



Original Article / 원저

## Nrf2 활성화를 통한 益胃升陽湯의 간세포 보호 효과

진효정, 박상미, 김은옥, 김상찬\*

대구한의대학교 한의과대학 방제학교실

## Hepatoprotective effect of Ikwiseungyang-tang via Nrf2 activation

Hyo Jeong Jin, Sang Mi Park, Eun Ok Kim, Sang Chan Kim\*

College of Korean Medicine, Daegu Haany University

### ABSTRACT

**Objectives** : Oxidative stress is a important cause of liver disease, and regulation of oxidative stress is essential to maintain the normal metabolic function of the liver. Until a recent date, there has been no studies on the hepatoprotective effect of Ikwiseungyang-tang (IWSYT). Therefore, this study aims to demonstrate the hepatoprotective effect of IWSYT and its related molecular mechanisms on arachidonic acid (AA) + iron induced oxidative stress model in HepG2 cells.

**Methods** : To determine the cytoprotective effect of IWSYT against AA + iron-induced oxidative stress, cell viability, apoptosis-related proteins, intracellular reactive oxygen species (ROS), GSH, and mitochondrial membrane potential (MMP) were measured. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) activation was analyzed by immunoblot analysis. In addition, Nrf2 transcription activation through ARE binding was measured by reporter gene assays, and the expression of the Nrf2 target antioxidant genes were confirmed by immunoblot analysis.

**Results** : IWSYT increased cell viability from cell death induced by AA + Iron, and inhibited apoptosis by regulating apoptosis-related proteins. Furthermore, IWSYT protected cells by inhibiting intracellular ROS production, GSH depletion, and MMP degradation. Nrf2 activation was increased by IWSYT, and Nrf2 target genes were activated by IWSYT too.

**Conclusions** : These results suggest that IWSYT can protect hepatocytes from oxidative stress through Nrf2 activation and can be potentially applied in the prevention and treatment of liver damage.

**Key words** : Ikwiseungyang-tang (IWSYT), oxidative stress, Nrf2 , HepG2 cells.

© 2021 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.

## I. 서론

간은 생명 활동에 있어서 인체 내 중요한 대사기관으로 탄수화물, 지방, 영양소, 비타민의 대사, 합성, 저장 및 재분배와 생체이물의 영향성을 감소시키는 해독 작용을 통한 대사 항상성 조절을 담당한다<sup>1)</sup>. 또한 간은 활성산소(reactive oxygen species, ROS)에 있어서 중요한 장소이다. 생명 유지를 위해 다양한 활동을 하는 간은 많은 에너지가 필요하므로 산소와 영양물질을 이용하여 에너지를 만드는 미토콘드리아가 한 개의 간세포에서 약 1000-2000개 정도로 존재한다. 미토콘드리아의 에너지 대사 과정에서 약 4-5% 정도가 ROS로 변하게 되므로 필요에너지의 생산이 많은 간에서는 ROS의 생성도 그만큼 늘어나게 된다<sup>2-4)</sup>. Hydroxyl radical (OH<sup>-</sup>), superoxide radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 등의 ROS는 반응성이 강한 불안정 물질이기도 하지만 인체에 침입한 이물질 제거와 간의 해독 작용에도 일부 이용되며 생존에 필요한 존재이다<sup>5)</sup>. 정상적인 생리 상태에서 생성되는 ROS는 이를 제거하는 superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase를 포함한 항산화 시스템과의 균형을 이루고 있으므로 인체에 큰 영향을 끼치지 않는다. 그러나 환경적, 외적 등의 요인에 의해 ROS를 제거하는 항산화 시스템을 넘어서는 과잉 ROS 생성은 연쇄적인 반응을 일으켜 산화적 스트레스를 유발한다<sup>3)</sup>. 간에서 발생한 산화적 스트레스는 세포 내 지질 및 단백질 또는 DNA손상을 유발하여 구조적 및 기능적 이상을 초래하여 정상적인 기능을 방해한다. 산화적 스트레스로 인한 간손상은 간염, 간섬유화, 간경변증 등을 거쳐 간암에까지 이르게 되는 간 질환을 초래하는 주요 원인으로 간주된다<sup>6)</sup>. 우리나라는 2019년 간질환으로 인한 사망률이 OECD 국가 중 2번째로 높았으며<sup>7)</sup> 또한 간질환은 국내 2019년 주요사인별 사망원인의 사망률이 10만 명당 12.7명으로 7번째이다<sup>8)</sup>. 따라서 간의 정상적인 대사 기능을 유지하도록 산화적 스트레스를 조절하는 것이 필수적이며<sup>6)</sup>, 이러한 까닭에 과도한 산화적 스트레스 억제 및 이에 의한 간 보호효능에 대한 다양한 연구가 이루어지고 있다<sup>9-12)</sup>.

益胃升陽湯은 蘭室秘藏에 기재된 방제로 補胃氣하여 生發之氣를 도우는 것으로, 陽生陰長하는 방제이다<sup>13)</sup>.

益胃升陽湯은 한방건강보험 요양급여 한약 제제 중 혼합엑스산제 56개 품목 중 하나로서, 氣血損傷으로 인한 피로 권태감의 개선, 대출혈 또는 만성출혈 후 원기회복, 心煩不安, 과다월경, 월경불순, 자궁 및 난소의 기능 부조로 인한 과다 출혈, 자궁내막증식증(endometrial hyperplasia), 유산(abortion) 혹은 자궁외임신 및 기태 임신(molar pregnancy)에 따른 합병증에 사용한다<sup>14)</sup>. 益胃升陽湯에 대한 연구로는 유등<sup>15)</sup>의 益胃升陽湯에 대한 서지학적 고찰, 강<sup>16)</sup>의 造血 및 免疫調節에 관한 연구, 이등<sup>17)</sup>의 摘出家兔의 腸管運動에 미치는 影響, 임등<sup>18)</sup>의 봉루환자에 대한 임상시험례 등이 보고되어 있지만, 현재까지 益胃升陽湯의 간보호 효과는 연구된 바가 없다. 또한 益胃升陽湯의 약물 구성은 白朮 6g, 黃芪 4g, 人蔘 3g, 神麴炒 3g, 當歸身 2g, 陳皮 2g, 炙甘草 2g, 升麻 1.2g, 柴胡 1.2g, 生黃芩 0.8g으로 구성되어 있으며<sup>19,20)</sup> 補中益氣湯에서 白朮을 증량하고, 神麴, 黃芩이 추가된 것이다. 이전 연구에서 보중익기탕 및 소음인 보중익기탕의 간 보호 효과<sup>21-23)</sup>가 보고되었고 益胃升陽湯의 간 보호 효과는 연구된 바가 없으므로 본 연구에는 益胃升陽湯의 간장질환 예방 및 치료에 대한 활용도를 제고하고자 HepG2 세포에 AA + iron 처치로 유도된 세포 독성 모델을 이용하여 益胃升陽湯의 세포 보호 효과와 이에 관여되는 작용기전을 연구하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 시약

본 연구에 사용한 익위승양탕은 (주)경진제약(이천, 한국)의 경진익위승양탕 혼합단미엑스산을 사용하였다. Poly(ADP ribose) polymerase (PARP), Bcl-2, caspase-3,  $\beta$ -actin, Lamin A/C, NQO-1, HO-1 항체와 HRP-conjugated anti-mouse, anti-rabbit IgGs는 Cell signaling Technology (Beverly, MA, USA)에서 구입하였다. Nrf2 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였고, Sestrin-2 항체는 Proteintech (Chicago, IL, USA)로부터 구입하였다. 세포배양에 필요한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)과 fetal bovine serum (FBS) 및 penicillin과 streptomycin

\*Corresponding author : Sang Chan Kim, Research Center for Herbal Convergence on Liver Disease, Department of Herbal Prescription, College of Korean Medicine, Daegu Haany University, 1, Hanuiddae-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 : September 3, 2021 / Revised : October 13, 2021 / Accepted : October 15, 2021



은 Gibco (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA)에서 구입하였다. Arachidonic acid (AA)는 Calbiochem (San Diego, CA, USA)에서 구매하였고, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)와 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) 및 rhodamine 123 등의 기타 시약들은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구매하였다.

## 2. 세포 배양

본 연구에 사용된 인체 유래 간 실질세포주인 HepG2 세포는 American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA)에서 구매하였으며, 10% FBS, 100 U/mL penicillin과 100  $\mu$ g/mL streptomycin을 포함한 DMEM 배지에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건으로 배양하였다. 모든 세포실험에 있어서 100 mm dish에서 80-90% 정도의 confluence로 배양된 세포를 사용하였다.

## 3. 세포 생존율 측정

24-well plate에 well당 세포를  $2 \times 10^4$ 개의 밀도로 분주하였으며 12시간 배양하여 세포의 confluence가 약 80%가 되었을 때, FBS가 포함되지 않은 배지에서 12시간 배양하였다. 0.03-1.0 mg/mL의 IWSYT를 1시간 전처리하고, 이후 10  $\mu$ M AA (12시간)와 5  $\mu$ M iron (2시간)을 순차적으로 처리하였다. 처리가 완료된 세포를 0.5 mg/mL의 MTT용액과 4시간 반응하여 생성된 formazan을 DMSO (dimethyl sulfoxide)로 용해시킨 후 automated microplate reader (Infinite M200 Pro, Tecan, Männedorf, Switzerland)를 이용하여 570 nm의 파장에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율은 control cell에 대한 백분율로 나타내었다. [cell viability (%) =  $100 \times (\text{absorbance of treated cell}) / (\text{absorbance of control cell})$ ]

## 4. 전세포 추출액, 핵 분획의 제조와 Immunoblot 분석

전세포 추출액 (whole cell lysates)을 얻기 위해 6-well plate에 배양하여 처리가 완료된 HepG2 세포를 phosphate buffered saline (PBS)로 세척한 후, protease 및 phosphatase inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA)이 첨가된 radioimmunoprecipitation assay buffer를 이용하여 용해한 뒤, 4°C, 15,000  $\times g$ 에서 15분간 원심분리하여 상층액을 취하였다. 핵 분획

(nuclear fraction)은 수거된 세포를 NER-PER<sup>TM</sup> Nuclear and cytoplasmic extraction reagents (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA)를 이용하여 제조사의 방법에 따라 상층액을 취하였다. 추출액은 bicinchoninic acid protein assay kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA)를 이용하여 단백질 함량을 정량하였다. Immunoblot을 위해 동량의 단백질을 8-12% sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel에서 전기영동을 통해 분리한 후, polyvinylidene fluoridemembranes (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK)으로 전이하였다. 5% skim milk로 상온에서 2시간 blocking한 후, 표적단백질에 대한 1차 항체와 12시간 이상 반응, horseradish peroxidase가 결합된 2차 항체와 상온에서 반응을 차례로 거친 뒤, enhanced chemiluminescence detection kit (Amersham Biosciences)와 image analyzing system (Imager 600, Amersham Biosciences)을 사용하여 감광하였다. 각 단백질의 상대적인 발현 정도는 Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>)를 이용하여 분석하였다.

## 5. 세포 내 ROS 측정

DCFH-DA를 이용하여 IWSYT의 세포 내 ROS의 변화를 측정하였다. 약물 처리가 완료된 HepG2 세포를 20  $\mu$ M DCFH-DA와 1시간 동안 37°C에서 반응시켜 형성된 DCF의 형광 강도를 excitation (485 nm), emission (530 nm)의 파장에서 automatic microplate reader (Tecan)를 이용하여 측정하였다.

## 6. GSH 함량 측정

6-well plate에서 배양 및 약물 처리가 완료된 HepG2 세포에 well당 500  $\mu$ L의 metaphosphoric acid로 용해한 후, GSH BIOXYTECH GSH-400 kit (Oxis International Inc., Portland, OR, USA)를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 GSH 함량을 405 nm의 파장에서 automated microplate reader (Tecan)로 측정하였다. 측정된 흡광도는 표준곡선을 이용하여 단백질의 농도로 보정하였다.

## 7. 미토콘드리아 막 전위의 측정

막투과성 양이온 형광 염료인 rhodamine 123을 이용하여 미토콘드리아 막 전위의 변화를 측정하였다. 0.05  $\mu$ g/mL의 rhodamine 123으로 약물 처리가 완료된

HepG2 세포를 30분간 염색한 후 1% FBS가 포함된 phosphate buffered saline에 부유시켜 각 샘플 당 10,000개의 세포를 Partec GmbH FACS Calibur flow cytometer (Münster, Germany)를 이용하여 측정하였다.

### 8. 리포터 유전자 분석

ARE가 매개되는 전사 활성화를 측정하기 위한 리포터 유전자 분석은 이전에 보고된 방법에<sup>24,25)</sup> 따라 수행하였다. 리포터 유전자인 pGL4.37[luc2P/ARE/Hygro] (Promega)이 형질 도입된 재조합 HepG2 세포를 24-well plate에 배양하여 약물 처치를 완료한 후, passive lysis buffer (Promega, Madison, WI, USA)로 용해시켜 luciferase assay system (Promega, Madison, WI, USA)을 이용하여 발현된 luciferase 활성을 측정하였다. Luciferase 활성은 표준곡선을 이용하여 단백질 농도로 보정하였다.

### 9. 통계분석

본 연구의 모든 실험 결과는 3회 반복 시행 후 SPSS version 26.0 (IBM Corp., Armonk, NY, USA)을 이용하여 통계분석을 수행하였다. 그룹 간의 통계적 유의성은 One way analysis of variance를 이용하여 검정하였다. 사후검정은 Tukey HSD test 또는 Dunnett T3 test를 이용하였으며 mean  $\pm$  standard deviation (S.D.)로 표기하였다. 유의수준이  $p < 0.05$  또는  $p < 0.01$ 인 경우를 기준으로 통계적으로 유의한 차이가 있는 것으로 판단하였다.

## III. 실험 결과

### 1. AA + iron 유도성 cell death에 대한 IWSYT의 세포 보호 효과

먼저 IWSYT 단독에서의 세포독성을 확인하기 위해 HepG2 세포에 0.03–1.0 mg/mL의 IWSYT를 24시간 동안 처치한 후 세포생존율을 측정하였다. 0.03–1.00 mg/mL의 IWSYT 단독처리 세포생존율은 각각 무처리 Control cell ( $100.00 \pm 3.27\%$ )의  $99.80 \pm 1.24$ ,  $100.26 \pm 2.30$ ,  $97.77 \pm 2.80$ ,  $95.94 \pm 2.13\%$ 로 통계적으로 유의한 세포독성을 나타내지 않았다 (Fig. 1A). 이에 따라 AA + iron 유도성 cell death에 대한 IWSYT의 세포 보호 효과를 세포독성을 나타내지 않은 1.0 mg/mL 이하의 농도에서 평가하였다. 0.03–1.0 mg/mL의 IWSYT를 1시간 전처리 한 HepG2 세포에 AA + iron를 처리한 결과, 무처리 Control cell ( $100.00 \pm 7.15\%$ )에 대비하여 AA + iron 처치는  $45.62 \pm 4.16\%$ 로 유의하게 ( $P < 0.01$ ) 세포 생존율을 감소시켰다. 그러나 AA + iron 처리로 감소된 세포생존율은 0.30, 1.0 mg/mL IWSYT의 전처치에 의해 각각  $71.09 \pm 1.93$ ,  $92.90 \pm 3.17\%$ 로 유의하게 ( $P < 0.01$ ) 증가하였다 (Fig. 1B). 이러한 결과는 IWSYT(-1.0 mg/mL)의 단독 세포독성은 없었으며, AA + iron 유도성 cell death에 대하여 0.30, 1.0 mg/mL의 농도에서 세포 보호 효과가 있음을 나타낸다.

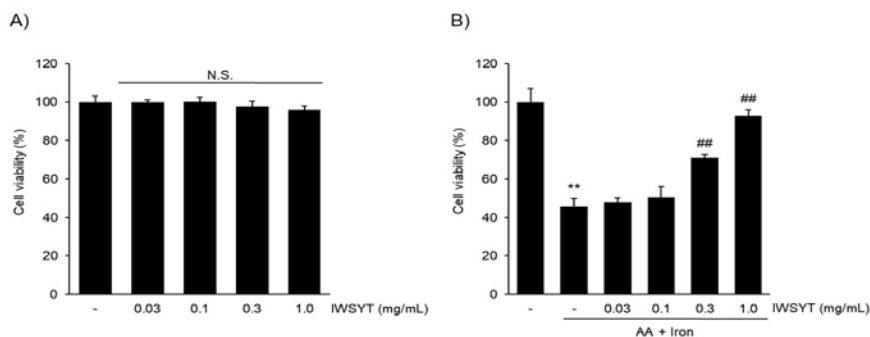


Fig. 1. Cytoprotective effect of IWSYT on AA + iron-induced cell death.

(A) To investigate the effect of IWSYT alone on cytotoxicity, HepG2 cells were treated with 0.03–1.0 mg/mL of IWSYT for 24h. (B) To determine the cytoprotective effect of IWSYT, HepG2 cells were pretreated with IWSYT at 0.03–1.0 mg/mL. Followed by exposed to AA(10  $\mu$ M) for 12h, and incubated with iron (5  $\mu$ M) for 2h. All data represent the mean  $\pm$  S.D. of three separated experiments (Significant compared with control, \*\* $P < 0.01$ ; Significant compared with AA + iron, ### $P < 0.01$ ; N.S., not significant).

## 2. AA + iron 유도성 세포자멸사에 대한 IWSYT의 억제

AA + iron으로 유도되는 cell death에는 세포자멸사 (apoptosis)가 관여됨이 보고되어 있다<sup>9,11,12</sup>. Caspase-3는 cysteine 단백질 분해 효소로 세포자멸사에 있어서 중요한 역할을 하는 단백질이다. 정상시의 비활성 pro-form인 procaspase-3는 세포사멸 신호에 의해 cleaved-form으로 활성화되어 DNA repair을 담당하는 PARP를 분할시켜 PARP의 기능을 억제한다. 또한 Bcl-2는 세포자멸사 억제에 관여하는 효소로 세포의 생존 여부를 결정하는데 관여한다<sup>26</sup>. 따라서 AA + iron으로 유도되는 세포자멸사를 IWSYT이 억제하는지 확

인하기 위해 PARP, procaspase-3 및 Bcl-2 발현의 변화를 immunoblot 분석하였다 (Fig. 2A). AA + iron 처치로 인한 PARP, procaspase-3, Bcl-2의 발현은 유의하게 ( $P < 0.01$ ) 감소하는 것으로 확인하였다. 그러나 IWSYT 1.0 mg/mL의 전처리에서는 PARP, procaspase-3, Bcl-2의 발현은 각각  $0.80 \pm 0.10$ ,  $0.84 \pm 0.05$ ,  $0.85 \pm 0.15$ 배로 유의하게 ( $P < 0.01$ ) 증가하였다. (Fig. 2B). 따라서 IWSYT의 세포 보호 효과는 AA + iron으로 유도된 세포자멸사의 억제를 통한 것으로 판단된다.

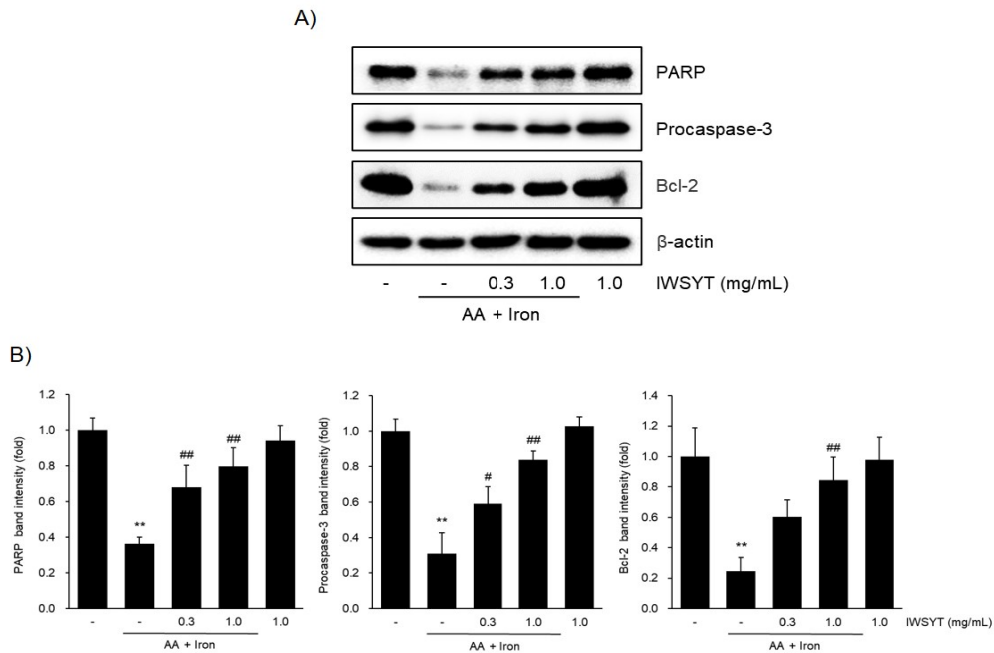


Fig. 2. Inhibition of IWSYT on AA + iron-induced apoptosis.

(A) Immunoblot analysis using whole cell lysates to confirm the effect of IWSYT on changes in apoptosis-related proteins. HepG2 cells were pretreated with 0.3 and 1.0 mg/mL of IWSYT for 1h before exposed 10  $\mu$ M AA for 12h, and with 5  $\mu$ M iron for 2h. For the equal protein loading,  $\beta$ -actin was used as an immunoblot loading control. (B) PARP, procaspase-3 and Bcl-2 expression intensities were determined by scanning densitometry. All data represent the mean  $\pm$  S.D. of three separated experiments (Significant compared with control, \*\* $P < 0.01$ ; Significant compared with AA + iron, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ ).

## 3. AA + iron 유도성 산화적 스트레스에 대한 IWSYT의 항산화 효과

AA + iron에 의한 산화적 스트레스 유발은 세포 내 ROS의 생성 증가와 GSH을 고갈시켜 세포자멸사를 유

도한다<sup>10,12</sup>. 세포 자멸사로부터 세포를 보호하는 IWSYT의 항산화 효과를 확인하기 위해 ROS와 GSH의 세포 내 농도를 측정하였다. HepG2 세포 내 ROS 생성은 AA + iron 처치로 인해 무처리 Control cell ( $1.00 \pm 0.01$ )에

비하여  $3.00 \pm 0.12$ 배로 유의하게 ( $P < 0.01$ ) 증가하였다. 그러나 세포 내 ROS 생성 증가는 IWSYT 1.0 mg/mL 전처치에 의해 유의하게 ( $P < 0.01$ ) 감소하였음을 확인할 수 있었다 (Fig. 3A). 또한 AA + iron 처치에서 주요 내인성 항산화 물질인 GSH의 세포 내 농도가 무처치 Control cell ( $43.70 \pm 1.62 \mu\text{mol/mg}$

protein)에 비하여  $32.17 \pm 4.49 \mu\text{mol/mg protein}$ 으로 통계적으로 유의하게 ( $P < 0.05$ ) 감소하였으나, IWSYT 1.0 mg/mL 전처치에서  $46.82 \pm 6.26 \mu\text{mol/mg protein}$ 으로 유의하게 ( $P < 0.01$ ) 증가하였다 (Fig. 3B). 따라서, IWSYT이 AA + iron로 유도된 세포독성 완화에는 항산화 효과가 관여되어 있음을 나타낸다.

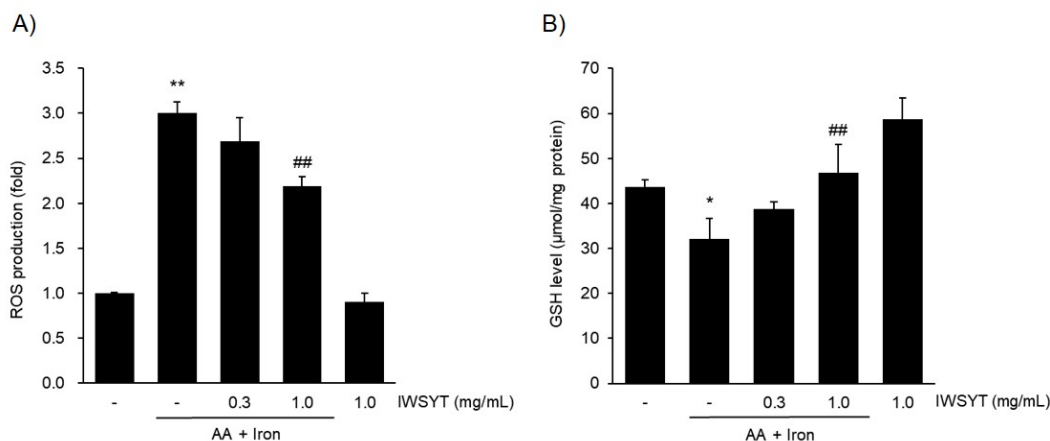


Fig. 3. Antioxidant effect of IWSYT on AA + iron-induced oxidative stress.

(A) ROS production was measured using an automatic microplate readers in response to  $20 \mu\text{M}$  DCFH-DA at  $37^\circ \text{C}$  for an hour in HepG2 cell. (B) GSH level was measured using commercial kits as mentioned in the methods and materials. The measured absorbance was converted to the concentration of protein using the standard curve. All data represent the mean  $\pm$  S.D. of three separated experiments (Significant compared with control, \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ ; Significant compared with AA + iron, ## $P < 0.01$ ).

#### 4. AA + iron 유도성 mitochondrial dysfunction에 대한 IWSYT의 저해 효과

AA + iron에 의한 산화적 스트레스는 세포자멸사의 유도에 관여하는 미토콘드리아 기능 이상을 야기한다<sup>11,12</sup>. IWSYT의 미토콘드리아 보호 효과를 알아보기 위해 FACS를 이용하여 mitochondrial membrane potential (MMP)를 측정하였다. 낮은 rhodamine 123 형광염색 정도를 보인 cell의 수인 RN1 fraction은 AA

+ iron 처치에서 무처치 Control cell ( $19.85 \pm 3.37\%$ )에 대비하여  $94.91 \pm 2.92\%$ 로 유의하게 ( $P < 0.01$ ) 증가하였다. 그러나 1.0 mg/mL IWSYT 전처치에서는  $46.06 \pm 10.98\%$ 로 통계적으로 유의한 ( $P < 0.05$ ) 감소를 나타내었다 (Fig. 4). 이는 AA + iron 유도성 미토콘드리아 막전위 저하를 IWSYT이 저해함으로써 세포자멸사를 억제하는 것으로 판단된다.

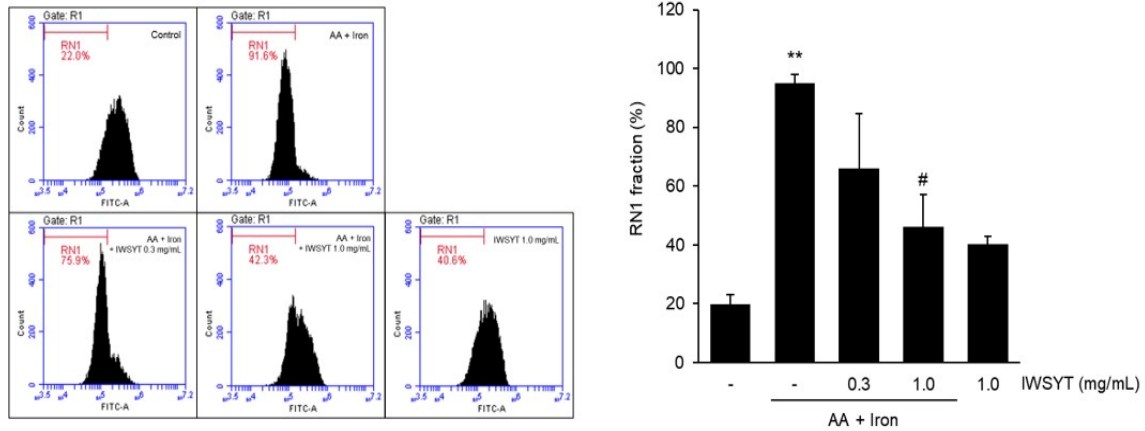


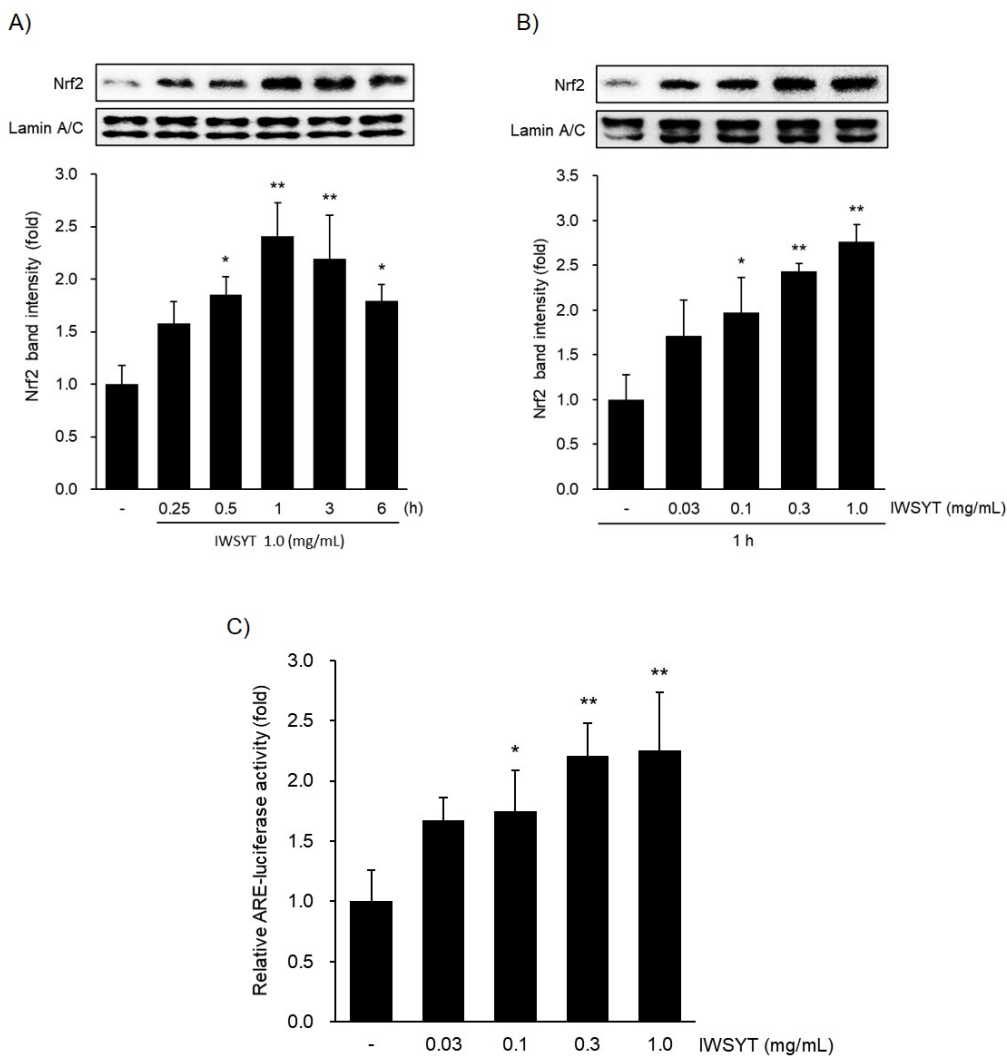
Fig. 4. Effect of IWSYT on AA + iron-induced mitochondrial dysfunction.

After the treatment was completed, HepG2 cell were stained with rhodamine 123 for 30 minutes, and then the changes in mitochondrial membrane permeability was analyzed using flow cytometry. Low rhodamine 123 intensities are defined as the RN1 fraction expressed as a percentage of total cells analyzed. Data represent the mean  $\pm$  S.D. of three separated experiments (Significant compared with control, \*\* $P < 0.01$ ; Significant compared with AA + iron, # $P < 0.05$ ).

### 5. IWSYT이 Nrf2의 활성화에 미치는 효과

항산화 시스템의 항상성 소실로 인한 산화적 스트레스는 세포와 조직의 손상을 야기하고 유전자의 변형을 초래하므로 적절하게 조절되어야 한다<sup>27)</sup>. 세포 내 산화적 스트레스를 제어할 수 있는 항산화 시스템 기전 중 Nrf2는 정상 생리 상태에서는 kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)과 복합체를 이루어 세포질에 존재하고 있는 전사인자이다. 다양한 신호에 의해 Keap1로부터 분리된 Nrf2는 핵으로 이동하여 프로모터 영역에 존재하는 ARE에 결합하여 주요 항산화 유전자들의 전사를 활성화함으로써 산화적 스트레스로 인한 세포독성을 억제한다<sup>28)</sup>. 그러므로 IWSYT의 AA + iron으로 유도된 산화적 스트레스에 대한 세포 보호 효과가 Nrf2의 활성화로부터 매개하는지를 확인하기 위해 핵 내 존재하는 Nrf2의 발현을 immunoblot 분석하였다. 우선, IWSYT (1.0 mg/mL)의 처치 시간에 따른 핵 내 Nrf2

발현 정도를 측정된 결과, 무처리 Control cell ( $1.00 \pm 0.18$ ) 대비 1시간에서는  $2.41 \pm 0.32$ 배로 통계적으로 유의하게 ( $P < 0.01$ ) 핵 내 Nrf2가 최대 발현되었으며 (Fig. 5A), 또한 IWSYT (1시간)의 처치 농도에 따른 핵 내 Nrf2 발현 정도를 측정된 결과, 농도 의존적 증가를 나타내었으며, 특히 1.0 mg/mL IWSYT에서는 무처리 Control cell ( $1.00 \pm 0.27$ ) 대비  $2.76 \pm 0.20$  배로 유의하게 ( $P < 0.01$ ) Nrf2의 발현을 증가시켰다 (Fig. 5B). IWSYT의 핵 내 Nrf2 축적이 ARE 매개 전사 활성화에 관여하는지 규명하기 위해 ARE-luciferase를 안정적으로 발현하는 재조합 HepG2 세포를 활용하여 Reporter gene 분석을 하였다. 0.30, 1.0 mg/mL IWSYT에서는 무처리 Control cell ( $1.00 \pm 0.26$ )과 비교하여 ARE-luciferase 활성이  $2.21 \pm 0.27$ ,  $2.25 \pm 0.48$ 배로 통계적으로 유의하게 ( $P < 0.01$ ) 증가하였다 (Fig. 5C).



**Fig. 5.** Effect of IWSYT on Nrf2 activation.

(A) To measure the time-course nuclear Nrf2 expression level, HepG2 cells were treated with 1.0 mg/mL IWSYT for 0.25, 0.5, 1, 3, 6 h. (B) To determine the concentration-dependent nuclear Nrf2 expression changes, HepG2 cells were treated 0.03–1.0 mg/mL IWSYT for 1 h. Immunoblot loading control for equal loadings was used as Lamin A/C. (C) Reporter gene assays to measure ARE-mediated transcriptional activation. The expressed luciferase activity of recombinant HepG2 cells treated with 0.03–1.0 mg/mL IWSYT for 24 hours was measured. All Data represent the mean  $\pm$  S.D. of three separated experiments (Significant compared with control, \*\* $P < 0.01$ , \* $P < 0.05$ ).



## 6. IWSYT의 Nrf2 표적 항산화 유전자 발현에 미치는 효과

IWSYT이 Nrf2 표적 항산화 유전자인 HO-1, NQO-1, Sestrin-2의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위해 1.0 mg/mL의 IWSYT을 1 또는 3시간 처치한 후 HepG2 세포를 immunoblot 분석하였다. HO-1 단백질의 발현은 무처리 Control cell (1.00 ± 0.11) 대비 1 또는 3시간에서 1.64 ± 0.12, 1.69 ± 0.18배로 유의하게 증

가하였으며, NQO-1 발현 정도도 무처리 Control cell (1.00 ± 0.15)에 비하여 1.84 ± 0.16, 2.44 ± 0.28배로 유의하게 ( $P < 0.01$ ) 증가하였다. Sestrin-2 단백질 발현 변화는 1시간에서는 유의한 증가가 나타나지 않았지만 3시간에서는 무처리 Control cell (1.00 ± 0.01)에 비교하여 1.60 ± 0.23배로 유의한 ( $P < 0.01$ ) 증가가 나타났다 (Fig. 6).

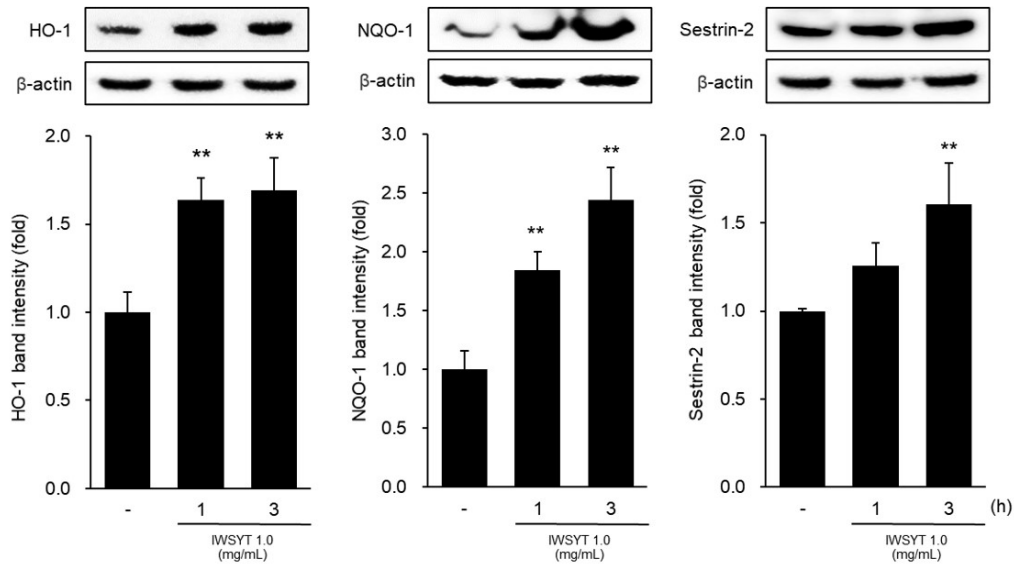


Fig. 6. Induction of Nrf2-targeted antioxidant genes by IWSYT.

To measure the expression of Nrf2 targeted genes HO-1, NQO-1, and Sestrin-2 by immunoblot analysis, HepG2 cells were treated with 1.0 mg/mL IWSYT for 1 or 3 h. Immunoblot loading control for equal loadings was used as  $\beta$ -actin. Nrf2-targeted antioxidant genes expression intensity determined by scanning densitometry. All Data represent the mean  $\pm$  S.D. of three separated experiments (Significant compared with control, \*\* $P < 0.01$ ).

## IV. 고찰

산화적 스트레스는 미토콘드리아의 에너지 대사 과정으로 인해 생성되는 ROS와 신체에 유해한 영향을 미치지 않게 이를 제거하는 항산화 시스템 간의 불균형이 발생한 상태이다<sup>27)</sup>. 산화적 스트레스는 지방산과 인지질의 산화를 촉진시켜 활성화된 phospholipase A2 통하여 세포막 내 아라키돈산(arachidonic acid, AA)을 유리시킨다. 유리된 AA는 다시 ROS를 생성하고<sup>29)</sup> 체내의 iron이 존재할 때, Haber-Weiss 반응으로 ROS 생성이 더욱 증가하게 된다<sup>3)</sup>. 간에서 발생한 산화적 스

트레스는 세포내 지질 및 단백질 또는 DNA손상 등 간조직 내의 정상세포, 쿠퍼세포들의 구조적 및 기능적 이상을 초래하여 급만성 간 질환을 유발하는 주요 원인으로 간주된다<sup>30)</sup>. 따라서 다양한 간 질환의 예방 및 치료를 위한 간 보호 후보 소재를 탐색하는 연구에서 간세포에 AA + iron 병용 처치로 유도되는 산화적 스트레스 모델이 다수 이용되고 있고<sup>31,32)</sup>, 본 연구에서도 AA + iron 유도 산화적 스트레스 모델을 사용하였다.

益胃升陽湯은 蘭室秘藏의 婦人門 經漏不止有二論에 기재된 방제로 血脫에 益氣하는 것은 古聖人の 법으로 먼저 補胃氣하여 生發之氣를 도우는 것으로, 곧 陽生

陰長 하기 때문이라고 기재되어 있다<sup>13)</sup>. 益胃升陽湯은 白朮 6g, 黃芪 4g, 人蔘 3g, 神麴炒 3g, 當歸身 2g, 陳皮 2g, 炙甘草 2g, 升麻 1.2g, 柴胡 1.2g, 生黃芩 0.8g 으로 구성되어 있으며<sup>19,20)</sup>, 補中益氣湯에서 白朮을 증량하고, 神麴, 黃芩이 추가된 것이다. 이러한 관계로 본 방제는 동의보감의 '崩漏治法', '勞倦傷治法'의 2곳에서 인용되어 있다<sup>20)</sup>. 益胃升陽湯의 간보호 효과에 대해서는 아직까지 보고된 바가 없었으나, 補中益氣湯 계열의 방제에 대한 간보호 효과는 다수 보고되었다<sup>21-23)</sup>. 따라서 본 연구에서는 간 보호의 후보 소재 발굴 및 한방의료보험 대상 방제인 益胃升陽湯의 활용도제고를 위하여 HepG2 세포에 AA + iron 유도성 산화적 스트레스에 대한 IWSYT의 영향을 확인하고자 하였다.

AA + iron으로 유발되는 산화적 스트레스는 세포자멸사를 통해 cell death를 야기한다<sup>9-12)</sup>. 세포자멸사는 세포의 정상적인 발달과 조직의 항상성에 있어서 중요한 세포 사멸 프로그램으로 단백질 분해 효소인 caspase에 의해 매개되며, cell shrinkage, nuclear condensation, DNA fragmentation, phosphatidylserine flipping, plasma membrane blebbing 과 같은 형태학적 변화가 특징적이다. Effector caspase의 일종인 caspase-3는 내외적 자극에 의해 procaspase-3가 활성화된 caspase-3로 분할되어 DNA repair를 담당하는 PARP를 분할하여 PARP의 기능을 억제시키는 세포사멸의 핵심 역할을 하는 단백질이다. 또한 Bcl-2는 미토콘드리아 외막에 존재하여 caspase-3를 활성화 시키는 Cytochrome-c가 미토콘드리아에서 방출되는 것을 억제하여 세포자멸사를 억제한다<sup>33,34)</sup>.

본 연구에서 IWSYT 단독은 세포 독성을 나타내지 않았으며 AA + iron 유도성 cell death에 대해 0.30과 1.0 mg/mL의 IWSYT이 세포 생존율을 증가시켰다. Immunoblot 분석을 통해 세포자멸사 관련 단백질인 PARP, procaspase-3 및 Bcl-2의 변화를 관찰한 결과, AA + iron 처치에서 감소한 발현 정도를 IWSYT이 유의하게 증가시키는 것을 확인하였다. 이는 IWSYT이 AA + iron로 유도된 세포자멸사를 억제함으로써 cell death에 대한 세포 보호 효과를 나타내는 것을 의미한다.

AA + iron으로 인한 산화적 스트레스는 ROS를 세포내에 과잉으로 축적시키고 이는 세포의 에너지 대사에 관여하는 미토콘드리아의 막 전위를 저하시킴으로써 미토콘드리아 기능장애와 세포자멸사와 관련된 일부 인자들

을 미토콘드리아 막내 공간(mitochondrial intermembrane space)에서 세포질로 방출시켜 세포자멸사를 유발한다<sup>35)</sup>. 또한 세포내 주요 내인성 항산화 물질인 GSH는 세포내 ROS를 제거하여 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하지만 AA + iron으로 유발되는 과도한 산화적 스트레스상황에서는 GSH가 세포내에서 고갈된다<sup>2,36)</sup>. IWSYT은 AA + iron 유도성 산화적 스트레스로 인해 HepG2 세포 내의 ROS 축적과 환원형 GSH의 고갈을 억제하여 항산화 효과를 나타내었으며, 미토콘드리아 막전위 저하를 억제함으로써 세포보호효과를 나타내었다.

선행연구에서는 AA + iron 유도성 산화적 스트레스로부터 세포 손상을 방어하는 분자로 AMP-activated protein kinase (AMPK)의 활성화가 제시되어<sup>9,11,12)</sup>, IWSYT의 세포 보호 효과가 AMPK의 활성화에 관여되는지 확인을 위해 AMPK의 화학적 억제제인 compound C 전처리 후 IWSYT과 AA + iron을 처리하였다. 결과로 IWSYT의 세포 보호 효과는 compound C에 의해서 억제되지 않았다 (Data not shown). 따라서 IWSYT은 AMPK의 활성화를 통한 세포 보호 효과가 아닌 다른 분자적 기전과 관련 있을 것으로 생각된다.

세포 내 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는 분자적 기전으로 Nrf2는 주요 항산화 관련 유전자들의 발현을 유도하는 중요 전사인자이다. 정상 상태에서의 Nrf2는 Keap1 단백질과 결합한 불활성 형태로 세포질에 존재한다. 그러나 산화적 스트레스 상태에서는 Nrf2-Keap1 복합체의 Cysteine-SH가 산화됨으로써 Nrf2-Keap1 구조가 변경되고 이로 인해 Nrf2가 Keap1에서 분리되어 핵으로 전위하여 c-Jun과 Maf와 같은 전사조절인자와 이종이합체의 형태를 형성하고, 해당하는 유전자의 촉진 인자 영역인 antioxidant response element (ARE)에 결합을 한다. Nrf2-ARE 결합은 NAD(P)H-quinone oxidoreductase (NQO1), glutamate cysteine ligase catalytic subunit (GCLC), heme oxygenase 1 (HO-1), sestrin-2와 같은 항산화 관련 유전자들의 발현을 조절한다<sup>28)</sup>. 본 연구에서 IWSYT은 핵 내의 Nrf2 축적을 증가시켰으며 Nrf2-ARE 결합을 통한 항산화 관련 유전자인 HO-1, NQO1, sestrin-2의 발현을 증가시킴을 확인하였다. 이는 IWSYT은 Nrf2 활성화를 통해 세포 보호 효과를 나타내는 것으로 시사하는 바이다.

IWSYT의 AA + iron 유도성 산화스트레스로부터

Nrf2 활성화를 통해 세포 보호 효과를 규명하였다. 본 연구는 *in vitro* 에서 IWSYT 연구로 국한되었지만 *in vivo* 수준에서의 IWSYT 효과와 Nrf2 활성화 관련 상위 신호분자에 대한 추가적인 후속 연구가 된다면 한방 건강보험 요양급여 한약 제제 중의 하나인 IWSYT의 활용 가능성을 제고할 수 있을 것으로 생각되며, 방제학적으로는 補中益氣湯 계열방제의 간보호효과에 대한 비교연구도 필요할 것으로 판단된다.

또한 총 56종의 한방건강보험 요양급여 한약 제제 중 간보호효과가 있는 것으로 연구 보고된 한약 제제로는 본 益胃升陽湯을 비롯하여 加味逍遙散<sup>37)</sup>, 葛根湯<sup>38)</sup>, 大柴胡湯<sup>39)</sup>, 半夏瀉心湯<sup>40)</sup>, 補中益氣湯<sup>22)</sup>, 小柴胡湯<sup>41)</sup>, 小青龍湯<sup>42)</sup>, 茵陳蒿湯<sup>43)</sup> 등 다수가 있으므로, 각 방제는 四診合參에 따른 환자의 증에 최적방제를 선택하여 활용하는 것이 타당할 것으로 생각된다.

## V. 결론

Hep2 cell에 AA + iron으로 인해 유도된 산화적 스트레스에 대한 益胃升陽湯 (IWSYT) 의 세포 보호 효과 연구에서는 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. IWSYT은 AA + iron에 의한 cell death를 농도 의존적으로 억제하였으며, 세포자멸사 관련 단백질인 PARP, procaspase-3 및 Bcl-2의 발현 감소를 억제하였다.
2. IWSYT은 AA + iron에 의한 세포 내 ROS 증가, 환원형 GSH 고갈을 억제하였으며, 미토콘드리아 기능 이상을 회복시켰다.
3. IWSYT은 핵 내 Nrf2의 축적을 증가시켰으며, ARE 결합을 통한 Nrf2 전사 활성화와 Nrf2 표적 항산화 유전자(HO-1, NQO-1, Sestrin-2)의 발현을 증가시켰다.

## Acknowledgement

This study was supported by the National Research Foundation of Korea funded by Korea government (MSIP) (Grant No.2018R1A5A2025272).

## References

1. Trefts E, Gannon M, Wasserman HD. The liver.

2. Son JR. Free radical & Antioxidant. Seoul:Biomedical. 2004:15-66.
3. Choi SY. Functional Medicine. Goyang:Gaonhaemedia. 2020:357-411.
4. An P, Wei LL, Zhao S, Sverdlov YD, Vaid AK, Miyamoto M et al. Hepatocyte mitochondria-derived danger signals directly activate hepatic stellate cells and drive progression of liver fibrosis. Nature Communications. 2020;11:2362.
5. Zhu R, Wang Y, Zhang L, Guo Q. Oxidative stress and liver disease. Hepatology Research, 2012;42:741-49.
6. Cichoż-Lach H, Michalak A. Oxidative stress as a crucial factor in liver diseases. World journal of gastroenterology. 2014;20(25):8082-91.
7. OECD.Stat. Health Status:Causes of mortality. 2019 [cited 2021 July 2]. Available from:URL:https://stats.oecd.org/.
8. Statistics Korea. Annual report on the cause of death statistics. Korean Statistical Information Service. 2019[cited 2020 Sept 22]. Available from:URL: http://kosis.kr/.
9. 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.
10. Kim JK, Park SM, Jegal KH, Kim YW, Byun SH, Kim SC et al. Gleditsia Spina Extract Protects Hepatocytes from Oxidative Stress through Nrf2 Activation. Kor J Herbol. 2015;30(4):57-64.
11. Park SM, Kim SW, Jung EH, Ko HL, Im CK, Lee JR et al. Sipjeondaebotang Alleviates Oxidative Stress-Mediated Liver Injury through Activation of the CaMKK2-AMPK Signaling Pathway. Evid Based Complement Alternat Med. 2018;2018:8609285.
12. 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 GSK3β. Journal of Functional Foods. 2016;20:303-16.

13. Li DY. Dongyuanyiji. Beijing:Renminweisheng publisher. 1993:211.
14. Herbal Formulations Text Compilation Committee. Herbal Formula Science in Korean Medicine (1st Ed). Paju:Koonja publisher. 2020:1603.
15. Yu HB, Yu DR. The bibliographical study of Igwiseungyangtang. Journal of Korean Medicine Research Institute. 1997;10(2):409-16.
16. Kang DH, Yoo DY. Study on the effect of YikwisSeungYangTang (YSYT) on the Hematopoiesis and Proliferation of Immune Function in Mice. The Journal of Oriental Obstetrics & Gynecology. 2000;13(1):304-41.
17. Lee HJ, No YB, Rhu DG, Han JH, Kang SS. Effects of Yikwiseungyangtang(益胃升陽湯) Water Extract and its Variants on the Mobility of Isolated Ileum in Rabbits. The Journal of Wonkwang Oriental Medicine. 1992;2(1):403-13.
18. Lim EM, Yuk SS. A case report of Abnormal Uterine Bleeding. The Journal of Oriental Obstetrics & Gynecology. 2006;19(4):245-55.
19. Hwang DY. Bangyakhappyeon. Seoul:Namsandang. 1985:145-46.
20. Huh J. Donguibogam. Seoul:Namsandang. 1987:159, 434.
21. Son JW, Jung JY, Kim KY, Hwangbo M, Park CA, Cho IJ, Back YD, Jung TY, Kim SC, Jee SY. The Protective Activity of Soeumin Bojungykgi-tang Water Extract Against Oxidative Stress-induced Hepato-Toxicity. Herbal Formula Science. 2017;25(4):509-26.
22. Park JH, Shin HM, Kang YH, Kim KH. A Study on the Effects of Bojungikgitang Extract on Recovery of Suppressed Immune Function induced by Cyclosporin A in Rats. Journal of Korean Medicine. 1994;15(1):451-66.
23. Nam HW, Jung WY. Effects of Bojungikgitang and Bogantang on the Recovery of Damaged Liver in Rat. Korean J. of Oriental Physiology & Pathology. 1991;6:127-44.
24. Park SM, Kim JK, Kim EO, Jegal KH, Jung DH, Lee SG et al. Hepatoprotective Effect of Pericarpium zanthoxyli Extract Is Mediated via Antagonism of Oxidative Stress. Evid Based Complement Alternat Med. 2020;2020:6761842.
25. Kim JK, Jung JY, Park SM, Park CA, Ku SK, Byun SH et al. Study of hepatoprotective effect of Haegan-jeon through activation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 and optimization of herbal composition based on molecular mechanism. Herb Formula Sci. 2018;26(3):207-21.
26. Reed JC. Mechanisms of Apoptosis. The American journal of pathology. 2000;157(5):1415-30.
27. Lim DG. Oxidative stress; reactive oxygen species and nitric oxide. Korean Journal of Critical Care Medicine. 2004;19(2):81-5.
28. Ma Q. Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2013;53:401-26.
29. Jayadev S, Linardic CM, Hannun YA. Identification of arachidonic acid as a mediator of sphingomyelin hydrolysis in response to tumor necrosis factor. Journal of Biological Chemistry. 1994;269(8):5757-63.
30. Videla LA. Oxidative stress signaling underlying liver disease and hepatoprotective mechanisms. World journal of hepatology. 2009;1(1):72-8.
31. Lee EH, Beak SY, Kim KY, Lee SG, Kim SC, Lee HS et al. Effect of Rheum undulatum Linne extract and Glycyrriza uralensis Fischer extract against arachidonic acid and iron-induced oxidative stress in HepG2 cell and CCl4-induced liver injury in mice. Herb Formula Sci. 2016;24(3):163-74.
32. Jung JY, Park SM, Ko HL, Lee JR, Park CA, Byun SH et al. Epimedium koreanum Ameliorates Oxidative Stress-Mediated Liver Injury by Activating Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2. The American Journal of Chinese Medicine. 2018;46(2):1-20.
33. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. Toxicologic pathology. 2007;35(4):495-516.
34. Zhang Y, Chen X, Gueydan C, Han J. Plasma membrane changes during programmed cell deaths. Cell research. 2018;28:9-21



35. Rigoulet M, Yoboue ED, Devin A. Mitochondrial ROS generation and its regulation: mechanisms involved in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> signaling. *Antioxidants & Redox Signaling*. 2011;14(3):459-68.
36. Shen D, Dalton TP, Nebert DW, Shertzer HG. Glutathione Redox State Regulates Mitochondrial Reactive Oxygen Production. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(27):25305-12.
37. Lee C, Yun JH, Yim YK. The Effect of Gamisoyo-san Intravenous Pharmacopuncture on Restoration of Liver Function after Partial Hepatectomy in SD Rat. *The Journal of Korean Medicine*. 2015;36(1):22-32.
38. Oh SY, Seo SH, Lee JH, Lee JS, Ma JY. Protective Effect of Galgeun-Tang Against CCl<sub>4</sub> Induced Hepatotoxicity. *Journal of physiology & pathology in Korean Medicine*. 2011;25(4):663-8.
39. Kim CH, Kwon YM, Lee YT, Park SD. The preventive effect of Daeshiho-tang on liver damage induced by acetaminophen in the rats. *Herbal formula science*. 2004;12(2):139-154.
40. Ju WS, Park HJ, Yun BG, Jung SY, Park SD. Effect of Banhasasintang on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats. *Kor J Herbol*. 1999;14(2):51-9.
41. Choi IS, Park YW. Effects of Sosihotang on Recovery of Ethanol-Induced Fatty Liver in Rats. *Korean Journal of Oriental Medical Pathology*. 2000;14(2):118-131.
42. Lee JS, Oh SY, Seo SH, Kim TS, Ma JY. Protective effect of Socheongryong-Tang on hydrogen peroxide-induced hepatotoxicity. *Kor J Herbol*. 2011;26(4):133-7.
43. Yoon JS, Kim JS. The Effect of the Injinhotang Extract on Hepatocarcinogenesis in Rats. *Korean J. Microscopy*. 2009;39(4):283-9.