

알코올로 인한 흰쥐의 백혈구 및 간 DNA 손상에 미치는 미더덕과 오만둥이 분말의 보충섭취 효과

김정미¹ · 박해룡² · 이승철² · 박은주^{1*}

¹경남대학교 식품영양학과

²경남대학교 식품생명학과

Ethanol Induced Leucocytic and Hepatic DNA Strand Breaks Are Prevented by *Styela clava* and *Styela plicata* Supplementation in Male SD Rats

Jung-Mi Kim¹, Hae-Ryoung Park², Seung-Cheol Lee², and Eunju Park^{1*}

¹Dept. of Food and Nutrition, Kyungnam University, Gyeongsan 631-701, Korea

²Dept. of Food Science and Biotechnology, Kyungnam University, Gyeongsan 631-701, Korea

Abstract

In this study, the ability of *Styela clava* or *Styela plicata* to reduce ethanol-induced hepatotoxicity and hepatic and leucocytic DNA damages was evaluated. Twenty four male SD rats were given 25% ethanol containing water (*ad lib*, *p.o.*) and divided into 3 groups; ethanol treated control group (EtOH), ethanol+3% *S. clava* (EtOH+SC), and ethanol+3% *S. plicata* (EtOH+SP). After 6 weeks, the supplementation of *S. clava* reduced the plasma ALT, ALP and LDH activities significantly ($p < 0.05$), while *S. plicata* induced significant decrease in the plasma LDH activity only. The comet assay was employed to quantify the alcohol-induced DNA damage in rat hepatocytes and leucocytes. A significant protective effect on hepatic and leucocytic DNA damages was observed in *S. clava* or *S. plicata* supplemented groups compared to the EtOH control group. The hepatic DNA damage was correlated positively with plasma ALP and LDH activities. These results demonstrated that *S. clava* or *S. plicata* supplementation protected alcohol-induced hepatic and leucocytic DNA damage.

Key words: *Styela clava*, *Styela plicata*, alcohol, liver function, DNA damage

서 론

간은 인체에서 가장 큰 장기로, 중요한 각종 대사작용 및 해독작용을 총괄하고 혈류량이 풍부하여 '인체의 화학공장', '제2의 심장' 등으로 불리기도 한다. 산업화 시대를 사는 우리 신체는 각종 공해물질 및 유독물질에 항상 노출되어 있어 이를 해독하기 위하여 간은 끊임없이 혹사당하고 있다. 특히 과도한 음주는 간 손상의 원인이 되어 간의 해독작용이 원활하게 수행되지 못함으로써 면역체계에 이상을 가져와 다른 질병의 원인이 되기도 한다(1).

2004년 우리나라의 알코올 섭취량은 15세 이상 성인 1인당 연 평균 음주량이 8.3리터로 OECD 평균인 9.6리터보다는 낮은 수준이지만(2), 해마다 알코올 섭취 수준은 꾸준히 증가하여 1962년에 비해 6.2배 정도 증가한 것으로 나타났다(3). 과도한 음주는 다양한 질병의 원인이 되지만 호흡기계 암, 식도, 췌장 및 간을 포함한 소화기계 암 및 유방암, 난소암, 간경변 등의 발병과 밀접한 관련이 있다(4). 특히 만성적인 알코올 섭취는 알코올 대사산물인 acetaldehyde에

의해 활성 산소종과 같은 유리 라디칼을 생성하여 지질과산화물을 형성하고 이로 인해 간세포 파괴 및 섬유화의 원인이 된다고 알려져 있다(5,6). 따라서 간독성을 일으키는 유발물질로부터 간세포를 보호하고, 간질환의 예방, 개선 및 치료 효과를 보이는 물질 및 알코올 다량 섭취로 인한 암 발생을 예방할 수 있는 물질의 탐색을 위한 연구가 필요하다.

해양 생태계는 지구상에 존재하는 생물계의 95%를 차지하고 있으며 육상생물에 없는 특유의 대사과정과 독특한 환경으로 인하여 다양한 신규 생리활성물질의 탐색 가능성을 가지고 있다(7). 육상생물은 이미 많은 연구가 진행된 반면 해양생물은 고대로부터 내려오는 해양생물을 이용한 민간요법의 부재와 해양생물의 수집의 어려움 등의 이유로 이제까지 제한된 연구만이 이루어져 앞으로 해양생물을 이용한 미지의 천연 물질의 개발에 대한 기대가 높게 평가되고 있다(8,9). 이와 관련하여 최근 조류(algae), 해면(sponges), 피낭동물(tunicates) 등의 해양생물로부터 유효성분을 분리하여 항암활성을 확인한 연구가 진행된 바 있다(9-11)

미더덕(*Styela clava*)은 척삭동물문 미색동물아문에 속하

*Corresponding author. E-mail: pej@kyungnam.ac.kr
Phone: 82-55-249-2218, Fax: 82-55-244-6504

는 해양생물로서, 1980년대 중반부터 본격적인 양식이 시작되면서 어민의 소득 증대에 기여하고 있다(12). 그리고, 미더덕은 우리나라 전역에서 발견되는 해양생물로서, 특히 경상남도 마산시에서 우리나라 소비량의 80%정도를 생산하고 있다. 독특한 맛과 향긋한 향 때문에 연중 이용되고 있으며, 4월부터 7월 사이가 생산량이 가장 많은 시기이다. 미더덕의 소비 형태는 주로 찜이나 된장찌개 등의 재료로 식품에 널리 이용되고 있으며, 그 밖에 횡감용으로는 4~5월경에 채취된 것이 이용되고 있다.

미더덕에 대한 연구는 스테롤함량(13), 계절에 따른 영양 성분 조성의 변화(14,15) 등 주로 성분에 대한 연구가 대부분이었으며, 기능성 성분으로 껍질로부터 글루코사미노글리칸(glycosaminoglycan)을 추출한 예(16)가 있고 근래 들어 미더덕 유래 용혈성 항균 펩티드에 대한 보고가 외국에서 연구되어 공지된바 있다(17-19).

한편, 오만둥이(*Styela plicata*)는 미더덕과(Styelidae)의 일종으로 척삭동물문의 미색동물아문, 해초강, 측성해초목에 속하는 해양생물에 속하는 주름 미더덕 또는 흰 멧게라고도 불리어진다(20). 오만둥이는 미더덕과 비교하여 형태는 비슷하지만 입수공과 출수공이 미더덕처럼 밖으로 나와 있지 않고 다소 둥그스름하며 꼬리가 없고, 껍질표면의 돌기가 굵고 다소 열린 빛깔을 띄고 있다. 오만둥이는 미더덕보다 향이 조금 약하며, 껍질이 부드럽고 쫄깃하여 씹는 맛이 미더덕보다 좋아 된장이나 찜에 널리 이용되고 있다(20). 오만둥이에는 헤파린과 dermatan sulfate가 함유되어 항응고효능을 갖으며(21,22), 항균 펩티드로서 plicatamide라는 octapeptide가 존재한다는 것이 보고되었다(23). 또한 오만둥이의 hemocyte는 사람의 K-562종양 세포주에 대한 세포독성 효과가 있다고 보고되었다(24).

최근 본 연구팀에 의해 미더덕과 오만둥이의 가공방법과 추출용매에 따른 항산화활성, 인체 백혈구 DNA 손상억제 및 대장암 세포주의 증식억제 활성이 밝혀진 바 있으나(25-27), 이들의 간세포 보호 작용에 대한 연구는 알려진 바 없다. 따라서 본 논문에서는 과량의 알코올을 투여한 흰쥐에게 미더덕과 오만둥이의 동결건조 분말을 6주간 섭취시킨 후 혈장 지질 성분과 alanine aminotransferase(ALT) 등을 비롯한 간 기능 지표와 백혈구, 간세포 DNA 손상 등을 측정함으로 미더덕과 오만둥이의 간 손상억제 활성의 가능성을 탐색해 보고자한다.

재료 및 방법

미더덕과 오만둥이 동결건조 분말 제조

본 연구에 사용된 미더덕(*Styela clava*)과 오만둥이(*Styela plicata*)는 경상남도 마산시 진동면 고현마을에서 구입하였다. 미더덕과 오만둥이는 구입한 직후 수돗물에 수세하여 표면에 붙어있는 염분 및 모래를 제거하고, 최종적으로

깨끗한 물에 조심스럽게 행군 후, 믹서기(Mixer MC 811C, (주)노비타, 한국)로 분쇄하였다. 분쇄한 미더덕과 오만둥이를 -70°C 의 심온 동결기(Upright Deep Freezer VX 530, 한국)에서 급속 동결한 후, 동결건조기(Freeze Dryer FD 5512, (주)일신랩, 한국)로 4일 동안 완전히 건조시킨 후 분쇄하여 27 mesh의 체로 걸러 미더덕 및 오만둥이 시료로 사용하였다. 미더덕과 오만둥이의 영양소 함유량은 (주)동진분석기술연구소(마산)에 의뢰하여 AOAC(28) 방법에 따라 분석하였다. 그 결과, 미더덕은 단백질, 지방, 탄수화물 및 회분이 각각 41.9, 6.2, 40.3, 11.6%이고, 오만둥이는 각각 42.8, 11, 30.4, 15.8%이었으며, 이를 감안하여 실험동물 사료 조성을 결정하였다.

실험동물 사육 및 식이

체중 250 내지 270 g인 8주령의 숫컷 Sprague-Dawley 흰쥐 24마리(㈜코아텍, 한국)를 구입하여 1주일간 lab-chaw 식이(5057, ㈜에그리브랜드 퓨리나 코리아)를 제공하면서 안정화시켰다. 그 후 난괴법(randomized block design)에 의해 3개의 그룹으로 나누었다. 세 그룹의 쥐들에게 각각 Table 1과 같이 AIN-93(29)을 기본으로 한 식이를 6주간 섭취시키면서 에탄올 투여군(EtOH군)에는 Liu 등(30)의 방법에 따라 25%의 에탄올 용액을 물 대신 준 뒤 매일 섭취량을 기록하였다. 에탄올+미더덕 투여군(EtOH+SC군)과 에탄올+오만둥이 투여군(EtOH+SP군)에는 에탄올과 함께 미더덕과 오만둥이를 각각 식이 3%로 섞어 투여하였다. 모든 사료는 4°C 에 보관하면서 급여하였고, 사육기간 동안 사육실의 온도는 20°C , 습도는 55%를 유지하였으며 명암은

Table 1. Diet composition (g/100 g diet)

Ingredients	EtOH control ¹⁾ (n=8)	EtOH+SC (n=8)	EtOH+SP (n=8)
Casein	20	18.716	18.743
Corn starch	55.949	54.563	54.392
Sucrose	10	10	10
Corn oil	5	4.67	4.814
Cellulose	4	4	4
Vitamin mixture ²⁾	1	1	1
Mineral mixture ³⁾	3.5	3.5	3.5
Choline bitartrate	0.25	0.25	0.25
DL-Methionine	0.3	0.3	0.3
Butylated hydroxy toluene	0.001	0.001	0.001
<i>Styela clava</i>	-	3	-
<i>Styela plicata</i>	-	-	3
Total	100	100	100

¹⁾EtOH control: 25% ethanol containing water, *ad lib*, *p.o.*, EtOH+SC: 25% ethanol containing water, *ad lib*, *p.o.*+3% *Styela clava*, EtOH+SP: 25% ethanol containing water, *ad lib*, *p.o.*+3% *Styela plicata*.

²⁾Vitamin mixture (g/kg) according to AIN-93 (ICN Biochemicals, Cleveland, USA).

³⁾Mineral mixture (g/kg) according to AIN-93 (ICN Biochemicals, Cleveland, USA).

12시간(08:00~20:00)을 주기로 자동 조절하였다. 식이와 알코올 용액 섭취량은 매일 기록하였고 매 7일마다 체중을 측정 후, 사육일지의 자료를 분석하였다.

6주간의 실험기간 후에 실험동물들은 12시간 동안 절식시킨 후 에테르 마취를 시키고 복부하대정맥으로부터 혈액 시료를 채취하였다. 채취한 혈액은 헤파린 처리된 시험관에 옮긴 후 전혈 일부는 백혈구 DNA 손상도 측정을 위한 comet assay를 실시하기 위해 채혈 당일 사용하였고 나머지 혈액은 3000 rpm에서 30분간 원심분리하여 혈장을 분리하고 분석시까지 -80°C 에서 보관하였다. 채혈 후 즉시 간, 심장, 신장 및 비장을 적출하여 생리식염수로 남아 있는 혈액 및 기타 부착물질을 제거하고 여지로 수분을 제거한 후 무게를 측정하였다. 간세포의 DNA 손상도 측정을 위해 적출한 간 1 g을 철저히 마쇄한 후 20 mL의 cold PBS가 담긴 50 mL plastic centrifuge tube에 조직을 넣어 -80°C 에서 보관하였다(31).

혈장 생화학 분석

혈장 총 콜레스테롤, HDL 콜레스테롤, 중성지방 농도 및 혈장 aspartate aminotransferase(AST), alanine aminotransferase(ALT), alkaline phosphatase(ALP), lactose dehydrogenase(LDH) 등의 효소활성은 BCS 진단 키트(Bio-clinical system, 한국)를 사용하여 측정하였다. LDL-콜레스테롤은 Friedewald 등(32)에 의한 계산법으로 산출하였다.

백혈구 DNA 손상 측정

미더덕과 오만동이 분말의 보충 섭취가 알코올로 유도된 백혈구 DNA 손상에 미치는 효과를 측정하기 위해 comet assay(33)를 실시하였다. 백혈구의 DNA 손상을 측정하고자 해부당일 채취한 전혈 5 μL 를 취해 75 μL 의 0.7% low melting agarose gel(LMA)과 섞은 후, 1.0% normal melting agarose(NMA)가 precoating된 normal slide 위로 cell suspension과 LMA의 현탁액이 골고루 분산되게 하고, 여기에 cover glass로 덮어 4°C 냉장고에 보관하여, 젤을 굳힌 후 그 위에 다시 0.7% LMA 용액 75 μL 로 한겹 더 덮었다. 슬라이드의 젤이 다 굳으면 미리 준비해 둔 차가운 alkali lysis buffer(2.5 M NaCl, 100 mM Na_2EDTA , 10 mM tris)에 사용 직전에 1% Triton X-100을 섞은 후 slide를 담가 저온, 암실에서 1시간 동안 침지시켜 DNA의 double strand를 풀어주었다. Lysis가 끝난 후, slide를 electrophoresis tank에 배열하고 4°C 의 차가운 전기영동 buffer(300 mM NaOH, 10 mM Na_2EDTA , $\text{pH}>13$)를 채워 40분 동안 unwinding 시켜 DNA의 alkali labile sites가 드러나게 한 후 25 V/300 \pm 3 mA의 전압을 걸어 20분간 전기영동을 실시하였다. 빛에 의해 DNA가 부가적으로 손상되는 것을 방지하기 위해 위의 과정은 전기영동 tank를 어두운 천으로 덮은 채 실시하였다. 전기영동이 끝난 후 0.4 M Tris buffer(pH 7.4)에 10분씩 담가 세척하는 과정을 3회 반복하여 slide를 건조시켰다. 20 μg /

mL 농도의 ethidium bromide로 핵을 염색하여 cover glass로 덮은 뒤 형광현미경(Leica, Germany)상에서 관찰하였다. CCD camera(Nikon, Japan)를 통해 보내진 각각의 세포핵 image는 Komet 5.0 comet image analyzing system(Kinetic Imaging, UK)이 설치된 컴퓨터 상에서 분석하였다. 백혈구의 hydrogen peroxide에 의한 DNA 손상 및 미더덕 추출물에 의한 손상억제 정도는 핵으로부터 이동해서 꼬리 부분으로 떨어져 나간 꼬리 부분 내 DNA %함량(% Tail intensity)과 핵과 꼬리사이의 거리(Tail Length) 및 Tail DNA와 Tail Length의 곱의 값인 Tail Moment로 측정하여 나타내었다. 각각의 처리구에서 2개의 slide를 만들어 각각 100개 세포의 DNA 손상 정도를 측정하였다.

간 세포 DNA 손상 측정

간세포의 DNA 손상도는 -80°C 에서 보관하였던 간 homogenate를 실험 당일 collagenase(150 units/1 g liver)가 함유된 10 mL의 Hank's Buffered Salt Solution(HBSS) 용액이 담긴 flask에 옮겨 37°C shaking incubator에서 10분간 보관한 후 $40\times g$ 의 속도로 5분간 원심분리하였다. 상층액만 취해 700 g에서 다시 한번 10분간 원심분리한 후 바닥에 모인 세포를 취해 75 μL 의 0.7% LMA와 섞은 후 백혈구와 같은 방법으로 슬라이드를 제작한 뒤 comet assay를 실시하였다(30,33).

통계처리

본 실험에서 나온 모든 결과는 SPSS 통계 패키지 프로그램을 이용하여 각 항목에 따라 백분율과 평균치 \pm 표준오차(SE)를 구하고, 각 군간의 평균차이에 대한 유의성 검정을 위해 one-way 분산분석(ANOVA)을 실시한 후 각 구간의 유의성 차이를 검증하기 위해 $p<0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test로 비교분석하였다. 변수들 간의 이변량 상관관계는 Pearson's correlation coefficient인 r 계수로 검증하였다.

결과 및 고찰

체중증가량, 식이와 에탄올 섭취량 및 장기무게에 미치는 영향

미더덕과 오만동이의 급여에 따른 체중증가량, 식이와 에탄올 섭취량 및 장기무게에 미치는 영향에 미치는 영향은 Table 2에 제시하였다. 6주간의 에탄올 단독 또는 에탄올과 미더덕, 오만동이 혼합식이에 따른 체중증가량과 식이섭취량 및 식이효율은 세 군간의 유의적인 차이가 없었다. 또한 하루 25% 에탄올 용액의 음용량이 EtOH 대조군, EtOH+SC, EtOH+SP군이 각각 15.9 ± 1.1 , 16.9 ± 1.0 , 17.1 ± 0.9 mL이었으며, 이를 하루 알코올 섭취량으로 환산하였을 경우 세 군간의 유의적인 차이가 없었다(Table 2). 미더덕과 오만동이 보충섭취는 간, 심장, 신장 및 비장 등의 장기무게에도

Table 2. Effects of *Styela clava* and *Styela plicata* on the weight gain, food efficiency ratio and relative organ weight in ethanol administrated rats¹⁾

	EtOH control ²⁾	EtOH+SC	EtOH+SP
Weight gain (g)	80.6±6.0 ^{ns3)}	81.1±4.2	74.4±5.2
Food intake (g/day)	11.5±0.2 ^{ns}	11.5±0.2	11.3±0.2
FER ³⁾ (%)	19.4±1.3 ^{ns}	19.5±0.8	18.3±1.1
Ethanol intake (g/day)	4.0±0.3 ^{ns}	4.2±0.3	4.3±0.2
Relative organ weight (g/kg BW)			
Liver	2.69±0.05 ^{ns}	2.58±0.05	2.64±0.04
Heart	0.35±0.01 ^{ns}	0.34±0.01	0.33±0.01
Kidney	0.74±0.02 ^{ns}	0.70±0.02	0.74±0.01
Spleen	0.20±0.00 ^{ns}	0.18±0.01	0.19±0.01

¹⁾Values are mean±SE for 8 animals in each group.

²⁾EtOH control: 25% ethanol containing water, *ad lib*, *p.o.*, EtOH+SC: 25% ethanol containing water, *ad lib*, *p.o.*+3% *Styela clava*, EtOH+SP: 25% ethanol containing water, *ad lib*, *p.o.*+3% *Styela plicata*.

³⁾ns: not significant.

유의적인 영향을 끼치지 않는 것으로 나타났다.

혈장 지질과 간기능 수치에 미치는 영향

과량의 알코올 섭취는 혈중 총콜레스테롤과 중성지방 농도를 증가시키는 등의 지질대사를 악화시키는 것으로 알려져 있다(34,35). 미더덕과 오만둥이의 보충섭취가 에탄올 투여 실험동물의 혈장 콜레스테롤 및 중성지방 함량에 미치는 영향은 Table 3에 나타낸 바와 같다. 미더덕 섭취군(EtOH+SC)의 경우 혈장 중성지방 및 동맥경화지수가 대조군(EtOH control)에 비해 약간 감소하는 경향이 있었지만 전반적으로 미더덕과 오만둥이의 혈장 지질 수준에 미치는 영향은 통계적인 유의성이 없는 것으로 나타났다. 현재까지 국내외로 미더덕이나 오만둥이의 보충섭취가 지질대사에 미치는 영향에 대해서 보고된 바 없으나, 미더덕과 오만둥이와 함께 같은 미색동물아문(tunicata)에 속하는 멧게(우렁쉥이, *Halocynthia roretzi*)의 경우 식이의 10 또는 20% 농도로 멧게 전체 또는 멧게 살 부분만을 따로 숫컷 Wistar rat에

Table 3. Effects of *Styela clava* and *Styela plicata* on plasma lipid profiles in ethanol administrated rats¹⁾

	EtOH control ²⁾	EtOH+SC	EtOH+SP
Total cholesterol (mg/dL)	93.9±2.8 ^{ns3)}	91.3±3.0	89.4±8.6
HDL-cholesterol (mg/dL)	37.3±3.3 ^{ns}	40.1±2.9	41.5±1.7
LDL-cholesterol (mg/dL)	41.4±5.1 ^{ns}	38.2±4.2	40.0±2.7
HDL-cholesterol/Total cholesterol (%)	39.3±3.0 ^{ns}	44.3±3.5	42.6±1.9
Triglycerides (mg/dL)	76.5±9.6 ^{ns}	64.6±2.4	81.0±5.2
Atherogenic index (AI)	1.6±0.2 ^{ns}	1.3±0.2	1.4±0.1

¹⁾Values are mean±SE for 8 animals in each group.

²⁾EtOH control: 25% ethanol containing water, *ad lib*, *p.o.*, EtOH+SC: 25% ethanol containing water, *ad lib*, *p.o.*+3% *Styela clava*, EtOH+SP: 25% ethanol containing water, *ad lib*, *p.o.*+3% *Styela plicata*.

³⁾ns: not significant.

3주간 투여하였을 때 대조군에 비해 혈청 총 콜레스테롤, 중성지방 및 인지질, nonesterified fatty acid 농도는 유의적으로 감소하였으며, 변으로의 중성과 산성 스테롤 배설은 유의적으로 증가한 것으로 보고하였다(36). 또한 Yook 등(37)은 SD rat을 대상으로 멧게 껍질로부터 정제한식이섬유를 식이의 5, 10, 20% 농도로 4주간 급여한 결과 혈청 총 콜레스테롤, LDL 콜레스테롤, 중성지질 및 인지질이 유의적으로 감소하였다고 보고하였다. 비록 본 실험을 통해 에탄올 과량 투여시 식이의 3% 농도의 미더덕과 오만둥이의 지질 강하 효과는 입증되지 못했지만 앞에서 언급한 연구에서와 같이 미더덕과 오만둥이의 식이내 함량을 증가시키거나(10 또는 20%) 미더덕이나 오만둥이의 껍질로부터 식이섬유소를 정제하는 등의 후속연구가 필요하다고 사료된다.

알코올 투여에 의한 혈장 AST, ALT, ALP, LDH 등의 효소 활성의 유의적인 증가는 알코올에 의한 간 손상 유발물질이 간 대사에 작용하여 대사 이상을 초래하며 간세포손상이 증대되어 나타난 것으로 알려져 있다(38,39). 특히 ALT의 증가는 급성 간염을 반영하는 지표로 사용되고(40), 증가한 ALP 활성은 골격근의 대사 변화와 관련이 있으며(41), 생체내 lysosomal 변화를 평가하는데 매우 유용한 지표이다(42). LDH는 간에 특이적이어서 혈중 LDH 활성의 증가는 간 질환과 매우 밀접한 관련이 있는 것으로 밝혀졌다(43). 본 실험결과, 미더덕 섭취군(EtOH+SC)은 에탄올 섭취 대조군에 비해 혈중 ALT, ALP, LDH의 활성이 각각 23.0, 35.5, 25.9%로 유의적으로 감소하였으며, 오만둥이 섭취군(EtOH+SP)은 LDH 활성만이 32.3%로 유의적으로 감소하였다(Table 4). 이와 같이 미더덕과 오만둥이의 보충섭취는 알코올에 의해 유도되는 간조직 손상에 대한 보호작용이 있는 것으로 나타났다.

백혈구 및 간 세포의 DNA 손상도에 미치는 영향

섭취된 알코올의 일부는 대사되지 않은 채 폐를 통해 또는

Table 4. Effects of *Styela clava* and *Styela plicata* on plasma liver function parameters in ethanol administrated rats¹⁾

	EtOH control ²⁾	EtOH+SC	EtOH+SP
AST (IU/L) ³⁾	63.8±2.3 ^{ns4)}	59.6±3.3	62.2±5.9
ALT (IU/L)	21.7±1.5 ^{ns5)}	16.7±1.1 ^a	21.0±2.3 ^{ab}
ALP (IU/L)	134.1±21.8 ^b	86.5±5.9 ^a	103.9±9.0 ^{ab}
LDH (IU/L)	561.0±59.7 ^b	415.7±34.7 ^a	379.7±21.2 ^a

¹⁾Values are mean±SE for 8 animals in each group.

²⁾EtOH control: 25% ethanol containing water, *ad lib*, *p.o.*, EtOH+SC: 25% ethanol containing water, *ad lib*, *p.o.*+3% *Styela clava*, EtOH+SP: 25% ethanol containing water, *ad lib*, *p.o.*+3% *Styela plicata*

³⁾AST: aspartate aminotransferase, ALT: alanine aminotransferase, ALP: alkaline phosphatase, LDH: lactose dehydrogenase.

⁴⁾ns: not significant.

⁵⁾Values in the same row that do not share a common superscript are significantly different at the $p < 0.05$ level.

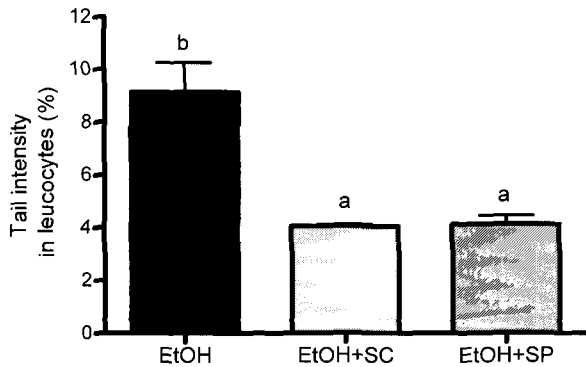


Fig. 1. Effects of *Styela clava* and *Styela plicata* on leucocytic DNA strand breaks in ethanol administrated rats. EtOH control: 25% ethanol containing water, *ad lib*, *p.o.*, EtOH+SC: 25% ethanol containing water, *ad lib*, *p.o.*+3% *Styela clava*, EtOH+SP: 25% ethanol containing water, *ad lib*, *p.o.*+3% *Styela plicata*. Bars represent mean±SE. Bars with different superscripts are significantly different at the $p<0.05$ level by ANOVA and Duncan's multiple range test.

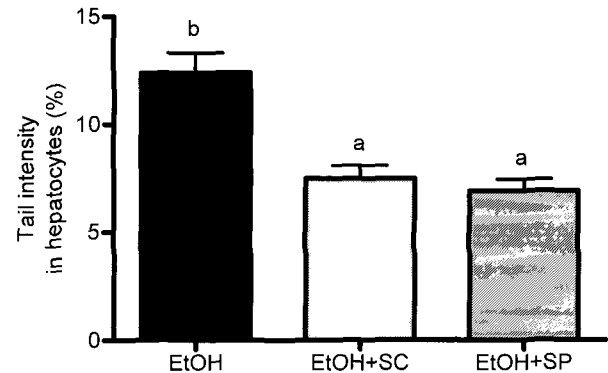


Fig. 2. Effects of *Styela clava* and *Styela plicata* on hepatic DNA strand breaks in ethanol administrated rats. EtOH control: 25% ethanol containing water, *ad lib*, *p.o.*, EtOH+SC: 25% ethanol containing water, *ad lib*, *p.o.*+3% *Styela clava*, EtOH+SP: 25% ethanol containing water, *ad lib*, *p.o.*+3% *Styela plicata*. Bars represent mean±SE. Bars with different superscripts are significantly different at the $p<0.05$ level by ANOVA and Duncan's multiple range test.

소변 및 땀으로 배설되고 나머지는 거의 완전히 흡수되어 각 조직으로 운반된다(44). 과량의 에탄올은 간에서 주로 microsomal ethanol oxidizing system(MEOS)에 의해 대사 되는데 이 과정에서 생성된 에탄올 대사산물인 acetaldehyde는 xanthine oxidase와 aldehyde oxidase에 의한 산화 과정 중에 superoxide ion(O₂⁻), hydrogen peroxide(H₂O₂)와 같은 활성산소종을 생성한다(45,46). 이들 활성산소종은 반응성이 더 강한 hydroxyl radical(OH[·])의 전구체로 작용하며, OH[·]는 에탄올과 반응하여 1-hydroxyethyl radical(CH₃[·]CHOH)을 생성하게 된다(47). 이 과정에서 생성되는 다양한 활성산소종 또는 acetaldehyde 그 자체는 산화력이 매우 강하여 간, 백혈구, 뇌 등의 각종 조직 내 DNA를 공격해 DNA 손상을 유발한다는 결과가 세포 및 동물실험을 통해 밝혀졌다(47-51).

미더덕과 오만둥이 및 에탄올을 6주간 투여 후 백혈구 및 간 세포의 DNA 손상정도를 최근 DNA 손상을 측정하는 방법으로 널리 사용하고 있는 comet assay(single cell gel electrophoresis) 분석법을 이용하여 측정하여 Fig. 1, 2와 Table 5에 제시하였다. Fig. 1에서와 같이 알코올 및 오만둥이와 미더덕 분말을 6주간 투여 후 백혈구 DNA 손상도를 측정된 결과 알코올 투여군에 비해 알코올과 미더덕, 알코올과 오만둥이를 병합 투여한 군에서 백혈구 DNA 손상도(tail intensity)가 각각 56, 55%로 유의적으로 감소한 것으로 나타났다. DNA 손상도를 나타내는 다른 지표인 tail moment와 tail length도 유의적으로 감소하였다(Table 5). Fig. 2에 나타난 바와 같이 간세포의 DNA 손상도 알코올 단독 투여군에 비해 미더덕과 오만둥이를 병합 투여한 군에서 tail intensity가 각각 40, 44%로 유의적으로 감소하였다. 간세포에서도 DNA 손상도를 나타내는 다른 지표인 tail moment와 tail length도 유의적으로 감소하였다(Table 5).

Table 5. Effects of *Styela clava* and *Styela plicata* on leucocytic and hepatic DNA strand breaks in ethanol administrated rats¹⁾

	EtOH control ²⁾	EtOH+SC	EtOH+SP
Leucocytes			
Tail Moment	6.4±2.0 ^{b3)}	1.4±0.1 ^a	1.5±0.4 ^a
Tail Length (μm)	35.6±6.8 ^b	23.1±0.9 ^a	21.9±3.5 ^a
Hepatocytes			
Tail Moment	17.9±2.8 ^b	6.7±0.9 ^a	6.2±0.4 ^a
Tail Length (μm)	102.0±10.0 ^b	73.5±3.0 ^a	76.4±1.7 ^a

¹⁾Values are mean±SE for 8 animals in each group.

²⁾EtOH control: 25% ethanol containing water, *ad lib*, *p.o.*, EtOH+SC: 25% ethanol containing water, *ad lib*, *p.o.*+3% *Styela clava*, EtOH+SP: 25% ethanol containing water, *ad lib*, *p.o.*+3% *Styela plicata*.

³⁾Values in the same row that do not share a common superscript are significantly different at the $p<0.05$ level.

이상의 결과에서 미더덕과 오만둥이 분말은 에탄올과 병합 투여한 경우 에탄올 단독 투여에 의한 백혈구와 간세포의 DNA 손상을 효과적으로 억제시키고 있음을 알 수 있었다. Navasumrit 등(47)은 동물실험을 통해 비타민 C와 비타민 E 등의 항산화제의 보충 투여가 에탄올 과량섭취에 의해 증가한 간 조직내 1-hydroxyethyl radical의 생성과 간세포 DNA 손상을 유의적으로 감소시켰음으로 보고하였다. 따라서 본 실험에서 미더덕과 오만둥이의 백혈구 및 간세포 DNA 손상억제 효과도 미더덕과 오만둥이에 함유된 항산화 성분에 의한 것으로 추측된다. 실제로 미더덕과 오만둥이의 항산화 및 항암활성은 본 연구팀의 선행연구에 의해 이미 밝혀져 발표된 바 있다(25-27). 현재까지 밝혀진 미더덕과 오만둥이에 함유된 항산화 성분은 β-carotene, β-cryptoxanthin, zeaxanthin, cynthiaxanthin 등을 비롯한 carotenoids 류가 있으며, total carotenoid 함량이 미더덕 껍질과 살 부분에 각각 4.89, 6.45mg%, 오만둥이의 경우 껍질과

살 부분에 각각 1.15, 2.39 mg% 정도 함유되어 있다고 Ha 등(52)에 의해 보고되었다. 그 밖에 미더덕과 오만둥이의 항산화 성분은 본 연구팀에 의해 용매 분획별로 현재 분석 중에 있다.

간세포 DNA 손상정도는 백혈구 DNA 손상정도와 매우 높은 유의적인 양의 상관관계($r=0.766$, $p=0.000$)를 보여주어 에탄올로부터 유도된 활성산소종들이 주로 대사가 일어나는 간에서의 DNA 손상을 일으킬 뿐만 아니라 간으로부터 혈액으로 방출되어 백혈구의 DNA 손상에도 간세포 DNA 손상과 정량적으로 영향을 주는 것으로 사료된다(Fig. 3). 또한 혈장 ALP와 LDH 활성은 백혈구 DNA 손상과는 유의적인 관련성이 없었지만 간세포 DNA 손상과 유의적인 양의 상관관계를 보여주었는데(Fig. 3) 이는 혈장 ALP와 LDH 활성을 간세포 내 DNA 손상 정도를 반영하는 지표로 사용이 가능한 것으로 생각된다. 그러나 현재까지 혈장 ALP 또

는 LDH 활성과 간세포 내 DNA 손상 정도와의 상호관련성을 직접적으로 밝힌 결과는 보고된 바 없으므로 이에 대한 추후 지속적인 연구가 필요하다.

요 약

미더덕과 오만둥이는 독특한 향과 맛이 있는 식품으로 널리 알려져 있으며 우리나라 전역에서 자생하나 경상남도 마산에서 가장 많이 생산되고 있는 해양생물이다. 한편, 과량의 에탄올 섭취는 microsomal ethanol oxidizing system(MEOS)에 의한 에탄올 산화를 증가시켜 superoxide ion, hydrogen peroxide, hydroxyl radical, 1-hydroxyethyl radical과 같은 활성산소종을 생성하여 산화적 스트레스 상태를 유발하게 된다. 본 연구에서는 미더덕과 오만둥이의 보충투여가 과량의 에탄올 투여로 인해 유도되는 간기능 관련 지표와 간세포 및 백혈구 DNA 손상정도에 미치는 영향을 보코자 SD계 수컷 쥐를 세 군으로 나누어 6주간 25% 에탄올 용액을 자유로이 섭취하게 하면서 동결 건조하여 분말화한 미더덕과 오만둥이를 식이의 3%(w/w) 수준으로 보충투여하였다. 6주간의 미더덕과 오만둥이 투여는 체중증가량, 식이 및 에탄올 섭취량, 간을 비롯한 각종 장기무게에는 아무런 영향을 끼치지 않았다. 미더덕과 오만둥이 보충투여는 총 콜레스테롤을 비롯한 혈장 지질 수준에는 유의적인 영향이 없었지만, 혈장 ALT, ALP, LDH 활성 등 간기능 관련 지표들을 유의적으로 감소시켰다. 또한 미더덕과 오만둥이는 과량의 에탄올 섭취로 유도된 흰쥐의 백혈구, 간세포의 DNA 손상을 유의적으로 감소시킨 것으로 나타났으며, 간세포 DNA 손상도는 혈장 ALP와 LDH 활성과 유의적인 양의 상관관계를 보여주었다. 결론적으로 미더덕과 오만둥이 분말의 보충투여는 알코올 섭취로 인해 유도된 간조직 손상에 대한 보호작용이 있는 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2007학년도 경남대학교 학술연구장려금 지원으로 이루어졌음.

문 헌

1. Reuben A. 2007. Alcohol and the liver. *Curr Opin Gastroenterol* 23: 283-291.
2. OECD Health Data 2006: Statistics and Indicators for 30 Countries. http://www.oecd.org/document/44/0,3343,en_2649_34631_2085228_1_1_1_1,00.html (accessed 2th July, 2007)
3. The Division of National Nutrition Survey. 2002. 2001 National Nutrition Survey Report in Korea. Ministry of Health and Welfare, Seoul.
4. Cargiulo T. 2007. Understanding the health impact of alcohol dependence. *Am J Health Syst Pharm* 64: S5-11.
5. Cederbaum AI. 1989. Introduction: Role of lipid peroxidation

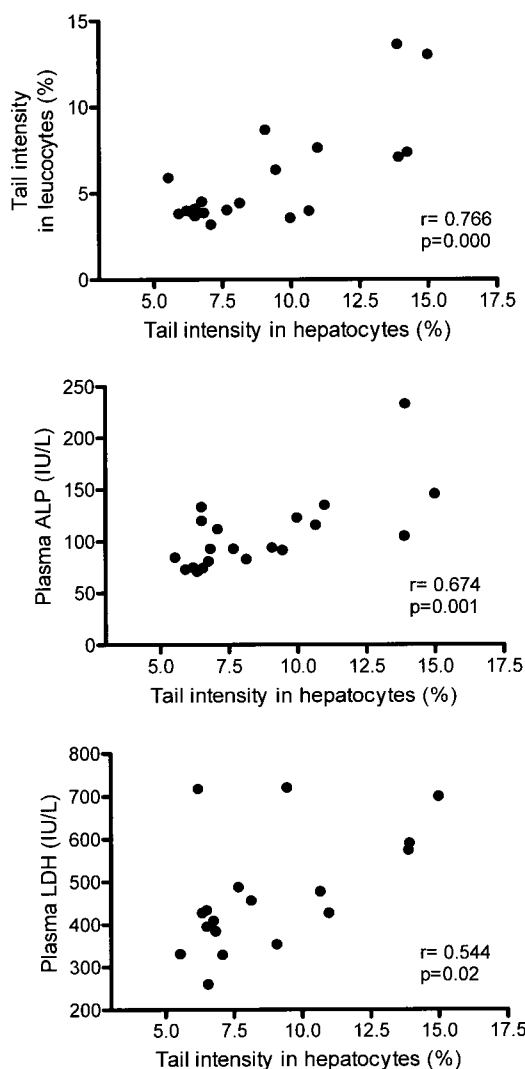


Fig. 3. Relationship between leucocytic DNA damage (upper), plasma ALP (middle), plasma LDH (lower) and hepatic DNA damage. r =Pearson's correlation coefficient.

- and oxidative stress in alcohol toxicity. *Free Radic Biol Med* 7: 537-539.
6. Bjorneboe GE. 1993. Antioxidant status and alcohol-related disease. *Alcohol Alcoholism* 28: 111-116.
 7. Rosenthal J. 1996. Investing in biological diversity. Proceedings of The Cairns conference. Cairns, Australia. OECD.
 8. Park JC. 1996. Screening of marine natural products on inhibitory effect of the formation of lipid peroxidation. *Korean J Pharmacogen* 27: 117-122.
 9. Amador ML, Jimeno J, Paz-Ares L, Cortes-Funes H, Hidalgo M. 2003. Progress in the development and acquisition of anticancer agents from marine sources. *Annals of Oncology* 14: 1607-1615.
 10. Garcia-Fernandez LF, Fernando R, Sanchez-Puelles JM. 2002. The marine Pharmacy: New antitumoral compounds from the sea. *Pharmaceutical News* 9: 495-501.
 11. Mayer AMS, Gustafson KR. 2003. Marine pharmacology in 2000: antitumor and cytotoxic compounds. *Int J Cancer* 105: 291-299.
 12. Ministry of Agriculture and Forestry. 1993. Ministry of Agriculture and Forestry Statistical Yearbook. p 291.
 13. Jo YG. 1978. The sterol composition of *Styela clava*. *Kor Fish Soc* 11: 97-101.
 14. Lee KH, Park CS, Hong BI, Jung BC, Cho HS, Jea YG. 1995. Seasonal variations of nutrients in warty sea squirt (*Styela clava*). *J Korean Soc Food Nutr* 24: 268-273.
 15. Ahn SH. 2003. Extraction of glycosaminoglycans from *Styela clava* tunic. *Biotechnol Bioproc Eng* 18: 180-185.
 16. Lehrer RI. 2001. Clavanins and styelins, alpha-helical antimicrobial peptides from the hemocytes of *Styela clava*. *Adv Exp Med Biol* 484: 71-76.
 17. Menzel LP, Lee IH, Sjostrand B, Lehrer RI. 2002. Immunolocalization of clavanins in *Styela clava* hemocytes. *Dev Comp Immunol* 26: 505-515.
 18. Lee IH, Zhao C, Nguyen T, Menzel, Waring AJ, Sherman MA, Lehrer RI. 2001. Clavaspirin, an antibacterial and haemolytic peptide from *Styela clava*. *J Pept Res* 58: 445-456.
 19. Taylor SW, Craig AG, Fischer WH, Park M, Lehrer RI. 2000. Styelin D, an extensively modified antimicrobial peptide from ascidian hemocytes. *J Biol Chem* 275: 38417-38426.
 20. Park SM, Seo HK, Lee SC. 2006. Preparation and quality properties of fish paste containing *Styela plicata*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 1256-1259.
 21. Cavalcante MCM, Allodi S, Valente AP, Strausi AH, Takahashi HK, Mourão PAS, Pavão MSG. 2000. Occurrence of heparin in the invertebrate *Styela plicata* (Tunicata) is restricted to cell layers facing the outside environment. *J Biol Chem* 275: 36189-36196.
 22. Pavão MSG, Aiello KRM, Werneck CC, Silva LCF, Valente AP, Mulloy B, Colwelli NS, Tollefseni DM, Mourão PAS. 1998. Highly sulfated dermatan sulfates from ascidians. *J Biol Chem* 273: 27848-27857.
 23. Tincu JA, Menzel LP, Azimov R, Sands J, Hong T, Waring AJ, Taylor SW, Lehrer RI. 2003. Plicatamide an antimicrobial octapeptide from *Styela plicata* hemocytes. *J Biol Chem* 278: 13546-13553.
 24. Raftos DA, Hutchinson A. 1995. Cytotoxicity reactions in the solitary tunicate *Styela plicata*. *Dev Comp Immunol* 19: 463-471.
 25. Kim JJ, Kim SJ, Kim SH, Park HR, Lee SC. 2005. Antioxidant and anticancer activities of extracts from *Styela plicata*. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 34: 937-941.
 26. Seo BY, Jung ES, Park HR, Lee SC, Park E. 2006. Effect of acetone extract from *Styela clava* on oxidative DNA damage and anticancer activity. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 49: 227-232.
 27. Jung ES, JY Kim, Park E, Park HR, Lee SC. 2006. Cytotoxic effect of extracts from *Styela clava* against human cancer cell lines. *J Korea Soc Food Sce Nutr* 35: 823-827.
 28. AOAC. 1990. *Official Methods of Analysis*. 15th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC.
 29. Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC. 1993. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J Nutr* 123: 1939-1951.
 30. Liu SJ, Ramsey RK, Fallon HJ. 1975. Effects of ethanol on hepatic microsomal drug metabolizing enzymes in the rat. *Biochem Pharmacol* 24: 36-378.
 31. Hu ML, Chuang CH, Sio HM, Yeh SL. 2002. Simple cryoprotection and cell dissociation techniques for application of the comet assay to fresh and frozen rat tissues. *Free Radic Res* 36: 203-209.
 32. Friedebald WT, Levy RI, Fedreison DS. 1979. Estimation of concentration of low density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18: 499-508.
 33. Singh PN, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175: 184-191.
 34. Woollett LA, Baldner-Shank GL, Aprahamian S, Engen RL, Beitz DC. 1987. Adaptation of lipogenesis and lipolysis to dietary ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 11: 336-339.
 35. Savolainen MJ, Baraona E, Leo MA, Lieber CS. 1986. Pathogenesis of the hypertriglyceridemia at early stages of alcoholic liver injury in the baboon. *J Lipid Res* 27: 1073-1083.
 36. Kawasaki M. 2004. Effects of dietary sea squirt (*Halocynthia roretzi*) on lipid metabolism in rats. *Biofactors* 22: 169-172.
 37. Yook HS, Kim JO, Choi JM, Kim DH, Cho SK, Byun MW. 2003. Changes of nutritional characteristics and serum cholesterol in rats by the intake of dietary fiber isolated from ascidian (*Halocynthia roretzi*) tunic. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 474-478.
 38. Ozdil S, Bolkent S, Yanardag R, Arda-Pirincci P. 2004. Protective effects of ascorbic acid, dl-alpha-tocopherol acetate, and sodium selenate on ethanol-induced liver damage of rats. *Biol Trace Elem Res* 97: 149-162.
 39. Bishayee A, Sarkar A, Chatterjee M. 1995. Hepatoprotective activity of carrot (*Daucus carota* L.) against carbon tetrachloride intoxication in mouse liver. *J Ethnopharmacol* 47: 69-74.
 40. Celia M, Wilkinson W. 1989. Liver function - a review. *Aust Vet J* 49: 163-169.
 41. Nerbelt WT. 1982. *Fundamentals of Clinical hemistry*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, USA. p 163-169.
 42. Tanaka K, Lizuka Y. 1968. Suppression of enzyme release from isolated rat liver lysosomes by non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Biochem Pharmacol* 17: 2023-2032.
 43. Yemitan OK, Izebu MC. 2006. Protective effects of *Zingiber officinale* (Zingiberaceae) against carbon tetrachloride and acetaminophen-induced hepatotoxicity in rats. *Phytotherapy Research* 20: 997-1002.
 44. Lieber CS, Leo MA. 1992. Alcohol and liver. In *Medical and nutritional complications of alcoholisms; mechanism and management*. Lieber CS, ed. Plenum Medical Book Co., New York. p 185.

45. Lieber CS. 1991. Alcohol induced hepatotoxicity. In *Hepatotoxicology*. Meeks RG, Harrison SD, Bull RJ, eds. CRC Press Inc., New York, USA. p 481-523.
46. Fridovich I. 1989. Oxygen radicals from acetaldehyde. *Free Radic Biol Med* 7: 557-558.
47. Navasumrit P, Ward TH, Dodd NJ, O'Connor PJ. 2000. Ethanol-induced free radicals and hepatic DNA strand breaks are prevented in vivo by antioxidants: effects of acute and chronic ethanol exposure. *Carcinogenesis* 21: 93-99.
48. Singh NP, Lai H, Khan A. 1995. Ethanol-induced single strand DNA breaks in rat brain cells. *Mutat Res* 345: 191-196.
49. Rajasinghe H, Jayatilake E, Shaw S. 1990. DNA cleavage during ethanol metabolism: role of superoxide radicals and catalytic iron. *Life Sci* 47: 807-814.
50. Fedeli D, Falcioni G, Olek RA, Massi M, Cifani C, Polidori C, Gabbianelli R. 2007. Protective effect of ethyl pyruvate on msP rat leukocytes damaged by alcohol intake. *J Appl Toxicol* 9; [Epub ahead of print]
51. Kim H, Oh E, Im H, Mun J, Yang M, Khim JY, Lee E, Lim SH, Kong MH, Lee M, Sul D. 2006. Oxidative damages in the DNA, lipids, and proteins of rats exposed to iso-fluranes and alcohols. *Toxicology* 220: 169-178.
52. Ha BS, Baek SH, Kim SY. 2000. Carotenoids components of tunicata, shellfishes and its inhibitory effects on mutagenicity and growth of tumor cell. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 29: 922-934.

(2007년 7월 24일 접수; 2007년 10월 2일 채택)