

[報 文]

일차 배양한 간세포에서의 권백의 간보호효과의 Screening Test

윤수홍·이주영*·하현**

대구효성가톨릭대학교 약학대학·중외제약*·신일전문대학**

Screening Test of *Selaginella tarmariscina* for Liver Protective Effects in Primary Cultured Hepatocytes

Yoon Soo Hong, Lee Ju Yeong* and Ha Hun**

Catholic University of Taegu Hyosung, College of Pharmacy, *Joongwae
Pharmaceutical Co. and **Shin Il Junior College

ABSTRACT

Selaginellae Herba has been used as folk medicine for antineoplastics, coagulants, antidotes and invigorants. To find an *in vitro* screening method for liver protective effect of *Selaginellae* Herba in benzo(a)pyrene intoxicated injury were examined in primary cultured rat hepatocytes. Using MTT assay, herba concentration showed dose dependently viability. The lowest concentration of benzo(a)pyrene giving cytotoxicity revealed around 50 μ M. The hepatoprotective effect of *Selaginellae* Herba in both water and chloroform extracts was also increased dose dependently.

서 론

Berry와 Friend¹⁾가 collagenase perfusion 방법에 의해 살아 있는 간세포를 분리한 이후 Seglen²⁾에 의한 관류 조건의 개선으로 90~95% 생존율을 지닌 간세포 분리와 간기능을 수일간 유지시킬 수 있는 배양법이 정립되었다.³⁻⁶⁾ 이 방법은 간단한 기구와 조작으로 비교적 쉽게 간세포를 많이 얻을 수 있어서 세포 수준에서의 약물 동력학, 약물 대사 및 대사 기능을 연구하는데 사용되며 다른 장기의 영향을 배제할 수 있고, 외부적으로 그 조건을 조절할 수 있는 장점이 있다.

간보호 작용 또는 간기능 촉진작용이 기대되는 물질의 탐색 일환으로 예로부터 각종 종양에 쓰이고 있는 권백, *Selaginella tarmariscina* (Beauv.) Spring⁷⁾

을 선택하여 간보호효과를 screening할 목적으로 환경 공해물질이며 다환방향족 탄화수소인 benzo(a)pyrene으로 실험적 간손상을 유도한 다음 일차 배양된 쥐 간세포에서 권백의 보호 효과를 검증하기 위한 *in vitro* 검색 방법을 설정하였다.

재료 및 방법

1. 시 약

William's E medium (WE)은 Flow Lab. 으로부터, Eagle's minimum essential medium (MEM)은 Nissui Pharmaceutical 으로부터, 또한, collagenase type I과 3-(4,5-dimethylthiazolyl-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT)와 dimethylsulfoxide (DMSO), benzo(a)pyrene (B(a)

P) 등은 Sigma의 것을 구입하였다.

2. 실험 동물 및 생약 시료

실험동물은 Life Science에서 구입한 150~180 g의 Sprague-Dawley계 웅성 흰쥐를 사용하였다. 본 실험에 사용된 권백은 1993년 영천시 한약 진재상에서 구입하여 세정, 음건하여 사용하였다.

3. 생약 분획 시료 조제

세절한 권백 50g을 취하여 9배량(w/v)의 증류수를 가하고 4시간 동안 가열 추출하였다. 추출액을 Whatman No.4 여지로 여과한 후, 그 여액을 감압 농축, 동결 건조하여 권백수침액으로 용시 희석시켜 사용하였다. Methanol:H₂O (4:1)혼액으로 24시간 실온에서 추출한 추출액을 감압 농축한 다음 chloroform으로 3회 반복 추출하여, chloroform층을 분리한 후, 다시 감압농축하여 chloroform 추출액을 얻었다. 각각의 추출액을 H₂O 및 dimethylsulfoxide로 녹인 후 3000×g에서 30분간 원심 분리한 후, 0.22 μm membrane filter (Millipore Co. U.S.A.)로 여과 멸균한 것을 시료로 사용하였다. 실험 결과의 통계 처리는 student t-test에 준하여 측정하였다.

4. 간세포 분리 및 배양

간세포는 Seglen 전관류법²⁾의 변법에 의해 다음과 같이 분리하였다. 흰쥐에 Nembutal (pentobarbital, 50 mg/kg)을 복강 주사하여 마취시킨 후 개복, 간문맥에 cannula (17G)를 삽입하여 고정한다. 다음, 37°C의 전관류액을 peristaltic pump로 25 ml/min 속도로 관류시켜 *in situ*에서 간을 digestion시켰다. Digestion된 간엽을 떼어 내어 적당량의 MEM을 가하여 조심스럽게 세절하고 250 μm tissue sieve로 여과하여 간세포를 분리하였다. 분리된 간세포를 MEM을 이용하여 4°C에서 50×g로 1분간 3회 원심 분리하여 수세하였다. Trypan blue exclusion test로 viability를 측정하여, 80% 이상일 때 배양 간세포로 이용하였다. 간세포 현탁액에 10% fetal bovine serum, 10⁻⁹M dexamethasone, 10⁻⁹M aprotinin 및 10⁻⁴M insulin이 함유된 WE를 가하여 5×10⁵ cells/well되게 조정된 후, 500 μl을 24-well culture plate (Corning Co.)에 넣어 CO₂ incubator (37°C, 95% O₂, 5% CO₂)에서 2시간 동안 배양하였다. 전 배양 후 배지를 갈아주고 12시간 경과한 다음,

간세포를 실험에 사용하였다.

5. MTT assay를 이용한 권백추출액의 간세포에 대한 proliferation과 세포 독성 측정

초대 배양 간세포에 MTT (5 mg/ml in PBS)용액을 well당 50 μl씩 넣은 후, 2시간 동안 37°C, 95% O₂, 5% CO₂ incubation시켰다. MTT 처리한 plate에 생성된 formazan 결정들을 DMSO로 용해시킨 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

이때 간세포의 생존율(percent survival)은 대조군의 흡광도에 대한 실험군의 흡광도의 비율로 표시하였다.

$$\text{percent survival(\%)} = \frac{\text{optical density of sample}}{\text{optical density of normal}} \times 100$$

6. 농도별 B(a)P에 의해 유발된 세포 독성의 측정

12시간 배양시킨 간세포에 B(a)P를 10 μl씩 가하여 최종 농도를 12.5, 25, 50, 100 및 200 μg/ml로 조정된 다음 24시간 동안 CO₂ incubation시킨 다음, GPT 활성을 505 nm에서 측정하였다.

7. 권백의 간세포 보호 효과 측정

간세포가 배양된 24-well plate (1×10⁶ cells/ml)에 권백의 각 추출액 10 μl를 농도별(최종 농도: 12.5, 25, 50, 100 및 200 μg/ml)로 가하고 B(a)P를 가해 50 μM이 되게 조정하여 24시간 배양한 후 GPT 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

1. MTT assay를 이용한 권백 추출액의 간세포에 대한 proliferation과 cytotoxicity 측정

MTT assay는 Mosmann³⁾에 의해 개발된 colorimetric tetrazolium assay로 radioisotope를 사용하지 않으므로 조작이 비교적 간편하고 짧은 기간 내에 실시할 수 있으며 정확도가 높다는 장점이 있어 살아 있는 세포의 수와 활성 측정을 통해 세포의 proliferation과 cytotoxicity 측정에 많이 쓰이고 있다.

권백 추출액의 초대 배양 간세포에 대한 proliferation과 cytotoxicity에 미치는 영향을 알아보기 위해 MTT assay를 이용하였다.

MTT assay를 이용한 권백 추출액의 간세포 독성

을 측정하여 Fig. 1에 나타내었다. 권백 추출액의 투여 농도의 범위 (12.5~200 µg/ml)에서는 초대 배양 간세포에 대한 세포 독성을 나타내지 않았으며 권백 추출액의 투여 농도가 높아짐에 따라 세포의 생존율이 점차 증가하는 경향을, 즉 간세포 증식에 있어 용량 의존적인 효과를 나타내었다.

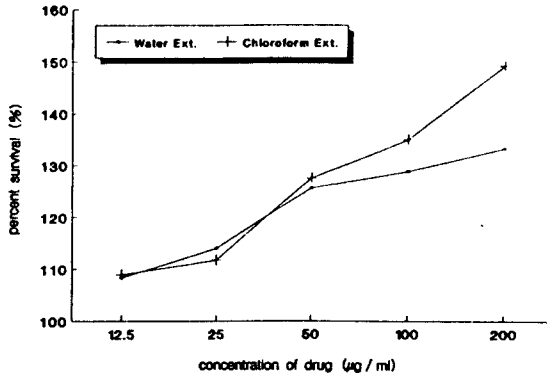


Fig. 1. Effect of *Selaginellae* Herba on percent survival of the primary cultured hepatocytes. After 12 h incubation, hepatocytes were exposed to various concentrations of *Selaginella tarmariscina* and then another 24 h, MTT assay was carried out. Each point represents the mean ± S.D. of 4 determinations.

2. B(a)P 농도에 따른 초대 배양 간세포의 GPT 활성의 변화

초대 배양 간세포에 B(a)P을 12.5, 25, 50, 100 및 200 µM씩 각각 처리하여 24시간 배양한 다음 배양액의 GPT 활성을 측정한 결과 Fig. 2에서와 같이 12.5 µM에서 50 µM 농도의 B(a)P이 처리되지 않은 대조군에 비해 16.3%에서 31.2%까지 지속적으로 증가하였으나, 50 µM 이상의 B(a)P의 투여시 서서히 감소하는 것으로 나타났다. 이런 결과로 B(a)P에 의한 실험적 간장해 유발적정 농도는 50 µM 정도라 사료된다.

3. 권백 추출액이 B(a)P으로 처리된 초대 배양 간세포의 GPT 활성에 미치는 영향

권백 추출액의 간세포 보호 효과를 알아보기 위해 초대 배양 간세포에 50 µM 농도의 B(a)P과 권백 추

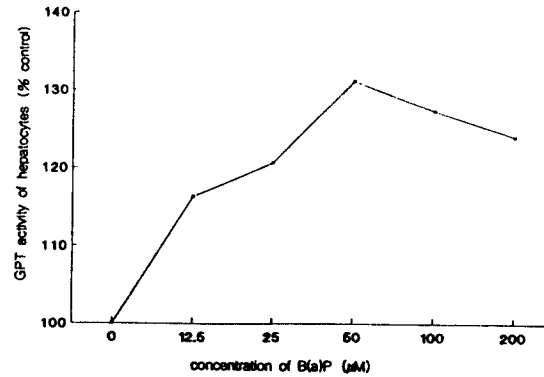


Fig. 2. Effect of B(a)P concentration on GPT activity of the primary cultured hepatocytes. After 12 h incubation, hepatocytes were exposed to various concentrations of B(a)P and GPT activity was determined. Each point represents the mean ± S.D. of 4 determinations.

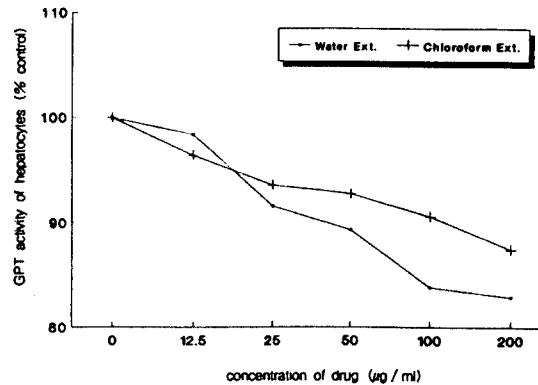


Fig. 3. Effect of *Selaginellae* Herba on GPT activity of the primary cultured hepatocytes. After 12 h incubation, hepatocytes were exposed to B(a)P and drug and then GPT activity was determined. Each point represents the mean ± S.D. of 4 determinations.

출액을 12.5, 25, 50, 100 및 200 µg/ml씩 가하여 24시간 배양한 후 배양액의 GPT 활성을 측정하였다.

Fig. 3에서와 같이 권백 수침액 및 chloroform 추출액에서 대조군보다 낮은 GPT 활성을 보여 간세포 보호 효과가 있는 것으로 나타났다.

권백 수침액의 농도가 증가함에 따라 GPT 활성은 대조군의 83.8%로 나타났으나, 100 µg/ml 이상의 농

도에서는 GPT 활성 감소의 폭이 둔화됨을 알 수 있었다.

권백 chloroform 추출액의 투여 역시 GPT 활성의 감소 경향이 용량 의존적으로 나타났으나, 200 µg/ml 농도에서의 GPT 활성은 대조군에 비해 87.4%로 동일 농도의 수침액 투여하였을 때보다 약간 높은 것으로 미루어 보아 권백 chloroform 추출액에 비해 권백 수침액은 간세포 보호 효과가 비교적 우수하다고 추정할 수 있었다.

효소 활성의 변동은 조직 세포의 효소 합성, 세포막의 투과성, 효소 작용의 저해 물질이나 활성화 물질의 혈중 출현 등에 영향 되는 바, 일반적으로 간손상, 즉 급성 간질환의 경우, 혈청중의 GOT, GPT, LDH 및 ALP 등의 활성도가 증가하고, cholinesterase 활성도가 감소⁹⁾하며, 약물 대사 속도 및 담즙 배설 속도 등의 parameter에도 변화가 나타난다고 알려져 있다.

결 론

Seglen의 변법인 collagenase perfusion법으로 배양한 간세포에 예로부터 종양 등에 쓰여 왔던 권백의 간보호효과와 *in vitro*에서의 최적의 검색 방법을 찾고자 MTT assay를 행하였다. 초대 배양 간세포에서의 간독성유발 물질로 쓰인 B(a)P의 농도는 50 µM이었으며, MTT assay를 이용한 권백의 농도 변화를 측정할 결과 투여 농도의 범위에서는 독성을 나타내지 않았으며, 200 µg/ml 정도에서 가장 높은 간세포의 viability를 나타내었다. B(a)P에 의하여 유도된 간세포 독성에 대한 권백의 효과는 dose-dependence를 나타내었으며 chloroform 추출액에 비해 수침액 처리가 우수하였다.

감사의 글

본 연구는 대구효성가톨릭대학교 교내 연구비 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Berry, M.N. and Friend, D.S.: High yield preparation of isolated rat liver parenchymal cells, *J. Cell Biol.*, **43**, 506, 1969
- Seglen, P.O.: Preparation of isolated rat liver cells, *Methods Cell Biology*, **13**, 29, 1976
- Ichihara A., Nakamura T., Tanaka K., Tomita Y., Aoyama K., Kato S. and Shino H.: Biochemical functions of adult rat hepatocytes in primary cultures, *Annals New York Academy of Sciences*, **77**, 1980
- Ichihara A., Nakamura T. and Tanaka K.: Use of hepatocytes in primary culture for biochemical studies on liver functions, *Molecular and Cellular Biochemistry*, **43**, 145, 1982
- Tanaka K., Kishi K. and Ichihara A.: Biochemical Studies on Liver Functions in Primary Cultured Hepatocytes of Adults Rats, *J. Biochem.*, **86**, 863, 1979
- Kato S., Aoyama K., Nakamura T. and Ichihara A.: Biochemical Studies on Liver Functions in primary Cultured Hepatocytes of Adults Rats, *J. Biochem.*, **86**, 1419, 1979
- 中華人民共和國 藥典委員會: 中華人民共和國 藥典, 化學出版社, **4**, 240, 1984
- Mosmann, T.: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assay, *J. Immuno. Method*, **65**, 55, 1983
- 太田庚辛, 田中昭: 診斷と治療, **65**, 991, 1977