

## 木香함유 DHL과 ML이 간세포 보호에 미치는 영향

박종찬, 윤용갑\*

성심한의원, \*원광대학교 한의과대학 방제학교실

### ABSTRACT

## Effects of *Radix Saussurea* on hepatoprotection

Jong-Chan Park, Young-Gab Yun\*

Sung Sim Oriental Clinic, \*Department of Oriental Medical Prescription, Wonkwang University

Dehydrocostus lactone (DHL) and Mokko lactone (ML) were isolated from *Saussureae Radix*, and their effects on heme oxygenase-1 (HO-1) expression and hepatoprotection in the liver cell line HepG2 were investigated. DHL induced HO-1 expression and HO activity in a dose-dependent manner, whereas ML lacking one double bond property at 11 and 13 carbons on its own chemical structure had no apparent effects. DHL also induced Nrf2 nuclear translocation and enhanced antioxidant response element (ARE) activation which mediated HO-1 gene transcription. Pretreatment with DHL protected HepG2 cells against oxidative damages caused by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Interestingly, the hepatoprotective effects of DHL appeared to be associated with HO enzymatic activation, HO-1 expression and Nrf2 activation, because blockage of HO activity by a HO inhibitor and inhibition of HO-1 and Nrf2 cellular synthesis by small interfering RNA abolished hepatoprotection afforded by DHL. Taken together, this investigation provides evidence supporting that *Saussureae Radix* is hepatoprotective against oxidative stress that causes abnormal liver damages.

- 
- 교신저자 : 윤용갑
  - 전북 익산시 신용동 344-2 원광대학교 한의과대학 방제학교실
  - Tel : 063-850-6834 E-mail : yunyg@wonkwang.ac.kr
  - 접수 : 2008/ 12/ 03 채택 : 2008/ 12/ 12

*Key word* : Dehydrocostus lactone (DHL), Mokko lactone (ML), Saussureae Radix, heme oxygenase-1 (HO-1)

## I. 緒 論

木香(*Radix Saussurea Seu Inulea*)은 국화과에 속하는 다년생 草本인 唐木香 川木香 土木香의 根을 말한다. 五香 密香 木香神 土木香 青木香 五香 木香 川木香 唐木香 등의 異名이 있으며, 唐木香 川木香은 중국 및 인도 등지에서 재배하고, 土木香은 우리나라에서 재배하며, 가을 겨울에 채취하여 잔뿌리를 제거하고, 햇볕에 말려 사용한다. 性味는 辛 苦 溫 無毒하고, 脾胃 大腸 肝 膽經에 작용하며, 胃腸氣滯 肝失疏泄 行氣止痛 健脾消食 등의 효능이 있는 것으로 알려져 있다<sup>1-6)</sup>.

木香에는 목향에는 sesquiterpene계 정유를 1~2.5% 함유하고 있고, 그 주성분은 costunolide, dehydrocostuslactone,  $\alpha$ -,  $\beta$ -cyclocostunolide, alantolactone 등이며, 기타 amino acid-sesquiterpene계 화합물인 saussureamine A~E가 함유되어 있으며, 鎮靜作用 降壓作用 抗菌作用 腸筋肉緊張抑制作用 氣管支平滑鎮靜作用 腸活動抑制作用 등이 있는 것으로 알려져 있다<sup>7-12)</sup>. 한편, 東醫寶鑑中 木香이 사용된 處方은 337方이 있으며, 이중 木香이 主藥으로 사용된 경우는 65개의 處方이 있다<sup>13-20)</sup>.

65개의 處方에 대한 活用 病症을 분석해보면, 泄瀉, 痢疾, 便秘, 疝病, 脹滿, 積聚, 食欲不振, 吞酸, 吐酸, 反胃, 醒酒 등으로 소화기 계통의 질환에 많이 사용하였으며, 현대 의학적으로 관찰하면 위장관이나 간기능에 관련된 질환이 주류를 이루고 있다.

최근 연구에 의하면 heme oxygenase-1 (HO-1)

은 세포손상을 초래하는 산화 스트레스를 효율적으로 제거하고 손상된 세포의 재생을 촉진하며, 간에서 발생하는 과도한 염증 반응을 억제함으로써 간세포를 효과적으로 보호하는 작용이 있는 것으로 보고되고 있다<sup>21-29)</sup>.

이에 저자는 HepG2를 이용하여 木香에 함유된 dehydrocostus lactone (DHL)과 mokko lactone (ML)을 에탄올로 분리하여 이들이 산화적 스트레스에 대한 간세포 보호에 미치는 영향과 간세포 보호, 간이식, 간세포재생, 간에서 독성물질 해독 작용 등에 직접적으로 관여하고 있는 것으로 알려져 있는 HO-1 발현 유도 및 활성화도, 발현 유도기전 등을 연구하여 보고하는 바이다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 시약 및 재료

배양배지 (RPMI 1640), antibiotic/antimycotic 및 Trypsin-EDTA 는 Gibco/BRL (Grand Island, NY, USA)로부터 구입하였고, FBS (fetal bovine serum)는 U.S. Bio-Technologies 사로부터 구입하여 사용하였다. HO-1 항체, Nrf2 항체, FITC-Ig 항체 및  $\beta$ -actin 항체는 Santa Cruz 사 (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하여 사용하였다. 모든 세포배양 용기 및 튜브는 Falcon 사 (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)로부터 구입하여 사용하였고, DAPI 및 기타 시약은 Sigma 사 (St. Louis, Missouri, USA)에서 구입하여 사용하였다.

## 2. 세포배양

인체 간암 세포주 (human hepatoma cell line, HepG2)를 ATCC (American Tissue Culture Collection)로부터 구입하여 10% FBS, antibiotic/antimycotic (100 U/mL penicillin, 25 µg/mL amphotericin D, 100 µg/mL streptomycin) 및 1.5% sodium bicarbonate가 첨가된 RPMI 1640 배지에서 95% 공기, 5% CO<sub>2</sub>, 습기가 충분한 37°C 의 대기로 배양하였다. 세포는 10 cm 배양접시에  $2 \times 10^6$  개가 되도록 2~3일에 한 번씩 분주하여 배양하였다.

## 3. 약재 선정, 추출, 분리 및 구조 규명

본 연구에서는 한방 문헌에 기초하여 간질환 치료에 약효를 지니고 있다고 예상되는 한약재를 선정 후 문헌적으로 보고되어 있는 선정된 식물의 화학성분을 검색하였다. 선정된 약재들을 모두 원광대학교 한의과대학 본초학 교실에서 기증받았으며, ethanol을 이용 1차 추출한 후 연구방법에 기술한 분석법을 이용하여 추출 혼합물의 활성 정도를 측정하며 활성이 있는 것으로 확인된 대상물은 다음의 과정을 이용하여 정제하였다. 생리활성 측정 결과를 바탕으로 각각의 추출물의 연구 우선순위를 먼저 결정하고 가장 우선순위가 높은 시료는 사용된 분석법에서 강한 효과를 갖고 있으나 그 화학성분이 널리 밝혀지지 않은 시료가 선택되었다. 일단 우선순위가 결정되면, 선정된 추출물은 대략적인 혼합물의 극성 정도에 따라 용매의 분획에 의해 구분하였다. 일반적으로 본 연구에서는 물과 hexane, ethyl acetate, butanol 사이의 연속적인 solvent partitioning 방법에 의하여 4개의 분획물을 확보하고 얻어진 각각의 분획물에 대한 활성 정도에 근거하여 계속적인 분리 과정을 지속하였다. 계속적인 분리과정으로서 얻어진 분획물에 대한 thin layer chromatography 분석 및 NMR spectroscopy 분석에 의하여 혼합물 내에 존재하는

유기 물질들의 대략적인 극성정도 및 대략적인 형태를 예측할 수 있으며, 이에 따라 다음 단계의 분리과정 (일반적으로 flash column chromatography)을 위한 고정상의 종류를 선택할 수 있다. 예를 들어, 수용성이 높은 시료의 경우는 reversed-phase silica gel chromatography가 우선 시도되었고, 그 외에 ion exchange chromatography, hydrophilic resin을 이용한 size exclusion chromatography 등이 경우에 따라서 시도되었다. 지용성이 높은 시료의 경우는 normal-phase silica gel chromatography를 우선적으로 적용되었고, 그 외에 Sephadex LH-20 등을 이용한 size exclusion chromatography 등이 사용하였다. 이상의 초기 분리 과정에서 얻어지는 분획 중 활성물질을 함유한 분획은 추가적인 column chromatography 혹은 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)를 이용한 분리과정을 통하여 순수한 물질을 정제하였다. 분리 과정 중 얻어지는 각각의 분획물은 Nuclear Magnetic Resonance (NMR) Spectroscopy 분석을 통하여 분리정도 및 혼합물 내에 존재하는 화합물의 종류를 예측할 수 있으며, 경우에 따라서는 기지물질을 확인 할 수도 있었다. 분리된 순수 천연 물질의 구조 분석은 Electron-Impact Mass spectrometry (EIMS), Electro-Spray Ionization Mass spectrometry (ESIMS) 및 500 MHz NMR Spectrometer 등을 이용하여 다음과 같이 진행한 다. NMR 및 MS 분석을 통한 분자식 및 부분구조 예상, 기지물질의 확인, High Resolution MS 분석을 통한 분자식 확인, Homonuclear decoupling, COSY, TOCSY 분석을 통한 분자내의 spin-system 규명, HMQC experiments 분석에 따른 분자내의 One-bond C-H correlations 규명, Selective INEPT, HMBC techniques 등을 통한 Long-range C-H correlations 확인 및 이에 따른 분자의 평면 (2차원) 구조 확인, NOE, NOESY, 혹은 ROESY 실험을 기초로 한 분자의 공간 (3차원) 구조 분석, 이상의 모든 NMR 실험은 원광대

학교의 500 MHz NMR spectrometer를 이용하여 수행하였다. 경우에 따라서는 위에서 언급한 실험만으로 구조결정이 불가능한 경우가 있을 수 있으며, 이러한 경우에는 추가적인 NMR 실험, MS-MS 방법 또는 추가적인 화학반응 등의 방법을 이용하였다. 상기와 같은 실험은 원광대학교 약학대학에 의뢰하여 필요한 추출물 및 순수화합물을 얻었다. 본 실험에 사용한 木香의 추출물인 DHL과 ML도 위와 같은 방법으로 분리동정 하였다.

#### 4. 세포 생존율 분석

HepG2 세포주의 세포 생존율을 MTT (2-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) 방법을 이용하여 분석하였다. 간단히하면, 세포주를 24-웰 플레이트에 웰당  $1 \times 10^4$  개가 되도록 분주한 다음 및 약제를 12 시간 처리하고 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 12 시간 처리한 다음 50 µg/mL이 되도록 MTT를 첨가하여 2~4시간 동안 반응시켰다. MTT와 생존세포로부터 생성된 보라색 불용성 formazan을 0.1% SDS 용액으로 용해하여 595 nm 파장에서 흡광도를 측정하고 대조군과 비교하여 백분율 (%)로 표시하였다.

#### 5. Western blot analysis

세포에 발현되는 특정 단백질을 조사하기 위해서는 충분히 확보된 세포에서 총 단백질을 분리하고 이것을 SDS-PAGE gel에 일정량 적제한 후에 전기장을 주어 단백질의 분자량에 따라 분리한다. 단백질이 분자량에 따라서 분리된 gel에 NC 막을 부착한 다음 전기적 특성을 이용하여 gel에 있는 단백질을 NC 막으로 이동시킨다. 단백질 이동을 완결한 후, 단백질이 부착된 NC 막에 특정 단백질과 반응하는 일차-항체를 부착하고 이 항체의 부착 여부를 판별할 수 이차-항체를 부착시켜 특정 단백질의 발현 정도를 확인한다.

#### 6. HO-1 activity 측정

목적 세포에 0.1 M potassium phosphate 완충 용액 200 µl를 부과한 후에 초음파 처리하여 원침한다. 이후 상층액에 반응용액 (50 µM hemin, 1 mM NADPH, 2 mM glucose-6-phosphate, 1U glucose-6-phosphate dehydrogenase)를 부과한 후에 37°C에서 30분 동안 반응시켜 bilirubin량을 spectrophotometer로 측정하여 분석한다.

#### 7. ARE activity 측정

GST-Ya ARE (5'-TAG CTT GGA AAT GAC ATT GCT AAT GGT GAC AAA GCA ACT TT-3')를 promoterless luciferase pGL-3 basic vector (Promega)에 도입, pGL-luc-ARE를 제작하였다. 제작된 pGL-luc-ARE (0.5 µg)는  $3 \times 10^5$  cell/well의 24 well plate 2.0 µg (1:4, w/w)의 TransIT-LT1 polyamine cell transfection reagent (Mirus Co.)와 혼합하여 28°C에서 4시간동안 transfection한 후 신선한 배지를 첨가해 주었다. 72시간 경과 후, PBS (phosphate-buffered saline)으로 세척한 cell을 110 µl Glo lysis buffer (Promega)에서 용균하였다. 용균된 시료는 luciferase activity 측정을 위해 동량의 Bright Dlo Substrate (Promega)와 혼합하여 Luciferase Assay System (Promega)의 방법에 준하여 Victor II luminometer microplate reader에서 활성을 측정하였다.

#### 8. 형광염색

세포에 목적한 시약을 처리한 다음 목적 시간에 회수하여 70% ethanol로 세포를 부착시켰다. Acetone을 이용하여 세포막 및 핵막의 투과성을 증가시킨 다음 Nrf2 항체를 2시간 부착시켰다. PBS로 3번 세척한 다음 FITC가 표지된 2차 항체를 2시간동안 부착시켰다. PBS로 3번 세척한 다음 고정액으로 고정하고, 형광현미경으로 관찰하였다. 한편 핵의 존재 영역을 확인하기 위해서 핵

을 DAPI로 염색하였다.

HO-1 발현을 유도하였다.

9. 통계분석

실험 결과는 mean ± S.D.로 표시하였으며 유의성 검정은 student's t-test에 의하였으며 p 값이 0.01 이하인 것만 유의성이 있는 것으로 하였다.

III. 實驗結果

1. 木香 추출물의 HO-1 발현 유도 효과

산화스트레스에 대하여 간세포를 보호할 것으로 예측되는 갈근(Puerariae Radix), 고삼(Sophorae Radix), 단삼(Salviae Miltorrhizae Radix), 대황(Rhei Rhizoma), 만형자(Viticis Fructus), 백모근(Imperatae Rhizoma) 방기(Sinomeni Caulis et Rhizoma), 목향(Radix Saussureae) 시호(Bupleuri Radix) 등 9개 한약재로부터 에탄올 추출물을 얻고, 이것을 세포독성이 나타나지 않은 200 µl/ml 농도로 HepG2 간세포에 12시간 처리한 다음에 총 단백질을 분리하여 HO-1 발현 여부를 Western blot 분석법으로 조사하였다. 비록 항산화 효과가 있다고 보고되어 있으나 8개의 한약재 추출물은 HO-1 발현을 유도하지 못했다. 그러나 이와는 다르게 木香 추출물은 HO-1 발현을 유도하였다.

2. HO-1 발현 활성물질 순수분리

세포에 활성이 있는 순수물질을 용이하게 분리하기 위하여 유기용매를 사용하여 木香 추출물로부터 HO-1 발현 활성을 보이는 dehydrocostus lactone (DHL) 순수분리하고 대조 순수물질로 DHL과 유사한 구조를 가진 mokko lactone(ML)을 순수분리 하였으며, 각각의 화학적 구조는 Fig. 2에 제시한 바와 같다. 두 순수 물질의 화학적 구조의 차이점으로 DHL에는 11번 탄소와 13번 탄소에 이중결합이 존재하고 ML에는 존재하지 않는다. Fig. 3에서와 같이 DHL은 농도 의존적으로

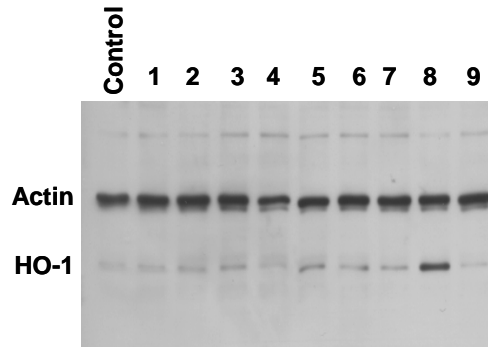


Fig. 1. Effect of ethanol extracts of medicinal plants on HO-1 expression in HepG2 cells.

Each extract at 200 µg/ml was exposed for 12 h to HepG2 cells; 1: *Pueraria thunbergiana*, 2: *Sophora angustifolia* Sieb, 3: *Salvia miltorrhiza* Bunge, 4: *Rheum coreanum* Nakai, 5: *Vitex rotundifolia*, 6: *Imperata cylindrica*, 7: *Menispermum trilobum* Thunb, 8: *Saussurea Seu Inulea*, and 9: *Bupleurum falcaum*. HO-1 expression was determined by Western blot analysis.

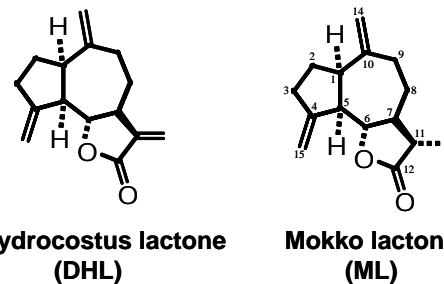


Fig. 2. Chemical structures of active dehydrocostus lactone and inactive mokko lactone isolated from ethanol extract of *Saussureae Radix*.

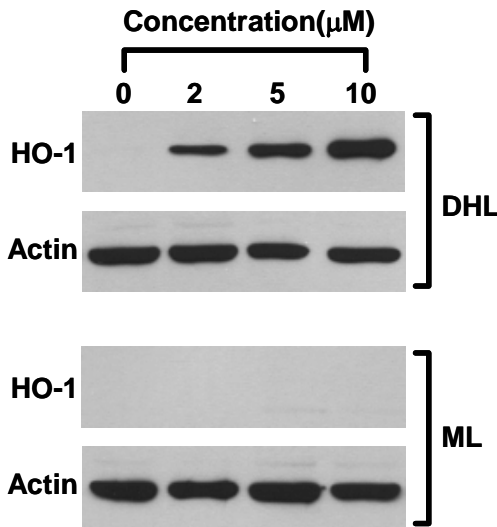


Fig. 3. Effects of DHL and ML on HO-1 expression in HepG2 cells.

HepG 2 cells were exposed for 12 h to either DHL or ML at indicated concentrations, total proteins were isolated and Western blot analysis was thereafter performed for HO-1 protein detection.

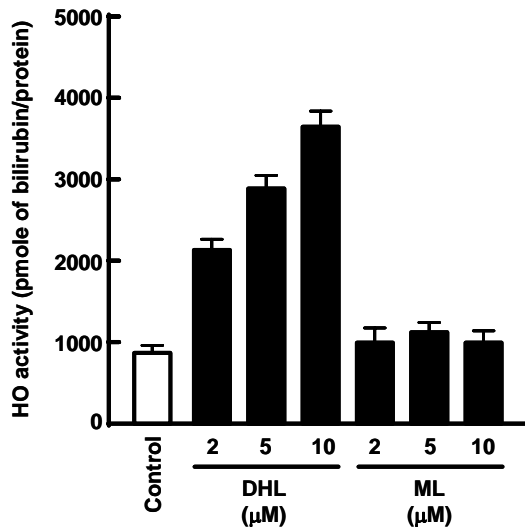


Fig. 4. Effects of DHL and ML on HO enzymatic activation in HepG2 cells.

HepG 2 cells were exposed for 12 h to either DHL or ML at indicated concentrations, enzymes were isolated and HO enzymatic activity was thereafter analyzed for 1 h.

### 3. DHL이 HO-1 활성도에 미치는 영향

세포에는 항상 발현되어 있는 HO-2와 특정 환경에서 발현이 유도되는 HO-1이 있다. DHL을 농도 별로 처리한 다음 세포에서 HO-2 및 HO-1을 분리하여 이들의 효소 활성을 조사하였다. Fig. 4에 제시한 바와같이 DHL은 HO 활성을 증가시켰으나, HO-1 발현에 영향이 없는 ML은 HO 활성 증가에 유의한 효과를 보이지 않았다. 이 결과는 DHL에 의한 HO 활성 증가가 HO-1 활성 증가에 의한 것이며 항상 발현되어 있는 HO-2의 발현에 의한 것이 아님을 보여준다.

### 4. DHL의 HO-1 발현 유도 메커니즘

세포에서 HO-1 발현은 세포질에 존재하는 핵 인자 Nrf2의 활성화에 의한 이 단백질의 핵 내로의 이동과 관련이 있다. 세포질에서 핵 내로 이동한 Nrf2는 표적 유전자의 전사를 지시할 수 있는 결합 부위에 존재하는 antioxidant response element (ARE)에 결합한다. 이후 Nrf2-ARE의 결합이 형성되면 표적 유전자인 HO-1의 발현을 전사된다. 한편 Nrf2가 무분별하게 핵 내로 이동하는 것을 차단하기 위하여 이 단백질은 Keap1 단백질과 결합되어 비활성화 상태로 존재한다. 어떤 원인에 의해서 Keap1이 Nrf2에서 이탈할 경우 자유로운 상태로 전환된 Nrf2는 핵 내부로 이동한다. Keap1이 Nrf2에서 이탈되는 메커니즘에 대하여 다수의 이론이 있으나, 가장 설득력을 얻고 있는 이론에는 Keap1 단백질에 존재하는 여러 개의 thiol 기가 변형되어 Keap1 단백질의 구조적 변화를 가져 오고 결국에는 Nrf2를 구속할 수 있는 능력을 상실하는 순차적 메커니즘이 있다. 이 이론은 thiol 기와 결합을 용이하게 형성하는 여러 가지 천연물의 활성을 설명하는데 사용되고 있다.

ML과 DHL은 단백질에 있는 thiol 기를 변형시킬 수 있는 능력에 있어서 차이점이 있다. 즉, ML은 11번과 13번 탄소 사이에 이중결합이 없기

때문에 thiol 기의 변형을 가져올 수가 없다. 반면, DHL은 단백질에 존재하는 thiol 기와 용이하게 결합할 수 있고 그 결과 단백질의 변형을 초래할 수가 있다.

DHL이 Nrf2를 핵 내부로의 이동을 촉진할 수 있는지 Nrf2 항체에 형광물질을 표지하여 Nrf2의 이동을 관찰하였다. Fig. 5에 의하면 DHL은 Nrf2의 핵 내부로의 이동을 매개한다. 반면 ML은 Nrf2의 핵 내부 이동을 유도할 수 없었다. 또한 Nrf2의 핵 내부로의 이동에 기인하는 ARE 활성의 증가가 DHL 처리군에서 발견되었으나, ML 처리군에서는 발견되지 못했다(Fig. 6).

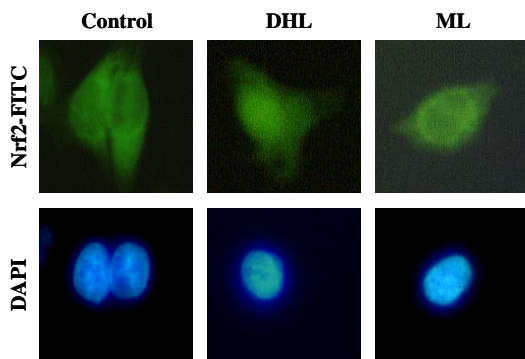


Fig. 5. Effects of DHL and ML on Nrf2 nuclear translocation in HepG2 cells.

HepG 2 cells were exposed for 2 h to either DHL or ML at 10  $\mu$ M, fixed and stained with anti-Nrf2 antibody conjugated with fluorescent FITC. The nuclei were stained with DAPI to show where to exist. When DHL-treated cells were confirmed under fluorescence microscopy, Nrf2 proteins were localized into the nuclei.

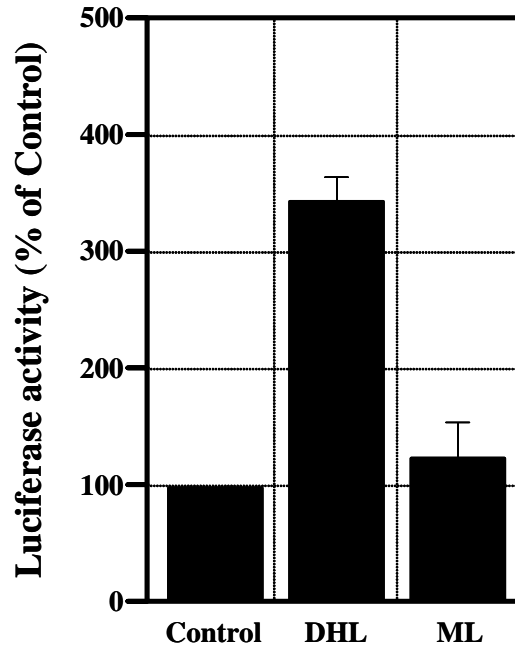


Fig. 6. Effects of DHL and ML on ARE activation in HepG2 cells.

HepG 2 cells were transiently transfected with reporter plasmids containing ARE, and exposed for 12 h to either DHL or ML at 10  $\mu$ M. The cells were then extracted and luciferase activity was measured.

### 5. 산화스트레스에 대한 DHL의 세포보호 효과

세포에서 HO-1 발현은 세포보호에 있어서 중요한 역할을 담당한다. 첫째로 HO-1은 각종 효소의 퇴화과정에서 유리된 산화성 헴을 분해하여 산화스트레스 생성을 조기에 차단한다. 둘째로 HO-1 활성결과로 생성되는 헴 분해산물 빌리루빈은 항산화작용이 있어 산화스트레스를 제거한다. 셋째로 다른 헴 분해산물 일산화탄소는 세포신호물질로 작용하여 항산화 메커니즘을 작동시킨다. 마지막으로 HO-1 활성결과로 유리된 철 이온은 이것의 재흡수를 촉진하는 ferritin의 발현을 촉진하여 부가적인 항산화작용을 촉진한다. 종합적으로 세포에서 발현된 HO-1은 산화스트레스를 제거하여 세포보호 효과를 제공한다.

간세포에서 HO-1 발현 유도 효과가 확인된 DHL의 항산화 작용에 의한 세포보호 효과를 조사하였다. 이 조사에서 산화스트레스는 산화성이 강한  $H_2O_2$ 를 이용하여 직접적으로 유도하였으며,  $H_2O_2$ 와 DHL이 직접적으로 반응하는 것을 방지하기 위하여 DHL을 12시간 전처리한 다음 DHL을 제거하고  $H_2O_2$ 를 처리하였다. Fig. 7에 나타난바와 같이 DHL은  $H_2O_2$ 에 대하여 세포보호 효과를 제공한다. 이러한 세포보호 효과는 HO-1 활성을 저해하는 SnPP의 처리에 의해서 상실되었다. 또한 HO-1 발현의 상위 단계로 판명된 Nrf2의 생성을 차단하거나, HO-1 발현을 siRNA를 이용하여 차단한 결과 세포보호 효과가 상실되었다. 이런 결과가 의미하는 바는 DHL은 Nrf2 활성에 의한 HO-1 발현 유도하고, 그 결과로 HO-1은 유리 헴을 분해하여 산화스트레스에 대하여 저항성을 제공한다고 볼 수 있다.

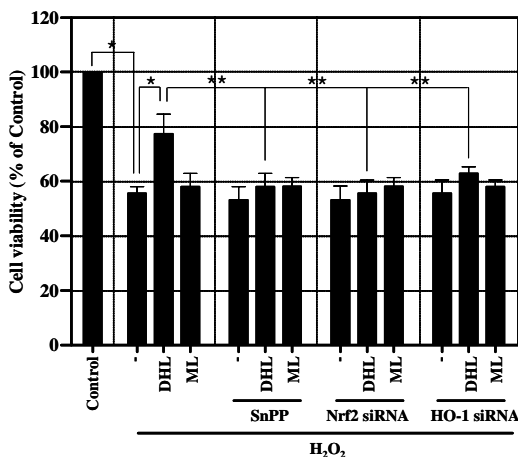


Fig. 7. Cytoprotective effects of DHL on  $H_2O_2$  damage in HepG2 cells.

HepG 2 cells were pre-incubated for 12 h with DHL at 10  $\mu$ M, washed three times with fresh media and then exposed for 12 h to  $H_2O_2$  at 200  $\mu$ M in the presence or absence of 50  $\mu$ M of SnPP. In another experimental condition, HepG2 cells were transiently transfected with siRNA for Nrf2 or HO-1, pre-incubated with DHL and exposed to  $H_2O_2$ . Cell viability was determined by

MTT assay. \* $p$ <0.05 with respect to untreated control and \*\* $p$ <0.05 with respect with each indicated control.

#### IV. 考 察

木香이 主藥으로 活用되는 方劑<sup>13-20</sup>를 살펴보면 瀉泄, 滑泄, 寒泄 症狀과 一般설사 및 痢疾에 活用된 加減木香散, 木香散, 四柱散, 固眞湯, 木香散 六神丸, 四磨散 등이 있으며 食傷症과 食欲不振 醒酒 吞酸, 吐酸 反胃에 活用된 處方으로는 豆蔻橘紅散, 安胃散, 人參開胃湯, 錢氏異功散, 千金養脾元, 神仙不醉丹, 透膈湯, 香橘餅 定生丹 등이 있다. 이러한 처방에 관련된 병증은 모두 소화기계통 질환이나 간병변 있을 때 나타나는 증후군들 이므로 여기에 活用된 主藥으로 活用된 木香도 간경변이나 소화기 계통에 직/간접적인 연관성이 있을 것으로 추측되며 특히 疝病은 팔약근의 경련성 통증에 해당되는 병증인데 여기에 活用되는 처방인 楊氏麝香元, 秘傳茱萸內消元, 二香丸, 聚香飲子, 木香金鈴丸에 모두 木香을 主藥으로 사용하고 있는 것으로 보아 木香이 간경변성 팔약근의 경련성 통증에도 깊은 연관성이 있는 것으로 사료된다.

또한 간경변 말기에 脹滿 腹水 등의 病症이 초래되는데 한의학적으로 이와 같은 病症에 活用할 수 있는 木香散, 木香分氣丸, 消脹元, 破積導飲丸, 進食丸, 廣朮化癥丸, 至聖丸 등의 處方이 모두 木香을 主藥으로 사용하고 있는 것으로 보아 木香은 간경변의 치료에 밀접한 연관성이 있음을 문헌적으로 시사하고 있는바 木香 유래 함유 성분에서 간세포 보호작용과 산화적 손상에 관련된 HO-1의 발현과 작용기전에 관련된 연구를 착수하게 되었다.

간은 영양소, 알코올 및 약물대사가 활발히 진행되면서 다양한 산화스트레스에 가장 많이 노출될 수 있는 장기 중의 하나이다. 산화스트레스는 간에 존재하는 다양한 항산화 물질에 의해서 효율적으로 제거되어 간에 직접적으로는 피해가 가지



않는다. 그러나 산화스트레스가 과량으로 유발되거나 또는 간에 풍부하게 존재하던 항산화 물질이 어떤 원인에 의해서 고갈될 경우 간은 산화스트레스에 의해 다소 손상을 받을 수가 있다. 독성물질에 노출된 간세포는 짧은 시간에 괴사되거나 정상적인 기능을 수행할 수 없게 손상되는 경우가 있다. 일반적으로 산화스트레스에 의해서 손상된 간세포는 간에 존재하는 대식세포인 Kupffer 세포에 의해서 1차적으로 탐식되어 대식세포의 활성화를 가져오고, 활성화된 Kupffer 세포는 여러 가지 세포활성물질을 분비하여 여러 종류의 면역세포를 간으로 유입시킨다. 이어서, 면역세포간의 상호작용에 의한 2차적인 염증반응이 초래되어 결국 간은 더 이상 간장으로서 역할을 수행할 수 없게 된다. 최근 여러 연구결과에 의하면 HO-1은 세포의 손상을 초래하는 산화스트레스를 효율적으로 제거하고, 산화스트레스에 의해서 손상된 세포의 재생을 촉진하는 것으로 알려졌다.<sup>30-39)</sup> 또한 HO-1은 간에서 발생된 부적절한 과다 염증반응을 억제한다.<sup>37)</sup> HO-1은 일차적으로 세포 손상의 필연적 결과로 나타나는 산화스트레스 유발 물질 free heme을 bilirubin, carbon monoxide (CO) 및 Fe(II)로 분해하고 제거하는 효소이다. 이차적으로 HO-1에 의해서 생성된 bilirubin은 강한 항산화 효과가 있으며, Fe(II)는 세포내 철의 함량을 조절하여 항산화 작용을 유도하는 ferritin 효소를 유도한다. 또한, CO는 nitric oxide (NO)와 유사한 효과가 있으나 NO 보다 독성이 적은 기체성 물질로 세포의 사멸 및 과다 염증을 차단한다.<sup>37)</sup> 종합적으로 간세포에서 HO-1 발현은 산화스트레스에 대하여 저항성을 제공할 뿐만 아니라 간에서 발생하는 부적절한 염증을 효과적으로 제거하여 간을 보호할 수 있다.

본 연구는 간세포로 HepG2를 사용하여, 이 세포에서 HO-1 발현 및 활성을 유도할 수 있는 한약재를 선별하고, 유효 성분을 분리한 다음 HO-1 발현 유도 메커니즘을 규명하고자 하였다. 또한,

한약재의 유효 성분에 의해서 발현된 HO-1이 간세포 보호에 효과가 있는지 조사하였다. 본 연구로부터 木香의 유효성분 DHL이 HO-1 발현을 유도하여 산화스트레스에 의한 간세포 손상을 억제할 수 있음을 알 수 있었다. 간 보호 효과가 있을 것으로 예측되는 8종의 한약재에서 에탄올 추출물을 얻었다. 각각의 추출물 200 µg/mL은 HepG2 세포에 대하여 유의한 독성을 유도하지 않았다. 이 농도의 추출물을 HepG2 세포에 12 시간 처리한 다음 세포를 회수하고, 총 단백질을 분리하여 SDS-PAGE로 분자량에 따른 단백질을 분석하였다. HO-1 단백질은 anti-HO-1 항체를 이용하여 Western blotting 방법으로 분석하였다. 8개의 추출물 중에서 1개가 HO-1 발현을 유도하였으며, 이것은 木香 추출물로 판명되었다 (Fig. 1). 이 추출물을 유기 용매로 분획하여 HO-1 활성을 보이는 순수물질을 분리하였다. 木香 추출물에서 얻어진 HO-1 활성 순수물질과 유사한 구조를 가진 비활성 순수물질의 화학적 구조를 Fig. 2와 Fig. 3에 제시하였으며, 각각 화합물명은 DHL과 ML로 판명되었다. 특히 DHL은 농도 의존적으로 HO-1 활성을 증가시켰다 (Fig. 4). 다음으로 DHL에 의한 HO-1 유도 메커니즘 및 간세포 보호 효과에 대하여 보다 자세히 연구하였다.

핵인자 Nrf2는 HO-1과 같은 항산화/세포보호 효소 발현 및 항산화물질 생성을 전사하는 역할을 수행한다.<sup>21)</sup> Nrf2는 비활성 상태에서 세포질 내에 있으며, 이것이 핵으로 무분별하게 이동하는 것을 방지하는 Keap1과 결합되어 있다. Keap1에는 세포내 산화상태에 반응하는 작동 센서(sensor)가 있다. Nrf2가 핵으로 이동하는 메커니즘으로 1) Nrf2 또는 Keap1이 인산화되어 핵으로 이동한다는 이론과, 2) Keap1에 있는 작동 센서가 'on' 상태로 유지되어 Nrf2가 Keap1으로부터 분리되고 이로써 Nrf2가 핵으로 이동한다는 이론이 있다. 이러한 두 경로를 통해서 핵으로 이동한 Nrf2는 표적 유전자(target gene)에 있는 ARE binding

site에 부착되고 그 결과로 ARE-의존 유전자의 전사가 시작된다. 전사되어 단백질로 전환된 다수의 단백질분자 중에서 항염증 및 세포보호 작용이 있는 단백질분자에는 HO-1이 있다. 종합적으로, HO-1 상위 신호전달 경로(signal transduction pathway)에는 핵인자 Nrf2에 의존하는 ARE의 활성 증가가 있다. 따라서 HO-1 유전자를 전사하는 Nrf2의 핵 내부로의 이동 및 ARE 활성 증가는 HO-1 유도 메커니즘을 연구하는 유용한 표적이 될 수 있다. HO-1 발현 유도활성을 보이는 물질 DHL이 Nrf2 활성에 어떠한 영향을 주는지 조사하였다. DHL 처리군에서 Nrf2의 핵 내로의 이동이 관찰되었으나, HO-1 유도 비활성을 보이는 ML 처리군에서는 대조군과 비교하여 어떤 차이점도 발견할 수 없었다 (Fig. 5). 또한, Nrf2 핵 내로의 이동한 결과에 의한 ARE 활성이 대조군에 비해 유의하게 증가된 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 6). 따라서 DHL에 의한 HO-1 발현은 Nrf2 핵 내로의 이동에 기인하는 ARE 활성 증가와 관련이 있음을 알 수 있었다.

일반적으로 HO-1 발현은 산화스트레스에 대하여 저항성을 제공한다.<sup>30)</sup> 활성물질을 12 시간 동안 전처리하여 HO-1 발현을 유도한 다음 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 이용한 산화스트레스를 유도시켰다. Fig. 7에 제시된 바와 같이 활성물질은 산화스트레스에 대하여 저항성을 제공했으며, 이런 저항성은 HO-1 활성과 밀접한 관계가 있음을 확인할 수 있었다. 즉, HO-1 활성 저해제를 처리한 세포에서는 산화스트레스 저항성이 감소되었다.

이상의 결과를 종합하면, 木香에서 순수 분리된 DHL은 핵인자 Nrf2 핵 내로의 이동을 유도하여 ARE 활성을 증가시키고, 그 결과로 HO-1이 발현되며 발현된 HO-1은 간 독성을 유도하는 산화스트레스에 대하여 저항성을 제공함으로써 간보호 효과를 제공하는 것으로 판단된다.

## V. 結 論

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 매개 산화스트레스에 대한 木香에서 순수 분리된 DHL의 간세포 보호효과를 조사하여, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. HepG2 세포에서 DHL은 농도 의존적으로 HO-1 발현을 유도하였다. 반면 유사한 구조를 가진 DL은 HO-1 발현 유도에 효과가 없었다. DHL에만 존재하는 활성 이중결합이 HO-1 발현에 중요한 역할을 할 수 있음을 알 수 있었다.
2. DHL은 HO 활성을 농도 의존적으로 증가시켰으나, ML은 어떤 유의한 효과를 보이지 못했다.
3. DHL은 HO-1 발현에 관여하는 상위 신호체계인 Nrf2의 핵 내부로의 이동을 유도하였으며, 이것의 결과로 ARE 활성 증가가 관찰되었다. 반면 ML은 ARE 활성을 유도하지 못했다.
4. DHL은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 매개 산화스트레스에 대하여 세포보호효과를 제공하였다. 산화스트레스에 대한 세포보호효과는 DHL에 의한 HO-1 발현 유도, Nrf2 활성 증가 및 HO-1 활성 증가와 관련이 있었다.

이상의 결과를 종합하여 다음과 같은 결론을 유도할 수 있었다. 첫째로, DHL은 Nrf2의 핵 내부로의 이동을 유도하여 ARE 활성을 증가시킴으로써 HO-1 발현을 유도하였다. 둘째로, DHL에 의해서 발현된 HO-1은 산화스트레스에 대하여 세포보호 효과를 제공하였다. 이러한 결과에 의하면 木香은 간에 작용하여 항산화 효과를 증가시킴으로써 간을 보호할 수 있음을 시사한다. 또한 木香의 약리효과에는 HO-1 발현 유도 효과 외에도 여러 가지 다른 효과가 있을 것으로 추정되며 이들 효과에 대한 더 많은 연구가 요청된다.

## 參考文獻

1. 雷載權, 張延模 主編, 中華臨床中藥學, 北京, 人民衛生出版社, 上卷, 1998, p. 972-976.
2. 李時珍, 도해본초강목, 高文社, 1980, p.498-499
3. 辛民教, 鄭善燮 共編. 圖解 鄉藥(生藥)大辭典. 서울. 永林社. 1990, p. 1056-1057.
4. 申佶求. 申氏本草學 各論. 서울. 壽文社. 1988, p.592-594.
5. 신민교, 원색본초유신, 서울, 경원문화사, 1979, p.142.
6. 田大準; 實用中藥辭典, 人民衛生出版社, 北京, 2002, 上卷 p.276-281.
7. 國家中醫藥管理局; 中華本草, 上海科學技術出版社, 下, 1998, p.1902-1908.
8. 김창민, 신민교, 안덕균, 이경순 외, 중약대사전, 서울, 정담, 2004, p.1385-1387.
9. 苗明三 主編, 法定 中藥藥理瓦臨床, 世界圖書出版公司, 西安, 1998年, p. 198-199.
10. 한중현, 김기명, 한방약리학, 의성당, 서울, 2004, p.312-315.
11. 박영순; 한방의 약리 해설, 서울, 아카데미서적, 2002, p.130.
12. 鄭虎占; 中藥現代研究與應用, 學苑出版社, 北京, 1998, p.938, 941.
13. 허준, 원본동의보감, 남산당 1975, p.184, 186, 191, 502, 663, 195, 476, 640, 319, 504, 18, 256, 263, 641, 452, 183, 431, 649, 93, 531, 183, 193, 437, 644, 647, 646, 650, 657, 653, 313, 613, 161, 269, 430, 649, 313, 504, 280, 401, 432, 435, 176, 499, 312, 314, 663, 464, 165, 184, 186, 191, 502, 663, 317, 222, 641, 648, 369, 278, 407, 643, 431, 641, 493.
14. 危亦林. 世醫得效方. 上海. 上海科學技術出版社. 1997, p.174, 201.
15. 陳師文 等; 太平惠民和劑局方, 人民衛生出版社, 北京, 1985, p.100, 83, 117, 127.
16. 李 梴. 醫學入門(新校 편주의학입문 下). 서울. 大星文化社. 1994, p.669, 760, 367, 351, 589, 340, 391, 161, 383.
17. 朱震亨; 丹溪心法附餘, 五州出版社, 1985, p.68
18. 龔廷賢; 萬病回春, 人民衛生出版社, 北京, 1984, p.107.
19. 龔信 纂輯, 古今醫鑑, 南昌, 江西科學技術出版社, 1990, p.400, 137, 377, 277.
20. 李 梴, 教精醫學入門, 翰成社, 1980, p.209.
21. Farombi EO, Surh YJ. Heme oxygenase-1 as a potential therapeutic target for hepatoprotection. *J Biochem Mol Biol.* 2006;39:479-491.
22. Wu L, Wang R. Carbon monoxide: endogenous production, physiological functions, and pharmacological applications. *Pharmacol Rev.* 2005;57:585-630.
23. Suematsu M, Tsukada K, Tajima T, Yamamoto T, Ochiai D, Watanabe H, Yoshimura Y, Goda N. Carbon monoxide as a guardian against hepatobiliary dysfunction. *Alcohol Clin Exp Res.* 2005;29:134S-139S.
24. Wang YW, Lin HC. Recent advances in hepatopulmonary syndrome. *J Chin Med Assoc.* 2005;68:500-505.
25. Romanque U P, Uribe M M, Videla LA. Molecular mechanisms in liver ischemic-reperfusion injury and ischemic preconditioning. *Rev Med Chil.* 2005;133:469-476.
26. Beaumont C, Canonne-Hergaux F. Erythrophagocytosis and recycling of heme iron in normal and pathological conditions: regulation by hepcidin. *Transfus Clin Biol.* 2005;12:123-130.
27. Kupiec-Weglinski JW, Busuttill RW. Ischemia and reperfusion injury in liver transplantation. *Transplant Proc.* 2005;37:1653-1656.

28. Kumar S, Bandyopadhyay U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol Lett.* 2005;157:175-188.
29. Xu C, Li CY, Kong AN. Induction of phase I, II and III drug metabolism/transport by xenobiotics. *Arch Pharm Res.* 2005;28:249-268.
30. Takahashi T, Morita K, Akagi R, Sassa S. Heme oxygenase-1: a novel therapeutic target in oxidative tissue injuries. *Curr Med Chem.* 2004;11:1545-1561.
31. Wijayanti N, Katz N, Immenschuh S. Biology of heme in health and disease. *Curr Med Chem.* 2004;11(8):981-986.
32. Naito M, Hasegawa G, Ebe Y, Yamamoto T. Differentiation and function of Kupffer cells. *Med Electron Microsc.* 2004;37:16-28.
33. Kim PK, Zuckerbraun BS, Otterbein LE, Vodovotz Y, Billiar TR. 'Til cell death do us part: nitric oxide and mechanisms of hepatotoxicity. *Biol Chem.* 2004;385:11-15.
34. Suematsu M, Suganuma K, Kashiwagi S. Mechanistic probing of gaseous signal transduction in microcirculation. *Antioxid Redox Signal.* 2003;5:485-492.
35. Selzner N, Rudiger H, Graf R, Clavien PA. Protective strategies against ischemic injury of the liver. *Gastroenterology.* 2003;125:917-936.
36. Bauer M. Heme oxygenase in liver transplantation : heme catabolism and metabolites in the search of function. *Hepatology.* 2003;38:286-288.
37. Wunder C, Potter RF. The heme oxygenase system: its role in liver inflammation. *Curr Drug Targets Cardiovasc Haematol Disord.* 2003;3:199-208.
38. Fondevila C, Busuttill RW, Kupiec-Weglinski JW. Hepatic ischemia/reperfusion injury—a fresh look. *Exp Mol Pathol.* 2003;74:86-93.
39. Zuckerbraun BS, Billiar TR. Heme oxygenase-1 : a cellular Hercules. *Hepatology.* 2003;37: 742-744.