산수유의 유리자유기에 의한 간손상 보호효과 및 기전에 대한 연구

하기태 · 김영미 · 김철호[1] · 최달영 · 김준기*

동국대학교 한의과대학 병리학교실, 1 : 성균관대학교 자연과학부 생명과학과

Study on the Protective Effect of Corni Fructus Against Free Radical Mediated Liver Damage

Ki Tae Ha, Young Mi Kim, Cheorl Ho Kim[1], Dall Yeong Choi, June Ki Kim*

Department of Pathology, College of Oriental Medicine, Dongguk University,
1 : Molecular and Cellular Glycobiology Unit, Department of Biological Sciences, Sungkyunkwan University

We evaluated the potential protective activity of the traditional Korean medicinal herb, Corni fructus (CF), in an experimental model of hepatotoxicity induced by carbontetrachloride (CCl_4). The CF exhibited a hepatoprotective activity against Chang cell. And The expression of cytochrome P450 2E1 (CYP2E1), measured by RT-PCR and western blot, was significantly decreased in the CF treated Chang cell. But CCl_4 and CF has no significant effect on 1A1 and 3A1 isoform of cytochrome P450. Based on these findings, it is suggested that hepatoprotective effects of CF possibly related to antioxidative effects and downregulation of CYP2E1 expression.

Key words : Corni Fructus, cytochrome P450 2E1, carbon tetrachloride, hepatoprotection, antioxidative effect

서 론

사염화탄소(CCl_4)는 실험적인 간독성 유발에 전형적으로 사용되고 있는 약물로서 혈청내 transaminase의 증가 등 각종 효소활성에 변화를 초래하며[1], 급성적으로는 간세포의 종창, 지방성 혹은 소엽중심성 괴사 등이 일어나고 만성적으로는 간경변을 초래한다[2]. 사염화탄소는 그 자체로는 무해하지만, 간세포의 무과립 내형질세망에 들어있고 지용성 약제나 기타 화합물의 대사에 관여하는 cytochrome P450에 의해 반응성이 높은 독성 free radical인 CCl_3^-로 전환되어[3] 세포막의 인지질 과산화 및 내형질세망의 구조와 기능 파괴, 미토콘드리아 및 세포내 효소활성의 파괴 등 다양한 세포 상해를 일으켜 세포의 괴사나 지방변성을 초래한다[4,5].

산수유(Corni Fructus)는 층층나무과의 낙엽성 관목인 산수유(Cornus officinalis Sieb. et Zucc.)의 성숙한 과실의 씨앗을 제거한 과육을 건조한 것으로[6], 補肝腎하는 대표적인 약재로 사용되어 왔다. 肝腎으로 귀경하며 氣味는 酸澁, 微溫하며 補益肝腎, 澁精固脫하는 효능이 있어서, 眩暈耳鳴, 腰膝酸痛, 陽痿遺精, 遺尿, 小便頻數, 崩漏帶下, 大汗虛脫 등의 질환을 치료하는 처방에 다용되었으며[7], 溫肝, 補肝의 대표적인 약물로 분류되고 있다[8]. 또한 최근 연구에 의하면 항당뇨[9], 항균 및 항산화성[10,11], 정자활동성 증가[12] 등에 대한 보고가 있다.

이와같이 산수유는 補肝腎하는 효능이 있을 것으로 생각되어 본 연구에서는 인간 정상 간세포주인 Chang cell을 이용하여 GOT, GPT 및 cytochrome P450의 발현을 검사하였다. 이와같이 산수유 열수추출물의 CCl_4로 유도된 간손상에 대한 보호작용을 in vitro에서 실험한 결과 유의한 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 시료

실험에 사용된 산수유는 경북 경주지방에서 재배한 것으로, 성심한약재(경북 경주)에서 구입하여 동국대학교 본초학교실에서 검증한 후 정선하여 사용하였다. 산수유 300 g에 증류수 1.5 ℓ를 넣고 100℃에서 3시간 동안 가열한 후 여과하여 약 650 ml

* 교신저자 : 김준기, 경주시 석장동 707, 동국대학교 한의과대학 병리학교실
· E-mail : graywolf@dongguk.ac.kr, · Tel : 054-770-2650
· 접수 : 2007/11/27 · 채택 : 2008/01/16

의 전탕액을 얻었으며, 이 전탕액을 감압농축한 후 동결건조하여 분말화하여 세포실험에 사용하였다.

2. 세포배양 및 약물처리

In vitro 실험에 사용된 세포주는 normal liver hepatocyte cell line인 Chang cell (ATCC CCL-13)을 사용하였다. Chang cell은 DMEM 배지에 10% FBS, penicillin (100 units/ml), streptomycin (100 ㎍/ml)과 sodium bicarbonate (3.7 g/L)을 첨가하여 collagen coat된 plate에서 37℃, 5% CO_2 상태에서 배양하였으며, 70～80% confluence가 되었을 때 실험에 사용하였다.

배양된 세포에 serum free DMEM으로 교체한 후, control군과 CCl_4 (100 mM) 처리군, CCl_4 (100 mM)와 산수유 100 ㎍/ml 처리군으로 하여 농도별로 처리하여 6시간 동안 배양한다. 6시간이 지난 후 배지는 따로 분리하여 1000 rpm으로 5분간 원심분리하여 cell debris를 제거한 후 -70℃에 보관하였다가 이후의 실험에 사용하였다. 배지를 제거한 plate에 1×PBS를 5 ml 첨가시켜 2회 washing한 후 -70℃에 보관하였다가 이후의 실험에 사용하였다.

3. 세포 생존율 검사 (XTT Assay)

CCl_4와 약재가 세포에 미치는 독성효과를 분석하기 위하여 96well plate에 Chang cell을 5×10^3개 되게 분주하여 37℃, 5% CO_2 조건으로 incubater에서 24시간 배양하였다. 배양액을 교체한 다음 CCl_4와 산수유추출물을 여러가지 농도로 처리하고 6 hr 배양한 후 0.3 mg/ml XTT를 50 ㎕/well로 처리하여 24시간 동안 배양한 후 ELISA reader로 450-500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. GOT 및 GPT의 활성측정

GOT 및 GPT 활성측정은 Reitman-Frankel의 방법[13]에 따라 조제된 시약 Kit(아산제약)를 사용하여 측정하였다. GOT, GPT 기질액 1.0 ml을 시험관에 가하여 37℃에서 5분간 방치한 다음 혈청 0.2 ml을 넣어 잘 혼합한 후 37℃에서 GOT는 60분, GPT는 30분간 반응시킨 뒤 정색시액 1.0 ml을 첨가하여 잘 혼합하여 실온에서 20분간 방치하여 반응을 종료시키고, 0.4 N NaOH 용액 10 ml을 가하여 잘 혼합한 다음 실온에서 약 10분간 방치하였다가 60분 이내에 505 nm에서 증류수를 대조로 흡광도 변화를 측정하였다. 혈청중 GOT, GPT의 활성도는 작성한 표준 검량곡선에서 산출하였으며 혈청 1 ml 당 IU/ℓ로 나타내었다.

5. Cytochrome P450 isoform의 mRNA 발현 측정

1) Total RNA의 분리 및 정량

Total RNA의 분리는 takara사의 catrimox-14™ RNA isolation kit ver 2.11을 사용하였다. Rat liver total RNA의 경우에는 -70℃에 보관중이던 간조직 1 g을 homogenizer을 이용하여 잘 분쇄한 다음 cartrimix-14 buffer 1 ml로 lysis시켜 실온에서 10,000 rpm으로 5분간 원심분리를 한다. 원심분리 후 상등액을 제거하고 pellet에 DEPC 1 ml을 첨가하여 12,000 rpm으로 2분간 다시 원심분리를 한다. 상등액을 제거시킨 pellet에 guanidinium 0.5 ml 첨가하여 vortex한 후 phenol/chloroform/iso-amylalchol (25:24:1)을 0.5 ml 첨가시켜 vortex하여 12,000 rpm으로 3분간 원심분리한 후 상등액을 취해 iso-propylalcol을 equeal volume 넣어 잘 혼합한 후 -20℃에 30분간 방치시킨다. 다시 12,000 rpm으로 10분간 원심분리를 하여 상등액을 제거시킨 pellet을 70% 에탄올로 washing시키고 나서 진공하에 건조시켜 0.1% DEPC 용액 1 ml에 녹여 사용하였다. Chang cell의 total RNA는 -70℃에 보관한 배지를 제거한 cell culture plate에 catrimox-14 buffer 1 ml을 첨가하여 lysis시켜서 RNA를 분리하였으며 이하의 과정은 rat liver 조직에서의 RNA 분리와 동일하다.

2) cDNA 합성 및 RT-PCR

cDNA 합성은 RNA PCR kit (AMV)를 사용하였다. 본 실험에서는 Total RNA 1 ㎍/㎕를 주형으로 사용하였으며, $MgCl_2$ (2.5 mM), 10xRNA PCR buffer, RNase free distilled H_2O, dNTP (10 mM), AMV reverse transcriptioase XL, Oligo dT (2.5 pmol/㎕)가 되게 넣고 total volume을 20 ㎕가 되게 해서 혼합한 후 RT 반응을 수행하였다. 즉 30℃에서 10분간 반응시키고 42℃에서 30분간 annaling시켜 신장할 수 있도록 만들어 주고 99℃에서 5분, 5℃에서 5분간 1 cycle을 실시한다. 합성된 cDNA는 sense 및 antisense primer(20 pmol) 각각 1 ㎕ 첨가하고 10x PCR buffer 5 ㎕, 2.5 mM dNTP 1 ㎕, LA taq polymerase 1 ㎕를 첨가한 다음 sterile distilled H_2O로 total volume 50 ㎕가 되도록 PCR tube에서 혼합한 후, 95℃에서 5분간 95℃에서 1분 간 denaturation 후 68℃에서 1분간 annaling시키고, 72℃에서 1분 30초 동안 35 cycle 반응시킨 다음 72℃에서 5분 동안 elongation 한다. 각각의 PCR product는 10 ㎕ 씩 1.2% ETBR stained agarose gel 상에서 loading하여 전기영동을 시행하여 분석하였다. Cytochrome P450 isoform 각각의 PCR을 위하여 사용된 sense, antisense primer는 아래의 표와 같다(Table 1).

Table 1. The primer sequences which were used in PCR reaction of three cytochrome P450 isoforms and β-Actin.

Gene	sense primer	antisense primer	product size
hsCYP1A1	TGGATGAGAACGCCAATGTC	TGGGTTGACCCATAGCTTCT	392 bp
hsCYP2E1	ACCACCAGCACAACTCTGAGATATGG	CAACTCCATGCGAGCCAGGCCTTCTCC	435 bp
hsβ-Actin	CAAGAGATGGCCACGGCTGCT	TCCTTCTGCATCCTGTCGGCA	275 bp

6. Cytochrome P450 2E1의 단백질발현 측정

배지를 제거하고 -70℃에 보관한 cell culture plate에 protein extraction buffer를 300 ㎕ 첨가시켜 cell을 모아 glass homogenizer를 사용하여 균질화한 후, 4℃ 12000 rpm에서 10 min간 원심분리를 하여 supernatent만 모아서 -70℃에 보관하였다가 실험에 사용하였다. 단백질의 정량은 앞에서 언급한 바와 같이 Bradeford의 방법에 따라 시행하였다. 냉동보관한 단백질을 얼음위에서 녹여 20 ㎍이 되도록 계산하여 loading한 후 10% SDS-PAGE로 전기영동하여 분리시켰다. 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane으로 electroblotting에 의해 transfer시킨 후, 5% skim milk를 함유한 TBS-T (0.1% Tween20 in TBS)를

이용하여 상온에서 1시간 incubation하여 비특이적인 단백질에 대한 blocking을 실시하였다. TBS-T로 10분간 2회 washing 후 anti-CYP2E1 antibody (0.5% BSA added TBS-T로 1:1000으로 희석하여 사용)를 primary antibody로 하여 4℃에서 overnight inbubation하여 항원항체 반응을 일으킨 후, TBS-T로 10분간 2회 washing하고 2차 항체로 HRP-conjugated anti-rabbit IgG (0.5% BSA added TBS-T로 1:2000으로 희석하여 사용)로 상온에서 1시간 incubation한 다음 ECL solution을 사용하여 암실에서 X-ray film에 약 3시간 감광시킨 후 develop하여 단백질의 발현양상을 분석하였다. 또한 CYP2E1의 단백질 발현을 분석한 것과 동일한 방법으로 GAPDH에 대한 western blot을 시행하여 단백질의 발현을 정량하였다.

7. 실험 성적의 통계처리

실험 결과에 대한 통계적인 분석은 SAS (The SAS System for Windows, version 6.12, SAS Institute, U.S.A.)을 이용하였다. 실험 성적은 평균±표준편차(mean±SD)로 나타내었으며, 각 실험군간의 유의성을 검증할 때에는 Student's t-test로 p-값이 0.05 미만일 때 유의한 차이가 있는 것으로 판정하였다.

결 과

1. CCl_4가 Chang cell의 세포생존에 미치는 영향

CCl_4가 Chang cell의 세포생존에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 96 well plate에 Chang cell을 5×10^3의 농도로 분주하여 24시간 배양한 후 XTT 방법에 의하여 측정한 결과 Fig. 1과 같은 결과를 얻었다. 처리한 CCl_4의 농도에 비례하여 Chang cell의 생존율이 감소하였는데, 특히 CCl_4 100 mM의 농도에서 대략 50% 정도의 생존율을 나타내었다. 따라서 CCl_4에 의한 Chang cell의 세포손상을 유발함에 있어서 100 mM의 농도를 기준으로 사용하였다.

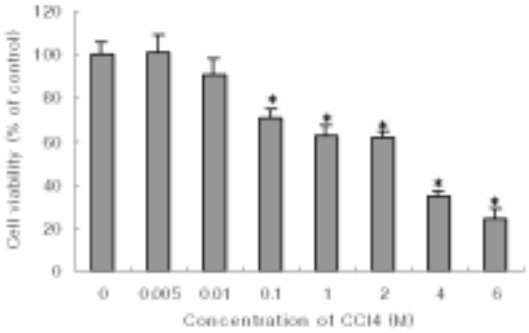

Fig. 1. Dose dependent cell viability of CCl_4 treated Chang cell. Cultured cells were exposed various concentration of CCl_4 for 24 hrs, respectively. Cell viability was measured by XTT assay and determined as % of control. (* : P<0.05)

2. 산수유가 Chang cell의 세포생존에 미치는 영향

산수유추출물이 Chang cell의 세포생존에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 96 well plate에 Chang cell을 5×10^3의 농도로 분주하여 24시간 배양한 후 XTT 방법에 의하여 측정한 결과 Fig. 2와 같은 결과를 얻었다. 처리한 산수유추출물의 농도에 비례하여 Chang cell의 생존율이 감소하는 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 없었으며, 특히 CCl_4 100 ㎍/ml의 농도에서도 60% 이상의 생존율을 나타내었다. 따라서 산수유추출물 자체에 의한 Chang cell의 세포독성은 매우 약함을 알 수 있으며, 이후의 실험에서는 100 ㎍/ml의 농도를 기준으로 사용하였다.

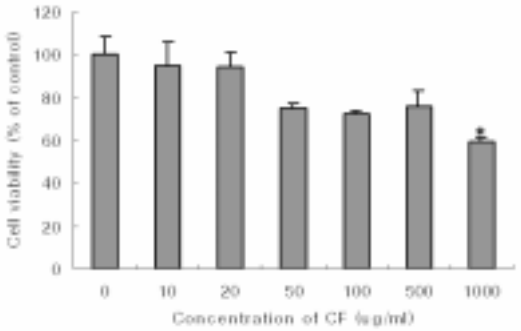

Fig. 2. Dose dependent cell viability of CF treated Chang cell. Cultured cells were exposed various concentration of the extract for 24 hrs, respectively. Cell viability was measured by XTT assay and determined as % of control. (* : P<0.05)

3. Chang cell의 GOT 및 GPT에 미치는 산수유의 영향

Collagen coated dish에서 10% FBS DMEM, 37℃, 5% CO_2 상태에서 70~80% confluence가 되도록 배양한 Chang cell에 serum free DMEM으로 교체한 후, CCl_4 및 산수유추출물을 각각 100 mM 및 100 ㎍/ml 씩 처리하여 6시간 이후에 배지를 분리하여 GOT 및 GPT를 측정하였다(Table 2). 정상대조군은 4.46±1.5 IU/ℓ인데 비하여 CCl_4만 처리한 대조군은 25.04±5.1 IU/ℓ로 현저히 증가하였다. CCl_4와 산수유추출물을 동시에 투여한 군에서는 7.49±3.2 IU/ℓ로 유의성있는 감소를 나타내었다. 또한 GPT는 정상대조군은 7.78±4.5 IU/ℓ인데 비하여 CCl_4만 처리한 대조군은 39.4±5.4 IU/ℓ로 현저히 증가하였다. CCl_4와 산수유추출물을 동시에 투여한 군에서는 8.29±3.4 IU/ℓ로 유의성있는 감소를 나타내었다.

Table 2. The effect of CF on GOT and GPT levels of Chang cell with hepatic damage induced by CCl_4.

	Control	CCl_4	CCl_4 + CF
GOT[1)]	4.46±1.5	25.04±5.1	7.49±3.2*
GPT[2)]	7.78±4.5	39.4±5.4	8.29±3.4*

Each value represents the mean±S.D. of 6 rats Unit : [1), 2)] IU/ℓ * Significantly different from the group(* : P < 0.05).

4. Chang cell의 CYP1A1 mRNA 발현에 미치는 산수유의 영향

Collagen coated dish에서 10% FBS DMEM, 37℃, 5% CO_2 상태에서 70~80% confluence가 되도록 배양한 Chang cell에 serum free DMEM으로 교체한 후, CCl_4 및 산수유추출물을 각각 100 mM 및 100 ㎍/ml씩 처리하여 6시간 이후에 배지를 제거하고 PBS로 washing 한 후 mRNA를 추출하였다. 그 다음 Table 1에서 언급한 human CYP1A1 gene의 sense와 antisense primer를 이용하여 RT-PCR을 시행하여 그 산물을 0.5% agarose gel에

서 전기영동하여 Fig. 3의 결과를 얻었다. CCl_4를 처리하지 않은 정상대조군 (Lane 1)보다 CCl_4만 처리한 대조군 (Lane 2) 및 산수유추출물을 함께 처리한 군 (Lane 3)에서 CYP1A1의 발현이 증가하지만 유의성은 없었다.

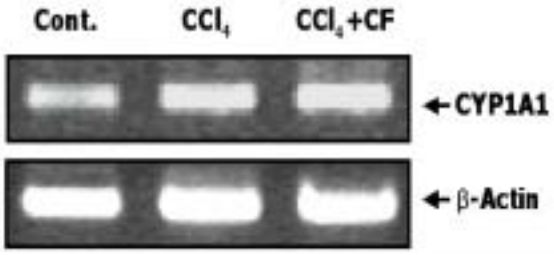

Fig. 3. The CYP1A1 mRNA expression levels of CCl_4 and CF treated Chang cell. Human CYP1A1 (392bp) RT-PCR product was loaded in 0.5% ETBR-stained agarose gel. The templates of the reaction were total mRNAs from the Chang cell which was no treated with CCl_4 as normal control (lane 1), treated with CCl_4 (100 mM) as positive control (lane 2), treated with CCl_4 (100 mM) and hot water extracts of CF (100 ㎍/ml).

5. Chang cell의 CYP2E1의 mRNA 발현에 미치는 산수유의 영향

Collagen coated dish에서 10% FBS DMEM, 37℃, 5% CO_2 상태에서 70~80% confluence가 되도록 배양한 Chang cell에 serum free DMEM으로 교체한 후, CCl_4 및 산수유추출물을 각각 100 mM 및 100 ㎍/ml 씩 처리하여 6시간 이후에 배지를 제거하고 PBS로 washing 한 후 mRNA를 추출하였다. 그 다음 Table 1에서 언급한 human CYP1A1 gene의 sense와 antisense primer를 이용하여 RT-PCR을 시행하여 그 산물을 0.5% agarose gel에서 전기영동하여 Fig. 4의 결과를 얻었다. CCl_4를 처리하지 않은 정상대조군에서는 CYP2E1의 mRNA가 거의 발현하지 않고 있으나 (Lane 1), CCl_4만 처리한 대조군에서는 CYP2E1이 매우 높은 농도로 발현하고 있음을 알 수 있다. (Lane 2) 또한 CCl_4와 함께 산수유추출물을 처리한 군에서는 CYP2E1의 발현이 현저히 낮아진 것을 확인할 수 있다. (Lane 3) 이것으로 보아 rat liver에서와 마찬가지로 human normal hepatocyte인 Chang cell에서도 CYP2E1은 CCl_4에 의하여 발현량이 매우 증가하며, 산수유추출물에 의해서 발현이 억제되는 것을 알 수 있다.

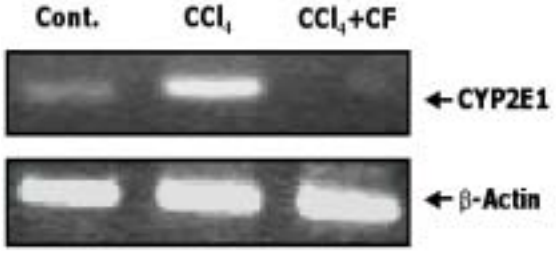

Fig. 4. The CYP2E1 mRNA expression levels of CCl_4 and CF treated Chang cell. Human CYP2E1 (435bp) RT-PCR product was loaded in 0.5% ETBR-stained agarose gel. The templates of the reaction were total mRNAs from the Chang cell which was no treated with CCl_4 as normal control (lane 1), treated with CCl_4 (100 mM) as positive control (lane 2), treated with CCl_4 (100 mM) and hot water extracts of CF (100 ㎍/ml).

6. Chang cell의 CYP2E1의 단백질 발현에 미치는 산수유의 영향

Collagen coated dish에서 10% FBS DMEM, 37℃, 5% CO_2 상태에서 70~80% confluence가 되도록 배양한 Chang cell에 serum free DMEM으로 교체한 후, CCl_4 및 산수유추출물을 각각 100 mM 및 100 ㎍/ml 씩 처리하여 6시간 이후에 배지를 제거하고 PBS로 washing 한 후 단백질을 추출하였다. 단백질을 전기영동하여 nitro-cellulose membrane에 이동시킨 다음, human CYP2E1에 특이적인 1차 항체와 anti-rabbit IgG를 이용하여 western blot을 시행하여 ECL 방법으로 신호를 검출하여 Fig. 5의 결과를 얻었다. CCl_4를 처리하지 않은 정상대조군에서 비하여 CCl_4만 처리한 대조군에서 CYP2E1 단백질이 낮은 농도로 발현이 증가하고 있음을 알 수 있으며 (Lane 1, 2), CCl_4와 함께 산수유추출물을 처리한 군에서는 CYP2E1의 발현이 현저히 낮아진 것을 확인할 수 있다(Lane 3).

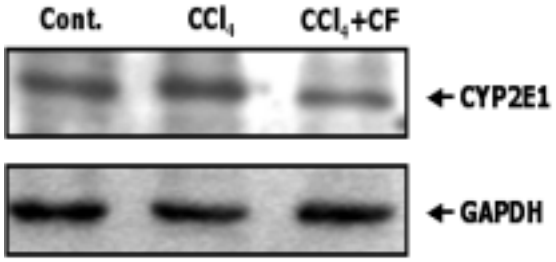

Fig. 5. The CYP2E1 protein expression levels of CCl_4 and CF treated Chang cell. Western blot was carried out by using CYP2E1 specific polyclonal antibody. The sample of the SDS-PAGE were total proteins from the liver of Chang cell which was no treated with CCl_4 as normal control (lane 1), treated with CCl_4 (100 mM) as positive control (lane 2), treated with CCl_4 (100 mM) and hot water extracts of CF (100 ㎍/ml).

고 찰

간손상의 실험적인 모델로는 carbon tetrachloride (CCl_4), D-galactosamine, thioacetamide ethionine 등을 이용한 독성 동물모형과 담관결찰을 통한 수술적인 방법 등이 사용되고 있다[14]. 이 가운데 CCl_4는 세탁소에서 많이 이용되는 유기용매로서 free radical에 의한 대표적인 세포손상으로서 실험적인 간실질 장해를 유도하기 위해서 많이 사용된다[15]. 사염화탄소는 그 자체로는 무해하지만 간세포의 무과립 내형질세망에 존재하는 약물대사효소인 cytochrome P450에 의하여 반응성이 높은 독성 free radical인 CCl_3^-로 전환되어 세포 상해를 일으킨다[16]. CCl_3^-는 OH^-처럼 지질과산화를 일으키는 강력한 물질로서, 세포막의 인지질 내에 있는 불포화지방산에서 수소원자를 공여받아 자신은 $CHCl_3$로 변하고 불포화지방산에 여분의 전자를 제공함으로써 지질의 free radical화를 유발하고, 이 radical이 산소와 반응(peroxidation)하여 유기 과산화물(organic peroxide)을 형성한다. 이러한 유기 과산화물은 그 자체가 free radical로 작용하여 새로운 free radical을 형성하며, 따라서 인지질의 과산화는 더욱 가속화된다[17].

이 반응은 세포막에서 가까운 내형질세망으로 급속히 진행되어 세포내 소기관 중 내형질세망의 구조와 기능이 먼저 파괴되며, CCl_4 투여 후 30분 이내에 간세포의 단백질 합성이 저하되며 2시간 이내에 전자현미경으로 내형질세망의 종창과 리보솜의

탈락, 그리고 폴리솜의 해리를 관찰할 수 있다고 보고되었다[18,19]. 세포손상이 진행됨에 따라 지질이 내형질세망에서부터 축적되기 시작하여 세포질로 확산되는데, 지질의 축적은 간세포의 단백질 합성이 저하되어 지질수용단백질의 합성까지 장애를 받기 때문이다. 즉 간세포가 tryglyceride를 분비하기 위해서는 지질수용단백질과 tryglyceride가 결합한 지질단백의 형태를 만들어야 하는데, 간세포에서 지질수용단백질이 생산되지 않기 때문에 지질단백을 형성할 수 없게 된다. 따라서 세포질 내에 tryglyceride가 다량으로 축적되어 CCl_4 중독의 특징인 지방간이 된다[20]. 내형질세망의 지질과산화 과정 중 작은 조각으로 잘린 비교적 안정된 fatty aldehyde가 생겨나는데, fatty aldehyde는 주위로 확산되어 세포막이나 미토콘드리아 등에 손상을 일으킨다고 보고되고 있다. 따라서 내형질세망에 이어서 미토콘드리아가 손상되므로 세포막의 이온채널의 에너지원이되는 ATP가 감소되어 세포막의 투과성이 증가되고 세포 전체의 종창이 일어난다. 세포막의 손상은 다량의 칼슘을 세포내로 들어오게 하여 칼슘이 미토콘드리아 내에 축적되어 미토콘드리아의 기능이 소실된다. 이후의 세포변화는 허혈성 손상에서와 비슷하게 진행되어 결국 세포의 괴사로 이어진다[21].

산수유(Corni Fructus)는 층층나무과의 낙엽성 관목인 산수유(Cornus officinalis Sieb. et Zucc.)의 성숙한 과실의 씨앗을 제거한 과육을 건조한 것으로, 肝腎으로 귀경하며 氣味는 酸澁, 微溫하며 補益肝腎, 澁精固脫하는 효능이 있어서 補肝腎하는 약재로 사용되었다[1]. 대표적인 주치증으로는 眩暈耳鳴, 腰膝酸痛, 陽痿遺精, 遺尿, 小便頻數, 崩漏帶下, 大汗虛脫 등이 있어서[2], 六味地黃丸와 地黃飮子[22], 補肝散[23] 등의 처방에 사용되었다. 또한 □□東醫寶鑑□□『湯液』에서는 五臟補瀉의 肝 편에서 "補用木瓜 · 阿膠 · 川芎 · 黃芪 · 山茱萸 · 酸棗仁 · 五加皮"[24]라고 하여 간을 補하는 약물로 분류하고 있으며, 淸代 王泰林은 □□西溪書屋夜話錄□□에서 산수유를 溫肝, 補肝의 대표적인 약물로 분류하였다[25].

산수유에 대한 최근의 연구를 살펴보면 먼저 국내에서는 박[4]이 streptozotocin으로 유발된 고혈당 백서에 대한 항당뇨효과를 보고하였으며, 박[5]은 산수유 약침의 항산화작용에 대하여 보고하였다. 또한 국외에서도 Mau 등[6]이 항균작용에 대하여 보고하였으며, 또한 Jeng 등[7]은 정자활동성 증가에 대하여 보고하였다.

현재까지 발표된 문헌에는 산수유의 간독성 보호작용에 대한 보고가 없지만, 산수유가 補肝腎하는 효능이 있고 補肝하는 약물로 분류되었으며 또한 항산화활성 등 여러가지 약리작용이 보고되고 있어서 간독성에 대한 보호작용을 할 것으로 기대되어 본 연구를 진행하게 되었다.

간세포의 손상을 검사하기 위하여 임상적으로 흔히 혈청내의 GOT 및 GPT 와 같은 효소의 활성도를 검사하는데[26], 혈청내에서의 GOT와 GPT의 활성치 증가는 간세포의 장애 정도와 비교적 상관성이 좋을 뿐 아니라, 간에서 혈액으로 유출되는 다른 효소에 비하여 예민하게 변동한다. 또한 다른 조직보다 간은 transaminase의 조직내 농도가 현저하게 높고 혈중으로 유출이 쉬운 혈행구조를 갖고 있기 때문에 GOT와 GPT의 혈중농도를 간질환의 진단에 널리 이용하고 있다[13].

본 연구에서는 이러한 효소활성을 in vitro에서 실험하여 간손상의 정도를 간접적으로 측정하였다. CCl_4와 산수유추출물의 적정 처리농도를 확인하기 위하여, 세포생존율을 XTT Assay로 검사하여 CCl_4는 100 mM, 산수유추출물은 100 ㎍/ml의 농도를 적정 처리농도로 확인하였다. 위의 농도로 인간정상간세포주인 Chang cell에 처리하였을 때, CCl_4만을 처리한 군에서 세포배양액에서의 GOT, GPT 활성치가 정상대조군에 비하여 모두 4-5배 정도 상승하였으나, CCl_4와 산수유추출물을 동시에 처리한 군에서는 정상과 비슷한 활성치를 나타내어 CCl_4 투여군에 비하여 유의성있는 감소를 나타내었다.

따라서 산수유 추출물이 CCl_4로 유도된 실험적 간손상에 있어서 간보호활성을 가짐을 확인할 수 있었으며, 그 기전을 확인하기 위하여 in vitro에서 CCl_4를 CCl_3^-로 전환하는 효소인 cytochrome P450의 발현조절에 대하여 실험하였다.

Cytochrome P450은 체외에서 들어오는 환경물질을 대사하는 중추적인 역할을 하는 효소로서, 간, 폐, 신장, 뇌, 피부 및 태반 등 전반적인 기관의 내형질세망(endoplasmic reticulum; ER)에 존재하며 특히 간에서 다량으로 발현하는 것으로 알려져 있다[21,27]. Cytochrome P450에는 여러 가지 다양한 isozyme이 존재하는데, 그 중에서 gene subfamily 1, 2, 3, 4의 isoform이 약물대사와 관련되어 흔히 발현하는 것으로 알려져 있다[28]. 특히 ethanol에 의해서 유도되는 2E1 isoform이 사염화탄소로 인한 간손상에 주로 관여하는 것으로 알려져 있으며[29], 1A1 isoform도 3-methylcholanthrene (MC)와 사염화탄소의 동시투여에서 3-MC의 단독투여보다 더 높은 발현을 보인다는 보고가 있었다[30]. 또한 ergosterol biosynthesis inhibiting fungicides (EBIFs)에 의한 rat의 간독성모델에서 1A1/2 및 3A isoenzyme의 발현이 증가한다는 보고가 있었다[31]. 따라서 본 연구에서는 산수유추출물이 사염화탄소를 통하여 유발되는 cytochrome P450 isoform 중 간독성모델과 관련있는 것으로 알려진 1A1, 3A1 및 2E1의 발현을 조절하는지 살펴보기 위하여 RT-PCR과 western blot을 이용하여 mRNA 및 단백질의 발현정도를 비교하였다. Chang cell을 통한 세포실험에서도 CYP1A1은 유의성을 확인하지 못했으며(Fig. 3), 2E1 isoform은 mRNA 및 단백질 수준에서 모두 CCl_4에 의하여 발현이 증가하였고 산수유추출물에 의하여 발현이 감소함을 알 수 있었다(Fig. 4-5). 이러한 결과는 Wong 등[32]이 CYP2E1 유전자를 결실시킨 생쥐에는 사염화탄소를 투여하여도 정상대조군과는 달리 GOT, GPT 수치가 증가하지 않으며 간손상이 발생하지 않음을 보고한 것과 일치하는 것으로 CCl_4를 통하여 유도된 간손상모델에서는 cytochrome P450 isoform 중에서 2E1이 핵심적인 역할을 하는 것을 알 수 있으며, 산수유추출물이 2E1의 발현을 억제함으로써 간보호작용을 나타내는 것으로 생각할 수 있다.

이상의 결과에서 산수유는 CCl_4로 유발된 실험적 간손상 모델에서 in vivo 및 in vitro에서 간보호활성을 가지고 있음을 확인하였으며, 그 기전으로는 간세포내 항산화계 활성증가와 CCl_4의 biotransformation에 관여하는 cytochrome P450 특히 2E1 isoform의 발현조절과 관련된 것임을 시사한다.

결 론

사염화탄소(CCl_4)로 유발된 간손상 모델을 통하여 산수유의 간보호활성 및 사염화탄소의 활성화에 관여하는 효소인 cytochrome P450의 발현조절에 대하여 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻게 되었다. Human normal hepatocyte인 Chang cell을 이용한 in vitro 실험에서는 CCl_4 100 mM 및 산수유추출물 100 ㎍/ml의 농도에서 6시간 배양하였을 때, GOT와 GPT가 모두 CCl_4만 처리한 군에 비하여 산수유추출물을 동시에 처리한 군에서 유의한 감소를 나타내었다. 또한 cytochrome P450 isoform 중에서 1A1은 영향이 없으며, 2E1의 발현이 CCl_4만 처리한 군에 비하여 산수유추출물을 함께 처리한 군에서 현저히 감소함을 알 수 있었다.

이상의 결과에서 산수유는 CCl_4로 유발된 간손상에 대하여 보호활성이 있음을 in vitro에서 확인할 수 있었으며, 그 기전은 간조직내 항산화계의 활성화 및 CYP2E1의 발현억제에 의한 것으로 생각된다.

참고문헌

1. 조병권. 사염화탄소 투여로 인한 血淸內 各種酵素의 活性變動에 關하여. 경북대학교 대학원 박사학위논문, 1984.
2. 서혜진. 사염화탄소의 반복투여가 백서 간장에 미치는 병리조직학적 연구. 영남대학교 대학원 석사학위논문, 1987.
3. Fernandez, G., Villarruel, M.C., de Toranzo, E.G., Castro, J.A. Covalent binding of carbon tetrachloride metabolites to the heme moiety of cytochrome P-450 and its degradation products. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol. 35(2):283-290, 1982.
4. Tomasi, A., Albano, E., Banni, S., Botti, B., Corongiu, F., Dessi, M.A., Iannone, A., Vannini, V., Dianzani, M.U. Free-radical metabolism of carbon tetrachloride in rat liver mitochondria. A study of the mechanism of activation. Biochem. J. 246(2):313-317, 1987.
5. Le Page, R.N., Cheeseman, K.H., Osman, N., Slater, T.F. Lipid peroxidation in purified plasma membrane fractions of rat liver in relation to the hepatoxicity of carbon tetrachloride. Cell. Biochem. Funct. 6(2):87-99, 1988.
6. 陳存仁. 圖說漢方醫藥大辭典(III). 東京, 講談社, p 208, 1982.
7. 전국한의과대학 본초학교수 공편. 본초학. 서울, 영림사, pp 626-627, 1991.
8. 王旭高. 西溪書屋夜話錄・王旭高醫書六種. 北京, 學苑出版社, p 110, 1996.
9. 朴瑛卿. 山茱萸 種子의 抗糖尿 效果-Streptozotocin 유발 고혈당 흰쥐에 미치는 영향. 中央大 大學院, 석사학위논문, 1991.
10. 朴炫宣. 산수유 약침의 항산화 작용에 관한 실험적 연구. 大田大 大學院, 석사학위논문, 1998.
11. Mau, J., Chen, C., Hsieh, P. Antimicrobial effect of extracts from Chinese chive, cinnamon, and corni fructus. J Agric Food Chem. 49(1):183-188, 2001.
12. Jeng, H., Wu, C.M., Su, S.J., Chang, W.C. A substance isolated from Cornus officinalis enhances the motility of human sperm. Am J Chin Med. 25(3-4):301-306, 1997.
13. Reitman, S. and Frankel, S. A colorimetric method for determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminases, Am. J. Clin. Pathol. 28: 58-63, 1957.
14. Poli, G. Liver damage due to free radicals. Br Med Bull. 49(3):604-620, 1993.
15. Kamokawa, A., Ohta, S., Tatsugi, A., Kumasaka, M., and Shinoda, M. Experimental Production of Various Types of Cholestasis and the Effects of Cystemine. YAKUGAKU ZASSHI. 106(8):709, 1986.
16. Noguchi, T., Fong, K.L., Lai, E.K., Olson, L. and McCay, P.B. Selective early loss of polypeptides in liver microsomes of CCl_4-treated rats. Relationship to cytochrome P-450 content. Biochem. Pharmacol. 31(5):609-614, 1982.
17. Weddle, C.C., Hornbrook, K.R. and McCay, P.B. Lipid peroxidation and alteration of membrane lipids in isolated hepatocytes exposed to carbon tetrachloride. J. Biol. Chem. 251(16):4973-4978, 1976.
18. Clawson, G.A., Sesno, J., Milam, K., Wang, Y.F., Gabriel, C. The hepatocyte protein synthesis defect induced by galactosamine involves hypomethylation of ribosomal RNA. Hepatology 11(3):428-434, 1990.
19. Watanabe, A., Akamatsu, K., Takesue, A., Taketa, K. Dysregulation of protein synthesis in injured liver. A comparative study on microsomal and cytosole enzyme activities, microsomal lipoperoxidation and polysomal pattern in D-galactosamine and carbon tetrachloride-injured livers. Enzyme. 23(5):320-327, 1978.
20. Poli, G., Chiarpotto, E., Albano, E., Cottalasso, D., Nanni, G., Marinari, U.M., Bassi, A.M., Dianzani, M.U. Carbon tetrachloride-induced inhibition of hepatocyte lipoprotein secretion: functional impairment of Golgi apparatus in the early phases of such injury. Life Sci. 36(6):533-539, 1985.
21. Biasi, F., Albano, E., Chiarpotto, E., Corongiu, F.P., Pronzato, M.A., Marinari, U.M., Parola, M., Dianzani, M.U., Poli, G. In vivo and in vitro evidence concerning the role of lipid peroxidation in the mechanism of hepatocyte death due to carbon tetrachloride. Cell Biochem Funct. 9(2):111-118, 1991.
22. 黃度淵. 方藥合編. 서울, 南山堂, p 121, 166, 1996.
23. 張介賓. 景岳全書. 北京, 人民衛生出版社, p 1650, 1992.
24. 許浚. 東醫寶鑑. 서울, 南山堂, p 971, 1992.
25. 王旭高. 西溪書屋夜話錄・王旭高醫書六種. 北京, 學苑出版社,

p 110, 1996.
26. Chenoweth, M.B. and Hake, C.L. The smaller halogenated aliphatic hydrocarbons. Ann. Rev. Pharmac. 2: 363-398, 1962.
27. Gwebu, E.T., Ttewyn, R.W., Cornwell, D.G. and Panganamala, R.V. Vitamin E and inhibition of platelet lipoxygenase. Res. Common. Chem. Pathol. Pharmacol. 28: 361-369, 1980.
28. Rogers, J.F., Nafziger, A.N., Bertino, J.S. Jr. Pharmacogenetics affects dosing, efficacy, and toxicity of cytochrome P450-metabolized drugs. Am J Med. 113(9):746-750, 2002.
29. Koop, D.R. Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1. FASEB J. 6(2):724-730, 1992.
30. Degawa, M., Mikami, K., Namiki, M., Hashimoto, Y. Inhibition of the induction and activity of hepatic P450IA isozymes by in vivo administration of carbon tetrachloride to rats. Biol Pharm Bull. 16(12):1248-1250, 1993.
31. Ronis, M.J., Ingelman-Sundberg, M., Badger, T.M. Induction, suppression and inhibition of multiple hepatic cytochrome P450 isozymes in the male rat and bobwhite quail (Colinus virginianus) by ergosterol biosynthesis inhibiting fungicides (EBIFs). Biochem Pharmacol. 48(10):1953-1965, 1994.
33. Wong, F.W., Chan, W.Y., Lee, S.S. Resistance to carbon tetrachloride- induced hepatotoxicity in mice which lack CYP2E1 expression. Toxicol Appl Pharmacol. 153(1):109-118, 1998.