황금의 간세포 보호활성 및 cytochrome P450 발현 조절에 관한 연구

하기태 · 정상신 · 김철호[1] · 최달영 · 김준기*

동국대학교 한의과대학 병리학교실, 1 : 성균관대학교 자연과학부 생명과학과

Study on the Hepatoprotective Effect and Cytochrome P450 Regulation of Scutellaria Radix

Ki Tae Ha, Sang Sin Jeong, 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

Carbon tetrachloride (CCl_4)-induced liver injury depends on a toxic agent that has to be metabolized by the liver NAPDH-cytochrome P450 enzyme system to a highly reactive intermediate. Although several isoforms of cytochrome P450 may metabolize $CC1_4$, attention has been focused largely on the cytochrome P450 2E1 (CYP2E1), which is ethanol-inducible. Alternations in the activity of CYP2E1 affect the susceptibility to hepatic injury from $CC1_4$. In this study, the liver protective effect of the hot water extracts of Scutellaria radix (SR) was investigated. The SR exhibited a hepatoprotective activity against CCl_4-induced liver damage in Chang liver cells. The expression of CYP2E1, measured by RT-PCR and Western blot analysis, was significantly decreased by SR treatment in Chang cells. Based on these findings, it is suggested that hepatoprotective effect of SR possibly related to downregulation of CYP2E1 expression.

Key words : Scutellaria radix, carbon tetrachloride, Chang liver cells, cytochrome P450 2E1, hepatoprotective effect

서 론

실험적인 간독성 유발에 흔히 사용되는 사염화탄소(CCl_4)는 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, 지용성 약제나 기타 화합물의 대사에 관여하는 cytochrome P450 특히 2E1 isoform (CYP2E1)에 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[4-6].

본 연구에 사용된 황금(Scutellaria radix)은 순형과의 다년생 초본인 속썩은 풀(Scutellaria baicalensis Georgi)의 뿌리로서[7], 주로 淸熱燥濕, 瀉火解毒하는 작용으로 쓰여지고 있고[8], 약리효과는 해열작용, 염증억제, 이뇨작용, 위액분비 억제 및 항균작용이 있는 것으로 알려져 있다[9]. 최근에는 황금이 약물성 및 담관결찰로 유발된 간장해에 대하여 보호작용이 있으며[10], 황금약침액도 흰쥐의 간세포내에서 항산화효과가 있음[11]이 보고되었다. 또한 김 등[12]은 황금 및 그 구성 flavonoid 성분이 aflatoxin B1의 대사에 관련된 cytochrome P450 isoform의 활성에 영향을 미친다고 보고하였다.

따라서 본 연구에서는 황금 열수추출물을 사용하여 인간 정상 간세포주인 Chang cell을 이용하여 XTT 및 현미경적 관찰과 cultured medium내의 GOT, GPT 활성을 통하여 간보호 효과를 확인하였으며, CYP2E1의 발현에 대하여 RT-PCR과 Western blot analysis으로 실험하였다. 이상과 같이 in vitro에서 황금의 간보호작용에 대하여 실험한 결과 유의한 성적을 얻었기에 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 시료

* 교신저자 : 김준기, 경주시 석장동 707, 동국대학교 한의과대학 병리학교실
· E-mail : graywolf@dongguk.ac.kr, · Tel : 054-770-2650
· 접수 : 2007/11/27 · 채택 : 2008/01/15

실험에 사용된 황금은 충북 제천지방에서 재배한 속썩은 풀(Scutellaria baicalensis Georgi)의 2년근 이상된 뿌리를 채취하여 주피를 벗긴 후 건조한 것으로, 성심한약재(경북 경주)에서 구입하여 동국대학교 본초학교실에서 검증한 후 정선하여 사용하였다. 황금 300 g에 증류수 1.5 ℓ를 넣고 100℃에서 3시간 동안 가열한 후 여과하여 약 650 ml의 전탕액을 얻었으며, 감압농축한 후 동결건조하여 9.2 g의 분말을 얻었으며 (수율 3.06%), 이를 -20℃에 보관하였다가 증류수에 용해시켜 실험에 사용하였다.

2. 세포배양 및 약물처리

In vitro 실험에 사용된 세포주는 human normal hepatocyte cell line인 Chang cell (ATCC cat# CCL-13, USA)을 사용하였다. Chang cell은 Dulbecco's modified essential medium (DMEM, Gibco, USA) 배지에 10% FBS (Gibco), penicillin (100 units/ml, Sigma, USA), streptomycin (100 ㎍/ml, Sigma)과 sodium bicarbonate (3.7 g/l, Sigma)을 첨가하여 collagen coated plate (Iwaki, Japan)에서 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 황금추출물 100 ㎍/ml 처리군으로 하여 농도별로 처리하여 6시간 동안 배양한다. 6시간이 지난 후 배지는 따로 분리하여 1,000 rpm으로 5분간 원심분리하여 cell debris를 제거한 후 -70℃에 보관하였다가 이후의 실험에 사용하였다. 배지를 제거한 plate에 1× phosphate buffered saline (PBS)를 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 96 well cell culture plate (BD Biosciences, USA)에 Chang cell을 5×10^3개 되게 분주하여 37℃, 5% CO_2 조건으로 24시간 동안 배양하였다. 배양액을 교체한 다음 CCl_4와 황금추출물을 여러가지 농도로 처리하고 6시간 배양한 후 0.3 mg/ml XTT (Roche, Germany) 시약을 50 ㎕/well로 처리하여 24시간 동안 배양한 후 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. GOT 및 GPT의 활성측정

GOT 및 GPT 활성측정은 Reitman-Frankel의 방법[13]에 따라 조제된 시약 Kit (아산제약, 서울)를 사용하여 측정하였다. GOT, GPT 기질액 1.0 ml을 시험관에 가하여 37℃에서 5분간 방치한 다음 1,000 rpm으로 5분간 원심하여 cell debris를 제거한 serum free 배양액 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

Total RNA의 분리는 takara사의 catrimox-14™ RNA isolation kit (Takara, Japan)을 사용하였다. 배지를 제거하고 PBS로 2회 washing한 후 -70℃에 보관중이던 cell culture plate에 catrimox-14 buffer 1 ml을 첨가하여 lysis한 후 RNA를 분리하여 0.1% DEPC 처리된 증류수에 1 ㎍/㎕가 되도록 녹여서 실험에 사용하였다. cDNA 합성은 AMV RNA PCR kit (Takara)를 사용하였다. 본 실험에서는 total RNA 1 ㎍을 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 30℃에서 10분간 반응시키고 42℃에서 30분간 annaling시킨 후 99℃에서 5분, 5℃에서 5분간 1 cycle을 실시하였다. 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 멸균된 3차 증류수로 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 elongation시켰다. 각각의 PCR product는 10 ㎕ 씩 1.5% ETBR stained agarose gel 상에서 loading하여 전기영동을 시행하여 분석하였다. PCR 반응을 위한 primer의 sequence는 다음의 Table 1과 같다.

Table 1. The primer sequences of CYP2E1 and β-Actin.

Gene	primer	sequence	product size
CYP2E1	sense	ACCACCAGCACAACTCTGAGATATGG	435 bp
	antisense	CAACTCCATGCGAGCCAGGCCTTCTCC	
β-Actin	sense	CAAGAGATGGCCACGGCTGCT	275 bp
	antisense	TCCTTCTGCATCCTGTCGGCA	

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℃ 12,000 rpm에서 10분간 원심분리를 하여 supernatent만 모아서 -70℃에 보관하였다가 실험에 사용하였다. 단백질의 정량은 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% Tween 20 in TBS)를 이용하여 상온에서 1시간 incubation하여 비특이적인 단백질에 대한 blocking을 실시하였다. TBS-T로 10분간 2회 washing 후 0.5% BSA가 첨가된 TBS-T에 1 : 1,000으로 희석한 anti-CYP2E1 (Chemicon, USA) 및 anti-GAPDH antibody (Santacruz, USA)를 primary antibody로 하여 4℃에서 overnight inbubation하여 항원항체 반응을 일으킨 후, TBS-T로 10분간 2회 washing하고 2차 항체로 0.5% BSA를 첨가한 TBS-T로 1 : 2,000으로 희석한 HRP-conjugated

anti-rabbit 및 anti-mouse IgG (Santacruz)로 상온에서 1시간 incubation한 다음 ECL solution (Amersham, USA)을 사용하여 암실에서 X-ray film에 약 30분간 감광시킨 후 develop하여 단백질의 발현양상을 분석하였다.

7. 실험 성적의 통계처리

실험 결과에 대한 통계적인 분석은 SAS (SAS Institute, USA)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_4 및 황금추출물이 Chang cell의 세포생존율에 미치는 영향

CCl_4와 황금추출물의 Chang cell의 세포생존에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 96 well plate에 Chang cell을 5×10^3의 농도로 분주하여 24시간 배양한 후 XTT 방법에 의하여 세포생존률을 측정한 결과 Fig. 1와 같은 결과를 얻었다.

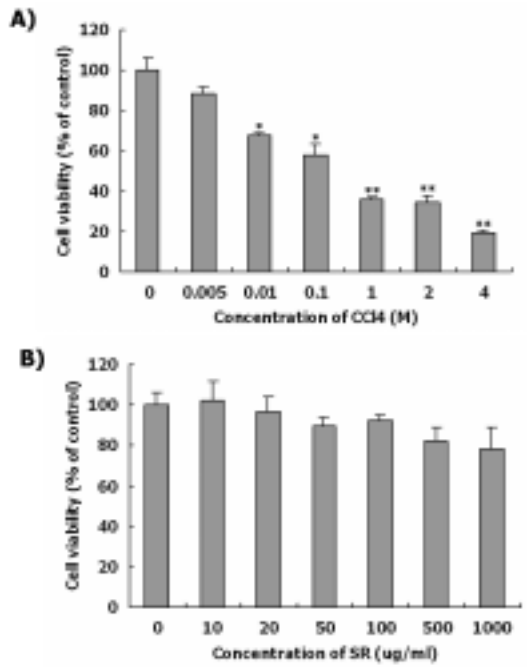

Fig. 1. Dose dependent cell viability of Chang cells by treatment of CCl_4 (A) or SR (B). Cultured cells were exposed various concentration of CCl_4 or SR for 24 hrs, respectively. Cell viability was measured by XTT assay and determined as % of control. (* : P<0.05, ** : P<0.01) Each value represents the mean±SD of 6 wells from three individual experiments.

처리한 CCl_4의 농도에 비례하여 Chang cell의 생존율이 감소하였는데, 특히 CCl_4 100 mM의 농도에서 대략 50%의 생존율을 나타내었다. 따라서 CCl_4에 의한 Chang cell의 세포손상을 유발함에 있어서 100 mM의 농도를 기준으로 사용하였다. 또한 황금추출물의 경우 농도에 비례하여 Chang cell의 생존율이 감소하는 경향을 보였으나 통계적인 유의성은 없었으며, 특히 CCl_4 500 μg/ml의 농도에서도 80% 이상의 생존율을 나타내었다. 따라서 황금추출물 자체에 의한 Chang cell의 세포독성은 거의 없음을 알 수 있으며, 이후의 실험에서는 독성이 거의 없는 것으로 나타난 100 μg/ml의 농도를 기준으로 사용하였다.

2. CCl_4에 의한 Chang cell의 세포사에 대한 황금추출물의 억제효과

황금추출물의 처리가 CCl_4에 의한 Chang cell의 세포사를 억제하는지를 확인하기 위하여, Chang cell을 96 well plate에 5×10^3의 농도로 분주하고, 무처리군, 100 μM의 CCl_4를 처리한 대조군 및 CCl_4와 함께 10, 50, 100 μg/ml의 농도로 황금추출물을 처리한 군으로 나누어 24시간 배양한 후 XTT 방법에 의하여 세포생존률을 측정한 결과 Fig. 2와 같은 결과를 얻었다.

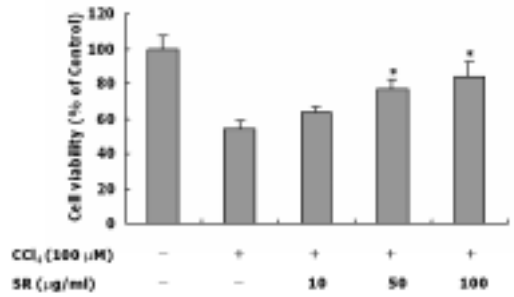

Fig. 2. The effect of SR on CCl_4 induced cell death of Chang cells. Cultured cells were exposed 100 μM of CCl_4 with or without various concentration of SR (10, 50 and 100 μg/ml) for 24 hrs, respectively. Cell viability was measured by XTT assay and determined as % of control. (* : P<0.05) Each value represents the mean±SD of 6 wells from three individual experiments.

무처리군에 비하여 CCl_4만을 처리한 군에서는 세포생존률이 50% 정도로 현저히 감소하였으나, CCl_4와 함께 황금추출물을 처리한 경우 농도의존적으로 세포의 생존율이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 Fig. 3에 나타난 바와 같이 세포의 현미경 사진에서도 동일한 결과를 확인할 수 있었다.

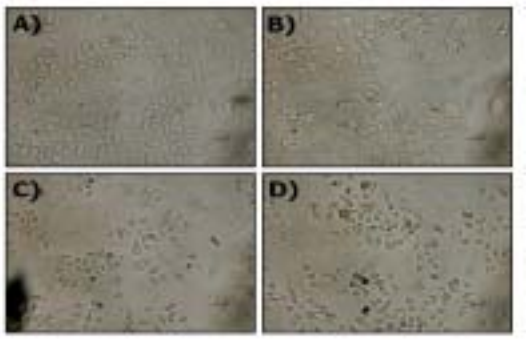

Fig. 3. The microphotographic observation of CCl_4 and SR treated Chang cells. Chang cells were cultured without CCl4 or SR (A), with only 100 μM of CCl_4 (B), with 100 μM of CCl_4 and 50 μg/ml of SR (C) and with 100 μM of CCl_4 and 100 μg/ml of SR (D) for 24 hrs, respectively.

3. Chang cell의 GOT 및 GPT에 대한 황금추출물의 효과

Collagen coated dish에서 10% FBS DMEM, 37℃, 5% CO_2 상태에서 70~80% confluence가 되도록 배양한 Chang cell을 PBS로 2회 washing 후 serum free DMEM으로 교체하고, CCl_4 및 황금추출물을 각각 100 mM 및 100 ㎍/ml 씩 처리하여 6시간 이후에 배지를 분리하여 GOT 및 GPT를 측정하였다. Table 2에 나타난 바와 같이 GOT와 GPT 모두 CCl_4를 처리한 군에서 정상대조군에서 현저히 상승한 것을 확인하였으며, 또한 CCl_4와 함께 황금추출물을 처리한 군에서는 모두 유의한 감소를 나타내었다.

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

	GOT (IU/l)	GPT (IU/l)
Control	4.46±1.5	7.78±4.5
CCl_4 (100 ㎛)	25.04±5.1	39.4±5.4
CCl_4 (100 ㎛) + SR 10 ㎍/ml	18.78±2.7*	24.1±6.3*
CCl_4 (100 ㎛) + SR 50 ㎍/ml	12.04±1.9*	19.21±2.3**
CCl_4 (100 ㎛) + SR 100 ㎍/ml	6.06±1.2**	10.37±4.2**

Each value represents the mean±SD of three individual experiments. * Significantly different from the CCl_4 group (* : $P < 0.05$, ** : $P < 0.01$).

4. Chang cell의 CYP2E1의 mRNA 발현에 대한 황금추출물의 효과

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 황금추출물을 각각 100 mM 및 10, 50, 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, CCl_4만 처리한 대조군에서는 CYP2E1이 매우 높은 농도로 발현하고 있음을 알 수 있다. 또한 CCl_4와 함께 황금추출물을 처리한 군에서는 CYP2E1의 발현이 농도의존적인 감소를 보였다. 이것으로 보아 collagen coated 된 조건에서 배양된 Chang cell에서 CYP2E1은 CCl_4의 처리에 의하여 유전자 발현량이 매우 증가하며, 황금추출물에 의해서 농도의존적으로 유전자 발현이 억제되는 것을 알 수 있다.

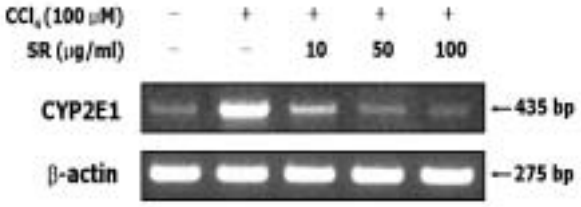

Fig. 4. The CYP2E1 mRNA expression levels of CCl_4 and SR treated Chang cell. Human CYP2E1 (435bp) RT-PCR product was loaded in 0.5% ETBR-stained agarose gel. The templates of the reaction were total mRNAs from the Chang cell which was no treated with CCl_4 as normal control, treated with CCl_4 (100 mM) as positive control, treated with CCl_4 (100 mM) and various concentration of SR (10, 50 and 100 ㎍/ml).

5. Chang cell의 CYP2E1의 단백질 발현에 대한 황금추출물의 효과

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 황금추출물을 각각 100 mM 및 10, 50, 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 정상대조군에서는 CYP2E1 단백질이 낮은 농도로 발현하고 있으나, CCl_4만 처리한 대조군에서는 CYP2E1 단백질이 매우 높은 농도로 발현하고 있음을 알 수 있다. 또한 CCl_4와 함께 황금추출물을 처리한 군에서는 CYP2E1 단백질의 발현이 농도의존적으로 현저히 낮아진 것을 확인할 수 있다(Lane 3).

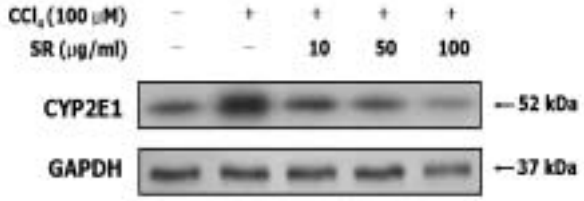

Fig. 5. The CYP2E1 protein expression levels of CCl_4 and SR treated Chang cell. Western blot was carried out by using CYP2E1 specific polyclonal antibody. The sample of the SDS-PAGE were total proteins from the liver of Chang cell which was no treated with CCl_4 as normal control, treated with CCl_4 (100 mM) as positive control, treated with CCl_4 (100 mM) and SR (10, 50 and 100 ㎍/ml).

고 찰

간장해는 담즙분비 장해와 간실질 장해의 2가지로 대별되는데, 실험적인 모델로 담즙분비 장해는 담관결찰을 통한 수술적 방법이 흔히 사용되고 간실질 장해는 사염화탄소(CCl_4), D-galactosamine, thioacetamide ethionine 등을 이용한 독성 동물모형이 흔히 사용되고 있다[14]. 이 가운데 CCl_4는 free radical에 의한 대표적인 세포손상으로서 실험적인 간실질 장해를 유도하기 위해서 많이 사용된다[15]. CCl_4는 원래 간독성이 없는 안정된 유기용매이지만 간세포의 활면 내형질세망(smooth endoplsamic reticulum)에 존재하는 대사효소인 cytochrome P450에 의하여 매우 불안정한 free radical인 CCl_3^-로 전환되어 산화적인 세포손상을 유발한다[16]. CCl_3^-에 의한 산화적 손상은 가장 먼저 세포막에서 시작하는데 세포막의 인지질에 포함된 불포화지방산에서 수소원자를 공여받아 자신은 $CHCl_3$로 변하고 불포화지방산에 여분의 전자를 제공함으로써 지질의 free radical화를 유발하고, 이 radical이 산소와 반응하여 유기 과산화물을 형성한다. 이러한 유기 과산화물은 그 자체가 free radical로 작용하여 새로운 free radical을 형성하게되어 인지질이 지속적으로 과산화된다[17].

세포막의 인지질이 과산화되면 세포막에서 가까운 내형질세망으로 반응이 진행되어 세포내 소기관 중에서 내형질세망의 구조와 기능이 가장 먼저 파괴되는데, 실험적으로 CCl_4 투여 후 30분 이내에 간세포의 단백질 합성이 저하되며 2시간 이내에 전자

현미경으로 내형질세망의 종창과 리보솜의 탈락, 그리고 폴리솜의 해리를 관찰할 수 있다[18,19]. 세포손상이 진행됨에 따라 간세포의 단백질 합성능력이 저하되므로 지질수용 단백질의 합성까지 장애를 받게되면 지질이 내형질세망에서부터 축적되기 시작하여 세포질로 확산된다. 즉 간세포가 tryglyceride를 분비하기 위해서 필요한 지질수용 단백질이 부족하므로 tryglyceride가 결합한 지질단백의 형태를 만들수 없어서 세포질 내에 tryglyceride가 다량으로 축적되어 CCl_4 중독의 특징인 지방간이 된다[20]. 또한 내형질세망의 지질과산화 과정 중에는 작은 조각으로 잘린 비교적 안정된 fatty aldehyde가 생겨나는데, 이 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].

황금(Scutellaria radix)은 순형과의 다년생 초본인 속썩은 풀(Scutellaria baicalensis Georgi)의 뿌리로서 그 해에 새로 돋아난 뿌리는 子芩, 2년 미만의 新根은 條芩, 2년근 이상의 오래된 뿌리는 古芩이라고 분류하는데[7] 본 실험에서는 2년근 이상된 古芩을 사용하였다. 황금은 心, 肝膽, 脾, 大小腸으로 귀경하고 淸熱燥濕, 瀉火解毒하는 효능이 있어서 風熱, 肺熱咳嗽, 風熱, 濕熱瀉痢, 腸癖, 黃疸, 熱淋 등의 질환에 사용되었다[8]. □□傷寒論□□에서 小柴胡湯 및 大柴胡湯 등의 처방에 사용된 이래[22] 黃疸, 肝脹 등의 질환에 사용되었으며, □□東醫寶鑑□□『湯液』篇에서는 五臟補瀉 중 肝에서 "凉用鱉甲・黃芩・黃連・草龍膽・草決明・柴胡・羚羊角"이라고 하여 凉肝하는 주약으로 인식하였다[23]. 또한 약리효과로는 항균소염, 혈압강하, 지질강하, 이뇨작용 및 간기능 개선 등이 있는 것으로 알려져 있다[24]. 최근에는 황금이 약물성 및 담관결찰로 유발된 간섬유화를 억제하는 작용이 있으며[10], 황금약침액이 흰쥐의 간세포내에서 항산화효과가 있음[11]이 보고되었다. 또한 김 등[12]은 황금 및 그 구성 flavonoid 성분이 aflatoxin B1의 대사에 관련된 cytochrome P450 isoform의 활성에 영향을 미친다고 보고하였으며, 황금에서 추출한 flavonoid들이 human liver microsome의 cytochrome P450 효소 특히 1A2 isoform의 활성을 억제하는 것으로 보고되었다[25]. 이러한 보고를 볼 때 황금은 간질환의 치료 및 예방에 효과가 있을 것으로 생각되어 전처리 및 후처리군으로 나누어 본 연구를 진행하였으며, 간보호작용의 기전과 관련하여 cytochrome P450과의 관련성에 대하여 실험하였다.

간세포의 손상을 검사하기 위하여 임상적으로 흔히 혈청내의 GOT, GPT 및 ALP와 같은 효소의 활성도를 검사하는데[21], 본 연구에서는 이러한 효소활성을 in vitro에서 실험하여 간손상의 정도를 간접적으로 측정하였다. 세포실험의 경우에는 CCl_4와 황금추출물의 적정 처리농도를 확인하기 위하여, 세포생존율을 XTT Assay로 검사하여 CCl_4는 100 mM, 황금추출물은 100 μg/ml의 농도를 적정 처리농도로 확인하였다(Fig. 1, 2). 위의 농도로 인간정상간세포주인 Chang cell에 처리하였을 때, CCl_4만을 처리한 군에서 세포배양액에서의 GOT, GPT 활성치가 정상대조군에 비하여 모두 4-5배 정도 상승하였으나, CCl_4와 황금추출물을 동시에 처리한 군에서는 정상과 비슷한 활성치를 나타내어 CCl_4 투여군에 비하여 유의성있는 감소를 나타내었다.

따라서 황금추출물이 CCl_4로 유도된 실험적 간손상에 있어서 간보호활성을 가짐을 확인할 수 있었으며, 그 기전을 확인하기 위하여 CCl_4를 CCl_3^-로 biotransformation하는 효소인 cytochrome P450의 유전자 및 단백질 발현에 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[21,26]. Cytochrome P450에는 여러 가지 다양한 isozyme이 존재하는데, 그 중에서 gene subfamily 1, 2, 3, 4의 isoform이 약물대사와 관련되어 흔히 발현하는 것으로 알려져 있다[27]. 특히 ethanol에 의해서 유도되는 2E1 isoform이 사염화탄소로 인한 간손상에 주로 관여하는 것으로 알려져 있으며[28], 1A1 isoform도 3-methylcholanthrene (MC)와 사염화탄소의 동시투여에서 3-MC의 단독투여보다 더 높은 발현을 보인다는 보고가 있었다[29]. 또한 ergosterol biosynthesis inhibiting fungicides (EBIFs)에 의한 rat의 간독성모델에서 1A1/2 및 3A isoenzyme의 발현이 증가한다는 보고가 있었다[30]. 따라서 본 연구에서는 황금추출물이 사염화탄소를 통하여 유발되는 cytochrome P450 isoform 중 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 황금추출물에 의하여 발현이 감소함을 알 수 있었다(Fig. 4, 5). 이러한 결과는 Wong 등[31]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, 황금추출물이 2E1의 발현을 억제함으로써 간보호작용을 나타내는 것으로 생각할 수 있다.

이상의 결과는 황금은 in vitro에서 간보호활성을 가지고 있으며, 그 기전은 간조직내 CCl_4를 독성라디칼인 CCl_3^-로 전환하는 효소인 CYP2E1의 발현조절과 관련된 것임을 시사한다.

결 론

사염화탄소(CCl_4)로 유발된 간손상 모델을 통하여 황금의 간보호활성 및 사염화탄소의 활성화에 관여하는 효소인 cytochrome P450의 발현조절에 대하여 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻게 되었다. Human normal hepatocyte인 Chang cell을 이용하여 CCl_4 100 mM 및 황금추출물 10, 50, 100 μg/ml의 농도

에서 6시간 배양하였을 때, 세포생존률 및 cultured medium 내의 GOT, GPT 효소활성이 모두 CCl_4만 처리한 군에 비하여 황금추출물을 동시에 처리한 군에서 농도의존적인 감소를 나타내었다. 또한 CYP2E1의 mRNA 및 단백질 발현은 CCl_4만 처리한 군에 비하여 황금추출물을 함께 처리한 군에서 농도의존적으로 감소함을 알 수 있었다. 이상의 결과에서 황금은 CCl_4로 유발된 간손상에 대하여 보호활성이 있음을 확인할 수 있었으며, 그 기전은 CYP2E1의 발현억제와 관련된 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. Srivastava, S.P., Chen, N.Q., Holtzman, J.L. The in vitro NADPH-dependent inhibition by CCl_4 of the ATP-dependent calcium uptake of hepatic microsomes from male rats. Studies on the mechanism of the inactivation of the hepatic microsomal calcium pump by the CCl3. radical. J. Biol. Chem. 265(15):8392-8399, 1990.
7. 辛民敎. 원색임상본초학. 서울, 남산당, pp 308-309, 1986.
8. 李尙仁. 本草學. 서울, 修書院, pp 501-503, 1991.
9. 小學館. 中藥大辭典. 上海科學技術 出版社, p 132, 1985.
10. Nan, J.X., Park, E.J., Kim, Y.C., Ko, G., Sohn, D.H. Scutellaria baicalensis inhibits liver fibrosis induced by bile duct ligation or carbon tetrachloride in rats. J Pharm Pharmacol 54(4):555-563, 2002.
11. 김성일, 김갑성, 도원석. 황금약침액의 흰쥐 간세포내의 항산화 효과에 관한 연구. 대한침구학회지 16(1):497-509, 1999.
12. Kim, B.R., Kim, D.H., Park, R., Kwon, K.B., Ryu, D.G., Kim, Y.C., Kim, N..Y, Jeong, S., Kang, B.K., Kim, K.S. Effect of an extract of the root of Scutellaria baicalensis and its flavonoids on aflatoxin B1 oxidizing cytochrome P450 enzymes. Planta Med 67(5):396-399, 2001.
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. 崔達永, 金俊錡. 傷寒論釋講. 서울, 大星文化社, p 149, 163, 1998.
23. 許浚. 東醫寶鑑. 서울, 南山堂, pp 512-515, 971, 1992.
24. 陳存仁. 圖說漢方醫藥大辭典(I). 東京, 講談社, p 146, 1982.
25. Kim, J.Y., Lee, S., Kim, D.H., Kim, B.R., Park, R., Lee, B.M. Effects of flavonoids isolated from Scutellariae radix on cytochrome P-450 activities in human liver microsomes. J Toxicol Environ Health A. 65(5-6):373-381, 2002.
26. 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.

27. Rogers, J.F., Nafziger, A.N., Bertino, J.S. Jr. Pharmacogenetics affects dosing, efficacy, and toxicity of cytochrome P450-metabolized drugs. Am J Med. Dec 15;113(9):746-750, 2002.
28. Koop, D.R. Oxidative and reductive metabolism by cytochrome P450 2E1. FASEB J. 6(2):724-730, 1992.
29. 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.
30. 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. 16, 48(10):1953-1965, 1994.
31. 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.