

갈조류 유래 알긴산이 HepG2 간세포 독성에 미치는 영향

강남성¹, 표석능¹, 정다혜¹, 음현애¹, 장기효², 엄병헌³, 손은화^{4*}¹성균관대학교 약학부, ²강원대학교 식품영양학과, ³한국과학기술연구원(KIST) 강릉분원 천연물소재연구센터,
⁴강원대학교 생약자원개발학과

Toxic Effects of Sodium Alginate from Brown Algae on HepG2 Human Liver Cell Functions

Nam Sung Kang¹, Suhkneung Pyo¹, Da Hye Jung¹, Hyun Ae Eum¹, Ki Hyo Jang²,
Byung Hun Um³, and Eun Hwa Sohn^{4*}¹College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Suwon, Korea²Department of Food and Nutrition, Kangwon National University, Samcheok 245-711, Korea³Natural Product Research Center, Korea Institute of Science and Technology KIST Gangneung Institute, Gangwon 210-340, Korea⁴Department of Herbal Medicine Resource, Kangwon National University Samcheok 245-711, Korea

Abstract - Alginates are polysaccharides isolated from brown algae with gel-forming properties composed of 1,4-linked beta-D-mannuronic acid (M), alpha-L-guluronic acid (G), and alternating (MG) blocks. In this study, we have examined the toxic effects of high M-alginate to activate HepG2 human liver cells. Alginate enhanced the NO production and iNOS protein expression in HepG2 cells. In addition, alginates stimulated the HepG2 to induce IL-1 release and expression of TGF-beta1, which could influence the liver inflammation and chirrrosis. These findings suggest that high M-alginate form brown algae may have toxic effects on liver cells.

Key words - sodium alginate, liver cells, TGF-beta, IL-1beta, iNOS

서 언

Sodium alginate(이하 alginate)는 β -1,4-linked D-mannuronic acid와 α -1,4-L-guluronic acid가 선상 중합체로 되어 있는 polysaccharide로 주로 미생물이나 해양조류에서 얻어진다. 미생물로부터 얻어지는 polysaccharide가 생체의 면역기능을 증강시키거나 억제된 면역기능을 정상으로 회복시킴으로써 면역조절작용을 나타낸다는 것은 많은 연구결과에 의하여 밝혀진 바 있다 (Seljelid *et al.*, 1989; Pedersen *et al.*, 1992; Krough *et al.*, 1991). 해양조류 갈조류에서 만들어지는 alginate는 β -(1 \rightarrow 4)-D-mannosyluronic acid와 α -(1 \rightarrow 4)-L-gulosyluronic acid의 선상 중합체로 이루어져 있으며 이는 미생물에서 분비하는 alginate와 그 구조가 유사하다.

Schlichtman 등은 *P. aeruginosa*에서 생산되는 alginate 구조에서 mannuronic acid기의 -O acetyl 부분이 neutrophil과 lymphocyte의 기능을 저하시킴으로써 *P. aeruginosa*로 인한 환자의 cystic fibrosis를 더욱 증가시킨다고 보고하였다(Schlichtman *et al.*, 1994). 그러나 해조에서 추출되는 alginate는 mannuronic acid부위에 -O acetyl기를 가지고 있지 않아 구조적인 면에서 미생물이 생산하는 alginate와는 또 다른 새로운 면역학적 효과가 기대된다. 따라서 본 연구에서는 국내 자원이 풍부하여 고부가가치의 기능성 소재로 인식되고 있는 해조류 유래 alginate에 대한 효능 연구를 진행하기로 하였다.

Alginate는 성분비율에 따라 물성-특히 viscosity가 달라진다. 해조에서 추출한 alginate도 추출하는 시기나 종(species)에 따라서, 또는 동일한 종이라도 부위별에 따라서 추출물의 특성이 달라지기 때문에 β -(1 \rightarrow 4)-D-mannosyluronic acid(M)와 α -(1 \rightarrow 4)-L-gulosyluronic acid(G)의 함량

*교신저자(E-mail) : ehson@kangwon.ac.kr

정도에 따라서 크게 high-G alginate와 high-M alginate, MG-alginate로 분류하고 있다.

해조추출물 alginate를 처리한 면역세포 human monocyte에서 inflammatory cytokine- tumor necrosis factor(TNF), interleukine-1(IL-1), interleukine-6(IL-6)-의 생성이 증가하였다는 보고가 있었다(Otterlei *et al.*, 1991). 이 보고에 의하면 특히 cytokine생성을 자극하는 alginate부위는 M 부위이며, G부위는 cytokine의 생성을 자극시키는 효과가 없다고 하였다. 또한 Iizaima-Mizui 등도 alginate가 in vivo system에서 sarcoma 180에 대한 항암효과를 가진다고 보고하였는데 이러한 항암작용을 가진 활성 fraction이 M을 많이 함유한 부분이라 하였다(Iizaima-Mizui *et al.*, 1985). 위의 연구들을 종합해보면, alginate가 가지는 D-mannuronic acid 부위는 면역증강작용을 나타낼 가능성이 매우 크다.

최근에 간은 새로운 제3의 면역기관으로 알려지고 있다. 간세포는 면역세포와는 달리 실질세포(parenchymal cell)임에도 불구하고, 간세포에 대한 외부 자극이 간염증 또는 간 섬유화를 일으킬 수 있는 NO, IL-1, IL-6, TNF- α , TGF- β 등을 분비하고 있기 때문이다(Nagata *et al.*, 2007).

건강식품분야외도 해조물 alginate는 의학분야에서 조직이식 거부반응을 masking하기 위하여 cell을 microencapsulation시키는 matrix로써 사용되고 있다. 간 조직이식술에서도 임상적으로 응용하기 위해 많은 시도가 이루어지고 있으며, 현재는 동물실험이 성공적으로 이루어진 상태다. 실험 단계가 human model로 옮겨가면서 조직이식시에 발생하는 염증 반응이 부작용으로 대두되고 있다(Soon-Shiong *et al.*, 1991). 이에 따라 본 연구는 high-M alginate의 간세포 자극에 대한 독성효과를 확인하고자 human liver cell HepG2 세포를 이용하여 간염증 유발에 주된 역할을 나타내는 NO-iNOS와 IL-1의 증가효과를 확인하고, 간섬유화 진행에 중요한 cytokine인 TGF- β 1의 발현을 mRNA 및 단백질 수준에서의 증가 효과를 확인함으로써, high-M alginate의 간세포에 대한 안전성을 평가하고자 하였다.

재료 및 방법

세포주 및 재료

HepG2(human hepatocellular carcinoma) 세포는 Ameri-

can Type Culture Collection(ATCC, Manassas, VA)에서 구입하여, 10% FBS, 2% penicillin-streptomycin (10,000 U pen/ml, 10,000 μ g strep/ml)을 첨가한 DMEM(GIBCO BRL, Grand Island, NY) 성장배지에 부착 배양하였으며 37°C, 5% CO₂ 조건을 유지하였다. Alginate는 *Macrocystis pyrifera*(Kelp)에서 추출한 sodium salt 형태로(Sigma, A0682) anhydro- β -D-mannuronic acid residue(1 \rightarrow 4)를 가진 친수성 콜로이드 형태의 polyuronic acid이다. Alginate를 Dulbecco's phosphate buffered saline(D-PBS)(Gibco, Grand Island, NY) 용액에 완전히 녹여 0.22 μ m filter에 여과하여 100, 10, 1 μ g/ml 농도로 만들었다. 사용된 시약들은 특별한 언급이 없으면 모두 Sigma사(St Louis, MO)에서 구입하였다.

Nitric oxide 생성량 측정

HepG2 간세포의 독성 정도를 측정하기 위하여 alginate의 처리에 의해 간세포가 분비하는 nitric oxide의 생성량을 측정하였다. HepG2를 96 well plate에 4 \times 10⁴/well이 되도록 분주하고 alginate를 농도별로 20시간 처리하였다. 새 배양액으로 바꾸어 20시간 더 배양한 후, 상층액 100 μ l만을 취하여 새 plate에 옮긴 후 100 μ l Griess reagent를 넣고 10분간 실온에서 방치하였다. ELISA reader를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하고 sodium nitrite의 검량선으로부터 HepG2 세포가 분비하는 nitric oxide를 정량하였다.

Western blot analysis

HepG2 세포를 lysis하여 30 μ g의 단백질을 얻은 후, Bradford's protein assay법으로 단백질을 정량하였다(Bradford, 1976). 동일한 양의 단백질을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE) gel에 전기 영동한 후 PVDF membrane으로 Tank-type transfer unit을 이용하여 transfer 하였다. Protein이 옮겨진 membrane은 1시간 동안 상온에서 blocking buffer (5% skim milk와 0.1% Tween-20을 함유한 TBST용액)를 처리한 후 각 검증 단백질에 대한 1차 항체(anti-iNOS, anti-TGF-beta1)를 가하여 1~2시간 동안 반응시켰다. 이어 0.1% Tween20을 함유한 TBST용액으로 10분간 3회 이상 세척 후 2차 항체(HRP-conjugated anti-IgG antibody)를 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 다시 3회 이상

세척 후에 detection reagent(AmershamTM)를 가한 후 Kodak scientific imaging film(Biomax Light)에 노출시켜 각 protein의 발현량을 확인하였다.

RT-PCR

TRIzol reagent(Invitrogen Co., Carlsbad, CA)를 이용하여, total RNA를 세포로부터 제조사의 방법에 따라 분리하였다. 분리된 total RNA를 정량한 뒤, 다음과 같은 TGF- β 1(TGF- β 1, sense: GCCCTGGACACCAAC TATTGCT, antisense: AGGCTCCAAATGTAGGGCAGG)의 primer를 이용하여 RT-PCR를 실시하였다. 먼저 1 μ g total RNA, 1 mM dNTP mix, 50 ng/ml Oligo(dT)12-18, DEPC-treated water를 10 μ l가 되도록 혼합하였으며

65°C에서 5분간 반응한 후 4°C에서 2분간 방치하였다. 여기에 2 μ l의 10X RT buffer, 4 μ l의 25 mM MgCl₂, 1 μ l의 100 mM DTT와 1 μ l의 RNaseOUTTM Recombinant RNase Inhibitor를 첨가하여 혼합한 후 42°C에서 2분간 반응시켰다. 그 다음 1 μ l(50 units)의 SuperScriptTM II RT를 첨가한 후 42°C에서 50분간 추가 반응시킨 다음 70°C에서 15분간 방치하여 반응을 종료하였다. 여기에 1 μ l의 RNase H를 각 시료에 첨가하고 37°C에서 20분간 반응하여 template mRNA를 제거하였으며, 생성된 cDNA mixture의 2 μ l를 PCR 반응에 이용하였다. 이때 각각의 RT-PCR에서 동량의 RNA가 사용되었음을 확인하기 위하여 house keeping gene인 β -actin에 대한 RT-PCR을 함께 진행하였다.

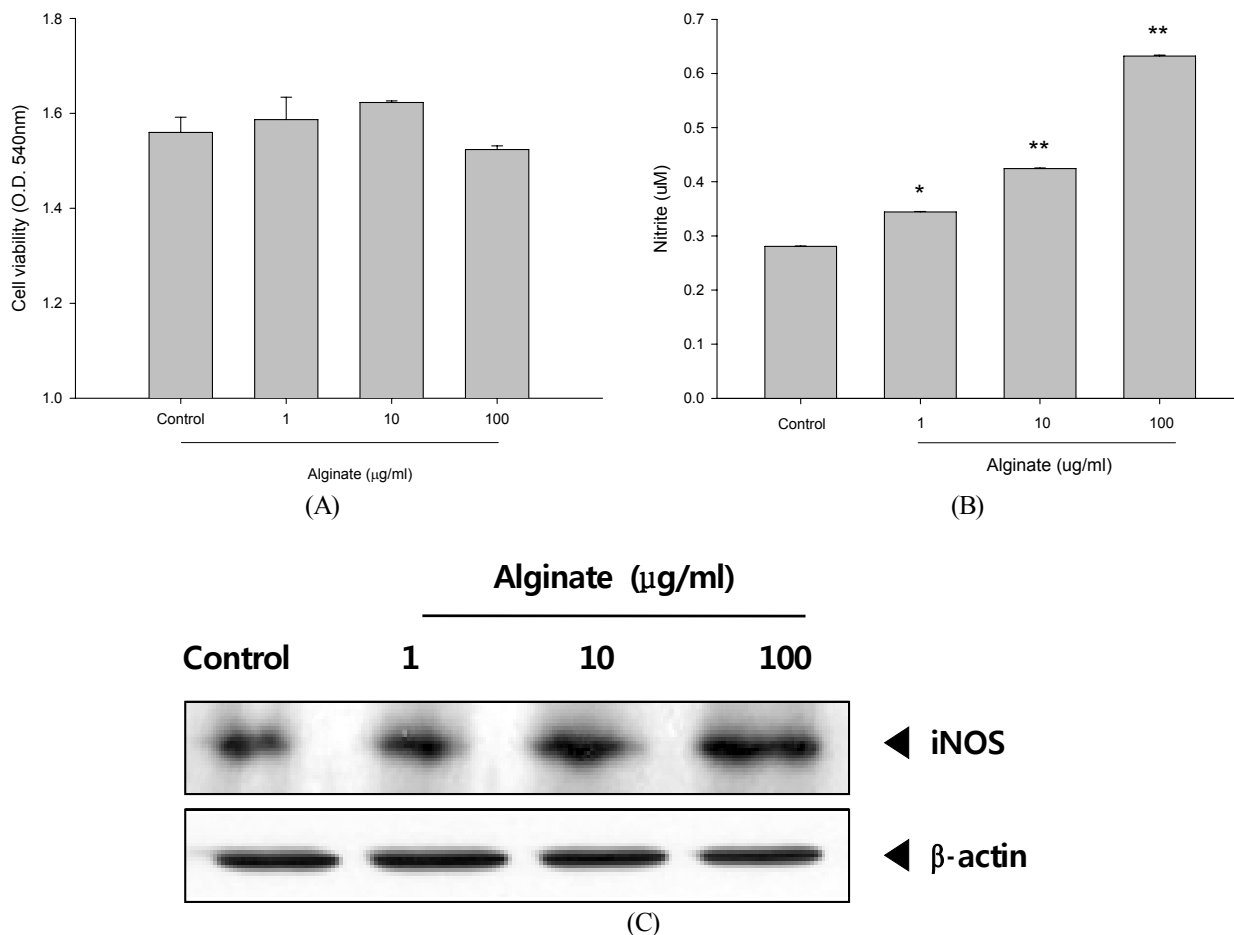


Fig. 1. Effects of alginate on viability of HepG2 cells (A), production of nitrite (B) and expression of iNOS in HepG2 cells (C). HepG2 (4×10^4 cells/well) were treated with various concentration of alginate for 20hrs. Cultured supernatants were collected and the levels of nitrite were measured as described in materials and method. These data represents the mean \pm SE of quadruplicate experiments. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$; significantly different from the control (no treatment). Cell lysates were prepared and subjected to western blotting with anti-iNOS antibody. These data shown are representative of three independent experiments.

IL-1β 분비량 측정

Alginate를 농도별로 처리하고 20시간 배양한 HepG2 상층액을 모아서 Interleukin-1[(h)IL-1] human, ELISA system(Amersham Life Science, England)을 이용하여 IL-1β의 분비량을 측정하였다. IL-1 측정방법은 IL-1β에 대한 항체가 코팅된 microtitre plate에 biotinylated antibody 50 μl를 넣은 다음 세포배양 상층액을 50 μl 넣은 후 실온에서 2시간 방치한 다음 세척하였다. 이어 streptavidine-HRP 용액 100 μl를 넣고 실온에서 30분간 방치한 다음 TMB substrate 용액 100 μl를 추가하여 반응시킨 후 정지용액을 넣고 450nm에서 흡광도를 측정하고 표준곡선을 작성하여 IL-1β 농도를 산출하였으며, 세 번 반복실험을 실시하였다.

통계분석

실험 결과는 3회 반복하였으며, 가장 대표적인 실험결과를 평균 ± 평균오차(mean ± S.E.)로 나타내었고, 유의수준은 *p<0.05와 **p<0.01로 Student t'-test를 실시한

결과를 표시하였다

결과 및 고찰

NO 분비 및 iNOS 발현에 미치는 영향

iNOS 유전자는 패혈증이나 출혈성 속을 포함하는 많은 간질환에 있어서 높게 발현된다(Wang *et al.*, 2001; Zamora *et al.*, 2000). 따라서 iNOS 단백질과 NO 분자는 다양한 형태의 간손상을 일으키는 물질로 알려지고 있다. iNOS의 발현은 허혈성 손상에 대한 간의 산화적 손상을 일으키는 원인으로 보고되고 있으며(Hierholzer *et al.*, 1998), NO는 간질환을 유발하는 second messenger로서의 역할도 보고되고 있다(Hartsfield, 2002). 본 연구에서는 alginate가 HepG2 간세포에 영향을 미치는 독성효과를 알아보기 위하여 NO 및 iNOS 조절을 측정하였는데, 세포독성을 나타내지 않는 농도 범위에서 NO 분비의 증가와 iNOS의 발현 증가를 나타내었다(Fig 1). NO 및 iNOS의 발현이 농도의 존적으로 증가하였으며, 이는 alginate가 iNOS-NO system

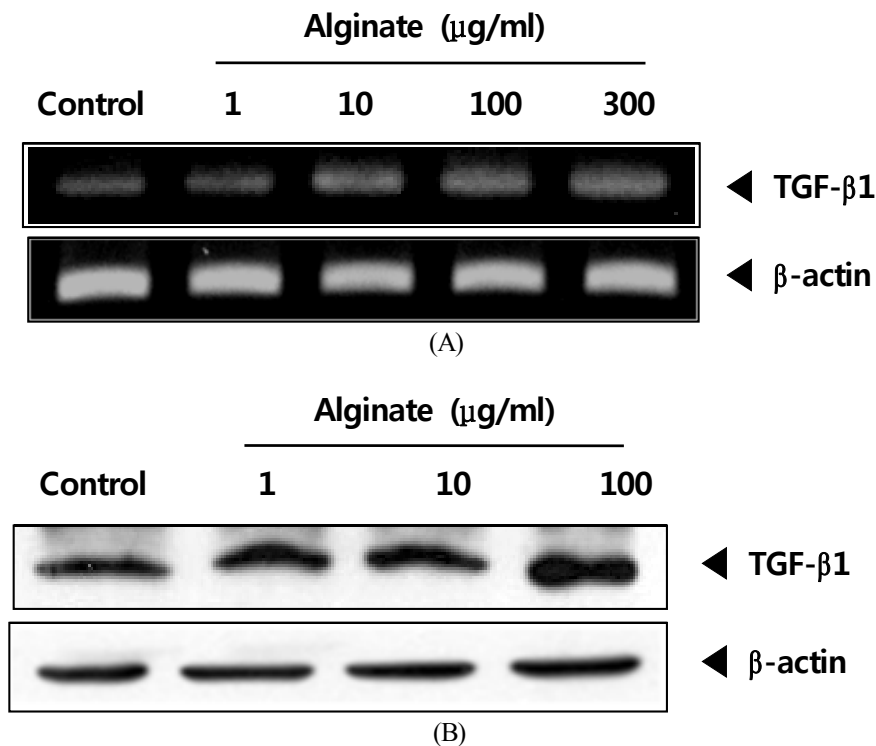


Fig. 2. Effects of alginate on TGF-β mRNA (A) and protein (B) synthesis levels in HepG2 cells. HepG2 cells were treated with alginate for 20hrs. Total RNA was extracted and subjected to reverse transcription polymerase chain reaction analysis. Cell lysates were prepared and subjected to western blotting with anti-TGF-β antibody. These data shown are representative of three independent experiments.

을 자극하는 것으로 사료된다.

TGF-β1의 발현에 미치는 영향

최근에 간세포는 면역세포와 같이 다양한 cytokine을 분비하는 세포로 알려지고 있으며, 이러한 cytokine은 간손상에 있어서 중요한 요소로 인식되고 있다(Nagata *et al.*, 2007). 특히 간섬유화 및 간경화를 일으키는 주된 profibrotic cytokine으로 TGF-β가 알려지고 있는데, 간세포에 증가된 TGF-β의 증가는 간을 이루는 stellate cell을 활성화하여 collagen을 과도하게 생성하게 되며 결국 간섬유화 및 간경화를 일으키게 된다(McClain *et al.*, 2004; Blobe *et al.*, 2000). 본 연구결과에 의하면 alginate는 HepG2 간세포를 자극하여 TGF-β의 분비를 증가시켰다. Fig. 2에서 나타내는 바와 같이 TGF-β1의 mRNA 및 단백질의 발현량을 농도 의존적으로 모두 증가시켰다.

IL-1 분비에 미치는 영향

Interleukin-1beta(IL-1β)는 간염증을 포함한 다양한 염증반응에 관여하는 중요한 cytokine이며 iNOS 유전자 발현에도 관여한다고 알려져 있다(Geller *et al.*, 1994; Taylor *et al.*, 1998). 본 연구에서는 NO-iNOS system을 자극하는 alginate가 IL-1β 분비 조절에도 관여하는지

와 이들의 상관 관계를 알아보려고 IL-1β를 측정하였으며, Fig. 3에서 나타낸 바와 같이 IL-1β를 유의적으로 증가시켰다. 그러나 alginate가 NO-iNOS system의 활성을 농도 의존적으로 증가시키는 것에 비하여, IL-1β는 저농도 1 μg/ml에서 가장 높은 농도로 분비되고, 10, 100 μg/ml 농도에서는 그보다 감소되는 양상으로 보아 alginate에 의한 IL-1β의 분비와 NO-iNOS system의 자극에는 상관성이 없는 것으로 보인다.

적 요

갈조류 유래 alginate 성분은 간식술에 있어서 cell microencapsulation시키는 matrix로써 임상적인 응용이 시도되고 있다. 이에 본 연구에서는 alginate의 간세포에 대한 안전성을 평가하기 위하여, 간세포를 자극하는 NO, iNOS, TGF-β1, IL-1β의 분비 및 발현량을 측정하였으며, 실험 결과 모두 증가시켰다. Alginate가 간세포를 자극하여 이러한 요소들을 증가시키는 것은 간염 및 간섬유화 등의 간질환을 일으킬 수 있다는 가능성을 제시하고 있으며, 이러한 결과는 간에 적용하는 alginate를 사용시에는 안전성이 요구되는 농도 조절 및 alginate의 자극 효과를 억제할 수 있는 새로운 재료의 첨가 등에 대한 고려를 제시할 수 있을 것으로 사료된다.

사 사

본 연구는 지식경제부 지방기술혁신사업(RTI05-01-02) 지원으로 수행되었음

인용문헌

- Blobe, G.C., Schieman, W.P. and Lodish, H.F. 2000. Role of transforming growth factor-β in human disease. *N. Engl. J. Med.* 342:1350-1358.
- Bradford, M.M. 1976. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.
- Geller, D.A., Freeswick, P.D., Nguyen, D., Nussler, A.K., Di Silvio, M., Shapiro, R.A., Wang, S.C., Simmons, R.L. and Billiar, T.R. 1994. Differential induction of nitric oxide

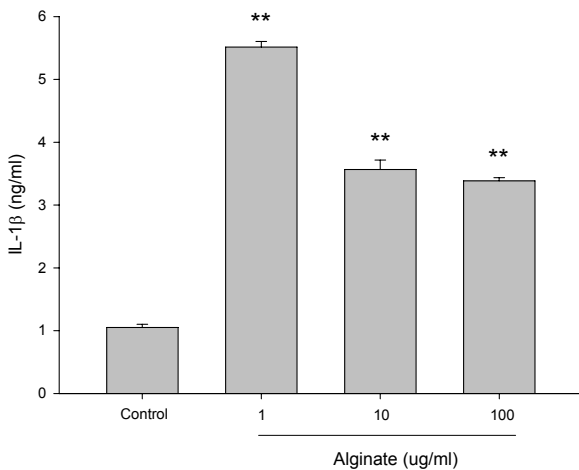


Fig. 3. Effects of alginate on IL-1β production in HepG2 cells. HepG2 Cells (4×10^4 cells/well) were treated with various concentration of alginate for 20hrs. Cultured supernatants were collected, and the levels of IL-1β were measured by ELISA. The results are presented as the means \pm SE. ** $p < 0.01$; significantly different from the control (no treatment). The experiments were repeated twice.

- synthase in hepatocytes during endotoxemia and the acute-phase response. *Arch. Surg.* 129:165-171.
- Hartsfield, C.L. 2002. Cross talk between carbon monoxide and nitric oxide. *Antioxid. Redox. Signal.* 4:301-307.
- Hierholzer, C., Harbrecht, B., Menezes, J.M., Kane, J., MacMicking, J., Nathan, C.F., Peitzman, A.B., Billiar, T.R., and Tweardy, D.J. 1998. Essential role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after hemorrhagic shock. *J. Exp. Med.* 187:917-928.
- Iizima-Mizui, N., Fujihara, M., Himeno, J., Komiyama, K., Umezawa, I. and Nagumo, T. 1985. Antitumor activity of polysaccharide fraction from the brown seaweed *Sargassum Kjellmanianum*. *Kitasato. Arch. Exp. Med.* 58:59-65.
- Krough, J., Hoiby, H., Stenvang, N. and Pedersen, S. 1991. Experimental immunization with *Pseudomonas aeruginosa* alginate induces IgA and IgG antibody response. *APMIS.* 99(12):1061-1068.
- McClain, C.J., Song, Z., Barve, S.S. and Hill, D.B. and Deaciuc, I. 2004. Recent advances in alcoholic liver disease: dysregulated cytokine metabolism in alcoholic liver disease. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 287:G497-502.
- Nagata, K., Suzuki, H., Nagata, K., Suzuki, H., Sakaguchi, S., Sakaguchi, S. 2007. Common pathogenic mechanism in development progression of liver injury caused by non-alcoholic or alcoholic steatohepatitis. *J. Toxicol. Sci.* 32(5):453-468.
- Otterlei, M., Østgaard, K., Skjak-Braek, G., Smidsrod, O., Soon-Shiong, P. and Espevik, T. 1991. Induction of cytokine production from human monocytes stimulated by alginate. *J. Immunother.* 10:286-291.
- Pedersen, S.S., Moller, H., Espersen, F., Sorensen, C.H., Jensen, T. and Hoiby, N. 1992. Mucosal immunity to *Pseudomonas aeruginosa* alginate in cystic fibrosis. *APMIS.* 100(4):326-334.
- Schlichtman, D., Kavanaugh-Black, A., Shankar, S. and Chakrabarty, A.M. 1994. Energy metabolism and alginate biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*; Role of the tricarboxylic acid cycle. *J. Bacteriol.* 176(19):6023-6029.
- Seljelid, R. 1989. Tumor regression after treatment with aminated β 1-3D polyglucose is initiated by circulatory failure. *Scand. J. Immunol.* 29:181-188.
- Soon-Shiong, P., Otterlei, M., Skjak-Braek, G., Smidsrod, O., Heintz, R., Lanza, R.P. and Espevik, T. 1991. An Immunologic basis for the fibrotic reaction to implantation microcapsules. *Transplant. Proc.* 23:758-759.
- Taylor, B.S., de Vera, M.E., Ganster, R.W., Wang, Q., Shapiro, R.A., Morris Jr., S.M., Billiar, T.R. and Geller, D.A. 1998. Multiple NF-kappaB enhancer elements regulate cytokine induction of the human inducible nitric oxide synthase gene. *J. Biol. Chem.* 273:15148-15156.
- Wang, Y., Vodovotz, Y., Kim, P.K.M., Zamora, R. and Billiar, T.R. 2001. Mechanisms of hepatoprotection by nitric oxide. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 962:415-422.
- Zamora, R., Vodovotz, Y. and Billiar, T.R. 2000. Inducible nitric oxide synthase and inflammatory diseases, *Mol. Med.* 6:347-373.

(접수일 2010.2.17; 수락일 2010.4.16)