pISSN 1229-1153 *J. Fd Hyg. Safety*
Vol. 30, No. 2, pp. 202~209 (2015)
http://dx.doi.org/10.13103/JFHS.2015.30.2.202

Journal of Food Hygiene and Safety
Available online at http://www.foodhygiene.or.kr

Streptozotocin에 의한 산화 스트레스로부터 매생이 추출물의 정소 조직 보호 효과

손원락 · 남미현 · 한아람 · 표민철 · 김세욱 · 정혜림 · 이화 · 김지연 · 이광원*
고려대학교 생명공학과

Protective Effects of *Capsosiphon fulvescens* and Pheophorbide a on Streptozotocin-induced Oxidative Stress in Testicular

Won-rak Son, Mi-Hyun Nam, Ah-Ram Han, Min-Cheol Pyo, Se-Wook Kim, Hye-Lim Jung, Hwa Lee, Ji-Yeon Kim, and Kwang-Won Lee*
Department of Food Bioscience and Technology, College of Life Science & Biotechnology, Korea University
(Received December 16, 2014/Revised January 20, 2015/Accepted March 17, 2015)

ABSTRACT - We investigated the effect of *Capsosiphon fulvescens* (CFE) and pheophorbide a (PhA) contained in CFE on oxidative stress regarded as a factor for diabetic complication. Streptozotocin (STZ), known as an oxidative stress inducer, was intraperitoneal injected for causing diabetes. After 7 days, CFE (4 and 20 mg/kg body weight) and PhA (0.2 mg/kg body weight) were treated once a day for 9 weeks. After the sacrifice, testis tissues were collected for the experiments. We confirmed that the treatment with CFE and PhA in diabetic animals not only decreased level of lipid peroxidation and serum nitric oxide compared with the diabetes group, but also the activities of glutathione peroxidase and glutathione-S-transferase were restored remarkably. Furthermore the activity of antioxidant enzymes, catalase and superoxide dismutase, were significantly recovered. With these results, our study suggest that CFE containing PhA may prevent seminal glands damages induced by oxidative stress in diabetic condition.

Key words: *Capsosiphon fulvescens*, pheoporbide a, testis dysfunction, oxidative stress, antioxidant enzymes

세계건강기구에 따르면 2008년 당뇨병을 앓고 있는 세계 인구가 약 3억 5천만이라고 발표하였다. 이는 성인 인구의 약 9.5%에 해당하며, 급격히 증가하여 2030년까지 2배가 될 것이라고 예상하였다[1]. 혈당 유지 실패로 인한 세포 내 고혈당으로 미토콘드리아에서 과잉 생산되는 활성산소종(Reactive Oxygen Species, ROS)은 조직 손상 기전의 활성을 촉진하여 합병증을 일으킨다[2]. 특히 간, 췌장, 뇌와 같이 체내 주요 기관에 걸쳐 기능적인 합병증을 야기한다[3,4]. Streptozotocin (STZ)은 체내에서 인슐린을 생산하는 췌장의 베타 세포 파괴를 일으켜 인슐린 결핍을 발생시키고[5,6], 내당능력 저하로 인한 베타 세포의 민감도를 감소시킨다고 알려져 있다[7,8]. 체내에 존재하는 superoxide dismutase, catalase와 같은 항산화계 효소는 체내에서 발생하는 활성산소종에 의해 생산되는 여러 과산화물을 효과적으로 제거한다. 한편, 고혈당은 산화적 스트레스를 유발하고, 이에 따라 지속적인 산화적 스트레스의 노출은 세포기능에 문제를 일으키는데, 특히, 정자 내 DNA의 산화뿐만 아니라 정액 내 항산화 수준을 떨어트려 생식세포와 정자 생산에 관여하는 정소의 기능에 문제를 일으킨다고 알려져 있다[9]. 정상적인 정자 생산을 위해 세포 자살과 재생은 중요한 조절요인으로 생각되는데, 고혈당과 같은 비정상적인 생리현상이 지속되면 그 균형을 깨트려 정소 기능의 문제가 발생한다[10-12]. 당뇨의 경우 발병 단계에 따라 병리학적 특징이 다양하게 나타나고, 현재 상용되고 있는 치료제의 여러 부작용 및 내성이 보고됨에 따라 천연물에 대한 항당뇨효과를 기대하고 있다[13]. 해양생물 중 해조류는 필수 미량원소와 알칼리 이온을 함유하고 있어, 체내 노폐물 배설과 신진대사 촉진, 콜레스테롤 저하 등의 해조류 종류에 따라 여러 생리활성에 효과를 나타내고 있다[14]. 녹조류 갈파래과인 매생이(*Capsosiphon fulvescens*, CF)는 항산화효과와 함께 α-글루코시데이즈 저해로 인한 혈당강하효과도 보고되고 있다[15]. 본 실험에서는 선행 연구 결과를 바탕으로 CF 주정 추출물(CFE)과 이에 함유된 항글라이케션 기능성 지표물질인 pheophorbide a를 경구투여

*Correspondence to: Kwang-Won Lee, Department of Food Bioscience & Technology, College of Life Science and Biotechnology, Korea University, Anam-Dong, Sungbuk-Gu, Seoul 136-701, Korea
Tel: 82-2-3290-3027, Fax: 82-2-927-1970
E-mail: kwangwon@korea.ac.kr

함으로써 당뇨 모델에서 산화스트레스에 의한 생식 내분비계 보호효과 연구를 수행하였다.

Materials and Methods

시험 물질

매생이(*Capsosiphon fulvescens,* CF)는 전라남도 장흥에서 자란 생물을 구매하였다. 흐르는 물로 3 회 세척하여 이물질과 염분을 제거한 후 70% 주정 에탄올로 환류 냉각하여 추출한 후, Whatman No. 2 (Clifton, NJ, USA)로 여과하였다. 여액을 감압 증류 한 다음 다시 동결건조 하여 매생이 주정 추출물을 얻었으며, 각 투여군의 농도에 따라 멸균수에 현탁하여 본 실험에 사용하였다.

시약 및 재료

Acarbose, 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB), citric acid, 5,5'-dithiobis nitrobenzonic (DTNB), N-ethylmalemide (NEM), ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), glucose, hepes, hydrogen peroxide, GSH reductase (glutathione reductase from baker's yeast), L-lactate dehydrogenase (LDH), β-nicotinamide adenine dinucleotide (NADH), β-nicotinamide adenine dinucleotide 2'-phosphate (NADPH), N-(1-naphtyl) ethylene diamine dihydrochloride (NEAD), potassium dichromate, sulfanilamide, 5-sulfosalicylic dihydrate, sodium citrate, streptozotocin, 2-vinylpyridine, xanthine, xanthine oxidase는 Sigma Chemical (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Pheophorbide a (PhA)는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였으며, 모든 시약은 특급 및 일급품을 사용하여 실험하였다.

시험동물 및 사육환경

동물 실험은 고려대학교 동물실험 윤리위원회의 규정에 따라 심의를 거친 후 진행 하였다(승인 번호 KUIACUC-2013-142). 실험 동물은 (주) 샘타코에서 5 주령의 Sprague-Dawley rats (130-160 g)을 구매하여 진행하였다. 실험 동물의 사육은 특정 병원균의 부재(specific pathogen free, SPF) 상태를 유지하기 위해 환기장치가 장착된 barrier system에서 사육 상자에 한 마리씩 사육하였다. 사육 조건은 20 ± 3°C, 습도 50 ± 1%, 명암주기를 12시간(08:00 점등~20:00 소등) 간격으로 유지하였으며, 조도 150~300 Lux, 환기회수 15~20회/hr로 설정된 환경에서 사육하였다. 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다.

실험군과 투여물질

실험에 사용한 랫드는 12시간 동안 절식시킨 다음 streptozotocin (STZ)을 0.1 M sodium citrate buffer (pH 4.5)에 녹여 40 mg/kg body weight (b.w.)의 농도로 복강 투여하였다. 한달 간의 유도기간 결과, 전 그룹에서 400 mg/dL의 공복 시 혈당을 확인한 후 시험 물질을 투여하여 실험하였다. 실험군은 총 여섯 그룹으로, 정상대조군(CON), 당뇨유발군(STZ), 양성대조군 0.2 mg/kg b.w. acarbose (AC), 4 mg/kg b.w. CFE 저농도 투여군(CL), 20 mg/kg b.w. CFE 고농도 투여군(CH), 0.2 mg/kg b.w. PhA 투여군(PhA)으로 각 군에 여섯 마리씩 사육하여 두 달 동안 투여하였다. 경구당부하검사(OGTT) 예비 실험을 통해 CFE 고농도인 20 mg/kg b.w. 과 40 mg/kg b.w. 투여군에서 효과를 보였고, 20 mg/kg b.w. 에서 OGTT 결과가 더 효과적으로 나타난 것을 토대로 고농도 투여군으로 설정하였다. 또한 PhA의 수율이 약 1.15% 되는 것을 감안하여 PhA 투여군 농도를 설정하여 실험하였다. 랫드를 이산화탄소로 마취시킨 후 희생시켜 정소 조직을 적출하였고 조직은 생화학적 분석을 위해 액체 질소로 급속 냉동 한 후 −70°C에 보관하였다.

혈액 내 nitric oxide (NO) 생성

랫드에서 얻어낸 혈청을 취하여 혈청에서 생성된 NO_2^-가 Griess reagent과 반응하여 azo compound를 형성하여 선홍색을 띄는 원리를 이용하였다[16]. 혈액 50 μL와 1% sulfanilamide에 5% H_3PO_4가 함유된 혼합물과 0.1% N-(1-naphtyl) ethylenediamine dihydrochloride를 1:1로 반응시킨 Griess reagent를 각각 50 μL씩 넣은 후, 5분간 정치하여 분광광도계를 이용하여 540 nm에서 측정하였다. 결과값은 $NaNO_2$로 표준곡선을 계산한 후 측정값에서 혈액의 공시험값을 빼준 후 표준곡선에 해당하는 혈액 내 serum NO μM로 표기하였다.

지질 과산화물(Thiobarbituric acid reactive, TBAR) 측정

정소 조직 0.1 g에 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.4)를 첨가하여 균질화 후 원심분리하여 상등액을 취해 시료로 사용하였다. 그 상등액에 TBA reagent (30% TCA, 1.5% TBA, 10 mg/ml BHT)를 넣어 100°C에서 20분간 가열하였다. 상온에서 식힌 후, 그 반응액을 10,000 rpm으로 5분간 원심분리하고 상등액을 취하여 exitation 530 nm/ emission 590 nm의 파장에서 spectrofluorometer (VICTOR3™, Perkin Elmer, MA, USA)를 이용하여 형광도를 측정하였다. 원심 분리된 침전물은 1 N NaOH에 녹인 후 단백질 정량하였고, 결과값은 1,1,3,3-tetraethoxy-propane의 산에 의한 가수분해로 얻어진 malondialdehyde (MDA)의 표준곡선을 계산한 후 이에 따른 결과값을 MDA 당량으로 표기 하였다.

환원형 글루타티온(GSH), 산화형 글루타티온(GSSG) 함량

GSH 함량 측정은 정소 조직 0.1 g에 50 mM NEM 1 mL를 넣어 마쇄 한 뒤 원심분리 후 그 상등액을 취하여 실험하였다. 그 상등액에 0.1 M PB (pH 7.4)와 100 mM

DTNB를 혼합하여 넣고 37°C에서 5분간 반응 후 분광광도계를 이용하여 412 nm에서 측정하였다. 조직 분쇄 상등액 대신 GSH 표준물질을 농도 별로 측정하여 얻은 검량곡선을 기준으로 조직 내 GSH 함량을 측정하였다.

GSSG 실험은 정소 조직 0.1 g에 5% sulfosalicylic acid 1 mL를 첨가하고 균질기로 마쇄한 뒤 원심분리 후 그 상등액을 취하여 실험하였다. 0.3 mM NADPH와 6 mM DTNB를 혼합하여 넣은 후 37°C에서 15분간 정치하여 반응액을 제조하였다. 조직 마쇄 후 얻은 상등액에 2-vinylpyridine, triethanolamine을 넣고 실온에서 60분동안 정치한 후 만들어놓은 반응액과 1 U/mL glutathione reductase를 첨가하고 412 nm에서 흡광도를 측정하였다. GSSG 표준물질을 농도 별로 측정하여 얻은 검량곡선을 기준으로 조직 내 GSSG 함량을 측정하였다. 또한 단백질 함량은 bicinchoninic acid (BCA) assay kit (Pierce, IL, USA)를 이용하여 정량하였다.

글루타티온 퍼옥시데이즈(GPx) 활성

실험액은 GSSG 실험과 동일한 상등액을 사용하였으며, GPx의 활성은 조직 내 효소가 기질과 반응하여 소모된 글루타티온을 환원형으로 되돌리는데 필요한 매개 물질인 NADPH의 양을 분광광도계를 이용하여 340 nm에서 측정하였으며 분 당 1 mmol의 NADPH를 산화시키는 g protein 내 효소의 활성으로 정의하였다.

글루타티온 환원효소(GR) 활성

GR 활성 측정에 사용된 실험액은 정소 조직을 균질기를 이용하여 1 mM EDTA를 함유한 0.1 M PB (pH 7.4)를 넣어 마쇄한 뒤 원심분리하여 얻은 상등액을 이용하였다. 그 상등액과 1 mM EDTA를 함유한 0.2 M PB (pH7.5)에 3 mM DTNB를 함유한 10 mM PB, 3차 증류수, 2 mM NADPH, 20 mM GSSG를 혼합하여 반응시킨 후 분광광도계를 이용하여 1분 간격으로 5분간 412 nm에서 측정하였다.

글루타티온 S-전이효소(GST) 활성

실험액은 GR 활성 측정 실험과 동일한 상등액을 사용하였으며, GST에 의해 GSH와 CDNB가 GS-CDNB로 전환되는 원리를 이용하여 실험하였다. 조직으로부터 얻은 상등액과 1 M PB (pH 6.5), 3차 증류수, 에탄올에 녹인 40 mM CDNB, 20 mM GSH을 혼합한 후 5분 간격으로 분광광도계를 이용하여 340 nm에서 측정하였다.

조직 내 superoxide dismutase (SOD) 활성 평가

SOD에 의해 소거되는 O_2^- 정도를 바탕으로 활성을 측정하였다[17]. CAT 활성측정과 동일한 상등액을 1 M PB (pH6.5), 0.1 M xanthine, 1 mM NADH, LDH enzyme, 5 mM EDTA를 혼합하여 실온에서 1분간 반응시킨 후 0.1 unit xanthine oxidase를 첨가하여 5분간 1분 간격으로 340 nm에서 흡광도를 측정하였다.

조직 내 catalase (CAT) 활성 평가

CAT는 세포 내 발생한 과산화수소를 물과 산소로 환원시키는 효소로써, acetic acid와 dichromate가 과산화수소와 만나 열을 가하였을 때 chromic acetate로 환원되어 발색하는 원리를 이용하였다[18]. 조직을 균질화하여 원심분리 후 그 상등액과 50 mM PB를 혼합 한 뒤 0.4 M의 H_2O_2 200 μL 첨가하여 1분간 반응한 후 5% $K_2Cr_2O_7$ 와 acetic acid의 혼합액을 첨가하여 100°C에서 10분 간 가열한 후 562 nm에서 흡광도를 측정하였다.

통계 처리

모든 실험 결과는 평균 ± 표준편차로 나타내었으며 실험그룹 간의 통계학적 분석은 Sigma-Stat 3.5 (Jandal Co., San Rafeal, CA, USA)를 이용하여 one-way analysis of variance (ANOVA)분석을 실시하였으며, 유의차가 있는 항목에 대해서는 t-Tests (LSD) for value 로 $p < 0.05$의 수준에서 통계학적 유의성을 검정하였다.

Results and Discussion

혈액 내 NO 생성

ROS의 과다 생성으로 인한 산화 스트레스는 세포 손상을 일으키고 이는 동맥경화, 고혈압 그리고 신경병성 질환들로 이어진다고 알려져 있다[19]. 또한, nitric oxide는 여러 종류의 ROS와 반응하며, 특히 반응성이 큰 superoxide anion (O_2^-)와 peroxynitrite ($ONOO^-$)을 형성하여 세포독성뿐 아니라 세포 사멸을 유도하여 조직 손상에도 영향을 주는 것으로 알려져 있다[20-22]. NO는 3가지 isoform을 가지는 NO synthase (NOS)에 의해 L-arginine의 guanidine nitrogen으로부터 생성된다[23,24]. NOS의 기질인 arginine 농도가 낮을 때 정자기형이 나타나고[25], 이는 NOS에 의한 O_2^-와 $ONOO^-$의 생성이 정자의 기능장애와 독성을 일으킨다[26]. 본 실험의 결과를 통해 당뇨로 인해 유발된 산화 스트레스로 혈액 내 NO 농도가 급증하였으나(23.64 ± 7.62 μM serum NO), 모든 샘플 투여군에서 그 농도가 유의적으로 감소하는 것을 볼 수 있었다(Fig. 1). 이를 통해 산화 스트레스에 의한 조직 손상 및 기능 저하에 대한 매생이 추출물의 보호 효과를 확인하였다.

정소 조직 내 지질 과산화물 측정

조직 내 발생한 ROS에 의해 인지질 세포막의 조직의 손상으로 발생하는 지질 과산화물은 조직 손상의 척도로 이용된다. 이 과정에서 연쇄 반응으로 발생하는 MDA등

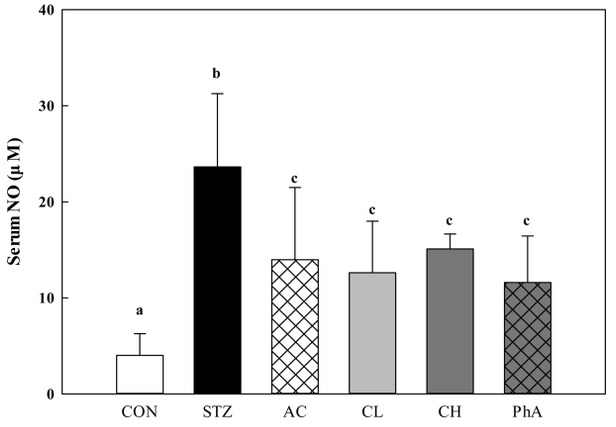

Fig. 1. Effects of *Capsosiphon fulvescens* (CFE) and pheophorbide a (PhA) on serum nitric oxide production of streptozotocin (STZ) -induced rat for 9 weeks. After the anesthesia, serum nitric oxides were determined by using rats' collected serum. Con; non-diabetic control group, STZ; diabetic control group, AC; acarbose treated diabetic group (0.2 mg/kg b.w.), CL; low dose of CFE treated diabetic group (4 mg/kg b.w.), CH; high dose of CFE treated diabetic group (20 mg/kg b.w.), PhA; pheophorbide a treated diabetic group (0.2 mg/kg b.w.). Bars with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by t - Tests (LSD) for value.

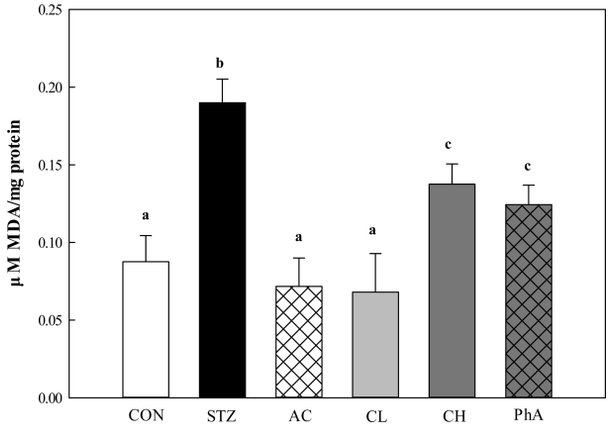

Fig. 2. Effects of *Capsosiphon fulvescens* (CFE) and pheophorbide a (PhA) on malondialdehyde (MDA) contents of testis tissue in streptozotocin (STZ)-induced rat for 9 weeks. After the treatment, the testicles were extracted, homogenized, and centrifuged to collect the tissue supernatant. Con; non-diabetic control group, STZ; diabetic control group, AC; acarbose treated diabetic group (0.2 mg/kg b.w.), CL; low dose of CFE treated diabetic group (4 mg/kg b.w.), CH; high dose of CFE treated diabetic group (20 mg/kg b.w.), PhA; pheophorbide a treated diabetic group (0.2 mg/kg b.w.). Values are means ± SD (n = 6 for each group). Bars with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by t - Tests (LSD) for value.

의 산화 생성물이 각종 질병의 원인이 되고 있다[27]. 정소 조직에서의 MDA 농도는 CON군(0.09 ± 0.02 μmol MDA/g protein)에 비하여 STZ군(0.19 ± 0.02 μmol MDA/g protein)

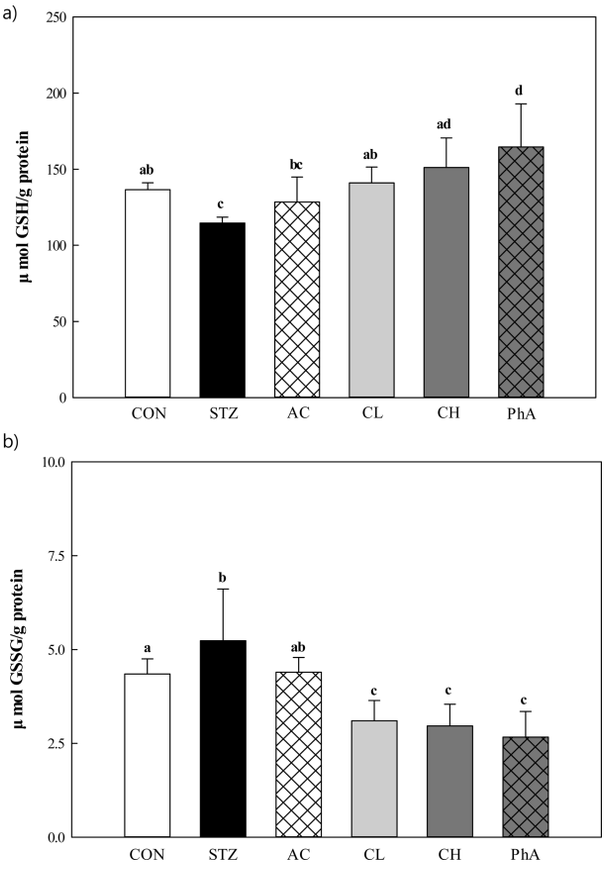

Fig. 3. Effects of *Capsosiphon fulvescens* (CFE) and pheophorbide a (PhA) on GSH, GSSG contents of testis tissue in streptozotocin (STZ)-induced rat for 9 weeks. After the treatment, the testicles were extracted, homogenized, and centrifuged to collect the tissue supernatant. (A) testicular GSH contents, (B) testicular GSSG contents. Con; non-diabetic control group, STZ; diabetic control group, AC; acarbose treated diabetic group (0.2 mg/kg b.w.), CL; low dose of CFE treated diabetic group (4 mg/kg b.w.), CH; high dose of CFE treated diabetic group (20 mg/kg b.w.), PhA; pheophorbide a treated diabetic group (0.2 mg/kg b.w.). Values are means ± SD (n = 6 for each group). Bars with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by t - Tests (LSD) for value.

에서 당뇨가 유발되었을 때, 과도한 산화 스트레스에 의해 약 2.1배 증가하였다. Acarbose는 당뇨 치료제로 쓰이는 약물로 혈장 내 지질 과산화물을 줄여준다고 보고되었으며[28], 양성대조군인 AC투여군에서 지질 과산화물을 정상 수준으로 줄여주는 것을 확인하였다(Fig. 2). 특히 CL군에서 AC군과 상응하는 감소 효과를 나타내었다. CH, PhA군에서 또한, 당뇨 유발군에 비해 지질 과산화물이 감소하는 것으로 보아 CFE와 PhA에 의한 정소 내 지질 과산화물 축적 저해 효과를 확인할 수 있었다.

특히 앞선 실험인 혈액 내 과산화물 지표인 serum NO 결과와 비슷한 양상을 나타내는데, 이는 CFE 또는 PhA는 고혈당으로 유발되는 과도한 산화 스트레스가 만들어내는

Table 1. Effects of PhA on testicular tissue enzymes glutathione peroxidase (GPx), glutathione-S-transferase (GST), glutathione reductase (GR)

Treatment Groups	GPx (mmol NADPH/min/g protein)	GR (units/g protein)	GST (μmol/min/mg protein)
Control	2.63 ± 1.11^{ab}	32.13 ± 1.31^{a}	0.49 ± 0.01^{ac}
STZ	4.51 ± 0.85^{c}	30.12 ± 3.68^{a}	0.58 ± 0.03^{b}
AC	1.33 ± 0.68^{b}	26.84 ± 4.00^{a}	0.42 ± 0.04^{ad}
CL	2.30 ± 1.01^{ab}	28.04 ± 8.49^{a}	0.37 ± 0.12^{d}
CH	2.94 ± 1.21^{a}	30.99 ± 10.27^{a}	0.42 ± 0.10^{ad}
PhA	2.26 ± 1.41^{ab}	31.12 ± 8.00^{a}	0.51 ± 0.11^{bc}

*Animals were treated with AC (0.2 mg/kg b.w.), CFE (4 and 20 mg/kg b.w.) or PhA (0.2 mg/kg b.w.) were gotten individually for treatment once a day for 9 weeks after the administration of streptozotocin. After the scarification, GPx, GST, GR were determined by using rats' extracted testis tissue. Con; non-diabetic control group, STZ; diabetic control group, AC; acarbose treated diabetic group (0.2 mg/kg b.w.), CL; low dose of CFE treated diabetic group (4 mg/kg b.w.), CH; high dose of CFE treated diabetic group (20 mg/kg b.w.), PhA; pheophorbide a treated diabetic group (0.2 mg/kg b.w.).Means with different superscript letters are significantly different at $p < 0.05$ by t - Tests (LSD) for value.

체내 과산화물들의 생성을 억제함으로써 조직 보호효과를 가지는 것을 확인 할 수 있었다.

정소 조직 내 글루타티온 보호

글리신, 글루타민, 시스테인 세 가지 아미노산이 결합된 글루타티온의 환원된 형태인 GSH는 시스테인에 연결된 thiol 잔기가 전자를 공여하고 자신은 활성화된 다른 글루타티온과 결합하여 산화된 형태인 GSSG를 형성하여, 체내에서 과잉 생산된 활성 산소를 제거하거나 단백질이나 DNA의 합성, 효소 활성의 조절 등에 중요한 역할을 한다[29]. 하지만 당뇨가 유발되면 조직 내에서 적혈구 내 GSH가 감소하며, 혈장 내 GSSG는 증가된다고 보고되고 있다[30]. Fig. 3A의 결과에서 여러 선행 연구와 같이, 조직 내 GSH함량은 CON군(136.6 ± 4.6 μmol GSH/g protein)에 비해 STZ군(114.7 ± 3.8 μmol GSH/g protein)에서 유의적인 감소를 보였다. 이는 과도한 산화스트레스로 인한 GSH의 산화로 판단되며, 매생이 추출물을 투여한 CL군(141.0 ± 10.4 μmol GSH/g protein), CH군(151.1 ± 19.5 μmol GSH/g protein) 에서 정상 수준으로 GSH 함량을 증가시켰으며 PhA군(164.7 ± 28.2 μmol GSH/g protein)에서는 정상대조군보다 GSH함량이 증가한 것을 확인하였다(Fig. 3A). 반면, STZ군에서 산화 스트레스에 대한 GSH의 산화로 GSSG의 함량이 증가하지만, 매생이 추출물과 지표물질 투여군에서 GSSG 함량이 감소하였다(Fig. 3B). GSH 결과와 종합하였을 때, 매생이 추출물과 PhA는 GSH 생성과 더불어 GSH 산화를 억제시키는 것을 확인하였다. 이를 통해 STZ에 의해 유발된 산화 스트레스로부터 정소 조직 보호활성을 가지는 것을 확인하였다.

정소 조직 내 GPx, GR 및 GST 활성

GPx는 생체 내에서 활성 산소에 의해 발생하는 과산화수소나 지질 과산화물을 제거하는 효소로 GSH를 GSSG로 전환시킴으로써 과산화물을 산소와 물로 분해하고 과산화물을 체내에서 제거하는 역할을 하는 효소이다[31]. 본 실험에서 STZ군에서 GPx 활성이 크게 증가한 것을 확인하였다. 이는 지질 과산화물 측정 실험의 결과와 비교해 보았을 때, STZ군에서 정소 조직 내 과량 축적된 지질 과산화물의 증가로 이를 제거하기 위한 GPx활성이 증가한 것으로 판단되며 CL, CH, PhA군에서 STZ군에 비해 GPx 활성을 정상 수준으로 완화시켰으며 GSH, GSSG 함량 변화를 통해 CFE군이 조직 내 GPx활성을 조절하는 것을 확인 할 수 있었다(Table 1). 앞선 실험인 조직 내 글루타티온 함량변화와 더불어, GSH 산화에 의한 GSSG의 증가는 과산화물 제거 효소 GPx의 활성에 의한 것으로 판단된다.

GR은 생체 내에서 GSH의 항산화 작용에 의해 발생한 GSSG를 NADPH를 NADP로 소모하면서 다시 GSH로 환원시키는 작용을 촉매한다[29]. 본 실험에서 GR은 모든 그룹에서 유의적인 차이를 볼 수 없었다(Table 1). 반면, 중요한 항산화 물질인 GSH를 이용하여 체내로 들어오는 환경오염물질, 발암물질, 과산화물 등으로부터 체내 독성을 가지는 물질들을 GSH와의 축합 반응을 촉진시켜 체내로부터 배출하기 쉬운 형태로 전환시켜 주거나, 무독화시키는 반응을 촉매하는 역할을 하는 GST활성의 변화를 관찰할 수 있었다. 당뇨가 유발되었을 때 정소 조직 내에서 GST활성이 증가된다는 선행 결과와 같이[32], 본 실험에서 GST 활성이 STZ군에서 증가한 것을 확인하였다. PhA군은 STZ군과 유의적 차이를 나타내지 않았지만, 추출물 투여군에서 GST활성이 정상수준으로 회복되는 것을 확인하였다(Table 1). 따라서, 앞선 실험결과를 미루어보아, 매생이 추출물인 CFE는 정소 조직에서 STZ으로 유도된 산화적 독성물질과 과산화물을 GR에 의해 순환되는 GSH 반응과정에서 이를 재사용하기 위한 효과보다 새로운 GSH 생성에 의한 과산화물 또는 독성물질을 직접적으로 축합반응시켜 과산화물을 제거함으로써 산화 스트레스에 의한

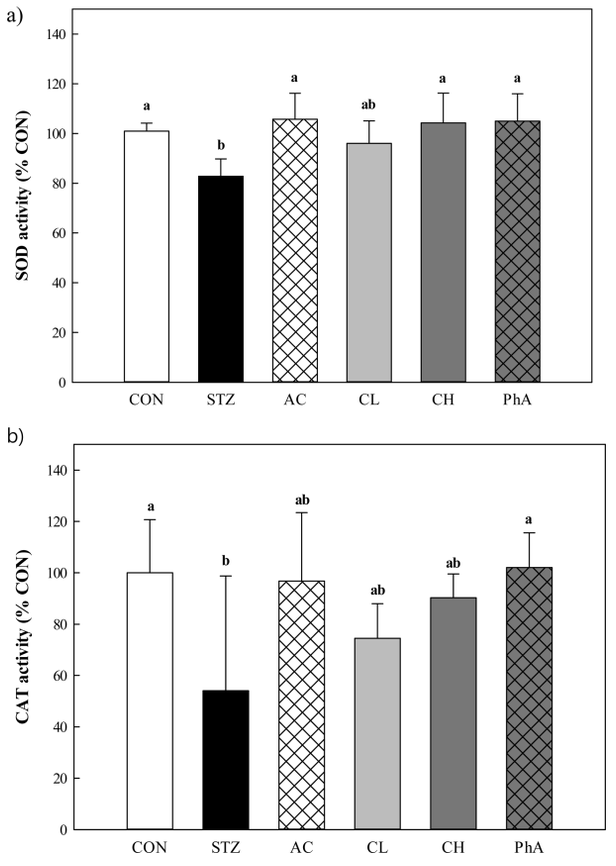

Fig. 4. Effects of *Capsosiphon fulvescens* (CFE) and pheophorbide a (PhA) on superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT) activity of testis tissue in streptozotocin (STZ)-induced rat for 9 weeks. After the treatment, the testicles were extracted, homogenized, and centrifuged to collect the tissue supernatant. (A) SOD activity, (B) CAT activity. Con; non-diabetic control group, STZ; diabetic control group, AC; acarbose treated diabetic group (0.2 mg/kg b.w.), CL; low dose of CFE treated diabetic group (4 mg/kg b.w.), CH; high dose of CFE treated diabetic group (20 mg/kg b.w.), PhA; pheophorbide a treated diabetic group (0.2 mg/kg b.w.). Values are means ± SD (n = 6 for each group). Bars with different superscripts are significantly different at $p < 0.05$ by t - Tests (LSD) for value.

과산화물 생성으로부터 조직 보호효과를 가지는 것으로 판단된다.

정소 내 SOD, CAT 활성

SOD는 산화 스트레스로 발생하는 활성 산소에 노출된 세포에서 항산화 역할을 수행하는 효소로, 활성 산소인 superoxide anion들을 과산화수소로 전환시켜 세포 외 배출을 용이하게 하는 것을 촉매하여 강력한 항산화 역할뿐 아니라 독성이 강한 활성산소로부터 세포 손상을 막아준다[33]. 하지만 SOD 활성이 감소되면 산화 스트레스로부터 보호 능력이 감소되어 지질 과산화물과 같은 과산화물질들이 축적되어 기능에 손상을 주게 된다[34]. 본 실험에서 SOD 활성은 CON군에 비해 STZ군(83 ± 7%)에서 약 20% 감소하였으나 CL(96 ± 9%), CH(104 ± 12%), PhA군(105 ± 11%)에서 SOD 활성이 정상 수준으로 회복되었다(Fig. 4A). 선행 연구들과 같이 SOD 활성이 감소한 STZ군에서의 지질 과산화물 그리고 혈액 내 nitric oxide와 같은 과산화물이 증가하지만, 샘플 투여시 정소 내 SOD 활성의 회복과 더불어 과산화물들의 생성을 억제하는 것을 확인하였다.

또한, CAT는 SOD의 활성산소 제거 반응으로부터 발생하는 과산화수소를 제거하는 효소로, SOD, GPx와 함께 세포 손상을 야기하는 자유 라디칼 물질들을 비-라디칼 물질로 바꿔 유해한 ROS를 제거한다[35]. 하지만 당뇨와 같은 고혈당 상태가 계속 될 때, CAT 효소의 당화로 인해 활성이 감소한다는 연구 결과가 보고되었다[36]. 본 실험에서도 STZ군에서 현저히 감소한 CAT 활성(54%)에 반해, CFE투여군에서 STZ군에 비하여 유의적인 차이를 나타내지 않았으나, PhA군(102 ± 13%)에서 정상대조군 수준으로 CAT 활성을 회복시키는 것을 확인하였다(Fig. 4B). 이를 통해, CFE와 PhA 투여 시 활성산소 또는 라디칼로부터 항산화계 효소를 회복시켜 조직 세포 내 손상을 예방할 수 있을 것으로 예상된다.

연구 결과를 종합하였을 때, 대한민국에서 자생하는 녹조류 갈파래과인 매생이의 주정 추출물과 그 지표물질인 PhA는 STZ으로 유발된 정소 조직 내 산화스트레스 보호 효과를 가지는 것을 당뇨 유발 쥐 모델에서 확인하였다. 산화 스트레스로부터 조직 내 GSH 생성을 증가시키고 GSH의 산화를 억제하며, 글루타티온의 항산화 역할에 간접적으로 관여하는 GPx, GST의 활성을 조절한다. 또한 조직 내 활성산소 또는 과산화물에 대한 직접적인 항산화 효소인 SOD, CAT를 회복시킴으로써 생식 내분비계 조직인 정소 보호효과를 가지는 것을 확인하였다.

Acknowledgement

본 연구는 해양수산부 재원으로 한국해양과학기술진흥원의 지원을 받아 수행되었다(한국산 해조류인 매생이(*Capsosiphon fulvescens*)를 이용한 미백 기능성과 항당뇨 및 항당뇨합병증 소재개발과 제품화).

국문요약

당뇨 합병증을 일으키는 중요 매체인 산화 스트레스에 대한 매생이 추출물과 그 지표물질인 pheophorbide a (PhA)의 정소 조직 내 산화 스트레스 보호 효과를 streptozotocin (STZ)에 의해 유발된 당뇨 쥐 모델에서 확인하였다. 당뇨를 유발하는 물질로 알려진 STZ를 40 mg/kg body weight (b.w.)의 농도로 복강 투여하여 당뇨를 일으킨 후, 매생이 추출물(CFE)샘플을 각각 4, 20 mg/kg b.w. 그리고 PhA를

0.2 mg/kg b.w.로 9 주간 투여하여 실험하였다. 정소 조직에서 산화 스트레스에 생성되는 체내 과산화물 지표인 혈액 nitric oxide와 지질 과산화물이 당뇨 유발군에 비해 CFE와 PhA 투여군에서 유의적인 감소를 보였으며, 체내 과산화물 축적을 제어하는 효소인 glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase가 정상 수준으로 회복되었다. 또한, 체내 항산화 방어기작에서의 중요한 효소인 superoxide dismutase, catalase 활성 또한 샘플 투여 시 회복되는 것을 보아 CFE 투여군과 PhA투여군에서 조직 내 항산화 효소 조절과 함께 과산화물 축적 저해 효과를 통하여 당뇨 상태에서 고혈당에 의한 산화 스트레스가 일으키는 생식 조직 손상으로부터 매생이 추출물과 그 지표물질인 PhA는 보호 효과를 가지는 것을 확인할 수 있었다.

References

1. Danaei, G., Finucane, M.M., Lu, Y., Singh, G.M., Cowan, M.J., Paciorek, C.J., Lin, J.K., Farzadfar, F., Khang, Y.H., Stevens, G.A., Rao, M., Ali, M.K., Riley, L.M., Robinson, C.A., Ezzati, M., and C, G.B.M.R.F.: National, regional, and global trends in fasting plasma glucose and diabetes prevalence since 1980: systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 370 country-years and 2.7 million participants. *Lancet*, **378**, 31-40 (2011).
2. Giacco, F. and Brownlee, M.: Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res*, **107**, 1058-1070 (2010).
3. Sisman, A.R., Kiray, M., Camsari, U.M., Evren, M., Ates, M., Baykara, B., Aksu, I., Guvendi, G., and Uysal, N.: Potential novel biomarkers for diabetic testicular damage in streptozotocin-induced diabetic rats: nerve growth factor Beta and vascular endothelial growth factor. *Dis Markers*, **2014**, 106-108 (2014).
4. Guneli, E., Tugyan, K., Ozturk, H., Gumustekin, M., Cilaker, S., and Uysal, N.: Effect of melatonin on testicular damage in streptozotocin-induced diabetes rats. *Eur Sur Res*, **40**, 354-360 (2008).
5. Redondo, M.J., Fain, P.R., and Eisenbarth, G.S.: Genetics of type 1A diabetes. *Recent Prog Horm Res, Vol 56*, **56**, 69-89 (2001).
6. Tsuji, K., Taminato, T., Usami, M., Ishida, H., Kitano, N., Fukumoto, H., Koh, G., Kurose, T., Yamada, Y., Yano, H., Seino, Y, and Imura H.: Characteristic features of insulin secretion in the streptozotocin-induced NIDDM rat model. *Metabolism*, **37**, 1040-1044 (1988).
7. Portha, B., Picon, L., and Rosselin, G.: Chemical diabetes in the adult rat as the spontaneous evolution of neonatal diabetes. *Diabetologia*, **17**, 371-377 (1979).
8. Giroix, M.H., Portha, B., Kergoat, M., Bailbe, D., and Picon, L.: Glucose insensitivity and amino-acid hypersensitivity of insulin release in rats with non-insulin-dependent diabetes. A study with the perfused pancreas. *Diabetes*, **32**, 445-451 (1983).
9. Kumar, T.R., Doreswamy, K., Shrilatha, B., and Muralidhara: Oxidative stress associated DNA damage in testis of mice: induction of abnormal sperms and effects on fertility. *Mutat Res-Gen Tox En*, **513**, 103-111 (2002).
10. Oksanen, A.: Testicular Lesions of Streptozotocin Diabetic Rats. *Horm Res*, **6**, 138-144 (1975).
11. Hikim, A.P.S. and Swerdloff, R.S.: Hormonal and genetic control of germ cell apoptosis in the testis. *Rev Reprod*, **4**, 38-47 (1999).
12. Cai, L., Hales, B.F., and Robaire, B.: Induction of apoptosis in the germ cells of adult male rats after exposure to cyclophosphamide. *Biol Reprod*, **56**, 1490-1497 (1997).
13. Zhang, B.B. and Moller, D.E.: New approaches in the treatment of type 2 diabetes. *Curr Opin Chem Biol*, **4**, 461-467 (2000).
14. Kwon, M.J., Nam, T.J..: Effects of Mesangi (*Capsosiphon fulvecens*) Powder on Lipid Metabolism in High Cholesterol Fed Rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr*, **35**, 530-535 (2006).
15. Cho, E.K., Yoo, S.K., Choi, Y.C.: Inhibitory Effects of Maesaengi (*Capsosiphon fulvescens*) Extracts on Angiotensin Converting Enzyme and α-Glucosidase *J Life Science*, **21**, 811-818 (2011).
16. Beda, N. and Nedospasov, A.: A spectrophotometric assay for nitrate in an excess of nitrite. *Nitric Oxide*, **13**, 93-97 (2005).
17. Spitz, D.R. and Oberley, L.W.: An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. *Anal Biochem*, **179**, 8-18 (1989).
18. Cohen, G., Dembiec, D., and Marcus, J.: Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Anal Biochem*, **34**, 30-38 (1970).
19. Modlinger, P.S., Wilcox, C.S., and Aslam, S.: Nitric oxide, oxidative stress, and progression of chronic renal failure. *Semin Nephrol*, **24**, 354-365 (2004).
20. Huie R.E., Padmaja S.: The reaction of NO with superoxide. *Free Rad. Res.*, **18**, 195-198 (1993).
21. Radi, R., Beckman, J.S., Bush, K.M., and Freeman, B.A.: Peroxynitrite oxidation of sulfhydryls. The cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *J Biol Chem*, **266**, 4244-4250 (1991).
22. Merry, P., Winyard, P.G., Morris, C.J., Grootveld, M., and Blake, D.R.: Oxygen free radicals, inflammation, and synovitis: and synovitis: the current status. *Ann Rheum Dis*, **48**, 864-870 (1989).
23. Griffith, O.W. and Stuehr, D.J.: Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annu Rev Physiol*, **57**, 707-736 (1995).
24. Snyder, S.H.: Nitric oxide. No endothelial NO. *Nature*, **377**, 196-197 (1995).
25. Xia, Y., Dawson, V.L., Dawson, T.M., Snyder, S.H., and Zweier, J.L.: Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 6770-6774 (1996).
26. Tomlinson, M.J., East, S.J., Barratt, C.L., Bolton, A.E., and Cooke, I.D.: Preliminary communication: possible role of

reactive nitrogen intermediates in leucocyte-mediated sperm dysfunction. *Am J Reprod Immunol*, **27**, 89-92 (1992).
27. Halliwell, B. and Gutteridge, J.M.C.: Lipid-Peroxidation, Oxygen Radicals, Cell-Damage, and Antioxidant Therapy. *Lancet*, **1**, 1396-1397 (1984).
28. Rosen, P. and Osmers, A.: Oxidative stress in young Zucker rats with impaired glucose tolerance is diminished by acarbose. *Horm Metab Res*, **38**, 575-586 (2006).
29. Wohaieb, S.A. and Godin, D.V.: Alterations in free radical tissue-defense mechanisms in streptozocin-induced diabetes in rat. Effects of insulin treatment. *Diabetes*, **36**, 1014-1018 (1987).
30. Bono, A., Caimi, G., Catania, A., Sarno, A., and Pandolfo, L.: Red cell peroxide metabolism in diabetes mellitus. *Horm Metab Res*, **19**, 264-266 (1987).
31. Pigeolet, E., Corbisier, P., Houbion, A., Lambert, D., Michiels, C., Raes, M., Zachary, M.D., and Remacle, J.: Glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase inactivation by peroxides and oxygen derived free radicals. *Mech Ageing Dev*, **51**, 283-297 (1990).
32. Shrilatha, B. and Muralidhara: Early oxidative stress in testis and epididymal sperm in streptozotocin-induced diabetic mice: its progression and genotoxic consequences. *Reprod Toxicol*, **23**, 578-587 (2007).
33. Mruk, D.D., Silvestrini, B., Mo, M.Y., and Cheng, C.Y.: Antioxidant superoxide dismutase - a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception*, **65**, 305-311 (2002).
34. Ricci, G., Catizone, A., Esposito, R., Pisanti, F.A., Vietri, M.T., and Galdieri, M.: Diabetic rat testes: morphological and functional alterations. *Andrologia*, **41**, 361-368 (2009).
35. Fujii, J., Iuchi, Y., Matsuki, S., and Ishii, T.: Cooperative function of antioxidant and redox systems against oxidative stress in male reproductive tissues. *Asian J Androl*, **5**, 231-242 (2003).
36. Yan, H. and Harding, J.J.: Glycation-induced inactivation and loss of antigenicity of catalase and superoxide dismutase. *Biochem J*, **328**, 599-605 (1997).