

사염화탄소로 독성을 유발시킨 일차배양 간세포에 미치는 G009의 효과

이미경 · 김홍표 · 이준우* · 정훈* · 이승룡* · 김영중[#]

서울대학교 약학대학, *일양약품 중앙연구소

(Received November 26, 1997)

Hepatoprotective Effect of G009 on CCl₄-induced Hepatotoxicity in Primary Cultured Rat Hepatocytes

Mi Kyeong Lee, Hong Pyo Kim, June Woo Lee*, Hoon Jung*,

Seung Yong Lee* and Young Choong Kim[#]

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

*Il Yang pharm. Co. Ltd., Central Research Center, Yongin, Kyonggi-Do 449-900, Korea

Abstract—G009, a polysaccharide isolated from the mycelia of *Ganoderma lucidum* IY009, showed a hepatoprotective activity against CCl₄-induced cytotoxicity in primary cultured rat hepatocytes. Incubation of CCl₄-intoxicated hepatocytes with G009 significantly reduced the levels of glutamic pyruvic transaminase and sorbitol dehydrogenase released from hepatocytes in the medium. G009 showed antioxidant effect by elevating the activities of glutathione reductase and superoxide dismutase, and the content of glutathione in CCl₄-intoxicated primary cultured rat hepatocytes. Furthermore, G009 significantly elevated glutathione-S-transferase activity in CCl₄-intoxicated primary cultured rat hepatocytes. G009 also reduced the production of malondialdehyde, a byproduct of lipid peroxidation. From these results, it could be concluded that G009 exerted hepatoprotective activity against CCl₄-induced cytotoxicity through antioxidation.

Keywords □ G009, primary cultured rat hepatocytes, CCl₄, glutamic pyruvic transaminase, sorbitol dehydrogenase, glutathione reductase, glutathione, superoxide dismutase, glutathione-S-transferase, malondialdehyde.

영지버섯(*Ganoderma lucidum*)은 이노, 강장, 정신안정 및 기관지염 등에 널리 사용되어 왔으며 그 약효를 규명하기 위한 활발한 연구가 수행되어 항암효과,^{1,2)} 혈당강하 효과,³⁾ insulin 분비 효과,⁴⁾ 보체계 활성화 효과,⁵⁾ 지질과산화 생성 억제 효과,⁶⁻⁷⁾ 간섬유화 억제효과,⁸⁾ 간 보호 효과⁹⁾ 등 다양한 활성이 보고 되었다.

본 연구에서는 최근 인간의 간세포와 생리적으로나 생화학적으로 유사하다고 알려진¹⁰⁾ 일차배양한 흰쥐의 간세포를 검색계로 이용하여 영지버섯의 균사체인 IY 009로부터 분리 정제한 다당체인 G009의 간세포

보호 작용 및 그 기전을 규명하고자 하였다. 일차배양한 흰쥐의 간세포에 대표적인 간독성 물질 중의 하나인 사염화탄소로 독성을 유발시킨 후 G009를 투여하여 간세포 보호 효과를 측정하였다. 간세포 보호 효과 및 그 작용기전은 배양액 중으로 유리되는 glutamic pyruvic transaminase, sorbitol dehydrogenase 및 간세포내에 존재하는 여러 효소들 즉, 해독작용에 관여하는 glutathione-S-transferase, 자유기 생성의 억제 및 생성된 자유기의 제거에 관여하는 glutathione reductase, superoxide dismutase의 활성 및 자유기로 인한 glutathione의 양, 지질과산화의 지표인 malondialdehyde의 양 등을 측정하여 알아 보았다.

[#] 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

(전화) 02-880-7842 (팩스) 02-888-2933

실험방법

실험 동물

흰쥐(Wistar, male, 150~200 g)는 서울대학교 실험동물 사육장으로부터 공급받은 것을 온도 $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 습도 $60 \pm 5\%$ 로 유지하면서 12시간 간격으로 명암을 바꿔주면서 사료와 물을 마음껏 섭취하도록 하였다. 실험시에는 하루 전부터 굶겨 공복 상태가 되도록 하였다.

시약 및 재료

본 연구에 사용한 모든 시약은 Sigma사(St. Louis, MO, U.S.A)의 제품을, fetal calf serum은 Hyclone사(Logan, Utah, U.S.A)의 제품을 사용하였으며 GPT kit은 영동제약으로부터 구입하였다. G009는 일양약품 중앙연구소로부터 제공받아 사용하였다.

간세포의 분리 및 배양

흰쥐의 간세포는 Berry와 Friend의 방법¹¹⁾을 약간 수정한 2단계 collagenase 관류법¹²⁻¹³⁾을 이용하여 분리하였다. 분리한 간세포는 5×10^5 cells/ml로 희석하여 collagen으로 도포된 용기에 배양하였다. 배양액으로는 Waymouth's MB 752/1 medium, 5% fetal calf serum, 2.0 mg/ml bovine serum albumin (fraction V), 10^{-6} M dexamethasone, 10^{-7} M insulin, 5.32×10^{-2} M L-serine, 4.09×10^{-2} M L-alanine, 2.67×10^{-2} M NaHCO_3 , 100 IU/ml penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin, 5 $\mu\text{g/ml}$ amphotericin B 또는 50 $\mu\text{g/ml}$ gentamycin sulfate로 구성된 것을 사용하였으며, 습도가 유지되는 37°C 배양기에서 공기(95%)와 CO_2 (5%)의 혼합기체를 계속 공급하면서 세포를 배양하였다.

시료의 제조

G009를 HBSS 완충용액으로 용해시킨 후 이를 milipore membrane(0.22 μm , Millex-GV U.S.A)을 사용하여 여과시켜 무균상태로 제조하였다.

사염화탄소에 의한 간세포 독성유도 및 G009의 투여

간세포를 배양한지 1.5시간이 지난 후 새로운 배양액으로 갈아준 다음 24시간 동안 세포를 배양한 후 10 mM 사염화탄소를 함유한 배양액으로 갈아주고 1.5시간 동안 세포를 더 배양하여 세포독성을 유도하였다.¹⁴⁾

G009는 사염화탄소를 함유하는 배양액으로 갈아주면서 동시에 투여하였다.

Glutamic pyruvic transaminase(GPT)의 활성 측정

세포 독성이 유도된 간세포의 배양액을 취하여 GPT의 활성을 GPT Kit를 사용하여 Reitman-Frankel의 방법¹⁵⁾으로 측정하였다.

Sorbitol dehydrogenase(SDH)의 활성 측정

세포 독성이 유도된 간세포의 배양액을 취하여 Gerlach의 방법¹⁶⁾을 약간 수정한 방법으로 SDH의 활성을 측정하였다.

Superoxide dismutase(SOD)의 활성 측정

일차배양한 간세포내의 SOD의 활성은 McCord와 Fridovich의 방법¹⁷⁾을 수정하여 측정하였다.

Glutathione-S-transferase(GST)의 활성 측정

일차배양한 간세포내의 GST의 활성은 Habig 등의 방법¹⁸⁾을 이용하여 측정하였다.

Glutathione reductase(GSSG-R)의 활성 측정

일차배양한 간세포내의 GSSG-R의 활성은 Carlberg와 Mannervik의 방법¹⁹⁾을 이용하여 측정하였다.

Glutathione의 정량

일차배양한 간세포내의 총 glutathione의 양과 oxidized glutathione(GSSG)의 양은 Griffith의 방법²⁰⁾으로 측정하였다.

지질과산화 측정

지질과산화 정도를 1,1,3,3-tetraethoxypropane을 표준물질로 하여 Masuage법²¹⁾에 의하여 측정하였다.

단백질 정량

단백질 양은 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 Lowry 방법²²⁾으로 측정하였다.

통계 처리

통계적 유의성을 검토하기 위해 대조치로부터의 변동을 "ANOVA" test에 의해 판정하였으며 P 값이 5% 미만일 때 통계적으로 유의성이 있다고 판정하였다.

결과 및 고찰

G009의 간세포 보호 활성을 알아보기 위하여 일차 배양한 간세포에 사염화탄소로 독성을 유발시키면서 G009를 투여하여 알아보았다.

간독성 유기용매인 사염화탄소는 3 mM 이상의 농도에서 선택성이 없는 독성 효과를 나타낸다.²³⁾ 이는 사염화탄소의 용매효과(solvent properties)라고 불리우며 세포막을 파괴하고 Ca²⁺의 항상성을 깨뜨려 결국은 세포괴사를 초래한다.²⁴⁾ 그러므로 일차배양한 간세포에 사염화탄소로 독성을 유발시키면 세포막의 파괴로 인하여 간세포내의 효소인 GPT 및 SDH의 배양액 중으로 유리가 증가된다. 또한 세포막의 파괴에 의해 유리된 불포화 지방산의 매개로 자유기가 생성되며 이 자유기는 연쇄반응을 거쳐 지질과산화물을 유도하고 세포내 여러 효소들을 파괴한다.²⁵⁾

일차배양한 흰쥐의 간세포에 사염화탄소로 독성을 유발시키면서 G009를 1 µg/ml에서부터 1000 µg/ml까

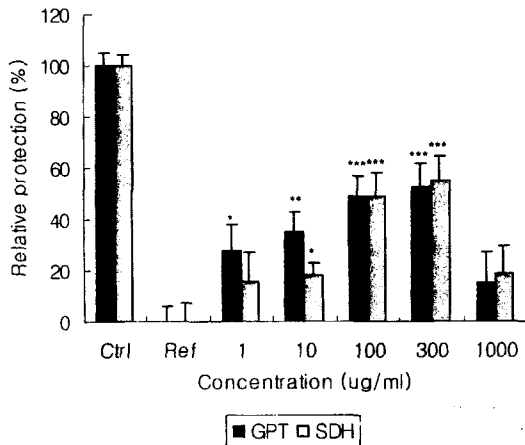


Fig. 1—The effects of G009 on the activities of GPT and SDH released from CCl₄-intoxicated primary cultured rat hepatocytes. Control (Ctrl) is the value of hepatocytes which were not challenged with CCl₄. The control values of GPT and SDH were 25.31±1.84 IU/l and 48.75±0.18 Unit/ml, respectively. Reference (Ref) is the value of hepatocytes which were challenged with CCl₄. The reference values of GPT and SDH were 108.27±1.92 IU/l, 2.75±0.02 Unit/ml, respectively. The percent of protection is calculated as 100×[(values of reference-value of sample)/(values of reference-values of control)]. Significantly different from the reference: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

지 농도를 증가시키면서 투여한 결과 1 µg/ml에서부터 300 µg/ml까지 농도의존적으로 배양액 중으로 유리되는 GPT 및 SDH의 양을 감소시켰으며 300 µg/ml의 농도에서 최고의 활성을 나타내어 독성을 50%나 차단시켰다(Fig. 1). 그러나 1000 µg/ml의 농도에서는 그 활성이 감소하였다. 이것이 G009의 자체 독성에 의한 것인지 또는 다른 작용기전에 의한 것인지는 추후 연구가 진행되어야 할 것이다.

세포내에는 oxidative stress에 대한 여러 방어기전이 존재한다. 그 방어기전의 대표적인 역할을 하는 GSH는 L-γ-glutamyl-L-cysteinylglycine으로 구성되어 있으며 2GSH⇌GSSG로 평형을 이루고 정상상태에서는 대부분 GSH의 형태로 존재한다. 그러나 oxidative stress로 인하여 자유기가 증가되면 GSH는

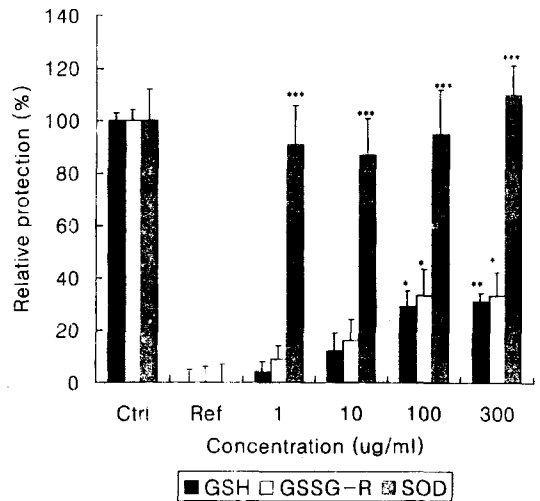


Fig. 2—The effects of G009 on GSH content and the activities of GSSG reductase and SOD in CCl₄-intoxicated primary cultured rat hepatocytes. Control (Ctrl) is the value of hepatocytes which were not challenged with CCl₄. The control value of GSH, GSSG reductase and SOD were 17.18±0.04 µM/mg protein, 3.30±0.11 Unit/mg protein and 3.23±0.34 U/mg protein, respectively. Reference (Ref) is the value of hepatocytes which were challenged with CCl₄. The reference values of GSH, GSSG reductase and SOD were 0.49±0.01 µM/mg protein, 1.12±0.09 Unit/mg protein and 1.89±0.11 U/mg protein, respectively. The percent of protection is calculated as 100×[(value of reference-value of sample)/(value of reference-value of control)]. Significantly different from the reference: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

GSSG로 변화되어 GSH가 고갈된다. 산화된 GSSG는 GSSG-R에 의하여 다시 GSH로 환원된다. 따라서 GSSG-R의 활성의 감소는 GSSG를 GSH로 환원시키지 못함을 의미하며 이는 GSH의 감소를 초래한다. 그러므로 GSH의 감소는 oxidative stress의 지표가 되며 결국에는 지질과산화이 진행된다.²⁶⁾

일차배양한 간세포에 사염화탄소로 독성을 유발시키면 간세포내의 GSH의 양이 감소되고 GSSG-R의 활성이 현저히 떨어진다. 그러나 G009를 투여한 경우 300 µg/ml의 농도에서 사염화탄소로 인하여 감소된 GSH의 양 및 GSSG-R의 활성을 정상상태 때의 30% 수준까지 회복시켜 항산화효과를 나타냄을 알 수 있었다. 또한 G009는 항산화효소인 SOD의 활성도 정상상태 때의 수준으로 유지시켜 G009의 항산화효과를 뒷받침하였다(Fig. 2).

사염화탄소로 인한 독성은 여러 반응을 거쳐 결국 지

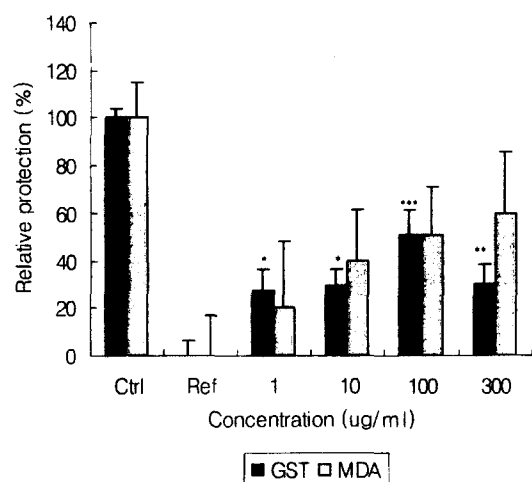


Fig. 3—The effects of G009 on MDA content and the activity of GST in CCl₄-intoxicated primary cultured rat hepatocytes.

Control (Ctrl) is the value of hepatocytes which were not challenged with CCl₄. The control value of GST and MDA were 0.37 ± 0.01 µmol product/min/mg protein, 2.40 ± 0.40 nmol/mg protein, respectively. Reference (Ref) is the value of hepatocytes which were challenged with CCl₄. The reference values of GST and MDA were 0.09 ± 0.01 µmol product/min/mg protein and 3.41 ± 0.32 nmol/mg protein, respectively. The percent of protection is calculated as $100 \times [(value\ of\ reference\ value\ of\ sample)/(value\ of\ reference\ value\ of\ control)]$. Significantly different from the reference: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

질과산화를 유도하고 이 과정의 최종산물인 MDA를 생성한다. G009를 투여한 후 MDA를 측정하여 지질과산화의 억제정도를 알아본 결과 유의성이 인정되지는 않았으나 300 µg/ml의 농도에서 가장 뚜렷한 억제효과를 나타내었다(Fig. 3).

GST는 간의 세포질에 주로 존재하는 가용성 단백질로 생체내 이물질의 대사와 배설에 중요한 역할을 하는 효소이다.¹⁸⁾ 사염화탄소로 간세포 독성을 유발시키면 GST의 활성이 현저히 감소되었으나 G009를 투여한 경우 그 활성이 점차 증가되어 100 µg/ml의 농도에서 정상상태 때의 50% 수준까지 유지시켜 G009가 해독작용에도 관여하여 간세포 보호 활성 나타냄을 알 수 있었다(Fig. 3).

이상의 결과로 G009는 사염화탄소로 독성을 유발시킨 일차배양한 흰쥐의 간세포에 투여하였을 때 간세포 보호 효과를 나타내었으며 이는 G009의 항산화 작용에 의한 것으로 생각된다.

결론

1. G009는 사염화탄소로 독성을 유발시킨 일차배양한 간세포에 투여하였을 때 배양액중으로 유리되는 GPT 및 SDH를 유의성있게 감소시켜 간세포 보호 활성을 나타내었다.
2. G009는 사염화탄소로 인하여 감소된 GSSG-R, SOD, GST의 활성 및 GSH의 양을 유의성있게 증가시켜 해독작용 및 항산화효과를 나타내었다.
3. G009는 사염화탄소로 인하여 증가된 MDA의 양을 감소시킴으로써 지질과산화 억제효과를 나타내었다.

감사의 말씀

본 연구는 보건복지부 보건의료기술 연구개발사업 (과제번호 HMP-96-D-5-0040) 및 일약약품 연구지원 비로 수행되었기에 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) Mizuno, T., Kato, N., Totsuka, A., Takenaka, K., Shinkai, K. and Shimizu, M.: Fractionation, structural features and antitumor activity of water soluble polysaccharide from 'Reishi', the fruit

- body of *Ganoderma lucidum*. *Nippon Noeigaku Kaishi* **58**, 871 (1984).
- 2) Miyazaki, T. and Nixhijima, M. : Studies on fungal polysaccharide of *Ganoderma lucidum*. *Chem. Pharm. Bull.* **29**, 3611 (1981).
 - 3) Kikono, H., Isiyama, M., Suzuki, Y. and Konno, D. : Mechanism of hypoglycemic activity of gonoderan B. A glycan of *Ganoderma lucidum* fruit bodies. *Planta Med.* **55**, 423 (1989).
 - 4) Jeong, H., Lee, J. W. and Lee, K. H. : Studies on anticomplementary activity of Korean higher fungi. *Kor. J. Mycol.* **18**, 145 (1990)
 - 5) Kohoda, H., Tokumato, W., Sakanoto, K., Fugi, M., Kirai, Y., Yamasaka, K., Komoda, Y., Nakamura, H., Ishihara, S. and Ushida, M. : The biologically active constituent of *Ganoderma lucidum* Karst., histamine release inhibitory triterpene. *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 1367 (1985).
 - 6) Lee, J. W., Jung, H., Han, M. D., Baek, S. J., Kim, Y. S. and Kang, S. M. : Effect of G009 on CCl₄-induced hepatic injury and lipid peroxidation in rats. *Kor. J. Pharmacogn.* **27**, 159 (1996).
 - 7) Lee, J. W., Jung, H., Lee, S. M., Kim, K. N., Han, M. D., Lee, S. Y., Kim, S. U. and Kang, S. M. : Effect of G009 on lipid peroxidation induced by peroxidizer in rats. *J. Applied Pharmacol.* **4**, 244 (1996).
 - 8) Park, E. J., Kim, K. Y., Kim, J. B., Kim, S. U., Lee, S. Y. and Sohn, D. H. : The antifibrotic effect of polysaccharides extracted from *Ganoderma lucidum* on the experimental hepatic cirrhosis. *Yakhak Hoeji* **38**, 338 (1994).
 - 9) Lee, J. Y., Park, K. S., Chung, J. H., Cho, M. Y., Ko, K. Y., Lee, J. W., Jung, H. and Lee, S. Y. : Effect of G009 on chemical-induced liver damage in rats. *J. Applied Pharmacol.* **2**, 206 (1994).
 - 10) Freshney, R. I. : "Manual of basic technique" in Culture of animal cells. Alan, R., ed. Liss Inc., New York, p 1. (1984).
 - 11) Berry, M. N. and Friend, D. S. : High-yield preparation of isolated rat liver paranchymal cells. *J. Cell Biol.* **43**, 5006 (1969).
 - 12) Berry, M. N., Edward, A. M. and Barritt, G. J. : Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, vol. 21. Elsevier, NY, p. 1 (1991).
 - 13) Lee, M. K., Choi, Y. J., Sung, S. H., Shin, D. I., Kim, J. W. and Kim, Y. C. : Antihepatotoxic Activity of Icarin, a Major Constituent of *Epimedium koreanum*. *Planta Med.* **61**, 523 (1995)
 - 14) Kiso, Y., Suzuki, Y. and Hikino H. : Assay method of antihepatotoxic activity using carbon tetrachloride induced cytotoxicity in primary cultured hepatocytes. *Planta Med.* **49**, 222 (1983).
 - 15) Reitman, S. and Frankel, S. : A colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic and glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin. Pathol.* **28**, 56 (1957).
 - 16) Gerlach U : Sorbitol dehydrogenase. In: Method in Enzymology. NY. Elsevier. p. 761 (1965).
 - 17) McCord, J. M. and Frivich, J. : Superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **244**, 6049 (1969).
 - 18) Habig, W. H., Pabst, M. J. and Jakoby, W. B. : Glutathione-S-transferase. *J. Biol. Chem.* **249**, 7130 (1974).
 - 19) Carlberg, I. and Mannervik, B. : Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *J. Biol. Chem.* **250**, 5475 (1975).
 - 20) Griffith, O. W. : Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinyl pyridine. *Anal. Biochem.* **106**, 207 (1980).
 - 21) Asakawa, T. and Matushita, S. : Thiobarbituric acids test for detecting lipid peroxides. *Lipids* **14**, 401 (1980).
 - 22) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265 (1951).
 - 23) Berger, L. M., Bhatt, H., Combes, B. and Estabrook, R. W. : CCl₄-Induced toxicity in isolated hepatocytes : The importance of direct of solvent injury. *Hepatology* **6**, 36 (1986).
 - 24) Albino, E., Carini, R., Parola, M., Bellomo, G., Goria-Gatti, L., Poli, G. and Dianzani, M. U. : Effects of carbon tetrachloride on calcium homeostasis, a critical reconsideration. *Biochem.*

- Pharmacol.* **38**, 2719 (1989).
- 25) Richard, O. R., Eric, A. G. and Robert, S. B. (1991) Free radical damage and lipid peroxidation. In: *Hepatotoxicology*. Florida, CRC Press, p. 401.
- 26) Prasada, R. S. K. and Harihara, M. M. (1991) Markers for the role of glutathione turnover in hepatotoxicity. In: *Hepatotoxicology*. Florida, CRC Press, p. 302.