

小青龍湯의 과산화수소로 유도된 간세포 독성에 대한 보호효과

이지선, 오수영, 서상희, 김태수, 마진열*

한국한의학연구원

Protective effect of Socheongryong-Tang on hydrogen peroxide-induced hepatotoxicity

Ji Seon Lee, Su Young Oh, Sanghee Seo, Taesoo Kim, Jinyeul Ma*

Center for Herbal Medicine Improvement Research, Korea Institute of Oriental Medicine (KIOM)

ABSTRACT

Objectives : Socheongryong-Tang (小青龍湯, SCRT) has been widely used to treat respiratory disease. In this study, we investigated the protective effects of SCRT on hydrogen peroxide-induced hepatotoxicity.

Methods : In the mouse primary liver cells, SCRT was pretreated for 1 h, and 1 mM H₂O₂ was treated to mouse primary liver cells. Cell viability was analyzed by using 3-4,5-Dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Also, the activity of AST, ALT and LDH were measured for the evaluation the protective effect of SCRT on H₂O₂-induced hepatotoxicity. Intracellular ROS level was analyzed by FACS.

Results : SCRT pretreatment decreased H₂O₂-induced hepatotoxicity and intracellular ROS production. Pretreatment of SCRT significantly reduced the cytotoxic effect induced by H₂O₂, associated with reducing DNA fragmentation and AST, ALT, LDH activities.

Conclusions : These results suggest that SCRT has protective effect against H₂O₂-induced hepatotoxicity.

Key words : Socheongryong-Tang, H₂O₂, Hepatotoxicity, ROS

서 론

활성산소는 세포 내 미토콘드리아에서 산화적 인산화 과정 중 주로 생성되며 이러한 활성산소의 생산이 과잉 되면서 산화적 스트레스를 유발시켜 세포의 기능을 손상시킴으로써 결국 세포사멸을 초래하게 되고 이는 여러 가지 질환의 원인이 된다¹⁾. 세포사멸의 원인이 되는 여러 형태의 생리학적 산화적 스트레스 유도 물질 중에서도 특히 활성산소의 주성분인 과산화수소는 다양한 세포들의 세포사멸을 유도하며 in vitro system에서 산화적 스트레스 유도제로 널리 사용되고 있다^{2,3)}.

소청룡탕(小青龍湯)은 한국, 일본, 중국에서 잘 알려진 호흡기 질환 치료제로, 마황, 작약, 세신, 건강, 감초, 계지, 반하, 오미자의 8가지 한약재로 이루어져 있다. 소청룡탕은 주로 알러지비염, 알러지천식, 감기 등에 주로 사용되어 왔으며 그 외에도 결막염, 습진, 수포, 신염 등에도 사용한다고 알려져 있다^{4,5)}.

최근 들어 소청룡탕이 항히스타민작용을 한다고 밝혀진 바 있으며 또한 다른 논문에서는 기관지 평활근의 확장 작용을 한다는 것이 밝혀졌다⁶⁻⁸⁾. 또한 천식 환자에게서 IL-4와 IgE의

레벨을 감소시키고 기도 내로의 염증세포 침윤을 막아 천식 치료에 도움을 준다는 사실도 알려져 있다⁹⁻¹²⁾. 그러나 소청룡탕의 간 보호 기능에 대해서는 알려진 바 없다.

본 연구에서는 흰쥐에서 분리한 간세포를 이용하여 과산화수소와 같은 산화적 스트레스에 의해 유발된 간세포독성에 대한 소청룡탕의 보호효과를 확인하였고, 이에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1. Hepatic primary 세포 배양

본 실험에 사용한 간세포 일차배양은 Berry와 Friend의 방법을 변형한 2단계 collagenase 관류법을 이용하여 다음과 같이 실시하였다. 흰쥐에 줄레틴과 림폰을 복강 내로 주사하여 마취한 후 개복하였으며, 간문맥에 24 gauge catheter를 삽관하여 Krebs-Ringer-HEPES 완충용액으로 관류시키고 collagenase (sigma, USA)로 구성된 소화용액을 순환 시켰다. 간세포가 소화된 후 간막을 벗겨 간세포가 유리되게 하였으며,

*교신저자 : 마진열, Korea Institute of Oriental Medicine, 483 Expo-ro, Yuseong-gu, Daejeon, 305-811, Korea.
· Tel : +82-42-868-9466 · Fax : +82-42-868-9573 · E-mail : jyma@kiom.re.kr.
· 접수 : 2011년 11월 4일 · 수정 : 2011년 11월 29일 · 채택 : 2011년 12월 16일

nylon mesh를 사용하여 여과하였다. 여과액은 400 rpm에서 3 분간 원심분리한 후 상등액을 버리고 침전된 간세포를 BSA (sigma, USA)가 포함된 완충용액에 현탁시켜 다시 원심분리하였다. 침전된 간세포를 배양액에 다시 현탁시켜 세포 현탁액을 얻은 뒤, 간세포 농도가 2×10^6 cells/ml이 되도록 조절하여, gelatin으로 미리 도포된 배양용기에 이식하였다. 배양액은 10% FBS (Hyclone), 500 U/l insulin (Roche, Switzerland), 2 mM L-glutamine (Lonza), 15 mM HEPES (Lonza, Switzerland), 10^5 U/l penicillin, 100 mg/l streptomycin (Gibco, USA)를 포함하는 William's E media (Gibco, USA)를 사용하였으며, 일정한 온도와 습도가 유지되는 37°C 배양기에서 CO₂ 5%의 혼합기체를 공급하여 배양하였다.

2. 시료의 추출 및 제조

본 실험에서 사용한 소청룡탕의 구성처방인 건강, 세신, 오미자, 백작약, 반하는 영천현대약업사 (경북 영천시 완산동 925-15)에서 구입하였으며, 마황은 풍산제약 (경북 안동시 수하동 311-1)에서, 계지는 류수한방제약 (서울 동대문구 제기동 860-18)에서, 감초는 허브팜 (경기도 남양주시 진건읍 용정리 800-5)에서 각각 구입하였다. 본 연구에서는 전탕추출법 (한국, 경서추출기 cosmos-660)에 의한 시험물질 조제를 실시하였으며 각 한약재들은 16.7 리터의 생수 (화이트, 경남 산청군 삼장면 덕교리 800)에 1 시간 동안 침적시킨 다음 180 분간 열탕 추출하였고, 동결건조기 (한국, 일신 FD5512)를 사용하여 분말 형태로 조제하였다.

3. MTT assay

세포에 소청룡탕을 10, 30, 100, 300, 1000 μ g/ml의 농도로 1 시간 전처리하고 과산화수소를 1 mM로 처리한 후 24 시간 동안 배양하여 배양액과 MTT 시약을 10 : 1의 비율이 되도록 MTT 시약을 첨가하였다. MTT 시약을 첨가하고 1 시간동안 배양한 뒤 배양액을 제거하고 배양접시의 각 well에 DMSO를 150 μ l씩 첨가하여 30 분 정도 흔들어 주고 ELISA reader를 이용하여 wave length 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 소청룡탕과 과산화수소를 처리하지 않은 대조군 세포를 100%로 하였을 때의 상대적인 세포생존율을 구하였다.

4. DNA fragmentation test

세포에 소청룡탕을 1 시간 전처리하고 과산화수소를 1 mM로 처리한 후 24 시간 동안 배양하였다. Genomic DNA는 Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega)를 사용하여 제공된 방법으로 추출하였고 1% agarose gel에서 전기영동을 시행하여 DNA fragmentation을 확인하였다.

5. ALT, AST와 LDH assay

ALT, AST 및 LDH의 측정은 1 mM의 과산화수소를 6 시간 처리하여 세포 독성이 유도된 간세포의 배양액을 취하여

측정하였다. ALT, AST의 활성은 ChemiLab ALT and AST assay kits (IVD Lab Co, Ltd, Korea)를 사용하여 제공된 시험방법에 따라 측정하였고, LDH는 Cytotoxicity detection kit (Roche Diagnostics GmbH, Germany)를 사용하여 Colorimetric assay 방법으로 측정하였다.

6. Intracellular ROS measurement

세포에 소청룡탕을 1 시간 전처리하고 과산화수소를 1 mM로 처리한 후 4 시간동안 배양하였다. 배양한 세포에 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (Invitrogen) 용액을 첨가하여 30 분간 처리한 후, 트립신으로 세포를 분리하고 원심분리하여 얻어진 세포를 PBS 300 μ l에 현탁시켜 fluorescence-activated cell sorting (BD Immunocytometry Systems)을 실시하였다.

결 과

1. Cell viability assay

과산화수소에 의한 세포 독성이 소청룡탕 전처리에 의해 감소되는지 확인하기 위하여 MTT assay 방법으로 정상군과 과산화수소 처리군, 그리고 과산화수소와 함께 소청룡탕을 농도별로 처리한 실험군을 비교하였다. 소청룡탕을 1 시간 동안 마우스의 일차 간세포에 전 처리한 후 과산화수소 1 mM를 24 시간 동안 처리하였다. 과산화수소를 단독 처리하였을 때, 약 42.5%의 세포생존율을 보였으나 소청룡탕을 전처리하였을 경우 농도 의존적으로 세포생존율이 회복되는 것을 확인하였다 (Fig. 1). 300 μ g/ml의 농도에서 가장 높은 생존율을 확인하여, 이후 실험에서는 300 μ g/ml의 소청룡탕으로 실험을 진행하였다.

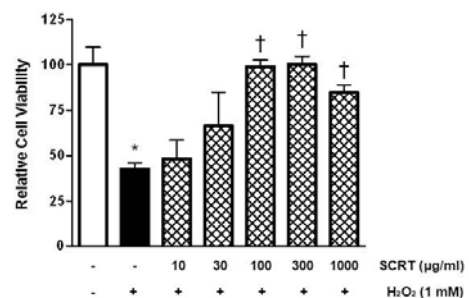


Figure 1. Protective effect of SCRT on the H₂O₂-induced cell death in hepatic primary cell. The cells were pretreated with SCRT (10, 30, 100, 300, 1000 μ g/ml) for 1 h and then treated 1 mM of H₂O₂. After 24 h, cell viability was measured by MTT assay. (* p<0.05 compared with the value of the cells not treated either SCRT or H₂O₂. † p<0.05 compared with the value of the cells treated with H₂O₂)

2. DNA fragmentation 확인

과산화수소에 의해 세포사멸이 유도된 세포에서 소청룡탕 전처리에 의한 세포보호 효과를 확인하기 위하여 DNA 단편화 실험을 진행하였다. 마우스의 일차 간세포에서 genomic DNA를 추출해 단편화 패턴을 관찰하였다. 세포에 소청룡탕

을 1 시간 전처리하고 과산화수소 1 mM 을 24 시간동안 처리한 후 genomic DNA를 추출하여 전기영동을 실시하였다. 대조군과 소청룡탕 단독처리군에서는 DNA 단편화가 관찰되지 않았으나 과산화수소 단독처리군에서는 뚜렷한 DNA 단편화가 관찰되어 과산화수소에 의한 세포사멸을 확인하였다. 이에 반해, 소청룡탕을 전처리한 샘플에서는 과산화수소에 의한 DNA 단편화가 억제되는 것을 확인하였다 (Fig. 2). 이와 같은 결과로 간세포에서 과산화수소에 의해 유도된 세포사멸이 소청룡탕에 의해 억제된다는 사실을 알 수 있었다.

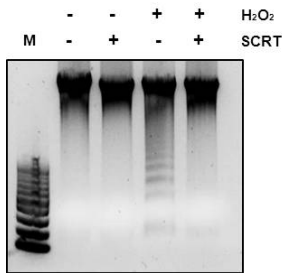


Figure 2. Effect of SCRT pretreatment on H₂O₂-induced DNA fragmentation in hepatic primary cells. The cells were pretreated with SCRT(300 μg/ml) for 1 h and then treated with 1 mM H₂O₂ for 24 h. DNA fragmentation was analyzed using 1% agarose gel.

3. 세포독성 검사

소청룡탕을 전처리하였을 때 과산화수소에 의해 유발되는 간세포독성이 감소되는지를 확인하기 위하여 다음과 같이 실험을 진행하였다. 마우스의 일차 간세포에 소청룡탕을 1 시간 동안 전처리 하고 1 mM의 과산화수소를 6 시간 동안 처리한 후 세포배양 배지를 수거하여 세포독성의 지표인 LDH의 발생량과 간독성의 지표인 ALT와 AST의 양을 조사하였다. 과산화수소를 단독 처리하였을 때 대조군에 비해 ALT, AST 및 LDH의 활성 증가를 나타내었다. 그러나 소청룡탕을 전처리하였을 경우, 과산화수소에 의한 LDH와 ALT, AST의 활성 증가가 100, 1000 μg/ml의 농도에서 억제되는 것을 확인하였다 (Fig. 3). 이러한 결과로 보아 소청룡탕이 과산화수소에 의해 유도된 간세포독성에 뚜렷한 간보호 효과를 나타내는 것을 보여준다.

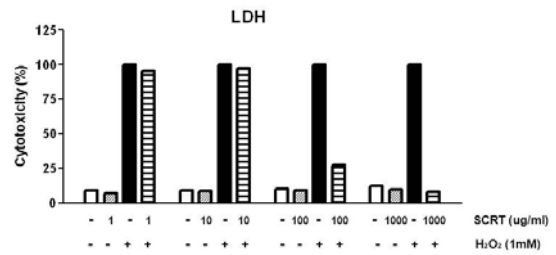
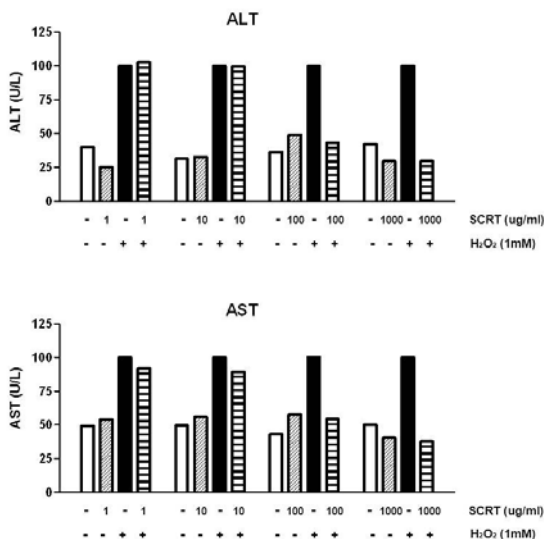


Figure 3. SCRT pretreatment decreases levels of ALT, AST and LDH in hepatic primary cells. The cells were pretreated with SCRT (1, 10, 100, 1000 μg/ml) for 1 h and then treated with 1 mM H₂O₂ for 4 h. ALT, AST and LDH levels were measured in cultured media.

4. 활성산소 생성 조사

소청룡탕의 활성산소 생성 억제 효과를 확인하기 위하여, 마우스 일차 간세포에 소청룡탕을 1 시간 전처리하고 1 mM의 과산화수소를 4 시간 동안 처리한 후 FACS를 이용하여 세포 내에 활성산소의 발생량을 측정하였다. 과산화수소에 의해 유발되는 활성산소가 소청룡탕 전처리에 의해 감소되는 것을 확인하였다 (Fig. 4).

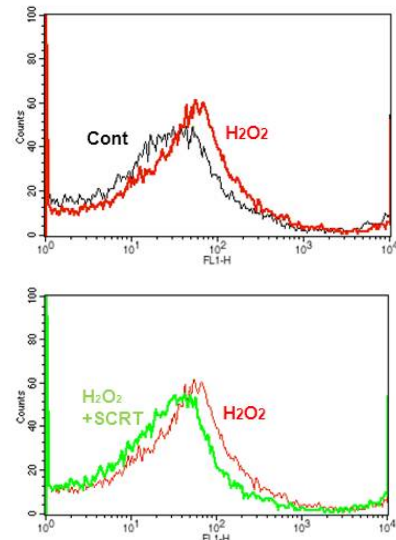


Figure 4. The inhibitory effect of SCRT on H₂O₂-induced intracellular ROS. Hepatic primary cells were pretreated with SCRT(300 μg/ml) for 1 h and then treated with 1 mM H₂O₂. After 4 h, cells were incubated with DCF and analyzed by FACS to detect intracellular ROS levels.

고 찰

소청룡탕은 예로부터 잘 알려진 호흡기 질환 치료제로 감기로 인한 기침, 기관지염, 알러지 천식 등의 호흡기 질환에 최근 들어 많이 사용되고 있는 호흡기계 처방 중 하나이다. 최근 들어 소청룡탕이 다른 항히스타민제에서 보이는 중추신경 억압에 의한 졸음이나 진정작용이 없이 항히스타민작용을 한다는 것이 밝혀졌으며 천식 환자에서 IL-4와 IgE의 레벨을 감소시킨다고 보고되는 등의 활발한 연구가 이루어지고 있지만 소청룡탕의 간보호 기능에 대해서는 아직 알려진 바 없다. 이에 본 연구에서는 소청룡탕을 전처리한 후, 산화적

스트레스 유발 모델로서 여러 세포주에서 용량의존적으로 세포사멸을 유발하는 과산화수소를 세포에 처치하여 소청롱탕의 간보호 효능을 확인하였다.

MTT assay는 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 청자색을 띠는 비수용성의 MTT formazan (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사법으로 MTT formazan의 흡광도가 최대가 되는 540 nm의 파장에서 측정된 흡광도는 대사가 왕성한 세포의 농도를 반영한다¹³⁾. 이 방법을 이용하여 소청롱탕을 전처리하였을 때 과산화수소에 의한 세포생존을 저해가 농도 의존적으로 회복되는 것을 확인하였다. 또한, 간세포 독성의 지표로 사용하는 ALT, AST, 및 LDH의 양을 측정된 결과, 소청롱탕의 전처리에 의해 과산화수소에 의한 세포 독성이 현저히 감소됨을 알 수 있었다.

세포사가 일어나면 세포내 endonuclease가 활성화되어 DNA가 일정한 크기 (200 base pair)로 잘라져 DNA 단편화가 관찰되는데^{14,15)} 과산화수소 단독처리군에서 뚜렷한 DNA 단편화가 관찰되어 세포사멸이 유도되었고 이러한 DNA 단편화가 소청롱탕 전처리에 의해 억제되는 것을 관찰하였다.

활성산소는 세포 내에서 유산소 호흡에 필연적으로 생성되며 과잉 생산된 활성산소는 세포막 분해, 단백질 분해, 지방산화, DNA 손상 등을 유발시켜 세포의 기능을 손상시키고 세포 사멸을 초래하게 되는데¹⁶⁾, 과산화수소에 의해 증가되는 활성산소가 소청롱탕 전처리에 의해 억제되는 것을 FACS를 이용하여 확인할 수 있었다.

이러한 결과로 소청롱탕은 과산화수소에 의한 간세포 독성을 억제하고 세포사멸을 억제함으로써 간세포 보호 효능이 있음을 알 수 있다.

결 론

본 연구에서는 소청롱탕의 간세포 보호 효과를 확인하기 위해 마우스의 일차 간세포를 이용하여 과산화수소에 대한 소청롱탕의 간세포 보호 효과와 세포사멸 억제 그리고 활성산소 생성 억제효과를 확인하였다. 그 결과, 소청롱탕 전처리하였을 때 과산화수소에 의한 세포생존을 저해가 회복되었고 과산화수소로 유발된 간세포 독성도 현저히 감소되었다. 또한 과산화수소에 의해 세포 내 증가된 활성산소가 소청롱탕 전처리에 의해 감소되어 소청롱탕이 항산화 효과가 있음을 확인하였다. 이러한 결과를 통해 소청롱탕이 과산화수소에 의한 간세포 독성을 억제하고 나아가 세포사멸을 억제하여 간세포 보호 효과를 나타낸다는 것을 알 수 있다.

감사의 글

이 연구는 교육과학기술부 지원 한국한의학연구원 기관고유사업 K11050의 지원을 받아 수행되었음

참고문헌

1. Parco, M. S., Y. Wang, and E. A. Stephen. Apoptotic signaling induced by H2O2-mediated oxidative stress in differentiated C2C12 myotubes. *Life Sci.* 2009 ; 84 : 468-81.
2. Jaeschke H, Gores GJ, Cederbaum AI, Hinson JA, Pessayre D, Lemasters JJ. Mechanisms of hepatotoxicity. *Toxicol Sci.* 2002 ; 65 : 166-76.
3. Fiers, W., R. Beyaert, W. Declercq, and P. Vandenebeele. More than one way to die : apoptosis and necrosis and reactive oxygen damage. *Oncogene.* 1999 ; 18 : 7719-30.
4. Jung S, Cho SJ, Moon KI, Kim HW, Kim BY, Cho SI. Effects of Socheongryong-Tang on Immunoglobulin Production in Asthmatic Mice. *Kor. J. Herbology.* 2008 ; 23(1) : 23-8.
5. Zuo Yanfu, Zhu Zhongbao, Huang Yuezhong, Tao Jinwen, Li Zhaoguo. *Science of prescriptions.* Nanjing. 2002 ; 44-6.
6. Sakaguchi M, Iizuka A, Yuzurihara M, Ishige A, Komatsu Y, Matsumiya T, et al. Pharmacological characteristics of Sho-seiryu-to, an antiallergic Kampo medicine without effects on histamine H1 receptors and muscarinic cholinergic system in the brain. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 1996 ; 18 : 41-7.
7. Kao ST, Lin CS, Hsieh CC, Hsieh WT, Lin JG. Effects of xiao-qing-long-tang(XQLT) on bronchoconstriction and airway eosinophil infiltration in ovalbumin-sensitized guinea pigs : in vivo and in vitro studies. *Allergy.* 2001 ; 56 : 1164-71.
8. Kao ST, Wang SD, Wang JY, Yu CK, Lei HY. The effect of Chinese herbal medicine, xiao-qing-long tang (XQLT), on allergen-induced bronchial inflammation in mite-sensitized mice. *Allergy.* 2000 ; 55(12) : 1127-33.
9. Ikeda Y, Kaneko A, Yamamoto M, Ishige A, Sasaki H. Possible involvement of suppression of Th2 differentiation in the anti-allergic effect of Sho-seiryu-to in mice. *Jpn J Pharmacol.* 2002 ; 90 : 328-36.
10. Makino T, Sasaki SY, Ito Y, Kano Y. Pharmacological properties of traditional medicine : effects of Gyokuheifusan on murine antigen-specific antibody production. *Biol Pharm Bull.* 2005 ; 28(1) : 110-3.
11. Ko E, Rho S, Cho C, Choi H, Ko S, Lee Y, Hong MC, Shin MK, Jung SG, Bae H. So-Cheong-Ryong-Tang, traditional Korean medicine, suppresses Th2 lineage development. *Biol Pharm Bull.* 2004 ; 27(5) : 739-43.

12. Ko E, Rho S, Lee EJ, Seo YH, Cho C, Lee Y, Min BI, Shin MK, Hong MC, Bae H. Traditional Korean medicine (SCRT) modulate Th1/Th2 specific cytokine production in mice CD4+ T cell. *J Ethnopharmacol*. 2004 ; 92(1) : 121-8.
13. Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays : the MTT assay. *Methods Mol Biol*. 2011 ; 731 : 237-45.
14. Shin SH, Kim DS, Kim MJ, Kim SH, Jo SK, Byun MW, Yee ST. Protective Effects of a Herbal Composition (HemoHIM) Against Apoptosis Induced by Oxidative Stress of Hydrogen Peroxide. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2006 ; 25(9) : 1127-32.
15. Patel T, Gores GJ, Kaufmann SH. The role of proteases during apoptosis. *FASEB J*. 1996 ; 10 : 587-97.
16. Lee SO, Lee HJ, Yu MH, Im HG, Lee IS. Total polyphenol contents and antioxidant activities of methanol extracts from vegetables produced in Ullung island. *Korean J. Food Sci. Technol*. 2005 ; 37 : 233-40.