



Original Article / 원저

삼릉(三稜) 추출물의 간세포 보호 및 미토콘드리아 보호 효과

서혜림, 이주희, 장미희, 권영원, 조일제, 김광중, 박숙자, 김상찬, 김영우*, 변성희**

대구한의대학교 한의과대학

Mitochondria protection of Sparganii Rhizoma against oxidative stress in hepatocytes

Hye-Lim Seo, Ju-Hee Lee, Mi-Hee Jang, Young-Won Kwon, Il-Je Cho, Kwang-Joong Kim, Sook-Jahr Park, Sang-Chan Kim, Young-Woo Kim* and Sung-Hui Byun**

Medical Research Center (MRC-GHF), College of Oriental Medicine,
Daegu Haany University

ABSTRACT

Objectives : Sparganii Rhizoma is frequently used in traditional herbal medicine for treatment of blood stasis, amenorrhea and functional dyspepsia and has been reported to exhibit anti-oxidant, anti-proliferation and anti-angiogenesis properties. In this study, we investigated the cytoprotective effect and underlying mechanism of Sparganii Rhizoma water extract (SRE) against oxidative stress-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis in hepatocyte.

Methods : To determine the effects of SRE on oxidative stress, we induced synergistic cytotoxicity by co-treatment of arachidonic acid (AA) and iron in the HepG2 cell, a human derived hepatocyte cell line.

Results : Treatment of SRE increased relative cell viability and altered the expression levels of apoptosis-related proteins such as Bcl-xL, Bcl-2 and procaspase-3. And SRE also inhibited the mitochondrial dysfunction and excessive reactive oxygen species production induced by AA+iron. In addition, SRE activated of AMP-activated protein kinase (AMPK), a potential target for cytoprotection, by increasing the phosphorylation of AMPK α at Thr-172. Moreover, SRE increased phosphorylation of acetyl-CoA carboxylase, a direct downstream target of AMPK.

Conclusion : These results indicated that SRE has the ability to protect against oxidative stress-induced hepatocyte damage, which may be mediated with AMPK pathway.

Keywords : Sparganii Rhizoma, hepatocyte, mitochondria, oxidative stress, AMPK

I. 서 론

활성산소(reactive oxygen species, ROS)는 성인병과 암을 비롯한 주요한 질병요인 중 하나이자 노화를 일으키는 주범이다. ROS는 일반적인 산소보다 활성이 크고 불안정하며 높은 에너지를 갖고 있는 산소로서 대표적인 예로는 superoxide anion (O_2^-), 과산화수소(hydrogen peroxide, H_2O_2), hydroxyl radical ($OH\cdot$) 등이 있다. 이러한 ROS는 세포내 소기관의 정상적인 대사 및 세포질내 일부 효소들에 의해 꾸준히 생성되어지는데, 생명체들은 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase와 같은 항산화 효소나 비타민 C, 비타민 E, flavonoids, carotenoids, glutathione (GSH)과 같은 항산화 물질들을 이용하여 우리 몸 안에 늘 일정한 양만큼의 ROS를 유지하고 있다. 그러나 약물, 환경오염물질, 그리고 세균 감염 등과 같은 여러 가지 외부 요인으로 ROS의 과도한 증가 및 세포의 항산화력 감소로 인해, 세포 내의 항산화적 방어기작으로 제거할 수 있는 ROS의 양보다 ROS가 훨씬 많이 존재할 때, 산화적 스트레스(oxidative stress)가 유발되어 세포 사멸, 질병 발생, 그리고 세포 노화를 일으키게 된다^{1,2)}.

미토콘드리아(Mitochondria)는 세포내 호기성 대사 및 ATP를 생성하며, 세포내 칼슘 농도의 조절¹⁾, ROS 생성²⁾, 세포주기와 성장의 조절, 세포분화 및 세포 사멸³⁾ 등에 있어서 매우 중요한 역할을 담당하는 세포소기관 중 하나이다. 미토콘드리아의 유전적 결함이나 생성의 감소, 염증에 의한 ROS 생성의 증가, 세포막 인지질 중 지방산의 산화적 변형 등은 미토콘드리아 기능이상(mitochondrial dysfunction)을 유발한다. 과도한 ROS 생성은 세포 내 산화적 스트레스를 유발하고, 이는 ATP, NAD 고갈, 단백질 손상, 체내 항산화제인 GSH 고갈을 통해 세포손상을 일으킨다⁴⁾. 또한 산화적 스트레스는 세포막 인지질에 변화를 일으켜 미토콘드리아 팽창 및 미토콘드리아 투과성 전이공(mitochondrial permeability transition pore, mPTP) 개방을 촉진한다^{5,6)}. 특히, 과량의 독성물질,

만성적인 알코올 섭취 및 감염에 의한 산화적 스트레스는 간세포 내 미토콘드리아의 손상 및 간손상을 유발할 뿐만 아니라 간염, 간섬유화, 간경화, 간암 등의 간질환의 주된 원인으로 알려져 있다^{5,6)}. 따라서, 간세포 보호 및 간질환의 예방·치료를 위한 연구들은 산화적 스트레스를 경감시키기 위해 항산화 효과가 높은 항산화제 개발에 힘쓰고 있으며, 특히 안전하고 경제적인 식물 유래의 천연항산화제에 대한 관심이 높다.

철은 체내에서 미토콘드리아의 전자전달계에서 산화-환원 반응에 관여하는 cytochrome계 효소와 헤모글로빈, 미오글로빈의 구성성분이며, 각 조직세포로의 산소운반, ATP 생성 등의 중요한 역할을 한다⁷⁾. 하지만 철이 세포 내에 과도하게 축적되면 free radicals 반응을 촉진시켜 지질과산화, 단백질 변성 및 DNA 손상을 일으킬 수 있으며⁸⁾, 1차적으로 철을 저장하는 장기인 간은 이러한 철분과다에 민감한 영향을 받을 수 있다⁹⁾. 아라키돈산(arachidonic acid, AA)은 염증성 지방산으로 세포막으로부터 생성되며¹⁰⁾, 여러 종류의 세포사멸(apoptosis) 유도기전에 관련되어 있다^{11,12)}. 세포 내 AA의 증가는 mPTP 개방 촉진 및 미토콘드리아의 팽창을 유도하며^{5,6)}, 이로 인해 cytochrome C가 유리되어 apoptosis를 일으킨다¹³⁾. 또한 철의 촉매작용 하에서 AA는 자가산화 반응을 하여 산화적 스트레스를 증가시키므로 두 약물의 병용 처치는 apoptosis 기전을 심화시킬 수 있다¹⁴⁾. 따라서 이에 대항하는 약물은 간세포 보호 효과를 가진다는 것을 의미하므로, 간세포에서 AA와 철을 이용한 산화적 스트레스 모델은 간을 보호하는 물질을 스크리닝할 수 있는 좋은 tool이 될 수 있다.

삼릉(三稜, *Sparganii Rhizoma*)은 흑삼릉과(*Sparganiaceae*)의 흑삼릉(*Sparganium stoloniferum* Buchanan-Hamilton)의 덩이뿌리를 말린 약재로서 뿌리와 줄기부분을 약용한다. 그리고 혈소판 응고, 혈전제거, 어혈을 풀어주는 약리작용을 하며¹⁵⁾, 항균 활성작용과 항산화 효과가 알려져 있다¹⁶⁾. 또한 최근 melanoma 세포주에 대해 tyrosinase 활성 저해 효과가 보고되어졌다¹⁷⁾. 그러나 아직까지 삼릉의 항산화효

* Corresponding Author : Young-Woo Kim, Assistant Professor, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University, 1, Hanuidae-ro, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, 38610, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-819-1861 Fax : +82-53-819-1860 E-mail : ywkim@dhu.ac.kr, shbyun@dhu.ac.kr

** Corresponding Author : Sung-Hui Byun, Professor, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University, 1, Hanuidae-ro, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, 38610, Republic of Korea.

· Tel : +82-53-819-1861 Fax : +82-53-819-1860 E-mail : ywkim@dhu.ac.kr, shbyun@dhu.ac.kr

• Received : October 26, 2015 / Revised : December 11, 2015 / Accepted : December 17, 2015

과 및 간세포 보호 효과에 대한 연구는 되어있지 않았다. 따라서 본 연구에서는 인간 간암 세포주 HepG2 cell을 이용하여 삼릉 물 추출물이 AA와 철에 의해 유도된 산화적 스트레스에 대해 미토콘드리아 보호효과가 있는지 그에 따른 간세포 apoptosis 저해효과를 가지는지 그 작용기전을 밝히고자 하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

삼릉은 대원약업사(Daegu, Korea)에서 구입하여, 200 g을 물 1.5 L에 넣고 3시간 동안 가열하여, 열수 추출한 후 추출물을 거즈로 1차 여과하고, 300 mm filter paper (Toyo Roshi Kaisha Ltd, Tokyo, Japan)로 여과하였다. 이 여과액을 rotary evaporator로 감압농축한 후, ultra-Low temperature freezer에 12시간동안 넣어 동결시켰다. 동결된 추출물을 동결건조기로 동결 건조하여 분말화 하여, 삼릉 추출물(SRE) 7.7 g을 얻었으며, -20℃에 보관하여 사용하였다. SRE의 수율은 3.8%였으며 세포배양배지에 녹여 0.22 μm filter (Millipore, USA)로 여과한 후, 실험에 사용하였다.

Immunoblot analysis를 위한 p-AMPK, p-ACC, Bcl-2, pro-caspase-3의 항체와 anti-mouse, anti-rabbit Horseradish peroxidase-linked IgG 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 Bcl-xL에 대한 항체는 Santa cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였으며, arachidonic acid (AA)와 rhodamine 123 (CALBIOCHEM)은 Merck Millipore (Billerica, MA, USA)에서 구입하였다. 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (H2DCF-DA), ferric nitrilotriacetic acid (Fe-NTA), 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazoleum bromide (MTT), β-actin 항체는 Sigma-aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

2. 세포 배양

Human hepatocyte에서 유래된 cell line, HepG2 cell은 ATCC (Rockville, MD, USA)에서 구입하였으며, Dulbecco's modified Eagle's medium

(DMEM)에 10% fetal bovine serum (FBS), 100 μg/ml penicillin 및 100 μg/ml streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여, 37℃, 5% CO₂조건의 incubator에서 배양하였다. 각각 실험과정에 맞는 plate에 세포를 적정농도로 분주하여 위의 배지에 12시간동안 배양한 다음, FBS를 포함하지 않는 배지로 교환하여 12시간 더 배양하였다. 실험과정의 모든 세포는 80~90%의 confluence에서 실험하였다.

3. MTT 분석법

세포 독성을 측정하기 위해, HepG2 cell은 24 well plate에 3×10⁵ cells/well 농도로 0.5 ml/well로 분주한 뒤 24시간 동안 배양한 후, SRE를 최종농도 (0, 1, 3, 10, 30, 100, 300 μg/ml)가 되도록 한 시간 전 처리, 10 μM AA를 12시간 처리 후 5 μM iron을 첨가하여 1시간 더 배양하였다. 이 후, 0.1 mg/ml MTT 용액을 가하고 37℃에서 2시간 더 배양하여, 배지를 제거하고 MTT를 환원시켜 생성된 formazan crystal을 dimethylsulfoxide로 용해시켜 Titertek Multiskan Automatic ELISA microplate reader (Model MCC/340, Huntsville, AL, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 control에 대한 백분율로 나타내었다. [i.e. viability (% control) = 100 × (absorbance of treated sample)/(absorbance of control)].

4. ROS 생성 측정

SRE의 ROS 소거활성을 측정하기 위하여 HepG2 cell을 이용하여 DCFH-DA assay를 실시하였다. HepG2 cell을 48 well plate에 5×10³ cells/well로 분주하여 배양하였다. SRE 100 μg/ml 한 시간 전 처리, 10 μM AA를 12시간 처리 후 iron 5 μM을 20분 동안 처리하였다. ROS의 양을 측정하기 위하여 10 μM DCFH-DA 시약을 샘플 수확 전 20분간 배양하고 fluorescence microplate reader (Tecan Infinite M200 PRO)를 사용하여 형광강도 excitation 485 nm, emission 535 nm로 측정하였다.

5. 면역염색법

6 well plate에 5×10⁵ cells/well로 분주하여 실험에 사용하였다. SRE 100 μg/ml 한시간 전 처리, AA 10μM을 12시간 처리 후 iron 5 μM을 1시간 동안

처리하였다. 20 mM Tris Cl (pH7.5), 1% Triton X-100, 137 mM sodium chloride, 10% glycerol, 2 mM EDTA, 1 mM sodium orthovanadate, 25 mM b-glycerophosphate, 2 mM sodium pyrophosphate, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride와 1 mg/ml leupeptin을 함유하는 buffer를 사용하여 세포를 용해 시켜, 15,000×g로 30분간 원심 분리하여 단백질을 추출하고, BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용하여 정량하였다. 단백질은 SDS-PAGE를 이용하여 크기별로 분리한 후 acrylamide gel로부터 nitrocellulose membrane으로 electrotransfer 시켰다. 이후 nitrocellulose membrane을 각각의 단백질에 맞는 항체를 사용하여 4℃에서 overnight 처리하였다. Secondary antibody는 HRP-linked anti-rabbit 혹은 anti-mouse를 사용하였으며, ECL chemiluminescence detection reagents를 이용하여 발색한 후 Image analyzing system (Ultra-Violet Products Ltd., Upland, CA, USA)을 사용하여 관찰하였다.

6. 유세포분석법

6 well plate에 5×10^5 cells/well로 분주하여 실험에 사용하였다. SRE 100 μ g/ml 한시간 전 처리, AA 10 μ M을 12시간 처리 후 iron 5 μ M을 40분 동안 처리하였다. 세포에 막 투과성 형광 염색 용액인 rhodamine 123을 0.05 μ g/ml 의 농도로 처리하고 은박지로 빛을 차단한 후 1시간 동안 염색하고, trypsin 용액을 처리하여 세포를 회수하였다. 이를 1% FBS가 함유된 phosphate buffered saline으로 세척한 후, Flow cytometer (FACS, Partec, Münster, Germany)로 MMP (mitochondrial membrane permeability, 미토콘드리아 막투과성)의 변화를 세포 10,000개에서 측정하였다.

7. 통계처리

실험 결과는 mean \pm S.D.로 나타내었으며, t-test의 통계처리방법으로 통계적 유의성을 검정하였다 ($p < 0.05$ 또는 $p < 0.01$).

III. 실험결과

1. SRE의 AA+iron로 유도된 apoptosis 저해 효과

AA처리는 HepG2 cell에서 산화스트레스와 apoptosis를 유발하고, iron처리는 AA로 유도된 독성을 증가시킨다. 따라서 본 실험에서는 HepG2 cell에서 SRE의 AA+iron으로 유도된 apoptosis 저해능을 관찰하기 위하여 MTT assay를 진행하였다. MTT assay로 300 μ g/ml 농도까지 세포독성을 분석한 결과 독성은 나타나지 않았다(Data not shown). 그러므로 본 실험에서는 SRE 1, 3, 10, 30, 100, 300 μ g/ml의 농도로 MTT assay를 진행하였다. 그 결과, AA+iron에 의해 감소한 세포 생존율은 SRE 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었으며, 30-300 μ g/ml의 농도에서 가장 효과적인 세포 보호능을 나타내었다 (Fig. 1A). MTT assay에 이어 apoptosis 관련 단백질의 immunoblotting을 진행하였다. SRE는 HepG2 cell에 AA+iron 처리 시 감소하는 Bcl-2, Bcl-xL, procaspase-3의 단백질 농도를 현저히 억제하였다 (Fig. 1B). 이러한 결과들은 HepG2 cell에서 AA+iron에 의한 cell death가 apoptosis 유도와 연관이 있고, SRE가 AA+iron으로 유도된 apoptosis에 반하여 세포 보호능이 있다는 것을 나타낸다.

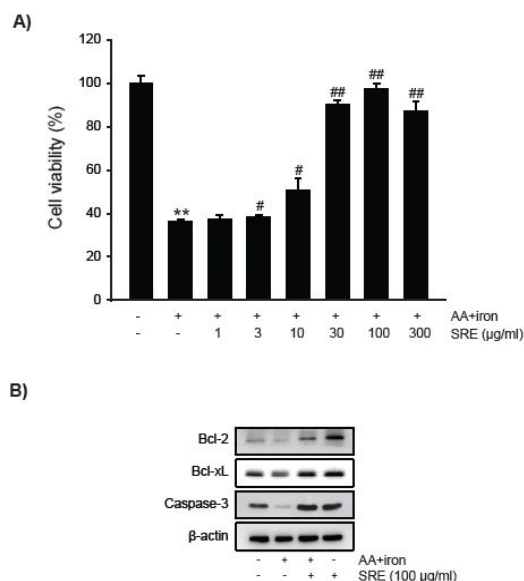


Fig. 1. The effect of Sparganii Rhizoma Extract (SRE) on hepatocyte viability
(A) The effects of SRE on cell viability were assessed using MTT assays. HepG2 cells were treated with various concentrations of SRE for 1 h and were continuously incubated with 10 μ M arachidonic acid (AA) for 12 h, followed by exposure to 5 μ M iron for 1 h.
(B) Immunoblottings for the proteins associated with apoptosis. Immunoblot analyses were performed on the lysates of HepG2 cells

that had been incubated with 100 µg/ml SRE for 1 h, continuously treated with 10 µM AA for 12 h, and then exposed to 5 µM iron for 1 h. The statistical significance of differences between treatments and either the vehicle-treated control (**p<0.01) or cells treated with AA+iron (#p<0.05 or ##p<0.01) was determined.

2. SRE의 항산화효과

AA+iron에 의한 산화적 스트레스로 생산된 과도한 ROS는 미토콘드리아막의 산화장애를 유발하여 apoptosis를 일으킨다. 따라서 본 연구에서는 세포 내의 ROS를 DCFH-DA를 이용하여 ELISA microplate reader로 측정하였다. 그 결과 AA+iron에 의한 ROS의 증가는 SRE 처리로 인해 저해되었다(Fig. 2).

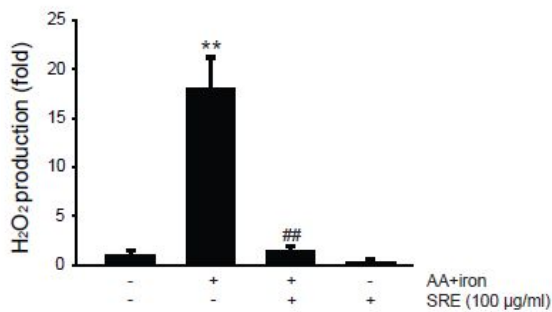


Fig. 2 Inhibition of hydrogen peroxide production by Sparganii Rhizoma Extract (SRE)

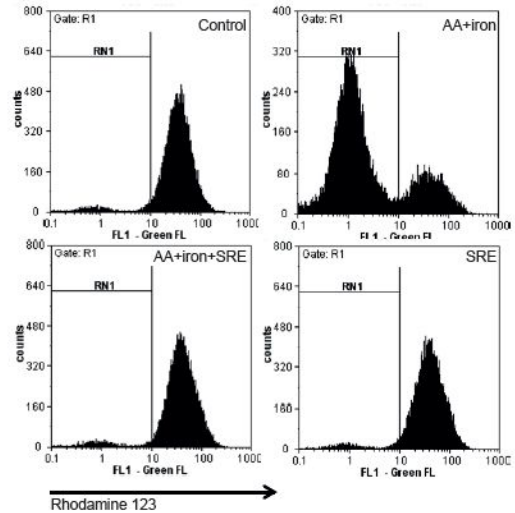
H₂O₂ production was monitored by measuring DCF fluorescence. The H₂O₂ production was assessed in cells that had been treated with 100 µg/ml SRE for 1 h, continuously treated with 10 µM arachidonic acid (AA) for 12 h, and then exposed to 5 µM iron for 20min. SRE treatment attenuated AA+iron-induced reactive oxygen species (ROS) production. Results were confirmed by three separate experiments. The statistical significance of differences between treatments and either the vehicle-treated control (**p<0.01) or cells treated with AA+iron (##p < 0.01) was determined.

3. SRE의 mitochondrial dysfunction 저해 효과

AA+iron에 의한 산화적 스트레스는 미토콘드리아 막전위를 파괴하여 미토콘드리아 막투과성 (mitochondrial membrane permeability, MMP)을 증가 시키고, apoptosis를 유도한다. 따라서 SRE가 AA+iron에 의한 apoptosis와 mitochondrial dysfunction을 억제할 수 있는지 알아보기 위해 Rhodamine 123 (Rh123)으로 세포를 염색하여 flow cytometric analysis를 통해 MMP를 측정하였다. 미토콘드리아 막전위에 의해 막에 부착되는 형광염료인 Rh123은 MMP를 측정하는 표지물질이다. Rh123의 낮은 staining 정도를 보인 RN1 fraction의 세포 수는 미토콘드리아의 손상과 기능 장애를 반영한다(Fig. 3A). AA+iron만을 처치한 실험군의 경우 RN1 fraction의 비율이 증가하였고 대조군과 유의성있는

차이를 보였으며, SRE를 AA+iron와 함께 처리했을 때 RN1 fraction 비율의 증가를 억제하였다(Fig. 3B). 그러므로 SRE가 AA+iron로 인한 미토콘드리아 기능 이상을 저해한다는 사실을 알 수 있다.

A)



B)

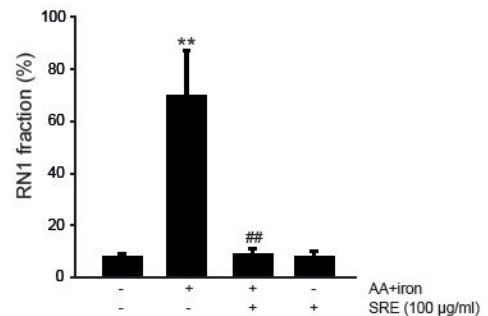


Fig. 3 Abrogation of mitochondrial dysfunction by Sparganii Rhizoma Extract (SRE)

(A) Mitochondrial membrane permeability (MMP) was investigated by using flow cytometry. HepG2 cells were treated with 100 µg/ml SRE for 1 h, continuously treated with 10 µM arachidonic acid (AA) for 12 h, and then exposed to 5 µM iron for 40min. The cell were harvested after Rhodamine 123 staining.

(B) AA+iron treatment increased the subpopulation of RN1 fraction (low Rh123 fluorescence), as indicated by the left shift of population. The statistical significance of differences between treatments and either the vehicle-treated control (**p<0.01) or cells treated with AA+iron (##p<0.01) was determined.

4. SRE에 의한 AMPK pathway 활성화

AMPK는 세포 내의 항상성 유지에 센서 역할을 하는 효소이다. 이러한 AMPK 활성화는 AA에 의해 유도된 apoptosis 억제 효과의 중요한 지표가 된다. 또한 다양한 물질들이 AMPK pathway를 통하여

AA+iron로 유도된 미토콘드리아 기능장애 및 산화적 손상을 억제한다고 알려져 있다¹⁴⁾. SRE 100 μ g/ml을 HepG2 cell에 일정한 시간 처리하여 관찰한 결과, SRE는 시간 의존적으로 AMPK의 인산화를 더욱 증가시켰고, 30분-6시간에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 그리고, AMPK의 downstream인 ACC의 인산화 또한 SRE에 의해 초기시간에 증가하는 것을 확인하였다(Fig. 4).

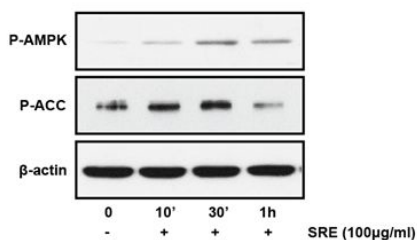


Fig. 4. AMPK pathway activation by Sparganii Rhizoma Extract (SRE)
Immunoblot analysis were performed on the lysates of HepG2 cells that had been treated with SRE (100 μ g/ml) for the indicated time period. Equal protein loading was verified by β -actin immunoblotting.

IV. 고 찰

간은 물질대사에 중요한 역할을 하며, 독성물질, 과다한 음주, 흡연, 각종 유해 화학물질에 의해 간이 손상을 입으면 간 기능이 저하되고, 심하면 간염, 지방간, 간섬유화, 간경화, 간암 등의 만성 간질환으로 발전하는 경우가 빈번하고 이로 인한 사망률 또한 증가하고 있는 추세이다^{3,4)}. 만성질환에 대한 예방적 개념 도입으로 약물처방이 치료형에서 예방형으로 변화됨에 따라, 유해물질로부터 간 손상을 방지하고, 손상된 간 보호를 위한 소재 개발에 대한 다양한 연구가 수행되고 있으며, 천연물 유래, 특히 한의학에서 주로 처방되는 한약재로부터 간보호 물질을 찾고자 하는 연구가 활발히 이루어지고 있다.

삼릉은 흑삼릉과(Sparganiaceae)에 속한 다년생 초본인 흑삼릉과(Cyperaceae)에 속한 다년생 초본인 매자기의 근경을 건조한 것으로 어혈(瘀血)로 인한 복부 통증에 많이 작용하여 치료하는 약재이다³⁰⁾. 성분으로는 β -sitosterol, β -sitosterol-3- β -D-glucuronopyranoside, 3-(4-hydroxyphenyl)-2-propenoic acid, sorbose, 1-O- β -Dglucopyranosyl-(2S, 3R, 4E, 8Z)-2-

[[2(R)-hydroxyeicosanoyl]amino]-4, -8-octadecadiene-1, 3-diol, β -sitosterol-3-O- β -glucopyranoside 등 6가지가 보고되어졌다³¹⁾. 최근에는 삼릉의 진통 및 항혈전 작용³²⁾, 항종양 효능³³⁾ 등이 보고된 바 있다. 본 연구에서는 인간 간암 세포주 HepG2 cell을 이용하여 삼릉 물 추출물이 인위적으로 유도된 산화적 스트레스 in vitro 모델에서 간세포 보호 효능을 평가하고, 그 작용기전에 대해 연구하였다.

철은 체내에 필수적인 영양소로서 산소운반 및 에너지대사에 필수적인 성분이나, 과도하게 축적이 되면, 산화적 스트레스를 일으켜 급속한 지질과산화 연쇄반응으로 혈액 내의 염증세포 또는 혈관의 내피세포와 조직에서 ROS free radical 형성 증가로 인한 세포와 조직의 손상을 유발한다^{26,27)}. 장 세포는 체내에 섭취된 철분을 흡수하여 ferritin에 부착시켜 저장하거나 transferrin과 결합하여 혈장으로 배출하며, 철분은 주로 간세포에 저장되므로, 간은 다른 장기보다 철분과다증에 민감하게 반응 할 수 있다⁹⁾. 간세포에서 일련의 화학반응인 펜톤 반응(Fenton reaction)을 통해 철은 ROS, superoxide (O_2^-), hydrogen peroxide (H_2O_2)로부터 hydroxyl radical(OH^\cdot)을 생성하는 과정을 촉매하고, 생성된 hydroxyl radical에 의해 지질과산화, 세포내 단백질 손상이 일어나 결국 세포 사멸(apoptosis)이 유도된다²⁸⁾. Arachidonic acid (AA) 또한 철의 촉매 하에 미토콘드리아 내의 superoxide 생성을 증가시키며 결과적으로 ROS 또한 증가시켜, 산화적 스트레스와 세포 손상을 더욱 촉진되게 한다²⁹⁾. 따라서 본 연구에서는 산화적 스트레스로 인한 apoptosis를 유도하는 약물로서 철과 AA의 병용처리 모델을 이용하였다.

먼저 AA와 철의 촉매 하에 유도된 산화적 스트레스에 대한 SRE의 세포 보호효과를 MTT assay를 통해 확인하였다. 그 결과 SRE는 HepG2 cell의 생존율을 통계적으로 유의하게 증가시켰고, 30-300 μ g/ml에서 높은 세포생존율을 나타내었다.

Apoptosis 관련 신호 전달물질인 caspase는 세포 내에서 불활성화 형태인 procaspase의 상태로 존재하다가 cytochrome-c가 ROS와 같은 자극을 받아 활성화 되면 분해되면서 활성화 된다³⁵⁾. Caspase-3는 여러 caspase family 중에서 caspase-8과 caspase-9의 신호를 증폭시켜 결과적으로 apoptosis를 유발한다³⁶⁾. 또한 apoptosis 방어인자 중 하나인 Bcl-xL은 미



토콘드리아 외막을 보전하는 인자 중 하나이다⁴⁰). 따라서, 본 연구에서는 procaspase-3 와 Bcl-2, Bcl-xL과 같은 apoptosis 관련 표지 단백질의 발현을 immunoblot analysis를 통해 관찰하였고, SRE 처치가 AA+iron으로 유도된 apoptosis 표지 단백질들의 발현 증가를 억제시킨다는 사실을 확인할 수 있었다.

정상상태에서 간세포는 여러 가지 항산화 과정을 통해 산화력을 가진 분자에 대하여 세포내의 ROS 수준을 안정적으로 유지할 수 있다. 그러나 불균형한 활성산소와 만성 산화적 스트레스의 증가는 지질과산화와 세포막의 파괴, DNA 손상 그리고 단백질 변형을 초래한다⁴¹). 또한 앞서 설명한 바와 같이 AA에 의해 생성된 ROS는 철과 반응하여 산화적 스트레스 및 세포 손상을 증폭시킨다. 본 연구에서 SRE는 DCFH-DA 염색으로 ROS 생산 범위를 측정할 결과 AA+iron 처치로 인해 증가한 H₂O₂ 생성에 대해 소거 효과를 보여 주었다.

미토콘드리아는 세포 내의 다양한 스트레스를 감지하여 세포 생존에 결정적인 역할을 한다. 미토콘드리아의 음이온 이동은 외막에 존재하는 voltage-dependent anion channel (VDAC)과 내막에 존재하는 inner membrane anion channel (IMAC)이라는 이온통로에 의해 발생한다. 박테리아의 porin과 유사한 구조를 가지는 VDAC은 전해질과 크기가 작은 비전해질 통과에 이용된다. Mitochondrial permeability transition (MPT)는 과도한 칼슘 유입으로 미토콘드리아 내막의 용질투과도가 급격히 증가하는 것을 말하며, 미토콘드리아에서 생성된 ROS는 막 단백질 thiol을 산화시켜 mPTP의 개방을 일으키고⁴²), 이로 인해 미토콘드리아의 산화적 스트레스 및 세포 독성을 유발한다^{43,44}). 본 연구에서 flow cytometry를 통해 MMP의 변화를 측정할 결과 RN1 fraction 분석을 통해 미토콘드리아 손상과 기능장애에 대한 SRE의 미토콘드리아 보호효과를 확인하였다. 즉, SRE는 미토콘드리아 막전위를 유지함으로써 세포 소기관을 보호하였다.

AMPK는 serine/threonine kinase의 일원으로 하나의 catalytic α subunit ($\alpha 1$ 또는 $\alpha 2$)과 두 개의 regulatory subunit β ($\beta 1$ 또는 $\beta 2$)와 γ ($\gamma 1$, $\gamma 2$ 또는 $\gamma 3$)로 heterotrimeric complex를 이루고 있다^{45,46}). 그 중, α subunit의 N-terminal 부분에는 catalytic

domain을 포함하고 있으며, 이 domain에 존재하는 threonine residue Thr 172의 인산화가 AMPK 활성화에 중요한 역할을 한다⁴⁷). AMPK activation은 AMP/ATP ratio에 의해 결정되는데, 이 ratio가 증가하면 AMPK는 활성화 되며, 활성화된 AMPK는 ATP 소비를 줄여 세포 내의 에너지량을 보존한다⁴⁸). AMPK upstream kinase 중 하나인 LKB1은 종양 억제인자로 알려져 있고, AMPK-dependent pathway를 통해 지속적인 활성을 나타내며 AMPK의 활성화를 촉진시킨다. 최근에는 간에서 LKB1 아세틸화가 LKB1의 세포 내 위치와 활성에 관여하는 것으로 나타났다⁴⁹). 활성화된 AMPK는 fatty acid synthase, pyruvate kinase 그리고 acetyl-CoA carboxylase C (ACC)와 같은 지질합성에 관계된 유전자 발현을 억제시킨다^{18,19}). 본 연구에서는 SRE의 AA+iron에 의해 유도된 산화적 스트레스에 대한 세포 보호능 작용 기전을 알아보기 위한 실험으로 immunoblot analysis를 수행하였다. SRE를 일정한 시간에 따라 처리한 결과 AMPK 활성화뿐만 아니라 AMPK에 의해 조절되는 ACC의 인산화가 증가하는 것을 확인하였다.

V. 결 론

위의 결과를 종합하여, 본 연구에서는 SRE가 AA+iron에 의해 유도된 산화적 스트레스 및 미토콘드리아 기능장애로부터 세포 보호 효과를 가지며, 이는 AMPK pathway 활성화를 통해 매개된다는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 이러한 SRE의 세포 보호 효과에 대한 분자 생물학적인 정확한 작용기전을 규명하기 위해서는 후속 연구가 필요할 것으로 여겨진다.

Acknowledgments

This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government [MSIP] (No.2012R1A5A2A42671316) and the NRF grant funded by the Korea government [MSIP] (No. 2014R1A2A2A01007375).

References

1. Murgia M, Giorgi C, Pinton P, Rizzuto R: Controlling metabolism and cell death: At the heart of mitochondrial calcium signalling. *Journal of molecular and cellular cardiology*. 2009;46(6):781-788.
2. Stowe DF, Camara AK: Mitochondrial reactive oxygen species production in excitable cells: Modulators of mitochondrial and cell function. *Antioxidants & redox signaling*. 2009;11(6):1373-1414.
3. Green DR, Kroemer G: The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*. 2004;305(5684):626-629.
4. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest*. 2004;114:147-52.
5. Cocco T, Di Paola M, Papa S, Lorusso M. Arachidonic acid interaction with the mitochondrial electron transport chain promotes reactive oxygen species generation. *Free radic Biol Med*. 1999;27:51-9.
6. Scorrano L, Penzo D, Petronilli V, Pagano F, Bernardi P. Arachidonic acid caused cell death through the mitochondrial permeability transition. Implications for tumor necrosis factor- α apoptotic signaling. *J Biol Chem*. 2001;276:12035-40.
7. Aisen P, Enns C, Wessling-Resnick M. Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism. *Int J Biochem Cell Biol*. 2001;33(10):940-959
8. Swanson CA. Iron intake and regulation: implications for iron deficiency and iron overload. *Alcohol*. 2003;30(2):99-102
9. McLaren CE, Gordeuk VR, Looker AC, Hasselblad V, Edwards CQ, Griffen LM, Kushner JP, Brittenham GM. Prevalence of heterozygotes for hemochromatosis in the white population of the United States. *Blood*. 1995;86:2021-7.
10. Muralikrishna Adibhatla R, Hatcher JF. Phospholipase A2, reactive oxygen species, and lipid peroxidation in cerebral ischemia. *Free Radic Biol Med*. 2006;40:376-87.
11. Claria, J. : Regulation of cell proliferation and apoptosis by bioactive lipid mediators. *Recent Pat. Anticancer Drug Discov*. 2006;1:369.
12. Nakanishi, M, and Rosenberg, D. W. : Roles of cPLA2 α and arachidonic acid in cancer. *Biochim. Biophys. Acta*. 2006;1761:1335.
13. Scorrano, L., Penzo, D., Petronilli, V., Pagano, F. and Bernardi, P. : Mitochondria are direct targets of the lipoxygenase inhibitor MK886. A strategy for cell killing by combined treatment with MK886 and cyclooxygenase inhibitors. *J. Biol. Chem*. 2001; 276:12035.
14. Shin SM, Kim SG. Inhibition of arachidonic acid and iron-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis by oltipraz and nove 1,2-dithiole-3thione congeners. *Mol Pharmacol* 2009;75:242-53.
15. Jang WD. Compound of *Sparganii Rhizoma*. *Journal of chinese medicine*. 1995;20(8):486-487.
16. Kim JG, Kang YM, Eum GS, Ko YM, Kim TY. Antioxidative activity and antimicrobial activity of extracts from medicinal plants. *Journal of agriculture & Life sciences*. 2003;37(4): 69-75.
17. Lee BC, Kim JH, Sim GS, Zhang YH, Pyo HB. The inhibitory effects of the *Sparganii Rhizoma* on melanogenesis. *J. Soc. Cosmet. Scientists*. 2005;31(4):305-310.
18. Wood A, Azzout-Marniche D, Foretz M, Stein SC, Lemarchand P, Ferre P, Foufelle F, Carling D: Characterization of the role of AMP-activated protein kinase in the regulation of glucose-activated gene expression using constitutively active and



- dominant negative forms of the kinase. *Mol Cell Biol.* 2000;20:6704–6711.
19. Foretz M, Carling D, Guichard C, Ferre P, Foufelle F: AMP-activated protein kinase inhibits the glucose-activated expression of fatty acid synthase gene in rat hepatocytes. *J Biol Chem* 1988;273:14767–1771
 20. Assifi MM, Suchankova G, Constant Sm Prenki M, Saha AK, Ruderman NB: AMP-activated protein kinase and coordination of hepatic fatty acid metabolism of starved/carbohydrate-refed rats. *Am j Physiol Endocrinol Metab.* 2005;289: E794–E800.
 21. Das S, Wong R, Rajapakes N, Murphy E, Steenbergen C. Glycogen synthase kinase 3 inhibition slows mitochondrial adenine nucleotide transport and regulates voltage-dependent anion channel phosphorylation. *Circ Res.* 2008;103:983–91.
 22. Grimes CA, jope RS. The multifaceted roles of glycogen synthase kinase 3 beta in cellular signaling. *Prog Neurobiol.* 2001;65:391–426.
 23. Kockeritz L, Doble B, Patel S, Woodgett JR. Glycogen synthase kinase-3—an overview of an over-achieving protein kinase. *Curr Drug Targets.* 2006;7:1377–88.
 24. Tong H, Imahashi K, Steenbergen C, Murphy E. Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 β during preconditioning through a phosphatidylinositol-3-kinase-dependent pathway is cardioprotective. *Circ Res.* 2002;90:377–9.
 25. Shin SM, Cho IJ, Kim SG. Resveratrol protects mitochondria against oxidative stress through AMPK-mediated GSK3 β inhibition downstream of poly(ADP-ribose)polymerase-LKB1 pathway. *Mol Pharmacol.* 2009;76:884–95.
 26. Henderson LM, Chappel JB. Article NADPH oxidase of neutrophils. *Biochim Biophys Acta.* 1996;1273: 87–107.
 27. Lee SM, Koh HJ, Park DC, Song BJ, Huh TL, Park JW. Cytosolic NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase status modulates oxidative damage to cells. *Free Radic Biol Med .* 2002;32: 1185–1196.
 28. Galaris, D., Pantopoulos, K. Oxidative stress and iron homeostasis: mechanistic and health aspects. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2008;45(1):1–23
 29. Choi SH, Kim YW, Kim SG. AMPK-mediated GSK-3 β inhibition by isoliquiritigenine contributes to protecting mitochondria against iron-catalyzed oxidative stress. *Biochem Pharmacol.* 2010;79(9):1352–62.
 30. Korea professors of Herbal medicine. *Herbal medicine.* Youngrimsa korea. 1991;418–9.
 31. Shin SY, Doh SH, Shin KH. Chemical constituents of the Rhizomes of *Sparganium stoloniferum*. *Yakhakhoeji.* 2000;44(4): 334–339.
 32. Huh SJ, Lee GS, Song BK. Study on the analgesic and anticoagulative effects of *Sparganii rhizoma* aqua acupuncture. *The society of korean medicine obstetrics and gynecology.* 2000;8:98.
 33. Shin SJ, Lee JH. Antitumor effects of SKT (Skullcap - Knope sedge - Trametes) mixture extract. *Korea journal of Pharmacogn.* 2004;35(4):325.
 34. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors : signaling and modulation. *Science.* 1998;281(5381): 1305–8.
 35. Cryns V, Yuan J. Proteases to die for. *Genes Dev.* 1998;12(11):1551–70.
 36. Tewari M, Quan LT, O'Rourke K, Desnoyers S, Zeng Z, Beidler DR, et al. Yama/ CPP32 beta, a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitable protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell.* 1995;81(5):801–809.
 37. Wang ZQ, Stingl L, Morrison C, Jantsch M, Los M, Schulze-Osthoff K, Wagner EF.

- PARP is important for genomic stability but dispensable in apoptosis. *Genes & Dev.* 1997;11(18):2347-2358.
38. Kang YK, EA Lee, HR Park. Neuroprotective effect according to reactive oxugen species scavenging activity from extracts of cudrania tricuspidata leaves. *Korean J Food cookery Sci.* 2012;28(6):821-8.
39. Shindo, Y., Witt, E., Han, D., Epstein, W., Packer, L. Enzymic and non-enzymic antioxidants in epidermis and dermis of human skin. *J Invest Dermatol.* 1944;102(1):112-128.
40. Yeom, J.B., Han, J. Mitochondrial Physiology. *Korean Society of Medical Biochemistry and Molecular Biology.* 2008;15(1):25-33.
41. Cocco, T., DiPaola, M., Papa, S., Lorusso, M. Arachidonic acid interaction with the mitochondrial electron transport chain promotes reactive oxygen species generation. *Free Radic Biol Med.* 1999;27(1-2):51-59.
42. Lan F, Cacicedo CJM, Ruderman N, Ido Y: SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMP-activated protein kinase activation. *J Biol Chem.* 2008;283:27628-27635.
43. Towler, M.C., Hardie, D.G. AMP-activated protein kinase in metabolic control and insulin signaling. *Circ Res.* 2007;100(3):328-341.
44. Carling, D. The AMP-activated protein kinase cascade—a unifying system for energy control. *Trends Biochem Sci.* 2004;29(1):18-24.
45. Hawley, S.A., Davison, M., Woods, A., Davies, S.P., Beri, R.K., Caring, D., Hardie, D.G. Haracterization of the AMP-activated protein kinase from rat liver and identification of threonine 172 as the major site at which it phosphorylates AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem.* 1996;271(44):27879-27887.
46. Shaw RJ, Kosmatka M, Bardeesy N, Hurley RL, Witters LA, DePinho RA, Cantley LC. The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-actkved kinase and regulates apoptosis in response to energy stress. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000;101:3329-35.
47. Lan F, Cacicedo JM, Ruderman N, Ido Y: SIRT1 modulation of the acetylation status, cytosolic localization, and activity of LKB1. Possible role in AMP-activted protein kinase activation. *J Biol Chem.* 2008;283:27628-27635.
48. Juhaszova M, Zorov DB, Kim SH, Pepe S, Fu Q, Fishbein KW, Ziman BD, Wang S, Ytrehus K, Antos CL, Olson EN, Sollott SJ. Glycogen synthase kinase-3beta mediates convergence of protection signaling to inhibit the mitochondrial permeability transition pore. *J Clin Invest.* 2004;113:1535-49.
49. Shin SM, Cho IJ, Kim SG. Resveratrol protects mitochondria against oxidative stress through AMPK-mediated GSK3β inhibition downstream of poly(ADP-ribose) polymerase-LKB1 pathway. *Mol Pharmacol.* 2009;76:884-95.