

# 뱀장어 (*Anguilla japonica*)로부터 추출된 Carnosine의 단백질당화 억제효과

송호수\* · 이근태 · 박성민 · 강옥주<sup>1</sup>  
 부경대학교 식품생명공학부, <sup>1</sup>경남대학교 생명과학부

## Inhibitory Effects of Eel (*Anguilla japonica*) Extracted Carnosine on Protein Glycation

Ho-Su SONG\*, Keun-Tai LEE, Seong-Min PARK and Ok-Ju KANG<sup>1</sup>  
 Department of Food Science and Biotechnology, Pukyong National University,  
 Busan 608-737, Korea

<sup>1</sup>Department of Food and Nutritional Sciences Kyungnam University 449 Wolyoung-dong,  
 Masan, Kyungnam, 631-701 Korea

Glycation and oxidation induce formation of carbonyl (CO) groups in proteins, which can be used to develop an index of cellular aging. Methyl glyoxal (MG) and hypochlorite anions are deleterious products of oxygen free-radical reaction. The effects of eel carnosine on protein modification mediated by MG and hypochlorite were studied. MG and hypochlorite induced formation of carbonyl groups with high molecular weight and cross-linked forms of ovalbumin. The presence of eel carnosine effectively inhibited these modifications in a concentration-dependent manner. Imidazole ring in eel carnosine might have a primary role in inhibition of protein glycation. Our data suggests that the eel carnosine may be useful as a “natural” anti-glycating agents.

Key words: Eel (*Anguilla japonica*), Carnosine, Glycation, Carbonyl (CO), Methyl glyoxal (MG), Hypochlorite

### 서 론

단백질에 산화적 손상이 일어나면 효소활성, 열불안정성 (heat lability), 단백질분해효소에 대한 반응성 및 항원성 등이 변하게 된다. 이러한 변화는 단백질의 3차구조가 변하기 때문이며 결과적으로 노화된 단백질의 교체가 지연되고 세포내에 축적된다. 즉, 단백질이 산화적 손상을 받으면 반응성이 풍부한 카르보닐 (carbonyl)기를 형성하며 노화가 진행됨에 따라 조직 내의 카르보닐기의 함량이 증가하게 되는 것이다 (Harris et al., 1990).

혈액과 세포내 당질은 단백질이나 DNA와 결합하게 되는데 이것을 당화 (glycation)라고 하며 당산화 (glycoxidation) 반응을 거쳐 당과 단백질이 결합된 최종당화산물 (Advanced Glycation Endproducts, AGE)을 형성하게 된다 (Bucala et al., 1995). 단백질은 정상적인 상태에서 비효소적으로 당과 반응하는 이른바 Maillard 반응을 일으키게 되며, 초기반응산물인 schiff base를 형성한 후 재배열되어 아마도리 (amadori)형의 초기당화산물이 생성되는데 이 단계까지의 반응은 가역적으로 일어나 그 농도가 조절된다. 그러나 일정농도이상의 혈당에서는 아마도리 산물이 재배열되어 단백질과 교차결합 하여 비가역적인 AGE가 생성되고 조직에 축적되게 되며, 이것은 혈당이 정상으로 조절되어도 분해되지 않고 단백질 생존 기간 동안 단백질 조직의 구조와 기능성을 비정상적으로 변

화시킨다 (Nagasaya et al., 2001; Yokozaya et al., 2001).

Carnosine은 이상과 같은 산화적 스트레스로 인한 단백질의 기능성 저하 감소와 최종당화산물에 대한 저항성을 증가시키는 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있으며 현재까지 보고된 바에 따르면 carnosine의 생리적 기능은 분자 내 이미다졸 고리 (imidazole ring)에 의한 완충작용 (Harris et al., 1990), 금속 킬레이트능 (Quinn et al., 1992) 및 자유라디칼 (Boldyrev et al., 1995)과 활성당분자의 소거능에 기인하는 것으로 추정되고 있다 (Lee et al., 1999).

따라서 본 연구에서는 뱀장어로부터 추출한 carnosine의 기능특성 규명을 위하여 인체의 생리적 기능에 중요한 역할을 담당하는 단백질의 비가역적 반응에 미치는 영향에 대하여 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 시료 및 시약

본 실험에 사용한 뱀장어 (*Anguilla japonica*)는 부산광역시 남천동 남천해변시장에서 평균체중 300-400 g, 체장 50-70 cm의 뱀장어를 구입하여 살아있는 상태로 실험실로 운반하여 실험에 사용하였다.

Carnosine과 linoleic acid, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl free radical과 ascorbic acid는 Sigma chemical (St. Louis, MO)에서 구입하였으며 그 외의 모든 시약은 특급시약을 사용하였다.

\*Corresponding author: hssong@pknu.ac.kr

시료 전처리

Carnosine 추출을 위해 살아있는 뱀장어를 수육상에서 3시간 정도 방치시킨 후 즉살시켜 껍질과 두부, 내장, 뼈를 제거한 후 carnosine 추출용 시료로 사용하였다.

뱀장어 Carnosine 추출

뱀장어로부터 carnosine 추출은 이온교환처리와 한외여과처리 방법을 병행하여 수행하였다. 즉, carnosine 추출은 전보 (Song et al., 2006)에서 밝힌 바와 같이 뱀장어 육에 10배가량의 1% picric acid를 가해 마쇄한 뱀장어 육을 균질화한 후 8,000×g에서 30분간 원심 분리시켜 침전물을 제거한 상등액을 Dowex-2 chloride column (2.5×30 cm)을 이용하여 단백질 잔여물과 picric acid를 제거하고 저분자 펩타이드인 carnosine 분리를 위해서 membrane filter (XM50, YM30, YM10, YM3, YM1, YC05)로 걸러서 분자량을 최종 500 Da이하까지 조절하였으며 여과액을 -50℃ 이하로 냉동시킨 후 동결 건조하여 실험용 시료로 사용하였다.

Carbonyl group 함량 측정

단백질의 산화반응에 따른 carbonyl group의 생성을 측정하는 Hipkiss (1998)의 방법에 따라 ovalbumin 10 mg을 10 mL의 potassium phosphate (100 mM, pH 7)에 용해시키고 뱀장어 추출 carnosine을 일정 농도로 첨가한 후 10µL의 hypochlorite (100 mM)를 첨가하고 37℃에서 60분간 반응시켰다. Hypochlorite 처리한 단백질은 5% trichloroacetic acid (TCA)로 침전시킨 후 원심분리를 통해 상층액을 제거하고 침전물을 5% TCA로 2번 수세하고 일정량의 2M HCl에 다시 용해시킨 후 500µL의 10 mM 2,4-DNPH를 첨가하고 37℃에서 2시간 동안 반응시킨 후 동량의 2 M NaOH를 첨가한 후 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

단백질의 당화

최종당화산물의 전구체 물질인 Methyl glyoxal과 carnosine과의 반응성을 살펴보기 위해 Hipkiss (1998)의 방법에 따라 ovalbumin 100 mg을 11 mL의 potassium phosphate (100 mM, pH 7)에 용해시킨 후 뱀장어 추출 carnosine을 일정 농도로 첨가하고 30분 후 일정량의 methyl glyoxal을 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 반응시킨 후 1H-NMR 분석용 시료 및 점도 측정용 시료로 사용하였다.

점도 측정

Hypochlorite 처리를 통해 산화 반응시킨 단백질에 뱀장어 추출 carnosine을 첨가한 시료와 첨가하지 않은 시료로 나누고 4℃ 간격으로 60-84℃까지 온도를 증가시키면서 단백질의 열변성을 야기시켜 점도변화를 측정하였다. 점도 측정은 Brookfield viscometer (Model LVTDVII+, Brookfield Eng Labs Inc., U.S.A)를 이용하였으며 spindle은 No. 42를 사용하여 측정하였다.

SDS-PAGE

단백질 산화반응에 의해 생성되는 가교결합 및 당화에 미치는 뱀장어 carnosine의 영향을 알아보기 위해 SDS 전기영동을 행하였다. 전기영동은 Mini-Protein 3 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)을 사용하여 Laemmli (1970)의 방법에 따라 행하였다. 7.5% polyacrylamide gel을 사용하였으며 시료를 각각 30µL씩 well에 주입하고 25 mM Tris-192 mM glycine 완충용액 (pH 8.3)을 전극액으로 사용하여 전기영동 하였다. 전기영동 후 SDS-gel의 염색은 Coomassie brilliant blue R-250을 사용하였고, 염색이 끝난 겔은 빙초산/에탄올/증류수 혼합액 (v/v/v, 1:2:7)으로 탈색하였다.

<sup>1</sup>H-NMR

뱀장어 추출 carnosine의 분자구조 확인 및 AGE 전구체 물질과의 반응성을 살펴보기 위해 핵자기공명분석기 (JEOL, Japan, JNM ECP-400)를 사용하여 Table 1의 분석조건으로 1H-NMR을 측정하였다.

Table 1. Operating condition of <sup>1</sup>H NMR for analyzing carnosine

Instrument	JNM ECP 400
X-domain	<sup>1</sup> H-NMR
X-frequency	399.78 MHz
90° pulse width	10.9µs
Solvent	D <sub>2</sub> O
Spectral width	14 ppm
Data point	16,384
X-resolution	0.34 Hz
Scan No.	16

결과 및 고찰

뱀장어 추출 carnosine이 단백질 변성에 미치는 영향 단백질 가교 결합 형성 억제능

Hypochlorite anions는 산소 자유라디칼에 의해 생성된 반응물로서 단백질과의 반응을 통해 반응성이 풍부한 carbonyl group을 형성하고 이것이 crystallin이나 ovalbumin 등과 반응하여 단백질의 가교결합 형성 및 고분자량의 물질을 형성시켜 질병 및 노화에 관련된 비가역적 작용을 하는 것으로 알려져 있다 (Hipkiss, 1998). 뱀장어 추출 carnosine이 hypochlorite에 의해 생성되는 carbonyl group 및 단백질 가교결합 형성에 미치는 영향을 조사한 결과는 다음과 같다.

Ovalbumin에 hypochlorite와 뱀장어 추출 carnosine을 첨가한 후 carbonyl group 감소율을 측정된 결과 (Table 2)에서 10, 20, 30, 40 mM 뱀장어 추출 carnosine을 첨가하였을 때 각각 7.81±2.16%, 18.37±1.24%, 32.57±2.04%, 51.39±1.86%의 carbonyl group 감소를 나타내었다. Fig. 1과 같이 hypochlorite 양을 20µL, 40µL로 각각 첨가한 결과에서도 carnosine 농도가 증가함에 따라 carbonyl group 생성이 크게 억제되는 것으로 나타났다. Bovine serum albumin (BSA)의 malondialdehyde와 hypochlorite에 의한 변성 시에도 carnosine 농도가 증가함에

Table 2. The effects of eel carnosine on the loss of carbonyl groups from hypochlorite treated ovalbumin\*

Concentration (mM)	CO group lost (%)
10	7.81 ± 2.16**
20	18.37 ± 1.24
30	32.57 ± 2.04
40	51.39 ± 1.86

\*Ovalbumin (10 mg/10 mL) was incubated with hypochlorite (10 $\mu$ L) for 60 min in the presence of eel carnosine (10-40 mM). Carbonyl (CO) groups remaining were measured by diphenylhydrazine reactivity.

\*\*Expressed as mean  $\pm$  standard deviation (n=3).

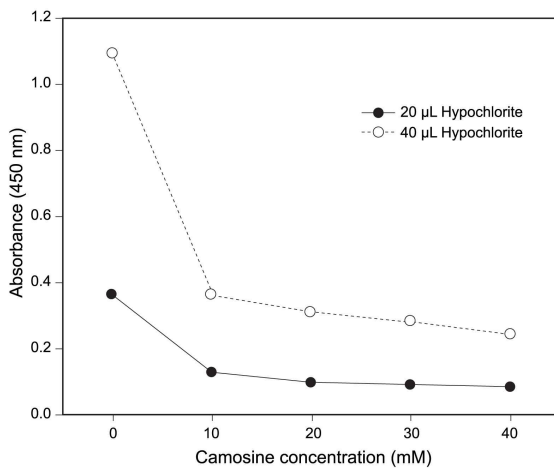


Fig. 1. Effect of eel carnosine on hypochlorite induced formation of protein carbonyl group. ovalbumin (10 mg/10 mL) was incubated with hypochlorite (20 and 40 $\mu$ L) for 60 min in the presence of eel carnosine (10-40 mM).

따라 carbonyl group 생성이 억제된다는 보고가 있으며 (Hipkiss et al., 1998), Hobart et al. (2004)은 BSA와 hypochlorite를 반응시킨 후 size-exclusion chromatography로 분석한 결과 단백질의 변성에 따른 고분자의 단백질이 생성되었지만 50 mM carnosine 첨가구의 경우에는 이러한 단백질의 변성이 감소된다고 보고하였다. Methyl glyoxal과 ovalbumin을 반응시킨 후 carnosine과 lysine을 50 mM 농도로 첨가 하였을 때 carbonyl group의 생성은 각각 47%, 56% 억제되었으며, 이는 carnosine이 단백질의 carbonyl group과 직접적으로 반응하기 때문이라고 보고되어 있다 (Hipkiss et al., 2001).

인체 세포내에서도 이와 같은 반응이 일어나며 carnosine이 단백질의 변성에 의해 생성된 carbonyl group을 비활성화 시키거나 소거시키는 작용을 할 수 있으므로 노화와 관련된 반응을 조절하는데 유용할 것으로 보여진다.

단백질 변성에 carnosine이 미치는 영향을 좀 더 자세히 알아보기 위해 ovalbumin에 뱀장어 carnosine을 0 mM, 20 mM, 40 mM의 농도로 첨가한 후 hypochlorite와 반응시켜 단백질을 변성시킨 후 전기영동을 행한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 1번은 hypochlorite 처리를 하지 않은 ovalbumin이고, 2번은 뱀장어 carnosine을 첨가하지 않고 hypochlorite 만으로 처리한

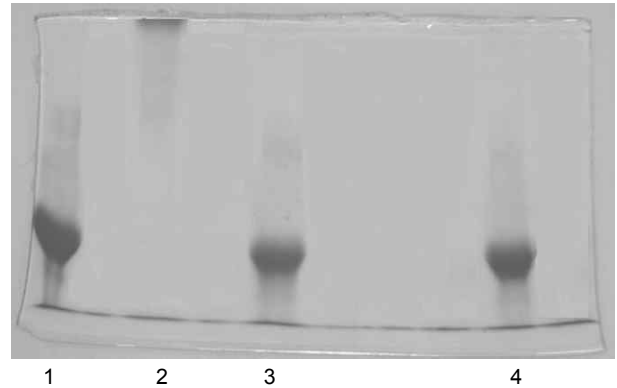


Fig. 2. SDS polyacrylamide gel electrophoresis showing the effects of eel carnosine on the generation of cross-linked protein between hypochlorite-modified ovalbumin and unmodified ovalbumin. Ovalbumin was treated with 100 mM hypochlorite for 1 weeks at 37 $^{\circ}$ C and then exhaustively dialyzed. Lane 1, unmodified ovalbumin; Lane 2, modified ovalbumin; Lane 3, modified ovalbumin treated with 20 mM eel carnosine; Lane 4, modified ovalbumin treated with 40 mM eel carnosine.

것이며 3과 4번은 hypochlorite와 함께 carnosine을 각각 20 mM과 40 mM로 첨가한 결과이다. carnosine 무 첨가구의 경우 hypochlorite에 기인한 단백질 가교결합에 의해 형성되어진 고분자의 단백질 밴드가 윗부분에서 나타난 반면 hypochlorite 무처리 ovalbumin과 carnosine을 첨가한 시료에서는 단백질 가교결합이 일어나지 않은 ovalbumin 밴드가 확인되었다.

Hipkiss et al. (1998)은 hypochlorite 처리에 의해 산화된 지방-단백질 복합체를 전기 영동한 결과 고분자 물질이 관찰되었다고 보고하였으며, bovine  $\alpha$ -crystallin을 hypochlorite 처리한 결과 단백질의 가교결합에 의한 고분자 물질의 형성이 확인되었고, 50 mM carnosine 첨가 시 고분자 물질이 나타나지 않았다고 보고하였다.

#### 단백질 당화 형성 억제

단백질의 당화산물은 펩타이드 간의 가교결합 형성 또는 생리적 기능을 저해하는 것으로 알려져 있다 (Hipkiss et al., 2001). 단백질은 비효소적으로 당과 반응하여 schiff base를 형성한 후 재배열되어 아마도리형의 초기당화산물이 생성된다. 이 과정은 가역적으로 일어나 그 농도가 조절되지만 일정 농도 이상의 혈당에서는 아마도리산물이 재배열되어 단백질과 교차 결합하여 비가역적인 AGE가 생성되고 조직에 축적된다 (Hamada et al., 1996; Thornalley et al., 1996; Frye et al., 1998).

이후 혈당이 정상으로 조절되어도 AGE가 분해되지 않고 단백질 조직의 구조와 기능을 비정상적으로 변화시켜 각종 질병을 유발하는 것으로 알려져 있다 (Stadtman, 1992; Miyata et al., 1998).

이러한 AGE 생성을 carnosine이 일정 수준 억제시킨다는 결과가 제시되고 있으며 (Hipkiss et al., 2001), 주요 기작은

carnosine의 imidazole 고리의 완충작용 및 금속 킬레이트능, 전자공여능 등에 의한 것으로 추정하고 있다. Torreggiani et al. (2001)은 carnosine의 금속 킬레이트능을 조사한 결과 imidazole 고리가 관여한다고 보고하였으며, Harris et al. (1990)과 Bate-Smith (1983)는 carnosine의 pKa는 6.8과 7.1로써 생리학적 pH 범위에서 혐기적 해당 작용으로 생성된 젖산을 효과적으로 중화시키며 이는 imidazole 고리에 의한 완충 효과에 의한 것이라고 보고하였다.

본 연구에서 추출한 뱀장어 carnosine의 AGE 생성 억제능을 확인하기 위하여 <sup>1</sup>H-NMR을 통하여 단백질의 당화과정에 관여하는 주요 인자인 methyl glyoxal과의 반응성을 살펴보았으며, carnosine의 AGE 생성 억제능 발현에 imidazole 고리가 관여하는지 여부를 조사하였다.

Carnosine 표준품과 뱀장어 추출 carnosine을 <sup>1</sup>H-NMR로 측정 한 결과 (Fig. 3, 4) H2, H4 즉 imidazole 고리를 모두 확인할 수 있었다. 표준품과 뱀장어 carnosine의 chemical shift 위치가 다른 것은 용매 및 pH 조절에 의한 영향이다. 뱀장어 carnosine과 methyl glyoxal을 반응시킨 후 측정 한 NMR 스펙트럼 (Fig. 5)에서 methyl glyoxal을 첨가하지 않은 carnosine의 경우 H2, H4의 imidazole 고리를 확인할 수 있었으나 methyl glyoxal을 첨가한 carnosine의 경우 H2, H4의 imidazole 고리가 감소하거나 사라진 것을 확인할 수 있었다.

이러한 결과로 미루어 보아 carnosine이 methyl glyoxal과 직접적으로 반응하는 것으로 보여지며, 특히 이 반응에 carnosine의 imidazole 고리가 중요한 역할을 하는 것으로 판단된다.

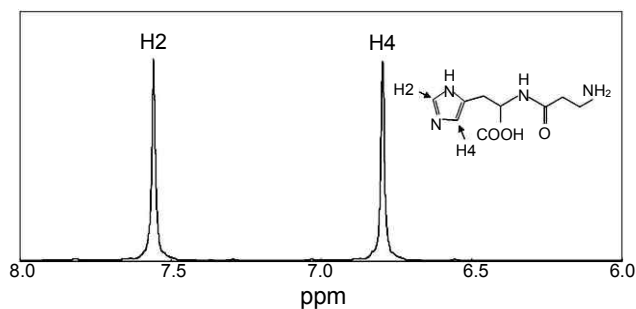


Fig. 3. NMR spectrum of imidazole ring in carnosine standard.

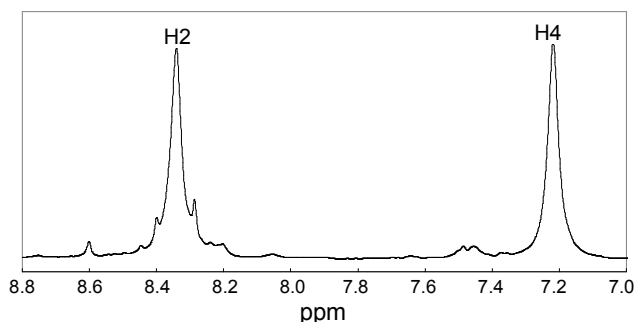


Fig. 4. NMR spectrum of imidazole ring in eel carnosine.

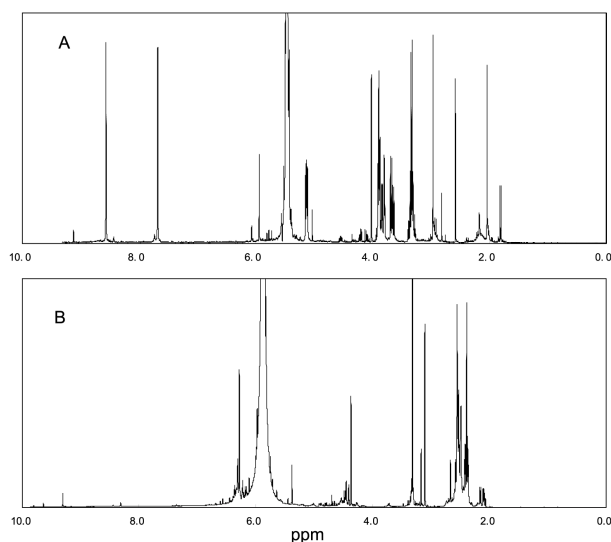


Fig. 5. NMR spectrum of eel carnosine and reacted eel carnosine with methyl glyoxal. A, Eel carnosine; B, Methyl glyoxal treated with 20 mM eel carnosine.

#### 단백질 열변성에 미치는 영향

단백질은 펩타이드 결합, 수소 결합, 이황화 결합, 이온 결합 등을 통해 고유의 구조를 이루고 있는데 단백질을 60°C 이상으로 가열하면 이들 결합이 붕괴되어 단백질 변성이 일어나는 것으로 알려져 있다 (Frye et al., 1989). 특히 당화된 단백질의 경우 변성이 더욱 크게 일어나는 것으로 알려져 있다 (Stadtman, 1992; Hipkiss et al., 1998). 이에 본 실험에서는 ovalbumin에 뱀장어 carnosine을 일정량 첨가한 후 hypochlorite를 첨가시켜 단백질 변성을 촉진시킨 후 60°C에서 84°C까지 4°C씩 온도를 증가시키면서 단백질 열변성에 따른 점도의 변화를 측정 한 결과 (Fig. 6). 뱀장어 carnosine 무 첨가

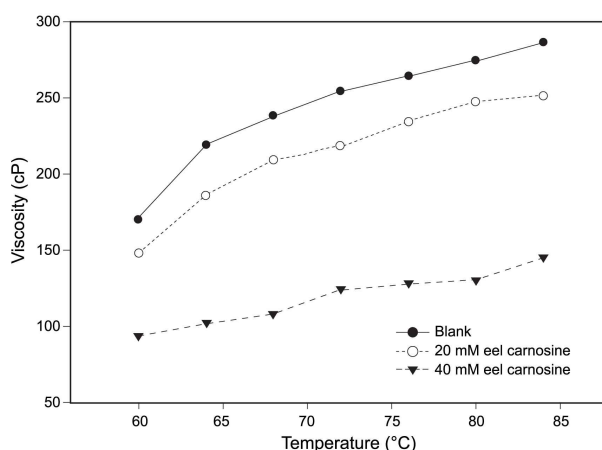


Fig. 6. Change in viscosity of hypochlorite treated ovalbumin. Closed circle: unmodified Ovalbumin, Open circle: modified Ovalbumin treated with 20 mM eel carnosine, Closed Triangle: modified Ovalbumin treated with 40 mM eel carnosine.

구의 경우 온도의 증가에 따라 상대적으로 점도가 증가되는 결과를 나타낸 반면 뱀장어추출 carnosine을 20 mM, 40 mM의 농도로 첨가한 경우 무 첨가구에 비해 상대적으로 낮은 점도를 나타내었으며 40 mM 첨가구가 가장 낮은 점도를 나타내었다. 단백질의 변성이 일어나게 되면 생물학적 활성 및 점도가 증가하는 것으로 알려져 있는데 이러한 결과를 살펴 볼 때 뱀장어 carnosine이 hypochlorite로 야기된 단백질 당화를 억제 시킴으로써 상대적으로 단백질의 열변성에 따른 안정성을 가진 것으로 사료되어진다.

### 참 고 문 헌

- Boldyrev, A., H. Abe, S. Stvolinsky and O. Tyulina. 1995. Effects of carnosine and related compounds on generation of free oxygen species: a comparative study. *Biochem. Physiol.*, 112, 481-485.
- Bucala, R., A. Cerami and H. Vlassara. 1995. Advanced glycosylation end products in diabetic complications. *Diabetes Rev.*, 3, 258-268.
- Bussayarat, M. and K.O. Intarapichet. 2005. Heat and ultrafiltration extraction of broiler meat carnosine and its antioxidant activity. *Meat Sci.*, 71, 364-374.
- Frye, E.B., T.P. Degenhardt, S.R. Thorpe and J.W. Baynes. 1998. Role of the Maillard reaction in aging of tissue proteins-advanced glycation end product-dependent increase in imidazolium crosslinks in human lens proteins. *J. Biol. Chem.*, 273, 18714-18719.
- Hamada, Y., N. Araki, N. Koh, J. Nakamura, S. Homuchi and N. Hotta. 1996. Rapid formation of advanced glycation end products by intermediate metabolites of the glycolytic pathway and polyol pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 228, 539-543.
- Harris, R.C., D.J. Marlin, D.H. Snow and E. Hultman. 1990. Muscle buffering capacity and dipeptide content in the throughbred horse, greyhound dog and man. *Biochem. Physiol.*, 97, 249-251.
- Hipkiss, A.R., C. Brownson and M.J. Carrier. 2001. Carnosine, the anti-ageing, anti-oxidant dipeptide, may react with protein carbonyl groups. *Mech. Aging Dev.*, 122, 1431-1445.
- Hipkiss, A.R., V.C. Worthington, D.T.J. Himsforth and W. Herwig. 1998. Protective effects of carnosine against protein modification mediated by malondialdehyde and hypochlorite. *Bioch. Biophys. Acta*, 1380, 46-54.
- Hipkiss, A.R. 1998. Carnosine, a protective, anti-aging peptide? *Bioche. Cell Biol.*, 30, 863-868.
- Hobart, L.J., I. Seibel, G.S. Yeagans and N.W. Seidler. 2004. Anti-crosslinking properties of carnosine: Significance of histidine. *Life Sci.*, 75, 1379-1389.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T3. *Nature*, 227, 680-685.
- Lee, B.J., J.H. Park, Y.S. Lee, M.H. Cho, Y.C. Kim and D.G. Hendricks. 1999. Effect of carnosine and related compounds on glucose oxidation and protein glycation in vitro. *J. Biochem. Mol. Biol.*, 32, 370-378.
- McManus, I.R. 1957. Some metabolic precursors of the N-1-methyl group of anserine in the rat. *J. Bio. Chem.*, 225, 325-334.
- Miyata, T., S. Sugiyama, D. Suziki, R. Inagi and K. Kurokawa. 1999. Increased carbonyl modification by lipids and carbohydrates in diabetic nephropathy. *Kidney Int.*, 56, 54-56.
- Nagasawa, T., T. Yokozawa and K. Terasawa. 2001. A study of kampo medicines in a diabetic nephropathy model. *J. Trad. Med.*, 19, 161-168.
- Quinn, P.R., A.A. Boldrev and V.E. Formazuyk. 1992. Carnosine : its properties, functions and potential therapeutic applications. *Mol. Aspects Med.*, 13, 379-444.
- Smith, E. and C. Bate. 1983. The buffering of muscle in rigor, protein, phosphate and carnosine. *J. Physiol.*, 92, 336-343.
- Song, H.S., K.T. Lee and O.K. Kang. 2006. Effect of extraction method on the carnosine, protein, and iron contents of eel (*Anguilla japonica*) extracts. *J. Kor. Fish. Soc.*, 39, 384-390.
- Stadtman, E.R. 1992. Protein oxidation and aging. *Science*, 257, 1220-1224.
- Thornalley, P.J. 1996. Advanced glycation and the development of diabetic complications. Unifying the involvement of glucose, methylglyoxal and oxidative stress. *Endocrinol. Metab.*, 3, 149-166.
- Torreggiani, A., G. Fini and G. Bottura. 2001. Effect of transition metal binding on the tautomeric equilibrium of the carnosine imidazolic ring. *J. Mol. Struct.*, 565, 341-346.
- Yokozawa, T., T. Nakagawa and K. Terasawa. 2001. Effects of oriental medicines on the production of advanced glycation products. *J. Trad. Med.*, 18, 107-112.

2008년 9월 22일 접수

2008년 12월 6일 수정

2009년 4월 2일 수리