

일차 배양 흰쥐 간세포에서 CCl₄ 유발 세포독성을 이용한 간보호 효과 검색방법

김영숙 · 박기현
한국인삼연초연구원

Screening Method for Antihepatotoxic Activity Using CCl₄-induced Cytotoxicity in Primary Cultured Rat Hepatocytes

Young Sook Kim and Ki Hyun Park

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon 305-345, Korea

Abstract—To devise an *in vitro* screening method for antihepatotoxic activity, CCl₄-induced cytotoxicities in primary cultures rat hepatocytes were examined. When rat hepatocytes were intoxicated with 0.5, 1.0 or 1.5 mM CCl₄ for 1.5, 3 or 19hr, in order of LDH>GOT>GPT release from hepatocytes was increased in a dose-dependent manner. Treatment with 1.5 mM CCl₄ for 1.5 hr showed maximum increase in activity of LDH, GOT or GPT released in the medium compared with the control. At this experimental condition, well known antihepatotoxic substances, glycyrrhizin and silybin markedly inhibited CCl₄-induced cytotoxicities. These results demonstrated that the screening method using CCl₄-induced injury in primary cultured rat hepatocytes might be suitable *in vitro* assay for antihepatotoxic activity.

Keywords—Antihepatotoxicity · screening method · CCl₄ · primary cultured rat hepatocytes · LDH · GOT · GPT

특정질환의 치료제 개발을 위해서는 그 효과를 검정할 수 있는 선택적이면서 감도가 높은 검색 방법 자체의 개발이 필수적으로 선행되어야 한다.¹⁾ 그 효능을 검정할 때 실험동물을 이용한 검색은 많은 동물 수가 필요하고 실험결과와 큰 편차와 재현성이 불량하며 많은 시간과 비용이 소요된다. 그러므로 빠르고 적은 시료량으로 많은 종류의 시료를 동시에 검색할 수 있는 간편한 *in vitro* 검색방법을 개발한다면 매우 효과적으로 효능 검정이 가능하다.^{2,3)}

Berry와 Friend⁴⁾가 collagenase perfusion 방법에 의한 살아있는 간세포를 분리한 이후 Seglen에 의한 관류조건의 개선으로 90~95% 생존율을 지닌 간세포 분리와 간기능을 수 일간 유지시킬 수 있는 배양 방법이 정립되었다.^{2,5,6)}

이 방법은 간단한 기구와 조작으로 비교적 쉽게 간세포를 많이 얻을 수 있어서 세포수준에서의 약물동력학, 약물대사 및 대사기능을 연구하는데 사용되며 다른 장기의 영향을 배제할 수 있고 외부적으로 그 조건을 조절할 수 있는 장점이 있다.

*In vitro*에서 배양 간세포는 약물 및 여러 화합물의 대사에 관련하는 cytochrome P-450 system이 8~24시간 내에 저하되기 때문에 이 system을 거쳐 대사되어 활성화 되는 독성물질의 생화학적 기전, 대사산물 및 독성을 연구하는데 제한점으로 고려된다.²⁾ 간 epithelial cell line과 co-culture 및 간 S9 fraction의 첨가로 cytochrome P-450 level을 유지시키는 여러방법이 제시되고 있다.^{2,7-10)}

간독성 물질로 많이 사용되는 CCl_4 는 간세포에서 cytochrome P-450 system에 의해 생성되는 free radical metabolite($\cdot\text{CCl}_3$)가 단백질, 지질, 고분자 물질과 공유결합하여 세포를 괴사시키며 지방간, 과산화지질 등을 생성하여 간독성을 유발한다.¹¹⁻¹⁴⁾ D-galactosamine은 형태학적, 기능적인면에서 사람의 바이러스성 간염과 매우 유사한 간병변을 일으키며¹⁵⁻¹⁸⁾ 이외에도 a-naphthyl isothiocyanate,¹⁹⁾ thioacetamide²⁰⁾ 등이 간독성 유발 물질로 사용되며 보체를 이용한 면역학적 간손상 유발²¹⁾도 보고되었다.

많은 연구자들이 천연물로 부터 간염 치료와 간보호 물질을 개발하기 위해 동물 실험^{20,22)} 또는 일차 배양 간세포를 이용하여 검색을 시도하였다.^{3,23,24)} 그러나 각 연구자들이 간보호 효과를 검정한 *in vivo* 모델은 간독성 유발 물질의 종류 및 용량과 투여경로, 기간 등이 각각 다르기 때문에 시료의 효과를 검정하기 위해서는 나름대로의 실험모델의 수립이 필요하다. 또한 위에서 언급한 여러 장점을 지닌 일차 배양 간세포를 이용한 *in vitro* 모델에서는 여러가지 독성지표를 비롯한 생화학적 기초 자료들이 매우 미흡하다.

본 연구에서는 천연물로 부터 간보호 효과 또는 간기능 촉진작용을 갖는 물질을 개발하기 위해 먼저 일차 배양 간세포에서 간독성 물질로서 CCl_4 를 사용하여 간보호 효과를 검정하기 위한 *in vitro* 검색방법을 설정하였다.

실험 재료 및 방법

시약 - Fetal bovine serum, William's E medium, L-glutamine, trypan blue stain은 GIBCO(Grand Island, NY)에서 구입하였고, collagenase(Type IV), insulin, dexamethasone, antibiotics, dimethyl sulfoxide(DMSO), glycyrrhizin, Hanks' balanced buffered solution(HBSS) 및 세포 배양에 필요한 시약은 cell culture grade의 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO) 제품을 사용하였으며 CCl_4 는 Aldrich Chemical Co.(Milwaukee, WI)에서 구입하였다. Silybin은 Carl Roth Co. 제품을 사용하였다.

실험동물 - 한국인삼연초연구원 동물 사육실

에서 표준조건($22 \pm 2^\circ\text{C}$, 상대습도 $55 \pm 5^\circ\text{C}$, 12 시간 명암주기)으로 사육한 150~180 g의 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐를 사용하였다.

흰쥐 간세포 분리와 배양 - Berry와 Friend의 collagenase perfusion⁴⁾을 기초로 개선된 방법을 이용하여 간세포를 분리 배양하였다. 흰쥐를 urethane (1 g/kg 체중, i.p)으로 마취시키고 70% ethanol로 복부를 소독한 뒤 개복하였다. 간 문맥에 20 gage($1\frac{1}{4}$ in) catheter을 삽관하고 사용전 미리 37°C 로 가온한 Ca^{2+} , Mg^{2+} -free HBSS를 25 ml/min으로 공기가 들어가지 않도록 관류시키며 이때 하대정맥을 잘라 혈액을 제거하였다. 흉강을 열어서 심장으로 통하는 상대정맥에 16 gage($2\frac{1}{4}$ in) catheter을 삽관하고 고정한다. 다음 하대정맥을 묶고 관류한 후 관류액을 0.05% collagenase 함유-HBSS로 바꾸어서 10~15 ml/min으로 간막에서 간세포가 유리될때 까지 관류한다. 간막에 손상이 없도록 조심스럽게 간을 절제하여 Ca^{2+} , Mg^{2+} -free HBSS가 들어 있는 250 ml 비이커에 옮겨 간막을 절개하여 간세포가 유리되도록 한다. 간세포 현탁액을 nylon mesh(pore size 125 μm)로 여과하고 여과액을 50xg에서 4분간 원심분리 한 뒤 상등액을 제거하고 Ca^{2+} , Mg^{2+} -free HBSS로 같은 조건에서 2회 원심분리, 세척한다. 마지막 세척후 cell pellet을 50 ml의 10% heat-inactivated fetal bovine serum, penicillin(100 U/ml), streptomycin(100 $\mu\text{g}/\text{ml}$), 4 mM L-glutamine, 10^{-6} M dexamethasone, 10^{-7} M insulin이 첨가된 William's E medium에 현탁시킨다. 0.2% trypan blue와 세포 현탁액을 동량 취하여 세포수 및 생존율을 측정하고 세포수를 2×10^5 cells/ml가 되도록 배양액으로 희석, 조절한다. 간세포 현탁액을 24 well plate(Falcon)에 1 ml씩 분주하고 5% $\text{CO}_2/95\% \text{O}_2$ 혼합기체를 공급하면서 일정습도를 유지하는 37°C 배양기에서 세포가 배양 용기 표면에 부착하도록 2시간 배양 후 새로운 배양액으로 교체한다.

간세포 독성 유도 및 시료처리 - 간세포가 배양 용기 표면에 부착하도록 2시간 배양후 DMSO에 용해한 CCl_4 (10 μl)을 세포 배양액 1 ml에 가하였다. 이때 DMSO에 용해한 10 μl 의

glycyrrhizin 또는 silybin을 동시에 가하고 일정 시간 배양하였다.

간세포 독성 측정 - 일정시간 배양후 배양액을 채취하여 3000 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리한 후 상등액을 취하였다. 아산제약 kit을 사용하여 비색정량법으로 lactic dehydrogenase (LDH) 활성을 측정하였고 Reitman과 Frankel의 방법²⁵⁾으로 glutamic oxaloacetic transaminase(GOT)와 glutamic pyruvic transaminase (GPT) 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

일차 배양 간세포에서 CCl₄ 처리에 의한 세포독성 - 0, 0.5, 1.0, 1.5 mM CCl₄을 처리하여 1.5, 3, 19시간 배양한 뒤 배지내 LDH, GOT와 GPT 활성을 측정하였다(Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3).

Fig. 1에서와 같이 CCl₄에 의한 간세포의 세포막 손상에 의한 배지로서 세포내 LDH 유리는 CCl₄ 처리 농도와 시간에 따라서 증가되었다. CCl₄을 처리하지 않은 대조군에서도 배양시간에 따라서 배지내 LDH 활성이 증가되었다. 각 농도의 CCl₄와 간세포를 1.5시간 또는 3시간 배양할 때 19시간 배양 때보다 대조군에 대한 LDH 유리 증가는 훨씬 높았으며, 1.5시간 또는 3시간 배양에 의한 LDH 유리 정도는 유사하였다. 즉, 단시간(1.5시간 또는 3시간) 배양이 19시간 배양때 보다 CCl₄에 의한 세포독성이 더 크게 유발되었다. 0, 0.5, 1.0, 1.5 mM CCl₄로 1.5시간 처리하였을 때 배지내 LDH 활성은 123±9, 274±8, 732±142, 970±159 W-Unit/ml였으며 이때 각 농도에서 대조군에 대한 증가율은 222%, 592%, 785%였다. 같은 배양조건에서 간세포 괴사에 의한 배지내 GOT와 GPT 활성 증가는 Fig. 2와 Fig. 3에서와

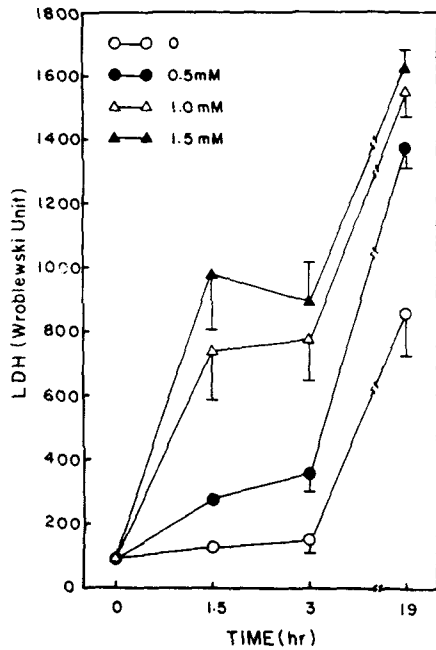


Fig. 1. Dose and time dependence of CCl₄-induced cytotoxicity in primary cultured rat hepatocytes. The cells were exposed to CCl₄/DMSO(10 μl) in fresh medium(1 ml) at 2h after initial plating and LDH activities were measured in the medium. Each point represents the mean±S.D. of three determinations.

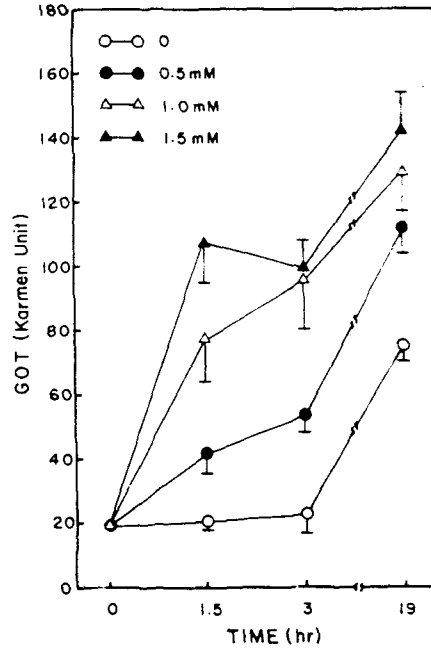


Fig. 2. Dose and time dependence of CCl₄-induced cytotoxicity in primary cultured rat hepatocytes. The cells were exposed to CCl₄/DMSO(10 μl) in fresh medium(1 ml) at 2h after initial plating and GOT activities were measured in the medium. Each point represents the mean±S.D. of three determinations.

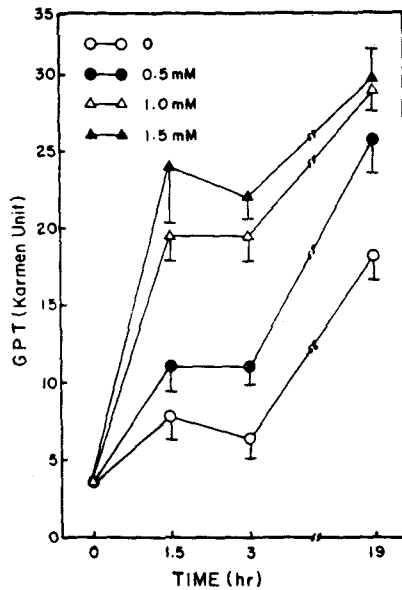


Fig. 3. Dose and time dependence of CCl_4 -induced cytotoxicity in primary cultured rat hepatocytes. The cells were exposed to CCl_4/DMSO (10 μl) in fresh medium (1 ml) at 2h after initial plating and GPT activities were measured in the medium. Each point represents the mean \pm S.D. of three determinations.

같이 CCl_4 농도와 배양시간에 따라서 증가되었으며 배지내 LDH 유리와 유사한 패턴을 나타내었다. 1.5 mM CCl_4 로 1.5, 3, 19시간 배양하였을 때

배지내 GOT 활성은 107 ± 12 , 98 ± 10 , 142 ± 12 Karmen Unit/ml였으며 각 배양시간의 대조군에 대하여 53%, 43%, 18% 증가하여 1.5 mM CCl_4 로 1.5시간 처리시 간세포로부터 배지내 GOT 유리가 가장 컸다(Fig. 2). 0, 0.5, 1, 1.5 mM CCl_4 와 1.5시간 배양할 때 배지내 GPT 활성은 8 ± 2 , 11 ± 2 , 20 ± 2 , 24 ± 3 Karmen Unit/ml였으며 3시간 배양에서도 유사하였다. 이때, 0, 0.5, 1.0, 1.5 mM CCl_4 에 의한 GPT 유리는 대조군에 대하여 117%, 222%, 313% 증가되었으며 19시간 배양 때보다 GPT 유리가 컸다(Fig. 3).

일차 배양 간세포를 0.5, 1.0, 1.5 mM CCl_4 와 90분, 3시간, 19시간 배양할 때 CCl_4 처리는 간세포로부터 LDH>GOT>GPT 순서로 유리가 증가되는 세포독성을 유발하였고 1.5 mM CCl_4 로 90분 배양할 때 간세포로부터 LDH, GOT, GPT 유리가 가장 증가하였다.

이상의 결과는 일차 배양 간세포에서 CCl_4 에 의한 세포독성은 장시간 처리 보다는 단시간 처리에 의해서 또한 1.5 mM 농도에서 충분한 세포독성이 유발되며 이 조건에서 생약시료의 간세포 보호 효과를 검증할 수 있음을 나타내었다.

Glycyrrhizin과 Silybin의 간세포 보호 효과 측정 - 일차 배양 간세포에서 CCl_4 처리 농도와 시간에 따른 세포 독성을 측정된 결과로부터 1.5 mM CCl_4 로 90분간 배양하면서 glycyrrhizin 또는 silybin 0.01, 0.1, 1.0 mg/ml을 동시 처리하

Table 1. Effects of natural products on CCl_4 -induced cytotoxicity in primary cultured rat hepatocytes

| Substance | Dose(mg/ml) | LDH(%) | | GOT(%) | | GPT(%) | |
|--------------|-------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| | | $\text{CCl}_4(-)$ | $\text{CCl}_4(+)$ | $\text{CCl}_4(-)$ | $\text{CCl}_4(+)$ | $\text{CCl}_4(-)$ | $\text{CCl}_4(+)$ |
| Control | - | $100 \pm 15^a)$ | $100 \pm 6^b)$ | $100 \pm 11^c)$ | $100 \pm 7^d)$ | $100 \pm 17^e)$ | $100 \pm 8^f)$ |
| | 0.01 | 100 ± 13 | 96 ± 6 | 104 ± 19 | 91 ± 10 | 96 ± 8 | 100 ± 7 |
| Glycyrrhizin | 0.1 | 99 ± 5 | $71 \pm 9^*$ | 108 ± 11 | $78 \pm 7^*$ | 87 ± 9 | $77 \pm 13^*$ |
| | 1.0 | $163 \pm 11^{**}$ | $47 \pm 8^{**}$ | 101 ± 5 | $42 \pm 9^{**}$ | 91 ± 12 | $39 \pm 6^{**}$ |
| Silybin | 0.01 | $81 \pm 3^*$ | 94 ± 3 | 106 ± 16 | 98 ± 3 | 97 ± 8 | 95 ± 7 |
| | 0.1 | 97 ± 19 | 87 ± 6 | 93 ± 11 | 88 ± 9 | 102 ± 5 | 83 ± 11 |
| | 1.0 | $153 \pm 11^{**}$ | $75 \pm 11^*$ | 97 ± 5 | $64 \pm 8^{**}$ | 98 ± 8 | $57 \pm 5^{**}$ |

The cells were preincubated for 2h and exposed to 1.5 mM CCl_4/DMSO (10 μl) and a sample in DMSO (10 μl) in fresh medium (1 ml) for 90 min. Each value represents the mean \pm S.D. of three determinations. Control enzymatic activity in the medium: a) 141 ± 21 W-U, b) 771 ± 45 W-U, c) 28 ± 3 K-U, d) 82 ± 6 K-U, e) 12 ± 2 K-U, f) 40 ± 3 K-U. Significantly different from the control: * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$.

여 이들 화합물의 간세포 보호 효과를 측정하였다(Table 1). Glycyrrhizin과 silybin은 CCl_4 을 처리하지 않은 정상 일차 배양 간세포에서 1.0 mg/ml 농도에서는 간세포로부터 LDH 유리를 각각 63%, 53% 증가시켰으나 GOT, 또는 GPT 유리에는 영향을 미치지 않았다. 1.5 mM CCl_4 처리에 의한 LDH, GOT와 GPT 유리는 glycyrrhizin 또는 silybin에 의해 농도의존적으로 유의성 있게 억제되었다. 1.0 mg/ml 농도에서 간세포로부터 CCl_4 에 의한 LDH, GOT와 GPT 유리를 glycyrrhizin은 각각 53%, 58%, 61% 억제하였고, silybin은 각각 25%, 36%, 43% 억제하였다.

감초(Glycyrrhizae Radix)에서 분리된 glycyrrhizin은 *in vivo*에서 간보호 작용^{3,23)} 및 항간염 효과²⁶⁾가 있으며 glycyrrhizin에 의한 CCl_4 유도 간손상 억제에 이 화합물의 항산화 작용이 부분적으로 기여한다고 보고되었다.²⁷⁾

Flavolignan 구조의 silybin²⁸⁾은 독일 Madaus 회사가 미나리 영경귀(Silybum marianum)에서 개발한 간장 보호제인 silymarin 제제의 활성성분이다.

이상과 같이 *in vivo*에서 간보호 효과를 갖는 천연물에서 분리된 glycyrrhizin과 silybin이 일차 배양 간세포에서 1.5 mM CCl_4 와 90분간 동시 처리한 실험 조건에서 CCl_4 의 세포독성을 현저하게 억제시키는 결과는 이 실험모델이 생약시료의 간보호 효과를 검증할 수 있는 적절한 *in vitro* 검색방법임을 제시하였다.

결 론

Collagenase perfusion에 의해 분리한 흰쥐 간세포를 여러 농도의 CCl_4 을 처리하여 배양하였다. 1.5 mM CCl_4 로 90분간 배양할 때 간세포로부터 배지로 유리된 LDH, GOT, GPT 활성의 증가율이 가장 컸다. 이 조건에서 간보호 물질인 glycyrrhizin 또는 silybin을 처리하면 CCl_4 에 의한 배지내 LDH, GOT, GPT 유리가 농도 의존적으로 현저하게 억제되었다. 생약시료의 간보호 효과를 *in vitro*에서 검증하기 위해서는 일차 배

양 간세포를 1.5 mM CCl_4 와 시료를 동시 처리하고 90분간 배양하는 검색방법이 적절함을 나타내었다.

감사의 말씀 - 본 연구는 과학기술처의 신동약개발 연구비 지원에 의해 수행되었기에 이에 감사드립니다.

(1994년 9월 17일 접수)

참고문헌

1. 김영중, 김선여: Proceeding of the 2nd symposium on the biochemical methodology for the research and development of the bioactive substances, 한국생화학회, 서울, p.93 (1991).
2. Benford, D.J. and Hubbard, S.A.: *Biochemical toxicology*, (ed. by Snell, K and Mullak, B.), IRL Press, Oxford, p.57 (1987).
3. Kiso, Y, Tohkin, M. and Hikino, H.: *J. Nat. Prod.* **46**, 1841 (1983).
4. Berry, M.N. and Friend, D.S.: *J. Cell Biol.* **43**, 506 (1969).
5. Ichihara, A., Nakamura, T. and Tanaka, K.: *Mol. Cell. Biochem.* **43**, 145 (1982).
6. Seglen, P.O.: *Methods in Cell Biology*, ed. by Prescott, D.M., vol. 19, Academic press, New York, p.29 (1976).
7. Dich, J. and Grunnet, N.: *Methods in Molecular Biology*, ed. by Pollard J.W. and Walker, J.M., vol. 5, Humana press, Clifton, N.J., p.161 (1990).
8. Chenery, R.J.: *In vitro methods in toxicology*, ed. by Atterwill C.K. and Steele, C.E., Cambridge University Press, Cambridge, p.211 (1987).
9. Guguen-Guillouzo, C. and Guillouzo, A.: *Mol. Cell. Biochem.* **53/54**, 35 (1983).
10. Guillouzo, A., Beaune, P., Gascoin, M.N., Begue, J.M., Campion, J.P., Guengerich, P.F. and Guguen-Guillouzo, C.: *Biochem. Pharmacol.* **34**, 2991 (1985).
11. Recknagel, R.O. and Glende, E.A.: *CRC, Crit. Rev. Toxicol.* **2**, 263 (1973).
12. Reynolds, E.S. and Ree, H.J.: *Lab. Invest.* **25**, 269 (1971).
13. Recknagel, R.O.: *Pharmacol. Rev.* **19**, 145

- (1967).
14. Noguchi, T., Fong, K-L., Lai, E.K., Alexander, S.S., Kang, M.W., Olson, L., Poyer, J.L. and McCay, P.B.: *Biochem. Pharmacol.* **31**, 615 (1982).
 15. Keppler, D., Lesch, R., Reutter, W. and Decker, K.: *Exp. Mol. Pathol.* **9**, 279 (1968).
 16. Decker, K. and Keppler, D.: *Prog. Liver Dis.* **4**, 183 (1972).
 17. Farber, J.L. and El-Mofty, S.K.: *Am. J. Pathol.* **81**, 237 (1975).
 18. Grun, M., Liehr, H. and Rasenack, U.: *Acta Hepatogastroenterol (Stuttg.)* **24**, 64 (1977).
 19. Matsuda, H., Samukawa, K. and Kubo, M.: *Planta Med.* **57**, 52 (1991).
 20. 은재순, 임종필, 박이규, 염정렬, 최동성, 안문생: *Kor. J. Pharmacogn.* **22**, 95 (1991).
 21. Kiso, Y., Kawakami, Y., Kikuchi, K. and Hikino, H.: *Planta Med.* **53**, 241 (1987).
 22. Yun-Choi, H. and Chang, I.: *Asian J. Pharmacy* **6**, 3 (1982).
 23. Kiso, Y., Tohkin, M. and Hikino, H.: *Planta Med.* **49**, 222 (1983).
 24. 이준우, 최준한, 강상모: *Kor. J. Pharmacogn.* **23**, 268 (1992).
 25. Reitman, S. and Frankel, S.: *Am. J. Clin. Pathol.* **28**, 53 (1957).
 26. Suzuki, H., Ohta, Y., Takino, T., Fuhisawa, K., Hirayama C., Shimizu, N., Aso, Y.: *Igaku no Ayumi* **102**, 562 (1977).
 27. Kiso, Y., Tohkin, M., Hikino, H., Hattori, M., Sakamoto, T. and Namba, T.: *Planta Med.* **50**, 298 (1984).
 28. Vogel, G.: *New natural products and plant drugs with pharmacological biological on therapeutical activity*, (ed. by Wagner, H. and Wolff, P.), Springer-Verlag, New York, p.249 (1976).