

작약에 의해 유도되는 HSP72 및 HO-1 유전자의 간독성 보호 효능

오수영 · 이지선 · 서상희 · 김태수 · 마진열*

한국한의학연구원

Paeonia lactiflora Pall Prevents H₂O₂-induced Hepatotoxicity by Increasing HSP72 and HO-1

Su Young Oh, Ji Seon Lee, Sang Hee Seo, Tae Soo Kim, Jin Yeul Ma*

Center for Herbal Medicine Improvement Research, Korea Institute of Oriental Medicine (KIOM)

In Korea, China, and Japan, *Paeonia lactiflora* Pall (PL) has been used in the treatment of rheumatoid arthritis, hepatitis, and fever for more than 1200 years. It has been reported that PL has protective effects against H₂O₂-induced oxidative stress and LPS-induced liver inflammation. However cellular and molecular mechanism of PL protection against oxidative stress has not fully been elucidated. Here, we describe that the water-soluble extract of PL decreased H₂O₂-induced hepatotoxicity. This hepatoprotective effect of PL is reason to decrease the level of intracellular reactive oxygen species (ROS) and increase expression of heme oxygenase 1 (HO-1) and heat shock protein 72 (HSP72) which proteins are involved in protecting the cells from stress like as oxidative stress. We also elucidated that hepatoprotective effect of PL was abolished by knock down of HO-1 and HSP72 by siRNA. These results suggest that the increasing of HO-1 and HSP72 protein by PL treatment might be participated in hepatoprotective effect against oxidative stress such as H₂O₂.

Key words : *Paeonia lactiflora* Pall, hydrogen peroxide, heme oxygenase-1, heat shock protein 72

서 론

작약은 미나리아재비목 미나리아재비과의 쌍떡잎식물의 약용식물이다. 사용되는 작약의 뿌리는 한방에서 귀중한 약재로 취급되고 있다. 꽃의 색깔에 따라 백작약 및 적작약으로 나뉘기도 한다. 작약은 한방에서 주로 빈혈 치료와 진통제, 부인병, 염증치료제, 혈압과 해열제로 이용되고 있는데, 작약의 구성성분 중, paeoniflorin, albinoflorin, benzolypaeoniflorin 등의 monoterpene glucoside에 의해 이와 같은 약리 작용이 나타나는 것으로 알려져 있다^{1,2)}. 최근 이들 물질에 대한 세포내 기작에 대해 활발한 연구가 이루어지고 있다. Paeoniflorin의 경우 heat shock protein 72 (HSP72)와 같은 샤페론 단백질의 발현을 증가 시킴으로써 스트레스에 대한 방어기작을 유도하거나³⁾, amyloid beta에 의해 유도되는 신경세포의 독성을 억제한다고 알려져 있

다⁴⁾. 적작약의 경우, heme oxygenase-1 (HO-1)의 발현을 증가시켜서 lipopolysaccharide (LPS)에 의한 폐 손상을 억제한다고 발표되었다⁵⁾.

작약은 활성산소에 대한 항산화 효능을 가지고 있는 것으로 알려져 있는데^{1,6)}, 유해산소라 불리는 활성산소는 산소라디칼 (oxygen free radical) 및 이것으로부터 파생된 산소화합물을 의미한다. 활성산소는 쌍을 이루고 있지 않는 전자를 가지고 있어서 다른 분자들과의 화학반응을 쉽게 일으킬 수 있는데, 이와 같은 큰 반응성으로 인해 생체 조직을 공격하여 DNA, 단백질, 효소 및 T 세포와 같은 면역체계에 관여하는 세포 혹은 인자들을 손상시켜 여러 가지 질환을 일으킨다. 최근 연구결과에 의하면, 작약은 신경세포에서 과산화수소에 의해 유도되는 세포사멸을 억제한다고 발표되었다⁷⁾. 작약 추출물이 간조직의 콜레스테롤 함량을 현저히 감소시키고¹⁾, 고콜레스테롤 식이 흰쥐 간조직의 항산화계를 증가시키고 지질 과산화물 수준을 감소시키는 것으로 알려졌다⁶⁾. 아울러 작약을 전 처리함으로써 tert-butyl hydroperoxide (t-BHP)에 의한 항산화 효소계의 활성 저하를 억

* 교신저자 : 마진열, 대전시 유성구 전민동 엑스포로 483, 한국한의학연구원

· E-mail : jyuma@kiom.re.kr, · Tel : 042-868-9466

· 접수 : 2011/09/09 · 수정 : 2011/09/27 · 채택 : 2011/10/04

제시킴으로서 t-BHP에 의한 간세포의 괴사에 대해 보호효과가 있음이 발표되었다⁸⁾.

이와 같이 작약의 간 손상에 대한 보호 효과가 여러 연구를 통하여 보고되고 있으나, 간 보호 효과에 대한 항산화 효능 이외의 메카니즘은 밝혀지지 않았다. 따라서 본 연구에서는 흰쥐에서 분리한 간세포를 이용하여 활성산소인 과산화수소에 대한 작약의 간 보호 효능의 기작을 연구하고자 하였고, 그 결과, HO-1와 HSP72 유전자의 관련성에 대한 유의한 결과를 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험동물 및 사육환경

실험에 사용된 동물은 수컷 ICR 마우스 (오리엔트 바이오, 경기도 성남시 중원구 상대원동 143-1) 5주령을 사용하였으며, 일주일간 시험을 실시하는 동물실에서 순화시키고 일반 임상증상을 관찰하여 건강한 동물을 사용하였다. 실험은 실험동물윤리위원회의 승인을 거쳐 이루어졌으며, 순화 및 실험기간 동안의 사육환경은 온도 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 환기횟수는 시간당 12~16회, 조명은 12시간 명암주기 (점등 7:00, 소등 19:00), 조도는 150~300 Lx로 조정하여 일정한 사육환경 조건을 유지하였다. 그리고 실험동물용 고형사료 (PMI nutrition, USA)와 물은 자유 섭취 조건으로 하였다.

2. Hepatic primary 세포 배양

Berry와 Friend의 방법을 변형하여 다음과 같이 실시하였다. ICR 마우스에 쥘레틸과 림폰을 복강 내로 주사하여 마취한 후 개복하였으며, 간문맥에 24 gauge catheter를 삽관하여 Krebs-Ringer-HEPES 완충용액으로 관류시키고 collagenase (sigma, USA)로 구성된 소화용액을 순환 시켰다. 간막을 벗겨 간세포가 유리시킨 후 nylon mesh를 사용하여 여과하였다. 여과액은 400 rpm에서 3분간 원심분리 한 후 상등액을 버리고 침전된 간세포를 BSA (sigma, USA)가 포함된 완충용액에 현탁시켜 다시 원심 분리하였다. 침전된 간세포를 배양액에 다시 현탁시켜 세포 현탁액을 얻은 뒤, 간세포 농도가 2×10^6 cells/ml이 되도록 조절하여, gelatin으로 미리 도포된 배양용기에서 배양하였다. 배양액은 10% FBS (Hyclone), 500 U/ℓ insulin (Roche, Switzerland), 2 mM L-glutamine (Lonza), 15 mM HEPES (Lonza, Switzerland), 10^5 U/ℓ penicillin, 100 mg/ℓ streptomycin (Gibco, USA)를 포함하는 William's E media (Gibco)를 사용하였으며, 일정한 온도와 습도가 유지되는 37°C 배양기에서 CO₂ 5%의 혼합기체를 공급하여 배양하였다.

3. 시료의 추출 및 제조

본 실험에서 사용한 작약은 영천현대약업사 (경북 영천시 완산동 925-15)에서 구입하였다. 전탕추출법 (한국, 경서추출기 cosmos-660)에 의한 시험물질 조제를 실시하였으며 16.7 리터의 생수 (화이트, 경남 산청군 삼장면 덕교리 800)에 1 시간 동안 침

적시킨 다음 180 분간 열탕 추출하였고, 동결건조기 (한국, 일신 FD5512)를 사용하여 분말 형태로 조제하였다.

4. MTT assay

작약 열추출물을 1시간동안 전처리 한 후 세포에 과산화수소를 1 mM로 처리하고 24 시간 배양 후 MTT 시약을 첨가하여 30 분 배양하였다. 배양액을 제거한 후 배양접시의 각 well에 DMSO를 150 μℓ씩 첨가하여 10 분정도 흔들어 준 뒤 ELISA reader를 이용하여 wave length 570 nm에서 흡광도를 측정한다.

5. DNA fragmentation

작약 열추출물을 1 시간동안 전 처리 한 후 세포에 과산화수소를 1 mM로 처리하고 24 시간 배양 후 Wizard® Genomic DNA Purification Kit (promega)를 이용하여 genomic DNA를 확보하여 1% agarose gel에서 전기영동 하였다.

5. ALT, AST와 LDH assay

ALT, AST 및 LDH의 측정은 세포 독성이 유도된 간세포의 배양액을 취하여 측정하였다. ALT, AST의 활성은 ChemiLab ALT and AST assay kits (IVD Lab Co. Ltd. Korea)를 사용하여 제공된 시험방법에 준하여 측정하였고, LDH는 Cytotoxicity detection kit (Roche Diagnostics GmbH, Germany)를 사용하여 Colorimetric assay 방법으로 측정하였다.

6. 세포내 활성산소 측정

세포에 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCF) (Invitrogen) 용액을 첨가하여 30 분간 처리하였다. 이후, 트립신으로 세포를 원심분리기를 사용하여 분리한 뒤, PBS 300 μℓ에 현탁한 세포를 이용하여 FACS analysis (BD Immunocytometry Systems)를 실시하였다.

7. PCR 과 real time PCR

Total RNA를 easy-spin™ Total RNA Extraction Kit (intron)을 이용하여 분리한 후, Qiagen Omniscript RT kit를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 프라이머 (actin-F, tggaaatcctgtggcatcatgaaa; actin-R, taaaacgcagctcagtaacagccg; CAT-F, ctctgttccctgcaatcag; CAT-R, gtgcagcagtaatcaccaag; SOD-F, ggacctcatttaactcactctaag; SOD-R, tgcccaggctccaacatg; GPx-F, tctcgagatacctgtgaactg; GPx-R, tagtcagggtggagctcagtg; HO-1-F, aacaagcagaaccagctct; HO-1-R, tgrcatctccagagtgttc; HSP72-F, accaacgacaagggcgcct; HSP72-R, actgtccagcacttcttc)를 사용하여 94°C 10분, [94°C (10초), 50°C (20초), 72°C (30초)] * 40 cycles 분의 조건으로 real time PCR (Eco™ Real-Time PCR System, Illumina)을 진행하였다.

8. Western blotting

세포에 PRO-PREPT™ Protein Extraction Solution (intron)을 처리하여 단백질을 확보하고, 12% SDS-PAGE를 진행하였다. 이

들을 nitrocellulose membrane으로 transfer 한 후 actin 및 HO-1에 대한 항체 (santacruz)와 HSP72 (stressgen) 항체를 이용하여 western blotting을 수행하였다.

9. siRNA transfection

HO-1 및 HSP72에 대한 siRNA (Bioneer)를 마우스 일차 간세포에 HiPerFect Transfection Reagent (Qiagen)을 이용하여 transfection 시켰다.

결 과

1. Cell viability assay 및 DNA fragmentation 확인

과산화수소에 의한 세포 독성이 작약의 전 처리에 의해 감소되는지 MTT assay 방법으로 세포생장률을 확인하였다. 작약 열추출물을 1 시간동안 마우스의 일차 간세포에 전 처리 한 후 1 mM의 과산화수소를 24 시간동안 처리하였다. Fig. 1에서 보이는 것처럼 과산화수소 단독 처리한 경우, 약 20%의 성장률을 보이지만 작약 열추출물을 처리하였을 경우 농도 (µg/ml) 의존적으로 세포 성장률이 증가되었다. 300 µg/ml의 농도에서 가장 높은 성장률을 확인하였고, 따라서 이후 실험에서는 300 µg/ml의 작약 열추출물로 실험을 진행하였다.

과산화 수소에 의한 세포사멸을 작약 열추출물을 전 처리하였을 경우 억제되는지 확인하기 위하여 DNA fragmentation을 진행하였다. 작약 열추출물을 1 시간 전 처리 한 후 1 mM의 과산화수소를 24 시간동안 처리한 후 genomic DNA를 확보하고 전기영동 한 결과, 작약 열추출물을 전 처리한 샘플의 DNA fragmentation이 과산화수소 단독처리한 경우에 비해 현저히 감소되어 있음을 확인하였다(Fig. 2).

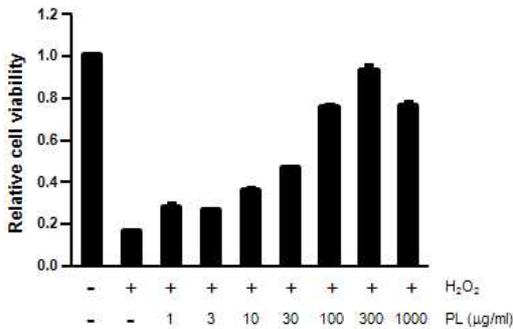


Fig. 1. The protective effect of PL on H₂O₂-induced cell death. in primary mouse hepatocyte. Cells were pretreated with PL (1 to 1000 µg/ml) for 1 h and then added 1 mM H₂O₂. After 24 h, cell viability was measured by MTT assay.

2. 세포독성 검사

작약 열추출물을 전 처리 하였을 경우, 과산화수소로 유발되는 간세포의 독성이 감소되는지 확인하였다. 마우스의 일차 간세포에 작약 열추출물을 1 시간동안 전 처리하고 과산화수소를 4 시간동안 처리한 후 세포 배양액을 수거하여 간세포 독성 및 세포독성의 지표인 ALT, AST 및 LDH의 량을 조사하였다(Fig. 3).

그 결과, 작약 열추출물을 전 처리한 샘플군에서 과산화수소로 인한 ALT, AST 및 LDH의 발생량이 감소됨을 알 수 있었고, 이러한 결과는 작약 열추출물이 과산화수소로 인해 발생하는 간세포 독성을 감소시킴을 나타낸다.

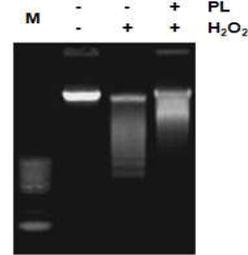


Fig. 2. The inhibitory effect of PL on H₂O₂-induced apoptosis in hepatic primary cells. H₂O₂-induced apoptotic event were detected by DNA fragmentation. Cells were pretreated with PL (300 µg/ml) for 1 h and then treated with 1 mM H₂O₂ for 24 h, after which cellular DNA was analyzed by agarose gel electrophoresis and ethidium bromide staining, Lane M: molecular size standard.

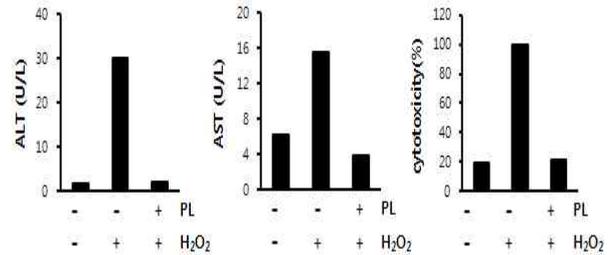


Fig. 3. PL decreases levels of secreted ALT, AST and LDH in hepatic primary cells. Cells were pretreated with PL (300 µg/ml) for 1 h and then treated with 1 mM H₂O₂ for 4 h. ALT, AST and LDH levels were measured in cultured media.

3. 활성산소 생성 조사

작약 열추출물의 활성산소 물질의 생성 억제효과를 확인하기 위하여 마우스의 일차 간세포에 열추출물을 전 처리한 후 과산화수소를 4 시간 동안 처리하였고 FACS를 이용하여 세포내 활성산소의 발생량을 측정하였다. 그 결과, 과산화수소에 의해 유발되는 활성산소는 작약 열추출물의 전 처리에 의해 현저히 감소되는 것을 알 수 있었다(Fig. 4).

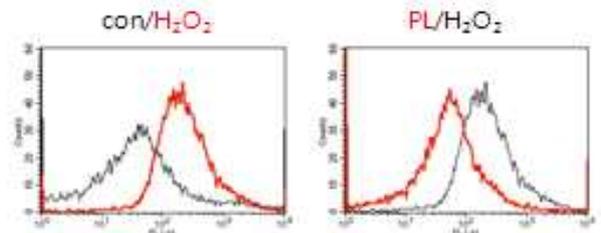


Fig. 4. The inhibitory effect of PL on H₂O₂-induced intracellular ROS. Hepatic primary cells were pretreated with PL (300 µg/ml) for 1 h and then added with 1 mM H₂O₂. After 4 h, cells were incubated with DCF and analyzed by FACS to detect intracellular ROS levels.

4. 항산화제 효소 유전자의 발현 조사

작약 열추출물이 과산화수소에 의한 활성산소의 억제와 함께 항산화제 효소의 발현을 조절하는지 확인하기 위하여, real time PCR 방법으로 catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) 및 superoxide dismutase (SOD) 유전자 발현을 확인하였다. 마우스 일차 간세포에 작약 열추출물을 1 시간동안 전 처리 후 과산화수소를 4 시간동안 처리한 후 total RNA를 분리하였다. 1 µg의 total RNA를 이용하여 cDNA를 제작한 후 real time PCR을 진행한 결과, GPx와 SOD 유전자는 유의성 있는 차이를 보이지 않았으나, CAT의 경우 작약 열추출물 전 처리한 샘플군에서 현저히 증가됨을 알 수 있었다(Fig. 5). 이러한 결과로 작약 열추출물이 활성산소를 순화할 뿐만 아니라 마우스 일차 간세포내의 항산화 시스템을 증가시킴을 알 수 있다.

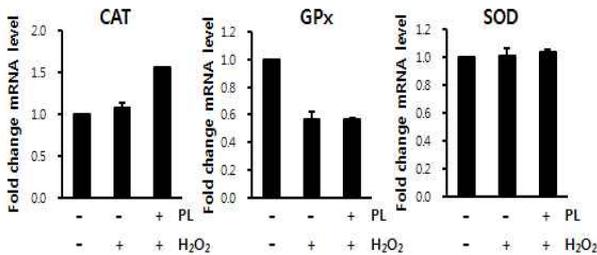


Fig. 5. The effect of PL on expression level of antioxidant enzymes. Hepatic primary cells were pretreated with PL (300 µg/ml) for 1 h and then treated with 1 mM H₂O₂. After 4 h, CAT, GPx and SOD mRNA expressions were analyzed by real time PCR. ** represents P < 0.01 compared to the H₂O₂ group.

5. HO-1 및 HSP72 유전자의 발현 조사

HO-1 유전자는 heme을 대사 시키는 작용을 수행하는데, 세포내 산화적 스트레스나 염증성 자극에 대한 반응으로 발현되고, 이들 유전자의 발현으로 인해 항염증작용이 증가하는 것이 밝혀져 있다^{9,10}. 또한 HSP72는 샤페론 단백질의 일종으로, 병리적, 환경적, 그리고 대사적 스트레스에 대하여 단백질의 3차원 구조를 유지시켜주는 기능을 수행함으로써 스트레스에 대한 세포의 손상을 최소화하는 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다^{11,12}. 본 연구에서는 과산화수소로 인한 간독성에서 작약 열추출물의 간보호 효능에 이들 유전자의 관련성을 확인하였다. 마우스 일차 간세포에 작약 열추출물을 1 시간 동안 전 처리 한 후, 과산화수소를 4 시간동안 처리하였다. 분리한 RNA에서 확보한 cDNA로 real time PCR을 진행한 결과, HO-1 및 HSP72의 유전자 발현이 작약 열추출물 샘플군에서 현저히 증가됨을 알 수 있었다(Fig. 6A). 또한 분리된 단백질을 이용하여 western blotting을 수행한 결과, 작약 열추출물 전 처리 샘플군에서 HO-1 및 HSP72 단백질이 현저히 증가됨을 관찰하였다(Fig. 6B).

7. siRNA

작약 열추출물의 전 처리에 의해 증가된 HO-1과 HSP72 단백질이 과산화수소에 의한 간독성을 억제시키는지 확인하기 위하여, siRNA를 이용하여 확인하였다(Fig. 7). HO-1 및 HSP72 siRNA를 세포에 transfection 시킨 후 24 시간동안 배양하였다. 작약 열추출물을 1 시간동안 전처리하고 1 mM 과산화수소를 24

시간동안 처리한 후 MTT assay를 수행하였다. 그 결과, HO-1 및 HSP72에 대한 siRNA를 처리한 샘플군이 siRNA를 처리하지 않은 샘플군에 비해 세포생장률이 현저히 감소되었다. 반면, negative control siRNA (NC)을 처리한 샘플군에서는 세포생장률이 감소되지 않았다. 이러한 결과는 작약 열추출물의 전처리에 의해 유도되는 HO-1 및 HSP72 단백질이 과산화수소에 의한 세포 사멸을 저해함을 나타낸다.

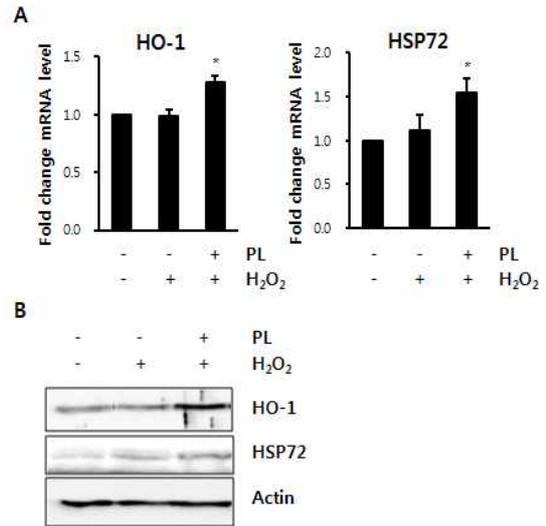


Fig. 6. PL increase the expression levels of HO-1 and HSP72. A. Hepatic primary cells were pretreated with PL (300 µg/ml) for 1 h and then treated with 1 mM H₂O₂. After 4 h, HO-1 and HSP72 mRNA expressions were analyzed by real time PCR. * represents P<0.05 compared to the H₂O₂ group. B. Hepatic primary cells were pretreated with PL (300 µg/ml) for 1 h and then treated with 1 mM H₂O₂. After 4 h, the levels of HO-1, HSP72 and actin protein were analyzed by western blotting.

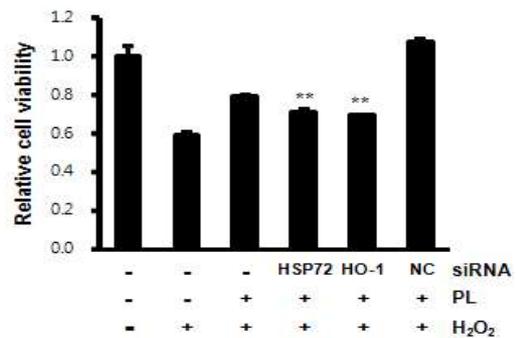


Fig. 7. Knockdown of HO-1 and HSP72 gene led to reduced cell viability. siRNA for HO-1 and HSP72 were transfected into hepatic primary cells and cultured for 24 h. After 24 h, cells were pretreated with PL (300 µg/ml) for 1 h and then treated with 1 mM H₂O₂ for 24h. Cell viability was measured by MTT assay. ** represents P < 0.01 compared to the H₂O₂-PL group.

고 찰

작약은 간이 허하여 생기는 생리불순, 붕루, 대하 등에 응용되고 흉복과 옆구리의 통증을 치료하며 어지럼증, 이명, 홍적색 얼굴, 안구충혈, 조급증, 화를 잘 내면서 머리가 무거운 증상에 사용된다. 또한 이유 없이 흘리는 땀을 멎게 하며 배가 아프면서

설사는 것을 치료한다고 알려져 있다^{13,14}). 최근 천연물에 대한 관심이 높아지면서 많은 연구가 이루어지고 있는데, 작약의 열추출물 뿐만 아니라 이들의 주 성분인 paeoniflorin, albinoflorin, benzolypaeoniflorin에 대한 분자생물학적 연구가 활발히 진행되어오고 있다¹⁻⁵). Paeoniflorin이 human umbilical vein endothelial cell에서 과산화수소에 의한 스트레스에 대해 보호 효능을 보이고¹⁵) t-BHP로 유도되는 간세포의 지질과산화반응을 억제하거나 항산화 효소를 활성화시키는 등⁸) 작약에 의한 항산화적 효능에 대해서도 많은 연구가 이루어지고 있다. 또한 paeoniflorin이 LPS에 의해 유도되는 간 염증을 완화시키는 결과를 포함하여 작약의 간 보호 효능에 대한 연구결과가 발표되고 있다²). 그러나 작약의 간보호 기능에 대한 명확한 분자메카니즘은 명확히 밝혀지지 않고 있다.

또한, 간세포에서 과산화수소와 같은 산화적 스트레스에 대한 작약의 간세포 보호 효능에 대한 연구가 이루어지지 않고 있다. 따라서 본 연구에서는 작약 열추출물의 활성산소에 대한 간세포 보호 효능의 메카니즘을 조사하기 위하여, 마우스의 일차 간세포를 이용하여 과산화수소에 대한 작약 열추출물의 간세포 보호 효능을 확인하였고 이러한 간세포 보호 효능에 HO-1과 HSP72와 같은 유전자가 관여한다는 사실을 규명하였다.

MTT assay는 탈수소 효소작용에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT tetrazolium을 청자색을 띄는 비수용성의 MTT formazan (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)- 2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사법인데, 대사가 왕성한 세포를 확인할 수 있다. 이 방법을 이용하여 작약 열추출물의 전 처리 하였을 경우, 과산화수소로 인한 세포 성장률의 저해가 억제됨을 확인하였다. 또한, 간세포 독성의 지표로 사용하는 ALT, AST 및 LDH의 량을 측정 한 결과, 작약 열추출물의 전 처리로 인하여 과산화수소에 의한 세포 독성이 현저히 감소됨을 알 수 있었다.

작약 열추출물의 항산화 효능은 FACS analysis를 이용하여 확인하였는데, 과산화수소에 의한 세포내 활성산소 증가가 작약 열추출물 전 처리로 인하여 현저히 감소됨을 알 수 있었다. 이러한 작약 열추출물의 활성산소 순화 효능뿐만 아니라 세포내 항산화 효소의 활성을 변화시키는지 real time PCR로 확인한 결과, GPx 및 SOD의 경우 유의성 있는 변화를 관찰하지 못하였으나, CAT의 경우, 작약 열추출물의 전 처리로 인하여 과산화수소 처리 샘플군에 비해 유의성 있는 증가를 확인하였다. 이러한 결과는 t-BHP를 이용하여 간세포의 지질과산화반응 및 항산화효소 활성을 확인한 실험⁶)의 결과와 일치한다.

작약의 주 구성물질인 paeoniflorin은 마우스의 위(stomach)에서 HSP72의 발현을 증가시킨다고 알려져 있고³) Radix Paeoniae Rubra의 경우 PC12 cell에서 HO-1의 발현을 증가시킨다고 발표되었다⁵). 따라서 본 실험에서는 작약 열추출물에 의한 간세포 보호 효능에 HO-1 및 HSP72 유전자가 관여하는지 확인하기 위하여 real time PCR과 western blotting을 통하여 이들 유전자 및 단백질 발현을 확인 한 결과, 작약 열추출물의 전 처리한 샘플군에서 이들 유전자의 mRNA와 단백질의 발현이

증가되었음을 확인하였다. 또한 siRNA 실험을 통하여 이들 유전자를 특징적으로 knock-down 시켰을 때 과산화수소에 의한 세포독성이 증가함을 확인하였다. 이러한 결과로, HO-1 및 HSP72 유전자가 과산화수소와 같은 산화적 스트레스에 대한 작약 열추출물에 의한 간세포 보호 효능에 중요한 역할을 수행하는 것을 추정할 수 있다.

결론

본 연구에서는 작약에서 추출한 열수 추출물의 간 보호 효능에 대하여 조사하기 위하여, 마우스의 일차 간세포를 이용하여 실험하였다. 그 결과, 작약 열추출물을 전 처리한 경우, 활성산소의 활성이 현저히 감소되었고, 항산화제인 CAT의 발현이 증가되었다. 또한 산화스트레스에 대한 방어역할을 수행하는 것으로 알려져 있는 HO-1와 HSP72 유전자의 발현이 증가되었다. 이에, 작약 열추출물은 활성산소 생성 억제 및 항산화제의 발현 증가와 함께 HO-1 및 HSP72 유전자의 발현을 증가시킴으로써 간 보호 역할을 수행하는 것으로 여겨진다.

감사의 글

이 연구는 교육과학기술부 지원 한국한의학연구원 기관고유사업 K11050의 지원을 받아 수행되었음

참고문헌

1. 서상희, 이향림, 이순재, 최상원, 조성희. 작약 (Paeonia lactiflora Pall.) 씨 추출물과 Resveratrol이 흰쥐 체내 지질 상태에 미치는 영향. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 32(7):1102-1107, 2003.
2. Kim, I.D., Ha, B.J. The effects of paeoniflorin on LPS-induced liver inflammatory reactions. Arch. Pharm. Res. 33(6):959-966, 2010.
3. Asai, M., Kawashima, D., Katagiri, K., Takeuchi, R., Tohnai, G., Ohtsuka, K. Protective effect of a molecular chaperone inducer, paeoniflorin, on the HCl- and ethanol-triggered gastric mucosal injury. Life Science. 88: 350-357, 2011.
4. Zhong, S.Z., Ge, Q.H., Qu, R., Ma, S.P. Peoniflorin attenuates Abeta((1-42))-mediated neurotoxicity by regulating calcium homeostasis and ameliorating oxidative stress in hippocampus of rats. J. Neurol. Sci. 280(1-2):71-78, 2009.
5. Zhan, L.Y., Xia, Z.Y., Chen, C., Wang, X.Y. Effect of Radix Paeoniae Rubra on the expression of HO-1 and iNOS in rats with endotoxin-induced acute lung injury. Chin. J. Traumatol. 9(3):181-186, 2006.
6. 이정민, 최상원, 조성희, 이순재. 작약 (Paeonia Lactiflora Pall)씨 추출물이 고콜레스테롤 식이 흰쥐 간조직의 항산화

- 계와 지질과산화에 미치는 영향. *Korean J. Nutr.* 36(8):793-800, 2003.
7. Lee, S.M., Yoon, M.Y., Park, H.R. Protective effects of *Paeonia lactiflora* Pall on hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC12 cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72(5):1272-1277, 2008.
8. 문진영. 작약 약침액이 tert-butyl hydroperoxide로 유도된 흰 쥐 배양 간세포의 지질과산화반응 및 항산화효소 활성에 미치는 영향. *The Journal of Korean Acupuncture & Moxibustion Society.* 17(3):176-187, 2009.
9. Ndisang, J.F. Role of Heme Oxygenase in Inflammation, Insulin-Signalling, Diabetes and Obesity. *Mediators of Inflammation.* 2010: 1-18, 2010.
10. Immenschuh, S., Baumgart-Vogt, E., Mueller, S. Heme oxygenase-1 and iron in liver inflammation: a complex alliance. *Curr. Drug Targets.* 11(12):1541-1550, 2010.
11. Moseley, P.L. Heat shock proteins and the inflammatory response. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 856: 206-213, 1998.
12. Febbraio, M.A., Koukoulas, I. HSP72 gene expression progressively increases in human skeletal muscle during prolonged, exhaustive exercise. *J. Appl. Physiol.* 89(3):1055-1060, 2000.
13. 박영순. 한방의 약리해설. 서울, 아카데미서적, pp 155-156, 2002.
14. 안덕균. 한국본초도감. 서울, 교학사, p 713, 2003.
15. Chen, T., Guo, Z., Jiao, X., Zhang, Y., Li, J., Liu, H. Protective effects of peoniflorin against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in human umbilical vein endothelial cells. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 89: 445-453, 2011.