

간기능 개선용 복합 식물 추출물(Hepa-1000)의 tert-butyl hydroperoxide(t-BHP)로 유도한 간세포 독성에 대한 보호 효과

이유진¹·김경범¹·정종문^{2†}

¹(주)벤스랩 중앙연구소

²수원대학교 생명과학과

Hepatoprotective Effects of Poly Herbal Formulation (Hepa-1000) on tBHP-Induced Toxicity in Human Hepatoma Cells

EuGene Lee¹, Kyung-Bum Kim¹ and Jong-Moon Jeong^{2†}

¹Research Center of Ben's Lab Co., Ltd., Gyeonggi 445-743, Korea

²Dept. of Life Science, The University of Suwon, Gyeonggi 445-743, Korea

Abstract

In the present study, the potential hepatoprotective effects of poly herbal formulation, Hepa-1000, against oxidative damages induced by tBHP were evaluated in HepG2 cells in order to relate *in vitro* antioxidant activity with cytoprotective effects. The tBHP induced considerable cell damage in HepG2 cells was shown by significant glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) and lactate dehydrogenase (LDH) leakage, and increased lipid peroxidation. Hepa-1000-treated cells showed an increased resistance to oxidative challenge, as revealed by higher survival capacity than the one of control cells against tBHP induced oxidative stress and hepatotoxicity. In addition, the Hepa-1000 had hepatoprotective effects lowering the activity of GOT and LDH, simultaneously. That is, it could inhibit the cell membrane damages resulting in the increased activities of GOT and LDH in the cell culture media. Furthermore, the Hepa-1000 could reduce tBHP-enhanced lipid peroxidation, which was evaluated by measuring the production of malonedialdehyde. Based on the data described above, it could be suggested that the Hepa-1000 has significant hepatoprotective effects and plays a protective role against lipid peroxidation by free radicals.

Key words: tert-butyl hydroperoxide, Hepa-1000, hepatoprotective, HepG2

서 론

간은 인체에 있어서 가장 큰 장기(성인 남자: 1~1.3 kg, 성인여자: 0.9~1.1 kg)중 하나로서 생활하는데 필수조직이며, 다른 조직의 기능들을 전체적인 맥락에서 조화롭게 관리한다. 그리고 동원 가능한 에너지의 근원을 쉽게 저장, 제공하므로(1) 영양소의 대사기능, 해독기능, 순환 조절 기능에 관여하고 있으며, 간의 화학적 잠재력과 빠른 재생력 등의 이유로 '화학공장', '저장고', '침묵의 장기'라고도 한다(2,3).

간 손상의 원인으로는 알코올, 흡연 외에도 바이러스에 의한 감염, 독물 또는 약제에 의한 중독, 영양장애 및 순환장애에서 스트레스같은 신변의 원인 등 여러 가지를 들 수 있다. 또한, 산화적 스트레스에 의한 반응성 유해 산소종(reactive oxygen species; ROS)의 생성은 간섬유화(4), 신장염(5), 췌부질환(6), 당뇨병(7) 등의 여러 가지 질환의 원인이 될 수 있으며, 특히 free radical(OH·, O₂⁻)은 분자상 산소가 활

성산소로 변하여 다른 분자들과 반응하면서 생성되어 노화, 염증, 발암, 동맥경화(8)와 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 불포화 지방산이 풍부한 세포막은 생성된 free radical에 의해서 지질과산화의 표적이 되어 세포소기관들이 정상적인 구조 및 기능을 잃게 되며, 국소적인 손상은 물론 알데하이드와 같은 지질과산화 분해 산물이 생성부위에서 멀리 떨어진 부위로 이동하여 세포 손상을 일으키게 된다(9). 이러한 지질과산화를 일으키는 대표적인 물질인 t-butyl hydroperoxide(t-BHP)는 배양 간세포에 저농도로 처리할 경우 간 세포에서 cytochrome P-450 효소에 의해 세포 구성물들을 산화시킬 수 있는 alkoxy free radical이나 peroxy free radical로 분해되며, 이러한 산물들이 DNA의 손상을 가져와 결국 세포를 죽이는 결과를 초래하여 간세포의 산화적 손상을 일으키는 실험 모델로 흔히 사용되고 있다(10-12). 또한 t-BHP는 간세포에서 GOT, LDH 유리, malonedialdehyde(MDA) 형성 등을 초래한다고 보고되었다(13). 이러한 free

†Corresponding author. E-mail: jmjeong@suwon.ac.kr
Phone: 82-31-222-6514, Fax: 82-31-222-6552

radical에 의한 생체의 산화적 손상은 catalase, superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPX), glutathione-S-transferase(GST)와 같은 항산화효소와 vitamine A, vitamine C, vitamine E 및 glutathione(GSH)과 같은 비효소적 항산화물질에 의해 어느 정도 방어되어진다(14,15). 일련의 연구 결과에 의하면 이러한 세포내 항산화 방어기구는 활성산소종의 생체내 생성을 최소화하거나 소거함으로써 free radical에 의한 산화적 손상을 억제한다고 하며(16,17), 특히 몇몇 천연물들은 지질과산화에 의한 손상을 효과적으로 보호함으로써 종양 및 노화의 예방에 있어서도 매우 중요한 역할을 수행함을 보여주고 있다(18,19).

인간 간암 세포인 HepG2 세포는 정상 인간 간세포의 특징을 소유하고 있어서 간에 대한 독성과 *in vitro* 상에서 생체이물 대사에 관한 연구의 좋은 모델로 사용된다(20). 특히, HepG2 세포는 우수한 항산화효소 활성을 보유하고 있어서 화학물의 세포보호, 유전독성 그리고 항유전독성 효과를 연구하는데 좋은 수단으로 사용된다(21,22). 최근, HepG2 세포에서 천연 항산화제에 의한 세포보호 연구에 독성물질로서 organic hydroperoxide인 t-BHP를 사용하는 연구가 많이 진행되고 있다(22-27).

따라서 본 연구에서는 식물성 복합 추출물인 간기능 개선제(Hepa-1000)가 t-BHP에 의해 유도된 산화적 스트레스에 대한 간 세포 보호 효과를 확인하기 위해 HepG2 세포를 이용하여 MTT assay를 통한 세포 생존율을 조사하였으며, 간 손상시 생성되는 효소인 GOT, LDH, 지질과산화 정도를 나타내는 MDA 등을 측정하여 생화학적 지표에 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

재료 및 방법

재료 및 기기

본 실험에 사용된 시약으로서 Fetal bovine serum(FBS), penicillin-streptomycin, Minimum Essential Medium (MEM)- α Medium은 Gibco BRL사(Gibco-BRL, Grand Island, New York, USA)로부터, tert-butyl hydroperoxide(t-BHP), 3-(4,5)-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide(MTT), dimethyl sulfoxide(DMSO), malonaldehyde(MDA) 등의 시약은 Sigma사(Sigma Chem. Co., St. Louis, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, 그 이외의 시약은 1급 또는 특급을 사용하였다. 흡광도 측정에 사용된 UV-VIS 흡광계는 Spectronic Genesys 5(Milton Roy Co., USA) 모델이며, ELISA microplate reader는 VersaMax(Molecular Device, USA)를 사용하였다.

세포 배양

본 실험에서 사용한 인간 간암 세포주인 HepG2 세포는 한국세포주은행으로부터 분양받아 계대 배양하여 사용하였다. 배지는 penicillin G(100 IU/mL), streptomycin(100

mg/mL)이 포함된 MEM- α 로 FBS를 전체양의 10%가 되도록 혼합하고 pH 7.4로 조절한 뒤 CO₂ incubator(37°C, 5% CO₂)에서 배양하여, 2~3일마다 한번씩 75-cm² plastic flask(Nunc, Denmark)에서 계대 배양하여 세포주를 유지하였다.

실험물질

식품 소재로 사용이 가능한 5종의 천연 식물로 알로에베라겔(미국산), 녹차(중국산), 쑥(국내산), 구아바잎(일본산), 아스파라거스(국내산) 등을 세척하고 마쇄하여 건조한 다음 분말화한 후, 각 건조 중량의 약 10배에 달하는 물을 가한 다음 1일 동안 3회 연속 추출하였다. 이 열수 추출물을 감압 여과하여 모은 다음 여과추출물을 감압농축하여 동결 건조시켜 보관하였다. 동결 건조한 시료를 필요에 따라 일정한 농도의 시료 용액으로 제조하여 사용하였다.

Hepa-1000의 간세포 독성 측정

배양한 인간 간암 세포주인 HepG2 세포를 0.05% Trypsin-EDTA를 처리하여 세포를 분리시키고 각 well 당 1×10^5 cells/mL로 조절하여 100 μ L씩 well에 넣은 다음 37°C의 humidified 5% CO₂/95% air incubator(Sanyo, USA)에서 24시간 예비 배양하였다. 배지를 제거한 후 Hepa-1000을 농도별로 처리하여 CO₂ incubator에서 48시간 동안 배양한 후, MTT assay로 세포 생존율을 측정하였다.

t-BHP 유발 독성에 대한 간세포 보호 활성 검색

인간 간암 세포에 t-BHP에 의한 산화적 손상 및 세포 괴사에 대한 Hepa-1000의 세포 보호 효과를 관찰하기 위하여, 먼저 96 well plate에 간세포를 1×10^5 cells/mL가 되도록 분주하고 CO₂ incubator에서 24시간 예비 배양하였다. 농도별로 희석한 Hepa-1000을 처리한 다음 CO₂ incubator에서 48시간 동안 배양하였다. 그 후 t-BHP(최종농도 1 mM)를 첨가하고 이를 다시 5시간 동안 배양한 다음, MTT assay로 세포의 생존율을 측정하였다.

MTT assay를 이용한 세포독성 측정

세포 생존율의 측정을 위한 MTT assay는 Sladowski 등의 방법(28)을 따라 행하였다. 간세포를 배양시킨 96 well plate에 PBS에 용해한 MTT 용액(5 μ g/mL)을 가하고, CO₂ incubator에서 2시간 방치한 다음 상등액을 제거한 뒤 DMSO:EtOH(1:1, v/v)를 well 당 100 μ L씩 넣고 20분간 shaking한 다음, 살아있는 세포의 미토콘드리아에 있는 mitochondrial dehydrogenase에 의해 MTT가 blue formazan을 형성하는 것을 ELISA reader로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포 배양액내 glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) 활성도 측정

간세포 손상 시 배양액으로 유리되어 나오는 GOT의 양을 측정함으로써 간세포 손상 여부를 확인할 수 있다. GOT 활

성도 측정을 위해 간세포를 5×10^5 cells/mL로 6 well에 3 mL씩 분주하여 24시간 예비 배양한 다음 농도별로 희석한 Hepa-1000을 처리하여 CO₂ incubator에서 48시간 동안 배양하였다. 그 후 t-BHP(최종농도 1 mM)를 첨가하고 이를 다시 5시간 동안 배양한 다음 각각의 세포 배양액을 취하여 GOT assay kit(아산제약)를 이용하여 GOT 활성을 측정하였다. 양성 대조 약물로는 현재 간 보호 작용이 있는 것으로 알려진 Silymarin을 사용하였다.

세포 배양액내 lactate dehydrogenase(LDH) 측정

Hepa-1000의 간세포 손상에 대한 영향을 조사하기 위해 배지내의 LDH 활성을 측정하였다. LDH 활성은 GOT 활성 측정과 동일한 방법으로 세포실험을 수행한 후 세포 배양액을 취한 다음 LDH assay kit(아산제약)를 이용하여 LDH 활성을 측정하였다.

Thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) assay

지질과산화는 배양액의 TBARS 농도를 측정함으로써 결정하였다. TBARS 농도를 측정하기 위해 Glascott의 TBA 방법(29)을 변형하여 세포배양액에 적용, 측정하였다(30). 먼저 실험군별로 t-BHP를 처리한 다음 5시간 동안의 배양이 완료되는 시점에서 세포 배양액을 채취하여 4°C에서 3,000 rpm으로 5분간 원심분리하였고, 상등액을 취하여 측정시까지 -20°C에서 보관하였다. 준비된 세포 배양액에 4.5% trichloroacetic acid(TCA) 1 mL, TBA 용액(0.45% 2-thiobarbituric acid(TBA), 7.5% acetic acid, pH 4.15) 2 mL를 가하였다. 이 반응액이 들어있는 튜브를 boiling water bath에서 5분간 방치한 다음, 수돗물로 튜브를 냉각시키고 532 nm에서 흡광도를 측정하였다. 한편 과산화지질의 함량은 malonaldehyde(MDA)로 검량 표준곡선을 작성한 다음, 이에 의거한 측정치를 MDA 농도(nmole/mg protein)으로 표기하였다.

통계처리

본 실험의 결과는 3~4회 측정된 값으로부터 means±SE로 나타냈고, 실험 결과는 Student's t-test를 실시하여 유의성 여부를 검증하였고, 그 결과 p값이 0.05 이하인 경우에 유의성을 인정하였다.

결과 및 고찰

농도별 Hepa-1000의 간세포 독성 측정

Hepa-1000이 간세포의 산화적 손상 및 세포괴사에 대해 보호 효과가 있는지 여부를 관찰하기 위한 실험의 전단계로 간기능 개선제인 Hepa-1000의 농도별 간세포 독성을 관찰하였다. HepG2 세포에 농도별로 Hepa-1000을 처리하고 48시간 배양한 다음, MTT assay로 세포 생존율을 측정된 결과, 아무런 처치도 하지 않은 대조군의 세포 생존율을 100%

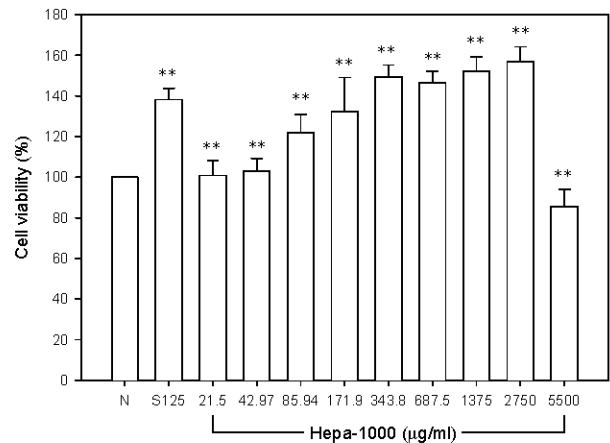


Fig. 1. Cytoprotective effect of various concentrations of Hepa-1000 in human hepatoma cells.

Cytoprotective effect of Hepa-1000 (21.5~5,500 µg/mL) was tested in human hepatoma cells (HepG2). HepG2 cells were incubated with Hepa-1000 and the general viability of cultured cells was determined by MTT assay following 48 hrs incubation. Results of MTT assay are expressed as percent of control values. Values are presented as the means±SE derived from six determinations. Significantly different from the normal group (**p<0.05). Silymarin 125 µg/mL (S125) was used as a positive control. N means the normal control.

로 보았을 때 Hepa-1000을 최고농도 5,500 µg/mL 첨가시 세포 생존율이 대조군에 비해 약 86%를 보이지만, 2,750 µg/mL 이하 농도를 처리한 실험군에서는 세포 생존율이 100~150%로 Hepa-1000에 의한 세포 괴사가 일어나지 않는 것으로 보이며, 2,750 µg/mL 이하의 농도로 Hepa-1000을 전처리하면 배양 간세포에 유의성 있는 독성을 나타내지 않음을 알 수 있었다(Fig. 1).

간세포의 산화적 손상 및 세포괴사에 대한 Hepa-1000의 보호 효과

간세포내에서 t-BHP는 2가지 방법에 의해 대사되어진다. 한 과정은 일차 배양된 간세포 내에서 cytochrom P-450에 의해 peroxy 및 alkoxy radical 등과 같은 독성물질로 전환되며, 이러한 radical이 초기 지질과산화를 일으킨다. 다른 대사 과정은 GSH peroxidase가 t-BHP와 결합하여 tert-butyl alcohol과 산화된 glutathions으로 전환됨으로서 해독되는 과정이다(10). 이러한 대사 과정을 통하여 간세포 내에서 상당량의 t-BHP는 free radical을 생성하게 되고, 이렇게 생성된 free radical은 세포막을 구성하는 불포화 지방산과 직접적 및 간접적으로 반응을 통해 결과적으로 MDA를 형성한다. 이러한 일련의 과정을 거쳐 t-BHP는 간세포의 세포 자연사나 세포괴사를 일으킨다(31).

본 실험 결과에서 Hepa-1000의 간세포 보호 효과를 규명하기 위해 HepG2 세포에 농도별로 Hepa-1000을 전처리한 다음, t-BHP를 1 mM이 되도록 첨가하고 다시 5시간 배양한 후, 세포 생존율을 MTT assay로 관찰하였다. 그 결과, 아무런 처치도 하지 않은 대조군의 세포 생존율을 100%로 보았

