

HepG2 세포에서 산화적 손상에 대한 곰취 유래 3,5-Dicaffeoylquinic Acid의 보호 효과

박선영 · 김거유 · 주진우

강원대학교 동물생명과학대학 축산식품과학전공

Protective Effect of 3,5-Dicaffeoylquinic Acid Isolated from *Ligularia fischeri* against Oxidative Damage in HepG2 Cells

Sun-Young Park, Gur-Yoo Kim, and Jin-Woo Jhoo

Animal Products and Food Science Program, College of Animal Life Sciences, Kangwon National University

ABSTRACT This study was conducted to investigate the hepatoprotective effects of 3,5-dicaffeoylquinic acid (3,5-DCQA) isolated from *Ligularia fischeri* against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HepG2 cells. Antioxidative effects of 3,5-DCQA were determined by measuring antioxidant enzyme [superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) glutathione peroxidase (GPx)] expression levels against hydrogen peroxide-induced oxidative stress using real-time PCR analysis. 3,5-DCQA treatment significantly increased gene expression levels of SOD, CAT, and GPx in a dose-dependent manner (10~30 µg/mL) in HepG2 cells. Hepatoprotective effects were analyzed by measuring glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), lactate dehydrogenase (LDH), and gamma-glutamyl transferase (GGT) activities using a biochemistry analyzer in hydrogen peroxide-treated HepG2 cells. 3,5-DCQA treatment significantly reduced GOT, LDH, and GGT activities in a dose-dependent manner (10~30 µg/mL) against increased liver function index enzyme activities induced by hydrogen peroxide oxidative stress in HepG2 cells. The results reveal that 3,5-DCQA compound isolated from *Ligularia fischeri* can be useful for the development of an effective hepatoprotective agent.

Key words: 3,5-dicaffeoylquinic acid, *Ligularia fischeri*, HepG2 cell, antioxidant enzymes, real-time PCR

서 론

인간을 비롯한 전자전달계에서 산소를 최종 전자수용체로 사용하는 생명체들은 공기 중의 산소를 이용하여 생명유지에 필요한 에너지 생성 및 대사과정에서 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)이 발생한다(1). 이러한 활성산소종으로는 superoxide radical($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radical($\cdot OH$), singlet oxygen(1O_2) 등이 존재한다. 산화스트레스가 지속되면 DNA가 손상되며, 세포생체막의 구성성분인 불포화지방산이 과산화반응을 일으켜 체내 과산화지질이 축적됨으로써 피부 노화를 비롯하여 동맥경화, 뇌졸중, 종양의 생성 등 여러 가지 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다(2,3). 과산화지질의 체내 축적을 억제하기 위하여 간세포를 포함한 생체 내 세포는 방어기전으로 효소계 산화방어기전을 가지고 있으며, superoxide dismutase (SOD), hydrogen peroxide를 제거하는 catalase(CAT) 및

glutathione peroxidase(GPx) 등이 있다. 이는 세포막뿐만 아니라 세포 내 여러 부분에서도 특이적으로 작용되어 조직들의 과산화를 억제한다(4,5).

곰취(*Ligularia fischeri*)는 넓은 잎을 가지고 있는 취의 일종으로 전국의 비옥 습윤한 토양이나 심산 수림에서 자라는 국화과의 다년생 초본 식물이다(6). 대부분 산지에서 재배되거나 자연에서 채취되는 산나물이지만 최근에는 강원 지역에서 재배를 많이 하고 있으며, 특유의 짭짤한 풍미를 지니며 다양한 기능성이 밝혀지면서(7,8) 곰취의 소비가 증가하고 있다. 또한, 지속적인 연구를 통하여 활성산소 생성 억제, 염증 억제, 항고혈압 효능과 멜라닌 생합성 및 자궁암 세포의 증식 억제 등에 효과가 밝혀진 바 있으며, 혈소판 응집 억제 및 미백 효과가 있다고 알려져 있다(7-12). 특히 항산화 활성과 관련하여 곰취 추출물의 활성이 입증되었으며, 다양한 항산화 성분이 함유되어 있는 것으로 보고되었다(13,14). 곰취 추출물의 주요 항산화 성분은 5-caffeoylquinic acid(5-CQA), 3,4-dicaffeoylquinic acid(3,4-DCQA), 3,5-dicaffeoylquinic acid(3,5-DCQA) 및 4,5-dicaffeoylquinic acid(4,5-DCQA)로 구성된 caffeoylquinic acid류 페놀성분 화합물로 알려지고 있다(11). Caffeoylquinic acid류는 caffeic acid와 quinic acid가 결합한 화합

Received 6 July 2017; Accepted 23 September 2017

Corresponding author: Jin-Woo Jhoo, Animal Products and Food Science Program, College of Animal Life Sciences, Kangwon National University, Chuncheon, Gangwon 24341, Korea
E-mail: jjhoo@kangwon.ac.kr, Phone: +82-33-250-8649

물이지만 여기서는 다른 phenylpropanoid계 화합물인 *p*-coumaric acid와 ferulic acid가 결합한 화합물까지 포함하여 caffeoylquinic acid라 부르기도 한다(15). 한편 caffeoylquinic acid는 결합하는 caffeic acid의 수에 따라 monocaffeoylquinic acid류, dicaffeoylquinic acid류, tricaffeoylquinic acid류 등이 있으며, 생리활성으로 진통작용, 소염 효과, 항바이러스 효과, 간 보호 효과, 항산화 효과, 혈소판 응집 억제 효과 등이 보고되어 있다(16). 그중 3,5-DCQA는 다른 이성질체 및 클로로겐산보다 높은 항산화 활성을 갖고 있으며, 곰취에 다른 클로로겐산 이성질체보다 많이 함유되어 있다(17).

본 연구는 곰취로부터 컬럼 크로마토그래피법을 이용하여 분리한 3,5-DCQA가 HepG2 세포에서 hydrogen peroxide 처리의 산화적 스트레스에 대한 항산화 활성 및 간세포 보호 효과를 분석하여 기능성을 알아보려 실시하였다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험에서 사용된 3,5-DCQA는 Hong 등(18)의 보고에 따라 강원대학교 식품생리활성물질실험실에서 곰취 잎의 에탄올 추출물로부터 컬럼 크로마토그래피법을 이용하여 분리한 3,5-DCQA를 사용하였으며, 분리된 물질의 구조는 NMR, MS 및 HPLC 분석을 통해 확인하였다(18). 세포배양에 사용된 HepG2 세포주는 American Type Culture Collection(Manassas, VA, USA)으로부터 구입하였다. Dulbecco's modified Eagle medium(DMEM), trypsin-EDTA 및 fetal bovine serum(FBS)은 HyClone(Logan, UT, USA)에서 구입하였으며, hydrogen peroxide(H₂O₂), dimethylsulfoxide(DMSO) 및 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide(MTT)는 Sigma-Aldrich Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. Real-time PCR 분석에서 사용된 dNTP, oligo(dT), RNase-free water 및 Superscript III First-Strand Synthesis는 Invitrogen(Carlsbad, CA, USA)으로부터 구입하였다. Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit 및 RNeasy Mini Kit은 Qiagen(Valencia, CA, USA)에서, oligonucleotide primers는 Bioneer(Daejeon, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 생화학 분석에 이용된 gamma-glutamyl transferase (GGT), lactate dehydrogenase(LDH), glutamic oxaloacetic transaminase(GOT) reagent는 Thermo Scientific(Vantaa, Finland)으로부터 구입하였다.

HepG2 세포주 배양

HepG2 세포주는 American Type Culture Collection으로부터 분양받았으며, DMEM 배지에 10% FBS 및 100 IU/mL penicillin과 100 µg/L streptomycin을 첨가하여 37°C에서 5% CO₂를 유지하는 incubator(HERACell 150, Thermo

Electron Corp., Waltham, MA, USA)에서 배양하였다.

MTT assay에 의한 HepG2 세포생존율 분석

3,5-DCQA의 세포독성실험은 MTT assay를 이용하여 측정하였다. 96-well plate에 DMEM 배지를 이용하여 1×10⁵ cells/well의 HepG2 세포를 분주하고 24시간 동안 5% CO₂ incubator에서 배양한 후 배지를 제거하고 PBS를 사용하여 2회 세척하였다. 3,5-DCQA를 10, 20 및 30 µg/mL의 농도로 FBS-free DMEM 배지에 희석하여 시료를 처리한 후 37°C가 유지된 5% CO₂ incubator에서 24시간 배양하였다. 상등액을 제거한 후 5 mg/mL의 MTT solution 20 µL와 PBS 180 µL를 첨가하여 CO₂ incubator에서 4시간 배양시켰다. 이후 상등액을 모두 제거하고 DMSO를 200 µL씩 첨가하여 30분간 암실에서 반응시켰으며 생성된 formazan을 microplate reader(Epoch, BioTek, Winooski, VT, USA)에서 550 nm로 측정하였다. 세포생존율(%)은 다음과 같은 식을 사용하였다.

$$\text{세포생존율(\%)} = \frac{\text{시료 처리군의 흡광도}}{\text{대조군의 흡광도}} \times 100$$

Real-time PCR을 이용한 항산화 유전자 발현분석

3,5-DCQA 처리가 항산화 효소의 유전자 발현에 미치는 영향을 검토하기 위하여 SOD-1(Cu-Zn SOD), SOD-2(Mn SOD), GPx 및 CAT의 mRNA 발현량을 real-time PCR을 이용하여 분석하였다.

24-well plate에 DMEM 배지를 이용하여 5×10⁵ cells/well의 HepG2 세포를 분주하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 배지를 제거하고 PBS를 사용하여 세포를 2회 세척하였으며, hydrogen peroxide(200 µM) 및 각각의 농도로 희석한 3,5-DCQA 시료를 FBS-free DMEM 배지를 이용하여 처리 후 24시간 CO₂ incubator에서 배양하였다. 배양 후 trypsin을 처리하였으며, 원심분리 하여 상등액을 제거하고 침전된 세포를 수집하였다. RNeasy Mini Kit(Qiagen)을 이용하여 RNA를 추출하였으며 genomic DNA를 제거하기 위해 RNase-free DNase set(Qiagen)를 처리하였다.

추출된 total RNA를 이용하여 Super Script III First-Strand Synthesis System(Invitrogen)을 사용하여 cDNA를 합성하였다. Total RNA에 dNTP와 Oligo dT를 첨가하여 65°C에서 5분, ice에서 1분 동안 반응 후, cDNA Synthesis Mix(RT buffer, DTT, MgCl₂, RNaseOUT 및 Super Script III RT)를 첨가하였다. 그 후 25°C에서 10분, 50°C에서 10분, 55°C에서 5분 후, 4°C를 유지하는 순으로 반응하였으며 1 µL의 *E. coli* RNase H를 첨가하여 37°C에서 20분 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 최종적으로 합성된 cDNA는 -20°C에서 보관하여 추후 분석에 이용하였다.

항산화 효소의 primer 염기서열은 Table 1에 제시하였다. Real-time PCR 반응액은 H₂O를 혼합한 후 합성한

Table 1. Oligonucleotide sequences of PCR primers used for quantitative real-time PCR

Primer	Oligonucleotide sequence	Temp. (°C)	Length (bp)
SOD-1	5'-ACGGTGGGCCAAAGGATGAA-3' 5'-TCATGGACCACCAGTGTGCG-3'	60	151
SOD-2	5'-AGAAGCACAGCCTCCCCGAC-3' 5'-GGCCAACGCCTCCTGGTACT-3'	60	152
GPx	5'-TCGGTGTATGCCTTCTCGGC-3' 5'-CCGCTGCAGCTCGTTCATCT-3'	60	150
CAT	5'-CCAACAGCTTTGGTGCTCCG-3' 5'-GGCCGGAATGTTCTCACAC-3'	60	180
β -Actin	5'-CGGGAAATCGTGCGTGACAT-3' 5'-GGACTCCATGCCAGGAAGG-3'	60	198

cDNA, Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix(Qiagen) 및 항산화 유전자의 -F, -R primer(10 pmol/ μ L)에 첨가하여 제조 후 사용하였다. Real-time PCR은 Qiagen의 Rotor-Gene Q 2plex 기기를 이용하였으며, 반응조건은 two step cycling protocol을 기준으로 95°C에서 5분 동안 predenaturation을 실시한 후 95°C에서 5초, 60°C에서 10초씩 40 cycles을 반복하였고, 60°C에서 95°C까지 3분 동안 증가하는 melting 단계 순으로 진행하였다. Real-time PCR을 통해 증폭된 산물은 Delta delta Ct method를 이용하여 정량하였으며, 각 시료는 β -actin(Bioneer)의 발현량으로 보정하였다. 각 PCR 산물들은 Red Safe(Intron Biotechnology Inc., Seongnam, Korea)가 함유된 1% agarose gel을 이용하여 100 V에서 20분간 전기영동을 하였으며, UVP GelDoc-It documentation system(UVP, Upland, CA, USA)을 이용하여 UV 하에서 촬영을 실시하였다.

간 기능 지표 효소 활성 측정을 통한 간세포 보호 효과

3,5-DCQA 처리가 hydrogen peroxide 처리에 의해 손상된 HepG2 세포에 대한 보호 효과를 검토하기 위하여 간 기능 지표 효소인 LDH, GOT 및 GGT를 분석하였다. 24-well plate에 DMEM 배지를 이용하여 5×10^5 cells/well의 HepG2 세포를 분주하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 hydrogen peroxide(200 μ M) 및 3,5-DCQA와 함께 처리하여 24시간 반응한 다음, 4,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상등액을 회수하여 생화학분석기(Konelab 20B, Thermo Scientific)를 통하여 LDH, GGT 및 GOT를 측정하였다.

통계 분석

실험 결과는 SPSS 22.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 ANOVA로 분석하였으며 집단 간 비교를 위한 사후분석은 Tukey의 b로 검증하였고 $P < 0.05$ 일 때만 통계적 유의성이 있는 것으로 판단하였다. 모든 분석항목은 3회 이상 반복 시험하여 얻은 결과를 평균 \pm 표준편차로 나타내었다.

결과 및 고찰

HepG2 세포주를 이용한 세포독성실험

3,5-DCQA의 세포독성을 측정하기 위하여 인간 간암 세포주인 HepG2 세포를 통해 세포생존율을 분석하여 Fig. 1에 나타내었다. MTT는 살아있는 세포의 미토콘드리아 내막에 있는 oxidoreductase의 효소 작용에 의해 환원되어 보라색의 formazan을 형성하게 되며 용해액 내 보라색 formazan의 발색 정도를 흡광도로 측정함으로써 세포생존율을 예측하는 실험방법으로 이용되고 있다(19). Hydrogen peroxide는 산화적 스트레스를 유발시키는 물질로서 *in vitro* 실험에 독성 유발 물질로 자주 이용된다(20). MTT assay를 통한 세포생존율을 알아본 결과 시료를 처리하지 않은 대조군의 세포생존율을 100%로 보았을 때 3,5-DCQA 10, 20 및 30 μ g/mL의 농도와 hydrogen peroxide 200 μ M을 처리한 세포생존율은 약 88% 이상이 나타났고 대조군과 비교하여 통계학적 유의미한 차이가 없었다. 따라서 세포생존율에 영향을 미치지 않는 10, 20 및 30 μ g/mL의 농도를 설정하여 후속 실험을 진행하였다.

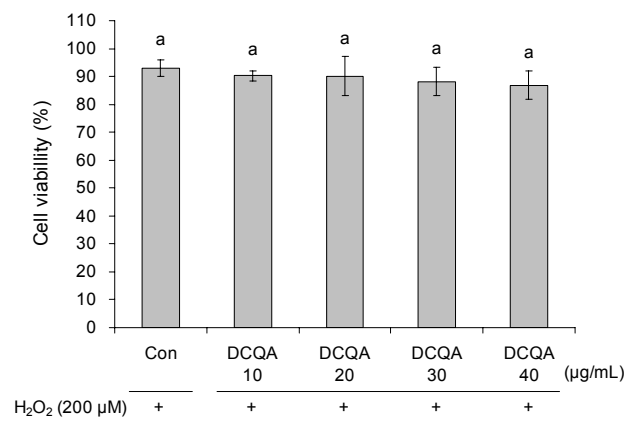


Fig. 1. Cell viability of HepG2 cells on different concentration of DCQA treatment. Values are mean of three replicate means \pm SD (n=3). Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$). DCQA, 3,5-dicaffeoylquinic acid.

HepG2 세포에서 항산화 효소 유전자 발현에 미치는 영향

인간 간암 세포주인 HepG2 세포를 통해 hydrogen peroxide 처리로부터 유발된 산화적 스트레스에 대한 3,5-DCQA의 세포 보호 기전을 확인하기 위하여 항산화 효소인 SOD, CAT 및 GPx의 유전자 발현량을 측정된 결과는 Fig. 2와 같다. Hydrogen peroxide 처리에 의해 유발된 산화적 스트레스는 SOD, CAT 및 GPx와 같은 항산화 효소 활성을 저하시킨다고 보고되어 있다(21). 항산화계 효소인 SOD는 superoxide anion($O_2^{\cdot-}$)과 같은 free radical을 hydrogen peroxide로 바꿔주고, CAT에 의해 H_2O 와 O_2 로 전환되어 배출되며, GPx는 과산화수소와 환원형 glutathione으로부터 물과 산화형 glutathione으로 만들어 세포를 보호하게 된다(22). HepG2 세포에 3,5-DCQA를 처리하여 24시간

배양하였으며, 이때 처리 농도는 세포독성이 없는 농도인 10, 20 및 30 $\mu\text{g/mL}$ 에서 실험을 진행하였다. Ursodeoxycholic acid 20 $\mu\text{g/mL}$ 를 투여한 처리군을 양성대조군으로 설정하였으며 시료를 처리하지 않은 처리군을 대조군으로 한 후 100%로 하여 상대정량 하였다. SOD-1의 발현량을 확인한 결과 3,5-DCQA는 hydrogen peroxide 처리에 의해 감소한 SOD-1의 mRNA 발현을 농도 의존적으로 증가시켰으며(Fig. 2A), 특히 30 $\mu\text{g/mL}$ 에서는 hydrogen peroxide 처리되지 않은 대조군에 비해 약 103%로 ursodeoxycholic acid 처리군과 유의적 차이가 없는 SOD-1 발현을 확인할 수 있었다. SOD-2의 mRNA 발현 또한 SOD-1의 결과와 같이 농도 의존적으로 증가하였으며(Fig. 2B), 30 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 약 85%로 가장 높은 발현량을 나타내었

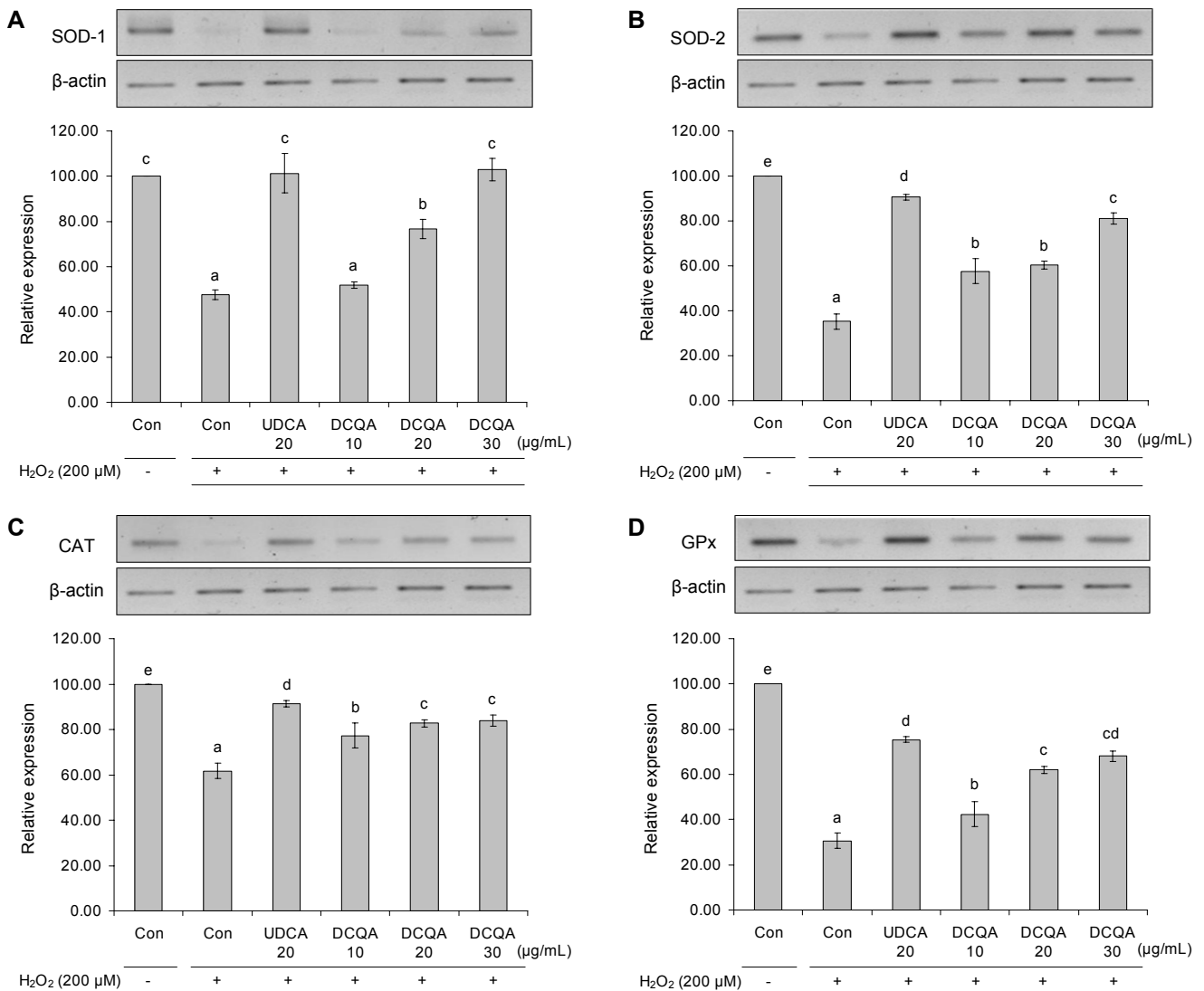


Fig. 2. Effect of DCQA on antioxidant enzymes gene expression in HepG2 cells against hydrogen peroxide oxidative stress. The PCR products were separated by performing electrophoresis in 1.0% agarose gel with Red-Safe stain, and visualized under UV light. Values are mean of three replicate means \pm SD (n=3). Different letters indicate significant differences ($P < 0.05$). DCQA, 3,5-dicaffeoylquinic acid; UDCA, ursodeoxycholic acid. (A), superoxide dismutase-1 (SOD-1); (B), superoxide dismutase-2 (SOD-2); (C), catalase (CAT); (D), glutathione peroxidase (GPx).

다. CAT의 발현량은 최고 처리 농도인 30 µg/mL에서 약 84%로 가장 높았지만(Fig. 2C), 20 µg/mL와 유의적인 차이는 나타나지 않았다. GPx에서도 30 µg/mL에서 약 68%를 나타내었으며 처리 농도 중 가장 높은 발현량을 확인하였다(Fig. 2D).

Yu 등(23)은 곰취 발효 추출물이 간 조직 내 SOD 활성을 증가시키고 지질과산화 반응을 억제시킴으로써 간 손상을 완화시키는 데 효과적이라고 보고하였으며, 이와 같이 곰취 추출물의 항산화 및 간 보호 효과는 곰취 추출물의 주요 성분인 CQA에 의한 것으로 보고되고 있다(24). 또한, Lee와 Moon(25)은 곰취 추출물은 높은 페놀화합물을 함유하고 있으며, 우수한 라디칼 소거 활성과 CAT 활성을 가지고 있다고 보고하였다. 따라서 본 연구의 실험 결과를 종합해볼 때 곰취 추출물 중 페놀화합물인 3,5-DCQA가 hydrogen peroxide로 감소한 항산화 효소의 유전자 발현을 증진시키며, 간세포 보호 효과에 있어서 효과적인 것으로 판단된다.

3,5-DCQA가 간 기능 지표 효소에 미치는 영향

3,5-DCQA가 간세포인 HepG2 세포에서 hydrogen peroxide에 처리에 의해 유도된 산화적 스트레스에 대한 보호 효과를 세포막 손상 시 배양액 내로 유출되는 간 기능 지표 효소 활성을 측정하였다. HepG2 세포에 hydrogen peroxide와 3,5-DCQA를 처리한 후 상등액 내 LDH, GOT 및 GGT를 분석한 결과는 Fig. 3~5와 같다. 음성대조군은 hydrogen peroxide만 처리하였고, 양성대조군은 ursodeoxycholic acid 20 µg/mL를 처리하였다. LDH는 lactate를 pyruvate로 전환되는 효소로 세포에 자극이 있을 경우 세포 외로 유리되어 배지 중에서 증가하게 된다. 즉 간세포에 손상이 생기면 배지 중으로 유출되는 효소의 양이 증가하게 되고, 간세포 보호 작용이 있는 약물은 유리된 효소의 양을 감소시키게 된다(26). 본 실험에서 LDH 분석 결과 양성대조

군은 정상군과 유사하게 감소하였으며, 3,5-DCQA 처리 농도가 증가함에 따라 유의적으로 감소하는 경향이 나타났다. 30 µg/mL 처리 농도에서에서 약 338.83 U/L로 가장 낮게 유출되었다(Fig. 3). GOT는 생체의 심장, 신장, 뇌 근육 등 여러 장기 세포 내에 존재하는 효소로 아미노기 전이반응을 촉매하는 효소이다. 이 효소는 aspartic acid에서 amino group을 α-ketoglutaric acid로 치환하여 oxaloacetic acid를 생성하며(27), 간세포의 손상 정도에 따라 혈액 내로 빠져나와 간경변, 간염 등의 지표로 쓰이고 있다. GOT 활성을 측정한 결과(Fig. 4) LDH 분석과 유사한 경향을 보였고 10, 20 및 30 µg/mL에서 약 74.49, 66.60 및 56.22 U/L로 나타났으며, 농도에 따라 유의적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었다. GGT는 간세포 내에서 다량 존재하는 효소이며 간 손상에 의하여 세포막이 파괴되면 세포 외로 유출된다. 간세포에 손상이 생기면 배지로 유리되는 이들 효소의 양은 증가

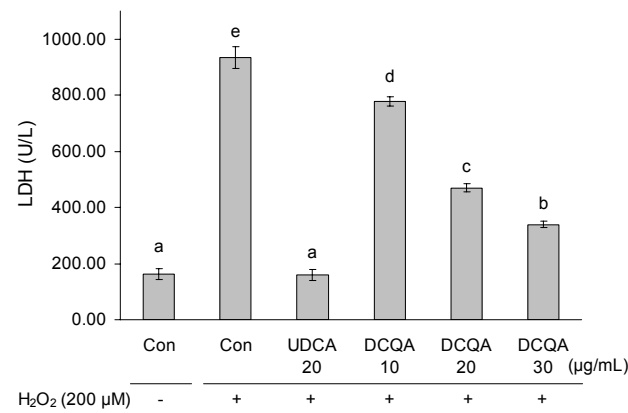


Fig. 3. Effect of DCQA on lactate dehydrogenase (LDH) activity in HepG2 cells against hydrogen peroxide oxidative stress. Values are mean of three replicate means±SD (n=3). Different letters indicate significant differences (P<0.05). DCQA, 3,5-dicaffeoylquinic acid; UDCA, ursodeoxycholic acid.

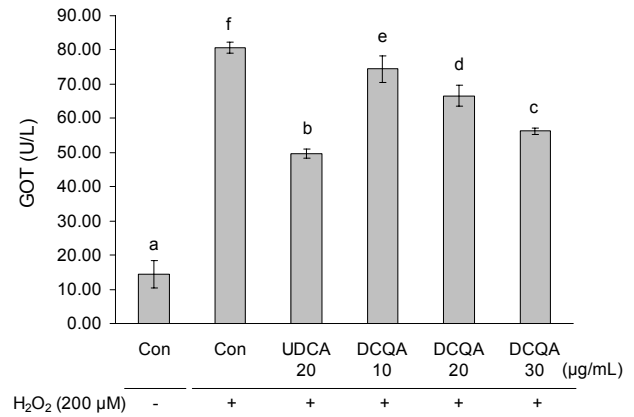


Fig. 4. Effect of DCQA on glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) activity in HepG2 cells against hydrogen peroxide oxidative stress. Values are mean of three replicate means±SD (n=3). Different letters indicate significant differences (P<0.05). DCQA, 3,5-dicaffeoylquinic acid; UDCA, ursodeoxycholic acid.

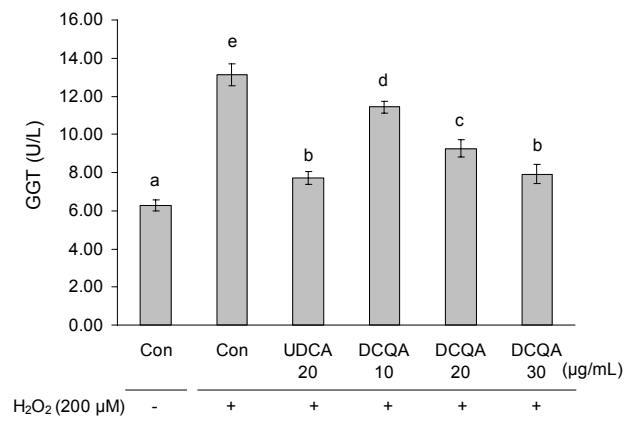


Fig. 5. Effect of DCQA on gamma glutamyl transferase (GGT) activity in HepG2 cells against hydrogen peroxide oxidative stress. Values are mean of three replicate means±SD (n=3). Different letters indicate significant differences (P<0.05). DCQA, 3,5-dicaffeoylquinic acid; UDCA, ursodeoxycholic acid.

하게 되고, 간세포의 손상이 억제되면 이들 효소의 양은 감소한다. 혈청 GGT 수치는 알코올 섭취로 인한 간질환의 진단에 이용된다. 알코올 섭취 이외에도 흡연에 의한 폐질환, 활동량에 따른 생활요인, 채식질환, 신경질환 및 당뇨병 등의 병적 요인에도 관련되어 있으며(28,29), 간세포와 담도 상피세포에 존재하여 간담도 질환 유무의 지표가 되며 알코올성 간질환에 의해 증가하는 것으로 알려졌다(28). HepG2 세포에서 hydrogen peroxide를 처리하였을 때 3,5-DCQA의 농도가 증가함에 따라 GGT 활성이 감소하는 경향이 나타났으며 30 µg/mL 처리 농도에서 약 7.92 U/L로 가장 낮은 수치를 나타내었으며 양성 대조군과 유의적으로 차이가 나지 않았다(Fig. 5). Lee 등(30)은 녹차 카테킨의 한 종류인 epigallocatechin gallate(EGCG)를 처리한 HepG2 세포에서 GGT 활성을 억제함으로써 에탄올에 의한 간세포의 독성을 감소시킨다고 하여 녹차 추출물이나 카테킨이 알코올에 의한 간세포 독성을 감소시킨다고 하였다. 본 연구 결과에서 3,5-DCQA는 hydrogen peroxide 처리에 의해 증가한 LDH, GOT 및 GGT의 활성을 유의적으로 감소시키며 산화적 스트레스로 손상이 야기된 간세포에 대하여 보호 효과를 가지는 것으로 생각된다.

요 약

본 연구는 곰취에서 분리한 3,5-dicaffeoylquinic acid (3,5-DCQA)의 간세포에 대한 보호기능을 평가하기 위해 HepG2 세포를 이용하여 hydrogen peroxide에 의해 유도된 산화적 스트레스에 대한 항산화 효소 유전자 발현량 및 간 기능 지표 효소(LDH, GGT, GOT) 활성에 미치는 영향을 분석하였다. 산화적 스트레스가 유도된 HepG2 세포에 3,5-DCQA를 10, 20 및 30 µg/mL 농도별로 처리한 후 real-time PCR을 이용하여 주요 항산화 효소들의 유전자 발현량을 측정된 결과, hydrogen peroxide 처리에 의해 감소한 SOD-1, SOD-2, CAT 및 GPx의 mRNA 발현량이 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, HepG2 세포에서 hydrogen peroxide 처리에 의해 증가한 주요 간 기능 지표 효소인 LDH, GGT 및 GOT 활성이 3,5-DCQA (10, 20, 30 µg/mL) 처리에 의해 유의적으로 감소하는 것으로 나타났다. 이와 같은 실험 결과로부터 곰취에서 분리한 페놀화합물인 3,5-DCQA는 HepG2 세포에서 산화적 스트레스에 대한 우수한 항산화 효과 및 간세포 보호 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었으며, 향후 관련 기능성 식품개발에 필요한 기초적인 자료로 활용될 수 있을 것으로 기대된다. 또한, 동물실험을 통한 3,5-DCQA의 추가적인 기능성 검증이 필요하다고 판단된다.

감사의 글

본 연구는 2014년도 강원대학교 학술연구조성비(과제번호:

C1010852-01-01)로 수행되었습니다.

REFERENCES

1. Beckman KB, Ames BN. 1998. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 78: 547-581.
2. Pellegrini M, Baldari CT. 2009. Apoptosis and oxidative stress-related diseases: the p66Shc connection. *Curr Mol Med* 9: 392-398.
3. Malle E, Marsche G, Arnhold J, Davies MJ. 2006. Modification of low-density lipoprotein by myeloperoxidase-derived oxidants and reagent hypochlorous acid. *Biochim Biophys Acta* 1761: 392-415.
4. Awasthi YC, Beutler E, Srivastava SK. 1975. Purification and properties of human erythrocyte glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 250: 5144-5149.
5. Li S, Tan HY, Wang N, Zhang ZJ, Lao L, Wong CW, Feng Y. 2015. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *Int J Mol Sci* 16: 26087-26124.
6. Cho SD, Kim GH. 2005. Food product development and quality characteristics of *Ligularia fischeri* for food resources. *Korean J Food Preserv* 12: 43-47.
7. Bae JH, Yu SO, Kim YM, Chon SU, Kim BW, Heo BG. 2009. Physiological activity of methanol extracts from *Ligularia fischeri* and their hyperplasia inhibition activity of cancer cell. *J Bio-Environment Control* 18: 67-73.
8. Choi E, Ding Y, Nguyen HT, Park S, Kim Y. 2007. Antioxidant activity of *Gomchi (Ligularia fischeri)* leaves. *Food Sci Biotechnol* 16: 710-714.
9. Kim D, Kim GW, Lee SH, Han GD. 2016. *Ligularia fischeri* extract attenuates liver damage induced by chronic alcohol intake. *Pharm Biol* 54: 1465-1473.
10. Kim JH, Kim HJ, Kim JK, Ahn EK, Ko HJ, Cho YR, Lee SJ, Bae GU, Kim YK, Park JW, Oh JS, Seo DW. 2015. *Ligularia fischeri* inhibits endothelial cell proliferation, invasion and tube formation through the inactivation of mitogenic signaling pathways and regulation of vascular endothelial cadherin distribution and matrix metalloproteinase expression. *Oncol Rep* 34: 221-226.
11. Yeon BR, Cho HM, Yun MS, Jho JW, Jung JW, Park YH, Kim S. 2012. Comparison of fragrance and chemical composition of essential oils in Gom-chewi (*Ligularia fischeri*) and Handaeri Gom-chewi (*Ligularia fischeri* var. *spicififormis*). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1758-1763.
12. Ham SS, Lee SY, Oh DH, Jung SW, Kim SH, Jeong CK, Kang IJ. 1998. Cytotoxicity of *Ligularia fischeri* extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 27: 987-992.
13. Kim SM, Kang SW, Um BH. 2010. Extraction conditions of radical scavenging caffeoylquinic acids from Gomchui (*Ligularia fischeri*) tea. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 399-405.
14. Rekha K, Sivasubramanian C, Thiruvengadam M. 2015. Evaluation of polyphenol composition and biological activities of two samples from summer and winter seasons of *Ligularia fischeri* var. *Spiciformis* Nakai. *Acta Biol Hung* 66: 179-191.
15. Park HJ, Nugroho A, Lee J, Kim JD, Kim WB, Lee KR, Choi JS. 2009. HPLC analysis of caffeoylquinic acids in the extract of *Cacalia firma* and peroxynitrite scavenging effect. *Kor J Pharmacogn* 40: 365-369.
16. Zhao Y, Zhao J, Li XP, Zhou CX, Sun HD, Hao XJ, Xiao PG. 2006. Advances in caffeoylquinic acid research. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 31: 869-874.

17. Shang YF, Kim SM, Song DG, Pan CH, Lee WJ, Um BH. 2010. Isolation and identification of antioxidant compounds from *Ligularia fischeri*. *J Food Sci* 75: C530-C535.
18. Hong S, Joo T, Jhoo JW. 2015. Antioxidant and anti-inflammatory activities of 3,5-dicaffeoylquinic acid isolated from *Ligularia fischeri* leaves. *Food Sci Biotechnol* 24: 257-263.
19. Gerlier D, Thomasset N. 1986. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J Immunol Methods* 94: 57-63.
20. Sikander M, Malik S, Yadav D, Biswas S, Katare DP, Jain SK. 2011. Cytoprotective activity of a trans-chalcone against hydrogen peroxide induced toxicity in hepatocellular carcinoma (HepG2) cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 12: 2513-2516.
21. Zhang R, Chae S, Kang KA, Piao MJ, Ko DO, Wang ZH, Park DB, Park JW, You HJ, Hyun JW. 2008. Protective effect of butin against hydrogen peroxide-induced apoptosis by scavenging reactive oxygen species and activating antioxidant enzymes. *Mol Cell Biochem* 318: 33-42.
22. Cho BO, Lee CW, So Y, Jin CH, Yook HS, Byun MW, Jeong YW, Park JC, Jeong IY. 2014. Protective effect of radiation-induced new blackberry mutant γ -B201 on H₂O₂-induced oxidative damage in HepG2 cells. *Korean J Food Sci Technol* 46: 384-389.
23. 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.
24. Choi J, Park JK, Lee KT, Park KK, Kim WB, Lee JH, Jung HJ, Park HJ. 2005. *In vivo* antihepatotoxic effects of *Ligularia fischeri* var. *spiciformis* and the identification of the active component, 3,4-dicaffeoylquinic acid. *J Med Food* 8: 348-352.
25. Lee IS, Moon HY. 2012. Antimicrobial activity on respiratory diseases inducing bacteria and antioxidant activity of water extracts from wild edible vegetables. *KSBB J* 27: 114-120.
26. Kim HJ, Lee IS, Lee KR. 1999. Antimutagenic and anticancer effects of *Ramaria botrytis* (Fr.) rick extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 28: 1321-1325.
27. Ahn SY, Park SY. 2012. A diagnostic approach to abnormal liver function tests in asymptomatic patients. *Korean J Med* 82: 134-142.
28. Kim KS, Jeon DS, Kim JS, Kim JS, Kim JM. 1982. GGT, ALPI and LDH in various liver diseases. *Kyungpook Univ Med J* 23: 325-333.
29. 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.
30. Lee SI, Kim HJ, Boo YC. 2008. Effect of green tea and (-)-epigallocatechin gallate on ethanol-induced toxicity in HepG2 cells. *Phytother Res* 22: 669-674.