대한한의학 방제학회지 제26권 제4호
Herbal Formula Science
2018;26(4):329~340
pISSN 1229-1218, eISSN 2288-5641 https://doi.org/10.14374/HFS.2018.26.4.329
Official Journal of The Korean Medicine Society For The Herbal Formula Study
Available at http://www.formulastudy.com HFS

Original Article / 원저

HepG2 세포에서 AMPK 활성화를 통한 胡蘿蔔 에탄올 추출물의 간 세포 보호 효과

김도연, 박상미, 변성희, 박정아, 조일제*, 김상찬**

대구한의대학교 한의과대학

Hepato-protective Effects of *Daucus carota* L. Root Ethanol Extract through Activation of AMPK in HepG2 Cells

Doyeon Kim, Sang Mi Park, Sung Hui Byun, Chung A Park, Il Je Cho*, Sang Chan Kim**

College of Korean Medicine, Daegu Haany University

ABSTRACT

Objectives : In Traditional Korean medicine, *Daucus carota* L. has been used for treating dyspepsia, diarrhea, dysentery and cough. Recent pharmacognosic evidence showed *D. carota* has anti-oxidant, anti-cancer, anti-fungal, and hypotensive effects. Present study investigated hepato-protective effect of *D. carota* ethanol extract (DCE) against oxidative stress in HepG2 cells.

Methods : After HepG2 cells were pretreated with different concentrations of DCE, the cells were exposed to *tert*-butyl hydroperoxide (tBHP) for inducing oxidative stress. Cell viability, hydrogen peroxide production, glutathione concentration, and mitochondrial membrane potentials were measured to explore hepato-protective effect of DCE. Phosphorylation of AMP-activated protein kinase (AMPK) and effect of compound C on cell viability were determined to investigate the role of AMPK on DCE-mediated cytoprotection.

Results : DCE significantly decreased the tBHP-mediated cytotoxicity in a concentration dependent manner and reduced the changes on apoptosis-related proteins by tBHP in HepG2 cells. In addition, DCE significantly prevented hydrogen peroxide production, glutathione depletion, and mitochondrial membrane impairment induced by

ⓒ 2018 The Korean Medicine Society For The Herbal Formula Study
This paper is available at http://www.formulastudy.com which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

tBHP. Treatment with DCE increased phosphorylation of AMPK, and the DCE-mediated cytoprotection was abolished by pretreatment with compound C.

Conclusions : These results demonstrate that DCE can protect hepatocytes from oxidative stress through activation of AMPK.

Key words : AMP-activated protein kinase (AMPK), *Daucus carota* L. *e*thanol extract (DCE), HepG2 cells, Oxidative stress, *tert*-butyl hydroperoxide (tBHP).

Ⅰ. 서론

인체에서 산소는 호흡을 통한 에너지 생산뿐 아니라, 면역 활동을 통한 병원체의 제거, 간에서의 해독과 대사활동에 관여하며 이 과정에서 필수 불가결하게 활성산소종 (reactive oxygen species)의 생성이 수반된다. 생체 내에서 생성된 활성산소종은 반응성이 큰 자유라디칼을 포함하고 있어 불안정하기 때문에 세포 내 거대 생체 분자 (예, 핵산), 세포막 지질 및 지단백질과 결합하여 그 기능을 저하시킨다. 따라서 활성산소종은 세포의 손상을 통한 인체의 노화와 각종 질병을 유발하는 주요 요인 중 하나로 인식되고 있다[1]. 정상적인 생리 환경에서는 활성산소종의 생성 속도보다 이를 제거하는 다양한 항산화시스템의 활성화 속도가 더 빨라 세포 내 생성된 활성산소종을 효과적으로 제거한다. 그러나, 다양한 원인에 의한 항산화시스템의 붕괴는 지속적으로 활성산소종을 축적하여 산화적 스트레스 (oxidative stress)를 유발한다[1,2]. 특히 간은 혈장 단백질의 합성, 에너지 대사 및 해독작용을 수행하는 기관이다. 다양한 원인에 의하여 발생한 산화적 스트레스는 간 실질세포의 사멸과 이를 통한 염증세포 및 성상세포의 활성화를 통하여 간염, 지방간, 간섬유화, 간경화와 간암을 포함한 다양한 급만성 간질환을 유발하는 핵심 원인으로 인식되고 있다[1,3].

산화적 스트레스에 대한 적응반응을 통하여 세포를 보호하는데 관여하는 세포 내 다양한 신호분자들이 연구되었으며, 본 연구실에서는 선행 연구를 통하여 다양한 처방, 약재 및 이들로부터 추출한 단일성분들이 AMP-activated protein kinase (AMPK)의 활성화를 통하여 산화적 스트레스로부터 세포를 보호할 수 있음을 보고하였다[4-8]. AMPK는 catalytic α-subunit과 regulatory subunit인 β- 및 γ-subunit로 구성된 이종삼량 복합체 (heterotrimeric complex)로 존재하는 serine/threonine 인산화 효소의 하나로써 탄수화물, 지방, 단백질의 이화작용을 통한 ATP 생성을 촉진하고 지방산 생합성 및 당신생을 포함한 ATP 소비 경로를 억제하여 세포 내 에너지 항상성의 유지에 관여하는 효소이다[9,10]. 또한 AMPK의 활성화는 산화적 스트레스에 의하여 손상된 미토콘드리아의 재생과 신생에 관여하는 유전자들의 발현을 증가시키고, 과도하게 축적된 비정상적 산화 분자들을 제거하는 자가포식 작용을 활성화시키며, nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2)의 활성 조절을 통한 다양한 항산화 유전자의 발현을 증가시켜 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는데 관여하는 것으로 보고되었다[9-11].

胡蘿蔔은 미나리과 식물인 당근 (*Daucus carota* L.) 뿌리의 한약재명으로 뿌리는 胡蘿蔔, 열매는 胡蘿蔔子라 불린다. 다른 이름으로는 紅菜頭, 紅蘿蔔, 홍당무, 홍대근 등으로 불려져 왔다. 胡蘿蔔의 性味는 甘平하며 독이 없어 달이거나 생 또는 생즙을 내어 복용한다. 胡蘿蔔은 肺와 脾經으로 들어가 健脾化滯, 潤燥明目, 化痰止咳, 淸熱解毒의 효능이 있어 기운을 내려주고 위장을 윤택하게 하며, 雀目, 視物昏花, 咳喘, 泄痢, 湯火傷, 痲疹, 百日咳, 癤腫의 치료

*Corresponding author : Il Je Cho, Research Center for Herbal Convergence on Liver Disease, Department of Herbal Formulation, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 1, Hanuidae-ro, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, 38610, Republic of Korea.
Tel : +82-53-819-1295, Fax : +82-53-819-1860, E-mail : skek023@dhu.ac.kr
**Corresponding author : Sang Chan Kim, Research Center for Herbal Convergence on Liver Disease, Department of Herbal Formulation, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 1, Hanuidae-ro, Gyeongsan-si, Gyeongsangbuk-do, 38610, Republic of Korea.
Tel : +82-53-819-1862, Fax : +82-53-819-1860, E-mail : sckim@dhu.ac.kr
• Received : November 5, 2018 / Revised : November 16, 2018 / Accepted : November 22, 2018

에 이용되어 왔다[12]. 胡蘿蔔의 효능과 관련된 연구를 통하여 항산화[13], 항진균[14], 항돌연변이[15], 암세포 사멸[16,17], 혈압저하[18] 효능이 보고되었으며, 胡蘿蔔 에탄올 추출물은 lipopolysacharide로 활성화된 대식세포에서 산화질소와 prostaglandin E_2, 전염증성 싸이토카인의 생성을 억제하는 효능이 있음을 규명하였다[19]. 그러나 胡蘿蔔의 항산화 효능에 관여하는 분자적 기전에 대한 연구는 상대적으로 부족하였다. 따라서 본 연구에서는 HepG2 세포에 대표적 지질 과산화물 유도체 중 하나인 *tert*-butyl hydroperoxide (tBHP)를 처치하여 산화적 스트레스를 통한 세포 독성을 유도하였고[20-23], 胡蘿蔔 에탄올 추출물의 세포 보호 효능 및 이와 관련된 분자기전을 규명하고자 하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

1. 胡蘿蔔 에탄올 추출물 제조

胡蘿蔔 에탄올 추출물 (*D. carota* ethanol extract, DCE)은 기 보고된 방법을[19] 약간 변형하여 제조하였다. 胡蘿蔔은 2016년 6월에 서문시장 (Daegu, Korea)에서 구입하고 냉동보관하였다. 胡蘿蔔 300 g을 100% 에탄올 3 L에 넣어 상온에서 3일간 용출시킨 후 거즈로 1차 여과하였다. 여과액을 3000 ×g에서 3분간 원심분리하여 얻은 상층액을 다시 Whatman No.2 filter (Nalgene, New York, USA)로 2차 여과한 후 동결건조 (LABCONCO, Kansas, MO, USA)하여 胡蘿蔔 에탄올 추출물, DCE를 제조하였다. DCE의 최종 수율은 7.41%였으며, dimethyl sulfoxide (DMSO)에 300 mg/mL의 농도로 용해하여 본 연구에 사용하였다.

2. 시약

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), phosphate-buffered saline (PBS), penicillin-streptomycin은 Gibco (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. tBHP, 3-(4.5-dimethylthlazol)-2.5-diphenyltetrazollum bromide (MTT), 2', 7'-dicholorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)와 anti-β-actin 항체는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, DMSO는 Junsei Chemical (Tokyo, Japan)에서 구입하였다. Rhodamine 123 (Rho123)과 compound C는 Calbiochem (San Diego, CA, USA)에서 구입하였다. Anti-poly(ADP-ribose) polymerase (PARP), anti-caspase-3, anti-Bcl-2, anti-phosphorylated AMPK (Ser172), anti-AMPK 및 horseradish peroxidase가 결합된 2차 항체는 Cell signaling Technology (Beverely, MA, USA)에서 구입하였다.

3. 세포 배양

인체 유래 간세포주인 HepG2 세포는 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 구입하였으며, 10% FBS, 100 units/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin을 포함한 DMEM 배지에서 37℃, 5% CO_2 조건으로 배양하여 실험목적에 맞는 multi-well plate 바닥 면적의 80-90% 정도 성장시킨 후 실험에 이용하였다.

4. 세포 생존율 분석

24-well plate에 5 × 10^5 cells/well의 농도로 분주하여 12시간 배양된 HepG2 세포를 12시간 동안 FBS가 포함되지 않은 DMEM에서 배양한 후, 3-300 μg/mL DCE를 처치하였다. DCE 처치 1시간 후 150 μM의 tBHP를 12시간 동안 처치하여 산화적 스트레스에 의한 세포 손상을 유도하였다. 약물 처치가 완료된 HepG2 세포에 1 mg/mL MTT 용액을 각 well 당 200 μL씩 첨가한 후 37℃에서 1시간 추가 배양하고 배양액을 완전히 제거하였다. 세포 내 생성된 formazan을 DMSO로 용해시킨 후 automated microplate reader (Infinite M200 Pro, Tecan, Männedorf, Switzerland)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 무처치 세포의 흡광도에 대한 상대적인 백분율로 계산하였다.

5. 전세포 단백질 조추출액 제조 및 면역화학 분석

처치가 완료된 HepG2 세포로부터 전세포 단백질 조추출액은 phosphatase 및 protease inhibitor가 첨가된 radioimmunoprecipitation buffer를 이용하여 기 보고된 방법에 따라 제조하였으며[8], bicinchoninic acid protein assay kit (Thermo Fischer Scientific, Rockford, IL, USA)를 이용하여 조추출액 내 단백질 함량을 정량하였다. 동량의 전세포 단백질 조추출액을 8-12% sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel에서 전기영동하여 분리한 후, nitrocellulose 또

는 polyvinylidene difluoride membrane으로 전이하였다. 5% skim milk (또는 bovine serum albumin)로 상온에서 2시간 반응시킨 후, 표적단백질에 대한 1차 항체와 반응시키고, horseradish peroxidase가 결합된 2차 항체와 반응시켰다. 반응이 종료된 membrane은 enhanced chemiluminescense detection kit와 Imager 600 (GE healthcare life sciences, Buckinghamshire, UK)을 이용하여 면역화학 분석을 수행하였다. 약물 처치에 따른 표적 단백질의 상대적인 발현량의 변화는 Image J (http://imagej.nih.gov/ij)를 이용하여 분석하였다.

6. 세포 내 H_2O_2 함량 측정

세포 내 H_2O_2 생성량의 변화를 측정하기 위해 약물 처치가 완료된 HepG2 세포를 30 μg/mL DCFH-DA와 10분간 반응시킨 후 세포를 회수하였다. 세포 내부의 H_2O_2와 DCFH-DA가 반응하여 생성된 dichlorofluorescin의 형광 강도를 485 및 530 nm의 파장에서 automated microplate reader (Tecan)로 측정하였다.

7. 환원형 GSH 함량 측정

약물 처치가 완료된 HepG2 세포에 500 μL의 metaphosphoric acid를 첨가하여 용해시킨 후, 3,000 ×*g*에서 10분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 상층액 내 존재하는 환원형 GSH 함량은 GSH determination kit (Oxis International, Portland, OR, USA)를 이용하여 automated microplate reader (Tecan)로 405 nm에서 측정하였다. 약물 처치에 따른 환원형 GSH 함량의 변화는 무처치 세포의 흡광도에 대한 백분율로 계산하였다.

8. 미토콘드리아 막 전위 측정

약물처치가 완료된 HepG2 세포를 0.05 μg/mL Rho123와 30분간 반응시켜 염색한 후, 세포를 회수하여 1%의 FBS가 포함된 phosphate-buffered saline에 부유시켰다. 부유된 세포의 미토콘드리아 막 전위의 변화는 Partec GmbH FACS Calibur flow cytometer (Münster, Germany)를 이용하여 10,000개의 세포의 형광을 측정하여 분석하였다.

9. 통계분석

모든 실험결과는 3회 반복시행 후 mean ± standard deviation (S.D.)로 표기하였으며, 그룹간 통계적 유의성은 one way analysis of variance로 분석한 후, Tukey HSD test 또는 Dunnett T3 test로 사후 검정하였다. 모든 결과의 통계적 유의성은 $P < 0.05$ 또는 $P < 0.01$을 기준으로 설정하였다.

Ⅲ. 실험 결과

1. 胡蘿蔔 에탄올 추출물의 tBHP 유도성 세포자멸사에 대한 세포 보호 효과

胡蘿蔔 에탄올 추출물 (DCE)의 세포 보호 효능을 연구하기에 앞서 DCE의 세포독성 여부를 HepG2 세포에 3-300 μg/mL의 DCE를 12시간 동안 처치한 후 세포 생존율의 변화를 측정하여 확인하였다. MTT assay 결과, 무처치 대조세포, 3, 10, 30, 100, 및 300 μg/mL DCE 처치에 의한 세포 생존율은 각각 대조세포 (100.00 ± 2.10%)의 97.42 ± 2.86, 96.36 ± 2.49, 96.38 ± 2.28, 97.65 ± 1.96 및 97.94 ± 3.19%였으며, 3-300 μg/mL DCE의 처치는 무처치 대조세포의 세포 생존율과 비교하여 통계적으로 유의한 변화를 나타내지 않았다 (Fig. 1A). 따라서 DCE는 300 μg/mL까지 HepG2 세포에 대한 독성이 없음을 확인하여 이후 모든 실험에서는 300 μg/mL 이하 농도의 DCE를 처치하여 DCE의 산화적 스트레스에 대한 세포 보호 효능과 분자기전을 연구하였다. tBHP는 산화적 스트레스를 유도하여 세포 사멸을 유발하는 대표적인 지질 과산화물 유도체이다[20-23]. DCE가 tBHP 유도성 세포 독성에 대한 보호 효능을 나타내는지 연구하기 위하여 10-300 μg/mL DCE를 전처치한 HepG2 세포에 150 μM tHBP를 12시간 동안 처치하였다. 선행 연구 보고와 유사하게[21-23], 12시간 동안의 tBHP 처치는 무처치 대조세포와 비교하여 세포 생존율을 29.89 ± 3.25%로 통계적으로 유의하게 감소시켰다. 그러나, 10-300 μg/mL의 DCE 전처치는 농도 의존적으로 tBHP에 의해 감소한 세포 생존율을 증가시키는 경향을 나타내었으며, 10-300 μg/mL의 DCE 전처치에 의한 세포 생존율의 변화는 tBHP 단독 처치세포와 비교하여 통계적으로 유의하였다. 10, 30, 100 및 300 μg/mL DCE 전처치 후 tBHP 처치에 의한 세포 생존율은 각각 대조세포 (100.00 ± 0.65%)의 55.40 ± 2.32, 67.00 ± 6.49, 87.53

± 1.80 및 98.18 ± 1.17%였다 (Fig. 1B).

DCE가 tBHP에 의하여 유도된 세포자멸사의 억제를 통하여 세포 보호 효능을 나타내는지 연구하기 위하여 세포자멸사 관련 단백질들의 발현 변화를 면역화학 분석으로 확인하였다. 선행 연구 보고와 유사하게 [21-23], 12시간 동안의 tBHP 처치는 무처치 대조세포와 비교하여 PARP 및 caspase-3 전구체와 Bcl-2 단백질의 발현을 감소시켰다. 그러나, DCE 전처치는 tBHP에 의하여 감소한 PARP 및 caspase-3 전구체와 Bcl-2 단백질의 발현을 현저히 증가시키는 경향을 나타내었다 (Fig. 1C). 300 μg/mL DCE의 단독 처치는 무처치 대조세포와 비교하여 PARP 및 caspase-3 전구체와 Bcl-2 단백질들의 발현을 변화시키지 않았다. 더불어 100-300 μg/mL의 DCE 전처치가 tBHP에 의하여 증가한 cleaved form의 PARP와 cleaved form의 caspase-3를 억제함을 확인하였다 (data not shown). 특히 100 또는 300 μg/mL의 DCE 전처치에 의한 PARP 전구체 단백질의 발현 변화와 300 μg/mL의 DCE 전처치에 의한 caspase-3 전구체 단백질의 발현 증가는 tBHP 처치 세포와 비교하여 통계적으로 유의하였다. tBHP 단독, tBHP + 100 μg/mL DCE, tBHP + 300 μg/mL DCE 및 300 μg/mL DCE 처치에 의한 PARP 전구체 단백질의 발현 변화는 각각 대조세포 (1.00 ± 0.16)의 0.54 ± 1.18, 0.80 ± 0.23, 0.82 ± 0.13 및 0.87 ± 0.18배였으며, caspase-3 전구체 단백질의 발현 변화는 각각 대조세포 (1.00 ± 0.17)의 0.41 ± 0.02, 0.89 ± 0.16, 1.02 ± 0.24, 및 0.78 ± 0.21 배였다 (Fig. 1D).

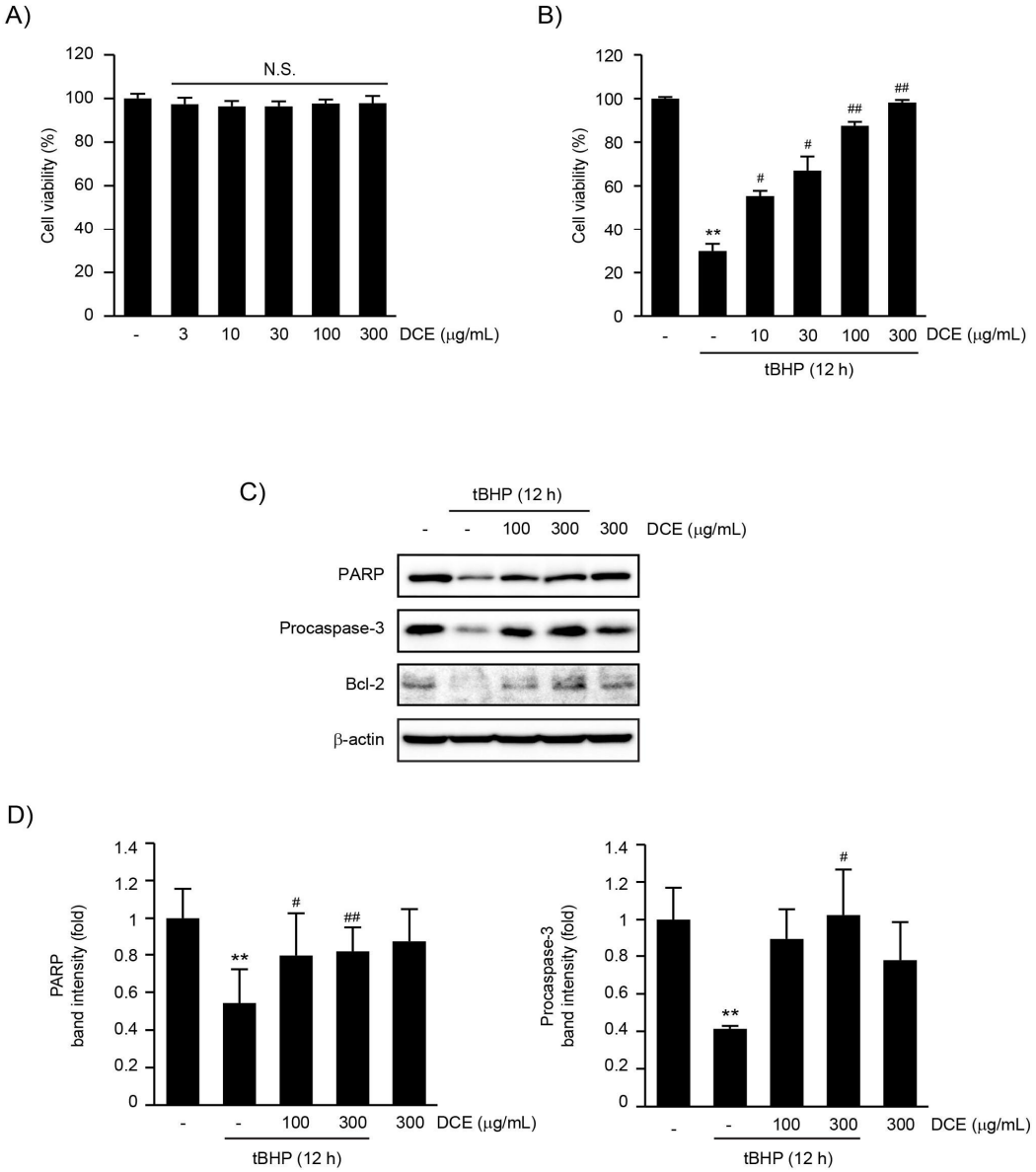

Fig 1. DCE inhibited tBHP-induced apoptosis in HepG2 cells. (A) Effect of DCE on viability of HepG2 cells. To investigate cytotoxicity of DCE, HepG2 cells were treated with 3-300 μg/mL of DCE for 12 h. Relative cell viability was determined by MTT assay. (B) Effect of DCE on tBHP-mediated cytotoxicity. HepG2 cells were pre-treated with 10-300 μg/mL of DCE for 1 h and subsequently exposed to 150 μM of tBHP for 12 h. (C) Effect of DCE on tBHP-induced apoptosis. Cells were treated with DCE and tBHP, as described in panel B. Expression of apoptosis-related proteins was determined by immunoblot analysis. Equal protein loading was verified by β-actin immunoblotting. (D) Densitometric analysis. Scanning densitometry was conducted to compare changes on total PARP and procaspase-3 expression. Results represent mean ± S.D. of three separated experiments (Significant versus untreated control cells, $^{**}P < 0.01$; significant versus tBHP-treated cells, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$; N.S., not significant).

2. 胡蘿蔔 에탄올 추출물의 tBHP 유도성 산화적 스트레스에 대한 억제 효과

tBHP는 세포 내에서 활성산소종 생성 증가, 환원형 GSH 고갈, 미토콘드리아 막전위 저하를 통하여 세포 사멸을 유도한다[21-23]. DCE가 산화적 스트레스의 억제를 통해 tBHP 유도성 세포 사멸에 대한 보호 효능을 나타내는지 규명하기 위하여 우선 DCE 전처치에 따른 세포 내 H_2O_2 생성의 변화를 연구하였다. HepG2 세포에서 12시간 동안의 tBHP 처치는 H_2O_2 생성을 무처치 대조세포 (1.00 ± 0.07)와 비교하여 1.94 ± 0.19배 통계적으로 유의하게 증가시켰다. 그러나, 100과 300 μg/mL의 DCE 전처치는 H_2O_2 생성을 각각 1.49 ± 0.11배와 1.37 ± 0.13배로 DCE 처치 농도 의존적으로 억제하였으며, 100과 300 μg/mL의 DCE 전처치에 의한 H_2O_2 생성의 변화는 tBHP 단독 처치 세포와 비교하여 통계적으로 유의하였다. HepG2 세포에 300 μg/mL DCE의 단독 처치는 무처치 대조세포와 비교하여 H_2O_2 생성을 변화시키지 않았다 (0.97 ± 0.13배)(Fig. 2A).

환원형 GSH는 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는 대표적인 내인성 항산화물질이다. 12시간 동안의 tBHP 처치는 세포 내 환원형 GSH 함량을 무처치 대조세포와 비교하여 20.84 ± 17.20%로 통계적으로 유의하게 감소시켰으나, 100과 300 μg/mL의 DCE 전처치는 tBHP에 의하여 감소된 환원형 GSH를 각각 44.65 ± 17.44와 107.76 ± 15.78%로 증가시켰다. 특히, 300 μg/mL의 DCE 전처치에 의한 환원형 GSH 함량의 변화는 tBHP 처치 세포와 비교하여 통계적으로 유의하였다 (Fig. 2B).

HepG2 세포에 12시간 동안의 tBHP 처치는 미토콘드리아 막전위의 저하를 나타내는 낮은 Rho123 형광강도를 가지는 세포의 비율 (RN1 fraction)을 무처치 대조세포와 비교하여 통계적으로 유의하게 증가시켰으며, 100과 300 μg/mL의 DCE 전처치는 RN1 fraction의 세포 비율을 통계적으로 유의하게 감소시켰다. 무처치 대조세포, tBHP 단독, tBHP + 100 μg/mL DCE, tBHP + 300 μg/mL DCE 및 300 μg/mL DCE 처치에 의한 RN1 fraction의 비율은 각각 5.24 ±0.42, 32.01 ± 2.16, 5.32 ± 1.33, 3.14 ± 0.27 및 9.99 ± 3.78%였다 (Fig. 2C). 300 μg/mL DCE 단독 처치에 의한 환원형 GSH 함량과 RN1 fraction의 비율은 무처치 대조세포와 비교하여 유의적인 변화는 나타내지 않았다. 따라서 이상의 결과는 DCE가 tBHP에 의하여 증가된 산화적 스트레스를 억제하여 세포 보호 효능을 나타냄을 시사한다.

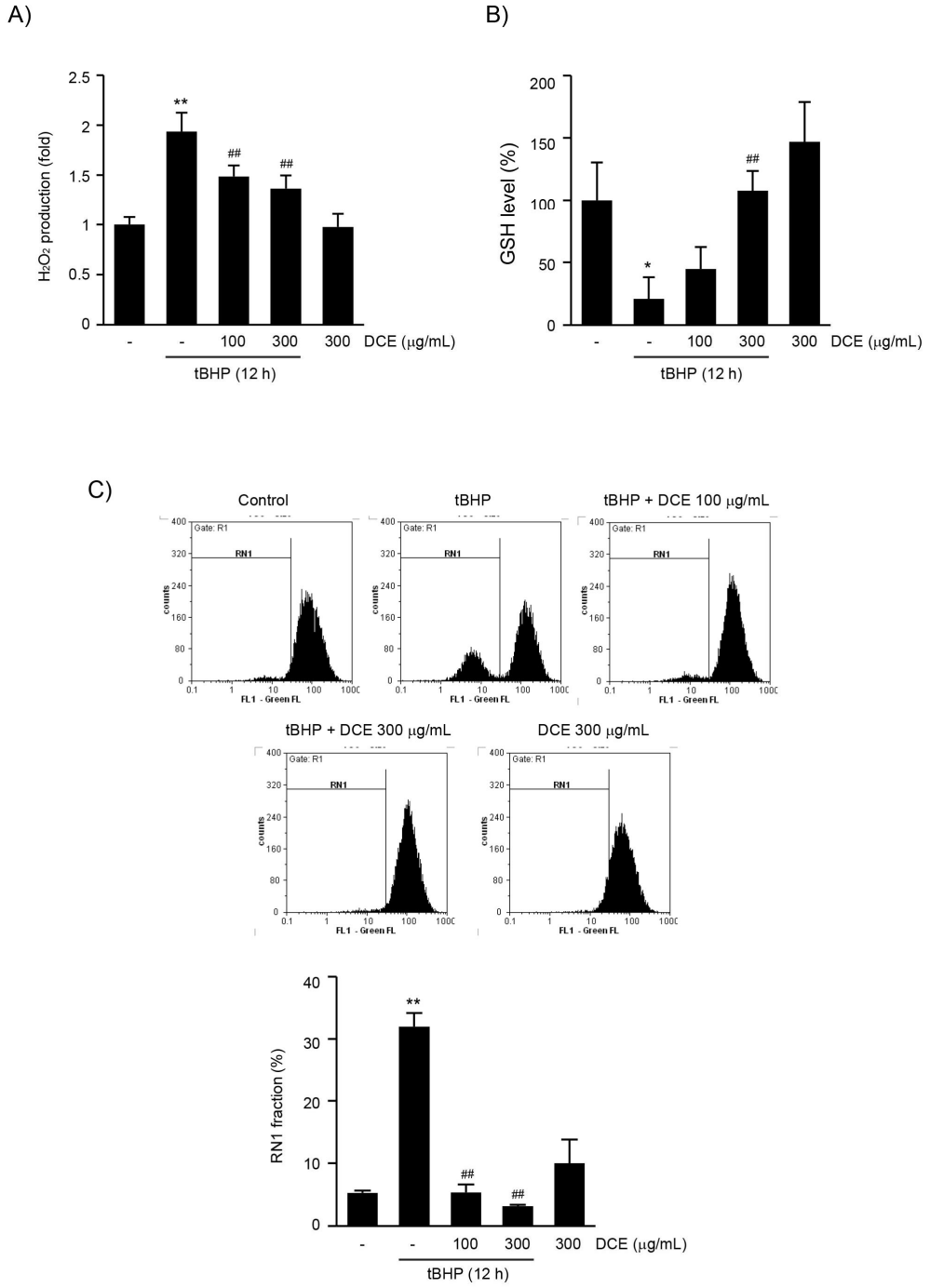

Fig. 2. DCE prevented tBHP-induced oxidative stress. (A) H_2O_2 production, (B) reduced GSH contents, and (C) mitochondrial membrane potentials were determined after HepG2 cells had been treated with DCE and tBHP, as described in panel B of figure 1. Cellular population showing low Rho123 intensities (RN1 fraction) were presented as percentage of the total cell analyzed (lower panel of C). Results represent mean ± S.D. of three separated experiments (Significant versus untreated control cells, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; Significant versus tBHP-treated cells, $^{\#\#}P < 0.01$).

3. 胡蘿蔔 에탄올 추출물의 AMPK 활성화를 통한 세포 보호 효능

본 연구실의 선행 연구를 통하여 특정 본초 추출물 및 단일성분들이 산화적 스트레스로부터 간 실질세포를 보호하는 과정에 AMPK의 활성화가 관여함을 보고하였다[4-8]. 따라서, DCE가 산화적 스트레스로부터 보호하는 과정에 AMPK의 활성화가 관여하는지 규명하기 위하여 HepG2 세포에 300 μg/mL의 DCE를 처치하였다. DCE 처치 시간에 따른 AMPK의 인산화를 관찰한 결과, DCE 처치 0.25, 0.5, 1, 3 및 6시간 후 AMPK의 인산화는 각각 대조세포(1.00 ± 0.49)의 1.45 ± 0.25, 2.09 ± 0.14, 2.77 ± 0.47, 2.30 ± 0.13, 및 1.66 ± 0.37배로 1시간에서 AMPK의 인산화가 가장 많이 증가하였고, 1시간 이후 감소하는 경향을 나타내었다. 무처치 대조세포와 비교하여 300 μg/mL의 DCE 처치 0.5, 1과 3시간의 AMPK의 인산화 증가가 통계적으로 유의하였다 (Fig. 3A).

다음으로 DCE에 의한 AMPK 인산화가 DCE의 세포 보호에 관여하는지 규명하기 위하여 AMPK 화학적 억제제인 compound C를 전처치한 후 300 μg/mL DCE와 150 μg/mL tBHP를 처치하여 세포 생존율의 변화를 관찰하였다. 그 결과, tBHP 유도성 세포 독성에 대한 DCE의 세포 보호 효능이 compound C 전처치에 의하여 억제됨을 확인하였다. 대조세포, tBHP 단독, tBHP + DCE, compound C, compound C + tBHP 및 compound C + tBHP + DCE의 세포생존율은 각각 100.00 ± 4.23, 30.63 ± 13.18, 68.30 ± 4.04, 94.58 ± 8.05, 17.86 ± 5.31 및 17.46 ± 6.34%였다 (Fig. 3B). 따라서 이상의 결과는 DCE가 AMPK의 활성화를 통하여 산화적 스트레스로부터 세포를 보호할 수 있음을 나타낸다.

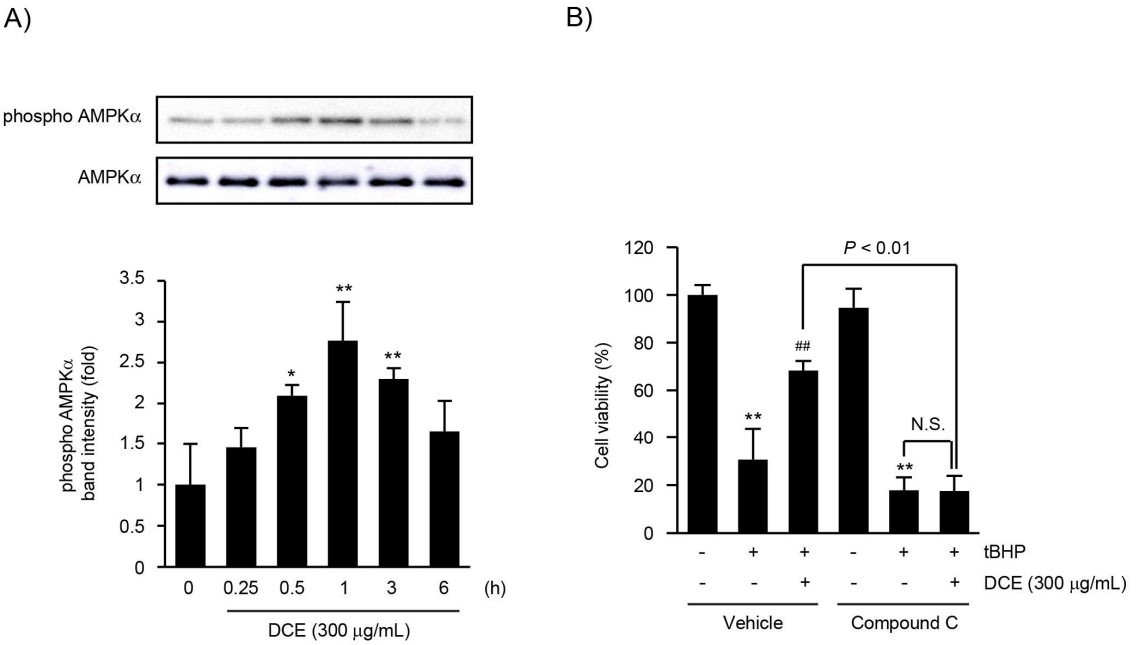

Fig. 3. DCE protected HepG2 cells from oxidative stress through AMPK activation. (A) AMPK phosphorylation by DCE. Whole cell lysates prepared from HepG2 cells that had been incubated with 300 μg/mL of DCE for 0.25-6 h were immunoblotted for phosphorylated AMPK (upper). Relative band intensity of phosphorylated AMPK was quantified by scanning densitometry (lower). (B) Role of AMPK on DCE-mediated cytoprotection. HepG2 cells were pre-treated with 10 μM compound C for 1 h and subsequently exposed to DCE and tBHP, as described in panel B of figure 1. Relative cell viability was determined by MTT assay. Results represent mean ± S.D. of three separated experiments (Significant versus untreated control cells, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; Significant versus tBHP-treated cells, $^{\#\#}P < 0.01$).

Ⅳ. 고찰

胡蘿蔔에는 α-, β-, γ-, ε-carotene, lycopene, phytofluene 등 여러 가지의 carotenoid류 화합물과 vitamine B1, vitamine B2, anthocyanidin 등을 함유하고 있으며[12,24], 특히 β-carotene은 胡蘿蔔에 포함된 가장 대표적인 항산화, 항암 활성을 나타내는 성분으로 보고되었다[15,25]. 선행 연구에서 胡蘿蔔 열수 추출물 및 정유 성분에 포함된 phenol, flavonoids, terpenes 등의 성분들이 사염화탄소로 유도한 급성 간독성 병태 동물 모델에서 항산화능을 증가시켜 급성 간독성과 관련된 혈액 및 조직학적 지표들을 개선할 수 있음이 보고되었으나[26-28], 항산화 효능의 증가와 관련된 胡蘿蔔의 세포 및 분자 수준에서의 기전 연구는 상대적으로 부족하였다. 따라서 본 연구에서는 간 실질세포주인 HepG2 세포를 이용하여 胡蘿蔔의 세포 보호 효능 및 이와 관련된 분자기전을 규명하고자 하였다.

본 연구실에서는 선행 연구를 통하여 대표적인 과산화 유기화합물인 tBHP가 HepG2 세포에서 활성산소종의 증가, 미토콘드리아 막전위 저하, 환원형 GSH의 고갈을 통하여 세포자멸사를 유도할 수 있음을 보고하였다[21-23]. 더불어 tBHP에 의한 세포사 과정에는 세포 외액에 존재하는 Ca^{2+}를 세포 내로 유입하여 내인적 회로 (intrinsic pathway)의 활성화를 통하여 세포 자멸사가 유도될 수 있음이 보고되었다[20]. 본 연구에서도 선행 연구와 유사하게 HepG2 세포에 150 μM의 tBHP를 12시간 동안 처치한 결과 세포 내 H_2O_2의 생성 증가, 환원형 GSH의 고갈, 미토콘드리아 막전위의 저하가 무처치 대조세포와 비교하여 통계적으로 유의하게 증가함을 확인할 수 있었다. 또한 150 μM의 tBHP에 의하여 Bcl-2, caspase-3 전구체와 PARP 전구체 단백질의 감소를 확인하여 tBHP가 내인적 회로의 활성화로 세포자멸사를 유도함을 규명하였다. HepG2 세포에 30-300 μg/mL의 DCE 전처치는 tBHP에 의한 세포 사멸을 농도 의존적으로 통계적으로 유의하게 억제하였으며, 더불어 tBHP에 의하여 유도되는 산화적 스트레스 (활성산소종의 증가, 미토콘드리아 막전위 저하, 환원형 GSH의 고갈)의 억제를 통하여 DCE가 세포자멸사를 억제할 수 있음을 규명하였다. 따라서 이상의 연구를 통하여 DCE의 항산화능을 세포 수준에서 입증하였으며, DCE에 함유된 주요 활성 성분들의 항산화 효능과 관련된 후속 연구가 필요할 것으로 생각된다.

본 연구에서는 DCE가 AMPK의 인산화 증가와 더불어 AMPK 화학적 억제제 전처치시 DCE의 세포 보호 효능이 억제됨을 연구하여 산화적 스트레스에 대한 DCE의 세포 보호 효능에 AMPK의 활성화가 수반됨을 규명하였다. 본 연구실에서는 선행 연구를 통하여 산화적 스트레스로부터 간 실질세포를 보호할 수 있는 소재로써 十全大補湯, 白芍藥, 夏枯草, 密蒙花, 靑蒿로부터 분리한 tryptanthrin, 艾葉으로부터 분리한 eupatilin 등을 발굴하였으며, 이들 모두 AMPK의 활성화를 통하여 세포 보호 효능을 나타냄을 규명하였다[4-8,29]. 이들 소재들의 기전 연구를 통하여 AMPK 하위 신호분자로서 glycogen synthase 3β의 인산화를 통한 억제[5], p38 mitogen-activated protein kinase의 인산화[8], sestrin2-AMPK를 통한 자가포식작용의 활성화가[29] 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는데 관여함을 보고하였다. Liver kinase B1, Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2, TGF-β activated kinase 1이 AMPK catalytic subunit의 인산화에 관여하는 상위 신호분자로서 규명되었으며[10], 十全大補湯과 夏枯草는 각각 Ca^{2+}/calmodulin-dependent protein kinase kinase 2와 Liver kinase B1가 AMPK의 상위 신호분자임을 보고하였다[4,6]. 더불어 문 등은 (2014) tBHP 유도성 산화적 스트레스의 억제에 extracellular signal-regulated kinase 의존적 Nrf2의 활성화가 관여함을 보고하였다[21]. 더불어 AMPK는 Nrf2의 핵 배출 영역 (nuclear export domain)에 포함되는 serine 550번의 인산화를 통하여 Nrf2의 핵 내 축적을 야기하여 항산화 유전자의 발현을 증가시킬 수 있음이 보고되었다[11].

본 연구에서는 胡蘿蔔 에탄올 추출물 (DCE)이 AMPK의 활성화를 통하여 tBHP 유도성 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는 항산화 효능이 있음을 규명하였다. 이후 DCE의 다른 산화적 스트레스 세포 모델에서의 효능 검증, AMPK 활성화와 관련된 상위/하위 신호분자 연구, DCE에 포함된 주요 항산화 화합물들의 동정, 실험동물 수준에서의 *in vivo* 간보호 효능과 관련된 후속 연구가 지속적으로 이루어진다면 산화적 스트레스가 원인인 다양한 급만성 간질환을 치료하는 처방을 구성하는 신규 약재로서 胡蘿蔔을 활용할 수 있을 것으로 생각된다.

V. 결론

HepG2 세포에서 산화적 스트레스에 대한 胡蘿蔔 에탄올 추출물 (DCE)의 간 실질세포 보호 효능 연구를 통하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. HepG2 세포에 10-300 μg/mL DCE의 전처치는 tBHP에 의한 세포 독성을 농도 의존적으로 억제하였으며, 세포자멸사와 관련된 PARP 전구체, caspase-3 전구체, Bcl-2 단백질의 발현 감소를 억제하였다.
2. DCE의 전처치는 tBHP에 의한 H_2O_2 생성 증가, 환원형 GSH 고갈과 미토콘드리아 막 전위 저하를 억제하였다.
3. DCE 처치 0.5-3시간에 AMPK의 인산화를 증가시켰으며, AMPK 화학적 억제제인 compound C의 처치는 DCE의 세포 보호 효능을 억제하였다.

감사의 글

이 논문은 2018년도 정부(과학기술정보통신부)의 재원으로 한국연구재단 (No. 2018R1A5A2025272)의 지원을 받아 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

1. Chandra J, Samali A, Orrenius S. Triggering and modulation of apoptosis by oxidative stress. Free Radical Biol. 2000;29(3-4):323-33.
2. Sosa V, Moliné T, Somoza R, Paciucci R, Kondoh H, LLeonart ME. Oxidative stress and cancer: an overview. Ageing Res Rev. 2013;12(1): 376-90.
3. Li S, Tan HY, Wang N, Zhang ZJ, Lao L, Wong CW, et al. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. Int J Mol Sci. 2015;16(11):26087-124.
4. Park SM, Kim SW, Jung EH, Ko HL, Im CK, Lee JR, et al. Sipjeondaebo-tang alleviates oxidative stress-mediated liver injury through activation of the CaMKK2-AMPK signaling pathway. Evid Based Complement Alternat Med. 2018;2018:8609285.
5. Ko HL, Jung EH, Jung DH, Kim JK, Ku SK, Kim YW, et al. Paeonia japonica root extract protects hepatocytes against oxidative stress through inhibition of AMPK-mediated GSK3 β. J Funct Foods. 2016;20:303-16.
6. Seo HL, Baek SY, Lee EH, Lee JH, Lee SG, Kim KY, et al. Liqustri lucidi Fructus inhibits hepatic injury and functions as an antioxidant by activation of AMP-activated protein kinase in vivo and in vitro. Chem Biol Interact. 2017;262:57-68.
7. Jung JY, Lee CW, Park SM, Jegal KH, Kim JK, Park CA, et al. Activation of AMPK by *Buddleja officinalis* Maxim. flower extract contributes to protecting hepatocytes from oxidative stress. Evid Based Complement Alternat Med. 2017;2017:9253462.
8. Jung EH, Jung JY, Ko HL, Kim JK, Park SM, Jung DH, et al. Tryptanthrin prevents oxidative stress-mediated apoptosis through AMP-activated protein kinase-dependent p38 mitogen-activated protein kinase activation. Arch Pharm Res. 2017;40(9):1071-86.
9. Hardi DG, Ross FA, Hawley SA. AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis. Nat Rev Mol Cell Biol. 2015;13(4):251-62
10. Jeon SM. Regulation and function of AMPK in physiology and diseases. Exp Mol Med. 2016;48(7):e245.
11. Joo MS, Kim WD, Lee KY, Kim JH, Koo JH, Kim SG. AMPK facilitates nuclear accumulation of Nrf2 by phosphorylating at serine 550. Mol Cell Biol. 2016;36(14):1931-42.
12. Kim CM, Shin MK, Ahn DK, Lee KS. The encyclopedia of oriental herbal medicine. 3rd ed. Seoul:Jungdam Publisher. 2004:4822-3.
13. Zhang D, Hamauzu Y. Phenolic compounds and their antioxidant properties in different tissues of carrots (Daucus carota L.). J Food Agric Environ. 2004;2(1):95-100.
14. Tavares AC. Gonçalves MJ, Cavaleiro C,

Cruz MT, Lopes MC, Canhoto J, et al. Essential oil of Daucus carota subsp. halophilus: composition, antifungal activity and cytotoxicity. J Ethnopharmacol. 2008; 119(1):129-34.
15. Lee HJ, Park YK, Kang MH. The effect of carrot juice, β-carotene supplementation on lymphocyte DNA damage, erythrocyte antioxidant enzymes and plasma lipid profiles in Korean smoker. Nutr Res Pract. 2011;5(6):540-7.
16. Han EJ. Cytotoxicity of Daucus carota L. on various cancer cells. J Korean Soc Food Sci Nutr, 2000;29(1):153-60.
17. Zaini RG, Brandt K, Clench MR, Le Maitre CL. Effects of bioactive compounds from carrots (Daucus carota L.), polyacetylenes, beta-carotene and lutein on human lymphoid leukaemia cells. Anticancer Agents Med Chem. 2012;12(6):640-52.
18. Gilani AH, Shaheen F, Saeed SA, Bibi S, Sadiq M, Faizi S. Hypotensive action of coumarin glycosides from Daucus carota. Phytomedicine. 2000;7(5):423-6.
19. Lee DJ, Park SM, Hwangbo M, Jung TY, Kim SC, Jee SY. Roots of Daucus carota sativa abrogates acute phase of Inflammation by the Inhibition of NO and Pro-Inflammatory Cytokine Production. J Korean Med Ophthalmol Otolaryngol Dermatol. 2013;26(2):45-57.
20. Kim JA, Kang YS, Kim YO, Lee SH, Lee YS. Role of Ca^{2+} influx in the tert-butyl hydrogenperoxide-induced apoptosis of HepG2 human hepatoblastoma cells. Exp Mol Med. 1998;30(3):137-44.
21. 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-E2-related factor 2 pathway. Biol Pharm Bull. 2014;37(10): 1633-40.
22. Park SM, Lee JR, Ku SK, Cho IJ, Byun SH, Kim SC, et al. Isoliquiritigenin in licorice functions as a hepatic protectant by induction of antioxidant genes through extracellular signal-regulated kinase-mediated NF-E2-related factor-2 signaling pathway. Eur J Nutr. 2016;55(8):2431-44.
23. Kim SC, Lee JR, Park SJ. Role of 6-shogaol in tert-butyl hydroperoxide-induced apoptosis of HepG2 cells. Pharmacology. 2014;93(3-4): 137-44.
24. Ksouri A, Dob T, Belkebir A, Krimat S, Chelghoum C. Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil and the methanol extract of Algerian wild carrot Daucus carota L. ssp. carota.(L.) Thell. J Mater Environ Sci. 2015;6(3):784-91.
25. Lee JM, Shin KS, Lee HJ. Determination of antioxidant vitamins in horticultural foods. J Korean Soc Food Sci Nutr. 1999;14(2): 167-75.
26. Bishayee A, Sarkar A, Chatterjee M. Hepatoprotective activity of carrot (Daucus carota L.) against carbon tetrachloride intoxication in mouse liver. J Ethnopharmacol. 1995;47(2):69-74.
27. Balasubramaniam P, Pari L, Menon VP. Protective effect of carrot (Daucus carota L.) against lindane-induced hepatotoxicity in rats. Phytother Res. 1998;12(6):434-6.
28. Shebaby WN, Daher CF, El-Sibai M, Bodman-Smith K, Mansour A, Karam MC, et al. Antioxidant and hepatoprotective activities of the oil fractions from wildcarrot (Daucus carota ssp. carota). Pharm Biol. 2015;53(9): 1285-94.
29. Jegal KH, Ko HL, Park SM, Byun SH, Kang KW, Cho IJ, et al. Eupatilin induces sestrin2-dependent autophagy to prevent oxidative stress. Apoptosis. 2016;21(5):642-56.