군 대비 77% 수준으로 유의적인 감소를 나타내었다($p < 0.001$)(Fig. 3b). 또한, BPA (200 µM)를 처리하면 HepG2 세포에 세포 손상이 유도되었으며, 해삼 추출물 중 85-Dw를 함께 처리하였을 경우에는 세포 생존율이 BPA 단독처리군에 비해 128% 수준으로 증가하였다($p < 0.01$)(Fig. 3c). 이러한 결과는, 해삼 추출물인 85-Dw가 간세포에서 발생하는 지방 축적과 세포 손상에 대한 억제효과를 갖는다는 것을 의미한다. 유효성분은 대부분 지용성 물질(지방산, triterpene-glycosides 등)로, 에탄올, 메탄올과 같은 유기용매를 이용해 추출했을 때 더 효과적으로 추출되고, 실제로 많은 연구들에서 유기용매를 이용한 해삼 추출물의 다양한 생리활성들이 보고되었다 [14]. 하지만, Husni 등[19]은 단지 열수로 추출한 해삼 추출물에서도 항산화 활성을 관찰하였으며, Cao 등[20]은 수용성의 해삼 protein-sulfated fucan 성분이 면역조절효능이 있다고 보고하였다. 본 연구에서도 해삼의 85도 물 추출물(85-Dw)이 간

세포에 대해 지방 축적 및 세포 손상 억제 활성을 갖고 있었으며, 반면 에탄올 추출물(85-EtOH)은 유사한 활성이 나타났지만 세포 독성이 동시에 나타나 활용 가능성이 낮은 것으로 판단되었다.

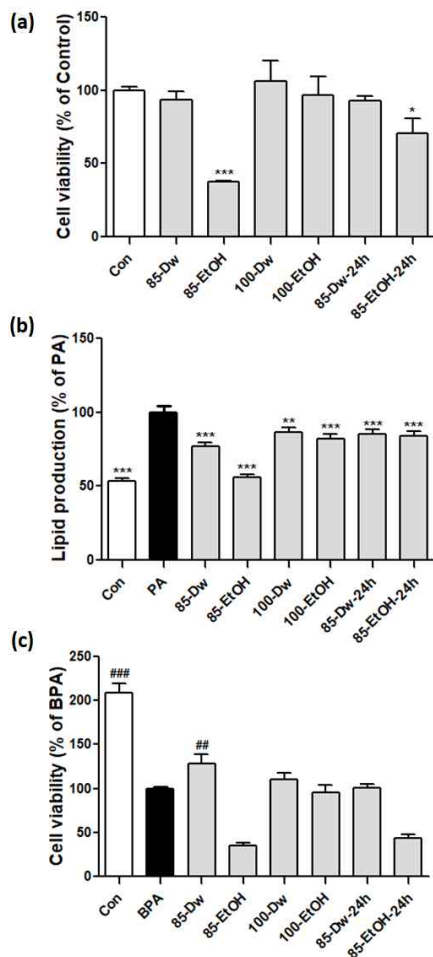


Fig. 3. Cytotoxicity (a), lipid production (b), and cell recovery (c) in HepG2 treated with sea cucumber extracts (3,000 µg/mL). *: means significantly decreased, #: means significantly increased compared to control, PA, or BPA ($p < 0.05^*$, 0.01^{**} , 0.001^{***}). Con; control, PA; treated with palmitic acid 300 µM, BPA; treated with bisphenolA 200 µM.

BPA 유도 간 손상 마우스 모델에서의 간 염증 개선 효과 세포실험에서 항염, 간세포 보호 활성이 있었던 해삼 추출물 85-Dw와 해삼 가수분해물 Pep-L를 이용해 BPA로 간 손상을 유도한 마우스 모델에서의 간 염증 개선 효과를 확인하였다. BPA는 환경 내에 존재하는 내분비교란물질로, 마우스에 처리하였을 때 간세포 독성과 염증반응을 일으키는 것으로 보고되었다 [21]. 또한, 실리마린은 밀크시슬

(*Silybum marianum*) 씨에서 분리한 플라보노이드 물질로 간 손상 개선에 효과가 좋은 천연 성분으로 알려져있어 본 실험에서 BPA로 인한 간 손상 치료제로서 음성대조군으로 사용하였다 [21]. 실험 결과, BPA 복강 투여는 간 기능의 주요 지표 인자인 혈청 ALT, AST 수준을 각각 135.6 ± 6.3 IU/L, 191.2 ± 14.0 IU/L 으로 증가시킨 반면, 85-Dw (2 g/kg)과 Pep-L (5 g/kg)을 처리한 경우 BPA 처리군에 비해 현저하게 감소한 혈청 ALT, AST 수준이 유지되는 것을 확인하였다($p < 0.001$)(Fig. 4a, and 4b). 이는 음성대조군인 SM (80 mg/kg) 처리군 보다도 감소된 수치로써, 본 실험에 사용된 해삼 추출물과 가수분해물이 간 염증 개선에 매우 효과적이라는 것을 의미한다.

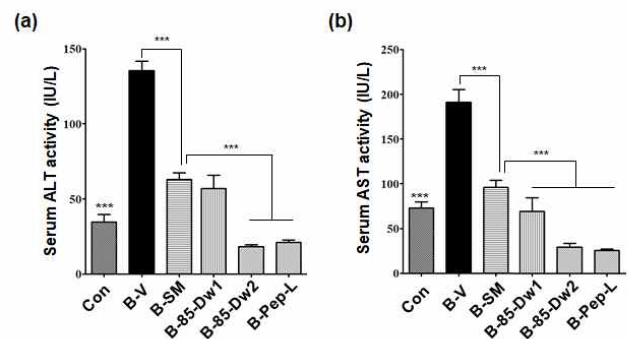


Fig. 4. Serum ALT (a) and AST (b) level in ICR mouse treated with bisphenolA and sea cucumber samples. *: means significantly decreased compared to control or LPS ($p < 0.05^*$, 0.01^{**} , 0.001^{***}). Con; saline solution, B-V/B-; bisphenolA 20 mg/kg, SM; silymarin 80 mg/kg, 85-Dw1; 1 g/kg, 85-Dw2; 2 g/kg, Pep-L; 5 g/kg.

또한, BPA를 투여한 마우스에서 해삼의 간 보호 효과를 확인하기 위해 간에 대한 조직학적 검사를 실시했다. 정상군은 간 조직에 병리학적 변화가 없었다(Fig. 5a). 하지만, BPA 투여한 마우스의 간 조직은 대부분이 swollen hepatocytes를 보이고, hepatic sinusoid 형태의 관찰이 어려웠다. 더불어, 정상조직에 비해 BPA 투여한 마우스의 간 조직에서 cytoplasmic hepatocellular vacuolization과 염증성 세포의 침윤이 뚜렷하게 관찰되었다(Fig. 5b). 그러나, 해삼 추출물 85-Dw와 해삼 가수분해물 Pep-L을 처리한 군에서는 정상군과 유사한 형태의 간조직 미세구조의 형태를 관찰할 수 있었다. 이는 홍삼추출물이 BPA에 의해 유도된 실험동물의 간 섬유화, 간세포 변성과 간세포

포 염증을 억제시켰던 선행 연구결과와 동일한 경향으로 [22], 본 실험에서 85-Dw와 Pep-L의 처리가 BPA에 의해 유도되는 간 조직의 변성 및 간 조직의 재생을 증가 시켰음을 의미한다.

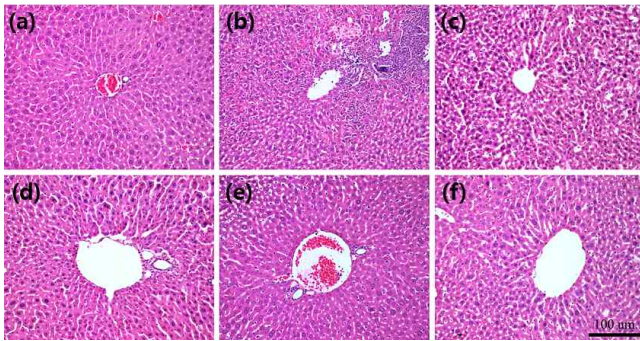


Fig. 5. The representative histological profiles of the liver sections. The liver sections were stained with hematoxylin and eosin (H&E). X100. (a) saline solution, (b) bisphenol A 20 mg/kg, (c) silymarin 80 mg/kg, (d) 85-Dw1 1 g/kg, (e) 85-Dw2 2 g/kg, (f) Pep-L 5 g/kg.

결론

결론적으로, 본 연구는 해삼 추출물 6종과 해삼 가수분해물 2종의 항염, 간 염증 개선 효과를 세포실험 및 동물실험을 통해 확인하였으며, 특히 해삼의 85도 물 추출물과 펩신 가수분해물이 간 손상을 유도한 마우스에서 간 염증 개선 효과가 있다는 것을 입증하였다. 따라서, 이러한 해삼 추출물과 가수분해물은 앞으로 만성 염증 개선, 간 기능 개선을 위한 기능성 물질로써 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 충청남도, 서천군의 해양바이오 전략소재 및 상품화 공정개발사업에서 재정적인 지원을 받아 수행되었습니다.

References

1. Coussens LM, and Werb Z. 2002. Inflammation and cancer. *Nature* 420, 860-867. <https://doi.org/10.1038/nature01>

2. Walker KA, Ficek BN, and Westbrook R. 2019. Understanding the role of systemic inflammation in Alzheimer’s disease. *ACS Chem Neurosci* 10, 3340-3342. <https://doi.org/10.1021/acscemneuro.9b00333>.

3. Alfaddagh A, Marin SS, Leucker TM, Michos ED, Blaha MJ, Lowenstein CJ, Jones SR, and Toth PP. 2020. Inflammation and cardiovascular disease: From mechanisms to therapeutics. *Am J Prev Cardiol* 4, 100130. <https://doi.org/10.1016/j.ajpc.2020.100130>.

4. Ozougwu J. 2017. Physiology of the Liver. *Int J Res Pharm Biosci* 4, 13-24. <http://doi.org/10.3889/oamjms.2019.153>

5. Shen X, Tang Y, Yang R, Yu L, Fang T, and Duan J. 2009. The protective effect of *Zizyphus jujube* fruit on carbon tetrachloride-induced hepatic injury in mice by anti-oxidative activities. *J Ethnopharmacol* 122, 555-560. <http://doi.org/10.1016/j.jep.2009.01.027>.

6. Ali SA, Sharief NH, and Mohamed YS. 2019. Hepatoprotective activity of some medicinal plants in Sudan. *Evid Based Complement Alternat Med* 2019, Article ID 2196315. <https://doi.org/10.1155/2019/2196315>.

7. Cheon JM, Kim HS, Choi EO, Kwon DH, Choi YH, Kim BY, and Hwang H. 2017. Anti-inflammatory activities of an ethanol extract of *Sargassum macrocarpum* in lipo polysaccharide (LPS)-stimulated RAW 264.7 macrophages. *J Life Sci* 27, 1437-1444. <https://doi.org/10.5352/JLS.2017.27.12.1437>.

8. Korea institute of marine science & technology promotion. 2014. The development of functional foods to enhance immune from Hiziki extracts (HIMMS-1). Project No. PJT200434.

9. Heo SJ, Kim EA, and Kang DH. 2020. Review on the Feasibility of Using Red Sea Cucumber (*Stichopus japonicus*) as a Multi-functional Marine Biomaterial and Comparing the Biochemical Components Collected from Different Regions in Korea. *J Mar Biosci Biotechnol* 12, 11-19. <https://doi.org/10.15433/ksmb.2020.12.1.011>.

10. Wang Z, Zhang H, Yuan W, Gong W, Tang H, Liu B, Krohn K, Li L, Yi Y, and Zhang W. 2012. Antifungal nortriterpene and triterpene glycosides from the sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka. *Food Chem* 132, 295 - 300. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.080>.

11. Zhou X, Wang C, and Jiang A. 2012. Antioxidant peptides isolated from sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Eur Food Res Technol* 234, 441 - 447. <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1610-x>.
12. Kim NY, Choi WY, Heo SJ, Kang DH, and Lee HY. 2017. Anti-skin cancer activities of *Apostichopus japonicus* extracts from low-temperature ultrasonification process. *J Healthc Eng* 2017, ID6504890. <https://doi.org/10.1155/2017/6504890>
13. Kariya Y, Mulloy B, Imai K, Tominaga A, Kaneko T, Asari A, Suzuki K, Masuda H, Kyogashima M, and Ishii T. 2004. Isolation and partial characterization of fucan sulfates from the body wall of sea cucumber *Stichopus japonicus* and their ability to inhibit osteoclastogenesis. *Carbohydr Res* 339, 1339 - 1346. <http://doi.org/10.1016/j.carres.2004.02.025>
14. Oh GW, Ko SC, Lee DH, Heo SJ, and Jung WK. 2017. Biological activities and biomedical potential of sea cucumber (*Stichopus japonicus*): a review. *Fish Aquatic Sci* 20, 28. <https://doi.org/10.1186/s41240-017-0071-y>.
15. Dakrory AI, Fahmy SR, Soliman AM, Mohamed AS, and Amer SAM. 2015. Protective and curative effects of the sea cucumber *Holothuria atra* extract against DMBA-induced hepatorenal diseases in rats. *Biomed Res Int* 2015, Article ID 563652, <https://doi.org/10.1155/2015/563652>.
16. Esmat AY, Said MM, Soliman AA, El-Masry KSH, and Badiea EA. 2013. Bioactive compounds, antioxidant potential, and hepatoprotective activity of sea cucumber (*Holothuria atra*) against thioacetamide intoxication in rats. *Nutrition* 29, 258-267. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2012.06.004>.
17. Bordbar S, Anwar F, and Saari N. 2011. High-value components and bioactives from sea cucumbers for functional foods-a review. *Mar Drugs* 9, 1761-1805. <http://doi.org/10.3390/md9101761>.
18. Zhu BW, Dong XP, Zhou DY, Gao Y, Yang JF, Li DM, Zhao XK, Ren TT, Ye WX, and Tan H. 2012. Physicochemical properties and radical scavenging capacities of pepsin-solubilized collagen from sea cucumber *Stichopus japonicus*. *Food Hydrocolloid* 28, 182 - 188. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.12.010>
19. Husni A, Shin IS, You S, and Chung D. 2009. Antioxidant properties of water and aqueous ethanol extracts and their crude saponin fractions from a far-eastern sea cucumber, *Stichopus japonicus*. *Food Sci Biotechnol* 18, 419 - 424.
20. Cao RA, Surayot U, and You S. 2017. Structural characterization of immunostimulating protein-sulfated fucan complex extracted from the body wall of a sea cucumber, *Stichopus japonicus*. *Int J Biol Macromol* 99, 539 - 548. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.026>.
21. Zaulet M, Kevorkian SEM, Dinescu S, Cotoraci C, Suciuc M, Herman H, Buburuzan L, Badulescu L, Ardelean A, and Hermenean A. 2017. Protective effects of silymarin against bisphenol A-induced hepatotoxicity in mouse liver. *Exp Ther Med* 13, 821-828. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4066>.
22. Choi J, Park CG, Seo KH, Kim HD, Yoon JH, Ahn YS, Kim JS. 2017. Red Ginseng Extract Improves Liver Fibrosis in Mice Treated with the Endocrine Disruptor Bisphenol A. *Korean J Plant Res* 30, 125-132. <https://doi.org/10.7732/kjpr.2017.30.2.125>.