

# 사염화탄소로 유도된 간손상에서 벵붉은잎에 의한 inducible nitric oxide synthase의 발현억제

안 미 정<sup>1</sup>, 신 태 균<sup>2</sup>

<sup>1</sup>제주대학교 의학전문대학원 해부학교실, <sup>2</sup>제주대학교 수의과대학 해부학교실

## Abstract

### Suppression of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-induced acute liver injury by *Callophyllis japonica*

Meejung Ahn<sup>1</sup>, Taekyun Shin<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departments of Anatomy, Jeju National University School of Medicine,

<sup>2</sup>Departments of Veterinary Anatomy, Jeju National University College of Veterinary Medicine, Jeju, Korea

*Callophyllis (C.) japonica*, which is a red seaweed, have been reported to have hepatoprotective effect on chemical-induced liver injury. In this study, we assessed whether oral administration of *C. japonica* influences the changes of inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-induced acute liver. The administration of *C. japonica* (150mg/kg) for 3 days before intraperitoneal injection of CCl<sub>4</sub> protected the liver cells from necrotic and fatty changes around the centrilobular lesions histologically. Western blot analysis showed that pre-treatment of *C. japonica* in CCl<sub>4</sub> injected group significantly decreased the level of iNOS expression, compared with those of vehicle treated CCl<sub>4</sub>-injected group (p<0.05). The immunostaining of iNOS in liver tissues in both groups was matched with Western blot results. Collectively, these finding suggest that increased level of iNOS in CCl<sub>4</sub>-induced liver injury is ameliorated by oral administration of a red seaweed, *C. japonica*, possibly protecting hepatocytes from liver injury. (J Med Life Sci 2010;7:126-130)

Key Words : *Callophyllis japonica*, Carbon tetrachloride, Red seaweed, iNOS

## 서 론

사염화탄소(Carbon tetrachloride, CCl<sub>4</sub>)는 간섬유화를 동반하는 간손상을 일으키기 위하여 널리 이용되고 있다<sup>1-3</sup>). 그 작용기전은 아직 알려져 있지 않으나 CCl<sub>4</sub>의 산화제로서의 역할이 중요시 되고 있다<sup>4</sup>). 즉 CCl<sub>4</sub>가 간내의 microsomal cytochrome P-450에서 산화기를 형성하게 되는데, 이 산화기가 직, 간접적으로 세포막의 지질 또는 다른 분자들에 손상을 유발하게 된다<sup>4</sup>). 이러한 손상 기전에 의해 간에서는 중심소엽의 괴사와 지방이 축적되게 된다<sup>4</sup>).

벵붉은잎(*Callophyllis japonica*)은 홍조류로서 우리나라 제주도, 부산, 추자도, 거문도, 완도, 방어진등의 해안에 널리 분포하

고 있으며 식용으로 이용되고 있다. 벵붉은잎은 항산화능을 비롯한 다양한 생리활성능을 가지는 것으로 알려져 있다<sup>6</sup>). 특히 *in vitro* 실험에서 세포내 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)인 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl기를 제거하며, 과산화지질을 억제하는 기능이 알려져 있고<sup>5</sup>), 방사선에 의한 소장 음와 세포 사멸을 억제함으로써 방사선 방호효과를 나타내는 것으로 알려져 있다<sup>6</sup>). 아울러 벵붉은잎은 사염화탄소에 의해 유도된 간 손상 모델에서 간손상시 증가되는 alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST)의 감소와 관련성이 있음이 확인된 바 있다<sup>7</sup>).

Nitric oxide (NO)는 L-arginine으로부터 분비되는 Nitric oxide synthase (NOS)에 의해 합성 된다<sup>8</sup>). 이러한 NOS는 다양한 자극에 의해 산화적 손상을 유도할 수 있으며<sup>9</sup>), 간에서 증가된 inducible NOS (iNOS)와 이들에 의해 생성된 NO는 사염화탄소에 의한 간손상과도 관련성이 깊은 것이 증명되고 있다<sup>10, 11</sup>). 그러나 아직까지 식용으로 활용되는 벵붉은잎이 간손상 시 증가되는 iNOS에 어떤 영향을 미치는지에 대한 연구는 거의 없다.

본 연구에서는 사염화탄소에 의해 산화적 손상을 일으키는 간 손상모델에서 벵붉은잎 투여가 간세포 손상을 일으킬 수 있는

Address for correspondence : Taekyun Shin  
Department of Veterinary Anatomy, Jeju National University College of Veterinary Medicine, 66 Jejudaeakno, 690-756, Jeju, Korea  
E-mail : shint@jeju.ac.kr

This project was supported by Honam Sea Grant R&D Program fund of 2009.

iNOS에 어떤 영향을 미칠 수 있는지를 생체에서 분석하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 벚꽃은잎의 준비

이 실험에 사용된 시료는 제주도 성산포 연안에 서식하는 벚꽃은잎을 담수를 이용하여 염분을 제거하였다. 염분을 제거한 시료는 건조과정을 거쳐 분말로 제작하였고, 생리식염수에 분말을 섞어 경구 투여하였다.

### 2. CCl<sub>4</sub>를 이용한 간 손상 유도

150-200g의 7-8주령 수컷 Sprague-Dawley 랫트를 이용하여, CCl<sub>4</sub>(Oriental Chemicals, Seoul)를 20% (v/v) 용액을 올리브 오일에 희석하여 1.25ml/kg로 복강투여 하였다<sup>12, 13</sup>.

벚꽃은잎의 예방효과를 확인하기 위하여 실험그룹은 1) 생리식염수 + 올리브 오일 대조군 2) 생리식염수 + CCl<sub>4</sub> 간손상 유도 그룹 3) 벚꽃은잎 + CCl<sub>4</sub> 간손상 유도 그룹으로 나누어 각 그룹당 10마리씩 실험하였다. 첫 번째 그룹은 3일 동안 생리식염수(10ml/kg)를 경구투여하고 희생전 6시간에 올리브 오일만을 복강 주사 하였고, 두 번째 그룹은 3일 동안 생리식염수(10ml/kg)를 경구투여 한 후, CCl<sub>4</sub> (1.25ml/kg)로 복강 주사하였고, 세 번째 그룹은 벚꽃은잎(150mg/kg/day)을 3일 동안 경구투여 한 후, CCl<sub>4</sub> (1.25ml/kg)로 복강주사 하여 화학적 간염을 유도하였고, 세 그룹 모두 6시간 후에 희생시켰다.

### 3. 조직표본 준비와 조직 검사

실험동물은 CO<sub>2</sub>로 마취하여 방혈하였고, 세 그룹 모두 CCl<sub>4</sub> 유도 후 6시간째에 희생시켜 간 조직을 조직 검사와 Western blotting을 위해 샘플링 하였다. 현미경 관찰을 위한 조직은 10% 포르말린 고정하고 에탄올과 자일렌으로 탈수와 투명화 과정을 거쳐 파라핀에 포매한 후 5µm의 두께로 조직절편을 만들어 H-E 염색을 실시하였다.

### 4. Western blotting

간 조직을 leupeptin (0.5 ug/ml), PMSF (1 mM), aprotinin (5 ug/ml)등의 protein inhibitor가 포함된 40 mM Tris-HCl, pH 7.4, 120 mM NaCl, 0.1% Nonidet P-40 (polyoxyethylene [9] p-t-octyl phenol)의 buffer에서 녹인 후, 갈아서 완전히 파쇄한 후, 14,000 g로 30분간 원심분리하여 상층액을 회수한다. 이들을 단백질 정량하여 변형시킨 후 동량 (20ug/20ul)으로 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel에서 전기영동하고, gel 상의 단백질을 다시 nitrocellulose membrane에 100V에서 2시간 동안 이동시켰다. 옮겨진 membrane을 5% skim milk로 blocking한 후, 1차 항체로 mouse monoclonal anti-iNOS (Transduction Laboratories, Lexington, KY)(1:1000)을 실온에서 1시간 반응시킨 후 2차 항체로는 horseradish peroxidase-

conjugated horse anti-mouse IgG (Vector Laboratories, Burlingame, CA)로 실온에서 60분간 반응시킨다. 면역반응이 끝난 membrane은 Amersham ECL reagents (Amersham Life Science, Buckinghamshire, UK)로 반응시켜, X-ray 필름에 노출시키고, 그 결과를 densitometer (M GS-700 Imaging Densitometer, Bio-Rad laboratories, Hercules, CA)로 측정하였다.

### 5. 면역조직화학

슬라이드 준비된 조직의 파라핀을 제거하고 내재성 peroxidase를 제거하기 위해 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 포함된 메탄올에 20분간 반응시켰다. 비특이적 반응을 방지하기 위해 10% normal horse serum으로 1시간 반응시켰다. 1차 항체로 mouse monoclonal anti-iNOS (Transduction Laboratory) (1:200)을 실온에서 1시간 반응시킨 후 biotinylated horse anti-mouse IgG (Vector) (1:200)로 45분간 반응시켰다. 이어 avidin-biotin peroxidase complex Elite kit (Vector)로 실온에서 45분간 반응시켰다. 각 단계가 끝나고 PBS (pH 7.4)로 5분간 3회 충분히 세척했으며, 면역반응이 끝난 조직절편은 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)(Sigma, St. Louis, MO, USA) 용액으로 발색했다. 그리고 hematoxylin용액으로 대조염색을 한 후, 에탄올과 자일렌으로 탈수와 투명화 과정을 거쳐 봉입하여 광학 현미경으로 관찰하였다.

### 6. 자료 통계

모든 실험에서 얻어진 자료는 one-way ANOVA (the post-hoc Student-Newman-Keuls)의 방법으로 유의성 검사하였고, 그들의 수치는 평균 표준편차 mean ± SE의 값으로 나타내었으며, p값이 0.05보다 작을 때 그 값을 유의성이 있는 값으로 정하였다.

## 결 과

### 1. 벚꽃은잎 투여 후 CCl<sub>4</sub>에 의한 간손상 완화

조직학적 검사 결과, 생리식염수를 경구투여하고 올리브 오일만을 복강주사 한 대조군에서는 정상적인 간조직의 일반적인 특징이 관찰되었다(Fig. 1A). 생리식염수를 투여하고 간손상을 유도한 그룹에서는 손상된 세포와 피사부위가 광범위하였고, 중심정맥의 수축과 간소엽의 확장, 지방 축적이 관찰되었다(Fig. 1B). 벚꽃은잎(150mg/kg/day)을 3일동안 경구투여 한 후 간손상을 유도한 그룹에서는 피사소견이 상대적으로 적게 나타났으며, 지방 축적 또한 생리식염수를 투여한 그룹에 비해 현저히 감소됨을 확인할 수 있었다(Fig. 1C).

### 2. iNOS의 발현에 대한 Western blotting 결과

Western blotting을 통해 iNOS의 양적인 변화를 확인한 결과,

iNOS의 발현은 올리브 오일만을 주사한 대조군에 비해 CCl<sub>4</sub>에 의해 손상 받은 그룹에서 약 7배가 증가하여 유의성 있는 결과를 나타내었고( $p < 0.01$ ). CCl<sub>4</sub> 손상 전 벚꽃은잎을 3일 동안 투여한 후 그룹에서는 생리식염수만을 투여한 그룹에 비해 현저히 감소하였다( $p < 0.5$ ) (Fig. 2).

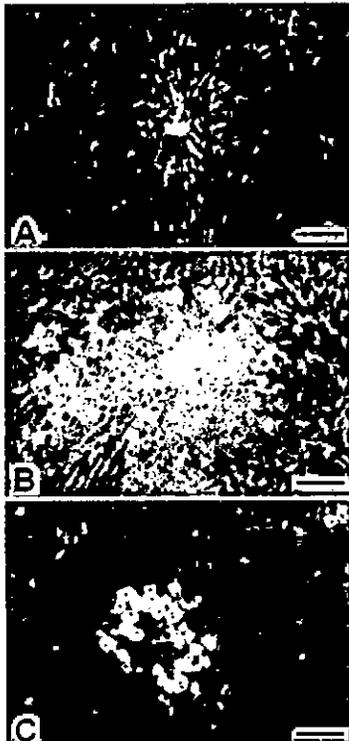
### 3. iNOS의 발현에 대한 면역조직화학적 결과

간조직에서 iNOS의 발현양상을 면역조직화학적 기법을 이용하여 확인한 결과, 올리브 오일만을 투여한 대조군에서는 iNOS의 발현은 중심정맥 주위 간세포에서 아주 약하게 나타났다 (Fig. 3A).

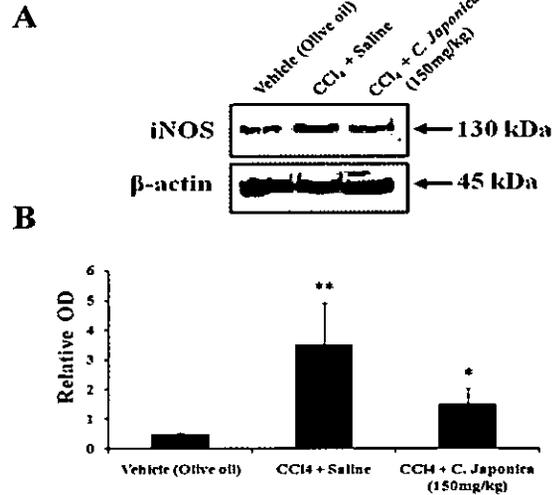
생리식염수를 투여하고 간손상을 유도한 그룹에서는 간삼조 (portal triad) 주변 간세포에서 iNOS가 발현되었으며 (Fig. 3B), 손상을 심하게 받은 중심정맥 주위 간세포에서 iNOS의 발현이 강하게 나타났다 (Fig. 3C, 3E).

반면 3일 동안 벚꽃은잎을 투여하고 간손상을 유도한 그룹에서의 iNOS의 발현은 생리식염수만을 투여한 그룹에 비해 양성세포의 수와 발현 강도가 약하게 나타났다 (Fig. 3D, 3F). 이러한 결과는 iNOS의 발현 양을 비교한 Western blotting 결과와도 일치하는 소견이었다.

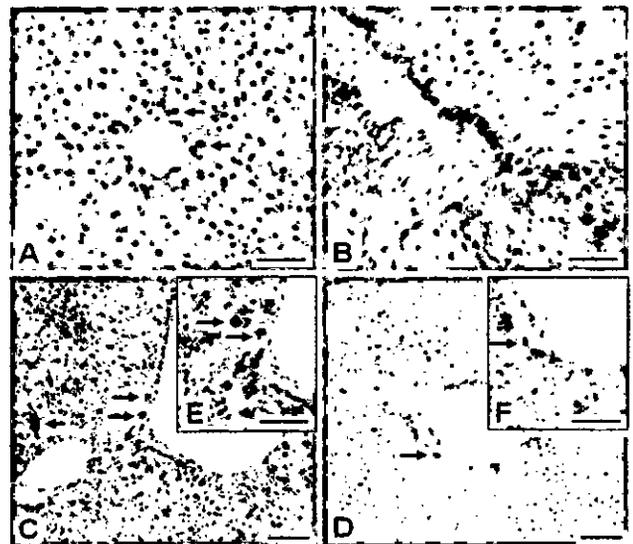
**Figure 1.** (A) Histological findings of livers with vehicle (olive oil) control rat, (B) normal saline control rat and (C) pre-treatment with *C. japonica* (150mg/kg) for 3 days in CCl<sub>4</sub>-injected rat (B-C). (A) Shows the normal appearance of liver. (B) Shows centrilobular fatty change and necrosis of liver cell in the liver. (C) Shows a decrease in the necrotic and fatty change in liver. Hematoxylin-eosin staining. Scale bar = 100  $\mu$ m.



**Figure 2.** Western blotting analysis of iNOS in the liver of vehicle control rats (Olive oil) and rats with normal saline and *C. japonica* (150mg/kg) for 3 days before CCl<sub>4</sub>-injected. (A) Representative photographs of Western blots for the detection of iNOS (130 kDa) and  $\beta$ -actin (45 kDa). (B) Results of densitometric data analysis (mean  $\pm$  S.E., n=3 rats/group). \*\*  $p < 0.01$  vs. vehicle controls, \*  $p < 0.05$  vs. normal saline controls.



**Figure 3.** Immunohistochemical staining of iNOS in the liver of vehicle control rats (A) and rats with normal saline (B, C and E) and *C. japonica* (150mg/kg) (D and F) for 3 days before CCl<sub>4</sub>injury. In the liver of the vehicle control rats, iNOS was weakly detected in some of the liver cell around centrilobular lesions (A arrows). At the normal saline treatment of CCl<sub>4</sub>-injury, increased levels of iNOS were strongly detected in the liver cells around portal triad lesions (B) and centrilobular lesions (C and E, arrows). However, in the liver of the pre-treatment with *C. japonica* (150mg/kg), the levels of iNOS immunoreactivity in the liver cells around centrilobular were decreased (D, and F, arrows). E and F were high magnification of C and D, respectively. The specimens were counterstained with hematoxylin. Scale bars: 50 $\mu$ m.



고 찰

NO와 prostacyclin은 문맥 고혈압의 과역동과 관련하여 혈관 수축에 관여하는 대표적인 물질로 보통 병리적으로 문맥압이 증가하였을 경우 증가하게 된다<sup>14)</sup>. 특히 iNOS는 NO의 과량생산에 의해 유도된 문맥고혈압의 비정상적인 혈관역동을 조절해주는 중요한 역할을 한다고 보고되었다<sup>14)</sup>.

CCl<sub>4</sub>를 이용한 급성 간손상 모델에서 오리나무더부살이 (*Boschniakia rossica*)식물에서 추출한 iridoid 배당체를 투여한 결과 염증매개인자인 TNF- $\alpha$ 와 iNOS의 발현을 감소시켰고<sup>15)</sup>, *Garcinia kola*의 열매에서 분리한 플라보노이드 성분인 Kolaviron를 간손상 모델에서 치료효과를 확인한 결과, iNOS와 COX-2의 발현을 감소시켜 항염효과 및 항산화 효과를 통해 간세포가 보호되었다<sup>16)</sup>.

본 연구에서는 CCl<sub>4</sub>에 의해 유도된 급성 간손상모델에서 벚붉은잎을 3일간 경구 투여하였을 경우 중심정맥 주위 괴사 및 지방 축적이 완화되었음을 확인하였고, Western blotting 결과 iNOS의 발현은 대조군에 비해 CCl<sub>4</sub>에 의해 손상 받은 그룹에서 유의성 있게 증가한 것으로 나타났다. 또한 벚붉은잎을 투여한 그룹에서는 생리식염수를 투여한 그룹에 비해 유의성 있게 감소하였다. 이와 같은 결과는 iNOS 억제능을 갖는 오리나무더부살이 등 여러 식물추출물의 연구 결과와 일치하였다<sup>15, 16)</sup>.

간손상에서 NO의 정확한 역할에 대해서는 현재까지도 논란이 되고 있다. 한 보고에 의하면, CCl<sub>4</sub>를 이용하여 급성 간손상을 유도한 경우 TNF- $\alpha$ , iNOS, COX-2와 같은 염증매개인자들의 발현이 증가되었고, CCl<sub>4</sub>와 함께 iNOS의 억제제인 5-methylisothiourrea hemisulfate (SMT) 와 1-N<sup>6</sup>-(1-iminoethyl)-lysine(L-NIL)을 투여하였을 경우, iNOS donor를 투여한 경우보다 이러한 염증매개인자들의 발현이 감소되었다고 보고하였다<sup>11)</sup>. 본 연구에서는 CCl<sub>4</sub> 손상 전 3일 동안 벚붉은잎을 투여한 경우 iNOS의 발현을 비교한 결과 벚붉은잎을 투여하지 않은 그룹에 비해 iNOS의 발현이 감소한 것은 벚붉은잎이 CCl<sub>4</sub>에 의한 간손상시 iNOS를 억제시켰고, iNOS의 억제제 역할을 하여, 치료 효과를 기대할 수 있음을 시사한다.

벚붉은잎은 CCl<sub>4</sub>에 의해 유도된 급성 간손상에서 간세포를 보호하는 것으로 확인되었고<sup>7)</sup>, 간세포 보호효과를 용량별로 확인한 경우, 150mg/kg/day가 가장 효과적인 용량이었다. 이 용량을 CCl<sub>4</sub> 손상 전에 투여한 경우, 혈청학적 검사를 통해 ALT와 AST의 수치가 유의성 있게 감소됨을 확인하였고, 본 연구에서는 벚붉은잎에 의한 간세포의 손상 완화 기전으로 iNOS가 억제되었음을 확인 하였다.

본 연구에서는 CCl<sub>4</sub>에 의해 간손상을 유도하기 전에 벚붉은잎을 투여하여 간세포 보호 기전을 확인하고자 하였으며, 벚붉은잎을 투여한 경우 중심정맥 주위 괴사와 지방의 축적을 감소시켰다. 이러한 간세포 손상이 완화될 수 있는 것은 iNOS의 발현 감소에 의한 것이고, 벚붉은잎은 급성 간손상 시, 산화적 손상으로 부터 방어할 수 있는 iNOS의 억제제 역할을 할 수 있다고 사료된다.

참 고 문 헌

- 1) Brenner DA, Veloz L, Jaenisch R, Alcorn JM. Stimulation of the collagen alpha 1 (I) endogenous gene and transgene in carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis. *Hepatology* 1993;17:287-92.
- 2) Gilani AU, Janbaz KH. Studies on protective effect of *Cyperus scariosus* extract on acetaminophen and CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity. *Gen Pharmacol* 1995;26:627-31.
- 3) Lee JI, Lee KS, Chung JP, Park YN, Lee SJ, Han KH, et al. The change of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 expressing and the effect of vitamin E in the acute rat liver injury with carbon tetrachloride. *Korean J Hepatol* 2002;6:147-55.
- 4) Castillo T, Koop DR, Kamimura S, Triadafilopoulos G, Tsukamoto H. Role of cytochrome P-450 2E1 in ethanol-, carbon tetrachloride- and iron- dependent microsomal lipid peroxidation. *Hepatology* 1992;16:992-6.
- 5) Kang KA, Bu HD, Park DS, Go GM, Jee Y, Shin T, et al. Antioxidant activity of ethanol extract of *Callophyllis japonica*. *Phytother Res* 2005;19:506-10.
- 6) Kim J, Moon C, Kim H, Jeong J, Lee J, Kim J, et al. The radioprotective effects of the hexane and ethyl acetate extracts of *Callophyllis japonica* in mice that undergo whole body irradiation. *J Vet Sci* 2008;9:281-4.
- 7) Park DS, Lee KH, Kim HC, Ahn MJ, Moon C, Ko MS, et al. Effects of *Callophyllis japonica* powder on carbon tetrachloride-induced liver injury in rats. *Orient Pharm Exp Med* 2005;5:231-5.
- 8) Xie QW, Nathan C. The high-output nitric oxide pathway: role and regulation. *J Leuk Biol* 1994;56:576-582.
- 9) Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991;43:109-42.
- 10) Patruno A, Speranza L, Teté S, Mastrangelo F, De Lutis MA, Pesce M, et al. iNOS activity in the aged rat liver tissue. *J Biol Regul Homeost Agents* 2007;21:89-95.
- 11) Tipoe GL, Leung TM, Liong E, So H, Leung KM, Lau TY, et al. Inhibitors of inducible nitric oxide (NO) synthase are more effective than an NO donor in reducing carbon-tetrachloride induced acute liver injury. *Histol Histopathol* 2006;21:1157-65.
- 12) Raju K, Anbuganapathi G, Gokulakrishnan V, Raj Kapoor B, Jayakar B, Manian S. Effect of dried fruits of *Solanum nigrum* LINN against CCl<sub>4</sub>-induced hepatic damage in rats. *Biol Pharm Bull* 2003;26: 1618-9.
- 13) Slater TF. Necrogenic action of carbon tetrachloride in the rat: a speculative mechanism based on activation.

Nature 1966;209: 36-40.

- 14) Xu J, Cao H, Liu H, Wu ZY. Role of nitric oxide synthase and cyclooxygenase in hyperdynamic splanchnic circulation of portal hypertension. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2008;7:503-8.
- 15) Quan J, Piao L, Xu H, Li T, Yin X. Protective effect of iridoid glucosides from *Boschniakia rossica* on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2009;73:849-54.
- 16) Farombi EO, Shrotriya S, Surh YJ. Kolaviron inhibits dimethyl nitrosamine-induced liver injury by suppressing COX-2 and iNOS expression via NF-kappaB and AP-1. *Life Sci* 2009;84:149-55.