

## 澤瀉가 유리지방산으로 유발된 HepG2 cell의 lipoapoptosis에 미치는 영향

김은영, 이장훈  
경희대학교 한의과대학 간계내과학교실

### The Effect of *Alisma orientale* Extract on Free Fatty Acid-induced Lipoapoptosis in HepG2 Cells

Eun-young Kim, Jang-hoon Lee  
Dept. of Internal Medicine, College of Korean Medicine, Kyung-Hee University

#### ABSTRACT

**Objectives :** This study was designed to investigate the effect on lipoapoptosis of *Alisma orientale* extract against free fatty acid-induced cellular injury.

**Methods :** HepG2 cells were used in an vitro model. HepG2 cells were treated with free fatty acids to generate a cellular model of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). Using this cellular model, the anti-apoptotic effect and reducing steatosis of *Alisma orientale* extract against free fatty acid-induced cellular injury was evaluated by measuring steatosis and apoptosis.

**Results :** *Alisma orientale* extract significantly attenuated free fatty acid-induced intracellular steatosis. *Alisma orientale* extract inhibited free fatty acid-mediated activation of pJNK, PUMA, BAX, caspase-3, and -9, and apoptotic kinases that are correlated with NAFLD. *Alisma orientale* extract also promoted Bcl-2, a anti-apoptotic protein.

**Conclusions :** From the above, the *Alisma orientale* extract decreased the hepatocyte steatosis and showed the hepatocellular protective effect by the regulation of apoptosis-related protein. It proposes the possibility of *Alisma orientale* extract to the treatment of nonalcoholic fatty liver disease in clinics.

**Key words :** nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), *Alisma orientale*, lipoapoptosis, HepG2 cell, free fatty acids (FFAs)

## 1. 서론

비알코올 지방간질환(Nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)은 알코올, 약물, 동반된 다른 간 질환 등이 없으면서 간 내 지방침착의 소견을 보

이는 질환으로<sup>1</sup>, 단순 지방증에서부터 지방간염, 간 섬유화 및 간경변에 이르는 다양한 스펙트럼을 포함한다<sup>2</sup>.

국내에서 비알코올 지방간질환의 유병률은 16~33%이며<sup>3</sup> 이중 10% 정도는 염증을 동반하는 지방간염이고 지방간염의 약 20~30%에서 간경변 및 간암으로 진행할 수 있다<sup>4,5</sup>. 비알코올 지방간질환은 최근 비만 및 당뇨 인구의 증가와 함께 유병률이 급격하게 증가하고 있으며 심혈관계 질환, 당뇨 등의 발생에 있어 독립적인 위험 인자로 작용할 수 있

· 교신저자: 이장훈 서울시 동대문구 경희대로 23  
경희의료원 한방병원 간계내과학교실  
TEL: 02-958-9118 FAX: 02-958-9258  
E-mail: komclive@khu.ac.kr

· 본 논문은 2014년도 경희대학교 한의과대학 대학원 한의학 석사학위 논문임.

음이 밝혀져 그 중요성이 증가하고 있다<sup>6</sup>.

Lipoapoptosis는 과도한 유리지방산에 의해 독성 대사물의 축적과 유해한 대사과정을 거침으로써 발생하는 세포사멸로 비알코올 지방간질환 발생의 주요 기전으로 알려져 있다<sup>7</sup>.

현재 비알코올 지방간질환의 약물치료로 인슐린 저항성 개선제, 고용량의 Vit.E와 같은 항산화제, 고지혈증 치료제 등이 사용되고 있으나 아직까지 표준 치료법은 제시되지 못하고 있으며, 주로 운동과 식이조절, 체중감량 등 보존적 치료를 하고 있는 실정이다<sup>8</sup>.

텍사는 이노, 지질 강하, 항염 작용 및 혈당 강하 효과가 있는 것으로 알려져 있다<sup>9</sup>. 텍사의 비알코올 지방간질환에 대한 연구로 한<sup>10</sup>은 지방증 감소효과와 세포사멸 관련 인자의 조절 및 항산화 효과에 대해 보고하였으며, 류<sup>11</sup>는 간보호 및 항산화 효과에 대해 보고하였으나 비알코올 지방간 모델 설정과 약리기전에 대한 연구는 아직까지 부족한 실정이다.

이에 저자는 먼저 oleic acid 및 palmitic acid를 혼합한 유리지방산과 에탄올 80%로 추출된 텍사를 각각 처리한 HepG2 cell의 MTT assay를 통해 세포 활성도 변화를 관찰하고, 이후 HepG2 cell에 유리지방산을 처리하여 lipoapoptosis 세포 모델을 설정하고 텍사 에탄올 추출물을 투여하여 Oil-Red-O staining, real-time PCR, western blot 등의 방법으로 세포내의 지방 축적 변화와 세포사멸과 관련되는 JNK, pJNK, PUMA, Bax, Bcl-2 및 caspase의 활성 변화를 관찰하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

## II. 실험

### 1. 재료

#### 1) 약제 및 추출

본 실험에 사용한 텍사(*Alisma orientale*, AO)는 경희의료원 한방병원 약제과(경희한약, 전남 순천,

Korea)에서 엄선한 것을 구입하였으며, 용량은 100 g을 사용하였다. 텍사의 추출은 에탄올을 이용하였다. 텍사를 적당한 크기로 마쇄한 후 마쇄 시료 100 g에 대해 10배의 80% 에탄올을 넣어 40 °C의 초음파 추출기(JAC-4020, KODO Technical Research Co.,Ltd, Hwaseong, Korea)에서 3시간 동안 2회 반복 추출하여 여과(Whatman No2, Maidstone, England)하였다. 여과한 에탄올 추출액을 감압농축(N-1000S-WD, Eyela Co., Tokyo, Japan)하여 얻은 에탄올 추출물에 80% 에탄올 100 mL로 용해시켜 40 °C에 하루 방치한 후 상층액을 다시 감압 농축 후 동결 건조(FDU-1100, Eyela Co., Tokyo, Japan)하여 에탄올 추출물을 제조하였다.

### 2. 방법

#### 1) 세포배양

HepG2 cell은 Korean Cell Line Bank(KCLB, Korea)에서 구입하였다. HepG2 cell을 배양액을 이용하여 5%로 이산화탄소가 공급되는 배양기에서 37 °C로 배양하였다. 세포 배양액은 10% fetal bovine serum(LONZA, U.S.A.)과 항생제(LONZA, U.S.A.)가 포함된 Dulbecco's modified Eagle's media(LONZA, U.S.A.)를 사용하였으며 3-4일 간격으로 배양세포에 0.25% trypsin을 넣고 처리하여 세포를 탈착시켜 계대 배양하였다.

#### 2) 간세포에 대한 약물처리

HepG2 cell을 6 well plate에 70%정도 잘 때까지 키운 뒤 lipoapoptosis 유도를 위해서 유리지방산 1 mM(0.66 mM oleic acid+0.33 mM palmitic acid, FFAs)을 24시간 처리하였다. oleic acid와 palmitic acid는 Sigma Aldrich(U.S.A.)에서 구매하였으며, isopropanol에 녹여서 사용하였다. 텍사 추출물은 유리지방산 처리 후 24시간 동안 진행하였다.

#### 3) MTT assay

MTT 시약은 Invitrogen(M6494, U.S.A.)에서 구매하였다. 사용 전 phosphate-buffered saline(PBS)에 1 mg/ml로 만들었으며, 세포는 96 well plate에

1.5×10<sup>3</sup> well로 48시간 배양하였다. 이후 유리 지방산 처리는 1시간과 24시간으로 나누어 진행되었으며, 텍사 추출물 처리는 농도별로 24시간동안 진행되었다. 그 후 MTT 시약은 2시간동안 처리하였으며, MTT 시약 처리 후 dimethylsulfoxide(DMSO) 100 µl로 formazan을 녹인 후 ELISA LEADER기 (Microplate Reader, U.S.A.)로 570 nm 흡광도에서 흡광도를 측정하였다

#### 4) Oil-Red-O staining

HepG2 cell의 지방축적은 Oil-Red-O staining을 이용하여 측정되었다. 세포를 10% formaldehyde로 1시간동안 고정시킨 후 60% isopropanol액으로 세척하였다. 세포를 60% Oil-Red-O(sigma, U.S.A.)로 30분간 염색하였다. 지방 함유량을 측정하기 위해 염색된 플레이트에 100% isopropanol을 넣고 5분 동안 상온에서 섞어준 뒤 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 5) Real-time PCR

HepG2 cell을 분주하여 약물을 처리한 후, HybridR kit(GeneAll, Korea)을 사용하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 template로 cDNA synthesis kit Intron(LeGene Bioscience, U.S.A.)을 이용하여 single stranded cDNA를 제조하였다. 발현되는 DNA에 유전자를 특이적으로 증폭하는 PUMA primers를 넣어 real-time PCR 방법을 이용하여 측정하였다. Internal control로는 GAPDH를 사용하였다. GAPDH의 forward primer와 reverse primer sequence는 5'-CATGGCCTTCCGTGTTCCCTA-3'와 5'-GCGGCA CGTCAGATCCA-3'였다. PUMA의 forward primer와 reverse primer sequence는 5'-GACGACCTCAAC GCACAGTA-3'와 5'-AGGAGTCCCATGATGAGAT TGT-3'였다.

#### 6) Western blot

지방간염을 유도한 세포를 분화시켜 약물을 농도별로 처리한 후, HepG2 cell을 RIPA buffer(50 mM Tris-HCl(pH 7.5), 0.1% SDS(sodium dodecyl sulphate), 0.1% Triton X-100, 1% Nonidet P-40,

0.5% sodium deoxycholate, 150 mM NaCl, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride)로 용해시킨 후 8% SDS-polyacrylamide gel 전기 영동한 다음 PVDF membrane에 transfer 하였다. 5% BSA(Cell signaling, U.S.A.)로 blocking한 후 β-actin, JNK, p-JNK, PUMA, Bax, Bcl-2, caspase-3,-9 등의 여러 가지 1차 항체 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., U.S.A.) 및 horseradish peroxidase가 부착된 2차 항체로 반응시키고 ECL 용액(Milipore, U.S.A.)을 사용하여 목적 단백질을 확인하였다.

### 3. 통계분석

실험 결과는 각 실험에 대한 평균값±S.E.M.로 표기 하였고, 각 그룹간의 차이를 결정하기 위한 통계 분석은 ONE-WAY ANOVA Test를 이용하였다. 모든 통계분석은 GRAPH Prism 5를 이용해서 수행되었다. P<0.05인 값을 통계적 유의성이 있는 것으로 판단하였다.

## III. 결 과

### 1. MTT assay

#### 1) 유리지방산이 cell viability에 미치는 영향

유리지방산 1 mM(0.66 mM oleic acid+0.33 mM palmitic acid)의 세포독성을 확인하기 위하여, 시료들을 1시간, 24시간으로 나누어 처리한 후, MTT assay를 시행하였다. 정상 대조군과 비교 관찰한 결과 1시간 후에는 cell viability가 100%에서 95%로 큰 변화가 없었으나 24시간 경과 후에는 43%로 감소되는 것이 관찰되었다(Fig. 1A). 이를 통해 유리 지방산 투여를 통한 lipotoxicity를 확인할 수 있었다.

#### 2) 텍사 추출물이 cell viability에 미치는 영향

텍사 80% 에탄올 추출물을 100, 500, 1000 µg/ml의 농도로 각기 투여한 결과 대조군에 비해 100 µg/ml에서는 cell viability가 100%에서 97%로 유의한 변화가 나타나지 않았으나 500 µg/ml와 1000 µg/ml에서는 각각 61%, 50%로 농도 의존적으로 감소되

는 것으로 나타났다(Fig. 1B). 이는 100 µg/ml에서는 세포독성이 나타나지 않는 것을 의미하며, 이를 토대로 이어지는 실험에서 24시간 처리한 100 µg/ml 농도의 택사 추출물을 사용하였다.

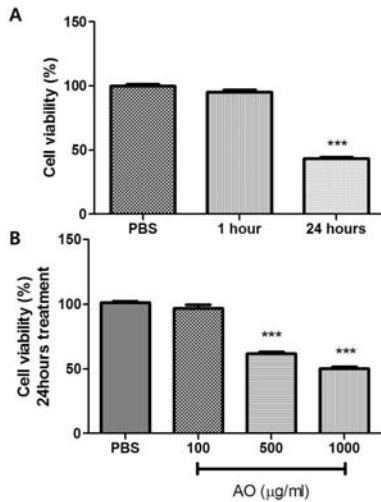


Fig. 1. Cell viability assay.

After treatment of 1 mM FFAs on HepG2 cell for 1 hour and 24 hours, MTT assay was tested. Treating for 24 hours showed toxicity to HepG2 cell (A). After treatment of AO on the HepG2 cell for 24 hours, MTT assay was tested. AO treated with the concentrations of 100, 500 and 1000 µg/ml. AO 100 µg/ml showed no toxicity to HepG2 cell (B). Statistical significance was determined by one-way ANOVA and the values are mean ± SEM; \*\*\* P<0.001

FFAs : free fatty acids  
AO : *Alisma orientale*

## 2. Oil-Red-O staining을 통한 세포내 지방의 양적 분석

HepG2 cell에 lipoapoptosis 유도를 위해서 유리 지방산 1 mM을 24시간 처리한 후 Oil-Red-O staining을 통해 세포 내 지방증(steatosis) 정도를 확인하였다. 세포 내 지방 축적의 정도를 보면 정상 대조군에 비해 유리지방산을 투여한 경우에 염색된 지방 세포의 수가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 그

리고 유리지방산과 택사 80% 에탄올 추출물을 비교해 보았을 때, 택사를 투여한 경우에 염색된 지방 세포의 수가 감소하였음을 관찰하였다(Fig. 2). 이를 통해 택사의 투여가 비알코올 지방간염의 주요 특징 중 하나인 지방증을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

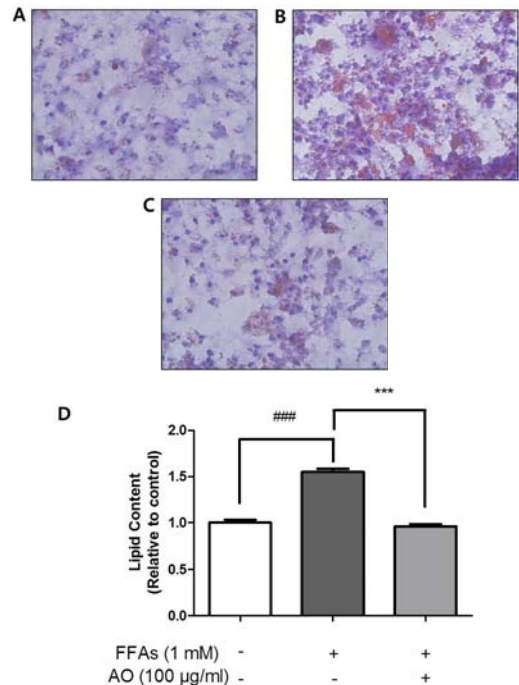


Fig. 2. Oil-Red-O staining for cell and quantitative analysis of lipid.

Cells were treated with 1 mM FFAs. The control cells (A) were treated only with 1 % BSA. (B) were treated with 1 mM FFAs for 24 hours, and (C) were pretreated with 1 mM FFAs for 24 hours and then cultured with AO for 24 hours. These images were captured by microscope at 400×. The quantitative analysis of lipid (D) was measured by Oil-Red-O staining deposition. Statistical significance was determined by one-way ANOVA and the values are mean ± SEM; ### P<0.001, control versus FFAs treated group (lipoapoptosis induced group) and \*\*\* P<0.001, lipoapoptosis induced group versus AO treated group.  
FFAs : Free Fatty Acids  
AO : *Alisma orientale*

### 3. 텍사 추출물이 pJNK 활성화에 미치는 영향

유리지방산에 의한 세포사멸 과정에 관여하는 것으로 알려진 JNK(c-Jun N-terminal kinase) 및 JNK가 활성화된 상태인 phospho-JNK(pJNK)의 양을 알아보기 위해 western blot을 시행한 결과, 정상 대조군에 비해 유리지방산 1 mM을 투여한 경우에서 pJNK가 증가하였음을 확인하였다. 그리고 유리지방산 투여에서 증가하였던 pJNK가 텍사 80% 에탄올 추출물에서 현저하게 감소하였음을 관찰하였다(Fig. 3). 이를 통해 텍사 추출물이 apoptosis를 유도하는 pJNK의 활성을 억제함을 확인하였다.

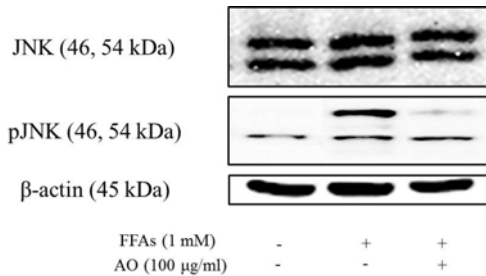


Fig. 3. JNK and pJNK expression level.

Total cell lysates were prepared from control cells, cells treated with 1 mM FFAs for 24 hours, and cells pretreated with 1 mM FFAs for 24 hours and then cultured with AO for 24 hours respectively. pJNK expression level was down-regulated after treatment of AO.  $\beta$ -Actin was used as internal control.

FFAs : Free Fatty Acids  
AO : *Alisma orientale*

### 4. 텍사 추출물이 PUMA 활성화에 미치는 영향

비알코올지방간염 환자들에게서 많이 검출되는 세포사멸 관련 인자인 PUMA(p53 up-regulated modulator of apoptosis)의<sup>12</sup> 활성 변화를 real-time PCR을 통해 살펴보았다. PUMA의 mRNA 변화량은 정상 대조군에 비해 유리지방산 1 mM을 투여한 경우에서 약 1.8배 증가하였음을 확인하였다. 그리고 유리지방산 투여로 1.8배 증가하였던 mRNA 양이 텍사 80% 에탄올 추출물 투여 시에는 1.1배로

감소하였다(Fig. 4).

Western blot을 통해 PUMA의 활성을 확인한 결과에서도 마찬가지로 정상 대조군에 비해 유리지방산을 투여하였을 때 1.2배로 증가하였으며, 유리지방산 투여로 증가하였던 PUMA protein 양이 텍사 80% 에탄올 추출물 투여 시에는 0.7배로 감소하였음을 관찰하였다(Fig. 5). 이를 통해 텍사 추출물이 apoptosis를 유도하는 PUMA의 mRNA 및 protein 모두에서 그 활성을 억제함을 확인하였다.

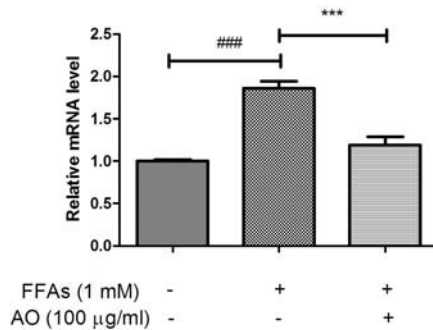


Fig. 4. PUMA mRNA expression level.

PUMA mRNA were prepared from control cells, cells treated with 1 mM FFAs for 24 hours, and cells pretreated with 1 mM FFAs for 24 hours and then cultured with AO for 24 hours respectively. Data were normalized with GAPDH level. All Statistical significance were determined by one-way ANOVA and the values are mean  $\pm$  SEM; ### P<0.001, control versus FFAs treated group (lipoapoptosis induced group) and \*\*\* P<0.001, lipoapoptosis induced group versus AO treated group.

FFAs : Free Fatty Acids  
AO : *Alisma orientale*

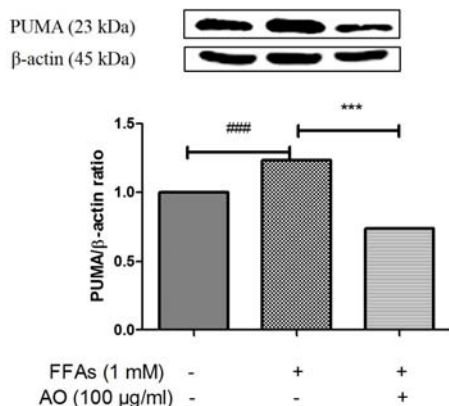


Fig. 5. PUMA protein expression level.

Total cell lysates were prepared from control cells, cells treated with 1 mM FFAs for 24 hours, and cells pretreated with 1 mM FFAs for 24 hours and then cultured with AO for 24 hours respectively. The protein expression level of PUMA was significantly reduced after treatment. PUMA levels were compared with β-actin level. Statistical significance was determined by one-way ANOVA and the values are mean ± SEM: ### P<0.001, control versus FFAs treated group (lipoapoptosis induced group) and \*\*\* P<0.001, lipoapoptosis induced group versus AO treated group.  
 FFAs : Free Fatty Acids  
 AO : *Alisma orientale*

5. 텍사 추출물이 Bax, Bcl-2 활성에 미치는 영향

PUMA의 활성화에 의해 활성화되는 Bax의 양을 확인하기 위해 western blot을 시행한 결과, 정상 대조군에 비해 유리지방산 1 mM을 투여하였을 때 Bax가 증가하였음을 확인하였다. 그리고 유리지방산 투여로 증가하였던 Bax의 양이 텍사 80% 에탄올 추출물에서 현저하게 감소하였음을 관찰하였다. 이와 반대로 anti-apoptosis 인자인 Bcl-2는 정상 대조군에 비해 유리지방산 1 mM에서 증가하였다가 텍사 80% 에탄올 추출물에서 현저하게 감소하였다(Fig. 6). 이를 통해 텍사 추출물이 apoptosis를 유도하는 Bax의 활성을 억제하고, anti-apoptosis를 유도하는 Bcl-2의 활성을 촉진함을 확인하였다.

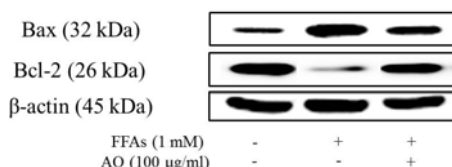


Fig. 6. Bax and Bcl-2 expression level.

Total cell lysates were prepared from control cells, cells treated with 1 mM FFAs for 24 hours, and cells pretreated with 1 mM FFAs for 24 hours and then cultured with AO for 24 hours respectively. Bax level was down-regulated after treatment of AO. Bcl-2 expression level was up-regulated after treatment of AO. β-Actin was used as internal control.

FFAs : Free Fatty Acids  
 AO : *Alisma orientale*

6. 텍사 추출물이 caspase 활성화에 미치는 영향

Caspase는 cleaved form일 때 활성화되는데, western blot 시행 결과, 정상 대조군에 비해 유리지방산 1 mM의 투여로 caspase-3,-9의 cleaved form이 증가하였음을 확인하였다. 그리고 유리지방산의 투여로 증가하였던 caspase-3,-9의 cleaved form이 텍사 80% 에탄올 추출물에서 현저하게 감소하였음을 관찰하였다(Fig. 7). 이를 통해 텍사 추출물이 apoptosis를 유도하는 caspase-3,-9의 활성을 억제함을 확인하였다.

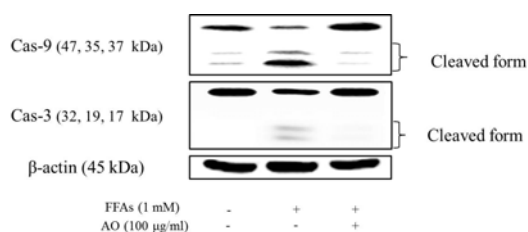


Fig. 7. Caspase expression level.

Total cell lysates were prepared from control cells, cells treated with 1 mM FFAs for 24 hours, and cells pretreated with 1 mM FFAs for 24 hours and then cultured with AO for 24 hours respectively. Cleaved form of caspase-3 and caspase-9 were down-regulated after treatment of AO. β-Actin was used as internal control.

FFAs : Free Fatty Acids  
 AO : *Alisma orientale*

#### IV. 고찰

비알코올 지방간질환은 단순 지방증과 비알코올 지방간염으로 구분할 수 있으며, 단순 지방증은 과도하게 지방이 침착된 상태로 임상적으로 예후가 양호한 양성 질환으로 여겨지나 비알코올 지방간염은 지방 침착과 함께 간세포 손상과 염증이 동반된 상태로 간섬유화, 간경변증, 간세포암종을 초래할 수 있는 질환이다.<sup>12</sup>

유리지방산은 생체 에너지 저장 등의 중요한 역할을 하지만 높은 지방 섭취는 비만과 제 2형 당뇨병과 연관되어있다<sup>13</sup>. 유리지방산의 양적, 질적 변화는 비알코올 지방간질환의 발생에 중요한 영향을 미치는데<sup>12,14</sup>, 비만인 비알코올 지방간질환 환자에서 불포화지방산/포화지방산 비율의 감소는 질병의 악화로 이어질 수 있으며<sup>15</sup>, 유리지방산의 증가는 비알코올 지방간질환의 주요 병인으로 작용하는 인슐린 저항성의 원인이 된다.

유리지방산은 화학적으로 포화 지방산과 불포화 지방산으로 분류되며 그 구조는 생물학적 효과에 영향을 미치는데, 포화지방산으로는 palmitic acid가 대표적이며 불포화지방산으로는 oleic acid가 대표적이다<sup>16</sup>. 간세포에서 지방 축적과 세포사멸에 대한 palmitic acid와 oleic acid 비교 연구에 따르면 oleic acid가 palmitic acid에 비해 지방증은 심하게 나타난 데 비해 세포사멸 효과는 적은 것으로 나타났다<sup>17</sup>. 그리고 oleic acid와 palmitic acid의 혼합 투여에서는 palmitic acid만을 단독으로 사용했을 때에 비해 더 높은 지방증 효과를 나타냈으나 세포사멸 및 인슐린 저항성 정도는 더 낮았는데, 이는 oleic acid의 보호 효과를 암시한다<sup>17</sup>. 이러한 연구결과를 바탕으로 palmitic acid로 lipoapoptosis를 유도한 기존 연구와는 다르게 이번 실험은 oleic acid와 palmitic acid의 2:1 배합으로 좀 더 비알코올 지방간염에 가까운 모델을 만들어 진행하였다.

Lipoapoptosis는 간 손상을 일으키는 주요 기전

으로, 과다한 지방산에 의하여 독성 대사물의 축적과 비산화성 대사 등의 유해한 대사 과정을 거침으로써 lipotoxicity가 발생하며 이는 lipoapoptosis라 불리는 세포사멸을 초래한다<sup>18</sup>. Lipoapoptosis는 비알코올 지방간염의 중요한 특징이며, 질병의 심각도와 연관이 있다.

높은 유리지방산은 지방증을 유발하며, 간세포의 세포사멸을 유발한다. 이때 JNK 신호 전달 경로의 활성화는 지방간염에서 유리지방산으로 유도되는 lipoapoptosis의 원인이 된다. JNK는 간세포에서 유리지방산의 자극, 또는 유리지방산으로 유도된 세포질 세망 스트레스의 반응에 의해 활성화된다. 이렇게 활성화된 JNK는 pro-apoptosis 단백질인 Bim, Bad, Bax 등을 활성화시키고<sup>19</sup>, anti-apoptosis 단백질인 Bcl-2와 Bcl-XL을 비활성화시킨다<sup>20</sup>.

PUMA는 pro-apoptosis 단백질로 유전자 독성 스트레스(genotoxic stress), 혈청 제거(serum withdrawal), 세포질 세망 스트레스 유도 등 다양한 유해 자극에 의해 세포사멸을 유도한다<sup>21,22</sup>. 포화유리지방산은 Bax를 활성화시켜 세포사멸을 야기하며, 이때 PUMA가 포화유리지방산에 의한 Bax 활성화를 활성화시킨다. 미토콘드리아 막에서 Bax의 oligomerization은 미토콘드리아의 장애를 유발하고, caspase-3,-6,-7 effector를 활성화하여 궁극적으로 세포사멸에 의한 세포사를 초래한다<sup>23</sup>.

Bcl-2는 분자량 26kD의 단백질로서 chemoresistance에 중요한 역할을 담당하여 여러 종류의 자극에 대해 세포사멸을 막는 특이 기능을 가지고 있다고 알려져 있다<sup>24-26</sup>. Bcl-2 family에 속하는 관련 단백질 Bcl-2, Bax 등의 발현은 세포가 세포사멸로 진행시 감수성을 결정한다<sup>27</sup>. Bcl-2 Family중 Bcl-2, Bcl-XL, Mcl-1, A1은 세포사멸을 억제하고, Bcl-Xs, Bax, Bak, Bad, Bid는 세포사멸을 증진시킨다. Bcl-2와 Bax는 서로 상대적인 단백질로 대부분의 경우 heterodimer의 형태로 존재한다고 알려졌다. 따라서 낮은 Bcl-2와 높은 Bax level에서 세포의 세포사멸이 일어나며, 반면에 세포사멸이 일어나지 않는 세포에서는 높은

Bcl-2와 낮은 Bax level이 나타남을 발견하였다<sup>28</sup>.

Caspase는 cysteine 단백 분해효소로서 세포사멸을 억제하고 있는 단백질들을 분해하여 apoptosis를 진행시킨다. Caspase-3는 caspase family 중의 하나이며 세포내 여러 종류의 기질단백을 절단하여 세포사멸을 진행시킨다. 세포사멸의 신호전달기전은 아직 확실히 밝혀져 있지 않으나 caspase-3는 여러 세포사멸 경로가 공통으로 통과하는 중요한 경로로 알려지고 있다.

본 연구는 택사가 유리지방산으로 유발된 HepG2 cell의 lipoapoptosis에 미치는 영향을 알아보기 위해 시행되었다. 이를 위해 우선 택사가 HepG2 cell의 활성화도에 미치는 영향을 알아보았으며, 세포내의 지방 축적 및 세포사멸 관련 단백질들의 활성화 정도를 관찰하였다.

MTT assay를 시행하여 유리지방산의 세포독성을 확인한 결과, 유리지방산 1 mM 투여 1시간 경과 후에는 유의한 변화가 없었으나 24시간 경과 후에는 cell viability가 유의하게 감소함을 확인하였다. 이를 통해 유리지방산의 투여를 통한 lipotoxicity를 확인할 수 있었다(Fig. 1A). 그리고 택사 추출물이 cell viability에 미치는 영향을 알아보기 위해 HepG2 cell에 택사를 농도별로 처리한 후 MTT assay를 시행한 결과 100 µg/ml에서는 유의한 변화가 관찰되지 않았고, 500 µg/ml과 1000 µg/ml에서는 cell viability가 유의하게 감소하였다(Fig. 1B). 이는 100 µg/ml에서는 세포독성이 나타나지 않는 것을 의미하며, 이를 토대로 이어지는 실험에서 24시간 처리한 100 µg/ml 농도의 택사 추출물을 사용하였다.

HepG2 cell에 lipoapoptosis 유도를 위해서 유리지방산 1 mM을 24시간 처리한 후 Oil-Red-O staining을 통해 세포내 지방증 정도를 확인하였다. 세포내 지방 축적의 정도를 보면 정상 대조군에 비해 유리지방산 1 mM의 투여로 염색된 지방 세포의 수가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 그리고 유리지방산과 택사 80% 에탄올 추출물을 비교해 보았을 때 염색된 지방 세포의 수가 감소하였음을 관찰하였

다. 따라서 택사의 투여가 비알코올지방간염의 주요 특징 중 하나인 지방증을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 2).

이어지는 실험에서는 비알코올 지방간 질환의 병리적 변화에 관여하며 특히 지방산에 의한 세포사멸 과정에 관여하는 것으로 알려진 단백질들의 활성을 알아보았다. 먼저 유리지방산에 의한 세포사멸 과정에 관여하는 것으로 알려진 JNK 및 JNK가 활성화된 상태인 pJNK의 활성을 알아보기 위해 western blot을 시행한 결과, 정상 대조군에 비해 유리지방산을 투여한 경우에 pJNK가 증가하였음을 확인하였다. 그리고 유리지방산의 투여로 증가하였던 pJNK가 택사 80% 에탄올 추출물에서 감소하였다(Fig. 3).

또한 비알코올 지방간염 환자들에게서 많이 검출되는 세포사멸 관련 인자인 PUMA의 활성을 살펴보았다. 먼저 real-time PCR을 통해 확인해 본 PUMA의 mRNA 변화량 결과, 정상 대조군에 비해 유리지방산을 투여한 경우에 mRNA양이 증가함을 확인하였다. 그리고 유리지방산의 투여로 증가하였던 mRNA양이 택사 80% 에탄올 추출물에서 감소하였다(Fig. 4). 그리고 western blot을 통해 PUMA의 활성을 확인한 결과도 마찬가지로 정상 대조군에 비해 유리지방산을 투여한 경우에 PUMA양이 증가하였으며, 유리지방산의 투여로 증가하였던 PUMA양이 택사 80% 에탄올 추출물에서 감소하였음을 관찰하였다. 이를 통해 택사 추출물의 투여가 PUMA 발현 감소에 있어 mRNA뿐만 아니라 protein level에서도 의미가 있음을 알 수 있었다(Fig. 5).

PUMA의 활성화에 의해 활성화되는 Bax의 양을 확인하기 위해 western blot을 시행한 결과, 정상 대조군과 비교하여 유리지방산을 투여한 경우에 Bax가 증가하였음을 확인하였다. 그리고 유리지방산의 투여로 증가하였던 Bax의 양이 택사 80% 에탄올 추출물에서 감소하였다. 이와 반대로 anti-apoptosis 인자인 Bcl-2는 정상 대조군에 비해 유리지방산을



투여한 경우에 증가하였다가 텍사 80% 에탄올 추출물에서 다시 감소하였다(Fig. 6).

Caspase의 경우 cleaved form일 때 활성화되는데, western blot을 시행한 결과 정상 대조군에 비해 유리지방산을 투여한 경우에 caspase-3,-9의 cleaved form이 증가하였음을 확인하였다. 그리고 유리지방산 투여로 증가하였던 caspase-3,-9의 cleaved form이 텍사 80% 에탄올 추출물에서 감소하였다(Fig. 7). 이와 같은 세포사멸 관련 인자들의 활성 변화를 통해 텍사 추출물의 투여가 유리지방산으로 유도된 세포사멸을 억제하는 것을 알 수 있었다.

이상에서 텍사 추출물은 세포내 지방 축적 감소 및 세포사멸 억제 효과를 나타내었다. 이를 통해 텍사 추출물이 단순 지방증 단계부터 세포손상으로 인한 다음 단계로의 진행 모두 개선시키는 효과를 나타내었다. 향후 기타 간 손상에 미치는 효과에 대한 다양한 연구가 지속적으로 이루어질 필요가 있을 것으로 사료된다.

## V. 결 론

텍사가 비알코올 지방간질환에 미치는 영향을 살펴보기 위해, 먼저 유리지방산 및 텍사 추출물 각각의 MTT assay를 통해 세포활성도를 측정하였고, 이후 HepG2 cell에 유리지방산을 처리하여 lipoapoptosis를 유도한 뒤 텍사 추출물을 투여하여 Oil-Red-O staining, real-time PCR, western blot 등의 방법으로 세포내의 지방 축적 변화와 세포사멸과 관련되는 JNK, pJNK, PUMA, Bax, Bcl-2 및 caspase의 활성 변화를 측정된 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. MTT assay 결과 유리지방산을 24시간 처리한 경우에 cell viability가 유의성 있게 감소하였으며, 텍사 추출물 100 µg/ml을 24시간 처리한 경우에는 유의한 변화가 나타나지 않았다.
2. 텍사 추출물은 Oil-Red-O staining 결과 대조군에 비해 세포내 지방 축적정도를 유의성 있게

감소시켰다.

3. 텍사 추출물은 pJNK를 대조군에 비해 현저하게 감소시켰다.
4. 텍사 추출물은 PUMA의 mRNA 및 protein 모두에서 그 양을 대조군에 비해 유의성 있게 감소시켰다.
5. 텍사 추출물은 Bax를 대조군에 비해 현저하게 감소시켰다.
6. 텍사 추출물은 Bcl-2를 대조군에 비해 현저하게 증가시켰다.
7. 텍사 추출물은 caspase-3,-9의 cleaved form을 대조군에 비해 현저하게 감소시켰다.

이상의 실험결과에서 텍사 에탄올 추출물이 간 세포의 지방증을 감소시키며, 세포사멸에 관여하는 관련 인자를 조절하여 lipoapoptosis를 억제하는 효능이 있음을 알 수 있었다. 이는 텍사의 단순 지방증에서 간손상으로 진행되는 과정을 억제하는 효과를 시사하는 것으로, 이와 관련하여 향후 텍사의 치료기전에 대한 보다 심도 있는 연구가 진행되어야 할 것으로 생각된다.

## 참고문헌

1. Sanyal AJ, Brunt EM, Kleiner DE, Kowdley KV, Chalasani N, Lavine JE, et al. Endpoints and clinical trial design for nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2011;54:344-53.
2. Serfaty L, Lemoine M. Definition and natural history of metabolic steatosis: clinical aspects of NAFLD, NASH and cirrhosis. *Diabetes Metab* 2008;34:634-7.
3. Park SH, Jeon WK, Kim SH, Kim HJ, Park DI, Cho YK, et al. Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease among Korean adults. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21:138-43.
4. Musso G, Gambino R, Cassader M, Pagano G.

- Meta-analysis: Natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and diagnostic accuracy of non-invasive tests for liver disease severity. *Ann Med* 2010;43(8):617-49.
5. Bellentani S, Marino M. Epidemiology and natural history of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Ann Hepatol* 2009;8(suppl.1):S4-8.
  6. Musso G, Cassader M, Gambino R. Diagnostic accuracy of adipose insulin resistance index and visceral adiposity index for liver histology and cardiovascular risk in NAFLD. *Hepatology* 2012;56(2):788-9.
  7. Gregor M, Hotamisligil G. Thematic review series: Adipocyte biology. Adipocyte stress: the endoplasmic reticulum and metabolic disease. *J Lipid Res* 2007;48:1905-14.
  8. 대한간학회. 비알코올 지방간질환 진료 가이드라인. 초판. 서울: 대한간학회; 2013. p. 17-27.
  9. Xiu RJ. Microcirculation and traditional Chinese medicine. *JAMA* 1988;260:1755-7.
  10. Han CW. Aqueous extract of *Alisma orientale* Attenuates palmitate-induced cellular injury by inhibiting production of reactive oxygen species in HepG2 cells. Graduate school of Kyung Hee university. 2010.
  11. Rhew KY. Antioxidative Effects of Dichloromethane Extract of *Alisma orientale* on Non-alcoholic Fatty Liver Disease Induced by Methionine and Choline-deficient (MCD) Diet. Graduate school of Kyung Hee university. 2012.
  12. Nehra V, Angulo P, Buchman AL, Lindor KD. Nutritional and metabolic considerations in the etiology of nonalcoholic steatohepatitis. *Dig Dis Sci* 2001;46(11):2347-52.
  13. McGarry JD. Banting lecture 2001: dysregulation of fatty acid metabolism in the etiology of type 2 diabetes. *Diabetes* 2002;51:7-18.
  14. Musso G, Gambino R, De Michieli F, Cassader M, Rizzetto M, Durazzo M, et al. Dietary habits and their relations to insulin resistance and postprandial lipemia in nonalcoholic steatohepatitis. *Hepatology* 2003;37:909-16.
  15. De Almeida IT, Cortez-Pinto H, Fidalgo G, Rodrigues D, Camilo ME. Plasma total and free fatty acids composition in human non-alcoholic steatohepatitis. *Clin Nutr* 2002;21:219-23.
  16. Baylin A, Kabagambe EK, Siles X, Campos H. Adipose tissue biomarkers of fatty acid intake. *Am J Clin Nutr* 2002;76:750-7.
  17. Ricchi M, Odoardi MR, Carulli L, Anzivino C, Ballestri S, Pinetti A, et al. Differential effect of oleic and palmitic acid on lipid accumulation and apoptosis in cultured hepatocytes. *J Gastroenterol Hepatol* 2009;24(5):830-40.
  18. Belfort R, Harrison SA, Brown K, Darland C, Finch J, Hardies J, et al. A placebo-controlled trial of pioglitazone in subjects with nonalcoholic steatohepatitis. *N Engl J Med* 2006;355:2297-307.
  19. Lei K, Davis RJ. Proc. JNK phosphorylation of Bim-related members of Bcl2 family induces BAX-dependent apoptosis. *Natl Acad Sci USA* 2003;100:2432-7.
  20. Yamamoto K, Ichijo H, Korsmeyer SJ. BCL-2 is phosphorylated and inactivated by an ASK1/Jun N-terminal protein kinase pathway normally activated at G(2)/M. *Mol Cell Biol* 1999;19:8469-78.
  21. Jeffers JR, Parganas E, Lee Y, Yang C, Wang J, Brennan J, MacLean KH, Han J, Chittenden T, Ihle JN, McKimmon PJ, Cleveland JL, Zambetti GP. Puma is an essential mediator of p53-dependent and -independent apoptotic pathways. *Cancer Cell* 2003;4:321-8.
  22. Luo X, He Q, Huang Y, Sheikh MS. Transcriptional

- upregulation of PUMA modulates endoplasmic reticulum calcium pool depletion-induced apoptosis via Bax activation. *Cell Death Differ* 2005;12:1310-8.
23. Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9(3):231-41.
  24. Findly HW, Gu L, Yeager AM, Zhou M. Expression and regulation of Bcl-2, Bcl-xL, Bax correlate with p53 status and sensitivity to apoptosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 1997;89(8):2986-93.
  25. Ikeda H, Hirato J, Akami M, Matsuyama S, Suzuki N, Takahashi A, Kuroiwa M. Bcl-2 Oncoprotein Expression and apoptosis in neuroblastoma. *Journal of Pediatric surgery* 1996;30(6):805-8.
  26. Itoh N, Tsujimoto Y, Nagata S. Effect of bcl-2 on Fas antigen-mediated cell death. *The journal of immunology* 1993;151(2):621-7.
  27. Ginsberg D, Mechta F, Yaniv M, Oren M. Wild-type p53 can down-modulate the activity of various promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88(22):9979-83.
  28. Schlesinger PH, Gross A, Yin AM, Yamamoto K, Saito M, Waksman G, Korsmeyer SJ. Comparison of the ion channel characteristics of proapoptotic BAX and antiapoptotic BCL-2. *proc natl Acad Sci USA* 1997;94(21):11357-62.