



Original Article / 원저

## 중금속 유도 산화적 스트레스에 대한 금은화의 세포 보호 효과

염승희<sup>1</sup>, 박선빈<sup>1</sup>, 박선동<sup>1\*</sup>, 박광일<sup>2\*</sup>, 김영우<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>동국대학교 한의학과 방제학교실

<sup>2</sup>경상대학교 수의과대학 수의생리학

## *Lonicera japonica* inhibited the oxidative Stress induced by the heavy metal

Seung-Hee Yeom<sup>1</sup>, Seon Been Bak<sup>1</sup>, Sun-Dong Park<sup>1\*</sup>, Kwang-Il Park<sup>2\*</sup>, Young Woo Kim<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>School of Korean Medicine, Dongguk University

<sup>2</sup>Department of Veterinary Physiology, College of Veterinary Medicine,  
Gyeongsang National University

### ABSTRACT

**Objectives** : *Lonicera japonica* is known for anti-inflammation and antibiotic effect in Korean medicine. This study aimed for investigating the cytoprotective effect of *Lonicera japonica* extract (LJE) for HepG2 cells against arachidonic acid (AA)+iron-induced oxidative stress.

**Methods** : The effect of LJE on cell viability was assessed by MTT assay. ROS assay was selected to assess antioxidant effect of LJE. To assess LJE's effect on mitochondrial function, flow cytometric analysis was operated. And immunoblot analysis was used to establish the underlying mechanism of LJE.

**Results** : LJE protected HepG2 cells against AA+iron-induced oxidative stress by phosphorylation of liver kinase B1 and blocked the decline of procaspase 3. Also, LJE preserved the mitochondrial membrane permeability induced by AA+iron.

**Conclusion** : LJE protected the hepatocyte from AA+iron-induced oxidative stress by activation of LKB1 by the preservation of mitochondrial functions.

**Key words** : *Lonicera japonica*, Arachidonic acid, Iron, Oxidative stress, LKB1.

## I. 서론

간은 인체 내에서 많은 물질대사에 관여하고 있다. 그만큼 다양한 유해인자에 노출되어 있다. 간질환은 바이러스, 세균, 미생물 등과 같은 병원체들로 인한 감염성질환과 알코올, 약물이나 기질적인 문제 등으로 인한 비감염성질환으로 나눌 수 있다. 따라서, 간세포는 간이 인체의 항상성과 물질대사에 많이 기여하는 만큼 염증 반응에 꾸준히 노출되어 있다.

간세포의 파괴는 주로 necrosis나 apoptosis에 의한 다. necrosis는 통제되지 않은 반응으로 동시다발적이며 급격한 손상에 의해 발생한다. 이에 반해 apoptosis는 생리적으로 통제된 반응으로 불필요한 세포나 손상 받은 세포를 제거한다. 그러나 지나친 apoptosis는 조직과 기관에 치명적인 손상을 입히게 된다. 따라서, apoptosis의 조절은 간질환의 치료방법으로 주목받고 있다<sup>1)</sup>.

유리지방산이 미토콘드리아의 산화적 인산화 과정에 상호작용하여 Reactive oxygen species (ROS)의 생산을 증가시킨다는 사실이 알려져 있다. Arachidonic acid (AA)은 염증반응에 관여하는 지방산으로 철 촉매 하에서 ROS의 생성을 증가시켜 산화적 스트레스를 증가시켜 세포의 손상을 악화시킨다<sup>2,3)</sup>.

철은 헤모글로빈과 미오글로빈의 구성 성분으로 산소 운반에 결정적인 역할을 하며, 미토콘드리아 전자전달계의 cytochrome의 구성 성분으로 ATP생성 과정에 직접적인 관여를 한다. 그러나 조직 내 과도한 축적은 펜톤 반응에 의한 ROS의 과도한 생성으로 이어져 단백질 변성과 인지질막 손상, DNA 손상을 유발할 수 있다<sup>4)</sup>.

금은화는 인동과 인동덩굴(*Lonicera japonica* Thunberg)의 꽃봉오리 또는 막 피기 시작한 꽃이다. 한의학에서 금은화는 疏散風熱(소산풍열), 清熱解毒(청열해독), 涼血止痢(량혈지리)의 효능을 가지며, 항균, 소염 작용 등을 가진다<sup>5)</sup>. 대표적인 간질환인 간세포암은 한의학에서 氣滯虛寒(기체허한), 氣滯濕阻(기체습조), 熱鬱血瘀(열울혈어), 濕鬱血瘀(습울혈어)으로 분류하여 치료하는데,

금은화는 清熱解毒(청열해독)을 목적으로 이용된다<sup>6)</sup>.

최근 금은화의 연구는 항산화 효과와 세포 보호 효과에 대해서 이루어지고 있으나<sup>7,8)</sup>, 그 기전은 정확히 알려지지 않았으며, 특히 간세포를 대상으로 하는 연구는 부족하다. 따라서, 본 연구에서는 사람 간암 세포주 HepG2를 이용하여 금은화 추출물이 AA와 iron에 의해 유도된 산화적 스트레스 환경에서 미토콘드리아를 보호할 수 있는지, apoptosis를 억제할 수 있는지와 그 기전에 대해 밝히고자 하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

금은화 물추출물 (*Lonicera japonica* water extract, LJE)는 금은화 100 g을 물 1.5 L에 넣어 3시간 동안 가열한 후 거즈로 여과시킨 후 0.2  $\mu$ m filter로 여과시켰다. 여과액을 rotary evaporator로 감압농축시키고, ultra-Low temperature freezer에 12시간 동안 동결시켰다. 이후 동결건조기를 이용하여 LJE를 26 g을 얻었으며,  $-20^{\circ}\text{C}$ 에 보관하였다. 수율은 26%였으며, 세포배양매지(DMEM)에 녹여 사용하였다.

### 2. 시약

Arachidonic acid (AA), ferric nitrilotriacetic acid (Fe-NTA, iron), isoliquiritigenin (IsoLQ), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)와 rhodamine 123 (Rh123), Calcein과 Propidium iodide (PI)는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서, Dimethyl sulfoxide (DMSO)는 Junsei Chemical (Tokyo, Japan)에서 구입하였다.

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), Penicillin Streptomycin, Fetal bovine serum (FBS)은 Welgene Inc.(Gyeongsan, Korea)에서 구입하였다. procaspase 3, p-LKB1에 대한 항체와 HRP-conjugated anti-rabbit IgG, HRP-conjugated anti-mouse IgG

\*Corresponding author: Sun-Dong Park, School of Korean Medicine, Dongguk University, 123 Dongdae-ro, Gyeongju-si, Gyeongsangbuk-do, 38066, Republic of Korea

Tel : +82-31-961-5825, Fax : +82-31-961-5835, E-mail : sundong@dongguk.ac.kr

\*Corresponding author: Kwang-Il Park, Department of Veterinary Physiology, College of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, 501 Jinju-daero, Jinju-si, Gyeongsangnam-do, 52828, Republic of Korea

Tel : +82-55-772-2342, Fax : +82-55-772-2349, 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

Tel : +82-31-961-5823, Fax : +82-31-961-5835, E-mail : ywk@dongguk.ac.kr

•Received : August 10, 2022 / Revised : August 16, 2022 / Accepted : August 26, 2022



antibodies는 Cell Signalling Technology (Beverly, MA, USA),  $\beta$ -actin에 대한 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA)에서 구입하였다.

### 3. 세포 배양

HepG2 cell (인체 유래 간 세포주)과 HeLa cell은 American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA)에서 구입해, 두 종류 세포 모두 DMEM에 10% FBS, 100 unit/ml penicillin, 100  $\mu$ g/ml streptomycin을 혼합한 배지로 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 환경의 incubator에서 배양하였다. 각 실험 전에는 12시간 동안 FBS를 포함하지 않은 DMEM으로 starvation을 시켰다.

### 4. MTT 분석법 (MTT assay)

HepG2 cell을 48 well plate에  $6 \times 10^4$  cells/well로 배양하여 진행하였다. Fig. 1B에서는 LJE를 10, 30, 100, 300  $\mu$ g/ml의 농도로, positive control에는 IsoLQ를 20  $\mu$ g/ml의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. Fig. 2A에서는 LJE를 10, 30, 100  $\mu$ g/ml의 농도로 AA 10  $\mu$ M을 함께 처리하고 12시간 동안 배양한 후 iron 5  $\mu$ M을 3시간 동안 처리하였다. Fig. 5B에서는 LJE 100  $\mu$ g/ml와 AA 10  $\mu$ M과 함께 처리하고 iron 5  $\mu$ M을 처리하였다. 이때, HeLa cell은 HepG2와 같은 방식으로 배양하여 진행하였다. 세포 생존율은 570 nm의 흡광도로 측정하여 control cell에 대한 백분율로 나타냈다.

### 5. 면역염색법 (Immunoblot analysis)

HepG2 cell을 6 well plate에  $1 \times 10^6$  cells/well로 배양하여 진행하였다. Fig. 2B에서는 LJE 100  $\mu$ g/ml와 AA 10  $\mu$ M을 12시간 동안 처리한 후 iron 5  $\mu$ M을 3시간 동안 처리하였다. Fig. 5A에서는 LJE를 10, 30, 100, 300  $\mu$ g/ml의 농도로 처리하고 1시간 동안 배양하고 진행하였다.

### 6. 형광현미경법 (Fluorescence microscopy)

HepG2 cell을 6 well plate에  $1 \times 10^6$  cells/well로 배양하여 진행하였다. LJE 100  $\mu$ g/ml와 AA 10  $\mu$ M을 함께 처리하고 12시간 동안 배양한 후 iron 5  $\mu$ M을 3시간 동안 처리하였다. 이후 Calcein과 PI를 0.5  $\mu$ M

농도로 1시간 동안 처리하였다. 형광도립현미경 (Nikon Ts2-FL)을 이용하여 10배율로 관찰하였다.

### 7. ROS 생성 측정 (ROS assay)

HepG2 cell을 96 well plate에  $1 \times 10^4$  cells/well로 배양하여 DCFH-DA assay를 진행하였다. LJE 100  $\mu$ g/ml, AA 10  $\mu$ M을 동시에 처리하여 12시간 동안 배양한 후 iron 5  $\mu$ M을 3시간 동안 처리하였다. 이후 DCFH-DA 시약을 10  $\mu$ M로 30분간 처리하고 fluorescence microplate reader (Tecan Infinite® M200 PRO)를 사용해 excitation 485nm, emission 535nm로 측정하였다.

### 8. 유세포분석법 (Flow cytometric analysis)

HepG2 cell을 6 well plate에  $1 \times 10^6$  cells/well로 배양하여 진행하였다. LJE 100  $\mu$ g/ml와 AA 10  $\mu$ M을 함께 처리하고 12시간 동안 배양한 후 iron 5  $\mu$ M을 3시간 동안 처리하였다. 이후 Rhodamine 123을 0.05  $\mu$ g/ml의 농도로 빛을 차단한 상태로 1시간 동안 처리하고, Trypsin을 이용하여 세포들을 수거하였다. 수거한 세포들은 phosphate buffered saline (PBS)로 세척한 다음 Flow cytometer로 미토콘드리아 막전위를 측정하였다.

### 9. 통계처리 (Statistical analysis)

실험 결과는 평균값  $\pm$  표준편차 (mean  $\pm$  S.D.)로 표시하였으며, Student's t-test를 이용하여 통계적 유의성을 검증하였다.

## III. 결과

### 1. 간세포에 대한 LJE의 영향

본 실험에서 사용하는 LJE는 금은화를 열수 추출하여 만들었다(Fig. 1A). 금은화 추출물(LJE)가 간세포에 대해 독성을 가지는지 확인하기 위하여 MTT assay를 이용하였다. HepG2세포에 LJE를 10, 30, 100, 300  $\mu$ g/ml의 농도로, positive control그룹에는 IsoLQ를 20  $\mu$ g/ml의 농도로 처리하였다. 24시간 처리 후 MTT assay를 실행한 결과, 대조군과 비교하였을 때 세포 독성은 나타나지 않았다(Fig. 1B).

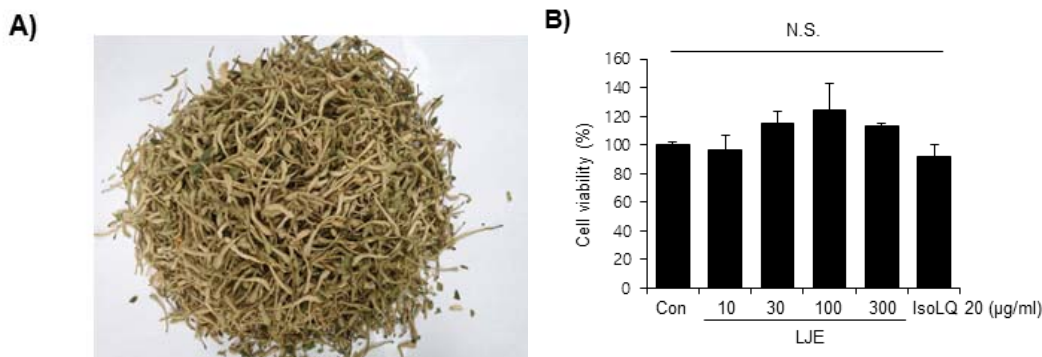


Fig. 1. The effect of *Lonicera japonica* extract(LJE) on the hepatocyte.

(A) LJE, used for following experiments, was extracted by hot water.

(B) To estimate independent effect on hepatocyte, LJE was administered to 4 groups of HepG2 cells, 10, 30, 100, 300 µg/ml each. Isoliquiritigenin (IsoLQ) was adopted as positive control (20 µg/ml). After 24 hours, MTT assay was operated. None of significant difference was observed comparing to control group.

## 2. AA+iron으로 유도한 산화적 스트레스 환경에서 LJE의 세포보호효과

다음으로는 AA+iron을 이용하여 산화적 스트레스를 유발한 환경에서 LJE의 세포보호효과를 측정하였다. 4개의 HepG2 그룹에 LJE를 각각 10, 30, 100, 300 µg/ml의 농도로 처리하고 MTT assay를 실행하였다. 대조군과 비교하였을 때 AA+iron만 처리한 실험군은 세포생존율에서 대조군 대비 약 51.0%의 생존율을 보이며 통계적으로 유의한 차이를 보였다. 따라서, AA+iron에 의한 산화적 스트레스가 간세포에 대한 독성을 유발한다는 것을 확인할 수 있었다. AA+iron 단독 처리군과 비교했을 때 LJE를 처리한 실험군들은 농도의존적으로 세포생존율을 증가시키는 경향을 보이며, 30 µg/ml 이상의 경우 모두 통계적으로 유의한 차이를 보였다. 100 µg/ml에서 대조군 대비 약 95.9%의 생존율을 보였으므로 이후 실험에서는 농도를 100 µg/ml로 사용하였다. IsoLQ는 AA+iron으로 유도된 산화적 스트레스에 대해 세포보호효과를 나타낸다고 알려져<sup>4)</sup> 본 MTT assay가 제대로 수행되었는지 확인하기 위한 positive control로 사용되었다. IsoLQ처리군과 Control 사이에 유의미한 차

이가 없고, AA+iron 단독 처리군과는 유의한 세포생존율을 보이므로, 본 MTT assay에서는 AA+iron으로 인한 산화적 스트레스가 세포생존율에 영향을 주는 요인인 것으로 볼 수 있다(Fig. 2A).

AA+iron으로 유도된 산화적 스트레스는 세포자멸사를 유도하므로 LJE 100 µg/ml를 AA 10 µg/ml와 함께 12시간 처리한 후, iron 5 µg/ml을 3시간 처리하고 immunoblot analysis를 이용하여 지표단백질의 발현을 확인하였다. 그 결과 procaspase 3의 발현이 대조군에 비해 AA+iron 단독 처리군에서 감소함을 관찰할 수 있었으며, LJE를 처리하면 그 감소가 반전됨을 확인하였다(Fig. 2B).

형광현미경을 이용하여 AA+iron으로 유도된 산화적 스트레스에 대한 LJE의 세포보호효과를 다시 한번 확인하였다. LJE 100 µg/ml를 AA 10 µg/ml와 함께 12시간 처리한 후, iron 5 µg/ml을 3시간 처리한 결과, AA+iron에서 세포막이 파괴된 상태일수록 진한 형광을 보이는 PI염색에서 다른 군에 비해 증가한 경향을 보이며, LJE를 투여한 경우 양상이 반전됨을 확인하였다(Fig. 2C).

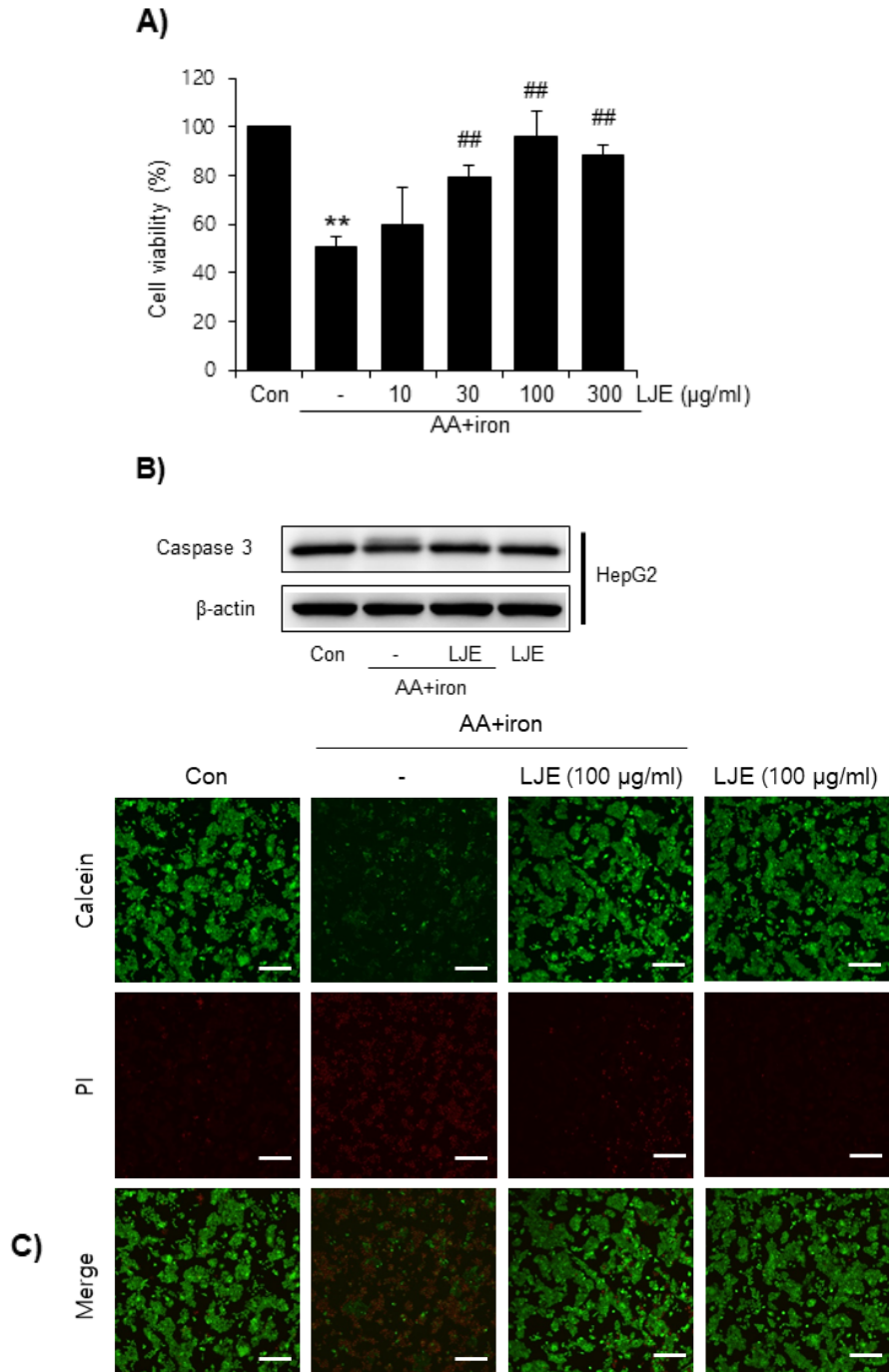


Fig. 2. The cytoprotective effect of LJE against cytotoxicity induced by AA+iron on the hepatocyte.

(A) MTT assay has been conducted to estimate cytoprotective effect of LJE. 4 groups of HepG2 cells were treated with LJE (10, 30, 100, 300  $\mu\text{g/ml}$ ) and AA (10  $\mu\text{M}$ ) for 16 hours, and then iron (5  $\mu\text{M}$ ) for 3 hours. \*\* $p < 0.01$ : Control vs. AA+iron alone, ## $p < 0.01$ : AA+iron alone vs. LJE treated group.

- (B) HepG2 cells were treated with LJE (100  $\mu\text{g/ml}$ ) and AA (10  $\mu\text{M}$ ) for 12 hours, and then iron (5  $\mu\text{M}$ ) for 3 hours. Immunoblot was conducted after iron treatment to detect apoptotic marker.  $\beta$ -actin verified proper proteins loading.
- (C) The cytoprotective effect of LJE against cytotoxicity induced by AA+iron on the hepatocyte was also estimated by fluorescence microscopy. HepG2 cells were treated with LJE (100  $\mu\text{g/ml}$ ) and AA (10  $\mu\text{M}$ ) for 12 hours, and then iron (5  $\mu\text{M}$ ) for 3 hours. After iron treatment, the cells were dyed with Calcein and PI (0.5  $\mu\text{M}$  each).

### 3. LJE의 항산화 효과와 미토콘드리아 보호 효과

AA+iron으로 유도된 산화적 스트레스에 대한 LJE의 항산화 효과를 확인하기 위해 ROS assay를 사용하였다. LJE는 10, 30, 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하였다. 그 결과, AA+iron 단독 처리한 실험군은 대조군 대비 약 2.4배로 통계적으로 유의하게 높았으며, LJE를 처리한 모든 실험군들은 AA+iron 단독 처리군에 비해 유의하게 낮았다. 따라서, LJE가 항산화작용을 가진다는 것을 알 수 있다(Fig. 3A).

AA+iron에 의한 산화적 스트레스는 미토콘드리아 막

전위를 파괴하여 막투과성을 증가시키고 이로 인해 세포자멸사가 일어난다. LJE가 미토콘드리아 막전위 파괴에 의한 세포자멸사를 막을 수 있는지 확인하기 위해 flow cytometric analysis를 실행하였다. AA+iron 단독 처리군은 미토콘드리아 막전위가 파괴된 상태인 RN1 fraction의 비율이 대조군의 13.3%에 비해 80.2%로 늘어났으나, LJE를 같이 처리하면 RN1 fraction의 비율이 13.3%를 나타내며 양상이 반전됨을 확인할 수 있었다. 따라서, LJE는 미토콘드리아 기능이상을 막는다는 것을 알 수 있다(Fig. 3B).

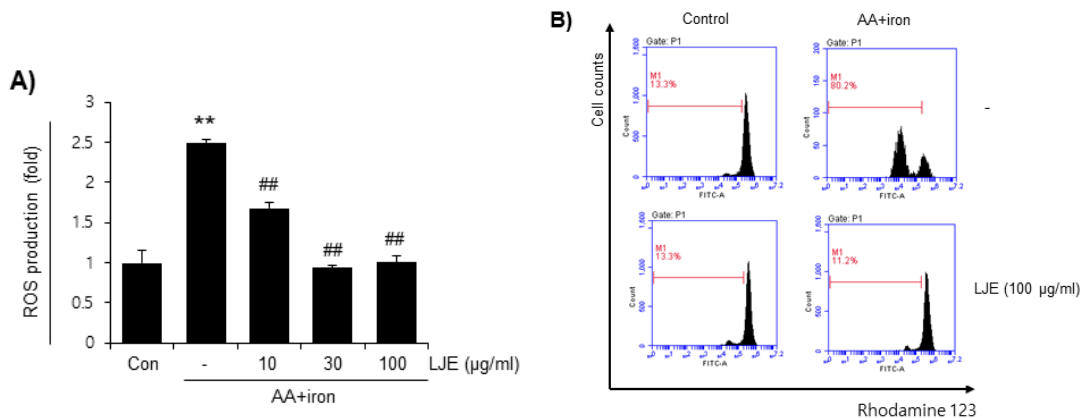


Fig. 3. The antioxidant and mitoprotective effect of LJE.

- (A) ROS assay has been conducted to estimate antioxidant effect of LJE. 3 groups of HepG2 cells were treated with LJE (10, 30, 100  $\mu\text{g/ml}$ ) and AA (10  $\mu\text{M}$ ) for 12 hours, followed by iron (5  $\mu\text{M}$ ) for 3 hours. \*\* $p < 0.01$ : Control vs. AA+iron alone, ## $p < 0.01$ : AA+iron alone vs. LJE treated group.
- (B) HepG2 cells were treated with LJE (100  $\mu\text{g/ml}$ ) and AA (10  $\mu\text{M}$ ) for 12 hours, and then iron (5  $\mu\text{M}$ ) for 3 hours. After Rhodamine 123 staining, fluorescence intensity was measured by FACS for mitochondrial membrane permeability (MMP).

#### 4. LJE의 LKB1 활성화 효과

LJE가 AA+iron로 유도된 산화적 스트레스로 인한 세포자멸사를 막는 기전을 확인하기 위해 immunoblot analysis를 진행하였다. LJE를 10, 30, 100, 300  $\mu$ g/ml의 농도로 처리하고 1시간 후 immunoblot analysis를 실행한 결과 p-LKB1의 발현을 관찰할 수 있었으며, p-LKB1의 발현정도가 LJE의 농도에 의존적으로 증가함을 확인할 수 있었다(Fig. 4).

또한, LJE의 AA+iron으로 유도된 apoptosis에 대한 억제작용이 LKB1에 의한 것임을 확인하기 위하여

HepG2와 LKB1이 결여된 HeLa cell를 비교하여 MTT assay를 진행하였다. HepG2의 결과에서는, AA+iron에 의해 세포생존율이 통계적으로 유의하게 감소하였으나, LJE를 처리한 경우 AA+iron 단독 처리군에 비해 통계적으로 유의하게 높은 생존율을 보였다. 반면 HeLa의 경우, AA+iron 단독 처리군과 LJE 처리군 모두 대조군에 비해 통계적으로 유의하게 세포생존율이 낮았다. 따라서, LJE의 AA+iron으로 유도된 세포자멸사 억제 작용은 LKB1과 관련이 있다는 것을 알 수 있었다.

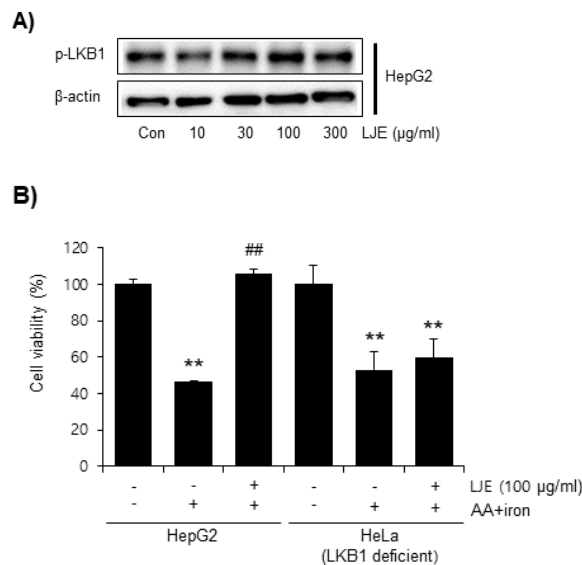


Fig. 4. LKB1 activating effect of LJE.

- (A) HepG2 cells were treated with LJE (10, 30, 100, 300  $\mu$ g/ml each) for 1 hour.  $\beta$ -actin verified proper proteins loading.
- (B) MTT assay has been conducted to compare effect of LJE on AA+iron induced cytotoxicity between HepG2 cells and LKB1-deficient HeLa cells. Both cells were treated LJE (100  $\mu$ g/ml) and AA (10  $\mu$ M), followed by iron treatment (5  $\mu$ M). \*\* $p$ <0.01: Control vs. AA+iron alone, ## $p$ <0.01: AA+iron alone vs. LJE treated group.

#### IV. 고찰

본 연구에서 MTT assay를 통해 AA+iron으로 유도된 산화적 스트레스 환경에서 HepG2의 항산화 효과를 확인하였다. LJE를 처리한 경우가 농도 의존적으로 세포 생존율이 높았으며 통계적 유의성이 나타났다. 또한, LJE를 농도별로 단독으로 처리한 후 MTT assay를 진행하여 대조군과 비교했을 때 통계적 유의성을 보이지

않았으므로 실험에 사용한 농도에서는 LJE가 세포독성을 나타내지 않았다고 볼 수 있다.

세포 내 ROS에 의해 미토콘드리아의 막전위가 파괴되면 미토콘드리아의 막투과성이 증가되면서 cytochrome C가 세포질로 분비되는데, 이때 caspase 3는 caspase 8과 caspase 9에 의해 불활성화 상태인 procaspase 형태에서 분해되며 활성화되어 apoptosis를 유도한다<sup>9)</sup>. AA+iron으로 산화적 스트레스를 유도한 환경에서 apoptosis

관련 인자인 caspase 3의 발현을 immunoblot analysis로 확인한 결과 대조군에 비해 감소하였으며, LJE를 처리하면 양상이 반전됨을 확인하였다.

Calcein과 PI를 이용한 fluorescence microscopy를 통해 AA과 iron로 유도된 산화적 스트레스 상황에서 대조군에 비해 초기 apoptosis 상태를 의미하는 PI의 면적이 더 넓은 것을 확인 할 수 있으며, LJE를 처리했을 때 그 양상이 반전됨을 확인하였다.

간세포에서는 펜톤 반응을 통해 철이 ROS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub><sup>-</sup>로부터 OH<sup>-</sup>를 생성하는 과정을 촉매하는데, 이때 생성된 OH<sup>-</sup>로 인해 세포내 구조물의 손상이 누적되면 apoptosis가 유도된다<sup>10)</sup>. 본 연구에서는 DCFH-DA 염색으로 ROS의 생산 범위를 측정한 결과, AA와 iron을 처리한 경우에서 ROS의 생산이 증가함을 확인하였고, LJE를 처리한 경우 ROS 생성이 억제됨을 확인하였다.

미토콘드리아에 누적된 손상에 의해 미토콘드리아의 막전위가 파괴되면 막투과성이 비정상적으로 증가하며 apoptosis가 유발되므로<sup>11)</sup> LJE의 효과를 확인하기 위해 flow cytometric analysis를 통해 확인하였다. 그 결과 AA와 iron으로 유도된 산화적 스트레스가 미토콘드리아 막전위를 파괴하며, LJE의 처리가 이를 억제함을 알 수 있었다.

AMPK는 세포 내 에너지 항상성 유지, apoptosis 억제와 DNA 손상에 대한 반응에 중요한 역할을 한다. 활성화된 AMPK는 미토콘드리아에서 cytochrome C의 분비를 막아 caspase 3의 활성화를 막는다. LKB1은 AMPK를 활성화시키는 효소로 apoptosis를 억제하는 역할을 한다<sup>12,13)</sup>. 금은화의 성분이 AMPK 활성화를 통해 세포보호효과를 나타낸다는 사실이 알려져 있다<sup>14)</sup>. 따라서 본 연구에서는 금은화의 AMPK 활성화 작용이 LKB1과 연관이 있는지 확인했다. 본 연구에서는 LJE가 AA+iron에 의한 산화적 스트레스에 대한 세포 보호 작용의 기전을 확인하기 위하여 농도별로 immunoblot analysis를 수행하였다. 그 결과 AMPK의 상위인자인 LKB1의 농도의존적 발현 증가를 확인할 수 있었다.

본 연구에서는 LJE가 AA+iron으로 유도된 산화적 스트레스에 대해 LKB1의 활성화와 미토콘드리아 막 보호를 통해 apoptosis를 억제하여 세포를 보호한다는 것을 확인할 수 있었다. LJE의 더 자세한 작용기전을 위해서는 후속 연구가 필요하다고 보여진다.

## V. 결론

본 연구는 금은화 추출물(LJE)의 간세포 보호 효과를 확인하기 위하여 HepG2 세포에 AA+iron을 처리하여 유도한 산화적 스트레스 환경에서의 세포 생존율과 apoptosis 지표 단백질의 발현, 미토콘드리아의 막전위, phospho-Liver kinase B1의 발현에 LJE가 미치는 영향을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. LJE는 10, 30, 100, 300  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도에서는 HepG2에 세포독성을 보이지 않았다.
2. AA+iron으로 산화적 스트레스를 유도한 환경에서 LJE를 10, 30, 100, 300  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하였을 때 농도의존적으로 세포생존율을 증가시키는 경향이 있으며, 30  $\mu\text{g/ml}$  이상에서 모두 통계적으로 유의한 결과를 보였다.
3. AA+iron으로 산화적 스트레스를 유도한 환경에서 apoptosis 지표 단백질인 procaspase 3의 발현이 감소하였고, LJE 100  $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 경우 감소양상이 반전되었다.
4. AA+iron으로 산화적 스트레스를 유도한 환경에서 LJE를 10, 30, 100  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하고 ROS assay로 항산화효과를 측정한 결과, 모든 농도에서 통계적으로 유의한 결과를 보였다.
5. AA+iron으로 산화적 스트레스를 유도한 환경에서 미토콘드리아 막전위가 유지되는지 확인한 결과, LJE 100  $\mu\text{g/ml}$ 을 처리한 경우 통계적으로 유의한 미토콘드리아 막전위 유지 효과를 보였다.
6. LJE가 산화적 스트레스로 인한 세포자멸사를 막는 기전을 확인하기 위해 10, 30, 100, 300  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하고 immunoblot analysis를 실행한 결과, p-LKB1의 발현이 농도의존적으로 증가함을 확인할 수 있었다. 또한, HepG2와 LKB1이 결여된 HeLa cell을 비교하여 MTT assay를 진행한 결과, 세포자멸사 억제 작용이 LKB1에 의한 것임을 확인하였다.





종합하면, LJE는 LKB1 활성화를 통해 AA+iron으로 유도된 산화적 스트레스와 미토콘드리아 막전위 손상에 대해 간세포를 보호하는 효과를 가진다는 것을 확인하였다. 다만, 정확한 기전의 파악을 위해 후속적인 연구가 필요할 것으로 보인다.

### Acknowledgments

This work was supported by National Research Foundation (NRF) grant funded by Korea government (No. 2022R111A3053818), and 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).

### References

- Guicciardi ME, Malhi H, Mott JL, Gores GJ. Apoptosis and necrosis in the liver. *Compr Physiol*. 2013;3(2):977-1010.
- Cocco T, Di Paola M, Papa S, Lorusso M. Arachidonic acid interaction with the mitochondrial electron transport chain promotes reactive oxygen species generation. *Free Radic Biol Med*. 1999;27(1-2):51-9.
- Balboa MA, Balsinde J. Oxidative stress and arachidonic acid mobilization. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1761(4):385-91.
- Choi SH, Kim YW, Kim SG. AMPK-mediated GSK3beta inhibition by isoliquiritigenin contributes to protecting mitochondria against iron-catalyzed oxidative stress. *Biochem Pharmacol*. 2010;79(9):1352-62.
- Seo BI, Kwon DY, Choi HY, Lee JH, Oh MS, Bu YM. *Medicinal Herbology*. 2<sup>nd</sup> ed. Seoul:Younglim-Sa. 2020:246-8
- National union for Liver systemic internal medicine of Colledge of Korean medicine. *Liver systemic internal medicine*. 6<sup>th</sup> ed. Seoul:Nado. 2016:355-371
- Lee HW, Ma CJ. Neuroprotective Activity of Lonicerin Isolated from *Lonicera japonica*. *Korean Journal of Pharmacognosy*. 2021;52(1):19-25.
- Kim Y, Yang SY, Oh YS, Lee JW, Lee YK, Park YC. Research trends of *Lonicera japonica* over the last 10 years. *Daejeon university institute of Korean medicine*. 2010;19(1):17-23.
- Tummers B, Green DR. Caspase-8: regulating life and death. *Immunol Rev*. 2017;277(1):76-89.
- Galaris D, Barbouti A, Pantopoulos K. Iron homeostasis and oxidative stress: An intimate relationship. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*. 2019;1866(12):118535.
- Scorrano L, Penzo D, Petronilli V, Pagano F, Bernardi P. Arachidonic acid causes cell death through the mitochondrial permeability transition. Implications for tumor necrosis factor- $\alpha$  apoptotic signaling. *J Biol Chem*. 2001;276(15):12035-40.
- Woods A, Johnstone SR, Dickerson K, Leiper FC, Fryer LG, Neumann D, Schlattner U, Wallimann T, Carlson M, Carling D. LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol*. 2003;13(22):2004-8.
- Alexander A, Walker CL. The role of LKB1 and AMPK in cellular responses to stress and damage. *FEBS Lett*. 2011;585(7):952-7.
- Park SY, Jin ML, Yi EH, Kim Y, Park G. Neochlorogenic acid inhibits against LPS-activated inflammatory responses through up-regulation of Nrf2/HO-1 and involving AMPK pathway. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2018;62:1-10