

In Vitro 및 In Vivo 알코올 유도 간 손상에 대한 신선초 추출물의 효과

이정윤¹ · 안연주¹ · 김지원¹ · 최효경² · 이유현¹

¹수원대학교 식품영양학과
²한국식품연구원 대사영양연구본부

Effect of *Angelica keiskei* Koidzumi Extract on Alcohol-Induced Hepatotoxicity *In Vitro* and *In Vivo*

Jeong Yoon Lee¹, Yeon Ju An¹, Ji Won Kim¹, Hyo-Kyoung Choi², and Yoo-Hyun Lee¹

¹Department of Food Science and Nutrition, University of Suwon

²Division of Nutrition and Metabolism Research Group, Korea Food Research Institute

ABSTRACT We investigated the hepatoprotective effects of *Angelica keiskei* Koidzumi extract (AK) in HepG2-overexpressing cytochrome P4502E1 (CYP2E1) and C57BL/6J mice. In HepG2 cells expressing CYP2E1, cell viability and catalase activity in the ethanol-AK co-treated group significantly increased compared to those in the ethanol-treated group. In the *in vivo* study with C57BL/6J mice, the AK-supplemented group with ethanol liquid diet showed significantly reduced hepatic markers, including serum aspartate aminotransferase, alanine aminotransferase, and γ -glutamyl transferase, compared to the ethanol group without AK supplementation. AK supplementation (20 mg/kg BW/d) also significantly attenuated reactive oxygen species generation and malondialdehyde level. Notably, a low dose of AK supplementation (20 mg/kg BW/d) suppressed expression of hepatic CYP2E1 and inhibited CYP2E1 enzyme activity. These data indicate that a low dose of AK supplementation could restrain alcohol-induced hepatic damage mediated by CYP2E1.

Key words: CYP2E1, alcohol, oxidative stress, *Angelica keiskei* Koidzumi

서 론

2010년 우리나라의 월간 음주율은 19세 이상 성인 기준으로 남성이 77.8%이며, 성인 남성 중 연간 월 1회 이상 폭음하는 비율은 65.5%에 이르는 것으로 나타났으며, 신체 및 정신건강 악화 및 다양한 사고에 위험요소로 작용하는 것으로 나타나고 있다(1).

문제가 되는 과량 혹은 지속적 음주는 간 지방증, 간염, 간섬유화, 간암 등의 간질환으로 발전될 수 있으며(2), 알코올 대사과정에서 발생하는 산화적 스트레스는 알코올성 간질환을 일으키는 중요한 요인으로 작용할 수 있다(2,3). 지속적인 음주 시 간에서의 알코올 대사는 마이크로솜 알코올 산화계(MEOS, microsomal ethanol oxidizing system)의 cytochrome P4502E1(CYP2E1) 효소를 유도하고 활성을 증가시켜(3), 산화적 스트레스를 증가시키고 항산화 효소를 고갈시킨다(4). CYP2E1 효소는 그 촉매과정에서 과산화수소(H₂O₂), 과산화물 음이온(O₂⁻), 히드록실 라디칼(OH⁻) 등

의 활성산소(ROS, reactive oxygen species)의 과량 생산을 동반하게 되는데, 이 결과로 체내 항산화 기전의 감소가 일어나고 간 손상으로 연결된다(2,5). 이러한 알코올 대사 중에 발생하는 활성산소의 제거를 위해서 효소적, 비효소적 항산화제를 상승시키는 방안이 간세포 보호를 위해 다양하게 연구되고 있다(6,7).

본 연구의 소재로 사용된 신선초(*Angelica keiskei* Koidzumi)는 미나리과에 속하는 다년생초본으로 고혈압, 당뇨 등에 효과가 있다고 알려져 채소, 녹즙 등의 형태로 섭취되어 왔다(8,9). 신선초에는 항산화성 폴리페놀이 다량 함유되어 있으며(9) 혈청지질 함량을 낮추고(10), 항암 효과(11)가 있다는 연구가 있다. 신선초는 특히 *in vitro*계에서 알코올 대사 효소인 alcohol dehydrogenase 및 aldehyde dehydrogenase에 대한 활성 촉진 효과가 있다고 보고되었으며(12), 습관성 음주자를 대상으로 진행한 임상시험에서 알코올로 상승한 gamma-glutamyl transferase(GGT)를 유의적으로 낮추는 연구 결과(13)가 보고되었다.

본 연구는 알코올성 간 손상을 유발한 *in vitro* 및 *in vivo* 시스템에서 신선초 추출물의 간세포 보호 효과 및 간 지표와 항산화 효소 등에 미치는 효과를 검토하였으며, 최종적으로 CYP2E1 효소의 발현과 활성 변화를 통하여 보호 효과의

Received 13 June 2016; Accepted 21 June 2016

Corresponding author: Yoo-Hyun Lee, Department of Food and Nutrition, University of Suwon, Hwaseong, Gyeonggi 18323, Korea
E-mail: creamut@suwon.ac.kr, Phone: +82-31-229-8194

기전을 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

신선초 추출물의 제조

본 연구에서 사용한 신선초는 강원, 충청, 전라도 등지에서 수확된 국내산 신선초의 잎 부위를 (주)폴무원(Seoul, Korea)으로부터 감별과정을 거친 후 적합품을 선별하여 공급받아 세척하고 건조하였다. 95% 에탄올을 원재료의 7배(W/V)로 넣고 55~60°C에서 3시간 동안 1차 추출을 시행하였고, 1차 추출을 마친 원재료에 다시 7배(W/V)의 30% 에탄올을 넣고 70°C에서 3시간 동안 추출하고 여과·농축하여 사용하였다.

세포의 배양

인간 간암세포주인 HepG2(ATCC, Manassas, VA, USA)는 modified Eagle's medium(MEM) 배지에서 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), 1% antibiotics/antimycotics(Gibco BRL)를 첨가하여 37°C, 5% CO₂ 조건의 습윤한 incubator에서 배양되었으며, human CYP2E1 cDNA가 클로닝된 vector(14)를 Lipofectamine 2000 transfection reagent(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)로 transfection 하여 사용하였다.

Cell viability

CYP2E1 과발현 HepG2 cell을 24 well에 5×10⁴ cells/well로 분주하고 배양 24시간 후, phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)으로 2회 세척을 하고 2% FBS가 포함된 배지로 교체한 다음 신선초 추출물(*Angelica keiskei* Koidzumi extract, AK)을 0, 5, 10 µg/mL의 농도로 처리하고 배양하였다. 1시간 후 200 mM의 에탄올을 처리하고 다시 24시간 동안 배양을 시행하고, 이를 3회 반복 시행하였다. 3회 반복 시행이 끝난 후 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(MTT; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)를 배지에 첨가하여 2시간 동안 배양하고 형성된 blue formazan을 DMSO에 녹여 microplate reader(BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)로 570 nm와 630 nm에서 absorbance를 측정하였다.

실험동물 및 식이

실험에 사용된 동물은 (주)대한바이오링크(Eumsung, Korea) 7주령의 수컷 C57BL/6J 마우스를 구입하여 사용하였다. 실험동물은 3일간 환경에 적응시킨 후 10마리를 한 군으로 난괴법에 의해 4군으로 분류하였다. 각 실험군은 정상식이군(Control), 알코올식이군(EtOH), 알코올-신선초 20군(EtOH-AK20), 알코올-신선초 100군(EtOH-AK100)으로 나누었다. 동물실험에 사용된 식이는 Lieber-DeCarli 액체식이(Dyets, Bethlehem, PA, USA)로 적응을 위해 일

Table 1. Composition of Lieber-DeCarli diet

Ingredient	Control diet	Ethanol diet
Casein (100 mesh)	41.4	41.4
L-Cystine	0.5	0.5
DL-Methionine	0.3	0.3
Corn oil	8.5	8.5
Olive oil	28.4	28.4
Safflower oil	2.7	2.7
Dextrin maltose	115.2	25.6
Cellulose	10	10
Choline bitartrate	0.53	0.53
Xanthan gum	3	3
Salt mix	8.75	8.75
Vitamin mix	2.5	2.5
Ethanol	0	48

주일간 급여한 후, 본 액체식이의 탄수화물인 maltose dextrin 대신 에탄올로 일부 열량을 대치하는 액체식을 제조하여 Control군을 제외한 나머지 군에 급여하였다(Table 1). 신선초 추출물은 EtOH-AK20군의 경우 20 mg/kg BW/d, EtOH-AK100군은 100 mg/kg BW/d로 동일한 시간에 경구투여 하였다.

식은는 매회 섭취량을 기록하였으며 총 6주간 사육하였다. 실험동물은 희생 후 혈액과 간을 수집하고, 혈액은 혈청으로 분리하고, 간은 무게 측정 후 각 실험에 사용 시까지 -70°C에 보관하였다. 본 동물실험은 수원대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받아 진행하였다(USW-IACUC-R-2015-006).

CYP2E1 효소 활성 측정

간 조직에 4배의 potassium phosphate buffer(KPB, pH 7.4)를 첨가하여 균질화하고 3,000 rpm에서 10분간 원심분리(Labogene, Seoul, Korea) 하여 상층액을 얻었으며, 여기서 CYP2E1 효소 활성을 측정하였다. CYP2E1 효소 활성은 특이적 기질인 *p*-nitrophenol(PNP)을 이용하여 측정하였는데, 0.1 M KPB(pH 7.4), 1 mM PNP, 0.2 mg 간 균질액에 최종농도 0.5 mM NADPH를 가하여 반응을 개시하였으며, 37°C에서 30분간 반응시킨 후 0.2 mL의 20% trichloroacetic acid(TCA)를 가하여 종결시켰다. 10,000 rpm에서 5분간 원심분리 하여 얻은 상층액에 0.5 mL의 2 M NaOH를 가하여 발색시켜 535 nm(BioTek Instruments, Inc.)에서 측정하였으며, 표준곡선은 본 반응의 생성물인 4-nitrocatechol을 사용하였다.

항산화 효소의 활성

간 조직에서 항산화 효소인 catalase(CAT) superoxide dismutase(SOD), glutathione *S*-transferase(GST), glutathione peroxidase(GPx), glutathione reductase(GR) 활성을 측정하였다. CAT 활성은 Aebi(15)의 방법으로 측정하였고, SOD, GST, GPx 및 GR의 활성은 kit(Biovision,

Milpitas, CA, USA)을 이용하여 분석하였다.

MDA의 측정

Malondialdehyde(MDA)의 양은 조직을 0.38% TBA와 15% TCA로 구성된 TBA reagent에 넣어 30분간 끓인 후, 5,000 rpm에서 20분간 원심분리 하였다(Thermo Scientific Sorvall, Waltham, MA, USA). 상등액을 회수하여 micro-plate reader(BioTek Instruments, Inc.)로 535 nm에서 측정 한 후 MDA 표준곡선에 따라 nM/mg protein으로 표기하였다.

간의 조직학적 분석

알코올 급여 마우스에서 신선초 추출물 투여에 따른 간 조직의 병리학적 분석을 위하여 4% para formaldehyde (Sigma-Aldrich Co.)로 처리하여 파라핀 블록을 만들고 슬라이스하여 hematoxylin-eosin 염색을 하고 광학현미경으로 관찰하였다.

Western blot

간에 4배의 RIPA buffer를 넣고 균질화하여 3,000 rpm에서 5분간 원심분리 하였다. 상등액을 수거하고 Bradford 법으로 단백질을 정량한 후, 각 군간 40 µg protein을 기준으로 10 % SDS gel에 전기영동하고 western blot을 시행하였다. Nitrocellulose membrane에 transfer 한 후 5% skim milk로 4°C에서 16시간 동안 blocking을 시행하였으며, 다시 primary 및 secondary antibody를 처리한 후 X-ray film에 인화하였다. 본 실험에 사용된 antibody의 정보는 다음과 같다. Rabbit polyclonal IgG CYP2E1(CYP2E1,

diluted 1:1,000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA), actin-mouse MAb(diluted 1:1,000; Sigma-Aldrich Co.), goat anti-rabbit IgG-HRP-conjugated(diluted 1:1,000; Santa Cruz Biotechnology)가 사용되었다.

통계처리

본 연구에서는 세포실험은 최소 3반복에 대한 평균 및 표준편차(mean±SD)로 표시하였으며, 동물실험은 평균 및 표준오차(mean±SE)로 표현하였다. 각 실험군 간의 통계적 유의성은 Duncan's multiple range test를 사용하여 $P < 0.05$ 에서 통계학적 유의성을 검정하였다. 통계검정은 SPSS (version 20, IBM Corporation, Armonk, NY, USA)를 이용하였다.

결과 및 고찰

In vitro에서 에탄올 처리에 대한 신선초 추출물의 효과

In vitro에서 에탄올 처리에 대한 신선초 추출물이 간세포에 미치는 영향을 검토하기 위하여 CYP2E1을 과발현시킨 HepG2 cell에서 MTT assay를 시행하였다. 과발현시킨 CYP2E1은 western blot으로 그 발현을 확인하였다(Fig. 1A). Fig. 1B에서와 같이 200 mM 에탄올 처리에 따라 세포 생존률은 Control군과 비교하였을 때 약 40% 유의적으로 감소하였으며, 10 µg/mL의 신선초 추출물을 처리한 EtOH-AK10군의 세포생존률은 Control군 수준으로 유의적으로 증가하는 것을 볼 수 있었다($P < 0.05$). Fig. 1C에서 에탄올 처리에 따라 유의적으로 감소한 CAT 활성은 신선초 추출물의 처리로 다시 증가하는 것을 볼 수 있다($P < 0.05$). 위의

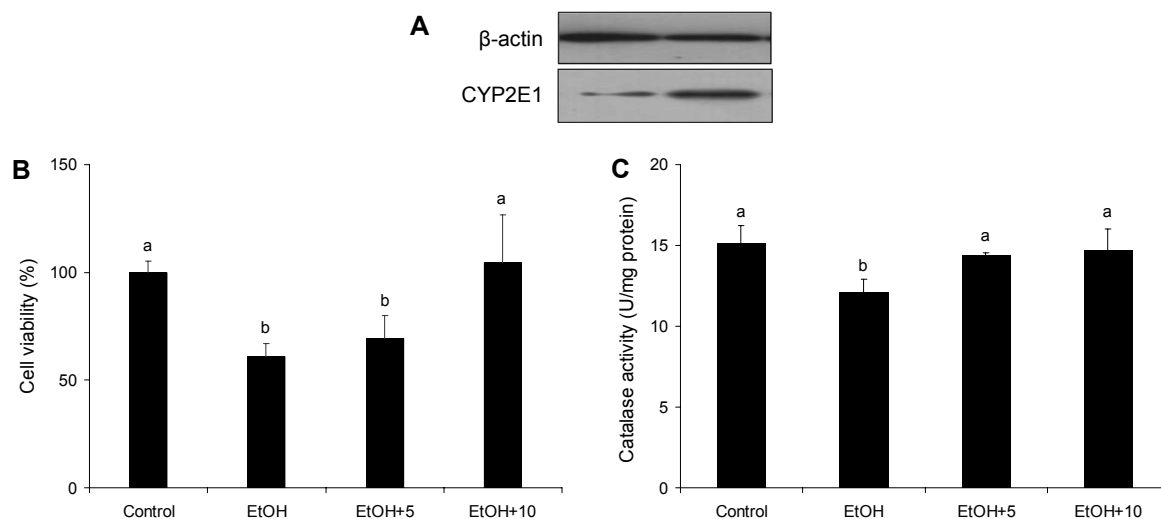


Fig. 1. Effects of *Angelica keiskei* extract on HepG2 cells overexpressing CYP2E1 against ethanol-induced toxicity. Data express the mean±SE. Different letters (a,b) above the bars are significantly different ($P < 0.05$). (A) CYP2E1 expression was measured by western blot (lane 1: HepG2, lane 2: transfected HepG2), (B) effect of *A. keiskei* extract on cell viability, (C) effect of *A. keiskei* extract on catalase activity in HepG2 overexpressing CYP2E1. In (B) and (C), Control group is non-treated group, EtOH group was treated with 200 mM ethanol, EtOH+5 group was treated with 5 µg/mL *A. keiskei* extract plus 200 mM ethanol, and EtOH+10 group was treated with 10 µg/mL *A. keiskei* extract plus 200 mM ethanol.

Table 2. Changes in the body and liver weights in ethanol-induced mice

Group ¹⁾	Body weight (g)		Weight gain (g)	Liver weight (g)
	0 week	6 weeks		
Control	19.95±0.24	24.76±1.46	4.81±0.37 ^{NS2)}	1.14±0.15 ^{NS}
EtOH	20.74±0.24	24.29±0.30	4.34±0.50	1.18±0.15
EtOH-AK20	20.56±0.15	24.07±0.21	3.51±0.14	1.05±0.12
EtOH-AK100	19.24±0.29	23.85±1.35	4.61±0.30	1.09±0.13

Values are expressed as mean±SE of 10 mice.

¹⁾Control: non-treated mice, EtOH: ethanol-treated mice, EtOH-AK20: ethanol mice supplied with 20 mg/kg BW/d of *Angelica keiskei* Koidzumi extract, EtOH-AK100: ethanol mice supplied with 100 mg/kg BW/d of *Angelica keiskei* Koidzumi extract.

²⁾Not significant.

결과는 CYP2E1에 의한 에탄올 대사 중 발생하는 활성산소에 의해 세포생존률이 감소했다고 생각되며, 이와 같은 에탄올 유도 산화적 스트레스는 Fig. 1B와 같이 신선초 추출물의 처리로 세포 내 catalase와 같은 항산화 효소의 증가로 연결되어 세포생존률의 증가를 가져왔다고 생각된다. 이 같은 결과는 Bak 등(16)의 연구에서 CYP2E1 과발현 HepG2에서 왕머루에서 분리한 procyanidin 처리로 세포생존률과 CAT 활성이 증가하였다는 보고와 같이 CYP2E1의 알코올 대사에서 발생한 ROS로 인한 산화적 스트레스를 신선초 추출물이 CAT와 같은 항산화 효소를 높여 세포손상을 감소시켰다고 생각된다.

*In vivo*에서 신선초 추출물 투여에 따른 체중과 간 무게 변화

*In vivo*에서 알코올 유도 간 손상에 대한 신선초 추출물의 효과를 검토하기 위하여 총 6주간의 Lieber Decarli 액체 알코올 식이를 급여하며 20, 100 mg/body weight/d의 신선초 추출물을 경구 투여하였으며, 이를 각각 EtOH-AK20, EtOH-AK100군으로 명명하였다. 신선초 추출물의 농도는 앞서 시행된 신선초 추출물의 인체적용 시험 결과(13)를 기반으로 1,000 mg/60 kg BW와 유사한 20 mg/kg BW의 농도를 설정하였고, 고농도에서 효과의 변화를 확인하기 위하여 100 mg/kg BW의 식이 농도를 선택하여 사용하였다. 전 실험기간 동안 실험동물은 모두 생존하였으며 실험동물을 희생시키고 부검한 결과 상기의 두 가지 농도에서 간 조직 외의 다른 조직에서 변화, 손상 등은 나타나지 않았다. 실험동물의 체중 변화와 간 무게는 Table 2와 같다. 체중 변화는 각 군에서 유사하게 증가하여 각 군당 유의적 차이는 보이지 않았으며 각 군당 간 무게도 유의적인 차를 보이지 않았다.

혈액의 생화학적 지표

Control군과 EtOH군, 그리고 신선초 각 군의 혈청 ALT, AST 및 GGT 결과는 Table 3과 같다. 혈액에서의 모든 생화학적 지표는 EtOH군에서 급격히 상승하였다. ALT와 AST는 가장 많이 측정되는 간 질환의 지표로, EtOH군의 AST 및 ALT는 Control군과 비교하여 각각 2배와 2.7배 각각 이상 상승하였으며, EtOH-AK20과 AK100군에서 유의적

Table 3. Effects of *Angelica keiskei* Koidzumi extract on hepatic markers in mice serum

Group ¹⁾	AST (Karmen)	ALT (Karmen)	Y-GTP (ng/mL)
Control	66.79±5.00 ^{b2)}	10.23±1.90 ^b	1.24±0.31 ^b
EtOH	144.66±13.24 ^a	27.50±4.02 ^a	3.47±0.64 ^a
EtOH-AK20	75.29±10.05 ^b	10.24±2.00 ^b	1.66±0.29 ^b
EtOH-AK100	77.98±15.84 ^b	17.39±3.71 ^b	1.33±0.15 ^b

Values are expressed as mean±SE of 10 mice.

¹⁾Refer to Table 2.

²⁾Means with different letters in a column are significantly different ($P<0.05$).

으로 감소하였다($P<0.05$). 본 연구 결과는 사염화탄소 투여로 상승한 AST와 ALT를 신선초 녹즙을 투여하여 유의적으로 억제한 Jung 등(9)의 연구와 일치하였다. GGT는 EtOH군에서 2배 이상 상승하였고 AK20과 AK100군에서 Control군과 유사하게 유의적으로 감소하는 경향을 보였다($P<0.05$). GGT는 glutathione 항상성에 관여하는 막효소로(17), 알코올 섭취 시 glutathione의 고갈로 산화적 스트레스가 유도되고 세포 내 GGT가 증가하므로(13) 산화적 스트레스의 지표 혹은 알코올 섭취로 인한 간질환의 진단에 널리 이용되어 왔다(17,18). Noh 등(13)의 연구에서 습관적 음주자에 신선초 추출물을 급여한 경우 GGT가 유의적으로 감소하는 변화를 보였으며, 본 연구에서도 에탄올을 급여한 마우스에서 상승했던 GGT가 신선초의 투여로 유의적 감소하므로 일치한다고 할 수 있다. 또한, 저농도인 EtOH-AK20군 및 고농도인 EtOH-AK100군 간의 생화학적 지표상의 차이도 유의적으로 나지 않아 본 실험에서 사용한 농도에서 치료 자체의 독성은 없다고 생각하였다.

알코올 급여 마우스의 간에서 신선초 투여에 따른 조직학적 변화

희생 후 각 군당 간의 조직학적 분석을 위하여 간 조직을 4% para formaldehyde로 처리하여 파라핀 블록을 만들고 슬라이스하여 hematoxylin-eosin 염색을 실시하였다(Fig. 2). Fig. 2B의 EtOH군의 간 조직에서는 periportal region의 macrosteatosis와 microsteatosis가 관찰되었으며, neutrophil과 함께 주변세포의 변성이 나타난 focal necrosis가 관찰되었다. 그러나 EtOH-AK20군(Fig. 2C)과

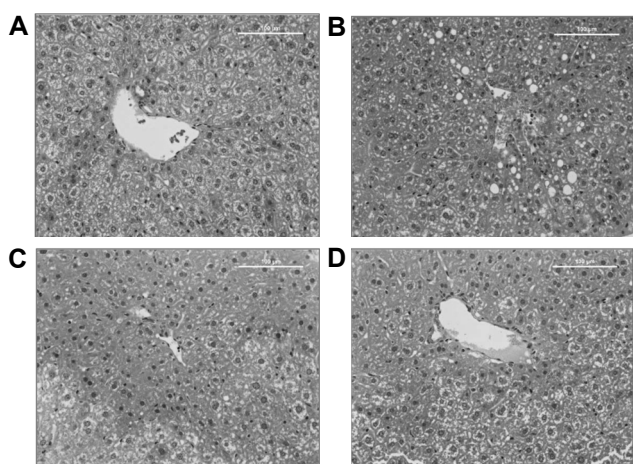


Fig. 2. Histopathological examination of mouse liver fed a liquid diet with ethanol or ethanol plus *A. keiskei* extract, compared to Control group. (A) Control group: non-treated mice, (B) EtOH group: ethanol-treated mice, (C) EtOH-AK20 group: ethanol mice supplied with 20 mg/kg BW/d of *A. keiskei* extract, (D) EtOH-AK100 group: ethanol mice supplied with 100 mg/kg BW/d of *A. keiskei* extract (hematoxylin & eosin staining).

EtOH-AK100군(Fig. 2D)에서는 Control군(Fig. 2A)과 같이 염증, 괴사, steatosis 등의 특별한 병변이 관찰되지 않았다.

항산화 효소 및 MDA의 변화

알코올 유도된 산화적 스트레스는 ROS를 생성하고 이들은 간세포 내의 SOD, GSH 등 항산화 효소에 의한 항산화 방어계를 무너뜨려 세포 내 항산화능을 고갈시킨다(7,18). 과량의 ROS는 세포막에 존재하는 다가불포화지방산(polyunsaturated fatty acid)과 반응하여 과산화지질을 형성하게 되는데, 이것의 최종산물인 MDA는 산화적 스트레스의 지표로 사용된다(2). 본 연구에서 6주간 신선초 추출물의 공급이 간 조직 내 항산화 효소에 미친 영향은 Table 4와 같다. EtOH군은 Control군보다 CAT, GST, GPx, GR 활성이 유의적으로 낮아졌으나, SOD(inhibition rate%)는 유의적으로 상승하였다. 신선초 투여군인 EtOH-AK20군과 EtOH-AK100군에서 다시 상승하는 경향을 보였다. 특히 저농도인 EtOH-AK20군에서 CAT, GPx, GR 활성이 EtOH

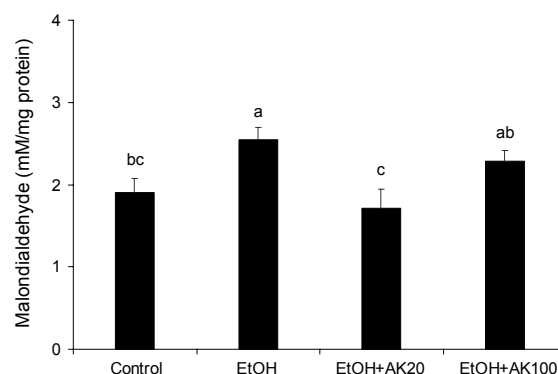


Fig. 3. Effects of *Angelica keiskei* Extract on MDA contents in ethanol-induced mouse liver. Data express the mean±SE. Different letters (a-c) above the bars are significantly different ($P < 0.05$). Control: non-treated mice, EtOH: ethanol-treated mice, EtOH-AK20: ethanol mice supplied with 20 mg/kg BW/d of *A. keiskei* extract, EtOH-AK100: ethanol mice supplied with 100 mg/kg BW/d of *A. keiskei* extract.

군보다 유의적으로 증가하였다($P < 0.05$).

간 조직에서 MDA 생성 역시 항산화 효소의 변화와 일치하는 결과를 보였는데(Fig. 3), EtOH군은 Control군에 비해 유의적으로 과산화지질이 증가하였으며, 신선초 급여군 중 특히 EtOH+ AK20군에서 유의적인 감소를 보였다($P < 0.05$).

알코올을 급여 마우스 간에서 CYP2E1 발현과 활성의 검토

앞선 결과에서와 같이 알코올에 의해 유도된 산화적 스트레스에 대한 신선초 추출물의 효과에 대한 기전을 이해하기 위하여 간 조직에서 CYP2E1의 발현과 효소 활성을 측정하였다. CYP2E1은 에탄올을 아세트알데히드로 전환하는 효소로 알코올 섭취 시 그 발현과 활성이 유도되며(2), 과량의 ROS를 발생시키는 결과를 초래하여 세포 내 효소적, 비효소적 항산화제의 억제와 고갈을 유도하게 된다(2,4,19-21). Fig. 4A에서와 같이 CYP2E1의 단백질 발현은 EtOH군에서 Control군보다 증가하였으며 EtOH+ AK20군에서 Control군 수준으로 감소하는 것을 볼 수 있었다. CYP2E1 효소 활성에서도 발현과 유사한 결과를 보였는데 EtOH군에서 CYP2E1의 활성은 2배 정도 유의적으로 높아졌으나 EtOH+ AK20군에서 다시 유의적 감소했다($P < 0.05$).

Table 4. Effects of oral administration of *Angelica keiskei* Koidzumi on enzymatic antioxidant activities of mice in chronic alcohol exposure

Group ²⁾	SOD ¹⁾ (Inhibition rate%)	CAT (U/mg protein)	GST (U/mg protein)	GPx (U/mg protein)	GR (U/mg protein)
Control	77.82±2.21 ^{b3)}	10.90±0.56 ^a	0.70±0.03 ^a	7.70±0.64 ^a	12.96±1.36 ^a
EtOH	83.92±1.22 ^a	6.79±0.53 ^c	0.56±0.02 ^b	6.60±1.24 ^b	10.00±0.47 ^b
EtOH+20	81.45±1.62 ^{ab}	9.22±0.37 ^b	0.66±0.04 ^{ab}	7.72±0.33 ^a	12.74±0.35 ^a
EtOH+100	81.20±1.65 ^{ab}	8.80±0.30 ^b	0.69±0.05 ^a	6.96±0.19 ^{ab}	12.11±0.62 ^{ab}

Values are expressed as mean±SE of 10 mice.

¹⁾SOD: superoxide dismutase, CAT: catalase, GST: glutathione-S-transferase, GPx: glutathione peroxidase, GR: glutathione reductase.

²⁾Refers to Table 2.

³⁾Values with different letters in a column are significantly different ($P < 0.05$).

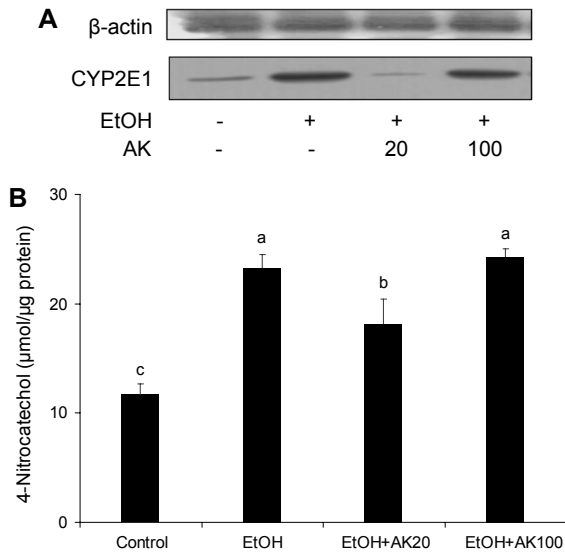


Fig. 4. Effects of *Angelica keiskei* on protein expression and enzyme activity of CYP2E1 in ethanol-induced mouse liver. (A) Western blot analysis of CYP2E1 in ethanol-induced mouse liver, (B) p-nitrophenol assay for CYP2E1 enzyme activity in ethanol-induced mouse liver. Data express the mean±SE. Different letters (a-c) above the bars are significantly different ($P<0.05$). Control: non-treated mice, EtOH: ethanol-treated mice, EtOH-AK20: ethanol mice supplied with 20 mg/kg BW/d of *A. keiskei* extract, EtOH-AK100: ethanol mice supplied with 100 mg/kg BW/d of *A. keiskei* extract.

본 연구에서 *in vitro* 및 *in vivo*에서 알코올 유도된 간 손상에 대하여 신선초 추출물의 보호 효과를 검토하였다. 여러 연구자의 신선초 추출물에 관한 연구에서 hyperoside 등의 quercetin 유도체를 비롯하여(10) luteolin, protocatechuic acid 등이 있으며(8), 그 외에도 다양한 페놀성 화합물과 chalcone(22) 등의 분리가 보고되었다. 알코올성 간세포 손상의 주요 인자인 산화적 스트레스에 대한 보호 효과는 페놀성 화합물(14) 및 chalcone이 보고된 바 있으며(23), flavonoid인 luteolin은 만성적 알코올 급여 마우스에서 간 손상을 완화시키는 것으로 보고되었고(24), hyperoside의 아세트아미노펜 유도 간 손상에 대한 효과도 보고된 바 있다(25). 최근 연구에서 감태의 polyphenol이 CYP2E1 효소 활성을 억제하고, 이 영향으로 ROS의 생성이 연쇄적으로 억제된다는 보고(26)와 chalcone 계열의 물질이 CYP2E1 효소 활성을 저해한다는 보고(27)가 있었으며, 신선초 추출물에 포함된 polyphenol과 chalcone 계열 물질 등의 효과로 CYP2E1의 발현 및 활성이 억제되고(Fig. 4), 그에 따라 ROS의 생성도 줄어드는 한편, 발생한 ROS에 대한 보호 효과를 확인할 수 있었다(Table 4)고 생각한다. 단지 고농도보다 저농도에서 효과적인 결과를 보였으며, 이것은 추출물에 함유된 다른 성분들에 의한 영향이라고 생각한다. 그러므로 앞으로의 연구에서는 신선초 농도별 효과에 대한 검토 및 예상되는 단일물의 효과 검토가 필요하다고 생각한다.

요 약

본 연구에서는 다양한 약리 활성 및 항산화 활성이 높다고 보고된 신선초 추출물을 대상으로 *in vitro* 및 *in vivo*계에서 알코올성 간세포 손상을 유도하여 그 효과를 검토하였다. 알코올 산화 효소인 cytochrome P4502E1(CYP2E1)이 과발현된 HepG2 세포에서 200 mM의 알코올과 신선초 추출물을 투여하였을 때 농도 의존적으로 세포생존률 및 catalase(CAT) 활성이 증가하였다. *In vitro*에서 신선초 추출물의 보호 효과를 확인한 후 7주령의 C57BL/6J 마우스에 알코올과 신선초 추출물 20, 100 mg/kg BW/d를 급여한 결과 혈중 ALT, AST, GGT의 농도는 대조군보다 유의적으로 증가한 알코올군에 비해 신선초 추출물을 급여한 군에서 유의적 감소함을 확인할 수 있었다. 그뿐만 아니라 알코올 투여로 세포변성과 지방구가 보이는 간 조직의 변화가 신선초 투여로 의해 대조군과 유사하게 관찰되었다. 항산화 효소의 변화와 지질과산화 수준은 대조군보다 알코올군이 유의적 증가했으며, 신선초 추출물 급여군에서 감소하는 결과를 보였고, 특히 신선초 20 mg/kg BW/d로 급여한 군에서 CAT, glutathione peroxidase, glutathione reductase, malondialdehyde(MDA) 등의 유의적 감소를 보였다. 이 같은 변화를 매개했다고 생각되는 CYP2E1의 발현과 활성은 대조군보다 알코올 투여군에서 유의적으로 상승하였으며, 특히 항산화 효소와 MDA 함량에서 유의적 감소했던 20 mg/kg BW/d의 신선초 투여군에서 유의적 감소하는 것으로 나타났다. 그러므로 이는 신선초 추출물에 함유된 luteolin, quercetin, chalcone 화합물 등의 성분에 의해 알코올 유도 산화적 스트레스가 감소하였다고 생각되며, 신선초 추출물은 알코올 대사과정에서 산화적 스트레스를 억제하여 간 보호 효과가 있을 것으로 생각한다.

REFERENCES

1. Lee SY, Lee SM, Park JH, Lee MS. 2012. The study of drinking behaviors, health status and mental health service - Heavy drinker who have visited emergency center of public hospital in Seoul. *The Mental Health* 3: 33-37.
2. Cao YW, Jiang Y, Zhang DY, Zhang XJ, Hu YJ, Li P, Su H, Wan JB. 2015. The hepatoprotective effect of aqueous extracts of *Penthorum chinense* Pursh against acute alcohol-induced liver injury is associated with ameliorating hepatic steatosis and reducing oxidative stress. *Food Funct* 6: 1510-1517.
3. You Y, Yoo S, Yoon HG, Park J, Lee YH, Kim S, Oh KT, Lee J, Cho HY, Jun W. 2010. *In vitro* and *in vivo* hepatoprotective effects of the aqueous extract from *Taraxacum officinale* (dandelion) root against alcohol-induced oxidative stress. *Food Chem Toxicol* 48: 1632-1637.
4. Veeramachaneni S, Ausman LM, Choi SW, Russell RM, Wang XD. 2008. High dose lycopene supplementation increases hepatic cytochrome P4502E1 protein and inflammation in alcohol-fed rats. *J Nutr* 138: 1329-1335.
5. Lee YH, Lee J, Im EJ, Jun W, Cho HY. 2009. Modulation

- of ethanol-induced P450 enzyme activities and antioxidants in mice by *Hordeum vulgare* extract. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 38: 1347-1352.
6. Jin DC, Jeong SW, Park PS. 2010. Effects of green tea extract on acute ethanol-induced hepatotoxicity in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 343-349.
 7. Yu KH, Lee SY, Yang HM, Ham YA, Lee SU, Chae SW, Lee YJ. 2015. Effect of fermented water extracts from *Ligularia fischeri* on hepatotoxicity induced by D-galactosamine in rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44: 1422-1430.
 8. Jo HW, Park JC. 2008. Phenolic compounds isolated from the leaves of *Angelica keiskei* showing DPPH radical scavenging effect. *Kor J Pharmacogn* 39: 146-149.
 9. Jung HK, Park PS, Huh NC, Kim SO, Kim KS, Lee MY. 1998. Inhibitory effect of *Angelica keiskei* Koidz green juice on the liver damage in CCl₄-treated rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 531-536.
 10. Choe KH, Choe SN, Choo JJ, Lee JY, Kim JY, Kim JW, Choi JS, Park KS, Park KH. 2007. Tissue concentration of quercetin, isoquercitrin and hyperoside, and lipid profile changes following 8-week feeding of *Angelica keiskei* powder in rats. *Korean J Food Sci Technol* 39: 721-724.
 11. Jeong YJ, Nam MK, Kang KJ. 2011. The effect of *Angelica keiskei* ethanol extract on proliferation, apoptosis, and ROS accumulation in human breast cancer MDA-MB-231 cells. *J East Asian Soc Diet Life* 21: 24-30.
 12. Kim MJ, Lim SW, Ahn HJ, Jun J, Kang MJ. 2016. Effect of fruit-vegetable juices containing *Angelica keiskei* on alcohol metabolizing enzyme activities *in vitro*. *KSBB J* 31: 8-13.
 13. Noh HM, Ahn EM, Yun JM, Cho BL, Paek YJ. 2015. *Angelica keiskei* Koidzumi extracts improve some markers of liver function in habitual alcohol drinkers: a randomized double-blind clinical trial. *J Med Food* 18: 166-172.
 14. Lee YH, Ho JN, Dong MS, Park CH, Kim HK, Hong B, Shin DH, Cho HY. 2005. Transfected HepG2 cells for evaluation of catechin effects on alcohol-induced CYP2E1 cytotoxicity. *J Microbiol Biotechnol* 15: 1310-1316.
 15. Aebi H. 1984. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* 105: 121-126.
 16. Bak MJ, Truong VL, Ko SY, Nguyen XN, Ingkasupart P, Jun M, Shin JY, Jeong WS. 2016. Antioxidant and hepatoprotective effects of procyanidins from wild grape (*Vitis amurensis*) seeds in ethanol-induced cells and rats. *Int J Mol Sci* doi: 10.3390/ijms17050758.
 17. Qian ZJ, Zhang C, Li YX, Je JY, Kim SK, Jung WK. 2011. Protective effects of emodin and chrysophanol isolated from marine fungus *Aspergillus sp.* on ethanol-induced toxicity in HepG2/CYP2E1 cells. *J Evidence-Based Complementary Altern Med* doi: 10.1155/2011/452621.
 18. Choi K, Kim BI, Cho YK, Park CY, Sohn JI, Jeon WK, Kim H, Chung ES, Keum DG, Lee HY, Lee SJ. 1999. Diagnostic usefulness of serum γ -glutamyl transferase (GGT) activity in fatty liver and relationship with other factors. *Korean J Med* 57: 1006-1013.
 19. Nagata J, Morino T, Saito M. 2007. Effects of dietary *Angelica keiskei* on serum and liver lipid profiles, and body fat accumulations in rats. *J Nutr Sci Vitaminol* 53: 133-137.
 20. Xu Y, Leo MA, Lieber CS. 2003. Lycopene attenuates arachidonic acid toxicity in HepG2 cells overexpressing CYP2E1. *Biochem Biophys Res Commun* 303: 745-750.
 21. Stice CP, Aizawa K, Greenberg AS, Ausman LM, Wang XD. 2015. Dietary tomato powder inhibits alcohol-induced hepatic injury by suppressing cytochrome p450 2E1 induction in rodent models. *Arch Biochem Biophys* 572: 81-88.
 22. Chang HR, Lee HJ, Ryu JH. 2014. Chalcones from *Angelica keiskei* attenuate the inflammatory responses by suppressing nuclear translocation of NF- κ B. *J Med Food* 17: 1306-1313.
 23. Ajiboye TO. 2016. Lophirones B and C attenuate acetaminophen-induced liver damage in mice: studies on hepatic, oxidative stress and inflammatory biomarkers. *J Biochem Mol Toxicol* doi: 10.1002/jbt.21814.
 24. Liu G, Zhang Y, Liu C, Xu D, Zhang R, Cheng Y, Pan Y, Huang C, Chen Y. 2014. Luteolin alleviates alcoholic liver disease induced by chronic and binge ethanol feeding in mice. *J Nutr* 144: 1009-1015.
 25. Xie W, Jiang Z, Wang J, Zhang X, Melzig MF. 2016. Protective effect of hyperoside against acetaminophen (APAP) induced liver injury through enhancement of APAP clearance. *Chem Biol Interact* 246: 11-19.
 26. Yamashita H, Goto M, Matsui-Yuasa I, Kojima-Yuasa A. 2015. *Ecklonia cava* polyphenol has a protective effect against ethanol-induced liver injury in a cyclic AMP-dependent manner. *Mar Drugs* 13: 3877-3891.
 27. He W, Wu JJ, Ning J, Hou J, Xin H, He YQ, Ge GB, Xu W. 2015. Inhibition of human cytochrome P450 enzymes by licochalcone A, a naturally occurring constituent of licorice. *Toxicol In Vitro* 29: 1569-1576.