

Nrf2 活性化를 통한芍藥의肝保護效果

이수환[#], 정지윤, 박상미, 제갈경환, 변성희, 조일제, 김상찬, 김광중, 김영우^{*}

대구한의대학교 한의과대학

Hepatoprotective effect of Paeoniae radix via Nrf2 activation

Soo Hwan Lee[#], Ji Yun Jung, Sang Mi Park, Kyung Hwan Jegal, Sung Hui Byun,
Il Je Cho, Sang Chan Kim, Kwang Joong Kim, Young Woo Kim^{*}

College of Oriental Medicine, Daegu Haany University

ABSTRACT

Objectives : Liver is one of the largest organs in the human, and has a function of detoxification and energy sensing to prevent severe disease. Paeoniae radix has been used to treat a variety of liver diseases such as hepatitis and chronic hepatic failure. Although P. radix has been used as an medicinal herb for a long time, the effects of P. radix on severe oxidative stress and its action mechanism on the liver was not clearly verified.

Methods : This study investigated the protective effects of P. radix extract (PRE), and the underlying mechanism of its action in the liver. *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP) and carbon tetrachloride (CCl₄) were used to induce oxidative stress in the HepG2 hepatocyte cell line and Sprague-Dawley rats, respectively.

Results : *t*-BHP significantly induced cell death and ROS production in HepG2 cell, as indicated by MTT and FACS analysis. However, pretreatment of PRE inhibited a decrease in cell viability and H₂O₂ production in the HepG2 cells. PRE also blocked the ability of *t*-BHP to damage in mitochondrial membrane transition. More importantly, PRE induced Nrf2 activation and antioxidant Phase II enzyme, which may have a role in the effects of PRE. In mice, PRE inhibited the liver damage induced by CCl₄.

Conclusions : PRE inhibited oxidative stress and hepatic damages as mediated with Nrf2 activation. This study unveil, in part, the effect and mechanism of old medicinal herb, P. radix.

Key words : Paeoniae radix, Oxidative stress, Nrf2 activation, Liver

서론

간은 복부에서 가장 큰 기관으로 담즙의 생산 및 분비 (1L/day), 소장 에 의해 흡수된 영양소의 처리와 저장, 신체내로 들어온 이물질의 해독작용과 배설, 알부민, 피브리노겐 등의 혈장단백질 합성작용을 한다¹⁾. 간장손상의 원인은 바이러스 감염, 알콜성 또는 비알콜성 지방간염외에²⁾, 흡연, 독물 또는 약제에 의한 중독, 영양장애 등이 있으며, 이러한 손상들은 대부분 산화적 스트레스와 밀접한 연관을 가지며, 이러한 간손상은 간섬유화 (liver fibrosis), 경화 (cirrhosis), 종

양 (hepatocellular carcinoma) 등을 유도하기도 한다. 그러므로, oxidative stress가 간장질환의 유도와 발전에 있어서 핵심적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다^{3,4)}.

항산화 유전자 발현의 대표적인 전사인자는 nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (Nrf2)이다⁵⁾. Nrf2는 여러 조직에 분포하고, kelch-like ECH-associated protein-1 (Keap1)과 결합하여 세포질에 불활성형으로 존재한다. Keap1이 산화적 스트레스 자극을 인식한 후에 Nrf2는 Keap1로부터 분리되어 핵 내로 이동하여 antioxidant response element (ARE)에 결합하여, 체내의 항산화유전자 발현을 조절한다⁶⁾.

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

· Tel : +82-53-819-1867 · E-mail : ywkim@dhu.ac.kr

#First author : Soo Hwan Lee, College of Oriental Medicine, Daegu Haany University, 1, Hanuidae-ro, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, 38610, South Korea Korea.

· Tel : +82-53-819-1861 · E-mail : kwangj@dhu.ac.kr

· Received : 31 December 2015 · Revised : 19 January 2016 · Accepted : 19 January 2016

이러한 항산화 유전자로는 glutamate-cysteine ligase (GCL), heme oxygenase-1 (HO-1), thioredoxin reductase, NAD (P)H:quinone oxidoreductase-1 (NQO-1) 및 glutathione S-transferase (GST) 등이 있다.

芍藥은 미나리아재비과(Ranunculaceae)에 속한 多年生草本인 함박꽃과 山芍藥의 根으로서, 우리나라 전국 고산지대의 陰地에서 자생한다.芍藥은 苦酸涼無毒하고 肝脾에 주로 작용한다. 養血斂陰, 平肝抑陽, 柔肝止痛 등의 효능이 있어, 肝血虧虛, 月經不調, 胎產諸證, 體虛多汗, 肝陰虛動風, 肝陽上亢, 肝急諸痛 등의 병증을 치료한다⁷⁾.芍藥은 monoterpene으로서 paeoniflorin, oxypaeoniflorin, benzoylpaeoniflorin, albiflorin, paeoniflorigenone, paeonilatone 등과, 기타 paeonol과 그 배당체인 paeonoside, 그리고 tannin, sucrose 등을 함유하고 있다⁸⁻¹¹⁾.芍藥 및 芍藥의 구성성분의 약리작용으로는, 中樞神經抑制, 抗痙攣, 記憶力改善, 心搏抑制, 血管擴張, 胃腸運動促進, 鎮痙, 鎮痛, 抗潰瘍, 抗炎症, 抗알레르기, 호르몬調節, 免疫活性, 抗菌作用등이 있는 것으로 보고되었다^{9,12-15)}.

芍藥에 대한 최근의 연구동향은,芍藥은 H₂O₂에 의한 신경 세포사멸을 억제하고, 고콜레스테롤 식이 랫트의 항산화계를 활성화시키며, Heme oxygenase와 Heat shock protein 72를 통한 간독성완화효과를 가지는 것으로 나타났다¹⁶⁻¹⁸⁾. 또한, high cholesterol diet 랫트에서 total cholesterol, triglyceride를 억제하고, 1-methyl-4-phenylpyridium로 유도된 신경세포독성에 대한 보호효과를 나타내며, 뇌내출혈로 유발되는 신경세포의 사멸을 억제하였다¹⁹⁻²¹⁾. 또한芍藥은 adenosine 5'-diphosphate, arachidonic acid, collagen으로 유도된 혈소판응집을 억제하였고, 허혈성 급성신부전에서 혈중 크레아티닌치 및 조직손상을 개선하였으며, *Streptococcus mutans*에 대하여 항균작용 및 Glucosyltransferase 억제효과를 나타내었다²²⁻²⁴⁾. 그리고,芍藥 물추출물은 *Corynebacterium xerosis*, *Candida albicans*, *Listeria monocytogenes*과 *Pseudomonas syringae* 등의 식품변패미생물에 대하여 세포막기능을 손상시켜 항균효과를 나타내었다²⁵⁾.

그럼에도 불구하고, 아직까지 산화적 스트레스에 의해 유도된 간세포 모델에서芍藥의 항산화효과 및 간세포 보호 작용, 그리고 그 작용 기전에 대해서는 규명된 바가 없다. 따라서 본 연구에서는芍藥의 항산화 효과에 중점을 두어서, 1) 사람의 간세포주 (HepG2 cell)에 ROS를 다량 생성하는 *tert*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP)를 처리한 모델과 2) 산화적 간조직 손상을 유발하는 사염화탄소(CCl₄) 동물모델에서芍藥 추출물(*Paeoniae radix* distilled water extract, PRE)의 세포보호 효과 및 이에 대한 작용기전을 규명하기 위한 실험을 실시하였다.

재료 및 방법

1.芍藥추출물 (*Paeoniae radix* Extract; PRE)

의 제조

芍藥은 대원약업사 (Daegu, Korea)에서 구입하였으며,芍藥 300 g을 2 L의 물로 3시간 전탕하고, 거즈로 1차 여과한 후, 0.2 μm 필터 (Nalgene, New York, NY, USA)로 여과

하였다. 여과한 여액을 농축하고, 동결건조하여 19.09 g의 추출물을 얻었다. 동결건조시료는 실험기간 동안 -20 °C에 보관하였다.芍藥추출물의 수율은 6.3 %였다.

2. 세포배양

본 연구에 사용된 HepG2 cell (human hepatocyte-derived cell line)은 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)로부터 구입하였으며, 세포배양은 10 % fetal bovine serum (FBS)과 50 U/ml penicillin, 50 mg/ml streptomycin을 함유하는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)를 사용하여 37 °C, 5 %의 CO₂환경에서 배양하였다. 모든 세포실험에서는 세포성장의 confluency가 80-90 %가 유지되는 경우에 실험하였고, 20회 이하의 계대배양세포만 사용하였다. HepG2 cell에서芍藥추출물의 세포보호효과를 평가하기 위하여, FBS가 제거된 배지에서 24시간 배양한 후에,芍藥추출물을 처리하고 1시간 후, *t*-BHP를 12시간 처리하였다.芍藥추출물은 DMEM에 녹여 사용하였다.

3. 시약

Anti-Nrf2 항체와 horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-goat는 Santa Cruz Biotechnology社 (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였고, Anti-NQO1, anti-Lamin A/C와 horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse, anti-rabbit IgGs는 Cell Signaling社 (Beverly, MA, USA)로부터 구입하였으며, Anti-GCLC는 Abcam社 (Cambridge, MA, USA)에서 구입하였다. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)과 fetal bovine serum (FBS)는 BioWhittaker社 (Walkersville, MD, USA)와 Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA)로부터 구입하였고, Penicillin 및 streptomycin은 Gibco/BRL (Eggenstein, Germany)로부터 구입하였다. 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)와 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoleum (MTT) 및 기타 시약들은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

4. 세포생존율 측정

24-well plate에 well당 세포를 1×10⁵개로 분주하여 배양한 후, 세포의 confluency가 80-90 % 되었을 때, serum을 제거한 배지로 24시간 배양하였다. 이후芍藥추출물을 처리하고 1시간 후, *t*-BHP를 12시간 처리하여 세포생존율을 측정하였다. 각 well에 MTT (0.5 μg/ml, 4 h)를 처리한 후, 4시간 배양하고, 배지를 조심스럽게 제거한 후, 생성된 formazan crystal을 DMSO (dimethyl sulfoxide)를 가하여 녹인 후, 570 nm에서 (Titertek Multiskan Automatic ELISA multimode reader [Model Infinite 200 PRO], Männedorf, Switzerland) 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 control cell에 대한 백분율로 나타내었다.

[i.e. viability (% control) = 100 × (absorbance of treated sample) / (absorbance of control)].

5. H₂O₂ production 생성량 측정

2'7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)는 cell-permeable non-fluorescent probe로서 intracellular esterases 및 H₂O₂에 의하여 2'7'-dichlorofluorescein (DCF)로 바뀌며, 이를 측정하여 H₂O₂의 양을 상대적으로 평가한다. 본 연구에서는 芍藥추출물과 *t*-BHP처리 후, 10 μM DCFH-DA로 37 °C에서 1시간 염색한 후, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 방법으로 측정하였다. DCF의 형광강도는 excitation (485 nm)와 emission (530 nm)로 Titertek Multiskan Automatic ELISA multimode reader을 사용하여 측정하였고, 대조군을 기준으로 하여 상대적인 값을 평가하였다.

6. Mitochondrial membrane potential의 측정

Mitochondrial membrane potential (MMP)은 membrane-permeable cationic fluorescent 염색약인 Rh123을 이용하여, fluorescence-activated cell sorter (FACS)로 측정하였다. HepG2 cell을 芍藥추출물과 *t*-BHP로 처리한 후 Rh123 0.05 μg/ml로 1시간 염색한 후, trypsin을 처리하여 tube에 모은 후, 1% FBS를 함유하는 PBS로 세척하였고, 이들 세포들을 FACS로 분석하였다. 이때 Rh123의 low density를 나타내는 군을 RN1 fraction으로 명명하여, 이를 비교하였다.

7. Nuclear fraction의 준비

핵분획은 이전에 보고된 Kay등의 방법²⁶⁾에 따라 준비하였다. 처리된 1 × 10⁷의 HepG2 cell을 ice-cold PBS로 2차례 세척한 후, PBS 1 ml을 가하여, 세포들을 microtubes에 수거하였다. 수거된 세포들을 원심분리한 후, 상등액인 PBS는 버리고, 침전된 세포에 hypotonic buffer 100 μl을 가하고, 얼음 위에서 10분간 세포를 팽윤 및 용해시켰다. 이를 원심분리 후, crude nuclei를 포함하는 pellet에 extraction buffer를 50 μl을 가하여, ice에서 1시간 동안 방치하였다. 이를 다시 원심분리하여, nuclear fraction을 포함하고 있는 상등액을 취하였으며, 사용시까지 -70 °C에 보관하였다.

8. Reporter gene assay

리포터 유전자 분석은 dual-luciferase reporter assay system (Promega, Madison, WI)을 사용하였다. 간세포주를 (7 × 10⁵ cells/well) 6-well에 배양하고 12시간 serum을 고갈하고 난 후 ARE luciferase construct를 주입한 세포를 Lipofectamine과 함께 3시간 동안 형질도입시켰다. 약물을 처리한 후, 세포를 용해시키고 루미노스캔 (Luminoscan)을 사용하여 활성도를 측정하였다. 대조군을 기준으로 활성도 값을 비교하여 상대적인 값을 사용하였다.

9. Immunoblot Analysis

단백질의 발현을 관찰하기 위하여, HepG2세포를 lysis buffer를 사용하여 lysate를 획득한 후, 15,000 × g에서 30분간 원심분리하여 찌꺼기를 제거하였다. 정량화된 lysate을

동일하게 SDS-PAGE로 분리시킨 후, amido black 염색으로 최종 보정하였다. 보정 후 loading한 후, 단백질을 nitrocellulose membrane으로 transfer하였다. 이 membrane에 각각의 항체를 결합시키고, 비특이적 결합을 제거하기 위하여 1시간 blocking한 후, ECL[®] chemiluminescence detection kit (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)로 각 protein band를 발색하였다. 발색 후 각 단백질의 발현량을 평가하기 위하여 Image analyzing system (Ultra-Violet Products Lts., CA, USA)으로 density를 측정 및 비교하였다.

10. 실험동물의 사육

실험동물은 6주령의 Sprague-Dawley계 흰쥐 (140-160 g) 수컷 32마리를 Samtaco Bio Korea (오산, 한국)로부터 공급받아 1주일 동안 실험실환경에 적응시킨 후 실험에 사용하였으며, 사육실 환경은 온도 20-23 °C, 습도 50%, 12시간 간격으로 light/dark cycle을 유지하고, 사료 (Nestle Purina Petcare Korea, Seoul, Korea)와 음용수는 자유롭게 섭취하도록 하였다.

11. 실험동물의 처치

실험은 아무런 처치를 하지 않은 군을 Control군으로 하고 간독성을 유발하기 위하여 CCl₄ 0.5 ml/kg을 처치하여 간독성을 유발하였다. CCl₄ 처치전 3일동안 PRE를 30, 100 mg/kg로 투여하고 CCl₄를 처치한 군을 각각 PRE 30, PRE 100군으로 하였다. CCl₄ 처리 24시간 후, 혈액 샘플을 모아서 assay를 실시하였다.

12. 혈액생화학적 검사

실험동물은 ethyl ether로 마취한 후, 복대정맥으로부터 혈액을 채취하였다. 3,000 × g, 4 °C에서 10분간 원심분리하여 상등액의 혈청을 얻었다. 혈청중 alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST)는 Automated blood chemistry analyzer (Photometer 5010, Robert Riele GmbH & Co KG, Berlin, Germany)를 사용하여 분석하였다.

13. 통계적 검증

실험 결과는 mean ± S.D.로 나타내었으며, 처치군간의 유의성은 one way analysis of variance (ANOVA)로 검정한 후 Tukey test로 검정하였다. 통계적 유의성 검정은 $p < 0.05$ 또는 $p < 0.01$ 로 하였다.

결 과

1. PRE의 *t*-BHP로 유도된 cell death 저해 효과

PRE의 *t*-BHP로 유도한 세포 자멸사(apoptosis)에 대한 보호 효능을 알아보기 위해 MTT assay를 진행하였다.

HepG2 cell에 *t*-BHP 100 μ M을 12시간 처리하였을 경우, 산화적 스트레스와 apoptosis를 유발하는 것을 예비 연구를 통하여 확인하였다 (data not shown). 그래서 본 실험에서도 100 μ M의 *t*-BHP를 12시간 처리하여 세포독성을 유발하였다. PRE 단독으로 농도별로 처리한 결과 0.3 mg/ml 농도 이하에서 세포 독성을 나타내지 않았다 (data not shown). 그러므로 본 실험에서는 PRE 0.01, 0.03, 0.10 mg/ml의 농도로 MTT 실험을 진행하였다. 그 결과, *t*-BHP에 의해 감소한 세포 생존율은 PRE 농도 의존적으로 증가하는 경향을 나타내었으며, 0.10 mg/ml의 농도에서 가장 효과적인 세포 보호능을 나타내었다(Fig. 1). 그래서 다음 실험들은 PRE 0.10 mg/ml의 농도를 사용하였다.

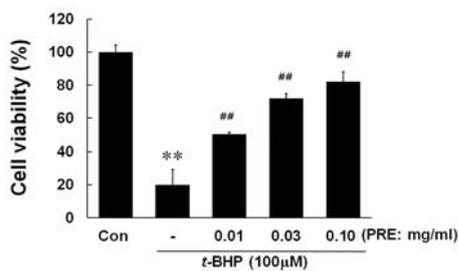


Fig. 1. The effect of PRE on *t*-BHP-induced cell death. HepG2 cells were incubated in 0.01, 0.03, 0.10 mg/ml of PRE for 1h prior to the addition of *t*-BHP (100 μ M), and the cells were further incubated for 12 h. The effect of PRE on cell viability was assessed using MTT assays. Data represent the mean \pm S.D. of four replicates (significant as compared with vehicle-treated control, ** p <0.01; significant as compared with *t*-BHP alone, ## p <0.01).

2. PRE의 항산화 효과

t-BHP는 산화적 스트레스를 유발하여 apoptosis를 일으킨다고 잘 알려져 있다. 그러므로 다음으로는 PRE의 항산화 작용에 대한 실험을 진행하였다. HepG2 cell에 100 μ M의 *t*-BHP를 12시간 처리하였을 경우, 세포내 H_2O_2 양이 유의적으로 증가하는 것을 관찰하였다(Fig. 2). 그러나, PRE 0.1 mg/ml을 전처리 하였을 경우, 증가된 H_2O_2 양이 유의적으로 감소하였다. 이러한 결과는 PRE가 *t*-BHP에 의해 유도된 ROS의 생성을 억제하여 HepG2 간세포의 자멸사를 억제한다는 것을 증명해 주고 있다.

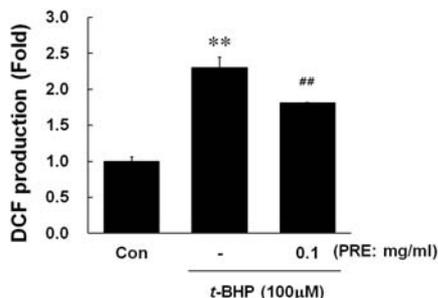


Fig. 2. The effect of PRE on ROS generation.

Cellular H_2O_2 production was monitored by ELISA analysis. HepG2 cells was treated with 0.10 mg/ml of PRE and/or *t*-BHP for 12h, and followed by incubation with DCFH-DA (10 μ M) for 30 min. Data represent the mean \pm S.D. of three replicates (significant as compared with vehicle-treated control, ** p <0.01; significant as compared with *t*-BHP alone, ## p <0.01).

3. PRE의 mitochondrial dysfunction 저해 효과

미토콘드리아는 세포내에서 세포호흡을 담당하는 소기관으로 잘 알려져 있다. 이러한 호흡의 과정에 미토콘드리아의 다양한 complex가 관여하고, complex의 기능저하가 세포내 ROS의 생성을 유발한다. 따라서, 세포내 ROS 생성의 중심장기로서 미토콘드리아를 인식하고 있다. 그러므로, 세포자멸사를 억제하고 ROS 생성을 제어하고 있는 PRE가 미토콘드리아의 손상에 대한 효과를 살펴보고자 하였다.

본 실험에서는 미토콘드리아 손상을 알아보기 위하여, mitochondrial membrane potential (MMP)를 이용하였고, MMP를 측정하기 위하여 막 삼투 양이온 형광 dye인 Rh123으로 staining한 cell을 FACS를 이용하여 측정하였다. *t*-BHP를 처리하였을 때, Rh123의 staining 정도가 떨어지는데 (MMP가 감소), 이것은 미토콘드리아의 손상과 기능장애가 증가했다는 것을 보여준다(Fig. 3A). 여기에서 보여지는 RN1 fraction의 세포 숫자가 손상받은 미토콘드리아와 기능장애를 가진 미토콘드리아를 나타내는데, *t*-BHP의 처리는 RN1 fraction 숫자의 증가를 유도하였고, PRE는 이를 억제하였다. 이러한 결과는 PRE의 세포와 미토콘드리아의 보호효과를 증명하는 것이다(Fig. 3B).

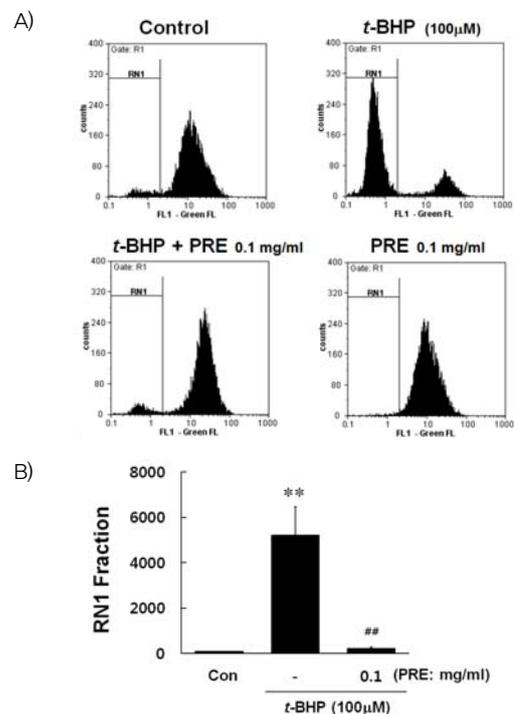


Fig. 3. The effect of PRE on mitochondrial dysfunction.

(A) Mitochondrial membrane potential (MMP), HepG2 cells were treated as described in methods section and stained with rhodamine 123 for 30 min. (B) Fold increase of relative RN1 fraction (population of cells poorly staining with rhodamine 123). Data represent the mean \pm S.D. of three replicates (significant as compared with vehicle-treated control, ** p <0.01; significant as compared with *t*-BHP alone, ## p <0.01).

4. PRE에 의한 Nrf2 활성화

세포 및 조직은 다양한 항산화 효소를 유도하여 산화적 스트레스로부터 세포를 보호한다. 간 조직에서는 이러한 세포

보호를 Phase II enzyme(2상 대사효소)이 주로 담당하고 있고, 항산화 2상대사효소의 전사적 발현을 Nrf2 전사인자가 담당하고 있다. Nrf2는 평소에 세포질에 존재하면서 Keap1과의 연결을 통해 분해되고 있지만, 산화적 자극이나 항산화 약물이 세포내로 들어오면, Nrf2는 인산화되어 Keap1과의 연결이 해제되고 핵내로 이동한다. 핵으로 이동한 Nrf2는 항산화 2상대사효소의 전사에 관여하는 antioxidant response element (ARE)에 결합하여 phase II enzyme의 전사적 발현을 유도한다. 그러므로, 본 실험에서는 먼저, Nrf2의 핵내 발현을 살펴보았다.

PRE 0.1 mg/ml을 HepG2 cell에 처리한 결과, Nrf2의 핵내 발현이 1-3시간 이후로 시간의존적으로 증가하는 것을 western blot을 통해 관찰하였다(Fig. 4A). 또한, PRE 0.1 mg/ml을 HepG2 세포에 1시간 처리한 결과, Nrf2의 인산화도 증가시켰다(Fig. 4B). 다음으로 ARE-luciferase reporter gene assay를 통하여 PRE의 ARE reporter gene활성화에 미치는 효과를 살펴보았다. PRE를 12시간 동안 HepG2 세포에 처리한 결과, ARE의 활성이 유의적으로 증가하는 것을 관찰하였다(Fig. 4C). 이와같은 결과는 PRE가 항산화 전사인자인 Nrf2를 활성화시킨다는 것을 증명해 주고 있다.

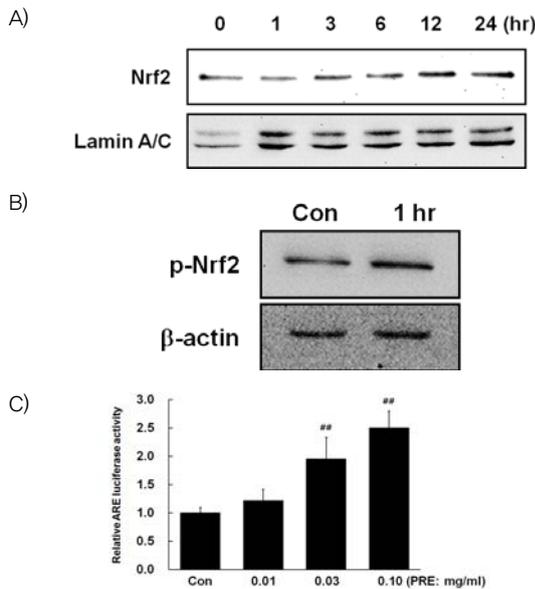


Fig. 4. Nrf2 activation by PRE (A) Nuclear Nrf2 levels, Nrf2 was immunoblotted in the nuclear fractions of HepG2 cells that had been treated with 0.10 mg/ml of PRE for 1, 3, 6, 12, 24 h. Immunoblottings for lamin A/C verified equal loading and purity of the nuclear proteins. (B) Phosphorylation of Nrf2, HepG2 cells has been treated with 0.1 mg/ml of PRE for 1 h. (C) ARE luciferase activity, HepG2 cells was treated with 0.1 mg/ml of PRE for 12 h after transient transfection of ARE reporter vector. The statistical significance of differences between each treatment group and the control [#]*p* < 0.01 was determined.

5. PRE에 의한 Nrf2 target 항산화 phase II 효소 발현 조절

Glutamate cysteine ligase catalytic subunit (GCLC)는 인체에서 항산화 인자로 잘 알려져 있는 글루타티온(glutathione) 대사 경로에 중요한 인자이다. NAD(P)H:quinone oxidoreductase

1 (NQO1)은 체내 여러기관에 고르게 분포하면서, 다양한 퀴논(quinone)에 의해 NAD(P)H를 NAD(P)+로 변환시키는 산화과정을 통하여 활성산소를 제거하는 항산화인자이다. 이러한 GCLC, NQO1은 모두 Nrf2의 전사적 조절을 받는 ARE를 함유한 target gene이다. 그러므로 다음으로 PRE가 2상 대사효소의 발현에 미치는 효과를 살펴보았다. HepG2세포에 PRE 0.1 mg/ml을 처리하였을 경우, GCLC, NQO1의 단백질 발현이 유의적으로 증가하는 것을 관찰하였다(Fig. 5). 이러한 결과는 PRE의 항산화 효과가 Nrf2의존적인 항산화 효소의 발현을 통하여 나타난다는 것을 보여주고 있다.

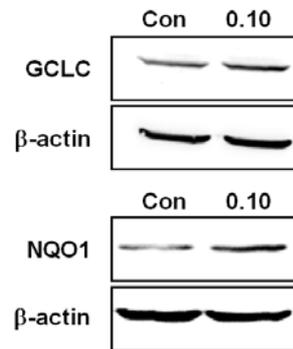


Fig. 5. GCLC and NQO1 activation by PRE Immunoblottings for GCLC and NQO1. The proteins of interest were immunoblotted in the lysates of HepG2 cells that had been treated with 0.1 mg/ml of PRE for 12 h. Immunoblottings for β -actin verified equal loading and purity of the total lysates.

6. PRE의 사염화탄소(CCl₄)에 의한 간손상 저해효과

다음 연구로서 PRE의 항산화 효능을 동물모델에서 탐구하고자 하였다. 사염화탄소(CCl₄)는 간조직의 산화적 스트레스를 유발하여, 간세포 손상, 간조직 괴사를 동반하는 염증성 간질환을 유도한다²⁷⁾. 그러므로, 본 연구에서도 mouse를 정상군, CCl₄ 투여군, CCl₄ + PRE 30mg/kg 투여군, CCl₄ + PRE 100 mg/kg투여군으로 나누어서 실험을 진행하였다. 예상된바와 같이, CCl₄는 간손상 혈액 지표인 ALT, AST의 수치를 유의적으로 증가시켰다(Fig. 6). 그러나, PRE를 3일 동안 경구투여한 군에서는 이러한 간손상이 예방되는 것이 관찰되었다. 이러한 결과는 PRE의 항산화 효과 및 간보호효과가 실험동물 수준에서도 적용가능한 것임을 보여주고 있다.

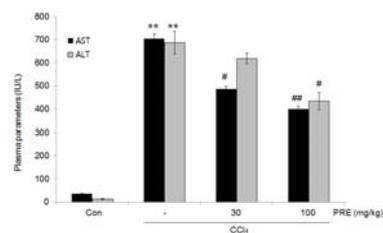


Fig. 6. Effects of PRE on CCl₄-induced liver toxicity Mice were treated were orally pretreated with 30 and 100 mg/kg PRE for 3 days followed by a single injection of CCl₄ (0.5 ml/kg, ip). The alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities were monitored in the plasma of mice. Values represent mean \pm S.D. (significantly different from vehicle-treated control, ^{*}*p* < 0.01; significantly different from CCl₄, [#]*p* < 0.01).

고찰

ROS는 chemical oxidant로의 역할뿐만 아니라, 유전자의 발현, 세포증식 조절 등의 subcellular messenger로서 작용을 한다. 그러나, 과도한 ROS의 생성은 산화적 스트레스를 일으켜 세포기능을 손상하거나, 세포의 손상 (apoptosis and necrosis)을 초래한다²⁷⁾. 임상적으로도 산화적 스트레스는 염증, 노화, 종양 등과 같은 질환에서 많은 부분에서 연관성이 있는 것으로 알려져 있다²⁸⁾. 인체의 세포는 병리학적으로 계속해서 ROS에 노출되어 있고, 산화적 스트레스를 받고 있는 것이다. 이러한 산화적 스트레스는 ROS가 과도하게 발생되거나 산화제 (pro-oxidant)와 항산화제 (anti-oxidant)간의 균형 관계가 깨어질 때 나타난다^{1,2)}. 생체에서는 대사과정의 부산물로서 ROS가 자연적, 지속적으로 발생하며, 불안정하고 반응성이 매우 강하기 때문에, 포유류 세포에서는 과도한 ROS의 제거와 독성을 완화하기 위한 기전이 구축되어 있다. 이러한 메커니즘은 주로 catalase, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX), glutathione-S-transferase (GST)와 같은 항산화 효소와 Vit A, -C, -E 및 glutathione (GSH)와 같은 비효소적 항산화물질에 의해 이루어지며, 생체 내에서 산화적 스트레스를 조절하여 건강을 유지시키는 역할을 한다^{29,30)}. 최근, ROS의 유해작용의 교정을 위한 항산화제의 복용이 증가되고 있고, 이러한 시대적인 흐름에 맞추어 질병을 예방하고, 치료하기 위한 천연 항산화제 개발에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

芍藥은 여러해살이풀로서, 낮은 지대에 주로 서식하는데, 한국, 중국, 일본, 몽골 등에서 생산되며, 한국에서는 의성에서 많이 재배된다.芍藥은 肝脾에 작용하여, 養血, 斂陰, 平肝, 止痛 등의 효능이 있다.芍藥 MeOH 추출물의 ethyl acetate분획은 항산화 및 tyrosine저해활성, melanin생성 억제활성이 있었고,芍藥 methanol 추출물의 ethyl acetate분획은 *Staphylococcus aureus*와 *S. epidermidis* 등의 일반적인 환경이나 인체에 상재하는 병원성 세균에 대해 항균 활성을 나타내었다^{31,32)}. 또한,芍藥으로부터 분리된 6-O-β-D-glucopyranosylbiflorin은 C57BL/6 mouse로부터 얻은 osteoblast-like cell인 MC3T3-E1의 alkaline phosphatase의 activity를 증가시켰다³³⁾. 본 실험에서는芍藥의 추출물 (PRE)의 산화 스트레스에 대한 간보호효과를 관찰하기 위하여, 1) *t*-BHP를 사용하여 산화적 스트레스를 유발한 인체 유래 간세포 HepG2 세포모델과 2) CCl₄로 유도한 간손상 동물모델을 활용하였다.

t-BHP는 잘 알려진 pro-oxidant로서, 세포내에서 ROS를 다량 생성함으로써 산화적 스트레스를 유발하고 세포손상을 유도하기 때문에, 산화적 스트레스로 인한 세포손상의 연구에 빈용되고 있다^{34,35)}.*t*-BHP는 간세포에 처리할 경우 간세포에서 cytochrome P-450에 의해 산화적 스트레스를 유도할 수 있는 alkoxy free radical이나 peroxy free radical로 대사되며, 이러한 free radical은 분자상 산소가 활성산소로 변하여 다른 분자들과 반응하면서 생성되어 lipid peroxidation, 단백질 불활성화, DNA damage 등에 관여한다³⁶⁾. 또한, 불포화지방산이 풍부한 세포막은 free radical에 의하여 지질과산화가 되어, 세포소기관들의 구조 및 기능을 상실하게 한다. 국소적 손상외에도 알데하이드와 같은 지질과

산화 분해산물이 생성부위로부터 멀리 떨어진 부위로 이동하여 세포손상을 일으키기도 한다¹⁾. 또한 *t*-BHP는 간세포에서 GOT, LDH의 유리, malonaldehyde (MDA) 형성을 초래한다고 보고되었다. 본 실험에서도 *t*-BHP는 HepG2 간세포에서 세포 자멸사를 유발하고, 세포내 H₂O₂의 생성을 유발하였으며, 미토콘드리아의 손상을 일으키는 것으로 나타났는데, 이러한 결과는 앞서 언급한 이전연구결과들과 일치하는 것이다.

CCl₄는 잘 알려진 간세포를 손상시키는 물질인데, 그 작용기전으로서 산화적 스트레스가 많이 보고되고 있다²⁷⁾. CCl₄에 의해 유도된 산화적 스트레스는 간조직에서 염증과 손상의 반복된 자극을 유발하여, 장기간 투여하였을 경우 경화성 간질환으로 진행된다는 보고도 있다⁶⁾. 이러한 CCl₄에 의한 산화적 간손상 모델은 항산화 물질의 효능을 스크리닝하기위한 좋은 모델로서 인정되고 있으며, 실제로 다양한 물질들이 CCl₄ 동물 모델을 활용하여 연구되고 있다²⁷⁾. 그러므로 본 연구에서도芍藥의 항산화 효능을 동물수준에서 증명하기 위하여 CCl₄를 single injection하는 acute liver toxicity모델을 활용하였으며, 이전의 연구결과와 마찬가지로 간손상 혈액지표인 ALT, AST의 유의적인 증가를 관찰할 수 있었고, PRE는 이러한 간손상을 예방하였다.

미토콘드리아는 세포의 생존을 결정하는 주요 소기관으로서, 세포 주기, 신호 전달, 세포 성장 조절 등에 관여하고, 전자전달계에서 생성된 ROS를 스트레스로 감지하는 역할을 한다³⁷⁾. ROS와 같은 산화적 스트레스는 미토콘드리아의 막전위를 파괴하고, 미토콘드리아 막의 투과성(Mitochondrial membrane permeability)을 증가시킴으로서 막공 (membrane pore)을 통하여 다양한 단백질 (예, cytochrome C와 같은 pro-apoptotic mediator들)을 세포질로 분비한다. 이러한 결과로 인하여, 여러 apoptosis 관련 주요 단백질들 (caspase 등)이 활성화되면 세포자멸사가 일어난다³⁸⁾. 미토콘드리아 막의 손상은 과도한 칼슘의 유입을 일으키고, 미토콘드리아 내막의 용질투과도가 급격히 증가하게 되어 mitochondrial permeability transition (MPT)라는 현상을 유발한다. MPT를 구성하는 단백질로는 cyclophilin D, adenine nucleotide translocator 등이 있다. Mitochondrial permeability transition pore (mPTP)의 개방은 미토콘드리아 ROS에 의한 막 단백질의 산화와 관련되며, 미토콘드리아의 산화적 스트레스 및 세포 독성을 유발한다³⁹⁾. 본 실험에서는 *t*-BHP를 처리한 HepG2 세포에서 FACS 분석법을 통해 MMP의 변화를 측정하였고, RN1 fraction (미토콘드리아 손상과 기능장애를 나타내는 세포의 숫자)의 증가를 통하여 PRE의 미토콘드리아 보호효과를 확인하였다.

Nrf2는 항산화 2상대사효소의 전사적 발현을 담당하고 있는 주요 전사인자이다⁵⁾. 세포 및 조직은 다양한 항산화 효소를 유도하여 산화적 스트레스로부터 보호하는데, 이러한 세포 보호를 Phase II enzyme(2상 대사효소)이 주로 담당하고 있다⁶⁾. Nrf2는 평소에 세포질에 존재하면서 Keap1과의 연결을 통해 분해되고 있지만, 산화적 자극이나 항산화 약물이 세포 내로 들어오면, Nrf2는 인산화되어 Keap1과의 연결이 해제되고 핵내로 이동한다. 핵내로 이동한 Nrf2는 항산화 2상대사효소에 존재하는 antioxidant response element (ARE)에 결합하여 phase II enzyme의 전사적 발현을 유도한다⁶⁾. 본 연구에서 PRE 처리에 의한 핵내 Nrf2 단백질 발현의 증가

및 인산화 증가를 통하여 Nrf2의 활성화를 관찰하였고, ARE reporter gene assay를 통하여, Nrf2 전사적 활성을 검증하였다. 또한 Nrf2의 target gene인 GCLC, NQO1의 발현증가를 통하여 Nrf2의 활성화가 실제로 세포보호에 기여하는 것을 확인할 수 있었다. 그러므로, PRE의 항산화 효과는 Nrf2 의존적인 항산화 효소의 발현과 관련지어 설명할 수 있다.

결론

PRE의 항산화 효과를 검증하기 위하여, *t*-BHP로 산화적 스트레스를 유발한 HepG2 cell에서 cell viability, ROS, mitochondrial dysfunction, Nrf2 activation에 미치는 영향을 조사하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. PRE(0.1 mg/ml)는 산화적 스트레스 유발물질인 *t*-BHP에 의한 cell death를 유의하게 억제하였다.
2. PRE는 *t*-BHP로 증가된 세포내 ROS 생성을 유의적으로 억제하여, 항산화 효과를 나타낸다.
3. PRE는 *t*-BHP로 유발된 미토콘드리아 기능손상으로부터 세포를 보호하여 미토콘드리아 보호효과를 가진다.
4. PRE는 시간 의존적으로 Nrf2의 핵내 증가를 유도하고, Nrf2의 인산화를 증가시키며, Nrf2 target 항산화 효소의 발현을 유발하였다.
5. PRE는 사염화탄소로 유발된 간손상 동물모델에서 간조직 손상 지표인 ALT와 AST의 증가를 억제하는 효과를 가진다.

일련의 실험결과로 PRE는 간에서 산화적 스트레스를 억제하고, 미토콘드리아를 보호하는 것으로 확인되었으며, 향후, 이러한 항산화에 대한 기전 연구가 지속적으로 필요할 것으로 판단된다. 이러한 연구결과는 나아가 신약개발 및 건강기능식품으로의 활용도가 있을 것으로 기대한다.

Acknowledgments

This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government [MSIP] (No.2012R1A5A2A42671316). Soo Hwan Lee would like to thank the Ph.D. program at Daegu Haany University for completing the thesis through this work.

References

1. Jo YH. Concepts of Human Physiology. Seoul : Beomun Education, 2013 : 268-70.

2. Zhu R, Wang Y, Zhang L, Guo Q. Oxidative stress and liver disease. *Hepatol Res*. 2012 ; 42(8) : 741-9.
3. Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. *J Clin Invest*. 2004 ; 114 : 147-52.
4. Lee E, Kim K, Jeong J. Hepatoprotective Effects of Poly Herbal Formulation (Hepa-1000) on *t*-BHP-Induced Toxicity in Human Hepatoma Cells. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2006 ; 35(9) : 1121-61.
5. Cheng X, Ku CH, Siow RC. Regulation of the Nrf2 antioxidant pathway by microRNAs: New players in micromanaging redox homeostasis. *Free Radic Biol Med*. 2013 ; 64 : 4-11.
6. Shin SM, Yang JH, Ki SH. Role of the Nrf2-ARE Pathway in Liver Diseases. *Oxid Med Cell Longev*. Epub. 2013 : 763257.
7. Shin MK. *Clinical Herbology*. Seoul : Younglimsa, 1997 : 240.
8. Lee J, Um Y, Park H, Lee J, J Ma. Quantitative Analysis of Marker Substances of *Paeonia lactiflora* by Solid Fermentation. *Korean J Orient Med*. 2009 ; 15(2) : 119-24.
9. Kimura Masayasu. *Kampo Pharmacology*. Tokyo : Nanzando, 1997 : 321-3.
10. Sung W, Yoon G, Jang S. Comparison of Effective Constituents of Korean Paeony Roots(*Paeoniae radix*) Cultivated in Different Regions. *Korean J Postharvest Sci Technol*. 2000 ; 7(3) : 297-302.
11. Kang SS, Kim JS, Yun HS, Han BH. Phytochemical Studies on *Paeoniae Radix*. *Kor J Pharmacogn*. 1993 ; 24(3) : 247-50.
12. Kim K, Choi Y, Honh Y, Yeo S, Choi J, Kim Y, Lee J, Lim S. Gene expression microarray analysis of *Paeoniae radix* on IL-1 β -stimulated primary human gingival fibroblast. *J Korean Orient Med*. 2010 ; 31(2) : 91-108.
13. Hong ND, Kim CW, Shin HD. A Study on the Analgesic and Anti-convulsional Effect of *Paeoniae Radix*. *Kor J Pharmacog*. 1979 ; 10(3) : 119-24.
14. Choi YH, Gu L, Kim YS, Kang SS, Kim JS, Yean MH, Kim HP. Effects of the Constituents of *Paeonia lactiflora* Root on Arachidonate and NO Metabolism. *J App Pharmacol*. 2006 ; 14(4) : 216-9.
15. Lee B, Shin YW, Bae EA, Han SJ, Kim JS, Kang SS, Kim DH. Antiallergic effect of the root of *paeonia lactiflora* and its constituents paeoniflorin and paeonol. *Arch Pharm Res*. 2008 ; 31(4) : 445-50.
16. Lee J, Choi S, Cho S, Lee S. Effect of Seeds Extract of *Paeonia Lactiflora* on Antioxidative System and Lipid Peroxidation of Liver in Rats Fed High-Cholesterol Diet. *Korean J Nutr*. 2003 ; 36(8) : 793-800.

17. Oh SY, Lee JS, Seo SH, Kim TS, Ma JY. Paeonia lactiflora Pall Prevents H₂O₂-induced Hepatotoxicity by Increasing HSP72 and HO-1. Korean J Orient Physiol Pathol. 2011 ; 25(5) : 843-48.
18. Lee SM, Yoon MY, Park HR. Protective effects of Paeonia lactiflora Pall on hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC12 cells. Biosci Biotechnol Biochem. 2008 ; 72(5) : 1272-7.
19. Ro HS, Ko WK, Park KK, Cho YH, Park HS. Antihyperlipidemic Effects of Bupleuri Radix, Paeoniae Radix and Uncariae Ramulus et Uncus on Experimental Hyperlipidemia in Rats. J App Pharmacol. 1997 ; 5 : 43-7.
20. Chae KH, Song YK, Lim HH. The protective effect of Paeoniae radix extract against 1-methyl-4-phenylpyridium-induced apoptosis on SK-N-MC neuroblastoma cells. Korean J Orient Med. 2005 ; 26(4) : 74-86.
21. Kim HJ, Kim SS, Lee JS. Paeonia radix decreases intracerebral hemorrhage-induced neuronal cell death via suppression on caspase-3 expression in rats. Korean J Orient Med. 2004 ; 25(4) : 95-107.
22. Kim JH, Yoo YS, Mang MH, Yun HS. Effects of Some Combined Crude Drug Preparations against Platelet Aggregations. Kor J Pharmacogn. 1990 ; 21(2) : 126-9.
23. Park Y, Kim S, Jo K, Yang E, Jung S. Anticariogenic and Antioxidant Activities from Medicinal Herbs. J Korean Soc Food Sci Nutr. 2006 ; 35(3) : 284-93.
24. Jung HJ, Kim M, Lim SH, Park JH, Lee H, Ahn KS, Lee J. Clinical Science ; The Effect of Extract of Paeonia Lactiflora on the Improvement of Ischemic Acute Renal Failure. Korean J Nephrol. 2009 ; 28(3) : 180-9.
25. Park K, Cho S. Antimicrobial Characteristics of Paeonia lactiflora Pall. Extract Tested against Food-putrefactive Microorganisms. Korean J Food Preserv. 2010 ; 17(5) : 706-11.
26. Kay HY, Kim YW, Ryu da H, Sung SH, Hwang SJ, Kim SG. Nrf2-mediated liver protection by sauchinone, an antioxidant lignan, from acetaminophen toxicity through the PKC δ -GSK3 β pathway. Br J Pharmacol. 2011 ; 163(8) : 1653-65.
27. Noh JR, Gang GT, Kim YH, Yang KJ, Hwang JH. Antioxidant effects of the chestnut (*Castanea crenata*) inner shell extract in *t*-BHP-treated HepG2 cells, and CCl₄- and high-fat-diet treated mice. Food Chem Toxicol. 2010 ; 48 : 3177-83.
28. Rhew KY, Choi HJ, Kim NJ, Lee JH. Hepatoprotective and Antioxidative Effects of *Alisma orientale*. Nat Prod Sci. 2011 ; 17(4) : 285-90.
29. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? Lancet. 1994 ; 344(8924) : 721-4.
30. Morton LW, Abu-Amsha Caccetta R, Puddey IB, Croft KD. Chemistry and biological effects of dietary phenolic compounds: relevance to cardiovascular disease. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2000 ; 27 : 152-9.
31. Im DY, Lee KI. Nitric Oxide Production Inhibitory Effect and Antibacterial Activity of the Extract and Fractions from Paeoniae Radix. Kor J Pharmacogn. 2012 ; 43(2) : 173-8.
32. Im DY, Lee KI. Tyrosinase Inhibitory Activity and Melanin Production Inhibitory Activity of the Extract and Fractions from Paeoniae Radix. Kor J Pharmacogn. 2011 ; 42(4) : 323-8.
33. Yen PH, Kiem PV, Nhiem NX, Tung NH, Quang TH, Minh CV, Kim JW, Choi EM, Kim YH. A New Monoterpene Glycoside from the Roots of Paeonia lactiflora Increases the Differentiation of Osteoblastic MC3T3-E1 Cells. Arch Pharm Res. 2007 ; 30(10) : 1179-85.
34. Rush GF, Gorski JR, Ripple MG, Sowinski J, Bugelski F, Hewitt WR. Organic hydroperoxide-induced lipid peroxidation and cell death in isolated hepatocytes. Toxicol Appl Pharmacol. 1985 ; 78 : 473-83.
35. Williams GM, Jeffrey AM. Oxidative DNA damage: endogenous and chemically induced. Regul Toxicol Pharmacol. 2000 ; 32 : 283-92.
36. Minotti G, Borrello S, Palombini G, Galeotti T. Cytochrome P-450 deficiency and resistance to *t*-butyl hydroperoxide of hepatoma microsomal lipid peroxidation. Biochem Biophys Acta. 1986 ; 876 : 220-5.
37. Zoratti M, Szabo I. The mitochondrial permeability transition. Biochim Biophys Acta. 1995 ; 1241 : 139-76.
38. Kantrow SP, Piantadosi CA. Release of cytochrome c from liver mitochondria during permeability transition. Biochem Biophys Res Commun. 1997 ; 232 : 669-71.
39. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. Science. 1998 ; 281 : 1305-8.