KFAS 한국수산과학회지 Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences
한수지 53(1), 123-131, 2020

Original Article
Korean J Fish Aquat Sci 53(1),123-131,2020

산화적 손상에 대한 키조개(*Atrina pectinata*) 효소 가수분해물의 간세포 보호 효과

한의정[1,2] · 신은지[2] · 김기웅[3] · 안긴내[2,3] · 배태진[2,3]*

[1](유)난타 5000, [2]전남대학교 식품공학 · 영양학과, [3]전남대학교 해양바이오식품학과

Cytoprotective Effect of a Neutrase Enzymatic Hydrolysate Derived from Korea Pen Shell *Atrina pectinata* Against Hydrogen Peroxide -Induced Oxidative Damages in Hepatocytes

Eui Jeong Han[1,2], Eun-Ji Shin[2], Kee-Woong Kim[3], Ginnae Ahn[2,3] and Tae Jin Bae[2,3]*

[1]Department of Research and Development, Nantapizza, Damyang 05854, Korea
[2]Department of Food Technology and Nutrition, Chonnam National University, Yeosu 59626, Korea
[3]Department Marine Bio-Food Sciences, Chonnam National University, Yeosu 59626, Korea

In this study, we investigated the protective effects of a Neutrase enzymatic hydrolysate derived from Korea pen shell *Atrina pectinata* (APN) against hydrogen peroxide (H_2O_2)-induced oxidative damage in hepatocytes. First, we confirmed that APN has antioxidant activities by scavenging 2,2-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline)-6-sulfonic acid radical ($ABTS^+$) and H_2O_2 and increasing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) value. Also, the treatment of APN increased the cell viability by reducing the intracellular reactive oxygen species (ROS) production in H_2O_2-stimulated hepatocytes. In addition, APN decreased the sub-G_1 DNA contents and the apoptotic body formation increased by H_2O_2 stimulation. Moreover, APN modulated the protein expression of apoptosis related molecules (Bcl-2, Bax and p53) by suppressing the activation of nuclear factor NFkB and ERK/p38 signaling in H_2O_2-stimulated hepatocytes. Furthermore, APN led to the activation of Nrf2/HO-1signaling known as antioxidant systems. These results suggest APN protects hepatocytes against oxidative damages caused by H_2O_2 stimulation.

Keywords: *Atrina pectinate,* Hydrogen peroxide, Oxidative damages, Hepatocytes

서 론

간은 인체 내에서 물질의 대사, 분비, 이화, 저장, 합성 등 다양한 기능을 담당하고 있는 중요한 기관으로, 독성물질의 지속적인 노출과 대사 과정의 부산물들로 인해 외부 인자로부터 가장 영향을 많이 받는 기관으로 알려져 있다(Cho et al., 2008). 실제로, 알콜성 지방간, 간염 및 간경변 등과 같은 간질환의 발생률이 매년 높은 수준으로 증가하고 있으며, 사망률 또한 폐암 다음으로 높은 순위를 차지하고 있다(Gum et al., 2007). 간질환의 발생 원인으로 음주, 세균, 바이러스, 및 약물 등이 있으나, 최근 자료에 따르면 이러한 원인 물질의 직접적인 작용보다는 2차적으로 발생되는 산화적 스트레스(oxidative stress)에 의한 영향이 더 크다고 연구된 바 있다(Heo et al., 2006). 산화적 스트레스는 외부물질 뿐만 아니라 호흡과정 중 발생되는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)에 의해서도 야기된다(Kim et al., 2012). ROS는 반응성이 매우 크기 때문에 다른 분자와 결합하여 자유라디칼(free radical) 및 H_2O_2 등을 생성하고, 이는 세포 내 DNA와 RNA를 손상시키거나 세포 사멸(apoptosis) 및 노화 등의 산화적 손상을 유발한다(Kim et al., 2012; Kim et al., 2016). 따라서 산화적 스트레스를 억제하는 것은 간질환 예방의 중요한 지표가 될 수 있다. 그러나 현재까지 주된 간질환 치료제는 바이러스 증식억제제를 중심으로 개발되어왔으며, 대부분 합성 소재에 국한되어 있다(Kim, 2009). 일반적으로 합성 소재는 인체에 잠재적인 위험성과 예측하지 못한 부작용을 유

***Corresponding author:** Tel: +82. 61. 659. 7211 Fax: +82. 61. 659. 7219
E-mail address: bae5658@gmail.com

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial Licens (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.

https://doi.org/10.5657/KFAS.2020.0123
Korean J Fish Aquat Sci 53(1), 123-131, February 2020
Received 20 January 2020; **Revised** 29 January 2020; **Accepted** 12 February 2020
저자 직위: 한의정(대학원생), 신은지(대학원생), 김기웅(강사), 안긴내(교수), 배태진(교수)

발시킬 수 있기 때문에 사용에 있어 매우 조심스럽고 지속적인 사용이 불가하다는 한계를 가지고 있다(Yoo et al., 2007). 따라서, 간을 보호할 수 있는 부작용이 적고 산화적 스트레스가 야기하는 손상에 대한 예방 효능을 보유한 천연 소재의 개발은 그 의의가 매우 크다고 사료 된다(Kim et al., 2002).

키조개(*Atrina pectinata*)는 연체동물 부족류 사색목 키조개과에 속하는 대형 패류로, 대부분 부산물이나 관자인 패주를 이용하여 가공 또는 포장, 제조 등의 연구들이 주된 연구 주제였다. 그러나, 최근에는 단순 제품가공에서 벗어나 기능성 소재로서의 활용 가능성을 보여주는 다양한 연구가 진행되고 있다. 대표적으로 밝혀진 키조개의 생리활성으로는, 항산화활성(Arrieche et al., 2011), 항염증(Kaneko et al., 2019) 및 면역조절(Arrieche et al., 2011) 등이 있다. 그러나, 산화적스트레스에 의해 야기된 간손상에 대한 연구는 현재까지 밝혀진 바가 거의 없다. 따라서 본 연구에서는 정상 간세포인 hepatocytes를 이용하여 H_2O_2가 유도하는 세포 손상에 대한 키조개의 효능과 기전을 구명하고자 한다.

재료 및 방법

실험 시약 및 재료

본 연구에서 사용된 키조개(*Atrina pectinata*, AP)는 여수 시장에서 구입하였으며, 세척을 통해 염과 모래를 제거하고 -56℃의 진공상태에서 동결 건조하여 실험에 사용하였다. 실험에 사용된 2,2-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline)-6-sulfonic acid (ABTS), hydrogen peroxide, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (trolox) 및 2,2-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)는 Sigma-Aldrich Co. (St Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였고, Dulbeco's modified Eagle's media (DMEM)는 Hyclone Co. (Logan, UT, USA)로부터 구입하였으며, fetal bovine serum (FBS)과 penicillin, SuperSignal™ west femto maximum sensitivity substrate 및 NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction kit 등은 Thermo Fisher Scientific Co. (Waltham, MA, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 실험에 사용된 항체는 모두 Cell Signaling Co. (Beverly, MA, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 그 외의 모든 분석 시약은 특급 또는 HPLC급 시약을 사용하였다.

키조개(AP) 전처리 및 원재료의 일반성분 분석

세척 후 건조된 AP는 실험 전까지 -20℃에서 보관하였으며, 일반성분은 AOAC (1990)법에 따라, 수분은 105℃의 상압 건조법, 조지방은 Soxhlet 추출법, 조단백질은 Kjeldahl법을 이용하여 분석하였다.

AP 효소 가수분해물 제조

AP와 증류수를 1:50 비율로 넣고 HCl을 이용하여 적정 pH (6.0)로 맞춘 다음, 원물 대비 0.01%의 Neutrase 효소(Novozyme, Bagsvaerd, Denmark)를 첨가하였다. 50℃에서 24시간 동안 추출하여 원심분리를 한 뒤, 여과지(Whatman No.6, Whatman, Maidstone, UK)로 여과하였고, 여과된 추출물(Neutrase extract of *Atrina pectinata*, APN)은 -56℃의 진공상태에서 동결 건조하여 실험에 사용하였다. APN의 수율은 아래의 식에 따라 계산하였다.

$$\text{수율}(\%) = (\text{추출 후 시료 무게}/\text{건조 후 시료 무게}) \times 100$$

APN의 일반성분 분석

APN의 단백질 함량은 Lowry et al. (1951)의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 각 시험관에 lowry reagent 용액 1 mL을 넣고 APN (1 mg/mL)을 200 μL 처리한 후, 50% folin-ciocalteu reagent 100 μL과 혼합하였다. 그 후, 30분간 암실에서 반응시키고 enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) reader (Sunrise, Tecan Co. Ltd., Grödig, Austria) 를 이용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 검량곡선은 BSA를 이용하여 작성하였고, APN 내에 포함되어 있는 단백질의 함량을 계산하였다. 탄수화물 함량은 Kang et al. (2017)의 방법을 사용하여 측정하였다. 시험관에 1 mL 시료 용액과 25 mL 80% phenol 시약 및 2.5 mL 황산을 혼합하여 상온에서 30분간 반응시키고, ELISA reader기를 이용하여 480 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 검량곡선은 glucose를 이용하여 작성하였고, APN 내에 포함된 탄수화물의 함량을 계산하였다.

페놀 함량은 Singleton et al. (1999)의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 시험관에 APN 500 μL, 500 μL의 95% ethanol과 2500 μL의 증류수를 혼합한 후, 250 μL 50% folin-ciocalteau reagent를 넣고 5분 동안 반응시켰다. 그 후, 5% Na_2CO_3 500 μL를 첨가하여 암실에서 60분 동안 반응시키고, ELISA reader기를 이용하여 흡광도 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 검량곡선은 gallic acid를 이용하여 작성하였고, APN 내에 포함되어 있는 페놀의 함량을 계산하였다.

APN의 유리아미노산 함량 분석

APN 0.1 g과 95% ethanol 20 mL을 30℃에서 130 rpm으로 1시간 동안 추출하고 lithium citrate buffer (0.12 N, pH 2.2)를 사용하여 10 mL로 정용하였다. 정용 후, sulfosalicylic acid 0.2 g을 첨가 하여 0.2 μM membrane filter (Whatman, Maidstone, UK)로 여과하였고, 그 중 1 mL을 취하여 아미노산 분석기(automated amino acid analyzer, Sykam GmbH, Germany, Munich)를 통해 정량분석 하였다.

ABTS 라디칼 소거 활성 측정

ABTS 라디칼 소거 활성 측정은 Park and Kim (2009)의 방법을 약간 변형하여 사용하였다. ABTS (7 mM)와 potassium

persulfate (2.4 nM)를 혼합하여 12시간 동안 상온에서 방치하여 ABTS 라디칼 용액을 제조하였다. 제조된 ABTS 라디칼 용액은 사용 직전에 414 nm에서 흡광도 값이 1.5가 되도록 몰 흡광계수($\varepsilon = 3.6 \times 10^4$ $M^{-1}cm^{-1}$)를 이용하여 증류수로 희석하였다. 희석된 ABTS 라디칼 용액은 APN 50 μL와 잘 혼합하여 상온에서 10분 반응시킨 뒤 ELISA reader기를 이용하여 414 nm에서 흡광도를 측정하였다. APN의 ABTS 라디칼 소거 활성은 다음과 같은 공식에 의해 계산하였다.

ABTS radical scavenging activity (%)
=[(control 흡광도-APN 흡광도)/control 흡광도] × 100

H_2O_2 소거 활성 측정

APN 50 μL와 20 μL의 H_2O_2 (10 mM) 및 120 μL의 sodium phosphate buffer (pH 6.0, 0.1 M)를 잘 혼합하여 37°C에서 5분간 반응시켰다. 그런 다음 30 μL의 ABTS (1.25 mM)와 30 μL peroxidase (1 Unit/mL)를 첨가하여 추가적으로 37°C에서 10분간 반응시킨 다음 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. APN의 H_2O_2소거 활성은 다음과 같은 공식에 의해 계산하였다.

Hydrogen peroxide scavenging activity (%)
=[(control 흡광도-APN 흡광도)/control 흡광도] × 100

Oxygen radical absorbance capacity (ORAC) 측정

ORAC assay는 항산화력 측정기법인 라디칼 소거 활성 측정법으로 Zulueta et al. (2009)이 제시한 방법에 의해 수행하였다. APN (200 μg/mL) 50 μL와 75 nM fluorescein 50 μL를 혼합하여 37°C incubator에서 15분 동안 반응 시킨 후, AAPH (221 mM) 10 μL를 첨가하였다. ELISA reader기를 이용하여 excitation 485 nm/emission 538 nm에서 5분 간격으로 120분간 측정하였고 표준시약인 trolox와 추출물의 area under the curve (AUC)를 측정하였다. APN의 ORAC 활성은 표준시약 농도와 AUC간의 회귀곡선을 이용하여 μM trolox equivalent (TE)/mg sample로 표기하였다.

세포 배양

실험에 사용한 hepatocytes는 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS)과 penicillin (100 unit/mL)이 포함된 DMEM 배지에서 배양하였다. 세포는 37°C와 5% CO_2 조건을 유지하는 배양기(Sanyo Electric Co., Ltd, Japan)에서 배양하였으며, 3일마다 계대배양을 실시하였다.

Hepatocytes의 생존율에 대한 APN의 효능 평가

Hepatocytes의 생존율에 대한 APN의 영향을 평가하기 위해 thiazolyl blue tetrazolium bromide (MTT) assay를 수행하였다. Hepatocytes (2×10^4 cells/well)를 96 well plate에 동일하게 분주하여 37°C, 5% CO_2 조건하에서 18시간 동안 안정화시킨 후, APN을 농도별(125, 250, 500 μg/mL)로 처리하였다. 24시간 후, 15 μL의 MTT 시약(AMRESCO, 5 mg/mL)을 각 well에 첨가하여 4시간 동안 반응시켰고 상층액을 제거한 다음 100 μL의 dimethylsulfoxide (DMSO)를 처리하여 생성된 formazan 침전물을 용해시켰다. 세포 생존율은 ELISA reader기를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정한 후, 다음과 같은 식에 의해 계산하였다.

세포 생존율(%)
=(APN 처리 세포 흡광도/control 세포 흡광도) × 100

H_2O_2 처리에 의해 산화적 손상이 유발된 hepatocytes의 생존율에 대한 APN의 효능 평가

H_2O_2 처리에 의해 감소된 hepatocytes의 생존율에 대한 APN의 영향을 확인하기 위해 MTT assay를 이용하여 측정하였다. Hepatocytes (2×10^4 cells/well)를 96 well plate에 동일하게 분주하여 37°C, 5% CO_2 조건하에서 18시간 동안 안정화시킨 후, APN을 농도별(125, 250, 500 μg/mL)로 처리하였다. 1시간 뒤, H_2O_2 (1 mM)를 세포에 처리하고 추가적으로 24시간 배양한 다음 위에 제시된 방법과 동일한 방법으로 세포 생존율을 평가하였다. 세포생존율은 다음과 같은 식에 의해 계산하였다.

세포 생존율(%)=(H_2O_2 또는 H_2O_2+APN 처리 세포의 흡광도/control 세포 흡광도) × 100

H_2O_2 처리가 야기하는 hepatocytes 내 ROS 생성에 대한 APN의 억제 효능 평가

H_2O_2 처리에 의해 증가된 세포 내 ROS 생성에 대한 APN의 억제 효능을 측정하기 위하여 2'-7'-dichlorofluorescin diacetate (DCF-DA) assay를 수행하였다. Hepatocytes (1.6×10^4 cells/well)를 96 well plate에 분주하여 37°C, 5% CO_2 조건하에서 18시간 동안 안정화시킨 후, APN을 각 농도별(125, 250, 500 μg/mL)로 처리하였다. 1시간 동안 반응시킨 다음, H_2O_2 (1 mM)로 자극하여 추가적으로 배양하였다. 1시간 후, DCFH-DA 용액(0.5 mg/mL)을 각 well에 첨가하여 5분 동안 반응시켰고 ELISA reader기를 통해 excitation 485 nm/emission 528 nm에서 형광강도를 측정하여 세포 내 ROS 생성량을 계산하였다.

ROS 생성량(%)= (control 및 H_2O_2+APN 처리 세포의 흡광도/H_2O_2 처리 세포의 흡광도) × 100

H_2O_2가 처리된 hepatocytes에서 apoptotic body 형성에 대한 APN의 억제 효능 평가

H_2O_2 처리가 야기한 hepatocytes 내 apoptotic body 형성에 대

한 APN의 억제 효능을 평가하기 위해 세포 간 투과성 DNA 염료인 Hoechst 33342를 사용하여 형광 염색을 수행하였다. 먼저 hepatocytes (5×10^5 cells/well)를 6 well plate에 분주하여 37°C, 5% CO_2 조건하에서 24시간 동안 안정화시킨 후, APN을 농도별(125, 250, 500 μg/mL)로 처리하였다. 1시간 동안 반응시킨 다음, H_2O_2 (1 mM)를 처리하여 추가적으로 12시간 동안 배양하였다. 배양 후, Hoechst 33342 시약(2 μg/mL)을 처리하여 30분 동안 반응시킨 다음, 형광현미경을 통해 염색된 세포 내 apoptotic body의 형성을 확인하였다.

H_2O_2가 처리된 hepatocytes에서 증가된 sub-G_1 DNA 함량에 대한 APN의 보호 효능 평가

H_2O_2 처리에 의해 증가된 hepatocytes 내 sub-G_1 DNA 함량에 대한 APN의 영향을 확인하기 위해 propidium iodide (PI) 염색을 수행하였다. 먼저 hepatocytes (5×10^5 cells/well)를 6 well plate에 분주하여 37°C, 5% CO_2 조건하에서 24시간 동안 안정화시킨 후, APN을 농도별(125, 250, 500 μg/mL)로 처리하였다. 1시간 동안 반응시킨 다음, H_2O_2 (1 mM)를 처리하여 추가적으로 배양하였다. 12시간 뒤, 세포를 70% 에탄올에서 고정하였고 RNase (10 μg/mL)와 PI 시약(100 μg/mL)을 첨가하여 30분 동안 반응시킨 후, CytoFLEX (Beckman coulter, California, USA)를 사용하여 sub-G_1 함량을 분석하였다.

H_2O_2가 처리된 hepatocytes에서 apoptosis, NFκB, MAPKs 및 Nrf2/HO-1 신호전달경로 활성화에 대한 APN의 영향 평가

H_2O_2가 처리된 hepatocytes에서 apoptosis와 관련된 대표적인 단백질(Bcl-2, Bax 및 p53)과 nuclear Factor-kappaB (NFκB), mitogen-activated protein kinase (MAPK) 및 nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)/heme oxygenase-1 (HO-1) 신호전달경로의 활성화에 대한 APN의 억제 효과를 알아보기 위하여 western blot을 수행하였다. Hepatocytes (5×10^5 cells/dish)를 6 cm dish에 분주하여 37°C, 5% CO_2 조건하에서 24시간 동안 안정화시킨 후, APN을 각 농도별(125, 250, 500 μg/mL)로 처리하였다. 1시간 동안 반응시킨 다음, H_2O_2 (1 mM)로 자극하여 추가적으로 60분(NFκB 및 MAPKs) 및 12시간(Bcl-2, Bax, p53 및 Nrf2/HO-1) 동안 배양하였다. 이후 NE-PER nuclear and cytoplasmic extraction kit를 사용하여 세포로부터 단백질을 추출한 뒤, BCA kit를 이용하여 정량하였다. 추출된 단백질(40 μg)을 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel에서 분자량별로 분리하였고, 분리된 단백질은 nitrocellulose membrane으로 전이시켰다. 단백질이 전이된 membrane은 비 특이적인 반응을 방지하기 위해 5% skim milk에서 blocking하여 1차 항체 Bcl-2 (1:1000), Bax (1:1000), p53 (1:1000), IκBα (1:1000), p65 (1:1000), phosphor(p)-IκBα (1:1000), p-p65 (1:1000), ERK (1:1000), p-ERK (1:1000), p38 (1:1000), p-p38 (1:1000), HO-1 (1:1000), β-actin (1:10000) 및 Lamin B (1:1000)와 반응시켰다. 이후에 2차항체인 anti-rabbit IgG conjugated HRP (horse-radish peroxidase), anti-mouse IgG conjugated HRP (3000:1)와 반응시킨 후, ECL detection reagent를 이용하여 표적 단백질의 발현을 측정하였다.

통계처리

실험결과는 3회 반복으로 행하여 평균±표준오차로 나타내었고 유의성은 SPSS (23.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)와 분산분석(ANOVA)을 실시하였으며, 각 측정 평균값의 유의성 ($P<0.05$)은 Duncan's multiple range test로 검정하였다.

결과 및 고찰

AP 일반성분 분석

AP의 일반성분을 분석한 결과는 아래 Table 1과 같다. AP는 단백질함량이 69.61±0.78%로 가장 높았고, 지방과 수분 함량은 각 2.78±0.04%와 31±0.24%였다.

APN의 수율 및 성분분석

APN의 수율 및 성분을 분석한 결과는 Table 2와 같다. APN의 수율은 76.39±0.60%였고, 단백질 성분이 52.37±1.99%로 가장 많은 함량을 나타내었고, 탄수화물은 8.60±0.51%, 페놀은 6.30±0.17%의 함량을 나타내었다. 일반적으로 생리활성 성분은 펩타이드에 기인하는 경우가 많은데 이러한 펩타이드는 효소에 의한 단백질 가수분해를 통해 생산된다 (Choi et al., 2013). Neutrase는 상업적으로 주로 이용되는 효소 중 하나로, Lee et al. (2016)에 의하면, 굴을 Neutrase 효소를 사용하여 가수분해 하였을 때 가수분해도가 좋았으며, ABTS 라디칼 소

Table 1. Proximate composition of AP (%)

Proximate composition	Contents (%)
Moisture	3.31±0.24
Crude protein	69.61±0.78
Crude fat	2.78±0.04

AP, Neutrase enzymatic hydrolysate derived from Korea pen shell *Atrina pectinata*.

Table 2. Yield and proximate composition of APN (%)

APN	Contents
Yield	76.39±0.60
Carbohydrate	8.60±0.51
Protein	52.37±1.99
Total phenol	6.30±0.17

APN, Neutrase enzymatic hydrolysate derived from Korea pen shell *Atrina pectinata*.

Table 3. Free amino acid contents of APN

Amino acid	APN	
	mg/100 g	% amino acid
Phosphoserine	ND	ND
Taurine	35.733	6.85
Phosphoethanolamine	ND	ND
Urea	ND	ND
Aspartic acid	6.913	1.17
Hydroxyproline	ND	ND
Threonine	25.171	4.25
serine	26.656	4.50
Asparagine	27.858	4.70
Sarcocine	ND	ND
α-aminoadipic acid	ND	ND
Proline	21.222	3.58
Glycine	17.236	2.91
Citrulline	ND	ND
α-aminobutyric acid	ND	ND
Valine	38.362	6.48
Cystine	ND	ND
Methionine	33.592	5.67
Isoleucine	37.153	6.27
Leucine	32.434	15.61
Tyrosine	22.632	3.82
phenylalanine	32.278	5.45
β-alanine	ND	ND
β-aminoisobutyric acid	ND	ND
γ-amino-n-butyric acid	ND	ND
Histidine	13.541	2.29
3-methylhistidine	1.318	0.22
1-methylhistidine	ND	ND
Carnosine	ND	ND
Anserine	ND	ND
Tryptopan	15.236	2.57
Hydroxylysine	ND	ND
Ornitine	16.204	2.74
Lysine	12.54	2.12
Ethanolamine	ND	ND
Arginine	15.126	2.55
Total	431.205	100.00

APN, Neutrase enzymatic hydrolysate derived from Korea pen shell *Atrina pectinata*; ND, Not detected.

거 활성도 우수하다고 보고한 바 있다. 또한, Kim et al. (2019)은 키조개 물 추출물 내 유리아미노산인 taurine (4 mg/100 g)에 의해 우수한 라디칼 소거 활성을 가지고 있을 뿐만 아니라 산화적 스트레스를 야기한 간세포에서 세포 보호 효과를 가진다고 보고하였다. 본 연구에서 사용된 APN은 taurine 함량이 35.73±0.00 mg/100 g으로 물 추출물보다 더 많은 taurine 함량을 보여 H_2O_2에 의해 야기되는 산화적 손상에 대한 세포 보호 효과를 가질 것으로 사료된다(Table 3).

APN의 항산화 활성 평가

APN의 *In vitro* 항산화 활성을 측정한 결과, APN을 처리하였을 때 농도의존적으로 ABTS 라디칼을 감소시켰고, 특히 고농도인 500 μg/mL에서 약 76%의 우수한 ABTS 라디칼 소거 활성을 보였다(Fig. 1A). 또한, APN은 33329.45 TE μM/mg sample의 우수한 ORAC 수치를 보였다(Fig. 1B). Fig. 1C는 APN의 H_2O_2 소거 활성을 나타낸 결과로, APN 처리에 의해 유의적으로 H_2O_2 소거 활성이 증가한 것을 확인하였다. 이전 연구결과는 Neutrase 효소를 이용하여 추출할 경우, leucine, alanine, methionine 및 taurine과 같은 유리아미노산 함량이 증가되어 자유라디칼 소거에 도움을 준다고 보고한 바 있다(Lee et al., 2016). Neutrase 추출에 의해 제조된 APN은 taurine을 비롯한 여러 유리아미노산의 증가를 유도하였고, 이렇게 증가된 유리아미노산 성분에 의해 우수한 항산화 활성을 보인 것으로 사료된다.

Hepatocytes에서 H_2O_2에 의해 감소된 생존율과 세포 내 ROS 생성에 대한 APN의 효능 평가

APN 처리에 의한 hepatocytes의 생존율 변화를 확인한 결과, APN을 농도별(125, 250, 500 μg/mL)로 처리하였을 때 대조군과 유의적인 생존율 차이를 보이지 않았다(Fig. 2A). 따라서 사용된 모든 농도의 APN이 세포 독성을 보이지 않음을 확인하였다. H_2O_2를 처리한 세포의 생존율이 아무것도 처리하지 않은 대조군에 비해 약 17.20±0.60%로 감소되었으나, APN을 처리함으로써 감소된 생존율이 유의적으로 증가된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2B). 또한, 흥미롭게도, H_2O_2 처리에 의해 증가된 세포 내 ROS 생성량이 APN 처리에 의해 감소되었다(Fig. 2C). 따라서 이러한 결과는 APN이 H_2O_2에 의해 증가된 세포 내 ROS 생성량을 감소시킴으로써 세포를 보호한다는 것을 제시한다. Yamaguchi et al. (1980)은 아미노산 중 taurine과 더불어 methionine, tyrosine 및 histidine이 항산화활성에 도움을 주며, methionine과 histidine의 경우에는 C-말단에, tyrosine의 경우 N-말단에 위치할 때 그 효과가 상승하고 산화적 스트레스를 감소시키는데 도움을 준다고 보고한 바 있다. APN 역시, Neutrase 추출에 의해 H_2O_2가 야기하는 세포 내 산화적 스트레스 감소에 도움을 주는 유리아미노산이 용출되어 세포 보호 효능을 가지는 것으로 사료된다.

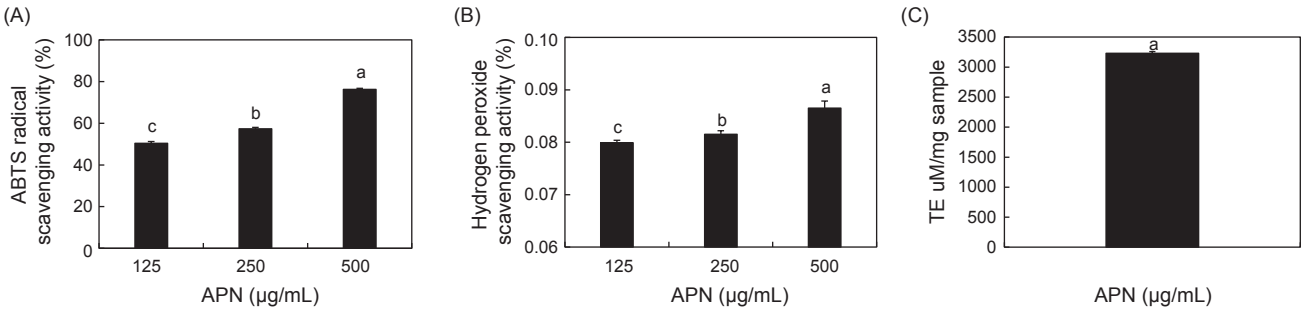

Fig. 1. Effects of APN on scavenging activities of ABTS radical (A) and H_2O_2 (B) and ORAC value (C). Values means±S.E of three determinations. APN, Neutrase enzymatic hydrolysate derived from Korea pen shell *Atrina pectinata*; ABTS, 2,2-azino-bis (3-ethylbenzthiazoline)-6-sulfonic acid radical; ORAC, oxygen radical absorbance capacity .

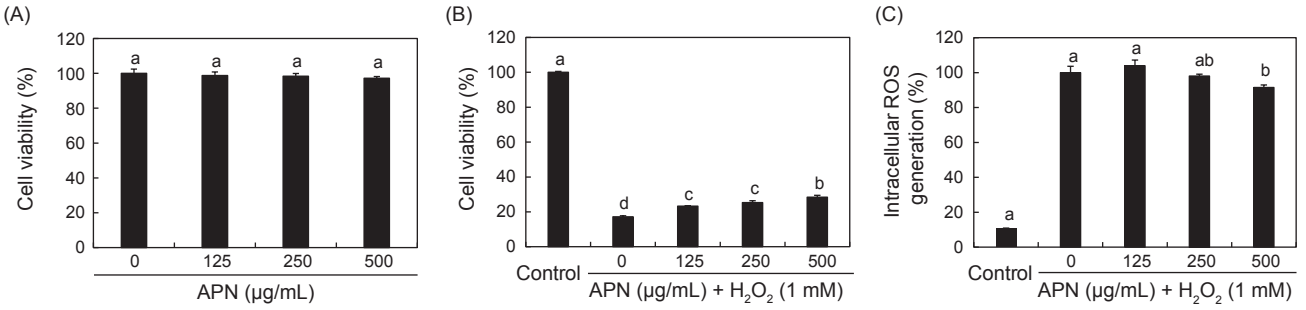

Fig. 2. Effects of APN on cell viability (A and B) and ROS production (C) in H_2O_2-treated or non-treated hepatocytes. Values means±S.E of three determinations. Bars with different letters are significantly different ($P<0.05$). APN, Neutrase enzymatic hydrolysate derived from Korea pen shell *Atrina pectinata*; ROS, reactive oxygen species

H_2O_2가 처리된 hepatocytes에서 apoptotic body 형성 및 sub-G_1 DNA 함량 증가에 대한 APN의 영향 평가

먼저 hepatocytes에서 H_2O_2 처리에 의해 야기된 apoptotic body 형성에 대한 APN의 억제 효능을 확인하기 위해 Hoechst 33342 염색을 수행하였다. 그 결과, 아무것도 처리하지 않은 군에서는 전체적으로 세포의 핵 손상이나 형태학적 변화가 없었으나, H_2O_2가 처리된 세포에서는 핵이 손상되어 apoptotic body가 많이 형성된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3A). 그러나 APN을 농도별(125, 250, 500 μg/mL)로 처리한 경우 H_2O_2에 의해 증가된 apoptotic body의 형성이 효과적으로 감소된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 3A). Fig. 3B는 H_2O_2 처리에 의한 hepatocytes 내 sub-G_1 DNA 함량에 대한 APN의 감소효과를 확인한 결과로, 아무것도 처리하지 않은 세포의 sub-G_1 DNA 함량은 10.49±1.20%였으나, H_2O_2 처리에 의해 30.34±0.42%까지 현저하게 증가된 것을 볼 수 있었다. 그러나, APN을 농도별(125, 250, 500 μg/mL)로 처리함으로써, H_2O_2에 의해 증가된 sub-G_1 DNA 함량이 농도 의존적으로 감소되었다. 따라서 이러한 결과로부터 APN는 H_2O_2 처리가 야기한 sub-G_1 DNA 함량과 apoptotic body 형성을 감소시킴으로써 hepatocytes를 보호한다는 것을 알 수 있었다.

H_2O_2가 처리된 hepatocytes에서 apoptosis 관련 단백질 발현에 대한 APN의 억제 효능 평가

Fig. 4에 제시된 것처럼 H_2O_2가 처리된 세포는 anti-apoptotic 분자인 Bcl-2의 발현량이 아무것도 처리하지 않은 세포에 비해 감소되었고, pro-apoptotic 분자인 Bax와 p53의 발현량은 증가되었다. 그러나, 이들은 APN을 농도별(125, 250, 500 μg/mL) 처리에 의해 그 발현량이 조절되었다. 따라서 이와 같은 결과로부터, APN은 apoptosis관련 단백질의 조절을 통해 apoptotic body 및 sub-G_1 DNA 함량을 감소시킴으로써 H_2O_2가 야기하는 산화적 손상으로부터 apoptosis를 억제한다는 것을 시사한다.

H_2O_2가 처리된 hepatocytes에서 NFκ B 및 MAPKs 신호전달경로 활성화에 대한 APN의 억제 효능 평가

NFκB는 일반적으로 염증과 관련된 대표적인 신호전달 경로이지만 ROS 및 apoptosis 단백질의 조절에도 밀접한 관계가 있다 (Hsu et al., 2013). 따라서 H_2O_2 처리에 의해 활성화된 NFκB 경로에 대한 APN의 억제 효능을 확인하였다. Fig. 5A에 제시된 것처럼 H_2O_2로 자극된 세포는 아무것도 처리하지 않은 세포에 비해 인산화된 IκBα (p-IκBα)와 NFκB p65

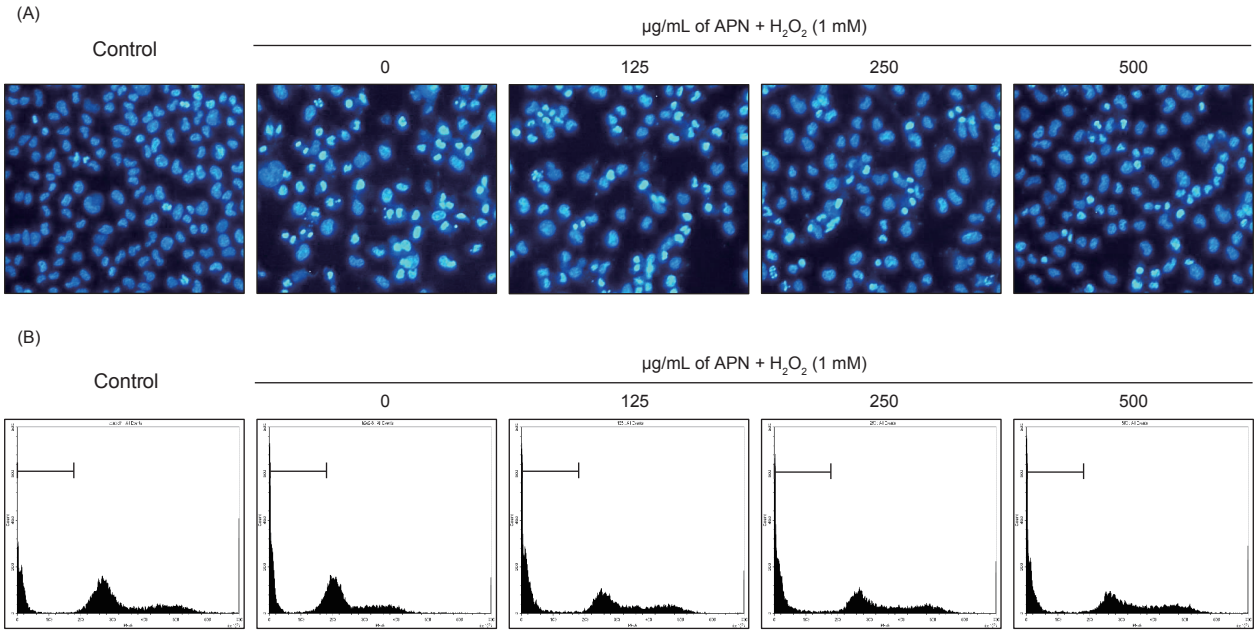

Fig. 3. Effect of APN on the formation of apoptotic body and sub-G_1 DNA contents induced by H_2O_2 treatment in hepatocytes (A). The apoptotic body formation was observed under a fluorescence microscope by examining Hoechst 33342 staining. And the cell cycle from PI staining was performed using flow cytometry (B). Values means±S.E of three determinations. APN, Neutrase enzymatic hydrolysate derived from Korea pen shell *Atrina pectinata*; PI, propidium iodide.

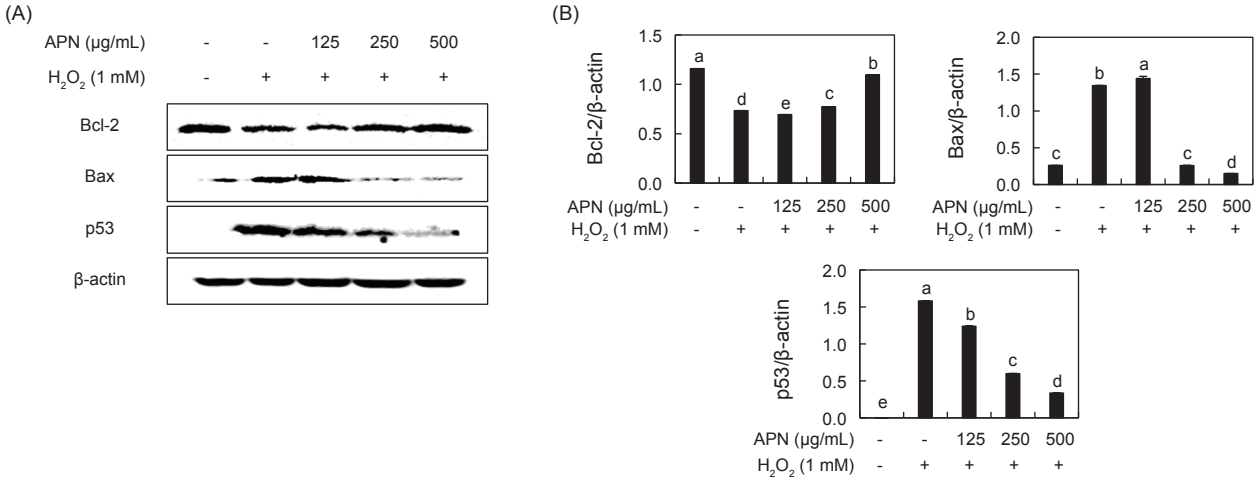

Fig. 4. Effects of APN on apoptosis in H_2O_2-stimulated hepatocytes. Bcl-2, Bax and p53 molecules were measured using western blot. Hepatocyte were pretreated with the indicated concentrations of APN for 1 h, and then stimulated with H_2O_2 for 12 h. Values means±S.E of three determinations. Bars with different letters are significantly different ($P<0.05$). APN, Neutrase enzymatic hydrolysate derived from Korea pen shell *Atrina pectinata*.

(p-NFκB p65)의 발현이 증가한 것을 확인할 수 있었으나 APN을 농도별(125, 250, 500 μg/mL)로 처리하였을 때, 농도의존적으로 p-IκBα 및 p-NFκB p65의 발현이 감소하였다. 또한, NFκB p65의 핵 내 발현량 역시 APN의 처리에 의해 그 발현량이 감소하였다.

다음은 NFκB의 상위기전으로 알려진 MAPKs 신호전달 경로에 대한 APN의 억제 효능을 확인하였다. Fig. 4B에 제시된 것처럼 H_2O_2 자극된 세포에서 아무것도 처리하지 않은 세포에

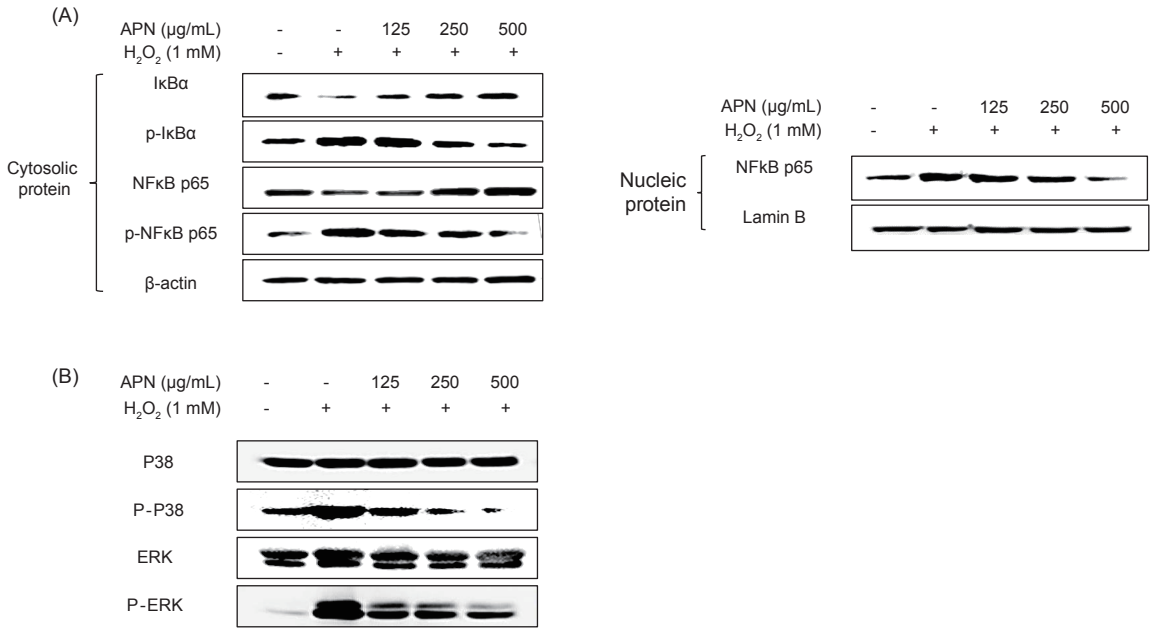

Fig. 5. Effects of APN on activated NFκB (A), MAPKs (B) signaling pathway in H_2O_2-stimulated hepatocytes. NFκB, MAPKs signaling molecules were measured using western blot. APN, Neutrase enzymatic hydrolysate derived from Korea pen shell *Atrina pectinata*.

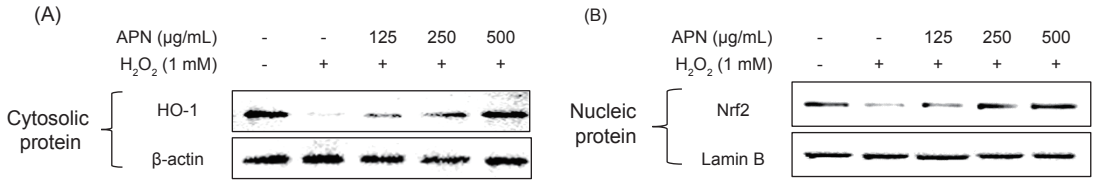

Fig. 6. Evaluation of the effect of APN on Nrf2/HO-1 signaling pathway in H_2O_2-stimulated hepatocytes. The bars with different letters represent significant differences ($P<0.05$). Values are expressed as means±SE (n=3). APN, Neutrase enzymatic hydrolysate derived from Korea pen shell *Atrina pectinata*.

비해 p-ERK와 p-p38의 발현이 증가한 것을 확인할 수 있었으나, APN (125, 250, 500 μg/mL)의 처리에 의해 농도 의존적으로 p-ERK 및 p-p38의 발현이 감소되었다. 따라서 APN은 H_2O_2 처리에 의한 NFκB 및 MAPKs 신호전달경로의 활성화를 효과적으로 억제한다는 것을 확인하였다.

H_2O_2가 처리된 hepatocytes에서 Nrf2/HO-1 신호전달경로에 미치는 APN의 영향 평가

산화적 스트레스를 받는 동안 Nrf2는 핵으로 들어가서 항산화 조절제를 코딩하는 유전자의 발현을 유도하게 되고, 이 중에서도 HO-1은 Nrf2가 프로모터에 결합할 수 있는 다수의 ARE 서열에 의해 우선적으로 유도되기 때문에 항산화와 관련하여 가장 대표적인 효소라고 볼 수 있다(Yuan et al., 2017). 최근 연구에 의하면 Nrf2/HO-1 신호전달 경로가 ROS 생성 및 산화적 스트레스와도 밀접하게 관련되어있다고 보고된 바 있기 때문에, H_2O_2가 처리된 hepatocytes에서 Nrf2/HO-1 신호전달에 대한 APN의 영향을 확인하였다. 그 결과, H_2O_2가 처리된 세포에서는 세포질의 HO-1과 핵 내의 Nrf2 발현량이 감소되었으나, 이것은 APN 처리에 의해 모두 증가되었다(Fig. 6). 이 결과로부터, APN은 NFκB, MAPKs 및 Nrf2/HO-1 신호전달경로 조절을 통해, H_2O_2가 야기하는 세포 손상으로부터 세포를 보호하는 것을 확인하였으며, 이는 Neutrase에 의해 AP 내의 taurine 함량이 용출되면서 생리활성에 도움을 준 것으로 사료된다. 나아가 산화적 손상에 의해 야기되는 간질환에 있어 부작용이 없는 천연의 소재로서 잠재적인 자원이 될 수 있음을 시사한다.

References

AOAC (Association of Official Analytical Chemists). 1990. Official method of analysis (15th ed.).AOAC, Washington D.C., U.S.A.

Arrieche D, Maeda-Martínez AN, Zenteno-Savin T, Ascencio-Valle F and Farías-Sánchez JA. 2011. Scope for growth, biochemical composition, and antioxidant immune responses of the penshell Atrina maura to flow velocity and concentration of microalgae. Aquaculture 319, 211-220. https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2011.06.040.

Choi DW, Kim NH and Son KB. 2013. Isolation of iron-binding peptides from sunflower *Helianthus annuus L.* seed protein hydrolysates. Korean J Food Cook Sci 42, 2288-5978.

Cho SH, Choi YJ, Rho CW, Choi CY, Kim DS and Cho SH. 2008. Reactive oxygen species and cytotoxicity of bamboo (Phyllostachys pubescens) sap. Korean J. Food Preserv 15, 105-110.

Gum SI, Lee DU and Cho MK. 2007. Protective effects of water extracts composed of Adenophora triphylla var. *japonica Hara* on the acetaminophen-induced hepatotoxicity. Korean J Food Sci Technol 39, 688-693.

Heo JH, Park JG, Cheon HJ, Kim YS, Kang SS, Bae KH and Lee SM. 2006. Hepatoprotective activities of gomisin A and gomisin N. Korean J Pharmacol 37, 294-306.

Hsu CC, Lien JC, Chang CW, Chang CH, Kuo SC and Huang TF. 2013. Yuwen02f1 suppresses LPS-induced endotoxemia and adjuvant-induced arthritis primarily through blockade of ROS formation, NFkB and MAPK activation. Biochem Pharmacol 85, 385-395. https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.11.002.

Kaneko G, Ushio H and Ji H. 2019. Application of magnetic resonance technologies in aquatic biology and seafood science. Fish Sci 85, 1-17.

Kang NL, Han EJ, Park SY, Jee YH, Jeon YJ, Ahn CB and Ahn GN. 2017. Inhibitory effects of *ecklonia cava* ethanol extracts against TNF-α/IFN-γ-Induced inflammation in human keratinocytes. J Chitin Chitosan 22, 82-88. http://dx.doi.org/10.17642/jcc.22.2.3.

Kim KS, Han SH, An IS, Ahn KJ, Kim KS, Han SH and Ahn KJ. 2016. Protective effects of ellagic acid against UVA-induced oxidative stress in human dermal papilla. Asian J Beauty Cosmetol 14, 191-200. https://doi.org/10.20402/ajbc.2016.0048

Kim OK, H JN, Nam DE, Jun WJ, Hwang KT, Kang JE and Lee JM. 2012. Hepatoprotective effect of Curdrania tricuspidata extracts against oxidative damage. J Korean Soc Food Sci Nutr 41, 7-13. https://doi.org/10.3746/jkfn.2012.41.1.007.

Kim S, Hwang CY, Kim NK, Park MC and Kim J. 2002. Effects of cordyceps militaris on CCl4-induced liver damage and cancer cell (HepG2 cell) growth. J Physiol Pathol Korean Med 16, 684-692.

Kim WJ. 2009. Epidemiology, clinical manifestations, and management of pandemic novel Influenza A (H1N1). Korean J Med 77, 157-164.

Kim YS, Kim EK, Dong X, Shin WB, Park JS, Kim SJ and Park PJ. 2019. Antioxidant and protective effects of atrina pectinata extract. Adv Expe Med Biol, 627-641.

Lee SS, Park SH, Kim HA and Choi YJ. 2016. Fermentation process for odor removal of oyster *Crassostrea gigas* hydrolysate and its properties. J Korean Soc Food Sci Nutr 45, 542-550. http://dx.doi.org/10.3746/jkfn.2016.45.4.542.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193, 265-275.

Park MK. and Kim CH. 2009. Extraction of polyphenols from apple peel using celluclast and pectinase and estimation of antioxidant activity. J Korean Soc Food Sci Nutr 38, 535-540. https://doi.org/10.3746/jkfn.2009.38.5.535.

Singleton VL, Orthofer R and Lamuela-ravetos RM. 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Meth Enzymol 299, 152-178. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)99017-1.

Yamaguchi N, Naito S, Yokoo Y and fujimaki M. 1980. Application of protein hydrolyzate to biscuit as antioxidant. J Japan Soc Food Sci Technol 27, 56-59. https://doi.org/10.3136/nskkk1962.27.56.

Yoo TW, Kim BI, Kim JB, Kim DJ, Kim JW, Baik SK, Kim KS and Cheon GJ. 2007. The Survey for the actual condition of drug medication and development of health care cost associated with toxic liver injury in Korean; A multicenter study for the detection and the development of nationwide reporting system of toxic liver injury. Korean J Hepatol 13, 34-43.

Yuan XY, Pang XW, Zhang GQ and Guo JY. 2017. Salidroside's protection against UVB-mediated oxidative damage and apoptosis is associated with the upregulation of Nrf2 expression. Photomed Laser Surg 35, 49-56. https://doi.org/10.1089/pho.2016.4151.

Zulueta A, Esteve MJ and Frigola A. 2009. ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. Food Chem 114, 310-316. 10.1016/j.foodchem.2008.09.033.