

지방간에 대한 백두구 에틸아세테이트 추출물의 억제 효과 및 기전 연구

임동우 · 김혁¹ · 박성윤¹ · 박선동² · 박원환¹ · 김재은*

동국대학교 한의과대학 병리학교실, 1: 동국대학교 한의과대학 진단학교실, 2: 동국대학교 한의과대학 방제학교실

Study of the Suppressive Effect and Its Mechanism of Amomum Cardamomum L. on Free Fatty Acid-induced Liver Steatosis

Dong Woo Lim, Hyuck Kim¹, Sung Yun Park¹, Sun Dong Park², Won Hwan Park¹, Jai Eun Kim*

Department of Pathology, 1: Department of Diagnostics, 2: Department of Prescription, College of Korean Medicine, Dongguk University

Through this study, the authors investigated the anti-steatosis effects of the Amomum cardamomum ethyl acetate fraction in free fatty acids (FFAs)-induced human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. The ethyl acetate fraction of Amomum cardamomum (ACEA) was extracted with 70% ethanol and then the extract was evaporated using a rotary evaporator prior to sequential fractionation. Human hepatocellular carcinoma were treated with different concentrations of ACEA in the presence and absence of FFAs. To demonstrate the reactive oxygen species (ROS) scavenging activity, DCFDA level was analyzed by using in vitro assay system. Cell viability, lipid accumulation, intracellular triglycerides, malondialdehyde (MDA), liver steatosis related signaling molecules and inflammatory cytokines such as interleukin (IL)-6, 8, tumor necrosis factor- α (TNF- α) were also investigated. As results, ACEA inhibited the FFAs-induced ROS, lipid accumulation, intracellular triglycerides, and MDA in a dose dependent manner. Treatment of human hepatocellular cells with ACEA induced the phosphorylation of 5' adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) and carnitine palmitoyltransferase I (CPT1) expression using western blot analysis. ACEA also potently suppressed the FFAs-induced inflammatory cytokines including IL-6, IL-8 and TNF- α . These results suggest that the ethyl acetate fraction of Amomum cardamomum extract own inhibitory effects of liver steatosis by inhibiting ROS, lipid accumulation, intracellular triglycerides, MDA through AMPK signaling and anti-inflammatory actions.

keywords : Amomum cardamomum, Liver steatosis, Human hepatocellular carcinoma cells, AMPK

서론

간(肝, liver)은 인체의 주요한 내장 기관 중 하나로 해독작용을 담당하는 것으로 알려져 있으며, 단백질 합성 및 양분의 저장 역할과 그 밖에 쓸개즙과 요소 등을 생산한다. 모든 내장 기관 중 가장 크고 물질대사의 중요한 역할을 담당하고 있으므로 생존에 반드시 필요한 장기라고 할 수 있다. 따라서 이러한 간이 산화적 스트레스(oxidative stress)와 같은 지속적 위해 요소에 노출되어 간 조직을 구성하는 세포 기능에 장애가 생기면 다양한 간 질환이 유발 된다^{1,2)}. 간에 부담을 주는 대표적 원인으로 과식과 음주를 꼽을 수 있으며, 만성적 음주를 원인으로 하는 알콜성 간 손상(alcoholic liver damage, ALD)은 알콜성 지방간, 알콜성 간염 및

알콜성 간경변증 등이 대표적 질환이다³⁾.

비알콜성 지방간(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)은 술을 전혀 마시지 않거나 소량의 음주를 하더라도 간에 지방이 축적되는 질병으로 비만, 제 2형 당뇨, 이상 지질혈증 및 대사증후군 등과 밀접한 연관이 있다^{4,5)}. 비알콜성 지방간 및 관련 대사 질환을 치료하기 위하여 반드시 식이 요법이 동반되어야 한다는 주장이 설득력을 얻고 있으며, 보조적으로 비타민 E 군의 고용량 처방이 NAFLD를 개선한다는 보고가 있다⁶⁾. 중증의 NAFLD에는 메트포민(metformin)과 스타틴(statin) 및 오메가(omega)-3 등을 병용 투여할 수 있는 것으로 알려져 있으나 각각 약물의 부작용을 최소화 시키는 고려가 필요하다⁷⁻⁹⁾.

백두구(白芎藭)는 생강과 백두구의 열매를 말린 것으로 약의

* Corresponding author

Jai Eun Kim, Department of Pathology, College of Korean Medicine, Dongguk University, 32, Dongguk-ro, Ilsandong-gu, Goyang-si, Gyeonggi-do, Republic of Korea

E-mail : herbqueen@dongguk.ac.kr Tel : +82-31-961-5829

Received : 2017/04/10 Revised : 2016/06/20 Accepted : 2017/06/22

© 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.2017.06.31.3.159>

Available online at <https://kmpath.jams.or.kr>

성질은 맵고 따뜻(辛溫)하며, 비위(脾胃)에 습기를 제거(祛濕)하고 소화 및 복부창만, 구토, 딸꾹질 및 주독(酒毒)을 해독하는 작용이 알려져 있다¹⁰⁾. 백두구 속에 함유되어 있는 대표적인 단일 성분으로 터펜(terpenes)류의 시네올(1,8-Cineole)이 지방간을 억제하는 효능과 항산화 활성을 통하여 다이옥신 등의 유독물로부터 간을 보호하는 효과 등이 보고되어 있다^{11,12)}.

진핵생명체의 세포 및 조직 대사의 조절자 중 하나로 알려진 AMP-activated protein kinase (AMPK)는 지질 대사에서 핵심적 역할을 담당하고 있으므로 지방간 질환의 치료에 주요한 분자적 목표로 제시 된다^{13,14)}. 특히 간에서 AMPK가 인산화(phosphorylation)되면 지방산의 합성과 지방질 생합성(lipogenesis)에 관여하는 주요 전사 인자인 sterol regulatory element-binding protein 1 (SREBP-1)의 발현을 감소시켜 간 내 지방의 축적을 억제 한다¹⁵⁾. 또한 AMPK 인산화의 복수 작용으로 세포 내 미토콘드리아 효소 중 일종인 carnitine palmitoyltransferase I (CPT1)의 발현이 증가되어 지질(lipids)의 베타-산화(beta-oxidation)를 유도하므로 간의 지방산이 감소된다¹⁶⁾.

알려진 바와 같이 간에 지방이 5%이상 쌓이게 되면 지방간이 되어 간이 정상적으로 수행하는 일을 방해하고 염증이 발생하게 되는데, 이러한 염증이 장기화 되면 간경변으로 진행되므로 중증 수준의 지방간인 경우 1차적으로 염증 관리를 하는 것이 질병 치료의 목표가 될 수 있다¹⁷⁾. 인체에서 면역을 담당하는 세포가 분비하는 단백질 중 인터류킨(interleukin, IL)-6, IL-8 및 tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)는 염증에 관련된 대표적인 사이토카인(cytokines)으로 이들의 관리는 염증을 제어한다는 측면에서 지방간 치료의 긍정적 효과를 얻을 수 있다¹⁸⁾.

본 연구진의 선행 연구 보고에서 백두구 70% 에탄올 추출물을 에틸아세테이트(ethyl acetate)분획하여 사염화탄소로 급성 간 손상을 유발한 흰쥐(rat)에서 간 보호 효과를 확인하였다¹⁹⁾. 하지만 세포 수준에서 지방간을 예방하거나 치료하는 백두구 추출물의 효과는 알려져 바 없으므로, 본 연구에서는 사람의 간암 세포인 HepG2 (human hepatocellular carcinoma)에서 자유 지방산(free fatty acids)로 유도한 지방간 모델에서 백두구 에틸아세테이트 분획이 AMPK 신호를 경유하여 간에 지방 축적을 억제하는 기전과 염증성 사이토카인을 조절하는 효과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 실험재료

에탄올을 포함하여 추출에 필요한 용매 및 사람의 low-density lipoprotein (LDL)은 모두 Merck 사(Darmstadt, Germany)의 제품을 구입하였으며, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFDA)는 Molecular Probes (Eugene, OR, USA) 제품을 실험에 사용하였다. Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS) 및 penicillin-streptomycin은 Hyclone 사(Logan, UT, USA)의 제품을, 실시간 중합효소 반응에 필요한 SYBR Green qPCR Master Mix (2X)는 Thermo Fisher Scientific 사(Foster City, CA,

USA)를 구매하였고, Oligo primers는 Macrogen (Seoul, Korea)에서 합성 하였다. p-AMPK 항체와 CPT1은 Cell Signaling Technology 사(Beverly, MA, USA)로부터 구입하였고, β -actin 항체 및 2차 항체는 Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA) 제품을 구매 하였다. Intracellular triglycerides는 아산제약(Asan, Korea)의 kit를 사용하여 제공된 protocol에 따라 실험을 실시하였고, 그 밖의 시약은 모두 Sigma-Aldrich 사(St. Louis, MO, USA)의 특급 제품을 사용하였다.

2. 시료 추출 및 분획

건조된 백두구는 동천당(경북 영천, 한국)에서 구입하여 정선 수치하고 추출을 진행하였다. 먼저 파쇄한 100 g의 분말 시료에 70% 에탄올 2 L를 첨가하여 실온에서 3일 동안 교반하고, Whatman filter#2에 여과시킨 후 rotary evaporator (Büchi, Flawil, Switzerland) 50°C의 온도에서 에탄올을 증발 시켰다(수율: 29.47%). 얻어진 에탄올 추출물 재료에 hexane, dichloromethane, ethyl acetate 및 butanol을 첨가하여 분별 하였으며, H₂O층의 여액을 분리하였다. 다음 과정으로 감압 농축을 실시하여 모든 시료에서 유기 용매를 제거하였으며, freezer dryer (Labconco, Kansas City, MO, USA) 동결 건조를 실시하여 시험에 사용할 수 있는 최종 분말 형태의 시료를 얻었다.

3. Relative electrophoretic mobility (REM) assay

Human LDL의 REM은 반 등20)의 방법을 일부 수정하여 agarose gel electrophoresis에서 실시하였다. 먼저 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)에 120 μ g/mL의 농도로 희석한 LDL에 추출물 및 분획물 시료를 최종 5 및 10 μ g/mL의 농도가 되도록 첨가하였다. 이어서 10 μ M의 CuSO₄를 혼합시켜 37°C에서 12시간 동안 반응을 유지한 후, 단백질 총량 기준으로 3 μ g의 LDL을 0.7% agarose gel에서 85 volt 전압으로 한 시간 동안 전기영동 하였다. Gel은 Coomassie brilliant blue R-250 용액으로 염색하고 탈색하는 과정을 반복하여 최종 결과를 획득하여 분석하였다.

4. 세포 배양 및 생존율 측정

사람의 간암 세포주 HepG2는 한국세포주 은행(Korean Cell Line Bank, KCLB)에서 분양 받아 실험에 사용하였으며, 10%의 FBS와 1%의 penicillin-streptomycin이 함유된 DMEM에서 세포를 배양 하였다. 계대 배양은 배양용기에 70-80% 세포가 채워졌을 경우 시행 하였으며, 5%의 이산화탄소가 공급되는 CO₂ 배양기에서 37°C 조건으로 배양을 유지 하였다. 세포 생존율 측정은 EZ-cytox viability assay kit (Daeil Lab Service, Seoul, Korea)의 제품을 이용하여 제공된 방법에 따라 실시하였다. 96 well의 세포배양 용기에 well당 1 \times 10⁵개의 세포를 접종시키고 24시간 동안 배양한 후 FBS가 들어있지 않은 DMEM 배지로 다시 24시간 starvation을 유도하였다. 다양한 농도의 ACEA (10 - 200 μ g/mL)가 포함된 배지로 교환하여 24시간을 배양하였으며, 10 μ L의 EZ-Cytox 반응액을 첨가하여 2시간 동안 반응을 유도한 후 상등액을 옮겨 450

nm에서 흡광도를 측정하였다.

5. 활성 산소종 소거능 측정(DCFDA)

ACEA가 세포 내 활성산소종(intracellular ROS)을 소거하는 능력을 평가하기 위하여 DCFDA법²⁰⁾을 이용한 실험을 진행하였다. 방법으로 1×10^5 cells/well의 세포를 black well culture plate에 접종시키고, 25 및 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 ACEA와 양성대조군으로 동일한 농도의 pravastatin을 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 반응을 마친 후 Hank's 용액으로 두 번 세척하고, Hank's 용액에 희석된 5 mM의 DCFDA 10 μL 를 well 마다 첨가하여 37°C에서 30분 동안 반응을 유도하였다. 반응 후 1 mM의 과산화수소(H_2O_2)를 첨가하여 10분 동안 정치하고, 다시 Hank's 용액으로 두 번 세척하였다. 최종 100 μL 의 Hank's 용액을 각 well 마다 첨가하여 spectrofluorometer (Gemini EM, Molecular Devices, CA, USA)에서 excitation 파장 485 nm와 emission 파장 535 nm를 이용하여 형광값을 측정하였다.

6. Oil Red O assay

HepG2 세포에서 간 지방의 축적 모델은 1 mM의 지방산 (palmitic acid 및 oleic acid, 1:2)으로 24시간 동안 실시하였으며, 저농도와 고농도의 ACEA (25 및 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 및 statin (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 각각 각각 처리하였다. 세포는 ice-cold phosphate-buffered saline (PBS)로 2회 세척하고 10%의 formalin 용액에서 30분 동안 고정시키는 과정 후 60%의 isopropanol에 녹인 0.3%의 Oil O Red을 첨가하여 다시 30분 동안 실온에서 지질의 염색을 실시하였다. 염색된 세포는 흐르는 물에 2분 간 세척 후 세포가 건조되기 전 즉시 hematoxylin 대비 염색으로 시험을 종료하였으며, 붉은 색으로 염색된 지질 방울은 isopropanol에 다시 녹여 흡광도 520 nm (Versamax, Molecular Devices, USA)에서 지질 값을 측정 하였다.

7. Intracellular triglycerides (TG) 측정

Intracellular TG를 측정하기 위한 방법으로 48 well 세포 배양 용기에 10×10^4 cells/mL의 HepG2 세포를 접종하고 지방산을 첨가한 후 실험 조건에 따라 ACEA 및 statin을 처리하여 48시간 동안 반응을 유도하였다. 반응을 종료한 후 배양 상등액을 제거한 뒤 PBS로 2회 세척을 실시하였으며, 초음파 분쇄기를 이용하여 세포의 lysate를 얻었다. Intracellular TG 값은 GPO-POD (glycerophosphate oxidase - peroxidase) kit (아산제약)에 제공된 방법에 따라 흡광도 492 nm에서 최종 값을 산출하였다.

8. 과산화지질의 정량

지질의 과산화 정도를 측정하기 위한 방법으로 MDA 법²⁰⁾을 실시하였으며, 실험 조건 배양을 마친 세포에서 배양 상등액을 제거한 후 부착 세포를 cell scraper로 긁어 e-tube에 옮겨 담았다. 차가운 PBS를 이용하여 재현탁 하였으며, spin down 과정을 거쳐 상등액 최종 농도가 8.1%(w/v)가 되도록 2-thiobarbituric acid (TBA, Sigma)을 첨가하여 95°C에서 1시간 동안 반응을 유도하였

다. 반응을 마친 시료를 3,000 rpm에서 30분 동안 원심분리를 하여 상등액을 다시 96 well plate로 옮긴 뒤 540 nm에서 흡광도를 측정하고 MDA equivalents로 지질의 과산화 정도를 평가하였다.

9. Western blot 분석을 통한 단백질 발현 측정

HepG2 세포를 차가운 PBS로 두 차례 세척한 후 protease 및 phosphatase inhibitor (Roche Diagnostics)가 함유된 RIPA buffer (Invitrogen, USA)를 분주하여 얼음에서 30분 동안 반응시켰다. 반응이 종료된 세포는 cell scraper를 이용하여 배양용기로부터 덜어낸 뒤 e-tube에 옮겨 4°C 조건으로 14,000 rpm에서 30분 동안 원심분리를 실시하였으며, 얻어진 상등액은 단백질 분석을 위한 시험을 실시할 때까지 -80°C에서 보관하였다. 단백질 정량은 BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, USA)을 이용하여 실시하였고, 5%의 β -mercaptoethanol이 함유된 Laemmli sample buffer (BioRad, USA)로 희석하여 전기영동 실시를 위한 준비를 하였다. 전기영동을 실시하기 직전 시료를 100°C에서 3분 동안 반응시켜 단백질의 변성을 유도하였으며, SDS-PAGE 전기영동에는 25 $\mu\text{g}/\text{lane}$ 의 단백질을 이용하였다. 본 실험을 수행하기 위한 조건으로 10%의 SDS-polyacrylamide gel 상에서 100 V의 전압으로 80 분 동안 전기영동을 실시하였으며, PVDF membrane에 모든 단백질을 이동시키기 위한 과정으로 transfer를 실시하였다. Membrane은 비특이적 항체의 결합을 방지하기 위하여 5% skim milk에 실온에서 60분 동안 노출시켰으며, 본 실험에 관련된 항체는 anti-phospho-AMPK (Thr 172) 및 anti-CPT1 α 는 Cell Signaling 제품을 사용하였다. 단, β -actin은 SantaCruz사의 제품을 이용하였다. 1차 항체의 반응은 4°C에서 over night 동안 결합을 유도한 후 2차 항체 반응을 위하여 TBST로 수차례 세척을 실시하였으며, horseradish peroxidase-conjugated anti-IgG 2차 항체를 1:2000의 비율로 TBST에 희석하여 90분 동안 반응을 전개 하였다. 최종 이미지는 Las3000 (Fujifilm, Japan)을 이용하여 분석을 실시하였고, 발현된 단백질에 대한 정량 값은 Las3000 장비를 이용하여 β -actin 대비 목적 단백질의 발현량으로 normalization을 진행하여 값으로 표시 하였다.

10. 실시간 역전사 효소 증합반응(Real-time PCR)

염증 반응 조건의 HepG2 세포에서 Trizol 용액(Invitrogen, USA)을 manufacture의 설명을 따라 total RNA를 분리하였으며, 흡광도 260 nm와 280 nm에서 RNA를 정량하였다. 분리된 RNA에 AccuPower RT PreMix kit (Bioneer, Korea)를 사용하여 제공된 manufacture의 설명에 따라 최종 부피가 20 μL 가 cDNA를 합성하였으며, 실시간 증합효소 반응에 의한 DNA의 증폭을 유도하기 위한 primers는 IL-6, forward: 5'-CCTTGGGTCCAGTTGCCTTCT-3', reverse: 5'-CCAGTGCTCTTTGCTGCTTTC-3', IL-8, forward: 5'-CTTTCAGAGACAGCAGAG-3', reverse: 5'-CTAAGTTCTTTAGCACTCC-3', TNF- α , forward: 5'-TCTTCTCGAACC CCGAGTGA-3', reverse: 5'-CCTCTGATGGCACCACCAG-3', 그리고 house keeping gene으로 β -actin은 forward: 5'-GTTGCGTTACACCCTTTCTTG-3', reverse, 5'-GACTGCTGTACCTTCA

CCGT-3'과 같다. 중합효소 연쇄반응은 Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green mix를 사용하여 Light Cycler instrument (Roche Applied Science, USA)에서 실시하였다.

11. 통계처리

실험결과의 통계처리는 평균값 ± 표준편차(means ± S.D)로 나타내었으며, 유의성 검증은 GraphPad Prism 5 프로그램에서 One-Way Anova 방법을 이용하여 p<0.05 인 경우에 결과 값이 유의한 것으로 인정하였다.

결 과

1. ACEA가 low-density lipoprotein (LDL)의 산화를 억제하는 효과

LDL은 주로 인지질과 콜레스테롤, apoB-100 등으로 구성된 heterogeneous 분자로 백두구 70% 에탄올 추출물(EtOH)과 EtOH 추출물에서 용매별 성분분획을 실시한 시료에서 산화적 손상에 의한 ox-LDL 형성 저해율을 비교 분석하였다(Fig. 1). EtOH와 헥산(hexane), 부탄올(butanol) 및 여액인 수층(water)에서는 LDL의 산화를 차단하는 효과가 거의 나타나지 않았으나, 백두구 에텔아세테이트 분획(Amomum cardamom, ethyl acetate fraction, ACEA) 층의 10 µg/mL의 농도에서 57.9%의 저해율이 관찰되었다. 디클로로메탄(dichloromethane, DCM)의 경우 마찬가지로 고동도에서 47.4% 비율로 LDL 산화를 차단하였으며, 양성대조군(positive control, P.C)으로 사용한 ascorbic acid는 10 µg/mL를 처리하였을 때 63.2%의 저해를 나타내었다.

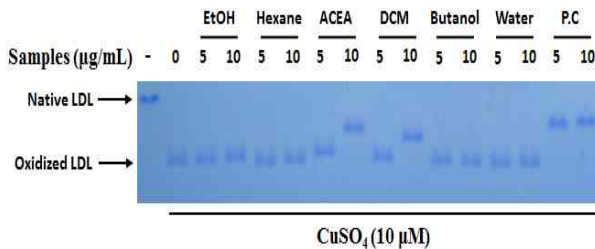


Fig. 1. Protective effects of ACEA on Cu²⁺-induced human LDL oxidation. Human LDL was incubated for 12 h at 37°C with indicated concentrations of ACEA in the absence or presence of 10 µM CuSO₄. Relative electrophoretic mobility (REM) for ox-LDL forming suppression was performed as described in materials and methods section. Results are representative images of 3 independent experiments.

2. ACEA가 세포 생존율에 미치는 영향 및 산화적 스트레스를 소거하는 효과

ACEA가 사람의 간암 세포주인 HepG2 cell의 생존율에 미치는 영향을 평가하고자 MTT assay를 실시한 결과 최종농도 10 - 200 µg/mL에서 각각 116.5, 85.4, 87.6, 76.8, 66.7 및 38.3%의 생존이 관찰되었다(Fig. 2A). 평가에 따른 결과로 세포가 안정한 농도를 25와 50 µg/mL로 설정하였으며, 1 mM의 free fatty acids (FFAs, palmitic acid 및 oleic acid, 1:2 비율)로 산화적 스트레스를 유발하였을 때 ACEA 50 µg/mL의 농도에서 형광값이 113.7로 시험군 중 가장 낮게 관찰 되었다(Fig. 2B).

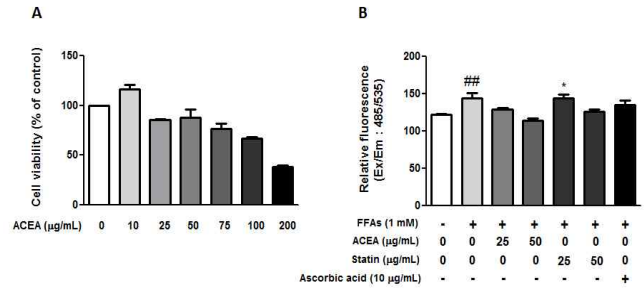


Fig. 2. Effects of ACEA on cell viability and its anti-oxidant property in HepG2 cells. (A) HepG2 cells were incubated for 48 h with various concentration of ACEA (10 - 200 µg/mL). Cell viability was determined as described in materials and methods section. (B) Quantification of ROS generation in HepG2 cell using DCFDA assay. HepG2 cells were cultured in 1 mM FFAs containing medium in the presence of ACEA (25 and 50 µg/mL) or statin (25 and 50 µg/mL), and ascorbic acid for 24 h. ##P < 0.01 compared to normal condition, and *P < 0.05 compared to FFAs-induced group.

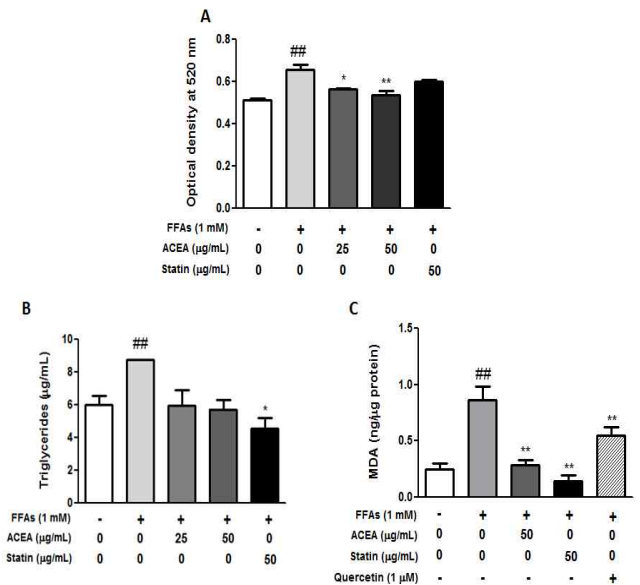


Fig. 3. Effects of ACEA on FFAs-stimulated lipid accumulation and peroxidation in HepG2 cells. (A) HepG2 cells were incubated for 24 h with various concentration of ACEA (25 and 50 µg/mL) and statin (50 µg/mL). Spectrophotometric-based quantitative measurement of the Oil Red O staining of cells subjected to experimental condition. (B) Evaluation of the effect of ACEA on the intracellular triglycerides. (C) HepG2 cells were cultured in 1 mM FFAs containing medium in the presence of ACEA (25 and 50 µg/mL) or statin (25 and 50 µg/mL), and quercetin (1 µM) for 24 h. Cells from each group was collected to investigated MDA level. All data represent the mean ± S.D of three different experiment. ##P < 0.01 compared to normal condition, and *P < 0.05, **P < 0.01 compared to FFAs-induced group.

3. ACEA가 세포 내 지방의 축적 방어와 TG, 지질과산화를 억제하는 효과

ORO 시험법으로 ACEA가 세포 내 지질 축적을 방어하는 효능을 살펴본 결과 25 및 25와 50 µg/mL 농도에서 의존적인 감소가 관찰되었으며(O.D 값 평균, 각 0.55 및 0.49), 양성 대조군으로 처리한 50 µg/mL statin 보다 우수한 효능을 나타내었다(Fig. 3A). Intracellular TG의 경우에는 FFAs로 유도한 그룹이 8.77 µg/mL

의 TG를 생산한 반면 ACEA를 처리하였을 때 최대 5.73 µg/mL까지 감소하였다(Fig. 3B). 지질의 과산화를 억제하는 효과를 관찰한 결과 50 µg/mL의 ACEA는 양성대조군으로 처리한 quercetin 1 µM 보다 약 2배 정도 효능이 우수한 것으로 나타내었다(Fig. 3C).

4. AMPK-signaling pathway 및 CPT1α의 발현에 ACEA가 미치는 영향

Western blot 방법으로 ACEA가 간 지방증을 억제하는 세포의 신호 기전을 알기 위하여 인산화 형태의 AMPK와 CPT1α를 측정된 결과 처리농도 25 µg/mL에서 가장 우수한 지방산의 생합성 감소 및 간 조직에서 지방의 베타 산화(β-oxidation)를 기대할 수 있는 결과를 보였다(Fig. 4).

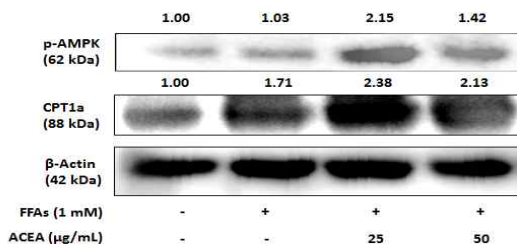


Fig. 4. Effects of ACEA on FFAs-stimulated activation of AMPK phosphorylation and CPT1α expression. HepG2 cells were incubated for 24 h with different concentrations of ACEA (25 and 50 µg/mL). Western blot analysis of phospho-AMPK and CPT1α in HepG2 cell lysates treated with FFAs (1 mM) in the absence or presence of different concentration of ACEA. Blot normalization determined as described in materials and methods section.

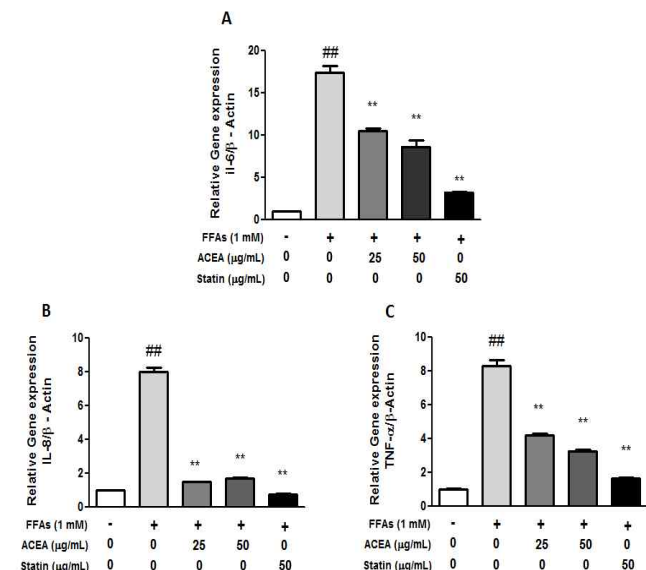


Fig. 5. Effects of ACEA on FFAs-stimulated IL-6, IL-8 and TNF-α mRNA expression levels in HepG2 cells. (A-C) The production of inflammatory cytokines including IL-6, IL-8 and TNF-α were determined using quantitative polymerase chain reaction. All data represent the mean ± S.D. of three different experiment. ##P < 0.01 compared to normal condition, and **P < 0.01 compared to FFAs-induced group.

5. 역전사 반응에 따른 염증성 사이토카인 mRNA의 발현 저해 효과

FFAs로 염증성 cytokines의 mRNA 발현을 유도한 결과 IL-6는 약 17.5배, IL-8은 8.0배, 그리고 TNF-α는 약 8.3배의 발현이 증가되었으나, ACEA 및 statin을 처리한 경우 IL-6 및 TNF-α는 ACEA 농도에 의존적인 발현 감소를 나타내었다. 대조군으로 사용한 statin은 본 연구 실험 중 염증성 cytokines를 가장 잘 조절하는 효능을 나타내었다(Fig. 5A, B, C).

고찰

백두구(白菟藪)는 생강과의 여러 해 살이 풀로 열매를 말려 약재로 사용한다. 성미는 온(溫)하고 신(辛)한 것으로 무독(無毒)하다 알려져 있으며, 비위(脾胃)에 습을 제거하고 복부창만과 음식에 생각이 없을 때 효력을 나타내는 것으로 기록되어 있다¹⁰. 위장이 차서 일어나는 구토, 복통 등을 치료하는 것을 보아 현대 의학적 해석으로 위액 분비 촉진과 장관의 흥분 등의 작용을 나타내어 소화기 질환에 적용 가능하다. 본 연구에서는 백두구를 성분 분획 추출하여 소화 작용을 상승시키는 약물이 간 지방증(liver steatosis)에 미치는 영향을 평가하였으며, 다음과 같은 긍정적 결론을 도출할 수 있었다.

사람의 low-density lipoprotein (LDL)은 혈관에서 몇몇의 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS) 및 이온과의 반응에 의하여 산화형 LDL (oxidized-LDL, ox-LDL)을 형성하는데, 변형된 ox-LDL은 생체에서 다양한 염증 반응을 매개 한다²¹. 특히, 단핵구(monocyte) 세포의 분화를 촉진하여 대식세포(macrophage)의 염증성 사이토카인(inflammatory cytokines)의 분비를 유도하여 궁극적으로 염증 반응의 진행에 부담을 증가 시키는 것으로 잘 알려져 있다²². 백두구 추출물 중 어떠한 성분 분획이 우수한 ox-LDL 저해 활성을 갖는지 살펴 본 결과 ethyl acetate (EA)층과 dichloromethan (DCM) 층에서 우수한 저해 성능을 나타내었다(Fig. 1). 열매를 사용하는 한약재의 경우 지질이 많이 함유되어 있는 특성 상 목적 질환에 유지(油脂) 성분이 유효한 한 것으로 알려져 있으나, 백두구의 경우에는 ox-LDL의 형성을 차단하는 효능이 EA 및 DCM 분획에 포함된 phenolic compounds로 추정되었다. 이러한 결과는 본 연구진의 선행 연구에서 CCL₄로 유도한 백서의 급성 간손상을 예방하거나 치료하는 백두구의 효능 결과와 일치하였으며 본 연구에서는 EA 층을 재료로 사용하여 실험을 진행하였다¹⁹.

스타틴(statins)은 현재까지 고지혈증을 치료할 수 있는 유일한 단일성분 합성 신약으로 평가되어 있으나 ROS와의 연계성에 대한 보고가 미흡하며, 일부 환자에서는 두통 등의 부작용을 나타내는 것으로 알려져 있다²³. 따라서 스타틴 계열 약물의 효능 향상과 성분 개량을 통한 부작용 감소의 노력이 다국적 제약 회사를 중심으로 연구 진행 중에 있으며, 민족 고유의 전통 한약에서 고지혈에 유효한 성분을 발견하는 것이 유의미한 연구가 될 것이다. 본 연구에서는 DCF-DA법을 이용하여 백두구 에틸아세테이트 분획(ACEA) 및 스타틴(pravastatin)을 인간의 간암 세포주(human hepatocellular carcinoma cell line, HepG2)에 처리하여 ROS를 소거하는 활성을 살펴보았다. 세포 생존을 실험에서 HepG2 cells의 생존에 아무

런 영향을 주지 않는 ACEA의 농도(Fig. 2A)와 동일한 비율로 실험 대조군 스타틴(pravastatin)을 사용하였으며, 결과적으로 스타틴보다 ACEA가 ROS를 소거하는 효능이 우수한 것으로 관찰이 되었다.

지속적인 고지방식의 공급은 혈액 및 관련조직(간, 근육, 지방)에 triglycerides (TG)와 같은 지질의 함량을 높이게 되고 축적된 지질은 ROS에 의하여 지질과산화가 일어나 최종적으로 비알콜성 지방간 병증(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)과 같은 연관 질병을 유발하는 것으로 알려져 있다²⁴). 간세포에 지방의 직접적 축적을 나타내는 Oil Red O 분석을 통하여 ACEA 및 statin이 지질의 축적을 저해하는 효능을 HepG2 세포에서 복합 지방산의 처리(palmitic acid 및 oleic acid)로 산출하였다(Fig. 3A). ACEA는 처리 농도 모두에서 statin 최고 농도(50 µg/mL)에서보다 유의적으로 의미 있는 지방 축적의 저해 정도를 나타내었으며, 아울러 세포 내 triglycerides의 축적을 제어하였다(Fig. 3B). 지질의 과산화 정도를 평가하기 위한 malondialdehyde (MDA) 지질과산화 측정법을 실시한 결과 양성대조군인 quercetin (최종농도 1 µM)보다 과산화 억제 효능이 우수한 것으로 측정되었다(Fig. 3C). Quercetin은 강력한 항산화 물질로 단일 성분에 대한 간 지방증 제어 효과에 대한 보고 뿐만 아니라 이를 함유하고 있는 한약의 활성에 대한 실험 연구가 다수 검증되어 있다²⁵⁻²⁷).

백두구 EA 분획 추출물이 산화적 스트레스(oxidative stress)의 제어를 통하여 간 지방증을 억제하는 효과를 세포 내부의 신호 분자(signaling molecule) 변화로 살펴보기 위하여 진핵생물체의 세포 및 조직 대사의 조절자 중 하나로 알려진 AMP-activated protein kinase (AMPK) 신호 전달 과정(AMPK signaling pathway)을 살펴보았다(Fig. 4). 알려진 바와 같이 AMPK는 지질 대사에서 핵심적 역할을 담당하고 있으며, 특히 간에서 AMPK가 인산화(phosphorylation)되면 지방산의 합성과 지방질 생합성이 차단된다²⁸). 복수의 작용으로 세포 호흡에 관여하는 미토콘드리아 효소인 carnitine palmitoyltransferase I (CPT1)의 발현 증가는 지방의 베타-산화(beta-oxidation)를 유도하여 간의 지방산을 감소시킨다¹⁶). ACEA는 AMPK 신호의 인산화에 자극을 전달하였을 뿐만 아니라 CPT-1α의 발현을 증가시켰으므로 지방산의 합성 차단과 베타 산화를 통한 지방산 연소를 통하여 간 지방증을 개선할 것으로 기대 할 수 있다.

염증(inflammation)의 관리를 목표로 하는 항염증 치료는 한약을 재료로 하는 연구에서 IL-6, IL-8 및 TNF-α의 조절을 1차적으로 수행하게 되는데, 이러한 염증 반응을 주도적으로 차단하는 것은 우리 몸의 거대한 조직 중 간의 지방화 감소를 기대할 수 있다^{17,29}). 인터류킨과 같은 사이토카인(cytokines)류는 인체의 면역 체계에서 체액성 면역과 세포성 면역 사이에서 균형을 맞추는 조절자로 IL-6 및 IL-8은 전염증성반응(pro-inflammatory)에서 염증성 감염원에 대응하는 역할을 수행한다³⁰). TNF-α 또한 체내의 염증성 반응 중 급성 단계 반응에서 세포 신호 전달에 관여하는 사이토카인으로 선제적 면역 반응(primary immune response)을 조절하는 것으로 알려져 있다. 따라서 ACEA가 지방산으로 유도한 이들 사이토카인류의 mRNA 수준을 정상 범위로 조절하는 효과 확인을 통하여 간의 만성적 염증에 의하여 축적된 간 지방증을 제어할

수 있을 것으로 분석 되었다.

이상의 실험결과 ACEA는 LDL의 산화를 차단하고, ROS를 소거하였으며, 조직에서 지방의 축적을 방어하는 효능을 나타내었다. 그리고 TG와 같은 지방산의 합성을 억제하였으며, 지방산의 산화로 인한 세포의 손상을 방어하는 것으로 관찰이 되었다. ACEA는 또한 세포내의 주요한 신호 전달 과정으로 AMPK-signaling pathway를 경유 하였으며, 인산화된 AMPK 신호의 주요한 하위 전달 과정에서 CPT-1α를 자극하여 간에서 지방산의 합성을 저해하는 것으로 확인이 되었다. 끝으로 복합 지방산에 의해 유도한 염증성 반응을 정상 범위 수준까지 낮춘 간에서 지방의 축적으로 인하여 유발되는 염증성 반응을 조기에 차단할 수 있을 것으로 예상되었다.

결 론

백두구의 에틸아세테이트 분획 추출물 (Ammomum cardamun L., Ethyl acetate fraction, ACEA)은 사람의 LDL 산화를 우수한 효능으로 방어 하였고, 산화적 스트레스를 억제하는 기전을 나타내었다. 세포 실험에서 ACEA가 생존율에 영향을 미치지 않는 범위에서 지질의 축적(ORO), 지방산 합성의 감소(TG) 및 지질과산화(MDA) 억제를 나타내었으며, AMPK 신호 전달 경로를 경유하는 것으로 보인다. 나아가 사이토카인류(IL-6, IL-8 및 TNF-α)를 정상 범위로 조절하는 것을 볼 때 고지방식으로 유도된 간의 지방증을 예방하거나 치료하는 비교적 구성이 간단한 물질로 ACEA는 안정적이며 유효성이 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2016년도 동국대학교 한의과대학 교내 기획연구 과제(한의과대학 공동연구 시스템 구축) 지원으로 이루어졌습니다.

References

1. Kumar A, Sharma A, Duseja A, Das A, Dhiman RK, Chawla YK, et al. Patients with nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD) have higher oxidative stress in comparison to chronic viral hepatitis. *J Clin Exp Hepatol*. 2012;3:12-8.
2. Li S, Tan HY, Wang N, Zhang ZJ, Lao L, Wong CW, Feng Y. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *Int J Mol Sci*. 2015;16:26087-124.
3. Griffith CM, Schenker S. The role of nutritional therapy in alcoholic liver disease. *Alcohol Res Health*. 2006;29:296-306.
4. Matteoni CA, Younossi ZM, Gramlich T, Boparai N, Liu YC, McCullough AJ. Nonalcoholic fatty liver disease: a spectrum of clinical and pathological severity. *Gastroenterology*. 1999;116:1413-9.

5. Marchesini G, Brizi M, Morselli-Labate AM, Buqianesi E, McCullough AJ, Forlani G. Association of nonalcoholic fatty liver diseases with insulin resistance. *Am J Med.* 1999;107:450-5.
6. Sato K, Goshio M, Yamamoto T, Kobayashi Y, Ishii N, Ohashi T, et al. Vitamin E has a beneficial effects on nonalcoholic fatty liver disease: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutrition.* 2015;31:323-930.
7. Rouabhia S, Milic N, Abenavoli L. Metformin in the treatment of non-alcoholic fatty liver disease: safety, efficacy and mechanism. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol.* 2014;8:343-9.
8. Pastori D, Polimeni L, Baratta F, Pani A, Del Ben M, Anselico F. The efficacy and safety of statins for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Dig Liver Dis.* 2015;47:4-11.
9. Di Minno MN, Russolilo A, Lupoli R, Ambrosino P, Di Minno A, Tarantino G. Omega-3 fatty acids for the treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2012;18:5839-47.
10. Heo J. *Translated Dongeuibogam.* 1st ed. Seoul: Bubinmunwha; 1999.
11. Lee DH, Kang SS, Chang IM, Mar W. Detection of anti-inflammatory agents from natural products as inhibitors of cyclooxygenase I and II. *Nat Prod Sci.* 1997;3:19-28.
12. Murata S, Ogawa K, Matsuzaka T, Chiba M, Nakayama K, Iwasaki K, et al. 1,8-Cineole ameliorates steatosis of pten liver specific KO mice via Akt inactivation. *Int J Mol Sci.* 2015;16:12051-63.
13. Viollet B, Foretz M, Guigas B, Horman S, Dentin R, Bertrand L, et al. Activation of AMP-activated protein kinase in the liver: a new strategy for the management of metabolic hepatic disorders. *J Physiol.* 2006;574: 41-53.
14. Smith BK, Marcinko K, Desjardins EM, Lally JS, Ford RJ, et al. Treatment of nonalcoholic fatty liver disease: role of AMPK. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2016;311: 730-40.
15. Kohijima M, Higuchi N, Kato M, Kotoh K, Yoshimoto T, Fujino T, et al. SREBP-1c, regulated by the insulin and AMPK signaling pathways, plays a role in nonalcoholic fatty liver disease. *Int J Mol Med.* 2008;21:507-11.
16. Thomson DM, Winder WW. AMP-activated protein kinase control of fat metabolism in skeletal muscle. *Acta Physiol.* 2009;196:147-54.
17. Tolman KG, Dalpiaz AS. Treatment of non-alcoholic fatty liver disease. *Ther Clin Risk Manag.* 2007;3:1153-63.
18. Braunersreuther V, Viviani GL, Mach F, Montecucco F. Role of cytokines and chemokines in non-alcoholic fatty liver disease. *World J Gastroenterol.* 2012;18:727-35.
19. Lim DW, Kim H, Park JY, Kim JE, Moon JY, Park SD, Park WH. Amomum cardamomum L. ethyl acetate fraction protects against carbon tetrachloride-induced liver injury via an antioxidant mechanism in rats. *BMC Complement Altern Med.* 2016;16:155.
20. Lim DW, Bose S, Wang JH, Choi HS, Kim YM, Chin YW, et al. Mofied SJH alleviates FFAs-induced hepatic steatosis through leptin signaling pathways. *Sci Rep.* 2017;7:45425.
21. Min KJ, Cho KH, Kwon TK. The effects of oxidized low density lipoprotein (oxLDL)-induced heme oxygenase-1 on LPS-induced inflammation in RAW 264.7 macrophage cells. *Cell Signal.* 2012;24:1215-21.
22. Bekkering S, Quintin J, Joosten LA, van der Meer JW, Netea MG, Riksen NP. Oxidized low-density lipoprotein induces long-term proinflammatory cytokine production and foam cell formation via epigenetic reprogramming of monocytes. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014;34:1731-8.
23. Beltowski J. Statins and modulation of oxidative stress. *Toxicol Mech Methods.* 2005;15:61-92.
24. Leamy AK, Eqnatchik RA, Young JD. Molecular mechanisms and the role of saturated fatty acids in the progression of non-alcoholic fatty liver disease. *Prog Lipid Res.* 2013;52:165-74.
25. Boots AW, Haenen GR, Bast A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *Eur J Pharmacol.* 2008;585:325-37.
26. Sultana B, Anwar F. Flavonols (kaempferol, quercetin, myricetin) contents of selected fruits, vegetables and medicinal plants. *Food Chem.* 2008;108:879-84.
27. Lee KG, Shibamoto T, Takeoka GR, Lee SE, Kim JH, Park BS. Inhibitory effects of plant-derived flavonoids and phenolic acids on malonaldehyde formation from ethyl arachidonate. *J Agric Food Chem.* 2003;51:7203-7.
28. Horton JD, Goldstein JL, Brown MS. SREBPs: activators of the complete program of cholesterol and fatty acid synthesis in the liver. *J Clin Invest.* 2002;109:1125-31.
29. Kim JE. Tribulus terrestris suppresses the lipopolysaccharide-induced inflammatory reaction in RAW264.7 macrophages through heme oxygenase-1 expression. *Korean J Oriental Physiology & Pathology.* 2014;28:63-8.
30. Sikora JP, Chlebna-Sokól D, Krzyńska-Oberbek A. Proinflammatory cytokine (IL-6, IL-8), cytokine

inhibitors (IL-6sR, STNFRII) and anti-inflammatory cytokines (IL-10, IL-13) in the pathogenesis of sepsis in

newborns and infants. Arch Immunol Exp. 2001;49:399-404.