

마황 추출물의 *in vitro* 간세포 염증반응 유도

김 일 낭^{1,*}

¹울산과학대학교 식품영양학과

In vitro hepatocyte inflammation by *Ephedra sinica* extracts

Ilrang Kim^{1,*}

¹Department of Food and Nutrition, Ulsan College

Abstract In this study, the *in vitro* hepatotoxic mechanism of *Ephedra sinica* (ma-huang) was investigated by measuring the degree of cell death, secretion of cytokine, and fat accumulation by treating HepG2 cells with 70% ethanolic extracts of ma-huang. Cell death was observed at concentrations of around 5-100 µg/mL by treatment with ma-huang extracts ($p < 0.05$). The secretion of interleukin 8 (IL-8) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), which are inflammatory cytokines, were significantly promoted at concentrations of around 0.05-100 and 0.5-100 µg/mL, respectively ($p < 0.05$). In this experiment, it was shown that the extracts of ma-huang stimulate the secretion of inflammatory cytokines, such as IL-8 and M-CSF, and lead to fat accumulation in the hepatocytes, thereby causing inflammation of the hepatocytes. Hepatotoxicity was observed at around 10-500 times lower concentration than the concentration required to cause serious toxicity, such as cell death, suggesting that hepatic toxicity (hepatitis) may be induced at a low dose.

Keywords: *Ephedra sinica* (ma-huang), inflammation, interleukin-8, macrophage colony-stimulating factor, lipid accumulation

서 론

건강증진식품이나 대체 의학으로 사용되고 있는 다양한 식물성 제제는 천연물이므로 안전하다고 인식되고 있다. 그러나 이러한 식물성 제제 섭취로 인한 부작용이 지속적으로 보고되고 있으며(Shaw, 2010), 특히 간손상은 식물성 제제 섭취로 인해 발생하는 가장 빈번한 부작용 중 하나이며 식물성 제제의 판매가 급증되는 가장 주요한 원인으로 알려져 있다(Björmsen, 2006; Estes 등, 2003; Stickel 등, 2005). 간독성을 유발하는 것으로 보고된 식물은 germander, comfrey, kava, chaparral, ma-huang 등이 있다.

Ephedrine, pseudoephedrine, norephedrine, norpseudoephedrine, N-methylephedrine, N-methylpseudoephedrine 등의 ephedrine-type alkaloid 성분을 함유하고 있는 마황(*ma-huang*, *Ephedra sinica*)은 전통적으로 천식, 비출혈, 발열 등의 치료를 위해 사용되어 왔으며, 특히 최근에는 체중 감소를 위한 목적으로 많이 섭취되고 있다(Lee 등, 2000). 그러나 마황의 섭취 빈도가 증가하면서 간염과 같은 간독성 사례가 지속적으로 보고되고 있다(Bajaj 등, 2003; Estes 등, 2003; Nadir 등, 1996; Skoulidis 등, 2005; Zhu 등, 2015).

지금까지 마황에 의한 간독성에 관한 연구는 대부분 마황 섭취 후 간손상이 유발된 환자에 대한 사례 보고들에 국한되어 있고 *in vitro*나 동물 실험을 통한 간독성 기전에 대한 연구는 전무한 실정이다.

이에 본 연구에서는 마황추출물에 의한 세포사멸, 사이토카인 분비, 세포 내 지방 축적 정도를 *in vitro* 간세포 실험을 이용하여 연구함으로써, 마황의 간독성 기전을 규명하기 위한 자료를 확보하고 나아가 식물성 제제의 안전성을 확립하기 위한 기초 자료로 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

마황 추출

본 실험에 사용된 마황은 경동시장에서 구입하여 동결건조한 후 분쇄하여 분말 상태로 만들어 실험에 사용하였다. 마황 분말에 20배(w/v)의 70% 에탄올(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 가하여 24시간 동안 70°C 진탕항온수조에서 추출 하였다. 추출 후 Whatman No. 42 여과지(Whatman, Maidstone, UK)로 여과시킨 추출물을 감압농축기를 이용하여 에탄올을 제거한 후 동결건조시켜 건조 추출물을 획득하였다. 건조 추출물을 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich)로 재용해하여 농도별로 준비한 후, 세포에 처리 시에는 배지로 희석하여 DMSO의 최종처리 농도를 0.1%로 하여 실험에 사용하였다.

세포 배양

HepG2 (human hepatocellular carcinoma) 세포는 ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)에서 분양 받아, 10% FBS (Gibco, Grand Island, NY, USA)를 첨가한 DMEM (Gibco, Grand Island, NY, USA) 배지를 이용하여 37°C, 5% CO₂의 배양기에서 배양하면서 실험에 사용하였다.

세포 사멸 측정

MTT assay를 통해 마황 추출물에 의한 HepG2 세포 독성을 알

*Corresponding author: Ilrang Kim, Department of Food and Nutrition, Ulsan College, Ulsan 682-715, Korea
Tel: +82-52-230-0745
Fax: +82-52-230-0749
E-mail: irkim@uc.ac.kr

Received November 5, 2018; revised December 5, 2018;
accepted December 6, 2018

아보았다. 55°C의 항온수조에서 열로 30분간 불활성화시킨 FBS를 10% 함유한 DMEM을 이용하여 HepG2 세포를 96 well plate에 분주하고 24시간 배양시켰다. 동일한 배지를 사용해 마황 추출물을 희석하여 농도별로 세포에 처리하고 37°C 배양기에서 반응시켰다. 24시간 후 추출물을 제거하고 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich) 시약을 가한 후 3시간 동안 배양기에서 반응시켰다. MTT 시약을 제거하고 DMSO를 가하여 실온에서 1시간 동안 반응시킨 후 microplate reader (Model 680, Bio-Rad Inc., Tokyo, Japan)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Lactate dehydrogenase (LDH) 분비를 측정하여 마황 추출물이 세포 사멸에 미치는 영향을 알아보았다. HepG2 세포에 마황 추출물을 24시간 동안 반응 시킨 후 *In vitro* toxicology assay kit/Lactate dehydrogenase based (Sigma chemical Co., St. Louis, Mo, USA)를 이용하여 405 nm에서 micro plate reader (Model 680, Bio-Rad Inc., Tokyo, Japan)로 흡광도를 측정하였다. 상층액을 분석하여 세포 밖으로 유출된 LDH의 양을 측정하고, 남은 well에 lysis buffer를 가하여 반응시킨 후 상층액을 분석하여 취하여 세포 외부로 유출된 양과 세포 내부 전체 LDH를 측정하였다. 총 LDH의 양 중에서 세포 외부로 유출된 LDH의 양을 비교하여 측정하였다.

사이토카인 분비 측정

마황 추출물에 의해 분비되는 사이토카인인 interleukin 8 (IL-8)의 측정을 위해 HepG2 세포를 열로 불활성화시킨 FBS를 10% 함유한 DMEM을 이용하여 48 well plate에 분주하고 24시간 동안 배양시켰다. 마황 추출물은 열로 불활성화시킨 FBS를 5% 함유한 DMEM을 사용해서 농도별로 희석하여 세포에 처리하고 37°C 배양기에서 반응시켰다. 24시간 후 상층액을 취하여 Quantikine Human CXCL8/IL-8 ELISA kit (R&D systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 실험한 후 microplate reader (Model 680, Bio-Rad Inc.)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 또 다른 사이토카인인 macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) 분비 측정은 IL-8 분비 실험과 동일하게 세포에 추출물을 처리하고 상층액을 취하여 Quantikine Human M-CSF ELISA kit (R&D systems)로 실험한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

지방 축적 측정

Black-walled 96 well optical plate에 세포를 분주하고 24시간 후에 마황 추출물을 농도별로 처리한 후 3시간 동안 반응시켰다. 상층액을 버리고 Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)로 2번 세척한 후 HBSS를 가하여 Victor3 plate reader (Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA)를 이용해 back ground 형광(excitation 535 nm, emission 580 nm)을 측정하였다. HBSS를 제거한 후 1 μM Nile-red (Sigma-Aldrich)를 첨가하고 4시간 동안 실온의 어두운 곳에서 반응시켰다. 상층액을 제거하고 HBSS로 3번 세척한 후 HBSS를 첨가하여 12시간 동안 실온의 어두운 곳에서 반응시킨 후 다시 형광을 측정하여 이 값으로부터 back ground 형광값을 빼서 상대적인 형광값을 비교하였다. 양성대조군으로 amiodarone (Sigma-Aldrich)을 동일한 방법으로 실험하여 비교하였다.

세포 내 축적된 지방에 Nile-red가 결합한 것을 확인하기 위해 8-well chamber slide에 세포를 분주하고 위와 같은 방법으로 실험한 후 공초점 주사 현미경(MRC-1024, confocal laser scanning microscope, Bio-Rad)을 이용하여 형광 이미지를 20배율에서 관찰하였다.

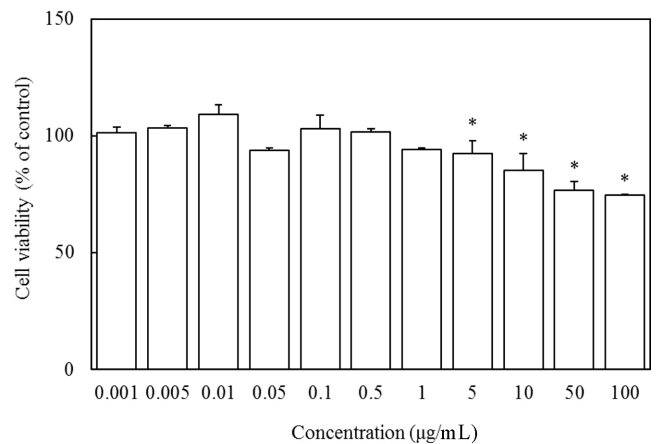


Fig. 1. HepG2 cell viability by ma-huang extract. HepG2 cells were treated ma-huang extract. After 24 h MTT assay was conducted. Results presented as % of control. Values are represented as mean±SD (n=3); **p*<0.05 compared with control group.

통계처리

모든 실험결과는 3회 반복 실시하여 결과를 평균±표준편차로 표시하였다. 각 실험군별 유의성은 SPSS (Statistical Package for the Social Science) 15.0 프로그램을 이용하여 ANOVA로 분석하였으며 *p*<0.05 수준에서 Duncan's multiple range test로 검정하였다.

결과 및 고찰

마황 추출물에 의한 간세포 사멸

MTT 실험을 통해 마황 추출물이 HepG2 간세포의 생존율에 미치는 영향을 측정한 결과(Fig. 1), 마황 추출물은 5-100 μg/mL의 처리 농도에서 대조군의 92.3-74.7% 수준으로 세포 생존율을 감소시키며 세포독성을 나타냈다(*p*<0.05).

마황의 이러한 세포 독성이 세포 사멸과 관련 있는지 확인하기 위해 LDH 분비 정도를 측정한 결과(Fig. 2), 마황 추출물은 5-100 μg/mL의 농도에서 대조군의 124.1-247.0% 수준으로 LDH를 분비하여 마황에 의한 세포 사멸 효과를 확인할 수 있었다 (*p*<0.05).

사이토카인 분비

Huang 등(1999)의 연구에 의하면 혈청의 IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-2r가 간경화 및 간암 환자에서 간염 환자보다 더 크게 증가하여 이러한 지표들이 간의 염증보다는 간경화 및 간암 같은 간 손상과 더 큰 연관이 있는 것으로 나타났다. 다른 인체 연구들에서도 간염 환자의 혈청에서 IL-8과 M-CSF가 고농도로 검출되었다 (Elewa 등, 2010; Zimmermen 등, 2011). 본 연구에서는 인체를 대상으로 한 연구들에서 간염 환자들에게서 유의적으로 증가한 사이토카인인 IL-8과 M-CSF를 *in vitro* 수준에서 HepG2 세포를 이용하여 측정함으로써 마황 추출물이 간의 염증에 미치는 영향을 측정해보고자 하였다.

마황 추출물이 염증성 사이토카인인 IL-8의 분비에 미치는 영향을 측정한 결과(Fig. 3), 마황 추출물 처리에 의해 0.05-100 μg/mL의 농도에서 간세포의 IL-8분비가 대조군의 116.1-409.9%까지 유의적으로 증가하였다(*p*<0.05). IL-8은 염증 반응 시에 분비되는 사이토카인으로 알코올성 간염 및 C형 간염 환자 등의 혈청에서

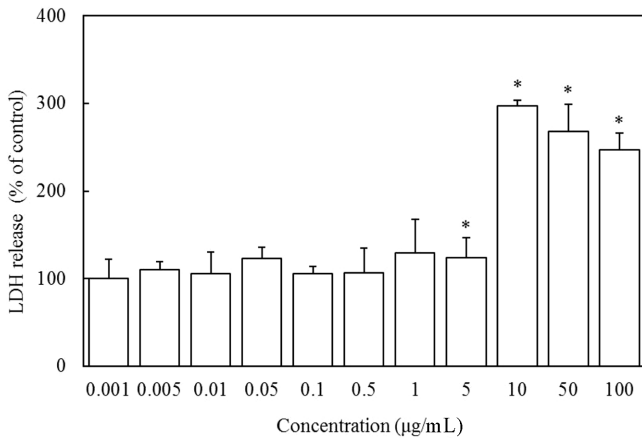


Fig. 2. LDH release of HepG2 cells by ma-huang extract. HepG2 cells were treated ma-huang extract. After 24 h LDH release was investigated. Results presented as % of control. Values are represented as mean±SD (n=3); *p<0.05 compared with control group.

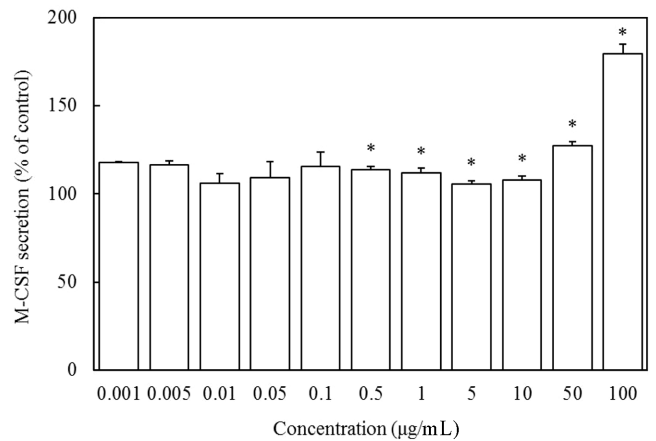


Fig. 4. M-CSF secretion of HepG2 cells by ma-huang extract. HepG2 cells were treated ma-huang extract. After 24 h M-CSF secretion was investigated. Results presented as % of control. Values are represented as mean±SD (n=3); *p<0.05 compared with control group.

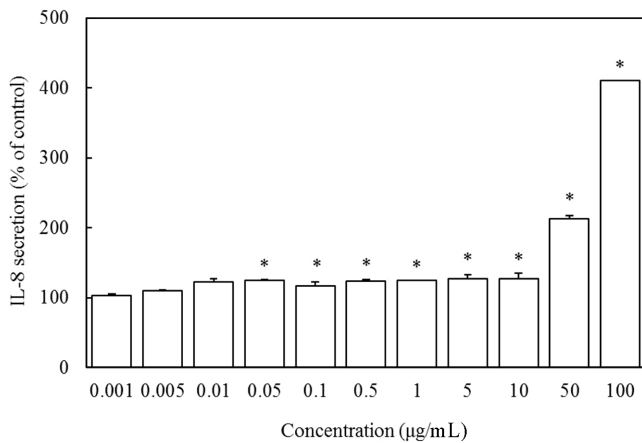


Fig. 3. IL-8 secretion of HepG2 cells by ma-huang extract. HepG2 cells were treated ma-huang extract. After 24 h IL-8 secretion was investigated. Results presented as % of control. Values are represented as mean±SD (n=3); *p<0.05 compared with control group.

간세포 지방 축적

마황 추출물에 의해 간세포에 지방 축적이 유도되는지를 확인한 결과(Fig. 5) 0.01-100 µg/mL의 처리 농도에서 대조군의 102.7-120.7%로 유의적인 지방 축적이 관찰되었다(p<0.05). 마황추출물은 185.8-439.2% 수준으로 지방을 축적시킨 양성 대조군인 amiodarone 보다는 낮은 정도로 지방을 축적하였으며, 추출물의 농도가 증가함에 따라 지방 축적이 크게 증가하기 보다는 낮은 수준이지만 넓은 범위의 농도에서 유의적으로 지방 축적이 관찰되어 심한 간손상 보다는 약한 염증을 유발할 가능성을 보여준다. 형광 이미징에서도 amiodarone 및 마황 추출물에 의한 지방 축적을 확인할 수 있다(Fig. 6). 독성물질에 의해 미토콘드리아가 손상되게 되면 지방산이 대사되지 못하고 지방이 축적되며, 이로 인해 활성산소종이 증가하고 지방을 산화시켜 유해한 알데히드를 생성하게 된다. 이러한 활성산소종이나 알데히드 부산물은 사이토카인의 생성을 증가시키고 염증반응을 초래함으로써 간세포 손상을 유발하게 된다고 알려져 있다(Browning와 Horton, 2004; Esterbauer 등, 1991). 따라서 마황 추출물에 의한 간세포의 지방 축적은 염증 반응으로 이어져 간손상을 유발할 수 있는 가능성을 보여준다.

간세포에 유의적으로 IL-8과 M-CSF를 분비시킨 마황 추출물의 농도 및 지방 축적을 유발시킨 마황 추출물의 농도는 간세포의 사멸을 유도한 농도보다 10-500배 낮은 농도였다. 이는 마황 추출물이 세포 사멸이라는 심각한 독성을 유발하지 않는 농도라 하더라도 사이토카인 분비나 지방 축적을 통해 염증반응을 일으킴으로써 간세포에 손상을 초래할 수 있음을 보여준다. 염증은 유해물질이 유도하는 간독성에 대한 민감도를 높이기 때문에 (Watkins와 Seeff, 2006) 세포사멸을 유도하지 않는 물질이나 저농도의 약물이라도 안전성에 대한 평가가 우선되어야 한다.

본 연구결과에서 마황 추출물은 간세포에서 IL-8이나 M-CSF와 같은 염증 관련 사이토카인을 분비하고, 간세포에 지방을 축적시킴으로써 염증반응을 일으킬 수 있는 것으로 나타났다. 식물성 제제는 추출방법이 다양하여 그 방법에 따라 유해 성분의 함량이 고농도로 함유될 수 있다. 또한 저농도로 섭취하더라도 장기간 섭취할 가능성이 많아 노출량이 증가할 수 있고 섭취대상자의 감수성에 따라 간손상 가능성은 달라질 수 있으므로 마황 추출물을 체중 감량 등의 목적으로 사용하는 식물성 제제로 사

IL-8 분비가 고농도로 검출되어 IL-8이 간염과 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되었다(Zimmerman 등, 2011). 본 연구와 동일한 HepG2 세포를 이용한 연구에서도 간독성을 유발하는 것으로 알려진 약물인 에탄올, lipopolysaccharide (LPS), 아세트알데히드가 HepG2 세포의 IL-8 분비를 각각 대조군의 139, 151, 158% 수준으로 증가시킨다고 보고되었는데(Gutierrez-Ruiz 등, 2001), 본 연구에서 마황 추출물은 이들 약물보다 더 높은 수준으로 분비를 촉진시켜 식물성 추출물에 의한 간염 및 간독성 유발의 위험성을 시사한다.

마황 추출물에 의한 또 다른 사이토카인인 M-CSF의 분비 정도를 측정된 결과에서도(Fig. 4), 마황 추출물은 0.5-100 µg/mL의 처리 농도에서 간세포의 M-CSF 분비를 대조군의 105.6-179.2% 수준으로 유의적으로 증가시켰다(p<0.05). 염증에 의해 분비가 촉진되는 사이토카인인 M-CSF는 간염 환자에게서 농도가 증가되는 것으로 보고되었고 IL-8과 마찬가지로 간염과 상관관계가 있는 것으로 알려져 있어(Itoh 등, 1994), 마황 추출물에 의해 간세포에 염증성 사이토카인 분비가 촉진된 본 연구 결과와 상응한다.

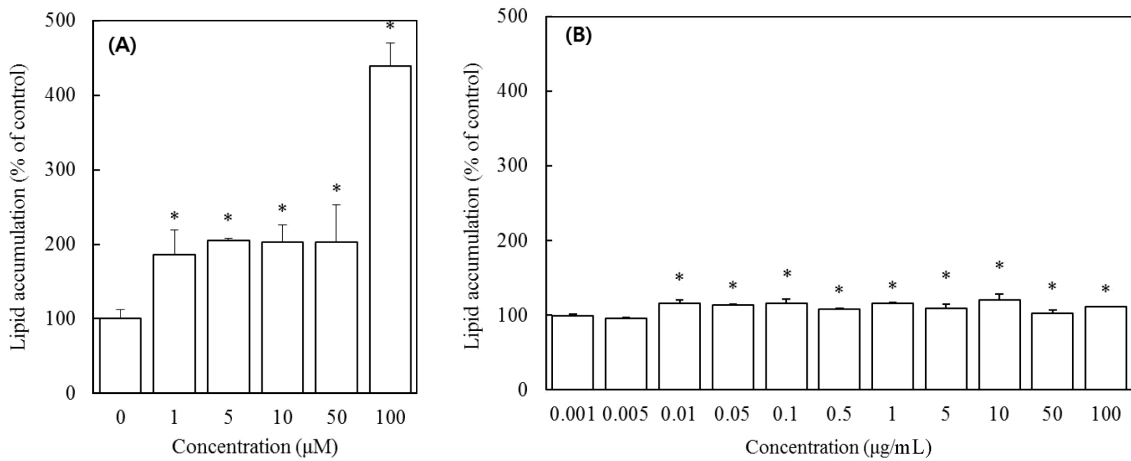


Fig. 5. Lipid accumulation of HepG2 cells by amiodarone (A) or ma-huang extract (B). HepG2 cells were treated amiodarone or ma-huang extract. After 3 h lipid accumulation was investigated. Results presented as % of control. Values are represented as mean±SD (n=3); *p<0.05 compared with control group.

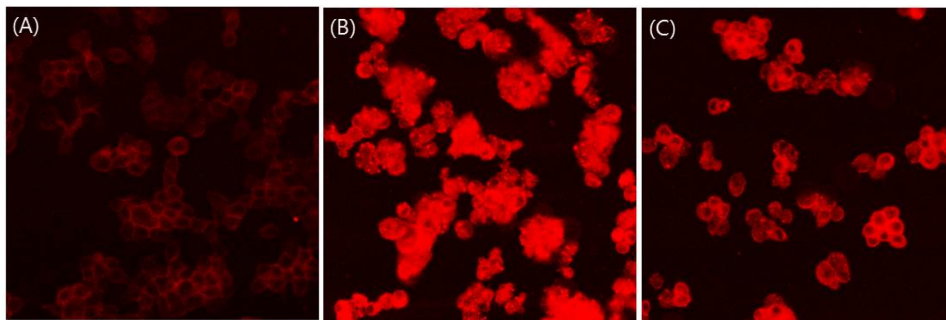


Fig. 6. Confocal imaging of Nile red binding in HepG2 cells after exposure to control (A), amiodarone (B) or ma-huang extract (C). HepG2 cells were treated medium, 100 μM amiodarone or 10 μg/mL ma-huang extract.

용하기 위해서는 독성 및 기전에 대한 실험이 추가적으로 수행되고 안전성에 대한 총체적인 평가가 수반되어야 할 것으로 사료된다.

요약

본 연구에서는 마황 70% 에탄올 추출물을 HepG2 세포에 0.001-100 μg/mL의 농도로 처리하여 세포사멸, 사이토카인 분비, 세포 내 지방 축적 정도를 측정함으로써 마황의 간독성 기전을 *in vitro* 실험을 통해 살펴보았다. 마황 추출물 처리에 의해 5-100 μg/mL의 농도에서 세포 사멸이 관찰되었다(p<0.05). 마황 추출물 처리에 의해 염증성 사이토카인인 IL-8과 M-CSF의 분비가 각각 0.05-100, 0.5-100 μg/mL의 농도에서 유의적으로 촉진되었으며, 세포 내 지방 축적은 0.01-100 μg/mL의 처리 농도에서 유의적으로 증가하였다(p<0.05). 본 실험에서 마황 추출물은 IL-8 및 M-CSF와 같은 염증성 사이토카인의 분비를 촉진시키고, 간세포에 지방을 축적시킴으로써 간세포에 염증을 유발하는 것으로 나타났다. 이러한 형태의 간독성은 세포 사멸과 같은 심각한 독성을 유발하는 농도보다 10-500배 낮은 농도에서 관찰되어 저농도의 마황 섭취에 의해 간염과 같은 간독성이 유발될 수 있음을 시사한다.

References

Bajaj J1, Knox JF, Komorowski R, Saeian K. The irony of herbal

hepatitis: Ma-Huang-induced hepatotoxicity associated with compound heterozygosity for hereditary hemochromatosis. *Dig. Dis. Sci.* 48: 1925-1928 (2003)

Björnsson E. Drug-induced liver injury: Hy's rule revisited. *Clin. Pharmacol. Ther.* 79: 521-528 (2006)

Browning JD, Horton JD. Molecular Mediators of Hepatic Steatosis and Liver Injury. *J. Clin. Invest.* 114: 147-152 (2004)

Elewa H, Abd-Elmeneem M, Hashem AM, Alshehaby A. Study of interleukin 8 (IL8) serum level in patients with chronic liver disease due to hepatitis C virus (HCV) with and without hepatocellular carcinoma (HCC). *Int. J. of Hepatol.* 1: 9-17 (2010)

Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and Biochemistry of 4-Hydroxynonenal, Malonaldehyde and Related Aldehydes. *Free Radic. Biol. Med.* 11: 81-128 (1991)

Estes JD, Stolpman D, Olyaei A, Corless CL, Ham JM, Schwartz JM, Orloff SL. High prevalence of potentially hepatotoxic herbal supplement use in patients with fulminant hepatic failure. *Arch. Surg.* 138: 852-858 (2003)

Gutierrez-Ruiz MC, Gomez Quiroz LE, Hernandez E, Bucio L, Souza V, Llorente L, Kershenovich D. Cytokine response and oxidative stress produced by ethanol, acetaldehyde and endotoxin treatment in HepG2 cells. *Isr. Med. Assoc. J.* 3: 131-136 (2001)

Huang YS, Hwang SJ, Chan CY, Wu JC, Chao Y, Chang FY, Lee SD. Serum levels of cytokines in hepatitis C-related liver disease: a longitudinal study. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 62: 327-333 (1999)

Itoh Y, Okanoue T, Enjyo F, Sakamoto S, Ohmoto Y, Hirai Y, Kagawa K, Kashima K. Serum levels of macrophage colony stimulating factor (M-CSF) in Liver Disease. *J. Hepatol.* 21: 527-535 (1994)

Lee MK, Cheng BW, Che CT, Hsieh DP. Cytotoxicity assessment of Ma-huang (Ephedra) under different conditions of preparation.

- Toxicol. Sci. 56: 424-430 (2000)
- Nadir A, Agrawal S, King PD, Marshall JB. Acute hepatitis associated with the use of a Chinese herbal product, ma-huang. *Am. J. Gastroenterol.* 91: 1436-1438 (1996)
- Shaw D. Toxicological risks of Chinese herbs. *Planta. Med.* 76: 2012-2018 (2010)
- Skoulidis F, Alexander GJ, Davies SE. Ma huang associated acute liver failure requiring liver transplantation. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 17: 581-584 (2005)
- Stickel F, Patsenker E, Schuppan D. Herbal hepatotoxicity. *J. Hepatol.* 43: 901-910 (2005)
- Watkins PB, Seeff LB. Drug-induced liver injury: Summary of a single topic clinical research conference. *Hepatology* 43: 618-631 (2006)
- Zhu Y, Li YG, Wang JB, Liu SH, Wang LF, Zhao YL, Bai YF, Wang ZX, Li JY, Xiao XH. Causes, Features, and Outcomes of Drug-Induced Liver Injury in 69 Children from China. *Gut. Liver* 9: 525-533 (2015)
- Zimmermann HW, Seidler S, Gassler N, Nattermann J, Luedde T, Trautwein C, Tacke F. Interleukin-8 is activated in patients with chronic liver diseases and associated with hepatic macrophage accumulation in human liver fibrosis. *PLoS One* 6: e21381 (2011)