KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 53, No. 3, pp. 344~347 (2021)
https://doi.org/10.9721/KJFST.2021.53.3.344

KOREAN JOURNAL OF
한국식품과학회지
FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY
©The Korean Society of Food Science and Technology

Chaparral 추출물에 의한 *in vitro* 간세포 염증반응

김 일 낭[1,*]
[1]울산과학대학교 식품영양학과

In vitro hepatocyte inflammation by chaparral extract

Ilrang Kim[1,*]
[1]*Department of Food and Nutrition, Ulsan College*

Abstract In this study, the hepatotoxic mechanism of chaparral (*Larrea tridentata*) was investigated through *in vitro* experiments that measured cell death, inflammatory cytokine secretion, and intracellular fat accumulation by treating HepG2 hepatocytes with a 70% ethanol extract of chaparral at concentrations ranging from 0.001 to 100 μg/mL. Cell death was observed after treatment with chaparral extract at concentrations of 1-100 μg/mL (p<0.05). The secretion of the inflammatory cytokines, interleukin-8 and macrophage-colony stimulating factor, and fat accumulation were significantly increased even at a concentration of 0.1 μg/mL, which was 10 times lower than the observed concentration resulting in cell death (p<0.05). Hepatitis caused by inflammatory cytokine secretion and fat accumulation was shown to be a form of hepatotoxicity induced by chaparral extract. Hepatitis was expressed at a concentration lower than that causing serious toxicity such as cell death, suggesting that hepatotoxicity, including hepatitis, may be caused by ingestion of low concentrations of chaparral.

Keywords: chaparral (*Larrea tridentata*), hepatotoxicity, hepatitis, cytokine, lipid accumulation

서 론

건강기능식품, 셀프 메디케이션(self-medication), 대체 의학, 한방치료 등의 목적으로 섭취하고 있는 다양한 식물 유래의 제품들은 천연물이므로 안전성에 문제가 없을 것이라고 인식하고 있는 경우가 많다. 그러나 식물성 제제의 섭취에 따른 부작용이 지속적으로 보고되고 있고(Shaw, 2010), 특히 식물성 제제의 복용으로 인한 가장 빈번한 부작용 사례는 간독성으로 이들 제품의 판매가 금지되는 가장 주요 원인으로 보고되고 있다(Björnsson, 2006; Estes 등, 2003; Stickel 등, 2005). 간독성을 유발하는 것으로 보고된 식물에는 germander, Jin Bu Huan, chaparral, ma-huang (Stickel 등, 2000) 등이 있다.

Chaparral은 전통적으로 멕시코나 미국 인디언들에 의해 차로 섭취하거나 신장결석, 담석 등의 질병 치료 목적으로 이용되어 왔으며(Sheikh 등, 1997), 근래에는 chaparral 단독 또는 다른 식물성 제제와 혼합하여 건강보조식품의 형태로 판매되어 왔다. 그러나 chaparral을 섭취한 사람들에게서 간독성 사례들이 보고되었다(Batchelor 등, 1995; Gordon 등, 1995; Sheikh 등, 1997). Chaparral에는 secoisoguaiacin, nordihydroguaiaretic acid (NDGA), dihydroguaiaretic acid 등의 성분이 독성 성분으로 함유되어있는데 이들 중 chaparral에 의한 독성을 유발하는 주된 성분은 NDGA로 알려져 있다(Arteaga 등, 2005). NDGA는 chaparral 건조 중량당 10% 정도까지 다량 함유되어 있는 것으로 알려져 있어 chparral로부터 섭취하는 NDGA는 상당한 양에 이르는 것으로 보고되었다(Lambert 등, 2002).

현재까지 chaparral의 간독성에 관한 연구는 대부분 chaparral 섭취로 인한 간손상 유발 환자에 관한 사례 보고에 한정되어 있고(Batchelor 등, 1995; Gordon 등, 1995; Sheikh 등, 1997) 동물실험이나 *in vitro* 실험을 통한 간독성 기전에 대한 연구는 부족한 실정이다. 수컷 랫드를 이용한 실험에서 세포 사멸을 유발하는 Fas 및 Fas ligand가 chaparral 투여 농도에 의존적으로 혈청 및 간조직에서 증가하였으며(Lee, 2006), chaparral의 주요 독성 성분인 NDGA 투여에 의해 마우스의 혈청 alanin aminotransferase (ALT)가 유의적으로 상승하였다(Lambert 등, 2002). 이러한 연구들을 통해 chaparral이 간손상을 유발하는 것으로 나타났으나, 그 외 간독성 기전에 대한 연구가 부족하고 임상 사례 연구를 통해 간독성과 밀접한 관련이 있다고 알려진 사이토카인인 interleukin 8 (IL-8) (Elewa 등, 2010; Zimmerman 등, 2011) 및 macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) (Itoh 등, 1994) 등에 대한 동물 및 세포 모델 연구는 보고된 바가 없어 이들 지표에 대한 연구가 필요한 상황이다.

Chaparral은 국내에서 판매되고 있지 않으며 이의 섭취로 인한 간손상 사례 또한 보고된 바 없으나 향후 차 등의 기호식품이나 식이보조제 등으로의 사용 가능성에 대비하여 위해성에 대한 자료를 확보해 두는 것이 필요하다고 사료된다. 이에 본 연구에서는 *in vitro* 간세포 실험을 통해 chaparral 추출물에 의한 간세포 사멸, IL-8 및 M-CSF와 같은 사이토카인 분비, 간세포 내 지방 축적 정도를 측정함으로써, chaparral의 간독성 기전에 관한 자료를 확보하고 나아가 건강보조식품 등으로 이용되는 식물성 제제

*Corresponding author: Ilrang Kim, Professor, Department of Food and Nutrition, Ulsan College, Ulsan 44022, Korea.
Tel: +82-52-230-0745
Fax: +82-52-230-0749
E-mail: irkim@uc.ac.kr
Received February 22, 2021; revised April 28, 2021;
accepted May 24, 2021

의 안전성 평가를 위한 기초 자료로 활용되고자 하였다.

재료 및 방법

Chaparral 추출

본 실험에 사용된 chaparral은 호주 산지의 것으로 잎과 줄기가 모두 포함된 제품을 구입하여 동결건조한 후 마쇄하여 분말 형태로 만들어 실험에 사용하였다. Chaparral 분말에 20배(w/v)의 70% 에탄올(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)을 가하여 70°C 진탕항온수조에서 24시간 동안 추출하였다. 추출액을 Whatman No. 42 여과지(Whatman, Maidstone, UK)로 여과시키고 감압농축기를 이용하여 에탄올을 제거한 후 동결건조 시켜 건조 추출물을 얻었다. 건조 추출물을 dimethylsulfoxide (DMSO, Sigma-Aldrich Co.)로 재용해한 후 배지를 이용하여 농도별로 희석하고 DMSO의 최종 농도를 0.1%로 하여 세포에 처리하였다.

세포 배양

ATCC (American Type Culture Collection, Manassas, VA, USA)에서 HepG2 (human hepatocellular carcinoma) 세포를 분양받아, 10% FBS (Gibco, Grand Island, NY, USA)를 첨가한 DMEM (Gibco, Grand Island) 배지를 이용하여 37°C, 5% CO_2의 배양기에서 배양하면서 실험에 사용하였다.

세포 사멸 측정

Chaparral 추출물이 세포 사멸에 미치는 영향을 알아보기 위해 MTT assay를 수행하였다. 55°C의 항온수조에서 30분간 열로 불활성화시킨 FBS를 10% 함유한 DMEM 배지를 이용하여 HepG2 세포를 96 well plate에 분주하고 24시간 동안 배양시켰다. 동일 배지를 사용하여 chaparral 추출물을 농도별로 희석하여 HepG2 세포에 처리한 후 37°C 배양기에서 24시간 동안 반응시켰다. 추출물을 제거하고 3-(4,5-dimethyl thiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT, Sigma-Aldrich) 시약을 가한 후 배양기에서 반응시켰다. 3시간 후 MTT 시약을 제거하고 DMSO를 가하여 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후 microplate reader (Model 680, Bio-Rad Inc., Tokyo, Japan)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

사이토카인 분비 측정

Chaparral 추출물에 의해 분비되는 사이토카인 IL-8의 측정을 위해 열로 불활성화시킨 FBS를 10% 함유한 DMEM 배지를 이용하여 HepG2 세포를 48 well plate에 분주하고 24시간 동안 배양시켰다. 열로 불활성화시킨 FBS를 5% 함유한 DMEM 배지를 이용하여 chaparral 추출물을 농도별로 희석한 후 세포에 처리하고 37°C 배양기에서 24시간 동안 반응시켰다. 그 후 상층액을 취하여 Quantikine Human CXCL8/IL-8 ELISA kit (R&D systems, Minneapolis, MN, USA)를 이용하여 실험하고 microplate reader (Model 680, Bio-Rad Inc.)로 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 사이토카인 M-CSF의 분비는 IL-8 분비 실험과 동일한 방법으로 세포에 추출물을 처리하고 상층액을 취하여 Quantikine Human M-CSF ELISA kit (R&D systems)로 실험하고 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

지방 축적 측정

세포를 Black-walled 96 well optical plate에 분주하고 24시간 후 chaparral 추출물을 농도별로 처리하고 37°C 배양기에서 반응시켰다. 3시간 후 상층액을 버리고 Hank's Balanced Salt Solution (HBSS, Sigma-Aldrich Co.)로 2번 세척한 다음 HBSS를 가하고 back ground 형광(excitation 535 nm, emission 580 nm)을 Victor3 plate reader (Perkin-Elmer, Wellesley, MA, USA)를 이용하여 측정하였다. HBSS를 제거하고 1 μM nile-red (Sigma-Aldrich Co.)를 첨가한 후 실온의 어두운 곳에서 4시간 동안 반응시켰다. 그 후 상층액을 제거하고 HBSS로 3번 세척한 후 HBSS를 첨가하여 실온의 어두운 곳에서 반응시켰다. 12시간 후 다시 형광을 측정하여 이 값으로부터 back ground 형광값을 빼서 상대적인 형광값을 비교하였다.

통계처리

모든 실험은 3회 반복실시하여 나온 결과를 평균±표준편차로 나타내었다. 각 실험군별 유의성은 SPSS (Statistical Package for the Social Science) 15.0 프로그램을 이용하여 ANOVA로 분석하였으며, $p<0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test로 검정하였다.

결과 및 고찰

간세포 사멸

Chaparral 추출물이 HepG2 간세포 사멸에 미치는 영향을 MTT 실험을 통해 측정한 결과(Fig. 1), chaparral 추출물은 1-100 μg/mL의 처리 농도에서 대조군의 61.34±6.79-86.64±3.10% 수준으로 세포 생존율을 감소시켜 세포 사멸에 의한 세포 독성을 유발하는 것으로 나타났다($p<0.05$).

IL-8 및 M-CSF 분비

염증반응 시에 분비되는 사이토카인인 IL-8은 알코올성 간염 및 C형 간염 환자 등의 혈청에서 고농도로 검출되어 간염과 밀접한 관계가 있는 지표로 보고되고 있다(Elewa 등, 2010; Zimmerman 등, 2011). 이에 본 연구에서는 chaparral 추출물이 간세포에 염증을 유발하는지를 알아보기 위해 chaparral 추출물 처리에 의한 염증성 사이토카인인 IL-8의 분비 정도를 측정하였다(Fig. 2). Chaparral 추출물은 0.1-100 μg/mL의 농도에서 간세포의 IL-8 분비를 대조군의 113.49±5.86-349.61±35.26%까지 유의적으로 증가시켰다($p<0.05$). Gutierrez-Ruiz 등(2001)은 간독성 유발 물질

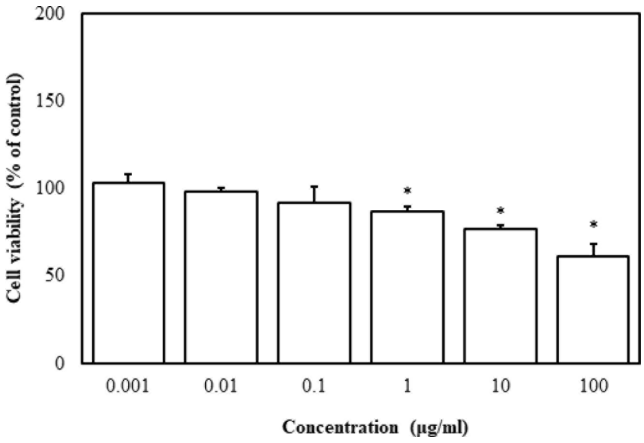

Fig. 1. HepG2 cell viability by chaparral extract. HepG2 cells were treated chaparral extract. After 24 h MTT assay was conducted. Results presented as % of control. Values are presented as mean±SD (n=3); *$p<0.05$ compared with control group.

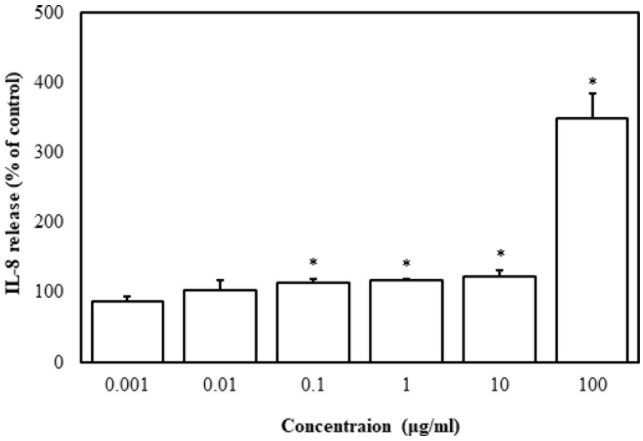

Fig. 2. IL-8 secretion of HepG2 cells by chaparral extract. HepG2 cells were treated chaparral extract. After 24 h IL-8 secretion was investigated. Results presented as % of control. Values are presented as mean±SD (n=3); *p<0.05 compared with control group.

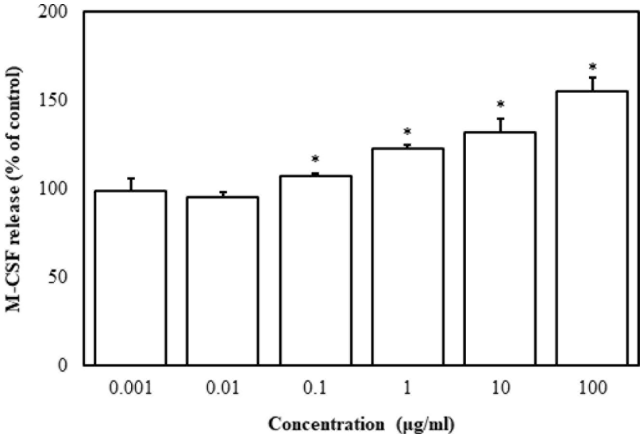

Fig. 3. M-CSF secretion of HepG2 cells by chaparral extract. HepG2 cells were treated chaparral extract. After 24 h M-CSF secretion was investigated. Results presented as % of control. Values are presented as mean±SD (n=3); *p<0.05 compared with control group.

로 잘 알려진 50 mM 에탄올, 1 μg/mL lipopolysaccharide (LPS), 175 μM 아세트알데히드가 HepG2 세포로부터 IL-8 분비를 각각 대조군의 196±11.5, 213±21, 223±18.9% 수준으로 촉진시키는 것으로 보고하였다. 본 연구에서의 chaparral 추출물은 단일 성분이 아니어서 에탄올 등의 약물과 직접적인 농도 비교는 어려우나 최대 349.61%까지 IL-8의 분비를 촉진하는 결과를 나타내어 고농도에서는 약물이 아닌 식물성 추출물에 의해서도 간염 및 간독성이 유발될 가능성과 그 위험성의 수준이 매우 클 수 있음을 시사한다.

염증에 의해 분비가 촉진되는 또 다른 사이토카인인 M-CSF도 급성 및 만성 간염 환자에게서 유의적으로 증가하는 것으로 알려져 있다(Itoh 등, 1994). HepG2 간세포에 chaparral 추출물을 처리한 결과 0.1-100 μg/mL의 농도에서 간세포의 M-CSF 분비가 대조군의 106.98±2.16-155.27±7.84% 수준으로 유의적으로 증가되었다(p<0.05) (Fig. 3). Chaparral 추출물에 의해 *in vitro* 간세포에서 염증성 사이토카인 M-CSF 분비가 촉진되는 것으로 나타난 본 연구와 간염 환자에게서 M-CSF가 증가된 연구는 서로 상응하는

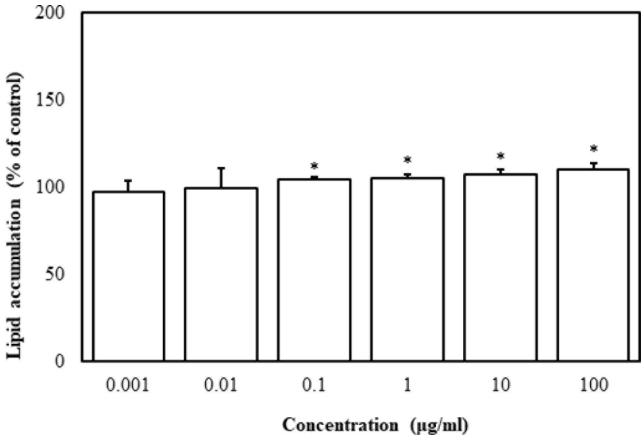

Fig. 4. Lipid accumulation of HepG2 cells by chaparral extract. HepG2 cells were treated chaparral extract. After 3 h lipid accumulation was investigated. Results presented as % of control. Values are presented as mean±SD (n=3); *p<0.05 compared with control group.

결과를 나타내 M-CSF가 간염과 밀접한 관련이 있음을 시사한다. 또한 본 연구에서 chaparral 추출물은 다른 농도에 비해 100 μg/mL 농도에서 사이토카인의 분비를 크게 증가시켜, chaparral 섭취로 이한 간손상 발생 환자들의 혈청과 간조직 등에서 chaparral의 성분 및 대사물질의 농도를 측정해 보는 것이 chaparral의 간독성 기전 및 안전성 평가를 위해 필요할 것으로 사료된다.

간세포 지방 축적

Chaparral 추출물에 의한 HepG2 간세포의 지방 축적 정도를 측정한 결과(Fig. 4) 0.1-100 μg/mL 농도에서 대조군의 104.58±2.01-109.72±0.80% 수준으로 세포 내 지방 축적이 유의적으로 관찰되었다(p<0.05). Chaparral 추출물의 처리 농도 증가에 따라 축적된 지방의 양이 큰 폭으로 상승하지는 않았으나 적은 양이지만 넓은 범위의 농도에서 지방의 축적이 유의적으로 나타나 심각한 간손상보다는 약한 염증을 통해 간에 영향을 미칠 수 있는 가능성을 나타냈다. 유독 물질에 의해 간세포의 미토콘드리아가 손상되면 대사되지 못한 지방이 축적되고, 이는 활성산소종의 증가를 통해 지방의 산화를 촉진시켜 유해한 알데히드를 생성시키게 된다. 이들 활성산소종이나 알데히드 부산물은 사이토카인의 분비를 증가시키고 염증 반응을 유발함으로써 간세포 손상을 초래한다고 알려져 있다(Browning과 Horton, 2004; Esterbauer 등, 1991). 따라서 chaparral 추출물에 의해 간세포에 지방이 축적되고 이는 염증 반응으로 이어져 간손상을 일으킬 수 있는 가능성을 시사한다.

본 연구결과에서 chaparral 추출물은 간세포에서 염증성 사이토카인인 IL-8이나 M-CSF를 분비시키고, 간세포 내에 지방을 축적시켜 염증을 유발하는 것으로 나타났다. 이는 chaparral을 섭취한 사람들에게서 간염이 보고된 임상 연구들과 상응하는 결과이다(Batchelor 등, 1995; Gordon 등, 1995; Sheikh 등, 1997).

본 연구에서 사이토카인 분비 및 지방 축적을 유의적으로 촉진시킨 chaparral 추출물의 농도는 간세포 사멸을 유발시킨 농도보다 10배 낮은 수준이었다. 이러한 결과는 chaparral 추출물이 간세포 사멸과 같은 심각한 독성을 초래하지 않는 농도일 때도 염증성 사이토카인의 분비나 세포 내 지방 축적을 통해 염증반응을 일으킴으로써 간에 손상을 줄 수 있음을 보여준다. 염증은 유독 물질에 의해 유발되는 간독성에 대한 감수성을 높일 수 있기 때문에(Watkins와 Seeff, 2006), 세포 사멸을 유발하지 않거나

저농도의 물질이라도 안전성 평가가 우선적으로 수반되어야 한다.

식물성 제재는 추출 용매 및 추출법이 다양하기 때문에 그 방법에 따라 유독한 성분이 고농도로 함유될 수 있다. 저농도로 섭취하는 경우에도 섭취 기간이 장기일 가능성이 많아 유독 물질에 대한 노출량이 클 수 있고 섭취하는 사람의 민감도에 따라 간독성의 가능성 및 정도는 달라지게 된다. 섭취 기간에 따라 다르나 간손상을 유발하는 chaparral의 섭취량은 일일섭취량이 259 mg인 경우 11주, 1,500 mg인 경우는 6주, 2,400 mg인 경우는 10일 섭취하였을 때 간손상이 발생한 것으로 보고되었다(Sheikh 등, 1997).

본 연구 결과 및 다양한 임상 사례들을 통해 chaparral의 섭취를 제한하는 것이 필요하며 특히 투여량을 제한하기 어려운 식품 형태로의 섭취에 대해서는 허용되지 않는 것이 바람직하다고 판단된다. Chaparral 추출물을 건강기능성 식품 및 식이 보충제 등의 식물성 제재로 사용하기 위해서는 간독성에 대한 평가 및 그 기전에 대한 연구가 지속적으로 수행되고 전반적인 안전성에 대한 확보가 이루어졌을 때 가능할 것으로 사료된다.

요 약

본 연구에서는 chaparral 70% 에탄올 추출물을 0.01-100 μg/mL의 농도로 HepG2 간세포에 처리하여 세포 사멸, 염증성 사이토카인 분비, 세포 내 지방 축적을 측정하는 *in vitro* 실험을 통해 chaparral의 간독성 기전을 조사하였다. Chaparral 추출물 처리에 의해 1-100 μg/mL의 농도에서 세포 사멸이 관찰되었으며, 염증성 사이토카인인 IL-8과 M-CSF의 분비 및 지방 축적은 10배 더 낮은 농도부터인 0.1-100 μg/mL에서 유의적으로 증가하였다(p<0.05). 본 연구결과에서 염증성 사이토카인 분비 및 지방 축적을 통한 간세포 염증은 chaparral 추출물에 의해 유발되는 간독성의 한 형태로 나타났다. 또한 간염 형태의 간독성은 세포 사멸이라는 심각한 독성을 야기시키는 농도보다 낮은 농도에서 발현되어 저농도의 chaparral 섭취에 의해 간염과 같은 간독성이 초래될 수 있음을 시사한다.

References

Arteaga S, Carmona A, Luis J, Andrade-Cetto A, Cardenas R. Effect of *Larrea Tridentata* (cresote bush) on cholesterol gallstones and bile secretion in hamsters. J. Pharm. Pharmacol. 57: 1093-1099 (2005)

Batchelor WB, Heathcote J, Wanless IR. Chaparral-induced hepatic injury. Am. J. Gastroenterol. 90: 831-833 (1995)

Björnsson E. Drug-induced liver injury: Hy's rule revisited. Clin. Pharmacol. Ther. 79: 521-528 (2006)

Browning JD, Horton JD. Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury. J. Clin. Invest. 114: 147-152 (2004)

Elewa H, Abd-Elmeneem M, Hashem AM, Alshehaby A. Study of interleukin8 (IL8) serum level in patients with chronic liver disease due to hepatitis C virus (HCV) with and without hepatocellular carcinoma (HCC). Int. J. of Hepatol. 1: 9-17 (2010)

Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H. Chemistry and biochemistry of 4-Hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. Free. Radic. Biol. Med. 11: 81-128 (1991)

Estes JD, Stolpman D, Olyaei A, Corless CL, Ham JM, Schwartz JM, Orloff SL. High prevalence of potentially hepatotoxic herbal supplement use in patients with fulminant hepatic failure. Arch. Surg. 138: 852-858 (2003)

Gordon DW, Rosenthal G, Hart J, Sirota R, Baker AL. Chaparral ingrstion. The broadening spectrum of liver injury caused by herbal medications. JAMA. 273: 489-490 (1995)

Gutierrez-Ruiz MC, Gomez Quiroz LE, Hernandez E, Bucio L, Souza V, Llorente L, Kershenobich D. Cytokine response and oxidative stress produced by ethanol, acetaldehyde and endotoxin treatment in HepG2 cells. Isr. Med. Assoc. J. 3: 131-136 (2001)

Itoh Y, Okanoue T, Enjyo F, Sakamoto S, Ohmoto Y, Hirai Y, Kagawa K, Kashima K. Serum levels of macrophage colony stimulating factor (M-CSF) in Liver Disease. J. Hepatol. 21: 527-535 (1994)

Lambert JD, Zhao D, Meyers RO, Kuester RK, Timmermann BN, Dorr RT, Nordihydroguaiaretic acid: hepatotoxicity and detoxification in the mouse. Toxicon. 40: 1701-1708 (2002)

Lee SM. Ninety days repeated dose safety test of chaparral extract to male SD-rats. MS thesis. Seoul National University, Seoul, Korea (2006)

Shaw D. Toxicological risks of Chinese herbs. Planta. Med. 76: 2012-2018 (2010)

Sheikh NM, Philen RM, Love LA. Chaparral-associated hepatotoxicity. Arch. Intern. Med. 157: 913-919 (1997)

Stickel F, Egerer G, Seitz HK. Hepatotoxicity of botanicals. Public. Health. Nutr. 3: 113-124 (2000)

Stickel F, Patsenker E, Schuppan D. Herbal hepatotoxicity. J. Hepatol. 43: 901-910 (2005)

Watkins PB, Seeff LB. Drug-induced liver injury: Summary of a single topic clinical research conference. Hepatology 43: 618-631 (2006)

Zimmermann HW, Seidler S, Gassler N, Nattermann J, Luedde T, Trautwein C, Tacke F. Interleukin-8 is activated in patients with chronic liver diseases and associated with hepatic macrophage accumulation in human liver fibrosis. PLoS One. 6: e21381 (2011)