



Original Article / 원저

## HepG2 세포에서 까마귀쪽나무 과육 열수 추출물의 소포체 스트레스 억제 효능

김은옥<sup>1</sup>, 제갈경환<sup>1,2</sup>, 김재광<sup>1</sup>, 이주상<sup>3</sup>, 박정아<sup>1</sup>, 김상찬<sup>1</sup>, 조일제<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>대구한의대학교 한의과대학, <sup>2</sup>서울대학교 약학대학, <sup>3</sup>제주한의학연구원

### Inhibitory Effects of *Litsea japonica* Flesh Water Extract against Endoplasmic Reticulum Stress in HepG2 Cells

Eun Ok Kim<sup>1</sup>, Kyung Hwan Jegal<sup>1,2</sup>, Jae Kwang Kim<sup>1</sup>, Ju Sang Lee<sup>3</sup>, Chung A Park<sup>1</sup>, Sang Chan Kim<sup>1</sup>, Il Je Cho<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>College of Korean Medicine, Daegu Haany University

<sup>2</sup>College of Pharmacy, Seoul National University

<sup>3</sup>Jeju institute of Korean Medicine

#### ABSTRACT

**Objectives** : Endoplasmic reticulum (ER) stress designates cellular responses to the accumulation of misfolded and unfolded proteins in ER, which is related to a variety of liver diseases. Present study investigated the inhibitory effects of *Litsea japonica* flesh water extract (LJE) against ER stress.

**Methods** : After HepG2 cells were pretreated with LJE and subsequently exposed to tunicamycin (Tm) or thapsigargin (Tg), expression of C/EBP homologous protein (CHOP), glucose regulated protein 78 kDa (GRP78), asparagine synthetase (ASNS), and endoplasmic reticulum DnaJ homologue 4 (ERDJ4) were determined by immunoblot and real-time PCR analysis. Three canonical signaling pathways in response to ER stress were examined to explore molecular mechanisms involved.

**Results** : Pretreatment of 1 mg/mL LJE inhibited Tm- or Tg-induced CHOP expression, while *L. japonica* fruit water extract did not. In addition, LJE decreased the levels of GRP78, ASNS, and ERDJ4 mRNA by Tm. Moreover, phosphorylations of eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$  and inositol-requiring enzyme 1, expression of nuclear form of activating transcription factor 6 $\alpha$ , and transactivation of ER stress response element- and unfolded protein response element-harboring luciferase activities were inhibited by LJE pretreatment.

**Conclusions** : Present results suggest that LJE would be a candidate to prevent or treat ER stress-mediated liver injuries.

**Key words** : Endoplasmic reticulum (ER) stress, HepG2 cells, *Litsea japonica* flesh water extract (LJE), Tunicamycin (Tm), Unfolded protein response (UPR).

## I. 서론

소포체 (endoplasmic reticulum, ER)는 진핵세포에서 단백질의 성숙, 단백질의 분비 및 지질 대사에 있어 핵심적인 기능을 담당하는 세포 내 소기관으로 소포체 항상성의 파괴는 다양한 인체 질환의 발생과 밀접한 연관이 있다<sup>1)</sup>. 소포체 내 Ca<sup>2+</sup> 또는 ATP의 고갈, 지단백질과 바이러스 유래 단백질의 과잉 생성, 불완전한 접합과 수식을 가진 비정상 단백질들의 축적, proteasome 매개 단백질 분해 반응의 교란 등은 unfolded protein response (UPR)으로써 소포체 스트레스를 유발한다. 소포체 스트레스는 세포 내에서 inositol-requiring enzyme 1 (IRE1)의 인산화를 통하여 splicing된 X box protein 1 (sXBP1)의 발현을 증가시킨다. 또한 protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (PERK)의 인산화를 통해 eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ )의 인산화를 증가시켜 단백질 번역을 감소시키고 activating transcription factor 4 (ATF4)의 발현을 증가시킨다. 더불어 소포체 스트레스는 소포체 내 chaperone인 glucose-regulated protein 78 kDa (GRP78)과 결합되어 있던 ATF6를 유리하여 골지체로 이동시키고, 골지체 내 site-1/2 protease에 의해 ATF6의 세포질 영역을 분해하여 활성형 ATF6가 핵으로 이동한다<sup>2)</sup>. 적절한 수준의 소포체 스트레스는 세포의 적응반응으로서 단백질 번역 과정을 억제하고, 자가포식 작용과 소포체 의존적 단백질 분해를

활성화시키며, chaperone 단백질들의 발현을 증가시켜 세포 내 비정상적으로 축적된 단백질들을 제거하는 과정을 활성화시키나, 과도하고 지속적인 소포체 스트레스는 궁극적으로 세포자멸사를 유도하여 조직 손상을 유발할 수 있다<sup>1-3)</sup>.

다양한 혈장 단백질과 저밀도 지단백 복합체의 생성과 분비를 담당하는 간실질세포 (hepatocyte)는 다른 세포들과 비교하여 소포체가 발달되어 있는 세포 중 하나이다. 따라서, 간실질세포에서의 조절되지 못한 소포체 스트레스는 다양한 급만성 간질환의 발병 과정의 중요한 요인으로 간주되어 왔다<sup>2)</sup>. 특히, methionine/choline 결핍 식이로 유도한 지방간염<sup>4)</sup>, acetaminophen 유도성 급성 간손상<sup>5)</sup>, carbon tetrachloride 유도성 간섬유화<sup>6)</sup>, diethylnitrosamine 유도성 간암<sup>7)</sup> 동물 모델에서 소포체 스트레스의 제어가 간손상을 억제할 수 있음이 보고되었다. 그럼에도 불구하고 소포체 스트레스를 제어하여 급만성 간질환을 치료할 수 있는 천연 유래 소재의 발굴과 관련된 연구는 상대적으로 부족하였다.

까마귀쪽나무 (*Litsea japonica* (Thunb.) Juss.)는 녹나무과 (*Lauraceae*) 까마귀쪽나무속의 상록 소교목으로 우리나라의 제주도를 포함한 남부지역에 자생하고 가마귀쪽나무 혹은 구릅비나무로 불리운다. 특히 까마귀쪽나무의 열매는 핵과로 타원형이며 8-9월 말경에 검은 자주색으로 익으며 식용이 가능하다고 보고되었으나, 《神農本草經》, 《中藥大辭典》, 《鄉藥集成方》, 《本草綱目》에 수재된 약용소재는 아니다.

\*Corresponding author: Il Je Cho, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 1, Hanuida-ro, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, 38610, Republic of Korea.

Tel : +82-53-819-1295, Fax : +82-53-819-1860, E-mail : skek023@dhu.ac.kr

• Received : September 21, 2018 / Revised : October 2, 2018 / Accepted : October 17, 2018



그럼에도 불구하고 최근 까마귀쪽나무 열매에 대한 다양한 약리 활성에 대한 연구가 활발히 진행되어 골관절염 및 위염 동물모델을 중심으로 염증 억제와 통증의 완화에 효능이 있음이 규명되었다<sup>8-11)</sup>. 그러나 급만성 간질환을 포함한 다른 질환에서 까마귀쪽나무 열매의 효능과 관련된 연구는 상대적으로 부족한 실정이다. 한의학에서 열매를 약용부위로 삼는 본초들의 경우 종종 열매 전체 (예, 白芫慈, 砂仁, 草果, 吴茱萸, 枳實 등), 종자 (예, 桃仁, 巴豆, 杏仁, 檳榔子 등) 또는 과육 (예, 烏梅, 山茱萸 등)을 구분하여 이용한다. 따라서 본 연구에서는 까마귀쪽나무 열매를 급만성 간질환 치료 및 예방의 신규 약용소재로써 활용 가능성을 제고하기 위한 한의학적 접근법으로써 과육 열수 추출물과 종자를 포함하는 열매 열수 추출물을 각각 구분하여 제조한 후 세포 수준에서의 소포체 스트레스에 대한 까마귀쪽나무 열매의 효능 및 기전을 연구하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 까마귀쪽나무 열매 및 과육 열수 추출물의 제조

까마귀쪽나무 열매는 제주한의학연구원으로부터 검증받은 시료를 분양 받았으며, 과육을 얻기 위해 씨앗을 제거하였다. 까마귀쪽나무 열매 전체 또는 과육 각 100 g을 물 1 L에 넣어 3시간 동안 가열하여 얻은 추출액을 Whatman No.2 filter (Nalgene, New York, USA)로 여과한 후 동결건조 (Labcono, Kansas, MO, USA)하여 까마귀쪽나무 열매 열수 추출물 (*L. japonica* fruit water extract, LJfE)과 까마귀쪽나무 과육 열수 추출물 (*L. japonica* flesh water extract, LJE)을 제조하였다. LJfE와 LJE의 최종 수율은 각각 8.64와 19.73%였으며, 멸균 증류수에 0.1 g/mL의 농도로 용해하여 실험에 사용하였다.

### 2. 시약

Anti-C/EBP homologous protein (CHOP), anti-phosphorylated eIF2 $\alpha$  (Ser51), anti-eIF2 $\alpha$ , anti-IRE1 $\alpha$  항체와 horseradish peroxidase가 결합된 2차 항체는 Cell Signaling Technology (Danver, MA, USA)에서 구입하였다. Anti-ATF6 $\alpha$ , anti-phosphorylated IRE1 (Ser724) 항체는 Abcam (Cambridge, UK)에서 구입하였다. Tunicamycin (Tm), thapsigargin (Tg),

anti- $\beta$ -actin 항체와 기타 분석용 시약은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

### 3. 세포 배양 및 약물 처치

HepG2 세포는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 구입하였으며, 10% fetal bovine serum, 100 units/mL penicillin, 100  $\mu$ g/mL streptomycin을 포함한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양하여 실험목적에 맞는 multi-well plate 바닥 면적의 80-90% 정도 성장시킨 후 실험에 이용하였다. 12시간 정도 serum이 포함되지 않은 DMEM에서 성장을 정지시킨 HepG2 세포는 0.1-1 mg/mL의 LJE를 1시간 전처치한 후, 3  $\mu$ g/mL의 Tm 또는 100 nM의 Tg를 9-12시간 동안 처치하였다.

### 4. 전세포 단백질 추출액 제조 및 면역화학 분석

전세포 단백질 추출액 (whole cell lysate)의 제조와 면역화학 분석 (immunoblot analysis)는 기확립된 방법에 따라 수행하였다<sup>3)</sup>. 간략하게 처치가 완료된 세포를 1 mM sodium fluoride, 1 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 1 mM sodium orthovanadate, 2.5 mM sodium pyrophosphate와 Xpert protease inhibitor cocktail (GenDEPOT, Barker, TX, USA)을 포함한 radioimmunoprecipitation buffer를 첨가하여 4°C에서 40분간 용해시킨 후, 15,000  $\times$ g에서 15분간 원심분리하여 상층액을 취하여 전세포 단백질 추출액으로 이용하였으며, bicinchoninic acid assay (Thermo, Rockford, IL, USA)로 추출액 내 단백질 농도를 정량하였다. 동량의 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 하에서 전기영동한 후, polyvinylidene fluoride membrane으로 전이시켰다. 항체와 반응한 단백질은 enhanced chemiluminescence detection kit (GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire, UK)와 Imager 600 (GE Healthcare Life Sciences)으로 검출하였다. 표적단백질들의 상대적인 발현량은 Image J software (<http://rsb.info.nih.gov/ij>)를 이용하여  $\beta$ -actin 발현량으로 보정하여 계산하였다.

### 5. Total RNA의 분리, cDNA 합성 및 real-time polymerase chain reaction (PCR) 분석

처치가 완료된 세포로부터 total RNA는 Tri-Solution

(Bioscience Technology, Daegu, Korea)을 이용하여 제조사의 표준방법에 따라 분리하였다. 분리된 total RNA (2 µg), oligo(dT)<sub>16</sub> primer, accupower RT premix (Bioneer, Daejeon, Korea)와 thermal cycler (Nexus GSX1, Eppendorf, Hamburg, Germany)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. Real-time PCR 분석은 SyBr green premix (TaKaRa Biotech, Shiga, Japan)와 유전자 특이적 primer를 이용하여 CFX-96 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)에서 수행한 후 표적 유전자들의 상대적인 발현량은 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase를 reference gene으로 이용하여 2<sup>-ΔΔCT</sup> 방법으로 계산하였다<sup>12)</sup>. 반응된 PCR 산물의 특이성은 melting curve 분석을 통해 확인하였다. Bioneer에서 각 유전자 특이적 primer를 합성하였으며 염기서열 정보 및 증폭된 산물의 크기는 다음과 같다. Human CHOP (hCHOP), forward 5'-GCACCTCCCAGAGCCCTCACTCTCC-3', backward 5'-GTCTACTCCAAGCTTCCCCCTGG-3', size 422 bp; human GRP78, forward 5'-TGCTTGATGTATGCCCCITA-3', backward 5'-CCTTGTCTTCAGCTGTCAC-3', size 303 bp; human asparagine synthetase (hASNS), forward 5'-AGGTTGATGATGCAATGATGG-3', backward 5'-TCCCCTATCTACCCACAGTCC-3', size 283 bp; human endoplasmic reticulum DnaJ homologue 4 (hERDJ4), forward 5'-AAAATAAGAGCCCGGATGCT-3', backward 5'-CGTTCTTGGATCCAGTGT-3', size 238 bp.

### 6. 리포터 유전자 분석

ER stress response element (ERSE)와 unfolded protein response element (UPRE)를 포함한 리포터 유전자 플라스미드 pGL3-Grp78-132-luc과 p5×ATF6GL3는 Dr. K. Mori (Kyoto University, Japan)으로부터 제공받았으며<sup>13,14)</sup>, pRL-SV는 Promega (Madison, WI, USA)에서 구입하였다. 12-well plate에 배양된 HepG2 세포에 FuGENE HD transfection reagent (Promega)를 이용하여 500 ng의 ERSE 리포터 유전자 플라스미드 (또는 UPRE 리포터 유전자 플라스미드)와 100 ng의 pRL-SV를 6시간 동안 형질도입하였다. 형질도입된 세포에 1 mg/mL의 LJE를 1시간 전처리한 후 3 µg/mL의 Tm을 12시간 처리하고, passive lysis buffer (Promega)를 이용하여 세포를 용해하였다. 세포 용해액 내의 luciferase 활성은 dual luciferase reporter assay system (Promega)을 이용하여 GloMax

20/20 Luminometer (Promega)로 측정하였다. 각 샘플별 firefly luciferase 활성은 *renilla* luciferase 활성으로 보정하여 상대적인 luciferase 활성을 계산하였다.

### 7. 통계분석

모든 실험결과는 3회 반복시행 후 mean ± standard deviation (S.D.)로 표기하였으며, 그룹간 통계적 유의성은 one way analysis of variance로 분석한 후, 등분산 가정의 결과에 따라 Tukey HSD test 또는 Dunnett T3 test로 사후 검정하였다. 모든 결과의 통계적 유의성은  $P < 0.05$  또는  $P < 0.01$ 을 기준으로 설정하였다.

## III. 실험 결과

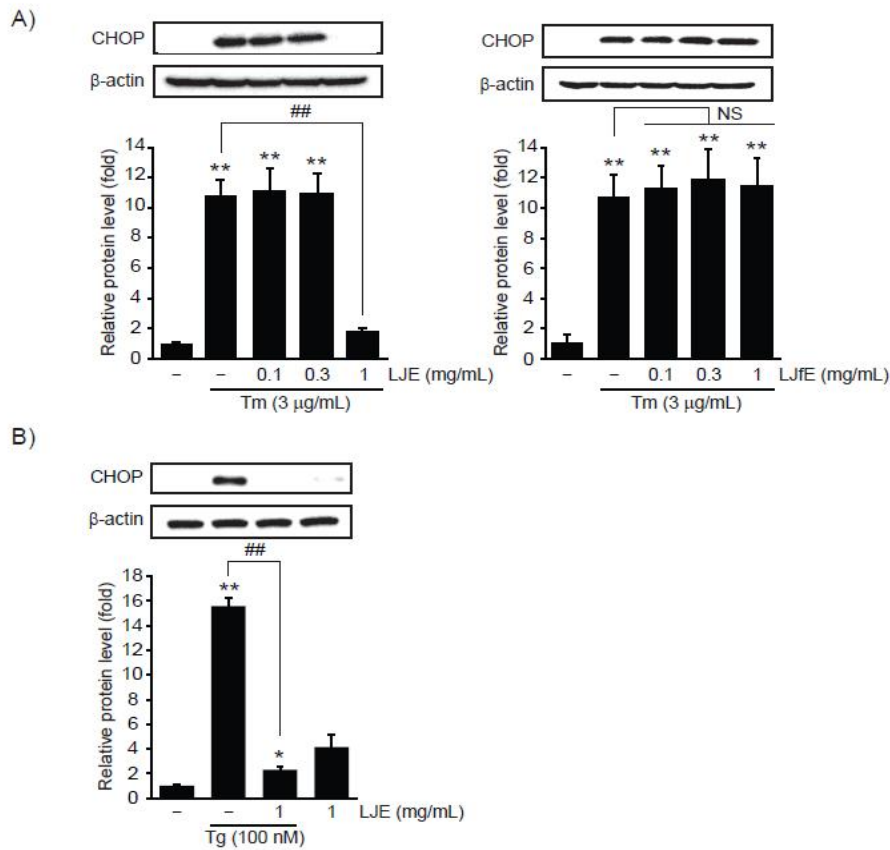
### 1. 까마귀쪽나무 과육 열수 추출물이 소포체 스트레스에 의해 유도된 CHOP 발현에 미치는 영향

Tm은 소포체 내의 단백질 당화 과정을 억제하고 Tg는 소포체 내 Ca<sup>2+</sup> 고갈을 통해 소포체 스트레스를 유도하는 대표적인 독성물질이다<sup>15)</sup>. 까마귀쪽나무 열매의 소포체 스트레스 제어 효능을 연구하기 위하여 0.1-1 mg/mL의 까마귀쪽나무 열매 열수 추출물 (LJFE)과 까마귀쪽나무 과육 열수 추출물 (LJE)을 전처리한 HepG2 세포에 3 µg/mL의 Tm을 9시간 동안 전처리하여 CHOP 단백질의 변화를 면역화학 분석으로 연구하였다. 선행 연구보고와 유사하게<sup>3)</sup>, HepG2 세포에 Tm 자극은 무처리 대조세포와 비교하여 통계적으로 유의하게 CHOP 단백질의 발현을 증가시켰다. 0.1-0.3 mg/mL의 LJE 전처리와 0.1-1 mg/mL의 LJFE 전처리는 Tm에 의하여 증가한 CHOP 단백질 발현을 변화시키지 못하였으나, 1 mg/mL LJE 전처리는 CHOP 단백질을 무처리 대조세포 수준으로 억제하였다. 무처리 대조세포, Tm 단독, Tm + 0.1 mg/mL LJE, Tm + 0.3 mg/mL LJE, Tm + 1 mg/mL LJE 처리에 의한 CHOP 단백질의 상대적인 발현은 각각 1.00 ± 0.25, 10.92 ± 1.08, 11.24 ± 1.48, 11.03 ± 1.38, 1.80 ± 0.32배였으며, 무처리 대조세포, Tm 단독, Tm + 0.1 mg/mL LJFE, Tm + 0.3 mg/mL LJFE, Tm + 1 mg/mL LJFE 처리에 의한 CHOP 단백질의 상대적인 발현은 각각 1.00 ± 0.35, 10.70 ± 1.54, 11.28 ± 1.50, 11.94 ± 1.98, 11.45 ± 1.82배였다.

(Figure 1A). 따라서 1.0 mg/mL의 LJE만이 Tm에 의한 CHOP 발현을 효과적으로 억제하였으므로, 이후 모든 실험은 1 mg/mL의 LJE를 이용하여 수행하였다.

다음으로 1 mg/mL LJE가 또 다른 소포체 스트레스 유도제인 Tg에 의하여 증가되는 CHOP 발현을 억제할 수 있는지 연구하기 위하여 1 mg/mL LJE가 전처리된 HepG2 세포에 100 nM의 Tg를 9시간 동안 처리하였다. 선행 연구보고와 유사하게<sup>3)</sup>, HepG2 세포에 Tg 자극은 통계적으로 유의하게 CHOP 단백질의 발현을 증가시켰으며 (무처리 대조세포 대비

15.57 ± 0.63배), 1 mg/mL의 LJE 전처치는 Tg에 의하여 증가된 CHOP 단백질 발현을 통계적으로 유의하게 억제하였다 (무처리 대조세포 대비 2.30 ± 0.25배). 1 mg/mL의 LJE 단독처치는 CHOP 단백질의 발현을 무처리 대조세포와 비교하여 증가시키는 경향을 나타내었으나 통계적으로 유의하지 않았다 (무처리 대조세포 대비 4.15 ± 0.94배)(Figure 1B). 따라서 이상의 결과는 1 mg/mL의 까마귀쭈나무 과육 열수 추출물만이 Tm 혹은 Tg에 의하여 유도되는 CHOP 단백질 발현을 억제할 수 있음을 나타낸다.



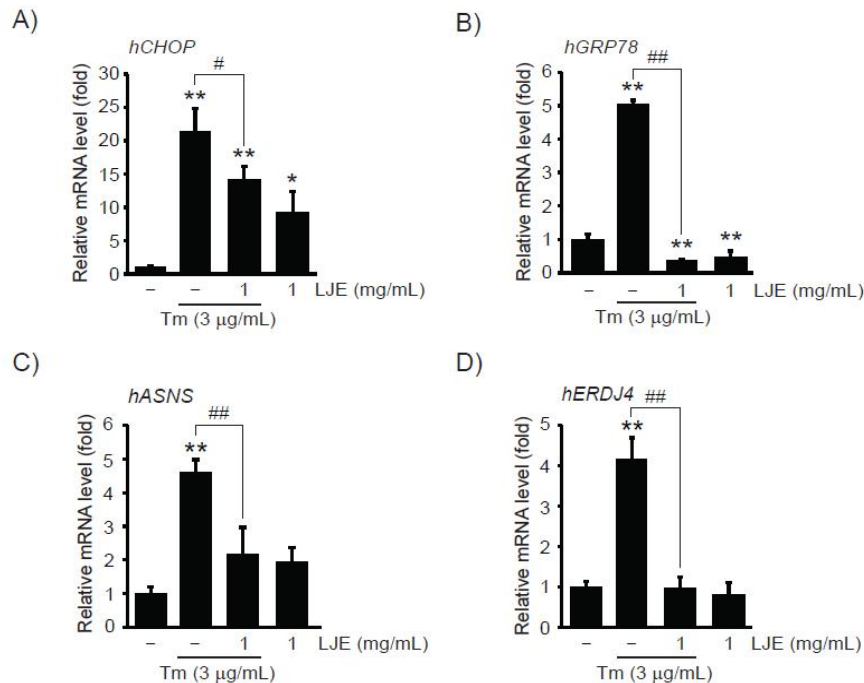
**Figure 1.** The effect of *L. japonica* water extract on ER stress-mediated CHOP expression. HepG2 cells were pretreated with 0.1–1 mg/mL of LJE or LJfE for 1 h. The cells were subsequently exposed to 3 µg/mL of Tm (A) or 100 nM of Tg (B) for 9 h. Levels of CHOP protein were determined by immunoblotting. Equal protein loadings were verified by β-actin immunoblotting. All data represent mean ± S.D. of three separated experiments; Significant vs control, \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ ; Significant vs Tm (or Tg), ## $P < 0.01$ ; LJE, *L. japonica* flesh water extract; LJfE, *L. japonica* fruit water extract; NS, not significant.

## 2. 까마귀쪽나무 과육 열수 추출물이 소포체 스트레스에 의해 유도되는 표적 유전자군 mRNA 전사에 미치는 영향.

1 mg/mL의 LJE에 의한 CHOP 단백질 발현 억제 가 전사 조절을 통하여 나타나는 결과인지 확인하기 위하여 CHOP mRNA를 real-time PCR 분석으로 연구하였다. HepG2 세포에 9시간 동안의 3 µg/mL의 Tm 자극은 CHOP mRNA를 무처리 대조세포 대비 21.38 ± 3.41배 증가시켰으나, 1 mg/mL의 LJE 전처치는 CHOP mRNA를 14.19 ± 2.00배로 통계적으로 유의하게 감소시켰다. 1 mg/mL의 LJE 단독처치에 의한 CHOP mRNA의 변화는 무처리 대조세포 대비 9.26 ± 3.15배로 무처리 대조세포와 비교하여 통계적으로 유의하였다 (Figure 2A).

세포에 소포체 스트레스 자극시 자극 정도에 따라 다양한 적응반응이 나타나며, 이 과정에 CHOP, GRP78, ASNS와 ERDJ4를 포함한 다양한 유전자들의 발현이 유도된다<sup>16,17</sup>. 따라서 1 mg/mL의 LJE가 CHOP 이외의 소포체 스트레스 유도성 표적 유전자군 mRNA의 전사를 조절할 수 있는지 연구하기 위하여

real-time PCR 분석을 수행하였다. CHOP mRNA의 발현 패턴과 유사하게 HepG2 세포에 9시간 동안의 Tm 자극은 GRP78, ASNS 및 ERDJ4 mRNA를 증가시켰으며, 1 mg/mL의 LJE 전처치는 Tm에 의하여 증가한 이들 유전자들의 mRNA를 통계적으로 유의하게 억제하였다. Tm 및 Tm + 1 mg/mL LJE 처치에 의한 GRP78 mRNA는 무처리 대조세포 대비 5.04 ± 0.11 및 0.38 ± 0.04배였으며, ASNS mRNA는 무처리 대조세포 대비 4.61 ± 0.37 및 2.16 ± 0.81배였으며, ERDJ4 mRNA는 무처리 대조세포 대비 4.17 ± 0.52 및 0.97 ± 0.27배였다. 1 mg/mL의 LJE 단독처치에 의한 CHOP mRNA의 변화는 무처리 대조세포 대비 각각 0.47 ± 0.18, 1.95 ± 0.43 및 0.81 ± 0.30배였으며, 이중 GRP78의 변화만이 무처리 대조세포와 비교하여 통계적으로 유의하였다 (Figure 2B-D). 따라서 이상의 결과는 1 mg/mL의 까마귀쪽나무 과육 열수 추출물이 전사 조절을 통해 Tm에 유도되는 다양한 표적 유전자군의 발현을 억제할 수 있음을 나타낸다.



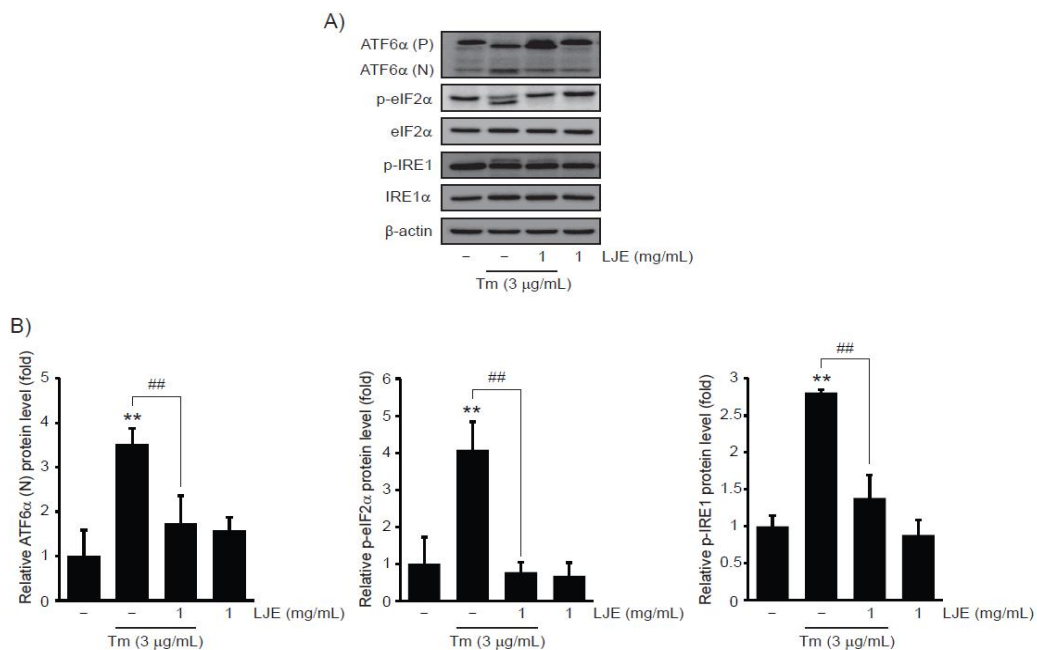
**Figure 2.** The effect of LJE on ER stress-dependent target genes expression. 1 mg/mL of LJE-pretreated HepG2 cells were exposed to 3 µg/mL of Tm for 9 h. mRNA levels of human CHOP (A), GRP78 (B), ASNS (C), and ERDJ4 (D) were quantified by real-time PCR analysis. All data represent mean ± S.D. of three separated experiments; Significant vs control, \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ ; Significant vs Tm, ## $P < 0.01$ , # $P < 0.05$ .

### 3. 까마귀쭈나무 과육 열수 추출물이 소포체 스트레스에 의해 유도되는 UPR 신호 분자의 활성화에 미치는 영향.

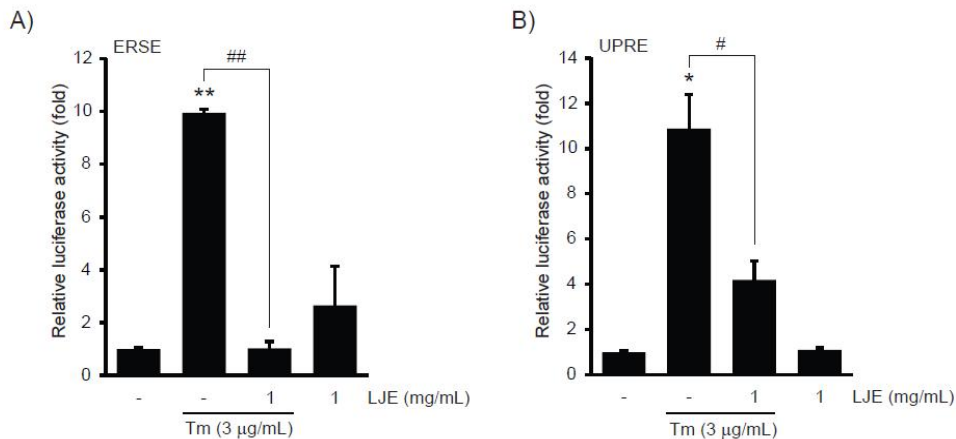
소포체 스트레스에 대한 LJE의 억제가 소포체 스트레스로 활성화되는 신호 전달 과정의 제어를 통하여 나타나는지 확인하기 위하여 LJE 전처치에 따른 UPR 신호 분자의 변화를 면역화학 분석으로 연구하였다. 9시간 동안 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 Tm 자극은 ATF6 $\alpha$ 의 가수분해를 촉진하여 활성형 ATF6 [ATF6 $\alpha$  (N)]의 발현을 증가시키고, eIF2 $\alpha$ 와 IRE1 단백질의 인산화를 증가시켰다. 그러나, 1 mg/mL의 LJE 전처치는 Tm에 의하여 증가한 활성형 ATF6의 발현과 eIF2 $\alpha$  및 IRE1의 인산화를 통계적으로 유의하게 억제하였으며, 1 mg/mL의 LJE 단독처치는 이들 신호 단백질들의 발현과 인산화를 변화시키지 못하였다 (Figure 3A). Tm, Tm + 1 mg/mL LJE 및 LJE 단독처치에 의한 활성형 ATF6의 발현은 무처치 대조세포와 비교하여 각각 3.53  $\pm$  0.35, 1.74  $\pm$  0.62 및 1.57  $\pm$  0.30 배였으며, eIF2 $\alpha$ 의 인산화는 각각 4.09  $\pm$  0.76, 0.78  $\pm$  0.26 및 0.67  $\pm$  0.35배였으며, IRE1의 인산화는 각각 2.81  $\pm$  0.04, 1.39  $\pm$  0.30 및 0.88  $\pm$  0.20배

였다 (Figure 3B).

LJE에 의한 UPR 신호 전달 과정의 제어가 궁극적으로 UPR에 의하여 활성화되는 전사인자들을 억제할 수 있는지 연구하기 위하여 HepG2 세포에 ERSE와 UPRE 영역을 포함하는 재조합 플라스미드를 형질도입한 후 리포터 유전자 분석을 수행하였다. 12시간 동안의 3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 Tm 자극은 ERSE와 UPRE가 결합된 luciferase 활성을 증가시켰으며, 1 mg/mL의 LJE 전처치는 Tm에 의하여 증가한 ERSE와 UPRE 매개 luciferase 활성을 통계적으로 유의하게 억제하였다. Tm, Tm + 1 mg/mL LJE 및 LJE 단독처치에 의한 ERSE 의존적 luciferase 활성은 무처치 대조세포와 비교하여 각각 9.95  $\pm$  0.13, 1.02  $\pm$  0.25 및 2.66  $\pm$  1.47배였으며 (Figure 4A), UPRE 의존적 luciferase 활성은 무처치 대조세포와 비교하여 각각 10.88  $\pm$  1.52, 4.19  $\pm$  0.85 및 1.10  $\pm$  0.09배였다 (Figure 4B). 따라서 이상의 결과는 1 mg/mL의 까마귀쭈나무 과육 열수 추출물이 Tm에 활성화되는 UPR 신호 분자 및 전사인자의 제어를 통해 소포체 스트레스를 억제할 수 있음을 나타낸다.



**Figure 3.** The effect of LJE on Tm-mediated UPR signaling pathway. (A) Immunoblot analysis for UPR signaling molecules was conducted from cell lysates that had been treated with LJE (1 mg/mL, 1 h) and Tm (3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 9 h). (B) Levels of nuclear form of ATF6 $\alpha$ , phosphorylated eIF2 $\alpha$ , and phosphorylated IRE1 were quantified by scanning densitometry. All data represent mean  $\pm$  S.D. of three separated experiments; Significant vs control, \*\* $P$  < 0.01; Significant vs Tm, ## $P$  < 0.01.



**Figure 4.** The effect of LJE on ERSE- and UPRE-luciferase activity by Tm. ERSE- (A) and UPRE-driven luciferase activities (B) were measured in cell lysates that had been treated with LJE (1 mg/mL, 1 h) and Tm (3 µg/mL, 12 h). All data represent mean ± S.D. of three separated experiments; Significant vs control, \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ ; Significant vs Tm, ## $P < 0.01$ , # $P < 0.05$ .

#### IV. 고찰

남궁 등(2015)은 Raw 264.7 세포에서 까마귀쪽나무 열매 추출물이 잎 추출물에 비하여 우수한 염증 억제 효능이 있음을 보고하여 전통적 식용 부위인 열매에 대한 다양한 활용 가능성을 제시하였다<sup>18)</sup>. Koo 등은 (2014) 까마귀쪽나무 열매 추출물이 말초성 통증 및 중추성 통증에 대한 진통 효능과 더불어 nuclear factor-κB, c-Jun N-terminal kinase, p38 mitogen-activated protein kinase의 인산화 억제를 통한 염증 억제 효능을 보고하였으며 진통 및 염증억제 효능에 추출물 중 지표성분인 hamabiwalactone A와 hamabiwalactone B의 역할을 제시하였다<sup>11)</sup>. 더불어 monosodium iodoacetate로 유도한 골관절염 실험동물 모델<sup>8)</sup>과 인도메타신 유도성 및 스트레스성 위염 실험동물 모델에서 까마귀쪽나무 열매 추출물의 억제 효능이 규명되었다<sup>9,10)</sup>. 또한 골관절염 환자를 대상으로 한 임상시험에서도 까마귀쪽나무 열매 추출물이 골관절염 환자의 통증 정도와 무릎 강직을 개선할 수 있음을 보고하였다<sup>9)</sup>. 본 연구그룹에서는 까마귀쪽나무 열매 추출물의 활용 분야를 확대하기 위한 예비 연구로써 간질세포주에서 *tert*-butylhydroperoxide로 유도한 산화적 스트레스에 대한 억제 효능을 확인하였으며 (data not shown), 이를 통해 까마귀쪽나

무 열매 추출물이 급만성 간질환에도 활용될 수 있는 가능성을 확인하였다.

CHOP이 유전적으로 결손된 실험동물에 담즙울혈 유도성 간손상<sup>20)</sup>, acetaminophen 유도성 간손상<sup>21)</sup> 및 galactosamine/lipopolysaccharide 유도성 염증성 간손상<sup>22)</sup> 유발시 간손상이 억제될 수 있음이 보고되어, CHOP이 간질세포 손상을 유도하는 과정에 관여하는 핵심 인자임이 규명되었다. 특히, 과도하고 지속적인 소포체 스트레스는 ATF4 의존적으로 CHOP의 발현을 증가시킬 뿐 아니라<sup>23)</sup>, IRE1/tumor necrosis factor receptor-associated factor 2/apoptosis signal regulating kinase 1/p38 mitogen-activated protein kinase 신호 전달 복합체의 활성화를 통하여 CHOP의 transactivation domain의 인산화를 촉진하여 활성화시키고<sup>24-26)</sup>, death receptor 5와 Bim을 포함한 세포자멸사 유도 단백질들의 발현을 증가시킨다<sup>27,28)</sup>. 따라서 본 연구에서는 소포체 스트레스에 대한 까마귀쪽나무 열매 추출물의 효과와 소포체 스트레스와 관련된 세포 내 신호 분자들의 변화를 연구하고자 우선적으로 CHOP 단백질의 발현 변화를 관찰하였다. HepG2 세포에서 다양한 농도의 까마귀쪽나무 과육 (LJE) 및 열매 열수 추출물 (LJfE)의 전처리 중 1 mg/mL의 과육 열수 추출물 (LJE) 전처리만이 특이적으로 Tm에 의하여 증가한 CHOP 발현을 억제하였다. 더불어 1 mg/mL의 LJE는 Tg에 의한 CHOP 단



백질의 증가 또한 통계적으로 유의하게 억제하였다. 이상의 결과는 까마귀쭈나무 열매의 과육에 특이적으로 소포체 스트레스를 억제할 수 있는 유효성분들이 함유되어 나타난 것으로 추정되며, 동일한 농도에서의 LJE는 씨앗 유래 성분들이 포함되어 상대적으로 과육 유래 유효성분들의 함량이 낮아 CHOP 발현을 억제하지 못하였을 것으로 생각된다. Tanaka 등 (1990)과 Takeda 등 (1972)은 까마귀쭈나무에 lactones, fatty acids, essential oils, alkaloids 및 terpenoids 등의 생리활성 성분을 포함하고 있음을 보고하였다<sup>29,30</sup>). 따라서 과육에 포함된 소포체 스트레스의 억제에 관여하는 유효성분들의 동정과 열매 및 과육 추출물 내의 이들 유효성분들의 함유량과 관련된 후속 연구가 지속적으로 필요할 것으로 사료된다.

GRP78은 소포체 내 존재하는 대표적인 molecular chaperone으로서 소포체 스트레스에 의하여 활성화된 ATF6 의존적으로 발현이 증가하며 소포체 내 변형된 단백질의 축적을 억제한다<sup>31</sup>). ERDJ4는 DnaJ protein family의 하나로서 소포체 스트레스에 의하여 XBP-1 의존적으로 발현이 증가하는 소포체 내 chaperone 분자이다<sup>32</sup>). ASNS는 소포체 스트레스 뿐만 아니라 아미노산 결핍에 의해 활성화되는 전사인자인 ATF4에 의존적으로 발현이 증가하여 신규 적응 단백질 합성에 요구되는 asparagine을 생합성하는데 관여한다<sup>23,33</sup>). 본 연구에서는 1 mg/mL LJE 전처치는 소포체 스트레스에 의하여 유도되는 CHOP mRNA 및 단백질 이외에 GRP78, ASNS와 ERDJ4 mRNA의 전사도 억제될 수 있음을 규명하였다. 따라서 이상의 결과는 LJE가 소포체 스트레스에 의하여 활성화되는 대표 신호 분자인 PERK, IRE1 및 ATF6 모두를 제어할 수 있는 가능성을 시사한다. 또한 소포체 스트레스 신호 분자들의 활성화를 면역화학 분석으로 관찰한 결과, 예측했던 바와 같이 1 mg/mL의 LJE 전처치는 Tm에 의한 PERK 의존적 eIF2α의 인산화, IRE1의 인산화 및 활성형 ATF6의 발현 증가를 억제할 수 있음을 확인하였다.

GRP78, GRP94, calreticulin의 프로모터 영역에서 동정된 ERSE (CCAAT-N<sub>9</sub>-CCACG)와 Herp의 프로모터 영역에서 동정된 ERSE-II (ATTGG-N-CCACG) 영역은 활성형 ATF6/sXBP-1 이형이합체 또는 sXBP-1 동형이합체와 결합할 수 있는 DNA 서열이다<sup>31,34,35</sup>). TGACGTGG/A의 공통 염기 서열을 가지는 UPRE는

주로 sXBP-1 동형이합체가 결합하여 전사를 조절하는 영역으로 동정되었다<sup>36</sup>). LJE에 의한 소포체 스트레스 의존적 신호 네트워크의 억제가 궁극적으로 전사인자들에 의한 전사활성화가 제어될 수 있는지 여부를 확인하기 위하여 ERSE 및 UPRE가 포함된 리포터 유전자 분석을 수행한 결과, Tm에 의하여 증가된 ERSE 및 UPRE 리포터 유전자 활성이 LJE 전처치에 의하여 억제될 수 있음을 규명하였다. 이상의 결과는 LJE는 소포체 스트레스에 의하여 활성화되는 신호 분자의 활성, 전사인자의 활성화 및 표적 유전자군의 전사 제어를 통해 소포체 스트레스를 억제할 수 있음을 나타낸다.

LJE 단독처치시 CHOP과 GRP78의 mRNA를 무처리 대조세포와 비교하여 통계적으로 유의하게 변화시켰다. 그러나, LJE 단독처치는 ASNS과 ERDJ4 mRNA, 소포체 스트레스 유도성 신호 분자들(ATF6, eIF2α 및 IRE1)의 활성, ERSE 및 UPRE 의존적 리포터 유전자 활성은 변화시키지 못하였다. 이와 같은 결과는 연구 방법의 민감도에 따른 차이 또는 다른 신호 분자의 활성화를 통하여 LJE가 선택적으로 CHOP 및 GRP78의 전사를 조절한 것으로 생각되며 이에 대한 후속 연구가 필요할 것으로 판단된다.

본 연구에서는 까마귀쭈나무 과육 열수 추출물이 세포 수준에서 소포체 스트레스에 대한 억제 효능이 있음을 규명하여, 급만성 간질환 치료 및 예방의 신규 약용소재로써 까마귀쭈나무 과육의 활용 가능성을 제시하였다. 이상의 연구와 더불어 까마귀쭈나무 과육 열수 추출물에 함유된 지표(효능)성분 연구, 까마귀쭈나무 과육 열수 추출물에 의한 소포체 스트레스 신호 분자들의 제어와 관련된 상위 신호 분자 연구, 동물 수준에서의 효능 및 안전성과 관련된 연구가 지속적으로 이루어진다면 급만성 간질환의 예방 또는 치료를 위한 처방에 까마귀쭈나무 과육을 추가하여 구성하거나, 처방을 구성하는 일부 약제를 대체할 수 있는 의약소재로써 까마귀쭈나무 과육을 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

## V. 결론

HepG2 세포에서 소포체 스트레스에 대한 까마귀쭈나무 과육 열수 추출물 (LJE) 및 열매 열수 추출물 (LJF)의 *in vitro* 효능 연구를 통하여 다음과 같은

결론을 얻었다.

1. LJfE의 전처치는 Tm에 의하여 유도된 CHOP의 발현을 억제하지 못하였으나, LJE (1 mg/mL)의 전처치는 Tg 및 Tm에 의하여 유도된 CHOP 단백질 발현을 억제하였다.
2. LJE 전처치는 Tm에 의하여 유도되는 CHOP, GRP78, ASNS, ERDJ4 mRNA의 전사를 억제하였다.
3. LJE 전처치는 Tm에 의하여 유도되는 활성형 ATF6의 발현, eIF2 $\alpha$ 와 IRE1의 인산화를 억제하였다.
4. LJE 전처치는 Tm에 의하여 유도되는 ERSE 및 UPR<sub>E</sub> 의존적 리포터 유전자 활성을 억제하였다.

### 감사의 글

본 연구는 2017년도 과학기술정보통신부/한국연구재단 (Grant No. 2015R1D1A1A01060284, 2018R1A5A2025272)의 연구개발비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### References

1. Wang S, Kaufman RJ. The impact of the unfolded protein response on human disease. *J Cell Biol.* 2012;197(7):857-67.
2. Dara L, Ji C, Kaplowitz N. The contribution of endoplasmic reticulum stress to liver diseases. *Hepatology.* 2011;53(5):1752-63.
3. Jegal KH, Park SM, Cho SS, Byun SH, Ku SK, Kim SC, et al. Activating transcription factor 6-dependent sestrin 2 induction ameliorates ER stress-mediated liver injury. *Biochim Biophys Acta.* 2017;1864(7):1295-307.
4. Cho EJ, Yoon JH, Kwak MS, Jang ES, Lee JH, Yu SJ, et al. Tauroursodeoxycholic acid attenuates progression of steatohepatitis in mice fed a methionine-choline-deficient diet. *Dig Dis Sci.* 2014;59(7):1461-74.
5. Kusama H, Kon K, Ikejima K, Arai K, Aoyama T, Uchiyama A, et al. Sodium 4-phenylbutyric acid prevents murine acetaminophen hepatotoxicity by minimizing endoplasmic reticulum stress. *J Gastroenterol.* 2017;52(5):611-22.
6. Wang JQ, Chen X, Zhang C, Tao L, Zhang ZH, Liu XQ, et al. Phenylbutyric acid protects against carbon tetrachloride-induced hepatic fibrogenesis in mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013;266(2):307-16.
7. Vandewynckel YP, Laukens D, Devisscher L, Paridaens A, Bogaerts E, Verhelst X, et al. Tauroursodeoxycholic acid dampens oncogenic apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress during hepatocarcinogen exposure. *Oncotarget.* 2015;6(29):28011-25.
8. Yoon WJ, Song SM, Ham YM, Oh DJ, Ko CS, Yoon SA, et al. Anti-osteoarthritis effects on fruit extract of *Litsea japonica*. *Korean J Plant Res.* 2015;28(5):591-9.
9. Park SH, Pakr IJ, Yun JH, Choi GH, Kim HJ, Seo YH, et al. Protective effect of *Litsea japonica* fruit flesh extract on indomethacin-induced gastritis in rats. *Korean J Food Preserv.* 2017;24(7):1017-24.
10. Park IJ, Park SH, Yun JH, Choi GH, Kim HJ, Seo YH, et al. Protective effect of *Litsea japonica* fruit flesh extract on stress-induced gastritis in rats. *J Food Hyg Saf.* 2017;32(6):536-41.
11. Koo HJ, Yoon WJ, Sohn EH, Ham YM, Jang SA, Kwon JE, et al. The analgesic and anti-inflammatory effects of *Litsea japonica* fruit are mediated via suppression of NF- $\kappa$ B and JNK/p38 MAPK activation. *Int Immunopharmacol.* 2014;22(1):84-97.
12. Livak KJ, Schmittgen T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods.* 2001; 25(4):402-8.
13. Wang Y, Shen J, Arenzana N, Tirasophon W, Kaufman RJ, Prywes R. Activation of ATF6 and an ATF6 DNA binding site by the endoplasmic reticulum stress response. *J Biol Chem.* 2000; 275(35):27013-20.



14. Calfon M, Zeng H, Urano F, Till JH, Hubbard SR, Hardig HP, et al. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature*. 2002; 415(6867):92-6.
15. Foufelle F, Fromenty B. Role of endoplasmic reticulum stress in drug-induced toxicity. *Pharmacol Res Perspect*. 2016;4(1):e00211.
16. Fusakio ME, Willy JA, Wang Y, Mirek ET, Al Baghdadi RJ, Adams CM, et al. Transcription factor ATF4 directs basal and stress-induced gene expression in the unfolded protein response and cholesterol metabolism in the liver. *Mol Biol Cell*. 2016;27(9):1536-51.
17. Agouni A, Mody N, Owen C, Czopek A, Zimmer D, Bentires-Alj M, et al. Liver-specific deletion of protein tyrosine phosphatase (PTP) 1B improves obesity- and pharmacologically induced endoplasmic reticulum stress. *Biochem J*. 2011;438(2):369-78.
18. Namkoong S, Jang SA, Sohn EH, Bak JP, Sohn ES, Koo HJ, et al. Comparative study of *Litsea japonica* leaf and fruit extract on the anti-inflammatory effects. *Korean J Plant Res*. 2015;28(2):145-52.
19. Ahn YS, Kwon OR, Kim EA, Yoon WJ, Kim JH, Kim JY. Randomized double-blind placebo-controlled study of the efficacy of *Litsea japonica* fruit extract in subjects with mild to moderate knee osteoarthritis. *J Funct Foods*. 2017;34:304-10.
20. Tamaki N, Hatano E, Taura K, Tada M, Kodama Y, Nitta T, et al. CHOP deficiency attenuates cholestasis-induced liver fibrosis by reduction of hepatocyte injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008; 294(2):G498-G505.
21. Uzi D, Barda L, Scaiewicz V, Mills M, Mueller T, Gonzalez-Rodriguez A, et al. CHOP is a critical regulator of acetaminophen-induced hepatotoxicity. *J Hepatol*. 2013;59(3):495-503.
22. Rao J, Zhang G, Wang P, Lu L, Qian X, Qin J, et al. C/EBP homologous protein (CHOP) contributes to hepatocyte death via the promotion of ERO1 $\alpha$  signaling in acute liver failure. *Biochem J*. 2015;466(2):369-78.
23. Harding HP, Zhang Y, Zeng H, Novoa I, Lu PD, Calfon M, et al. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol Cell*. 2003;11(3):619-33.
24. Nishitoh H, Matsuzawa A, Tobiume K, Saegusa K, Takeda K, Inoue K, et al. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev*. 2002;16(11): 1345-55.
25. Wang XZ, Ron D. Stress-induced phosphorylation and activation of the transcription factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science*. 1996;272(5266):1347-9.
26. Sano R, Reed JG. ER stress-induced cell death mechanisms. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1833(12):3460-70.
27. Yamaguchi H, Wang HG. CHOP is involved in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis by enhancing DR5 expression in human carcinoma cells. *J Biol Chem*. 2004; 279(44):45495-502.
28. Puthalakath H, O'Reilly LA, Gunn P, Lee L, Kelly PN, Huntington ND, et al. ER stress triggers apoptosis by activating BH3-only protein Bim. *Cell*. 2007;129(7):1337-49.
29. Tanaka H, Nakamura T, Ichino K. Butanolides from *Litsea japonica*. *Phytochemistry*. 1990; 29(3):857-9.
30. Takeda K, Sakurawi K, Ishii H. Components of the Lauraceae family-1. New lactonic compounds from *Litsea japonica*. *Tetrahedron*. 1972;28(14):3757-66.
31. Yamamoto K, Sato T, Matsui T, Sato M, Okada T, Yoshida H, et al. Transcriptional induction of mammalian ER quality control proteins is mediated by single or combined

- action of ATF6alpha and XBP1. *Dev Cell*. 2007;13(3):365-76.
32. Kanemoto S, Kondo S, Ogata M, Murakami T, Urano F, Imaizumi K. XBP1 activates the transcription of its target genes via an ACGT core sequence under ER stress. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;331(4):1146-53.
33. Gjymishka A, Su N, Kilberg MS. Transcriptional induction of the human asparagine synthetase gene during the unfolded protein response does not require the ATF6 and IRE1/XBP1 arms of the pathway. *Biochem J*. 2009;417(3):695-703.
34. Yoshida H, Haze K, Yanagi H, Yura T, Mori K. Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J Biol Chem*. 1998;273(50):33741-9.
35. Kokame K, Kato H, Miyata T. Identification of ERSE-II, a new cis-acting element responsible for the ATF6-dependent mammalian unfolded protein response. *J Biol Chem*. 2001;276(12):9199-205.
36. Yamamoto K, Yoshida H, Kokame K, Kaufman RJ, Mori K. Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive cis-acting elements ERSE, UPR and ERSE-II. *J Biochem*. 2004;136(3):343-50.