



Original Article / 원저

## 산화적 스트레스에 대한 生肝健脾湯加淫羊藿 (2:1)의 간보호효과

박상미<sup>1</sup>, 정대화<sup>2</sup>, 진효정<sup>1</sup>, 김예림<sup>1</sup>, 김정순<sup>1</sup>, 황보민<sup>1</sup>, 김상찬<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> 대구한의대학교 한의과대학, <sup>2</sup> 대구한의대학교 제약공학과

## SKT + EKE (2:1) protects oxidative stress induced-liver damage

Sang Mi Park<sup>1</sup>, Dae Hwa Jung<sup>2</sup>, Hyo Jeong Jin<sup>1</sup>, Ye Lim Kim<sup>1</sup>, Kyung-soon Kim<sup>1</sup>,  
Min Hwangbo<sup>1</sup>, Sang Chan Kim<sup>1\*</sup>

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

<sup>2</sup> Department of Pharmaceutical Engineering, Daegu Haany University

### ABSTRACT

**Objective** : Saengkankunbi-tang (SKT) is used as a traditional Korean herbal formula for treatment of liver diseases. We investigated the hepatoprotective effects of SKT plus Epimedium koreanum Nakai (EKE) against arachidonic acid (AA) + iron-mediated cytotoxicity in HepG2 cells and carbon tetrachloride (CCl<sub>4</sub>)-mediated acute liver damage in mice.

**Methods** : The cyto-protective effects of SKT + EKE were determined by MTT assay, western blot and fluorescence activated cell sorting analysis. In mice, blood biochemistry and western blot were assessed in CCl<sub>4</sub>-induced acute hepatic damage. The animal groups included vehicle-treated control, CCl<sub>4</sub>, SKT (200 mg/kg/day), EKE (100 mg/kg/day), SKT (200 mg/kg/day) + EKE (100 mg/kg/day) and silymarin (200 mg/kg/day).

**Results** : In HepG2 cells, pretreatment with SKT + EKE significantly suppressed cytotoxicity induced by AA + iron and reduced the expression of proteins related to apoptosis. In addition, pretreatment with SKT + EKE significantly prevented the increase in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production, GSH depletion, and lower mitochondrial membrane potential induced by AA + iron. In CCl<sub>4</sub>-induced liver damage mice, the administration of SKT + EKE prevented the liver damage by inhibition of hepatocyte damage and expression of apoptosis proteins in liver. More importantly, *in vitro* and *in vivo* assay, SKT + EKE showed significant effect compare with SKT alone or EKE alone in all parameters.

**Conclusions** : These results indicated that SKT + EKE could protect against oxidative stress-induced liver damage, and SKT + EKE is more effective than SKT alone or EKE alone.

**Key words** : Saengkankunbi-tang (SKT), Epimedium koreanum Nakai (EKE), SKT + EKE, Hepatocyte, Liver, Oxidative stress

## I. 서론

生肝健脾湯은 金秉雲 선생이 制方한 方劑로 임상에서 간질환 치료를 위해 빈용되는 방제이며, 生肝健脾湯의 임상적, 비임상적 연구는 국내 연구진에 의해 다수 발표되었다.

먼저 Kim<sup>1)</sup>은 1979-1982년 (3년 2개월)간 만성간염으로 진단된 환자 3136례 중, 경도의 간질환자로 단기간 투여로 개선된 경우를 제외한 1602례에 대하여 生肝健脾湯을 3개월 이상 투여한 결과, 임상증상 호전율이 71.6%, 간기능검사 호전율이 67.9%이었음을 보고하였으며, 또한 Gwak<sup>2)</sup>은 生肝健脾湯 투여 후 간기능 검사상 호전율은 평균 69.1%이었음을 보고하였으며, Kim과 Cho<sup>3)</sup>는 1991년 1월부터 6개월간 대학부속 한방병원의 만성간염 환자 중, 生肝健脾湯을 30일 이상 투여한 환자에 대한 임상증상 호전율 (71.9%)과 간기능검사상의 호전율 (46.1%)을 보고한 바 있다. 또한, Jung과 Park<sup>4)</sup>은 消化不良을 主訴로 하는 만성 B형 간염환자에게 生肝健脾湯을 투여하여, 임상증상 개선 및 간효소수치를 저하시킴을 보고하였다.

生肝健脾湯과 비만 및 간에 대한 연구로 Lee<sup>5)</sup>등은 비만과 간기능이상 환자 23명에서 肝正格과 生肝健脾湯 투여 후 간기능 수치 ALT와  $\gamma$ -GTP, triglyceride, total cholesterol, obesity index가 감소함을 밝혔으며, Hwang<sup>6)</sup>등은 MAFLD (metabolic dysfunction-associated fatty liver disease) 환자에게 약 4개월간 生肝健脾湯을 투여한 결과 간기능 및 지질검사 결과, hepatic steatosis index 및 임상증상의 개선을 보고하였다.

그 외 약물성 간손상에 대한 生肝健脾湯의 효과로, Choi와 Jeong<sup>7)</sup>은 太陰調胃湯으로 인한 藥因性 간손상에 대하여 生肝健脾湯의 치료효과를 보고하였으며, Kwon<sup>8)</sup>등은 atorvastatin이 원인으로 추정되는 간 기능장애에 生肝健脾湯 加味方을 투여하여 간기능 개선효과를 보고하였으며, Hwang<sup>9)</sup>등은 生肝健脾湯이 장기적인 알코올 섭취로 인한 고지혈증과 간손상에 대한

예방 효과가 있음을 보고하였다.

비임상연구로는 Hong<sup>10)</sup>이 生肝健脾湯은 HepG2 세포의 간 지방독성 모델에서 세포 보호효과와 TG 축적 감소, ROS 생성 억제, mitochondria에서 cytochrome-c 유출 억제 효과가 있음을 보고하였고, Choi<sup>11)</sup>등은 TAA로 유발된 간섬유화 동물모델에서 生肝健脾湯이 간섬유화 관련 마커를 억제하여 간섬유화를 개선시키는 효과가 있음을 보고하였으며, Hong<sup>12)</sup> 등은 70%의 간절제를 시행한 rat에서 生肝健脾湯이 肝組織의 신속한 회복에 유의함을 보고하였다. 본 연구실에서도 生肝健脾湯이 ERK/Nrf2 Pathway를 통하여 산화적 간손상을 억제함을 보고하였으며<sup>13)</sup>, 또한 다수의 本草를 스크리닝하여 도출된 淫羊藿이 Nrf2를 활성화하여 간보호효과<sup>14)</sup>를 나타냄과, nuclear factor- $\kappa$ B억제를 통한 항염증 효과<sup>15)</sup>, Smad 신호 억제를 통한 간성상세포의 활성 억제효과<sup>16)</sup>를 보고한 바가 있다.

이처럼 生肝健脾湯에 대한 임상적, 비임상적 연구는 다수 이루어져 있으나, 生肝健脾湯의 약물 구성 및 加味方에 대한 연구는 매우 미흡한 실정이다. 生肝健脾湯은 총 19종의 약물로 구성되어 있으며, 기본방의 용량은 건조 약재로서 99.1 g이다.

본 연구는 生肝健脾湯의 투여용량 최소화 및 이를 통한 복약 편의성, 복약 순응도를 제고하기 위하여 生肝健脾湯의 배합연구를 시행하였으며, 生肝健脾湯과 淫羊藿의 2:1배합이 간보호효과에 우수함을 확인하고 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 연구방법

### 1. 시약

본 연구에 사용한 生肝健脾湯의 구성약재 및 淫羊藿은 대원약업사 (Daegu, Korea)에서 구매하였다. Procaspace-3, poly (ADP ribose) polymerase (PARP), lamin A/C,  $\beta$ -Actin, NAD(P)H-quinone oxidoreductase 1 (NQO1) 항체와 HRP conjugated

\*Corresponding author: Sang Chan Kim, Research Center for Herbal Convergence on Liver Disease, Department of Herbal Prescription, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 1, Hanuidae-ro, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, 38610, Republic of Korea.  
Tel : +82-53-819-1263, Fax : +82-53-819-1860, E-mail : sckim@dhu.ac.kr

•Received : January 18, 2024 / Revised : February 13, 2024 / Accepted : February 15, 2024

anti-rabbit IgG, HRP conjugated anti-mouse IgG는 Cell signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구매하였다. Bcl-2, nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구매하였으며, Sestrin2 항체는 Protein tech group (Chicago, IL, USA)으로부터 구입하였고, glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (GCLC) 항체는 Abcam (Cambridge, UK)으로부터 구입하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS) 및 penicillin과 streptomycin은 Gibco (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. Arachidonic acid (AA)는 Calbiochem (San Diego, CA, USA)에서 구매하였고, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)와 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA), ferric nitrilotriacetic acid (iron) 및 rhodamine 123 등의 기타 시약들은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다. NE-PER™ nuclear and cytoplasmic extraction reagents와 bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit는 Thermo Fisher Scientific Inc. (Rockford, IL, USA)에서 구입하였다. GSH BIOXYTECH GSH-400 kit는 Oxis International Inc. (Portland, OR, USA)에서 구입하였다.

## 2. 세포 배양

HepG2 cell (human hepatocyte derived cell line)은 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구입하였다. 세포 배양은 10% FBS와 100

U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin을 DMEM에 혼합하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub>가 유지되는 incubator (MCO-20AIC, Sanyo Electric Biomedical Co., Japan)에서 배양하였다. 모든 세포 실험은 80-90% confluence로 배양된 세포를 사용하였다.

## 3. 生肝健脾湯(SKT)과 淫羊藿(EKE) 추출물의 제조

SKT은 茵陳(15.4g), 澤瀉(15.4g), 白朮(7.7g), 山查(7.7g), 麥芽(7.7g), 陳皮(3.8g), 茯苓(3.8g), 豬苓(3.8g), 厚朴(3.8g), 藿香(3g), 蘿蔔子(3g), 枳實(3g), 三稜(3g), 蓬朮(3g), 青皮(3g), 木香(3g), 砂仁(3g), 甘草(3g), 生薑(3g)으로 구성되었으며, 1점의 약물구성과 용량은 Table 1과 같다.

SKT 2점의 용량 198 g을 1차 증류수 1.5 L로 3시간 동안 대용약탕기로 추출하고, 추출물을 Advantec Filter paper NO.2 (Toyo Roshi Kaisha Ltd, Japan)로 여과하였으며, 이 여과액을 회전증발농축기로 농축하여, 다시 농축액을 Ultra-low temperature freezer (Operon, Korea)에 동결한 후 Freeze Dryer(Operon, Korea)를 이용하여 동결건조물을 수득하였다 (수득율 21.79%).

EKE은 구입 후 잡질을 제거한 후, 200 g을 1차 증류수 1.5 L로 3시간 동안 대용약탕기로 추출하여 열수 추출물을 수득하였으며, EKE 추출물 역시 SKT 추출물과 동일한 방법으로 여과, 농축, 동결건조하였다 (수득율 16.53%). SKT와 EKE 동결건조물은 *in vitro*에서는 배지에 녹여 300 mg/mL의 stock을 제조하여 농도에 맞게 희석하여 사용하고, *in vivo*에서는 동결 건조물을 농도에 맞게 물에 녹여서 사용하였다.

Table 1. Compositions and amount of SKT in this study

Herb	Amount
茵陳 (Artemisiae Capillaris Herba)	15.4
澤瀉 (Alismatis Rhizoma)	15.4
白朮 (Atractylodis Rhizoma Alba)	7.7
山查 (Crataegi Fructus)	7.7
麥芽 (Hordei Fructus Germinatus)	7.7
陳皮 (Citri Unshius Pericarpium)	3.8
茯苓 (Poria Sclerotium)	3.8
豬苓 (Polyporus)	3.8
厚朴 (Magnoliae Cortex)	3.8

藿香 (Agastachis Herba)	3
蘿菔子 (Raphani Semen)	3
枳實 (Ponciri Fructus Immaturus)	3
三稜 (Sparganii Rhizoma)	3
蓬朮 (Zedoariae Rhizoma)	3
青皮 (Citri Unshius Pericarpium Immaturus)	3
木香 (Aucklandiae Radix)	3
砂仁 (Amomi Fructus)	3
甘草 (Glycyrrhizae Radix et Rhizoma)	3
生薑 (Zingiberis Rhizoma Recens)	3
Total	99.1

#### 4. 세포 생존율 측정

24-well plate에 HepG2 cell을 well당  $1.5 \times 10^5$ 개로 분주하여 배양 후, 세포의 confluence가 약 80-90% 되었을 때, 12시간 동안 FBS를 고갈하여 배양하였다. 각각의 목적에 맞게 SKT 또는 EKE를 1시간 전처리한 후  $10 \mu\text{M}$  AA를 12시간,  $5 \mu\text{M}$  iron을 1시간 동안 처리한 후 MTT assay로 세포 생존율을 측정하였다. 해당 약물 처리가 완료된 HepG2 cell에  $0.5 \text{ mg/mL}$ 의 MTT solution을 추가한 후 4시간 동안 반응시켜 dimethyl sulfoxide를 이용하여 생성된 formazan을 용해한 후, automated microplate reader (Infinite M200 Pro, Tecan, Männedorf, Switzerland)로  $570 \text{ nm}$ 에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 무처리 세포의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다. [cell viability (%) =  $100 \times (\text{absorbance of treated cell}) / (\text{absorbance of control cell})$ ]

#### 5. 전세포추출액 및 핵분획의 제조와 immunoblot 분석

전세포추출액은 protease & phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific Inc.)이 첨가된 radioimmunoprecipitation assay buffer로 용해하여  $4^\circ\text{C}$ ,  $15,000 \times g$ 에서 15분 동안 원심분리하여 상등액을 전세포추출액(whole cell lysate)으로 취하였다. 핵분획(nuclear fraction)은 세포에 NE-PER™ nuclear and cytoplasmic extraction reagents를 이용하여 제조사에서 제시된 방법에 따라 상등액을 추출하였다. 추출액들은 BCA protein assay kit를 이용하여 단백질 정량하였다. 정량화된 lysate는 동일량을 sodium dodecyl

sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 전기영동을 통해 분리 후, nitrocellulose membrane으로 전이하였다. 이후, 표적 단백질에 대한 1차 항체 및 2차 항체를 순차적으로 반응시키고, enhanced chemiluminescence detection kit (Amersham Pharmacia, Uppsala, Sweden)와 image analyzing system (Imager 600, Amersham Biosciences)으로 발색하였다. 각 단백질의 상대적인 발현 정도는 Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>)를 이용하여 분석하였으며, 발현 정도는 무처리 세포의 density에 대한 비율로 나타내었다. [Relative protein level = protein level of treated cell / (protein level of control cell)]

#### 6. GSH 함량 측정

6-well plate에 HepG2 cell을 well당  $1.5 \times 10^5$ 개로 분주하여 배양 후, SKT, EKE, SKT + EKE, AA, iron을 순차적으로 처리하였다. 처리가 완료된 세포에 각 well당 metaphosphoric acid  $500 \mu\text{L}$ 를 넣어 용해하고, GSH BIOXYTECH GSH-400 kit를 이용하여  $405 \text{ nm}$ 에서 automated microplate reader (Tecan)를 사용하여 흡광도를 측정하였다.

#### 7. 세포 내 ROS 측정

24-well plate에 HepG2 cell을 well당  $1.5 \times 10^5$ 개로 분주하여 배양 후, SKT, EKE, SKT + EKE, AA, iron을 순차적으로 처리하였다. 이후  $20 \mu\text{M}$ 의 DCFH-DA를 처리하여 30분 동안  $37^\circ\text{C}$ 에서 배양한 후, DCF의 형광 강도를 excitation ( $485 \text{ nm}$ ), emission ( $530 \text{ nm}$ )의

파장으로 automated microplate reader (Tecan)를 사용하여 측정하였다.

## 8. 리포터 유전자 분석

Antioxidant response element (ARE)가 매개되는 전사 활성화를 측정하기 위하여 이전에 보고된 리포터 유전자 분석<sup>17)</sup> 방법을 따라 수행하였다. pGL4.37 [luc2P/ARE/Hygro] (Promega, Madison, WI, USA) 리포터 유전자 형질이 도입된 재조합 HepG2 cell을 24-well plate에 배양한 후, SKT, EKE, SKT + EKE를 처리하고, passive lysis buffer (Promega, Madison, WI, USA)를 이용하여 용해하였다. 이후, luciferase assay reagent (Promega)를 첨가하여 발현된 luciferase 활성을 측정하였다. Luciferase의 활성도는 표준곡선을 이용해 단백질 농도를 기준으로 보정하였다.

## 9. 미토콘드리아 막 전위의 측정

미토콘드리아 막 전위의 변화는 막투과성 양이온 형광 염료인 rhodamine 123을 이용하여 분석하였다. SKT, EKE, SKT + EKE, AA, iron을 순차적으로 처리한 HepG2 cell에 0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 rhodamine 123을 30분 동안 처리하고, 1% FBS가 포함된 phosphate buffered saline을 이용하여 세포를 회수하였다. Sample 당 10,000개의 세포를 BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer (BD Bioscience, San Jose, CA, USA)를 이용하여 측정하였다.

## 10. 실험동물의 사육 및 처치

동물실험은 대구한의대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받은 후 수행하였다 (승인번호: DHU2023-030). 실험동물은 6주령 ICR계 수컷 마우스 (20 g 내외)를 Orient Bio Inc. (Seongnam, Korea)에서 공급받아 사육실 환경에 1주간 적응시켰다. 음용수와 사료는 자유롭게 섭취하도록 하였고, 사육환경은 온도 22-25°C, 습도 40-45%, light/dark cycle은 12시간이 유지되는 ECRS (Shin Bio Tech, Seoul, Korea)사육기에서 사육하였다. 실험군은 아무런 처치를 하지 않은 대조군을 vehicle 군으로 하고, corn oil로 희석한  $\text{CCl}_4$  0.5 mL/kg을 복강주사(injection peritoneal, i.p.)하여 간독성을 유발한 군을  $\text{CCl}_4$  군으로, SKT 200 mg/kg을 투여한 군을 SKT 200 군으로, EKE 100 mg/kg을 투여한 군을 EKE 100 군으로, SKT 200 mg/kg과 EKE 100 mg/kg을 병용 투여한 군을 SKT 200 + EKE 100 군으로 설정하였다.

Silymarin 200 mg/kg은 양성대조군으로 사용하였으며, silymarin 200 군으로 설정하였다.  $\text{CCl}_4$  처치 전 Silymarin 과 약물을 4일간 투여하고 각 군당 실험동물의 수는 8마리로 총 48마리를 사용하였다.

## 11. 혈청 분리 및 혈액생화학적 검사

$\text{CCl}_4$  처치 24시간 후에 각 실험동물의 복대정맥으로부터 1 mL 이상을 채혈한 후 실온에서 1시간 이상 방치한 뒤, 4°C의 원심분리기에서 3000  $\times$ g로 20분간 원심분리하여 혈청을 얻었다. 혈청 중 alanine aminotransferase (ALT) 및 aspartate aminotransferase (AST)의 함량은 Analysis reagents (IVDLab Co., Ltd., Hwaseong, Korea)를 사용하여 Automated blood chemistry analyzer (Robert Riele GmbH & Co KG, Berlin, Germany)로 분석하였다.

## 12. 통계분석

본 연구의 모든 실험 결과는 3회 반복 시행 후 SPSS version 26.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA)을 이용하여 통계분석을 수행하였다. 그룹 간의 통계적 유의성은 one way analysis of variance를 이용하여 검정하였다. 사후검정은 Tukey HSD test 또는 Dunnett T3 test를 이용하였으며 mean  $\pm$  S.D.로 표기하였다. 유의수준이  $p < 0.05$  또는  $p < 0.01$ 인 경우를 기준으로 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다.

# III. 실험 결과

## 1. SKT + EKE가 세포생존율에 미치는 영향

본 연구팀에서 기 간보호효과가 있는 것으로 보고한 SKT와 EKE에 대하여 AA + iron으로 유도된 산화적 스트레스 모델에서 다시 농도별 세포생존율을 평가하였다.

SKT는 10, 30, 100, 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 AA + iron (28.38  $\pm$  1.21%) 대비 각각 29.85  $\pm$  3.51, 33.72  $\pm$  4.50, 77.44  $\pm$  3.09, 94.36  $\pm$  7.46 (%)을 나타내어 유의한 간세포보호 효능을 나타내었으며 (Fig. 1A), SKT + EKE의 효과를 평가하기 위한 농도로 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 선정하였다.

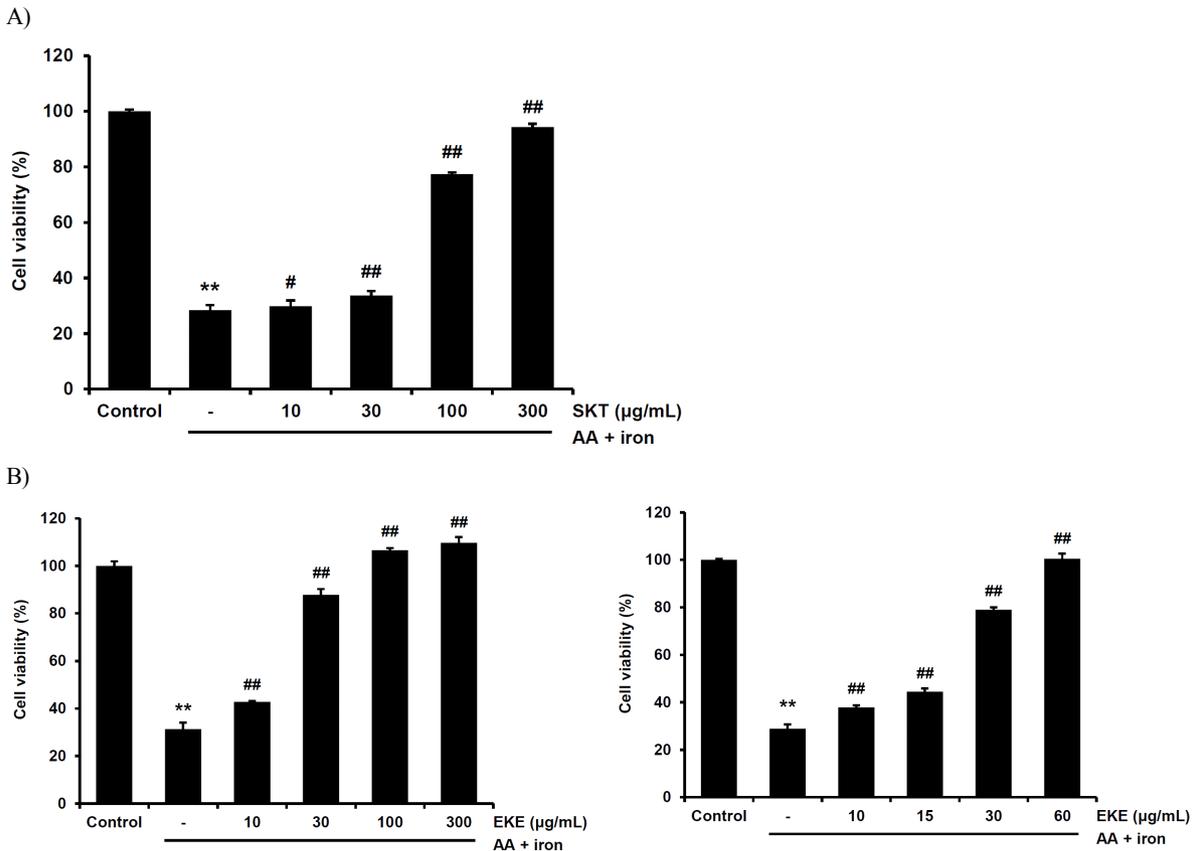
한편 EKE는 10, 30, 100, 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 AA + iron (31.33  $\pm$  2.72%) 대비 각각 42.81  $\pm$  0.29, 87.80  $\pm$  2.52, 106.60  $\pm$  0.84, 109.71  $\pm$  2.35 (%)을 나타내어 유의한 간세포보호 효능을 나타내었으며 (Fig. 1B, left), SKT + EKE의 효과를 평가하기 위한 EKE의 농도를 구하기

위하여 다시 EKE 10, 15, 30, 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 세포생존율을 측정된 결과, AA + iron ( $28.91 \pm 1.78\%$ ) 대비 각각  $37.84 \pm 0.83$ ,  $44.43 \pm 1.37$ ,  $79.09 \pm 1.05$ ,  $100.50 \pm 2.11$  (%)을 나타내어 유의한 간세포보호 효능을 나타내어, SKT + EKE의 효과를 평가하기 위한 농도로 10과 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 을 선정하였다 (Fig. 1B, right).

SKT + EKE의 간보호효과를 평가하기 위하여 SKT는 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , EKE는 10, 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  배합하여 AA + iron에 대한 간보호효과를 평가하였다. AA + iron은 control ( $100 \pm 0.97\%$ ) 대비  $40.00 \pm 0.78\%$ 로 유의하게 세포생존율을 감소시켰으며, SKT 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 은  $44.10 \pm 0.57\%$ 로

증가하는 경향이 있었으나, 유의성이 없었으며, EKE는 10, 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 는 각각  $46.42 \pm 3.27$ ,  $48.50 \pm 2.85$  (%)로 유의한 증가를 나타내었다. SKT 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 EKE 10 또는 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 배합한 경우는 각각  $81.36 \pm 2.54$ ,  $89.28 \pm 2.33$  (%)로 유의한 증가를 나타내었다. 또한 SKT 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 과 EKE 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 를 배합한 경우는 SKT 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  대비 2.02배, EKE 10 또는 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  대비 1.92배 및 1.84배를 나타내었으며, 통계적으로 유의하게 세포생존율을 증가시켰다 (Fig. 1C).

따라서 본 연구에서는 SKT 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  + EKE 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 배합이 간보호효과에 미치는 영향을 연구하였다.



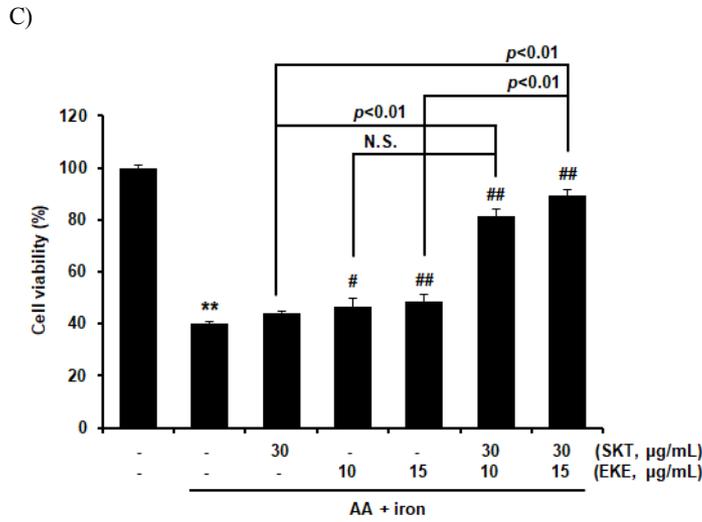


Fig. 1. Protective effect of SKT, EKE and SKT + EKE on AA + iron-induced cytotoxicity.

(A) HepG2 cells were pretreated with 10–300 μg/mL SKT for 1 h and subsequently exposed to AA (10 μM) for 12 h, followed by iron (5 μM) for 1 h. (B) HepG2 cells were pretreated with 10–300 μg/mL EKE for 1 h and subsequently exposed to AA (10 μM) for 12 h, followed by iron (5 μM) for 1 h. (C) HepG2 cells were pretreated with 10–300 μg/mL EKE for 1 h and subsequently exposed to AA (10 μM) for 12 h, followed by iron (5 μM) for 1 h. All data represent the mean ± S.D. of three separated experiments (Significant compared with control, \*\*  $p < 0.01$ ; Significant compared with AA + iron, #  $p < 0.05$ , ##  $p < 0.01$ ).

## 2. SKT + EKE가 세포자멸사에 미치는 영향

본 연구실에서는 AA + iron에 의한 세포 독성에는 세포자멸사 (apoptosis)가 관여됨을 보고한 바 있다<sup>17,18)</sup>. 본 연구에서도 AA + iron에 의하여 cleaved PARP, procaspase-3, Bcl-2는 유의적인 증감을 나타내었다.

먼저 cleaved PARP의 경우 AA + iron은 control (1.00 ± 0.16) 대비 2.31 ± 0.22배로 유의하게 증가하였으나, SKT 30 μg/mL, EKE 15 μg/mL은 각각 1.12 ± 0.08, 1.17 ± 0.12배로 AA + iron대비 유의한 감소를 나타내었다. 또한 SKT 30 μg/mL + EKE 15 μg/mL은 0.68 ± 0.15배로 AA + iron뿐만 아니라, SKT 30 μg/mL 및 EKE 15 μg/mL의 단독처리와 비교하여서도 유의성 있는 감소를 나타내었다 (Fig. 2A and B).

Procaspase-3에서 AA + iron은 control (1.00 ± 0.05) 대비 0.33 ± 0.06배로 유의하게 감소시켰으나, SKT 30

μg/mL, EKE 15 μg/mL은 각각 0.28 ± 0.02, 0.40 ± 0.05배로 AA + iron 대비 유의성을 나타내지 않았다. 그러나 SKT 30 μg/mL + EKE 15 μg/mL은 0.71 ± 0.09배로 AA + iron뿐만 아니라, SKT 30 μg/mL 및 EKE 15 μg/mL의 단독처리와 비교하여서도 유의성 있는 증가를 나타내었다 (Fig. 2A and C).

Bcl-2에서는 AA + iron이 control (1.00 ± 0.10) 대비 0.31 ± 0.17배로 유의하게 감소시켰으나, SKT 30 μg/mL, EKE 15 μg/mL은 각각 0.28 ± 0.25, 0.52 ± 0.08배로 AA + iron 대비 유의성을 나타내지 않았다. 그러나 SKT 30 μg/mL + EKE 15 μg/mL은 1.00 ± 0.04배로 AA + iron뿐만 아니라, SKT 30 μg/mL 및 EKE 15 μg/mL의 단독처리와 비교하여서도 유의성 있는 증가를 나타내었다 (Fig. 2A and D).

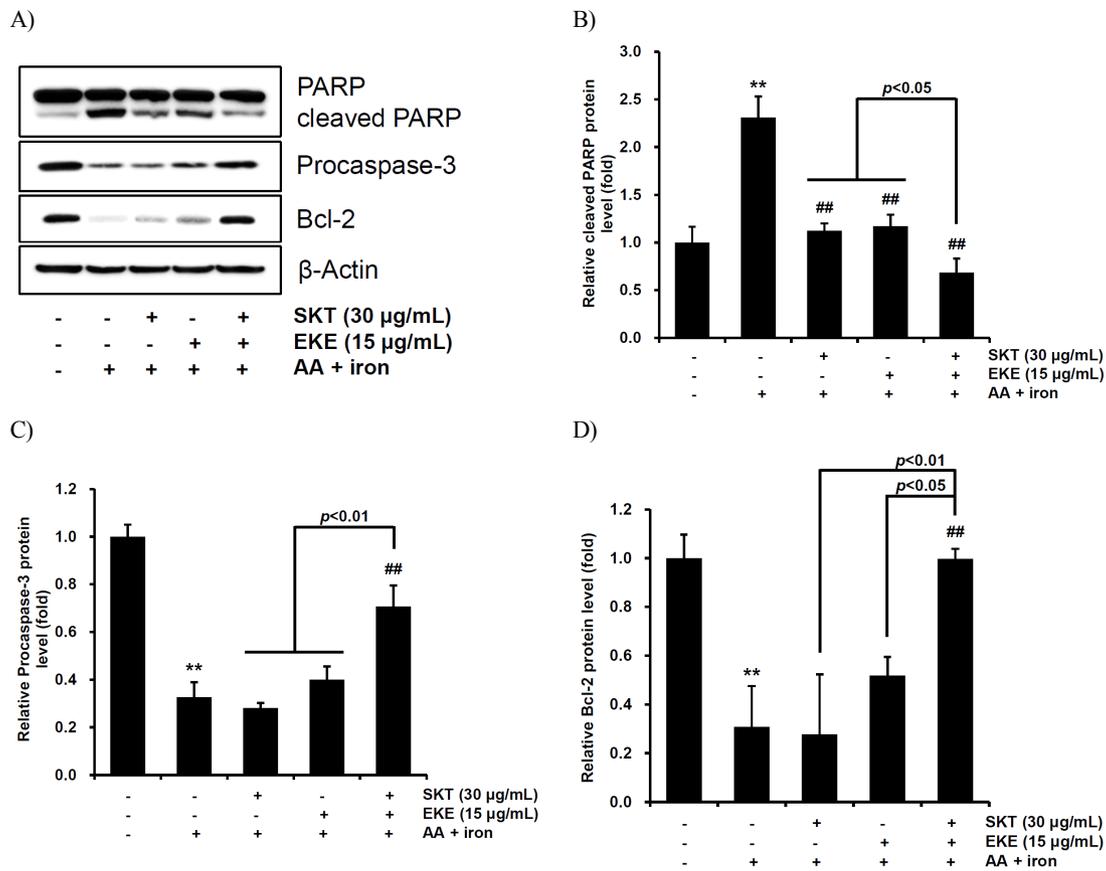


Fig 2. Effect of SKT, EKE and SKT + EKE on AA + iron-induced apoptosis-related proteins.

HepG2 cells pretreated with SKT (30 µg/mL), EKE (15 µg/mL) and SKT (30 µg/mL) + EKE (15 µg/mL) for 1 h and then further incubated with 10 µM AA (12 h) and 5 µM iron (1 h) (A) Apoptosis-related proteins were monitored by immunoblot analysis. (B) Cleaved PARP, (C) procaspase-3, and (D) Bcl-2 expression intensities were quantified by scanning densitometry. All data represent the mean ± S.D. of three separated experiments (Significant compared with control, \*\*  $p < 0.01$ ; Significant compared with AA + iron, ##  $p < 0.01$ ).

### 3. SKT + EKE가 산화적 스트레스에 미치는 효과

본 연구실에서는 선행연구를 통하여 AA + iron에 의한 세포 독성에는 세포자멸사가 관여되고, 이에는 ROS 생성과 GSH의 고갈이 매개됨을 보고하였다<sup>17,18</sup>.

본 연구에서도 세포자멸사를 억제하는 SKT + EKE의 항산화효과를 평가하기 위하여 GSH 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 함량을 평가하였다.

먼저, GSH에서 AA + iron은 control (68.17 ± 2.94 µM/mg) 대비 50.62 ± 5.39 µM/mg로 유의하게 감소시켰으나, SKT 30 µg/mL, EKE 15 µg/mL은 각각

51.08 ± 8.61, 55.21 ± 3.17 µM/mg로 AA + iron 대비 유의성을 나타내지 않았다. 그러나 SKT 30 µg/mL + EKE 15 µg/mL은 69.01 ± 3.12 µM/mg로 AA + iron뿐만 아니라, SKT 30 µg/mL 및 EKE 15 µg/mL의 단독처치와 비교하여서도 유의성 있는 증가를 나타내었다 (Fig. 3A).

또한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에서 AA + iron은 control (1.00 ± 0.10) 대비 9.74 ± 0.29배로 유의하게 증가시켰으며, SKT 30 µg/mL, EKE 15 µg/mL은 각각 8.45 ± 0.01, 7.92 ± 0.22배로 AA + iron 대비 유의성 있는 감소를 나타내었다. 특히 SKT 30 µg/mL + EKE 15 µg/mL은 4.23 ±

0.22배로 AA + iron뿐만 아니라, SKT 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  및 EKE 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 단독처치와 비교하여서도 유의성 있는 감소를 나타내었다 (Fig. 3B).

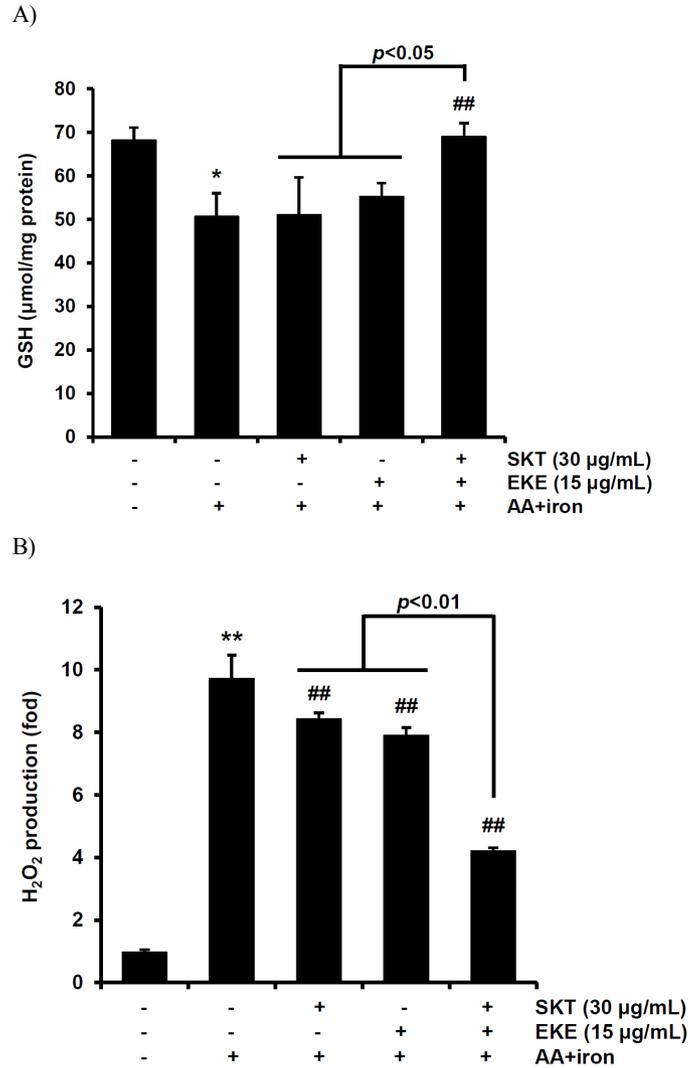


Fig. 3. Effects of SKT, EKE and SKT + EKE on AA + iron-induced GSH depletion and ROS production.

(A) The cellular GSH contents were measured by using commercial kit as mentioned in materials and methods section, and the values were normalized by protein concentration. (B) To observe the intracellular ROS, cells were treated with SKT, EKE, and SKT + EKE and then treated with AA + iron. After then, DCFH-DA (20  $\mu\text{M}$ ) was added for 1 h. DCF fluorescence was monitored by automated microplate reader. All data represent the mean  $\pm$  S.D. of three separated experiments (Significant compared to control, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; Significant compared to AA + iron, ## $p < 0.01$ ).

#### 4. SKT + EKE가 mitochondrial dysfunction에 미치는 효과

AA + iron에 의한 산화적 스트레스는 세포자멸사의 유도에 관여하는 미토콘드리아 기능 이상을 야기하므로<sup>19)</sup>, SKT + EKE의 미토콘드리아 보호 효과를 알아보았다. R1 fraction은 rhodamine 123 (Rh123)의 염색양이 적은 분획으로, AA + iron에서는 control (22.12 ± 1.90%) 대비 84.21 ± 3.75%로 유의하게 증가시켰으나, SKT 30

μg/mL, EKE 15 μg/mL은 각각 73.06 ± 1.94, 72.99 ± 3.29%로 AA + iron 대비 유의하게 억제하였으며, SKT 30 μg/mL + EKE 15 μg/mL은 53.54 ± 3.14%로 AA + iron뿐만 아니라, SKT 30 μg/mL 및 EKE 15 μg/mL의 단독치치와 비교하여서도 유의성 있는 감소를 나타내었다 (Fig. 4).

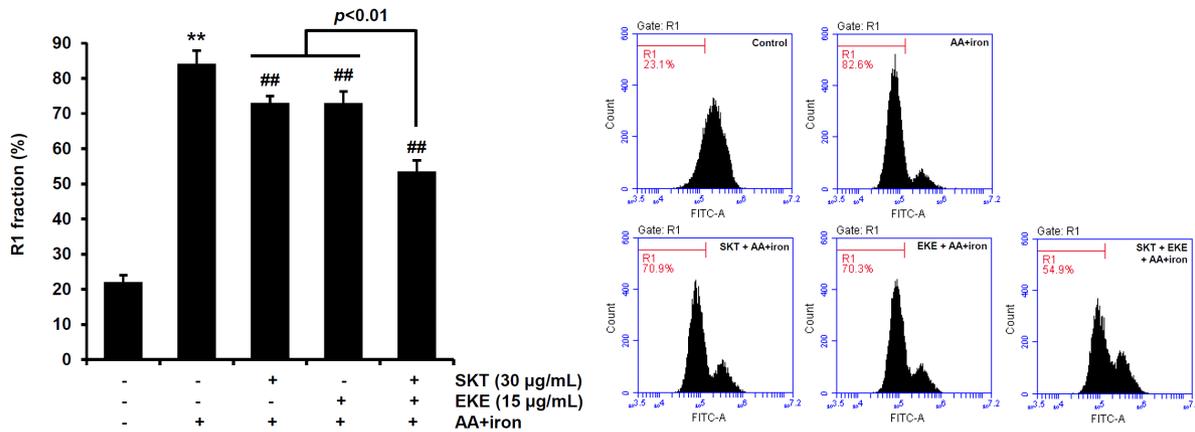


Fig. 4. Effect of SKT, EKE and SKT + EKE on AA + iron-induced mitochondrial dysfunction.

HepG2 cells pretreated with SKT (30 μg/mL), EKE (15 μg/mL) and SKT (30 μg/mL) + EKE (15 μg/mL) for 1 h and then further incubated with 10 μM AA (12 h) and 5 μM iron (1 h). And then, cells were further incubated with 0.05 μg/mL rhodamine 123 for 0.5 h. Proportions of low rhodamine 123 intensities (R1 fraction) were analyzed by flow cytometer. All data represent the mean ± S.D. of three separated experiments (Significant compared to control, \*\* $p < 0.01$ ; Significant compared to AA + iron, ## $p < 0.01$ ).

#### 5. SKT + EKE가 Nrf2에 미치는 효과

Nrf2는 세포질에서 저용량으로 유지되고 있으나, Nrf2가 활성화되면, Keap1과 분리되고 핵으로 전위되어 프로모터 영역의 ARE에 결합한 후 Sestrin2, HO-1, NQO1, GCLs, PSTs 등 항산화 관련 단백질의 발현을 유도하여 세포를 보호하는 전사인자이다<sup>20,21)</sup>.

핵내 Nrf2의 발현에서, SKT 30 μg/mL + EKE 15 μg/mL은 0.25, 0.5, 1, 3, 6 시간에 control (1.00 ± 0.17) 대비 각각 1.13 ± 0.19, 1.99 ± 0.29, 1.51 ± 0.18, 1.17 ± 0.30, 1.12 ± 0.37배를 나타내었으며, 0.5시간 (30분)에 유의한 증가를 나타내었다 (Fig 5A). 다음으로 30분 처치에서 SKT, EKE, SKT + EKE의 Nrf2 발현을 비교하였다.

Control (1.00 ± 0.14) 대비 SKT 30 μg/mL은 1.00 ± 0.10, EKE 15 μg/mL은 0.97 ± 0.13으로 유의한 변화를 나타내지 않았으나, SKT 30 μg/mL + EKE 15 μg/mL은 1.83 ± 0.02로 control뿐만 아니라, SKT 30 μg/mL 및 EKE 15 μg/mL의 단독치치와 비교하여서도 유의성 있는 증가를 나타내었다 (Fig. 5B). 또한 ARE-luciferase 활성 역시 control (1.00 ± 0.13) 대비 SKT 30 μg/mL은 0.89 ± 0.09, EKE 15 μg/mL은 0.82 ± 0.02로 유의성 있는 증가를 나타내지 못하였지만, SKT 30 μg/mL + EKE 15 μg/mL은 2.29 ± 0.06으로 control뿐만 아니라, SKT 30 μg/mL 및 EKE 15 μg/mL의 단독치치와 비교하여서도 유의성 있는 증가를 나타내었다 (Fig. 5C).

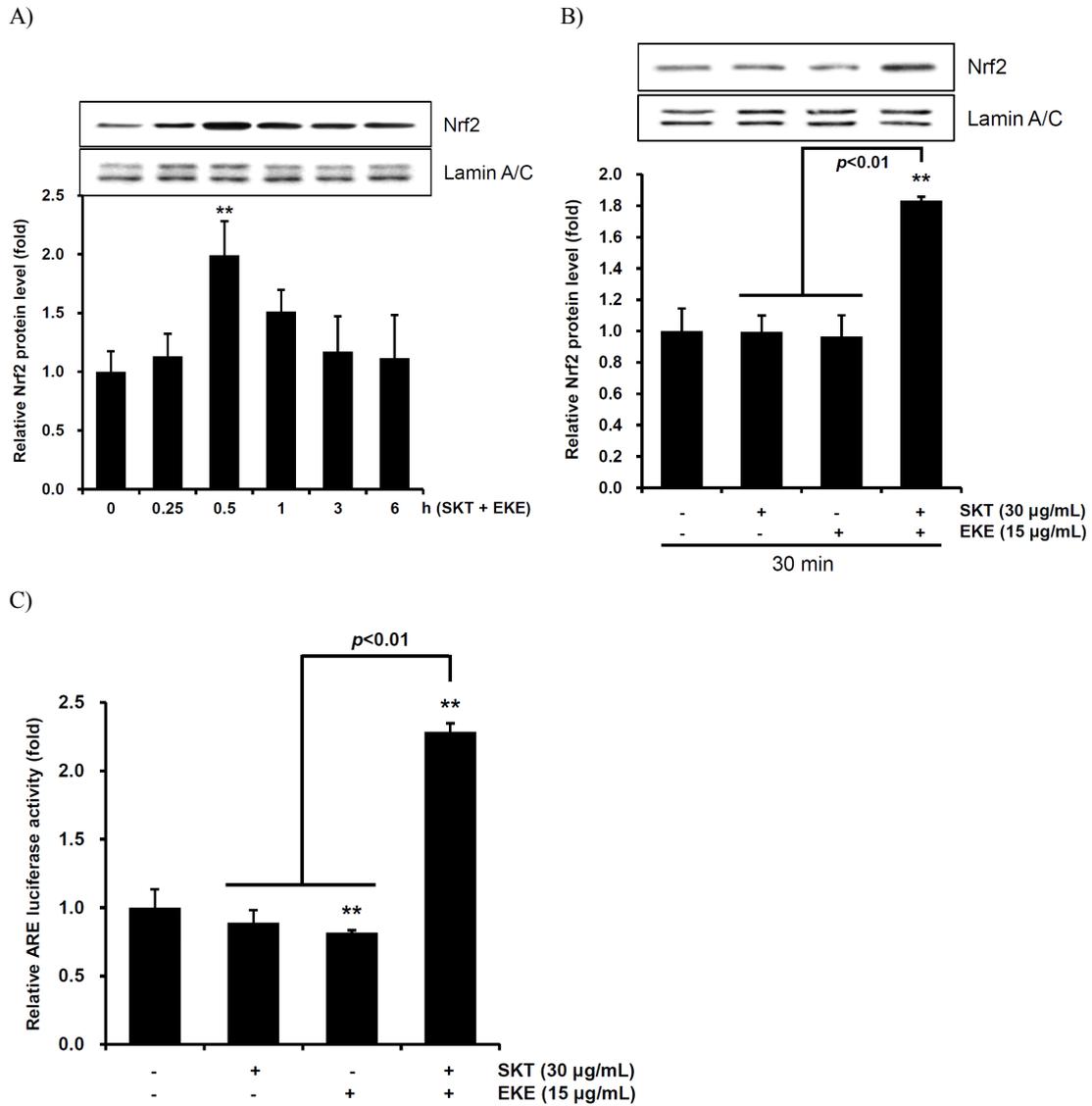


Fig. 5. Effect of SKT, EKE and SKT + EKE on ARE reporter gene activity and Nrf2 activation

(A) To measure the time-course nuclear Nrf2 expression levels, HepG2 cells were treated with SKT, EKE and SKT + EKE for 0.25–6 h. (B) To determine the concentration-dependent nuclear Nrf2 expression changes, HepG2 cells were treated with SKT, EKE and SKT + EKE for 0.5 h. Immunoblot loading control for equal loadings was used as lamin A/C. (C) The luciferase activity was measured in HepG2 cells transfected with ARE-driven luciferase, treated with SKT, EKE and SKT + EKE for 24 h. All data represent mean  $\pm$  S.D. of three separated experiments. (Significant compared with control, \*\* $p < 0.01$ ).

### 6. SKT + EKE가 Nrf2 표적 항산화 유전자 발현에 미치는 영향

SKT 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  + EKE 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이 30분에서 Nrf2의 활성을 유도함에 따라, Nrf2의 표적 항산화 인자인 GCLC, NQO1, Sestrin2의 변화를 immunoblot으로 분석하였다.

먼저 GCLC 발현에서, SKT 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  + EKE 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 은 0.5와 1 시간에 control (1.00  $\pm$  0.01) 대비 각각 1.59  $\pm$  0.16, 1.67  $\pm$  0.13배로 유의한 증가를

나타내었으며 (Fig 6A and B), NQO1 발현에서도 SKT 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  + EKE 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 은 0.5와 1 시간에 control (1.00  $\pm$  0.01) 대비 각각 1.37  $\pm$  0.06, 1.59  $\pm$  0.09배로 유의한 증가를 나타내었다 (Fig 6A and C). 또한 Sestrin2의 경우에서도, SKT 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  + EKE 15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 은 0.5와 1 시간에 control (1.00  $\pm$  0.05) 대비 각각 1.50  $\pm$  0.07, 1.54  $\pm$  0.02배로 유의한 증가를 나타내었다 (Fig 6A and D).

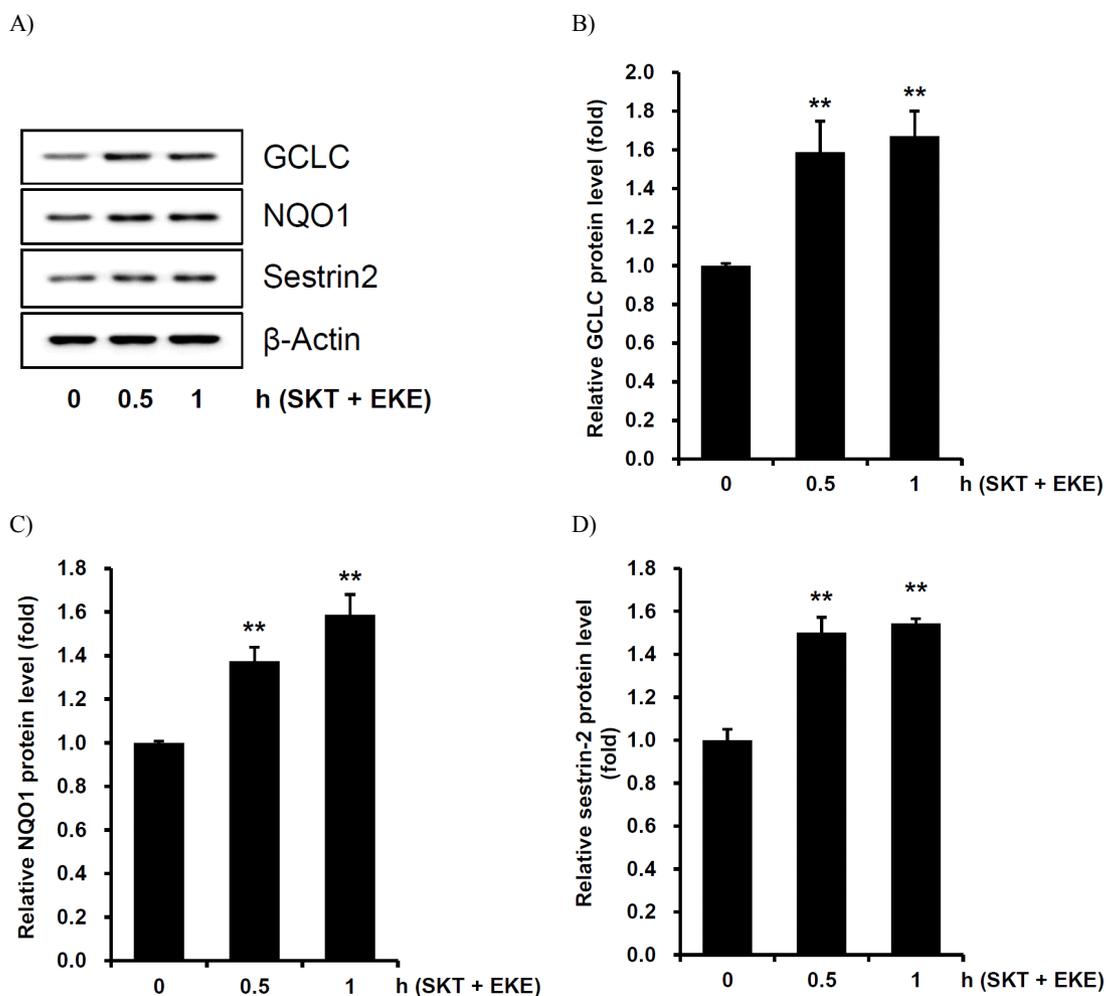


Fig. 6. Effect of SKT, EKE and SKT + EKE on Nrf2 target proteins

The protein levels of GCLC, NQO1, Sestrin-2 were immunoblotted in the HepG2 cells treated with SKT, EKE and SKT + EKE for 1 h. (A) The proteins were monitored by immunoblot analysis. (B) GCLC, (C) NQO1, and (D) Sestrin-2 expression intensities were quantified by scanning densitometry. Equal protein loading was confirmed by  $\beta$ -Actin immunoblotting. All data represent the mean  $\pm$  S.D. of three separated experiments (Significant compared with control, \*\*  $p < 0.01$ ).

### 7. SKT + EKE가 혈청 ALT, AST에 미치는 영향

*In vitro*에서 SKT + EKE가 유의한 간보호효과를 나타내어, *in vivo* 연구로 CCl<sub>4</sub>로 유도된 간독성에 대한 SKT + EKE의 간보호효과를 평가하였다.

먼저 ALT는 0.5 mL/kg을 복강주사하여 간독성을 유발한 CCl<sub>4</sub> 군에서는 903.93 ± 18.25로, vehicle control (4.62 ± 0.45) 대비 유의한 증가를 나타내었다. SKT 200 군, EKE 100 군에서는 각각 825.60 ± 27.30 및 838.92 ± 19.56을 나타내어 유의한 결과를 나타내지 못하였으나, SKT 200 + EKE 100 군은 611.30 ± 35.16으로 CCl<sub>4</sub>

군뿐만 아니라, SKT 200 군, EKE 100 군 대비 유의한 감소를 나타내었다 (Fig. 7A)

AST는 CCl<sub>4</sub> 군에서는 813.02 ± 28.21로, vehicle control (5.20 ± 0.50) 대비 유의한 증가를 나타내었다. SKT 200 군, EKE 100 군에서는 각각 855.56 ± 37.58 및 719.15 ± 38.90을 나타내어 유의한 결과를 나타내지 못하였으나, SKT 200 + EKE 100 군은 527.40 ± 75.23로 CCl<sub>4</sub> 군뿐만 아니라, SKT 200 군, EKE 100 군 대비 유의한 감소를 나타내었다 (Fig. 7B)

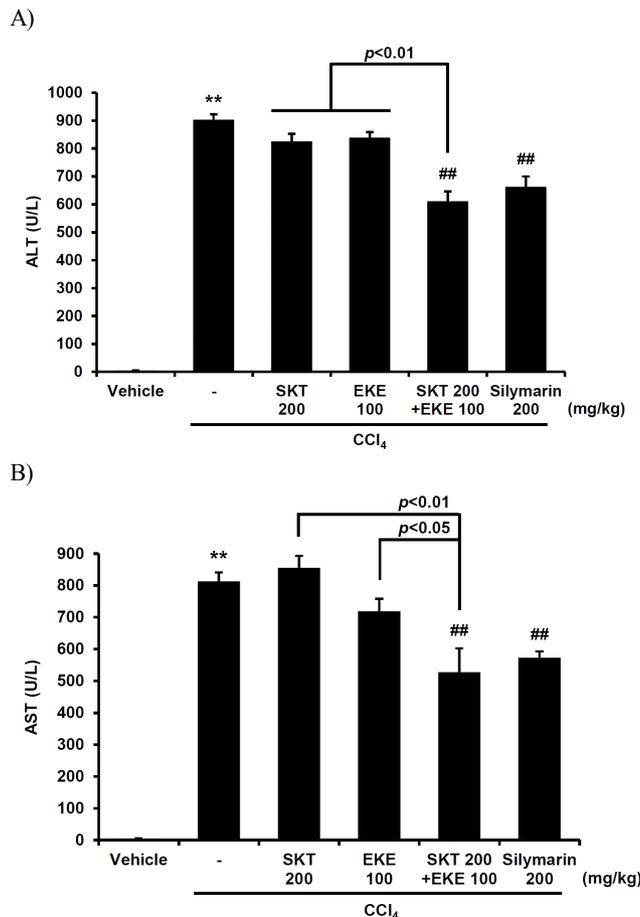


Fig. 7. Effects of SKT, EKE and SKT + EKE on CCl<sub>4</sub>-induced ALT and AST.

SKT, EKE, SKT + EKE and silymarin dissolved in water, were administered orally to mice for 4 consecutive days. At 1 h after final SKT, EKE, SKT + EKE and silymarin treatment, the mice were injected (i.p.) with 0.5 mL/kg CCl<sub>4</sub>, dissolved in corn oil. All mice were sacrificed 24 h after the CCl<sub>4</sub> injection. The contents of (A) ALT and (B) AST in blood were measured by Automated blood chemistry analyzer. All data represent the mean ± S.D. of seven mice (Significant compared with vehicle mice, \*\**p* < 0.01; Significant compared to CCl<sub>4</sub>-treated mice, ##*p* < 0.01).

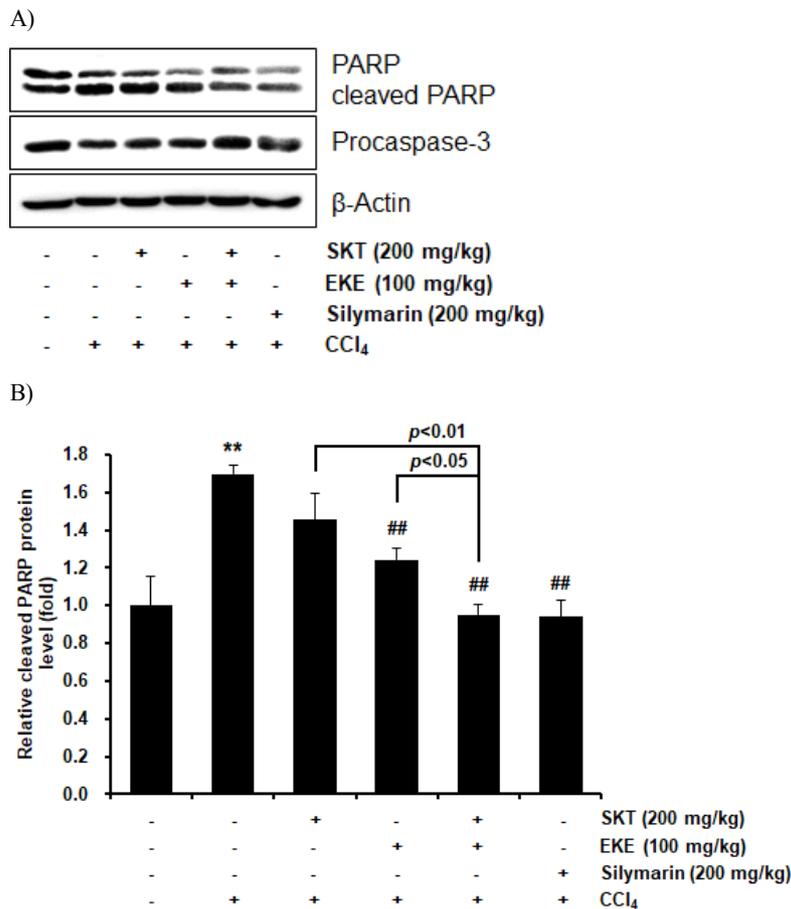
8. SKT + EKE가 간조직에서 세포사멸 단백질에 미치는 영향

*In vitro*에서 SKT + EKE는 세포사멸 관련 단백질을 유의하게 억제하였고, 또한 *in vivo*에서 CCl<sub>4</sub>는 산화적 스트레스로 세포사멸을 유도하는 것으로 알려져 있으므로<sup>22)</sup>, CCl<sub>4</sub>로 유도된 간손상 조직에서 세포사멸 관련 단백질의 발현을 평가하였다.

먼저 cleaved PARP는 0.5 mL/kg을 복강주사하여 간독성을 유발한 CCl<sub>4</sub> 군에서는 1.70 ± 0.05로, vehicle control (1.00 ± 0.15) 대비 유의한 증가를 나타내었다. SKT 200 군에서는 1.46 ± 0.14를 나타내어 유의한 결과를 나타내지 못하였으나, EKE 100 군에서는 1.24 ±

0.06을 나타내어 유의한 결과를 나타내었다. SKT 200 + EKE 100 군은 0.95 ± 0.06으로 CCl<sub>4</sub> 군뿐만 아니라, SKT 200 군, EKE 100 군 대비 유의한 감소를 나타내었다 (Fig. 8A and B)

Procaspase-3는 CCl<sub>4</sub> 군에서는 0.56 ± 0.06으로, vehicle control (1.00 ± 0.04) 대비 유의한 감소를 나타내었다. SKT 200 군, EKE 100 군에서는 각각 0.64 ± 0.04 및 0.63 ± 0.06을 나타내어 유의한 결과를 나타내지 못하였으나, SKT 200 + EKE 100 군은 0.92 ± 0.03로 CCl<sub>4</sub> 군뿐만 아니라, SKT 200 군, EKE 100 군 대비 유의한 증가를 나타내었다 (Fig. 8A and C)



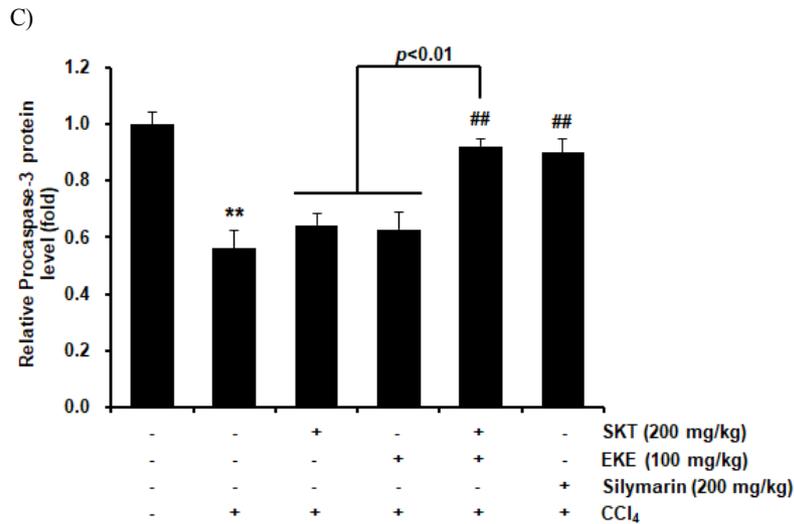


Fig. 8. Effects of SKT, EKE and SKT + EKE on CCl<sub>4</sub>-induced apoptosis-related proteins.

SKT, EKE, SKT + EKE and silymarin dissolved in water, were administered orally to mice for 4 consecutive days. At 1 h after final SKT, EKE, SKT + EKE and silymarin treatment, the mice were injected (i.p.) with 0.5 mL/kg CCl<sub>4</sub>, dissolved in corn oil. (A) Apoptosis-related proteins were monitored by immunoblot analysis in homogenized liver tissue. (B) Cleaved PARP and (C) procaspase-3 expression intensities were quantified by scanning densitometry. All data represent the mean ± S.D. of three separated experiments (Significant compared with control, \*\**p* < 0.01; Significant compared with AA + iron, ##*p* < 0.01).

#### IV. 고찰

生肝健脾湯은 간질환 치료를 위해 빈용되는 방제로, 주로 국내 연구진에 의해 임상적, 비임상적 연구가 수행되었다. 임상적 연구로 만성간염 1602례<sup>1)</sup>, 만성간염 35례<sup>2)</sup>, 급성간염 30례<sup>3)</sup>, 만성 B형 간염<sup>4)</sup>, 약물성 간손상<sup>7,8)</sup> 알코올성 간손상<sup>9)</sup> 등에 대한 다양한 연구보고가 있었으며, 비임상 연구로는 지방간<sup>10)</sup> 및 간섬유화 개선효과<sup>11)</sup>, 간조직재생<sup>12)</sup>, 산화적 간손상억제<sup>13)</sup> 등이 보고되어 있으나, 生肝健脾湯의 약물 구성 및 加味方에 대한 연구는 매우 미흡하다. 본 연구는 生肝健脾湯의 투여용량 최소화 및 이를 통한 복약 편의성, 복약 순응도를 제고하기 위하여 生肝健脾湯의 배합연구를 시행하였다.

生肝健脾湯은 약물구성상 胃苓湯 <古今醫鑑> (五苓散 合 平胃散)에서 祛桂, 加藿香, 大腹皮, 山查, 蘿菴子, 三稜, 蓬朮, 靑皮한 加減胃苓湯 <古今醫鑑>을 化裁한 것이다. 즉, 生肝健脾湯은 加減胃苓湯 <古今醫鑑>에서 祛蒼朮, 半夏, 芍藥, 大棗, 大腹皮하고, 加麥芽, 木香, 砂仁, 枳實한 것이다 (Table 2).

또한, 淫羊藿은 본 연구실에서 다수의 本草를 스크리닝한 결과, 산화적 스트레스에 대한 간실질세포주 (HepG2)보호효과<sup>14)</sup>, LPS로 활성화된 대식세포주 (Raw 264.7)에서 항염증 효과<sup>15)</sup>, TGF-β1으로 활성화된 간성상세포주 (LX-2)에서 항섬유화 효과<sup>16)</sup>의 3가지 항목 모두에서 뛰어난 효능을 나타낸 본초이다.

Table 2. Comparison of Herbal Formulae's Composition<sup>23-25)</sup>

方劑名	茵陳	白朮	茯苓	澤瀉	猪苓	桂枝	蒼朮	厚朴	陳皮	甘草	半夏	芍藥	生薑	大棗	藿香	腹皮	山查	蘿蔔	三稜	蓬朮	青皮	麥芽	木香	砂仁	枳實
五苓散		○	○	○	○	○																			
茵陳五苓散	○	○	○	○	○	○																			
平胃散							○	○	○	○			○	○											
胃苓湯 <方藥合編>		○	○	○	○	○	○	○	○	○			○	○											
胃苓湯 <古今醫鑑>		○	○	○	○	○	○	○	○	○		○	○	○											
加減胃苓湯 <古今醫鑑>		○	○	○	○		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○				
生肝健脾湯	○	○	○	○	○			○	○	○			○				○	○	○	○	○	○	○	○	○

본 연구는 生肝健脾湯 (SKT) + 淫羊藿 (EKE)이 산화적 스트레스로 인한 간손상에 대한 효능을 평가하였으며, 연구모델로서 *in vitro*에서는 HepG2 cell에서 AA (arachidonic acid) + iron로 유도한 세포독성 모델을 사용하였다. AA는 일반적으로 세포막에서 인지질의 형태로 존재하지만, 세포막이 자극을 받으면, PLA2와 PLC에 의해 인지질이 가수분해되어 AA가 유리된다<sup>26)</sup>. AA는 survivin을 억제하고, Fas receptor를 활성화하며, 미토콘드리아로부터 cytochrome-c를 유리하여 세포자멸사를 유도하며<sup>19,27)</sup>, 또한 iron이 AA와 함께 처치되면 AA에 의해 활성산소가 생성되고, 미토콘드리아 막 전위가 저하되어 더 강한 세포 독성을 유발할 수 있다고 보고되었다<sup>28,29)</sup>.

*In vivo* 모델에서는 사염화탄소(carbon tetrachloride, CCl<sub>4</sub>)로 간독성을 유발한 동물모델을 사용하였다. CCl<sub>4</sub> 유도 간손상 모델은 일반적으로 산화적 스트레스로 인한 급성 간손상의 연구에 사용되는 모델이다<sup>30,31)</sup>. CCl<sub>4</sub>는 plasma 및 ribosome, 미토콘드리아 membrane의 투과성을 변화시켜 직접적으로 간손상을 유발하고, 또한 CYP2E1에 의해 대사되어 반응성이 높은 free radical을 형성하여 지질과산화 및 간손상을 유발한다<sup>32)</sup>.

본 연구에서는 먼저, SKT, EKE, SKT + EKE가 AA + iron로 유도된 세포독성을 완화할 수 있는지 평가하였다. SKT는 10, 30, 100, 300  $\mu\text{g/mL}$ 에서 AA + iron ( $28.38 \pm 1.21\%$ ) 대비 각각  $29.85 \pm 3.51$ ,  $33.72 \pm 4.50$ ,  $77.44 \pm 3.09$ ,  $94.36 \pm 7.46$  (%)을 나타내었고, EKE는 10, 15, 30, 60  $\mu\text{g/mL}$ 에서 AA + iron ( $28.91 \pm 1.78\%$ ) 대비 각각  $37.84 \pm 0.83$ ,  $44.43 \pm 1.37$ ,  $79.09 \pm 1.05$ ,  $100.50 \pm$

2.11 (%)을 나타내어, SKT + EKE의 효과를 평가하기 위한 농도로 SKT 30  $\mu\text{g/mL}$ 와 EKE 10과 15  $\mu\text{g/mL}$ 을 선정하였다.

SKT와 EKE를 배합한 SKT 30  $\mu\text{g/mL}$  + EKE 10  $\mu\text{g/mL}$ , SKT 30  $\mu\text{g/mL}$  + EKE 15  $\mu\text{g/mL}$ 는 AA + iron ( $40.00 \pm 0.78\%$ ) 대비 각각  $81.36 \pm 2.54$ ,  $89.28 \pm 2.33$  (%)로 세포생존율을 유의하게 증가시켰으며, 특히 SKT 30  $\mu\text{g/mL}$  + EKE 15  $\mu\text{g/mL}$  (이하 SKT + EKE)는 SKT 단독 및 EKE 단독처치에 비교하여서도 유의한 증가를 나타내었다.

AA + iron에 의한 세포 독성에는 세포자멸사가 관여되어 있으므로<sup>17,18)</sup>, SKT + EKE가 cleaved PARP, procaspase-3, Bcl-2에 미치는 영향을 평가한 결과, cleaved PARP에서는 SKT + EKE가 SKT 단독 및 EKE 단독처치에 비교하여서도 유의한 ( $p < 0.05$ ) 감소를 나타내었으며, procaspase-3에서는 SKT + EKE가 SKT 단독 및 EKE 단독처치에 비교하여서도 유의한 ( $p < 0.01$ ) 증가를 나타내었으며, Bcl-2에서는 SKT + EKE가 SKT 단독 ( $p < 0.01$ ) 및 EKE 단독처치 ( $p < 0.05$ )에 비교하여서도 유의한 증가를 나타내었다. 이러한 결과는 SKT + EKE가 AA + iron로 유도된 세포독성을 완화하며, 이의 기전에는 세포자멸사 억제가 매개되어 있음을 나타낸다.

또한, AA + iron이 함께 처치되면 AA에 의해 활성산소가 생성되고, 미토콘드리아 막 전위가 저하되어 더 강한 세포독성을 유발할 수 있는 것으로 보고되었고<sup>28,29)</sup>, 본 연구실에서도 선행연구를 통하여 AA + iron에 의한 세포 독성에는 세포자멸사가 관여되고, 이에는 ROS

생성과 GSH의 고갈이 매개됨을 보고하였다<sup>17,18)</sup>. 따라서 SKT + EKE가 산화적 스트레스에 미치는 효과 및 mitochondrial dysfunction에 미치는 효과를 평가하였다.

SKT + EKE는 GSH 함량에서 SKT 단독 및 EKE 단독처치에 비교하여 유의성 있는 ( $p < 0.05$ ) 증가를 나타내었으며,  $H_2O_2$ 의 생성량에서도 SKT + EKE는 SKT 단독 및 EKE 단독처치에 비교하여 유의성 있는 ( $p < 0.01$ ) 감소를 나타내었다. Mitochondrial dysfunction에서도 SKT + EKE는 R1 fraction을 SKT 단독 및 EKE 단독처치에 비교하여 유의성 있는 ( $p < 0.05$ ) 감소를 나타내었다.

세포 내 항산화 관련 인자 발현을 유도하는 Nrf2는 산화적 스트레스가 발생할 경우 항산화의 역할을 담당하는 핵심 전사인자로서 antioxidant response element (ARE)에 결합하여 NQO1, HO-1, Sestrin2, GCLC 등의 항산화 효소들의 발현을 증가시킨다<sup>20,33-35)</sup>. Nrf2는 일반적인 경우, 세포질에서 Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap 1)과 결합하여 있으나, 산화적 스트레스가 발생되면 Keap 1과 분리되어 핵내로 전위하여 phase II와 산화방지 유전자의 promoter 영역의 ARE에 결합하여 표적유전자의 전사를 유도한다<sup>21,36-38)</sup>.

SKT + EKE는 0.5시간 (30분)에 핵내 Nrf2의 유의한 증가를 나타내었으며, 30분 처치시 SKT, EKE, SKT + EKE의 Nrf2 발현 비교시에는 SKT + EKE가 SKT 단독 및 EKE 단독처치에 비교하여 유의성 있는 ( $p < 0.01$ ) 증가를 나타내었다. 또한 Nrf2가 결합하는 ARE의 luciferase 활성 역시 SKT + EKE가 SKT 단독 및 EKE 단독처치에 비교하여 유의성 있는 ( $p < 0.01$ ) 증가를 나타내었으며, Nrf2와 ARE에 의해 조절되는 GCLC, NQO1, Sestrin2 등의 항산화 효소 역시 SKT + EKE의 처치시 유의하게 증가됨을 확인하였다.

*In vitro*에서 SKT + EKE는 Nrf2활성화를 통하여 산화적 스트레스에 의한 간세포의 손상을 억제하고, SKT + EKE가 SKT 단독 및 EKE 단독처치에 비교하여 유의성 있는 간보호효능을 나타냄에 따라, *in vivo*연구로서  $CCl_4$ 로 간독성을 유발한 동물모델에서 SKT 200 mg/kg + EKE 100 mg/kg (이하 SKT 200 + EKE 100)의 효능을 평가하였다.  $CCl_4$ 는 직접적으로 간손상을 유발하기도 하고, 또한 대사체의 산화적 스트레스로 간손상을 유발한다<sup>32)</sup>.

$CCl_4$  처치시 ALT는 vehicle control 대비 유의한 ( $p < 0.01$ ) 증가를 나타내었으나, SKT 200 + EKE 100 군은

$CCl_4$  군, SKT 200 군, EKE 100 군 대비 유의한 ( $p < 0.01$ ) 감소를 나타내었다. AST에서도  $CCl_4$  군은 vehicle control 대비 유의한 ( $p < 0.01$ ) 증가를 나타내었으나, SKT 200 + EKE 100 군은  $CCl_4$  군 ( $p < 0.01$ ), SKT 200 군 ( $p < 0.01$ ), EKE 100 군 ( $p < 0.05$ ) 대비 유의한 감소를 나타내었다. 특히 SKT 200 + EKE 100 군은 ALT, AST 모두에서 양성대조군으로 사용된 silymarin (200 mg/kg)과 유사한 정도의 수치를 나타내었다.

SKT + EKE는 *in vitro*에서 세포자멸사 관련 단백질을 유의하게 억제하였으므로,  $CCl_4$ 로 유도된 간손상 동물의 간조직을 균질화하여 세포자멸사 관련 단백질의 발현을 평가한 결과, cleaved PARP는  $CCl_4$  군에서 vehicle control 대비 유의한 ( $p < 0.01$ ) 증가를 나타내었으나, SKT 200 + EKE 100 군은  $CCl_4$  군 ( $p < 0.01$ ), SKT 200 군 ( $p < 0.01$ ), EKE 100 군 ( $p < 0.05$ ) 대비 유의한 감소를 나타내었다. Procaspase-3 역시  $CCl_4$  군에서는 vehicle control 대비 유의한 ( $p < 0.01$ ) 감소를 나타내었으나, SKT 200 + EKE 100 군은  $CCl_4$  군, SKT 200 군, EKE 100 군 대비 유의한 ( $p < 0.01$ ) 감소를 나타내었다. 본 단백질 발현의 결과는 ALT, AST에서와 같이 양성대조군으로 사용된 silymarin (200 mg/kg)과 유사한 정도의 수치를 나타내었다.

본 연구결과는 SKT 단독 또는 EKE 단독 처치보다 SKT + EKE가 산화적 스트레스에 대한 간손상에 유의하다는 것을 시사하며, 또한 SKT 단독처치보다 투여용량을 줄임으로서 복약의 편의성을 개선할 수 있다는 결과를 제시하였다. 또한 방제학적으로는 SKT의 활용법을 추가하였다는 것에 의미가 있다.

그러나 본 연구는 *in vitro* 및 *in vivo* 연구결과로서 향후 임상적 연구가 추가되면 SKT의 활용도를 더욱 제고할 수 있으며, 또한 본 연구는 산화적 스트레스로 인한 간손상에 대한 연구결과이므로 다양한 간질환에 대한 추가적인 연구 역시 필요할 것으로 생각된다.

## V. 결론

산화적 스트레스로 인한 간세포 및 간손상에서 生肝健脾湯 (SKT) + 淫羊藿 (EKE)의 간보호 효과를 연구하였다.

*In vitro*에서 SKT + EKE는 세포자멸사를 억제하여 간손상을 억제하였으며, 또한 Nrf2를 활성화하여 항산화 관련 단백질의 발현을 증가시켰으며, 모든 지표에서 SKT 단독 및 EKE 단독보다 유의성 있는 결과를 나타내었다. *In*

*in vivo*에서도 SKT + EKE는 혈액지표를 유의하게 감소시켰으며, 간조직에서의 세포자멸사 유도단백질의 활성화를 유의하게 억제하였다. 또한 SKT + EKE는 SKT 단독 및 EKE 단독보다 유의성 있는 결과를 나타내었으며, 양성대조군으로 사용된 silymarin과 유사한 수준을 나타내었다.

## Acknowledgement

This study was supported by the National Research Foundation of Korea funded by Korea government (MSIP) (Grant No.2018R1A5A2025272)

## References

1. Kim BW. Clinical analysis of 3,136 cases of chronic hepatitis and treatment effect of Saeng-gan-geon-bi-tang. J Korean Med. 1993;14(1):213-23.
2. Gwak GG, Kim YJ, Jo JG. Clinicle analysis of 35 examples of chronic hepatitis, using the Sangkonbitang. Journal of Hawhwa Medicine. 1997;6(1):313-16.
3. Kim JD, Cho CK. Clinical Study on the Effect of Saeng-gan-geon-bi-tang for Chronic Hepatitis in 30 Cases. Journal of Hawhwa Medicine. 1992;1(1):88-94.
4. Jung WS, Park JM. The rapid recovery of serum aminotransferase in a case of chronic active hepatitis type B treated with Sengangeonbi-tang. Korean J. Orient. Ont. Med. 2000;21(2):337-39.
5. Lee SN, Kim SJ, Lee JS, Kim EG, Jang SG. Effect of Ganjeonggyeok Acupuncture and Saengkankunbi-tang Treatment in the Changes of LFT and Lipid-obesity Index Values. Journal of Acupuncture Research. 2008;25(6):47-54.
6. Hwang CH, Lee JY, Lee EK, Jang EY, Kim YC, Lee JH. Case Report of Metabolic Dysfunction-Associated Fatty Liver Disease Treated with Saenggangunbi-tang. J. Int. Korean Med. 2023;44(2):138-45.
7. Choi HS, Jeong TY. One Case of Drug-Induced Liver Injury Treated with Saenggangeonbi-tang. Korean J. Orient. Ont. Med. 2004;25(4):207-11.
8. Kwon JY, Kim YJ, Park JK, Kong KH, Go HY. A Case Report of Suggested Liver Dysfunction by Atorvastatin Treated with Saenggangeonbi-tang. J. Int. Korean Med. 2017;38(5):548-54
9. Hwang SJ, Choi HS, Kim SM, Woo CH. Effects of Saengkankeonbi-tang on Prevention of Hyperlipidemia and Liver Damage Induced by Alcohol. Kor. J. Herbol. 2009;24(4):9-15.
10. Hong IS. The Effects of Saengkankunbi-tang and Its Composition on Free Fatty Acid-Induced Lipotoxicity in HepG2 Cell. Korean J. Orient. Int. Med. 2013;34(1):14-30.
11. Choi JW, Chung SM, Shin MR, Jeong DU, Roh SS. Protective effect of Saenggangeonbi-tang on liver fibrosis induced by thioacetamide. Kor. J. Herbol. 2022;37(6):9-17.
12. Hong ND, Kim JW, Kim BW, Shon JG. Studies on the Efficacy of the Combined Preparation of Crude Drugs (VII) -Effect of 'Saengkankunbi-Tang' on the Liver Tissue Recovery-. Kor. J. Pharmacog. 1982;13(2):70-8.
13. Lee IW, Choi HY, Lee JH, Park SD, Kim SM, Ku SK, Zhao RJ, Kim SC, Kim YW, Choi HS. Saeng-Kankunbi-Tang Protects Liver against Oxidative Damage through Activation of ERK/Nrf2 Pathway. Chin J Integr Med. 2016;22(8):619-28.
14. Jung JY, Park SM, Ko HL, Lee JR, Park CA, Byun SH, Ku SK, Cho IJ, Kim SC. Epimedium koreanum Ameliorates Oxidative Stress-Mediated Liver Injury by Activating Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2. Am J Chin Med. 2018;46(2):469-88.
15. Jung JY, Byun SH, Park CA, Cho IJ, Kim SC. Anti-inflammatory Effects of Epimedium Herba Water Extract through Inhibition of Nuclear Factor- $\kappa$ B in RAW 264.7 Cells. Kor. J. Herbol. 2018;33(2):19-28.
16. Jung JY, Min BG, Park CA, Byun SH, Cho IJ, Kim SC. Epimedium koreanum Nakai Water Extract Regulates Hepatic Stellate Cells Activation through Inhibition of Smad Signaling Pathway. Herb.

- Formula Sci. 2018;26(3):183-93.
17. Jin HJ, Park SM, Kim EO, Kim SC. Hepatoprotective effect of Ikwiseungyang-tang via Nrf2 activation. *Herb. Formula Sci.* 2021;29(4):167-79.
  18. 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.
  19. Yin H, Zhou Y, Zhu M, Hou S, Li Z, Zhong H, Lu J, Meng T, Wang J, Xia L, Xu Y, Wu Y. Role of mitochondria in programmed cell death mediated by arachidonic acid-derived eicosanoids. *Mitochondrion.* 2013;13(3):209-24.
  20. Taguchi K, Motohashi H, Yamamoto M. Molecular mechanisms of the Keap1-Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells.* 2011;16(2):123-40.
  21. Tejo FV, Quintanilla RA. Contribution of the Nrf2 Pathway on Oxidative Damage and Mitochondrial Failure in Parkinson and Alzheimer's Disease. *Antioxidants.* 2021;10:1069.
  22. Emre K, Ali K, Nejdet S, Ismail C, Adem K, Serap Y, Yildiray K, Fikrullah K. Protective effect of Panax ginseng against serum biochemical changes and apoptosis in liver of rats treated with carbon tetrachloride (CCl4). *J Hazard Mater.* 2011;195:208-13.
  23. Herbal Formula Textbook Compilation Committee. *Herbal Formula Science in Korean Medicine (Special)*. Paju:Koonja Publisher. 2023:970, 1040, 1048.
  24. Heo J. *Donguibogam*. Seoul:Namsandang. 1987:182, 512.
  25. Hwang DY. *Bangyakhappyeon*. Seoul:Namsandang. 1985:129.
  26. Wang T, Fu X, Chen Q, Patra JK, Wang D, Wang Z, Gai Z. Arachidonic Acid Metabolism and Kidney Inflammation. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20:3683.
  27. Li Y, Zhao H, Wang Y, Zheng H, Yu W, Chai H, Zhang J, John R, Falck, Guo AM, Yue J, Peng R, Yang J. Isoliquiritigenin induces growth inhibition and apoptosis through downregulating arachidonic acid metabolic network and the deactivation of PI3K/Akt in human breast cancer. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013;272(1):37-48.
  28. 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.
  29. Lee EH, Baek SY, Kim KY, Lee SG, Kim SC, Lee HS, Kim YW. Effect of Rheum undulatum Linne extract and Glycyrriza uralensis Fischer extract against arachidonic acid and iron-induced oxidative stress in HepG2 cell and CCl4-induced liver injury in mice. *Herb. Formula Sci.* 2016;24(3):163-74.
  30. Liu JY, Chen CC, Wang WH, Hsu JD, Yang MY, Wang CJ. The protective effects of Hibiscus sabdariffa extract on CCl4-induced liver fibrosis in rats. *Food Chem. Toxicol.* 2006;44:336-43.
  31. Li S, Tan HY, Wang N, Zhang ZJ, Lao L, Wong CW, Feng Y. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2015;16:26087-124.
  32. Fujii T, Fuchs BC, Yamada S, Lauwers GY, Kulu Y, Goodwin JM, Lanuti M, Tanabe KK. Mouse model of carbon tetrachloride induced liver fibrosis: Histopathological changes and expression of CD133 and epidermal growth factor. *BMC Gastroenterol.* 2010;10:79.
  33. Zhang X, Yu Y, Lei H, Cai Y, Shen J, Zhu P, He Q, Zhao M. The Nrf-2/HO-1 Signaling Axis: A Ray of Hope in Cardiovascular Diseases. *Cardiol Res Pract.* 2020;2020:5695723.
  34. Kang KW, Lee SJ, Kim SG. Molecular mechanism of nrf2 activation by oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 2005;7(11-12):1664-73.
  35. Zhang Q, Liu J, Duan H, Li R, Peng W, Wu C. Activation of Nrf2/HO-1 signaling: An important molecular mechanism of herbal medicine in the treatment of atherosclerosis via the protection of vascular endothelial cells from oxidative stress. *J*

- Adv Res. 2021;34:43-63.
36. He F, Ru X, Wen T. NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. *Int J Mol Sci.* 2020;21(13):4777.
37. Ulasov AV, Rosenkranz AA, Georgiev GP, Sobolev AS. Nrf2/Keap1/ARE signaling: Towards specific regulation. *Life Sci.* 2022;291:120111.
38. Lee JS, Surh YJ. Nrf 2 as a novel molecular target for chemoprevention. *Cancer Letters.* 2005;224:171-84.