

HepG2 cell에서 유리지방산 유발 지방독성에 대한 生肝健脾湯과 일부 조성 한약물의 효과

홍성인
경희의료원 한방병원 동서협진실

The Effects of *Saengkankunbi-tang* and Its Composition on Free Fatty Acid-Induced Lipotoxicity in HepG2 Cell

Sung-in Hong

Dept. of East-West Integrated Medicine, Kyung-Hee University Medical Center

ABSTRACT

Objectives : The aim of this study was to investigate whether the effects of extract from *Saengkankunbi-tang* and its composition that *Artemisiae capillaris Herba*, *Crataegi Fructus*, *Alismatis Rhizoma*, *Hoelen* and *Raphani Semen* could protect HepG2 cells from palmitic acid-induced lipotoxicity through lysosomal and mitochondrial pathways in an *in vitro* model.

Methods : To examine the effects of the extracts from *Saengkankunbi-tang* and its composition that *Artemisiae capillaris Herba*, *Crataegi Fructus*, *Alismatis Rhizoma*, *Hoelen* and *Raphani Semen* on palmitic acid-induced lipotoxicity in HepG2 cells, we measured the contents of cell viability, cytotoxicity. Then to investigate the effects of the extract from *Saengkankunbi-tang*, *Artemisiae capillaris Herba* and *Raphani Semen*, we measured that triglyceride, reactive oxygen species, ATP levels, glutathione levels, cytochrome c and cathepsin B.

Results : The extracts from *Saengkankunbi-tang* and its composition had a cell-protective function. The extracts from *Saengkankunbi-tang*, *Artemisiae capillaris Herba* and *Raphani Semen* controlled triglyceride over-accumulation in cells and reduced overproduction of reactive oxygen species. The extracts from *Saengkankunbi-tang* and *Raphani Semen* increased ATP and glutathione levels which had been decreased by lipotoxicity. The extracts from *Saengkankunbi-tang*, *Artemisiae capillaris Herba* and *Raphani Semen* reduced leakage of cytochrome c and the extracts from *Saengkankunbi-tang* and *Raphani Semen* reduced leakage of cathepsin B in lipotoxicity.

Conclusions : These results show that the extracts from *Saengkankunbi-tang* and its composition that *Artemisiae capillaris Herba* and *Raphani Semen* have cell protective effects on palmitic acid-induced lipotoxicity through lysosomal and mitochondrial pathways.

Key words : *Saengkankunbi-tang*, *Artemisiae capillaris Herba*, *Raphani Semen*, lipotoxicity

1. 서론

알코올과 관계없이 간 내에 과도한 지방 축적으

로 본래 간 중량의 5%를 초과하면 비알콜성 지방 간 질환(nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD)으로 정의하며¹ 이는 음주 경력이 간 질환을 유발할 정도로 있지 않은 환자에서 알코올성 간질환과 유사하게 간에 조직학적 손상이 나타나는 질환이다². 서구에서는 NAFLD가 매우 흔하여 미국의 경우 근래

· 교신저자: 홍성인 서울시 동대문구 회기동 1번지
경희의료원 한방병원 3313호 동서협진실
TEL: 02-958-1812 FAX: 02-958-9212
E-mail: sthong@khu.ac.kr

유병률이 약 30%로 조사되었고, 우리나라는 2006년에 유병률이 16%로 보고된 바 있다^{3,4}. 아시아-태평양 지역의 조사 연구에서도 10~24% 정도로 서구와 비슷하였으며, 고지방·고열량 식사, 신체활동 감소 등 생활습관 변화에 따라 급격히 증가하고 있다⁵.

저장성 에너지 형태인 중성지방(triglyceride, TG)이 간, 근육, 췌장 등 비지방조직에 과도하게 축적되면 세포독성으로 작용하여 조직 내 세포의 기능 부전과 세포사멸을 유발하게 되고 질병을 유발하는데 이를 지방독성(lipotoxicity)이라 한다⁶. NAFLD의 경우 대개 'two-hit hypothesis'로 설명되는데 이에 의하면 간조직에 지방 침착이 먼저 발생하고 시간을 두고 나타나는 지방 과산화와 염증성 반응, mitochondria와 lysosome의 막 불안정에 따른 기능 저하와 파괴, apoptosis로 이어지는 지방독성으로 간세포 및 조직 손상이 야기되고 추가 질병으로 이어지는 것으로 보고 있다^{7,8}. 이러한 병리기전들에 의해 NAFLD는 단순 지방간에서 비알코올성 지방간염, 간경변 등으로 진행될 수 있으며 간질환 이외에 비만, 이상지질증, 당뇨, 고혈압, 동맥경화성 심혈관질환 등의 대사증후군(metabolic syndrome)이 동반되는 것으로 나타나 NAFLD의 심각성이 주목되고 있다⁹.

한편, 임상에서 바이러스성 급·만성 간염, 간경변증 등 각종 간질환에 광범위하게 사용되고 있는 한약 방제로 生肝健脾湯을 대표적으로 들 수 있는데脾胃의 濕熱을 제거하고 利尿, 健脾, 利膽 작용으로 간기능을 원활하게 하는 목적으로 다용되고 간장 대사와 재생능력에 대한 영향 분석 및 임상 치료 효과도 보고된 바 있다¹⁰. 또한 근래 生肝健脾湯은 HepG2 cell에서 reactive oxygen species(ROS)에 의한 apoptosis를 억제하고¹¹, 흰쥐 혈관내 지질 감소 효과도 보고되었다¹².

生肝健脾湯은 茵陳, 山楂, 澤瀉, 白茯苓, 蘿蔔子 등 19종의 한약물로 처방이 구성되는데¹¹, 이 가운데 茵陳(*Artemisiae Capillaris Herba*)은 利濕退黃, 清熱解毒하여 黃疸, 傷寒時疾, 狂熱 등에 적용하고 利膽, 補肝하여 급만성간염과 담도질환에 이용되는

것으로 알려져 왔는데, 근래 연구들에서 혈중 지질 강하작용으로 고지혈증에 활용하고 간세포독성 예방, 세포보호, 항암작용, 면역조절 등이 보고되고 있다¹³⁻¹⁵. 山楂(*Crataegi Fructus*)는 消食化積, 活血散瘀하여 食積停滯, 脘腹脹痛, 瘀血經閉 등에 적용하여 왔는데, 혈중 지질강하작용으로 고지혈증, 죽상동맥경화증에도 활용하고 비만 및 고지혈 방지 작용, 간세포 보호기능 등이 보고되고 있다^{13,14,16}. 澤瀉(*Alismatis Rhizoma*)는 利水滲濕, 泄熱하여 小便不利, 水腫, 淋濁, 遺精, 眩暈 등에 적용하여 왔는데, 혈중 지질강하작용, 이뇨작용, 간 독성 개선작용, 혈당 강하작용 등이 보고되었다^{13,17,18}. 白茯苓(*Hoelen*)은 利水滲濕, 健脾, 寧心安神하는데 이뇨작용, 진정작용, 항암작용, 혈중 지질강하작용 등이 보고되었다^{13,19}. 蘿蔔子(*Raphani Semen*)은 消食化積, 降氣化痰하여 食積不化, 噎腐吞酸, 痰壅氣喘咳嗽 등에 적용하여 왔는데, 혈당 강하작용, 혈중 지질강하작용 등이 보고되었다^{13,20,21}. 이러한 선행 연구들로 보아 生肝健脾湯이 직접 간 지질대사에 영향을 미쳐 간 지방독성 예방 및 완화에 작용할 것을 시사하고 있지만 아직 급·만성 간염이 아닌 간 지방증이나 지방간염 등 NAFLD의 지방독성에 직접 미치는 효과에 초점을 맞춘 조사는 아직 없었고 生肝健脾湯의 조성 약제 중에서 그에 대해 중요한 작용을 할 것으로 예상되는 茵陳, 山楂, 澤瀉, 白茯苓, 蘿蔔子 역시 간 지방독성에 직접 미치는 효과는 아직 조사된 바가 없다.

이에 본 연구에서는 生肝健脾湯과 그 주요 조성 한약물들이 간 지방독성에 보호 효과가 있으리라 가정하였고 그 기전을 구체적으로 살펴보고자 HepG2 cell에 生肝健脾湯과 茵陳, 山楂, 澤瀉, 白茯苓, 蘿蔔子 각각의 물 전탕 추출물을 전처리한 후 포화지방산인 palmitic acid를 HepG2 cell에 처리하여 지방독성을 유발해서 세포독성과 세포 내 중성지방 축적, 산화스트레스, mitochondrial dysfunction, lysosomal leakage 등에 미치는 억제 효과를 관찰해보고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

1) 약재

본 실험에 사용한 약재는 대한약전 및 대한약전의 한약규격주해에 근거하여 (주)옵니허브에서 엄선한 것을 구입하여 사용하였으며 처방의 내용과 용량은 Table 1과 같다.

Table 1. Prescription of *Saengkankunbi-tang*.

Korean name	Herbs	Amounts (g)
茵 陳	Artimisiae capillaris Herba	15.00
澤 瀉	Alismatis Rhizoma	15.00
白 朮	Atractylodis Rhizoma alba	7.50
山 楂	Crataegi Fructus	7.50
麥 芽	Hordei Fructus	7.50
陳 皮	Aurantii nobilis Pericarpium	3.75
白 茯 苓	Hoelen	3.75
豬 苓	Poylporus	3.75
厚 朴	Machili Cortex	3.75
藿 香	Agastaches Herba	3.00
蘿 蔔 子	Raphani Semen	3.00
枳 實	Ponciri Fructus	3.00
三 稜	Scripi Tuber	3.00
蓬 朮	Zedoariae Rhizoma	3.00
青 皮	Aurantii Pericarpium	3.00
唐 木 香	Saussureae Radix	3.00
砂 仁	Amomi Semen	3.00
甘 草	Glycyrrhizae Radix	3.00
生 薑	Zingiberis Rhizoma	3.00
Total		97.50

2) 검액의 조제

실험용 검액의 조제를 위하여 生肝健脾湯 1첩 분량(97.50 g)을 3차 증류수 500 ml에 혼합하여 수냉식 냉각기가 달린 전기가열기를 사용하여 2시간 동안 가열하였다. 이를 상온으로 식힌 후 Watmann 여과지를 이용하여 여과하고 여과용액을 rotary evaporator에서 각기 0.2 L정도로 감압 농축하였다.

감압동결건조장치(FD8512, ilshin lab, 서울, 대한민국)에서 이를 동결건조하여 분말상태의 추출물을 구하였고 1첩에서 얻은 검액을 합한 결과 총 23 g을 얻었다. 이를 -80 °C 냉동고에 보관하였고 필요할 때마다 media에 녹여 보관용액을 만들고 사용하기 전에 0.4 µm pore 막으로 여과하여 침전물을 제거하고 세포에 처리하였다.

그리고 茵陳, 澤瀉, 山楂, 白茯苓, 蘿蔔子 각 200 g을 1 L의 3차 증류수에 담구고 수냉식 냉각기가 달린 전기가열기를 사용하여 2시간 동안 가열하였다. 이를 상온에서 식힌 후 여과지로 걸러 침전물을 제거한 후, 얻어진 추출액(대략 400 ml)을 둥근 바닥 플라스크로 옮겼다. 드라이아이스/에탄올 냉각조(-80 °C) 상에서 이 플라스크를 돌려가며 얼음이 플라스크 표면에 넓게 형성하도록 하여 감압동결건조장치(FD8512, ilshin lab, 서울, 대한민국)를 사용하였다. 동결건조에서 얻어진 추출고형물들은 무게를 잰 뒤 밀봉시키고 이를 -80 °C 냉동고에 보관하였다. 이후 필요 시 media에 녹여 보관용액을 만들고 사용하기 전에 0.4 µm pore 막으로 여과하여 침전물을 제거하고 세포에 처리하였다. 각 약재별 건조추출물의 총 수득율은 Table 2와 같다.

Table 2. The Total Yields of Dried Extracts from *Saengkankunbi-tang* and Its Composition.

Herbs	Weight (g) before extraction	Weight (g) after freeze-drying	Total yield (%)
生肝健脾湯 (SKT)	200	13.76	6.88
茵 陳 (AC)	200	9.639	4.82
山 楂 (CF)	200	33.80	16.9
蘿 蔔 子 (RS)	200	12.88	6.44
澤 瀉 (AR)	200	18.58	9.29
白 茯 苓 (HO)	200	0.2548	0.127

SKT : *Saengkankunbi-tang*, AC : *Artimisiae capillaris Herba*, CF : *Crataegi Fructus*, RS : *Raphani Semen*, AR : *Alismatis Rhizoma*, HO : *Hoelen*

3) 시 약

Hep G2 세포주는 American Type Culture Collection (ACTT)(VA, USA)에서 구입하였다. Fetal bovine serum(FBS)은 Welgene Inc.(South Korea), PS (penicillin-streptomycin)과 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium)은 Invitrogen Corporation (NY, USA), Carboxyl-H₂DCFDA는 Invitrogen Corporation (OR, USA)에서 구입하였다. 용액으로 만들어진 RIPA buffer는 PIERCE(IL, USA), Tris base는 Bio-Rad laboratories, Inc.(CA, USA), ECL substrate는 iNtRON Biotechnology, Inc.(South Korea), BODIPY 490/503는 Invitrogen Corporation(NY, USA), 그 외 시약들은 Sigma-Aldrich Corporation (MO, USA)에서 구입하였다. Primary antibody와 Second antibody, Bovine serum albumin(BSA)은 Santa Cruz Biotechnology(CA, USA)에서 구입하였으며 western blot의 ECL 검출용 사진 Film은 AGFA(Mo, Belgium)에서 구입하였다. Tubulin은 Santa Cruz Biotechnology(CA, USA)에서 그리고 cathepsin B와 cytochrome c는 Abcam(Cambridge, UK)에서 구입하였다.

2. 방법

1) 세포배양 및 한약물의 세포처리

Human hepatoma 세포주인 HepG2 cell line을 10% fetal bovine serum(FBS), 1% penicillin-streptomycin을 포함한 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle Medium) 배양액에서 배양하였다. 세포는 10 cm 지름의 원형배양접시에서 37 °C, 5% CO₂ 조건으로 세포배양기(NU-4750G, NuAire Inc.(MN, USA))에서 유지한 채 배양하였으며 2~3일간 배양한 후 분주하였다. 본 실험에서는, 세포에 각 한약물을 처리하기 위하여 세포가 각 well에 분주되고 24시간 동안 안정화시킨 후, 한약물 혹은 지방산이 함유된 배양액으로 교환하였다. 세포에 한약물과 지방산을 처리하는 순서는 지방산에 의한 독성에 관한 한약물의 예방효과를 보기 위하여 한약물을 먼저 처리하고

24시간 후 palmitic acid를 처리하였다.

2) Cell viability(MTT assay) 측정

세포 활성도 측정은 Molecular Probes(OR, USA)가 제공한 MTT assay(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assay)를 이용하였다. 실험과정을 간략히 서술하면, 세포를 24-well plate(2 cm²)에 well 당 10⁵ cells이 되도록 분주하고 24시간 동안 안착시킨 후, 지방산 및 한약물 처리 등 실험에 사용하였다. 배양액을 적정농도의 palmitic acid가 포함된 1 mL의 배양액으로 교체하고 24시간 후에 MTT assay를 실시하였다. 이때 배양액을 제거하고 세포가 남아 있는 well에 각기 100 µL의 MTT stock(5 mg/ml)을 처리한 후 2시간 동안 알루미늄 포일로 빛을 차단한 상태에서 상온에서 반응시켰다. 그 후 상등 용액을 제거하고 각 well에 남아 있는 세포에 500 µL의 DMSO를 더하여 세포 내에서 산화환원 효소들에 의해 형성된 formazan을 용해하고 ELISA reader(VERSARMAX, Molecular Devices(CA, USA))를 이용해 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 적정 대조군을 설정하여 각 관찰치는 보정하였다. 이때 아무런 처리를 하지 않은 세포를 이용하여 얻어진 흡광도를 100%로 하고 각 실험시료의 흡광도를 상대비율로 구하였고 이에 대한 통계처리값을 cell viability라 정의하여 결과에서 나타내었다.

3) Cytotoxicity(LDH assay) 측정

세포독성 측정은 세포 배양액에서의 lactate dehydrogenase 활성 측정에 기반하여 실시되었다. Roche(Mannheim, Germany)에서 제공된 LDH assay (Lactate dehydrogenase assay)를 이용하였다. 간략히 설명하면 1×10⁴개의 세포를 96-well plate의 각 well에 분주하고 24시간 동안 안착한 후 실험에 사용하였다. 한약물 혹은 지방산을 처리한 후 24시간 후에 50 µL의 배양액을 취하여 LDH assay에 사용하였다. 이 시료를 Eppendorf 튜브로 옮기고 50 µL의 물을 더하였다. (+) control 군으로는 배양액을 제거한 well에 10% Tween 20 용액 50 µL를 사용

하여 lysis하고 이에 50 μ L의 물을 더한 시료를 사용하였고, (-) control로는 세포가 없는 50 μ L의 DMEM 배양액에 50 μ L의 물을 더하였다. 이런 방식으로 준비된 시료에 100 μ L의 반응시료를 더한 후 상온에서 30분간 반응시키고 stop 용액을 더하여 반응을 종결시켰다. ELISA reader(VERSARMAX, Molecular Devices(CA, USA))를 이용하여 490 nm에서 이의 흡광도를 측정하였다. cytotoxicity는 다음과 같은 계산으로 정의하였다.

Cytotoxicity (%) = [시료의 흡광도 - (-)control의 흡광도]/[(+)control의 흡광도 - (-)control의 흡광도] \times 100

4) 세포 내 triglyceride(TG) 축적 측정

Paimitate 처리 후 세포 내 축적된 triglyceride (TG)는 confocal microscopy에 의한 증성지방의 존재확인 실험과 정량적인 측정법이 사용되었다.

(1) Triglyceride(TG) confocal microscopy

24 well plate에 준비된 세포를 1.0 ml PBS(11.7 g NaCl; 5.5 g Na₂HPO₄-7H₂O; 1.35 g NaH₂PO₄; pH 7.4)로 2차례 간단히 씻은 후, BODIPY 490/503를 포함한 용액을 더하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건에서 10 min 간 배양하였으며 이때 형광염료 BODIPY의 최종 농도는 1 μ g/ml로 하였다. 이후 1.0 ml의 PBS로 3번 씻은 후 최소량의 PBS만 남은 상태에서 Confocal Microscopy(LSM 510 meta, Carl Zeiss (Jena, Germany))로 형광을 관찰하였다. 이때 excitation wavelength는 488 nm로 하였고 emission filter는 505~530 nm bandpass filter를 각기 사용하였다. 모든 형광실험은 최소한의 빛만 허용하기 위하여 알루미늄 포일로 빛을 차단하였다.

(2) Triglyceride(TG) 정량분석

세포내 triglyceride의 양은 BioVision Inc.(CA, USA)에서 제공한 Triglyceride Quantification Kit를 사용하여 정량하였고 간략히 요약하면 다음과 같다. 5×10^5 개의 세포를 6-well plate에 배양하여 실험조건에 따라 처리하고 세포를 회수하였다. 이를 Eppendorf 튜브에 수확하여 각 시료에 0.5 ml의

5% Triton-X100를 더하고, 100 $^{\circ}$ C에서 5분간 처리한 후 상온으로 천천히 식혔다. 녹지 않는 침전물질을 제거하기 위하여 1000 g 조건에서 5분간 원심분리하여 상등액만 회수하고 이에 3차 증류수를 더하여 50 μ L로 되게 하였다. 이에 2 μ L의 lipase를 더하고 20분 간 상온에서 처리한 후, 완충용액, 효소가 포함된 준비된 reagent mix 50 μ L를 더하였다. 이 시료를 빛이 차단된 상태에서 1시간 동안 상온에서 유지한 후 ELISA reader(VERSARMAX, Molecular Devices(CA, USA))로 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료의 triglyceride 양은, 실험의 각 well에서 얻어진 값을 회사에서 제공된 표준 triglyceride에 의한 표준정량선과 비교하여 정하였다.

5) 세포내 reactive oxygen species(ROS) 측정

준비된 세포에 carboxyl-H₂DCFDA를 최종농도가 10 μ M이 되게 처리하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 배양하였다. 이 후 세포를 Eppendorf 튜브에 수확하여 RIPA buffer로 세포를 녹이고, PerkinElmer (MA, USA)사의 VICTOR² fluorometer를 이용하여 530 nm에서 형광을 측정하였다. (+) control로는 100 μ M hydrogen peroxide 처리한 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 배양한 시료를 사용하였다.

6) 세포내 ATP 정량분석

BioVision Inc.(CA, USA)에서 제공한 ATP Colorimetric/Fluorometric Assay Kit를 사용하여 정량하였고 간략히 요약하면 다음과 같다. 준비된 세포를 200 μ L의 ATP Assay Buffer에 녹이고 15,000 g에 2분간 간단히 원심분리하여 녹지 않는 물질은 제거하였다. 상등액 50 μ L를 96 well plate로 옮긴 후 회사에서 제공한 반응용액을 첨가하고 빛이 차단된 상태에서 상온 30분간 유지하였다. 이의 흡광도를 570 nm에서 ELISA reader(VERSARMAX, Molecular Devices(CA, USA))로 측정하였다. 측정된 흡광도 값은 제공된 ATP 표준용액으로 제작된 표준 곡선을 이용하여 농도로 환산하였다.

7) 세포 내 glutathione 측정

세포 내 total glutathione(GSH) level은 Dojindo

(MD, USA)에서 제공된 흡광도 측정용 assay kit(the total Glutathione Quantification kit)를 이용하였고, free glutathione(GSH) level은 Anaspec Inc.(CA, USA)에서 제공한 흡광도 측정용 assay kit(Thiol Quantification kit)를 사용하였다. 실험의 자세한 과정은 각 회사에서 제공된 과정을 따랐다. Well 당 3×10^5 의 세포를 6-well plate에 분주하여 3 ml DMEM medium으로 배양하였다.

8) Western blot(cathepsin B, cytochrome c)

실험조건에 따라 처리하고 24시간 배양 후 얻어진 각 세포군을 homogenization buffer(0.32 M sucrose, 10 mM HEPES, 10 mM 2-mercaptoethanol, 20 ug/ml PMSF, pH 7.4)로 homogenize 한다. 얻은 samples를 1000 g, 5분간 원심분리하여 얻은 supernatant를 15,000 g, 20분간 다시 원심분리 하여 pellet 상태로 crude organelle을 얻었다. 각 sample 30 ug을 12% SDS-PAGE를 이용하여 분리하였고 transfer buffer(39 mM glycine, 48 mM Tris-base, pH 8.3, 0.37%(w/v) SDS, 20%(v/v) methanol)에서 semidry transfer 장비(Trans-Bolt SD, Bio-Rad(CA, USA))를 이용하여 0.2 mm PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane에 transfer(15 V, 30 min) 하였다. PVDF membrane을 5% non-fat dry milk(in TBS-T)로 1시간 동안 상온에서 blocking 한 후 각 antibody를 tubulin (1:500), cathepsin B(1:250) 그리고 cytochrome C(1:100)으로 희석하여 4 °C에서 overnight하였다. Tris buffer saline(TBS; 0.2 M Tris base, 1.37 M NaCl, pH 7.6)에 Tween 20가 첨가된(최종농도 0.1% (v/v)) 용액(TBS-T)으로 washing 한 뒤 1:1000으로 희석한 HRP-labeled secondary antibody에 1시간 상온

에서 incubation 시킨 뒤 다시 TBS-T로 washing 한 후 iNtRON Biotechnology, Inc.(South Korea)에서 제공한 WEST-one™을 이용하여 bands를 detection 하였다.

3. 통계처리

모든 실험 결과는 평균 및 표준오차로 표시하였다. 대조군과 실험군 사이의 비교에는 Student's t-test를 이용하였고, *p*값이 0.05 미만인 경우를 통계적으로 유의성이 있는 것으로 보았다.

III. 결 과

1. Palmitic acid가 HepG2 세포주의 cell viability와 cytotoxicity에 미치는 영향

포화지방산 용량을 결정하기 위하여, HepG2 세포주를 포화지방산인 palmitic acid를 다양한 농도로 처리하여 세포 외부 배양액에서 MTT assay에서 formazan이 형성되는 cell viability를 측정된 결과 0.5 mM과 1.0 mM에서 각기 83.8%와 73.5%의 cell viability를 보였다. 그리고 LDH assay로 cytotoxicity를 조사한 결과 Palmitic acid의 농도가 증가됨에 따라 HepG2 세포의 cytotoxicity는 점차적으로 증가하였고 지방산이 처리되지 않은 normal 군에 비하여 0.3 mM 이상의 palmitic acid 처리군에서는 유의한 정도로 세포독성이 관찰되었으며 정상군이 약 5.2%의 cytotoxicity를 보인 반면, 0.5 mM와 1.0 mM의 palmitic acid 처리군에서는 각기 14.8%, 37.9%의 cytotoxicity를 보였다(Table 3, Fig. 1).

Table 3. Dose-dependency of Palmitic Acid (PA) on Cell Viability (A) and Cytotoxicity (B) of Human Hepatoma HepG2 Cell Line.

PA (mM)	Cell Viability (%) (A)	Standard error (A)	p value (A)	Cytotoxicity (%) (B)	Standard error (B)	p value (B)
0.0	100	3.6	—	5.2	0.1	—
0.1	86.2*	4.2	0.0375	6.4	1.0	0.2410
0.2	86.4	6.0	0.0867	7.0	1.0	0.1308
0.3	83.4†	2.7	0.0064	11.0*	1.5	0.0135
0.5	83.8*	3.9	0.0157	14.8†	2.0	0.0041
0.7	84.1*	3.8	0.0169	21.4†	0.8	5.51E-07
1.0	73.5†	4.0	0.0012	37.9†	0.4	2.37E-11

* $p < 0.05$ judged by Student's t-test

† $p < 0.01$ judged by Student's t-test

Normal : without any intervention

PA : palmitic acid treated

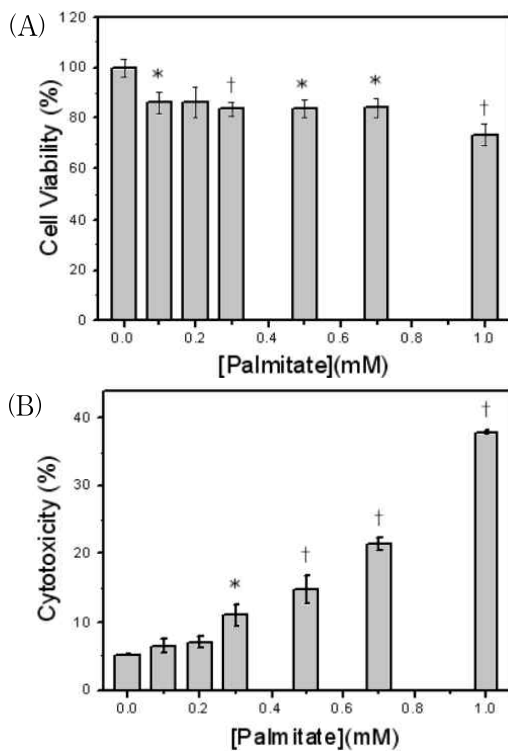


Fig. 1. Dose-dependency of palmitic acid on cell viability (A) and cytotoxicity (B) of human hepatoma HepG2 cell line.

* $p < 0.05$ judged by Student's t-test, † $p < 0.01$ judged by Student's t-test

2. 生肝健脾湯과 그 일부 조성 한약물인 茵陳, 澤瀉, 山楂, 白茯苓, 蘿蔔子 각각의 1.0 mM palmitic acid에 의한 지방독성 모델에 대한 효과

生肝健脾湯(SKT)과 그 일부 조성 한약물에 관해 지방독성에 관한 보호효과를 조사하기 위하여, 이들을 세포에 20~500 $\mu\text{g/ml}$ 의 다양한 농도로 투여하고 24시간 후 1.0 mM의 palmitic acid를 처리하여 24시간 후에 HepG2 세포의 cytotoxicity를 측정하였는데 그 결과, 生肝健脾湯(SKT) 등은 모두 농도 의존적으로 palmitic acid가 처리된 세포의 cytotoxicity를 줄이는 것으로 나타났다. 生肝健脾湯(SKT)은 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도 이상에서 유의한 정도로 세포보호효과가 관찰되었으며 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 palmitic acid 처리군에 비하여 35.0%의 감소를 보였다. 茵陳(AC)은 20 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도 이상에서 유의한 세포보호효과가 나타났으며 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 palmitic acid 처리군에 비해 cytotoxicity가 58.5%의 감소를 보였다. 澤瀉(AR)는 50 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도 이상에서 유의한 세포보호효과가 나타났으며 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 palmitic acid 처리군에 비해 cytotoxicity가 21.1%의 감소를 보였다. 山楂(CF)는 100 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도 이상에서 유의한 세포보호효과가 나타났으며 500 $\mu\text{g/ml}$ 의 농

도에서는 palmitic acid 처리군에 비해 cytotoxicity가 26.3%의 감소를 보였다. 白茯苓(HO)은 500 µg/ml의 농도에서만 유의한 세포보호효과가 나타났으며 palmitic acid 처리군에 비해 cytotoxicity가 40.3%

의 감소를 보였다. 蘿蔔子(RS)는 200 µg/ml의 농도 이상에서 유의한 세포보호효과가 나타났으며 500 µg/ml의 농도에서는 palmitic acid 처리군에 비해 cytotoxicity가 66.6%의 감소를 보였다(Table 4).

Table 4. Dose-dependency of SKT and its composition on Cytotoxicity of Human Hepatoma HepG2 Cell Line Induced by 1.0 mM Palmitate.

Groups	Cytotoxicity levels					
	SKT	AC	AR	CF	HO	RS
Normal	7.9±1.0	9.5±1.3	9.3±1.7	10.2±1.7	9.7±2.3	6.8±3.1
Control	29.7±0.8	25.3±2.9	26.5±0.6	28.9±1.4	25.8±2.3	31.4±2.6
20	29.9±2.4	18.1±1.3 [†]	24.2±2.4	28.2±1.9	23.7±1.5	30.3±1.5
50	26.3±1.9	13.3±0.6 [†]	23.0±2.0*	23.7±3.1	23.6±1.1	31.7±2.4
100	20.9±1.6 [†]	11.4±0.7 [†]	24.6±2.4	24.4±0.7*	23.8±1.4	29.3±4.5
200	22.8±1.4 [†]	10.9±0.4 [†]	21.1±0.3 [†]	20.7±0.7 [†]	22.6±1.1	15.8±2.3 [†]
500	19.3±0.4 [†]	10.5±0.4 [†]	20.9±0.6 [†]	21.3±0.7 [†]	15.4±0.4 [†]	10.5±0.5 [†]

*p<0.05 judged by Student's t-test

[†]p<0.01 judged by Student's t-test

Values are expressed average cytotoxicity ± standard error.

Normal : without any intervention

Control : 1.0 mM palmitic acid treated

20, 50, 100, 200, 500 : 1.0 mM palmitic acid treated

+ (20, 50, 100, 200, 500) µg/mL herbs treated

SKT : *Saengkankunbi-tang*, AC : *Artemisiae Capillaris Herba*, AR : *Alismatis Rhizom'*, CF : *Crataegi Fructus*, HO : *Hoelen*, RS : *Raphani Semen*

3. 生肝健脾湯, 茵陳과 蘿蔔子 각각의 지방축적에 미치는 효과

Confocal microscopic study는 세포내 중성지방과의 상호작용에서만 형광을 보이는 Bodipy 염료를 사용하여 축적된 TG 등 중성지방을 보였다. 生肝健脾湯(SKT), 茵陳(AC) 그리고 蘿蔔子(RS)를 각각 전처리한 HepG2 세포는 추후의 1.0 mM palmitic acid에 의한 세포내 지방축적을 억제하는 효과를 보여주었다(Fig. 2). 한편, 이 효과에 대한 정량분석을 실시하기 위하여 triglyceride의 glycerol

의 양을 측정하는 kit를 사용하였다. 그 결과로 1.0 mM의 palmitic acid의 경우 정상군에 비해 약 2.11배의 TG를 가지고 있는 것으로 보였다. 한편 生肝健脾湯(SKT), 茵陳(AC), 蘿蔔子(RS)를 각각 처리한 경우 1.0 mM의 palmitic acid로 처리한 경우에 비하여 각기 26.7%, 27.5%, 21.7% 감소를 보였다. 이러한 값들은 정상군에 비하여 약 1.5배 높은 편이지만 palmitic acid 처리군에 비하여 TG를 유의성 있게 감소시켰다(Table 5).

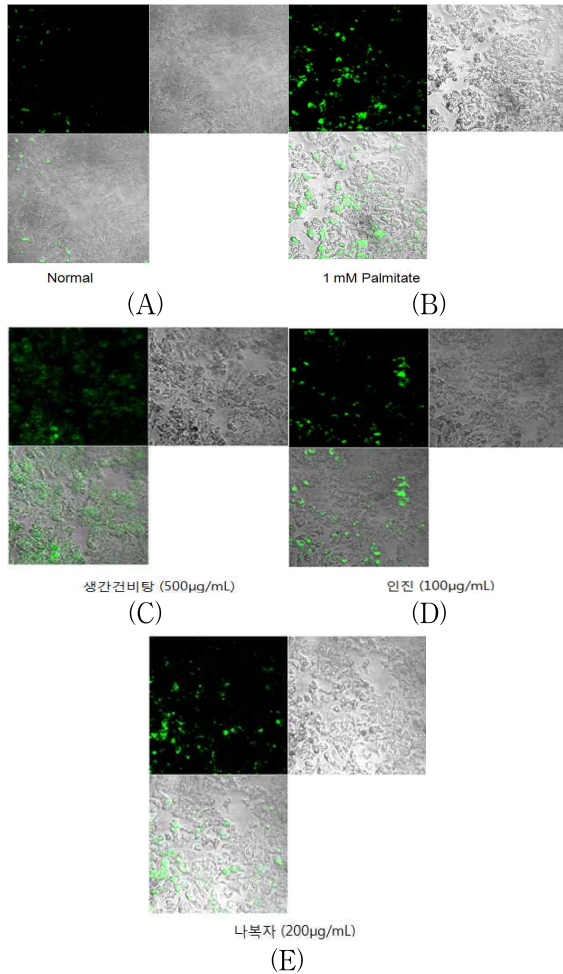


Fig. 2. Effects of herbs in confocal microscopic images on TG accumulation by 1.0 mM palmitic acid in human hepatoma HepG2 cell line.

Normal (A) : without any intervention
 Control (B) : 1.0mM palmitic acid treated
 SKT (C), AC (D), RS (E) : 1.0 mM palmitic acid treated + (SKT 500 µg/mL, AC 100 µg/mL, RS 200 µg/mL) treated
 SKT : *Saengkankunbi-tang*, AC : *Artemisiae Capillaris Herba*, RS : *Raphani Semen*

Table 5. Effects of Herbs on TG Accumulation by 1.0 mM Palmitic acid in Human Hepatoma HepG2 Cell Line.

Group	Average TG (nmol)	Standard error	Standard deviation	n
Normal	8.8	0.3	0.5	3
Control	18.6	0.9	1.6	3
SKT	13.7*	0.7	1.5	4
AC	13.5*	0.3	0.6	3
RS	14.6*	0.5	1.0	4

* $p < 0.05$ judged by Student's t-test

Normal : without any intervention

Control : 1.0 mM palmitic acid treated

SKT, AC, RS : 1.0 mM palmitic acid treated

+ (SKT 500 µg/mL, AC 100 µg/mL, RS 200 µg/mL) treated

SKT : *Saengkankunbi-tang*, AC : *Artemisiae Capillaris Herba*, RS : *Raphani Semen*

4. 生肝健脾湯, 茵陳과 蘿蔔子 각각의 세포내 ROS 량에 미치는 효과

Mitochondria의 기능 이상에서 기인한 것으로 생각되는 reactive oxygen species(ROS)의 증가는 세포사 진행에서 중요한 역할을 한다. 이에 미치는 한약물의 효과를 조사하기 위하여 한약물을 투여하고 palmitic acid의 존재하에서 ROS를 측정하였다. Palmitic acid를 투여한 경우 정상군에 비하여 59% 증가한 ROS 값을 보여주었다. 이 값이 정확하게 ROS의 농도를 의미하지는 않지만 상대적으로 보았을 때 유의성 있는 증가를 보여준 것으로 판단된다. 세포에 한약물을 투여한 후 24시간 후에 palmitic acid를 투여하였을 경우 palmitic acid를 투여한 군에 비하여 ROS 값은 生肝健脾湯(SK T), 茵陳(AC), 蘿蔔子(RS)가 각각 22.5%, 30.3%, 36.0% 감소한 값을 보여주었다(Table 6).

Table 6. Effect of Herbs on the Level of the ROS of Human Hepatoma HepG2 Cell Line Induced by 1.0 mM Palmitic Acid.

Group	Average (a.u.)	Standard error	p value
Normal	11100	600	—
H ₂ O ₂	23500	1700	—
Control	17800	1300	—
SKT	13800*	600	0.0468
AC	12400*	1000	0.0310
RS	11400*	800	0.0120

*p<0.05 judged by Student's t-test
 Normal : without any intervention
 H₂O₂ : hydrogen peroxide treated
 Control : 1.0 mM palmitic acid treated
 SKT, AC, RS : 1.0 mM palmitic acid treated + (SKT 500 µg/mL, AC 100 µg/mL, RS 200 µg/mL) treated
 SKT : *Saengkankunbi-tang*, AC : *Artemisiae Capillaris Herba*, RS : *Raphani Semen*

5. 生肝健脾湯, 茵陳과 蘿蔔子 각각의 세포내 ATP 양에 미치는 효과

Palmitic acid에 세포독성이 나타날 때 ER stress와 더불어 mitochondria의 기능 이상이 관여한다. 이 과정에 지방산의 β-oxidation 감소 등이 나타나지만 결과적으로는 ATP의 생성이 억제된다. 본 연구에서는 lipotoxicity가 유발된 세포에서 한약물이 세포내 ATP level에 미치는 효과를 조사하였는데 1.0 mM palmitic acid를 HepG2 세포주에 처리하면 ATP level은 well당 6.62 nmol로서 정상군의 34.4%로 감소하였다. 生肝健脾湯(SKT) 및 蘿蔔子(RS)를 각각 처리한 실험군에서는 palmitic acid를 처리한 군에 비해 1.86배 및 2.03배 유의성 있게(p<0.05) 증가된 값을 각각 보여주었다. 하지만 茵陳(AC)을 전처리한 군은 2.42 nmol/well로 lipotoxicity에 의한 ATP 감소에 큰 영향을 주지 못하였다(Table 7).

Table 7. Effect of Herbs on the Level of the ATP of Human Hepatoma HepG2 Cell Line Induced by 1.0 mM Palmitic Acid.

Group	Average (nmol/well)	Standard error	p value
Normal	6.52	0.27	—
Control	2.24	0.42	—
SKT	4.16*	0.39	0.0289
AC	2.42	0.38	0.7742
RS	4.54*	0.65	0.0414

*p<0.05 judged by Student's t-test
 Normal : without any intervention
 Control : 1.0 mM palmitic acid treated
 SKT, AC, RS : 1.0 mM palmitic acid treated + (SKT 500 µg/mL, AC 100 µg/mL, RS 200 µg/mL) treated
 SKT : *Saengkankunbi-tang*, AC : *Artemisiae Capillaris Herba*, RS : *Raphani Semen*

6. 生肝健脾湯, 茵陳과 蘿蔔子 각각의 glutathione 양에 미치는 효과

Palmitic acid가 HepG2 세포주에 야기하는 산화적 손상을 조사하고 이에 미치는 한약물의 효과를 조사하기 위하여 한약물 혹은 palmitic acid 존재 하에서 glutathione의 총량과 환원된 free 형태의 glutathione 양을 측정하였다. Glutathione의 총량은 정상군의 경우 well당 약 40.6 nmol의 total glutathione이 검출되었으며 1.0 mM의 palmitic acid가 처리되었을 경우는 21.6 nmol/well로 약 46.8% 감소하여 정상치의 약 절반으로 줄어들었다. 生肝健脾湯(SKT), 茵陳(AC), 蘿蔔子(RS)를 각각 전처리하여 24시간 동안 배양한 후 1.0 mM의 palmitic acid를 처리한 경우에는 이 값이 각각 28.5, 22.3, 29.9 nmol/well이었다. 이 중 生肝健脾湯(SKT)과 蘿蔔子(RS)에 의한 증가는 palmitic acid 처리군에 비해 각기 31.9%, 38.4% 가량 유의성 있는 증가를 보여주었으며 茵陳(AC)의 경우 유의한 변화가 관측되지 않았다. 항산화효과에서 환원된 형태의 glutathione의 level 또한 매우 중요한 요소로서 정상군에서는 그 값이 24.7 nmol/well이었지만 1.0 mM의 palmitic

acid를 처리한 경우 17.5 nmol/well로 약 29.2% 정도 유의성 있는 감소를 보였다. 生肝健脾湯(SKT)과 茵陳(AC)을 처리한 경우 평균값은 19.9와 19.4 nmol/well로 palmitic acid만 처리한 경우보다 약간

증가한 값을 보였으나 유의성은 없었지만 蘿蔔子(RS)를 전처리한 경우 21.4 nmol/well로 palmitic acid만 처리했을 경우보다 약 22.3% 정도 유의성 있는 증가를 보였다(Table 8).

Table 8. Effect of Herbs on the Level of the Total Glutathione (A) and Free Glutathione (B) of Human Hepatoma HepG2 Cell Line Induced by 1.0 mM Palmitic Acid.

Group	Average (nmol/well)(A)	Standard error (A)	p value (A)	Average (nmol/well)(B)	Standard error (B)	p value (B)
Normal	40.6	0.1	—	24.7	1.5	—
Control	21.6	1.0	—	17.5	1.1	—
SKT	28.5*	1.1	0.0103	19.9	1.0	0.1793
AC	22.3	2.3	0.7717	19.4	1.0	0.2788
RS	29.9*	1.8	0.0147	21.4*	0.4	0.0326

* $p < 0.05$ judged by Student's t-test

Normal : without any intervention

Control : 1.0 mM palmitic acid treated

SKT, AC, RS : 1.0 mM palmitic acid treated

+ (SKT 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, AC 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, RS 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) treated

SKT : *Saengkankunbi-tang*, AC : *Artemisiae Capillaris Herba*, RS : *Raphani Semen*

7. 生肝健脾湯, 茵陳과 蘿蔔子 각각의 세포 crude organelle mixture 내 cathepsin B, cytochrome c level에 미치는 효과

Palmitic acid가 HepG2 세포주에 야기하는 lysosomal leakage와 mitochondrial dysfunction 등을 통한 세포독성에 대한 영향과 이에 미치는 한약물의 효과를 조사하기 위하여 cathepsin B와 cytochrome c의 세포 crude organelle mixture 내 level을 western blot으로 조사하였다. Cathepsin B의 level은 정상군에 비해 1.0mM의 palmitic acid가 처리되었을 경우는 Band Intensity가 약 43.0% 감소하였다. 生肝健脾湯(SKT), 茵陳(AC), 蘿蔔子

(RS)를 각각 전처리하여 24시간 동안 배양한 후 1.0mM의 palmitic acid를 처리한 경우에는 生肝健脾湯(SKT), 蘿蔔子(RS)에서 palmitic acid만을 투여한 군에 비해 각각 약 47%, 71% 증가하였고 茵陳(AC)은 유의하지 않았다(Fig. 3). Cytochrome c의 level은 정상군에 비해 1.0 mM의 palmitic acid가 처리되었을 경우는 Band Intensity가 약 43.0% 감소하였다. 生肝健脾湯(SKT), 茵陳(AC), 蘿蔔子(RS)를 각각 전처리하여 24시간 동안 배양한 후 1.0 mM의 palmitic acid를 처리한 경우에는 palmitic acid만을 투여한 군에 비해 각각 약 49%, 59%, 75% 증가하였다(Fig. 4).

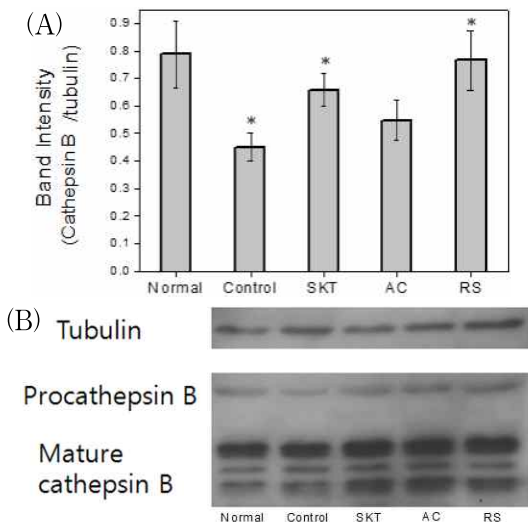


Fig. 3. Effects of herbs in band intensity (A) and western blot images (B) on the level of cathepsin B in the crude organelle mixture of human hepatoma HepG2 cell line induced by 1.0 mM palmitic acid(* $p < 0.05$ judged by student's t-test).

Normal : without any intervention
 Control : 1.0 mM palmitic acid treated
 SKT, AC, RS : 1.0mM palmitic acid treated + (SKT 500 $\mu\text{g/mL}$, AC 100 $\mu\text{g/mL}$, RS 200 $\mu\text{g/mL}$) treated
 SKT : *Saengkankunbi-tang*, AC : *Artemisiae Capillaris Herba*, RS : *Raphani Semen*

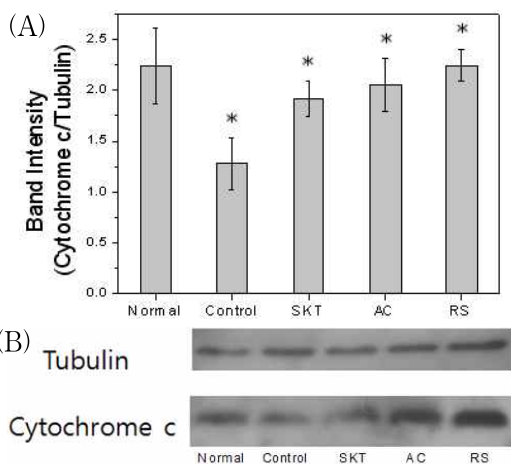


Fig. 4. Effects of herbs in band intensity (A) and western blot images (B) on the level of cytochrome c in the crude organelle mixture

of human hepatoma HepG2 cell line induced by 1.0 mM palmitic acid(* $p < 0.05$ judged by student's t-test).

Normal : without any intervention
 Control : 1.0 mM palmitic acid treated
 SKT, AC, RS : 1.0mM palmitic acid treated + (SKT 500 $\mu\text{g/mL}$, AC 100 $\mu\text{g/mL}$, RS 200 $\mu\text{g/mL}$) treated
 SKT : *Saengkankunbi-tang*, AC : *Artemisiae Capillaris Herba*, RS : *Raphani Semen*

IV. 고찰

간의 세포질로 유입된 지방산은 β -oxidation으로 ATP를 형성하거나, 인지질을 형성하게 되는데, 일부는 diacylglycerol(DG)이나 acyl-CoA가 결합한 triglyceride(TG)를 형성하게 된다. 축적된 TG는 세포 내 지방입자(lipid droplet)를 이루고 B100 등과 조합하여 very low-density lipoprotein(VLDL)을 형성하고 세포 외로 방출되는데 지방독성은 이러한 과정의 일부가 원활하지 못하여 발생한다고 생각된다²². 지방독성은 포화지방산이 불포화지방산에 비해 강하다고 알려져 있으며 불분명 하지만 불포화지방산의 경우 포화지방산의 독성을 감소시켜주는 효과가 알려져 있다²³. 포화지방산을 간세포에 투여하게 될 경우 TG를 세포 내에 일부 축적하는 현상이 나타나고, 한편으로는 apoptosis를 야기하여 간염으로 진행된다²⁴.

NAFLD는 lipotoxicity를 거쳐 간경변 등으로 악화되거나 당뇨 등 대사증후군으로 합병될 수 있는데 현재까지는 효과적인 치료를 위해 체중 감량을 우선시하고 약물로 metformin, thiazolidinediones 등 당뇨병 약제, statin 계열의 항고지혈제에 호전을 보인다는 보고가 있고 간세포 보호제, 항산화제 등을 투여하기도 하지만 대부분은 위험인자들을 교정해 주는데 그 목적을 두고 있어 NAFLD의 자연 경과를 직접 교정하는 효과적인 치료법은 잘 알려져 있지 않았다²⁵⁻²⁷. 근래 감초의 성분인 glycyrrhizin과 그 주요 대사산물인 18 β -glycyrrhetic acid가 HepG2

cell, NAFLD 모델에서 유리지방산에 의한 지방 축적과 apoptosis 방지에 효과가 있다는 연구 결과가 있었고²⁸, 한약물을 통한 적용에는 대추 추출물이 효과를 보인다는 보고도 있다²⁹. 이에 본 연구에서는 간세포의 지방독성에 미치는 生肝健脾湯과 그 일부 조성 한약물인 茵陳, 山楂, 澤瀉, 白茯苓, 蘿蔔子の 효과를 연구하기 위하여 HepG2 cell에 이들을 전처리하고 palmitic acid의 지방독성에 대한 보호 효과를 조사하였다.

HepG2 cell은 생리학적, 형태학적으로 간세포의 특징이 많고 대표적인 long chain 포화지방산인 palmitic acid에 의해 염증 전구물질이 발생한다는 보고가 있으며³⁰, 지방산으로 지방간을 유발했을 때 인간의 간세포와 유사한 지방독성 연구 모델로 사용이 가능하여³¹ 선택하였다. 본 연구에서 palmitic acid의 농도가 1.0 mM까지 cytotoxicity가 일관되고 1.0 mM 일 때 변화가 가장 크게 세포 생존도가 감소하면서 독성을 일으키는 것을 볼 수 있었다. LDH assay를 통해 볼 때 生肝健脾湯과 茵陳, 澤瀉, 山楂, 白茯苓, 蘿蔔子를 전처리하면 각각 palmitic acid에 의한 세포독성이 모두 농도 의존적으로 감소하는 것을 알 수 있었다. 生肝健脾湯은 500 µg/ml에서 35%, 茵陳과 蘿蔔子は 각기 100 µg/ml과 200 µg/ml에서 약 50%의 특히 강한 세포보호 효과를 보였는데 흥미로운 점은 茵陳의 경우에는 농도가 높아질수록 점차 높은 세포보호효과를 보였고 蘿蔔子は 100 µg/ml까지는 특이하지 않다가 200 µg/ml에서 높은 보호효과를 보였다. 澤瀉와 山楂의 경우는 보호효과가 각각 21.1%와 26.3%로 상대적으로 낮았고, 백복령의 경우 500 µg/ml에서만 효과를 보였다. 따라서 추후의 실험은 生肝健脾湯, 茵陳, 蘿蔔子에서만 행하여졌다.

NAFLD는 insulin 저항성, 간 내 지방침착과 지방독성, 산화스트레스와 지질과산화에 따른 ROS 생성 및 염증성 cytokine분비 등으로 염증과 섬유화가 진행되는 것으로 알려져 있는데, TG는 간 내 지방침착의 대부분을 차지하며 지방간 등에 임상

적 의미가 있다³². 본 연구에서 confocal microscopic study와 정량분석으로 TG를 측정하여 유의한 효과를 얻었는데 生肝健脾湯, 茵陳, 蘿蔔子 추출물은 palmitic acid에 의한 세포내 지방축적을 억제하고 감소시키는 효과를 보여주었다. 이것은 이들이 세포 내 과축적 TG로 유발된 지방독성으로부터 세포 보호효과를 나타낸다는 것을 시사한다.

과도한 유리지방산은 간세포 내 mitochondria의 산화 증가로 ROS가 증가되고 발생하는 지질과산화는 다시 respiratory chain을 손상시키는 악순환을 일으킨다. 만약 mitochondria의 β-oxidation이 포화되어 peroxisome에서 β-oxidation이 발생하면 증가된 활성화 유리산소기가 간세포막을 손상시킨다³³. 정량분석을 통한 ROS 발생량을 측정에서 生肝健脾湯, 茵陳, 蘿蔔子は palmitic acid에 의한 과도한 ROS level을 모두 감소시켜 주는 것으로 나타났다으며 산화 스트레스 및 지질과산화에 유의한 효과가 있음을 의미한다. 다만, palmitic acid를 투여할 당시 한약물은 존재하지 않기 때문에 이러한 ROS의 감소는 한약물에 포함된 환원제의 antioxidant 역할에 의한 것은 아닐 것으로 생각된다. 한약물들이 세포의 항산화관련 유전자 발현을 증가시켰을 가능성도 있지만 본 연구에서는 조사를 실시하지 않았고 추후 조사가 필요하다.

세포내 ROS 생성 증가로 mitochondria의 기능 이상과 ATP level의 감소가 예상되었고 生肝健脾湯, 茵陳, 蘿蔔子が 과도한 ROS level을 감소시켰기 때문에 ATP level도 증가시키는지 ATP 양 정량 분석을 하였다. 生肝健脾湯과 蘿蔔子は 유의하게 증가시켰고 茵陳은 큰 영향을 주지 못하였는데, 이는 生肝健脾湯이 lipotoxicity에 의한 ATP 감소를 억제하는 효과를 가지며 이에 蘿蔔子が 많이 기여할 것이라는 것을 시사하고 있다.

한편, cytochrome P450이 지방산을 분해하는 과정에서 유리산소기가 발생되는데 지질과산화 과정에서 대표적인 항산화물질인 mitochondria 내 glutathione 및 superoxide dismutase(SOD), glutathione

peroxidase(GPx), catalase 등의 효소와 ROS 등 pre-oxidant와의 불균형이 더욱 심해지는데 Glutathione은 glutathione peroxidase, glutathione S-transferase (GST) 등 여러 효소에 중요한 조효소로 작용하며 과산화물과 free radical의 제거, 생체 이물질의 독성 제거, 단백질의 -SH기 유지, 세포막에서 아미노산의 통과 등의 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있다³⁴. 산화적 손상에 미치는 약물의 효과를 조사하기 위하여 세포내 glutathione의 총량과 환원된 free 형태의 glutathione 양을 측정하였다. glutathione의 총량은 生肝健脾湯과 蘿蔔子가 유의한 증가를 나타내었고 茵陳은 유의한 변화가 관측되지 않았다. Glutathione의 총량이 증가된 것은 glutathione의 합성을 증가시키는 효과가 生肝健脾湯에 있으며, 이것은 茵陳 보다 蘿蔔子の 기여와 관련되어 있을 것이다. 그리고 항산화효과에서 환원된 free 형태의 glutathione의 level은 매우 중요한 요소인데³⁵, 生肝健脾湯과 茵陳을 처리한 경우 약간 증가하였으나 유의성은 없었고 蘿蔔子를 전처리한 경우에 유의한 증가를 보였다. 이로서 total glutathione에서와 유사하게, free glutathione의 양에도 茵陳 보다는 蘿蔔子가 더욱 중요한 역할을 할 것으로 생각된다. 하지만 生肝健脾湯 자체가 이러한 효과를 뚜렷하게 보이지 않기 때문에 임상적인 중요한 지표로 주장하기는 어려운 것으로 생각된다. 그렇지만 total glutathione에 미치는 蘿蔔子の 효과는 生肝健脾湯의 효과에 크게 기여하므로 항산화효과에서 의미가 있을 것이다.

그런데 mitochondria에서 대량의 ROS 생성에 따른 'mitochondria hypothesis'와 lysosome내 hydrolytic protease의 하나인 cathepsin B의 세포질 유출이 mitochondria dysfunction의 원인이 된다는 'lysosomal mitochondria axis'설이 최근 대두되고 있는데³⁶⁻³⁸, 본 연구에서 세포 crude organelle mixture 내 cathepsin B와 cytochrome c level을 조사한 결과 palmitic acid에 의해 cathepsin B와 cytochrome c 모두 저하되었으나 cathepsin B는 生肝健脾湯, 蘿蔔子에서 각각

대조군에 비해 유의하게 증가되었다. 또한 cytochrome c는 生肝健脾湯, 茵陳, 蘿蔔子에서 모두 유의하게 증가되었다. 이는 지방독성으로 lysosome의 외막 파괴로 인한 cathepsin B의 세포질 내 유출이 生肝健脾湯, 蘿蔔子에 의해 각각 방지되었고 mitochondria의 외막 파괴로 인한 cytochrome c의 세포질 내 유출이 生肝健脾湯, 茵陳, 蘿蔔子에 의해 각각 방지되었음을 시사한다.

이상의 결과에서 生肝健脾湯과 茵陳, 澤瀉, 山楂, 白茯苓, 蘿蔔子은 지방독성에 보호 효과를 보였으며 그 중에서 茵陳과 蘿蔔子가 특히 강한 효과를 보였다. 生肝健脾湯, 茵陳, 蘿蔔子는 세포내 TG의 축적 감소 및 ROS 생성 억제 등에 효과를 미치고 있음을 보였으나 세포내 ATP level에서는 生肝健脾湯과 蘿蔔子는 유의하게 증가시켰지만 茵陳은 큰 영향을 주지 못하였다. 세포내 glutathione의 총량에서는 生肝健脾湯, 蘿蔔子가 유의하게 증가시켰고 환원된 free 형태의 glutathione 양은 蘿蔔子에서만 유의하게 증가하였다. 또한, 生肝健脾湯, 蘿蔔子는 세포내 cathepsin B의 유출을 감소시켰고 生肝健脾湯, 茵陳, 蘿蔔子는 세포내 cytochrome c의 유출을 감소시켰다. 따라서 종합하여 보면 세포내 TG 축적에 따른 지방독성에 生肝健脾湯이 효과가 있으며 조성 한약물 중 특히 茵陳과 蘿蔔子가 지방독성의 mitochondrial dysfunction으로 인한 cytotoxicity의 예방에 유의한 효과를 보이고 蘿蔔子가 산화스트레스 방지와 lysosomal leakage로 인한 지방독성의 예방에 유의한 것으로 나타나 NAFLD의 치료에 임상적 의의가 있을 것이라 기대한다. 추후 연구에서는 生肝健脾湯, 茵陳과 蘿蔔子の 유효성분 탐색과 *in vivo* 실험, 순차적 임상 시험 등이 필요할 것으로 사료된다.

V. 결론

본 연구에서는 生肝健脾湯과 그 일부 조성 한약물인 茵陳, 澤瀉, 山楂, 白茯苓, 蘿蔔子 각각의 물

전탕 추출물이 HepG2 cell에서 palmitic acid로 인한 지방독성에 미치는 효과를 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 生肝健脾湯과 茵陳, 澤瀉, 山楂, 白茯苓, 蘿蔔子是 지방독성에 의해 감소된 cell viability를 증가시켰고, cytotoxicity를 감소시켰다.
2. 生肝健脾湯과 茵陳, 蘿蔔子是 세포내 triglyceride의 축적을 감소시키는 효과가 있었다.
3. 生肝健脾湯과 茵陳, 蘿蔔子是 지방독성에 수반되는 ROS 생성을 억제하였다.
4. 生肝健脾湯과 蘿蔔子是 지방독성으로 감소된 세포내 ATP 양을 증가시키는 효과가 있었고 茵陳은 효과가 유의하지 않았다.
5. 生肝健脾湯과 蘿蔔子是 지방독성 상태에서 glutathione 양을 증가시키는 효과는 있었지만 茵陳은 증가시키는 효과가 없었다.
6. 生肝健脾湯과 茵陳, 蘿蔔子是 지방독성 상태에서 cytochrome c의 세포내 유출을 감소시키는 효과가 있었다. 한편, 生肝健脾湯, 蘿蔔子是 지방독성 상태에서 cathepsin B의 세포내 유출을 감소시키는 효과가 있었다.

이상과 같이 生肝健脾湯과 茵陳, 蘿蔔子是 HepG2 세포주의 간 지방독성 모델에서 세포 보호효과와 TG 축적 감소, ROS 생성 억제, mitochondria에서 cytochrome c 유출 억제 효과가 있다. 또한, 生肝健脾湯과 蘿蔔子是 ATP 양과 glutathione 양을 정상에 가깝게 회복시키고 cathepsin B가 lysosome에서 유출되는 것을 억제한다. 따라서 生肝健脾湯과 茵陳, 蘿蔔子是 간 지방독성에 보호 효과가 있고 비알코올성 지방간 질환(NAFLD) 치료에 임상적 의의가 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

1. van Herpen NA, Schrauwen-Hinderling VB. Lipid

accumulation in non-adipose tissue and lipotoxicity. *Physiol Behav* 2008;94:231-41.

2. Angulo P. Nonalcoholic fatty liver disease. *N Engl J Med* 2002;346:1221-31.
3. Browning JD, Szczepaniak LS, Dobbins R, Nuremberg P, Horton JD, Cohen JC, et al. Prevalence of hepatic steatosis in an urban population in the United States: impact of ethnicity. *Hepatology* 2004;40:1387-95.
4. Park SH, Jeon WK, Kim SH, Kim HJ, Park DI, Cho YK, et al. Prevalence and risk factors of non-alcoholic fatty liver disease among Korean adults. *J Gastroenterol Hepatol* 2006;21:138-43.
5. Fan JG, Saibara T, Kim BI, Kim BI, Sung JJ, Chutaputti A. What are the risk factors and settings for non-alcoholic fatty liver disease in Asia-Pacific?. *J Gastroenterol Hepatol* 2007;22:794-800.
6. Schaffer JE. Lipotoxicity: when tissues overeat. *Curr Opin Lipidol* 2003;14:281-7.
7. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of "two hits"?. *Gastroenterology* 1998;114:842-5.
8. Feldstein AE, Werneburg NW, Li Z, Bronk SF, Gores GJ. Bax inhibition protects against free fatty acid-induced lysosomal permeabilization. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006;290:G1339-46.
9. Hamaguchi M, Kojima T, Takeda N, Nakagawa T, Taniguchi H, Fujii K, et al. The metabolic syndrome as a predictor of nonalcoholic fatty liver disease. *Ann Intern Med* 2005;143:722-8.
10. 김병운. 만성간염 3,136례에 대한 임상분석과 生肝健脾湯의 치료효과. 대한한의학회지 1993; 14(1):216-23.
11. 김재용, 김영철, 이장훈, 우홍정. 生肝健脾湯이 HepG2 cell의 증식, 세포사멸 및 활성조절 신호전달계에 미치는 영향. 대한한방내과학회지

- 2006;27(1):149-65.
12. 정성충, 김덕호, 우홍정, 김병운. 흰쥐의 實驗的 動脈硬化症에 對한 生肝健脾湯의 효과. 경희한의대논문집 1991;14:53-84.
 13. 김호철. 한약약리학. 서울: 집문당; 2001, p. 239-41, 283-5.
 14. 반상석, 윤현덕, 신오철, 신유정, 박치상, 박지하, 등. 고지방 식이로 유도된 비만 흰쥐에 茵陳, 枳實, 山楂가 미치는 영향. 대한본초학회지 2006;21(3):55-67.
 15. Lee HS, Kim HH, Ku SK. Hepatoprotective effects of *Artemisiae Capillaris Herba* and *Picrorrhiza Rhizoma* combinations on carbon tetrachloride-induced subacute liver damage in rats. *Nutr Res* 2008;28:270-7.
 16. Thirupurasundari CJ, Jayalakshmi R, Niranjali Devaraj S. Liver architecture maintenance by tincture of *Crataegus* against isoproterenol-induced myocardially infarcted rats, *J Med Food* 2005; 8:400-4.
 17. 이장천, 이은, 이영철. 택사농축액이 고지방식이를 급여한 흰쥐의 지질구성 및 TBARS량에 미치는 영향. 대한본초학회지 2008;23(3):113-7.
 18. Hur JM, Choi JW, Park JC. Effects of methanol extract of *Alisma orientale* Rhizome and its major component, Alisol B 23-acetate, on hepatic drug metabolizing enzymes in rats treated with bromobenzene. *Arch Pharm Res* 2007;30:1543-9.
 19. 윤희진, 차효미, 김성원, 신완철, 김혜경, 최석영. 복령 추출물이 혈중 지질성상에 미치는 영향. 한국식품영양과학회지 2006;35(8):1005-9.
 20. 명성하, 이학인, 김연섭. 竹茹와 蘿蔔子가 實驗的 糖尿에 미치는 영향. 대한본초학회지 1999; 14(1):79-86.
 21. Lee JR, Shin JH, Byun SH, Park SJ, Jo MJ, Park SM, et al. Anti-obese and hypolipemic effects of the aqueous extracts of raphani semen in mice fed high fat diet. *J Korean Soc Appl Biol Chem* 2009;52(1):50-7.
 22. Borchardt RA, Davis RA. Intrahepatic assembly of very low density lipoproteins. *J Biol Chem* 1987;262:16394-402.
 23. Maedler K, Spinas GA, Dyntar D, Moritz W, Kaiser N, Donath MY. Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acids on beta-cell turnover and function. *Diabetes* 2001; 50:69-76.
 24. Wei Y, Wang D, Topczewski F, Pagliassotti MJ. Saturated fatty acids induce endoplasmic reticulum stress and apoptosis independently of ceramide in liver cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2006;291:E275-81.
 25. Angelico F, Burattin M, Alessandri C, Del Ben M, Lirussi F. Drugs improving insulin resistance for non-alcoholic fatty liver disease and/or non-alcoholic steatohepatitis. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;(1):CD005166.
 26. Krsnoff JB, Painter PL, Wallace JP, Bass NM, Merriman RB. Health-related fitness and physical activity in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* 2008;47:1158-66.
 27. Rallidis LS, Crakoulis CK, Parasi AS. Pravastatin in patients with nonalcoholic steatohepatitis: results of a pilot study. *Atherosclerosis* 2004; 174:193-6.
 28. Wu X, Zhang L, Gurley E, Studer E, Shang J, Wang T, et al. Prevention of free fatty acid-induced hepatic lipotoxicity by 18beta-glycyrrhetic acid through lysosomal and mitochondrial pathways. *Hepatology* 2008;47:1905-15.
 29. 성경화. HepG2 cell에서 palmitic acid로 유발된 lipotoxicity에 대한 대추의 보호효과. 경희대학교; 2010.
 30. Joshi-Barve S, Barve SS, Amancherla K,

- Gobejishvili L, Hill D, Cave M, et al. Palmitic acid induces production of proinflammatory cytokine interleukin-8 from hepatocytes. *Hepatology* 2007;46:823-30.
31. Gómez-Lechín MJ, Donato MT, Martínez-Romero A, Jiménez N, Castell JV, O'Connor JE. A human hepatocellular in vitro model to investigate steatosis. *Chem Biol Interact* 2007;165:106-16.
32. Sanyal AJ. Mechanisms of Disease: pathogenesis of nonalcoholic fatty liver disease. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005;2:46-53.
33. Robertson G, Leclercq I, Farrell GC. Nonalcoholic steatosis and steatohepatitis. II. Cytochrome P-450 enzymes and oxidative stress. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2001;281:G1135-9.
34. Fernandez-Checa JC, Kaplowitz N. Hepatic mitochondrial glutathione: transport and role in disease and toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 2005;204:263-73.
35. Miura T, Muraoka S, Ogiso T. Antioxidant activity of metallothionein compared with reduced glutathione. *Life Sci* 1997;60:301-9.
36. Schrauwen P, Schrauwen-Hinderling V, Hoeks J, Hesselink MK. Mitochondrial dysfunction and lipotoxicity. *Biochem Biophys Acta* 2010;1801:266-71.
37. Li Z, Berk M, McIntyre TM, Gores GJ, Feldstein AE. The lysosomal-mitochondrial axis in free fatty acid-induced hepatic lipotoxicity. *Hepatology* 2008;47:1495-503.
38. Almaguel FG, Liu JW, Pacheco FJ, de Leon D, Casiano CA, de Leon M. Lipotoxicity-mediated cell dysfunction and death involve lysosomal membrane permeabilization and cathepsin L activity. *Brain Res* 2010;1318:133-43.