

중금속유도 세포독성에 대한 liquiritigenin의 보호효과

김상찬

대구한의대학교 한의학과

서론

神農本草經에 수재되어 있는 감초(*Glycyrrhizae radix*)는 콩과에 속한 다년생 식물로, 주로 뿌리가 이용되며 홍갈색 또는 암갈색이고 맛은 달고 독이 없으며, 키가 30-70cm정도로 중국의 동북부, 몽골이 원산지이며 그 밖에 시베리아산 (*G. glabra* var. *glandulifera*), 스페인산 (*G. glabra*) 등이 있고 세계각지에서 약초로 재배되고 있다.

감초는 전통적으로 生用하면 補脾胃不足 以瀉心火하고, 炙用하면 補三焦元氣 以散表寒하는 것으로 알려져 있고, 또 生肌止痛, 通行十二經, 解百藥毒하는 것으로 알려져 있다. 감초의 주요성분으로는 glycyrrhizin, isoliquiritin, isoliquiritigenin, liquiritigenin, formononetin, glabric acid, liquiritin등이 알려져 있으나, 감초에 대한 많은 연구들은 주로 glycyrrhizin의 연구에 집중되어 있다. 최근 연구에 따르면 동물모델에서 에스트라디올 E2-관련 자궁내막 발암성이 감초에 의해 억제되었다는 것이 제시된 바 있다. 또한 동물모델에서, N-methyl-N-nitrosourea에 의해 유도된 자궁내막 발암성이 감초에 의해 예방되었다. 甘草의 활성 성분인 glycyrrhizin은 만성 C형 간염의 치료에 유효하였고, SARS관련 바이러스의 복제를 억제하며, 말초혈액의 단핵구배양환경에서 HIV의 복제를 억제하였으며, 또 glycyrrhizin은 aflatoxin으로 유도된 독성에 대하여 세포보호작용이 있음이 보고되었다.

한편 카드뮴은 중금속 중에서도 독성이 높은 물질 중의 하나이며, 발암물질로 분류된다. 인간이 평생 동안 섭취하는 총 카드뮴의 양은 대략 2g정도이며, 음식이나 작업실 공기 중에 존재하는 카드뮴을 만성적으로 섭취할 경우에는 카드뮴이 축적된 조직의 세포를 사멸시켜 기관(organ)이상을 야기할 수 있다. 카드뮴은 주로 간과 신장에 축적되고, 낮은 용량일지라도 만성적으로 축적된 카드뮴은 폐, 간, 신세뇨관 질환을 야기한다. 특히 비직업적인 노출의 경우에 카드뮴의 환경노출은 쌀의 소비와 같이 주로 음식을 통한 것이 많다(예를 들어 아시아 국가들) (Moon et al, 2003). 흡연 또

한 카드뮴 섭취의 원인이 된다. 한 개의 담배는 1-2 μ g의 카드뮴을 포함하며, 이 중에서 10%가 흡입되고, 흡입된 카드뮴 중 약 50%가 흡수된다.

본 연구에서는 이러한 카드뮴유도 세포사에 대한 감초의 세포보호효과를 밝히고자 하였다.

실험방법

MTT assay로 중금속의 세포독성을 측정하였으며, 세포내 GSH level은 GSH determination kit를 사용하여 측정하였다. Immunoblot analysis로 세포사멸단백질을 분석하였고, Flow cytometric analysis로 Sub-G1 phase에서의 cell들의 축적을 분석하였다.

실험결과

카드뮴은 0.03-10 μ M에서 세포사를 유도하였고, BSO로 GSH를 고갈시킨 경우 세포사가 더욱 증폭되었다(Fig. 1). Cd 1.0 μ M(\pm BSO)에서는 PARP분할이 일어났지만, Cd0.3 μ M+BSO에서는 PARP분할이 일어나지 않았다(Fig. 2). 이는 Cd0.3 μ M+BSO가 Cd 1.0 μ M(\pm BSO)의 세포사와는 다른 경로의 세포사를 의미하고, 이를 FACS로 분석 결과, Cd1.0 μ M(\pm BSO)는 apoptotic cell death를, Cd0.3 μ M+BSO는 non apoptotic cell death를 나타내었다(Fig. 5). 이러한 결과가 BSO 전처리 대신 다른 상황에서도 발생하는지를 H₂O₂를 전처리하여 관찰하였으나, Cd+H₂O₂에서는 그러한 변화가 발생하지 않았다(Fig.3-5). 이러한 Cd의 cell death를 감초 extract (GRE)는 90-100% 회복시켰으며(Fig. 6), 그러한 기작은 Bad의 mitochondria로의 translocation을 억제함에서 기인하였다(Fig. 7). 또한 GRE는 다른 중금속인 As유도 세포사를 유효하게 억제하였다(Fig. 8). GRE의 이러한 효과가 어떤 성분에서 기인하는지 실험한 결과 Glycyrrhizin이나 isoliquiritigenin은 1 mM농도까지에서도 카드뮴으로 유도된 세포독성에 대하여 세포를 보호효과를 나타내

지 않았지만, liquiritigenin은 10-100 μ M수준에서 세포보호 효과를 나타내었다(Fig. 9).

결론

감초추출물은 과 liquiritigenin은 카드뮴으로 유도되는 세포사멸을 효과적으로 방어하였으며, BSO로 증폭된 세포사멸에 대해서도 효과적으로 방어하였다. 감초추출물은 Cd 또는 Cd+BSO에 의해 유도된 Bad의 translocation을 억제하였다.

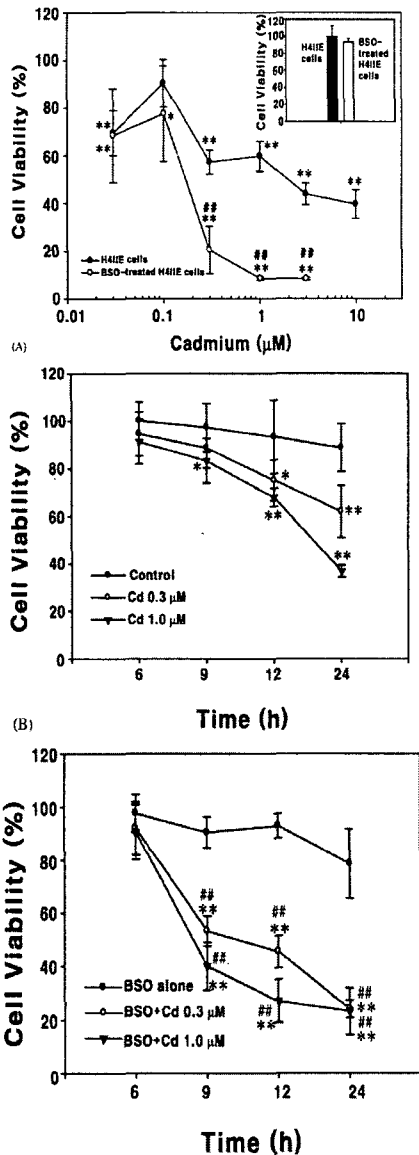


Fig. 1. Viability of H4IIE cells exposed to Cd with or without BSO.

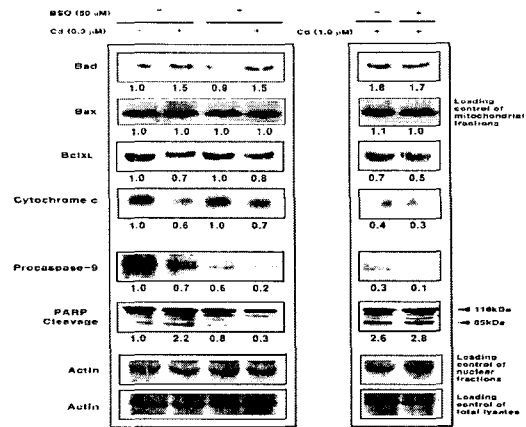


Fig. 2. The effects of submicromolar and micromolar concentrations of Cd on the levels of proteins associated with apoptosis.

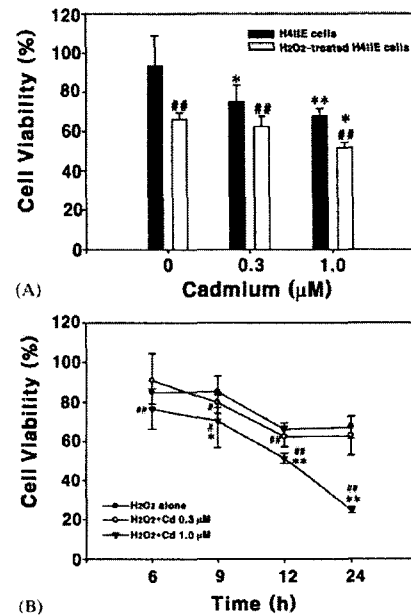


Fig. 3. Viability of H4IIE cells exposed to Cd with or without H₂O₂.

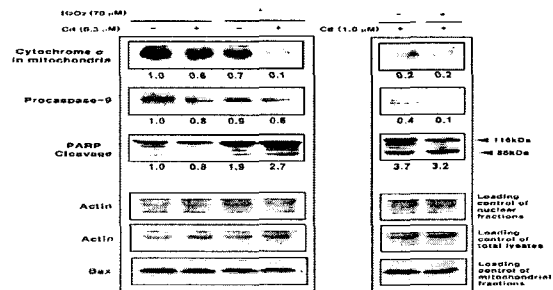


Fig. 4. The effects of submicromolar and micromolar Cd on the levels of cytochrome c (mitochondria), procaspase-9 and cleaved fragments of PARP in the cells treated with hydrogen peroxide.

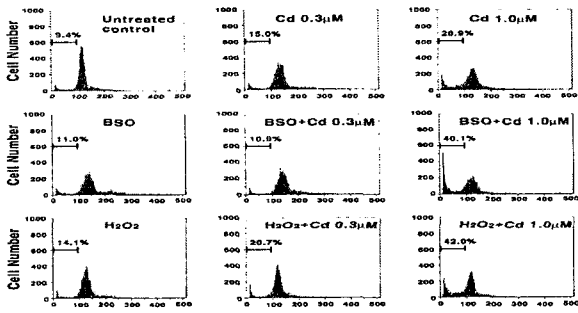


Fig. 5. The effects of micromolar or submicromolar Cd on the percentage of cell numbers in the sub-G1 phase of cells exposed to BSO or H₂O₂.

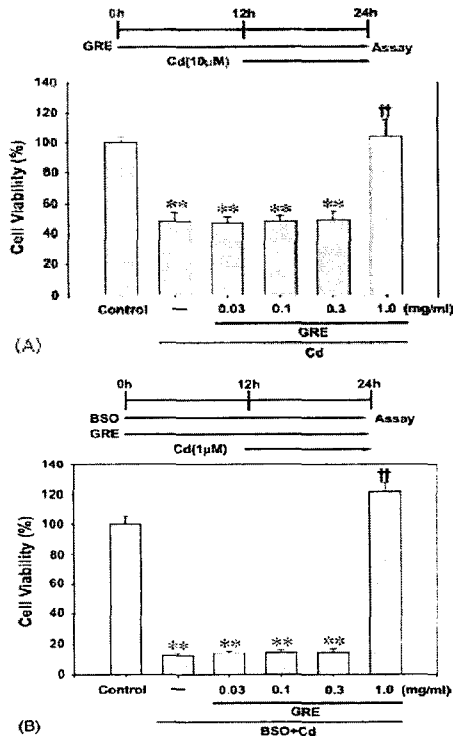


Fig. 6. (A) Control cells were treated with 10 µM Cd alone for 12 h. Cell viability was assessed by MTT assay. (B) Viability was assessed by MTT assay.

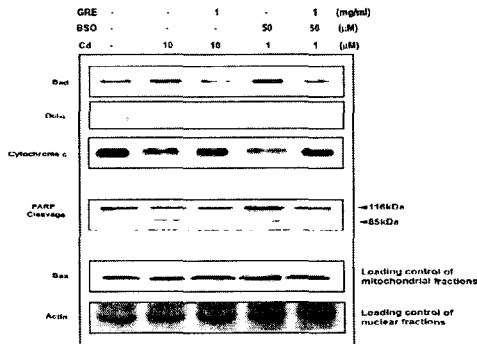


Fig. 7. The effects of GRE on the levels of proteins associated with apoptosis.

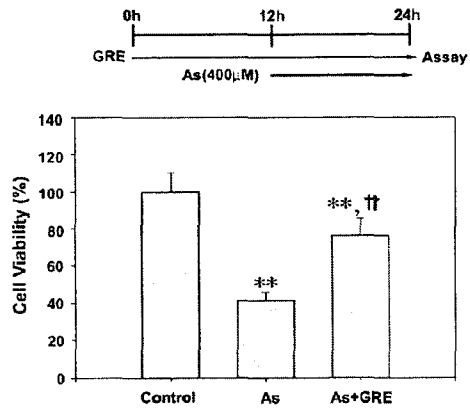


Fig. 8. The effect of GRE on the viability of H4IIE cells exposed to As.

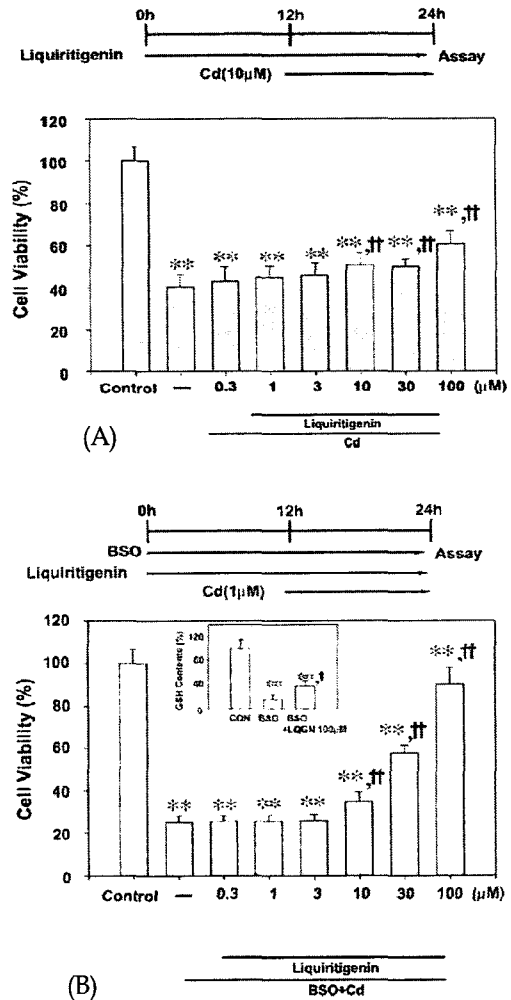


Fig. 9. The effects of liquiritigenin on the viability of H4IIE cells

* This work was supported by the grant (No. R12-2003-002-02002-0) from the Basic Research Program of the Korea Science and Engineering Foundation.

References

1. Albering, H.J., van Leusen, S.M., Moonen, E.J., Hoogewerff, J.A. & Kleinjans, J.C. (1999). *Environ. Health Perspect.*, 107, 37-43.
2. Chan, H.T., Chan, C. & Ho J.W. (2003). *Toxicology*, 188, 211-217.
3. Cinatl, J., Morgenstern, B., Bauer, G., Chandra, P., Rabenau, H. & Doerr, H.W. (2003). *Lancet*, 361, 2045-2046.
4. Cook, S.A., Sugden, P.H. & Clerk, A. (1999). *Circ. Res.*, 85, 940-949.
5. El-Agha, O. & Gokmen, I.G. (2002). *Biol. Trace Elem. Res.*, 88, 31-43.
6. Fujioka, T., Kondou, T., Fukuhara, A., Tounou, S., Mine, M., Mataka, N., Hanada, K., Ozaka, M., Mitani, K., Nakaya, T., Iwai, T. & Miyakawa, H. (2003). *Hepatol. Res.*, 26, 10-14.
7. Kamei, J., Nakamura, R., Ichiki, H. & Kubo, M. (2003). *Eur. J. Pharmacol.*, 469, 159-163.
8. Kang, K.W., Ryu, J.H. & Kim, S.G. (2000). *Mol. Pharmacol.*, 58, 1017-1025.
9. Kang, K.W., Novak, R.F., Lee, C.H. & Kim, S.G. (2002). *Free Radic. Biol. Med.*, 32, 1017-1032.
10. Kim, S.C., Cho, M.K., & Kim, S.G. (2003). *Toxicol Lett.* 144, 325-336.
11. Moon, C.S., Paik, J.M., Choi, C.S., Kim, D.H. & Ikeda, M. (2003). *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 76, 282-288.
12. Mori, H., Niwa, K., Zheng, Q., Yamada, Y., Sakata, K. & Yoshimi, N. (2001). *Mutat. Res.*, 480-481, 201-207.
13. Niwa, K., Hashimoto, M., Morishita, S., Yokoyama, Y., Mori, H. & Tamaya, T. (1999). *Jpn. J. Cancer Res.*, 90, 726-732.
14. Sasaki, H., Takei, M., Kobayashi, M., Pollard, R.B. & Suzuki, F. (2002-2003). *Pathobiology*, 70, 229-236.
15. Son, M.H., Kang, K.W., Lee, C.H. & Kim, S.G. (2001a). *Biochem. Pharmacol.*, 62, 1379-1390.
16. Son, M.H., Kang, K.W., Lee, C.H. & Kim, S.G. (2001b). *Toxicol. Lett.*, 121, 45-55.