



알로에 베라 추출물에 의한 사람 간암 세포주 HepG2의 Apoptosis 유도

김일남¹ · 권훈정^{1,2}

¹서울대학교 생활과학대학 식품영양학과, ²서울대학교 생활과학연구소

Induction of Apoptosis by Aloe Vera Extract in Human Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells

Ilrang Kim¹ and Hoonjeong Kwon^{1,2}

¹Department of Food and Nutrition, College of Human Ecology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

²Research Institute of Human Ecology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Received October 13, 2006; Accepted December 15, 2006

ABSTRACT. Ethanolic extract of Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) was examined for the cellular toxicity on HepG2 human hepatocellular carcinoma cells. Treatment with Aloe vera extract resulted in DNA fragmentation but not LDH release, suggesting an apoptosis instead of necrosis. Aloe vera induced cytotoxicity was mediated by decrease in ATP levels, whereas GSH depletion, increase in intracellular Ca²⁺, or activation of caspase-3/7 could not be observed with statistical significance. No activation of caspase-3/7 suggests the possibility of caspase-independent apoptosis. Taken together, our results show that Aloe vera extract induce HepG2 apoptosis by ATP depletion-related impairment of mitochondria, which is caspase-independent.

Keywords: Aloe vera, Hepatotoxicity, HepG2, Apoptosis.

서 론

알로에의 품종 중 가장 초기부터 연구되어 오고 있는 (Sheo, 1995) 알로에 베라(*Aloe vera*, *Aloe barbadensis* Miller)는 하제, 상처 및 화상 치료, 항염 등의 목적으로 사용되고 있다(Reynolds and Dweek, 1999). 알로에 베라의 주성분은 anthraquinones, glycoproteins, saccharides, vitamins 등이다(Choi and Chung, 2003). 특히 emodin, aloe-emodin, aloin, barbaloin 등의 anthraquinone은 알로에 베라의 중요한 생리 활성 물질로 알려져 있다. 그러나 이들 물질은 이러한 효능과 더불어 유전독성, 돌연변이, 발암 효과 등도 보고되고 있다(Brusick and Mengs, 1997; Muller *et al.*, 1996; Grimminger and Witthohn, 1993).

알로에는 판매되는 종류가 매우 다양하며(Kim, 2004),

1999년 판매된 건강보조식품 중 세 번째로 많이 판매된 식품이었다(Son and Park, 2004). 판매량 및 섭취량의 증가에도 불구하고, 안전에 관한 연구는 거의 없는 실정이며 emodin(Shieh *et al.*, 2004), aloe-emodin(Kuo *et al.*, 2002) 등 알로에 베라로부터 추출한 단일 성분에 관한 연구가 대부분이어서 알로에 베라의 전체적인 효과가 분명하지 않다.

본 연구는 알로에에 대한 안전성 평가의 일부로 HepG2 세포를 이용하여 알로에 베라 추출물에 의한 세포독성 지표들을 측정함으로써 단일 물질이 아닌 알로에 베라 추출물이 간세포에 미치는 영향을 추정하고자 하였다.

재료 및 방법

알로에 추출

알로에 베라는 경상남도 거제 산지의 것을 구입하여 겔과 껍질 부위 모두를 실험에 사용하였다. 알로에 베라를 동결건조한 후 마쇄하였다. 동결건조시료 20 g에 70% 에탄올 400 ml을 가하여 70°C 수욕상에서 24시간 동안

Correspondence to: Hoonjeong Kwon, Department of Food and Nutrition, College of Human Ecology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
E-mail: hjkwon@snu.ac.kr

추출 하였다. 추출 후 여과지(Whatman No. 42)로 여과하여 불용성 잔여물을 제거하였다. 여과시킨 추출물을 감압농축기를 이용하여 에탄올을 모두 날린 후 동결건조하여 얻은 건조물을 DMSO로 재용해하고 단계적으로 희석하여 실험에 사용하였다.

세포주 및 배양 조건

HepG2(human hepatocellular carcinoma, ATCC #HB 8065, American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA) 세포는 10% FBS(Gibco, Grand Island, NY, USA)를 첨가한 DMEM(Gibco, Grand Island, NY, USA)을 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하였다.

추출물 처리 조건

30분간 55°C의 열로 불활성화시킨 10% FBS를 함유한 DMEM을 이용하여 HepG2 세포를 96 well plate에 seeding(1×10^4 cells/well) 한 후 24시간 후에 추출물(100 µl/well)을 처리하였다. 추출물은 열로 불활성화시킨 5% FBS를 함유한 DMEM을 이용해서 희석하여 처리하였다.

MTT

HepG2 세포에 알로에 베라 추출물을 24시간 동안 반응시킨 후 배지를 걷어내고 100 µl MTT(0.2 µg/ml) 시약을 넣고 37°C 배양기에서 3시간 동안 반응시켰다. MTT 시약을 걷어내고 100 µl DMSO를 가하여 실온에서 1시간 동안 방치한 후 micro plate reader(Bio-Rad Inc., Japan)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

LDH

LDH는 알로에 베라 추출물을 HepG2 세포에 24시간 동안 반응시킨 후 *In vitro* toxicology assay kit/Latate dehydrogenase based(Sigma chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 이용하여 측정하였다. 세포 밖으로 유출된 LDH의 양은 상층액을 30 µl 취하여 60 µl LDH 시약을 넣고 실온에서 30분간 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 상층액을 일부 취하고 남은 well에 lysis buffer를 가하여 37°C에서 45분간 반응시킨 후 상층액을 취하여 위와 같은 방법으로 흡광도를 측정하여 세포 외부와 내부 전체 LDH의 양을 측정하였다. 전체 LDH의 양 중에서 세포 밖으로 유출된 LDH의 양을 비교하여 세포의 괴사를 추정하였다.

DNA fragmentation

알로에 베라 추출물을 처리하고 16시간 동안 반응 시킨

후 Cell death detection ELISA plus kit(Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA)을 이용하여 측정하였다. 배지를 제거하고 200 µl lysis buffer를 넣은 후 20 µl 상층액을 streptavidin-coated plate에 넣고 80 µl immunoreagent를 첨가하여 2시간(상온, 200 rpm) 반응시킨다. 여기에 100 µl ABTS 시약을 넣고 30분 반응시킨 후 micro plate reader(Bio-Rad Inc., Japan)를 이용하여 405 nm (reference 490 nm)에서 흡광을 측정하였다.

Caspase-3/7

알로에 베라 추출물을 처리하고 16시간 동안 반응시킨 후 Caspase Glo-3/7 assay kit(Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 측정하였다. 시약을 well 당 100 µl 첨가하여 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 FLx800 microplate fluorescence reader(Bio-Tek Instruments, Inc, Highland Park, VT, USA)를 luminescence로 설정하여 luminescence를 측정하였다.

GSH

알로에 베라 추출물을 24시간 동안 반응시킨 후 상층액을 버리고 100 µM monochlorobimane(mBCl)을 100 µl 첨가하여 상온에서 30분간 반응시킨 후 Victor3 plate reader(Perkin-Elmer, Wellesley, Massachusetts, USA)를 이용하여 형광(excitation 360 nm, emission 480 nm)을 측정하였다.

Intracellular Ca²⁺

알로에 베라 추출물을 처리하고 24시간 동안 반응시킨 후 Fluo-4 NW Calcium assay kit(Molecular Probes, Eugene, OR, USA)를 이용하여 측정하였다. 배지를 걷어낸 후, Fluo-4 시약을 well 당 100 µl 첨가하여 37°C에서 30분, 실온에서 30분간 반응시킨 후 Victor3 plate reader(Perkin-Elmer, Wellesley, Massachusetts, USA)를 이용하여 형광(excitation 485 nm, emission 535 nm)을 측정하였다.

ATP

알로에 베라 추출물을 처리하고 24시간 동안 반응시킨 후 CellTiter-Glo luminescent cell viability assay kit(Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 측정하였다. 시약을 well 당 100 µl 첨가하여 실온에서 10분 동안 반응시키고 FLx800 microplate fluorescence reader(Bio-Tek Instruments, Inc, Highland Park, VT, USA)를 luminescence로 설정하여 luminescence를 측정하였다.

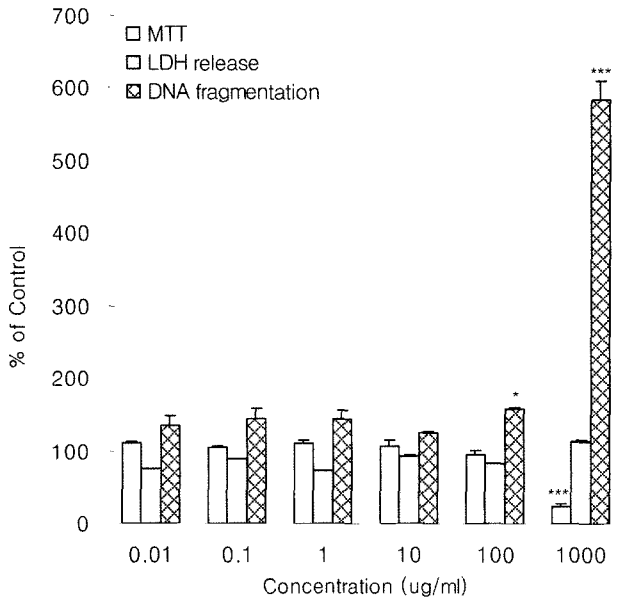


Fig. 1. Cytotoxicity of Aloe vera extract on HepG2 cells. HepG2 cells were treated Aloe vera extract. After 24 h MTT and LDH assays were conducted. DNA fragmentation was determined after 16 h exposure to Aloe vera extract. Results presented as % of control. Values are presented as mean \pm SD (n = 4); *P < 0.01, ***< 0.0001 compared with control group.

결과 및 고찰

MTT 실험 결과 알로에 베라 추출물은 1000 μ g/ml에서 유의적으로 세포독성을 나타냈다(Fig. 1). 미토콘드리아 대사 이상 및 세포 증식 억제를 의미하는 이러한 세포독성이 necrosis나 apoptosis에 의한 세포 사멸과 관계 있는지 알아보기 위해 necrosis 지표인 LDH 유출과 apoptosis 지표로서 DNA fragmentation을 측정하였다. 그 결과 LDH 유출은 1000 μ g/ml에서 증가하는 경향을 보였으나 유의적이지 않은 반면, 100 μ g/ml와 1000 μ g/ml에서 DNA fragmentation이 유의적으로 증가하여 알로에 베라에 의한 세포사멸은 apoptosis가 주원인임을 추정할 수 있었다(Fig. 1).

알로에 베라 추출물에 의한 apoptosis 기전을 알아보기 위해 GSH, ATP, Ca²⁺, Caspase-3/7을 측정하였다. 알로에 베라 추출물은 모든 농도에서 산화적 손상 지표인 GSH의 감소를 보이지 않았다(Fig. 2). 또한 세포질내 Ca²⁺을 증가시키지 않았으나 1000 μ g/ml에서 ATP가 유의적으로 감소하여 알로에 베라 추출물에 의해 미토콘드리아 손상이 유발되었음을 보여준다(Fig. 2). 25~70%의 ATP 감소는 apoptosis를 70~100%의 감소는 necrosis를 유도한다는 보고(McConkey, 1998)는 약 37%의 ATP 감소를 나타낸 1000 μ g/ml 알로에 베라 추출물에 의해

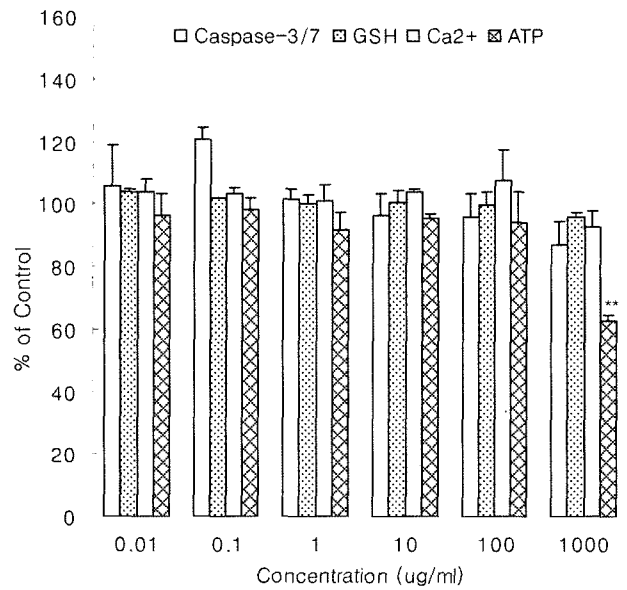


Fig. 2. Evaluation of Aloe vera extract toxicity to HepG2 cells. HepG2 cells were treated Aloe vera extract. Caspase-3/7 was determined after 16 h exposure to Aloe vera extract. After 24 h of treatment GSH, intracellular Ca²⁺, and ATP assays were conducted. Results presented as % of control. Values are presented as mean \pm SD (n = 4); **< 0.001 compared with control group.

apoptosis가 유도된 본 연구 결과와 일치한다. 특히적으로, 알로에 베라 추출물은 DNA fragmentation이 유의적으로 관찰되었음에도 불구하고 모든 농도에서 caspase-3/7 활성이 관찰되지 않았다(Fig. 2). Caspase-3는 apoptosis를 유도하는 effector caspase로서 세포의 apoptosis에 있어서 절대적인 역할을 한다. 그러나 caspase 비의존적인 apoptosis에 의한 세포사멸 기전도 보고되고 있다(Kaplowitz, 2000). Endonuclease G(endo G) 및 apoptosis inducing factor(AIF)와 같은 미토콘드리아 단백질의 핵내 이동은 caspase 비의존성 apoptosis를 유도하는 것으로 알려져 있다(van Loo *et al.*, 2001). 알로에 베라에 의한 세포 사멸이 caspase 비의존성 apoptosis에 의한 것인지 기전을 명확히 하기 위해서는 이러한 미토콘드리아 단백질에 관한 연구가 더 진행되어야 할 것으로 보인다. Shieh *et al.*(2004)은 알로에 베라의 성분인 emodin이 HepG2/3A 간암 세포주에서 caspase-3 활성을 유도한다고 보고하였으나, 이는 추출물이 아닌 한가지 물질에 의한 작용이며 본 연구와는 다른 세포주를 사용하였으므로 직접적인 비교는 어렵다.

본 연구에서 알로에 베라 추출물은 ATP 감소를 통한 apoptosis 및 세포독성을 나타내었으나, 세포 내 Ca²⁺이나 GSH 수준에는 변화를 주지 않았다. Norikura *et al.* (2002)은 100 μ g/ml의 알로에 추출물이 GSH 고갈 및

protein-SH이 고갈되는 것을 억제함으로써 세포 내 thiol 수준을 유지하여 1,4-naphthoquinone에 의해 유도되는 쥐의 간세포 독성에 대해 보호효과를 가진다고 보고하였으며, Hu *et al.*(2003)은 100 µg/ml의 알로에 베라 추출물이 라디칼 소거 및 peroxide 생성 억제를 통한 항산화 활성을 나타낸다고 보고하였다. 그러나 본 연구에서 1000 µg/ml 알로에 베라 추출물은 세포 내 GSH 수준에는 변화를 일으키지 않았지만 ATP 감소를 통해 apoptosis를 유도하였으며, 100 µg/ml에서는 GSH 및 ATP 감소가 보이지 않았으나 apoptosis가 관찰되어 세포 사멸을 유도하는 또 다른 기전이 있음을 추정할 수 있다. 따라서 이러한 결과는 어느 한 가지 지표를 측정하는 것만으로 알로에의 안전성 또는 기능성을 평가하는 것의 문제점을 뚜렷이 보여주고 있다. 또한 알로에 베라 추출물은 저농도에서 HepG2 간세포에 독성을 일으키지 않았으나 고농도에서 apoptosis에 의한 세포 사멸을 유도하였으므로, 건강 보조식품의 특성상 장기간 고농도로 섭취할 가능성이 있는 알로에 베라가 간에 미치는 영향에 관한 동물 실험 등의 추가적인 연구가 필요함을 시사한다.

현재 판매되고 있는 알로에 제품은 알로에 겔을 농축하거나 분말로 만든 것, 잎에서 즙을 얻은 것, 비가식 부위를 제외한 나머지 부분의 분말 형태이다(KFDA, 2004). 지금까지 알로에 추출물의 안전성에 관한 *in vitro* 연구들은 부족한 실정이며, 알로에 자체에 대한 연구보다는 알로에 추출물의 다당류 분획(Kim and Lee, 1997; Kim *et al.*, 1999)이나 저분자량 분획(Avila *et al.*, 1997) 등 특정 분획에 관한 보고들이 대부분이어서 이러한 연구들은 알로에 속에 함유되어 있는 여러 가지 성분들에 의한 복합적인 영향을 설명하지 못한다. 따라서 본 연구는 알로에 속의 특정 화합물이나 특정 분획이 아닌 알로에 베라 잎을 대상으로 간세포에 미치는 영향을 추정하고 안전성을 평가하였다는 점에서 의의를 가진다.

감사의 글

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것으로 이에 감사드립니다 (A030083).

참고문헌

Avila, H., Rivero, J., Herrera, F. and Fraile, G. (1997): Cytotoxicity of a low molecular weight fraction from Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) gel. *Toxicol.*, **35**, 1423-1430.
 Brusick, D. and Mengs, U. (1997): Assessment of the genotoxic risk from laxative senna products. *Environ. Mol.*

Mutagen., **29**, 1-9.
 Choi, S. and Chung, M.H. (2003): A review on the relationship between aloe vera components and their biologic effects. *Semin. Integr. Med.*, **1**, 53-62.
 Grimminger, W. and Witthohn, K. (1993): Analytics of senna drugs with regard to the toxicological discussion of anthra-noids. *Pharmacology*, **47**(suppl. 1), 98-109.
 Hu, Y., Xu, J. and Hu, Q. (2003): Evaluation of antioxidant potential of aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) extracts. *J. Agric. Food Chem.*, **51**, 7788-7791.
 Kaplowitz, N. (2000): Mechanisms of liver cell injury. *J. Hepatol.*, **32**(suppl. 1), 39-47.
 KFDA (2004): Standards and Specifications for Health Functional Foods, in Notification No. 2004-14.
 Kim, H.K. (2004): Current status and prospect of nutraceuticals. *Food Ind. Nutr.*, **9**, 1-14.
 Kim, H.S. and Lee, B.M. (1997): Inhibition of benzo[a]pyrene-DNA adduct formation by *Aloe barbadensis* Miller. *Carcinogenesis*, **18**, 771-776.
 Kim, H.S., Kacew, S. and Lee, B.M. (1999): In vitro chemopreventive effects of plant polysaccharides (*Aloe barbadensis* miller, *Lentinus edodes*, *Ganoderma lucidum* and *Coriolus versicolor*). *Carcinogenesis*, **20**, 1637-1640.
 Kuo, P.L., Lin, T.C. and Lin, C.C. (2002): The antiproliferative activity of aloe-emodin is through p53-dependent and p21-dependent apoptotic pathway in human hepatoma cell lines. *Life Sciences*, **71**, 1879-1892.
 McConkey, D.J. (1998): Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. *Toxicol. Lett.*, **99**, 157-168.
 Muller, S.O., Eckert, I., Lutz, W.K. and Stopper, H. (1996): Genotoxicity of the laxative drug components emodin, aloe-emodin and danthron in mammalian cells: Topoisomerase II mediated?. *Mutat. Res.*, **371**, 165-173.
 Norikura, T., Kennedy, D.O., Nyarko, A.K., Kojima, A. and Matsui-Yuasa, I. (2002): Protective effect of aloe extract against the cytotoxicity of 1,4-naphthoquinone in isolated rat hepatocytes involves modulations in cellular thiol levels. *Pharmacol. Toxicol.*, **90**, 278-284.
 Reynolds, T. and Dweek, A.C. (1999): Aloe vera leaf gel: a review update. *J. Ethnopharmacol.*, **68**, 3-37.
 Sheo, H.J. (1995): The physiological efficacy of aloe gel. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, **24**, 1026-1038.
 Shieh, D.E., Chen, Y.Y., Yen, M.H., Chiang, L.C. and Lin, C.C. (2004): Emodin-induced apoptosis through p53-dependent pathway in human hepatoma cells. *Life Science*, **74**, 2279-2290.
 Son, S.M. and Park, J.K. (2004): Study on the classification of health food circulated in the market. *J. Korean Dietetic Assoc.*, **10**, 58-64.
 van Loo, G., Schotte, P., van Gurp, M., Demol, H., Hoorelbeke, B., Gevaert, K., Rodriguez, I., Ruiz-Carrillo, A., Vandekerckhove, J., Declercq, W., Beyaert, R. and Vandenberghe, P. (2001): Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ.*, **8**, 1136-1142.