

Effect of Baicalein on *t*-Butylhydroperoxide-Induced Cell Injury in Renal Tubular Epithelial Cells

Soon-Hee Jung[†]

Department of Clinical Pathology, Jinju Health College, Jinju 660-757, Korea

This study was undertaken to investigate the effect of baicalein, a major flavone component of *Scutellaria bicalcalensis* Georgi, on oxidant-induced cell injury in renal epithelial cells. Opossum kidney cells, an established proximal tubular epithelial cells, were used as a cell model of renal epithelial cells and *t*-butylhydroperoxide (*t*BHP) as an oxidant drug model. Cell viability was measured by MTT assay and lipid peroxidation was estimated by measuring the content of malondialdehyde, a product of lipid peroxidation. Exposure of cells to *t*BHP caused cell death and its effect was dose-dependent over concentration range of 0.1~1.0 mM. When cells were exposed to *t*BHP in the presence of various concentrations (0.1~10 μM) of baicalein, *t*BHP-induced cell death was prevented with a manner dependent of baicalein concentration. *t*BHP induced ATP depletion, which was significantly prevented by baicalein. Similarly, *t*BHP-induced DNA damage was prevented by baicalein. *t*BHP produced a marked increase in lipid peroxidation and its effect was completely inhibited by baicalein. These results indicate that *t*BHP induces cell injury through a lipid peroxidation-dependent mechanism in renal epithelial cells, and baicalein prevented oxidant-induced cell injury via antioxidant action inhibiting lipid peroxidation. In addition, these results suggest that baicalein may be a candidate for development of drugs which are effective in preventing and treating renal diseases.

Key Words: *t*-butylhydroperoxide-induced cell injury, Baicalein, Opossum kidney

서 론

신장에서 반응성 산소기들 (유해산소; reactive oxygen species)은 허혈성 급성신부전, 항생제나 독성물질에 의해 유발되는 급성신부전 및 사구체신염 등과 같은 여러 급성 및 만성 신장질환의 발병에 중요한 역할을 하는 것으로 인정되고 있다^{17,19,27,28}. 정상적인 조건에서 산소를 소모하는 모든 세포는 미토콘드리아에서 대사과정 중에 소모되는 산소의 약 2~5%가 superoxide나 H₂O₂와 같은 반응성 산소기들로 전환된다. 그러나 세포들은 이들을 분해하는 효소나 물질들을 가지고 있어 그 독성으로부터 세포를 보호하고 있다^{9,20}. 반응성 산소기가 어떤 기전으로 세포손상을 유발시키는 지에 대해서는 분명하게 밝혀져 있지 않으나, 반응성 산소기들은 지질, 단백질 및 DNA 등 세포의 여러 구성성분을 공격할 수 있지

만 생체막은 면적이 넓고 불포화지방산을 많이 함유하고 있기 때문에 반응성 산소기들에 의해 쉽게 공격을 받아 지질의 과산화 발생되게 되는데^{7,13}, 지질의 과산화가 일어나게 되면 세포막의 투과성이 증가되고^{4,7}, 세포의 기능이 저해되어 결국에는 세포가 사망까지 이르게 된다⁹.

따라서 지질의 과산화를 방지할 수 있는 약제들로 반응성 산소기에 의한 질병발생을 방지하거나 질병을 치료하려는 시도는 이루어지고 있으나 아직은 만족할만한 성과가 나타나지 않고 있다. Flavonoid들은 대부분의 식물에서 발견되고 많은 식물성 약제들의 주요 약리학적 구성성분으로 작용하고 있다. 이들은 혈관확장⁸, 항암, 항염증, 항알러지 및 항바이러스 효과 등 다양한 생물학적인 활성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다^{6,14}.

Baicalein은 식물성 약제 황금 (*Scutellaria bicalcalensis* Geori)에서 추출한 flavonoid 중에서 주요 구성물질로 알려진 약제이다²⁴. 본 연구에서는 baicalein이 신장세뇨관상피세포에서 oxidant인 *t*-butylhydroperoxide (*t*BHP)에 의한 세포손상에 어떤 효과를 가지고 있는지를 조사하였다. 근위세뇨관 유래세포인 opossum kidney (OK)세포를 신장세뇨관상피세포의 모델로 이용하였다.

*논문 접수: 2003년 12월 5일

수정재접수: 2003년 12월 13일

[†]별책 요청 저자: 정순희, Department of Clinical Pathology, Jinju Health College, Jinju 660-757, Korea

Tel: 055-740-1847, Fax: 055-740-1846,

e-mail: jsh53@chc.ac.kr

이 논문은 2003년 진주보건대학 학술연구 논문 연구비 지원비로 수행되었음.

재료 및 방법

1. Opossum kidney (OK) 세포의 배양

신장세뇨관에서 유래한 배양세포인 OK세포는 American Type Culture Collection (ATCC)에서 구입하여 사용하였다. 세포의 배양은 Dulbecco's modified Eagle medium (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO)에 10% 송아지 혈청 (GIBCO, Life Technologies, Grand Island, NY)을 첨가한 배양액에서 5% CO₂~5% 공기, 포화 습도, 온도 37°C 조건 하에서 배양하였다. 처음에는 250 ml flask에서 배양하며 3일에 한번씩 새 배양액으로 교환해 주었고, 6일 후 0.1% trypsin/EDTA를 이용하여 subculture를 시행하며 이후 2일에 한번씩 새 배양액으로 갈아 주며 5~7일째 실험에 사용하였다.

2. 세포생존력 측정

세포생존 정도는 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay 방법을 이용하여 측정하였다. MTT같은 tetrazolium염은 미토콘드리아에 있는 dehydrogenase에 의해 푸른색갈의 formazan 색소를 형성하기 때문에 세포생존력을 측정하는 데 유용한 방법이다. 세포들을 oxidant에 노출시킨 다음 Hank's balanced salt 용액 (HBSS)으로 세척한 후 MTT를 0.5 mg/ml 농도로 각 well에 첨가하였다. 세포들을 37°C에서 2시간 동안 incubation한 후 상층액을 제거하여 생존세포에서 형성된 formazan crystal을 110 µl의 dimethyl sulfoxide로 용해시켜 ELISA 기록기 (Bio-Tek instrument, EL, 311)로 550 nm에서 측정하였다. 성적은 tBHP를 처리하지 않은 정상세포에서 측정된 값의 100분율로 나타내었다.

3. 세포내 ATP 함량 측정

ATP 함량은 luciferin-luciferase 방법을 이용하여 측정하였다. 간단히 설명하면 세포를 0.5% Triton X-100 0.5 ml로 용해한 후 0.6 M perchloric acid 0.1 ml를 첨가하여 산성화시키고, 얼음위에 방치하였다. 다시 세포 부유물을 4 mM MgSO₄가 함유한 10 mM potassium phosphate 원충액으로 희석한 후에 20 mg/ml luciferin-luciferase 0.1 ml를 첨가하여 luminometer (MicroLumat LB96P, Berthold, Germany)로 20초 동안 기록하였다. 단백질 함량은 Arstila 등이 제시한 방법으로 측정하였다⁴⁾.

4. Lipid peroxidation 측정

세포막 지질의 과산화 정도는 그 산물인 malondialdehyde (MDA) 양을 측정하여 평가하였다²⁰⁾. 간단히 설명하면, 세포를 차가운 1.15% KCl 용액 (5% wt/vol)속에서 파쇄하고 이 조직파쇄 균질액 0.5 ml에 1% 인산 용액 3 ml과 0.6% thio-

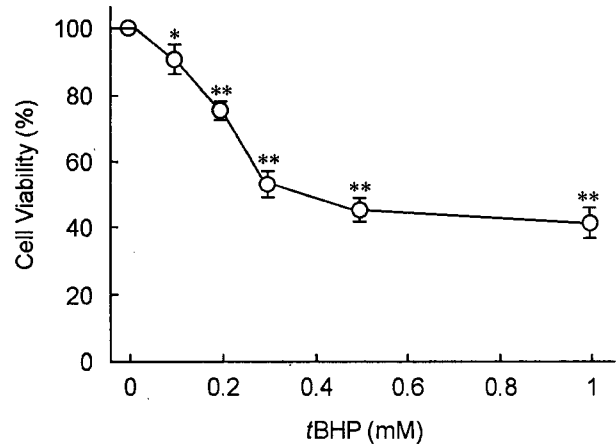


Fig. 1. Dose-dependency of *t*-butylhydroperoxide (tBHP) cytotoxicity in opossum kidney cells. Cells were exposed to various concentrations (0.1~1 mM) of tBHP for 120 min. Cell viability was measured by MTT assay. Data are mean \pm SE of five experiments.

barbituric acid 용액 1 ml을 첨가하여 끓는 물에서 45분간 가열하였다. n-Butanol 4 ml을 첨가하여 완전히 섞은 다음 2,000 g에서 20분간 원심분리한 후, 상층액의 흡광도를 536와 520 nm에서 측정하였다.

5. DNA 손상 측정

DNA 손상 정도는 DNA strand break를 DNA precipitation 방법으로 측정하여 산정하였다¹⁰⁾. 세포를 0.25 µCi/ml [³H] methylthymidine으로 24시간 동안 incubation한 후 tBHP에 노출시키고, HBSS로 세척하여 용해원충액 (10 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, 50 mM NaOH, 2% SDS, pH 12.4)으로 용해시켜 0.12 M KCl 0.5 ml를 첨가하였다. 용해액을 65°C에서 10분 동안 incubation한 후 5분 동안 얼음위에서 냉각시켰다. 200 g에서 10분 동안 원심분리하여 침전시키고 상층액을 얻어 용액속에 함유한 방사선동위원소의 활성을 liquid scintillation counter (TRI-CARB 2100TR, Packard, USA)로 측정하였다. 성적은 총 stranded DNA (double + single stranded)에 대한 single stranded DNA의 비로 나타내었다.

6. 자료정리 및 통계처리

성적은 평균치±표준오차로 나타내었으며, 평균치간의 유의성은 Student's *t*-test를 이용하여 검정하였고 *P* 값이 0.05 미만일 때 유의한 것으로 판정하였다.

결 과

1. 세포손상에 대한 tBHP의 농도 변화의 영향

Fig. 1은 OK세포에서 세포손상에 대한 tBHP의 농도변화

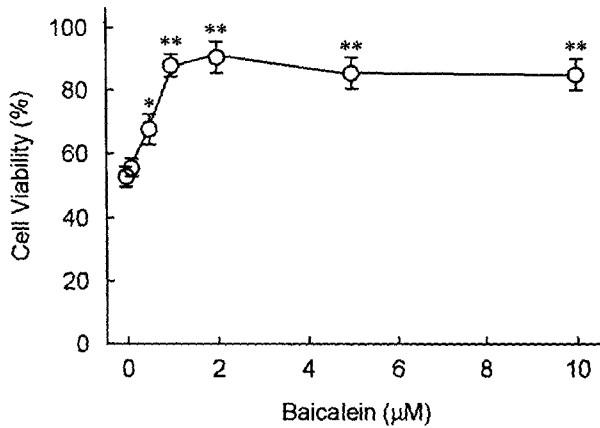


Fig. 2. Effect of baicalein on *t*-butylhydroperoxide (*t*BHP) cytotoxicity in opossum kidney cells. Cells were exposed to 0.5 mM *t*BHP in the presence or absence of various concentrations (0.1–10 μM) of baicalein for 120 min. Cell viability was measured by MTT assay. Data are mean ± SE of five experiments.

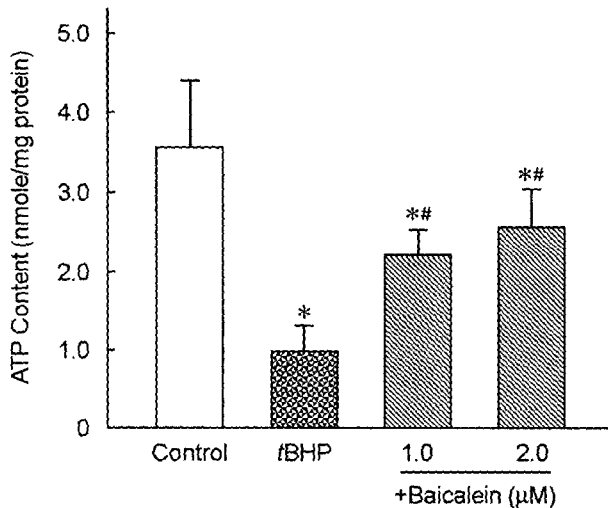


Fig. 3. Effect of baicalein on *t*-butylhydroperoxide (*t*BHP)-induced ATP deletion in opossum kidney cells. Cells were exposed to 0.5 mM *t*BHP in the presence or absence of 1.0 and 2.0 μM baicalein for 120 min. ATP content was measured by aluciferin-luciferase assay. Data are mean ± SE of four experiments.

의 영향을 조사한 것이다. 세포를 여러 농도의 *t*BHP이 존재하는 용액속에 2시간 동안 노출시켰을 때 세포생존율이 *t*BHP의 농도가 증가함에 따라 감소하였으나, *t*BHP의 농도가 0.5 mM 이상에서는 농도 증가에 따라 세포생존율의 변화가 크게 감소하지 않았다. 따라서 이후 실험에서는 세포를 0.5 mM *t*BHP에 2시간 동안 노출시켜 실험하였다.

2. *t*BHP의 독성효과에 대한 baicalein의 효과

Baicalein이 *t*BHP에 의한 세포손상을 방지할 수 있는지를

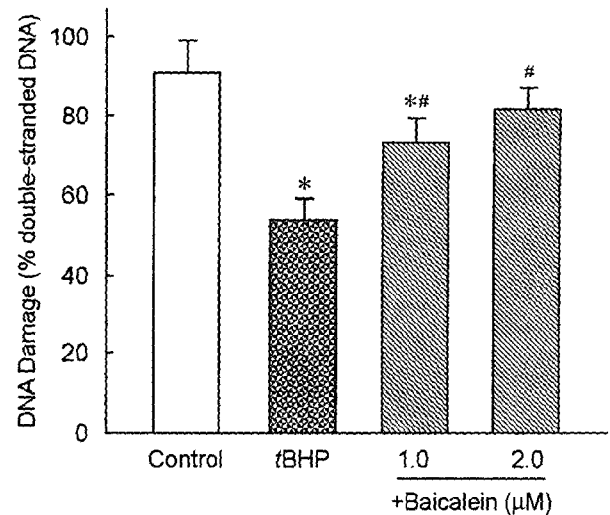


Fig. 4. Effect of baicalein on *t*-butylhydroperoxide (*t*BHP)-induced DNA damage in opossum kidney cells. Cells were exposed to 0.5 mM *t*BHP in the presence or absence of 1.0 and 2.0 μM baicalein for 120 min. DNA damage was measured by DNA precipitation assay. Data are mean ± SE of four experiments.

확인하기 위하여 세포를 여러 농도의 baicalein이 들어 있는 용액속에서 *t*BHP에 노출시켰다. Baicalein의 농도를 0.1에서 10 μM까지 변화시켜 관찰한 결과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 0.5 μM의 농도에서 세포손상을 유의하게 방지하였으며, 1 μM 보다 높은 농도에서 세포의 생존율을 정상세포의 약 90%까지 증가시켰으므로 최대 방지효과를 보였고, baicalein의 농도를 더욱 증가시키도 방지효과는 더욱 증가하지 않았다.

3. *t*BHP에 의한 ATP 고갈에 대한 baicalein의 효과

세포를 oxidant에 노출시켰을 때 ATP의 고갈이 초기 반응으로 나타나며, 이러한 ATP 고갈이 세포손상의 병인과 연관되어 있음이 알려져 있다²³⁾. 따라서 baicalein이 *t*BHP에 의한 ATP 고갈을 방지할 수 있는지를 조사하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 세포를 0.5 mM *t*BHP에 노출시켰을 때 ATP 함량이 0.99±0.21 nmole/mg protein으로 정상세포 (3.34±0.85 nmole/mg protein)의 약 30%까지 감소하였으며, 이러한 변화는 0.1 및 0.2 μM의 baicalein에 의해 유의하게 방지되었다.

4. *t*BHP에 의한 DNA 손상에 대한 baicalein의 효과

Oxidant들은 DNA 손상을 유도하고, 이러한 효과가 oxidant가 세포손상을 일으키는 데 중요한 역할을 하고 있는 것으로 보고되었다^{23,25)}. 따라서 baicalein이 *t*BHP에 의한 DNA 손상을 방지하는지를 관찰하였다. Fig. 4에 나타난 결과는 *t*BHP에 노출된 세포에서는 DNA 손상이 유발되며, 이러한 변화는 baicalein이 유의하게 방지함을 보이고 있다.

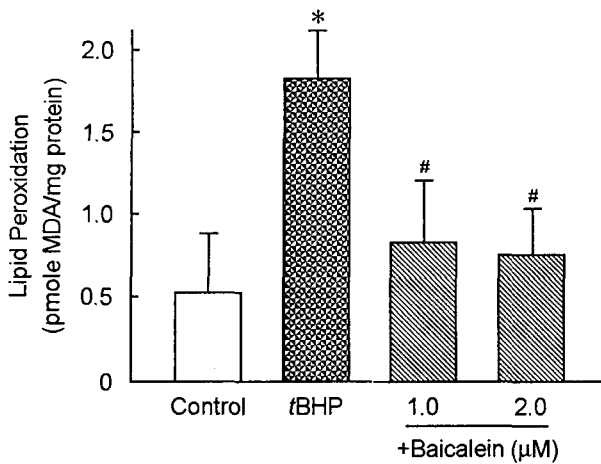


Fig. 5. Effect of baicalein on *t*-butylhydroperoxide (*t*BHP)-induced lipid peroxidation in opossum kidney cells. Cells were exposed to 0.5 mM *t*BHP in the presence or absence of 1.0 and 2.0 μM baicalein for 120 min. Lipid peroxidation was estimated by measuring malondialdehyde content. Data are mean ± SE of five experiments.

5. *t*BHP에 의한 지질의 과산화에 대한 baicalein의 효과

일반적으로 신장세포를 포함한 여러 세포에서 oxidant들은 지질의 과산화를 초래하여 세포의 기능을 저해하는 것으로 알려져 있다²¹⁾. 따라서 OK세포에서 *t*BHP가 지질의 과산화를 증가시키고, 이러한 변화에 대한 baicalein의 효과를 조사하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 세포에 0.5 mM *t*BHP를 처리하였을 때 지질의 과산화가 유의하게 증가하였으며, 이러한 증가는 0.1 및 0.2 μM의 baicalein에 의해 거의 정상 수준까지 억제되었다.

고 찰

자연식물에서 추출한 약물들이 서구의학의 질병치료에 많은 영향을 미치고 있다. 현재 이용하고 있는 약 120가지의 약물이 식물에서 얻어졌다¹⁸⁾. 과일, 채소 등 많은 종류의 식물속에 있는 항산화제들은 암을 포함한 반응성 산소기로부터 매개되는 여러 가지 질병의 예방약물로 이용할 가능성이 제시되고 있다¹⁾. 이런 점에서 특히 flavonoid들은 염증, 허혈 및 환경요인에 의해 유발되는 질병을 치료약물로서의 유용성이 있어 많은 관심의 대상이 되고 있다. 황금은 많은 종류의 flavonoid들을 가지고 있는데^{15,24)}, 이들은 강력한 항산화 작용을 가지고 있다¹⁰⁾. 황금이 가지고 있는 flavonoid의 주요성분은 baicalein으로 알려져 있으나²⁴⁾, 이 약물이 신장세포에서 oxidant에 의한 세포손상에 어떤 영향을 미치는 지에 대해서는 알려진 바가 없다.

본 실험에서 신장세포를 *t*BHP에 노출시켰을 때 각각의 세포

손상의 지표로 사용한 MTT 환원력이 *t*BHP의 농도에 비례하여 감소함으로써 *t*BHP가 농도에 비례하여 세포손상을 유발하고 있음을 알 수가 있다 (Fig. 1). *t*BHP를 세포에 노출시킬 때 baicalein을 0.1에서 10 μM 농도로 변화시켜 첨가한 결과 *t*BHP에 의한 세포손상이 현저하게 방지되었으며, 이러한 효과는 baicalein의 농도 의존적으로 나타났다 (Fig. 2).

본 실험결과 baicalein이 *t*BHP에 의한 ATP고갈을 방지하였으나, *t*BHP에 의한 세포손상을 방지하는 효과가 ATP고갈을 방지하여 나타난 결과인지는 본 실험의 결과로는 분명하지 않다. 비록 ATP고갈이 oxidant에 노출된 세포에서 나타나는 초기 반응이라 할지라도, 몇몇 저자들이 ATP고갈과 oxidant에 의해 유발되는 세포손상과는 관련성이 없다는 보고들을 하고 있다^{2,11)}.

DNA는 oxidant들의 주요 공격 대상이 되며, 세포가 oxidant의 공격을 받았을 때 DNA 손상이 일어나고 그 결과 세포사망에 이르게 된다⁹⁾. 실제로 본 실험에서도 baicalein이 *t*BHP에 의한 DNA 손상을 유의하게 방지하였다. 그렇지만 신장세포에서 DNA 손상이 oxidant에 의한 세포손상의 일차적인 원인인지에 대해서는 의문이 많다. 많은 저자들^{9,23)}이 DNA 손상이 세포사망의 직접적인 원인이 된다고 주장한 반면 다른 저자들^{2,12)}은 DNA 손상이 oxidant 처리 후에 유발되는 세포사망의 일차적인 원인이 아님을 보고하였다. 따라서 본 실험에서 *t*BHP에 의한 DNA 손상을 baicalein이 방지하였으나 이러한 효과가 세포손상을 방지하는 효과와 직결되는지는 더욱 실험을 진행하여야만 확인할 것으로 생각된다.

Oxidant들은 어떤 기전으로 세포손상을 유발시키는 지에 대해서는 명백하게 밝혀져 있지 않다. 이들은 지질, 단백질 및 DNA 등 세포의 여러 구성성분을 공격할 수 있지만 생체막은 면적이 넓고 불포화지방산을 많이 함유하고 있기 때문에 세포가 oxidant들에 노출되게 되면 지질의 과산화가 발생되게 되고^{7,13)}, 지질의 과산화가 일어나게 되면 세포막의 투과성이 증가되고^{7,4)}, 세포가 사망하게 된다⁹⁾. 신장세포를 이용한 실험에서 H₂O₂나 *t*BHP가 같은 oxidant들이 지질의 과산화를 일으켜 세포사망을 이르게 하는 것으로 밝혀졌다^{21,22)}. 본 실험에서도 세포를 *t*BHP에 노출시켰을 때 지질의 과산화가 현저하게 증가되었으며, baicalein을 처리했을 때는 증가되었던 지질의 과산화가 완전히 억제되었다. 이러한 실험결과는 *t*BHP이 지질의 과산화를 통해 세포손상을 일으켜, baicalein이 세포손상을 방지하는 효과가 지질의 과산화를 억제하는 항산화작용에 있음을 암시하고 있다. Flavonoid들이 항산화작용을 가지고 있음이 알려져 있다¹⁰⁾.

참 고 문 헌

- 1) Ames BN, Gold LS and Willett WC (1995): The causes and

- prevention of cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*, **92**: 5258-5265.
- 2) Andreoli SP (1989): Mechanisms of endothelial cell ATP depletion after oxidant injury. *Pediatr Res*, **25**: 97-101.
 - 3) Andreoli SP and Mallett CP (1997): Disassociation of oxidant-induced ATP depletion and DNA damage from early cytotoxicity in LLC-PK1 cells. *Am J Physiol*, **272**: F729-F735.
 - 4) Arstila AU, Smith MA and Trump BF (1972): Microsomal lipid peroxidation: Morphological characterization *Science*, **175**: 530-533.
 - 5) Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**: 248-524.
 - 6) Brown JP (1980): A review of the genetic effects of naturally occurring flavonoids, anthraquinones and related compounds. *Mutat Res*, **75**: 243-277.
 - 7) Chance B, Sies H and Boveris A (1979): Hydroperoxide metabolism un mammalian organs. *Physiol Rev*, **59**: 527-605.
 - 8) Duarte J, Perez Vizcaino F, Utrilla P, Jimenez J, Tamargo J and Zarzuelo A (1993): Vasodilatory effects of flavonoids in rat aortic smooth muscle. Structure-activity relationships. *Gen Pharmacol*, **24**: 857-862.
 - 9) Farber JL, Kyle ME and Coleman JB (1990): Biology of disease: Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Lab Invest*, **62**: 670-679.
 - 10) Formica JV and Regelson W (1995): Review of the biology of quercetin and related bioflavonoids. *Food Chem Toxicol*, **33**: 1061-1080.
 - 11) Frenkel K and Gleichauf C (1991): Hydrogen peroxide formation by cells treated with a tumor promoter. *Free Radic Res Commun*, **12-13**: 783-794.
 - 12) Latour I, Demoulin JB and Buc CP (1995): Oxidative DNA damage by t-butyl hydroperoxide causes DNA single strand breaks which is not linked to cell lysis. A mechanistic study in freshly isolated rat hepatocytes. *FEBS Lett*, **373**: 299-302.
 - 13) Mead JF (1976): Free radical mechanisms of lipid damage and consequences for cellular membranes. In: *Free Radicals in Biology* (Pryor W Eds.), pp. 51-68, Academic Press, New York.
 - 14) Middleton E and Jr, Kandaswami C (1992): Effects of flavonoids on immune and inflammatory cell functions. *Biochem Pharmacol*, **43**: 1167-1179.
 - 15) Morimoto S, Tateishi N, Matsuda T, Tanaka H, Taura F, Furuya N, Matsuyama N and Shoyama Y (1998): Novel hydrogen peroxide metabolism in suspension cells of *Scutellaria baicalensis* Georgi. *J Biol Chem*, **273**: 12606-12611.
 - 16) Olive PL (1998): DNA precipitation assay: a rapid and simple method for detecting DNA damage in mammalian cells. *Environ Mol Mutagen*, **11**: 487-495.
 - 17) Paller MS and Neumann TV (1991): Reactive oxygen species and rat renal epithelial cells during hypoxia and reoxygenation. *Kid Int*, **40**: 1041-1049, 1991.
 - 18) Pezzuto JM (1984): Plant-derived anticancer agents. *Biochem Pharmacol*, **53**: 121-133.
 - 19) Rehan A, Johnson KJ, Wiggins RC, Kunkel RG and Ward PA (1984): Evidence for the role of oxygen free radicals in acute nephrotoxic nephritis. *Lab Invest*, **51**: 396-403.
 - 20) Ross D and Moldeus P (1993): Antioxidant defence systems and oxidative stress. In: *Membrane Lipid Oxidation* (Ed. by Vigo-Pelfrey C), Vol II, pp. 151-170, CRC Press, Boston.
 - 21) Salahudeen AK (1995): Role of lipid peroxidation in H₂O₂-induced renal epithelial (LLC-PK1) cell injury. *Am J Physiol*, **268**: F30-F38.
 - 22) Schnellmann RG (1988): Mechanisms of t-butyl hydroperoxide-induced toxicity to rabbit renal proximal tubules. *Am J Physiol*, **255**: C28-C33.
 - 23) Schraufstatter I, Hyslop PA, Jackson JH and Cochrane CG (1988): Oxidant-induced DNA damage of target cells. *J Clin Invest*, **82**: 1040-1050.
 - 24) Shao ZH, Li CQ, Vanden Hoek TL, Becker LB, Schumacker PT, Wu JA, Attele AS and Yuan CS (1999): Extract from *Scutellaria baicalensis* Georgi attenuates oxidant stress in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol*, **31**: 1885-1895.
 - 25) Szabo C, Zingarelli B, O'Connor M and Salzman AL (1996): DNA strand breakage, activation of poly (ADP-ribose) synthetase, and cellular energy depletion are involved in the cytotoxicity of macrophages and smooth muscle cells exposed to peroxynitrite. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**: 1753-1758.
 - 26) Uchiyama M and Mihara M (1978): Determination of malonaldehyde precursor in tissue by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem*, **86**: 271-278.
 - 27) Walker PD and Shah SV (1988): Evidence of the role of hydroxyl radical in gentamicin-induced acute renal failure in rats. *J Clin Invest*, **81**: 334-341.
 - 28) Weinberg JM (1991): The cell biology of ischemic renal injury. *Kid Int*, **39**: 476-500.