

고지방식이로 유도한 신장의 산화적 스트레스에 대한 紫花地丁의 항산화 효과

최미혜 · 박인식*

동국대학교 한의과대학 해부학교실

Antioxidant Effect of *Viola mandshurica* W. Becker on the High Fat Diet-Induced Renal Oxidative Stress

Mi Hye Choi, In Sik Park*

Department of Anatomy, College of Korea Medicine, Dongguk University

The prevalence of renal disease is increased with the overweight and obesity. High fat diet-associated oxidative stress increases production of reactive oxygen species (ROS) and induces apoptosis. There are two types of antioxidant defense mechanisms for oxidative stress. One is the enzyme defense mechanism by antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT). The other is non-enzyme defense mechanism by signaling molecules such as nuclear factor-like 2 (Nrf-2), HO-1. In this study, we induced obesity in mice with high fat diet for six weeks and thereafter administered orally *Viola mandshurica* for 4 weeks. *V. mandshurica* is known to clear heat, detoxify and cool blood, and subside a swelling effect. In the *V. mandshurica* administered group, the immunoreactive signal of the Tunel staining was weaker than that of obesity group. Proapoptotic Bax, caspase 3 immunoreactives of the *V. mandshurica* administered group was lower than those of obesity group, whereas anti-apoptotic Bcl-2 immunoreactivity was higher in the *V. mandshurica* administered group. Antioxidant enzyme mechanism such as superoxide dismutase 2 (SOD2), catalase (CAT) immunoreactives of the *V. mandshurica* administered group and Antioxidant non-enzyme mechanism such as Nuclear factor-like 2 (Nrf2), Heme Oxygenase 1 (HO-1) immunoreactives of the *V. mandshurica* administered group was higher than those of obesity group. These results demonstrate that *V. mandshurica* had the antioxidant and anti-apoptosis effects on obese mice.

keywords : *Viola mandshurica* W. Becker, Antioxidant effect, Apoptosis, High fat diet

서 론

과도한 지방섭취와 신체활동 저하로 인하여 과체중과 비만이 최근 사회적인 문제가 되고 있다. 2014년 국민건강보험공단이 전 국민의 12년간 건강검진 데이터를 분석한 결과, 정상 체중인 사람에 비해 비만인 사람에게서 고혈압, 당뇨병, 이상지혈증, 신장질환이 동반될 위험이 2배 이상 높게 나타났으며,¹⁾ 2014년 발표된 2013년의 국민건강영양조사 결과 만성신장질환 유병률(만30세 이상, 중등도 이상)은 2009년 2.6%에서 2013년 3.9%로 증가하였고, 특히 비만인 경우 만성신장질환 유발 가능성이 2.7배 높은 것으로 나타났다.²⁾

최근 비만에 대한 연구들을 살펴보면 비만은 지질과산화물 형

성을 촉진시켜 체내 항산화 시스템이 불균형과 관련이 있다고 보고되어 있다.³⁾ 항산화는 활성산소(reactive oxygen species, ROS)가 계속 생성되어 세포가 손상되는 산화적 스트레스(oxidative stress)에 대한 작용이다. 이러한 활성산소에 대한 내인성 방어기작으로는 superoxide dismutase(SOD), catalase(CAT) 등과 같은 효소적 방어체계가 있으며, 외인성 방어기작으로는 Vit A,C,E, Flavonoid 계열, Polyphenol류의 비효소적 방어체계가 존재한다.⁴⁾

한편 자화지정(紫花地丁)은 제비꽃과(Violaceae)에 속한 다년생 초본인 제비꽃(*Viola mandshurica* W. Baker) 및 동속 근연식물의 뿌리를 포함한 전초를 건조한 한방 생약재이다.⁵⁾ 본초강목에서 자화지정(紫花地丁)의 성미는 고(苦), 신(辛), 한(寒), 무독(無毒)하고 청열해독(淸熱解毒), 랑혈소종(涼血消腫)의 효과를 가지고 있

* Corresponding author

In Sik Park, Department of Anatomy, College of Korea medicine, Dongguk University, Gyeongju Campus 123, Dongdae-ro, Gyeongju-si, Gyeongsangbuk-do, Korea 780-714

E-mail : inspark@dongguk.ac.kr Tel : +82-54-770-2662

Received : 2016/03/10 Revised : 2016/04/22 Accepted : 2016/05/11

© The Society of Pathology in Korean Medicine, The Physiological Society of Korean Medicine

pISSN 1738-7698 eISSN 2288-2529 <http://dx.doi.org/10.15188/kjopp.2016.08.30.4.250>

Available online at <http://www.hantopic.com/kjopp/KJOPP.htm>

다.⁶⁾ 화농성 염증 질환, 종기, 임파선 결핵, 피부질환 등 살균, 해열, 소염 등의 치료제로 사용하며 소화기 질환인 장염, 설사, 이질, 복통 및 눈다래끼, 독사 등에 의한 교상, 전염성 간염 초기에 사용되었다.⁷⁾ 이런 항염증 효과 이외에도 항비만 효과⁸⁾, 항산화 활성화 및 세포보호 효과⁹⁻¹¹⁾, 항천식 효과¹²⁾, 류마티스 관절염 치료효과¹³⁾ 등이 보고되고 있다.

자화지정은 살리실산, 메틸배당체, 알칼로이드 및 다양한 종류의 사포닌을 함유하고 있어 염증 치료에 주로 사용되고 있다.⁴⁾ 하지만 최근 연구에 따르면 자화지정은 수산기를 2개 이상 가지고 있는 물질인 폴리페놀 화합물의 항산화 성분을 함유하고 있는 것으로 보고되고 있다.^{9,10)} 자화지정 뿌리의 Flavonoid 함량이 당귀보다는 낮으나 인삼보다 약 13배 이상 높고, 잎과 꽃의 Flavonoid는 산채류보다 많이 함유되어 있다고 한다. Polyphenol은 썩, 시금치, 썩갓에 비해 함량이 높은 것으로 분석되었다.⁷⁾

고지방식이 신장질환을 일으키는 과정을 한의학적으로 살펴보면 장기적인 고지방식은 수곡정미(水谷精微)의 정상적인 대사 작용에 영향을 주게 되고 운화실조(運貨失調)가 발생하게 된다. 이 습(濕)이 모여 담(痰)이 발생하게 되고 맥도(脈道)를 막는다. 기기(氣機)의 흐름이 정체되면 혈(血)의 흐름을 통창하지 못하게 되고 어(瘀)가 발생하게 된다. 신장(Kidney)은 정을 저장하고(腎藏精), 물을 주관하는 곳이다(腎主水). 습(濕), 담(痰), 어(瘀)가 서로 호결(互結)하여 신(腎)기능이 떨어지게 되면 신(腎)의 기화(氣化) 능력이 떨어져 수액(水液)이나 독소(毒素)의 운화기능에도 영향을 주게 되어 습열(濕熱), 어혈(瘀血)이 발생하게 된다.

지금까지 자화지정(紫花地丁)의 항염증 효과에 관한 연구는 활발히 이루어졌지만 고지방식으로 유도된 신장의 산화적 스트레스에 미치는 영향에 대한 연구는 제대로 이루어지지 않은 상황이다. 또 최근 많은 연구에서 비만, 지방간, 당뇨 치료에 청열해독(淸熱解毒) 약제를 사용하고 있다.²⁰⁾ 따라서 본 연구는 고지방식으로 신장의 산화적 스트레스를 유도한 후 청열해독(淸熱解毒), 랑혈소종(涼血消腫)의 효과를 가지고 있는 자화지정이 신장에 미치는 항산화 효과를 연구하였으며 이에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험재료

1) 실험동물

실험에 사용된 동물은 체중 20g전후의 Balb/c mouse(male, 6주령)를 오리엔트바이오에서 구입하였으며, 1주일동안 온도 22±1°C, 습도 55±3%인 실험실 환경에서 12시간 밤낮 주기로 적응시킨 후 각 실험군 당 7~8마리씩 나누어 사용하였다. 적응기간 동안에는 모든 mice에게 일반사료를 섭취하게 하였다.

2) 실험군 배정

실험군은 고지방식이군(HF), 고지방식이와 함께 자화지정 투여군(JJ)으로 나누었으며, 일반식이를 한 정상군(Nor)을 대조군으로 하였다. 각 실험군 당 실험동물은 7~8마리씩 나누었다. HF군은 10주간 60kcal%fat(DIO DIET, USA)의 고지방식이를 투여하여 비만을 유발하였다. JJ군은 6주간 60kcal%fat(DIO DIET, USA)의 고지

방식이를 투여하고, 7주~10주에는 고지방식이를 하면서 매일 1회 일정한 시각(오후 2시)에 자화지정을 경구투여 하였다. 실험기간 동안 일주일에 한번 몸무게를 측정하여 체중의 변화를 관찰하였다.

3) 자화지정 분말 추출

자화지정 41.6 g에 물 2000 ml을 넣어 90°C에서 3시간 달인 후 100 ml로 감압 농축한 후, 동결 건조하여 자화지정 건조분말을 25.6%을 수득하였다. 실험쥐에게 1일 1회 400 mg/kg씩 구강 투여하였다.

2. 실험방법

1) 조직표본 준비

동물을 sodium pentobarbital로 마취시킨 후 복부를 절개하여 얻어진 조직을 10% 중성 포르말린에 12시간 고정시킨 후 흐르는 물에 수세하였으며, 탈수화과정을 거친 다음 파라핀에 포매시켜 6µm 두께로 연속 절편하였다. 이 절편들은 조직화학적, 면역조직화학적 염색 그리고 tunnel 염색하는데 이용하였다.

2) 조직화학 및 면역조직화학적 염색

절편된 조직 표본을 xylene을 이용하여 탈파라핀한 후 가수화(rehydration)하였다. 조직화학적 염색은 PAS 염색을 진행하였다. 면역조직화학적 염색은 탈파라핀한 후 가수화시킨 표본을 proteinase K (20 µg/ml)에 5분 동안 proteolysis 과정을 거친 후 3% 과산화수소로 5분간 처리하여 조직내의 내인성 과산화효소를 제거하고, 1차 항체를 처리하여 4°C humidified chamber에서 24시간 동안 반응시켰다. 1차항체 중 Superoxide dismutase 2 (SOD2), Cleaved caspase3, Bax는 Cell signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA를 사용하였으며, Bcl-2, Nuclear factor-like 2 (Nrf-2), Catalase (CAT), Heme Oxygenase1 (HO-1)는 Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, Texas, USA를 사용하였다. 이후 PBS로 충분히 수세한 후 2차 항체를 처리하여 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. ABC 용액 (ABC kit, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA)에 실온에서 30분간 반응시킨 후 0.05% 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB, Sigma)로 발색 반응을 확인하였으며, Hematoxylin으로 대조 염색하여 광학현미경 (Olympus BX50, Japan) 하에서 비교 관찰한 후 디지털 카메라 (Nikon E995, Japan)로 촬영하였다.

3) Apoptosis

Apoptosis 확인을 위해 in situ apoptosis detection kit (Apoptag, Intergen, USA)를 이용한 Tunel (terminal deoxynucleotid transferase-mediated dUTP-biotin nick-end labeling) 염색을 실시하였다. 절편된 조직을 탈파라핀한 후 proteinase K에 5분간 proteolysis 시킨 다음 equilibration buffer에서 20초간 처리하였다. Strength TdT enzyme를 37°C에서 1시간동안 반응시킨 후 strength stop/wash buffer에서 10분, anti-digoxigenin-peroxidase에서 1시간 처리한 후 DAB로 발색 반응을 확인하고 eosin으로 대조염색하여 광학현미경 하에서 관찰하였다.

4) 영상분석 및 통계처리

조직 표본 샘플은 400배율에서 각각 그 발현 값을 pixel

count로 영상분석 (Image-Pro Plus, ver. 7.0)하고, means±SD 값으로 그래프 (SigmaPlot 2000)에 나타내었다. 각 조직표본 당 3 곳을 측정하여 통계 처리하였다. 실험군 간의 유의성 검증을 위해 SPSS (ver. 21.0) program을 이용하였으며, one-way ANOVA로 분석하고 DUNCAN, Tukey, Scheffe으로 사후 검증하였다. 유의 수준은 $p < 0.05$ 에서 판별하였다.

결 과

1. 체중 변화

10주간 일반 사료를 섭취한 Nor군은 1주차에 비해 10주차에 체중이 34% 증가했고, 10주간 고지방식을 섭취한 HF군과 6주간 고지방식이 섭취 후 4주동안 자화지정을 투여한 JJ군은 체중이 각각 60%, 35% 증가하였다. 이는 Nor군에 비해 각각 26%, 1% 체중이 증가한 것이다(Fig. 1A).

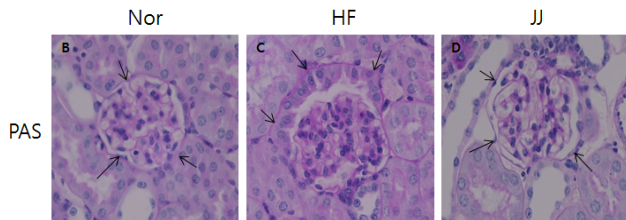
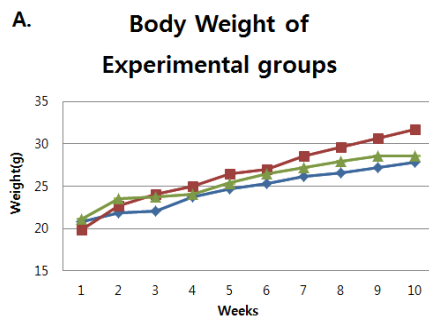


Fig. 1. (A) Comparison of body weight of mice for 10 weeks. ◆ : Normal group(Nor), ▲ : High fat diet + *V. mandshurica* extracts administered group(JJ), ■ : High fat diet group(HF). (B,C and D)The PAS staining was performed in kidney section from Normal, high fat diet and *V. mandshurica* administered groups. (C)Bowman capsule parietal epithelial cell became swollen, cuboidal and columnar in high fat diet kidney. And glomerular basement membrane thickening, mesangial space expansion, mesangial cell hyperplasia and bowman capsule space expansion in the high fat diet kidney (arrows). (D)Bowman capsule parietal epithelial cell became flat, little swollen in *V. mandshurica* administered group. And *V. mandshurica* administered group reduced glomerular basement membrane thickening, mesangial space expansion, mesangial cell hyperplasia and bowman capsule space expansion (arrows). Original magnification, x400.

2. 조직학적 변화

PAS 염색 결과 HF군의 토리주머니 벽측상피세포(bowman capsule parietal epithelial cell)의 형태 변화를 관찰할 수 있었다. Nor군에서 편평상피 또는 약간의 비후된 형태를 띄고 있었으나 HF군에서는 입방형 또는 원주형을 띄면서 팽창되어 있는 것을

확인할 수 있다. 또 토리(glomerulus)의 기저막 비후, 토리사이질(mesangium)의 확장과 혈관사이세포(mesangial cell) 증가, 토리주머니공간(bowman capsule space)의 확대 등이 나타난다. 반면 JJ군에서는 HF군에 비해 토리주머니 벽측상피세포(bowman capsule parietal epithelial cell)의 형태가 편평상피 또는 약간의 비후된 상태를 띄고 있으며, 토리기저막(glomerular basement membrane) 비후와 토리사이질(mesangium) 확장이 관찰되지 않거나 감소하였고, 혈관사이세포(mesangial cell) 또한 감소하였다. 토리주머니공간(bowman capsule space)이 HF군에 비해 줄어들어 Nor군과 비슷한 형태를 띄는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 1B, C, D).

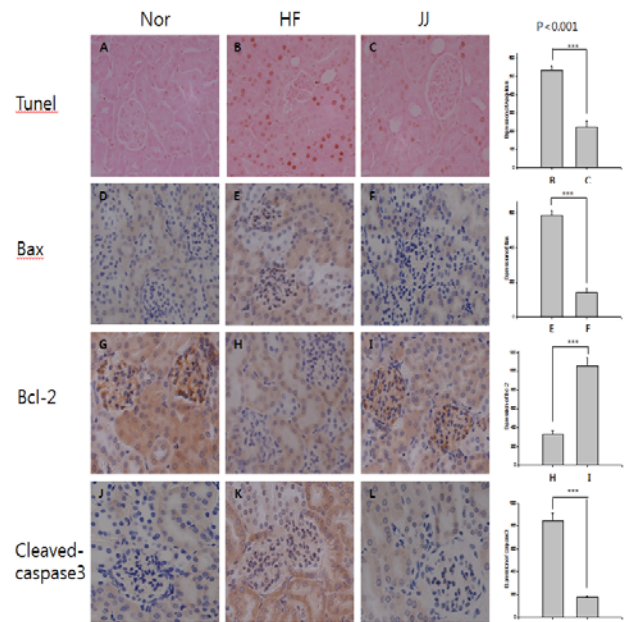


Fig. 2. (A, B and C) The TUNEL staining was performed in kidney section from normal, high fat diet and *V. mandshurica* administered groups. Expression of apoptotic nuclei are increased in high fat diet group. Weaker expression of apoptotic nuclei are seen by *V. mandshurica* administered group. (D, E and F) Proapoptotic Bax are present in the bowman capsule, glomerulus, mesangial cell and proximal convoluted tubule of kidney. Expression is increased in high fat diet group. Weaker expression of Bax is seen by *V. mandshurica* administered group. (J, K and L) Proapoptotic cleaved-caspase3 are present in the bowman capsule, glomerulus, mesangial cell and proximal convoluted tubule of kidney. Expression is increased in high fat diet group. Weaker expression of cleaved-caspase3 is seen by *V. mandshurica* administered group. (G, H and I) Anti-apoptotic Bcl-2 are present in the glomerulus, mesangial cell and proximal convoluted tubule of kidney. Expression is increased in *V. mandshurica* administered group. Weaker expression of Bcl-2 is seen by high fat diet group. Original magnification, x400. Data are expressed as mean±SD(n=3). ***P<0.001 vs. high fat diet group.

3. 세포사멸

Tunel 염색 결과 HF군에서의 apoptosis의 발현은 Nor군에 비해 유의적으로 증가하였고, JJ군에서는 HF군에 비해 유의적으로 감소하는 것을 관찰할 수 있었다(Fig. 2A, B, C).

Apoptosis를 유도하는 것으로 알려진 Bax의 발현은 HF군에서 Nor군에 비해 토리주머니(bowman capsule), 토리(glomerulus)

및 혈관사이세포(mesangial cell), 토리쪽곱슬세관(proximal convoluted tubule)에서 발현이 현저히 증가하였고 통계적으로 유의적인 증가를 관찰할 수 있었다. 하지만 JJ군은 HF군에 비해 토리주머니(bowman capsule), 토리(glomerulus) 및 혈관사이세포(mesangial cell), 토리쪽곱슬세관(proximal convoluted tubule)에서 발현이 현저히 감소하였고 통계적으로 유의적인 감소를 관찰할 수 있었다(Fig. 2D, E, F).

Apoptosis를 억제하는 것으로 알려진 Bcl-2의 발현은 HF군에서 Nor군에 비해 토리(glomerulus) 및 혈관사이세포(mesangial cell), 토리쪽곱슬세관(proximal convoluted tubule)에서 증가하였고 통계적으로도 유의적인 증가를 관찰하였다. 하지만 JJ군은 HF군에 비해 토리(glomerulus) 및 혈관사이세포(mesangial cell), 토리쪽곱슬세관(proximal convoluted tubule)에서 발현이 감소하였고 통계적으로 유의적인 감소를 관찰할 수 있었다(Fig. 2G, H, I).

Bax에 의해 활성화되는 Cleaved caspase3 발현은 HF군에서 Nor군에 비해 토리주머니(bowman capsule), 토리(glomerulus) 및 혈관사이세포(mesangial cell), 토리쪽곱슬세관(proximal convoluted tubule)에서 증가하였고 통계적으로 유의적인 증가를 관찰할 수 있다. 반면 JJ군에서 Cleaved caspase3 발현은 HF군에 비해 토리주머니(bowman capsule), 토리(glomerulus) 및 혈관사이세포(mesangial cell), 토리쪽곱슬세관(proximal convoluted tubule)에서 감소하였고 통계적으로도 유의적인 감소를 관찰할 수 있었다(Fig. 2J, K, L).

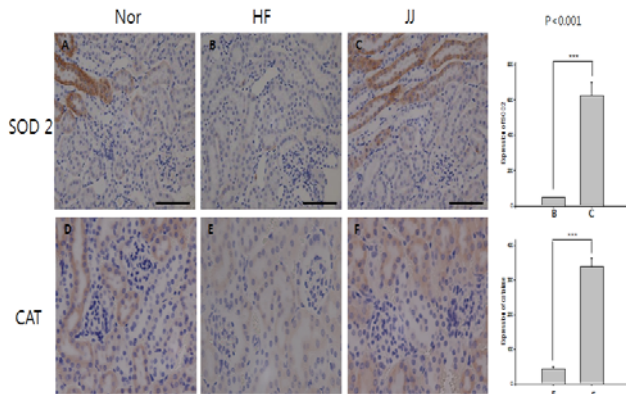


Fig. 3. *Viola mandshurica* increases renal antioxidant effect. Immunohistochemistry analysis for the antioxidant enzyme mechanism-associated SOD2, CAT. (A, B and C) SOD2 are present in the proximal convoluted tubule, proximal straight tubule of kidney. Expression is increased in *V. mandshurica* administered group. Weaker expression of SOD2 is seen by high fat diet group. (D, E, and F) CAT are present in the glomerulus, proximal convoluted tubule of kidney. Expression is increased in *V. mandshurica* administered group. Weaker expression of CAT is seen by high fat diet group. Original magnification, x400 / Scale bars: A,B,C=100µm. Data are expressed as mean±SD(n=3). ***P<0.001vs. high fat diet group.

4. 항산화 효과

1) 효소성 방어기전

HF군에서 SOD2의 발현은 Nor군에 비해 토리쪽곱슬세관(proximal convoluted tubule), 토리쪽곧은세관(proximal

straight tubule)에서 감소하였고 통계적으로도 유의적인 감소성을 보였지만, JJ군은 HF군에 비해 토리쪽곱슬세관(proximal convoluted tubule), 토리쪽곧은세관(proximal straight tubule)에서 발현이 증가하였고 통계적으로 유의적인 증가를 보였다(Fig. 3A, B, C).

CAT는 HF군에서 Nor군에 비해 토리(glomerulus), 토리쪽곱슬세관(proximal convoluted tubule)에서 발현이 감소하였고 통계적으로 유의적인 감소가 나타났으며, JJ군은 HF군에 비해 토리(glomerulus), 토리쪽곱슬세관(proximal convoluted tubule)에서 CAT의 발현이 증가하고 통계적으로도 유의적인 증가를 관찰하였다(Fig. 3D, E, F).

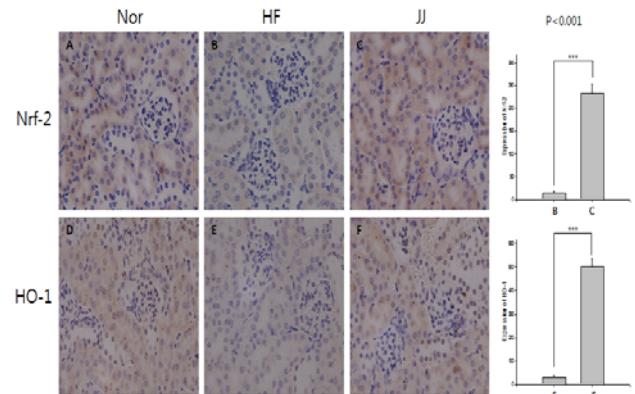


Fig. 4. *Viola mandshurica* increases renal antioxidant effect. Immunohistochemistry analysis for the antioxidant non-enzyme mechanism associated Nrf-2, HO-1. (A, B and C) Nrf-2 are present in the bowman capsule, proximal convoluted tubule of kidney. Expression is increased in *V. mandshurica* administered group. Weaker expression of Nrf-2 is seen by high fat diet group. (D, E and F) HO-1 are present in the bowman capsule, glomerulus, mesangial cell, proximal convoluted tubule and distal convoluted tubule of kidney. Expression is increased in *V. mandshurica* administered group. Weaker expression of HO-1 is seen by high fat diet group. Original magnification, x400. Data are expressed as mean±SD(n=3). ***P<0.001vs. high fat diet group.

2) 비효소성 방어기전

HF군은 Nor군에 비해 토리주머니(bowman capsule), 토리쪽곱슬세관(proximal convoluted tubule)에서 Nrf2의 발현이 감소하였고 통계적으로 감소를 관찰하였다. 반면 JJ군은 HF군에 비해 토리주머니(bowman capsule), 토리쪽곱슬세관(proximal convoluted tubule)에서 Nrf2의 발현 증가하였고 통계적으로 유의적인 증가를 관찰하였다(Fig. 4A, B, C).

Nrf-2에 의해 활성화된다고 알려진 HO-1의 발현은 HF군에서 Nor군에 비해 토리주머니(bowman capsule), 토리(glomerulus) 및 혈관사이세포(mesangial cell), 토리쪽곱슬세관(proximal convoluted tubule), 먼쪽곱슬세관(distal convoluted tubule)에서 감소하였고 통계적으로도 유의적인 감소성을 보였다. 하지만 JJ군은 HF군에 비해 토리주머니(bowman capsule), 토리(glomerulus) 및 혈관사이세포(mesangial cell), 토리쪽곱슬세관(proximal convoluted tubule), 먼쪽곱슬세관(distal convoluted tubule)에서 유의적으로 증가하였다(Fig. 4D, E, F).

고 찰

최근 활성산소(ROS)란 단어를 언론매체에서 흔하게 접할 수 있다. 세포대사과정에서 생성되는 활성산소(ROS)는 세포막 손상, DNA 변성, 단백질 분해, 지질 산화 등을 유발하기 때문에 노화나 성인병, 암, 심혈관 질환, 당뇨, 신장질환 등 다양한 질병의 주범이라고 알려져 있다. 하지만 우리 신체는 정상적인 상태에서는 신체 내의 SOD, Catalase 등과 같은 효소적 방어체계와 외부에서 신체로 공급하는 Vit A,C,E, Flavonoid 계열, Polyphenol류의 비효소적 방어체계가 활성산소(ROS)를 제거하여 균형을 이루고 있기 때문에 문제가 되지 않는다. 하지만 장기적인 고지방식은 지질과산화물 형성을 촉진시켜 이러한 방어체계의 능력을 초과하는 활성산소(ROS)의 생성으로 산화 스트레스(oxidative stress)를 유발하여 항산화 시스템에 불균형을 일으킨다^{3,4)}.

지속적인 고지방식이 하는 경우 토리주머니 벽측상피세포(bowman capsule parietal epithelial cell)가 편평상피에서 입방형 또는 원주형으로 바뀌어 팽창되어 있는 것을 관찰할 수 있었다. 또 토리기저막(glomerular basement membrane) 비후, 토리사이질(mesangium)의 확장과 혈관사이세포(mesangial cell) 증가, 토리주머니공간(bowman capsule space)의 확대가 관찰되었다. 이러한 신장의 조직학적인 변화의 유발인자는 angiotensin II, 인슐린 및 교감신경계 활성 등 신경체액성인자나 신장 내의 물리적 힘의 변화 등이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다¹⁷⁾. 비만하면 지방에 의한 신 피막 압박, 간질세포 및 세뇨관 주변의 세포외기질의 증가와 같은 신 수질의 조직학적 변화가 신 수질에 압박을 가할 수 있으며 이는 신장 간질액(renal interstitial fluid) 압력의 증가 및 조직부종(tissue edema) 등과 관계가 있다고 알려져 있다¹⁸⁾. 반면 고지방식이를 하면서 자화지정을 경구 투여한 결과 토리기저막(glomerular basement membrane) 비후, 토리사이질(mesangium)의 확장과 혈관사이세포(mesangial cell) 증가, 토리주머니공간(bowman capsule space)의 확대와 같은 조직학적인 변화가 감소했음을 관찰할 수 있었다.

세포자멸사의 과정은 크게 2가지로 대별되어 왔다. 사망수용체(death receptor, Fas/FasL, TNF- α 등)를 통한 수용체 매개성(외인성) 세포사멸 경로와 항암화학제, 활성산소종(ROS) 등 다양한 인자들에 의해 유발되는 산화 스트레스(oxidative stress)로 인한 미토콘드리아 매개성(내인성) 세포사멸 경로가 있다¹⁹⁾. 미토콘드리아에서의 intrinsic apoptosis 기전을 살펴보면 Bax는 평상시에는 monomer로 존재하면서 anti-apoptosis 단백질인 Bcl-2에 의해 그 작용이 저해를 받게 된다. 하지만 고지방식으로 인하여 활성산소(ROS)가 증가하게 되고 이는 oxidative stress가 상승하게 하여 apoptosis 신호가 들어오면 Bax의 형태 변화가 일어나 cytochrome C와 같은 물질이 밖으로 나가게 된다. 이것이 하위의 caspase를 활성화시켜 apoptosis를 더욱 빠르게 진행하게 된다^{14,15)}. 본 연구에서 고지방식이를 하는 경우 일반식이를 하는 것보다 apoptosis 발현이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 그리고 Bax와 Cleaved-caspase3는 신장의 토리주머니, 토리 및 혈관사이세포, 토리쪽곱슬세관에서 발현이 증가하는 것을 관찰할 수 있었

다. 즉 Bax는 미토콘드리아의 칼슘섭취를 조장하여 막 전압이 감소되어 apoptosis를 매개하는 단백질들이 미토콘드리아에서 세포질로 유출되는 과정을 촉진하여 apoptosis를 유발하고 caspase를 활성화시킨다. 하지만 활성산소(ROS)가 증가로 인해 oxidative stress가 상승하여 apoptosis 신호가 들어왔을 때 Bcl-2는 비정상적인 칼슘유리를 방해하여 apoptosis를 억제한다¹⁴⁻¹⁶⁾. 본 연구에서 고지방식이를 한 경우 일반식이를 한 것보다 신장의 토리 및 혈관사이세포, 토리쪽곱슬세관에서 Bcl-2 발현이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. Bcl-2의 세포 내에서의 존재위치는 미토콘드리아와 핵막, endoplasmic reticulum인 것으로 알려져 있다. 모든 기능이 명확히 알려져 있지는 않지만 항산화제로서의 역할, 지질과산화의 저지, 활성유해산소 생성의 저지, 핵과 미토콘드리아 내로의 Ca²⁺ 유입저지, caspase 활성화의 저지, cytochrome C의 유출저지 등의 여러 효과를 나타낸다고 보고되어 있다²⁰⁾.

고지방식으로 인한 oxidative stress의 인체 방어기구는 효소성 방어기전과 비효소성 방어기전이 있다. 효소성 방어기전은 SOD, catalase 등이 있다. 미토콘드리아 내 호흡작용의 부산물로서 생성되는 superoxide(2O₂⁻)분자는 미토콘드리아 효소인 SOD2에 의해 빠르게 과산화수소로 전환된다. 그 후 과산화수소는 세포질 내로 확산되어 peroxisome 내에서 catalase에 의해 2H₂O₂에서 물과 산소(2H₂O+O₂)로 전환하여 독성을 제거해준다^{3,16)}. 본 연구에서 자화지정을 경구투여 한 경우 고지방식이를 한 것보다 신장의 토리쪽곱슬세관, 토리쪽곧은세관에서 SOD2 발현이 증가하는 것을 관찰할 수 있었고, catalase는 토리, 토리쪽곱슬세관에서 발현이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 비효소성 방어기전은 전사인자 Nrf2와 센서인자 keap1로 구성되어 있다. 평상시 Nrf2가 매개하는 전사는 음성조절자인 keap-1에 의하여 억제되어 있다가 산화 스트레스(oxidative stress)가 발생하면 Nrf2는 keap1으로부터 떨어져 나와 핵 안으로 이동하여 antioxidant response element (ARE)와 결합하여 NAD(P)H quinone oxidoreductase (NQO1), glutathione Stransferase(GCS), g-glutamate cystein ligase (GCL), HO-1와 같은 항산화 효소들의 발현을 증가시켜 세포보호 효과를 나타낸다^{21,22)}. 본 연구에서 자화지정을 경구투여 한 경우 고지방식이를 한 것보다 Nrf2의 발현이 신장의 토리주머니, 토리쪽곱슬세관에서 유의적으로 증가하였고, HO-1은 토리주머니, 토리 및 혈관사이세포, 토리쪽곱슬세관, 면쪽곱슬세관에서 발현이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다.

자화지정은 항염증 효과가 있는 사포닌 성분 외에도 폴리페놀 화합물과 같은 항산화 성분을 함유하고 있다^{7,9,10)}. 본 연구 결과 고지방식이를 하면서 자화지정을 경구 투여한 그룹이 고지방식이만 한 그룹보다 체중감소 효과 및 신장에서 apoptosis 발현이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 또 항산화 효소인 SOD2, CAT와 비효소성 항산화 작용을 하는 Nrf-2, HO-1 모두 고지방식이를 하면서 자화지정을 경구 투여한 그룹이 고지방식이만 한 그룹보다 신장에서 발현이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 이에 고지방식으로 유도한 신장의 산화적 스트레스(oxidative stress)에 대한 자화지정의 항산화 효과를 확인할 수 있었다. 임상에서도 항염증 효과 이외에도 항산화 효과를 이용한 추가적인 연구가 이루어져야 할 것이다.

결 론

고지방식으로 유도한 신장의 산화적 스트레스에 대한 자화지정의 항산화 효과에 대해 다음과 같은 결과를 얻었다.

체중은 고지방식이군이 정상군에 비해 26% 증가했고, 자화지정군은 정상군에 비해 1% 증가하였다.

PAS 염색 결과 정상군의 토리주머니 벽측상피세포(bowman capsule parietal epithelial cell)는 편평상피 또는 약간의 비후된 형태를 띠고 있었으나, 고지방식이군 토리주머니 벽측상피세포(bowman capsule parietal epithelial cell)에서는 입방형 또는 원주형을 띄면서 팽창되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 또 고지방식이군에서 토리(glomerulus)의 기저막 비후, 토리사이질(mesangium)의 확장 및 혈관사이세포(mesangial cell) 증가, 토리주머니공간(bowman capsule space)의 확대 등이 나타난다. 반면 자화지정군에서 고지방식이군에 비해 토리주머니 벽측상피세포(bowman capsule의 parietal epithelial cell)의 형태가 편평상피 또는 약간의 비후된 상태를 띄고 있으며, 토리기저막(glomerular basement membrane) 비후와 토리사이질(mesangium) 확장, 혈관사이세포(mesangial cell), 토리주머니공간(bowman capsule space)이 감소하였다.

고지방식이군은 정상군에 비해 신장의 apoptosis 발현이 증가하였고, Bax와 Cleaved-caspase3는 토리주머니, 토리 및 혈관사이세포, 토리쪽굽슬세관에서 발현이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 또 토리 및 혈관사이세포, 토리쪽굽슬세관에서 Bcl-2 발현이 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 자화지정군은 고지방식이군에 비해 신장의 apoptosis 발현이 감소하였고, Bax와 Cleaved-caspase3는 토리주머니, 토리 및 혈관사이세포, 토리쪽굽슬세관에서 발현이 감소하는 것을 관찰할 수 있었으며 토리 및 혈관사이세포, 토리쪽굽슬세관에서 Bcl-2 발현이 증가하는 것을 관찰할 수 있었다.

고지방식이군은 정상군에 비해 토리쪽굽슬세관(proximal convoluted tubule), 토리쪽곧은세관(proximal straight tubule)에서 SOD2 발현이 감소하였고, 토리(glomerulus)와 토리쪽굽슬세관(proximal convoluted tubule)에서 CAT 발현이 감소하였다. 자화지정군은 고지방식이군에 비해 토리쪽굽슬세관(proximal convoluted tubule), 토리쪽곧은세관(proximal straight tubule)에서 SOD2 발현이 증가하였고, 토리(glomerulus)와 토리쪽굽슬세관(proximal convoluted tubule)에서 CAT의 발현이 증가하였다.

고지방식이군은 정상군에 비해 Nrf2의 발현이 신장의 토리주머니와 토리쪽굽슬세관에서 감소하였고, HO-1은 토리주머니, 토리 및 혈관사이세포, 토리쪽굽슬세관, 먼쪽굽슬세관에서 발현이 감소하였다. 자화지정군은 고지방식이군에 비해 Nrf2의 발현이 신장의 토리주머니와 토리쪽굽슬세관에서 증가하였고, HO-1은 토리주머니, 토리 및 혈관사이세포, 토리쪽굽슬세관, 먼쪽굽슬세관에서 발현이 증가하였다.

References

1. Big data streering Dept. Health Insurance Big Data

Analytics for 12 years 1 million case. Extremely obese increased more than four times in 20~30 age. Korea's first trend analysis about extremely obese per year. National Health Insurance Service. [cited 2014 Sep 15]; URL:<http://www.nhis.or.kr/bbs7/boards/B0039/3164>

2. Centers for Disease Control & Prevention. 2013 National health statistics. Ministry of Health and Welfare, Centers for Disease Control & Prevention. 6(1):50-51, 2014.
3. Bae, G.G., Ha, B.J. Antioxidative effect of Fermented *Rhynchosia nulubilis* in Obese Rats. *J. Food Hyg. Saf.* 30(4):383-389, 2015.
4. Lee, B.B., Park, S.R., Suk Han, C.S., Han, D.Y., Park, E.J., Park, H.R., Lee, S.C. Antioxidant Activity and Inhibition Activity against α -Amylase and α -Glucosidase of *Viola mandshurica* Extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 37(4):405-409, 2008.
5. Sin, M.G. *Clinical Traditional Herbalogy in color.* Seoul:Namsandang. p 340, 1986.
6. Lee S.Z. *Ben Cao Gang Mu(Compendium of Materia Medica).* Seoul:Gomunsa. p 647, 1983.
7. Lee, Y.S., Kim, N.W. Comparative Analysis of the Amino Acids and Effective Components from *Viola mandshurica*. *Korean J. Food Preserv.* 15(5):699-705, 2008.
8. Sung, Y.Y., Kim, D.S., Kim, H.K. *Viola mandshurica* ethanolic extract prevents high-fat-diet-induced obesity in mice by activating AMP-activated protein kinase. *environmental toxicology and pharmacology.* 38: 41-50, 2014.
9. Ko, K.S. A study on Antioxidant Effect of Methanol Extract from *Viola Mandshurica*. *Journal of the korean society of Cosmetology.* 18(5):1082-1086, 2012.
10. Lee, M.R., Hwang, J.H., Park, J.H., Kim, H.J., Park, E.J., Park, H.R. Antioxidant Activity and Protective Effects of 9-hydroxy- α -tocopherone from *Viola mandshurica* Extracts. *Kor. J. Pharmacogn.* 41(3):166-173, 2010.
11. Jeon, G.I., Yoon, M.Y., Park, H.R., Lee, S.C., Park, E.J.. Neuroprotective Activity of *Viola mandshurica* Extracts on Hydrogen Peroxide-Induced DNA Damage and Cell Death in PC12 Cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1171: 576-582, 2009.
12. Lee, M.Y., Yuk, J.E., Kwon, O.K., Kim, H.S., Oh, S.R., Lee, H.K., Ahn, K.S. Anti-inflammatory and anti-asthmatic effects of *Viola mandshurica* W. Becker(VM) ethanolic (EtOH) extract on airway inflammation in a mouse model of allergic asthma. *Journal of Ethnopharmacology.* 127: 159-164, 2010.
13. Lee, B.U. Inhibitory effect of *Viola* herba extract on

- inflammatory cytokine production induced by IL-1 β and TNF- α in cultured human synovial cells. Dept. of Oriental Pathology, College of Traditional Korea med., Daejeon Univ. 2003.
14. Ramesh, G., Brian Reeves, W. Cisplatin increases TNF- α mRNA stability in kidney proximal tubule cells. *Ren Fail.* 28: 583-592, 2006.
 15. Kondoh, M., Araragi, S., Sato, K., Higashimoto, M., Takiguchi, M., Sato, M. Cadmium induces apoptosis partly via caspase-9 activation in HL-60 cells. *Toxicology.* 170(1-2):111-117, 2002.
 16. Sang Won Kang. Role of Reactive Oxygen Species in Cell Death Pathways. *Hanyang Med Rev.* 2013;33:77-82
 17. Park, J.Y., Kim, D.M., Kim, B.W., Kim, Y.K., Kim, Y.J., Kim, T.H., Yoo, H.J., Lee, M.K., Lee, Y.K., Cha, B.Y., Ha, S.W. Pathogenic Mechanisms of Hypertension and Kidney Disease in Metabolic Syndrome. *Biological Research Information Center, BioWave.* 1: 1-11, 2002.
 18. Alonso-Galicia, M., Dwyer, T.M., Herrera, G.A., Hall, J.E. Increased hyaluronic acid in the inner renal medulla of obese dogs. *Hypertension.* 25: 888-892, 1995.
 19. Kim, S.H., Han, Y.J., Park, J.H., Yoo, S.J. Glutamate Induces Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Apoptosis in Primary Rat Astrocytes. *J Korean Geriatr Soc.* 14(4):242-252, 2010.
 20. Park, S.W., Seo, H.S., Kim, J.W., Hong, S.J., Shin, S.H., Rha, S.W., Ahn, J.C., Song, W.H., Park, C.G., Shim, W.J., Oh, D.J., Ro, Y.M. Effect of Human Bcl-2 Gene Expression on the Peripheral Atherosclerotic Lesions of Apolipoprotein E-Deficient Mouse. *Korean Circulation J.* 35: 725-733, 2005.
 21. Choi, J.Y., Kim, K.H., Choi, J.Y., Han, C.W., Ha, K.T., Jeong, H.S., Joo M.S. Identification of the Plant Part of *Gleditsia sinensis* that Activates Nrf2, an Anti-oxidative Transcription Factor. *Korean J. Oriental Physiology & Pathology.* 28(3):303-309, 2014.
 22. Turpaev, K.T. Keap1-Nrf2 signaling pathway : mechanisms of regulation and role in protection of cells against toxicity caused by xenobiotics and electrophiles. *Biochemistry.* 78(2):111-126, 2013.