

Attenuation of Oxidative Stress - Induced HepG2 Cellular Damage by *Cirsium japonicum* Root Extract

Da Jung Ha¹, Seohwi Kim², Byunwoo Son¹, Myungho Jin¹, Sungwoo Cho³, Sang Hoon Hong¹, Yung Hyun Choi^{4*} and Sang Eun Park^{1*}

¹Department of Internal Medicine, Dong-eui University College of Korean Medicine, Busan 47227, Korea

²Department of Medical History, Wonkwang University College of Korean Medicine, Iksan 54538, Korea

³Department of Rehabilitation Medicine, Dong-eui University College of Korean Medicine, Busan 47227, Korea

⁴Department of Biochemistry, Dong-eui University College of Korean Medicine, Busan 47227, Korea

Received October 8, 2023 /Revised November 1, 2023 /Accepted November 1, 2023

The root of *Cirsium japonicum* var. *maackii* (Maxim.) has long been used in traditional medicine to prevent the onset and progression of various diseases and has been reported to exert a wide range of physiological effects, including antioxidant activity. However, research on its effects on hepatocytes remains scarce. This study used the human hepatocellular carcinoma HepG2 cell line to investigate the antioxidant activity of ethanol extract of *C. japonicum* root (EECJ) on hepatocytes. Hydrogen peroxide (H₂O₂) was used to mimic oxidative stress. The results showed that EECJ significantly reverted the decrease in cell viability and suppressed the release of lactate dehydrogenase in HepG2 cells treated with H₂O₂. Moreover, an analysis of changes in cell morphology, flow cytometry, and microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) expression showed that EECJ significantly inhibited HepG2 cell autophagy induced by H₂O₂. Furthermore, it attenuated H₂O₂-induced apoptosis and cell cycle disruption by blocking intracellular reactive oxygen species and mitochondrial superoxide production, indicating strong antioxidant activity. EECJ also restored the decreased levels of intracellular glutathione (GSH) and enhanced the expression and activity of superoxide dismutase and GSH peroxidase in H₂O₂-treated HepG2 cells. Although an analysis of the components contained in EECJ and *in vivo* validation using animal models are needed, these findings indicate that EECJ is a promising candidate for the prevention and treatment of oxidative stress-induced liver cell damage.

Key words : Apoptosis, autophagy, *Cirsium japonicum* root, HepG2 cells, reactive oxygen species

서 론

간은 약물 대사에 가장 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 많은 유해 물질의 주요 표적 기관이기도 하다. 일부 약물이나 생체 이물, 알코올 등의 장기간 사용 및 과다 복용은 간세포에서 과도한 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 형성시켜 심각한 간 독성을 유발할 수 있음이 밝혀진 이후, ROS는 만성 간 손상의 중요한 발병기전으로 인식되고 있다[30, 33]. 생리적 수준의 ROS는 간세포를 포함한 모든 세포의 정상적 기능의 유지에 중요한 신호 분자

로 작용하며, 세포 내 과잉의 ROS는 glutathione (GSH), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) 및 GSH peroxidase (GPx)과 같은 내인성 항산화제에 의해 제거되고 조절된다. 그러나, 세포 내 ROS의 축적이 과도해지면 세포 내 생체 거대 분자와 세포 내 소기관의 심각한 산화적 손상이 유도되어 정상적인 세포 기능의 상실을 초래하여 간을 포함한 다양한 기관의 병리학적 장애의 원인이 된다 [33, 42]. 특히, ROS에 의해 유발된 산화적 스트레스는 간 독성, 간 경변, 간 섬유증, 간 지방증, 비알코올성 지방간 질환, 알코올성 간 질환 및 바이러스 간염 등 다양한 간 질환의 중요한 병인이다[3, 25, 38]. ROS 표적 세포 내 소기관 중, 산화적 스트레스에 취약한 미토콘드리아의 기능 장애는 미토콘드리아 전자 전달 사슬의 기능을 상실시켜 ROS와 같은 자유 라디칼(free radicals)의 과도한 생성을 초래한다. 궁극적으로 ROS의 소거능을 초래한 과도한 ROS의 축적은 미토콘드리아와 핵 DNA 손상을 동반한 세포사멸(apoptosis)을 증가시킨다[28, 44]. 따라서 ROS 매개 효과의 억제와 산화적 스트레스로 인한 손상에 대응하

*Corresponding authors

Tel : +82-51-890-3319, Fax : +82-51-893-3333

E-mail : choiyh@deu.ac.kr (Yung Hyun Choi)

Tel : +82-51-890-3343, Fax : +82-51-893-3333

E-mail : pse@deu.ac.kr (Sang Eun Park)

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

기 위한 주요 항산화 반응의 조절이 간 손상을 예방하거나 개선에 유용성을 지닐 수 있으며, 간 손상 치료를 위해 전통적으로 사용되어 온 약용식물들에 대한 효능의 재평가에 관한 관심이 최근 증가되고 있다.

국화과(Asteraceae genus)에 속하는 엉겅퀴(*Cirsium japonicum* var. *maackii* (Maxim.))는 우리나라를 포함하여 일본, 중국 등에 자생하며, 오랫동안 간 기능 장애의 치료에 널리 사용되어 왔다[2]. 이 식물의 건조된 전초(全草) 또는 뿌리 부분을 칭하는 대계(大薊, *Cirsii radix et herba*)는 전통적으로 혈열(血熱)을 식히고 지혈시키거나 어혈(瘀血)을 없애고 옹종(癰腫)을 제거하는 약재로 사용되었다. 그리고 이뇨제, 소염제, 지혈제 및 해독제로서 기능을 가지며, 잎과 꽃 추출물은 담낭, 간 및 비장 질환을 완화하는 작용을 한다[15]. 여러 선행 연구들에 의하면 엉겅퀴 추출물에는 flavonoids, flavonolignans 및 polyphenolic compounds가 풍부하며, 엉겅퀴 추출물의 강력한 자유 라디칼 제거 능력은 이들의 존재에 기인한 것으로 보고된 바 있다[17, 22]. 예를 들어, Jung et al. [18]은 엉겅퀴 유기 용매 분획들의 항산화 및 항염증 효능과 자유 라디칼 및 염증성 cytokine의 생성을 촉진하는 최종 당화산물(advanced glycation endproducts) 형성 억제 효능은 주로 분획물에 함유된 flavonoids에 의한 것임을 보고하였으며, 이러한 효능은 엉겅퀴 지상부 추출물에서도 유사하였다[35]. 최근 Pang et al. [27]의 보고에 의하면, 엉겅퀴 꽃 추출물이 amyloid β 에 노출된 신경교세포에서 ROS의 생성을 차단하면서 항염증 효능을 나타냄을 보고하면서 엉겅퀴 추출물이 신경퇴행성 질환 예방을 위한 유망한 제제가 될 수 있음을 제시하였다. 그리고 *Caenorhabditis elegans* 모델에서 엉겅퀴의 phenolic compounds는 ROS 생성을 감소시키고 수명을 늘렸으며, 노화로 인한 ROS의 생성을 차단하여 엉겅퀴 추출물이 노화 방지 소재로 사용될 수 있음을 시사된 바 있다[9]. 또한, 엉겅퀴 씨앗 에탄올 추출물은 비알코올성 지방간염 모델에서 간세포 사멸과 염증 반응의 억제와 함께 감소된 세포 GSH 농도를 증가시키고 SOD 기능을 강화하며 지질 과산화를 예방하여 간 기능을 개선시키는 것으로 보고된 바 있다[1]. 아울러, 엉겅퀴 줄기와 꽃 추출물은 간 섬유화 과정에서 핵심적인 역할을 하는 간 정상 세포의 비정상적인 증식을 유의적으로 차단하였다[20]. 그리고 엉겅퀴에서 추출된 메탄올 및 flavonoids는 HepG2 세포에서 산화적 스트레스 유도제인 *t*-butyl hydroperoxide (*t*-BHP)에 의한 고갈된 GSH 수준을 회복하고 ROS의 생성을 억제하였다[16]. 그러나 현재까지 간세포에서 대계 추출물의 항산화 활성 및 관련 기전에 관한 연구는 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 간세포에서 대계 에탄올 추출물(Ethanol extract of *C. japonicum* root, EECJ)의 항산화 활성을 조사하기 위한 *in vitro* 실험 모델로서 간 상피와 유사한 형태를 가지며 약물 대사 및 간

독성 연구에 가장 일반적으로 사용되는 인간 간모세포종(human hepatocellular carcinoma) HepG2 세포를 선정하였으며, 산화적 스트레스를 모방하기 위하여 과산화수소(hydrogen peroxide, H_2O_2)를 처리하였다.

재료 및 방법

세포배양 및 H_2O_2 와 EECJ의 처리

본 연구에 사용된 HepG2 세포(American Typical Culture Collection, Manassas, VA, USA)는 10%의 fetal bovine serum과 1%의 penicillin/streptomycin이 함유된 Dulbecco's modified Eagle's medium를 사용하여 5% CO_2 및 37°C 조건에서 배양하였으며, 세포배양에 필요한 재료들은 WelGENE, Inc. (Gyeongsan, Republic of Korea)에서 구입하였다. EECJ의 제조를 위한 ㈜대한생약제품(Pusan, Republic of Korea)에서 구입한 건조된 대계를 잘게 잘라 분쇄한 후 초고속 저온추출기(Kyungseo E&P Co., Incheon, Republic of Korea)를 이용하여 50°C에서 4시간 동안 1:10 (v/v)의 비율로 60% 에탄올로 추출하였다. 획득된 추출물(EECJ)을 여과하여 용해되지 않은 잔류물을 제거하고 진공 회전 증발기(Tokyo Rikakikai Co. Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 농축한 다음 동결 건조기(SP Industries, Inc., Warminster, PA, USA)를 사용하여 건조 후 4°C 냉장고에 보관하였다. EECJ를 세포에 처리하기 위해서는 에탄올에 다시 적정 농도로 용해하여 0.22 μm 여과막으로 여과한 후 배지에 적정 농도로 희석하였다. H_2O_2 는 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였으며, HepG2 세포에 처리하기 위하여 phosphate-buffered saline (PBS)에 적정 농도로 녹인 후 배지에 희석하였다.

세포 생존율 측정

HepG2 세포에서 산화적 스트레스에 미치는 EECJ의 효능 평가를 위해 EECJ와 H_2O_2 를 24시간 처리하거나 1시간 동안 EECJ 처리 후 H_2O_2 를 24시간 처리하였다. 처리가 끝난 세포의 세포 생존율을 Cell Counting Kit-8 kit (CKK-8, Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 사용하여 제조사의 지침에 따라 산출하였다. 아울러 다양한 조건에서 배양된 세포들의 형태학적 변화는 위상차 현미경(phase-contrast microscope, Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)을 이용하여 관찰하였다.

젖산 탈수소효소(lactate dehydrogenase, LDH) 방출의 분석

EECJ가 있거나 없는 조건에서 H_2O_2 에 24시간 노출된 세포에서 방출된 LDH 양을 정량적으로 평가하기 위하여 LDH-Cytotoxic Test Wako kit (Wako Pure Chemical Industries, Osaka, Japan)를 사용하여 제조사의 지침에 준하여

LDH 방출 양을 산출하였다.

유세포 분석

H₂O₂ 처리에 의한 HepG2 세포의 자가포식(autophagy) 유발에 미치는 EECJ의 영향을 조사하기 위하여 Cyto-ID® Autophagy Detection kit (Enzo Life Sciences Inc, Farmingdale, NY, USA)를 사용하였다. 제조사의 지침에 따라 다양한 조건에서 배양된 세포를 모두 모아 PBS로 세척하고 kit에 제공된 Cyto-ID 염색액으로 상온 및 암 하에서 염색한 후 자가포식 유도 세포의 빈도를 유세포 분석기(flow cytometer, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 이용하여 분석하였다. 동일한 조건에서 배양된 세포들을 대상으로 세포주기 분석을 위하여 PBS로 세척한 후 70% 에탄올로 고정하였다. 고정된 세포를 RNAase와 PI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)로 반응시키고 세포주기 분포는 유세포 분석법을 사용하여 주기별 세포 집단의 분포도를 산출하였다. H₂O₂ 처리에 의한 ROS의 생성에 미치는 EECJ의 영향을 정량적으로 분석하기 위하여 EECJ를 1시간 전처리 후, H₂O₂를 1시간 동안 처리하였다. 처리 후, 처리 군별 세포 내 형성된 전체 ROS (intracellular ROS)의 양을 비교하기 위하여 세포를 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA, Molecular Probes, Leiden, Netherlands)로 염색하고 유세포 분석기를 이용하여 ROS의 생성 정도를 제조사의 지침에 따라 측정하였다. 또한, MitoSOX™ Red mitochondrial superoxide indicator (Thermo Fisher Scientific)를 사용하여 미토콘드리아 과산화물(mitochondrial superoxide)을 측정하였다. 이를 위하여 준비된 세포를 대상으로 제조사의 지시에 따라 MitoSOX로 염색한 후, 방출된 MitoSOX 형광을 유세포 분석기로 검출하였다.

단백질 발현의 분석

EECJ의 항산화 활성에 관여하는 관련 단백질들의 발현을 분석하기 위하여, EECJ가 존재하거나 없는 배지에서 1시간 배양된 HepG2 세포에 H₂O₂를 24시간 동안 처리하였다. Western blot 분석을 수행하기 위하여 처리가 끝난 세포를 모아 PBS로 수세 후, Radioimmunoprecipitation Assay (RIPA) Lysis Buffer (Sigma-Aldrich Chemical Co.)를 사용하여 총 단백질을 추출하였다. 분리된 단백질을 정량화한 후, 각 처리군별 동량의 단백질을 sodium-dodecyl sulfate-polyacrylamide gel을 이용한 전기영동으로 분리하고, polyvinylidene difluoride membrane (Bedford, MA, USA)으로 전이시켰다. 단백질이 전이된 막을 4°C에서 검출 대상 단백질에 해당하는 1차 항체에 반응시키고, PBS로 세척 후, 2차 항체(horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA)에 반응시켰다. 이어서 enhanced chemiluminescence 용액(R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA)과 Fusion

FX Imaging System (Vilber Lourmat, Torcy, France)을 이용하여 해당 단백질의 발현 정도를 검출하였다. 본 연구에 사용된 항체는 Abcam, Inc. (Cambridge, MA, USA), Cell Signaling Technology Inc. (Beverly, MA, USA) 및 Santa Cruz Biotechnology Inc.에서 구입하였다.

핵 염색을 통한 세포사멸의 분석

4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) 염색법을 사용하여 H₂O₂를 EECJ가 있거나 없는 조건에서 처리된 HepG2 세포의 핵의 변형에 기초한 세포사멸 유발 정도를 비교하였다. 이를 위하여 처리가 끝난 세포를 PBS로 수세 후 3.7% paraformaldehyde로 고정하였다. 고정된 세포를 다시 PBS로 세척하고, 2.5 µg/ml의 DAPI (Sigma-Aldrich Chemical Co.)용액으로 10분 동안 염색한 후, 형광 현미경(fluorescence microscope, Carl Zeiss) 하에서 핵의 형태적 변화를 관찰하였다. DAPI 염색에 의한 세포사멸 유발 정도를 정량적으로 평가하기 위하여 처리군당 3회 반복 100개 이상의 세포를 대상으로 핵의 단편화(nuclear fragmentation)와 염색질의 응축(chromatin condensation)이 유도된 세포의 빈도를 계수하여 평균치를 제시하였다.

형광 염색에 의한 ROS 생성 및 GSH 수준의 변화 관찰

EECJ에 의하여 H₂O₂에 의한 세포 내 ROS 생성 억제에 미치는 영향을 시각적으로 평가하기 위하여 EECJ를 1시간 전처리 후, 1시간 동안 H₂O₂에 노출된 세포를 DCF-DA로 염색 후, 형광 현미경 하에서 관찰하였다. 또한, 미토콘드리아 과산화물 형성의 정도와 GSH 수준의 관찰을 위하여 각각 MitoSOX 및 green 5-chloromethyl-fluorescein diacetate (CMFDA, Abcam, Inc.)를 이용하여 제조사의 지침에 따라 염색을 하였다. 아울러 MitoSOX와 CMFDA 염색 후 다시 DAPI 용액으로 핵을 염색하여 세포 내 미토콘드리아 과산화물 및 GSH의 분포 범위를 형광 현미경 하에서 관찰하여 형광 이미지를 획득하였다.

EECJ의 항산화 활성 평가

H₂O₂에 대한 EECJ의 항산화 활성을 평가하기 위하여 GSH/GSSG Ratio Assay kit (Abcam, Inc.)를 사용하여 GSH와 GSH disulfide (GSSG) 비율을 평가하였다. 이를 위하여 EECJ를 1시간 전처리 후, 24시간 동안 H₂O₂를 처리한 HepG2 세포를 모아 제조사가 권장하는 조건에서 반응시킨 후, GSH와 GSSG의 표준 곡선을 바탕으로 GSH와 GSSG의 농도를 측정하였다. 아울러 동일한 조건에서 배양된 세포를 대상으로 manganese SOD (MnSOD) 및 GSH peroxidase (GPx) 활성의 분석에는 Abcam, Inc.에서 구입한 Colorimetric kit를 이용하였다. 이를 위하여 제조사의 지침에 준하여 세포 분획물을 제조하고 각 효소의 활성은 대조군에 대한 상대적인 값으로 제시하였다.

통계 처리

실험 결과의 유의성 평가를 위한 통계 분석은 GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA)으로 수행한 후 Tukey 사후 테스트로 수행하였다. 모든 결과는 최소 세 번의 독립적인 실험에서 얻은 결과들을 평균 ± 표준편차(standard deviation, SD)로 제시하였고, $p < 0.05$ 의 값을 통계적 유의미한 차이를 나타내는 것으로 간주하였다.

결 과

HepG2 세포에서 H₂O₂에 의한 세포독성에 미치는 EECJ의 영향

H₂O₂ 처리에 의한 HepG2 세포의 세포독성 유발에 미치는 EECJ의 영향을 분석하기 위하여, CCK-8 분석에 따른 세포 생존율 및 LDH 방출의 정도를 조사하였다. Fig. 1A에 나타난 결과에 의하면, EECJ의 처리 농도가 증가할수록 HepG2 세포의 세포 생존율이 감소하였지만, 200 µg/ml 이하의 EECJ가 처리된 세포에서는 대조군에 비하여 유의적인 차이(대조군 대비 97.22%)가 나타나지 않았다. 그리고 100 µM 이하의 H₂O₂가 단독 처리된 HepG2 세포에서도 유의적인 세포 생존율의 변화는 없었지만(대조군 대비

95.92%), 그 이상의 H₂O₂ 처리 농도(200~400 µM)에서는 H₂O₂ 처리 농도 의존적으로 세포 생존율이 처리 농도 의존적으로 억제되었다(Fig. 1B). 따라서 HepG2 세포에서 산화적 세포 손상 유발을 위한 H₂O₂의 처리 농도는 대조군 대비 약 60% 정도의 세포 생존율을 보인 300 µM로 설정하였으며, H₂O₂에 의한 세포 생존율 억제에 미치는 EECJ의 효능 검증을 위한 전처리 농도는 200 µg/ml로 설정하였고, H₂O₂를 HepG2 세포에 24시간 처리하기 전에 200 µg/ml의 EECJ를 1시간 전처리하였다. Fig. 1C에 제시된 결과에 의하면, 대조군 대비 H₂O₂ 단독 처리로 61% 정도로 억제된 HepG2 세포의 세포 생존율이 200 µg/ml의 EECJ가 전처리된 조건에서 대조군 대비 80% 정도로 나타나 H₂O₂에 의한 세포 생존율 저하가 유의적으로 회복되었음을 알 수 있었다. 아울러 양성 대조군으로 사용한 대표적인 ROS 생성 억제제인 N-acetyl-l-cysteine (NAC)이 전처리된 조건에서는 95% 정도로 대조군에 유사한 수준으로 회복되었다. 다음은 EECJ가 H₂O₂에 의한 세포독성을 차단하였다는 추가적인 증거를 확보하기 위하여 LDH 방출의 정도를 분석하였다. Fig. 1D의 결과에서 알 수 있듯이, 300 µM의 H₂O₂가 처리된 HepG2 세포에서 LDH의 방출은 대조군에 비하여 6배 정도 증가하였지만, 200 µg/ml의

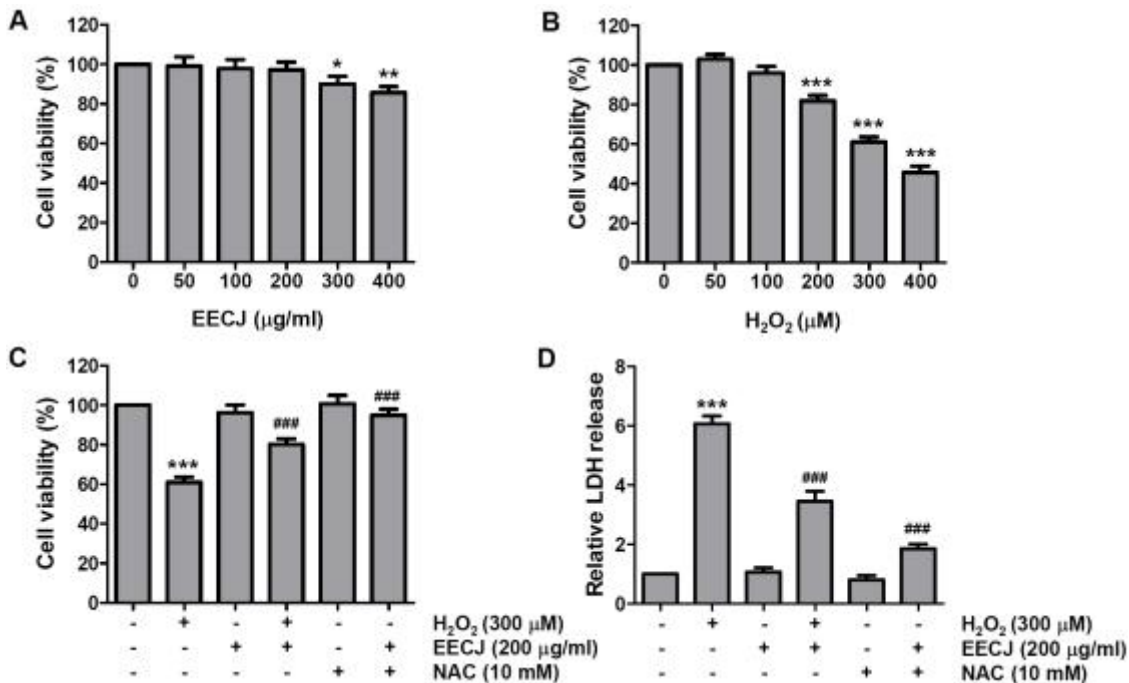


Fig. 1. Inhibitory effects of EECJ on H₂O₂-induced reduction of cell viability and release of LDH in HepG2 cells. Cells were treated with various concentrations of EECJ (A) or H₂O₂ for 24 hr (B), or treated with 200 µg/ml EECJ for 1 hr, and then stimulated with 300 µM H₂O₂ for 24 hr (C and D). (A-C) The results of quantitative analysis of cell viability according to the CCK-8 assay were presented. (D) The LDH leakage was measured using the LDH-Cytotoxic Test kit. NAC, a ROS inhibitor, was used as a positive control. The data were represented as mean ± SD of three independent experiments. Significant differences compared to the control cells ($p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$) or H₂O₂-treated cells ($p < 0.001$) were shown.

EECJ 및 10 mM의 NAC의 전처리군에서는 각각 3.45 및 1.85배 정도로 현저하게 감소되어 EECJ가 H₂O₂에 의한 세포독성을 유의적으로 차단하였음을 보여주었다.

HepG2 세포에서 H₂O₂에 의한 자가포식 유도에 미치는 EECJ의 영향

HepG2 세포에서 EECJ에 의한 H₂O₂ 유도 세포독성의 억제와 연관된 세포의 형태를 변화를 관찰한 결과, H₂O₂가 단독 처리된 세포는 대조군 세포보다 세포의 크기가 줄어들면서 부착력의 상실되었고 세포질에 공포(vacuole)의 형성이 증가되었지만, EECJ가 존재하는 조건에서는 현저히 억제되었다(Fig. 2A). 세포질 내 공포의 형성은 자가포식 현상의 대표적인 특징이므로 HepG2 세포에서 H₂O₂에 의한 세포독성이 자가포식 현상을 동반하는지를 조사하기 위하여 Cyto-ID 염색에 따른 유세포 분석을 수행하였으며, H₂O₂가 단독 처리된 세포에서 대조군 세포(2.37%)

에 비하여 자가포식이 유도된 세포의 빈도(44.32%)가 약 19배 정도 증가되었다(Fig. 2B, Fig. 2C). 그러나 EECJ가 전처리된 조건에서 H₂O₂가 처리된 세포에서의 자가포식 유발 빈도(13.46%)는 현저하게 감소하였으며, 자가포식이 유도된 세포에서 관찰되는 microtubule-associated protein light chain 3 (LC3)-II의 발현도 H₂O₂가 단독 처리된 세포에서 현저하게 증가되었지만, EECJ가 존재하는 조건에서는 LC3-I 뿐만 아니라 LC3-II의 발현도 매우 감소되었다(Fig. 2D).

HepG2 세포에서 H₂O₂에 의한 세포사멸 유도에 미치는 EECJ의 영향

다음은 H₂O₂에 의한 HepG2 세포의 세포독성 및 자가포식의 유도가 세포사멸과 직접적인 관련이 있는지, 또한 H₂O₂에 의한 HepG2 세포의 세포사멸을 EECJ가 차단할 수 있는지를 조사하였다. Fig. 3A 및 Fig. 3B에 나타낸 DAPI

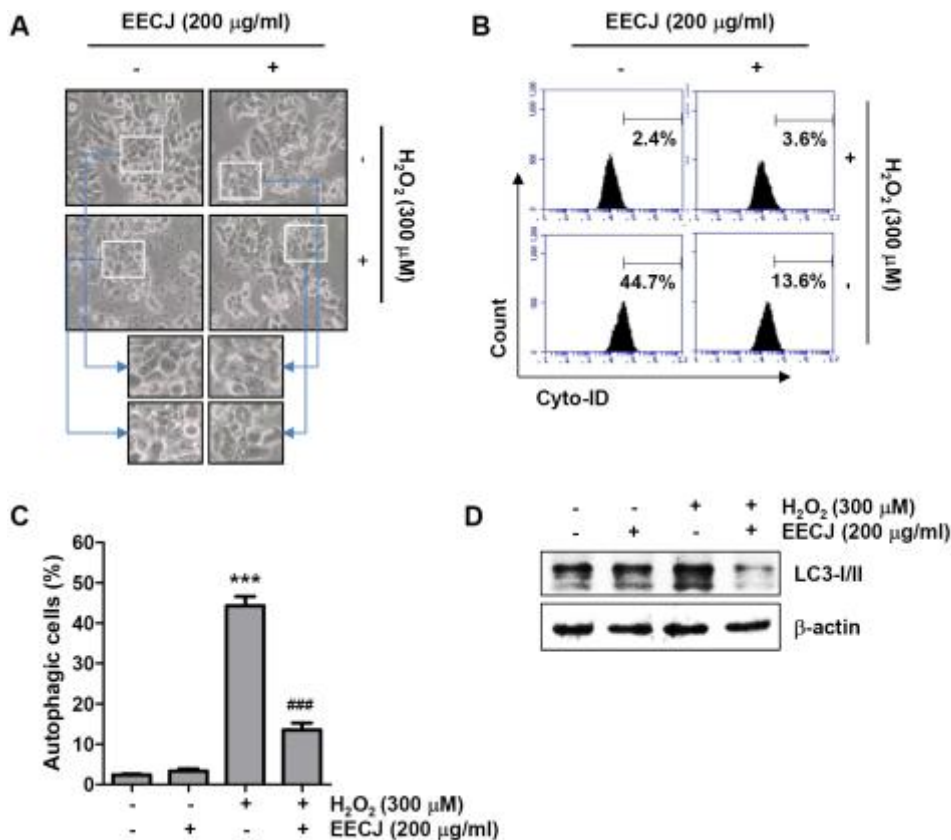


Fig. 2. Suppression of H₂O₂-induced autophagy by EECJ in HepG2 cells. Cells were cultured in medium containing 200 µg/ml EECJ for 1 hr, and then exposed to 300 µM H₂O₂ for 24 hr. (A) After treatment, cell morphological changes were observed under a phase-contrast microscope. (B and C) Cells were washed with PBS, stained with Cyto-ID, and then analyzed by flow cytometry. (B) Representative histograms of flow cytometry for each experimental group were presented. (C) The percentages of autophagic cells were determined by counting Cyto-ID-positive cells. The results of flow cytometry analysis were expressed as the mean ± SD. Significant differences compared to the control cells (***p*<0.001) or H₂O₂-treated cells (###*p*<0.001) were shown. (D) After collecting cells and isolating total protein, changes in LC3 expression were detected using Western blot analysis. β-actin was used as a loading control.

염색의 결과에 의하면, H₂O₂가 단독 처리된 HepG2 세포에서 세포사멸이 유도된 세포에서 특이적으로 관찰되는 핵의 단편화와 염색질의 응축이 유도된 세포의 빈도(대조군 1.95%, H₂O₂ 단독 처리군 21.02%)가 증가하였지만, EECJ가 전처리된 세포(5.48%)에서는 유의적으로 감소되었다. 아울러 H₂O₂에 대한 EECJ의 세포독성 억제 효과가 세포주기 분포도 변화와 연관성이 있는지를 조사하기 위하여 동일한 조건에서 배양된 세포를 대상으로 PI 염색 후 유세포 분석을 통하여 세포주기 각 단계에 속하는 세포의 빈도를 조사하였다. Fig. 3C의 히스토그램 결과에 의하면, 대조군에 비하여 H₂O₂가 단독 처리된 세포에서 DNA 합성기에 해당되는 S기에 속하는 세포의 빈도가 상대적으로 감소된 반면, G2/M기에 해당되는 세포의 빈도는 다소 증가하였다. 그러나 EECJ의 전처리는 H₂O₂ 처리에 의한 이러한 변화를 차단하였으며, EECJ 단독 처리군

에서는 대조군과 유사한 경향성을 보였다. 반면, 세포사멸이 유도된 세포의 빈도를 의미하는 sub-G1기에 속하는 세포의 빈도는 DAPI 염색의 결과와 유사하게 H₂O₂ 처리에 의하여 매우 증가하였으며(대조군 1.43%, H₂O₂ 단독 처리군 29.92%), EECJ의 존재 하에서는 유의적으로 감소(9.18%)되었다(Fig. 3C, Fig. 3D).

HepG2 세포에서 H₂O₂에 의한 ROS 생성에 미치는 EECJ의 영향

HepG2 세포에서 산화적 자극에 대한 EECJ의 보호 효과가 항산화 활성과 직접 연관성을 가지는지를 조사하기 위하여 EECJ의 ROS 생성 차단 여부를 먼저 평가하였다. 이를 위하여 H₂O₂를 1시간 처리하기 전에 EECJ를 1시간 전처리하였으며, 세포 내 축적된 총 ROS의 생성을 비교하기 위하여 DCF-DA 염색 후 유세포 분석을 수행하였다.

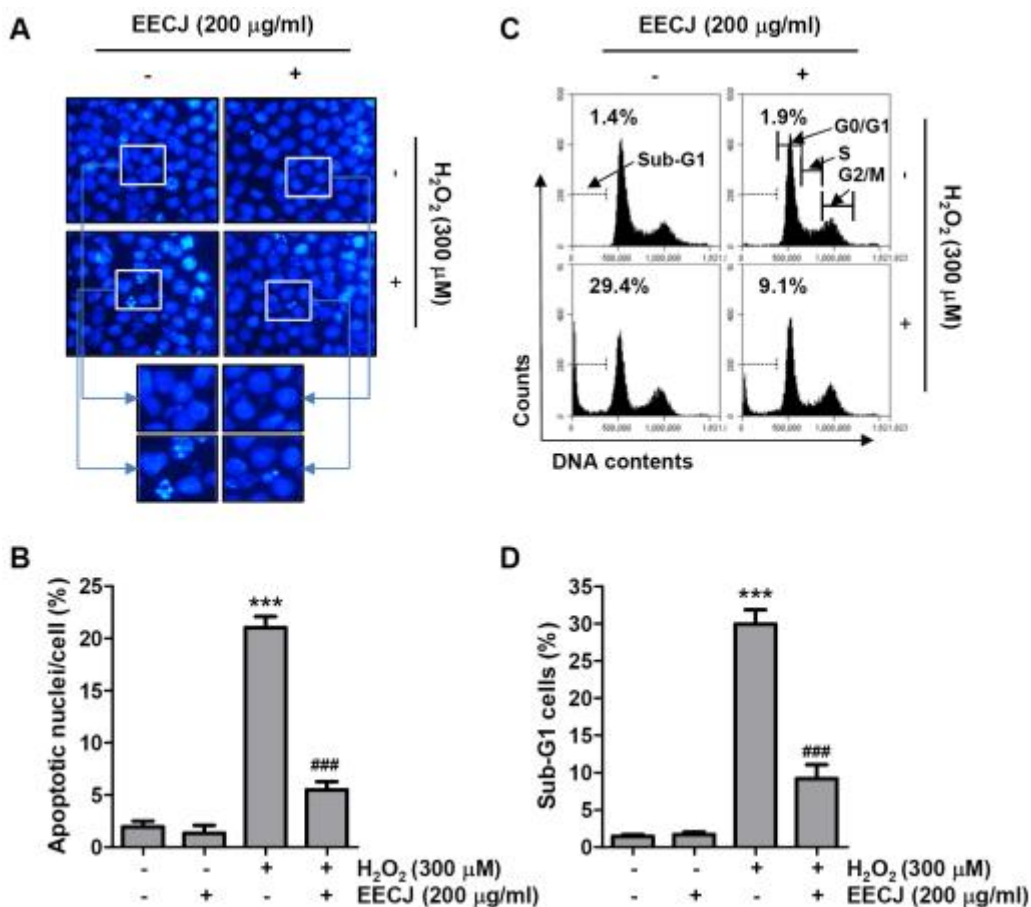


Fig. 3. Inhibition of H₂O₂-induced apoptosis by EECJ in HepG2 cells. Cells were treated with 200 μg/ml EECJ for 1 hr, and then stimulated with 300 μM H₂O₂ for 24 hr. (A and B) After staining with DAPI, the morphology of the nucleus was observed. Representative photomicrographs of nuclei (A) and quantified results of apoptosis-induced cells (B) were shown. (C and D) Cells were fixed, stained with PI solution, and then analyzed by flow cytometry. (C) Representative histograms of flow cytometry for each experimental group were presented. (D) The percentages of apoptotic sub-G1 cells for each experimental group were presented. (C and D) Significant differences compared to the control cells (***p*<0.001) or H₂O₂-treated cells (###*p*<0.001) were shown.

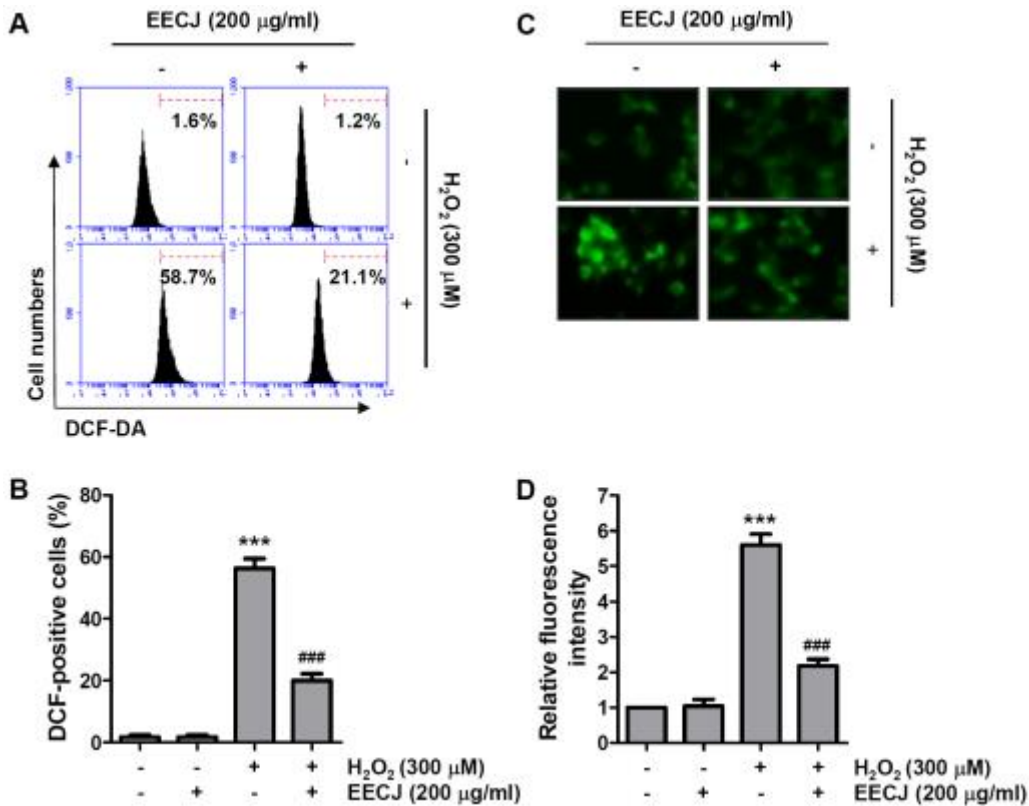


Fig. 4. Protection of H₂O₂-induced intracellular ROS generation by EECJ in HepG2 cells. Cells were incubated for 1 hr in conditions treated with 200 μg/ml EECJ, and then stimulated for an additional 1 hr with or without 300 μM H₂O₂. After treatment, cells were collected and stained with DCF-DA. The levels of intracellular ROS generation were determined using a flow cytometry and representative profiles were shown (A), with the percentage of DCF-positive cells displayed as bars (B). After DCF-DA staining, the level of intracellular ROS production was observed under a fluorescence microscope. Representative fluorescence images (C) and the relative values of green fluorescence intensity (D) for each experimental group were presented. (B and D) The results were expressed as the mean ± SD (***p*<0.001 compared with the control group; ###*p*<0.001 compared with the H₂O₂-treated group).

Fig. 4A 및 Fig. 4B의 결과에서 알 수 있듯이, DCF 양성 세포의 빈도가 H₂O₂ 단독 처리군에서 현저히 증가(대조군 1.70%, H₂O₂ 단독 처리군 56.33%)하였으나, EECJ의 존재 하에서는 H₂O₂ 단독 처리군에 비하여 1/3 정도(20.05%)로 감소하였다. 아울러 DCF-DA 염색 후 형광 현미경 하에서 ROS의 생성 변화를 관찰하였으며, ROS 생성을 의미하는 형광 강도(green)가 대조군에 비하여 H₂O₂ 단독 처리군에서 5배 이상 증가하였으나, 이는 EECJ의 존재 하에서 대조군 대비 약 2배 정도로 감소되었다(Fig. 4C, Fig. 4D). 이어서 EECJ의 H₂O₂ 유도 세포 내 ROS 축적 억제에 미토콘드리아 ROS (mitochondrial ROS) 생성 차단과 연관성이 있는지를 조사하기 위하여 MitoSOX 염색을 통한 미토콘드리아 과산화물의 생성 정도를 비교하였다. Fig. 5A 및 Fig. 5B에 제시한 결과에 의하면, MitoSOX 양성 세포의 빈도가 EECJ 단독 처리군(1.77%)에서는 대조군(1.20%)과 유사하였지만, H₂O₂가 함유된 배지에서 1시간 동안 배양된 세포에서는 매우 증가(62.70%)하였으며, 이는 EECJ의 존

재 하에서 유의적으로 억제(17.88)되었다. 또한, MitoSOX 염색 후, DAPI 염색을 통한 형광 현미경적 관찰의 결과에 의하면, H₂O₂가 처리된 세포에서 MitoSOX의 발현(red)이 세포질에서 광범위하게 관찰되었으며, 이러한 발현은 EECJ가 존재하는 조건에서 현저하게 감소하여 유세포 분석의 결과와 잘 일치됨을 알 수 있었다(Fig. 5C).

HepG2 세포에서 H₂O₂에 의한 GSH 함량 및 항산화 효소 활성의 감소에 미치는 EECJ의 영향

환원된 GSH와 산화된 GSH (GSSG)와의 비율은 산화적 스트레스의 지표로 널리 사용되기 때문에, H₂O₂가 처리된 HepG2 세포에서 이들의 비율을 감소하는지, 또한 이를 EECJ가 회복시킬 수 있는지를 조사하였다. Fig. 6A의 결과에 의하면, H₂O₂가 단독으로 24시간 처리된 세포에서 GSH/GSSG의 비율은 대조군 대비 약 44% 정도 감소되었지만, EECJ가 1시간 전처리된 조건에서는 24% 정도로서 H₂O₂에 의한 GSH의 감소를 유의적으로 회복시켰다. 아울

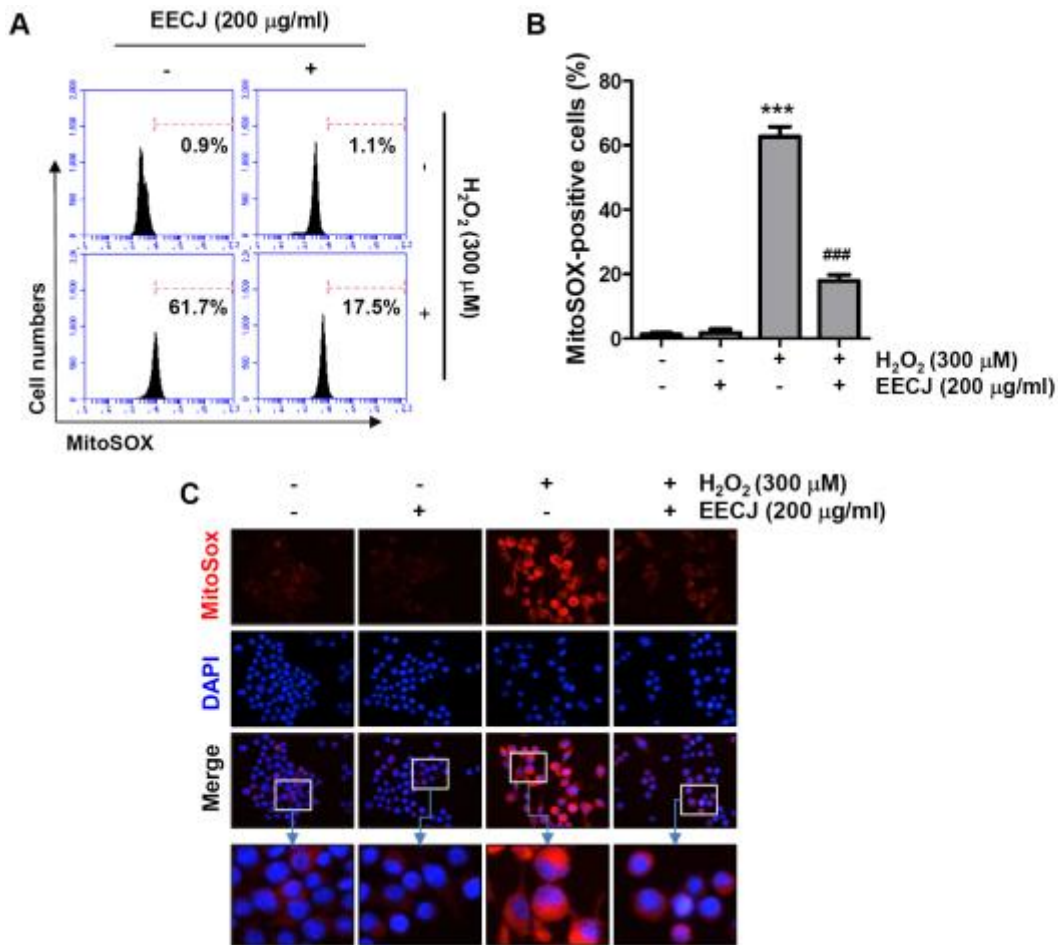


Fig. 5. Attenuation of H₂O₂-induced mitochondrial superoxide production by EECJ in HepG2 cells. Cells were exposed to 200 µg/ml EECJ for 1 hr and then stimulated with 300 µM H₂O₂ for 1 hr. (A and B) After cells were collected and stained with MitoSOX, the levels of mitochondrial superoxide were measured using flow cytometry. Representative profiles were shown (A), and the percentages of MitoSOX-positive cells were indicated as a bar (B). (C) After treatment, cells were fixed and stained with MitoSOX (red), which tracks mitochondrial superoxide, followed by DAPI staining (blue) of nuclei. Representative fluorescence images for each treatment group were captured under a fluorescence microscope.

러 CMFDA를 이용한 GSH의 발현 정도를 확인한 실험에서도 CMFDA의 형광 강도(green)가 H₂O₂ 단독 처리된 세포에서 현저히 저하되었지만, EECJ 전처리는 감소된 GSH 수준을 크게 상승시켰다(Fig. 6B). 다음은 H₂O₂ 처리에 의한 세포 내 ROS와 미토콘드리아 과산화물 생성의 증가 및 GSH 수준의 감소와 연관된 세포 내 효소의 활성 변화를 조사하기 위하여 MnSOD와 GPx의 발현을 조사하였다. Fig. 7A 및 Fig. 7C에 나타난 결과에 의하면, H₂O₂가 처리된 HepG2 세포에서 MnSOD와 GPx 단백질의 발현은 현저히 감소하였지만, EECJ의 존재 하에서는 회복되는 경향성을 보여주었다. 그리고 H₂O₂ 단독 처리군에서 MnSOD와 GPx의 활성은 대조군 대비 각각 40% 및 30% 정도 감소하였지만, EECJ 전처리에서는 각각 20% 및 17% 정도로 감소되어 모두 유의하게 증가되었음을 알 수 있었다(Fig. 7B, Fig. 7D).

고 찰

본 연구에서는 HepG2 세포를 이용하여 대개 에탄올 추출물(EECJ)이 산화적 스트레스에 의한 세포 손상에 미치는 영향을 조사하였다. 산화적 스트레스를 유도하기 위해서는 주요 ROS 중 하나인 H₂O₂를 사용하였으며, H₂O₂는 세포 내에서 해리되어 DNA 손상과 그에 따른 세포의 사멸에 기여하는 반응성이 높고 파괴적인 수산화 라디칼(hydroxyl radical)을 형성하기 때문에 항산화 능력 및 관련 기전 연구에서 산화 손상을 평가를 위해 널리 사용된다 [40]. *In vitro* 조건에서 세포의 생존력 분석은 세포의 대사 혹은 세포 내에 존재하는 효소들의 활성과 관련된 약물을 이용하는데, CCK-8 분석법은 수용성 tetrazolium salt가 세포 내 dehydrogenase에 의한 환원을 통해 형성되는 formazan의 흡광도를 분석하여 세포 생존능력을 간접적으로

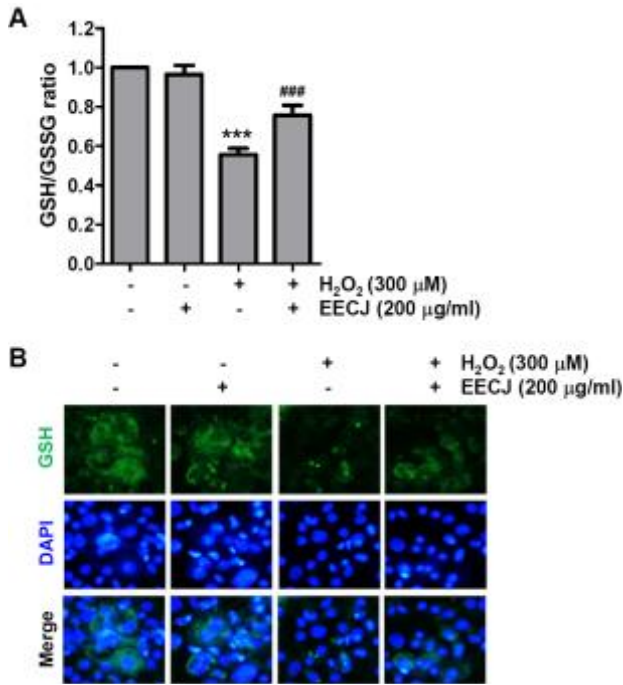


Fig. 6. Restoration of the reduced GSH/GSSG ratio by EECJ in H₂O₂-treated HepG2 cells. Cells exposed with or without 200 μg/ml EECJ for 1 hr were stimulated with 300 μM H₂O₂ for 24 hr. (A) Bar chart indicated the GSH/GSSG ratio following the exposure to H₂O₂ and pretreatment with EECJ. The results were expressed as the mean ± SD (^{***}*p*<0.001 compared with the control group; ^{###}*p*<0.001 compared with the H₂O₂-treated group). (B) After treatment, the level of GSH was detected by staining with CMFDA (green), and the nuclear location was confirmed by double staining with DAPI (blue), and representative fluorescence images were presented.

평가하는 방법이다[36]. 그리고 포도당이 젖산으로 전환되는 과정을 조절하는 LDH는 대부분의 진핵세포에 존재하는 안정한 가용성 세포질 효소이며, 원형질막의 기능이 손상되면 LDH는 세포 배양액으로 방출되기 때문에 LDH의 유리는 세포독성의 평가 지표로 활용된다[37]. 본 연구에서 H₂O₂가 처리된 HepG2 세포에서 CCK-8 분석에 따른 세포 생존율 및 LDH 유리의 정도로 평가한 결과, H₂O₂ 처리된 세포에서 감소된 세포 생존율과 증가된 LDH 유리는 ROS 소거제인 NAC에 의한 것처럼 EECJ 존재 하에서 유의적으로 회복되어 EECJ는 H₂O₂에 의한 세포독성을 억제할 수 있음을 확인하였다(Fig. 1).

선행 연구들에 의하면 H₂O₂가 처리된 HepG2 세포에서의 세포사멸 유도에는 자가포식이 동반되며, 항산화 활성제는 이를 차단할 수 있음을 알 수 있다[11, 41]. 자가포식은 세포의 증식 조절에서 이중적인 역할을 하며, 일반적으로 가벼운 자가포식은 세포사멸을 억제할 수 있으며

세포 보호 역할을 하지만, H₂O₂에 의한 과도한 자가포식은 자가포식과 관련된 세포사멸(autophagic cell death)을 촉진하는 병리학적 과정과 연관되어 있다[13, 26]. 자가포식의 가장 일반적인 특징은 세포질 내 공포(autophagic vacuoles)의 형성이며, 리소좀과의 융합을 통해 세포질 성분을 삼켜 분해하는 자가포식 소체(autophagosome)의 형성 과정에서 소포체의 막이 세포질 일부를 격리하여 새로운 이중 막 액포(double-membraned vacuole)를 형성한다[6, 18]. 자가포식은 자가포식 관련 유전자에 의해 암호화된 유전자들에 의하여 엄격하게 조절되며, 이들 단백질 중에서 LC3은 자가포식 소체의 생합성 및 성숙에 필수적이다. 자가포식 유도 시, LC3는 LC3-I으로 전환되어 phosphatidylethanolamine에 결합하여 불용성 LC3-II로 변환되기 때문에 자가포식 소체의 형성과 LC3의 변환은 자가포식의 지표로 사용된다[8, 21]. 선행 연구의 결과와 유사하게, 본 연구에서도 H₂O₂가 처리된 HepG2 세포에서 자가포식이 일어났음을 의미하는 공포의 형성과 LC3-II의 발현이 증가되었지만, 이러한 자가포식 지표는 EECJ가 전처리된 HepG2 세포에서는 유의적으로 억제되어 H₂O₂에 대한 EECJ의 세포독성 차단 효능은 자가포식 억제와 연관성이 있음을 알 수 있다(Fig. 2).

특정 자극에 의한 세포사멸 유도는 세포주기 진행의 교란을 동반하는 경우가 빈번하다. 예를 들어 Li et al. [23]은 H₂O₂가 처리된 HepG2 세포에서 G1기 및 G2/M기에 속하는 세포의 빈도는 약간 증가하거나 억제된 반면, DNA 합성기에 속하는 S기 세포의 빈도가 유의적으로 감소되면서 세포사멸이 유도되었음을 보고한 바 있다. Zanetti et al. [43] 또한 이와 유사한 현상을 보고하였는데, 이러한 세포주기의 교란은 항산화제에 의하여 정상 수준으로 회복되었으며, 이는 세포사멸 억제와 연관성이 있었다. 세포사멸 유도의 가장 특징적인 지표는 DNase 활성에 의한 핵 DNA의 절단이며, 이로 인하여 세포사멸이 진행되는 동안 염색질은 단편화되어 압축된 DNA인 세포사멸체(apoptotic bodies)로 포장되는 응축된 형태로 변한다[19, 39]. 따라서 DNA 단편화와 병행되는 염색질 응축은 세포사멸이 일어난 세포를 식별하는 데 사용되는 가장 중요한 기준 중 하나이다. 따라서 H₂O₂가 처리된 HepG2 세포에서 세포사멸이 유도되는지, 또한 이 과정에서 세포주기의 교란이 동반되는지를 조사하였다. DNA에 결합하여 핵을 염색하거나 세포사멸 검출에 널리 사용되는 DAPI 염색의 결과는 H₂O₂가 처리된 HepG2 세포에서 DNA 절단에 따른 염색질 응축과 핵의 단편화를 의미하는 세포 사멸체의 형성이 유의적으로 증가하였음을 보여주었으며, 세포주기 중, S기에 포함된 세포의 빈도가 H₂O₂가 처리된 HepG2 세포에서 매우 감소된 반면, 세포사멸이 유도된 세포의 빈도를 의미하는 sub-G1기에 해당하는 세포의 빈도는 유의적으로 증가하였다. 그러나 이러한 변화들은 EECJ가

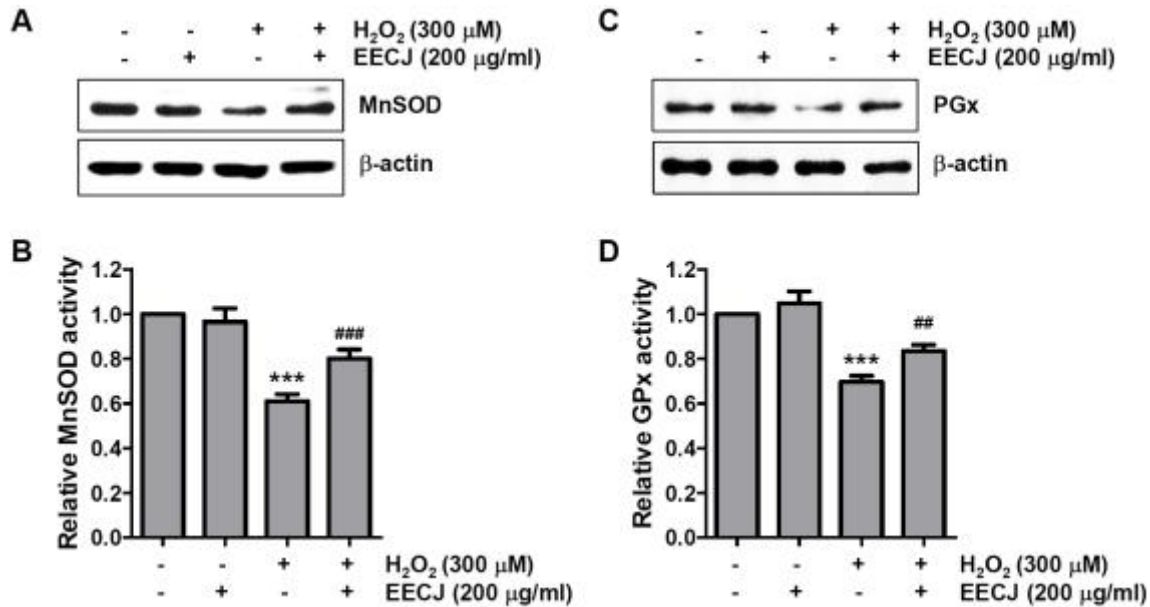


Fig. 7. Abrogation of H₂O₂-induced inactivation of MnSOD and GPx by EECJ in HepG2 cells. Before treating the cells with 300 μM H₂O₂ for 24 hr, they were incubated in the presence or absence of 200 μg/ml EECJ for 1 hr. (A and C) The expression of MnSOD (A) and GPx (C) was investigated using Western blot analysis using the respective antibodies. β-actin was used as reference gene. (B and D) Changes in the enzymatic activity of MnSOD and GPx were obtained using commercially available assay kits according to their manufacturer's instructions. All data were expressed as the mean ± SD (****p*<0.001 compared with the control group; #*p*<0.01 and ###*p*<0.001 compared with the H₂O₂-treated group).

존재하는 조건에서는 모두 유의적으로 차단되었다(Fig. 3). 따라서 본 연구의 결과는 H₂O₂에 의한 산화적 스트레스 조건에서 HepG2 세포의 생존력 저하는 DNA 합성기의 감소와 연관된 세포사멸 유도에 의한 것이었으며, 선행 연구 결과들과 비교하였을 때, 이 과정에서 자가포식은 아마도 세포사멸 촉진에 기여하였을 것으로 추정된다. 그리고 이러한 현상들은 EECJ에 의하여 상쇄되었으며, 이는 EECJ가 HepG2 세포에서 H₂O₂에 의한 세포주기 교란, 자가포식 및 세포사멸 유도를 차단함으로써 세포주기의 지속적 진행과 세포 생존이 유지되었음을 나타내는 결과이다.

다양한 항산화제가 HepG2 세포에서 산화적 스트레스에 의한 ROS의 생성을 억제하면서 세포 손상을 차단할 수 있는 것으로 밝혀졌다. 많은 선행 연구에서 밝혀졌듯이, 영경귀 추출물 및 구성 성분들은 강력한 ROS 소거능을 가진다[9, 14, 16, 27]. 본 연구의 결과에서도 EECJ가 H₂O₂에 의한 ROS의 생성을 억제하였음을 DCF-DA 염색을 통한 분석으로 확인하였고(Fig. 4), 이러한 세포 내 ROS 생성의 억제가 미토콘드리아 유래 ROS 생성의 억제와 관련이 있음을 미토콘드리아 과산화물 지표인 MitoSOX 염색을 통하여 검증하였다(Fig. 5). 비록 이러한 EECJ의 ROS 생성 억제력이 미토콘드리아 기능 교란의 차단에 의한 것이지는 확인하지는 못하였지만, 에탄올이 처리된 쥐의 간에서 억제된 미토콘드리아 aldehyde dehydrogenase의 활

성이 영경귀 메탄올 추출물 및 구성 성분에 의하여 회복되었으며 이는 항산화 활성과 연관성이 있다는 선행 보고 [29]에 근거하여, EECJ가 최소한 산화적 스트레스에 의한 미토콘드리아의 손상을 차단하였을 것으로 유추된다. 한편, GSH는 세포 내 항산화 활성뿐만 아니라 및 약물 대사에 관여하며, GSH는 일반적으로 환원형(reduced form : GSH)으로 존재하지만, 산화적 스트레스 하에서 산화형(oxidized form : GSSG)으로 전환된다. GSH는 또한 GPx, GSH S-transferase (GST) 및 thiol transferase 등과 같은 항산화 효소의 기질로 작용하기 때문에 GSH와 GSSG의 비율은 산화적 스트레스의 지표로 사용된다[7, 10]. 따라서 EECJ에 의한 ROS 생성의 억제가 GSH 함량의 보존과 연관성이 있는지를 조사한 결과, H₂O₂에 의해 감소된 GSH/GSSG 비율이 EECJ가 존재하는 조건에서는 유의적으로 회복되었으며, GSH의 소실을 나타내는 감소된 CMFDA 형광 강도 또한 EECJ가 전처리된 조건에서는 회복되었다(Fig. 6). 본 연구의 결과와 유사하게, Zhao et al. [45]의 결과에 의하면, CCl₄로 유발된 급성 간 손상 모델에서 확인된 영경귀 추출물의 간 보호 효과는 Cu/ZnSOD, GST 및 MnSOD를 포함한 간 항산화 효소의 발현 회복에 기인한 것이었다. 또한, *t*-BHP가 처리된 HepG2 세포에서 다양한 영경귀 메탄올 추출물을 전처리하였을 때 과도한 ROS 생성이 감소하였고 GSH 수준이 추출물 처리 용량 의존적으로 증가했음을 보고된 바 있다[16]. 아울러, GPx는 지질

과산화물(lipid hydroperoxides)을 알코올로 환원시키고, H₂O₂를 물로 환원시켜 세포를 산화 손상으로부터 보호하는 역할을 하며[12, 34], SOD는 과도한 양의 ROS로 인한 잠재적인 손상으로부터 세포를 보호하는 주요 ROS 해독에 핵심적인 역할을 한다[4, 31]. 특히, MnSOD는 미토콘드리아 호흡의 주요 부산물인 자유 라디칼 슈퍼옥사이드(free radical superoxide)를 해독하는 필수 미토콘드리아 항산화 효소이다[5, 24]. 따라서 이들은 ROS의 비정상적인 축적을 차단하고 산화적 스트레스로부터 세포를 보호하는 핵심적인 역할을 한다. 본 연구의 결과에 의하면, H₂O₂가 처리된 HepG2 세포에서 MnSOD 뿐만 아니라 GPx의 발현과 활성이 모두 억제되었지만, EECJ가 존재하는 배지에서 H₂O₂에 노출된 HepG2 세포에서는 그들의 발현과 활성이 모두 유의적으로 회복되었다(Fig. 7). 따라서 EECJ의 항산화 활성은 GSH의 함량 및 MnSOD와 GPx의 발현 및 활성의 보전에 의한 것으로 유추되며, 이는 미토콘드리아의 항상성 유지에 의한 것일 가능성이 있음을 시사하는 것이다.

이상의 결과를 종합하면, 산화적 스트레스에 노출된 HepG2 세포의 세포사멸 유도에는 세포주기의 교란 및 자가포식 현상이 동반되었으며, 이는 ROS의 축적에 기인한 것으로 유추된다. 그리고 EECJ의 항산화 활성은 ROS 생성의 차단에 기여하는 GSH의 함량과 MnSOD와 GPx의 활성 감소를 억제하였기 때문이라 생각된다. 특히, 산화적 스트레스 하에서 EECJ에 의한 MnSOD 활성의 보존은 미토콘드리아 ROS 생성의 차단과 최소한의 연관성이 있음을 알 수 있었다. 즉, HepG2 세포에서 EECJ에 의한 세포독성의 억제는 항산화 활성과 직접적인 연관성이 매우 높음을 알 수 있으며, ROS 생성의 억제는 세포 내 항산화 시스템의 활성 유지에 의한 것으로 추정된다. 그러나 미토콘드리아의 기능 손상과 연관된 에너지 대사 관련 EECJ의 역할에 관한 연구는 추가로 수행되어야 할 것이며, EECJ 내에 포함된 생리활성 물질의 탐색과 간에서 대개 추출물의 항산화 활성에 대한 동물 모델에서의 효능 검증 또한 요구된다.

감사의 글

본 연구는 과학기술정보통신부의 재원으로 한국연구재단에서 시행한 기초연구사업 지원(No. 2021R1A2C2009549)에 의해 수행되었습니다.

The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

1. Aghazadeh, S., Amini, R., Yazdanparast, R. and Ghaffari, S. H. 2011. Anti-apoptotic and anti-inflammatory effects of Silybum marianum in treatment of experimental steatohepatitis. *Exp. Toxicol. Pathol.* **63**, 569-574.
2. Benali, T., Jaouadi, I., Ghchime, R., El Omari, N., Harboul, K., Hammani, K., Rebezov, M., Shariati, M. A., Mubarak, M. S., Simal-Gandara, J., Zengin, G., Park, M. N., Kim, B., Mahmud, S., Lee, L. H. and Bouyahya, A. 2022. The current state of knowledge in biological properties of Cirsimaritin. *Antioxidants (Basel)* **11**, 1842.
3. Blas-Garcia, A. and Apostolova, N. 2023. Novel therapeutic approaches to liver fibrosis based on targeting oxidative stress. *Antioxidants (Basel)* **12**, 1567.
4. Brand, M. D. 2020. Riding the tiger - physiological and pathological effects of superoxide and hydrogen peroxide generated in the mitochondrial matrix. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **55**, 592-661.
5. Candas, D. and Li, J. J. 2014. MnSOD in oxidative stress response-potential regulation via mitochondrial protein influx. *Antioxid. Redox Signal.* **20**, 1599-1617.
6. Cao, W., Li, J., Yang, K. and Cao, D. 2021. An overview of autophagy: Mechanism, regulation and research progress. *Bull. Cancer* **108**, 304-322.
7. Chai, Y. C. and Mieyal, J. J. 2023. Glutathione and glutaredoxin-key players in cellular redox homeostasis and signaling. *Antioxidants (Basel)* **12**, 1553.
8. Chino, H. and Mizushima, N. 2023. ER-Phagy: Quality and quantity control of the endoplasmic reticulum by autophagy. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **15**, a041256.
9. Cho, M., Kim, Y., You, S., Hwang, D. Y. and Jang, M. 2023. Chlorogenic acid of *Cirsium japonicum* resists oxidative stress caused by aging and prolongs health span via SKN-1/Nrf2 and DAF-16/FOXO in *Caenorhabditis elegans*. *Metabolites* **13**, 224.
10. Corso, C. R. and Acco, A. 2018. Glutathione system in animal model of solid tumors: From regulation to therapeutic target. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **128**, 43-57.
11. Filomeni, G., De Zio, D. and Cecconi, F. 2015. Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death Differ.* **22**, 377-388.
12. Flohé, L., Toppo, S. and Orian, L. 2022. The glutathione peroxidase family: Discoveries and mechanism. *Free Radic. Biol. Med.* **187**, 113-122.
13. Ha, J. H., Noh, H. S., Shin, I. W., Hahm, J. R. and Kim, D. R. 2012. Mitigation of H₂O₂-induced autophagic cell death by propofol in H9c2 cardiomyocytes. *Cell Biol. Toxicol.* **28**, 19-29.
14. Jang, M., Kim, K. H. and Kim, G. H. 2020. Antioxidant capacity of Thistle (*Cirsium japonicum*) in various drying methods and their protection effect on neuronal PC12 cells and *Caenorhabditis elegans*. *Antioxidants (Basel)* **9**, 200.
15. Jordon-Thaden, I. E. and Louda, S. M. 2003. Chemistry of Cirsium and Carduus: A role in ecological risk assessment for biological control of weeds? *Biochem. Syst. Ecol.*

- 31, 1353-1396.
16. Jung, H. A., Abdul, Q. A., Byun, J. S., Joung, E. J., Gwon, W. G., Lee, M. S., Kim, H. R. and Choi, J. S. 2017. Protective effects of flavonoids isolated from Korean milk thistle *Cirsium japonicum* var. maackii (Maxim.) Matsum on tert-butyl hydroperoxide-induced hepatotoxicity in HepG2 cells. *J. Ethnopharmacol.* **209**, 62-72.
 17. Jung, H. A., Kim, Y. S. and Choi, J. S. 2009. Quantitative HPLC analysis of two key flavonoids and inhibitory activities against aldose reductase from different parts of the Korean thistle, *Cirsium maackii*. *Food Chem. Toxicol.* **47**, 2790-2797.
 18. Jung, H. A., Park, J. J., Min, B. S., Jung, H. J., Islam, M. N. and Choi, J. S. 2015. Inhibition of advanced glycation endproducts formation by Korean thistle, *Cirsium maackii*. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **8**, 1-5.
 19. Kijima, M., Yamagishi, H., Hara, Y., Kasai, M., Takami, Y., Takemura, H., Miyinari, Y., Shinkai, Y. and Mizuta, R. 2019. Histone H1 quantity determines the efficiency of chromatin condensation in both apoptotic and live cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **512**, 202-207.
 20. Kim, S. J., Kim, S. Y., Kim, J. A., Park, I. S., Yu, K. Y., Chung, C. H., Shim, J. S., Jang, S. I. and Jeong, S. I. 2012. Inhibitory effect of *Cirsium japonicum* root or flower extract on hepatic stellate cells activation. *Kor. J. Pharmacogn.* **43**, 27-31.
 21. Lamark, T. and Johansen, T. 2021. Mechanisms of selective autophagy. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* **37**, 143-169.
 22. Lee, J., Rodriguez, J. P., Lee, K. H., Park, J. Y., Kang, K. S., Hahm, D. -H., Huh, C. K., Lee, S. C. and Lee, S. 2017. Determination of flavonoids from *Cirsium japonicum* var. maackii and their inhibitory activities against aldose reductase. *Appl. Biol. Chem.* **60**, 487-496.
 23. Li, Y., Guo, J., Zhang, H., Lam, C. W. K., Luo, W., Zhou, H. and Zhang, W. 2020. Protective effect of thymidine on DNA damage induced by hydrogen peroxide in human hepatocellular cancer cells. *ACS Omega* **5**, 21796-21804.
 24. Liu, M., Sun, X., Chen, B., Dai, R., Xi, Z. and Xu, H. 2022. Insights into manganese superoxide dismutase and human diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **23**, 15893.
 25. Ma, Y., Lee, G., Heo, S. Y. and Roh, Y. S. 2021. Oxidative stress is a key modulator in the development of non-alcoholic fatty liver disease. *Antioxidants (Basel)* **11**, 91.
 26. Pan, X., Song, X., Wang, C., Cheng, T., Luan, D., Xu, K. and Tang, B. 2019. H2Se induces reductive stress in HepG2 cells and activates cell autophagy by regulating the redox of HMGB1 protein under hypoxia. *Theranostics* **9**, 1794-1808.
 27. Pang, Q. Q., Lee, S., Cho, E. J. and Kim, J. H. 2023. Protective effects of *Cirsium japonicum* var. maackii flower on amyloid beta₂₅₋₃₅-treated C6 glial cells. *Life (Basel)* **13**, 1453.
 28. Paradies, G., Paradies, V., Ruggiero, F. M. and Petrosillo, G. 2014. Oxidative stress, cardiolipin and mitochondrial dysfunction in nonalcoholic fatty liver disease. *World J. Gastroenterol.* **20**, 14205-14218.
 29. Park, J. C., Hur, J. M., Park, J. G., Kim, S. C., Park, J. R., Choi, S. H. and Choi, J. W. 2004. Effects of methanol extract of *Cirsium japonicum* var. ussuriense and its principle, hispidulin-7-O-neohesperidoside on hepatic alcohol-metabolizing enzymes and lipid peroxidation in ethanol-treated rats. *Phytother. Res.* **18**, 19-24.
 30. Roeb, E. 2021. Non-alcoholic fatty liver diseases: current challenges and future directions. *Ann. Transl. Med.* **9**, 726.
 31. Roy, Z., Bansal, R., Siddiqui, L. and Chaudhary, N. 2023. Understanding the role of free radicals and antioxidant enzymes in human diseases. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **24**, 1265-1276.
 32. Seen, S. 2021. Chronic liver disease and oxidative stress - A narrative review. *Expert. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **15**, 1021-1035.
 33. Seitz, H. K., Moreira, B. and Neuman, M. G. 2023. Pathogenesis of alcoholic fatty liver a narrative review. *Life (Basel)* **13**, 1662.
 34. Sharapov, M. G., Gudkov, S. V. and Lankin, V. Z. 2021. Hydroperoxide-reducing enzymes in the regulation of free-radical processes. *Biochemistry (Mosc)* **86**, 1256-1274.
 35. Shin, M. S., Park, J. Y., Lee, J., Yoo, H. H., Hahm, D. H., Lee, S. C., Lee, S., Hwang, G. S., Jung, K. and Kang, K. S. 2017. Anti-inflammatory effects and corresponding mechanisms of cirsimaritin extracted from *Cirsium japonicum* var. maackii Maxim. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **27**, 3076-3080.
 36. Stockert, J. C., Horobin, R. W., Colombo, L. L. and Blázquez-Castro, A. 2018. Tetrazolium salts and formazan products in cell biology: Viability assessment, fluorescence imaging, and labeling perspectives. *Acta. Histochem.* **120**, 159-167.
 37. Stoddart, M. J. 2011. Cell viability assays: Introduction. *Methods Mol. Biol.* **740**, 1-6.
 38. Subramanian, V., Chakravarthi, S., Jegasothy, R., Seng, W. Y., Fuloria, N. K., Fuloria, S., Hazarika, I. and Das, A. 2021. Alcohol-associated liver disease: A review on its pathophysiology, diagnosis and drug therapy. *Toxicol. Rep.* **8**, 376-385.
 39. Toné, S., Sugimoto, K., Tanda, K., Suda, T., Uehira, K., Kanouchi, H., Samejima, K., Minatogawa, Y. and Earnshaw, W. C. 2007. Three distinct stages of apoptotic nuclear condensation revealed by time-lapse imaging, biochemical and electron microscopy analysis of cell-free apoptosis. *Exp. Cell Res.* **313**, 3635-3644.
 40. Vara, D. and Pula, G. Reactive oxygen species: physiological roles in the regulation of vascular cells. *Curr. Mol. Med.* 2014, **14**, 1103-1125.
 41. Wu, Z., Wang, H., Fang, S. and Xu, C. 2018. Roles of endoplasmic reticulum stress and autophagy on H₂O₂-induced oxidative stress injury in HepG2 cells. *Mol. Med. Rep.* **18**, 4163-4174.
 42. Yan, H., Du, J., Chen, X., Yang, B., He, Q., Yang, X. and Luo, P. 2019. ROS-dependent DNA damage contributes to crizotinib-induced hepatotoxicity via the apoptotic pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **383**, 114768.

43. Zanetti, T. A., Biazi, B. I., Baranoski, A., D'Epiro, G. F. R., Corveloni, A. C., Semprebon, S. C., Coatti, G. C. and Mantovani, M. S. 2018. Response of HepG2/C3A cells supplemented with sodium selenite to hydrogen peroxide-induced oxidative stress. *J. Trace. Elem. Med. Biol.* **50**, 209-215.
44. Zhang, C., Zhao, Y., Yu, M., Qin, J., Ye, B. and Wang, Q. 2022. Mitochondrial dysfunction and chronic liver disease. *Curr. Issues Mol. Biol.* **44**, 3156-3165.
45. Zhao, Z. W., Chang, J. C., Lin, L. W., Tsai, F. H., Chang, H. C. and Wu, C. R. 2018. Comparison of the hepatoprotective effects of four endemic Cirsium species extracts from Taiwan on CCl₄-induced acute liver damage in C57BL/6 mice. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 1329.

초록 : HepG2 세포에서 대개 추출물에 의한 산화적 스트레스 유발 세포 손상의 억제

하다정¹ · 김서휘² · 손변우¹ · 진명호¹ · 조성우³ · 홍상훈¹ · 최영현^{4*} · 박상은^{1*}

(¹동의대학교 한의과대학 한방내과, ²원광대학교 한의과대학 의사학교실, ³동의대학교 한의과대학 한방재활의학과, ⁴동의대학교 한의과대학 생화학교실)

다양한 질병의 발병 및 진행을 예방하기 위해 오랫동안 사용되어 온 대개는 항산화 활성을 포함하여 광범위한 생리 활성을 갖는 것으로 보고되었으나, 간세포에서의 효능에 대한 연구는 여전히 미비한 실정이다. 본 연구에서는 간세포에서 대개 에탄올 추출물(EECJ)의 항산화 활성 및 관련 기전을 조사하기 위해 인간 간세포암종 HepG2 세포주를 선택하였고, 산화적 스트레스를 모방하기 위해 H₂O₂를 처리하였다. 본 연구 결과에 따르면 EECJ는 H₂O₂가 처리된 HepG2 세포에서 세포 생존율의 감소와 LDH의 방출을 유의적으로 억제하였다. EECJ는 또한 세포 형태학적 변화의 관찰, 유세포 분석 및 LC3의 발현 결과에서 입증된 바와 같이 H₂O₂에 의해 유도된 자가포식을 유의하게 감소시켰으며, H₂O₂에 의해 유도된 세포사멸과 세포 주기의 교란을 약화시켰다. 이는 H₂O₂에 노출된 HepG2 세포가 EECJ에 의하여 지속적인 세포 분열과 증식이 유지되고 있음을 의미한다. 또한, EECJ가 강력한 항산화 활성을 가지고 있음을 세포 내 ROS 및 미토콘드리아 슈퍼옥사이드 생산의 차단으로 확인하였으며, 이는 H₂O₂에 의해 감소된 세포 내 GSH 함량의 회복과 MnSOD 및 GPx의 발현 및 활성을 보존과 연관성이 있었다. 비록 EECJ에 함유된 활성 성분의 분석과 *in vivo* 동물 모델에서의 검증이 요구되지만, 본 연구의 결과는 EECJ가 산화적 스트레스로 인한 간세포의 손상을 예방하고 치료하기 위한 잠재적인 후보로 사용될 수 있음을 의미한다.