

과산화수소로 유도된 산화성 간세포 손상에 대한 소시호탕(小柴胡湯)의 효과

서상희, 오수영, 이지선, 조원경, 김태수, 마진열
한국한의약연구원 신한방제제연구센터

Effects of *Soshiho-tang* on Hydrogen Peroxide-induced Oxidative Damage in Hepatocytes

Sang-hee Seo, Su-young Oh, Ji-seon Lee, Won-kyung Cho, Tae-soo Kim, Jin-yeul Ma
Center for Herbal Medicine Improvement Research, Korea Institute of Oriental Medicine (KIOM)

ABSTRACT

Objectives : The aim of this study was to investigate the hepatoprotective effect of *Soshiho-tang* (SSH) in mouse primary liver cells against hydrogen peroxide (H_2O_2)-induced oxidative stress. We also elucidated the molecular mechanism of hepatoprotective effect by SSH.

Methods : Cell viability, level of ALT, AST and LDH, intracellular ROS level, mRNA expression and activity of antioxidant enzymes were used to evaluate hepatoprotection of SSH against H_2O_2 . Target gene expressions were analyzed by real-time PCR.

Results : Pre-treatment with SSH for 1 hour prevented cytotoxicity against H_2O_2 . H_2O_2 -induced ROS level decreased under SSH pre-treatment. mRNA expression of GPx and SOD increased in SSH-treated cells. In addition, HSP72 and HSP40 gene expression were elevated under SSH-treatment.

Conclusions : These results indicate that SSH protects mouse primary liver cells from H_2O_2 -induced oxidative injury. This hepatoprotective activity of SSH is mediated by decreasing intracellular ROS and increasing antioxidant enzyme expression (GPx and SOD) and stress response protein (HSP72 and HSP40).

Key words : *Soshiho-tang*, hepatoprotective, oxidative stress, mouse primary liver cell

1. 서 론

소시호탕(小柴胡湯)은 한국, 중국 그리고 일본에서 만성간질환, 특히 만성간염과 간경변증 환자의 치료를 위해서 사용되는 대표적인 한방처방이다¹⁻³. 또한 소시호탕은 항염증⁴, 항산화⁵, 면역조절⁶,

간보호⁷, 간재생⁸, 그리고 항암효과⁹등의 다양한 약리작용을 보인다¹⁰.

소시호탕의 처방내용은 시호, 황금, 인삼, 반하, 감초, 생강, 그리고 대추의 7가지 한약재이다. 이 중 시호는 간 기능을 강화하여 간 장애의 치료제로 사용되며 acetaminophen으로 유도된 간 손상 흰쥐에서의 개선효과가 보고된바 있다¹¹. 황금에는 소염작용, 담즙배설 촉진작용, 이뇨작용, 모세혈관 투과성 억제작용 및 강간작용 등이 있다. 또한 이 두 약재를 함께 투여할 때는 진정작용이 나타나고, 자율신경의 긴장을 완화시키며, 이담작용도 발휘한

· 교신저자: Jin-yeul Ma 483 Expo-ro, Yuseong-gu, Dae-jeon, 305-811, Korea
Korea Institute of Oriental Medicine
TEL: +82-42-868-9466 FAX: +82-42-868-9573
E-mail: jyama@kiom.re.kr

다. 인삼은 망내계의 탐식작용을 높이고 소화흡수를 증강시키며 전신기능을 부활시키고, 감초는 steroid 유사 작용에 의해 소염작용을 나타내고, antianaphylaxis 작용과 해독작용도 나타낸다. 반하는 진토작용과 진해, 거담작용을 나타내고 생강과 같이 작용하여 위의 연동운동을 조정한다. 대추는 여러 약들을 조화시키며 영양·자유했다¹².

활성산소는 산화적 스트레스에 의해 간손상을 유발하는 가장 대표적인 인자이다. 활성산소는 높은 반응성을 가지고 있어서 세포내 DNA나 단백질 등과 반응하여 DNA상에 염기서열을 변형시키거나 효소 단백질의 구조를 변형시켜 제 기능을 못하게 함으로서 체내 세포에 손상을 입힌다. 이러한 활성산소가 간세포에 축적되면 간세포의 손상이 일어나게 되는데, 항산화 효소 등에 의해서 간세포의 활성산소에 대한 간세포 파괴가 억제된다^{13,14}.

소시호탕의 간 보호 효능에 대한 연구가 활발히 진행되어오고 있다. 소시호탕이 사염화탄소에 의한 간세포 독성을 억제시킨다는 보고와 함께¹⁵, 소시호탕의 주 구성물질인 시호에 대한 흰 쥐에서 CCl_4 에 의한 간독성의 보호효과도 입증되었다^{16,17}. 그러나 H_2O_2 에 대한 소시호탕의 간 보호 효능에 대한 연구는 이루어지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 활성산소인 H_2O_2 에 대한 간 독성을 억제하는 소시호탕의 효능을 확인하고, 이들의 간 보호 효능에 관여하는 분자메카니즘을 규명하였고, 이를 보고하고자 한다.

II. 재료와 방법

1. 실험동물 및 사육환경

체중이 30 ± 3 g의 수컷 ICR 마우스(오리엔트 바이오, 경기도 성남시 중원구 상대원동 143-1) 5주령을 사용하였으며, 일주일간 시험을 실시하는 동물실에서 순화시키고 일반 임상증상을 관찰하여 건강한 동물을 사용하였다. 실험은 실험동물윤리위원회의 승인을 거쳐 이루어졌으며, 순화 및 실험기

간 동안의 사육환경은 온도 23 ± 3 °C, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 환기횟수는 시간당 12~16회, 조명은 12시간 명암주기(점등 7:00, 소등 19:00), 조도는 150~300 Lx로 조정하여 일정한 사육환경 조건을 유지하였다. 그리고 실험동물용 고품사료(PMI nutrition, USA)와 물은 자유 섭취 조건으로 하였다.

2. Hepatic primary 세포 배양

Berry와 Friend의 방법¹⁹을 변형하여 다음과 같이 실시하였다. 마우스에 쥘레틸과 렘폰을 복강 내로 주사하여 마취한 후 개복하였으며, 간문맥에 24 gauge catheter를 삽관하여 Krebs-Ringer-HEPES 완충용액으로 관류시키고 collagenase(sigma, USA)로 구성된 소화용액을 순환 시켰다. 간막을 벗겨 간세포가 유리한 후 nylon mesh를 사용하여 여과한 후, 여과액을 원심분리하여 간세포를 침전시켰다. 침전된 간세포를 BSA(sigma, USA)가 포함된 완충용액에 현탁 시켜 다시 원심 분리하였다. 침전된 간세포를 배양액에 다시 현탁시켜 세포 현탁액을 얻은 뒤, 간세포 농도가 1×10^5 cells/ml이 되도록 조절하여, gelatin으로 미리 도포된 배양용기에서 배양하였다. 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)를 사용하였으며, 일정한 온도와 습도가 유지되는 37 °C 배양기에서 CO₂ 5%의 혼합기체를 공급하여 배양하였다.

3. 시료의 추출 및 제조

본 실험에서 사용한 소시호탕의 처방 구성은 Table 1과 같다. 시호, 황금, 인삼, 반하, 대추는 영천현대약업사(경북 영천시 완산동 925-15)에서 구입하였으며, 감초는 미릉생약(경북 영천시 금노동 377-26)에서, 생강은 농협에서 각각 생산자 및 재배포지역이 명확한 한약재를 구입하였다. 본 연구에서는 전탕추출법(한국, 경서추출기 Cosmos-660)에

의한 시험물질 조제를 실시하였으며 각 한약재들은 16.7 L의 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(수율: 24.89%).

Table 1. The Prescription of *Soshiho-tang*.

Herb	Scientific Name	Dose (g)
시호	<i>Bupleurum falcatum L.</i>	600
황금	<i>Scutellaria baicalensis Georgi</i>	400
반하	<i>Pinellia ternata Breit</i>	200
생강	<i>Zingiber Officinale Roscoe</i>	74.5
인삼	<i>Panax ginseng C.A. Meyer</i>	200
대조	<i>Zizyphus jujuba</i>	100
감초	<i>Glycyrrhiza uralensis Fisch</i>	100
Total amount		1674.5

4. MTT assay

마우스의 일차 간세포를 48-well microtiter plate 에 세포농도 1×10^5 cells/ml로 조절하여 200 μ l/well 에 넣고 소시호탕 물추출물(10, 30, 100, 300, 1000 μ g/ml)을 1 시간 동안 전처리한 후 세포에 H₂O₂ 1 mM을 처리하고 24 시간 배양 후 MTT 시약을 첨가하여 30 분 배양하였다. 배양액을 제거한 후 DMSO를 첨가하여 형성된 불용성 formazan을 용해시킨 후 ELISA reader를 이용하여 wave length 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. DNA fragmentation

소시호탕 물추출물 200 μ g/ml을 1 시간 동안 전처리 한 후 세포에 H₂O₂ 1 mM로 처리하고 24 시간 배양 후 Wizard[®] Genomic DNA Purification Kit(promega)를 이용하여 genomic DNA를 확보하였다. 이를 1% agarose gel에서 전기영동 하였다.

6. ALT, AST와 LDH assay

ALT, AST 및 LDH의 측정은 간세포의 배양액을 취하여 측정하였다. ALT, AST의 활성은 ChemiLab

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

7. 세포내 ROS 측정

마우스의 일차 간세포 내 ROS 양은 형광 probe인 DCF-DA을 사용하여 측정하였다. 배양액에 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate(DCF-DA)(Invitrogen) 용액을 첨가하여 30 분간 처리하였다. 트립신이 처리된 세포를 수거하여 PBS로 현탁한 후 이를 fluorescence-activated cell sorting(BD Immunocytometry Systems)를 사용하여 세포내 ROS와 반응한 형광정도를 측정하였다.

8. Enzyme activity

항산화제 효소 활성 측정은 Catalase Activity Assay Kit(K762-100, 바이오비전), Superoxide Dismutase (SOD) Activity Assay Kit(K33-100, 바이오비전) 및 Glutathione Peroxidase Activity Assay Kit (K773-100, 바이오비전)를 사용하여 바이오비전에서 제시한 방법에 준하여 측정하였다.

9. Real-time PCR

Total RNA를 easy-spin[™] Total RNA Extraction Kit(intron)을 이용하여 분리한 후, Qiagen Omniscript RT kit를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 프라이머 (actin-F, tggatcctgtggcatccatgaaa; actin-R, taaaa cgcagctcagtaacagtcgc; CAT-F, ctctgtttcccgtagcaatcag; CAT-R, gtcagccagtaatcaccaag; SOD-F, ggacctca ttttaactcctactctaag; SOD-R, tgcccaggttccaacatg; GPx-F, tctgcagatacctgtgaactg; GPx-R, tagtcagggtggacgtcagt; HSP72-F, accaacgacaagggccgcct; HSP72-R, acttgtccagcacttcttc; HSP40-F, ttacaag cgcaggagaagac; HSP40-R, ttgacaatctgacctggatg; HSP27-F, tgcttcacccggaatacac; HSP27-R, ctcgaa

agtaaccggaatgg)를 사용하여 94 °C 10 분, [94 °C (10 초), 50 °C (20 초), 72 °C (30 초)] * 40 cycles 분의 조건으로 real-time PCR(Eco™ Real-Time PCR System, Illumina)을 진행하였다.

10. 통계학적 방법

실험결과는 SPSS package program(version 12.0)을 이용하여 평균과 표준편차를 구하였으며 실험군 간의 차이의 유의성은 one-way ANOVA(analysis of variance)와 Dunnet test에 의하여 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.

III. 결 과

1. Cell viability assay 및 DNA fragmentation 확인

H₂O₂에 의한 세포 독성이 소시호탕의 전처리에 의해 감소되는지 MTT assay 방법으로 세포생장률을 확인하였다. 소시호탕 물추출물을 농도별로 1 시간동안 마우스의 일차 간세포에 전처리 한 후 H₂O₂ 1 mM를 24 시간동안 처리하였다. Fig. 1에서 보이는 것과 같이 H₂O₂ 단독 처리군의 경우, 약 40%의 성장률을 보이지만 소시호탕 물추출물을 전처리하였을 경우 100 µg/ml의 농도에서 93.19 ± 5.18%, 300 µg/ml의 농도에서 99.38 ± 4.61%, 1000 µg/ml의 농도에서 91.23 ± 3.40%으로 통계적으로 유의한 세포생장률의 증가가 보였다. MTT 결과 세포생장률을 증가시키는 소시호탕의 적정 농도를 200 µg/ml이라 판단하여 이후 진행된 실험에서 소시호탕의 농도를 200 µg/ml으로 전 처리하여 실험을 진행하였다.

또한 H₂O₂에 의한 세포사멸이 소시호탕 물추출물의 전처리에 의해 억제되는지 확인하기 위하여 DNA fragmentation을 진행하였다(Fig. 2). 소시호탕 물추출물을 1 시간 전 처리 한 후 1 mM의 H₂O₂를 24 시간동안 처리하여 genomic DNA를 확보하고 전기영동 한 결과, 소시호탕 물추출물을 전 처리 한 시료의 DNA fragmentation이 H₂O₂ 단독 처리

한 시료에 비해 현저히 감소되었음을 확인하였다.

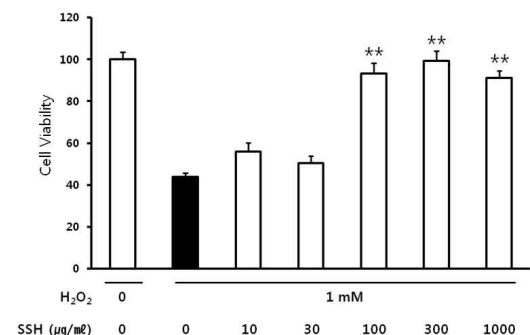


Fig. 1. SSH protects hepatic primary cells against H₂O₂-induced cell damage.

Cells were pre-treated with SSH (1 to 1000 µg/ml) for 1 h, and exposed to 1 mM H₂O₂ for 24 h. Cell viability was measured by MTT assay, as % untreated cells at the same time point. Values represent the mean ± standard deviations in triplicate (n=3). Significant difference (** $p < 0.01$) compared to H₂O₂-exposed untreated control group.

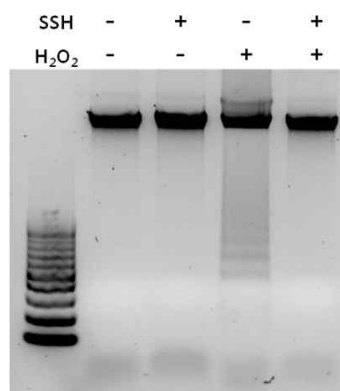


Fig. 2. SSH decreases H₂O₂-induced DNA fragmentation in hepatic primary cells.

Cells were pre-treated with SSH (200 µg/ml) for 1 h and exposed to 1 mM H₂O₂ for 24 h, and then which cellular genomic DNA was analyzed by agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining.

2. 세포독성 검사

H₂O₂로 유발되는 간세포의 독성이 소시호탕 물추출물을 전처리함으로써 감소되는지 확인하였다. 마우스의 일차 간세포에 소시호탕 물추출물 200 µg/ml을 1 시간동안 전처리한 후 H₂O₂를 6 시간동안 처리하였고, 세포 배양액을 수거하여 간세포 독성 및 세포독성의 지표인 ALT, AST 및 LDH의 양을 조사하였다(Fig. 3). ALT는 정상군(5.24±0.57)에 비해 H₂O₂의 처리에 의해 83.26±0.13(100%)으로 증가하였으나 소시호탕의 전처리에 의해서 21.99±

0.04(26.42±0.053%)로 유의성 있게 회복되었고, AST 역시 정상군(6.57±0.48)에 비해 H₂O₂의 처리로 53.11±0.75(100%)으로 증가하였으나 소시호탕의 전처리에 의해 17.98±0.18(33.86±0.33%)로 현저하게 감소되었다. 이와 함께, LDH assay는 대개 조직손상이나 세포 손상 측정에 사용되는데, H₂O₂ 처리에 의해 LDH활성도는 239.24±18.16(100%)으로 정상군(18.82±1.19)과 비교했을 때 현저히 증가하였는데, 이는 소시호탕 전처리에 의해 128.83±0.93(53.85±0.39%)로 유의성 있게 감소되었다.

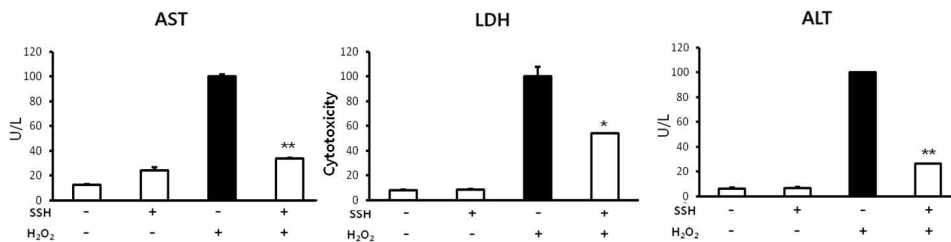


Fig. 3. Hepatic primary cell were pre-treated with SSH (200 µg/ml) for 1 h and further exposed to 1 mM H₂O₂ for 24 h, and then the level of ALT, AST and LDH were measured in cultured media.

Values represent the mean ± standard deviations in duplicate (n=2). Significant difference (** $p < 0.01$ and * $p < 0.05$) compared to H₂O₂-exposed untreated control group (black bar) and H₂O₂-exposed pre-treated group.

3. 활성산소 생성 조사

소시호탕 물추출물에 의한 세포내 활성산소의 생성 억제효과를 확인하기 위하여 마우스의 일차 간세포에 소시호탕 물추출물 200 µg/ml을 전처리한 후 H₂O₂를 4 시간 동안 처리하였고 FACS를 이

용하여 세포내 활성산소의 발생량을 측정하였다. 그 결과, H₂O₂에 의해 유발되는 활성산소가 소시호탕 물추출물의 전처리에 의해 감소되는 것을 알 수 있었다(Fig. 4).

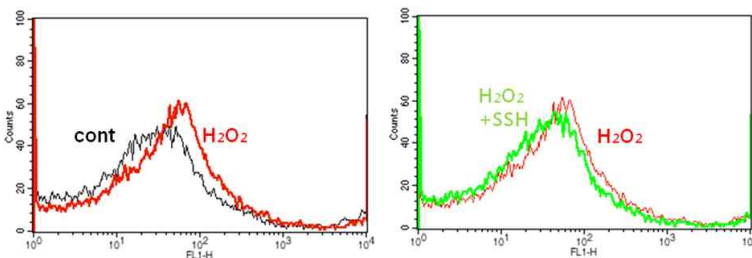


Fig. 4. SSH pre-treatment decrease H₂O₂-induced ROS generation.

Hepatic primary cells were pre-treated with SSH (200 µg/ml) for 1 h and then added with 1 mM H₂O₂. After 4 h, cells were incubated with DCF and analyzed by FACS to detect intracellular ROS levels.

4. 항산화제 효소 유전자의 발현 조사

소시호탕 물추출물이 H₂O₂에 의한 활성산소의 억제와 함께 항산화제 효소의 발현을 조절하는지 확인하기 위하여, real-time PCR 방법으로 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GPx) 및 catalase(CAT) 유전자 발현을 확인하였다. 마우스 일차 간세포에 소시호탕 물추출물을 1 시간동안 전 처리 후 H₂O₂를 6 시간동안 처리한 후 total RNA를 분리하였다. 이를 이용하여 cDNA를 제작하고, real-time PCR을 진행한 결과, CAT의 경우 정상군(1.00±0.00)에 비해 H₂O₂ 처리로 1.17±0.08으

로 증가하였고 이는 소시호탕의 전처리에 의해서 0.84±0.02로 감소되는 경향을 보였지만 유의성은 없었다. 그러나 SOD 유전자의 경우 정상군(1.00±0.00)과 비교했을 때 H₂O₂의 처리로 SOD와 GPx 유전자 발현량은 각각 0.83±0.19, 1.37±0.06으로 변화하였고, 소시호탕의 전처리에 의해 1.84±0.07, 1.97±0.02로 현저히 증가됨을 확인하였다(Fig. 5). 이러한 결과는 소시호탕 물추출물이 활성산소를 순화할 뿐만 아니라 마우스 일차 간세포내의 SOD, GPx와 같은 항산화효소의 발현량도 증가시킴을 알 수 있다.

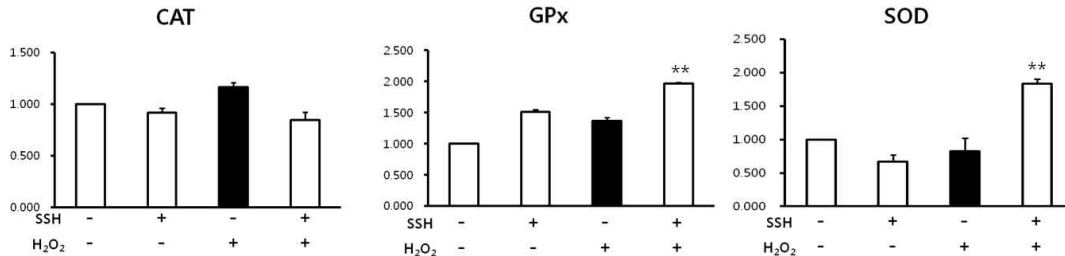


Fig. 5. Hepatic primary cells were pre-treated with SSH (200 μ g/ml) for 1 h and then treated with 1 mM H₂O₂.

After 6 h, the levels of CAT, GPx and SOD mRNA expressions were analyzed by real-time PCR. The values shown represent the mean \pm standard deviations of three experiments. Significant difference from the H₂O₂-exposed untreated control group: ** $p < 0.01$.

5. 항산화제 효소 활성 조사

소시호탕 물추출물에 의해 항산화제 효소의 활성이 조절되는지 확인하기 위하여, 이들 효소의 활성을 관찰하였다(Fig. 6). 소시호탕 물추출물을 1 시간 동안 처리 한 후 H₂O₂를 1 mM 처리하고 6 시간동안 배양하였다. 배양액을 수거한 후 항산화

효소인 SOD, GPx 그리고 CAT의 활성을 확인한 결과, SOD의 경우 변화를 관찰할 수 없었다. CAT는 소시호탕 처리에 의해 약간 감소하는 경향은 보이나 유의성은 없었다. 반면, GPx의 활성은 소시호탕을 처리하였을 때 증가하는 패턴을 보이지만 유의성은 없었다.

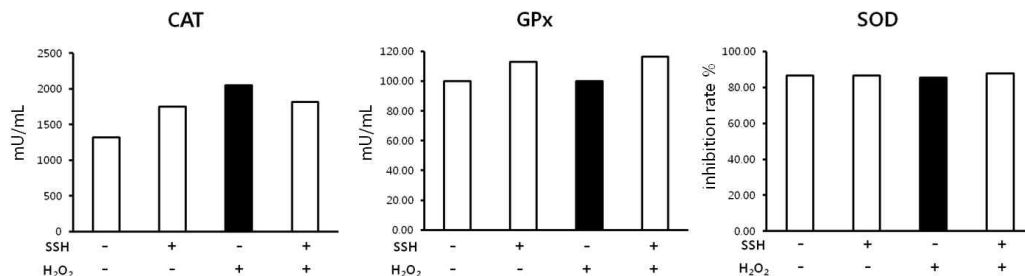


Fig. 6. Hepatic primary cells were pre-treated with SSH (200 μ g/ml) for 1 h and exposed to 1 mM H₂O₂. After 6 h, the activities of antioxidant enzymes(CAT, GPx and SOD) were measured.

6. HSP27, HSP40 및 HSP72 유전자의 발현 조사

HSP는 chaperone 단백질의 일종으로, 병리적, 환경적, 그리고 대사적 스트레스에 대하여 단백질의 3차원 구조를 유지시켜주는 기능을 수행함으로써 스트레스에 대한 세포의 손상을 최소화하는 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다^{20,21}. 이들 HSPs는 허혈 손상, 과열, 흥분성 손상, 중금속, 그리고 약물 노출 등 스트레스에 대한 반응으로 발현되는 것으로 알려져 있다²². 본 연구에서는 H₂O₂로 인한 간독성에서 소시호탕 물추출물의 간보호 효능에

HSPs 유전자의 관련성을 확인하였다. 마우스 일차 간세포에 소시호탕 물추출물을 1시간 동안 전 처리 한 후, H₂O₂를 6 시간동안 처리하였다. 분리한 RNA에서 확보한 cDNA로 real-time PCR을 진행한 결과, HSP40 및 HSP72의 유전자 발현이 소시호탕 물추출물의 전처리 실험군에서 증가됨을 알 수 있었다. 반면, H₂O₂에 의해 증가된 HSP27 mRNA level은 소시호탕에 의해 유의하게 감소됨을 확인하였다(Fig. 7).

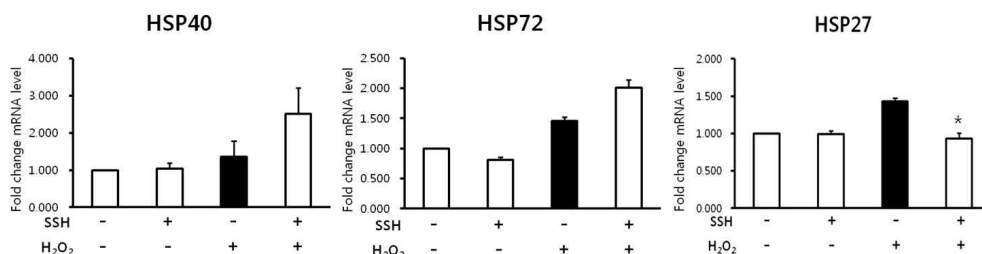


Fig. 7. SSH pre-treatment elevate levels of HSP40, HSP27 and HSP72 mRNA expression.

Hepatic primary cells were pre-treated with SSH(200 μ g/ml) for 1 h and further exposed to 1 mM H₂O₂. After 6 h, the levels of HSP40, HSP27 and HSP72 mRNA expressions were analyzed by real-time PCR.

IV. 결론 및 고찰

소시호탕(小柴胡湯)은 만성간질환, 특히 만성간염과 간경변증 환자의 치료를 위해서 사용되는 대표적인 한방처방으로¹⁻³, 항염증⁴, 항산화⁵, 면역조절

⁶, 간보호⁷, 간재생⁸, 그리고 항암효과⁹등의 다양한 약리작용을 보인다¹⁰. 소시호탕의 7가지 구성 약재 중 특히 시호는 그 주요 약효성분인 Saikosaponin은 간기능을 강화하여 간장에 치료제로 사용되고 있고, 흰 쥐에서 CCl₄에 의한 간독성의 보호효과와

연구결과가 발표되어 있다¹⁵. 그러나 H₂O₂에 의한 산화성 간세포 손상에 대한 소시호탕의 영향에 관한 연구는 이루어져있지 않았다. 이에 본 연구에서는 H₂O₂에 의한 산화성 간세포 손상 모델을 이용하여 소시호탕의 간보호 효과를 확인하였다.

MTT assay²²는 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 검사법이다. 이러한 MTT formazan의 흡광도는 570 nm의 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 흡광도는 살아있고 대사가 왕성한 세포의 농도를 반영한다. 이 방법을 이용하여 소시호탕의 전처리로 인해 세포의 성장률이 높아짐을 확인하였다.

ALT와 AST는 간세포 안에 들어있는 효소로서 간세포가 파괴되거나 손상을 받으면 유출되어 혈중 농도가 증가하게 되는데, 급성이나 만성간염 시 이들 수치가 올라간다. 따라서 간염의 정도를 대략적으로 알려주는 검사로서 흔히 '간수치' 라고 부른다. 본 연구에서 세포독성 비교를 위하여 ALT와 AST를 확인한 결과, H₂O₂를 단독으로 처리한 경우(100%)에 비해, 소시호탕을 전 처리한 경우 ALT는 26.42±0.053%, AST는 33.86±0.33%로 현저하게 감소하였다. 이와 함께, LDH assay는 대개 조직손상이나 세포 손상을 측정하는데 사용되는데²³, H₂O₂ 단독의 경우(100%)에 비해 소시호탕 전처리에 의해 53.85±0.39%로 유의성 있게 감소되었다. 이러한 결과는 H₂O₂에 의한 세포독성이 소시호탕의 전처리에 의해 감소된다는 것을 보여준다.

소시호탕 물추출물의 항산화 효능은 FACS analysis를 이용하여 확인하였으며 H₂O₂에 의한 세포내 활성산소 증가가 소시호탕 물추출물 전처리로 인하여 현저히 감소됨을 알 수 있었다.

본 연구에서는 소시호탕 물추출물의 활성산소 순화 효능 뿐 만 아니라 세포내 항산화 효소의 활성변화도 관찰하였다. 산소를 이용하는 생물체는

superoxide를 제거하는 효소인 SOD를 가지고 있어 superoxide radical을 H₂O₂로 전환시키고 그때 생성된 H₂O₂는 catalase와 GSH-Px에 의해 H₂O와 O로 분해하여 무독화시켜 체외로 배출시킨다. GST 또한 catalase와 유사한 기능을 수행하는 효소로 간세포의 원형질에 주로 존재하며 친전자적 중심을 가지고 있으며, 지방에 친화적인 생체이물(xenobiotic)과 내부에서 생산된 독성 물질들을 환원된 glutathione과 결합시키는 효소이다²⁴. 이러한 세포내 항산화 효소의 활성을 real-time PCR로 확인한 결과, SOD와 CAT의 경우 유의성 있는 변화를 보이지 않았으나, GPx의 경우 소시호탕 물추출물의 전처리로 인하여 H₂O₂ 처리 실험군에 비해 유의성 있는 증가를 확인하였다. 반면, 소시호탕 물추출물에 의한 항산화제 효소 활성을 실험한 결과, GPx의 활성은 유전자의 발현 양상과 비슷하게 소시호탕을 처리하였을 때 증가하는 패턴을 보이지만 유의성은 없었다. CAT 역시 real-time PCR 결과와 마찬가지로 소시호탕 처리에 의해 약간 감소하는 경향은 보이나 유의성은 없었고, SOD의 경우는 소시호탕 물추출물에 의한 활성변화를 확인할 수 없었다.

HSP 단백질은 스트레스 환경에 대해 발현이 증가되어 세포를 보호하는 기능을 수행하는 것으로 알려져 있다²⁵. HSP40은 DnaJ로도 불리기도 하는데, HSP70과 함께 세포내에서 chaperone 기능을 수행하는 것으로 알려져 있고²⁶, HSP27는 특히 apoptosis를 억제하는 등 세포자멸사 신호전달에도 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다²⁷. 본 연구에서는 소시호탕에 대한 간 보호 효과에 이들 HSPs 유전자의 관련성을 확인하였다. 그 결과, HSP72와 HSP40의 경우, 소시호탕 전 처리한 실험군에서 증가되었으나, HSP27의 경우 오히려 소시호탕 처리에 의해 감소되었다. 이러한 결과를 바탕으로, 소시호탕에 의해 HSP27, HSP40 및 HSP72 유전자의 관련성을 추측 할 수 있고, 명확한 기전을 규명하기 위하여 추후 실험이 필요할 것으로 판단된다.

감사의 글

이 연구는 교육과학기술부 지원 한국한의학연구원 기관고유사업 K12050의 지원을 받아 수행되었음

참고문헌

- Hirayama C, Okumura M, Tanikawa K, Yano M, Mizuta M, Ogawa N. A multicenter randomized controlled clinical trial of Shosaiko-to in chronic active hepatitis. *Gastroenterol Jpn* 1989;24(6):715-9.
- Tajiri H, Kozaiwa K, Ozaki Y, Miki K, Shimuzu K, Okada S. Effect of sho-saiko-to(xiao-chai-hu-tang) on HBeAg clearance in children with chronic hepatitis B virus infection and with sustained liver disease. *Am J Chin Med* 1991;19(2):121-9.
- Oka H, Yamamoto S, Kuroki T, Harihara S, Marumo T, Kim SR, et al. Prospective study of chemoprevention of hepatocellular carcinoma with Sho-saiko-to(TJ-9). *Cancer* 1995;76(5):743-9.
- Amagaya S, Umeda M, Ogihara Y. Inhibitory action of shosaikoto and daisaikoto(traditional Chinese medicine) on collagen-induced platelet aggregation and prostaglandin biosynthesis. *Planta Med* 1986;5:345-9.
- Sakaguchi S, Tsutsumi E, Yokota K. Preventive effects of a traditional Chinese medicine(sho-saiko-to) against oxygen toxicity and membrane damage during endotoxemia. *Biol Pharm Bull* 1993;16:782-6.
- Fujiwara K, Mochida S, Nagoshi S. Regulation of hepatic macrophage function by oral administration of xiao-chai-hu-tang(sho-saiko-to, TJ-9) in rats. *J Ethnopharmacol* 1995;46:107-14.
- Amagaya S, Hayagawa M, Ogihara Y, Fujiwara K. Effect of Syo-saiko-to and Dai-saiko-to on carbon tetrachlorideinduced hepatic injury in rats. *J Med Pharm Soc Wakan Yaku* 1988;5:129-36.
- Amagaya S, Miyake A, Ogihara Y, Fujiwara K. Effect of Syo-saiko-to on liver regeneration in partially hepatectomized rats. *J Med Pharm Soc Wakan Yaku* 1988;5:137-45.
- Haranaka K, Satomi N, Sakurai A et al. Antitumor activities and tumor necrosis factor producibility of traditional Chinese medicines and crude drugs. *Cancer Immunol Immunother* 1985;20:1-5.
- Ito H, Shimura K. Effects of a blended Chinese medicine, Xiao-ChaiHu-Tang, on Lewis lung carcinoma growth and inhibition of lung metastasis, with special reference to macrophage activation. *Jpn J Pharmacol* 1986;41:307-14.
- 권영모, 이재은, 박선동, 시호가 acetaminophen 으로 유도된 간손상 흰쥐에 미치는 영향. 대한본초학회지 2004;19(4):91-104.
- 김대근, 김만배, 김훈, 박진한, 임종필, 홍승현. 본초생약학 4. 서울: 도서출판 신일북스; 2009. p. 104-6, 358-61, 348-51, 287-8, 55-7, 352-3.
- Cesaratto L, Vascotto C, Calligaris S, Tell G. The importance of redox state in liver damage. *Ann Hepatol* 2004;3(3):86-92.
- Ma SF, Nishikawa M, Katsumi H, Yamashita F, Hashida M. Liver targeting of catalase by cationization for prevention of acute liver failure in mice. *J Control Release* 2006;110(2):273-82.
- Dang SS, Wang BF, Cheng YA, Song P, Liu ZG, Li ZF. Inhibitory effects of saikosaponin-d on CCl4-induced hepatic fibrogenesis in rats. *World J Gastroenterol* 2007;13(4):557-63.

16. 안영근, 김성오, 정대영. 랫트에 있어서 사염화탄소 독성에 대한 소시호탕 엑기스와 prednisolone의 영향. *환경독성보건학회* 1989;4(2):61-75.
17. Taira Z, Yabe K, Hamaguchi Y, Hirayama K, Kishimoto M, Ishida S, et al. Effects of Sho-saiko-to extract and its components, Baicalin, baicalein, glycyrrhizin and glycyrrhetic acid, on pharmacokinetic behavior of salicylamide in carbon tetrachloride intoxicated rats. *Food Chem Toxicol* 2004;42(5):803-7.
18. Berry MN, Freind DS. High-yield preparation of isolated rat liver parenchymal. A biochemical and fine structural study. *J Cell Biol* 1969;43:506-20.
19. Moseley PL. Heat shock proteins and the inflammatory response. *Ann N Acad Sci* 1998;856:206-13.
20. Febbraio MA, Koukoulas I. HSP72 gene expression progressively increases in human skeletal muscle during prolonged, exhaustive exercise. *J Appl Physiol* 2000;89(3):1055-60.
21. 이종은. 스트레스 단백질과 허혈성 내성. *J Neurocrit Care* 2008;1:12-21.
22. Van Meerloo J, Kaspers GJ, Cloos J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. *Methods Mol Biol* 2011;731:237-45.
23. Koh JY, Choi DW. Quantitative determination of glutamate mediated cortical neuronal injury in cell culture by lactate dehydrogenase efflux assay. *J Neurosci Methods* 1987;20:83-90.
24. 박영숙. 고지방 식이 흰쥐에서 오가피 추출물의 항산화 효과 및 지질 개선 효과. *동아시아식생활학회지* 2010;20(1):37-45.
25. Vega VL, Charles W, De Maio A. A new feature of the stress response: increase in endocytosis mediated by Hsp70. *Cell Stress Chaperones* 2010;15(5):517-27.
26. Sterrenberg JN, Blatch GL, Edkins AL. Human DNAJ in cancer and stem cells. *Cancer Lett* 2011;312(2):129-42.
27. 윤길숙. 신세포암종에서 Heat Shock Protein 27의 발현과 세포사멸사에 대한 연구. *대한 병리학회지* 2006;40:39-45.