



Original Article / 원저

## 산화적 스트레스에 대한 석결명의 세포 보호 효과

김광연<sup>1#</sup>, 이승진<sup>2#</sup>, 지선영<sup>3#</sup>, 배수진<sup>2</sup>, 송유림<sup>2,3</sup>, 윤언정<sup>2</sup>, 박선빈<sup>2</sup>, 송종국<sup>4</sup>, 손태진<sup>5</sup>, 손재동<sup>6</sup>,  
김우현<sup>6</sup>, 양주혜<sup>1</sup>, 박선동<sup>2</sup>, 김상찬<sup>3\*</sup>, 김영우<sup>2\*</sup>, 박광일<sup>6\*</sup>

<sup>1</sup>한국한의학연구원, <sup>2</sup>동국대학교 한의과대학 방제학교실, <sup>3</sup>대구한의대학교  
한의학과, <sup>4</sup>용인대학교, <sup>5</sup>경일대학교, <sup>6</sup>경상대학교 수의과 대학

## Cellular-protective effects of *Nardotidis seu Sulculii Concha* Extract against oxidative stress

Kwang Yeon Kim<sup>1#</sup>, Seung Jin Lee<sup>2#</sup>, Seon Young Jee<sup>3#</sup>, Su Jin Bae<sup>2</sup>, Yu Rim Song<sup>2,3</sup>,  
Un-Jung Yun<sup>2</sup>, Seonbeen Bak<sup>2</sup>, Jong Kuk Song<sup>4</sup>, Tae Jin Son<sup>5</sup>, Jae-Dong Son<sup>6</sup>,  
Woo Hyun Kim<sup>6</sup>, Ju Hye Yang<sup>1</sup>, Sun Dong Park<sup>2</sup>,  
Sang Chan Kim<sup>3\*</sup>, Young Woo Kim<sup>2\*</sup>, Kwang-Il Park<sup>6\*</sup>

<sup>1</sup>Korea Institute of Oriental Medicine, <sup>2</sup>School of Korean Medicine,  
Dongguk University, <sup>3</sup>College of Korean Medicine, Daegu Haany  
University, <sup>4</sup>Yong In University, <sup>5</sup>Kyung Il University, <sup>6</sup>College of  
Veterinary Medicine, Gyeongsang National University

### ABSTRACT

**Objectives** : This study investigated cellular-protective effects of *Nardotidis seu Sulculii Concha* water extract (NSCE) against oxidative stress induced by arachidonic acid (AA)+iron or tert-butylhydroperoxide (tBHP).

**Methods** : *In vitro*, MTT assay was assessed for cell viability, and immunoblotting analysis was performed to detect expression of AMP-activated kinase (AMPK) signaling pathway and autophagy related proteins. *In vivo*, mice were orally administrated with the aqueous extract of NSCE of 500 mg/kg for 3 days, and then injected with CCl<sub>4</sub> 0.5 mg/kg body weight to induce acute damage. The level of liver damage was measured by serum aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and lactate dehydrogenase (LDH) analysis.

**Results** : Treatment with NSCE inhibited cell death induced by AA+iron and tBHP. NSCE induced the phosphorylation of AMPK, and this compound also induced the phosphorylation of LKB1, an upstream kinase of AMPK, and Acetyl-CoA carboxylase (ACC), a primary downstream target of AMPK. NSCE increased the protein levels of autophagic markers (LC3II and beclin-1) and decreased the phosphorylation of mammalian target of rapamycin (mTOR) and simultaneously increased the phosphorylation of unc-51-like kinase-1 (ULK-1) in time-dependent manner.

**Conclusions** : NSCE has the ability 1) to protect cells against oxidative stress induced by AA+iron or tBHP. NSCE 2) to activate AMP-activated protein kinase (AMPK), and 3) to regulate autophagy, an important regulator in cell survival.

**Key words** : Nardotidis seu Sulculii Concha, oxidative stress, cell injury, cellular-protective effect.

## I. 서론

간은 다양한 물질대사가 이루어지는 매우 중요한 장기이며, 간세포의 소기관 중 하나인 미토콘드리아는 체내에 들어온 영양소들을 분해하여 대사에 필요한 에너지를 만들어 제공한다. 그리고 간은 약물이나 독성물질을 해독하는 과정에서 생성되는 여러 가지 물질 및 활성산소가 단백질과 DNA의 변형을 유도하여 독성에 대한 감수성을 증가시킨다. 또한, 만성적인 간 손상에서는 반복되는 손상과 회복의 과정을 통해 염증반응이 나타나고, 다양한 염증 인자들에 의해 세포사멸이 일어난다<sup>1-5)</sup>. 그 중 산화적 스트레스가 원인이 된 간세포의 손상은 염증, 간경화, 간암 등의 간 질환의 발생과 진행에 관여한다고 알려져 있다<sup>6-8)</sup>. 따라서 간에서의 산화적 스트레스는 지방간, 간염, 간경화, 간암과 같은 만성 간질환을 유발하는 원인 중 하나라고 할 수 있다.

그리고 AMP-activated protein kinase (AMPK)는 지질과 포도당 대사의 조절인자로 세린/트레오닌 계열의 단백질 인산화 효소이다<sup>9)</sup>. AMPK는 비활성 상태로 있다가 AMP/ATP 비율을 증가시키는 고강도 운동이나 저혈당, 저산소증 등의 신호전달 기전과 세포의 산화적 스트레스에 의해 활성화된다. 또한, AMPK 하위 인자인 acetyl CoA carboxylase (ACC)

는 이러한 AMPK의 활성화를 통해 억제되어 지방 합성과 관련된 체내 지질 대사를 조절하거나 포도당 신생합성의 억제를 통해 포도당 대사를 조절하고, ATP의 생성을 증가시키며 ATP를 소모하는 세포의 성장 및 증식을 억제하여 세포 내 에너지 항상성을 유지시킨다<sup>10-12)</sup>. AMPK의 상위 인산화효소(upstream kinase) 중 하나인 liver kinase B1 (LKB1)은 AMP의  $\gamma$  소단위 부착을 강화시킴으로써 세포가 증식되는 것을 조절하고 종양이 억제되는 효과를 가진다고 알려져 있다<sup>9,12,13)</sup>.

Autophagy는 영양이 부족한 상태이거나 불필요 또는 손상이 있는 소기관의 저하를 포함한 여러 가지 중요한 대사작용과 관련이 있으며<sup>14)</sup>, 영양 부족, 소포체(endoplasmicreticulum, ER)스트레스, 감염, 저산소증 등에 대항하여 간세포의 항상성을 유지하는 세포 보호와 관련된 중요한 작용을 하고 있기에 간 질환 치료제 연구의 대상이 될 수 있다<sup>15)</sup>. 이전 연구에 따르면 autophagy의 기능이 향상되면 체내 지방 축적, 인슐린 저항성 및 비알코올성 간질환 (non-alcoholic fatty liver disease)을 감소시키는 효과가 있으며<sup>16)</sup>, autophagy 작용이 비정상적인 경우 간세포의 암 생성이 증가되었다. 그러므로 간세포에서 autophagy 작용을 강화시키면 간암을 포함한 여러 가지 간 질환에 대한 치료 기전이 될 수 있다<sup>17)</sup>.

#These authors (KY Kim, SJ Lee and SY Jee) equally contributed to this work.

\*Corresponding author : Kwang Il Park. College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, 501, Jinju-daero, Jinju-si, Gyeongsangnam-do, 52828, Republic of Korea  
Tel : +82-53-940-3877, Fax : +82-53-940-3899, E-mail : kipark@gnu.ac.kr

\*Corresponding author : Young Woo Kim. School of Korean Medicine, Dongguk University, 123, Dongdae-ro, Gyeongju-si, Gyeongsangbuk-do, 38066, Republic of Korea.  
Fax : +82-31-961-5835, E-mail : ywk@dongguk.ac.kr

\*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, Hanuida-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 : January 13, 2021 / Revised : February 16, 2021 / Accepted : March 2, 2021



석결명은 전복과 동물의 조개껍질로 만든 약재로 두통, 현기증, 갑작스런 인체 경련 등에 쓰인다<sup>18)</sup>. 석결명에 대한 이전 연구로는 자외선으로 손상된 피부 세포에 대한 항산화 및 항노화 효과에 대한 연구와<sup>19,20)</sup>, 인삼 모상근의 성장과 Ginsenoside 성분들의 생합성에 미치는 석결명의 영향에 대한 연구가 있다<sup>21)</sup>.

하지만 위의 연구들에서도 산화적 스트레스로 유도된 간 손상에 대한 석결명의 효과에 대한 연구결과는 아직 보고된 것이 없다. 따라서 석결명의 간 보호 효과를 평가하기 위해 HepG2 세포에 AA+iron 또는 tBHP를 처리하여 유도된 세포 독성 모델에서 석결명의 효과를 in vitro에서 평가하였고, 또한 CCl<sub>4</sub>에 의해 유발되는 mouse의 급성 간 손상 모델에 대한 석결명의 간 보호 효과를 in vivo에서 평가하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 실험재료

anti-phospho acetyl-CoA carboxylase (p-ACC), anti-phospho AMP-activated protein kinase (p-AMPK), anti-phospho liver kinase B1 (p-LKB1), anti-phospho mammalian target of rapamycin (mTOR), anti-phospho unc-51-like kinase-1 (ULK-1), horseradish per-oxidase-conjugated goat anti-mouse IgG는 Cell Signaling Technology (Beverly, MA)에서 구입하였고, horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG는 Thermo (Rockford, IL, USA)에서 구입하였다. 그리고 Arachidonic acid (AA)는 Calbiochem (San Diego, CA, USA)에서 구입하였으며, Fetal bovine serum과 antibiotics는 Gibco/BRL(Eggenstein, Germany)에서 구입하였고, NC paper는 Schleicher & Schuell (Dassel, Germany)사의 것을 사용하였다. 그 외 tBHP, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoleum (MTT), ferric nitrilotriacetic acid (Fe-NTA),  $\beta$ -actin 항체 등 다른 시약들은 Sigma (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

### 2. 추출물 제조

석결명은 대원약업사 (Daegu, Korea)에서 구입하여 석결명 200g을 3차 증류수로 실온에서 열수 추출

하였다. 열수 추출한 농축액은 0.2  $\mu$ m filter를 이용하여 여과한 뒤 동결건조하여 실험에 사용하였다.

### 3. 세포 배양 및 처리

인간 간암세포주인 HepG2 세포를 10% fetal bovine serum (FBS)과 1% penicillin/streptomycin을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지를 사용하여, 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 24시간 배양하였다. 그리고 FBS가 첨가되지 않은 DMEM 배지로 교체하여 12시간 serum-starvation 시킨 다음, AA+iron 실험에서는 30~1000  $\mu$ g/mL 농도의 NSCE와 30  $\mu$ M AA를 동시 처리하여 12시간 배양한 후, 5  $\mu$ M iron (Fe-NTA)을 추가로 2시간 처리하였고, tBHP 실험에서는 30~1000  $\mu$ g/mL 농도의 NSCE를 처리하고 1시간 뒤 200  $\mu$ M의 tBHP를 처리한 후에 24시간 배양하였다.

### 4. 세포 생존률 측정 (MTT assay)

HepG2 세포를 24-well plate에  $2 \times 10^5$  cells/well로 24시간 배양하여 AA+iron 실험에서는 0, 30, 100, 300, 1000  $\mu$ g/mL의 NSCE와 30  $\mu$ M AA를 12시간 처리한 후, 5  $\mu$ M iron을 2시간 더 처리하였고, tBHP 실험에서는 0, 30, 100, 300, 1000  $\mu$ g/mL의 NSCE를 처리하고 1시간 후 200  $\mu$ M의 tBHP를 처리하여 24시간 동안 배양하였다.

그리고 3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) 시약을 처리하여 37°C에서 2시간 반응시킨 후, 살아있는 세포가 시약과 반응하여 생성된 formazan crystal을 dimethylsulfoxide(DMSO)로 용해시키고, microplate 측정기(Tecan Infinite® M200 PRO, USA)를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 5. Immunoblot analysis

HepG2 세포를 6-well plate에 배양하고, NSCE 300  $\mu$ g/mL을 0.1~6시간 처리한 후 분석을 실시하였다. phosphate buffered saline (PBS)로 2회 washing한 다음, lysis buffer (Thermo, Rockford, IL, USA)를 첨가하여, scrapper로 세포를 모아 tube에 넣고 세포를 균질화하였다. 그리고 얼음 위에서 Buffer와 cell이 들어 있는 tube를 vortex한 후, 15,000 $\times$ g로 4°C에서 30분간 원심분리하여 상층액만

취하고, bicinchoninic acid (BCA) protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA)로 단백질 정량을 실시하였다. 세포에서 추출한 단백질을 전기영동하고 enhanced chemiluminoscent system (Amersham, Buckinghamshire, UK)을 사용하여 image analyzing system (Ultra-Violet Products Ltd., Upland, CA, USA) 또는 X-ray 필름에 감광하였고, Image J 1.42 software (NIH Bethesda, USA)를 이용하여 정량하였다.

## 6. 실험동물의 사육 및 처치

실험동물은 6주령 수컷 흰쥐(180-200 g)를 1주일 간 환경에 적응시킨 다음 실험에 사용하였으며, 온도 20-23°C, 습도 60%, 12시간 light/dark cycle을 유지하면서 사료 (Nestle Purina Petcare Korea, Seoul, Korea)와 물은 제한 없이 섭취하도록 하였다 (승인번호: D-16-015).

아무런 처치를 하지 않은 군을 대조군(N=8)으로 하고 간손상을 유도하는 CCl<sub>4</sub>만을 투여한 군을 CCl<sub>4</sub> 군으로 하였으며, CCl<sub>4</sub>와 NSCE를 500 mg/kg로 투여한 CCl<sub>4</sub>+NSCE군, NSCE 500 mg/kg을 단독으로 투여한 NSCE군으로 나누어 실시하였다. NSCE는 500 mg/kg의 농도로 총 3일 동안 경구 투여하였으며, 3일 동안은 1일 1회씩 사료와 물을 자유롭게 공급하면서 NSCE를 경구투여하였고, 마지막 NSCE를 투여하고 2시간 경과 후 CCl<sub>4</sub> 0.5 mg/kg씩 복강으로 주사하여 급성 간 손상을 유발하였다. 전체 실험 기간 중 대조군과 CCl<sub>4</sub> 투여군에는 NSCE 투여량과 동일한 양의 생리식염수를 경구 투여하였다.

## 7. 혈액생화학적 검사

실험동물의 복대정맥으로부터 3 ml 이상의 혈액을 채혈한 후 원심분리기를 사용하여 4°C에서 10분간 3000×g로 혈청을 분리하였다. 혈청 중 alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) lactate dehydrogenase (LDH)는 Analysis

kits (Pointe Scientific Inc., Canton, MI, USA)와 Automated blood chemistry analyzer (Photometer 5010, Robert Riele GmbH & Co KG, Berlin, Germany)를 사용하여 분석하였다.

## 8. 통계 처리

실험 결과는 mean ± S.D. 로 나타내었고, t-test 및 one way ANOVA로 통계적 유의성을 검정하였고, p<0.01 또는 p<0.05의 유의성을 검증하였다.

## III. 결과

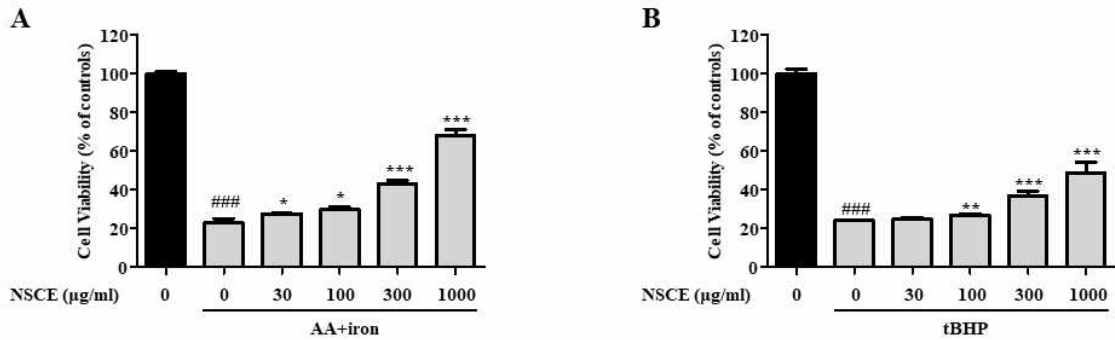
### 1. AA+iron 또는 tBHP로 유도된 산화적 스트레스에 대한 NSCE의 세포 보호 효과

산화적 스트레스에 대한 NSCE의 간세포 보호 효과를 평가하였다 (Figure. 1).

30, 100, 300, 1000 µg/ml의 NSCE와 30 µM의 AA를 동시에 처리하여 12시간 동안 배양한 다음, 5 µM의 iron을 2시간 더 처리하였으며 그 결과, AA+iron 단독 처리군은 아무 처치도 하지 않은 대조군에 비해 세포 생존율이 현저하게 감소하였다(Figure 1A). 하지만 NSCE 처리군은 농도 의존적으로 세포 생존율이 증가했으며, AA+iron 단독 처리군과 비교하였을 때, NSCE 30~1000 µg/ml의 모든 농도에서 통계적으로 유의하게 증가하였다(Figure 1A).

그리고 NSCE가 tBHP에 의해 유도된 세포 독성에 대한 효과를 관찰하고자 NSCE를 30, 100, 300, 1000 µg/ml의 농도로 처리하고, 1시간 후 tBHP를 200 µM로 24시간 처리하였다. tBHP 단독 처리군에서는 세포 생존율이 현저하게 감소하였지만 NSCE 처리군에서 농도 의존적으로 세포 생존율이 유의하게 증가하는 것을 확인하였다(Figure 1B).

특히 두 실험에서 모두 NSCE 300 µg/ml에서 세포 생존율이 뚜렷하게 증가하는 것으로 나타나 이후 실험에서는 NSCE 300 µg/ml의 농도를 사용하였다.

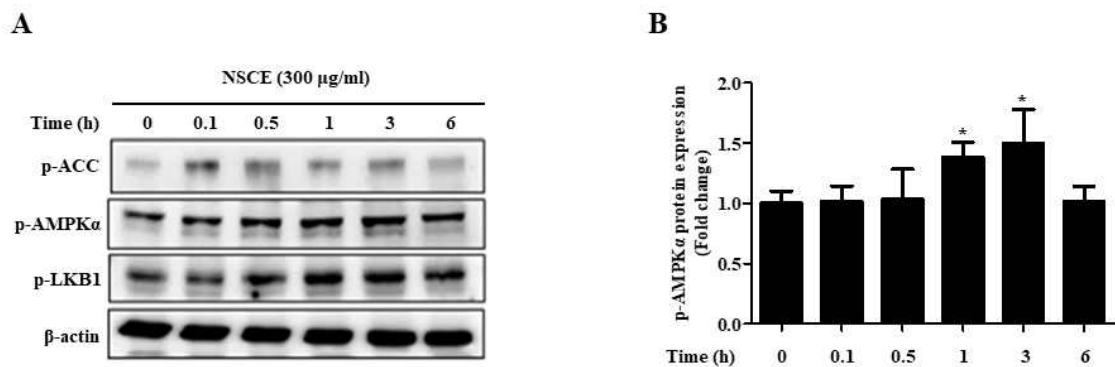


**Figure 1.** Effects of *Nardotidis seu Sulculii Concha* water extract (NSCE) on cell viability of HepG2 cells. (A) Cell viability of NSCE in AA+Fe-treated HepG2 cells. Cells were pretreated with various concentrations (30-1000 µg/ml) of NSCE for 1 h and then treated with 30 µM arachidonic acid (AA) for 12 h, followed by treatment of 5 µM iron for 2 h. (B) Cell viability of NSCE in tBHP-treated HepG2 cells. Cells were pretreated with various concentrations (30-1000 µg/ml) of NSCE for 1 h and then followed by treated with 200 µM tBHP for 24 h. Cell viability was determined using a Cell Counting Kit-8. Cell viability is represented as the percentage relative absorbance compared with the controls. The results represent the mean ± standard error of the mean values of each cell in the same group. ###p < 0.001 versus the control group, \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 versus the AA+iron or tBHP-treated group.

## 2. NSCE가 AMPK pathway 활성화에 미치는 영향

NSCE 세포 보호의 분자기전으로서 AMPK pathway와의 연관성을 규명하고자 HepG2 세포에 300 µg/mL NSCE를 시간 의존적으로 10분에서 6시간까지 처리 해본 결과, NSCE는 AMPK의 인산화를 1시간에서 3

시간까지 증가시켰다(Figure 2A,2B). 그리고 이와 더불어 AMPK 상위 인산화효소(upstream kinase)인 LKB1과 AMPK의 하위 기질인 ACC의 인산화도 함께 증가하는 경향을 보였다(Figure 2A).

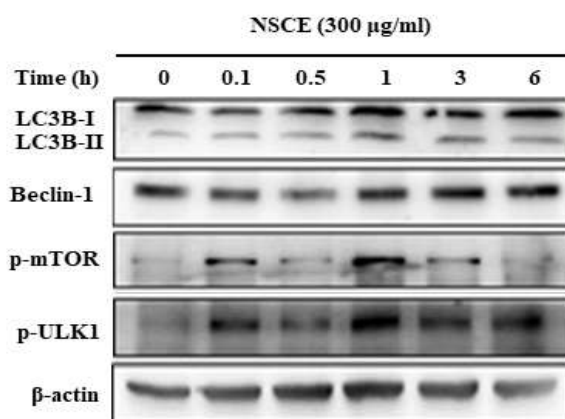


**Figure 2.** Effects of *Nardotidis seu Sulculii Concha* water extract (NSCE) on AMPK signaling pathway. (A) Effects of NSCE on AMPK, ACC and LKB1 expression in HepG2 cells. Phosphorylated form of AMPK, ACC and LKB1 were immunoblotted in the whole cell lysates treated with 300 µg/ml of NSCE for the indicated time. (B) Fold change of p-AMPKα protein expression was analysed by β-actin loading control. The results represent the mean ± standard error of the mean values of each mouse in the same group. \* p < 0.05 versus the control group.

### 3. NSCE가 autophagy 관련 단백질 발현에 미치는 영향

세포 보호 기전 중 하나인 autophagy 작용에 NSCE가 미치는 영향을 규명하고자 HepG2 세포에 NSCE를 처리한 후 western blot 분석을 통해 autophagy 관련 단백질을 확인하였다. HepG2 세포에 300 µg/mL NSCE를 시간 의존적으로 10분에서 6

시간까지 처리해본 결과, NSCE의 처리 시간에 따라 autophagy와 관련된 LC3B-I, LC3B-II 및 Beclin-1 단백질의 발현 정도가 6시간까지 증가하는 것을 확인하였다(Figure 3). 또한 NSCE를 시간에 따라 처리하였을 때 mTOR의 인산화를 억제시켰으며, 동시에 ULK1의 인산화는 증가시키는 것을 확인하였다(Figure 3).

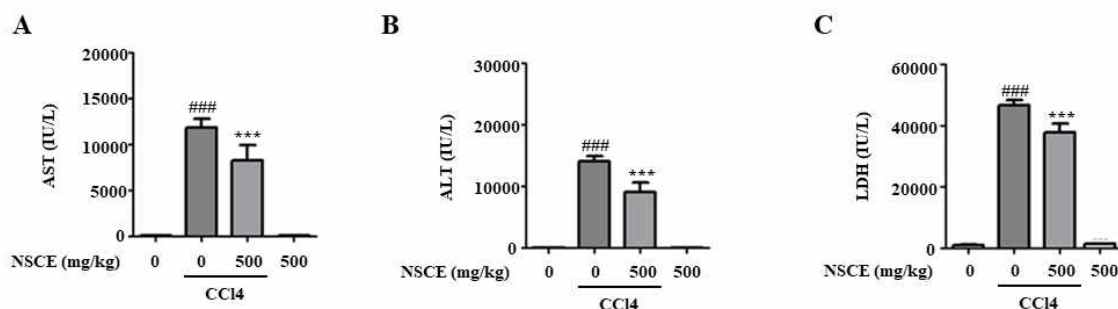


**Figure 3.** Effects of Nardotidis seu Sulculii Concha water extract (NSCE) on autophagy-related protein expression. Effects of NSCE on LC3B, Beclin-1, p-mTOR and p-ULK1 expression in HepG2 cells. Protein expression of LC3B, Beclin-1, p-mTOR and p-ULK1 were immunoblotted in the whole cell lysates treated with 300 µg/ml of NSCE for the indicated time.

### 4. NSCE가 CCl<sub>4</sub>로 유도된 간 손상에 미치는 영향

생체 내에서 CCl<sub>4</sub>에 의해 유도된 급성 간 손상에 대해 NSCE가 미치는 영향을 알아보기 위해 혈청 내 AST, ALT 및 LDH를 측정하였다. 먼저 NSCE를 단독으로 투여한 NSCE군에서는 AST, ALT, LDH의 유의한 증가가 관찰되지 않았고, CCl<sub>4</sub> 투여로 인한 간

의 손상 정도를 확인하기 위한 CCl<sub>4</sub> 투여군에서는 혈청 AST, ALT, LDH가 아무 처치도 하지 않은 대조군에 비하여 현저히 증가하였으며, NSCE를 미리 경구 투여했던 NSCE+CCl<sub>4</sub>군에서는 CCl<sub>4</sub>를 투여해도 수치가 유의하게 감소하는 것을 확인하였다(Figure 4A,4B,4C).



**Figure 4.** Effects of Nardotidis seu Sulculii Concha water extract (NSCE) on CCl<sub>4</sub>-induced hepatic damage in mice. (A) Effects of NSCE on serum AST level. (B) Effects of NSCE on serum ALT level. (C) Effects of NSCE on serum LDH level. The results represent the mean ± standard error of the mean values of each mouse in the same group. ###p < 0.001 versus the control group, \*\*\*p < 0.001 versus the CCl<sub>4</sub> alone.



#### IV. 고찰

간은 대사작용에 필수적인 철이 저장되는 곳으로 철이 과도하게 축적되면 지질 과산화를 촉진하고, 활성화된 phospholipase A2가 아라키돈산 (arachidonic acid, AA)의 분비를 자극하여 산화적 스트레스 또는 염증을 유발한다<sup>22-24</sup>). 그리고 세포가 산화적 스트레스를 과도하게 받으면 지방산의 산화 및 세포막의 변형이 촉진되고, phospholipase가 활성화되어 ω-6 다가불포화 지방산인 AA의 유리가 세포 내외에서 증가된다<sup>23</sup>). 또한 iron이 AA와 함께 처리되면 AA에 의해 활성산소가 생성되고, 미토콘드리아 막 전위가 저하되어 더 강한 세포 독성을 유발할 수 있다고 보고되었다<sup>24</sup>).

위와 같은 이전 연구들에 의하면, AA+iron 처치는 간세포 손상과 관련된 기전 연구에서 세포 내 활성산소를 증가시키는 산화적 스트레스를 유도하는 물질로 이용될 수 있어 간세포 보호 및 항산화 물질의 효능을 평가하는 지표로 이용되었다<sup>6</sup>). 따라서 본 연구에서도 간세포에 AA+iron의 처리로 유도된 산화적 스트레스로 세포 독성을 유발하여, NSCE의 간 보호 효과에 대해 알아보았다. 먼저, 세포 생존율을 MTT assay로 측정하였고, 그 결과 AA+iron으로 유도된 세포 손상이 NSCE 농도 의존적으로 억제되는 것으로 보아, NSCE는 세포를 보호하는 효과를 가진다고 생각할 수 있었다. 그리고 tert-butylhydroperoxide(tBHP)는 강력한 산화제로 hydroperoxide 유사체이며 미토콘드리아 막 전위 손실을 일으켜 세포 ATP 생성을 억제시킴으로써 세포사멸을 유도하고<sup>25</sup>), 미토콘드리아 단백 sulfhydryl기를 산화시킨다고 알려져 있다<sup>26</sup>).

이러한 선행 연구에 따라 tBHP는 산화적 스트레스로 세포사멸을 유발하는 물질로서 항산화제를 통한 세포 보호 물질의 탐색 연구에 이용될 수 있다. 따라서 본 연구에서는 NSCE가 tBHP에 의한 세포 손상에 대해 세포보호 작용을 할 수 있는가를 알아보기 위해 NSCE가 세포 생존율에 미치는 영향을 MTT assay로 평가하였다. 그 결과 NSCE는 tBHP에 의해 유도된 세포 손상을 통계적으로 유의하게 억제시킨 것을 확인할 수 있었고, 이는 tBHP가 유도한 산화적 스트레스에 의한 세포 독성을 NSCE가 유효하게 억제함을

의미한다.

활성화된 AMPK는 인산화되어 세포 내 효소를 조절한다는 연구결과를 바탕으로<sup>6,24</sup>), 산화적 스트레스로부터 NSCE의 세포 보호 효과의 기전 연구로서 AMPK pathway를 확인하였다. 본 연구에서 NSCE를 처리한 시간을 달리하여 immunoblot assay를 수행하였고, AMPK의 인산화가 시간 의존적으로 증가함을 확인하였으며, 또한 이전의 연구들에서 autophagy 작용이 영양 부족, 소포체 손상 및 조직의 감염 등 여러 가지 원인으로 인해 손상되었거나 필요 없어진 세포 소기관 또는 단백질을 제거하는 작용을 통해 세포의 생존 기전으로서 작용한다는 것을 보여주었다<sup>14</sup>). 본 연구에서도 역시 AMPK의 상위 인자인 LKB1과 하위 인자인 ACC의 인산화도 증가되는 것을 관찰할 수 있었다. 그리고 NSCE의 처리 시간에 따라 autophagy와 관련된 LC3B-I, LC3B-II 및 Beclin-1 단백질 발현의 증가가 관찰되었고, mTOR의 인산화를 억제시켰으며 동시에 ULK1의 인산화는 증가시키는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과들로 NSCE가 HepG2 세포에서 AMPK pathway를 활성화시키고, autophagy를 유도한다는 것을 알 수 있었다.

in vivo 모델에서 사용된 CCl<sub>4</sub>는 생체 내에서 trichloromethyl radical을 생성하고, 여기서 생성된 CCl<sub>3</sub>는 O<sub>2</sub>와 결합하여 trichloromethyl peroxyradical을 만들며, 세포막의 인지질에서 지질의 과산화를 일으키는 대표적인 간독성 유발물질이다. 그리고 이러한 지질 과산화는 미토콘드리아나 DNA, 세포막과 같은 세포의 주요 기관에 영향을 주어 간세포의 괴사를 유발하고, 활성산소 생성 및 세포사멸로 인해 알코올성 또는 비알코올성 지방간염, 간 독성 및 혈색소증 등의 간 질환을 유발한다<sup>27</sup>).

그리고 ALT는 간세포의 변성이나 괴사를 민감하게 반영하여 ALT의 상승은 간 손상의 여부를 매우 의미 있게 나타내므로, 간 손상에 대한 예측치가 매우 높아 ALT는 간 손상의 정도를 평가하는 이상적인 지표로 보고되고 있으며<sup>28</sup>), AST는 ALT와 함께 심근, 간, 골격근 등의 여러 장기 및 조직에 많이 존재하고, 혈중에 존재하는 양은 극히 미량이다. 따라서 혈액 내의 AST와 ALT가 상승하면 AST와 ALT가 다량 존재

하고 있는 장기에서의 세포 변성 및 괴사를 의미하며, 특히 간 질환 또는 심장 질환의 지표로 이용되고 있다. LDH 또한 체내의 여러 조직에 존재하고, AST, ALT와 같이 간세포로부터 빠져나와 급성 간염에서 수치가 상승되는 것을 보여준다<sup>29)</sup>.

따라서 본 연구에서도 NSCE의 간 보호 효과를 동물실험에서 평가하기 위하여 CCl<sub>4</sub>로 유도된 간 독성 모델에서 혈액 내 AST, ALT, LDH를 평가하였다. 이전의 연구결과와 마찬가지로 CCl<sub>4</sub>는 간 손상의 혈액학적 지표인 AST, ALT, LDH의 유의적인 증가를 유도하였고, 500mg/kg의 NSCE 투여는 이러한 간 손상 지표들을 유의하게 억제하였으며, 이는 NSCE가 CCl<sub>4</sub>로 유도된 산화적 스트레스에 의한 간 독성을 억제하여 간 보호 작용을 한다는 것을 나타낸다. 이러한 결과를 종합해 보면 본 연구에서는 NSCE는 AA+iron, tBHP 그리고 CCl<sub>4</sub> 같은 산화적 스트레스 물질에 대해 간세포 및 간의 보호 작용을 나타낸다는 것을 알 수 있었다.

## V. 결론

본 연구에서는 석결명추출물 (NSCE)의 간 보호 효과를 알아보기 위하여 HepG2 세포와 AA+iron 및 tBHP를 활용한 *in vitro* 모델, 그리고 mouse와 CCl<sub>4</sub>를 이용한 간 손상 *in vivo* 모델에서의 효능을 살펴본 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. NSCE는 AA+iron에 의해 유도된 세포 손상으로부터 세포를 보호한다.
2. NSCE는 AMPK의 활성화 효과를 가진다.
3. NSCE는 autophagy 조절 작용 효과를 가진다.
4. NSCE는 CCl<sub>4</sub>에 의해 유도된 급성 간 손상에서 간 보호 효과를 가진다.

이러한 결과에 따라 석결명이 *in vitro* 및 *in vivo* 모델에서 산화적 스트레스로 인한 손상에 대해 세포와 간 보호 효과가 있음을 알 수 있었으며, 간을 보호하는 유효한 약물 후보로서 석결명이 AMPK 활성화 및 autophagy 조절에 관여하는 다양한 분자 기전과 석결명의 활성 성분에 대한 지속적인 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## Acknowledgments

This research was supported by a grant of the Korea Health Technology R&D Project through the Korea Health Industry Development Institute (KHIDI), funded by the Ministry of Health & Welfare, Republic of Korea (number: HF20C0212). This work was also supported by Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF) funded by the Ministry of Education (NRF-2017R1D1A1B03032284) (No.2019R1A2C1003200) and by grant (No. 20190055) funded by the Ministry of Oceans and Fisheries, Republic of Korea.

## References

1. Liu J, Qu W, Kadiiska MB. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009 ; 238(3) : 209-214.
2. Wu SB, Ma YS, Wu YT, Chen YC, Wei YH. Mitochondrial DNA mutation-elicited oxidative stress, oxidative damage, and altered gene expression in cultured cells of patients with MERRF syndrome. *Mol Neurobiol.* 2010 ; 41(2-3) : 256-266.
3. Reinehr R, Häussinger D. CD95 activation in the liver : ion fluxes and oxidative signaling. *Arch Biochem Biophys.* 2007 ; 462(2) : 124-131.
4. Diesen DL, Kuo PC. Nitric oxide and redox regulation in the liver : Part I. General considerations and redox biology in hepatitis. *J Surg Res.* 2010 ; 162(1) : 95-109.
5. Wojcik M, Burzynska-Pedziwiatr I, Wozniak LA. A review of natural and synthetic antioxidants important for health and longevity. *Curr Med Chem.* 2010 ; 17(28) : 3262-3288.
6. Oh JM, Lee JY, Lee GH, Kim BH, Kim SK. Evaluation oxidative stress and antioxidant enzyme expression in human hepatocarcinoma SK-Hep-1 cells treated with stearic acid.





- Yakhak Hoeji. 2012 ; 56(1) : 14-19.
7. Lee CH. Effect of reactive oxygen species against hepatic vascular resistance. Korean Society of Gastroenterology. 2006 ; 513(16) : 271-272.
  8. Park SY, Cho JH. Effect of Vitamin A on Hepatic Mitochondrial Activity. Kor. J. Vet. Publ. Hlth. 2003 ; 27(1) : 53-58.
  9. Hardie DG. Mini review: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status. Endocrinol. 2003 ; 144 : 5179-5183.
  10. Winder WW, Thomson DM. Cellular energy sensing and signaling by AMP-activated protein kinase. Cell Biochem Biophys. 2007 ; 47 : 332-347.
  11. Ouchi N, Shibata R, Walsh K. AMP-activated protein kinase signaling stimulates VEGF expression and angiogenesis in skeletal muscle. Circ Res 2005 ; 96 : 838-846.
  12. Choi HC. AMP-activated protein kinase Activating Agent and Its Implication. Endocrinol Metab. 2012 ; 27(2) : 109-115.
  13. Boudeau J, Sapkota G, Alessi DR. LKB1, a protein kinase regulating cell proliferation and polarity. FEBS Lett. 2003 ; 546 : 159-165.
  14. Yang Z, Klionsky DJ. Eaten alive: a history of macroautophagy. Nat Cell Biol. Sep 2010 ; 12(9) : 814-822.
  15. Rautou PE, Mansouri A, Lebrec D, Durand F, Valla D, Moreau R. Autophagy in liver diseases. J Hepatol. Dec 2010 ; 53(6) : 1123-1134.
  16. Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease. N Engl J Med. Feb 14 2013 ; 368(7) : 651-662.
  17. Dreux M, Gastaminza P, Wieland SF, Chisari FV. The autophagy machinery is required to initiate hepatitis C virus replication. Proceedings of the National Academy of Sciences. 2009 ; 106(33) : 14046-14051.
  18. Kang So Sin Medical Institute. Dictionary of Chinese Medical Herbs. Shanghai Science Publishing. 1998 ; 2895-6.
  19. Jang JH, Lee C, Kim SC, Chung JW, Park CI. Protective Effect of Marine Natural Products against UVB-induced Damages in Human Skin Fibroblast via Antioxidant Mechanism. J Soc Cosmet Scientists Korea. 2010 ; 36 : 79-87.
  20. Lee C, Jang JH, Kim BA, Park CI. Anti-aging Effects of Marine Natural Extracts against UVB-induced Damages in Human Skin Cells. J Soc Cosmet Scientists Korea. 2012 ; 38 : 255-261.
  21. Jeong DY, Kim YJ, Shim JS, Lee JH, Jung SK, Kim SY, et al. The Effect of *Haliotidis Concha* on the Growth and Ginsenoside Biosynthesis of Korean Ginseng Hairy Root. J Ginseng Res. 2009 ; 33 : 206-211.
  22. Shimizu T, Wolfe LS. Arachidonic acid cascade and intercellular signal transduction. J Neurochem. 1990 ; 55(1) : 1-15.
  23. Balboa MA, Balsinde J. Oxidative stress and arachidonic acid mobilization. Biochim Biophys Acta. 2006 ; 1761(4) : 385-391.
  24. 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) : 242-253.
  25. Chen HW, Chiang T, Wang CY, Lii CK. Inhibition of tert-butyl hydroperoxide-induced cell membrane bleb formation by alpha-tocopherol and glutathione. Food Chem Toxicol 2000 ; 38 : 1089-1096.
  26. Alia M, Sonia Ramos S, Mateos R, Bravo L, Goya L. Response of the antioxidant defense system to tert-butyl hydroperoxide and hydrogen peroxide in a human hepatoma cell line (HepG2). J Biochem Mol Toxicol 2005 ; 19 : 119-128
  27. Kim TH, Kim YW, Shin SM, Kim CW, Yu IJ, Kim SG. Synergistic hepatotoxicity of N,N-dimethylformamide with carbon tetrachloride in association with endoplasmic reticulum stress.

- Chem Biol Interact 2010 ; 184 : 492-501.
28. Tan KK, Bang SL, Vijayan A, Chiu MT. Hepatic enzymes have a role in the diagnosis of hepatic injury after blunt abdominal trauma. *Injury*. 2009;40:978-83.
  29. Sherlock S, Dooley J. *Diseases of the Liver and Biliary System*, 11th ed., Blackwell Science, London, 2002. p.23.