

皂角刺 추출물의 Nrf2 활성화를 통한 간세포 보호 효과

김재광[#], 박상미, 제갈경환, 김영우, 변성희, 김상찬, 조일제^{*}

대구한의대학교 한의과대학 방제학교실

Gleditsia Spina Extract Protects Hepatocytes from Oxidative Stress through Nrf2 Activation

Jae Kwang Kim[#], Sang Mi Park, Kyung Hwan Jegal,
Young Woo Kim, Sung Hui Byun, Sang Chan Kim, Il Je Cho^{*}

Department of Herbal Formula, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Gyeongsan 712-715, Republic of Korea.

ABSTRACT

Objectives : Oxidative stress is one of the most causes of hepatocyte injury. *Gleditsia spina*, the thorns of *Gleditsia sinensis* Lam., has been known for its anti-cancer and anti-inflammatory effects in Korean medicine. The present study investigated hepatoprotective effect of *Gleditsia spina* water extract (GSE) against oxidative stress induced by arachidonic acid (AA) + iron in HepG2 cells.

Methods : To investigate cytoprotective effect of GSE, cells were pretreated with GSE and then subsequently exposed to 10 μ M AA for 12 h, followed by 5 μ M iron. Cell viability was monitored by MTT assay, and expression of apoptosis-related proteins was examined by immunoblot analysis. To identify responsible molecular mechanisms, reactive oxygen species (ROS) production, GSH contents, and mitochondrial membrane potential were measured. In addition, effect of GSE on nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) activation was determined by immunoblot and antioxidant response element (ARE)-driven reporter gene assays.

Results : GSE pretreatment prevented AA + iron-mediated cytotoxicity in concentration dependent manner. In addition, ROS production, glutathione depletion, and mitochondrial impairment by AA + iron were significantly inhibited by GSE. Furthermore, GSE promoted translocation of Nrf2 to nucleus, which acts as essential transcription factor for induction of antioxidant genes. Increased nuclear Nrf2 that caused by GSE treatment promoted transcriptional activity of ARE. Finally, GSE up-regulated sestrin-2 which was widely recognized as target gene of Nrf2.

Conclusions : This study demonstrates that GSE protects hepatocytes from oxidative stress via activation of Nrf2 signaling pathway.

Key words : *Gleditsia spina*, *Gleditsia sinensis* Lam., Hepatoprotection, Oxidative stress, Nrf2, Antioxidant gene

서론

간은 인체에서 가장 큰 장기로서 혈액순환의 중심에 위치해 에너지 흡수, 해독 작용 등을 수행하므로 체외의 독소로부터 지속적인 노출을 받는 장기이다¹⁾. 간질환은 2013년 한국

인의 사망원인 중 8번째로 많은 6,665명으로 10만명당 13.2명의 사망률을 나타내 암, 심혈관계 질환 등과 더불어 한국인의 주요 사망원인 가운데 하나이다²⁾. 급만성 간질환은 과도한 알코올 섭취, 바이러스 감염 등이 주요 원인으로 지목되어 왔

*Corresponding author : Il Je Cho, Ph.D, MRC-GHF, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Gyeongsan 712-715, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-819-1862 · Fax : +82-53-819-1860 · E-mail : skek023@dhu.ac.kr

#First author : Jae Kwang Kim, K.M.D, MRC-GHF, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, Gyeongsan 712-715, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-819-1864 · Fax : +82-53-819-1860 · E-mail : kiriwiry@gmail.com

· Received : 22 June 2015 · Revised : 18 July 2015 · Accepted : 20 July 2015

으며, 최근에는 서구화된 식생활과 생활습관의 변화 등으로 말미암아 간에 지방이 침착되는 비알콜성 지방간의 발생이 증가하고 있어 간질환 연구의 필요성은 여전히 강조되고 있다³⁾. 특히 간은 물질대사가 활발한 기관으로써 대사의 결과로 생성된 대사체들로 인해 산화적 스트레스의 영향을 많이 받는다⁴⁾. 그로 인한 간조직 내 과도한 산화적 스트레스는 세포 내의 효소, 신호분자, 유전자의 발현을 교란하여 간세포의 사멸과 함께 이를 통한 염증과, 간섬유화 및 간경화를 매개하므로 만성 간질환의 주요 원인으로 알려져 있다^{4,5)}.

산화적 스트레스는 급만성 간질환 뿐 아니라, 암, 심혈관계 질환, 신경계 질환, 당뇨, 비만을 포함한 다양한 만성 질환을 유발하는 것으로 보고되고 있다⁶⁾. 정상 생리 상태에서 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)은 세포 내 존재하는 다양한 항산화시스템에 의해 제거될 수 있지만, 과도한 ROS의 생성은 항산화시스템의 항상성 소실로 산화적 스트레스를 유발하며 미토콘드리아를 매개한 세포자멸사 신호의 활성화를 통하여 세포 독성을 나타낸다⁵⁾. 따라서 세포 내 발생한 과도한 산화적 스트레스를 제어할 수 있는 다양한 세포 내 기전에 대한 연구가 활발히 진행되고 있으며, 이중 nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)는 항산화 관련 단백질의 발현 증가를 유도하여 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는 핵심 전사인자 중 하나로 알려져 있다⁷⁾. 다양한 신호분자에 의해 활성화된 Nrf2는 세포질에서 핵으로 이동하여 프로모터 영역에 존재하는 antioxidant response element (ARE)에 결합하여 sestrin-2, glutamate-cysteine ligase catalytic subunits, heme oxygenase 1, NAD(P)H quinone oxidoreductase 1 등을 포함한 항산화 유전자들의 전사를 활성화시킨다^{5,8,9)}. 다양한 화합물에 의한 Nrf2의 활성화는 산화적 스트레스가 원인으로 알려진 만성 간질환을 포함하여 심혈관계 질환, 신경계 질환에 대한 보호 및 치료효능이 보고되고 있으며^{7,10,11)}, 특히 고지방 식이를 투여한 실험동물모델에서 Nrf2 유전자 결손시 산화적 스트레스의 조절능 저하로 인해 지방간염과 간경화가 악화될 수 있음이 보고되었다¹²⁾.

따라서 항산화 물질은 Nrf2 활성화를 통하여 세포 내 다양한 원인에 의한 산화적 스트레스를 억제하고 세포를 보호하여 급만성 간질환을 예방할 수 있는 후보소재로써 활용의 가치가 높다. 본 연구실에서는 선행 연구를 통하여 간질환세포에 산화적 스트레스를 유발할 수 있는 *in vitro* 세포 독성 모델로써 아라키돈산 (arachidonic acid, AA)과 철 (iron)의 병용처리 모델을 확립하고, 이 모델을 활용하여 다양한 본초추출물 및 천연물의 세포 보호효능을 보고한 바가 있다¹³⁻¹⁵⁾.

皂角刺 (*Gleditsia spina*)는 *Gleditsia sinensis* Lam.의 가시를 건조한 것으로 消腫排膿, 祛風殺蟲하는 효능이 있으며 癰疽, 腫毒, 瘰癧, 產後缺乳, 胎衣不下를 치료한다¹⁶⁾. 皂角刺에는 플라본 배당체, 페놀류, amino acid, tannin, triacanthine 등의 성분이 존재하는 것으로 밝혀져 있으며^{16,17)}, 이전 연구에서 皂角刺의 에탄올 추출물에서 신생혈관의 생성억제¹⁸⁾, HCT116 세포에서의 대장암 억제효과^{19,20)}, SNU-5 세포에서의 위암 억제효과²¹⁾, lipopolysaccharide로부터 활성화된 대식세포에서의 염증인자 억제효과²²⁾ 등이 보고된 바 있다. 하지만 皂角刺의 급만성 간질환에 대한 효과 및 기전에 대한 연구는 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 皂角刺의 열수 추출물 (*Gleditsia*

spina water extract, GSE)을 급만성 간질환 치료 및 예방의 후보 소재로써 발굴하고자 하였다. 이를 위해 인간 유래의 hepatocarcinoma 세포로써, 간질환세포의 대용세포주로 활용되는 HepG2 세포^{13,23-25)}를 이용하여 AA와 iron의 병용처리를 통해 산화적 스트레스가 매개되는 세포 독성 모델에서 세포 보호효능과 분자기전을 확인하고자 연구를 진행하였다.

재료 및 방법

1. 시약

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin-streptomycin은 GibcoBRL (Eggenstein, Germany)에서 구입하였다. Arachidonic acid (AA), rhodamine 123은 Calbiochem (San Diego, CA, USA)에서 구매하였다. 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), metaphosphoric acid, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), ferric nitrilotriacetic acid (iron), β -actin 항체는 Sigma (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. Dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Junsei Chemical (Tokyo, Japan)에서 구입하였다. HRP-conjugated anti-rabbit IgG, HRP-conjugated anti-mouse IgG, pro-caspase-3 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)로부터 구입하였다. Poly (ADP ribose) polymerase (PARP)와 Nrf2 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다. Sestrin-2 항체는 Proteintech (Chicago, IL, USA)로부터 구입하였다. Lamin A/C 항체는 BD Biosciences (San Jose, CA, USA)에서 구입하였다.

2. GSE의 제조

皂角刺 (나눔제약; 원산지, 중국; 규격, 대한약전; 수입원, 동경종합상사(주)보은; 품질검사연월일, 2010년 10월 22일; 품질검사기관, 나눔제약(주)부설실험실; 제조번호, NA1001710002)는 대원약업사 (Daegu, Korea)에서 구입하였다. 증류수 세척 후 음건한 건조중량 100 g의 皂角刺를 증류수 1.5 L에 넣고 3시간 전탕하여 얻은 열수 추출액을 No.2 filter paper (Nalgene, New York, NY, USA)로 여과 후 진공회전농축기 (EYELA, Tokyo, Japan)를 이용하여 농축하였다. 이 농축액을 Ultra-Low temperature freezer (Operon, Korea)를 통해 -75°C에서 12시간 동결한 후, 동결건조 (LABCONCO, Kansas, MO, USA)하여 5.89 g의 추출물을 얻어 -20°C에 보관하였으며, UPLC 분석을 통해 본 연구에 활용한 GSE의 개략적 성분 프로파일을 확보하였다. GSE는 증류수에 녹인 후 0.2 μ m filter로 여과하여 실험에 사용하였다.

3. 세포 배양

HepG2 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)로부터 구입하여 10% FBS, 100 U/mL penicillin, 100 μ g/mL streptomycin을 포함한

는 DMEM 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 세포는 100 mm dish에서 80%의 confluency로 배양한 후 실험에 사용하였다.

4. 세포 생존율 측정

세포 생존율은 MTT assay를 통하여 측정하였다. HepG2 세포를 24-well plate에 각 well 당 2×10^5 개씩 분주하여 12시간 배양한 후, serum을 고갈한 배지에서 12시간 동안 배양하여 증식을 억제시킨 뒤 GSE와 AA + iron을 처리하였다. 처리가 완료된 세포에 MTT 용액을 최종농도가 0.5 µg/mL이 되도록 넣고 2시간 추가 배양한 후에 배지를 제거하였다. 생성된 formazan을 DMSO로 용해시킨 후 Titertek Multiskan Automatic microplate reader (Model infinite M200pro, Huntsville, AL, USA)를 이용하여 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 무처리군에 대한 백분율로 다음과 같이 계산하였다.

[Relative cell viability (% of control) = (absorbance of treated sample) / (absorbance of control) × 100].

5. 전세포 추출액 및 핵 분획 제조

전세포 추출액 (whole cell lysates)은 세포를 phosphate buffered saline으로 2회 세척한 후 scrapper를 이용하여 수거한 뒤 radioimmunoprecipitation buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM sodium chloride, 1% sodium deoxycholate, 1% nonidet P-40, 1 mM EDTA, 1 mM β-glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 1 mM sodium fluoride, 2.5 mM sodium pyrophosphate)와 protease inhibitor cocktail (GenDEPOT, Barker, TX, USA)을 혼합한 lysis buffer 100 µL 를 첨가하여 4°C에서 1시간 용해한 후, $15,000 \times g$ 에서 30분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 핵 분획 (nuclear fraction)은 수거된 세포를 10 mM HEPES-KOH (pH 7.9), 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 1 mM dithiothreitol, 0.1% nonidet P-40와 protease inhibitor cocktail (GenDEPOT)을 혼합한 hypotonic buffer 100 µL를 첨가하여 4°C에서 10분간 용해한 뒤 $7,800 \times g$ 에서 5분간 원심분리하여 얻은 pellet에 10 mM HEPES-KOH (pH 7.9), 400 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 25% glycerol과 protease inhibitor cocktail (GenDEPOT)을 혼합한 hypertonic buffer 50 µL 첨가하여 1시간 용해 후 $14,000 \times g$ 에서 15분간 원심분리하여 얻은 상층액을 이용하였다.

6. Immunoblot 분석

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis를 통하여 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane에 전이시켰다. Membrane에 전이된 단백질을 skim milk를 이용하여 blocking한 후 표적 단백질의 1차 항체와 반응, horseradish peroxidase와 결합된 2차 항체와 반응을 차례로 거친 후 Enhanced chemiluminescence detection kit (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA)을

이용하여 발현된 단백질의 정도를 확인하였다. Densitometric analysis는 Java software (Image J)를 이용하여 수행하였다.

7. 세포 내 ROS 측정

세포 내 ROS의 측정은 이전에 보고한 방법에 따라 수행하였다¹³⁻¹⁵. HepG2 세포를 96-well black plate에 각 well 당 1×10^4 개씩 분주하여 12시간 배양한 후, 12시간 동안 serum을 고갈하였다. GSE (30 µg/mL)를 1시간 전처리한 후, AA (10 µM)을 12시간 처리하였다. 배지를 완전히 제거한 세포에 phosphate buffered saline에 희석한 iron (5 µM)을 30분간 처리하고 이후 DCFH-DA (10 µM)로 30분간 염색하였다. DCFH-DA는 세포막을 투과하여 세포 내의 esterase와 H₂O₂에 의해 순차적으로 반응하여 형광을 나타내는 dichlorofluorescein (DCF)으로 변환된다. DCF의 형광 강도는 Titertek Multiskan Automatic microplate reader를 이용하여 excitation (485 nm), emission (530 nm)의 파장에서 측정하였다.

8. Glutathione (GSH) 함량 측정

6-well plate에 배양 및 처리된 세포에 샘플당 500 µL의 metaphosphoric acid를 첨가하여 용해한 후 GSH determination kit (Oxis International, Portland, OR, USA)를 이용하여 GSH 함량을 405 nm의 파장에서 측정하였다. 측정된 흡광도는 BCA protein assay를 통한 단백질의 농도로 보정하였다.

9. 미토콘드리아 막 전위 측정

미토콘드리아 막 전위의 변화를 측정하기 위하여 막투과성 양이온 형광 염료인 rhodamine 123을 이용하였다. 약물처리를 완료한 HepG2 세포에 0.05 µg/mL의 rhodamine 123으로 30분간 염색한 후 trypsin을 이용하여 세포를 수집하고, 1% FBS를 포함한 phosphate buffered saline으로 현탁하여 분석당 2×10^4 개의 세포를 Partec GmbH FACS Calibur flow cytometer (Münster, Germany)를 이용하여 측정하였다.

10. 리포터 유전자 분석

ARE 매개 전사 활성화를 측정하기 위한 리포터 유전자인 pGL4.37[luc2P/ARE/Hygro] (Promega, Madison, WI, USA)을 Fugene HD lipofectamine (Promega)을 이용하여 형질 도입하였다. 이후 hygromycin으로 선별하여 pGL4.37을 안정적으로 발현하는 세포주를 확립하였다. 약물처리 후 세포를 Luciferase Reporter Assay System™ kit (Promega)를 이용하여 luciferase 활성을 측정하였다. 측정된 luciferase 활성은 단백질 농도로 보정하였다.

11. 통계 분석

처리군간의 통계적으로 유의한 차이를 확인하기 위하여 One-way ANOVA를 이용하여 검정하였다. 사후검정은 Tukey HSD test를 이용하여 수행하였다. 유의수준이 $p < 0.05$ 또

는 $p < 0.01$ 인 경우 통계적 유의성이 있는 것으로 판단하였다. 통계 분석은 SPSS version 20.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA)을 이용하여 수행하였다.

결 과

1. AA + iron으로 유도된 세포 독성에 대한 GSE의 세포 보호효과

AA + iron으로 유도된 세포 사멸에 대한 GSE의 세포 보호효과를 확인하기 위하여 세포 생존율을 측정하였다(Fig. 1A). HepG2 세포에 12시간 동안 serum을 고갈하고, 3-30 $\mu\text{g/mL}$ GSE를 1시간 동안 전처리한 후, 10 μM AA (12시간), 5 μM iron (2시간)을 순차적으로 처리한 뒤 MTT assay를 수행하였다. 무처리 대조세포군 ($100.00 \pm 4.03\%$)에 비하여 AA + iron의 처리에 의해 세포 생존율이 $31.76 \pm 0.97\%$ 로 유의하게 감소하여 AA + iron에 의한 세포 독성을 확인하였다. 3 $\mu\text{g/mL}$ GSE 전처치는 AA + iron에 의한 세포 생존율의 감소를 변화시키지 못하였으나, 10, 30 $\mu\text{g/mL}$ GSE 전처치에 의하여 세포 생존율이 대조세포군 대비 각각 $73.59 \pm 16.05\%$, $106.29 \pm 3.28\%$ 로 AA + iron으로 인한 세포 독성을 통계적으로 유의하게 억제하였다. 또한 30 $\mu\text{g/mL}$ GSE 단독처치는 세포 생존율에 영향을 미치는 세포 독성이 발견되지 않았다 (대조세포의 생존율 대비 $120.66 \pm 9.48\%$). 본 연구실에서는 선행 연구를 통하여 AA + iron에 의한 세포 독성에 세포사멸사 (apoptosis)가 관여함을 보고한 바 있다¹³⁻¹⁵. 따라서 GSE에 의한 세포 보호효과가 AA + iron에 의해 유도되는 세포사멸사 신호를 억제함으로써 나타나는지 관찰하기 위하여, 세포사멸사 관련 단백질의 변화를 immunoblot 분석을 통하여 관찰하였다(Fig. 1B). 선행 보고와 동일하게 AA + iron의 처리는 PARP, pro-caspase-3 단백질의 발현을 억제하여 세포사멸사를 유도함을 확인하였으며¹³⁻¹⁵, 30 $\mu\text{g/mL}$ GSE 전처치는 AA + iron에 의한 세포사멸사 관련 단백질의 발현 변화를 통계적으로 유의하게 억제하였다. 이러한 결과는 GSE가 HepG2 세포에서 AA + iron에 의한 세포사멸사를 억제하여 세포 보호효과를 나타낸다는 것을 시사한다.

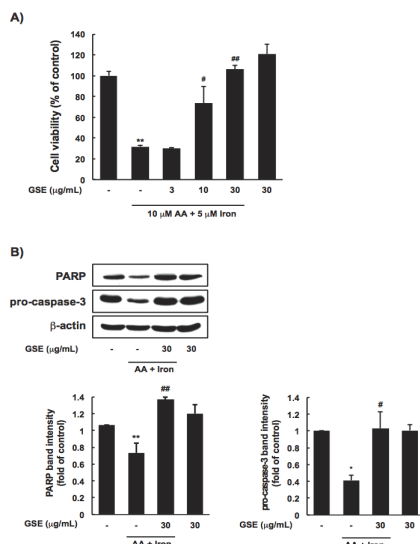


Fig. 1. Protective effect of GSE on AA+iron-induced cytotoxicity. A) Cell viability. HepG2 cells were treated with AA (10 μM) for 12 h, followed by iron (5 μM) for 2 h. GSE was pretreated 1 h earlier than AA treatment. B) Immunoblotting of apoptosis-related proteins. HepG2 cells were treated with 30 $\mu\text{g/mL}$ GSE. After 1 h, cells were incubated with AA (10 μM) for the next 12 h, and then subsequently exposed to iron (5 μM) for 1.5 hour. Expression of apoptosis-related proteins were observed by immunoblotting. Immunoblot against β -actin was used as loading control. Data represent mean \pm SD of three separated experiments (significant compared to control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; significant compared to AA+iron, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$).

2. GSE가 세포 내 ROS와 GSH에 미치는 효과

AA + iron에 의한 세포사멸사 과정에는 ROS 생성과 세포 내 환원형 GSH의 고갈을 통한 산화적 스트레스의 유발이 보고되었다¹³⁻¹⁵. 본 연구에서는 GSE의 세포 보호효과에 AA + iron에 의해 유도된 산화적 스트레스의 역제가 매개되는지 관찰하기 위하여 우선 DCFH-DA를 이용한 세포 내 ROS 생성에 미치는 영향을 평가하였다(Fig. 2A). HepG2 세포에서 AA + iron의 처리는 대조세포에 비하여 2.66 \pm 0.47배 많은 ROS의 생성을 보였으나, GSE 30 $\mu\text{g/mL}$ 의 전처치에 의하여 ROS의 생성이 1.59 \pm 0.39배로 유의하게 억제된 것을 확인할 수 있었다. 또한 GSE 30 $\mu\text{g/mL}$ 단독처치는 세포 내 ROS의 증가가 관찰되지 않았다. 이와 더불어 대조세포에서 70.75 \pm 26.14 nmol/mg으로 유지되었던 세포 내 GSH 함량이 AA + iron의 처리에 의해 7.39 \pm 11.56 nmol/mg으로 통계적으로 유의한 수준으로 감소되었으며, 30 $\mu\text{g/mL}$ GSE 전처치는 73.35 \pm 26.99 nmol/mg으로 세포 내 GSH 함량을 정상세포 수준으로 회복시켰다. 30 $\mu\text{g/mL}$ GSE 단독처치는 세포 내 GSH 함량에 영향을 끼치지 않았다(Fig. 2B). 따라서, GSE는 AA + iron에 의해 유도된 산화적 스트레스의 역제를 통하여 세포 보호효과를 나타내는 것으로 판단된다.

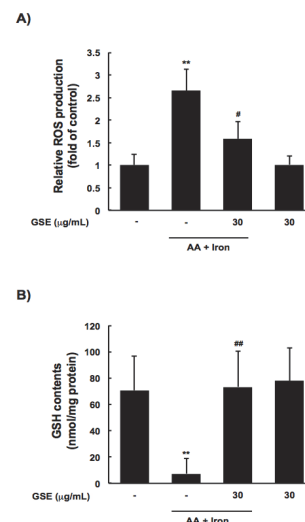


Fig. 2. Effect of GSE on AA+iron-induced ROS production and GSH depletion. HepG2 cells were treated with 30 $\mu\text{g/mL}$ GSE and AA described in Figure 1. Cells were incubated with iron (5 μM) for 1 h. DCFH-DA (10 μM) was added 30 min after iron treatment. DCF fluorescence was monitored by automated microplate reader. B) Cellular GSH contents. GSH contents were measured by using commercial kit as mentioned in method section, and the values were normalized by protein concentration. All data represent mean \pm SD of three separated experiments (significant compared to control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; significant compared to AA+iron, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$).

3. GSE가 AA + iron으로 유도된 미토콘드리아 기능 장애에 미치는 효과

AA + iron에 의해 유도된 산화적 스트레스는 미토콘드리아 막 기능 장애를 통하여 세포자멸사를 유도한다¹³⁻¹⁵). GSE가 AA + iron으로 유도된 세포자멸사를 억제하였으므로, 이 과정에 GSE를 통한 미토콘드리아 막 전위의 회복이 관여되는지 알아보기 위하여 rhodamine 123 염색 후 flow cytometry로 미토콘드리아 막 전위 변화를 측정하였다(Fig. 3). 선행 연구결과와 유사하게 AA + iron의 처치는 rhodamine 123에 대한 저 형광 염색 강도를 가지는 세포의 수 (RN1 fraction)를 대조세포 (3.56 ± 0.89%) 대비 약 45.66 ± 3.79%로 통계적으로 유의하게 증가시켰으며, 이는 AA + iron에 의한 미토콘드리아 막 전위의 저하로 미토콘드리아 기능 장애가 유발되었다는 것을 의미한다. 30 µg/mL GSE의 전처치는 AA + iron에 의해 증가한 RN1 fraction을 6.53 ± 2.28%로 통계적으로 유의하게 감소시켰다. 이와 더불어 GSE 30 µg/mL 단독처치의 RN1 fraction의 비율은 5.77 ± 1.81%로 미토콘드리아 기능 장애에 어떠한 영향도 미치지 않음을 확인하였다. 따라서, GSE는 AA + iron에 의하여 유도되는 미토콘드리아 기능 장애를 방어하여 세포 보호효능을 나타내는 것으로 생각된다.

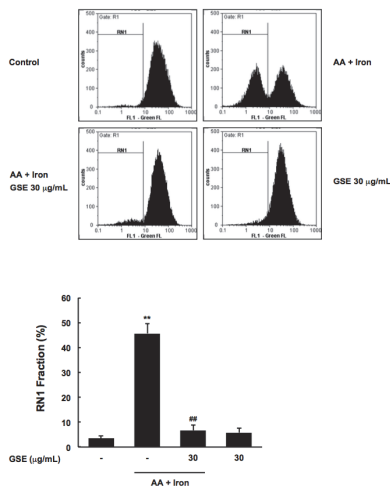


Fig. 3. Effect of GSE on AA+iron-induced mitochondrial dysfunction. HepG2 cells were treated with GSE, AA, and iron as described in Figure 2, and subsequently stained by rhodamine 123 (0.05 µg/mL) for 30 min. Proportion of low rhodamine 123 intensity was defined as RN1 fraction. Data represent mean ± SD, ***p* < 0.01; significant compared to AA + iron, ##*p* < 0.01).

4. GSE가 Nrf2 활성화에 미치는 효과

GSE의 세포 보호효능에 산화적 스트레스의 생성 억제가 동반되는 연구결과 (Fig. 2)를 바탕으로 GSE가 산화적 스트레스 제어에 관여하는 핵심 전사인자인 Nrf2의 활성화에 미치는 영향을 평가하였다. GSE의 세포 보호효능에 Nrf2의 활성화가 매개되는지 관찰하기 위하여 핵 분획에 존재하는 Nrf2 단백질을 immunoblot 분석을 통하여 확인하였다(Fig. 4A). 30 µg/mL GSE를 0.2-3시간 처치한 결과, 핵 분획 내

Nrf2 축적이 0.2, 0.5, 1시간에서 통계적으로 유의하게 증가하였다. 또한 3-100 µg/mL GSE를 0.5시간 처치하여 핵 분획 내 Nrf2의 축적이 GSE 처치 농도에 의존하여 증가함을 확인하였으며, 30, 100 µg/mL GSE에 의해서는 통계적으로 유의하게 Nrf2의 핵 내 축적이 증가하였다. GSE에 의하여 핵 내 축적된 Nrf2가 표적 유전자 프로모터 내 ARE와 결합하여 전사 작용을 활성화시키는지 확인하기 위하여 ARE-luciferase를 안정적으로 발현하는 재조합 세포주를 이용하여 리포터 유전자 분석을 실시하였다(Fig. 4B). GSE 30 µg/mL을 3 또는 6시간 처치한 결과 대조세포 대비 각각 3.26 ± 0.53, 2.54 ± 0.13배 통계적으로 유의하게 ARE 리포터 유전자 활성을 증가시켰다. 이와 더불어 GSE는 대표적인 Nrf2 표적 유전자 중 하나인 sestrin-2의⁸⁾ 단백질 발현을 농도 의존적으로 증가시켰다(Fig. 4C). 이상의 결과는 GSE가 Nrf2의 활성화와 이에 따른 표적 유전자 발현을 통하여 산화적 스트레스를 억제할 수 있음을 시사한다.

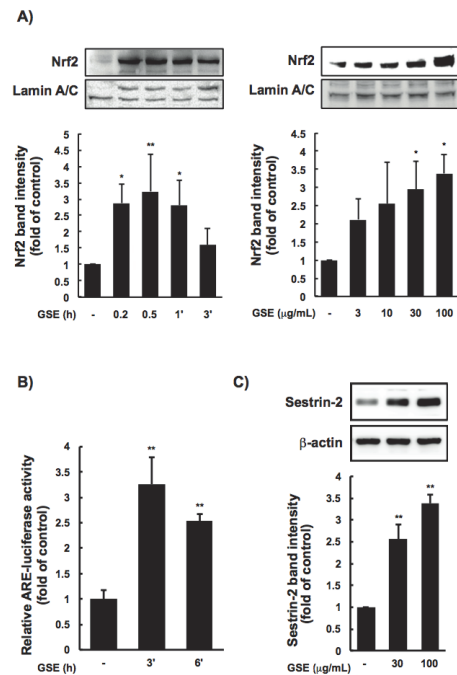


Fig. 4. Effect of GSE on Nrf2 activation. A) Nuclear accumulation of Nrf2. HepG2 cells were treated with GSE (30 µg/mL) for 0-3 h (left), and treated with GSE 3-100 µg/mL for 30 min (right). Nuclear fraction was prepared as shown in method section. Equal protein loading was verified by Lamin A/C. B) ARE-driven reporter gene assay. HepG2 cells that had been stably transfected with pGL4.37 were treated with GSE 30 µg/mL for the indicated time periods. Luciferase activities were normalized by protein concentration. C) Immunoblotting of sestrin-2. HepG2 cells were treated with GSE 30 or 100 µg/mL for 6 h and immunoblotted for sestrin-2. Equal protein loading was confirmed by β-actin immunoblotting. All Data represent mean ± SD of three separated experiments (significant compared to control, **p* < 0.05, ***p* < 0.01).

고찰

산화적 스트레스는 세포의 사멸 뿐만 아니라 염증 인자의 유리를 통하여 조직의 손상을 유발하므로 급만성 간질환의 주요 원인으로 알려져 있다. 특히 산화적 스트레스는 지방산과

인지질을 산화시킴으로써 세포 내 phospholipase A₂의 활성화를 통해 세포막에서의 AA 유리를 촉발하여 다시 세포 내 산화적 스트레스의 축적을 일으키는 악순환으로 염증반응을 촉진한다²⁶⁾. 만성적 알코올의 섭취, 만성 간염, 간경화, 용혈성 간독성, 염증 및 당뇨와 같은 병리상태에서는 간조직 내 비정상적 철의 축적으로 인해 AA를 포함한 염증매개인의 유리가 촉진된다는 것이 보고되었다²⁷⁾. 이와 더불어 AA + iron을 HepG2 세포에 처리하였을 때 산화적 스트레스를 매개로 세포자멸사가 증가되는 것이 보고되었다²⁵⁾. 따라서 HepG2 세포에 대한 AA + iron 처리는 산화적 스트레스를 매개로 간 실질세포의 독성을 억제할 수 있는 후보소재의 발굴에 활용 가능한 유용한 *in vitro* 모델이다. 본 연구실에서는 선행 연구를 통하여 紅蓼, 木通, isorhamnetin 등의 간세포 보호효능을 HepG2 세포를 활용하여 규명한 바 있다¹³⁻¹⁵⁾. 皂角刺는 消腫, 排膿, 祛風 등의 효능이 있어 癰疽, 瘰癧, 腫毒 등의 종양성 질환의 치료에 응용되어 왔다. 따라서 현대의 연구에서도 조각자의 종양 억제효능에 주목하여 대장암 억제^{19,20)}, 위암 억제²¹⁾, 신생혈관 생성 억제효과¹⁸⁾를 중심으로 한 연구가 진행된 바 있다. 본 연구에서는 皂角刺의 간질환 예방 및 치료 후보소재로서 새로운 활용 가능성을 모색하고자 산화적 스트레스를 통해 유도한 간 실질세포 사멸에 대한 세포 보호효능을 연구하였으며, 皂角刺 열수 추출물 (GSE)은 AA + iron에 의해 유도된 세포 독성을 농도 의존적으로 억제하였다. 이와 더불어 GSE는 AA + iron에 의해 활성화되는 세포자멸사 관련 단백질 (PARP 및 pro-caspase-3)의 분해를 억제함을 확인하였다.

AA + iron에 의한 세포 독성 과정에는 세포 내 ROS의 증가, GSH의 고갈, 미토콘드리아 막 전위의 저하가 수반된다²⁵⁾. 산화환원 준위의 항상성 유지에 있어 핵심인자인 GSH는 자유 라디칼, 지질 과산화, 약물 대사체로부터 유도되는 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는 대표적인 내재적 항산화 인자이다²⁸⁾. 과도한 산화적 스트레스는 세포 내 GSH를 고갈시켜 활성산소의 축적을 야기하며, 세포 내에서 산소 호흡을 담당하는 미토콘드리아의 막 전위 변화를 통한 기능 장애를 유발하여 세포 내 활성산소의 축적을 가속화시키고, 미토콘드리아를 경유하는 내인성 세포자멸사 회로를 활성화시킨다²⁹⁾. 선행 연구결과와 동일하게 HepG2 세포에서 AA + iron의 병용처치는 ROS의 축적, GSH의 고갈, 미토콘드리아 막 전위의 저하를 일으켰으며²⁵⁾, 30 µg/mL GSE 전처치가 통계적으로 유의하게 억제하였다. 따라서 皂角刺는 세포 내 축적된 산화적 스트레스를 억제하여 세포 보호효능을 나타내는 것으로 생각된다.

AA + iron에 의한 세포 독성을 억제할 수 있는 세포 내 신호분자로서 AMP-activated protein kinase (AMPK)의 활성화가 관여함이 보고되었으며²⁵⁾, 선행 연구에서 紅蓼, 木通 등을 포함한 본초 추출물의 세포 보호효능이 compound C를 통한 AMPK의 억제에 의해 상쇄되었으며, AMPK의 활성화 (예, AICAR, metformin, constitutive active AMPK)는 직접적으로 AA + iron에 의한 미토콘드리아 막 전위 저하와 세포 독성을 억제하였다^{13,14)}. 그러나, GSE는 AMPK의 인산화를 증가시키지 않았으며, GSE에 의한 세포 보호효능이 AMPK 화학적 억제제인 compound C의 전처치에 의해서도 억제되지 않았다 (data not shown). 따라서, GSE는 AMPK의 활

성화가 아닌 다른 세포 내 신호분자의 활성화를 통하여 세포 보호효능을 가지는 것으로 생각된다.

Nrf2는 주요 항산화 효소들의 전사를 촉진하는 상위 신호분자로 세포 내 산화적 스트레스를 조절하는 중요 전사인자로 알려져 있다^{5,9)}. 정상 상태에서 Nrf2는 세포질에 Keap1 단백질과 결합되어 ubiquitin proteasome system에 의해 분해된다. 세포에 유발된 산화적 스트레스는 Keap1으로부터 Nrf2를 해리시키고, 세포질에 존재하던 Nrf2가 핵으로 이동하여 표적유전자 프로모터 내 ARE에 결합하여 항산화 관련 유전자의 전사를 활성화시킨다⁹⁾. 본 연구에서는 GSE에 의한 Nrf2의 핵 내 축적의 증가, ARE 리포터 유전자의 활성화 및 대표 표적유전자인 sestrin-2의 유도를 통해 GSE에 의한 Nrf2의 활성 증가를 확인할 수 있었다. 특히 본 연구에서 확인한 sestrin-2는 Nrf2에 의해 발현이 증가하는 대표적인 표적 유전자로서, 세포 내 항산화능을 증가시키는 데 중요한 역할을 담당한다⁸⁾. 이와 더불어 sestrin-2는 대식세포에서 lipopolysaccharide에 의해 증가하는 활성산소의 생성 억제를 통하여 염증매개인의 유리를 억제하고³⁰⁾, 간조직 내 지방 생합성을 억제³¹⁾하는 등 간조직에서 다양한 보호기능을 갖는 단백질로 보고되고 있다.

Nrf2의 활성화 과정은 산화적 스트레스에 의한 직접적인 Nrf2/Keap1 복합체 변형을 통한 Nrf2의 유리, protein kinase C, p38 mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase, 또는 phosphatidylinositol 3-kinase 등에 의한 Nrf2 인산화가 관여하는 것으로 보고되었다³²⁻³⁴⁾. 이상의 결과를 바탕으로 皂角刺의 Nrf2 활성화에 관여하는 상위 신호분자의 규명에 대한 후속 연구와 더불어 *in vivo* 모델에서의 효능 및 기전이 확보된다면, 급만성 간질환 관련 후보소재로서 皂角刺를 활용할 수 있을 것으로 기대한다.

결론

본 연구에서는 皂角刺 열수 추출물 (GSE)이 HepG2 세포에서 AA + iron의 병용처치로 유도된 산화적 스트레스에 대한 세포 보호효과를 연구하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. GSE는 HepG2 세포에서 AA + iron 자극에 의한 세포 독성을 농도 의존적으로 억제하였고, 이 과정에서 세포자멸사 관련 단백질의 변화를 억제하였다.
2. GSE는 HepG2 세포에서 AA + iron 자극에 의한 ROS 축적, GSH 고갈, 미토콘드리아 막 전위 저하를 억제하였다.
3. GSE는 농도 의존적으로 Nrf2의 핵 내 축적을 증가시켰고, ARE 결합을 통한 Nrf2의 전사 활성화와 표적유전자인 sestrin-2의 발현을 증가시켰다.

감사의 글

본 연구는 2014년도 한국연구재단의 연구개발비 (Grant No.

2012R1A5A2A42671316) 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. Arias I, Wolkoff A, Boyer J, Shafritz D, Fausto N, Alter H, Cohen D. The Liver: Biology and Pathobiology. 5th ed. Chichester : John Wiley & Sons Ltd, 2009 : 3-15.
2. Statistics Korea. Annual report on the cause of death statistics. Korean Statistical Information Service, 2013[cited 2015 Jun 17]. Available from : URL : <http://kosis.kr/>
3. Park SH, Jeon WK, Kim SH, Kim HJ, Park DI, Cho YK, Sung IK, Sohn CI, Keum DK, Kim BI. Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease among Korean adults. *J Gastroenterol Hepatol*. 2006 ; 21(1 Pt 1) : 138-43.
4. Raymond JMN, John de V, Mannfred AH. Toxicology: Principle and Application. 1st ed. Boca Raton, Florida : CRC press Inc, 1996 : 702-23.
5. Cichoż-Lach H, Michalak A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World J Gastroenterol*. 2014 ; 20(25) : 8082-91.
6. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. *Free Radic Biol Med*. 2010 ; 49(11) : 1603-16.
7. Tang W, Jiang YF, Ponnusamy M, Diallo M. Role of Nrf2 in chronic liver disease. *World J Gastroenterol*. 2014 ; 20(36) : 13079-87.
8. Shin BY, Jin SH, Cho IJ, Ki SH. Nrf2-ARE pathway regulates induction of Sestrin-2 expression. *Free Radic Biol Med*. 2012 ; 53(4) : 834-41.
9. Kaspar JW, Niture SK, Jaiswal AK. Nrf2:INrf2 (Keap1) signaling in oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2009 ; 47(9) : 1304-9.
10. Reuland DJ, Khademi S, Castle CJ, Irwin DC, McCord JM, Miller BF, Hamilton KL. Upregulation of phase II enzymes through phytochemical activation of Nrf2 protects cardiomyocytes against oxidant stress. *Free Radic Biol Med*. 2013 ; 56 : 102-11.
11. Scapagnini G, Vasto S, Abraham NG, Caruso C, Zella D, Galvano F. Modulation of Nrf2/ARE Pathway by Food Polyphenols: A Nutritional Neuroprotective Strategy for Cognitive and Neurodegenerative Disorders. *Mol Neurobiol*. 2011 ; 44(2) : 192-201.
12. Meakin PJ, Chowdhry S, Sharma RS, Ashford FB, Walsh SV, McCrimmon RJ, Dinkova-Kostova AT, Dillon JF, Hayes JD, Ashford ML. Susceptibility of Nrf2-null mice to steatohepatitis and cirrhosis upon consumption of a high-fat diet is associated with oxidative stress, perturbation of the unfolded protein response, and disturbance in the expression of metabolic enzymes but not with insulin resistance. *Mol Cell Biol*. 2014 ; 34(17) : 3305-20.
13. Dong GZ, Jang EJ, Kang SH, Cho IJ, Park SD, Kim SC, Kim YW. Red ginseng abrogates oxidative stress via mitochondria protection mediated by LKB1-AMPK pathway. *BMC Complement Altern Med*. 2013 ; 13 : 64.
14. Dong GZ, Lee JH, Ki SH, Yang JH, Cho IJ, Kang SH, Zhao RJ, Kim SC, Kim YW. AMPK activation by isorhamnetin protects hepatocytes against oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Eur J Pharmacol*. 2014 ; 740 : 634-40.
15. Jung EH, Kim SC, Cho IJ, Kim YW. Akebiae Caulis Inhibits Oxidative Stress through AMPK Activation. *J Physiol Pathol Korean Med*. 2015 ; 29(1) : 18-26.
16. Professors of herbology in colleges of Korean medicine. *Herbology*. Seoul : Yeonglimsa, 2004 : 481-2.
17. Kim CM, Shin MG, An DG, Lee KS. Unabridged Dictionary of Chinese Medication. Seoul : Jungdam, 1998 : 4940-42.
18. Yi JM, Park JS, Oh SM, Lee J, Kim J, Oh DS, Bang OS, Kim NS. Ethanol extract of *Gleditsia sinensis* thorn suppresses angiogenesis *in vitro* and *in vivo*. *BMC Complement Altern Med*. 2012 ; 12 : 243.
19. Lee SJ, Cho YH, Kim H, Park K, Park SK, Ha SD, Kim WJ, Moon SK. Inhibitory effects of the ethanol extract of *Gleditsia sinensis* thorns on human colon cancer HCT116 cells *in vitro* and *in vivo*. *Oncol Rep*. 2009 ; 22(6) : 1505-12.
20. Lee SJ, Park K, Ha SD, Kim WJ, Moon SK. *Gleditsia sinensis* thorn extract inhibits human colon cancer cells: the role of ERK1/2, G2/M-phase cell cycle arrest and p53 expression. *Phytother Res*. 2010 ; 24(12) : 1870-6.
21. Lee SJ, Ryu DH, Jang LC, Cho SC, Kim WJ, Moon SK. Suppressive effects of an ethanol extract of *Gleditsia sinensis* thorns on human SNU-5 gastric cancer cells. *Oncol Rep*. 2013 ; 29(4) : 1609-16.
22. Ha HH, Park SY, Ko WS, Kim Y. *Gleditsia sinensis* thorns inhibit the production of NO through NF-kappaB suppression in LPS-stimulated macrophages. *J Ethnopharmacol*. 2008 ; 118(3) : 429-34.
23. Hwang YJ, Wi HR, Kim HR, Park KW, Hwang KA, Pinus densiflora Sieb. et Zucc. alleviates lipogenesis and oxidative stress during oleic acid-induced steatosis in HepG2 cells. *Nutrients*. 2014 ; 6(7) :

- 2956-72.
24. Siddiqui MA, Ahmad J, Farshori NN, Saquib Q, Jahan S, Kashyap MP, Ahamed M, Musarrat J, Al-Khedhairy AA. Rotenone-induced oxidative stress and apoptosis in human liver HepG2 cells. *Mol Cell Biochem*. 2013 ; 384(1-2) : 59-69.
 25. Shin SM, Kim SG. Inhibition of arachidonic acid and iron-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis by oltipraz and novel 1,2-dithiole-3-thione congeners. *Mol Pharmacol*. 2009 ; 75(1) : 242-53.
 26. Balboa MA, Balsinde J. Oxidative stress and arachidonic acid mobilization. *Biochim Biophys Acta*. 2006 ; 1761(4) : 385-91.
 27. Galaris D, Pantopoulos K. Oxidative stress and iron homeostasis: mechanistic and health aspects. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2008 ; 45(1) : 1-23.
 28. Chen Y, Dong H, Thompson DC, Shertzer HG, Nebert DW, Vasiliou V. Glutathione defense mechanism in liver injury: insights from animal models. *Food Chem Toxicol*. 2013 ; 60 : 38-44.
 29. Ribas V, García-Ruiz C, Fernández-Checa JC. Glutathione and mitochondria. *Front Pharmacol*. 2014 ; 5 : 151.
 30. Yang JH, Kim KM, Kim MG, Seo KH, Han JY, Ka SO, Park BH, Shin SM, Ku SK, Cho IJ, Ki SH. Role of sestrin2 in the regulation of proinflammatory signaling in macrophages. *Free Radic Biol Med*. 2015 ; 78 : 156-67.
 31. Jin SH, Yang JH, Shin BY, Seo K, Shin SM, Cho IJ, Ki SH. Resveratrol inhibits LXR α -dependent hepatic lipogenesis through novel antioxidant Sestrin2 gene induction. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2013 ; 271(1) : 95-105.
 32. Huang HC, Nguyen T, Pickett CB. Phosphorylation of Nrf2 at Ser-40 by protein kinase C regulates antioxidant response element-mediated transcription. *J Biol Chem*. 2002 ; 277(45) : 42769-74.
 33. Zipper LM, Mulcahy RT. Erk activation is required for Nrf2 nuclear localization during pyrrolidine dithiocarbamate induction of glutamate cysteine ligase modulatory gene expression in HepG2 cells. *Toxicol Sci*. 2003 ; 73(1) : 124-34.
 34. Kang KW, Lee SJ, Park JW, Kim SG. Phosphatidylinositol 3-kinase regulates nuclear translocation of NF-E2-related factor 2 through actin rearrangement in response to oxidative stress. *Mol Pharmacol*. 2002 ; 62(5) : 1001-10.