

Original Article / 원저

산화적 스트레스로 유도된 간손상에 대한 소음인보중익기탕 열수추출물의 간세포보호효과

손진원¹, 정지윤¹, 김광연², 황보민¹, 박정아¹, 조일제¹, 백영두³, 정태영¹, 김상찬¹, 지선영^{1*}

¹대구한의대학교 한의과대학, ²한국한의학연구원 ³대구보건대학교

The Protective Activity of Soeumin Bojungykgi-tang Water Extract Against Oxidative Stress-induced Hepato-Toxicity

Jin Won Son¹, Ji Yun Jung¹, Kwang-Youn Kim², Min Hwangbo¹, Chung A Park¹, IL Je Cho¹,
Young Doo Back³, Tae Young Jung¹, Sang Chan Kim¹, Seon Young Jee^{1*}

¹College of Korean medicine, Daegu Haany University,
²Korea Institute of Oriental Medicine, ³Daegu Health College

ABSTRACT

Background and objectives : Soeumin Bojungykgi-tang (seBYTE) has been used to supplement *qi* in Korean medicine. It has been demonstrated to possess various biological functions such as anti-cancer, anti-aging and anti-inflammatory effects. The present study evaluated the protective roles of seBYTE in hepatotoxic *in vitro* and *in vivo* model.

Methods : To investigate cytoprotective effect of seBYTE, HepG2 cells were pretreated with seBYTE and then subsequently exposed to 10 μ m AA for 12 h, followed by 5 μ m iron. Cell viability was examined by MTT assay, and expression of apoptosis-related proteins was evaluated by immunoblot analysis. For responsible molecular mechanisms, ROS production, GSH contents, and mitochondrial membrane potential were measured. In addition, hepatoprotective effect of seBYTE *in vivo* was assessed in CCl₄-induced animal model.

Results : seBYTE prevented AA + iron-induced cytotoxicity in concentration dependent manner. In addition, ROS production, GSH depletion, and mitochondrial dysfunction induced by AA + iron were significantly reduced by seBYTE pretreatment. Furthermore, seBYTE recovered expression of the pro-apoptotic proteins such as PARP and

pro-caspase-3. In animal experiment, plasma ALT and AST levels were significantly elevated in CCl₄ treatment, but seBYTE significantly decreased the ALT and AST levels. Moreover, seBYTE alleviated the numbers of histological activity index, percentages of degenerative regions, degenerated hepatocytes, infiltrated inflammatory cells, nitrotyrosine- and 4-hydroxynonenal-positive cells in liver.

Conclusions : These results showed that hepatoprotective effect of seBYTE against on CCl₄-induced hepatic damages is partly due to antioxidative and anti-apoptotic process.

I. 緒論

일반적으로 산소를 사용하는 생체의 에너지 생산과정에서는 superoxide radical, hydrogen peroxide, hydroxyl radical, singlet oxygen 등의 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)이 생성되며, 이러한 ROS는 체내 superoxide dismutase, catalase, glutathione 등에 의하여 적절하게 제거되어 체내 항상성을 유지한다¹⁾. 그러나 과도한 ROS의 생성 또는 체내 항산화능 저하로 인하여 이러한 항상성이 파괴되면 산화적 스트레스(oxidative stress)가 유발되고²⁾, 산화적 스트레스는 DNA, proteins, lipids에 광범위한 손상을 유도하여, 종양, 치매 등을 비롯한 다양한 질환을 유도하게 된다³⁾.

간은 albumin 및 단백질을 생산하며, 소장에서 흡수된 영양소의 처리와 저장에 주된 역할을 하고, 특정 신체 내 배설물과 이물질을 파괴 및 제거한다. 또한 간은 물질대사가 활발한 장기로 대사의 결과물인 대사체들로 인한 산화적 스트레스에 많은 영향을 받는다⁴⁾. 간에서의 과도한 산화적 스트레스는 간염, 간섬유화, 간경화, 간암 등의 간장질환과 밀접하게 관련되어 있다⁵⁾.

少陰人補中益氣湯은 李濟馬의 <東醫壽世保元>에 收載된 方劑로, 李東垣 <脾胃論>의 補中益氣湯에 柴胡와 升麻를 제거하고, 藿香과 蘇葉을 가하고, 人蔘과 黃芪를 증량한 方劑이다. 東醫壽世保元의 少陰人腎受熱表熱病論에서는 發熱惡寒而有汗의 亡陽初證에 黃芪桂枝湯, 補中益氣湯, 升陽益氣湯 등을 사용할 수 있으며, 少陰人 泛論에서는 陽明太陽之危者에 獨參八物湯, 補中益氣湯 등을 사용할 수 있음을 제시하였다^{6,7)}.

소음인보중익기탕에 대한 연구를 살펴보면, 소음인보중익기탕의 적응증 확장 연구로서 人蔘黃芪湯의 주치와 효능이 제시되었으며⁸⁾, 소음인보중익기탕이 alloxan으로 유도된 당뇨모델에서 혈당강화작용 및 항산화작용을 나타내며, 이러한 효과는 보중익기탕의 藿香-蘇葉보다 이를 제외한 補氣血藥과 연관되어 있음이 보고되었다^{9,10)}. 또한 소음인보중익기탕은 mice의 적출회장에서 이완효과를 나타냄이 보고되었고¹¹⁾, 항암작용을 가지며 또한 항암제 cyclophosphamide에 의한 부작용을 감소시키는 효과가 보고되었다^{12,13)}. 소음인보중익기탕의 항산화, 항암효능이 다수 보고되었으나, 항산화능을 기반으로 한 후속 연구는 미흡한 편이며, 특히 소음인보중익기탕의 간세포보호작용에 대해서는 아직까지 보고된 바가 없었다.

따라서 본 연구에서는 소음인보중익기탕이 항산화작용을 가진다는 이전의 연구에 근거하여, 소음인보중익기탕의 항산화효과를 중심으로 *in vitro* 연구로서 HepG2 cell에 아라키도닉산(AA; arachidonic acid)과 철(iron)을 병용 처리하여 산화적 스트레스를 유발하고, 또한 *in vivo* 모델로서 CCl₄를 투여하여 산화적 스트레스를 유발한 동물모델에서 간세포보호효과를 평가하여 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 소음인보중익기탕 (seBYTE)의 제조

소음인보중익기탕의 구성 약제는 대원약업사 (Daegu, Korea)에서 구입하였으며, 소음인보중익기탕 10첩 분량 397.5 g을 4 L의 물로 3시간 탕전하고, 거르로 1차 여과한 뒤, 0.2 μm 필터 (Nalgene, New York, NY,

*Corresponding author : Seon Young Jee, Pohang Oriental hospital of Daegu Haany University, 411, Saecheonneon-daero, Nam-gu, Pohang-si, Gyeongsangbuk-do, 37685, Republic of Korea.

Tel : +82-54-281-0055, E-mail : jeesy@dhu.ac.kr

• Received : September 7, 2017 / Revised : November 10, 2017 / Accepted : November 20, 2017

USA)로 필터링하였다. 여과한 여액을 rotary evaporator (EYELA, Tokyo, Japan)로 감압 농축한 후, ultra-low temperature freezer (Nihon freezer, Japan)에서 동결하고, 동결된 추출물을 동결건조기 (Labconco, USA)로 동결건조하여 28.74 g (수율 17.23 %)의 소음인보중익기탕 추출물(seBYTE; Soeumin Bojungykgi-tang Extract)을 얻었다. 동결건조시료는 실험기간 동안 -20°C에 보관하였다.

Table 1. Composition of Soeumin Bojungykgi-tang Used in This Study

本草名	生藥名	用量(g)
人蔘	Ginseng Radix	11.25
黃芪	Astragali Radix	11.25
炙甘草	Glycyrrhizae Radix	3.75
白朮	Atractylodis Macrocephalae Rhizoam	3.75
當歸	Angelicae Sinensis Radix	3.75
陳皮	Citri Reticulatae Pericarpium	3.75
藿香	Pogostemonis Herba	1.125
蘇葉	Perillae Folium	1.125
Total amount		39.75

2. 시약

Fetal bovine serum (FBS)과 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)은 Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA)와 BioWhittaker (Walkersville, MD, USA)로부터 구입하였고, streptomycin 및 penicillin은 Gibco/BRL (Eggenstein, Germany)에서 구입하였다. Arachidonic acid (AA)와 rhodamine 123은 Calbiochem (Santacruz, CA, USA)로부터 구입하였고, 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)와 ferric nitrilotriacetate acid (Fe-NTA), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoleum (MTT)는 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. HRP-conjugated anti-mouse IgG, HRP-conjugated anti-rabbit IgG, pro-caspase-3 항체는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하였으며, Poly (ADP ribose) polymerase (PARP) 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)로부터 구입하였다. Anti-nitrotyrosine polyclonal antibody는 Millipore Corporation (Temecula, CA, USA)에서, anti-4-Hydroxynonenal polyclonal antibody는 Abcam (Cambridge, UK)에서 구입하였으며, Vectastain Elite ABC kit와 Peroxidase substrate kit는 Vector Lab (Burlingame, CA, USA)에서 구입하였다.

3. 세포배양

In vitro assay에 사용된 HepG2 cell (human hepatocyte-derived cell line)은 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 구입하였으며, DMEM에 10% FBS와 50 mg/ml streptomycin, 50 U/ml penicillin을 혼합한 배지를 사용하여 5%의 CO₂ 및 37°C가 유지되는 incubator (Sanyo, Japan)에서 배양하였다. 실험에 사용된 모든 세포는 confluence가 80-90%가 유지되는 경우 실험에 사용하였고, 또한 20회 이하의 계대배양세포만 사용하였다. HepG2 cell에서 seBYTE의 간세포보호효과를 평가하기 위하여, 배양 후 FBS가 제거된 배지에서 24시간 배양한 후, seBYTE를 DMEM배지에 녹여 처치하고 1시간 후, 10 μm arachidonic acid (AA)를 12시간 후, 5 μm iron을 1시간 처치하였다.

4. 세포생존율 측정 (MTT assay)

세포생존율을 측정하기 위해 24-well plate의 각 well당 HepG2 cell을 3×10⁵개로 well당 0.5ml씩 분주하여 배양한 후, well내의 세포 confluence가 80-90%가 되었을 때, FBS를 제거한 배지만 24시간 배양하였다. 이후 seBYTE를 최종농도 0, 10, 30, 100, 300 μg/ml로 처치하고 1시간 후, 10 μm AA를 12시간, 이후 5 μm iron을 1시간 처치하여 세포생존율을 측정하였다. seBYTE, AA, iron을 순차적으로 처치 후 각 well당 MTT (0.5 μg/ml)용액을 가한 후, 4시간 더 배양하고, 배지를 조심스럽게 제거한 후, MTT를 환원시켜 생성된 formazan crystal에 DMSO (dimethyl sulfoxide)를 더하여 용해시켰다. 이후 570 nm에서 Titertek Multiskan Automatic ELISA multimode reader (Model Infinite 200 PRO, Männedorf, Switzerland)로 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 아래와 같이 control cell에 대한 백분율로 나타내었다.

$$\text{Cell viability (\%)} = \frac{(\text{absorbance of se.BYTE} \div \text{absorbance of Control}) \times 100}{100}$$

5. Immunoblot Analysis

단백질의 발현을 알아보기 위해, 6-well plate에 각 well당 HepG2 cell을 5×10⁵개로 분주하고, seBYTE를 전처치하고, 순차적으로 AA 및 iron을 처치하였다. 처치된 세포에서 전추출액 (whole cell lysate)을 추출하기 위하여 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10% glycerol, 2 mM sodium pyrophosphate, 1% Triton X-100, 137 mM sodium chloride, 1 mM sodium

orthovanadate, 25 mM β -glycerophosphate, 1 mg/ml leupeptin, 2 mM EDTA, 1 mM phenyl methyl sulfonyl fluoride를 포함하는 buffer를 사용하여 세포를 용해시켰다. 이 lysate를 15,000 \times g에서 30분간 원심분리하여 찌꺼기를 제거하고, 세포의 전추출액으로서 상등액을 얻었다. 상등액을 BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA)를 이용하여 정량하고, 정량화된 lysate을 동일하게 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 크기별로 분리시킨 후, acrylamide gel을 amido black으로 염색하여 최종 보정하였다. 보정 후의 용량으로 다시 SDS-PAGE로 분리한 뒤, 단백질을 nitrocellulose membrane으로 electro-transfer하였다. 단백질이 전이된 nitrocellulose membrane에 각각의 항체를 결합시킨 뒤 비특이적 결합을 제거하기 위해 blocking buffer (0.1% Tween 20와 5% non-fat milk을 함유한 PBS 용액)로 1시간 blocking하고, ECL[®] chemiluminescence detection kit (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)로 각 protein band를 발색하였다. 발색 이후 각 단백질의 발현량을 평가하기 위해 image analyzing system (Ultra-Violet Products Ltd., Upland, CA, USA)으로 density를 측정 후 비교하였다.

6. 세포내 활성산소종 생성량 측정

seBYTE의 ROS 소거능을 평가하기 위하여 이전의 방법¹⁴⁾에 따라 DCFH-DA assay를 실시하였다. 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA)는 cell-permeable non-fluorescent probe로서 H₂O₂와 intracellular esterases에 의하여 2',7'-dichlorofluorescein (DCF)로 바뀌며, 이의 형광강도를 측정하여 H₂O₂의 양을 상대적으로 평가한다. 본 연구에서는 HepG2 cell을 48-well plate에 well 당 3 \times 10⁵개로 분주하여 배양하고, seBYTE를 100, 300 μ g/ml로 처리하고, 1시간 후 10 μ M AA를 12시간 처리하고, 이후 5 μ M iron을 1시간 처리하였다. 이후 10 μ M DCFH-DA를 처리하고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 배양한 뒤, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 방법을 통해 측정하였다. DCFH의 형광강도는 excitation 485nm와 emission 530nm로 Titertek Multiskan Automatic ELISA multimode reader을 사용하여 측정하였다.

7. Glutathione (GSH) 함량 측정

GSH 함량을 측정하기 위하여, 6-well plate에 각 well당 HepG2 cell을 5 \times 10⁵개로 분주하고, seBYTE, AA 및 iron을 순차적으로 처리하고, well당 500 μ l의 metaphosphoric acid를 처리하여 용해한 후, GSH detection kit (Oxis International, Portland, OR, USA)를 이용하여 405 nm의 파장으로 microplate reader (Tecan, Huntsville, AL, USA)를 사용하여 측정하였다.

8. Mitochondrial membrane potential (MMP)의 측정

Mitochondrial membrane potential (MMP)은 이전의 방법¹⁵⁾에 따라 membrane-permeable cationic fluorescent 염색약인 Rh123을 이용하여, Partec GmbH FACS Calibur flow cytometer (Münster, Germany)로 측정하였다. seBYTE, AA, iron을 순차적으로 처리한 HepG2 cell에 막 투과성 형광 염색용액인 Rh123 0.05 μ g/ml를 처리하고, 은박지로 차광하여 1시간 염색한 후, trypsin을 처리하여 cell을 tube에 회수하였다. 회수된 세포는 1% FBS를 함유하는 PBS로 세척하고, 샘플당 10,000개의 세포를 FACS로 분석하였다.

9. 실험동물의 사육 및 처치

In vivo study를 위한 실험동물은 6주령 male ICR mouse (25-30 g)를 Samtaco Bio Korea (오산, 한국)로부터 구입하여 1주일 동안 실험실환경에 적응시킨 뒤 실험에 사용하였고, 사육실 환경은 습도 50%, 온도 20-23 $^{\circ}$ C, 12시간 간격으로 light/dark cycle을 유지하고, 사료 (Nestle Purina Petcare Korea, Seoul, Korea)와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다.

아무런 처치를 하지 않은 군을 control군으로 하여 실험하고, 급성 간독성을 유발하기 위하여 corn oil에 녹인 CCl₄를 0.5 ml/kg로 처리하여 간독성을 유발하였다. CCl₄로 간독성을 유발하기 전 3일 동안 seBYTE를 300 mg/kg과 1,000 mg/kg로 투여하고 CCl₄를 처리한 군을 각각 seBYTE 300, seBYTE 1,000군으로 하였고, seBYTE만 1,000 mg/kg 처리한 군을 seBYTE alone으로 하였으며 (Table 2), 각 군의 실험동물 수는 5마리로 하였다. 혈액 및 간조직 샘플은 CCl₄ 처리 24시간 후 채취하여 assay를 실시하였다. 동물실험은 대구한의대학교 동물실험윤리위원회 (IACUC)의

규정에 따라 윤리위원회의 승인 (DHU2016-097)을 획득한 후 시행하였다.

Table 2. Animal Group of This Study

Group	CCl ₄	seBYTE 300 mg/kg	seBYTE 1000 mg/kg
Control	-	-	-
seBYTE alone	-	-	+
CCl ₄	+	-	-
seBYTE 300	+	+	-
seBYTE 1000	+	-	+

10. 혈액생화학적 검사

처치가 종료된 실험동물을 ethyl ether로 마취한 뒤, 복대정맥에서 혈액을 채취하고, 이를 3,000 ×g, 4°C에서 10 분간 원심분리해 상등액의 혈청을 얻었다. 혈청 중 alanine aminotransferase (ALT)와 aspartate aminotransferase (AST)는 Analysis kits (Pointe Scientific Inc., Canton, MI, USA)를 사용하였고, Automated blood chemistry analyzer (Photometer 5010, Robert Riele GmbH & Co KG, Berlin, Germany)를 이용하여 분석하였다.

11. 조직학적 평가

Control, CCl₄, CCl₄와 seBYTE 300 및 1,000 mg/kg 투여군, seBYTE 1,000 mg/kg 단독 투여군의 간 실질 조직의 일부를 채취하여, 10% neutral formalin에 고정시킨 후 일반적인 방법으로 탈수 와 파라핀 포매를 실시하고, 3~4 μm의 절편을 제작하여, hematoxylin-eosin 염색을 실시한 다음 광학현미경하에서 관찰하였으며, 또한 간 실질조직에서 nitrotyrosine (NT) 및 4-hydroxynonenal (4-HNE) 면역반응세포의 변화를 면역조직화학적으로 각각 관찰하였다. 즉, 간조직의 손상 정도를 간세포의 apoptosis, confluent necrosis 및 염증세포의 침윤 정도를 기준으로 하는 modified histological activity index (HAI) semiquantative histopathological scoring system을 이용하여, 최대 10점을 기준으로 평가하였으며 (Table 3), 간 실질 중 변성부위의 비율 (%/mm²), 변성 간세포의 수 (cells/1,000 hepatocytes) 및 침윤 염증세포의 수 (cells/mm²)를 현미경 시야에서 자동영상분석장치 (i Solution FL ver 9.1, IMT i-solution Inc., Vancouver, Quebec, Canada)를 이용하여 각각 평가하였고, 1,000개의 간세포 중 세포질의 20% 이상이 NT 및 4-HNE 에 면역 염색된 양성 면역반응 세포의 수적 변화 역시 각각 관찰하였다.

Table 3. Modified HAI Grading: Inflammatory Scores Used in This Study

A. Confluent necrosis	
Absent	0
Focal confluent necrosis	1
Zone 3 necrosis in some areas	2
Zone 3 necrosis in most areas	3
Zone 3 necrosis + occasional portal-central bridging	4
Zone 3 necrosis + multiple portal-central bridging	5
Panacinar or multiacinar necrosis	6
B. Focal (spotty) lytic necrosis, apoptosis and focal inflammation	
Absent	0
One focus or less per 10× objective	1
Two to four foci per 10× objective	2
Five to ten foci per 10× objective	3
More than ten foci per 10× objective	4

HAI grading scores = A + B

Possible maximum total scores = 10

Modified from the method described by Ishak et al¹⁶⁾.

12. 간조직에서 pro-caspase-3 단백질 발현 측정

seBYTE과 CCl₄를 순차적으로 처치하고, CCl₄ 처리 후 24시간에 간조직을 채취하여 assay를 실시하였다. 채취한 간조직 0.1 g에 1 ml의 total lysis buffer를 넣고 균질화한 후 4°C에서 20분 동안 15,000 ×g로 원심분리하여 상층액을 얻고, 이 상층액을 bicinchoninic acid assay로 정량해 실험에 사용하였다. 정량화된 protein 20 μg을 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis로 전기영동한 후 NC paper로 단백질을 전이시켰다. NC paper를 pro-caspase-3 antibody에 반응시킨 후 2차 항체로 반응시킨 후 ECL kit (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA)로 pro-caspase-3의 발현을 확인하였다.

13. 통계적 검증

실험 결과는 mean ± SD로 나타내었고, 처치군 사이의 통계적 유의성은 one way ANOVA로 검정하였다 (p<0.05 또는 p<0.01). 사후검정은 등분산 가정이 성립 하였을 때에는 Least-significant difference multi-comparison (LSD) test (*in vivo* study)와 Tukey HSD test (*in vitro* study)를 이용하였고, 등분산 가정이 성립하지 않았을 때에는 Mann-Whitney U

(MW) (*in vivo* study) test와 Tamhane test (*in vitro* study)를 실시하였다.

III. 실험결과

1. seBYTE 의 AA + iron 으로 유도된 세포독성 및 세포자멸사 억제효과

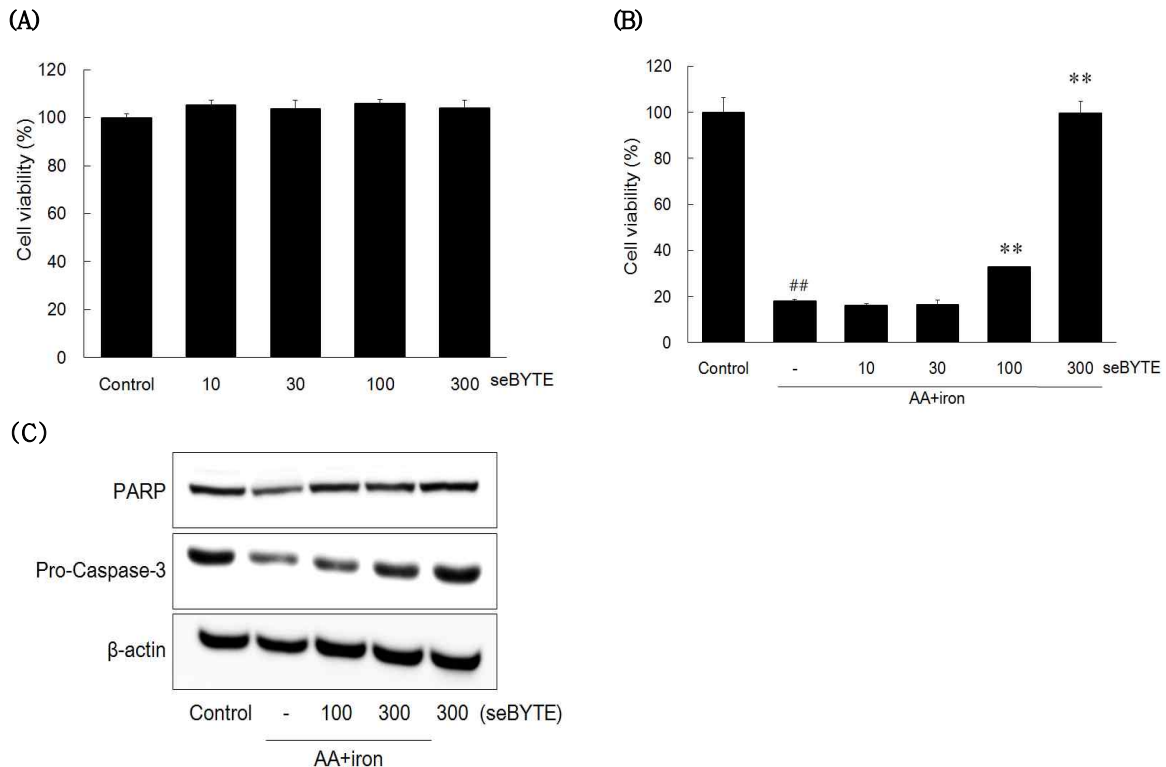
seBYTE의 세포독성을 평가하기 위하여 MTT assay로 세포생존율을 평가하였다. seBYTE를 10, 30, 100, 300 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 24시간 처리한 결과 control군의 세포생존율 100.00 \pm 1.66에 비교하여, seBYTE 10, 30, 100, 300 $\mu\text{g/ml}$ 처리군에서는 각각 105.18 \pm 2.16, 103.74 \pm 3.61, 105.78 \pm 1.88, 103.92 \pm 3.35로 유의한 세포독성을 나타내지 않았다 (Fig. 1A).

세포독성을 나타내지 않는 seBYTE 10, 30, 100, 300 $\mu\text{g/ml}$ 을 1시간 전처리한 후, 10 μM 의 AA를 12시간 처리한 후, 5 μM 의 iron을 처리한 후, seBYTE의 세포독성 억제효과를 평가하였다. 연구결과 control군의 세포생존율 100.00 \pm 6.24에 비교하여, AA + iron

처리군은 17.87 \pm 0.84로서 유의한 세포독성을 나타내었다. 그러나 이러한 AA + iron의 세포독성은 seBYTE 100, 300 $\mu\text{g/ml}$ 군에서 각각 32.72 \pm 0.43, 99.51 \pm 5.22로 유의하게 세포독성이 억제되었다 (Fig. 1B).

AA와 iron의 병용처치로 유도되는 산화적 스트레스는 세포자멸사를 유도한다는 보고가 다수의 연구를 통해 입증되었다¹⁷⁾. 따라서 seBYTE가 AA + iron으로 유도된 세포자멸사를 억제할 수 있는지를 평가하였다. PARP의 발현은 AA + iron처리군이 0.71 \pm 0.06이었으며, seBYTE 100과 300 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 0.99 \pm 0.08, 1.06 \pm 0.14배로 유의하게 증가하였으며 (Fig. 1C and D), pro-caspase-3의 발현은 AA + iron처리군이 0.76 \pm 0.02배로 유의하게 감소하였으며, seBYTE 100과 300 $\mu\text{g/ml}$ 에서 각각 0.83 \pm 0.01, 1.11 \pm 0.12배로 유의하게 증가하였다 (Fig. 1C and E)

이러한 결과는 seBYTE가 AA + iron으로 유도되는 세포독성을 억제하고, 이러한 세포독성의 억제에는 세포자멸사의 억제가 관여됨을 나타낸다.



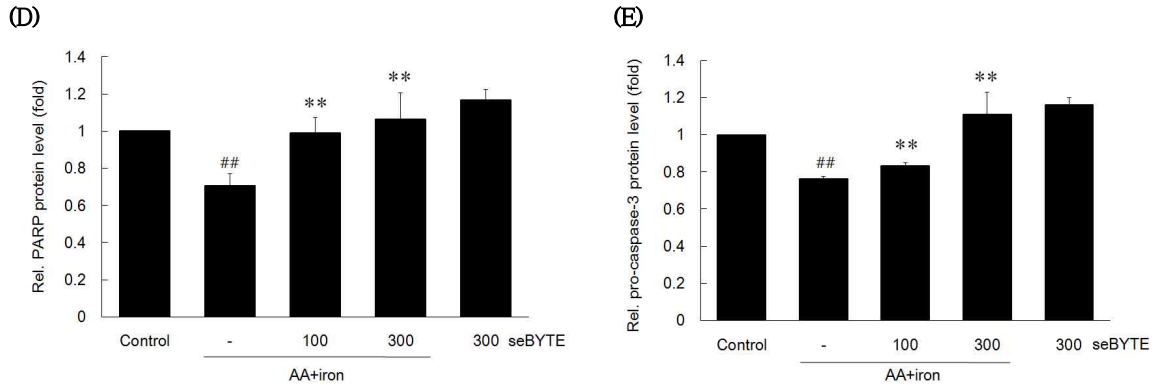


Fig. 1. The effect of seBYTE on AA + iron-induced cell death.

The effect of seBYTE on cell viability were assessed using MTT assay. (A) HepG2 cells were incubated in 10, 30, 100, 300 $\mu\text{g/ml}$ of seBYTE alone for 24 h. (B) HepG2 cells were incubated in 10, 30, 100, 300 $\mu\text{g/ml}$ of seBYTE for 1h and were continuously incubated with 10 μM arachidonic acid (AA) for 12 h, followed by treatment of 5 μM iron for 1 h. (C) Immunoblottings of apoptosis-related proteins. Immunoblot analyses were performed on the lysates of HepG2 cells that had been incubated with 100 and 300 $\mu\text{g/ml}$ seBYTE for 1 h, continuously treated with 10 μM AA for 12 h, and then exposed to 5 μM iron for 1 h. Immunoblotting of β -actin was used as a loading control. The relative density levels of PARP and pro-caspase-3 protein bands were measured by scanning densitometry (D and E). Data represent the mean \pm SD of four replicates (significant as compared with vehicle-treated control, ## p <0.01; significant as compared with AA + iron alone, ** p <0.01).

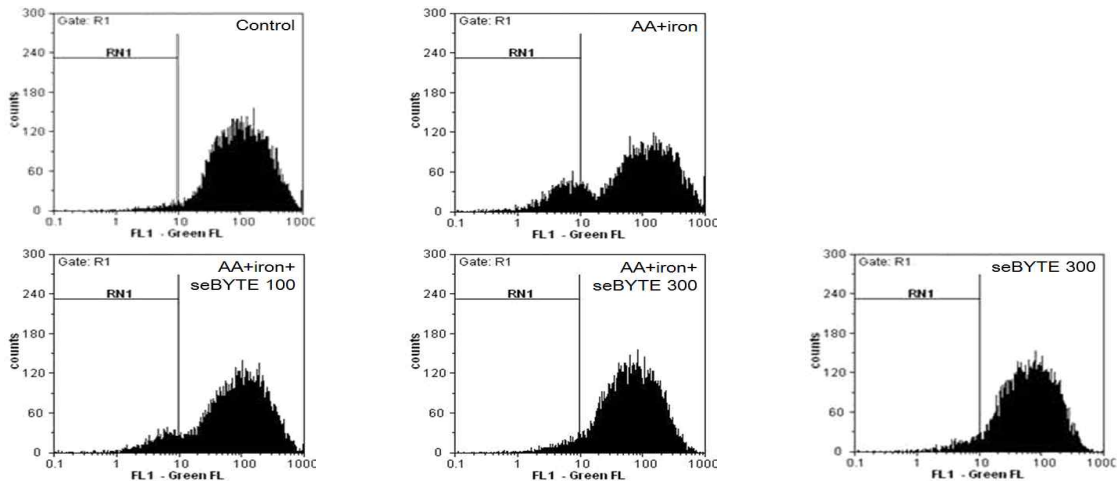
2. seBYTE의 AA + iron으로 유도된 mitochondrial dysfunction 억제효과

AA와 iron의 병용처치는 산화적 스트레스를 유발하고, 이러한 산화적 스트레스에 따라 유발되는 세포자멸사에는 미토콘드리아의 막전위손상에 의한 미토콘드리아 막투과성 (mitochondrial membrane potential; MMP) 증가로 인해 유도되는 것으로 알려져 있다¹⁸⁾. 그러므로 본 연구에서도 seBYTE가 AA + iron으로

유도되는 mitochondrial dysfunction을 억제할 수 있는지를 평가하였다.

RN1 fraction은 AA + iron군에서 $16.63 \pm 0.96\%$ 로 유의하게 증가하였으나, seBYTE 100과 300 $\mu\text{g/ml}$ 에 의하여 각각 12.03 ± 2.61 , 10.22 ± 3.41 (%)로 유의하게 감소되었다 (Fig. 2). 이러한 결과는 seBYTE가 산화적 스트레스로 유도되는 mitochondrial dysfunction을 억제함을 나타낸다.

(A)



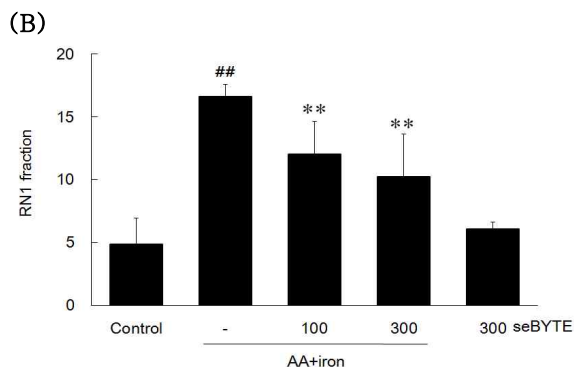


Fig. 2. Protective effect of seBYTE on AA + iron-induced mitochondrial dysfunction.

HepG2 cells were treated with seBYTE for 1 h, AA (10 μ m) for 12 h, followed by iron (5 μ m) for 1 h. (A) Mitochondrial membrane potential permeability. After treatment of seBYTE, AA and iron, HepG2 cells were stained with Rhodamin 123 (0.05 μ g/ml/well) for 0.5 h and measured fluorescence intensity using FACS. AA + iron treated-cells increased the subpopulation of RN1 fraction (low Rho 123 fluorescence), as indicated by the left shift of population. But seBYTE reduced the population of RN1 fraction. (B) Relative percentage of RN1 fraction. Data represent the mean \pm SD of four replicates (significant as compared with vehicle-treated control, ## p <0.01; significant as compared with AA + iron alone, ** p <0.01).

3. seBYTE의 AA + iron으로 유도된 산화적 스트레스 억제효과

seBYTE의 항산화 활성을 평가하기 위하여 AA와 iron의 병용치치로 산화적 스트레스를 유발한 후, H₂O₂의 농도를 측정하였다. DCF의 형광강도는 AA + iron에 의하여 control 대비 5.80 \pm 0.32배로 유의하게 증가하였으며, seBYTE 300 μ g/ml에 의하여서는 2.96 \pm 0.05배로 AA + iron에 비교하여 유의하게 감소하였다 (Fig. 3A).

또한 AA와 iron의 병용치치에 의해 유도되는 세포자멸

사에는 세포내 환원형 glutathione (GSH)의 고갈을 통한 산화적 스트레스가 매개됨이 다수 보고되어 있으며¹⁹⁾, GSH는 독성물질의 배출을 촉진시킴으로써 간손상을 막아주는 항산화 물질로서²⁰⁾ 세포내 GSH의 고갈은 체내의 항산화 기전을 적절하게 조절할 수 없게 되고 세포독성을 유도한다. 연구결과 GSH의 함량은 AA + iron에 의하여 control 대비 0.53 \pm 0.03배로 유의하게 감소하였으나, seBYTE 300 μ g/ml에 의하여 0.77 \pm 0.02배로 AA + iron에 비교하여 유의하게 증가하였다 (Fig. 3B).

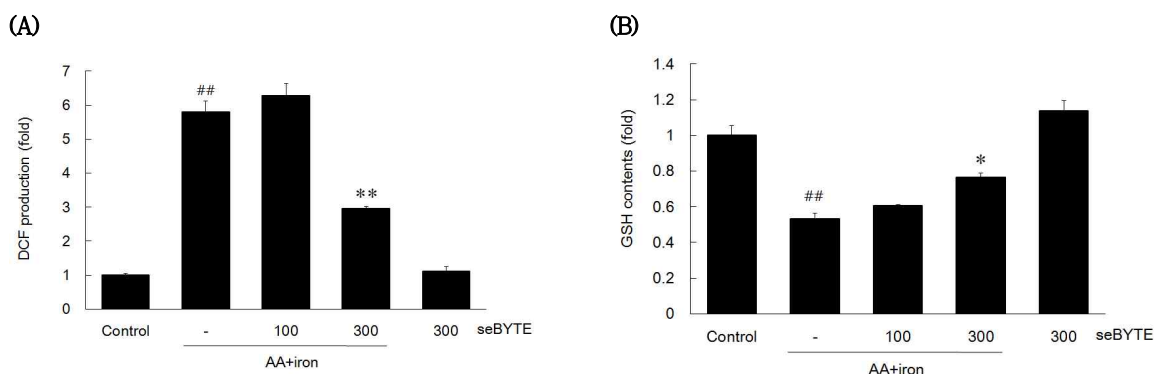


Fig. 3. The effect of seBYTE on Oxidative Stress.

HepG2 cells were treated with seBYTE for 1 h, AA (10 μ m) for 12 h, followed by iron (5 μ m) for 1 h. DCFH-DA (10 μ m) was added 0.5 h after iron treatment. DCF fluorescence was measured by automated microplate reader (A). For the GSH contents metaphosphoric acid (500 μ l/well) was added after iron treatment. GSH contents were measured by automated microplate reader at 405 nm wavelength. Data represent the mean \pm SD of four replicates (significant as compared with vehicle-treated control, ## p <0.01; significant as compared with AA + iron alone, * p <0.05, ** p <0.01).

4. seBYTE의 CCl₄에 의한 간손상 억제효과

일반적으로 간손상이 발생하면 다량의 AST, ALT, LDH 등이 혈중으로 분비되며²¹⁾, ALT는 간손상에서 민감하게 증가하므로 AST와 함께 간손상의 유력한 지표로 활용되고 있다²²⁾. 사업화탄소(CCl₄)는 간조직에 산화적 스트레스를 유발하고, 이는 간세포 손상과 간조직 괴사를 동반하는 염증성 간질환을 유도하는 것으로 알려져 있다²³⁾.

연구 결과 ALT에서 정상군 및 seBYTE 단독처치군은 각각 6.00 ± 0.71, 6.60 ± 0.24 (IU/ml)로서 두 군 모두 within normal limit (WNL)이었으며, CCl₄ 투여군은 570.60 ± 60.38 IU/ml로 control 대비 유

의한 간손상을 유발하였다. 그러나 이러한 ALT의 증가는 seBYTE 300과 1,000 mg/kg 투여군에서는 각각 271.20 ± 87.78, 222.60 ± 52.08 (IU/ml)으로 CCl₄ 투여군에 비해 유의하게 감소하였다 (Fig. 4A). 또한 AST에서는 정상군 및 seBYTE 단독처치군이 각각 10.20 ± 0.20, 8.20 ± 0.49 (IU/ml)로서 WNL이었으며, CCl₄ 투여군은 858.60 ± 49.71 IU/ml로 control 대비 유의한 간손상을 유발하였다. seBYTE 300 mg/kg에서는 635.25 ± 188.01로 CCl₄ 투여군에 비하여 감소하였으나, 통계적 유의성은 없었으며, seBYTE 1,000 mg/kg 투여군에서는 576.80 ± 87.29 IU/ml로 유의하게 감소하였다 (Fig. 4B).

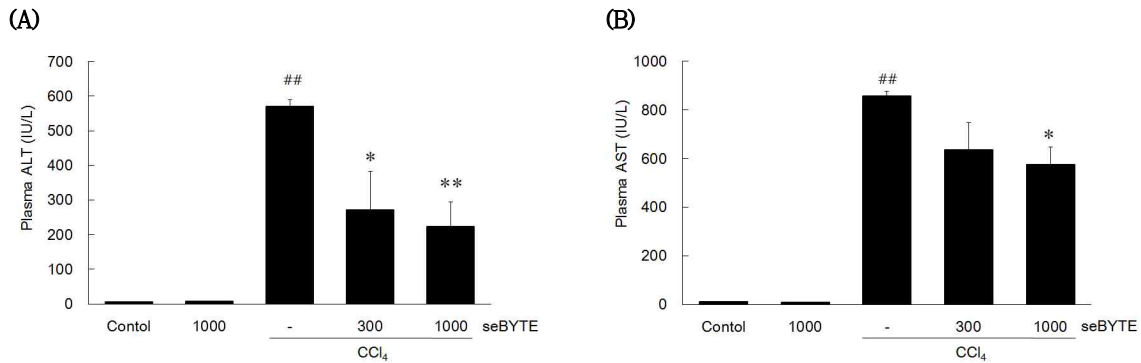


Fig. 4. Effects of seBYTE on CCl₄-induced liver injury.

Mice were treated were orally pretreated with 300 and 1,000 mg/kg seBYTE for 3 days followed by a single injection of CCl₄ (0.5 ml/kg, ip). The (A) alanine aminotransferase (ALT) and (B) aspartate aminotransferase (AST) activities were monitored in the plasma of mice using Analysis kits and Automated blood chemistry analyzer. Values represent mean ± SD (significantly different from vehicle-treated control, ##p<0.01; significantly different from CCl₄, *p<0.05, **p<0.01).

5. seBYTE의 CCl₄에 의한 조직학적 간손상 억제효과

CCl₄에 의한 급성 간독성에 대한 seBYTE의 효과를 연구하기 위해 조직학적 평가를 시행하였다. 본 연구에서는 HAI score, 간실질 부위 중의 변성비율 (%/mm² of hepatic parenchyma), 변성 간실질세포의 수 (cells/1,000 hepatocytes) 및 침윤 염증세포의 수 (cells/mm² of hepatic parenchyma)를 평가하였다.

HAI score에서 control은 0.40 ± 0.55이었으며, CCl₄에 의해 7.80 ± 0.84로 control 대비 유의하게 증가되었으며, 이러한 HAI score의 증가는 seBYTE 300, 1,000 mg/kg에 의하여 각각 4.40 ± 0.55, 3.80 ± 0.84로 CCl₄에 비교하여 유의하게 감소하였다. 간실질 부위 중의 변성비율은 control에서는 2.46 ± 2.28 %/mm²를 나타내었으며, CCl₄에 의해서는 77.79 ± 11.76 %/mm²로

유의하게 증가되었다. 그러나 이러한 간 변성율의 증가는 seBYTE 300, 1,000 mg/kg에 의하여 각각 47.33 ± 6.03, 42.64 ± 8.64 (%/mm²)로 유의하게 감소하였다. 변성된 간실질세포의 수 또한 control에서는 29.40 ± 16.26 개를 나타내었으며, CCl₄에 의해서는 796.60 ± 130.99 개로 유의하게 증가되었다. 그러나 이러한 변성 간실질세포의 수는 seBYTE 300, 1,000 mg/kg에 의하여 각각 487.40 ± 64.07, 429.20 ± 110.32 개로 유의하게 감소하였다. 염증세포의 침윤 수는 control에서는 27.40 ± 10.38 개를 나타내었으며, CCl₄에 의해서는 279.60 ± 38.66 개로 유의하게 증가되었다. 그러나 이러한 침윤 염증세포의 증가는 seBYTE 300, 1,000 mg/kg에 의하여 각각 122.00 ± 33.41, 89.00 ± 12.25 개로 유의하게

감소하였다. seBYTE 1,000 mg/kg 단독 처치군은 HAI score, 간실질 부위 중 변성비율, 변성 간세포의

수 및 침윤 염증세포의 수에서 control과 비교하여 유의한 변화를 나타내지 않았다 (Fig. 5, Table 4).

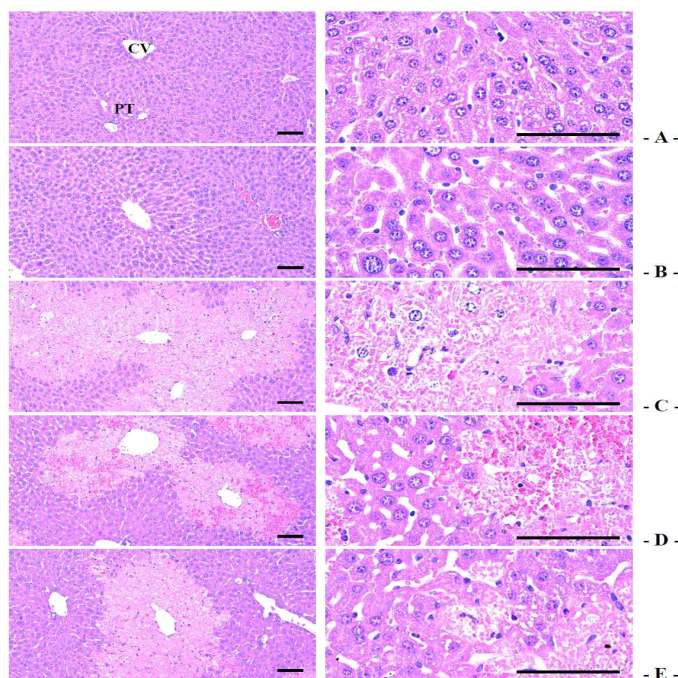


Fig. 5. Representative general histopathological profiles of the hepatic tissues, taken from intact or acute CCl₄-treated mouse with/without seBYTE administration.

Note that degenerative changes on the hepatic tissues—centrolobular necrosis including ballooning of hepatocytes, deposit of lipid droplets in hepatocytes (fatty changed cells), and infiltration of inflammatory cells were detected at histopathological observation in the lateral lobes, respectively. However, these CCl₄ treatment-related acute hepatic damages were significantly and dose-dependently inhibited by additional treatment of seBYTE 300 and 1,000 mg/kg as compared with CCl₄.

A = Control mice, B = seBYTE 1,000 mg/kg mice, C = CCl₄ treated mice, D = CCl₄ with seBYTE 300 mg/kg treated mice, E = CCl₄ with seBYTE 1,000 mg/kg treated mice. HAI = Histological activity index, CV = Central vein, PT = Portal triad regions.

All Hematoxylin-eosin stain. Scale bars = 120 μm.

Table. 4 General Histomorphometrical Analysis of Mouse Hepatic Tissues

Groups Index	General histomorphometry			
	Histological Activity Index (Scores; Max = 10)	Percentages of degenerative regions (%/mm ²)	Numbers of degenerative hepatocytes (cells/1000 hepatocytes)	Numbers of inflammatory cells infiltrated(cells/mm ²)
Control	0.40 ± 0.55	2.46 ± 2.28	29.40 ± 16.26	27.40 ± 10.38
seBYTE 1,000 mg/kg	0.40 ± 0.55	2.30 ± 1.87	27.00 ± 12.78	25.80 ± 11.01
CCl ₄	7.80 ± 0.84 ^a	77.79 ± 11.76 ^c	796.60 ± 130.99 ^c	279.60 ± 38.66 ^c
CCl ₄ + 300 mg/kg	4.40 ± 0.55 ^{ab}	47.33 ± 6.03 ^{cd}	487.40 ± 64.07 ^{cd}	122.00 ± 33.41 ^{cd}
CCl ₄ + 1,000 mg/kg	3.80 ± 0.84 ^{ab}	42.64 ± 8.64 ^{cd}	429.20 ± 110.32 ^{cd}	89.00 ± 12.25 ^{cd}

Values are expressed as mean ± SD of five histological fields.

^a p<0.01 as compared with intact vehicle control by LSD test ^cp<0.01 as compared with control by MWtest

^b p<0.01 as compared with CCl₄ control by LSD test ^dp<0.01 as compared with CCl₄ by MWtest

8. CCl₄로 유도된 산화적 스트레스에 대한 seBYTE의 간세포보호효과

CCl₄는 간조직 내에서 cytochrome P450 2E1에 의해 대사되는 과정에서 미토콘드리아 막 및 세포막 투과성의 변화와 활성 산소 생성의 증가를 통해 산화적 스트레스를 유발하여 nitrotyrosine (NT)의 형성과 4-hydroxynonenal (4-HNE)의 형성을 증가시킨다²⁴⁾.

NT 양성세포의 수는 control에서 7.60 ± 5.94 개이었으며, CCl₄에서는 651.00 ± 62.55 개로 유의하게 증가되었다. 그러나 이러한 NT 양성세포의 증가는 seBYTE

300, 1,000 mg/kg에 의하여 각각 409.40 ± 77.33, 319.20 ± 69.53 개로 유의하게 감소하였다. 4-HNE 양성세포의 수는 control에서 4.80 ± 2.28 개이었으며, CCl₄에서는 741.00 ± 69.93 개로 유의하게 증가되었다. 그러나 이러한 4-HNE 양성세포의 증가는 seBYTE 300, 1,000 mg/kg에 의하여 각각 429.20 ± 68.48, 339.20 ± 76.09 개로 유의하게 감소하였다. seBYTE 1,000 mg/kg 단독 처치군은 NT 및 4-HNE 양성세포의 수가 각각 5.40 ± 4.56, 5.00 ± 3.39개로서 control과 비교하여 유의한 변화를 나타내지 않았다 (Fig. 6, Table 5).

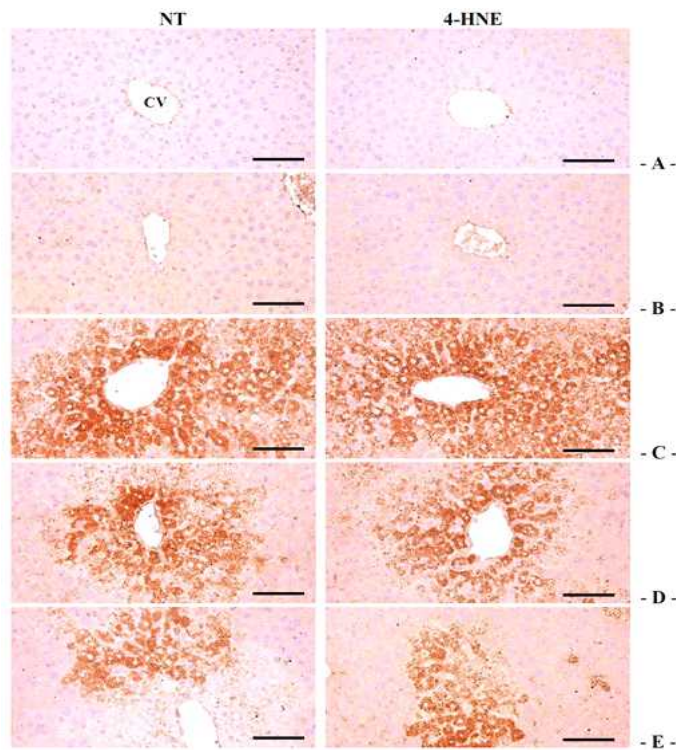


Fig. 6. Representative NT and 4-HNE immunoreactivities of the hepatic tissues, taken from intact or acute CCl₄-treated mouse with/without seBYTE administration.

Marked and significant increases of NT and 4-HNE immunoreactive cells were observed in CCl₄ as compared with control, but they were also significantly and dose-dependently reduced by additional treatment of seBYTE 300 and 1,000 mg/kg as compared with CCl₄, in this histopathological experiment. No significant changes on the hepatic NT and 4-HNE immunolabeled cell numbers were demonstrated in seBYTE 1,000 mg/kg treated mice as compared with those of control, in the current immunohistochemical measurement.

A = Control mice, B = seBYTE 1,000 mg/kg mice, C = CCl₄ treated mice, D = CCl₄ with seBYTE 300 mg/kg treated mice, E = CCl₄ with seBYTE 1,000 mg/kg treated mice. HAI = Histological activity index, CV = Central vein, PT = Portal triad regions.

CV = Central vein, NT = Nitrotyrosine, 4-HNE = 4-Hydroxynonenal.

Immunoreactive cells were stained by avidin-biotin-peroxidase methods.

Scale bars = 120 μm.

Table 5. Immunohistochemical-Histomorphometrical Analysis of Mouse Hepatic Tissues

Groups	Positive cells by immunohistochemistry (cells/1000 hepatocytes)	
	Nitrotyrosine	4-Hydroxynonenal
Control	7.60 ± 5.94	4.80 ± 2.28
seBYTE 1,000 mg/kg	5.40 ± 4.56	5.00 ± 3.39
CCl ₄	651.00 ± 62.55 ^a	741.00 ± 69.93 ^a
CCl ₄ + 300 mg/kg	409.40 ± 77.33 ^{ab}	429.20 ± 68.48 ^{ab}
CCl ₄ + 1,000 mg/kg	319.20 ± 69.53 ^{ab}	339.20 ± 76.09 ^{ab}

Values are expressed as mean ± SD of five histological fields

^a p<0.01 as compared with control by MW test, ^b p<0.01 as compared with CCl₄ by MW test

9. CCl₄로 유도된 간세포자멸사에 미치는 seBYTE의 효과

CCl₄로 유도된 급성 간손상 동물모델에서 세포자멸사에 미치는 seBYTE의 효과를 평가하였다. Immunoblot analysis를 통해 pro-caspase-3의 양을 측정된 결과, CCl₄에 의해 유도된 pro-caspase-3의 발현은 control

에 비교하여 감소를 나타내었다 (Fig. 7). 그러나 이러한 감소는 *in vitro*의 결과와 유사하게 1,000 mg/kg의 seBYTE 전처리에 의해 현저히 증가되는 것을 관찰할 수 있었다.

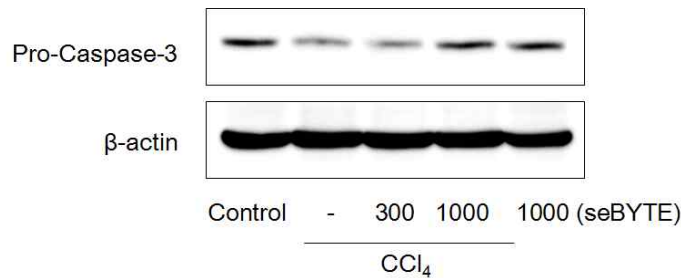


Fig. 7. The effect of seBYTE on apoptosis marker protein in CCl₄-induced liver damage.

Pro-caspase-3 level was observed in mice treated with CCl₄ +/- seBYTE (300 and 1,000 mg/kg for 4 days) treatment. Immunoblot assessed in the liver samples, which were obtained 24 after CCl₄ treatment. β-actin was used as a loading control.

IV. 고찰

소음인보중익기탕은 李濟馬의 <東醫壽世保元>에 收載된 方劑로, 李東垣 <脾胃論>의 보중익기탕중 柴胡와 升麻를 藿香과 蘇葉으로 바꾸고, 人蔘과 黃芪를 증량한 方劑이다^{6,7)}.

<脾胃論>의 보중익기탕에 대한 연구로는 methotrexate로 유도된 면역저하모델에서 면역세포의 증가²⁵⁾, elevated plus-maze test를 이용한 동물모델에서의 항불안효과²⁶⁾, 방사선 조사에 대한 세포보호효과 및 항암효과²¹⁾, cyclophosphamide에 의한 부작용감소효과^{10,11)}, alloxan유도 당뇨모델에서 혈당강하작용⁹⁾ 및 항산화작용¹⁰⁾, urethane유도 폐암모델에서의 항암효과³¹⁾, ovalbumin으

로 유도된 알레르기에서 cytokine 및 total IgE 억제 효과³²⁾, LPS와 LPS+IFN-γ로 활성화된 *in vitro* 모델에서 염증매개물질의 억제효과³³⁾ 및 항산화작용을 통한 항노화작용³⁴⁾ 등 다양한 방면에서 연구가 이루어졌다.

<東醫壽世保元>의 소음인보중익기탕에 대한 연구로는 소음인보중익기탕의 적응증 확장 연구⁸⁾, alloxan으로 유도된 당뇨모델에서의 혈당강하작용 및 항산화작용^{9,10)}, mice의 적출회장에서서의 이완효과¹¹⁾, 항스트레스효과³⁵⁾, 항암작용 및 항암제에 의한 부작용 감소 효과^{12,13)}, sodium levothyroxin에 의한 세포성 및 체액성면역반응저하, 체중저하에 대한 회복효과³⁶⁾, 세포성, 체액성 면역증가효과 및 NK cell 활성화 증가 효과³⁷⁾, 陽虛病證 개선효과 등이 보고되었으나³⁸⁾, 아



직까지 산화적 스트레스에 의한 간세포보호작용에 대해서는 보고된 바가 없었다.

따라서 본 연구에서는 소음인보중익기탕 열수추출물 (seBYTE)이 산화적 스트레스에 의해 유도되는 간손상에 대한 세포보호효과를 평가하였다. *In vitro* 모델로서는 HepG2 세포주에 AA + iron을 처치하여 산화적 스트레스를 유발하여 seBYTE의 간세포보호효과를 평가하였고, *in vivo* 모델에서는 CCl₄에 의해 유발되는 급성 간손상에 대한 seBYTE의 세포보호효과를 관찰하였다.

인체는 에너지 생산과정에서 필연적으로 활성산소종 (ROS)을 생성하며, 과잉 생성된 ROS는 체내 항산화시스템에 의하여 적절하게 제거된다¹⁾. 그러나 ROS의 과도한 생성 또는 체내 항산화능이 저하되면 ROS는 산화적 스트레스를 유발한다²⁾. 또한 산화적 스트레스는 세포독성으로 인한 세포자멸사 외에도 염증 매개물질의 유리를 통해 조직손상을 유발하여 급만성 간질환의 주요 원인이 되는 것으로 알려져 있다³⁹⁾. 과도하게 형성된 ROS는 산화적 스트레스를 유발하여 phospholipase A₂ (PLA₂)를 활성화하여 세포막의 지방산과 인지질을 인산화시킴으로써 아라키돈산 (arachidonic acid; AA)을 유리한다⁴⁰⁾. AA는 cyclooxygenase-1, -2 또는 peroxidase 등의 prostaglandin H₂ (PGH₂) synthase에 PGH₂를 유도하고, 또한 FLAP, Alox5 등의 lipooxygenase에 의해 leukotriene을 유도하여 염증반응에 관여하고⁴¹⁾, 에스테르화되지 않은 AA (unesterified AA)는 neutral sphingomyelinase를 활성화하여 sphingomyelin을 2차 신호전달자인 ceramide로 전환시키고, ceramide는 caspase를 활성화하여 세포자멸사를 유도한다^{39,40)}.

Iron은 장에서 흡수되어 주로 간에 저장된다. 간에서 iron은 Fenton반응을 통해 hydroxyl radical을 생성하는 과정을 촉매하고, hydroxyl radical은 지질과산화 및 세포내 단백질을 손상시켜 세포독성을 나타낸다¹⁷⁾. 이와 더불어 AA와 iron을 HepG2 세포에 병용 처치하였을 때 산화적 스트레스를 매개로한 세포자멸사가 증가되는 것이 보고되었으며⁴²⁾, 만성 간염, 간경화, 용혈성 간독성과 같은 병리상태에서는 간조직내 비정상적 iron의 축적으로 인해 AA를 포함한 염증매개인자의 유리가 촉진된다는 것이 보고되었다⁴³⁾.

또한 대표적인 간독성 유발물질인 CCl₄는 cytochrome

(CYP) 2E1, CYP2B1, CYP2B2 또는 CYP3A에 의하여 trichloromethyl radical (CCl₃·)을 형성하고, CCl₃·는 세포내 nucleic acid, protein, lipid 등의 분자들과 결합하여 지방대사 등에 핵심적 손상을 유도하여 지방변성을 통한 steatosis를 초래하고, DNA 손상을 유도하므로 간암의 개시자로서 인식되고 있다⁴⁴⁾. 그리고 CCl₃·는 O₂와 반응하여 고반응성의 trichloromethylperoxy radical (CCl₃OO·)을 형성하고, CCl₃OO·는 세포막의 인지질을 공격 및 파괴하여 지질의 과산화를 유발한다. 이러한 지질의 과산화는 미토콘드리아 막투과성, DNA, endoplasmic reticulum, 세포막을 포함하는 주요 세포구조물에 유독한 영향을 미쳐 간세포의 손상을 유발한다⁴⁵⁾.

먼저 *in vitro* 연구로서, seBYTE의 세포독성을 평가하였다. seBYTE는 10, 30, 100, 300 µg/ml의 농도에서 control군의 세포생존율에 비교하여 어떠한 세포독성도 나타내지 않았으며, 세포독성을 나타내지 않는 100, 300 µg/ml의 seBYTE는 10 µM AA와 5 µM iron을 병용처치한 세포독성을 유의하게 억제하였다. 이전의 연구¹⁷⁾에서 AA와 iron의 병용처치는 산화적 스트레스를 유발하고, 이러한 산화적 스트레스에 따라 세포자멸사를 유도하는 것으로 보고되었다. 본 연구에서도 세포자멸사와 관련된 full length PARP 단백질의 발현은 AA + iron에 의하여 control에 비하여 유의하게 감소하였으나, seBYTE 100과 300 µg/ml에 의하여 유의하게 증가하였으며, pro-caspase-3의 발현 역시 AA + iron에 의하여 유의하게 감소하였고, seBYTE 100과 300 µg/ml에 의하여 유의하게 증가하였다. 이러한 결과는 이전의 연구결과들⁴⁶⁾과 동일하게 AA + iron이 세포자멸사를 경유하는 세포독성을 유발하고, seBYTE는 AA + iron으로 유도되는 세포독성을 억제하고, 세포독성의 억제에는 세포자멸사의 억제가 관여됨을 나타낸다. 이러한 AA와 iron의 병용 처치에 의한 세포자멸사에는 미토콘드리아의 막전위 손상에 의한 미토콘드리아 막투과성 (mitochondrial membrane potential; MMP) 증가에서 기인함이 잘 알려져 있다¹⁸⁾. 본 연구에서도 control군은 4.88 ± 2.07%의 RN1 fraction을 나타내었으나, AA + iron 병용 처치군에서는 RN1 fraction이 16.63 ± 0.96%로 유의하게 증가되었고, 이러한 미토콘드리아의 막전위 손상은 seBYTE 100과 300 µg/ml에 의하여 각각 12.03 ± 2.61, 10.22 ± 3.41 (%)로 유의하게 감

소되었다. 이러한 결과는 seBYTE가 산화적 스트레스로 유도되는 세포자멸사를 억제함에는 seBYTE의 미토콘드리아 보호효과가 개재되고 있음을 나타낸다.

세포사멸과 mitochondrial dysfunction에는 AA + iron에 의한 산화적 스트레스가 매개되므로, seBYTE의 항산화능을 평가하였다. 세포내의 ROS를 DCFH-DA로 H₂O₂에 의하여 DCF로 산화된 형광강도를 측정된 결과, AA + iron은 control 대비 5.80 ± 0.32배의 ROS를 생성하였으며, seBYTE 300 µg/ml에 의하여서는 2.96 ± 0.05배로 AA + iron에 비교하여 ROS의 생성을 유의하게 감소하였다. 또한, 산화적 스트레스는 ROS의 과다한 생성뿐만 아니라, 체내 항산화능의 저하에서도 기인하므로, 세포내 GSH의 함량을 평가하였다. GSH는 간손상을 막아주는 항산화 물질로서²⁰⁾ 세포내 GSH의 고갈은 체내의 항산화 기전을 적절하게 조절할 수 없게 되고 세포독성을 유도하는 것으로 알려져 있으며, 이미 이전의 연구¹⁹⁾에서도 AA와 iron의 병용 처치는 세포내 환원형 GSH의 고갈을 통해 산화적 스트레스가 매개됨이 다수 보고되었다. 본 연구에서 seBYTE 300 µg/ml는 AA + iron에 의해 유도되는 GSH의 고갈을 유의하게 억제시켰다. 이러한 연구결과는 seBYTE가 산화적 스트레스를 억제하고, 이로 말미암아 간세포보호효과를 나타냄을 의미한다.

*In vitro*에서 seBYTE의 항산화 효능을 확인한 후, seBYTE의 항산화 효능을 *in vivo*에서 평가하기 위하여 사염화탄소(CCl₄)로 유도된 급성 간손상모델로 평가하였다. CCl₄는 간조직에 산화적 스트레스를 유발하여 간조직 괴사와 간세포 손상을 동반하는 염증성 간질환을 유도하는 것으로 알려져 있다²³⁾. 연구 결과 ALT 및 AST는 정상군 및 seBYTE 단독처치군에서 모두 정상소견을 나타내었고, CCl₄ 투여군은 570.60 ± 60.38 및 858.60 ± 49.71 IU/ml로 control 대비 유의한 간손상을 유발하였고, 이러한 급성 간손상 소견은 seBYTE 300 mg/kg (ALT) 및 seBYTE 1,000 mg/kg (ALT, AST)에 의하여 유의하게 감소하였다.

CCl₄는 지질 침착을 통하여 간실질세포의 공포화 및 팽윤을 유도하고, 또한 염증세포의 침윤을 통하여 중심정맥 부위의 간세포의 괴사를 유도한다⁴⁷⁾. 본 연구에서는 HAI score, 간실질 부위의 변성비율, 변성 간세포의 수 및 침윤 염증세포의 수를 평가하였다. CCl₄의 처치에 의해 HAI score 및 간실질 부위의 변성비율, 변성 간세포의 수, 침윤 염증세포의 수는 모

두 control에 비교하여 유의한 간손상을 초래하였으며, 이러한 증가된 간손상의 지표들은 seBYTE 300, 1,000 mg/kg에 의하여 CCl₄에 비교하여 유의하게 감소하였다.

Nitrotyrosine (NT)은 peroxyntirite anion, 이산화질소와 같은 활성질소종 (reactive nitrogen species; RNS)에 의해 매개되는 tyrosine nitration 화합물로서, NT는 세포 손상, 염증 및 NO 생성의 지표로 활용된다. 일반적으로 산화적 스트레스는 superoxide (O₂⁻)와 NO 형성, peroxyntirite (ONOO⁻)를 유도하며, 생성된 ONOO⁻는 lipoprotein을 산화시키고, 또한 단백질의 tyrosine 잔기를 nitration시킬 수 있다. 따라서 다수의 연구에서 단백질의 nitrotyrosine을 평가하여 간접적으로 ONOO⁻ 및 nitrative stress를 평가하는 방법으로 사용되고 있다^{24,48)}. 본 연구에서도 CCl₄에 의해서는 NT 양성세포의 수가 유의하게 증가하였으며, 이러한 증가는 RNS에 의한 산화적 스트레스가 간조직에 유발되었음을 의미하고, 이러한 NT 양성세포의 수는 seBYTE (300, 1,000 mg/kg)에 의하여 유의하게 감소하였다.

4-Hydroxynonenal (4-HNE; C₉H₁₆O₂)은 lipid peroxidation에 의해 생성되는 것으로 만성 염증, 퇴행성 신경계 질환, 호흡기계 질환, 동맥 경화, 당뇨와 같은 다양한 만성질환이 유발될 조직 내 농도가 높아지는 것으로 알려져 있으며, 또한 4-HNE는 세포내에서 다양한 신호전달체계에서도 중요한 역할을 하지만, 산화적 스트레스 상황하에서는 급격히 증가하는 것으로 알려져 있다. 또한 CCl₄의 대사 과정에서도 다불포화 지방산의 과산화이 일어나 4-HNE와 malondialdehyde가 증가되는 것으로 보고되었다⁴⁹⁾. 본 연구에서도 CCl₄에 의해 4-HNE 양성세포의 수가 증가하였으며, 이러한 증가는 seBYTE (300, 1,000 mg/kg)에 의하여 유의하게 감소하였다.

이상의 결과들로부터 seBYTE는 CCl₄로 유도된 급성 간독성에 대해 유의한 세포보호효과를 지닌 것으로 사료되며, 이러한 seBYTE의 간세포보호효과는 일부 항산화효과를 통하여 세포보호효과를 나타내는 것으로 평가된다.

그러나, seBYTE의 구성약물인 人蔘, 黃芪, 甘草, 當歸 등 대부분의 구성약물은 모두 항산화효능이 있는 것으로 보고되어,⁵⁰⁻⁵³⁾ seBYTE의 항산화효능이 약물간 상승작용으로 나타난 것인지, 아니면 구성약



물중의 특정 약재 또는 특정 약재들간의 상승 효능으로 도출되었는지는 향후 추가적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.

V. 결론

소음인보중익기탕 열수추출물 (seBYTE)의 간독성에 대한 세포보호효과를 평가하기 위해 HepG2 세포주에 arachidonoc acid (AA)와 iron을 병용처리 한 *in vitro* 모델과 mouse에 CCl₄를 처치한 급성 간손상 *in vivo* 모델에서 효능을 관찰한 결과 아래와 같은 결론을 얻었다.

1. AA + iron은 HepG2 세포에 유의한 세포독성을 나타내었으나, seBYTE (100, 300 $\mu\text{g/ml}$)에 의해 세포생존율이 유의하게 증가하였다. 또한 seBYTE 단독으로는 300 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도까지 HepG2 세포에 어떠한 세포독성도 나타내지 않았다.
2. seBYTE는 AA + iron에 의해 발현이 억제된 pro-caspase-3 및 full length PARP의 발현을 유도하여 세포자멸사를 억제하였다.
3. AA + iron에 의해 미토콘드리아 막투과성이 유의하게 증가하였으며, seBYTE (100과 300 $\mu\text{g/ml}$)에 의하여 유의하게 감소되었다.
4. seBYTE는 AA + iron에 의해 유도된 hydrogen peroxide을 유의하게 억제하였으며, AA + iron에 의해 감소된 GSH의 함량을 증가시켰다.
5. CCl₄로 유도된 급성 간독성 모델에서 seBYTE는 혈중 ALT와 AST의 활성을 억제하였으며, HAI score, 간실질 부위의 변성비율, 변성 간세포의 수 및 침윤 염증세포의 수를 억제하였다.
6. CCl₄로 유도된 급성 간독성 모델에서 seBYTE는 농도 의존적으로 간조직 내 4-hydroxynonenal과 nitrotyrosine 양성세포의 수를 억제하였다.
7. seBYTE는 CCl₄에 의해 유도된 pro-caspase-3의 발현 감소를 현저히 증가시켰다.

이러한 결과는 소음인보중익기탕이 *in vivo*와 *in vitro* 모델에서 산화적 손상에 대해 세포 보호 효능이 있음을 나타낸 것으로, 향후 소음인보중익기탕의 구성 약물, 약물배합에 대한 항산화효능 및 임상적 연구가 추가적으로 필요할 것으로 생각된다.

References

1. Janssen-Heininger YM, Mossman BT, Heintz NH, Forman HJ, Kalyanaraman B, Finkel T, Stamler JS, Rhee SG, van der Vliet A. Redox-based regulation of signal transduction: principles, pitfalls, and promises. *Free Radic Biol Med.* 2008;45(1):1-17.
2. Thanan R, Oikawa S, Hiraku Y, Ohnishi S, Ma N, Pinlaor S, Yongvanit P, Kawanishi S, Murata M. Oxidative Stress and Its Significant Roles in Neurodegenerative Diseases and Cancer. *Int J Molecul Sci.* 2014;16(1):193-217.
3. Cai Z, Yan LJ. Protein Oxidative Modifications: Beneficial Roles in Disease and Health. *J Biochem Pharmacol Res.* 2013;1(1):15-26.
4. Raymond JMN, John de V, Mannfred AH. *Toxicology: Principle and Application.* 1st ed. Boca Raton, Florida: CRC press Inc. 702-23; 1996.
5. Cichoż-Lach H, Michalak A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. *World J Gastroenterol.* 2014;20(25):8082-91.
6. Lee JM. Dongeuisusebowon. Seoul:Haenglim publisher. 29,54;1986.
7. Park S, Jeong C, Baik Y, Jang W. A Study of the Treatment Method of Ikgi(益氣) and Seung-yang(升陽) in the Soeumin Exterior Disease. *The journal of Korean medical classics.* 2009;22(2):337-47.
8. Lee B, Baek J. Extended indications of Four-Constitution Medicinal formula analyzing composition on Dongeuibogam formula - The case of Bojungyikgi-tang for So-Eum type -. *The journal of Korean medical classics.* 2013;26(3):99-109.
9. Park SD, Ko WD, Shin HS. Effects of Bojungikgitang, Soeumin bojungikgitang and its component groups on diabetes in alloxan induced diabetic rats. *Herbal formula science.* 2001;9(1):215-30.
10. Park SD, Seo KS, Park WH. Effects of

- Bojungikgitang , Soeumin Bojungikgitang and its component groups on Antioxidant Activities in alloxan - induced diabetic rats. Kor. J. Herbol. 2001;16(2):113-26.
11. Yun SH, Cho YH Ryu KW, Hong ND. The Abstracts of 17th Annual Convention (1986) ; Studies on the Efficacy of Combined Preparation of Crude Drugs (X X X IV) . - Effect of Soeuminbojungikgitang on the isolated ileum , digestive system and blood pressure -. Kor. J. Pharmacogn.. 1987;18(1):80.
 12. Kim SJ, Leem NC, Kim SH. The Effects of Bojungikgitang & Soeumin-bojungikgitang on the Antitumor Activity against S-180 and the Reduction of Side Effects Induced by Cyclophosphamide. J of Oriental Medical Pathology. 1993;8:119-36.
 13. Kwak KH, Kim SH. Effect of Souminbojungikgitang & Souminbojungikgitangkamibang on The Ancancer Activity and The Reduction of Side Effect by Cyclophosphamide. J of Oriental Medical Pathology. 1996;10(2):122-40.
 14. Moon SY, Lee JH, Choi HY, Cho IJ, Kim SC, Kim YW. Tryptanthrin protects hepatocytes against oxidative stress via activation of the extracellular signal-regulated kinase/NF- κ B-related factor 2 pathway. Biol Pharm Bull. 2014;37(10):1633-40.
 15. Kim JK, Park SM, Jegal KH, Kim YW, Byun SH, Kim SC, Cho IJ. Gleditsia Spina Extract Protects Hepatocytes from Oxidative Stress through Nrf2 Activation. Kor. J. Herbol. 2015; 30(4):57-64.
 16. Ishak K, Baptista A, Bianchi L, Callea F, De Groote J, Gudat F, Denk H, Desmet V, Korb G, MacSween RN, Phillips MJ, Portmann BG, Paulsen H, Scheuer PJ, Schmid M, Thaler H. Histological grading and staging of chronic hepatitis. J Hepatol. 1995;22:696-9.
 17. Choi SH, Kim YW, Kim SG. AMPK-mediated GSK-3 β inhibition by isoliquiritigenin contributes to protecting mitochondria against iron-catalyzed oxidative stress. Biochem Pharmacol. 2010;79(9):1352-62.
 18. Kang YK, Lee EA, Park HR. Neuroprotective effect according to reactive oxygen species scavenging activity from extracts of cudrania tricuspidata leaves. Korean J. Food cookery SCI. 2012;28(6):821-8.
 19. Dong GZ, Lee JH, Ki SH, Yang JH, Cho IJ, Kang SH, Zhao RJ, Kim SC, Kim YW. AMPK activation by isorhamnetin protects hepatocytes against oxidative stress and mitochondrial dysfunction. Eur J Pharmacol. 2014;740:634-40.
 20. Han D, Shinohara M, Ybanez MD, Saberi B, Kaplowitz N. Signal transduction pathways involved in drug-induced liver injury. Handb Exp Pharmacol. 2010;196:267-310.
 21. Skilleter D, Cain K, Dinsdale D, Paine A. Biochemical mechanisms and morphology selectivity in hepatotoxicity: Studies in cultures of hepatic-parenchymal and non-parenchymal cells. Xenobiotica. 1985;15: 687-93.
 22. Clark JM, Diehl AM. Defining nonalcoholic fatty liver disease: implications for epidemiologic studies. Gastroenterology. 2003;24:248-50.
 23. Lee IW, Choi HY, Lee JH, Park SD, Kim SM, Ku SK, Zhao RJ, Kim SC, Kim YW, Choi HS. Saeng-Kankunbi-Tang protects liver against oxidative damage through activation of ERK/Nrf2 pathway. Chin J Integr Med. 2016;22(8): 619-28.
 24. Chen JH, Tipoe GL, Liong EC, So HS, Leung KM, Tom WM, Fung PC, Nanji AA. Green tea polyphenols prevent toxin-induced hepatotoxicity in mice by down-regulating inducible nitric oxide-derived prooxidants. Am J Clin Nutr. 2004;80:742-51.
 25. Kim JH, Park HJ, Lee HS, Lee HJ. The Effect of Herb-acupunctures of Bojoongggi-tang (Buzhongyiqi-tang), Ginseng Radix, and Astragali Radix on Immune Responses in Rats. J of Korean institute of Herbal- acupuncture. 2000;3(2):79-97.
 26. Ryu JH, Kim MS, Hwang YS, Yook CS.



- Anxiolytic Effects of the Three Kinds of Traditional Chinese Medicine, Shin-Ki-Hwan, Bo-Jung-Ik-Ki-Tang, and Sa-Mul-Tang, Using the Elevated Plus-maze Test. *The Journal of Applied Pharmacology*. 2001;9:125-30.
27. Shin SH, Chae SY, Ha MH, Jo SK, Kim SH, Byun MW, Lee ST. Effect of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang on B Cell Development. *J Korean Soc Food Sci Nutr*. 2004;33(2): 271-7.
 28. Lee HJ, Kim HS, Park YJ, Kim JS, Moon CJ, Kim JC, Bae CS, Jo SK, Kim SH. The Effect of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang on Epidermal Melanocytes in Ultraviolet B-irradiated Mice. *Journal of Radiation Protection*. 2008;33(3):87-91.
 29. Kim SR, Jo SK, Kim SH. Late Biological Effect of Gamma Radiation and the Effect of Bu-Zhong-Yi-Qi-Tang on Radiation- Induced Late Biological Effect in Mice. *Korean J of Vet Res*. 2003;43(3):323-31.
 30. Lee SE, Hong JE, Lee SH, Shin JY, RO SS. Study on Apoptosis Effect and Mechanism by Bojungikki-tang on Human Cancer Cell Line H460. *Korean J Orient Int Med*. 2004;25(4-2): 274-88.
 31. Kwack JJ, Kim HC. Effect of Soeuminbojungikgitang on the Lung Tumor of A/J mouse induced with Urethane. *Herbal Formula Science*. 2005;13(2): 17-40.
 32. Kim SM, Sim SY, Byun HS, Kim KJ. The Effect of the Bojungikgi-tang in a Mouse Model of Allergic Rhinitis. *The journal of Korean Medicine Ophthalmology & Otolaryngology & Dermatology*. 2005;18(3):26-36.
 33. Jang SI, Kim HJ, Kim YJ, Pae HO, Chung HT, Yun YG, Jeong OS, Kim YC. Bojungikgitang Inhibits LPS Plus Interferon- γ -induced Inflammatory Mediators in RAW 264.7 Macrophages. *Herbal Formula Science*. 2003;11(1):115-28.
 34. Park SM, Leem MH, Lee JH, Park JH. Antioxidative effects of Bojungikgi-tang and Yukmijihwang-tang in the Liver of senescence-accelerated mouse(SAM). *Kor. J. Herbol*. 2003;18(4):175-91.
 35. Shin YC. The experimental study of Soüm-In Bojungikitang on the Anti stress Effect. *Kyung Hee University Master Thesis*. 1987.
 36. Cho HS, Ko BH, Song IB. The experimental study of Soüm-In Bojungikitang, Sibjeondaebotang, Soyang-In Hyeongbangjihwangtang and Sibyimijihwangtang on Hyperthyroidism. *KyungHee University Oriental Medical Journal*. 1994;17: 201-23.
 37. Jang HJ. The experimental study of Soyang-In Hyeongbangjihwangtang, Sibyimijihwangtang and Soüm-In Bojungikitang on the Immune Response. *Kyung Hee University Doctor Thesis*. 1994.
 38. Ahn KM, Song IB, Ko BH. The experimental study of Soüm-In Bojungikit'ang and Dong-Won Bojungikit'ang on Yang-Insufficient Syndrome Induced by Hydrocortisone acetate. *Journal of constitutional medicine*. 1995;7(2): 213-25.
 39. Balboa MA, Balsinde J. Oxidative stress and arachidonic acid mobilization. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1761(4):385-91.
 40. Chen JK, Capdevila J, Harris RC. Cytochrome p450 epoxygenase metabolism of arachidonic acid inhibits apoptosis. *Mol Cell Biol*. 2001;21(18): 6322-31.
 41. Ehsanian R, Van Waes C, Feller SM. Beyond DNA binding - a review of the potential mechanisms mediating quinacrine's therapeutic activities in parasitic infections, inflammation, and cancers. *Cell Commun Signal*. 2011;9:13. doi: 10.1186/1478-811X-9-13
 42. Shin SM, Kim SG. Inhibition of arachidonic acid and iron-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis by oltipraz and novel 1,2-dithiole-3-thione congeners. *Mol Pharmacol*. 2009;75(1):242-53.
 43. Galaris D, Pantopoulos K. Oxidative stress and iron homeostasis: mechanistic and health aspects. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2008;45(1):1-23.
 44. Weber LW, Boll M, Stampfl A. Hepatotoxicity and mechanism of action of haloalkanes: carbon

- tetrachloride as a toxicological model. *Crit Rev Toxicol.* 2003;33(2): 105-36.
45. Knockaert L, Berson A, Ribault C, Prost PE, Fautrel A, Pajaud J, Lepage S, Lucas-Clerc C, Bégué JM, Fromenty B, Robin MA. Carbon tetrachloride-mediated lipid peroxidation induces early mitochondrial alterations in mouse liver. *Lab Invest.* 2012;92(3): 396-410.
46. Jegal KH, Ko HL, Park SM, Byun SH, Kang KW, Cho IJ, Kim SC. Eupatilin induces Sestrin2-dependent autophagy to prevent oxidative stress. *Apoptosis.* 2016;21(5): 642-56.
47. Lee HS, Keum KY, Ku SK. Effects of *Picrorrhiza rhizoma* water extracts on the subacute liver damages induced by carbon tetrachloride. *J Med Food.* 2007;10:110-17.
48. Pacher P, Beckman JS, Liaudet L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev.* 2007;87(1):315-424.
49. Smathers RL, Galligan JJ, Stewart BJ, Petersen DR. Overview of lipid peroxidation products and hepatic protein modification in alcoholic liver disease. *Chem Biol Interact.* 2011;192:107-12.
50. Kim EH and Rhee DK. Anti-oxidative properties of ginseng. *J. Ginseng Res.* 2009;33(1):1-7
51. Yin Y, Heo SI, Jung MJ, Wang MH. Antioxidant and Antidiabetic Effects of Various Sections of *Astragalus membranaceus* Kor. *J. Pharmacogn.* 2009;40(1):1-5.
52. Han SB, Gu HA, Kim SJ, Kim HJ, Kwon SS, Kim HS, Jeon SH, Hwang JP, Park SN. Comparative Study on Antioxidative Activity of *Glycyrrhiza uralensis* and *Glycyrrhiza glabra* Extracts by Country of Origin. *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea.* 2013;39(1): 1-8.
53. Cho NJ, Lee WH, Kim KK, Han HS. Investigation of the Antioxidant Effect of *Angelicae Radix* from Korea, China and Japan. *J Physiol & Pathol Korean Med.* 2017;31(3): 182-87.